I737584

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 **(11)證書號數：TW I737584 B**

(45)公告日： 中華民國 110 (2021) 年 09 月 01 日

(21)申請案號：104136745 (22)申請日： 中華民國 104 (2015) 年 11 月 06 日

(51)Int. Cl.： ***C12N15/41 (2006.01)*** ***A61K39/125 (2006.01)***

(30)優先權：2014/11/07 美國 62/077,139

(71)申請人：美商武田疫苗公司 (美國) TAKEDA VACCINES, INC. (US)
美國

(72)發明人：達斯 蘇巴許 查達拉 DAS, SUBASH CHANDRA (US)；聖塔奇洛 裘瑟芬 大衛 SANTANGELO, JOSEPH DAVID (US)；史汀奇科畢 丹 湯瑪斯 STINCHCOMB, DAN THOMAS (US)；奧索里歐 裘奇E OSORIO, JORGE E. (US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

Victorio CBL et al., "Phenotypic and Genotypic Characteristics of Novel Mouse Cell Line (NIH/3T3)-Adapted Human Enterovirus 71 Strains (EV71:TLLm and EV71:TLLmv)", PLOS ONE, Vol.9, No.3, e92719, 2004/03/26

Lin YC et al., "Characterization of a vero cell-adapted virulent strain of enterovirus 71 suitable for use as a vaccine candidate", Vaccine, Vol.20, No.19-20, P.2485-2493, 2002/06/07

An WQ et al., "The immunogenicity and protection effect of the BPL-inactivated CA16 vaccine in different animal systems", Human Vaccines & Immunotherapeutics, Vol.10, No.3, P.628-639, 2014/03

Hwa SH et al., "Preclinical Evaluation of the Immunogenicity and Safety of an Inactivated Enterovirus 71 Candidate Vaccine", PLOS Neglected Tropical Diseases, Vol.7, No.11, e2538, 2013/11

Ong KC et al., "Formaldehyde-Inactivated Whole-Virus Vaccine Protects a Murine Model of Enterovirus 71 Encephalomyelitis against Disease", Journal of Virology, Vol.84, No.1, P.661-665, 2010/01

審查人員：施雅儀

申請專利範圍項數：16 項 圖式數：25 共 221 頁

(54)名稱

手、足及口疫苗及其製備及使用方法

(57)摘要

本發明係關於手、足及口病疫苗以及免疫原性組合物，其具有一或多種來自至少一種引起人類之手、足及口病的病毒之抗原；以及其製造、調配及測試的方法及用途。

The present disclosure relates to hand, foot, and mouth disease vaccines and immunogenic compositions having one or more antigens from at least one virus that causes hand, foot, and mouth disease in humans, and methods of manufacture, formulation, and testing, and uses thereof.

指定代表圖：

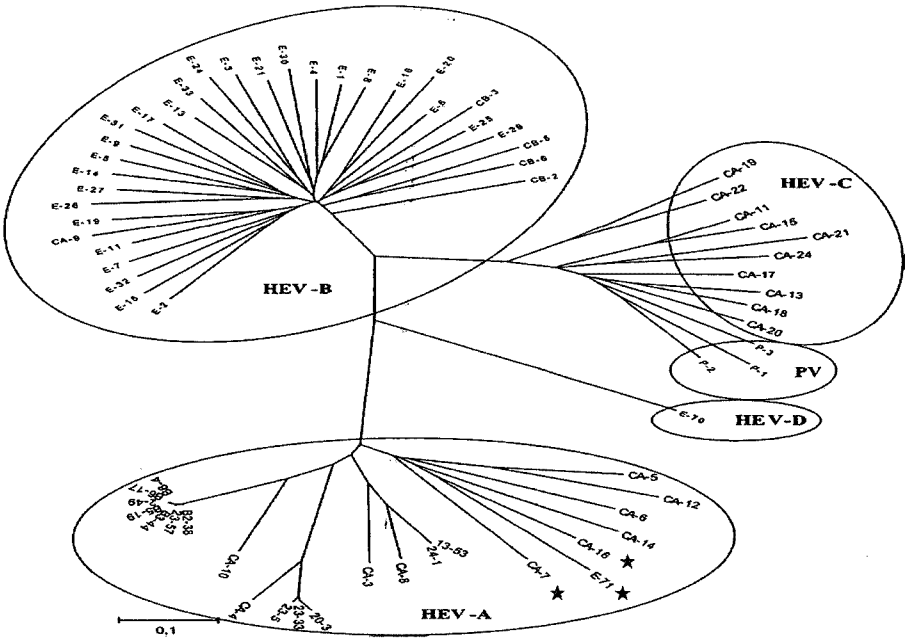

HEV-B
HEV-C
PV
HEV-D
HEV-A
CA-19
CA-22
CA-11
CA-15
CA-21
CA-24
CA-17
CA-13
CA-18
CA-20
P-3
P-2
P-1
E-10
CA-5
CA-12
CA-6
CA-14
CA-16
CA-7
E-7
CA-3
CA-8
13-53
24-1
CA-10
CA-4
0,1

圖1

I737584

公告本

發明摘要

※ 申請案號：104136745

※ 申請日：104年11月6日　　※IPC 分類：*C12N 15/41* (2006.01)
A61K 39/125 (2006.01)

【發明名稱】

手、足及口疫苗及其製備及使用方法

HAND, FOOT, AND MOUTH VACCINES AND METHODS OF MANUFACTURE AND USE THEREOF

【中文】

本發明係關於手、足及口病疫苗以及免疫原性組合物，其具有一或多種來自至少一種引起人類之手、足及口病的病毒之抗原；以及其製造、調配及測試的方法及用途。

【英文】

The present disclosure relates to hand, foot, and mouth disease vaccines and immunogenic compositions having one or more antigens from at least one virus that causes hand, foot, and mouth disease in humans, and methods of manufacture, formulation, and testing, and uses thereof.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（1）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

(無)

發明專利說明書

（本說明書格式、順序，請勿任意更動）

【發明名稱】

手、足及口疫苗及其製備及使用方法

HAND, FOOT, AND MOUTH VACCINES AND METHODS OF MANUFACTURE AND USE THEREOF

相關申請案之交叉參考

本案主張2014年11月7日申請之美國臨時申請案第62/077,139號的權益，該案以全文引用的方式併入本文中。

序列表以正文檔案提交

以ASCII正文檔案提交之以下內容以全文引用的方式併入本文中：電腦可讀形式(CRF)之序列表（檔案名稱：606772000940SEQLIST.TXT，記錄日期：2015年10月29日，大小：92 KB)。

【技術領域】

本發明係關於具有一或多種抗原的手、足及口病疫苗以及免疫原性組合物，該等抗原來自一或多種導致人類之手、足及口病的病毒；以及其製造、調配及測試的方法及用途。

【先前技術】

手、足及口病(HFMD)係由人類腸病毒A (HEV-A)群組中之若干成員引起。其通常為影響大多數兒童的自限性感染且特徵為手、足及口腔出現潰瘍及小泡。然而，更嚴重形式的疾病可能出現神經學症狀，諸如腦膜炎、腦炎、脊髓灰質炎樣麻痹，及引起肺水腫的腦幹腦炎(Huang, C.等人, (1999) *N Engl J Med* 341: 936-942；Chang, L.等人, (1998) Lancet 352: 367-368；Ooi, M.等人, (2009) *BMC Infect Dis* 9:

3)。人類腸病毒A屬於非包膜正義RNA病毒之小核糖核酸病毒科，其亦包括脊髓灰質炎病毒及鼻病毒。可引起HFMD之HEV-A群組成員包括腸病毒71 (EV71)及柯沙奇病毒(Coxsackieviruses)，包括血清型A1、A4、A6、A10及A16 (Pallansch及Roos, (2007) Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, 編者. Fields Virology. Philadelphia, PA Lippincott Williams & Wilkins. 第839-894頁；及Kobayashi M等人, *Jpn J Infect Dis* 2013; 66:260-1)。

腸病毒71及柯沙奇病毒含有四種衣殼蛋白(VP1-VP4)及七種非結構蛋白。除保護病毒RNA之外，衣殼蛋白亦識別宿主細胞表面上之受體且促成病毒之抗原性概況[8] (Jubelt 2014 Handbook of Clinical Neurology)。EV71之已知人類細胞表面受體為清道夫受體B2 (scavenger receptor B2，SCARB2)，及P-選擇素醣蛋白配位體1 (P-selectin glycoprotein ligand 1，PSGL-1)(Yamayoshi S.等人, (2009) *Nat Med* 15:798-801；Nishimura Y.等人, (2009) *Nat Med* 15: 794-797)，而柯沙奇A病毒結合至細胞內黏附分子-1 (intracellular adhesion molecule-1，ICAM)、衰減加速因子(decay accelerating factor，DAF)、整合素αvβ3，及MHC-I相關之葡萄糖調節性蛋白78 (glucose regulated protein 78，GRP78)(Bergelson, J.等人, (2013) *Adv Exp Med* 790: 24-41))。

HFMD之發病率通常隨著年齡增長而降低。然而，五歲以下兒童由於CNS經EV71感染而特別易患最嚴重形式的HFMD。此可導致神經疾病，包括無菌性腦膜炎、腦幹及/或小腦腦炎以及急性弛緩性麻痺(Ooi, M.等人, (2010) *Lancet Neurol.* 9: 1097-1105；McMinn, P.等人, (2002) *FEMS Microbiol. Rev.* 26: 91-107)。一些此等嚴重情況亦導致自主神經系統感染，接著可引起神經性肺水腫，神經性肺水腫又可引起心肺衰竭。相較於具有CNS受累、但不具有神經性肺水腫的患者，

EV71感染伴CNS受累及心肺衰竭已與長期神經後遺症、神經發育延遲及認知功能降低相關(Chang, L.等人, (2007) *N. Engl. J. Med.* 356:1226-1234；Ooi, M.等人, (2010) *Lancet Neurol.* 9: 1097-1105；Solomon, T. 等人, (2010) *Lancet Infect. Dis.* 10: 778-790)。長期神經後遺症的病因被認為是由於神經元被EV71直接感染而引起的神經元損傷。

在亞洲，每年均發生HFMD流行病，其中有許多嚴重病例報導。2007年散佈於中國的報導顯示逾80,000個嚴重HFMD病例。2008年，據報導中國有近500,000個嚴重疾病病例。中國衛生部(Chinese Ministry of Health，MOH)報導，2009年1月與7月之間，存在逾787,000個HFMD病例，其中嚴重病例逾10,500例，定義為CNS受累。來自中國的近期報導進一步指出，2010年存在逾1.5百萬個經診斷患有HFMD的兒童。

儘管HFMD盛行於中國，但目前針對HFMD的疫苗無法獲得，針對感染之有效抗病毒療法亦無法獲得。治療HFMD僅聚焦於症狀緩解。嚴重口腔潰瘍可產生疼痛性口腔炎，其干擾食物與流體之口服攝入，導致脫水，此可能需要住院。腦膜腦炎及心肺驟停需要應急的及全面的支援性療法及管理。

【發明內容】

因此，需要開發用於治療及/或預防手、足及口病、尤其兒童之手、足及口病的疫苗及免疫原性組合物。為了滿足此需要，本發明提供用於治療及/或預防手、足及口病的疫苗及免疫原性組合物，其包括來自至少一種引起人類之手、足及口病之病毒(諸如EV71、CA6及CA16)的抗原。有利的是，抗原可包括至少一個允許在所培養非人類細胞株(諸如Vero細胞)中產生的適應突變。此外，如本文所揭示，本發明之疫苗及免疫原性組合物已證明可誘導針對引起人類之手、足及

口病之病毒的保護性免疫反應。

因此，本發明之某些態樣提供手、足及口疫苗，其含有一或多種來自引起人類之手、足及口病之至少一種病毒的抗原，其中一或多種抗原包括至少一個非人類細胞適應突變。因此，本發明之某些態樣提供手、足及口免疫原性組合物，其含有一或多種來自引起人類之手、足及口病之至少一種病毒的抗原，其中一或多種抗原包含至少一個非人類細胞適應突變。本發明之其他態樣提供一種藉由向有需要之個體投與治療有效量之任一種本文所揭示疫苗或免疫原性組合物來治療或預防該個體之手、足及口病的方法。本發明之其他態樣提供一種藉由向有需要之個體投與免疫原性量之任一種本文所揭示疫苗或免疫原性組合物來誘導該個體發生免疫反應的方法。

本發明之其他態樣提供手、足及口疫苗，其含有一或多種來自引起人類之手、足及口病之至少一種不活化病毒的抗原，其中該至少一種病毒為EV71、CA16或兩者，且其中該至少一種病毒用β-丙內酯(BPL)不活化。本發明之其他態樣提供手、足及口免疫原性組合物，其含有一或多種來自引起人類之手、足及口病之至少一種不活化病毒的抗原，其中該至少一種病毒為EV71、CA16或兩者，且其中該至少一種病毒用β-丙內酯(BPL)不活化。本發明之其他態樣提供一種藉由向有需要之個體投與治療有效量之任一種本文所揭示疫苗或免疫原性組合物來治療或預防該個體之手、足及口病的方法。本發明之其他態樣提供一種藉由向有需要之個體投與免疫原性量之任一種本文所揭示疫苗或免疫原性組合物來誘導該個體發生免疫反應的方法。本發明之其他態樣提供一種如下使手、足及口病毒製劑不活化的方法：(a)自一或多個非人類細胞中分離出手、足及口病毒製劑，其中該等細胞用於產生病毒製劑；(b)用有效量之β-丙內酯(BPL)處理病毒製劑；及(c)用有效量之福馬林(formalin)處理病毒製劑，其中福馬林處理步驟與

步驟(b)同時發生或在步驟(b)之後發生，且其中病毒係選自EV71、CA6及CA16中之一或多者。

本發明之其他態樣提供手、足及口疫苗，其含有一或多種來自引起人類之手、足及口病之至少一種不活化病毒的抗原，其中該至少一種病毒為CA6、CA16或兩者，且其中該至少一種病毒用福馬林加以不活化。本發明之其他態樣提供手、足及口免疫原性組合物，其含有一或多種來自引起人類之手、足及口病之至少一種不活化病毒的抗原，其中該至少一種病毒為CA6、CA16或兩者，且其中該至少一種病毒用福馬林加以不活化。本發明之其他態樣提供一種藉由向有需要之個體投與治療有效量之任一種本文所揭示疫苗或免疫原性組合物來治療或預防該個體之手、足及口病的方法。本發明之其他態樣提供一種藉由向有需要之個體投與免疫原性量之任一種本文所揭示疫苗或免疫原性組合物來誘導該個體發生免疫反應的方法。本發明之其他態樣提供一種如下使手、足及口病毒製劑不活化的方法：(a)自一或多個非人類細胞分離出手、足及口病毒製劑，其中該等細胞用於產生病毒製劑；(b)用有效量之福馬林處理病毒製劑；及(c)自福馬林純化病毒製劑，其中病毒係選自EV71、CA6及CA16中之一或多者。

本發明之其他態樣提供手、足及口疫苗，其含有一或多種來自引起人類之手、足及口病之至少一種病毒的抗原及鋁鹽佐劑，其中至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%抗原吸附至鋁鹽佐劑。本發明之其他態樣提供手、足及口免疫原性組合物，其含有一或多種來自引起人類之手、足及口病之至少一種病毒的抗原及鋁鹽佐劑，其中至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%抗原吸附至鋁鹽佐劑。本發明之其他態樣提供一種藉由向有需要之個體投與治療有效量之任一種本文所揭示疫苗或免疫原性組合物來治療或預防該個

體之手、足及口病的方法。本發明之其他態樣提供一種藉由向有需要之個體投與免疫原性量之任一種本文所揭示疫苗或免疫原性組合物來誘導該個體發生免疫反應的方法。本發明之其他態樣提供一種如下製備有佐劑之手、足及口疫苗的方法：(a)將疫苗與鋁鹽佐劑混合，其中疫苗包括一或多種來自引起人類之手、足及口病之至少一種病毒的抗原；及(b)在適合條件下將混合物培育約16小時至約24小時範圍內之時間段，其中至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%抗原吸附至鋁鹽佐劑，且其中至少一種引起手、足及口病的病毒係選自EV71、CA6及CA16中之一或多者。本發明之其他態樣提供一種製備有佐劑之手、足及口免疫原性組合物的方法：(a)將免疫原性組合物與鋁鹽佐劑混合，其中免疫原性組合物包括一或多種來自引起人類之手、足及口病之至少一種病毒的抗原；及(b)在適合條件下將混合物培育約16小時至約24小時範圍內之時間段，其中至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%抗原吸附至鋁鹽佐劑，且其中至少一種引起手、足及口病的病毒係選自EV71、CA6及CA16中之一或多者。

【圖式簡單說明】

該專利或申請案檔案含有至少一個彩製圖。在申請且支付必要費用後，專利局將提供附有彩圖之此專利或專利申請公開案之複本。

圖1顯示描繪人類腸病毒之系譜關係的樹。

圖2顯示例示性EV71株系之基因結構。

圖3顯示經適應之腸病毒71疫苗在不同劑量水準下、在小鼠中的免疫原性，得自TCID50中和分析的幾何平均效價值係以橫跨縱向時間點的圖形式呈現。

圖4顯示針對所選EV71子基因組(sub-genogroups)之EV71抗血清的交叉中和。

圖5顯示經適應之腸病毒71疫苗在NZW兔中的免疫原性，得自TCID50中和分析的幾何平均效價值係以橫跨縱向時間點的圖形式呈現。

圖6顯示CVA6基因組之圖。

圖7顯示對若干流行中之CVA6株系之VP1蛋白進行比較的胺基酸序列比對。

圖8顯示對CVA16之全長基因組測序所用之引子的圖。

圖9顯示CVA16基因組之圖。

圖10顯示流行中之CVA16株系之VP1蛋白的胺基酸序列比對。

圖11顯示基於VP1基因之CVA16的系譜分類。

圖12顯示CVA6及CVA16對經病毒RNA轉染之Vero細胞所顯現的細胞病變效應。

圖13A顯示藉由限制稀釋法對CVA6進行純系分離之方案的圖。圖13B顯示在第一輪CVA6限制稀釋中所選之純系的圖。圖13C顯示在第二輪CVA6限制稀釋中所選之純系的圖。

圖14顯示RNA再衍生CVA6在Vero細胞及RD細胞中之效價之比較。

圖15A顯示CVA16之第一輪空斑純化。圖15B顯示CVA16之第二輪空斑純化。

圖16顯示VP1蛋白在所選殖CVA16與P-3病毒之間的胺基酸序列比對。

圖17顯示針對EV71、CVA16及CVA6之抗體的幾何平均效價。

圖18顯示對小鼠進行免疫接種且用EV71及CVA16攻擊(challenge)的處理方案。

圖19顯示經EV71攻擊之小鼠的存活率。

圖20顯示所免疫小鼠中之血清EV71病毒效價。

圖21顯示經CVA16攻擊之小鼠的存活率。

圖22顯示所免疫小鼠中之血清CVA16病毒效價。

圖23顯示對小鼠進行被動免疫接種且用CVA6攻擊的處理方案。

圖24顯示經CVA6攻擊之小鼠的存活率。

圖25顯示所免疫小鼠中之血清CVA6病毒效價。

【實施方式】

通用技術

本文所述或所提及之技術及程序通常很好理解且普遍使用習知方法、由熟習此項技術者採用，諸如以下文獻中廣泛使用之方法：Sambrook等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*第3版(2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel等人編, (2003))；系列叢書*Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.): *PCR 2: A Practical Approach* (M.J. MacPherson, B.D. Hames及G.R. Taylor編(1995)); Harlow及Lane編(1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, 及*Animal Cell Culture* (R.I. Freshney編, (1987)); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait編, 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J.E. Cellis編, 1998) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney)編, 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J.P. Mather及P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J.B. Griffiths, 及D.G. Newell編, 1993-8) J. Wiley and Sons; *Handbook of Experimental Immunology* (D.M. Weir及C.C. Blackwell編); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.M. Miller及M.P. Calos編, 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis等人編, 1994); *Current Protocols in Immunology* (J.E. Coligan等人編, 1991); *Short Protocols in Molecular*

Biology (Wiley and Sons, 1999); *Immunobiology* (C.A. Janeway及P. Travers, 1997); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: A Practical Approach* (D. Catty.編, IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal Antibodies: A Practical Approach* (P. Shepherd及C. Dean.編, Oxford University Press, 2000); *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (E. Harlow及D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies* (M. Zanetti及J. D. Capra編, Harwood Academic Publishers, 1995); 及 *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (V.T. DeVita等人編, J.B. Lippincott Company, 1993)。

手、足及口病致病病毒

本發明之某些態樣係關於至少一種引起手、足及口病、可適用於疫苗及/或免疫原性組合物中之病毒，包括(但不限於)純化病毒、不活化病毒、減毒病毒、重組病毒，或用於次單位疫苗的經純化及/或重組病毒蛋白。

人類之手、足及口病(HFMD)起因於人類腸病毒A (HEV-A)群組之若干成員(**圖1**)。人類腸病毒A屬於非包膜正義RNA病毒之小核糖核酸病毒科，其亦包括脊髓灰質炎病毒及鼻病毒。可引起HFMD之HEV-A群組成員包括腸病毒71 (EV71)及柯沙奇病毒。因此，本發明之引起手、足及口病之適合病毒之實例包括(但不限於)腸病毒71 (EV71)；柯薩奇病毒A株系，包括血清型A1、A2、A4、A5、A6、A8、A9、A10或A16，或柯薩奇病毒B株系，包括血清型B3或B5或其任何組合。如本文所使用，術語「CA6」可與「CVA6」及「柯薩奇病毒A6」互換使用。如本文所使用，術語「CA16」可與「CVA16」及「柯薩奇病毒A16」互換使用。在一些實施例中，至少一種病毒可為選自EV71、CA6及CA16中之一或多種，兩種或兩種以上，或三種病毒。在一些實施例中，至少一種病毒可為EV71及CA6。在一些實施例中，至少

一種病毒可為EV71及CA16。在一些實施例中，至少一種病毒可為CA6及CA16。在一些實施例中，至少一種病毒可為EV71。

因此，在一些實施例中，引起手、足及口病之本發明病毒可用於本文所揭示之任一種疫苗及/或免疫原性組合物中。舉例而言，引起手、足及口病之本發明病毒可用於提供適用於治療或預防有需要之個體之手、足及口病及/或誘導有需要之個體發生針對手、足及口病之免疫反應(諸如保護性免疫反應)的一或多種抗原。

病毒抗原

本發明之其他態樣係關於一或多種來自引起手、足及口病之至少一種病毒、可適用於疫苗及/或免疫原性組合物中的抗原，包括(但不限於)純化病毒、不活化病毒、減毒病毒、重組病毒，或用於次單位疫苗之經純化及/或重組病毒蛋白。

本發明之抗原可為能夠誘發免疫反應的任何物質。適合抗原之實例包括(但不限於)完整病毒、減毒病毒、不活化病毒、蛋白質、多肽(包括活性蛋白及蛋白質內之個別多肽抗原決定基)、醣多肽、脂多肽、肽、多醣、多醣結合物、肽，以及多醣及其他分子、小分子、脂質、醣脂及碳水化合物之非肽模擬物。

在一些實施例中，本發明之抗原可來自已知可引起HFMD的任何病毒，包括(但不限於)腸病毒71 (EV71)；柯薩奇病毒A株系，包括血清型A1、A2、A4、A5、A6、A8、A9、A10或A16，或柯薩奇病毒B株系，包括血清型B3或B5，或其任何組合。在一些實施例中，本發明之抗原可為選自EV71、CA6及CA16中之一或多種，兩種或兩種以上，三種或三種以上，四種或四種以上，五種或五種以上，六種或六種以上，七種或七種以上，八種或八種以上，九種或九種以上，或十種或十種以上抗原。在一些實施例中，本發明之抗原可來自EV71及CA6。在一些實施例中，本發明之抗原可來自EV71及CA16。在一些

實施例中，本發明之抗原可來自CA6及CA16。在一些實施例中，本發明之抗原可來自EV71。在一些實施例中，本發明之抗原可來自CA6。在一些實施例中，本發明之抗原可來自CA16。

本發明之抗原可包括至少一種非人類細胞適應突變。適應突變可藉由採用病毒於特定細胞株中生長而產生。舉例而言，細胞可經病毒轉染且繼代，從而使病毒複製且其核酸發生突變。核酸突變可為點突變、插入突變或缺失突變。核酸突變可引起病毒蛋白質內發生促使病毒於非人類細胞中生長之胺基酸變化。適應突變可促使病毒發生表型變化，包括改變之空斑大小、生長動力學、溫度敏感性、抗藥性、毒性，及細胞培養中的病毒產量。此等適應性突變可適用於藉由提高病毒於細胞株中所培養之速度及產量而製成的疫苗。另外，適應性突變可藉由改變免疫原性抗原決定基之結構來增強病毒抗原之免疫原性。

因此，在某些實施例中，來自至少一種引起手、足及口病之病毒的本發明抗原包括至少一個非人類細胞適應突變。在某些實施例中，適應突變為病毒抗原相對於非人類細胞發生的突變。在一些實施例中，非人類細胞可為哺乳動物細胞。非人類哺乳動物細胞之實例包括(但不限於) VERO細胞(來自猴腎臟)、MDBK細胞、MDCK細胞、ATCC CCL34 MDCK (NBL2)細胞、MDCK 33016 (寄存編號DSM ACC 2219，如WO97/37001中所述)細胞、BHK21-F細胞、HKCC細胞，或中國倉鼠卵巢細胞(CHO細胞)。在一些實施例中，非人類細胞可為猴細胞。在一些實施例中，猴細胞來自Vero細胞株。適合Vero細胞株之實例包括(但不限於) WHO Vero 10-87、ATCC CCL-81、Vero 76 (ATCC寄存編號CRL-1587)，或Vero C1008 (ATCC寄存編號CRL-1586)。

EV71、CA6及CA16具有線性、正義、單股RNA基因組(圖2)。此

等病毒基因組中之每一者編碼結構多肽與非結構多肽。由此等病毒中之每一者編碼的結構多肽包括(但不限於) VP1、VP2、VP3及VP4，其可一起組成病毒衣殼。由此等病毒中之每一者編碼的非結構多肽包括(但不限於)涉及例如病毒複製及毒性的2A、2B、2C、3A、3B、3C及3D。

因此，在某些實施例中，本發明之抗原可含有至少1個、至少2個、至少3個、至少4個、至少5個、至少6個、至少7個、至少8個、至少9個、至少10個、至少11個、至少12個、至少13個、至少14個、至少15個、至少16個、至少17個、至少18個、至少19個、至少20個或20個以上非人類細胞適應突變於一或多種、兩種或兩種以上、三種或三種以上、四種或四種以上、五種或五種以上、六種或六種以上、七種或七種以上、八種或八種以上、九種或九種以上、或十種或十種以上病毒抗原內，包括(但不限於) VP1、VP2、VP3、2A、2B、2C、3A、3B、3C及3D。在一些實施例中，本發明之抗原包括完整不活化病毒，其可含有至少1個、至少2個、至少3個、至少4個、至少5個、至少6個、至少7個、至少8個、至少9個、至少10個或10個以上非人類細胞適應突變於病毒之5'或3'未轉譯區(UTR)內。

在一些實施例中，至少一個非人類細胞適應突變位於EV71之VP1多肽內。來自例示性EV71株系之VP1多肽的胺基酸序列闡述為：

GDRVADVIESSIGDSVSRALTQALPAPTGQNTQVSSHRLDTGEVPALQAAEIGASSNT
SDESMIETRCVLNSHSTAETTLDSFFSRAGLVGEIDLPLEGTTNPNGYANWDIDITGY
AQMRRKVELFTYMRFDAEFTFVACTPTGEVVPQLLQYMFVPPGAPKPESRESLAWQ
TATNPSVFVKLTDPPAQVSVPFMSPASAYQWFYDGYPTFGEHKQEKDLEYGACPNN
MMGTFSVRTVGSSKSKYPLVVRIYMRMKHVRAWIPRPMRNQNYLFKANPNYAGNS
IKPTGTSRNAITTL (SEQ ID NO: 1)。

在一些實施例中，至少一個非人類細胞適應突變發生於EV71之VP1多肽內之一或多個胺基酸位置。在一些實施例中，當使用成對

(pairwise)比對演算法對EV71之VP1多肽與SEQ ID NO: 1比對時，突變可發生於選自SEQ ID NO: 1之7、14、145及282之一或多個、兩個或兩個以上、三個或三個以上或四個胺基酸位置，或發生於與SEQ ID NO: 1之位置7、14、145或282對應的位置。在一些實施例中，當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 1比對時，突變發生於SEQ ID NO: 1之位置7或與SEQ ID NO: 1之位置7對應之位置。在一些實施例中，當使用成對比對演算法對EV71之VP1多肽與SEQ ID NO: 1比對時，突變發生於SEQ ID NO: 1之位置7，或SEQ ID NO: 1之位置7、14、145或282中的兩個或兩個以上，三個或三個以上或所有四個位置，或與SEQ ID NO: 1之位置7、14、145或282對應的位置。在一些實施例中，位置7之突變為纈胺酸經甲硫胺酸取代。在一些實施例中，位置14之突變為天冬胺酸經天冬醯胺取代。在一些實施例中，位置145之突變為麩胺酸經麩醯胺酸取代。在一些實施例中，位置282之突變為天冬醯胺經天冬胺酸取代。

在一些實施例中，至少一個非人類細胞適應突變位於CA6之VP1多肽內。來自例示性CA6株系之VP1多肽的胺基酸序列闡述為：

NDPISNAIENAVSTLADTTISRVTAANTAASSHSLGTGRVPALQAAETGASSNASDEN
LIETRCVMNRNGVNEASVEHFYSRAGLVGVVEVKDSGTSQDGYTVWPIDVMGFVQ
QRRKLELSTYMRFDAEFTFVSNLNDSTTPGMLLQYMYVPPGAPKPDGRKSYQWQT
ATNPSIFAKLSDPPPQVSVPFMSPASAYQWFYDGYPTFGEHKQATNLQYGQCPNNM
MGHFAIRTVSESTTGKNVHVRVYMRIKHVRAWVPRPFRSQAYMVKNYPTYSQTISN
TAADRASITTTDYEGGVPANPQRTF (SEQ ID NO: 2)。

在一些實施例中，至少一個非人類細胞適應突變發生於CA6之VP1多肽內之一或多個胺基酸位置。在一些實施例中，當使用成對比對演算法對CA6之VP1多肽與SEQ ID NO: 2比對時，突變可發生於選自SEQ ID NO: 2之46、90、96及268中的一或多個、兩個或兩個以上、三個或三個以上或四個胺基酸位置，或發生於與SEQ ID NO: 2之

位置46、90、96及268對應的位置。在一些實施例中，當使用成對比對演算法對CA6之VP1多肽與SEQ ID NO: 2比對時，突變發生於SEQ ID NO: 2之位置46、90、96及268中之一或多個、兩個或兩個以上、三個或三個以上或所有四個位置，或發生於與SEQ ID NO: 2之位置46、90、96及268對應之位置。在一些實施例中，位置46之突變為丙胺酸經纈胺酸取代。在一些實施例中，位置90之突變為麩胺酸經離胺酸取代。在一些實施例中，位置96之突變為蘇胺酸經丙胺酸取代。在一些實施例中，位置268之突變為纈胺酸經異白胺酸取代。

在一些實施例中，至少一個非人類細胞適應突變位於CA6之VP2多肽內。來自例示性CA6株系之VP2多肽的胺基酸序列闡述為：

SPSVEACGYSDRVAQLTVGNSTITTQEAANIVLSYGEWPGYCPSTDATAVDKPTRPD
VSVNRFYTLSTKSWKTESTGWYWKFPDVLNDTGVFGQNAQFHYLYRSGFCMHVQC
NASKFHQGALLVVVIPEFVVAASSPAMKPNGQGLYPDFAHTNPGKEGQVFRDPYVL
DAGIPLSQALVFPHQWINLRTNNCATIIMPYVNALPFDSALNHSNFGLAVIPISPLKYC
NGATTEVPITLTIAPLNSEFSGLRQAIKQ (SEQ ID NO: 3)。

在一些實施例中，當使用成對比對演算法對CA6之VP2多肽與SEQ ID NO: 3比對時，突變可發生於SEQ ID NO: 3之胺基酸位置144，或發生於與SEQ ID NO: 3之位置144對應的位置。在一些實施例中，位置144之突變為麩醯胺酸經離胺酸取代。

在一些實施例中，至少一個非人類細胞適應突變位於CA6之VP3多肽內。來自例示性CA6株系之VP3多肽的胺基酸序列闡述為：

GLPTELKPGTNQFLTTDDGTSPPILPGFEPTPLIHIPGEFTSLLDLCRIETILEVNNTTGT
TGVNRLLIPVRAQNNVDQLCASFQVDPGRNGPWQSTMVGQICRYYTQWSGSLKVTF
MFTGSFMATGKMLIAYTPPGSAQPTTREAAMLGTHIVWDFGLQSSVTLVIPWISNTH
FRAVKTGGVYDYYATGIVTIWYQTNFVVPPDTPSEANIIALGAAQENFTLKLCKDTD
EIRQTAEYQ (SEQ ID NO: 4)。

在一些實施例中，至少一個非人類細胞適應突變發生於CA6之VP3多肽內之一或多個胺基酸位置。在一些實施例中，當使用成對比

對演算法對CA6之VP3多肽與SEQ ID NO: 4比對時，突變可發生於SEQ ID NO: 4之胺基酸位置102，或發生於與SEQ ID NO: 4之位置102對應的位置。在一些實施例中，位置102之突變為異白胺酸經纈胺酸取代。

在一些實施例中，至少一個非人類細胞適應突變位於CA6之5'UTR內。來自例示性CA6株系之5'UTR的核酸序列闡述為：

TTAAAACAGCTAGTGGGTTGCACCCACTCACAGGGCCCACTGGGCGCTAGCACA
CTGATTTCCCGGAATCCTTGTGCGCCTGTTTTATATCCCCTCCCCCATGCGCAACT
TAGAAGCAATCTACACCTTCGATCAATAGCAGGCGTGGCGCGCCAGCCATGTCTA
GATCAAGCACTTCTGTTTCCCCGGACTGAGTATCAATAAACTGCTCACGCGGTTG
AAGGAGAAAATGTTCGTTACCCGGCTAACTACTTCGAGAAACCTAGTAGCACCA
TGAAAATTGCAGAGCGTTtCGcTCAGCGcTtCCCCcGCGtAGATCAGGCTGATGAGT
CACTGCATTCCTCACGGGCGACCGTGGCAGTGGCTGCGTTGGCGGCCTGCCCATG
GGGTAACCCATGGGACGCTCTAATATGGACATGGTGTGAAGAGTCTATTGAGCT
AGTTAGTAGTCCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCTAACTGCGGAGCACATAC
CCCCAAACCAGGGGGCGGTGTGTCGTAACGGGCAACTCTGCAGCGGAACCGACT
ACTTTGGGTGTCCGTGTTTCCTTTTATTCTTATATTGGCTGCTTATGGTGACAATT
GAAAGATTGTTACCATATAGCTATTGGATTGGCCATCCGGTGAATAACAGAGCCT
TGATATACCTTTTTGTAGGGTTTATACCACTTACTCTTCGCGTTGTTGAGACTCTA
AAGTACATTCTAATCTTGAACACTAGAAA (SEQ ID NO: 8)。

在一些實施例中，至少一個非人類細胞適應突變發生於CA6之5'UTR內的一或多個核酸位置。在一些實施例中，當使用成對比對演算法對CA6之5'UTR與SEQ ID NO: 8比對時，突變可發生於選自SEQ ID NO: 8之1、13、14、15、16、21、23、34及40中的一或多個、兩個或兩個以上、三個或三個以上、四個或四個以上、五個或五個以上、六個或六個以上、七個或七個以上、八個或八個以上，或九個核酸位置，或發生於與SEQ ID NO: 8之位置1、13、14、15、16、21、23、34及40對應的位置。在一些實施例中，當使用成對比對演算法對CA6之5'UTR與SEQ ID NO: 8比對時，突變發生於SEQ ID NO: 8之位置1、13、14、15、16、21、23、34及40中的一或多個、兩個或兩個

以上、三個或三個以上、四個或四個以上、五個或五個以上、六個或六個以上、七個或七個以上、八個或八個以上，或所有九個位置，或發生於與SEQ ID NO: 8之位置1、13、14、15、16、21、23、34及40對應的位置。在一些實施例中，位置1之突變為胸腺嘧啶經鳥嘌呤取代。在一些實施例中，位置13之突變為鳥嘌呤經腺嘌呤取代。在一些實施例中，位置14之突變為胸腺嘧啶經鳥嘌呤取代。在一些實施例中，位置15之突變為鳥嘌呤經胞嘧啶取代。在一些實施例中，位置16之突變為鳥嘌呤經腺嘌呤取代。在一些實施例中，位置21之突變為胞嘧啶經胸腺嘧啶取代。在一些實施例中，位置23之突變為胞嘧啶經胸腺嘧啶取代。在一些實施例中，位置34之突變為鳥嘌呤經胸腺嘧啶取代。在一些實施例中，位置40之突變為胞嘧啶經鳥嘌呤取代。

