

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2026.06.002

· 专家论坛 ·

慢病毒递送与体内CAR-T细胞——靶向递送策略及研究进展

高成, 朱凯璇, 赵继敏(郑州大学 基础医学院 病理生理学系, 郑州 450001)



赵继敏 医学博士, 副教授, 郑州大学基础医学院病理生理学系硕士生导师。兼任河南省癌症化学预防国际联合实验室骨干成员, 专注于食管癌免疫治疗与靶向药物转化研究。近年来研究方向聚焦于肿瘤免疫治疗, 重点开展抗体药物、抗体偶联药物(ADC)、体内CAR-T细胞及T细胞衔接器(TCE)等新型免疫治疗策略的研究。曾主持国家自然科学基金面上项目(81472324)“DNA聚合酶 β 突变体在食管癌发生中的作用和机制研究”, 并作为主要参与者完成国家自然科学基金青年项目及科技部重大新药创制专项子课题。以通信作者或共同第一作者在 *Biomed Res Int*, *Mol Carcinog*, *J Transl Med*, *Oncol Rep* 等期刊发表多篇论文。

[摘要] 嵌合抗原受体T细胞(CAR-T细胞)疗法在血液系统恶性肿瘤中显示出显著疗效, 但传统体外制备存在流程复杂、周期长和成本高等局限。体内CAR-T细胞通过递送载体在患者体内直接重编程T细胞, 有望简化制造流程并提高治疗可及性。慢病毒载体具有载荷容量较大、可稳定整合和生产体系相对成熟等优势, 但其天然或假型化包膜的广谱嗜性可能导致非靶细胞转导和安全性风险。本文综述水疱性口炎病毒G蛋白(VSV-G)、Cocal病毒包膜蛋白(COCV-G)、辛德比斯病毒及麻疹病毒/尼帕病毒包膜等假型化与去受体化工程策略, 讨论CD3、TCR、CD4、CD8和CD7等靶向受体的选择及CD2/CD28共刺激信号整合, 并梳理相关临床前研究和早期临床转化进展。现有证据表明, 靶向慢病毒可在体内生成具有抗肿瘤活性的CAR-T细胞, 但仍需解决插入突变、脱靶转导、免疫原性、剂量控制和规模化生产等问题。本文旨在为下一代体内CAR-T细胞递送系统的设计与转化提供参考。

[关键词] 慢病毒载体; 体内CAR-T细胞; 包膜假型化; T细胞靶向; 共刺激分子

[中图分类号] R730.51; R730.54 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2026)06-0602-09

Lentiviral delivery for *in vivo* CAR-T cell generation: targeted delivery strategies and research progress

GAO Cheng, ZHU Kaixuan, ZHAO Jimin (Department of Pathophysiology, School of Basic Medical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan, China)

[Abstract] Chimeric antigen receptor T (CAR-T) cell therapy has shown remarkable efficacy in hematologic malignancies, but conventional *ex vivo* manufacturing is limited by procedural complexity, long production cycles, and high cost. *In vivo* CAR-T cell generation directly reprograms T cells in patients through gene-delivery vectors and may simplify manufacturing and improve accessibility. Lentiviral vectors offer relatively large payload capacity, stable genomic integration, and mature manufacturing systems; however, broad tropism of native or pseudotyped envelopes may cause off-target transduction and safety risks. This review summarizes envelope pseudotyping and receptor-detargeting strategies based on the envelopes of vesicular stomatitis virus glycoprotein (VSV-G), Cocal virus glycoprotein (COCV-G), Sindbis virus, measles virus, and Nipah virus; discusses the selection of CD3, TCR, CD4, CD8, and CD7 as targeting receptors and the integration of CD2/CD28 costimulatory signals; and reviews preclinical studies and early clinical translation. Available evidence indicates that targeted lentiviral vectors can generate functional antitumor CAR-T cells *in vivo*, although insertional mutagenesis, off-target transduction, immunogenicity, dose control, and scalable manufacturing remain major challenges. This review provides a technical reference for the design and translation of next-generation *in vivo* CAR-T cell delivery systems.

[Key words] lentiviral vector; *in vivo* CAR-T cell; envelope pseudotyping; T-cell targeting; costimulatory molecule

[Chin J Cancer Biother, 2026, 33(6): 602-610. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2026.06.002]

[基金项目] 河南省科技攻关计划项目(242102311031)

[作者简介] 高成, 男, 硕士生

[通信作者] 赵继敏(扫码获取作者通信方式)



传统嵌合抗原受体 T 细胞(CAR-T 细胞)疗法在血液系统恶性肿瘤中疗效显著,但受个体化制备周期长、流程复杂及成本高等因素制约^[1-2]。相比之下,体内 CAR-T 细胞技术通过递送遗传指令,直接在体内重编程 T 细胞表达 CAR,有望简化制造流程、降低成本并缩短治疗等待时间;构建高效、安全的体内基因递送系统,是该策略实现临床转化的重要前提。目前,病毒与非病毒递送载体各具特点:脂质纳米颗粒(lipid nanoparticle, LNP)等非病毒载体制备相对便捷,适合递送 mRNA,但表达短暂,通常需要重复给药^[3];慢病毒载体可将 CAR 基因稳定整合,有望实现持久表达^[4],因此成为重要研究方向。病毒载体研发的关键挑战,是精准靶向 T 细胞并降低非靶细胞转导风险^[5]。因此,通过包膜假型化及表面展示特异性配体对慢病毒包膜进行靶向工程化改造,使其识别并定向转导 T 细胞,已成为研究重点^[6]。本文聚焦慢病毒载体介导的体内 CAR-T 细胞,系统阐述其靶向改造原理与技术进展,评述临床前及早期临床转化现状,并分析其在有效性、安全性和可生产性方面的挑战,以期为该领域发展提供参考。

1 慢病毒载体介导体内 CAR-T 细胞的构建策略

在多种体内递送体系中,不同载体在基因表达持续性、递送效率和安全性方面存在差异。综合现有研究进展,慢病毒载体能较好地平衡上述指标,展现出其他体系难以兼顾的综合优势,因而逐渐成为

