

計畫編號：DOH94-DC-2016

行政院衛生署疾病管制局九十四年度科技研究發展計畫

腸病毒 71 型疫苗製程改良與免疫特性分析 Process improvements and immunogenicity analysis 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
陳沛玲

執行期間： 94 年 1 月 1 日至 94 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.....	10
五、疫苗效價的測定.....	12
六、批次疫苗中和試驗.....	12
※結果.....	12
一、病毒 71 型分離株病毒庫建立.....	12
二、病毒原液濃縮操作條件建立.....	12
三、腸病毒疫苗最適生產製程建立.....	13
四、腸病毒原型疫苗中和特性分析.....	15
※討論.....	16
※參考文獻.....	21
※圖表.....	23
圖一：腸病毒疫苗種庫生長特性分析.....	23
表一：不同孔徑超濾膜於腸病毒 71 型量產原液濃縮 應用特性之比較.....	23
圖二、不同孔隙超過濾膜濃縮效果比較.....	24
圖三：不同濃縮操作條件之特性比較.....	24
表二、連續批次量產各階段產物比較.....	25
圖四、不同溫度病毒培養條件之比較.....	25
圖五、不同培養溫度之批次量產病毒毒力及抗原 ELISA 效價比較.....	26
圖六、批次量產原液中細胞 DNA 含量與病毒力價及 抗原 ELISA 效價變化之比較.....	27
圖七、病毒在 SFM 及 FBS 培養基生長之毒力比較.....	27
圖八、分析純化產物，病毒力價與抗原 ELISA 效價與 細胞殘留 DNA 趨勢相近.....	28

圖九、經 Benzonase 處理後，病毒原液中細胞殘留 DNA 變化情形.....	29
表三、經由離子交換樹脂純化製程，可進一步提高產品 單位效價，但回收率卻相對較低.....	29
表四、不同溫度條件下不活化反應之病毒力價及 中和抗體效價比較.....	30
表五、病毒在 SFM 及 FBS 培養基生長之純化產物 安定性比較.....	31
表六、利用腸病毒 71 型原型疫苗免疫小鼠所產生之 中和抗體進行病毒交叉中和特性分析.....	31、32
表七、建立已分離腸病毒 71 型毒株病毒庫.....	33
表八、批次量產原型疫苗小鼠免疫所使用劑量及蛋白濃度..	34
圖十、批次量產原型疫苗小鼠免疫中和試驗結果.....	35

中 文 摘 要

在本研究計畫之中，我們延續先前的成果，進一步在 cGMP 等級的場所建立腸病毒 71 型疫苗株種庫 230 支。建立疫苗生產製程最適條件方面，上游製程中，我們測試 32°C 的培養條件，並與原來的 37°C 培養比較，結果顯示 32°C 下培養，病毒力價穩定上升，至第 4-5 天達到高原期，抗原酵素連結免疫試驗(Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay, ELISA)效價亦呈現相同趨勢，而且綜合比較病毒力價和抗原 ELISA 效價，以 32°C 的培養條件狀況較佳，所以病毒培養條件改為 32°C 培養，並於第五天收穫。無血清培養基的應用，可相對提高病毒產量，但在後續的安定性實驗中，卻發現其抗原穩定性較差，於 4°C 儲存 6 個月後，其蛋白質濃度已降至可偵測範圍以下。在下游製程方面，病毒原液濃縮操作條件選定抗原損失較少之 300k 超過濾膜。離子交換樹脂製程的導入，將可提高純化產物的單位效價，但回收率卻會降低。為了建立完整原型疫苗保護效果之免疫分析數據，並嘗試選擇第二疫苗候選株，我們共比較了 34 株腸病毒 71 型分離株之交叉中和保護力價。原型疫苗免疫抗體對其中 16 株可有 1:40 以上的中和效價，而對於 2004 年以後分離的大陸 C genotype 病毒株，原型疫苗免疫抗體之中和力價皆低於 1:40。其餘 18 株病毒株間則無明顯的交叉保護力價，若要建立第二疫苗候選株則尚需進一步的努力。在批次量產原型疫苗株的中和抗體試驗結果顯示，以抗原 ELISA 免疫劑量為 50 OD₄₅₀/ mL，或抗原蛋白質含量為 2ug / mL 以上免疫小鼠時，中和抗體力價可達 1:40 以上，顯示原型疫苗具有相當穩定之免疫產生性，將有利於後續臨床前試驗所需材料之準備，此是下一階段努力的目標。

中文關鍵詞：腸病毒 71 型原型疫苗、中和抗體力價試驗、酵素連結免疫試驗法

英 文 摘 要

We have already set up EV 71 master virus bank which is total 230 vials in a cGMP facility. Optimum vaccine production process condition was trying to be established. For the upstream process, when the cultivation temperature was set at 32 °C, the virus titer increased steadily and reached peak at 4-5 days, and the Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) titer corresponds with this result. From the preliminary results obtained from the virus titer and antigen ELISA titer, the best cultivation temperature was at 32 °C and harvest virus at day 5. Serum free medium was found to produce a higher yield of virus, however from the stability test the antigen stability was lower, and the protein concentration decreased below detection limit after storage at 4 °C for 6 months.

For the downstream process, 300k ultrafiltration membrane was found to produce the best result for the virus concentration. The introduction of ion exchange purification process has increased the about 35% ELISA unit titer of purified product, but the recovery rate was lower. In order to establish a complete prototype vaccine protection immunization data, and to choose a second virus strain candidate, we have compared the cross neutralization results from 34 strains of EV71. The neutralization titer of the antibody from vaccine strain virus against 16 strains is 1:40, but the neutralization titer is below 1:40 against C genotype isolate of mainland China after 2004, and no significant cross protection titer against other 18 strains. The neutralization results from this vaccine prototype strain showed that the immunization dose was 50 OD₅₀/mL or 2ug/mL, and the neutralization antigen titer were above 1:40. For the next step

of the project is to prepare all the essential materials for the pre-clinical trials.

Keyword: Enterovirus 71 prototype vaccine, Neutralization test, ELISA

前 言

腸病毒在台灣自民國八十七年爆發至九十四年七月為止，在已確定的一千五百三十六個重症案例中，腸病毒 71 型佔了六百一十七例(40.1%)；而在 240 個腸病毒死亡病例中，腸病毒 71 型佔了一〇八例(45%) 【Lin et al., 2003, Kuo et al. 2004】。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，腸病毒疫苗的研發有其必要性。

血清疫苗研製中心在腸病毒 71 型疫苗開發工作中，已初步建立包括 20 公升量產系統、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。在個別製程條件確立之後，如何有效提升批次疫苗的產率，以及將各製程作最適當的配合，來確立完整製程步驟，就是我們下一個必須面對的課題。

切向流過濾 (tangential flow filtration) 是為了改良單向式過濾而發展出的過濾濃縮技術【van Reis et al., 2001】。單向式過濾法由於濾膜與溶液濾出方向垂直，當過濾體積較大時，容易造成濾膜的阻塞；切向流過濾法由於濾膜的配置與濾液流向平行，若對於流速、壓力加以控制，其操作體積往往可達到單向式的數十倍，也因此目前在許多生物製劑的製程中，均加入了切向流過濾濃縮步驟【Mendonca et al.,

1993 ; Maranga et al., 2002 ; Choi et al., 2003】。目前在腸病毒疫苗製程中，由量產原液進入純化步驟前，我們利用微過濾方式，先去除細胞碎片與其他較大的分子物質，而後利用切向流過濾方式，依循細胞培養日本腦炎疫苗製程的操作條件，進行病毒液的濃縮，以方便後續純化操作。不過在特性上，日本腦炎病毒是以“外吐”（exocytosis）方式釋出到胞外，相對的腸病毒卻是以造成細胞破裂方式釋出胞外，因此兩者在量產原液上的澄淨度而言，是有相當大的差別。也因此，改良切向流過濾的操作與應用，以達到提升量產病毒原液純度，並維持穩定且高回收率的目的，對於疫苗的產程而言是相當重要的一部份。

此外，疫苗產程的適當規劃，也是提升疫苗產率及營運效率的重要因素。繁雜的製程步驟，除了耗費時間外亦會造成產率的降低。因此在完成個別操作條件的最適化之後，我們擬將各製程作交替運用，以確立最適當的生產流程。

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】。為了瞭解本中心所研發腸病毒原型疫苗對其他不同基因型之中和效價，我們計畫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°C 含 5% CO₂ 之培養箱中。

2、病毒的培養

以 2×10^7 TCID₅₀ 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—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、病毒之純化

1. 微過濾法 (microfiltration)

利用拋棄式過濾膜 (膜孔徑分別為 1.2μm 與 0.45μm)，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)，以每分鐘 0.2 公升之

流速，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°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，流速 13 毫升/分鐘，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，流速 20 毫升/分鐘，於 0.1M Tris 緩衝溶液 pH 7.5-9.0 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 $50\mu\text{m}$ ，至入 96 孔微量盤中，加入 Bradford reagent $150\mu\text{m}$ ，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°C 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 0.5 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，分別於 4 、

22 及 37 三個溫度下靜置，進行病毒去活化反應。反應期間，定期取樣檢測 50% Tissue Culture Infection Dose (TCID₅₀)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°C 不活化血清 30 分鐘，保存於-20°C。

