

用于癌症免疫疗法的慢病毒载体的研究进展

邱苏赣 综述,白玉 审校

国家食品药品监督管理总局药品审评中心,北京 100022

摘要: 近年来,得益于对癌症免疫监视和逃逸机制理解的不断深入及基因转运载体的发展,免疫疗法在临床上取得了一系列的成功。本文将介绍包括慢病毒载体(lentivirus, LV)的基本结构和生活史在内的发展历程。LV 应用中的最主要安全性风险来源于具有复制能力的慢病毒载体(replication competent LV, RCL),针对这一问题发展出了一系列新的 LV 和相应的辅助手段。目前作为癌症免疫疗法主流的过继细胞传输法包括 T 细胞受体(T cell receptor, TCR)-T 细胞和嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)-T 细胞疗法,其中 LV 已被广泛应用。此外本文还针对 LV 应用中的一些监管方面的问题及 LV 的未来发展方向进行探讨。

关键词: 肿瘤;免疫疗法;慢病毒载体

中图分类号: R730.5 文献标识码: A 文章编号: 1004-5503(2019)05-0589-05

DOI:10.13200/j.cnki.cjb.002622

Progress in research on lentivirus vector used for immunotherapy of tumor

QIU Su-gan, BAI Yu

Drug Evaluation Center, State Food and Drug Administration, Beijing 100022, China

Corresponding author: BAI Yu, E-mail: baiy@cde.org.cn

Abstract: Recently, due to the advancement in understanding of mechanism of immunological surveillance and escape of cancer as well as the development of gene delivery vector, immunotherapy achieved a number of clinical success. In this review we will overview the progress in research on lentivirus (LV) including its basic structure and life cycle. The main issue of lentivirus in safety comes from the replication competent LV (RCL), therefore iteration vector and other approaches have been developed. Nowadays, LV has been broadly used in the adoptive T-cell transfer therapy, the mainstream of cancer immunotherapy, such as T cell receptor (TCR)-T therapy and chimeric antigen receptor (CAR)-T therapy. The problem in regulation and the future direction of LV vector are also discussed.

Key words: Tumor; Immune therapy; Lentivirus vector

癌症免疫疗法是指为了根除肿瘤细胞而利用免疫系统的疗法。体内的免疫细胞本来就有识别和攻击恶性细胞的机制,免疫疗法旨在通过多种不同方法来加强和补充这些自然反应,其中包括抗体和细胞因子疗法、癌症疫苗和过继细胞输注。这些疗法中一些需要对患者的细胞进行基因改造,或直接杀伤肿瘤细胞或诱导免疫反应或提高其靶向和细胞毒性。2006 年,有研究者首次尝试利用特异性 T 细胞受体导入淋巴细胞以治疗黑色素瘤,当时使用的病毒载体是 γ -反转录病毒载体(γ -RV)^[1]。与 γ -RV 相比,慢病毒载体(lentivirus, LV)是最近才在免疫基因疗法中得到应用的。 γ -RV 和 LV 均能稳定的将其荷载整合入靶细胞的基因组从而达成目的基因的

持续表达。此外 LV 有 3 个显著的特性使其相较于 γ -RV 更适用于基因疗法:LV 可容纳高达 10 kb 大小的基因;LV 在宿主基因组中选择较为安全的整合位点;LV 可转导分裂细胞及非分裂细胞^[2-3]。2012 年,19.7%的基因疗法试验中使用了 γ -RV,使用 LV 的仅占 2.9%^[4],而 2017 年,两者占比分别为 17.9%和 7.3%^[5]。

1 慢病毒载体的结构及生活史

LV 和 γ -RV 同属逆转录病毒科,其基因组包含两类基因,第一类为逆转录病毒感染和复制所必须的基础基因,包括编码结构蛋白的 *gag* 基因、编码酶蛋白的 *pol* 基因、编码包膜糖蛋白的 *env* 基因;第二

类为病毒复制必需的 *rev* 和 *tat* 基因以及附加基因 *vif*、*vpr*、*vpu* 和 *nef*^[6]。结构蛋白对于病毒核心内 RNA 周围的结构包装至关重要。病毒核心内含有 2 个拷贝的相同 RNA 以及与核衣壳蛋白结合在一起的整合酶、反转录酶及蛋白酶。核心的外部,存在一层能与外层脂膜相互作用的基质蛋白。由 *env* 编码的糖蛋白镶嵌于此外层中。