体内 CAR-T 细胞研究与临床转化的重要技术路线之一。在此背景下,本文系统梳理以慢病毒为递送载体的体内 CAR-T 细胞构建策略及其工程改造。

1.1 慢病毒载体用于体内 CAR-T 细胞构建的优势

从分子结构和临床转化角度看,慢病毒载体之所以能够支撑体内 CAR-T 细胞策略,主要体现在其载荷容量、基因整合特性,以及相对成熟的生产与安全体系等多个层面。

首先,基于 HIV 改造的慢病毒载体可容纳较大的 CAR 基因片段,并能稳定整合至 T 细胞基因组^[7],实现较持久的 CAR 表达,即使细胞增殖后仍可维持功能^[8],为体内免疫记忆形成提供基础;相比之下, mRNA/LNP 等非病毒体系通常仅能短暂表达 CAR,需要重复给药,较难建立持久效应^[9]。其次,慢病毒已在传统体外 CAR-T 细胞制备中广泛应用,生产工艺和安全性数据积累较为充分^[10];第二、三代慢病毒载体通过安全性改造降低了复制型病毒形成风险^[11],并已用于获批的 CAR-T 细胞产品^[12]。早期临床研究^[13]显示,体内给药后的免疫相关毒性总体可控;加之相对成熟的 GMP 生产和质量控制体系,慢病毒载体成为具有潜力的体内 CAR-T 细胞递送平台^[14]。针对整合可能带来的插入突变风险,仍需通过自失活型载体设计、整合位点分析和严格临床监测进行系统管理。总体而言,病毒载体与非病毒载体在递送效率、靶向性、装载能力、安全性、生产周期、临床进展及免疫原性等方面各具特点,具体比较见表 1。

表1 病毒载体与非病毒载体递送的比较

特 征	病毒载体(LV/AAV)	非病毒载体(LNP/聚合物)
递送效率	高 ^[15]	中等至高 ^[16]
靶向性	依赖包膜工程化	配体定向功能化
装载能力	有限(LV ≤ 8 kb, AAV ≤ 4.7 kb)	灵活(LNP > 10 kb, 聚合物复合物可达 14 kb)
安全性	潜在插入突变风险(LV), 肝毒性(AAV) ^[17]	瞬时表达, 无基因组整合风险
生产周期	较复杂(2~3 周)	简化(约 1 周)
临床进展	领先	快速推进
免疫原性	中等至高	低

LV:慢病毒载体(lentiviral vector); AAV:腺相关病毒(adeno-associated virus)。

1.2 慢病毒假型化工程

HIV-1 来源的慢病毒载体具有天然包膜糖蛋白(envelope glycoprotein, Env)固有的细胞嗜性,这一特性限制了其靶向应用。为此,研究者发展了病毒包膜假型化技术,即用异源病毒包膜替换 HIV-1 天然 Env,实现对病毒细胞嗜性的重编程^[18-19]。其中,水疱性口炎病毒 G 蛋白(vesicular stomatitis virus glycoprotein, VSV-G)能赋予载体广泛的宿主范围并支持高滴度制备,已成为经典的假型化策略^[20]。然

而,当应用场景转向体内时, VSV-G 的广谱嗜性反而成为瓶颈。由于 VSV-G 通过广泛表达的低密度脂蛋白受体(low-density lipoprotein receptor, LDLR)进入细胞,载体在体内缺乏特异性,可能转导多种非靶细胞,不仅降低靶向递送效率,还可能增加脱靶风险^[12, 21]。因此,如何在保留慢病毒高效转导优势的同时降低脱靶风险,是实现体内 CAR-T 细胞安全递送的关键。为提升靶向性,研究者尝试采用具有固有受体嗜性的天然病毒包膜,如麻疹病毒^[22-24]、丙型肝炎

病毒包膜等^[25]。但这些天然包膜的靶向谱相对固定,在转导效率、稳定性和生产便利性方面难以全面替代 VSV-G。因此,仅依赖天然包膜切换难以满足 T 细

胞精准靶向需求,还需对包膜进行主动工程化改造。下文将详述主要包膜工程策略(图 1)。

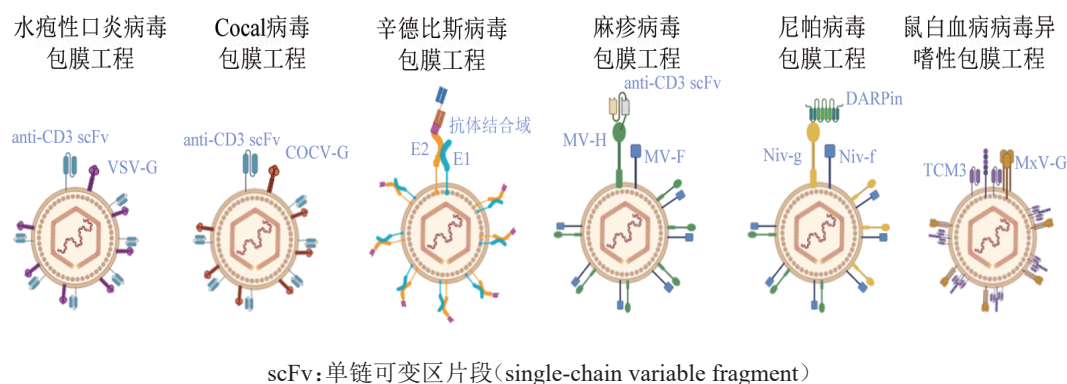


图 1 常见慢病毒包膜假型化工程示意图(以包膜表达抗 CD3 scFv 为例)

1.2.1 水疱性口炎病毒包膜工程

VSV-G 是 I 型跨膜糖蛋白,其 N 端结构域负责识别 LDLR 等宿主受体,靠近跨膜区的胞外部分则介导膜融合。利用 VSV-G 膜融合活性可与受体结合功能解耦的特点,通过对 VSV-G 蛋白进行改造可实现功能分离。VSV-G 受体结合区域附近的 K47 和 R354 是与 LDLR 家族相互作用的关键氨基酸^[21,26]。据此,研究者通过结构生物学指导的定点突变,破坏 VSV-G 与天然受体 LDLR 的结合界面:将 K47 或 R354 分别突变为谷氨酰胺或丙氨酸(K47A、K47Q、R354A 和 R354Q),可显著削弱 VSV-G 与 LDLR CR2/CR3 结构域的亲和力,使病毒对天然宿主的感染力下降,且不明显影响膜融合功能^[26]。此外,近年来还发现 I182E 等其他有效突变位点^[27]。这些受体失活型突变体为模块化靶向递送工程奠定了基础。