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 TCID₅₀ 的病毒混合。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。

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 100μL OPD(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 OD₄₅₀/ml、50 OD₄₅₀/ml、25 OD₄₅₀/ml、12.5 OD₄₅₀/ml、6.25 OD₄₅₀/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。

結 果

一、腸病毒 71 型分離株病毒庫建立

目前已將通過黴漿菌(mycoplasma)及細菌測試的腸病毒 71 型病毒株做成種庫，並建立繼代史，完成腸病毒 71 型疫苗株種庫製備，共計有 230 支冷凍小管，病毒力價 (TCID₅₀) 達 $10^{7.4}$ / mL。不同接種濃度之病毒生長曲線如圖一，結果顯示無論接種 2.5×10^6 或 2.5×10^7 的病毒，經 3 天培養後皆可達到 $10^{7.5}$ 的高峰，然後稍呈下降趨勢，至第七天仍可維持 10^6 以上。

二、病毒原液濃縮操作條件建立

我們嘗試探討 300K 及 1000K 兩種孔徑超過濾膜應用於製程中之可行性，以期降低操作時間並進一步提高回收率。實驗結果中，300K 與 1000K 孔徑之超濾膜操作，濃縮液與廢液間專一性抗原含量比值分別約為 97 及 17，總蛋白質回收率則分別約為 69%及 47% (如表一)，顯示 1000K 之超濾膜雖然能夠降低濃縮液中總蛋白質含量，卻同時造成專一性抗原的流失(圖二)，並無法有效達到濃縮的目的，

因此製程上選擇應用 300K 超濾膜。

至於在尋找濃縮操作的條件最適化方面，我們主要以穿膜壓 (transmembrane pressure; TMP) 作為探討的標的。本計畫我們利用分子孔徑濾膜經切向流過濾系統，以 300KDa 超濾膜以及在不同的 TMP 下，進行 20 公升腸病毒液的濃縮，並以 ELISA 分析濃縮後所產生的濃縮液及廢液，其中在廢液並無大量之腸病毒顆粒損失 (總損失量約 0.4~3.4%)，濃縮液的 TCID₅₀ 亦沒有大量損失或下降的情形。因此在不造成超過濾膜阻塞並提高過濾效率的情形下，以 TMP=4psi 的條件進行腸病毒液的濃縮，有利於縮短製程中超過濾濃縮所需的時間，與 TMP=2 psi 相比，約可節省三分之一以上的時間(圖三)。

三、腸病毒疫苗最適生產製程建立

目前依先前所建立之病毒產製及膠體層析方式，完成 19 批次 20 公升病毒量產及相關資料之建立，包含各中間製程步驟之蛋白質濃度、抗原濃度、回收率等等，各批次最終純化產物之蛋白質平均濃度約為 15 ug/ mL 左右，而單位蛋白質抗原 ELISA 效價(OD₄₅₀ /ug)，皆可達 15 以上(原始病毒液 OD₄₅₀ /ug <1.0)，此 ELISA 值將是未來計算人用免疫劑量的一項重要指標，此純化產物(LC)之最終抗原回收率均維持 35%以上。(表二)

製程技術改良方面，可分為下面幾部分：

1. 病毒培養條件最適化

我們針對培養溫度、收獲天數、病毒力價(TCID₅₀、ELISA)，細胞殘留 DNA 進行探討，並嘗試引進無血清培養基系統；在病毒培養條件方面，已進行不同溫度培養條件(32°C、37°C)及生長日數(4 天、5 天、6 天)之比較，結果顯示，32°C 培養條件下病毒力價(圖四 A)和抗原 ELISA 效價(圖四 B)皆呈現穩定上升，至約第 5 天之病毒力價達

最高，而 37°C 培養時，病毒則是在第三天即達高點，但隨即有下降的情形(圖四 C)，而抗原 ELISA 效價則在第 7 天再達高峰。在連續批次量產培養上亦觀察到類似的結果(圖五)，而偵測由細胞破碎所釋放出的細胞 DNA 濃度，在第五天達到最高(圖六)。另外在無血清培養基的應用上，實驗結果顯示無血清培養基呈現較佳的生長特性所培養的病毒較含血清培養基高出了半個對數值(圖七)。

2. 病毒純化製程最適化

在下游製程方面除先前所提濃縮操作條件探討之外，並進行離子交換病毒純化技術之建立與膠體層析技術交替應用之可行性評估。分析各個純化 fraction 產物之細胞殘留 DNA 的分布並與病毒力價及抗原 ELISA 效價做比較，我們發現三者有高度的正相關性(圖八)，並可確認收集的 fraction 是我們病毒主要分布處。另外若將病毒原液先以酵素(Benzonase)處理後，所能偵測到的細胞殘留 DNA 含量在 4°C，2 小時反應後明顯降低，至第 29 小時已降至 8.4ng/ mL(圖九)，而 1/5 Benzonase 劑量的實驗結果顯示在反應 29 小時後，可將細胞殘留 DNA 降至 26.4 ng/ mL。

在離子交換樹脂純化製程的搭配應用上，結果顯示未經此一純化步驟，純化產物之單位 ELISA 效價(OD/ug)為 8.7，而經過離子交換樹脂處理後，可提高至 11.8，但在回收率卻僅有 19.8%(表三)。

3. 病毒不活化條件最適化

在不同不活化條件之可行性評估方面，總共進行了 4、22 及 37 三個溫度下靜置不活化的試驗。結果顯示於 22 與 37 條件下添加福馬林的組別，皆能在第七天將病毒力價降至 0，而 4 條件下添加福馬林的組別，則在第 30 天才可將病毒力價降至 0。但是由動

物中和抗體效價實驗結果發現，如果病毒單獨在溫度 37 條件下，抗原性會改變而導致中和抗體效價降低，如過溫度 37 加上福馬林則可保護抗原性，中和抗體效價繼續維持穩定狀態(表四)。

4. 原型疫苗安定性的測定

在不活化 6 個月後，我們測試儲存於 4 純化產物之蛋白質含量及抗原 ELISA，追蹤其變化情形以建立原型疫苗之安定性數據。結果顯示蛋白質濃度有稍微下降情形，但抗原效價並未下降；而無血清培養基之純化產物，其蛋白質濃度卻低於可測範圍(表五)。

四、腸病毒原型疫苗中和特性分析

(1) 腸病毒 71 型分離株交叉中和試驗

利用現有腸病毒 71 型原型疫苗產生之免疫抗體，針對自 1998 至 2004 年之 33 株腸病毒 71 型分離株及 BrCr 病毒株進行中和試驗，結果顯示中和效價可達 1:40 以上佔 16 株 (47.0%)，中和效價介於 1:10~1:40 間佔 4 株(11.8%)，中和效價低於 1:10 佔 14 株(41.2%) (如表六)。利用基因序列分析結果發現，中和效價低於 1:10 的 14 株腸病毒中，於 2003 年以前分離的佔了 2 株，於 2004 年後所分離的佔了 11 株，而且型別上均屬於 C genotype。整體而言，相對於 2004 以後分離的大陸 C genotype 病毒株，原型疫苗免疫抗體之中和力價皆低於 1:40。在其他病毒株抗血清交叉中和反應上，基因型為 C 及大陸 C 的 1998、2004 病毒株血清，進行交叉中和後可中和 2003 前大多數的 B type 病毒及 C type 病毒。由無法中和之病毒株中進行交叉中和試驗，結果顯示，其中除 1049、1116 及 1118 三病毒株較易被其他血清中和外(中和抗體力價可大於 1:10)，其他病毒株交叉中和抗

體力價幾乎都低於 1:10。這 34 株腸病毒 71 型病毒株已分別建立各 10 支冷凍小管之病毒庫以備進一步實驗使用(表七)。

(2) 批次中和試驗

在批次量產原型疫苗小鼠免疫中和試驗方面(免疫劑量見表八)，各批次抗原 ELISA 免疫劑量為 200 OD₄₅₀/ml 者，其產生的中和抗體力價皆可高於 1：100。而各批次免疫劑量降為 50 OD₄₅₀/ mL 時，除 05EV07、 05EV10 與 05EV011 抗體力價低於 1：100 之外，其餘批次所產生的中和抗體力價也可達 1：100 以上，抗原免疫劑量再降為 25 OD₄₅₀/ mL 時，則除 05EV08 外，其餘批次所產生的中和抗體力價皆低於 1:40，故若欲訂定中和抗體力價在 1:40 以上，則以抗原免疫劑量為 50 OD₄₅₀/ mL，或抗原蛋白質含量為 2ug / mL 以上時為佳 (圖十)。

討 論

腸病毒 71 型自 1998 年暴發以來至今，已造成一 0 八人死亡，每年仍造成國內幼童對於腸病毒 71 型之危害恐懼，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，也是本計畫執行之最終目標。

在先前的研究當中，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。當前的目標規劃以提升產率與回收率為工作目標，結合過去研究成果進行產程整合的最佳化，進行批次量產，並持續收集建立各種進入臨床前試驗之必要資料。首先我們在小型 cGMP 先導工廠內建立了通過黴漿菌(mycoplasma)及細菌測試的腸病毒 71 型疫

