

基于质谱的免疫肽组学在肿瘤新抗原鉴定中的研究进展

杨雨岱^{1,2}, 余利岩², 徐平^{1,2}, 张振鹏¹

(1. 医学蛋白质组学国家重点实验室, 国家蛋白质科学中心(北京), 中国医学科学院蛋白组学与新药研发研究单元, 军事科学院军事医学研究院, 北京 102206; 2. 中国医学科学院 & 北京协和医学院, 医药生物技术研究所, 北京 100050)

摘要: 肿瘤新抗原是精准免疫治疗的关键靶点, 其肿瘤特异性与免疫原性决定了临床转化潜力。作为唯一能够直接、无偏解析体内主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)呈递肽的技术, 基于质谱的免疫肽组学为肿瘤新抗原的发现提供了证据链。近年来, 得益于质谱仪灵敏度的提升、离子迁移等技术的整合, 免疫肽组学实现了覆盖度与定量稳定性的显著提升, 推动了候选新抗原的高通量发现与优选, 为挖掘肿瘤新抗原提供了技术支撑。本文围绕“质谱免疫肽组学鉴定肿瘤新抗原的技术体系”, 系统综述样本制备与免疫肽富集、质谱检测、数据库搜索等关键环节的研究进展与技术瓶颈, 讨论其在融合基因组和转录组信息的免疫肽解析中的应用潜力, 并展望免疫肽组学作为关键上游技术在精准免疫治疗与个体化疫苗研发中的发展方向。

关键词: 免疫肽组学; 质谱检测; 数据库构建; 新抗原筛选; 多组学整合

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2026)03-0349-12

DOI: 10.7538/zpxb.2025.0148

CSTR: 32365.14.zpxb.2025.0148

Research Progress in the Identification of Tumor Neoantigens Based on Mass Spectrometry-based Immunopeptidomics

YANG Yu-dai^{1,2}, YU Li-yan², XU Ping^{1,2}, ZHANG Zhen-peng¹

(1. State Key Laboratory of Medical Proteomics, National Center for Protein Sciences (Beijing), Research Unit of Proteomics & Research and Development of New Drug of Chinese Academy of Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 102206, China; 2. Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: Tumor neoantigens, arising from tumor-specific genetic and post-transcriptional alterations, represent highly attractive targets for precision cancer immunotherapy due to their strict tumor specificity and low risk of off-target toxicity. Accurate identification of neoantigens presented on major histocompatibility complex (MHC) molecules remains a central challenge, as most candidate neoantigens predicted from genomic or transcriptomic data are not ultimately processed and presented on the cell surface. Mass spectrometry (MS)-based immunopeptidomics is currently the only experimental approach capable of directly and unbiasedly identifying naturally presented MHC-bound peptides, thereby providing critical evidence for validating tumor neoantigens at the protein functional level. Over the past decade, substantial advances in MS instrumentation, ion mobility

separation, and data acquisition strategies have markedly improved the depth, sensitivity, and quantitative robustness of immunopeptidomic analysis. These developments have enabled systematic characterization of tumor antigen landscapes from increasingly limited biological material and have accelerated the transition of neoantigen discovery from computational prediction to experimental verification. In this review, the current methodological framework of MS-based immunopeptidomics for tumor neoantigen identification was comprehensively summarized, with an emphasis on key technical steps, recent innovations, and remaining challenges. The immunopeptidome sample preparation strategies were first discussed, focusing on mild acid elution and immunoaffinity purification. While mild acid elution offers simplicity and scalability, its limited specificity and susceptibility to contaminating peptides restrict its application, particularly for complex tissue samples. Immunoaffinity purification using anti-MHC antibodies remains the gold standard due to its high specificity and ability to capture native MHC-peptide complexes, although issues related to sample loss, throughput, and reproducibility persist. Emerging microfluidic and automated platforms have shown promise in addressing these limitations and enabling high-sensitivity analysis of scarce clinical specimens. Next, recent progress in mass spectrometric detection technologies that are tailored for immunopeptidomics was reviewed. Chemical derivatization and isobaric labeling strategies have been developed to enhance peptide ionization efficiency, chromatographic performance, and quantitative accuracy. Advances in MS design, including ion trapping, high-duty-cycle detection, and ion mobility separation (IMS), have substantially improved the detectability of low-abundance immunopeptides. Modern platforms integrating ion mobility with rapid fragmentation schemes now support high-coverage immunopeptidome profiling at low cellular inputs, thereby expanding the applicability of immunopeptidomics to clinically relevant samples. The data acquisition and analysis strategies were further examined, highlighting the complementary roles of data-dependent acquisition (DDA), data-independent acquisition (DIA), and targeted mass spectrometry. DDA remains indispensable for high-confidence peptide identification and spectral library construction, whereas DIA offers improved reproducibility and quantitative consistency. Hybrid workflows combining DDA-derived spectral libraries with DIA analysis currently represent the most reliable approach for large-scale immunopeptidomic studies. Targeted mass spectrometry techniques, supported by isotopically labeled standards, enable absolute quantification and validation of selected neoantigens, providing a critical bridge to translational and clinical applications. Finally, the database construction strategies for neoantigen discovery were summarized, including mutation-derived databases, non-canonical translation databases, and post-translational modification-specific databases. Integration of multi-omics data has greatly expanded the identifiable antigen repertoire beyond conventional coding mutations, revealing neoantigens originating from RNA editing, alternative translation events, and modified peptides. Despite these advances, challenges remain in database size control, false discovery rate (FDR) management, and functional immunogenicity validation. In conclusion, MS-based immunopeptidomics has evolved into a central technology for experimentally grounded tumor neoantigen discovery. Continued progress in instrumentation, computational analysis, and standardized workflows is expected to further enhance sensitivity, reproducibility, and clinical feasibility. Coupled with artificial intelligence-driven data interpretation and integrative multi-omics approaches, immunopeptidomics is poised to play an increasingly important role in precision immunotherapy and personalized cancer vaccine development.