基于上述功能解耦原理,研究者可使用 VSV-G 突变体作为融合功能组分,同时将特异性靶向配体(如 scFv)独立展示于病毒颗粒表面。由此构建的系统使病毒在遇到表达相应抗原的靶细胞时附着并启动融合,从而提高细胞特异性转导。该模块化设计可通过更换配体灵活调整靶向性。处于临床研究阶段的体内 B 细胞成熟抗原(B-cell maturation antigen, BCMA)CAR-T 细胞疗法 ESO-T01 采用工程化慢病毒载体,通过在包膜融合蛋白中引入 I331E、A51E 或 I182E 等突变降低其与天然受体 LDLR 的结合,同时在病毒包膜表面展示抗 TCR 重链抗体可变区(variable domain of a heavy-chain-only antibody, VHH),以实现 T 细胞靶向^[28]。

1.2.2 Coccal 病毒(Coccal virus, COCV)包膜工程

COCV 作为水疱性口炎病毒属中与 VSV 亲缘关系最近的病毒之一,其包膜蛋白(COCV-G)与 VSV-G 具有约 72% 的氨基酸序列一致性,并共同利用 LDLR 家族作为进入受体。与 VSV-G 相比,COCV-G 对人血清补体

灭活具有更强耐受性,能够在人血清环境中保持较高感染活性,因此是具有潜力的体内递送假型化包膜^[29]。基于两者受体结合界面的结构保守性,COCV-G 也可进行受体去靶向和配体展示等工程化改造。在此基础上,可进一步展示抗 CD3 或 CD8 等高亲和力配体,实现对特定 T 细胞亚群的靶向。相关体内研究^[30]显示,采用 COCV-G 假型化并结合 T 细胞靶向及共刺激配体的慢病毒载体,可在小鼠模型中生成并扩增 CAR-T 细胞,其转导效率和 CAR-T 细胞比例均优于传统 VSV-G 假型化载体。因此,COCV-G 兼具工程可塑性和体内稳定性,是改良体内 CAR-T 细胞递送的候选假型化包膜。

1.2.3 辛德比斯病毒(Sindbis virus, SINV)包膜工程

SINV 包膜工程为慢病毒假型化提供了另一种模块化设计框架,其优势源于 SINV 所属甲病毒科病毒的结构分工特性:E2 蛋白负责识别并附着靶细胞,E1 蛋白主要介导膜融合^[31-32]。这使 E2 蛋白可被工程化改造,以实现特定细胞的附着。研究者通过突变 E2 蛋白,使其丧失对天然受体的结合能力,从而构建无天然趋向性的假型化慢病毒载体(SINV-LV)。为实现 T 细胞靶向递送,研究者设计了基于串联 Fab(tandem Fab, tFab)结构的双特异性抗体,其一端结合突变 E2 蛋白,另一端识别 T 细胞表面的 CD3 分子。病毒与 tFab 在体外混合后可形成非共价结合的靶向复合物,实现对 CD3⁺ T 细胞的特异性转导^[33]。该策略无需反复改造病毒基因组,只需更换双特异性抗体即可切换靶点,有利于提高载体筛选效率和治疗开发速度^[33]。

1.2.4 麻疹病毒(measles virus, MV)与尼帕病毒包膜工程

基于 MV 和尼帕病毒(Nipah virus, NiV)包膜中附

着蛋白(H/G)与融合蛋白(F)功能分离的特性^[34-35],研究者开发了受体替换工程。具体做法是用抗体 scFv 或人工设计的锚蛋白(designed ankyrin repeat protein, DARPIn)靶向模块替代H/G蛋白中的天然受体结合域,从而获得高特异性、可编程的靶向性^[35-36]。这种整体置换而非局部改造的方式,可从源头降低病毒的天然宿主嗜性,使其靶向性更可控。实验^[37]显示,携带抗CD8 scFv的MV-H假型化慢病毒可特异性转导CD8⁺ T细胞,并显示抗肿瘤活性;装载抗CD3或CD8模块的NiV-G假型化慢病毒,可在动物模型中于48 h内生成功能性CAR-T细胞并清除肿瘤^[38]。此外,该策略兼容DARPIn等非抗体小型蛋白支架,为载体性能优化提供了更多选择。

1.2.5 鼠白血病病毒异嗜性包膜工程

鼠白血病病毒异嗜性包膜糖蛋白(murine leukemia virus-derived xenotropic envelope glycoprotein, MxV-G)属于 γ 逆转录病毒包膜家族,具有跨物种感染细胞的潜力。然而,该蛋白介导人源细胞融合的效率有限。为此,研究者通过定向突变对MxV-G进行优化,提高其介导人源细胞膜融合的能力。在此基础上,研究者开发了名为IMV101的慢病毒平台。该平台以MxV-G为假型化包膜,并在病毒表面整合特异性T细胞靶向模块3(T cell-targeting module 3, TCM3),从而实现对人T细胞的高选择性转导^[39]。

2025年美国基因与细胞治疗学会年会公布的会议海报数据显示,MxV-G假型化载体策略具有以下特点:(1)与传统VSV-G或COCV-G假型化载体相比,病毒生产滴度可提高约2~5倍;(2)在靶向特异性上,对T细胞具有高度选择性,而对B细胞、上皮细胞等非靶细胞的感染率较低。体内实验数据显示,单次静脉注射IMV101可在人源化小鼠模型中快速诱导功能性CAR-T细胞生成,外周血CAR⁺ T细胞峰值可达 2×10^5 个/mL,并实现CD19⁺肿瘤清除。病毒颗粒在给药后主要定位于脾和淋巴结,未在主要实质器官中持续检出,且未引发明显的细胞因子升高,显示出良好的体内安全性与可控性^[39]。这一方案为体内CAR-T细胞递送提供了新的技术路径。

总体而言,慢病毒载体包膜假型化工程可提高体内CAR-T细胞的靶向精度和转导效率。通过解耦受体识别与膜融合功能,VSV-G、COCV-G、MV-H/F、NiV-H/G及MxV-G等包膜体系可被工程化改造,使慢病毒在保持一定滴度和融合活性的同时,提高对特定T细胞亚群的识别和转导能力。这些进展为体内CAR-T细胞递送奠定了技术基础。在此基础上,还需选择合适的T细胞表面分子作为靶向受体,并设计与之特异结合的配体展示于慢病毒载体表面,以进一

