

体内嵌合抗原受体 T 细胞 (*in vivo* CAR-T) 研究进展及非临床研究一般考虑

周宇, 张旻, 闫莉萍

(国家药品监督管理局药品审评中心, 北京 100022)

[摘要] 体外嵌合抗原受体 T 细胞 (*ex vivo* CAR-T) 在改善血液系统恶性肿瘤 (尤其是 B 细胞恶性肿瘤) 方面显示出卓越的治疗潜力, 但其广泛应用面临巨大挑战, 包括体外制造工艺复杂、生产成本高昂等因素。近年来, 随着 RNA 药物、靶向递送系统等领域的快速发展, 体内嵌合抗原受体 T 细胞 (*in vivo* CAR-T) 作为一种创新策略应运而生。*in vivo* CAR-T 通过病毒载体或脂质纳米颗粒 (LNPs) 等靶向递送系统, 将编码 CAR 的遗传物质直接导入患者体内, 实现体内 T 细胞工程化改造, 这一策略从根本上省去了繁琐的体外细胞操作步骤和传统的化疗预处理环节。本研究系统梳理了 *in vivo* CAR-T 的技术进展与非临床研究考虑。*in vivo* CAR-T 兼具基因治疗与细胞治疗的双重属性, 涉及多种递送载体, 类型多样, 机制复杂, 其非临床研究可遵循基于风险、个案处理的原则, 在现有相关技术指导原则框架下, 合理设计并开展非临床研究, 以获取科学规范的试验数据来支持开展临床试验和批准上市。

[关键词] 体内嵌合抗原受体 T 细胞 (*in vivo* CAR-T); 非临床研究; 病毒载体; LNP 载体

[中图分类号] R915.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2095-3593(2025)06-0409-07

Research Progress and General considerations on Nonclinical Evaluation of *In Vivo* Chimeric Antigen Receptor (CAR)-T Cell Therapy

ZHOU Yu, ZHANG Min, YAN Liping

(Center For Drug Evaluation, NMPA, Beijing 100022, China)

[Abstract] Chimeric antigen receptor (CAR)-T cell therapy has demonstrated significant therapeutic potential in hematologic malignancies (particularly B-cell malignancies). However, its broad application faces considerable challenges, including complex *ex vivo* manufacturing processes and high production costs. In recent years, with rapid advancements in RNA therapeutics and targeted delivery systems, *in vivo* generation of chimeric antigen receptor T cells (*in vivo* CAR-T) has emerged as an innovative strategy. This approach utilizes viral vectors or lipid nanoparticles (LNPs) as targeted delivery systems to directly introduce genetic material encoding the CAR into patients, enabling *in vivo* T cell engineering. This strategy fundamentally eliminates the need for cumbersome *ex vivo* cell manipulation steps and traditional chemotherapy-based preconditioning regimens. This article systematically reviews the technological progress and non-clinical research considerations for *in vivo* CAR-T. As *in vivo* CAR-T combines attributes of both gene therapy and cell therapy, involves diverse delivery vectors, and exhibits varied types and complex mechanisms, its nonclinical studies can be guided by risk-based, case-by-case principles. Within the framework of existing relevant technical guidelines, scientifically sound nonclinical studies should be rationally designed and conducted to generate robust experimental data supporting clinical trials and marketing approval.

[Key Words] *In vivo* CAR-T; Non-clinical research; Viral vector; LNP vector

近年来,随着生物技术的发展,免疫治疗领域发生了重大变革,在这其中,CAR-T 因其在血液系统恶性肿瘤治疗中取得的变革性成功而广受关注^[1]。目前获批上市的 CAR-T 药物均为体外细胞产品 (*ex vivo*

CAR-T), 涉及从患者体内采集 T 细胞、体外基因工程改造、扩增以及最终回输等多个步骤, 整个过程耗时较长且需要高度专业化的设施^[2,3]。此外, 患者在接受 CAR-T 治疗前还需要进行淋巴清除化疗, 这不仅增加了治疗复杂性, 还带来了额外的副作用^[4]。这些因素共同导致患者等待治疗时间延长, 治疗成本高昂, 极大地限制了该技术的可及性。因此, 该领域一

