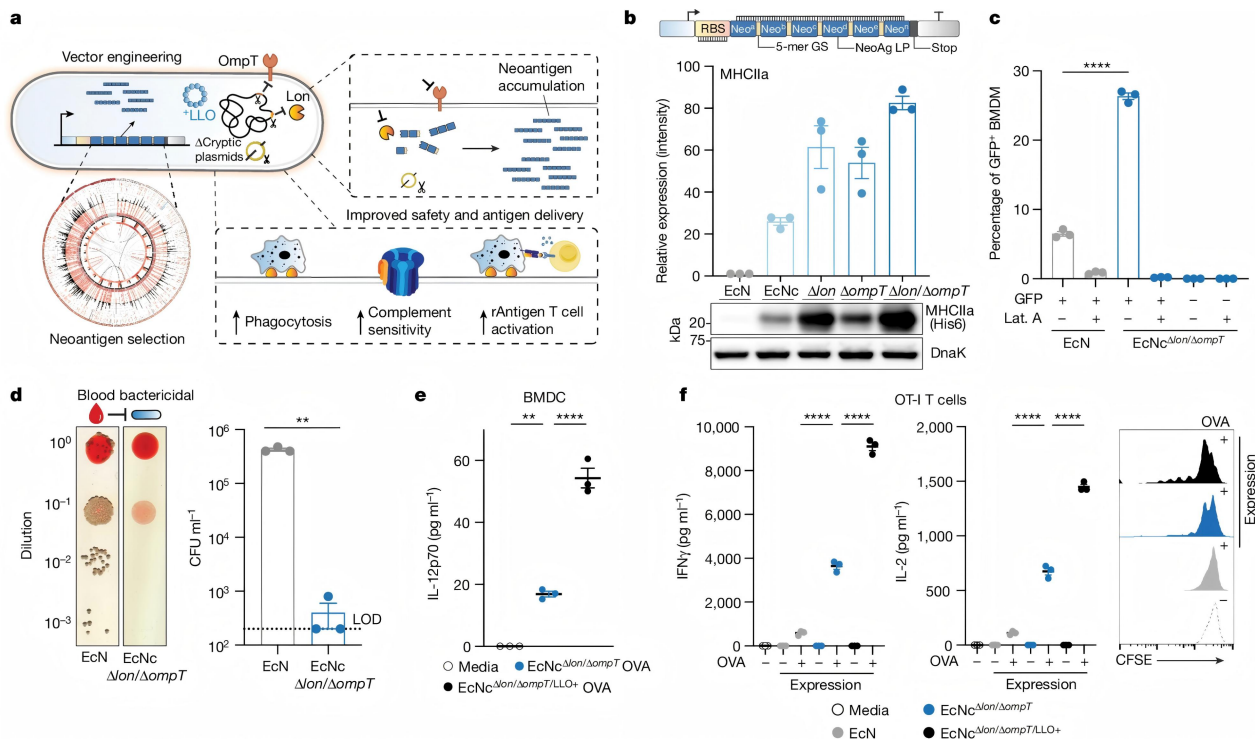


Summary

Author: xiongxin

Name of the Article: Probiotic neoantigen delivery vectors for precision cancer immunotherapy	
Journal:Nature	Year:2024
Methods and Backgrounds (Experiment Methods and Techniques.) NetMHCpan 预测算法 多抗原串联设计 CRISPR/Cas9 + λ -Red 系统 载体构建 免疫荧光显像 骨髓来源树突细胞 (BMDCs) 与巨噬细胞 (BMDMs) 共培养 CFSE 染色 流式细胞计数 肿瘤体积监测 IVIS 活体成像 HE 染色	
癌症一直是生命科学研究的热点，其中新抗原疫苗是针对癌症疫苗的一种前沿设计方案，传统抗原在抗原递送，免疫诱导和个性化构建效率方面还有挑战，这个实验就是设计了一个工程化益生菌 EcN 载体，搭载多种新抗原串联表达，通过细菌原实现个性化的癌症免疫治疗。	
What does the article mainly tell us? (<i>no more than 200 words, in English.</i>)	
<p>The article presents a novel cancer immunotherapy strategy using engineered probiotic bacteria (<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917) to deliver tumor-specific neoantigens directly within the body. By incorporating predicted neoantigen sequences and co-expressing Listeriolysin O (LLO) to enhance antigen presentation, these bacteria stimulate robust CD8⁺ and CD4⁺ T cell responses. The engineered microbes effectively colonize tumors and activate antigen-presenting cells, leading to significant tumor regression and the formation of long-term immunological memory in mouse models. Compared to traditional peptide vaccines, this method shows superior tumor control and systemic immune activation without apparent toxicity. The study demonstrates that microbial neoantigen delivery offers a flexible, safe, and potent platform for personalized cancer immunotherapy.</p>	

Figures explanation



a 图展示了工程化 *EcN* 的整体设计思路，首先针对全基因组信息进行个体化肿瘤新抗原的选择，将筛选出来的抗原构建到细菌的基因通路中，并且删除 *Lon*（与荚膜和生物膜调控相关）和 *OmpT*（与补体降解相关）这两个内源蛋白酶从而最大化抗原的想过，使用 LLO 系统递送，达到提高巨噬细胞吞噬，提升补体敏感性和促进 T 细胞活化的作用。

b 图首先展示了新抗原串联构建的基因线路，由于免疫特异性反应和抗原的剂量有关，所以作者就构建了很多个抗原，并且在抗原长段中间插入了 5 聚体甘氨酸-丝氨酸的接头，使表达量大大增加。而后是验证了构建的这个接头确实是能够增加抗原的表达，以 *DnaK* 作为内参蛋白，检测和 *MHCIIa* 的结合亲和力，展示了这个接头对于增加抗原表达的有效性。

