

· 技术与方法 ·

# 靶向CD19抗原的CAR-V $\delta$ 1T细胞的制备方法 及功能鉴定

汪敏<sup>1</sup> 张萍<sup>1</sup> 许汉英<sup>1</sup> 杨林<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>博生吉安科细胞技术有限公司技术中心, 合肥 230088; <sup>2</sup>博生吉医药科技(苏州)有限公司新药研究院, 苏州 215000

**摘要** 该文旨在探讨靶向CD19抗原的CAR-V $\delta$ 1T细胞的制备方法, 并评估其在体外及小鼠体内对B细胞起源肿瘤细胞的抗肿瘤作用。借鉴自体嵌合抗原受体T细胞(chimeric antigen receptor T-cell, CAR-T)技术, 构建靶向CD19抗原的嵌合抗原受体V $\delta$ 1T(CD19-CAR-V $\delta$ 1T)细胞。用人工抗原呈递细胞(aAPC)体外制备CD19-CAR-V $\delta$ 1T细胞。运用Annexin V/7-AAD法、流式微球阵列(CBA)法, 分别检测CD19-CAR-V $\delta$ 1T细胞对CD19抗原阳性肿瘤细胞的体外杀伤作用及杀伤后CD19-CAR-V $\delta$ 1T细胞抗炎细胞因子分泌水平。通过流式细胞术对其杀伤、抗炎细胞因子分泌作用进行验证; 并进行荷瘤免疫缺陷小鼠体内药效及毒性实验验证, 通过定期对荷瘤免疫缺陷小鼠进行活体成像、体质量监测及生存期观察, 评估CD19-CAR-V $\delta$ 1T细胞对荷瘤免疫缺陷小鼠的体内药效及安全性。扩增结果显示: 用aAPC在体外能成功制备CD19-CAR-V $\delta$ 1T细胞, V $\delta$ 1T细胞平均扩增倍数大于10 000倍。体外杀伤结果表明: 相较于对照组, CD19-CAR-V $\delta$ 1T细胞对CD19抗原阳性肿瘤细胞表现出显著的特异性杀伤能力及持久的体外抗肿瘤活性; 体外抗炎细胞因子分泌结果表明: 相较于对照组, CD19-CAR-V $\delta$ 1T细胞针对CD19阳性肿瘤细胞具有显著的抗原特异性细胞因子分泌能力。荷瘤免疫缺陷小鼠体内药效及毒性实验结果表明: 相较于对照组, CD19-CAR-V $\delta$ 1T细胞治疗不仅显著延长了荷瘤小鼠的生存期, 且表现出了良好的安全性。总之, CD19-CAR-V $\delta$ 1T细胞具备对B细胞起源肿瘤的治疗潜力。

**关键词** CD19; V $\delta$ 1T细胞; 人工抗原呈递细胞; CD19-CAR-V $\delta$ 1T细胞

## Preparation Method and Preliminary Functional Characterization of Chimeric Antigen Receptor V $\delta$ 1T Cells Targeting CD19 Antigen

WANG Min<sup>1</sup>, ZHANG Ping<sup>1</sup>, XU Hanying<sup>1</sup>, YANG Lin<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>Technology Center, PersonGen-Anke Cellular Therapeutics Co., Ltd, Hefei 230088, China;<sup>2</sup>Innovative Drug Research Institute, PersonGen BioTherapeutics (Suzhou) Co., Ltd., Suzhou 215000, China)

**Abstract** This study aims to investigate the preparation methods of CD19-targeting CAR-V $\delta$ 1T cells and evaluate their antitumor effects against B cell-derived tumor cells both *in vitro* and *in vivo*. Leveraging the principles of CAR-T cell engineering, CD19-CAR-V $\delta$ 1T cells targeting CD19 were designed. aAPCs (artificial antigen-

收稿日期: 2026-02-03 接受日期: 2026-03-23

安徽省重点研究与开发计划(批准号: 2023s07020010)、国家生物药技术创新中心“揭榜挂帅”技术攻关项目(批准号: NCTIB2023XB01003)和苏州市科技计划(批准号: SYG2024066)资助的课题

\*通信作者。Tel: 0551-65728071, E-mail: lin.yang@persongen.com

Received: February 3, 2026 Accepted: March 23, 2026

This work was supported by the Key Research and Development Program of Anhui Province (Grant No.2023s07020010), the “Open Competition to Select the Best Candidates” Key Technology Program for Cell Therapy of NTICB (Grant No.NCTIB2023XB01003), and the Suzhou Science and Technology Program (Grant No.SYG2024066)

\*Corresponding author. Tel: +86-551-65728071, E-mail: lin.yang@persongen.com

presenting cells) were utilized for *in vitro* expansion and activation of CD19-CAR-V $\delta$ 1T cells. Cytotoxic activity and anti-inflammatory cytokine secretion against CD19 antigen-positive cell lines separately were quantified using Annexin V/7-AAD apoptosis assays and CBA (cytometric bead array). Flow cytometry was employed to validate the cytotoxic activity and anti-inflammatory cytokine secretion of CD19-CAR-V $\delta$ 1T cells. Additionally, *in vivo* efficacy and toxicity were assessed in tumor-bearing immunodeficient mice through regular bioluminescence imaging, body mass monitoring, and survival observation. Expansion results showed that CD19-CAR-V $\delta$ 1T cells were successfully generated *in vitro* using aAPCs, with an average expansion fold of V $\delta$ 1T cells exceeding 10 000-fold. *In vitro* cytotoxicity assays demonstrated that CD19-CAR-V $\delta$ 1T cells exhibited significant antigen-specific cytotoxicity and sustained anti-tumor activity against CD19-positive tumor cells compared with the control group. *In vitro* anti-inflammatory cytokine secretion assays showed that CD19-CAR-V $\delta$ 1T cells displayed robust antigen-specific cytokine secretion in response to CD19-positive tumor cells compared with the control group. Furthermore, *in vivo* pharmacodynamic and toxicological studies in tumor-bearing immunodeficient mice revealed that CD19-CAR-V $\delta$ 1T cell treatment not only significantly prolonged the survival of tumor-bearing mice, but also demonstrated a favorable safety profile compared with the control group. Overall, CD19-CAR-V $\delta$ 1T cells demonstrate therapeutic potential for the treatment of B cell-derived malignancies.

**Keywords** CD19; V $\delta$ 1T cells; artificial antigen presenting cells; CD19-CAR-V $\delta$ 1T cells

自体嵌合抗原受体T细胞(chimeric antigen receptor T-cell, CAR-T)疗法在B细胞恶性血液肿瘤领域取得巨大成功,已成为癌症治疗领域的重要支柱<sup>[1]</sup>。目前自体CAR-T细胞疗法虽在部分B细胞恶性肿瘤中疗效显著,但其临床应用仍存在多重挑战。其高昂的成本、冗长的制备周期及不稳定的产品质量,不仅可能导致患者错失治疗窗口,还限制了该疗法的大规模应用<sup>[2-4]</sup>。

一种克服上述障碍的策略是采用供体来源的CAR-T细胞<sup>[2-4]</sup>。其优势包括:可预先生产以实现“现货”供应,规模化生产可降低成本,以及产品质量均一可控<sup>[5]</sup>。然而,未经基因编辑敲除T细胞受体(T cell receptor, TCR)的供体CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞可能诱发移植物抗宿主病(graft-versus-host disease, GvHD),并因宿主抗移植物(host-versus-graft, HvG)反应导致疗效受限<sup>[5]</sup>。为此,研究者尝试通过基因编辑敲除内源性TCR及人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)或分化簇52(cluster of differentiation 52, CD52),联合阿仑单抗清除宿主淋巴细胞以减轻宿主对供体细胞的排斥<sup>[5-7]</sup>。但该策略增加了CAR-T细胞生产的复杂性,同时阿仑单抗治疗的介入可能加剧血细胞的减少<sup>[6]</sup>。

近年来, $\gamma\delta$ T细胞因其抗肿瘤潜力备受关注<sup>[8-9]</sup>。根据TCR链类型,T细胞可分为 $\alpha\beta$ 和 $\gamma\delta$ 两大亚群<sup>[10]</sup>,后者主要包括V $\delta$ 1和V $\delta$ 2亚群。V $\delta$ 2T细胞是外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)中 $\gamma\delta$ T细胞的主要亚群,而V $\delta$ 1T细胞在外周血中含量较

