

腸病毒 71 型病毒疫苗之研發

劉家齊

國家衛生研究院 感染症與疫苗研究所

前 言

臺灣於 1998 年爆發腸病毒 71 型的大流行，造成 78 件孩童死亡的案例，引起社會大眾的重視。而近十年來於 2000、2001、2008 年有較嚴重的大流行，並分別造成 25、27、14 起死亡案例。一般腸病毒感染主要常見症狀為發燒、手足口病 (Hand-Foot-Mouth Disease, HFMD) 或疱疹性咽峽炎 (Herpangina) 外，極有可能會導致幼童發生嚴重神經性疾病如腦膜炎、肢體麻痺與神經性肺水腫等的重症外甚至造成死亡。然而目前世界上尚未有疫苗產品可以預防此傳染疾病，因此幼童健康與醫療權益顯然受到威脅。近年亞洲各國如越南及中國大陸均陸續有此疫情的流行，並有死亡案例。自 1998 年的大流行後，衛生署疾病管制局 (CDC) 於 1999 年起於臺灣各地成立相關病毒合約實驗室，逐步建立起各種病毒性疾病的監測網與統計系統，長期的記錄腸病毒 71 型

的病例與相關資訊[1]。依據我國歷年監測資料顯示，幼童為感染腸病毒 71 型併發重症及死亡之高危險群體，重症致死率約在 3.8% 至 25.7% 之間。藉由搜集而來的腸病毒 71 型病例與相關資訊的分析，流行病學家進而推測約每 3~4 年可能會出現一次的大流行，並亦發現臺灣每次所流行之腸病毒 71 型有基因亞型上的變化，因此腸病毒 71 型病毒疫苗之發展格外受到重視。為保障國人健康，政府投入相關資源積極發展腸病毒 71 型疫苗。

腸病毒71型病毒疫苗之發展過程

近年來研發的腸病毒 71 型疫苗是針對結構蛋白為主進行疫苗的研發，發展之方向有：減毒疫苗 (Live-attenuated virus)、死毒疫苗 (Inactivated whole-virion)、基因重組蛋白疫苗 (Recombinant VP1 protein)、DNA 疫苗 (VP1 DNA)、基因轉殖植物 (transgenic

plant)、細菌載體疫苗 (Bacteria vector)、胜肽疫苗 (Synthetic peptide) 與似病毒粒子疫苗 (Virus-like particle) 等[2]。各研發類型的疫苗各有其優點，均是表現全部或部分之結構蛋白促使免疫系統誘發出中和抗體。經由小鼠與兔子等動物進行實驗後，普遍認為完整病毒顆粒能誘發較佳的免疫能力。由於腸病毒 71 型疫苗為新型疫苗，參考小兒麻痺疫苗的研發經驗後，選擇發展以去活化完整病毒顆粒之死毒疫苗為主力疫苗。

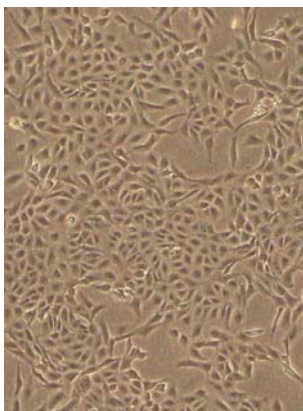
為開發腸病毒 71 型病毒疫苗，疾病管制局江正榮博士主持並進行研發疫苗之相關研究；從收集的許多病毒株中進行動物試驗，比較不同的病毒株其誘發交叉中和抗體的能力，進而篩選出適當的疫苗候選株 EV71-E59 病毒株[3]。政府為防範因新興傳染病如 SARS、新型流感等一旦爆發緊急疫情，屆時可能面臨疫苗取得不易之窘境，影響防疫與國家安全甚鉅，因此投入資源籌建具疫苗生產能力之 cGMP 設施。國家衛生研究院於 2003 年成立疫苗研發中心並於 2008 年底完成符合 PIC/S 國際規範之 cGMP 生物製劑廠，以期連結上游學術研發及下游業界產品化之角色，扮演本土性疫苗研發與供應、緊急備用疫苗製造及提供疫苗研發技術與成果給廠商等重要功能。