[作者简介] 周宇, 男, 主管药师, 研究方向: 药品技术审评。

***[通信作者]** 闫莉萍, 女, 主任药师, 研究方向: 药品技术审评。

直在不断创新,以克服这些局限,充分发挥 CAR-T 的潜力。

从 *ex vivo* CAR-T 开发中获得的关键经验,推动了体内嵌合抗原受体 T 细胞(*in vivo* CAR-T)的研发进程。*in vivo* CAR-T 通过递送编码 CAR 的核酸直接对机体免疫细胞进行 CAR 工程改造,可简化和标准化复杂的体外 CAR-T 细胞制造过程,省去了限制可及性的物流环节,避免了基于化疗的清淋预处理,从而为充分释放 CAR 技术的潜力(包括应用于安全性要求更高的适应证)提供了可能。随着 *in vivo* CAR-T 技术平台的不断创新和突破,并在临床研究中显示出良好疗效,我国在此新兴领域迅速跟进,已有多家企业进行了研发布局,数个产品向监管机构递交了临床试验申请前沟通交流。此类产品以基因产品形式进行给药,体内的药效作用物质为基因修饰细胞,且涉及病毒、纳米脂质体等多种类型载体,其非临床药理学、药代动力学以及安全性研究与常规基因治疗药物和细胞治疗药物相比更为复杂,这给 *in vivo* CAR-T 的开发带来了挑战。本研究基于对此类产品研发现状的调研和梳理分析,提出非临床研究的一般考虑,旨在抛砖引玉,引发研究者对此领域非临床研究的若干思考,为未来相关的科学研究与讨论提供思路。

1 *in vivo* CAR-T 研究进展

in vivo CAR-T 源于 RNA 药物、纳米技术、病毒学和 CAR 疗法等多个领域的交叉融合。目前,两种 *in vivo* CAR-T 技术平台正处于临床转化阶段:一种是基于工程化病毒载体的平台,可实现载荷在基因组中的整合,在需要较高药效以实现临床疗效的适应证中可能具有优势;另一种是基于脂质纳米颗粒(LNPs)载体的平台,可实现载荷的瞬时表达,这在安全性要求更高的适应证中可能具有优势。

1.1 工程化病毒载体

病毒载体作为 *in vivo* CAR-T 的核心技术之一,主要通过工程化慢病毒、 γ -逆转录病毒或腺相关病毒载体实现 CAR 基因在患者 T 细胞内的精准递送。早期研究发现,利用靶向 CD8 的慢病毒载体在小鼠模型中成功生成 CAR-T 细胞,证实了体内定向 T 细胞基因转导的可行性^[5]。这些工作奠定了病毒载体的核心机制——通过修饰病毒包膜(如尼帕病毒糖蛋白或 VSV-G 蛋白)实现 T 细胞特异性靶向,避免非目标细胞摄取,从而提高转导效率和安全性^[6]。关键进展包括消除天然受体结合、引入高亲和力结合剂以及优化融合元件,以促进基因组整合和持久 CAR

表达。

近年来,病毒载体技术显著优化,聚焦于提高靶向性、稳定性和可控性。工程化策略包括:采用 CD3/CD8 或 CD4 特异性结合策略实现 T 细胞亚群选择性转导;整合“不要吃我”信号(如 CD47)减少巨噬细胞对载体的消耗;以及开发新型假型化包膜以增强血清稳定性^[7]。多家公司已推动病毒载体平台进入临床阶段:Interius BioTherapeutics 的 INT2104(靶向 CD7 的慢病毒载体)在非人灵长类动物和人源化小鼠模型中显示出特异性 T 细胞转导和 B 细胞耗竭,并于 2024 年启动 I 期试验^[8-10];Umoja Biopharma 的 VivoVec 平台通过共刺激配体(如 CD80/CD58)与抗 CD3 scFv 融合,模拟抗原呈递细胞功能,在非人灵长类动物中实现高达 65% 的 CAR-T 生成^[11,12];EsoBiotec 的靶向 TCR $\alpha\beta$ 的慢病毒载体在多发性骨髓瘤患者中诱导快速完全缓解,初步显示了临床疗效^[13]。这些进展凸显了病毒载体的高效靶向基因转导特性。

尽管病毒载体研究进展迅速,但仍面临诸多挑战:规模化生产存在巨大的技术难度;整合型载荷可能导致 CAR-T 细胞过度扩增或持续存在,引发细胞因子释放综合征(CRS)、神经毒性(ICANS)或迟发性毒性;需长期监测致癌性风险;针对某些病毒成分的免疫原性也可能影响该类产品的应用和重复给药。未来优化方向包括:开发细胞谱系特异性启动子或自杀开关以增强可控性;探索双特异性靶向策略(如 CD3/CD8 组合)提高精准度;以及结合基因编辑技术(如 CRISPR)实现更安全的基因组整合。

1.2 LNP 载体

LNP 载体通过脂质纳米颗粒递送 RNA 载荷,实现免疫细胞的瞬时工程化,从而克服传统 *ex vivo* CAR-T 在制造复杂性、可扩展性和安全性方面的局限。该平台的核心优势在于其非整合特性,允许通过重复给药精确控制 CAR 表达水平,避免基因组插入风险,并适用于安全性要求高的适应证,如自身免疫性疾病。近年来,借助 COVID-19 疫情期间 mRNA-LNP 疫苗的技术积累,LNP 载体在脂质设计、靶向策略和载荷优化方面取得显著进展,例如通过可电离脂质的改进降低免疫原性,并利用抗体功能化实现细胞选择性递送,为体内免疫工程提供了高度模块化工具^[14]。

