

計畫編號：MOHW103-CDC-C-315-000108

衛生福利部疾病管制署 103 年度科技研究發展計畫

疫苗株篩選技術平台之建立

研究報告

執行機構：衛生福利部疾病管制署血清疫苗研製中心

計畫主持人：江正榮

研究人員：鍾瑋、張靜如、陳奕安、陳明哲

執行期間：103 年 1 月 1 日至 103 年 12 月 31 日

## 目錄

|  |    |
|--|----|
| 目錄 .....                               | 1  |
| 中文摘要.....                              | 2  |
| 英文摘要.....                              | 3  |
| 前言.....                                | 4  |
| 材料與方法.....                             | 8  |
| 一、 病毒的馴化增量與病毒庫製作.....                  | 9  |
| 二、 細胞和病毒的培養.....                       | 9  |
| 三、 病毒之檢驗 .....                         | 10 |
| 四、 病毒株效價的測定 .....                      | 11 |
| 結果 .....                               | 12 |
| 一、 腸病毒 71 型四種 subgenotype 馴化與初步篩選..... | 12 |
| 二、 病毒原液之檢測與分析 .....                    | 13 |
| 三、 小鼠及兔子動物試驗與血清中和抗體效價分析 .....          | 14 |
| 四、 市售 EV71 全病毒免疫抗體分析比較.....            | 16 |
| 討論.....                                | 19 |
| 圖表.....                                | 23 |
| 參考文獻.....                              | 34 |
| 期末報告審查意見回覆.....                        | 38 |

## 中文摘要

自民國 87 年腸病毒爆發後，腸病毒疫情以三年為一循環，侵襲台灣抵抗力較弱之嬰幼兒族群，WHO 也將之列為遠東地區的重要新型傳染病。本署為保障國民健康，已完成兩株腸病毒疫苗候選株 E59 與 E36 的開發，其基因亞型分別為 B4 與 C4，前者已技轉至國衛院並完成第一期臨床試驗，後者與國光生技合作，採用無血清培養系統搭配生物反應器提高製程效率；近 4 年來腸病毒 71 型流行於台灣的基因亞型轉變為以 B5 為主、C4 次之、及少數的 C2 與 C5。雖然根據動物與病患檢體相關試驗，EV71 只有一種血清型，但由國家衛生研究院所發表腸病毒 71 型疫苗一期臨床試驗，免疫後受試者血清明顯對 B1、B5 和 C4A 交叉中和較佳，對 C2 和 C4B 則效果較為有限。

本計畫針對 B5、C2、C2-like 和 C5 等四種 genotype 共 15 株病毒進行測試。首先藉由 CPE 時間與 TCID<sub>50</sub> 的高低選拔出 8 株毒力與增殖速度上兼具潛力的病毒。此 8 株病毒在小鼠試驗的免疫效果與中和效價的寬廣性結果顯示，2 株 B5(E11-56、E11-36)和 1 株 C2 (E12-20) 能夠引起高免疫反應(1:794、1:724.89、1:531.79)，且能交叉中和最多 subgenotype。再利用兔子試驗做進一步確認，兔子血清中和抗體效價達 40 以上者 E11-56(B5)、E11-36(B5)各占 22 株 (73.33%)，E12-20 (C2) 占 21 株 (70.00%)；就中和寬廣性來說三者均對 A、B1 和 C2-like 較差，但 E12-20 (C2)對 C5 中和效價優於 E11-56(B5)和 E11-36(B5)，故本計畫最終選擇以 E12-20 (C2)作為疫苗候選株。

此外，本中心將所有腸病毒 71 型病毒分離株經由 vero 細胞繼代，目前已完成共計 4 種不同 genogroups 15 株腸病毒 71 型病毒株種庫，並以 TCID<sub>50</sub> 和西方墨點法確認其病毒含量，可供未來疫苗試量產及交叉中和等應用，並於篩選流程首度加入西方墨點法分析病毒抗原。

關鍵字：腸病毒七十一型、基因亞型、免疫抗原性、中和試驗、

疫苗標準化、中和抗體效價比

## 英文摘要

Since the 1998 outbreak, enterovirus 71 (EV71) infections in Taiwan have occurred in 3 year cycles and show no sign of abatement, primarily targeting infants and children with compromised immune systems. As such, the WHO has identified it as an emerging infectious disease in the Far East. Our Center for Disease Control (CDC) has developed two strains of candidate vaccines: E59 and E36, from the subgenotypes B4 and C4 respectively. The former has already passed phase 1 clinical trials after a technology transfer to the National Health Research Institute (NHRI), while the latter is in preclinical development after adopting a serum-free bioreactor manufacturing process to increase production scale with Adimmune Corporation. However, since 2011 the subgenotypes circulating in Taiwan is primarily B5, with comparatively fewer cases of C4, C2 and C5. Ostensibly EV71 has three genotypes (A, B and C) but only one serotype, but varying results have been reported in animal and human trials. In cross-neutralization tests of clinical samples, some studies have found slight antigenic differences between genogroups (B and C) and within genogroups (B4 and B5), while others have not. Human serum samples collected from clinical trials of formalin-inactivated B4 and C4 vaccines show the B4 strain was able to cross neutralize B1, B5 and C4A while having limited effect on C2 and C4B. So, it was needed to monitor the variation of immune-antigenicity of new subgenogroups.

The CPE and TCID<sub>50</sub> method were used for screening four genotypes (B5、C2、C2-like and C5), we have gotten 8 vaccine candidates strains. In animal studies, intraperitoneal (IP) injection of mice with antigen of three viruses (E11-56 / B5、E11-36 / B5 and E12-20 / C2) can induce neutralization titer of 1:794、1:724.89、1:531.79. In cross-neutralization experiments, our E11-56 / B5、E11-36 / B5 and E12-20 / C2 viruses showed good neutralization titer against 22, 22 and 21 out of 30 isolates from A, B1, B4, B5, C2, C4 and C5 genogroups in rabbit, exhibiting the best neutralization characteristics against the C2, C4, B4 and B5 genogroups. But B5 strains elicited weak cross-neutralizing antibody responses against A, B1, C2-like and C5.

Lastly, we established a virus bank of 15 different strains of EV71, using TCID<sub>50</sub> and western blot to verify their virus titer and antigen form ratio. Most isolates displayed good TCID<sub>50</sub> titers in the 6.5~7.5 range. Such a virus bank would be useful for future vaccine development and neutralization needs.

Keyword : Enterovirus 71、subgenogroup、immunogenicity、

Neutralization test、standalization、NT ratio

## 前言

美國疾病管制與預防中心指出 2012 年全球 5 大傳染病威脅，腸病毒 71 型名列其中，文中認為此病毒將會持續在東南亞國家威脅數十萬幼童性命與健康【1】。依據傳染病統計暨監視年報台灣自民國 88 年開始監控腸病毒疫情至 101 年底為止共有 1791 例重症病患，腸病毒 71 型佔了 1122 例(62.6%)，分析每年案例，發現腸病毒 71 型在死亡病例中的所占比例也一直居高不下。被感染者大都集中於身體抵抗力較弱之四歲以下嬰幼兒族群【2、3、4、5】。值得注意的是目前並無有效抑制腸病毒藥物上市，現行治療方式多給予支持性療法【6、7、8】。因此在流行期對於家中有小孩的民眾，易造成恐慌與壓力，影響社會安定。基於保障國人健康、生命及免除疾病威脅，為能有效控制疫情的發生，降低醫療成本與健保負擔，政府自民國九十五年六月起公告新藥政策計畫，強化台灣防疫系統並明定疫苗為國防工業之一環。因此，持續對於腸病毒 71 型疫苗之研究與發展是件刻不容緩的事，也是本署之職責。

現行全球仍未具有藥物許可證的腸病毒 71 型疫苗，疫苗目前開發速度，由中國大陸暫居領先的地位。本中心技轉予國家衛生研究院之 B4 genotype 腸病毒 71 型福馬林不活化疫苗，是由滾動培養瓶搭配無血清培養基產製之 B4 病毒作為抗原，經純化後以福馬林使病毒不活化，搭配鋁鹽佐劑製成疫苗，現已由國衛院完成第一期臨床試驗【9】。國光生物科技公司和基亞疫苗科技股份有限公司向國衛院取得第一期臨床試驗結果，於今年(103 年)六月向食品藥物管理署 (TFDA)送件欲展開第二期臨床試驗。在中國方面，已完成第三期臨

床試驗，並於 2013 年發表在 Lancet 上，文中以 5120 名 6-35 個月大孩童作為試驗對象，施打含鋁鹽佐劑之 EV71 不活化疫苗後約可引起 90% 的受試者發生免疫反應，而嚴重不良反應約佔受試人數的 1.2%，整體來說其結果仍相當不錯【26】。近期也開始針對 EV71 與 CA16 (coxsackie A16 virus) 雙價疫苗在動物實驗上的免疫反應。其他研發團隊如新加坡之 Inviragen 產製 B2 genotype 之死毒疫苗，2012 年 3 月已完成第一期臨床試驗。馬來西亞之 Sentinext 公司類病毒顆粒(VLP)疫苗，預期在 2013 年展開臨床試驗【25】。雖然有許多研發團隊開發出 VLP 疫苗【5】、胜肽疫苗【6】、DNA 疫苗【7】、減毒疫苗【8】等多種疫苗形式，目前普遍仍認為以完整活病毒不活化後製成之不活化疫苗其免疫效價較受肯定【18、19】。

