



吕璐璐博士，现任合源生物科技股份有限公司首席执行官。曾为血液科医生，并于美国纽约医学院作为访问学者，进行血液病治疗方面的研究。她参与创立了合源生物科技股份有限公司，组织搭建了具有国际竞争力的多疾病领域的细胞治疗产品管线和专业团队，带领公司实现了从细胞药物研发到商业化，并实现了全球化的战略布局。首个自主原研核心产品源瑞达[®](纳基奥仑赛注射液)，针对血液肿瘤的2个适应症，获得国家药品监督管理局批准上市，同时该产品在自身免疫性疾病领域以及全球化方面完成了战略性布局。吕璐璐博士在生物科学研究、创新药研发方面拥有超过20年经验，在国际国内杂志发表学术论文30余篇，并获授权发明专利27项。

CAR-T细胞的生产与质控

石琳 王永增 吕璐璐*

(合源生物科技股份有限公司, 天津 300384)

摘要 嵌合抗原受体T细胞(CAR-T)是一种新型的免疫细胞疗法，近几年在血液肿瘤治疗中取得了显著成效，同时在自身免疫性疾病以及实体肿瘤领域也取得了突破性进展。CAR-T细胞产品制备工艺复杂，其生产与质控流程的规范对保障治疗安全性与有效性至关重要。该文详细阐述了CAR-T细胞产品的生产工艺以及质量控制各环节需要充分考虑的技术要点与关键控制项目，包括生产物料、生产模式、生产设备和生产工艺，以及某些质量控制项目。此外，该文结合临床应用实践的经验，展望了未来CAR-T细胞产品技术发展路径和检测方法开发方向，旨为CAR-T细胞治疗领域从业同仁提供参考，共同推动该领域规范化发展。

关键词 CAR-T细胞；细胞治疗；生产工艺；质量控制

Production and Quality Control of CAR-T Cells

SHI Lin, WANG Yongzeng, LÜ Lulu*

(Juventas Co., Ltd., Tianjin 300384, China)

Abstract CAR-T (chimeric antigen receptor T-cell) therapy is a novel form of immunotherapy with significant breakthroughs achieved in hematologic malignancies in recent years. Additionally, remarkable progress has been made in the treatment of autoimmune diseases and solid tumors. The manufacturing process of CAR-T cell products is complex, and standardization of production and quality control processes is crucial to ensure the safety and efficacy of the therapy. This article provides a detailed description of the production process for CAR-T cell products, including materials, manufacturing models, equipment, and process development, as well as quality control. Furthermore, based on clinical experience, the article discusses ongoing developments of CAR-T cell technologies and analysis methods, offering valuable insights for professionals in the field to promote the standardization of the development of CAR-T cell therapy.

Keywords CAR-T cells; cell therapy; production process; quality control

收稿日期: 2025-09-08

接受日期: 2025-10-16

*通信作者。Tel: 010-65960098, E-mail: lvlulu@juventas.cn

Received: September 8, 2025 Accepted: October 16, 2025

*Corresponding author. Tel: +86-10-65960098, E-mail: lvlulu@juventas.cn

细胞治疗作为现代医学领域中极具创新性与前沿性的治疗手段,近年来在全球范围内掀起了一场医学革命。随着生命科学基础研究的持续深入,细胞治疗,尤其是免疫细胞治疗,已从早期的理论设想逐步演变为切实可行的临床治疗方案,为众多传统治疗手段难以攻克的疑难杂症开辟了全新的治疗途径。嵌合抗原受体T细胞(chimeric antigen receptor T-cell, CAR-T)是其中发展最快的一类细胞治疗产品。

CAR-T细胞治疗产品首先需针对嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)进行目的基因序列的设计和筛选,并通过基因工程技术构建的修饰系统(如病毒载体、转座子系统及体外转录mRNA等非病毒载体),在体外将CAR基因转入T细胞,得到可特异性识别并杀伤靶细胞的T细胞产品。CAR-T细胞产品是一种新型的免疫细胞治疗产品,在血液肿瘤治疗领域展现出令人瞩目的疗效^[1-5]。自2017年以来,全球已有多款CAR-T细胞产品获批上市,截止到2025年7月份,全球共有14款CAR-T细胞产品获批上市,其中美国FDA批准了7款,我国国家药品监督管理局(National Medical Products Administration, NMPA)批准了7款,获批上市的CAR-T产品均为自体CAR-T细胞治疗产品,且均以CD19或BCMA为靶点,分别用于治疗复发或难治性大B细胞淋巴瘤、复发或难治B细胞白血病和多发性骨髓瘤等血液系统肿瘤^[6-9]。CAR-T细胞产品的上市开启了国内细胞治疗的新时代(表1)。

随着CAR-T细胞产品在临床应用方面的探索,其在自身免疫性疾病领域也初步展现出广阔的应用前景。2022年,德国团队发表的研究表明,5例难治性系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)患者接受CAR-T治疗后,所有患者在3个月内达到缓解,中位随访8个月期间仍维持无药缓解^[10]。截至2024年初,该团队对15名自身免疫疾病患者(严重SLE、特发性炎症性肌炎和系统性硬化症的患者)进行了CAR-T细胞单次输注,其中所有入组的SLE患者都达到了DORIS(definition of remission in SLE)缓解,所有入组的特发性炎症性肌炎患者都达到了ACR-EULAR主要临床反应,所有系统性硬化症患者的EUSTAR活动评分都有所下降,其中1名患者维持了600天的无药物缓解期^[11]。2023年,HAGHICKIA等^[12]报道了CAR-T细胞治疗难治性重症肌无力的

成功案例,患者症状显著改善。MÜLLER等^[13]报道了2例抗Jo-1抗体阳性的抗合成酶综合征患者接受CAR-T治疗后,肌酸激酶水平正常化,肺部和肌肉炎症消退,高滴度的抗Jo-1抗体消失。2024年的一项研究显示,2例多发性硬化症患者接受CAR-T治疗后病情稳定^[14]。本公司开发的CAR-T产品纳基奥仑赛注射液,探索性应用于治疗SLE相关的免疫性血小板减少症(immune thrombocytopenia, SLE-ITP),患者病情改善明显^[15],针对该适应症的注册临床试验申请已经获得了默示许可,注册临床试验研究正在进行中。随着技术的不断进步,CAR-T细胞治疗在实体瘤治疗等方面也在积极探索^[16],应用前景不断拓宽。

现有已上市的CAR-T细胞治疗产品均为自体个性化细胞治疗产品,因而具有不同于传统生物制品的特殊性。比如,供者材料源于人体,可能含有传染病病原;供者材料的质量受个体化差异影响较大;每批细胞产品批量小;无法通过终端灭菌或过滤保障无菌,需全流程无菌控制^[17]。另外,自体CAR-T细胞产品生产用原材料种类多,制备工艺复杂,其生产过程涉及多个环节,从患者外周血单个核细胞(Peipheral blood mononuclear cell, PBMC)的采集,到T细胞的分离、活化、转导、扩增,再到最终产品的灌装与冻存,以及产品的质量检测和放行,每一步都对产品的质量和安全性有着关键影响。因此,自体CAR-T细胞产品生产工艺设计和质量控制需要充分考虑供者材料个体化差异的影响,制定合理的工艺步骤和参数,以及相应的质量控制措施。严格规范的生产与质量控制流程是确保CAR-T细胞产品能够安全、有效地应用于临床治疗的基础。本文将围绕CAR-T细胞的生产工艺开发与质量控制展开详细阐述,以期为该领域的发展提供有益参考。

1 CAR-T细胞的生产工艺

CAR-T细胞的生产工序包括血液样本的采集、冷链运输、细胞分选冻存(进一步选择和富集T淋巴细胞群)、细胞激活(使T细胞活化,以便可以更高效地进行基因转导)、细胞转导(通过基因修饰系统,将CAR基因转入T细胞中,通过CAR基因在细胞内的转录与翻译,在T细胞膜上表达CAR蛋白)、细胞扩增(获得足够细胞数量的预期产品)、细胞收获洗涤(去除/减少杂质、制剂溶液置换)、辅料添加(在细

