

嵌合抗原受体 T 细胞疗法在结直肠癌中的研究进展

晁子健, 刘文莉, 刘宇*

武汉科技大学生命科学与健康学院, 湖北 武汉 430065

晁子健, 刘文莉, 刘宇. 嵌合抗原受体 T 细胞疗法在结直肠癌中的研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(5): 1365-1379.
CHAO Zijian, LIU Wenli, LIU Yu. Advances of CAR-T cell therapy in treating colorectal cancer[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(5): 1365-1379.

摘要: 全球范围内, 结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是第三大常见的恶性肿瘤和癌症相关死亡的第二大原因。据世界卫生组织统计, 全球每年新增超过 190 万例 CRC 患者, 每年大约 90 万人死于结肠或直肠癌。近年来, 嵌合抗原受体 T (chimeric antigen receptor T, CAR-T)细胞疗法在部分血液肿瘤的治疗中取得了临床成功, 更多靶向治疗 CRC 等实体瘤的 CAR-T 细胞疗法也正在陆续开发中。目前针对癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)、自然杀伤细胞受体 2D 配体(natural killer group 2, member D ligand, NKG2DL)等靶点的 CAR-T 细胞疗法已经在临床试验中取得了显著效果, 但同时也面临一些困境。本文总结了目前 CAR-T 细胞疗法治疗 CRC 的有效靶点的最新信息及其在临床试验或临床前研究的相关进展。同时, 本文介绍了 CAR-T 细胞疗法在治疗 CRC 时面临的挑战(包括缺乏肿瘤特异性抗原、细胞因子释放综合征、不利的肿瘤微环境以及 CAR-T 细胞浸润程度低等)。综上所述, 本文总结了 CAR-T 细胞疗法治疗 CRC 的最新研究进展及挑战, 以期为 CRC 的临床治疗提供新思路。
关键词: 嵌合抗原受体 T (CAR-T)细胞疗法; 结直肠癌; 靶向治疗; 临床试验

Advances of CAR-T cell therapy in treating colorectal cancer

CHAO Zijian, LIU Wenli, LIU Yu*

College of Life Sciences and Health, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430065, Hubei, China

Abstract: Globally, colorectal cancer (CRC) ranks as the third most common cancer and the second leading cause of cancer-related fatalities. According to the World Health Organization, there are over 1.9 million annual cases of CRC diagnosed worldwide, resulting in more than 900 000 deaths. In recent years, chimeric antigen receptor T (CAR-T) cell therapy has shown clinical

资助项目: 湖北省科技厅自然科学基金青年项目(2023AFB105)

This work was supported by the Youth Project of Natural Science Foundation of Science and Technology Department of Hubei Province (2023AFB105).

*Corresponding author. E-mail: ly93hfut@163.com

Received: 2023-10-26; Accepted: 2024-01-17

success in treating certain hematological malignancies and is now being explored for its potential in targeting solid tumors like CRC. Currently, CAR-T cell therapies targeting carcinoembryonic antigen (CEA), natural killer group 2, member D ligand (NKG2DL), and other markers have achieved remarkable results in clinical trials, albeit encountering significant challenges. This review summarizes the promising targets of CAR-T cell therapy for CRC and highlights progress made in clinical trials and preclinical studies. Additionally, the review discusses the challenges faced by CAR-T cell therapy in CRC treatment, including a shortage of tumor-specific antigens, cytokine release syndrome, adverse tumor microenvironment, and limited infiltration of CAR-T cells. In summary, this review provides an overview of the latest research progress and challenges in CAR-T cell therapy for CRC, aiming to contribute fresh insights for the clinical treatment of this disease.

Keywords: chimeric antigen receptor T (CAR-T) cell therapy; colorectal cancer; targeted therapy; clinical trials

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是由结肠和胃肠道末端上皮细胞异常增生和侵袭引起的一种恶性肿瘤^[1]。通常情况下,这种癌前病变会在大肠内形成小的良性细胞团,即息肉。然而,随着时间推移,部分息肉可能会恶变成恶性细胞团,进而发展为CRC。多项研究表明,CRC的发生与多种因素有关,如基因组突变、慢性炎症性肠病、胃肠道腺瘤性息肉、酗酒、吸烟、遗传和胃肠道癌症家族史、低纤维和高脂肪饮食、胃肠道微生物群、糖尿病和肥胖等^[2]。

CRC是全球第三大最常见的恶性肿瘤,约占所有癌症病例的10%,也是全球第二大恶性肿瘤死亡原因^[3]。根据世界卫生组织国际癌症研究机构发布的最新癌症负担数据,2020年全球新增CRC病例和相关死亡人数估计分别为188.0万和91.5万^[4]。由于人口增长和老龄化,预计到2035年,死于结肠癌和直肠癌的人数将分别增加60.0%和71.5%^[5]。据统计,CRC在诊断时约有50%的患者出现向肝或肺的远处转移。这种癌症的转移特性对患者来说是致命的,而转移性结直肠癌(metastatic colorectal cancer, mCRC)患者的预后通常较差,5年生存率小于15%^[6]。

CRC的临床治疗多采用以手术切除、放疗、化疗或分子靶向药物为基础的综合治疗。化疗药物包括氟尿嘧啶、奥沙利铂和伊立替康等;新一代靶向药物如西妥昔单抗、帕尼单抗和贝伐单抗也已问世,然而,这些药物均存在特异性不高和不良毒性等缺陷。此外,CRC的早期诊断率较低,多数患者在出现明显临床症状和体征时已进入中晚期阶段。因此,当癌细胞浸润或转移到周围组织时,传统的治疗方法不能完全抑制CRC的进展、转移和复发^[7]。目前已经开展了多项针对不同靶点的嵌合抗原受体T(chimeric antigen receptor T, CAR-T)细胞疗法的临床试验或临床前研究,取得了令人振奋的抑瘤效果。本文就CAR的结构、CAR-T细胞疗法治疗CRC的有效靶点以及现阶段该疗法面临的挑战等方面进行综述。

1 CAR-T 细胞疗法

CAR-T细胞疗法是一种通过基因工程手段对T细胞进行体外修饰的方法,能够更有效地识别和消除肿瘤细胞。这种疗法的优势在于它不依赖于主要组织相容性复合物(major histocompatibility complex, MHC)的参与,从而避免了由于肿瘤表面MHC下调引起的T细胞

功能障碍。自问世以来, CAR-T 细胞疗法已成为抗癌细胞免疫疗法中发展最快、应用最广泛的分支之一, 其迅速改变了血液恶性肿瘤的治疗格局, 并且已经占据了目前正在研发的细胞疗法一半以上。尽管 CAR-T 细胞疗法已被证实对靶向血液恶性肿瘤具有显著疗效, 但用于治疗实体瘤仍面临重大挑战^[8]。

多年来, CAR 结构的不同代次不断被设计和提出, 目前已经研究到第五代 CAR 结构(图 1)。每一代的 CAR 结构都包含细胞外结构域的单链抗体(single-chain fragment variable, scFv)片段, 并且细胞内结构域均有显著修饰。在第一代 CAR 中, 细胞内结构域仅包含 CD3 ζ 分子用于信号传导, 其在临床应用阶段无效。在第二代和第三代 CAR 中, 在 CD3 ζ 分子基础上额外添加了共刺激分子, 如 CD28、OX40 和 4-1BB 等, 用于促进细胞因子的产生^[10]。然而, 实体瘤存在具有免疫抑制作用的肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME), 第二代和第三代 CAR-T 细胞在这种环境下疗效并不理想^[11]。因

此在第二代 CAR 的基础上, 被称为 TRUCKs 的第四代 CAR 增加了可以诱导细胞因子[如白细胞介素-12 (interleukin-12, IL-12)或 IL-15]的活化 T 细胞核因子(nuclear factor of activated T cells, NFAT)。该结构域有助于刺激抗肿瘤反应, 并以自分泌的方式招募和激活肿瘤的内源性先天免疫细胞, 修饰 TME 并增加 T 细胞持久性^[12]。最后, 第五代 CAR 被设计具备多种功能, 主要包括对癌细胞的靶向作用、减轻炎症反应以及募集其他免疫细胞来对抗肿瘤。这些功能中, 最具代表性的就是向 CAR 中引入 IL-2R β 。这种受体的引入, 可以通过 mRNA 转录诱导蛋白酪氨酸激酶(janus kinase, JAK)的产生以及信号传导子和转录激活子 3/5 (signal transducer and activator of transcription 3/5, STAT3/5)的激活^[13]。这些被释放的信号不仅可以维持 CAR-T 细胞的激活状态, 刺激记忆 T 细胞的增殖, 还能够重新激活并刺激免疫系统。客观地看, 这些改造的新型 CAR 结构在临床治疗实体瘤的有效性 & 安全性上还需进一步验证。

