

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.04.012

· 基础研究 ·

## 嵌合抗原受体修饰的 CD19-CAR-T 的体外构建、扩增及初步功能鉴定

李剑<sup>1a,2</sup>, 田芳<sup>1b</sup>, 姜鹏君<sup>1a</sup>, 孔祥图<sup>1a</sup>, 吴坚<sup>1b</sup>, 殷婷婷<sup>1a</sup>, 邢芸<sup>2</sup>, 金亮<sup>2</sup>, 郝瑞栋<sup>3</sup>, 刘根桃<sup>3△</sup>, 朱学军<sup>1</sup>(1. 南京中医药大学附属江苏省中医院 a. 血液科, b. 中心实验室, 江苏南京 210029; 2. 中国药科大学生命科学与技术学院, 江苏南京 210009; 3. 上海科医联创生物科技有限公司, 上海 201321)

**[摘要]** **目的:** 探索一种特异性靶向 CD19 分子的嵌合抗原受体修饰的 CD19-CAR-T 的构建方法, 并明确其体外杀伤靶细胞的效果。**方法:** 运用分子克隆技术, 将 PCR 获得的 CD19-CAR 片段构建到 pCDH-GFP 慢病毒载体上, 利用包装的慢病毒颗粒转染供者 CD3<sup>+</sup> T 细胞, 通过流式细胞术及 PCR 鉴定转染效率, 并通过 7-AAD 染色鉴定扩增得到的 CD19-CAR-T 细胞体外杀伤 CD19<sup>+</sup> Ramos 靶细胞的效果。**结果:** 经慢病毒转染 T 细胞在体外培养 10 d 后, CD3<sup>+</sup> T 扩增达 (78.8±23.2) 倍, (58.3±5.4)% 的 CD3<sup>+</sup> T 细胞表达 GFP, CD19-CAR-T 体外杀伤 CD19<sup>+</sup> Ramos 靶细胞在效靶比 5:1 时效率为 (57.4±9.3)%。**结论:** 本实验成功建立了一种有效的体外构建及扩增 CD19-CAR-T 的方法, 且具有明显靶向性, 为 CD19<sup>+</sup> B 细胞肿瘤临床治疗提供实验依据。

**[关键词]** CD19 嵌合抗原受体; 白血病; 淋巴瘤; 细胞杀伤

**[中图分类号]** Q785; R730.51 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)04-0389-05

## *In vitro* construction and amplification and primary functional analysis of anti-CD19 chimeric antigen receptor (CD19-CAR) modified T cells

LI Jian<sup>1a,2</sup>, TIAN Fang<sup>1b</sup>, JIANG Pengjun<sup>1a</sup>, KONG Xiangtu<sup>1a</sup>, WU Jian<sup>1b</sup>, YIN Tingting<sup>1a</sup>, XING Yun<sup>2</sup>, JIN Liang<sup>2</sup>, HAO Ruidong<sup>3</sup>, LIU Gentao<sup>3△</sup>, ZHU Xuejun<sup>1</sup>(1. a. Department of Hematology, b. Central Laboratory, Jiangsu Provincial Hospital of TCM Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu, China; 2. College of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, Jiangsu, China; 3. Shanghai Biomed-Union Biotechnology Co. Ltd., Shanghai 201321, China)

**[Abstract] Objective:** To establish a chimeric antigen receptor (CAR) modified T cells specifically targeting CD19 molecule (CD19-CAR-T cells) and to testify their *in vitro* killing effect on target cells. **Methods:** CD19-CAR fragments yielded by PCR were constructed into pCDH-GFP lentiviral vectors by molecular cloning technology. The packaged lentiviral particles were transduced into CD3<sup>+</sup> T cells of donors. Transduction efficiency was measured by flow cytometry and PCR. The *in vitro* cytotoxicity of obtained CD19-CAR-T cells against CD19<sup>+</sup> Ramos cells was tested by 7-AAD staining. **Results:** The amplification folds of CD3<sup>+</sup> T cells increased to (78.8±23.2) folds after *in vitro* culture for 10 days, and about (58.3±5.4)% cells expressing GFP. About (57.4±9.3)% CD19<sup>+</sup> Ramos cells were specifically killed by the CD19-CAR-T cells *in vitro* at the E:T ratio of 5:1. **Conclusion:** This study successfully established an effective method for constructing and amplifying CD19-CAR-T cells *in vitro*, which showed profound efficiency and specific cytotoxicity against CD19<sup>+</sup> Ramos cells. And this report might provide an experimental evidence for clinical treatment of CD19<sup>+</sup> B cell neoplasmas.