生活史方面,病毒的感染起始于由 *env* 编码的糖蛋白与细胞膜受体结合之时。结合事件的发生使得病毒与细胞发生融合。在结合之后,病毒内容物被传输至细胞。一旦进入细胞,病毒解包装并将核心组分释放入胞浆。其中单链 RNA 基因组会被转化为 cDNA 并运输入细胞核。LV 将其 DNA 整合入宿主基因组,然后利用宿主的机制将其基因转录回 RNA。一旦完成复制并回到胞浆,病毒 RNA 被翻译并包装入一个新的病毒颗粒中,然后以出芽方式离开细胞完成生命周期^[7]。

2 LV的发展

慢病毒系统的生产过程,是将 1 个传输载体、1 个包装载体以及 1 个编码包膜的载体共转染 HEK293T 细胞,然后从细胞培养上清中收获病毒颗粒。在最初的第 1 代 LV 中,传输载体提供了病毒 RNA,其中包含 2 个长末端重复序列(long terminal

repeat LTR)、1 个 Rev 反应元件(Rev reaction element, RRE)、1 个包装信号(Ψ)及 1 个转基因表达盒。包装载体中包含 2 个调节性基因(*tat* 和 *rev*)、辅助基因及 *gag* 和 *pol* 基因。包膜载体中编码包膜的基因并非来自慢病毒本身,而是包含水泡口炎病毒 G 蛋白(vesicular stomatitis virus G protein, VSV-G)的包膜基因,目的在于改善 LV 的亲嗜性。

为了减少具有复制能力的慢病毒载体(replication competent LV, RCL)生成,对第 1 代 LV 进行了安全性方面的改造,通过将包装载体中的辅助基因(*vif*、*vpr*、*vpu* 和 *nef*)去除,形成第 2 代 LV;通过进一步在传输载体中利用 1 个巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)启动子/LTR 杂交体来代替 *tat* 基因,获得了第 3 代 LV。一般认为同源重组是导致 RCL 生成的主要原因之一,为了降低同源重组的发生几率,第 3 代 LV 的设计思路除了去除非必要基因外,还可将功能性的病毒基因分别单独用质粒表达,从而明显降低同源重组的几率。

另一个可以提高 LV 安全性的策略是删除位于转移载体的 3'LTR U3 区的启动子和增强子元件。这种缺失的载体被称为自我灭活型(self-inactivating, SIN)载体,在逆转录过程中,U3 缺失区域从 3'LTR 到 5'LTR 被复制,产生了包含 U3 修饰的 LTR 的整合载体,可减少启动子的活性(大约为原活性的 10%)。目前常见的 LV 生产系统见表 1。

表 1 LV 生产系统的比较

Tab 1. Comparison of LV production system

生产系统	质粒数	3'LTR 的切除(自失活)	含有 HIV 基因的包装质粒数	辅助基因 <i>vif</i> 、 <i>vpr</i> 、 <i>vpu</i> 、 <i>nef</i>	编码 <i>Tat</i> 和 <i>Rev</i> 蛋白的序列	重叠的 <i>Gag</i> 和 <i>Pol</i> 多重蛋白结构	RCL 形成的需求
第 1 代	3	无	1	全部包含	<i>Tat</i> 和 <i>Rev</i> 被包含在单个包装质粒中	在同一个质粒中	2 次同源重组
第 2 代	3	无	1	全部缺失	<i>Tat</i> 和 <i>Rev</i> 被包含在单个包装质粒中	在同一个质粒中	3 次同源重组
SIN 第 3 代	4	有	2	全部缺失	<i>Tat</i> 缺失, <i>Rev</i> 由单个独立质粒表达	在同一个质粒中	在不具同源性的质粒间发生 4 次同源重组,从而得到一个弥补“SIN”的启动子
Lenti-X™	6	无	3	全部缺失,除了无功能 <i>vpr</i> 的会与 <i>pol</i> 编码序列并作为反转录酶和整合酶的融合蛋白被包装进颗粒	<i>Tat</i> 和 <i>Rev</i> 由单个质粒独立表达	分别在两个质粒中	在不具同源性的质粒间发生 4 次同源重组,与传输载体重组,修复点突变以并得到启动子以表达 <i>Tat</i> 、 <i>Rev</i> 、 <i>Gag</i> 和 <i>Pro</i>
Translenti-viral™	6	有	3	全部缺失,除了无功能 <i>vpr</i> 的会与 <i>pol</i> 编码序列并作为反转录酶和整合酶的融合蛋白被包装进颗粒	<i>Tat</i> 和 <i>Rev</i> 由两个质粒独立表达	分别在两个质粒中	在不具同源性的质粒间发生 4 次同源重组,与传输载体重组,修复点突变以并得到启动子以表达 <i>Tat</i> 、 <i>Rev</i> 、 <i>Gag</i> 和 <i>Pro</i>

