

DOI: 10.3724/cbls.2026068

CSTR: 32203.14.cbls.2026068

文章编号: 1004-0374(2026)04-0689-13



王振坤, 研究员/博士生导师。现任国家卫生健康委细胞移植重点实验室PI、哈医大一院干细胞临床研究管理办公室主任、黑龙江省细胞临床研究学术委员会秘书长、中国研究型医院学会生物治疗学专业委员会委员、中国抗癌协会肿瘤微环境专业委员会委员、亚太医学生物免疫学会血液学分会常务委员、黑龙江省医学会医学细胞生物学会分会委员。主持国家自然科学基金、省“双一流”学科协同创新重点项目等多项课题, 发表SCI论文30余篇, 出版学术专著1部(主编), 获黑龙江省卫生厅医疗新技术成果奖一等奖。围绕细胞治疗及机制开展多项研究, 主导细胞培养基及关键试剂自主研发, 申请国家发明专利3项, 并成功实现成果转化与产业化落地。

体内CAR-T载体递送技术的研究现状与展望

于 阔^{1,2}, 王振坤^{1,3*}

(1 哈尔滨医科大学, 国家卫生健康委员会细胞移植重点实验室, 哈尔滨 150000; 2 东北农业大学生命科学学院, 黑龙江省动物细胞与遗传工程重点实验室, 哈尔滨 150030; 3 哈尔滨医科大学附属第一医院中心实验室, 哈尔滨 150000)

摘要: 体内原位生成嵌合抗原受体T细胞(chimeric antigen receptor T cell, CAR-T)疗法作为一种新兴的治疗策略, 在实现标准化产品制备、降低治疗成本以及缩短治疗周期方面展现出巨大潜力。本文聚焦于体内CAR-T治疗的关键技术——载体递送系统, 深入探讨了不同递送载体的作用机制及其优劣势, 综述了该领域的最新研究进展与面临的技术挑战, 旨在为优化体内CAR-T治疗策略及推动其临床转化提供理论参考。

关键词: 体内CAR-T治疗; 载体递送系统; 基因治疗; 病毒载体; 非病毒载体

中图分类号: Q813 **文献标识码:** A

Research progress and future perspectives on *in vivo* CAR-T vector delivery technology

YU Kuo^{1, 2}, WANG Zhen-Kun^{1, 3*}

(1 NHC Key Laboratory of Cell Transplantation, Harbin Medical University, Harbin 150000, China; 2 Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Animal Cell and Genetic Engineering, College of Life Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 3 Central Laboratory, First Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150000, China)

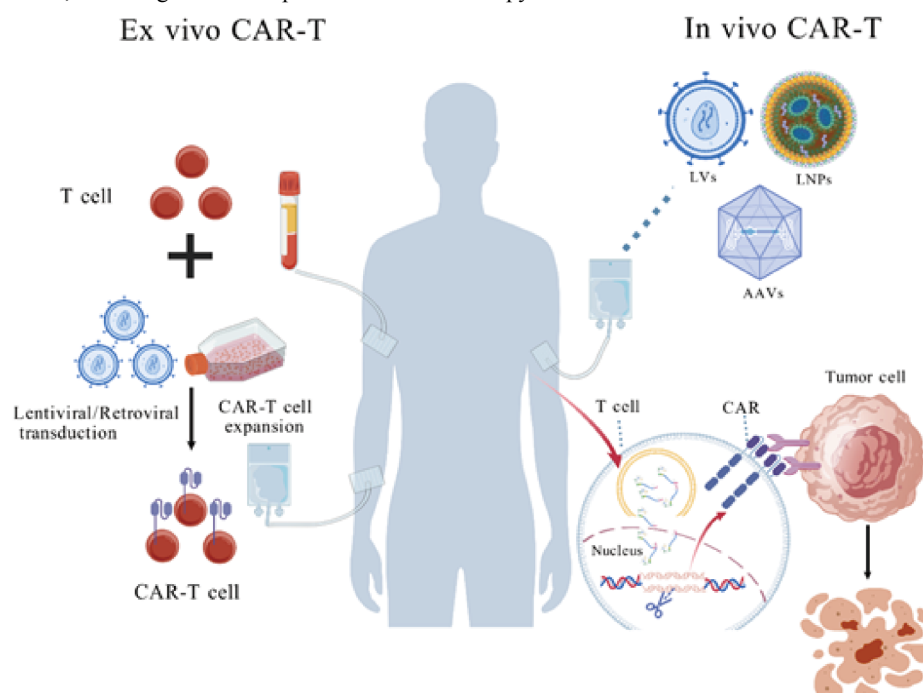
Abstract: *In vivo* chimeric antigen receptor T-cell (CAR-T) therapy is an emerging paradigm that enables direct genetic engineering of T cells within patients, bypassing *ex vivo* manufacturing. This approach addresses key limitations of traditional CAR-T therapy, including lengthy production time, high costs, T-cell exhaustion, and integration-related mutagenesis risks, while promising standardized, accessible, and safer treatments. This review systematically evaluates vector delivery systems essential for *in vivo* CAR-T generation. Viral vectors, including lentiviral (LVs) and adeno-associated viral (AAVs) vectors, leverage natural transduction mechanisms. Engineered LVs with retargeted envelopes achieve efficient, durable CAR

收稿日期: 2025-11-26; 修回日期: 2026-01-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(82101929); 黑龙江省协同创新项目(LJGXCG2023-003); 哈尔滨医科大学附属第一医院杰出青年基金项目(2021J02)

*通信作者: E-mail: zhenkunwang@hrbmu.edu.cn

expression via genomic integration. AAVs offer lower immunogenicity and primarily episomal persistence, enhanced by serotype optimization and capsid engineering for improved T-cell specificity and reduced pre-existing immunity. Non-viral vectors, led by lipid nanoparticles (LNPs), provide scalable production, flexible cargo capacity (mRNA/DNA/CRISPR), and proven safety from mRNA vaccine applications. Challenges like hepatic tropism are mitigated through lipid formulation tuning, surface ligand conjugation, and alternative dosing routes. Emerging biomimetic nanoparticles, such as cell membrane-coated or fusogenic virus-like particles, enhance biocompatibility, immune evasion, and targeted cytosolic delivery. Key challenges include viral integration/immunogenicity risks, non-viral transient expression and endosomal escape, off-target effects, and solid tumor microenvironment barriers. Solutions encompass multi-domain ligands, transposon integration, co-delivery of immunomodulators, and stimulus-responsive designs. Comparative analysis reveals application-specific suitability: LVs for hematologic malignancies needing long-term surveillance; LNPs for autoimmune diseases via transient "immune reset"; biomimetics for superior evasion. Phase I trials of viral platforms show promising safety and efficacy. Future success hinges on enhancing delivery precision, balancing expression durability with safety, and standardizing production. Multidisciplinary advances will expand *in vivo* CAR-T beyond oncology to autoimmune disorders, transplant tolerance, and chronic infections, heralding accessible precision immunotherapy.