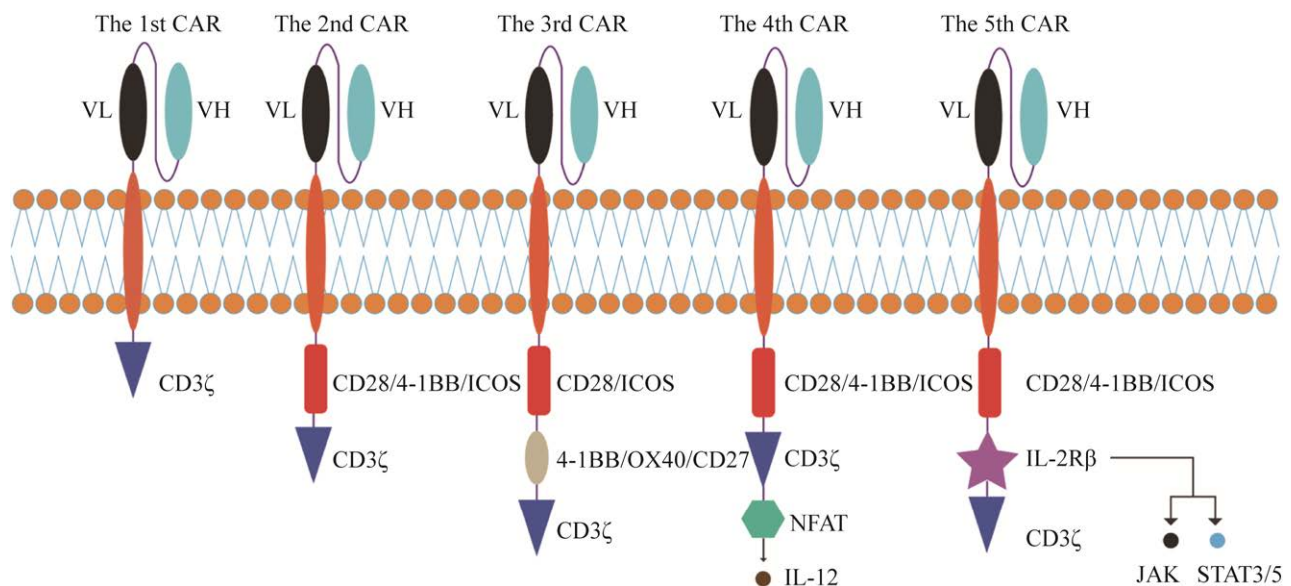


图 1 历代 CAR 结构发展、演变示意图^[9]

Figure 1 Schematic diagram of CAR structure development and evolution^[9].

从 CAR-T 细胞的设计和制备过程来看, 这是一种高度个性化的疗法。概括地说, 先从患者血液的外周血单核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 中分离出 T 细胞。随后, 通过病毒或非病毒载体将 CAR 基因导入已经被激活的 T 细胞, 使 T 细胞表达 CAR 基因。接着, CAR-T 细胞经体外扩增后被重新回输至患者体内(图 2)。最后, 进入患者体内的 CAR-T 细胞通过识别肿瘤的目标抗原而消除肿瘤细胞^[15]。

2 CAR-T 细胞疗法治疗 CRC 的主要靶点

CAR-T 细胞疗法在肿瘤的个性化免疫治疗中显示出巨大潜力。大量临床研究已经提出了诸多策略来进一步提高 CAR-T 细胞疗法的疗效和安全性, 其中靶点选择是至关重要的一步。理想情况下, 肿瘤特异性抗原(tumor specific antigen, TSA)更适合作为 CAR-T 细胞的抗原靶标以确保临床安全性, 然而 TSA 却很少存在于

大多数实体瘤中。因此, CAR-T 细胞在实体瘤中识别的靶点一直是肿瘤相关抗原(tumor associated antigen, TAA)。目前用于治疗 CRC 的 CAR-T 细胞疗法的靶标通常在正常细胞中共同表达, 具有低特异性。靶向非特异性表面抗原的 CAR-T 细胞可产生交叉反应, 诱导正常细胞死亡和严重毒性反应。因此, 针对 CAR-T 细胞介导的肿瘤细胞识别和杀伤过程, 寻找合适的肿瘤抗原以提高 CAR-T 细胞疗法的安全性和有效性, 同时保持 CAR-T 细胞的抗肿瘤活性, 是当前研究的一项重大挑战。本文总结了针对 CAR-T 细胞治疗 CRC 的可能靶点(图 2)和最近的临床研究(表 1)。

2.1 靶向肿瘤特异性标志物

癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)是一种具有人胚胎抗原特性的酸性糖蛋白, 可在人类胚胎和胎儿的早期阶段表达^[16]。在正常成人组织中, CEA 仅在胃肠道内腺上皮的顶端表面低水平表达。CEA 在多种肿瘤中过表达, 包括 CRC、胰腺癌、胃癌、肺癌和卵巢癌等^[17]。

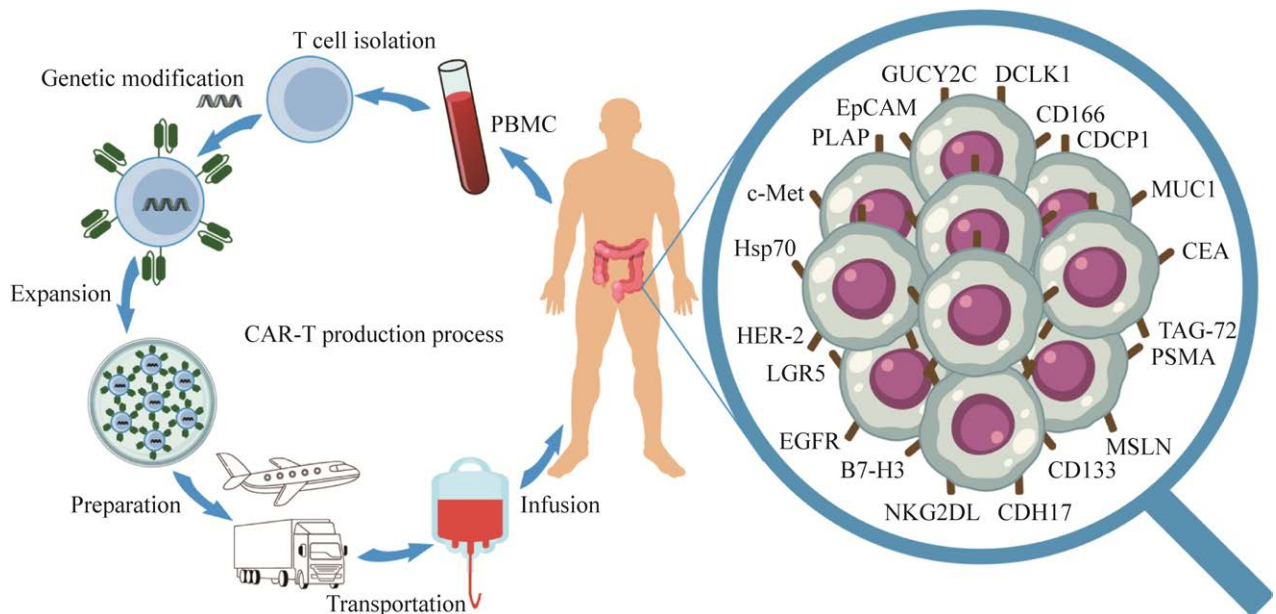


图 2 CAR-T 细胞生产流程及 CRC 靶点图^[14]

Figure 2 CAR-T cell production process and CRC targets map^[14].

