

開發細胞馴化 A 型流感 H7N9 不活化全病毒疫苗

陳柏伶 李敏西

國家衛生研究院 A 型流感 H7N9 疫苗研發團隊

前 言

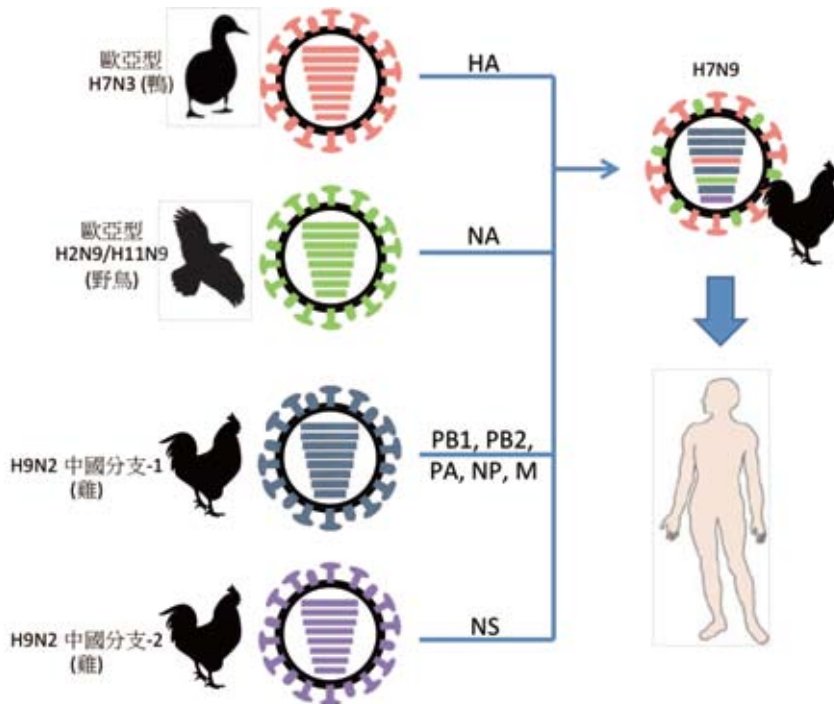
依據世界衛生組織 (WHO) 於 2015 年 2 月發出之風險評估報告指出，自 2013 年人類感染 H7N9 禽流感疫情爆發，至今已累計 571 例確診病例，包含 212 例死亡病例，死亡率約 37%。其中中國有 552 起病例，其他國家包含香港 12 例，台灣 4 例，加拿大 2 例與馬來西亞 1 例皆是由中國移入之病例[1]。H7N9 病毒的傳播方式與自然宿主不明，病人多因接觸受污染的家禽或環境而得病。目前資料顯示 H7N9 病毒雖然人傳人的機率不高，但禽傳人的機率高於 H5N1 病毒[2]。台灣地理位置緊鄰疫區，有必要在禽鳥管控、藥物儲備及疫苗研發上做妥善的準備。

H7N9 禽流感病毒

H7N9 禽流感病毒為重組病

毒，其基因組合至少來自 4 個歐亞型禽流感病毒株。血球凝集素 (Hemagglutinin, HA) H7 亞型的基因片段與中國東岸的鴨子禽流感病毒 (H7N3) 相近；神經氨酸酶 (Neuraminidase, NA) N9 亞型則與中國東岸候鳥群分離出的禽流感病毒 (H2N9 與 H11N9) 相近；另外 6 段基因則是來自歐亞型 H9N2 與中國本土 H9N2 病毒重組過後的兩群 H9N2 禽流感病毒 (圖一) [3]。

分析 H7N9 禽流感病毒的氨基酸序列，顯示 H7N9 病毒部分基因的氨基酸位點已從類禽流感轉變成類人流感病毒。就 HA 而言，若氨基酸序列 226 號位置 (H3 numbering) 若由穀氨醯胺 (Glutamine, Q) 變成亮氨酸 (Leucine, L)，則病毒對宿主細胞表面受體的結合，則會由傾向結合禽類的 α -2,3 唾液酸多醣受體 (α -2,3 sialic acid, SA) 改變為傾向結合哺乳類的 α -2,6 SA。而在 H7N9 禽流感病毒



圖一 H7N9 禽流感病毒基因組成分析[3]

