化学合成糖肽抗肿瘤疫苗进展

灵 仪[1#], 翟景明[2#], 丁飞青[1*], 蔡 辉[1*]

(1. 中山大学药学院 (深圳), 广东 深圳 518107; 2. 河南科技大学第一附属医院普外科, 河南 洛阳 471003)

摘要: 在肿瘤发生过程中, 糖基转移酶的表达会发生显著变化, 这导致与健康细胞相比, 肿瘤细胞表面的糖蛋白呈现出独特的糖链结构特征, 即高度截短的糖链。此类异常糖基化的产物被称为肿瘤相关糖抗原 (tumor-associated carbone antigens, TACAs)。作为恶性肿瘤的重要分子标志物, TACAs不仅参与调控肿瘤的发生、发展、侵袭和转移等多个关键环节, 同时在肿瘤免疫逃逸中发挥重要作用。基于此, 靶向肿瘤的异常糖基化蛋白质或肽段已经成为目前抗肿瘤药物研发的重要策略之一。然而, 从天然来源中分离糖蛋白较为困难, 且使用化学方法合成具有复杂结构的糖蛋白或者糖肽仍具有一定的挑战性。本文系统综述了近年来利用化学方法合成糖肽抗肿瘤疫苗的研究进展, 以期为后续糖肽抗肿瘤疫苗的研发提供理论依据和技术参考。

关键词: 异常糖基化; 肿瘤相关糖抗原; 糖肽; 化学合成疫苗; 抗肿瘤疫苗

中图分类号: R914 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-4870(2025)07-1978-13

Advances in chemically synthesized glycopeptide-based antitumor vaccines

LING Yi[1#], ZHAI Jing-ming[2#], DING Fei-qing[1*], CAI Hui[1*]

(*1. School of Pharmaceutical Sciences Shenzhen, Sun Yat-sen University, Shenzhen 518107, China;*
2. Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital and College of Clinical Medicine, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China)

Abstract: There exist significant changes in glycosyltransferase expression during tumorigenesis, which leads to the unique sugar chain structural characteristics of glycoproteins on the surface of tumor cells compared to normal cells, namely highly truncated sugar chains. These aberrant glycosylated products are called tumor-associated carbohydrate antigens (tumor-associated carbone antigens, TACAs). As an important molecular marker of malignant tumors, TACAs not only participate in the regulation of tumor occurrence, development, invasion and metastasis of tumors, but also play a key role in tumor immune escape. Thus, targeting abnormally glycosylated proteins or peptides on tumors have become one of most important anti-tumor drug development strategies. However, it is difficult to isolate glycoproteins from natural sources, and it is still challenging to synthesize complex glycoproteins or glycopeptides by chemical methods. This review summarizes the progress of glycopeptide anti-tumor vaccine synthesized by chemical methods in recent years, in order to provide theoretical basis and technical reference for the research and development of glycopeptide anti-tumor vaccine in the future.

Key words: aberrant glycosylation; tumor-associated carbone antigen; glycopeptide; chemically synthesized vaccine; anti-tumor vaccine

收稿日期: 2025-04-17; 修回日期: 2025-06-03.
基金项目: 深圳市协同创新科技计划−国际科技合作项目 (GJHZ20220913142602004).
#共同第一作者.
*通讯作者 Tel / Fax: 86-755-23260204, E-mail: dingfq3@mail.sysu.edu.cn; caihui5@mail.sysu.edu.cn
DOI: 10.16438/j.0513-4870.2025-0439

尽管癌症治疗目前已取得显著进展, 但据世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 统计, 全球每年因癌症死亡人数仍在持续上涨。传统的治疗方法如手术、放疗和化疗虽然在一定程度上改善了患者的生存率, 但存在化疗耐药性、毒副作用大以及复发率高等问题。因此, 探索能够更精准靶向肿瘤、副作用小且高效的治疗策略成为当前癌症研究的重点方向。近年来, 癌症的免疫疗法已经在临床上证实了它的有效性, 其中, 基于肿瘤相关抗原 (tumor-associated antigen, TAAs) 的免疫治疗策略备受关注。TAAs是肿瘤细胞表面或内部特异性表达的抗原分子, 能够被免疫系统识别并引发抗肿瘤免疫反应。但是, 由于大多数TAA是自身抗原, 因此要首先克服免疫耐受这一障碍[1]。而肿瘤疫苗可以打破对特定 TAA的耐受性并诱导长期存在的适应性免疫反应, 特别是糖肽肿瘤疫苗, 由于其具有高特异性、低不良反应以及良好的可控性等优势, 已成为肿瘤免疫治疗领域的重要研究方向[2]。

糖肽疫苗的抗肿瘤免疫机制在于其对异常糖基化肿瘤相关糖抗原 (tumor-associated carbone antigens, TACAs) 的特异性识别。蛋白质的糖基化是最重要的蛋白质翻译后修饰 (protein post-translational modifications, PTMs) 之一, 可以发生在蛋白质生命周期的任何阶段。蛋白质通过酶或非酶糖基化, 其中葡萄糖 (醛形式) 与蛋白质中的赖氨酸和精氨酸残基反应, 并经历进一步的变化, 最终导致晚期糖基化终产物的生成[3]。糖基化作为控制多种生理病理过程的关键调节机制, 在肿瘤细胞中表现出异常糖基化这一重要特征。肿瘤细胞会过度表达一些糖链截短以及末端唾液酸化的寡糖, 主要表现为唾液酸Lewis结构的增加、核心岩藻糖基化异常、N-糖支链增加或黏蛋白型O-糖、Tn抗原的暴露[4]。已有研究表明, 这种糖基化模式的改变会破坏正常的细胞功能, 最终导致其转移性和侵袭性行为[5]。这些异常糖基化的糖蛋白由于其特异性已经成为有前途的抗肿瘤靶标。

虽然已经证明异常糖基化的糖蛋白可以作为肿瘤的靶标, 但是合成带有明确聚糖的完整糖蛋白仍面临巨大技术挑战。因此, 大部分研究将糖肽作为一种有效的替代方案。然而, 从合成的角度来看, 糖肽的合成本身也具有挑战性, 因为它涉及到肽的合成和糖化学的组合。同时, 由于糖肽抗原属于自身抗原, 存在免疫原性较弱的缺点, 需要共价偶联免疫刺激组分或者佐剂提高其免疫原性, 促进机体产生高亲和力的lgG抗体[6]。本文仅对近年来研究人员在克服上述挑战、推进化学合成糖肽抗肿瘤疫苗研发方面所取得的重要进展作一简要的概述。

1　肿瘤相关糖抗原

TACAs是基于肿瘤细胞异常糖基化机制形成的特异性分子标志物, 在人肿瘤细胞上过表达, 可用于区分肿瘤细胞和正常细胞, 已经成为癌症免疫治疗中极具潜力的临床靶点之一[7]。根据连接物的不同, 目前已经发现的TACAs主要分为两类: ① 糖蛋白抗原: 包括与黏蛋白 (mucin) 相关的与αO-Ser/Thr连接的Tn抗原、Thomsen-Friendreich (TF) 抗原和唾液酸-Tn(sTn)抗原[8-10], 以及前列腺特异性膜抗原 (prostate-specific membrane antigen, PSMA)[11]; ② 糖脂抗原: 是与神经酰胺脂质连接并通过疏水相互作用锚定在细胞表面的脂质双层上的糖类化合物。糖脂可以进一步分为几个家族: 神经节苷脂 (ganglioside, G) 类, 例如GD2、GD3、GM2、GM3和岩藻糖基GM1; Globo类, 例如Globo-H、Gb3、Gb4和Gb5; 血型决定簇类, 例如Lewis X、Lewis Y及其唾液酸化衍生物[12]。

1.1　糖蛋白类抗原　黏蛋白作为人体内广泛表达的高分子质量糖蛋白, 其核心特征是通过O-糖基化将*N*-乙酰半乳糖胺 (GalNAc) 与丝氨酸/苏氨酸 (Ser/Thr) 残基连接, 与许多生理和病理过程有关[13]。在前文已经叙述过, 异常的糖基化被广泛认为是癌症的独特标志之一。黏蛋白在生理条件下参与黏液屏障的组成, 帮助维持体内的环境平衡; 然而, 在经历异常糖基化后, 它们会通过改变核心结构的表达促进细胞增殖、减少肿瘤细胞的黏附导致肿瘤转移、促进免疫逃逸和化疗耐药等机制促进癌症发展[14]。

在癌症中, 黏蛋白发生的特征性糖基化改变会形成3种重要的肿瘤相关表位, 即聚糖Tn、唾液酸Tn和TF抗原[14]。Tn抗原 (GalNAcα1-O-Ser/Thr) 通常定义为与Ser或Thr相连的单糖*N*-乙酰半乳糖胺, 它是最简单的O-糖, 可以通过修饰生成唾液酸Tn抗原 (Neu5Acα2-6GalNAcα1-O-Ser/Thr, STn)[15]。Tn和STn抗原可以作为疫苗的潜在靶标, 临床数据表明, 高达90%的上皮癌都存在Tn和STn抗原, 包括乳腺癌、肺癌、卵巢癌、胃癌和前列腺癌等[16]。而TF抗原 (Galβ1-3GalNAcα1-O-Ser/Thr) 是通过β-糖苷键向Tn抗原添加Gal单元而形成的肿瘤靶点, 它在乳腺癌、结肠癌、膀胱癌、前列腺癌、肝癌和胃癌上特异性高表达[17]。

