

計畫編號：DOH95-DC-2031

行政院衛生署疾病管制局九十五年度科技研究發展計畫

腸病毒 71 型原型疫苗免疫特性研究與動物感染模式建立  
Pre-clinical study of enterovirus 71 prototype vaccine

## 研究報告

執行機構：血清疫苗研製中心

計畫主持人：江正榮

研究人員：連偉成、李政道、張正鵬、陳京瑤、鄭佳瑋、郭孟欣、  
李璧秀、彭敬祥、古華蓉、莊佩珊、呂亞蓉、張瑞原

執行期間：95 年 1 月 1 日至 95 年 12 月 31 日

\* 本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見 \*

# 目 錄

中文摘要.....	3
英文摘要.....	4
前言.....	6
材料與方法.....	8
一、細胞和病毒的培養.....	8
二、病毒之純化.....	8
三、純化後病毒之檢驗.....	9
四、病毒的不活化.....	11
五、疫苗效價的測定.....	11
六、批次疫苗中和試驗.....	12
七、安定性試驗.....	12
八、安全性試驗之異常毒性試驗.....	12
結果.....	13
一、量產 GMP 級原型疫苗，並建立各批次包括病毒生產趨勢、 產程各階段蛋白質含量與抗原含量、純度、回收率等資 料.....	13
二、添加物 Benzonase 的殘留量測定與確認.....	14
三、利用無血清培養病毒可行性評估.....	14
四、進行小鼠及兔子動物試驗與血清抗體中和效價分析.....	14
五、進行腸病毒 71 型原型疫苗安定性試驗.....	15
六、執行腸病毒 71 型原型疫苗異常毒性試驗.....	15
七、疫苗株之交叉保護性研究及病毒株篩選.....	16
八、標準品製備.....	16
九、分析方法確效.....	17
討論.....	17
參考文獻.....	20
圖表.....	22
圖 1、病毒生長之病毒力價及抗原量監測 .....	22
圖 2、9 批次 EV71 純化階段產物 ELISA 抗原回收率比較... ..	22
圖 3、量產純化產物毒力及 ELISA 效價比較.....	23
圖 4、批次量產各階段產物分析.....	23
圖 5、EV71 批次純化層析圖譜分析.....	24

表 1、EV71 批次純化階段產物品比較.....	25
圖 6 9 個批次純化階段產物 ELISA 抗原單位效價比較.....	26
表 2 核酸分解酵素(benzonase)殘留量測試.....	26
圖 7、比較含血清培養基及三種無血清培養基之 病毒生長曲線.....	27
表 3 純化產物 LC#3& #4 免疫效價比較.....	27
圖 8 量產批次不活化小鼠免疫試驗.....	28
表 4 量產批次原型疫苗兔子免疫試驗中和效價.....	28
圖 9 內部標準品安定性試驗.....	29
表 5 量產批次之安定性試驗.....	29
圖 10、ICR 小鼠異常性試驗結果.....	30
表 6 原型疫苗 E59 免疫小鼠之抗體中和效價.....	31
表 7 腸病毒 71 型 C type 病毒株交叉 ELISA 結果.....	32
圖 11、以 vp1 單株抗體辨識 EV71 C type strains 的 western blotting 結果.....	32
表 8、原型疫苗 E59 及第二疫苗候選株 E36 , 以活毒免疫兔子之抗體中和效價.....	33
圖 12 超高速離心所得之腸病毒 71 型產物收集液分析.....	34
圖 13、批次純化產物與標準品之比較.....	34
圖 14 以內部標準品進行 ELISA 檢測系統之線性分析.....	35
圖 15 以內部標準品進行 ELISA 檢測系統之精密度分析.....	36

## 中 文 摘 要

目前使用本中心以所建立之病毒試量產純化系統，已實際執行 20 批次以上的腸病毒 71 型原型疫苗，就各項產物分析所得一致性參數如下：(1) 病毒量產收獲：病毒於接種後，收獲日(第 5 天)之病毒毒力 TCID<sub>50</sub> 維持在  $10^{7.7\pm 0.45}$ /ml，而抗原 ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay，酵素連結免疫試驗法)OD 值約為  $0.57\pm 0.03$ ；(2) 病毒濃縮：利用切向流過濾進行病毒濃縮，以 ELISA OD 值測定之抗原回收率，平均為 91%；(3) 病毒純化：各量產批次最終純化產物之蛋白質平均濃度約為 17 ug/ mL，抗原回收率約為 46%，而單位蛋白質抗原 ELISA 效價(OD<sub>450</sub>/ug)，皆可達 15 以上(原始病毒液 OD<sub>450</sub>/ug < 1.0)且純度及抗原專一性高。各量產批次間的純化圖譜產物析出之時間軸點亦極為相近具有穩定性。製程中所添加之去核酸分解酵素，經由殘留量測試可證明並未殘留於純化產物中。而在無血清的培養方面，已比較多種培養基的腸病毒 71 型滾動瓶生長參數，培養四天後病毒毒力約為  $10^{7.1\pm 0.25}$ /mL，已擬選定其中一種無血清培養基進行量產培養。動物試驗方面，以腹腔注射老鼠產生中和抗體的免疫效應最好，而 50 ELISA OD 的抗原劑量可穩定產生 1:40 以上的血清抗體中和效價；在兔子試驗方面，無論靜脈或皮下注射，500 ELISA OD 的抗原劑量皆可產生 1:5000 以上的血清抗體中和效價。而在原型疫苗安定性試驗方面，疫苗於 4 儲存 100 天後，所測得抗原量未明顯下降。異常毒性試驗的結果，小鼠體重皆正常增加，並無異常毒性之疑慮。由於現行疫苗株抗血清對 C4 type 病毒中和效價偏低的狀況發生，目前已篩選出一支 genotype 為 C4 的疫苗候選株 E36，此病毒株以活毒靜脈免疫兔子後之血清對 39 株腸病毒 71 型分離株所得的抗體中和效價皆高於之前篩選出的原型疫苗株 E59。由於 ELISA 檢測抗原系統是產程監測的一項重要工具，為驗證其所測量數據的精密度和準確性，已利用內部標準品進行 12 組以上的線性及範圍測試及 100 點以上的精密度測試，所得結果符合生物性檢測之確效標準(線性回歸係數  $r^2 > 0.95$ ，變異係數 CV < 15%)，而 ELISA 檢測線性檢測範圍在 0.2-0.9 OD 之間。

中文關鍵詞：腸病毒 71 型原型疫苗、中和抗體力價試驗、精密度

## 英 文 摘 要

More than 20 lots of EV 71 prototype vaccine has been produced using the pilot production scale set up by our center. The results of reproducibility in different production procedure are as follows: (1)Virus Harvest: The titer of the virus harvested at the fifth day after infection maintained at  $10^{7.7\pm 0.45}$ /ml tested by TCID<sub>50</sub>; and the OD value of ELISA is around  $0.57\pm 0.03$  ; (2)Virus Concentration: Using tangential flux flow method, the antigen recovery rate determined by ELISA OD is averaged at 91% ; (3)Virus Purification: The average protein concentration of final product of each lot is around 17 ug/ mL; the antigen recovery rate is around 46%; the antigen content per unit protein ( OD<sub>450</sub> /ug ) can all reach above 15 (original bulk OD<sub>450</sub> /ug <1.0 ), it means that the purity and specificity of final product are high.

Benzonase added during the process can be totally removed, therefore no residual of benzonase was found after purification. Several serum free mediums was used and one has been chosen for the growth of virus in the roller bottle based on growth curve of EV71 and the titer which is around  $10^{7.1\pm 0.25}$ / mL at the fourth day after infection.

The results from animal study shows that intraperitoneal injection of the mice can induce the best neutralization result, and the dosage of 50 ELISA OD can stably induce a neutralization titer of 1:40; and the intravenous or subcutaneous injection of the rabbit using dosage of 500 ELISA OD can both induce 1:5000 neutralization titer. The stability test of prototype vaccine shows no decrease in antigen after 100 days at 4 storage.

The neutralizing titer from the serum of the current vaccine strain against C4 type virus is low, therefore another vaccine strain from genotype C4, E36, has been chosen. The serum from rabbit immunized intravenously with E36 live virus appeared to show higher neutralization titer against 36 EV71 isolates compared to the E59 vaccine strain. Because ELISA is an important assay method to verify the production process, therefore the accuracy and precision of

this method needs to be validated. More than 100 points were tested for precision using internal standard, and more than 12 sets of experiments were carried out to determine the linearity and range. The results were all within the standards (coefficient of variation,  $CV < 15\%$ , and regression coefficient  $r^2 > 0.95$ ), and the ELISA linearity and range is between 0.2 – 0.9 OD.

Keywords: : EV71 prototype vaccine, neutralization titer test, precision

## 前 言

腸病毒在台灣自民國八十七年爆發至九十四年底為止，在已確定的一千五百四十八個重症案例中，腸病毒 71 型佔了六百二十六例 (40.1%)；而在 244 個腸病毒死亡病例中，腸病毒 71 型佔了一百一十一例(45.5%) 【Lin et al., 2003 , Kuo et al. 2005】，就每年分布而言，在腸病毒 71 型病例在重症案例中的比例也一直居高不下。而被感染者大都集中於身體抵抗力較弱之嬰幼兒族群【Ho et al., 1999 ; Wang et al., 1999 ; Wong et al., 1999 ; Wu et al., 1999】。若無有效方法加以控制，對於一般民眾甚至是家中有小孩的人來說，將造成恐慌與無形的壓力。而依據血清流行病學調查顯示，雖有部份幼童已具有腸病毒 71 型之抗體，但是仍有一半以上幼童不具有抵抗力，亦即未來腸病毒 71 型在台灣地區仍有造成流行的空間。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，是一件刻不容緩的事。

血清疫苗研製中心在腸病毒 71 型疫苗開發工作中，已建立包括 20 公升以上之試量產系統、膠體層析病毒純化系統、病毒不活化劑量與期程、佐劑選擇與吸附條件、動物免疫方式與期程、抗原抗體檢測系統等製程與檢驗方式。除了進一步確立個別製程條件外，以完整製程步驟外，由於研究開發已有相當成果，同時相關標準操作流程文件也已陸續建立，因此本中心規劃將腸病毒 71 型疫苗研發進入臨床前試驗階段，期能夠藉此初步證明其可應用性。

臨床前試驗為進入人體試驗前所進行的一系列體內、體外之藥物測試，絕大多數係以動物試驗為主，藉以建立安全性與有效性資料。

一般的動物試驗通常使用兩種以上的哺乳動物做為實驗動物，其中一種為嚙齒目動物，另一種則為非嚙齒目動物，必要時會採用大型靈長目動物。而「原型疫苗免疫特性研究」與「動物感染模式建立」等兩大主題，就是疫苗中心針對腸病毒 71 型疫苗臨床前試驗在未來兩年的重點規劃研究工作。

第一年主要針對本研究計畫目標之一「原型疫苗免疫特性研究」進行研究，本中心規劃連續量產 GMP 級原型疫苗，分析各批次製程指標，例如病毒生產趨勢、產程各階段蛋白質含量與抗原含量、純度、回收率、動物免疫效價等，以確立疫苗產品製程之一致性；以酵素免疫連結法與動物免疫血清效價結果，分析原型疫苗之效期與保存需求，以確立疫苗原液之安定性；利用小鼠、兔子等動物，以多重不同稀釋濃度之原型疫苗分別進行接種採血與中和效價分析，以初步確立原型疫苗之有效性，並藉以評估人類免疫之有效劑量及生產能量；以原型疫苗有效性報告之劑量分析結果為基礎，利用嚙齒類動物建立異常毒性試驗以確立疫苗之安全性。