注: Lenti-X™ 是由 Clontech 实验室生产的商业用 LV 表达系统; Translenti-viral™ 是由 Open Biosystem 提供的商业用 LV 表达系统。

3 LV 在癌症免疫疗法中的应用

伴随着一系列临床上应用的成功,过继传输经过基因工程改造的 T 细胞已经成为目前癌症免疫疗法中的主流。自体 T 细胞疗法包括从患者身上获取 T 细胞并选取在抗原选择上对肿瘤具有良好亲和力的高度抗原特异性的 T 细胞,然后将这些细胞进行激活、扩增并回输给患者。而对 T 细胞进行基因工程改造可提高其识别、增殖以及杀伤特异肿瘤细胞的能力。利用重组 LV 进行基因改造的 T 细胞,包括基因有异源性的 T 细胞受体(T cell receptor, TCR)和嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)。

TCR-T 细胞疗法中,TCR 是由 1 条 α 链和 1 条 β 链组成的异二聚体结构,识别由主要组织相容性复合物(major histocompatibility complex, MHC)和经处理的细胞内蛋白组成的复合物。TCR 与 CD3 信号复合物相结合,是通过 TCR 激活 T 细胞所必需的过程。现在有一种策略,即从对肿瘤相关抗原(tumor-associated antigen, TAA)具有高度特异性和活性的 T 细胞中,获取 TCR 并将其 cDNA 转移至从另一群患者体内分离的外周血 T 细胞中。这项策略的关键点在于被转移的 TCR 能保持高度的肿瘤反应性和特异性。在这方面,由于具有双顺反子的慢病毒能更为方便的表达 TCR 复合物的 α 和 β 链基因,从而使 LV 成为 TCR 疗法中选择的转基因载体^[8]。目前有多项使用 LV 转导 TCR 针对不同癌症的自体 T 细胞的临床实验正在进行中,比较具代表性的为一项以 NY-ESO-1 为靶点的治疗食管癌的一期临床试验(临床试验代号:NCT01795976);此外还有多个以转移黑色素瘤中的 T 细胞识别的黑色素瘤抗原-1(melanoma antigen recognized by T cells 1, MART-1)为靶点的试验,其中包括一个联合使用针对 MART-1 和递呈 MART-1 的 DC 的一期临床试验(临床试验代号:NCT00910650)。

TCR-T 细胞疗法所面临的一个潜在问题就是外源性 TCR 链与内源性 TCR 链组合产生了意外的异源性 TCR 形式而造成的脱靶毒性^[9]。一个可行的解决方案是使用经过特异性设计的锌指核酶(zinc finger nuclease, ZFN)来干扰内源性基因。研究表明,以 TCR 基因为靶点的 ZFN 可有效阻断 T 细胞中的 TCR 表达,以 LV 为载体的 Wilms 肿瘤 1 抗原特异性 TCR 经 ZFN 编辑的 T 细胞与未经 ZFN 编辑的 T 细胞相比,TCR 纯度显著提高,而脱靶效应显著降低^[10]。

CAR-T 细胞疗法是目前最为主流的癌症免疫疗

法,到目前为止已有两项 CAR-T 疗法获得美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)的上市批准^[11-12],其中一项使用的就是 LV^[12]。CAR-T 细胞疗法,是通过在体外向患者 T 细胞转导 CAR 序列以达到对 T 细胞进行改造的目的,CAR 则是由不同蛋白的多个不同结构域组成并被装配成一个人工的受体。这些受体被设计定位在细胞膜上,并且由胞外和胞内区域组成,其胞外区域被设计与肿瘤细胞表面表达的特异性 TAA 结合。此区域通常由一个来自抗体的单链可变区(single-chain variable fragment, scFv)组成,识别并结合特异性的 TAA 从而使免疫细胞具有针对靶癌症细胞的特异性。胞内结构域的数量为 1~3 个,被设计用来激活/加强 T 细胞的细胞毒能力。胞内结构域能增加效应细胞的细胞因子分泌、增殖和持久性。这些结构域一般包括来自 TCR 的 CD3 ζ ,以及 CD28、OX40 和/或 4-1BB 等共刺激分子。第一代 CAR 分子的胞内结构域仅包含 TCR 的 CD3 ζ ,第二代 CAR 分子的胞内结构域还包含 CD28、OX40 和/或 4-1BB 等共刺激分子中的一种^[13],第三代 CAR 分子的胞内结构域则包含 2 个共刺激分子(CD28、4-1BB)^[14],而最近开发的第四代 CAR 分子还引入了促炎症细胞因子(如 IL-12)和共刺激配体(4-1BBL 和 CD40L)^[15-16]。