在一些實施例中，至少一個非人類細胞適應突變位於CA16之2A多肽內。來自例示性CA16株系之2A多肽的胺基酸序列闡述為：

GKFGQQSGAIYVGNYRVVNRHLATHNDWANLVWEDSSRDLLVSSTTAQGCDTIAR
CDCQTGIYYCSSKRKHYPVSFTKPSLIFVEASEYYPARYQSHLMLAVGHSEPGDCGGI
LRCQHGVVGIVSTGGNGLVGFADVRDLLWLDEEAMEQ (SEQ ID NO: 5)。

在一些實施例中，至少一個非人類細胞適應突變發生於CA16之2A多肽內的一或多個胺基酸位置。在一些實施例中，當使用成對比對演算法對CA16之2A多肽與SEQ ID NO: 5比對時，突變可發生於SEQ ID NO: 5之胺基酸位置2，或發生於與SEQ ID NO: 5之位置2對應的位置。在一些實施例中，位置2之突變為離胺酸經麩胺酸取代。

在一些實施例中，至少一個非人類細胞適應突變位於CA16之VP2多肽內。來自例示性CA16株系之VP2多肽的胺基酸序列闡述為：

SPSAEACGYSDRVAQLTIGNSTITTQEAANIVIAYGEWPEYCPDTDATAVDKPTRPDV
SVNRFFTLDTKSWAKDSKGWYWKFPDVLTEVGVFGQNAQFHYLYRSGFCVHVQCN
ASKFHQGALLVAVLPEYVLGTIAGGTGNENSHPPYATTQPGQVGAVLMHPYVLDAG
IPLSQLTVCPHQWINLRTNNCATIIVPYMNTVPFDSALNHCNFGLLVIPVVPLDFNAG
ATSEIPITVTIAPMCAEFAGLRQAVKQ (SEQ ID NO: 6)。

在一些實施例中，至少一個非人類細胞適應突變發生於CA16之VP2多肽內的一或多個胺基酸位置。在一些實施例中，當使用成對比對演算法對CA16之VP2多肽與SEQ ID NO: 6比對時，突變可發生於SEQ ID NO: 6之胺基酸位置161，或發生於與SEQ ID NO: 6之位置161對應的位置。在一些實施例中，位置161之突變為甲硫胺酸經蘇胺酸取代。

在一些實施例中，至少一個非人類細胞適應突變位於CA16之VP1多肽內。來自例示性CA16株系之VP1多肽的胺基酸序列闡述為：

GDPIADMIDQTVNNQVNRSLTALQVLPTAANTEASSHRLGTGVVPALQAAETGASS
NASDKNLIETRCVLNHHSTQETAIGNFFSRAGLVSIITMPTTDTQNTDGYVNWDIDLM
GYAQLRRKCELFTYMRFDAEFTFVVAKPNGVLVPQLLQYMYVPPGAPKPTSRDSFA
WQTATNPSVFVKMTDPPAQVSVPFMSPASAYQWFYDGYPTFGEHLQANDLDYGQC
PNNMMGTFSIRTVGTEKSPHSITLRVYMRIKHVRAWIPRPLRNQPYLFKTNPNYKGN
DIKCTSTSRDKITTL (SEQ ID NO: 7) 。

在一些實施例中，至少一個非人類細胞適應突變發生於CA16之VP1多肽內的一或多個胺基酸位置。在一些實施例中，當使用成對比對演算法對CA16之VP1多肽與SEQ ID NO: 7比對時，突變可發生於選自SEQ ID NO: 7之99及145中的一或多個或兩個胺基酸位置，或發生於與SEQ ID NO: 7之位置99或145對應的位置。在一些實施例中，位置99之突變為天冬胺酸經甘胺酸取代。在一些實施例中，位置145之突變為纈胺酸經麩胺酸取代。

在一些實施例中，至少一個非人類細胞適應突變位於CA16之5'UTR內。來自例示性CA16株系之5'UTR的核酸序列闡述為：

AGCCTGTGGGTTGTTCCCACCCACAGGGCCCAGTGGGCGCTAGCACACTGATTCT
GCGGGATCTTTGTGCGCCTGTTTTATAACCCCTTCCCTAAGCAGCAACTTAGAAG
TTTCACACAATCACGACCAGTAGTGGGCGTGGCGCGCCAGTCACGTCTTGGTCAA
GCACTTCTGTTCCCCCGGACTGAGTATCAATAGACTGCTCACGCGGTTGAAGGAG
AAAACGTTCGTTATCCGGCTAACTACTTCGAGAAACCTAGtAGCACCGTGAAAGT
TGCGGAGtGTttCGCTCAGCACTTCCCCCGTGTAGATCAGGTCGATGAGTCACTGTA
AACCCCACGGGCGACCGTGACAGTGGCTGCGTTGGCGGCCTGCCCATGGGGTAA
CCCATGGGACGCTCTAATACAGACATGGTGTGAAGAGTCTATTGAGCTAGTTAGT
AGTCCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCTAACTGCGGAGCACGCACCCTCAAC
CCAGGGGGCGGCGTGTCGTAATGGGTAACTCTGCAGCGGAACCGACTACTTTGG
GTGTCCGTGTTTCCTTTTATTCCTTATTGGCTGCTTATGGTGACAATTGAAAAGTT
GTTACCATATAGCTATTGGATTGGCCATCCGGTGTCTAACAGAGCTATTGTTTAC
CTATTTATTGGATACGTCCCTCTTAATCTCAAGGCCATTCAAACTCTTGATTATAT
ATTGCTCCTTAACTGTAAGAAA (SEQ ID NO: 9) 。

在一些實施例中，至少一個非人類細胞適應突變發生於CA16之5'UTR內的一或多個核酸位置。在一些實施例中，當使用成對比對演算法對CA16之5'UTR與SEQ ID NO: 9比對時，突變可發生於選自SEQ ID NO: 9之6及33中的一或多個或兩個核酸位置，或發生於與SEQ ID NO: 9之位置6或33對應的位置。在一些實施例中，當使用成對比對演算法對CA16之5'UTR與SEQ ID NO: 9比對時，突變發生於SEQ ID NO: 9之位置6與33，或發生於與SEQ ID NO: 9之位置6與33對應的位置。在一些實施例中，位置6之突變為鳥嘌呤經腺嘌呤取代。在一些實施例中，位置33之突變為鳥嘌呤經胞嘧啶取代。

在本發明之上述實施例中，例示性成對比對演算法為尼德曼-翁施全局比對演算法(Needleman-Wunsch global alignment algorithm)，其使用預設參數(例如空隙敞口罰分=10.0，空隙延伸罰分=0.5，使用EBLOSUM62計分矩陣)。此演算法宜用EMBOSS套裝中的針工具實施。

在一些實施例中，來自至少一種引起手、足及口病之病毒的本發明抗原可用於本發明之任一種疫苗及免疫原性組合物中。舉例而

言，本發明之抗原可適用於治療或預防有需要之個體之手、足及口病及/或誘導有需要之個體發生針對手、足及口病的免疫反應，諸如保護性免疫反應。

疫苗及免疫原性組合物之產生

本發明之其他態樣係關於含有一或多種來自引起手、足及口病之至少一種病毒之本發明抗原的手、足及口疫苗及免疫原性組合物。此類疫苗及免疫原性組合物可適用於例如治療或預防有需要之個體之手、足及口病及/或誘導有需要之個體發生針對手、足及口病的免疫反應，諸如保護性免疫反應。本發明之疫苗及/或免疫原性組合物可包括(但不限於)純化病毒、不活化病毒、減毒病毒、重組病毒、用於次單位疫苗的經純化及/或重組病毒蛋白。本發明之疫苗及/或免疫原性組合物可進一步包括純化抗原疫苗或免疫原性組合物、次單位疫苗或免疫原性組合物、不活化完整病毒疫苗或免疫原性組合物，或減毒病毒疫苗或免疫原性組合物。

本發明之疫苗及/或免疫原性組合物的產生包括使至少一種引起手、足及口病之病毒生長，其中抗原係由所生長之病毒製備。在細胞培養物中生長為製備本發明之疫苗及/或免疫原性組合物的方法。供病毒生長用之細胞可在懸浮液中或在黏附條件下培養。

適於供本發明之至少一種病毒生長用的細胞株較佳具有哺乳動物來源，且包括(但不限於)：VERO細胞(來自猴腎臟)、馬、牛(例如MDBK細胞)、綿羊、犬(例如來自犬腎臟之MDCK細胞，ATCC CCL34 MDCK (NBL2)或MDCK 33016，寄存編號DSM ACC 2219，如WO97/37001中所述)、貓及嚙齒動物(例如倉鼠細胞，諸如BHK21-F、HKCC細胞或中國倉鼠卵巢細胞(CHO細胞))，且可自廣泛多個發育階段獲得，包括例如成人、新生兒、胎兒及胚。在某些實施例中，使細胞永生化(例如PERC.6細胞，如WO01/38362及WO02/40665中所述，

且以ECACC寄存編號96022940寄存)。在較佳實施例中，使用哺乳動物細胞且可選自及/或來源於以下非限制性細胞類型中之一或多者：纖維母細胞(例如皮膚、肺)、內皮細胞(例如主動脈、冠狀動脈、肺、血管、真皮微血管、臍)、肝細胞、角質細胞、免疫細胞(例如T細胞、B細胞、巨噬細胞、NK、樹突狀細胞)、乳腺細胞(例如上皮)、平滑肌細胞(例如血管、主動脈、冠狀動脈、動脈、子宮、支氣管、子宮頸、視網膜周細胞)、黑色素細胞、神經細胞(例如星形膠質細胞)、前列腺細胞(例如上皮、平滑肌)、腎細胞(例如上皮、腎小球膜、近端小管)、骨胳細胞(例如軟骨細胞、破骨細胞、成骨細胞)、肌肉細胞(例如肌母細胞、骨胳、平滑肌、支氣管)、肝細胞、視網膜母細胞及基質細胞。WO97/37000及WO97/37001描述產生能夠在懸浮液中及在無血清培養基中生長且適用於產生及複製病毒的動物細胞及細胞株。

上述細胞類型之培養條件已知且描述於多個公開案中，或者培養基、補充劑及條件可市購，諸如如Cambrex Bioproducts (East Rutherford, N.J.)之目錄及其他文獻中所述。

在某些實施例中，本文所述方法中所用的細胞係在無血清及/或無蛋白質培養基中培養。在本發明之上下文中，培養基稱為無血清培養基，其中不存在來自人類或動物來源之血清的添加劑。無蛋白質理解為意謂其中細胞增殖係在蛋白質、生長因子、其他蛋白質添加劑及非血清蛋白質排除之情況下發生、但視情況可包括病毒生長可能需要之蛋白質(諸如胰蛋白酶或其他蛋白酶)的培養物。在此類培養物中生長的細胞天然含有蛋白質本身。

已知的無血清培養基包括伊斯科夫氏培養基(Iscove's medium)、超CHO培養基(BioWhittaker)或EX-CELL (JRH Bioscience)。普通的含血清培養基包括伊格爾氏基本培養基(Eagle's Basal Medium，BME)或最低必需培養基(Minimum Essential Medium，MEM)(Eagle, Science,

130, 432 (1959))或杜爾貝科氏修飾之伊格爾氏培養基(DMEM或EDM)，其通常結合多達10%胎牛血清或類似添加劑使用。視情況，最低必需培養基(MEM)(Eagle, Science, 130, 432 (1959))或杜爾貝科氏修飾之伊格爾氏培養基(DMEM或EDM)可不結合任何含血清補充劑使用。無蛋白質培養基，如PF-CHO (JHR Bioscience)；化學上已定義之培養基，如ProCHO 4CDM (BioWhittaker)或SMIF 7 (Gibco/BRL Life Technologies)及促有絲分裂肽，如Primactone、Pepticase或HyPep.TM.(皆得自Quest International)或乳白蛋白水解物(Gibco及其他製造商)，亦充分已知於先前技術中。基於植物水解物的培養基添加劑具有可排除病毒、黴漿菌或未知傳染媒介物污染的特別優勢。

細胞培養條件(溫度、細胞密度、pH值等)由於根據本發明所使用之細胞株的適合性而可在非常廣泛的範圍內變化且可依照特定病毒株的需要來調適。

使病毒在所培養細胞中傳播的方法通常包括如下步驟：用欲培養之株系接種所培養細胞，將所感染細胞培育所要時間段供病毒傳播，諸如如藉由病毒效價或抗原表現所測定(例如接種之後24小時與168小時之間)，且收集所傳播病毒。所培養細胞係利用1:500至1:1、較佳1:100至1:5、更佳1:50至1:10之病毒(藉由PFU或TCID50量測)與細胞比率來接種。將病毒添加至細胞懸浮液中或塗覆於細胞單層上，且在25℃至40℃、較佳在28℃至37℃下，使病毒在細胞上吸收至少60分鐘，但通常小於300分鐘，較佳在90分鐘與240分鐘之間。所感染細胞培養物(例如單層)可藉由冷凍-解凍或藉由酶促作用來移除，以增加所收集之培養物上清液中的病毒含量。所收集之流體接著不活化或冷凍儲存。所培養細胞可在約0.0001至10、較佳為0.002至5、更佳為0.001至2的感染倍率(「m.o.i.」)下感染。再更佳地，細胞在約0.01之m.o.i下感染。感染後30至60小時，或感染後4至10天，可收集所感染細

胞。在某些實施例中，感染後34至48小時收集細胞。在某些較佳實施例中，感染後4至7小時收集細胞。更佳地，感染後4至5天收集細胞。在一些實施例中，可在允許病毒釋放的細胞培養期間添加蛋白酶(例如胰蛋白酶)，且可在培養期間的任何適合階段添加蛋白酶。或者，在某些實施例中，可收集所感染細胞培養物的上清液且可自上清液中分離出病毒或以其他方式純化病毒。

病毒接種物及病毒培養物較佳不含(亦即已針對以下病毒之污染加以測試且得到陰性結果)單純性疱疹病毒、呼吸道合胞病毒、副流感病毒3、SARS冠狀病毒、腺病毒、鼻病毒、呼腸孤病毒、多瘤病毒、囊病毒、環病毒及/或小病毒[WO2006/027698]。

若病毒已在細胞株上生長，則標準實務為使最終疫苗中之殘餘細胞株DNA的量最小化，以便最小化DNA的任何致癌活性。可在疫苗製備期間，使用標準純化程序(例如層析等)移除污染性DNA。移除殘餘宿主細胞DNA可藉由核酸酶處理(例如藉由使用DNA酶)來增強。減少宿主細胞DNA污染的方便方法揭示於參考文獻中[Lundblad (2001) Biotechnology and Applied Biochemistry 34:195-197, *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation.* 美國健康及人類服務部食品與藥物管理局藥物評價及研究中心(CDER)獸醫學醫藥中心(CVM)(U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM)), 2001年5月]，該方法包括兩步處理：首先使用可在病毒生長期間使用的DNA酶(例如核酸酶)，接著使用可在病毒粒子破裂期間使用的陽離子清潔劑(例如CTAB)。亦可使用藉由β-丙內酯處理來進行的移除。

抗原之產生

用於疫苗及/或免疫原性組合物中之本發明抗原(包括(但不限於)

純化病毒、不活化病毒、減毒病毒、重組病毒，或用於次單位疫苗的經純化及/或重組病毒蛋白質，以治療或預防手、足及口病及/或誘導針對手、足及口病之免疫反應，諸如保護性免疫反應)可藉由此項技術中已知的任何適合方法產生及/或純化或以其他方式分離。本發明之抗原可包括(但不限於)自至少一種引起手、足及口病之病毒產生、衍生、純化及/或以其他方式分離出的完整病毒、減毒病毒、不活化病毒、蛋白質、多肽(包括活性蛋白質及蛋白質內之個別多肽抗原決定基)、醣多肽、脂多肽、肽、多醣、多醣結合物、肽以及多醣及其他分子、小分子、脂質、醣脂及碳水化合物之非肽模擬物。舉例而言，適合抗原可包括(但不限於)來自病毒(諸如EV71、CA6及CA16)的結構多肽，諸如VP1、VP2、VP3及VP4，及非結構多肽，諸如2A、2B、2C、3A、3B、3C及3D。

本發明之抗原可以化學方式或以酶促方式合成，以重組方式產生，自天然來源分離，或前述者之組合。在某些實施例中，本發明之抗原係由引起手、足及口病之至少一種本發明病毒(諸如EV71、CA6及CA16)產生、純化、分離及/或衍生。本發明之抗原可經純化，部分純化或可為粗萃取物。在一些實施例中，本發明之抗原為如標題「疫苗及免疫原性組合物之產生」之上述章節中所述產生的病毒，諸如不活化病毒。

在某些實施例中，一或多種本發明抗原可藉由培養非人類細胞來產生。適用於產生一或多種本發明抗原的細胞株較佳具有哺乳動物來源，且包括(但不限於)：VERO細胞(來自猴腎臟)、馬、牛(例如MDBK細胞)、綿羊、犬(例如來自犬腎臟之MDCK細胞，ATCC CCL34 MDCK (NBL2)或MDCK 33016，寄存編號DSM ACC 2219，如WO97/37001中所述)、貓及嚙齒動物(例如倉鼠細胞，諸如BHK21-F、HKCC細胞或中國倉鼠卵巢細胞(CHO細胞))，且可自廣泛多個發育階

段獲得，包括例如成人、新生兒、胎兒及胚。在某些實施例中，使細胞永生化(例如PERC.6細胞，如WO01/38362及WO02/40665中所述，且以ECACC寄存編號96022940寄存)。在較佳實施例中，使用哺乳動物細胞且可選自及/或來源於以下非限制性細胞類型中之一或多者：纖維母細胞(例如皮膚、肺)、內皮細胞(例如主動脈、冠狀動脈、肺、血管、真皮微血管、臍)、肝細胞、角質細胞、免疫細胞(例如T細胞、B細胞、巨噬細胞、NK、樹突狀細胞)、乳腺細胞(例如上皮)、平滑肌細胞(例如血管、主動脈、冠狀動脈、動脈、子宮、支氣管、子宮頸、視網膜周細胞)、黑色素細胞、神經細胞(例如星形膠質細胞)、前列腺細胞(例如上皮、平滑肌)、腎細胞(例如上皮、腎小球膜、近端小管)、骨胳細胞(例如軟骨細胞、破骨細胞、成骨細胞)、肌肉細胞(例如肌母細胞、骨胳、平滑肌、支氣管)、肝細胞、視網膜母細胞及基質細胞。WO97/37000及WO97/37001描述產生能夠在懸浮液中及在無血清培養基中生長且適用於產生病毒抗原的動物細胞及細胞株。在某些實施例中，非人類細胞係在無血清培養基中培養。

多肽抗原可使用此項技術中已知之標準蛋白質純化方法自天然來源分離，包括(但不限於)液相層析(例如高效液相層析、快速蛋白質液相層析等)、尺寸排阻層析、凝膠電泳(包括一維凝膠電泳、二維凝膠電泳)、親和層析，或其他純化技術。在多個實施例中，抗原為純化抗原，例如約50%至約75%純度、約75%至約85%純度、約85%至約90%純度、約90%至約95%純度、約95%至約98%純度、約98%至約99%純度，或大於99%純度。

可使用固相肽合成技術，其中此類技術已為熟習此項技術者所知。參見Jones, The Chemical Synthesis of Peptides (Clarendon Press, Oxford) (1994)。一般而言，在此類方法中，肽係經由依序添加活化單體單元至固相結合之生長肽鏈來產生。

可利用充分確立的重組DNA技術來產生多肽，其中例如將包含編碼多肽之核苷酸序列的表現構築體引入適當宿主細胞(例如以單細胞實體形式在活體外細胞培養物中生長的真核宿主細胞，例如酵母細胞、昆蟲細胞、哺乳動物細胞等)或原核細胞(例如在活體外細胞培養物中生長)中，從而產生經基因修飾之宿主細胞；經基因修飾之宿主細胞在適當培養條件下產生蛋白質。

除殺死之病毒及減毒病毒免疫原性組合物之外，可使用將手、足及口病病毒之抗原性組分呈遞至動物的次單位免疫原性組合物或其他類型之免疫原性組合物。抗原性組分可為當注入人類中時刺激人類之免疫反應以使得人類產生針對手、足及口病之保護性免疫的蛋白質、醣蛋白、脂質結合之蛋白質或醣蛋白、經修飾之脂質部分，或其他病毒組分。對於次單位免疫原性組合物而言，病毒可如上文所述在哺乳動物細胞上培養。細胞培養物可均質化且免疫原性組合物可藉由使細胞培養均質物通過適當管柱或通過適當孔徑的過濾器或經由將細胞培養均質物離心而分離。

若抗原性組分為蛋白質，則可分離出編碼該蛋白質之核酸且產生含有該經分離核酸的免疫原性組合物。編碼抗原性組分的核酸可置放於真核啟動子信號序列下游之質體上。該質體可含有一或多個可選標記物且轉染至減毒原核生物體中，諸如沙門氏菌屬(Salmonella spp.)、志賀桿菌屬(Shigella spp.)或其他適合細菌。接著可將細菌投與人類，以使得人類可產生針對抗原性組分的保護性免疫反應。或者，可將編碼抗原性組分的核酸置放於原核啟動子下游，其具有一或多個可選標記物，且轉染至減毒原核生物體中，諸如沙門氏菌屬、志賀桿菌屬或其他適合細菌。接著可將細菌投與需要針對所關注抗原之免疫反應的真核個體。參見例如針對Hone等人之美國專利第6,500,419號。

對於次單位免疫原性組合物而言，可將編碼手、足及口病病毒之蛋白質抗原性組分的核酸選殖至質體中，諸如國際專利申請公開案第WO 00/32047號(Galen)及國際專利申請公開案第WO 02/083890號(Galen)中所述的質體。接著可將質體轉染至細菌中且細菌可產生所要抗原性蛋白質。可藉由兩個專利申請案中所述的多種方法分離且純化所要抗原性蛋白質。

病毒不活化

本發明之某些態樣係關於手、足及口疫苗及免疫原性組合物，其含有一或多種來自引起手、足及口病之至少一種病毒的抗原。本發明之疫苗及/或免疫原性組合物可包括純化病毒、完整病毒、重組病毒、活減毒完整病毒或較佳為不活化完整病毒，或來自不活化病毒之亞單元、多肽及/或抗原。因而，本發明之某些實施例係關於含有一或多種來自引起手、足及口病之至少一種不活化病毒之抗原的手、足及口疫苗及/或免疫原性組合物。不活化或殺死病毒以破壞其感染哺乳動物細胞之能力的方法在此項技術中已知。此類方法包括化學與物理方式。適用於不活化病毒的方式包括(但不限於)用有效量之一或多種藥劑處理，該等藥劑選自清潔劑、福馬林(在本文中亦稱為「甲醛」)、β-丙內酯(BPL)、二元乙胺(BEI)、乙醯基伸乙基亞胺、熱、電磁輻射、x射線輻射、γ輻射、紫外輻射(UV輻射)、UV-A輻射、UV-B輻射、UV-C輻射、亞甲基藍、補骨脂素、羧基富勒烯(carboxyfullerene)(C60)及其任一者之任何組合。

在本發明之某些實施例中，至少一種病毒係以化學方式不活化。化學不活化藥劑及化學不活化方法在此項技術中已熟知且描述於本文中。在一些實施例中，至少一種病毒在化學上用BPL、福馬林或BEI中之一或多者不活化。在其中至少一種病毒使用BPL進行化學不活化的某些實施例中，病毒可含有一或多種修飾。在一些實施例中，

一或多種修飾可包括經修飾之核酸。在一些實施例中，經修飾之核酸為烷基化核酸。在其他實施例中，一或多種修飾可包括經修飾之多肽。在一些實施例中，經修飾之多肽含有經修飾之胺基酸殘基，包括以下中之一或多者：經修飾之半胱胺酸、甲硫胺酸、組胺酸、天冬胺酸、麩胺酸、酪胺酸、離胺酸、絲胺酸及蘇胺酸。在其中至少一種病毒使用福馬林進行化學不活化的某些實施例中，病毒可含有一或多種修飾。在一些實施例中，一或多種修飾可包括經修飾之多肽。在一些實施例中，一或多種修飾可包括交聯多肽。在其中至少一種病毒使用福馬林進行化學不活化的一些實施例中，疫苗或免疫原性組合物進一步包括福馬林。在其中至少一種病毒使用BEI進行化學不活化的某些實施例中，病毒可含有一或多種修飾。在一些實施例中，一或多種修飾可包括經修飾之核酸。在一些實施例中，經修飾之核酸為烷基化核酸。

在其中至少一種病毒使用BEI或BPL進行化學不活化的一些實施例中，未反應之任何殘餘BEI或BPL可使用硫代硫酸鈉中和(亦即水解)。一般而言，過量添加硫代硫酸鈉。在一些實施例中，硫代硫酸鈉可以約25 mM至約100 mM、約25 mM至約75 mM或約25 mM至約50 mM範圍內的濃度添加。在某些實施例中，硫代硫酸鈉可在約25 mM、約26 mM、約27 mM、約28 mM、約29 mM、約30 mM、約31 mM、約32 mM、約33 mM、約34 mM、約35 mM、約36 mM、約37 mM、約38 mM、約39 mM或約40 mM之濃度下，以1份濃縮硫代硫酸鈉相對於20份BEI之比率添加。在一些實施例中，溶液可使用混合器(諸如管線內靜態混合器)混合，且隨後過濾(例如澄清)。一般而言，抽吸兩種溶液通過混合器，導致完全混合且藉由硫代硫酸鈉中和BEI。

本發明之某些實施例係關於一種使手、足及口病毒製劑不活化

的方法。在一些實施例中，方法包括(a)自一或多個用於產生病毒製劑的非人類細胞分離出手、足及口病毒製劑及(b)用有效量之BEI處理病毒製劑。在某些實施例中，用有效量之BEI處理包括(但不限於)用約0.25% v/v至約3.0% v/v範圍內之量的BEI處理。在某些實施例中，經分離且經處理之病毒係選自EV71、CA6及CA16中之一或多者。在方法之某些實施例中，病毒製劑係在約25℃至約42℃範圍內之溫度下經BEI處理。在方法之某些實施例中，病毒製劑經BEI處理約1小時至約10小時範圍內之時間段。在某些實施例中，方法進一步包括用有效量之硫代硫酸鈉使未反應之BEI不活化(亦即水解)。在一些實施例中，硫代硫酸鈉之有效量係在約25 mM至約100 mM、約25 mM至約75 mM或約25 mM至約50 mM範圍內。

在一些實施例中，方法包括(a)自一或多個用於產生病毒製劑之非人類細胞中分離出手、足及口病毒製劑；(b)用有效量之β-丙內酯(BPL)處理該病毒製劑；及視情況，(c)在步驟(b)的同時或之後，用有效量之福馬林處理該病毒製劑。或者，在一些實施例中，方法包括(a)自一或多個用於產生病毒製劑之非人類細胞中分離出手、足及口病毒製劑；(b)病毒製劑用有效量之β-丙內酯(BPL)處理第一時間段；及(c)病毒製劑用有效量之BPL處理第二時間段以使病毒製劑完全不活化。在一些實施例中，第一及/或第二時間段在約12小時至約36小時範圍內。在某些實施例中，第一及/或第二時間段為約24小時。在某些實施例中，用有效量之BPL處理包括(但不限於)用約0.05% v/v至約3.0% v/v (0.1% v/v至約2% v/v，或約0.1% v/v至約1% v/v)範圍內之量的BPL處理。在某些實施例中，用有效量之BPL處理包括(但不限於)用0.05% v/v、0.06% v/v、0.07% v/v、0.08% v/v、0.09% v/v、0.1% v/v、0.2% v/v、0.3% v/v、0.4% v/v、0.5% v/v、0.6% v/v、0.7% v/v、0.8% v/v、0.9% v/v或1% v/v BPL處理。在某些實施例中，經分

離且經處理之病毒係選自EV71、CA6及CA16中之一或多者。在方法之某些實施例中，病毒製劑係在約2℃至約8℃範圍內之溫度下經BEI處理。在某些實施例中，方法包括將病毒製劑在37℃之溫度下加熱足以使BPL水解的時間段。在某些實施例中，時間段在約1小時至約6小時範圍內。或者，在一些實施例中，方法進一步包括用有效量之硫代硫酸鈉使未反應之BPL不活化(亦即水解)。在一些實施例中，硫代硫酸鈉之有效量係在約25 mM至約100 mM、約25 mM至約75 mM或約25 mM至約50 mM範圍內。

在一些實施例中，方法包括(a)自一或多個用於產生病毒製劑的非人類細胞分離出手、足及口病毒製劑；(b)用有效量之福馬林處理該病毒製劑；及(c)自福馬林純化該病毒製劑。在某些實施例中，用有效量之福馬林處理包括(但不限於)用約0.05% v/v至約3.0% v/v、0.1% v/v至約2% v/v或約0.1% v/v至約1% v/v範圍內之量的福馬林處理。在某些實施例中，經分離且經福馬林處理之病毒係選自EV71、CA6及CA16中之一或多者。在某些實施例中，病毒製劑自福馬林中純化之程度較高，此程度的量為約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%或99%以上。

含有一或多種來自引起手、足及口病之至少一種不活化病毒之抗原的本發明疫苗及/或免疫原性組合物可適用於治療或預防有需要之個體之手、足及口病及/或誘導有需要之個體發生針對手、足及口病的免疫反應，諸如保護性免疫反應。

疫苗及/或免疫原性組合物之調配物

本發明之其他態樣係關於含有一或多種來自引起手、足及口病之至少一種病毒之抗原的本發明疫苗及免疫原性組合物之調配物。含有一或多種來自引起手、足及口病之至少一種病毒之抗原的本發明之此類疫苗及/或免疫原性組合物可適用於治療或預防有需要之個體之

手、足及口病及/或誘導有需要之個體發生針對手、足及口病的免疫反應，諸如保護性免疫反應。

典型地，本發明之疫苗及/或免疫原性組合物製備為液體溶液或懸浮液形式之可注射劑；亦可製備適於在注射之前溶於或懸浮於液體中的固體形式。此類製劑亦可乳化或以乾粉形式產生。活性免疫原性成分通常與醫藥學上可接受的且與活性成分相容的賦形劑混合。適合之賦形劑為例如水、生理鹽水、右旋糖、蔗糖、甘油、乙醇或其類似物及其組合。另外，必要時，疫苗或免疫原性組合物可含有助劑，諸如濕潤劑或乳化劑、pH緩衝劑，或增強疫苗或免疫原性組合物之有效性的佐劑。

疫苗或免疫原性組合物可習知地以非經腸方式、藉由注射投與，例如皮下、經皮、皮內、皮下或肌肉內。適於其他投藥方式的其他調配物包括栓劑及(在一些情況下)口服、經口、鼻內、頰內、舌下、腹膜內、陰道內、肛門及顱內調配物。對於栓劑而言，傳統黏合劑及載劑可包括例如聚烷二醇或甘油三酯；此類栓劑可由含有0.5%到10%或甚至1-2%範圍內之活性成分的混合物形成。在某些實施例中，首先使低熔點蠟(諸如脂肪酸甘油酯混合物或可可脂)熔融且使本文所述之手、足及口病疫苗或免疫原性組合物均勻分散，例如藉由攪拌來達成。接著將熔融之均勻混合物倒入適宜大小之模具中，使其冷卻且固化。

適於鼻內遞送的調配物包括液體(例如以氣溶膠或滴鼻劑形式投與的水溶液)及乾燥散劑(例如用於在鼻孔內快速沈積)。調配物包括諸如醫藥級甘露醇、乳糖、蔗糖、海藻糖、木糖醇及聚葡萄胺糖之常用賦形劑。黏膜黏著劑(諸如聚葡萄胺糖)可用於液體或粉末調配物中以延遲鼻內所投調配物之黏液纖毛清除。糖類(諸如甘露醇及蔗糖)可用作液體調配物中之穩定劑及乾粉調配物中之穩定劑、增積劑或粉末流

動劑及上漿劑。另外，液體與乾粉調配物中均可使用佐劑(諸如單磷醯基脂質A (MLA)或其衍生物，或CpG寡核苷酸)作為免疫刺激性佐劑。

適於口服遞送的調配物包括液體、固體、半固體、凝膠、錠劑、膠囊、口含錠及其類似物。適於口服遞送的調配物包括錠劑、口含錠、膠囊、凝膠、液體、食物產品、飲料、營養藥劑及其類似物。調配物包括諸如醫藥級甘露醇、乳糖、澱粉、硬脂酸鎂、糖精鈉、纖維素、碳酸鎂及其類似物之常用賦形劑。其他手、足及口病疫苗及免疫原性組合物可呈溶液、懸浮液、丸劑、持續釋放型調配物或散劑之形式且含有10-95%活性成分，或25-70%。對於口服調配物而言，霍亂毒素為受關注的調配搭配物(以及可能的結合搭配物)。

手、足及口病疫苗及/或免疫原性組合物當針對陰道投藥而調配時可呈子宮托、棉塞、乳膏、凝膠、糊狀物、發泡體或噴霧劑之形式。任一種前述調配物可含有除手、足及口病疫苗及免疫原性組合物抗原之外、此項技術中已知為適當的藥劑，諸如載劑。

在一些實施例中，本發明之手、足及口病疫苗及/或免疫原性組合物可經調配供全身性或局部遞送。此類調配物在此項技術中已熟知。非經腸媒劑包括氯化鈉溶液、林格氏右旋糖(Ringer's dextrose)、右旋糖及氯化鈉、乳酸化林格氏液或不揮發性油。靜脈內媒劑包括流體及營養補充劑、電解質補充劑(諸如基於林格氏右旋糖的彼等物)及其類似物。全身性及局部投藥途徑包括例如皮內、局部施用、靜脈內、肌肉內等。

本發明之疫苗及/或免疫原性組合物可以與劑型相容的方式及以治療上有效且產生免疫原性的量投與。投藥量視待治療的個體而定，包括例如待建立免疫反應之個體免疫系統的能力，及所要保護程度。適合的劑量範圍為每次疫苗接種數百微克活性成分之量級，例示性範

圍為約0.1 μg至10 μg (即使涵蓋1-10 mg範圍內之較高量)，諸如約0.1 μg至5 μg範圍，或甚至0.6 μg至3 μg範圍或約1 μg至3 μg範圍，或甚至0.1 μg至1 μg範圍。在某些實施例中，劑量可為每劑約0.1 μg、約0.2 μg、約0.3 μg、約0.4 μg、約0.5 μg、約0.6 μg、約0.7 μg、約0.8 μg、約0.9 μg、約1 μg、約1.1 μg、約1.2 μg、約1.3 μg、約1.4 μg、約1.5 μg、約1.6 μg、約1.7 μg、約1.8 μg、約1.9 μg、約2 μg、約2.1 μg、約2.2 μg、約2.3 μg、約2.4 μg、約2.5 μg、約2.6 μg、約2.7 μg、約2.8 μg、約2.9 μg或約3 μg。在某些實施例中，本發明之疫苗及/或免疫原性組合物可以每劑1 μg之量投與。在包含選自EV71、CA6及CA16中之兩者或兩者以上的本發明多價疫苗及/或免疫原性組合物(例如二價或三價疫苗及/或免疫原性組合物)中，各組分之劑量係以相等劑量比投與(亦即二價三價疫苗及/或免疫原性組合物為1:1且三價疫苗及/或免疫原性組合物為1:1:1)。

適用於初次投藥及加打的療法亦為可變的，但典型的是，初次投藥後，隨後為接種或其他投藥。

施用方式可廣泛變化。用於投與疫苗或免疫原性組合物的任一種習知方法均為適用的。此等方法包括在生理學上可接受之固體餵上經口施用或在生理學上可接受之分散液中藉由注射或其類似方式而非經腸施用。疫苗或免疫原性組合物之劑量將視投藥途徑而定且根據所接種人員之年齡及抗原調配物而變化。疫苗或免疫原性組合物可具有大於0.5 mL、0.5 mL或小於0.5 mL之單位劑量體積，如本文所述。舉例而言，可以0.25 mL之體積投與。

亦可使用改善黏膜黏附的遞送劑來改善遞送及免疫原性，特別是鼻內、口服或基於肺遞送之調配物。一種此類化合物聚葡萄胺糖(甲殼素之N去乙醯化形式)用於許多醫藥調配物中。由於其能夠延遲黏液纖毛清除且允許更多的時間用於黏膜抗原吸收及處理，因此其為

用於鼻內疫苗遞送的引人注目之黏膜黏著劑。另外，其可短暫開放緊密接合點，從而可增強抗原經上皮傳輸至NALT。在近期的人類試驗中，與聚葡萄胺糖一起、但不與任何其他佐劑一起鼻內投與的三價不活化流感疫苗產生的血清轉化及HI效價僅稍微低於肌肉內接種之後所獲得的血清轉化及HI效價。

聚葡萄胺糖亦可用在鼻內發揮良好作用的佐劑調配，諸如以遺傳方式解毒的大腸桿菌不耐熱腸毒素突變體LTK63。在遞送處於頂峰時，此添加了免疫刺激性作用，及聚葡萄胺糖所賦予的黏著益處，從而增強黏膜及全身性反應。

最後，應注意聚葡萄胺糖調配物亦可以乾粉形式製備，其已顯示可改善疫苗穩定性且進一步延遲液體調配物的黏液纖毛清除。此發現於近期的人類臨床試驗中，其涉及用聚葡萄胺糖所調配之鼻內乾粉白喉類毒素疫苗，其中鼻內途徑與傳統的肌肉內途徑同樣有效，其中分泌性IgA反應的益處增加。疫苗亦具有非常良好的耐受性。含有聚葡萄胺糖及MLA或其衍生物之鼻內乾粉狀炭疽病疫苗在兔中誘導的反應比肌肉內接種更強且針對氣溶膠孢子攻擊亦具有保護性。