苗株種庫 230 支，接下來將會陸續建立工作種庫並送至國外機構進行安全性的認證，以穩定維持未來病毒的批次量產。由病毒生長試驗的結果顯示，降低 M.O.I. 亦可達到相同的病毒濃度，如此更可放大種庫的使用批次數。

在病毒濃縮操作的改良方面，依據 2005 年 Wickramasinghe 等人的報告，分別以 100K 和 300K 的超過濾膜及 $0.1\ \mu\text{m}$ 、 $0.2\ \mu\text{m}$ 和 $0.45\ \mu\text{m}$ 微過濾膜進行人類 A 型流感病毒的濃縮與純化，流感病毒可以經由控制切向流系統中的 TMP (Transmembrane pressure)、膜孔徑和孔徑分佈 (pore size distribution) 等條件，將病毒顆粒完整的從其他微粒中分離，或移除宿主細胞蛋白質及 DNA，使病毒疫苗之後續純化步驟更簡單化，亦適合病毒或病毒載體的大量純化。本中心試圖將此技術應用於腸病毒超過濾濃縮的最適化上，針對超過濾膜之孔徑挑選，主要以 300K 及 1000K 為主，在 TMP 的選擇則是針對 TMP=2、3、4 psi 進行最適化，並以腸病毒的 TCID₅₀ (50% Tissue culture infective dose) 及 ELISA (Enzyme linked immuno-sorbent assay) 分析作為測定指標。在超過濾膜孔徑 300K 及 1000K 的選擇上，經過對病毒液、濃縮產物及廢液的 TCID₅₀ 分析，以 300K 的濃縮效果最佳，其中經 300K 濾膜濃縮的產物，log TCID₅₀/mL 的數值顯著提升了 1 個對數值，廢液亦無明顯的損失情形，經 1000K 濾膜濃縮之產物則無明顯的對數值上升，病毒的回收量也較低。因此，膜孔徑 300K 之超過濾膜，較適合作為腸病毒液的超過濾濃縮用途且可縮短製程中超過濾濃縮所需的時間，連續批次量產各階段產物比較中，可以看出病毒液濃縮後的單位蛋白質抗原 ELISA 效價 (OD₄₅₀ /ug) 上升 1 倍以上，可得知經此超過濾濃縮的處理，確能去除細胞蛋白質，保留病毒蛋白。

Yoon 等人 (2004) 的報告指出較低溫度的培養，能促進 Chinese Hamster Ovary (CHO) cell 的生長和專一性蛋白生產率。Daniel I.C. Wang

(MIT 教授) 於 January 25, 2005 在國光公司舉辦之研討會針對 "BIOTECHNOLOGY OF MAMMALIAN CELLS: INCREASING PRODUCTIVITY AND QUALITY" 議題中提到降低溫度能有效增加專一性生產率主要是由於使 mRNA 的量增高，另外一項是增進力價主要是因為增進整合性細胞的存活率，並以 32°C 和 37°C 舉例說明。基於上述數據證實 32°C 是一好條件，因此我們嘗試以 32°C 取代原先 37°C 的病毒培養條件，結果發現 32°C 的生長溫度的確能使病毒穩定溫和的生長，病毒力價在 4-5 天達高峰並能維持在高原期，較 37°C 培養結果為佳，也不會因為代謝廢物的迅速累積而使病毒力價下降(第 4 天)，顯示病毒處於一個更為健康更有活力的狀況。而抗原 ELISA 效價亦與此相呼應，可見 32°C 應是更佳的選擇，故我們選擇 32°C，5 天培養做為生產病毒的培養條件。而由細胞破碎(釋放出細胞 DNA)的角度觀之(第五天達最高)，亦得可驗證病毒力價的變化情形。

在無血清培養基的應用上，實驗結果顯示雖然無血清培養基對病毒生長有較佳的影響，但在抗原的保存性上似較含血清培養基為差，因為不活化 6 個月後，無血清培養產製的病毒純化原液，其蛋白質濃度已低於可測範圍(<6.25ug/mL)，故就長期保存而言，可能需要添加其他保存劑以利保存。而由於含血清培養基所生產疫苗之蛋白含量亦有所降低，故亦不排除可能是不活化後蛋白質結構改變，使以偵測胜肽鍵為主的偵測方法產生偏差。

由純化產物的細胞殘留 DNA 分析，細胞殘留 DNA 呈現與病毒分子相似的分布，可推測應是這些細胞破碎所殘留的 DNA 依附在病毒顆粒上與之結合，故無法透過超過濾膜將之移除，所以 Benzonase 的添加仍有其必要，

可確實解決 DNA 殘留問題，使產物細胞殘留 DNA 濃度符合 WHO 之傳代細胞系(continuous cell line)產製疫苗殘留 DNA 需在 10 ng/dose 以內的規範，而我們亦嘗試降底劑量以節省成本，由於 1/5 劑量的實驗結果在 29 小時後，可將殘留 DNA 降至 26.4 ng/ mL，雖然略高於合格標準，但適當降低使用劑量以節省成本應是確實可行的方向。

另外在純化製程中結合離子交換樹脂，可明顯提升純化產物的單位抗原 ELISA 效價(OD/ug)達 35%，但在回收率上卻不佳，故若無法進一步提升回收率，將可能只適合應用於疫苗標準品的製備。

在病毒不活化方面，往往在產程中花費相當久的時間，如過真能由過去 4 和福馬林(1:4000)改為 37 和福馬林(1:4000)，可將不活化期程縮短為原來之一半以上(原為 45 天)。加上血清中和力價試驗結果顯示，37 條件下不活化的疫苗原液的免疫產生性和 4 組別相差不大，更讓我們確認由於福馬林能有效保護抗原，提高不活化溫度將是節省製程時間的一項不錯選擇。另外 22 需進一步做抗原性的確認，明年將累積更多數據做進一步確認。

由於在 34 株腸病毒分離株中，目前原型疫苗株所產生之抗血清中和效價可達 1:40 以上只佔 16 株 (47.0%)，但其他病毒株交叉中和效價多數低於 1:10，甚至無法被本身所產生的抗血清所中和，此結果不甚合理。為找出問題徵結所在，本團隊嘗試採取兩個方案解決目前所遭遇的問題：1.利用不同的中和抗體試驗方式比較無法中和之病毒株中(以大陸 C genotype 為主)的抗體中和效果，委託研究檢驗中心病毒實驗室進行中和實驗，實驗結果仍然和本團隊之前的結果相同。推測原因可能是此類病毒易產生聚集 (aggregation)，故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，造成誤判。目前考慮利用氯仿或其他介面活性劑

進行疫苗原液及中和試驗感染病毒液之前處理，以降低凝集的情形，此一部分尚需進一步的實驗確認是否解決問題。2.若確實目前的疫苗株無法產生足夠的抗體，將可能依循小兒麻痺疫苗(poliiovirus vaccine)以不同病毒株構成多價疫苗(trivalent)的模式，尋求具潛力的第二疫苗候選株，以提高原型疫苗之保護效果，這部分還有賴進一步的努力。

在最適生產製程的建立上，目前已實際執行了 19 個批次的量產，各批次最終產物的蛋白質平均濃度約為 15 ug/ mL 左右，單位蛋白質抗原 ELISA 效價(OD_{450} /ug)，皆可達病毒量產培養原液 15 倍以上(原始病毒培養液 OD_{450} /ug <1.0)，且抗原回收率皆能維持在 35%以上，批次純化產物品質具有相當的穩定性。另外我們的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 效價(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_{450} /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之穩定性，若欲訂定中和抗體力價在 1:40 以上，則以抗原免疫劑量為 50 OD_{450} / mL，或抗原蛋白質含量為 2ug / mL 以上時為佳，此點可做為進一步臨床前試驗免疫劑量的參考。綜合以上我們開發之腸病毒 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量產製程的穩定性和免疫抗體中和效價的一致性，明年將確認疫苗株保護的寬廣性，做為是否挑選第二候選疫苗株提高疫苗保護效果的依據。當然腸病毒 71 型原型疫苗安定性試驗、安全性試驗(包含異常毒性試驗、亞急性毒性試驗)、動物感染模式之建立等亦是我們進入下一階段臨床前試驗，所需要進一步努力完成的目標。

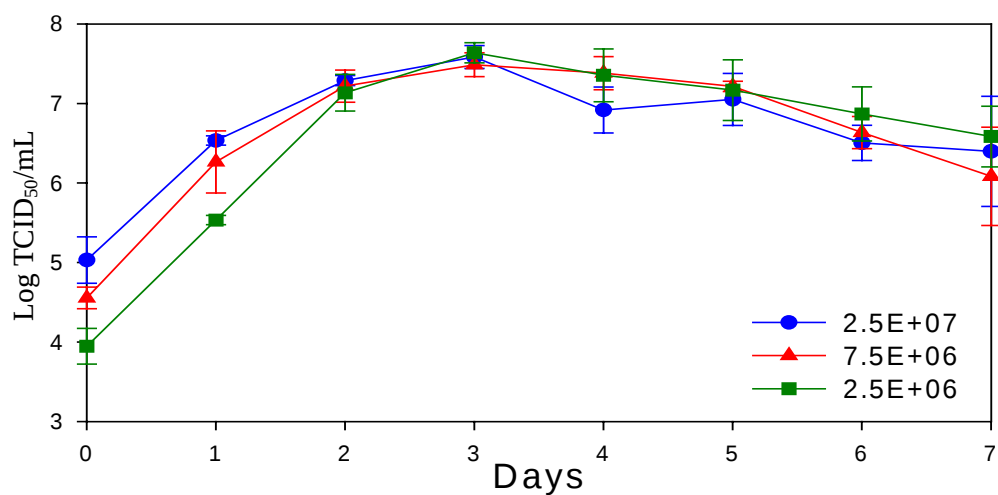
參 考 文 獻

- 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. 2004. Communicable Diseases of Interest to the Public: Enterovirus. Center for Disease Control, Taiwan, 2004 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.