4 LV 应用中的监管考虑

LV 在 CAR-T 等癌症免疫疗法中最主要的安全性问题就是发生病毒间的同源重组,这种重组会产生 RCL^[17],而当 LV 中 RCL 含量升高以后,伴随着病毒复制的增多对宿主 DNA 的插入突变发生几率也会随之增高。因此, FDA、欧洲药品管理局(European Medicines Agency, EMA)以及世界上大部分监管机构均要求对载体和患者进行 RCL 的检测^[17-18],也就是要求对病毒载体及经过遗传改造的细胞产品均需进行 RCL 检测。目前检测 RCL 的最主要方法为 S+L 检测,这是一种将检测样本与允许病毒复制的细胞一起孵育的方法^[19],通过 PCR 或血清学检测可以监测患者体内的 RCL。FDA 建议在第 1 年对接受过免疫疗法的患者每 3 个月进行 1 次检测。因为通过多质粒体系将病毒基因组分开表达,第三代具有 SIN 设计的 LV 产生 RCL 的可能性较低。

由于使用 LV 具有产生 RCL 的可能性,而由此产生的 RCL 引起的插入突变会导致肿瘤,因此,美国和欧洲的卫生监管部门对于接受过使用 LV 的疗法均要求进行长时间的随访。各国对于随访的要求

不同,在美国推荐的方案是在接受疗法后 15 年每年随访 1 次,获得 FDA 批准的 tisagenlecleucel 其长期上市后监管方案就是以此为理论参考的。但是对于患者长期随访的最佳持续时间并非一成不变,而是取决于对多种因素的综合考虑,其中包括载体以及转基因的表达持续时间。除了对 RCL 以及次生的肿瘤,患者还需进行检查以诊断神经性、风湿性和自身免疫性不良反应的发生及恶化^[20]。FDA 还要求对参与使用 LV 的临床试验的患者,均需将所使用的 LV 作用机理以及整合进宿主 DNA 的可能性进行告知。

5 讨论及展望

为了提高 LV 的安全性已进行了很多的研究,其中大多研究均是针对 LV 进行设计。非整合型慢病毒(non-integrating lentiviral vector, NILV)就是一个可以避免插入性突变的方法。NILV 能转染分裂细胞和非分裂细胞,其病毒整合酶蛋白有缺陷,病毒基因组游离于胞内而不是整合进宿主的基因组 DNA 中^[21]。这样预计在分裂细胞中 NILV 仅能维持短时间的表达,尽管这种稀释效应在某些情况下很不利,但对于免疫细胞疗法这种不需要长时间基因表达的条件下,反而会有利于安全性。

目前在很多临床前研究中将 NILV 当作疫苗使用,可诱导体液和细胞免疫反应,还有抗肿瘤免疫反应^[22]。还可将 ZFN 与 NILV 一起共转染细胞,以便于将编码载体的重组 DNA 整合进宿主 DNA 的特异位点,而不是随机整合^[23],这样可降低由于逆转录病毒随机插入宿主基因组而导致的原癌基因激活或抑癌基因沉默而使细胞向肿瘤转化的风险。在一项临床前研究中,研究者尝试利用 ZFN 将 T 细胞中内源性的 TCR 除去,由 NILV 携带的具有抗肿瘤特异性的 TCR 替代^[10]。本文前面已经提及过 ZFN 对于内源性 TCR 的编辑能降低脱靶效应。如果需要在分裂细胞中进行长期表达,可通过表达噬菌体 ϕ C31 的整合酶的双重 NILV 系统^[24]。

6 结语

针对癌症的免疫疗法近年来取得了重大进展,而 LV 因其具有较高的安全性和较好的长期表达能力越来越多被应用于癌症免疫疗法中。科研工作者对 LV 进行了大量的迭代改进,而监管机构人员也需对其安全性的考量进行充分的评估,以便更好的