在研究进展方面,基于 LNP 载体的体内 CAR-T 细胞工程平台可根据其递送系统的靶向策略分为两大类:一类依赖脂质纳米颗粒(LNPs)的天然组织和

细胞嗜性,另一类则为靶向修饰的 LNP (tLNPs), 依赖细胞选择性靶向抗体, 精确导向 T 细胞亚群, 增强递送特异性和效率。Myeloid Therapeutics 利用髓系细胞嗜性 LNP 递送 CAR mRNA^[15], 其候选产品 MT-302 (靶向 TROP2) 和 MT-303 (靶向 GPC3) 已进入 I 期临床试验, 初步数据显示具有一定抗肿瘤活性, 及可控的细胞因子释放综合征; Capstan Therapeutics 则开发了靶向 LNP (tLNP), 通过抗 CD8 抗体实现 T 细胞特异性工程化, 在非人灵长类动物中实现深度 B 细胞耗竭、初始 B 细胞重新填充, 并计划应用于自身免疫性疾病^[16,17]; Orna Therapeutics 创新性地采用环状 RNA 载荷 (抗 CD20 和抗 CD19 CAR), 结合免疫嗜性 LNP, 在啮齿类和非人灵长类动物模型中实现单次给药后持久的 B 细胞耗竭^[18,19]。这些进展凸显了 LNP 载体在协同利用多种免疫细胞 (如 T 细胞、髓系细胞、自然杀伤细胞) 方面的灵活性, 以及通过高通量筛选和人工智能优化脂质组合提升递送效率的趋势。

LNP 载体应用前景广阔, 但其临床转化仍面临挑战, 包括制剂的免疫原性、急性输注反应风险以及非靶细胞转导可能导致的脱靶毒性等。未来发展方向需聚焦于进一步优化脂质配方以支持重复给药, 同时增强组织特异性, 并探索载荷多样化 (如联合递送免疫调节因子) 以提升载体安全性。

2 总体考虑

in vivo CAR-T 通过递送遗传物质至体内细胞, 在体生成 CAR-T, 属于基因治疗药物; 从药效作用物质和作用机制来看, 其通过体内生成的基因修饰细胞发挥治疗作用。*in vivo* CAR-T 兼具基因治疗药物和细胞治疗药物双重属性, 其非临床研究除了关注基因治疗和细胞治疗属性外, 还应特别关注其独特的“体内生成”属性所带来的新挑战。因此在参考国家药品监督管理局药品审评中心发布的《基因治疗产品非临床研究与评价技术指导原则 (试行)》《细胞治疗产品研究与评价技术指导原则 (试行)》《基因修饰细胞治疗产品非临床研究技术指导原则 (试行)》等指导原则的同时, 应遵循“基于风险”和“个案处理”的原则, 科学合理设计、开展非临床研究, 以探索药物的靶向基因转导药理作用, 充分暴露其在靶毒性、脱靶毒性以及递送载体相关的风险, 从而保障受试者安全。

3 非临床研究内容

3.1 动物种属

通常, *in vivo* CAR-T 需考虑采用相关动物种属开

展非临床研究。选择相关动物种属时应考虑产品到达靶部位或靶细胞的可行性/易感性, 动物靶细胞的生物分布或生物学功能与人的相似性, 荷载基因及其表达产物或转导产物的生物学功能与人的相似性。通常, 此类产品的病毒载体靶向膜蛋白、LNP 偶联的靶向抗体、以及所荷载的基因可能具有种属特异性。若产品具有高度人特异性, 无相关动物种属时, 可能需要考虑采用人源化动物和/或采用替代产品开展非临床研究。免疫缺陷小鼠 (如 NSG, NCG) 通过植入人免疫细胞 (PBMC) 或干细胞 (CD34⁺) 建立人源化动物模型, 在此类模型中可采用临床拟用样品开展非临床研究, 但该模型存在移植物抗宿主病 (GvHD)、免疫系统不完整等问题; 食蟹猴与人在生理、代谢和免疫系统具有一定的相似性, 具备完整的免疫系统, 有助于更全面地评估靶向/脱靶风险和免疫原性/免疫毒性, 但在此类模型中需采用替代产品开展试验, 不能充分代表临床拟用样品, 因而可能无法充分暴露其毒性风险, 其毒性耐受剂量不适合作为拟定临床起始剂量的依据。鉴于动物试验开展存在困难, 多个在研产品采用了药理、生物分布和毒性研究一体化设计。