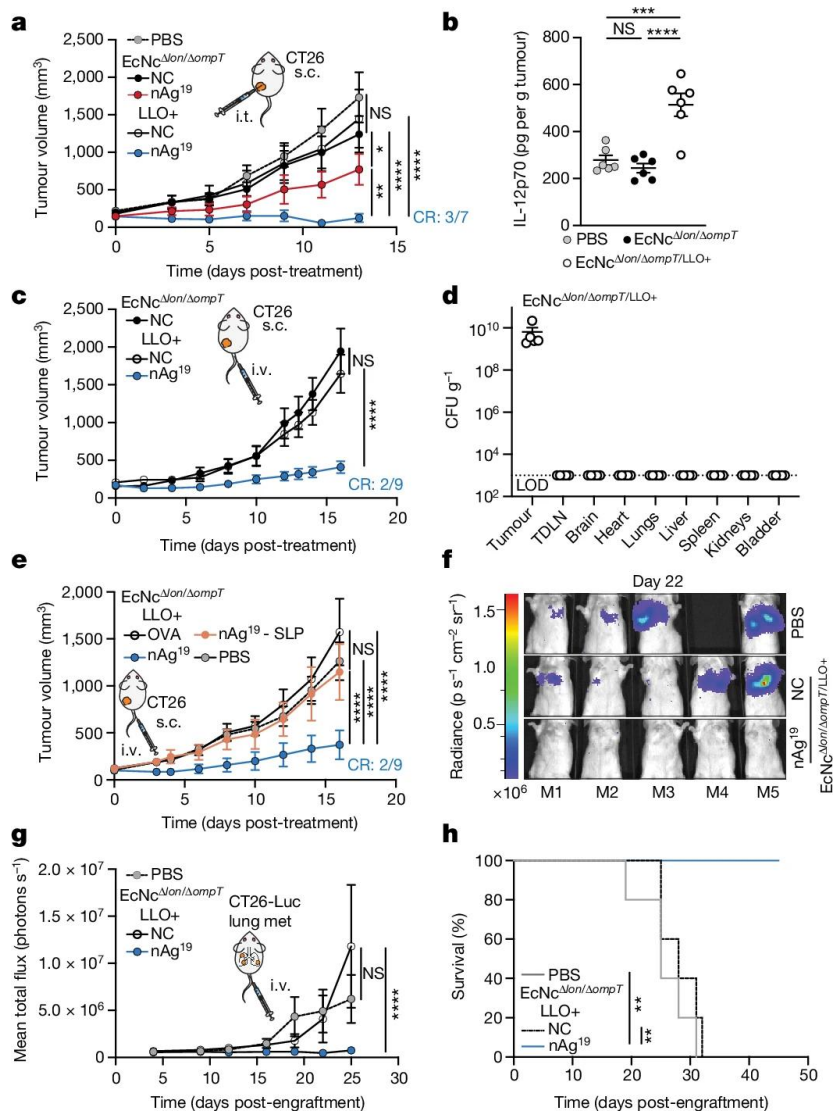
然后是验证 *lon* 和 *ompT* 的突变能够显著提高抗原的表达，与 BL21 相比较，发现敲除了隐蔽质粒的 *EcN* 能够使表达的 DNA 维持多大概 30 倍的时长。抗原的产量可以增加 80 多倍。c 图是测定了野生型 *EcN* 与 Δ *lon*/ Δ *ompT* 菌株被骨髓来源巨噬细胞（BMDM）吞噬的比例，其中 Lat.A 是抑制吞噬的药物，用来说明吞噬的发生来源于细胞主动社区，组间对照发现 *EcN* 野生型被吞噬的效果远不及突变型，同时组内对照证明了吞噬很大程度上直接来自于巨噬细胞的吞噬。

d 图是血液中细菌滴度的稀释图，左侧显示野生型细菌能够存活至 10⁶ CFU/mL，而构建的突变型几乎完全被清除，说明了其具有很高的安全性。

e 图是揭示了携带 OVA 抗原的突变型菌株使用 LLO 系统能够显著提高骨髓里的 树突状细胞分泌 IL-12 p70 这个细胞因子，见解说明使用该系统可以激活树突状细胞诱导免疫。

f 图检测了 T 细胞分泌干扰素和 IL-情况，发现表达 OVA 抗原的工程菌能显著引起 T 细胞分裂（两种细胞分泌的干扰素都增强了 2-2.5 倍）而对对照组的野生型则显著低于实验组，且未检测到细胞因子的分泌。

于是他们认为，他们成功构建了一个微生物平台，针对多种肿瘤抗原可以驱动特异性 T 细胞的激活和细胞免疫的增强。



以直肠癌作为目标模型进行进一步验证，构建了模型小鼠，

a 图在肿瘤局部进行注射工程菌，与 PBS 阴性、NC 空白载体、和工程菌体系的对照，发现工程菌显著抑制肿瘤生长。

b 图展示了肿瘤内的 IL12 p70 (前文提过的细胞因子)的水平，检测发现工程菌产生大量 IL-12

p70, 说明工程菌显著增强免疫原性, 激活抗原递呈细胞。

c 图表示在静脉注射情况与 a 相似, 验证了这个系统静脉注射的有效性。

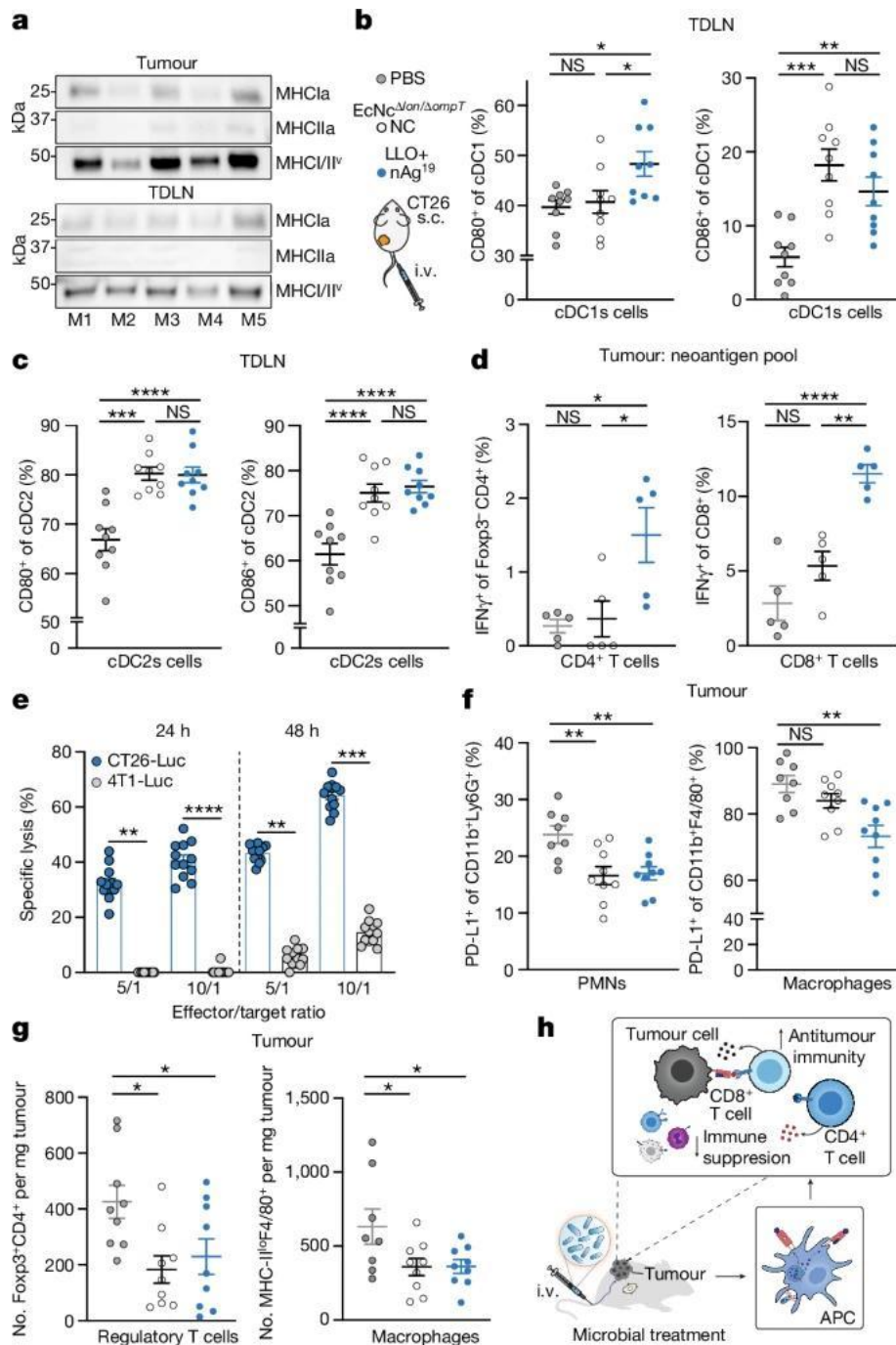
d 图展示了 EcN 菌株的安全性, 发现 EcN 天然趋化于低氧环境, 只在肿瘤中富集, 而非系统性扩散, 不会在其他部位造成伤害。