步提高基因递送的特异性和安全性。

1.3 T细胞靶向受体及促进扩增的共刺激分子选择

通过包膜假型化在病毒表面表达靶向配体,需要选择相应的T细胞表面分子作为靶向受体。理想受体应在目标T细胞群中高表达且具有较高特异性,能介导有效的病毒内化,同时避免引发过度激活。当前T细胞靶向受体各有侧重,共同构成候选靶点体系。进一步将靶向扩展至共刺激分子,还可在递送基因的同时提供活化信号,从而在体内协同促进CAR-T细胞生成和功能优化。

1.3.1 T细胞表面受体的选择

体内CAR-T细胞生成的首要问题,是如何选择合适的T细胞表面受体引导载体进入靶细胞。目前已探索多种靶向策略。CD3覆盖多数成熟T细胞,结合后还可提供激活信号,从而在无需预激活的条件下转导静息T细胞^[6];但其可能引起TCR下调或过度激活,需通过配体亲和力或达沙替尼等方式调控信号强度^[40-41]。TCR靶向提供了不同于CD3靶向的路径,ESO-T01早期临床研究^[13]在人体验证了抗TCR VHH介导的体内CAR-T细胞生成可行性,同时观察到临床缓解。CD8和CD4靶向策略分别聚焦细胞毒性T细胞和辅助性T细胞以直接增强抗肿瘤作用,但其相对优势取决于疾病模型、载体设计和评价终点^[42-45]。CD7可同时靶向T细胞和NK细胞,形成“T + NK”双重效应,但需监测两类细胞的转导比例和安全性^[27]。靶向CD5可避免直接作用于TCR复合物,可能降低过度激活风险^[46];靶向白细胞介素7受体(interleukin-7 receptor, IL-7R)可通过细胞因子受体通路促进特定T细胞亚群存活和转导,但需关注其在非靶细胞中的表达^[47-48]。总体而言,靶点选择需在覆盖范围、亚群偏好、激活强度和安全性之间权衡,与具体疾病和治疗目标相匹配。

1.3.2 共刺激分子促进体内CAR-T细胞生成

共刺激分子可增强体内CAR-T细胞的生成效率与功能。CD2和CD28是T细胞上重要的两类共刺激受体,在T细胞激活、增殖和记忆形成中发挥关键作用。CD28广泛表达于CD4⁺ T细胞和CD8⁺ T细胞,是经典的第二信号受体;CD2通过与其配体CD58结合促进免疫突触形成,增强细胞间黏附和效应活性。因此,将病毒靶向工程扩展至这些共刺激受体,可在介导基因递送的同时向T细胞提供共刺激信号,从而在体内实现更有效、均衡的T细胞激活和扩增。

已有研究将共刺激分子配体直接整合到病毒靶向结构中。在VivoVec平台中,NICOLAI等^[6]构建了一种多功能融合蛋白,将抗CD3 scFv与CD80(CD28的配体)及CD58(CD2的配体)的胞外结构域共同展示于慢病毒

包膜表面,使载体在结合TCR/CD3后同步触发CD28和CD2共刺激通路。这一设计增强了病毒与T细胞的附着稳定性,也提高了基因递送后T细胞的活化和扩增。动物实验显示,与仅携带抗CD3 scFv的载体相比,该多结构域包膜载体可在非人灵长类体内生成更高比例的CAR-T细胞,循环T细胞中CAR⁺比例可达约65%,并伴有持续的B细胞清除效应^[6]。这些结果表明,整合CD2/CD28

等共刺激信号可在体内重编程过程中协同实现识别、激活和扩增,为提高体内CAR-T细胞生成效率和质量提供了有潜力的策略(图2)。

此外,未来还可考虑引入其他共刺激配体(如OX40L、4-1BBL等),根据不同T细胞亚群和治疗需求优化第二信号的组合,旨在增强扩增效应的同时兼顾安全性。

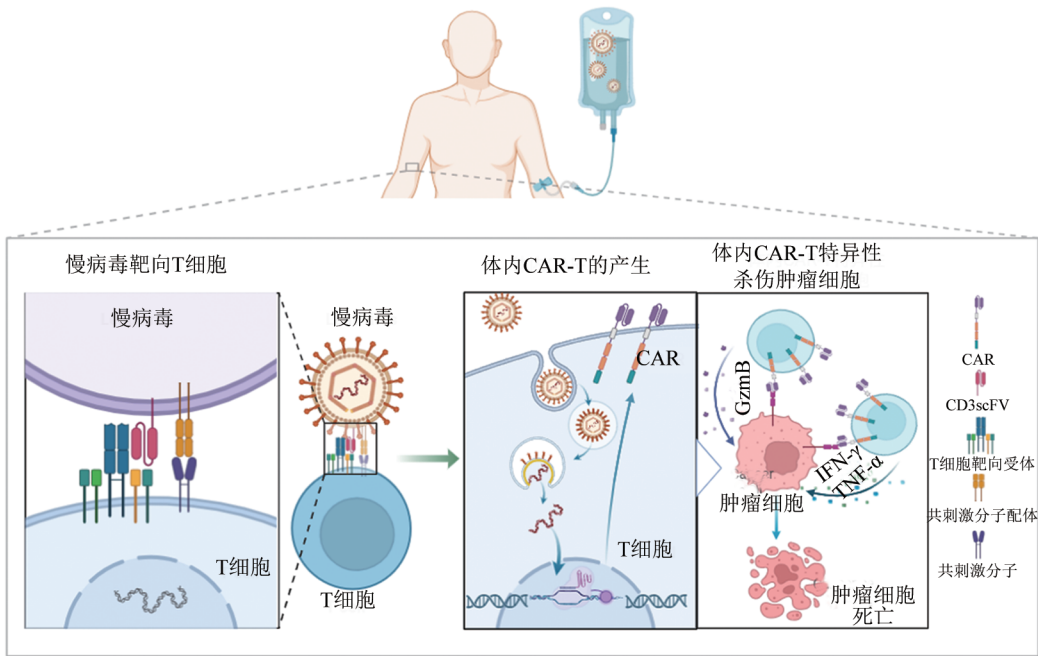


图2 慢病毒靶向T细胞并生成CAR-T细胞的示意图(以包膜表达CD3 scFv为例)

