

ROR蛋白在癌症中的研究进展

赵鑫^{1,2} 丁琳² 陈煜选² 胡庆华^{1*}

(¹中国药科大学药学院, 南京 211198; ²上海复宏汉霖生物医药有限公司上海创新中心, 上海 200233)

摘要 ROR蛋白家族包含受体酪氨酸激酶ROR1和ROR2, 作为Wnt受体, 它们对于非经典Wnt信号通路至关重要, 并与癌细胞增殖存活、侵袭转移和治疗抵抗密切相关。ROR蛋白在大多数成人健康组织中几乎不表达, 但在一些癌症中却有较高的表达水平。有趣的是, 两种ROR蛋白可能在肿瘤中发挥不同的作用, ROR1主要促进肿瘤发生, 而ROR2在不同类型的肿瘤中促进或抑制肿瘤进展。目前这两种受体作为潜在的治疗靶点已经引起了人们的兴趣, 该文总结了ROR蛋白的结构学特征及其在不同组织中的表达情况。此外, 该文还回顾了ROR蛋白调控的生物学过程和信号通路, 解释了其在癌症中发挥的重要作用。最后汇总了目前处于临床试验阶段的靶向ROR蛋白的生物药包括单抗、双抗、抗体偶联药物等。

关键词 受体酪氨酸激酶样孤儿受体; 癌症; 抗体; 肿瘤靶向治疗

Recent Advances of RORs in Cancer

ZHAO Xin^{1,2}, DING Lin², CHEN Yu-Syuan², HU Qinghua^{1*}

(¹School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China;

²Shanghai Henlius Biotech, Inc., Shanghai Innovation Center, Shanghai 200233, China)

Abstract The ROR family contains ROR1 and ROR2, which are Wnt receptors that are critical for non-classical Wnt signaling pathways and are associated with cancer cell proliferation, survival, invasion, metastasis, and treatment resistance. RORs are less expressed in healthy adult tissues, but are overexpressed in several type of cancers. Interestingly, the two RORs may play different roles in tumors, with ROR1 always promoting tumorigenesis and ROR2 promoting or inhibiting tumor progression in different tumor types. This review summarizes the structural characteristics of RORs and its expression in different tissues. In addition, it reviews the biological processes and signaling pathways regulated by RORs to explain its important role in cancer. Finally, the biological drugs of targeting RORs in clinical trials of cancer therapies were summarized, including monoclonal antibodies, bispecific antibody and antibody-drug conjugate, etc.

Keywords receptor tyrosine kinase-like orphan receptors; cancer; antibody; targeted cancer therapy

WHO 2020年全球癌症数据显示: 2020年全球有约1 930万新增癌症病例, 近1 000万人因癌症死亡^[1]。国际癌症研究机构预计这种情况会变得更糟, 到2040年, 全球癌症负担将达到2 840万例, 比2020年增加47%。聚焦中国, 人口老龄化和快速城市化进程引起的社会经济发展导致癌症发病率增长迅速^[2],

2020年新增癌症病例高达456万, 并导致300万人死亡。

化疗在癌症常规治疗中起着核心作用, 但由于其缺乏选择性, 易造成严重的副作用, 这大大降低了患者的依从性和生活质量。目前癌症治疗已经从非选择性发展到选择性和针对性, 靶向治疗已被证明优于非靶向治疗, 其效果更好, 并能够降低药物诱导的毒性, 改善患者的生活质量^[3]。然而由于先天和后天的耐药性, 许多患者并没有从中获益, 因此需要

收稿日期: 2022-06-29

接受日期: 2022-07-25

*通讯作者。Tel: 025-86185970, E-mail: huqh@cpu.edu.cn

Received: June 29, 2022

Accepted: July 25, 2022

*Corresponding author. Tel: +86-25-86185970, E-mail: huqh@cpu.edu.cn

确定新的靶点来改善癌症治疗。耐药的一个主要机制是由于凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein, IAP)、FLIP、p53、Fas、caspases和bcl-2家族蛋白等的异常表达而导致细胞死亡途径的严重失调,而受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase, RTK)表达异常可能在驱动这种抵抗中发挥着重要的作用^[4]。此外癌症的另一个重要特征是对胚胎发生至关重要的发育途径的重新激活,其中包括对胚胎发育至关重要的Wnt信号通路。显然,作为Wnt受体中的RTK家族成员,受体酪氨酸激酶样孤儿受体(receptor tyrosine kinase-like orphan receptors, RORs)在癌症发生及化疗耐药中发挥的作用值得深入探讨。

RORs包含ROR1和ROR2两种受体,在早期胚胎发育期间发挥重要作用,在妊娠晚期,它们的表达下调而后在大多数健康成人组织中趋近消失。现已知RORs是Wnt家族信号分子Wnt5a/b、Wnt11和Wnt16的受体^[5],能够通过激活非经典Wnt通路(non-canonical Wnt pathways),调节细胞分裂、增殖、迁移和趋化等多种细胞过程。ROR1在多种肿瘤类型中高表达,促进肿瘤生长,靶向ROR1可以提高患者对化疗的反应,是癌症治疗的理想靶点。相比之下,ROR2似乎具有双重作用,在不同肿瘤中发挥不同的功能。

1 ROR蛋白结构与分布

1.1 ROR蛋白结构

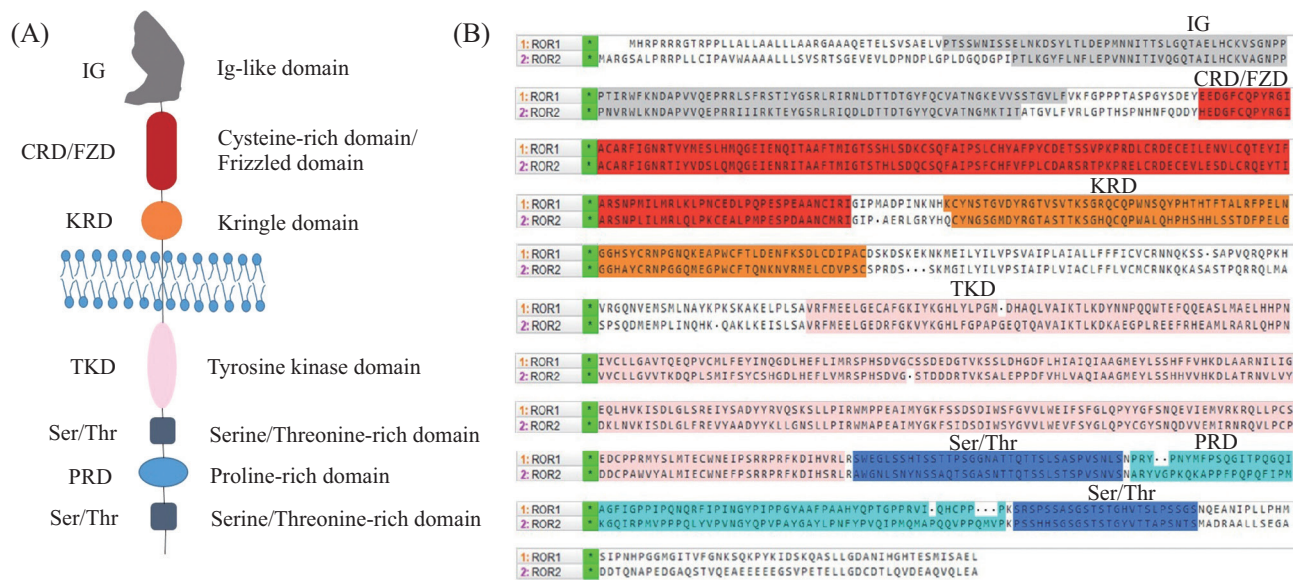
RORs是一种隶属于RTK家族的I型跨膜蛋白(图1)。人类RORs的胞外区(extra-cellular domain, ECD)由位于氨基末端的免疫球蛋白样结构域(Ig-like domain)、富含半胱氨酸的卷曲结构域(Frizzled domain, FZD)及近膜端的环状结构域(kringle domain, KRD)构成。目前RORs的Ig-like结构域的具体功能尚未得到解析,但已知部分RTK家族成员的Ig-like结构域可以与配体结合,此外还具有改变FZD和KRD功能的作用^[6];FZD通过与配体Wnt5a结合介导非经典Wnt信号通路的信号传递^[7];而KRD可以作为ROR1/ROR2二聚化及RORs与其他受体如卷曲受体(Frizzled receptor)相互作用的识别模块^[8]。