腸病毒 71 型根據其外鞘蛋白 VP1 核酸序列分為 A、B、C 三個基因型，基因型 B 和 C 可進一步各分出數個亞基因型(B0、B1、B2、B3、B4、B5、C1、C2、C3、C4、C5)，其中又可把 C4 (C4a、C4b) 和 B5 (B5a、B5b 和 B5c) 再做細分。基因型 B 主要分布於東南亞地區如馬來西亞與新加坡等，而基因型 C 則主要分布於中國、越南等地【15、16、17】。近期持續於印度發現基因型 D 和從非洲病人檢體分離出的基因型 E 與 F【18】。台灣位於兩地之間，便捷的交通工具加上貿易來往與交流的頻繁，人群移動迅速，容易在潛伏期時將他國病毒帶入。依據 1960 到 2011 年西太平洋各國腸病毒 71 型流行之亞型分析，台灣在 1998 年首次爆發嚴重流行的基因亞型為 C2、1999~2003 年腸病毒 71 型主要流行的基因亞型為 B4 (與馬來西亞、新加坡相近)、2004~2005 年流行的基因亞型 C4 (源自中國大陸)，之後由 2007~2009 年流行的基因亞型又轉變為 B5 (與馬來西亞、新加坡

相近)，2010 年流行的基因亞型為 C4，2011~2012 年流行的基因亞型又變回 B5，其中又出現可能源自越南的新基因型 C5 和 C2-like，由此可見台灣流行之病毒株會受到周邊各國影響而導致多次轉變，且每次基因型的轉變皆造成腸病毒的大流行【23、24、25】，再加上潛在的野生型病毒株可說是一大隱憂。

因此疫苗株之選定至為重要，雖然日本 Arita M 與新加坡 Damian Guang Foo 等學者以猴子或小鼠研究也發現經免疫 EV71 後的猴子或小鼠所取得之血清抗體，也可以成功的中和各種 EV71 genogroups (A, B1, B4, C2, C4)，發現單一病毒株的中和抗體，可能有交叉中和其他基因型病毒株的能力，進而歸納出腸病毒 71 型只有一種血清型【26、27、28】。但國家衛生研究院 Huang Mei-Liang 博士等人也以感染腸病毒 71 型病患的血清，和基因型 A、B1~B5 與 C1~C5 進行試驗，結果顯示，感染 B4 或 B5 病童之血清對 B genogroup 病毒的抗體效價較 C genogroup 或 A 病毒至少有高於四倍的差異。成功大學王貞仁教授以及日本 Mizuta 博士等人的研究也與此結果相符。依據國衛院最新發表腸病毒 71 型一期臨床試驗中疫苗受試者血清對不同 genogroup 之交叉中和試驗結果，免疫 2 劑 EV71 B4 疫苗後受試者血清中的中和抗體對於 C2 和 C4b genogroup 病毒中和效價小於 1：8【24】，也呼應本中心 103 年科技計畫發現兔子其免疫血清在不同亞基因型病毒交叉反應之結果；亞基因型 B 的血清對於部分亞基因型 C 的病毒中和效果較差。顯示當有新腸病毒 71 型流行時，單一病毒株的中和抗體，可能無法完全交叉中和其他基因型病毒株【29、30、31】。2012 年柬埔寨爆發腸病毒 71 型疫情時更首度發現有 7 歲及 61 歲的重症病患，無獨有偶台灣也於 2013 年出現首例 34 歲成人因腸病毒

71 型而導致之重症病患。中國近期也針對腸病毒 71 型和柯沙奇病毒 A16 嚴重發生的區域進行病毒基因分析，發現兩種病毒有部分基因發生重組互換【25】。上述發現是否顯示病毒致病性提高，或是病毒抗原性有重大改變，加上目前仍沒有明顯證據顯示那類基因亞型容易導致重症發生，若只仰賴單一型別疫苗株，可能會導致注射疫苗後仍再次受到病毒感染之情事發生，所幸每個亞型轉換造成爆發前都有腸病毒 71 型次要亞型的存在，因此持續監控腸病毒 71 型基因型變化，並建立完善之腸病毒疫苗株篩選平台，能在亞型轉換造成爆發前及時更換疫苗株，使疫苗保護效力達到最高。

本計畫主要目的將進一步建立更完善之腸病毒疫苗株篩選平台，並以 B5、C2、C2-like 和 C5 做為目標挑選具有潛力之疫苗候選株，評估未來發展多價基因型疫苗之需求性與必要性，並以此候選株制定出 EV71 疫苗效價之標準品，最終以小鼠建立出疫苗株交叉中和保護效力之對照平台，加速腸病毒 71 型疫苗上市。同時培訓本局血清疫苗研製中心人員的專業技能，支援疫苗工廠之永續發展及提升國內疫苗產業專業能力，並作為國衛院所建立之疫苗緊急生產線的儲備人力。



## 材料與方法

### 一、病毒的馴化增量與病毒庫製作

#### 1. 病毒的馴化增量

選取腸病毒 71 型之 15 株本土分離株，每株病毒接種 1 ml 於 175 T-Flask 細胞培養瓶中的 Vero 細胞，於 37°C 含 5% CO<sub>2</sub> 條件培養，持續每天觀察細胞之 CPE (細胞病理現象)，當 CPE 達 80% 以上，即可以 4°C、4000 rpm 離心 30 分鐘去除細胞碎屑，收取病毒液，取 1 ml 進行 TCID<sub>50</sub> 定量、1 ml 重複馴化增量 2-3 次至 TCID<sub>50</sub> 達到穩定，其於保存於 -80°C 冷凍庫。

#### 2. 病毒庫製作

於每一代病毒增量馴化後，以 4°C、4000 rpm 離心 30 分鐘去除細胞碎屑，收取病毒液，分裝於冷凍小管，標示好日期、病毒名稱、編號置於冷凍 -80°C 三天，之後移至液態氮桶保存。

### 二、細胞和病毒的培養

#### 1. 細胞株的培養

Vero 細胞培養在含 5% 胎牛血清之 M199 培養基，溫度 37°C 含 5% CO<sub>2</sub> 之培養箱中。

#### 2. 病毒的培養

將每株病毒以 MOI=0.1-0.01 的感染力價接種於細胞培養滾動瓶感染 vero 細胞作病毒的繁殖，待細胞達到 CPE 80% 以上，過濾上清液後添加福馬林，置於 37°C 不活化病毒。

#### 3. 黴漿菌的檢測

以 Ez-PCR Mycoplasma Test Kit 進行檢測：取 1 ml 待測樣品以 250 xg 離心去除細胞碎片，再以 15000-2000 xg 離心去除上

清液，回溶於 50 $\mu$ l Buffer Solution 後以 95 度 C 加熱 3 分鐘，完成待測養品製備。以聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 將待測樣品放大，以 2% Agarose gel 分析待測樣品、Positive Control 以及 Negative Control，若有黴漿菌污染將會於 270 bp 位置觀察到。

### 三、病毒之檢驗

#### 1. 病毒的定量-TCID<sub>50</sub>

將病毒以序列稀釋的方法，接種於 96 well 細胞培養盤中的 vero 細胞，經由 5-7 天的培養，觀察細胞之 CPE (細胞病理現象)，並經由結晶紫染色或免疫螢光染色法，來證實細胞受病毒感染的情形，以其最高具 50% CPE 的稀釋濃度決定 TCID<sub>50</sub> 的效價。

#### 2. 蛋白質濃度之測定

取樣品及 Bovine Serum Albumin 之標準液，至入 96 孔微量盤中，加入 Bicinchoninic acid working reagent 200  $\mu$ l，震盪 30 秒，放置於 37 $^{\circ}$ C 作用 30 分鐘，於波長 562nm 測定其吸光值。

#### 3. 蛋白質電泳

純化之樣品以 4—20% 梯度的正十二烷硫酸鈉—聚丙烯醯胺膠體，在電壓 150 伏特之下做電泳分離 90—120 分鐘，之後以銀染色方式分析蛋白質電泳的情況。

#### 4. 西方點墨沾漬法

純化之樣品經過蛋白質電泳後，利用 Semi-phor 半乾式轉移槽，將蛋白質樣品由膠體轉移至硝酸纖維膜上，加入 5% 脫脂奶粉溶液於纖維膜上，震盪 40 分鐘後以 0.1% Tween80/PBS 清洗之後加入經過適當稀釋的腸病毒 71 型單株抗體於纖維膜

上，在 37°C 保溫箱中作用 3 小時，以 0.1% Tween20/PBS 清洗三次來清除未結合之抗體。加入適當稀釋之 HRP-conjugated goat anti-mouse IgG 抗體，在 37°C 保溫箱中作用 1 小時，以 0.1% Tween80/PBS 清洗三次來清除未結合之抗體。將 BCIP/NBT 溶於 10mL 水中後置於纖維膜上，震盪 5-10 分鐘，待其呈色後以去離子水洗淨纖維膜上，並觀察染色情形。

