計畫編號： DOH102-DC-2602

行政院衛生署疾病管制局 102 年度科技研究發展計畫

# 腸病毒 71 型疫苗之開發-
# 建立 C4 腸病毒 71 型疫苗產程和免疫效價之檢測(II)

研 究 報 告

執行機構：行政院衛生署疾病管制局血清疫苗研製中心

計畫主持人：江正榮

研究人員：陳奕安、張靜如、莊傑閔、鍾瑋

執行期間：102 年 1 月 1 日至 102 年 12 月 31 日

# 目錄

目錄 …… ……2

中文摘要 .....3

英文摘要 .....5

前言 ……7

材料與方法 .....12

一、 細胞和病毒的培養 .....12

二、 病毒之過濾與濃縮 .....13

三、 病毒之純化 .....13

四、 純化後病毒之檢驗 .....14

五、 病毒的不活化 .....15

六、 疫苗效價的測定 .....15

結果 ……..17

一、 利用 50L Tidecell 010 潮汐式生物反應器培養 EV71 C4 病毒過程中，各個產程參數最適化之探討： .....17

二、 六批 50L TideCell010 產程之過濾、濃縮及純化之分析比較 .....21

三、 小鼠及兔子動物試驗與血清中和抗體效價分析 .....24

討論 ……..26

圖表 … ……..30

參考文獻 .....48

期末報告審查意見回覆……..52

# 中文摘要

本計畫為建立易於線性放大之疫苗生產平台，以及去除產品中外源性蛋白可能產生之風險，將傳統滾動培養瓶搭配胎牛血清之細胞病毒生產方式，推進到使用 TideCell 生物反應器搭配 BioNOC II 微載體生產平台，以無外源蛋白(血清及胰蛋白酶)系統產製腸病毒 71 型 C4 genogroup 之原型疫苗。另為評估 TideCell 生物反應器搭配無血清產製原型疫苗之可行性，進一步探討因生物反應器、濃縮、純化以及檢驗平台的不同，造成對原型疫苗產製效率的影響，以求達到最適化條件。

延續去年初步建立 50L TideCell010 病毒試量產平台及純化經驗，今年進一步測試攻毒換液、潮汐速率、潮汐滯留時間、延長管柱層析體積、超高速離心純化、更新 ELISA 多株抗體等條件，完成六批 50 L TideCell010 生物反應器原型疫苗試製，50 L 生物反應器產製之病毒抗原量最高為 ELISA 22.59 OD/ml、$TCID_{50}$ 6.6 log；管柱層析純化與超高速離心純化回收率達 25%、93%；原型疫苗經過福馬林不活化後接種小鼠，血清抗體中和效價最高可達到 1:79。

今年度 50 L TideCell010 共 6 次疫苗試製產程中，單位體積 ELISA OD 值及 $TCID_{50}$ 值均穩定；管柱層析純化方面能有效分離 EV71 及移除宿主蛋白，並於線性放大後改善回收區間過窄之問題；超高速離心可分離出兩種 EV71 病毒顆粒，經由西方墨點法確認病毒顆粒組成不同，分別進行免疫小鼠實驗，結果顯示兩者抗原性相當。儘管 50L TideCell010 產程順利擴增並維持穩定，但嘗試諸多調整卻仍未掌握提升 50L TideCell010 產程效果之關鍵，未來將朝向篩選多

種 EV71 疫苗株，與開發具有分辨抗原免疫性之能力的檢驗平台目標前進。

關鍵字：腸病毒 71 型原型疫苗、C4 genogroup、TideCell 生物反應器、BioNOC II 微載體。

# 英文摘要

In order to establish a linear scale-up model for EV71 vaccine production and eliminate potential risks involved in the inclusion of animal-derived products, we have advanced our virus production platform from traditional roller bottles and medium that contains fetal bovine serum (FBS), to a bioreactor-based, animal component free method of Ev71 C4 genogroup prototype vaccine production. Furthermore, to assess the feasibility of prototype vaccine production using the TideCell bioreactor and serum-free medium, we explored the effects of differences in temperature, bioreactor, tangential flow ultrafiltration, purification, and diagnostic platform on the efficacy of our vaccine production model.

First, the growth of vero cells and E36 virus yield were tested under serum free medium and varying inoculation and cultivation temperatures, using the same roller bottle virus production and purification platform as last year. Results comparable to last year were achieved under 37℃. After testing the viability of vero cell growth on BioNOCII fiber, six batches of 50L TideCell prototype vaccine with the best ELISA value of 22.59 OD/ml and $TCID_{50}$ 6.6 log were completed. These results were comparable to those achieved with an roller bottle production platform, though still lower than our serum-containing results from last year. Using a linear scale-up model of last year's processes for downstream

purification of gel filtration and sucrose density gradient centrifugation, the equivalent recovery rate of 25% and 93% was reached. In animal studies, our formaldehyde-inactivated prototype vaccine was able to achieve a neutralization titer of 1:79. These results suggest that we achieved linear scale-up on our 50L bioreactor-based prototype vaccine production method.

In six batches of 50L prototype vaccine production conducted this year shows that consistent and acceptable levels of ELISA OD and $TCID_{50}$ were achieved; and the gel filtration can separate EV71 from host proteins effectively. We also improve the problem that is the recovery range is too narrow by linear magnification; two types of EV71 virus particles are separated by Ultracentrifugation, confirm the composed of virus particles by Western Blot, and immunized the mice immunological trial respectively. The result shows both particles have similar antigencity. Despite the production process of 50L prototype vaccine is amplified successfully and maintained stably; hoever we can’t get the key point to upgrade the production process through adjust many times. Our goal in the future is to screen varieties of EV71 vaccine strain, and develop a examine platform with the ability to distinguish the antigen’s immunity.

Keywords: EV71 prototype vaccine, C4 genogroup, TideCell bioreactor, BioNOCII fiber.

# 前言

腸病毒為亞太地區新生兒及幼兒之重要疾病。台灣自民國八十七年爆發至今，國內每年腸病毒病例一直居高不下，去年（民國 101 年）一月至十一月已累計 152 例腸病毒感染併發重症確定病例，相較前年 51 例確診病例增加 3 倍。而在腸病毒中，除了小兒麻痺病毒之外，以腸病毒 71 型（enterovirus type 71）最容易引起神經系統的併發症。腸病毒在台灣自民國八十七年爆發至九十九年底為止，在 1989 確定病例中，腸病毒 71 型佔了 1013 例(50.9%)；而在 263 個腸病毒死亡病例中，腸病毒 71 型佔了 129 例(49%) 【1、2】。以亞太地區整體而言，今年亦頻頻爆發重大疫情。世界衛生組織證實今年四月至七月柬埔寨造成 52 人死亡之神秘疾病為腸病毒 71 型【3】，越南在年初也發生造成 34 人死亡之腸病毒感染【4】。新加坡 101 年一至八月已累計 29,383 手足口病例較去年增加 2.8 倍，中國大陸所發生的 1,520,274 手足口病例也較去年增加 1.6 倍。而政府自民國九十五年六月起公告新藥政策計畫，為強化台灣防疫系統已明定疫苗為國防工業之一環。因此，為能有效控制疫情的發生，為了保障國人健康，開發質、價、量皆宜之不活化細胞培養腸病毒 71 型疫苗作為預防接種防疫之用，是為目前當務之急。

目前全球尚未有正式通過臨床試驗、取得藥證許可的腸病毒 71 型疫苗。在疫苗開發上，台灣與中國大陸暫居領先的地位。國家衛生研究院技轉本局之 B4 genotype 腸病毒 71 疫苗，以傳統滾筒式培養瓶搭配無血清培養基產製之 B4 死毒疫苗，目前已完成第一期臨床試驗，預計於明年（103 年）底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 不活化疫苗後其保護效力可達 90%，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】。其他研發團隊如新加坡之 Inviragen 產製 B2 genotype 之死毒疫苗，去年**(101 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，預期今年展開臨床試驗【25】。雖然目前有其他國內外研發團隊發展出 VLP 疫苗【5】、胜肽疫苗【6】、DNA 疫苗【7】、減毒疫苗【8】等多種抗原表現策略，然而有多項報告指出死毒疫苗所激發之免疫抗體反應高過 DNA、減毒疫苗或 VLP 疫苗【9、10、11、12】，而小兒麻痺死毒疫苗多年來之成功施打經驗也證實死毒疫苗對於腸病毒屬具有極佳的效果。目前各國腸病毒 71 型疫苗發展方針仍以死毒疫苗為主【13、25】。

傳統滾動瓶對於貼附型細胞之小量培養具有簡單、廉價及架設方便等優點。然而，其人力密集(labor intensive)、無法線上(on-line)監控、各別換液及採收困難等特性會成為製程放大時的瓶頸。以腸病毒 71 型之流行病學而言，滾動瓶培養恐無法應付疫情爆發時需求量突增等突發狀況，目前中國方面產程已趨向改為細胞工廠的形式取代滾動瓶培養，也是為了改善滾動培養瓶之缺點。生物反應器應用於疫苗製程【15】、重組蛋白【14】及單株抗體【16】已成為時勢所趨。從傳統的攪拌式 (stirred tank)、氣泡塔式 (bubble column)及及氣舉式 (air lifter)發酵槽到現今推出之振盪式可拋棄式生物反應器 (disposable bioreactor)，搭配適當的微載體 (microcarrier)系統，均能夠提供較滾動瓶優越的體積傳質係數【17】。在腸病毒 71 型疫苗研發方面，國家

衛生研究院技轉本局新開發之 B4 genotype 腸病毒 71 疫苗也是以 BIOFLO 310 生物反應器應搭配 Cytodex 1 微載體進行量產【18、19】。

與國光生技合作案所使用的生物反應器為賽宇細胞科技(Cesco Bioengineering)所發展之 TideCell 振盪式生物反應器(oscillating bioreactor)，搭配 BioNOC II PET 纖維載體。其作用原理是將貼附型細胞附著於含 BioNOC II 的填充床式(packed bed)載體瓶中，再利用潮汐動作(tide motion)使培養基液面在載體瓶中設定時間升降，依序在液位低於載體時細胞進行氣體交換、液位蓋過載體時進行養份補充。此系統在過去被運用於生產日本腦炎病毒【20】、桿狀病毒(baculovirus)及腺相關病毒(adeno-associated virus, AAV)重組蛋白【21、22】、IgG 融合蛋白【23】、及藥物動力學【24】等多項用途。其中日本腦炎病毒之生產使用 Vero 細胞，與本單位腸病毒 71 型技術平台相同，並相較於同體積之攪拌式培養瓶(spinner flask)搭配 Cytodex 1 微載體系統能夠達到三倍以上之細胞數量，而以 semi-batch 方式生產日本腦炎病毒時，PFU 更可達到 Cytodex 1 微載體之五倍之多。在其他研究報告中亦指出，BioNOC II 單位體積所能達到的細胞密度(cell density)，均較傳統微載體高。此外，TideCell 振盪式生物反應器為臺灣自行研發之傑出產品，利用此系統生產 EV71 疫苗有助於促進本國生技產業之永續發展。

本中心於民國 100 年度完成 C4 genotype 疫苗候選株滾動瓶培養之試量產作業，結果顯示 C4 genotype 不但能夠在老鼠與兔子試驗引發較高之抗體力價，並且有與 B4 相當之產率及交叉中和能力，而近年來中國和越南之腸病毒重症是由 C4 genotype 所引起【25】，因此 C4 genotype 為一個值得繼續開發之疫苗候選株。另有鑑於近年來生

物反應器及無血清培養基為疫苗研發之重點【14】，本中心於 101 與 102 年度與國光生物科技股份有限公司(Adimmune Corporation)合作開發 TideCell 振盪式生物反應器和無血清製程之量產技術平台，本計畫主要目的是以滾動培養瓶無血清培養之 EV71 C4 原型疫苗量產平台為基礎，進一步發展 TideCell 振盪式生物反應器，建立以 C4 genogroup 為原型疫苗的無血清量產技術平台，並將其生物反應器細胞培養、濃縮及純化等條件最適化，尋求並開發效率更高，量產放大更簡便之產製平台。

本中心 101 年先以相同平台測試 vero 細胞株及 EV71 C4 病毒株在無血清系統下的穩定性及最適溫度等條件，確定病毒於 37℃培養，成效與以往有滾動培養平有血清產程相當。接著將 vero 細胞培養於 BioNOC II 微載體，分析測試生長條件後，完成兩批 20 L TideCell 生物反應器原型疫苗試製，20 L 生物反應器產製之病毒抗原量與 8L 無血清滾動培養瓶相當，為 ELISA 82.67 OD/ml，但仍低於以往有血清產程；濃縮與管柱層析純化部份經由線性放大回收率達 28.04%與 100 年有血清產程相當；原型疫苗經過福馬林不活化後 4 倍稀釋接種小鼠，產生之血清抗體中和效價可達 1:100，無血清產程以 20 L TideCell002 生物反應器產製原型疫苗效率達到線性放大之目標。批次量產由 20 L TideCell002 進入 50 L TideCell010，在 101 年度 6 次疫苗試製過程中，單位體積 ELISA OD 值及 $TCID_{50}$ 值穩定，然而仍未達到 20L 生物反應器及滾筒培養瓶的高點。純化方面已能有效純化分離病毒，但仍有進步空間。

今年度目標為繼承 101 年度 50 L TideCell010 經驗，於 6 批疫苗試製中更進一步調整並測試各項參數，如 TideCell010 部分的攻毒換

液、潮汐速率與潮汐滯留時間，純化部分的延長管柱層析體積與增加超高速離心，以及檢驗部分的測試不同 ELISA 抗體等條件，以期增加 50 L TideCell010 抗原產量、抗原回收率與血清中和效價。另並可同時培訓本署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，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、 細胞和病毒的培養

