

• 专题研究:肿瘤 •

监测免疫治疗反应的颗粒酶B靶向分子影像探针研究进展

杨继辰^{1,2}, 邱玲^{1,2}, 林建国^{1,2*}

¹南京医科大学药学院核药学系, 江苏 南京 211166; ²国家卫生健康委员会核医学重点实验室, 江苏省分子核医学重点实验室, 江苏省原子医学研究所, 江苏 无锡 214063

[摘要] 近年来, 癌症免疫治疗尤其是免疫检查点抑制剂(immune checkpoint inhibitor, ICI), 在临床实践中取得了显著进展。然而, 由于个体间免疫反应的异质性, 患者对治疗的应答具有差异, 因此对治疗效果的监测显得尤为重要。在肿瘤微环境中, 细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)的活性是评估免疫治疗效果的关键指标。颗粒酶B(granzyme B, GzmB)作为一种主要存在于CTL中的丝氨酸蛋白酶, 是早期预测免疫治疗反应的重要生物标志物。靶向GzmB的分子影像探针可以监测免疫治疗过程中肿瘤部位GzmB表达的变化, 进而为评估治疗效果提供依据。文章总结了各类GzmB靶向分子探针的研究进展, 并分析了探针的结构设计、成像原理及其在早期监测肿瘤免疫治疗反应中的应用潜力, 旨在为GzmB靶向分子探针的进一步开发和临床应用提供参考。

[关键词] 癌症; 免疫治疗; 疗效监测; 颗粒酶B; 分子影像探针

[中图分类号] R730.51

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2025)09-1267-09

doi: 10.7655/NYDXBNSN250417

Research progress of granzyme B targeted molecular imaging probes for monitoring immunotherapy response

YANG Jichen^{1,2}, QIU Ling^{1,2}, LIN Jianguo^{1,2*}

¹Department of Radiopharmaceuticals, School of Pharmacy, Nanjing Medical University, Nanjing 211166; ²National Health Commission Key Laboratory of Nuclear Medicine, Jiangsu Key Laboratory of Molecular Nuclear Medicine, Jiangsu Institute of Nuclear Medicine, Wuxi 214063, China

[Abstract] In recent years, cancer immunotherapy, especially immune checkpoint inhibitor (ICI), has made remarkable progress in clinical practice. However, due to the heterogeneity of immune responses among individuals, patients' responses to treatment vary, making the monitoring of treatment efficacy particularly important. In the tumor microenvironment, the activity of cytotoxic T lymphocyte (CTL) is a key indicator for evaluating the efficacy of immunotherapy. Granzyme B (GzmB), a serine protease mainly present in CTLs, is considered as an important biomarker for early prediction of the response to immunotherapy. Molecular imaging probes targeting GzmB can monitor the changes in GzmB expression at tumor sites during immunotherapy, providing a basis for evaluating treatment efficacy. This review summarizes the research progress of various GzmB-targeted molecular probes, and analyzes the structural design, imaging principle of the probes and their application potential in early monitoring of tumor immunotherapy response, aiming to provide reference for the further development and clinical application of GzmB-targeted molecular probes.

[Key words] cancer; immunotherapy; efficacy monitoring; granzyme B; molecular imaging probe

[J Nanjing Med Univ, 2025, 45(09): 1267-1275]

[基金项目] 国家自然科学基金(22076069)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: linjianguo@jnsim.org

(ORCID: 0000-0003-1018-9794)

免疫治疗是一种通过激活或增强患者自身免疫系统诱导抗肿瘤免疫、杀伤癌细胞的疗法, 近年来已发展成为临床治疗癌症的重要策略^[1]。免疫检查点抑制剂(immune checkpoint inhibitor, ICI), 如

针对程序性细胞死亡蛋白1(programmed death 1, PD-1)、程序性细胞死亡配体1(programmed cell death-ligand 1, PD-L1)和细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4, CTLA-4)的单克隆抗体,在多种晚期癌症中显示出显著疗效^[2-4]。例如,ICI在错配修复缺陷(mismatch repair deficiency, dMMR)和微卫星不稳定性高(microsatellite instability-high, MSI-H)的转移性结直肠癌患者中能够发挥显著的治疗效果,明显提高患者的总体生存期(overall survival, OS)。然而,ICI的临床疗效仅限于少数癌症患者(通常<30%),响应率较低^[5-6],且可能会诱发免疫治疗相关不良事件(immune-related adverse event, irAE)^[7]。据统计,在临床上有高达50%的抗PD-1和抗CTLA-4抗体联合治疗的患者会发生III~IV级irAE,这很大程度上限制了免疫治疗在实体瘤中的广泛应用^[8-10]。因此,实时可视化监测免疫治疗反应至关重要,通过早期评估患者对免疫治疗的反应,不仅可以最大限度地发挥免疫治疗的作用、减少不良反应的发生,还能及时调整治疗决策,为治疗无应答的患者寻求替代策略,从而有效改善患者病情。

随着无创分子成像技术的发展,非侵入性、动态、实时和可视化监测免疫反应已成为可能^[11]。例如,近红外荧光(near-infrared fluorescence, NIRF)成像操作简便,背景噪声较低,可提供较为准确的成像结果^[12]。正电子发射断层扫描(positron emission tomography, PET)则凭借其高灵敏度和强组织穿透性,能够准确提供示踪剂的空间定位信息,并对生物学功能进行定量表征,从而为全身免疫反应提供详细的功能性和动态信息^[13]。¹⁸F-FDG是临床上癌症诊断及治疗预后监测最常用的显像剂,其在高代谢活性的肿瘤细胞内摄取显著升高,可用于指示肿瘤进展。然而,¹⁸F-FDG难以区分增殖性肿瘤和免疫治疗诱导的免疫细胞浸润性肿瘤,且在炎症和感染等病变具有非特异性摄取,易导致假阳性结果,限制了其在免疫治疗监测方面的应用^[14]。PD-1/PD-L1作为免疫治疗的重要靶点,与肿瘤免疫抑制功能密切相关。靶向PD-1/PD-L1的成像探针可实现免疫检查点表达水平的可视化监测,但其无法直接反映细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)的杀伤功能,且PD-1/PD-L1的表达水平可能受到肿瘤异质性、免疫治疗药物等多种因素的影响,难以全面评估肿瘤的免疫状态^[15-16]。此外,针对免疫T细胞表面标志物(如CD8、CD4和CD3等)的成像示

