

糖芯片技术在肿瘤研究中的应用

许倍宁¹, 刘银坤², 谢裕安¹

1 广西医科大学附属肿瘤医院 实验研究部, 广西 南宁 530021

2 复旦大学附属中山医院肝癌研究所 癌变与侵袭原理教育部重点实验室, 上海 200032

许倍宁, 刘银坤, 谢裕安. 糖芯片技术在肿瘤研究中的应用. 生物工程学报, 2020, 36(11): 2313–2326.

Xu BN, Liu YK, Xie YA. Application of glycan microarrays in cancer research. Chin J Biotech, 2020, 36(11): 2313–2326.

摘要: 糖基化修饰是蛋白质常见的翻译后修饰之一, 通过与糖结合蛋白如凝集素、抗体等相互作用调节肿瘤细胞侵袭、转移的能力及肿瘤异质性。通过化学合成法、化学-酶合成法或释放天然聚糖构建的糖芯片是分析聚糖与糖结合蛋白相互作用的重要工具。文中综述了常见的点制糖芯片的技术及糖芯片在癌症疫苗、单克隆抗体及诊断标志物中的广泛运用。由于肿瘤发生的各个环节都伴随着聚糖结构的改变, 利用糖芯片探究肿瘤细胞特异表达的聚糖所参与的生理病理过程具有重大意义。

关键词: 糖芯片, 糖结合蛋白, 癌症疫苗, 单克隆抗体, 诊断标志物

Application of glycan microarrays in cancer research

Beining Xu¹, Yinkun Liu², and Yu'an Xie¹

1 Department of Oncology Research, Guangxi Medical University Affiliated Tumor Hospital & Oncology Medical College, Nanning 530021, Guangxi, China

2 Key Laboratory of Carcinogenesis and Cancer Invasion (Ministry of Education), Liver Cancer Institute, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

Abstract: Glycosylation is one of the common post-translational modifications of proteins to regulate the ability of tumor invasion, metastasis and tumor heterogeneity by interacting with glycan-binding proteins such as lectins and antibodies. Glycan microarray can be constructed by chemical synthesis, chemical-enzyme synthesis or natural glycan releasing. Glycan microarray is an essential analytical tool to discover the interaction between glycan and its binding proteins. Here we summarize the standard techniques to construct glycan microarray for the application in cancer vaccine, monoclonal antibody and diagnostic markers.

Keywords: glycan microarray, glycan binding proteins, cancer vaccines, monoclonal antibody, diagnostic biomarkers

Received: March 18, 2020; **Accepted:** September 3, 2020

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 81260320).

Corresponding author: Yu'an Xie. Tel/Fax: +86-771-2860509; E-mail: gxxya@aliyun.com

国家自然科学基金 (No. 81260320) 资助。

1 糖芯片是检测肿瘤 GBP 的有力工具

蛋白质糖基化修饰是常见的翻译后修饰之一^[1-2], 常见的肿瘤标志物如卵巢癌中的粘蛋白-16 (Carbohydrate antigen 125, CA125)、乳腺癌中的糖类抗原 15-3 (Carcinoma antigen 15-3, CA15-3)、前列腺癌中的前列腺特异性抗原 (Prostate-specific antigen, PSA)、结直肠癌中的癌胚抗原 (Carcinoembryonic antigen, CEA)、卵巢癌和胃癌以及肺癌中的触珠蛋白 (Haptoglobin)、卵巢癌和胃癌中的 α -1-酸性糖蛋白 (Alpha-1-acid glycoprotein) 和肝癌中的 α -1 抗胰蛋白酶 (Alpha-1-antitrypsin) 和甲胎蛋白 (Alphafetoprotein, AFP) 均是糖蛋白。聚糖通过与糖结合蛋白 (Glycan binding protein, GBP) 如凝集素、病毒、抗体、生长因子等相互作用, 调节肿瘤免疫逃逸、促进肿瘤细胞侵袭细胞外基质、侵入血管、黏附非原发器官成为继发肿瘤等过程, 增强肿瘤细胞侵袭、转移的能力及肿瘤异质性^[3]。

肿瘤细胞的异常糖基化改变导致其表面出现许多异常糖类抗原, 如 T 抗原、Tn 抗原、Globo H 抗原等, 会影响肿瘤细胞与对应 GBP 的结合, 从而影响肿瘤细胞的细胞通讯^[4]。如 Tn 抗原是不完全的人类血型抗原, 其抗原决定簇为连接在肽链 N 端的丝氨酸或苏氨酸上的乙酰半乳糖胺。在正常细胞中, Tn 抗原被肽链遮盖或被共价结合的 GBP 所掩盖, 从而失去免疫原性, 但在上皮来源恶性肿瘤细胞中常常裸露从而表现出免疫原性。其表达与肿瘤的侵袭性呈正相关, 可能是由于正常细胞中 Tn 抗原常处于细胞顶端, 而肿瘤细胞中 Tn 抗原则处于基底部, 有利于增强侵袭性, 且躲避自身天然抗体的结合^[5]。详解影响 Tn 抗原的免疫原性的因素有利于开发针对 Tn 抗原的肿瘤治疗方式, 将在应用部分中阐述。

GBP 与聚糖结合的特异性由糖识别结构域 (Carbohydrate recognition domain, CRD) 的多肽链残基三维空间结构、CRD 超二级结构所含辅因

子与所识别聚糖的寡糖链末端羟基空间结构的相互作用所决定^[6]。

糖芯片技术是酶联免疫吸附型试验 (Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 的延伸, 是一种研究聚糖与 GBP 反应的有力工具, 类似于蛋白芯片和 DNA 芯片的作用原理, 糖芯片将不同聚糖分子通过共价或者非共价方法固定于经化学修饰的载玻片表面上^[7]。共价方法通过将聚糖与载玻片表面的 N-羟基丁二酰亚胺 (NHS) 酯或含环氧化合物的反应而固定于其表面^[8]; 非共价方法用于将糖脂等固定在硝化纤维素涂层的载玻片上^[9]。糖芯片的打印方法类似于 DNA 芯片, 打印机器以接触或非接触的方式, 将数纳升的聚糖溶液滴入芯片表面直径微米级别的孔内。打印后的芯片经过潮湿环境中孵育, 洗去未结合聚糖和反应基团以及离心干燥等步骤后可长期保存。在不同类型的聚糖或糖脂等固定于芯片表面制成糖芯片后, 将 GBP 与糖芯片结合, 结合完毕将未反应 GBP 洗去后便可在荧光扫描仪中读取芯片各个位点的反应强度, 以此表示 GBP 与特定糖型结合的特异性^[7]。

糖芯片分析涉及荧光检测, 以芯片上位点的荧光强度表示反应的强度, 可以直接对芯片上聚糖进行荧光标记, 例如在非共价结合中利用经典的生物素-链霉亲和素系统, 但这种做法可能会导致芯片上聚糖结构的结合位点被掩盖^[10]。另一种方案是通过还原胺化将荧光连接剂附着在聚糖上, 但这样做会引入更多的合成步骤使打印芯片复杂化^[11]。此外还可以使用荧光标记的 GBP 与糖芯片反应, 但这样可能会致蛋白变性或糖结合区域的改变, 因为聚糖通常通过多价键结合 GBP, 聚糖在芯片上的固定方式可能影响其与 GBP 的结合, 而标记在 GBP 上的荧光基团大部分连接于非游离端。所以也可以选择“三明治”法, 利用荧光二抗结合 GBP 再进行读取, 但二抗的特异性数量限制了“三明治”法的应用^[12]。