1. 病毒庫：所有腸病毒 71 型病毒分離株皆經過 vero 細胞 4-6 次繼代後，檢測病毒 $TCID_{50}$ 並建立種庫。
2. 細胞株的培養：以 VP-SFM (Invitrogen)無血清培養基進行 Vero 細胞之培養及擴大。擴大方式先由 150T flask 培養，再以 850 cm2 roller bottle 擴增，,接著將細胞移至 BelloCell 500A 生物反應器(Cesco)培養，最後再移至 TideCell 010 生物反應器(Cesco)(圖一)。以 glucose uptake rate (GUR)及 crystal violet blue (CVD)染劑確認細胞在 BioNOC II 纖維上之生長狀況。
3. 病毒的培養：以 TideCell010 五十公升潮汐式生物反應器搭配 BioNOC II 纖維載體以 MOI: 10-4 進行病毒培養(圖一)，葡萄醣濃度維持在 2g/L 以上，pH 值維持在 6.9~7.2 之間，以溶氧量回升及麩醯胺酸(glutamine)反彈判定收槽時間培養天數，通常培養時間為 7 天。 用 ELISA OD450 及 TCID50 評估 Vero 細胞及腸病毒在各系統中之生長狀況。
4. 病毒的收取:將含病毒之 50 公升培養基混合袋在生物安全櫃下直接連接管路，以蠕動幫浦過 1μm/0.45μm 過濾球去除細胞碎屑，並將過濾病毒液收集於密閉收集筒內。
5. 病毒的定量－TCID50：將病毒以系列稀釋的方法，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 TCID50 的效價。

## 二、 病毒之過濾與濃縮

1. 微過濾法（Microfiltration; MF）

   利用孔徑分別為 1.0/0.5 μm 或 0.65/0.45 μm 以及 0.22 μm 之拋棄式過濾膜，蠕動幫浦（Millipore）搭配矽膠管路(Masterflex)，以每分鐘 0.9 公升之流速，初步分離細胞碎片及病毒顆粒。

2. 限外超過濾純化法（ultrafiltration）

   利用切向流過濾系統，採用反覆循環過濾方式（recirculation filtration)，配合分子量 30 萬（MW cutoff 300,000 regenerated cellulose）或 100 萬之過濾卡匣（cassette)，以每分鐘 0.45 公升之流速，濃縮病毒及減少小分子蛋白。

3. 經過濃縮之病毒液一面搖動一面加入 Benzonase 與 MgCl2，靜置於 4℃作用約 18 小時，然後進行下列純化步驟。

## 三、 病毒之純化【17、18、19】

1. 液相層析法

   以 pharmacia AKTA　Explorer 或 Pilot 之 FPLC 系統：

   配合 Sepharose Fast Flow 之 BPG200 管柱(80 cm/25 L or 90 cm/30 L)，流速使液面每分鐘下降 0.5 cm，於 0.1 M 磷酸緩衝液（pH 7.4）中進行病毒之純化，於波長 280nm 下收集分離產物。

2. 蔗糖梯度超高速離心法

   離心陀預冷後安裝於超高速離心機上，當 10~50%蔗糖梯度注入完成後，將濃縮病毒液依 10 c.c./min 流速注入超高速離心轉子中，設定溫度為 4˚C、轉速 30,000 轉、離心時間 7 hr 進行超高速離心。離心後，收集含有病毒的蔗糖溶液，並分別測其糖

度及抗原含量（ELISA OD450）。取抗原含量高的分畫管(fraction)，以 PBS 緩衝液稀釋後進行連續透析濃縮總體積之四倍，最後的透析液即為最終純化產品。

四、 純化後病毒之檢驗

1. 蛋白質濃度之測定：取樣品及 bovine serum albumin 之標準液 50 μm，置入 96 孔微量盤中，加入 Bradford reagent 150 μm，震盪 30 秒，於波長 595 nm 測定其吸光值。
2. 蛋白質電泳：純化之樣品以 12％的 SDS-PAGE(NuPAGE Bis-Tris Gel, Invitrogen)，在電壓 120 伏特之下做電泳分離 150 分鐘，之後以銀染色(SilverQuest Silver Staining Kit, Invitrogen)方式分析蛋白質電泳的情況。
3. 西方墨點法：純化之樣品經過蛋白質電泳後，利用 Semi－phor 半乾式轉漬槽，將蛋白質樣品由膠體轉移至硝酸纖維膜上，加入 5％ bovine serum albumin (BSA)溶液於纖維膜上，震盪 60 分鐘後以 0.1％Tween-20/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 4℃冰箱中作用 18 小時，以 0.1％Tween-20/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℃保溫箱中作用 1 小時，以 0.1％Tween-20/PBS 清洗三次來清除未結合之抗體。將 10mL 4CN (4-chloro-1-napthol) 呈色劑置於纖維膜上，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。
4. ELISA 檢測－酵素連結免疫反應法：黏附小鼠腸病毒 71 型病毒抗體於 96 孔微量滴定盤上，使用 ELISA 清洗儀，清除未黏附之抗體，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℃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℃保溫箱中作用 30 分鐘。清洗後，在每孔中加入 100ml OPD (0－phenylenediamine dihydrochloride)酵素受質體放置於室溫暗處，呈色反應 30 分鐘，以 ELISA 吸光儀（Molecular Device , Emax）讀取波長 450nm 及 650nm 吸收值。

## 五、 病毒的不活化

福馬林溶液以 1：4000 的比例加入純化之病毒液中，反應條件於 37℃培養箱反應 3 天，即可完全使病毒去活化。反應期間，定期取樣檢測 50% Tissue Culture Infection Dose ($TCID_{50}$)觀察病毒力價的變化，確保無病毒無存活為止。

## 六、 疫苗效價的測定

**1.** 動物免疫之操作

以 4 倍序列稀釋腸病毒原液，分別有原液、4 倍兩種濃度，再加入鋁鹽佐劑終濃度為 0.3mg/ml 混合，於 4℃冰箱以震盪器震盪，進行佐劑吸附。動物免疫試驗取 12-14 克的 ICR 小鼠（公母各 5 隻/籠）分為一組，共有三組（含有對照組），免疫以腹腔免疫 0.5c.c 之病毒液，免疫時程分為以第一週及第三週，進行二次免疫，第四週以小鼠心臟採血，採集血清，後血清於離心機，離心（3000 rpm，30 分鐘），於 56℃水浴槽進行去補體，反應 30 分鐘。後將血清分裝置於-20℃中保存。取 1.6-1.8 公斤的兔子，在第一週先以耳動脈採血 5ml，在抽過後各在第一、三、五和九週以肌肉注射原型疫苗及經稀釋 4 倍之疫苗(每隻各 2ml)共 4 次免疫，而在第一、三、五、七和九週進行採血，每次採血後將採到的血離心取上清液，於 56℃水浴槽進行去補體，反

應 30 分鐘。後將血清分裝置於-20℃中保存。

**2.** 病毒抗體中和試驗

測試的血清檢體系列稀釋，並與 100 個 $TCID_{50}$ 的病毒混合，接種於 96 well 細胞培養盤中的 vero 細胞，經由 6 天的培養，觀察細胞之 cytopathic effect (CPE)現象。

# 結果

## 一、 利用 50L Tidecell 010 潮汐式生物反應器培養 EV71 C4 病毒過程中，各個產程參數最適化之探討：

### 1. 以 BelloCell 平台，尋找病毒培養換液最適化方式：

經過 101 年 TideCell 的經驗，已經確立潮汐式生物反應器細胞培養條件與參數，今年主要針對病毒培養之條件最適化；基於線性放大的理念，經由小量發酵確立病毒培養各項參數後，再進行大量生產之製程，是為較便宜且快速的方式，故使用 BelloCell 平台建立小量發酵系統用以最適化各項發酵參數；BelloCell-500A 及 BelloCell500-AP 為 500ml 之微型潮汐式生物反應器，內含 BioNOCII 微載體與 TideCell002(20L)、TideCell010(50L)潮汐式生物反應器相同，BelloCell 培養基交換策略為物理性推擠，類似於 TideCell 的氣體幫浦以壓力方式控制培養基流動，BelloCell500-AP 則額外設計交換管用以交換額外的培養基，模擬 perfusion 換液模式。

EV71 病毒培養換液最適化，我們嘗試並比較四種病毒培養的換液方式，分別為：batch、fed batch、semi-batch 和 perfusion，batch 組進行 EV71 攻毒並培養於 500ml 培養基中，直到收穫前均不更換培養基，細胞/培養基之比例模擬 TideCell010 之 batch 產程；fed-batch 組以 batch 組相同的參數攻毒 EV71，另每日補充 glucose/glutamine 溶液至葡萄糖濃度維持於 3.5 g/L 以上，與調整酸鹼值於正常範圍(6.9~7.1) ；semi-batch 組攻毒後每日更

換 500ml 培養基並留存，此外增加一組減半攻毒細胞數之 semi-batch 少細胞組(Semi-batch reduced)，用於模擬去年 12EV08~12EV10 產程之細胞密度；perfusion 組使用 BelloCell500-AP 培養細胞，並於攻毒後連接至一瓶 2.2L 新鮮的 VP-SFM 培養基，並每日交換 500ml (圖二 A)。

Batch 組之葡萄糖消耗速率(glucose uptake rate; GUR)在攻毒後 48 小時內下降 15 mg/hr 直到葡萄糖含量低於 1 g/L，fed-batch 組也在攻毒後 24 小時內穩定的下降，但下降幅度少於 batch 組，兩種 semi-batch 組不管細胞數多寡均在攻毒後 96 小時內維持很高的葡萄糖消耗率，而 CPE 現象及 ELISA OD 值均在這段期間開始增加，另外 perfusion 組因持續交換培養基無法以此方式測得正確的糖度數據。

由於不同組別間培養基總量不相同，$TCID_{50}$ 及 ELISA 的單位則換算為整體做為表示而非每毫升，儘管在 BelloCell 五個測試組別中病毒力價 $TCID_{50}$ 均達到 9.58 log(由 7 log $TCID_{50}$0/ml 換算回 500ml 數值)，兩組 semi-batch 組的 $TCID_{50}$ 值達為五組中最高，分別為 10.39 和 10.05 log (圖二 B)，在 ELISA OD 數據上呈現更顯著的差異，perfusion 組之總 ELISA OD 值是五組最高為 139700，比 batch 組(6425) 及 fed-batch (13635)高出了 10 倍以上，Semi-batch 組及 Semi-batch 少細胞組(Semi-batch reduced)也有較佳之總 ELISA OD 值為 80865 及 86675(圖二 C)。

**2. TideCell010 以半換液(semi-batch)方式對病毒產量的影響：**

經過不同種病毒培養條件測試，嘗試以半換液(semi-batch)進

行 TideCell010 50L 病毒培養(圖三)，13EV01 於細胞停止消耗氧氣時進行 EV71 攻毒(MOI: 10-4)，攻毒後 24 小時將一半培養基 25L 移出系統並灌入相同體積之新鮮 VP-SFM 培養基，並在攻毒後 48 小時重複此一動作，總共更換 50L 新鮮 VP-SFM 培養基，之後以 glucose/glutamine 溶液及 NaOH 維持糖濃度與酸鹼值平衡；移出系統之培養基由於攻毒後 48 小時內產出之病毒量極少，故捨去只收穫最後的 50L 病毒培養液。

病毒增殖階段後(攻毒後 72~96 小時)停止消耗碳源，培養基內葡萄糖濃度維持在 2 g/L (圖四 A)，並且單位細胞葡萄糖消耗量也高於去年 fed-batch 產程，13EV01 病毒力價於收穫時達到 6 log TCID50/ml，ELISA OD 值達到 7.92(圖四 B)，比起去年 fed-batch 產程 12EV10 不額外外加葡萄糖之結果(8.49 ELISA OD)較差，此現象指出 glucose 與 glutamine 可能不是 EV71 產量好壞的限制因素，所以綜合去年經驗，於 TideCell010 嘗試 batch、fed-batch 及 semi-batch 產程均無法顯著提高病毒生產量，顯示養分的攝取對於 EV71 的生長可能不是扮演最關鍵的角色。

**3. 以 BelloCell 平台，提升培養基潮汐速度與停滯時間對病毒培養之影響：**

目前可知 TideCell010 與 BelloCell 最主要的差異在於培養基潮汐速率的不同，原廠建議 BelloCell 以 1 mm/sec 作為潮汐速率，經換算得約一個潮汐週期為 130 秒、潮汐頻率為每小時交換 27.7 次，對比 TideCell010 建議速率為 2500 ml/min，經換算得約一個潮汐週期為 317 秒、潮汐頻率為每小時交換 11.3 次，

儘管此數據可能會因細胞微載體堆疊密實與否與潮汐高低點的不同而產生些微變化，但大致上不會產生太大偏差，由此可知原廠建議 TideCell010 潮汐周期和頻率遠低於 BelloCell。

只有在培養基淹沒 BioNOCII 微載體的情況下，培養基中的營養物質才能與細胞交換，我們懷疑 TideCell010 因潮汐周期和頻率降低的關係，導致微載體接觸培養基的時間及次數下降，使養分交換的機會變低而導致細胞微環境不佳，宿主細胞代謝功能受阻進而影響病毒產率，ELISA 及 $TCID_{50}$ 檢驗數據的落差解釋了儘管在類似的培養環境下，TideCell010 及 BelloCell 因不同潮汐條件而造成不同的結果，故我們增加 TideCell010 培養基淹沒微載體的停留時間以及潮汐速率，以增加細胞微環境營養交換的機會。

