

糖代谢标记在肿瘤靶向治疗中的应用策略

王佳佳, 李霞(河南大学 抗体药物开发技术国家地方联合工程实验室, 河南 开封 475000)



李霞, 博士, 河南大学“杰出人才特区支持计划”第四层次特聘教授, 现任河南大学抗体药物开发技术国家地方联合工程实验室主任、河南大学基础医学院副院长、河南大学转化医学研究所所长。主要研究方向为天然免疫和炎症的调控机制及转化应用。2017 年至今先后担任中国环境诱变剂学会第六届致癌专业委员会委员、河南省抗癌协会第一届青年理事会常务理事、中国细胞生物学会免疫细胞生物学会分会委员等, 曾获第六届中国免疫学会青年学者奖、第十四届河南省青年科技奖。在 *Nature*、*Nat Immunol* 等杂志发表 SCI 收录论文 10 余篇, 主持国家自然科学基金面上项目 2 项、河南省优秀青年项目 1 项, 参与国家重点研发计划政府重点专项 1 项, 主持完成省部级课题 3 项, 获批中国发明专利 2 项。

[摘要] 肿瘤细胞的特异性识别和结合是实现肿瘤靶向治疗的关键, 缺乏有效靶标仍然是肿瘤靶向治疗面临的主要问题。糖代谢标记以其可以进行活体标记并且具有密度高、毒性低、干扰小等特点, 使其能够为肿瘤靶向治疗提供新的策略。基于糖代谢标记策略, 可以对肿瘤细胞进行半抗原、抗原、化疗药物及细胞毒性药物等的标记, 从而实现对肿瘤细胞的特异性识别, 或激活机体的细胞和体液免疫应答, 还可以通过标记免疫细胞增加其对肿瘤细胞的特异性识别和结合。糖代谢标记在肿瘤靶向治疗中具有广阔的应用前景。

[关键词] 非天然糖; 糖工程; 代谢标记; 靶向治疗; 抗肿瘤

[中图分类号] R730.54; Q591.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2022)04-0276-08

The application strategies of glycan metabolic labeling in tumor targeted therapy

WANG Jiajia, LI Xia (Joint National Laboratory for Antibody Drug Engineering, Henan University, Kaifeng 475000, Henan, China)

[Abstract] The specific recognition and binding of tumor cells are crucial to targeted therapy. However, lacking effective targets is still the main challenge for targeted therapy. Glycan metabolic labeling provides a potential approach for tumor targeted therapy with advantages of *in vivo* labeling, high labeling efficiency, low toxicity and less interference. Through labeling tumor cells with hapten, antigen, chemotherapeutic drugs and cytotoxic drugs, labeling strategy based on glycan metabolism realizes the specific recognition of tumor cells or stimulates cellular and humoral immune responses *in vivo*. In addition, through labeling immune cells, this strategy also improves immune cells' specific recognition and binding of tumor cells. The strategy of glycan metabolic labeling provides broad application prospects in tumor targeted therapy.

[Key words] unnatural carbohydrate; glycan engineering; metabolic labeling; targeted therapy; anti-tumor

[Chin J Cancer Biother, 2022, 29(4): 276-283. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.04.002]

糖代谢标记是指将含有化学标签的非天然糖经过细胞代谢添加到天然糖链结构中, 通过化学反应可对相应的化学标签进一步标记, 从而应用于细胞成像、蛋白质富集或靶向治疗等领域。通过该标记方法可以实现对肿瘤细胞和免疫细胞的细胞膜标记, 增强肿瘤细胞的免疫原性或提高免疫细胞对肿瘤细胞的特异性识别。糖代谢标记可为肿瘤靶向治疗提供新的策略, 有望解决尚缺乏有效靶标的肿瘤类型的治疗难题。

1 糖代谢标记的独特性原理为其在肿瘤靶向治疗中的应用奠定了基础

20 世纪 90 年代, KAYSER 等^[1]发现, 唾液酸合成前体

N-乙酰甘露糖胺(*N*-acetyl-mannosamine, ManNAc)类似物 *N*-丙酰甘露糖胺可以在大鼠体内多个器官中代谢并整合到聚糖结构中。MAHAL 等^[2]受到上述研究结果的启发, 设计并合成了非天然糖分子 ManNAc 类似物 *N*-4-氧代戊酰甘露糖胺(*N*-levulinoyl mannosamine, ManLev)。ManLev 经细胞内代谢酶作

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 31770987; No. 81971497; No. 21907022); 河南省自然科学基金优秀青年项目资助 (No. 202300410037)

[作者简介] 王佳佳 (1985—), 男, 博士, 副教授, 主要从事糖分子探针的开发与应用研究, E-mail: jwang77@vip.henu.edu.cn

[通信作者] 李霞, E-mail: lixia_kf@126.com

用后可以转化为 *N*-4-氧代戊酰唾液酸, 进而可取代天然唾液酸, 参与细胞膜糖链的组装, 最终在细胞膜表面糖链结构中引入了新的化学反应基团——酮基官能团, 其中的酮基和酰肼基可以通过发生配对化学反应来引入荧光基团或生物素, 从而实现细胞膜的荧光标记或生物素标记。该过程所需的非天然糖分子需要经过细胞内脱酯酶和代谢通路中其他酶的代谢加工成相应的糖基供体, 进而参与到细胞糖链的合成和组装, 最终实现细胞膜的标记, 因此被称为糖代谢标记 (metabolic glycan labeling, MGL)。鉴于糖代谢标记的原理, 所有参与糖链组装的糖基供体的类似物均可代谢到相应的糖链结构中进行标记。除 ManNAc 类似物外, 目前已发现甘露糖^[3]、半乳糖^[4-5]、岩藻糖^[6]、唾液酸^[7]、乙酰氨基葡萄糖^[8-13]和葡萄糖^[14-17]等多种糖的类似物, 均可用来进行糖代谢标记, 且都具有良好的标记效果, 进一步提高了糖代谢标记中非天然糖分子的可选择性。此外, 还可以对同一天然糖分子进行不同类型的化学修饰, 以进一步扩充糖分子探针的种类并提高代谢标记效率。SAXON 等^[18]于2000年首次报道了叠氮基取代的 ManNAc 类似物 *N*-azidoacetyl mannosamine (ManNAz), 其进入细胞后可以通过唾液酸合成通路转化成含叠氮的唾液酸 (SiaNAz) 分子, 进而整合到细胞膜表面的糖链结构中, 从而在细胞膜表面人为地添加上了叠氮基团, 而后通过叠氮基与三苯基磷的配对反应, 最终实现细胞的标记。