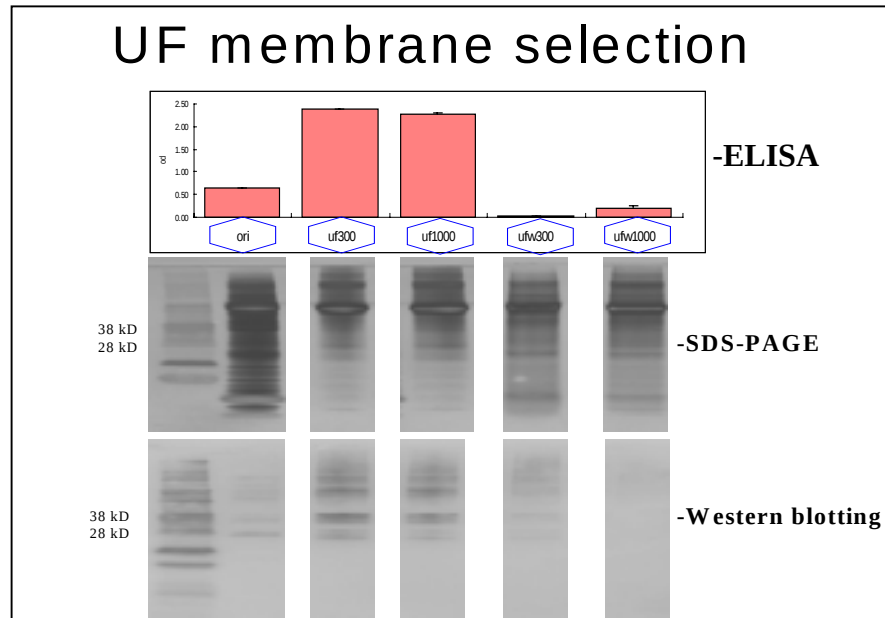
圖 表



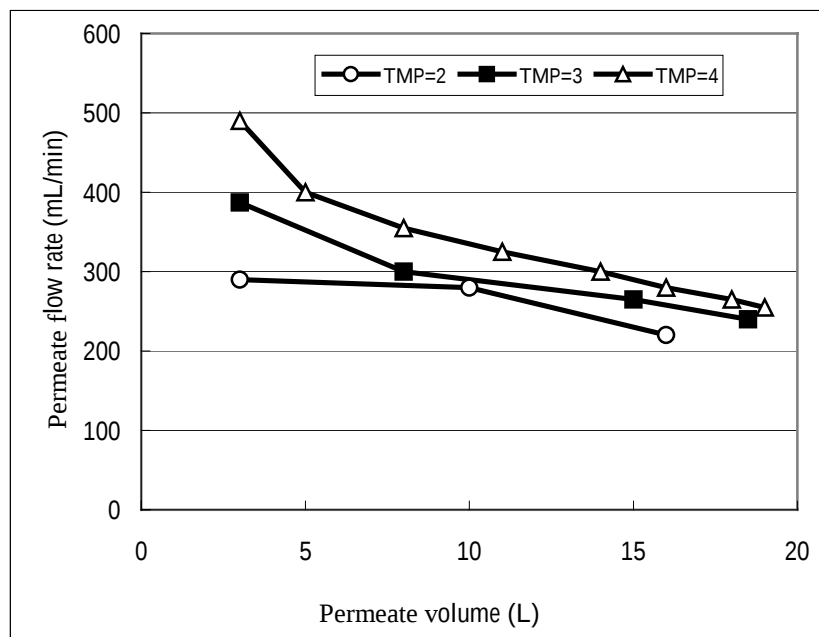
圖一：腸病毒疫苗種庫生長特性分析（圖中右下角標示為病毒起始接種劑量，單位為 TCID₅₀）

表一：不同孔徑超濾膜於腸病毒 71 型量產原液濃縮應用特性之比較

濾膜種類 (孔徑)	製程各階段專一性抗原濃度 (OD ₄₅₀ /mL)			UF / UFW ratio	總蛋白質 回收率 (%)
	Origin	UltraFiltration (UF)	UltraFiltration waste(UFW)		
300K	44.61	558.08	5.76	97	69
1000K	44.61	517.46	30.85	17	47



圖二、不同孔隙超濾膜(300K 及 1000K)濃縮效果比較(ELISA、SDS-PAGE 及 Western blotting)，1000K 膜的廢液有較高的抗原效價。

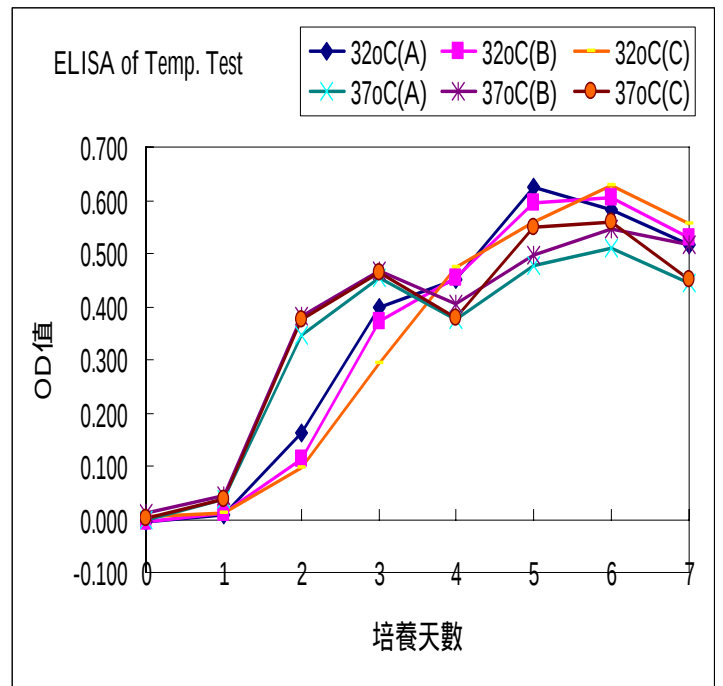
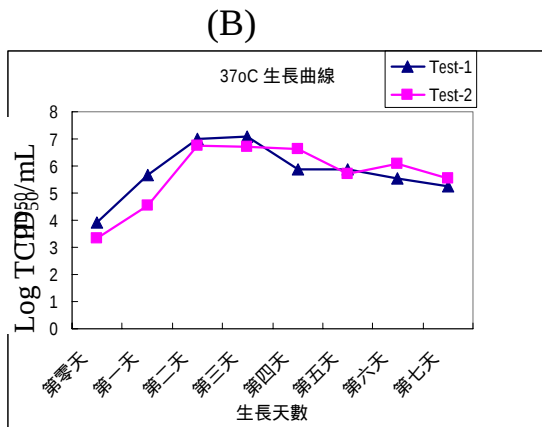
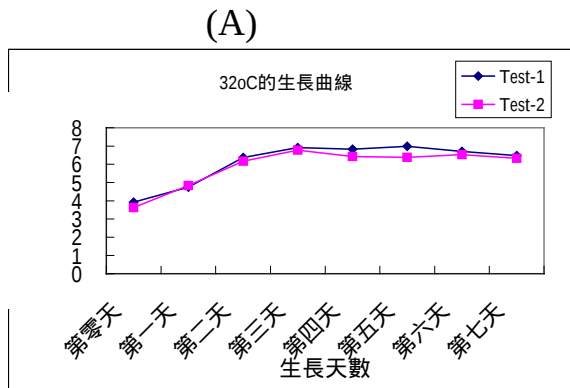


圖三：不同濃縮操作條件之特性比較(超濾膜孔徑為 300K)