踪剂虽可揭示T细胞的空间分布信息,但无法准确反映T细胞的活化程度及功能状态^[17]。

相比监测免疫检查点或免疫细胞表面标志物的表达水平,肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)中免疫细胞的激活和功能状态,与免疫治疗疗效的相关性则更为直接,因此在预测免疫治疗反应方面更具优势^[18-19]。基于此,相关免疫生物标志物,例如T细胞共刺激分子OX40、 γ 干扰素(interferon γ , IFN- γ)及颗粒酶B(granzyme B, GzmB)等的成像表征被视为更具价值的监测手段。然而,OX40仅能反映T细胞的激活状态,IFN- γ 则间接指示Th1型免疫反应的强度,二者均不足以全面评估免疫细胞的功能状态,并且相关成像技术尚不成熟^[20-21]。GzmB是一种丝氨酸蛋白酶,主要由CTL和自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)分泌,且GzmB表达水平的变化发生在肿瘤体积变化之前,能够更早、更灵敏地反映免疫治疗的疗效^[1]。免疫被激活时,T细胞活化为CTL,与靶细胞形成免疫突触并释放细胞毒性颗粒,包括穿孔素和GzmB等。GzmB作为毒性颗粒中主要效应分子,能够借助穿孔素形成的通道内吞进入肿瘤细胞,并通过直接或间接触发凋亡蛋白酶Caspase级联反应以及激活线粒体导致DNA损伤等途径来诱导肿瘤细胞凋亡^[22-23]。由于GzmB直接参与CTL的杀伤过程,不仅能指示CTL在肿瘤中的定位,还能评估其杀伤肿瘤细胞的潜力(图1)。

鉴于GzmB在免疫治疗早期敏感反映肿瘤应答方面展现出的显著潜力,利用无创成像技术可视化监测GzmB活性,为预测CTL的抗肿瘤效能及评估肿瘤对免疫治疗早期反应提供了理想策略。目前,已开发出多种靶向GzmB的分子成像探针,根据成像方式的不同,主要分为PET探针和NIRF探针,以及少数其他类型的探针。综上,文章将对这些探针的结构、靶向性和成像性能及其在监测免疫治疗反应中的作用进行综述。

1 GzmB靶向PET探针

1.1 镓-68标记PET探针

2017年,Larimer等^[24]首次报道了一种GzmB靶向特异性PET探针⁶⁸Ga-NOTA-GZP,用于监测免疫治疗效果。该探针基于GzmB识别底物Ile-Glu-Phe-Asp(IEFD)设计而成^[25],除GzmB的靶向识别肽IEFD外,探针的结构还包括作为连接剂和亲水性修饰剂的聚甘氨酸Gly-Gly-Gly,用于连接靶向肽与金属螯合基团1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸

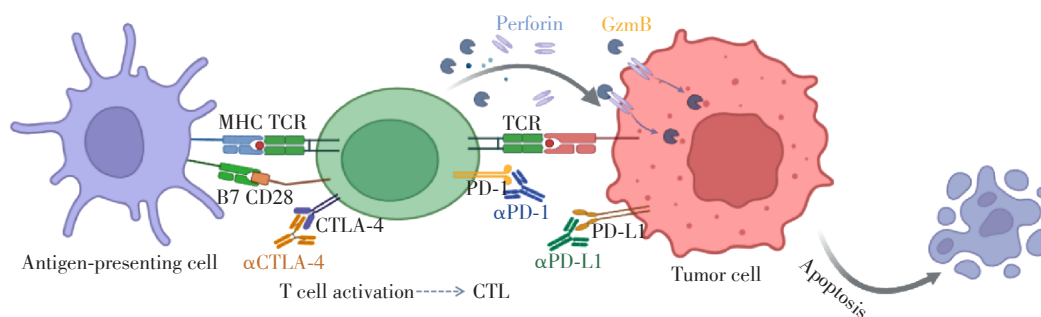


图1 免疫治疗激活T细胞释放GzmB进而诱导肿瘤细胞凋亡的机制图

Figure 1 The mechanism diagram of tumor cell apoptosis induced by GzmB released from T cells activated by immunotherapy

(1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid, NOTA), 最后利用正电子核素 ^{68}Ga 标记获得 ^{68}Ga -NOTA-GZP。该探针与多肽代谢快的药代动力学性质相匹配^[26-27], 且对 GzmB 具有高亲和力和高特异性。在抗 PD-1 单药治疗、抗 PD-1 和抗 CTLA-4 联合治疗以及未治疗的同基因结直肠癌 CT26 荷瘤鼠模型中评估了 ^{68}Ga -NOTA-GZP 的 PET 成像能力, 并将探针的总肿瘤摄取除以左心室摄取得出的肿瘤与血液比率 (tumor-to-blood ratio, TBR) 作为特异性信号的衡量标准。结果显示, ^{68}Ga -NOTA-GZP 在治疗组荷瘤鼠肿瘤中均有较高的摄取, 抗 PD-1 单药治疗的肿瘤 TBR 为 1.29 ± 0.12 , 而联合免疫治疗的肿瘤摄取更高, TBR 达到了 1.83 ± 0.18 。相比治疗组肿瘤, 未治疗组荷瘤鼠肿瘤没有明显摄取, TBR 仅为 0.96 ± 0.11 , 这表明 ICI 单药治疗和联合治疗的荷瘤鼠肿瘤内 GzmB 的表达活性均显著高于未治疗组。临床试验研究进一步证明 ^{68}Ga -NOTA-GZP 能够在肿瘤体积变化之前精准地区分治疗应答者和无应答者, 治疗应答的高摄取肿瘤最终均显示肿瘤消退, 治疗无应答的低摄取肿瘤则持续增长。表明 ^{68}Ga -NOTA-GZP 的 PET 成像能够无创、实时地定量 GzmB 活性, 避免了重复活检带来的损害, 并且能够在早期区分真正的肿瘤进行性增殖(真进展)和免疫细胞浸润导致的肿瘤假性增殖(假进展), 从而有效改善患者分层。