少,主要分布于皮肤、肠道、脾脏及肝脏等上皮和黏膜组织中<sup>[11-14]</sup>。V $\delta$ 1T细胞因其独特生物学特性成为肿瘤免疫治疗的理想候选细胞。(1) 主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)非依赖性抗原识别:V $\delta$ 1T细胞可直接识别肿瘤抗原,无需抗原呈递细胞参与<sup>[15]</sup>,且能靶向清除MHC I类分子缺失的肿瘤细胞,有效规避肿瘤免疫逃逸<sup>[16]</sup>;(2) 组织驻留与肿瘤趋向性:V $\delta$ 1T细胞作为组织驻留淋巴细胞,兼具固有和适应性免疫功能<sup>[12]</sup>,相比于其他免疫细胞,能高效迁移并浸润实体瘤<sup>[17]</sup>;(3) 预后相关性:V $\delta$ 1T细胞与多种癌症良好预后密切相关,具有作为生物标志物和治疗靶点的潜力<sup>[18-20]</sup>;(4) 多重激活机制:V $\delta$ 1T细胞可整合TCR信号、共刺激信号及NK细胞激活通路[如NKG2D(natural killer group 2, member D)、DNAM-1(DNAX accessory molecule-1)等]<sup>[8]</sup>。因此,V $\delta$ 1T细胞凭借其多样化的肿瘤识别机制,在应对肿瘤抗原异质性方面展现出巨大潜力。

然而,V $\delta$ 1T细胞在人外周血中比例极低,且分离激活技术复杂<sup>[11,17,21-22]</sup>,导致其临床开发受限<sup>[23]</sup>。本研究创新性地选用V $\delta$ 1T细胞作为CAR-T治疗平台,成功构建了表达CD19-CAR的V $\delta$ 1T(CD19-CAR-V $\delta$ 1T)细胞,并在体外及小鼠异种移植模型中系统评估了其安全性与有效性。结果表明,该细胞兼具良好安全性与显著抗肿瘤效果,此特征为将异体CAR-V $\delta$ 1T细胞开发为安全有效的癌症治疗新策略提供了有力支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物、细胞及主要试剂

实验使用 6~8 周龄、体质量(20±2) g 的 NPG (NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup> IL2rg<sup>tm1Vst/Vst</sup>) 雌性重度免疫缺陷小鼠, 其购自北京维通达生物技术有限公司。

人 Burkitt 淋巴瘤细胞系 Raji、B 细胞急性淋巴细胞白血病(B-cell acute lymphoblastic leukemia, B-ALL) 细胞系 Nalm-6 及白血病细胞系 K562 均购自美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC); RPMI-1640 和 DMEM 培养基购自 Hyclone 公司; X-VIVO 培养基购自 Lonza 公司; 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS) 购自兰州民海生物工程有限公司; CD19 抗体、TCR V $\delta$ 1-PE 抗体、TCR  $\alpha$ B-PE 抗体、IgG1-PE 同型抗体、抗 CD3/CD28 磁珠和抗 PE 磁珠购自美天旎生物技术有限公司; IL-2、IL-15 和 IL-21 购自上海近岸生物科技有限公司; CD3 抗体、CD64 抗体、CD86 抗体、CD137L 抗体、CD27 抗体、CD45RA 抗体、7AAD 荧光核酸染料、granzyme B 检测试剂盒、IL-2 检测试剂盒和 IFN- $\gamma$  检测试剂盒购自 BD 公司; AhCD19 抗体购自爱康得生物医学技术(苏州)有限公司; OKT3 抗体购自北京百普赛斯生物科技股份有限公司; Annexin V/7-AAD 杀伤试剂盒购自杭州联科生物科技股份有限公司; 慢病毒载体 pCDH-CMV-MCS-EF1-CopGFP 购自长沙泽琼生物技术有限公司。

### 1.2 细胞培养

Raji、Nalm-6、CD19-K562、K562 细胞系培养在含有 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基中, 健康人外周血 V $\delta$ 1T 细胞在 X-VIVO 培养基中培养, HEK293T 细胞在含有 10% FBS 的 DMEM 培养基中培养。所有细胞均在 5% CO<sub>2</sub>、37 °C、饱和湿度下培养。

### 1.3 CD19-CAR 的构建

CD19-CAR 结构包括信号肽(signal peptide, SP)、人源化 CD19-ScFv、IgG4 Fc 铰链区、CD28 跨膜区及胞内信号域。其中 SP 源自粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子受体(granulocyte-macrophage colony-stimulating fac-

tor receptor, GM-CSF receptor) 信号肽序列, ScFv 序列来自人源化改造的 FMC63 抗体序列, 铰链区为人 IgG4 Fc 序列, 胞内区包含 CD3 $\zeta$ (CD3 zeta, T 细胞活化的第一信号) 和 CD28 序列(T 细胞活化的第二信号)(图 1)。本研究合成该结构后将其克隆至慢病毒质粒 pCDH-CMV-MCS-EF1-CopGFP 中, 构建好的 CD19-CAR 结构经苏州金唯智生物科技有限公司测序验证无误。

### 1.4 基于 K562 细胞构建 aAPC

以 K562 细胞为基础, 通过慢病毒转导及单克隆筛选, 构建稳定共表达 CD64、CD86 和 CD137L 的 aAPC, 并建立细胞库。同时, 对该细胞系进行全面鉴定, 包括短串联重复序列(short tandem repeat, STR) 分析以确认其身份, 以及支原体 qPCR 检测以确认无支原体污染。在 aAPC 制备过程中, 细胞经复苏及体外扩增后, 采用 10 Gy (Co-60 源, 剂量率为 2.04 Gy/min) 辐照处理。辐照后在 2~8 °C 条件下, 以 1×10<sup>6</sup> 个细胞对应 1  $\mu$ g OKT3 抗体的比例进行混匀, 孵育 50 min, 经洗涤、分装后冻存储备用。

### 1.5 慢病毒制备和对 V $\delta$ 1T 细胞的转导

慢病毒制备过程同博生吉医药科技(苏州)有限公司其他团队以往的方法<sup>[24]</sup>操作。将健康人外周血(V $\delta$ 1T 细胞占比 $\geq$ 0.3%)与无菌 PBS 缓冲液按 1:1 混合稀释后, 缓慢加入装有淋巴细胞分离液(混合物: 分离液=2:1) 的离心管中, 20 °C、3 500 r/min 离心 10 min, 收集 PBMC, 利用 TCR V $\delta$ 1-PE 抗体和抗 PE 磁珠富集 V $\delta$ 1T 细胞(纯度 $\geq$ 60%)。V $\delta$ 1T 细胞接种于 24 孔板或培养袋中, 接种密度为 1×10<sup>6</sup>/mL, 并按 1×10<sup>8</sup>/mL 的比例加入抗 CD3/CD28 磁珠激活 V $\delta$ 1T 细胞 48 h。激活后, 用浓缩 15 倍的病毒上清[感染复数(multiplicity of infection, MOI)=10]于培养箱(5% CO<sub>2</sub>、37 °C)中静置转导 24 h。转导后的细胞在含 IL-2(200 IU/mL)、IL-15(20 ng/mL) 及 IL-21(30 ng/mL) 的 X-VIVO 培养基中培养 19~21 d, 其间于第 7 天(Day 7) 和第 14 天(Day 14) 分别加入 2 倍数量的 aAPC 进行扩增, 当 CD19-CAR-V $\delta$ 1T 细胞达到足够量后转移至 WAVE 生物反应器(美国 GE Healthcare 公司)中进行规模化培养。



TM: 跨膜。

TM: transmembrane.

图1 CD19-CAR 结构示意图  
Fig.1 Schematic diagram of the CD19-CAR

## 1.6 CD19-K562稳定细胞株的构建

使用CD19慢病毒转导K562细胞, 病毒MOI为1, 转导条件为在5% CO<sub>2</sub>、37 °C培养箱中静置转导48 h, 使得K562细胞膜表面表达CD19抗原。转导后, 继续培养细胞至状态稳定, 收集细胞并将其与抗人CD19-APC抗体在室温避光条件下孵育30 min。随后, 通过APC荧光流式分选收集染上抗体的CD19细胞并扩增。