e 图将工程菌与短肽疫苗向对比, 发现工程菌对肿瘤体积减少能力更强。

f 图使用荧光素酶的 CT26, 对肿瘤进行实时活体成像, 发现工程菌可以使肿瘤完全清除或大幅抑制

g 图是将 CT26-Luc 细胞静脉注射诱导肺转移, 检测荧光总量认为工程菌消除能力不错

h 图是对生存率进行的图形可视化, 发现工程菌系统的存活率最好, 能够显著延长生存并实现长期免疫保护。



a 图对肿瘤细胞和肿瘤引流淋巴结裂解物进行 WB，主要是为了检测抗原呈递的能力和免疫启动效率，具体检测了三种蛋白 MHC I（呈递胞内抗原，激活 CD8⁺ 细胞毒性 T 细胞）MHC II（呈递外源抗原，激活 CD4⁺ 辅助 T 细胞）MHC I/II 用于显示整体 MHC I 族表达，最终得出工程菌可以增强局部免疫激活所需的 MHC 表达，启动适应性免疫。

Bc 均为流式细胞分析，分别对 TDLN 里的 cDC1 和 cDC2 检测活化状态，（共刺激分子 CD80 和 CD86 的表达比例）评估诱导的 T 细胞活化能力，发现工程菌的诱导能力很强（80/86 比值高）

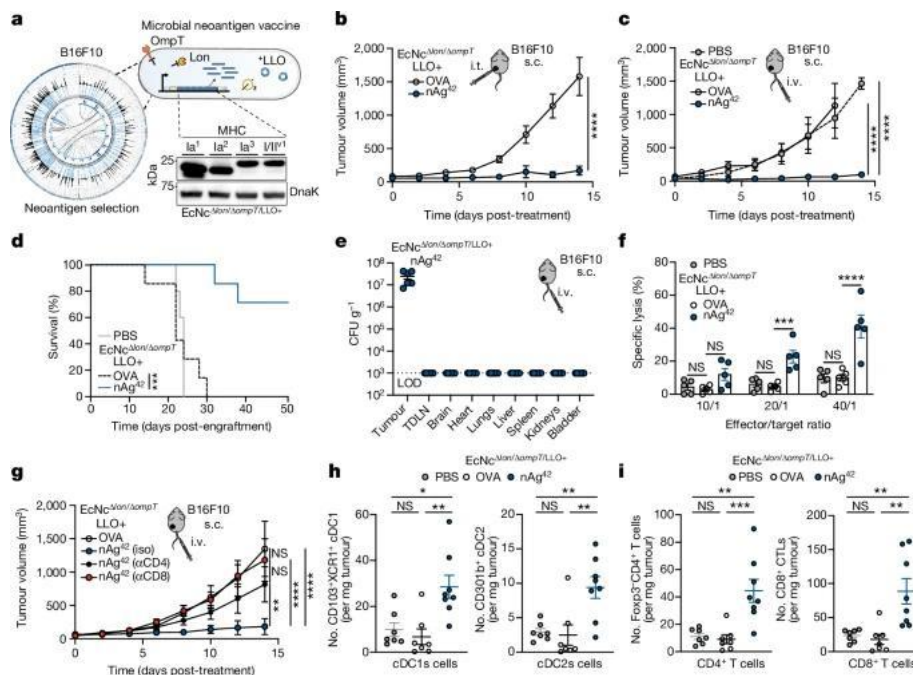
d 图对肿瘤浸润的淋巴细胞的 T 细胞功能状态进行分析，用流式分别检测调节性 T 细胞（FoxP3-CD4⁺）的比例，以及 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞中 IFN- γ 的分泌水平。nAg¹⁹ 组显著降低 Treg 比例，减少免疫抑制，同时显著提高 CD4⁺ 与 CD8⁺ T 细胞的功能性细胞因子表达，提示该治疗策略有助于逆转免疫抑制微环境并激发强效肿瘤特异性免疫应答。

e 图是将构造出来的 nAg 工程菌处理的小鼠细胞中的 TILs 单独拿出来，检测其特异性的识别杀伤能力，设置不同的效应细胞与靶细胞比例，检测 24 h 和 48 h 的杀伤率，发现 nAg 诱导出俩的 T 细胞可高效、特异性地裂解同源肿瘤细胞 CT26-Luc，而对异源肿瘤细胞 4 T1-Luc 几乎无杀伤，说明工程菌递送的新抗原可引发精准、高效的肿瘤特异性 CD8⁺ 细胞毒性反应。

f 图主要是对中性粒细胞和巨噬细胞里的 PD-L1（抑制免疫的一种抗体）表达进行检测，发现两者都有所降低，但是巨噬细胞内的降低更加显著。

g 图进一步量化了肿瘤组织中两类调节性 T 细胞（FoxP3⁺CD4⁺）和抑制型巨噬细胞（MHCII^{low}F4/80⁺）的数量，发现 nAg 治疗对对照组能够显著降低这两类细胞的数量，但是和 NC 空载体的对照并不显著。

h 图是总结了实验结果背后的机制：工程化益生菌通过肿瘤富集后被 APCs 处理与激活，增强 MHC 与共刺激分子表达，进而诱导肿瘤特异性 CD4⁺ 与 CD8⁺ T 细胞反应，并抑制免疫抑制细胞（Treg 与 MDSCs），最终推动强效的抗肿瘤免疫应答。



然后希望进一步验证这个构造出来的工程菌体系具有可改造性和特异性, 选用黑色素瘤再进行了实验

a 图是作者基于 B16 F10 黑色素瘤模型设计并构建表达个体化新抗原 EcN 工程菌的示意图, 作者用了和 CT26 一样的预测算法, 识别出来了许多 B16 F10 的特异性新抗原, 并设计了七个构建体, 每个均包含六个独特的预测新抗原, 同样敲除两个蛋白酶基因。

Bc 是分别做的局部注射和静脉注射, 发现工程菌组能够有效抑制肿瘤体积, 同时之前用于直肠癌的一组没有效果, 只有新构造的特异性的菌株 (包含独特抗原) 的才能够治疗, d 是生存曲线, 工程菌体系的小鼠生存率最高, 证明了新抗原介导的免疫应答具有持续的保护里。