2 慢病毒载体介导体内CAR-T细胞的实验研究与临床转化

以慢病毒为载体的体内CAR-T细胞疗法正从概念

验证向临床转化推进,研究靶点主要集中于血液系统恶性肿瘤相关抗原,如CD19、CD20和BCMA等。本节从动物实验和早期临床证据两方面,梳理慢病毒载体介导体内CAR-T细胞的抗肿瘤研究进展(表2)。

表2 慢病毒载体介导体内免疫细胞CAR工程化的研究进展

研究者或公司	递送载体	免疫细胞	包膜假型化	靶向免疫细胞组件	共刺激结构	靶点	CAR结构	临床研究
PFEIFFER等	LV	T细胞	NiV-G/F	CD8-scFv	—	CD19	抗CD19 CAR	临床前 ^[49]
Sana Biotechnology	LV	T细胞	NiV-G/F	CD8-VHH	—	CD20	抗CD20 CAR	临床前 ^[50]
Oxford Biomedica	LV	T细胞	NiV-G/F	CD8-DARPin/VHH	—	CD19	抗CD19-4-1BB-CD3 ζ CAR	临床前 ^[38]
Kelonia Therapeutics	LV	T细胞	VSV-G	CD3-scFv	CD80	BCMA	抗BCMA-4-1BB-CD3 ζ CAR	I期临床试验中 ^[51]
Umoja Biopharma	LV	T细胞	COCV-G	CD3-scFv	CD80、CD58	CD19	抗CD19-4-1BB-CD3 ζ CAR	IND获FDA许可, I期临床试验中 ^[52]
Interius BioTherapeutics	LV	T、NK细胞	VSV-G	CD7-scFv	—	CD20	抗CD20-4-1BB-CD3 ζ CAR	澳大利亚I期临床试验获准开展 ^[53]
EsoBiotec	LV	T、NK细胞	VSV-G	CD3、CD4、CD8、TCR(VHH)	—	BCMA	抗BCMA-4-1BB-CD3 ζ CAR	研究者发起的临床试验中 ^[28]
济因生物	LV	NK细胞	VSV-G	CD7-scFv	—	CD19	抗CD19-4-1BB-CD3 ζ CAR	研究者发起的临床试验中 ^[54]

2.1 基础实验研究

早期研究在小型动物模型中验证了体内CAR-T细胞治疗的概念。PFEIFFER等^[49]证实,向人源化小鼠注射靶向CD8⁺ T细胞的CD19-CAR慢病毒后,可在体内生成功能性CAR-T细胞并清除Raji淋巴瘤细胞。进一步向移植人CD34⁺细胞的小鼠注射慢病毒颗粒后,观察到10只接受治疗的小鼠中有7只出现CAR-T细胞生成和CD19⁺ B细胞耗竭。随后,多项研究^[41-45]通过包膜假型化技术展示抗CD3、CD4或CD8等scFv,实现T细胞亚群的特异性转导,并在人源化小鼠模型中生成CAR-T细胞、杀伤肿瘤细胞。这些研究初步证明了体内生成CAR-T细胞的可行性。

随后,研究重点转向提高靶向效率和可控性。在靶向策略方面^[47],"DIRECTED"模块化平台使用VSV-G K47Q/R354Q双突变融合蛋白提供膜融合功能,同时利用可更换的抗体桥联模块实现靶细胞识别。例如,在病毒表面表达蛋白A/G(protein A/G, pA/G),使其结合外源抗体Fc段,再由抗体Fab段识别靶细胞,从而将融合与特异性识别模块化组合。在共培养实验中,表达pA/G的病毒样颗粒与抗CD3抗体结合后,可对CD3阳性Jurkat细胞实现剂量依赖的特异性转导;递送后,目的基因可稳定整合并维持14 d以上的表达。考虑到体内血清抗体可能与pA/G竞争,研究者还提出两种策略:一是将靶向CD3或CD5的scFv直接锚定于病毒包膜;二是利用SNAP标签蛋白与经苄基鸟嘌呤(benzylguanine, BG)修饰的抗体共价偶联,将抗体稳定固定在病毒表面。这两种策略不依赖非共价亲和捕获,有助于降低体内血清抗体干扰,在复杂生理环境中仍维持精准靶向。研究^[47]采用的病毒样颗粒 α CD5-SNAP-CreVLP在小鼠脾脏中显示出较高的T细胞靶向效率,并降低了非靶细胞转导和相关炎症反应。相比野生型VSV-G的广谱嗜性,这种设计更适合体内应用。总体而言,DIRECTED平台将去除天然受体结合与可替换靶向配体,既保留了高效入侵所需的膜融合能力,又以商品化抗体为接口实现快速换靶,为体内T细胞定向递送提供了可扩展的工程框架。

在安全性和扩增调控方面,可药物调节的策略取得了进展。MICHELS等^[30]在VivoVec载体递送的基因载荷中引入由FK506结合蛋白12(FK506 binding protein 12, FKBP12)与FKBP-雷帕霉素结合域(FKBP-rapamycin binding domain, FRB)介导的雷帕霉素响应型合成细胞因子受体。给雷帕霉素后,该受体可在转导细胞中形成信号复合物并提供选择性扩增信号,从而实现体内CAR-T细胞扩增和存活的药物依赖性调控。该设计主要调节转导细胞的扩增,而非直接开关CAR的抗原识别功能;因此,相关表述应与“开关型CAR”

加以区分。这种小分子调控策略为提高体内CAR-T细胞治疗的安全性和可控性提供了思路。

迈向临床转化的重要一步,是在免疫健全的大型动物模型中验证该策略。NICOLAI等^[6]单次静脉注射VivoVec™靶向慢病毒,无需淋巴清除即可在食蟹猴体内生成CD19-CAR-T细胞,并产生持续的B细胞清除效应。ANDORKO等^[27]在猕猴模型中应用靶向CD7的工程化慢病毒载体INT2104,实现T细胞和NK细胞的双重转导,并介导CD20⁺ B细胞清除。这些大型动物数据支持慢病毒载体介导体内CAR-T细胞的临床转化可行性。