Key words: immunopeptidomics; mass spectrometry detection; database construction; neoantigen identification; multi-omics integration

癌症已成为全球范围内威胁人类健康的重大公共卫生问题。传统的手术、放疗和化疗手段虽能在一定程度上控制肿瘤进展,但由于肿瘤的高度异质性及对正常组织的非特异性损伤,疗效和安全性仍受显著限制。而免疫治疗通过激活机体自身免疫系统识别并清除肿瘤细胞,为癌症治疗开辟了新路径,其中,肿瘤抗原的精准识别是实现免疫治疗特异性和持久疗效的关键。

肿瘤新抗原由体细胞基因突变、基因重排或异常翻译事件产生,仅在肿瘤细胞中表达并由主要组织相容性复合体(MHC)呈递至细胞表面,可被T细胞识别并诱导特异性免疫应答,从而有效避免对正常组织的攻击,显著降低免疫相关不良反应。肿瘤新抗原兼具肿瘤特异性与免疫原性,因此被认为是精准免疫治疗的理想靶点。

然而,肿瘤新抗原的发现面临诸多挑战,肿瘤基因突变的高度异质性导致潜在抗原谱极为复杂;同时,在免疫肽组中的丰度通常极低,使得传统基因组或转录组预测方法难以验证其真实呈递状态。基于质谱的免疫肽组学技术通过对肿瘤组织或细胞中MHC呈递肽段的富集、分离与高分辨质谱检测,实现对天然免疫肽的直接鉴定,其整体技术流程包括样本裂解、MHC-肽复合物富集、肽段分离、液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)分析及数据库检索等关键步骤。随着质谱仪灵敏度、分辨率及数据采集模式的持续优化,并结合多组学整合分析,该技术正不断推动新抗原研究从预测走向实证。

本文将系统综述基于质谱的免疫肽组学在肿瘤新抗原鉴定领域的研究进展,重点分析样本制备、质谱检测、数据采集及数据库构建等关键技术环节的创新与挑战,并展望其在肿瘤免疫治疗与精准医学中的应用前景。

1 免疫肽组样本制备

1.1 免疫肽的理论丰度与检测局限

理论上,每个有核细胞表面约表达 $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 个MHC-I分子^[1],鉴于每种MHC等位基因可呈递数千至上万种不同肽段,理论上单个细胞可同时展示约 $10^4 \sim 10^5$ 种独特免疫肽^[2-3]。然而,这一庞大而复杂的理论免疫肽库在实际质谱分析中仅能被部分解析。由于个体MHC分子与

其结合肽的丰度分布极不均衡,特定肽段在单细胞中的拷贝数通常处于极低水平。以百万级细胞样本为例,若某肽段在单细胞中平均仅有几十至百个拷贝数,其总体丰度仍可能低于质谱检测限,极易被掩盖在复杂的背景信号中^[4]。因此,样本制备的纯度、富集效率及整体回收率直接决定了免疫肽组检测的深度与可靠性。在肿瘤细胞中,这一问题尤为突出,MHC分子的表达常因免疫逃逸机制而被下调,抗原加工通路也可能发生突变或功能障碍,导致可被呈递的免疫肽数量明显减少^[5-6]。此外,由于肿瘤组织样本的异质性及有限量采样,肿瘤免疫肽组的检测灵敏度与覆盖度受到显著制约。如果想在有限样本中获取尽可能全面、真实的免疫肽谱,就必须最大限度地降低富集过程中的非特异性结合与物理损失。因此,免疫肽组样本制备的关键是在高特异性富集与低损失回收之间取得平衡。

1.2 弱酸洗脱

1987年,Sugawara等^[7]首次利用酸性柠檬酸缓冲液处理细胞,发现可特异性消除表面MHC-I分子抗原性,为弱酸洗脱(mild acid elution, MAE)技术的出现奠定了基础。MAE技术源于对MHC与肽相互作用的早期研究,其核心原理是利用低pH值环境破坏MHC与肽的非共价结合,实现从细胞表面洗脱目标肽段。该技术具有操作简便、成本低、无需依赖特异性抗体等优点,可在不裂解细胞的前提下获取表面MHC结合肽,从而有效避免细胞内蛋白降解产生的非特异性肽污染。如,Fortier等^[8]利用MAE从活细胞中洗脱MHC-I类肽,能够从约 1×10^8 个活细胞中获得约2 000~4 000条可鉴定的肽段,同时避免了因使用洗涤剂导致的低亲和力肽丢失。此外,MAE在悬浮细胞样本处理中表现优异,可实现规模化样本的快速处理。

然而,该方法存在诸多缺陷,MAE易导致大量非免疫肽类污染物。Lanoix等^[9]报道,MAE提取物中MHC-I类肽的相对比例约为30%~40%,还包含相当一部分其他污染肽。Mao等^[10]提到,MAE可能会非特异性地释放表面肽或膜蛋白质,增大结果偏差。此外,MAE方法对样本类型要求苛刻,不适用于实质组织样本,对冷冻细胞的处理效果不佳,且可能导致部分低亲和力肽丢失,影响对免疫肽组全貌的准确呈现。

1.3 免疫亲和纯化

免疫亲和纯化 (immunoaffinity purification, IP) 技术起源于 Campbell 等^[11]于 1951 年提出的固相免疫吸附概念, 该团队通过将蛋白抗原固定在不溶性载体上, 实现了抗体的特异性结合与分离。这一策略成为免疫层析与抗原-抗体分离技术的理论起点。随后, 研究者将其应用于免疫肽组学, 通过特异性抗体富集 MHC-肽复合物, 开发出解析 MHC 配体特征、建立肽结合基序与构建 MHC 配体数据库的关键手段^[12-13]。免疫沉淀 (IP) 是当前免疫肽组样本制备的主流技术, 利用抗 MHC 抗体的特异性识别能力, 从复杂样本中富集 MHC-肽复合物, 并经酸洗脱使肽段与 MHC 分离, 进而获得目标肽段。该方法可直接捕获天然存在的免疫肽, 真实反映体内抗原呈递状态, 为解析免疫识别机制提供了实验基础。

目前, 该技术已被广泛用于系统研究不同 MHC 等位基因的肽结合谱, 揭示抗原呈递的多样性规律, 为肿瘤免疫相关抗原及新抗原筛选提供了高置信度支持^[12]。与 MAE 相比, IP 依赖抗体与 MHC 的高特异性结合, 能够从细胞、组织等复杂样本中选择性地富集 MHC 结合肽, 显著降低非特异性肽段干扰, 所得样本纯度远高于 MAE, 二者的性能对比情况列于表 1。然而, IP 技术亦存在局限性。如, 流程复杂, 包括细胞裂解、抗体孵育和多步洗涤等步骤, 实验周期长且易造成样本损失; 另外, 回收率受抗体亲和力、裂解效率及操作条件的影响, 不同实验批次间的波动可达 20%~30%, 难以实现 MHC 配体的动态监测或连续提取, 尤其在微量样本和高通量研究中的应用受限^[13]。

表 1 MAE 与 IP 技术在免疫肽组学样本制备中的性能比较

Table 1 Comparison of the performance of MAE and IP techniques in immunopeptidomics sample preparation

参数 Parameter	弱酸洗脱 MAE	免疫沉淀 IP
样本类型	均匀细胞样本	细胞、复杂组织样本
富集特异性	较低	高
操作复杂度	简单	复杂
样本量要求	较大	较小
适用范围	快速初筛, 适合中等规模实验	高精度分析, 适合临床与高精度研究

为克服这些限制, 研究人员尝试通过自动化与微型化技术提升 IP 的稳定性与效率。Feola 等^[14]开发的 PeptiCHIP 微流控平台在芯片表面固定抗 MHC 抗体, 实现免疫纯化的微量化与高效化, 显著降低了抗体用量并缩短操作时间。Stutzmann 等^[15]设计的 CHIP-IP 系统在芯片内集成流体控制模块, 实现样本自动化加载与洗脱, 有效减少了人工转移导致的损失, 使检测灵敏度提高约 3 倍。这些基于微流控的新平台为临床有限样本及高通量免疫肽组研究提供了可行路径。