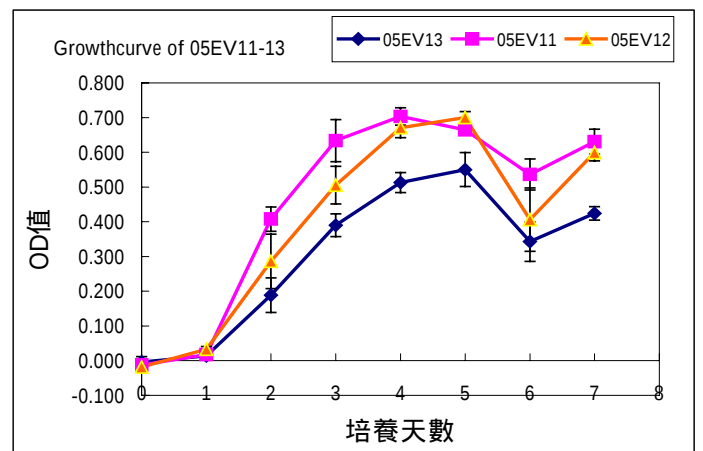
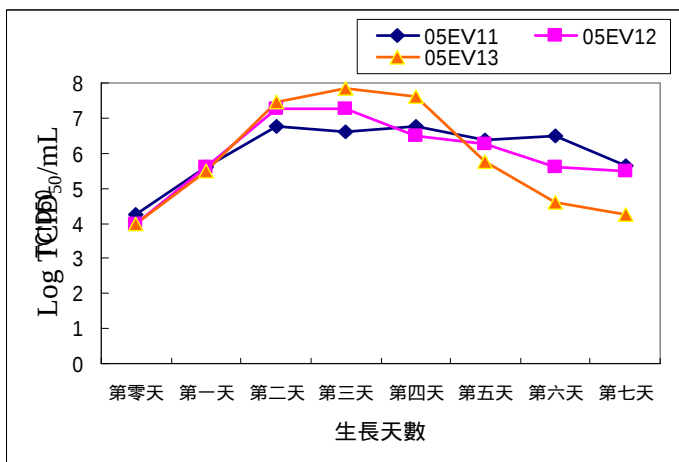
表二、連續批次量產各階段產物比較

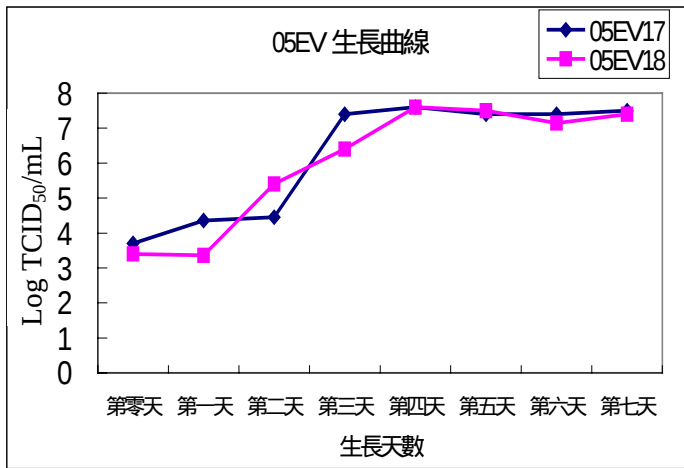
(ori:病毒培養液，uf:病毒初濃縮液，ufdi-fin:病毒透析濃縮液， LC:病毒純化產物)

Batch No./Step	Volume(mL)	OD ₄₅₀ /ug	ELISA OD ₄₅₀ /100uL	Total ELISA OD ₄₅₀	Recovery(%)	Purification fold	TCID ₅₀ /mL	Total TCID ₅₀	
05EV04	ori	20000	0.39	19.67	3933333	100.00	1.00	1.0x10 ⁵	2.0x10 ⁹
	uf	1300	0.71	312.80	4066400	103.38	1.82	1.0x10 ⁶	1.3x10 ⁹
	ufdi-fin	1300	2.03	441.60	5740800	145.95	5.24	3.98x10 ⁶	5.17x10 ⁹
	LC	2600	20.52	80.96	2104960	53.52	53.04	-	-
05EV05	ori	20000	0.53	26.53	5306667	100.00	1.00	3.16x10 ⁵	6.32x10 ⁹
	uf	1300	0.87	468.80	6094400	114.84	1.66	3.16x10 ⁶	4.1x10 ⁹
	ufdi-fin	1200	1.75	515.20	6182400	116.50	3.32	3.16x10 ⁶	4.1x10 ⁹
	LC	2400	23.16	99.63	2391040	45.06	44.11	-	-
05EV06	ori	20000	0.35	13.36	2672000	100.00	1.00	1.38x10 ⁶	2.76x10 ¹⁰
	uf	1300	0.70	217.07	2821867	105.61	1.97	8.6x10 ⁶	1.18x10 ¹⁰
	ufdi-fin	1200	2.20	242.13	2905600	108.74	6.22	6.13x10 ⁶	7.36x10 ⁹
	LC	2400	15.45	43.73	1049600	39.28	43.62	-	-

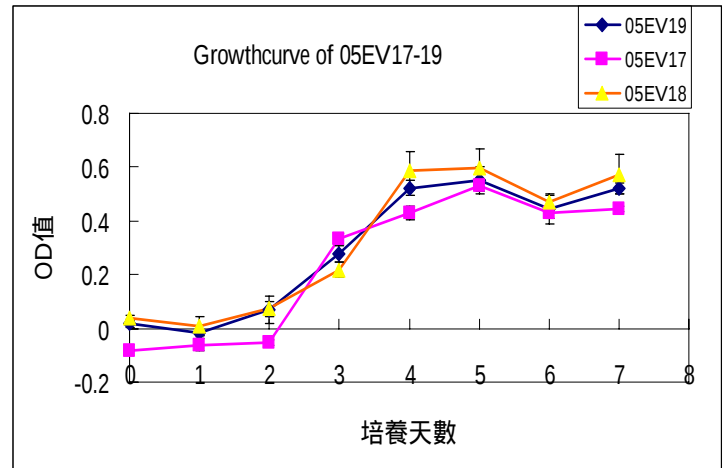


圖四、不同溫度病毒培養條件之比較。(A)32°C下培養病毒力價穩定上升，約在第5天達到高峰，(B)32°C下培養 ELISA titer 皆穩定上升，約在第5天達到高峰；37°C則在第3天即達高峰但隨即下降，第6天達第二次高峰。(C)37°C病毒力價則在第3天即達高峰但隨即下降。



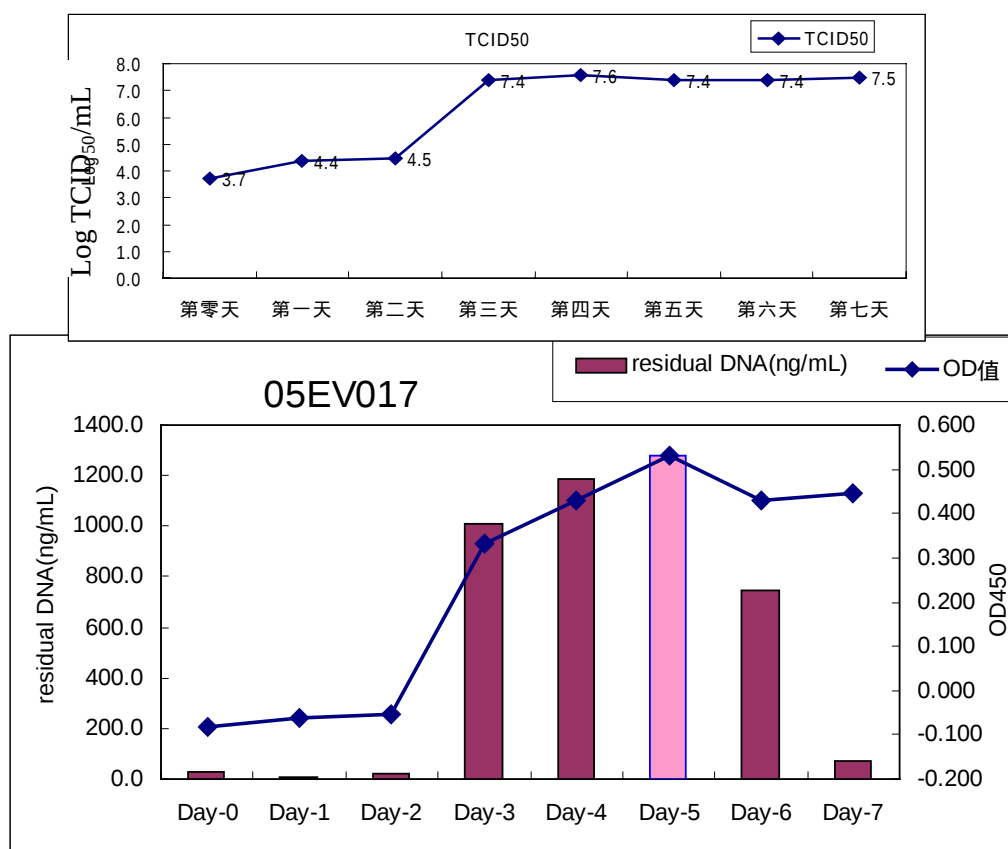


(B)