3.2 药理学

在研 *in vivo* CAR-T 产品均开展了包括体外和体内药理/药效学试验在内的概念验证研究。体外试验一般会围绕基因转导特异性、基因转导效率、CAR 的特异选择性、功能活性等开展。靶向递送方面, Interi-us BioTherapeutics 公司的候选药物 INT2104 采用靶向 CD7 的慢病毒载体, 旨在递送 CAR20 转基因 (编码抗 CD20 CAR 构建体), 用于治疗 B 细胞恶性肿瘤^[8-10], INT2104 处理人外周血单个核细胞后, 采用数字 PCR 等技术证实载体可成功转导 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞, 且转导效率与体外制备的传统 CAR-T 细胞相当, 验证了其递送系统的效率; EsoBiotec/深圳普瑞金联合开发的 ESO-T01 为基于慢病毒载体的抗 BCMA CAR 产品, 用于治疗多发性骨髓瘤, 将 ESO-T01 处理的免疫细胞与多发性骨髓瘤细胞系共培养后, 可见剂量依赖性的肿瘤细胞杀伤作用, 并与细胞毒性因子 (如颗粒酶 B) 的释放相关, 初步证明了其功能性^[13]。Umoja Biopharma 的 VivoVec 系统研究则更进一步, 不仅验证了 CAR-T 细胞对肿瘤细胞的杀伤能力, 还特别设计了连续再刺激试验, 即反复多次将 CAR-T 细胞与新鲜肿瘤细胞共培养, 结果显示, 与缺乏共刺激信号的对照组 (仅含 anti-CD3 scFv) 相比, 含有 CD80/CD58 共刺激分子的 VivoVec 系统所

产生的 CAR-T 细胞能够持续抑制肿瘤生长,表现出更强的持久性^[11,12]。

体内试验则重点关注 CAR-T 细胞的生成效率、扩增动力学、功能活性、持久性以及安全性指标等。通过检测外周血和组织中 CAR 表达细胞的百分比及绝对数量,以评估 T 细胞生成效率;通过监测靶细胞(如 B 细胞)耗竭程度、肿瘤负荷变化(通过影像学或生物标志物)和细胞因子释放(如 IL-6、IFN- γ)来验证功能活性;通过长期观察 CAR-T 细胞的持续存在与记忆表型形成来考察持久性。尽管人源化小鼠非常适合作为体内 CAR 递送的概念验证模型,但大型动物模型(如 NHPs)被证明对临床转化至关重要,非人灵长类动物模型在指导平台、产品和给药方案优化方面发挥了关键作用^[11,20,21]。复旦大学开发的荷载环装 RNA 的 *in vivo* CAR 产品,分别在 BALB/c 小鼠(OVA 诱导哮喘模型)、BALB/c 或 C57BL/6 小鼠(表达人 HER2 的 MC38-HER2、CT26-HER2 等同种移植瘤模型)、MRL/MpJ-Fas^{lpr} 小鼠(系统性红斑狼疮模型)、17 月龄衰老小鼠和食蟹猴中进行了概念验证研究。研究者分别构建了抗人 CD19 CAR (circRNA^h-CD19-CAR)、抗鼠 CD19 CAR (circRNA^mCD19-CAR) 和抗 HER2 CAR,在鼠中使用了上述 3 种 CAR,而在食蟹猴中则使用了抗人 CD19 CAR。在鼠中, circRNA-CAR 可抑制肿瘤生长,改善哮喘相关指标,并逆转衰老表型,在食蟹猴中, circRNA-CAR 可导致 B 细胞耗竭,并持续约 40 ~ 50 d^[22,23]。Umoja Biopharma 开发的 VivoVec 为表面工程化慢病毒载体平台,其载体系统可表达多结构域融合蛋白(抗 CD3 scFv、CD80 和 CD58),从而实现靶向 T 细胞的高特异性, VivoVec 载体携带抗 CD19 CAR 在人源化小鼠(NSG MHC I/II KO 小鼠植入 PBMC)移植瘤模型中可实现肿瘤完全清除以及生存期延长;在食蟹猴中, VivoVec 载体采用抗 NHP CD3 scFv 替代抗人 CD3 scFv,保留 CD80 和 CD58 的人源胞外结构域(人和 NHP 序列高度同源),并选择靶向 NHP 与人类交叉反应表位的抗 CD20 CAR,结果显示, VivoVec 载体携带抗 CD20 CAR 在食蟹猴中可生成 CAR-T 细胞(占循环 T 细胞的 65%),并导致 B 细胞完全耗竭,持续达 76 d^[11,12]。