表1 全球批准上市的CAR-T细胞产品
Table 1 Globally approved CAR-T products for market authorization

产品名称 Product name	研发公司 Developing company	靶点 Target	批准机构 Approval authority	获批时间 Approval date	适应症 Indication
Tisagenlecleucel (Kymriah)	Novartis	CD19	FDA	August, 2017	Pediatric r/r B-ALL r/r LBCL
Axicabtagene ciloleucel (Yescarta)	Gilead	CD19	FDA	October, 2017	r/r LBCL LBCL r/r FL
Brexucabtagene autoleucel (Tecartus)	Gilead	CD19	FDA	July, 2020	Adult r/r B-ALL r/r MCL
Lisocabtagene maraleucel (Breyanzi)	BMS	CD19	FDA	February, 2021	r/r LBCL LBCL r/r MCL r/r FL r/r CLL/SLL
Idecabtagene vicleucel (Abecma)	BMS	BCMA	FDA	March, 2021	r/r MM
Ciltacabtagene autoleucel (Carvykti)	J&J	BCMA	FDA	February, 2022	r/r MM
Obecabtagene autoleucel (Aucatzy)	Autolus	CD19	FDA	November, 2024	Adult r/r B-ALL
Axicabtagene ciloleucel	FosunKairos	CD19	NMPA	June, 2021	r/r LBCL LBCL
Relmacabtagene autoleucel	JW	CD19	NMPA	September, 2021	r/r LBCL r/r FL
Equecabtagene autoleucel	IASO	BCMA	NMPA	June, 2023	r/r MM
Inaticabtagene autoleucel	JUVENTAS	CD19	NMPA	November, 2023	Adult r/r B-ALL
				November, 2025	r/r LBCL
Zevorcabtagene autoleucel	CARsgen	BCMA	NMPA	March, 2024	r/r MM
Ciltacabtagene autoleucel	LEGEND	BCMA	NMPA	August, 2024	r/r MM
Ranicabtagene autoleucel	HRAIN	CD19	NMPA	July, 2025	r/r LBCL

r/r B-ALL: 复发或难治性B淋巴细胞白血病; r/r LBCL: 复发或难治性大B细胞淋巴瘤; r/r MCL: 复发或难治性套细胞淋巴瘤; r/r FL: 复发或难治性滤泡性淋巴瘤; r/r CLL/SLL: 复发或难治性慢性淋巴细胞白血病或小淋巴细胞白血病; r/r MM: 复发或难治性多发性骨髓瘤。

r/r B-ALL: relapsed or refractory B-cell acute lymphoblastic leukemia; r/r LBCL: relapsed or refractory large B-cell lymphoma; r/r MCL: relapsed or refractory mantle cell lymphoma; r/r FL: relapsed or refractory follicular lymphoma; r/r CLL/SLL: relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma; r/r MM: relapsed or refractory multiple myeloma.

胞中添加缓冲液、蛋白质、辅助物质和冷冻保护剂, 保护细胞活性)、灌装、贴签、冻存等工序(图1)。在实际工艺开发及生产过程中, 可根据具体研究数据, 并基于质量风险管理确定生产工艺与工序, 明确产品各工序对应的关键工艺参数(critical process parameter, CPP)与关键质量属性(critical quality attribute, CQA), 确定CAR-T细胞治疗产品生产过程中各主要生产设备和程序的选择, 以及参数设置和范围。同时, 由于自体CAR-T细胞治疗不可避免地存在患者间个体差异, 应特别关注参数范围制定的合理性^[18]。

当前, 已上市的或在研的CAR-T细胞产品常见

的生产工艺、对应的某些工艺参数与质量属性参考如表2所示。

1.1 生产物料

在自体CAR-T细胞产品的生产工艺开发中, 生产物料的筛选和控制是一个复杂而关键的过程, 涉及质粒、病毒载体(如慢病毒和γ-逆转录病毒)和其他物料等多个方面, 为确保终产品的质量、安全性和有效性, 需对其进行严格的风险评估、实验研究和质量控制。

关于质粒和病毒载体, 主要基于后续CAR-T细胞所使用的制造工艺以及载体转移的预期目的, 设计质粒结构以及选择使用的病毒载体种类。同时,

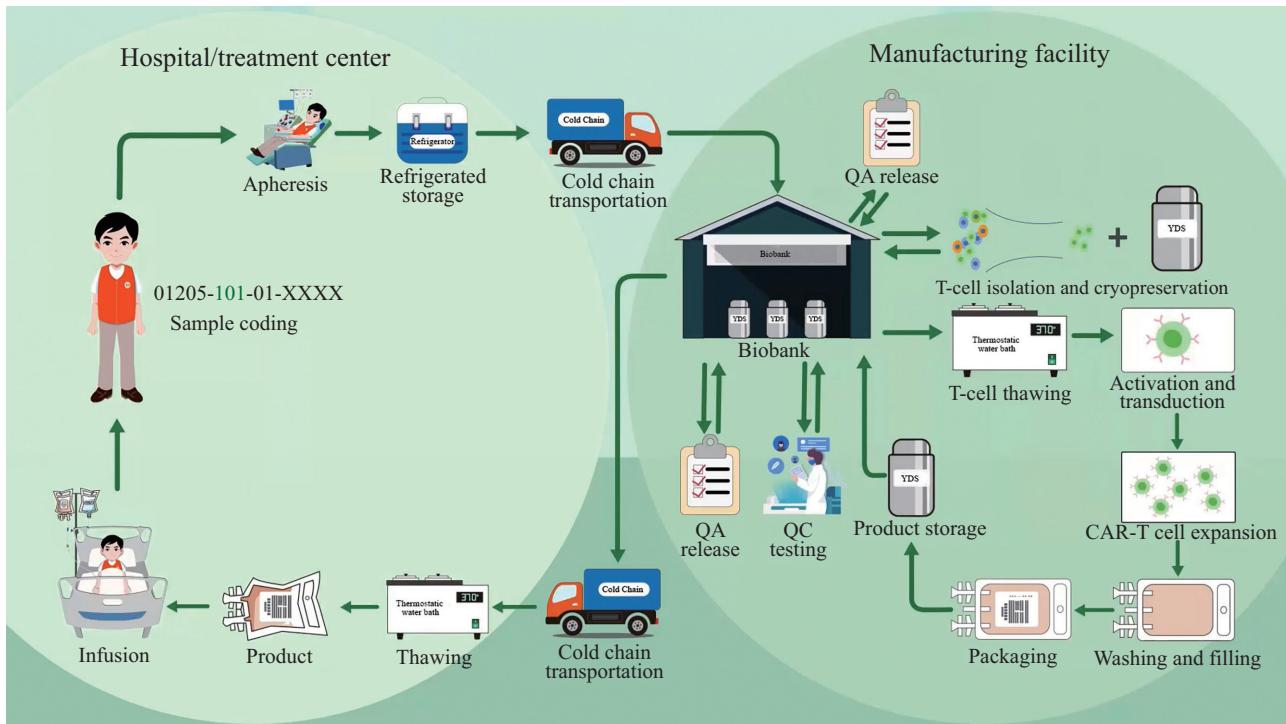


图1 CAR-T细胞治疗工作流程示意图

Fig.1 Schematic diagram of the CAR-T cell therapy workflow

表2 CAR-T细胞产品典型生产工序及对应工艺参数与质量属性参考

Table 2 Typical production processes of CAR-T products and corresponding process parameters and quality attributes for reference

