

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.10.004

· 基础研究 ·

小鼠结肠癌新抗原 Glud1-V546I 及其 DC 疫苗能够在体内和体外诱导有效的抗肿瘤免疫应答

徐淑华^a, 赵婕^a, 苗红霞^a, 孙伟红^b, 赵鹏^b, 牛爱荣^a (康复大学青岛中心医院暨青岛市中心医院 a. 检验科; b. 生物治疗中心, 山东 青岛 266042)

[摘要] **目的:** 开发针对结肠癌(CRC)个性化治疗的新抗原肽疫苗, 探讨新抗原肽及其诱导的新抗原反应性 T(NRT)细胞治疗 CRC 的可行性和有效性。**方法:** 提取小鼠结肠癌 CT26 细胞的 DNA 和 RNA, 采用全外显子和转录组测序分析肿瘤基因的突变及表达。通过基于机器学习的新抗原预测体系, 筛选、合成具有高免疫原性多肽。用合成的多肽经皮下注射免疫小鼠, 通过流式细胞术检测免疫鼠脾细胞的 IFN- γ 分泌水平, 筛选具有强免疫原性多肽。用免疫原性多肽负载小鼠骨髓来源的树突状细胞(BMDC)免疫结肠癌建模小鼠, 通过 ELISPOT 检测效应细胞分泌 IFN- γ 的能力, 时间分辨荧光免疫分析法检测免疫鼠脾细胞对相应靶细胞的杀伤力, 观察荷瘤小鼠肿瘤生长情况和小鼠存活期。**结果:** 新抗原肽 Glud1-V546I 具有更强的诱导 NRT 细胞分泌 IFN- γ 的能力 ($P < 0.0001$)。与野生肽 (Glud1-WT) 相比, Glud1-V546I 在荷瘤鼠体内诱导的 NRT 细胞有更高的 IFN- γ 分泌能力 ($P < 0.0001$) 和细胞毒作用 ($P < 0.0001$)。同时, Glud1-V546I 能明显抑制小鼠肿瘤生长 ($P < 0.001$) 并延长荷瘤鼠的生存期 ($P < 0.01$)。**结论:** 小鼠 CT26 细胞的新抗原肽 Glud1-V546I 能够显著促进小鼠 NRT 细胞的 IFN- γ 的分泌, 用其制备的 DC 疫苗在结肠癌荷瘤鼠体内显示出有效的抗肿瘤反应, 提示开发基于新抗原的 CRC 个性化免疫治疗是可能的。

[关键词] 新抗原; 肿瘤疫苗; 新抗原反应性 T 细胞; 结肠癌

[中图分类号] R735.3; R730.51 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2024) 10-0963-07

Mouse colon cancer neoantigen Glud1-V546I and its DC vaccine can induce potent anti-tumor immune responses *in vivo* and *in vitro*

XU Shuhua^a, ZHAO Jie^a, MIAO Hongxia^a, SUN Weihong^b, ZHAO Peng^b, NIU Airong^a (a. Department of Clinical Laboratory; b. Biotherapy Center, Qingdao Central Hospital, University of Health and Rehabilitation Sciences, Qingdao 266042, Shandong, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a neoantigen peptide vaccine for personalized treatment of colorectal cancer (CRC), and to explore the feasibility and effectiveness of neoantigen peptide and its induced neoantigen reactive T cells (NRT) therapy for CRC. **Methods:** DNA and RNA were extracted from mouse CRC cell line CT26, followed by whole-exome and transcriptome sequencing to analyze tumor gene mutations and expression. Peptides with high immunogenicity were screened and synthesized through a machine learning based neoantigen prediction system. Mice were subcutaneously immunized with synthesized peptides, and the interferon (IFN)- γ level of splenocytes from immunized mice was determined using flow cytometry to screen peptides with strong immunogenicity. Afterwards, bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs) loaded with immunogenic peptides were used to immunize mice bearing CRC model. The IFN- γ secretion ability by effector cells was determined by ELISPOT assay, and the cytotoxicity of γ secretion ability by effector cells was determined by ELISPOT assay, and the cytotoxicity of splenocytes from immunized mice was examined by time-resolved fluorescence immunoassay. In addition, the tumor growth and survival period of tumor-bearing mice were observed. **Results:** The neoantigen Glud1-V546I induced stronger IFN- γ secretion by NRT cells ($P < 0.0001$). Compared with the wild peptide (Glud1-WT), Glud1-V546I induced higher IFN- γ secretion by NRT cells ($P < 0.0001$) and stronger cytotoxicity ($P < 0.0001$) in tumor-bearing mice. Meanwhile, Glud1-V546I significantly inhibited tumor growth ($P < 0.001$) and prolonged the survival of tumor-bearing mice ($P < 0.01$). **Conclusion:** The neoantigen peptide Glud1-V546I from mouse CT26 cells demonstrates effective anti-tumor responses in tumor-bearing mice, suggesting the potential for developing neoantigen-based personalized immunotherapies in CRC.