## 1.7 流式细胞术检测工程化V $\delta$ 1T细胞、毒性实验用靶细胞及aAPC表型

收集 $2 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个待测细胞, 3 500 r/min、20 °C离心3 min后弃上清, 然后用pH7.4的PBS洗涤1次, 将其与相应的荧光抗体于室温避光共孵育染色12 min。其中, 实验使用5  $\mu$ L CD3-BV510、2  $\mu$ L TCR V $\delta$ 1-PE及1  $\mu$ L AhCD19-FITC对V $\delta$ 1T细胞及CD19-CAR转导的V $\delta$ 1T细胞进行染色, 并以未转导的V $\delta$ 1T细胞作为同型对照, 通过流式细胞术检测CD3<sup>+</sup>V $\delta$ 1TCR<sup>+</sup>AhCD19<sup>+</sup>(CAR<sup>+</sup>)的细胞比例以评估转导效率; 用5  $\mu$ L CD3-BV510、2  $\mu$ L TCR V $\delta$ 1-PE、1  $\mu$ L AhCD19-FITC、5  $\mu$ L CD27-PE-Cy7及5  $\mu$ L CD45RA-BV421对CD19-CAR转导的V $\delta$ 1T细胞进行染色, 通过流式细胞仪检测V $\delta$ 1TCR、CAR、CD27、CD45RA阳性细胞比例; 使用5  $\mu$ L CD3-APC-Cy7、2  $\mu$ L TCR  $\alpha\beta$ -PE及2  $\mu$ L TCR  $\alpha\beta$ 同型抗体IgG1-PE对CD19-CAR转导的V $\delta$ 1T细胞进行染色, 通过流式细胞仪检测CD3<sup>+</sup> $\alpha\beta$ TCR<sup>+</sup>的细胞比例以评估 $\alpha\beta$ T细胞残留情况; Raji、Nalm-6、CD19-K562和K562细胞分别用2  $\mu$ L CD19-PE-Vio770抗体进行染色, 以验证CD19表达情况, 从而为后续细胞毒性实验明确靶细胞表型; aAPC分别与2  $\mu$ L CD64-APC、2  $\mu$ L CD86-APC及2  $\mu$ L CD137L-APC单独孵育(室温避光孵育12 min), 以检测其表面分子的表达情况。所有细胞染色后, 均经PBS洗涤2次, 以100  $\mu$ L PBS重悬。加入2  $\mu$ L 7-AAD-PerCP于室温避光孵育3~5 min, 以标记并排除死细胞。最终使用流式细胞仪检测细胞表面蛋白表达率, 各实验均独立重复3次。

## 1.8 Annexin V/7-AAD染色法评估CD19-CAR-V $\delta$ 1T细胞对CD19阳性肿瘤细胞的体外细胞毒性

采用Annexin V/7-AAD双染色法评估CD19-CAR-V $\delta$ 1T细胞对CD19阳性肿瘤细胞的体外杀伤活性。实验设置了3组效靶比(E:T, 3:1、1:1和1:3), 分别取适量的Raji、Nalm-6、CD19-K562和K562细

胞。其中, Raji、Nalm-6、CD19-K562细胞作为CD19阳性靶细胞, K562作为CD19阴性靶细胞对照以验证CD19-CAR-V $\delta$ 1T细胞的杀伤特异性。4种细胞经CFSE(carboxyfluorescein succinimidyl ester)染色后以 $3 \times 10^5$ /孔的密度接种于48孔板, 再按不同效靶比加入转导CD19-CAR的V $\delta$ 1T细胞或未转导的V $\delta$ 1T细胞, 置于5% CO<sub>2</sub>、37 °C培养箱中孵育18~24 h。随后, 使用PBS清洗2次, 将细胞沉淀与Annexin V-APC及7-AAD-PerCP常温避光共孵育12 min。最后, 采用流式细胞仪检测FITC、APC与PerCP通道的荧光信号。靶细胞死亡率(即杀伤比例)被定义为7-AAD<sup>+</sup>Annexin V<sup>-</sup>、7-AAD<sup>-</sup>Annexin V<sup>+</sup>及7-AAD<sup>+</sup>Annexin V<sup>+</sup> 3个区域的细胞比例之和。

通过抗原重复刺激实验评估CD19-CAR-V $\delta$ 1T细胞体外抗肿瘤效果的持久性。每次抗原再刺激时, 取 $3 \times 10^5$ 个经CFSE染色的Raji细胞作为靶细胞, 按初次刺激时的效应细胞与靶细胞比例加入CD19-CAR转导的V $\delta$ 1T细胞或未转导的V $\delta$ 1T细胞中。将效应细胞与靶细胞于5% CO<sub>2</sub>、37 °C培养箱中共孵育18~24 h后, 收集部分共孵育细胞, 使用流式细胞术检测肿瘤细胞凋亡情况。剩余细胞再与新鲜的CFSE染色靶细胞于5% CO<sub>2</sub>、37 °C培养箱中额外孵育18~24 h, 此过程根据刺激次数重复进行。

## 1.9 CBA法检测CD19-CAR-V $\delta$ 1T细胞体外杀伤CD19阳性肿瘤细胞过程中的细胞因子分泌情况

采用CBA法评估CD19-CAR-V $\delta$ 1T细胞体外杀伤CD19阳性肿瘤细胞时的细胞因子分泌能力。在效靶比为1:1时, 分别收集CD19-CAR-V $\delta$ 1T细胞对Raji、Nalm-6、CD19-K562和K562细胞的体外杀伤实验上清, 以及V $\delta$ 1T细胞对Raji、Nalm-6细胞的体外杀伤实验上清各50  $\mu$ L, 依次加入granzyme B、IL-2和IFN- $\gamma$ 捕获微球各50  $\mu$ L, 充分混匀, 室温避光孵育2 h, 再依次加入granzyme B、IL-2和IFN- $\gamma$ 抗体各50  $\mu$ L, 混匀, 室温避光孵育1 h, 孵育完成后, PBS清洗1次, 通过流式细胞仪检测荧光强度来定量granzyme B、IL-2和IFN- $\gamma$ 的分泌量。

## 1.10 Burkitt淋巴瘤(Raji)荷瘤免疫缺陷小鼠体内实验

CD19-CAR-V $\delta$ 1T细胞外周药代动力学实验: 在第0天(Day 0)对每只小鼠通过尾静脉接种 $1 \times 10^6$ 个携带荧光素酶-GFP(Luci-GFP)的Raji细胞, 第3天(Day 3)对小鼠进行随机分组, 分成3组(每组5只小

鼠), 其中5只输注  $1.50 \times 10^7$  个 CD19-CAR-V $\delta$ 1T 细胞 (总 V $\delta$ 1T 细胞数为  $3.68 \times 10^7$  个), 5只输注  $3.68 \times 10^7$  个 V $\delta$ 1T 细胞, 5只输注等体积的细胞冻存液; 在实验过程中对小鼠定期进行活体成像、体质量与生存期监测, 观察期为7周。

**CD19-CAR-V $\delta$ 1T 细胞毒性实验:** 于 Day 0 对每只小鼠通过尾静脉接种  $1 \times 10^6$  个携带 Luci-GFP 荧光的 Raji 细胞, 于 Day 3 对小鼠进行随机分组, 分成2组(每组5只小鼠), 其中5只输注  $1.5 \times 10^7$  个 CD19-CAR-V $\delta$ 1T 细胞, 5只输注等体积的 PBS; 在实验过程中对小鼠的肿瘤体积和体质量进行监测, 观察期为2周。肿瘤体积计算公式为:  $V=(D \times d^2 \times \pi)/6$  ( $D$  代表长径,  $d$  代表短径)。

**伦理终点:** 当小鼠体质量下降超过20%以及小鼠出现呼吸困难或者无自主活动等严重的临床症状时, 对其进行安乐死。

### 1.11 苏木精-伊红染色及形态学分析

收集小鼠脑、心脏、肝脏、脾脏、肺脏和肾脏组织, 经10%多聚甲醛固定(固定液与组织体积比  $\geq 10:1$ , 室温固定24~72 h)后, 常规脱水、透明、石蜡包埋, 制备成4  $\mu$ m 厚的石蜡切片, 经苏木精-伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色后, 在光学显微镜下观察是否存在炎症或组织损伤。动物实验由昭衍(苏州)新药研究中心有限公司完成, 并经该公司实验动物福利伦理委员会审查批准(批准号: S-ACU24-0098)。

### 1.12 统计学处理

采用 GraphPad Prism 5 和 Social Sciences 23.0 软件进行统计分析, 结果用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间差异比较采用单因素  $t$  检验, 多组间差异比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 以  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$  或  $****P < 0.0001$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 aAPC 细胞表面的 CD64、CD86 及 CD137L 呈高表达

流式细胞术检测结果显示, aAPC 表面的 CD64、CD86 及 CD137L 的表达率分别为 99.89% (图 2A)、97.47% (图 2B) 与 99.98% (图 2C)。