生产工序 Production steps	工艺参数参考 Reference process parameters	相关质量属性参考 Reference related quality attributes
Blood sample collection	Apheresis procedure, anticoagulant ratio, whole blood processing volume, number of cycles, apheresis collection volume	Donor infectious disease testing, cell viability, number of PBMCs in apheresis product, sterility
Sample transportation	Transportation temperature and duration	Appearance, labeling
Cell sorting and cryopreservation	Type and dosage of sorting magnetic beads, magnetic bead incubation time and temperature, equipment sorting program and parameter settings, cryoprotectant type and dosage, filling volume, temperature reduction program, storage temperature and duration	Cell density and viability
Cell thawing and activation	Thawing temperature, thawing duration, viable cell count prior to activation, type and dosage of activators, incubation conditions and duration, activation conditions and duration	Cell density and viability, sterility
Cell transduction	Cell count post-activation, viral vector dosage, incubation conditions and duration, viral vector washing procedure	Total viable cell count post-transduction
Cell expansion	Culture system (medium type and dosage, cytokine type and dosage), culture conditions and duration	Cell density and viability, CAR-positive cell ratio
Cell harvesting	Maximum harvest time, bead removal conditions, number of concentration and washing cycles, washing solution composition	Target cell count, cell density and viability, sterility, mycoplasma testing
Excipient addition	Formulation composition (e.g., cell cryopreservation solution containing DMSO, etc.) and dosage	Cell density and viability
Cell filling, labeling and cryopreservation	Filling volume and number of filled units, labeling information, temperature reduction program, storage temperature	Appearance, labeling

在工艺开发过程中,还应考虑选择的病毒载体可以达到的预期效果,比如,降低生产成本、实现高转导效率以及获得的CAR-T细胞有较强的杀伤功能等。另外,对于质粒和病毒载体如何满足监管的要求,各国药品监管机构之间尚未建立统一的生产质量管理标准。有的监管机构将其视为产品生产工艺的重要组成部分,而有的监管机构将其视为关键起始物料。无论是作为生产工艺的一部分,还是作为关键起始物料,对其质量的根本要求与质量管理在基本原则上都是一致的,即病毒载体和质粒的生产商应建立质量管理体系,按照质量风险管理,即最大限度地降低污染/交叉污染、混淆以及差错等风险,建立生产工艺规程和质量标准,确保持续、稳定地生产出符合预定用途的产品。

关于起始原材料,如供者细胞或单采血,是通过白细胞分离术收集的非动员单个核细胞。单采血采集后可以在2 °C~8 °C的条件下运输到制造工厂新鲜使用,也可以在采集后先冷冻保存,然后再运输到制造工厂使用。两种形式各有利弊(表3),具体采用哪种方式,取决于CAR-T细胞生产工艺的设计。目前,大多数商业化CAR-T细胞产品使用新鲜的单采血作为起始原材料进行生产。相比之下,Kymriah/Tisagenlecleucel(诺华)使用经冷冻保存的单采血作为起始原材料投入生产。

单采血采集后,需要对其进行检测,以保证采集的细胞数量可以满足后续CAR-T细胞的生产,比如进行细胞分类计数、淋巴细胞亚群分析等。此外,

微生物检测对于确保起始材料的无菌性至关重要。在大多数情况下,微生物污染源自患者,主要与细菌或病毒感染有关。但如果采集袋出现泄漏或破损,也可能导致单采血污染。

关于其他原材料(如培养基、细胞因子、抗体、磁珠、其他生化试剂等),以及生产过程中使用的管路、滤器、培养瓶或培养袋等一次性耗材、包装容器等,在生产工艺开发过程中均需要经过严格的筛选,开展适用性和生物安全性评估,并根据评估结果开展相应的研究。风险评估内容包括原材料的来源、组分、功能、质量控制等,需要具备的相关文件包括来源证明、检验报告书(certificate of analysis, COA)、说明书、无TSE/BSE声明等,以证明其符合使用要求,适用于其预期用途。建议尽可能使用治疗级原材料,如果没有,则应使用最佳可用选项,最好在GMP条件下生产。建议尽可能避免使用仅供研究使用的原材料和生物来源的材料。

1.2 生产模式以及生产设备

1.2.1 生产模式 目前国内的CAR-T产品生产企业的生产模式大致有2种:生产单元式生产模式和功能间模块式生产模式^[19]。

在生产单元式生产模式中,车间布局的每个生产单元之间无物理隔断,各生产单元内部均配备各工序生产需要的所有设备(图2A)。一个批次的单采血从进入生产车间后,所有生产步骤如分选、激活、转染、扩增、收获灌装等均在一个生产单元内完成。生产期间,中间产品不离开生产单元,一个批次生产

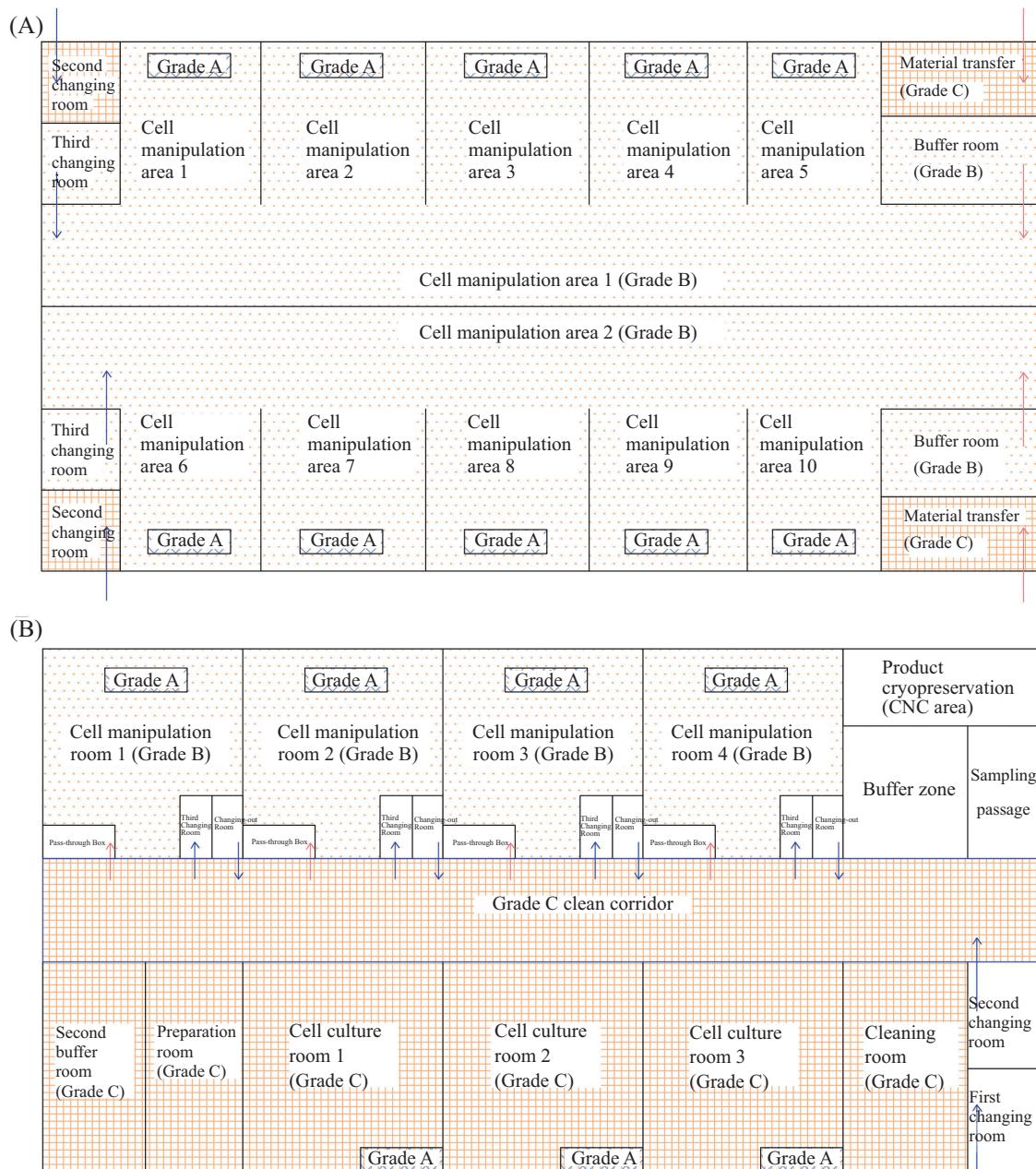
表3 使用新鲜或冷冻单采血优劣势比较

Table 3 Advantages and disadvantages of using fresh versus cryopreserved leukapheresis