在释放天然来源聚糖制成的糖芯片中, 荧光双功能接头发挥重要作用, 用荧光双功能接头标记天然来源的聚糖使得研究人员可以监控多维色谱净化分离天然聚糖的过程, 确定不同结构的聚糖得以分离。分离之后的聚糖用于创建荧光双功能接头标记的聚糖糖库, 随后打印固定制成芯片成品^[13]。荧光双功能接头根据不同的分离天然聚糖的化学方法决定, 常用的荧光双功能接头包括 2-amino-N-(2-aminoethyl)-benzamide (AEAB)^[14]、*p*-nitrophenyl anthranilate (PNPA) 以及 2,6-diaminopyridine (DAP)^[15]。在最新的研究中, 研究人员使用氟甲苯甲氧基碳酸酯 (Fmoc) 连接于 3-(methoxyamino)propylamine (F-MAPA) 作为双功能荧光接头制造天然来源的糖芯片取得了成功, F-MAPA 作为荧光双功能接头连接于聚糖使得其还原端处于闭环状态, 具有更高的荧光性, 同时还具有易于解离的性质, 使天然来源糖芯片鉴定出具有生理意义的聚糖后可以解离 F-MAPA 进行聚糖结构分析, 进一步拓宽了糖芯片的应用^[16]。

利用糖芯片观测聚糖与 GBP 的相互作用, 揭示 GBP 参与肿瘤发生发展的机制^[17-18]。比如, 肿瘤细胞来源的糖芯片可以发现肿瘤特异聚糖抗原^[19]和检测针对肿瘤聚糖的自身抗体^[20]。利用肿瘤特异聚糖抗原生产的癌症疫苗, 显示出对肿瘤细胞更好的疗效和较小的副作用^[21]; 此外, 通过肿瘤特异聚糖抗原确定糖基转移酶的类型以及特异性, 可以提供更精确的治疗靶点以减少药物毒性^[22]。

2001 年, Consortium for Functional Glycomics (CFG) 成立, 可以向研究人员提供已有糖芯片的详细信息包括制作流程、原料、所探究的 GBP 以及糖芯片制作者的联系方式等^[23]。常见的糖芯片的构建方法包括释放天然聚糖和合成聚糖, 但受限于聚糖结构的准确鉴定、合成繁琐费时等因素, 因此, 点制糖芯片仍具有挑战。

聚糖结构的复杂性、多样性、长度和空间形态以及在细胞中糖基化的位点都会影响其作为聚糖抗原的免疫原性与各种 GBP 的反应, 分析聚糖

相关免疫反应尤为复杂^[24]。聚糖合成技术的日益改进、天然聚糖分离技术的不断成熟 (构建糖芯片的主要方法以及简化流程见图 1)、聚糖数据库的逐渐丰富、聚糖数据标准化的建立以及糖库中数据的积累有利于运用糖芯片分析肿瘤相关的免疫反应及其机制研究。

2 构建糖芯片

2.1 化学合成法及化学-酶合成法

化学合成法的优势在于可以合成很难天然获取的聚糖, 其关键步骤是糖苷键的合成^[25]。化学合成法可大致分为液相合成法、固相自动合成法以及计算机辅助一锅法。(1) 液相合成法: 传统的合成方法, 需要首先将极性功能基团 (如羟基等) 取代以使其溶于有机溶剂, 再进行保护基的引入及脱离。由于不同的糖基基团在溶液中发生聚合, 液相合成法只能合成相同的糖基, 严重限制了其应用范围。(2) 固相自动合成法: 固相自动合成法关键在于固定糖链的形成和空间构型的可控^[25], 通过先将单糖或类似物固定于固相树脂上, 选择不同反应条件逐个添加不同的类似物, 最后脱保护得到目的寡糖链^[26-27]。固相自动合成法的商业化使得常规多糖与糖胺聚糖的合成速度大大加快, 但是对于唾液酸糖基以及 α 构型糖基的合成仍待探索更有效的合成方法。(3) 计算机辅助一锅法合成: 对糖基化机制的理解加深和计算机技术的进展催生了计算机辅助一锅法合成, 通过计算选择糖苷供体的相对反应值, 并配备适当的保护组来调整反应活性, 以确保产生目标寡糖^[28]。使用这种方法合成了肿瘤相关 N3 抗原八糖^[29]及 Globo H^[30] 肿瘤抗原用于打印糖芯片。

除化学法之外, 另一种常用的聚糖合成法为酶法, 相比较化学合成法需要引入保护基团、离去基团再脱保护, 酶法高效便捷地将需要引入的基团通过酶促反应添加到特定底物之上^[31]。因组织表达水平限制可以从天然细胞处可以较成熟获得的糖基转移酶只有半乳糖基转移酶^[32]、唾液酸

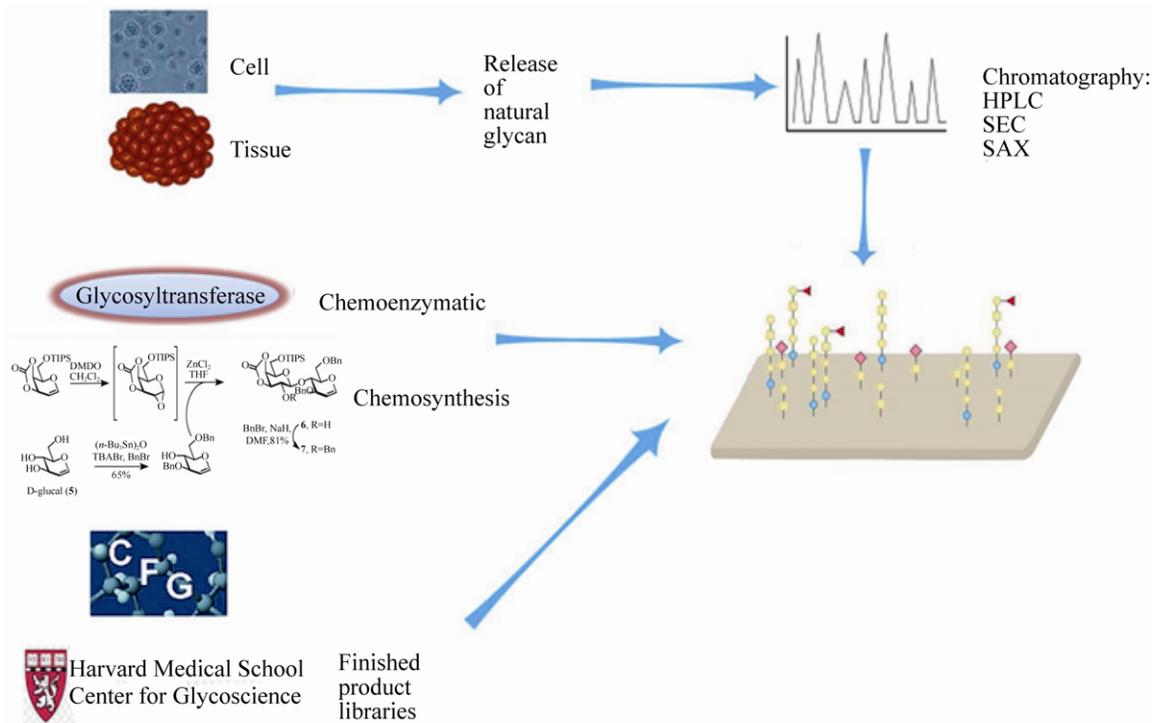


图 1 糖芯片的构建

Fig. 1 Construction of glycan microarray.