而目前腸病毒 71 型分離株中，各專家利用腸病毒上不同的基因片段進行基因樹分析 ( phylogenetic analysis )，將台灣腸病毒 71 型區分為 B 基因群與 C 基因群【Ho et al., 2000 ; Chu et al., 2001 ; Wang et al., 2002】。由之前的研究顯示，本中心所研發腸病毒原型疫苗所誘發之小鼠抗血清，對其他不同基因型病毒株之中和效價確有所差異，我們計畫進一步以此原型疫苗對現有可取得之腸病毒病毒株進行中和篩選，除釐清本疫苗株與不同基因群腸病毒 71 型之間的關連性，並篩選出第二候選疫苗株，評估未來發展多價基因型疫苗之需求性。

# 材 料 與 方 法

## 一、細胞和病毒的培養

### 1、細胞株的培養

Vero 細胞培養在含 4% 胎牛血清之 M199 培養基，溫度 37 含 5% CO<sub>2</sub> 之培養箱中。

### 2、病毒的培養

以  $2 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub> 的腸病毒 71 型感染 vero 細胞作病毒的繁殖，感染時培養液中胎牛血清的含量下降至 1%。

### 3、病毒的收取

收集培養基中之培養液，以 3000rpm，30 分鐘的操作條件去除細胞碎屑。

### 4、病毒的定量 - TCID<sub>50</sub>

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 TCID<sub>50</sub> 的效價。

## 二、病毒之純化

### 1. 微過濾法 ( microfiltration )

利用拋棄式過濾膜 ( 膜孔徑分別為 1.2 $\mu$ m 與 0.45 $\mu$ m )，幫浦 ( WAT - SON MARLOW 505S ) 以 90 rpm 運轉，初步分離細胞及病毒。

### 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), 濃縮病毒及清除病毒雜質液。

經過濃縮之病毒液一面搖動一面加入適量之 Benzonase 與  $MgCl_2$ , 於  $4^{\circ}C$  作用約 24 小時, 然後進行下列純化步驟。

### 3. 液相層析法

以 pharmacia AKTA Aexphorer FPLC 系統：

- a. 配合 Sepharose Fast Flow 之 BPG100 管柱, 於 1/75M 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。
- b. 配合 DEAE sepharose Fast Flow 凝膠管柱, 於 0.1M Tris 緩衝溶液 pH 8.5-9.0 中將病毒液通過管柱, 並設定 0 - 100 之鹽梯度進行沖洗, 收集波長 280nm 下之吸收峰。

## 三、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  $50\mu m$ , 至入 96 孔微量盤中, 加入 Bradford reagent  $150\mu m$ , 震盪 30 秒, 於波長 595nm 測定其吸光值。

### 2. 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。

### 3. 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 30 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% Tween80/PBS 清洗三次來清除未結合之抗體。加入適當稀釋之 AP - 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。將適量之 TMB 呈色劑倒於纖維膜上，震盪 5 - 10 分鐘，待其呈色後以去離子水洗淨纖維膜上之殘液，照相做成紀錄檔。

#### 4. 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 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 20 分鐘，以 ELISA 吸光儀 (Molecular Device, SPECTRA MAX 340pc) 讀取波長 450nm 及 650nm 吸收值。

#### 5. DNA 含量的測定

檢體於 55 先以 proteinase K 消化處理，然後再利用 Molecular Devices, Menlo Park, CA 生產之 Threshold analysis 來測定 DNA 的含量，靈敏度可達 pg 範圍。

#### 6. Benzonase 含量之測定

利用 Merck kGaA 生產之 Benzonase ELISA kit 分析 Benzonase 殘留量，靈敏度可 0.2 ng/ml。

### 四、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，於 4 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。

## 五、疫苗效價的測定

### 1. 動物免疫之操作

取 12-15 克的小白鼠，每週先以心臟抽血 10 隻 ICR 小鼠，在抽血過後各在第 1 和 4 週以腹腔免疫老鼠共 2 次，而繼續在每星期採血直到實驗結束，每次採血後將採到的血混合，離心取上清液，以 56 不活化血清 30 分鐘，保存於-20 。

### 2. 病毒抗體中和試驗

先將欲測試的血清檢體系列稀釋，並與 100 個 TCID<sub>50</sub> 的病毒混合。在 37 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。

### 3. 抗體檢測--酵素連結免疫反應

先黏覆純化之白兔抗腸病毒 71 型病毒 IgG 於 96 孔微量滴定盤上，4°C 隔夜反應。實驗前使用 ELISA 清洗儀，清除未黏覆之抗體，之後加入純化之腸病毒 71 型病毒，37°C 反應二小時後，再加入適當稀釋之待測或對照組抗腸病毒 71 型病毒抗體樣品，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(或 rabbit)馬山葵過氧化酵素複合體，於 37°C 反應 30 分鐘。清洗後，在每孔中加入 100μLOPD(o - 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 , SPECTRA MAX 340pc ) 讀取波長 450nm 及 650nm 吸收值。

## 六、批次疫苗中和試驗

批次純化之病毒經福馬林去活化後，稀釋成 200 OD<sub>450</sub>/ml、50 OD<sub>450</sub>/ml、25 OD<sub>450</sub>/ml、12.5 OD<sub>450</sub>/ml、6.25 OD<sub>450</sub>/ml 等五個免疫劑量，各在第一與第三週免疫小老鼠，第四週採血。每次採血後將採到的血混合，離心取血清，將血清做中和試驗測其抗體力價。而兔子免疫部分則採靜脈注射及皮下注射，於第一、三、五週免疫，第一、三、四、五、六週耳朵採血。免疫用的原型疫苗原始抗原 ELISA 力價為 288 OD/mL。因佐劑 AlPO<sub>4</sub> 不宜從靜脈免疫，故 A 組未加佐劑，每次免疫 4 mL；B 組則添加佐劑，考量佐劑增幅效應，免疫量減半為 2 mL。

## 七、安定性試驗

以腸病毒 71 型原型疫苗量產批次及內部參考標準品為樣品，依安定性試驗之指導原則取樣至少需四點以上，為儘可能收集完整資訊，故設定取樣時間點為 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12 個月。樣品貯存於 4℃，以酵素連超結免疫分析法(ELISA)進行效價測試。

## 八、安全性試驗之異常毒性試驗

本安全性試驗的主要目標，乃為證實細胞培養腸病毒 71 型疫苗及所使用之佐劑於免疫後，在此期間不會對試驗動物造成死亡或呈現任何異常症狀，且體重維持正常。實驗的作法是將 ICR 小鼠分成 6 組，每組各有 6 隻(公鼠母鼠各 3 隻)，每隻小鼠的體

重介於 12-14 公克，實驗組以腹腔注射 ( intraperitoneally, IP ) 方式施打五個免疫劑量 ( 100、50、25、12.5、6.25 OD<sub>450</sub>/ mL ) 之腸病毒 71 型病毒液，對照組則施打 saline，每天量體重，觀察 19 天。

## 結 果

一、利用病毒力價、單位蛋白質抗原含量、ELISA OD 值、蛋白質含量、純度、回收率等指標，確認各批次原型疫苗產程一致性：

目前使用本中心先前已建立之病毒試量產及膠體層析純化系統，實際執行 20 批次以上的腸病毒 71 型原型疫苗生產，依據產程步驟不同分析其一致性如下：( 1 ) 病毒量產收穫：病毒於接種後第 5 天達到最高力價，所以收穫日(第 5 天)之病毒毒力 TCID<sub>50</sub> ( 9 批 ) 維持在  $10^{7.7\pm 0.45}$ /ml (見圖 1A)，而單位蛋白質所含抗原量雖然是第 6 或 7 天達到最高，但因其相對病毒力價確降低且愈晚收集病毒細胞破裂愈多，會影響後續純化步驟，所以病毒收穫仍以第五日為標準，ELISA OD 值 ( 9 批 ) 約為  $0.57\pm 0.03$  ( 見圖 1B )；( 2 ) 病毒濃縮：利用切向流過濾進行病毒濃縮，以 ELISA OD 值測定 9 個批次濃縮液回收率，平均為 91%(圖 2 )；( 3 ) 病毒純化：病毒經純化後以 LC#3 及 LC#4 fraction 之病毒力價及單位蛋白質抗原量(OD/ug)皆最高(圖 3)，兩者合計之抗原回收率在 45 % 以上(表 1)；進一步進行純化產物純度及抗原專一性分析( SDS- PAGE、Western blot )，結果亦可印證純化產物 LC#3 及 LC#4 fraction 的抗原專一性比其他 fraction 高(圖 4)；另外就各批次的純化圖譜進行比較( 16 批次)，批次間的差異性也不大(見圖

5) , 所以證明純化系統具一致性。各量產批次最終純化產物 ( LC#3+LC#4 )之蛋白質平均濃度約為 17 ug/ mL 左右 , 回收率約在 46% (圖 2 及表 1) , 而單位蛋白質抗原 ELISA 效價( $OD_{450} /ug$ ) , 皆可達 15 以上(原始病毒液  $OD_{450} /ug < 1.0$ )(圖 6) , 所以純化倍數約為 30 倍。

## 二、添加物核酸分解酵素(Benzonase)的殘留量測定與確認：

為檢測純化圖譜(圖 2)中後段之小吸收峰(文字方塊處) , 是否為殘留核酸分解酵素(Benzonase)所產生的位置 , 我們將其收集後與純化產物一起進行核酸分解酵素殘留量測試 , 結果顯示 , 純化產物(LC#3 及#4)的核酸分解酵素殘留量低於可偵測範圍( $< 0.2 \text{ ng/mL}$ ) , 而該小吸收峰之殘留量為  $1.77 \text{ ng/ mL}$  , 應為核酸分解酵素析出位置無誤(表 2)。

## 三、利用無血清培養病毒可行性評估：

另外為延續去年無血清培養基的應用 , 使用三種不同廠牌之無血清培養基 , 接種  $MOI=10^{-2}$  病毒 , 實驗結果顯示三種無血清培養基和含血清培養基在第四天收穫之病毒力價皆為  $10^{7.1 \pm 0.25} / \text{mL}$  , 並無明顯差異 ; 但在抗原量方面 , 含血清培養基培養病毒之 ELISA OD 值為 0.71 , 而其他三種無血清培養基(SF1、SF2、及 SF3) 培養之病毒分別為 0.26、0.33 及 0.25 , 相較之下 , 有大約 2 3 倍的差異 ( 見圖 7 )。

## 四、執行小鼠及兔子動物試驗與血清抗體中和效價分析：

以肌肉、腹腔及皮下等注射方式免疫老鼠 50 ELISA OD 之原型疫苗 , 結果顯示以腹腔注射老鼠產生的中和抗體的免疫效應最好。所以連續量產批次純化產物 , 依 ELISA 檢測出之抗原量 , 進行不同免疫劑量之小鼠動物試驗皆以腹腔注射為主 , 並分析其抗血清中和效價。由表 3 中可得知純化產物 LC#3 及 LC#4 皆有良好的免疫產生性 , 所得抗血清

抗體中和效價與免疫劑量呈現正相關。

另外比較 10 組(5 批次)腸病毒 71 型不活化原型疫苗小鼠免疫中和抗體實驗，免疫劑量分別為 12.5、25、50 ELISA OD，結果顯示，與之前的實驗結果相似，每批原型疫苗 50 ELISA OD 抗原的免疫劑量皆可產生大於 1:40 以上之中和效價(圖 8)。而在兔子免疫試驗中，以靜脈注射約 1000 ELISA OD 之不活化原型疫苗可在第三週測得 1:10000 以上之血清中和抗體效價，而到第六週更高達 1:20000 以上；而減半免疫劑量(500 ELISA OD)之皮下注射免疫，所誘發之血清中和抗體效價第三週可達 1:2000 以上，至第六週也增高至 1:5000 以上(表 4)。