[Key words] neoantigen; tumor vaccine; neoantigen-reactive T cell (NRT cell); colorectal cancer (CRC)

[Chin J Cancer Biother, 2024, 31(10): 963-969. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.10.004]

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目 (No. 82072927); 青岛市 2022 年度医药卫生科研指导项目 (No. 2022-WJZD065)

[作者简介] 徐淑华 (1975—), 女, 硕士, 主要从事白血病和肿瘤疫苗的研究。E-mail: xwzzqth@163.com

[通信作者] 牛爱荣, E-mail: hddyl2017@163.com

截至2022年,中国结直肠癌(colorectal cancer, CRC)的发病率明显增加,已成导致癌症死亡的五大原因之一^[1],其5年生存率约13%^[2]。手术和辅助化疗的标准疗法往往受到不良反应和化疗耐药性的限制^[3-4]。因此,开发其他治疗CRC的策略至关重要。近年来肿瘤免疫疗法取得了巨大进展^[5-7]。然而,只有不到5%的晚期CRC患者受益于PD-1检查点阻断免疫疗法,对CRC的疗效有限^[8]。随着二代测序(next-generation sequencing, NGS)的出现,用于个性化疫苗治疗的特异性新抗原的鉴定已变得可行。几项利用针对黑色素瘤、胶质母细胞瘤和其他类型肿瘤的新抗原反应性T细胞(neoantigen-reactive T cell, NRT细胞)的临床试验结果^[9-10]显示,基于新抗原的多肽疫苗具有免疫原性和安全性,有良好的临床治疗效果。在CRC中,基于靶向KRAS G12D 癌基因突变的HLA-C*08:02限制性肿瘤浸润淋巴细胞(tumor-infiltrating lymphocyte, TIL)的免疫疗法促进了1例CRC患者的肿瘤消退^[11]。然而,基于新抗原的免疫疗法在CRC中的有效性和安全性,尤其是在中国人群中,尚未得到很好的研究。因此,本研究应用课题组已构建的预测和评估体系^[12],对小鼠结肠癌CT26细胞进行新抗原多肽预测和效用评价,为肿瘤个性化免疫治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞、实验动物及主要试剂

BALB/c 鼠源性结肠癌未分化腺癌细胞CT26、乳腺癌细胞4T1和肝癌细胞H22购自ATCC。细胞置于含10%胎牛血清的1640培养基中,在37℃、5%CO₂、饱和湿度的培养箱中培养。

6~8周龄BALB/c小鼠由北京维通利华公司提供。小鼠饲养于青岛大学医学院实验动物中心(SPF级、独立送回风净化笼具(individual ventilated cages, IVC)饲养室,实验动物生产许可证号:SCXK(京)2016-0002;实验动物使用许可证号:1140150000434449)。实验方案经青岛市中心医院伦理委员会批准(伦理审批号:QDU-HEC-2021142)。

RPMI 1640培养基、胎牛血清购自美国Gibco公司,小鼠重组-GM-CSF(mGM-CSF)、IL-2(mIL-2)、IL-4(mIL-4)购自美国R&D公司,FITC-CD3、PE-IFN-γ小鼠单克隆流式荧光抗体均购自美国BD公司,DNeasy Blood and Tissue Kit购自德国Qiagen公司,RNeasy mini kit购自美国Illumina公司,SureSelectX7 Mouse All Exon Kit购自美国Agilent Technologies公司,小鼠IFN-γ ELISPOT试剂盒购自美国R&D公司,DELTA EuTDA细胞毒性检测试剂盒购自美国PerkinElmer公司。

1.2 肿瘤突变基因预测

为进行全外显子组测序(WES),应用QIAGEN血液/组织基因组DNA提取试剂盒提取CT26细胞和BALB/c小鼠尾部组织的DNA。将基因组DNA经剪切、末端修复后连接到条形码Illumina测序适配器,扩增并选择大小。使用安捷伦SureSelectX7小鼠全外显子试剂盒进行全外显子组捕获。然后,通过实时定量PCR(qPCR)对所得文库进行定量、合并,后使用Illumina Novaseq 6000平台(配对末端,150 bp)对文库进行测序。为了RNA测序(RNA-seq),应用Illumina TruSeq链特异性转录组文库试剂盒(用于细胞悬浮液)建立RNA序列文库。根据使用说明,应用HiSeq2500进行流动细胞簇扩增和测序^[12]。