#### 5. 抗原檢測—酵素連結免疫反應法

黏覆小鼠腸病毒 71 型病毒抗體於 96 孔微量滴定盤上，使用 ELISA 清洗儀，清除未黏覆之抗體，之後加入待測或對照組腸病毒 71 型病毒抗原樣品，放置於 37°C 保溫箱中一小時，再加入腸病毒 71 型單株抗體。最後加入 goat anti-mouse 馬山葵過氧化酵素複合體，放置於 37°C 保溫箱中作用二小時。清洗後，在每孔中加入 100 ml OPD ( 0-phenylenediamine dihydrochloride ) 酵素受質體放置於室溫暗處，呈色反應 20 分鐘，以 ELISA 吸光儀 ( Molecular Device , Emax ) 讀取波長 450nm 及 650nm 吸收值之差值。

#### 6. 病毒去活化

福馬林溶液以 1:4000 的比例加入純化之病毒液中，至於 37°C 下靜置，進行病毒去活化反應。反應期間，定期取樣檢測 50% Tissue Culture Infection Dose (TCID<sub>50</sub>) 觀察病毒力價的變化，直至無病毒存活為止。經 3 天後，將去活化病毒混合鋁鹽佐劑，置備免疫用疫苗。

### 四、病毒株效價的測定

#### 1、動物免疫之操作

##### A. 小鼠實驗

取 12-15 克的 ICR 小鼠，於第 1 和 3 週以腹腔免疫老鼠共 2 次，第 4 週以乙醚麻醉致死進行心臟全採血，每次採血後將採收到的血混合，以 4 度 C、3000rpm 離心 30 分鐘取上清液，再以 56°C 不活化血清 40 分鐘，保存於-20°C。

#### B. 兔子實驗

取 2.5 公斤的紐西蘭白兔，第一週先以耳動脈採血 5 ml，在抽血過後於第 1、3、5 和 7 週以肌肉注射免疫共 4 次，於第 1、3、5、7 和 9 週進行耳動脈採血 5-10 ml 直到實驗結束，每次採血後將採到的血混合，以 4 度 C、3000rpm 離心 30 分鐘取上清液，再以 56°C 不活化血清 30 分鐘，保存於-20°C。

#### 2、病毒抗體中和試驗

以棋盤交叉法作病毒中和試驗，比較各病毒免疫性的差異。將待測血清檢體系列稀釋，並依序與 100 個 TCID<sub>50</sub> 的各株病毒混合。在 37°C 作用 30 分鐘後，接種於 96 well 細胞培養盤中的 vero 細胞，經由 5-7 天的培養，觀察細胞之 CPE 現象，並經由結晶紫染色，或免螢光染色法，來證實細胞受病毒感染的情形。抗體之中和效價以血清在最高稀釋濃度下，仍可抑制病毒感染細胞的倍率來決定。

## 結果

### 一、腸病毒 71 型四種 subgenotype 馴化與初步篩選：

本計畫挑選台灣由 2005~2013 年來流行或是曾引發重症病例之病毒株(不包含 B4、C4)，依照基因亞型不同分為 B5, C2-like, C2 及 C5 等 4 種共 15 株，作為新疫苗株篩選候選株之基因型別。各個病毒株經由 Vero 細胞繼代五次，馴化後建立病毒種庫，並觀察 CPE 天數以及 TCID<sub>50</sub>，作為篩選候選疫苗株第一步。根據表一顯示隨著病毒繼代次數增加，馴化到第五代(V5)比起只馴化二代(V2)的病毒其 CPE 時間明顯縮短，TCID<sub>50</sub> 也隨代數增加而增高，最終的 TCID<sub>50</sub> 均大於 5.5 以上，顯示此四種腸病毒亞型皆可馴化，並能在 Vero 細胞內增殖。實驗初期使用 TCID<sub>50</sub> 作為初步篩選標準，每種亞型挑選 TCID<sub>50</sub> 最高的兩株作為疫苗候選株，其餘病毒株均凍存於-80°C 作為病毒種庫。此四種腸病毒亞型，分別為 B5:E11-56, E11-36；C2-like: E08-01, E08-49；C2:E11-59, E12-20 及 C5: E07-04, E09-92 總共 8 株(表二)，其 TCID<sub>50</sub> 均在 6 以上，其中 B5 與 C2 之 TCID<sub>50</sub> 則均高於 7，顯示病毒毒力佳、適應良好。

### 二、病毒原液之檢測與分析：

#### 1. 抗原定量(bicinchoninic acid ,BCA assay 與 ELISA assay)

分別針對 8 株不同型 EV71 候選病毒以 175cm<sup>2</sup> T flask 小量製備，經離心處理與 0.2 μm 濾膜過濾得到病毒液進行分析。其蛋白質定量均為 1000 ug/ml 之上，推測主要是因為

2%FBS 有血清培養基的影響使總蛋白質量偏高，比照使用無血清培養基產程定量結果，初過濾病毒原液蛋白質濃度均低於 100 ug/ml，故蛋白質總量無法直接反應總抗原量，須藉由 ELISA 進一步專一性測定 EV71 抗原量。使用腸病毒 B4 免疫之兔子多株抗體固定候選株病毒顆粒，MAB979 單株抗體主要是辨認腸病毒 VP0 與 VP2 抗原位，8 株疫苗候選株之 ELISA 數值為 1.14 到 7.52 OD/ml(表二)，與 TCID<sub>50</sub> 數值沒有明顯相關性(相關係數為 0.23，只具些微正相關)，推論 ELISA 與 TCID<sub>50</sub> 反映疫苗株不同面向之定量結果，並非 TCID<sub>50</sub> 高則 ELISA 也高。將 ELISA 病毒抗原量/蛋白質含量可獲得每 ml 病毒抗原量/蛋白質含量之比值，比值越高表示每單位蛋白質所含的相對抗原量越高(圖一)，作為 8 株病毒間抗原量比較之依據。

## 2. 抗原比例分析(Western. Blotting)

已知腸病毒顆粒是由外殼蛋白(capsid)包覆其單股 RNA，外殼蛋白由 VP1、VP2、VP3 與 VP4 四種蛋白質共同組成，VP4 與病毒 RNA 的穩定性有關，而 VP1、VP2 以及 VP3 則是與細胞接受器及抗體結合有關，其中 VP1 是發展疫苗與中和抗體主要作用區域；然而在培養病毒的過程中亦會大量出現 VP2 與 VP4 的前驅蛋白 VP0，VP0 亦會與 VP1、VP3 形成不含 RNA 的空心病毒顆粒。根據本中心與國家衛生研究院研究均顯示空心病毒顆粒的免疫力價低於完整病毒【10】。因此有必要藉由西方墨點法進行抗原型式分析，比較各病毒株間是否

對於空心病毒顆粒和完整病毒生成的比例間是否有所差異，避免進入試量產時完整病毒比例過低導致產量不佳。用 MAB979 對 VP0 和 VP2 進行偵測，由結果可以發現不同病毒間生成比例上有明顯差異，大致上可分為兩組，分別是 VP0 多於 VP2 和 VP0 與 VP2 比例相近兩種(圖二)。其中 4 株 B5、2 株 C2(E11-59、E12-05)和 2 株 C5(E06-81、E09-92)為 VP0 比例多於 VP2(VP0/VP2 比值大於 1.5)；而 1 株 B5(E11-56)、1 株 C2(E12-20)、2 株 C2-like(E08-01、E08-49)和 3 株 C5(E07-04、E08-69、E10-75)則屬 VP0 與 VP2 比例相近(VP0/VP2 比值小於 1.5)。另外使用 VP1 專一性抗體 MAB5639 比較各病毒間的總抗原量，VP1 專一性抗體所偵測抗原比例與 ELISA 數值大致上吻合，但仍與 TCID<sub>50</sub> 數值呈現低關聯性(表二、圖二)。依據本中心過去腸病毒 71 型 C4 原型疫苗的量產計畫所得結果與經驗，有病毒抗原生產量過低之情形，若剔除掉無血清生物反應器培養之因素外，也曾建議前期初步篩選病毒株時除考慮病毒毒力外，也應將病毒抗原產生量與抗原比例做為參考。

### 三、病毒株中和效價的測定

動物試驗首先將 8 株病毒培養液經離心、過濾及去活化後，以原倍進行腹腔免疫注射，每劑 0.5 ml 注射兩劑，注射時間間隔 14 天。將小鼠安樂死後，進行心臟採血，分離得到抗血清將補體去活化後，凍存於-20°C 備用。以中和試驗檢測 8 株抗血清抗體效價(表三)，12 株病毒以 200 TCID<sub>50</sub> 力價進行細胞攻毒。結果顯示中和性抗體效價範圍可從最低的 7.07 到最高的 841.4 以上。

B5 (E11-56、E11-36)抗血清對於 B5 病毒株皆能產生高保護效價，也可中和不同基因型病毒株，而 C2 (E11-59、E12-20)、C5 (E08-92)抗血清也能對於自身基因型病毒具有不錯的中和抗體效價，惟 C2like (E08-01、E08-49)和 C5 (E07-04)卻無法對於本身基因型來源之病毒株有好的中和效價。若以 ELISA 檢測抗原量當基準，實驗結果發現 C2like E08-01、E08-49 及 C5 E07-04 分別含有 7.52、2.50 和 3.80 等高抗原量，且 C5 E07-04(3.8 OD/ml)高於 C5 E08-92(1.14 OD/ml)，但是中和試驗結果卻無法與抗原量有正相關性(表三)，未來將持續進行其他病毒株測試。整體而言此 8 株抗血清對於 B4、B5、C2、C4、C5 等病毒皆具備不錯之交叉中和抗體效價，但對 A、B1 和 C2like 等病毒的中和效價則無或偏低，比較特別的是 C2、C2like 和 C5 對於 B 基因型中和效價卻高於本身 C 基因型，而 C2like 和 C5 抗血清交叉中和抗體效價皆不如 B5 和 C2 高，因此綜合來看 B5 和 C2 較有潛力成為疫苗候選株。