2 质谱检测技术优化

2.1 肽段化学修饰与标记

免疫肽的低丰度与非酶切特性导致其在质谱检测中的鉴定率较低。针对这一问题, 研究者通过化学修饰与化学标记技术改善肽段的色谱分离性能、电离效率及定量准确性, 从而提升免疫肽检测的灵敏度与覆盖度。

在化学修饰策略中, 二甲基化主要作用于肽段 N 末端及含胺氨基酸残基。该方法通过增加肽段疏水性改善反向色谱分离效果, 使保留时间延长、峰形更对称, 从而显著提升质谱分辨率^[16]。但二甲基化对肽段碎片化模式影响有限, 难以提高序列覆盖度, 因此常与其他修饰技术联用以增强鉴定效率^[16-17]。烷基酰胺化主要修饰肽段的酸性氨基酸及羧基端^[16-17], 在质谱碎裂过程中, 该修饰可诱导产生更多 y 离子, 提高肽段序列覆盖度与数据库匹配准确性, 同时增强电离效率, 使检测灵敏度提升 2~5 倍。需要注意的是, 试剂浓度对反应效果影响显著, 如二甲基氨基丙胺控制在 10~20 mmol/L 范围内, 浓度过大会引起非特异性修饰, 从而降低结果的可信度^[16-17]。

与化学修饰不同, 化学标记技术旨在引入可定量的报告基团, 以实现多样本的对比。串联质谱标签 (tandem mass tag, TMT) 是目前免疫肽定量研究中最常用的标记策略^[18]。该策略可实现最多 35 个样本的并行分析, 结合同步前体选择-MS³ 模式可提升低丰度肽的检测灵敏度, 能够在单次实验中获得高置信度的相对定量结果。更重要的是, TMT 标记可同时关联免疫肽组与蛋白质组数据, 揭示免疫肽来源及形成机制^[18]。但其对不含赖氨酸的肽段定量灵敏度较低, 且存在

同位素干扰问题,需通过优化色谱条件和碎裂能量进行控制。

在实际应用中,二甲基化与烷基酰胺化联用可实现优势互补,显著提高免疫肽的鉴定数量与质量;TMT标记技术则在免疫肽动态变化研究及临床多组学整合分析中展现出独特优势,为免疫肽定量研究提供了重要的技术支撑。

2.2 质谱检测技术

质谱检测技术以高灵敏度、高特异性和精确定量能力,成为解析免疫肽特征及挖掘肿瘤新抗原的核心手段。与传统蛋白质组学相比,该技术可直接检测体内天然非酶切免疫肽,显著提高低丰度肽段的检出率。

新型离子聚积释放技术在提升检测灵敏度方面展现出潜力。以ZenoTOF技术为例,在传统QTOF体系基础上集成了Zeno阱模块,可在TOF检测前暂存并同步释放离子,使离子利用率由传统的10%~20%提升至90%以上^[19]。最新一代ZenoTOF质谱对肽分子实现了飞摩尔级灵敏度,线性动态范围达5个数量级。Dorvash等^[20]在ZenoTOF 7600系统上整合了ZenoSWATH DIA采集模式,在低至 10^6 个Panc1细胞(相当于约1 mg组织)的输入量下,鉴定到720~940条肽段,经干扰素 γ (IFN- γ)处理后,检测数量进一步增加至3 070~6 540条。

此外,离子迁移分离(ion mobility separation, IMS)技术的应用也是提升质谱检测灵敏度的关键。该技术在质谱检测前对离子进行预分离,有效降低了肽段的共流出干扰,使低丰度肽离子在“干净背景”中完成检测,从而提高信噪比。Bruker公司的timsTOF系列质谱仪通过tims阱结合平行累积-串行碎裂(parallel accumulation-serial fragmentation, PASEF),实现了沿IMS阱的多维同步释放,既提升了低丰度肽的检测灵敏度,又支持高密度 MS^2 扫描,使低输入量样本也能获得高 MS^2 覆盖。其中,timsTOF Ultra能够在单细胞灵敏度(0.125 ng)下鉴定5 000多种蛋白质和55 000条多肽,且拥有高置信度。Phulphagar等^[21]利用timsTOF SCP平台并优化PASEF参数,仅需 10^6 个A375细胞即可鉴定800余种MHC-I肽,单次分析可覆盖15 000条独特肽段,检测效率较Exploris+FAIMS系统提升4倍。Thermo公司最新推出的Orbitrap Astral系统在此

基础上进一步整合了多项创新技术,其“双场”设计将传统Orbitrap分析器与采集速率高达200 Hz的Astral分析器协同运行,兼顾高分辨率与高速扫描;同时,在离子路由多极杆中蓄积离子形成紧密离子包,提高了进入分析器的离子利用率,从而在低输入量样本下仍能获取大量 MS^2 事件;在蛋白质组学表现方面,能够从250 pg HeLa细胞蛋白酶切产物中鉴定出超过6 500种蛋白质。结合FAIMS Pro Duo接口,Orbitrap Astral可在低至 10^5 个细胞的投入量下鉴定出超过5 000条肽段,显著提升了低丰度免疫肽的检测能力和肽组覆盖深度^[22]。

质谱检测技术的更新迭代将免疫肽组学推向了“低样本量-高覆盖度”的新阶段,对低丰度肽的检出显著增强,为发现临床微量样本的新抗原提供了可行路径。

3 数据采集与分析策略

3.1 数据依赖采集

与传统蛋白质组学不同,免疫肽来源于细胞内MHC分子呈递的天然非酶切肽,其长度、修饰类型及裂解位点呈高度多样化,缺乏可预测的酶切特征,导致数据库搜索匹配效率较低、假阳性率较高。因此,数据采集策略直接影响免疫肽组分析的深度与准确性。数据依赖采集(DDA)通过在 MS^1 全扫描中实时选取强度最高的前若干母离子并触发 MS^2 碎裂,从而获得高质量碎片谱用于肽段序列解析,凭借其可获得高置信度、高分辨率的单肽碎片谱,在免疫肽研究中具有不可替代的作用。1992年,Hunt等^[23]首次利用DDA鉴定MHC-A2.1结合肽,揭示了MHC呈递肽的序列特征,奠定了免疫肽组学研究的技术基础。随后,随着高分辨率质谱的发展,DDA在单次分析中可鉴定数百至上万条MHC相关肽段^[21],广泛用于抗原呈递与免疫识别研究。

近年来,DDA技术在采集策略与算法层面均得到改进。Gomez-Zepeda等^[24]通过延长捕集离子淌度质谱(trapped ion mobility spectrometry, TIMS)梯度时间并调整 MS^2 帧数,使数据采集完整性提升5.4%,结合 MS^2 谱图预测与重评分算法,肽段鉴定率进一步提升30%~40%,利用 10^6 个JY人B淋巴瘤母细胞系(JY human B lymphoblastoid cell line)即可鉴定5 738个MHC结