### 2.2 CD19-K562 细胞表面的 CD19 抗原呈高表达

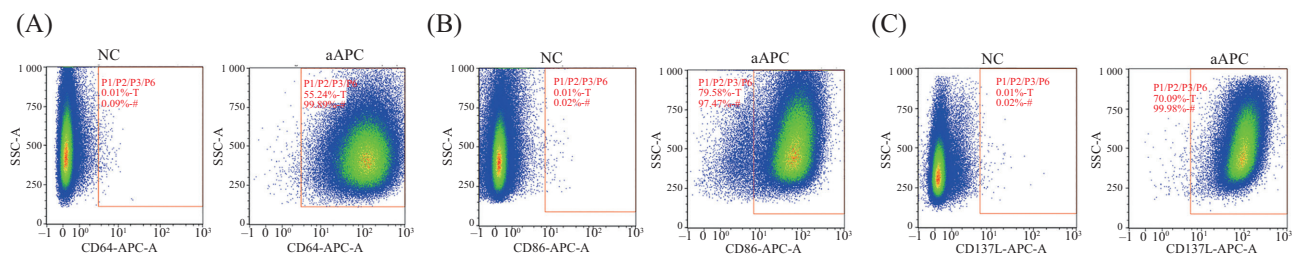
流式细胞术检测结果显示, 在正常 (未经处理) 的 K562 细胞中, CD19 抗原几乎不表达 (0.36%, 图 3A); CD19-K562 细胞表面 CD19 抗原表达率为 96.04% (图 3B)。

### 2.3 CD19-CAR-V $\delta$ 1T 细胞在体外可实现高倍扩增

将 CD19-CAR 包装成慢病毒后转导 V $\delta$ 1T 细胞, 于 Day 7 和 Day 14 分别加入 2 倍数量的 aAPC 进行扩增, 总培养时间为 19~21 d (图 4A)。流式检测显示, CD19-CAR-V $\delta$ 1T 细胞表达率为 40%~80%, 平均转导效率为  $57.46\% \pm 8.40\%$  (图 4B)。终产品质控结果 (图 4C~图 4E) 显示: V $\delta$ 1T 细胞平均纯度为  $99.20\% \pm 0.49\%$ , 幼稚 T 细胞记忆表型 [ $T_N$  (naive T cell),  $CD27^+CD45RA^+$ ] 占比为  $68.79\% \pm 0.80\%$ ,  $\alpha\beta$ T 细胞残留率为  $0.073\% \pm 0.025\%$ ; 细胞总数达  $1.2 \times 10^{11}$  个以上, 平均扩增倍数  $> 10\,000$  倍。终产品放行标准包括: V $\delta$ 1T 细胞纯度  $\geq 80\%$ 、CAR 转导效率  $\geq 20\%$ 、细胞活率  $\geq 70\%$ 、 $\alpha\beta$ T 细胞残留率  $\leq 1\%$ , 以及微生物学检测合格等 (表 1)。

### 2.4 CD19-CAR-V $\delta$ 1T 细胞对 CD19 阳性肿瘤细胞具有显著的抗原特异性细胞毒性及持久的杀伤活性

Annexin V/7-AAD 检测结果显示, CD19-CAR-V $\delta$ 1T 细胞对 Raji (图 5A)、Nalm-6 (图 5B) 和 CD19-K562 (图 3B) 均具有较强的特异性杀伤作用。代表性数据如下: 效靶比为 1:1 的 Raji 组 (图 5C), CD19-CAR-V $\delta$ 1T 细胞杀伤率达  $80.38\% \pm 4.95\%$ , 显著高

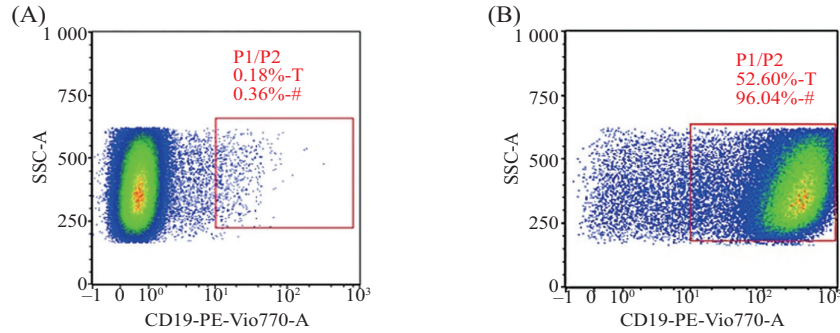


A: CD64 蛋白的表达率; B: CD86 蛋白的表达率; C: CD137L 蛋白的表达率。T 代表所有细胞 (包含活细胞和死细胞) 表面的各蛋白表达率, # 代表活细胞表面的各蛋白表达率。

A: expression rate of CD64 proteins; B: expression rate of CD86 proteins; C: expression rate of CD137L proteins. T represents the percentage of cell surface protein expression in the total cell population (including both live and dead cells), and # represents the percentage of cell surface protein expression in live cells.

图2 aAPC 细胞系的构建

Fig.2 Construction of aAPC cell line

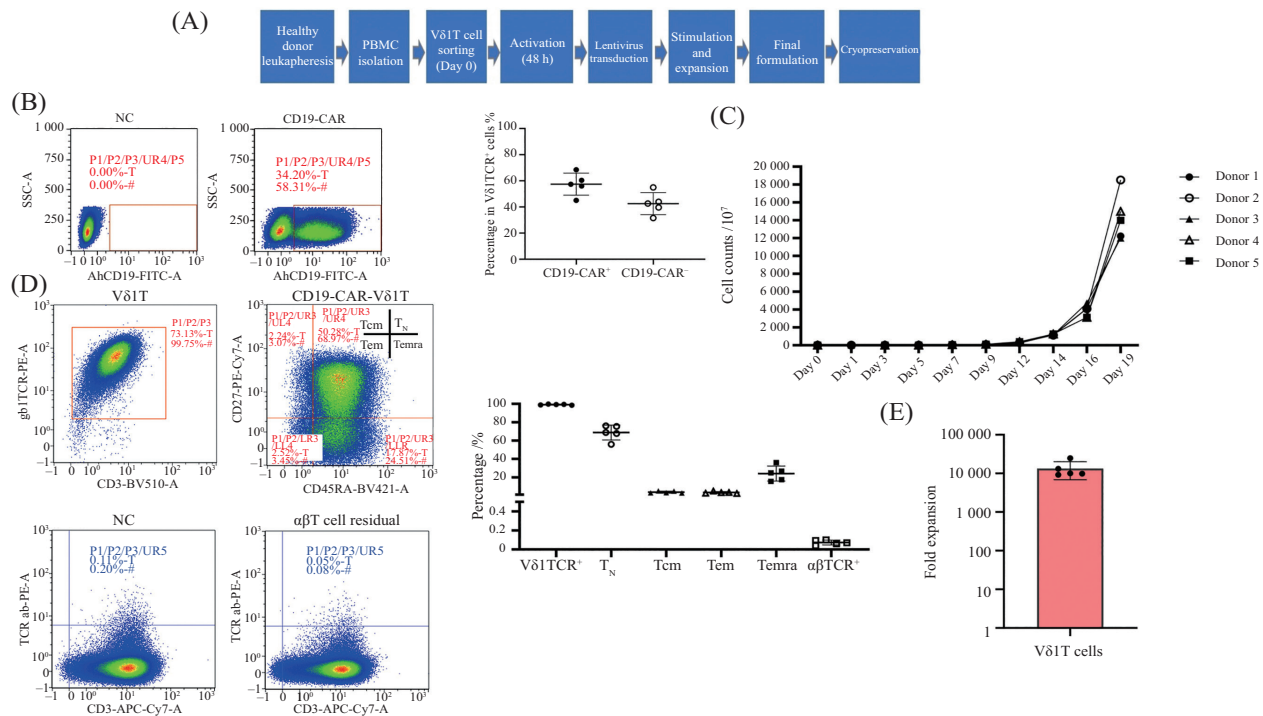


A: K562细胞表面CD19抗原的表达率; B: CD19-K562细胞表面CD19抗原的表达率。T代表所有细胞(包含活细胞和死细胞)表面的CD19表达率, #代表活细胞表面的CD19表达率。

A: expression rate of CD19 antigen on the surface of K562 cells; B: expression rate of CD19 antigen on the surface of CD19-K562 cells. T represents the percentage of cell surface CD19 expression in the total cell population (including both live and dead cells), and # represents the percentage of cell surface CD19 expression in live cells.