1.3 肿瘤新抗原预测

参照先前的研究^[12-14]进行表位预测。对于突变检测,使用BWA(Burrows Wheeler Aligner)软件将DNA读数与参考基因组mm10进行比较^[15],分析CT26细胞和小鼠尾部组织的重复外显子是否存在单核苷酸变异(single nucleotide variant, SNV)。在正常样本中对这些位点进行了纯合基因型的鉴定和筛选,从而在SNV中保持了高度的特异性。对其余位点进行进一步检查,以确定推测的纯合或杂合突变是否存在。对可疑位点进行筛选,以排除潜在的假阳性,测试重复位点的总和,合并重复位点。将鉴定变体的基因组坐标与加州大学圣克鲁斯分校(UCSC)提供的详细的已知基因转录坐标进行了比较,进一步确定了变体与基因、转录物、潜在的氨基酸序列变化和RNA-seq衍生的表达值之间的关系。对于RNA-Seq,使用Bowtie将RNA读数与mm10参考基因组和转录组进行比较^[16]。然后使用突变肽提取器和信息器(MuPeXI)管线评估剩余突变的免疫原性^[17]。分别产生了8~11氨基酸长度的MHC I类分子限制性多肽和12~15氨基酸长度的MHC II类分子限制性多肽。用RNA-seq数据在每百万个转录物中测定突变基因的表达。用变异检测工具MuTect2测定突变等位基因频率^[18-19]。根据MHC(小鼠H-2)亲和力、表达水平、与自身肽的相似性和突变等位基因频率,给每个肽提供优先级评分。选择优先级得分>0的肽作为新抗原候选。

1.4 新抗原多肽合成与验证

5条长度27个氨基酸的候选新抗原多肽由吉尔生化(上海)有限公司通过反相高效液相色谱法合成,其纯度>95%,通过质谱法进行验证。用二甲亚砜溶解多肽为10 mmol/L的溶液,之后分装,-80℃保存,使用前用PBS稀释为1 mmol/L。

1.5 新抗原多肽免疫BALB/c小鼠

为了检测突变多肽的免疫原性,取10只6~8周

龄 BALB/c 鼠,在第 0、7 天,分别用 200 μ L 多肽和免疫佐剂 poly(I:C)的混合液在腹部皮下多点注射免疫 BALB/c 鼠。末次免疫后 7 d,根据之前的研究^[20]方法获取小鼠脾细胞,即 NRT 细胞。后用 PBS 洗涤 2 遍,计数,备用。

1.6 ELISPOT 检测 NRT 细胞的 IFN- γ 分泌

按照试剂说明书及文献^[20]操作。简言之,将 5×10^5 个免疫鼠的脾细胞加入包被有特异性抗小鼠 IFN- γ 单克隆抗体的 ELISPOT 板中,同时分别加入 20 μ mol/L 的相应肿瘤新抗原肽,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中培养 12~48 h。另设加入野生型(WT)肽、无关肽、培养基因组为对照。阳性对照组用植物血凝素(5 μ g/mL)刺激。实验结束后用 ELISPOT Reader(美国 CTL 公司)读取斑点数。

1.7 流式细胞术检测 NRT 细胞的 IFN- γ 分泌

取 2×10^6 个 NRT 细胞,用 20 μ mol/L 的相应新抗原肽刺激 16 h,为防止胞内蛋白泌出,同时加入 20 μ g/mL Brefeldin A(蛋白转运抑制剂)。对照组用无关肽刺激。阳性对照用佛波酯(0.5 μ g/mL)和离子霉素(1 μ g/mL)刺激。收集细胞,PBS 洗 2 次,室温下用血清封闭 Fc 受体 15 min。细胞用 PBS 洗后,加入 FITC-CD3 单克隆抗体,4 $^{\circ}$ C 反应 30 min。PBS 洗涤后,细胞用 4% 甲醛固定,用试剂盒打孔液打孔后,加入 PE-IFN- γ 单克隆抗体,4 $^{\circ}$ C 下放置 30 min 后上机检测。

1.8 负载新抗原 DC 疫苗的制备

为获取小鼠骨髓来源的树突状细胞(bone marrow-derived dendritic cell, BMDC),安乐法处死 BALB/c 小鼠,具体操作按照文献^[20]进行。从股骨中冲洗出骨髓细胞,加入抗 Ia、B220、CD4、CD8 单抗(终浓度均为 10 μ g/mL)及补体(稀释比例 10:1),除去 T、B 细胞,其余细胞重新悬浮并在含有重组小鼠 mGM-CSF(10 ng/mL)和 mIL-4(1 ng/mL)细胞因子的完全 PRMI 1640 培养基(即 DC 培养液)中,在 37 $^{\circ}$ C 的温度下培养。第 3 天,吸弃培养基及悬浮细胞,重新加入新鲜的 DC 培养液。第 6 天,收集悬浮细胞及疏松贴壁生长的细胞,离心后,加入新鲜的 DC 培养液并重新铺板培养。第 8 天,收集悬浮细胞,调细胞密度为 2×10^6 个/mL,加入新抗原肽(20 μ mol/L)刺激,37 $^{\circ}$ C 下处理 5 h 后,加入 TNF- α (250 U/mL)、LPS(1 μ g/mL),诱导其成熟。第 10 天,收集悬浮细胞,PBS 调整细胞密度为 1×10^6 个/200 μ L 备用。

1.9 新抗原免疫荷瘤鼠模型的构建及治疗

取对数生长期的鼠 CT26 细胞,调整细胞密度为 5×10^5 个/mL。在小鼠腋窝中部外侧皮下接种 200 μ L 细胞悬液。接种后第 3、10 和 17 天,每只鼠用