**[Key words]** CD19 chimeric antigen receptor; leukemia; lymphoma; cytotoxicity

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(4): 389-393. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.04.012]

**[基金项目]** 江苏省社会发展-临床前沿技术资助项目(No. BE2016809); 南京市科技发展计划项目资助(No. 201503011)。Project supported by the Foundation of the Jiangsu Social Development - Clinical Frontier Technology (No. BE2016809), and the Foundation of the Nanjing Science and Technology Development Plan (No. 201503011)

**[作者简介]** 李剑(1985-), 男, 博士生, 主要从事肿瘤免疫治疗相关的基础研究, E-mail: lijian\_cpu@126.com

**[通信作者]** 朱学军(ZHU Xuejun, corresponding author), 博士, 主任医师, 硕士生导师, 主要从事肿瘤综合治疗相关研究, E-mail: zhuxj2@sina.com; 刘根桃(LIU Gentao, corresponding author), 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事肿瘤干细胞与免疫治疗相关研究, E-mail: liugt@hotmail.com。△为共同通信作者

应用 CAR-T 技术治疗 B 系淋巴细胞白血病及淋巴瘤在国外临床上已经取得了令人瞩目的治疗效果<sup>[1-3]</sup>。CAR-T 疗法的核心机制是通过在 T 细胞表面表达嵌合抗原受体,同时引入 CD28 和/或 CD137(4-1BB)等共刺激因子,形成具有靶向性、MHC 非依赖性和记忆性的新一代细胞治疗技术,其能够打破宿主免疫耐受状态,克服肿瘤免疫逃逸,最终杀灭肿瘤细胞,具有以往其他免疫细胞疗法所没有的卓越优点<sup>[4-7]</sup>。国内近年才开始 CAR-T 技术领域的探索,但目前仍缺乏规范的临床应用方案。本研究以临床应用为基础,针对 CD19<sup>+</sup>的血液系统恶性肿瘤设计了一种可特异性识别 CD19 抗原的重组 CD19-CAR-T,探讨重组慢病毒转染健康供者来源 T 细胞的效果,建立了安全有效的 CD19-CAR-T 的体外扩增方案,进一步检测了其靶细胞的体外杀伤作用,为 CAR-T 技术在血液系统恶性肿瘤中的临床研究及应用提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞系和主要试剂

293T 及 Ramos 细胞系购自美国 ATCC 细胞库,人外周血单个核细胞(PBMC)来源于江苏省中医院健康供者,病毒包膜质粒 VSV-G 和包装质粒  $\Delta$ R、REV 由苏州大学唐仲英血液研究中心杨林教授惠赠。胎牛血清(FBS)购自美国 Life Technology 公司,X-VIVO 15 培养基购自瑞士 Lonza 公司,鼠抗人 CD3-PerCP 抗体、鼠抗人 CD4-PE 抗体、鼠抗人 CD8-APC-Cy7 抗体、鼠抗人 CCR7-APC 抗体、鼠抗人 CD45RA-PE 抗体以及鼠抗人同型对照 Isotype 抗体均购自美国 BD Bioscience 公司,OKT3 购自美国 Biolegend 公司,IL-2 购自美国 Peprotech 公司,CD3 磁珠、MACS 细胞分选缓冲液及 LS 纯化柱购自德国美天旎公司。

### 1.2 构建 pCDH-CD19-CAR 重组质粒

由苏州金唯智生物科技有限公司合成 CD19 scFv 序列 FMC63,利用搭桥 PCR 技术将 CD19-ScFv、铰链区 CH2-CH3、CD28 穿膜区和信号区以及胞内传递信号的 CD3 $\zeta$  片段依次串联,形成第二代 CAR 分子结构的 CD19-CAR,通过酶切位点 *EcoRI/XbaI* 将 CD19-CAR 连接到 pCDH-CMV-MCS-EF1-CopGFP 载体上获 pCDH-CD19-CAR 质粒,用于后续慢病毒包装。

