

腸病毒疫苗全球協同化

翁子玉 李敏西

國家衛生研究院 感染症與疫苗研究所

人類腸病毒可分成四種，包括 A、B、C 和 D，總共有超過一百個血清型，其中腸病毒 71 型 (EV-A71) 容易導致嬰幼童手足口病，甚至可能會造成神經系統等併發症。近兩年全球新冠病毒大流行，國內因為落實勤洗手，戴口罩等政策，使得腸病毒確診數下降，但是腸病毒依舊是亞太地區的嬰幼兒容易感染到的疾病，因此，發展 EV-A71 疫苗是刻不容緩。目前有三家 EV-A71 疫苗 (中國醫學科學院，北京科興和北京微谷) 在中國取得上市許可，國內有高端和國光公司在進行跨國第三期臨床試驗，此疫苗是由疾管署及國衛院合作開發，然後以非專屬授權技轉給這兩家公司，國衛院腸病毒國合團隊持續協助這兩家公司到越南進行第三期臨床試驗，高端已在期刊發表其最新第三期試驗結果，臨床保護力高達 95% 以上，是國內開發人用疫苗的新里程碑 [1]。

從疫苗開發到上市的路上，有許多過程跟細節環環相扣。以去活化病毒疫苗的定量來說，雖然去活化病毒會經由純化的步驟獲得，但是不同的生產平台及純化方式會有不同的純度，其不純物可能包含來自於生產病毒的細胞蛋白質等。因此，傳統的蛋白質定量法並不能代表病毒的抗原量。另外，如果使用新開發的酵素免疫分析法 (ELISA) 來偵測病毒抗原，但是標準品若不統一，偵測到的抗原量也會有差異。所以若能有一致的偵測方法或標準品，就可以確實知道病毒疫苗的有效劑量，藉此協助驗證疫苗的品質，以及後續偵測疫苗之有效性。

由於各家公司對於定量有效病毒抗原劑量 (Potency assay) 的標準不一，因此需要有公認的標準品及方法來進行定量，以確保疫苗的劑量和品管。中國在 2011 年開始製備第一個國家標準品 (National standard, NS)

[2]，其病毒株是 EV-A71 的 C4 型別。首先，這四家實驗室先選出一特異性，再現性及準確性較高的 ELISA 方法，然後再用這個方法去定量標準品。之後又利用不同的 ELISA 方法去驗證這個標準品具有良好線性。另外，中和試驗可幫助評估疫苗的免疫原性以及偵測族群中的陽性率。但是，若使用不同的方法跟不同的病毒株去進行中和試驗，會使得在評估不同疫苗的效力跟病毒抗原性跟免疫原性上有差異。因此，除了建立疫苗標準品，開發 EV-A71 的標準血清也是很重要的。英國生物製劑標準品與管制國家實驗室 (National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC) 和中國食品藥品檢定研究所 (China National Institutes for Food and Drug Control, NIFDC) 也發起了開發第一個 EV-A71 國際標準血清的共標試驗，總共有 17 個團隊加入此國際研究，台灣國衛院李敏西研究員及食藥署也受邀參加，所有的參與者會用各家的中和方法進行測試，並使用同一株的病毒感染細胞 (基因型 C4) [3]。所建議的共標測量方法是 TCID₅₀，也有參與者是使用其他方法如 Plaque reduction neutralization test (PRNT)。首先，他們從 62 個血清中選出 25 個血清是對 CA16 沒有中和效果，但是對 EV-A71 是有中和效果的，這幾個血清再各別混合為三個標準血清的候選物。整體來說，三個候選物對基因型 C4 是有較好的中和

效果的。他們也在測試後發現，使用不同的 Vero 細胞或 RD 細胞進行實驗沒有顯著上差異。以穩定度測試來說，大體上三個候選物在負二十度、四度、二十度並沒有顯著上差異。統整結果後，14/140 被選為第一個 EV-A71 的國際標準血清，14/138 為另一個未來可以取代 14/140 的標準血清，13/238 則被選為參考血清試劑。