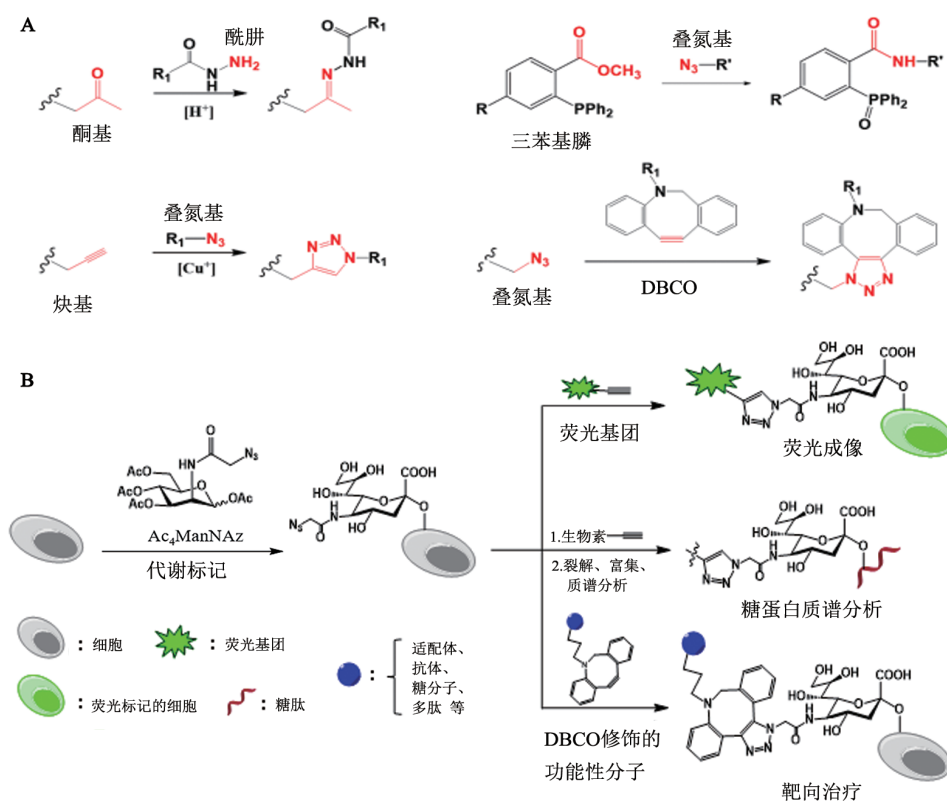
MAHAL 和 SAXON 等^[2,15]开发了两种 ManNAc 类似物 ManLev 和 ManNAz, 两者在进行糖代谢标记时, 利用的化学反应分别是酮基/酰肼基的配对反应和叠氮基-三苯基磷的配对反应。此类化学反应被称之为生物正交反应 (bioorthogonal reaction), 是指在不干扰生物自身生化反应条件下能够在活体细胞或组织中进行的化学反应, 参加反应的化学基团具有惰性、空间位阻小、天然状态下不存在于生物体内、水溶性好且具有较高的反应效率等特点。酮基-酰肼基的反应条件较为严苛, 需要在弱酸条件下才能发生, 由于体内含有较多的酮基结构, 故容易造成非特异性反应。叠氮基-三苯基磷的反应速率较为缓慢, 影响了其标记效率。目前, 糖代谢标记所采用的生物正交反应, 除了以上两种配对基团之外, 还有炔基/叠氮基、叠氮基/二苯并环辛炔 (dibenzocyclooctyne, DBCO) 等 (图 1A)。其中叠氮基/DBCO 反应又被称为“环张力促使的环加成 (strain-promoted alkyne-azide cycloaddition, SPAAC)”策略, 该反应由于不需要铜离子催化, 并且 DBCO 与叠氮基团反应活性高, 可以快速、高效地发生

共价连接而形成复合物。该策略已应用于斑马鱼和小鼠的体内标记, 并取得了良好的标记效果^[19-21], 这也是目前生物体内糖代谢标记应用最为广泛的生物正交反应^[22-24]。

基于糖代谢标记的独特性原理, 糖代谢标记具有以下特点: (1) 密度高, 细胞膜表面具有丰富的糖链结构, 在哺乳动物体内的糖链通常由 9 种基本的单糖分子通过不同组合排列组装形成, 糖代谢标记非天然糖分子通过细胞代谢替代原有的天然单糖分子参与糖链的组装, 从而使其在细胞表面标记具有较高的覆盖率 (约 1×10^7 个/细胞), 比高表达抗原多出 10 倍 ~ 1 000 倍^[25-26]; (2) 可进行活体标记, 糖代谢标记利用生物正交反应对细胞膜的相应化学基团进行标记, 可以在不干扰生物自身生化反应条件下进行, 实现体内活体标记, 该方法已应用于细菌、斑马鱼、小鼠等的活体标记和活体成像, 这为靶向治疗提供了可能; (3) 干扰小, 非天然糖分子通过糖代谢标记仅对糖链中相应单糖分子进行了化学基团的修饰, 如叠氮基或者炔基等, 这些化学修饰空间位阻小, 一般不会影响或干扰细胞间的识别与信息传递; (4) 低毒性, 通过代谢标记所引入的化学结构, 因其分子量较小、抗原性弱, 不易引发机体免疫应激等不良反应, 具有较高的安全性。基于以上特点, 糖代谢标记结合生物正交反应策略可以对肿瘤细胞进行高密度的半抗原、抗原、化疗药物及细胞毒性药物等的标记, 从而实现对肿瘤细胞的特异性识别或激活机体的细胞和体液免疫应答; 还可以在不影响免疫细胞正常功能活性的情况下, 通过对免疫细胞的标记增加其对肿瘤细胞的特异性识别和结合, 使其除了用于细胞成像、蛋白富集之外, 还可以应用于肿瘤靶向治疗^[27-28] (图 1B)。