合肽,有效改善了短肽与非典型谱图的匹配准确性。碎裂方式的改进同样提升了 DDA 的检测深度。Caron 等^[25]引入电子转移/高能碰撞解离 (electron-transfer/higher-energy collision dissociation, EThcD) 模式,可同时生成 b/y 与 c/z 系列离子,使 MHC-I 肽 MS² 匹配可信度由 10% 提升至 39%,显著增强了 DDA 对非典型肽段的鉴定能力。Shapiro 等^[26]结合临床需求,进一步设计出 NeoDiscMS 工作流程,将二代测序技术 (next generation sequencing, NGS) 实时生成的个体化突变数据库直接整合至质谱采集过程,实现了实时搜索驱动的 DDA 采集,动态优先选择潜在突变肽进行碎裂分析,使突变肽鉴定数量提升了 3~5 倍,并将分析周期缩短至 24 h 以内。

DDA 技术参数的一系列优化提升了免疫肽的检出能力,然而,获得高置信度的肽序列仍需通过手动或半自动验证 DDA 谱图,基于此构建的高质量特异性谱库也可为后续训练数据非依赖采集搜索算法奠定基础。

3.2 数据非依赖采集

数据非依赖采集 (DIA) 技术因具有高通量和良好重复性在免疫肽组学中受到关注,但其涉及 MS² 谱图,增加了肽段序列解析的不确定性。天然非酶切免疫肽序列复杂、不可预测,使得直接基于 DIA 进行高置信度鉴定面临困难。

目前,较为成熟的解决方案是采用 DDA 辅助的质谱库-DIA 策略,即先通过 DDA 获得高可信度免疫肽鉴定结果并构建质谱库,再用于 DIA 数据的匹配与定量。Dorvash 等^[20]利用高 pH 值反相色谱对提取的 MHC 结合肽混合物进行预分离,并结合 DDA 模式分析各馏分,构建了一个超过 23 000 条独特肽段的高质量定制质谱库,基于该质谱库开展的 DIA 分析共检测到约 8 571 条免疫肽,比传统 DDA 提升了 26%。Pak 等^[27]建立了 BigLib 多 MHC 整合谱库,整合 40 个样本,覆盖 61 种 MHC 等位基因,使 DIA 鉴定率较样本特异谱库提升约 2 倍、较 DDA 提升约 3 倍,其中 92%~96% 的肽段为真实 MHC 结合肽。进一步再利用 BigLib 作为参考,采用 Prosit 预测高能碰撞诱导解离谱和保留时间标准化指数,生成预测谱库,在识别 39 种肿瘤相关抗原及 2 条非经典免疫肽时,准确度仅比实验谱库低 7%~10%,并且能够发现 DDA 未覆盖到的额

外肽段。

随着 DIA 采集模式和数据分析算法的不断发展,无需实验谱库的 Direct-DIA 策略在免疫肽组学中的可行性也逐渐得到验证。Oliinyk 等^[28]在 timsTOF 平台上建立了 diaPASEF 模式,在仅 5×10^5 个细胞条件下可检测到 3 426 条肽段;结合细胞培养中氨基酸的稳定同位素标记技术 (stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC) 定量标记,在 10^6 个单等位基因细胞中可定量 13 种新抗原,检测限达 33 amol,验证了 DIA 在低样本量下具有较高的灵敏度与稳定性。Ritz 等^[29]在 Q Exactive 平台上通过优化 DIA 隔离窗口宽度,在 10^8 个细胞样本中可鉴定超过 10 000 条 MHC-I 肽,且在 10^6 个细胞条件下仍保持约 50% 的检出率,并在血清及组织样本中展现出良好的重复性。

目前,DDA 辅助的光谱库-DIA 策略是免疫肽组学中最稳健、最可靠的分析路线。同时,随着高分辨率质谱平台、离子淌度分离技术及 Direct-DIA 方法的不断成熟,DIA 在低输入量及临床相关免疫肽分析中的应用潜力正在持续提升。

3.3 靶向质谱分析

靶向质谱分析通过预设目标肽的质荷比 (m/z) 和保留时间,实现特定肽段的精准捕获与定量,是新抗原验证及临床样本靶向分析的核心方法。该技术以“已知靶点”为基础,兼具高灵敏度与高定量精度,可在复杂背景中实现低丰度肽的高置信度检测与验证。

为进一步提升检测精度与灵敏度,研究者在靶向质谱分析中引入了多种内标校准与信号触发策略,实现了免疫肽的绝对定量与动态监测。Hassan 等^[30]首次提出基于同位素标记肽-MHC 复合物的内标策略,在细胞裂解后直接加入内标,使其参与免疫纯化全过程,有效校正了 90%~99% 的肽段损失,使 JY 细胞中次要组织相容性抗原的定量误差控制在 1.5% 以内,实现了免疫肽的高精度绝对定量。Stopfer 等^[31]开发的 SureQuant-IsoMHC 技术通过合成重氨基酸标记的免疫肽标准品,构建内嵌多点校准曲线,在 SKMEL5 黑色素瘤细胞中定量分析 18 种肿瘤相关抗原,检测限达 10 amol,表达范围覆盖近 4 个数量级;在 1.1 mg 肿瘤穿刺样本中可检测 7 种低

丰度抗原, 而传统 DDA 仅能识别最多 2 种。Pollock 等^[32]提出的由偏移质量触发精确质量高分辨率精确定量(triggered by offset mass accurate-mass high-resolution accurate quantitation, TOMAHAQ)技术结合内标触发的平行反应监测与 TMT 标记, 实现了多肽同步检测, 在 MC38 小鼠结肠癌细胞中定量分析了 223 种合成新抗原, 灵敏度提升至 amol/ μ L 水平。该技术还可动态监测抗原呈递变化, 如药物诱导 Adpgk(R304M) 突变蛋白降解后, 新抗原呈递量增加 2~3 倍, 揭示了药物调控免疫表位呈递的分子机制。

靶向质谱技术通过结合同位素内标校准与靶向质谱采集, 实现了免疫肽的绝对定量和动态监测, 适用于药物应答评估及肿瘤新抗原验证。但由于需预设目标肽特征(如, m/z 、保留时间等), 限制了该技术在未知新抗原发现中的应用。

4 数据库搜索

4.1 突变来源数据库

免疫肽组质谱鉴定结合突变来源数据库构建是精准挖掘突变相关免疫肽并发现肿瘤新抗原的核心策略。该方法通过整合多组学与公共突变信息, 突破传统仅依赖个体外显子组测序(whole-exome sequencing, WES)的局限, 不仅提升了低丰度突变肽的检出灵敏度, 还弥补了个体测序中稀有或未检测突变覆盖不足的问题^[33]。