图3 肿瘤细胞表面CD19抗原的表达率

Fig.3 Expression rates of CD19 antigen on the surface of tumor cells



A: 异体CD19-CAR-V $\delta$ 1T细胞体外制备流程示意图; B: CD19-CAR表达率( $n=5$ ); C: 培养过程中V $\delta$ 1T细胞数量变化( $n=5$ ); D: CD19-CAR-V $\delta$ 1T细胞表型特征( $n=5$ ); E: 培养结束时V $\delta$ 1T细胞的扩增倍数( $n=5$ )。T代表所有细胞(包含活细胞和死细胞)表面的各蛋白表达率, #代表活细胞表面的各蛋白表达率。

A: schematic diagram of manufacturing allogeneic CD19-CAR-V $\delta$ 1T cells *in vitro*; B: expression rate of CD19-CAR ( $n=5$ ); C: the number of V $\delta$ 1T cells during the culture ( $n=5$ ); D: the phenotypes of CD19-CAR-V $\delta$ 1T cells ( $n=5$ ); E: fold expansion of V $\delta$ 1T cells at the end of the expansion protocol ( $n=5$ ). T represents the percentage of cell surface protein expression in the total cell population (including both live and dead cells), and # represents the percentage of cell surface protein expression in live cells.

图4 CD19-CAR-V $\delta$ 1T细胞的高倍扩增

Fig.4 Large-scale expansion of CD19-CAR-V $\delta$ 1T cells

于未转导V $\delta$ 1T细胞的 $10.57\% \pm 4.93\%$ ; 效靶比为1:3的Nalm-6组(图5D), CD19-CAR-V $\delta$ 1T细胞杀伤率达 $96.51\% \pm 2.36\%$ , 显著高于未转导V $\delta$ 1T细胞的 $31.06\% \pm 2.27\%$ ; 效靶比为3:1的CD19-K562组(图5E), CD19-CAR-V $\delta$ 1T细胞杀伤率达 $76.71\% \pm 7.44\%$ ,

显著高于CD19-CAR-V $\delta$ 1T细胞对K562的杀伤率( $13.58\% \pm 5.70\%$ )。此外, CD19-CAR-V $\delta$ 1T细胞经Raji细胞多次刺激后仍保持较强的细胞毒性(图5F), 同时在与Raji细胞共培养过程中持续增殖(图5G), 表明该细胞体外持久性良好。

## 2.5 CD19-CAR-V $\delta$ 1T细胞在体外杀伤CD19阳性肿瘤细胞过程中表现出很强的抗原特异性细胞因子分泌能力

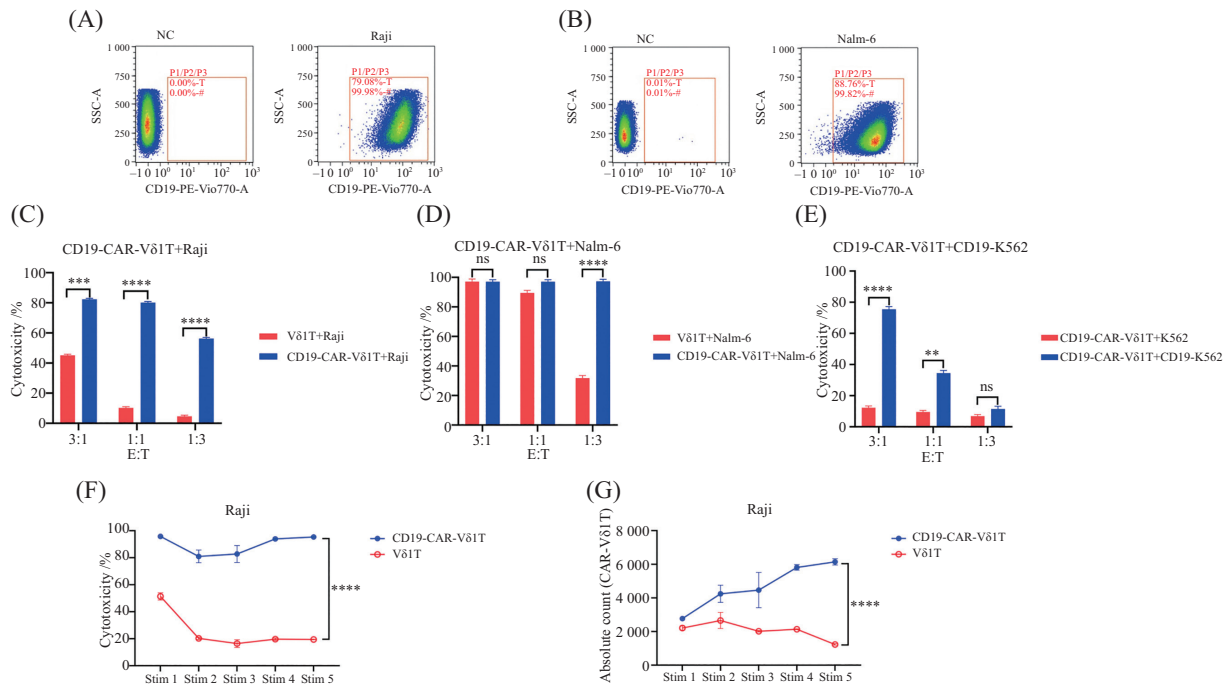
CBA检测结果显示,与对照组相比,IL-2(图

6A)、granzyme B(图6B)和INF- $\gamma$ (图6C)三种细胞因子的分泌量明显增多,表明CD19-CAR-V $\delta$ 1T细胞在体外杀伤CD19阳性肿瘤细胞过程中表现出很强的抗原特异性细胞因子分泌能力。

表1 CD19-CAR-V $\delta$ 1T细胞放行标准

Table 1 Release specifications for CD19-CAR-V $\delta$ 1T cells

检测项目	放行标准	批次1	批次2	批次3	批次4	批次5
Test items	Release criteria	Batch 1	Batch 2	Batch 3	Batch 4	Batch 5
Cell viability	$\geq 70\%$	86%	96%	94%	88%	96%
CAR transduction efficiency	$\geq 20.00\%$	60.34%	45.08%	56.06%	68.46%	57.35%
V $\delta$ 1T cell purity	$\geq 80.00\%$	99.80%	99.30%	99.52%	98.87%	98.57%
$\alpha\beta$ T cell residual rate	$\leq 1.00\%$	0.06%	0.07%	0.04%	0.10%	0.10%
aAPC residual	$\leq 1.00\%$	0.02%	0.01%	0.01%	0.02%	0.04%
CAR gene copy number	$\leq 5.0$ copies/CAR <sup>+</sup> cell	2.2	2.3	1.8	2.0	2.2
IFN- $\gamma$ release	$\geq 2\ 000$ pg/mL	9 670	9 625	15 623	10 892	16 012
Sterility test	Sterility	Sterility	Sterility	Sterility	Sterility	Sterility
Mycoplasma test	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
Bacterial endotoxin test	$\leq 5.0$ EU/mL	<2.5	<2.5	<2.5	<2.5	<2.5
Replication-competent lentivirus	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative

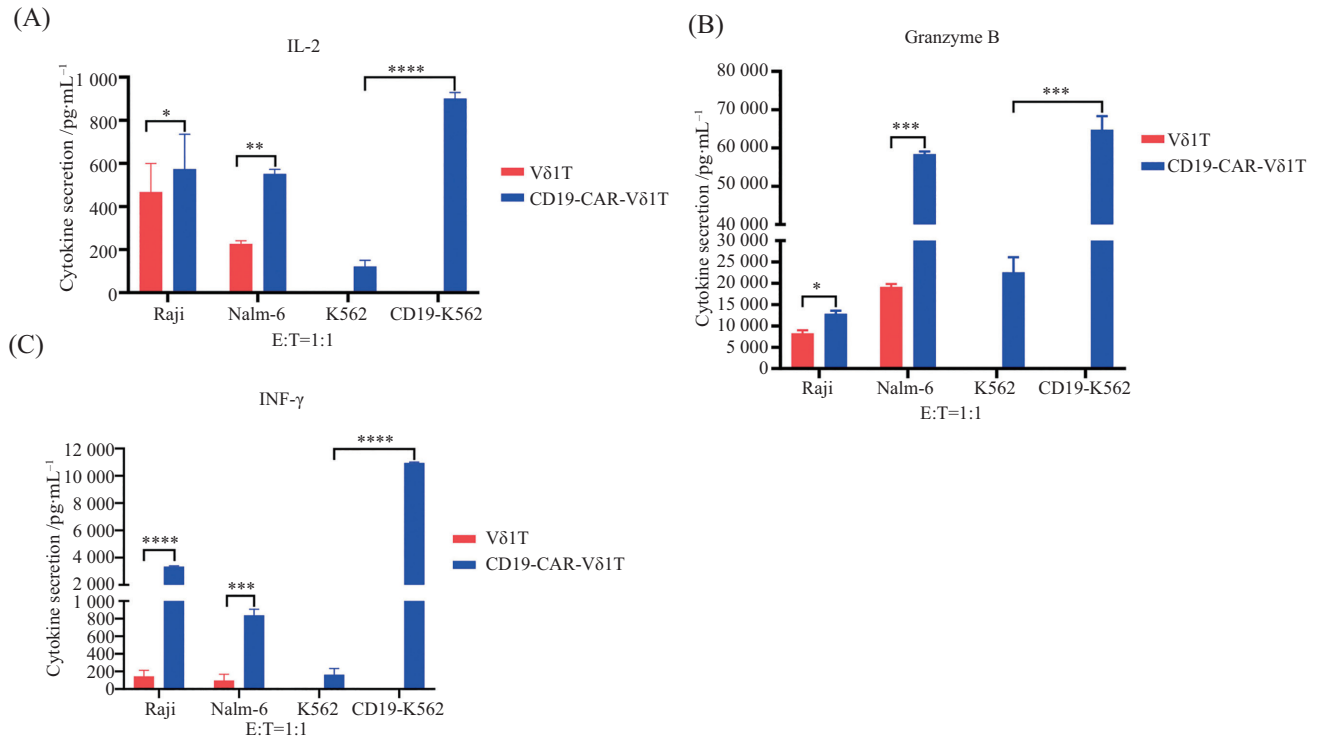


A: Raji细胞; B: Nalm-6细胞; C: 流式细胞术检测CD19-CAR-V $\delta$ 1T细胞对Raji细胞的杀伤效应; D: 流式细胞术检测CD19-CAR-V $\delta$ 1T细胞对Nalm-6细胞的杀伤效应; E: 流式细胞术检测CD19-CAR-V $\delta$ 1T细胞对CD19-K562细胞的杀伤效应; F: 在抗原重复刺激实验(共5次)中,比较CD19-CAR-V $\delta$ 1T组与V $\delta$ 1T组的抗肿瘤持久性; G: 每次抗原重复刺激后,CD19-CAR-V $\delta$ 1T细胞的绝对数量统计。 \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ , ns: 无显著差异。T代表所有细胞(包含活细胞和死细胞)表面的CD19表达率,#代表活细胞表面的CD19表达率。

A: Raji cells; B: Nalm-6 cells; C: the killing effect of CD19-CAR-V $\delta$ 1T cells toward Raji cells detected by flow cytometry; D: the killing effect of CD19-CAR-V $\delta$ 1T cells toward Nalm-6 cells detected by flow cytometry; E: the killing effect of CD19-CAR-V $\delta$ 1T cells toward CD19-K562 cells detected by flow cytometry; F: compared the antitumor durability of CD19-CAR-V $\delta$ 1T group with V $\delta$ 1T group in the antigen-repeated stimulation assay (five times); G: the absolute number of CD19-CAR-V $\delta$ 1T cells after each antigen-repeated stimulation. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ , ns: not significant. T represents the percentage of cell surface CD19 expression in the total cell population (including both live and dead cells), and # represents the percentage of cell surface CD19 expression in live cells.

图5 CD19-CAR-V $\delta$ 1T细胞对靶细胞的杀伤情况

Fig.5 The killing effect of CD19-CAR-V $\delta$ 1T cells towards target cells



A: CD19-CAR-V $\delta$ 1T细胞与靶细胞共孵育(E:T=1:1)后上清液中IL-2的分泌水平; B: CD19-CAR-V $\delta$ 1T细胞与靶细胞共孵育(E:T=1:1)后上清液中颗粒酶B的分泌水平; C: CD19-CAR-V $\delta$ 1T细胞与靶细胞共孵育(E:T=1:1)后上清液中INF- $\gamma$ 的分泌水平。\* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001, \*\*\*\* $P$ <0.0001。  
A: IL-2 production in the supernatant of CD19-CAR-V $\delta$ 1T cells after coincubation with target cells (E:T=1:1); B: granzyme B production in the supernatant of CD19-CAR-V $\delta$ 1T cells after coincubation with target cells (E:T=1:1); C: INF- $\gamma$  production in the supernatant of CD19-CAR-V $\delta$ 1T cells after coincubation with target cells (E:T=1:1). \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001, \*\*\*\* $P$ <0.0001.

图6 CD19-CAR-V $\delta$ 1T细胞杀伤靶细胞后的细胞因子分泌情况

Fig.6 The cytokine secretion by CD19-CAR-V $\delta$ 1T cells after target cell killing

## 2.6 CD19-CAR-V $\delta$ 1T细胞显著降低人Burkitt淋巴瘤(Raji)荷瘤免疫缺陷小鼠的肿瘤负荷

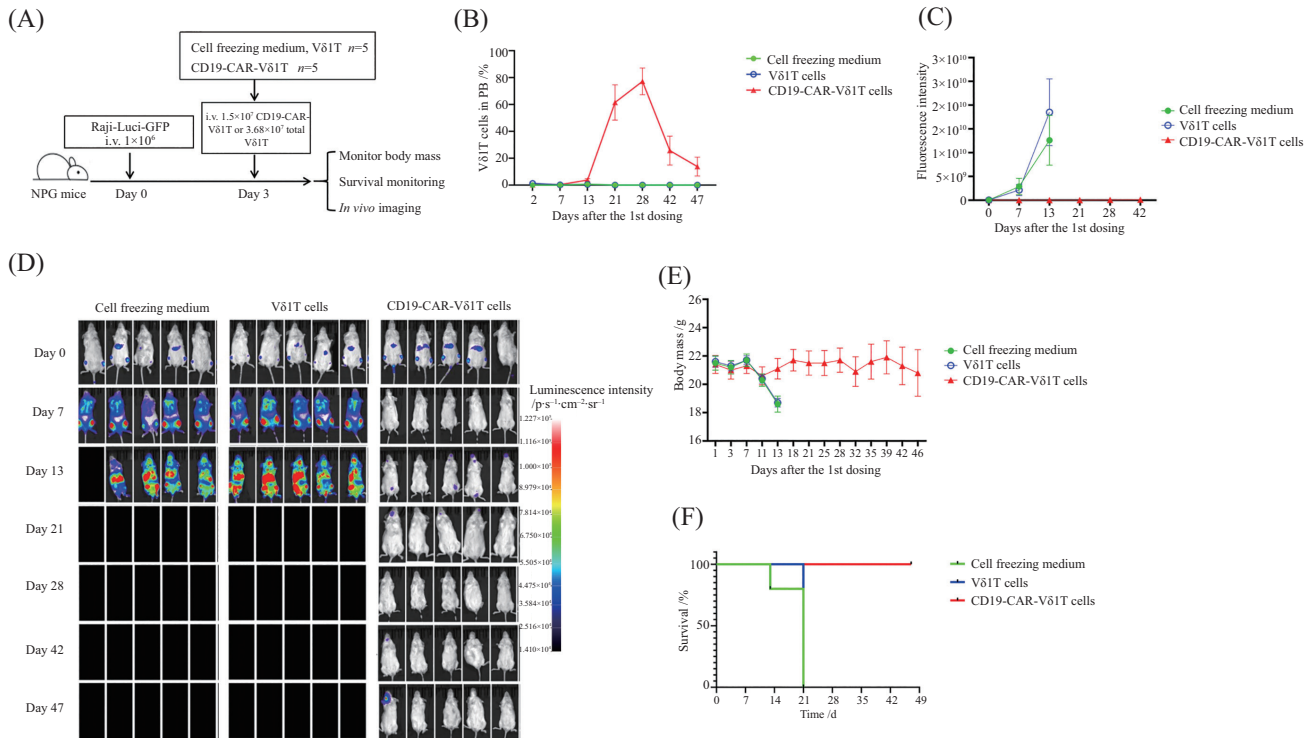
为了验证CD19-CAR-V $\delta$ 1T细胞对B细胞起源肿瘤的治疗潜力及潜在毒性,本研究构建了人Burkitt淋巴瘤(Raji)荷瘤免疫缺陷模型(图7A和图8A),CD19-CAR-V $\delta$ 1T细胞给药后在荷瘤小鼠外周血中表现出显著的体内扩增能力,于Day 28达到峰值(约75%),随后逐渐下降;而V $\delta$ 1T细胞单独输注组及冻存液对照组中未观察到V $\delta$ 1T细胞明显扩增(图7B),并且CD19-CAR-V $\delta$ 1T细胞给药后小鼠肿瘤负荷被显著降低(图7C和图7D)。图7E结果显示,未治疗组小鼠体质量随肿瘤负荷增长呈下降趋势,而CD19-CAR-V $\delta$ 1T细胞治疗后小鼠体质量相对稳定。图7F结果显示,与细胞冻存液和V $\delta$ 1T细胞组相比,经CD19-CAR-V $\delta$ 1T细胞治疗后荷瘤小鼠的生存期显著延长。图8B结果显示,CD19-CAR-V $\delta$ 1T细胞组与细胞冻存液组相比,相对器官重量(脏体比)无显著差异(尽管细胞冻存液组在镜下可见肿瘤浸润,但