PSMA是一种位于细胞膜上的II型跨膜糖蛋白, 具有叶酸水解酶和*N*-乙酰-α连接的酸性二肽酶的双酶活性[18]。它在非前列腺组织或正常组织中的表达水平极低, 而特异性高度表达于前列腺癌 (prostatic carcinoma, PCa) 组织中, 特别是在低分化、转移性和去势抵抗的PCa组织中, 它的表达水平要高得多[19,20]。近期也有研究表明, PSMA的N-Glycan修饰与前列腺

癌的进展密切相关, 因此PSMA已经成为PCa诊断和治疗的重要靶点[21]。

糖蛋白CA72-4, 也被称为肿瘤相关抗原72 (TAG-72), 是一种黏蛋白样的高分子质量糖蛋白, 它是特异性的胃癌 (gastric carcinoma, GC) 肿瘤标志物。研究表明, 它已被用于GC患者的诊断、高危GC患者筛查、术前预测转移、术后预测复发和预后, 说明CA72-4有作为预测因子和潜在的治疗靶点的能力[22]。

1.2 糖脂类抗原 神经节苷脂主要包括GD2、GD3、GM2、GM3和岩藻糖基GM1, 它们通过神经酰胺锚定于细胞膜, 在肿瘤免疫调控中发挥重要作用。最近的研究表明, 神经节苷脂在肿瘤发生中所参与的过程主要有: 促进肿瘤相关血管生成, 减少细胞黏附从而肿瘤转移和充当免疫抑制因子等[23]。二唾液酸神经节苷脂主要包括GD2和GD3。其中, GD2在大多数神经母细胞瘤、黑色素瘤、视网膜母细胞瘤以及几种尤文氏肉瘤中都有表达, 但在正常组织中不表达[24]; 而GD3仅表达于神经外胚层起源的癌症, 例如胶质瘤和神经母细胞瘤[25]。单唾液酸神经节苷脂GM3在黑色素瘤、肺癌和脑癌等癌症中过表达, 同时, 它在膜表面的表达水平与肿瘤是否存在转移呈正相关[26,27]。而岩藻糖基GM1 (FucGM1) 则主要在小细胞型支气管肺癌中过表达, 在大多数正常成人组织中无法被检测到, 说明FucGM1可能会成为针对于高度侵袭性癌症的一个有力的靶点[28,29]。

Globo类糖脂抗原主要包括阶段特异性胚胎抗原 (SSEA-3、SSEA-4) 和Globo-H, 它们与各种生物过程有关[30], 并且已被证明参与肿瘤发生的各个环节, 包括增殖、侵袭、转移和血管生成, 还会导致免疫抑制[31]。其中, 最常见的是Globo-H神经酰胺 (Globo H ceramide, GHCer), 它在多种癌症中都过表达, 包括乳腺癌、胃癌、肺癌、胰腺癌和前列腺癌等[32]。GHCer会从癌细胞转移到位于肿瘤微环境中的非肿瘤细胞中, 也会转移到T细胞中, 抑制IL-2、IL-4和干扰素-γ的分泌, 从而导致免疫抑制[33,34]。GHCer在肿瘤细胞中的特异性表达及其在肿瘤进展中发挥的作用, 使它成为癌症免疫疗法一个具有潜力的靶点。

血型决定簇Lewis抗原是属于人类组织血型系统的末端岩藻糖基化的糖类化合物, 包括1型 (Lewis A、Lewis B) 和2型 (Lewis X、Lewis Y) 糖类化合物, 它们仅在糖苷键上有所不同。H1、H2、LewisA (LeA)、Lewis B (LeB)、Lewis X (LeX) 和Lewis Y (LeY) 在外分泌上皮细胞中通过岩藻糖基转移酶合成[15,35], 表达于卵巢癌、乳腺癌、前列腺癌、胃癌、肺癌和胰腺癌等癌症中。多项研究表明, Lewis抗原及其唾液酸化形式抗原主要通过参与血管生成早期中的细胞迁移参与了癌症的进展和转移[36-39]。

1.3 肿瘤相关糖抗原的抗肿瘤机制 TACA能够被免疫系统的先天免疫和适应性免疫识别。其中, 先天免疫反应通过模式识别受体将TACA识别为危险信号, 并迅速转导信号激活适应性免疫反应[40]。抗原呈递细胞 (antigen presenting cell, APC) 将TACA从多肽上切断, 将所得到的TACA以及多肽表位提呈到细胞表面。TACA能够识别B淋巴细胞上的受体, 活化B细胞, 产生IgM抗体; 而多肽表位则作为组织相容性II类分子复合物与T细胞受体结合, 激活T辅助细胞, 产生IgG抗体[41-43]。目前, 常见的糖肽表位主要有O-糖基化的黏蛋白型糖肽 (MUC1、MUC4、MUC16) 和N-糖基化的PSMA, 而MUC1在原发性和转移性肿瘤上的广泛分布使MUC1成为许多诊断和免疫治疗癌症方法中应用最多的靶标, 并被美国国家癌症研究所转化研究工作组列为75种肿瘤相关抗原中第二有前途的癌症研究靶标[44]。

MUC1在大多数癌症中过表达, 并表现出异常的糖基化。MUC1的胞外结构域由包含25～125个重复序列的可变数串联重复序列 (variable number tandem repeat, VNTR) 和20个氨基酸序列组成 (图1A)[45]。VNTR中含有5个潜在的糖基化位点, 主要通过Ser/Thr残基和截短聚糖发生O-糖基化, 即得到癌症相关糖抗原Tn、STn和TF抗原[46,47]。MUC1的异常糖基化不仅产生肿瘤相关糖抗原, 还因为截短的聚糖不能完全覆盖肽表面产生肽表位, 从而被免疫系统识别[48]。因此, MUC1被认为是开发有效糖肽抗肿瘤疫苗一种有前途的抗原。

PSMA是谷氨酸羧肽酶II在前列腺癌中的形式, 由跨越3个结构域的750个氨基酸残基组成: 分别为19个氨基酸的胞内结构域、24个氨基酸的跨膜结构域和707个氨基酸的胞外结构域 (图1B)[49]。在PCa的发生和发展过程中, 处于核心地位的雄激素信号通路会受到糖基化的调节。研究人员发现PSMA具有高度糖基化的特征, 在51、76、121、140、153、195、336、459、476和638位的天冬酰胺残基处具有10个预测的N-连接糖基化位点。这些N-糖基化产物会影响PSMA的结构和酶功能[50]。其中, α-2,3-唾液酸PSMA被证实与侵袭性PCa形式相关[51,52]。PSMA的高组织特异性以及与PCa发展的相关性, 使其成为诊断和治疗前列腺癌的理想靶点。

2 糖肽疫苗的构建

TACAs的发现虽然为开发新型糖肽疫苗及多表位疫苗提供了关键分子靶标, 但是其应用仍面临诸多

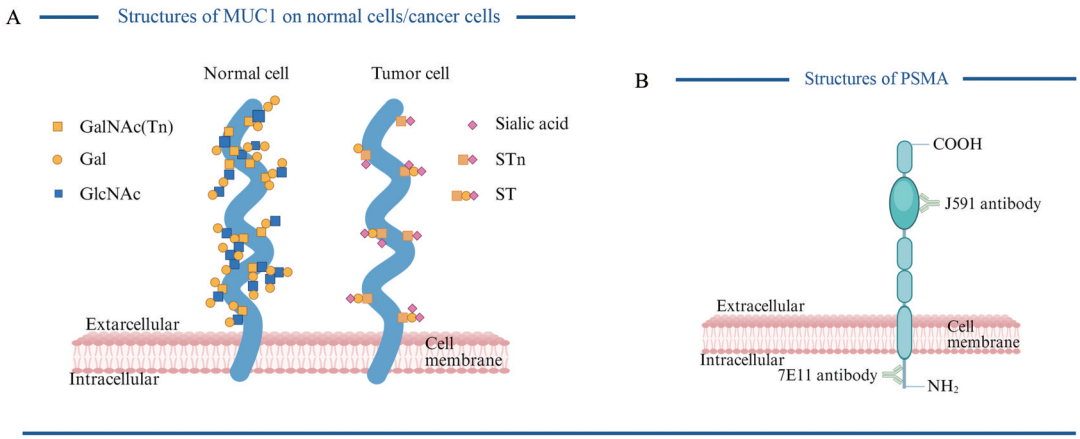


Figure 1　Structures of major glycopeptide antigens. A: Structure of MUC1 on normal cells/cancer cells; B: Structure of PSMA. MUC1: Mucin 1; PSMA: Prostate-specific membrane antigen

困难。一方面, 由于生物样本的异质性, 从天然来源中获取到这些抗原较为困难, 而通过化学手段合成异常糖基化的糖蛋白也具有一定的挑战性; 另一方面, 由于大多数TACA属于自身抗原, 其免疫原性较差, 不能被免疫系统有效识别, 需依赖与载体蛋白共价偶联或化学修饰等策略才能有效激活抗肿瘤免疫应答[53]。

2.1　糖肽的合成　目前, 合成糖肽的策略主要有以下3种: 全化学合成法、半化学合成法 (其中部分反应通过酶促完成) 和糖缀合物合成法 (利用简化的聚糖修饰肽)。其中, 应用较多的是全化学合成法和半化学合成法, 它们可以合成出具有与天然糖肽相同结构的产物, 第3种方法主要生成的是用于特定功能研究的非天然糖肽[54,55]。