#### 五、執行腸病毒 71 型原型疫苗安定性試驗：

已選擇適當之量產批次純化產物及內部標準品進行安定性試驗，所有的檢體實際儲存溫度為 4℃，經過 90 天後，在同樣的稀釋倍數下，以抗原含量(ELISA OD)變化為指標，目前所得測試結果並未有明顯的變化(圖 9)，而以統計方式分析數據，可發現以 018LC 此一標準品之數據偏係數(CV%)為 8.79，在三種標準品中最低，故較具可信賴性。另外亦進行 10 個量產批次以上之安定性前期試驗，在相同稀釋倍數下，所得結果亦顯示原型疫苗抗原效價經過 120 天以上儲存後，並未出現明顯下降情形(表 5)。

#### 六、執行腸病毒 71 型原型疫苗異常毒性試驗：

實驗中將 ICR 小鼠分成 6 組(3 批次，公母)，分別以腹腔注射 (IP) 方式施打五個免疫劑量 (100、50、25、12.5、6.25 OD<sub>450</sub>/mL) 之腸病毒 71 型不活化病毒液，對照組則施打 saline，每天量體重，所得之結果，初步顯示免疫不同劑量的原型疫苗，ICR 小鼠無論公母，體重皆呈

上揚趨勢(圖 10), 因此證明目前的原型疫苗對於小鼠不具傷害性, 安全性是無虞的。

#### 七、疫苗株之交叉保護性研究及病毒株篩選：

為了解疫苗株交叉保護效應並為篩選第二疫苗候選株做準備, 我們準備腸病毒 71 型原型疫苗於 ICR 小鼠產生之免疫抗體, 針對自 1998 至 2005 年之 38 株腸病毒 71 型分離株及 BrCr 病毒株共 39 株進行中和抗體交叉試驗, 結果顯示中和效價達 1:40 以上佔 15 株 (38.46%), 中和效價介於 1:10~1:40 間佔 7 株(17.95%), 中和效價低於 1:10 佔 17 株 (43.59%)。利用基因序列分析結果發現, 中和效價低於 1:10 的 17 株腸病毒中, 4 株是 2003 年以前分離出來的; 13 株是 2004 年後分離出來, 而且型別均屬於 C4 genotype。整體而言, 原型疫苗免疫抗體對 2004 及 2005 的 C4 genotype 病毒株之中和效價皆低於 1:40 (表 6)。

為了解 C4 genotype 與疫苗株是否有不同抗原決定位置, 我們另外針對 C4 genotype 與疫苗株免疫的抗血清做 ELISA 交叉實驗, 結果顯示疫苗株抗血清對於 C4 genotype 的 binding 效果低於疫苗株本身之辨識 (<1.00)(表 7); 同時我們亦利用 VP1 單株抗體進行 Western blot 分析實驗, 結果顯示對於大部分 C4 genotype 仍具辨識效果(圖 11)。目前已篩選出一支屬於 C4 genotype 的疫苗候選株 E36, 靜脈接種活病毒於兔子的初步結果顯示, 其所產生之抗體針對 39 株腸病毒 71 型分離株所得的中和效價皆高於之前篩選出的原型疫苗株 E59 (見表 8)。

#### 八、標準品製備(超高速離心)

除了利用已建立之產程所生產之原型疫苗當做每次批次量產的參照標準品外, 目前亦嘗試利用超高速離心方式製備腸病毒疫苗標準品,

在 43000rpm, 4.5hrs 的操作條件下，收集 ELISA OD 值高的病毒液，發現病毒液集中於糖濃度為 31-33%之間(圖 12)，再與其他批次純化產物一齊進行 SDS-PAGE 及 Western blotting 分析試驗，結果顯示和標準產程生產之原型疫苗圖譜相似(圖 13)。

## 九、分析方法確效

ELISA 檢測抗原系統為產程監測的一項重要工具，為驗證其所測量數據的精密度和準確性，所以利用內部標準品進行 12 組以上的 ELISA 檢測系統線性分析及範圍測試，所得回歸係數  $r^2$  皆大於 0.98，呈線性之 OD 值範圍在 0.2-0.9 之間(變異係數  $CV < 10\%$ )(圖 14)。而綜合 12 組數據所求得之公式，線性回歸係數  $r^2 = 0.9583$ ，進行 100 點以上的內部標準品精密度測試，代入公式換算後所得結果，變異係數  $CV < 11\%$  (圖 15)，符合生物性檢測方法之線性回歸係數  $r^2 > 0.95$ ，變異係數  $CV < 15\%$  之確效標準。

## 討 論

在先前的研究中，疫苗中心在腸病毒 71 型疫苗製程的開發以及檢驗系統的建立上，已獲得了初步的成果。分析各量產批次純化程式進行所得液相層析圖譜之吸收峰可得知，時間軸點幾乎相同，由此可知純化管柱之操作具有高度之一致性和穩定性。而進一步分析腸病毒 71 型原型疫苗量產批次之超過濾濃縮中間產物及液相層析最終產物趨勢，可發現兩者之間的高度相關，而回收率分別為  $91 \pm 20\%$  及  $46 \pm 15\%$ ；而最終產物之每 ug 蛋白質抗原量為  $19 \pm 20\%$  ELISA OD，為病毒收獲原液(約 0.5 ELISA OD/ug)之 30 倍以上，顯示目前之產程具有穩定性、再現性及高效率的純化表現。

ELISA 檢測系統分析是我們產程監測的一項重要工具，我們利用自

製的標準品進行分析方法確效，證實整個檢測系統的穩定與精密性( $r^2 > 0.95$ ， $CV < 11\%$ ，ELISA OD 值範圍為 0.2~0.9)，更堅信檢測系統能提供今後原型疫苗產品的品質檢測優良指標。

在無血清培養基的應用上，由於無血清缺少足夠的細胞貼壁因子，因此對於細胞貼壁能力較慢且不佳；就病毒生長之病毒力價及抗原量結果顯示雖然無血清培養基對病毒生長並未優於含血清培養基，使用無血清培養基是未來疫苗研發的趨勢，所以在培養基品質穩定性、病毒濃縮、純化及保存方面仍待進行探討，不可排除其發展的潛力。目前進行測試的無血清培養基包含國內外各家廠牌，由於國外公司其培養基配方無法配合本中心需求進行調整，因此考慮與國內公司合作，可配合本中心試驗結果進行配方修改，以達到無血清配養基的最適條件，進而提高病毒力價。

另外我們以批次量產純化產物進行了一系列的小鼠免疫試驗，並以抗原 ELISA OD 值做為免疫劑量的參考依據，結果顯示各批次免疫劑量為 200 OD<sub>450</sub>/mL 者，其產生的中和抗體力價皆可高於 1:100，故可驗證原型疫苗生產批次之穩定性，若訂定中和抗體力價在 1:40 以上為一個標準值，則以抗原免疫劑量為 50 OD<sub>450</sub>/ mL，或疫苗原液蛋白質含量為 5ug / mL 以上時為佳，此點可做為未來臨床試驗免疫劑量的參考依據。而在兔子的免疫試驗顯示，無論以皮下或靜脈注射方式免疫，所產生之血清，皆可產生 1:5000 以上之中和抗體效價。

在執行腸病毒 71 型原型疫苗安定性試驗方面，內部標準品及量產批次產物，以實際儲存溫度 4 進行安定性比較，目前試驗所得的抗原含量變化趨勢並不明顯，可以確知的是經過 90 天後 抗原效價並未有明顯的下降，是否能維持更長時間，尚需累積更多數據以得到結論。而在 10 個量產批次之安定性前期試驗中，已進行較長時間試驗(超過 120 天)的部分批次所得測

試結果，抗原效價也並未有明顯的下降，能呼應上述的論點。

由於在 39 株腸病毒分離株中，目前原型疫苗株所產生之小鼠抗血清中和效價可達 1:40 以上只佔 15 株( 38.46.% )，而 2004、2005 年的 C4 genotype 病毒則低於 1:40，此結果不甚理想。原先認為 C4 type 病毒易產生聚集 (aggregation) 而造成實際免疫抗原量的不足，無法誘發足夠的保護抗體，或病毒不易被抗體中和而造成誤判，所以我們事先使用氯仿及 EDTA 進行疫苗原液及中和試驗感染病毒液之前處理，但仍無法解決對 C4 type 無法產生中和效價的問題(數據未列出)。另外我們亦發現以疫苗株活毒靜脈免疫兔子產生之抗血清，卻對 C4 病毒株具高中和效價，初步認為可能是福馬林不活化病毒時改變了病毒抗原決定位置的原始結構，所以誘發抗體無法中和 C4。故參考研究檢驗中心病毒實驗室的做法以 UV 光進行疫苗株病毒不活化。但目前所得實驗結果顯示不僅 ELISA 所測得之抗原量易下降，免疫後血清之中和效價(對疫苗株本身)亦較福馬林不活化的免疫結果為低，故仍待進一步實驗釐清原因何在。另外依據研究檢驗中心病毒實驗室的實驗結果，感染腸病毒 71 型( B4 type ) 癒後病人的血清對所有 C4 type 病毒皆具 1:10 以上之中和效價，此結果與小鼠免疫血清抗體具選擇性的中和效果不同，故其中的差異是否因物種不同造成，亦尚需進一步探討與釐清。如果我們的疫苗株真的無法中和 C4 genotype，我們解決之道就是仿照 polio 疫苗，含有二種以上不同型別病毒的想法，積極尋找出具潛力的第二疫苗候選株，但仍然需在病毒不活化條件及動物免疫上進行改良，以提高原型疫苗之保護效果。

綜合上述，我們開發之腸病毒 71 型原型疫苗生產製程，包含：病毒培養、濃縮、純化及不活化等已具有批次試量產製程的穩定性和一致性，免疫後之抗體中和效價亦呈現相對的穩定性。明年將挑選第二候選疫苗株，

循 polio 多價疫苗模式以提高疫苗保護效果，而在腸病毒 71 型原型疫苗安定性試驗、安全性試驗(異常毒性試驗)方面都有了初步的成果，我們也努力朝下一階段完成臨床前試驗的目標邁進。

## 參 考 文 獻

- Choi Y, Ahn CJ, Seong KM, Jung MY, Ahn BY. (2003). Inactivated Hantaan virus vaccine derived from suspension culture of Vero cells. *Vaccine*. May 16;21(17-18):1867-73
- 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
- Ho M. Enterovirus 71: the virus, its infections and outbreaks. (2000). *J Microbiol Immunol Infect* Dec 33(4):205-16
- Ho, M., Chen, E. R., Hsu, K. H., Twu, S. J., Chen, K. T., Tsai, S. F., Wang, J. R., and Shih, S. R. (1999). An epidemic of enterovirus 71 infection in Taiwan. Taiwan. Taiwan Enterovirus Epidemic Working Group. *N Engl J Med* 341, 929-935.
- Kuo, H.S. et al. 2005. Communicable Diseases of Interest to the Public: Enterovirus. Center for Disease Control, Taiwan, 2005 Annual Report, 53-55
- 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.
- Maranga L, Rueda P, Antonis AF, Vela C, Langeveld JP, Casal JI, Carrondo MJ. (2002). Large scale production and downstream processing of a recombinant porcine parvovirus vaccine. *Appl Microbiol Biotechnol*. Jun;59(1):45-50.