1×10^6 负载新抗原的 DC + 50 μ g poly(I:C)(混合在 200 μ L PBS 中)皮下免疫。

1.10 细胞毒性检测试剂盒检测 NRT 细胞的细胞毒性

应用 DELFIA EuTDA 细胞毒性检测试剂盒,具体操作根据商品说明书进行。先用荧光增强配体标记靶细胞,之后按照不同的效靶比加入效应细胞并在 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 、饱和湿度培养箱中培养 2 h。最后取上清,用时间分辨荧光分析仪检测荧光。实验设背景孔(培养基孔)、自发释放孔(靶细胞孔)、最大释放孔(靶细胞 + 裂解液孔)和实验释放孔(靶细胞 + 效应细胞孔)。特异性杀伤率计算公式:特异性杀伤率 = (实验释放 - 自发释放) / (最大释放 - 自发释放) $\times 100\%$ 。

1.11 小鼠生存期的评估

小鼠接种肿瘤细胞 3 d 后开始接受新抗原 DC 疫苗和对照治疗。肿瘤在治疗后每 3 d 用游标卡尺测量移植瘤的长径(a)和短径(b),按照公式“ $V = (a \times b^2) / 2$ ”计算肿瘤体积。每 3 d 记录小鼠体重变化。另外,观察荷瘤小鼠精神状态、活动情况及其肿瘤生长情况(有无破溃、质地、活动度等)。观察荷瘤鼠生存时间,对 100 d 后仍存活小鼠实施安乐处死。

1.12 统计学处理

采用 Graphpad Prism 7.0 软件对数据进行统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均数比较采用独立样本 t 检验,各组间肿瘤体积比较采用 Mann-Whitney U 检验。生存期分析绘制 Kaplan-Meier 生存曲线。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 合成 5 条具有 MHC 分子高亲和力的新抗原多肽

根据基因测序和 MHC 亲和力预测结果,选取并合成 5 条与 MHC 有高亲和力的新抗原多肽,见表 1。

2.2 免疫原性新抗原鉴定

流式细胞术检测结果(图 1)显示,与无关肽 VSV-NP43-69 相比,新抗原肽 Glud1-V546I、Uchl3-A224T 和 Hnnpdl-D163N 诱导的效应 T 细胞 IFN- γ 分泌能力明显升高($t = 27.64$ 、8.075、6.042、3.402, $P < 0.0001$ 或 $P < 0.01$);与对照组相比, Mch1-G367S 和 Xrn2-S485F IFN- γ 的分泌无显著差异。结果表明,合成的新抗原肽 Glud1-V546I、Uchl3-A224T 和 Hnnpdl-D163N 具有免疫原性。

2.3 Glud1-V546I 在荷瘤鼠中诱导出新抗原特异性的 T 细胞应答

ELISPOT 检测结果(图 2A、B)显示,与 Glud1-WT 相比,新抗原 Glud1-V546I 能诱导更强的 T 细胞应答

($t = 8.533$, 均 $P < 0.0001$), 而 Uchl3-A224T 和 Hnrnpdl-D163N 与相应的 WT 相比, 其诱导 IFN- γ 分泌的能力无显著差异。因此, 选择诱导 IFN- γ 分泌能力最强的 Glud1-V546I 进行后续实验。

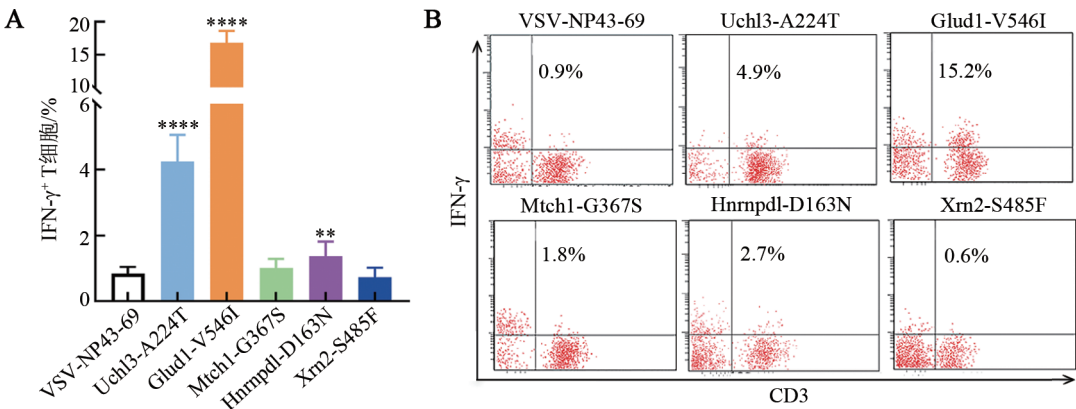
DELFA EuTDA 细胞毒性检测法检测结果 (图 2C) 显示, Glud1-V546I 所诱导的 NRT 细胞能特异性杀伤表达突变抗原的 CT26 细胞, 而不能有效杀伤相同背景来源的、不表达相应突变抗原的乳腺癌