在全化学合成方法中, Fmoc法固相合成 (solid phase peptide synthesis, SPPS) 是糖肽合成中最为常见的一种方法, 它为糖肽的合成提供了一种有效的通用途径[56]。固相合成首先需要制备Fmoc保护的糖基氨基酸结构单元, 通过标准Fmoc-SPPS条件将这些氨基酸掺入到所需的多肽序列后, 从树脂中切割出粗糖肽并对糖进行脱保护, 在合成过程中可以通过使用过量的氨基酸和试剂提高多肽产量[42,43]。值得注意的是, 对于基于Fmoc策略的SPPS, 制备用适当保护基团保护的糖基氨基酸单元是必要的先决条件[57]。同时, 虽然SPPS已经成为糖肽合成一种通用的方法, 但N-糖肽与O-糖肽之间的合成步骤也具有差异性。在O-糖肽中, 通常在合成前期就会在氨基酸与寡糖之间引入糖苷键, 而大多数N-糖肽合成的关键是后期糖胺和天冬酰胺的缩合[55,58]。

虽然固相合成一定程度上降低了糖肽合成的难度, 但使用化学合成方法仍需解决立体选择性和异构选择性等无法避免的难题。酶能够提供更精细的区域选择性和立体选择性, 在温和的条件下裂解特异性键并合成特异性键。因此, 可以将酶促反应与化学合成相结合去简化糖肽的合成, 应用在N-糖基化和O-糖基化反应中[55]。目前, 糖基化主要使用的酶是*N*-乙酰氨基葡萄糖苷内切酶 (endo-β-*N*-acetylglucosaminidase, ENGase), 它能够将N-糖转移到肽受体上合成新的糖肽, 主要包括来自冻土毛霉 (*Mucor hiemalis*) 的Endo M和来自原玻璃蝇节杆菌 (*Arthrobacter protophormiae*) 的Endo A等[59-61]。已有多项研究证实, 在恶唑啉形式的糖作为转糖基化供体底物的情况下, Endo A、野生型Endo M和Endo M的突变体Y217F和N175Q都具有较强的转糖基活性[61-64]。

2.2　免疫增强策略　除了糖肽的化学合成之外, TACAs的临床应用还存在以下局限性: ① 由于TACA的内源性, 单独使用TACA时容易产生免疫耐受和免疫抑制; ② TACA大多数是T细胞非依赖性抗原, 它们不能直接与主要组织相容性复合物 (major histocompatibility complex, MHCs) 结合, 导致无法成功激活T细胞免疫[65]。基于以上挑战, 目前已经开发了几种能够有效提高TACAs免疫原性的策略。

其中之一是将TACAs与含有T细胞表位的蛋白质或肽载体进行共价偶联。含有T细胞表位的载体经APC加工后与MHC分子结合, 将TACAs呈递给T细胞, 产生共刺激信号, 激活T细胞, 同时产生高亲和力IgG抗体[66,67]。目前应用较多的载体蛋白有牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA)、锁孔帽贝血蓝蛋白 (keyhole limpet hemocyanin, KLH)、人血清白蛋白 (human serum albumin, HSA)、卵清蛋白 (Ovalbumins, OVA) 和破伤风类毒素 (tetanus toxoid, TT) 等[68-70]。最近还有研究表明, CRM_{197}蛋白有希望成为另一种有前景的结合疫苗载体蛋白[71]。共价偶联载体蛋白的糖肽

疫苗可以根据与载体蛋白连接的TACAs数量或类型的不同分为单价疫苗、单价簇状疫苗和多价疫苗。其中, 单价疫苗仅含有一种类型TACAs, 单价簇状疫苗含有1种簇状的TACA, 多价疫苗含有几种不同类型的TACAs[72]。目前, 多项研究表明, 将MUC1或Globo-H与载体蛋白偶联后能够增强TACA的免疫原性[73-76]。虽然偶联载体蛋白的方法已经被广泛使用, 但载体蛋白可能会引起针对自身的强烈免疫反应, 对免疫反应产生影响。近年来, 已经开发出了结构明确的全合成载体与TACAs进行偶联, 基于全合成载体的糖肽疫苗能够准确靶向并激活免疫细胞, 从而引发强大的免疫反应[76]。

此外, 还可以通过连接佐剂激活免疫系统的适应性免疫应答从而改善免疫效果。Toll样受体 (toll like receptor, TLR) 激动剂是目前应用最为广泛的佐剂, 其主要形式有脂肽、单链DNA和RNA, 主要包括6个跨质膜的TLRs (TLR-1、2、4、5、6和10) 和4个定位于内体膜的TLRs (TLR-3、7、8和9)[77-79]。在激活免疫应答的过程中, TLR协调许多功能。TLR的主要作用机制是作为危险信号传感器, TLR会增加免疫细胞向疫苗接种部位的运输, 并增强MHC-I和MHC-II分子的抗原捕获、处理和呈递, 从而促进APC成熟和细胞因子表达。同时, 激活TLR还可导致共刺激分子 (如CD80和CD86) 的上调, 这些分子对于APC启动初始T细胞至关重要[79-81]。郭军课题组[82-84]利用MUC1糖肽分别与TLR3、TLR4、TLR7激动剂和载体蛋白或佐剂偶联得到MUC1糖肽疫苗, 研究结果表明该疫苗能够显著抑制肿瘤生长。综上所述, TLR是一种先天免疫受体, 能够响应病原体相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMP), 激活先天免疫和适应性免疫途径, 对于糖肽疫苗的开发具有重要意义。

近年来, 纳米材料在医疗领域中的应用前景十分广阔, 目前已经广泛应用于疫苗以及其他癌症免疫疗法中。纳米材料成为有潜力的疫苗平台主要在于它具有改善抗原呈递、激活先天免疫、增强适应性免疫反应的能力[85]。目前, 用于癌症免疫治疗的纳米材料主要分为生物、半合成或全合成纳米载体3种, 具体有外泌体、病毒纳米颗粒和脂质体等。其中, 金纳米颗粒 (gold nanoparticles, AuNPs) 由于其具有尺寸较小、水溶性、生物相容性、对糖酵解酶稳定和靶向特定细胞等特点而受到广泛关注[76]。纳米颗粒不仅自身可以将细胞因子等免疫调节化合物直接递送到肿瘤部位, 调节肿瘤微环境并激活免疫细胞, 还可以作为佐剂, 通过与抗原呈递细胞结合来刺激免疫反应[85,86]。近年来, 已经开发了许多基于纳米颗粒的糖肽疫苗, 证实了纳米颗粒作为疫苗载体能够诱导强IgG抗体滴度, 增强T细胞毒性, 引发强抗肿瘤免疫反应[87-91]。纳米颗粒调节免疫反应的功能对于开发抗肿瘤疫苗, 提高抗肿瘤免疫反应至关重要[92]。

3 化学合成类糖肽疫苗

3.1 基于载体蛋白的糖肽疫苗 第一批全合成的糖肽疫苗主要将经TACA修饰MUC1串联重复序列中Ser和Thr位点所合成的糖肽与载体蛋白 (如TT、KLH等) 进行偶联, 再与佐剂进行物理混合。

Shinefield等[71]将Tn抗原修饰的MUC1糖肽与作为载体蛋白的TTox连接合成糖肽疫苗 (图2A)。此前, TT偶联物已被应用于多种疫苗中。结果表明, 与TTox偶联的疫苗在所有小鼠中能诱导强烈的免疫反应, 其抗体滴度可高达1/100 000～1/200 000。同时, 抗原与破伤风类毒素的结合首次提供了将这种疫苗免疫从小鼠转移到人类的可能性。类似地, Gaidzik等[93]也开发了与TTox偶联的MUC1糖肽疫苗 (图2B), 其中MUC1糖肽由Tn抗原或者T抗原修饰。结果表明, 该疫苗在野生型小鼠中诱导了极高的抗体滴度, 同时这些抗体能够与MCF-7乳腺肿瘤细胞结合。虽然TTox结合疫苗已在临床被证明具有安全性, 然而, 该蛋白质含有肽表位, 这对于免疫激活是不必要的, 并且在疫苗接种过程中可能会出现干扰。因此, Cai等[94]利用来自TTox的P4、P2、P30肽作为T辅助细胞表位与MUC1糖肽进行偶联得到糖肽疫苗。结果表明, 与P30偶联的糖肽疫苗通过能够诱导更强的免疫反应 (图2C)。除TTox之外, 研究人员[93,94]还利用BSA与糖肽进行偶联得到糖肽疫苗, 结果表明, 该种疫苗也能够在小鼠体内诱导高抗体滴度 (图2D、E)。

目前还没有成功用于临床的MUC1疫苗, 可能是因为整个患者群体诱导的抗MUC1免疫效果并不好。因此, 需要持续优化疫苗结构, 以诱导更高水平的抗体滴度。Wu[95]等设计合成了三代Qβ-MUC1偶联物用于构建糖肽疫苗 (图2F)。第一代疫苗能够靶向MUC1 (糖) 肽表位。但结果显示, 第一代疫苗尽管诱导了高IgG滴度, 但这些血清对表达MUC1的肿瘤细胞的识别能力要弱得多。而他们发现MUC1的游离C端对抗体识别很重要, 于是将第二代疫苗通过MUC1糖肽的C端与Qβ偶联。结果表明, 该疫苗诱导了高IgG抗体滴度, 并且其与肿瘤细胞的结合能力较强。为了进一步将抗体反应集中在所需区域, 他们将缩短的MUC1应用于第三代疫苗。结果表明, 第三代疫苗不仅诱导高IgG抗体滴度, 其与肿瘤细胞的结合能力也高于所有其他疫苗, 证明除去非必需的表位可显著提高抗体的反应。