3.3 药代动力学

3.3.1 生物分布

in vivo CART 的生物分布研究旨在确定载体和转基因细胞在体内的分布模式,包括靶向器官、组织或细胞类型,以及潜在的脱靶分布,这有助于评估其

靶向特异性、安全性和有效性。在研产品的生物分布研究包括独立开展,以及结合药理学和/或毒理学试验开展等不同形式。VivoVec 平台首个研发项目 UB-VV111 编码靶向 CD19 的 CAR,同时携带雷帕霉素激活的细胞因子受体(RACR),研究者开展了一系列生物分布试验。NHP 淋巴结(IN)和静脉注射(IV)给予替代产品,IN 给药后,血液中未检测到载体 RNA, IV 给药后,血液中的载体 RNA 迅速达到峰值浓度(约在注射后 5 min),2 h 后,不足峰值的 5%。在表达 LDL-R (VivoVec 载体潜在结合配体)的组织(肝、肾上腺、肺、肾、结肠)中分离人原代细胞,未见荷载基因转导。在犬中采用与犬 T 淋巴细胞无靶向结合的受试物进行了 IN 或 IV 给药 8 周生物分布试验,以探索脱靶基因转导。结果显示,IN 和 IV 给药,病毒载体转导仅限于免疫器官的免疫细胞,未观察到其他组织的非特异转导;且 8 周时任何器官均未观察到可量化的荷载基因转导。在 CD34 + 人源化 NSG 小鼠 13 周毒理学试验中整合了生物分布研究,UB-VV111 载体基因组整合呈剂量依赖性,且随时间减少,肝脏和脾脏中载体含量最高,转导细胞主要为免疫细胞,包括小鼠巨噬细胞或人 T 细胞^[24,25]。

3.3.2 脱落

尽管目前 *in vivo* CAR-T 多使用复制缺陷型病毒,但研究者仍在生物分布等非临床研究中对病毒的脱落进行了检测。如非人源化 NSG 小鼠静脉(IV)或腹膜内(IP)注射给予 UB-VV111 后的各时间点,在粪便中均未检测到载体 RNA 基因组^[25]。

3.4 安全性

3.4.1 安全药理学

已上市 CAR-T 产品的主要毒性反应包括免疫效应细胞相关神经毒性综合征(ICANS)。另外,此类产品所采用的载体也可能对重要生理功能(如心血管、呼吸和中枢神经系统)具有非预期影响。因此可基于产品特点、临床适应证等考虑开展安全药理学研究。Capstan Therapeutics 在介绍其靶向 LNPs (tLNPs)平台的安全性时^[16,17],特别强调食蟹猴静脉注射 tLNPs 制剂后,未观察到中枢神经系统症状或癫痫发作。

3.4.2 一般毒理学

现有研究显示,*in vivo* CAR-T 的一般毒性反应主要为靶向免疫反应放大导致的毒性反应,脱靶免疫反应导致的毒性反应,脱靶基因转导导致的毒性反应以及递送载体相关的生物安全性、免疫原性/免疫毒性、组织趋向毒性等。*in vivo* CAR-T 可根据产品类型和

临床适应证参考 ICH S9、ICH M3、《基因治疗产品非临床研究评价技术指导原则(试行)》等相关指导原则开展一般毒理学试验。此类产品的体内存续以及药效作用持久,设计试验时需考虑 CAR⁺ 细胞的药代动力学指标,以充分评价毒性反应持续时间和可逆性。

如前述相关动物种属内容,此类产品通常需采用人源化动物或替代产品开展一般毒性试验。人源化小鼠和非人灵长类动物各有优缺点,对于此类高风险产品,有研究者通过多项研究对毒性风险进行了评估。

若产品采用了全新的病毒载体,需考虑生物安全性,在开发早期可关注国家出台的一系列生物安全法规和政策。如涉及到全新的辅料(如 LNP 新组分),可考虑参考辅料的相关指导原则对新组分的毒性风险进行研究。

UB-VV111 在 CD34 + 人源化 NSG 小鼠中采用临床拟用样品开展了单次腹腔或静脉给药观察 13 周的 GLP 毒理学试验,同时在猴和犬中开展的生物分布研究中,同时进行了一定的安全性观察,为毒性风险评估提供了多方证据^[25]。Capstan 公司开发的负载抗 CD19 CAR 的 tLNPs 制剂采用食蟹猴开展了安全性研究。由于抗 CD19 CAR 对食蟹猴 B 细胞缺乏交叉反应性,选择了抗 CD20 CAR 作为替代产品(CD8-L289-tLNP-CD20)^[16,17]。ESO-T01 采用荷瘤(多发性骨髓瘤细胞 NCI-H929)人源化(移植人 CD34⁺ 造血干细胞)小鼠开展了体内研究,该研究为一体化试验设计,整合了药理学(抗肿瘤活性)、药代动力学(CAR-T 细胞扩增和分布)和毒理学(细胞因子释放等)评估^[13]。