胞内结构域(intracellular domain, ICD)包括1个酪氨酸激酶样结构域(tyrosine kinase domain, TKD)、2个富含丝氨酸/苏氨酸结构域(serine/threonine-rich domain, Ser/Thr)和1个富含脯氨酸结构域(proline-

rich domain, PRD)。不同于典型的ATP结合基序(GXGXXG/K),RORs的TKD内ATP结合基序存在偏离共有序列的氨基酸替换,因此也有人将其归类到缺乏催化活性的伪激酶中^[6,9]。事实上,RORs伪激酶结构域的磷酸化被认为是由SRC募集介导的^[10-11]。ROR1包含8个可磷酸化的酪氨酸,3个位于TKD(Y⁶⁴¹、Y⁶⁴⁵和Y⁶⁴⁶),5个位于PRD(Y⁷⁸⁶、Y⁷⁸⁹、Y⁸²²、Y⁸²⁸和Y⁸³⁶);ROR2包含9个可磷酸化的酪氨酸,4个位于TKD(Y⁶⁴¹、Y⁶⁴⁵、Y⁶⁴⁶、Y⁷²²),5个位于PRD(Y⁸¹⁸、Y⁸²⁴、Y⁸³⁰、Y⁸³³、Y⁸³⁸)。ROR1中位于PRD的酪氨酸可直接被MET磷酸化,而位于伪激酶结构域的酪氨酸磷酸化则需通过SRC的中间激活介导完成^[11]。人类ROR2的TKD内还具有一个含有酪氨酸的基序YALM,当其中的酪氨酸被磷酸化时可以与Shc、C-端Src激酶(C-terminal Src kinase, Csk)和磷脂酰肌醇三激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)的p85亚基上的SH2结构域相互作用^[12]。RORs的PRD能够与具有SH3结构域(Src homology 3 domains)的蛋白以中等亲和力结合从而参与细胞信号通路转导。此外,人类ROR1的PRD内具有XPPXY保守序列,可以结合WW结构域蛋白调控多种疾病发生^[13]。PRD两侧的丝氨酸和苏氨酸残基是几种蛋白丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶的潜在磷酸化位点,RORs可能因此受到这些激酶的调控。研究表明,CKIε激酶磷酸化ROR2中Ser/Thr引起PRD中酪氨酸的自磷酸化,从而激活ROR2酪氨酸激酶活性^[14]。另一项研究表明,Wnt5a与ROR2的相互作用招募GSK-3(GSK3α和/或GSK3β)并诱导ROR2中Ser/Thr磷酸化,随后激活介导细胞迁移的Wnt-JNK通路^[15]。

1.2 ROR蛋白组织学研究

在哺乳动物中,RORs在胚胎面部、四肢、心脏、肺发育过程中发挥重要作用^[16]。研究表明,缺乏Ror2表达的小鼠表现为侏儒症、短肢短尾、面部异常、心脏间隔缺损、严重发绀和呼吸功能障碍,此种异常生理情况最终导致新生小鼠死亡^[17]。相比之下,Ror1缺陷的小鼠不会表现出任何骨骼或心脏的形态异常,但它们在出生后24小时内由于肺泡发育不良而死于呼吸衰竭,Ror1/Ror2双突变体则出现四肢骨骼畸形增强和胸骨缺陷、耻骨联合发育不良和完全性大动脉转位,说明Ror1和Ror2对肺的发育和功能都是必需的但在骨骼和心脏发育过程中存在功能上的冗余和基因间相互作用,Ror2可以弥补



A: RORs结构示意图; B: ROR1与ROR2蛋白质序列比对分析采用MOE软件。

A: schematic diagram of RORs structure; B: comparison analysis of ROR1 and ROR2 protein sequences using MOE.

图1 RORs结构与蛋白质序列

Fig.1 Structure and protein sequences of RORs

Ror1缺陷小鼠中Ror1功能的缺失^[18]。而与Ror2在肢体上的广泛表达不同, Ror1的表达局限于近端肢体区域, 参与晚期肢体发育而非早期肢体发育^[16]。此外, PAGANONI等^[19]研究发现ROR1和ROR2在小鼠中枢神经中共定位, 并在哺乳动物海马神经突触的形成过程中发挥重要作用。目前尚无人类疾病与ROR1突变相关的报道, 但人类ROR2突变会导致B型短指症和Robinow综合征^[20-21]。

ROR1在健康成年人的组织中表达程度较低或不表达。在正常B细胞系中, ROR1在早期发育阶段缺失, 在中晚期(large/small pre-BII和immature B)高度表达, 然后在成熟的B细胞中下调^[22]。而与此稍显不同的是, 研究人员预测ROR2在胃肠道、子宫内膜等多个正常成人组织中有着低至中等表达水平^[23]。

与正常组织相反, ROR1在多种癌症包括血液癌症, 如慢性淋巴细胞白血病^[24]、套细胞淋巴瘤^[25]和实体瘤(卵巢癌、乳腺癌、肺癌、前列腺癌、黑色素瘤和结肠直肠癌等)中高表达^[26]。ROR1的表达特性使其成为癌症治疗的理想药物靶点。与此同时, 在许多实体瘤如转移性黑色素瘤、骨肉瘤、乳腺癌、肾细胞癌中也检测到ROR2表达升高, 不同的是在肝癌、结直肠癌、胃癌中却发现ROR2下调, 其表达量的变化与癌症不良预后显著相关^[23]。

2 ROR蛋白在癌症中的分子机制探索

2.1 血液恶性肿瘤

血液系统恶性肿瘤是一组包括白血病、淋巴瘤及多发性骨髓瘤等在内的造血系统疾病, 具有恶性程度高、治疗复杂、预后较差等特点。2016年WHO在造血与淋巴系统肿瘤分类中将血液肿瘤根据细胞起源分为髓系肿瘤和淋系肿瘤^[27]。RORs高表达于B细胞淋巴瘤, 包括急性B淋巴细胞白血病(acute B lymphoblastic leukemia, B-ALL)、套细胞淋巴瘤(mantle cell lymphoma, MCL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL)、边缘区B细胞淋巴瘤(marginal zone lymphoma, MZL)、慢性淋巴细胞白血病/小淋巴细胞淋巴瘤(chronic/small lymphocytic leukemia, CLL/SLL)^[28], 以上疾病恶性程度逐渐降低。

YU等^[8]发现用Wnt5a处理CLL细胞可诱导ROR1与ROR2寡聚化并招募鸟嘌呤交换因子ARHGEF1、ARHGEF2和ARHGEF6, 从而激活Rac1和RhoA, 增强CLL的趋化和增殖能力。除含有一个SH3结构域的ARHGEF6外, ARHGEF1和ARHGEF2均无法直接与ROR1结合^[29], 但已有研究表明ROR1可以通过衔接蛋白14-3-3 ζ 招募ARHGEF2^[30]。此外他们还证实, ROR1与胞质分裂蛋白2(dedicator of cytokinesis 2, DOCK2)结合(ROR1^{808P}起关键作用)后招

募/激活Rac1/2增强CLL细胞增殖能力^[31]。ROR1也可以独立于其他受体发挥作用,通过与造血细胞特异性蛋白1(hematopoietic-lineage-cell-specific protein 1, HS1)结合(ROR1^{841P}起关键作用)使HS1^{378Y}磷酸化,进而招募/激活ARHGEF1引起RhoA局部激活,促进肌动蛋白F-actin聚合和CLL细胞迁移^[32]。此外,在双转基因*Eμ-TCL1*×*ROR1*小鼠模型研究中,发现CLL细胞表面高水平的ROR1可以通过与T细胞白血病/淋巴瘤蛋白1(T-cell leukemia/lymphoma 1, TCL1)相互作用强烈激活PI3K/AKT/mTOR通路^[33]。DANESHMAN-ESH等^[34]随后也证明抗ROR1单抗诱导CLL细胞发生凋亡前,ROR1、SRC、PI3K p85亚基、PI3Kδ、AKT、mTOR和CREB蛋白磷酸化程度均显著降低。

大量研究表明,联合靶向ROR1和B细胞抗原受体(B-cell receptor, BCR)或Bcl-2家族在多种血液癌症包括t(1:19) B-ALL、CLL和MCL中具有协同效应,仅调控ROR1或BCR在杀死癌细胞方面不如同时拮抗这两种途径有效,但在不同癌细胞中两者联合作用机制存在差异。由护士样细胞(nurse like cells, NLCs)分泌的Wnt5a与CLL细胞表面ROR1结合后通过NF-κB信号通路上调Mcl-1和Bcl2-xL蛋白水平,导致CLL细胞对Bcl-2选择性抑制剂维奈托克(Venetoclax)的治疗抵抗^[35]。但BTK抑制剂伊布替尼(Ibrutinib)治疗对CLL中ROR1介导的Rac1激活没有影响,这表明ROR1和BCR通路在CLL中独立发挥作用^[36]。与此不同的是,达沙替尼(Dasatinib)抑制pre-BCR信号可导致t(1:19) B-ALL细胞中ROR1的上调,并随后通过ROR1/MEK/ERK信号通路部分激活AKT(S⁴³⁷磷酸化),从而恢复细胞活力^[22]。KARVONEN等^[37]通过对ROR1靶向前后的MCL细胞进行高通量药物敏感性实验,发现了ROR1与BCR及Bcl-2家族共同靶向之间的协同效应,具体来说,由于在MCL中ROR1和BCR通路都受到经典NF-κB途径的调控,尽管BTK抑制剂Ibrutinib抑制BCR通路同时会削弱ROR1的表达并持续降低ROR1靶向MCL治疗疗效,但靶向ROR1的表达却可以通过下调NF-κB p65的表达来增强BCR抑制剂的作用。