4T1 细胞和肝癌 H22 细胞。另外, 为了进一步探究 Glud1-V546I 所诱导的 NRT 细胞与 WT 肽所诱导 NRT 细胞的细胞毒性, 在效靶比 50:1 条件下, 检测了两种效应 T 细胞对 CT26 细胞的杀伤能力。结果表明, 新抗原 Glud1-V546I 诱导的 NRT 细胞杀伤 CT26 细胞的能力明显高于 WT 肽诱导的 NRT 细胞 ($t = 11.34$, $P < 0.0001$; 图 2D)。

表 1 计算机预测 CT26 细胞中与 MHC I/II 类分子有高亲和力的突变

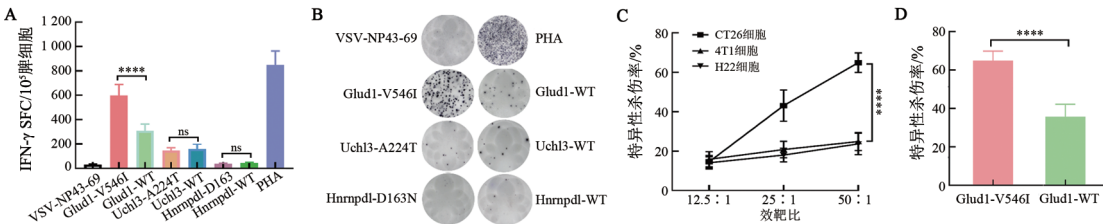
突变	基因	MHC 限制性	用于疫苗接种的突变序列 ^a	替代(WT, AA#, Mut)	预测得分 ^b
Uchl3-A224T	Uchl3	H-2-Db	DAIEVCKKFMERDPDELRFN T IALSAA	A224T	56
Glud1-V546I	Glud1	H-2-Kb	DLRTAAYVNAIEK I FKVYNEAGVTFT	V546I	54
Mtch1-G367S	Mtch1	H-2-Kd	KSWIHCWKYLSVQ S QLFRGSSLLFRRV	G367S	53
Xrn2-S485F	Xrn2	H-2-Kb	PSISPNTSFASDG F PSPLGGIKRKAED	S485F	50
Hnrnpdl-D163N	Hnrnpdl	H-2-Db	MFIGGLSWDTSKK N LTEYLSRFGEVVD	D163N	50

^a红色粗体字母为突变残基; WT: 野生型; AA#: p 突变氨基酸位置; Mut: 突变; ^bMHC I 和 II 分子亲和力分别用 netMHCpan4.0 和 netMHCIIpan3.2 预测。



A: 流式细胞术检测新抗原多肽免疫鼠脾细胞中 IFN- γ ⁺ CD3⁺ T 细胞的比例; B: 流式检测的典型代表图。与 VSV-NP43-69 相比, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ 。

图 1 来自小鼠结肠癌 CT26 细胞的新抗原的免疫原性评价



A: 新抗原诱导 NRT 细胞 IFN- γ 分泌能力的评价; B: ELISPOT 检测 IFN- γ 分泌的典型图 (图中点状为单个 T 细胞分泌的 IFN- γ); C: Glud1-V546I 诱导的 NRT 细胞的抗原特异性细胞毒性评价; D: Glud1-V546I 诱导的 NRT 细胞与 WT 肽诱导的 NRT 细胞对靶细胞 CT26 的细胞毒性评价。SFC: 斑点形成细胞 (spot forming cell); **** $P < 0.0001$, ns: 差异无统计意义。

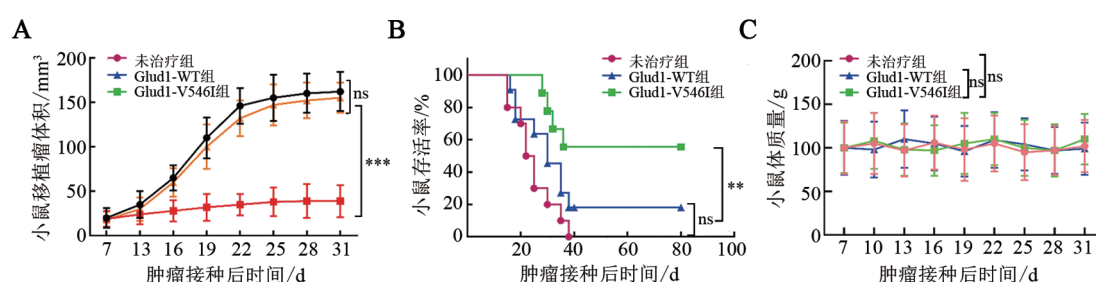
图 2 Glud1-V546I 诱导的新抗原特异性 T 细胞应答

2.4 Glud1-V546I 诱导的免疫应答抑制荷瘤鼠的肿瘤生长

观察负载新抗原肽 Glud1-V546I 肽 DC 疫苗治疗 CT26 细胞的荷瘤鼠, 结果发现, 与 Glud1-WT 组相

比, Glud1-V546I 肽 DC 疫苗诱导的免疫应答能明显抑制荷瘤鼠的肿瘤生长(图 3A)。Glud1-V546I 肽 DC 疫苗免疫鼠在肿瘤接种后 80 d 的存活率是 60% (6/10), 而 Glud1-WT 肽 DC 疫苗免疫鼠, 超过 80 d 的存活率为 10% (1/10, 图 3B)。在无治疗组, 小鼠在荷瘤后 17~40 d 全部死亡。结果表明, 新抗原肽比 WT