起始原材料形式 Starting raw material forms	优势 Advantages	劣势 Disadvantages
Fresh apheresis	(1) maintains high cell viability (2) eliminates the need for cryopreservation facilities and equipment at collection centers (3) low transportation costs (4) rapid cell proliferation and short preparation cycle	(1) short shelf life post-collection (2) inflexible patient apheresis scheduling, which must be aligned with manufacturing timelines (3) rigid transportation scheduling (4) limited timeframe for quality control testing prior to use
Cryopreserved apheresis	(1) flexible patient apheresis scheduling (2) flexible transportation scheduling (3) long shelf life (4) sufficient timeframe for quality control testing (5) facilitates production planning	(1) requires collection centers to be equipped with separation and cryopreservation facilities and equipment, imposing high requirements on collection sites (2) high transportation costs (3) impaired cell viability and low separation yield following freeze-thaw cycles (4) slow initial cell proliferation and prolonged preparation cycle

完成后, 经过清场/清洁/消毒(或灭菌)等程序, 再进行下一个批次的生产, 不同批次间的生产在一个生产单元内不会发生重叠。1个生产区域内可以有多个生产单元, 可同时生产多个批次产品, 此种生产模式一般多采用密闭性生产系统组织生产。此种生产模式的优势是方便安排生产, 不易产生批次间的混淆。但也有一定的劣势, 比如运营成本高, 每个生产单元的利用率低, 对设备选型和工艺设计要求高。

功能间模块式生产模式, 车间布局是按照生产工序分为独立的操作房间, 每个操作间均有单独的人流和物流(图2B)。每个操作间可以完成1项或多项的生产操作, 如细胞分选、病毒转导、细胞洗涤收获等。除细胞培养外, 每个操作间同一时间只进行1个批次产品的生产。此种生产模式的优势是生产车间有部分为C级环境, 运营成本相较单元式生产模式低, 而且每个细胞操作间均为物理隔离, 同一



A: 生产单元式生产车间布局示意图; B: 功能间式生产车间布局示意图。

A: layout schematic diagram of the unit-based production workshop; B: layout schematic diagram of the functional room-based production workshop.

图2 生产车间布局示意图

Fig.2 Layout schematic diagram of the production workshop

天某一批次生产结束清场后可进行下一批次产品的生产,利用率高。但缺点是对生产排班要求高,需要建立严格的防混淆追溯系统。

1.2.2 生产设备 CAR-T细胞产品制备所需的工艺设备根据操作方式一般分为开放式手工操作设备和封闭式自动化设备。目前常见的封闭式自动化设备有: CliniMACS Prodigy系统、Biosafe C-pro系统、Xuri W25细胞扩增系统、CAR-T Xpress平台等,这些设备自动化程度较高,且均采用无菌一次性材料^[20]。对于CAR-T细胞产品制备使用手工开放式操作的,一般需要在生物安全柜或者隔离器中进行操作,而用于细胞生产的隔离器实际上并非是制药行业常用的标准隔离器^[21],而是由设备厂商根据产品工艺需求进行个性化定制的隔离器,有些甚至集成了二氧化碳培养箱、嵌入式离心机、显微观察系统、复温器、冷藏箱、培养箱联合摇床等仪器形成一体化设备^[22]。

无论选择何种设备,均需要具备满足CAR-T细胞制备过程的各项功能需求,比如精确的温控系统,确保细胞在不同阶段的最佳生长环境;高效的液体处理系统,可实现细胞与试剂的精确混合与分配。对于自动化设备,还需要可靠的监测系统,对生产过程中的关键参数进行实时监控和反馈调整;同时,设备还需符合相关法规,具备完整的质量控制和追溯系统,能够记录生产过程中的所有数据,确保产品的可追溯性和质量一致性。另外,设备还需具备良好的稳定性、耐用性和可维护性,确保长时间运行的可靠性和降低维护成本。

1.3 生产工艺的开发

1.3.1 起始原材料采集、运输与储存 目前,CAR-T细胞生产的起始材料主要来源于患者自身的PBMC,采集多采用血细胞分离机进行,通常称为单采。采集前,需要对每位患者进行病原学检测,至少包括艾滋病毒(HIV-1/2)、丙型肝炎病毒、乙型肝炎病毒和梅毒,如可能,还需进行包括EBV、CMV、HTLV-I/II等的检测,如果出现活动性病毒感染,单采可能会推迟。

单采过程需严格控制采集参数,确保采集到数量足够且质量良好的PBMC。通常要求采集的单个核细胞数达到 $(1\sim3)\times10^9$,其中T细胞的比例应符合后续生产要求。在采集过程中,还要密切关注患者的身体状况,避免因采集操作引发不良反应。例如,对于一些体质较弱或合并其他基础疾病的患者,需

提前做好评估与应对措施,防止出现低血压、心律失常等并发症。

起始原材料来源于患者,患者的病情差异可能导致淋巴细胞计数低,如复发性或难治性血液系统恶性肿瘤患者,或肿瘤负荷高且T细胞缺乏的患者,难以获得足够数量的PBMC或T细胞,所以需要研发企业对采集机构进行培训和认证,并制定采集的操作规程,以保证可以满足采集要求。

起始原材料的运输和储存对温度和时限都有严格的要求,取决于采集后单采血的保存方式。如果采集后的单采血需要在采集中心经冷冻保存后再进行运输,则需要建立冷冻保存的技术规范,在采集中心设置细胞清洗冷冻的场所和设备,一般置于温度 $<-130^{\circ}\text{C}$ 的气相液氮存储设备中储存和运输,保存的时限相对较长,一般数天到数月。如果采集后的单采血不进行冷冻保存,则需及时运输至细胞制备中心,保存时限相对较短,一般需控制在48小时以内。在运输过程中,要确保细胞处于合适的温度环境,一般为 $2^{\circ}\text{C}\sim8^{\circ}\text{C}$,应使用专门的细胞运输装置,以维持细胞活性。采集后单采血储存方式的优劣势详见表3。

单采血的运输和储存需进行稳定性研究,设置合适的储存时间。到达制备中心后,若不能立即进行后续处理,需将单采血在规定的时间内置于合适温度的设备中进行保存,保存过程要严格监控储存设备的温度,防止温度波动对细胞造成损伤。同时,要建立完善的细胞储存记录,除储存温度外,还包括细胞的来源,追溯码(如适用)、采集时间、储存位置等信息,以便后续追溯。

1.3.2 T细胞的分离与活化 自体CAR-T细胞生产过程通常从成熟T细胞开始,但单采血中某些类型细胞的存在会对T细胞的激活和扩增产生不利影响。比如粒细胞和红细胞,可能会抑制T细胞的增殖^[23]。因此,最好对单采血进行纯化,以确保稳健的制造工艺。这种纯化可以通过不同的方法实现。

从单采血中分离T细胞的方法主要有密度梯度离心法结合磁珠分选技术。密度梯度离心初步分离出PBMC中的单个核细胞群后,再利用磁珠表面偶联的针对T细胞特异性标志物(如CD3、CD4、CD8)的抗体,通过磁场作用将T细胞从混合细胞群体中精准分选出来。这种方法能够获得高纯度的T细胞,满足后续CAR-T细胞制备的需求。一般通过优化磁珠

分选条件,可使分选后的T细胞纯度达到95%以上。此步骤在工艺开发过程中,比较有挑战的是需要兼顾分选出的T细胞的纯度和分选后细胞的得率,这就需要在工艺设计时,同步考虑选择的分选磁珠种类以及分选条件的优化。