### 1.3 慢病毒制备与病毒滴度检测

将病毒包膜质粒 VSV-G 和包装质粒  $\Delta$ R、REV 与 pCDH-CD19-CAR 共转染 293T 细胞,收集含有包装病毒的培养上清。通过超高速离心法浓缩上清中的

病毒颗粒,分装保存至 -80°C 冰箱。测定滴度前 1 d 将 293T 细胞接种于 96 孔板中,第 2 天感染前计数,并加入病毒 0.1  $\mu$ l 和 1  $\mu$ l。因为 pCDH 载体带有 GFP 融合蛋白,感染 72 h 后,通过流式细胞术检测 GFP 阳性水平并计算病毒感染效率,从而推算出一定体积中病毒的颗粒数。选取感染效率为 5%~30% 组进行病毒滴度计算,计算公式:病毒滴度(TU/ml)=感染效率 $\times$ 感染时细胞数 $\times 10^3$ /病毒悬液体积( $\mu$ l)。

### 1.4 CD19-CAR-T 的构建、扩增与鉴定

通过淋巴细胞分离液分离供者全血中的 PBMC,将 PBMC 与 CD3 磁珠共孵育,其中表达 CD3 的 T 细胞将会被吸附到 LS 吸附柱上。然后用分选专用 MACS 缓冲液将吸附在磁柱上的细胞冲洗出,通过流式细胞术检测 CD3<sup>+</sup> T 细胞的百分比来鉴定分选效率。分选完成后,将包装好的病毒加入 CD3<sup>+</sup> T 细胞培养体系中进行感染,感染后 24、48 及 72 h 分别通过流式细胞术检测 GFP 的表达水平从而确定转染效率。感染后的 T 细胞接种在经 OKT3 预包被的 6 孔板上,在含 500 U/ml IL-2 的 X-VIVO 无血清培养液中连续培养 10 d,并在第 4、7 天更换含有 IL-2 的新鲜培养液,换液的同时进行细胞计数,取出  $2 \times 10^5$  个细胞,通过流式细胞术确定 CD3<sup>+</sup> T 细胞纯度,计算 CD3<sup>+</sup> T 细胞的扩增倍数,同时通过流式细胞术检测表达 GFP 的 CD3<sup>+</sup> T 细胞的比例。第 10 天时,提取 T 细胞基因组 DNA,通过 PCR 检测目的片段的插入效果,上游引物序列:5'-TACATCCTCCCTGTCTGCCTCT-3',下游引物序列:5'-CCACTGCCACTGAACCTTGA-3'。

### 1.5 CD19<sup>+</sup> Ramos 靶细胞体外杀伤实验

Ramos 细胞是表达 CD19 抗原的人淋巴瘤细胞,因此实验以 Ramos 细胞为靶细胞,CD19-CAR-T 为效应细胞,按 5:1 效靶比将这两种细胞共培养,体外杀伤 4 h 后,通过 7-AAD 染色确定死细胞百分比,其中通过 CD3 标记去除 T 细胞,并通过 CD19 标记进一步确定 Ramos 细胞,通过计算 CD3<sup>+</sup> CD19<sup>+</sup> 细胞中 7-AAD 阳性染色率确定杀伤效果。

### 1.6 统计学处理

流式细胞术数据应用 Flowjo 软件进行分析处理,其他数据应用 Graphpad 软件进行统计学分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,均数间比较采用 *t* 检验,以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 成功构建 pCDH-CD19-CAR 重组质粒

本研究 CD19-CAR 采用经典第二代 CAR 分子结构,胞外识别区为 CD19-scFv FMC63,铰链区为 CH2-CH3,共刺激信号为 CD28,信号区为 CD3 $\zeta$ ,通过 PCR

方法将以上片段依次串联形成CD19-CAR片段(图1),将得到的CD19-CAR片段通过经典分子克隆方法,利用双酶切位点 *EcoRI*和 *XbaI*构建到慢病毒载体pCDH上。

2.2 pCDH-CD19-CAR 病毒滴度检测

流式细胞术检测结果(图2)显示,0.1和1 μl 浓缩病毒转染 293-T 的效率分别为 22.8% 和 78.5%, 由此计算出浓缩后的病毒滴度为  $1.2 \times 10^8$  TU/ml。