肽能诱导更强的抗肿瘤效应。体质量是一个重要的健康指标, 可以反映治疗对动物整体健康状况的影响。如图 3C 所示, 在所有多肽免疫治疗组小鼠中都没有观察到明显的体质量变化, 这表明多肽免疫疗法耐受性良好。



A: 治疗后小鼠肿瘤体积变化曲线; B: 治疗后不同时间点荷瘤鼠存活率; C: 不同处理对小鼠体质量的影响。

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, ns: 差异无统计意义。

图3 新抗原 Glud1-V546I 治疗 CT26 细胞荷瘤鼠的疗效

3 讨论

肿瘤特异性体细胞突变被认为是肿瘤免疫治疗的理想靶点, 但基于新抗原的免疫治疗在 CRC 中的研究很少。为了研究靶向新抗原的 CRC 个性化肿瘤治疗的可行性和有效性, 本研究对小鼠结肠癌 CT26 细胞进行了新抗原鉴定和免疫原性评估, 结果发现 Glud1-V546I 在荷瘤小鼠模型中显示出良好的抗肿瘤免疫诱导能力。

肿瘤突变可以在 HLA 分子上形成 T 细胞识别的新表位, 有助于临床免疫治疗的成功^[21-23]。越来越多的研究^[24-26]表明, 针对新抗原的过继 T 细胞疗法已成功用于治疗许多人类实体瘤。TRAN 等^[27]使用基于全外显子组测序的方法, 在 1 例放疗和化疗失败的转移性胆管癌患者中鉴定了新抗原。随后, 同一研究团队在转移性 CRC 患者中成功应用了过继 TIL 细胞疗法^[11, 28]。在其他的研究^[29-30]中, 发现 InDel 相关的新抗原覆盖了很大一部分微卫星高度不稳定 CRC 患者。VAN DEN BULK 等^[31]在 7 例 DNA 错配修复完整 (MMR-p) CRC 患者的 TIL 和外周血淋巴细胞中证实了新抗原特异性 T 细胞反应的存在。另一研究小组^[32]证明了包括 CRC 在内的几种类型的 MMR-p 胃肠道肿瘤转移中存在 NRT 细胞。这些数据表明, 新抗原特异性 T 细胞存在于 CRC 的原发性和转移性肿瘤中。本研究结果显示, 肿瘤突变新抗原 Glud1-V546I 在结肠癌荷瘤鼠中诱导出的 NRT 细胞能特异性杀伤表达突变抗原的肿瘤细胞, 而且比 WT 肽具有更强的细胞毒性。

最近的研究^[25, 33-35]显示, 突变肽诱导的 NRT 细胞能有效抑制黑色素瘤、胰腺癌、胸腺癌和肺癌等肿瘤的生长并延长患者的生存期。同样的, 本研究的结果显示, 负载 Glud1-V546I 肽 DC 疫苗治疗荷瘤小鼠后, 能显著抑制荷瘤鼠肿瘤的生长并延长生存期。尽管新抗原疫苗在动物肿瘤模型中获得了充满希望的效果。但在临床环境下, 新抗原疫苗的应用要求更高, 抗肿瘤效应的发挥更加复杂, 所以在临床应用前, 还需开展更多的研究, 包括免疫佐剂的选择、免疫方式的改进等。

综上所述, 本研究通过基因测序、软件预测和功能评价, 成功筛选出功能性新抗原, 在体外和体内证实了其抗原特异性的细胞毒性, 表明基于新抗原的治疗可能是 CRC 的可行治疗方法, 在实现最大治疗特异性、克服免疫耐受和最大限度地降低自身免疫风险方面具有巨大潜力。此外, 本研究也证明了肿瘤新抗原是肿瘤精准治疗和个性化免疫治疗的潜在靶点。

作者利益冲突声明: 所有作者声明此论文没有任何相关利益冲突。

[参考文献]

- [1] XIA C F, DONG X S, LI H, *et al.* Cancer statistics in China and United States, 2022: profiles, trends, and determinants[J/OL]. Chin Med J, 2022, 135(5): 584-590[2024-04-13]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8920425/>. DOI: 10.1097/CM9.0000000000002108.
- [2] ORANGIO G R. The economics of colon cancer[J]. Surg Oncol Clin N Am, 2018, 27(2): 327-347. DOI: 10.1016/j.soc.2017.11.007.
- [3] SHARIF S, O'CONNELL M J, YOTHERS G, *et al.* FOLFOX and