國衛院承接疾病管制局的腸病毒 71 型病毒疫苗先期研究成果，由疫苗研發中心莊再成主任主持臺灣人用疫

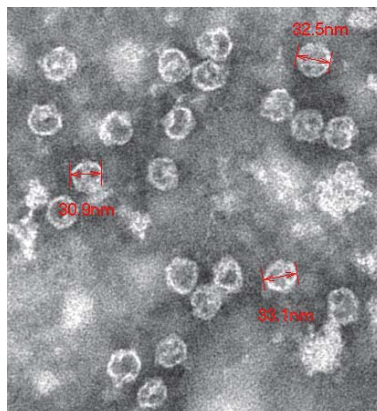
苗研發(含量產技術)之五年計畫，開始後續的製程開發、疫苗檢測方法與疫苗規格之研究，並使用無血清培養製程以避免可能來自動物血清的污染，同時亦可提高純化過程的純度[3,4]。疫苗生產所使用的細胞庫與病毒庫為符合國際標準並確定為安全且無遭受污染，因此委託英國專業檢驗公司 (Bio-Reliance) 進行檢驗之確效作業，耗時近二年的時間證明其具安全且無致癌性。腸病毒 71 型病毒疫苗的生產，在製程上使用產業界已成熟的滾動轉瓶培養並以無血清培養基培養猴腎細胞，當猴腎細胞長滿轉瓶後便進行疫苗株的接種。經過 6 天的培養後，收穫病毒液進行濃縮並使用液相層析法純化出病毒顆粒(圖一)。純化後的病毒顆粒使用甲醛進行去活化後，製備出病毒疫苗原液 (Bulk)。病毒疫苗原液還需與人用鋁鹽佐劑 (AlPO₄) 混合後，進行無菌充填以完成疫苗成品(圖一)，疫苗成品還需進行動物試驗以確認具有免疫性。整個生產的流程中由品管部門 (QC) 進行檢驗，並由品保部門 (QA) 確保各項生產與檢驗步驟均符合規範。在申請人體臨床試驗前，疫苗還需完成臨床前毒理試驗。此毒理試驗委託國內進階公司臨床試驗中心，選擇大鼠與兔子注射三劑二倍劑量的疫苗後觀察是否具有毒性，結果顯示在試驗期間內並無實驗動物死亡，並觀察到其不具有毒性。因此，自 2007 年到 2011 年間疫苗研發中心建立了符合國際規範



滾動轉瓶培養
Roller bottle culture



無血清培養
猴腎細胞



純化後的病毒粒子



第一期人體臨床試驗用之腸病毒 71 型疫苗包裝樣品

圖一 腸病毒 71 型疫苗之生產、純化後的病毒顆粒與包裝樣品

之 cGMP 生物製劑廠及具有疫苗產製專業技術之團隊，發展細胞培養製程生產符合 PIC/S cGMP 國際規範疫苗成品，促使腸病毒 71 型疫苗進入第一期人體臨床試驗，此疫苗為我國完全自行從實驗室研發乃至進入人體臨床試驗之自製疫苗。

目前腸病毒 71 型疫苗使用技術

成熟的滾動轉瓶培養進行生產，然而單一批次需要大量的轉瓶進行培養。為提高腸病毒 71 型疫苗的產量，本所同時也發展微載體生物反應器之生產製程。由本所合聘之清華大學吳夙欽教授與疾管局連偉成博士，已建立起無血清微載體生物反應器之生產模式[5]，現正改良此生物反應器之生產

模式用以提高產量。此外，本院奈米中心楊重熙主任實驗室以穿透式電子顯微鏡觀察疫苗原液，可以鑑定出疫苗原液具有完整病毒顆粒(圖一)。在疫苗的安定性測試中，除了基本檢測如 pH 值、蛋白質濃度與無菌測試外，另使用小鼠檢測其免疫性，結果顯示疫苗成品置於 4°C 冷藏環境下 18 個月依然維持穩定並能誘發中和抗體 [4]。近年來由於腸病毒 71 型之受器 (Receptor: SCARB2 and PSGL-1) 的發現，本所亦發展 hSCARB2 之轉殖基因鼠作為動物模式以確認疫苗之保護能力。