3.4.3 免疫原性和免疫毒性

基于病毒载体和 LNP 载体的 *in vivo* CAR-T 均具有潜在免疫原性。对于病毒载体,多种因素可影响其免疫原性,包括病毒载体本身的成分、表达产物以及宿主的预存抗体等,在早期产品设计中尽量降低免疫原性以减少对 *in vivo* CAR-T 有效性和安全性的影响。如 INT2104 通过对 VSV-G 蛋白进行工程化改造(氨基酸替换减少脱靶结合)以增强其在血液中的稳定性^[8,9],VivoVec 颗粒采用 Cocal 融合病毒糖蛋白(假型/伪型化)以抵抗人血清的灭活作用,从而提高体内稳定性^[11,12]。对于 LNP 载体,因外源 RNA 本身和 LNP 均有可能诱导机体的固有免疫反应,同时该方法为瞬时工程化,可能需要重复给药以实现足够暴露,因此产品的免疫原性可能成为限制因素,有产品

通过环化 RNA(circRNA)以降低免疫原性并延长体内的表达持续时间^[22,26]。总之,*in vivo* CAR-T 在非临床安全性研究中进行全面的免疫原性评估至关重要,因为这直接关系到产品的安全性、有效性和临床转化潜力。

ex vivo CAR-T 已累积大量临床数据,治疗相关不良事件主要为免疫毒性反应,包括细胞因子释放综合征(CRS)、免疫效应细胞相关神经毒性综合征(ICANS)、免疫效应细胞相关噬血细胞综合征样综合征(IEC-HS)、中性粒细胞减少症,以及与低丙种球蛋白血症相关的 B 细胞耗竭,这些毒性主要源于 CAR-T 细胞在体内的过度激活、非特异性靶向或长期作用。而 *in vivo* CAR-T 通过直接在体内递送编码 CAR 的基因而生成 CAR-T 细胞,其安全性风险更为复杂:一方面,病毒载体的 CAR 序列在基因组中永久整合,可能出现 CAR-T 细胞活化、扩增和再扩增,引发免疫过度激活;另一方面,瞬时表达特性(如 LNP 平台)虽可能降低长期毒性,但重复给药或高剂量下仍可能诱发急性炎症反应。因此,开展系统的免疫毒性研究至关重要,通过早期识别 CRS 和神经毒性等信号,从而为临床试验设计提供安全性依据。Kelson Therapeutics 开发的 KLN-1010 采用 CD3 靶向慢病毒载体,编码全人源抗 BCMA CAR,非临床安全性研究数据显示,未见 CRS 或神经毒性^[27,28];Capstan Therapeutics 的 tLNPs 制剂在食蟹猴中虽未引起中枢神经系统症状或癫痫,却观察到 1 例 IEC-HS,提示即使短期 CAR 表达也可能触发全身性免疫反应。

3.4.4 遗传毒性

已有文献报道,采用整合病毒载体的 *ex vivo* CAR-T 具有整合插入突变导致的致癌性风险^[29-31],而对于 *in vivo* CAR-T,由于体内环境更为复杂,比如载体(如慢病毒)整合可能影响非靶细胞(如造血干细胞)等,因此研究者通常会将遗传毒性研究作为评估 *in vivo* CAR-T 安全性的核心环节。比如 UB-VV111 在非临床研究中开展了遗传毒性风险评估。结果显示,UB-VV111 的载体拷贝数(VCN)较低,平均每个 CAR-T 细胞仅 1.77 个拷贝,且整合插入位点分布类似于已上市的慢病毒载体 *ex vivo* CAR-T,表现为低频整合于重复基因组区域,并倾向于内含子区域(而非启动子或外显子)。对于采用非整合病毒载体(如腺相关病毒载体、LNP 载体)的 *in vivo* CAR-T 因非整合特性可能具有较低的遗传毒性风险,但仍需考虑可能导致遗传毒性风险的因素(如环状 RNA, LNP

脂质成分等),必要时需考虑开展相应的遗传毒性试验。

3.4.5 致癌性

通常,需根据产品特征、临床适应证考虑评估致癌性风险。当标准致癌性试验不可行时,可考虑采用体外、体内等多种证据对其致癌性风险进行综合评估。证据可来自于如下数据:载体整合特性;靶向/脱靶转导特;药物靶点和药理作用通路与肿瘤发生发展的相关性;非临床和临床研究的长期监测数据;生产体系中可能存在的潜在致癌风险;AI 预测等。

3.4.6 生殖毒性

in vivo CAR-T 产品需根据产品特性、作用机制、临床适应症和拟用人群、一般毒理学试验中的发现、生物分布等信息考虑评估潜在的生殖和发育毒性风险。病毒载体产品需关注生殖系传递风险,当其在性腺持续存在时,需考虑进一步研究其在生殖细胞(例如卵母细胞、精子)的暴露水平,如有暴露,开展生殖系传递试验。基于 LNP 载体的产品虽基因整合风险低,但仍需评估 LNP 的组织嗜性所引起的潜在生殖/发育毒性风险。