Key words: *in vivo* CAR-T; vector delivery system; gene therapy; viral vector; non-viral vector

嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)于1989年提出^[1],其设计将T细胞受体(T-cell receptor, TCR)的细胞内信号域与抗体可变区融合,赋予T细胞识别肿瘤抗原并发挥细胞毒性的能力。基于此概念发展出的CAR-T细胞疗法是一种革新的免疫治疗方法,其核心原理是从患者体内分离T细胞,通过基因工程将识别肿瘤抗原的CAR导入细胞,扩增后回输给患者,使T细胞可不依赖主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)识别并杀伤目标细胞,已经在急性B淋巴细胞白血病、淋巴瘤及自身免疫性疾病的治疗中取得了显著成效^[2-5]。然而,CAR-T疗法目前依赖的传统“体外(*ex*

vivo)”制备模式面临多重挑战:流程烦琐且耗时漫长,从T细胞分离、病毒载体转导、体外扩增到回输,高昂的费用与时间成本使许多患者无法受益;病毒载体的随机整合带来潜在的基因插入突变风险;长期的体外培养易导致T细胞功能耗竭,削弱其体内持久性与治疗效果等^[6,7]。

体内(*in vivo*)CAR-T细胞工程能够摒弃繁琐的体外步骤,通过体内递送技术直接对T细胞进行CAR修饰,实现其原位转化^[8,9]。这种“现货型”(off-the-shelf)疗法有望从根本上简化制备流程、降低成本,并提高治疗的安全性与可及性。

体内CAR-T治疗核心理念,不仅在于将外源

基因成功递送至体内,更在于确保具有治疗效应的基因片段能够在特定的靶细胞亚群中实现持续、稳定且高水平的表达。然而,面对体内复杂的生理环境,如何突破递送瓶颈成为关键。目前,学术界主要致力于两大类递送系统的研发:一是利用具有天然侵染机制的工程化病毒载体,二是通过材料设计实现高效包封与释放的非病毒载体。本文主要探讨这两类递送技术在体内CAR-T疗法中的研究进展、面临的挑战以及解决策略。

1 体内 CAR-T递送系统

1.1 基于病毒载体的CAR-T递送技术

体内CAR-T技术的核心挑战,在于如何实现编码CAR的核酸序列(DNA或mRNA)的安全、精准及高效体内递送。因此,具备天然“遗传物质递送机制”的病毒载体成为解决这一难题的关键工具。在此背景下,基于病毒的基因治疗技术已发展为一项常规策略,其中慢病毒(lentivirus, LVs)与腺相关病毒(adeno-associated virus, AAVs)已逐渐应用于在体生成CAR-T这一前沿领域。

1.1.1 慢病毒载体递送技术

慢病毒作为逆转录病毒家族的一员,因其独特的生物学特性在CAR-T细胞疗法中占据核心地位。其优势在于能够有效感染分裂和非分裂细胞,并将外源基因稳定整合到宿主细胞基因组中,从而实现CAR基因的长期表达^[10]。这种特性对于CAR-T细胞能够长期行使免疫监视功能和抗肿瘤效应至关重要。

LVs通常具有较大的载体容量,可以承载编码复杂CAR结构所需的较长序列。Frank等^[11]提出利用表达抗CD3单链可变片段(single-chain variable fragment, scFv)的慢病毒载体(CD3-LVs)直接在体内工程化T细胞。NSG小鼠体内实验证实,注射候选载体TR66.opt-LV成功诱导了CD19-CAR-T细胞的原位生成,实现了对B细胞的特异性杀伤,且未发现脱靶转导迹象。Coradin等^[12]利用第四代慢病毒载体平台TetraVecta,结合改进型靶向性尼帕病毒包膜系统(Nipah envelope system)特异性靶向T细胞,与传统的水疱性口炎病毒糖蛋白(vesicular stomatitis virus glycoprotein, VSV-G)假型载体相比,TetraVecta载体对T细胞表现出更高的特异性。此外,Huckaby等^[13]发布了一种双靶向

的慢病毒递送系统,研究人员使用了一种基于辛德毕斯病毒的假型慢病毒载体(SINV-LV),并且对载体中的包膜蛋白2(envelope 2, E2)糖蛋白进行突变,从而消除了其对人类细胞的天然趋向性,并通过双特异性串联抗原结合段(fragment antigen-binding, Fab)连接病毒突变E2糖蛋白与CD3抗体,这种重定向的慢病毒递送系统展现出卓越的特异性和转导效率。

1.1.2 腺相关病毒载体递送技术

腺相关病毒因其较低的免疫原性和非致病性而备受关注,它是一种小型、二十面体、无包膜的病毒,直径约为25 nm,含有单链DNA基因组。AAVs能够高效感染多种细胞类型,包括静息状态的T细胞,并且主要以附加体形式(episomal DNA)存在于细胞核中,而非整合到宿主细胞基因组,这使得其基因组整合的风险远低于LVs^[14]。此外,AAVs血清型的多样性赋予了其广泛的组织和细胞靶向潜力,每种血清型都具有独特的组织嗜性和转导效率,通过选择合适的血清型,可以实现对特定T细胞亚群的体内转导,增强递送效率。例如,AAV6在体内CAR-T构建中具有显著优势,因为它能够有效转导原代T细胞,包括在体内占比最大的静息T细胞^[15]。有研究者选用高嗜性的AAV-DJ载体递送靶向CD4的CAR基因,在人源化白血病小鼠模型中,仅需单次注射即可生成足量且主要为CD8⁺表型的功能性CAR-T细胞,实现了与传统体外制备CAR-T细胞相似的肿瘤消退效果^[15]。

1.2 基于非病毒载体的CAR-T递送技术

以脂质纳米颗粒(lipid nanoparticle, LNP)为代表的非病毒载体在临床转化层面具有显著优势,即易于实现GMP标准的规模化制备、成本可控并且存储稳定性更好^[16,17]。其核心优势在于此类载体具备优异的装载包容性与灵活性,不仅能够突破病毒衣壳的容量限制,装载大片段质粒DNA,还能高效递送mRNA以实现治疗分子的瞬时表达,甚至可封装CRISPR/Cas9核糖核蛋白复合物(RNP)进行精准的基因组编辑^[18]。

LNP在COVID-19 mRNA疫苗中的成功实践,已在规模化生产、安全性与递送效率方面得到充分验证,为体内T细胞工程奠定了关键的技术与药学基础^[19-21]。LNP体系的构建通常涉及四种核心脂质组分(图1),分别为可电离脂质、辅助脂质、胆固醇

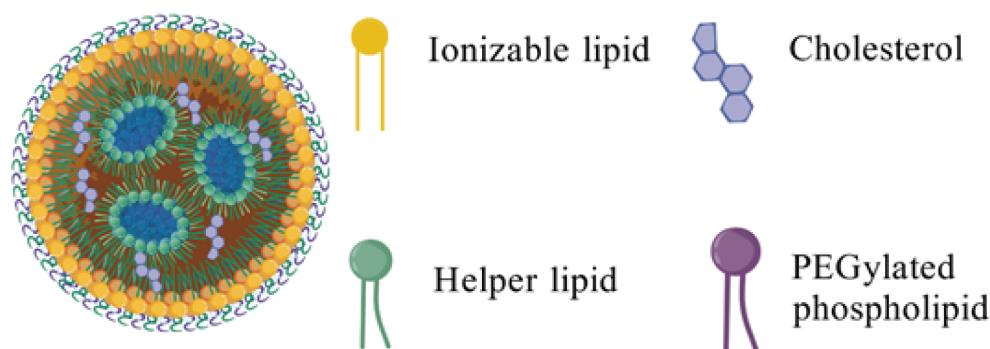


图1 脂质纳米颗粒的四种核心组分

Figure 1 Four core components of lipid nanoparticles

醇、聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)化磷脂,并通过微流控技术与带负电荷的mRNA分子进行自组装^[22,23]。各脂质组分在结构中发挥特定功能:

(1)可电离脂质是LNP功能的核心,其独特的pH敏感性使其能在酸性内体环境中迅速质子化而带正电荷,进而有效破坏内体膜结构,促进封装mRNA的胞质释放,是实现高效基因递送的关键步骤。(2)辅助脂质通常为磷脂,有助于形成LNP的结构骨架,提供稳定性和生物相容性。磷脂的双层结构是脂质纳米颗粒的基础,有助于维持颗粒的形态和防止内容物泄漏。(3)胆固醇与磷脂共同构成LNP的结构骨架,维持其结构完整性、物理稳定性和膜的适度流动性,有效防止其在血液循环中被免疫系统识别和清除,从而延长其体内循环半衰期。(4)PEG化磷脂带有一个PEG链,在LNP表面形成一个亲水性涂层,抑制血浆蛋白在LNP表面的非特异性吸附,避免了LNP被单核吞噬细胞系统迅速清除,从而显著延长了LNP在血液循环中的半衰期。同时,PEG化磷脂还能够有效防止LNP颗粒之间发生聚集,维持颗粒分散的稳定性^[24,25]。