第一期人體臨床試驗

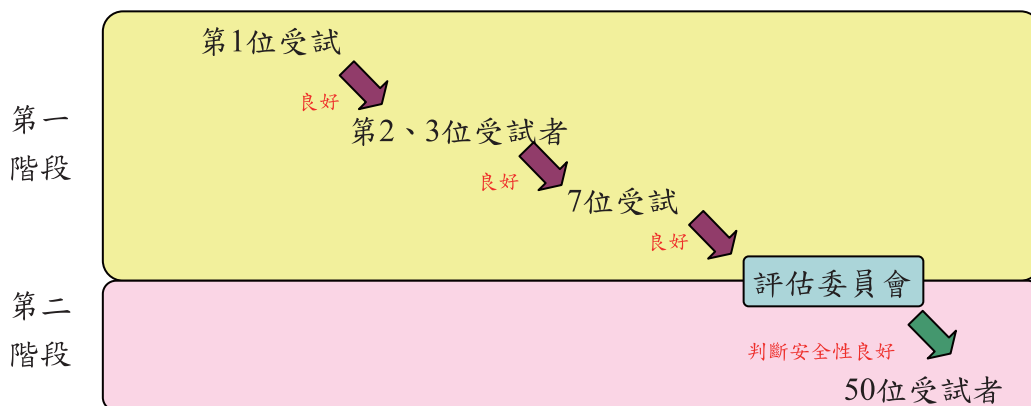
自 2009 年開始生產腸病毒 71 型疫苗後，於 2010 年第一季向行政院衛生署食品藥物管理局 (TFDA) 申請人體試驗。由於腸病毒 71 型疫苗為新型疫苗，審查過程基於安全的考量極為慎重，過程中由藥品查驗中心與藥審會諮詢各領域的專家學者檢視所有相關資料，並召開多次的討論會議，最後於 2010 年 10 月份取得第一期人體臨床試驗許可證。人體臨床試驗由台北榮民總醫院與台大醫院進行共同合作，由馮長風主任與謝思民醫師共同主持第一期人體臨床試驗。試驗著重安全性的考量，因此第一期臨床試驗受試者招募 60 位 20~60 歲健康成人，受試者需接種二劑疫苗且試驗設計分為二個階段。第一階段 10 位受試者在

台北榮民總醫院進行，於 2010 年 12 月份開始第一位受試者接種低劑量疫苗。確認安全後才請第 2、3 位受試者接種疫苗，然後再請 7 位受試者接種疫苗。如此謹慎的步驟，於 2011 年 6 月份完成第一階段十人臨床試驗，而 10 位受試者的資料再由評估委員會判斷安全性良好，才進行第二階段 50 位受試者(圖二)。2012 年 3 月份完成所有受試者疫苗施打，並持續觀察受試者至 2012 年 9 月份。臨床試驗的資料顯示安全性良好，並引發顯著的中和能力。

世界各國之發展近況與我國試驗規範

從流行病學的資料得知，世界各國都曾有腸病毒 71 型病例之報導，然而近年來發現此病毒在亞洲各國間流行，尤其在越南與中國大陸出現許多重症死亡的病例，且長期觀察到此病毒的基因亞型有出現變化。在腸病毒 71 型疫苗的研發上，新加坡與中國大陸同樣在進行人體臨床試驗。依現有資訊顯示新加坡剛完成第一期試驗，而中國大陸已完成第二期試驗並正進行第三期試驗。

此腸病毒 71 型疫苗為臺灣自製發展之疫苗，且國際上目前完全沒有腸病毒疫苗臨床試驗品質與法規相關規範，因此我國醫藥法規單位 (TFDA) 以審慎嚴謹之態度建立相關規範。本所疫苗開發以國際規格與全球市場為