表 1 CAR-T 细胞疗法用于 CRC 治疗的临床试验

Table 1 Clinical trials of CAR-T cell therapy for CRC

Antigen	Status	Phase	Year	Identifier	Sponsor
CEA	Unknown	I	2015	NCT02349724	Southwest Hospital
	Completed	I	2015	NCT02416466	Roger Williams Medical Center
	Recruiting	I/II	2016	NCT02959151	Shanghai GeneChem Co., Ltd.
	Completed	I	2016	NCT02850536	Roger Williams Medical Center
	Withdrawn	I	2018	NCT03682744	Sorrento Therapeutics, Inc.
	Unknown	I	2020	NCT04513431	Ruijin Hospital
	Recruiting	I/II	2020	NCT04348643	Chongqing Precision Biotech Co., Ltd.
	Recruiting	I	2022	NCT05396300	Chongqing Precision Biotech Co., Ltd.
	Recruiting	I	2022	NCT05240950	Changhai Hospital
	Recruiting	I	2022	NCT05401318	Akershus University Hospital
	Recruiting	I	2022	NCT05415475	Chongqing Precision Biotech Co., Ltd.
	Recruiting	I/II	2023	NCT05736731	A2 Biotherapeutics, Inc.
	NKG2DL	Unknown	I	2017	NCT03370198
Unknown		I/II	2017	NCT03018405	Celyad Oncology SA
Recruiting		I	2018	NCT03692429	Celyad Oncology SA
Unknown		I	2019	NCT04107142	CytoMed Therapeutics Pte. Ltd.
Unknown		I	2020	NCT04550663	The Affiliated Nanjing Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School
Recruiting		I	2021	NCT04991948	Celyad Oncology SA
Recruiting		I	2022	NCT05382377	The Affiliated Hospital of the Chinese Academy of Military Medical Sciences
Recruiting		I	2022	NCT05248048	The Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University
EGFR	Unknown	I/II	2013	NCT01869166	Chinese PLA General Hospital
	Unknown	I/II	2017	NCT03152435	Shenzhen Second People's Hospital
	Unknown	I	2018	NCT03542799	Shenzhen Second People's Hospital
HER2	Recruiting	I/II	2016	NCT02713984	Southwest Hospital
	Recruiting	I	2018	NCT03740256	Baylor College of Medicine
	Recruiting	I	2020	NCT04660929	Carisma Therapeutics, Inc.
MUC1	Unknown	I/II	2015	NCT02617134	PersonGen BioTherapeutics Co., Ltd.
	Recruiting	I/II	2022	NCT05239143	Poseida Therapeutics, Inc.
EpCAM	Unknown	I/II	2017	NCT03013712	First Affiliated Hospital of Chengdu Medical College
	Recruiting	I	2021	NCT05028933	Zhejiang University
MSLN	Unknown	I	2020	NCT04503980	Shanghai Cell Therapy Group Co., Ltd.
	Recruiting	I	2021	NCT05089266	Shanghai Cell Therapy Group Co., Ltd.
GUCY2C	Recruiting	I	2022	NCT05319314	Innovative Cellular Therapeutics, Inc.
	Recruiting	I	2022	NCT05287165	Beijing Immunochina Medical Science & Technology Co., Ltd.
CD133	Completed	I/II	2015	NCT02541370	Chinese PLA General Hospital
c-Met	Unknown	I/II	2018	NCT03638206	Shenzhen BinDeBio Technology Co., Ltd.
PSMA	Recruiting	I	2020	NCT04633148	AvenCell Europe GmbH
B7-H3	Recruiting	I	2022	NCT05190185	PersonGen BioTherapeutics (Suzhou) Co., Ltd.
LGR5	Active, not recruiting	I/II	2023	NCT05759728	Carina Biotech Limited

Data source: <https://clinicaltrials.gov/>.

CEA 在 98.8% 的 CRC 组织样品中过表达, 因此被视为是最重要的诊断和预后肿瘤标志物之一, 这些特性使其成为 CAR-T 细胞疗法的潜在靶标^[18]。中国第三军医大学西南医院进行了 I 期临床试验(NCT02349724), 旨在评估针对具有肺和肝转移的 CEA⁺ CRC 患者的 CAR-T 细胞疗法的安全性和疗效。结果显示, CEA CAR-T 细胞在 CEA⁺ CRC 患者中耐受性良好, 且未报告严重的治疗相关不良事件^[19]。此外, Owen 等^[20]研究发现, 环磷酸胺选择性地消耗免疫抑制细胞, 与抗 CEA CAR-T 联合使用可有效增强其抗肿瘤活性。

间皮素(mesothelin, MSLN)是一种糖基磷脂酰肌醇锚定的细胞表面糖蛋白, 通常在正常组织如胸膜、腹膜和心包中以较低水平表达, 但在 CRC、胰腺癌、乳腺癌和卵巢癌等多种恶性肿瘤中高度表达^[21]。MSLN 在 60% 的 CRC 患者中呈阳性表达, 但其在 CRC 发病机制中的生物学功能和分子机制尚未完全阐明^[22]。Liu 等^[23]发现 shRNA 介导的 PD-1 沉默能增强 CAR-T 细胞的抗肿瘤活性。因此, 通过 shRNA 沉默 MSLN CAR-T 细胞的 PD-1 可能会改善 CAR-T 细胞的治疗效果。目前, 上海细胞治疗集团有限公司正在对能分泌 PD-1 纳米抗体的 MSLN CAR-T 细胞疗法进行安全性、耐受性和有效性的评估(NCT05089266)。

粘蛋白 1 (mucin 1, MUC1)是一种高度糖基化跨膜蛋白, 常形成于大多数腺上皮细胞的顶端表面, 发挥重要的保护作用并介导信号传导, 是上皮细胞肿瘤中公认的 TSA^[24]。MUC1 在 CRC、肺癌、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌、肺癌、乳腺癌和前列腺癌等实体瘤中过表达^[25]。已进行的 I/II 期临床试验(NCT02617134)旨在评估 MUC1 CAR-T 细胞疗法在复发性或难治性实体瘤(包括 CRC、胃癌和恶性胶质瘤)患者中的安全性和有效性。目前 P-MUC1C-ALLO1

同种异体 CAR-T 细胞治疗晚期或转移性实体瘤(NCT05239143)正在招募患者。

鸟苷酸环化酶 C (guanylyl cyclase C, GUCY2C) 是膜结合鸟苷酸环化酶家族的成员, 仅在肠上皮细胞的顶端表面和下丘脑神经元亚群中表达^[26]。该受体具有催化三磷酸鸟苷(guanosine triphosphate, GTP) 转化为环磷酸鸟苷(cyclic guanosine monophosphate, cGMP)的功能, 能触发 cGMP 相关信号通路的激活, 进而调节肠内稳态过程, 包括上皮细胞增殖、分化和凋亡。该信号传导轴的失调可促进炎性肠病、肠转运障碍以及癌症的发生。GUCY2C 在近 95% 的 CRC 患者以及胰腺癌、胃癌和食管癌患者中过表达^[27]。Magee 等^[28]在小鼠模型中进行了 GUCY2C CAR-T 细胞治疗, 结果显示肿瘤显著缩小, 且未观察到副作用, 同时生存期较对照组延长。该团队提出可以开发靶向人 GUCY2C 的 CAR-T 细胞用于治疗表达 GUCY2C 的 mCRC。目前两项临床试验 I 期(NCT05319314 和 NCT05287165)正在进行患者招募。本团队也在开展靶向 GUCY2C 的 CAR-T 细胞的研发工作。GEPIA 数据库(<http://gepia.cancer-pku.cn/>)信息显示, GUCY2C 在人结肠癌或直肠癌组织中的表达量高于正常组织(图 3A、3B)。另外, 本团队对一例晚期 mCRC 患者的术后切片样本进行免疫组化(immunohistochemistry, IHC)检测, 结果显示 GUCY2C 蛋白在 CRC 组织样本中呈阳性表达(图 3C)。现阶段, 本团队已对兔子进行了人 GUCY2C 的抗原免疫, 正在用噬菌体展示技术筛选候选 scFv 序列。未来拟构建 GUCY2C CAR-T 进行体外杀瘤实验和动物实验, 以进一步确证靶向 GUCY2C 的 CAR-T 细胞的有效性。

前列腺特异性膜抗原(prostate-specific membrane antigen, PSMA)也被称为叶酸水解酶 I 或谷氨酸羧肽酶 II, 是前列腺上皮细胞膜的