2.2 临床转化的启动

在临床前研究基础上,体内CAR-T细胞技术已进入早期临床开发阶段。自2024年起,多项项目获准开展临床研究。例如,Umoja公司的UB-VV111获美国FDA批准开展I期临床试验^[52],Interius公司的INT2104获准在澳大利亚开展I期临床试验^[53]。2024年11月,一项复发/难治性弥漫性大B细胞淋巴瘤病例研究^[55]报道,静脉注射靶向CD3的慢病毒载体后,患者体内生成CD19 CAR-T细胞;患者于治疗后第17天出现CAR-T细胞扩增峰值,于第35天达到部分缓解。安全性方面,观察到1级细胞因子释放综合征和骨髓毒性,未报告神经毒性或感染。该病例为体内CAR-T细胞的人体应用提供了早期临床证据。2025年美国血液学会年会上,Kelonia公司公布KLN-1010 I期临床研究的早期数据^[56],受试者出现体内CAR-T扩增并达到微小残留病(minimal residual disease, MRD)阴性;由于样本量小、随访时间短,其疗效和安全性仍需进一步验证。同年,ESO-T01 I期临床研究^[13]报道,4例复发/难治性多发性骨髓瘤患者接受单次低剂量(约 0.25×10^9 TU)抗BCMA体内CAR-T细胞生成载体输注后,均获得客观缓解并达到MRD阴性。观察到的毒性总体可控,初步支持该策略在人体中的可行性。ESO-T01的早期结果进一步推动了该领域的临床转化。

3 展 望

尽管新兴递送平台不断涌现,慢病毒载体仍凭借其稳定整合能力和工程可塑性,成为实现持久体内CAR-T细胞的重要技术路线。未来,该领域的发展将主要围绕临床转化过程中的安全性、可控性和细胞选择性展开。安全性方面,可开发非整合型慢病毒,以降低基因组插入风险;靶向性方面,可超越单一受体识别,设计具有逻辑门控特性或受肿瘤微环境调控的智能包膜;递送效率方面,可探索展示CD47等分子以降低吞噬清除、延长载体体内半衰期。

进一步而言,未来可能超越单一载体形式,走向技术融合和功能集成。近期研究初步验证了这一方向:

工程化包膜递送载体(enveloped delivery vehicle, EDV)与AAV联用,可在体内将CAR基因位点特异性敲入T细胞基因组,并在B细胞急性淋巴细胞白血病、多发性骨髓瘤和肉瘤等动物模型中显示抗肿瘤活性^[57]。该协同策略提示可利用不同载体的固有优势。例如,可由慢病毒建立持久存在的基础CAR-T细胞群,再利用mRNA/LNP按需递送新指令,以应对肿瘤异质性。另一种可能方向是构建可编程的集成免疫平台,将合成生物学控制开关植入T细胞,并利用LNP等载体进行按需调控,从而实现对CAR-T细胞功能的动态管理和个体化管理。

[参 考 文 献]

- [1] ZOINE J T, IMMADISSETTY K, IBANEZ-VEGA J, et al. Peptide-scFv antigen recognition domains effectively confer CAR T cell multiantigen specificity[J]. *Cell Rep Med*, 2024, 5(2): 101422. DOI:10.1016/j.xcrm.2024.101422.
- [2] SCHULTZ L, MCNERNEY K, LAMBLE A J, et al. The quintessential role for CAR T cell therapy in children, adolescents and young adults with cancer[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2026, 23(4): 260-278. DOI:10.1038/s41571-025-01115-w.
- [3] ANG M J Y, METZLOFF A E, THATTE A S, et al. Lipid nanoparticles for engineering next generation CAR T cell immunotherapy[J]. *Nanoscale Horiz*, 2026, 11(1): 22-36. DOI: 10.1039/d5nh00432b.
- [4] ARDUINI A, KATIYAR H, LIANG C. Progress in pseudotyping lentiviral vectors towards cell-specific gene delivery *in vivo*[J]. *Viruses*, 2025, 17(6): 802. DOI:10.3390/v17060802.
- [5] KROTOVA K, NENAVATH G N, PACKIRISWAMY N, et al. *In vivo* generation of functional CD19 CAR-T cells using a serum-stable CD3-targeted lentiviral vector[J]. *Blood*, 2023, 142(Suppl 1): 767. DOI:10.1182/blood-2023-186992.
- [6] NICOLAI C J, PARKER M H, QIN J, et al. *In vivo* CAR T-cell generation in nonhuman primates using lentiviral vectors displaying a multidomain fusion ligand[J]. *Blood*, 2024, 144(9): 977-987. DOI: 10.1182/blood.2024024523.
- [7] JARGALSAIKHAN B E, MUTO M, EMA M, et al. The era of gene therapy: the advancement of lentiviral vectors and their pseudotyping. *viruses* 2025, 17, 1036[J]. *Viruses*, 2025, 17(11): 1511. DOI:10.3390/v17111511.
- [8] MILONE M C, FISH J D, CARPENITO C, et al. Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy *in vivo*[J]. *Mol Ther*, 2009, 17(8): 1453-1464. DOI:10.1038/mt.2009.83.
- [9] KIM S J, MUGUNDU G M, SINGH A P. Translational PK-PD model for *in vivo* CAR-T-cell therapy delivered using CAR mRNA-loaded polymeric nanoparticle vector[J]. *Clin Transl Sci*, 2024, 17(12): e70101. DOI:10.1111/cts.70101.
- [10] ZUGASTI I, ESPINOSA-AROCA L, FIDYT K, et al. CAR-T cell therapy for cancer: current challenges and future directions[J]. *Sig Transduct Target Ther*, 2025, 10: 210. DOI: 10.1038/s41392-025-02269-w.
- [11] NALDINI L. Gene therapy returns to centre stage[J]. *Nature*, 2015, 526(7573): 351-360. DOI:10.1038/nature15818.
- [12] MILONE M C, O'DOHERTY U. Clinical use of lentiviral vectors [J]. *Leukemia*, 2018, 32(7): 1529-1541. DOI: 10.1038/s41375-018-0106-0.
- [13] XU J, LIU L, PARONE P, et al. *In-vivo* B-cell maturation antigen CAR T-cell therapy for relapsed or refractory multiple myeloma[J]. *Lancet*, 2025, 406(10500): 228-231. DOI: 10.1016/s0140-6736(25) 01030-x.
- [14] JADLOWSKY J K, LESKOWITZ R, MCKENNA S, et al. Long-term stability of clinical-grade lentiviral vectors for cell therapy[J]. *Mol Ther Meth Clin Dev*, 2024, 32(1): 101186. DOI:10.1016/j.omtm.2024.101186.
- [15] GENG G N, XU Y X, HU Z Y, et al. Viral and non-viral vectors in gene therapy: current state and clinical perspectives[J]. *eBioMedicine*, 2025, 118: 105834. DOI:10.1016/j.ebiom.2025.105834.
- [16] KIM M, HWANG Y, LIM S, et al. Advances in nanoparticles as non-viral vectors for efficient delivery of CRISPR/Cas9[J]. *Pharmaceutics*, 2024, 16(9): 1197. DOI:10.3390/pharmaceutics16091197.
- [17] PUPO A, FERNÁNDEZ A, LOW S H, et al. AAV vectors: the Rubik's cube of human gene therapy[J]. *Mol Ther*, 2022, 30(12): 3515-3541. DOI:10.1016/j.ymthe.2022.09.015.
- [18] NALDINI L, BLÖMER U, GALLAY P, et al. *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector [J]. *Science*, 1996, 272(5259): 263-267. DOI: 10.1126/science.272. 5259.263.
- [19] CRONIN J, ZHANG X Y, REISER J. Altering the tropism of lentiviral vectors through pseudotyping[J]. *Curr Gene Ther*, 2005, 5(4): 387-398. DOI:10.2174/1566523054546224.
- [20] BURNS J C, FRIEDMANN T, DRIEVER W, et al. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, 90(17): 8033-8037. DOI:10.1073/pnas.90.17.8033.
- [21] FINKELSHTEIN D, WERMAN A, NOVICK D, et al. LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(18): 7306-7311. DOI:10.1073/pnas.1214441110.
- [22] FUNKE S, SCHNEIDER I C, GLASER S, et al. Pseudotyping lentiviral vectors with the wild-type measles virus glycoproteins improves titer and selectivity[J]. *Gene Ther*, 2009, 16(5): 700-705. DOI:10.1038/gt.2009.11.
- [23] SCHOENHALS M, FRECHA C, BRUYER A, et al. Efficient transduction of healthy and malignant plasma cells by lentiviral vectors pseudotyped with measles virus glycoproteins[J]. *Leukemia*, 2012, 26(7): 1663-1670. DOI:10.1038/leu.2012.36.
- [24] HUMBERT J M, FRECHA C, BOUAFIA F A, et al. Measles virus glycoprotein-pseudotyped lentiviral vectors are highly superior to vesicular stomatitis virus G pseudotypes for genetic modification of monocyte-derived dendritic cells[J]. *J Virol*, 2012, 86(9): 5192-5203. DOI:10.1128/jvi.06283-11.
- [25] BARTOSCH B, DUBUISSON J, COSSET F L. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes[J]. *J Exp Med*, 2003, 197(5): 633-642. DOI: 10.1084/jem.20021756.
- [26] NIKOLIC J, BELOT L, RAUX H, et al. Structural basis for the