尚未造成显著的器官重量改变);进一步对两组小鼠的各器官进行组织病理学检查(HE染色),结果显示,细胞冻存液组小鼠脑、肝脏、脾脏和肺均有肿瘤细胞浸润,而CD19-CAR-V $\delta$ 1T细胞组中未见明显异常改变(图8C)。以上结果表明,CD19-CAR-V $\delta$ 1T细胞在显著降低肿瘤负荷的同时表现出良好的安全性。

## 3 讨论

传统自体CAR-T疗法分离的患者 $\alpha$ B $\delta$ T细胞,经激活和基因改造后回输,具有GvHD风险低、不受MHC限制等优势。然而,该疗法存在明显局限:患者个体状况(如无法耐受清淋化疗、细胞质量差)影响治疗可行性;制备周期长达4~6周,易延误最佳治疗时机;且自体CAR-T疗法高度个体化导致成本高昂,临床可及性受限。因此,开发通用现货型(off-the-shelf)细胞产品以提高治疗可及性和效率,已成为该领域亟待解决的问题。

$\gamma$  $\delta$ T细胞因MHC非依赖性识别、低GvHD风险



A: NPG荷瘤小鼠体内实验设计示意图; B: 不同时间点, 外周血中CD19-CAR-V $\delta$ 1T细胞的检测; C: Raji荷瘤NPG小鼠荧光强度的统计学分析; D: Raji荷瘤NPG小鼠的体内成像; E: Raji荷瘤NPG小鼠体质量的统计学分析; F: Raji荷瘤NPG小鼠的生存期分析。PB: 外周血。

A: scheme of the *in vivo* tumor-bearing NPG mouse experiment design; B: the detection of CD19-CAR-V $\delta$ 1T cells in the peripheral blood at different points; C: statistical analysis of fluorescence intensity in Raji NPG mice; D: *in vivo* imaging of Raji NPG mice; E: statistical analysis of body mass in Raji NPG mice; F: survival analysis of Raji NPG mice. PB: peripheral blood.

图7 CD19-CAR-V $\delta$ 1T细胞在B细胞起源肿瘤免疫缺陷小鼠模型中的抗肿瘤效果

Fig.7 The antitumor efficacy of CD19-CAR-V $\delta$ 1T cells in NPG mice bearing B-cell-derived tumors

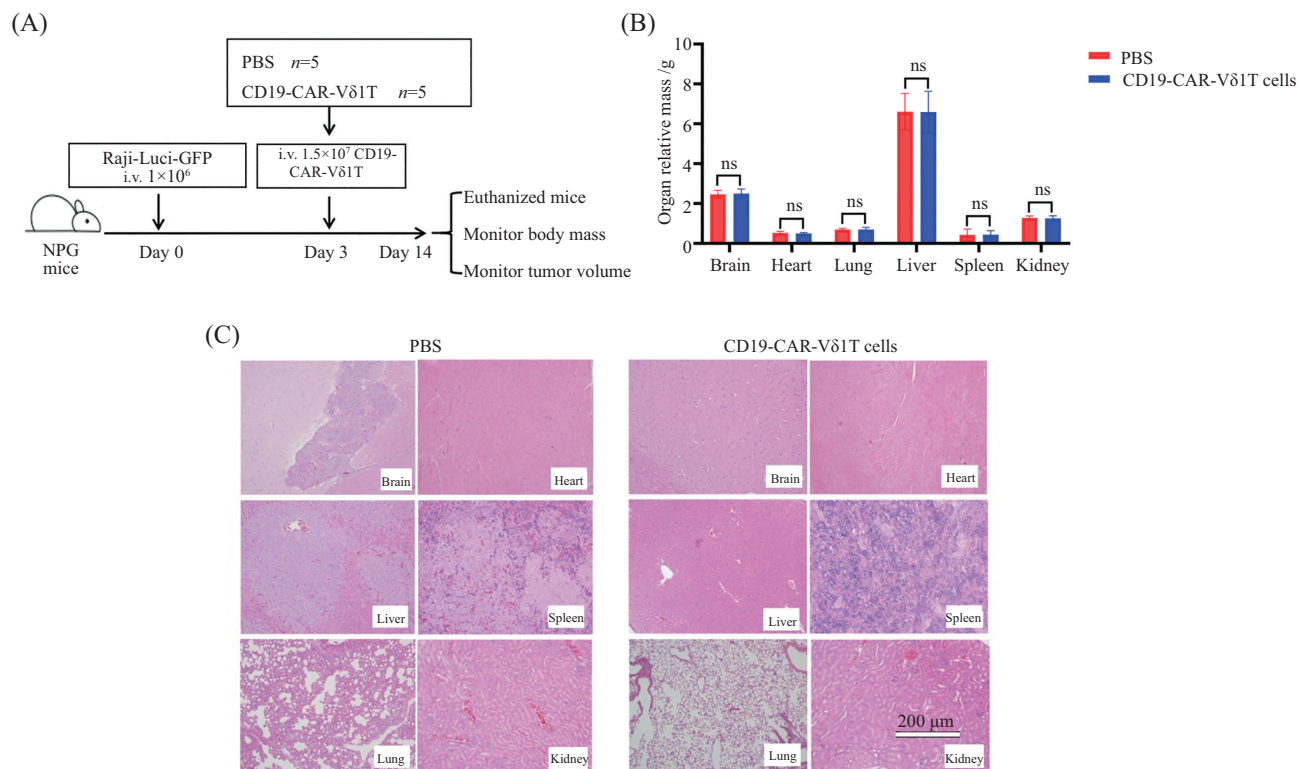
及兼具先天和适应性免疫功能<sup>[25-27]</sup>, 以及其在血液肿瘤和实体瘤中的存在与临床获益相关<sup>[18,28]</sup>, 成为通用型细胞疗法的理想候选细胞。然而, 其临床转化仍面临规模化生产和功能维持的挑战。值得注意的是, V $\delta$ 2T细胞在实体瘤治疗中疗效有限<sup>[18]</sup>, 而V $\delta$ 1T细胞与实体瘤更好的预后密切相关<sup>[18-20]</sup>, 因此, V $\delta$ 1T细胞更具被开发成通用现货型异体细胞疗法的潜力。

V $\delta$ 1T细胞在PBMCs中占比不足1%<sup>[29]</sup>, 其规模化扩增与功能维持是开发通用现货型产品的关键。本研究建立了异体外周血V $\delta$ 1T细胞的大规模生产工艺, 并明确了CD19-CAR-V $\delta$ 1T细胞的表型与功能特征。表型分析显示, 该细胞呈幼稚T细胞记忆表型, 提示其体内持久性优势; 功能层面则表现为特异性抗肿瘤活性、较强的细胞因子分泌能力及体外持久性, 且在荷瘤小鼠模型中可有效抑制肿瘤生长, 同时表现出良好的安全性。这些临床前数据为CD19-CAR-V $\delta$ 1T细胞的临床转化提供

了有力支撑。

aAPC通常基于K562细胞系构建, 通过表达抗原或膜结合抗体激活T细胞并促进其离体增殖。此类aAPC表达共刺激分子(CD86、CD137L)及用于锚定OKT3抗体的Fc受体(CD32、CD64)<sup>[30]</sup>, 其介导的T细胞增殖效率显著高于传统的CD3/CD28抗体激活法。鉴于V $\delta$ 1T细胞在PBMC中占比<1%<sup>[29]</sup>, 其规模化扩增仍是技术瓶颈。本研究构建了专用于CD19-CAR-V $\delta$ 1T细胞的aAPC细胞, 其共表达CD86、CD137L及CD64分子, 实现了V $\delta$ 1T细胞的高效扩增, 扩增所得细胞数量不仅满足了临床多次回输需求, 也为CD19-CAR-V $\delta$ 1T细胞疗法的广泛应用奠定了基础。

本研究的局限性包括: 由于难以获取临床患者的原代B-ALL细胞, 本研究未能在体内外对患者来源的B-ALL细胞进行实验; 由于对其他现货型细胞产品(如CD19-CAR-NK细胞、CD19-CAR-V $\delta$ 2T细胞等)的生产工艺缺乏深入了解, 本研究未能获取



A: NPG荷瘤小鼠体内实验设计示意图; B: 实验终点时PBS组和CD19-CAR-V $\delta$ 1T组小鼠脏器(脑、心、肺、肝、脾、肾)相对质量; C: 实验终点时PBS组和CD19-CAR-V $\delta$ 1T组小鼠各脏器(脑、心、肝、脾、肺、肾)的HE染色结果。ns: 无显著差异。

A: scheme of the *in vivo* tumor-bearing NPG mouse experiment design; B: mouse organ relative mass (brain, heart, lung, liver, spleen and kidney) of PBS and CD19-CAR-V $\delta$ 1T groups at the endpoint; C: HE staining results of various organs (brain, heart, liver, spleen, lung and kidney) in the PBS and CD19-CAR-V $\delta$ 1T groups at the endpoint. ns: not significant.