而与上述B细胞淋巴瘤中情况相反的是,Wnt5a/ROR2非经典信号通路拮抗经典Wnt信号通路,在人慢性髓系白血病细胞K562中发挥抑癌作用^[38]。

2.2 乳腺癌

乳腺癌是一种高度异质性疾病,基于*PAM50*基

因可将其分为五种亚型:基底细胞样型(basal-like)、ERBB2-过表达型(ERBB2-overexpressing)、管腔上皮A型(luminal A)、管腔上皮B型(luminal B)和正常乳腺样型(normal-breast-like)^[39]。乳腺癌患者发生癌症转移概率高,治疗药物少,从而降低了其存活率。

RORs通常表达于缺乏激素受体和/或HER2/Neu的低分化基底细胞样型乳腺癌细胞(basal-like breast cancer, BLBC)中。在三阴性乳腺癌MDA-MB-231细胞中,ROR1结合Wnt5a后通过与CK1ε相互作用,激活下游PI3K/AKT/CREB信号通路,从而增强癌细胞对凋亡的抵抗能力,并促进癌细胞生长^[40]。

在人类乳腺癌中,RORs的表达水平与癌细胞侵袭性密切相关,与ER阳性MCF-7细胞相比,高侵袭性的MDA-MB-231细胞中ROR1、Wnt5a和Wnt5b强烈表达^[41]。ROR1可以通过氯喹抑制的蛋白质降解途径在翻译后水平调控FGFR1蛋白水平稳态,增强MDA-MB-231细胞的侵袭能力^[42]。同时ROR1的表达与上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)高度相关,沉默ROR1降低了易转移乳腺癌细胞株中EMT相关蛋白如SNAIL-1/2、ZEB1和波形蛋白(Vimentin)的表达量,增加了上皮细胞角蛋白(如CK-19)和紧密连接蛋白(如ZO-1)的表达量,并显著降低了MDA-MB-231细胞在免疫缺陷小鼠体内形成转移灶的能力^[43]。LI等^[44]的研究表明,ROR1-HER3和Hippo-YAP通路以一种lncRNA依赖方式相串联促进乳腺癌的骨转移,具体机制为:在神经调节蛋白(neuregulin-1, NRG1)刺激下,ROR1与HER3发生异源二聚化使HER3^{1307Y}磷酸化,pHER3^{1307Y}招募连接蛋白LLGL2、lncRNA MAYA(MST1/2-拮抗YAP的激活)和甲基转移酶NSUN6,最终导致MST1^{59K}位点的甲基化。甲基化破坏MST1激酶的活性,激活YAP和靶基因,从而引发破骨细胞分化和乳腺癌细胞的骨转移。目前也有研究表明,ROR2可以不依赖于Wnt5a,通过调控MAPK/p38信号通路促进EMT,使上皮性乳腺癌细胞向远端迁移^[45]。ROR2影响乳腺癌的脑转移,ROR2与Wnt11在乳腺癌脑转移组织中高表达,并且乳腺癌患者的基因表达数据显示,基于ROR2/WNT模块的基因签名与总生存期和无转移生存期(metastasis-free survival, MFS)相关^[46-47]。ROR2的过表达、Wnt5a的刺激以及两者的结合均可增强MCF-7细胞的侵袭能力^[46];除此之外Wnt11也可以作

为ROR2的配体与ROR2的CRD区结合,并通过Rho/ROCK通路介导WNT/PCP信号,使MCF-7乳腺癌细胞转变为侵袭性表型^[47]。总之,这些结果表明,通过ROR1/2受体介导的非典型Wnt信号通路在乳腺癌转移进程中发挥了重要作用。

另有研究表明,RORs参与介导了乳腺癌患者的治疗抵抗。对曲妥珠单抗偶联T-DM1的耐药患者中部分ROR1阳性的BC细胞具有肿瘤干细胞(cancer stem cell, CSC)特性,如同时表达CD44和ALDH1,HER2阳性的BC细胞经T-DM1治疗后通过激活Hippo转录共激活因子YAP1上调ROR1表达,从而增强BC细胞的CSC特性和T-DM1抗性,因此抑制ROR1可能有助于降低由T-DM1治疗引起的CSC介导的治疗耐药性^[48]。另有研究表明,YAP/TAZ过表达可诱导乳腺癌患者对紫杉烷类和阿霉素耐药^[49]。目前RORs介导YAP/TAZ转录激活的具体机制已得到部分解读,YAP/TAZ在各种癌细胞包括PIK3CA突变乳腺癌中的表达与Wnt5a呈正相关,YAP/TAZ是Wnt5a和ROR1的下游效应分子,而WNT5a又是YAP/TAZ的直接靶基因,RORs/FZD复合物被Wnt5a/b激活后通过与Gα_{12/13}结合激活RhoA,抑制Lats1/2活性,从而导致YAP/TAZ去磷酸化并易位到细胞核中与TEAD家族转录因子结合,反过来刺激WNT5a、DKK1等靶基因表达,参与细胞增殖、干细胞自我更新和肿瘤发生^[50]。同时YAP/TAZ转录的增加,反过来上调了RORs的表达。除此之外,Wnt5a仅结合ROR1也可以诱导细胞内信号转导,导致AKT激活增加,进而磷酸化BMI-1三个高度保守的丝氨酸残基,从而降低BMI-1蛋白的降解速率,诱导乳腺癌细胞的CSC特性和化疗耐药性^[51]。

2.3 肺癌

肺癌主要分为非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)和小细胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC),非小细胞肺癌约占肺癌总量的85%^[52]。非小细胞肺癌又可分为三种主要的组织学亚型:鳞状细胞癌、腺癌和大细胞肺癌,肺腺癌是最常见的非小细胞肺癌类型。

目前已知ROR1在肺腺癌中是谱系特异性原癌基因NKX2-1/TTF-1的直接转录靶点^[53]。ROR1在肺腺癌中选择性表达并通过PI3K/AKT/mTOR信号通路介导肿瘤细胞的增殖存活^[54]。GENTILE等^[55]发现,ROR1作为一种伪激酶在肺腺癌增殖和肿瘤发

生中的作用是通过被肝细胞生长因子受体c-MET转磷酸化维持的。随后TOMOYA等^[53]研究表明ROR1以激酶依赖性和激酶非依赖性两种方式维持肺腺癌细胞PI3K/AKT促生存信号通路:ROR1通过其PRD与c-Src相互作用激活下游AKT并抑制PTEN活性,以及通过其CRD与EGFR相互作用维持EGF诱导的EGFR-ERBB3-PI3K-AKT信号通路。与此同时ROR1通过其C末端Ser/Thr结构域与ASK1相互作用降低ASK1和MKK3/6的磷酸化程度,从而抑制肺腺癌细胞中促凋亡ASK1-p38信号转导^[56]。此外,还有证据表明ROR1通过激酶依赖的方式参与常氧和缺氧环境下肺腺癌细胞中HIF-1α的表达调控^[57]。

KARACHALIOU等^[58]对27名EGFR^{T790M}突变的肺腺癌患者的ROR1 mRNA表达进行了评估,结果显示:在厄洛替尼(Erlotinib)治疗的患者中,ROR1的高表达与显著缩短无进展生存期(progression-free survival, PFS)相关。高表达ROR1在干扰肺腺癌患者预后中的作用机制值得进一步研究,目前已证实ROR1敲除有效逆转了由肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)介导的MET旁路信号激活所引起的EGFR-TKI抗性,其机制与胞膜窖(caveolae)的形成有关^[59]。ROR1不依赖其激酶活性作为CAV1(caveolin-1)、Cavin-1和Cavin-3的支架蛋白参与维持胞膜窖结构和其介导的内吞作用,进而维持包括MET和IGF-IR在内的多种RTK的PI3K-AKT促生存信号^[59-60]。这些发现为ROR1如何通过不同的RTK旁路信号通路引发肺腺癌EGFR-TKI耐药提供了机制上的见解,这也是目前主要的临床障碍。相比ROR1,ROR2在肺癌中的研究较少,目前已知ROR2和Wnt5a在NSCLC组织中的表达显著升高,且与不良预后相关^[61]。ROR2在肺腺癌细胞中通过其CRD特异性地与Fzd2而非Fzd7结合协同介导Wnt3a激活经典Wnt通路,潜在机制可能为ROR2作为辅受体促进Fzd2和Lrp5/6耦合^[62]。