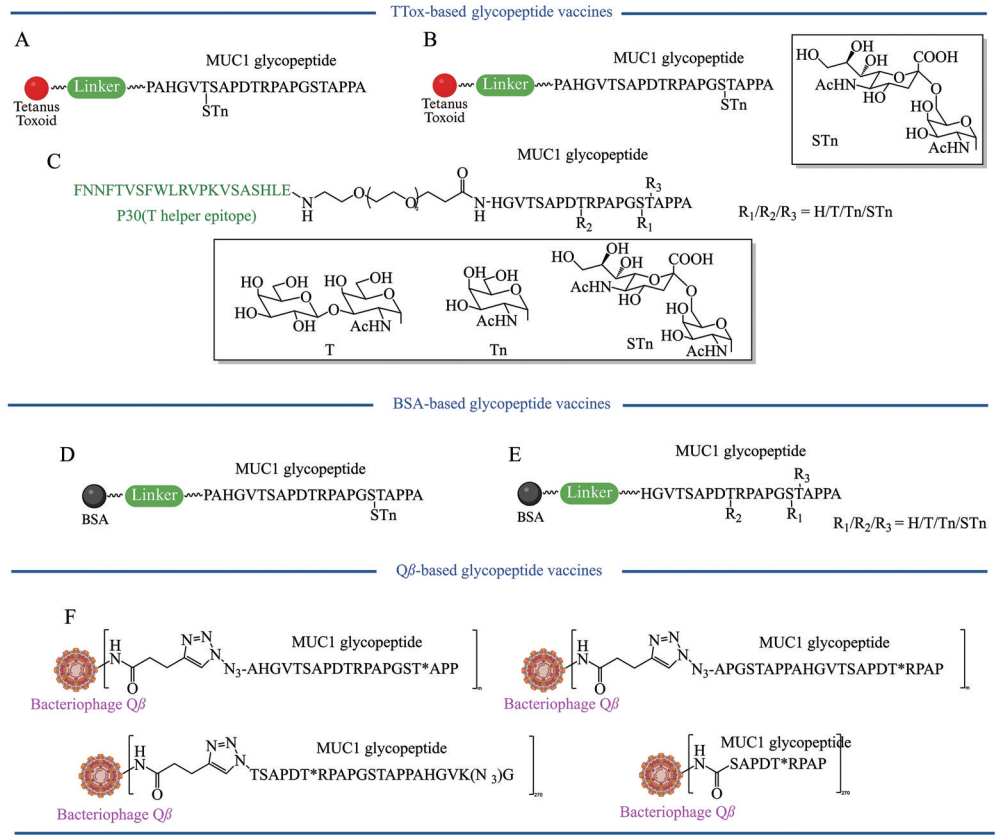


Figure 2　Carrier protein-based glycopeptide vaccines. A−C: TTox-based glycopeptide vaccines; D, E: BSA-based glycopeptide vaccines; F: Qβ-based glycopeptide vaccines

3.2　基于全合成的自佐剂糖肽疫苗　虽然基于载体蛋白的糖肽疫苗能够产生高抗体滴度, 但载体蛋白和物理混合的佐剂可能会产生抗载体反应和系统性炎症, 限制了这些疫苗的应用。针对载体蛋白的局限性, 研究人员开发出了自佐剂疫苗。自佐剂疫苗是将佐剂直接共价偶联到抗原上, 快速激活 APC, 并诱导有效的免疫应答并降低毒副作用产生的可能性[96]。

为了克服天然佐剂的一些局限性, 例如 QS-21 具有稀缺性、异质性、化学不稳定性和剂量限制性毒性等不足, Fuentes 等[97]在 QS-21 的基础上优化而设计合成了皂苷平台和双组分皂苷-Tn 缀合物 (图 3A)。结果表明, 这种皂苷-Tn 缀合物能够在动物模型中诱导 Tn 特异性抗体应答。在此基础上, 为了增强免疫原性, Pifferi 等[98]用 Tn 修饰的 MUC1 糖肽代替 Tn 抗原, 更好地模拟了异常糖基化的 MUC1 糖蛋白, 再将 Tn-MUC1 与皂苷或 T 细胞表位 $PV_{103-115}$ 进行偶联, 合成了两组分和三组分疫苗 (图 3B)。结果表明, 合成的三组分疫苗能够产生更高的抗体水平, 并识别癌细胞表面上的天然 Tn-MUC1 抗原的抗体。

Gabba 等[99]利用巨噬细胞半乳糖型凝集素 (macrophage galactose-type lectin, MGL) 的配体构建了基于 Tn-MUC1 的全合成糖肽疫苗, 该疫苗由 Tn 修饰的 MUC1 糖肽、带有 α GalNAc 残基的靶向 MGL 糖簇配体和 1 个 T 细胞表位组成 (图 3C)。其中, MGL 是一种位于 APC 的内吞受体, 能够结合末端 α 或 β-GalNAc 残基, 与 Tn 抗原相互作用促进 APCs 的抗原呈递。结果表明, 该疫苗诱导了更高水平的抗体滴度, 并且其产生的抗体能够更有效的与 MUC1-Tn 阳性的 T47D 人类乳腺癌细胞相结合。

笔者所在课题组同样采用 Tn-MUC1 糖肽合成了三组分自佐剂糖肽疫苗。具体是将 Tn-MUC1 糖肽作为 B 细胞表位, 与 Th 细胞表位破伤风类毒素肽 P30 和 TLR2 的配体 Pam3-Cys-Ser-Lys4 (Pam3CSK4) 进行偶联得到疫苗 (图 3D), 并在野生型和转基因型小鼠模型中评估了疫苗效力。结果表明, 该疫苗在两种小鼠模型中都表现出有效的抗肿瘤免疫应答, 延缓了肿瘤生长并延长了小鼠的存活时间[100]。

研究证实, 自佐剂糖肽疫苗将佐剂与抗原进行共价偶联后, 解决了物理混合佐剂的局限性, 降低了毒副作用发生的可能性。同时, 自佐剂糖肽疫苗能够诱导高抗体滴度, 刺激细胞因子分泌, 提高抗肿瘤免疫效果。然而, 一些非天然的载体蛋白类似物由于合成复

杂度导致产率降低, 从而限制了大规模生产。此外, 由于动物模型与人体免疫微环境存在差异, 并未实现自佐剂糖肽疫苗的临床应用。

3.3 基于非天然糖抗原的糖肽疫苗 虽然天然糖肽已经被证明可以有效诱导抗肿瘤免疫应答, 但由于天然糖肽之间的糖苷键存在不稳定性, 可能无法有效抵抗体内糖苷酶的水解。为了克服这一局限性, 研究人员设计并合成了天然糖抗原和糖肽的模拟物, 以期在体内达到更长效的免疫刺激[91,101-107]。

目前的研究大部分集中在糖抗原类似物的合成。已经有研究利用Tn抗原 (α GalNAc-Ser/Thr) 的立体异构体 (β GalNAc-Ser/Thr) 合成了Tn模拟物: 具有保护基团保护的O-糖基化氨基酸衍生物β GalNAc-SerOBn和β GalNAc-ThrOBn (图4A), 并在此基础上合成了MUC1糖蛋白的模拟物。结果表明, 该糖肽能够产生高抗体滴度, 并且识别肿瘤细胞的能力更高[101]。Marchiori等[102]合成了STn抗原类似物三唑糖基氨基酸Neu5Ac-α/β2-triazole-6-βGalNAc-ThrOH (图4B), 并利用SPPS合成了MUC1糖肽类似物。虽然与天然糖肽相比, 这种非天然的糖肽与抗体的相互作用并不相同, 但分子动力学模拟显示, 非天然的糖肽会以类似的方式与抗体相互作用。Awad等[103]用C键取代了二糖的Gal和GalNAc之间的天然β-糖苷键, 合成了Tf抗原模拟物MUC1-β-Tf (图4C), 该模拟物提高了对于糖苷酶的稳定性, 同时, 与佐剂进行共价偶联后能够产生较高的特异性IgG抗体滴度。Wu等[104]在此基础上将