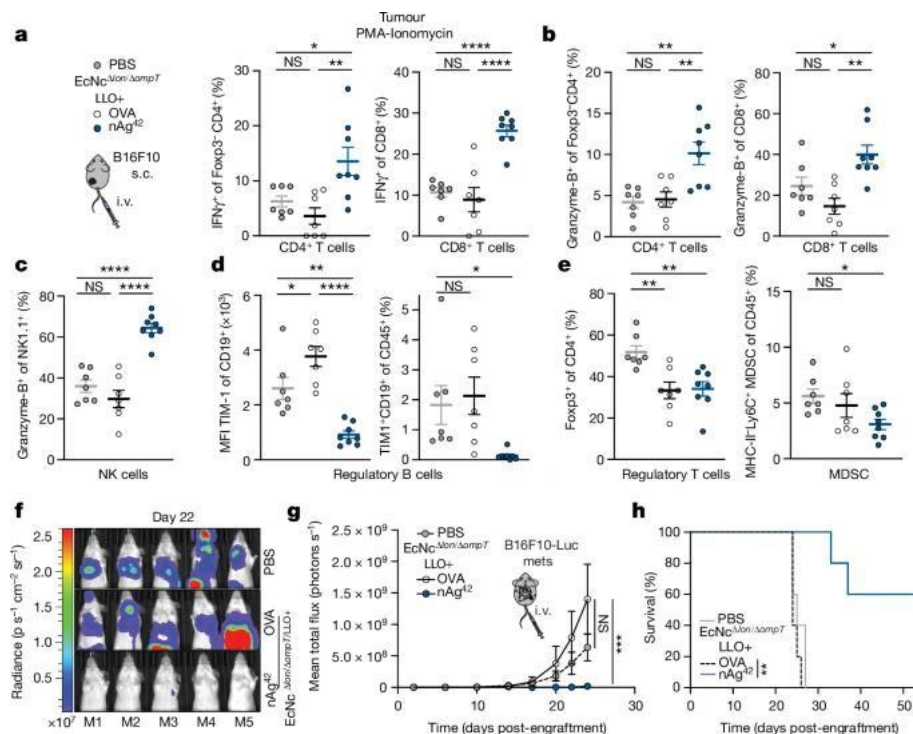
e 图是同样做的组织分布, 发现只在肿瘤体系里面表达 EcNc

f 图是体外细胞毒性实验, 将纯化的脾脏 T 细胞与 B16 F10 肿瘤细胞在体外共同培养, 同样在不同的效应细胞和靶细胞的比例下检测杀伤效率, 发下现确实是由 nAg 这个体系构造出来激活的免疫细胞对肿瘤的杀伤能力有增强。

g 图是进行具体发挥作用的 T 细胞进行检测, 通过注射抗 CD4、抗 CD8 抗体阻断特定 T 细胞, 通过肿瘤体积的变化发现 CD8⁺ 阻断后完全丧失免疫效果, 说明主要由 CD8⁺T 细胞介导; CD4⁺ 也有部分作用, 参与辅助。

h 图是对 DC 集群细胞进行检测 (cDC1 和 cDC2), 流式计数 DC 细胞的量, 发现 nAg 显著提高 cDC1 和 cDC2 数量, 说明能够显著激活 APCs。

i 图是对共刺激的 T 细胞进行检测, 同样是流式计数, 发现 nAg 组肿瘤中 T 细胞数量显著上升。



检测干扰素,

a 图左边展示了进行实验的小鼠模型以及相关的图示, 右边是评估了不同组的不同 t 细胞细胞因子的分泌, 用 PMA-Ionomycin 处理肿瘤, 发现 nAg 组显著提升 CD4⁺ 和 CD8⁺

T 细胞中的 IFN- γ 干扰素。

b 图则是检测了 T 细胞毒性（用 Granzyme B 穿孔酶指示）发现 nAg 组 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞里面的细胞毒性分子也显著高于其他组。

c 图是检测 NK 杀伤细胞里的穿孔酶，nAg 也高于其他组

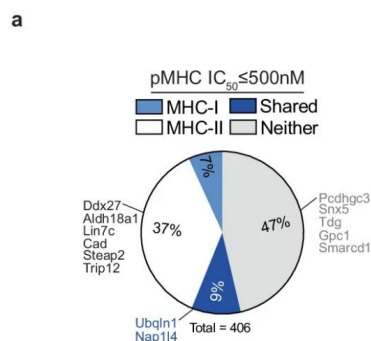
d 图是对调节 B 细胞的标志检测，用 CD19 和 CD45 的 MFI（平均荧光强度）指示细胞数量，发现对于 nAg 组调节性 B 细胞功能被抑制，说明免疫抑制的作用被缓解了。

e 图比较了调节 T 细胞核髓源性抑制细胞的数量，通过检测调节性 T 细胞中 FoxP3⁺/CD4⁺ 的比例，发现在 nAg 组中 FoxP3⁺ 的比例小，即抑制免疫反应的调节性 T 细胞少，而且 MDSC 也是显著小于对照组，说明肿瘤中免疫抑制细胞被抑制。