进行管理。本文为更好地发挥 LV 的功效并提高其安全性提供了参考。

参考文献

- [1] MORGAN R A, DUDLEY M E, WUNDERLICH J R, *et al.* Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes [J]. *Science*, 2006, 314 (5796): 126-129.
- [2] BRECKPOT K, AERTS J L, THILEMANS K. Lentiviral vectors for cancer immunotherapy: transforming infectious particles into therapeutics [J]. *Gene Ther*, 2007, 14 (11): 847-862.
- [3] ESCORS D, BRECKPOT K. Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential [J]. *Arch Immunol et Ther Exp*, 2010, 58 (2): 107-119.
- [4] GINN S L, ALEXANDER I E, EDELSTEIN M L, *et al.* Gene therapy clinical trials worldwide to 2012-an update [J]. *J Gene Med*, 2013, 15 (2): 65-77.
- [5] GINN S L, AMAYA A K, ALEXANDER I E, *et al.* Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: an update [J]. *J Med*, 2018, 20 (5): e3015.
- [6] MALIM M H, EMERMAN M. HIV-1 accessory proteins-ensuring viral survival in a hostile environment [J]. *Cell Host & Microbe*, 2008, 3 (6): 388-398.
- [7] PALÙ G, PAROLIN C, TAKEUCHI Y, *et al.* Progress with retroviral gene vectors [J]. *Rev Med Virol*, 2015, 10 (3): 185-202.
- [8] YANG S, COHEN C, ZHAO Y, *et al.* Development of optimal bicistronic lentiviral vectors facilitates high-level TCR gene expression and robust tumor cell recognition [J]. *Gene Ther*, 2008, 15 (21): 1411.
- [9] BENDLE G M, LINNEMANN CHOOIJKAAS A I, BIES L, *et al.* Lethal graft-versus-host disease in mouse models of T cell receptor gene therapy [J]. *Nat Med*, 2010, 16 (5): 565-570.
- [10] ELENA P, PIETRO G, ANGELO L, *et al.* Editing T cell specificity towards leukemia by zinc finger nucleases and lentiviral gene transfer [J]. *Nat Med*, 2012, 18 (5): 807-815.
- [11] GHOBADI A. Chimeric antigen receptor T cell therapy for non-Hodgkin lymphoma [J]. *Curr Res Translat Med*, 2018, 66 (2): 43-49.
- [12] LIU Y, CHEN X, HAN W, *et al.* Tisagenlecleucel, an approved anti-CD19 chimeric antigen receptor T-cell therapy for the treatment of leukemia [J]. *Drugs Today (Barcelona, Spain: 1998)*, 2017, 53 (11): 597-608.
- [13] JENSEN M C, RIDDELL S R. Design and implementation of adoptive therapy with chimeric antigen receptor-modified T cells [J]. *Immunol Rev*, 2013, 257 (1): 127-144.
- [14] CARMINE C, MILONE M C, RAFFIT H, *et al.* Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106 (9): 3360-3365.

- [15] MARKUS C , CAROLINE K , HOMBACH A A , *et al.* IL-12 release by engineered T cells expressing chimeric antigen receptors can effectively Muster an antigen-independent macrophage response on tumor cells that have shut down tumor antigen expression [J]. *Cancer Res* , 2011 , 71 (17) : 5697.
- [16] ZHAO Z G , CONDOMINES M , SADELAIN M , *et al.* Structural design of engi-neered costimulation determines tumor rejection kinetics and persistence of CAR T cells [J]. *Cancer Cell* , 2015 , 28 (4) : 415-428.
- [17] BEAR A S , MORGAN R A , CORNETTA K , *et al.* Replication-competent retroviruses in gene-modified T cells used in clinical trials : is it time to revise the testing requirements [J]. *Mol Ther J Am Soci Gene Ther* , 2012 , 20 (2) : 246.
- [18] Products CIPM. Editor note for guidance on the quality , preclinical and clinical aspects of gene transfer medicinal products [S]. London : The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products , 2001.
- [19] CHEN J , REEVES L , CORNETTA K. Safety testing for replication-competent retrovirus associated with gibbon ape leukemia virus-pseudotyped retroviral vectors [J]. *Hum Gene Ther* , 2001 , 12 (1) : 61-70.
- [20] Administration UFaD. Guidance for industry : supplemental guidance on testing for replication competent retrovirus in retroviral vector based gene therapy products and during follow-up of patients in clinical trials using retroviral vectors [OL]. (2001-11-14) [2018-11-17]. [http :// www.fda.gov / Biologics-Blood-Vaccines / GuidanceComplianceRegulatoryInformation / Guidances / Cellulara](http://www.fda.gov/Biologics-Blood-Vaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Cellulara).
- [21] STÉPHANIE P , CHAMSY S , MARTINE B , *et al.* Lentiviral vectors with a defective integrase allow efficient and sustained transgene expression in vitro and in vivo [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* , 2006 , 103 (47) : 17684-17689.
- [22] KATARZYNA K , SAYANDIP M , LUIS A , *et al.* Nonintegrating lentivector vaccines stimulate prolonged T-cell and antibody responses and are effective in tumor therapy [J]. *J Virol* , 2009 , 83 (7) : 3094.
- [23] CORNU T I , CATHOMEN T. Targeted genome modifications using integrase-deficient lentiviral vectors [J]. *Mol Ther* , 2007 , 15 (12) : 2107-2113.
- [24] GRANDCHAMP N , ALTÉMIR D , PHILIPPE S , *et al.* Hybrid lentivirus-phiC31-int-NLS vector allows site-specific recombination in murine and human cells but induces DNA damage [J]. *PLoS One* , 2014 , 9 (6) : e99649.