鼻內疫苗代表一種例示性調配物，原因在於其可影響上呼吸道及下呼吸道，相比之下，非經腸投與之疫苗更好地影響下呼吸道。此可有益於誘導對基於過敏原之疫苗的耐受性及誘導基於病原體之疫苗的免疫力。

除在上呼吸道及下呼吸道中提供保護之外，鼻內疫苗避免針接種之併發症且提供一種經由微粒及/或可溶性抗原與鼻咽相關淋巴組織(NALT)之相互作用來誘導黏膜及全身體液性及細胞反應的方式。

本發明之疫苗及/或免疫原性組合物為醫藥學上可接受的。其可包括除抗原及佐劑之外的組分，例如其典型地包括一或多種醫藥載劑及/或賦形劑。此類組分之充分論述可獲得於Gennaro (2000)

Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 第20版, ISBN: 0683306472。

為了控制張力，較佳包括生理學上的鹽，諸如鈉鹽。較佳為氯化鈉(NaCl)，其可以1 mg/ml至20 mg/ml存在。可存在的其他鹽包括氯化鉀、磷酸二氫鉀、磷酸氫二鈉脫水物、氯化鎂、氯化鈣等。

本發明之疫苗及/或免疫原性組合物可包括一或多種緩衝液。典型緩衝液包括：磷酸鹽緩衝液；Tris緩衝液；硼酸鹽緩衝液；丁二酸鹽緩衝液；組胺酸緩衝液(尤其聯合氫氧化鋁佐劑)；或檸檬酸鹽緩衝液。典型地包括5-20 mM範圍內的緩衝液。

疫苗或免疫原性組合物之pH通常介於5.0與8.1之間，且更典型地介於6.0與8.0之間，例如6.5與7.5之間，或7.0與7.8之間。本發明之製造方法因此可包括封裝之前調節本體疫苗之pH的步驟。

疫苗或免疫原性組合物較佳為無菌的。其較佳為無熱原質的，例如每劑含有<1 EU (內毒素單位，標準量度)且較佳為每劑<0.1 EU。其較佳為無麩質的。

在某些實施例中，本發明之疫苗及/或免疫原性組合物可包括有效濃度的清潔劑。在一些實施例中，有效量之清潔劑可包括(但不限於)約0.00005% v/v至約5% v/v或約0.0001% v/v至約1% v/v。在某些實施例中，清潔劑之有效量為約0.001% v/v、約0.002% v/v、約0.003% v/v、約0.004% v/v、約0.005% v/v、約0.006% v/v、約0.007% v/v、約0.008% v/v、約0.009% v/v或約0.01% v/v。不希望被理論束縛，清潔劑有助於維持本發明之疫苗及/或免疫原性組合物處於溶液中且有助於防止疫苗及/或免疫原性組合物聚集。

適合清潔劑包括例如聚氧乙烯脫水山梨糖醇酯界面活性劑(已知為『Tweens』)、辛苯聚醇(諸如辛苯聚醇-9 (Triton X 100)或第三辛基苯氧基聚乙氧基乙醇)、十六烷基三甲基溴化銨(『CTAB』)及去氧膽

酸鈉，尤其適用於分離的或表面抗原疫苗。清潔劑可僅痕量存在。痕量的其他殘餘組分可為抗生素(例如新黴素、康黴素、多黏菌素B)。在一些實施例中，清潔劑含有聚山梨醇酯。在一些實施例中，清潔劑之有效濃度包括約0.00005% v/v至約5% v/v之範圍。

疫苗及/或免疫原性組合物較佳在2℃與8℃之間儲存。其不應冷凍。理想上，其應避光保存。抗原及乳液典型地處於混合物中，然而其最初可以臨時混合之各別組分之套組形式呈遞。疫苗及/或免疫原性組合物投與個體時通常呈水性形式。

佐劑

本發明之其他態樣係關於手、足及口疫苗及/或免疫原性組合物，其含有一或多種來自引起手、足及口病之至少一種病毒的抗原與一或多種佐劑之組合。本發明之此類有佐劑之疫苗及/或免疫原性組合物可適用於治療或預防有需要之個體之手、足及口病及/或誘導有需要之個體發生針對手、足及口病的免疫反應，諸如保護性免疫反應。

對疫苗達成佐劑作用的各種方法已知且可結合本文所揭示之手、足及口疫苗及/或免疫原性組合物使用。一般原理及方法詳述於"The Theory and Practical Application of Adjuvants", 1995, Duncan E. S. Stewart-Tull (編), John Wiley & Sons Ltd, ISBN 0-471-95170-6, 以及"Vaccines: New Generation Immunological Adjuvants", 1995, Gregoriadis G等人(編), Plenum Press, New York, ISBN 0-306-45283-9。

在一些實施例中，手、足及口疫苗或免疫原性組合物包括抗原及佐劑。抗原可與至少一種佐劑混合，其基於重量之比率為約10:1至約10^{10}:1抗原:佐劑，例如約10:1至約100:1、約100:1至約10^3:1、約10^3:1至約10^4:1、約10^4:1至約10^5:1、約10^5:1至約10^6:1、約10^6:1至約

10^7:1、約10^7:1至約10^8:1、約10^8:1至約10^9:1，或約10^9:1至約10^{10}:1抗原:佐劑。熟習此項技術者經由關於佐劑的資訊及可確定最佳比率的常規實驗可容易確定適當比率。

例示性佐劑可包括(但不限於)鋁鹽、鐸樣受體(toll-like receptor，TLR)促效劑、單磷醯基脂質A (MLA)、MLA衍生物、合成脂質A、脂質A模擬物或類似物、細胞激素、皂素、胞壁醯二肽(MDP)衍生物、CpG寡核苷酸、革蘭氏陰性細菌(gram-negative bacteria)之脂多醣(LPS)、聚膦氮烯、乳液、病毒顆粒(virosomes)、脂質捲(cochleates)、聚(丙交酯-共-乙交酯)(PLG)微粒、泊洛沙姆顆粒(poloxamer particles)、微粒、脂質體、完全弗氏佐劑(Complete Freund's Adjuvant，CFA)，及不完全弗氏佐劑(Incomplete Freund's Adjuvant，IFA)。在一些實施例中，佐劑為MLA或其衍生物。

在一些實施例中，佐劑為鋁鹽。在一些實施例中，佐劑包括明礬、磷酸鋁、氫氧化鋁、硫酸鉀鋁及Alhydrogel 85中的至少一者。在一些實施例中，本發明之鋁鹽佐劑已發現可增強本發明之HFMD疫苗及/或免疫原性組合物中之抗原的吸附。因此，在一些實施例中，至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%抗原吸附至鋁鹽佐劑。

本發明之某些實施例包括製備有佐劑之手、足及口疫苗或免疫原性組合物的方法，其包括(a)將疫苗或免疫原性組合物與鋁鹽佐劑混合，其中該疫苗或免疫原性組合物包括一或多種來自引起手、足及口病之至少一種病毒的抗原；及(b)在適合條件下將混合物培育約16小時至約24小時範圍內之時間段，其中至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%抗原吸附至

鋁鹽佐劑。在該方法之某些實施例中，至少一種引起手、足及口病的病毒係選自EV71、CA6及CA16中之一或多者。在該方法之一些實施例中，混合物在約2℃至約8℃範圍內之溫度下培育。在該方法之一些實施例中，使用此項技術中已知的任何適合混合器，在不斷的混合下培育混合物。在該方法之一些實施例中，混合物在約6.5至約8、約6.8至約7.8、約6.9至約7.6或約7至約7.5範圍內之pH值下培育。在某些較佳實施例中，混合物在中性pH下培育。在該方法之一些實施例中，鋁鹽佐劑係選自明礬、磷酸鋁、氫氧化鋁、硫酸鉀鋁及Alhydrogel 85。

單磷醯基脂質A (MLA)(來自沙門氏菌之脂質A之無毒性衍生物)為已開發為疫苗佐劑的強TLR-4促效劑(Evans等人, 2003)。在臨床前鼠類研究中，鼻內MLA已顯示可增強分泌性以及全身體液性反應(Baldridge等人, 2000；Yang等人, 2002)。其作為疫苗佐劑，亦已在超過120,000個患者的臨床研究中證實為安全且有效的(Baldrick等人, 2002; 2004)。MLA刺激經由TLR-4受體誘導先天性免疫且因此能夠誘發針對廣泛範圍之感染性病原體(包括革蘭氏陰性與革蘭氏陽性細菌、病毒及寄生蟲)的非特異性免疫反應(Baldrick等人, 2004；Persing等人, 2002)。MLA包含於鼻內調配物中應提供內生反應之快速誘導，誘發來自病毒攻擊的非特異性免疫反應，同時增強由疫苗中之抗原性組分所產生的特異性反應。

因此，在一個實施例中，本發明提供一種組合物，其包含單磷醯基脂質A (MLA)、3 De-O-醯基化單磷醯基脂質A (3D-MLA)或其衍生物作為適應性及內生免疫力之增強劑。在化學上，3D-MLA為3 De-O-醯基化單磷醯基脂質A與4、5或6條醯基化鏈的混合物。3 De-O-醯基化單磷醯基脂質A之較佳形式揭示於歐洲專利0 689 454 B1 (SmithKline Beecham Biologicals SA)中。在另一個實施例中，本發明

提供一種組合物，其包含合成脂質A、脂質A模擬物或類似物(諸如BioMira之PET脂質A)，或經設計可發揮如TLR-4促效劑作用的合成衍生物。

其他例示性佐劑包括(但不限於)多肽佐劑，其可藉由與多肽組分共表現或與多肽組分融合產生嵌合多肽而容易添加至本文所述之抗原中。細菌鞭毛蛋白(鞭毛之主要蛋白質成分)為一種佐劑，由於其被內生免疫系統、被鐸樣受體TLR5識別，因此其作為佐劑蛋白質已受到愈來愈多的關注(65)。經由TLR5發生的鞭毛蛋白信號傳導藉由誘導DC成熟及遷移以及活化巨噬細胞、嗜中性球及腸上皮細胞、從而產生促炎性介體來影響內生與適應性免疫功能(66-72)。

TLR5識別鞭毛蛋白單體內之保守性結構，此結構為此蛋白質特有的且為鞭毛功能所必需的，從而排除其回應於免疫壓力而發生的突變(73)。受體對100 fM濃度敏感，但不識別完整纖絲。結合及刺激需要鞭毛分解成單體。

作為佐劑，鞭毛蛋白對於非經腸或鼻內投與的異質抗原具有誘導保護性反應的強活性且對於DNA疫苗的佐劑效應亦已報導。當使用適於呼吸性病毒(諸如流感)的鞭毛蛋白時，觀測到Th2偏移，但在小鼠或猴中尚未觀測到IgE誘導的證據。另外，鼻內或全身性投與猴之後，尚無局部或全身性發炎反應的報導。使用鞭毛蛋白後所誘發的Th2反應特徵稍微出人意料，原因在於以MyD88依賴性方式經由TLR5發生的鞭毛蛋白信號及經由TLR發生的所有其他MyD88依賴性信號已顯示可導致Th1偏移。重要的是，針對鞭毛蛋白的預存在抗體對於佐劑功效無明顯影響，從而使其成為引人注目的多用途佐劑。

近期鼻內疫苗多次試驗中的共同主題為使用佐劑及/或遞送系統來改善疫苗功效。在一項此類研究中，含有以遺傳方式解毒之大腸桿菌不耐熱腸毒素佐劑(LT R192G)的流感H3疫苗對H5攻擊產生異源亞

型保護，但僅在鼻內遞送之後如此。保護係基於交叉中和性抗體之誘導且證明在開發新疫苗時對於鼻內途徑具有重要影響。

細胞激素、群落刺激因子(例如GM-CSF、CSF及其類似物)；腫瘤壞死因子；介白素-2、介白素-7、介白素-12；干擾素及其他，如生長因子，亦可用作佐劑，因為其可藉由與多肽組分混合或融合而容易包括於手、足及口疫苗或免疫原性組合物中。

在一些實施例中，本文所揭示之手、足及口疫苗及免疫原性組合物可包括經由鐸樣受體起作用的其他佐劑，諸如包含5'-TCG-3'序列的核酸TLR9配位體；咪唑并喹啉TLR7配位體；經取代之鳥嘌呤TLR7/8配位體；其他TLR7配位體，諸如洛索立賓(Loxoribine)、7-去氮雜去氧鳥苷、7-硫雜-8-側氧基去氧鳥苷、咪喹莫特(Imiquimod)(R-837)及雷西莫特(Resiquimod)(R-848)。

某些佐劑促使疫苗分子被APC (諸如樹突狀細胞)吸收，且活化此等物。非限制性實例係選自由以下組成之群：免疫靶向佐劑；免疫調節佐劑，諸如毒素、細胞激素及分支桿菌衍生物；油調配物；聚合物；微胞形成佐劑；皂素；免疫刺激性複合物基質(ISCOM基質)；顆粒；DDA；鋁佐劑；DNA佐劑；MLA；及囊封佐劑。

佐劑的其他實例包括諸如以下之藥劑：鋁鹽，諸如氫氧化物或磷酸鹽(明礬)，其通常以緩衝生理鹽水中之0.05至0.1%溶液使用(參見例如Nicklas (1992) Res. Immunol. 143:489-493)；與糖類之合成聚合物(例如Carbopol®)的混合物，其以0.25%溶液使用；分別地，用70℃至101℃範圍內之溫度熱處理30秒至2分鐘時段可能會使疫苗中之蛋白質發生聚集，且藉助於交聯劑亦可能發生聚集。亦可使用藉由經胃蛋白酶處理之抗體(Fab片段)再活化來發生聚集，與細菌細胞(諸如微小隱孢子蟲或內毒素或革蘭氏陰性細菌之脂多醣組分)混合，在生理學上可接受之油媒劑(諸如二縮甘露醇單油酸酯(Aracel A))中乳化或使用

用作阻斷替代物之全氟化碳(Fluosol-DA)之20%溶液乳化。亦可使用與油(諸如角鯊烯及IFA)的混合物。

DDA (二甲基二(十八烷基)溴化銨)為受關注之候選佐劑，而且弗氏完全及不完全佐劑(Freund's complete and incomplete adjuvants)以及皂樹皂素(諸如QuilA及QS21)亦受關注。其他可能性包括脂多醣之聚[二(羧酸根苯氧基)膦氮烯(PCPP)衍生物，諸如單磷醯基脂質A (MLA)、胞壁醯二肽(MDP)及蘇胺醯胞壁醯二肽(tMDP)。基於脂多醣之佐劑亦可用於產生主要的Th1型反應，包括例如單磷醯基脂質A (諸如3-de-O-醯基化單磷醯基脂質A)與鋁鹽一起之組合。

脂質體調配物亦已知可賦予佐劑效應，且因此，脂質體佐劑可結合手、足及口病疫苗及/或免疫原性組合物使用。

免疫刺激性複合物基質型(ISCOM®基質)佐劑亦可結合手、足及口病疫苗抗原及免疫原性組合物使用，特別是由於已顯示此類型佐劑能夠藉由APC來上調MHC II級表現。ISCOM基質係由皂皮樹(Quillaja saponaria)之(視情況分離)皂素(三萜化合物)、膽固醇及磷脂組成。與免疫原性蛋白質(諸如手、足及口病疫苗或免疫原性組合物抗原)混合時，所得微粒調配物為已知為ISCOM顆粒的物質，其中皂素可佔60-70% w/w，膽固醇及磷脂佔10-15% w/w且蛋白質佔10-15% w/w。與免疫刺激性複合物之組成及用途相關的細節可發現於例如牽涉佐劑的上述教科書中，而且Morein B等人, 1995, Clin. Immunother. 3: 461-475以及Barr I G及Mitchell G F, 1996, Immunol. and Cell Biol. 74: 8-25提供適用於製備完全免疫刺激性複合物的說明。

可與本文所揭示之手、足及口病疫苗抗原及免疫原性組合物以佐劑組合使用的皂素(無論是否呈免疫刺激複合物形式)包括來源於皂皮樹莫利納(Molina)之樹皮，稱為Quil A及其分離部分，如以下文獻中所述：美國專利第5,057,540號及"Saponins as vaccine adjuvants",

Kensil, C. R., Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 1996, 12 (1-2):1-55；及EP 0 362 279 B1。Quil A之例示性分離部分為QS21、QS7及QS17。

β-七葉素(β-Escin)為用於手、足及口病疫苗及/或免疫原性組合物之佐劑組成中的另一種溶血性皂素。七葉素在Merck索引(第12版：條目3737)中描述為皂素混合物，其存在於七葉樹(Lat: Aesculus hippocastanum)之種子中。其分離描述為藉由層析及純化(Fiedler, Arzneimittel-Forsch. 4, 213 (1953))及離子交換樹脂(Erbring等人，美國專利第3,238,190號)達成。七葉素之分離部分已純化且顯示具有生物學活性(Yoshikawa M等人, (Chem Pharm Bull (Tokyo) 1996年8月;44(8):1454-1464))。β-七葉素亦稱為七葉皂苷(aescin)。

用於手、足及口病疫苗及/或免疫原性組合物中之另一種溶血性皂素為毛地黃皂苷(Digitonin)。毛地黃皂苷在Merck索引(第12版，條目3204)中描述為皂素，其來源於毛地黃(Digitalis purpurea)之種子且根據Gisvold等人, J. Am. Pharm. Assoc., 1934, 23, 664；及Ruhenstroth-Bauer, Physiol. Chem., 1955, 301, 621所述之程序純化。其用途描述為供膽固醇測定用之臨床試劑。

達成佐劑效應之另一種受關注之可能性為使用Gosselin等人, 1992中所述之技術。簡言之，相關抗原(諸如本發明之手、足及口病疫苗及/或免疫原性組合物中之抗原)之呈遞可藉由使抗原與針對單核球/巨噬細胞上之F_C受體之抗體(或抗原結合性抗體片段)結合來增強。特定言之，抗原與抗F_CRI之間的結合物已證明可增強用於疫苗接種目的之免疫原性。抗體可在產生之後或作為產生之一部分與手、足及口病疫苗或免疫原性組合物抗原結合，包括作為與手、足及口病疫苗及免疫原性組合物抗原之多肽組分中之任一者融合來表現。其他可能性包括使用靶向及免疫調節物質(亦即細胞激素)。另外，亦可使用細胞激素之合成誘導劑，諸如聚I:C。

適合的分支桿菌衍生物可選自由以下組成之群：胞壁醯二肽、完全弗氏佐劑、RIBI (Ribi ImmunoChem Research Inc., Hamilton, Mont.)及海藻糖二酯，諸如TDM及TDE。

適合免疫靶向佐劑之實例包括CD40配位體及CD40抗體或特別是其結合片段(參見上文論述)、甘露糖、Fab片段及CTLA-4。

適合聚合物佐劑之實例包括碳水化合物，諸如聚葡萄糖、PEG、澱粉、甘露聚糖及甘露糖；塑膠聚合物；及乳膠，諸如乳膠珠粒。

調節免疫反應之又一受關注方式為將免疫原(視情況與佐劑及醫藥學上可接受之載劑及媒劑一起)包括於「虛擬淋巴結」(VLN)(ImmunoTherapy, Inc.開發的專有醫學裝置, 360 Lexington Avenue, New York, N.Y. 10017-6501)中。VLN (薄管裝置)模擬淋巴結之結構及功能。將VLN插入皮膚下，使用細胞激素及趨化激素之上升產生無菌炎症位點。T細胞及B細胞以及APC對危險信號快速作出反應，回歸至發炎位點且在VLN之多孔基質內積聚。已顯示當使用VLN時，建立針對抗原之免疫反應所需要的必要抗原劑量減少，且使用VLN、藉由疫苗接種賦予的免疫保護作用超過使用Ribi作為佐劑的習知免疫接種。該技術簡單描述於Gelber C等人, 1998, "Elicitation of Robust Cellular and Humoral Immune Responses to Small Amounts of Immunogens Using a Novel Medical Device Designated the Virtual Lymph Node", 於: "From the Laboratory to the Clinic, Book of Abstracts, 1998年10月12日至15日, Seascape Resort, Aptos, Calif."。

寡核苷酸可作為佐劑聯合手、足及口病疫苗及免疫原性組合物抗原使用且可含有藉由至少三個或三個以上或甚至至少六個或六個以上核苷酸分離之兩個或兩個以上二核苷酸CpG基元。含CpG寡核苷酸(其中CpG二核苷酸未發生甲基化)誘導主要的Th1反應。此類寡核苷酸已熟知且描述於例如WO 96/02555、WO 99/33488及美國專利第

6,008,200號及第5,856,462號中。

此類寡核苷酸佐劑可為去氧核苷酸。在某些實施例中，寡核苷酸中之核苷酸主鏈為二硫代磷酸酯或硫代磷酸酯鍵，然而亦可使用磷酸二酯及其他核苷酸主鏈，諸如具有混合主鏈鍵聯之含PNA寡核苷酸。產生硫代磷酸酯寡核苷酸或二硫代磷酸酯的方法描述於美國專利第5,666,153號、美國專利第5,278,302號及W095/26204中。

例示性寡核苷酸具有以下序列。序列可含有經硫代磷酸酯修飾之核苷酸主鏈：

(SEQ ID NO:10) OLIGO 1: TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (CpG 1826)；

(SEQ ID NO:11) OLIGO 2: TCT CCC AGC GTG CGC CAT (CpG 1758)；

(SEQ ID NO:12) OLIGO 3: ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG；

(SEQ ID NO:13) OLIGO 4: TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (CpG 2006)；及

(SEQ ID NO:14) OLIGO 5: TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (CpG 1668)。

替代性CpG寡核苷酸包括其中具有不連貫缺失或添加的上述序列。作為佐劑的CpG寡核苷酸可藉由此項技術中已知之任何方法(例如EP 468520)合成。舉例而言，此類寡核苷酸可使用自動化合成儀合成。此類寡核苷酸佐劑可具有10-50個鹼基長度。另一佐劑系統包括含CpG寡核苷酸與皂素衍生物之組合，特定言之，CpG與QS21之組合揭示於WO 00/09159中。

已描述許多單相或多相乳化系統。熟習此項技術者可容易調適用於手、足及口病疫苗及免疫原性組合物抗原之此類乳化系統，以使

得乳化不會破壞抗原結構。水包油乳化佐劑本身已表明適用作佐劑組合物(EPO 399 843B)，水包油乳液與其他活性劑之組合亦已描述為疫苗佐劑(WO 95/17210；WO 98/56414；WO 99/12565；WO 99/11241)。其他油乳化佐劑已有描述，諸如油包水乳液(美國專利第5,422,109號；EP 0 480 982 B2)及水包油包水乳液(美國專利第5,424,067號；EP 0 480 981 B)。

用於本文所述之手、足及口病疫苗及/或免疫原性組合物的油乳化佐劑可為天然或合成的，且可為無機或有機的。無機及有機油之實例對於熟習此項技術者而言為顯而易見的。

為了使任何水包油組合物適於投與人類，乳化系統中之油相可包括可代謝的油。術語可代謝油之含義在此項技術中已熟知。可代謝可定義為「能夠藉由代謝轉化」(Dorland's Illustrated Medical Dictionary, W.B. Sanders Company, 第25版(1974))。油可為任何植物油、魚油、動物油或合成油，其對於接受者而言無毒且能夠藉由代謝轉化。堅果(諸如花生油)、種子及穀粒為植物油之常見來源。合成油亦可使用且可包括市售油，諸如NEOBEE®及其他。角鯊烯(2,6,10,15,19,23-六甲基-2,6,10,14,18,22-二十四碳己烯)為一種不飽和油，其大量發現於鯊魚肝油中且少量發現於橄欖油、麥胚芽油、稻糠麩油及酵母中，且可結合手、足及口病疫苗及免疫原性組合物抗原使用。角鯊烯為可代謝的油，實情在於其為膽固醇生物合成中的中間物(Merck索引，第10版，條目第8619號)。

例示性油乳液為水包油乳液，且特定言之，水包角鯊烯乳液。

另外，用於手、足及口病疫苗及免疫原性組合物抗原的油乳化佐劑可包括抗氧化劑，諸如油α-生育酚(維生素E，EP 0 382 271 B1)。

WO 95/17210及WO 99/11241揭示基於角鯊烯、α-生育酚及TWEEN 80 (TM)、視情況與免疫刺激劑QS21及/或3D-MLA一起調配

的乳化佐劑。WO 99/12565揭示經由添加固醇至油相中來改善此等角鯊烯乳液。另外，可向油相中添加三酸甘油酯(諸如三辛酸甘油酯(C27H50O6))，以便使乳液穩定(WO 98/56414)。

穩定的水包油乳液內所發現的油滴尺寸可小於1微米，其直徑範圍可為實質上30-600 nm，實質上約30-500 nm，或實質上150-500 nm，且特定而言，約150 nm，如藉由光子相關光譜學所量測。就此而言，80%油滴的數值可在此等範圍內，大於90%或大於95%油滴的數值在所定義的尺寸範圍內。存在於油乳液中之組分的量習知地在2至10%油(諸如角鯊烯)；及(存在時) 2至10% α生育酚；及0.3至3%界面活性劑(諸如聚氧乙烯脫水山梨糖醇單油酸酯)之範圍內。油:α生育酚之比率可等於或小於1，因為此提供更穩定的乳液。SPAN 85 (TM)亦可以約1%之含量存在。在一些情況下，本文所揭示之手、足及口病疫苗及/或免疫原性組合物進一步含有穩定劑可為有利的。

產生水包油乳液的方法已為熟習此項技術者所熟知。通常，該方法包括如下步驟：將油相與界面活性劑(諸如PBS/TWEEN80®溶液)混合，隨後使用均質器進行均質化，熟習此項技術者顯而易知包含將混合物傳送通過注射器針兩次的方法適用於使小體積之液體均質化。同樣，熟習此項技術者可調適微流體化床(M110S微流體學機器，在6巴之最大壓力輸入端(輸出壓力為約850巴)下，最大通過50次，時間為2分鐘)乳化製程，以產生較小或較大體積的乳液。此調適可藉由常規實驗實現，包含量測所得乳液直至實現具有所需直徑之油滴的製劑。

或者，可將手、足及口病疫苗及/或免疫原性組合物與由以下組成的疫苗媒劑合併：聚葡萄胺糖(如上文所述)或其他聚陽離子聚合物、聚丙交酯及聚(丙交酯-共-乙交酯)、基於聚N-乙醯基葡糖胺之聚合物基質、由多醣或經化學修飾之多醣組成的顆粒、基於脂質體及脂

質之顆粒、由甘油單酯組成的顆粒等。皂素亦可在膽固醇存在下調配以形成微粒結構，諸如脂質體或ISCOM。此外，可將皂素與聚氧乙烯醚或酯一起調配成非微粒溶液或懸浮液，或調配成微粒結構，諸如少片層脂質體或ISCOM。

用於如本文所述之手、足及口病疫苗及/或免疫原性組合物中的其他說明性佐劑包括SAF (Chiron, Calif., United States)、MF-59 (Chiron，參見例如Granoff等人(1997)Infect Immun.65(5):1710-1715)、SBAS佐劑系列(例如SB-AS2 (含有MLA及QS21的水包油乳液)；SBAS-4 (含有明礬及MLA的佐劑系統)，獲自SmithKline Beecham, Rixensart, Belgium)；Detox (Enhanzyn®)(GlaxoSmithKline)、RC-512、RC-522、RC-527、RC-529、RC-544及RC-560 (GlaxoSmithKline)及其他胺基烷基胺基葡糖苷4-磷酸酯(AGP)，諸如申請中之美國專利申請案第08/853,826號及第09/074,720號中所述之彼等物。

佐劑之其他實例包括(但不限於) Hunter之TiterMax®佐劑(CytRx Corp., Norcross, Ga.)；Gerbu佐劑(Gerbu Biotechnik GmbH, Gaiberg, Germany)；硝化纖維(Nilsson及Larsson (1992) Res. Immunol. 143:553-557)；基於明礬(例如氫氧化鋁、磷酸鋁)乳液之調配物，包括礦物油、非礦物油、油包水或水包油乳液，諸如Seppic ISA系列之Montamide佐劑(例如ISA-51、ISA-57、ISA-720、ISA-151等；Seppic, Paris, France)；及PROVAX® (IDEC Pharmaceuticals)；OM-174 (與脂質A相關的葡糖胺二醣)；利什曼原蟲伸長因子(Leishmania elongation factor)；形成微胞的非離子嵌段共聚物，諸如CRL 1005；及Syntex佐劑調配物。參見例如O'Hagan等人(2001) Biomol Eng. 18(3):69-85；及"Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols" D. O'Hagan編(2000) Humana Press。

其他例示性佐劑包括以下通式之佐劑分子：

$HO(CH_2CH_2O)_n$-A-R，(I)

其中，n為1-50，A為一鍵或--C(O)--，R為C_{1-50}烷基或苯基C_{1-50}烷基。

一個實施例由包含通式(I)之聚氧乙烯醚的疫苗調配物組成，其中n為1與50之間、4-24，或9；R組分為C_{1-50}、C_4-C_{20}烷基，或C_{12}烷基，且A為一鍵。聚氧乙烯醚之濃度應在0.1-20%、0.1-10%範圍內，或在0.1-1%範圍內。例示性聚氧乙烯醚係選自以下群組：聚氧乙烯-9-十二烷基醚、聚氧乙烯-9-十八烷基醚、聚氧乙烯-8-十八烷基醚、聚氧乙烯-4-十二烷基醚、聚氧乙烯-35-十二烷基醚，及聚氧乙烯-23-十二烷基醚。聚氧乙烯醚(諸如聚氧乙烯十二烷基醚)描述於Merck索引(第12版：條目7717)中。此等佐劑分子描述於WO 99/52549中。

根據上述通式(I)之聚氧乙烯醚必要時可與另一佐劑合併。舉例而言，佐劑組合可包括如上文所述的CpG。

適用於本文所揭示之手、足及口病疫苗及/或免疫原性組合物中之醫藥學上可接受之賦形劑的其他實例包括水、磷酸鹽緩衝鹽水、等張性緩衝溶液。

本發明之方法

本發明之其他態樣係關於使用含有一或多種來自引起手、足及口病之至少一種病毒之抗原的本發明疫苗及/或免疫原性組合物治療或預防有需要之個體之手、足及口病及/或誘導有需要之個體發生針對手、足及口病之免疫反應的方法。在一些實施例中，本發明係關於治療或預防有需要之個體之手、足及口病的方法，係藉由向個體投與治療有效量之含有一或多種來自引起手、足及口病之至少一種病毒之抗原的本發明疫苗及/或免疫原性組合物。在一些實施例中，本發明係關於誘導有需要之個體發生針對手、足及口病之免疫反應的方法，

係藉由向該個體投與治療有效量之含有一或多種來自引起手、足及口病之至少一種病毒之抗原的本發明疫苗及/或免疫原性組合物。

在一些實施例中，投藥步驟誘導個體發生保護性免疫反應。在一些實施例中，保護性免疫反應包括針對EV71、CA6及CA16中之一或多者的免疫反應。在一些實施例中，保護性免疫反應包括針對一或多種EV71病毒基因型(諸如B4、C2、C4及C5)的免疫反應。

本文所揭示之手、足及口病疫苗及/或免疫原性組合物可用於保護或治療易患或罹患病毒感染的哺乳動物或鳥類，其係藉助於鼻內、經口、口服、頰內、舌下、肌肉內、腹膜內、皮內、經皮(transdermal)、皮下、陰道內、肛門、顱內、靜脈內、經皮(transcutaneous)或皮下投藥來投與疫苗。全身性投與本發明之疫苗及/或免疫原性組合物的方法可包括習知注射器及針，或經設計可彈道式遞送固體疫苗的裝置(WO 99/27961)，或無針壓力液體噴射裝置(美國專利第4,596,556號；美國專利第5,993,412號)，或經皮貼片(WO 97/48440；WO 98/28037)。本發明之手、足及口病疫苗及/或免疫原性組合物亦可施用於皮膚(經皮(transdermal或transcutaneous)遞送，WO 98/20734；WO 98/28037)。本發明之手、足及口病疫苗及/或免疫原性組合物因此可包括預填裝手、足及口病疫苗或免疫原性組合物的全身性投藥遞送裝置。相應地，提供治療或預防個體(諸如哺乳動物或鳥類)之手、足及口病及誘導個體發生免疫反應的方法，包括向個體投與本發明之疫苗或免疫原性組合物(視情況包括佐劑及/或載劑)的步驟，其中疫苗或免疫原性組合物經由非經腸或全身性途徑投與。

本發明之疫苗及/或免疫原性組合物可用於保護或治療易患或罹患病毒感染的哺乳動物或鳥類，係經由黏膜途徑(諸如口服/消化途徑或經鼻途徑)投與疫苗或免疫原性組合物。替代性黏膜途徑為陰道內及直腸內途徑。黏膜投藥途徑可經由經鼻途徑，稱為鼻內疫苗接種。

鼻內疫苗接種方法在此項技術中已熟知，包括將液滴、噴霧劑或乾粉形式之疫苗投與欲免疫之個體鼻咽內。霧化或氣溶膠化疫苗調配物為本文所揭示之手、足及口病疫苗及/或免疫原性組合物的潛在形式。經腸調配物(諸如口服的耐胃酸膠囊及顆粒)、直腸或陰道投與之栓劑亦為本發明之疫苗及/或免疫原性組合物之調配物。

本發明之手、足及口病疫苗及/或免疫原性組合物亦可經由經口途徑投與。在此等情況下，醫藥學上可接受之賦形劑亦可包括鹼性緩衝液，或經腸膠囊或微粒。本發明之手、足及口病疫苗及/或免疫原性組合物亦可經由陰道途徑投與。在此等情況下，醫藥學上可接受之賦形劑亦可包括乳化劑、聚合物(諸如CARBOPOL®)，及陰道乳膏及栓劑之其他已知穩定劑。手、足及口病疫苗及/或免疫原性組合物亦可藉由直腸途徑投與。在此等情況下，賦形劑亦可包括此項技術中已知用於形成直腸栓劑的蠟及聚合物。

在一些實施例中，投藥步驟包括一或多次投藥。投藥可依循單次劑量時程或多次劑量(初打-加打)時程。在多次劑量時程中，各種劑量可藉由相同或不同途徑給予，例如非經腸初打及黏膜加打、黏膜初打及非經腸加打等。典型地，其將藉由相同途徑給予。多次劑量的投與典型地相隔至少1週(例如約2週、約3週、約4週、約6週、約8週、約12週、約16週等)。兩次劑量相隔25-30天(例如28天)特別適用。

本發明之方法包括投與治療有效量或免疫原性量之本發明疫苗及/或免疫原性組合物。治療有效量或免疫原性量可為誘導所投與之未感染、感染或未暴露之個體發生保護性免疫反應的本發明疫苗及/或免疫原性組合物之量。此類反應通常將使得個體中產生針對疫苗的分泌性、細胞及/或抗體介導之免疫反應。通常，此類反應包括(但不限於)以下效應中之一或多者；產生任一免疫類別的抗體，諸如免疫球蛋白A、D、E、G或M；B及T淋巴球增殖；提供活化、生長及分化

信號至免疫細胞；輔助T細胞、抑制T細胞及/或細胞毒性T細胞之擴增。

較佳地，治療有效量或免疫原性量足以達成疾病症狀之治療或預防。確切需要量將視以下而變化：所治療之個體；所治療之個體的年齡及一般狀況；個體免疫系統合成抗體的能力；所要保護程度；所治療之病狀的嚴重程度；所選特定的手、足及口病抗原多肽及其投與方式，及其他因素。適當的治療有效量或免疫原性量可容易由熟習此項技術者確定。治療有效量或免疫原性量的範圍相對廣泛，其可經由常規試驗確定。

所列舉實施例

以下所列舉實施例代表本發明之一些態樣。

1. 一種手、足及口疫苗，其包含一或多種來自引起人類之手、足及口病之至少一種病毒的抗原，其中該一或多種抗原包含至少一個非人類細胞適應突變。

2. 一種手、足及口免疫原性組合物，其包含一或多種來自引起人類之手、足及口病之至少一種病毒的抗原，其中該一或多種抗原包含至少一個非人類細胞適應突變。

3. 如實施例1或實施例2之疫苗或免疫原性組合物，其中該至少一種病毒係選自EV71、CA6及CA16中之一或多者。

4. 如實施例1或實施例2之疫苗或免疫原性組合物，其中該至少一種病毒包含EV71、CA6及CA16。

5. 如實施例1或實施例2之疫苗或免疫原性組合物，其中該至少一種病毒包含EV71及CA6。

6. 如實施例1或實施例2之疫苗或免疫原性組合物，其中該至少一種病毒包含EV71及CA16。

7. 如實施例1或實施例2之疫苗或免疫原性組合物，其中該至少

一種病毒包含CA6及CA16。

8. 如實施例1或實施例2之疫苗或免疫原性組合物，其中該至少一種病毒為EV71。

9. 如實施例1或實施例2之疫苗或免疫原性組合物，其中該一或多種抗原係選自EV71、CA6、CA16及其任何組合。

10. 如實施例9之疫苗或免疫原性組合物，其中該一或多種抗原來自EV71。

11. 如實施例1至10中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其中該一或多種抗原包含EV71之VP1多肽，且其中該VP1多肽包含至少一個非人類細胞適應突變。