在数据库构建方面, Wang 等^[34]针对肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)突变负荷低、样本异质性高的特点, 基于 COSMIC 数据库整合了 3 306 例 HCC 体细胞突变, 利用该库对 HepG2 细胞 MHC-I 免疫肽组进行质谱分析, 共鉴定出 16 条突变肽, 而基于 WES 专属数据库仅检出 1 条突变肽。在应用层面, 该策略已成功揭示多种肿瘤的新抗原特征。Bassani-Sternberg 等^[35]结合 MaxQuant 与宽松突变调用, 在 5 例黑色素瘤患者原发组织中鉴定出 11 条突变肽, 其中 4 条可诱导自体 T 细胞免疫应答, SYTL4 突变肽已被证实可被肿瘤浸润淋巴细胞识别, 直接验证了其免疫原性。此外, 针对突变来源数据库构建的准确性需要对近邻突变进行校正。Hundal 等^[36]通过分析 430 例肿瘤样本发现, 约 5% 的体细胞突变与 89 bp 范围内的近邻变异同相, 若未校正, 可导致 8~11 个氨基酸长度的肽段假阳性率

和假阴性率分别为 6.9%、2.6%。在黑色素瘤样本中, MARCH10 基因突变与生殖系单核苷酸多态性共存, 未经校正时被误判为强结合肽, 而校正后仅表现为弱结合, 提示近邻变异对突变肽结合预测具有重要影响。经此类校正与优化, 基于突变数据库的免疫肽组分析显著提升了突变肽识别的准确性与可信度, 既可在高突变负荷肿瘤中系统揭示新抗原谱系, 也能在低突变负荷肿瘤中提高稀有突变肽的检出率。

4.2 非经典来源数据库

在免疫肽组研究中, 非经典来源数据库是突破传统编码区抗原局限、挖掘非典型肿瘤抗原的重要途径。该类数据库整合非编码转录本、RNA 编辑事件及新开放阅读框(novel open reading frame, nuORF)等信息, 依托多组学数据构建, 显著扩展了免疫肽组的抗原来源范围, 尤其在低突变负荷肿瘤抗原补充与临床免疫靶点验证中展现出独特价值。目前已报道的非经典来源蛋白/肽数据库及其数据来源、规模与验证方式列于表 2。

表 2 非经典来源蛋白/肽数据库概况

Table 2 Overview of non-canonical protein/peptide databases

数据库 Database	来源 Source	数据库容量 Database size	验证级别 Validation level
FuncPEP	ncRNA	112	实验验证
ncEP		77	
cncRNADB		1818	ncRNA识别
MicroProteinDB		~50k	
SPENCER		~29k	
LncPep	lncRNA	~10M	
TransLnc		~580k	
riboCIRC	circRNA	2 247	
NCPbook	Genomes	~180k	基因组验证
SmProt		~25k	
sORF.org		~26k	
OpenProt	Trascriptomes	~4M	转录组预测

注: k表示千级条目数量; M表示百万级条目数量

Chong 等^[37]针对黑色素瘤与肺癌样本, 整合 WES、单细胞测序及核糖体测序数据, 对非编码转录本进行系统性翻译预测, 并按三框翻译生成多肽序列。研究采用“突变位点上下游各延伸

50个氨基酸”的策略压缩数据库规模,在保证覆盖度的同时显著提升质谱匹配效率,为非编码来源抗原的系统识别奠定了基础。Ouspenskaia等^[38]基于29个健康及癌症样本的Ribo-seq数据,提出“样本-组织-全数据集”三级分层预测模式,构建了nuORF数据库,共收录323 848个nuORF,数据库规模比传统转录组参考库缩小了25倍,在特异性与计算效率间实现了平衡。该研究首次系统性揭示了未注释蛋白普遍存在于MHC-I呈递体系中,强调了翻译调控层面对免疫肽生成的影响。Zhang等^[39]从RADAR数据库中提取1 369个A-to-IRNA编辑位点,并结合RNA-seq验证编辑转录本表达,建立RNA编辑肽专属数据库,用于识别由RNA编辑事件驱动的免疫肽。研究表明, RNA编辑可为肿瘤细胞提供额外的抗原多样性来源,其产物在部分样本中的丰度显著高于正常组织,提示此类肽段可能具有潜在的免疫靶点价值。

非经典肽来源数据库通过系统整合多层组学信息与功能验证数据,为解析非典型抗原的免疫呈递规律、揭示肿瘤特异抗原生成机制及拓展肿瘤免疫治疗靶点资源提供了新的研究框架。

4.3 翻译后修饰相关数据库

翻译后修饰(post-translational modification, PTM)对蛋白质的结构和功能至关重要,免疫肽组源于蛋白质被蛋白酶切割后呈递的片段,因此蛋白质上的PTM往往也会保留并体现在免疫肽上,不同PTM不仅改变肽段与MHC的亲合力,还会影响T细胞受体(T cell receptor, TCR)的识别,调节肽段免疫原性。目前较常见的免疫肽修饰有磷酸化^[40]、糖基化^[41]与瓜氨酸化^[42]等,其中,磷酸化修饰在MHC-I/II呈递肽中均可见^[43],肿瘤激酶网络失常导致磷酸化位点谱异常^[44],相关片段被加工后呈递,因此多数磷酸化免疫肽具有一定的肿瘤特异性^[45]。相比之下,糖基化、瓜氨酸化等修饰免疫肽来源蛋白多为分泌型或膜蛋白,天然降解路径以内吞-溶酶体为主,更多由MHC-II呈递^[41,46-47]。这些PTM为肽段赋予了可被TCR有效识别的“化学标签”,在不同患者间呈现更高的重现性与普适性^[48]。

相较于突变或非经典来源数据库,PTM相关数据库构建更复杂,需先进行开放式搜索来捕捉未知 Δ Mass,再以定向闭合搜索做位点级定

位确定修饰类型。Zhai等^[49]在强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis, AS)患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)蛋白质组中,采用开放式搜索发现+72.021 u的半胱氨酸位点质量偏移显著富集,随后利用特异抗体进行靶向富集与质谱确证,最终显示半胱氨酸羧乙基化可在多种蛋白质上生成MHC-DR4限制的修饰型新抗原,诱导CD4⁺T细胞与自身抗体应答,并与AS等免疫相关病理相关联。此外,面向泛PTM的计算平台不断完善,显著提升了PTM免疫的肽识别效率与准确度。Fasoulis等^[50]开发了APE-Gen2.0平台,将PyTMs插件与OpenMM分子动力学引擎结合,实现了多种类型PTM肽的快速建模与能量最小化,通过锚点识别模块修正非典型免疫肽构象,显著缩短了建模时间,并在磷酸化及瓜氨酸化肽结合预测中显著提升了精度。Kacen等^[51]开发了PROMISE工具用于检测29种PTM组合,亚组水平假阳性率控制在5%的条件下,在210个样本中共鉴定出32 798条修饰肽。

PTM相关数据库为泛修饰免疫肽的系统发现提供了关键支点。随着预测建库、结构建模与新型质谱技术的协同推进,修饰相关免疫肽的检测深度与定位置信度有望进一步提升,为普适性新抗原的挖掘提供可行路径。