3.4.7 制剂安全性

in vivo CAR-T 需基于给药途径,采用终产品制剂开展合适的制剂安全性研究。

3.4.8 平台技术产品研发的考虑

in vivo CAR-T 的研发中可能涉及相同递送载体的平台技术,目前监管机构虽常收到关于此类平台技术的沟通交流申请,但其界定标准非常严格,需基于载体特性、生产工艺、质量属性,并结合同一平台下其他产品的开发进程,进行药学、药理毒理、临床等多专业的综合评估。目前,鉴于 *in vivo* CAR-T 采用同平台技术荷载不同的 CAR 基因,CAR 相关“在靶”和“脱靶”风险差异较大,笔者认为此类产品可能不适合基于平台技术进行监管。然而,同一平台技术产品可能在载体生物分布、安全性等方面实现一定程度上的研究数据共享。

4 结语与展望

in vivo CAR-T 作为新兴技术,通过病毒载体或 LNP 载体平台实现体内免疫细胞工程化,有望克服传统 *ex vivo* CAR-T 在制造复杂性、可扩展性和安全性方面的局限,然而其“体内生成”的特性也带来远比传统产品更加复杂的研究与评价挑战,因此,开展系统且严谨的非临床研究将有助于推动该技术从概念走向临床应用。*in vivo* CAR-T 兼具基因治疗和细胞

治疗产品双重属性,同时涉及到不同类型的递送载体,应遵循“基于风险”、“和“个案处理”的原则开展科学合理的非临床研究,以评价药理/药效作用,毒性风险特征,以及与药物暴露/生物分布之间的关系,随着医药创新的不断发展,未来预计会出现更多新型递送载体,更多类型的靶向识别技术,以及更广泛的适应证拓展。本研究中的相关考虑仅代表研究者当前的认识。研究者和监管方应紧跟研究进展,共同探索合理的非临床研究与评价策略,在积极促进药物研发的同时,切实保障用药安全有效。

参考文献

- [1] Cappell KM, Kochenderfer JN. Long-term outcomes following CAR T cell therapy: what we know so far[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2023, 20(6): 359-371.
- [2] Mikhael J, Fowler J, Shah N. Chimeric antigen receptor T-cell therapies: barriers and solutions to access[J]. JCO Oncol Pract, 2022, 18(12): 800-807.
- [3] Sterner RC, Sterner RM. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies[J]. Blood Cancer J, 2021, 11(4): 69.
- [4] Lickefett B, Chu L, Ortiz-Maldonado V, et al. Lymphodepletion—an essential but undervalued part of the chimeric antigen receptor T-cell therapy cycle[J]. Front Immunol, 2023, 14: 1303935.
- [5] Zhou Q, Schneider IC, 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.
- [6] Anliker B, Abel T, Kneissl S, et al. Specific gene transfer to neurons, endothelial cells and hematopoietic progenitors with lentiviral vectors[J]. Nat Methods, 2010, 7(11): 929-935.
- [7] Ho N, Agarwal S, Milani M, et al. *In vivo* generation of CAR T cells in the presence of human myeloid cells[J]. Mol Ther Methods Clin, 2022, 26: 144-156.
- [8] 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[J]. Mol Ther, 2025, 33(10): 4937-4952.
- [9] Russell RM, Boral D, Andorko JI, et al. Rational design of a detargeted vesiculovirus fusogen to enable targeted *in vivo* gene delivery [EB/OL]. (2024-05-07) [2025-10-25]. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe>.
- [10] Mullen KF. *In vivo* generation of both CAR T cells and CAR NK cells using a CD7 targeted lentiviral vector [EB/OL]. (2024-05-07) [2025-10-25]. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe>.
- [11] Nicolai CJ, Parker MH, Qin J, et al. *In vivo* CAR T-cell generation in non-human primates using lentiviral vectors displaying a multidomain fusion ligand[J]. Blood, 2024, 144(9): 977-987.
- [12] Michels KR, Sheih A, Hernandez SA, 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.
- [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.
- [14] Wolff JA, Malone RW, Williams P, et al. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo* [J]. Science, 1990, 247(4949 Pt1): 1465-1468.
- [15] Wang Y, Zhao H, Cochran E, et al. *In vivo* programming of myeloid cells by