Rurik等^[26]开发了表面修饰有CD5抗体的LNP递送系统,其内部包裹编码靶向成纤维细胞激活蛋白CAR的修饰mRNA,成功实现了体内瞬时CAR-T细胞的原位重编程。该系统展现出卓越的mRNA递送效能,不仅在体外实现了超过80%的T细胞转染效率,在心力衰竭小鼠模型中,也能稳

定诱导约20%的脾脏T细胞原位重编程为CAR-T细胞。这部分比例的CAR-T细胞高效地清除致病性成纤维细胞,大幅逆转心脏纤维化。

2 体内CAR-T技术面临的核心挑战与解决策略

2.1 病毒载体介导的体内CAR-T技术面临的问题及解决策略

尽管病毒载体具备独特的递送优势,但其临床应用仍面临严峻挑战,其中安全性是首要顾虑,特别是慢病毒载体带来的随机基因组整合风险不容忽视。这种随机整合可能引发插入突变,导致原癌基因激活或抑癌基因失活,从而产生显著的致癌风险。这一安全隐患增加了治疗的不确定性,为该技术的临床转化和监管审批带来障碍。为解决这一问题,研究者们已展开多项相关研究。

整合酶缺陷型慢病毒载体(integrase-deficient lentiviral vector, IDLV)是一种经过基因改造的慢病毒载体,其核心特征是缺乏有功能的整合酶。传统LVs可能将CAR基因插入到宿主的抑癌基因导致失活或原癌基因附近导致激活,从而诱发T细胞白血病。而IDLV进入细胞后,其DNA主要以游离环状DNA形式存在于细胞核内,不中断宿主基因组。因此,IDLV的非整合特性有效避免了插入突变的风险,降低了发生永久性基因组损伤或癌变的可能性^[27,28]。然而,IDLV的应用是一个典型的“安全性”与“疗效持久性”之间的博弈:首先,IDLV形成的

游离环DNA不具备复制原点,无法随宿主DNA一起复制。随着T细胞的扩增,携带CAR的效应细胞比例会被迅速稀释。其次,游离的DNA在细胞核内容易受到表观遗传修饰的影响,导致基因表达被“沉默”。即使细胞没有分裂,IDLV介导的CAR表达水平也可能随着时间推移而降低,使得CAR-T细胞持续性极差^[29]。鉴于IDLV在持续性上的局限,将研究思路从改变病毒整合机制转变为改进递送系统精确度或许是更好的选择。

INT2104载体是一种创新的体内基因治疗技术,旨在通过单次静脉注射在患者体内直接生成靶向CD20的CAR-T细胞和CAR-NK细胞,用于治疗B细胞恶性肿瘤。该载体包含两种关键的包膜蛋白:靶向病毒的融合蛋白(Gen 2.1 Fusogen)和靶向CD7分子的scFv。首先,研究人员对Gen 2.1 Fusogen进行单点突变,使其不再与体内广泛存在的天然受体——低密度脂蛋白受体(LDL-R)结合,从而避免了载体的非特异性递送。同时,通过引入氨基酸替代物(T214N和T352A),显著提升了载体在血液中的稳定性,使其适用于静脉给药。此外,载体表面还装载了特异性靶向CD7分子的scFv,由于CD7主要在T细胞和NK细胞表面表达,该设计能够使慢病毒载体精准靶向循环系统中的CD7⁺T细胞(包括CD4⁺和CD8⁺亚群)与NK细胞。临床前研究证实,INT2104能高效清除CD20⁺B细胞,且未在肝脏等非靶向组织中表达,显示出良好的安全性与有效性^[30]。

VivoVec同样是一种经过工程化改造的慢病毒载体,然而与INT2104载体不同的是,研究者将T细胞激活和共刺激信号以多结构域融合蛋白(multi-domain fusion protein, MDF)的形式结合到VivoVec颗粒表面,该蛋白在一条多肽链上整合了多种模拟T细胞生理性激活所需的信号,包括用于T细胞识别的抗CD3scFv,以及共刺激分子CD58和CD80的结构域。这种设计极大地增强了载体与T细胞的结合、激活和转导能力,从而能更高效地生成CAR-T细胞。同时,该平台采用Cocal病毒的融合糖蛋白对慢病毒载体进行假型化,与常用的VSV-G糖蛋白相比,Cocal糖蛋白能够更好地抵抗人血清的灭活作用,提高了载体在体内的稳定性和持久性。并且优化了给药方式,通过淋巴结内注射,提高载体与T细胞的接触时间,同时减少全身暴露,提高了安全性^[31]。INT2104和VivoVec的创新性改造都实现了在确保

高效转导的同时最小化脱靶毒性,为开发下一代慢病毒载体提供了宝贵的理论基础和创新方向。

AAVs尽管整合风险较低,且不同AAV血清型提供了一定的组织倾向性,但仍不足以实现T细胞的特异性转导^[32,33]。此外,病毒载体固有的免疫原性也是阻碍其临床应用的主要瓶颈,尤其对于AAVs而言,预存免疫的影响尤为显著:患者体内预先存在的抗AAV中和抗体会直接阻断载体与靶细胞的结合,严重限制AAV在体内的递送效能^[15]。

因此,优化基于AAVs递送载体的体内CAR-T技术的核心在于提高其靶向精准度。Michels等^[34]开发了靶向小鼠CD8⁺T细胞的基因递送系统,将筛选出的高特异性的重复蛋白(designed ankyrin repeat proteins, DARPins)插入到AAV2衣壳蛋白中,使该载体在保持高度转导特异性的同时,还克服了转导障碍,其在小鼠脾细胞中的基因递送活性较传统AAV2提高了20倍以上。而Demircan等^[35]开发的DARPins靶向AAVs(DART-AAVs)通过突变消除了AAV6对天然受体(硫酸肝素蛋白聚糖和唾液酸)的结合能力,并利用柔性G4S接头在AAV6的衣壳蛋白上插入DARPins配体,在保持衣壳核心结构完整的同时,实现了配体在表面的有效表达。DART-AAVs展现了极高的T细胞靶向性和转导效率,即使在全血复杂环境中也能维持较高转导效率。

2.2 非病毒载体介导的体内CAR-T技术面临的问题及解决策略

尽管LNP技术在mRNA递送领域已取得显著成就,但在实现高效、精准的免疫细胞靶向递送方面仍面临挑战。其核心瓶颈在于LNP静脉注射后普遍表现出显著的肝脏趋向性。具体而言,绝大部分LNP在抵达目标淋巴器官或免疫细胞前,即被肝脏非特异性截获与清除,导致能有效转染靶细胞的载体剂量极低。这种显著的肝脏蓄积效应严重限制了LNP的递送能力,制约了体内CAR-T细胞的转染效率^[36,37]。针对这一难题,研究人员已开发出多种旨在逃避肝脏清除、增强免疫靶向的新型策略。

(1)LNP脂质配方优化:LNP的组分构成及摩尔比是决定其理化性质、生物学功能及最终递送效率的关键参数。FDA已批准上市的RNA药物,如用于治疗转甲状腺素蛋白淀粉样变性的Patisiran,以及两款COVID-19 mRNA疫苗BNT162b2 (Pfizer-BioNTech)和mRNA-1273(Moderna),其LNP配方中

各脂质组分的摩尔比均经过了严谨的优化与验证^[38-40]。这些成功案例显示,可电离脂质、中性磷脂、胆固醇与PEG化磷脂通常以一个高度精确的摩尔比例(例如Patisiran和mRNA-1273中的摩尔比均为50:10:38.5:1.5,BNT162b2中为46.3:9.4:42.7:1.6)协同作用,以达到最佳的封装效率、内体逃逸能力、循环稳定性和最小的毒副作用^[39,41]。

精确调整辅助脂质的摩尔比例,被证实能够影响LNP的膜融合效率、稳定性以及蛋白冠的组成,进而间接调控其在体内的生物分布和T细胞递送效率(表1)^[42]。这种内源性配方优化旨在通过改变其在体内的药代动力学行为,使其更多地靶向到富含T细胞的免疫器官,而非肝脏。

