

DOI: 10.19338/j.issn.1672-2019.2024.03.003

· 论 著 ·

一种可满足产业化需求的靶向 EpCAM 嵌合抗原受体慢病毒生产工艺*

周文婷¹, 邓公平², 付舒翔¹, 田方艳¹, 吴珊珊¹, 柏清玉¹,
邓长云¹, 唐颖鑫¹, 朱淑英¹, 张培湘¹

(1. 湖南远泰生物技术有限公司, 湖南 长沙 410221; 2. 海南省人民医院 急诊科, 海南 海口 570311)

摘要: **目的** 建立一种可满足产业化需求的靶向上皮细胞粘附分子 (EpCAM) 嵌合抗原受体 (CAR) 慢病毒生产工艺。**方法** 以 EpCAM 蛋白为抗原, 免疫小鼠获得 EpCAM 单抗, 采用 EpCAM 单抗的 scFv 为胞外单链可变区, 构建人源化靶向 EpCAM 的第三代 CAR 载体质粒, 并通过 EpCAM CAR 载体质粒与慢病毒包装质粒共转染 HEK 293T 细胞获得慢病毒粗毒液, 粗毒液经核酸酶孵育、过滤澄清、Core 700 层析、浓缩换液、除菌过滤、制剂分装等工序获得 EpCAM 慢病毒成品。**结果** 通过 EpCAM 单抗成功构建了靶向 EpCAM 抗原的嵌合抗原受体 Humanized EpCAM ScFv-CD28-CD3 ζ -CAR, 并通过该 EpCAM CAR 进行 2 L 悬浮体系慢病毒包装所收获粗毒液, 经层析及超滤浓缩等纯化工艺收获慢病毒成品 100 mL, 成品慢病毒转导滴度达 2.16×10^8 TU/mL, 慢病毒总量达 2.16×10^{10} TU。成功开发了可满足产业化需求的靶向 EpCAM CAR 慢病毒上游包装及下游纯化生产工艺。**结论** 具有成本效益的慢病毒 (LV) 载体制备对于满足产业化需求至关重要, 本研究在 EpCAM 蛋白、EpCAM 抗体、及 EpCAM CAR 载体质粒的基础上, 结合完整的慢病毒悬浮生产工艺, 制备高滴度高纯度的靶向 EpCAM 嵌合抗原受体慢病毒, 为 EpCAM CAR-T 细胞治疗实体瘤应用及其产业化奠定基础。

关键词: 上皮细胞粘附分子; 嵌合抗原受体; CAR-T 细胞治疗; 慢病毒生产

中图分类号: R392

A production process for lentivirus of chimeric antigen receptor targeting EpCAM that can meet industrial needs*

ZHOU Wenting¹, DENG Gongping², FU Shuxiang¹, TIAN Fangyan¹, WU Shanshan¹, BAI Qingyu¹,
DENG Changyun¹, TANG Yingxin¹, ZHU Shuying¹, ZHANG Peixiang¹

(1. Forevertek Biotechnology Co., Ltd, Changsha, Hunan 410221, China; 2. Department of Emergency, Hainan General Hospital, Haikou, Hainan 570311, China)

Abstract: [Objective] To establish a production process for targeted epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) chimeric antigen receptor lentivirus that can meet the needs of industrialization. **[Methods]** The EpCAM protein was used as the antigen to immunize mice and obtain EpCAM monoclonal antibodies. The scFv of the EpCAM monoclonal antibody was used as the extracellular single chain variable region to construct a humanized third-generation chimeric antigen receptor (EpCAM CAR) vector plasmid targeting EpCAM. The crude lentiviral solution was obtained by co-transfecting the EpCAM CAR vector plasmid with the lentiviral packaging plasmid into HEK 293T cells. The crude solution was incubated with nuclease, filtered and clarified, subjected to Core 700 chromatography, concentrated and changed, and sterilized and filtered obtaining EpCAM lentivirus finished products through processes such as formulation packaging. **[Results]** A chimeric antigen receptor Humanized was targeting EpCAM antigen was successfully constructed using EpCAM monoclonal antibody, and the crude venom was obtained from 2 L suspension system lentivirus packaging using this EpCAM CAR. After purification processes such as chromatography and ultrafiltration