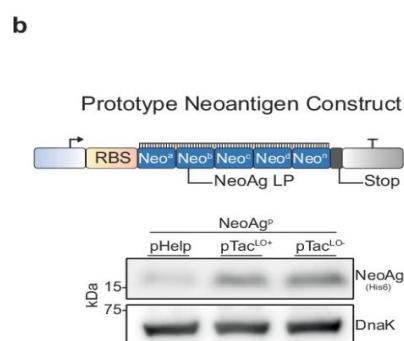
f 图同样是活体成像,显示实验组的显著效果

g 图是量化了活体的荧光信号,是同样说明了实验组对远端肿瘤的控制效果优于对照组。

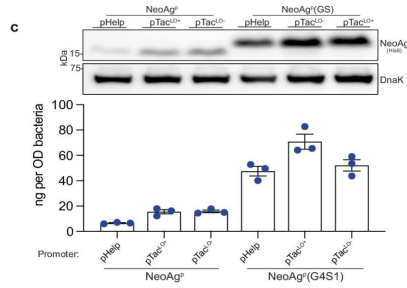
h 图是生存率的可视化,也显示出 nAg 的存活时间更长。



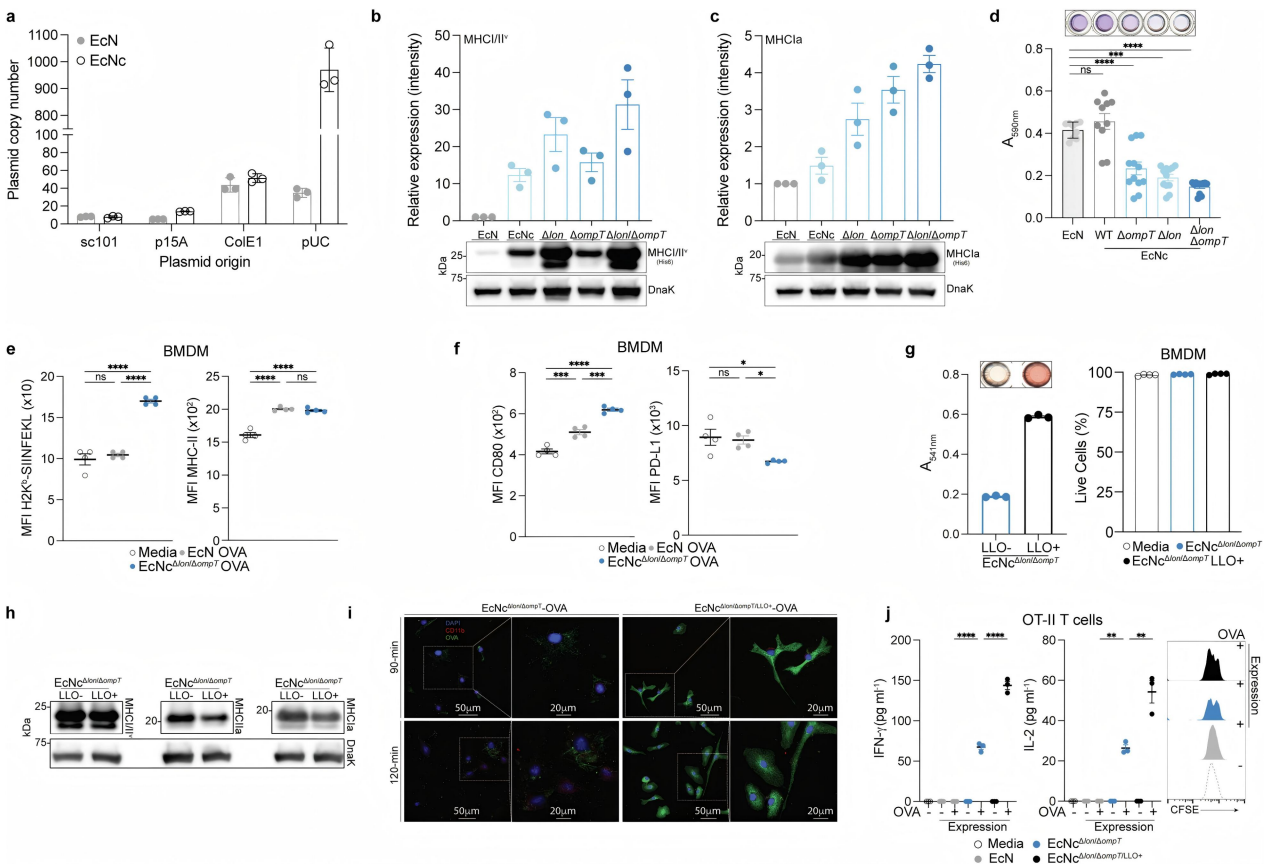
补充 1 图 a 部分展示了对 CT26 结肠癌细胞系进行的突变新抗原预测分析。研究者通过对该细胞系已知的体细胞突变进行筛选，利用 MHC-I 亲和力预测算法（NetMHCpan）对潜在的免疫原性突变肽段进行打分，并进行了聚类，用于后续工程菌的抗原表达与递送。这一部分为主文图 1 a 的构建策略提供了明确的数据基础，解释了新抗原选择的理论依据。



补充 1 图 b 部分通过凝胶电泳展示了 nAg 融合基因片段的合成与克隆结果，证实该串联序列可成功插入至 pGEN 载体并在 EcN $\Delta lon/\Delta ompT$ 中稳定表达。



补充 1 图 c 则通过 WB 进一步验证了 EcN 构建体在不同条件下对 nAg 蛋白的表达能力，使用 His 标签和 DnaK 作为检测与内参，显示在工程菌中抗原可稳定积累。



补充图 2

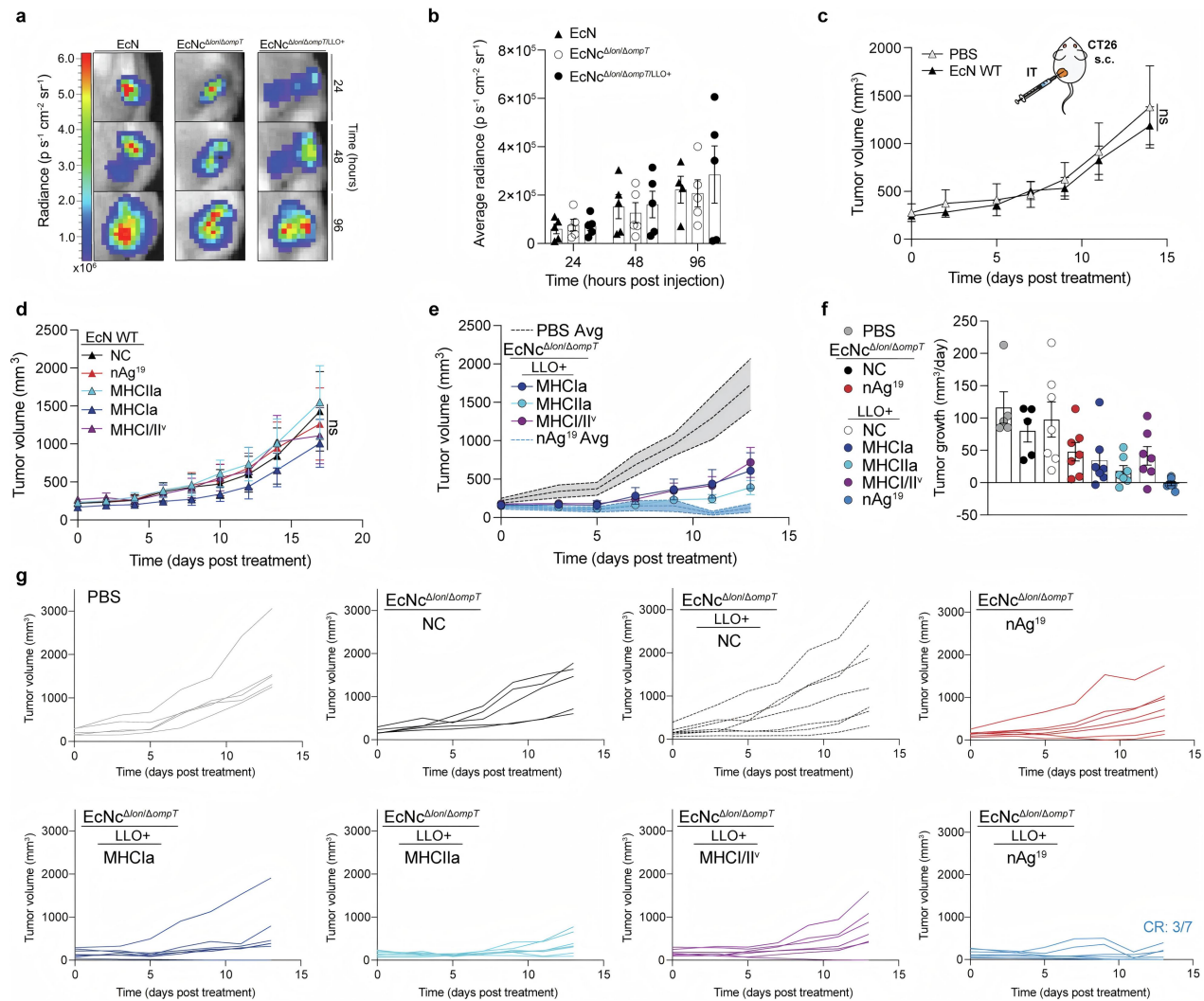
c 是构建了工程菌体系对 BMDMs 的激活能力的验证，首先是通过不同启动子两者表达量的不同，指示了抗原表达增强的一大原因，其次是通过与内参对比，发现构建体在共孵育后，能显著上调巨噬细胞表面共刺激分子 CD86 和 MHC II 的表达，促进巨噬细胞想 APC 发展，增强对 T 细胞的激活能力。