不同的可电离脂质种类及其电荷密度,能改变细胞膜与LNP的亲力和随后的内吞途径。此外,LNP表面吸附的血浆蛋白冠(protein corona)受其自身脂质构成的影响,而蛋白冠的自身特异性,是介导LNP在体内生物分布和细胞靶向性的一个重要因素^[43]。例如,LNP静脉注射后因肝脏ApoE受体介导的摄取而表现出肝脏趋向性。策略性地调整LNP脂质配方,能够降低其肝脏非特异性蓄积,并间接促进其向免疫细胞的递送^[42,44]。

通过改变可电离脂质的分子结构,如调整其pKa值、疏水链长度和支化度,可以影响LNP与血浆蛋白冠的形成以及其与ApoE受体的相互作用强度,从而降低肝脏的非特异性摄取。因此,LNP组分设计不仅是提升递送效率、降低毒性的关键,更是实现体内特定细胞精准靶向的核心手段。

(2)LNP表面修饰:除上述配方优化外,还可通过LNP表面的共价或非共价修饰,赋予其对T细胞或其特定亚群的主动靶向能力。这通常涉及在其PEG化磷脂链的末端偶联能够特异性识别T细胞表面标志物的配体^[45]。例如,连接抗CD5、抗CD8等单克隆抗体或其Fab片段,可实现LNP对T细胞或其特定

亚群(如CD8⁺细胞毒性T细胞)的精准靶向^[46]。有研究表明,抗CD5抗体修饰的LNP能够显著提高mRNA在脾脏T细胞中的表达^[26]。此外,为降低潜在的免疫原性并增强在致密组织中的穿透能力,使用更小分子量的靶向配体,如纳米抗体(VHHs)、特异性多肽或适配子,正成为当前研究的重要方向^[47-49]。

基于上述策略的优化,有研究者开发了基于DNA的靶向LNP(NCtX),旨在突破现有mRNA-LNP技术的局限性。NCtX内部共封装了两种关键核酸分子。其一为编码CAR的微小环状DNA(mcDNA),该DNA包含转座子系统所需的末端反向重复序列(ITRs);其二为编码SB100x转座酶的mRNA。当LNP被T细胞摄取后,mRNA会瞬时表达SB100x从而精准识别mcDNA上的CAR基因序列,并将其“剪切”下来,整合到宿主T细胞的基因组中,实现CAR的长期稳定表达。此外,为了确保LNP能够精准地作用于T细胞,其表面同时修饰了两种特异性配体。首先是抗CD7纳米抗体,它能高效靶向T细胞并促进LNP的内吞。其次是抗CD3scFv,用于诱导T细胞活化。体外及人源化小鼠模型研究证实,NCtX不仅能在远低于传统mRNA-LNP的剂量下生成具有效应功能的CAR-T细胞,更凭借基因整合优势,实现了CAR蛋白的长期稳定表达^[45]。

(3)递送路径与给药方式的策略性选择:虽然静脉注射是实现全身性递送的常用途径,但其固有的肝脏清除机制是主要障碍。因此,探索替代给药途径,如局部淋巴结注射、腹腔注射或瘤内注射,有望降低LNP的系统暴露和肝脏摄取,从而在局部区域实现更高的递送效率。

2.3 体内CAR-T治疗实体瘤面临的瓶颈问题

实体瘤复杂的免疫抑制微环境几乎是所有细胞疗法必须面对的难题。实体瘤的肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)是一个高度复杂并且动态

表1 FDA已批准的LNP的脂质摩尔比
Table 1 Lipid molar ratios of FDA-approved LNP

	Patisiran	BNT162b2	mRNA-1273	CVnCoV	OXLUMO
内容药物类型	siRNA	mRNA	mRNA	mRNA	siRNA
可电离脂质	DLin-MC3-DMA	ALC-0315	SM-102	Cationic Lipid	DLin-MC3-DMA
辅助脂质	1,2-DSPC	1,2-DSPC	1,2-DSPC	Phospholipid	1,2-DSPC
胆固醇	Cholesterol	Cholesterol	Cholesterol	Cholesterol	Cholesterol
PEG化磷脂	DMG-PEG2000	ALC-0159	DMG-PEG2000	PEG-ylated Lipid	DMG-PEG2000
脂质摩尔比	50:10:38.5:1.5	46.3:9.4:42.7:1.6	50:10:38.5:1.5	50:10:38.5:1.5	50:10:38.5:1.5

变化的生态系统。它不仅通过致密的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)阻碍CAR-T细胞的有效浸润,更构建了一个由缺氧、酸性代谢物堆积,以及大量免疫抑制性细胞(如调节性T细胞、髓源抑制性细胞)和TGF- β 、PD-L1等免疫抑制性因子交织而成的负性调控网络。如何让体内生成的CAR-T细胞有效浸润到肿瘤组织内部,并在缺氧、酸性、充满抑制性细胞和因子的环境中保持活性和杀伤功能,是决定该技术能否成功应用于实体瘤治疗的关键。

应对策略往往采用联合应用方式,例如纳米载体递送与免疫检查点抑制剂、TME重塑药物的协同,或多模态递送系统,以增强CAR-T细胞的浸润与功能维持。(1)协同递送微环境重塑因子与免疫检查点抑制剂:利用纳米颗粒共递送编码促炎细胞因子(如IL-12、IL-15)的mRNA,或分泌型免疫检查点抑制剂(如可溶性PD-1、CTLA-4抗体),甚至引入代谢重编程因子,以提升CAR-T细胞在TME中的存活能力和持续杀伤功能。近期研究显示,工程化CAR-T细胞分泌 α PD-L1-IL-12融合蛋白,可在实体瘤模型(如前列腺癌和卵巢癌)中实现肿瘤局部IL-12释放,提升IFN- γ 水平、促进CAR-T浸润和TME重塑,同时减少系统性炎症毒性^[50]。类似地,IL-15修饰的CAR-T在临床试验中显示出增强持久性和抗瘤活性,并且与PD-1抑制剂联合后进一步放大效应功能^[51]。(2)降解物理屏障促进浸润:通过纳米颗粒共递送介导重塑TME的酶或耗竭免疫抑制细胞的RNA分子。例如,将编码分泌型透明质酸酶(hyaluronidase, HAase)的mRNA封装于纳米颗粒中,或直接将HAase负载于刺激响应型纳米凝胶武装CAR-T细胞表面。表达的HAase能够催化降解实体瘤细胞外基质中的透明质酸分子,从而显著降低ECM的黏度和刚度,增加细胞间隙,有效瓦解肿瘤的物理屏障。近期研究显示,HAase纳米凝胶修饰的CAR-T在实体瘤模型中显著提升ECM降解和CAR-T深部浸润,抑制率达83%,并缓解抑制性TME^[52]。(3)联合耗竭免疫抑制细胞或因子:设计多功能纳米载体,同时递送靶向调节性T细胞或髓源抑制性细胞的siRNA/CRISPR组件,或编码耗竭TGF- β 等抑制因子的分子,以直接削弱TME的负向调控网络。临床前和临床研究证实,dnTGF- β R11修饰的CAR-T在TGF- β 丰富TME中的增殖、持久性和瘤清除效率显著提升^[53,54]。多模态递送系统进一

步优化此策略,例如靶向响应型LNP(如CD3/CD7靶向LNP)共递送CAR mRNA与PD-1干扰组件,或刺激响应型纳米颗粒在TME酸性/缺氧条件下释放重塑因子,实现精准局部调控^[55,56]。

即便上述的部分策略仅实践于体外CAR-T治疗中,但将这些针对实体瘤TME的改进策略协同递送载体的优化策略,将有望在未来攻克实体瘤等具有挑战性的疾病。

2.4 递送载体的免疫原性调控

体内CAR-T递送载体的免疫原性是制约其安全性、重复给药能力和临床转化潜力的核心因素。不同类型载体会在体内引发先天性或适应性免疫响应,包括中和抗体产生、补体激活、促炎细胞因子释放以及细胞毒性T细胞反应等,导致载体被快速清除、转导效率下降以及潜在的炎症毒性。