2 基于糖代谢标记的原理及特点而提出的肿瘤靶向治疗新策略

随着肿瘤靶向治疗的兴起, 尤其是首个抗体靶向药物和小分子靶向药物曲妥珠单抗和伊马替尼在乳腺癌和白血病治疗中极大地提高了患者的 5 年生存率, 使人们看到了肿瘤治疗的希望。如何提高对肿瘤细胞的靶向性是肿瘤靶向治疗的关键。但是近年来肿瘤细胞表面的特异性靶点, 例如肿瘤特异性抗原研究及应用进展缓慢, 急需通过新的技术手段为肿瘤靶向治疗提供新的特异靶点。糖代谢标记以其可以活体标记并且密度高、低毒性、干扰小的特点使其为肿瘤细胞提供高密度的特异靶点成为可能。



A: 生物正交反应常用的反应基团; B: 全乙酰化叠氮乙酰基甘露糖胺(1,3,4,6-tetra-acetyl-N-azidoacetyl mannosamine, $Ac_4ManNAz$)代谢标记为含叠氮唾液酸在细胞成像、蛋白质鉴定和配体靶向识别方面的应用

图1 糖分子探针在生物标记中的应用示意图

2.1 基于肿瘤细胞标记的应用策略

通过糖代谢标记策略在肿瘤细胞表面添加半抗原、抗原、化疗药物或细胞毒性药物等,以激活机体免疫应答、提供有效肿瘤治疗靶点或提高化疗药物或细胞毒性药物的肿瘤靶向性,进而提高对肿瘤组织的杀伤作用。

2.1.1 肿瘤细胞标记半抗原以激活机体免疫应答 机体的免疫系统在肿瘤发生发展过程中发挥重要的免疫监视功能,并且抗肿瘤免疫应答在杀伤或清除肿瘤细胞中发挥重要作用,但是肿瘤细胞会通过抗原缺失和抗原调变等多种机制发生免疫逃逸,从而促进肿瘤的发生发展。通过糖代谢标记在肿瘤细胞膜表面进行半抗原标记可有效激活机体免疫应答。ZHAO等^[29]利用非天然糖分子 $Ac_4ManNAz$ 在乳腺癌和肺癌细胞表面标记半抗原三酰酯肽[Pam3CSK4/Pam3Cys-Ser-(Lys)4],从而增加了肿瘤细胞的抗原性,该半抗原标记的肿瘤细胞可以激活小鼠的体液免疫反应和T细胞介导的细胞免疫反应,从而有效抑制肿瘤的发生。

2.1.2 肿瘤细胞标记抗原以提供有效治疗靶点 糖代谢标记还可以在肿瘤细胞表面标记已知抗原,从而为肿瘤靶向治疗提供有效治疗靶点。以乳腺癌为例,目前针对乳腺癌的肿瘤特异性抗原HER2开发的

肿瘤靶向抗体药物曲妥珠单抗,在HER2阳性的乳腺癌治疗中可以有效杀伤肿瘤细胞,取得良好的临床疗效,但是针对HER2阴性的乳腺癌例如三阴性乳腺癌则疗效甚微^[30]。糖代谢标记可以在三阴性乳腺癌细胞表面标记已知抗原——HER2抗原,从而为应用曲妥珠单抗靶向杀伤三阴性乳腺癌等缺乏有效靶标的肿瘤类型提供可能。

2.1.3 通过糖代谢标记实现化疗药物、细胞毒性药物等的肿瘤靶向性 传统的化疗药物或细胞毒性药物因其缺乏靶向性,往往会对机体正常组织和细胞造成损伤,从而引起多种不良反应。利用糖代谢标记方法可以在肿瘤细胞膜表面标记上叠氮基或DBCO基团,然后通过生物正交反应,与DBCO或叠氮基偶联的化疗药物可以特异性地与肿瘤细胞靶向结合,从而降低化疗药物的不良反应。TOMÁS等^[31]通过糖代谢标记在肿瘤细胞膜表面添加叠氮基团,然后与DBCO-化疗药聚合物通过共价结合使得化疗药聚合物的半最大效应浓度(EC_{50})提高10倍,该策略不但可以促使细胞膜破损,还可以通过糖循环内化方式诱导细胞凋亡,为非传统的生物大分子治疗药物提供了新的途径。WANG等^[32]在三阴性乳腺癌、前列腺癌等动物模型中,通过活体特异性标记,在肿瘤细胞膜表面标记叠氮基团,随后通过尾静脉注射DBCO-多

柔比星,发现能够有效抑制肿瘤的生长,同时实验组小鼠的生存期比对照小鼠提高了62%。另外,WANG等^[33]将DBCO修饰的非天然糖分子Ac₄ManN-DBCO在肿瘤原位注射,可以高效标记LS174T结肠癌细胞,随后利用位阻较小的叠氮基团标记超微硅纳米颗粒,该策略首次证明了较大位阻的修饰基团DBCO不影响非天然糖分子在细胞内的代谢标记,联合叠氮基标记的纳米载药系统可以实现理想的标记和治疗效果。

2.2 基于免疫细胞标记的应用策略

随着T细胞及NK细胞免疫治疗的发展,糖代谢标记基于T细胞和NK细胞修饰的应用可以为CAR-T、TCR-T以及CAR-NK细胞治疗提供更多的靶点选择性。

2.2.1 标记T细胞以扩展T细胞免疫治疗的应用范围

CAR-T细胞疗法在血液系统肿瘤治疗中取得了突破性进展^[34-37],但因尚缺乏特异性肿瘤靶标而限制了CAR-T疗法在实体肿瘤中的应用。糖代谢标记策略可以在免疫细胞膜表面引入特异性靶标分子,使其可以特异性识别实体肿瘤细胞,从而发挥靶向治疗作用,进一步拓展其在实体肿瘤中应用的可能性。LIU等^[38]通过糖代谢标记在CD3⁺T细胞表面引入肿瘤细胞表面特异性适配体单链DNA,成功制备了具有靶向SGC-7901胃癌细胞和CT26结肠癌细胞功能的适配体-T(aptamer-T)细胞。适配体-T细胞通过改善肿瘤微环境并促进细胞毒性因子的释放,如穿孔素、颗粒酶、CD107a等,对肿瘤细胞生长有显著抑制效果;此外,PD-L1适配体修饰的T(aptPD-L1-CD3⁺T)细胞对小鼠结肠癌CT26细胞具有显著的抗肿瘤效果,可延缓肿瘤进程并提高荷瘤小鼠生存率,而且aptPD-L1-CD3⁺T细胞的抑瘤作用优于PD-1抗体,如两者联用对CT26细胞的抑制作用更为显著。