Zhou 等^[28]对 NOTA-GZP 的结构进行了优化, 通过增加刚性三环拟肽支架提高了探针的体内稳定性, 并使用 1,2,3-三唑基替代醛基以提高选择性, 设计开发出一种 GzmB 特异性 PET 探针 ^{68}Ga -grazytracer。该探针对免疫激活后 CD8^+ T 细胞分泌的 GzmB 具有良好的靶向性, 能够有效监测肿瘤对 ICI 和过继细胞转移 (adoptive cell transfer, ACT) 治疗的反应。与 ^{18}F -FDG 相比, ^{68}Ga -grazytracer 在区分治疗应答者和无应答者方面展现出更显著的优势, 在高、中等程

度免疫原性的结直肠癌 MC38 和三阴性乳腺癌 4T1 荷瘤鼠模型中, 该探针能够精准识别免疫治疗后肿瘤的真进展与假进展。与 ^{68}Ga -NOTA-GZP 相比, ^{68}Ga -grazytracer 在注射到荷瘤鼠体内 0.5 h 的肿瘤摄取约是 ^{68}Ga -NOTA-GZP 的 1 倍, 靶本比也更高。这种提高可能与其刚性三环肽类支架和 1,2,3-三唑基药效团的结构特性有关, 使其在体内更耐水解和酶裂解, 从而改善了代谢稳定性^[29]。此外, 另一项研究发现 ^{68}Ga -grazytracer 可用于监测心脏功能, 在表征心肌梗死的炎症反应和重构方面展示出潜力^[30]。最近, 该团队通过一项 I/II 期临床试验对 ^{68}Ga -grazytracer 在肺癌、胸腺癌和黑色素瘤等实体瘤以及淋巴瘤患者中的安全性、生物分布、靶向特异性和预测效用进行了评价, 发现其在患者体内的安全性与耐受性良好, 肾脏和血液中具有显著的摄取且能够通过肾脏快速代谢清除, 肿瘤周围观测到探针的集中摄取, 与 T 淋巴细胞的浸润模式一致^[31]。此外, 患者肿瘤活检标本中 GzmB 的免疫组织化学染色结果与 ^{68}Ga -grazytracer 的肿瘤摄取呈显著正相关, 证实了 ^{68}Ga -grazytracer 对 GzmB 的特异性^[31]。以上研究表明, ^{68}Ga -grazytracer 的 PET 成像在肿瘤进展和短期预后具有较高的预测价值, 在评估早期免疫治疗反应、改善患者分层和优化临床治疗决策方面可作为 ^{18}F -FDG PET 和 CT 等传统成像技术的替代工具。

Liu 等^[32]和 Jiang 等^[33]研发了一种 GzmB 靶向特异性 PET 探针 ^{68}Ga -NOTA-GSI, 在经免疫治疗的黑色素瘤 B16-F10 荷瘤鼠模型中肿瘤摄取和信噪比显著增加, 显示出该探针具有临床转化潜力。为探究 ^{68}Ga -NOTA-GSI 是否能够在免疫治疗过程中早期监测 ICI 对肿瘤的治疗效果, 研究团队招募了 72 例 III~IV 期胃癌患者进行联合免疫治疗后的 ^{68}Ga -NOTA-GSI PET/CT 成像结果表明, ^{68}Ga -NOTA-GSI 的安全性和耐受性良好, 探针的摄取

主要发生在肿瘤及转移灶,在体内能够被肾脏快速清除,具有较高的肿瘤背景比。此外,治疗应答的患者肿瘤中探针的摄取量明显高于治疗无应答的患者肿瘤,提示 $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-GSI}$ 对胃癌患者联合免疫治疗后的应答情况具有良好的预测价值,可作为临床监测胃癌患者对ICI免疫治疗早期反应的一种有效手段。

1.2 氟-18标记PET探针

Fu等^[34]利用2-氰基苯并噻唑(2-cyanobenzothiazole, CBT)和半胱氨酸(cysteine, Cys)之间的点击缩合反应策略^[35-36],结合分子内大环化支架SF^[37]和一步氟离子交换法,开发了两种 ^{18}F 标记的GzmB靶向PET探针 $[^{18}\text{F}]\text{SF-M-14}$ 和 $[^{18}\text{F}]\text{SF-H-14}$ 。探针的结构主要包括GzmB的特异性识别肽Ile-Glu-Phe-Asp(IEFD)和Ile-Glu-Pro-Asp(IEPD)、大环化支架SF以及标记基团AmBF₃,通过响应GzmB和还原物质谷胱甘肽进行分子内环化并自组装成纳米聚集体,从而提高探针在肿瘤中的滞留性。在治疗与未治疗的4T1荷瘤鼠模型中通过PET成像评估了两个探针检测免疫治疗诱导的GzmB表达水平变化的能力,结果显示经免疫诱导药物S-(2-硼酸基乙基)-L-半胱氨酸盐酸盐(BEC hydrochloride, BEC)治疗的4T1荷瘤鼠肿瘤对探针的摄取为未治疗组肿瘤的3.5倍。从BEC治疗与未治疗的4T1荷瘤鼠中分离肿瘤组织进行免疫荧光染色与蛋白质免疫印迹试验,进一步证实了BEC治疗促进肿瘤组织内GzmB表达上调。这些结果表明,探针 $[^{18}\text{F}]\text{SF-M-14}$ 和 $[^{18}\text{F}]\text{SF-H-14}$ 在免疫治疗的临床前研究及疗效的早期评价中具有较大潜力。