NIBSC 和 NIFDC 在後續也對 EV-A71 疫苗的標準品發起國際共標試驗，此國際合作研究有 14 個實驗室參與，包括台灣四個團隊 (國衛院、食藥署、國光公司、高端公司)，各實驗室需要利用 NIBSC 所開發和自行開發的 ELISA 方法去定量四種國際標準品 (International standard, IS) 候選物，所使用的參考品就是中國當初開發的 NS，因為那是當時唯一已知病毒抗原量的標準品。另外，NIBSC 也同時開發了凍乾方法來優化國際標準品，並測試這些候選品的穩定性。WHO 整理 EV-A71 標準品國際共標研究的結果後，選出了 18/116 為其去活化疫苗的第一個國際標準品。WHO 的報告中提到，18/116 的安瓶保存數量較多，沒有偵測到細菌污染，整體結果也比其它的標準品好。其他的標準品候選物 18/120 和 18/156 也被選為參考試劑[4]，未來的研究方向則是朝向建立這些標準品的動物體內效力測定模式。

近幾年來，世界各地也舉辦和

腸病毒疫苗相關的研討會，以下節錄已有發表會議結論的兩場。另外，兩場會議都有提到小兒麻痺病毒也是腸病毒的一種，因為小兒麻痺疫苗已經被廣泛地使用，可以作為 EV-A71 疫苗開發過程的參考。EV-A71 疫苗具有不同結構的空殼病毒顆粒 (Empty particle) 和完整病毒顆粒 (Full particle) [5]。不同疫苗產品，甚至是不同批次之間，如果有不同比例的兩種顆粒病毒存在，可能也會影響到疫苗的一致性。因此，這兩種不同的病毒顆粒對 EV-A71 疫苗的抗原性，定量方法，或動物體內的免疫特性都需要再進一步釐清。

2019 年腸病毒疫苗全球協同化國際研討會 (International workshop on global harmonization of enterovirus vaccines, Taipei) [6]：

此會議是由亞太腸病毒偵測網絡 (Asia-Pacific Network for Enterovirus Surveillance, APNES) 在台北舉辦，邀請了產學界以及國外如來 NIBSC、美國 PATH (Program for Appropriate Technology in Health) 交流腸病毒疫苗標準化的經驗[6]。APNES 是國家衛生研究院和其他國家共同建立，成員間可分享腸病毒流行資訊，檢體和病毒株，以及人員的交流及訓練等[7]。在此次會議中，與會者分享世界衛生組織 (WHO) 為了根除小兒麻痺所建議發展的病毒株，即沙賓疫苗株衍生的去活化病毒疫苗的進展，和 EV-A71 疫苗的全球發展和前述的國

際共標試驗。

會議中討論到為了根除小兒麻痺病毒，將會逐漸淘汰原本利用野生病毒株來生產不活化疫苗 (wIPV) 的方式，未來將用減毒沙賓疫苗株來開發去活化小兒麻痺病毒疫苗 (sIPV)，不過先前用於定量 wIPV 抗原的國際標準品不能有效地定量 sIPV，因此 NIBSC 發起國際共標計畫來建立 sIPV 國際標準品及試劑，目前已順利完成。另外，台灣有四個團隊加入 EV-A71 疫苗國際共標試驗，在此次研討會中也有實驗室分享了他們參與共標試驗的成果，他們利用不同的單株抗體和多株抗體建立了自行開發的 ELISA。此外，不同國家使用不同的 EV-A71 基因型來開發疫苗，國際標準品也需考慮此差異[6]。

2019, Working group meeting to develop WHO recommendations to assure the quality, safety and efficacy of enterovirus 71 vaccines, Shanghai[8]:

有鑒於各界的需求，WHO 於 2019 年在中國上海舉行對 EV-A71 疫苗的會議，主要是討論確保去活化 EV-A71 疫苗的品質、安全性和有效性的方法，其他尚在開發階段的疫苗比如類病毒顆粒 (Virus-like particle, VLP) 則不包含在內。與會者介紹腸病毒的背景及流行病學，並討論到疫苗開發和監管評估的過程。來自各國正在開發腸病毒疫苗或是已經有疫苗上市的公司分享他們的結果，討論到如生產平台、使用技術、動物實驗結