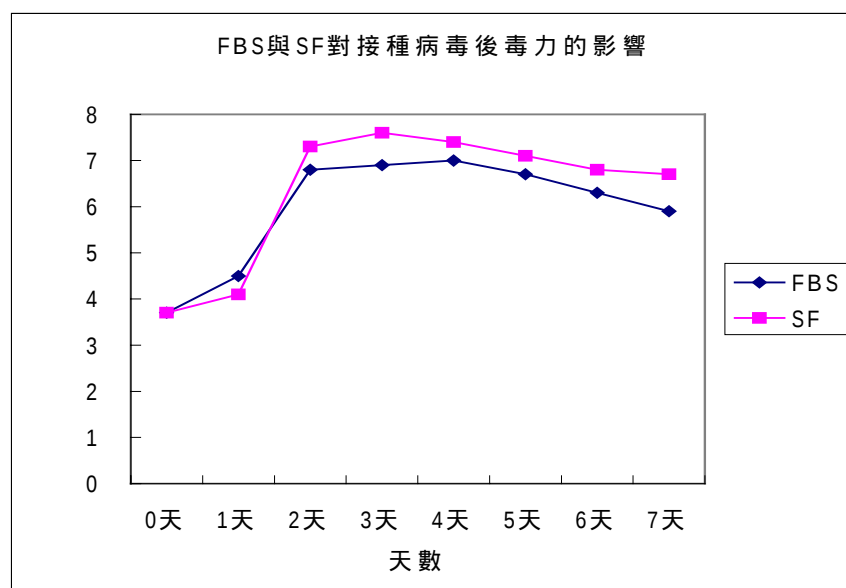


(D)

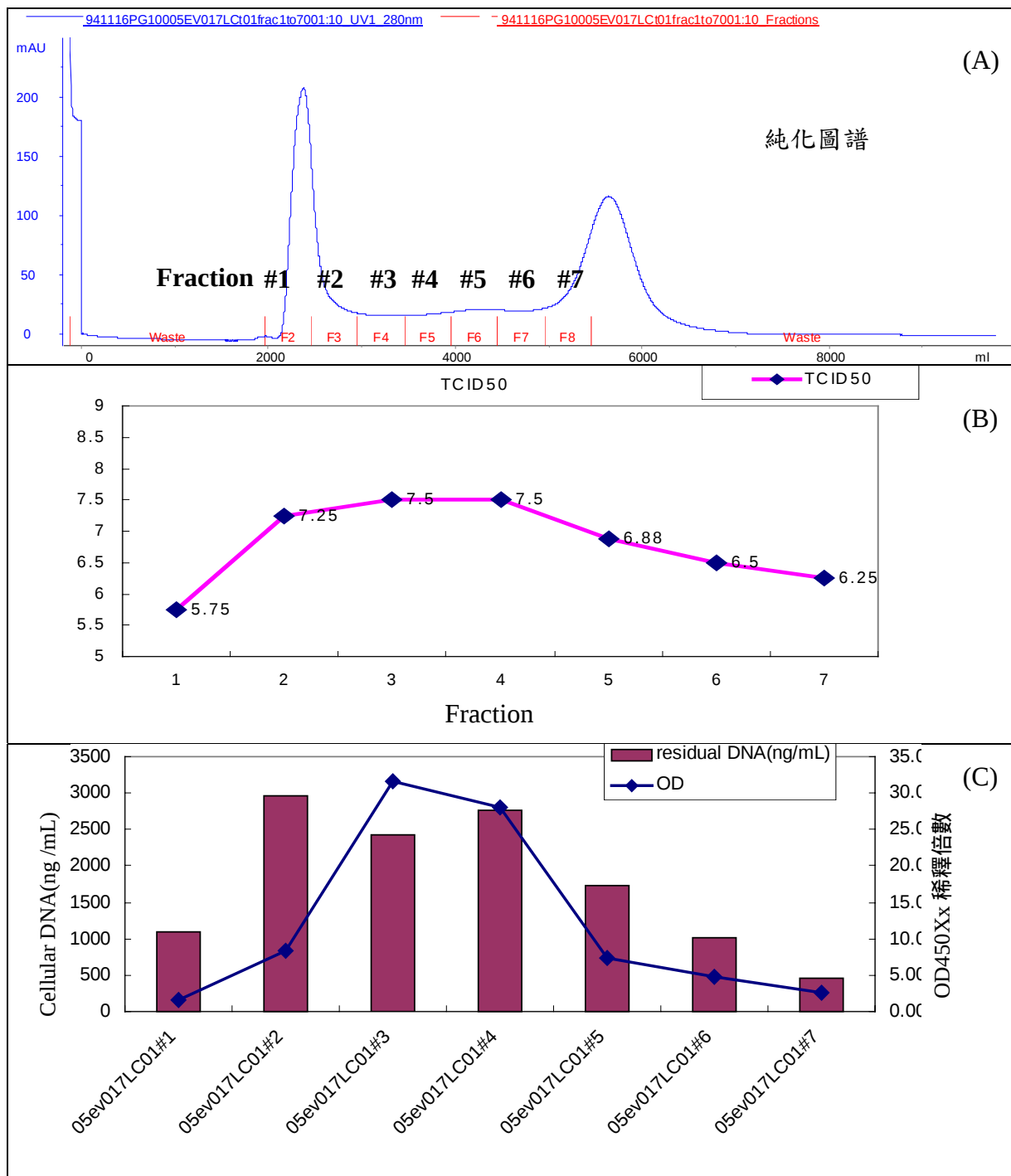
圖五、不同培養溫度之批次量產病毒毒力及抗原 ELISA 效價比較。(A) 37°C 條件下培養之連續三批次量產病毒力價，第 3 天至高峰，而後下降 (B) 32°C 條件下培養之批次量產力價，穩定上升至第 4、5 天形成高原期 (C) 37°C 條件下培養之連續三批次量產病毒抗原 ELISA 效價(D) 32°C 條件下培養之量產病毒抗原 ELISA 效價。



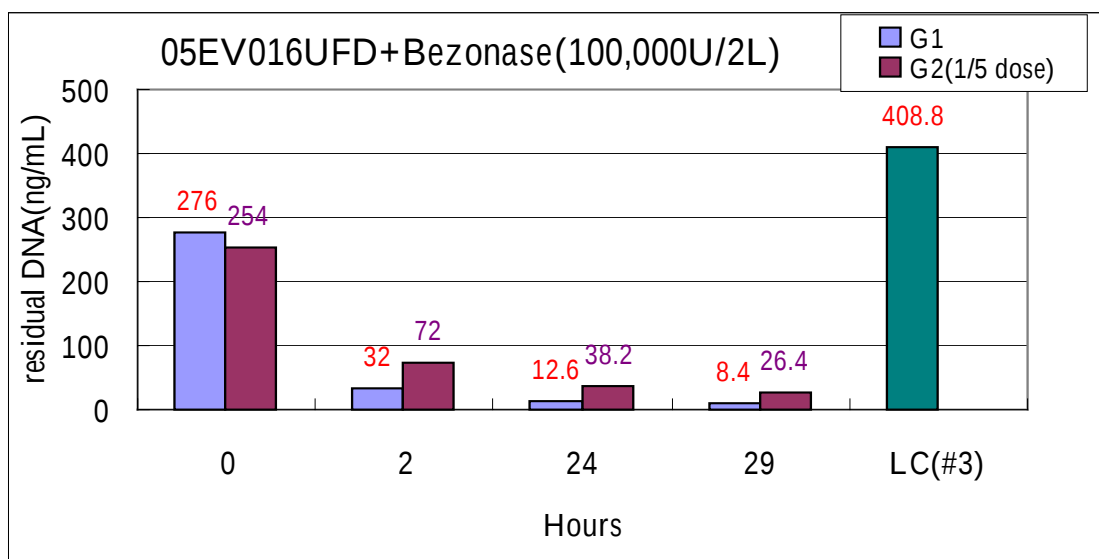
圖六、批次量產原液中細胞 DNA 含量與病毒力價及抗原 ELISA 效價變化之比較，三者的趨勢相符合。(第 5 天為收穫日)



圖七、病毒在無血清培養基(SFM)及含血清培養基(FBS)培養基生長之病毒力價比較



圖八、分析純化產物，病毒力價與抗原 ELISA 效價與細胞殘留 DNA 趨勢相近。(A)液相層析純化圖譜 (B)純化分液收集液病毒力價分布 (C)純化分液收集液細胞殘留 DNA 及抗原 ELISA 效價變化情形。



圖九、經 BENZONASE 處理後，病毒原液中細胞殘留 DNA 變化情形。2 小時即迅速下降，一日後即低於 10 ng/ mL，其中 LC 為未加酵素處理之純化產物。(G2 為 G1 之 1/5 用量)

表三、經由離子交換樹脂純化製程，可進一步提高產品單位效價，但回收率卻相對較低。(#為分液收集)

Fraction	OD ₄₅₀ /ug	Recovery(%)	Purification fold
05EV01LC2-1	8.696	100.00	1.00
05EV01DEAE#2	0.229	0.09	0.03
05EV01DEAE#3	1.950	0.91	0.22
05EV01DEAE#4	4.935	4.51	0.57
05EV01DEAE#5	2.659	5.19	0.31

表四 A、不同溫度條件下原型疫苗不活化反應之病毒力價及免疫後中和抗體效價比較

Condition		Day				
		6	12	24	30	
Virus Titer (LogTCID ₅₀ /100ul)	4	4.5	5	5.14	5	5.5
	4 +Formalin	3.6	<2.5	3	2.6	<2.5
	37	3.14	2.4	<1.5	<1.5	<1.5
	37 +Formalin	<2.5	<2.5	<2.5	<2.5	<2.5
Neutralization Titer (LogTCID ₅₀ /100ul)	4	288.67	493.508	350.75	366	65.405
	4 +Formalin	395.486	414.989	246.6	297	384.84
	37	375.8	446.68	101.86	73.115	158.485
	37 +Formalin	378.768	665.126	897.25	603.78	507.77