收稿日期: 2024-01-18

* 基金项目: 海南省重点研发计划项目 (ZDYF2020228), 湖南省科药联合基金 (2022JJ80019)

[通信作者] 邓公平, E-mail: denggongp@163.com

concentration, 100 mL of the finished lentivirus product was obtained, with a lentivirus transduction titer of 2.16×10^8 TU/mL, and a total amount of 2.16×10^{10} TU. A targeted EpCAM CAR lentivirus upstream packaging and downstream purification production process that can meet industrial needs was successfully developed. **【Conclusion】** The preparation of cost-effective lentivirus (LV) vectors is crucial for meeting industrial needs. This study, based on EpCAM protein, EpCAM antibody, and EpCAM CAR vector plasmid, combined with a complete lentivirus suspension production process, prepared a high titer and high purity targeted EpCAM chimeric antigen receptor lentivirus, laying the foundation for the application and industrialization of EpCAM CAR-T cell therapy for solid tumors.

Keywords: epithelial cell adhesion molecule (EpCAM); chimeric antigen receptor (CAR); CAR-T therapy; lentivirus produce

随着基因细胞治疗行业的飞速发展，嵌合抗原受体 T 细胞 (CAR-T) 作为一种基因工程修饰的新型高效、精准靶向的肿瘤细胞免疫治疗药物，已经在血液肿瘤治疗中展现巨大治疗潜力，国内外已有多个产品获批上市。基因传递/转染是制备 CAR-T 的关键，载体的导入效率影响着 CAR-T 产品的成本和质量。目前全球范围内在研的细胞免疫治疗管线中，绝大部分项目选用慢病毒作为感染 T 细胞的载体。慢病毒载体是以 HIV-1 (人类免疫缺陷 I 型病毒, 80~120 nm) 为基础发展起来的细胞与基因治疗载体，主要由荚膜、蛋白壳及内部包裹的 RNA 构成。慢病毒载体可以将外源基因有效地整合到宿主细胞的染色体上，从而实现外源基因的稳定表达，是工业和临床科研常用的一类病毒载体。上皮细胞粘附分子 (EpCAM, 又称为 CD326) 抗原是由 EpCAM 基因编码约 30~40 kDa 的细胞表面糖蛋白。人 EpCAM 蛋白由 314 个氨基酸组成。该蛋白包含一个信号肽和三个结构域 (细胞外 AA24-265、跨膜 AA266-288、细胞质 AA289-314)。EpCAM 参与 Wnt、ERK 和 AKT 生存信号传导，并在运动、增殖和细胞生长中发挥作用。EpCAM^[1-2] 最初被发现是人类结肠癌^[3] 的主要抗原，是一种 I 型跨膜糖蛋白，位于正常上皮细胞^[4] 的一个亚群和许多干细胞表达^[5] 上。在一些上皮性癌症^[6] 中，包括卵巢癌^[7]，EpCAM 抗原也以异质性的方式过表达。EpCAM 在细胞粘附、生长、增殖、炎症、癌症和转移中起着至关重要的作用，并且明显呈现在各种癌变的细胞表面，使其成为 CAR-T 细胞治疗中的一个非常有吸引力的靶点^[8-9]。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验用细胞 病毒生产用人胚肾上皮细胞

(HEK 293T) 悬浮细胞由湖南远泰生物技术有限公司自主驯化所得，并按照《中华人民共和国药典》2020 年版三部生物制品生产检定用动物细胞基质制备及质量控制等指导文件建立三级细胞库。HEK 293T 细胞培养：LVPY01 培养基、病毒包装转染用 LVZR02 培养基、提高病毒表达产量补料用 LVBL03 培养基/LVBL04 培养基均为远泰生物自制。检定用 HEK 293T 细胞购自美国 ATCC 生物生物标准品资源中心，货号 CRL-3216。