基转移酶^[33]以及 N-乙酰葡糖胺转移酶等。运用转基因及克隆技术可以在小鼠身上获得岩藻糖基转移酶^[34]。由于哺乳动物糖基转移酶以及糖苷酶都对底物具有很强的专一性^[35]，所以酶法合成聚糖主要受到酶数量的限制。利用糖芯片可以探索糖基转移酶的底物特异性，可以为酶法合成提供更多可能^[23]。虽然酶库中糖基转移酶的数量与日俱增^[36]，但仍需探索更多样糖基转移酶以及聚糖合成方式来满足糖芯片更广泛研究需求^[31]。

2.2 释放天然聚糖

天然来源聚糖在糖功能组学研究方面有巨大的潜力以及优势，但聚糖结构的高度复杂性以及其非模板合成的方式决定了其无法在现有技术条件下进行扩增^[37]。通常采用酶解法获取天然存在的聚糖，大多数完整的 N-聚糖可以通过 PNGase F 释放；其他内切酶 Endo D、Endo H 可特异性酶解 N-聚糖外周糖链的特定糖苷键；而对于 O-聚糖，常采用 β -消去反应完成解离^[13]。

2016 年 Song 等开发了 Oxidative release of natural glycans (ORNG) 技术，使用次氯酸钠释放天然聚糖获得了成功^[14]。其主要流程是将组织、细胞进行均一化处理，加入次氯酸钠溶液解离天然聚糖而不破坏其完整性，包括 N-聚糖、O-聚糖及鞘糖脂聚糖在内的糖聚合物都成功实现了分离。分离纯化荧光标记的聚糖，建立糖库，用于打印糖芯片，进行功能糖组学研究。ORNG 法大大丰富了可用于研究的糖库，为高通量聚糖研究提供了可能性^[38]。但由于次氯酸钠本身的化学性质，可能会部分降解胺键、巯基或碳双键等官能团作为功能基团的聚糖。

其他从糖蛋白中提取聚糖成分的手段包括胍解作用，在可控的强碱环境下进行一种名为“ β -elimination”的过程，以选择性释放 N-聚糖或者 O-聚糖，它通常伴随着硼氢化物的还原得到一种醛糖醇^[39]。最近发展了碱基处理与吡啶啉酮衍生化的方法，在色谱分离中起吸收紫外线的作用。

但所有化学方法都有可能导致部分或完全失去不稳定的修饰的缺点,如 O-乙酰化或硫酸化^[40]。

从天然来源释放的聚糖,无论其来源是什么,都依赖于分离技术提纯出可以用于后续的糖芯片打印和结构功能分析的聚糖或糖缀合物,用于分离纯聚糖或糖缀合物的方法通常是色谱法,如尺寸排阻色谱 (SEC)、强或弱阴离子交换色谱 (SAX) 以及最常用的反相高压高效液相色谱 (HPLC)^[41] (提取天然聚糖的简化流程见图 1)。从自然来源提取聚糖打印糖芯片,与 GBP 结合后根据荧光提示筛选出具有生理意义的聚糖进行分析的糖芯片称为“鸟枪法”糖芯片^[15]。

3 糖芯片在肿瘤研究中的重要应用

3.1 癌症疫苗

肿瘤疫苗分为确切抗原 (Defined antigen) 疫苗以及非确切 (Undefined antigen) 抗原疫苗,非确切抗原疫苗如树突状细胞疫苗、热休克蛋白疫苗等虽然在临床实验中显示了疗效却伴随着自身免

疫病等副作用,肿瘤相关糖类抗原 (Tumor-associated carbohydrate antigens, TACAs) 是在肿瘤细胞发生发展过程中表达于其表面结构异于正常细胞的确切抗原^[42],可以用于制备疫苗,直接诱导肿瘤细胞凋亡、激活抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用或者激活补体途径杀伤肿瘤^[43-44]。根据 TACAs 设计的肿瘤疫苗的优势在于精确靶向肿瘤,但由于 TACAs 为内源性产生,其免疫原性以及免疫反应性较弱,需要用糖芯片评估其反应性以及选择合适的抗原载体加强免疫反应 (构建疫苗以及用糖芯片评估疫苗疗效的简易流程模式见图 2),已有报道乳腺癌细胞表面异常高表达的一种多聚己糖 Globo H 作为抗原搭配不同蛋白载体来制备癌症疫苗^[45]。为了比较不同的蛋白载体交联 Globo H 引发的免疫反应的强度,作者使用已产生抗体的小鼠血清来结合经化学合成法合成的 Globo H 糖芯片,结果显示 Globo H 交联 α -半乳糖酰基鞘氨醇 C34 显示了最强的免疫原性。

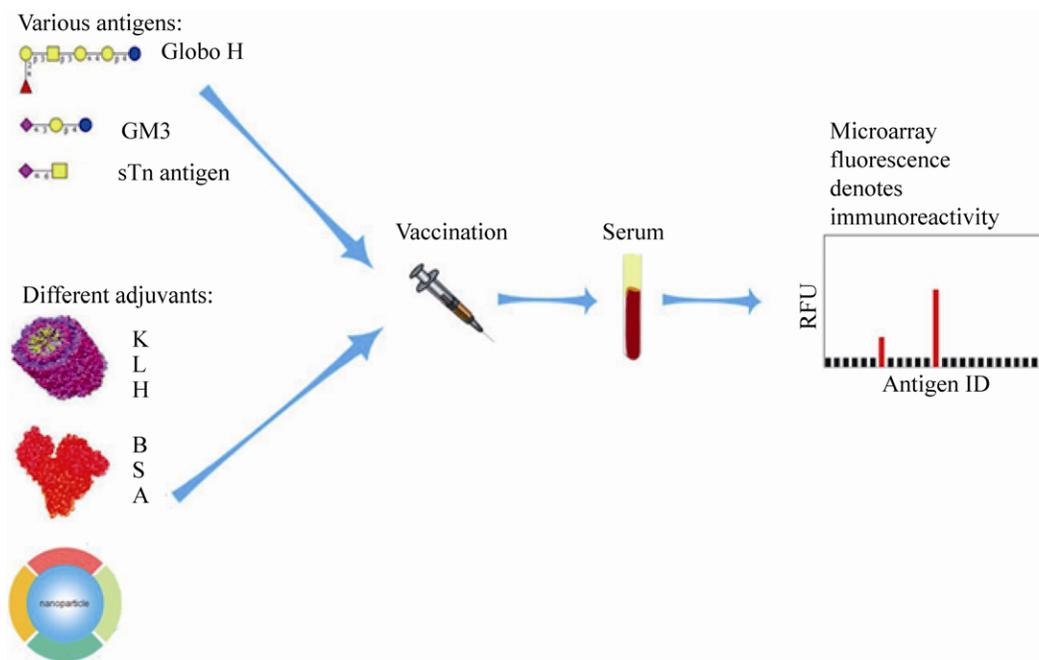


图 2 聚糖来源癌症疫苗的构建

Fig. 2 Construction of glycan-derived cancer vaccines.

与蛋白抗原不同,大多数 TACAs 是非 T 细胞依赖型抗原,无法与人类主要组织相容性复合体结合并激活 T 细胞,只能与 B 细胞表面受体弱结合,经非 T 细胞依赖途径产生低亲和力、低滴度的 IgM 抗体^[46]。为了激活辅助性 T 细胞,使得 B 细胞经 T 细胞依赖途径产生高亲和力 IgG 抗体(同时释放细胞因子诱导产生细胞毒性 T 细胞),在另一项研究中,研究人员改进了制备 Globo H 癌症疫苗的方法,将 TACAs 与载体蛋白搭配提升其免疫原性以激活 T 细胞,使得疫苗诱导产生不止 IgM 抗体,同时还产生 IgG 抗体且激活了 T 细胞,并进行了 II 期和 III 期临床试验。将受试患者的血清与 Globo H 抗原及其类似物打印的糖芯片结合,发现疫苗诱导产生的抗体不仅与 Globo H 抗原反应,也与 SSEA3 和 SSEA4 抗原结构反应,同时发现以血蓝蛋白作为载体蛋白引发的免疫反应更强烈,但以白喉类毒素作为载体蛋白则对 Globo H 的特异性更高^[47]。

糖蛋白 MUC1 上的异常聚糖是最常见的 TACAs 之一,以肿瘤细胞上异常表达的 MUC1 糖蛋白 sTn 结构为靶点制备的癌症疫苗 Theratope 进行了 III 期临床试验,但 5 年后病人的生存并未达到预期^[48-49]。为了探究更有效的癌症疫苗,研究人员将 MUC1 糖蛋白上的约包含 20-22 个氨基酸的肽段,和肽段上的异常糖基化产物与噬菌体 Q β 载体蛋白结合制成疫苗接种在患癌小鼠身上。但出乎意料,接种疫苗的小鼠血清 IgG 抗体并未与高表达 MUC1 糖蛋白的肿瘤强烈结合。为了进一步揭示原因,研究人员将 20 个 MUC1 肽段打印在糖芯片上,并用小鼠血清与之结合,结果显示包含 SAPDTRPAP 的肽段与小鼠血清反应强烈,揭示 SAPDTRPAP 序列对 MUC1 的免疫原性至关重要。基于此设计的下一代疫苗在小鼠身上诱导产生的血清 IgG 抗体,与肿瘤细胞反应并强烈结合。为了进一步探究 MUC1 糖蛋白上免疫原性最强的聚糖结构,研究人员将 72 种不同聚糖