12. 如實施例11之疫苗或免疫原性組合物，其中該至少一個非人類細胞適應突變當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 1比對時，發生於SEQ ID NO: 1之位置7，或與SEQ ID NO: 1之位置7對應的位置；或當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 1比對時，發生於SEQ ID NO: 1之位置7、14、145或282或與SEQ ID NO: 1之位置7、14、145或282對應之位置中的兩個或兩個以上、三個或三個以上或所有四個位置。

13. 如實施例12之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 1比對時位於SEQ ID NO: 1之位置7或與SEQ ID NO: 1之位置7對應之位置的突變為纈胺酸經甲硫胺酸取代。

14. 如實施例12之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 1比對時位於SEQ ID NO: 1之位置14或與SEQ ID NO: 1之位置14對應之位置的突變為天冬胺酸經天冬醯胺取代。

15. 如實施例12之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 1比對時位於SEQ ID NO: 1之位置145或與SEQ ID NO: 1之位置145對應之位置的突變為麩胺酸經麩醯胺酸取代。

16. 如實施例12之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對

演算法與SEQ ID NO: 1比對時位於SEQ ID NO: 1之位置282或與SEQ ID NO: 1之位置282對應之位置的突變為天冬醯胺經天冬胺酸取代。

17. 如實施例1至16中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其中該一或多種抗原包含CA6之VP1多肽且其中該VP1多肽包含至少一個非人類細胞適應突變。

18. 如實施例17之疫苗或免疫原性組合物，其中該至少一個非人類細胞適應突變當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 2比對時，發生於SEQ ID NO: 2之位置46、90、96或268或與SEQ ID NO: 2之位置46、90、96或268對應的位置中之一或多個、兩個或兩個以上、三個或三個以上或所有四個位置。

19. 如實施例18之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 2比對時位於SEQ ID NO: 2之位置46或與SEQ ID NO: 2之位置46對應之位置的突變為丙胺酸經纈胺酸取代。

20. 如實施例18之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 2比對時位於SEQ ID NO: 2之位置90或與SEQ ID NO: 2之位置90對應之位置的突變為麩胺酸經離胺酸取代。

21. 如實施例18之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 2比對時位於SEQ ID NO: 2之位置96或與SEQ ID NO: 2之位置96對應之位置的突變為蘇胺酸經丙胺酸取代。

22. 如實施例18之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 2比對時位於SEQ ID NO: 2之位置268或與SEQ ID NO: 2之位置268對應之位置的突變為纈胺酸經異白胺酸取代。

23. 如實施例1至22中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其中該一或多種抗原包含CA6之VP2多肽且其中該VP2多肽包含至少一個非人類細胞適應突變。

24. 如實施例23之疫苗或免疫原性組合物，其中該至少一個非人

類細胞適應突變當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 3比對時，發生於SEQ ID NO: 3之位置144，或與SEQ ID NO: 3之位置144對應的位置。

25. 如實施例24之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 3比對時位於SEQ ID NO: 3之位置144或與SEQ ID NO: 3之位置144對應之位置的突變為麩醯胺酸經離胺酸取代。

26. 如實施例1至25中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其中該一或多種抗原包含CA6之VP3多肽且其中該VP3多肽包含至少一個非人類細胞適應突變。

27. 如實施例26之疫苗或免疫原性組合物，其中該至少一個非人類細胞適應突變當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 4比對時，發生於SEQ ID NO: 4之位置102，或與SEQ ID NO: 4之位置102對應的位置。

28. 如實施例27之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 4比對時位於SEQ ID NO: 4之位置102或與SEQ ID NO: 4之位置102對應之位置的突變為異白胺酸經纈胺酸取代。

29. 如實施例1至28中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其中該一或多種抗原包含CA6之5'未轉譯區(UTR)，且其中CA6之該5'UTR包含至少一個非人類細胞適應突變。

30. 如實施例29之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法將CA6之該5'UTR與SEQ ID NO: 8比對時，該至少一個非人類細胞適應突變發生於SEQ ID NO: 8之位置1、13、14、15、16、21、23、34或40中的一或多個、兩個或兩個以上、三個或三個以上、四個或四個以上、五個或五個以上、六個或六個以上、七個或七個以上、八個或八個以上或所有九個位置，或與SEQ ID NO: 8之位置1、13、14、15、16、21、23、34或40對應的位置。

31. 如實施例30之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 8比對時位於SEQ ID NO: 8之位置1或與SEQ ID NO: 8之位置1對應之位置的突變為胸腺嘧啶經鳥嘌呤取代；當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 8比對時位於SEQ ID NO: 8之位置13或與SEQ ID NO: 8之位置13對應之位置的突變為鳥嘌呤經腺嘌呤取代；當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 8比對時位於SEQ ID NO: 8之位置14或與SEQ ID NO: 8之位置14對應之位置的突變為胸腺嘧啶經鳥嘌呤取代；當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 8比對時位於SEQ ID NO: 8之位置15或與SEQ ID NO: 8之位置15對應之位置的突變為鳥嘌呤經胞嘧啶取代；當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 8比對時位於SEQ ID NO: 8之位置16或與SEQ ID NO: 8之位置16對應之位置的突變為鳥嘌呤經腺嘌呤取代；當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 8比對時位於SEQ ID NO: 8之位置21或與SEQ ID NO: 8之位置21對應之位置的突變為胞嘧啶經胸腺嘧啶取代；當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 8比對時位於SEQ ID NO: 8之位置23或與SEQ ID NO: 8之位置23對應之位置的突變為胞嘧啶經胸腺嘧啶取代；當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 8比對時位於SEQ ID NO: 8之位置34或與SEQ ID NO: 8之位置34對應之位置的突變為鳥嘌呤經胸腺嘧啶取代；或當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 8比對時位於SEQ ID NO: 8之位置40或與SEQ ID NO: 8之位置40對應之位置的突變為胞嘧啶經鳥嘌呤取代。

32. 如實施例1至31中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其中該一或多種抗原包含CA16之2A多肽，且其中該2A多肽包含至少一個非人類細胞適應突變。

33. 如實施例32之疫苗或免疫原性組合物，其中該至少一個非人類細胞適應突變當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 5比對時，發生於SEQ ID NO: 5之位置2，或與SEQ ID NO: 5之位置2對應的位置。

34. 如實施例33之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 5比對時位於SEQ ID NO: 5之位置2或與SEQ ID NO: 5之位置2對應之位置的突變為離胺酸經麩胺酸取代。

35. 如實施例1至34中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其中該一或多種抗原包含CA16之VP2多肽，且其中該VP2多肽包含至少一個非人類細胞適應突變。

36. 如實施例35之疫苗或免疫原性組合物，其中該至少一個非人類細胞適應突變當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 6比對時，發生於SEQ ID NO: 6之位置161，或與SEQ ID NO: 6之位置161對應的位置。

37. 如實施例36之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 6比對時位於SEQ ID NO: 6之位置161或與SEQ ID NO: 6之位置161對應之位置的突變為甲硫胺酸經蘇胺酸取代。

38. 如實施例32至37中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其進一步在CA16之VP1多肽中包含至少一個另外的非人類細胞適應突變。

39. 如實施例38之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 7比對時，該至少一個另外的非人類細胞適應突變發生於SEQ ID NO: 7之位置99或145中的一或多者或兩者，或與SEQ ID NO: 7之位置99或145對應的位置。

40. 如實施例39之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 7比對時位於SEQ ID NO: 7之位置99或與SEQ ID NO: 7之位置99對應之位置的突變為天冬胺酸經甘胺酸取代。

41. 如實施例39之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 7比對時位於SEQ ID NO: 7之位置145或與SEQ ID NO: 7之位置145對應之位置的突變為纈胺酸經麩胺酸取代。

42. 如實施例1至41中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其中該

一或多種抗原包含CA16之5'未轉譯區(UTR)，且其中CA16之該5'UTR包含至少一個非人類細胞適應突變。

43. 如實施例42之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法將CA6之5'UTR與SEQ ID NO: 8比對時，該至少一個非人類細胞適應突變發生於SEQ ID NO: 9之位置6或33中之一者或兩者，或與SEQ ID NO: 9之位置6或33對應的位置。

44. 如實施例43之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 8比對時位於SEQ ID NO: 9之位置6或與SEQ ID NO: 9之位置6對應之位置的突變為鳥嘌呤經腺嘌呤取代；或當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 8比對時位於SEQ ID NO: 9之位置33或與SEQ ID NO: 9之位置33對應之位置的突變為鳥嘌呤經胞嘧啶取代。

45. 如實施例1至44中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其中該非人類細胞為哺乳動物細胞。

46. 如實施例1至44中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其中該非人類細胞為猴細胞。

47. 如實施例46之疫苗或免疫原性組合物，其中該猴細胞來自Vero細胞株。

48. 如實施例47之疫苗或免疫原性組合物，其中該Vero細胞株係選自WHO Vero 10-87、ATCC CCL-81、Vero 76 (ATCC寄存編號CRL-1587)，及Vero C1008 (ATCC寄存編號CRL-1586)。

49. 如實施例1至48中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其中該一或多種抗原係藉由培養非人類細胞而產生。

50. 如實施例49之疫苗或免疫原性組合物，其中該細胞係在無血清培養基中培養。

51. 如實施例1至50中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其中該疫苗或免疫原性組合物為經純化之抗原疫苗或免疫原性組合物、次單

位疫苗或免疫原性組合物、不活化完整病毒疫苗或免疫原性組合物，或減毒病毒疫苗或免疫原性組合物。

52. 如實施例1至51中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其中該至少一種病毒係以化學方式達成不活化。

53. 如實施例52之疫苗或免疫原性組合物，其中該至少一種病毒在化學上係用β-丙內酯(BPL)、福馬林或二元伸乙基亞胺(BEI)中之一或多者達成不活化。

54. 如實施例52之疫苗或免疫原性組合物，其中該至少一種病毒在化學上用BPL達成不活化。

55. 如實施例52之疫苗或免疫原性組合物，其中該至少一種病毒在化學上用福馬林達成不活化。

56. 如實施例52之疫苗或免疫原性組合物，其中該至少一種病毒在化學上用BPL與福馬林之組合達成不活化。

57. 如實施例53、54或56中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其中藉由BPL達成不活化的該至少一種病毒包含一或多個修飾。

58. 如實施例57之疫苗或免疫原性組合物，其中該一或多個修飾包含經修飾之核酸。

59. 如實施例58之疫苗或免疫原性組合物，其中該經修飾之核酸為烷基化核酸。

60. 如實施例57之疫苗或免疫原性組合物，其中該一或多個修飾包含經修飾之多肽。

61. 如實施例60之疫苗或免疫原性組合物，其中該經修飾之多肽包含經修飾之胺基酸殘基，該胺基酸殘基係選自半胱胺酸、甲硫胺酸、組胺酸、天冬胺酸、麩胺酸、酪胺酸、離胺酸、絲胺酸及蘇胺酸中之一或多者。

62. 如實施例53、55或56中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其

中藉由福馬林達成不活化的該至少一種病毒包含一或多個修飾。

63. 如實施例62之疫苗或免疫原性組合物，其中該一或多個修飾包含經修飾之多肽。

64. 如實施例62之疫苗或免疫原性組合物，其中該一或多個修飾包含交聯多肽。

65. 如實施例62至64中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其中該疫苗或免疫原性組合物進一步包含福馬林。

66. 如實施例52之疫苗或免疫原性組合物，其中該至少一種病毒在化學上用BEI達成不活化。

67. 如實施例53或實施例66之疫苗或免疫原性組合物，其中藉由BEI達成不活化的該至少一種病毒包含一或多個修飾。

68. 如實施例67之疫苗或免疫原性組合物，其中該一或多個修飾包含經修飾之核酸。

69. 如實施例68之疫苗或免疫原性組合物，其中該經修飾之核酸為烷基化核酸。

70. 如實施例66至69中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其中未反應之BEI係用硫代硫酸鈉進行水解。

71. 如實施例1至70中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其進一步包含有效濃度的清潔劑。

72. 如實施例71之疫苗或免疫原性組合物，其中該清潔劑包含聚山梨醇酯[80]。

73. 如實施例72之疫苗或免疫原性組合物，其中該有效濃度在約0.001%至約0.01%範圍內。

74. 如實施例1至73中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其進一步包含佐劑。

75. 如實施例74之疫苗或免疫原性組合物，其中該佐劑係選自由

以下組成之群：鋁鹽、鐸樣受體(TLR)促效劑、單磷醯基脂質A(MLA)、合成脂質A、脂質A模擬物或類似物、MLA衍生物、細胞激素、皂素、胞壁醯二肽(MDP)衍生物、CpG寡核苷酸、革蘭氏陰性細菌之脂多醣(LPS)、聚膦氮烯、乳液、病毒顆粒、脂質捲、聚(丙交酯-共-乙交酯)(PLG)微粒、泊洛沙姆顆粒、微粒、脂質體、完全弗氏佐劑(CFA)及不完全弗氏佐劑(IFA)。

76. 如實施例75之疫苗或免疫原性組合物，其中該佐劑為鋁鹽。

77. 如實施例75之疫苗或免疫原性組合物，其中該佐劑係選自明礬、磷酸鋁、氫氧化鋁、硫酸鉀鋁及Alhydrogel 85。

78. 如實施例76或實施例77之疫苗或免疫原性組合物，其中至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%抗原吸附至佐劑。

79. 如實施例75之疫苗或免疫原性組合物，其中該佐劑為單磷醯基脂質A (MLA)及其衍生物。

80. 一種用於治療或預防有需要之個體之手、足及口病的方法，包含向該個體投與治療有效量之如實施例1至79中任一例之疫苗或免疫原性組合物。

81. 一種誘導有需要之個體發生免疫反應的方法，包含向該個體投與免疫原性量之如實施例1至79中任一例之疫苗或免疫原性組合物。

82. 如實施例80或實施例81之方法，其中該投藥誘導該個體發生保護性免疫反應。

83. 如實施例82之方法，其中該免疫反應包含針對EV71、CA6及CA16中之一或多者的免疫反應。

84. 如實施例82之方法，其中該免疫反應包含針對一或多種選自B4、C2、C4及C5之EV71病毒基因型的免疫反應。

85. 如實施例80至84中任一例之方法，其中該投藥係選自由以下組成之群：皮下遞送、經皮遞送、皮內遞送、皮下遞送、肌肉內遞送、經口遞送、口服遞送、鼻內遞送、頰內遞送、舌下遞送、腹膜內遞送、陰道內遞送、肛門遞送及顱內遞送。

86. 如實施例80至85中任一例之方法，其中該投藥包含一或多次投藥。

87. 一種手、足及口疫苗，其包含一或多種來自引起人類之手、足及口病之至少一種不活化病毒的抗原，其中該至少一種病毒為EV71、CA16或兩者，且其中該至少一種病毒係用β-丙內酯(BPL)達成不活化。

88. 一種手、足及口免疫原性組合物，其包含一或多種來自引起人類之手、足及口病之至少一種不活化病毒的抗原，其中該至少一種病毒為EV71、CA16或兩者，且其中該至少一種病毒係用β-丙內酯(BPL)達成不活化。

89. 如實施例87或實施例88之疫苗或免疫原性組合物，其中該至少一種不活化病毒包含一或多個修飾。

90. 如實施例89之疫苗或免疫原性組合物，其中該一或多個修飾包含經修飾之核酸。

91. 如實施例90之疫苗或免疫原性組合物，其中該經修飾之核酸為烷基化核酸。

92. 如實施例89之疫苗或免疫原性組合物，其中該一或多個修飾包含經修飾之多肽。

93. 如實施例92之疫苗或免疫原性組合物，其中該經修飾之多肽包含經修飾之胺基酸殘基，該胺基酸殘基係選自半胱胺酸、甲硫胺酸、組胺酸、天冬胺酸、麩胺酸、酪胺酸、離胺酸、絲胺酸及蘇胺酸中之一或多者。

94. 如實施例87至93中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其進一步包含一或多種來自CA6的抗原。

95. 如實施例94之疫苗或免疫原性組合物，其中該一或多種抗原包含至少一個非人類細胞適應突變。

96. 如實施例95之疫苗或免疫原性組合物，其中該一或多種抗原包含EV71之VP1多肽，且其中該VP1多肽包含至少一個非人類細胞適應突變。

97. 如實施例96之疫苗或免疫原性組合物，其中該至少一個非人類細胞適應突變當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 1比對時，發生於SEQ ID NO: 1之位置7，或與SEQ ID NO: 1之位置7對應的位置；或當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 1比對時，發生於SEQ ID NO: 1之位置7、14、145或282或與SEQ ID NO: 1之位置7、14、145或282對應之位置中的兩個或兩個以上、三個或三個以上或所有四個位置。

98. 如實施例97之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 1比對時位於SEQ ID NO: 1之位置7或與SEQ ID NO: 1之位置7對應之位置的突變為纈胺酸經甲硫胺酸取代。

99. 如實施例97之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 1比對時位於SEQ ID NO: 1之位置14或與SEQ ID NO: 1之位置14對應之位置的突變為天冬胺酸經天冬醯胺取代。

100. 如實施例97之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 1比對時位於SEQ ID NO: 1之位置145或與SEQ ID NO: 1之位置145對應之位置的突變為麩胺酸經麩醯胺酸取代。

101. 如實施例97之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 1比對時位於SEQ ID NO: 1之位置282或與SEQ ID NO: 1之位置282對應之位置的突變為天冬醯胺經天冬胺酸取

代。

102. 如實施例95至101之疫苗或免疫原性組合物，其中該一或多種抗原包含CA6之VP1多肽且其中該VP1多肽包含至少一個非人類細胞適應突變。

103. 如實施例102之疫苗或免疫原性組合物，其中該至少一個非人類細胞適應突變當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 2比對時，發生於SEQ ID NO: 2之位置46、90、96或268或與SEQ ID NO: 2之位置46、90、96或268對應之位置中的一或多個、兩個或兩個以上、三個或三個以上或所有四個位置。

104. 如實施例103之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 2比對時位於SEQ ID NO: 2之位置46或與SEQ ID NO: 2之位置46對應之位置的突變為丙胺酸經纈胺酸取代。

105. 如實施例103之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 2比對時位於SEQ ID NO: 2之位置90或與SEQ ID NO: 2之位置90對應之位置的突變為麩胺酸經離胺酸取代。

106. 如實施例103之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 2比對時位於SEQ ID NO: 2之位置96或與SEQ ID NO: 2之位置96對應之位置的突變為蘇胺酸經丙胺酸取代。

107. 如實施例103之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 2比對時位於SEQ ID NO: 2之位置268或與SEQ ID NO: 2之位置268對應之位置的突變為纈胺酸經異白胺酸取代。

108. 如實施例95至107之疫苗或免疫原性組合物，其中該一或多種抗原包含CA6之VP2多肽且其中該VP2多肽包含至少一個非人類細胞適應突變。

109. 如實施例108之疫苗或免疫原性組合物，其中該至少一個非

人類細胞適應突變當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 3比對時，發生於SEQ ID NO: 3之位置144，或與SEQ ID NO: 3之位置144對應的位置。

110. 如實施例109之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 3比對時位於SEQ ID NO: 3之位置144或與SEQ ID NO: 3之位置144對應之位置的突變為麩醯胺酸經離胺酸取代。

111. 如實施例95至110之疫苗或免疫原性組合物，其中該一或多種抗原包含CA6之VP3多肽且其中該VP3多肽包含至少一個非人類細胞適應突變。

112. 如實施例111之疫苗或免疫原性組合物，其中該至少一個非人類細胞適應突變當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 4比對時，發生於SEQ ID NO: 4之位置102，或與SEQ ID NO: 4之位置102對應的位置。

113. 如實施例112之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 4比對時位於SEQ ID NO: 4之位置102或與SEQ ID NO: 4之位置102對應之位置的突變為異白胺酸經纈胺酸取代。

114. 如實施例95至113之疫苗或免疫原性組合物，其中該一或多種抗原包含CA6之5'未轉譯區(UTR)，且其中CA6之該5'UTR包含至少一個非人類細胞適應突變。

115. 如實施例114之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法將CA6之該5'UTR與SEQ ID NO: 8比對時，該至少一個非人類細胞適應突變發生於SEQ ID NO: 8之核酸位置1、13、14、15、16、21、23、34或40中之一或多個、兩個或兩個以上、三個或三個以上、四個或四個以上、五個或五個以上、六個或六個以上、七個或七

個以上、八個或八個以上或所有九個核酸位置，或與SEQ ID NO: 8之位置1、13、14、15、16、21、23、34或40對應的位置。

116. 如實施例115之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 8比對時位於SEQ ID NO: 8之位置1或與SEQ ID NO: 8之位置1對應之位置的突變為胸腺嘧啶經鳥嘌呤取代；當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 8比對時位於SEQ ID NO: 8之位置13或與SEQ ID NO: 8之位置13對應之位置的突變為鳥嘌呤經腺嘌呤取代；當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 8比對時位於SEQ ID NO: 8之位置14或與SEQ ID NO: 8之位置14對應之位置的突變為胸腺嘧啶經鳥嘌呤取代；當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 8比對時位於SEQ ID NO: 8之位置15或與SEQ ID NO: 8之位置15對應之位置的突變為鳥嘌呤經胞嘧啶取代；當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 8比對時位於SEQ ID NO: 8之位置16或與SEQ ID NO: 8之位置16對應之位置的突變為鳥嘌呤經腺嘌呤取代；當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 8比對時位於SEQ ID NO: 8之位置21或與SEQ ID NO: 8之位置21對應之位置的突變為胞嘧啶經胸腺嘧啶取代；當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 8比對時位於SEQ ID NO: 8之位置23或與SEQ ID NO: 8之位置23對應之位置的突變為胞嘧啶經胸腺嘧啶取代；當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 8比對時位於SEQ ID NO: 8之位置34或與SEQ ID NO: 8之位置34對應之位置的突變為鳥嘌呤經胸腺嘧啶取代；或當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 8比對時位於SEQ ID NO: 8之位置40或與SEQ ID NO: 8之位置40對應之位置的突變為胞嘧啶經鳥嘌呤取代。

117. 如實施例95至116之疫苗或免疫原性組合物，其中該一或多種抗原包含CA16之2A多肽，且其中該2A多肽包含至少一個非人類細胞適應突變。

118. 如實施例117之疫苗或免疫原性組合物，其中該至少一個非

人類細胞適應突變當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 5比對時，發生於SEQ ID NO: 5之位置2，或與SEQ ID NO: 5之位置2對應的位置。

119. 如實施例118之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 5比對時位於SEQ ID NO: 5之位置2或與SEQ ID NO: 5之位置2對應之位置的突變為離胺酸經麩胺酸取代。

120. 如實施例95至119之疫苗或免疫原性組合物，其中該一或多種抗原包含CA16之VP2多肽，且其中該VP2多肽包含至少一個非人類細胞適應突變。

121. 如實施例120之疫苗或免疫原性組合物，其中該至少一個非人類細胞適應突變當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 6比對時，發生於SEQ ID NO: 6之位置161，或與SEQ ID NO: 6之位置161對應的位置。

122. 如實施例121之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 6比對時位於SEQ ID NO: 6之位置161或與SEQ ID NO: 6之位置161對應之位置的突變為甲硫胺酸經蘇胺酸取代。

123. 如實施例117至122中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其進一步在CA16之VP1多肽中包含至少一個另外的非人類細胞適應突變。

124. 如實施例123之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 7比對時，該至少一個另外的非人類細胞適應突變發生於SEQ ID NO: 7之位置99或145中的一或多者或兩者，或與SEQ ID NO: 7之位置99或145對應的位置。

125. 如實施例124之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 7比對時位於SEQ ID NO: 7之位置99或與SEQ ID NO: 7之位置99對應之位置的突變為天冬胺酸經甘胺酸取代。

126. 如實施例124之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 7比對時位於SEQ ID NO: 7之位置145或與SEQ ID NO: 7之位置145對應之位置的突變為纈胺酸經麩胺酸取代。

127. 如實施例95至126之疫苗或免疫原性組合物，其中該一或多種抗原包含CA16之5'未轉譯區(UTR)，且其中CA16之該5'UTR包含至少一個非人類細胞適應突變。

128. 如實施例127之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法將CA6之5'UTR與SEQ ID NO: 8比對時，該至少一個非人類細胞適應突變發生於SEQ ID NO: 9之位置6或33中之一者或兩者，或與SEQ ID NO: 9之位置6或33對應的位置。

129. 如實施例128之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 8比對時位於SEQ ID NO: 9之位置6或與SEQ ID NO: 9之位置6對應之位置的突變為鳥嘌呤經腺嘌呤取代；或當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 8比對時位於SEQ ID NO: 9之位置33或與SEQ ID NO: 9之位置33對應之位置的突變為鳥嘌呤經胞嘧啶取代。

130. 如實施例87至129中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其中該非人類細胞為哺乳動物細胞。

131. 如實施例87至129中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其中該非人類細胞為猴細胞。

132. 如實施例131之疫苗或免疫原性組合物，其中該猴細胞來自Vero細胞株。

133. 如實施例132之疫苗或免疫原性組合物，其中該Vero細胞株係選自WHO Vero 10-87、ATCC CCL-81、Vero 76 (ATCC寄存編號CRL-1587)，及Vero C1008 (ATCC寄存編號CRL-1586)。

134. 如實施例87至133中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其中

該一或多種抗原係藉由培養該非人類細胞而產生。

135. 如實施例134之疫苗或免疫原性組合物，其中該細胞係在無血清培養基中培養。

136. 如實施例87至135中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其中該疫苗或免疫原性組合物為經純化之抗原疫苗或免疫原性組合物、次單位疫苗或免疫原性組合物、不活化完整病毒疫苗或免疫原性組合物，或減毒病毒疫苗或免疫原性組合物。

137. 如實施例87至136中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其中該至少一種病毒係用BPL與福馬林之組合達成不活化。

138. 如實施例137之疫苗或免疫原性組合物，其中由福馬林達成不活化的該至少一種病毒包含一或多個修飾。

139. 如實施例138之疫苗或免疫原性組合物，其中該一或多個修飾包含經修飾之多肽。

140. 如實施例138之疫苗或免疫原性組合物，其中該一或多個修飾包含交聯多肽。

141. 如實施例137至140中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其中該疫苗或免疫原性組合物進一步包含福馬林。

142. 如實施例87至141中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其進一步包含有效濃度的清潔劑。

143. 如實施例142之疫苗或免疫原性組合物，其中該清潔劑包含聚山梨醇酯[80]。

144. 如實施例143之疫苗或免疫原性組合物，其中該有效濃度在約0.001%至約0.01%範圍內。

145. 如實施例87至144中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其進一步包含佐劑。

146. 如實施例145之疫苗或免疫原性組合物，其中該佐劑係選自

由以下組成之群：鋁鹽、鐸樣受體(TLR)促效劑、單磷醯基脂質A(MLA)、合成脂質A、脂質A模擬物或類似物、MLA衍生物、細胞激素、皂素、胞壁醯二肽(MDP)衍生物、CpG寡核苷酸、革蘭氏陰性細菌之脂多醣(LPS)、聚膦氮烯、乳液、病毒顆粒、脂質捲、聚(丙交酯-共-乙交酯)(PLG)微粒、泊洛沙姆顆粒、微粒、脂質體、完全弗氏佐劑(CFA)及不完全弗氏佐劑(IFA)。

147. 如實施例146之疫苗或免疫原性組合物，其中該佐劑為鋁鹽。

148. 如實施例146之疫苗或免疫原性組合物，其中該佐劑係選自明礬、磷酸鋁、氫氧化鋁、硫酸鉀鋁及Alhydrogel 85。

149. 如實施例147或實施例148之疫苗或免疫原性組合物，其中至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%抗原吸附至佐劑。

150. 如實施例146之疫苗或免疫原性組合物，其中該佐劑為單磷醯基脂質A (MLA)及其衍生物。

151. 一種用於治療或預防有需要之個體之手、足及口病的方法，其包含向該個體投與治療有效量之如實施例87至150中任一例之疫苗或免疫原性組合物。

152. 一種誘導有需要之個體免疫反應的方法，其包含向該個體投與免疫原性量之如實施例87至150中任一例之疫苗或免疫原性組合物。

153. 如實施例151或實施例152之方法，其中該投藥誘導該個體發生保護性免疫反應。

154. 如實施例153之方法，其中該免疫反應包含針對EV71、CA6及CA16中之一或多者的免疫反應。

155. 如實施例153之方法，其中該免疫反應包含針對一或多種選

自B4、C2、C4及C5之EV71病毒基因型的免疫反應。

156. 如實施例151至155中任一例之方法，其中該投藥係選自由以下組成之群：皮下遞送、經皮遞送、皮內遞送、皮下遞送、肌肉內遞送、經口遞送、口服遞送、鼻內遞送、頰內遞送、舌下遞送、腹膜內遞送、陰道內遞送、肛門遞送及顱內遞送。

157. 如實施例151至156中任一例之方法，其中該投藥包含一或多次投藥。

158. 一種用於使手、足及口病毒製劑達成不活化的方法，包含：

(a)自一或多個非人類細胞中分離出手、足及口病毒製劑，其中該等細胞用於產生該病毒製劑；

(b)用有效量之β-丙內酯(BPL)處理該病毒製劑；及

(c)用有效量之福馬林處理該病毒製劑，其中福馬林處理步驟與步驟(b)同時發生或在步驟(b)之後發生，及

其中該病毒係選自EV71、CA6及CA16中之一或多者。

159. 如實施例158之方法，其中該方法進一步包含將該病毒製劑在37℃之溫度下加熱足以使BPL水解的時間段。

160. 如實施例159之方法，其中該時間段在約1小時至約6小時範圍內。

161. 如實施例158至160中任一例之方法，其中該不活化病毒製劑包含一或多個修飾。

162. 如實施例161之方法，其中該一或多個修飾包含經修飾之核酸。

163. 如實施例162之方法，其中該經修飾之核酸為烷基化核酸。

164. 如實施例161之方法，其中該一或多個修飾包含經修飾之多肽。

165. 如實施例164之方法，其中該經修飾之多肽包含經修飾之胺基酸殘基，該胺基酸殘基係選自半胱胺酸、甲硫胺酸、組胺酸、天冬胺酸、麩胺酸、酪胺酸、離胺酸、絲胺酸及蘇胺酸中之一或多者。

166. 一種手、足及口疫苗，其包含一或多種來自引起人類之手、足及口病之至少一種不活化病毒的抗原，其中該至少一種病毒為CA6、CA16或兩者，且其中該至少一種病毒係用福馬林達成不活化。

167. 一種手、足及口免疫原性組合物，其包含一或多種來自引起人類之手、足及口病之至少一種不活化病毒的抗原，其中該至少一種病毒為CA6、CA16或兩者，且其中該至少一種病毒係用福馬林達成不活化。

168. 如實施例166或實施例167之疫苗或免疫原性組合物，其中藉由福馬林達成不活化的該至少一種病毒包含一或多個修飾。

169. 如實施例168之疫苗或免疫原性組合物，其中該一或多個修飾包含經修飾之多肽。

170. 如實施例168之疫苗或免疫原性組合物，其中該一或多個修飾包含交聯多肽。

171. 如實施例166至170中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其中該疫苗或免疫原性組合物進一步包含福馬林。

172. 如實施例166至171中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其進一步包含一或多種來自EV71的抗原。

173. 如實施例172之疫苗或免疫原性組合物，其中該一或多種抗原包含至少一個非人類細胞適應突變。

174. 如實施例173之疫苗或免疫原性組合物，其中該一或多種抗原包含EV71之VP1多肽，且其中該VP1多肽包含至少一個非人類細胞適應突變。

175. 如實施例174之疫苗或免疫原性組合物，其中該至少一個非人類細胞適應突變當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 1比對時，發生於SEQ ID NO: 1之位置7，或與SEQ ID NO: 1之位置7對應的位置；或當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 1比對時，發生於SEQ ID NO: 1之位置7、14、145或282或與SEQ ID NO: 1之位置7、14、145或282對應之位置中的兩個或兩個以上、三個或三個以上或所有四個位置。

176. 如實施例175之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 1比對時位於SEQ ID NO: 1之位置7或與SEQ ID NO: 1之位置7對應之位置的突變為纈胺酸經甲硫胺酸取代。

177. 如實施例175之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 1比對時位於SEQ ID NO: 1之位置14或與SEQ ID NO: 1之位置14對應之位置的突變為天冬胺酸經天冬醯胺取代。

178. 如實施例175之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 1比對時位於SEQ ID NO: 1之位置145或與SEQ ID NO: 1之位置145對應之位置的突變為麩胺酸經麩醯胺酸取代。

179. 如實施例175之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 1比對時位於SEQ ID NO: 1之位置282或與SEQ ID NO: 1之位置282對應之位置的突變為天冬醯胺經天冬胺酸取代。

180. 如實施例173至179之疫苗或免疫原性組合物，其中該一或多種抗原包含CA6之VP1多肽且其中該VP1多肽包含至少一個非人類細胞適應突變。

181. 如實施例180之疫苗或免疫原性組合物，其中該至少一個非人類細胞適應突變當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 2比對時，發生於SEQ ID NO: 2之位置46、90、96或268或與SEQ ID NO: 2之位置

46、90、96或268對應之位置中的一或多個、兩個或兩個以上、三個或三個以上或所有四個位置。

182. 如實施例181之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 2比對時位於SEQ ID NO: 2之位置46或與SEQ ID NO: 2之位置46對應之位置的突變為丙胺酸經纈胺酸取代。

183. 如實施例181之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 2比對時位於SEQ ID NO: 2之位置90或與SEQ ID NO: 2之位置90對應之位置的突變為麩胺酸經離胺酸取代。

184. 如實施例181之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 2比對時位於SEQ ID NO: 2之位置96或與SEQ ID NO: 2之位置96對應之位置的突變為蘇胺酸經丙胺酸取代。

185. 如實施例181之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 2比對時位於SEQ ID NO: 2之位置268或與SEQ ID NO: 2之位置268對應之位置的突變為纈胺酸經異白胺酸取代。

186. 如實施例173至185之疫苗或免疫原性組合物，其中該一或多種抗原包含CA6之VP2多肽且其中該VP2多肽包含至少一個非人類細胞適應突變。

187. 如實施例186之疫苗或免疫原性組合物，其中該至少一個非人類細胞適應突變當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 3比對時，發生於SEQ ID NO: 3之位置144，或與SEQ ID NO: 3之位置144對應的位置。

188. 如實施例187之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 3比對時位於SEQ ID NO: 3之位置144或與SEQ ID NO: 3之位置144對應之位置的突變為麩醯胺酸經離胺酸取代。

189. 如實施例173至188之疫苗或免疫原性組合物，其中該一或多種抗原包含CA6之VP3多肽且其中該VP3多肽包含至少一個非人類細胞適應突變。

190. 如實施例189之疫苗或免疫原性組合物，其中該至少一個非人類細胞適應突變當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 4比對時，發生於SEQ ID NO: 4之位置102，或與SEQ ID NO: 4之位置102對應的位置。

191. 如實施例190之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 4比對時位於SEQ ID NO: 4之位置102或與SEQ ID NO: 4之位置102對應之位置的突變為異白胺酸經纈胺酸取代。

192. 如實施例173至191之疫苗或免疫原性組合物，其中該一或多種抗原包含CA6之5'未轉譯區(UTR)，且其中CA6之該5'UTR包含至少一個非人類細胞適應突變。

193. 如實施例192之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法將CA6之該5'UTR與SEQ ID NO: 8比對時，該至少一個非人類細胞適應突變發生於SEQ ID NO: 8之核酸位置1、13、14、15、16、21、23、34或40中之一或多個、兩個或兩個以上、三個或三個以上、四個或四個以上、五個或五個以上、六個或六個以上、七個或七個以上、八個或八個以上或所有九個核酸位置，或與SEQ ID NO: 8之位置1、13、14、15、16、21、23、34或40對應的位置。

194. 如實施例193之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 8比對時位於SEQ ID NO: 8之位置1或與SEQ ID NO: 8之位置1對應之位置的突變為胸腺嘧啶經鳥嘌呤取代；當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 8比對時位於SEQ ID NO: 8之位置13或與SEQ ID NO: 8之位置13對應之位置的突變為鳥嘌呤經腺嘌呤取

代；當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 8比對時位於SEQ ID NO: 8之位置14或與SEQ ID NO: 8之位置14對應之位置的突變為胸腺嘧啶經鳥嘌呤取代；當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 8比對時位於SEQ ID NO: 8之位置15或與SEQ ID NO: 8之位置15對應之位置的突變為鳥嘌呤經胞嘧啶取代；當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 8比對時位於SEQ ID NO: 8之位置16或與SEQ ID NO: 8之位置16對應之位置的突變為鳥嘌呤經腺嘌呤取代；當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 8比對時位於SEQ ID NO: 8之位置21或與SEQ ID NO: 8之位置21對應之位置的突變為胞嘧啶經胸腺嘧啶取代；當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 8比對時位於SEQ ID NO: 8之位置23或與SEQ ID NO: 8之位置23對應之位置的突變為胞嘧啶經胸腺嘧啶取代；當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 8比對時位於SEQ ID NO: 8之位置34或與SEQ ID NO: 8之位置34對應之位置的突變為鳥嘌呤經胸腺嘧啶取代；或當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 8比對時位於SEQ ID NO: 8之位置40或與SEQ ID NO: 8之位置40對應之位置的突變為胞嘧啶經鳥嘌呤取代。