1.1.2 实验用动物 SPF 级雌性 BALB/C 小鼠产自湖南远泰生物技术有限公司。

1.1.3 主要试剂与材料 EpCAM 蛋白产自湖南远泰生物技术有限公司；EpCAM 特异性 CAR 的慢病毒载体质粒构建由美国 ProMab 公司完成；pMD2.G、pMDLg-pRRE、pRSV-Rev 慢病毒三个包装质粒从 Addgene 购买并经远泰生物进行了 KanR 改造，KanR 改造完成后三个质粒分别命名为 P004、P005、P006 质粒；1 M MgCl₂ 溶液购自 Thermo，货号 AM9530G；Super Nuclease 核酸酶购自北京义翘神州，货号 GMP-SSNP01；Capto Core 700 填料购自 Cytiva，货号 17548103；层析缓冲液 LVPH01 溶液为远泰生物自制；LVBC06 病毒保存液为远泰生物自制。Biotin-Human Fab specific 购自 Jackson ImmunoResearch，货号 109-066-097；PE Streptavidin 购自 BioLegend，货号 405204；7AAD 购自 BioLegend，货号 420404。

1.2 实验方法

1.2.1 EpCAM 单抗制备实验方法 ①小鼠免疫及测血：采用 EpCAM 蛋白与福氏完全佐剂/福氏不完全佐剂混匀乳化，皮下注射，每只免疫 EpCAM 蛋白量约 25~50 μg。按照 Day 1 至 Day 21 至 Day 35 周期免疫，第三次注射后 10 d 测血 [酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay,

ELISA) /蛋白免疫印迹 (western blot, WB) /流式细胞术 (flow cytometry, FCM)], 达到滴度即可做准备融合前准备。②加强免疫及融合: 融合前 3~4 d, 小鼠尾静脉加强免疫 EpCAM 蛋白量约 25~50 μg 。加强免疫完成后无菌操作获取小鼠脾脏, 制成小鼠脾细胞悬液后, 与准备好的小鼠骨髓瘤细胞按一定的比例, 通过聚乙二醇 (PEG) 进行融合, 融合后的细胞采用预温的完全 HAT 培养液于 96 孔板中共培养。③杂交瘤的扩增和筛选: 融合后 4~5 d, 更换 96 孔板中 HAT 培养液至 HT 培养液。融合后 8~10 d 进行 96 孔杂交瘤细胞的筛选, 筛选 96 孔板中所得阳性孔转入 24 孔进行扩增培养。④有限稀释单克隆化及扩大培养: 筛选 24 孔板中所得阳性孔进行有限稀释至 96 孔板, 进而筛选有限稀释后的 96 孔板中, 所得单克隆阳性孔转入 24 孔进行扩增培养, 继续筛选 24 孔板中所得阳性孔扩增至 6 孔板。⑤阳性克隆细胞冻存与抗体生产: 将 6 孔板中阳性细胞冻存保种后, 将细胞扩增至 T75/T175 瓶中, 当阳性细胞达到小鼠腹水生产需求量时, 按一定的细胞数量进行小鼠腹腔注射, 约 7~10 d 收集小鼠腹腔内腹水, 采用 Protein A 进行腹水纯化, 纯化后即为 EpCAM 单克隆抗体。

1.2.2 EpCAM 单抗检测方法 在单克隆抗体制备过程中可根据产品需求对小鼠血清、母克隆、亚克隆、定珠杂交瘤细胞、上清、腹水、抗体等中间品和成品进行相关检测如 ELISA、WB、FCM、免疫组织化学、免疫荧光等检测项目。本文主要呈现 ELISA 法: 纯化抗体按照 1 : 10³、1 : 10⁴、1 : 10⁵ 进行梯度稀释, 纯化抗体稀释后加入包被有相应抗原的酶标板中, 同时设定好对照, ELISA 结果判断标准为 450 nm 波长测定吸光值, 阴性对照 OD 值 < 0.2, 阳性对照 OD 值 > 1.0, 待测抗体 OD 值 > 0.2, P/N > 2.1 时, 纯化抗体的最大稀释倍数为抗体的 ELISA 效价。

1.2.3 EpCAM CAR 质粒构建及制备实验方法
①EpCAM 阳性单克隆细胞株可变区测序: 复苏并培养阳性单克隆细胞株, 通过 Trizol、氯仿等试剂提取阳性细胞 RNA, 采用一步法 cDNA 反转录试剂盒进行聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR)、反转录 PCR (reverse transcription PCR, RT-PCR) 反应, 逆转录得到 DNA 后采用 pMDTM19-T 载体克隆试剂盒连接至 T-vector, 将所得反应体系