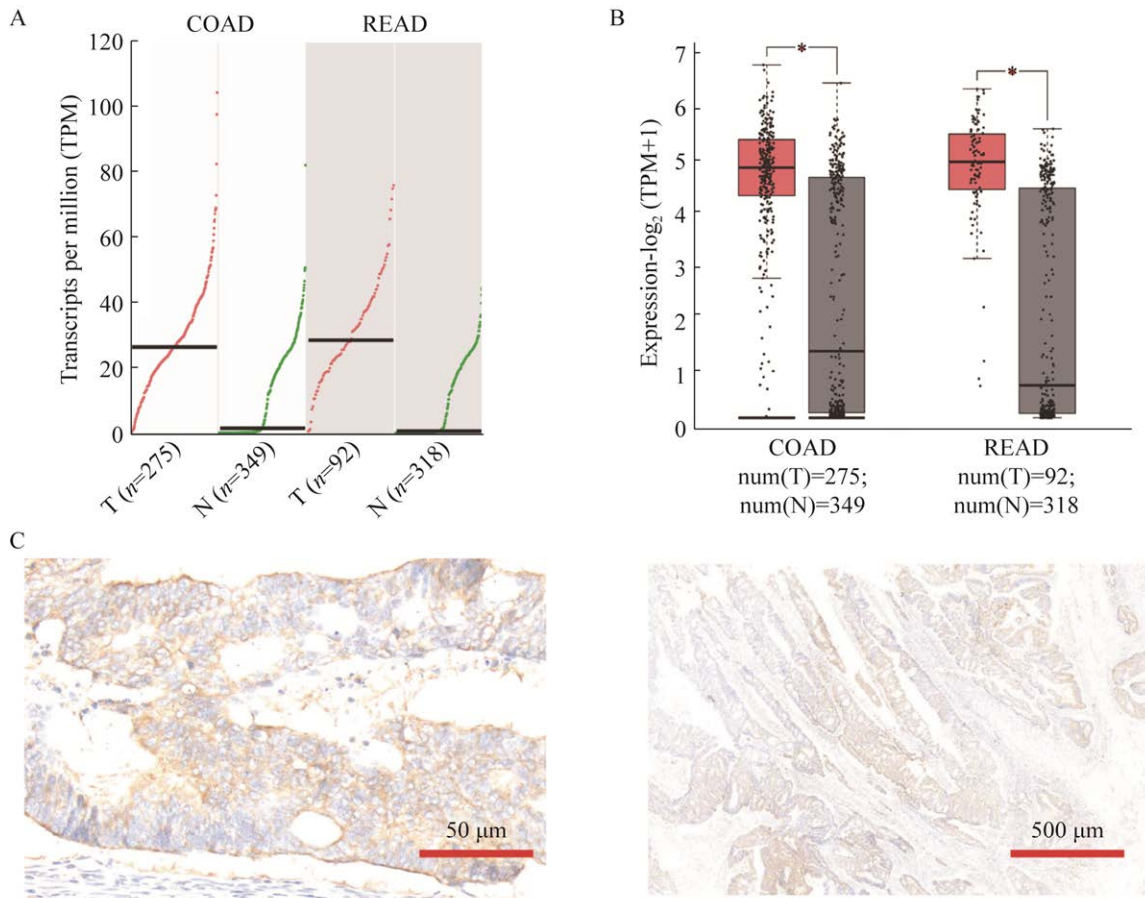


图 3 GUCY2C 在 CRC 患者样本中的表达情况

Figure 3 Expression of GUCY2C in CRC patients. A: Scatter diagram. B: Box plot (from GEPIA database). C: Immunohistochemical staining was performed using anti-human GUCY2C Alexa Fluor[®] 488-conjugated antibody to investigate the protein expression of GUCY2C, and images were obtained at different magnifications.

特有跨膜蛋白。然而，PSMA 并非仅限于在前列腺组织中表达，亦表达于唾液腺、十二指肠黏膜、近端肾小管亚群和结肠隐窝神经内分泌细胞亚群。在肿瘤进展过程中，PSMA 不仅在前列腺上皮肿瘤细胞中高表达，还在多种 CRC 亚型、移行细胞癌、肾细胞癌以及新血管的瘤周和肿瘤内皮细胞中过表达^[29]。目前，针对 PSMA 阳性的肿瘤患者的新型药物 UniCAR02-T-pPSMA 细胞的安全性及副作用正在评估中，其剂量升级的临床试验(NCT04633148)正在进行中。

肿瘤相关糖蛋白 72 (tumor-associated

glycoprotein 72, TAG-72)是一种高分子量的糖蛋白，除分泌期子宫内膜和胎儿组织外，在大多数正常组织中均不表达。TAG-72 主要在 CRC、胃癌、食管癌、胰腺癌、卵巢癌、乳腺癌和肺癌等肿瘤中高水平表达，并且与不良预后相关^[30]。Hege 等^[31]将 TAG-72 用作 CAR-T 治疗 mCRC 患者的肿瘤靶点。经静脉输注或肝动脉输注的患者短期内在血液之中持续存在 TAG-72 CAR-T 细胞，并且均未观察到显著的治疗相关毒性。

2.2 靶向免疫调控及免疫检查位点

自然杀伤细胞受体 2D (natural killer group 2,

member D, NKG2D)是一种 C 型凝集素样激活受体,主要表达于 NK 细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞、 $CD8^+$ T 细胞和 $CD4^+$ T 细胞亚群^[32]。它通过识别靶细胞表面的 NKG2D 配体(NKG2D ligand, NKG2DL)来传递活化信号并激活免疫细胞对靶细胞发挥杀伤作用,在肿瘤免疫治疗中发挥重要作用^[33]。NKG2DL 在多种肿瘤中表达,包括 CRC、宫颈癌、卵巢癌、乳腺癌和肺癌等。Deng 等^[34]针对 NKG2DL 的 CAR-T 细胞疗法已显示出对 CRC 细胞的特异性毒性,并且能显著抑制肿瘤生长以及延长小鼠的总生存期。Celyad Oncology SA 公司进行的一项临床试验(NCT03018405)旨在研究基于 NKG2DL 的 CAR-T 细胞(NKR-2)治疗 7 种难治性肿瘤(包括 CRC)的安全性和临床疗效。研究结果显示, NKR-2 对多种肿瘤具有显著的长期抗肿瘤活性,并在多次给药后观察到最大疗效^[35]。

B7 同源物 3 (B7 homolog 3, B7-H3)又称 CD276,属于 B7/CD28 家族,是一种与细胞程序性死亡-配体 1 (programmed cell death-ligand 1, PD-L1)细胞外结构域序列相似的 I 型膜蛋白^[36]。B7-H3 在 T 细胞介导的免疫应答过程中发挥关键作用,其能够抑制 T 细胞的活化和增殖,减少细胞因子(如 IL-2、IFN- γ)的产生,并促进肿瘤细胞的免疫逃逸。B7-H3 在正常人体组织中表达水平较低,但在 CRC、前列腺癌、乳腺癌和黑色素瘤等恶性肿瘤中高表达,并且与肿瘤分期、转移和患者的不良预后密切相关^[37]。B7-H3 可通过激活 PI3K-Akt 途径上调 Smad1 表达来促进 CRC 细胞中的上皮向间充质转化^[38]。因此, B7-H3 有望成为 CRC 免疫治疗的靶点,相关临床试验(NCT05190185)正在招募患者。

2.3 靶向肿瘤调控/形成机制

表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)也被称为人表皮生长因子受体 1 (human epidermal growth factor receptor 1, HER-1),

是酪氨酸激酶受体家族的成员。其能通过与配体结合来激活二聚化,进而启动细胞增殖、生存和分化过程^[39]。EGFR 在肿瘤的发生中也起着重要的驱动作用。近期研究表明, EGFR 具有与自噬和代谢相关的新功能,这些功能可以在细胞和环境压力的作用下被诱导激活,从而为癌细胞提供生存优势并对治疗产生抵抗性^[39]。EGFR 在大多数实体瘤中的表达较高,包括 CRC、乳腺癌、肾癌、卵巢癌、头颈癌、胶质母细胞瘤、非小细胞肺癌和脑癌等^[40]。目前,深圳市第二人民医院正在进行一项 I/II 期临床试验(NCT03152435),旨在探究在 mCRC 患者中使用 EGFR-IL-12 CAR-T 细胞和 EGFR CAR-T 细胞的最大耐受剂量、安全性和可行性。

人表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER-2)是调节细胞生长、分化和凋亡的关键蛋白,属于人表皮生长因子受体家族的重要成员^[41]。在正常情况下, HER-2 处于非激活状态。当有致癌因子刺激时, HER-2 能调节血管内皮生长因子的表达,促进肿瘤新生血管的生成,增强肿瘤细胞的侵袭和转移能力。在人体中, HER-2 主要存在于呼吸和消化系统的上皮结构以及脑室的室管膜细胞中。在多种肿瘤中,包括 CRC、乳腺癌、胃癌、肺癌、胰腺癌和食管腺癌等, HER-2 均呈现过表达状态^[42]。Teng 等^[43]在 CRC 小鼠模型中,通过过继转移 HER-2 CAR-T 细胞,成功诱导 CRC 异种移植物的消退甚至消除,并展现出防止肿瘤复发和改善存活的优势。此外, Xu 等^[44]的研究也表明 HER-2 CAR-T 细胞在转移性异种移植小鼠模型中对 mCRC 展现出强大的免疫治疗能力。美国贝勒医学院正在进行一项临床试验(NCT03740256),旨在评估 HER-2 CAR-T 细胞用于治疗多种实体瘤(包括 CRC)患者的安全性和疗效^[45]。

细胞间充质上皮转换因子(cellular-mesenchymal epithelial transition factor, c-Met)也称为肝细胞生长因子受体(hepatocyte growth factor receptor, HGFR),属于酪氨酸激酶受体家族成员。c-Met在多种类型的细胞中均有表达,包括上皮细胞、内皮细胞、神经元、肝细胞和造血细胞^[46]。c-Met在细胞增殖和运动、组织再生、伤口愈合、上皮向间充质转化和血管生成等过程中发挥重要作用。在多种实体瘤中,c-Met的表达水平均有所提升,包括CRC、胃癌、胰腺癌、肺癌、头颈癌、卵巢癌、肾癌、前列腺癌和乳腺癌等。Safaie等^[47]研究发现c-Met在30%–70%的CRC病例中过表达,并且与肿瘤的发展和转移密切相关。目前,在涉及多种恶性肿瘤的自体CAR-T/TCR-T细胞治疗I/II期试验(NCT03638206)中,c-Met被用作CRC、肝癌、卵巢癌以及肾癌的治疗靶点。