5 总结与展望

基于质谱的免疫肽组学已成为连接肿瘤多组学信息与功能免疫研究的核心技术,为新抗原精准鉴定与个体化免疫治疗提供了前所未有的可能。从样本制备、质谱采集到数据库构建的系统优化,使免疫肽检测的深度与准确性持续提升。弱酸洗脱与免疫沉淀策略的改进提高了MHC结合肽的提取纯度与重现性;DIA和靶向质谱等先进采集模式的引入,显著提高了低丰度免疫肽的检出灵敏度与定量稳定性;突变来源、非经典来源及PTM数据库的建立,为免疫肽组学提供了全新的数据支撑框架,使抗原发现从传统编码突变扩展至非编码、翻译调控与修饰层面,形成了多维度的免疫抗原谱系。

尽管免疫肽组学取得了显著进展,但仍面临关键挑战。首先,质谱检测高度依赖样本量和信号强度,限制了其在微量临床样本中的应用;其

次, 免疫肽结合预测、谱图匹配及数据库搜索受到算法精度与参考数据覆盖度的制约; 此外, 突变、非经典及 PTM 肽的免疫原性验证尚缺乏系统性实验标准, 阻碍了从数据发现到临床转化的闭环建立。

因此, 未来的发展方向应聚焦于“智能化”与“标准化”两条主线。在智能化方向, 人工智能(AI), 尤其是深度学习模型, 有望在免疫肽组学的多个关键环节中发挥重要作用。基于免疫肽实测数据训练的 AI 谱图生成与解析模型, 可提高低信噪比谱图及非经典肽段的鉴定可信度; 结合保留时间与碎片强度的联合建模, 有助于压缩搜索空间、降低假阳性率, 从而改善复杂免疫肽库中的整体鉴定性能。同时, AI 驱动的 MHC 结合与抗原加工模型可通过持续整合实测免疫肽数据, 不断优化对不同 HLA 等位基因呈递偏好的刻画, 为新抗原优先级评估提供更可靠的依据。

在标准化方向, 通过统一免疫肽富集与数据解析流程, 并结合可迁移的算法模型和评价体系, 有望提升不同研究结果之间的可比性与稳定性。进一步将免疫肽组学与单细胞免疫组学和空间组学数据相结合, 将有助于从时间和空间维度更精细地解析抗原呈递过程。随着算法、质谱性能及临床微量样本处理流程的协同优化, 免疫肽组学有望从抗原发现拓展至免疫应答评估与疗效监测, 成为精准免疫治疗的重要技术支撑。

参考文献:

- [1] YEWEDELL J W, BENNINK J R. Immunodominance in major histocompatibility complex class I-restricted T lymphocyte responses[J]. *Annual Review of Immunology*, 1999, 17: 51-88.
- [2] BASSANI-STERBERG M, GFELLER D. Unsupervised HLA peptidome deconvolution improves ligand prediction accuracy and predicts cooperative effects in peptide-HLA interactions[J]. *Journal of Immunology*, 2016, 197(6): 2 492-2 499.
- [3] ABELIN J G, KESKIN D B, SARKIZOVA S, HARTIGAN C R, ZHANG W, SIDNEY J, STEVENS J, LANE W, ZHANG G L, EISENHAURE T M, CLAUSER K R, HACOEN N, ROONEY M S, CARR S A, WU C J. Mass spectrometry profiling of HLA-associated peptidomes in mono-allelic cells enables more accurate epitope prediction[J]. *Immunity*, 2017, 46(2): 315-326.
- [4] PURCELL A W, RAMARATHINAM S H, TERNETTE N. Mass spectrometry-based identification of MHC-bound peptides for immunopeptidomics[J]. *Nature Protocols*, 2019, 14(6): 1 687-1 707.
- [5] YANG Q, LV Z, WANG M, KONG M, ZHONG C, GAO K, WAN X. LATS1/2 loss promote tumor immune evasion in endometrial cancer through downregulating MHC-I expression[J]. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2024, 43(1): 54.
- [6] RENNE S L, SAMA' L, KUMAR S, MINTEMUR O, RUSPI L, SANTORI I, SICOLI F, BERTUZZI A, LAFFI A, BONOMETTI A, COLOMBO P, D'AMATO V, BRESSAN A, SCORSETTI M, TERRACCIANO L, NAVARRIA P, D'INCALCI M, QUAGLIUOLO V, PASQUALINI F, GRIZZI F, CANANZI F C M. Disruptions in antigen processing and presentation machinery on sarcoma[J]. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2024, 73(11): 228.
- [7] SUGAWARA S, ABO T, KUMAGAI K. A simple method to eliminate the antigenicity of surface class I MHC molecules from the membrane of viable cells by acid treatment at pH 3[J]. *Journal of Immunological Methods*, 1987, 100(1/2): 83-90.
- [8] FORTIER M H, CARON E, HARDY M P, VOISIN G, LEMIEUX S, PERREAULT C, THIBAUT P. The MHC class I peptide repertoire is molded by the transcriptome[J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 2008, 205(3): 595-610.
- [9] LANOIX J, DURETTE C, COURCELLES M, COSSETTE É, COMTOIS-MAROTTE S, HARDY M P, CÔTÉ C, PERREAULT C, THIBAUT P. Comparison of the MHC I immunopeptidome repertoire of B-cell lymphoblasts using two isolation methods[J]. *Proteomics*, 2018, 18(12): e1700251.
- [10] MAO Z, NESTERENKO P A, McLAUGHLIN J, DENG W, BURTON SOJO G, CHENG D, NOGUCHI M, CHOUR W, DeLUCIA D C, FINTON K A, QIN Y, OBUSAN M B, TRAN W, WANG L, BANGAYAN N J, TA L, CHEN C C, SEET C S, CROOKS G M, PHILLIPS J W, HEATH J R, STRONG R K, LEE J K, WOHLSCHLEGEL J A, WITTE O N. Physical and in silico immunopeptidomic profiling of a cancer antigen prostatic acid phosphatase reveals targets enabling TCR isolation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022, 119(31):