- FLOX regimens for the adjuvant treatment of resected stage II and III colon cancer[J/OL]. *Cancer Invest*, 2008, 26(9): 956-963[2024-04-13]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2588473/>. DOI: 10.1080/07357900802132550.
- [4] VAN LOON K, VENOOK A P. Curable patient with metastatic colorectal cancer: balancing effective therapies and toxicities[J]. *J Clin Oncol*, 2014, 32(10): 991-996. DOI: 10.1200/JCO.2013.53.5195.
- [5] LESTERHUIS W J, HAANEN J B A G, PUNT C J A. Cancer immunotherapy: revisited[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2011, 10(8): 591-600. DOI: 10.1038/nrd3500.
- [6] GODDARD E T, LINDE M H, SRIVASTAVA S, *et al*. Immune evasion of dormant disseminated tumor cells is due to their scarcity and can be overcome by Tcell immunotherapies[J/OL]. *Cancer Cell*, 2024, 42(1): 119-134.e12[2024-04-13]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10864018/>. DOI: 10.1016/j.ccell.2023.12.011.
- [7] 曹惠琳, 吴艳峰. 肿瘤治疗性 mRNA 疫苗的研究进展[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2023, 30(9): 810-816. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.09.010.
- [8] LLOSA N J, CRUISE M, TAM A, *et al*. The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints[J/OL]. *Cancer Discov*, 2015, 5(1): 43-51[2024-04-13]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4293246/>. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-14-0863.
- [9] KESKIN D B, ANANDAPPA A J, SUN J, *et al*. Neoantigen vaccine generates intratumoral T cell responses in phase I b glioblastoma trial[J/OL]. *Nature*, 2019, 565(7738): 234-239[2024-04-13]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6546179/>. DOI: 10.1038/s41586-018-0792-9.
- [10] OTT P A, HU Z T, KESKIN D B, *et al*. An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma[J/OL]. *Nature*, 2017, 547(7662): 217-221[2024-04-13]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5577644/>. DOI: 10.1038/nature22991.
- [11] TRAN E, ROBBINS P F, LU Y C, *et al*. T-cell transfer therapy targeting mutant KRAS in cancer[J/OL]. *N Engl J Med*, 2016, 375(23): 2255-2262[2024-04-13]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5178827/>. DOI: 10.1056/NEJMoa1609279.
- [12] ZHANG W, YIN Q, HUANG H D, *et al*. Personal neoantigens from patients with NSCLC induce efficient antitumor responses[J/OL]. *Front Oncol*, 2021, 11: 628456[2024-04-13]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8076796/>. DOI: 10.3389/fonc.2021.628456.
- [13] ZENG Y Y, ZHANG W, LI Z L, *et al*. Personalized neoantigen-based immunotherapy for advanced collecting duct carcinoma: case report[J/OL]. *J Immunother Cancer*, 2020, 8(1): e000217[2024-04-13]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7247377/>. DOI: 10.1136/jitc-2019-000217.
- [14] GUO L L, HUO H W. An efficient Burrows-Wheeler transform-based aligner for short read mapping[J/OL]. *Comput Biol Chem*, 2024, 110: 108050[2024-04-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38447272/>. DOI: 10.1016/j.compbiolchem.2024.108050.
- [15] LI H, DURBIN R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform[J/OL]. *Bioinformatics*, 2009, 25(14): 1754-1760[2024-04-13]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2705234/>. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp324.
- [16] GHOSH S, CHAN C K K. Analysis of RNA-seq data using TopHat and cufflinks[J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1374: 339-361. DOI: 10.1007/978-1-4939-3167-5_18.
- [17] BJERREGAARD A M, NIELSEN M, HADRUP S R, *et al*. MuPeXI: prediction of neo-epitopes from tumor sequencing data[J/OL]. *Cancer Immunol Immunother*, 2017, 66(9): 1123-1130[2024-04-13]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC11028452/>. DOI: 10.1007/s00262-017-2001-3.
- [18] KIM B, WON D, JANG M, *et al*. Next-generation sequencing with comprehensive bioinformatics analysis facilitates somatic mosaic APC gene mutation detection in patients with familial adenomatous polyposis[J/OL]. *BMC Med Genomics*, 2019, 12(1): 103[2024-04-13]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6610853/>. DOI: 10.1186/s12920-019-0553-0.
- [19] MARUZANI R, BRIERLEY L, JORGENSEN A, *et al*. Benchmarking UMI-aware and standard variant callers for low frequency ctDNA variant detection[J/OL]. *BMC Genomics*, 2024, 25(1): 827[2024-04-13]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC11370058/>. DOI: 10.1186/s12864-024-10737-w.
- [20] SUN W H, SHI J Y, WU J, *et al*. A modified HLA-A*0201-restricted CTL epitope from human oncoprotein (hPEBP4) induces more efficient antitumor responses[J/OL]. *Cell Mol Immunol*, 2018, 15(8): 768-781[2024-04-13]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6141579/>. DOI: 10.1038/cmi.2017.155.
- [21] LOWERY F J, KRISHNA S, YOSSEF R, *et al*. Molecular signatures of antitumor neoantigen-reactive T cells from metastatic human cancers[J/OL]. *Science*, 2022, 375(6583): 877-884[2024-04-13]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8996692/>. DOI: 10.1126/science.abl5447.
- [22] LIU L C, CHEN J H, ZHANG H Y, *et al*. Concurrent delivery of immune checkpoint blockade modulates T cell dynamics to enhance neoantigen vaccine-generated antitumor immunity[J/OL]. *Nat Cancer*, 2022, 3(4): 437-452[2024-04-13]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9050907/>. DOI: 10.1038/s43018-022-00352-7.
- [23] MISRA M K, MOSTAFA A, CHARRON D. Editorial: HLA in personalized medicine[J/OL]. *Front Genet*, 2024, 15: 1480936[2024-04-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39257964/>. DOI: 10.3389/fgene.2024.1480936.
- [24] PALITZSCH B, HARTMANN S, STERGIOU N, *et al*. A fully synthetic four-component antitumor vaccine consisting of a mucin glycopeptide antigen combined with three different T-helper-cell epitopes[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2014, 53(51): 14245-14249. DOI: 10.1002/anie.201406843.
- [25] LEIDNER R, SANJUAN SILVA N, HUANG H Y, *et al*. Neoantigen T-cell receptor gene therapy in pancreatic cancer[J/OL]. *N Engl J Med*, 2022, 386(22): 2112-2119[2024-04-13]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9531755/>. DOI: 10.1056/NEJMoa2119662.
- [26] 马丽华, 王静, 吕姝婕, 等. 肿瘤特异性个体化多靶点 DC-CIK 治疗晚期非小细胞肺癌的临床疗效与安全性[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2023, 30(6): 505-510. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2023.06.007.
- [27] TRAN E, TURCOTTE S, GROS A, *et al*. Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4⁺ T cells in a patient with epithelial cancer[J/OL]. *Science*, 2014, 344(6184): 641-645[2024-04-13]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6686185/>. DOI: 10.1126/science.1251102.
- [28] LEON-FERRE R A, JONAS S F, SALGADO R, *et al*. Tumor-

- infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancer[J/OL]. JAMA, 2024, 331(13): 1135-1144[2024-04-13]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10988354/>. DOI: 10.1001/jama.2024.3056.
- [29] CHEN C, LIU S M, QU R K, *et al.* Recurrent neoantigens in colorectal cancer as potential immunotherapy targets[J/OL]. Biomed Res Int, 2020, 2020: 2861240[2024-04-13]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7383341/>. DOI: 10.1155/2020/2861240.
- [30] YOSSEF R, KRISHNA S, SINDIRI S, *et al.* Phenotypic signatures of circulating neoantigen-reactive CD8⁺ T cells in patients with metastatic cancers[J/OL]. Cancer Cell, 2023, 41(12): 2154-2165.e5[2024-04-13]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10843665/>. DOI: 10.1016/j.ccell.2023.11.005.
- [31] VAN DEN BULK J, VERDEGAAL E M E, RUANO D, *et al.* Neoantigen-specific immunity in low mutation burden colorectal cancers of the consensus molecular subtype 4[J/OL]. Genome Med, 2019, 11(1): 87[2024-04-13]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6938004/>. DOI: 10.1186/s13073-019-0697-8.
- [32] PARKHURST M R, ROBBINS P F, TRAN E, *et al.* Unique neoantigens arise from somatic mutations in patients with gastrointestinal cancers [J/OL]. Cancer Discov, 2019, 9(8): 1022-1035[2024-04-13]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7138461/>. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-18-1494.
- [33] CHEN G L, KONG D X, LIN Y. Neo-antigen-reactive T cells immunotherapy for colorectal cancer: a more personalized cancer therapy approach[J/OL]. Glob Chall, 2023, 7(11): 2200186[2024-04-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37970536/>. DOI: 10.1002/gch2.202200186.
- [34] HANADA K I, ZHAO C H, GIL-HOYOS R, *et al.* A phenotypic signature that identifies neoantigen-reactive T cells in fresh human lung cancers[J/OL]. Cancer Cell, 2022, 40(5): 479-493.e6[2024-04-13]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9196205/>. DOI: 10.1016/j.ccell.2022.03.012.
- [35] KRISTENSEN N P, HEEKE C, TVINGSHOLM S A, *et al.* Neoantigen-reactive CD8⁺ T cells affect clinical outcome of adoptive cell therapy with tumor-infiltrating lymphocytes in melanoma[J/OL]. J Clin Invest, 2022, 132(2): e150535[2024-04-13]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8759789/>. DOI: 10.1172/JCI150535.

[收稿日期] 2024-04-14

[修回日期] 2024-09-25

[本文编辑] 党瑞山