转化至异丙基硫代- β -D-半乳糖苷 (isopropylthio- β -D-galactoside, IPTG)、X-gal、Amp 的 LB 平板中培养过夜后扩大培养, 并针对每个重链和轻链克隆送上海生工进行测序。得到测序结果后, 通过分析确定重链和轻链的可变区序列。EpCAM CAR 质粒构建: ProMab 公司采用 EpCAM 阳性单克隆细胞株可变区测序结果, 构建编码人源化 EpCAM 特异性 CAR 的慢病毒载体质粒。②EpCAM CAR 质粒制备实验方法。a: 采用 ProMab 公司构建好的 EpCAM CAR 原始质粒转化 DH5 α 感受态细胞, 挑选单克隆菌落并扩大培养, 按照《中华人民共和国药典》2020 年版三部: 生物制品生产检定用菌毒种的管理及质量控制等文件指导内容, 建立 DH5 α -EpCAM 三级菌种库。b: 复苏一支 DH5 α -EpCAM 工作库菌种扩大培养至 10 L 发酵罐, 发酵约 24 h, 菌液 OD 600 nm 值达到 50, 即收获发酵菌液; 将发酵菌液经高速离心收获湿菌, 湿菌经裂解、澄清、三步层析、浓缩换液、除菌过滤、制剂分装等工序获得 EpCAM CAR 载体质粒成品。

1.2.4 EpCAM 慢病毒生产方法
①HEK 293T 细胞复苏: 复苏一支 HEK 293T 悬浮工作库细胞, 加入到预热的远泰自制 LVPY001 培养基, 离心重悬并计数后, 按一定的细胞密度接种至 125 mL 摇瓶, 于 CO₂ 浓度为 5% 的振荡培养箱 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养。
②HEK 293T 细胞传代: 采用远泰自制 LVPY01 培养基进行传代培养至 1 个或多个 1 000 mL 摇瓶, 应注意细胞密度、细胞活率等数据, 传代期间应保持细胞活率 > 95%。根据慢病毒成品需求量确定产毒细胞需求量, 从而确定细胞传代次数和传代周期。
③病毒包装: 取适量 HEK 293T 细胞离心后, 采用远泰自制 LVZR02 培养基重悬细胞; 采用 EpCAM CAR 载体质粒以及三种包装质粒 (分别为 P004、P005、P006 质粒), 四种质粒按一定的比例与 PEI 转染试剂, 共转染人胚肾细胞 (HEK 293TS) 细胞。于 CO₂ 浓度为 5% 的振荡培养箱 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养。
④补料: 转染后 7~24 h, 分别采用远泰自制 LVBL03 培养基、LVBL04 培养基进行补料。
⑤粗毒液收获: 转染后 48 h, 收获所有转染细胞培养瓶中的细胞悬液, 离心后收获上清即为粗毒液。
⑥酶孵育与过滤澄清: 加入适量 MgCl₂ 溶液、Super Nuclease 核酸酶溶液至粗毒液中孵育后, 采用 0.45 μm 一次性囊式过滤器进行过滤澄清。

⑦Core 700 层析：采用 Capto Core 700 填料层析柱，连接层析柱到 AKTA pure-150M 层析系统上。平衡：采用远泰自制 LVPH05 溶液 1~3 cV，上样，上样完成后继续用 LVPH05 溶液进行冲洗 1~3 cV。层析方法线性流速 ≥ 120 cm/h，紫外收集信号波段为 A280 200 mAU~200 mAU。⑧浓缩换液、除菌过滤、制剂分装：收获层析洗脱液后选取合适规格的中空纤维柱进行浓缩换液，采用 0.22 μm 滤器对病毒浓缩液进行除菌过滤，采用远泰自制 LVBC06 病毒保存液按比例加入病毒原液中，最后进行无菌分装，所得 EpCAM 慢病毒成品于 -80°C 冰箱保存。