- e2203410119.
- [11] CAMPBELL D H, LUESCHER E, LERMAN L S. Immunologic adsorbents: I. isolation of antibody by means of a cellulose-protein antigen[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1951, 37(9): 575-578.
- [12] NELDE A, KOWALEWSKI D J, STEVANOVIĆ S. Purification and identification of naturally presented MHC class I and II ligands[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2019, 1988: 123-136.
- [13] KOWALEWSKI D J, STEVANOVIĆ S. Biochemical large-scale identification of MHC class I ligands[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2013, 960: 145-157.
- [14] FEOLA S, HAAPALA M, PELTONEN K, CAPASSO C, MARTINS B, ANTIGNANI G, FEDERICO A, PIETIÄINEN V, CHIARO J, FEODOROFF M, RUSSO S, RANNIKKO A, FUSCIELLO M, KOSKELA S, PARTANEN J, HAMDAN F, TÄHKÄ S M, YLÖSMÄKI E, GRECO D, GRÖNHOLM M, KEKARAINEN T, ESHAGHI M, GURVICH O L, YLÄ-HERTTUALA S, BRANCA R M M, LEHTIÖ J, SIKANEN T M, CERULLO V. PeptiCHIP: a microfluidic platform for tumor antigen landscape identification [J]. *ACS Nano*, 2021, 15(10): 15 992-16 010.
- [15] STUTZMANN C, PENG J, WU Z, SAVOIE C, SIROIS I, THIBAUT P, WHEELER A R, CARON E. Unlocking the potential of microfluidics in mass spectrometry-based immunopeptidomics for tumor antigen discovery[J]. *Cell Reports Methods*, 2023, 3(6): 100 511.
- [16] CHEN R, FAUTEUX F, FOOTE S, STUPAK J, TREMBLAY T L, GURNANI K, FULTON K M, WEERATNA R D, TWINE S M, LI J. Chemical derivatization strategy for extending the identification of MHC class I immunopeptides[J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(19): 11 409-11 416.
- [17] CHEN R, LI J. Enhanced mass spectrometry detection of MHC peptides[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2019, 2024: 245-257.
- [18] MURPHY J P, YU Q, KONDA P, PAULO J A, JEDRYCHOWSKI M P, KOWALEWSKI D J, SCHUSTER H, KIM Y, CLEMENTS D, JAIN A, STEVANOVIĆ S, GYGI S P, MANCIAS J D, GUJAR S. Multiplexed relative quantitation with isobaric tagging mass spectrometry reveals class I major histocompatibility complex ligand dynamics in response to doxorubicin[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(8): 5 106-5 115.
- [19] LOBODA A V, CHERNUSHEVICH I V. A novel ion trap that enables high duty cycle and wide m/z range on an orthogonal injection TOF mass spectrometer[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2009, 20(7): 1 342-1 348.
- [20] DORVASH M, ILLING P T, CROFT N P, RAMARATHINAM S H, PURCELL A W. Deep exploration of the immunopeptidome of a pancreatic cancer cell line: implications for clinical immunopeptidomics and immunotherapy[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2025, 24(8): 101 030.
- [21] PHULPHAGAR K M, CTORTECKA C, JACOME A S V, KLAEGER S, VERZANI E K, HERNANDEZ G M, UDESHI N D, CLAUSER K R, ABELIN J G, CARR S A. Sensitive, high-throughput HLA-I and HLA-II immunopeptidomics using parallel accumulation-serial fragmentation mass spectrometry[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2023, 22(6): 100 563.
- [22] SALVATO F, HEIL L, HAKIMI A, PEKAR HART T. Enhancing immunopeptide profiling with orbitrap astral mass spectrometer for unbiased discovery of neoantigens [R]. Dresden, Germany: Thermo Fisher Scientific, 2024.
- [23] HUNT D F, HENDERSON R A, SHABANOWITZ J, SAKAGUCHI K, MICHEL H, SEVILIR N, COX A L, APPELLA E, ENGELHARD V H. Characterization of peptides bound to the class I MHC molecule HLA-A2.1 by mass spectrometry[J]. *Science*, 1992, 255(5 049): 1 261-1 263.
- [24] GOMEZ-ZEPEDA D, ARNOLD-SCHILD D, BEYRLE J, DECLERCQ A, GABRIELS R, KUMM E, PREIKSCHAT A, ŁĄCKI M K, HIRSCHLER A, RIJAL J B, CARAPITO C, MARTENS L, DISTLER U, SCHILD H, TENZER S. Thunder-DDA-PASEF enables high-coverage immunopeptidomics and is boosted by MS2Rescore with MS2PIP timsTOF fragmentation prediction model[J]. *Nature Communications*, 2024, 15: 2 288.
- [25] CARON E, KOWALEWSKI D, CHIEK KOH C, STURM T, SCHUSTER H, AEBERSOLD R. Analysis of major histocompatibility complex (MHC) immunopeptidomes using mass spectrometry[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2015, 14(12): 3 105-3 117.
- [26] SHAPIRO I E, HUBER F, MICHAUX J, BASSANI-STERNBERG M. Sensitive neoantigen discovery by real-time mutanome-guided immunopeptidomics[J]. *Nature Communications*, 2025, 16: 7 269.
- [27] PAK H, MICHAUX J, HUBER F, CHONG C, STEVENSON B J, MÜLLER M, COUKOS G, BAS-