T细胞的活化对于CAR-T细胞产品的有效性至关重要,因为它直接影响CAR基因的转导整合效率和离体培养过程中CAR-T细胞的扩增^[24]。此外,细胞活化试剂和活化持续时间之间的关系会对CAR-T细胞的扩增速率、表型以及终产品的质量产生影响。

T细胞通常可用可溶性抗CD3抗体来刺激活化。但最常用的方法是用CD3和CD28抗体包被的磁珠,比如Dynabeads或TransAct磁珠,可在悬浮液中为T细胞提供适当的刺激,从而激活T细胞。抗CD3抗体提供更好的T细胞交联和活化第一信号,而CD28抗体可激活靶细胞中的共刺激第二信号转导途径。与TransAct相比,用Dynabeads激活的细胞显示出更高的扩增效率,但在制备最终产品之前,必须去除磁珠,以避免患者输注过程中的潜在风险。用TransAct激活的T细胞,虽然后续扩增效率不高,但其干性表型比例更高。

在T细胞活化过程中,要精确控制抗体或激活磁珠的浓度以及活化的时间等参数。合适的活化条件能够促使T细胞进入快速增殖状态,同时保持良好的细胞活性和功能。一般来说,活化培养24~48小时后,T细胞会出现明显的活化迹象,表现为细胞体积增大、分裂活跃。

1.3.3 CAR基因转导

目前,CAR基因转导最常用的病毒载体为慢病毒载体和逆转录病毒载体。慢病毒载体通常通过多质粒瞬转细胞生产,具有能够将外源基因稳定整合到宿主细胞基因组中、转导效率高、可感染分裂期和非分裂期细胞等优点;逆转录病毒载体一般通过稳转细胞系生产,具有操作相对简便、生产成本较低的特点。在实际生产中,需根据产品特点和生产工艺要求选择合适的病毒载体。

在CAR基因转导过程中,比较有挑战的是要精确控制病毒载体的感染复数(multiplicity of infection, MOI),以确保在获得较高转导效率的同时,避免因病毒载体过多导致细胞毒性增加和过多CAR基因整合到T(靶)细胞基因组。此外,转导时的细胞状态、培养条件、转导时间等因素也会对转导效率产生影响。一般会在转导前对T细胞进行激活,使其处于活

化状态,以提高转导效率。同时,优化转导培养基的成分,添加适量的转导增强剂,如聚凝胺等,能够有效提高病毒载体与T细胞的结合效率,从而提升转导效果。例如,通过优化转导条件,可使CAR-T细胞的转导效率达到30%~80%。

1.3.4 CAR-T细胞扩增培养

选择合适的基础培养基对于CAR-T细胞产品的生产至关重要,因为它会影响最终产品中CAR-T细胞的关键质量属性,例如扩增能力、活性、CD4/CD8比例、表型或功能等。培养基包括各种成分,它们不仅可以作为能量来源,还可以调节细胞扩增和分化进程。此外,培养基在维持pH值和渗透压方面也发挥着至关重要的作用,理想的培养基应能提供确保细胞生长的理想环境。

在研发的早期阶段,在T细胞扩增培养阶段常在基础培养基中补充使用血清,然而,这种做法可能有安全性风险并使监管审批程序复杂化。因此,市面上已有多种用于T细胞培养的无血清培养基。无血清培养基成分明确,不仅减少了CAR-T细胞产品批间变异性,也降低了细菌、真菌或病毒污染的风险。大多数无血清培养基定位于一种细胞类型,因此工艺开发时需要对细胞激活方法、细胞接种密度、扩增培养补液程序等参数在选定的培养体系中进行优化。

另外,培养体系中还需要添加促进T细胞增殖、持久性和抗肿瘤活性的细胞因子。有一些细胞因子常用于CAR-T细胞扩增,如IL-2、IL-7、IL-15和IL-21,最常用的组合是IL-2/IL-7/IL-7+IL-15。IL-2是用于T细胞扩增最常用的细胞因子之一,它可以促进T细胞生长、存活和增殖。然而,用IL-2扩增的细胞通常具有成熟的末端效应T细胞表型,使其在血液中的存续时间降低。与IL-2相比,IL-7在增强活化和增殖的同时,可抑制CAR-T细胞的终末分化。IL-7和IL-15的组合还可以促进分化程度较低的T细胞(例如幼稚T细胞和干细胞样中央记忆T细胞)的存活和维持,并增加最终细胞悬液中记忆型细胞的百分比,从而改善其体内持久性^[25]。IL-21对T细胞也具有免疫刺激作用,可以促进T细胞的增殖、分化和效应功能,也可以增强CAR-T细胞的抗肿瘤活性。研究表明,IL-21与IL-2、IL-7或IL-15联合使用,可增强T细胞转染,富集和扩增分化程度较低的CAR-T细胞,并改善CAR-T细胞的杀伤活性,这与效应细胞因子的分泌增加有关^[26]。因此,细胞因子对CAR-T细胞产

品有重大影响, 研究人员必须系统优化其使用条件。

在CAR-T细胞扩增过程中, 要严格控制培养环境的温度和二氧化碳浓度, 一般培养温度为37 °C左右, 二氧化碳浓度为5%左右。另外, 要定期对细胞的生长状态、密度、活率和数量等参数进行监测。通过细胞计数仪, 测定细胞密度和活率。同时, 通过流式细胞术检测CAR-T细胞表面CAR的表达水平, 评估CAR-T细胞的质量。随着扩增时间的延长, CAR-T细胞的数量会呈指数级增长, 在合适的培养条件下, 通常经过7~14天的扩增培养, 可达到产品制备所需的收获标准。

1.3.5 产品制备与冻存 扩增培养后的CAR-T细胞需进行激活磁珠去除(如需要)、细胞浓缩、洗涤, 并将细胞保存于合适的制剂缓冲液中。在细胞收获过程需对磁珠去除条件、洗涤液组成、洗涤次数等参数进行研究。在制剂处方研究过程中需要对处方组成, 如人血白蛋白、DMSO浓度等参数进行研究, 以防止细胞在冷冻和解冻过程中受到损伤。在灌装过程中, 需要对灌装容器、灌装体积、灌装细胞数量等进行研究, 以平衡患者使用量以及检测用量, 在保证满足患者使用的前提下, 有足够的细胞数量用于检测和留样。

配制好的CAR-T细胞产品一般需要进行冻存。冻存过程通常采用程序降温法, 将细胞程序性缓慢降温至-80 °C后, 再转移至气相液氮罐中进行长期保存。在冻存过程中, 要严格控制降温速率, 在不同的阶段, 设置不同的降温速率, 减少细胞在冻存过程中的损伤。同时, 要建立详细的冻存记录, 包括冻存时间, 冻存细胞的批次、数量、储存位置等信息。

2 CAR-T细胞的质量控制

在CAR-T细胞产品从实验室走向临床应用的过程中, 细胞产品的质量控制至关重要。质量控制一般应考虑理化检测(外观、pH值和摩尔渗透压)、安全性检测(无菌、内毒素、支原体等)、细胞存活率及细胞数量、细胞纯度、CAR阳性率、CAR基因拷贝数、生物学效力、工艺相关杂质(如磁珠残留、细胞因子残留等)和RCL/RCR检测等。

原则上应尽可能用终产品进行检测, 但考虑到因个性化单批次制备的批量有限, 为配合患者的治疗时间, 有的可能难以完成所有的检测; 又由于CAR-T细胞产品为无菌制剂, 且不能采用终端灭菌

工艺及除菌过滤工艺, 因此可采用过程控制和终产品放行检测相结合的控制策略对这类产品进行质量控制和条件放行。即采用在制备过程中不同的点取样结合CAR-T细胞制剂取样进行上述项目检测的策略, 取样点的设定需要根据工艺特点及工艺验证的结果确定。