基于 $[^{18}\text{F}]\text{AIF}$ 放射性标记方法^[38],Goggi等^[39-41]开发了GzmB特异性探针 $[^{18}\text{F}]\text{AIF-mNOTA-GZP}$,通过在缓冲液中将螯合剂NOTA修饰的前体与 $[^{18}\text{F}]$ 及氯化铝在100℃下加热15 min即可获得目标探针。在CT26和MC38两种同基因结直肠癌模型中评估该探针监测肿瘤对ICI单药及联合治疗反应的能力,PET-CT/MRI图像的肿瘤定量分析显示,不同治疗组之间探针的摄取具有显著差异,联合治疗组的摄取水平明显高于单药治疗组。在成功抑制肿瘤生长的治疗应答者中,探针的摄取量明显高于所有治疗无应答者和未治疗组,证明 $[^{18}\text{F}]\text{AIF-mNOTA-GZP}$ 能够有效区分治疗应答与无应答者。此外,还发现MC38肿瘤的探针总体摄取量高于CT26肿瘤,且对照组和治疗无应答者的背景摄取量也更高,这可能与MC38肿瘤中的dMMR/MSI表型相关。综

上, $[^{18}\text{F}]\text{AIF-mNOTA-GZP}$ 能有效预测免疫治疗的疗效,但由于探针在肿瘤中的摄取较低,且可能受到肿瘤表型的影响,后续还将进一步研究以考察其不同肿瘤类型中的应用价值。

1.3 铜-64标记PET探针

Zhao等^[42]设计了一种GzmB特异性切割的“限制性相互作用肽”RIP,并利用 ^{64}Cu 标记得到PET探针 $^{64}\text{Cu-GRIP B}$ 。RIP由从N端到C端的3个结构域组成,包括与放射性同位素偶联的无毒抗菌肽(antimicrobial peptide, AMP)、特定的内源性蛋白酶切割位点以及阻止AMP转变为螺旋构象的PAR1肽“掩蔽”区域。当重组人GzmB裂解RIP上的特定序列(IEPDVSQV)后会释放放射性标记的AMP,随后AMP经历自发的构象转移沉积在附近的膜上,并与磷脂双分子层紧密结合,从而在靶部位积累放射性信号。研究人员对接受抗PD-1和抗CTLA-4联合治疗的CT26荷瘤鼠进行了 $^{64}\text{Cu-GRIP B}$ 的PET/CT成像,根据动态PET获取的时间-活性曲线, $^{64}\text{Cu-GRIP B}$ 在治疗组肿瘤中能够迅速积累,注射后10 min内就已达到约5 %ID/mL的水平,而未治疗组肿瘤中的探针摄取量明显较低,且不随时间变化。静态PET/CT扫描结果显示,治疗组肿瘤中 $^{64}\text{Cu-GRIP B}$ 的摄取呈上升趋势,注射后2 h已明显高于未治疗组,且24 h后依然有清晰的放射性信号积聚。体内成像结果分析和肿瘤体积跟踪监测表明,与治疗前相比,第11天治疗结束后肿瘤对 $^{64}\text{Cu-GRIP B}$ 的摄取与肿瘤体积增长变化呈显著负相关。此外,通过放射自显影和免疫荧光实验还发现,组织中探针的结合区域与GzmB和T细胞标志物CD3的表达一致。这些结果表明, $^{64}\text{Cu-GRIP B}$ 可通过成像体内GzmB活性,评估肿瘤对早期免疫治疗的反应,团队目前正在进行 $^{64}\text{Cu-GRIP B}$ 的临床试验。

2 GzmB靶向NIRF探针

2.1 NIRF可激活淬灭探针

Nguyen等^[43]设计了一种基于GzmB的NIRF纳米复合物GNR,由刺激响应聚合物偶联免疫治疗药物以及可激活的GzmB成像探针组成,使其既能递送免疫治疗药物,又能实时监测GzmB活性,从而实现治疗监测一体化。GNR将多肽底物IEPD与荧光染料及淬灭剂偶联,与始终“开启”的荧光探针相比,可激活淬灭探针仅在目标生物标志物GzmB存在时激活荧光信号,极大程度增强了信号特异性,从而降低了背景信号,使信噪比大幅提升。偶联抗

PD-L1 抗体药物的 GNR 可有效抑制 PD-1 与 PD-L1 之间的相互作用, 并诱导活化 T 细胞介导的 GzmB 释放, 从而激活探针进行 NIRF 成像。在不同的荷瘤小鼠模型中利用 GNR 对免疫治疗反应进行实时监测, 结果显示治疗应答的 MC38 荷瘤鼠肿瘤中荧光信号明显“开启”并显著增强, 而在治疗未应答的 B16-F10 荷瘤鼠肿瘤中未检测到荧光信号, 说明 GNR 能够有效区分高反应性和低反应性肿瘤。这些结果证实了 GNR 作为一个极具潜力的 NIRF 探针, 能够对免疫治疗反应进行无创、灵敏成像。

He 等^[44]通过将 GzmB 特异性识别肽 IEFD 和 IEPD 分别与花菁染料 CyOH 和对氨基苯甲醇 (*p*-aminobenzyl alcohol, PABA) 连接, 成功构建了处于荧光淬灭状态的 NIRF 探针 CyGbP_F 和 CyGbP_P。当 GzmB 将底物序列 IEFD 和 IEPD 剪切后, PABA 基团的离去使得淬灭的荧光信号重新“开启”。此外, 探针的被动靶向肿瘤能力, 使其能够实时检测免疫治疗后肿瘤中的 GzmB 表达水平, 从而评估免疫治疗期间的免疫激活状态及治疗反应。在 4T1 荷瘤鼠模型中, 研究者评估了 CyGbP_F 和 CyGbP_P 在体内实时监测 GzmB 表达的能力, 分别使用 NLG919、R848、BMS-1、Pexidartinib 和 BEC 5 种免疫治疗药物来激活免疫应答, NIRF 成像定量结果显示, 各组肿瘤区域的荧光信号随时间的推移逐渐增强, 并在探针注射后 6 h 达到峰值。免疫荧光和流式细胞术分析也证实了探针的荧光信号强度与其他免疫相关生物标志物如 CD8、CD4 受体具有正相关性。此外, CyGbP_F 和 CyGbP_P 在 24 h 内探针的肾脏排泄量占注射剂量的 60%, 如此高的肾脏清除率为免疫激活的光学尿液分析提供了可能性。因此, CyGbP_F 和 CyGbP_P 有望成为首类能够实时成像免疫治疗相关生物标志物并实现活体动物尿液分析的 NIRF 探针, 对于推动荧光成像技术在免疫治疗监测中的应用具有重要意义。