195. 如實施例173至194之疫苗或免疫原性組合物，其中該一或多種抗原包含CA16之2A多肽，且其中該2A多肽包含至少一個非人類細胞適應突變。

196. 如實施例195之疫苗或免疫原性組合物，其中該至少一個非人類細胞適應突變當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 5比對時，發生於SEQ ID NO: 5之位置2，或與SEQ ID NO: 5之位置2對應的位置。

197. 如實施例196之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 5比對時位於SEQ ID NO: 5之位置2或與SEQ ID NO: 5之位置2對應之位置的突變為離胺酸經麩胺酸取代。

198. 如實施例173至197之疫苗或免疫原性組合物，其中該一或多種抗原包含CA16之VP2多肽，且其中該VP2多肽包含至少一個非人

類細胞適應突變。

199. 如實施例198之疫苗或免疫原性組合物，其中該至少一個非人類細胞適應突變當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 6比對時，發生於SEQ ID NO: 6之位置161，或與SEQ ID NO: 6之位置161對應的位置。

200. 如實施例199之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 6比對時位於SEQ ID NO: 6之位置161或與SEQ ID NO: 6之位置161對應之位置的突變為甲硫胺酸經蘇胺酸取代。

201. 如實施例195至200中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其進一步在CA16之VP1多肽中包含至少一個另外的非人類細胞適應突變。

202. 如實施例201之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 7比對時，該至少一個另外的非人類細胞適應突變發生於SEQ ID NO: 7之位置99或145中的一或多者或兩者，或與SEQ ID NO: 7之位置99或145對應的位置。

203. 如實施例202之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 7比對時位於SEQ ID NO: 7之位置99或與SEQ ID NO: 7之位置99對應之位置的突變為天冬胺酸經甘胺酸取代。

204. 如實施例202之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 7比對時位於SEQ ID NO: 7之位置145或與SEQ ID NO: 7之位置145對應之位置的突變為纈胺酸經麩胺酸取代。

205. 如實施例173至204之疫苗或免疫原性組合物，其中該一或多種抗原包含CA16之5'未轉譯區(UTR)，且其中CA16之該5'UTR包含至少一個非人類細胞適應突變。

206. 如實施例205之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比

對演算法將CA6之5'UTR與SEQ ID NO: 8比對時，該至少一個非人類細胞適應突變發生於SEQ ID NO: 9之位置6或33中之一者或兩者，或與SEQ ID NO: 9之位置6或33對應的位置。

207. 如實施例206之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 8比對時位於SEQ ID NO: 9之位置6或與SEQ ID NO: 9之位置6對應之位置的突變為鳥嘌呤經腺嘌呤取代；或當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 8比對時位於SEQ ID NO: 9之位置33或與SEQ ID NO: 9之位置33對應之位置的突變為鳥嘌呤經胞嘧啶取代。

208. 如實施例166至207中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其中該非人類細胞為哺乳動物細胞。

209. 如實施例166至207中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其中該非人類細胞為猴細胞。

210. 如實施例209之疫苗或免疫原性組合物，其中該猴細胞來自Vero細胞株。

211. 如實施例210之疫苗或免疫原性組合物，其中該Vero細胞株係選自WHO Vero 10-87、ATCC CCL-81、Vero 76 (ATCC寄存編號CRL-1587)，及Vero C1008 (ATCC寄存編號CRL-1586)。

212. 如實施例166至211中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其中該一或多種抗原係藉由培養該非人類細胞而產生。

213. 如實施例212之疫苗或免疫原性組合物，其中該細胞係在無血清培養基中培養。

214. 如實施例166至213中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其中該疫苗或免疫原性組合物為經純化之抗原疫苗或免疫原性組合物、次單位疫苗或免疫原性組合物、不活化完整病毒疫苗或免疫原性組合物，或減毒病毒疫苗或免疫原性組合物。

215. 如實施例166至214中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其中該至少一種病毒係用福馬林與BPL之組合達成不活化。

216. 如實施例215之疫苗或免疫原性組合物，其中由BPL達成不活化的該至少一種病毒包含一或多個修飾。

217. 如實施例216之疫苗或免疫原性組合物，其中該一或多個修飾包含經修飾之核酸。

218. 如實施例217之疫苗或免疫原性組合物，其中該經修飾之核酸為烷基化核酸。

219. 如實施例216之疫苗或免疫原性組合物，其中該一或多個修飾包含經修飾之多肽。

220. 如實施例219之疫苗或免疫原性組合物，其中該經修飾之多肽包含經修飾之胺基酸殘基，該胺基酸殘基係選自半胱胺酸、甲硫胺酸、組胺酸、天冬胺酸、麩胺酸、酪胺酸、離胺酸、絲胺酸及蘇胺酸中之一或多者。

221. 如實施例166至215中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其進一步包含有效濃度的清潔劑。

222. 如實施例221之疫苗或免疫原性組合物，其中該清潔劑包含聚山梨醇酯[80]。

223. 如實施例222之疫苗或免疫原性組合物，其中該有效濃度在約0.001%至約0.01%範圍內。

224. 如實施例166至223中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其進一步包含佐劑。

225. 如實施例224之疫苗或免疫原性組合物，其中該佐劑係選自由以下組成之群：鋁鹽、鐸樣受體(TLR)促效劑、單磷醯基脂質A(MLA)、合成脂質A、脂質A模擬物或類似物、MLA衍生物、細胞激素、皂素、胞壁醯二肽(MDP)衍生物、CpG寡核苷酸、革蘭氏陰性細

菌之脂多醣(LPS)、聚膦氮烯、乳液、病毒顆粒、脂質捲、聚(丙交酯-共-乙交酯)(PLG)微粒、泊洛沙姆顆粒、微粒、脂質體、完全弗氏佐劑(CFA)及不完全弗氏佐劑(IFA)。

226. 如實施例225之疫苗或免疫原性組合物，其中該佐劑為鋁鹽。

227. 如實施例225之疫苗或免疫原性組合物，其中該佐劑係選自明礬、磷酸鋁、氫氧化鋁、硫酸鉀鋁及Alhydrogel 85。

228. 如實施例226或實施例227之疫苗或免疫原性組合物，其中至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%抗原吸附至佐劑。

229. 如實施例225之疫苗或免疫原性組合物，其中該佐劑為單磷醯基脂質A (MLA)及其衍生物。

230. 一種用於治療或預防有需要之個體之手、足及口病的方法，包含向該個體投與治療有效量之如實施例166至229中任一例之疫苗或免疫原性組合物。

231. 一種誘導有需要之個體發生免疫反應的方法，包含向該個體投與免疫原性量之如實施例166至229中任一例之疫苗或免疫原性組合物。

232. 如實施例230或實施例231之方法，其中該投藥誘導該個體發生保護性免疫反應。

233. 如實施例232之方法，其中該免疫反應包含針對EV71、CA6及CA16中之一或多者的免疫反應。

234. 如實施例232之方法，其中該免疫反應包含針對一或多種選自B4、C2、C4及C5之EV71病毒基因型的免疫反應。

235. 如實施例230至234中任一例之方法，其中該投藥係選自由以下組成之群：皮下遞送、經皮遞送、皮內遞送、皮下遞送、肌肉內

遞送、經口遞送、口服遞送、鼻內遞送、頰內遞送、舌下遞送、腹膜內遞送、陰道內遞送、肛門遞送及顱內遞送。

236. 如實施例230至235中任一例之方法，其中該投藥包含一或多次投藥。

237. 一種用於使手、足及口病毒製劑達成不活化的方法，包含：

(a)自一或多個非人類細胞中分離出手、足及口病毒製劑，其中該等細胞用於產生該病毒製劑；

(b)用有效量之福馬林處理該病毒製劑；及

(c)自福馬林中純化該病毒製劑，其中該病毒係選自EV71、CA6及CA16中之一或多者。

238. 如實施例237之方法，其中該不活化病毒製劑包含一或多個修飾。

239. 如實施例238之方法，其中該一或多個修飾包含經修飾之多肽。

240. 如實施例238之方法，其中該一或多個修飾包含交聯多肽。

241. 如實施例237至240中任一例之方法，其中該疫苗或免疫原性組合物進一步包含福馬林。

242. 一種手、足及口疫苗，其包含一或多種來自引起人類之手、足及口病之至少一種病毒的抗原及鋁鹽佐劑，其中至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%抗原吸附至鋁鹽佐劑。

243. 一種手、足及口免疫原性組合物，其包含一或多種來自引起人類之手、足及口病之至少一種病毒的抗原及鋁鹽佐劑，其中至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%抗原吸附至鋁鹽佐劑。

244. 如實施例242或實施例243之疫苗或免疫原性組合物，其中該佐劑係選自明礬、磷酸鋁、氫氧化鋁、硫酸鉀鋁及Alhydrogel 85。

245. 如實施例242至244中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其中該至少一種病毒係選自EV71、CA6及CA16中之一或多者。

246. 如實施例242至244中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其中該至少一種病毒包含EV71、CA6及CA16。

247. 如實施例242至244中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其中該至少一種病毒包含EV71及CA6。

248. 如實施例242至244中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其中該至少一種病毒包含EV71及CA16。

249. 如實施例242至244中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其中該至少一種病毒包含CA6及CA16。

250. 如實施例242至244中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其中該至少一種病毒為EV71。

251. 如實施例242至244中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其中該一或多種抗原係選自EV71、CA6、CA16及其任何組合。

252. 如實施例251之疫苗或免疫原性組合物，其中該一或多種抗原來自EV71。

253. 如實施例242至252中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其中該一或多種抗原包含至少一個非人類細胞適應突變。

254. 如實施例253之疫苗或免疫原性組合物，其中該一或多種抗原包含EV71之VP1多肽，且其中該VP1多肽包含至少一個非人類細胞適應突變。

255. 如實施例254之疫苗或免疫原性組合物，其中該至少一個非人類細胞適應突變當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 1比對時，發生於SEQ ID NO: 1之位置7，或與SEQ ID NO: 1之位置7對應的位置；

或當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 1比對時，發生於SEQ ID NO: 1之位置7、14、145或282或與SEQ ID NO: 1之位置7、14、145或282對應之位置中的兩個或兩個以上、三個或三個以上或所有四個位置。

256. 如實施例255之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 1比對時位於SEQ ID NO: 1之位置7或與SEQ ID NO: 1之位置7對應之位置的突變為纈胺酸經甲硫胺酸取代。

257. 如實施例255之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 1比對時位於SEQ ID NO: 1之位置14或與SEQ ID NO: 1之位置14對應之位置的突變為天冬胺酸經天冬醯胺取代。

258. 如實施例255之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 1比對時位於SEQ ID NO: 1之位置145或與SEQ ID NO: 1之位置145對應之位置的突變為麩胺酸經麩醯胺酸取代。

259. 如實施例255之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 1比對時位於SEQ ID NO: 1之位置282或與SEQ ID NO: 1之位置282對應之位置的突變為天冬醯胺經天冬胺酸取代。

260. 如實施例253至259中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其中該一或多種抗原包含CA6之VP1多肽且其中該VP1多肽包含至少一個非人類細胞適應突變。

261. 如實施例260之疫苗或免疫原性組合物，其中該至少一個非人類細胞適應突變當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 2比對時，發生於SEQ ID NO: 2之位置46、90、96或268或與SEQ ID NO: 2之位置46、90、96或268對應之位置中的一或多個、兩個或兩個以上、三個或三個以上或所有四個位置。

262. 如實施例261之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比

對演算法與SEQ ID NO: 2比對時位於SEQ ID NO: 2之位置46或與SEQ ID NO: 2之位置46對應之位置的突變為丙胺酸經纈胺酸取代。

263. 如實施例261之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 2比對時位於SEQ ID NO: 2之位置90或與SEQ ID NO: 2之位置90對應之位置的突變為麩胺酸經離胺酸取代。

264. 如實施例261之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 2比對時位於SEQ ID NO: 2之位置96或與SEQ ID NO: 2之位置96對應之位置的突變為蘇胺酸經丙胺酸取代。

265. 如實施例261之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 2比對時位於SEQ ID NO: 2之位置268或與SEQ ID NO: 2之位置268對應之位置的突變為纈胺酸經異白胺酸取代。

266. 如實施例253至265之疫苗或免疫原性組合物，其中該一或多種抗原包含CA6之VP2多肽且其中該VP2多肽包含至少一個非人類細胞適應突變。

267. 如實施例266之疫苗或免疫原性組合物，其中該至少一個非人類細胞適應突變當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 3比對時，發生於SEQ ID NO: 3之位置144，或與SEQ ID NO: 3之位置144對應的位置。

268. 如實施例267之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 3比對時位於SEQ ID NO: 3之位置144或與SEQ ID NO: 3之位置144對應之位置的突變為麩醯胺酸經離胺酸取代。

269. 如實施例253至268之疫苗或免疫原性組合物，其中該一或多種抗原包含CA6之VP3多肽且其中該VP3多肽包含至少一個非人類細胞適應突變。

270. 如實施例269之疫苗或免疫原性組合物，其中該至少一個非人類細胞適應突變當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 4比對時，發生於SEQ ID NO: 4之位置102，或與SEQ ID NO: 4之位置102對應的位置。

271. 如實施例270之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 4比對時位於SEQ ID NO: 4之位置102或與SEQ ID NO: 4之位置102對應之位置的突變為異白胺酸經纈胺酸取代。

272. 如實施例253至271之疫苗或免疫原性組合物，其中該一或多種抗原包含CA6之5'未轉譯區(UTR)，且其中CA6之該5'UTR包含至少一個非人類細胞適應突變。

273. 如實施例272之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法將CA6之該5'UTR與SEQ ID NO: 8比對時，該至少一個非人類細胞適應突變發生於SEQ ID NO: 8之核酸位置1、13、14、15、16、21、23、34或40中之一或多個、兩個或兩個以上、三個或三個以上、四個或四個以上、五個或五個以上、六個或六個以上、七個或七個以上、八個或八個以上或所有九個核酸位置，或與SEQ ID NO: 8之位置1、13、14、15、16、21、23、34或40對應的位置。

274. 如實施例273之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 8比對時位於SEQ ID NO: 8之位置1或與SEQ ID NO: 8之位置1對應之位置的突變為胸腺嘧啶經鳥嘌呤取代；當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 8比對時位於SEQ ID NO: 8之位置13或與SEQ ID NO: 8之位置13對應之位置的突變為鳥嘌呤經腺嘌呤取代；當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 8比對時位於SEQ ID NO: 8之位置14或與SEQ ID NO: 8之位置14對應之位置的突變為胸腺嘧啶經鳥嘌呤取代；當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 8比對時位於SEQ

ID NO: 8之位置15或與SEQ ID NO: 8之位置15對應之位置的突變為鳥嘌呤經胞嘧啶取代；當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 8比對時位於SEQ ID NO: 8之位置16或與SEQ ID NO: 8之位置16對應之位置的突變為鳥嘌呤經腺嘌呤取代；當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 8比對時位於SEQ ID NO: 8之位置21或與SEQ ID NO: 8之位置21對應之位置的突變為胞嘧啶經胸腺嘧啶取代；當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 8比對時位於SEQ ID NO: 8之位置23或與SEQ ID NO: 8之位置23對應之位置的突變為胞嘧啶經胸腺嘧啶取代；當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 8比對時位於SEQ ID NO: 8之位置34或與SEQ ID NO: 8之位置34對應之位置的突變為鳥嘌呤經胸腺嘧啶取代；或當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 8比對時位於SEQ ID NO: 8之位置40或與SEQ ID NO: 8之位置40對應之位置的突變為胞嘧啶經鳥嘌呤取代。

275. 如實施例253至274之疫苗或免疫原性組合物，其中該一或多種抗原包含CA16之2A多肽，且其中該2A多肽包含至少一個非人類細胞適應突變。

276. 如實施例275之疫苗或免疫原性組合物，其中該至少一個非人類細胞適應突變當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 5比對時，發生於SEQ ID NO: 5之位置2，或與SEQ ID NO: 5之位置2對應的位置。

277. 如實施例276之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 5比對時位於SEQ ID NO: 5之位置2或與SEQ ID NO: 5之位置2對應之位置的突變為離胺酸經麩胺酸取代。

278. 如實施例253至277之疫苗或免疫原性組合物，其中該一或多種抗原包含CA16之VP2多肽，且其中該VP2多肽包含至少一個非人類細胞適應突變。

279. 如實施例278之疫苗或免疫原性組合物，其中該至少一個非人類細胞適應突變當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 6比對時，發

生於SEQ ID NO: 6之位置161，或與SEQ ID NO: 6之位置161對應的位置。

280. 如實施例279之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 6比對時位於SEQ ID NO: 6之位置161或與SEQ ID NO: 6之位置161對應之位置的突變為甲硫胺酸經蘇胺酸取代。

281. 如實施例275至280中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其進一步在CA16之VP1多肽中包含至少一個另外的非人類細胞適應突變。

282. 如實施例281之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 7比對時，該至少一個另外的非人類細胞適應突變發生於SEQ ID NO: 7之位置99或145中的一或多者或兩者，或與SEQ ID NO: 7之位置99或145對應的位置。

283. 如實施例282之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 7比對時位於SEQ ID NO: 7之位置99或與SEQ ID NO: 7之位置99對應之位置的突變為天冬胺酸經甘胺酸取代。

284. 如實施例282之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 7比對時位於SEQ ID NO: 7之位置145或與SEQ ID NO: 7之位置145對應之位置的突變為纈胺酸經麩胺酸取代。

285. 如實施例253至284之疫苗或免疫原性組合物，其中該一或多種抗原包含CA16之5'未轉譯區(UTR)，且其中CA16之該5'UTR包含至少一個非人類細胞適應突變。

286. 如實施例285之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法將CA6之5'UTR與SEQ ID NO: 8比對時，該至少一個非人類細胞適應突變發生於SEQ ID NO: 9之位置6或33中之一者或兩者，或與SEQ ID NO: 9之位置6或33對應的位置。

287. 如實施例286之疫苗或免疫原性組合物，其中當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 8比對時位於SEQ ID NO: 9之位置6或與SEQ ID NO: 9之位置6對應之位置的突變為鳥嘌呤經腺嘌呤取代；或當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 8比對時位於SEQ ID NO: 9之位置33或與SEQ ID NO: 9之位置33對應之位置的突變為鳥嘌呤經胞嘧啶取代。

288. 如實施例242至287中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其中該非人類細胞為哺乳動物細胞。

289. 如實施例242至287中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其中該非人類細胞為猴細胞。

290. 如實施例289之疫苗或免疫原性組合物，其中該猴細胞來自Vero細胞株。

291. 如實施例290之疫苗或免疫原性組合物，其中該Vero細胞株係選自WHO Vero 10-87、ATCC CCL-81、Vero 76 (ATCC寄存編號CRL-1587)，及Vero C1008 (ATCC寄存編號CRL-1586)。

292. 如實施例242至291中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其中該一或多種抗原係藉由培養該非人類細胞而產生。

293. 如實施例292之疫苗或免疫原性組合物，其中該細胞係在無血清培養基中培養。

294. 如實施例242至293中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其中該疫苗或免疫原性組合物為經純化之抗原疫苗或免疫原性組合物、次單位疫苗或免疫原性組合物，或減毒病毒疫苗或免疫原性組合物。

295. 如實施例242至294中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其中該至少一種病毒係以化學方式達成不活化。

296. 如實施例295之疫苗或免疫原性組合物，其中該至少一種病毒在化學上係用β-丙內酯(BPL)、福馬林或二元伸乙基亞胺(BEI)中之

一或多者達成不活化。

297. 如實施例295之疫苗或免疫原性組合物，其中該至少一種病毒在化學上用BPL達成不活化。

298. 如實施例295之疫苗或免疫原性組合物，其中該至少一種病毒在化學上用福馬林達成不活化。

299. 如實施例295之疫苗或免疫原性組合物，其中該至少一種病毒在化學上用BPL與福馬林之組合達成不活化。

300. 如實施例296、297或299中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其中藉由BPL達成不活化的該至少一種病毒包含一或多個修飾。

301. 如實施例300之疫苗或免疫原性組合物，其中該一或多個修飾包含經修飾之核酸。

302. 如實施例301之疫苗或免疫原性組合物，其中該經修飾之核酸為烷基化核酸。

303. 如實施例300之疫苗或免疫原性組合物，其中該一或多個修飾包含經修飾之多肽。

304. 如實施例303之疫苗或免疫原性組合物，其中該經修飾之多肽包含經修飾之胺基酸殘基，該胺基酸殘基係選自半胱胺酸、甲硫胺酸、組胺酸、天冬胺酸、麩胺酸、酪胺酸、離胺酸、絲胺酸及蘇胺酸中之一或多者。

305. 如實施例296、298或299中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其中藉由福馬林達成不活化的該至少一種病毒包含一或多個修飾。

306. 如實施例305之疫苗或免疫原性組合物，其中該一或多個修飾包含經修飾之多肽。

307. 如實施例305之疫苗或免疫原性組合物，其中該一或多個修飾包含交聯多肽。

308. 如實施例305至307中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其中該疫苗或免疫原性組合物進一步包含福馬林。

309. 如實施例295之疫苗或免疫原性組合物，其中該至少一種病毒在化學上用BEI達成不活化。

310. 如實施例296或實施例309之疫苗或免疫原性組合物，其中藉由BEI達成不活化的該至少一種病毒包含一或多個修飾。

311. 如實施例310之疫苗或免疫原性組合物，其中該一或多個修飾包含經修飾之核酸。

312. 如實施例311之疫苗或免疫原性組合物，其中該經修飾之核酸為烷基化核酸。

313. 如實施例309至312中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其中未反應之BEI係用硫代硫酸鈉進行水解。

314. 如實施例242至313中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其進一步包含有效濃度的清潔劑。

315. 如實施例314之疫苗或免疫原性組合物，其中該清潔劑包含聚山梨醇酯[80]。

316. 如實施例315之疫苗或免疫原性組合物，其中該有效濃度為約0.001%至約0.01%。

317. 如實施例242至316中任一例之疫苗或免疫原性組合物，其進一步包含至少一種其他佐劑。

318. 如實施例317之疫苗或免疫原性組合物，其中該至少一種其他佐劑係選自由以下組成之群：鐸樣受體(TLR)促效劑、單磷醯基脂質A (MLA)、合成脂質A、脂質A模擬物或類似物、MLA衍生物、細胞激素、皂素、胞壁醯二肽(MDP)衍生物、CpG寡核苷酸、革蘭氏陰性細菌之脂多醣(LPS)、聚膦氮烯、乳液、病毒顆粒、脂質捲、聚(丙交酯-共-乙交酯)(PLG)微粒、泊洛沙姆顆粒、微粒、脂質體、完全弗

氏佐劑(CFA)及不完全弗氏佐劑(IFA)。

319. 一種用於治療或預防有需要之個體之手、足及口病的方法，包含向該個體投與治療有效量之如實施例242至318中任一例之疫苗或免疫原性組合物。

320. 一種誘導有需要之個體發生免疫反應的方法，包含向該個體投與免疫原性量之如實施例242至318中任一例之疫苗或免疫原性組合物。

321. 如實施例319或實施例320之方法，其中該投藥誘導該個體發生保護性免疫反應。

322. 如實施例321之方法，其中該免疫反應包含針對EV71、CA6及CA16中之一或多者的免疫反應。

323. 如實施例321之方法，其中該免疫反應包含針對一或多種選自B4、C2、C4及C5之EV71病毒基因型的免疫反應。

324. 如實施例319至323中任一例之方法，其中該投藥係選自由以下組成之群：皮下遞送、經皮遞送、皮內遞送、皮下遞送、肌肉內遞送、經口遞送、口服遞送、鼻內遞送、頰內遞送、舌下遞送、腹膜內遞送、陰道內遞送、肛門遞送及顱內遞送。

325. 如實施例319至324中任一例之方法，其中該投藥包含一或多次投藥。

326. 一種製備有佐劑之手、足及口疫苗的方法，包含：

(a)將疫苗與鋁鹽佐劑混合，其中該疫苗包含一或多種來自引起人類之手、足及口病之至少一種病毒的抗原；及

(b)將混合物在適合條件下培育約16小時至約24小時範圍內之時間段，

其中至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%抗原吸附至鋁鹽佐劑，及

其中至少一種引起手、足及口病的病毒係選自EV71、CA6及CA16中之一或多者。

327. 一種製備有佐劑之手、足及口免疫原性組合物的方法，包含：

(a)將免疫原性組合物與鋁鹽佐劑混合，其中該免疫原性組合物包含一或多種來自引起人類之手、足及口病之至少一種病毒的抗原；及

(b)將混合物在適合條件下培育約16小時至約24小時範圍內之時間段，

其中至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%抗原吸附至鋁鹽佐劑，及

其中至少一種引起手、足及口病的病毒係選自EV71、CA6及CA16中之一或多者。

328. 如實施例326或實施例327之方法，其中該混合物在約2℃至約8℃範圍內的溫度下培育。

329. 如實施例326至328中任一例之方法，其中該佐劑係選自明礬、磷酸鋁、氫氧化鋁、硫酸鉀鋁及Alhydrogel 85。

參考以下實例將更充分地理解本發明。然而其不應解釋為以任何方式限制本發明之任何態樣或範疇。

實例

實例1：EV71在Vero細胞中之適應

對腸病毒71 (EV71)進行兩輪完整病毒基因組RNA萃取且轉染於Vero細胞中，隨後進行兩輪空斑純化，產生子基因組B2 EV71之新適應株系，如下文所述。對病毒基因組測序，鑑別VP1多肽中之四個適應性突變。適應性病毒用於產生主病毒種原(pre-Master Virus Seed，pre-MVS)，其隨後用於製造EV71疫苗。

源病毒株

用於製備適應性病毒的EV71/7423/MS/87病毒種株獲自John Hopkins's Institute, Singapore。[GenBank寄存編號U22522]。

Vero細胞株

EV71/7423/MS/87株適應及病毒產生所用的Vero細胞株來源於Vero細胞株WHO Vero 10-87，WHO Vero 10-87來源於ATCC CCL-81 Vero細胞株。

轉染及空斑純化

獲自John Hopkins's Institute, Singapore的EV71病毒種用於感染T25燒瓶中之伊格爾氏最小必需培養基(MEM) + 10%胎牛血清(FBS)中所生長的80%匯合Vero細胞單層。涉及EV71傳播之所有程序中所用的FBS獲自澳大利亞來源以最小化原材料所產生之傳染性海綿狀腦病之風險。吸附1.5小時之後，抽吸病毒上清液且添加MEM + 2% FBS培養基。感染之後第3及6天，當觀測到細胞病變效應(CPE)時，收集病毒上清液。第6天收集的病毒在Vero細胞(另外繼代四次)中、使用類似程序進一步擴增。

使用用於回收EV71病毒及RNA轉染的Roche高純度病毒RNA套組萃取病毒RNA。得自SVCR0059的Vero細胞在含有10% FBS的MEM中生長，以每孔5×10^5個細胞接種於6孔盤上，且在36±1℃培育一天。此培育之後，各孔中之細胞已生長至>90%匯合。使用Qiagen TransMessenger™轉染試劑將EV71完整基因組RNA轉染至Vero細胞中。約3小時之後，用PBS洗滌細胞且向各孔中添加2.5 mL MEM (無血清)。轉染後第4天，觀測到CPE且收集細胞及病毒上清液，在≤-60℃冷凍1小時，接著解凍。將樣品離心且將繼代1次(PN 1)病毒上清液儲備液等分試樣且在≤-60℃儲存直至進一步使用。使用PN 1儲備液重複RNA萃取及轉染程序以產生PN 2病毒儲備液。

在6孔盤中進行空斑純化，其中中性紅染色之Sea plaque瓊脂糖覆疊於Vero細胞單層上。使用PN 2病毒儲備液產生4個經充分分離之空斑(PN 3)，個別地在Vero細胞中擴增。含有細胞及病毒的所擴增個別搜集物各自進行冷凍-解凍處理及核酸酶(benzonase)處理，隨後離心以分離出含病毒上清液(PN 4)，在≤-60℃儲存。針對Vero細胞測定PN 4病毒儲備液在50%組織培養感染性劑量(TCID50)下的效價。

效價最高的兩個病毒儲備液使用相同程序再次進行空斑純化且作為PN 6病毒儲備液儲存。此第二輪空斑純化之後，選擇產生最高TCID50效價的純系病毒群用於在Vero細胞中以0.1之感染倍率(MOI)進一步擴增。感染後第4天，細胞顯示90% CPE，且收集且進行一次冷凍-解凍循環。離心之後，收集含有上清液的病毒儲備液(PN 7)且在≤-60℃儲存。PN 7病毒儲備液用於在兩層細胞工廠(1,264 cm2表面積)中以0.1之MOI感染Vero細胞以便產生pre-MVS。感染後第3天，觀測到培養物中的CPE。如上文所述，對所感染培養物進行相同的冷凍-解凍循環及離心，隨後將病毒上清液分配於40×5 mL及126×1.5 mL等分試樣中且在≤-60℃儲存。此PN 8病毒儲備液指定為適應性EV71，且隨後用作pre-MVS。

適應性EV71之測序

使用QIAmp病毒RNA微套組(Qiagen目錄號52904)，根據製造商說明書，自適應性EV71 (PN8)中分離出病毒RNA。使用RNA隨機引子進行兩次逆轉錄反應及缺乏逆轉錄酶的對照反應。所得cDNA產物接著在PCR擴增中用作模板，PCR擴增使用基於EV71/7423/MS/87株系[GenBank寄存編號U22522]之參考序列所設計的引子對。擴增產物係藉由瓊脂糖凝膠電泳目測且使用ExoSAP-IT PCR產物清除套組(GE Healthcare目錄號US78200)、根據製造商說明書加以純化。接著使用BigDye終止子v1.1循環測序套組(Applied Biosystems目錄號4337451)

對PCR擴增子進行測序且使用Applied Biosystems 3730xl DNA分析儀偵測序列。使用Sequencher軟體4.9版將所產生的序列資料組裝成鄰接序列。獲得最小四倍覆蓋度，病毒序列之各DNA股為兩倍覆蓋率，例外之處為幾個較短內部片段在單一方向上以及在序列之5'及3'端處的覆蓋率為四倍。藉由Beckman Coulter Genomics (BioOutsource的分包商)測定適應性EV71的完整核苷酸序列。

基於VP1基因之序列分析的基因分組展現適應性EV71株系歸類為B2子基因組。VP1基因序列與株系MS/7423/87之比較展現12個核苷酸差異。其中8個差異為靜默的且4個變化導致VP1中之四個胺基酸差異。四個胺基酸取代及其在SEQ ID NO: 1內的相應位置顯示於下表1中。

表1. EV71之全長基因組測序：P-0相對於P-8

	胺基酸序列	
	EV71 P0	EV71 P8 -適應性株系
VP1	7-V	7-M
	14-D	14-N
	145-E	145-Q
	282-N	282-D

實例2：疫苗製造及調配

實例1中所產生之適應性EV71病毒用於製造不活化的手、足及口病疫苗。為了製造疫苗，使病毒在Vero細胞中生長，收集且用二元伸乙基亞胺(BEI)達成不活化。接著純化非感染性不活化病毒顆粒且用氫氧化鋁調配。

製備主細胞庫及主病毒種

製備Vero主細胞庫(MCB)

將得自ATCC的一瓶Vero (WHO) 10-87細胞種儲備液在37±1℃快速解凍，離心且再懸浮於杜爾貝科氏修飾之伊格爾氏培養基(DMEM)

+ 10% FBS + L-麩醯胺酸(DGEM)中，隨後接種於T150燒瓶中(指定為PN 135)。燒瓶在5±0.5% CO2氛圍保溫箱中、在36±1℃培育。第4天，當細胞達到匯合時，使用TrypLE Select®溶液將Vero細胞自燒瓶移出且分入五個T225燒瓶中(PN 136)。匯合單層形成之後，自保溫箱移除燒瓶，用TrypLE Select®溶液移出細胞且分入一個具有6,320 cm2表面積的10層細胞工廠(CF10)中(PN 137)。以類似方式進行另一次繼代，其中將細胞接種至四個CF10中(PN 138)。

使用TrypLE Select®溶液移出四個CF10中的Vero細胞且收集。進行細胞計數且添加冷凍培養基(DMEM + 20% FBS + 20% DMSO)以將細胞濃度調節至1.0×10^7個細胞/毫升。將細胞以每個小瓶1 mL之體積等分至224個小瓶中且指定為MCB。

製備適應性EV71主病毒種。

將來自PN 138之一瓶MCB的Vero細胞解凍，離心且用於接種含有DGEM的2個T25燒瓶(PN 139)。在37±1℃、在5±1% CO2氛圍下培育5天之後，使細胞單層在1個T225燒瓶中繼代(PN 140)。在此次及所有隨後的細胞繼代中，細胞單層用不含Ca及Mg的杜爾貝科氏磷酸鹽緩衝鹽水(DPBS)洗滌，用TrypLE Select®溶液處理，隨後添加新鮮DGEM且在37±1℃、在5±1% CO2氛圍下培育。培育3天之後，細胞於1個T150及8個T225燒瓶中第二次繼代(PN 141)。培育3天之後，細胞於1個2層細胞工廠(CF2；1,264 cm2表面積)中第三次繼代(PN 142)。培育4天之後，細胞於1個T225及2個10層細胞工廠(CF10；6,320 cm2表面積)中第四次繼代(PN 143)。

當單層為約90至100%匯合時，將T225燒瓶及2個CF10培育3天。藉由用TrypLE Select®溶液處理而自1個T225燒瓶中移出細胞且計數以測定CF10中之每平方公分表面積的近似細胞密度。各細胞工廠中的單層用不含Ca及Mg的DPBS洗滌以移除任何殘餘生長培養基。製備

兩瓶感染培養基，各含有1 L新鮮無血清DMEM + L-麩醯胺酸，用於感染CF10。將兩瓶得自實例1的適應性EV71 pre-MVS解凍且添加0.95 mL至兩瓶感染培養基中之每一者中以實現約0.05之MOI。根據製造商說明書添加感染培養基至2個CF10中。所感染之CF10在37±1℃、在5±1% CO2氛圍下培育。培育3天之後，自保溫箱中移除CF10且收集所感染之培養上清液，合併且分配於4個離心瓶中。粗收集物質以1,424×g離心10分鐘且收集上清液且在5±3℃暫時儲存。將各細胞集結粒再懸浮於100 mL DMEM中且進行3次冷凍-解凍循環，隨後以1,424×g離心10分鐘。收集此等上清液且與得自第一離心步驟的上清液合併在一起。接著經由具有標稱0.22 μm孔徑的millipak 100過濾器組合件過濾溶液且收集濾液。將此本體MVS溶液以每個小瓶4 mL之體積等分至506個冷凍小瓶(5 mL)中。所有小瓶轉移至SAFC (Carlsbad California,USA)在≤-60℃進行可控儲存。

疫苗製造

步驟1：Vero細胞起始

PN 138之一瓶VERO MCB (LN 173-09001)在37±3℃、在恆定渦旋下快速解凍，直至剩有少量冰。接著自水浴中移出小瓶，允許靜置直至完全解凍且內容物直接添加至含有9 mL DGEM的拋棄式15 mL無菌離心管中。細胞在18±3℃以200×g離心5分鐘。移除上清液且將細胞集結粒再懸浮於2.0 mL DGEM中。將所再懸浮細胞之全部內容物添加至含有15 mL DGEM的T75燒瓶中且燒瓶在5±2% CO2保溫箱中、在37±2℃培育。

步驟2：培養基更換

培育3-4天之後，進行培養基更換。藉由抽吸移除細胞培養基且將15 mL新鮮DGEM添加至T75燒瓶中。

步驟3：第一次細胞繼代

觀測到T75燒瓶中有單層形成。一旦單層為約80-100%匯合(典型地在第6天)，則抽吸消耗培養基且細胞用不含Ca及Mg的10 mL DPBS洗滌一次以移除細胞碎片。移除DPBS之後，藉由添加3 mL TrypLE Select®溶液移出細胞，來回搖盪燒瓶以分散溶液。燒瓶在37±1℃培育4±2分鐘，隨後輕緩地敲打燒瓶以懸浮細胞。添加9 mL新鮮DGEM至燒瓶中且將細胞濕磨以破碎任何細胞凝塊。全部體積(約12 mL)添加至15 mL錐形離心管中且在16±2℃、以200×g離心5分鐘。抽吸上清液且小心地將細胞集結粒再懸浮於2 mL DGEM中。移除細胞懸浮液樣品用於細胞計數及存活率測定。基於細胞計數，使用最大量的細胞懸浮液、以每平方公分約1×10^4個細胞之接種密度分別接種適當數目個各含15 mL、35 mL或45 mL DGEM的T75、T175及T225燒瓶。燒瓶在5±2% CO2保溫箱中、在37±2℃培育直至匯合(典型地為3天)。