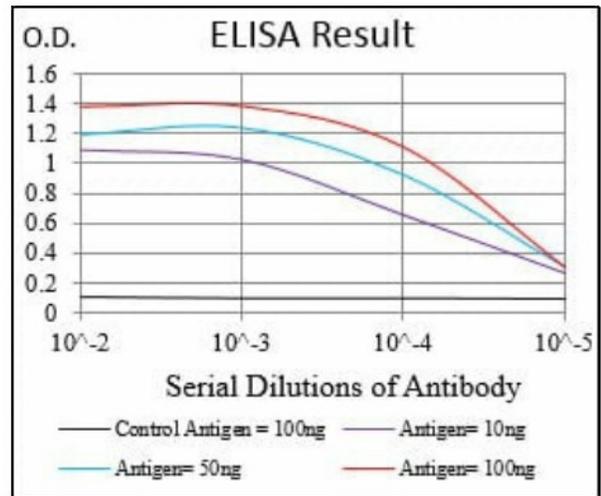
1.2.5 EpCAM 慢病毒检测方法 在生产过程中可根据产品需求对慢病毒粗毒液、终末细胞、慢病毒原液、慢病毒成品等进行相关检测，如复制型慢病毒 (RCL)、转导滴度、P24 抗原滴度、宿主 DNA 残留、宿主蛋白残留、目的基因鉴别、核酸酶残留、质粒 DNA 残留、猿猴病毒 40 大 T 抗原 (SV40LTA) 和腺病毒早期区域 1A 蛋白 (E1A) 残留、内毒素、无菌、支原体等检测项目。本文主要呈现转导滴度检测方法：采用检定用 HEK 293T 细胞进行 24 孔铺板，取 EpCAM 慢病毒成品样本进行梯度稀释，根据对慢病毒样品转导滴度的估计，先将病毒稀释到适当浓度，然后每步 2~5 倍依次进行梯度稀释，使转导后的检定细胞的阳性率检测值落在取值可信范围内；将各梯度稀释的慢病毒样本接种到 HEK 293T 细胞中，约 20~24 h 补加培养基，约 48 h 收获感染细胞进行流式检测。

2 结果

2.1 EpCAM 单抗制备及检测

采用 EpCAM 蛋白进行小鼠免疫及测血、加强免疫及融合、杂交瘤的扩增和筛选、有限稀释单克隆化及扩大培养 [经过有限稀释和筛选，最后得到的克隆为 7B5 (7B5C10)]、阳性克隆细胞 (7B5) 冻存与抗体生产，最终获得 EpCAM 单克隆抗体 (7B5)，为验证 EpCAM 单抗 (7B5) 的特异性，进行 ELISA/WB/FCM/IHC 等检测。

2.1.1 EpCAM 单抗 (7B5) ELISA 检测结果 根据不同的 EpCAM 蛋白抗原包被浓度 10 ng/50 ng/100 ng，使用 EpCAM 小鼠单克隆抗体 (7B5) 为一抗，图 1 可见该抗体与 EpCAM 蛋白抗原特异性结合阳性反应的最大浓度为 $1:10^5$ ，该抗体的 ELISA 效价为 $1:10^5$ 。



黑线：对照抗原 (100 ng)；紫线：抗原 (10 ng)；蓝线：抗原 (50 ng)；红线：抗原 (100 ng)。

图 1 使用 EpCAM 小鼠单克隆抗体 (7B5) 进行 ELISA 检测

2.1.2 EpCAM 单抗 (7B5) Western blot 检测结果

采用 HCT116 人结肠癌细胞 (泳道 1)、HT-29 人结肠癌细胞 (泳道 2)、SW480 人结肠癌细胞 (泳道 3)、Sw620 人结肠癌细胞 (泳道 4)、T47D 人乳腺管癌细胞 (泳道 5)，五种细胞裂解液进行的 EpCAM 小鼠单克隆抗体 (7B5) 的 WB 分析。图 2 可见不同的细胞裂解液用 EpCAM 小鼠单克隆抗体进行免疫印迹后均在 40 kDa 目的分子量条带处出现了特异性条带。