2.2 NIRF 自组装探针

基于能够靶向原位配体聚集的多功能骨架 TESLA, Xie 等^[45]设计了新型 GzmB 激活的自组装小分子 G-SNAT, 其中包含 GzmB 底物 IEFD, 并通过偶联花青素 5 (cyanine5, Cy5) 得到灵敏的 NIRF 探针 G-SNAT-Cy5。当 GzmB 识别剪切 IEFD 并被肿瘤微环境中丰富的 GSH 还原后, Cys 与芳香腈反应生成分子内环化产物, 随后在疏水和 π - π 相互作用的促进下自组装成纳米聚集体, 使荧光信号得以聚集增强并实现 GzmB 活性成像。在抗 PD-1 和抗 CTLA-4

联合治疗的 CT26 荷瘤鼠模型中进行 G-SNAT-Cy5 的 NIRF 成像, 显示经过 ICI 的联合治疗后引发了异质性反应, 在治疗终点时治疗应答的小鼠肿瘤体积明显缩小, 而治疗无应答的小鼠以及未治疗的小鼠肿瘤则持续生长。由此可见, G-SNAT-Cy5 成像能够监测肿瘤对 ICI 治疗的反应, 在免疫治疗早期区分应答者与无应答者, 为其在临床应用中的发展奠定了基础。

Xu 等^[22]利用 CBT-Cys 点击缩合自组装策略制备了双淬灭的 NIRF 探针 Cys(StBu)-Ile-Glu-Phe-Asp (IEFD)-Lys(Cy5.5)-CBT, 命名为 Cy5.5-CBT, 用于特异性检测 GzmB 活性。与 G-SNAT-Cy5 不同, Cy5.5-CBT 通过二硫键的体外还原产生环状二聚体, 导致单次信号淬灭, 随后借助分子间疏水和 π - π 堆叠自组装成纳米聚集体 Cy5.5-CBT-NPs, 荧光信号进一步产生“双淬灭”。Cy5.5-CBT-NPs 在体外保持着这种极低荧光强度的双淬灭状态, 而当探针内吞进入肿瘤细胞后, 通过 GzmB 对 IEFD 序列的裂解, 可使纳米颗粒解组装并激活荧光, 从而实现对肿瘤中 GzmB 活性的 NIRF 成像监测。免疫荧光染色实验证实, 开启的 NIRF 信号与 CTL 的肿瘤内浸润和 GzmB 表达水平具有正相关性。此外, 进一步的体内成像研究显示, Cy5.5-CBT-NPs 能够对 BEC 治疗后的黑色素瘤 B16-OVA 荷瘤鼠模型体内 CTL 的活性进行 NIRF 成像, 以识别治疗应答的肿瘤。这些研究表明, Cy5.5-CBT-NPs 可用于监测免疫治疗期间 TME 中 GzmB 的活性, 从而有效评估免疫治疗反应。

2.3 荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 探针

Scott 等^[46]构建了一系列 FRET 六肽探针 H1 - H7, 其中探针 H5 表现出卓越的反应活性和催化效率。通过酶促反应速率测试对比发现, 六肽探针 H5 (IEPDAL) 与人 GzmB 的反应速度显著快于短四肽 IEPD, 在 30 min 内即可快速完成反应, 其 k_{cat}/K_m 值为 1.2×10^7 L/(mol·s), 比先前报道的荧光四肽 Ac-IEPD-AMC、CyGbP_F 以及本次工作中合成的 FRET 四肽 T1 等提高了 1 000 倍以上^[44, 46-47]。此外, 探针 H5 对人 GzmB 的检测限低至 6 pmol/L, 显示出极高的选择性和特异性。在 CD8⁺ T 细胞与乳腺癌 E0771 细胞的共培养体系中, 探针 H5 的荧光信号能够特异性地聚集在免疫介导杀伤的癌细胞中, 其荧光信号的强弱差异能够反映免疫介导的肿瘤细胞杀伤效果, 由此证明该探针为免疫治疗反应的评估提供了一种有力工具。研究进一步发现, 探针 H5 对小鼠 GzmB

同样具有良好的反应性,在鳞状细胞癌模型中能够预测免疫治疗引起的肿瘤消退,并监测体内 GzmB 活性;在人肺癌肿瘤活检中,探针 H5 的临床分析效用进一步证明了其在监测肿瘤对免疫疗法早期反应中的潜在价值。

3 其他 GzmB 靶向分子探针

3.1 化学发光(chemiluminescence, CL)成像探针

CL 团因其无需外部激发光以及极低的背景干扰,可作为设计高灵敏度探针的理想平台。Scott 等^[48]基于 GzmB 底物 IEPD 设计了一种新型 CL 探针 1,该探针由 IEPD、PABA 以及产生 CL 的苯氧二氧乙烷 3 个部分组成。通过优化可激活的苯氧二氧乙烷结构,实现了被 GzmB 特异性识别裂解后 CL 信号的“开启”,进而用于实时成像 GzmB 介导的 NK 细胞对癌细胞的杀伤活性。探针 1 与重组人 GzmB 在 10 min 内快速反应可使 CL 信号增加 139 倍,而在 GzmB 抑制剂 Ac-IEPD-CHO 的存在下,探针的 CL 强度则会降低 90% 以上,证明其对 GzmB 具有高选择特异性。相比具有相同肽序列的可激活荧光探针 Ac-IEPD-AMC,探针 1 与活性 GzmB 反应 30 min 后展现出更高的信噪比,并在酶裂解后几分钟内迅速产生约 520 nm 的强 CL 信号,背景信号可忽略不计。探针 1 的快速响应性和极低的背景特性,使其在酶动力学性质方面优于之前报道的 GzmB 响应荧光探针^[44, 49]。为研究探针 1 在体内成像 NK 细胞活性的能力,利用免疫功能低下的 NSG 小鼠构建乳腺癌 MDA-MB-231 异种移植癌症模型,在小鼠两侧背部接种皮下肿瘤,一侧肿瘤注射与 IL-2 共培养的 NK 细胞,另一侧不注射,随后向小鼠体内注射探针。结果显示,仅在注射 NK 细胞的肿瘤中检测到明亮的 CL 信号,而在未注射 NK 细胞的肿瘤中仅产生极低的 CL。以上研究表明探针 1 作为一种新型 CL 探针,能够在 MDA-MB-231 肿瘤中实时成像 NK 细胞或其分泌的 GzmB 活性,从而为快速、选择性地监测 NK 细胞对癌细胞的识别与杀伤提供了有力工具。