CAR-T细胞产品作为无菌药品, 质量控制项目应首选按照中国药典的要求进行检测, 如pH值、摩尔渗透压、无菌、内毒素、支原体等。但由于其作为创新药的特殊性, 大部分检测项目的检测方法需要根据产品设计以及工艺特点进行开发, 并经过方法学验证, 比如细胞存活率、CAR阳性率、CAR基因拷贝数、细胞纯度、生物学活性、RCL/RCR检测以及快速的无菌及支原体检测等。

2.1 细胞存活率与细胞数量测定

细胞存活率和细胞数量是设置CAR-T细胞产品包装规格及临床患者回输剂量的重要指标, 因此, 需要建立准确的细胞计数及细胞活率检测方法。目前有多种方法用于CAR-T细胞治疗产品的细胞计数和存活率检测, 包括传统血球计数板计数法及细胞自动计数仪计数法, 细胞自动计数仪又包括不同的计数原理, 如利用锥虫蓝染色计数、荧光染色法计数及非染色法计数等。与人工计数板计数法相比, 自动细胞计数仪计数法具有快速、准确、重复性好的优点。

不同的自动细胞计数仪因计数原理不同, 对同一样本的计数结果会有明显的差异, 这些差异可能来自于染料的特性及其标记特性、区分细胞不同活力状态(如活细胞、死亡、凋亡细胞)的能力及计数软件的设计等。目前最常用的检测方法有锥虫蓝染色法和AOPI荧光染色法。锥虫蓝染色法是利用细胞完整性判断活力, 锥虫蓝是一种阴离子染料, 正常活细胞的细胞膜结构完整, 可排斥染料进入; 而死细胞或细胞膜受损的细胞, 染料能自由进入并使细胞核及胞质着色(呈蓝色)。通过显微镜观察计数着色(死细胞)与未着色(活细胞)的细胞数量, 计算细胞活力。AOPI染色法是基于核酸特异性荧光染色区分死活细胞, AOPI试剂是由吖啶橙(acridine orange, AO)和碘化丙啶(propidium iodide, PI)组成的。其中, AO可穿透所有细胞膜(活细胞和死细胞), 并嵌入所有细胞的细胞核, 检测到绿色荧光。PI不能通过完整的细胞膜, 只能进入死细胞的细胞膜, 并嵌入死细

胞的细胞核，检测到红色荧光。通过自动化细胞计数仪检测荧光信号，绿色荧光细胞为活细胞，红色荧光细胞为死细胞，从而实现细胞存活率以及细胞密度检测的目的。锥虫蓝染色计数法，操作简单、设备要求低、成本低，但其准确性低、主观性强、适用样本范围窄。AOPI荧光染色法准确性高、灵敏度强、重复性好、适用范围广，但设备成本高、耗材贵、操作相对复杂。两种方法没有绝对的“优劣”，需根据实验目的、样本特性、预算及通量需求综合选择。

2.2 CAR阳性率检测

CAR-T细胞产品中发挥靶细胞杀伤作用的有效成份是CAR阳性的T细胞，并且CAR-T细胞产品的包装规格及临床使用剂量是以CAR-T阳性细胞数标示的，因此，开发CAR阳性率的检测方法至关重要。目前常用流式细胞术检测CAR阳性率，有针对CAR不同结构区域的检测方法，包括针对CAR抗原结合位点的，如CD19抗原或抗ScFv抗体，或针对轻链或铰链区的抗Fab或Protein L。与其他两种方法相比，针对抗原结合部位的CAR阳性率检测方法具有更好的专属性。

Protein L和抗Fab抗体都是常用的通用性检测试剂，可检测多种不同靶点构建的CAR-T细胞。Protein L能够与抗体的κ轻链结合，适配性较强，但其识别范围有限，在某些构建背景下存在检测盲区。抗Fab抗体能够识别抗体Fab区域，但这类试剂通常来源于多克隆抗体，背景值较高、批间差异性大。上述两种检测试剂商品化产品质量参差不齐，可能会影响数据的重复性和准确性。

抗ScFv抗体是一种高度特异性的工具，可直接识别scFv结构中的抗原结合位点。这类抗体具备高特异性、高灵敏度、低背景等优点，是CAR特异性检测的理想选择，但由于其高度专属性，往往需要定制开发，周期较长。靶点蛋白作为检测工具也是常用策略之一，该方法依赖CAR结构中ScFv与目标抗原的结合特性，因而具备良好的靶点专属性，可在一定程度上评估CAR与靶标的功能性结合能力，但其检测灵敏度会受到ScFv与靶蛋白之间亲和力的显著影响。

2.3 CAR基因拷贝数检测

CAR基因拷贝数与CAR-T细胞的功能和安全性密切相关。目前，检测CAR基因拷贝数的方法主要有实时荧光定量聚合酶链式反应(qPCR)和数字

PCR(dPCR)^[27-28]。qPCR是一种基于荧光信号累积与标准曲线的相对定量方法，通过标准曲线(比如将编码CAR基因的质粒进行连续稀释获得)，以及根据qPCR的反应效率和用于PCR反应的DNA量进行适当修正来确定CAR-T细胞产品中的CAR基因拷贝数。其核心是“与标准品比对”，属于相对定量技术。dPCR基于单分子扩增与泊松分布的绝对定量检测方法，将待检样本均匀分割成数万至数百万个独立的微反应单元(如微滴、微孔)，每个单元中最多含有一个目标分子(CAR基因)，经PCR扩增后，通过荧光信号判断“含目标分子”与“不含目标分子”的数量，最后根据泊松分布公式计算出样本中CAR基因的绝对拷贝数，不依赖标准品，无需标准曲线。两种检测方法相比，qPCR法成本低、动态范围宽、高通量效率高，但其是相对定量，低表达丰度的样本准确性差、受抑制剂影响大。而dPCR法是绝对定量，不依赖标准品，且准确性高、灵敏度强、重复性极佳，但其成本高、动态范围窄、检测效率较低。因此，在实际检测中，可根据设备的条件和检测要求选择合适的方法，并经过方法学验证。一般CAR基因拷贝数在不高于5拷贝/细胞的范围内，可确保转导后细胞的安全性和有效性。

2.4 细胞纯度检测

自体CAR-T细胞产品中除T细胞外的非目的细胞，尤其是肿瘤细胞对产品质量可能具有不利的影响。因此，需要通过T细胞纯度检测来评估CAR-T细胞产品中存在的残留肿瘤细胞以及非目的细胞类型，例如，粒细胞、单核细胞、NK细胞、B细胞等。目前，常用流式细胞术配合不同荧光素标记的抗体组合对不同的细胞表面标志物进行检测，来控制细胞纯度。比如通过检测CD3、CD4、CD8等标志物可以区分T细胞及其不同亚群，检测CD19可以鉴定B细胞，检测CD56和CD16可以鉴定NK细胞等。

利用流式细胞术检测细胞纯度的核心挑战主要体现在样本干扰、选择的抗体特异性不足和结果重复性差等方面。优化的策略可以从通过标准化操作减少变量、筛选抗体及其配色方案来提升特异性等方面考虑，比如通过样本制备的精细化、抗体组合方案的科学化、仪器操作的标准化及数据分析的模板化，可显著提升检测结果的准确性与可靠性。

2.5 快速无菌与支原体检测

无菌检查和支原体检测是CAR-T细胞产品质

量控制项目中非常重要的安全性控制指标,为确保受试者安全性,建议在可行的情况下,首选药典经典方法用于无菌检查和支原体检测。但考虑到这两种检测方法的检测时限性,以及CAR-T细胞产品的患者急需的特殊性,监管部门也鼓励研究者开发快速无菌检查法和快速支原体检测方法作为中间过程监测或放行检测方法,且在开展临床试验前按照《中国药典》要求以及参考国际监管机构要求对无菌快速检查法进行充分验证或确认。

目前,CAR-T细胞产品快速无菌检查常用替代方法是使用全自动微生物检测系统,此系统是基于微生物在培养过程中产生的新陈代谢变化进行检测。当微生物在培养瓶中生长时会释放二氧化碳,这些二氧化碳可透过培养瓶底部的硅胶膜,改变颜色感应器内的酸碱度值,使感应器颜色产生变化。感应器内颜色的变化与微生物释放的二氧化碳量成正比,系统通过测量荧光水平来判断微生物的生长情况,并将结果与预设的阳性参数进行对比,从而得出检测结果。类似的方法还有通过能量代谢中产生ATP触发的荧光变化检查微生物生长水平。