自小鼠試驗中挑選 3 株較具潛力疫苗候選株(E11-56、E11-36 及 E12-20)進行兔子試驗，首先將病毒培養液經離心、過濾及去活化後，以原倍進行肌肉免疫注射，每劑 1 ml 注射兩劑，注射時間間隔 14 天。從兔子耳動脈採血，分離得到抗血清將補體去活化後，凍存於-20 °C 備用。以中和試驗檢測 3 株抗兔子血清效價(表四)。結果顯示第 3 周後可看到抗體效價升高，中和抗體效價從最低的 7.07 到最高的 2455。分別以三株兔抗血清 B5 (E11-56、E11-36) 及 C2 E12-20 針對不同亞型 EV71 病毒株進行交叉中和抗體效價實驗(表五)，綜合表二及表三結果發現三株疫



苗株產生之抗體對於 B4、B5、C2、C4 及 C5 等亞型病毒皆能有效中和，且對自身同一亞型病毒有很好中和保護力。

#### 四、市售 EV71 全病毒免疫抗體分析比較：

為持續調整腸病毒 71 型抗原檢測所使用之抗體，及加強與國內生技公司合作，除 Merck & Millipore 所產出之腸病毒 71 型專一性抗體 MAB979 外，另搜集三支由國內生技公司所生產之抗體，此四隻抗體均以全病毒顆粒免疫，具有中和效價。MAB979 與 MAB5639 是以小鼠免疫後取得之單株抗體、GTX124261 為兔子免疫之多株抗體、Ah-I4 則是蛋雞免疫之多株抗體。一般認為 EV71 的 VP1 抗原具有好的免疫原性，較適合做為檢測標的，早期 EV71 抗體選擇性較少，故本中心多以 MAB979 作為主要偵測抗體。

##### 1. 西方墨點法結果比較

病毒樣品經膠體純化後進行 SDS-PAGE 分析並銀染確認病毒外殼蛋白，再以此樣品進行西方墨點法實驗藉以比較此四支抗體差異。由圖三可知四隻抗體皆對 VP0 有高專一性，MAB979 對於 VP2 具有高專一性，MAB5639 和 Ah-I4 對於 VP1 具有專一性。然而 VP0 是 VP2 和 VP4 的前驅蛋白，空心病毒顆粒含量較多，抗原性 (antigenicity) 較差，若只以 VP0 作為腸病毒 71 型疫苗之檢驗標的恐無法獲得較真實的抗原品質，所以選擇 MAB979、MAB5639 和 Ah-I4 進行後續試驗。

## 2.ELISA 分析法比較

以兔子免疫 B4 病毒株之抗血清作為 capture，再加入本次計畫中的 15 株病毒原液，檢測時採用 MAB979、MAB5639 和 Ah-I4 等三株抗體。以 OD 讀值來看背景值(PBS)，以 Ah-I4 最高、MAB979 次之、MAB5639 最低(圖四)。這同樣也反應在 15 株病毒的偵測上， Ah-I4 讀值最高、MAB979 次之、MAB5639 最低，顯示出此三株抗體與抗原結合力的高低為 Ah-I4 > MAB979 > MAB5639。雖然此三株抗體在各抗原量比例偵測上顯示出一致性，但過高讀值顯示需要將抗原或是抗體再繼續進行稀釋。以結果來看 MAB979 作為 ELISA 法的檢測抗體仍較為合適。

## 3.交叉中和效價能力比較

抗體的中和能力高低會與抗體所偵測到抗原的抗原性高低有關，若往後欲做為疫苗產品的檢驗，中和能力便顯得重要。本次實驗主要評估檢測抗體是否會因為基因型的不同而有差異進而造成實驗誤差。測試抗體同樣選用 MAB979、MAB5639 和 Ah-I4 等三株；MAB979 由 EV71/BrCr 所免疫得來中和效價為 1:16、MAB5639 由 EV71/B4 免疫得來中和效價為 1:16 而 Ah-I4 由 EV71/C2 免疫得來中和效價為 1:32，病毒樣品共 15 株，另加入疫苗株 E59(B4)做為標準品。三株抗體均能中和疫苗株，其中以 Ah-I4 交叉中和能力最佳，15 株病毒株可中和 11 株，有 4 株無法中和(C2-like 1 株、C5 3 株)，

MAB979 可中和 7 株，有 8 株無法中和(C2 2 株、C2-like 2 株，C5 4 株)，MAB5639 交叉中和能力最差，只可中和 4 株(表六)。與 ELISA 結果來看，抗體中和能力並不影響 ELISA 實驗對抗原的偵測，但可看出中和能力越高的抗體其 ELISA 實驗背景值越高，抗原相對讀值也高，與抗原結合力也強。

綜合上述結果可判定 Ah-I4 適合用於 ELISA 中的 capture 抗體，MAB979 可繼續做為 ELISA 中的檢測抗體與西方墨點法分析抗原型式(VP0 與 VP2)，MAB5639 較適合用於西方墨點法分析總抗原(VP1)量，GTX124261 不適合用於 ELISA 或是西方墨點法任一實驗。

## 討論

本計畫主要是使本中心已建立之腸病毒 71 型疫苗相關種庫與疫苗株效價之開發與檢測平台更為完備，並持續針對現行已建立之腸病毒 71 型疫苗開發技術不足處，進行補強與改善，冀望能確立篩選系統，增加往後新疫苗株量產之成功性，從而降低時間與成本。

根據本署研究檢驗中心每年對於腸病毒基因型分析，及國衛院腸病毒 71 型 B4 疫苗第一期臨床試驗結果，選擇 B5、C2、C2-like 和 C5 四型等共 15 株病毒來補足先前選出之 B4 和 C4 疫苗株先天可能之缺陷。篩選初期以生產疫苗用細胞株 Vero 細胞作為宿主，因此可初步藉由病毒對 Vero 之適應性與毒力是否增加做為判斷，依據篩選 B4 與 C4 疫苗株之經驗，以 5 天內 CPE 達 70% 以上及 TCID<sub>50</sub> 之 log 值達 6.5 以上為允收標準。由此得到 B5 type 2 株(E11-56、E11-36)、C2 type 2 株(E11-59、E11-20)、C2-like type 2 株(E08-01、E08-49)和 C5 type 2 株(E07-04、E09-92)，共 4 種 type 8 株。此允收方式判定是由於病毒原液並未經過純化處理，故蛋白質 BCA 法測定並無法反應真實抗原蛋白量，然而 ELISA 分析因為無法與 TCID<sub>50</sub> 之 log 值有正相關性，考慮之下以 TCID<sub>50</sub> 高低為判斷標準。這是因為本中心無純化的病毒標準品可供 ELISA 數值進行定義；如 1 OD value 含有多少抗原量與 TCID<sub>50</sub>，無法作為標準。故只能以 TCID<sub>50</sub> 定義；能讓培養細胞之 50% 產生 CPE 的病毒量為準則。

根據 B4 與 C4 疫苗量產實驗發現，病毒抗原生產量會隨著無血清培養系統及生物反應器的使用而下降，也可能容易使病毒產生較多低免疫原性的中空病毒顆粒，導致低產量低免疫原性，但是若能於疫

苗株篩選初期多增加病毒生成量與抗原型式兩種考慮因素，更能使未來量產效率與成功率大幅提升。

為了補足此一缺陷，嘗試利用西方墨點法探討病毒抗原量和抗原型式。由於西方墨點法會先經由蛋白質膠體電泳進行初步分離，避免細胞和培養血清雜蛋白干擾，也能夠減少 ELISA 所使用之 capture 抗體的影響，並能夠分辨抗原型式(如 VP0 與 VP2)，可以利用圖像分析軟體進行相對定量等優點。由結果可看出病毒本身在抗原產生量(VP1)以及抗原產生類型(中空病毒顆粒 VP0 與完整病毒 VP2)均不相同，即使是同一基因型也不一致。VP1 抗原量與 ELISA 法得到之抗原 OD 值相呼應，但與 TCID<sub>50</sub> 關聯性仍低；如 E07-04(C5) ELISA OD 值大於 E09-92(C5)，西方墨點法也顯示 E07-04(C5) VP1 抗原量多於 E09-92(C5)，但 TCID<sub>50</sub> 數值卻是 E09-92(C5)高於 E07-04(C5)。同樣的，抗原類型比例的多寡與 TCID<sub>50</sub> 也無絕對關聯性；如 E12-20(C2)和 E11-59(C2)兩者 TCID<sub>50</sub> 數值與 VP1 抗原量相近，但 E12-20(C2) VP2 比例卻多於 E11-59(C2)。因此建議將病毒生成量與抗原型式獨立為一篩選標準。

依據小鼠和兔子抗血清發現 C2-like 和 C5 兩個 subgenotypes 免疫原性(immunogenicity)較差，也較不易被其他 subgenotypes 所中和(表三、表五、表六)，雖然跟據本署研究檢驗中心的監測，在台灣 C2-like 只出現在 2008 年、C5 出現在 2006~2010 年【35】，但無證據顯示該兩種 subgenotypes 不會再次出現並引發大流行，因為中國就曾在 2008 年有一波 A subgenotype 的疫情【36】，所以交叉中和能力的高低影響著疫苗保護效力。本次計畫中 E12-20 (C2)、E11-56 (B5)、E11-36(B5) 三株病毒均能有效的引起免疫反應(表四)；在交叉中和的寬廣性上，