- Mendonca RZ, Ioshimoto LM, Mendonca RM, De-Franco M, Valentini EJ, Becak W, Raw I, Pereira CA. Preparation of human rabies vaccine in VERO cell culture using a microcarrier system. *Braz J Med Biol Res.* 1993 Dec;26(12):1305-17.
- Wang JR, Tuan YC, Tsai HP, Yan JJ, Liu CC, Su IJ. (2002). Change of major genotype of enterovirus 71 in outbreaks of hand-foot-and-mouth disease in Taiwan between 1998 and 2000. *J Clin Microbiol.* Jan 40(1):10-5
- Wang, S. M., Liu, C. C., Tseng, H. W., Wang, J. R., Huang, C. C., Chen, Y. J., Yang, Y. J., Lin, S. J., and Yeh, T. F. (1999). Clinical spectrum of enterovirus 71 infection in children in southern Taiwan, with an emphasis on neurological complications. *Clin Infect Dis* 29, 184-90.
- Wickramasinghe, S.R., B. Kalbfus, A. Zimmermann, V. Thom, U. Reich.(2005). Tangential Flow Microfiltration and Ultrafiltration for Human Influenza A Virus Concentration and Purification. *Biotechnology and Bioengineering,* 92(2), 199-208.
- Wong, K. T., Chua, K. B., and Lam, S. K. (1999). Immunohistochemical detection of infected neurons as a rapid diagnosis of enterovirus 71 encephalomyelitis [letter]. *Ann Neurol* 45,271-2.
- Wu, T. N. Tsai, S. F., Li, S. F., Lee, T. F., Huang, T. M., Wang, M. L., Hsu, K. H., and Shen, C.Y. (1999). Sentinel surveillance for enterovirus 71, Taiwan, 1998. *Emerg Infect Dis* 5, 458-60.
- Van Reis R, Zydney A. (2001). Membrane separations in biotechnology. *Curr Opin Biotechnol.* Apr;12(2):208-11.
- Yoon, S.K., Hwang, S.O., Lee, G.M.(2004), Enhancing effect of low culture temperature on specific antibody productivity of recombinant Chinese hamster ovary cells: clonal variation. *Biotechnol Prog.* 20(6):1683-1638.

## 圖 表

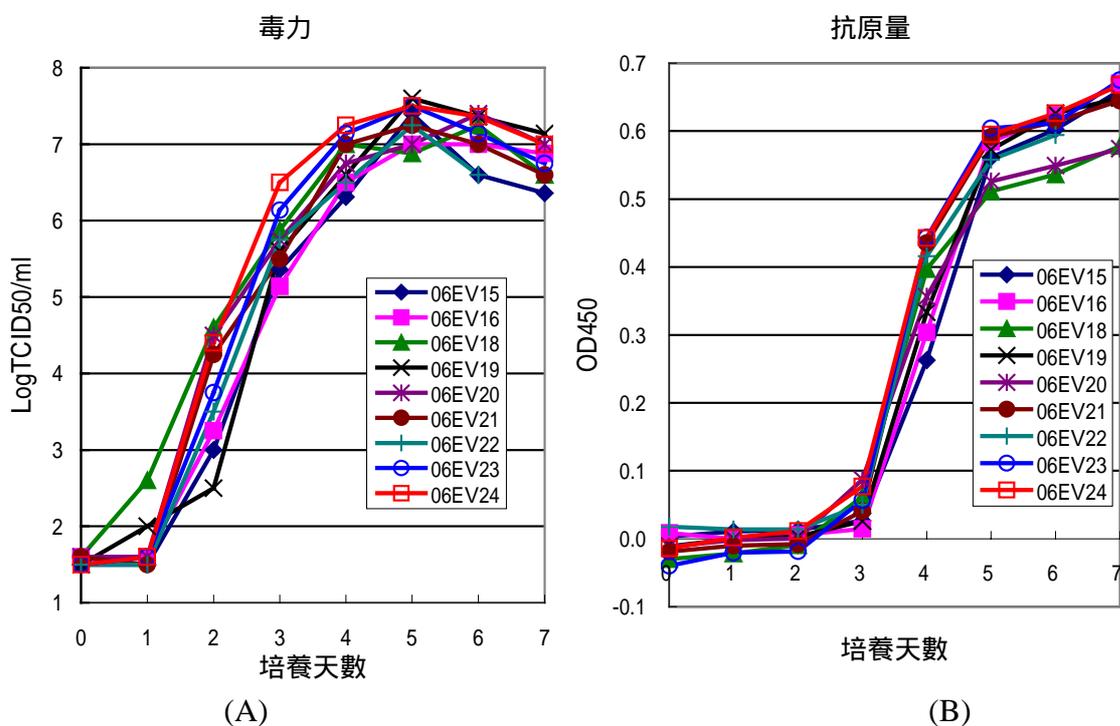


圖 1、病毒生長之病毒力價及抗原量監測(列出九批)：(A)病毒毒力 (B)抗原量

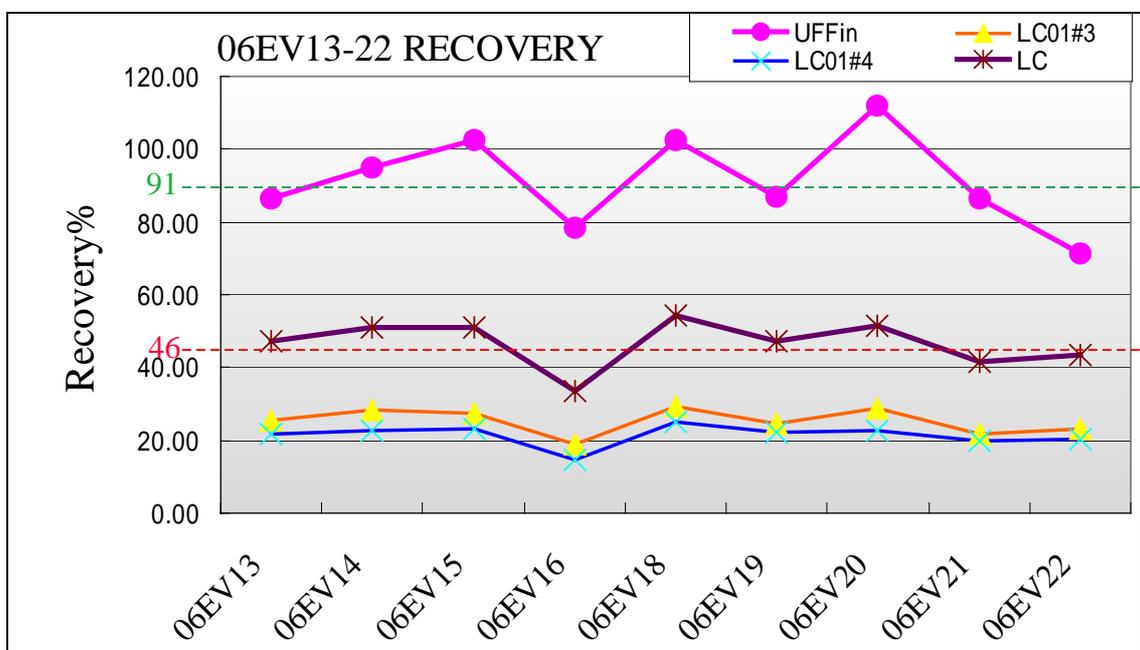


圖 2. 9 個批次量產純化階段產物 ELISA 抗原回收率比較，與病毒收獲原液相較，經切向流過濾之濃縮液回收率約為 91%，而最終液相層析產物之回收率為 46%

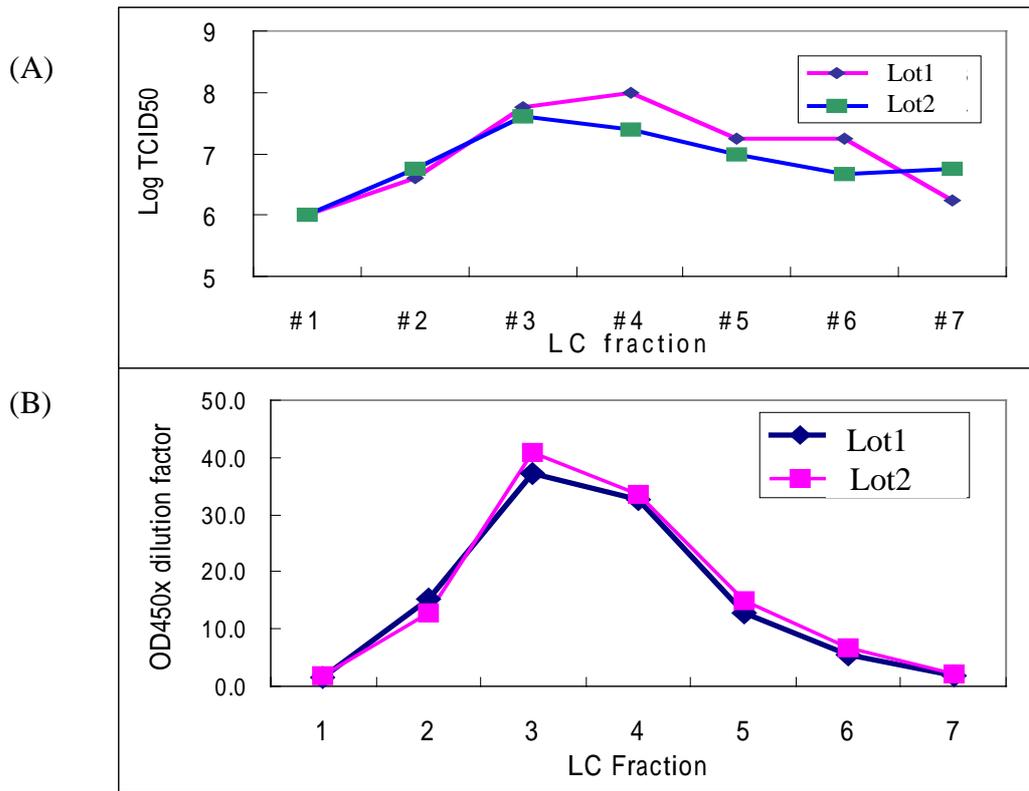


圖 3 量產純化產物毒力及 ELISA 效價比較 (A). LC#1~7(病毒層析純化收集液#1-7) 之病毒毒力(TCID<sub>50</sub>)。 (B). 病毒層析純化收集液(LC)#1-7 之抗原 ELISA 效價。

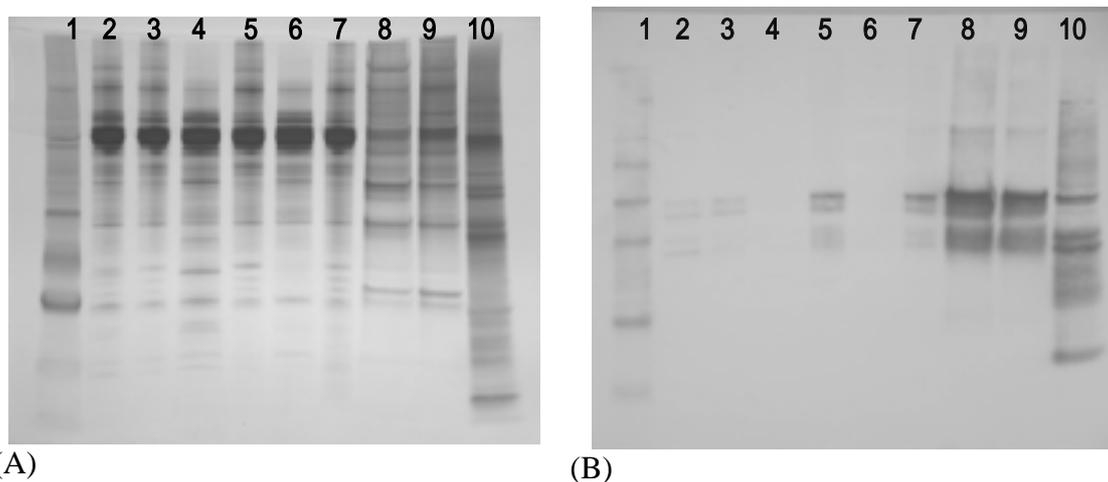


圖 4 批力量產各階段產物分析(A)SDS-PAGE ;(B) Western blotting: 1. marker, 2. ori ,3. uf, 4.ufw, 5.ufdi, 6.ufdiw, 7.fin, 8. lc#3, 9.lc#4, 10.positive control