2.4 其他癌症

ROR1通过PI3K/AKT通路调控N-cadherin表达,参与黑色素瘤细胞的生长和迁移。ROR2高表达于转移性黑色素瘤,并且网格蛋白介导的ROR2内化依赖于PKC激酶^[63]。葡萄膜黑色素瘤细胞对MEK抑制剂曲美替尼(Trametinib)的耐药性与RORs有关,抑制MEK通路增强Wnt5a介导的ROR1/2激活从而增加AKT磷酸化,导致临床前模型的治疗性耐药^[64]。此

外CASTRO等^[65]最新研究证明ROR2可增强黑色素瘤细胞对化疗药物和BH3模拟物的耐药性来促进肿瘤进展。这种作用是通过ERK过度激活介导的。ROR2正向调控MDM2水平,导致p53下调, Mcl-1和Bcl2-xL上调,同时负向调控Bax和Bid的表达抑制细胞凋亡。

在细胞实验中, ROR2促进体外骨肉瘤(osteosarcoma, OS)细胞增殖和集落形成, ROR2沉默降低c-Myc、Cyclin D1、Cyclin E和CDK4表达水平, 导致细胞G₀/G₁期阻滞^[66]。而早在之前, LIU等^[67]就发现在U2OS骨肉瘤细胞中ROR2同源二聚化激活其酪氨酸激酶活性后招募并磷酸化支架蛋白14-3-3 β , 但对其在OS中发挥的生理作用并未进行深入研究。目前更多研究集中于Wnt/ROR2信号通路对OS细胞侵袭转移的促进作用: Wnt5b/ROR2对细胞运动性有显著影响, 但对细胞增殖影响较小^[68]; Wnt5a/ROR2不仅可以通过PI3K α /AKT信号通路激活RhoA并促进骨肉瘤细胞迁移^[69], 还能激活Src家族蛋白酪氨酸激酶SFKs上调MMP-13的表达赋予骨肉瘤细胞侵袭性^[70]。此外, Wnt5a/ROR2可被Snail诱导的EMT激活从而上调MMP-2表达, 表明Wnt5a/ROR2与EMT之间存在正反馈回路^[71]。ROR1在Wnt5a诱导的骨肉瘤细胞迁移中也发挥促进作用, Wnt5a与ROR1/2结合后激活DAAM1/RhoA和PI3K α /AKT两条平行信号通路调节骨肉瘤细胞迁移。

WRIGHT等^[72]发现在肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)中ROR2通过上调细胞外基质重塑相关基因*Twist*和*MMP2*促进细胞外基质重塑, 沉默ROR2抑制了癌细胞生长迁移。随后他们又发现ROR2与RCC的pVHL功能丧失相关, ROR2作为缺氧诱导因子HIF-1 α 或HIF-2 α 的靶基因被VHL-HIF轴调控其转录^[73]。除此之外, RCC细胞中ROR2表达上调介导蓬松蛋白DVL磷酸化激活, 维持 β -catenin稳定并促使其转位到细胞核驱动靶基因(即*Axin2*)的转录, 在同时接受Wnt3a刺激后, 可观察到 β -catenin稳定性和靶基因扩增转录进一步增强^[74]。

不同于上面所有癌症模型, Wnt5a/ROR2在肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)中具有肿瘤生长抑制作用, Wnt5a和ROR2缺失与HCC不良预后相关^[75-76]。与之相似的是shRNA介导的ROR1敲除改变了HCC细胞的EMT状态, 表现为波形蛋白增加, E-cadherin和细胞角蛋白19减少, 从而增强了HCC细胞

对凋亡和失巢凋亡的抗性^[77]。因此, ROR1表达的降低对EMT细胞周期阻滞表型有积极的贡献, 但却意外地降低了细胞增殖和迁移能力。而更重要的是, ROR1耗竭的上皮HCC通过上调多种耐药基因, 包括*ABCB1*(又称*MDR1*)、*ABCC6*和*ABCG1*, 诱导化疗药物耐药。

与HCC相似, 相比于正常胃上皮细胞, 几种常见胃癌细胞系中ROR2的表达水平降低。将ROR2质粒转染胃癌细胞后发现, 恢复ROR2的表达可显著抑制胃癌细胞的增殖并诱导其凋亡, 其机制与Wnt5a无关。此外, 观察到ROR2过表达细胞在G₀/G₁期积累, 提示过表达ROR2可导致细胞周期阻滞在G₀/G₁期。对其潜在机制的研究表明, ROR2通过激活非经典Wnt信号通路抑制经典Wnt信号转导, 这可以通过核内 β -catenin水平的降低以及c-Myc表达水平的降低来证明。与之相反, ROR1在胃腺癌组织中高表达, 并与癌细胞的pAKT、pCREB高表达和高增殖指数相关^[78]。显示MET成瘾表型的胃癌细胞HS746T表现出高水平的ROR1酪氨酸磷酸化, 沉默ROR1可引起癌细胞生长抑制。作为一个没有催化活性的假激酶, ROR1的磷酸化依赖于Met过度活化后发生的转磷酸化而与其他组成型活性酪氨酸激酶(包括EGFR和ErbB2)无关, 同时ROR1转磷酸化似乎对维持MET成瘾至关重要^[55]。后续深入机制探索发现ROR1仅在同时被MET和SRC磷酸化时才能控制HS746T细胞侵袭, 而对细胞增殖的促进作用则仅由MET磷酸化ROR1的PRD调控, 而非SRC对TKD的磷酸化^[11]。

3 靶向ROR蛋白药物临床现状

3.1 单克隆抗体

Oncternal Therapeutics研发的靶向ROR1的单克隆抗体药物Zilovertamab(原名Cirmtuzumab或UC-961)能够与ROR1的IG/FZD结构域结合, 阻止ROR1与Wnt5a的结合, 抑制癌症的生长和转移。对接受Zilovertamab治疗的患者进行CLL细胞和血浆检测发现, 治疗后的样本中磷酸化p65水平降低, CLL细胞中NF- κ B和STAT3靶基因表达减少, 以及血浆中IL-6水平降低^[79]。已有研究证明, 在CLL细胞中白细胞介素6(IL-6)通过诱导STAT3磷酸化激活ROR1启动子活性, 并以时间和剂量依赖的方式上调ROR1蛋白水平^[80]。Zilovertamab阻断Wnt5a/ROR1介导的NF- κ B活化, 从而抑制CLL中IL-6依赖的自分泌

STAT3磷酸化激活。在CLL患者中的I期研究表明,该抗体也可以在体内阻断ROR1信号通路,抑制白血病细胞Rho-GTPases的激活和HS1的磷酸化^[81]。同时已有研究表明,Zilovetamab和伊布替尼在CLL治疗上具有协同作用,Wnt5a可诱导接受过伊布替尼处理的CLL细胞中Rac1的激活从而增强癌细胞增殖存活能力,而该激活路径可被Zilovetamab所阻断^[82]。在乳腺癌方面,Zilovetamab联合紫杉醇在体内已被证明比单独两种治疗更有效^[51],但有趣的是对于高级别浆液性卵巢癌和子宫内膜癌,体外实验中Zilovetamab单药治疗似乎比联合普通化疗药物更有效^[83]。

在ASH2020公布的Ib/II期临床结果中,Zilovetamab与BTK抑制剂伊布替尼联用,在复发、难治性MCL适应症上客观缓解率(objective response rate, ORR)达到83.3%,部分缓解(partial response, PR)达到58.3%;对于CLL适应症总ORR为88%,其中对于从未接受治疗患者ORR高达91.2%^[82]。此外,Zilovetamab联合紫杉醇治疗转移性乳腺癌正在开展I期临床试验(表1),其早期数据表明,在既往接受过多线治疗的转移性乳腺癌患者中,联合治疗耐受性良好,与单独使用紫杉醇相比没有额外的毒性,其中53%(8/15)获得PR,另有27%(4/15)处于疾病稳定(stable disease, SD)状态。

3.2 双功能抗体

NVG-111是由NovalGen首创的一种以T细胞作为效应细胞的双特异性单链抗体(BiTE),由靶向ROR1和CD3的人源化单链可变片段(single-chain variable fragment, scFv)串联组成,可同时结合CD3阳性T细胞及ROR1阳性肿瘤细胞,并诱导T细胞靶向杀伤肿瘤细胞。临床前研究结果表明,与已上市的CD19×CD3双抗Blinatumomab相比,NVG-111表现出相似的T细胞依赖性细胞毒性、T细胞活化程度和细胞因子释放水平^[84]。目前NVG-111正在进行I/II期临床试验,旨在评估其在复发或难治性CLL/SLL和MCL至少二线治疗患者中的安全性、药代动力学和疗效。