结构和肽段 PAHGVTSAPDTRPAPGSTA 制成糖芯片,与血清反应结果显示包含 Tn 抗原结构与 PDTR 肽段的 MUC1 与小鼠 IgG 反应最剧烈^[50]。

在另一项研究的第一代疫苗中,虽然针对 Tn 抗原的 IgG 抗体滴度尚可,但抗体对高侵袭性 TA3 乳腺癌细胞的识别和结合能力都很弱。而第二代的疫苗引发的抗体对癌细胞显示出了很强的结合能力,接种第二代疫苗的小鼠也比第一代具有更好的预后。研究人员使用包含 Tn 抗原的糖蛋白和糖脂打印的糖芯片,与接种疫苗的小鼠血清结合,结果显示第二代疫苗诱导产生的抗体比第一代更多样,与 Tn 抗原结合也更紧密,但抗体滴度与第一代相比并未显著提升。结果提示我们:TACAs 制备的癌症疫苗在过去只关注抗体的滴度,而忽略了抗体的多样性对疫苗效果的影响;第一代与第二代疫苗的主要区别在于载体蛋白的选择以及载体蛋白和 Tn 抗原连接方式的不同,提示载体蛋白和连接方式会对 TACA 的抗原性产生巨大影响继而影响疫苗疗效^[51]。

在一项研究中,研究人员使用一锅法合成前列腺癌细胞表达的己糖抗原 RM2。首先将 RM2 与其他 95 种聚糖打印于糖芯片上,用特异性结合 RM2 的抗体与糖芯片结合,荧光结果显示,抗体只与合成的 RM2 抗原结合,特异性良好。然后,研究人员将不同比例 RM2 搭配变异的白喉毒素 CRM197 以及糖脂 C34 作为抗原制成疫苗,接种 BALB/c 小鼠。然后,将 RM2 以及在 RM2 基础上衍生的聚糖打印成糖芯片,以此检测不同 RM2 比例的接种策略接种疫苗的小鼠血清抗体免疫反应强度,结果显示,4.7 个 RM2 搭配 CRM197 和 C34 制成的疫苗,在小鼠体内显示了最高的 IgG 抗体滴度,揭示了最佳接种策略^[52]。

癌细胞异常表达的糖基化产物也属于新生抗原,由此制造的癌症疫苗通常引起特异性更高以及更强烈的针对癌细胞的免疫反应。Neu5Gc 是一种人类自身无法合成、但可以通过食物摄取聚集在

结直肠癌细胞表面的糖基化新生抗原^[53]。已有研究将 Neu5Gc 作为疫苗的靶点,利用仿生纳米颗粒装载 Neu5Gc 并固定于红细胞上注入患有结直肠癌的小鼠体内,引发了强烈的免疫反应。在此研究中,糖芯片仍然作为抗原抗体反应强度的评估工具,在佐剂选择、注射间隔选择以及疗效评估中发挥重要作用。此外,糖芯片测得的免疫反应剧烈的程度与小鼠肿瘤体积缩小的程度成正比,可作为疗效的预测指标^[50]。

由此可见,在针对上述不同的 TACAs 如黏蛋白相关糖抗原、Lewis 血型相关糖抗原以及 GLOBO 相关糖抗原制备的肿瘤疫苗中,糖芯片都作为评估所选 TACAs 免疫原性、所引起免疫反应强度以及合适抗原载体选择(疫苗制备的重要步骤)的评估分析工具,在治疗中发挥了重要的作用(图 2)。

3.2 单克隆抗体

免疫疗法最近在肿瘤治疗中展现出了极大潜力,肿瘤免疫治疗可分为主动与被动两种方式,上述的癌症疫苗是主动免疫治疗的代表,被动治疗的主要方式为免疫检查点抑制剂、杀伤性单克隆抗体以及过继性治疗细胞转移^[54]。

针对免疫检查点 PD-1 及其配体 PD-L1 的单克隆抗体偶联药物抑制剂是近年癌症治疗最引人注目的发现,但其仍在许多癌种中未显示出疗效,限制了其应用^[55]。PD-1 及 PD-L1 都是高度糖基化的蛋白^[56],研究人员证明了其表面聚糖结构对抑制 T 细胞功能是必要的,同时,研究人员研制特异性结合 PD-L1 表面聚糖结构的单克隆抗体偶联药物治疗三阴性乳腺癌小鼠,治疗后小鼠肿瘤体积显著缩小生存时间显著延长,而在人体实验中针对蛋白结构的免疫检查点阻滞剂并未对三阴性乳腺癌患者显示获益^[57]。在另一项研究中,研究人员通过酶移去组织切片上的 PD-L1 蛋白的 N 连接型聚糖,以去糖基化的 PD-L1 蛋白作为免疫检查点抑制剂的疗效预测标志物,准确性显著提

高,同时也发现了 PD-L1 表面 N 连接型聚糖阻碍 PD-L1 抗体与其结合^[58]。这说明免疫蛋白表面聚糖显著影响其功能,例如免疫原性以及 T 细胞的抑制作用。癌症免疫治疗的成功,依赖于靶向肿瘤细胞免疫蛋白的单克隆抗体的良好的特异性, T 细胞激活效应以及潜在的细胞杀伤效应等。而肿瘤细胞表面异常表达的聚糖结构,是很有潜力的单抗识别或治疗靶点^[59]。

利用糖芯片寻找与免疫蛋白互作的聚糖,寻找可以结合肿瘤或肿瘤免疫蛋白的单克隆抗体,可以拓宽免疫治疗的应用,如制造杀伤性单克隆抗体或针对肿瘤免疫蛋白表面聚糖的免疫检查点抑制剂^[60]。mAb A4 原本是为了特异性结合人类胚胎干细胞制造的一种单克隆抗体,后经研究发现其可以特异性结合卵巢癌细胞^[61]。研究人员通过“鸟枪法”糖芯片策略^[15],获得了卵巢癌细胞天然表达的所有聚糖结构,结合质谱分析确定了 mAb A4 与卵巢癌细胞结合的抗原表位为 Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc (H type 1) 以及 Gal β 1-3GlcNAc (type 1 LacNAc),其中 H type 1 特异性表达于卵巢癌细胞表面,并利用糖芯片探究 mAb A4 特异性结合 H type 1 的具体机制^[62]。FDA 目前已批准一种单克隆抗体 Unituxin[®] (Dinutuximab) 的上市,用于治疗高危神经母细胞瘤的二线治疗药物,该药针对的靶点为双唾液酸神经节苷脂 GD2^[63]。

上文提及的 Globo H 是一种在多种癌症尤其是乳腺癌中高表达的 TACAs,有研究人员使用计算机辅助一锅法合成 Globo H 及其相关抗原,并将其打印于糖芯片上,分别与鼠源性单克隆抗体 MBr1、VK-9 以及乳腺癌病人血清结合。结果显示,血清抗体与鼠源性单克隆抗体结合效果有差别: Globo H 末端的四糖或五糖结合鼠源性单克隆抗体效果相同,且必须存在末端岩藻糖基化才能结合。而乳腺癌病人血清抗体与末端去岩藻糖的五糖或岩藻糖基化的六糖结合能力未显示出明

显差异,提示可能是由于血清抗体的多克隆性或在乳腺癌不同阶段对不同聚糖存在不同的免疫反应所致^[30]。

在另一项研究中,研究人员把目标定位在多种肿瘤细胞高表达而在正常细胞罕见的 sTn 抗原,化学合成了 71 种 sTn 相关结构 TACAs 打印于糖芯片,探索了 8 种目标单克隆抗体结合 sTn 抗原的特异性,随后联合 ELISA 和流式细胞技术分析,得出了目标 mAb 与 TACAs 结合的抗原表位以及亲和力。随后,研究人员将目标单克隆抗体与单甲基偶联金葡菌素 E 相连,制成治疗性抗体,这些治疗性抗体在体外实验中,抑制了表达 sTn 的肿瘤的生长^[64]。