FORMALIN : 1/4000

表四 B、不同溫度條件下不活化反應之病毒力價變化比較

病毒批次	05EV04				
	7th day (LogTCID ₅₀ /ml)	14th day (LogTCID ₅₀ /ml)	21th day (LogTCID ₅₀ /ml)	28th day (LogTCID ₅₀ /ml)	35th day (LogTCID ₅₀ /ml)
-20	6.14				
4度	5.7	6.25	5.6	5.6	5.4
4度-F	2.75	2.6	<2.5	<2.5	<2.5
22度	5.5	5.75	5.14	4.66	4.25
22-F	<2.5	<2.5	<2.5	<2.5	<2.5
37度	4.4	3.5	2.5	<1.5	<1.5
37度-F	<2.5	<2.5	<2.5	<2.5	<2.5
control	7.5	7	7.25	7	7

病毒批次	05EV05				
-20	6.5				
4度	6.6	6.14	6.5	6.5	6.14
4度-formalin	4.25	3.14	3	2.75	<2.5
22度	5.5	6.14	6	5.14	4.75
22-formalin	<2.5	<2.5	<2.5	<2.5	<2.5
37度	4.75	3.14	2.5	2	<1.5
37度-formalin	<2.5	<2.5	<2.5	<2.5	<2.5
control	7.5	7	7.25	7	7

表五、病毒在 SFM 及 FBS 培養基生長之純化產物不活化 6 個月後安定性比較

	OD平均值	蛋白質濃度	原始濃度(ug/mL)	OD/ug
05EV01LC-ina	0.369	0.817	65.346	4.517
05EV01LC-6Month	0.419	0.650	51.996	6.442
05EV02-ina	0.613	0.741	47.424	8.273
05EV02LC-6Month	0.731	0.370	29.591	19.772
EV71SF01-ina	0.123	0.236	15.111	5.209
SF01LC-6Months	0.175	-0.082	<<6.25	-

表六：利用腸病毒 71 型原型疫苗(E259)免疫小鼠所產生之中和抗體進行病毒交叉中和特性分析

(vx : x 為於 vero 上培養的代數)

		抗體中和效價											
年份	基因型	serum virus	E259-V5	1207-rabbit	1207-V5	YN3H-V4	E815-V5	1225-V4	1232-V5	1263-V5	1341-V5	236-V5	459-V4
老鼠免疫抗原量 (OD/ml)			50 OD/ml	-	50 OD/ml	50 OD/ml	50 OD/ml	50 OD/ml	50 OD/ml	50 OD/ml	50 OD/ml	50 OD/ml	50 OD/ml
1998	C	E815-V5	40 < X < 160	-	10 < X < 40	40 < X < 160	40 < X < 160	-	-	-	40 < X < 160	10 < X < 40	40 < X < 160
	C	1207-V5	160 < X < 640	X > 12800	160 < X < 640	40 < X < 160	-	-	-	-	10 < X < 40	10 < X < 40	10 < X < 40
	C	1225-V4	160 < X < 640	-	160 < X < 640	40 < X < 160	-	40 < X < 160	-	-	10 < X < 40	10 < X < 40	10 < X < 40
	C	1232-V5	40 < X < 160	-	10 < X < 40	40 < X < 160	-	-	40 < X < 160	-	10 < X < 40	10 < X < 40	40 < X < 160
	C	1263-V5	10 < X < 40	X < 100	X < 10	X < 10	-	-	-	10 < X < 40	10 < X < 40	10 < X < 40	10 < X < 40
	大陸C	1341-V5	40 < X < 160	-	40 < X < 160	40 < X < 160	-	-	-	-	40 < X < 160	10 < X < 40	40 < X < 160
	C	YN3-V7	X < 10	X < 100	X < 10	X < 10	-	-	-	-	X < 10	X < 10	X < 10
	C	YN3H-V4	X < 10	X < 100	X < 10	X < 10	-	-	-	-	X < 10	X < 10	X < 10
2000	B	E43-V5	40 < X < 160	-	10 < X < 40	40 < X < 160	-	-	-	-	40 < X < 160	10 < X < 40	10 < X < 40
	B	E92-V5	40 < X < 160	-	40 < X < 160	40 < X < 160	-	-	-	-	40 < X < 160	40 < X < 160	40 < X < 160
	B	E259-V5		-	160 < X < 640	40 < X < 160	-	-	-	-	10 < X < 40	10 < X < 40	40 < X < 160
2002	B	E73-V5	40 < X < 160	-	40 < X < 160	40 < X < 160	-	-	-	-	10 < X < 40	10 < X < 40	10 < X < 40
	B	E75-V5	40 < X < 160	-	40 < X < 160	40 < X < 160	-	-	-	-	10 < X < 40	10 < X < 40	40 < X < 160
	B	E117-V5	40 < X < 160	-	40 < X < 160	40 < X < 160	-	-	-	-	10 < X < 40	10 < X < 40	40 < X < 160
	B	E119-V6	40 < X < 160	-	10 < X < 40	10 < X < 40	-	-	-	-	10 < X < 40	X < 10	10 < X < 40
	B	E120-V4	X > 640	-	X > 640	40 < X < 160	-	-	-	-	40 < X < 160	10 < X < 40	40 < X < 160
	B	E122-V6	10 < X < 40	-	10 < X < 40	10 < X < 40	-	-	-	-	10 < X < 40	10 < X < 40	10 < X < 40
2003	B	2161-V3	160 < X < 640	-	40 < X < 160	40 < X < 160	-	-	-	-	40 < X < 160	10 < X < 40	40 < X < 160
	B	1762-V3	X > 640	-	160 < X < 640	40 < X < 160	-	-	-	-	40 < X < 160	10 < X < 40	40 < X < 160
	B	1763-V4	40 < X < 160	-	40 < X < 160	160 < X < 640	-	-	-	-	10 < X < 40	40 < X < 160	160 < X < 640
2004	大陸C	236-V5	X < 10	X < 100	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10
	大陸C	459-V4	X < 10	X < 100	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10
	大陸C	624-V4	X < 10	X < 100	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10
	大陸C	798-V4	X < 10	X < 100	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10
	大陸C	887-V5	X < 10	X < 100	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10
	大陸C	912-V4	X < 10	X < 100	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10
	大陸C	1049-V4	10 < X < 40	X < 100	X < 10	10 < X < 40	10 < X < 40	10 < X < 40	10 < X < 40	10 < X < 40	10 < X < 40	10 < X < 40	10 < X < 40
	大陸C	1116-V5	10 < X < 40	X > 12800	10 < X < 40	10 < X < 40	10 < X < 40	10 < X < 40	10 < X < 40	X < 10	10 < X < 40	10 < X < 40	40 < X < 160
	大陸C	1118-V4	X < 10	X < 100	X < 10	10 < X < 40	10 < X < 40	X < 10	10 < X < 40	X < 10	X < 10	X < 10	10 < X < 40
	大陸C	1276-V4	X < 10	X < 100	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10
	大陸C	1295-V4	X < 10	X < 100	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10
	大陸C	1623-V4	X < 10	X < 100	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10
	大陸C	1627-V4	X < 10	X < 100	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10
1970	A	BrCr-V4	X < 10	-	X < 10	X < 10	-	-	-	-	X < 10	X < 10	X < 10

表六(續)