3.3 抗体偶联药物

由VelosBio开发的Zilovetamab vedotin(MK-2140)[曾用名VelosBio 101(VLS-101)],于2022年1月13日在国内获批临床,用于治疗复发性或难治性弥漫性大B细胞淋巴瘤。VLS-101是人源化IgG1单抗UC961通过一种蛋白酶可切割的连接子马来酰亚胺己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苯甲酸酯

(mc-vc-PAB)与微管聚合抑制剂单甲基奥瑞他汀E(monomethyl auristatin E, MMAE)连接起来的抗体偶联药物(antibody-drug conjugate, ADC), DAR均值为4,目前处于临床I/II期阶段。VLS-101与细胞表面ROR1结合并导致其快速内化,从而特异性地向ROR1阳性肿瘤细胞传递细胞毒性载荷MMAE。一项VLS-101对四种不同ROR1表达水平RS患者来源的异种移植模型(richter syndrome patient-derived xenograft mouse models, RS-PDXs)的药效学研究结果表明,5 mg/kg药物剂量下VLS-101可使高表达ROR1的RS-PDXs肿瘤负担完全缓解并显著延长小鼠生存期,但对ROR1低表达的RS-PDX无反应^[85]。此外,VLS-101对CAR-T细胞治疗抵抗、伊布替尼和/或维奈托克耐药的套细胞淋巴瘤有效^[86]。在治疗血液瘤的I期临床试验中,MK-2140在MCL患者中ORR达到47%(7/15),在DLBCL患者中ORR达到80%(4/5)^[87]。值得一提的是,这些患者经多种其他抗癌疗法治疗后疾病未缓解或复发,代表着非常难治的患者群体。

NBE-002是由人源化单抗huXBR1-402与蒽环类抗生素PNU-159682通过转肽酶Sorase A介导的位点特异性转肽反应,在预先设定的药物抗体比(DAR=2)下定点定量酶联生成的^[88]。通过噬菌体展示技术从兔免疫抗体库中筛选得到单克隆抗体XBR1-402,以较高的亲和力(K_d=5.8 nmol/L)结合ROR1的Ig/Fc结构域,经过人源化改造后得到的huXBR1-402亲和力并未下降^[89]。NBE002在体内体外均能有效抑制ROR1阳性淋巴瘤细胞生长,且与维奈托克在Bcl-2低表达的白血病细胞中具有协同作用^[90]。NBE-002正在进行I/II期临床试验,以评估其在晚期实体瘤尤其是三阴性乳腺癌患者中的安全性和免疫原性。

基石药业从LegoChem引进的LCB71/ABL202(现更名为CS5001)的临床试验申请于2022年3月3日获国家药品监督管理局药品审评中心受理。CS5001由全人源噬菌体展示文库获得的ROR1单克隆抗体连接肿瘤特异激活的吡咯并苯二氮卓(Pyrrrolobenzodiazepine, PBD)前毒素二聚体和β-葡萄糖苷酸连接子构成,DAR值为2。CS5001连接子和前毒素在血液循环中是稳定存在的,但能被癌细胞中过度表达的溶酶体β-葡萄糖醛酸酶切割,从而导致PBD前毒素在肿瘤细胞内被选择性释放^[91]。这种连接子加前毒素的“双控”机制有效地解决了与传统PBD载荷有

关的典型毒性问题, 有更大的安全和治疗窗口。在2021年AACR上, 基石药业公布了CS5001的临床前研究数据, CS5001在多种表达ROR1的细胞系中展现出了较强的选择性细胞毒性, 并在异种移植小鼠模型中显示出了显著的体内抗肿瘤活性^[92]。

BA3021(Ozuriftamab Vedotin)为BioAtla正在开发的一款ROR2单抗偶联MMAE的ADC, 目前正在

全球开展针对不同实体瘤的I/II期临床试验。与传统ADC相比, 作为一种条件性激活生物制剂(Conditionally Active Biologics, CAB)技术改造后的产品, BA3021只有接触到酸性肿瘤微环境才会被可逆激活, 因此具有更高的靶向选择性、安全性和更强的有效性^[93]。在BA3021的I期剂量爬坡试验中观察到了1个CR(黑色素瘤)和3个PRs(1头颈部鳞癌, 2

表1 靶向ROR蛋白药物临床现状

Table 1 Clinical status of drugs targeting RORs

类型 Drug form	药品名称 Drug name	靶点 Target	研发机构 Research institution	标识符 ClinicalTrials.gov Identifier	症状或疾病 Condition or disease	阶段 Phase	状态 Recruitment status
mcAb	Cirmtuzumab	ROR1	Oncternal therapeutics	NCT02222688	CLL	I	Completed
				NCT03088878	B-CLL SLL MCL	I/II	Active, not recruiting
				NCT02776917	HER2/BC	I	Active, not recruiting
	Cirmtuzumab+ Paclitaxel			NCT05156905	mCRPC	II	Not yet recruiting
	Cirmtuzumab+ Docetaxel						
BsAb	NVG-111	ROR1CD3	NovalGen	NCT04763083	CLL SLL MCL	I/II	Recruiting
ADC	VLS-101	ROR1	VelosBio	NCT04504916	Solid tumors	II	Recruiting
				NCT03833180	HM	I	Recruiting
	NBE-002	ROR1	NBE-therapeutics	NCT04441099	Solid tumors	I/II	Recruiting
	CS5001	ROR1	CStone pharmaceuticals	NCT05279300	Advanced solid Tumors and lymphomas	I	Recruiting
	BA3021	ROR2	BioAtla	NCT03504488	NSCLC TNBC Melanoma HNSC	I/II	Recruiting
				NCT05271604	HNSC	II	Not yet recruiting
CAR-T	JCAR 024	ROR1	JUNO therapeutics/BMS	NCT02706392	CLL MCL ALL NSCLC TNBC	I	Terminated
				NCT05274451	NSCLC TNBC	I	Recruiting
				NCT03960060	Solid tumors	I	Active, not recruiting
	LYL-797	ROR1	Lyell immunopharma	NCT0393936	Stage IV RCC	I/II	Active, not recruiting

McAb: 单克隆抗体; BsAb: 双特异性抗体; ADC: 抗体偶联药物; CAR-T: 嵌合抗原受体T细胞免疫疗法; CLL: 慢性淋巴细胞白血病; SLL: 小淋巴细胞淋巴瘤; ALL: 急性淋巴细胞白血病; MCL: 套细胞淋巴瘤; HM: 血液系统恶性肿瘤; TNBC: 三阴性乳腺癌; NSCLC: 非小细胞肺癌; mCRPC: 转移性去势抵抗性前列腺癌; HNSC: 头颈鳞状细胞癌; RCC: 肾细胞癌。

McAb: monoclonal antibody; BsAb: bispecific antibody; ADC: antibody-drug conjugate; CAR-T: chimeric antigen receptor T-cell immunotherapy; CLL: chronic lymphocytic leukemia; SLL: small lymphocytic lymphoma; ALL: acute lymphoblastic leukemia; MCL: mantle cell lymphoma; HM: hematologic malignancies; TNBC: triple negative breast cancer; NSCLC: non small cell lung cancer; mCRPC: metastatic castration-resistant prostate cancer; HNSC: head and neck squamous cell carcinoma; RCC: renal cell carcinoma.