此三株抗血清對於近年來流行之 B5、C4 subgenotypes 都有高的中和效價，但對於 A、B1 和 C2-like 效果較差，而 E12-20 (C2)較 E11-56 (B5)、E11-36(B5)在 C5 subgenotype 有較高的中和效價，雖然 E12-20 (C2)在交叉中和測試中總測試株數的 70.00%中和效價高於 1:40，略低於 E11-56 (B5)和 E11-36(B5)的 73.33%，考慮到交叉中和的所能保護的 subgenotypes 種類，仍以 E12-20 (C2)較適合選為疫苗候選株，未來將進一步比較無血清培養下 E12-20 (C2)與疫苗株 B4 (E59)和 C4(E36)產生之原型疫苗效價。

隨著腸病毒 71 型疫苗的研發以及防疫單位的重視，偵測腸病毒 71 型的抗體也越來越多樣，依據生產方式可分為單株抗體與多株抗體，抗原來源可分為重組抗原及病毒顆粒免疫，免疫宿主也有小鼠、兔子、禽類等選擇。而要能應用到疫苗品質的檢驗，除了要有高度專一性外，如何反應出有效抗原比例是很重要的。因此考慮到免疫抗原特性(抗原形式、subgenotype)收集四株由病毒顆粒免疫之抗體。並利用西方墨點法、ELISA 法和中和試驗對其抗體進行測試。總結分析，由中和試驗來看 Ah-I4 能中和最多 subgenotype，且西方墨點法測試中可以辨識 VP1，但在 ELISA 測試有太高背景值，故較適合應用於 ELISA 法中的 capture，並適用於不同 subgenotype 檢驗抗體；MAB979 只對 C2-like 和 C5 type 中和效果較差，ELISA 測試背景值適中，辨識 VP0 和 VP2 能力強，但無法反應重要抗原 VP1 是一個考慮點，但仍可用於 ELISA 和西方墨點法；MAB5639 雖然能較專一性的識別 VP1，但中和效果較差，ELISA 讀值偏低可能有偽陰性問題，但應用於西方墨點法結果良好。

由本次計畫結果，建議疫苗株或標準病毒株篩選步驟，1. 由

TCID<sub>50</sub> 和 CPE 挑選容易培養與增殖的病毒。2.以 ELISA 與西方墨點法分析找出高抗原量的類型。3.小鼠試驗選出高免疫反應與中和效價寬廣的病毒。4.兔子試驗作為最後確認。

## 圖表

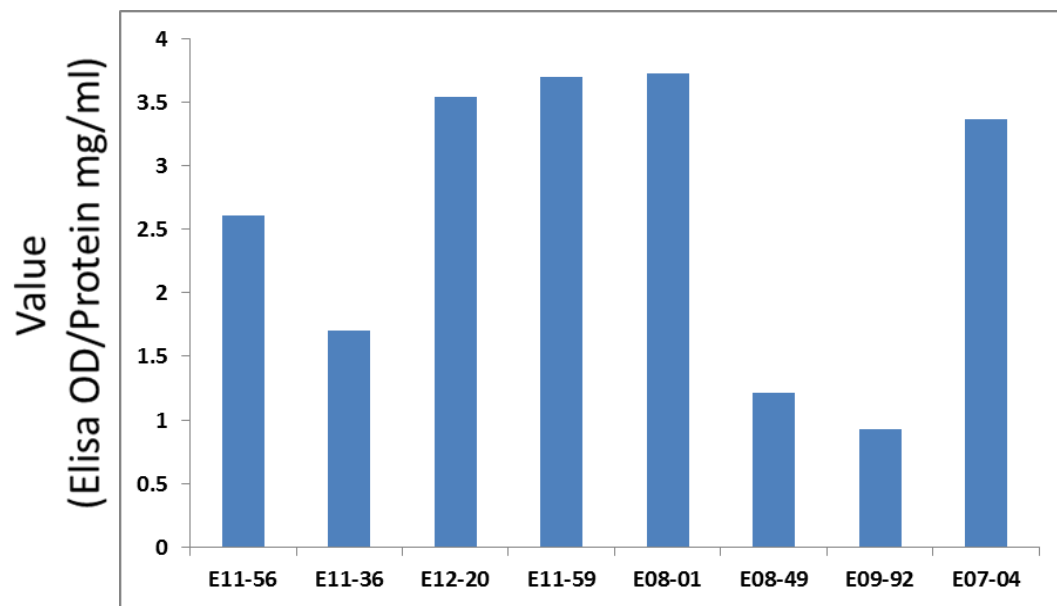
表一、腸病毒 71 型 4 種 subgenotype 15 株病毒經 2 到 5 代馴化後 CPE  
與 TCID<sub>50</sub> 變化。

| number of passages | V2      |                    | V3      |                    | V4      |                    | V5      |                    |
|--------------------|---------|--------------------|---------|--------------------|---------|--------------------|---------|--------------------|
|                    | CPE/day | TCID <sub>50</sub> | CPE/day | TCID <sub>50</sub> | CPE/day | TCID <sub>50</sub> | CPE/day | TCID <sub>50</sub> |
| <b>B5</b>          |         |                    |         |                    |         |                    |         |                    |
| E13-11             | 3       | 6.14               | 3       | 7.14               | 3       | 7.4                | 3       | 7.13               |
| E12-24             | 4       | 5.1                | 3       | 6.5                | 3       | 7.84               | 3       | 6.84               |
| E11-36             | 4       | 6.4                | 3       | 6.4                | 3       | 7.84               | 3       | 7.66               |
| E11-56             | 4       | 5.4                | 3       | 6.7                | 3       | 8.36               | 3       | 7.66               |
| E12-73             | 7       | 5.3                | 6       | 6.5                | 6       | 5.5                | 4       | 6.31               |
| <b>C2-like</b>     |         |                    |         |                    |         |                    |         |                    |
| E08-01             | 4       | 6                  | 3       | 6.5                | 3       | 7.31               | 3       | 7.5                |
| E08-49             | 6       | 4.66               | 6       | 5.3                | 6       | 5.69               | 5       | 6                  |
| <b>C2</b>          |         |                    |         |                    |         |                    |         |                    |
| E11-59             | 6       | 6.31               | 6       | 6.5                | 6       | 6.36               | 5       | 7.36               |
| E12-05             | 7       | 5.36               | 6       | 5.5                | 4       | 5.75               | 4       | 5.75               |
| E12-20             | 5       | 7.36               | 5       | 7.69               | 5       | 7.69               | 5       | 7.66               |
| <b>C5</b>          |         |                    |         |                    |         |                    |         |                    |
| E06-81             | 3       | 4.6                | 3       | 5.4                | 4       | 5.6                | 4       | 6.5                |
| E07-04             | 3       | 5.14               | 3       | 7.3                | 3       | 6.75               | 3       | 6.69               |
| E08-69             | 5       | 5.24               | 5       | 4.75               | 5       | 5.5                | 6       | 5.66               |
| E09-92             | 4       | 6                  | 4       | 6.5                | 4       | 6.47               | 4       | 7                  |
| E10-75             | 4       | 5                  | 4       | 6                  | 4       | 6.14               | 3       | 6.75               |