2.2.2 标记NK细胞以提高NK细胞免疫治疗的靶向性 NK细胞是固有免疫中直接杀伤肿瘤细胞的重要组成部分,NK细胞疗法已成为当今免疫治疗研究的热点。通过糖代谢标记亦可对NK细胞膜进行标记,添加特异性靶标,从而让NK细胞的杀伤作用具有更高的靶向性。在血液系统肿瘤中,可以利用淋巴细胞等表达的细胞特异性表面分子对NK细胞进行标记。WANG等^[39]通过糖代谢标记方法,将B细胞表面标志分子CD22的配体间苯氧基苯甲酸(m-phenoxybenzoic acid,MPB)标记到NK细胞膜表面,MPB标记后的NK细胞对CD22⁺淋巴细胞具有较高的杀伤作用,无论是CD22⁺细胞系还是肿瘤患者来源的淋巴细胞,其杀伤效果与标记程度均呈现浓度依赖性,并且该标记对NK细胞所分泌的穿孔素、颗粒酶及IFN- γ 等炎症因子的杀伤功能无影响,该策略在小鼠肿瘤模型中可有效抑制肿瘤的生长且延长荷瘤鼠生存期。对于缺乏

特异性肿瘤靶标的实体肿瘤来说,可以利用已上市的肿瘤抗体药物及其靶点进行标记。例如WANG等^[40]通过糖代谢标记在NK-92细胞表面引入西妥昔单抗,被标记的NK-92细胞对表达EGFR和KRAS基因突变体的SW480结肠癌细胞具有很高的细胞毒性,并且在肿瘤组织中积累和浸润,显著抑制肿瘤生长。

2.3 基于肿瘤细胞和免疫细胞双标记的应用策略

免疫细胞作为抗肿瘤免疫的主力军,其发挥抗肿瘤免疫应答的前提是其在肿瘤部位的浸润,并有效识别肿瘤表面抗原。通过糖代谢标记策略可以同时肿瘤细胞和免疫细胞表面进行成对标记,以促使两种细胞更易接近从而加强免疫细胞的靶向性,并且可与光敏等仿生纳米新材料联合应用以增强光热等物理疗法的靶向性。

2.3.1 提高细胞间的易接近性 免疫细胞在肿瘤组织的浸润及其与肿瘤细胞的空间靠近是杀伤肿瘤细胞的先决条件。在糖代谢标记中,利用生物正交反应或联合化学主客体结构,将生物正交反应的配对化学基团或配对的主客体结构分别偶联或标记在肿瘤细胞和免疫细胞膜表面,通过化学基团或主客体结构的成对结合,实现肿瘤细胞和免疫细胞的空间靠近,通过增强肿瘤细胞和免疫细胞的相互作用调动机体免疫系统达到治疗肿瘤的目的。LI等^[41]分别用全乙酰化N-双环[6.1.0]壬炔-甘露糖胺(Ac₄ManN-BCN)和全乙酰化叠氮乙酰基半乳糖胺(Ac₄GalNAz)标记肿瘤细胞和T细胞并将其共同培养,体外实验结果表明,叠氮标记的T细胞与双环[6,1,0]壬炔(BCN)修饰的肿瘤细胞可以充分靠近,对肿瘤细胞的杀伤效率可提高2~4倍。PLUMET等^[42]通过在肿瘤细胞和T淋巴细胞表面修饰互补的主客体结构三聚物 β -环糊精和金刚烷,当主客体相遇时可以促使肿瘤细胞和T细胞的空间靠近,通过刺激T细胞分泌IL-2进而活化NK细胞,最终实现杀伤肿瘤细胞的目的。

2.3.2 实现免疫细胞的靶向性 可以通过联合肿瘤细胞和T细胞、NK细胞的标记策略,将天然的成对受体配体或体外筛选的抗原抗体对通过糖代谢标记的方法分别标记到肿瘤细胞和免疫细胞的膜表面,从而实现免疫细胞对肿瘤细胞的特异性识别。此种策略可以为缺乏肿瘤特异性靶标的肿瘤提供靶向治疗方案,进而通过肿瘤细胞活体标记联合体外标记T或NK细胞的免疫疗法实现。目前,针对肿瘤细胞的特异性体内标记技术已经通过多种方法在动物模型中得以实现,而针对免疫细胞的糖代谢标记策略主要在体外体系中开展研究,尚缺乏免疫细胞体内标记的方法。

2.3.3 提高光热等物理疗法的靶向性 糖代谢标记方法也可以与光敏剂等新材料联合应用,以提高肿瘤光热治疗的特异性和靶向性。例如HAN等^[43]利用糖代谢标记技术在T细胞表面进行叠氮基标记,然后提取细胞膜并与吡啶菁绿聚合物整合形成仿生纳米光敏剂,该仿生纳米光敏剂拥有完整的被叠氮基标记的T细胞膜,可以与BCN标记的肿瘤细胞发生高效、特异的生物正交反应,从而使光敏材料特异性聚集在肿瘤组织局部。与未修饰的肿瘤细胞相比,该策略可使光热治疗效率提高1.5倍,为肿瘤靶向治疗提供新思路。

2.4 基于外泌体或细胞外囊泡标记的应用策略

糖代谢标记外泌体或细胞外囊泡技术可以进一步增加外泌体或细胞外囊泡的靶向性。例如,为了增强外泌体对类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)的炎症部位的靶向能力,YOU等^[44]利用糖代谢标记对脂肪干细胞的细胞膜表面进行了葡聚糖标记,而后通过外泌体技术形成葡聚糖标记的外泌体(dextran sulfate-exosomes, DS-EXO),该DS-EXO可以靶向RA炎症部位中活化的M1型巨噬细胞,通过诱导M1向M2型巨噬细胞的极化,从而抑制局部炎症反应,为RA提供了一种新的治疗系统。该调节巨噬细胞异质性的靶向策略可以扩展到各种与巨噬细胞相关的疾病,如炎症性肠病、动脉粥样硬化、阿尔茨海默病和肿瘤等。此外,该团队还通过糖代谢标记策略将可靶向CD44分子的聚乙二醇/透明质酸标记到细胞膜表面,从而形成可靶向CD44的细胞外囊泡,该细胞外囊泡可通过血液循环在肿瘤和关节炎处聚集,为细胞外囊泡在体内的靶向运输和治疗提供了可靠的实施途径^[45]。