CAR-T细胞产品快速支原体检测常用qPCR方法来进行,使用针对支原体特异性保守序列的探针做荧光标记,使PCR扩增后的产物带有荧光,利用荧光信号的变化和配套软件,进行DNA扩增反应的实时监测。相较于药典要求的培养法和指示细胞法,该方法操作简便快速、灵敏度高、特异性强。

开展这些替代方法的方法学验证是非常有挑战的工作,需特别关注药典方法和替代方法的等效性对比,确保替代方法检测能力不低于或优于药典方法。另外,还需开展多次重复试验以确保获得的试验结果满足统计学要求。

尽管对于治疗恶性肿瘤譬如B型急性淋巴细胞白血病(r/r B-ALL)的自体CAR-T细胞产品,快速无菌检查和快速支原体检测因为临床急需,监管允许快速放行用于临床使用,但快速检测并不是药典方法的完全替代,一般在快速检测的同时需要平行开展药典方法的检测,以保证快速检测假阴性结果出现时患者的用药安全。另外,对于即用型细胞治疗产品譬如通用性CAR-T细胞产品,甚至针对进展缓慢疾病的自体CAR-T细胞产品,无菌快速检查和支原体快速检测对产品放行的意义不会像用于恶行肿瘤的自体CAR-T细胞产品那样急迫。所以,产品开

发时应综合考虑检测方法的必要性和应用场景。

2.6 复制型病毒(RCL/RCR)检测

通常RCL/RCR检测是被用于检测病毒载体或者CAR-T细胞产品的。对病毒载体进行检测时,通过分别将病毒载体生产上清液和生产终末细胞与具有高敏感性的细胞系C8166进行共培养来进行检测。对于病毒载体,一般要在前述放行检测通过后才投入使用。对于CAR-T细胞产品,在病毒载体RCL/RCR使用细胞培养法检测合格的前提下,目前常用的被监管认可的做法是通过qPCR方法进行快速放行,同时需对每批产品进行留样,以备长期随访时潜在的安全性回溯。

3 展望

CAR-T细胞治疗作为一种极具潜力的新型治疗手段,为肿瘤患者带来了新的希望。目前全球范围内已有14款CAR-T细胞产品上市,疗效确切。对于恶性血液肿瘤,一次输注,可以长期获益,部分患者可以恢复正常生活。但是,现有已上市CAR-T细胞产品均属于自体定制型,从单个患者细胞采集、生产制备、质量检测和放行乃至独立运输,都需要定制化操作^[29]。生产和检测周期长且复杂,成本高昂、产能有限,对医疗单位资质也有较高的要求。从单采血采集到最终产品的放行,每一个环节都需要精确控制和严格监测,以确保产品的质量、安全性和有效性。这就导致患者需要等待时间长,等待期间甚至需要桥接治疗,可及性差^[30]。因此,我们需要研究下一代CAR-T细胞产品开发的策略,以应对CAR-T细胞生产和质控中的关键挑战。

CAR-T细胞生产方面,缩短和简化细胞生产工艺可部分解决自体CAR-T细胞产品可支付性低和可及性差的问题。譬如,快速制备方式生产的CAR-T细胞产品,可以使制备周期大幅缩短,并且细胞功能比目前传统工艺CAR-T产品更强,成本也大幅下降。国内外多家生物医药企业,如诺华制药(Novartis AG)、百时美施贵宝(Bristol-Myers Squibb,简称BMS)、亘喜生物科技(上海)有限公司、合源生物科技股份有限公司等,均在此领域布局,进行自体CAR-T细胞产品产业迭代^[31-32]。加强生产流程自动化,也可以降低生产成本,减少人为错误导致生产失败以及人工操作可能发生的污染^[33]。此外,自动化还可以显著降低所需的生产人员数量和经验水

平。国外某些监管机构，允许一些自动化全封闭系统在非GMP的设施内运行，支持现场生产或床旁制备，从而可以为患者更快地提供产品。然而，在确保产品质量始终如一的同时，将这种做法扩展到大量医疗中心仍然是一个巨大挑战。更关键的，近两年，行业已快速进入体内(*in vivo*)生成CAR-T细胞的研究领域，从根本上解决自体CAR-T细胞治疗量产和可及性问题，最近已进入临床验证期。几项研究表明，能够使用慢病毒载体、脂质纳米颗粒(lipid nanoparticle, LNP)和聚合物纳米载体在体内将CAR基因有效递送到免疫细胞(T和NK细胞)^[34-36]。为了实现T细胞靶向性，研究人员正在使用靶向CD3、CD4或CD8的单抗单链可变片段或其他结合结构域，对病毒载体或纳米载体(譬如LNP)进行修饰。在体内生成CAR-T细胞的治疗方式将不再需要从患者采集细胞，而是像生产抗体和小分子化药一样规模化生产，降低成本到普惠性药物水平，同时临床使用也更加便捷，体内CAR-T将开创细胞治疗普惠时代。

在CAR-T细胞质量控制方面，由于细胞治疗产品批量小、批次多的特点，尤其是对于个体化治疗使用的CAR-T类产品，每批次产品可用于检测的样本更是珍贵，现有的检测技术存在通量不足和灵敏度不高的问题。如何提高检测通量，以及在小量样本中检测特定细胞类型或特定分子标志，是当前的一大技术挑战。行业检测方法和标准不统一，影响了结果的可比性，同时增加了挖掘规律性结论和问题的难度。建立标准化的操作流程和检测标准也是技术发展的关键。另外，开发新型的检测技术，研发智能化与自动化的检测平台，配合机器学习和人工智能技术，以提高数据处理效率和结果的准确性不仅是行业的需求也是发展的趋势。

CAR-T细胞产品已成为血液系统恶性肿瘤越来越重要的治疗选择，临床试验已将CAR-T细胞疗法的应用扩展到实体瘤和自身免疫性疾病的治疗。因此，开发高效可靠生产高质量CAR-T细胞产品的生产工艺，对于支持及时、安全和有效的患者治疗至关重要。随着技术的不断发展和完善，相信采用新技术平台生产的CAR-T细胞产品将在临床应用中发挥更大的作用，造福更多患者。同时，持续加强对CAR-T细胞生产与质控的研究和规范，是推动该领域健康、可持续发展的关键。

参考文献 (References)