基于相似的策略, Cox 等根据胚胎发育时期以及肿瘤发生过程中细胞表面表达的 α 2,8 连接型聚唾液酸残基制作了嵌合单抗。发现其可以与肺癌、胶质瘤以及胰腺癌表面的唾液酸特异性结合并对唾液酸抗原产生胞吞作用,有潜在的抗原提呈效果^[65]。HAE3 是针对 TA3 乳腺癌细胞表面黏蛋白设计的单抗,利用糖芯片发现 HAE3 可以与多种乳腺癌细胞,甚至是三阴性乳腺癌细胞表面的一种 O-聚糖结合,因此 HAE3 也可以作为乳腺癌治疗的潜在靶向工具^[66]。

在一项研究中,研究人员将糖芯片技术与饱和转移差谱 NMR 技术结合,鉴定了抗 MUC1 糖蛋白单克隆抗体家族和抗 Tn 抗原单克隆抗体家族与对应抗原结合的表位图。结果显示,抗 MUC1 单克隆抗体 VU3C6 和 VU-11E2 识别 MUC1 肽,并以肽序列依赖的方式结合 GalNAc。相反,抗 Tn 单克隆抗体 8D4 和 14D6 克隆主要识别 GalNAc 结构,不与 MUC1 肽结合;这些抗 Tn 单克隆抗体对含有 Tn-Ser 抗原的糖肽表现出明显的更高的亲和力,而对含有 Tn-Thr 的糖肽则并未显示,强调了 Ser 或 Thr 在抗原抗体结合中发挥重要作用。这项发现揭示了抗原抗体结合反应最细微结构特异性,对改进以 MUC1 糖蛋白为主要

靶点的癌症疫苗,或为新的以单克隆抗体为基础的治疗方式打下基础^[67]。

在另一项治疗性单克隆抗体的研究实验中,糖芯片依旧作为检测所制备单抗与目标 TACAs 结合特异性的工具。通过构建 TACAs-两性离子聚合物,研究人员通过杂交瘤技术制备了针对 Tn 抗原结构的治疗性鼠源性单克隆抗体 Kt-IgM-8。经计算机辅助一锅法与化学-酶合成法合成的糖芯片包括 70 种 Tn 相关的 TACAs,将单克隆抗体 Kt-IgM-8 与糖芯片结合,结果显示在 70 种 TACAs 中, Kt-IgM-8 对 Tn 抗原显示出了最强的亲和力;后续研究证实, Kt-IgM-8 在体内和体外均对乳腺癌细胞株 MCF-7 有杀伤作用,有潜在的临床价值^[68]。

TF 抗原 (Thomsen-Friedenreich antigen) 常在侵袭能力强、恶性程度高的肿瘤细胞上高表达^[69]。在 2018 年的一项研究中,研究人员将 TF 抗原偶联金纳米颗粒疫苗,不添加佐剂注射于小鼠腹腔引发小鼠对 TF 抗原的反应,经结果分析选择了 MUC4 糖蛋白上重复串联肽段序列第五位氨基酸残基上的 TF 抗原 (5TFag-TR MUC4) 作为最佳靶点。将含有 738 个相关 TACAs 结构的糖芯片与小鼠多克隆血清结合分析,发现小鼠多克隆血清抗体与上述 TF 抗原特异性结合。同时,与糖芯片中其他含有 TF 抗原的结构未显示结合,显示出了极高的特异性。随后,研究人员将兔接种诱导产生的多克隆血清与糖芯片结合分析,显示出了同样的高特异性^[70]。受此启发,研究人员分析血清抗体后,利用杂交瘤技术制备了可以特异性结合 5TFag-TR MUC4 的单克隆抗体 F5。同样,使用含有 738 个相关 TACAs 结构的糖芯片结合分析后, F5 也显示出了极高的特异性,只与 TF 抗原特异性结合。这一表位的发现代表了一种新的免疫原或免疫治疗的靶点,可借此发展肿瘤诊断抗体,或探究针对各种 MUC4 糖蛋白阳性的癌症的免疫疗法^[71]。

Le 抗原系统 (Lewis antigens) 是一种人类血

型抗原系统^[72]。有研究为了检测两种具有肿瘤杀伤潜力的单克隆抗体 FG88.2 和 FG88.7 的抗原特异性,将含有超过 600 种合成或天然 TACAs 的糖芯片与上述两种单克隆抗体结合。结果显示,FG88.2 和 FG88.7 与许多包含 Le 结构的 TACA 结合,显示了巨大靶向肿瘤细胞的潜力。在接下来的实验发现,FG88.2 和 FG88.7 与 71% 的结直肠癌、81% 的胰腺癌、54% 的胃癌、23% 的非小细胞肺癌和 31% 的卵巢癌组织结合。后续实验还证明了 FG88.2 和 FG88.7 具有杀伤肿瘤细胞的潜力,并在小鼠肝癌模型上得到了证实,为免疫治疗应用于实体瘤提供了研究方向^[73]。

研究发现单克隆抗体 HAE3 与包括肺癌、前列腺癌、膀胱癌、食道癌和卵巢癌在内的许多人类上皮性肿瘤发生交叉反应^[66]。经糖芯片反应后显示 HAE3 可以识别各种肿瘤之间共表达的保守 TACAs 结构。研究人员将 HAE3 亚克隆制得 HAE3-C1,并将其与乳腺癌相关 TACAs 打印的糖芯片反应,结果显示 HAE3-C1 与 HAE3 一样对相关 TACAs 具有高亲和力。随后,将 HAE3-C1 作为探针,结合糖芯片技术和光纤阵列扫描技术,定量分析了乳腺癌病人循环血中 HAE3-C1 阳性结合细胞的表达水平,结果显示,在 IV 期乳腺癌病人中,约 40% 的病人显示 HAE3-C1 结合强阳性;值得注意的是,三阴性乳腺癌病人中 HAE3-C1 结合强阳性率为 92.5%。

由上述例子可见,免疫治疗的疗效取决于合适的 mAb 用于构建药物载体或嵌合抗原,糖芯片为寻找、构建与肿瘤细胞反应性良好的 mAb 提供了丰富的信息,如决定 mAb 与肿瘤结合能力的抗原表位的具体信息、筛选合适的 mAb 作为治疗性单抗或免疫检查点抑制剂的药物载体。

3.3 诊断标志物

在肿瘤细胞发生发展过程中,其糖基转移酶如岩藻糖转移酶、唾液酸转移酶等上调表达,因此肿瘤细胞表现出异于正常细胞的糖基化修饰^[74]。这

种异常糖基化改变包括更多的分支数、更多的末端唾液酸化、不完整 O-聚糖表达等^[2]。TACAs 如 CA19-9、CA-125 作为诊断标志物在临床上已经成熟应用多年,但在恶性肿瘤发生发展的早期,其异常的糖基化表现已出现^[75],但限于此时肿瘤体积以及肿瘤细胞数量,这种异常的糖基化难以直接被检测到。但异常的糖基化结构导致的相应抗体水平的升高可以被检测到。所以,肿瘤细胞糖异常糖基化修饰改变,导致针对其的体内抗体水平变化,具有早期诊断的价值。此外,有研究发现针对异常聚糖结构的抗体具有患癌风险评估、预后评估和药物反应预测的价值,相关机制仍在探索^[76]。