- recognition of LDL-receptor family members by VSV glycoprotein[J]. Nat Commun, 2018, 9: 1029. DOI:10.1038/s41467-018-03432-4.
- [27] ANDORKO J I, RUSSELL R M, SCHNEPP B C, et al. Targeted *in vivo* delivery of genetic medicines utilizing an engineered lentiviral vector platform results in CAR T and NK cell generation[J]. Mol Ther, 2025, 33(10): 4937-4952. DOI:10.1016/j.ymthe.2025.06.036.
- [28] ESOBIOTEC SA. EsoBiotec doses first patient in investigator initiated trial of *in vivo* BCMA CAR-T candidate ESO-T01 for multiple myeloma[EB/OL]. (2025-01-08)[2026-06-25]. <https://www.esobiotec.com/esobiotec-doses-first-patient-in-investigator-initiated-trial-of-in-vivo-bcma-car-t-candidate-eso-t01-for-multiple-myeloma/>.
- [29] TROBRIDGE G D, WU R A, HANSEN M, et al. Cocapsudotyped lentiviral vectors resist inactivation by human serum and efficiently transduce primate hematopoietic repopulating cells [J]. Mol Ther, 2010, 18(4): 725-733. DOI:10.1038/mt.2009.282.
- [30] 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. DOI:10.1136/jitc-2022-006292.
- [31] KIELIAN M. Mechanisms of virus membrane fusion proteins[J]. Annu Rev Virol, 2014, 1: 171-189. DOI:10.1146/annurev-virology-031413-085521.
- [32] STRAUSS J H, STRAUSS E G. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution[J]. Microbiol Rev, 1994, 58(3): 491-562. DOI:10.1128/mr.58.3.491-562.1994.
- [33] HUCKABY J T, LANDONI E, JACOBS T M, et al. Bispecific binder redirected lentiviral vector enables *in vivo* engineering of CAR-T cells[J]. J Immunother Cancer, 2021, 9(9): e002737. DOI: 10.1136/jitc-2021-002737.
- [34] PLEMPER R K. Cell entry of enveloped viruses[J]. Curr Opin Virol, 2011, 1(2): 92-100. DOI:10.1016/j.coviro.2011.06.002.
- [35] HASHIGUCHI T, OSE T, KUBOTA M, et al. Structure of the measles virus hemagglutinin bound to its cellular receptor SLAMF2[J]. Nat Struct Mol Biol, 2011, 18(2): 135-141. DOI:10.1038/nsmb.1969.
- [36] NAVARATNARAJAH C K, LEONARD V H J, CATTANEO R. Measles virus glycoprotein complex assembly, receptor attachment, and cell entry[M]//Measles. Berlin, Heidelberg: Springer, 2009: 59-76. DOI:10.1007/978-3-540-70523-9_4.
- [37] ZHOU Q, SCHNEIDER I C, EDES I, et al. T-cell receptor gene transfer exclusively to human CD8⁺ cells enhances tumor cell killing[J]. Blood, 2012, 120(22): 4334-4342. DOI: 10.1182/blood-2012-02-412973.
- [38] CORADIN T, KEATING A L, BARNARD A R, et al. Efficient *in vivo* generation of CAR T cells using a retargeted fourth-generation lentiviral vector[J]. Mol Ther, 2025, 33(10): 4953-4967. DOI:10.1016/j.ymthe.2025.07.006.
- [39] FAN X J, ZHANG S S, LI Y T, et al. MxV glycoproteins: a novel fusogen for *in vivo* CAR-T generation[J]. Mol Ther, 2025, 33(4 Suppl 1): 792. DOI:10.1016/j.ymthe.2025.04.028.
- [40] ALCOVER A, ALARCÓN B, DI BARTOLO V. Cell biology of T cell receptor expression and regulation[J]. Annu Rev Immunol, 2018, 36: 103-125. DOI:10.1146/annurev-immunol-042617-053429.
- [41] BRAUN A H, FRANK A M, HO N, et al. Dasatinib is a potent enhancer for CAR T cell generation by CD3-targeted lentiviral vectors[J]. Mol Ther Meth Clin Dev, 2023, 28: 90-98. DOI:10.1016/j.omtm.2022.12.002.
- [42] FRANK A M, WEIDNER T, BRYNZA J, et al. CD8-specific designed ankyrin repeat proteins improve selective gene delivery into human and primate T lymphocytes[J]. Hum Gene Ther, 2020, 31(11/12): 679-691. DOI:10.1089/hum.2019.248.
- [43] ZHOU Q, UHLIG K M, MUTH A, et al. Exclusive transduction of human CD4⁺ T cells upon systemic delivery of CD4-targeted lentiviral vectors[J]. J Immunol, 2015, 195(5): 2493-2501. DOI: 10.4049/jimmunol.1500956.
- [44] JAMALI A, KAPITZA L, SCHASER T, et al. Highly efficient and selective CAR-gene transfer using CD4- and CD8-targeted lentiviral vectors[J]. Mol Ther Meth Clin Dev, 2019, 13: 371-379. DOI:10.1016/j.omtm.2019.03.003.
- [45] AGARWAL S, WEIDNER T, THALHEIMER F B, et al. *In vivo* generated human CAR T cells eradicate tumor cells[J]. OncoImmunology, 2019, 8(12): e1671761. DOI:10.1080/2162402x.2019.1671761.
- [46] VOISINNE G, GONZALEZ DE PEREDO A, RONCAGALLI R. CD5, an undercover regulator of TCR signaling[J]. Front Immunol, 2018, 9: 2900. DOI:10.3389/fimmu.2018.02900.
- [47] STREIBINGER D, FRANGIEH C J, FRIEDRICH M J, et al. Cell type-specific delivery by modular envelope design[J]. Nat Commun, 2023, 14: 5141. DOI:10.1038/s41467-023-40788-8.
- [48] VERHOEYEN E, DARDALHON V, DUCREY-RUNDQUIST O, et al. IL-7 surface-engineered lentiviral vectors promote survival and efficient gene transfer in resting primary T lymphocytes[J]. Blood, 2003, 101(6): 2167-2174. DOI:10.1182/blood-2002-07-2224.
- [49] PFEIFFER A, THALHEIMER F B, HARTMANN S, et al. *In vivo* generation of human CD19-CAR T cells results in B-cell depletion and signs of cytokine release syndrome[J]. EMBO Mol Med, 2018, 10(11): EMM201809158. DOI:10.15252/emmm.201809158.
- [49] PFEIFFER A, THALHEIMER F B, HARTMANN S, et al. *In vivo* generation of human CD19-CAR T cells results in B-cell depletion and signs of cytokine release syndrome[J]. EMBO Mol Med, 2018, 10(11): EMM201809158. DOI:10.15252/emmm.201809158.
- [50] SANA BIOTECHNOLOGY INC. CD8-specific antibody constructs and compositions thereof: US 2022/0333134 A1[P/OL]. (2022-10-20) [2026-05-15]. <https://patents.google.com/patent/US20220333134A1/en>.
- [51] KELONIA THERAPEUTICS. Kelonia Therapeutics announces late-breaking oral presentation of first-in-human data from *in vivo* BCMA CAR-T therapy at the American Society of Hematology 2025 Annual Meeting[EB/OL]. (2022-10-20) [2026-05-15]. <https://keloniatx.com/kelonia-therapeutics-announces-late-breaking-oral-presentation-of-first-in-human-data-from-in-vivo-bcma-car-t-therapy-at-the-americansociety-of-hematology-ash-2025-annual-meeting/>.
- [52] UMOJA BIOPHARMA. Umoja Biopharma announces FDA clearance of IND application for UB-VV111, a CD19-directed *in situ* CAR T therapy for hematologic malignancies[EB/OL]. (2024-07-31)[2026-06-25]. <https://www.umoja-biopharma.com/news/umoja-biopharma-announces-fda-clearance-of-ind-application-for-ub-vv111-a-cd19-directed-in-situ-car-t-for-hematologic-malignancies>.
- [53] INTERIUS BIOTHERAPEUTICS. Interius BioTherapeutics receives HREC approval and CTN clearance from the TGA to commence a phase 1 clinical trial for its *in vivo* CAR therapeutic