病毒载体的免疫原性主要源于其天然病毒成分。AAVs载体虽整体免疫原性较低,但人群中预存中和抗体普遍存在,血清阳性率通常在30%~70%之间。这些预存中和抗体可阻断载体与靶细胞结合、激活补体途径或促进吞噬清除,导致转导失败并限制重复给药;高滴度的预存中和抗体甚至可诱发补体相关血栓性微血管病或急性损伤。

LVs载体整合效率虽高,但常用包膜蛋白易被血清灭活并引发炎症响应,尤其在系统给药时放大免疫识别。为缓解这些问题,当前调控策略主要包括衣壳或包膜工程化改造,例如插入DARPs配体或突变消除天然受体结合,以提升T细胞特异性并降低预存免疫影响^[35];假型化处理则采用Nipah、Cocal或Sindbis病毒包膜,提高血清抵抗力和T细胞靶向性^[12,31];此外,IgG降解酶可瞬时清除预存中和抗体,结合血浆置换或空衣壳“诱饵”策略,进一步拓宽治疗窗口^[57];包膜混合(如NiV与VSV-G)则可在特异性和效率间实现平衡。这些优化已在临床前模型中证实,可显著提升体内CAR-T生成效率并最小化免疫毒性。

以脂质纳米颗粒为代表的非病毒载体,虽无病毒蛋白,但仍会激活补体系统引发补体激活相关假性过敏,诱发促炎细胞因子释放,并产生抗PEG抗体,导致血清清除加速和重复给药失效。PEG化脂质是主要诱因,尤其在预存抗PEG个体中放大响应。调控策略聚焦于脂质组分优化,例如前文提到的调整可电离脂质pKa值、辅助脂质比例,或直接替换

PEG为聚肌氨酸(polysarcosine, pSar)等低免疫原性聚合物,以降低补体激活和细胞因子分泌^[58];表面修饰引入靶向配体(如抗CD3/CD7)可减少非特异吸附,同时采用生物可降解离子化脂质进一步提升相容性^[59];此外,给药路径优化,如局部或淋巴结注射,也可避免系统暴露。

2.5 递送载体对调节性T细胞的错误编辑

病毒载体以及非病毒载体在体内递送中均可能导致对调节性T细胞(regulatory T cells, Tregs)的意外靶向或错误编辑。Tregs是一类CD4⁺T细胞亚群,主要表达Foxp3转录因子,负责维持免疫耐受和抑制过度免疫反应,在抗肿瘤免疫中起到负调控作用。如果Treg被意外转导为CAR-Treg,可能会增强其免疫抑制功能,导致效应T细胞活性降低、肿瘤微环境进一步抑制,从而削弱整体抗肿瘤疗效,甚至引发自身免疫失调或治疗失败。为规避此风险,可通过表面修饰使用CD8特异性纳米抗体、scFv或DARPin靶向细胞毒性T细胞进行表面修饰,实现对细胞毒性T细胞的精准靶向,避免对Treg的非特异性靶向。同时,利用mRNA的瞬时表达特性或非整合型载体(如IDLV或AAV)避免永久基因组整合,减少Treg的长期功能干扰。此外,整合高保真编辑工具(如base editing)或T细胞特异性启动子,可进一步降低off-target编辑风险,确保安全性。这些优化不仅提升了安全性,还确保了疗效的针对性。

3 仿生纳米颗粒递送技术的发展现状与未来展望

3.1 仿生纳米颗粒递送技术的研究现状

仿生纳米颗粒(biomimetic nanoparticles)指模仿生物体结构的纳米载体,相比合成材料,它们具有更好的生物相容性、免疫逃逸能力和靶向性。虽然目前大多数基于仿生纳米颗粒的研究聚焦于化疗药物递送或小核酸干扰,但现有文献充分证实了该技术在体内CAR-T递送中的潜力。

细胞膜纳米颗粒(cell membrane-derived nanoparticles, CMNPs)作为一种创新性的仿生递送平台,凭借其表面包覆的生物细胞膜所赋予的卓越免疫逃逸能力、源自原始细胞膜的归巢特性,以及天然低免疫原性的生物相容优势,有望成为mRNA药物的体内精准、高效递送的理想平台^[60,61]。CMNPs不仅能够有效跨越核酸胞内递送所面临的

屏障,更可实现对目标免疫细胞亚群的精确锚定,同时显著降低传统合成纳米载体可能引发的全身性免疫毒性风险。其设计理念在于提取特定生物源细胞的天然细胞膜,并将其作为包覆层封装mRNA、siRNA或各类治疗药物。

Cui等^[62]构建了一种用于递送siRNA的CMNPs,该系统利用基因工程化的细胞膜包裹遗传物质,并通过表面修饰功能性的突变蛋白实现对特定受体的识别;更关键的是,其整合了基于凝血酶的酶控膜融合机制,能够在大分子蛋白或酶的触发下直接介导载体膜与细胞膜/内体膜融合,从而实现高效的胞质递送。尽管该研究初衷是利用siRNA沉默实体瘤中的EGFR基因并抑制转移,但其独特的“伪装-靶向-膜融合”设计理念在体内CAR-T制备中展现出巨大的转化潜力。特别是其突破性的酶控胞质释放机制,有效解决了非病毒载体难以逃逸内体捕获的瓶颈问题,这对于需要进入胞质翻译的编码CAR基因的mRNA递送至关重要。此外,该平台的表面配体具有高度的可工程化特性,如果通过将肿瘤靶向配体替换为T细胞特异性抗体(如anti-CD3),将有望赋予仿生纳米囊泡优异的靶向能力。

T-FVLP-mCAR是一种模拟人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)的T细胞特异性融合病毒样颗粒。研究者在其表面表达了经过突变的HIV病毒包膜糖蛋白gp160。改造后的gp160蛋白被赋予了特异性识别并介导与人CD4⁺和CD8⁺T细胞膜融合的能力,有效地将病毒宿主靶向性转化为递送载体的细胞趋向性。同时,其内部通过巧妙利用Peg10衣壳蛋白实现了对编码抗CD19的CAR-mRNA的高效封装与保护^[34]。该策略的独特之处在于,它模拟了病毒的天然感染机制,规避了病毒基因组整合和复制的固有风险,并且降低了毒性^[35]。此外,有研究者使用RAW264.7巨噬细胞衍生的纳米囊泡(FuNVs),并在其表面修饰了基于呼肠病毒或麻疹病毒的CD3靶向融合蛋白。通过识别T细胞表面的CD3分子,FuNVs诱导膜融合并将CAR蛋白直接整合至T细胞膜,从而实现功能性CAR-T细胞的快速制备。由于CAR蛋白会随着时间自然降解,该策略避免了CAR-T细胞的持续性激活,从而显著降低了与之相关的毒副作用风险。动物模型数据进一步证实了其良好的安全性:该疗法未诱导关键炎症细胞

因子(如IL-6)水平升高,有效规避了细胞因子释放综合征(cytokine release syndrome, CRS) CRS的发生。同时,主要器官未见组织毒性,且重复给药后未检测到抗体反应,显示出极低的免疫原性^[59]。

这三项研究不仅验证了仿生纳米颗粒用于体内CAR-T治疗的可行性,也为未来设计下一代具备高生物相容性、环境响应能力及精准靶向功能的非仿生纳米颗粒递送系统提供了思路。