我們使用 BelloCell 平台不換液體(batch)的方式，以相同細胞數攻毒(MOI:$10^{-4}$)，為了模擬 TideCell010 潮汐條件，將潮汐速率自 1 mm/sec 調降至 0.5 mm/sec，周期約為 16.4 cycles/hr 接近 TideCell010 建議潮汐條件，另外兩組採用 1 mm/sec 速率及兩種滿/低潮的停滯時間，分別為滿潮停滯時間 30 秒/低潮停滯時間 10 秒(30s/10s)，以及原廠建議之滿潮停滯時間 10 秒/低潮停滯時間 30 秒，(10s/30s)用以了解何者潮汐條件對病毒生長較佳。

實驗結果顯示 0.5 mm/s 的葡萄糖消耗速率 GUR 稍高於其他兩組 (圖五 A)，BelloCell 潮汐速率為 1.0 mm/sec、停滯時間為 30s/10s 的組別在 TCID50 為三組最高 7.4 log，而模擬 TideCell010 的組別潮汐速率為 0.5 mm/sec、停滯時間為 10s/30s 的組別則位居末座 6.5 log (圖五 B)，這也類似於先前在

TideCell010 產程上得到之 $TCID_{50}$ 數值，經小量實驗顯示增加潮汐速率與停滯時間，似乎可以為 TideCell010 產程帶來助益。

**4. TideCell010 加快潮汐速度對病毒產量的影響：**

經由 BelloCell 的潮汐速率測試，13EV02~13EV06 改良為加快潮汐速度的五批 fed-batch 產程：13EV02 及 13EV03 潮汐速率調整為 3200 ml/min 約為 13.3 cycles/hour；13EV04 潮汐速率調整為 5000 ml/min 約為 22.5 cycles/hour；13EV05 及 13EV06 潮汐速率調整為 4000 ml/min 並降低培養基交換的體積，約為 22 cycles/hour。

綜合五批次結果，13EV02 及 13EV03 (3200 ml/min, 13.3 cycles/hour)比未調整潮汐速率之 13EV01 產程稍微好，TCID50 達到 6.6 和 6.5 log，ELISA 值為 20.81 和 19.17 (圖六)，但並無太大改善，故進一步增加潮汐速率及週期至 4000 ml/min 和 22 cycle/hour (13EV05 及 13EV06)，其 TCID50 最高點和 ELISA OD 值皆與 3200 ml/min 組別差不多，但若將潮汐速率增加至 5000 ml/min (13EV04)則會造成反效果，TCID50 與 ELISA 值下降至 5.6 log 與 17.80(表一)，除此之外增加潮汐速率也會稍微降低葡萄糖消耗速率與增加 CPE 現象。

**二、 六批 50L TideCell010 產程之過濾、濃縮及純化之分析比較：**

**1. EV71 病毒液過濾與濃縮**

由表二知經超過濾(ultrafiltation)濃縮後回收率約在 60 %左右，除 13EV01 和 13EV03 因微過濾(microfiltration)後總 OD 值

較低，導致 UF 回收率超過 100%，其餘顯示此濃縮方式應無太大問題。將各純化階段樣品以 SDS-PAGE 檢視其背景值 (圖七)，經蔗糖梯度超高速離心或膠體過濾純化後，背景值與宿主細胞雜蛋白可有效去除，能在膠片上明顯分辨出 EV71 外殼蛋白，VP0 (38 KDa)、 VP1 (34 KDa)和 VP 3 (25 KDa)。

**2. EV71 病毒液膠體層析純化**

為了能將抗原波峰(Elisa OD/ml; 紅線)與雜蛋白波峰(OD280; 藍線)分離開(圖八)，增加可回收區間，並減少雜蛋白殘留。將 BPG200 管柱增高到 800 mm，其純化的回收率最低為 6%最高為 17%，而回推總回收率最低為 8%最高可達 25%，可見此純化並不穩定，且回收時仍會收集到一部分雜蛋白波峰，如欲增加收集區間提高回收率則會使雜蛋白增多。有鑑於此，並考量本中心無塵室高度，把 BPG200 管柱增高到 900 mm，13EV04~13EV06 使用此新管柱，由圖八可以看到綠框收集範圍向右移，Elisa 波峰與蛋白質波峰已分離得更開，且再往右增加回收區間雜蛋白仍在相當低的範圍，經 SDS-PAGE 分析 BPG200/ 800 與 BPG200/ 900 的收集管混合液(fraction mix)，顯示在同樣蛋白質濃度的情況下，由 BPG200/ 900 純化出的抗原更為精純，雜蛋白也更少(圖九)，惟回收率仍未達理想，純化的回收率不到 10%，而回推總回收率最高只達 12%。以 SDS-PAGE(圖九-A)及西方墨點法(圖九-B)分析各批次病毒抗原，能明顯分辨出 EV71 外殼蛋白，VP0 (38 KDa)、VP1 (34 KDa)和 VP 3 (25 KDa)。以抗體 MAB979 進行偵測則可看到外殼蛋

白 VP2 (28 KDa)。

### 3. EV71 病毒液蔗糖梯度超高速離心純化

每批次產程皆分出 250 ml 濃縮抗原以超高速離心(Ultracentrifugation; UC)的方式純化做為對照與分析抗原。使用不連續蔗糖密度梯度離心法，每批次純化時皆固定蔗糖濃度、體積與離心時間。其純化的回收率最低為 14%最高為 42%，而回推總回收率皆超過 50% (13EV01 因未收集完抗原導致回收率偏低，不列入討論) 回收率高於膠體層析 (表二)。依據每批次的各收集管所繪製出之抗原波峰(ELISA OD/ml; 紫線)與蛋白波峰(OD280; 綠線)純化圖譜間差異性極大；其中抗原波峰有 2 個，位於圖譜左側之較低糖梯度收集管的抗原波峰為不完整病毒顆粒(peak 1)，位於圖譜右側之較高糖梯度收集管的抗原波峰為完整病毒顆粒(peak 2) (圖十)，可以在西方墨點法的結果上看到完整病毒顆粒具有外殼蛋白 VP2，而不完整病毒顆粒則無 VP2(圖十一-C、D)。進一步比較可發現各批次產程不完整病毒顆粒之沉降係數較不一致，且各批次的兩個波峰抗原量比例也不盡相同 (不完整病毒顆粒 peak 1：完整病毒顆粒 peak 2)，在 13EV02 為 2：8、13EV04 為 2：8、13EV05 為 4：6 (圖十二)。由此顯示產程仍不穩定。

### 4. DNA 殘留量測定

病毒液收穫後經過濾濃縮步驟，於純化前加入 Benzonase 核酸分解酵素以除去宿主細胞 DNA(Vero)，待作用完畢後

Benzonase 與 DNA 片段經由純化步驟分離並移除，為檢測純化後產程是否有殘留 DNA，以 DNA 微量分析儀檢測產程各批次 MF、UF、UF+B、UC-P1、UC-P2 及 GF 的 DNA 殘留量 (表三)。結果顯示加入核酸分解酵素(Benzonase)後，DNA 殘留量皆降於 0.03 ng/ml 以下，最終去活化樣品所殘留之宿主 DNA 也低於可偵測範圍(0.4 pg/ml)。

## 三、 小鼠及兔子動物試驗與血清中和抗體效價分析：

TideCell010 五十公升腸病毒試量產，經由濃縮、純化、去活化處理後之原型疫苗，因純化方式分為膠體層析(Gel filtration; GF)與超高速離心(ultracentrifugation; UC)，故分為兩組原型疫苗進行動物免疫實驗，而 UC 部分分離出兩種病毒顆粒(peak 1 and peak 2; p1 and 2)，於 13EV02~03 分開進行免疫， 13EV04~05 採兩種病毒顆粒混和濃縮後進行免疫。原型疫苗病毒活性(表四 B)不活化程度以 $TCID_{50}$ 測定，當 $TCID_{50}$ 為 2.5 代表不活化步驟已去除病毒致病機能，是為不活化疫苗，可進行後續動物實驗。另使用 ELISA 方式檢測抗原含量 (表四 A)是否被破壞，結果顯示抗原含量仍保留。

去活化之原型疫苗分別以原液、4 倍稀釋濃度，經腹腔注射方式免疫小鼠，經兩次免疫最終以心臟採血分離血清進行中和試驗，數據顯示 13EV03 批次原型疫苗中和效價較佳，13EV03-GF 達到 79.43 中和效價，較 13EV03-UC-P1 和 13EV03-UC-P2 中和效價 25.11 和 39.81 為高(表五)，儘管 GF 原型疫苗抗原含量稍低於 UC 原型疫苗(表四)，但中和效果普遍

優於 UC。綜上，整體來說中和效價並未達到以往本中心所設定的疫苗生產標準 100 以上。另為了預估原型疫苗之最佳劑量，101 年度血清產製之原型疫苗施打 ELISA OD 值為 10.498 即可達到 40 以上之中和效價，但今年度卻無法建立 ELISA OD 與中和效價之正相關性(圖十三)。

今年年初首先利用兔子檢測測定去年(101 年)利用生物反應器 TideCell002 產製之 12EV02 及 12EV03 兩批原型疫苗的中和抗體效價，13EV02 以原倍而 13EV03 以稀釋 8 倍濃度分別用肌肉注射方式施打兔子，施打劑量每隻為 1ml，共四次免疫並以耳動脈採血取得血清進行中和試驗。結果(表六)顯示 12EV02 原液及 12EV03 稀釋 8 倍濃度兩批原型疫苗中和效價分為 43.58 及 39.36，比預期結果差且和 101 年中和效價可達 100-200(老鼠)有很大差別。今年度為確認生物反應器所產製之原型疫苗在兔子所產生之中和抗體效價，目前檢測 13EV02 UC P1、13EV03 GF 及 13EV03 UC P2 等三批原型疫苗，皆以原倍進行肌肉注射，施打劑量每隻為 1ml，共四次免疫並以耳動脈採血取得血清進行中和試驗。初步結果在第一劑免疫後中和效價分別為 12.58、10.4 及 11.28。

# 討論

本計畫延續 101 年度 TideCell010 潮汐式生物反應器原型疫苗適量產，完成六批腸病毒 71 型 C4 genotype strain E36，無血清培養 50 公升之細胞及病毒擴增、過濾及純化(13EV01~13EV06)，以及五批動物試驗血清中和效價測試(13EV01~13EV05)。

於潮汐式生物反應器開發 EV71 C4 疫苗株試量產製程，在歷經溫度、細胞數、MOI、氧氣、葡萄糖、乳酸滲透壓、攻毒換液、潮汐速率、滿低潮停滯時間等種種參數琢磨與修正下，均無法維持產程線性放大的目標；雖然在 101 年度 20L TideCell002 產程平均每單位體積 $TCID_{50}$ 7.589 log 及 ELISA $OD_{450}$ 值 82.67，與 8L Roller Bottle 產程所獲得的 log $TCID_{50}$ 7.25 及 ELISA $OD_{450}$ 89.99 相當，但免疫小鼠抗血清中和效價約為 8L Roller Bottle 的 40%(685：282)；隨著產程放大至 50L TideCell010，病毒回收與中和效價問題並無得到緩解，今年 50L TideCell010 六批次 $TICD_{50}$ 與 ELISA 值穩定，平均為 6.26 log 與 17.62 OD/ml(表一)，與 101 年 50L TideCell010 產程相當，儘管嘗試調整更多參數也無法產生顯著的進步，相反的是 TideCell 產程中，細胞增殖線性放大幾乎無阻礙，顯示 TideCell 系統於細胞線性放大具有優勢，唯獨病毒攻毒後不同培養條件帶來不同的結果，如調整潮汐速度後超高速離心分離圖譜不相等、CPE 時間提早(13EV06)等現象，是否因而影響病毒與中和效價目前尚未明瞭機轉，此外 BelloCell 平台參數也無法完全對應於 TideCell 系統，如 fed-batch/semi-batch 換液方式與不同潮汐速率/停滯時間，於 BelloCell 平台有影響但實踐於 TideCell 系統卻是相同結果，造成 TideCell 疫苗產程陷入瓶頸，未來

將朝向篩選其他 EV71 疫苗候選株嘗試應用於生物反應器產程。

目前使用之Millipore 1.0/0.5 μm膜面積0.49 $m^2$之粗過濾膜足以應對 50 L 之粗病毒液，但仍須視收槽時病毒液之混濁度調整濾膜大小，才能在不阻塞之情況下回收最多的微過濾病毒液，而目前已測試出可等量放大的膜面積，將來製成放大只需增加膜面積及控制流速即可。在切向流濃縮部份，濃縮卡匣為兩片 0.5 $m^2$，並考量回收率將膜孔徑改為 100 k，適用體積為 20~50 L (濃縮時間約 30~150 min)，回收率仍有改善空間，也許是高倍率濃縮時雜蛋白與抗原間非專一性吸附，使得抗原被雜蛋白包裹導致 ELISA 測量時低估了真實的抗原濃度。

在病毒液純化方面，為更進一步加強純化效果與可回收區域在 13EV04~13EV06 三批產程使用 BPG200/900，增加了管柱長度與膠體體積，由純化圖譜(圖八)與 SDS-PAGE(圖九-A)來看純化效果更佳，可回收的區域也增加，但是回收率卻由 17%降為 8%，回推總回收也從 25%降到 12%。探究其中緣由可能是純化路徑的加長，使管柱中膠體與抗原間的非專一性吸附增加；也可能是抗原被雜蛋白包裹聚合，而落於純化圖譜的雜蛋白區間，造成流失。因此如何改善高倍率濃縮時抗原聚集的問題及減少非專一性吸附，仍是當前課題。未來可朝流速，更換管柱膠體種類調整。