3.2 生物发光(bioluminescence, BL)成像探针

BL 是一种由荧光素酶催化其底物荧光素发生的反应,具有高灵敏度、高特异性,能够在体内迅速降解,可短时间内重复成像^[50]。Chen 等^[51]将 IEPD 与 D-荧光素结合开发了一种可激活 BL 探针 GBLI-2,在转基因表达荧光素酶的 CT26 同基因小鼠结肠癌模型中对 GBLI-2 进行了评估,以评价其成像 GzmB 活性和监测免疫治疗效果的能力。研究结果

表明,GBLI-2 在 ICI 治疗产生应答的肿瘤中产生的 BL 信号 $[(1.6 \pm 0.3) \times 10^5 \text{ p}/(\text{s} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{sr})]$ 显著强于无应答 $[(0.4 \pm 0.1) \times 10^5 \text{ p}/(\text{s} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{sr})]$ 和未治疗 $[(0.3 \pm 0.3) \times 10^5 \text{ p}/(\text{s} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{sr})]$ 的肿瘤,表明该探针在肿瘤处的荧光信号强度与 GzmB 表达水平呈正相关。综上,GBLI-2 的开发将为抗肿瘤免疫机制以及免疫治疗方法的研究提供新的思路与参考。

3.3 近红外荧光/光声(near-infrared fluorescence/photoacoustic, NIRF/PA)双模态成像探针

2021 年,Zhang 等^[52]开发了一种可激活的半导体聚合物纳米探针 SPNP,通过被动靶向肿瘤并与 GzmB 原位反应,实现了 NIRF/PA 双模态成像,以监测免疫激活后的 GzmB 活性。SPNP 是由两亲性半导体聚合物 SP 与染料 IR800 标记的 GzmB 识别肽 IEPD 偶联而成的自组装结构,当 GzmB 裂解染料标记的识别肽 IEPD 后,染料 IR800 的 NIRF 和 PA 信号减弱,通过信号比值的变化实现对 GzmB 活性的监测。与 NIRF 成像相比,PA 成像结合了 NIRF 激发和热超声检测,可提供深达 12 cm 的强组织穿透力。基于探针 SPNP 的高灵敏度和高特异性,在 4T1 荷瘤鼠体内 SPNP 能够被动靶向肿瘤并与 GzmB 原位反应,通过 NIRF 和 PA 信号的比例变化成功监测了经 BEC 免疫治疗后 4T1 荷瘤鼠肿瘤内 T 细胞的活化情况。这项研究不仅展示了 SPNP 作为首个体内成像免疫激活的 NIRF/PA 双模态探针的成功应用,还为其他免疫相关生物标志物的分子探针设计提供了有价值的参考。

4 总结与展望

GzmB 作为肿瘤免疫治疗反应的重要早期生物标志物,可用于监测 TME 中 CTL 的活性,进而直接反映肿瘤对免疫治疗的响应程度。靶向 GzmB 的分子影像探针能够无创、实时和动态地监测癌症患者对免疫疗法的应答情况,有助于肿瘤免疫治疗的临床决策。文章对已报道的 GzmB 靶向分子影像探针进行了归纳总结(表 1),其中不乏一些在临床前研究和早期临床试验(I/II 期)中表现出优异成像性能的探针,有望作为评估肿瘤对免疫治疗早期反应的新型分子诊断工具。然而,现有探针仍面临着诸多挑战,如肿瘤摄取较低、体内稳定性有待提高等。未来通过进一步的结构优化与改造,相信靶向 GzmB 的分子影像探针将为临床免疫疗效的精准评估和治疗决策提供更全面的成像信息支持,进而推动肿瘤免疫治疗的个性化应用。

表1 靶向颗粒酶B的分子影像探针总结

Table 1 Summary of molecular imaging probes targeting granzyme B

Imaging mode	Probe name	Probe property	Experimental model	Research stage
PET	⁶⁸ Ga-NOTA-GZP	Mouse-derived	CT26	Preclinical ^[24]
PET	⁶⁸ Ga-grazytracer	Human-derived	MC38, 4T1	Phase I / II clinical trial ^[28]
PET	[⁶⁸ Ga]Ga-NOTA-GSI	Mouse-derived	B16-F10	Phase I / II clinical trial ^[32]
PET	[¹⁸ F]SF-M-14	Mouse-derived	4T1	Preclinical ^[34]
PET	[¹⁸ F]SF-H-14	Human-derived	4T1	Preclinical ^[34]
PET	[¹⁸ F]AIF-mNOTA-GZP	Mouse-derived	MC38, CT26	Preclinical ^[40]
PET	⁶⁴ Cu-GRIP B	Human-derived	MC38, CT26	Clinical trial ^[42]
NIRF	GNR	Human-derived	MC38, B16-F10	Preclinical ^[43]
NIRF	CyGbp _F	Mouse-derived	4T1	Preclinical ^[44]
NIRF	CyGbp _P	Human-derived	4T1	Preclinical ^[44]
NIRF	G-SNAT-Cy5	Mouse-derived	CT26	Preclinical ^[45]
NIRF	Cy5.5-CBT-NPs	Mouse-derived	B16-OVA	Preclinical ^[22]
NIRF	H5	Human-derived	E0771	Preclinical ^[46]
CL	I	Human-derived	MDA-MB-231	Preclinical ^[48]
BL	GBLI-2	Mouse-derived	CT26-Luc	Preclinical ^[51]
NIRF/PA	SPNP	Mouse-derived	4T1	Preclinical ^[52]

利益冲突声明:

所有作者声明无利益冲突。

Conflict of Interests:

All authors declare no conflict of interests.