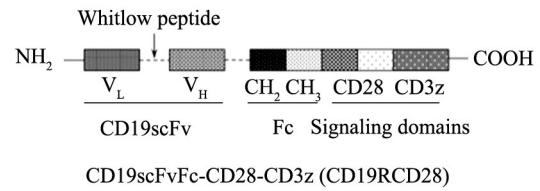


图1 CD19-CAR重组质粒的构建

Fig. 1 The construction of recombinant plasmid pCDH-CD19-CAR

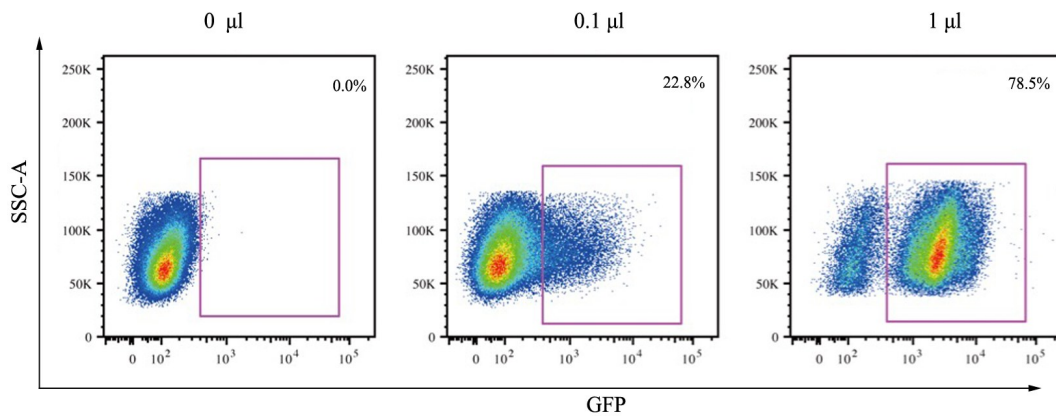


图2 流式术检测病毒转染 293-T 细胞效果

Fig.2 Analysis of transfection efficiency of lentivirus in 293-T cells by FACS

2.3 病毒转染T细胞效率的鉴定

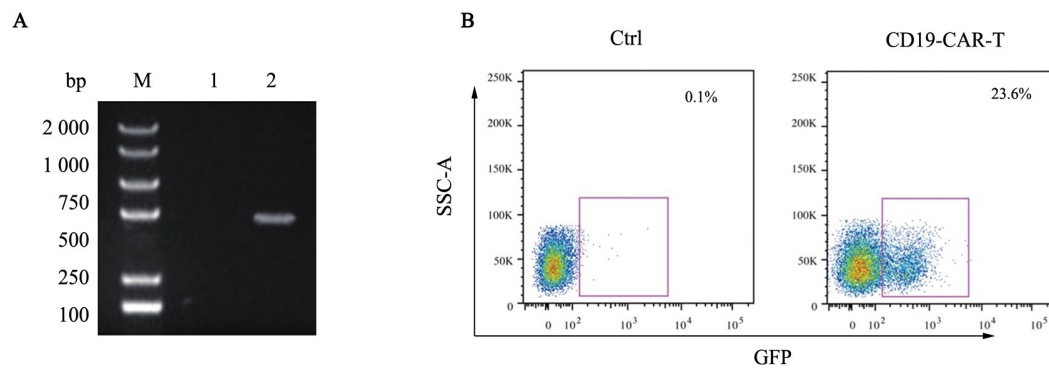
核酸电泳结果(图3A)显示,未被基因修饰的T细胞没有检测到目的片段,而被 CD19-CAR 基因修饰的T细胞内检测出大小约 500 bp 左右的目的片段。

流式检测T细胞表达GFP的水平确定转染效率,结果(图3B)显示,转染72 h后,约有 23.6% 的T细胞表达GFP。

2.4 体外扩增CD19-CAR-T

将转染了CD19-CAR的T细胞在含有IL-2的培

养基中进行培养,10 d后流式检测T细胞表型,结果显示细胞分群正常。在培养过程中细胞培养产物中CD3<sup>+</sup>T细胞的比例维持在90%以上。在培养第10天时,约有(93.7±3.5)%的细胞表达CD3,CD3<sup>+</sup>T细胞扩增倍数为(78.8±23.2)(图4A),其中CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T细胞占比(69.4±18.3)%,CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T细胞占比(21.8±12.4)%。CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>的初始T细胞占比(13.8±5.9)%,CCR7<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>的效应记忆T细胞占比(52.8±10.2)%(图4B)。