每批蔗糖梯度超高速離心由於條件皆相同，因此實驗變因較膠體層析小，因此純化圖譜的差異可以說是反映樣品的變異(圖十)，也顯示製程的不穩定影響病毒生成量。由於完整病毒顆粒較不完整的病毒顆粒有更高的免疫原性 (immunogenicity)，因此藉由超高速離心分析抗原製程中完整病毒顆粒的比例有助於優化製程，以今年度製程來說

13EV02~13EV04 為 2：8 (不完整病毒顆粒：完整病毒顆粒)、13EV05~13EV06 為 4:6，顯然以 13EV02~13EV04 製程條件較佳 (圖十二)。在兩個抗原波峰間仍有部分抗原，未來可進一步分析後回收增加抗原量與超高速離心回收率。

本中心利用動物實驗之施打劑量 ELSIA OD 值與所產生之中和抗體效價來推估未來人體接種最適劑量。101 年度血清產製之原型疫苗施打 EV71 ELISA OD 值為 10.498 OD 即可達到 40 以上之中和效價，惟今年施打較高劑量之 ELISA OD 值仍產生非常低之中和效價，無法呈現出正相關性。由於今年產程單位體積 ELISA OD 值及 $TCID_{50}$ 值仍非常穩定，故初步認為可能是中和效價檢測方法出問題，為排除人為因素請本署研檢中心腸道實驗室幫忙檢測相同來源血清，結果仍相同。另外觀察不同動物種類(兔子)與所產生之中和抗體效價，發現無血清生物反應器產製之原型疫苗皆無法達到有血清滾動瓶產製之抗體免疫反應。

目前推測無法產生較佳抗原之病毒與前端病毒量產平台具相關性，因為病毒培養關鍵參數改變，經由**超高速離心純化所產生之**兩個波峰抗原量比例也不盡相同。另外在 SDS PAGE 檢測結果之經超高速離心樣品分離出兩波峰(P1、P2)，結果可看到病毒成份比例差異，但在 ELSIA 檢測方法並不能有效分辨有效中和抗體。故整個製程量產可能因病毒培養方式之不同產生病毒成份改變，造成動物實驗之抗原免疫性相對降低。

如前所述，20L TideCell002 產程與 8L Roller Bottle 產程單位抗原量相等，但血清中和效價卻有明顯差距，而今年 50L Tidecell010 產程免疫小鼠 ELISA 劑量不相同卻得出類似結果(圖十三)，故推測以目前

$TCID_{50}$及 ELISA 兩個檢驗平台無法確實分辨抗原免疫效果好壞，動物實驗雖然直接但耗時耗力，完成一批測試須至少 3 周，對於篩選較佳抗原性之 EV71 疫苗稍嫌緩慢，因此本中心為求完備 EV71 抗原檢驗平台，並促進國內生技廠商發展，已針對國內三家廠商所生產之 4 株 EV71 單株抗體、3 株 EV71 多株抗體進行初步篩選，目前發現 1 株多株抗體具有分辨完整病毒與不完整病毒之潛力，未來將持續測試分析，建立具備能有效分辨抗原免疫效果之檢驗平台，協助 EV71 不活化疫苗之上市。

# 圖表

## 表一、103 年 TideCell010 產程總覽

| batch number | method | alterations and events | peak $TCID_{50}$ | peak ELISA |
|---|---|---|---|---|
| **13EV01** | TideCell010 | 50L medium exchange (semi-batch) during infection. | 6 | 7.92 |
| **13EV02** | TideCell010 | Increase bioreactor up/down speed from 2500 ml/min to 3200 ml/min. | 6.6 | 20.81 |
| **13EV03** | TideCell010 | Same conditions as 13EV02. Cells delayed during bellocell expansion | 6.5 | 19.17 |
| **Bellotest-3** | BelloCell-500A BelloCell-500AP | revise up/down holding time to mimic TideCell010 frequency (0.5 mm/sec) | 7.4 | -- |
| **13EV04** | TideCell010 | Changed pump. Increase up/down speed from 3200 ml/min to 5000 ml/min | 5.6 | 17.80 |
| **13EV05** | TideCell010 | Decrease bioreactor up/down speed from 5000 ml/min to 4000 ml/min | 6.5 | 17.44 |
| **13EV06** | TideCell010 | Increase infection cell count to $9x10^{10}$ Decrease infection time from 120 to 96 hrs | 6.36 | 22.59 |

比較 103 年 50L 腸病毒 EV71 型 C 亞型之 TideCell010 原型疫苗適量產程之病毒力價($TCID_{50}$)和抗原定量(ELISA OD)，病毒力價波峰(peak $TCID_{50}$)為產程中產生最高病毒力價的數值，收穫時略低於 peak $TCID_{50}$ 但 ELISA OD 為最高(peak)。Bellotest-3 為 BelloCell 平台小量測試，病毒力價波峰最高為 7.4 log，較 TideCell010 產程高。

**表二、6 批次 C4 腸病毒 71 型疫苗產程純化總表。**

| 13EV-01 | final volume (mL) | elisa OD /ml | protein (ug/ml) | total OD | purification (X) | recovery (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Microfiltration (0.5um+0.2um | 52500 | 8.41 | 43.51 | 441525 | 1 | 100 |
| Ultrafiltration (300k) | 1000 | 451.44 | 817.84 | 451440 | 2.86 | 102 |
| Gel filtration | 200 | 132.79 | 11.72 | 26558 | 58.6 | 6 (8) |
| Ultracentrifugation | 200 | 187.64 | 182.99 | 37528 | 5.31 | 8 (34) |

| 13EV-02 | final volume (mL) | elisa OD/ml | protein (ug/ml) | total OD | purification (X) | recovery (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Microfiltration 0.5um+0.2um | 50000 | 15.66 | 72.03 | 783000 | 1 | 100 |
| Ultrafiltration (300k) | 790 | 642.22 | 852.16 | 507354 | 3.47 | 65 |
| Gel filtration | 200 | 278 | 9.51 | 55600 | 134.46 | 7 (10) |
| Ultracentrifugation | 400 | 881.75 | 115.86 | 352700 | 35.01 | 39 (82) |

| 13EV-03 | final volume (mL) | elisa OD/ml | protein (ug/ml) | total OD | purification (X) | recovery (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Microfiltration 0.5um+0.2um | 50000 | 8.72 | 57.09 | 436000 | 1 | 100 |
| Ultrafiltration (300k) | 790 | 648.13 | 802.32 | 512023 | 5.29 | 117 |
| Gel filtration | 200 | 377.66 | 12.3 | 75532 | 201.02 | 17 (25) |
| Ultracentrifugation | 400 | 457.62 | 115.12 | 183048 | 26.03 | 42 (133) |

| 13EV-04 | final volume (mL) | elisa OD/ml | protein (ug/ml) | total OD | purification (X) | recovery (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Microfiltration 0.5um+0.2um | 50000 | 15.84 | 62.77 | 792000 | 1 | 100 |
| Ultrafiltration (300k) | 750 | 642.35 | 603.97 | 481760 | 4.21 | 61 |
| Gel filtration | 200 | 201.11 | 66.86 | 40222 | 11.92 | 5 (8) |
| Ultracentrifugation | 400 | 493.53 | 60.56 | 197412 | 32.3 | 25 (75) |

| 13EV-05 | final volume (mL) | elisa OD/ml | protein (ug/ml) | total OD | purification (X) | recovery (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Microfiltration 0.5um+0.2um | 50000 | 14.99 | 49.19 | 749333 | 1 | 100 |
| Ultrafiltration (300k) | 800 | 576.31 | 561.38 | 461051 | 3.37 | 61 |
| Gel filtration | 100 | 604.49 | 89.42 | 60449 | 22.19 | 8 (12) |
| Ultracentrifugation | 200 | 1093.61 | 722.94 | 218723 | 4.97 | 29 (93) |

| 13EV-06 | final volume (mL) | elisa OD/ml | protein (ug/ml) | total OD | purification (X) | recovery (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Microfiltration 0.5um+0.2um | 50000 | 16.71 | 53.3 | 835440 | 1 | 100 |
| Ultrafiltration (300k) | 1000 | 468.67 | 549.89 | 468672 | 2.72 | 56 |
| Gel filtration | 50 | 9.39 | 296.12 | 470 | 0.1 | 0.05 (0.06) |
| Ultracentrifugation | 100 | 1201.41 | 916.66 | 120141 | 4.18 | 14 (56) |

**表三、原型疫苗 DNA 殘留量測定**

| DNA residual (ng/ml) | | |
|---|---|---|
| **13EV01** | MF | 0.005 |
| | UF | 0.112 |
| | UF+b | 0.021 |
| | UC | * |
| | GF | 0.0018 |
| **13EV02** | MF | 0.042 |
| | UF | 0.42 |
| | UF+b | 0.013 |
| | UC-P1 | 0.0188 |
| | UC-P2 | 0.017 |
| | GF | * |
| **13EV03** | MF | 0.087 |
| | UF | 0.56 |
| | UF+b | * |
| | UC-P1 | 0.003 |
| | UC-P2 | 0.0036 |
| | GF | * |
| **13EV04** | MF | 0.252 |
| | UF | 0.26 |
| | UF+b | * |
| | UC-P1 | * |
| | UC-P2 | 0.0004 |
| | GF | * |
| **13EV05** | MF | 0.17 |
| | UF | 0.02 |
| | UF+b | * |
| | UC-P1 | 0.0098 |
| | UC-P2 | * |
| | GF | 0.017 |

MF=初過濾病毒液，UF=濃縮病毒液， UF+b=濃縮病毒液添加核酸分解酵素，UC-P1/P2=超高速離心純化原型疫苗， GF=膠體層析純化原型疫苗。*<0.0004 ng/ml

**表四、原型疫苗去活化後之 ELISA 抗原含量與 $TCID_{50}$**

**A**

| Lot No. | ELISA(OD/ml) |
|---|---|
| 13EV01-GF | 9.575 |
| 13EV01-UC | 11.099 |
| 13EV02-GF | 21.538 |
| 13EV02-UC-P1 | 35.584 |
| 13EV02-UC-P2 | 68.424 |
| 13EV03-GF | 40.124 |
| 13EV03-UC-P1 | 70.64 |
| 13EV03-UC-P2 | 126.384 |
| 13EV04-GF | 43.54 |
| 13EV04-UC-P1 | 45.956 |
| 13EV04-UC-P2 | 178.448 |
| 13EV04-UC-MIX | 136.832 |
| 13EV05-GF | 156.512 |
| 13EV05-UC-P1 | 37.812 |
| 13EV05-UC-P2 | 6.585 |
| 13EV05-UC-MIX | 175.856 |

**B**

| Lot No. | | log TCID 50 | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Inactive 0 Day | Inactive 1 Day | Inactive 2 Day | Inactive 3 Day |
| 13EV01 | GF | 7 | 1.75 | 1.6 | 1.6 |
| | UC | 7.25 | 2.5 | 2.25 | 2.25 |
| 13EV02 | GF | 6 | 2.4 | 2.4 | 2.4 |
| | UC P1 | 6.36 | 2.5 | 2.5 | 2.5 |
| | UC P2 | 6.5 | 2.5 | 2.5 | 2.4 |
| 13EV03 | GF | 6.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 |
| | UC P1 | 6.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 |
| | UC P2 | 7.25 | 2.5 | 2.5 | 2.5 |
| 13EV04 | GF | 5.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 |
| | UC P1 | 6.36 | 2.5 | 2.5 | 2.5 |
| | UC P2 | 6.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 |
| 13EV05 | GF | 5.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 |
| | UC P1 | 5.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 |
| | UC P2 | 5.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 |
| | UC Mix | 5.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 |

(A) 原型疫苗去活化後之 ELISA 抗原含量。 (B) 原型疫苗去活化後之 $TCID_{50}$ 確認是否不活化成功(< 2.5 log)。MF=初過濾病毒液，UF=濃縮病毒液， UC-P1/2=超高速離心純化原型疫苗， GF=膠體層析純化原型疫苗。

表五、小鼠免疫試驗中和效價結果

**A**

| Mouse neutralization titer-GF | | |
|---|---|---|
| lot | dilution | Neutralization titer |
| 13EV01 | original | 43.93 |
| 13EV02 | original | 43.28 |
| | 4x | 27.64 |
| 13EV03 | original | 79.43 |
| 13EV04 | original | 19.95 |
| | 4x | 11.88 |
| 13EV05 | original | 23 |
| | 4x | 19 |