作者贡献声明:

杨继辰负责文献检索、资料的收集分析以及文章的整体构思与写作,并根据修改意见进行修订。邱玲参与综述手稿的修订与校稿,对文章的知识性内容作批评性审阅。林建国负责文章的构思设计与手稿修订,提供资金支持并承担监督工作。

Author's Contributions:

YANG Jichen was responsible for literature retrieval, data collection, conception, writing, and revision. QIU Ling participated in the critical review, editing, revision, and proofreading. LIN Jianguo was responsible for conception, revision, financial support, and supervision.

[参考文献]

[1] AMGHEIB A, FU R S, ABOAGYE E O. Positron emission tomography probes for imaging cytotoxic immune cells[J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14(10): 2040

[2] 魏艳秋, 季辰菲, 孙伟, 等. 肺癌合并免疫检查点抑制剂相关肺炎的临床特征和预后分析[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2024, 44(7): 947-953

WEI Y Q, JI C F, SUN W, et al. Clinical characteristics and prognosis of lung cancer with immune checkpoint inhibitor-associated pneumonia [J]. *Journal of Nanjing Medical University (Natural Sciences)*, 2024, 44(7):

947-953

[3] PARDOLL D M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12(4): 252-264

[4] RIBAS A, WOLCHOK J D. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade [J]. *Science*, 2018, 359(6382): 1350-1355

[5] CHEN L P, HAN X. Anti-PD-1/PD-L1 therapy of human cancer: past, present, and future[J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(9): 3384-3391

[6] 张虎, 毛春蓉, 练云, 等. 一种新型结直肠癌预后模型的建立与治疗预测[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2024, 44(9): 1217-1226

ZHANG H, MAO C R, LIAN Y, et al. Establishment and treatment prediction of a new prognostic model for colorectal cancer[J]. *Journal of Nanjing Medical University (Natural Sciences)*, 2024, 44(9): 1217-1226

[7] 许杨悦, 胡蒙, 武常玲, 等. 真实世界中肺癌免疫检查点抑制剂治疗的安全性及有效性[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2023, 43(12): 1668-1674

XU Y Y, HU M, WU C L, et al. Safety and efficacy of immune checkpoint inhibitors for lung cancer in the real world[J]. *Journal of Nanjing Medical University (Natural Sciences)*, 2023, 43(12): 1668-1674

[8] NISHINO M, RAMAIYA N H, HATABU H, et al. Monitoring immune-checkpoint blockade: response evaluation and biomarker development [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017, 14(11): 655-668

- [9] HAN Y Q, WANG J Y, SUN T, et al. Predictive biomarkers of response and survival following immunotherapy with a PD-L1 inhibitor benmelstobart (TQB2450) and antiangiogenic therapy with a VEGFR inhibitor anlotinib for pretreated advanced triple negative breast cancer [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 429
- [10] GIBNEY G T, WEINER L M, ATKINS M B. Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy [J]. *Lancet Oncol*, 2016, 17(12): e542–e551
- [11] LIU Z Y, LI Z. Molecular imaging in tracking tumor-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) [J]. *Theranostics*, 2014, 4(10): 990–1001
- [12] MAC Q D, MATHEWS D V, KAHLA J A, et al. Non-invasive early detection of acute transplant rejection *via* nanosensors of granzyme B activity [J]. *Nat Biomed Eng*, 2019, 3(4): 281–291
- [13] WEGRZYNIAK O, LECHI F, MITRAN B, et al. Non-invasive PET imaging of liver fibrogenesis using a RESCA-conjugated Affibody molecule [J]. *iScience*, 2024, 27(5): 109688
- [14] PILKINGTON P, LOPCI E, ADAM J A, et al. FDG-PET/CT variants and pitfalls in haematological malignancies [J]. *Semin Nucl Med*, 2021, 51(6): 554–571
- [15] DECAZES P, BOHN P. Immunotherapy by immune checkpoint inhibitors and nuclear medicine imaging: current and future applications [J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(2): 371
- [16] BENSCH F, VAN DER VEEN E L, LUB-DE HOOGE M N, et al. ⁸⁹Zr-atezolizumab imaging as a non-invasive approach to assess clinical response to PD-L1 blockade in cancer [J]. *Nat Med*, 2018, 24(12): 1852–1858
- [17] WEI W J, JIANG D W, EHLERDING E B, et al. Noninvasive PET imaging of T cells [J]. *Trends Cancer*, 2018, 4(5): 359–373
- [18] RASHIDIAN M, INGRAM J R, DOUGAN M, et al. Predicting the response to CTLA-4 blockade by longitudinal noninvasive monitoring of CD8 T cells [J]. *J Exp Med*, 2017, 214(8): 2243–2255
- [19] HACKL H, CHAROENTONG P, FINOTELLO F, et al. Computational genomics tools for dissecting tumour-immune cell interactions [J]. *Nat Rev Genet*, 2016, 17(8): 441–458
- [20] NOBASHI T W, MAYER A T, XIAO Z Y, et al. Whole-body PET imaging of T-cell response to glioblastoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2021, 27(23): 6445–6456
- [21] GIBSON H M, MCKNIGHT B N, MALYSA A, et al. IFN γ PET imaging as a predictive tool for monitoring response to tumor immunotherapy [J]. *Cancer Res*, 2018, 78(19): 5706–5717
- [22] XU L L, LIU N H, ZHAN W J, et al. Granzyme B turns nanoparticle fluorescence “on” for imaging cytotoxic T lymphocyte activity *in vivo* [J]. *ACS Nano*, 2022, 16(11): 19328–19334
- [23] LI X X, CHEN G Y, WU K C, et al. Imaging and monitoring of granzyme B in the immune response [J]. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2024, 16(1): e1928
- [24] LARIMER B M, WEHRENBURG-KLEE E, DUBOIS F, et al. Granzyme B PET imaging as a predictive biomarker of immunotherapy response [J]. *Cancer Res*, 2017, 77(9): 2318–2327
- [25] LARIMER B M, BLOCH E, NESTI S, et al. The effectiveness of checkpoint inhibitor combinations and administration timing can be measured by granzyme B PET imaging [J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(4): 1196–1205
- [26] ZHANG Y J, DESHANE J S, YANG E S, et al. A novel translational PET imaging approach to quantifying distal tumor immune activation after targeted radiation therapy and checkpoint blockade [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2024, 118(5): 1217–1227
- [27] CAPACCIONE K M, DOUBROVIN M, BHATT N, et al. Granzyme B PET imaging of the innate immune response [J]. *Molecules*, 2020, 25(13): 3102
- [28] ZHOU H Y, WANG Y P, XU H C, et al. Noninvasive interrogation of CD8⁺ T cell effector function for monitoring early tumor responses to immunotherapy [J]. *J Clin Invest*, 2022, 132(16): e161065
- [29] ABBASI GHARIBKANDI N, CONLON J M, HOSSEIN-IMEHR S J. Strategies for improving stability and pharmacokinetic characteristics of radiolabeled peptides for imaging and therapy [J]. *Peptides*, 2020, 133: 170385
- [30] XU H C, WEI Z X, CHEN B X, et al. Granzyme B PET imaging inflammation and remodeling in myocardial infarction [J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2024, 51(4): 991–1001
- [31] SHEN X L, ZHOU H Y, ZHOU X, et al. ⁶⁸Ga-grazytracer PET for noninvasive assessment of response to immunotherapy in solid tumors and lymphomas: a phase 1/2 clinical trial [J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 8791
- [32] LIU Q F, XU X P, YANG Z Y, et al. Granzyme B PET/CT imaging evaluates early response to immunotherapy in gastric cancer [J]. *J Nucl Med*, 2024, 65(11): 1695–1701
- [33] JIANG C J, TIAN Q W, XU X P, et al. Enhanced antitumor immune responses *via* a new agent [¹³¹I]-labeled dual-target immunosuppressant [J]. *Eur J Nucl Med Mol*