A: Detection of CD19-CAR in transfected T cells by PCR; B: The frequency of GFP<sup>+</sup> cells in CD3<sup>+</sup> T cell;

M: DNA maker; 1: T; 2: CD19-CAR-T

图3 流式术检测病毒转染T细胞效果

Fig. 3 Evaluation of transfection efficiency of lentivirus in T cells by FACS

### 2.5 CD19-CAR-T体外高效杀伤Ramos细胞

流式细胞术检测结果(图5)显示,Ramos细胞均表达CD19。CD19-CAR-T杀伤Ramos细胞的效果显著高于未经转染的T细胞[(57.4±9.3)% vs (10.5±3.9)%,*P*<0.01]。

### 2.6 体外扩增CD19-CAR-T质控合格

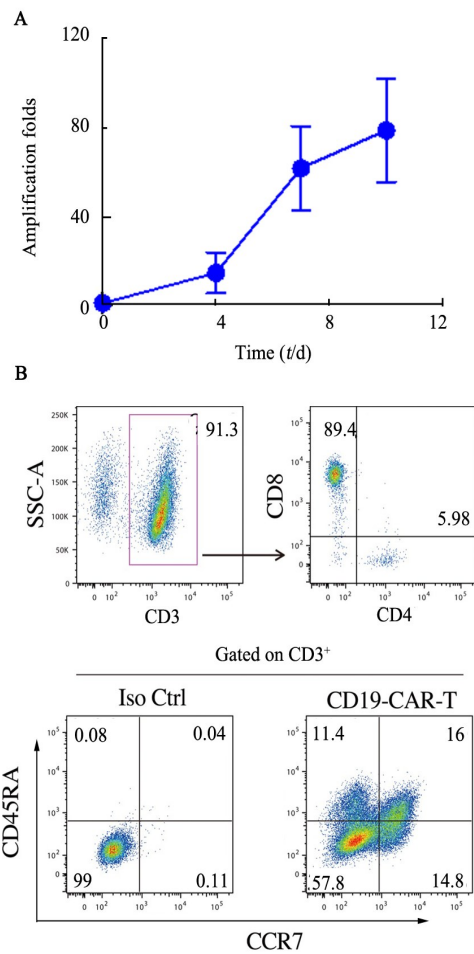
体外检测CD19-CAR-T中细菌、真菌、支原体和衣原体均为阴性,内毒素水平<2 EU/ml。

## 3 讨论

目前在美国、中国、欧洲、日本等国家和地区开展的CAR-T临床治疗研究已经超过100项,包括应用CAR-T靶向CD19、CD20治疗淋巴瘤和白血病,靶向CD138、BCMA治疗多发性骨髓瘤,靶向GD2治疗神经母细胞瘤,靶向CEA治疗胃癌和大肠癌,靶向HER2治疗乳腺癌等的临床治疗研究等,均取得了令人振奋的治疗效果<sup>[8-13]</sup>。特别是靶向CD19分子的CAR-T治疗取得了令人振奋的治疗效果,已治愈多例复发性、难治性白血病患者和淋巴瘤患者<sup>[2-6]</sup>。

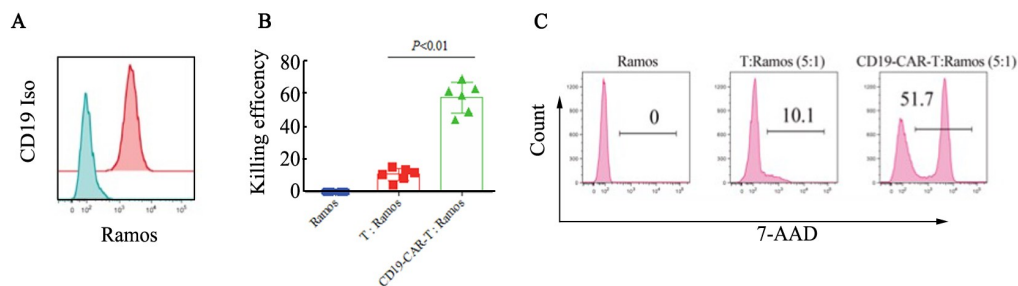
总体来说,中国在这个领域起步较晚,目前技术有待完善,因此本研究探索了用慢病毒转染原代T细胞,构建CD19-CAR-T的技术路线,并验证了重组CD19-CAR-T体外杀伤靶细胞的效果<sup>[14-16]</sup>。通过反复摸索,优化载体结构,最终确定的慢病毒转染体系在人原代T细胞中的转染效率在转染初期达到11%~23%,经扩增体系培养至5 d后,表达GFP的细胞在总的T细胞中可达到40%以上。DAVILA等<sup>[2]</sup>在Sci Transl Med上发表的论文中使用了γ-逆转录病毒对T细胞进行转导,最终平均转染效率为24%,并且在回输患者后得到了显著的疗效,而本研究中的CAR分