**B**

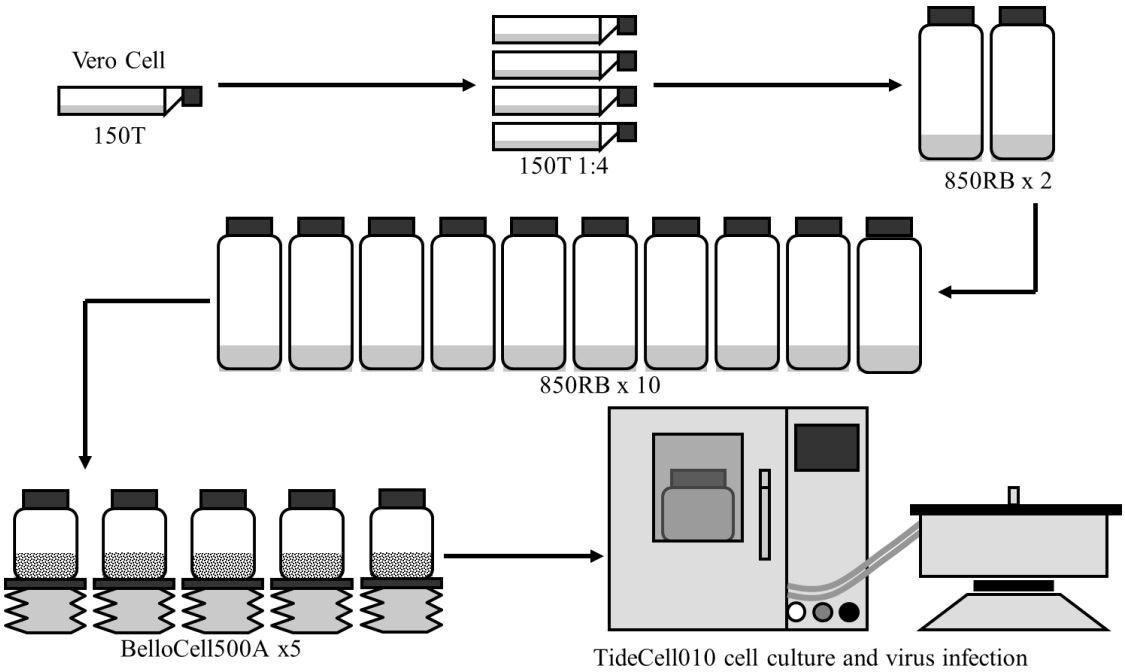
| Mouse neutralization titer-UC | | |
|---|---|---|
| lot | dilution | Neutralization titer |
| 13EV01 | original | 17.99 |
| 13EV02-UC-peak1 | original | 43.28 |
| | 4x | 27.64 |
| 13EV02-UC-peak2 | original | 29.95 |
| | 4x | 7.07 |
| 13EV03-UC-peak1 | original | 25.11 |
| 13EV03-UC-peak2 | original | 39.81 |
| 13EV04-UC-MIX | original | 12.39 |
| | 4x | 12.39 |
| 13EV05-UC-MIX | original | 16.37 |
| | 4x | 11.48 |

(A) 經膠體層析純化之原型疫苗，免疫小鼠之血清中和效價。 (B) 超高速離心純化之原型疫苗，免疫小鼠之血清中和效價。UC-Peak1/2/MIX=超高速離心純化原型疫苗， GF=膠體層析純化原型疫苗。

**表六、量產批次之兔子免疫試驗中和效價結果**

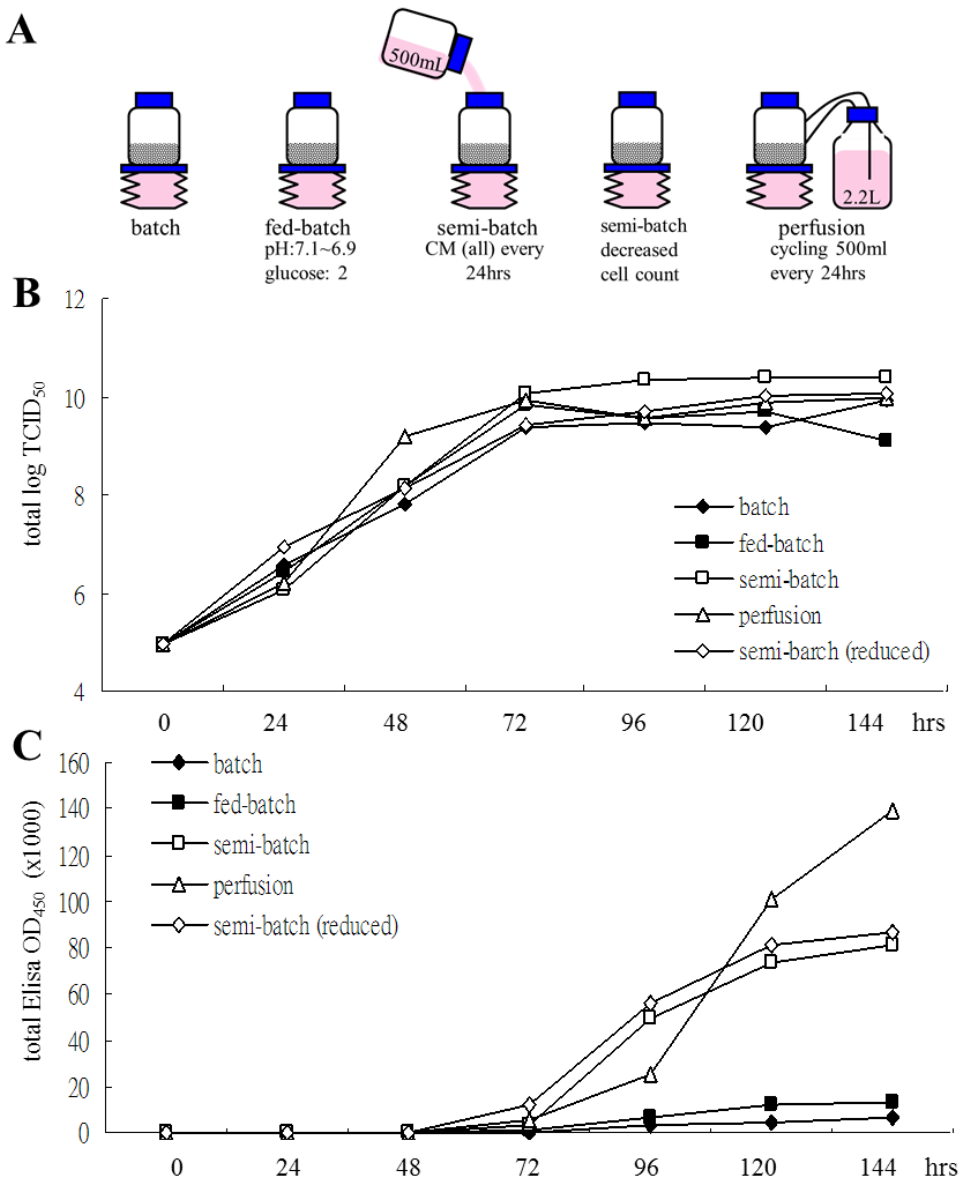
| | Neutralization Titer | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Lot No.** | Week1 | Week3 | Week5 | Week7 | Week9 |
| **12EV02-original** | 7.07 | 7.74 | 26.97 | 21.53 | 43.58 |
| **12EV03-8X** | 7.07 | 7.24 | 16.54 | 22.56 | 39.36 |

原型疫苗 12EV02 原倍及 12EV03 八倍稀釋免疫兔子，經 1、3、5、7、9 周採血測量血清中和效價之結果。



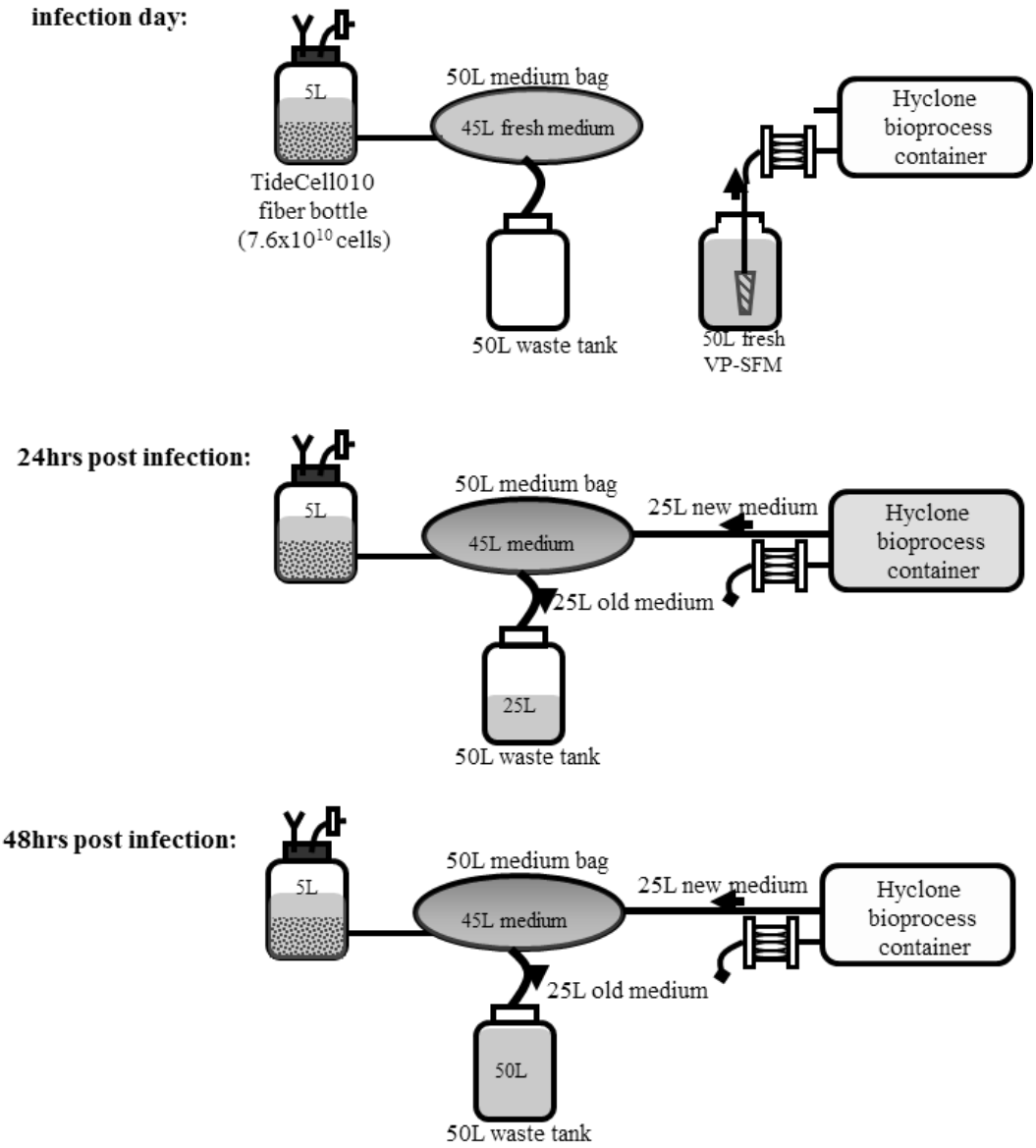

**圖一、50L 產程 TideCell010 細胞增殖流程示意圖**

解凍國衛院提供之 Vero cell 細胞於 150T，經由 4 個 150T、2 個 Roller Bottle、10 個 Roller Bottle 及 5 個 BelloCell 細胞放大，最後至 TideCell010 接種腸病毒。



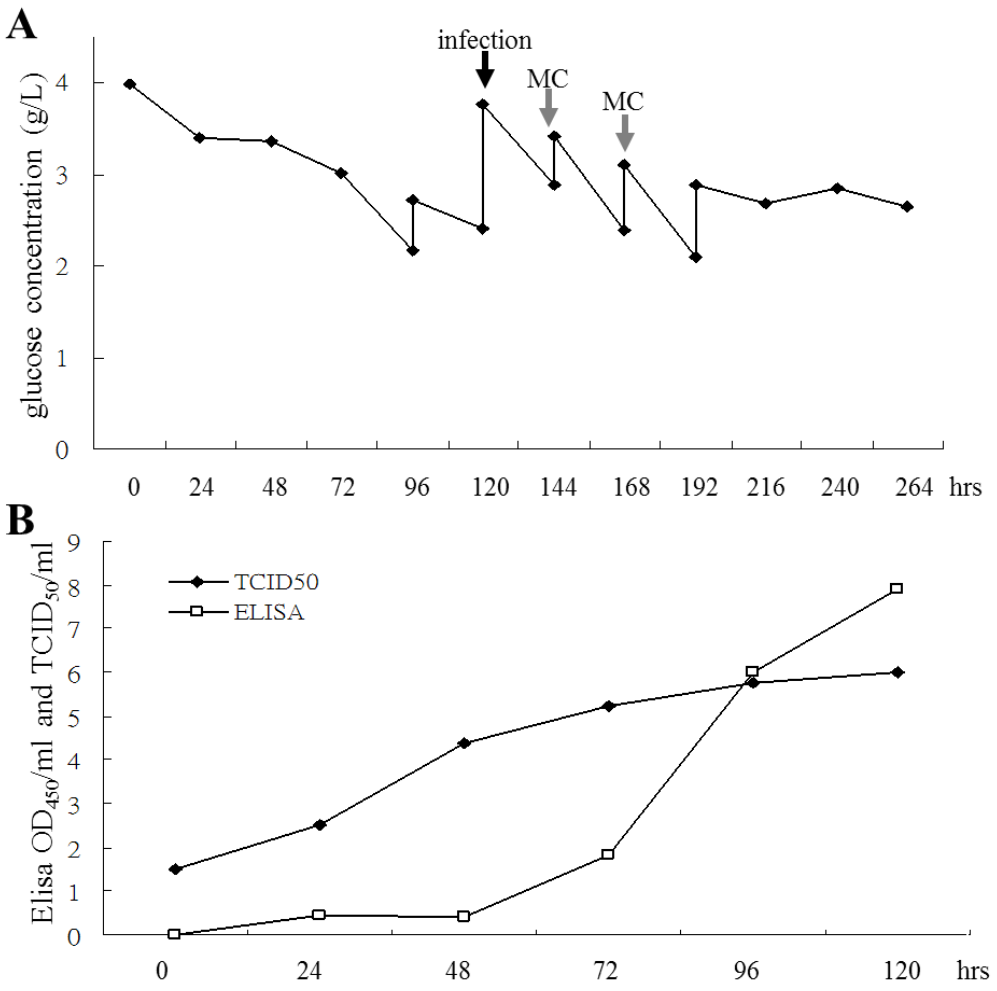

**圖二、Batch、Fed-batch、Semi-batch 及 Perfusion 之 BelloCell 病毒培養條件測試**

(A) BelloCell 病毒培養小量測試組別示意圖，Batch、Fed-batch、Semi-batch、及 Perfusion 組接種病毒(MOI: $10^{-4}$) ，減少細胞數之組別 Semi-batch (reduced) 則為 Semi-batch 細胞數一半時接種，兩組 Semi-batch 每 24 小時更換一次全新培養基。(D、E) TCID50 及 ELISA OD 值。