步驟4：第二次細胞繼代

觀測到步驟3的組織培養燒瓶中有單層形成。一旦單層為約80-100%匯合(典型地在第9天)，抽吸消耗培養基且用適量的DPBS (T75燒瓶各用10 mL且T175及T225燒瓶各用20 mL)洗滌細胞。移除DPBS之後，藉由添加適量的TrypLE Select®溶液(T75燒瓶各用5 mL且T175及T225燒瓶各用7 mL)來移出細胞，來回搖盪燒瓶以分散溶液。燒瓶在37±1℃培育4±2分鐘，隨後輕緩地敲打燒瓶以懸浮細胞。添加12 mL DGEM至各燒瓶(不論尺寸)中，且濕磨細胞以破碎任何細胞凝塊。將細胞懸浮液合併於50 mL拋棄式無菌離心管中且在16±2℃、以200×g離心5分鐘。移除上清液且將細胞集結粒再懸浮於3.0 mL DGEM中。移除細胞懸浮液樣品用於細胞計數及存活率測定。基於細胞計數，使用適量的細胞懸浮液、以每平方公分約1×10^4個細胞之密度接種各含有45 mL新鮮DGEM的8-10x T225燒瓶。燒瓶在5±2% CO2保溫箱中、在37±2℃培育直至匯合(典型地為3天)。

步驟5：第三次細胞繼代

觀測到8-10x T225燒瓶中有單層形成。一旦單層為約80-100%匯合(典型地在第12天)，則抽吸消耗培養基且用20 mL DPBS洗滌各燒瓶中的細胞。移除DPBS之後，藉由添加7.0 mL TrypLE Select®溶液至各燒瓶中來移出細胞且在37±2℃培育4±2分鐘，隨後輕緩地敲打燒瓶以懸浮細胞。添加28 mL DGEM至各燒瓶中且濕磨細胞以破碎任何細胞凝塊。將細胞懸浮液合併於500 mL無菌離心瓶中且在16±2℃、以200×g離心5分鐘。抽吸上清液且將細胞集結粒再懸浮於10 mL DGEM中且將懸浮液轉移至50 mL拋棄式無菌管中。用20 mL DGEM沖洗500 mL離心瓶且添加沖洗液至上述50 mL管中。輕緩地混合細胞懸浮液且移出樣品用於細胞計數及存活率測定。基於細胞計數，使用適量的細胞懸浮液、以每平方公分約1×10^4個細胞之密度接種2x 10層細胞工廠(CF10，6,320 cm2表面積)。對於各CF10而言，經由含有2,000 mL新鮮DGEM之5 L Stedim袋之注入口無菌添加適量的細胞懸浮液。將袋輕緩地混合且根據製造商說明書將內容物無菌轉移至CF10。CF10在5±1% CO2保溫箱中、在37±2℃培育直至匯合(典型地為4天)。

步驟6：第四次細胞繼代

觀測到2x CF10中有單層形成。一旦單層為約80-100%匯合(典型地在第16天)，則如下依序移出各CF10中的細胞：自第一CF10移除消耗培養基且根據製造商說明書用400 mL DPBS洗滌細胞。移除DPBS之後，藉由添加150 mL TrypLE Select®溶液至第一CF10中來移出細胞。允許TrypLE Select®溶液在各托盤之整個表面上均勻擴散且0.5-1分鐘之後移除過量溶液。CF10在37±2℃培育4±1分鐘以促使細胞分離。此培育期之後，在相差顯微鏡下觀測細胞以監測細胞分離。根據製造商說明書添加300 mL DGEM至第一CF10中且允許在各托盤之整個表面上均勻擴散。此時，第一CF10擱置一旁，同時以相同方式處

理第二CF10。將來自兩個CF10的細胞懸浮液合併於2 L拋棄式無菌錐形瓶(Erlenmeyer flask)中且輕緩地混合。合併之細胞懸浮液無菌轉移至2×500 mL離心瓶中且在16±2℃、以200×g離心5分鐘。抽吸上清液且將各細胞集結粒再懸浮於40.0 mL DGEM中且合併。輕緩地混合所合併之細胞懸浮液且移出樣品用於細胞計數及存活率測定。基於細胞計數，使用適量的細胞懸浮液、以每平方公分約1×10^4個細胞之密度接種10x CF10。對於各CF10而言，經由含有2,000 mL新鮮DGEM之5 L Stedim袋之注入口無菌添加適量的細胞懸浮液。將袋輕緩地混合且根據製造商說明書將內容物無菌轉移至CF10。CF10在5±1% CO2保溫箱中、在37±2℃培育直至匯合(典型地為4天)。

步驟7：細胞感染

計劃感染之前日(典型地為第19天)，在37±2℃培育各含有2,000 mL無血清DMEM的10 x 5L Stedim袋以預溫熱培養基用於感染。感染當天，當單層為約90至100%匯合(典型地在第20天)時，將2個含有EV71 MVS (LN 173-10001)的小瓶在37±2℃水浴中快速解凍且經由各Stedim袋之注入口添加0.6 mL MVS，以使得MOI為約0.03。此MOI係基於如下假設來計算：平均細胞密度為每平方公分2×10^5個細胞且EV71 MVS病毒效價為3.4×10^7 TCID50/mL。對於各CF10而言，移除消耗培養基且用400 mL DPBS洗滌細胞，如上述步驟6中所述。根據CF10製造商說明書，藉由添加2,000 mL上述含病毒無血清DMEM製劑之一來感染各CF10。所感染之CF10在5±1% CO2保溫箱中、在37±2℃培育直至觀測到100% CPE (典型地為4天)。

步驟8：病毒收集

病毒感染期結束時(典型地在第24天)，在相差顯微鏡下觀測各細胞工廠以確保100% CPE。無菌收集來自10 x CF10的上清液且根據CF10製造商說明書合併於Stedim 20L Flexboy袋中。此代表粗病毒收

集物。

步驟9：核酸酶處理

經由含有粗病毒收集物之20 L Stedim袋之注入口無菌添加適量的250,000 U/mL核酸酶溶液及1 M MgCl2溶液，以分別達成20 U/ml及2 mM的最終濃度。混合袋內容物，隨後在37±1℃培育18-24小時。

步驟10：病毒不活化

即將使用之前，藉由添加6.2 g之2-溴乙胺氫溴酸鹽(BEA)至300 mL之175 mM NaOH中且在37±1℃水浴中培育來製備BEI不活化溶液。一旦BEA溶解，則常規地檢查BEI溶液之pH值，直至pH下降至pH 8-9範圍內。BEI溶液在pH值落入此範圍之60分鐘內用於不活化，此係藉由使用蠕動泵抽吸溶液直接通過0.2 μm過濾器囊盒進入含有經核酸酶處理之粗病毒收集物的20 L袋中來達成。手動混合BEI粗病毒收集物至少5分鐘，接著為了促進進一步混合，將BEI粗收集物溶液抽吸至新的20 L Stedim Flexboy袋中。BEI粗病毒收集物再次手動混合至少5分鐘，接著在37±1℃培育6-7小時。

步驟11：BEI中和

殘餘BEI經由添加1 L 32 mM硫代硫酸鈉而水解。含有經BEI處理之粗收集物的Flexboy袋與含有1 L 32 mm硫代硫酸鈉的袋使用Y連接器並聯連接。Y連接器之管道下游包括管線內靜態混合器。經BEI處理之粗收集物及32 mM硫代硫酸鈉溶液分別以1 L/min及50 mL/min、經由靜態混合器同時抽吸至Y連接器中且收集至新的Flexboy袋中。不活化且經中和之粗收集物接著立即如下文所述澄清。

步驟12：澄清

使用4階段過濾組合件來澄清經核酸酶處理、不活化、經中和之病毒池。組合件由上游的Sartorius Sartoclean GF過濾器囊盒與Sartorious Sartopore 2過濾器囊盒串聯而組成。前兩個過濾階段容納

於具有標稱3.0 μm及0.8 μm乙酸纖維素過濾器的Sartoclean GF囊盒中。第三及第四階段容納於具有標稱0.45 μm及0.2 μm聚醚碸過濾膜的Sartopore 2過濾器囊盒中。經由過濾組合件抽吸病毒池且收集於5×5 L Flexboy袋(各約4 L)中。最後5 L Flexboy袋連接至過濾組合件之出口且經由組合件抽吸3 L PBST以洗滌過濾器且收集任何殘餘的不活化病毒。

步驟13：濃縮及透濾

三個各具有0.1 m2、100 kDa分子量截止Sartorius Hydrosart膜的Sartorius Slice拋棄式掃流過濾匣並聯連接，以經由切向流過濾(TFF)將經澄清的不活化病毒池濃縮10倍(體積)。TFF之後，使用10個體積之PBS-Tween 80 (10 mM Na-PO4、150 mM NaCl、0.002% Tween 80) pH 7.5進行恆定體積透濾。在整個運作中維持每小時300 L/m2 (LMH)之恆定通量及0.40至0.45巴之跨膜壓力(TMP)。使用相等體積的緩衝液洗滌TFF卡匣組合件以便改善病毒回收。最終滯留物濃度為經由0.45 μm及0.2 μm無菌過濾器過濾之前的約5倍。經過濾之滯留物在層析純化之前，在5±3℃儲存不超過7天或在≤-60℃儲存長達4週。

步驟14：陰離子交換層析

利用陰離子交換層析、經由Fractogel® EMD TMAE (Merck)介質進行第一純化步驟以捕捉EV71，部分地移除污染性宿主細胞蛋白質及任何殘餘的宿主核酸。在產物形成之此階段，陰離子交換層析(AEX)介質視為單次使用的且產物專用的管柱在每次生產運作時再裝填。GE Healthcare 70 x 500 mm (ID x 高度)INdEX管柱用約390 mL Fractogel® EMD TMAE層析介質裝填以產生約100 mm之床層高度。裝填之後，用4 mL AEX測試溶液(20 mM磷酸鈉緩衝液、2 mM MgCl2、1 M NaCl，pH 7.5)裝載管柱以量測理論盤等效高度(HETP)及不對稱性(As)。若HETP及As分別為>3,000個盤/m及0.8-1.8，則管柱

為使用所接受的。管柱在室溫下以150 cm/h (約96 mL/min)之線性流速操作，且使用設定在2,000 mAU範圍的GE Healthcare UVis 920偵測器、在215 nm監測管柱溶離液之吸光度。管柱用2個管柱體積(CV)之0.5 M NaOH消毒且用3-5 CV之結合緩衝液(20 mM磷酸鈉緩衝液、2 mM MgCl2、100 mM NaCl，pH 7.5)平衡，隨後裝載得自步驟13的經過濾之滯留物。此管柱之結合容量為每毫升樹脂約1.96 mg蛋白質且樣品係在40-80%管柱穿透率下裝載。得自步驟13之經過濾的滯留物裝載至AEX管柱上，其中降低流速(必要時)以避免引入空氣。經過濾的滯留物裝載之後，用結合緩衝液洗滌管柱直至獲得基線吸光度(約2-5 CV)。含有EV71抗原的材料以階段梯度方式、使用溶離緩衝液(20 mM磷酸鈉緩衝液、2 mM MgCl2、250 mM NaCl，pH 7.5)溶離。當偵測器指示100 mAU時開始收集溶離份且持續至吸光度下降低於100 mAU (約2-4 CV)。得自步驟13之經過濾滯留物的體積大小及蛋白質濃度，綜合AEX管柱尺寸及結合容量而言，典型地必需2輪AEX層析循環以完成所有材料之處理。第一次運作結束時，使用5 CV再生緩衝液(20 mM磷酸鈉緩衝液、2 mM MgCl2、2 M NaCl，pH 7.5)洗提AEX管柱，隨後用3-5 CV結合緩衝液平衡(直至獲得基線吸光度)，隨後裝載經過濾之滯留物的其餘部分。所有AEX運作完成之後，合併含有EV71的溶離份且管柱用5 CV再生緩衝液洗提且用2 CV之0.5 m NaOH及5 CV之0.01 M NaOH消毒，隨後儲存。合併之AEX溶離份在如下文所述的陽離子交換層析之前，在5±3℃儲存不超過3天。

步驟15：陽離子交換層析

利用陽離子交換層析、使用Fractogel® EMD SO3 (Merck)介質進行第二純化步驟以進一步移除流過物溶離份中存在的雜質。在產物形成之此階段，陽離子交換層析(CEX)介質視為單次使用的且產物專用的管柱在每次生產運作時再裝填。Omnifit 35 x 250 mm (ID x 高

度)BenchMark管柱用約100 mL Fractogel® EMD SO3層析介質裝填以產生約100 mm之床層高度。結合緩衝液、溶離緩衝液、再生緩衝液、線性流速(150 cm/h，約24 mL/min)及監測條件與上述陰離子交換純化步驟14中所用者相同。裝填之後，用0.5 mL再生緩衝液裝載管柱以量測HETP及As。若HETP及As分別為>4,000個盤/m及0.8-1.8，則管柱為使用所接受的。管柱在裝載樣品之前，用2個管柱體積(CV)之0.5 M NaOH消毒且用3-5個管柱體積(CV)之結合緩衝液平衡。得自上述陰離子交換步驟的含EV71溶離份(250 mM NaCl)在裝載之前用20mM磷酸鈉緩衝液、2mM MgCl2 (pH 7.5)稀釋(約3次)以降低鹽濃度。此管柱之結合容量為每毫升樹脂2.7 mg蛋白質且經稀釋之EV71溶離液以40-80%管柱穿透率裝載至CEX管柱上，其中降低流速(必要時)以避免引入空氣。經稀釋的AEX樣品裝載之後，用結合緩衝液洗滌管柱直至獲得基線吸光度(約2-5 CV)。使用溶離緩衝液自陽離子交換管柱溶離含有EV71抗原的材料。當偵測器指示50 mAU時開始收集溶離份且持續至吸光度下降低於50 mAU (約3-5 CV)。得自步驟14之所合併滯留物的體積大小及蛋白質濃度，綜合CEX管柱尺寸及結合容量而言，典型地必需2輪CEX層析循環以完成所有材料之處理。在首次運作結束時，CEX管柱用5 CV再生緩衝液洗提，隨後用3-5 CV之結合緩衝液平衡(直至獲得基線吸光度)，隨後裝載所合併AEX溶離份之其餘部分。所有CEX運作完成之後，合併含有EV71的溶離份且管柱用5 CV再生緩衝液洗提且用2 CV之0.5 m NaOH及5 CV之0.01 M NaOH消毒，隨後儲存。合併之CEX溶離份在如下文所述的尺寸排阻層析之前，在5±3℃儲存不長於3天。

步驟16：尺寸排阻層析

使用Sephacryl S-400 HR (GE Healthcare)介質的尺寸排阻層析在EV71抗原純化方法中作為最後精製步驟使用。在產物形成之此階

段，尺寸排阻層析(SEC)介質視為單次使用的且產物專用的管柱在每次生產運作時再裝填。兩個GE Healthcare 100 x 500 mm (ID x 高度)BPG管柱用約2.35 L各種Sephacryl S-400 HR層析介質裝填以產生每個管柱250-300 mm之床層高度。裝填之後，管柱個別地用25 mL各種SEC測試溶液(10 mM Na-PO4、2 M NaCl、0.002% Tween 80，pH 7.5)裝載，以量測HETP及As。若HETP及As分別為>4,000個盤/m及0.8-1.8，則管柱為使用所接受的。兩個管柱個別地用1 CV之0.5 M NaOH消毒，用3-5 CV之運作緩衝液(PBST：10 mM Na-PO4、150 mM NaCl、0.002% Tween 80，pH 7.5)平衡，接著串聯組裝供使用。得自上述步驟16的所合併CEX溶離份以總管柱體積的2.5-5.0%裝載至SEC管柱組合件上且管柱在室溫下利用24 cm/h (31.4 mL/min)之線性流速等度操作。使用設定在100 mAU範圍的GE Healthcare UVis 920偵測器、在215 nm監測管柱溶離液的吸光度。自所觀測到之溶離峰各收集50-100 mL溶離份。基於層析圖之形態來調節溶離份大小。根據先前經驗，以約0.45 0.60 CV溶離≥90%純度的EV71溶離份。所合併之CEX溶離份之體積大小及管柱尺寸典型地必需4輪SEC層析循環以完成所有材料之處理。在每個循環結束時，管柱用3-5 CV之運作緩衝液再平衡直至獲得基線吸光度。所有SEC運作完成之後，管柱用1 CV之0.5 m NaOH消毒，隨後用2 CV 0.01 M NaOH消毒，隨後儲存。藉由SDS PAGE及西方墨點法分析個別溶離份，以允許選擇及合併含有≥90%純度之EV71抗原的彼等溶離份。合併所選≥90%純度之適應性EV71疫苗溶離份且在濃縮之前，在5±3℃儲存不超過3天。

步驟17：濃縮

使用TFF進行濃縮，其中2 x 30 kDa分子量截止Sartorius Hydrosart膜匣組裝於Sartorius Sartocon® Slice 200固持器中。在整個製程中維持300 LMH之恆定通量且TMP在0.40-0.45巴之間波動。濃縮

倍率在10-40倍範圍內，此視得自步驟16之所選經合併SEC溶離份中的總蛋白質濃度及調配物需要而定。濃縮溶液經由0.2 μm過濾器過濾且在<-60℃儲存長達6個月或在5±2℃儲存長達2週。

疫苗調配物

步驟1：吸附至氫氧化鋁

自儲存中移出適量的適應性EV71疫苗產物且與PBST (PBS + 0.002% Tween 80)混合以產生劑量特異性稀疫苗產物供用氫氧化鋁調配。添加Tween 80以減少疫苗聚集。稀疫苗產物直接經由0.2 μm孔徑過濾器(Pall Acropak)過濾進入混合容器中。添加十分之一體積的無菌氫氧化鋁懸浮液(Alhydrogel 85)至混合容器中且內容物在攪拌盤上、在5±3℃混合16-24小時。用於製備適應性EV71疫苗的氫氧化鋁佐劑係由Brenntag Biosector, Frederiksund Denmark製造且依Alhydrogel 85之商標，以2% (w/v)溶液形式出售。約100%吸附至Alhydrogel 85上。

步驟2：填充

適應性EV71疫苗使用經驗證之手動填充操作無菌填充至3 mL無菌玻璃(USP I型)小瓶(Schott)中。填充操作係在位於10,000級(ISO 7)室中之100級(ISO 5)生物安全櫃中進行。填充小瓶用無菌氯丁基橡膠塞(West Pharma)塞住且使用半自動小瓶捲邊站(Kebby Pro-Seal)、用無菌鋁易拉型密封件(West Pharma)密封。密封之後，小瓶用1.50"x 0.75"不透明白色雷射印刷Cryo-Tag標籤(Diversified Biotech, LCRY-1200)手動打上標籤。

步驟3：目視檢驗及儲存

所有小瓶進行目視檢驗且若其未填滿、蓋子鬆散、玻璃件鬆散或具有其他顆粒，則退回。目視檢驗之後，疫苗產物在5±3℃儲存。

適應性疫苗之質譜

藉由M-Scan (United Kingdom)對適應性疫苗原料藥進行質譜

(MS)分析。樣品在二硫蘇糖醇中發生還原，用碘乙酸發生羧甲基化，在碳酸氫銨緩衝液中經由離心管柱(3 kDa截止膜)濃縮，在膜上用胰蛋白酶進行消化，且所得肽藉由LC-ES-MS/MS (高壓液相層析-電噴霧四極子飛行時間質譜)加以溶離及分析。根據使用高能MS所得的質譜產生肽序列，且所得序列用於詢問NCBI資料庫(使用MASCOT軟體)。根據上文所述，MS分析證明衣殼蛋白VP1、VP2、VP3及VP4為測試樣品中的主要組分。

實例3：免疫效能研究

免疫效能測試用於證明適應性EV71疫苗的效能。設計分析以藉由評估適應性EV71疫苗接種之小鼠隨時間有規律地發生特異性EV71免疫反應來報導適應性EV71疫苗的有效性及穩定性。因而，該分析內亦併有TCID50病毒中和方法。

簡言之，小鼠(每組六隻)各在第0天及第14天接種低劑量或高劑量的適應性EV71疫苗，此係經由在相同肢體進行2 x 50 μL IM注射以靶向相同淋巴結來達成。由於小鼠之注射體積限制(總共100 μL)，因此動物接受1/5之所調配疫苗劑量，其中低劑量免疫小鼠接受每劑量0.12 μg蛋白質及0.1 mg鋁膠且高劑量免疫動物接受每劑量0.6 μg蛋白質及0.1 mg鋁膠。六隻動物之對照組接受每劑量含有0.1 mg鋁膠的單獨鋁膠調配物。為了評估免疫效能，在以下三個時機自各動物收集血清：第0天及第14天的免疫接種前放血及第28天的最後放血。來自各群組的血清樣品進行熱不活化且合併。來自各群組的合併血清在Vero細胞分析培養基(含有2% FBS的MEM)中連續稀釋且向此等樣品中添加已知量的適應性EV71活病毒(100 TCID50/50 μL)且培育混合物1.5小時。接著將此等樣品及對照樣品(EV71 100 TCID50/50 μl作為陽性對照物；分析培養基作為陰性對照物)添加至96孔盤中之Vero細胞中，如針對TCID50所述。第3-5天觀測CPE且結果以血清中和效價表示，

血清中和效價定義為最大血清稀釋度，其中三個複本中之至少兩者對於CPE呈陰性。此等實驗之結果提供於下表2-4中。

表2. 來自對照組的血清中和效價

天數	個別動物					
	1	2	3	4	5	6
0	NR	NR	NR	NR	NR	NR
14	NT	NT	NT	NT	NT	NT
28	NR	NR	NR	NR	NR	NR

單獨明礬對照組之第5天結果；NT=未測試，NR=抗體反應<1/128。

如表2中所示，陰性對照組的六隻個別動物中之每一者在第0天與第28天均提供陰性反應，證明單獨明礬未引起抗EV71抗體增加。

表3. 來自低劑量組的血清中和效價

天數	個別動物					
	1	2	3	4	5	6
0	NR	NR	NR	NR	NR	NR
14	NR	NR	NR	NR	NA	NR
28	NR	128	128	1024	512	128

低劑量組之第5天結果；NA=用於分析的樣品體積不足，NR=抗體反應<1/128。

如表3中所示，在第0天收集的預放血中未偵測到來自低劑量組的中和抗體反應，表明該等動物先前尚未暴露於EV-71樣病毒。第14天亦獲得陰性結果，證明14天間隔時間之後的單一劑量不足以產生可偵測的免疫反應。然而，第28天，6隻動物中有5隻提供可量測的抗血清中和效價。當利用低劑量組中之6隻動物中之每一者製備池時，偵測到可量測的中和抗血清反應。

表4. 來自高劑量組的血清中和效價

天數	個別動物					
	1	2	3	4	5	6
0	NR	NR	NR	NR	NR	NR
14	NR	NR	NR	NR	NR	NR
28	2048	2048	2048	1024	4096	2048

高劑量組的第5天結果；NR=抗體反應<1/128。

如表4中所示，在第0天收集的預放血中未偵測到來自高劑量組的中和抗體反應，表明該等動物先前尚未暴露於EV-71樣病毒。第14天亦獲得陰性結果，證明14天間隔時間之後的單一劑量不足以產生可偵測的免疫反應。然而，第28天，所有動物均提供可量測的抗血清中和效價。當利用高劑量組中之6隻動物中之每一者製備池時，產生1/512之中和抗體效價。當利用在第14天接受高劑量之4隻動物中之每一者製備池時，產生1/1,024之中和抗體效價。

此等結果證明適應性EV71疫苗之免疫效能。低劑量與高劑量處理誘導可量測的中和抗體反應。

實例4：使用及不使用明礬佐劑調配的3種劑量水準之EV71抗原

此實例評估在使用或不使用明礬佐劑調配之適應性EV71疫苗抗原在各種劑量水準下、在雄性Balb/c小鼠中的免疫反應。用動物評估三種劑量水準(0.12、0.6及3 μg EV71抗原/劑量)；各組動物由每組8隻小鼠組成。不具有明礬(第1組)及具有明礬(第5組)之調配物的陰性對照物分別為PBST (磷酸鹽緩衝鹽水 + 0.002% v/v Tween 80)及氫氧化鋁。明礬(Alhydrogel 85)在含有此佐劑之所有調配物中的量為恆定的(每劑量0.5 mg)。第0天及第28天藉由IM注射來使小鼠免疫。第0天(免疫接種前)、第28天(加打免疫接種前)及第56天(末端放血)收集血清以評估各處理組在各劑量水準下的中和抗體效價及血清轉化率。使用基於TCID50的中和分析來測定血清中和抗體效價。根據中和抗體效價的免疫反應與對照進行比較，對照為不使用佐劑調配的EV71抗原。利用個別的倒數(reciprocal)中和效價計算各組的幾何平均效價(GMT)。血清轉化率定義為指定群組中之倒數中和效價≥128的動物百分比。

此研究之結果呈現於下表5中。

表5. 具有及不具有明礬佐劑之EV71抗原的免疫原性

群組	處理	第28天		第42天		第56天	
		GMT	%SCR(N)[b]	GMT	%SCR(N)	GMT	%SCR(N)
1	PBST[a]對照	1	0	1	0	1	0
2	0.12 μg EV71	3	12.5(1/8)	256	100(8/8)	304	100(8/8)
3	0.6 μg EV71	8	12.5(1/8)	395	87.5 (7/8)	724	100(8/8)
4	3 μg EV71	45	37.5(3/8)	395	100(8/8)	362	100(8/8)
5	明礬對照	1	0	1	0	1	0
6	0.12 μg EV71 + 明礬	41	37.5(3/8)	1328	100(8/8)	1448	100(8/8)
7	0.6 μg EV71 + 明礬	181	100(8/8)	1579	100(8/8)	1722	100(8/8)
8	3 μg EV71 + 明礬	512	100(8/8)	2435	100(8/8)	3158	100(8/8)

[a] PBST = 磷酸鹽緩衝鹽水 + 0.002% (v/v) Tween 80，經純化之不活化EV71的緩衝基質

[b] 血清轉化率(SCR)定義為倒數中和效價≥128的動物百分比

所有動物在免疫接種之前的第0天無可量測的中和抗體。相較於接受相同劑量之無佐劑之EV71抗原的小鼠，使用氫氧化鋁調配的EV71抗原在所有劑量水準下、在小鼠中產生較高中和抗體效價。添加明礬佐劑亦影響血清轉化率，如依0.6 μg及3 μg劑量水準投與單一劑量(第28天樣品)之後所注意到。

結果表明，EV71抗原調配物中包含明礬佐劑使適應性EV71疫苗之總免疫原性改善。使用明礬佐劑之群組中出現的較高GMT中和效價證明了此結果，效價範圍為第28天之GMT的11至23倍(1次劑量之後)、第42天之GMT的4至6倍(2次劑量之後)及第56天之GMT的2.4至9倍(2次劑量之後)。此為重要的，特別是關於免疫反應之長壽命及疫苗提供針對流行中之異源EV71子基因組之保護作用的能力而言。

實例5：對小鼠進行之劑量範圍研究

此實例證明使用明礬佐劑調配之不同劑量之適應性EV71疫苗誘導小鼠產生中和抗體的能力。雄性Balb/c小鼠經由IM注射、用每劑量0.12、0.6、3、9及15 μg之適應性EV71疫苗免疫兩次(第0天及第28

天)。明礬在所有調配物中的量恆定為每劑量0.5 mg。使用TCID50 EV71病毒中和分析來測定第0、28及56天的倒數中和抗體效價。此研究所產生的資料用於確定人類試驗中所用的劑量水準。所有動物在免疫接種之前的第0天無可量測的中和抗體(表6)。

表6. 對INV21疫苗在小鼠中之劑量範圍研究

群組	劑量	第28天		第56天	
		GMT	% SGR(N)[a]	GMT	% SCR (N)
1	明礬對照物	1	0(0/10)	1	0(0/10)
2	0.12 ug EV7l-明礬	2	10(1/10)	64	50(5/10)
3	0.6 μg EV71+明礬	18	20 (2/10)	1261	90 (9/10)
4	3 μg EV71+明礬	128	70(7/10)	2048	100(10/10)
5	9 μg EV71+明礬	56	40(4/10)	1448	100(10/10)
6	15 μg EV71+明礬	239	80(8/10)	2702	100(10/10)

[a] 血清轉化率(SCR)定義為倒數中和效價≥128的動物百分比

單獨明礬對照組(0 μg劑量之適應性EV71疫苗抗原)在所分析之任何時間點均未產生任何中和抗體。一次劑量之適應性EV71疫苗之後，僅3 μg及15 μg劑量水準產生高含量之中和抗體，如第28天之GMT≥128所指示。兩次劑量之疫苗之後，觀測到接受0.6 μg或高於0.6 μg之劑量的動物中出現高含量的中和抗體(第56天之GMT ≥128)。在接受15 μg最高劑量之動物組中發現最高GMT (2702)。在所有劑量組中，第二疫苗投與之強化效應在第56天為顯而易見的。

出於計算血清轉化率之目的，倒數中和效價≥128用於將個別動物歸類為已血清轉化。一次劑量之疫苗之後(第28天)，在所有劑量水準(範圍為10% (0.12 μg劑量水準)至80% (15 μg劑量水準))下發現不完全的血清轉化。兩次劑量之適應性EV71疫苗之後，在各劑量水準下達成的SCR (第56天)高於第28天，其中50%動物在0.12 μg劑量下、90%動物在0.6 μg劑量下且100%動物在3、9及15 μg劑量水準下出現血清轉化。相較於128倒數中和效價(虛線)，所有劑量組的GMT顯示於圖3中。

該等結果類似於上述實例4的結果，證明兩劑之適應性EV71疫苗對於產生高量之中和抗體效價為最佳。尚未確立針對EV71之中和抗體量在人類的保護性效價；然而，Yu等人(2000)描述在EV71感染之小鼠攻擊模型中，倒數(reciprocal)中和效價≥128為最小保護性效價。Wu等人(2002)描述在EV71被動疫苗接種及攻擊之相關小鼠模型中類似保護性效價。此效價水準在**圖3**中以水平虛線表示。此研究之結果顯示，在兩次免疫接種之後，0.6 μg及高於0.6 μg之適應性EV71疫苗劑量能夠產生超過此臨限值的GMT。綜合而言，此研究的資料連同實例4的資料一起能夠得到以下結論：適應性EV71疫苗之低劑量及高劑量調配物(分別為每劑量0.6 μg及3.0 μg)適用於人類測試。

實例6：適應性EV71疫苗針對所選EV71子基因組之免疫反應的交叉中和

分析來自使用適應性EV71疫苗免疫之動物的低效價大鼠血清及高效價兔血清在活體外中和三株其他子基因組(B4、B5及C4)之EV71的能力。包括與該疫苗株相同的B2子基因組作為陽性對照。此實驗中所用的分析為TCID50中和分析，其經修改以允許感染後的較長觀測時間(長達10天而非5天)，因為B4、B5及C4株分離物引起Vero細胞發生細胞病變效應所需之時間較長。測試樣品之中和效價定義為≥50%複本中抑制Vero細胞感染的最高稀釋度。

兔抗EV71血清針對B4及B5子基因組的倒數中和效價與針對同源B2子基因組所得之效價相同(**圖4**)。該兔血清針對C4子基因組之倒數中和效價為B2效價的約1.4倍。大鼠抗血清針對B4、B5及C4病毒之倒數中和效價分別為針對同源B2子基因組所得效價的約0.25、0.18及2.8倍(表7)。

表7. 針對同源及異源EV71子基因組之INV21的倒數中和效價

抗血清	子基因組			
	B2	B4	B5	C4
大鼠	724	181	128	2048
兔	32768	32768	32768	46341

總之，結果證明，針對適應性EV71疫苗產生的血清可誘導至少兩種動物物種中產生針對異源EV71株系的交叉中和抗體。

實例7：毒理學研究

對兔進行的毒理學研究

進行毒理學研究，其中使用NZW兔作為適當物種來進行初始評價，對NZW兔進行毒性評估以支持在人類中之給藥。在此研究中，三次劑量之適應性EV71疫苗之後，評估NZW兔的免疫反應。兩組動物(每組2隻雄兔)用以下免疫：用每劑量0.5 mg明礬調配之15 μg適應性EV71疫苗或單獨明礬對照調配物(每劑量0.5 mg於PBS中)，藉由IM注射。動物在第0、28及56天免疫，且在長達84天之整個研究期間中之不同時間點測定中和抗體含量。包括第三次免疫接種以為產生具有高抗體效價的血清以用作分析顯色試劑及參考標準。使用TCID50中和分析量測中和抗體效價。

接受適應性EV71疫苗的所有動物均誘發良好的免疫反應，如第14天(一次免疫接種之後)起始及直至第84天終末放血(三次免疫接種之後)的高倒數中和抗體效價所指示(表8)。

表8. INV21在NZW兔中之免疫原性

群組	GMT					
	第0天	第14天	第28天	第42天	第56天	第84天
1. 明礬對照物	1	1	1	1	1	1
2. INV21	1	8192	16384	92682	46341	32768

倒數中和抗體效價在投與第二劑量之適應性EV71疫苗之後的第42、14天最高。第三劑量之適應性EV71未引起在第84天所量測的倒數中和效價增加(**圖5**)。在所分析的所有時間點，明礬對照組動物中

未偵測到中和抗體。

結果證明NZW兔適用作其中進行GLP毒理學研究的物種，如免疫接種適應性EV71疫苗之後的高含量中和抗體所證明。

GLP毒理學研究及局部耐受

進一步評價適應性EV71疫苗在NZW兔中之毒性。另外，評價對疫苗之局部耐受。此研究之目標為，重複IM免疫接種之後，評估適應性EV71疫苗之毒性及局部耐受；及評估任何效應在兩至四週無處理時段期間的可逆性。此研究中所用的測試物為低劑量及高劑量適應性EV71疫苗調配物，其分別由每劑量0.6 μg EV71及每劑量3.0 μg EV71組成，用每劑量0.5 mg之明礬佐劑調配(表9)。

表9. INV21 (NC-NSP-007)之重複及局部耐受研究中的處理組

群組	處理	EV71 (μg)	明礬 (mg)	劑量體積 (mL)	免疫接種日	處死日[a]	動物數目		
							M	F	總計
G1	生理鹽水安慰劑	0	0	0.5	0, 28	30, 56	6	6	12
G2	疫苗安慰劑[b]	0	0.5	0.5	0, 28	30, 56	8	8	16
G3	低劑量疫苗	0.6	0.5	0.5	0, 28	30, 56	10	10	20
G4	高劑量疫苗	3.0	0.5	0.5	0, 28, 42	44, 56	10	10	20

M-雄性；F-雌性

[a] 最後免疫接種之後的2天(第30天或第44天(G4))，各組中的動物數目一半被處死，且各組之其餘部分在第56天處死(終末處死)。

[b] 疫苗安慰劑組接受單獨明礬佐劑調配物。

所包括之對照物為生理鹽水安慰劑(PBS)及單獨明礬佐劑調配物(每劑量0.5 mg)，後者在此研究中稱為疫苗安慰劑。所有群組動物在第0天及第28天以IM注射方式給予測試物及對照物。第4組動物(高劑量疫苗)在第42天接受額外的免疫接種，其超過1期研究中之預定兩劑量方案一個劑量。觀測所有動物的任何總體臨床變化、注射位點處之局部反應、死亡率及罹病率、臨床病理學、血液學、臨床化學、總體

病理學及病理組織學。

就適應性EV71疫苗之總體毒性而言，在兩個及三個時機藉由IM注射至NZW兔而分別給予之低劑量(每劑量0.6 μg)與高劑量(每劑量3.0 μg)調配物未引起死亡或罹病且血液學或臨床化學不存在與處理相關的顯著變化。另外，平均體重、食物消耗、呼吸速率或直腸溫度以及總體病理學檢查、絕對及相對器官重量不存在與處理相關的變化。此外，研究中未觀測到與處理相關的神經毒性、腎或血液副作用。就局部耐受而言，任何動物中均未觀測到紅斑或水腫。用顯微鏡在注射位點處觀測到一些肌肉病變，然而在最後免疫接種之後的14或28天無處理時段中，此等效應為可逆的。在接受含有明礬佐劑之調配物的所有群組中，在動物亞群中觀測到發生或未發生單核細胞(MNC)/嗜伊紅血球浸潤的肌肉變性。在接受生理鹽水安慰劑(PBS)的群組G1中未觀測到發生或未發生MNC/嗜伊紅血球浸潤的肌肉變性。觀測到肌肉變性的動物數目顯示於表10中。

表10. 注射位點處發生肌肉變性的兔數目

群組	處理	EV71劑量(μg)	肌肉變性(數目/群組)[a]		
			未發生浸潤	發生浸潤	總計[b]
G1	生理鹽水安慰劑	0	0/12	0/12	0/12
G2	疫苗安慰劑[c]	0	4/16	2/16	6/16
G3	低劑量疫苗	0.6	4/20	6/20	10/20
G4	高劑量疫苗	3.0	0/20	8/20	8/20

[a] 值係以具有至少一個觀測結果之動物數目/每個處理組動物總數呈現

[b] 在總計下所示的值為發生與未發生MNC/嗜伊紅血球浸潤之肌肉變性觀測結果的總數。

[c] 疫苗安慰劑組接受單獨明礬佐劑調配物。

在除G1 (生理鹽水PBS對照物)之外的所有群組中，注射位點處之肌肉病變包含發生或未發生MNC/嗜伊紅血球浸潤的不同程度之變

性。此等病變與已知和疫苗製劑中之鋁鹽佐劑相關之變化一致(Gherardi 1998；Gherardi 2001；Verdier 2005)。此外，在第56天處死的所有動物中均注意到病變消退。因此推斷，注射位點處之肌肉病變視為用於調配適應性EV71疫苗之明礬佐劑的效應且並非EV71抗原存在之結果，且該等效應為可逆的。