d-f 都是检测不同构造对细胞因子量的影响，结果显示工程菌那个系统诱导的细胞因子水平远高于空载体及其他对照。

g-h 部分进一步评估工程菌处理对 APC 存活性的影响，说明即使表达 LLO，EcN 并不会造成 BMDM 或 BMDC 的显著毒性

i 部分通过免疫荧光显微镜观察了 OVA 抗原在巨噬细胞中的分布，EcN $\Delta lon/\Delta ompT$ 表达 LLO 的菌株能使抗原逃逸出溶酶体进入胞质，但是不表达 LLO 时抗原被限制于体内，说明了 LLO 的功能有效性。

j 部分进一步在 BMDC 中评估 OT-I 与 OT-II T 细胞共培养后的细胞因子分泌，补充了主图 1 f 关于 CD8⁺和 CD4⁺ T 细胞协同被激活的机制。右边图主要是证明了确实是有细胞减少。



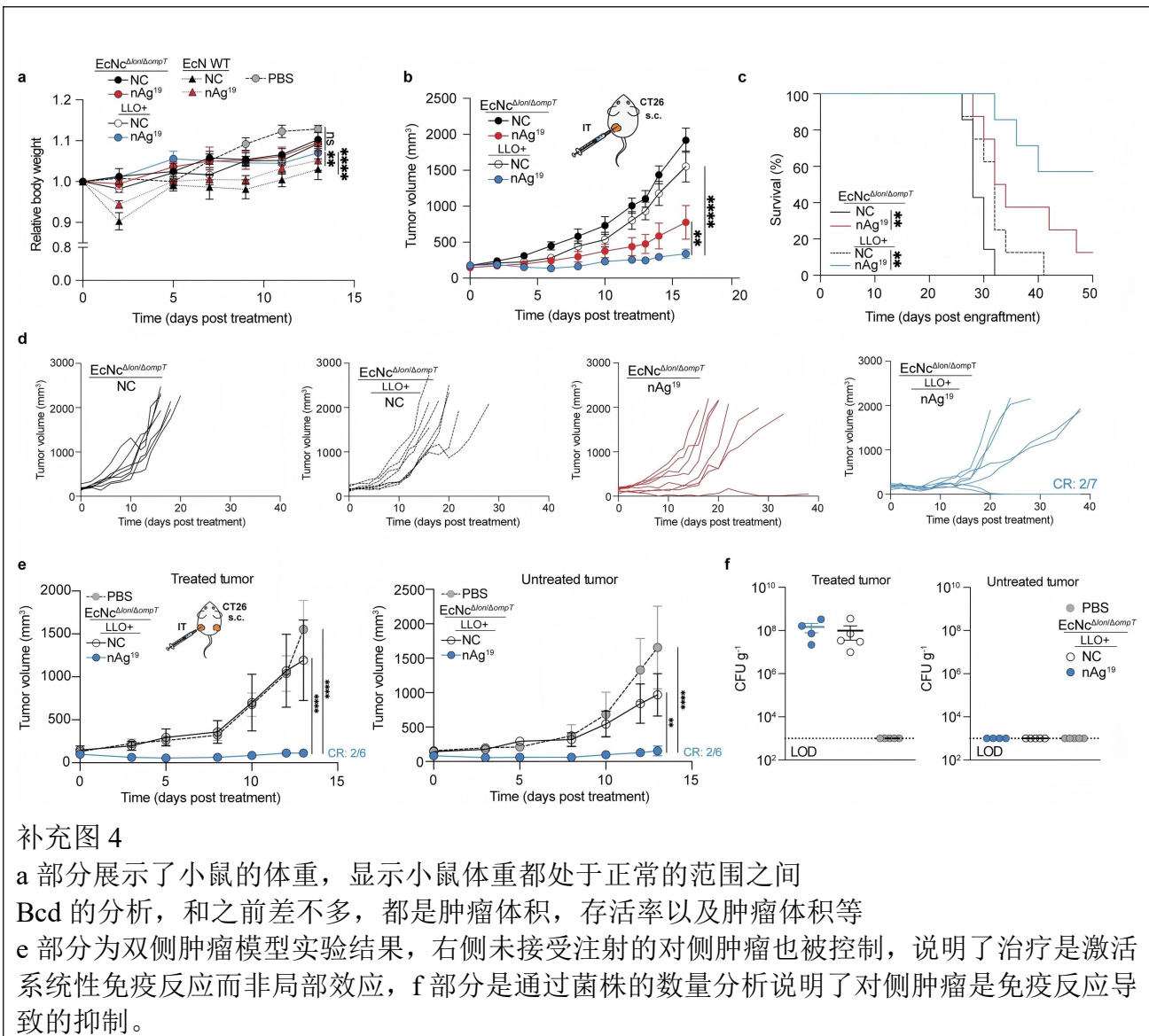
补充图 3

ab 部分主要是对之前流式的补充，通过染色显示 T 细胞的分裂情况，证明新抗原的表达是 T 细胞扩增的关键因素。

Cde 都是对不同体系下治疗无效的结果分析，通过构建多种线路发现在 15 天后肿瘤体积都会大大增大，没有出发免疫，为之前正文部分强调的抗原的精准递送和表达是触发免疫的关键提供了反向的支撑。