2.4 靶向肿瘤干细胞

上皮细胞粘附分子(epithelial cell adhesion molecule, EpCAM)是一种I型跨膜糖蛋白,主要在正常上皮细胞的基底外侧膜中表达^[48]。正常情况下,EpCAM参与细胞间黏附,并调节祖细胞和胚胎干细胞的分化,但在某些情况下,其过表达与异常的细胞增殖、迁移、侵袭以及肿瘤转移有关。尽管EpCAM在多种上皮性肿瘤中过表达,但其表达局限于某些类型的特定肿瘤,如CRC、乳腺癌、前列腺癌、胆囊癌、卵巢癌、膀胱癌、胰腺癌和腺样囊性癌等,且与预后不良相关^[49]。在CRC中,超过90%的癌细胞过表达EpCAM,且与肿瘤发展密切相关^[50]。Zhang等^[51]研究发现在CRC的异种移植小鼠模型中,EpCAM CAR-T细胞分泌大量的TNF- α 和IFN- γ ,显著抑制肿瘤的形成和生长,并且显示出良好的安全性。另外,Li等^[52]研究发现Wnt和TGF- β 途径的活化与多种肿瘤(包括CRC)中的EpCAM表达呈正相关,并且相比肿

瘤原发期,其表达在转移期显著增加。因此,可以通过EpCAM CAR-T细胞疗法与Wnt抑制剂的组合来提高CAR-T细胞治疗实体瘤的疗效。目前,浙江大学的一项临床试验(NCT05028933)正在评估静脉输注EpCAM CAR-T细胞治疗晚期消化系统恶性肿瘤的安全性和耐受性。

造血干细胞抗原CD133也称为AC133或prominin-1,是一种位于细胞膜突起中的5次跨膜糖蛋白。该蛋白由来源于各种上皮细胞的癌症干细胞(cancer stem cell, CSC)表达,被广泛用于检测和分离来自各种实体瘤的CSC^[53]。Akbari等^[54]研究发现,CD133表达与CRC的化疗耐药性、高转移和复发率密切相关。中国人民解放军总医院开展的一项临床试验(NCT02541370)结果表明,将CD133 CAR-T细胞输注到患有CD133⁺ mCRC、胰腺癌和肝细胞癌的患者体内,抗肿瘤疗效显著且毒性可耐受。此外,在首次细胞输注后实现肿瘤缩小的患者中,重复的细胞输注使病人获得了较长的疾病稳定期^[55]。

G蛋白偶联受体5(leucine rich repeat containing G protein-coupled receptor 5, LGR5)又称G蛋白偶联受体49(G protein coupled receptor 49, GPR49),包含17个富含亮氨酸的重复序列,属于G蛋白偶联受体类家族成员^[56]。LGR5是一种干细胞标记物,是Wnt/ β -catenin信号通路中的关键信号分子之一。已知LGR5在多种组织中表达,特别是在肠隐窝内和毛囊底部的干细胞中表达较高。LGR5阳性细胞具有可塑性和干细胞表型,使其被认定为包括CRC在内的多种实体肿瘤的CSC标志物^[57]。Carina Biotech进行的一项临床前研究发现,LGR5 CAR-T通过靶向CSC,降低新肿瘤生成,增强肿瘤抑制,并预防肿瘤复发。目前,针对晚期mCRC患者的I/II期临床试验(NCT05759728)已经获批。

2.5 其他临床前研究靶点

除了上述应用于临床试验的靶点,国内外研究团队也积极探索其余新型靶点。本文总结了目前尚处于临床前研究的用于 CRC 治疗的 CAR-T 细胞进展(表 2)。

3 CAR-T 细胞治疗 CRC 的挑战

3.1 缺乏肿瘤特异性抗原

理想的 CAR-T 细胞靶标应仅在肿瘤细胞中高表达,而在既没有免疫逃逸也无突变的健康组织中不表达或低表达。然而,当前使用的 TAA 靶标在正常组织中广泛表达,因此常诱发实际治疗过程中的脱靶效应。肿瘤细胞可以通过抗原依赖性改变来逃避 CAR-T 细胞的攻击,从而增加抗肿瘤治疗的耐药性。抗原下调可以导致 CAR-T 细胞对恶性细胞的抗肿瘤药理疗效降低。目前研究者们已经提出了双 TAA 靶向系统和 synNotch 受体 CAR-T 细胞等优化策略来提高 CAR-T 细胞的靶向效果,以增强其对肿瘤细胞的杀伤作用^[64-65]。

3.2 细胞因子释放综合征

除了因缺乏肿瘤相关抗原而导致的脱靶效应外,细胞因子释放综合征(cytokine release syndrome, CRS)也限制了 CAR-T 疗法的应用。当 CAR-T 细胞在体内识别到肿瘤细胞后,会被激活并释放高水平的细胞因子,继而引发全身性免疫反应。被释放的细胞因子可以进一步激活免疫细胞,释放大量炎症因子,从而加剧 CRS,其典型的临床表现包括发热、多器官和系统的功能受损^[66]。在临床上,托珠单抗和嵌合抗 IL-6 抗体-西妥昔单抗是治疗中度至重度 CRS 的首选药物。大多数患者在使用这 2 种药物后,能快速逆转 CRS 症状,但 2 种药物之间的治疗间隔时间较长,导致急性突发性 CRS 治疗具有滞后性^[57]。因此,对 CAR-T 细胞的增殖和分化进行精确调节,以减轻 CRS 的发生是至关重要的。此外,及时诱导 CAR-T 细胞失活是预防 CRS 的关键措施之一,这可以通过构建含有自杀基因的 CAR 结构来实现。然而,这种方法虽然减少了 CRS 的发生,但也可能导致自杀

表 2 临床前研究中 CAR-T 细胞疗法治疗 CRC 的靶点

Table 2 The targets of CAR-T cell therapy for CRC in preclinical studies

Antigen	Journal	Team	Results
DCLK1	Cancers (2019)	The University of Oklahoma Health Science Center	DCLK1 CAR-T cells induce cytotoxicity and release IFN- γ <i>in vitro</i> and inhibit xenograft growth in a CRC mouse model ^[58]
PLAP	Frontiers in Bioscience (2020)	The Ohio State University	Humanized PLAP CAR-T cells significantly inhibited tumor growth in a mouse model, and the combination of checkpoint inhibitors increased the therapeutic efficacy of CRC ^[59]
Hsp70	Frontiers in Immunology (2022)	Central Institute for Translational Cancer Research Technische Universität München	Hsp70 CAR-T cells can effectively kill CRC cells by releasing granzyme B and IFN- γ <i>in vitro</i> ^[60]
CDH17	Nature Cancer (2022)	Perelman School of Medicine at the University of Pennsylvania	CDH17 CAR-T cells can efficiently kill tumors without damaging CDH17-expressing normal tissues in a CRC mouse model ^[61]
CDCP1/CD318	Clinical and Experimental Medicine (2022)	China-New Zealand Joint Laboratory of Biomedicine and Health	CD318 CAR-T cells have strong antitumor capacity <i>in vitro</i> and inhibit xenograft growth in a CRC mouse model ^[62]
ALCAM/CD166	Translational Oncology (2023)	West China Hospital, Sichuan University	CD166 CAR-T cells showed strong cytotoxicity to CRC CSCs, and IFN- γ was released significantly in a dose-dependent manner ^[63]

基因过早且不可逆地清除 CAR-T 细胞,从而降低治疗效果。

3.3 不利的肿瘤微环境

实体肿瘤的细胞间连接更为紧密,与血液肿瘤相比,免疫细胞穿越 TME 存在更大壁垒。在实体瘤组织的 TME 内,由于高压的存在,使得 CAR-T 细胞难以进入,从而限制了其疗效^[67]。不利的 TME 对 CAR-T 细胞发挥药理学功效构成了显著障碍。据报道,与较大体积的肿瘤相比, CAR-T 细胞在小尺寸肿瘤中的疗效更高^[68]。因此,针对肿瘤内高压致使 T 细胞不能浸润并无法表现出活性的情况,可以通过局部输注 CAR-T 细胞来提高肿瘤内 CAR-T 细胞的数量,从而改善治疗效果。此外,实体瘤中肿瘤细胞释放的代谢废物的积累会抑制 CAR-T 细胞的增殖和功能。多项研究表明,可以利用诸如 IL-12、IL-18 或 IL-23 等细胞因子帮助 CAR-T 细胞有效穿过细胞外基质。这一方法能够改善 TME 中的免疫抑制状态,从而增强 CAR-T 细胞对肿瘤细胞的杀伤作用^[69]。