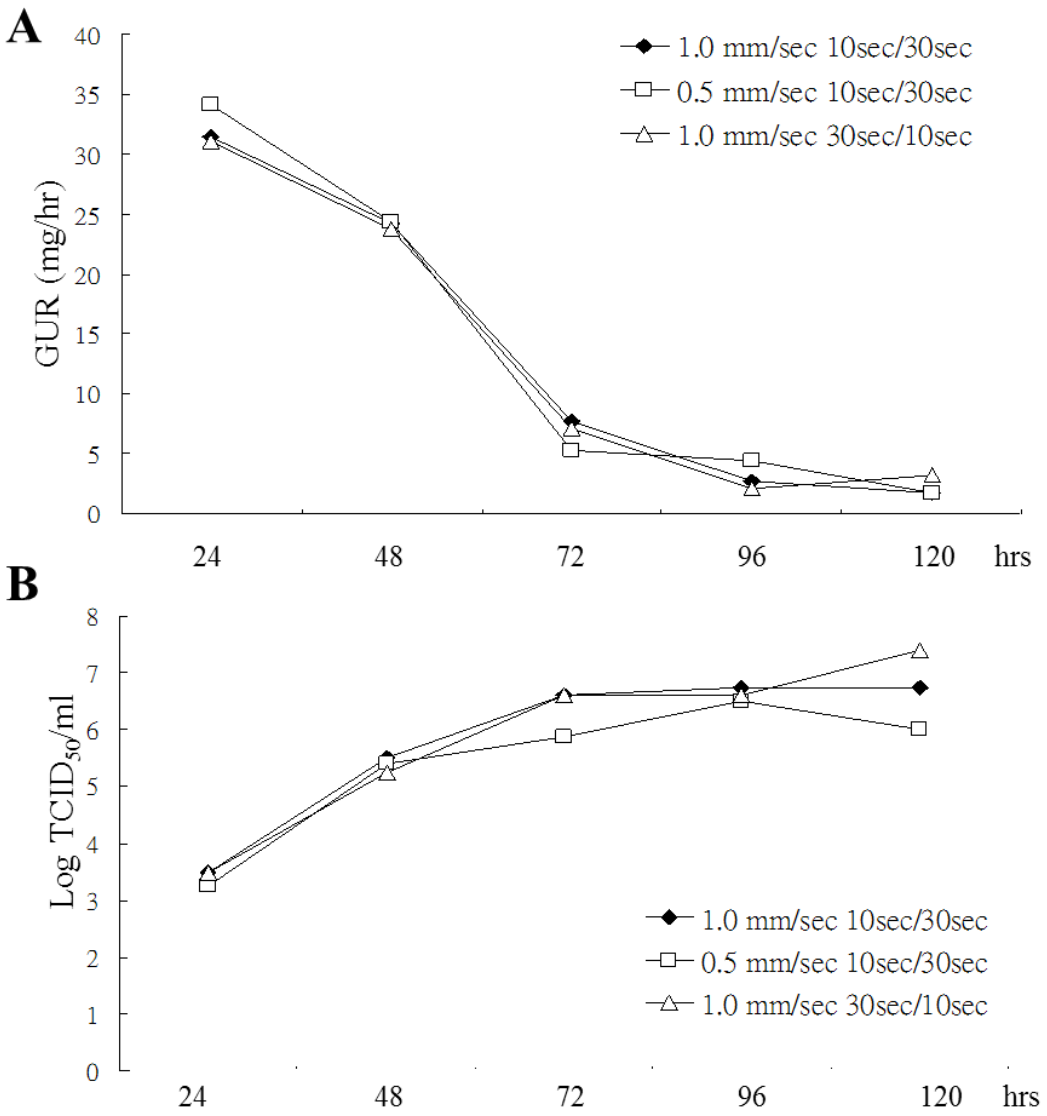

**圖三、TideCell010 之 50L 產程使用 semi-batch 病毒培養換液條件流程示意圖**

13EV01 於細胞數 $7.6x10^{10}$ 進行 EV71 攻毒(MOI: $10^{-4}$)，攻毒後 24 小時將一半培養基 25L 移出系統並灌入相同體積之新鮮 VP-SFM 培養基，並在攻毒後 48 小時重複此一動作，總共更換 50L 新鮮 VP-SFM 培養基。



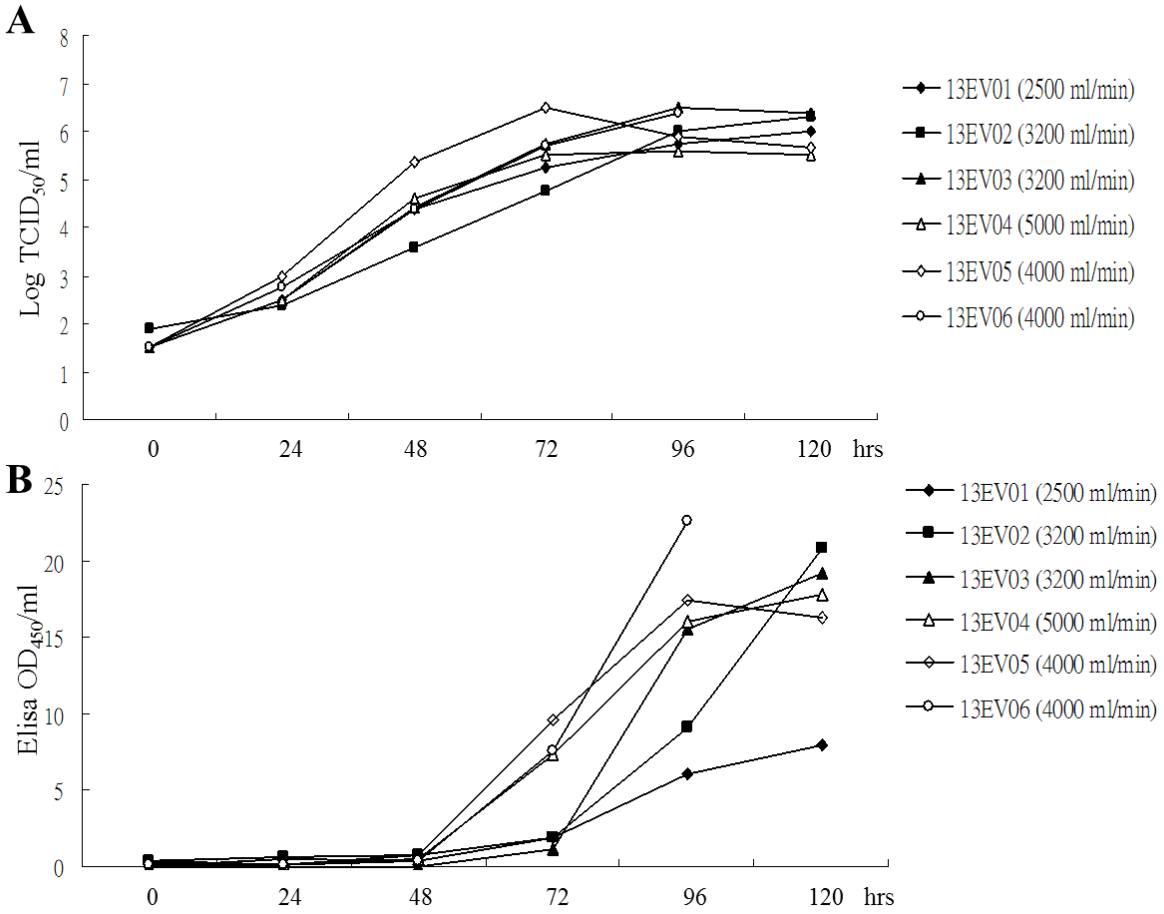

**圖四、TideCell010 之 50L 產程使用 semi-batch 病毒培養換液條件之葡糖糖攝取速率及病毒定量**

(A) 葡萄糖濃度由細胞培養與病毒培養階段每日採樣 2 次並計算葡萄糖消耗速率。(B) 病毒接種後每日採樣並測量 $TCID_{50}$ 與 ELISA 值。50L TideCell010 產程使用 semi-batch 換液方式示意圖已列於圖三，黑色箭頭(↓) 代表攻毒時間點，灰色箭頭(↓) MC 為更換 25L 新鮮培養基。



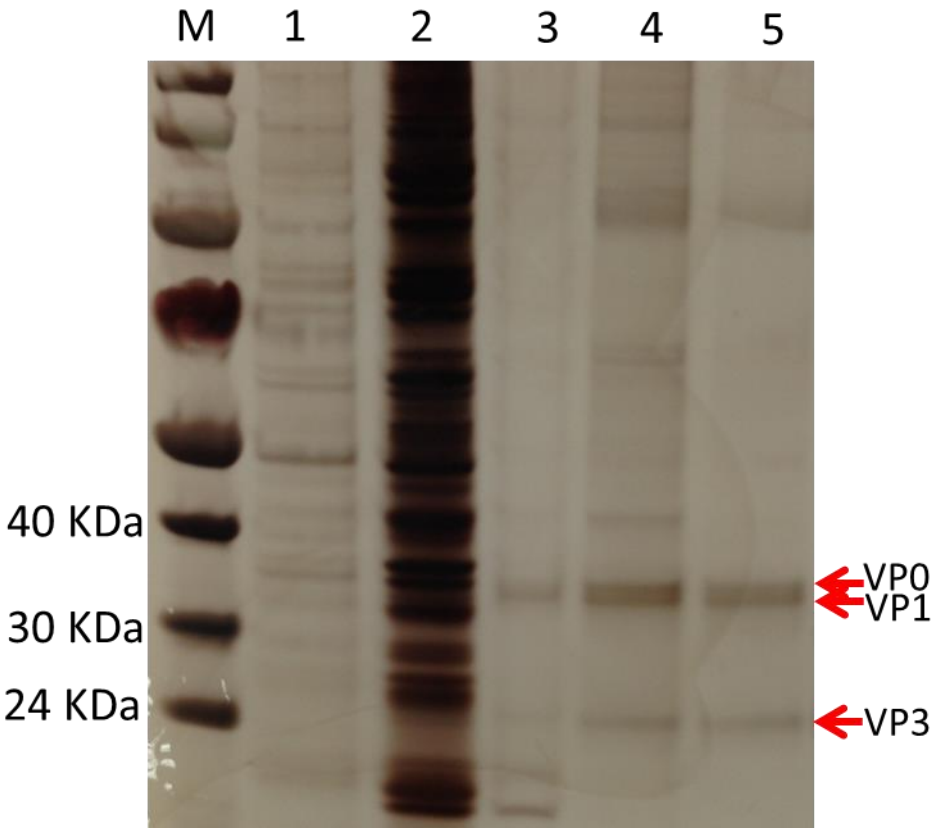

**圖五、BelloCell 測試不同潮汐速率與停滯時間**

潮汐速率設定為 1.0 和 0.5 mm/s，滿/低潮停滯時間設定為 10s/30s 或 30s/10s ，以 MOI=$10^{-4}$ 進行 BelloCells 攻毒，並採樣定量(A) 葡萄糖消耗速率 GUR 與 (B) 病毒力價 $TCID_{50}$。



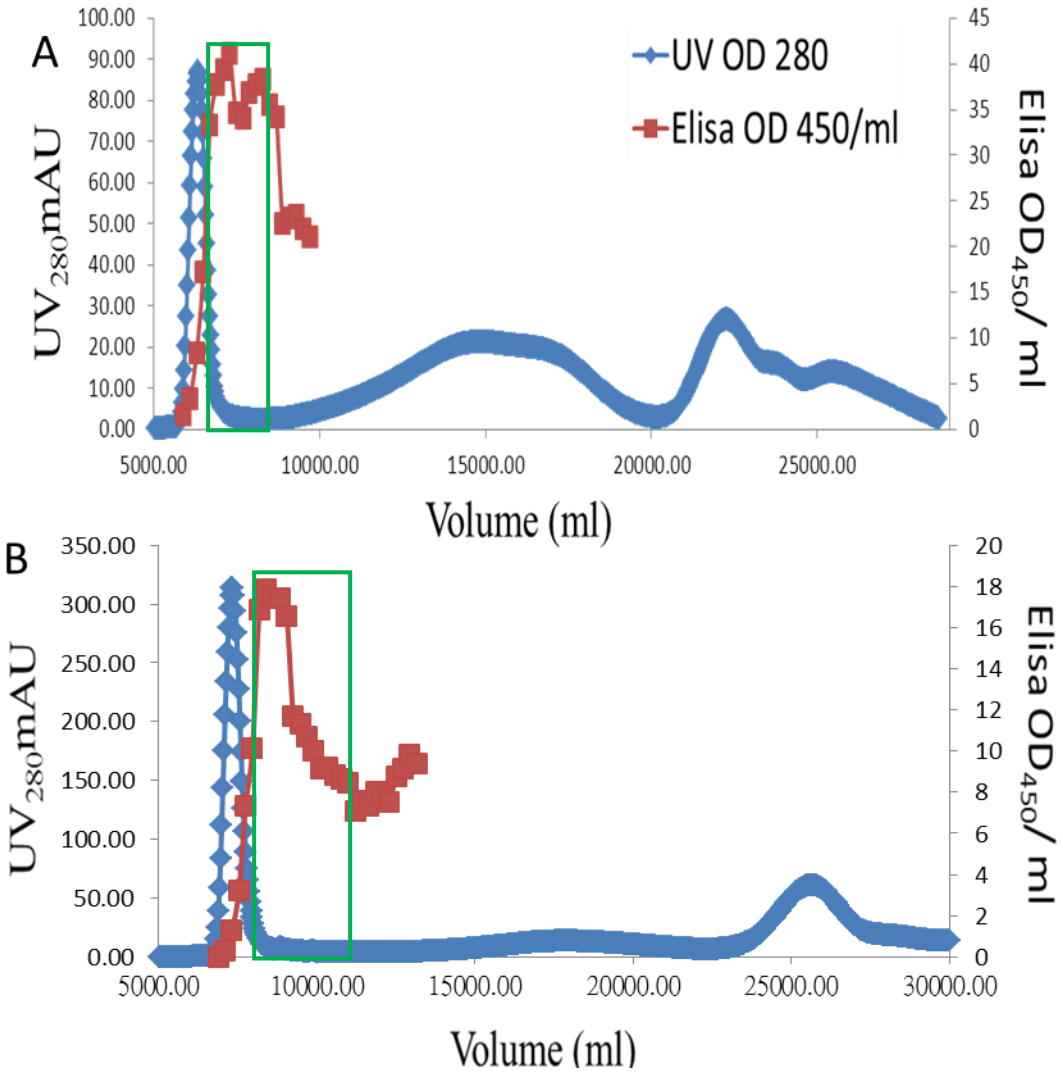

**圖六、50L TideCell 產程採用 fed-batch 換液搭配不同潮汐速度**

13EV02 到 13EV06 共 5 批次 TidcCell010 產程分別採用不同潮汐速率，並採樣定量(A) $TCID_{50}$ (B) ELISA OD 值。13EV02~03 潮汐速率微 3200 ml/min、13EV05~06 為 4000 ml/min 以及 13EV04 為 5000 ml/min，加上 13EV01 2500ml/min 為對照組。