f 是对肿瘤增长的速率进行了一个定量，和之前的分组抑制，显示只有目标组的肿瘤速率显著下降。

g 部分是在不同组下肿瘤体积的变化，只有 nAg 组的免疫有较好的效果。

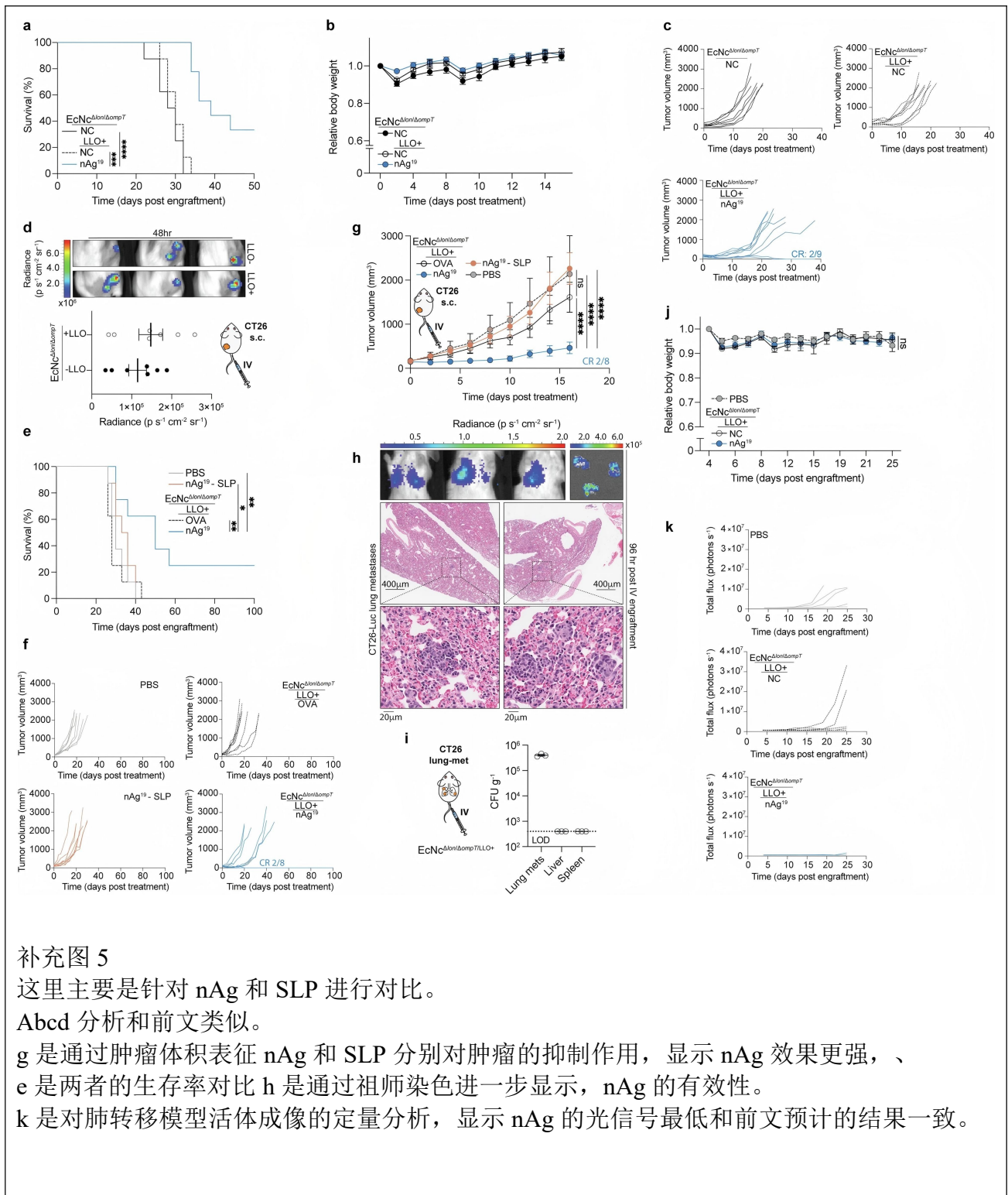


补充图 4

a 部分展示了小鼠的体重，显示小鼠体重都处于正常的范围之内

Bcd 的分析，和之前差不多，都是肿瘤体积，存活率以及肿瘤体积等

e 部分为双侧肿瘤模型实验结果，右侧未接受注射的对侧肿瘤也被控制，说明了治疗是激活系统性免疫反应而非局部效应，f 部分是通过菌株的数量分析说明了对侧肿瘤是免疫反应导致的抑制。



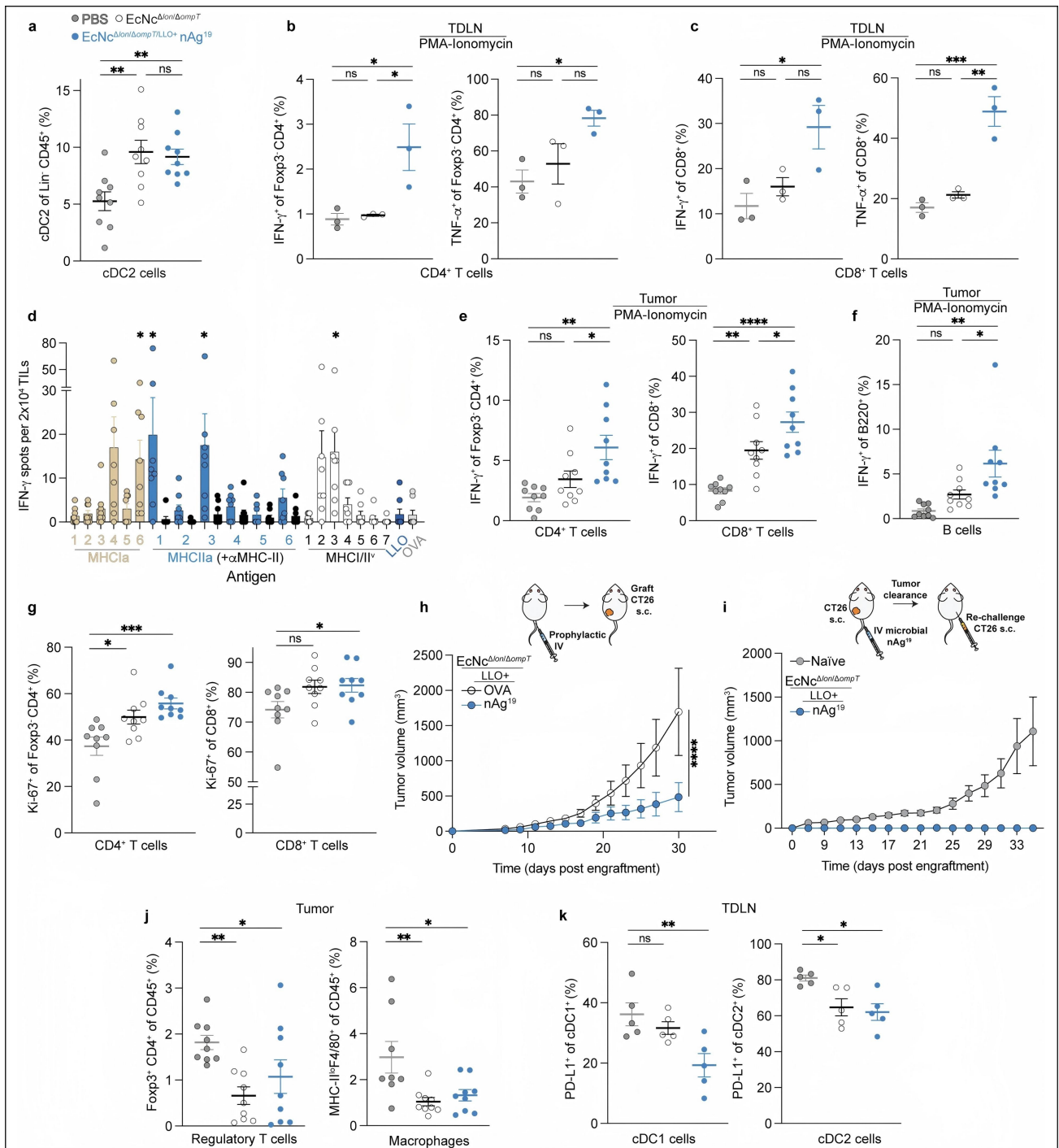
补充图 5

这里主要是针对 nAg 和 SLP 进行对比。

Abcd 分析和前文类似。

g 是通过肿瘤体积表征 nAg 和 SLP 分别对肿瘤的抑制作用，显示 nAg 效果更强、e 是两者的生存率对比 h 是通过祖师染色进一步显示，nAg 的有效性。