在低劑量疫苗及高劑量疫苗組動物之內臟器官中觀測到不同的組織病理學變化，其類似於疫苗安慰劑及生理鹽水組。此外，該等病變視為非特異性、不顯著且不依循任何模式，且因而，此等變化在性質上視為自發或偶發的。

結果表明，在注射位點處觀測到用明礬調配之疫苗製劑典型的局部反應，其中低劑量及高劑量適應性EV71疫苗調配物以及單獨明礬對照調配物發現具可逆性。另外，低劑量與高劑量適應性EV71疫苗調配物未誘導與處理相關之任何生理學或病理學變化。總體而言，此研究之結果證明適應性EV71疫苗為安全的且耐受性良好。

實例8：適應性EV71疫苗在成人自願者中為安全的、具有免疫原性且誘導交叉中和抗體反應

在健康成人的I期臨床試驗中，評價實例1-7中所述之適應性EV71疫苗。在新加坡國立大學醫院醫學研究單位(Investigational Medicine Unit, National University Hospital, Singapore)募集年齡為21至45歲的三十六位健康男性及女性加入隨機、雙盲、安慰劑對照研究。此研究為適應性EV71疫苗之首次人類研究。動物研究資料已證明，適應性EV71疫苗在多個動物物種中引發高含量病毒中和抗體且為選擇免疫原性終點之基礎。

個體

簽署知情同意書之後，篩選適於研究的個體，如下文所述。篩選訪視時，程序包括身體檢查、生命體徵、ECG及實驗室測試。篩選

可在疫苗接種之前的至多42天進行。

為了適於研究，個體須滿足以下標準：男性或女性年齡在篩選時為21至45歲(包含21歲及45歲)；健康良好，如根據醫療史及身體檢查所確定；普通臨床安全實驗室檢查[Na、K、Cl、葡萄糖、BUN、肌酐、磷酸鹽、鈣、蛋白質、白蛋白、丙胺酸轉胺酶(ALT)、天冬胺酸轉胺酶(AST)、膽紅素、白血球(WBC)、血紅蛋白、血小板及尿分析。安全實驗室測試的正常範圍係根據執行安全實驗室測試之實驗室中所用的彼等範圍。若此等實驗室結果中之任一者超出正常範圍，則重複測試。若重複結果超過正常範圍，則可募集個體，但惟根據研究者與醫學監測者之批准；具有19-28 kg/m^2範圍內之身體質量指數(BMI)；有對人類免疫缺陷病毒(HIV)、C型肝炎抗體及B型肝炎表面抗原呈血清陰性記錄；有生育潛力之女性在篩選期間必須具有陰性尿液妊娠測試結果且即將接種疫苗之前進行陰性尿液妊娠測試且願意自篩選直至最後血液樣品(第196天)之後使用口服、可植入、經皮或可注射避孕藥或研究者所批准之其他可靠避孕方式(子宮內裝置、女性避孕套、殺精子隔膜、子宮頸帽、性伴侶或無菌性伴侶使用避孕套，或禁慾)；願意且能夠出示欲參與的書面知情同意書；願意且能夠與研究者交流且瞭解研究之需要；且顯示低含量之EV71中和抗體，如下文所述。

理想上，此研究僅募集未經EV71感染之個體以便獲得免疫原性之早期指示。雖然一些個體對於EV71具有預免疫力，但研究中僅包括具有倒數中和效價≤8或最低倒數中和效價(以現場篩選之健康自願者群體中先出現者為準)的個體，以能夠在缺乏預存在免疫力的情況下對免疫原性達成一些評估。

滿足以下任一標準的個體不適於參與研究：研究者判斷為方案參與之禁忌症或降低自願者出示知情同意書之能力的任何醫學、精神

病學、社交病狀、職業性原因或其他責任；根據研究者的判斷，臨床上顯著的血液(包括出血病症)、腎、肝、肺(包括哮喘)、中樞神經系統(包括癲癇症、癲癇發作、痙攣，或慢性偏頭痛)、心血管或胃腸病症；進行中的皮疹或其他皮膚病；異常ECG，如研究者所評估；疫苗接種之前的三天內出現發熱性疾病(體溫≥38℃)或中度或重度急性疾病或感染；糖尿病病史；對任何疫苗過敏；伴有CNS受累之重度HFMD病史；第一次試驗疫苗接種之前的4週內接受任何疫苗；此研究中每次疫苗接種之後的4週內計劃接受任何疫苗；已知或懷疑有先天性或後天性免疫缺乏；在首次疫苗接種之前的前6個月內經歷免疫抑制性或細胞毒性療法，諸如抗癌化學療法或放射療法；或在首次疫苗接種之前經歷長期(前3個月內的至少2週)全身性皮質類固醇療法(劑量為至少每天0.5 mg/kg)；胸腺病理學、胸腺切除術、肌無力或任何免疫缺乏之病史；復發性偏頭痛病史或服用治療復發性頭痛或偏頭痛之處方藥物；每次疫苗接種之前的3天立即使用任何非類固醇消炎藥(NSAID)、乙醯胺苯酚或抗組織胺；首次疫苗接種(第0天)之前的7天使用處方或非處方藥，不包括避孕藥；針對可卡因(cocaine)、安非他明(amphetamines)、鴉片劑(opiates)或大麻素(cannabinoids)進行的陽性尿液測試；參與或計劃參與任何臨床試驗，包括首次疫苗接種之前一個月直至最後疫苗接種之後一個月接受其他研究性產物；首次疫苗接種(第0天)之前8週接受血液製品或免疫球蛋白或在研究期間計劃使用；首次疫苗接種(第0天)之前的6週或在研究期間的任何時間獻血；或女性懷孕或處於哺乳期。

試驗方案由獨立的倫理委員會批准。完全根據『赫爾辛基宣言(Declaration of Helsinki)(1964)』(包括後續修訂版)之原則或地方法律及法規來進行研究。此研究完全依循『Guideline for Good Clinical Practice』International conference on Harmonization (ICH) Tripartite

(1996)中所概述之原則或地方法律及法規。所有有希望的個體均提供資訊表及同意書之批准版複本供閱讀。研究調查者有責任確保進入試驗的所有參與者理解其擔當且已閱讀資訊表。告知個體其可自由拒絕參與研究或在任何時間退出研究，且其接受的醫學照護不受其同意或拒絕參與研究的影響。

產物投與

募集之後，將個體分入第1組(低劑量)或第2組(高劑量)且隨機接受適應性EV71疫苗或安慰劑，但其中守望個體首先接受適應性EV71疫苗接種，隨後各組中之其餘個體在兩個時機(第0天及第28天)接受疫苗接種。低劑量組包括12位個體接受適應性EV71疫苗(每劑量0.6 μg EV71)及6位個體接受安慰劑；高劑量組包括12位個體接受適應性EV71疫苗(每劑量3 μg EV71)及6位個體接受安慰劑。安慰劑處理為磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)，其根據測試產物來投與。在各劑量水準(低或高)下，募集個體分成兩組18位個體。在每組中，一位守望個體在該組其餘個體之前接受初打劑量。因而，隨機分組時程確定各組內其餘個體(N=17)之治療。個體隨機分組以接受疫苗或安慰劑。不涉及研究分析的隨機統計學家製備隨機分組清單以將個體編號隨機賦予群組及療法。適當方框圖用於確保治療分配之間的平衡得以維持。所有療法之組合物及劑量體積提供於下表11中。

表11.

劑量水準	EV71抗原	氫氧化鋁	劑量體積
低	0.6 μg	每劑量0.5 mg	0.5 mL
高	3.0 μg	每劑量0.5 mg	0.5 mL
安慰劑	磷酸鹽緩衝生理鹽水		0.5 mL

適應性EV71疫苗之劑量係基於調配物中的EV71抗原量。此研究評價適應性EV71疫苗在兩種劑量水準(低劑量調配物及較高劑量調配物)下的安全性及免疫原性，其中各劑量水準之間的EV71蛋白質絕對

量相差5倍。在兩種劑量水準下，明礬佐劑的量為恆定的(每劑量0.5 mg)。

希望低劑量調配物之組成提供對適應性EV71疫苗在人類自願者中之安全性的初始評估。低劑量與高劑量調配物均在兔中所進行的關鍵安全性研究加以測試。此外，在兔研究中投與三次劑量，其比此研究中所用之預定兩次劑量方案多一次劑量。

此研究中所測試之建議劑量水準係基於小鼠劑量範圍研究，其中兩次劑量之適應性EV71疫苗之後誘發足夠中和效價的最低劑量(基於文獻中所報導之1:128之保護性效價)為每劑量0.6 μg。除9微克/劑量水準(其中倒數中和效價及血清轉化率(SCR)低於3微克/劑量之倒數中和效價及血清轉化率)之外，3及15微克/劑量水準未引起中和效價及SCR出現明顯差異。因此，選擇3 μg作為此研究中欲評價的高劑量水準。

個體在三角肌區域中接受兩次肌肉內注射(第0天為初打劑量；第28天為加打劑量)。每隔一定時間獲得血液樣品，用於評估安全(血液學、血清化學)及免疫原性(針對EV71之中和抗體)。給予個體日記，日記在每次疫苗接種之後14天完成以記錄口腔溫度及疫苗接種之後所經歷的任何症狀(局部及全身性)。記錄在研究期間發生的任何不良事件。

研究中不允許在每次疫苗接種之前的3天服用以下藥物：NSAID、乙醯胺苯酚或抗組織胺。此研究中允許存在以下用藥及療法：若個體發熱≥37.8℃或若個體有明顯的臂痛、肌痛或頭痛，則可在每次疫苗接種之後的前7天期間使用NSAID、乙醯胺苯酚或抗組織胺。NSAID或乙醯胺苯酚僅在個體日記記錄症狀或發熱之後服用且並非為了預防而服用；每天一次不超過100 mg的低劑量阿司匹林(aspirin)及低劑量麻醉劑(諸如含有羥考酮(oxycodon)及乙醯胺苯酚的

撲熱息痛(Percocet))僅在個體日記記錄症狀之後服用且不應為了預防而服用。

為了製備研究性產物，藉由使用非盲研究協調者或被指派者而使個體及研究者對於療法(疫苗或安慰劑)不知情，包括遮蔽注射器及用特有注射器編號及個體標識標記注射器。含有產物的注射器用標籤遮蔽以防止內容物顏色可視。由於樣品僅用個體特有的標識號、日期及方案編號標記，因此執行血液學、血清化學、尿分析及中和抗體分析的實驗室對於療法不知情。投與研究性產物的人員(研究者或合格被指派者)及涉及安全評估的人員在整個研究中保持不知情。

隨機分組時程不供研究者、不知情監測者使用或在研究期間不供研究團隊使用。非盲僅在嚴重不良事件或醫學應急的情況下，經研究者特別請求時發生。在打破治療法則的情況下，僅針對所述個體且經研究者或助理研究者向非盲研究協調者或隨機化統計學家提出書面請求後才可打破以便能夠作出關於繼續研究的決定。

需要個體在最後劑量之後的2個月(第84天)及6個月(第196天)返回至現場以便進行隨訪安全及免疫原性評估。各個體參與總共約8.5個月，包括42天篩選及最後劑量之後的6個月隨訪(第196天訪視)。

事件(包括所有安全及功效量測)之研究時程概述於下文表12及13中。

表12. 研究第-42天至第14天之事件時程(初打劑量)

研究月	篩選	再篩選[1]	1					
研究日	-42至-1		0	1	2	3	7	14
訪視次數	1		2	守望[2]		3	4	5
知情同意書	X							
審查I/E標準	X	X	X[3]					
醫療史	X	X						
人口統計資料	X							
身體檢查[10]	X	X	X[3]					
伴隨用藥	X	X	X	X	X	X	X	X
尿液妊娠測試 (♀)	X	X	X[4]					

尿液濫用藥物測試	X	X	X[3]					
12引線ECG	X	X						
血清學(EV71、HIV、Hep B/C)	X	X						
疫苗投與[10]			X[5]					
生命體徵	X	X	X[6]	X	X	X	X	X
注射位點評價[10]			X[7]	X	X	X	X	X
血清化學	X	X	X[3]				X	X
血液學	X	X	X[3]				X	X
尿分析[8]	X	X	X[3]				X	X
血清中和抗體			X[3]					X
個體日記分配			X					
個體日記審查				X	X	X	X	X[9]
記錄不良事件			X	X	X	X	X	X

[1]未隨機分入低劑量組之適合個體若其處於42天篩選期間內，則可隨機分入高劑量組。若其處於42天篩選期之外，則對其再篩選，其中除知情同意程序及收集人口統計資料之外，重複所有測試及程序。

[2]各組中之守望個體在該組其餘個體之前首先給藥。觀測守望個體2天且守望個體需在第1天及第2天需要返回至單位進行安全評估。

[3]疫苗接種之前，審查或進行納入/排除(I/E)標準及身體檢查。疫苗投與之前，收集樣品用於濫用藥物測試、血清化學、血液學、尿分析及血清中和抗體分析。

[4]疫苗投與之前獲得尿液妊娠測試結果且對於繼續進行研究之個體而言呈陰性。

[5]記錄疫苗所投與之手臂。

[6]疫苗投與之前及疫苗投與之後的5、30及60分鐘。

[7]疫苗投與之後的5、30及60分鐘。

[8]為了尿分析，記錄女性個體在樣品收集時是否月經。

[9]第14天訪視時，自個體收集個體日記。

[10]身體檢查、疫苗接種及注射位點評價係由研究者或其指派者進行。

表13. 研究第28天至第196天之事件時程(加打劑量)

研究月	2				3	4	8	N/A
研究日	28[1]	31	35	42	56[2]	84[3]	196[4]	N/A
訪視次數	6	7[5]	8[6]	9[7]	10	11	12	隨訪[8]
身體檢查[20]	X[9]				X			X
伴隨用藥	X	X	X	X	X	X	X	X
尿液妊娠測試 (♀)	X[10]				X			
尿液濫用藥物測試	X[9]							
疫苗投與[20]	X[11]							
生命體徵	X[12]	X	X	X	X	X	X	X
注射位點評價[20]	X[13]	X	X	X				X[14]
血清化學	X[9]		X	X	X			X
血液學	X[9]		X	X	X			X
尿分析[15]	X[9]		X	X	X			X
血清中和抗體	X[9]			X	X	X	X	X[16]
個體日記分配	X							
個體日記審查		X	X	X[17]				
記錄不良事件[18]	X	X	X	X	X			
SAE隨訪[19]						X	X	

[1]針對加打劑量的第28天訪視可在第28天±3天發生

[2]第56天訪視可在第56天±3天發生

[3]第84天訪視可在第84±5天發生

[4]第196天訪視可在第196天±7天發生

[5]訪視7始終在加打後第3天發生(亦即，若加打在第28天投與，則訪視7在第31天發生；若加打在第30天投與，則訪視7在第33天發生；若加打在第26天投與，則訪視7在第29天發生)

[6]訪視8始終在加打後第7天發生(亦即，若加打在第28天投與，則訪視8在第35天發生；若加打在第30天投與，則訪視8在第37天發生；若加打在第26天投與，則訪視8在第33天發生)

[7]訪視9始終在加打後第14天發生(亦即，若加打在第28天投與，則訪視9在第42天發生；若加打在第30天投與，則訪視9在第44天發生；若加打在第26天投與，則訪視9在第40天發生)

[8]隨訪訪視僅在個體未完成直至第196天之研究或較早中斷研究

(較早終止)時才適用

[9]身體檢查必須在疫苗接種之前進行。疫苗投與之前，必須收集樣品用於濫用藥物測試、血清化學、血液學、尿分析及血清中和抗體分析

[10]疫苗投與之前必須獲得尿液妊娠測試結果且對於繼續進行研究之個體而言必須呈陰性

[11]記錄疫苗所投與之手臂

[12]疫苗投與之前及疫苗投與之後的5、30及60分鐘

[13]疫苗投與之後的5、30及60分鐘

[14]若較早終止發生於第一或第二次疫苗接種之14天內，則評價注射位點

[15]為了尿分析，記錄女性個體在樣品收集時是否月經

[16]若較早終止發生於第一或第二劑量疫苗之14天內，則收集血液用於血清中和抗體分析

[17]第42天訪視時，自個體收集個體日記

[18]記錄第一次疫苗接種(第0天)至最後劑量後第28天(第56天)的所有不良事件

[19]在第84天及第196天訪視時，對個體就其在最後劑量之後的6個月內可能經歷的任何SAE而言進行質疑

[20]身體檢查、疫苗接種及注射位點評價係由研究者或其指派者進行。

安全量測結果評估

評估完整醫療史，包括審查所有主要身體系統。在篩選訪視期間藉由面診獲得重要的過去及當前醫療史。在篩選訪視期間記錄目前使用或篩選之前三(3)個月預先使用的處方及非處方藥物(包括維生素及補充劑)之詳情。在每次訪視時審查伴隨用藥記錄且記錄任何新的

用藥。

人口統計資料包括如個體所述之年齡、身高、體重、BMI及人種。個體在穿輕便裝且脫鞋的同時量測體重及身高。使用下式計算BMI (公制單位)：$BMI=體重(kg)/身高(m)^2$。在篩選期間獲得人口統計資料。

在篩選時由研究者或其指派者對各個體進行全面身體檢查，隨後在第0天及第28天及第56天投與疫苗。檢查由以下器官/系統之評估組成：頭；眼；耳、鼻、喉；頸；心血管；胸；呼吸系統；腹部；泌尿生殖系統；肢體；肌骨胳；神經系統；皮膚；及其他值得注意的條件。在身體檢查期間自預先檢查中注意到的任何變化均記錄。

生命體徵包括口腔溫度、血壓、脈動速率及呼吸速率。在篩選時、在第0天(疫苗投與之前及疫苗投與之後的5、30及60分鐘)、第1天(僅守望者)、第2天(僅守望者)、第3、7、14天、第28天(疫苗投與之前及疫苗投與之後的5、30及60分鐘)及第31、35、42、56、84及196天，獲得生命體徵。在個體就座且休息5分鐘之後，自個體手臂量測血壓，其中手臂支撐在心臟高度。依最近的mmHg記錄血壓。當安排生命體徵與血液收集同時進行時，首先獲得生命體徵，但第0天及第28天除外，此時在疫苗接種前及疫苗接種後獲得生命體徵。

所有個體在募集加入研究之前需要具有正常ECG。在篩選時進行標準的12引線ECG。審查各ECG說明且由研究者確認。機器說明只要其經研究者確認，為可接受的。

注射之前，負責投與研究性產品的研究人員使用不能拭除的標記物圍繞實際注射位點畫圓(直徑約1")。程序詳述於研究程序手冊中。記錄注射所投與的手臂。

第0天(疫苗接種後的5、30及60分鐘)、第1天(僅守望者)、第2天(僅守望者)、第3、7、14天、第28天(疫苗接種後的5、30及60分鐘)、

第31、35及42天，使用評估量表評價注射位點的局部反應原性。在觀測到注射位點反應的情況下，研究者提供適當照護。對注射位點反應進行攝像，其中標尺清晰可見於像片中。像片僅根據個體標識代碼、訪視編號及日期來鑑別，以確保對個體身分的保護。

要求個體完成日記(「症狀日記」)，此日記始於每次疫苗接種日及其後14天(第0至14天及第28至42天)。在此時間期間，需要個體獲取其口腔溫度(在每天相同的時間)且將其記錄於日記中。另外，要求其記錄其在此時間段期間經歷的任何症狀，包括：注射位點反應，諸如疼痛、發紅(紅斑)、腫脹(水腫/硬結)及搔癢(搔癢症)；一般身體症狀，諸如頭痛、肌肉疼痛(肌痛)、疲勞(疲乏)、身體皮疹、噁心及嘔吐(次數)；及其他症狀。要求個體將其日記帶至各訪視點，由研究者或其指派者在訪視期間審查。

臨床實驗室評價

臨床實驗室評價由血液學、血清化學及尿分析組成。在篩選時及在第0天(給藥前)、第7、14、28天(給藥前)、第35、42及56天進行血液學、血清化學及尿分析。測試參數列舉於表14中。

表14. 臨床實驗室、尿分析及其他測試之清單

血液學	血清化學	尿分析*	其他
血紅素	鈉	葡萄糖	尿液妊娠測試
血小板	鉀	蛋白質	血清學(EV71、HIV-1及
WBC (白血球)	氯化物	血液	HIV-2抗體、B型肝炎表
	葡萄糖		面抗原及C型肝炎抗體)
	血尿素氮	顯微鏡下：	
	肌酐	Rbc/hpf (每個高倍	
	磷酸鹽	視野的紅血球數)	
	鈣		
	總蛋白質		
	白蛋白		
	ALT (丙胺酸轉胺酶)		
	AST (天冬胺酸轉胺酶)		
	總膽紅素		

* 獲自女性之被鱗狀上皮細胞污染的清潔收集尿分析可重複進行以獲得不含鱗狀上皮細胞的清潔試樣。對於女性而言，記錄個體在樣品收集時是否月經。

要求所有女性個體在篩選時及在第0天及第28天投與研究性產品之前具有陰性的尿液妊娠測試結果。第56天重複進行尿液妊娠測試。任何陽性測試結果均相應地進行隨訪。

在篩選參與研究時，要求所有個體對於濫用藥物(可卡因、鴉片劑、大麻素及安非他明)具有陰性測試結果。另外，第0天及第28天給藥之前進行此測試。任何陽性測試結果均向適當當局報導。

第0天(給藥前)、第14、28天(給藥前)、第42及56天獲得血液樣品，用於量測針對EV71的中和抗體含量。藉由量測第84天及第196天所得之樣品中的中和抗體含量來評估較長術語免疫原性。功效終點包括：基於初打疫苗接種之後第14、28、42及56天之中和抗體效價的幾何平均中和抗體效價(GMT)；量測針對EV71之中和效價相對於基線的增加倍數；及免疫反應耐久性，如根據加打疫苗接種之後的2個月(第84天)及6個月(第196天)時的針對EV71之中和抗體及GMT所評估。

資料品質及保證

藉由根據源文獻檢驗及交叉檢查個案報告表(Case Report Forms，CRF)(源資料檢驗)來保證準確且可靠的資料收集。將所收集之資料輸入電子資料庫且在資料庫鎖定之前進行品質保證檢查。

在研究期間，定期對研究現場進行監測訪視以確保依循方案之所有方面。主持人員或其指派者(研究監測者)接觸且訪視研究者且允許在請求時檢驗各種研究相關記錄及源文獻，其限制條件為根據本地要求維持個體機密性。源文獻定義為原始文獻、資料及記錄，包括(但不限於)研究者檔案、研究用藥、個體記錄、知情同意文件以及CRF及相關文獻之審查。

監測者之責任為在整個研究中每隔一定時間檢驗CRF，以驗證對方案的依循及輸入其中之資料的完整性、一致性及準確性。監測者存取實驗室測試報導及為驗證CRF輸入項所需的其他記錄。重要的是，

在監測訪視期間，研究者及其他研究人員為可獲得的，且有足夠的時間致力於該程序以確保在此等監測訪視期間內所偵測的任何問題均得到解決。

研究現場亦可由主持者或由獨立稽核員進行品質保證稽核，以驗證研究已根據方案、GCP、ICH要求及適用法規進行。在此類情形中，主持者所指定的稽核員預先接觸現場以安排稽核性訪視。稽核員可請求訪視收集實驗室樣品、儲存及製備藥物的機構，及研究期間所用的任何其他機構。另外，存在此研究已經國家或國際監管機構稽核的可能性。若任何監管機構為了檢驗而接觸研究現場，則應立即告知主持者。允許研究者在檢驗及稽核期間直接存取研究文獻。

資料庫鎖定之前，由Copper Rock Research, Inc.編制研究統計分析計劃(SAP)。其包括以下規範。

安全群體由以下組成：接受至少一次劑量之研究疫苗及其給藥後安全資料已獲得的所有隨機分組個體。根據實際上接受之療法來分析個體。

全分析組係由以下組成：接受至少一次劑量之研究疫苗及已收到就免疫原性而言有效之給藥前及給藥後血液樣品的所有隨機分組個體。根據隨機分組所指定之療法來分析個體，不論其實際上所接受之療法。

符合方案群係由以下組成：在資料庫鎖定之前未發生所定義之任何重大方案違規的情況下完成研究的所有隨機分組個體。個體係根據其實際上接受之療法來分析。募集、配置及重要方案偏離之概述向所有隨機分組個體呈現。人口統計、基線特徵及安全資料之概述係基於安全群體。免疫原性資料之概述係基於全分析組以及符合方案群。資料清單顯示所有隨機分組個體之所有可獲得資料。

個體配置之概述顯示經隨機分組、接受研究疫苗、完成研究或

中斷之個體的數目。此概述中亦包括個體中斷，其顯示根據研究終止/中斷之原因未完成研究之個體的數目。各分析組中所包括之個體之數目及百分比的概述為所有隨機分組個體之治療組之概述。亦提供個體清單及自任何分析組排除之原因。個體配置、隨機分組排除情況及理由、治療組分配、分析組納入及排除理由，以及研究完成情況及較早終止理由，均呈現於資料清單中。

記錄在研究期間所報導的重要方案偏離。重要方案偏離(IPD)定義為可潛在影響研究結論的偏離。研究資料庫鎖定之前，審查方案偏離且鑑別IPD。此等IPD概述於資料清單中。醫療史呈現於資料清單中。

人口統計資料(年齡、性別及人種)及基線特徵(身高、體重、身體質量指數[BMI])係利用描述性統計學及頻率表來概述。

藉由使用對數轉換計算各研究日之GMT來概述針對EV71的中和抗體，且求其冪函數以恢復為原始單位用於報導目的。描述性統計學包括個體數目(n)、幾何平均值，及幾何平均值之95%信賴區間。

使用未轉換效價值，藉由將基線後各研究日之效價值除以基線值來計算各研究日之針對EV71之中和抗體效價相對於基線的增加倍數。使用描述性統計學來概述研究日及治療組之相對於基線的增加倍數。另外，概述在各研究日達成血清轉化(定義為相對於基線的四倍增幅)之個體的數目及百分比。提供在首次疫苗接種之後之任何時間達成血清轉化之個體之數目及百分比的總體概述。藉由重複進行上述分析，根據幾何平均中和抗體效價(GMT)、相對於基線之增加倍數以及加打疫苗接種之後2個月(研究第84天)及6個月(研究第196天)之血清轉化百分比來評估免疫反應之持久性。

根據MedDRA (12.0版)系統器官類別(SOC)及較佳術語分類的治療引發之未請求不良事件列舉且概述於頻率表中。頻率表包括事件數

S

目、經歷各事件一或多次之獨特個體的數目，及治療組中經歷各事件一或多次之個體的百分比。亦提供與研究藥物有關之不良事件(AE)的頻率表。

亦根據最大強度經歷事件之個體之數目及百分比對不良事件進行列表。在根據最大強度所列的表中，根據相同較佳術語編碼之事件超過一個的個體係根據最嚴重事件分類。各不良事件之持續時間係以AE終止日期-AE起始日期+1來計算。持續時間係根據SOC、較佳術語及療法、使用描述性統計學來概述。嚴重AE、死亡及導致過早中斷研究之AE呈現於資料清單中。

請求性不良事件係根據疫苗接種劑量(首次或第二次)及治療組來概述。此等頻率表包括事件數目、經歷各事件一或多次之獨特個體的數目，及各疫苗接種劑量及治療組中之經歷各事件一或多次之個體的百分比。百分比之分母為相關概述表中之接受疫苗接種劑量的個體數目。請求AE亦根據最高強度來概述。在此表中，經歷AE多次之個體係根據最密集的AE來分類。

在每個14天隨訪時段期間報導的各症狀累積天數係根據症狀、治療組及疫苗接種劑量、使用描述性統計學來概述。各隨訪時段之第14天所報導的任何症狀均呈現於單獨的資料清單中。個體日記之其他項目，包括口腔溫度、發紅及腫脹之大小、嘔吐次數及疫苗耐受性之總體評估，均根據疫苗接種劑量及治療組來概述。個體症狀日記(包括個體所報導的請求AE及任何其他症狀及評論)顯示於資料清單中。

使用頻率表概述疼痛、壓痛、紅斑/發紅、硬結/腫脹、及搔癢症/搔癢之注射位點反應，頻率表顯示在各研究日及時間點經歷各反應(根據嚴重度等級)之個體的數目及百分比。兩位守望個體在研究第1天及第2天所記錄之注射位點反應未概述，但顯示於資料清單中。兩位守望個體在所有其他研究日所記錄之注射位點反應包括於概述表

中，概述表係根據疫苗接種劑量及治療組來概述。

身體檢查結果(正常、異常)係根據身體系統及研究日而概述於頻率表中。

描述性統計學(例如N、平均值、SD、最小值、中值、最大值)之兩個概述表呈現所觀測之生命體徵資料。第一個表包括各研究日至第196天針對口腔溫度(℃)、脈動速率(每分鐘跳動數)、呼吸速率(每分鐘呼吸)及血壓(收縮壓及舒張壓，mmHg)所觀測之描述性統計學之值的概述。

第二概述表包括上文提及之生命體徵參數在基線觀測值相對於各給藥日之各劑量後時間點(直至第196天)之變化之描述性統計學概述。兩位守望個體在研究第1天及第2天所記錄的生命體徵未如上文所述概述，但顯示於資料清單中。所有其他研究日之守望個體資料包括於概述表中。篩選時所進行之12引線ECG結果的結果僅呈現於資料清單中。

血液學及臨床化學觀測資料係根據研究日及治療組之觀測值及相對於基線的變化、使用描述性統計學(平均值、SD、中值、最小值及最大值)來概述。血液學、臨床化學及尿分析資料亦概述於比較毒性等級相對於基線之轉移的轉移表中。

所有其他臨床實驗室資料僅呈現於資料清單中。在所有實驗室資料清單中，若指定參數有正常範圍可供利用，則該正常範圍包括於清單中。另外，超出範圍值係用「L」或「H」(分別為小於正常值下限或大於正常值上限)標記。清單亦提供毒性等級、相對於基線的最大等級轉移及相對於基線的結果變化。若重複進行血液學或臨床化學測試，則統計學概述中使用得自初始預定集合的值。所有值均包括於資料清單中。

第一劑量之研究疫苗之前停止的用藥視為先前用藥。第一劑量

之研究疫苗之前開始且持續至研究的用藥，或始於第一劑量之研究疫苗或第一劑量之研究疫苗之後的用藥，係以伴隨用藥報導。先前用藥及伴隨用藥係由個體呈現於單獨的資料清單中。

以下其他資料僅作為資料清單、由個體呈現：納入及排除標準、隨機分組及知情同意書、研究藥物投與、評論日誌，及日誌完成核驗。

此研究為探索性試驗，以評估使用兩種劑量水準之不活化EV71疫苗在健康成人中進行疫苗接種之短期安全性及耐受性及免疫原性。因此，此研究不旨在偵測潛在安全性及免疫原性資料在各處理組之間的任何差異。為了提供關於安全及耐受性的早期資料，樣品大小選36，以提供得自最少數目個個體的資料。

募集總共36位個體加入研究。36位個體中有35位依計劃完成研究(亦即完成直至第56天的研究)且依計劃接受兩種劑量之研究性產物。高劑量組中之一位個體由於第一劑量之後的投藥而撤回知情同意書。

方案偏離清單獲自研究監測者在現場所得的觀測結果及對研究資料庫之審查。36位個體中有28位報導有方案偏離。方案偏離之大部分與合格性偏離及後期個體訪視相關。

功效評價

所有個體包括於安全群體、全分析組及符合方案群體中，且因此使用所有個體之所有資料集進行分析。對此研究中所獲得之功效資料不進行正式的統計學分析。對於自研究早期退出的任何個體而言，在早期終止訪視時所收集的所有免疫原性及安全資料自概述表中排除，但呈現於資料清單中。

各劑量組之性別、年齡、身高、體重及BMI之平均人口統計資料之概述呈現於表15中。

表15. 平均(SD)人口統計資料之概述

	低劑量		高劑量	
	適應性EV71疫苗 (N=12)	安慰劑 (N=6)	適應性EV71疫苗 (N=12)	安慰劑 (N=6)
性別 N (%)	男性，5 (42%) 女性，7 (58%)	男性，5 (83%) 女性，1 (17%)	男性，7 (58%) 女性，5 (42%)	男性，6 (100%) 女性，0
年齡(歲) 平均值(SD) *中值*	33.7 (7.9) *32*	31.2 (5.5) *32.5*	30.9 (5.8) *30.5*	30.2 (7.2) *29.5*
身高(m) 平均值(SD) *中值*	1.633 (0.106) *1.61*	1.697 (0.082) *1.72*	1.660 (0.086) *1.685*	1.710 (0.055) *1.71*
體重(kg) 平均值(SD) *中值*	61.13 (13.55) *54.4*	68.27 (10.86) *69.1*	62.08 (9.17) *61.1*	69.95 (10.13) *66.05*
BMI (kg/m^2) 平均值(SD) *中值*	22.62 (2.52) *22.2*	23.62 (2.21) *23.7*	22.53 (2.83) *21.5*	23.83 (2.10) *23.15*

研究中募集的所有個體均為亞洲人。整個處理組的個體在年齡、身高、體重及BMI方面均為良好匹配的。適應性EV71疫苗組的平均年齡為31-34歲且安慰劑組的平均年齡為30-31歲。所有處理組的BMI範圍為22.5-23.8。適應性EV71疫苗劑量組的個體在性別方面的匹配為相對良好的。安慰劑組中之男性個體比例較高。篩選時記錄醫療史。此研究中之目標群體為健康成人。研究中募集的個體在篩選時不具有臨床上任何顯著的持續醫療史。在篩選時進行標準的12引線ECG。所有個體在募集加入研究之前具有正常ECG。在篩選時量測EV71倒數中和抗體效價之水準且呈現於表16中。

表16. 篩選時的EV71倒數中和抗體效價

EV71倒數中和抗體效價	低劑量(合併的疫苗及安慰劑) N=18 N (總%)	高劑量(合併的疫苗及安慰劑) N=18 N (總%)
<8	0 (0%)	2 (11.1%)
8	6 (33.3%)	5 (27.8%)
16	5 (27.8%)	2 (11.1%)
32	2 (11.1%)	3 (16.7%)
64	3 (16.7%)	1 (5.6%)
128	2 (11.1%)	4 (22.2%)
256	0 (0%)	1 (5.6%)

如表16中所示，在低劑量組中，大部分個體(72.2%)在篩選時具

有具有低含量之EV71中和抗體，其中6位(33.3%)個體的倒數EV71效價為8，5位(27.8%)個體的倒數EV71效價為16且2位(11.1%)個體的倒數EV71效價為32。類似地，在高劑量組中，大部分個體在篩選時具有低含量的EV71中和抗體，其中2位(11.1%)個體的倒數EV71效價為<8，5位(27.8%)個體的倒數EV71效價為8，2位(11.1%)個體的倒數EV71效價為16且3位(16.7%)個體的倒數EV71效價為32。

利用在第0天(給藥前)、第14、28天(給藥前)、第42、56、84及196天獲得的血液樣品製備血清，用於分析EV71中和抗體含量。免疫原性資料係在下表17中以GMT及GMT增加倍數及血清轉化率呈現。

表17. EV71中和抗體效價之幾何平均值之概述

訪視	低劑量				高劑量			
		疫苗		安慰劑		疫苗		安慰劑
	N	GMT (95% CI)[a]	N	GMT (95% CI)	N	GMT (95% CI)	N	GMT (95% CI)
篩選	12	20.2 (11.7 - 34.7)	6	25.4 (6.6 - 98.4)	12	28.5 (12.1 - 67.2)	6	25.4 (7.7 - 83.3)
第0天	12	20.2 (11.7 - 34.7)	6	32.0 (7.5 - 137.1)	12	28.5 (11.9 - 68.6)	6	22.6 (6.3 - 81.4)
第14天	12	128.0 (32.2 - 508.8)	6	20.2 (4.2 - 97.0)	12	143.7 (29.9 - 690.1)	5	36.8 (8.9 - 151.2)
第28天	12	80.6 (22.5 - 289.5)	6	28.5 (5.0 - 163.5)	11	99.5 (20.6 - 481.1)	6	22.6 (6.3 - 81.4)
第42天	12	322.5 (144.3 - 720.7)	6	32.0 (6.1 - 168.1)	11	451.4 (163.4 - 1247)	6	32.0 (7.0 - 147.2)
第56天	12	203.2 (76.1 - 542.4)	5	24.3 (3.3 - 175.9)	11	350.8 (122.9 - 1001)	6	25.4 (6.1 - 106.2)
第84天	12	143.7 (53.3 - 386.9)	6	28.5 (6.5 - 125.8)	11	290.4 (94.9 - 888.2)	6	28.5 (5.0 - 163.5)
第196天	12	80.6 (31.9 - 203.6)	6	25.4 (6.6 - 98.4)	11	145.2 (53.7 - 392.6)	6	22.6 (6.3 - 81.4)

[a] *GMT (95% CI) = 幾何平均效價(95%信賴區間)*

在低劑量組與高劑量組中，以GMT呈現的EV71中和抗體含量在

S

第42天(第二劑量之後的14天)均為最高的。在低劑量組中，在一次劑量之適應性EV71疫苗之後，GMT自20.2提高至給藥後14天時的128.0。第二劑量之後，GMT自80.6 (第28天；給藥前)提高至在疫苗接種後14天(第42天)時的322.5。雖然GMT在第56天至第196天時稍微降低(分別為203.2及80.6)，但其在第二劑量之後的長達6個月仍然較高且為基線值的約四倍。在研究期間所分析的所有時間點，安慰劑組中之GMT類似於基線值。