3 肿瘤细胞活体特异性糖代谢标记的策略

实现肿瘤细胞的活体特异性标记是糖代谢标记策略在肿瘤靶向治疗中的关键。目前,研究人员已开发出肿瘤原位注射、肿瘤自身特异性酶类、靶向运输载体等策略以实现非天然糖分子在肿瘤组织的活体靶向标记。

3.1 肿瘤原位注射策略

实现肿瘤组织的特异性标记是开展肿瘤靶向治疗的前提。肿瘤原位注射是实现肿瘤细胞的特异性标记最直接、简便的方法^[46-49]。例如,HU等^[46]在小鼠4T1肿瘤组织原位注射非天然糖分子叠氮基取代的乙酰化唾液酸,随后尾静脉注射BCN修饰的聚集诱导发光的光敏剂,结果表明,该新型光敏剂在叠氮基预处理的肿瘤部位局部特异性聚集发光,展现了良好的选择性标记效果,该研究为体内肿瘤靶向标记提

供了实验依据。肿瘤原位注射策略操作简单、效果显著,但在未知肿瘤位置以及深部时,其应用具有局限性。

3.2 利用肿瘤自身特异性酶类的策略

根据肿瘤自身所含特异性水解酶的特点,研究者开发了一系列含有可被肿瘤细胞内特异酶调控的保护基团的非天然糖分子,用于实现对肿瘤组织的体内特异性标记。例如,有研究^[47]利用肿瘤组织高表达组织蛋白酶B的特点,设计合成了含有Lys-Gly-Arg-Arg(KGRR)肽段的ManNAz类似物——RR-S-Ac₃ManNAz(其中S为对氨基苄氧羰基连接臂),该非天然糖分子的“RR”二肽结构只有在高表达组织蛋白酶B的肿瘤细胞内被特异性水解,释放出的ManNAz进入肿瘤细胞,可以实现体内特异性糖代谢标记人结肠癌细胞HT-29。该研究基于肿瘤自身组织蛋白酶B高表达的特点,为肿瘤的靶向标记和靶向治疗提供了新思路。此外,CHANG等^[50]根据前列腺癌细胞表达前列腺特异性抗原(prostate-specific antigen, PSA)的特点,设计合成了含有吗啉酰脲基修饰的六肽结构(Mu-HSSKLY)的1,3,4-三乙酰基-N-叠氮乙酰甘露糖胺(Ac₃ManNAz),该非天然糖分子达到前列腺癌细胞附近时其多肽结构可被PSA水解,从而释放Ac₃ManNAz进入前列腺癌细胞,进而进行特异性标记,进一步实现对目标组织的选择性标记。此外,基于肿瘤细胞与正常细胞微环境的差异,比如酸碱度、活性氧和谷胱甘肽水平等的不同,寻求更多异质性的靶向策略用于体内活体特异性标记肿瘤细胞依然是此领域的重点研究方向^[51]。

3.3 利用糖工程人工载体策略

研究人员开发了壳聚糖、脂质体、微管等不同类型的纳米材料来包装和运输糖代谢标记相关非天然糖分子,以期实现非天然糖探针分子的靶向性^[52-54]。LEE等^[55]用乙二醇壳聚糖纳米材料包装Ac₃ManNAz,通过尾静脉注射可以提升其增强渗透滞留效应(enhanced permeability and retention effect, EPR),进而实现对肿瘤细胞膜表面的叠氮基标记,随后通过尾静脉注入纳米载药颗粒使之与叠氮基发生非铜介导的生物正交反应,最终实现药物的靶向运输。该策略可以对任何肿瘤细胞进行特异性标记,从而增强体内肿瘤靶向治疗效果,另外还可以通过纳米材料进行修饰以进一步实现肿瘤细胞的特异性体内标记。例如,XIE等^[56]通过叶酸修饰的脂质体进行非天然糖分子的包装,可以靶向高表达叶酸受体的肿瘤细胞和组织并展现出了显著的特异性标记效果。另外,该课题组还通过用环状多肽(Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys, cRGDyK)修饰的脂质体实现对整合

素 $\alpha\text{v}\beta 3$ 阳性的小鼠皮肤黑色素瘤 B16F10 细胞的体内特异性糖代谢标记^[57]。该策略也为细胞表面的其他配体或受体等靶向标记提供了可靠的实验依据。此外, 纳米材料包装和运输体系还可以结合超声等物理手段实现肿瘤细胞的体内特异性标记。WANG 等^[58]将包裹的 Ac_4ManAz 脂质体与微泡相连, 该共聚物经血液运输, 在生理条件下具有良好的稳定性, 通过对肿瘤局部的超声使该共聚物分解破碎, 释放出的 Ac_4ManAz 通过肿瘤脉管系统进入肿瘤细胞, 进而特异性标记肿瘤细胞, 该方法可明显提升对肿瘤的特异性标记效率, 为原位肿瘤的示踪、监测和治疗提供了新方法。

4 临床应用的展望

糖代谢标记通过对肿瘤细胞和免疫细胞进行修饰可以应用于肿瘤靶向治疗。其中, 基于肿瘤细胞自身修饰, 可以在肿瘤细胞表面人为添加特异性抗原从而增加肿瘤细胞的靶向性。例如, 可在肿瘤细胞表面添加已知的半抗原, 即可以通过半抗原-载体激活抗肿瘤免疫。此外, 还可以连接已上市的肿瘤特异性抗体药物的抗原靶点分子, 即可以改变三阴性乳腺癌等肿瘤类型无药可用的窘境; 或者修饰特异性抗原, 同时利用其配对抗体制备 CAR-T 细胞, 从而实现个体化的肿瘤免疫治疗等(图2)。随着 T 细胞及 NK 细胞免疫治疗的发展, 基于糖代谢标记的 T 细胞和 NK 细胞修饰可以为 CAR-T、TCR-T 以及 CAR-NK 细胞治疗提供更多的靶点选择性。