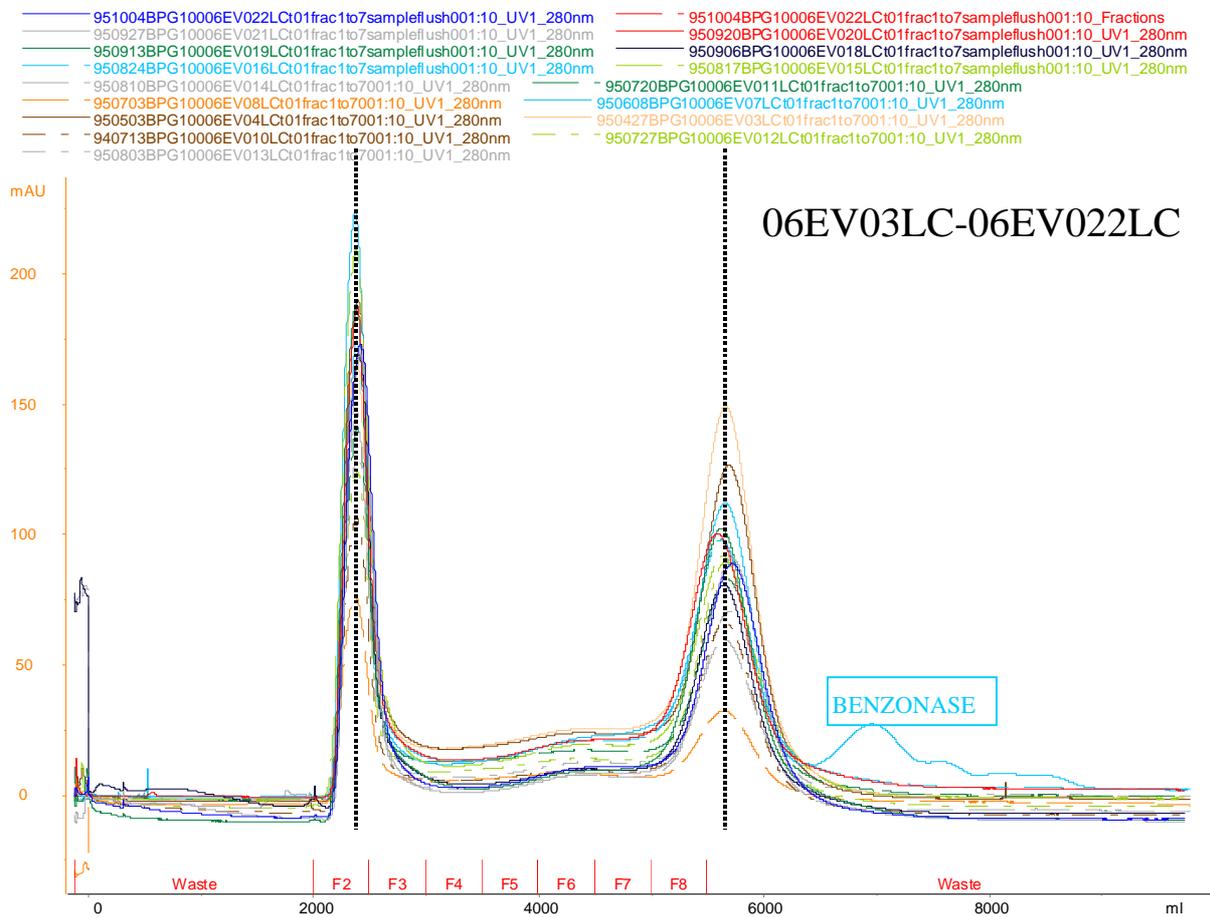


圖 5. 16 個量產批次純化層析圖譜分析。由圖中之兩個吸收峰之相對位置，可發現液相層析純化程序具有高度一致性和穩定性。

表 1.9 個量產批次純化階段產物品比較。

批次	產物	稀釋倍數	OD平均值	stdev	蛋白質濃度	原始濃度(ug/mL)	OD/ug	OD/mL	Volume	Total OD	Recovery %	purify coefficient	purify fold
	Ori	40	0.512	0.016	14.28	571.11	0.36	204.7	10000	2047423	--	--	--
06EV13	UFFin	400	0.515	0.004	7.50	3001.14	0.69	2059.7	860	1771363	86.52	0.87	1.91
	LC01#3	80	0.380	0.012	0.25	19.69	15.42	303.7	1720	522400	25.51	0.29	43.02
	LC01#4	80	0.321	0.024	0.43	34.66	7.40	256.7	1720	441471	21.56	0.25	20.65
	LC									963871	47.08		
	Ori	40	0.478	0.010	12.30	492.18	0.39	191.0	10000	1910217	--	--	--
06EV14	UFFin	800	0.324	0.014	1.60	1282.89	2.02	2595.5	700	1816880	95.11	0.95	5.21
	LC01#3	80	0.485	0.035	0.21	16.88	22.99	388.0	1400	543212	28.44	0.30	59.24
	LC01#4	80	0.385	0.011	0.31	24.82	12.42	308.3	1400	431671	22.60	0.24	32.01
	LC									974883	51.04		
	Ori	40	0.610	0.013	13.36	534.28	0.46	244.1	10000	2440952	--	--	--
06EV15	UFFin	800	0.391	0.031	3.78	3023.45	1.04	3131.4	800	2505136	102.63	1.03	2.27
	LC01#3	80	0.526	0.009	0.31	25.05	16.78	420.5	1600	672821	27.56	0.27	36.74
	LC01#4	80	0.446	0.025	0.46	36.55	9.76	356.6	1600	570581	23.38	0.23	21.36
	LC									1243402	50.94		
	Ori	80	0.323	0.020	6.71	537.04	0.48	258.8	10000	2587788	--	--	--
06EV16	UFFin	800	0.353	0.032	3.45	2760.39	1.02	2826.3	720	2034940	78.64	0.79	2.12
	LC01#3	80	0.425	0.018	0.27	21.69	15.68	340.1	1440	489696	18.92	0.24	32.53
	LC01#4	80	0.329	0.022	0.33	26.70	9.87	263.6	1440	379562	14.67	0.19	20.49
	LC									869258	33.59		
	Ori	40	0.561	0.017	13.56	542.30	0.41	224.5	10000	2245202	--	--	--
06EV18	UFFin	800	0.360	0.025	3.69	2951.35	0.98	2882.2	800	2305723	102.70	1.03	2.36
	LC01#3	80	0.512	0.017	0.24	19.32	21.18	409.3	1600	654858	29.17	0.28	51.16
	LC01#4	80	0.442	0.025	0.40	32.30	10.95	353.8	1600	566082	25.21	0.25	26.45
	LC									1220940	54.38		
	Ori	40	0.588	0.019	13.97	558.95	0.42	235.1	10000	2350671	--	--	--
06EV19	UFFin	800	0.354	0.006	4.43	3547.62	0.80	2831.1	720	2038415	86.72	0.87	1.90
	LC01#3	80	0.506	0.024	0.23	18.59	21.77	404.8	1440	582948	24.80	0.29	51.77
	LC01#4	80	0.454	0.046	0.34	27.43	13.25	363.6	1440	523525	22.27	0.26	31.52
	LC									1106473	47.07		
	Ori	40	0.513	0.023	13.36	534.28	0.38	205.4	10000	2053928	--	--	--
06EV20	UFFin	800	0.399	0.037	3.78	3023.45	1.06	3193.8	720	2299559	111.96	1.12	2.75
	LC01#3	80	0.514	0.023	0.31	25.05	16.40	410.9	1440	591723	28.81	0.26	42.67
	LC01#4	80	0.406	0.027	0.46	36.55	8.88	324.6	1440	467465	22.76	0.20	23.10
	LC									1059188	51.57		
	Ori	80	0.349	0.014	7.27	581.22	0.48	279.3	10000	2793413	--	--	--
06EV21	UFFin	800	0.419	0.024	4.38	3505.99	0.96	3348.3	720	2410759	86.30	0.86	1.99
	LC01#3	80	0.528	0.018	0.27	21.69	19.48	422.6	1440	608506	21.78	0.25	40.53
	LC01#4	80	0.483	0.029	0.40	31.84	12.15	386.7	1440	556903	19.94	0.23	25.28
	LC									1165409	41.72		
	Ori	80	0.343	0.022	6.16	493.02	0.56	274.6	10000	2746079	--	--	--
06EV22	UFFin	800	0.327	0.022	3.51	2804.28	0.93	2619.7	750	1964754	71.55	0.72	1.68
	LC01#3	80	0.532	0.014	0.24	19.47	21.86	425.7	1500	638487	23.25	0.32	39.24
	LC01#4	80	0.466	0.025	0.36	28.50	13.08	372.8	1500	559125	20.36	0.28	23.48
	LC									1197612	43.61		

\*Ori 為病毒收獲原液；UFFin 為病毒濃縮液；LC#3、LC#4 為分液收集；LC 為 LC#3+LC#4

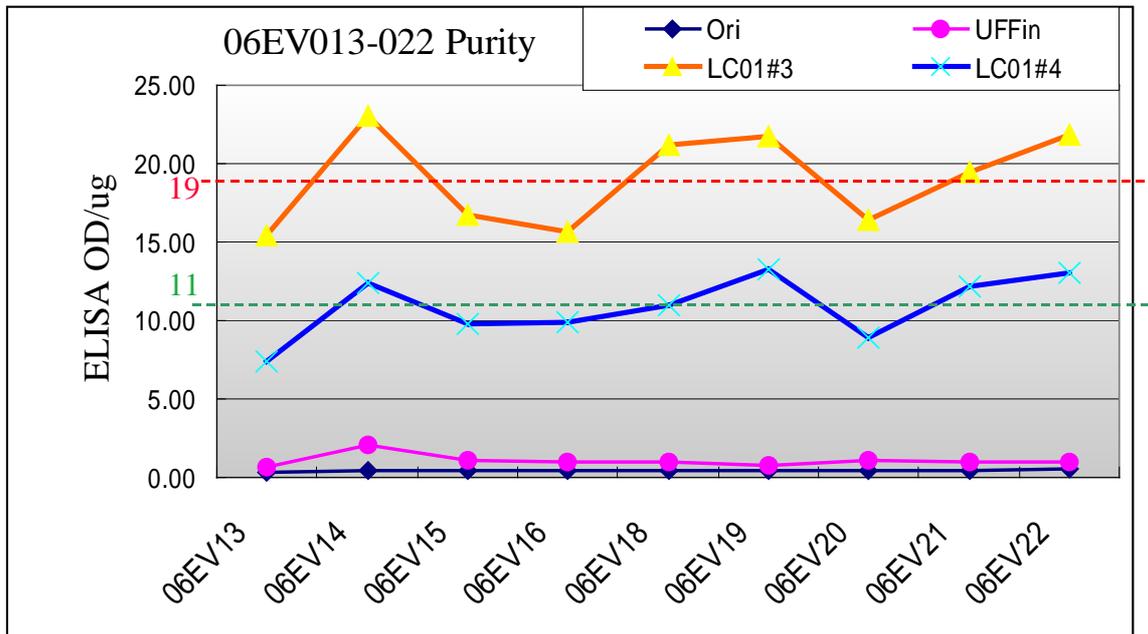


圖 6. 9 個量產批次純化階段產物單位效價比較。最終純化產物(LC#3)之每 ug 單位抗原量為 19±20% ELISA OD, 高於病毒收獲原液(Ori)(約 0.5 ELISA OD/ug)30 倍以上。