抗體中和效價

年份	基因型	serum virus	798-V4	887-V5	912-V5	1049-V5	1116-V5	1118-V5	1276-V4	1295-V4	1623-V4	1627-V4	BrCr-V4
老鼠免疫抗原量 (OD/ml)			50 OD/ml	50 OD/ml	50 OD/ml	50 OD/ml	50 OD/ml	50 OD/ml	50 OD/ml	50 OD/ml	50 OD/ml	50 OD/ml	50 OD/ml
1998	C	E815-V5	40 < X < 160	160 < X < 640	-	-	40 < X < 160	-	40 < X < 160	40 < X < 160	-	-	40 < X < 160
	C	1207-V5	40 < X < 160	40 < X < 160	-	-	40 < X < 160	-	10 < X < 40	10 < X < 40	-	-	10 < X < 40
	C	1225-V4	40 < X < 160	40 < X < 160	-	-	40 < X < 160	-	40 < X < 160	10 < X < 40	-	-	40 < X < 160
	C	1232-V5	40 < X < 160	10 < X < 40	-	-	10 < X < 40	-	40 < X < 160	40 < X < 160	-	-	40 < X < 160
	C	1263-V5	10 < X < 40	10 < X < 40	-	-	10 < X < 40	-	10 < X < 40	10 < X < 40	10 < X < 40	10 < X < 40	10 < X < 40
	大陸C	1341-V5	40 < X < 160	40 < X < 160	-	-	160 < X < 640	-	40 < X < 160	40 < X < 160	-	-	40 < X < 160
	C	YN3-V7	X < 10	X < 10	-	-	X < 10	-	X < 10	X < 10	-	-	X < 10
2000	C	YN3H-V4	X < 10	X < 10	-	-	X < 10	-	X < 10	X < 10	-	-	X < 10
	B	E43-V5	40 < X < 160	40 < X < 160	-	-	10 < X < 40	-	10 < X < 40	40 < X < 160	-	-	40 < X < 160
	B	E92-V5	40 < X < 160	40 < X < 160	-	-	40 < X < 160	-	40 < X < 160	40 < X < 160	-	-	40 < X < 160
2002	B	E259-V5	40 < X < 160	40 < X < 160	-	-	10 < X < 40	-	40 < X < 160	10 < X < 40	-	-	40 < X < 160
	B	E73-V5	40 < X < 160	40 < X < 160	-	-	40 < X < 160	-	40 < X < 160	10 < X < 40	-	-	40 < X < 160
	B	E75-V5	40 < X < 160	40 < X < 160	-	-	10 < X < 40	-	40 < X < 160	10 < X < 40	-	-	40 < X < 160
	B	E117-V5	40 < X < 160	40 < X < 160	-	-	10 < X < 40	-	40 < X < 160	40 < X < 160	-	-	40 < X < 160
	B	E119-V6	10 < X < 40	10 < X < 40	-	-	10 < X < 40	-	10 < X < 40	X < 10	-	-	10 < X < 40
	B	E120-V4	40 < X < 160	40 < X < 160	-	-	160 < X < 640	-	40 < X < 160	10 < X < 40	-	-	40 < X < 160
	B	E122-V6	40 < X < 160	10 < X < 40	-	-	10 < X < 40	-	10 < X < 40	X < 10	-	-	10 < X < 40
2003	B	2161-V3	40 < X < 160	40 < X < 160	-	-	160 < X < 640	-	40 < X < 160	X < 10	-	-	40 < X < 160
	B	1762-V3	40 < X < 160	40 < X < 160	-	-	160 < X < 640	-	40 < X < 160	X < 10	-	-	40 < X < 160
	B	1763-V4	160 < X < 640	160 < X < 640	-	-	40 < X < 160	-	160 < X < 640	X < 10	-	-	160 < X < 640
2004	大陸C	236-V5	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10
	大陸C	459-V4	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10
	大陸C	624-V4	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10
	大陸C	798-V4	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10
	大陸C	887-V5	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10
	大陸C	912-V4	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10
	大陸C	1049-V4	10 < X < 40	10 < X < 40	10 < X < 40	10 < X < 40	X < 10	10 < X < 40	10 < X < 40	10 < X < 40	10 < X < 40	10 < X < 40	10 < X < 40
	大陸C	1116-V5	40 < X < 160	40 < X < 160	40 < X < 160	10 < X < 40	40 < X < 160	40 < X < 160	40 < X < 160	10 < X < 40	10 < X < 40	10 < X < 40	40 < X < 160
	大陸C	1118-V4	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	10 < X < 40	X < 10	10 < X < 40	10 < X < 40	10 < X < 40	X < 10
	大陸C	1276-V4	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10
	大陸C	1295-V4	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	10 < X < 40	X < 10	X < 10	X < 10
	大陸C	1623-V4	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10
1970	大陸C	1627-V4	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10	X < 10
	A	BrCr-V4	X < 10	X < 10	-	-	X < 10	-	X < 10	X < 10	-	-	X < 10

表七、建立已分離腸病毒 71 型毒株病毒庫

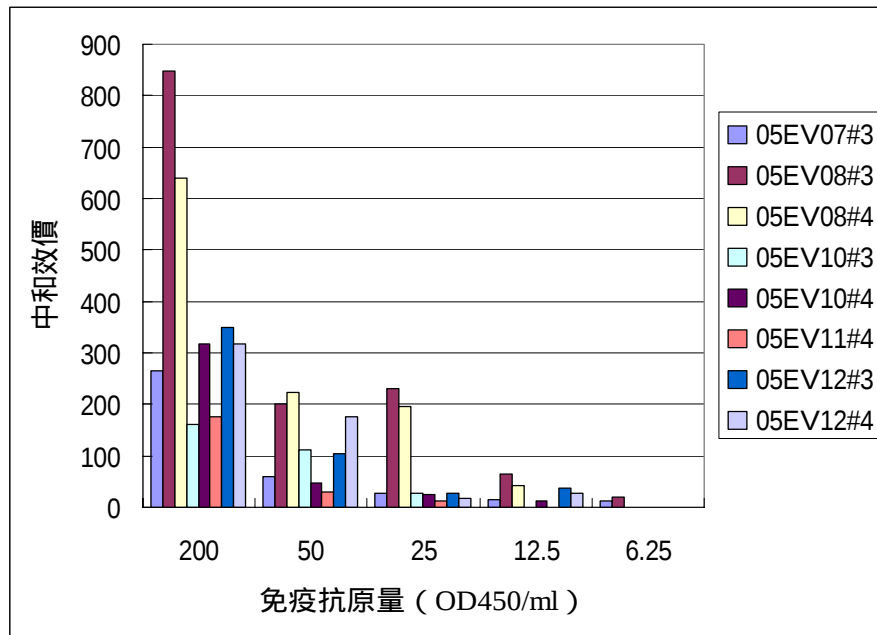
病毒庫建立

年份	病毒株	基因型	代數 Vero	TCID ₅₀ (ml)	抗原量 (OD/ml)	年份	病毒株	基因型	代數 Vero	TCID ₅₀ (ml)	抗原量 (OD/ml)
1998	E815	C	5	6.50	298.70	2004	236	大陸C	5	6.13	230.62
	1207	C	5	7.18	99.04		459	大陸C	4	6.13	171.12
	1225	C	4	6.48	205.16		624	大陸C	4	6.45	120.72
	1232	C	5	7.25	141.49		798	大陸C	4	5.68	234.79
	1341	大陸C	5	6.60	93.16		887	大陸C	5	6.27	48.47
	1263	C	5	5.88	210.66		912	大陸C	4	5.25	69.53
	YN3	C	7	7.00	196.38		1049	大陸C	4	5.75	89.05
	YN3H	C	4	6.25	65.44		1116	大陸C	5	6.70	139.96
2000	E43	B	5	6.00	—		1118	大陸C	4	5.75	50.81
	E92	B	3	5.50	—		1276	大陸C	4	5.60	121.64
	E259	B	5	7.45	—		1295	大陸C	4	5.60	187.55
2002	E73	B	5	7.13	—		1623	大陸C	4	5.85	120.01
	E75	B	5	7.55	—		1627	大陸C	4	5.75	81.42
	E117	B	5	7.75	—	1970	BrCr	A	4	5.87	77.82
	E119	B	6	7.48	—						
	E120	B	4	6.19	—						
	E122	B	6	7.10	—						
2003	2161	B	3	6.72	—						
	1762	B	3	5.63	—						
	1763	B	4	7.50	—						

1. 1970/2003/2004年新病毒株經過adapt後，毒力皆上升到 10^5 /ml以上。

表八、批次量產原型疫苗小鼠免疫所使用劑量及蛋白濃度 (#為收集之編號)

病 毒 株	原 始 病 毒 力 價 (O D /m L)	免 疫 病 毒 力 價 (O D /m L)	免 疫 蛋 白 濃 度 (u g /m L)
0 5 E V 0 7 # 3	7 1 2 . 5 3	2 0 0	1 2 . 8 9
		5 0	3 . 2 2
		2 5	1 . 6 1
		1 2 . 5	0 . 8 1
		6 . 2 5	0 . 4 1
0 5 E V 0 8 # 3	2 9 3 . 4 7	2 0 0	8 . 6 1
		5 0	2 . 1 5
		2 5	1 . 0 8
		1 2 . 5	0 . 5 4
		6 . 2 5	0 . 2 7
0 5 E V 0 8 # 4	3 1 7 . 9 2	2 0 0	1 0 . 2 5
		5 0	2 . 5 6
		2 5	1 . 2 8
		1 2 . 5	0 . 6 4
		6 . 2 5	0 . 3 2
0 5 E V 1 0 # 3	4 6 6 . 7 5	2 0 0	7 . 9 3
		5 0	1 . 9 8
		2 5	0 . 9 9
		1 2 . 5	0 . 5 0
		6 . 2 5	0 . 2 5
0 5 E V 1 0 # 4	3 2 7 . 5 3	2 0 0	1 2 . 6 7
		5 0	3 . 1 7
		2 5	1 . 5 8
		1 2 . 5	0 . 7 9
		6 . 2 5	0 . 4 0
0 5 E V 1 1 # 4	4 0 3 . 9 0	2 0 0	6 . 4 5
		5 0	1 . 6 1
		2 5	0 . 8 1
		1 2 . 5	0 . 4 0
		6 . 2 5	0 . 2 0
0 5 E V 1 2 # 3	3 3 0 . 6 2	2 0 0	4 . 1 1
		5 0	1 . 0 3
		2 5	0 . 5 1
		1 2 . 5	0 . 2 6
		6 . 2 5	0 . 1 3
0 5 E V 1 2 # 4	3 9 7 . 0 4	2 0 0	3 . 8 2
		5 0	0 . 9 6
		2 5	0 . 4 8
		1 2 . 5	0 . 2 4
		6 . 2 5	0 . 1 2



圖十、批次量產原型疫苗小鼠免疫中和試驗結果，各批次免疫劑量為 200 OD₄₅₀/mL 者，其產生的中和抗體力價皆可高於 1：100。