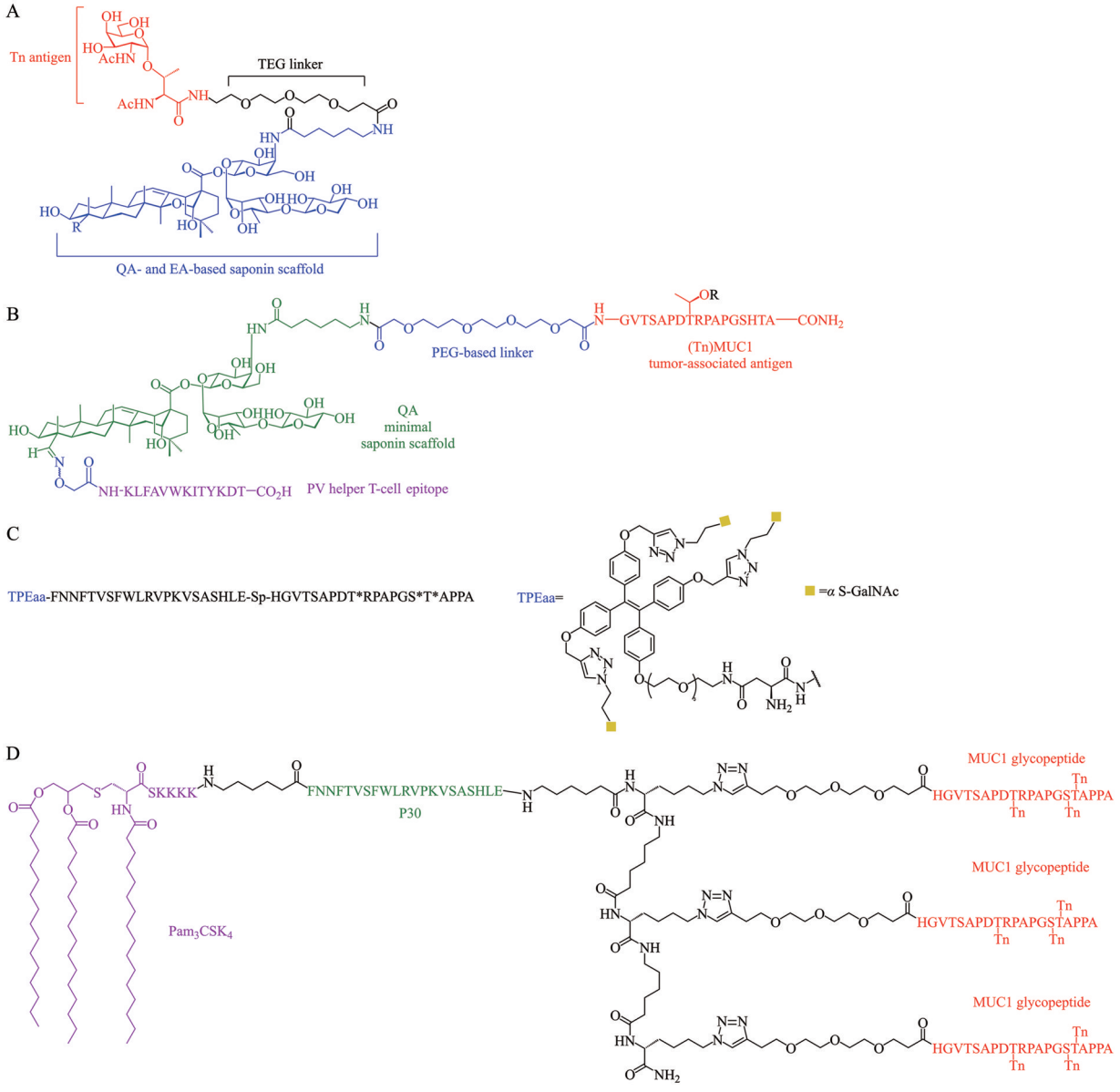


Figure 3 Fully synthetic self-adjuvanted glycopeptide vaccines. A−D: Fully synthetic self-adjuvanted glycopeptide vaccines synthesized by different researchers

MUC1-β-Tf与噬菌体Qβ缀合(图4D)。结果表明, 该缀合物能够产生高水平的IgG抗体, 不仅识别天然MUC1-αTf糖肽, 而且识别其他表达MUC1的肿瘤细胞, 为抗癌疫苗开发提供了新的线索。

在之前研究的基础上, Compañón等[105]利用单原子替代法, 即用S/Se取代糖苷处的O原子, 分别设计了S-(α-d-GalNAc)-硫苏氨酸和Se-(α-d-GalNAc)-硒代苏氨酸合成非天然糖肽(图4E)。结果表明, 单独的糖肽模拟物和偶联纳米颗粒的糖肽疫苗都展现了识别肿瘤细胞并诱导抗肿瘤免疫应答的能力。类似地, Guerreiro等[106]使用S取代糖苷处的O, 并将得到的非天然抗原与免疫原性载体蛋白CRM_{197}进行缀合(图4F)。这个过程涉及到了CRM_{197}的二硫键选择性还原和再桥接[107], 采用该策略能够得到保持CRM_{197}结构完整性和免疫原性的疫苗。结果表明, 该疫苗能够在小鼠中产生强免疫应答, 激活Th1免疫并促进细胞毒性T淋巴细胞的产生。

除了合成糖抗原的非天然类似物之外, 也有研究报道了非天然MUC1衍生物的合成, 以期达到提高糖肽抗原亲和力和免疫原性的目的。例如, Bermejo等[91]用(2*S*,3*R*)-3-羟基正缬氨酸替换掉Thr残基,合成了MUC1衍生的GalNAc糖肽(图4G)。结果表明, 该代替物与天然糖肽抗原具有相似的构象并且具有与天然抗原相比同等或更高的结合亲和力。将非天然MUC1衍生物与不同载体进行连接后, 发现与AuNPs或者载体蛋白缀合而成的糖肽疫苗中的抗原呈现高亲和力, 与天然抗原相比能够产生更高的抗体滴度。

非天然糖肽衍生物能够提高对体内糖苷酶的稳定性, 产生与天然糖肽相比相同或者更高的抗体滴度, 促进毒性T细胞的产生。但是, 非天然糖肽与佐剂的共价连接需精确控制立体化学与反应条件, 否则产率将会大幅降低。

3.4　基于纳米颗粒的糖肽疫苗　虽然非天然糖肽一定程度上解决了天然糖肽易酶解的问题, 但同样面临着半衰期短、产率低以及靶向效率低等问题。近年来, 将纳米材料用于肿瘤疫苗的设计和开发引起了极大的关注, 纳米载体能够实现精准靶向递送, 纳米包封也可屏蔽糖肽表面易酶解位点, 使半衰期延长, 增强免疫反应, 并且几乎不引起毒副作用。因此, 纳米载体已经在糖肽抗肿瘤疫苗中被广泛使用[108]。

Brinas等[109]利用金纳米颗粒构建糖肽疫苗, 该疫苗是将MUC4糖肽抗原和佐剂进行物理混合后包被在金纳米颗粒上, 但只能引起中度的免疫应答(图5A)。基于此, Trabbic等[110]开发了一种基于多糖包被的AuNPs的糖肽疫苗(图5B), 该疫苗能够靶向表达*Dectin-1*的

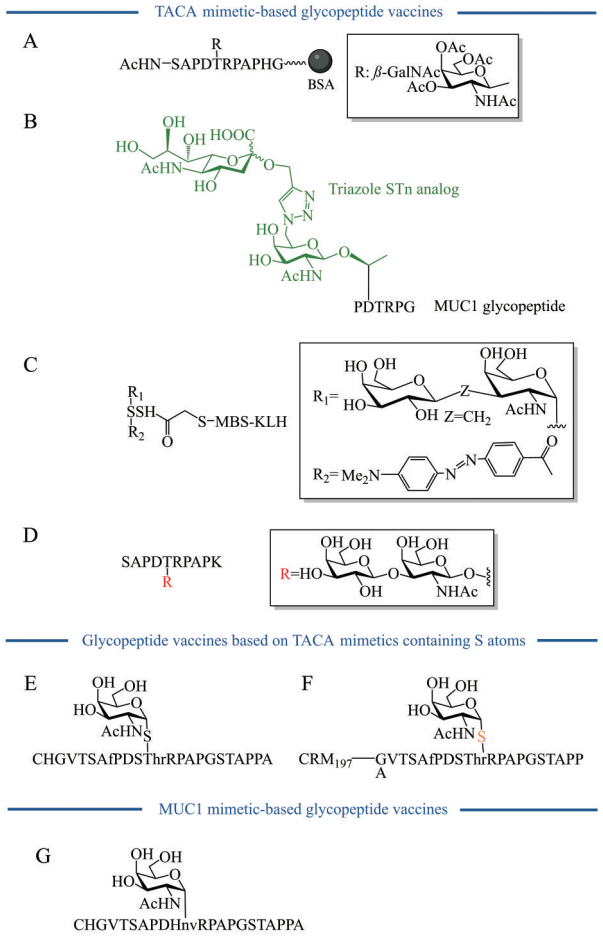


Figure 4　Non-natural TACA-based glycopeptide vacccines. A–D: TACA mimetic-based glycopeptide vaccines; E, F: Glycopeptide vaccines based on TACA mimetics containing S atoms; G: MUC1 mimetic-based glycopeptide vaccines

APC。其中, 金纳米颗粒被多糖B13G包被, B13G可以与*Dectin-1*结合, 将抗原递送至APC, 作为免疫刺激剂激活先天性免疫应答; 所递送的糖肽抗原是黏蛋白4(MUC4), 一种泛癌TACA。结果表明, 该疫苗能够通过产生高抗体滴度和引发抗原识别T细胞共同引发强烈的体内免疫应答。同时, 该疫苗平台具有通用性, 可以将纳米颗粒与不同种类的抗原缀合, 并有效地递送至表达Dectin-1的APC。

除了金纳米颗粒之外, 聚乳酸–羟基乙酸共聚物[poly(lactic-*co*-glycolic acid), PLGA]纳米颗粒也是目前较为先进的抗原递送平台。由于PLGA具有携带多种分子、生物相容性和生物降解性等特点使其成为理想的抗原载体, 能够通过控制持续释放抗原延长免疫刺激, 从而增强疫苗免疫效果[111]。Freitas等[112]利用PLGA-PEG纳米颗粒作为糖肽的递送系统设计合成了一种糖肽疫苗(图5C)。其中, MUC16-Tn糖蛋白由于