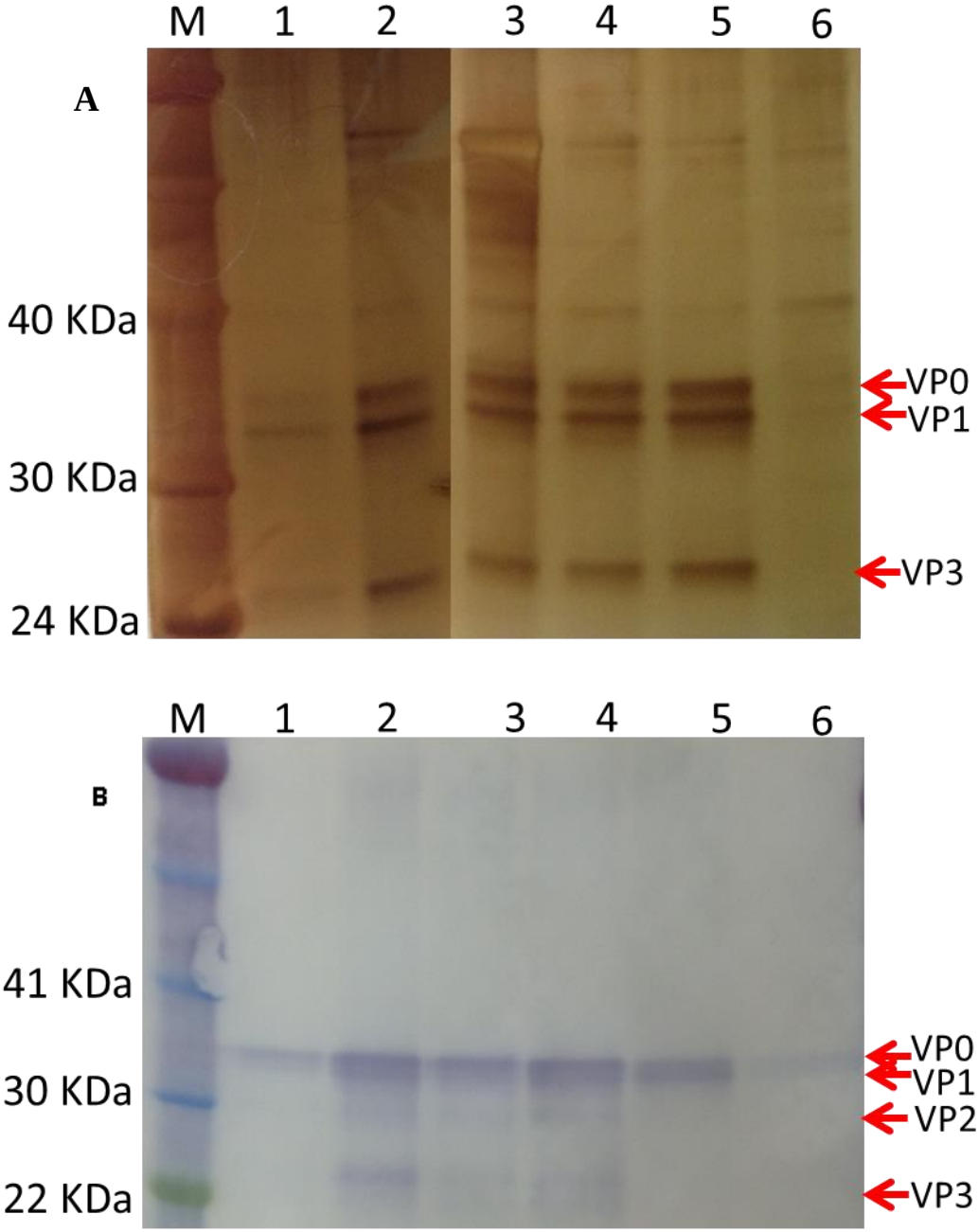

**圖七、各純化階段之 SDS-PAGE。**

Lane M = protein marker, lane 1 ~5 = microfiltration (MF)、ultrafiltration (UF)、Ultracentrifugation (UC)、Gel filtration (GF/800) and Gel filtration (GF/900). Arrows indicate virus structural proteins VP0 (38 KDa), VP1(34 KDa), VP3 (25 KDa).




**圖八、50L Tidecell010 生物反應器試量產之 FPLC 膠體純化圖譜。**

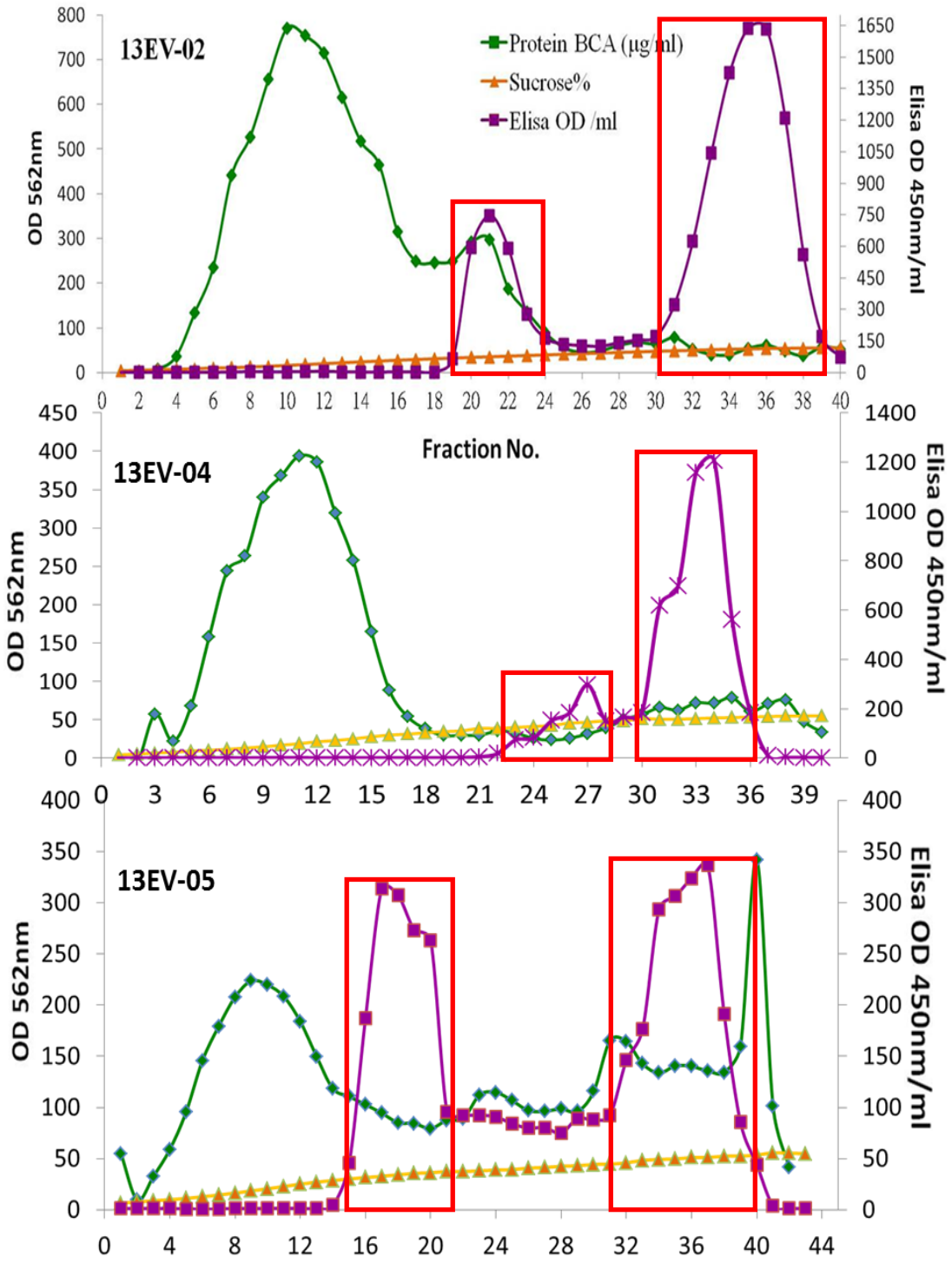
(A)使用 BPG200/ 800 膠體層析管柱純化 (B) 使用 BPG200/ 900 膠體層析管柱純化。綠框處為抗原收集區段。




**圖九、6 批次 EV71 病毒液經 FPLC 純化之外殼蛋白 SDS-PAGE 與 Western blot。**

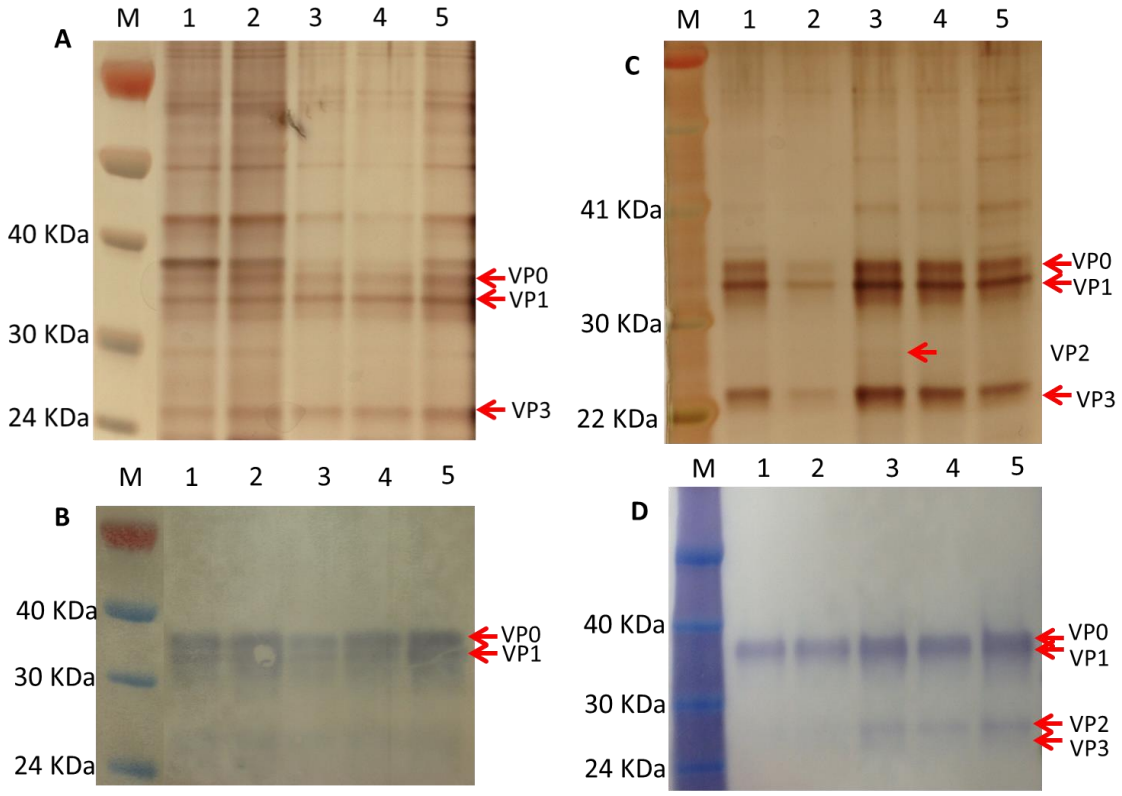
**(A)銀染，(B) Western blot。**

Lane M = protein marker, lane 1 ~6 = lot number 13ev01~13ev06. Arrows indicate virus structural proteins VP0 (38 KDa), VP1(34 KDa), VP2 (28 KDa) and 3 (25 KDa). Primary Antibodies: MAB979 (Millipore).