NSCLC), 所有患者均接受过PD-1治疗且失败。目前单药疗法或与PD-1联合治疗已开展II期临床试验, 受试者包括ROR2阳性且对PD-1/PD-L1治疗耐药的NSCLC和黑色素瘤患者。同时BA3021联合PD-1抑制剂治疗铂类耐药卵巢癌患者的II期临床试验也已在加拿大和美国启动。

3.4 嵌合抗原受体T细胞疗法

RORs特异性嵌合抗原受体T细胞疗法(chimeric antigen receptor T-cell immunotherapy, CAR-T)是指抽取患者血液, 提取、扩增T细胞, 并经基因工程改造, 使T细胞表达RORs特异性受体, 再将细胞回输入患者体内, 从而特异性杀伤RORs阳性肿瘤细胞的治疗方法。利用Cirmtuzumab的scFv结构域构建而成的CAR-T细胞在体外和体内都能有效和选择性地杀死携带ROR1的肿瘤细胞^[94]。JCAR 024为JUNO Therapeutics研发的一款自体ROR1 CAR-T细胞疗法, 目前处于临床I期阶段, 用于治疗ROR1阳性的实体瘤和血液癌症, 包含非小细胞肺癌、三阴性乳腺癌、CLL、MCL和ALL。2018年SABCS报告的初步数据显示: 4例接受了自体ROR1 CAR-T细胞治疗的TNBC患者(IHC ROR1>20%)均未出现剂量限制毒性、严重神经毒性或严重细胞因子释放综合征(severe cytokine release syndrome, sCRS), 2例患者发生1级CRS; 3例可评价受试者中出现1例PR, 2例SD, 说明ROR1 CAR-T细胞可以安全地回输, 并在TNBC患者体内扩增^[95-96]。此外, 由Lyell Immunopharma开发的LYL797已开展I期临床探索用于治疗NSCLC和TNBC, 其适应症与BMS的CAR-T相同。CCT301-59为EXUMA Biotechnology开发的一款自体ROR2 CAR-T细胞疗法, 目前正在开展I期临床试验以确定其在复发或难治性IV期转移性实体瘤(软组织肉瘤、胃癌、胰腺癌、膀胱癌等)患者中的安全性和初步疗效。

4 展望

RORs最近因其癌胚抗原特性及其与癌症信号的相关性, 成为了肿瘤治疗干预研究的中心, 靶向RORs可有效诱导恶性肿瘤细胞凋亡, 已经被临床研究证实。尽管RORs对这些关键途径的影响是明确的, 但最终的作用机制仍不确定。因此, 我们相信, 一旦对RORs信号机制的结构和功能方面的研究取得进展, 将会有更多的机会出现, 这将对RORs靶向

治疗以及Wnt信号通路在发育和疾病中的基础研究产生重大影响。在这里, 我们重点回顾了已知的关于RORs在癌症中的作用以及作为癌症治疗靶点的潜力。RORs可能与不同的受体结合发挥多效性作用, 参与PI3K-AKT、Ras-MAPK、Hippo-YAP/TAZ、NF- κ B等信号通路转导。总的来说, 这种作用是复杂的, 可能受肿瘤微环境、细胞表面辅助受体以及细胞外Wnt配体和抑制剂的影响。事实上, 对ROR2的机制研究开启较早, 在2003年就有研究发现ROR2可以通过激活Wnt/JNK和抑制 β -catenin-TCF介导Wnt5a信号通路^[97-98]。后续更多研究证实在由经典Wnt信号通路驱动的癌症如结肠癌或肝细胞癌中, ROR2可能与经典信号通路的不同成员相互作用抑制肿瘤生长; 而在非经典Wnt信号驱动的癌症如黑色素瘤中ROR2可能在驱动肿瘤发生中发挥更关键和直接的作用。由于其作用的多变复杂性, 目前临床上靶向ROR2的癌症治疗策略较少。而与ROR2的情况不同, ROR1在多种肿瘤中均发挥肿瘤生长迁移促进作用, 因此开发针对ROR1的单克隆抗体的尝试很有希望, 但由于缺乏ROR1受体晶体结构数据, 靶向ROR1的抗体设计也具有更多的挑战。现今靶向RORs的治疗更多集中于ADC方向, 通过靶向癌细胞特异性高表达的RORs传递化学毒素, 以有效地杀死目标细胞。但因受细胞表面RORs数量的限制需要寻找更稳定的偶联方式和更强效的毒素。除此之外, BiTE双抗策略和CAR-T细胞疗法也在稳步推进, 我们期待终有一日靶向RORs的治疗药物可以取得上市批准。

参考文献 (References)

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-49.
- [2] ZHANG S, SUN K, ZHENG R, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2015 [J]. *J Natl Cancer Center*, 2021, 1(1): 2-11.
- [3] SANTHOSH S, KUMAR P, RAMPRASAD V, et al. Evolution of targeted therapies in cancer: opportunities and challenges in the clinic [J]. *Future Oncol*, 2015, 11(2): 279-93.
- [4] MATTIA G, PUGLISI R, ASCIONE B, et al. Cell death-based treatments of melanoma: conventional treatments and new therapeutic strategies [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(2): 112.
- [5] KARVONEN H, PERTTILÄ R, NIININEN W, et al. Wnt5a and ROR1 activate non-canonical Wnt signaling via RhoA in TCF3-PBX1 acute lymphoblastic leukemia and highlight new treatment strategies via Bcl-2 co-targeting [J]. *Oncogene*, 2019, 38(17):

- 3288-300.
- [6] YODA A, OISHI I, MINAMI Y. Expression and function of the Ror-family receptor tyrosine kinases during development: lessons from genetic analyses of nematodes, mice, and humans [J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2003, 23(1): 1-15.
- [7] SATO A, YAMAMOTO H, SAKANE H, et al. Wnt5a regulates distinct signalling pathways by binding to Frizzled2 [J]. *EMBO J*, 2010, 29(1): 41-54.
- [8] YU J, CHEN L, CUI B, et al. Wnt5a induces ROR1/ROR2 heterooligomerization to enhance leukemia chemotaxis and proliferation [J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(2): 585-98.
- [9] SHEETZ J B, MATHEA S, KARVONEN H, et al. Structural insights into pseudokinase domains of receptor tyrosine kinases [J]. *Mol Cell*, 2020, 79(3): 390-405.e7.
- [10] AKBARZADEH S, WHELDON L M, SWEET S M, et al. The deleted in brachydactyly B domain of ROR2 is required for receptor activation by recruitment of Src [J]. *PLoS One*, 2008, 3(3): e1873.
- [11] GENTILE A, LAZZARI L, BENVENUTI S, et al. The ROR1 pseudokinase diversifies signaling outputs in MET-addicted cancer cells [J]. *Int J Cancer*, 2014, 135(10): 2305-16.
- [12] SONGYANG Z, SHOELSON S E, MCGLADE J, et al. Specific motifs recognized by the SH2 domains of Csk, 3BP2, fps/fes, GRB-2, HCP, SHC, Syk, and Vav [J]. *Mol Cell Biol*, 1994, 14(4): 2777-85.
- [13] SUDOL M. The WW module competes with the SH3 domain [J]. *Trends in biochemical sciences*, 1996, 21(5): 161-3.
- [14] KANI S, OISHI I, YAMAMOTO H, et al. The receptor tyrosine kinase Ror2 associates with and is activated by casein kinase I ϵ [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(48): 50102-9.
- [15] YAMAMOTO H, YOO S K, NISHITA M, et al. Wnt5a modulates glycogen synthase kinase 3 to induce phosphorylation of receptor tyrosine kinase Ror2 [J]. *Genes Cells*, 2007, 12(11): 1215-23.
- [16] MATSUDA T, NOMI M, IKEYA M, et al. Expression of the receptor tyrosine kinase genes, Ror1 and Ror2, during mouse development [J]. *Mech Dev*, 2001, 105(1/2): 153-6.
- [17] TAKEUCHI S, TAKEDA K, OISHI I, et al. Mouse Ror2 receptor tyrosine kinase is required for the heart development and limb formation [J]. *Genes Cells*, 2000, 5(1): 71-8.
- [18] NOMI M, OISHI I, KANI S, et al. Loss of mRor1 enhances the heart and skeletal abnormalities in mRor2-deficient mice: redundant and pleiotropic functions of mRor1 and mRor2 receptor tyrosine kinases [J]. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(24): 8329-35.
- [19] PAGANONI S, BERNSTEIN J, FERREIRA A. Ror1-Ror2 complexes modulate synapse formation in hippocampal neurons [J]. *Neuroscience*, 2010, 165(4): 1261-74.
- [20] OLDRIDGE M, FORTUNA A M, MARINGA M, et al. Dominant mutations in ROR2, encoding an orphan receptor tyrosine kinase, cause brachydactyly type B [J]. *Nat genet*, 2000, 24(3): 275-8.
- [21] VAN BOKHOVEN H, CELLI J, KAYSERILI H, et al. Mutation of the gene encoding the ROR2 tyrosine kinase causes autosomal recessive Robinow syndrome [J]. *Nat Genet*, 2000, 25(4): 423-6.
- [22] BICOCCA V T, CHANG B H, MASOULEH B K, et al. Crosstalk between ROR1 and the Pre-B cell receptor promotes survival of t(1;19) acute lymphoblastic leukemia [J]. *Cancer Cell*, 2012, 22(5): 656-67.
- [23] CASTRO M V, LOPEZ-BERGAMI P. Cellular and molecular mechanisms implicated in the dual role of ROR2 in cancer [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2022, 170: 103595.
- [24] FUKUDA T, CHEN L, ENDO T, et al. Antisera induced by infusions of autologous Ad-CD154-leukemia B cells identify ROR1 as an oncofetal antigen and receptor for Wnt5a [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(8): 3047-52.
- [25] MELLSTEDT H, GHADERI A, ASCHAN J, et al. ROR1 small molecule inhibitor (KAN0441571C) Induced significant apoptosis of mantle cell lymphoma (MCL) cells [J]. *Blood*, 2019, 134(Supplement_1): 5312.
- [26] ZHANG S, CHEN L, WANG-RODRIGUEZ J, et al. The onco-embryonic antigen ROR1 is expressed by a variety of human cancers [J]. *Am J Pathol*, 2012, 181(6): 1903-10.
- [27] BARBUI T, THIELE J, GISSLINGER H, et al. The 2016 WHO classification and diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms: document summary and in-depth discussion [J]. *Blood Cancer J*, 2018, 8(2): 15.
- [28] BASKAR S, KWONG K Y, HOFER T, et al. Unique cell surface expression of receptor tyrosine kinase ROR1 in human B-cell chronic lymphocytic leukemia [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(2): 396-404.
- [29] ROSSMAN K L, DER C J, SONDEK J. GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6(2): 167-80.
- [30] YU J, CHEN L, CHEN Y, et al. Wnt5a induces ROR1 to associate with 14-3-3 ζ for enhanced chemotaxis and proliferation of chronic lymphocytic leukemia cells [J]. *Leukemia*, 2017, 31(12): 2608-14.
- [31] HASAN M K, YU J, WIDHOPF G F, 2ND, et al. Wnt5a induces ROR1 to recruit DOCK2 to activate Rac1/2 in chronic lymphocytic leukemia [J]. *Blood*, 2018, 132(2): 170-8.
- [32] HASAN M K, YU J, CHEN L, et al. Wnt5a induces ROR1 to complex with HS1 to enhance migration of chronic lymphocytic leukemia cells [J]. *Leukemia*, 2017, 31(12): 2615-22.
- [33] WIDHOPF G F, 2ND, CUI B, GHIA E M, et al. ROR1 can interact with TCL1 and enhance leukemogenesis in Emu-TCL1 transgenic mice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(2): 793-8.
- [34] DANESHMANESH A H, HOJJAT-FARSANGI M, MOSHFEGH A, et al. The PI3K/AKT/mTOR pathway is involved in direct apoptosis of CLL cells induced by ROR1 monoclonal antibodies [J]. *Br J Haematol*, 2015, 169(3): 455-8.
- [35] GUO Y, PEI H, LU B, et al. Aberrantly expressed Wnt5a in nurse-like cells drives resistance to Venetoclax in chronic lymphocytic leukemia [J]. *Cell Death Discov*, 2022, 8(1): 82.
- [36] YU J, CHEN L, CUI B, et al. Cirmtuzumab inhibits Wnt5a-induced Rac1 activation in chronic lymphocytic leukemia treated with ibrutinib [J]. *Leukemia*, 2017, 31(6): 1333-9.
- [37] KARVONEN H, CHIRON D, NIININEN W, et al. Crosstalk between ROR1 and BCR pathways defines novel treatment strategies in mantle cell lymphoma [J]. *Blood Adv*, 2017, 1(24): 2257-68.
- [38] YUAN Y, NIU C C, DENG G, et al. The Wnt5a/Ror2 noncanonical signaling pathway inhibits canonical Wnt signaling in K562 cells [J]. *Int J Mol Med*, 2011, 27(1): 63-9.
- [39] PARKER J S, MULLINS M, CHEANG M C, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes [J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(8): 1160-7.