子阳性率达到40%以上,故已达到临床应用的要求。



A: The growth curve of CD19-CAR-T cells;  
B: The phenotype of CD19-CAR-T cells on Day 10

图4 CD19-CAR-T的扩增及表型检测  
Fig. 4 CD19-CAR-T amplification and phenotype detection



A: CD19 expression on Ramos cells; B, C: Killing efficiency of CD19-CAR-T cells against CD19<sup>+</sup> Ramos cells  
图5 流式术检测CD19-CAR-T体外杀伤Ramos细胞的效果

Fig. 5 Cytotoxicity of CD19-CAR-T against CD19<sup>+</sup> Ramos cells detected by FCM

经转染的T细胞在无血清培养体系中培养至第10天,T细胞数量从初始的1×10<sup>7</sup>个扩增到了8×10<sup>8</sup>个左右,达到了之前多篇报道中所回输的细胞数量<sup>[2-5]</sup>。3次流式检测显示T细胞经CAR-T慢病毒感染、扩增

10 d后,CD3<sup>+</sup>T细胞含量高于98%。CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T细胞为效应T细胞,介导T细胞对靶细胞进行杀伤,其含量越高,杀伤效果越好。将扩增得到的T细胞与CD19<sup>+</sup>Ramos细胞系共培养后,通过7-AAD染色检测

细胞杀伤效果显示,CD19-CAR-T可特意向识别并杀伤靶细胞,效靶比5:1时体外杀伤效率可达(57.4±9.3)%。曹隼凡等<sup>[17]</sup>使用CD19-CAR-T杀伤靶细胞杀伤靶细胞CD19-K562,在效靶比为5:1时其杀伤效率仅为17%,BARBARA等报道<sup>[18]</sup>使用CD19-CAR-T杀伤不同的靶细胞时,在5:1效靶比下,杀伤K562-CD19的效率为20%~50%。本研究的杀伤效率优于此两者的报道,可能是由于本研究中所得到的CAR-T的阳性率更高,并且CD8<sup>+</sup>T细胞比例较高。经微生物学检测显示,经体外培养得到的重组T细胞无病原体污染及内毒素残留,符合临床应用安全标准。

随着人们对肿瘤免疫治疗技术日渐深入,测序技术的进步帮助人们进一步找到了一些肿瘤特异性抗原<sup>[12,19-20]</sup>,也逐步拓展了嵌合抗原受体技术在除了血液肿瘤以外的肿瘤类别中的应用,对CAR-T技术的不断探索将为免疫治疗在临床恶性肿瘤治疗应用中取得突破性进展提供更多可能。