糖芯片技术使得研究人员可以高通量地分析肿瘤表达的异常聚糖结构和对应的抗体,是否有作为检测癌症的生物标志物的可能性^[77]。已有研究将乳腺癌、卵巢癌和前列腺癌异常高表达的 Globo H 聚糖抗原 (Fuc α 1-2Gal β 1-3GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc) 打印于糖芯片上,检测乳腺癌患者的血清,结果显示针对 Globo H 的抗体明显升高,结果具有统计学意义^[30]。糖芯片在血液系统肿瘤的标志物检测中也显示了潜力,患经典霍奇金淋巴瘤的 16 名病人、18 名患弥漫性大 B 淋巴瘤的患者与 12 名非淋巴瘤患者作为实验组,健康人作为对照组,分别检测两组针对 L- α -arabinose 与 Tn 抗原的抗体水平,结果显示,淋巴瘤组针对 L- α -arabinose 的 IgM 水平显著增高,具有统计学意义,而针对 Tn 抗原的抗体升高也具有统计学意义^[78]。此外,利用 AFP-L1 与 AFP-L3 制成的糖芯片可以检测乙肝相关的肝细胞肝癌患者的血清抗体^[79]。

糖蛋白 MUC1 中的聚糖结构 Tn-MUC1、sTn-MUC1 和 core3-MUC1 (GlcNAc β 1-3GalNAc-MUC1),及其肽段也被打印成糖芯片。结果显示,针对 Tn-MUC1、sTn-MUC1 和 core3-MUC1 结构的 IgG 抗体在乳腺癌、卵巢癌以及前列腺癌患者

中显著升高, 具有统计学意义。研究同时发现, 抗体的特异性不仅与聚糖结构相关, 也与糖蛋白的特定肽段相关^[80]。还有报道, 针对 core3-MUC1 和 sTn-MUC1 结构的 IgG 水平与乳腺癌预后正相关, 与转移率负相关, 提示此抗体可能对乳腺癌的进展有影响, 可以作为预后的标志物^[81]。在一项针对间皮瘤的标志物研究中, 发现针对间皮瘤异常表达聚糖 Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc β 的抗体升高与诊断相关, 针对 Glc α 1-4Glc β 的抗体升高与预后相关, 两者的升高都具有统计学意义^[82]。在一项针对结直肠癌的标志物研究中, 研究人员通过对癌细胞表达的 MUC 糖蛋白家族上的异常表达 O-聚糖结构进行了综合分析, 选择 MUC1 和 MUC4 糖蛋白上的异常 O-聚糖如 Tn 抗原、core 2 结构和 core 3 结构等作为潜在抗原, 利用酶法合成后打印于糖芯片上。将 58 名结直肠癌患者作为实验组, 56 名健康个体作为对照组, 将两组血清与糖芯片反应之后分析得出结果: 针对 MUC1 和 MUC4 糖蛋白上的异常 Tn 抗原以及 sTn 抗原产生的 IgA 和 IgG 抗体在 79% 的患者中被发现, 特异度为 92%。此外, 通过单抗检测确认 Tn 和 sTn 抗原是诱导产生抗体的主要抗原^[83]。

除了异常表达的 O-聚糖, 异常表达的 N-聚糖在肿瘤中也很常见。在 2011 年的一项研究中, 将前列腺癌细胞异常表达的 16 种 N-型聚糖打印成糖芯片。糖芯片结合前列腺癌患者的血清, 结果显示针对高甘露糖型的异常结构 Man9(Man α 1-2Man α 1-6(Man α 1-2Man α 1-3)Man α 1-6(Man α 1-2Man α 1-2Man α 1-3) Man β 1-4GlcNAc), 以及三或四天线型的复杂型 N-聚糖结构的抗体明显升高, 具有统计学意义^[84]。此外, 有研究使用化学法合成了可能的乳腺癌异常表达聚糖抗原, 其中包括 11 种 N-聚糖、3 种 O-聚糖和 2 种鞘糖脂, 将其打印于糖芯片上。将不同分期的交界性非粘液性肿瘤或卵巢癌病人的血清与糖芯片结合, 结果显示, 针对 24 种包括 P1 结构 (Gal α 1-4Gal β 1-4GlcNAc β)

在内的聚糖抗原的抗体明显升高, 灵敏度和特异度分别达到 79.2% 和 84.8%, 诊断效率与 CA125 相当^[85]。

4 总结与展望

由于肿瘤发生的各个环节都伴随着糖基转移酶表达水平的改变以及酶活性和相应的聚糖结构的改变, 所以探究肿瘤细胞特异表达的聚糖结构以及所参与的促侵袭、转移等生理病理过程具有重大治疗意义, 作为诊断标志物以及治疗靶点也有巨大的临床潜力。糖芯片在分析肿瘤聚糖与 GBP 相互作用有着广阔的应用前景, 探索肿瘤相关聚糖的特异性结合 GBP 可以制备识别肿瘤的单抗以靶向肿瘤, 作为免疫治疗的药物载体、制备治疗性抗体以直接介导细胞毒作用或激活补体杀伤肿瘤细胞; 以及用糖芯片分析以 TACAs 制备的癌症疫苗的治疗效果从而优化癌症疫苗策略等。

此外, 糖基转移酶在不同癌症中往往呈上调趋势, 且与癌症较高的转移潜力、较差的预后相关^[86-87], 升高的糖基转移酶水平还可以调高肿瘤干细胞或原癌基因的转录水平^[88]。因此, 理论上抑制糖基转移酶可以达到治疗癌症的效果。利用糖芯片测定糖基转移酶的底物特异性^[77], 可以有助于开发对肿瘤聚糖选择性更高、副作用更小的糖基转移酶抑制剂, 开拓新的肿瘤治疗策略。

随着对聚糖生理机制的研究、聚糖合成技术的改进、获取天然或有生物学功能聚糖技术的提高以及糖芯片制备工艺的提升, 糖芯片在肿瘤研究中的作用会进一步拓展, 被更多实验室所使用, 从而也进一步推动糖组学的发展。

REFERENCES

- [1] Oliveira-Ferrer L, Legler K, Milde-Langosch K. Role of protein glycosylation in cancer metastasis. *Semin Cancer Biol*, 2017, 44: 141–152.
- [2] Pinho SS, Reis CA. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nat Rev*