- [40] ZHANG S, CHEN L, CUI B, et al. ROR1 is expressed in human breast cancer and associated with enhanced tumor-cell growth [J]. PLoS One, 2012, 7(3): e31127.
- [41] KLEMM F, BLECKMANN A, SIAM L, et al. beta-catenin-independent WNT signaling in basal-like breast cancer and brain metastasis [J]. Carcinogenesis, 2011, 32(3): 434-42.
- [42] PANDEY G, BORCHERDING N, KOLB R, et al. ROR1 potentiates FGFR signaling in basal-like breast cancer [J]. Cancers, 2019, 11(5): 718.
- [43] CUI B, ZHANG S, CHEN L, et al. Targeting ROR1 inhibits epithelial-mesenchymal transition and metastasis [J]. Cancer Res, 2013, 73(12): 3649-60.
- [44] LI C, WANG S, XING Z, et al. A ROR1-HER3-lncRNA signaling axis modulates the Hippo-YAP pathway to regulate bone metastasis [J]. Nat Cell Biol, 2017, 19(2): 106-19.
- [45] XU J, SHI J, TANG W, et al. ROR2 promotes the epithelial-mesenchymal transition by regulating MAPK/p38 signaling pathway in breast cancer [J]. J Cell Biochem, 2020, 121(10): 4142-53.
- [46] BAYERLOVA M, MENCK K, KLEMM F, et al. Ror2 signaling and its relevance in breast cancer progression [J]. Front Oncol, 2017, 7: 135.
- [47] MENCK K, HEINRICHS S, WLOCHOWITZ D, et al. WNT11/ROR2 signaling is associated with tumor invasion and poor survival in breast cancer [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2021, 40(1): 395.
- [48] ISLAM S S, UDDIN M, NOMAN A S M, et al. Antibody-drug conjugate T-DM1 treatment for HER2⁺ breast cancer induces ROR1 and confers resistance through activation of Hippo transcriptional coactivator YAP1 [J]. EBioMedicine, 2019, 43: 211-24.
- [49] NGUYEN C D K, YI C. YAP/TAZ Signaling and resistance to cancer therapy [J]. Trends Cancer, 2019, 5(5): 283-96.
- [50] PARK H W, KIM Y C, YU B, et al. Alternative Wnt signaling activates YAP/TAZ [J]. Cell, 2015, 162(4): 780-94.
- [51] ZHANG S, ZHANG H, GHIA E M, et al. Inhibition of chemotherapy resistant breast cancer stem cells by a ROR1 specific antibody [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2019, 116(4): 1370-7.
- [52] HERBST R S, HEYMACH J V, LIPPMAN S M. Lung cancer [J]. N Engl J Med, 2008, 359(13): 1367-80.
- [53] YAMAGUCHI T, YANAGISAWA K, SUGIYAMA R, et al. NKX2-1/TITF1/TTF-1-induced ROR1 is required to sustain EGFR survival signaling in lung adenocarcinoma [J]. Cancer Cell, 2012, 21(3): 348-61.
- [54] LIU Y, YANG H, CHEN T, et al. Silencing of receptor tyrosine kinase ROR1 inhibits tumor-cell proliferation via PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in lung adenocarcinoma [J]. PLoS One, 2015, 10(5): e0127092.
- [55] GENTILE A, LAZZARI L, BENVENUTI S, et al. Ror1 is a pseudokinase that is crucial for Met-driven tumorigenesis [J]. Cancer Res, 2011, 71(8): 3132-41.
- [56] IDA L, YAMAGUCHI T, YANAGISAWA K, et al. Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1, a target of NKX2-1/TTF-1 lineage-survival oncogene, inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1-mediated pro-apoptotic signaling in lung adenocarcinoma [J]. Cancer science, 2016, 107(2): 155-61.
- [57] ISOMURA H, TAGUCHI A, KAJINO T, et al. Conditional Ror1 knockout reveals crucial involvement in lung adenocarcinoma development and identifies novel HIF-1 α regulator [J]. Cancer Sci, 2021, 112(4): 1614-23.
- [58] KARACHALIOU N, GIMENEZ-CAPITAN A, DROZDOWSKYJ A, et al. ROR1 as a novel therapeutic target for EGFR-mutant non-small-cell lung cancer patients with the EGFR T790M mutation [J]. Transl Lung Cancer Res, 2014, 3(3): 122-30.
- [59] YAMAGUCHI T, LU C, IDA L, et al. ROR1 sustains caveolae and survival signalling as a scaffold of cavin-1 and caveolin-1 [J]. Nat Commun, 2016, 7: 10060.
- [60] YAMAGUCHI T, HAYASHI M, IDA L, et al. ROR1-CAVIN3 interaction required for caveolae-dependent endocytosis and pro-survival signaling in lung adenocarcinoma [J]. Oncogene, 2019, 38(26): 5142-57.
- [61] LU C, WANG X, ZHU H, et al. Over-expression of ROR2 and Wnt5a cooperatively correlates with unfavorable prognosis in patients with non-small cell lung cancer [J]. Oncotarget, 2015, 6(28): 24912-21.
- [62] LI C, CHEN H, HU L, et al. Ror2 modulates the canonical Wnt signaling in lung epithelial cells through cooperation with Fzd2 [J]. BMC Mol Biol, 2008, 9: 11.
- [63] O'CONNELL M P, FIORI J L, XU M, et al. The orphan tyrosine kinase receptor, ROR2, mediates Wnt5A signaling in metastatic melanoma [J]. Oncogene, 2010, 29(1): 34-44.
- [64] FAIÃO-FLORES F, EMMONS M F, DURANTE M A, et al. HDAC inhibition enhances the *in vivo* efficacy of MEK inhibitor therapy in uveal melanoma [J]. Clin Cancer Res, 2019, 25(18): 5686-701.
- [65] CASTRO M V, BARBERO G A, MASCOLO P, et al. ROR2 increases the chemoresistance of melanoma by regulating p53 and Bcl2-family proteins via ERK hyperactivation [J]. Cell Mol Biol Lett, 2022, 27(1): 23.
- [66] HUANG J, SHI Y, LI H, et al. Knockdown of receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2 inhibits cell proliferation and colony formation in osteosarcoma cells by inducing arrest in cell cycle progression [J]. Oncol Lett, 2015, 10(6): 3705-11.
- [67] LIU Y, ROSS J F, BODINE P V, et al. Homodimerization of Ror2 tyrosine kinase receptor induces 14-3-3(beta) phosphorylation and promotes osteoblast differentiation and bone formation [J]. Mol Endocrinol, 2007, 21(12): 3050-61.
- [68] MORIOKA K, TANIKAWA C, OCHI K, et al. Orphan receptor tyrosine kinase ROR2 as a potential therapeutic target for osteosarcoma [J]. Cancer Sci, 2009, 100(7): 1227-33.
- [69] ZHANG A, YAN T, WANG K, et al. PI3K α isoform-dependent activation of RhoA regulates Wnt5a-induced osteosarcoma cell migration [J]. Cancer Cell Int, 2017, 17: 27.
- [70] ENOMOTO M, HAYAKAWA S, ITSUKUSHIMA S, et al. Autonomous regulation of osteosarcoma cell invasiveness by Wnt5a/Ror2 signaling [J]. Oncogene, 2009, 28(36): 3197-208.
- [71] REN D, MINAMI Y, NISHITA M. Critical role of Wnt5a-Ror2 signaling in motility and invasiveness of carcinoma cells following Snail-mediated epithelial-mesenchymal transition [J]. Genes Cells, 2011, 16(3): 304-15.
- [72] WRIGHT T M, BRANNON A R, GORDAN J D, et al. Ror2, a developmentally regulated kinase, promotes tumor growth potential in renal cell carcinoma [J]. Oncogene, 2009, 28(27): 2513-23.
- [73] WRIGHT T M, RATHMELL W K. Identification of Ror2 as a hypoxia-inducible factor target in von Hippel-Lindau-associated