k 是对肺转移模型活体成像的定量分析，显示 nAg 的光信号最低和前文预计的结果一致。



补充图 7

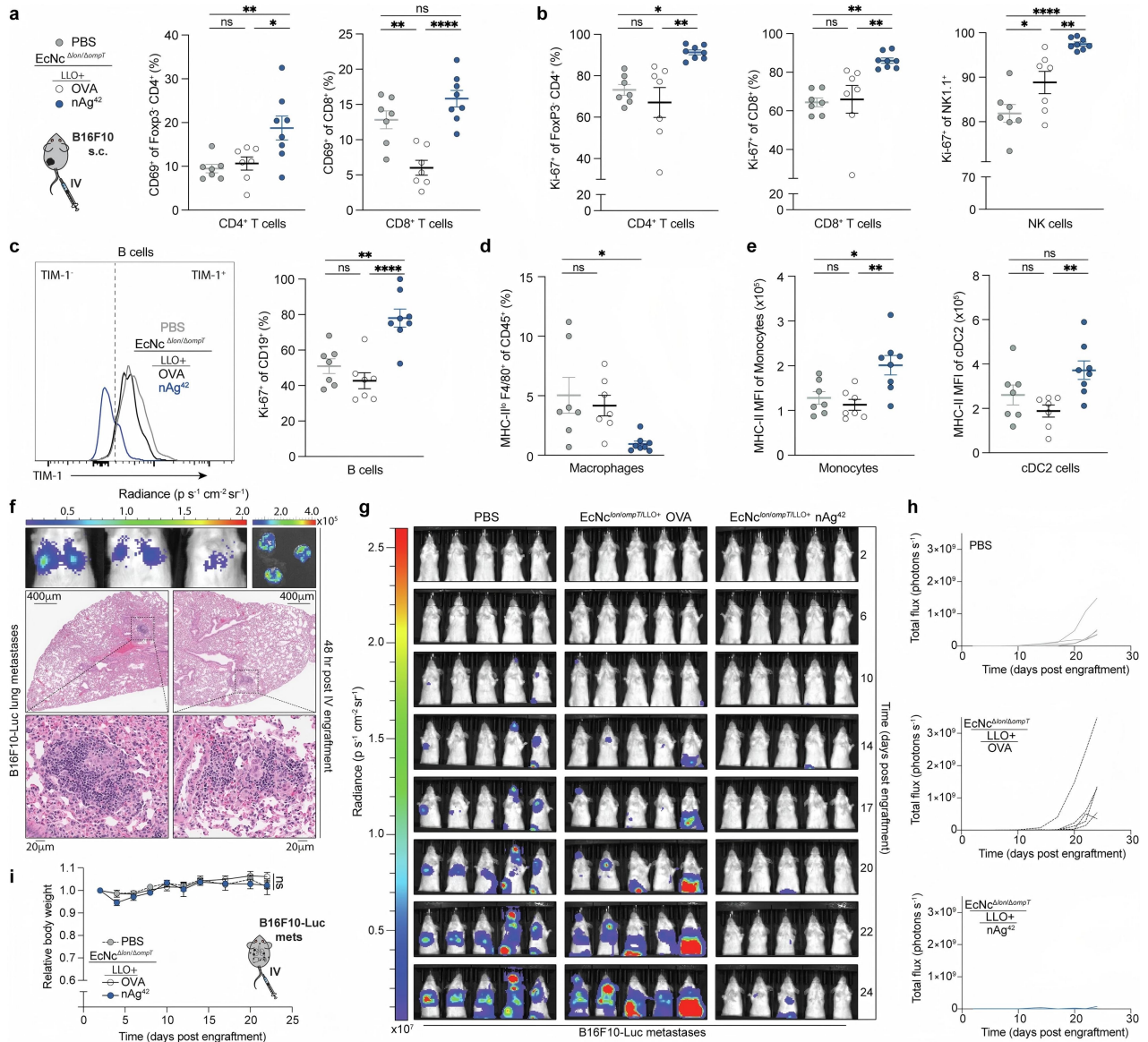
主要在 CT26 模型中进一步验证免疫激活情况。

a-g 部分显示 nAg 组可增强 cDC2 成熟、T 细胞功能因子 (IFN- γ 、TNF- α) 分泌，增强 B 细胞活性，并减少 Treg 比例

h 显示 nAg 菌株在肿瘤接种前使用具有预防性免疫保护作用

i 展示再挑战实验中，已清除肿瘤的小鼠在再次接种 CT26 后无复发，提示强免疫记忆

j-k 进一步揭示 nAg 组显著降低 Treg 和免疫抑制型巨噬细胞，同时抑制 cDC 上的 PD-L1 表达，从机制层面强化了主文中所提出的“重塑肿瘤微环境”的概念。



补充图 8

将 nAg 策略拓展至 B16 F10 黑色素瘤模型，a-e 显示 nAg 组在 B16 F10 模型中同样可诱导 CD4⁺/CD8⁺/NK 细胞活化、B 细胞增殖和抗原呈递能力增强，说明具有良好适应性
f-g 为肺转移组织病理和活体成像结果，nAg 组显著减少肺部肿瘤负荷；h 为定量发光追踪，进一步确认转移灶生长被显著抑制
i 显示 nAg 组体重稳定，安全性良好。

Personal Review (What do you learn from / think of this article.)

发 nature 工作量真的很大,这篇工作量肉眼可见的恐怖,整个文章阐释实验设计的部分很少,大部分内容都是在验证,更是说明了这个体系效果可能确实是不错的,不然不会往下做这么多设计。

这个实验验证部分做的很严密,虽然不是所有结果都非常完美(也不太可能这样),但是整个验证的思路非常完整,从抗原设计--表达--激活--杀伤,几乎所有通道都被想到并且验证了,当然其中不可避免会有些冗余的重复(比如做两种瘤里面在同一体系下只是换了抗原的情况下,再验证一遍全身的安全性不太必要,还有一些免疫细胞的验证)但是在一定程度上也算是科学的严谨性。

但是这个整篇文献比较偏向于应用与证明,这个体系具体是如何实现的以及具体各部分的效果的机制没有阐述。

这篇和之前的都体现了工程化模块化的思想,主要是通过一个模块或者是一个体系搭载设计的一些效应因子,辅助一些增强效应的模块,最终达到一个完美构建体,既具有特异性,也可以进行差异化改造。

后续可以基于这种模式,添加一些其他的感应器,调控系统,以及一些更加复杂的工程化元件,最终达到精准的调控模式。