- Cancer, 2015, 15(9): 540–555.
- [3] Häuselmann I, Borsig L. Altered tumor-cell glycosylation promotes metastasis. *Front Oncol*, 2014, 4: 28.
- [4] Chia J, Goh G, Bard F. Short O-GalNAc glycans: regulation and role in tumor development and clinical perspectives. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1860(8): 1623–1639.
- [5] Fu C, Zhao H, Wang Y, et al. Tumor-associated antigens: Tn antigen, sTn antigen, and T antigen. *HLA*, 2016, 88(6): 275–286.
- [6] Bewley CA, Shahzad-UI-Hussan S. Characterizing carbohydrate-protein interactions by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biopolymers*, 2013, 99(10): 796–806.
- [7] Wang DN, Collins N. The 10th anniversary of carbohydrate microarrays (2002–2012). *J Proteomics Bioinform*, 2013, 6(2): e22.
- [8] Wang HB, Zhang YM, Yuan X, et al. A universal protocol for photochemical covalent immobilization of intact carbohydrates for the preparation of carbohydrate microarrays. *Bioconjugate Chem*, 2011, 22(1): 26–32.
- [9] Takada W, Fukushima M, Pothacharoen P, et al. A sulfated glycosaminoglycan array for molecular interactions between glycosaminoglycans and growth factors or anti-glycosaminoglycan antibodies. *Anal Biochem*, 2013, 435(2): 123–130.
- [10] Alvarez RA, Blixt O. Identification of ligand specificities for glycan-binding proteins using glycan arrays. *Methods Enzymol*, 2006, 415: 292–310.
- [11] Song XZ, Xia BY, Stowell SR, et al. Novel fluorescent glycan microarray strategy reveals ligands for galectins. *Chem Biol*, 2009, 16(1): 36–47.
- [12] Ruprecht C, Bartetzko MP, Senf D, et al. A synthetic glycan microarray enables epitope mapping of plant cell wall glycan-directed antibodies. *Plant Physiol*, 2017, 175(3): 1094–1104.
- [13] Song XZ, Heimbürg-Molinari J, Cummings RD, et al. Chemistry of natural glycan microarrays. *Curr Opin Chem Biol*, 2014, 18: 70–77.
- [14] Song XZ, Ju H, Lasanajak Y, et al. Oxidative release of natural glycans for functional glycomics. *Nat Methods*, 2016, 13(6): 528–534.
- [15] Song XZ, Lasanajak Y, Xia BY, et al. Shotgun glycomics: a microarray strategy for functional glycomics. *Nat Methods*, 2011, 8(1): 85–90.
- [16] Wei MH, Mckitrick TR, Mehta AY, et al. Novel reversible fluorescent glycan linker for functional glycomics. *Bioconjugate Chem*, 2019, 30(11): 2897–2908.
- [17] Agrawal P, Fontanals-Cirera B, Sokolova E, et al. A systems biology approach identifies FUT8 as a driver of melanoma metastasis. *Cancer Cell*, 2017, 31(6): 804–819.e7.
- [18] Li Z, Chai WG. Mucin O-glycan microarrays. *Curr Opin Struct Biol*, 2019, 56: 187–197.
- [19] Liao B, Tan B, Teo G, et al. Shotgun glycomics identifies tumor-associated glycan ligands bound by an ovarian carcinoma-specific monoclonal antibody. *Sci Rep*, 2017, 7: 14489.
- [20] Park S, Gildersleeve JC, Blixt O, et al. Carbohydrate microarrays. *Chem Soc Rev*, 2013, 42(10): 4310–4326.
- [21] Padler-Karavani V. Glycan microarray reveal the sweet side of cancer vaccines. *Cell Chem Biol*, 2016, 23(12): 1446–1447.
- [22] Ogura A, Tahara T, Nozaki S, et al. Glycan multivalency effects toward albumin enable N-glycan-dependent tumor targeting. *Bioorg Med Chem Lett*, 2016, 26(9): 2251–2254.
- [23] Raman R, Raguram S, Venkataraman G, et al. Glycomics: an integrated systems approach to structure-function relationships of glycans. *Nat Methods*, 2005, 2(11): 817–824.
- [24] de Vries RP, Smit CH, de Bruin E, et al. Glycan-dependent immunogenicity of recombinant soluble trimeric hemagglutinin. *J Virol*, 2012, 86(21): 11735–11744.
- [25] Huang TY, Zulueta MML, Hung SC. Regioselective one-pot protection, protection-glycosylation and protection-glycosylation-glycosylation of carbohydrates: a case study with D-glucose. *Org Biomol Chem*, 2014, 12(2): 376–382.
- [26] Cedillo I, Chreng D, Engle E, et al. Synthesis of 5'-GalNAc-Conjugated oligonucleotides: a comparison of solid and solution-phase conjugation strategies. *Molecules*, 2017, 22(8): 1356.

- [27] Fair RJ, Hahm HS, Seeberger PH. Combination of automated solid-phase and enzymatic oligosaccharide synthesis provides access to $\alpha(2,3)$ -sialylated glycans. *Chem Commun (Camb)*, 2015, 51(28): 6183–6185.
- [28] Kulkarni SS, Wang CC, Sabbavarapu NM, et al. “One-Pot” protection, glycosylation, and protection-glycosylation strategies of carbohydrates. *Chem Rev*, 2018, 118(17): 8025–8104.
- [29] Lee JC, Wu CY, Apon JV, et al. Reactivity-based one-pot synthesis of the tumor-associated antigen N3 minor octasaccharide for the development of a photocleavable DIOS-MS sugar array. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2006, 45(17): 2753–2757.
- [30] Huang CY, Thayer DA, Chang AY, et al. Carbohydrate microarray for profiling the antibodies interacting with Globo H tumor antigen. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(1): 15–20.
- [31] Wen LQ, Edmunds G, Gibbons C, et al. Toward automated enzymatic synthesis of oligosaccharides. *Chem Rev*, 2018, 118(17): 8151–8187.
- [32] Saito F, Suyama A, Oka T, et al. Identification of novel peptidyl serine α -galactosyltransferase gene family in plants. *J Biol Chem*, 2014, 289(30): 20405–20420.
- [33] Wang LB, Liu Y, Wu LJ, et al. Sialyltransferase inhibition and recent advances. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1864(1): 143–153.
- [34] Ernst LK, Rajan VP, Larsen RD, et al. Stable expression of blood group H determinants and GDP-L-fucose: beta-D-galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase in mouse cells after transfection with human DNA. *J Biol Chem*, 1989, 264(6): 3436–3447.
- [35] Esko JD, Varki A, Cummings RD, et al. *Essentials of Glycobiology*. 3rd ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2015.
- [36] Lombard V, Ramulu HG, Drula E, et al. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(D1): D490–D495.
- [37] Song XZ, Lasanajak Y, Rivera-Marrero C, et al. Generation of a natural glycan microarray using 9-fluorenylmethyl chloroformate (FmocCl) as a cleavable fluorescent tag. *Anal Biochem*, 2009, 395(2): 151–160.
- [38] Smith DF, Cummings RD, Song XZ. History and future of shotgun glycomics. *Biochem Soc Trans*, 2019, 47(1): 1–11.
- [39] Kudelka MR, Antonopoulos A, Wang YC, et al. Cellular O-glycome reporter/amplification to explore O-glycans of living cells. *Nat Methods*, 2016, 13(1): 81–86.
- [40] Wang CJ, Zhang P, Jin WJ, et al. Quantitative O-glycomics based on improvement of the one-pot method for nonreductive O-glycan release and simultaneous stable isotope labeling with 1-(d₆/d₃)phenyl-3-methyl-5-pyrazolone followed by mass spectrometric analysis. *J Proteom*, 2017, 150: 18–30.
- [41] Vreeker GCM, Wuhler M. Reversed-phase separation methods for glycan analysis. *Anal Bioanal Chem*, 2017, 409(2): 359–378.
- [42] Jin KT, Lan HR, Chen XY, et al. Recent advances in carbohydrate-based cancer vaccines. *Biotechnol Lett*, 2019, 41(6/7): 641–650.
- [43] Zheng XJ, Yang F, Zheng MW, et al. Improvement of the immune efficacy of carbohydrate vaccines by chemical modification on the GM3 antigen. *Org Biomol Chem*, 2015, 13(22): 6399–6406.
- [44] Geissner A, Seeberger PH. Glycan arrays: from basic biochemical research to bioanalytical and biomedical applications. *Annu Rev Anal Chem*, 2016, 9: 223–247.
- [45] Huang YL, Hung JT, Cheung SKC, et al. Carbohydrate-based vaccines with a glycolipid adjuvant for breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(7): 2517–2522.
- [46] Bovin N, Obukhova P, Shilova N, et al. Repertoire of human natural anti-glycan immunoglobulins. Do we have auto-antibodies? *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1820(9): 1373–1382.
- [47] Danishefsky SJ, Shue YK, Chang MN, et al. Development of Globo-H cancer vaccine. *Acc Chem Res*, 2015, 48(3): 643–652.
- [48] Holmberg LA, Sandmaier BM. Theratope vaccine (STn-KLH). *Expert Opin Biol Ther*, 2001, 1(5): 881–891.
- [49] Holmberg LA, Sandmaier BM. Vaccination with Theratope[®] (STn-KLH) as treatment for breast