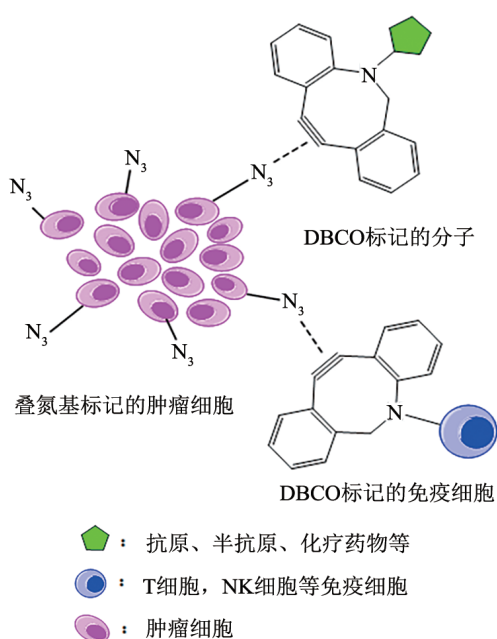


图2 糖代谢标记在肿瘤靶向治疗中的应用策略示意图

糖代谢标记在肿瘤靶向治疗中的研究取得阶段性成果, 初步证明了糖代谢标记应用于肿瘤靶向治疗的可能性, 但是未来在临床中的应用仍然任重道远。目前, 研究人员先后运用肿瘤原位注射、肿瘤自身特异性酶类、靶向运输载体等方法提高非天然糖分子在肿瘤组织的体内活体靶向标记, 但是仍然无法避免发生正常细胞的非特异标记, 因此设计并合成更高特异性的非天然糖分子是提高肿瘤细胞特异性标记的关键。另外, 对于非天然糖分子在正常小鼠体内的分布及其代谢动力学和不良反应还缺乏系统的研究。如何提高体内靶向肿瘤组织的特异性并实现临床应用是该研究领域面临的巨大挑战, 期待基于糖代谢标记技术的肿瘤靶向治疗策略能够在临床应用中取得更大的突破。

[参考文献]

- [1] KAYSER H, ZEITLER R, KANNICHT C, *et al.* Biosynthesis of a nonphysiological sialic acid in different rat organs, using *N*-propanoyl-*D*-hexosamines as precursors[J]. *J Biol Chem*, 1992, 267(24): 16934-16938. PMID: 1512235.
- [2] MAHAL L K, YAREMA K J, BERTOZZI C R. Engineering chemical reactivity on cell surfaces through oligosaccharide biosynthesis[J]. *Science*, 1997, 276(5315): 1125-1128. DOI: 10.1126/science.276.5315.1125.
- [3] CHANG P V, CHEN X, SMYRNIOTIS C, *et al.* Metabolic labeling of sialic acids in living animals with alkynyl sugars[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2009, 48(22): 4030-4033. DOI: 10.1002/anie.200806319.
- [4] DAUGHTRY J L, CAO W, YE J, *et al.* Clickable galactose analogues for imaging glycans in developing zebrafish[J]. *ACS Chem Biol*, 2020, 15(2): 318-324. DOI: 10.1021/acscchembio.9b00898.
- [5] WANG J J, DOU B, ZHENG L, *et al.* The metabolic chemical reporter $\text{Ac}_4\text{6AzGal}$ could incorporate intracellular protein modification in the form of UDP-6AzGlc mediated by OGT and enzymes in the leloir pathway[J/OL]. *Front Chem*, 2021, 9: 708306[2021-11-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8546251/>. DOI: 10.3389/fchem.2021.708306.
- [6] KIZUKA Y, FUNAYAMA S, SHOGOMORI H, *et al.* High-sensitivity and low-toxicity fucose probe for glycan imaging and biomarker discovery[J]. *Cell Chem Biol*, 2016, 23(7): 782-792. DOI: 10.1016/j.chembiol.2016.06.010.
- [7] CHENG B, XIE R, DONG L, *et al.* Metabolic remodeling of cell-surface sialic acids: principles, applications, and recent advances[J]. *Chembiochem*, 2016, 17(1): 11-27. DOI: 10.1002/cbic.201500344.
- [8] LI J, WANG J J, WEN L Q, *et al.* An OGA-resistant probe allows specific visualization and accurate identification of *O*-GlcNAc-modified proteins in cells[J]. *ACS Chem Biol*, 2016, 11(11): 3002-3006. DOI: 10.1021/acscchembio.6b00678.
- [9] WANG J J, DOU B, ZHENG L, *et al.* Synthesis of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ mediated cleavable affinity tag for labeling of *O*-GlcNAc modified proteins via azide-alkyne cycloaddition[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2021, 48: 128244. DOI: 10.1016/j.bmcl.2021.128244.