果以及免疫反應等。另外，還有來自 NIFDC 和 NIBSC 的與會者介紹參考品的品管跟發展[8]。

討論的重點有生產疫苗的過程比如病毒的去活化、空殼病毒和完整病毒顆粒測量方式、測量抗原的方法、抗體試劑、動物模式、疫苗交叉保護效果、臨床試驗的病況觀察終點，以及疫苗注射後的第四期臨床試驗觀察，比如交叉保護力等[8]。這些都能在未來提供給國家認證機構跟疫苗製造商在疫苗發展過程的建議。

會議中有也有討論到病毒的去活化步驟，病毒可能會因為有聚集物造成去活化不完全而有安全上的疑慮。以先前發展小兒麻痺病毒跟 A 型肝炎疫苗的經驗來說，如果有去活化不完全的可能性，WHO 對此則有過濾病毒的建議，這也是 EV-A71 疫苗在生產中可以使用的�式。

建議書的初稿在 2020 年 4 月到 5 月公布在網站，在這次會議之後，於同年 6 月再舉辦了一次線上討論[9]，目的是針對所提出的建議再經過各方意見溝通後進行修改。修正後的建議書已公告在 WHO 的網頁上[10]，內容包括 EV-A71 疫苗生產過程、臨床跟非臨床部分的評估，以及對認證機構的建議。

目前這些 EV-A71 標準品或標準血清都可從 NIBSC 購得。除了 EV-A71 之外，克沙奇病毒也是容易造成手足口病的病原體，但是其抗原性和 EV-A71 不相同，也是在未來發展多

價腸病毒疫苗的重點之一，之後若能依照不同型別選出國際標準品，相信更能優化其定量方法或疫苗的品管上之提升。

參考文獻

1. Nguyen TT, Chiu CH, Lin CY, et al: Efficacy, safety, and immunogenicity of an inactivated, adjuvanted enterovirus 71 vaccine in infants and children: a multiregion, double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet* 2022;399:1708-17.
2. Liang Z, Mao Q, Gao Q, et al: Establishing China's national standards of antigen content and neutralizing antibody responses for evaluation of enterovirus 71 (EV71) vaccines. *Vaccine* 2011;29:9668-74.
3. Cooper G, Mao Q, Crawl L, et al: Establishment of the 1st WHO International Standard for anti-EV71 serum (Human). *Biologicals* 2018;53:39-50.
4. Tedcastle A, Mao Q, Hockley J, et al (2019, August 21). Report on the WHO collaborative study to establish the 1st International Standard for Enterovirus A71 inactivated vaccine. Available <https://www.who.int/publications/m/item/WHO-BS-2019.2362>
5. Chia MY, Chung WY, Wang CH, et al: Development of a high-growth enterovirus 71 vaccine candidate inducing cross-reactive neutralizing antibody responses. *Vaccine* 2018;36:1167-73.
6. Weng TY, Yen H, Mahmood K, et al: Workshop report on global harmonization of enterovirus vaccines. *Emerg Infect Dis* 2020;26:e191273.
7. Chiu ML, Luo ST, Chen YY, et al: Establishment of Asia-Pacific network for enterovirus surveillance. *Vaccine* 2020;38:1-9.
8. Lei D, Griffiths E, Martin J: WHO working group meeting to develop WHO Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of enterovirus 71 vaccines. *Vaccine* 2020;38:4917-23.
9. Griffiths E and Lei D (2020, June 8). WHO informal consultation on recommendations

to assure the quality, safety and efficacy of Enterovirus 71 vaccines. Available <https://www.who.int/publications/m/item/EV71-who-consultation>

10. WHO drafting group (2021 May 11). Recommendations to assure the quality,

safety and efficacy of enterovirus 71 vaccines (inactivated), Annex 3, TRS No 1030. Available <https://www.who.int/publications/m/item/ev71-recommendations>