中的確有觀察到 HA Q226L (Q217L, H7 numbering) 的變異，且有多項研究指出帶有此變異的 H7N9 病毒同時具有結合 α -2, 3 SA 與 α -2, 6 SA 的能力。除了 HA 上的變異，在 H7N9 的 PB2 基因胺基酸序列 627 號位置也發現由古氨酸 (Glutamic acid, E) 變為離胺酸 (Lysine, K)。已有文獻指出 PB2-627K 能幫助禽流感病毒在哺乳類細胞複製，並增加病毒傳播能力。而在雪貂與天竺鼠研究中也發現由病人分離出的 H7N9 病毒株具有接觸傳染能力，與有限的飛沫傳染力 [2-4]。此外部分 H7N9 病毒株的 NA 基因胺基酸位置 292 號轉變為離胺酸 (Lysine, K)，也使得 H7N9 病毒對

neuraminidase 抑制劑，如 Oseltamivir (Tamiflu 克流感) 及 Zanamivir，產生抗藥性[4]。

台灣 H7N9 疫苗研發

由於 H7N9 禽流感病毒相較於 H5N1 有較高的傳播率，以及部分病毒對 neuraminidase 抑制劑產生抗藥性，再加上台灣所處的地理位置緊鄰疫區，因此更需要防範 H7N9 疫情的傳播與流行。衛生福利部於 2013 年 6 月徵求 2 個研究計畫，進行 H7N9 疫苗的開發與製備。此 2 計畫包括蛋 (egg-based) 及細胞培養 (cell-based) 疫苗，以通過新藥審查 (IND) 並完成

第二期臨床試驗為標的。國衛院感染症與疫苗研究所(感疫所)負責執行開發「細胞馴化 A 型流感 H7N9 不活化全病毒疫苗」之計畫。

2013 年 4 月起世界衛生組織(WHO)參考實驗室便開始提供雞胚蛋培養系統所使用的 H7N9 疫苗株，其六段 internal gene 來自 PR8 (表一) [5]。在國衛院感疫所承接此計畫以後，便積極與各參考實驗室聯繫，共取得 RG32A、RG267 與 RG268 三株 H7N9 疫苗株。由於 WHO 參考實驗室所提供的疫苗株並不適合在細胞大量培養，因此疫苗株須先進行細胞培養馴化。2013 年 7 月感疫所取得美國 CDC 提供的 RG32A 疫苗株(以合成的上海第二型 H7N9 之 HA 與 NA 基因製備)，8 月中另外取得兩株由英國 NIBSC 所提供的疫苗株 RG267 (以合成的上海第二型 H7N9 之 HA 與 NA 基因製備)與 RG268 (以安徽株之 HA 與 NA 基因製備)。由位於竹南院區的感疫所與生物製劑廠，以及本院於台南「成大病毒合約實驗室」三個研究團隊共同執行疫苗株馴化。三組研究團隊同時將疫苗株於 MDCK 與 Vero 細胞進行培養馴化，評估血液凝集抗原 (HA) 力價及病

毒力價 (TCID₅₀)。經過繼代培養，MDCK 細胞繼代的 RG268 疫苗株在培養第三代之後，血液凝集抗原力價達 512，而病毒力價可達 10⁷ TCID₅₀/ml 以上，而 RG32A 需至第 7 代才能達到同樣標準。因此經專家會議考量病毒株的生長條件、智財權與廠商承接意願，選定 MDCK 細胞繼代的 RG268 疫苗株進入製程開發 (圖二) [6]。

選定病毒株後以微載體 (microcarrier) 及轉動瓶 (roller bottle) 細胞培養系統進行試產，發現微載體生物反應器培養系統產能較佳，因此選定此培養系統進行量產。在下游純化方面，開發管柱層析技術，純化後的疫苗抗原以美國 FDA 提供的標準抗原及血清進行 HA 抗原定量。完成抗原定量的疫苗接著以雪貂測試其免疫力與保護力，因為雪貂是檢驗流感病毒在哺乳類的致病力與傳播效率最適合的動物模式。而從 H5N1 疫苗製備所得到的經驗，全病毒疫苗的免疫效果優於次單位疫苗，且添加佐劑的 H5N1 全病毒疫苗其免疫力與保護力遠高於未添加佐劑的疫苗。因此在雪貂實驗中，分別測試有添加佐劑的 H7N9 全病毒疫苗與未添加佐劑的

表一 2013 年 5 月世界衛生組織公告之 H7N9 疫苗株

| Parent virus | Candidate vaccine virus | Type of virus or reassortant | Developing institute | Available from |
|-------------------|-------------------------|------------------------------|----------------------|----------------|
| A/Shanghai/2/2013 | IDCDC-RG32A* | Reverse genetics | CDC, USA | CDC, USA |
| Synthetic HA&NA | NIBRG-267** | Reverse genetics | NIBSC, UK | NIBSC, UK |
| | CBER-RG4A** | Reverse genetics | CBER, USA | CBER, USA |
| A/Anhui/1/2013 | | Wild type virus | | WHO CCS |
| | NIBRG-268** | Reverse genetics | NIBSC, UK | NIBSC, UK |