- mRNA mediated delivery of novel FeA fusion receptor activates anti-tumor immunity[EB/OL]. (2022-10-07) [2025-10-25]. <https://doi.org/10.1136/jite-2022-SITC2022>.
- [16] Franz AM, Riener R, Wang A, et al. Profound B Cell depletion and repopulation with predominantly na⁺ve B cells in non-human primates achieved through a novel *in vivo* CD8-targeted lipid nanoparticle mRNA CAR[EB/OL]. (2024-11-14) [2025-10-25]. <https://rheumatology.org/annual-meeting>.
- [17] Hunter TL, Bao Y, Zhang Y, et al. *In vivo* CAR T cell generation for cancer and autoimmune disease[J]. Science, 2025, 388(6753): 1311-1317.
- [18] Wesselhoeft RA, Kowalski PS, Anderson DG. Engineering circular RNA for potent and stable translation in eukaryotic cells[J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 2629.
- [19] Wesselhoeft RA, Kowalski PS, Parker-Hale FC, et al. RNA circularization diminishes immunogenicity and can extend translation duration *in vivo*[J]. Mol Cell, 2019, 74(3): 508-520.
- [20] Cunningham J. In vivo delivery of a CD20 CAR using a CD8-targeted fusosome in southern pig-tail macaques (*M. nemestrina*) results in B cell depletion[EB/OL]. (2021-12-11) [2025-10-25]. <https://www.hematology.org>.
- [21] Mullard A. In vivo CAR T cells move into clinical trials[J]. Nat Rev Drug Discov, 2024, 23(10): 727-730.
- [22] Wang Y, Wang X, Pan Q, et al. CircRNA-based, non-integrated, *in vivo* panCAR-mediated B cell immune resetting in mouse models and non-human primates[C/OL]. bioRxiv. (2025-08-11) [2025-10-25]. <https://doi.org/10.1101/2025.08.11.669448>.
- [23] Wang Y, Lin L, Wang X, et al. Synergically enhanced anti-tumor immunity of *in vivo* CAR by circRNA vaccine boosting[C/OL]. bioRxiv. (2024-07-05) [2025-10-25]. <https://doi.org/10.1101/2024.07.05.600312>.
- [24] Nicolai C, Qin J, Pankau M, et al. VivoVec: a novel lentiviral-based *in vivo* CAR T cell generation platform with viral particle surface engineering incorporating T cell activating and co-stimulatory ligands[EB/OL]. (2022-05-16) [2025-10-25]. <https://www.umoja-biopharma.com/wp-content/uploads/2022/11/CN-ASGCT-Poster-Umoja1>.
- [25] Brandes AH, Koo ASM, Perez A, et al. Nonclinical Toxicology, Biodistribution, and Pharmacokinetics of UB-VV111, an *In Vivo* Anti-CD19 CAR T Cell Therapy[EB/OL]. (2024-10-05) [2025-10-25]. <https://doi.org/10.1182/blood-2024-211032>.
- [26] Wesselhoeft RA, Kowalski PS, Parker-Hale FC, et al. RNA circularization diminishes immunogenicity and can extend translation duration *in vivo*[J]. Mol Cell, 2019, 74(3): 508-520.
- [27] Contrastano SG. Potent *in vivo* transduction by iGPS particles generates CAR T cells with durable anti-tumor activity[EB/OL]. (2023-05-17) [2025-10-25]. <https://keloniatx.com/wp-content/uploads/2023/05/2023-ASGCT-Kelonia-Presentation>.
- [28] Beura ET, Latimer HJ, Wong D, et al. T cell-specific *in vivo* transduction with preclinical candidate KLN-1010 generates BCMA directed CAR T cells with potent anti-multiple myeloma activity[EB/OL]. (2023-03-22) [2025-10-25]. <https://doi.org/10.1158/1538-7445>.
- [29] Hu J, Dunbar CE. T-cell lymphomas in recipients of CAR-T cells: assessing risks and causalities[J]. Blood, 2024, 144(24): 2473-2481.
- [30] Hamilton MP, Sugio T, Noordenbos T, et al. Risk of second tumors and T-cell lymphoma after CAR T-cell therapy[J]. N Engl J Med, 2024, 390(22): 2047-2060.
- [31] Ruella M, June CH. CAR T-cell resistance to oncogenic transformation[J]. Blood Cancer Discov, 2024, 5(4): 229-233.
- [32] Xiao T, Zha G, Shi L, et al. An *in vivo* CAR T producer (HN2301) for autoimmune disease enables B cell depletion in NHP tissues and performs therapeutic effect in an SLE mouse model[EB/OL]. (2025-05-13) [2025-10-25]. <https://www.sciencedirect.com/journal/molecular-therapy/vol/33/issue/4/suppl/S1>.
- [33] Wang Q, Xiao Z, Zheng X, et al. *In vivo* CD19 CAR T-cell therapy for refractory systemic lupus erythematosus[J]. N Engl J Med, 2025, 393(15): 1542-1544.
- [34] Muraro PA, Martin R, Mancardi GL, et al. Autologous haematopoietic stem cell transplantation for treatment of multiple sclerosis[J]. Nat Rev Neurol, 2017, 13(7): 391-405.

(编辑:郭述金 收稿日期:2025-10-26)