3.2 仿生纳米颗粒递送技术面临的核心挑战及解决策略

尽管仿生纳米颗粒具有天然优势,其临床转化仍面临多重挑战,主要包括规模化生产难度、批次间稳定性以及体内药代动力学限制。(1)规模化生产与批次一致性问题:实现仿生纳米颗粒的高效、批次间均一性且符合GMP标准的规模化生产是临床转化的首要前提。在制备过程中,如何精准控制囊泡大小、表面膜蛋白拓扑结构和膜组分比例,以确保功能活性和重复性,仍是技术瓶颈^[63]。因此,优化CMNPs的制备工艺是解决这一问题的关键,例如近年来,更多的研究者采用精密的微流控系统取代传统的挤出或超声方法,实现CMNPs粒径、形貌和组分分布的均一性控制,提高批次间稳定性。(2)体内非特异性清除与脱靶蓄积:与LNPs类似,CMNPs在静脉注射后将同样面临肝脏、脾脏等主要清除器官的非特异性摄取问题。这种组织滞留效应将显著降低CMNPs在外周血中对T细胞的有效递送比例,并可能引发潜在的脱靶毒性,从而限制其治疗窗口。因此,对仿生纳米颗粒进行进一步的工程化表面修饰,增强主动靶向性,或开发环境响应型设计,在免疫器官局部优先激活是解决这一问题的核心思路。(3)免疫原性与长期安全性:尽管仿生设计降低免疫识别风险,但异源细胞膜成分仍可能诱发潜在免疫反应,尤其重复给药时,这种风险尤为突出。因此,应优先选用自体或通用型源细胞膜(如红细胞、血小板膜),或通过基因编辑去除免疫原性表位,并且在临床前严格评估重复给药后的抗体应答与炎症因子水平。

综上所述,仿生纳米颗粒凭借其天然的生物相容性与优异的免疫逃逸能力,正在重塑体内CAR-T递送的技术格局。然而,该技术的临床转化面临制备工艺以及药代动力学限制等严峻挑战,仍需要不断地研究与探索。未来,随着工程化制备工艺的革

新与智能靶向设计的优化,仿生递送系统有望打破现有壁垒,为开发低成本、现货型的体内CAR-T疗法开辟全新路径。

4 不同载体技术的横向对比及疾病领域应用差异

4.1 不同载体技术的横向对比

体内CAR-T载体递送技术主要分为病毒载体(慢病毒LVs、腺相关病毒AAVs)、非病毒载体(以脂质纳米颗粒LNP为主)以及新兴仿生纳米颗粒三大类。这些技术在递送效率、安全性、表达持久性、生产成本、靶向精准性以及临床转化进度等方面存在显著差异(表2)。病毒载体(如LVs)转导效率高、表达持久,常用于需要长期免疫监视的场景,但面临插入突变风险和生产复杂性高等挑战;腺相关病毒(AAVs)的免疫原性较低、非整合特性提升安全性,但载量有限且易受预存抗体影响;非病毒载体(如LNP)安全性优异、生产易规模化、成本低,且支持重复给药,已借鉴mRNA疫苗经验快速推进临床,但表达相对瞬时且存在肝脏趋向性;仿生纳米颗粒兼具优秀生物相容性和免疫逃逸能力,能有效规避网状内皮系统清除,目前仍处于早期研发阶段,但批次稳定性与规模化生产是主要瓶颈。

4.2 不同递送载体在疾病领域的应用差异与适用场景

不同载体技术在血液肿瘤、实体瘤及自身免疫性疾病中的应用存在明显差异,主要源于疾病微环境、所需CAR表达持久性及安全性需求的不同。

在血液肿瘤领域,病毒载体尤其是LVs优势显著,其持久表达有助于实现长期免疫监视。目前多数体内CAR-T临床试验聚焦于此,已有约7个项目进入I期,主要采用病毒载体平台。例如,Interius的INT2104在澳大利亚和欧洲开展I期试验,初步安全性良好,无严重CRS或ICANS报告;Umoja的UB-VV111在复发/难治性B细胞肿瘤中获得FDA快速通道资格,剂量爬坡期临床数据显示CRS发生率可控、无重度神经毒性;EsoBiotec的ESO-T01的I期临床数据显示,5例经历过多线治疗的复发/难治性多发性骨髓瘤患者在单次静脉输注后,4例达到客观缓解,其中3例为严格完全缓解。非病毒载体也可应用,但其瞬时表达更适合辅助或短期强化治疗,而仿生颗粒仍处于临床前阶段。尽管病毒整合风险需持续监

表2 不同载体类型的横向对比
Table 2 Comparison of different vector types

参数	慢病毒载体(LV)	腺相关病毒(AAV)	脂质纳米颗粒(LNP)	仿生纳米颗粒
递送效率	高(高效感染分裂/非分裂细胞)	中等(具有组织差异)	中等(依赖细胞内吞作用, mRNA 释放与翻译迅速)	中等(高度依赖载体与靶细胞的膜融合效率)
靶向特异性	较低(天然泛嗜化)	中等(具有天然组织嗜性)	高(需主动靶向)	高(天然归巢)
安全性	中等(存在插入突变以及较高的免疫原性)	高(低整合风险,但大剂量易引发肝毒性及预存中和抗体反应)	高(无基因组整合风险、免疫原性低、可重复给药)	高(免疫逃逸能力强、毒性低)
表达持久性	永久(基因组整合)	长期(主要以游离体形式存在)	瞬时或中长期(视载荷不同而定)	瞬时或中长期(视载荷不同而定)
生产成本与规模化	高(需活细胞体系,GMP级大规模扩增与纯化流程复杂)	中等(质量控制难度大,GMP制造成本高)	低(无细胞化学合成体系,微流控易实现规模化)	高(活体细胞膜提取、破碎与均一性包覆极难实现标准化与放大)
临床转化进度	I期(主要为血液肿瘤)	临床前为主	I期(自身免疫、部分肿瘤)	临床前为主
主要优势	持久表达、对分裂期和非分裂期细胞均具有较高的转导效率	低免疫原性、致癌风险低	安全性高、支持多次重复给药、成本低易于规模化生产	生物相容性强、天然归巢、免疫逃逸能力强
主要局限	存在插入突变风险、制备难度大	载量有限、存在预存免疫屏障	瞬时表达、具有肝脏趋向性、靶向性改造难度大	难以实现批次稳定、规模化生产难度极大

控,但早期安全性数据总体优于预期。

实体瘤领域进展相对缓慢,所有载体均面临肿瘤微环境抑制、CAR-T细胞浸润困难及抗原异质性等挑战。目前主要限于临床前或早期I期试验,尚未有体内CAR-T专属项目报告成熟疗效数据,如客观缓解率或微小残留病阴性率。非病毒载体如LNP通过共递送微环境重塑因子显示潜力,可协同降解细胞外基质或阻断抑制信号;病毒载体持久表达有利于长期监视,但脱靶效应及TME抑制显著限制效率;仿生颗粒的免疫逃逸优势有望改善浸润。

在自身免疫性疾病领域,非病毒载体如LNP-mRNA最具优势,其瞬时表达可实现“免疫重置”并避免长期毒性,已率先进入临床。例如,Capstan的CPTX2309于2025年启动I期试验,初步数据显示,给药后可实现B细胞的快速耗竭、无需清淋化疗、CRS发生率低且支持重复给药。

5 总结与展望

本综述系统梳理并剖析了体内CAR-T细胞工程领域的递送技术前沿。我们重点探讨了以脂质纳米颗粒为代表的纳米颗粒递送技术,以及慢病毒、腺相关病毒为代表的病毒载体递送技术的设计原理、机制、进展与挑战。尽管前景广阔,体内CAR-T疗法的全面临床转化仍面临一系列深刻挑战,亟待跨学科

协同攻关。

递送效率与靶向精准性:如何在复杂体内环境中,克服生理屏障与非特异性清除,实现纳米载体对目标T细胞群的高效、精准基因递送,确保生成足量的功能性CAR-T细胞,是当前的核心难题。

疗效持久性与安全性的平衡:mRNA的瞬时表达特性在保障安全性的同时,也限制了其在对抗实体瘤时所需的长期免疫监视能力。开发自扩增RNA、环状RNA等新型技术,以在不牺牲安全性的前提下延长CAR表达时长,成为关键研究方向。

肿瘤微环境的抑制:实体瘤的免疫抑制性TME是主要障碍。未来的递送系统需能促进CAR-T细胞的浸润,并帮助其在乏氧、酸性的恶劣环境中维持功能,甚至协同递送免疫调节因子以重塑TME。