**圖十、50L Tidecell010 生物反應器試量產之蔗糖梯度超高速離心圖譜。**

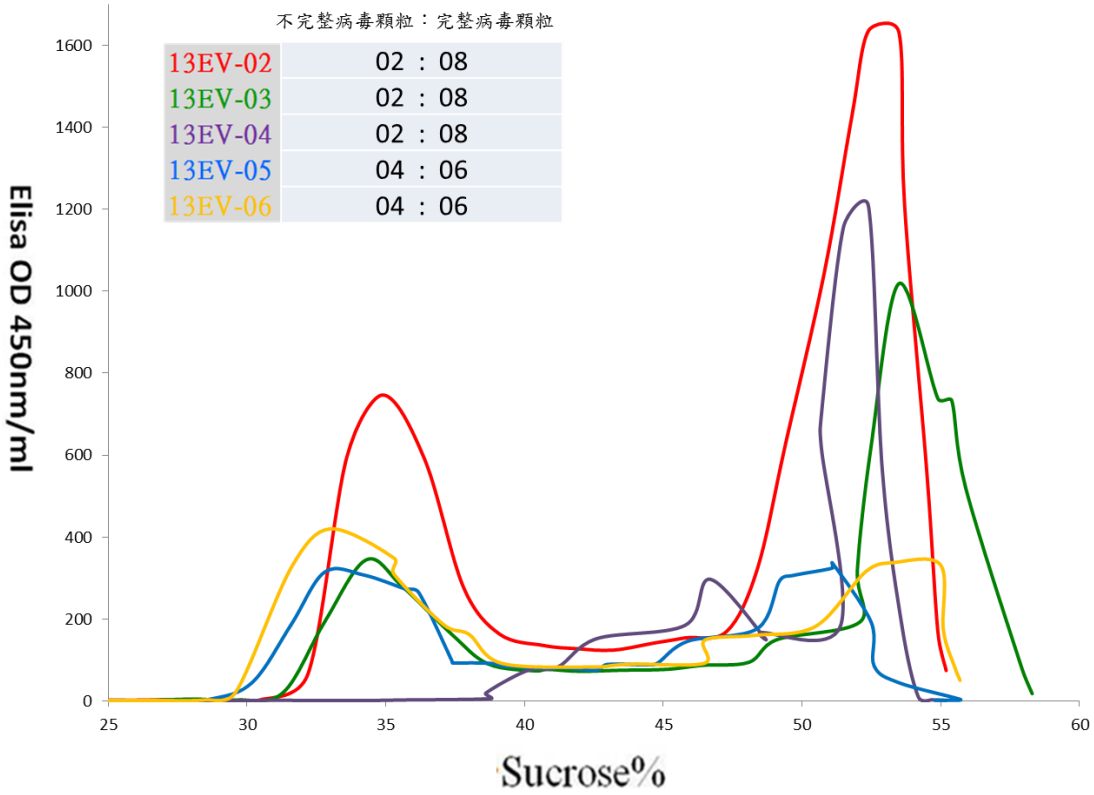
紅框處為抗原收集區段。



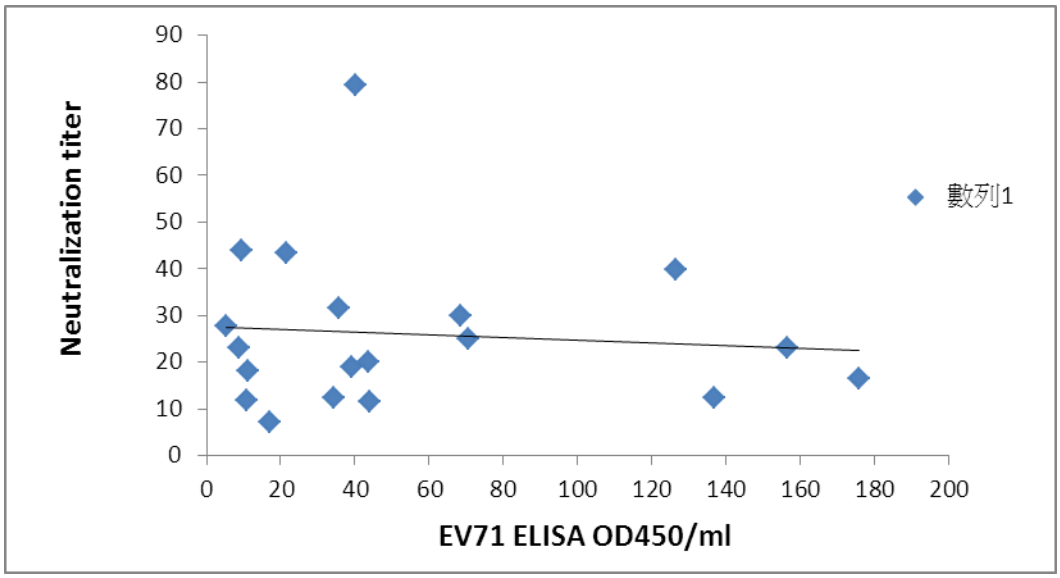

**圖十一、5 批次 EV71 病毒液經蔗糖梯度超高速離心純化之外殼蛋白 SDS-PAGE 與 Western blot。**

**(A)不完整病毒外殼蛋白銀染，(B) 不完整病毒外殼蛋白 Western blot，(C) 完整病毒外殼蛋白銀染，(D) 完整病毒外殼蛋白 Western blot。**

Lane M = protein marker, lane 1 ~5 = lot number 13ev02~13ev06. Arrows indicate virus structural proteins VP0 (38 KDa), VP1(34 KDa), VP2 (28 KDa) and 3 (25 KDa). Primary Antibodies: MAB979 (Millipore).




**圖十二、5 批次 EV71 病毒液經蔗糖梯度超高速離心純化之病毒分布圖譜比較。**




圖十三、小鼠血清及 ELISA OD450/ml 相對比較結果。

# 參考文獻


1. 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.
2. Kuo HS *et al*. (2005). Communicable Diseases of Interest to the Public: Enterovirus. Centers for Disease Control, Taiwan, *Annual Report*, 53-55.
3. WHO Global Alert and Response. Severe complications of hand, foot and mouth disease (HFMD) caused by EV-71 in Cambodia – conclusion of the joint investigation. July 13, 2012.
4. DOH updates list of HFMD cases (press release). July 31, 2012.
5. 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.
6. Ch'ng WC, Stanbridge EJ , Wong KT, Ong KC, Yusoff K, Shafee N (2012). Immunization with recombinant enterovirus 71 viral capsid protein 1 fragment stimulated antibody responses in hamsters. *Virology Journal* 9:155-160
7. Tung WS, Bakar SA, Sekawu Z, Rosli R (2007). DNA vaccine constructs against enterovirus 71 elicit immune response in mice. *Genet Vaccines Ther* 5:6.
8. Lin YC, Wu CN, Shih SR, Ho MS (2002). Characterization of a Vero cell-adapted virulent strain of enterovirus 71 suitable for use as a vaccine candidate. *Vaccine* 20:2485-2493.
9. Wu CN, Lin YC, Fann C, Liao NS, Shih SR, Ho MS (2001). Protection against lethal enterovirus 71 infection in newborn mice by passive immunization with subunit VP1 vaccines and inactivated virus.

*Vaccine* 20:895–904.

10. Chiu CH, Chu C, He CC, Lin TY (2006). Protection of neonatal mice from lethal enterovirus 71 infection by maternal immunization with attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium expressing VP1 of enterovirus 71. *Microbes Infect.* 8, 1671–1678.
11. Wu TC, Wang YF, Lee YP (2007). Immunity to avirulent enterovirus 71 and coxsackie A16 virus protects against enterovirus 71 infection in mice. *J.Virol.* 81, 10310–10315.
12. Lin YL, Yu CI, Hu YC, Tsai TJ, Kuo YC, Chi WK, Lin AN, Chiang BL. Enterovirus type 71 neutralizing antibodies in the serum of macaque monkeys immunized with EV71 virus-like particles (2012). *Vaccine* 30:1305-12.
13. Lee MS, Chang YL (2010). Development of enterovirus 71 vaccines. *Expert Rev Vaccines* 9:149-156
14. Jesus MD, Wurm FM (2011). Manufacturing recombinant proteins in kg-ton quantities using animal cells in bioreactors. *Eur J Pharm Biopharm.* Jun;78(2):184-8.
15. Chu C, Lugovtsev V, Lewis A, Betenbaugh M, Shiloach J (2010). Production and antigenic properties of influenza virus from MDCK-siat7e cells in a bench-scale bioreactor. *Vaccine* Oct 18;28(44):7193-201.
16. Li F, Vijayasankaran N, Shen AY, Kiss R, Amanullah A (2010). Cell culture processes for monoclonal antibody production. *Mabs* Sep-Oct;2(5):466-79.
17. Ansorge S, Lanthier S, Transfiguracion J, Durocher Y, Henry O, Kamen A (2009). Development of a scalable process for high-yield lentiviral vector production by transient transfection of HEK293 suspension cultures. *J Gene Med* Oct;11(10):868-76.
18. Wu SC, Liu CC, Lian WC (2004). Optimization of microcarrier cell

culture process for the inactivated enterovirus type 71 vaccine development. *Vaccine* 22:3858-64.

19. Liu CC, Gou MS, Lin FH, Hsiao KN, Chang HW, Chou AH, Wang YC, Chen YC, Yang CS, Chong CS (2011). Purification and characterization of enterovirus 71 viral particles produced from Vero cells grown in a serum-free microcarrier bioreactor system. *PLoS ONE* May 6:5.
20. Toriniwa H, Komiya T (2007). Japanese encephalitis virus production in Vero cells with serum-free medium using a novel oscillating bioreactor. *Biologicals* 35:221-226.
21. Hu YC, Lu JT, Jung YC (2003). High density cultivation of insect cells and production of baculovirus using a novel oscillating bioreactor. *Cytotechnology* Sep; 43(3):145-153.
22. Huang KS, Hsieh SY, Chang KM, Wang YC, Chu A, Shaw SY, Ou JJ, Ho L (2007). Combination of baculovirus-mediated gene delivery and packed-bed reactor for scalable production of adeno-associated virus. *Hum Gene Ther* Nov; 18(11):1161-70.
23. Wang KI, Hsieh SY, Chang KM, Wang YC, Chu A, Shaw SY, Ou JJ, Ho L (2005). A novel control scheme for inducing angiostatin-human IgG fusion protein production using recombinant CHO cells in a oscillating bioreactor. *J Biotech* 121: 418-419.
24. Brown AN, McSharry JJ, Adams JR, Kulawy R, Barnard RJ, Newhard W, Corbin A, Hazuda DJ, Louie A, Drusano GL (2012). Pharmacodynamic analysis of a serine protease inhibitor, MK-4519, against hepatitis C virus using a novel in vitro pharmacodynamic system. *Antimicrob Agents Chemother* Mar;56(3):1170-81.
25. McMinn PC (2012). Recent advances in the molecular epidemiology and control of human enterovirus 71 infection. *Current Opinion in Virology* 2:199–205.

26. Zhu FC, Meng FY, Li JX, Li XL, Mao QY, Tao H, Zhang YT, Yao X, Chu K, Chen QH, Hu YM, Wu X, Liu P, Zhu LY, Gao F, Jin H, Chen YJ, Dong YY, Liang YC, Shi NM, Ge HM, Liu L, Chen SG, Ai X, Zhang ZY, Ji YG, Luo FJ, Chen XQ, Zhang Y, Zhu LW, Liang ZL and Shen XL (2013). Efficacy, safety, and immunology of an inactivated alum-adjuvant enterovirus 71 vaccine in children in China: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. Lancet 381(9882):2024-32.

# 期末報告審查意見回覆

王有欽委員：

1. 建議強化及確立病毒培養及檢測平台之 QC 及 QA。

   Ans：感謝委員建議，由於人力有限且仍於開發階段，所以尚未讓本中心 QC 及 QA 系統正式納入本計畫，我們會努力朝該目標前進。

2. 似乎人力減少了，此情況下建議儘速確立最佳培養及純化方式單一方法。

   Ans：感謝委員建議， 經過兩年的條件測試已初步確立 50L 培養產程，純化方式採用 FPLC 與超高速離心兩組互相對照，其純化效果不相上下，但各有其優點， FPLC 易於操作與放大而蔗糖梯度超高速離心則可以有效分離出兩種病毒顆粒，未來仍希望是承接廠商依據本計畫的結果資料做最適選擇。

3. 如能精進培養及純化最佳化，加強其特殊性及創新，可助文章發表。

   Ans:病毒培養和純純化最佳條件之特殊性及創新一直是本中心努力的目標，感謝委員建議。

4. 部分圖列成重複(圖八、圖九)，圖說可再加強。

   Ans：感謝委員提點，錯誤已修正。

5. 製程量產可能因病毒培養方式不同產生病毒成分改變，可能是純化方式所造成?

Ans：為求產程之連續性，滾動培養瓶進入生物反應器均無改變純化方式，純化方式仍採用 FPLC 與超高速離心，惟線性放大需加高 FPLC 管柱與超高速離心增加次數，故兩種純化方式可有效檢測出出不同量產製程病毒顆粒之些微差異，所以我們推論不同病毒培養方式才是產生病毒成分改變的最主要因素。

廖明一委員：

1. 依報告之結果顯示目前操作量產 50L 已顯示不穩定，將來要達到量產 500L 以上則問題更多，可能影響公共衛生對疫苗價格的訂定影響對腸病毒 71 型的控制。

Ans：感謝委員提點，目前無血清 C4 腸病毒原型疫苗於 50L 生物反應器試量產效益不如傳統滾動培養瓶，未來有機會將諮詢其他生物反應器專家，努力朝產程能穩定線性放大的目標。

2. 報告中第 28 頁第二段第一行 ELISA 可能有誤宜修正。

Ans：感謝委員提點，錯誤已修正。