- [1] WANG Y, LÜ L, SONG Y, et al. Inatcabtagene autoleucel in adult relapsed or refractory B-cell acute lymphoblastic leukemia [J]. Blood Adv, 2025, 9(4): 836-43.
- [2] MAUDE S L, LAETSCH T W, BUECHNER J, et al. Tisagenlecleucel in children and young adults with B-cell lymphoblastic leukemia [J]. N Engl J Med, 2018, 378(5): 439-48.
- [3] NEELAPU S S, JACOBSON C A, GHOBADI A, et al. Five-year follow-up of ZUMA-1 supports the curative potential of axicabtagene ciloleucel in refractory large B-cell lymphoma [J]. Blood, 2023, 141(19): 2307-15.
- [4] SHAH B D, GHOBADI A, OLUWOLE O O, et al. KTE-X19 for relapsed or refractory adult B-cell acute lymphoblastic leukaemia: phase 2 results of the single-arm, open-label, multicentre ZUMA-3 study [J]. Lancet, 2021, 398(10299): 491-502.
- [5] MORSCHHAUSER F, DAHIYA S, PALOMBA M L, et al. Lisocabtagene maraleucel in follicular lymphoma: the phase 2 TRANSCEND FL study [J]. Nat Med, 2024, 30(8): 2199-207.
- [6] HANSEN D K, SIDANA S, PERES L C, et al. Idecabtagene vicleucel for relapsed/refractory multiple myeloma: real-world experience from the myeloma CAR T consortium [J]. J Clin Oncol, 2023, 41(11): 2087-97.
- [7] JAGANNATH S, MARTIN T G, LIN Y, et al. Long-term (≥ 5 -year) remission and survival after treatment with ciltacabtagene autoleucel in CARTITUDE-1 patients with relapsed/refractory multiple myeloma [J]. J Clin Oncol, 2025, 43(25): 2766-71.
- [8] KOPMAR N E, CASSADAY R D. Clinical insights on brexucabtagene autoleucel for the treatment of patients with relapsed or refractory B-cell acute lymphoblastic leukemia [J]. Cancer Manag Res, 2024, 16: 1587-96.
- [9] AN N, LI J, LUO P, et al. Key predictors of long-term outcomes in BCMA-targeted CAR-T therapy for relapsed/refractory multiple myeloma [J]. J Transl Med, 2025, 23(1): 552-64.
- [10] MACKENSEN A, MÜLLER F, MOUGIAKAKOS D, et al. Anti-CD19 CAR T cell therapy for refractory systemic lupus erythematosus [J]. Nat Med, 2022, 28(10): 2124-32.
- [11] MÜLLER F, TAUBMANN J, BUCCI L, et al. CD19 CAR T-cell therapy in autoimmune disease: a case series with follow-up [J]. N Engl J Med, 2024, 390(8): 687-700.
- [12] HAGHIKIA A, HEGELMAIER T, WOLLESCHAK D, et al. Anti-CD19 CAR T cells for refractory myasthenia gravis [J]. Lancet Neurol, 2023, 22(12): 1104-5.
- [13] MÜLLER F, BOELTZ S, KNITZA J, et al. CD19-targeted CAR T cells in refractory antisynthetase syndrome [J]. Lancet, 2023, 401(10379): 815-8.
- [14] FISCHBACH F, RICHTER J, PFEFFER L K, et al. CD19-targeted chimeric antigen receptor T cell therapy in two patients with multiple sclerosis [J]. Med, 2024, 5(6): 550-8.
- [15] LI M, ZHANG Y, JIANG N, et al. Anti-CD19 CAR T cells in refractory immune thrombocytopenia of SLE [J]. N Engl J Med, 2024, 391(4): 376-8.
- [16] HOU A J, CHEN L C, CHEN Y Y. Navigating CAR-T cells through the solid-tumour microenvironment [J]. Nat Rev Drug Discov, 2021, 20(7): 531-50.
- [17] 国家药品监督管理局食品药品审评查验中心. 细胞治疗产品生产质量管理指南(试行)[Z]. 北京: 国家药品监督管理局食品药品审评查验中心, 2022. [2026-01-05]. <https://www.cfdi.org>.

- cn/cfdi/resource/news/14938.html.
- [18] 颜若曦. 嵌合抗原受体T细胞产品生产系统的质量管理要点考量[J]. 中国医药工业杂志(YAN R X. The consideration on key quality management points in production system of CAR-T products [J]. Chinese Journal of Pharmaceuticals), 2024, 55(12): 1612-9.
- [19] 杨敬鹏, 颜若曦, 赵嵩月. 嵌合抗原受体T细胞免疫治疗产品扩大产能过程中的风险因素分析[J]. 中国医药工业杂志(YANG J P, YAN R X, ZHAO S Y. Analysis of risk factors in the manufacturing scale-up of chimeric antigen receptor T cell therapeutic products [J]. Chinese Journal of Pharmaceuticals), 2024, 55(11): 1589-94.
- [20] 陈国笋. 细胞治疗产品的工艺平面与厂房设施的设计[J]. 上海医药(CHEN G S. Design of process layout and plant facilities for the production of cell therapy products [J]. Shanghai Medical & Pharmaceutical Journal), 2019, 40(9): 71-3.
- [21] CUNDELL T, DRUMMOND S, FORD I, et al. Risk assessment approach to microbiological controls of cell therapies [J]. PDA J Pharm Sci Technol, 2020, 74(2): 229-48.
- [22] 孙程洁, 成殷, 俞佳宁. PIC/S GMP 先进治疗产品附录与我国细胞治疗产品生产质量管理指南的对比分析[J]. 中国药事(SUN C J, CHENG Y, YU J N. Comparative analysis of the GMP appendix of PIC/S advanced therapeutic medicinal products and manufacture quality management guidelines of China's cell therapy products [J]. Chinese Pharmaceutical Affairs), 2023, 37(5): 504-12.
- [23] ABOU-EL-ENEIN M, ELSALLAB M, FELDMAN S A, et al. Scalable manufacturing of CAR T cells for cancer immunotherapy [J]. Blood Cancer Discov, 2021, 2(5): 408-22.
- [24] AYALA CEJA M, KHERICHA M, HARRIS C M, et al. CAR-T cell manufacturing: major process parameters and next-generation strategies [J]. J Exp Med, 2024, doi: 10.1084/jem.20230903.
- [25] SILVEIRA C R F, CORVELONI A C, CARUSO S R, et al. Cytokines as an important player in the context of CAR-T cell therapy for cancer: their role in tumor immunomodulation, manufacture, and clinical implications [J]. Front Immunol, 2022, doi: 10.3389/fimmu.2022.947648.
- [26] DU L, NAI Y, SHEN M, et al. IL-21 optimizes the CAR-T cell preparation through improving lentivirus mediated transfection efficiency of T cells and enhancing CAR-T cell cytotoxic activities [J]. Front Mol Biosci, 2021, doi: 10.3389/fmolb.2021.675179.
- [27] KUNZ A, GERN U, SCHMITT A, et al. Optimized assessment of qPCR-based vector copy numbers as a safety parameter for GMP-grade CAR T cells and monitoring of frequency in patients [J]. Mol Ther Methods Clin Dev, 2020, 17: 448-54.
- [28] SCHUBERT M L, BERGER C, KUNZ A, et al. Comparison of single copy gene-based duplex quantitative PCR and digital droplet PCR for monitoring of expansion of CD19-directed CAR T cells in treated patients [J]. Int J Oncol, 2022, 60(5): 48.
- [29] SAN-MIGUEL J, DHAKAL B, YONG K, et al. Cilta-cel or standard care in lenalidomide-refractory multiple myeloma [J]. N Engl J Med, 2023, 389(4): 335-47.
- [30] RODDIE C, NEILL L, OSBORNE W, et al. Effective bridging therapy can improve CD19 CAR-T outcomes while maintaining safety in patients with large B-cell lymphoma [J]. Blood Adv, 2023, 7(12): 2872-83.
- [31] YANG J, HE J, ZHANG X, et al. Next-day manufacture of a novel anti-CD19 CAR-T therapy for B-cell acute lymphoblastic leukemia: first-in-human clinical study [J]. Blood Cancer J, 2022, 12(7): 104-12.
- [32] WANG M. Express delivery of next-generation CAR T cells with preserved naive and stemness phenotypes for the treatment of aggressive lymphomas [J]. Cancer Discov, 2023, 13(9): 1961-3.
- [33] TRAINOR N, PURPURA K A, MIDDLETON K, et al. Automated production of gene-modified chimeric antigen receptor T cells using the Cocoon platform [J]. Cytotherapy, 2023, 25(12): 1349-60.
- [34] MICHELS A, HO N, BUCHHOLZ C J. Precision medicine: *in vivo* CAR therapy as a showcase for receptor-targeted vector platforms [J]. Mol Ther, 2022, 30(7): 2401-15.
- [35] MICHELS K R, SHEIH A, HERNANDEZ S A, et al. Preclinical proof of concept for VivoVec, a lentiviral-based platform for *in vivo* CAR T-cell engineering [J]. J Immunother Cancer, 2023, 11(3): e006292.
- [36] RURIK J G, TOMBÁCZ I, YADEGARI A, et al. CAR T cells produced *in vivo* to treat cardiac injury [J]. Science, 2022, 375(6576): 91-6.