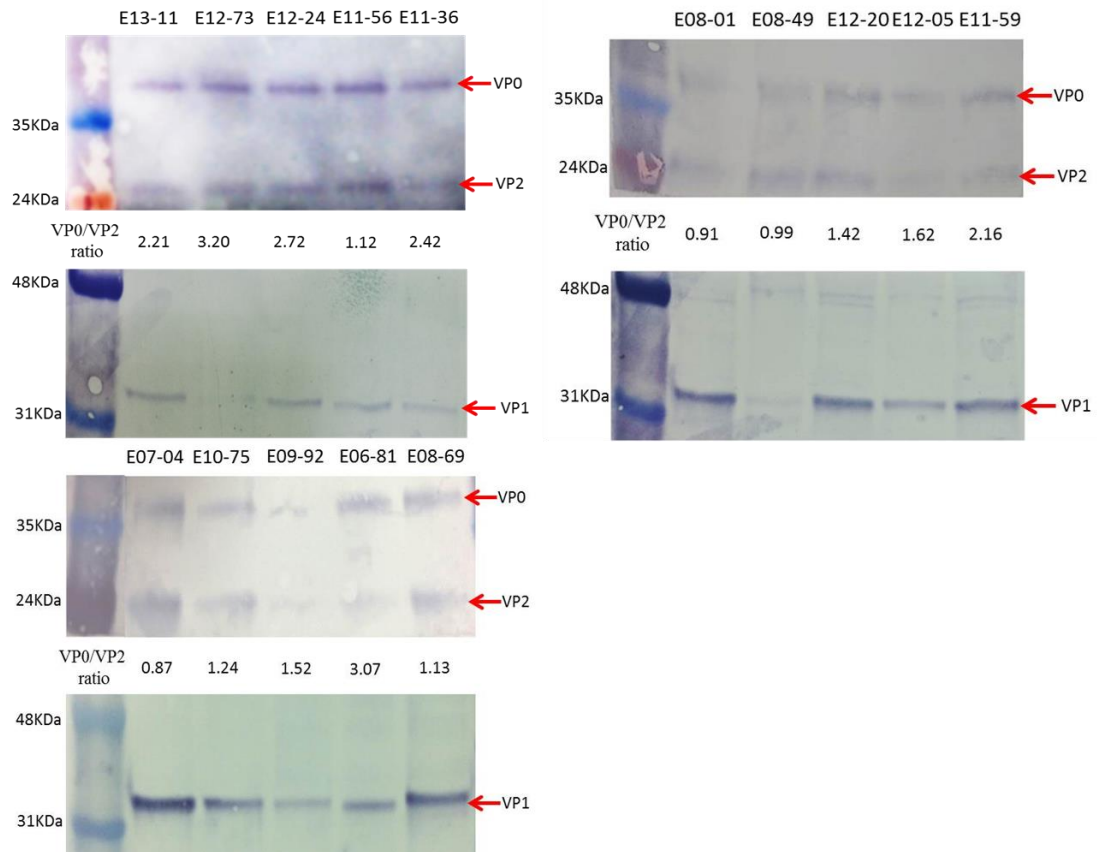


表二、8 株腸病毒 71 型疫苗候選株病毒原液蛋白質和抗原數值。

| Subgenotypes |        | Protein<br>(ug/ml) | ELISA<br>(OD/ml) |
|--------------|--------|--------------------|------------------|
| B5           | E11-56 | 1147               | 2.99             |
|              | E11-36 | 1168               | 1.99             |
| C2-like      | E08-01 | 2022               | 7.52             |
|              | E08-49 | 2051               | 2.50             |
| C2           | E11-59 | 1774               | 6.57             |
|              | E12-20 | 1556               | 5.51             |
| C5           | E07-04 | 1127               | 3.80             |
|              | E09-92 | 1228               | 1.14             |



圖一、8株腸病毒71型疫苗候選株病毒原液每單位蛋白質所含的相對抗原量。



圖二、15 株 EV71 病毒株培養原液 Western blot 分析。

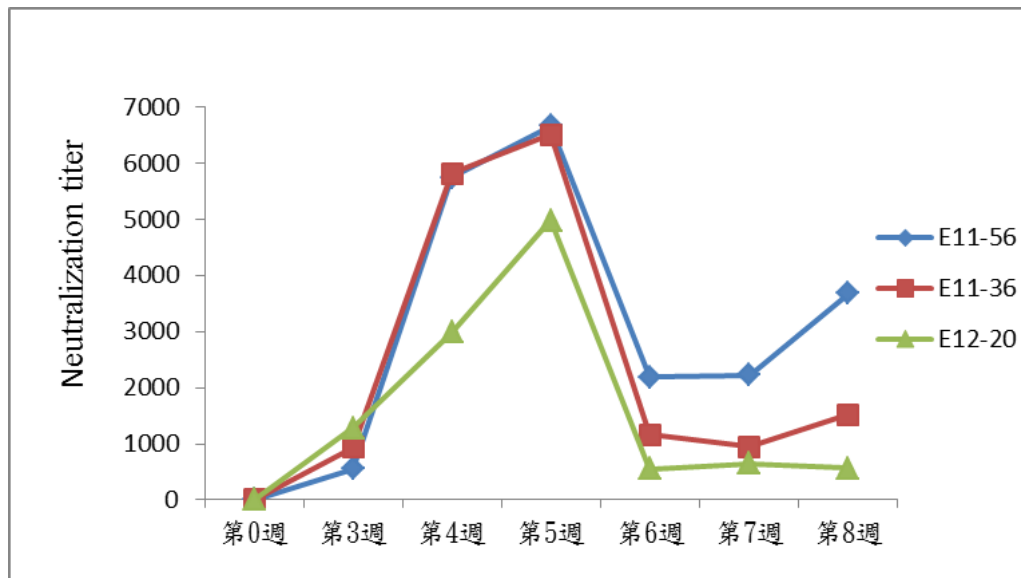
VP0 和 VP2 以 MAB979 (1:1000) 偵測，VP1 以 MAB5639 (1:1000) 偵測；VP0 (38 KDa)、VP1 (34 KDa)、VP2 (28 KDa)；VP0/VP2 ratio 以 imageJ 圖像分析軟體將顯色條帶面積數值化後進行計算。

表三、8 株腸病毒 71 型疫苗候選株小鼠抗血清對 12 株病毒株(8 種 subgenotype)交叉中和數值。

| 候選株抗血清/<br>攻毒用病毒株 | E11-36 | E11-56 | E08-49 | E08-01 | E11-59 | E12-20 | E07-04 | E08-92 |
|-------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1 A-BrCr          | 7.07   | 7.07   | 7.07   | 7.07   | 7.07   | 7.07   | 7.07   | 7.07   |
| 2 B1-E743         | 7.07   | 7.07   | 7.07   | 7.07   | 7.07   | 7.07   | 7.07   | 7.07   |
| 3 B4-E59          | 631    | 275.85 | 341.45 | 347    | 223.87 | 841.4  | 174.93 | 133.35 |
| 4 B5-E11-56       | 794    | 724.89 | 223.87 | 170.66 | 208.9  | 492.03 | 112.2  | 128.2  |
| 5 B5-E11-36       | 490    | 468.81 | 188.36 | 112.2  | 133.35 | 512.86 | 79.43  | 79.43  |
| 6 C2-E12-20       | 225.79 | 28.18  | 59.02  | 70.13  | 158.48 | 175.79 | 44.15  | 43.25  |
| 7 C2-E11-59       | 56.23  | 17.1   | 228    | 193.07 | 85.77  | 79.43  | 108.02 | 181.27 |
| 8 C2like-E08-01   | 43.94  | 7.07   | 79.43  | 7.07   | 100.63 | 7.07   | 43.4   | 8.13   |
| 9 C2like-E08-49   | 19.95  | 7.07   | 14.13  | 26.3   | 25.59  | 18.36  | 30.19  | 10     |
| 10 C4-E236        | 219.37 | 56.91  | 112.2  | 244.63 | 121.3  | 531.79 | 144.83 | 48.78  |
| 11 C5-E08-92      | 93.93  | 43.32  | 188.36 | 223.54 | 172.69 | 190.24 | 133.35 | 73.11  |
| 12 C5-E07-04      | 7.07   | 7.07   | 7.07   | 7.07   | 7.58   | 10     | 7.07   | 7.07   |

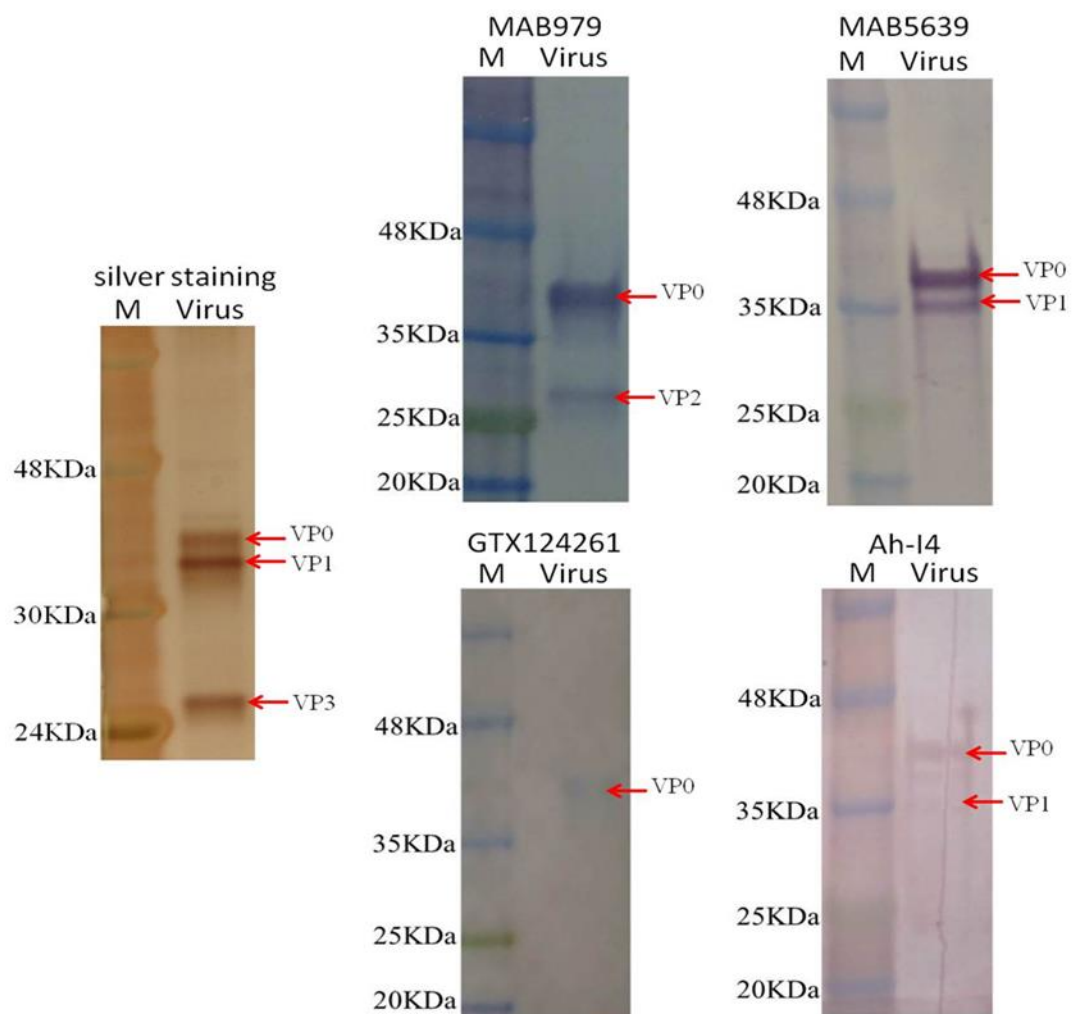
表四、3 株腸病毒 71 型抗原於兔子抗血清力價消長趨勢。

| 週/候選<br>病毒株          | 第 0 週  | 第 3 週   | 第 4 週  | 第 5 週  | 第 6 週  | 第 7 週  | 第 8 週  |
|----------------------|--------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|
| <b>E11-56</b><br>/B5 | 10.605 | 551.035 | 5746.5 | 6657.5 | 2190   | 2218.5 | 3682.5 |
| <b>E11-36</b><br>/B5 | 10.605 | 930.715 | 5811.5 | 6504   | 1156.5 | 946.5  | 1516.5 |
| <b>E12-20</b><br>/C2 | 10.605 | 1282.34 | 2984.5 | 4978   | 550.5  | 655    | 565    |