其在正常组织中表达最少, 在更具侵袭性的原发性肿瘤和转移瘤的细胞表面高度表达的特性作为新抗原靶向APC。结果表明, 该疫苗不仅能够在体外刺激树突状细胞 (dendritic cells, DCs) 的成熟, 而且能够在体内产生特异性靶向MUC16和MUC16-Tn糖蛋白的IgG, 增强抗肿瘤免疫反应, 并且几乎不存在毒副作用。

纳米载体在肿瘤疫苗中的应用在一定程度上实现了肿瘤的精准免疫治疗, 解决了非靶向治疗的局限性, 增加了APCs对抗原的摄取, 从而提高免疫效果。但纳米载体在体内长期滞留可能会引发组织沉积, 存在生物相容性不足等问题。

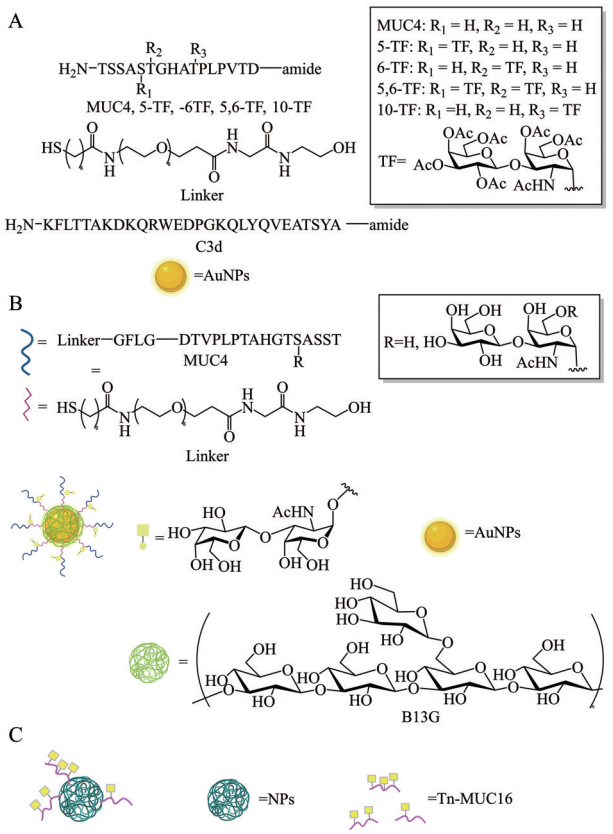


Figure 5 Nanoparticle-based glycopeptide vaccines. A − C: Nanoparticle-based glycopeptide vaccines synthesized by different researchers. NPs: Nanoparticles

综上所述, 化学合成类糖肽疫苗通过技术创新显著提升了抗肿瘤免疫治疗的精准性与免疫效果。研究人员们通过合成自佐剂疫苗和非天然糖肽模拟物等方法突破了传统糖肽疫苗的局限性, 例如传统佐剂的毒副作用和天然糖肽的酶解不稳定性问题。优化后得到的糖肽疫苗具有增加抗原呈递、产生高抗体滴度、毒副作用小等优点, 能够精准靶向肿瘤并有效诱导抗肿瘤免疫应答。

4 展望与挑战

TACAs中异常糖基化的MUC1及PSMA作为肿瘤特异性标志物, 为糖肽抗肿瘤疫苗的开发提供了重要分子靶标。近年来, 化学合成技术的突破显著推动了糖肽抗肿瘤疫苗的发展, 成功构建了多种具有高免疫原性和生物安全性的糖肽疫苗。通过全化学合成、酶促反应及偶联载体蛋白或佐剂等策略, 研究人员克服了天然抗原分离困难、糖链异质性调控及免疫原性差等挑战。然而, 当前研究仍面临多重挑战。首先, 化学合成工艺的复杂性限制了糖肽疫苗的大规模生产, 同时由于糖肽的体内代谢稳定性及免疫耐受机制仍未完全解决, 目前并没有成功上市的糖肽疫苗。但是随着化学合成手段的不断进步与递送系统的快速发展, 相信通过进一步研究, 糖肽抗肿瘤疫苗有望突破传统疗法的局限, 实现临床应用, 为癌症患者带来更有效、更安全的治疗选择。

作者贡献: 灵仪负责文献资料收集和综述撰写; 翟景明、丁飞青、蔡辉负责修改。所有作者阅读并认可终稿。

利益冲突: 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

References

[1] Cheever MA, Allison JP, Ferris AS, et al. The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research [J]. Clin Cancer Res, 2009, 15: 5323-5337.

[2] Buskas T, Thompson P, Boons GJ. Immunotherapy for cancer: synthetic carbohydrate based vaccine [J]. Chem Commun (Camb), 2009, 36: 5335-5349.

[3] Fournet M, Bonté F, Desmoulière A. Glycation damage: a possible hub for major pathophysiological disorders and aging [J]. Aging Dis, 2018, 9: 880-900.

[4] Pinho SS, Reis CA. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications [J]. Nat Rev Cancer, 2015, 15: 540-555.

[5] Wei T, Liu QL, He FL, et al. The role of N-acetylglucosaminyl-transferases V in the malignancy of human hepatocellular carcinoma [J]. Exp Mol Pathol, 2012, 93: 8-17.

[6] Abdel-Aal AB, El-Naggar D, Zaman M, et al. Design of fully synthetic, self-adjuvanting vaccine incorporating the tumor-associated carbohydrate Tn antigen and lipoamino acid-based toll-like receptor 2 ligand [J]. J Med Chem, 2012, 55: 6968-6974.

[7] Xu YF, Sette A, Sidney J, et al. Tumor-associated carbohydrate antigens: a possible avenue for cancer prevention [J]. Immunol Cell Biol, 2005, 83: 440-448.

[8] Corfield AP. Mucins: a biologically relevant glycan barrier in mucosal protection [J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1850: 236-252.

[9] Ju TZ, Wang YC, Aryal RP, et al. Tn and sialyl-Tn antigens,

aberrant O-glycomics as human disease markers [J]. Proteomics Clin Appl, 2013, 7: 618-631.

[10] Di W, Wang L, Peng T, et al. Advances in the study of antitumor vaccines with tumor-associated carbohydrate antigen [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2005, 40: 591-599.

[11] Czerwinska M, Bilewicz A, Kruszewski M, et al. Targeted radionuclide therapy of prostate cancer-from basic research to clinical perspectives [J]. Molecules, 2020, 25: 1743-1774.

[12] Lou YW, Wang PY, Yeh SC, et al. Stage-specific embryonic antigen-4 as a potential therapeutic target in glioblastoma multiforme and other cancers [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111: 2482-2487.

[13] Wi DH, Cha JH, Jung YS. Mucin in cancer: a stealth cloak for cancer cells [J]. BMB Rep, 2021, 54: 344-355.

[14] Sun LB, Zhang YH, Li WY, et al. Mucin glycans: a target for cancer therapy [J]. Molecules, 2023, 28: 7033.

[15] Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al. Essentials of glycobiology [M]. 4nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2022: chapter 11.

[16] Kudelka MR, Tongzhong J, Heimburg-Molinaro J, et al. Chapter three- simple sugars to complex disease—mucin-type O-glycans in cancer [J]. Adv Cancer Res, 2015, 126: 53-135.

[17] Karsten U, Goletz S. What controls the expression of the core-1 (Thomsen-Friedenreich) glycotope on tumor cells? [J]. Biochemistry (Mosc), 2015, 80: 801-807.

[18] Mesters JR, Barinka C, Li WX, et al. Structure of glutamate carboxypeptidase II, a drug target in neuronal damage and prostate cancer [J]. EMBO J, 2006, 25: 1375-1384.

[19] Kinoshita Y, Kuratsukuri K, Landas S, et al. Expression of prostate-specific membrane antigen in normal and malignant human tissues [J]. World J Surg, 2006, 30: 628-636.

[20] Cimadamore A, Cheng M, Santoni M, et al. New prostate cancer targets for diagnosis, imaging, and therapy: focus on prostate-specific membrane antigen [J]. Front Oncol, 2018, 8: 653-663.

[21] Lü QZ, Yang JC, Wang YJ. Advances in prostate-specific membrane antigen-mediated antitumor drugs [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2016, 51: 234-240.

[22] Marrelli D, Pinto E, De Stefano A, et al. Clinical utility of CEA, CA 19-9, and CA 72-4 in the follow-up of patients with resectable gastric cancer [J]. Am J Surg, 2001, 181: 16-19.

[23] Birklé S, Zeng G, Gao L, et al. Role of tumor-associated gangliosides in cancer progression [J]. Biochimie, 2003, 85: 455-463.

[24] Nazha B, Inal C, Owonikoko TK. Disialoganglioside GD2 expression in solid tumors and role as a target for cancer therapy [J]. Front Oncol, 2020, 10: 1000.

[25] Kohla G, Stockfleth E, Schauer R. Gangliosides with O-acetylated sialic acids in tumors of neuroectodermal origin [J]. Neurochem Res, 2002, 27: 583-592.

[26] Zheng CP, Terreni M, Sollogoub M, et al. Ganglioside GM3 and its role in cancer [J]. Curr Med Chem, 2019, 26: 2933-2947.