生产工艺与免疫原性:实现规模化、标准化的合规生产,并精确控制载体的免疫原性,是推动该技术迈向临床的先决条件,也是当前亟待攻克产业化难题。规模化生产必须严格遵守GMP(good manufacturing practice)标准,对于病毒载体,要求其滴度达到 $10^{12}\sim 10^{14}$ vg/mL级别,且要求宿主细胞蛋白及DNA残留量低于10 ng/剂、复制型病毒检测(RCR/RCA)须呈阴性;对于非病毒载体,则须严格控制颗粒均一性(PDI<0.2)、核酸封装率(>90%)及内毒素水平。目前,实验室级别的手工微流控或离心制备难以直接放大,常导致颗粒聚集或免疫原性

增加。因此,开发自动化的闭环生产线、推进可电离脂质等核心原料的国产化以控制成本,是弥合基础研究与临床应用差距的必由之路。

随着这些技术挑战的逐步克服,体内CAR-T疗法终将实现其“off-the-shelf”细胞免疫治疗的目标。这种直接在患者体内生成CAR-T细胞的策略,不仅在肿瘤治疗领域展现出更安全、更经济、更高可及性的优势,更在非肿瘤性疾病的精准免疫调控中蕴含巨大潜力。

自身免疫性疾病的深度重置:通过设计靶向致病性自身反应性T或B细胞的CAR,结合瞬时表达的非病毒递送系统,可在体内选择性耗竭或重编程致病免疫细胞,同时避免传统体外CAR-T可能带来的过度免疫抑制和长期毒性风险。该策略有望为系统性红斑狼疮、多发性硬化症、类风湿关节炎、1型糖尿病等难治性自身免疫性疾病提供全新的治疗模式,实现疾病缓解甚至治愈。

诱导器官移植耐受:传统器官移植后需终身使用广谱免疫抑制剂,这会显著增加感染和诱发肿瘤的风险。为解决这一临床困境,通过体内递送技术递送遗传物质,以编码特定嵌合抗原受体或靶向同种异体抗原的抑制性嵌合抗原受体,可在移植受者体内原位生成具有免疫耐受诱导功能的CAR-Treg细胞或iCAR-T细胞(inhibitory chimeric antigen receptor T cells, iCAR-T)。这些细胞能够在移植微环境中特异性抑制抗供者免疫反应,促进移植器官的长期存活,同时保留对病原体 and 肿瘤的正常免疫监视能力。这一策略若与优化后的靶向递送系统相结合,有望从根本上改变器官移植的治疗范式,显著提升移植成功率并改善患者生活质量。

届时,这种更安全、更经济、更具个性化潜力的治疗模式,不仅将改变肿瘤治疗的现有格局,推动肿瘤治疗进入真正的普惠时代,更有望将其应用至自身免疫性疾病、移植耐受诱导、慢性病毒感染乃至再生医学等更为广阔的临床领域,从而开启个体化精准免疫治疗的新纪元。

参考文献

- [1] Gross G, Waks T and Eshhar Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989, 86: 10024–28.
- [2] Li YR, Lyu Z, Chen Y, et al. Frontiers in CAR-T cell therapy for autoimmune diseases. *Trends Pharmacol Sci*, 2024, 45: 839–57.
- [3] Ma, S, Li X, Wang X, et al. Current progress in CAR-T cell therapy for solid tumors. *Int J Biol Sci*, 2019, 15: 2548–60.
- [4] Hunter TL, Bao Y, Zhang Y, et al. *In vivo* CAR T cell generation to treat cancer and autoimmune disease. *Science*, 2025, 388: 1311–17.
- [5] Ernst M, Oeser A, Besiroglu B, et al. Chimeric antigen receptor (CAR) T-cell therapy for people with relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Cochrane Database Syst Rev*, 2021, 9: Cd013365.
- [6] Sterner RC and Sterner RM. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. *Blood Cancer J*, 2021, 11: 69.
- [7] Peng JJ, Wang L, Li Z, et al. Metabolic challenges and interventions in CAR T cell therapy. *Sci Immunol*, 2023, 8: eabq3016.
- [8] Wang X, Fan R, Mu M, et al. Harnessing nanoengineered CAR-T cell strategies to advance solid tumor immunotherapy. *Trends Cell Biol*, 2025, 35: 782–98.
- [9] Gu X, Zhang Y, Zhou W, et al. Infusion and delivery strategies to maximize the efficacy of CAR-T cell immunotherapy for cancers. *Exp Hematol Oncol*, 2024, 13: 70.
- [10] Streibinger D, Frangieh CJ, Friedrich MJ, et al. Cell type-specific delivery by modular envelope design. *Nat Commun*, 2023, 14: 5141.
- [11] Frank AM, Braun AH, Scheib L, et al. Combining T-cell-specific activation and *in vivo* gene delivery through CD3-targeted lentiviral vectors. *Blood Adv*, 2020, 4: 5702–15.
- [12] Coradin T, Keating AL, Barnard AR, et al. Efficient *in vivo* generation of CAR T cells using a retargeted fourth-generation lentiviral vector. *Mol Ther*, 2025, 33: 4953–67.
- [13] Huckaby JT, Landoni E, Jacobs TM, et al. Bispecific binder redirected lentiviral vector enables *in vivo* engineering of CAR-T cells. *J Immunother Cancer*, 2021, 9: e002737.
- [14] Naso MF, Tomkowicz B, Perry WL, 3rd, et al. Adeno-associated virus (AAV) as a vector for gene therapy. *BioDrugs*, 2017, 31: 317–34.
- [15] Nawaz W, Huang B, Xu S, et al. AAV-mediated *in vivo* CAR gene therapy for targeting human T-cell leukemia. *Blood Cancer J*, 2021, 11: 119.
- [16] Bevers S, Kooijmans SAA, Van de Velde E, et al.