- SANI-STERNBERG M. Sensitive immunopeptidomics by leveraging available large-scale multi-HLA spectral libraries, data-independent acquisition, and MS/MS prediction[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2021, 20: 100 080.
- [28] OLIINYK D, GURUNG H R, ZHOU Z, LESKOSKE K, ROSE C M, KLAEGER S. diaPASEF analysis for HLA-I peptides enables quantification of common cancer neoantigens[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2025, 24(4): 100 938.
- [29] RITZ D, KINZI J, NERI D, FUGMANN T. Data-independent acquisition of HLA class I peptidomes on the Q exactive mass spectrometer platform[J]. *Proteomics*, 2017, 17(19), DOI:10.1002/pmic.201700177.
- [30] HASSAN C, KESTER M G D, OUDGENOEG G, de RU A H, JANSSEN G M C, DRIJFHOUT J W, SPAAPEN R M, JIMÉNEZ C R, HEEMSKERK M H M, FREDERIK FALKENBURG J H, van VEELLEN P A. Accurate quantitation of MHC-bound peptides by application of isotopically labeled peptide MHC complexes[J]. *Journal of Proteomics*, 2014, 109: 240-244.
- [31] STOPFER L E, GAJADHAR A S, PATEL B, GALLIEN S, FREDERICK D T, BOLAND G M, SULLIVAN R J, WHITE F M. Absolute quantification of tumor antigens using embedded MHC-I isotopologue calibrants[J]. *PNAS*, 2021, 118(37): e2111173118.
- [32] POLLOCK S B, ROSE C M, DARWISH M, BOUZIAT R, DELAMARRE L, BLANCHETTE C, LILL J R. Sensitive and quantitative detection of MHC-I displayed neoepitopes using a semiautomated workflow and TOMAHAQ mass spectrometry[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2021, 20: 100 108.
- [33] ZHANG Y, CHEN T, LI X, LAN A, JI P, ZHU Y, MA X. Advances and challenges in neoantigen prediction for cancer immunotherapy[J]. *Frontiers in Immunology*, 2025, 16: 1 617 654.
- [34] WANG F, ZHANG Z, MAO M, YANG Y, XU P, LU S. COSMIC-based mutation database enhances identification efficiency of HLA-I immunopeptidome[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2024, 22(1): 144.
- [35] BASSANI-STERNBERG M, BRÄUNLEIN E, KLAR R, ENGLEITNER T, SINITYCYN P, AUDEHM S, STRAUB M, WEBER J, SLOTTA-HUSPENINA J, SPECHT K, MARTIGNONI M E, WERNER A, HEIN R, H BUSCH D, PESCHEL C, RAD R, COX J, MANN M, KRACKHARDT A M. Direct identification of clinically relevant neoepitopes presented on native human melanoma tissue by mass spectrometry[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 13 404.
- [36] HUNDAL J, KIWALA S, FENG Y Y, LIU C J, GOVINDAN R, CHAPMAN W C, UPPALURI R, SWAMIDASS S J, GRIFFITH O L, MARDIS E R, GRIFFITH M. Accounting for proximal variants improves neoantigen prediction[J]. *Nature Genetics*, 2019, 51(1): 175-179.
- [37] CHONG C, MÜLLER M, PAK H, HARNETT D, HUBER F, GRUN D, LELEU M, AUGER A, ARNAUD M, STEVENSON B J, MICHAUX J, BILIC I, HIRSEKORN A, CALVIELLO L, SIMÓ-RIUDALBAS L, PLANET E, LUBIŃSKI J, BRYŚKIEWICZ M, WIZNEROWICZ M, XENARIOS I, ZHANG L, TRONO D, HARARI A, OHLER U, COUKOS G, BASSANI-STERNBERG M. Integrated proteogenomic deep sequencing and analytics accurately identify non-canonical peptides in tumor immunopeptidomes[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 1 293.
- [38] OUSPENSKAIA T, LAW T, CLAUSER K R, KLAEGER S, SARKIZOVA S, AGUET F, LI B, CHRISTIAN E, KNISBACHER B A, LE P M, HARTIGAN C R, KESHISHIAN H, APFEL A, OLIVEIRA G, ZHANG W, CHEN S, CHOW Y T, JI Z, JUNGREIS I, SHUKLA S A, JUSTESEN S, BACHIREDDY P, KELLIS M, GETZ G, HACOEN N, KESKIN D B, CARR S A, WU C J, REGEV A. Unannotated proteins expand the MHC-I-restricted immunopeptidome in cancer[J]. *Nature Biotechnology*, 2022, 40(2): 209-217.
- [39] ZHANG M, FRITSCHKE J, ROSZIK J, WILLIAMS L J, PENG X, CHIU Y, TSOU C C, HOFFGAARD F, GOLDFINGER V, SCHOOR O, TALUKDER A, FORGET M A, HAYMAKER C, BERNATCHEZ C, HAN L, TSANG Y H, KONG K, XU X, SCOTT K L, SINGH-JASUJA H, LIZEE G, LIANG H, WEINSCHENK T, MILLS G B, HWU P. RNA editing derived epitopes function as cancer antigens to elicit immune responses[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 3 919.
- [40] MOLVI Z, KLATT M G, DAO T, URRACA J, SCHEINBERG D A, O'REILLY R J. The landscape of MHC-presented phosphopeptides yields actionable shared tumor antigens for cancer immunotherapy across multiple HLA alleles[J]. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 2023, 11(9): e006889.
- [41] BEDRAN G, POLASKY D A, HSIAO Y, YU F, DA VEIGA LEPREVOST F, ALFARO J A, CIESLIK M, NESVIZHSHKII A I. Unraveling the glycosylated immunopeptidome with HLA-glyco[J]. *Nature Commu-*

- nications, 2023, 14: 3 461.
- [42] KATAYAMA H, KOBAYASHI M, IRAJIZAD E, SEVILLANO A M, PATEL N, MAO X, RUSLING L, VYKOUKAL J, CAI Y, HSIAO F, YU C Y, LONG J, LIU J, ESTEVA F, FAHRMANN J, HANASH S. Protein citrullination as a source of cancer neoantigens[J]. *Journal for immunotherapy of Cancer*, 2021, 9(6): e002549.
- [43] MEYER V S, DREWS O, GÜNDER M, HENNENLOTTER J, RAMMENSEE H G, STEVANOVIC S. Identification of natural MHC class II presented phosphopeptides and tumor-derived MHC class I phospholigands[J]. *Journal of Proteome Research*, 2009, 8(7): 3 666-3 674.
- [44] SONG G, CHEN L, ZHANG B, SONG Q, YU Y, MOORE C, WANG T, SHIH I M, ZHANG H, CHAN D, ZHANG Z, ZHU H. Proteome-wide tyrosine phosphorylation analysis reveals dysregulated signaling pathways in ovarian tumors[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2019, 18(3): 448-460.
- [45] PENNY S A, ABELIN J G, MALAKER S A, MYERS P T, SAEED A Z, STEADMAN L G, BAI D L, WARD S T, SHABANOWITZ J, HUNT D F, COBBOLD M. Tumor infiltrating lymphocytes target HLA-I phosphopeptides derived from cancer signaling in colorectal cancer[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 723 566.
- [46] CURRAN A M, GIRGIS A A, JANG Y, CRAWFORD J D, THOMAS M A, KAWALERSKI R, COLLIER J, BINGHAM C O, NA C H, DARRAH E. Citrullination modulates antigen processing and presentation by revealing cryptic epitopes in rheumatoid arthritis[J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 1 061.
- [47] ROCHE P A, FURUTA K. The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2015, 15(4): 203-216.
- [48] FLENDER D, VILENNE F, ADAMS C, BOONEN K, VALKENBORG D, BAGGERMAN G. Exploring the dynamic landscape of immunopeptidomics: unravelling posttranslational modifications and navigating bioinformatics terrain[J]. *Mass Spectrometry Reviews*, 2025, 44(4): 599-629.
- [49] ZHAI Y, CHEN L, ZHAO Q, ZHENG Z, CHEN Z, BIAN H, YANG X, LU H, LIN P, CHEN X, CHEN R, SUN H, FAN L, ZHANG K, WANG B, SUN X, FENG Z, ZHU Y, ZHOU J, CHEN S, ZHANG T, CHEN S, CHEN J, ZHANG K, WANG Y, CHANG Y, ZHANG R, ZHANG B, WANG L, LI X, HE Q, YANG X, NAN G, XIE R, YANG, YANG J, ZHU P. Cysteine carboxyethylation generates neoantigens to induce HLA-restricted autoimmunity[J]. *Science*, 2023, 379(6 637): eabg2482.
- [50] FASOULIS R, RIGO M M, LIZÉE G, ANTUNES D A, KAVRAKI L E. APE-Gen2.0: expanding rapid class I peptide-major histocompatibility complex modeling to post-translational modifications and noncanonical peptide geometries[J]. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2024, 64(5): 1 730-1 750.
- [51] KACEN A, JAVITT A, KRAMER M P, MORGENSTERN D, TSABAN T, SHMUELI M D, TEO G C, DA VEIGA LEPREVOST F, BARNEA E, YU F, ADMON A, EISENBACH L, SAMUELS Y, SCHUELER-FURMAN O, LEVIN Y, NESVIZHISKII A I, MERBL Y. Post-translational modifications reshape the antigenic landscape of the MHC I immunopeptidome in tumors[J]. *Nature Biotechnology*, 2023, 41(2): 239-251.

(收稿日期: 2025-11-17; 修回日期: 2025-12-26)