圖二 國衛院 H7N9 人用疫苗開發流程

H7N9 全病毒疫苗。結果顯示 H7N9 疫苗無論是否添加佐劑，接種的雪貂皆無出現明顯的副作用。而添加佐劑的 H7N9 疫苗其免疫力明顯優於未添加佐劑的疫苗(表二)。

疫苗接種後的雪貂以野生安徽株 H7N9 病毒進行疫苗保護力測試。結果顯示三組雪貂在感染野生 H7N9 病毒後並沒有出現明顯的病徵，但接種佐劑組的雪貂在感染 H7N9 病毒後體重明顯下降(大於總體重的 5%)，而接種 H7N9 疫苗的另外兩組則沒有這現象。進一步分析雪貂體內是否有 H7N9 活病毒的繁殖，顯示佐劑組與 H7N9 疫苗組的雪貂體內皆偵測到活病毒，但 H7N9 疫苗加佐劑組的雪

貂體內並無活病毒繁殖。由雪貂實驗的結果顯示 H7N9 疫苗添加佐劑可以提供較佳的免疫力與保護力。雪貂實驗結果已發表於國際知名期刊 PLoS ONE [7]。

完成雪貂試驗與臨床前毒理試驗(大鼠及兔子)後，H7N9 全病毒疫苗於 2014 年 4 月技轉給基亞疫苗科技公司規劃臨床試驗。基亞疫苗公司委託本所生物製劑廠生產臨床試驗用疫苗，經衛福部食品藥物管理署實地查核後，於 2015 年 3 月 17 日取得國際醫藥品稽查協約組織(The Pharmaceutical Inspection Convention and Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme, PIC/S) GMP 許可，

表二 疫苗接種後的雪貂中和抗體幾何平均效價

| 病毒中和力價 | 佐劑組 | H7N9 疫苗組 (1.5 µg HA) | H7N9 疫苗加佐劑組 (1.5 µg HA + 氫氧化鋁) |
|--------|------|-------------------------|-----------------------------------|
| 第一次接種後 | < 40 | < 40 | 48 |
| 第二次接種後 | < 40 | 80 | 640 |

備註：每組接種四隻雪貂

目前已進入臨床試驗。

結 語

根據登錄於美國衛生研究院臨床試驗資料 (<https://www.clinicaltrials.gov/>)，至 2015 年 6 月有 12 項 H7N9 疫苗的臨床試驗。其中有 4 項 H7N9 活性減毒疫苗、2 項 H7N9 上海株的不活化疫苗、1 項 H7N9 次單元疫苗、1 項 H7N9 不活化裂解疫苗、1 項 H7 DNA 疫苗、一項 H7N9 安徽株類流感病毒顆粒 (VLP) 疫苗、1 項 H7 重組蛋白疫苗，皆不同於本計畫所開發的 H7N9 安徽株不活化全病毒疫苗。而本計畫「細胞馴化 A 型流感 H7N9 不活化全病毒疫苗」在技轉給廠商之後也已獲核准執行 I/II 期臨床試驗，期盼未來能在疫情需要時提供國人安全有效之疫苗。

致 謝

感謝衛福部提供經費補助，疾管署提供 H7N9 野生病毒株，美國 FDA 提供標準抗原與血清，國防醫學院預醫所協助雪貂試驗。本計畫主持人為蘇益仁特聘研究員與陳宜君研究員，

協同計畫主持人為黃一旭博士及李敏西研究員，國衛院 A 型流感 H7N9 疫苗研發團隊包含研究員李敏西研究室、助研究員胡勇誌研究室及生物製劑廠。

參考文獻

1. Who risk assessment of human infections with avian influenza A (H7N9) virus. Available http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/influenza_h7n9/RiskAssessment_H7N9_23Feb20115.pdf
2. Robert G, Webster, Arnold S, et al: (2013) Textbook of influenza, 2nd edition, chapter 30.
3. Watanabe T, Watanabe S, Maher EA, et al. Pandemic potential of avian influenza A (H7N9) viruses. Trends in Microbiology 2014;22:623-31.
4. 國衛院電子報：2013 年中國大陸流感 H7N9 疫情及疫苗研發。摘自 http://enews.nhri.org.tw/enews_list_new2_more.php?volume_idx=501&showx=showarticle&article_idx=9475
5. Summary of status of development and availability of avian influenza A (H7N9) candidate vaccine viruses. Available http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/candidates_reagents/a_h7n9/en/
6. 國衛院電子報：本院完成第一階段 H7N9 疫苗株馴化並選出優質 H7N9 疫苗株。摘自 http://enews.nhri.org.tw/enews_list_new2_more.php?volume_idx=523&showx=showarticle&article_idx=9704
7. Chia MY, Hu AYC, Tseng YF, et al: Evaluation of MDCK Cell-Derived Influenza H7N9 Vaccine Candidates in Ferrets. PLoS ONE 2015;10:e0120793. doi:10.1371/journal.pone.0120793