- mRNA-LNP vaccines tuned for systemic immunization induce strong antitumor immunity by engaging splenic immune cells. *Mol Ther*, 2022, 30: 3078–94.
- [17] Kenjo E, Hozumi H, Makita Y, et al. Low immunogenicity of LNP allows repeated administrations of CRISPR-Cas9 mRNA into skeletal muscle in mice. *Nat Commun*, 2021, 12: 7101.
- [18] Cullis PR and Hope MJ. Lipid nanoparticle systems for enabling gene therapies. *Mol Ther*, 2017, 25: 1467–75.
- [19] Pilkington EH, Suys EJA, Trevaskis NL, et al. From influenza to COVID-19: Lipid nanoparticle mRNA vaccines at the frontiers of infectious diseases. *Acta Biomater*, 2021, 131: 16–40.
- [20] Schoenmaker L, Witzigmann D, Kulkarni JA, et al. mRNA-lipid nanoparticle COVID-19 vaccines: Structure and stability. *Int J Pharm*, 2021, 601: 120586.
- [21] Miao L, Zhang Y and Huang L. mRNA vaccine for cancer immunotherapy. *Mol Cancer*, 2021, 20: 41.
- [22] Eygeris Y, Gupta M, Kim J, et al. Chemistry of lipid nanoparticles for RNA delivery. *Acc Chem Res*, 2022, 55: 2–12.
- [23] Zong Y, Lin Y, Wei T, et al. Lipid Nanoparticle (LNP) enables mRNA delivery for cancer therapy. *Adv Mater*, 2023, 35: e2303261.
- [24] Hald Albertsen C, Kulkarni JA, Witzigmann D, et al. The role of lipid components in lipid nanoparticles for vaccines and gene therapy. *Adv Drug Deliv Rev*, 2022, 188: 114416.
- [25] Cullis PR and Felgner PL. The 60-year evolution of lipid nanoparticles for nucleic acid delivery. *Nat Rev Drug Discov*, 2024, 23: 709–22.
- [26] Rurik JG, Tombácz I, Yadegari A, et al. CAR T cells produced *in vivo* to treat cardiac injury. *Science*, 2022, 375: 91–96.
- [27] Asperti C, Canarutto D, Porcellini S, et al. Scalable GMP-compliant gene correction of CD4⁺ T cells with IDLV template functionally validated *in vitro* and *in vivo*. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2023, 30: 546–57.
- [28] Ferrari S, Jacob A, Cesana D, et al. Choice of template delivery mitigates the genotoxic risk and adverse impact of editing in human hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2022, 29: 1428–44.e1429.
- [29] Liu KC, Lin BS, Gao AD, et al. Integrase-deficient lentivirus: opportunities and challenges for human gene therapy. *Curr Gene Ther*, 2014, 14: 352–64.
- [30] Andorko JI, Russell RM, Schnepf BC, et al. Targeted *in vivo* delivery of genetic medicines utilizing an engineered lentiviral vector platform results in CAR T and NK cell generation. *Mol Ther*, 2025, 33: 4937–52.
- [31] Nicolai CJ, Parker MH, Qin J, et al. *In vivo* CAR T-cell generation in nonhuman primates using lentiviral vectors displaying a multidomain fusion ligand. *Blood*, 2024, 144: 977–87.
- [32] Mendell JR, Al-Zaidy SA, Rodino-Klapac LR, et al. Current clinical applications of *in vivo* gene therapy with AAVs. *Mol Ther*, 2021, 29: 464–88.
- [33] Challis RC, Ravindra Kumar S, Chen X, et al. Adeno-associated virus toolkit to target diverse brain cells. *Annu Rev Neurosci*, 2022, 45: 447–69.
- [34] Michels A, Frank AM, Günther DM, et al. Lentiviral and adeno-associated vectors efficiently transduce mouse T lymphocytes when targeted to murine CD8. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2021, 23: 334–47.
- [35] Demircan MB, Zinser LJ, Michels A, et al. T-cell specific *in vivo* gene delivery with DART-AAVs targeted to CD8. *Mol Ther*, 2024, 32: 3470–84.
- [36] Sebastiani F, Yanez Arteta M, Lerche M, et al. Apolipoprotein E binding drives structural and compositional rearrangement of mRNA-containing lipid nanoparticles. *ACS Nano*, 2021, 15: 6709–22.
- [37] Da Silva Sanchez AJ, Dobrowolski C, Cristian A, et al. Universal barcoding predicts *in vivo* apoe-independent lipid nanoparticle delivery. *Nano Lett*, 2022, 22: 4822–30.
- [38] Semple SC, Akinc A, Chen J, et al. Rational design of cationic lipids for siRNA delivery. *Nat Biotechnol*, 2010, 28: 172–76.
- [39] Butler JS, Chan A, Costelha S, et al. Preclinical evaluation of RNAi as a treatment for transthyretin-mediated amyloidosis. *Amyloid*, 2016, 23: 109–18.
- [40] Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine. *N Engl J Med*, 2020, 383: 2603–15.
- [41] Wang C, Zhang Y and Dong Y. Lipid nanoparticle-mRNA formulations for therapeutic applications. *Acc Chem Res*, 2021, 54: 4283–93.
- [42] Billingsley MM, Singh N, Ravikumar P, et al. Ionizable lipid nanoparticle-mediated mRNA delivery for human CAR T cell engineering. *Nano Lett*, 2020, 20: 1578–89.
- [43] Tenchov R, Bird R, Curtze AE, et al. Lipid nanoparticles—from liposomes to mRNA vaccine delivery, a landscape of research diversity and advancement. *ACS Nano*, 2021, 15: 16982–7015.
- [44] Sahay G, Querbes W, Alabi C, et al. Efficiency of siRNA delivery by lipid nanoparticles is limited by endocytic recycling. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 653–58.
- [45] Bimbo JF, van Diest E, Murphy DE, et al. T cell-specific

- non-viral DNA delivery and *in vivo* CAR-T generation using targeted lipid nanoparticles. *J Immunother Cancer*, 2025, 13: e011759.
- [46] Tilsed CM, Sadiq BA, Papp TE, et al. IL7 increases targeted lipid nanoparticle-mediated mRNA expression in T cells *in vitro* and *in vivo* by enhancing T cell protein translation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2024, 121: e2319856121.
- [47] Panova EA, Kleymenov DA, Shcheblyakov DV, et al. Single-domain antibody delivery using an mRNA platform protects against lethal doses of botulinum neurotoxin A. *Front Immunol*, 2023, 14: 1098302.
- [48] Herrera-Barrera M, Ryals RC, Gautam M, et al. Peptide-guided lipid nanoparticles deliver mRNA to the neural retina of rodents and nonhuman primates. *Sci Adv*, 2023, 9: eadd4623.
- [49] Gamboa L, Zamat AH, Thiveaud CA, et al. Sensitizing solid tumors to CAR-mediated cytotoxicity by lipid nanoparticle delivery of synthetic antigens. *Nat Cancer*, 2025, 6: 1073–87.
- [50] Murad JP, Christian L, Rosa R, et al. Solid tumour CAR-T cells engineered with fusion proteins targeting PD-L1 for localized IL-12 delivery. *Nat Biomed Eng*, 2026, 10: 613–29.
- [51] Steffin D, Ghatwai N, Montalbano A, et al. Interleukin-15-armoured GPC3 CAR T cells for patients with solid cancers. *Nature*, 2025, 637: 940–46.
- [52] Wang S, Li Y, Xu C, et al. An oncolytic vaccinia virus encoding hyaluronidase reshapes the extracellular matrix to enhance cancer chemotherapy and immunotherapy. *J Immunother Cancer*, 2024, 12: e008431.
- [53] Li N, Rodriguez J L, Yin Y, et al. Armored bicistronic CAR T cells with dominant-negative TGF- β receptor II to overcome resistance in glioblastoma. *Mol Ther*, 2024, 32: 3522–38.
- [54] Kloss CC, Lee J, Zhang A, et al. Dominant-negative TGF- β receptor enhances PSMA-targeted human CAR T cell proliferation and augments prostate cancer eradication. *Mol Ther*, 2018, 26: 1855–66.
- [55] Billingsley MM, Gong N, Mukalel AJ, et al. *In vivo* mRNA CAR T cell engineering via targeted ionizable lipid nanoparticles with extrahepatic tropism. *Small*, 2024, 20: e2304378.
- [56] Meng S, Hara T, Sato T, et al. Targeting fibroblast activation protein in solid tumors via LNP-mediated CAR-mRNA delivery promotes durable regression in murine models. *Sci Rep*, 2025, 16: 1624.
- [57] Leborgne C, Barbon E, Alexander JM, et al. IgG-cleaving endopeptidase enables *in vivo* gene therapy in the presence of anti-AAV neutralizing antibodies. *Nat Med*, 2020, 26: 1096–101.
- [58] Kang DD, Hou X, Wang L, et al. Engineering LNPs with polysarcosine lipids for mRNA delivery. *Bioact Mater*, 2024, 37: 86–93.
- [59] Zhao G, Zhang Y, Xu CF, et al. *In vivo* production of CAR-T cells using virus-mimetic fusogenic nanovesicles. *Sci Bull*, 2024, 69: 354–66.
- [60] Zhang P, Rashidi A, Zhao J, et al. STING agonist-loaded, CD47/PD-L1-targeting nanoparticles potentiate antitumor immunity and radiotherapy for glioblastoma. *Nat Commun*, 2023, 14: 1610.
- [61] Papp TE, Zeng J, Shahnawaz H, et al. CD47 peptide-cloaked lipid nanoparticles promote cell-specific mRNA delivery. *Mol Ther*, 2025, 33: 3195–208.
- [62] Cui L, Cui Y, Liu J, et al. Bioengineered nanovesicles for efficient siRNA delivery through ligand-receptor-mediated and enzyme-controlled membrane fusion. *Nat Commun*, 2025, 16: 6174.
- [63] Zhang Z, Ma B, Li B, et al. Cardiolipin-mimic lipid nanoparticles without antibody modification delivered senolytic *in vivo* CAR-T therapy for inflamm-aging. *Cell Rep Med*, 2025, 6: 102209.