表 2 .核酸分解酵素(benzonase)殘留量測試。

Benzonase(ng/mL)	
UF	<0.1
UF+B	67.38
LC#3	<0.1
LC#4	<0.1
LC#B	1.77

\*B: Benzonase

\*\* The detection limit: 0.2ng/ml

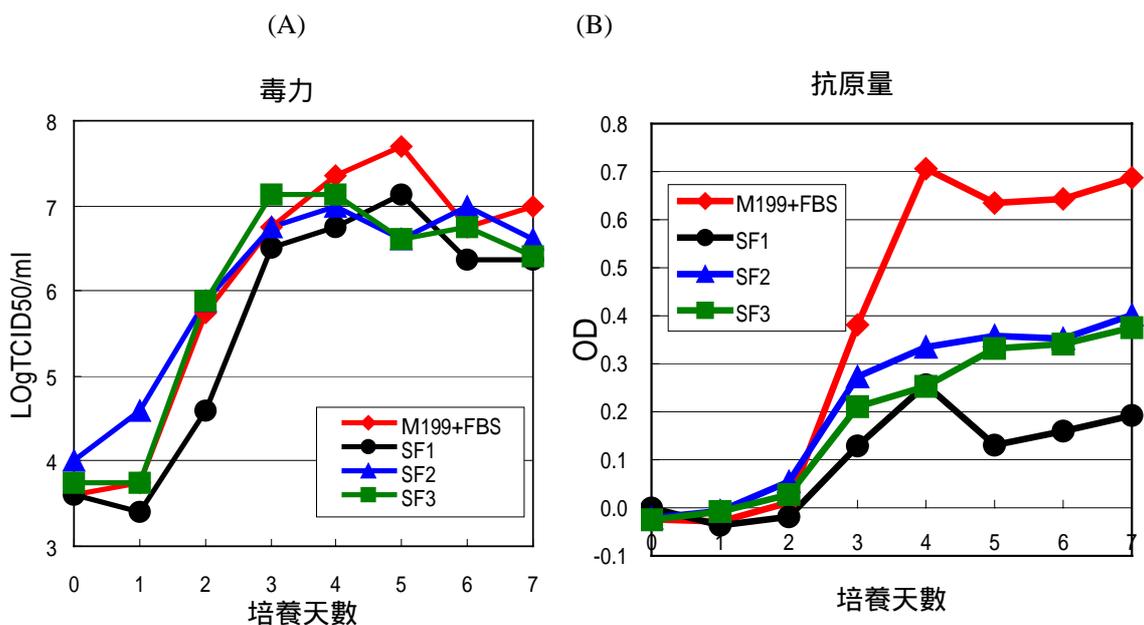


圖 7、比較含血清培養基及三種無血清培養基之病毒生長曲線。

(A)病毒毒力 (B)抗原量

表 3.純化產物 LC#3& #4 免疫效價比較。

病毒批次	病毒力價 (LogTCID50/ml) LC#3 / LC#4	ELISA unit (OD450/ml)	中和效價 (IP)			
			LC#3		LC#4	
			Lc01(shaker)	Lc02( rest)	Lc01(shaker)	Lc02( rest)
1	7.66 / 7.66	200	1258.90	1548.80	1496.20	954.99
		50	446.68	468.81	446.68	749.89
			IM 316.22			
			IP 391.74			
		SC 172.18				
25	112.20	239.88	512.86	492.03		
12.5	94.40	194.98	104.70	266.07		
6.25	73.11	79.40	239.88	66.83		
2	7.25 / 7.25	200	1059.20	1059.20	1258.90	1659.60
		50	343.56	375.80	1496.20	891.25
		25	133.35	133.35	223.87	208.90
		12.5	120.22	60.25	158.48	223.87
		6.25	61.94	33.49	66.83	28.18
3	7.125 / 7.195	200	580.76	699.84	1135.00	749.89
		50	285.10	266.07	512.86	512.86
		25	60.25	133.35	133.35	133.35
		12.5	56.23	52.48	169.79	123.59
		6.25	30.19	18.36	7.58	88.1

IM:肌肉 IP:腹腔

SC:皮下

\* shaker:震盪不活化 30 天 ; rest:靜置不活化 30 天。

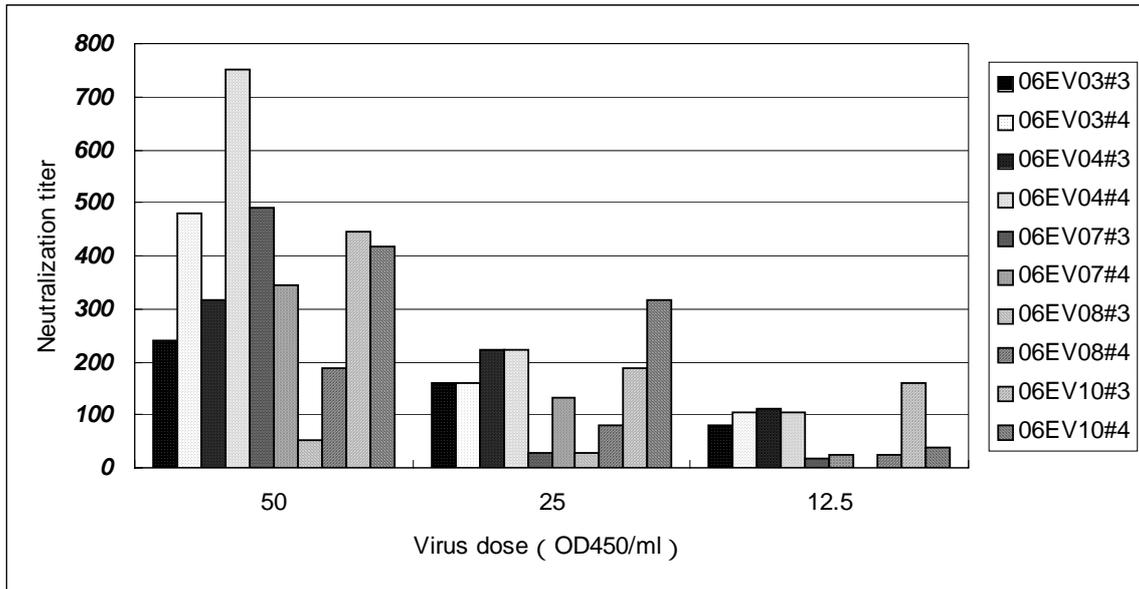


圖 8. 量產批次不活化小鼠免疫試驗，免疫劑量為 50 ELISA OD 時，所得血清可產生 1:40 以上的抗體中和效價。

表 4. 量產批次原型疫苗兔子免疫試驗中和效價。

代號	兔子免疫血清抗體中和效價					Immunized path
	第一週	第三週	第四週	第五週	第六週	
<b>A</b>	<10	266	13277	5036	24722	<b>I.V.</b>
<b>B</b>	<10	479	2992	2992	5036	s.c.

\* I.V.: 靜脈注射；S.C.：皮下注射

\*\* 第一、三、五週免疫，第一、三、四、五、六週耳朵採血

\*\*\*A 及 B 皆經福馬林不活化，原始抗原 ELISA 力價為 288 OD/ML。因佐劑  $AlPO_4$  不宜從靜脈免疫，故 A 未加佐劑，每次免疫 4ml；B 組則添加佐劑，考量佐劑增幅效應，免疫量減半為 2mL。

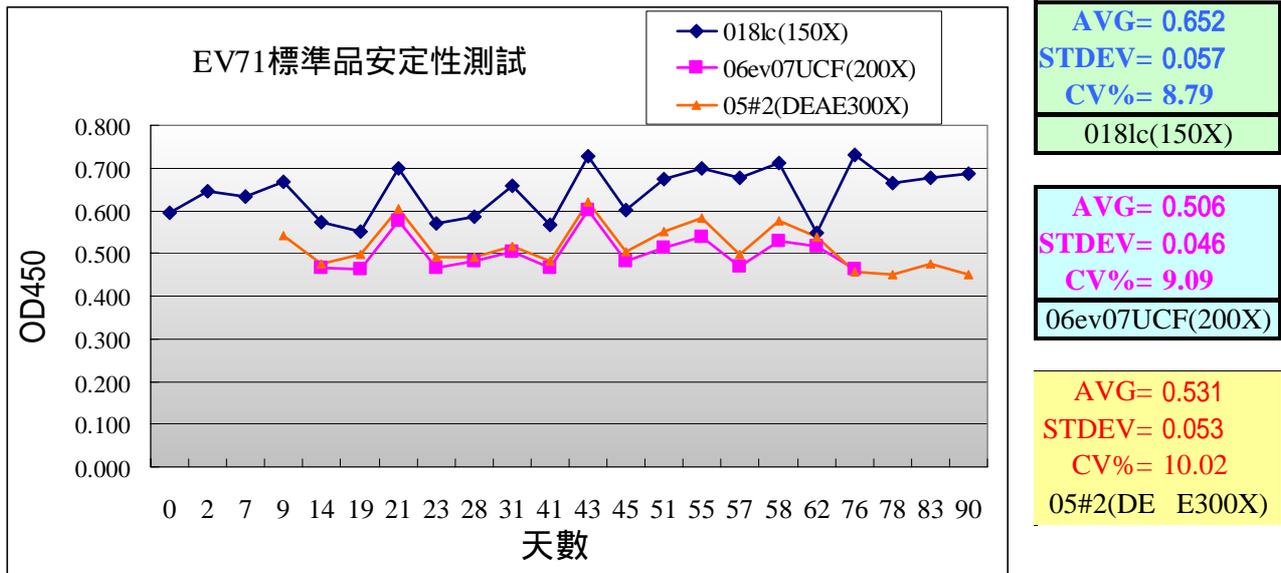


圖 9. 內部標準品安定性試驗，其中 018LC 之 CV 僅為 8.79%，結果相對較具可信賴性。

表 5. 原型疫苗 10 個量產批次之安定性試驗結果。  
(持續進行中，時間最長者已進行至第 210 天)

Lot No.	稀釋倍數	OD450					
		DAY0	7月31日	8月30日	9月25日	10月31日	11月23日
06EV03#3	160	0.242	0.206	0.385	0.452	0.439	0.394
06EV03#4	80	0.290	0.271	0.506	0.556	0.576	0.516
DAY		4月27日	96	126	151	187	210
06EV04#3	160	0.310	0.343	0.317	0.349	0.408	0.343
06EV04#4	80	0.427	0.434	0.404	0.458	0.527	0.444
DAY		5月5日	87	117	142	178	201
06EV07#3	160	0.339	0.372	0.358	0.408	0.412	
06EV07#4	80	0.500	0.484	0.482	0.555	0.530	
DAY		6月14日	47	77	102	138	161
06EV08#3	160	0.112	0.239	0.226	0.252	0.246	0.218
06EV08#4	80	0.326	0.331	0.337	0.372	0.384	0.318
DAY		7月5日	26	56	81	117	140
06EV010#3	160	0.249	0.328	0.289	0.324	0.294	0.331
06EV010#4	80	0.420	0.448	0.372	0.434	0.419	0.433
DAY		7月14日	17	47	72	108	131
06EV011#3	160	0.329	0.431	0.360	0.399	0.360	0.396
06EV011#4	80	0.534	0.538	0.450	0.525	0.498	0.590
DAY		7月21日	10	40	65	101	124
06EV012#3	160	0.295		0.314	0.362	0.412	0.293
06EV012#4	80	0.475		0.412	0.466	0.587	0.384
DAY		7月28日		33	58	94	117
06EV013#3	160	0.196		0.193	0.222	0.211	0.165
06EV013#4	80	0.304		0.300	0.346	0.291	0.230
DAY		8月9日		21	46	82	105
06EV014#3	160	0.243		0.231	0.256	0.237	0.262
06EV014#4	80	0.328		0.341	0.356	0.316	0.369
DAY		8月11日		19	44	80	103
06EV015#3	160	0.437		0.312	0.299	0.333	0.252
06EV015#4	80	0.566		0.371	0.364	0.434	0.352
DAY		8月23日		7	32	68	91