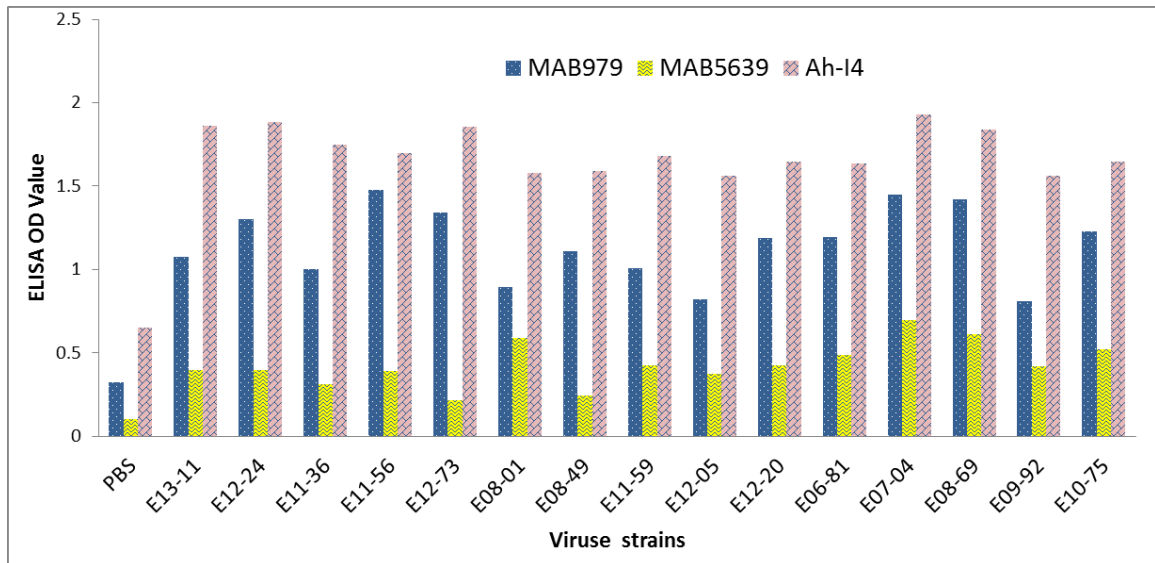


表五、3 株腸病毒 71 型疫苗候選株兔子抗血清對 30 株病毒株(8 種 subgenotype)中和結果

| 候選株抗血清/<br>攻毒用病毒株 |            | E12-20 | E11-56 | E11-36 |
|-------------------|------------|--------|--------|--------|
| 1                 | A-BrCr     | 7.07   | 7.07   | 7.07   |
| 2                 | B1-E743    | 20     | 8      | 13     |
| 3                 | B4-E59     | 1622   | 3020   | 3020   |
| 4                 | B4-E75     | 28095  | 10000  | 11653  |
| 5                 | B4-E117    | 871    | 5957   | 30903  |
| 6                 | B4-E22     | 2941   | 2042   | 2188   |
| 7                 | B5-E56     | 1122   | 870    | 6463   |
| 8                 | B5-E36     | 1122   | 2884   | 6166   |
| 9                 | B5-E005    | 71     | 25     | 24     |
| 10                | B5-E358    | 25     | 12.7   | 7.07   |
| 11                | C2-E20     | 871    | 479    | 1230   |
| 12                | C2-E59     | 1514   | 661    | 2238   |
| 13                | C2-E15     | 7.07   | 447    | 136    |
| 14                | C2-E07     | 1229   | 1159   | 6457   |
| 15                | C2-E25     | 2454   | 1148   | 3034   |
| 16                | C2-E32     | 38.9   | 4140   | 1044   |
| 17                | C2-E63     | 219    | 533    | 1247   |
| 18                | C2-E41     | 3020   | 39811  | 33519  |
| 19                | C2-YN3     | 35.81  | 398    | 215    |
| 20                | C2-YN3H    | 7.07   | 8.41   | 7.07   |
| 21                | C2like-E01 | 324    | 47     | 330    |
| 22                | C2like-E49 | 11.7   | 7.07   | 26     |
| 23                | C4-E236    | 55     | 408    | 154    |
| 24                | C4-E49     | 977    | 387    | 282    |
| 25                | C4-E16     | 1062   | 1259   | 1363   |
| 26                | C4-E18     | 146    | 363    | 489    |
| 27                | C4-Y100    | 1347   | 169    | 528    |
| 28                | C4-E27     | 7.07   | 7.07   | 7.07   |
| 29                | C5-E92     | 1122   | 54     | 554    |
| 30                | C5-E04     | 78     | 16     | 17.2   |



圖三、市售 4 株腸病毒 71 型專一性抗體以西方墨點法檢測之結果。MAB979、MAB5639、Ah-I4 和 GTX124261 稀釋倍率為 1:1000；VP0 (38 KDa)、VP1(34 KDa)、VP2 (28 KDa)；樣品為經膠體分子篩純化之 C4 病毒株。



圖四、市售 3 株腸病毒 71 型專一性抗體作為 ELISA 法偵測抗

體，對腸病毒 71 型 15 株病毒(4 種 subgenotype)檢測之結果。

ELISA: capture 使用兔子 B4 病毒抗血清(1:2000)，detection 的三株抗體稀釋倍率均為 1:1000。



表六、市售三株抗體對 15 株腸病毒 71 型(4 種 subgenotype)和 B4 疫苗株中和力價測試。

| Subgenotypes /<br>commercial antibody &<br>titer | MAB979 (BrCr)<br>1:16 | Ah-I4 (C2)<br>1:32 | MAB5639 (B4)<br>1:16 |
|--|-----------------------|--------------------|----------------------|
| <b>B4</b>  |                       |                    |                      |
| E59 (vaccine strain )                            | ◎                     | ◎                  | ◎                    |
| <b>B5</b>  |                       |                    |                      |
| E13-11   | ◎                     | ◎                  | ◎                    |
| E12-24   | ◎                     | ◎                  | X                    |
| E11-36   | ◎                     | ◎                  | X                    |
| E11-56   | ◎                     | ◎                  | X                    |
| E12-73   | ◎                     | ◎                  | ◎                    |
| <b>C2-like</b>                                   |                       |                    |                      |
| E08-01   | X                     | X                  | X                    |
| E08-49   | X                     | ◎                  | X                    |
| <b>C2</b>  |                       |                    |                      |
| E11-59   | X                     | ◎                  | X                    |
| E12-05   | X                     | ◎                  | ◎                    |
| E12-20   | ◎                     | ◎                  | X                    |
| <b>C5</b>  |                       |                    |                      |
| E06-81   | ◎                     | X                  | X                    |
| E07-04   | X                     | ◎                  | X                    |
| E08-69   | X                     | X                  | ◎                    |
| E09-92   | X                     | ◎                  | X                    |
| E10-75   | X                     | X                  | X                    |