3.4 CAR-T 细胞浸润程度低

利用 CAR-T 细胞治疗肿瘤,至关重要的是确保这些细胞能够到达肿瘤部位并执行杀伤功能。在实体肿瘤中, CAR-T 细胞必须穿过血管屏障和间质屏障才能进入肿瘤部位以发挥其功效,而肿瘤内血管床和间质的异常是影响疗效的关键因素^[70]。因此,可以设计靶向促进血管生成和肿瘤转移相关分子(如 VEGF-2 和 $\alpha v\beta 6$)的 CAR-T 细胞,以限制营养供应从而抑制 CRC 的转移^[71]。此外,许多 T 细胞缺乏与肿瘤或肿瘤基质表达的趋化因子匹配的趋化因子受体,从而无法有效结合至肿瘤细胞表面。并且当趋化因子/趋化因子受体轴出现错配时,肿瘤细胞会分泌微量趋化因子,导致 T 细胞无法抵达肿瘤组织^[72]。因此,利用趋化因子及其受体的趋化特性,可以设计在膜上表达 CCR5 和 CXCR3 的 CAR-T 细胞,通过释放肝素酶来更有效地提

高其移动和肿瘤浸润的能力^[73]。

4 展望

近 10 年来, CAR-T 细胞免疫疗法在血液肿瘤治疗领域取得了极大的成功。截至目前,美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)已经批准了 6 款 CAR-T 细胞治疗产品,中国国家药品监督管理局(National Medical Products Administration, NMPA)也批准了 3 款 CAR-T 细胞产品,9 款产品的靶点均为靶向血液系统恶性肿瘤治疗的 CD19 或 BCMA。目前,在针对 CRC 的各种细胞疗法研究中, CAR-T 细胞疗法被认为是最具前景的方法之一。尽管 CAR-T 细胞治疗 CRC 的临床研究仍处于早期阶段,但根据已有的临床前研究结果和临床试验数据,其有效性和安全性已得到证实。然而,该疗法在临床应用中面临诸多挑战,包括肿瘤特异性抗原的缺乏、在肿瘤组织中的穿透能力差以及高昂的治疗成本等。研究人员目前正在通过蛋白质组学技术寻找特异性靶点、对 CAR 结构进行改造等手段解决上述问题。此外, CAR-T 细胞治疗过程中可能出现一系列毒副反应,其中最常见的是 CRS 和神经毒性。对于上述毒副反应,现阶段临床上的应对策略是分别采用托珠单抗和肾上腺皮质激素进行治疗。因此, CAR-T 细胞治疗通常需与其他抗肿瘤治疗方法(如传统放疗、靶向治疗和免疫治疗)联合使用,并根据患者的肿瘤免疫微环境制定特异的药物组合、给药时间和顺序的治疗方案。综上所述, CAR-T 细胞免疫治疗在 CRC 领域已展现出良好前景,能为 CRC 患者的治疗提供新的方向和希望。

REFERENCES

- [1] HE K, WANG ZH, LUO MC, LI BW, DING N, LI L, HE B, WANG H, CAO JJ, HUANG CH, YANG J, CHEN HN. Metastasis organotropism in colorectal cancer:

- advancing toward innovative therapies[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2023, 21(1): 1-23.
- [2] LI N, LU B, LUO CY, CAI J, LU M, ZHANG YH, CHEN HD, DAI M. Incidence, mortality, survival, risk factor and screening of colorectal cancer: a comparison among China, Europe, and northern America[J]. *Cancer Letters*, 2021, 522: 255-268.
- [3] 李瑞娜, 徐辉, 李宁宁, 高小玲. MALAT1、HOTAIR、NEAT1 调控结直肠癌的研究进展[J]. *国际检验医学杂志*, 2023, 44(17): 2149-2154.
- LI RN, XU H, LI NN, GAO XL. Research progress in the regulation of colorectal cancer by MALAT1, HOTAIR, and NEAT1[J]. *International Journal of Laboratory Medicine*, 2023, 44(17): 2149-2154 (in Chinese).
- [4] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL RL, LAVERSANNE M, SOERJOMATARAM I, JEMAL A, BRAY F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 2021, 71(3): 209-249.
- [5] ARAGHI M, SOERJOMATARAM I, JENKINS M, BRIERLEY J, MORRIS E, BRAY F, ARNOLD M. Global trends in colorectal cancer mortality: projections to the year 2035[J]. *International Journal of Cancer*, 2019, 144(12): 2992-3000.
- [6] REISWICH V, GORBOKON N, LUEBKE AM, BURANDT E, MENZ A, KLUTH M, HUBE-MAGG C, WITTMER C, WEIDEMANN S, FRAUNE C, MÖLLER K, LEBOK P, SAUTER G, SIMON R, UHLIG R, WILCZAK W, JACOBSEN F, MINNER S, KRECH R, BERNREUTHER C, et al. Pattern of placental alkaline phosphatase (PLAP) expression in human tumors: a tissue microarray study on 12, 381 tumors[J]. *The Journal of Pathology: Clinical Research*, 2021, 7(6): 577-589.
- [7] SAWICKI T, RUSZKOWSKA M, DANIELEWICZ A, NIEDŹWIEDZKA E, ARLUKOWICZ T, PRZYBYŁOWICZ KE. A review of colorectal cancer in terms of epidemiology, risk factors, development, symptoms and diagnosis[J]. *Cancers*, 2021, 13(9): 2025.
- [8] SCHEPISI G, GIANNI C, PALLESCHI M, BLEVE S, CASADEI C, LOLLI C, RIDOLFI L, MARTINELLI G, de GIORGI U. The new frontier of immunotherapy: chimeric antigen receptor T (CAR-T) cell and macrophage (CAR-M) therapy against breast cancer[J]. *Cancers*, 2023, 15(5): 1597.
- [9] YI X, HU WW. Advances in adoptive cellular therapy for colorectal cancer: a narrative review[J]. *Annals of Translational Medicine*, 2022, 10(24): 1404.
- [10] ZHANG XM, ZHANG H, LAN HX, WU JM, XIAO Y. CAR-T cell therapy in multiple myeloma: current limitations and potential strategies[J]. *Frontiers in Immunology*, 2023, 14: 1101495.
- [11] STERNER RC, STERNER RM. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies[J]. *Blood Cancer Journal*, 2021, 11(4): 69.
- [12] CHMIELEWSKI M, ABKEN H. TRUCKs: the fourth generation of CARs[J]. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2015, 15(8): 1145-1154.
- [13] TOKAREW N, OGONEK J, ENDRES S, von BERGWELT-BAILDON M, KOBOLD S. Teaching an old dog new tricks: next-generation CAR T cells[J]. *British Journal of Cancer*, 2019, 120(1): 26-37.
- [14] GHAZI B, EL GHANMI A, KANDOUSSI S, GHOUZLANI A, BADOU A. CAR T-cells for colorectal cancer immunotherapy: ready to go?[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 978195.
- [15] MERINGA AD, HERNÁNDEZ-LÓPEZ P, CLEVEN A, de WITTE M, STRAETEMANS T, KUBALL J, BERINGER DX, SEBESTYEN Z. Strategies to improve $\gamma\delta$ TCRs engineered T-cell therapies for the treatment of solid malignancies[J]. *Frontiers in Immunology*, 2023, 14: 1159337.
- [16] TURNER MA, LWIN TM, AMIRFAKHRI S, NISHINO H, HOFFMAN RM, YAZAKI PJ, BOUVET M. The use of fluorescent anti-CEA antibodies to label, resect and treat cancers: a review[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(12): 1819.
- [17] DAEI SORKHABI A, MOHAMED KHOSROSHAHI L, SARKESH A, MARDI A, AGHEBATI-MALEKI A, AGHEBATI-MALEKI L, BARADARAN B. The current landscape of CAR T-cell therapy for solid tumors: mechanisms, research progress, challenges, and counterstrategies[J]. *Frontiers in Immunology*, 2023, 14: 1113882.
- [18] ADEBAYO AS, AGBAJE K, ADESINA SK, OLAJUBUTU O. Colorectal cancer: disease process, current treatment options, and future perspectives[J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15(11): 2620.
- [19] ZHANG CC, WANG Z, YANG Z, WANG ML, LI SQ, LI YY, ZHANG R, XIONG ZX, WEI ZH, SHEN JJ, LUO YL, ZHANG QZ, LIU LM, QIN H, LIU W, WU F, CHEN W, PAN F, ZHANG XQ, BIE P, et al. Phase I escalating-dose trial of CAR-T therapy targeting CEA+ metastatic colorectal cancers[J]. *Molecular Therapy*, 2017, 25(5): 1248-1258.
- [20] OWEN K, GHALY R, SHOHDY KS, THISTLETHWAITE F. Lymphodepleting chemotherapy practices and effect on safety and efficacy outcomes in patients with solid