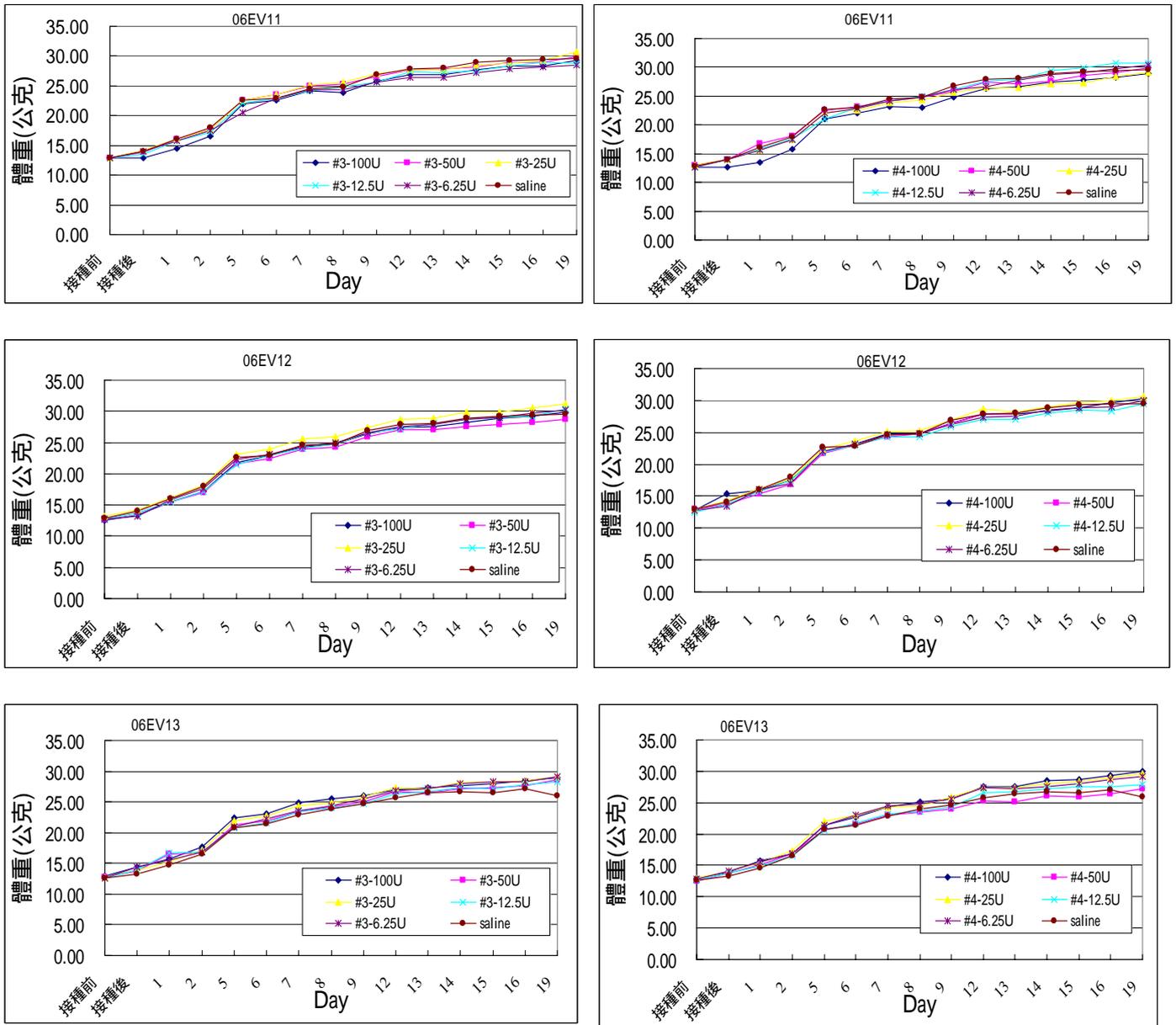


圖 10. 小鼠異常性試驗結果，小鼠體重皆正常上揚。分成 6 組，每組各有 6 隻(公鼠(左)母鼠(右)各 3 隻)，實驗組以腹腔注射 (IP) 方式施打五個免疫劑量 (50 OD450/ml、25 OD450/ml、12.5 OD450/ml) 之腸病毒 71 型病毒液，對照組則施打 saline。

表 6. 原型疫苗株 E59 免疫小鼠之抗體中和力價。

serum		inactive E59 immunize mice	
1970	A	BrCr	< 10
1998	C2	E15	47
	C2	E07	224
	C2	E25	417
	C2	E32	47
	C2	E63	16
	C4	E41	60
	C2	YN3	< 10
	C2	YN3H	< 10
	B1	E743	< 10
2000	B4	E43	52
	B4	E59	> 1280
2002	B4	E73	143
	B4	E75	112
	B4	E17	158
	B4	E19	111
	B4	E20	1159
	B4	E22	37
2003	B4	E61	209
	B4	E62	776
	B4	E763	105
2004	C4	E36	< 10
	C4	E45	< 10
	C4	E24	< 10
	C4	E98	< 10
	C4	E87	< 10
	C4	E12	< 10
	C4	E49	14
	C4	E16	28
	C4	E18	< 10
	C4	E76	< 10
	C4	E95	< 10
	C4	E23	< 10
	C4	E27	< 10
2005	C4	E80	< 10
	C4	E79	15
	C4	E31	15
	C4	E51	15
	C4	E100	< 10

表 7.腸病毒 71 型 C type 病毒株交叉 ELISA 結果。

virus \ serum	E36	E45	E24	E98	E87	E12	E49	E16	E18	E76	E95	E23	E27	BrCr	E59
E36-v	1.00	0.83	1.04	1.10	0.95	0.94	0.96	1.19	0.88	0.79	0.78	1.01	1.05	1.48	0.71
E45-v	1.06	1.00	1.13	1.23	1.09	1.04	0.93	1.33	1.05	0.99	0.87	1.09	1.19	1.69	0.81
E24-v	0.89	0.69	1.00	0.85	0.86	0.89	0.88	1.02	0.87	0.78	0.82	0.94	0.90	1.19	0.58
E98-v	1.05	0.84	1.07	1.00	0.94	0.95	1.10	1.14	0.97	0.86	0.85	0.98	1.00	1.45	0.72
E87-v	1.07	0.87	1.01	1.01	1.00	0.96	1.11	1.17	0.99	0.90	0.92	1.03	1.02	1.51	0.71
E12-v	1.02	0.87	0.98	1.06	0.93	1.00	1.20	1.24	1.05	0.97	0.92	1.10	1.01	1.51	0.75
E49-v	0.58	0.47	0.56	0.53	0.52	0.51	1.00	0.65	0.61	0.48	0.45	0.55	0.52	0.83	0.38
E16-v	0.80	0.58	0.83	0.66	0.76	0.73	0.85	1.00	0.81	0.59	0.81	0.81	0.93	0.98	0.46
E18-v	0.94	0.69	0.98	0.83	0.88	0.88	1.09	1.24	1.00	0.79	0.91	0.96	1.04	1.32	0.60
E76-v	0.99	0.90	1.09	1.15	1.09	0.97	1.26	1.27	1.16	1.00	1.10	1.18	1.31	1.70	0.82
E95-v	1.07	0.83	1.03	0.97	1.00	0.94	1.10	1.25	1.15	0.90	1.00	1.03	1.09	1.42	0.72
E23-v	1.07	0.83	1.03	1.03	0.96	0.91	1.03	1.26	1.10	0.87	0.96	1.00	1.05	1.49	0.84
E27-v	0.94	0.79	0.87	0.87	0.89	0.88	0.91	1.24	1.00	0.90	0.93	1.03	1.00	1.31	0.68
BrCr	1.20	0.83	1.06	1.11	0.97	0.97	1.35	1.63	1.21	0.89	1.17	1.17	1.12	1.00	0.65
E59-v	0.92	0.77	1.01	1.00	0.84	0.79	1.03	1.12	0.95	0.76	0.80	0.86	0.68	1.02	1.00
LC(E59)	0.44	0.39	0.41	58	0.40	0.36	0.62	0.67	0.48	0.35	0.36	0.41	0.36	0.88	0.72

\*E59 為目前之原型疫苗株

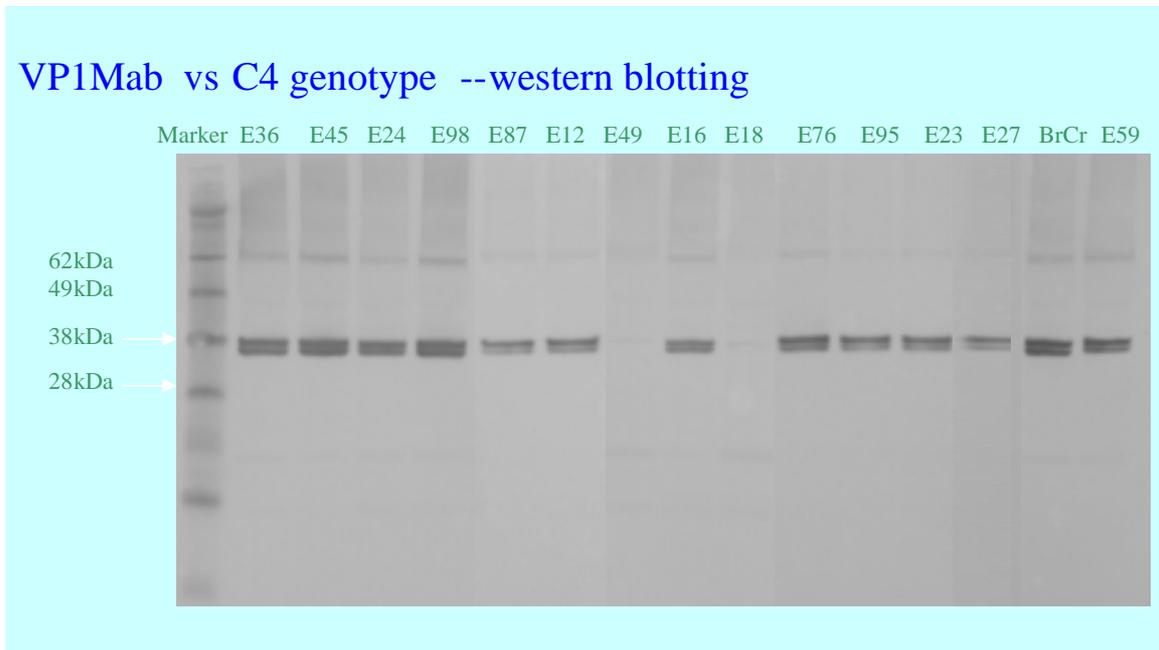
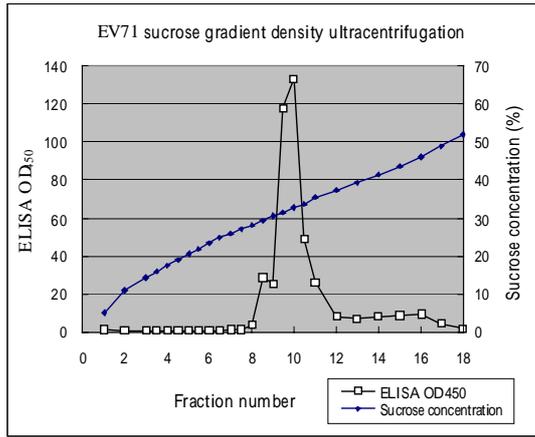