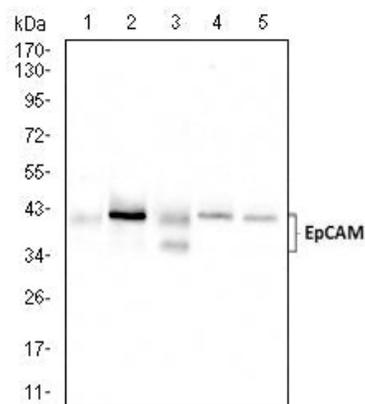


图 2 使用 EpCAM 小鼠单克隆抗体 (7B5) 进行 WB 分析

2.1.3 EpCAM 单抗 (7B5) Flow cytometric 检测结果

采用 EpCAM 小鼠单克隆抗体 (7B5) (绿色) 和阴性对照 (红色) 对 Lovo 人结肠癌细胞进行 FCM 分析，图 3 可见在 Lovo 人结肠癌细胞中有明显阳性表达。

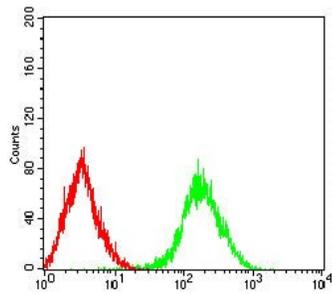
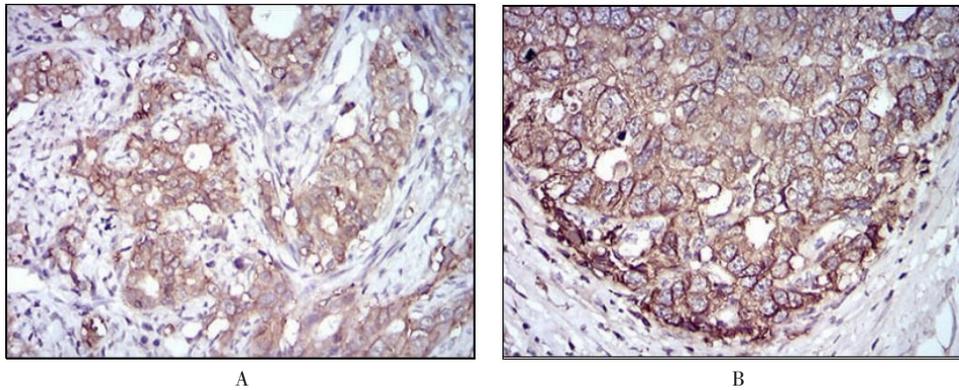


图 3 使用 EpCAM 小鼠单克隆抗体 (7B5) 进行 FCM 分析

2.1.4 EpCAM 单抗 (7B5) 免疫组织化学检测结果 石蜡包埋癌症组织使用 EpCAM 小鼠单克隆抗体 DAB 染色, 图 4 可见在人宫颈癌和人食管癌



A: 人宫颈癌组织; B: 人食管癌组织。

图 4 使用 EpCAM 小鼠单克隆抗体 (7B5) 进行免疫组织化学检测

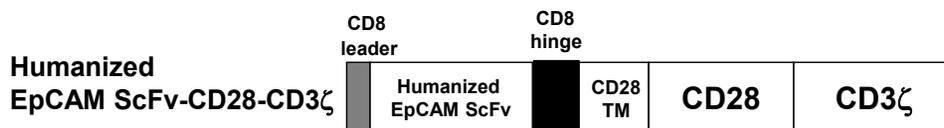


图 5 将人源化 EpCAM-ScFv 融合到跨膜和 CD28/CD3-zeta T 细胞活化结构域, CAR 构建体 EpCAM 被克隆到慢病毒载体中

2.3 EpCAM 慢病毒 (LV376) 生产

本研究慢病毒生产中的上游病毒包装部分采用四质粒系统, 包括载有目的基因的重组穿梭质粒 (即 EpCAM CAR 载体质粒) 以及三种包装质粒 (分别为 pGag/Pol、pRev、pVSV-G), 四种质粒按一定的比例与 PEI 转染试剂, 共转染 HEK 293T 自主驯化悬浮细胞, 48 h 后经离心收获慢病毒粗毒液 2 000 mL, 粗毒液经核酸酶孵育、过滤澄清、COR700 层析、浓缩换液、除菌过滤、制剂分装等工序获得 EpCAM 慢病毒成品, 最终收获单批次成