- tumours undergoing T cell receptor-engineered T cell (TCR-T) therapy: a systematic review and meta-analysis[J]. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2023, 72(4): 805-814.
- [21] HOU XG, WANG F, MENG XX, LI D, DING J, CHEN Y, WANG ZL, ZHU H, YANG Z. Construction of a 124I-labeled specific antibody for the noninvasive detection of mesothelin-overexpressing tumors[J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2022, 19(10): 3623-3631.
- [22] INOUE S, TSUNODA T, RIKU M, ITO H, INOKO A, MURAKAMI H, EBI M, OGASAWARA N, PASTAN I, KASUGAI K, KASAI KJ, IKEDA H, INAGUMA S. Diffuse mesothelin expression leads to worse prognosis through enhanced cellular proliferation in colorectal cancer[J]. *Oncology Letters*, 2020, 19(3): 1741-1750.
- [23] LIU GD, ZHANG Q, LI DH, ZHANG LS, GU ZJ, LIU JB, LIU GP, YANG M, GU JW, CUI XB, PAN YJ, TIAN XL. PD-1 silencing improves anti-tumor activities of human mesothelin-targeted CAR T cells[J]. *Human Immunology*, 2021, 82(2): 130-138.
- [24] GAO T, CEN QH, LEI H. A review on development of MUC1-based cancer vaccine[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2020, 132: 110888.
- [25] CHOWDHURY P, KIM S, LEE ES, CHA BS, PARK KS. DNA micelle-templated copper nanoclusters for fluorescent imaging of MUC1-positive cancer cells[J]. *Mikrochimica Acta*, 2022, 189(11): 404.
- [26] FLICKINGER JC Jr, RAPPAPORT JA, BARTON JR, BAYBUTT TR, PATTISON AM, SNOOK AE, WALDMAN SA. Guanylyl cyclase C as a biomarker for immunotherapies for the treatment of gastrointestinal malignancies[J]. *Biomarkers in Medicine*, 2021, 15(3): 201-217.
- [27] LISBY AN, FLICKINGER JC Jr, BASHIR B, WEINDORFER M, SHELUKAR S, CRUTCHER M, SNOOK AE, WALDMAN SA. GUCY2C as a biomarker to target precision therapies for patients with colorectal cancer[J]. *Expert Review of Precision Medicine and Drug Development*, 2021, 6(2): 117-129.
- [28] MAGEE MS, ABRAHAM TS, BAYBUTT TR, FLICKINGER JC JR, RIDGE NA, MARSZALOWICZ GP, PRAJAPATI P, HERSPERGER AR, WALDMAN SA, SNOOK AE. Human GUCY2C-targeted chimeric antigen receptor (CAR)-expressing T cells eliminate colorectal cancer metastases[J]. *Cancer Immunology Research*, 2018, 6(5): 509-516.
- [29] CUDA TJ, RIDDELL AD, LIU C, WHITEHALL VL, BOROWSKY J, WYLD DK, BURGE ME, AHERN E, GRIFFIN A, LYONS NJR, ROSE SE, CLARK DA, STEVENSON ARL, HOOPER JD, PUTTICK S, THOMAS PA. PET imaging quantifying 68Ga-PSMA-11 uptake in metastatic colorectal cancer[J]. *Journal of Nuclear Medicine*, 2020, 61(11): 1576-1579.
- [30] JELSKI W, MROCZKO B. Biochemical markers of colorectal cancer-present and future[J]. *Cancer Management and Research*, 2020, 12: 4789-4797.
- [31] HEGE KM, BERGSLAND EK, FISHER GA, NEMUNAITIS JJ, WARREN RS, McARTHUR JG, LIN AA, SCHLOM J, JUNE CH, SHERWIN SA. Safety, tumor trafficking and immunogenicity of chimeric antigen receptor (CAR)-T cells specific for TAG-72 in colorectal cancer[J]. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 2017, 5: 22.
- [32] TAN G, SPILLANE KM, MAHER J. The role and regulation of the NKG2D/NKG2D ligand system in cancer[J]. *Biology*, 2023, 12(8): 1079.
- [33] SACRAMENTO LA, FARIAS AMORIM C, CAMPOS TM, SALDANHA M, ARRUDA S, CARVALHO LP, BEITING DP, CARVALHO EM, NOVAIS FO, SCOTT P. NKG2D promotes CD8 T cell-mediated cytotoxicity and is associated with treatment failure in human cutaneous leishmaniasis[J]. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2023, 17(8): e0011552.
- [34] DENG XN, GAO F, LI N, LI QX, ZHOU Y, YANG T, CAI ZQ, DU PP, CHEN F, CAI JH. Antitumor activity of NKG2D CAR-T cells against human colorectal cancer cells *in vitro* and *in vivo*[J]. *American Journal of Cancer Research*, 2019, 9(5): 945-958.
- [35] LONEZ C, VERMA B, HENDLISZ A, AFTIMOS P, AWADA A, van den NESTE E, CATALA G, MACHIELS JP H, PIETTE F, BRAYER JB, SALLMAN DA, KERRE T, ODUNSI K, DAVILA ML, GILHAM DE, LEHMANN FF. Study protocol for THINK: a multinational open-label phase I study to assess the safety and clinical activity of multiple administrations of NKR-2 in patients with different metastatic tumour types[J]. *BMJ Open*, 2017, 7(11): e017075.
- [36] GUO XP, CHANG MQ, WANG Y, XING B, MA WB. B7-H3 in brain malignancies: immunology and immunotherapy[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2023, 19(12): 3762-3780.
- [37] CHEN SJ, ZHAN SH, DING SS, ZHANG QG, XUAN HQ, ZHANG XG, CAO L. B7-H3 and CD47 co-expression in gastric cancer is a predictor of poor prognosis and potential targets for future dual-targeting immunotherapy[J]. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 2023, 149(18): 16609-16621.
- [38] RASIC P, JEREMIC M, JEREMIC R, DUSANOVIC

- PJEVIC M, RASIC M, DJURICIC SM, MILICKOVIC M, VUKADIN M, MIJOVIC T, SAVIC D. Targeting B7-H3—a novel strategy for the design of anticancer agents for extracranial pediatric solid tumors treatment[J]. *Molecules*, 2023, 28(8): 3356.
- [39] SABBAH DA, HAJJO R, SWEIDAN K. Review on epidermal growth factor receptor (EGFR) structure, signaling pathways, interactions, and recent updates of EGFR inhibitors[J]. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2020, 20(10): 815-834.
- [40] HAGAR FF, ABBAS SH, GOMAA HAM, YOUSSEF BGM, SAYED AM, ABDELHAMID D, ABDEL-AZIZ M. Chalcone/1,3,4-oxadiazole/benzimidazole hybrids as novel anti-proliferative agents inducing apoptosis and inhibiting EGFR & BRAFV600E[J]. *BMC Chemistry*, 2023, 17(1): 116.
- [41] BUDI HS, AHMAD FN, ACHMAD H, ANSARI MJ, MIKHAILOVA MV, SUKSATAN W, CHUPRADIT S, SHOMALI N, MAROFI F. Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-specific chimeric antigen receptor (CAR) for tumor immunotherapy; recent progress[J]. *Stem Cell Research & Therapy*, 2022, 13(1): 1-21.
- [42] FRAGA T, de SOUSA MJ, MAGALHÃES J, BASTO R, PAULO J, BONITO N, MAGALHÃES JP, FIGUEIREDO P, SOUSA GM. HER2 status in RAS and BRAF wild-type metastatic colorectal cancer: a portuguese study[J]. *Cureus*, 2023, 15(7): e42536.
- [43] TENG RD, ZHAO JJ, ZHAO YD, GAO JS, LI HB, ZHOU SX, WANG Y, SUN Q, LIN ZQ, YANG WF, YIN M, WEN JH, DENG HK. Chimeric antigen receptor-modified T cells repressed solid tumors and their relapse in an established patient-derived colon carcinoma xenograft model[J]. *Journal of Immunotherapy*, 2019, 42(2): 33-42.
- [44] XU J, MENG QT, SUN H, ZHANG XW, YUN J, LI B, WU SS, LI XB, YANG HB, ZHU HT, ASCHNER M, RELUCENTI M, FAMILIARI G, CHEN R. HER2-specific chimeric antigen receptor-T cells for targeted therapy of metastatic colorectal cancer[J]. *Cell Death & Disease*, 2021, 12(12): 1109.
- [45] McGRATH K, DOTTI G. Combining oncolytic viruses with chimeric antigen receptor T cell therapy[J]. *Human Gene Therapy*, 2021, 32(3/4): 150-157.
- [46] DAS B, SETHY C, CHATTERJEE S, DASH SR, SINHA S, PAUL S, GOUTAM K, KUNDU CN. Quinacrine inhibits cMET-mediated metastasis and angiogenesis in breast cancer stem cells[J]. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 2023, 17(4): 1371-1388.
- [47] SAFAIE QAMSARI E, SAFAEI GHADERI S, ZAREI B, DOROSTKAR R, BAGHERI S, JADIDI-NIARAGH F, SOMI MH, YOUSEFI M. The c-Met receptor: implication for targeted therapies in colorectal cancer[J]. *Tumor Biology*, 2017, 39(5): 101042831769911.
- [48] LEE CC, YU CJ, PANDA SS, CHEN KC, LIANG KH, HUANG WC, WANG YS, HO PC, WU HC. Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) regulates HGFR signaling to promote colon cancer progression and metastasis[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2023, 21(1): 1-22.
- [49] GIRES O, PAN M, SCHINKE H, CANIS M, BAEUERLE PA. Expression and function of epithelial cell adhesion molecule EpCAM: where are we after 40 years?[J]. *Cancer and Metastasis Reviews*, 2020, 39(3): 969-987.
- [50] EYVAZI S, FARAJNIA S, DASTMALCHI S, KANIPOUR F, ZARREDAR H, BANDEHPOUR M. Antibody based EpCAM targeted therapy of cancer, review and update[J]. *Current Cancer Drug Targets*, 2018, 18(9): 857-868.
- [51] ZHANG BL, LI D, GONG YL, HUANG Y, QIN DY, JIANG L, LIANG X, YANG X, GOU HF, WANG YS, WEI YQ, WANG W. Preclinical evaluation of chimeric antigen receptor-modified T cells specific to epithelial cell adhesion molecule for treating colorectal cancer[J]. *Human Gene Therapy*, 2019, 30(4): 402-412.
- [52] LI WZ, ZHOU Y, WU ZG, SHI YP, TIAN EM, ZHU YQ, WANG T, DOU W, MENG XJ, CHEN M, ZHAI B, ZHU D. Targeting Wnt signaling in the tumor immune microenvironment to enhancing EpCAM CAR T-cell therapy[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, 12: 724306.
- [53] YUE M, GUO T, NIE DY, ZHU YX, LIN M. Advances of nanotechnology applied to cancer stem cells[J]. *World Journal of Stem Cells*, 2023, 15(6): 514-529.
- [54] AKBARI M, SHOMALI N, FARAJI A, SHANEHBANDI D, ASADI M, MOKHTARZADEH A, SHABANI A, BARADARAN B. CD133: an emerging prognostic factor and therapeutic target in colorectal cancer[J]. *Cell Biology International*, 2020, 44(2): 368-380.
- [55] WANG Y, CHEN MX, WU ZQ, TONG C, DAI H, GUO YL, LIU Y, HUANG JH, LV HY, LUO C, FENG KC, YANG QM, LI XL, HAN WD. CD133-directed CAR T cells for advanced metastasis malignancies: a phase I trial[J]. *Oncoimmunology*, 2018, 7(7): e1440169.
- [56] TOH Y, WU L, PARK S, WANG A, TU JH, YU WS, ZUO MX, CARMON KS, LIU QYJ. LGR4 and LGR5 form distinct homodimers that only LGR4 complexes with RNF43/ZNRF3 to provide high affinity binding of