#### [参 考 文 献]

- [1] CHEADLE E J, GORNALL H, BALDAN V, et al. CAR T cells: driving the road from the laboratory to the clinic[J]. *Immunol Rev*, 2014, 257(1):91-106. DOI:10.1111/imr.12126.
- [2] DAVILA M L, RIVIERE I, WANG X, et al. Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia[J]. *Sci Transl Med*, 2014, 6(224): 224ra25. DOI: 10.1126/scitranslmed.3008226.
- [3] GARFALL A L, MAUS M V, HWANG W T, et al. Chimeric antigen receptor T cells against CD19 for multiple myeloma[J]. *N Engl J Med*, 2015, 373(11): 1040-1047. DOI:10.1056/NEJMoa1504542.
- [4] GRUPP S A, KALOS M, BARRETT D, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia[J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(16):1509-1518. DOI:10.1056/NEJMoa1215134.
- [5] KOCHENDERFER J N, ROSENBERG S A. Treating B-cell cancer with T cells expressing anti-CD19 chimeric antigen receptors[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2013, 10(5): 267-276. DOI: 10.1038/nrclinonc.2013.46.
- [6] MARTIN P. The use of CAR T cells in diffuse large B-cell lymphoma and mantle cell lymphoma[J]. *Clin Adv Hematol Oncol*, 2017, 15(4):247-249.
- [7] ROMERO D. Immunotherapy: A CAR T-cell recipe for success[J/OL]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017, 14(6): 330[2017-09-01]. <https://www.nature.com/articles/nrclinonc.2017.64>. DOI:10.1038/nrclinonc.2017.64.
- [8] BRENTJENS R J, SANTOS E, NIKHAMIN Y, et al. Genetically targeted T cells eradicate systemic acute lymphoblastic leukemia xenografts[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(18 Pt 1): 5426-5435. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-0674.
- [9] HUDECEK M, LUPO-STANGHELLINI M T, KOSASIH P L, et al. Receptor affinity and extracellular domain modifications affect tumor recognition by ROR1-specific chimeric antigen receptor T cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(12):3153-3164. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-13-0330.
- [10] KARLSSON H, LINDQVIST A C, FRANSSON M, et al. Combining CAR T cells and the Bcl-2 family apoptosis inhibitor ABT-737 for treating B-cell malignancy [J]. *Cancer Gene Ther*, 2013, 20(7): 386-393. DOI:10.1038/cgt.2013.35.
- [11] WEILAND J, ELDER A, FORSTER V, et al. CD19: A multifunctional immunological target molecule and its implications for Blinatumab acute lymphoblastic leukemia[J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2015, 62(7):1144-1148. DOI:10.1002/pbc.25462.
- [12] GOMES-SILVA D, SRINIVASAN M, SHARMA S, et al. CD7-edited T cells expressing a CD7-specific CAR for the therapy of T-cell malignancies[J]. *Blood*, 2017, 130(3):285-296. DOI:10.1182/blood-2017-01-761320.
- [13] KRENCIUTE G, PRINZING B L, YI Z, et al. Transgenic expression of IL15 improves antitumor activity of IL13Ralpha2-CAR T cells but results in antigen-loss variants[J]. *Cancer Immunol Res*, 2017, 5(7):571-581. DOI:10.1158/2326-6066.CIR-16-0376.
- [14] TUMAINI B, LEE D W, LIN T, et al. Simplified process for the production of anti-CD19-CAR-engineered T cells[J]. *Cytotherapy*, 2013, 15(11):1406-1415. DOI:10.1016/j.jcyt.2013.06.003.
- [15] LEE D W, KOCHENDERFER J N, STETLER-STEVENSON M, et al. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial[J]. *Lancet*, 2015, 385(9967): 517-528. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)61403-3. <https://www.nature.com/articles/nbt0617-492>. DOI:10.1038/nbt0617-492.
- [16] ABBASI J. Amid FDA approval filings, another CAR-T therapy patient death[J/OL]. *JAMA*, 2017, 317(22): 2271[2017-09-02]. <https://jamanetwork.com/journals/jama/article-abstract/2631510?redirect=true>. DOI:10.1001/jama.2017.7153.
- [17] 曹隼凡, 羊铁驹, 康立清, 等. CD19-CAR-T和CD19-CAR-CIK细胞对表达CD19 K562细胞株杀伤作用的比较[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2017, (6):28-31. DOI:10.13404/j.cnki.cjbh.2017.06.011.
- [18] BARBARA T, DANIEL W L, TASHA L, et al. Simplified process for the production of anti-CD19-CAR engineered T cells[J]. *Cytotherapy*, 2013, 15(11): 1406-1415. DOI: 10.1016/j.jcyt.2013.06.003
- [19] OTT P A, HU Z, KESKIN D B, et al. An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma[J]. *Nature*, 2017, 547(7662): 217-221. DOI:10.1038/nature22991.
- [20] SAHIN U, DERHOVANESSIAN E, MILLER M, et al. Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer[J]. *Nature*, 2017, 547(7662): 222-226. DOI:10.1038/nature23003.

[收稿日期] 2017-12-16

[修回日期] 2018-02-08

[本文编辑] 黄静怡