组织的细胞浆膜阳性染色, 间质可见少许非特异染色。同时笔者在其他的人病理组织芯片广筛可见食道癌, 胃癌, 结肠癌, 结肠癌旁组织, 直肠癌, 直肠癌旁组织, 肝癌, 肺癌, 乳腺癌, 卵巢癌也可见细胞浆膜阳性染色。

2.2 EpCAM CAR 质粒构建及制备

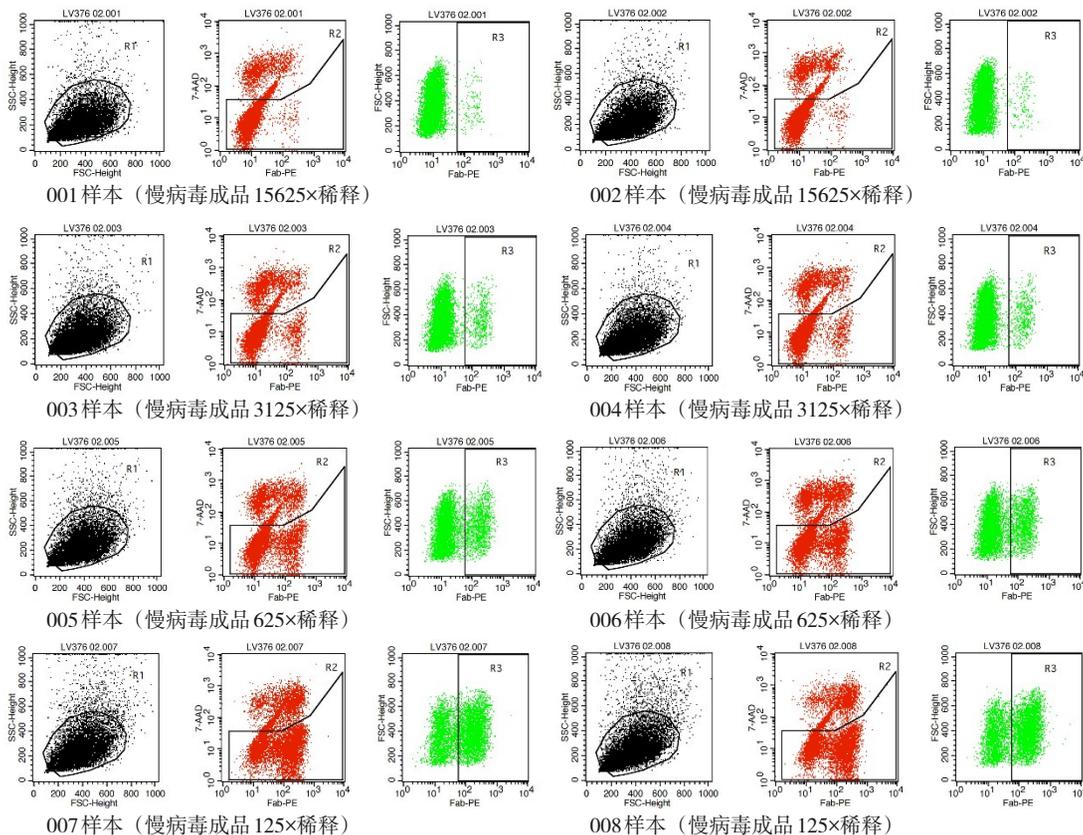
编码人源化 EpCAM 特异性 CAR 的慢病毒载体质粒由 ProMab USA 设计与合成, 命名为 PL376 质粒, 见图 5。经质粒上游菌种发酵及下游层析纯化等工艺收获质粒成品后, 送检成品质粒 DNA 至上海生工测序, 使用“NCBI 在线标准核苷酸匹配工具”与标准序列匹配。覆盖率 100%; 匹配 100%, 得出结论: 序列完全正确。