圖二 第一期臨床試驗之設計

考量，研發生產設施與原料管理皆符合 PIC/S cGMP 國際規範，並經我國 TFDA 依 PIC/S GMP 規範審核通過。且人體臨床試驗追求安全、品質、嚴謹、正確，並需考量長遠的發展並符合國際規範。基於醫學倫理與人權考量，臨床試驗設計以追求受試者安全與試驗品質為核心價值，因此以最嚴謹的方式執行臨床試驗，並在執行過程常與醫藥法規單位、學界專家與臨床醫生諮詢與討論。然而中國大陸開發此型疫苗之考量是快速研發並上市，以符合大陸本身市場需求，研發的相關資訊並不明朗，其醫藥法規單位採取一次性的批准第一期至第三期人體臨床試驗的方式進行。所使用之細胞庫與病毒庫是否依國際標準進行安全性確效檢驗仍待商榷。

未來方向

由於腸病毒 71 型疫苗為臺灣第

一次發展的人用小兒疫苗，為求慎重並廣納各界專家意見，於 2011 年 9 月邀請國內、外病毒疫苗專家組成委員會，針對手足口症病毒疫苗與疫情，評估後續發展與提出建言。腸病毒 71 型病毒現有 11 種亞型病毒，現有的 B4 疫苗株是否能誘發大量足以涵蓋其他亞型病毒與未來新亞型病毒的中和抗體，此點仍需進一步的研究。現有的腸病毒 71 型病毒疫苗是否能預防克沙奇病毒造成的手足口症也是亟待釐清的課題，這將有助於發展對抗手足口症之第二代疫苗。因此，蘇益仁所長著手整合本所之腸病毒疫苗研發團隊，包括流行病學研究 (李敏西博士)、病毒學研究 (王貞仁教授)、生化製程研究 (劉家齊博士)、免疫學研究 (莊再成博士與謝鐸源博士)、分析檢驗開發 (周愛湘博士與宋旺洲博士)、動物模式建立 (周彥宏博士)、cGMP 生產 (黃一旭博士) 與臨床試驗規劃 (齊嘉鈺醫師)，以期能涵蓋各領域進

行整合性研究計畫，並與疾病管制局江正榮博士與國家實驗動物中心余俊強主任積極合作後續相關工作。本所在腸病毒 71 型疫苗之開發成果，如果能夠發展成為疫苗成品上市，不但能避免腸病毒 71 型對幼童的傷害並帶給民眾信心。就產業發展而言，這將也是第一項由我國完全自行研發成功的疫苗，因此具有實質的指標意義。

參考文獻

1. Taiwan CDC Notifiable Infectious Diseases Statistics System (<http://nidss.cdc.gov.tw/singledisease.aspx?Pt=s&Dc=2&Dt=1&disease=0749>)
2. Lee MS, Chang LY: Development of enterovirus 71 vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2010;9:149-56.
3. Chang JY, Chang CP, Tsai HH, et al: Selection and characterization of vaccine strain for Enterovirus 71 vaccine development. *Vaccine* 2012;30:703-11.
4. Chou AH, Liu CC, Chang CP, et al: Pilot scale production of highly efficacious and stable enterovirus 71 vaccine candidates. *PLoS One* 2012;7:e34834.
5. Wu SC, Liu CC, Lian WC: Optimization of microcarrier cell culture process for the inactivated enterovirus type 71 vaccine development. *Vaccine* 2004;22:3858-64.
6. Liu CC, Guo MS, Lin FH, et al: Purification and characterization of enterovirus 71 viral particles produced from vero cells grown in a serum-free microcarrier bioreactor system. *PLoS One* 2011;6:e20005.
7. Liu CC, Chang HW, Yang G, et al: Development of a quantitative enzyme linked immunosorbent assay for monitoring the Enterovirus 71 vaccine manufacturing process. *J Virol Method* 2011;176:60-8.
8. Liu CC, Chou AH, Lien SP, et al: Identification and characterization of a cross-neutralization epitope of Enterovirus 71. *Vaccine* 2011;29:4362-72.
9. Chang HW, Liu CC, Lin MH, et al: Generation of murine monoclonal antibodies which cross-neutralize human enterovirus genogroup B isolates. *J Virol Methods* 2011;173:189-95.