- renal cell carcinoma [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(17): 12916-24.
- [74] RASMUSSEN N R, WRIGHT T M, BROOKS S A, et al. Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2 (Ror2) expression creates a poised state of Wnt signaling in renal cancer [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(36): 26301-10.
- [75] GENG M, CAO Y C, CHEN Y J, et al. Loss of Wnt5a and Ror2 protein in hepatocellular carcinoma associated with poor prognosis [J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(12): 1328-38.
- [76] BI L, LIU X, WANG C, et al. Wnt5a involved in regulation of the biological behavior of hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(3): 987-95.
- [77] CETIN M, ODABAS G, DOUGLAS L R, et al. ROR1 expression and its functional significance in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Cells*, 2019, 8(3): 210.
- [78] CHANG H, JUNG W Y, KANG Y, et al. Expression of ROR1, pAkt, and pCREB in gastric adenocarcinoma [J]. *Ann Diagn Pathol*, 2015, 19(5): 330-4.
- [79] CHEN Y, CHEN L, YU J, et al. Cirmtuzumab blocks Wnt5a/ROR1 stimulation of NF- κ B to repress autocrine STAT3 activation in chronic lymphocytic leukemia [J]. *Blood*, 2019, 134(13): 1084-94.
- [80] LI P, HARRIS D, LIU Z, et al. Stat3 activates the receptor tyrosine kinase like orphan receptor-1 gene in chronic lymphocytic leukemia cells [J]. *PLoS One*, 2010, 5(7): e11859.
- [81] CHOI M Y, WIDHOPF G F, 2ND, GHIA E M, et al. Phase I trial: cirmtuzumab inhibits ror1 signaling and stemness signatures in patients with chronic lymphocytic leukemia [J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 22(6): 951-9, e3.
- [82] LEE H J, CHOI M Y, SIDDIQI T, et al. Cirmtuzumab, an anti-ROR1 antibody, in combination with ibrutinib: clinical activity in mantle cell lymphoma (MCL) or chronic lymphocytic leukemia (CLL) from a Phase 1/2 study [J]. *Blood*, 2020, 136(Supplement 1): 45-6.
- [83] LIU D, KAUFMANN G F, BREITMEYER J B, et al. The anti-ROR1 monoclonal antibody zilovertamab inhibits the proliferation of ovarian and endometrial cancer cells [J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14(4): 837.
- [84] GRANGER D, GOHIL S, BARBARULO A, et al. NVG-111, a novel ROR1 \times CD3 bispecific antibody for non-Hodgkin lymphoma [J]. *J Clin Oncol*, 2021, 39(15_suppl): 7549.
- [85] VAISITTI T, ARRUGA F, VITALE N, et al. ROR1 targeting with the antibody-drug conjugate VLS-101 is effective in Richter syndrome patient-derived xenograft mouse models [J]. *Blood*, 2021, 137(24): 3365-77.
- [86] JIANG V C, LIU Y, JORDAN A, et al. The antibody drug conjugate VLS-101 targeting ROR1 is effective in CAR T-resistant mantle cell lymphoma [J]. *J Hematol Oncol*, 2021, 14(1): 132.
- [87] WANG M L, BARRIENTOS J C, FURMAN R R, et al. Zilovertamab vedotin targeting of ROR1 as therapy for lymphoid cancers [J]. *NEJM Evidence*, 2022, 1(1).
- [88] PENG H. Perspectives on the development of antibody-drug conjugates targeting ROR1 for hematological and solid cancers [J]. *Antib Ther*, 2021, 4(4): 222-7.
- [89] PENG H, NERRETER T, CHANG J, et al. Mining naive rabbit antibody repertoires by phage display for monoclonal antibodies of therapeutic utility [J]. *J Mol Biol*, 2017, 429(19): 2954-73.
- [90] HU E Y, DO P, GOSWAMI S, et al. The ROR1 antibody-drug conjugate huXBR1-402-G5-PNU effectively targets ROR1⁺ leukemia [J]. *Blood Advances*, 2021, 5(16): 3152-62.
- [91] GREGSON S J, BARRETT A M, PATEL N V, et al. Synthesis and evaluation of pyrrolbenzodiazepine dimer antibody-drug conjugates with dual β -glucuronide and dipeptide triggers [J]. *Eur J Med Chem*, 2019, 179: 591-607.
- [92] LI F, LI Y, ZHANG L, et al. Abstract LBA008: CS5001, a novel ROR1-targeting antibody drug conjugate (ADC) armed with tumor-cleavable β -glucuronide linkers and pyrrolbenzodiazepine (PBD) prodrugs for hematological and solid malignancies [J]. *Mol Cancer Ther*, 2021, 20(12_Supplement): LBA008-LBA.
- [93] CHANG H W, FREY G, LIU H, et al. Generating tumor-selective conditionally active biologic anti-CTLA4 antibodies via protein-associated chemical switches [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118(9): e2020606118.
- [94] PRUSSAK C E, OH C, LUJAN J V, et al. Preclinical evaluation of anti-ROR1 CAR T cells employing a ROR1 binding SCFV derived from the clinical stage mab cirmtuzumab [J]. *J Clin Oncol*, 2020, 38(5_suppl): 41.
- [95] SPECHT J, LEE S, TURTLE C, et al. Abstract P2-09-13: a phase I study of adoptive immunotherapy for ROR1⁺ advanced triple negative breast cancer (TNBC) with defined subsets of autologous T cells expressing a ROR1-specific chimeric antigen receptor (ROR1-CAR) [J]. *Cancer Res*, 2019, 79(4_Supplement): P2-09-13-P2-09-13.
- [96] SPECHT J M, LEE S, TURTLE C J, et al. Abstract CT131: A phase I study of adoptive immunotherapy for advanced ROR1⁺ malignancies with defined subsets of autologous T cells expressing a ROR1-specific chimeric antigen receptor (ROR1-CAR) [J]. *Cancer Res*, 2018, 78(13_Supplement): CT131.
- [97] MIKELS A J, NUSSE R. Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context [J]. *PLoS Biol*, 2006, 4(4): e115.
- [98] OISHI I, SUZUKI H, ONISHI N, et al. The receptor tyrosine kinase Ror2 is involved in non-canonical Wnt5a/JNK signalling pathway [J]. *Genes Cells*, 2003, 8(7): 645-54.