品体积为 100 mL。该生产规模可根据产业化需求放大至 100~1 000 mL。

2.4 EpCAM 慢病毒 (LV376) 成品转导滴度检测结果

感染 EpCAM 慢病毒 (LV376) 48 h 后收获 HEK 293T 细胞进行流式检测, 转染 EpCAM 慢病毒倍数分别为 125 \times 、625 \times 、3125 \times 、15625 \times , 其阳性表达分别为 92.31%、25.10%、6.90%、0.92%, 通过慢病毒滴度检测计算公式, 该检测批次 LV376 慢病毒转导滴度为 2.16×10^8 TU/mL, 该

批次收获成品体积为 100 mL，即该批次收获慢病毒毒总量为 2.16×10^{10} TU。见图 6。



001 与 002 样本为平行孔（慢病毒成品 15625×稀释）流式样本；003 与 004 样本为平行孔（慢病毒成品 3125×稀释）流式样本；005 与 006 样本为平行孔（慢病毒成品 625×稀释）流式样本；007 与 008 样本为平行孔（慢病毒成品 125×稀释）流式样本。

图 6 感染 EpCAM 慢病毒 (LV376) 48 h 后 HEK 293T 细胞流式检测结果

3 讨论

虽然 CAR-T 治疗在血液学肿瘤中取得了很大的进展，但 CAR-T 治疗在实体肿瘤^[10]中仍存在许多问题和局限性。同时 CAR-T 治疗中为了产生可满足临床方案中较多的目的基因工程化 T 细胞，具备成本效益的慢病毒载体的大量生产显得尤为关键。

本研究成功制备了在人宫颈癌、人食管癌、人结肠癌等癌组织中有高度表达的特异性 EpCAM 鼠单抗，并采用 EpCAM 阳性单克隆细胞株可变区测序，构建了编码人源化 EpCAM 特异性 CAR 的慢病毒载体质粒，结合完整的慢病毒悬浮生产工艺，生产出高滴度高纯度的靶向 EpCAM 嵌合抗原受体慢病毒，该慢病毒生产工艺可根据产业化需求放大至 $10 \times 10^{10} \sim 10 \times 10^{11}$ TU 慢病毒总量，为

EpCAM CAR-T 细胞治疗实体瘤应用及其产业化奠定基础。

参考文献

- [1] MAETZEL D, DENZEL S, MACK B, et al. Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM[J]. *Nat Cell Biol*, 2009, 11(2): 162-171.
- [2] VAN DER GUN BTF, MELCHERS LJ, RUITERS MHJ, et al. EpCAM in carcinogenesis: the good, the bad or the ugly[J]. *Carcinogenesis*, 2010, 31(11): 1913-1921.
- [3] HERLYN M, STEPLEWSKI Z, HERLYN D, et al. Colorectal carcinoma-specific antigen: detection by means of monoclonal antibodies[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76(3): 1438-1442.
- [4] MIYAJIMA A, TANAKA M, ITOH T. Stem/progenitor cells in liver development, homeostasis, regeneration, and reprogramming [J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 14(5): 561-574.
- [5] WENT P, VASEI M, BUBENDORF L, et al. Frequent high-level expression of the immunotherapeutic target Ep-CAM in colon, stomach, prostate and lung cancers[J]. *Br J Cancer*, 2006, 94(1): 128-135.

- [6] SPIZZO G, WENT P, DIRNHOFER S, et al. Overexpression of epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) is an independent prognostic marker for reduced survival of patients with epithelial ovarian cancer[J]. *Gynecol Oncol*, 2006, 103(2): 483-488.
- [7] YOSHIDA GJ, SAYA H. EpCAM expression in the prostate cancer makes the difference in the response to growth factors[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 443(1): 239-245.
- [8] QIN DY, LI D, ZHANG BX, et al. Potential lung attack and lethality generated by EpCAM-specific CAR-T cells in immunocompetent mouse models[J]. *Oncoimmunology*, 2020, 9(1): 1806009.
- [9] FU J, SHANG YH, QIAN Z, et al. Chimeric Antigen receptor-T (CAR-T) cells targeting Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) can inhibit tumor growth in ovarian cancer mouse model [J]. *J Vet Med Sci*, 2021, 83(2): 241-247.
- [10] ELAHI R, KHOSH E, TAHMASEBI S, et al. Immune cell hacking: challenges and clinical approaches to create smarter generations of chimeric antigen receptor T cells[J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 1717.

(张咏 编辑)