图8 CD19-CAR-V $\delta$ 1T细胞在B细胞起源肿瘤免疫缺陷小鼠模型中表现出良好的安全性

Fig.8 CD19-CAR-V $\delta$ 1T cells exhibited good safety in NPG mice bearing B-cell-derived tumors

CD19-CAR-V $\delta$ 1T细胞与其他现货型细胞的对比数据,以充分凸显CD19-CAR-V $\delta$ 1T细胞作为通用现货型产品的优势。尽管如此,基于V $\delta$ 1T细胞的天然优势,其作为通用现货型细胞产品仍具显著开发潜力。

总之,本研究成功开发了一种创新方法,此方法利用慢病毒载体转导以及人工抗原呈递细胞(aAPC)扩增技术,从健康供体的外周血液中获取V $\delta$ 1T细胞,并进一步将其制备成CD19-CAR-V $\delta$ 1T细胞。这些经过基因改造的V $\delta$ 1T细胞不仅在体外展现出显著的扩增能力,还具备强大的抗肿瘤活性,该细胞疗法有望作为一种通用现货型疗法,为未来的癌症治疗提供新的可能方向。

### 参考文献 (References)

- [1] ROSSI M, BREMAN E. Engineering strategies to safely drive CAR T-cells into the future [J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1411393.
- [2] ZHAO J J, LIN Q D, SONG Y P, et al. Universal CARs, universal T cells, and universal CAR T cells [J]. *J Hematol Oncol*, 2018, 11(1): 132.
- [3] LYMAN G H, NGUYEN A, SNYDER S, et al. Economic evaluation of chimeric antigen receptor T-cell therapy by site of care among patients with relapsed or refractory large B-cell lymphoma [J]. *JAMA Network Open*, 2020, 3(4): e202072.
- [4] GRAHAM C, JOZWIK A, PEPPER A, et al. Allogeneic CAR-T cells: more than ease of access [J]? *Cells*, 2018, 7(10): 155.
- [5] DEPIL S, DUCHATEAU P, GRUPP S A, et al. 'Off-the-shelf' allogeneic CAR T cells: development and challenges [J]. *Nat Rev Drug Discovery*, 2020, 19(3): 185-99.
- [6] BENJAMIN R, GRAHAM C, YALLOP D, et al. Genome-edited, donor-derived allogeneic anti-CD19 chimeric antigen receptor T cells in paediatric and adult B cell acute lymphoblastic leukaemia: results of two phase 1 studies [J]. *The Lancet*, 2020, 396(10266): 1885-94.
- [7] KAGOYA Y K, GUO T X, YEUNG B, et al. Genetic ablation of HLA class I, class II, and the T cell receptor enables allogeneic T cells to be used for adoptive T cell therapy [J]. *Cancer Immunol Res*, 2020, 8(7): 926-36.
- [8] SAURA-ESTELLER J, DE JONG M, KING L A, et al. Gamma delta T-cell based cancer immunotherapy: past-present-future [J].

- Front Immunol, 2022, 13: 915837.
- [9] MENSYRADO S, BLANCO-DOMÍNGUEZ R, SILVA-SANTOS B. The emerging roles of  $\gamma\delta$ T cells in cancer immunotherapy [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2023, 20(3): 178-91.
- [10] QIU S, HAN Q Y, ZHAO X, et al. A preliminary study on the therapeutic role of  $\gamma\delta$ T cells in triple-negative breast cancer [J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2025, 41(8): e70029.
- [11] JIANG L C, YOU F T, WU H, et al. B7-H3-targeted CAR-V $\delta$ 1T cells exhibit potent broad-spectrum activity against solid tumors [J]. *Cancer Res*, 2024, 84(23): 4066-80.
- [12] ADAMS E J, GU S, LUOMA A M. Human gamma delta T cells: evolution and ligand recognition [J]. *Cell Immunol*, 2015, 296(1): 31-40.
- [13] PAN L J, ZHOU Y R, KUANG Y Y, et al. Progress of research on  $\gamma\delta$  T cells in colorectal cancer [J]. *Oncol Rep*, 2024, 52(6): 160.
- [14] ZHAN C J, PENG C X, WEI H X. Diverse subsets of  $\gamma\delta$ T cells and their specific functions across liver diseases [J]. *Int J Mol Sci*. 2025, 26(6): 2778.
- [15] LÚ J Z, LIU Z, REN X T, et al.  $\gamma\delta$ T cells, a key subset of T cell for cancer immunotherapys [J]. *Front Immunol*, 2025, 16: 1562188.
- [16] VANTOUROUT P, HAYDAY A. Six-of-the-best: unique contributions of  $\gamma\delta$  T cells to immunology [J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(2): 88-100.
- [17] ALMEIDA A R, CORREIA D V, FERNANDES-PLATZGUMMER A, et al. Delta one T cells for immunotherapy of chronic lymphocytic leukemia: clinical-grade expansion/differentiation and preclinical proof of concept [J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(23): 5795-804.
- [18] WU Y, KYLE-CEZAR F, WOOLF R T, et al. An innate-like V $\delta$ 1<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T cell compartment in the human breast is associated with remission in triple-negative breast cancer [J]. *Sci Transl Med*, 2019, 11(513): eaax9364.
- [19] FOORD E, ARRUDA L C M, GABALLA A, et al. Characterization of ascites- and tumor-infiltrating  $\gamma\delta$  T cells reveals distinct repertoires and a beneficial role in ovarian cancer [J]. *Sci Transl Med*, 2021, 13(577): eabb0192.
- [20] WU Y, BISWAS D, USAITE L, et al. A local human V $\delta$ 1 T cell population is associated with survival in nonsmall-cell lung cancer [J]. *Nat Cancer*, 2022, 3(6): 696-709.
- [21] FERRY G M, AGBUDUWE C, FORRESTER M, et al. A simple and robust single-step method for CAR-v $\delta$ 1  $\gamma\delta$ T cell expansion and transduction for cancer immunotherapy [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 863155.
- [22] MAKKOUK A, YANG X C, BARCA T, et al. Off-the shelf V $\delta$ 1 gamma delta T cells engineered with glypican-3 (GPC-3)-specific chimeric antigen receptor (CAR) and soluble IL-15 display robust antitumor efficacy against hepatocellular carcinoma [J]. *J Immunother Cancer*, 2021, 9(12): e003441.
- [23] ZLATAREVA I, WU Y. Local  $\gamma\delta$  T cells: translating promise to practice in cancer immunotherapy [J]. *Br J Cancer*, 2023, 129(3): 393-405.
- [24] CHEN Y, YOU F T, JIANG L C, et al. Gene-modified NK-92MI cells expressing a chimeric CD16-BB- $\zeta$  or CD64-BB- $\zeta$  receptor exhibit enhanced cancer-killing ability in combination with therapeutic antibody [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(23): 37128-39.
- [25] GAO Z F, BAI Y F, LIN A Q, et al. Gamma delta T-cell-based immune checkpoint therapy: attractive candidate for antitumor treatment [J]. *Mol Cancer*, 2023, 22(1): 31.
- [26] LI W J, ZHAO X, REN C X, et al. The therapeutic role of  $\gamma\delta$ T cells in TNBC [J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1420107.
- [27] ZHENG L, XUE R, MA X F, et al. Study on the anti-tumor effect of PDL1-CAR- $\gamma\delta$ T cells constructed with nanobody sequences on glioblastoma [J]. *Am J Cancer Res*, 2025, 15(11): 4780-94.
- [28] SIEGERS G M, LAMB L S J. Cytotoxic and regulatory properties of circulating V $\delta$ 1<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T cells: a new player on the cell therapy field [J]? *Mol Ther*, 2014, 22(8): 1416-22.
- [29] DAVEY M S, WILLCOX C R, JOYCE S P, et al. Clonal selection in the human V $\delta$ 1 T cell repertoire indicates  $\gamma\delta$  TCR dependent adaptive immune surveillance [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 14760.
- [30] DENIGER D C, SWITZER K, MI T, et al. Bispecific T-cells expressing polyclonal repertoire of endogenous gamma delta T-cell receptors and introduced CD19-specific chimeric antigen receptor [J]. *Mol Ther*, 2013, 21(3): 638-47.