◎表示所有 well 內細胞無 CPE 現象，X任一 well 內細胞有 CPE 現象

## 參考文獻

1. Christian A. K., Ijaz K., Dowell F. S., Chow C. C., Chitale A. R., Bresee S. J., Mintz E., Pallansch A. M., Wassilak S., McCray E. and Arthur R. R. 2013 What we are watching\*five top global infectious disease threats, 2012:a perspective from CDC's Global Disease Detection Operations Center. *Citation: Emerg Health Threats J*, 6: 20632.
2. Lin TY, Twu SJ, Ho MS, Chang LY, Lee CY. 2003 Enterovirus 71 outbreaks, Taiwan: occurrence and recognition. *Emerg Infect Dis*. Mar; 9(3):291-3.
3. Kuo, H.S. et al. 2005. Communicable Diseases of Interest to the Public: Enterovirus. Centers for Disease Control, Taiwan, *Annual Report*, 53-55.
4. Ho, M., Chen, ER, Hsu, KH, Twu, SJ, Chen, KT, Tsai, S F, Wang, J R, and Shih, SR. 1999 An epidemic of enterovirus 71 infection in Taiwan. Enterovirus Epidemic Working Group. *N Engl J Med* 341, 929-935.
5. Wang, SM, Liu, CC, Tseng, HW, Wang, JR, Huang, CC, Chen, YJ, Yang, YJ, Lin, SJ, and Yeh, TF. 1999 Clinical spectrum of enterovirus 71 infection in children in southern Taiwan, with an emphasis on neurological complications. *Clin Infect Dis* 29, 184-90.
6. Wong, KT, Chua, KB, and Lam, SK. 1999 Immunohistochemical detection of infected neurons as a rapid diagnosis of enterovirus 71 encephalomyelitis [letter]. *Ann Neurol* 45,271-2.
7. Wu, T N, Tsai, SF, Li, SF, Lee, TF, Huang, TM, Wang, ML, Hsu, KH, and Shen, CY. 1999 Sentinel surveillance for enterovirus 71, Taiwan, 1998. *Emerg Infect Dis* 5, 458-60.
8. Chang LY, King CC, Hsu KH, et al. Risk factors of enterovirus 71 infection and associated hand, foot, and mouth disease/herpangina in children during an epidemic in Taiwan. *Pediatrics* 2002;109:e88
9. Liang Z.L., Mao Q.Y., Wang Y.P., Zhu F.C., Li J.X., Yao X., Gao F., Wu X., Xu M. and Wang J.Z. 2013 Progress on the research and development of inactivated EV71 whole-virus vaccines. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* , 9(8) 1-5.
10. Cheng A, Fung CP, Liu CC, Lin YT, Tsai HY, Chang SC, Chou AH, Chang JY, Jiang RH, Hsieh YC, Su IJ, Chong PC, Hsieh SM. 2013 A Phase I, randomized, open-label study to evaluate the safety and immunogenicity of an enterovirus 71 vaccine. *Vaccine*. 31(20):2471-6
11. Chung YC, Ho MS, Wu JC, Chen WJ, Huang JH, Chou ST, Hu YC. 2008. Immunization with virus-like particles of enterovirus 71 elicits

- potent immune responses and protects mice against lethal challenge. *Vaccine* 26: 1855-1862.
12. Zhu F.C., Meng F.Y., Li J.X., Li X.L., Mao Q.Y., Tao H., Zhang Y.T., Yao X., Chu K., Chen Q.H., Hu Y.M., Wu X., Liu P., Zhu L.Y., Gao F., Jin H., Chen Y.J., Dong Y.Y., Liang Y.C., Shi N.M., Ge H.M., Liu L., Chen S.G., Ai X., Zhang Z.Y., Ji Y.G., Luo F.J., Chen X.Q., Zhang Y., Zhu L.W., Liang Z.L. and Shen X.L. 2013 Efficacy, safety, and immunology of an inactivated alum-adjutant enterovirus 71 vaccine in children in China: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3. trial *The Lancet*, 381: 2024–32
  13. Liu Q., Huang X., Ku Z., Wang T., Liu F., Cai Y., Li D., Leng Q. and Huang Z. 2012 Characterization of enterovirus 71 capsids using subunit protein-specific polyclonal antibodies. *Journal of Virological Methods*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.09.024>.
  14. Ma S, Mao Q, Liang Z, Zhang C, Yang W, Sun Z, Zhang H, Shen X and Bi S, Sun L. 2013 Development of a sandwich ELISA for the quantification of enterovirus 71. *Cytotechnology*.
  15. Meng T., Kolpe A. B., Kiener T. K., Chow V. T. K and Kwang J., 2011 Display of VP1 on the Surface of Baculovirus and Its Immunogenicity against Heterologous Human Enterovirus 71 Strains in Mice. *PLoS ONE* . 6 ( 7 ) : e21757.
  16. Chong P., Hsieh S.Y., Liu C.C., Chou A.H., Chang J.Y., Wu S.C., Liu S.J. 2012 Production of EV71 vaccine candidates. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 8:12, 1–9.
  17. Tan C. W., Chan Y. F., Sim K.M., Tan E. L., Poh C. L. 2012 Inhibition of Enterovirus 71 (EV-71) Infections by a Novel Antiviral Peptide Derived from EV-71 Capsid Protein VP1. *PLoS ONE*. 7( 5 ) : e34589 .
  18. Xuc J., Qian Y., Wang S., Jill M. G. S., Li W., Huang Z., Lua S. 2010 EV71: An emerging infectious disease vaccine target in the Far East? *Vaccine*. 28: 3516–3521.
  19. Lee M.S., Tseng F.C., Wang J.R., Chi C.Y., Chong P., Su I.J. 2012 Challenges to Licensure of Enterovirus 71 Vaccines. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 6(8 ): e1737.
  20. Ho M. Enterovirus 71: the virus, its infections and outbreaks. (2000). *J Microbiol Immunol Infect* Dec 33(4):205-16
  21. Chu PY, Lin KH, Hwang KP, Chou LC, Wang CF, Shih SR, Wang JR, Shimada Y, Ishiko H. (2001). Molecular epidemiology of enterovirus 71 in Taiwan. *Arch Virol* 146(3): 589-600
  22. Chan YF, Sam IC, Abubakar S. Phylogenetic designation of enterovirus 71 genotypes and subgenotypes using complete genome sequences. *Infect. Genet. Evol.* DOI: 10.1016/j.meegid.2009.05.010
  23. Lee M.S. and Chang L.Y. 2010 Development of enterovirus 71

- vaccines. *Expert Rev. Vaccines*. 9(2), 149–156.
24. McMinn P. C 2012 Recent advances in the molecular epidemiology and control of human enterovirus 71 infection. *Current Opinion in Virology*. 2:199–205.
  25. Kung SH, Wang S F, Huang CW, Hsu CC, Liu HF, Yang JY. 2007 Genetic and antigenic analyses of enterovirus 71 isolates in Taiwan during 1998-2005. *Clin Microbiol Infect*. 13:782-7.
  26. Foo DGW, Alonso S, Phoon MC, Ramachandran NP, Chow VTK, Poh CL. Identification of neutralizing linear epitopes from the VP1 capsid protein of enterovirus 71 using synthetic peptides. *Virus Res* 2007;125:61-8.
  27. Foo DGW, Alonso S, Chow VTK, Poh CL. 2007 Passive protection against lethal enterovirus 71 infection in newborn mice by neutralizing antibodies elicited by a synthetic peptide *Microbes and Infection* 9, 1299-1306.
  28. Arita M, Nagata N, Iwata N, Ami Y, Suzaki Y, Mizuta K, et al. 2007 An attenuated strain of enterovirus 71 belonging to genotype A showed a broad spectrum of antigenicity with attenuated neurovirulence in cynomolgus monkeys. *J Virol*. 81:9386-95.
  29. Huang M.L., Chiang P.S., Chia M.Y., Luo S.T., Chang L.Y., Lin T.Y., Ho M.S., Lee M.S. 2013 Cross-reactive Neutralizing Antibody Responses to Enterovirus 71 Infections in Young Children: Implications for Vaccine Development. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 7( 2 ): e2067.
  30. Mizuta K, Aoki Y, Suto A, Ootani K, Katsushima N, Itagaki T, Ohmi A, Okamoto M, Nishimura H, Matsuzaki Y, Hongo S, Sugawara K, Shimizu H, Ahiko T. 2009 Cross-antigenicity among EV71 strains from different genogroups isolated in Yamagata, Japan, between 1990 and 2007. *Vaccine*. May 21;27(24):3153-8. Epub 2009 Apr 10.
  31. Maranga L, Rueda P, Antonis AF, Vela C, Langeveld JP, Casal JJ, Carrondo MJ. (2002). Large scale production and downstream processing of a recombinant porcine parvovirus vaccine. *Appl Microbiol Biotechnol*. Jun;59(1):45-50.
  32. Wickramasinghe, SR., Kalbfus, B., Zimmermann, A., V. Reich TU. 2005 Tangential Flow Microfiltration and Ultrafiltration for Human Influenza A Virus Concentration and Purification. *Biotechnology and Bioengineering*, 92(2), 199-208.
  33. Van Reis R, Zydney A. (2001). Membrane separations in biotechnology. *Curr Opin Biotechnol*. Apr;12(2):208-11.
  34. Wu, CN, YC Lin, C Fann, NS Liao, SR Shih, and MS Ho. 2001. Protection against lethal enterovirus 71 infection in newborn mice by passive immunization with subunit VP1 vaccines and inactivated virus. *Vaccine* 20(5-6):895-904.

35. Huang Y.P., Lin T.L., Lin T.H., Wu H.S. 2013. Antigenic and genetic diversity of human enterovirus 71 from 2009 to 2012, Taiwan. *PLoS One*. 15;8(11):e80942. doi: 10.1371/journal.pone.0080942. eCollection 2013.
36. Chong P., Liu C.C., Chow Y.H., Chou A.H., Klein M. 2014. Review of Enterovirus 71 Vaccines. *Clin Infect Dis*. doi: 10.1093/cid/ciu852.

## 期末報告審查意見回覆

王有欽委員

1. 建立疫苗株篩選之內部標準作業程序(SOP)。

Ans. 感謝委員提點，已將篩選流程每個階段之測試寫成 SOP。

2. 整理研究之特殊性及發現，加強文章之發表。

Ans. 感謝委員建議，本中心有機會會盡量將成果發表，但目前仍傾向於將相關研發成果與發現以技術授權方式技轉予國衛院或是致力於疫苗發展單位接續研究。