[27] Tringali C, Silvestri I, Testa F, et al. Molecular subtyping of metastatic melanoma based on cell ganglioside metabolism profiles [J]. BMC Cancer, 2014, 14: 560.

[28] Zhang S, Cordon-Cardo C, Zhang HS, et al. Selection of tumor antigens as targets for immune attack using immunohistochemistry: I. Focus on gangliosides [J]. Int J Cancer, 1997, 73: 42-49.

[29] Groux-Degroote S, Delannoy P. Cancer-associated glycosphingolipids as tumor markers and targets for cancer immunotherapy [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22: 6145.

[30] Yu AL, Hung JT, Ho MY, et al. Alterations of glycosphingolipids in embryonic stem cell differentiation and development of glycan-targeting cancer immunotherapy [J]. Stem Cells Dev, 2016, 25: 1532-1548.

[31] Sigal DS, Hermel DJ, Hsu P, et al. The role of Globo H and SSEA-4 in the development and progression of cancer, and their potential as therapeutic targets [J]. Future Oncol, 2021, 18: 117-134.

[32] Zhang S, Zhang HS, Reuter VE, et al. Expression of potential target antigens for immunotherapy on primary and metastatic prostate cancers [J]. Clin Cancer Res, 1998, 4: 295-302.

[33] Cheng JY, Wang SH, Lin J, et al. Globo-H ceramide shed from cancer cells triggers translin-associated factor X-dependent angiogenesis [J]. Cancer Res, 2014, 74: 6856-6866.

[34] Yu J, Hung JT, Wang SH, et al. Targeting glycosphingolipids for cancer immunotherapy [J]. FEBS Lett, 2020, 594: 3602-3618.

[35] Blanas A, Sahasrabudhe NM, Rodríguez E, et al. Fucosylated antigens in cancer: an alliance toward tumor progression, metastasis, and resistance to chemotherapy [J]. Front Oncol, 2018, 8: 39.

[36] Fukuda M. Carbohydrate-dependent cell adhesion [J]. Bioorg Med Chem, 1995, 3: 207-215.

[37] Westwood JA, Murray WK, Trivett M, et al. The Lewis-Y carbohydrate antigen is expressed by many human tumors and can serve as a target for genetically redirected T cells despite the presence of soluble antigen in serum [J]. J Immunother, 2009, 32: 292-301.

[38] Lee T, Teng ZJ, Shelat VG. Carbohydrate antigen 19-9- tumor marker: past, present, and futurer [J]. World J Gastrointest Surg, 2020, 12: 468-490.

[39] Engle DD, Tiriac H, Rivera KD, et al. The glycan CA19-9 promotes pancreatitis and pancreatic cancer in mice [J]. Science, 2019, 364: 1156-1162.

[40] Freire T, Osinaga E. The sweet side of tumor immunotherapy [J]. Immunotherapy, 2012, 4: 719-734.

[41] Bentebibel S, Schmitt N, Banchereau J, et al. Human tonsil B-cell lymphoma6(BCL6) -expressing $CD4^+$ T-cell subset specialized for B-cell help outside germinal centers [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108: 488-497.

[42] Zhang TT, Franklin A, Alt FW, et al. Downstream class switching

leads to IgE antibody production by B lymphocytes lacking IgM switch regions [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107: 3040-3045.

[43] Rudd PM, Elliott T, Cresswell P, et al. Glycosylation and the immune system [J]. Science, 2001, 291: 2370-2376.

[44] Beckwith DM, Cudic M. Tumor-associated O-glycans of MUC1: carriers of the glyco-code and targets for cancer vaccine design [J]. Semin Immunol, 2020, 47: 101389.

[45] McDonald DM, Byrne SN, Payne RJ. Synthetic self-adjuvanting glycopeptide cancer vaccines [J]. Front Chem, 2015, 3: 60.

[46] Brassard J, Hughes MR, Roskelley CD, et al. Antibody-drug conjugates targeting tumor-specific mucin glycoepitopes [J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2022, 27: 301.

[47] Ninkovic T, Hanisch FG. O-glycosylated human MUC1 repeats are processed *in vitro* by immunoproteasomes [J]. J Immunol, 2007, 179: 2380-2388.

[48] Acres B, Limacher JM. MUC1 as a target antigen for cancer immunotherapy [J]. Expert Rev Vaccines, 2005, 4: 493-502.

[49] Kinoshita Y, Kuratsukuri K, Newman N, et al. Targeting epitopes in prostate-specific membrane antigen for antibody therapy of prostate cancer [J]. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2005, 8: 359-363.

[50] Mackay S, Oduor IO, Burch TC, et al. Prostate-specific membrane antigen (PSMA) glycoforms in prostate cancer patients seminal plasma [J]. Prostate, 2024, 84: 479-490.

[51] Mackay S, Oduor IO, Burch TC, et al. Increased α2,3-sialyl N-glycosylated prostate-specific membrane antigen (PSMA) in post-DRE urine is associated with high grade group prostate cancer [J]. Prostate, 2024, 84: 1067-1075.

[52] Tao R, Ni ZH, Liu C, et al. Expression, purification and identification of an immunogenic fragment in the ectodomain of prostate-specific membrane antigen [J]. Exp Ther Med, 2016, 11: 747-752.

[53] Jin KT, Lan HR, Chen XY, et al. Recent advances in carbohydrate-based cancer vaccines [J]. Biotechnol Lett, 2019, 41: 641-650.

[54] Fehres CM, Kalay H, Bruijns SC, et al. Cross-presentation through langerin and DC-SIGN targeting requires different formulations of glycan-modified antigens [J]. J Control Release, 2015, 203: 67-76.

[55] Doelman W, van Kasteren SI. Synthesis of glycopeptides and glycopeptide conjugates [J]. Org Biomol Chem, 2022, 20: 6487-6507.

[56] Brocke C, Kunz H. Synthesis of tumor-associated glycopeptide antigens [J]. Bioorg Med Chem, 2002, 10: 3085-3112.

[57] Arsequell G, Valencia G. O-glycosyl α-amino acids as building blocks for glycopeptide synthesis [J]. Tetrahedron Asymmetry, 1997, 8: 2839-2876.

[58] Taylor CM. Glycopeptides and glycoproteins: focus on the glycosidic linkage [J]. Tetrahedron, 1998, 54: 11317-11362.

[59] Yamamoto K, Kadowaki S, Watanabe J, et al. Transglycosylation activity of *Mucor hiemalis* endo-β-*N*-acetylglucosaminidase which transfers complex oligosaccharides to the *N*-acetylglucosamine moieties of peptides [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1994, 203: 244-252.

[60] Takegawa K, Yamaguchi S, Kondo A, et al. Enzymatic synthesis of novel oligosaccharides by use of transglycosylation activity of endo-β-*N*-acetylglucosaminidase from Arthrobacter protophormiae [J]. Biochem Int, 1991, 25: 829-835.

[61] Li B, Zeng Y, Hauser S, et al. Highly efficient endoglycosidase-catalyzed synthesis of glycopeptides using oligosaccharide oxazolines as donor substrates [J]. J Am Chem Soc, 2005, 127: 9692-9693.

[62] Fujita M, Shoda S, Haneda K, et al. A novel disaccharide substrate having 1,2-oxazoline moiety for detection of transglycosylating activity of endoglycosidases [J]. Biochim Biophys Acta, 2001, 1528: 9-14.

[63] Umekawa M, Huang W, Li B, et al. Mutants of Mucor hiemalis endo-β-*N*-acetylglucosaminidase show enhanced transglycosylation and glycosynthase-like activities [J]. J Biol Chem, 2008, 283: 4469-4479.

[64] Zhang SR, Yu YL, Xu CS, et al. Determination of N-glycans in glycoproteins using chemoenzymatic labeling with Endo-M N175Q [J]. Microchem J, 2017, 130: 390-399.

[65] Danishefsky SJ, Allen JR. From the laboratory to the clinic: a retrospective on fully synthetic carbohydrate-based anticancer vaccines [J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2000, 39: 836-863.

[66] Liu CC, Ye XS. Carbohydrate-based cancer vaccines: target cancer with sugar bullets [J]. Glycoconj J, 2012, 29: 259-271.

[67] He CX, Xie XS. Recent advance in carbohydrate-based cancer vaccines [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2012, 47: 261-270.

[68] Bettahi I, Dasgupta G, Renaudet O, et al. Antitumor activity of a self-adjuvanting glyco-lipopeptide vaccine bearing B cell, $CD4^+$ and $CD8^+$ T cell epitopes [J]. Cancer Immunol Immunother, 2009, 58: 187-200.

[69] Zhu JL, Wan Q, Lee D, et al. From synthesis to biologics: preclinical data on a chemistry derived anticancer vaccine [J]. J Am Chem Soc, 2009, 131: 9298-9303.

[70] Kaiser A, Gaidzik N, Westerlind U, et al. A synthetic vaccine consisting of a tumor-associated sialyl-TN-MUC1 tandem-repeat glycopeptide and tetanus toxoid: induction of a strong and highly selective immune response [J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2009, 48: 7551-7555.

[71] Shinefield HR. Overview of the development and current use of CRM197 conjugate vaccines for pediatric use [J]. Vaccine, 2010, 28: 4335-4339.

[72] Olive C. Pattern recognition receptors: sentinels in innate immunity and targets of new vaccine adjuvants [J]. Expert Rev Vaccines, 2012, 11: 237-256.