收稿日期 :2018-12-04 编辑 :王佳凤

(上接第 588 页)

- [10] DUINTJER TEBBENS R J , PALLANSCH M A , COCHI S L , *et al.* An economic analysis of poliovirus risk management policy options for 2013-2052 [J]. *BMC Infect Dis* , 2015 , 15 (1) : 389.
- [11] DUINTJER TEBBENS R J , PALLANSCH M A , KIM J H , *et al.* Oral poliovirus vaccine evolution and insights relevant to modeling the risks of circulating vaccine-derived polioviruses (cVDPVs) [J]. *Risk Anal* , 2013 , 33 (4) : 680-702.
- [12] WASSILAK S , PATE M A , WANNEMUEHLER K , *et al.* Outbreak of type 2 vaccine-derived poliovirus in Nigeria : emergence and widespread circulation in an underimmunized population [J]. *J Infect Dis* , 2011 , 203 (7) : 898-909.
- [13] BURNS C C , DIOP O M , SUTTER R W , *et al.* Vaccine-derived polioviruses [J]. *J Infect Dis* , 2014 , 210 (Suppl 1) : S283-S293.
- [14] World Health Organization. Meeting of the Strategic Advisory Group of Experts on immunization , April 2016-conclusions and recommendations [J]. *Wkly Epidemiol Rec* , 2016 , 91 (21) : 266-284.
- [15] CEYHAN M , YILDIRIM I , TEZER H. A fully liquid DTaP-IPV-HB-PRP-T hexavalent vaccine for primary and booster vaccination of healthy Turkish infants and toddlers [J]. *Turkish J Med Sci* , 2017 , 47 : 1247-1256.
- [16] XING L L , CAO L S. Poliomyelitis immunization status and progress [J]. *Chin J Vacc Immun* , 2018 , 24 (2) : 243-248. (in Chinese)
- 邢力莉 , 曹玲生. 脊髓灰质炎疫苗接种现状与进展 [J]. *中国疫苗和免疫* , 2018 , 24 (2) : 243-248.
- [17] YU W Z , WEN N , WANG H B , *et al.* Challenges and strategies on maintaining polio-free status in current period in China [J]. *Chin J Vacc Immun* , 2013 , 19 (5) : 468-472. (in Chinese)
- 余文周 , 温宁 , 汪海波 , 等. 我国现阶段维持无脊髓灰质炎状态面临的挑战和对策 [J]. *中国疫苗和免疫* , 2013 , 19 (5) : 468-472.
- [18] US CDC. Importation of wild poliovirus into Qinghai Province-China , 1999 [J]. *JAMA* , 2000 , 283 (11) : 1414-1415.
- [19] SHENG J , ZHU Q R. Poliovirus vaccine immunization strategy in China after the eradication of wild poliovirus [J]. *Chin J Prac Pediatr* , 2016 , 31 (5) : 330-332. (in Chinese)
- 沈军 , 朱启镨. 我国消灭脊髓灰质炎野病毒流行后的脊髓灰质炎疫苗接种 [J]. *中国实用儿科杂志* , 2016 , 31 (5) : 330-332.
- [20] National Institutes for Food and Drug Control. [2018-10-31]. [http :// www.nifdc.org.cn / CL0006 /](http://www.nifdc.org.cn/CL0006/).
- [21] THOMASSEN Y E , BAKKER W A. sIPV process development for costs reduction [J]. *Vaccine* , 2015 , 33 (35) : 4307.

收稿日期 :2018-11-01 编辑 :王佳凤