- [10] VOCADLO D J, HANG H C, KIM E J, *et al.* A chemical approach for identifying *O*-GlcNAc-modified proteins in cells[J]. PNAS, 2003, 100(16): 9116-9121. DOI: 10.1073/pnas.1632821100.
- [11] BOYCE M, CARRICO I S, GANGULI A S, *et al.* Metabolic cross-talk allows labeling of *O*-linked β -*N*-acetylglucosamine-modified proteins via the *N*-acetylgalactosamine salvage pathway[J]. PNAS, 2011, 108(8): 3141-3146. DOI: 10.1073/pnas.1010045108.
- [12] CHUH K N, ZARO B W, PILLER F, *et al.* Changes in metabolic chemical reporter structure yield a selective probe of *O*-GlcNAc modification[J]. J Am Chem Soc, 2014, 136(35): 12283-12295. DOI: 10.1021/ja504063c.
- [13] LI S S, WANG J J, ZANG L L, *et al.* Production of glycopeptide derivatives for exploring substrate specificity of human OGA toward sugar moiety[J/OL]. Front Chem, 2019, 6: 646-652[2021-11-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6340312/>. DOI: 10.3389/fchem.2018.00646.
- [14] DARABEDIAN N, GAO J X, CHUH K N, *et al.* The metabolic chemical reporter 6-azido-6-deoxy-glucose further reveals the substrate promiscuity of *O*-GlcNAc transferase and catalyzes the discovery of intracellular protein modification by *O*-glucose[J]. J Am Chem Soc, 2018, 140(23): 7092-7100. DOI: 10.1021/jacs.7b13488.
- [15] ZARO B W, BATT A R, CHUH K N, *et al.* The small molecule 2-azido-2-deoxy-glucose is a metabolic chemical reporter of *O*-GlcNAc modifications in mammalian cells, revealing an unexpected promiscuity of *O*-GlcNAc transferase[J]. ACS Chem Biol, 2017, 12(3): 787-794. DOI: 10.1021/acscmbio.6b00877.
- [16] WANG J J, ZHANG D Z, WEN Y H, *et al.* Efficient chemoenzymatic synthesis of UDP- α -6- N_3 -glucose[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2019, 29(9): 1148-1151. DOI: 10.1016/j.bmcl.2019.02.002.
- [17] PEDOWITZ N J, PRATT M R. Design and synthesis of metabolic chemical reporters for the visualization and identification of glycoproteins[J]. RSC Chem Biol, 2021, 2(2): 306-321. DOI: 10.1039/d1cb00010a.
- [18] SAXON E, BERTOZZI C R. Cell surface engineering by a modified staudinger reaction[J]. Science, 2000, 87(5460): 2007-2010. DOI: 10.1126/science.287.5460.2007.
- [19] LAUGHLIN S T, BASKIN J M, AMACHER S L, *et al.* *In vivo* imaging of membrane-associated glycans in developing zebrafish[J/OL]. Science, 2008, 320: 664-667[2021-11-20]. <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1155106>. DOI: 10.1126/science.1155106.
- [20] PRESCHER J A, DUBE D H, BERTOZZI C R. Chemical remodelling of cell surfaces in living animals[J]. Nature, 2004, 430(7002): 873-877. DOI: 10.1038/nature02791.
- [21] RONG J, HAN J, DONG L, *et al.* Glycan imaging in intact rat hearts and glycoproteomic analysis reveal the upregulation of sialylation during cardiac hypertrophy[J]. J Am Chem Soc, 2014, 136: 17468-17476. DOI: 10.1021/ja508484c.
- [22] WANG Z Y, LI D L, TIAN X R, *et al.* A copper-free and enzyme-free click chemistry-mediated single quantum dot nanosensor for accurate detection of microRNAs in cancer cells and tissues[J]. Chem Sci, 2021, 12(31): 10426-10435. DOI: 10.1039/d1sc01865e.
- [23] LU D H, WANG Y P, ZHANG T, *et al.* Metabolic radiolabeling and *in vivo* PET imaging of cytotoxic T lymphocytes to guide combination adoptive cell transfer cancer therapy[J]. J Nanobiotechnology, 2021, 19(1): 175-204. DOI: 10.1186/s12951-021-00924-2.
- [24] LIU Z H, LIANG Y H, CAO W H, *et al.* Proximity-induced hybridization chain reaction-based photoacoustic imaging system for amplified visualization protein-specific glycosylation in mice[J]. Anal Chem, 2021, 93(25): 8915-8922. DOI: 10.1021/acs.analchem.1c01352.
- [25] ROMOND E H, PEREZ E A, BRYANT J, *et al.* Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer[J]. N Engl J Med, 2005, 353(16): 1673-1684. DOI: 10.1056/NEJMoa052122.
- [26] SANTRA S, KAITTANIS C, SANTIESTEBAN O J, *et al.* Cell-specific, activatable, and theranostic prodrug for dual-targeted cancer imaging and therapy[J]. J Am Chem Soc, 2011, 133(41): 16680-16688. DOI: 10.1021/ja207463b.
- [27] STEICHEN S D, CALDORERA-MOORE M, PEPPAS N A. A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics[J]. Eur J Pharm Sci, 2013, 48(3): 416-427. DOI: 10.1016/j.ejps.2012.12.006.
- [28] WU X, CHEN J, WU M, *et al.* Aptamers: active targeting ligands for cancer diagnosis and therapy[J]. Theranostics, 2015, 5(4): 322-344. DOI: 10.7150/thno.10257.
- [29] ZHAO Y J, LI S Y, LV J Y, *et al.* Generation of triacyllipopeptide-modified glycoproteins by metabolic glycoengineering as the neoantigen to boost anti-tumor immune response[J]. Theranostics, 2021, 11(15): 7425-7438. DOI: 10.7150/thno.60211.
- [30] AMIRI-KORDESTANI L, BLUMENTHAL G M, XU Q C, *et al.* FDA approval: ado-trastuzumab emtansine for the treatment of patients with HER2-positive metastatic breast cancer[J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(17): 4436-4441. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0012.
- [31] TOMÁS R M F, GIBSON M I. Covalent cell surface recruitment of chemotherapeutic polymers enhances selectivity and activity[J]. Chem Sci, 2021, 12(12): 4557-4569. DOI: 10.1039/d0sc06580c.
- [32] WANG H, WANG R B, CAI K M, *et al.* Selective *in vivo* metabolic cell-labeling-mediated cancer targeting[J]. Nat Chem Biol, 2017, 13(4): 415-424. DOI: 10.1038/nchembio.2297.
- [33] WANG H, TANG L, LIU Y, *et al.* *In vivo* targeting of metabolically labeled cancers with ultra-small silica nanoconjugates[J]. Theranostics, 2016, 6(9): 1467-1476. DOI: 10.7150/thno.16003.
- [34] KOZANI P S, NASERI A, MIRAREFIN S M J, *et al.* Nanobody-based CAR-T cells for cancer immunotherapy[J/OL]. Biomark Res, 2022, 10(1): 24[2022-02-05]. <https://biomarkerres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40364-022-00371-7>. DOI: 10.1186/s40364-022-00371-7.
- [35] FEINS S, KONG W M, WILLIAMS E F, *et al.* An introduction to chimeric antigen receptor (CAR) T-cell immunotherapy for human cancer[J]. Am J Hematol, 2019, 94(S1): S3-S9. DOI: 10.1002/ajh.25418.
- [36] GUMBER D, WANG L D. Improving CAR-T immunotherapy: overcoming the challenges of T cell exhaustion[J]. EBio Med, 2022, 77: 103941. DOI: 10.1016/j.ebiom.2022.103941.
- [37] DIMITRI A, HERBST F, FRAIETTA J A. Engineering the next-generation of CAR T-cells with CRISPR-Cas9 gene editing[J]. Mol Cancer, 2022, 21(1): 78-112. DOI: 10.1186/s12943-022-01559-z.
- [38] LIU C G, WANG Y, LIU P, *et al.* Aptamer-T cell targeted therapy for tumor treatment using sugar metabolism and click chemistry[J]. ACS Chem Biol, 2020, 15(6): 1554-1565. DOI: 10.1021/acscmbio.0c0164.