圖 11.以 vp1 單株抗體辨識 EV71 C type strains 的 western blotting 結果。

表 8. 原型疫苗株 E59 及第二疫苗候選株 E36, 以活毒免疫兔子之抗體中和力價

neutralized virus	serum		active E59 immunize rabbit	active E36 immunize rabbit
	A	BrCr		
1970	A	BrCr	55	255
1998	C2	E15	3319	12915
	C2	E07	3820	13277
	C2	E25	7130	13277
	C2	E32	5036	14260
	C2	E63	28	67
	C4	E41	6638	21831
	C2	YN3	14	28
	C2	YN3H	< 10	< 10
	B1	E743	569	3146
2000	B4	E43	7130	10071
	B4	E59	14260	14260
2002	B4	E73	33896	26553
	B4	E75	23940	16948
	B4	E17	36553	28520
	B4	E19	3557	4237
	B4	E20	23940	40286
	B4	E22	22986	19953
2003	B4	E61	28452	30560
	B4	E62	74161	26553
	B4	E763	26553	28452
2004	C4	E36	1660	13308
	C4	E45	1496	25830
	C4	E24	16	285
	C4	E98	33	712
	C4	E87	835	6839
	C4	E12	< 10	54
	C4	E49	1349	15280
	C4	E16	4635	14260
	C4	E18	879	8555
	C4	E76	< 10	85
	C4	E95	28	188
	C4	E23	1259	5120
	C4	E27	17	51
	2005	C4	E80	17
C4		E79	891	5036
C4		E31	205	3090
C4		E51	57	436
C4		E100	20	36



Fraction number	Sucrose concentration (%)	ELISA OD <sub>450</sub>	Protein concentration (μg/mL)
1	5.0	1.029	1631.6
2	11.0	0.627	1405.4
3	14.2	0.839	855.6
3.5	16.0	0.553	192.0
4	17.5	0.453	273.1
4.5	19.1	0.497	73.0
5	20.4	0.561	64.5
5.5	21.9	0.613	54.5
6	23.4	0.707	53.3
6.5	24.8	0.932	51.2
7	25.8	1.241	51.7
7.5	27.0	1.219	46.4
8	28.1	3.811	46.0
8.5	29.2	28.589	44.5
9	30.4	25.720	41.8
9.5	31.5	117.453	44.4
<b>10</b>	<b>32.6</b>	<b>133.164</b>	<b>44.7</b>
10.5	33.7	49.034	42.3
11	35.4	26.183	21.8
12	37.2	8.120	19.1
13	39.3	6.938	17.2
14	41.3	7.834	17.6
15	43.6	8.999	18.4
16	46.1	9.269	18.0
17	49.0	4.258	11.4
18	52.0	2.017	5.4

離心條件：43,000 rpm; 4.0 hours  
 ELISA OD<sub>450</sub>/per 100 μ L : 261.9

圖 12.超高速離心所收集之腸病毒 71 型產物 fraction 分析。

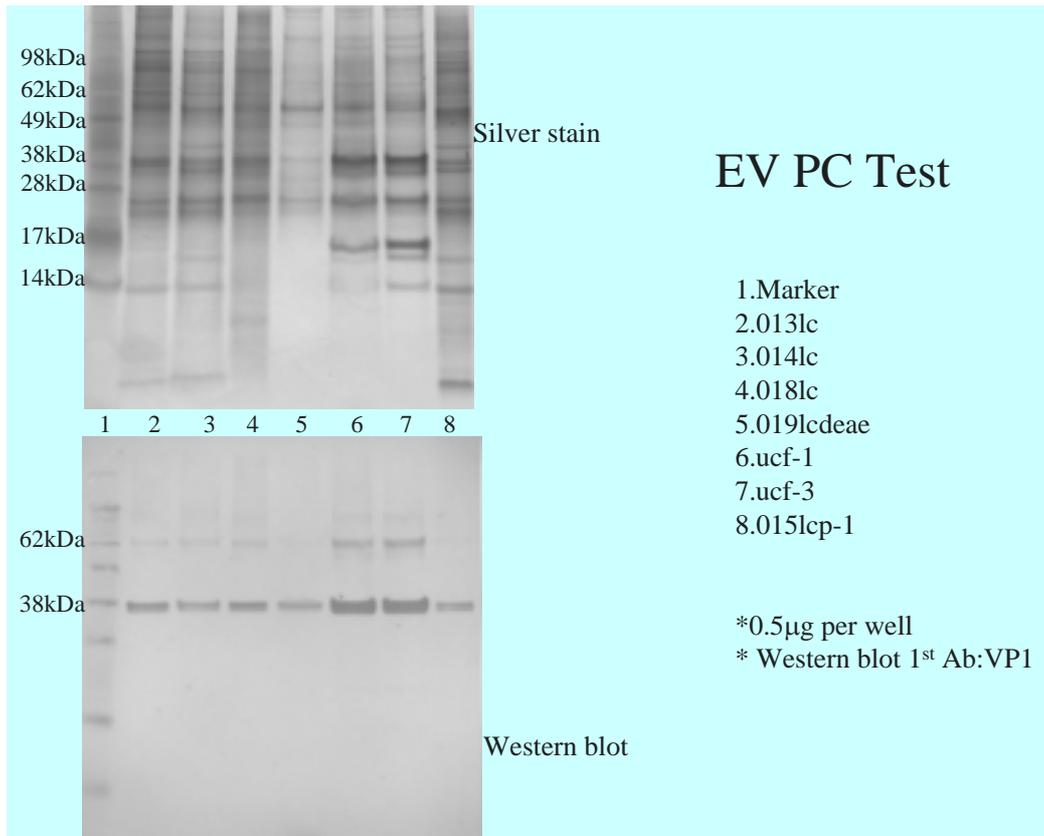


圖 13.批次純化產物與標準品之比較。( LC：批次純化產物 DEAE：離子交換樹脂純化產物，Ucf：超高速離心純化產物 )

圖 14.分析方法確效，以內部標準品進行 ELISA 檢測系統之線性分析，呈線性之 OD 值範圍在 0.2-0.9 之間(CV%<10)，而 r<sup>2</sup> 皆可達 0.98 以上(僅列出 4 組分析數據)。

950728-p						R <sup>2</sup> >0.98					
018lc	OD值			OD平均值	stdev	cv%	稀釋倍數	公式計算值	計算值與測量值stdev	計算值與測量值avg	cv%
20	2.067	2.046	2.146	2.086	0.053	2.53	0.050	0.0263	0.0168	0.03813	44.02
40	1.480	1.490	1.534	1.501	0.029	1.91	0.025	0.0186	0.0045	0.02179	20.80
80	1.012	0.979	1.049	1.013	0.035	3.46	0.013	0.0122	0.0002	0.01234	1.78
160	0.597	0.602	0.610	0.603	0.007	1.09	0.006	0.0068	0.0004	0.00653	6.05
320	0.347	0.331	0.348	0.342	0.010	2.79	0.003	0.0034	0.0002	0.00326	5.67
640	0.217	0.188	0.193	0.199	0.016	7.78	0.002	0.0015	0.0000	0.00154	2.18
1280	0.111	0.104	0.109	0.108	0.004	3.34	0.001	0.0003	0.0003	0.00055	59.72

012sfGC 100倍OD=0.846

CV% < 15

950721-p-1						R <sup>2</sup> >0.98					
018lc	OD值			OD平均值	stdev	cv%	稀釋倍數	公式計算值	計算值與測量值stdev	計算值與測量值avg	cv%
20	1.957	1.947	1.924	1.943	0.017	0.87	0.050	0.0272	0.0161	0.03862	41.65
40	1.341	1.314	1.309	1.321	0.017	1.30	0.025	0.0182	0.0048	0.02161	22.16
80	0.879	0.857	0.983	0.906	0.067	7.43	0.013	0.0122	0.0002	0.01235	1.72
160	0.529	0.538	0.535	0.534	0.005	0.86	0.006	0.0068	0.0004	0.00652	5.89
320	0.291	0.296	0.307	0.298	0.008	2.75	0.003	0.0034	0.0002	0.00325	5.25
640	0.170	0.172	0.178	0.173	0.004	2.40	0.002	0.0016	0.0000	0.00156	0.31
1280	0.086	0.083	0.093	0.087	0.005	5.88	0.001	0.0003	0.0003	0.00054	61.65

011-1sfG 100倍OD=0.755

950721-p-2						R <sup>2</sup> >0.98					
018lc	OD值			OD平均值	stdev	cv%	稀釋倍數	公式計算值	計算值與測量值stdev	計算值與測量值avg	cv%
20	1.931	1.925	1.929	1.928	0.003	0.16	0.050	0.0297	0.0143	0.03986	35.98
40	1.272	1.290	1.280	1.281	0.009	0.70	0.025	0.0194	0.0040	0.02219	17.93
80	0.840	0.822	0.825	0.829	0.010	1.16	0.013	0.0122	0.0002	0.01233	1.94
160	0.498	0.493	0.499	0.497	0.003	0.65	0.006	0.0069	0.0004	0.00655	6.53
320	0.285	0.274	0.285	0.281	0.006	2.26	0.003	0.0034	0.0002	0.00327	6.30
640	0.159	0.162	0.169	0.163	0.005	3.14	0.002	0.0015	0.0000	0.00155	1.40
1280	0.085	0.080	0.085	0.083	0.003	3.46	0.001	0.0003	0.0004	0.00052	71.94

011-2sfG 100倍OD=0.694

950721-t-2						R <sup>2</sup> >0.98					
018lc	OD值			OD平均值	stdev	cv%	稀釋倍數	公式計算值	計算值與測量值stdev	計算值與測量值avg	cv%
20	1.966	1.984	1.979	1.976	0.009	0.47	0.050	0.0258	0.0171	0.03788	45.27
40	1.425	1.433	1.446	1.435	0.011	0.74	0.025	0.0184	0.0046	0.02171	21.41
80	0.961	0.976	0.983	0.973	0.011	1.15	0.013	0.0122	0.0002	0.01234	1.79
160	0.582	0.592	0.595	0.590	0.007	1.15	0.006	0.0070	0.0005	0.00663	8.01
320	0.338	0.329	0.344	0.337	0.008	2.24	0.003	0.0036	0.0003	0.00335	9.66
640	0.179	0.175	0.182	0.179	0.004	1.97	0.002	0.0014	0.0001	0.00150	5.65
1280	0.101	0.097	0.097	0.098	0.002	2.35	0.001	0.0004	0.0003	0.00057	52.87

pc=948

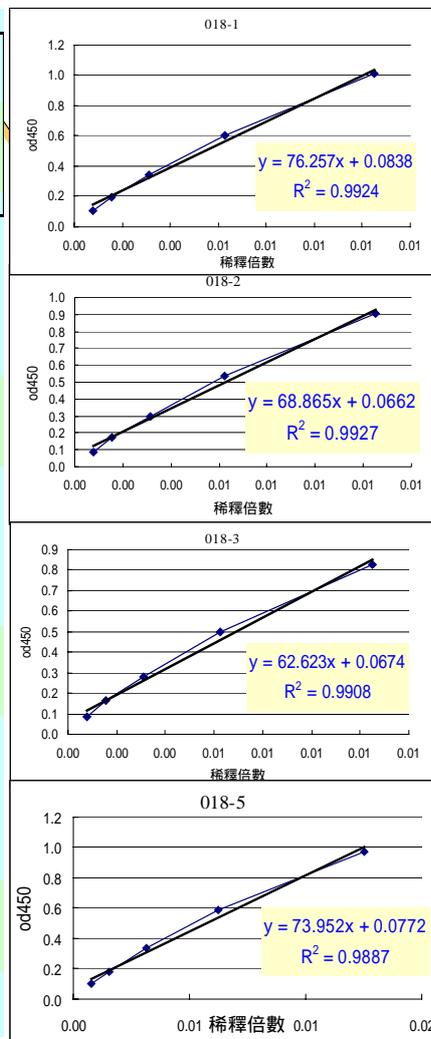


圖 15.分析方法確效，以內部標準品進行 ELISA 檢測系統之精密度分析。以由 12 組樣品數建立之公式計算，在回歸係數師  $r^2 > 0.95$  的標準下，內部標準品 107 組測試，所得變異係數  $CV < 11\%$ 。