- for B-cell malignancies[EB/OL]. (2024-07-09) [2026-06-25]. <https://interiusbio.com/2024/07/interius-biotherapeutics-receives-hrec-approval-and-ctnclearance-from-the-tga-to-commence-a-phase-1-clinical-trial-for-itsfirst-in-class-in-vivo-car-therapeutic-for-b-cell-malignancies-willinitiate/>.
- [54] 深圳市济因生物科技有限公司. 靶向载体及其制备方法与用途: WO, WO2024067870A1[P/OL]. (2024-04-04)[2026-05-15]. <https://patents.google.com/patent/WO2024067870A1/zh>.
- [55] CHEN X F, HUANG K, LIU J Y, et al. 1482 *in-vivo* CAR-T cells produced by specific virus in refractory B cell lymphoma[J]. J Immuno Ther Cancer, 2024, 12(Suppl 3): A1712-A1712. DOI: 10.1136/jitc-2024-site2024.1482.
- [56] HARRISON S, HO P J, LIM S L, et al. Minimal residual disease (MRD)-negative outcomes following a novel, *in vivo* gene therapy generating anti-B-cell maturation antigen (BCMA) chimeric antigen receptor (CAR) -T cells in patients with relapsed and refractory multiple myeloma (RRMM): Preliminary results from inMMycAR, the first-in-human phase 1 study of KLN-1010[J]. Blood, 2025, 146(Supplement 2): LBA-1-LBA-1. DOI: 10.1182/blood-2025-lba-1.
- [57] NYBERG W A, BERNARD P L, NGO W, et al. *In vivo* site-specific engineering to reprogram T cells[J]. Nature, 2026, 652(8110): 712-721. DOI:10.1038/s41586-026-10235-x.
- [收稿日期] 2026-04-03 [修回日期] 2026-05-18
[本文编辑] 苏念