- [39] WANG X W, LANG S Y, TIAN Y P, *et al.* Glycoengineering of natural killer cells with CD22 ligands for enhanced anticancer immunotherapy[J]. *ACS Cent Sci*, 2020, 6(3): 382-389. DOI: 10.1021/acscentsci.9b00956.
- [40] WANG X W, LUO X, TIAN Y P, *et al.* Equipping natural killer cells with cetuximab through metabolic glycoengineering and bioorthogonal reaction for targeted treatment of KRAS mutant colorectal cancer[J]. *Acs Chemical Biology*, 2021, 16(4): 724-730. DIO: 10.1021/acschembio.1c00022.
- [41] LI W J, PAN H, HE H M, *et al.* Bio-orthogonal T cell targeting strategy for robustly enhancing cytotoxicity against tumor cells [J/OL]. *Small*, 2019, 15(4): e1804383[2021-11-20]. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/smll.201804383>. DOI: 10.1002/smll.201804383.
- [42] PLUMET C, MOHAMED A S, VENDEUVRE T, *et al.* Cell-cell interactions *via* non-covalent click chemistry[J]. *Chem Sci*, 2021, 12(26): 9017-9021. DOI: 10.1039/d1sc01637g.
- [43] HAN Y T, PAN H, LI W J, *et al.* T cell membrane mimicking nanoparticles with bioorthogonal targeting and immune recognition for enhanced photothermal therapy[J/OL]. *Adv Sci (Weinh)*, 2019, 6(15): 1900251[2021-11-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6685477/>. DOI: 10.1002/adv.201900251.
- [44] YOU D G, LIM G T, KWON S, *et al.* Metabolically engineered stem cell-derived exosomes to regulate macrophage heterogeneity in rheumatoid arthritis[J/OL]. *Sci Adv*, 2021, 7(23): eabe0083[2021-11-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8172131/>. DOI: 10.1126/sciadv.abe0083.
- [45] LIM G T, YOU D G, HAN H S, *et al.* Bioorthogonally surface-edited extracellular vesicles based on metabolic glycoengineering for CD44-mediated targeting of inflammatory diseases[J/OL]. *J Extracell Vesicles*, 2021, 10(5): e12077[2021-11-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7953464/>. DOI: 10.1002/jev.2.12077.
- [46] HU F, MAO D, KENRY, *et al.* A light-up probe with aggregation-induced emission for real-time bio-orthogonal tumor labeling and image-guided photodynamic therapy[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2018, 57(32): 10182-10186. DOI: 10.1002/anie.201805446.
- [47] SHIM M K, YOON H Y, RYU J H, *et al.* Cathepsin B-specific metabolic precursor for *in vivo* tumor-specific fluorescence imaging [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2016, 55(47): 14698-14703. DOI: 10.1002/anie.201608504.
- [48] YOON H Y, SHIN M L, SHIM M K, *et al.* Artificial chemical reporter targeting strategy using bioorthogonal click reaction for improving active-targeting efficiency of tumor[J]. *Mol Pharm*, 2017, 14(5): 1558-1570. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b01083.
- [49] ZHAO Z Y, ZHANG Z M, DUAN S Z, *et al.* Cytosolic protein delivery *via* metabolic glycoengineering and bioorthogonal click reactions[J]. *Biomater Sci*, 2021, 9(13): 4639-4647. DOI: 10.1039/d1bm00548k.
- [50] CHANG P V, DUBE D H, SLETTEN E M, *et al.* A strategy for the selective imaging of glycans using caged metabolic precursors[J]. *J Am Chem Soc*, 2010, 132(28): 9516-9518. DOI: 10.1021/ja101080y.
- [51] HE Q Y, CHEN J, YAN J H, *et al.* Tumor microenvironment responsive drug delivery systems[J]. *Asian J Pharm Sci*, 2020, 15(4): 416-448. DOI: 10.1016/j.ajps.2019.08.003.
- [52] DU L H, QIN H, MA T, *et al.* *In vivo* imaging-guided photothermal/photoacoustic synergistic therapy with bioorthogonal metabolic glycoengineering-activated tumor targeting nanoparticles[J]. *ACS Nano*, 2017, 11(9): 8930-8943. DOI: 10.1021/acsnano.7b03226.
- [53] LEE S M, JUNG S, KOO H, *et al.* Nano-sized metabolic precursors for heterogeneous tumor-targeting strategy using bioorthogonal click chemistry *in vivo*[J]. *Biomaterials*, 2017, 148: 1-15. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2017.09.025.
- [54] WANG H, BO Y, LIU Y, *et al.* *In vivo* cancer targeting *via* glycopolyester nanoparticle mediated metabolic cell labeling followed by click reaction[J/OL]. *Biomaterials*, 2019, 218: 119305 [2021-11-20]. <https://www.cciencedirect.com/science/article/pii/S0142961219304041>. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2019.119305.
- [55] LEE S M, KOO H, NA J H, *et al.* Chemical tumor-targeting of nanoparticles based on metabolic glycoengineering and click chemistry[J]. *ACS Nano*, 2014, 8(3): 2048-2063. DOI: 10.1021/nn406584y.
- [56] XIE R, HONG S L, FENG L S, *et al.* Cell-selective metabolic glycan labeling based on ligand-targeted liposomes[J]. *J Am Chem Soc*, 2012, 134(24): 9914-9917. DOI: 10.1021/ja303853y.
- [57] XIE R, DONG L, HUANG R B, *et al.* Targeted imaging and proteomic analysis of tumor-associated glycans in living animals[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2014, 53(51): 14082-14086. DOI: 10.1002/anie.201408442.
- [58] WANG H, GAUTHIER M, KELLY J R, *et al.* Targeted ultrasound-assisted cancer-selective chemical labeling and subsequent cancer imaging using click chemistry[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2016, 55(18): 5452-5456. DOI: 10.1002/anie.201509601.

[收稿日期] 2022-02-05

[修回日期] 2022-03-25

[本文编辑] 阮芳铭, 黄静怡