[73] Stergiou N, Gaidzik N, Heimes AS, et al. Reduced breast tumor

growth after immunization with a tumor-restricted MUC1 glycopeptide conjugated to tetanus toxoid [J]. Cancer Immunol Res, 2019, 7: 113-122.

[74] Weng WZ, Ren SM, Teng CC, et al. Chemoenzymatic synthesis and immunological evaluation of sialyl-Thomsen-Friedenreich (sTF) antigen conjugate to CRM197 [J]. Bioorg Med Chem, 2024, 100: 117615.

[75] Du JJ, Zhou SH, Liu J, et al. Diphtheria toxoid-derived T-helper epitope and α -galactosylceramide synergistically enhance the immunogenicity of glycopeptide antigen [J]. ACS Pharmacol Transl Sci, 2024, 7: 3889-3901.

[76] Teng CC, Ma WJ, Liu JF, et al. Chemoenzymatic liquid-phase synthesis and immunogenic assessment of tumor-associated complex MUC1 glycopeptide variants [J]. Int J Biol Macromol, 2025, 320: 140525.

[77] Wei MM, Wang YS, Ye XS. Carbohydrate-based vaccines for oncotherapy [J]. Med Res Rev, 2018, 38: 1003-1026.

[78] Beutler B, Hoebe K, Du X, et al. How we detect microbes and respond to them: the toll-like receptors and their transducers [J]. J Leukoc Biol, 2003, 74: 479-485.

[79] Kaur A, Baldwin J, Brar D, et al. Toll-like receptor (TLR) agonists as a driving force behind next-generation vaccine adjuvants and cancer therapeutics [J]. Curr Opin Chem Biol, 2022, 70: 102172.

[80] Gaidzik N, Westerlind U, Kunz H. The development of synthetic antitumour vaccines from mucin glycopeptide antigens [J]. Chem Soc Rev, 2013, 42: 4421-4442.

[81] Montero Vega MT, de Andrés Martín A. Toll-like receptors: a family of innate sensors of danger that alert and drive immunity [J]. Allergol Immunopathol (Madr), 2008, 36: 347-357.

[82] Du JJ, Zhou SH, Cheng ZR, et al. MUC1 specific immune responses enhanced by coadministration of liposomal DDA/MPLA and lipoglycopeptide [J]. Front Chem, 2022, 10: 814880.

[83] Zhou SH, Li YT, Zhang RY, et al. Alum adjuvant and built-in TLR7 agonist synergistically enhance anti-MUC1 immune responses for cancer vaccine [J]. Front Immunol, 2022, 13: 857779.

[84] Zhou SH, Zou YK, Liu YL, et al. Poly(I: C)/c-GAMP/Alum ternary adjuvant system synergistically enhances the immunogenicity of glycopeptide antigen [J]. J Carbohydr Chem, 2023, 42: 252-267.

[85] Smith D, Simon J, Baker J Jr. Applications of nanotechnology for immunology [J]. Nat Rev Immunol, 2013, 13: 592-605.

[86] Zhang Y, Lin S, Wang XY, et al. Nanovaccines for cancer immunotherapy [J]. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol, 2019, 11: e1559.

[87] Liu Y, Wang Z, Yu F, et al. The adjuvant of α-galactosylceramide presented by gold nanoparticles enhances antitumor immune responses of MUC1 antigen-based tumor vaccines [J]. Int J Nanomedicine, 2021, 16: 403-420.

[88] Liu YH, Li MJ, Zhu HM, et al. Alum colloid encapsulated inside β-glucan particles enhance humoral and CTL immune responses of MUC1 vaccine [J]. Chin Chem Lett, 2021, 32: 1963-1966.

[89] Toraskar S, Madhukar Chaudhary P, Kikkeri R. The shape of nanostructures encodes immunomodulation of carbohydrate antigen and vaccine development [J]. ACS Chem Biol, 2022, 17: 1122-1130.

[90] Dong PJ, Cheng SY, Wang YD, et al. A self-adjuvanting antitumor nanoliposomal vaccine based on fluorine-substituted MUC1 glycopeptide [J]. Chem Commun (Camb), 2022, 58: 8642-8645.

[91] Bermejo IA, Guerreiro A, Eguskiza A, et al. Structure-guided approach for the development of MUC1-glycopeptide-based cancer vaccines with predictable responses [J]. JACS Au, 2024, 4: 150-163.

[92] Jyothi BN, Joseph AM, Sanoop P, et al. Impact of nanoparticles on immune cells and their potential applications in cancer immunotherapy [J]. Biocell, 2024, 48: 1579-1602.

[93] Gaidzik N, Kaiser A, Kowalczyk D, et al. Synthetic antitumor vaccines containing MUC1 glycopeptides with two immunodominant domains—induction of a strong immune response against breast tumor tissues [J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2010, 50: 9977-9981.

[94] Cai H, Chen MS, Sun ZY, et al. Self-adjuvanting synthetic antitumor vaccines from MUC1 glycopeptides conjugated to T-cell epitopes from tetanus toxoid [J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2013, 52: 6106-6110.

[95] Wu XJ, Yin ZJ, McKay C, et al. Protective epitope discovery and design of MUC1-based vaccine for effective tumor protections in immunotolerant mice [J]. J Am Chem Soc, 2018, 140: 16596-16609.

[96] Dziadek S, Kowalczyk D, Kunz H. Synthetic vaccines consisting of tumor-associated MUC1 glycopeptide antigens and bovine serum albumin [J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2005, 44: 7624-7630.

[97] Fuentes R, Aguinagalde L, Sacristán N, et al. Design, synthesis, and initial immunological evaluation of glycoconjugates based on saponin adjuvants and the Tn antigen [J]. Chem Commun (Camb), 2021, 57: 11382-11385.

[98] Pifferi C, Aguinagalde L, Ruiz-De-Angulo A, et al. Development of synthetic, self-adjuvanting, and self-assembling anticancer vaccines based on a minimal saponin adjuvant and the tumor-associated MUC1 antigen [J]. Chem Sci, 2023, 14: 3501.

[99] Gabba A, Attariya R, Behren S, et al. MUC1 glycopeptide vaccine modified with a GalNAc glycocluster targets the macrophage galactose C-type lectin on dendritic cells to elicit an improved humoral response [J]. J Am Chem Soc, 2023, 145: 13027-13037.

[100] Zhou Y, Li XR, Guo YJ, et al. Synthetic self-adjuvanted multivalent mucin 1 (MUC1) glycopeptide vaccines with improved *in*

vivo antitumor efficacy [J]. MedComm (2020), 2024, 5: e484.

[101] Campo VL, Riul TB, Bortot LO, et al. A synthetic MUC1 glycopeptide bearing *β*GalNAc-Thr as a Tn antigen isomer induces the production of antibodies against tumor cells [J]. Chembiochem, 2017, 18: 527-538.

[102] Marchiori MF, Bortot LO, Carvalho I, et al. Synthesis of MUC1-derived glycopeptide bearing a novel triazole STn analog [J]. Carbohydr Res, 2020, 498: 108155.

[103] Awad L, Madani R, Gillig A, et al. A C-linked disaccharide analogue of Thomsen-Friedenreich epitope induces a strong immune response in mice [J]. Chemistry, 2012, 18: 8578-8582.

[104] Wu XJ, McFall-Boegeman H, Rashidijahanabad Z, et al. Synthesis and immunological evaluation of the unnatural *β* linked mucin-1 Thomsen-Friedenreich conjugate [J]. Org Biomol Chem, 2021, 19: 2448-2455.

[105] Compañón I, Guerreiro A, Mangini V, et al. Structure-based design of potent tumor-associated antigens: modulation of peptide presentation by single-atom O/S or O/Se substitutions at the glycosidic linkage [J]. J Am Chem Soc, 2019, 141: 4063-4072.

[106] Guerreiro A, Compañón I, Lazaris FS, et al. Non-natural MUC1 glycopeptide homogeneous cancer vaccine with enhanced immunogenicity and therapeutic activity [J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2024, 63: e202411009.

[107] Martínez-Sáez N, Sun S, Oldrini D, et al. Oxetane grafts installed site-selectively on native disulfides to enhance protein stability and activity *in vivo* [J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2017, 56: 14963.

[108] Peres C, Matos AI, Moura LIF, et al. Preclinical models and technologies to advance nanovaccine development [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2021, 172: 148-182.

[109] Brinãs RP, Sundgren A, Sahoo P, et al. Design and synthesis of multifunctional gold nanoparticles bearing tumorassociated glycopeptide antigens as potential cancer vaccines [J]. Bioconjug Chem, 2012, 23: 1513-1523.

[110] Trabbic KR, Kleski KA, Barchi JJ Jr. Stable gold-nanoparticle-based vaccine for the targeted delivery of tumor-associated glycopeptide antigens [J]. ACS Bio Med Chem Au, 2021, 1: 31-43.

[111] Athanasiou E, Agallou M, Tastsoglou S, et al. A poly(lactic-*co*-glycolic) acid nanovaccine based on chimeric peptides from different *Leishmania infantum* proteins induces dendritic cells maturation and promotes peptide-specific IFNγ-producing $CD8^+$ T cells essential for the protection against experimental visceral leishmaniasis [J]. Front Immunol, 2017, 8: 684.

[112] Freitas R, Ferreira E, Miranda A, et al. Targeted and self-adjuvated nanoglycovaccine candidate for cancer immunotherapy [J]. ACS Nano, 2024, 18: 10088-10103.