- cancer. *Expert Rev Vaccines*, 2004, 3(6): 655–663.
- [50] Reuven EM, Ben-Arye SL, Yu H, et al. Biomimetic glyconanoparticle vaccine for cancer immunotherapy. *ACS Nano*, 2019, 13(3): 2936–2947.
- [51] Yin ZJ, Chowdhury S, McKay C, et al. Significant impact of immunogen design on the diversity of antibodies generated by carbohydrate-based anticancer vaccine. *ACS Chem Biol*, 2015, 10(10): 2364–2372.
- [52] Chuang HY, Ren CT, Chao CA, et al. Synthesis and vaccine evaluation of the tumor-associated carbohydrate antigen RM2 from prostate cancer. *J Am Chem Soc*, 2013, 135(30): 11140–11150.
- [53] Labrada M, Dorvignit D, Hevia G, et al. GM3(Neu5Gc) ganglioside: an evolution fixed neoantigen for cancer immunotherapy. *Semin Oncol*, 2018, 45(1/2): 41–51.
- [54] Sharma P, Hu-Lieskovan S, Wargo JA, et al. Primary, adaptive, and acquired resistance to cancer immunotherapy. *Cell*, 2017, 168(4): 707–723.
- [55] Wang DY, Salem JE, Cohen JV, et al. Fatal toxic effects associated with immune checkpoint inhibitors: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Oncol*, 2018, 4(12): 1721–1728.
- [56] Liu HC, Guo LJ, Zhang J, et al. Glycosylation-independent binding of monoclonal antibody toripalimab to FG loop of PD-1 for tumor immune checkpoint therapy. *MAbs*, 2019, 11(4): 681–690.
- [57] Li CW, Lim SO, Chung EM, et al. Eradication of triple-negative breast cancer cells by targeting glycosylated PD-L1. *Cancer Cell*, 2018, 33(2): 187–201.e10.
- [58] Lee HH, Wang YN, Xia WY, et al. Removal of N-linked glycosylation enhances PD-L1 detection and predicts anti-PD-1/PD-L1 therapeutic efficacy. *Cancer Cell*, 2019, 36(2): 168–178.e4.
- [59] Salatino M, Girotti MR, Rabinovich GA. Glycans pave the way for immunotherapy in triple-negative breast cancer. *Cancer Cell*, 2018, 33(2): 155–157.
- [60] Gao C, Wei MH, McKittrick TR, et al. Glycan microarrays as chemical tools for identifying glycan recognition by immune proteins. *Front Chem*, 2019, 7: 833.
- [61] Choo M, Tan HL, Ding V, et al. Characterization of H type 1 and type 1 *N*-acetylglucosamine glycan epitopes on ovarian cancer specifically recognized by the anti-glycan monoclonal antibody mAb-A4. *J Biol Chem*, 2017, 292(15): 6163–6176.
- [62] Liao B, Tan B, Teo G, et al. Shotgun glycomics identifies tumor-associated glycan ligands bound by an ovarian carcinoma-specific monoclonal antibody. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 1–13.
- [63] Mora J. Dinutuximab for the treatment of pediatric patients with high-risk neuroblastoma. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 2016, 9(5): 647–653.
- [64] Prendergast JM, Da Silva APG, Eavarone DA, et al. Novel anti-Sialyl-Tn monoclonal antibodies and antibody-drug conjugates demonstrate tumor specificity and anti-tumor activity. *MAbs*, 2017, 9(4): 615–627.
- [65] Cox EC, Thornlow DN, Jones MA, et al. Antibody-mediated endocytosis of polysialic acid enables intracellular delivery and cytotoxicity of a glycan-directed antibody-drug conjugate. *Cancer Res*, 2019, 79(8): 1810–1821.
- [66] Wang DN, Tang J, Liu SY, et al. Carbohydrate microarrays identify blood group precursor cryptic epitopes as potential immunological targets of breast cancer. *J Immunol Res*, 2015, 2015: 510810.
- [67] Coelho H, Matsushita T, Artigas G, et al. The quest for anticancer vaccines: deciphering the fine-epitope specificity of cancer-related monoclonal antibodies by combining microarray screening and saturation transfer difference NMR. *J Am Chem Soc*, 2015, 137(39): 12438–12441.
- [68] Trabbic KR, Kleski KA, Shi MC, et al. Production of a mouse monoclonal IgM antibody that targets the carbohydrate Thomsen-nouveau cancer antigen resulting in *in vivo* and *in vitro* tumor killing. *Cancer Immunol Immunother*, 2018, 67(9): 1437–1447.
- [69] Mereiter S, Polom K, Williams C, et al. The thomsen-friedenreich antigen: a highly sensitive and specific predictor of microsatellite instability in gastric cancer. *J Clin Med*, 2018, 7(9): 256.
- [70] Brinas RP, Sundgren A, Sahoo P, et al. Design and synthesis of multifunctional gold nanoparticles bearing tumor-associated glycopeptide antigens as potential cancer vaccines. *Bioconjugate Chem*, 2012, 23(8): 1513–1523.

- [71] Trabbic KR, Whalen K, Abarca-Heideman K, et al. A tumor-selective monoclonal antibody from immunization with a tumor-associated mucin glycopeptide. *Sci Rep*, 2019, 9 (1): 1–12.
- [72] Kazi AM, Cortese MM, Yu Y, et al. Secretor and salivary ABO blood group antigen status predict rotavirus vaccine take in infants. *J Infect Dis*, 2017, 215(5): 786–789.
- [73] Chua JX, Vankemmelbeke M, McIntosh RS, et al. Monoclonal antibodies targeting leclax-related glycans with potent antitumor activity. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(13): 2963–2974.
- [74] Zhang XH, Chen F, Petrella A, et al. A high-throughput glycosyltransferase inhibition assay for identifying molecules targeting fucosylation in cancer cell-surface modification. *ACS Chem Biol*, 2019, 14(4): 715–724.
- [75] Yu AL, Hung JT, Ho MY, et al. Alterations of glycosphingolipids in embryonic stem cell differentiation and development of glycan-targeting cancer immunotherapy. *Stem Cells Dev*, 2016, 25(20): 1532–1548.
- [76] Magalhães A, Duarte HO, Reis CA. Aberrant glycosylation in cancer: a novel molecular mechanism controlling metastasis. *Cancer Cell*, 2017, 31(6): 733–735.
- [77] Hyun JY, Pai I, Shin I. The glycan microarray story from construction to applications. *Acc Chem Res*, 2017, 50(4): 1069–1078.
- [78] Lawrie CH, Marafioti T, Hatton CSR, et al. Cancer-associated carbohydrate identification in Hodgkin's lymphoma by carbohydrate array profiling. *Int J Cancer*, 2006, 118(12): 3161–3166.
- [79] Wu CS, Lee TY, Chou RH, et al. Development of a highly sensitive glycan microarray for quantifying AFP-L3 for early prediction of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *PLoS ONE*, 2014, 9(4): e99959.
- [80] Wandall HH, Blixt O, Tarp MA, et al. Cancer biomarkers defined by autoantibody signatures to aberrant O-glycopeptide epitopes. *Cancer Res*, 2010, 70(4): 1306–1313.
- [81] Blixt O, Buetti D, Burford B, et al. Autoantibodies to aberrantly glycosylated MUC1 in early stage breast cancer are associated with a better prognosis. *Breast Cancer Res*, 2011, 13(2): R25.
- [82] Vuskovic MI, Xu NY, Bovin NV, et al. Processing and analysis of serum antibody binding signals from Printed Glycan Arrays for diagnostic and prognostic applications. *Int J Bioinform Res Appl*, 2011, 7(4): 402–426.
- [83] Pedersen JW, Blixt O, Bennett EP, et al. Seromic profiling of colorectal cancer patients with novel glycopeptide microarray. *Int J Cancer*, 2011, 128(8): 1860–1871.
- [84] Wang D. *N*-glycan cryptic antigens as active immunological targets in prostate cancer patients. *J Proteomics Bioinform*, 2012, 5(4): 90–95.
- [85] Jacob F, Goldstein DR, Bovin NV, et al. Serum antiglycan antibody detection of nonmucinous ovarian cancers by using a printed glycan array. *Int J Cancer*, 2012, 130(1): 138–146.
- [86] Gonzalez-Vallinas M, Molina S, Vicente G, et al. Expression of microRNA-15b and the glycosyltransferase GCNT3 correlates with antitumor efficacy of Rosemary diterpenes in colon and pancreatic cancer. *PLoS ONE*, 2014, 9(6): e98556.
- [87] Ashkani J, Naidoo KJ. Glycosyltransferase gene expression profiles classify cancer types and propose prognostic subtypes. *Sci Rep*, 2016, 6: 26451.
- [88] Schultz MJ, Holdbrooks AT, Chakraborty A, et al. The tumor-associated glycosyltransferase ST6Gal-I regulates stem cell transcription factors and confers a cancer stem cell phenotype. *Cancer Res*, 2016, 76(13): 3978–3988.

(本文责编 陈宏宇)