- R-spondin ligands[J]. *Scientific Reports*, 2023, 13(1): 10796.
- [57] CAO Y, EFETOV SK, HE MZ, FU Y, BEERAKA NM, ZHANG J, ZHANG XL, BANNIMATH N, CHEN K. Updated clinical perspectives and challenges of chimeric antigen receptor-T cell therapy in colorectal cancer and invasive breast cancer[J]. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 2023, 71(1): 1-19.
- [58] SUREBAN SM, BERAHOVICH R, ZHOU H, XU S, WU L, DING K, MAY R, QU D, BANNERMAN-MENSON E, GOLUBOVSKAYA V, HOUCHEM CW. DCLK1 monoclonal antibody-based CAR-T cells as a novel treatment strategy against human colorectal cancers[J]. *Cancers*, 2020, 12(1): 54.
- [59] LI X, BERAHOVICH R, ZHOU H, LIU XH, LI F, XU S, WEI YH, OUARET D, BODMER W, WU LJ, GOLUBOVSKAYA V. PLAP-CAR T cells mediate high specific cytotoxicity against colon cancer cells[J]. *Frontiers in Bioscience*, 2020, 25(9): 1765-1786.
- [60] BASHIRI DEZFOULI A, YAZDI M, BENMEBAREK MR, SCHWAB M, MICHAELIDES S, MICCICHÈ A, GEERTS D, STANGL S, KLAPPROTH S, WAGNER E, KOBOLD S, MULTHOFF G. CAR T cells targeting membrane-bound Hsp70 on tumor cells mimic Hsp70-primed NK cells[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 883694.
- [61] FENG ZJ, HE X, ZHANG XY, WU Y, XING BW, KNOWLES A, SHAN QN, MILLER S, HOJNACKI T, MA J, KATONA BW, GADE TPF, SCHRADER J, METZ DC, JUNE CH, HUA XX. Potent suppression of neuroendocrine tumors and gastrointestinal cancers by CDH17CAR T cells without toxicity to normal tissues[J]. *Nature Cancer*, 2022, 3(5): 581-594.
- [62] LI M, LI SL, ZHAO RC, LV J, ZHENG DW, QIN L, LI SY, WU QT, LONG YG, TANG ZY, TANG YL, YANG LH, YAO Y, LUO XQ, LI P. CD318 is a target of chimeric antigen receptor T cells for the treatment of colorectal cancer[J]. *Clinical and Experimental Medicine*, 2023, 23(6): 2409-2419.
- [63] HE S, LI SR, GUO J, ZENG XZ, LIANG DD, ZHU YJ, LI Y, YANG D, ZHAO XD. CD166-specific CAR-T cells potently target colorectal cancer cells[J]. *Translational Oncology*, 2023, 27: 101575.
- [64] MAREI HE, ALTHANI A, CACECI T, ARRIGA R, SCONOCCHIA T, OTTAVIANI A, LANZILLI G, ROSELLI M, CARATELLI S, CENCIARELLI C, SCONOCCHIA G. Recent perspective on CAR and Fcγ-CR T cell immunotherapy for cancers: preclinical evidence versus clinical outcomes[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2019, 166: 335-346.
- [65] MOGHIMI B, MUTHUGOUNDER S, JAMBON S, TIBBETTS R, HUNG L, BASSIRI H, HOGARTY MD, BARRETT DM, SHIMADA H, ASGHARZADEH S. Preclinical assessment of the efficacy and specificity of GD2-B7H3 SynNotch CAR-T in metastatic neuroblastoma[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 511.
- [66] SCHUBERT ML, SCHMITT M, WANG L, RAMOS CA, JORDAN K, MÜLLER-TIDOW C, DREGER P. Side-effect management of chimeric antigen receptor (CAR) T-cell therapy[J]. *Annals of Oncology*, 2021, 32(1): 34-48.
- [67] ZHENG YS, LAI ZS, WANG B, WEI ZW, ZENG YY, ZHUANG QY, LIU XL, LIN KC. Natural killer cells modified with a Gpc3 aptamer enhance adoptive immunotherapy for hepatocellular carcinoma[J]. *Discover Oncology*, 2023, 14(1): 1-14.
- [68] SAFARZADEH KOZANI P, SAFARZADEH KOZANI P, RAHBARIZADEH F. Novel antigens of CAR T cell therapy: new roads; old destination[J]. *Translational Oncology*, 2021, 14(7): 101079.
- [69] HUANG RH, LI XP, HE YD, ZHU W, GAO L, LIU Y, GAO L, WEN Q, ZHONG JF, ZHANG C, ZHANG X. Recent advances in CAR-T cell engineering[J]. *Journal of Hematology & Oncology*, 2020, 13(1): 1-19.
- [70] WANG HF, PAN WH. Challenges of chimeric antigen receptor-T/natural killer cell therapy in the treatment of solid tumors: focus on colorectal cancer and evaluation of combination therapies[J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2023, 478(5): 967-980.
- [71] SHEN J, YANG DS, DING YM. Advances in promoting the efficacy of chimeric antigen receptor T cells in the treatment of hepatocellular carcinoma[J]. *Cancers*, 2022, 14(20): 5018.
- [72] DAGAR G, GUPTA A, MASOODI T, NISAR S, MERHI M, HASHEM S, CHAUHAN R, DAGAR M, MIRZA S, BAGGA P, KUMAR R, AL-SHABEEB AKIL AS, MACHA MA, HARIS M, UDDIN S, SINGH M, BHAT AA. Harnessing the potential of CAR-T cell therapy: progress, challenges, and future directions in hematological and solid tumor treatments[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2023, 21(1): 1-36.
- [73] D'ALOIA MM, ZIZZARI IG, SACCHETTI B, PIERELLI L, ALIMANDI M. CAR-T cells: the long and winding road to solid tumors[J]. *Cell Death & Disease*, 2018, 9(3): 282.

(本文责编 陈宏宇)