- Imaging, 2023, 50(2): 275-286
- [34] FU J Y, XI H J, CAI S Y, et al. Development of granzyme B-targeted smart positron emission tomography probes for monitoring tumor early response to immunotherapy [J]. ACS Nano, 2024, 18(29): 18910-18921
- [35] LIANG G L, REN H J, RAO J H. A biocompatible condensation reaction for controlled assembly of nanostructures in living cells[J]. Nat Chem, 2010, 2(1): 54-60
- [36] YANG Y, LIU X Y, WU X F, et al. Enzyme-instructed CBT-cys-like click cyclization reactions for bioimaging [J]. Chem Biomed Imaging, 2023, 2(2): 98-116
- [37] LIN J G, GAO D Y, WANG S J, et al. Stimuli-responsive macrocyclization scaffold allows In situ self-assembly of radioactive tracers for positron emission tomography imaging of enzyme activity [J]. J Am Chem Soc, 2022, 144(17): 7667-7675
- [38] ARCHIBALD S J, ALLOTT L. The aluminium-¹⁸F fluoride revolution: simple radiochemistry with a big impact for radiolabelled biomolecules [J]. EJNMMI Radiopharm Chem, 2021, 6(1): 30
- [39] GOGGI J L, RAMASAMY B, TAN Y X, et al. Granzyme B PET imaging stratifies immune checkpoint inhibitor response in hepatocellular carcinoma [J]. Mol Imaging, 2021, 2021: 9305277
- [40] GOGGI J L, HARTIMATH S V, XUAN T Y, et al. Granzyme B PET imaging of combined chemotherapy and immune checkpoint inhibitor therapy in colon cancer [J]. Mol Imaging Biol, 2021, 23(5): 714-723
- [41] GOGGI J L, TAN Y X, HARTIMATH S V, et al. Granzyme B PET imaging of immune checkpoint inhibitor combinations in colon cancer phenotypes [J]. Mol Imaging Biol, 2020, 22(5): 1392-1402
- [42] ZHAO N, BARDINE C, LOURENÇO A L, et al. In vivo measurement of granzyme proteolysis from activated immune cells with PET [J]. ACS Cent Sci, 2021, 7(10): 1638-1649
- [43] NGUYEN A, RAMESH A, KUMAR S, et al. Granzyme B nanoreporter for early monitoring of tumor response to immunotherapy [J]. Sci Adv, 2020, 6(40): eabc2777
- [44] HE S S, LI J C, LYU Y, et al. Near-infrared fluorescent macromolecular reporters for real-time imaging and urinalysis of cancer immunotherapy [J]. J Am Chem Soc, 2020, 142(15): 7075-7082
- [45] XIE J H, EL RAMI F, ZHOU K X, et al. Multiparameter longitudinal imaging of immune cell activity in chimeric antigen receptor T cell and checkpoint blockade therapies [J]. ACS Cent Sci, 2022, 8(5): 590-602
- [46] SCOTT J I, MENDIVE-TAPIA L, GORDON D, et al. A fluorogenic probe for granzyme B enables in-biopsy evaluation and screening of response to anticancer immunotherapies [J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 2366
- [47] HARRIS J L, PETERSON E P, HUDIG D, et al. Definition and redesign of the extended substrate specificity of granzyme B [J]. J Biol Chem, 1998, 273(42): 27364-27373
- [48] SCOTT J I, GUTKIN S, GREEN O, et al. A functional chemiluminescent probe for in vivo imaging of natural killer cell activity against tumours [J]. Angew Chem Int Ed, 2021, 60(11): 5699-5703
- [49] JANISZEWSKI T, KOŁT S, KAISERMAN D, et al. Noninvasive optical detection of granzyme B from natural killer cells with enzyme-activated fluorogenic probes [J]. J Biol Chem, 2020, 295(28): 9567-9582
- [50] ZAMBITO G, CHAWDA C, MEZZANOTTE L. Emerging tools for bioluminescence imaging [J]. Curr Opin Chem Biol, 2021, 63: 86-94
- [51] CHEN M, ZHOU K X, DAI S Y, et al. In vivo bioluminescence imaging of granzyme B activity in tumor response to cancer immunotherapy [J]. Cell Chem Biol, 2022, 29(10): 1556-1567.e6
- [52] ZHANG Y, HE S S, CHEN W, et al. Activatable polymeric nanoprobe for near-infrared fluorescence and photoacoustic imaging of T lymphocytes [J]. Angew Chem Int Ed, 2021, 60(11): 5921-5927

[收稿日期] 2025-04-09

(本文编辑: 蒋莉)