類似地，在高劑量組中，在一次劑量之適應性EV71疫苗之後，GMT自第0天時(給藥前)之28.5提高至疫苗接種後第14天的143.7。第二劑量之後，GMT自99.5 (第28天；給藥前)提高至在疫苗接種後14天(第42天)時的451.4。雖然GMT在第56天至第196天時稍微降低(分別為203.2及145.2)，但其在第二劑量之後的長達6個月仍然較高且為基線值的至少五倍。在研究期間所分析的所有時間點，安慰劑組中之GMT類似於基線值。

在各研究日計算GMT隨時間增加的量值(以針對EV71之中和抗體效價相對於基線(第0天)的增加倍數表示)且使用描述性統計學概述。表18提供各處理組之間之GMT隨時間之增加倍數的概述。

表18. 平均(SD)中和抗體效價之概述：相對於基線之增加倍數

訪視	低劑量				高劑量			
	疫苗		安慰劑		疫苗		安慰劑	
	N	平均值(SD)	N	平均值(SD)	N	平均值(SD)	N	平均值(SD)
第14天	12	19.6667 (35.9351)	6	0.7708 (0.3743)	12	11.7500 (18.7040)	5	1.4000 (0.5477)
第28天	12	10.1250 (17.8149)	6	1.0000 (0.5477)	11	11.2727 (19.6168)	6	1.0000 (0.0000)
第42天	12	23.0000 (21.1746)	6	1.0833 (0.4916)	11	31.6364 (36.4178)	6	1.5000 (0.5477)
第56天	12	15.5000 (17.3126)	5	0.9000 (0.2236)	11	29.4545 (37.2676)	6	1.1667 (0.4082)
第84天	12	10.8333 (10.9365)	6	1.0000 (0.5477)	11	20.0000 (18.6548)	6	1.5000 (1.2247)
第196天	12	5.7500 (5.2936)	6	0.8333 (0.2582)	11	7.6364 (4.8015)	6	1.0000 (0.0000)

如表18中所示，第28天至第196天，觀測到高劑量組之GMT增幅(以相對於基線之增加倍數表示)高於低劑量組。第42天觀測到低劑量組與高劑量組均出現最大的GMT增幅，其中效價相較於第0天分別出現23倍及32倍增幅。第42天的高抗體含量可藉由在第28天給予之加打劑量之適應性EV71疫苗來解釋。在安慰劑組中，GMT增幅最小。

血清轉化定義為至少4倍之基線後抗體效價增幅。血清轉化率(SCR)之概述呈現於表19中。總體研究SCR定義為在研究之任何時間點實現血清轉化之個體的百分比。

表19. 血清轉化率之概述

訪視	低劑量				高劑量			
	疫苗		安慰劑		疫苗		安慰劑	
	N	SCR (%)	N	SCR (%)	N	SCR (%)	N	SCR (%)
第14天	12	58.3	6	0.0	12	58.3	5	0.0
第28天	12	50.0	6	0.0	11	54.5	6	0.0
第42天	12	100	6	0.0	11	100	6	0.0
第56天	12	91.7	5	0.0	11	81.8	6	0.0
第84天	12	91.7	6	0.0	11	81.8	6	16.7
第196天	12	58.3	6	0.0	11	81.8	6	0.0
總體研究	12	100	6	0.0	12	100		16.7

此等結果證明，在第14、28、42、56及84天，在適應性EV71疫苗低劑量組與高劑量組之間，達成血清轉化之個體百分比相似。第196天，高劑量組中實現血清轉化之個體百分比高於低劑量組(分別為81.8%相對於58.3%)。低劑量安慰劑組中之個體在研究期間之任何時間均未實現血清轉化。高劑量安慰劑組中一位個體在第84天實現血清轉化，然而安慰劑組之GMT在直至第196天的整個研究期間仍為較低的。

對於自研究早期較早退出之個體而言，在早期終止訪視時所收集的所有免疫原性及安全資料自概述表中排除，但呈現於資料清單中。缺失值定義為空白、未知、未進行CRF或對CRF不適用的值。除非相同評估存在篩選措施，否則不估算缺失基線評估，且在第一劑量

之研究疫苗之日期之前的42天內進行篩選訪視。不估算在預定訪視時缺失的免疫原性終點。低於偵測極限之針對EV71的中和抗體效價報導為<8。此等效價設定等於8以用於分析目的。資料清單在適用情況下顯示該資料為「<8」。出於確立與研究療法相關之事件時間之目的，估算未請求AE及伴隨用藥之缺失日期。所有資料清單顯示所估算日期，而非如CRF上所報導的資料。對免疫原性資料進行三次非盲中期分析。

免疫原性結論

此研究之另一個目標為藉由量測在整個研究中之不同時間點所收集之血清中之EV71中和抗體含量來評估適應性EV71疫苗之免疫原性。

高劑量組中所觀測之GMT高於低劑量組。在低劑量組與高劑量組中，依據中和效價所觀測之免疫反應依循類似模式，其中在第一劑量後14天(第14天)及第二劑量後14天(第42天)觀測到GMT增加。第42天觀測到兩個劑量組中均出現最高GMT。兩個劑量組之GMT自第56天至第196天隨時間稍微降低；然而，其在此期間仍然充分高於基線值。兩個安慰劑組(低劑量與高劑量)之GMT在整個研究期間中保持在基線水準。

第14、28、42、56及84天，在高劑量組與低劑量組之間，血清轉化(定義為EV71中和抗體之含量相對於基線增加≥4倍)相似。第196天，高劑量組中實現血清轉化之個體百分比高於低劑量組(分別為81.8%相對於58.3%)。低劑量組及高劑量組中的所有個體在第42天(第二劑量之後的14天)實現血清轉化。安慰劑組中一位個體在第84天實現血清轉化，然而安慰劑組之GMT在直至第196天的整個研究期間仍為較低的。

概言之，高劑量組中所觀測之GMT高於低劑量組。在低劑量組

與高劑量組中，依據中和效價所觀測之免疫反應依循類似模式。第42天觀測到兩個劑量組中均出現最高GMT。低劑量組及高劑量組中之所有個體在第42天(第二劑量之後的14天)實現血清轉化且高劑量組與低劑量組之間的血清轉化率相似。兩個劑量組之GMT自第56天至第196天隨時間稍微降低；然而，其在此期間仍然充分高於基線值。

安全評價

安全分析中包括總共36位個體。36位個體中有35位接受兩次劑量(第0天及第28天)之適應性EV71疫苗。高劑量組中之分配適應性EV71疫苗之個體147由於收回同意書而未接受第二劑量。

橫跨兩個劑量組之36位個體中有22位報導總共42個AE (直至第56天)。在低劑量組中，18位個體中有11位報導總共22個AE。在高劑量組中，18位個體中有11位報導總共20個AE。

除一個事件的嚴重度為中度(痔瘡)之外，所有AE的嚴重度均被認為是輕度。僅兩個事件被認為與研究性產物相關。兩個事件均發生於低劑量組之隨機分入安慰劑組之個體中。此等個體之一經歷肌骨胳僵硬，且其他個體經歷頭痛。

最常報導的不良事件屬於『呼吸、胸部及縱隔病症』之系統器官類別且包括咳嗽、流鼻涕及口咽疼痛。此研究中無顯著不良事件(SAE)報導。無個體因AE而退出研究。所有處理組中發生之最常報導的AE呈現於表20中。

表20. 不良事件之概述

系統器官類別*/較佳術語**	低劑量		高劑量	
	疫苗 (N=12) 頻率；個體之 N (%)	安慰劑 (N=6) 頻率；個體之 N (%)	疫苗 (N=12) 頻率；個體之 N (%)	安慰劑 (N=6) 頻率；個體之 N (%)
呼吸、胸部及縱隔病症	**4 (33%)**	**1 (17%)**	**3 (25%)**	**2 (33%)**
咳嗽	3 (25%)	1 (17%)	1 (8%)	-
流鼻涕	1 (8%)	-	2 (17%)	2 (33%)

系統器官類別*/較佳術語**	低劑量		高劑量	
	疫苗 (N=12) 頻率；個體之 N (%)	安慰劑 (N=6) 頻率；個體之 N (%)	疫苗 (N=12) 頻率；個體之 N (%)	安慰劑 (N=6) 頻率；個體之 N (%)
口咽疼痛	3 (25%)	-	-	-
打噴嚏	1 (8%)	-	-	-
喉刺激	1 (8%)	-	-	-
胃腸病症	**1 (8%)**	-	**4 (33%)**	-
腹脹	-	-	1 (8%)	-
上腹痛	1 (8%)	-	-	-
腹瀉	1 (8%)	-	-	-
胃食道逆流疾病	-	-	1 (8%)	-
痔瘡	-	-	1 (8%)	-
口腔潰瘍	-	-	1 (8%)	-
嘔吐	-	-	1 (8%)	-
一般病症及投藥位點病狀	**1 (8%)**	-	**3 (25%)**	-
發熱	1 (8%)	1 (17%)	2 (17%)	-
血管穿刺點血腫	-	-	1 (8%)	-
感染及傳染	**2 (17%)**	**1 (17%)**	**1 (8%)**	**1 (17%)**
流感	-	1 (17%)	1 (8%)	1 (17%)
鼻咽炎	1 (8%)	-	-	-
扁桃腺炎	1 (8%)	-	-	-
泌尿道感染	1 (8%)	-	-	-
肌骨胳及結締組織病症	**1 (8%)**	**1 (17%)**	**-**	**-**
背痛	1 (8%)	-	-	-
肌骨胳僵硬	-	1 (17%)	-	-
神經系統病症	**-**	**1 (17%)**	**1 (8%)**	**-**
頭痛	-	1 (17%)	1 (8%)	-
皮膚及皮下組織病症	**1 (8%)**	-	**1 (8%)**	-
皮疹	-	-	1 (8%)	-
斑丘疹	1 (8%)	-	-	-
損傷、中毒及手術併發症	**-**	**-**	**1 (8%)**	**-**
手骨折	-	-	1 (8%)	-
肢體損傷	-	-	1 (8%)	-

來自『呼吸、胸部及縱隔病症』之系統器官類別的不良事件為高劑量組與低劑量組中最常報導的事件。此系統器官類別中最常報導的AE為咳嗽及口咽疼痛，其中在低劑量組中的發生率最大，兩個事件在3位(25%)個體中均觀測到。低劑量安慰劑組中之一位個體(17%)

亦報導有咳嗽。在高劑量組中，無個體報導口咽疼痛且僅1位(8%)個體報導咳嗽。高劑量組中僅觀測到流鼻涕。適應性EV71疫苗組中有2位(17%)個體且安慰劑組有2位(33%)個體經歷此事件。

最常報導的AE歸類於『胃腸病症』之系統器官類別內。此等AE在高劑量組中報導的頻率最大：4位(33%)個體，相比之下，低劑量組中為1位(8%)個體且安慰劑組中無一者。高劑量組中之胃腸病症包括腹脹、胃食道逆流病、痔瘡、口腔潰瘍及嘔吐。在低劑量組中，一位個體經歷上部腹痛及腹瀉。

一般病症及投藥位點病狀在高劑量組中報導的頻率最大：3位(25%)，相比之下，低劑量組中為1位(8%)個體。在低劑量組中，適應性EV71疫苗組中有1位(8%)個體且安慰劑組中有1位(17%)個體經歷發熱。在高劑量組中，2位(17%)個體報導發熱。

除經歷一個中度嚴重度事件之外，所有AE的嚴重度為輕度。該事件為痔瘡，其發生於第一次疫苗接種之後的8天且持續2天。

若不良事件被認為是明確地或可能與研究性產物之投與相關，則認為不良事件為相關的。僅存在2個不良事件被認為與研究性產物投與相關，兩位個體均屬於低劑量組且分配至安慰劑組。事件為頸部僵硬及頭痛。兩個事件的嚴重度為輕度。

評價注射位點在第0天(疫苗接種後的5、30及60分鐘)、第3、7、14天、第28天(疫苗接種後的5、30及60分鐘)、第31、35及42天出現的疼痛、壓痛、紅斑、硬結及搔癢症。

表21及22提供具有注射位點反應之個體數目的概述。由研究者進行評估且各症狀使用以下等級：1級(輕度)、2級(中度)、3級(重度)或4級(威脅生命)。疼痛、壓痛及搔癢症係根據症狀嚴重度分級，而紅斑及硬結係根據影響區域之大小分級(1級=2.5-5 cm；2級=5.1-10 cm；3級=>10 cm；4級=壞死)。

表21. 第一劑量之後的注射位點反應

訪視	症狀	低劑量				高劑量(N=12)			
		疫苗(N=12)		安慰劑(N=6)		疫苗(N=12)		安慰劑(N=6)	
		無	1級	無	1級	無	1級	無	1級
第0天[a]	紅斑	12 (100%)	0 (0%)	5 (83%)	1 (17%)	11 (92%)	1 (8%)	6 (100%)	0 (0%)
第3天	疼痛	12 (100%)	0 (0%)	6 (100%)	0 (0%)	11 (92%)	1 (8%)	6 (100%)	0 (0%)
第7天	任一者	12 (100%)	0 (0%)	6 (100%)	0 (0%)	12 (100%)	0 (0%)	6 (100%)	0 (0%)
第14天	任一者	12 (100%)	0 (0%)	6 (100%)	0 (0%)	12 (100%)	0 (0%)	5 (83%)[b]	0 (0%)

[a] 評估第0天給藥後5、30及60分鐘時的注射位點；[b] 一位個體未完成第14天的評估。

表22. 第二劑量之後的注射位點反應

訪視	症狀	低劑量				高劑量(N=12)			
		疫苗(N=12)		安慰劑(N=6)		疫苗(N=12)[b]		安慰劑(N=6)	
		無	1級	無	1級	無	1級	無	1級
第28天[a]	疼痛	11 (92%)	1 (8%)	5 (83%)	1 (17%)	10 (83%)	1 (8%)	6 (100%)	0 (0%)
第31天	疼痛	10 (83%)[c]	1 (8%)	5 (83%)[c]	0 (0%)	11 (92%)	1 (8%)	6 (100%)	0 (0%)
	硬結	11 (92%)[c]	0 (0%)	5 (83%)[c]	0 (0%)	9 (75%)	1 (8%)	6 (100%)	0 (0%)
第35天	任一者	12 (100%)	0 (0%)	5 (83%)[d]	0 (0%)	11 (92%)	0 (0%)	6 (100%)	0 (0%)
第42天	任一者	12 (100%)	0 (0%)	6 (100%)	0 (0%)	11 (92%)	0 (0%)	6 (100%)	0 (0%)

a 評估第0天給藥後5、30及60分鐘時的注射位點；b 一位個體在第28天之前退出；

c 一位個體未完成第31天評估；d 一位個體未完成第35天評估

總體而言，存在幾個注射位點反應報導。任何治療組(適應性EV71疫苗或安慰劑)中至多僅一位個體在指定評估時間點報導任何症狀。適應性EV71疫苗組與安慰劑組之間或低劑量組與高劑量組之間或第一劑量與第二劑量之間不存在反應頻率的差異。

利用個體日記收集請求性不良事件。要求個體完成日記，該日記始於各疫苗接種日且其後持續14天(第0天至第14天及第28天至第42

天)。應注意，此等事件為除未請求事件之外的事件。表23提供個體日記中捕捉之所記錄症狀之概述。

表23. 日記症狀之概述

系統器官類別*/較佳術語**	低劑量		高劑量	
	疫苗 (N=12) 頻率；個體之 N (%)	安慰劑 (N=6) 頻率；個體之 N (%)	疫苗 (N=12) 頻率；個體之 N (%)	安慰劑 (N=6) 頻率；個體之 N (%)
注射位點之疼痛	10 (83%)	2 (33%)	9 (75%)	1 (17%)
肌肉疼痛	6 (50%)	2 (33%)	5 (42%)	0
疲勞	5 (42%)	2 (33%)	5 (42%)	1 (17%)
頭痛	1 (8%)	1 (17%)	4 (33%)	1 (17%)
注射位點之水腫	0	0	4 (33%)	0
體表皮疹	3 (25%)	0	1 (8%)	0
注射位點之搔癢症	1 (8%)	0	1 (8%)	0
注射位點之紅斑	1 (8%)	0	1 (8%)	0
噁心	0	0	2 (17%)	0

個體日記中捕捉頻率最大的事件為注射位點之疼痛。各治療組之間的發生率相似，且據報導，適應性EV71疫苗低劑量組中有10位(83%)個體發生且適應性EV71疫苗高劑量組中有9位(75%)個體發生。低劑量與高劑量安慰劑組中經歷注射位點之疼痛之個體較少：低劑量安慰劑組中有2位(33%)個體且高劑量安慰劑組中有1位(17%)個體。

在適應性EV71疫苗低劑量組與高劑量組之間，肌肉疼痛及疲勞之發生率亦相似。相較於適應性EV71疫苗治療組，兩個安慰劑組中經歷肌肉疼痛及疲勞之個體較少。適應性EV71疫苗高劑量組中有4位(33%)個體報導頭痛，相比之下，適應性EV71疫苗低劑量組中有1位(8%)個體報導頭痛。各安慰劑組中有一位個體1 (17%)經歷頭痛。惟適應性EV71疫苗高劑量組(4位[33%]個體)報導注射位點之水腫。類似地，惟適應性EV71疫苗高劑量組個體報導噁心(2位[17%]個體)。

在低劑量組與高劑量組之間，注射位點之搔癢症及紅斑的發生率相同(各組中有1位[8%]個體報導)，但安慰劑組個體無報導。概言之，高劑量及低劑量治療組所記錄日記之症狀數目大於安慰劑組。

對研究組中少數者出現的不良事件頻率或嚴重度進行非正式的統計學分析。在此研究期間無死亡或SAE報導。

實驗室參數之評價

各實驗室參數之毒性等級係使用不良事件之常見術語標準(Common Terminology Criteria for Adverse Events，CTCAE)第4版(2009)或食品與藥物管理局(FDA)行業導引：預防性疫苗臨床試驗中所募集之健康成人及青少年自願者之毒性分級量表(Food and Drug Administration (FDA) Guidance for Industry: Toxicity Grading Scale for Healthy Adult and Adolescent Volunteers Enrolled in Preventive Vaccine Clinical Trials)(2007年9月)來確定。對第0天後的所有毒性等級與基線等級進行比較且分析毒性等級的任何變化或轉移。

相較於適應性EV71疫苗高劑量組，適應性EV71疫苗低劑量組個體經歷的血清化學值相對於基線之變化頻繁。在低劑量組中，葡萄糖增加為最常報導的事件，繼之為鉀減少、鈉增加及葡萄糖減少。在高劑量組中，葡萄糖增加及減少為最常報導的值轉移。大部分變化為1級或2級。

此研究中僅報導一個4級變化：葡萄糖增加。此個體隨機分入適應性EV71疫苗低劑量組。此個體在第0天時，葡萄糖含量較低：3.5 mmol/L (正常範圍4-7.8 mmol/L)，且在第7天與第35天之間恢復至正常限值內，且再次下降至3.4 mmol/L而低於正常範圍。第56天，葡萄糖含量顯著提高至8.8 mmol/L。第56天相較於第0天的總體變化導致在此時間段期間發生4級轉移。此事件未作為不良事件加以報導且未被研究者視為臨床上顯著的。

血紅蛋白發生的最顯著血液學變化減少。高劑量組與低劑量組中均觀測到血紅蛋白出現相似的值轉移頻率(主要為1級)。尿分析中最常報導之值變化為泌尿紅血球之存在的變化。適應性EV71疫苗高

劑量組與安慰劑劑量組與適應性EV71疫苗低劑量組中均注意到此等1級變化。血清化學、血液學及尿分析之最常報導值相對於基線之轉移的概述呈現於表24中[報導疫苗(V)與安慰劑(P)組之此等轉移]。

表24. 常報導值相對於基線之轉移的概述

實驗室結果	低劑量(疫苗N=12)(安慰劑N=6) 相對於基線之等級變化個體之N (%)								高劑量(疫苗N=12)(安慰劑N=6) 相對於基線之等級變化個體之N (%)							
	1級		2級		3級		4級		1級		2級		3級		4級	
	V	P	V	P	V	P	V	P	V	P	V	P	V	P	V	P
血清化學*																
葡萄糖(升高)	7 (58%)	3 (50%)	2 (17%)	1 (17%)	-	-	1 (8%)	-	3 (25%)	1 (17%)	1 (8%)	1 (17%)	-	-	-	-
葡萄糖(降低)	1 (8%)	1 (17%)	2 (17%)	1 (17%)					2 (17%)	1 (17%)	3 (25%)	1 (17%)				
鉀(降低)	4 (33%)	1 (17%)	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (8%)	-	-	-	-	-
鈉(升高)	3 (25%)	3 (50%)	-	-	-	-	-	-	1 (8%)	1 (17%)	-	-	-	-	-	-
血液學*																
血紅素(降低)	10 (83%)	6 (100%)	-	-	1 (8%)	-	-	-	9 (75%)	4 (67%)	1 (8%)	-	-	-	-	-
尿分析*																
尿液紅血球	3 (25%)	-	-	1 (17%)	-	-	-	-	4 (33%)	4 (67%)	-	-	1 (8%)	-	-	-

**實驗室結果，其中標註任何劑量組中之大於20%個體的值*

評估直至第196天之整個研究中的生命體徵，包括溫度、脈動速率、呼吸速率及血壓(收縮壓及舒張壓)。對於所記錄之任一種生命體徵而言，臨床上無顯著發現。脈動速率、呼吸速率及血壓隨時間相對保持恆定且各治療組之間未觀測到有差異。對溫度隨時間發生之相對於基線之變化的審查證明，觀測到適應性EV71疫苗高劑量組在第0天(亦即大於0.5℃)、給藥後5及30分鐘出現稍微較大的增幅(平均變化分別為0.53℃及0.55℃)；相比之下，在相同時間點，低劑量組之平均增幅為0.29℃及0.24℃，安慰劑低劑量組之平均增幅為0.25℃及0.37℃且安慰劑高劑量組之平均增幅為0.25℃及0.48℃。

在篩選時由研究者或其指派者對各個體進行全面身體檢查，隨後在第0天及第28天及第56天投與疫苗。第56天，適應性EV71疫苗低

劑量組之個體僅存在一個異常身體發現(耳、鼻、喉及頸)，其隨後作為不良事件扁桃腺炎加以報導。任一個體在任何時間點均無其他顯著身體發現的報導。

安全性結論

橫跨兩個劑量組之36位個體中有23位報導總共42個AE (直至第56天)。在低劑量組中，18位個體中有12位報導總共22個AE。在高劑量組中，18位個體中有11位報導總共20個AE。

除一個中度嚴重度的事件之外，所有AE的嚴重度視為輕度。僅兩個事件被認為與研究性產物相關，兩者均發生於低劑量組中。一位個體經歷肌骨胳僵硬，且另一個體經歷頭痛。兩位個體隨機分入安慰劑組。最常報導的AE為咳嗽、流鼻涕、發熱及口咽疼痛。

注射位點反應之發生率較低，其中在任一時間點經歷反應之個體至多為17%。注射位點反應最常發現於初打劑量與加打劑量(第0天及第28天)之疫苗接種之後的60分鐘內。適應性EV71疫苗組與安慰劑組之間或低劑量組與高劑量組之間或初打劑量與加打劑量之間不存在反應頻率的差異。

低劑量組中經歷相對於基線之值轉移的個體多於高劑量組。葡萄糖增加為最常報導的血清化學變化。亦觀測到血液學及尿分析參數的值變化。低劑量組與高劑量組之間的發生率相似。無一個值變化作為不良事件報導或被認為是臨床上顯著的。

第56天(適應性EV71疫苗低劑量組)，存在僅一個異常身體發現(耳、鼻、喉及頸)，其隨後作為不良事件扁桃腺炎報導。任一個體在任何時間點均無其他顯著身體發現的報導。概言之，低劑量水準與高劑量水準下的適應性EV71疫苗被認為是安全及良好耐受的。

總體結論

此為適應性EV71疫苗之首次人類研究。此研究之一個目標為評

估適應性EV71疫苗在健康成人中的安全性及耐受性。希望低劑量組合物提供對適應性EV71疫苗安全性的初始評估。

審查AE證明，治療組之間、劑量組之間及第一劑量與第二劑量之間的AE發生率相似。除一個中度嚴重度的事件之外，所有AE的嚴重度視為輕度。僅兩個事件被認為與研究性產物相關。低劑量組中發生的事件肌骨胳僵硬及頭痛之嚴重度均為輕度的且接受安慰劑之兩位個體均有報導。

所有劑量組及治療組之注射位點反應的發生率相似且為最小的，其中在任一時間點經歷反應之個體僅為17%。大部分注射位點反應發生於初打劑量與加打劑量(第0天及第28天)之疫苗接種之後的60分鐘內。實驗室參數值之所觀測變化無一者作為不良事件報導或被研究者認為是臨床上顯著的。

此研究之另一目標為評估適應性EV71疫苗之免疫原性，此係藉由量測在研究期間的不同時間所收集之血清中之EV71中和抗體含量來達成。高劑量組中所觀測之GMT高於低劑量組。在低劑量組與高劑量組中，依據中和效價所觀測之免疫反應依循類似模式。第42天觀測到兩個劑量組中均出現最高GMT。低劑量組及高劑量組中之所有個體在第42天(第二劑量之後的14天)實現血清轉化且高劑量組與低劑量組之間的血清轉化率相似。兩個劑量組之GMT自第56天至第196天隨時間稍微降低；然而，其在此期間仍然充分高於基線值。

概言之，低劑量水準與高劑量水準下的適應性EV71疫苗被認為是安全及良好耐受的。在低劑量與高劑量水準下投與一次及兩次劑量之適應性EV71疫苗之後，就EV71中和效價及血清轉化而言觀測到良好的免疫反應(持續至第196天)。

實例9：CVA6在Vero細胞中之適應

藉由使源病毒在Vero細胞中繼代11次來進行CVA6之適應。類似

於實例1中所述之適應方案，對CVA6使用兩輪轉染。然而，由於CVA6在Vero細胞中未形成空斑，因此在兩輪轉染之後，藉由限制稀釋法進行兩輪選殖。

針對不同繼代次數之適應性病毒進行之TCID50中和分析的結果顯示於表25中。

表25. CVA6之適應

在Vero細胞中傳播之病毒	收集物 (細胞及上清液)	RD細胞滴定 TCID50/ml	Vero細胞滴定 TCID50/ml
CVA6 P-1	**第14天**	**1e3**	**N/A**
CVA6 P-11	**第10天**	**2.4e7**	**N/A**

CVA6 P-11病毒引起整個單層發生廣泛的細胞圓化，但未使Vero細胞展現明顯的CPE。使用CVA6 P-11進行將來的再衍生化及純系選擇。

適應性CVA6之全長基因組之測序

一個冷凍-解凍循環之後，自經澄清之收集物純化RNA。藉由RT-PCR，自RNA擴增4個涵蓋全長基因組的DNA片段(**圖6**)。

在UW-Biotech中心，藉由Sanger的循環測序方法進行測序。使用DNAstar (Laser基因)軟體組裝序列且在PubMed使用BLAST程式進行比較。在CVA6 P-0與CVA6 P-11之間發現總共21個核苷酸變化(**圖7**)。

表26. CVA6: P-0相對於P-11之全長基因組之測序

	核苷酸序列		胺基酸序列	
	CVA6 P-0	**CVA6 P-11**	**CVA6 P-0**	**CVA6 P-11**
5'UTR	**1-T** **13-G** **14-T** **15-G** **16-G** **21-C** **23-C** **34-G** **40-C**	1-G **13-A** 14-G 15-C **16-A** 21-T **23-T** 34-T 40-G	-	-
VP4	無變化	無變化	無變化	無變化
VP2	**1216-C** **1382-C**	1216-T 1382-A	**88-D** **144-Q**	88-D 144- K

VP3	**1753-C** **2024 - A** **2275 -T**	1753-T 2024 - G 2275 -C	**11-N** **92-I** **175-D**	11-N 92-V 175-D
VP1	**2577 -C** **2708 -G** **2726-A** **3022 - A** **3242 - G**	2577-T 2708 - A 2726 - G 3022 - T 3242 - A	**46-A** **90-E** **96-T** **194-S** **268-V**	46-V 90-K 96-A 194-S 268-I
2A	**3691 - C**	3691-T	**112-G**	112-G
3'UTR	**7395 -G**	7395 - T	-	-

5'UTR區域中叢集了較高數目個變化(9個核苷酸)(表26)。適應性CVA6株系中所鑑別之九個核酸取代位於5'未轉譯區(UTR)之位置1、13、14、15、16、21、23、34及40。在VP1蛋白質中觀測到最高數目個胺基酸突變(4)。四個胺基酸取代及其在SEQ ID NO: 2內的相應位置顯示於上表26中。基於測序結果，CVA6 P-11之VP1蛋白質中的所有胺基酸突變(46A-V、90E-K、96T-A、268V-I)為獨特的且未在任何流行株系中發現(圖7)。在VP2及VP3蛋白質中之每一者中觀測到一個突變。所測試之所有野外分離株及CVA6已完成此等胺基酸之保守性。因此，在Vero細胞中之適應產生此等突變。在位置5、10、14、33、98、160、174、194、261、279、283、305，CVA6 P-0及P-11具有相同序列，但不同於野外分離株。野外分離株n28297及n40428的序列在位置：98、160、174及194與CVA6 P-0及P-11相似。

實例10：CVA16在Vero細胞中之適應

藉由使源病毒在Vero細胞中繼代3次來進行CVA16之適應。類似於實例1中所述之適應方案，在Vero細胞中適應之後，萃取RNA且藉由將RNA轉染至Vero細胞中連續兩次來使病毒再衍生化。接著經由兩輪空斑純化來分離單一病毒純系。針對不同繼代次數之適應性病毒進行之TCID50中和分析的結果顯示於表27中。類似於適應性EV71病毒，適應性CVA16 P-3病毒使Vero細胞展現廣泛的CPE。CVA16 P-3用於將來的再衍生化及純系選擇。

表27. CVA16株系在Vero細胞中之適應

在Vera細胞中傳播之病毒	收集物(細胞及上清液)	RD細胞滴定 TCID50/ml	Vero細胞滴定 TCID50/ml
CVA16 P-1	第7天	2.14e6	N/A
CVA16 P-3	第4天	1.5e7	4.2e7

適應性CVA16之全長基因組之測序

用於對適應性CVA16基因組進行測序的引子顯示於圖8中。藉由RT-PCR擴增涵蓋全長基因組的DNA片段(圖9)。CVA16 P-0與CVA16 P-3之間發現總共6個核苷酸變化。四個胺基酸取代及其在SEQ ID NO: 5-7內的相應位置(2A對應於SEQ ID NO: 5，VP2對應於SEQ ID NO: 6，且VP1對應於SEQ ID NO: 7)顯示於下表28中。

表28. CVA16: P-0相對於P-3之全長基因組之測序

	核苷酸序列		胺基酸序列	
	CVA16 P-0	CVA16 P-3	CVA16 P-0	CVA16 P-3
5'UTR	6-G 33-G	6-A 33-C		
VP2	1427-T	1427-C	161-M	161-T
VP1	2729-A 2867-T	2729-G 2867-A	99-D 145-V	99-G 145-E
2A	3328-A	3328-G	2-K	2-E

在適應性CVA16病毒之5'UTR區域中，在位置6及33鑑別出兩個核酸取代(表28)。另外，在VP1蛋白質中的位置99及145鑑別出兩個胺基酸取代，在VP2蛋白質中的位置161鑑別出一個胺基酸取代，且在2A蛋白質中的位置2鑑別出一個胺基酸取代(表28)。所得P3病毒之VP1蛋白質中的兩個突變存在於流行株系中，而VP2及2A多肽中的突變為獨特的且不存在於流行株系中(圖10)。基於VP1基因之系譜分類(圖11)，CVA16株系歸類為基因組C。

實例11：針對其他CVA16分離株之抗CVA16抗體的交叉反應性

將不活化CVA16疫苗接種後第42天所收集的血清樣品合併且藉由微量中和分析進行測試。針對CVA16產生的抗體有效地中和其他CVA16分離株(表29)。

表29. 針對其他CVA16分離株之抗CVA16/P-0抗體的交叉反應性

病毒	中和效價
CVA16 P-0	≥5120
CVA16/737	2560
CVA16/721	2560
CVA16/494	1280
CVA16/1160	2560

實例12：Vero適應性病毒之抗原穩定性

用不活化CVA16 (P-0)或CVA6 (P-0)連同明礬一起接種小鼠。將兩次免疫接種(第0天、第28天)之後所收集的血清樣品合併且使用基於TCID50之習知分析來測試中和抗體效價(表30)。在適應性病毒與未適應病毒之間，未觀測到中和效價存在顯著差異，表明對抗原性無影響。

表30. Vero適應性病毒之抗原穩定性。

	CVA16
分析病毒	所合併之抗血清之中和效價
CVA16 p0(RD細胞)	320
CVA16 p3(Vero)	320
	CVA6
分析病毒	所合併之抗血清之中和效價
CVA6 p0(RD細胞)	2560
CVA6 p11 (Vero)	1280

實例13：適應性CVA6及CVA16株系之再衍生化及選殖

適應性CVA6及CVA16株系自經純化之病毒RNA、經由兩輪轉染而再衍生化。經適應性CVA6 (P11)及CVA16 (P3)轉染的細胞在收集日、在-80℃冷凍，解凍，澄清且等分試樣。將一個等分試樣解凍且針對病毒效價進行滴定。病毒效價結果顯示於表31中。CVA6及CVA16在經病毒RNA轉染之Vero細胞中所顯現的細胞病變效應顯示於**圖12**中。

表31. CVA6及CVA16自經純化之RNA的再衍生化

	第1輪轉染			第2輪轉染		
病毒	病毒RNA之量	收集日	病毒效價 TCID50/ml	病毒RNA之量	收集日	病毒效價 TCID50/ml
CVA16 P-3	**100 ng**	**4**	**1.78E+05**	**90ng**	**6**	**3.16E+05**
CVA6 P-11	2000 ng	4	3.16E+05	270ng	8	1.00E+04

藉由限制稀釋法選殖CVA6

使用限制稀釋技術製備適應性CVA6主病毒種原。對病毒進行連續稀釋且鑑別支持病毒生長的最後一個孔。在Vero細胞中培育14天之後，將細胞及上清液冷凍。如下鑑別陽性孔：將細胞溶胞物轉移至RD細胞中，培育4-5天，且隨後自對Vero細胞中之病毒CPE呈陽性的孔中擴增病毒。病毒效價定量之後，選擇純系1B7、1C3、1G3及2D6進行第二輪限制稀釋。選擇純系1B7F3及2D6G4進行第三輪限制稀釋。將來自此等純系的病毒擴增，定量且藉由第三輪限制稀釋來進一步選殖。限制稀釋技術之圖示顯示於**圖13A-13C**中。Vero及RD細胞中之RNA再衍生CVA6之效價的比較顯示於**圖14**中。RD細胞及Vero細胞之病毒效價計算值不同。重複進行限制稀釋，其中已知$TCID_{50}$值係藉由Vero細胞中之病毒滴定來計算。已完成兩輪限制稀釋。擴增之後，基於病毒效價來選擇純系且生長以製備儲備液用於表徵。

藉由空斑純化選殖CVA16

Vero細胞用適應性CVA16病毒之10倍稀釋液感染且用含有0.5% Sea Plaque瓊脂糖的無血清培養基覆蓋。感染後第4-5天挑選空斑且在37攝氏度(degrees Celsius)下培育24小時。藉由接種250/750 μl量的Vero細胞來擴增病毒且當CPE為90-100%時收集。在4攝氏度下核酸酶處理隔夜之後，將病毒等分試樣且在-85攝氏度下儲存。進行兩輪空斑純化，如**圖15A-15B**中所示。相較於上述P-3病毒，所選殖CVA16(純系1-250)未顯示VP1蛋白質中有任何胺基酸變化，如**圖16**中所示。進一步表徵適應性CVA16病毒且用於製備pre-MVS，如實例1中針對適應性EV71病毒所述。

實例14：三價HFMD疫苗之免疫原性

以下實例證明不活化EV71、CVA6及CVA16三價HFMD疫苗在成年小鼠中的功效。主動免疫接種與被動轉移研究均使用成年小鼠進

行。

如實例1-14中所述調配不活化單價EV71、CA6及CA16疫苗。三種單價疫苗以1:1:1之比率組合以產生不活化三價疫苗。不活化單價疫苗中之每一者用作對照物。此實例所述的研究中使用成年A129 (α/β干擾素(IFN)受體缺乏)及AG129 (α/β，γ IFN受體缺乏)小鼠。

免疫接種單價疫苗之後的血清交叉中和潛力

AG129小鼠群組在第0天及第28天接種1.5 μg EV71、CVA16或CVA6單價疫苗。將疫苗接種後第42天收集的血清根據群組合併且藉由針對各病毒的微量中和分析進行測試。結果描繪於表32中。

表32

抗血清	中和效價		
	EV71	**CVA16**	**CVA6**
抗EV71	**2280**	<40	<40
抗CVA16	<40	**≥5120**	<40
抗CVA6	<40	<40	**≥5120**

表32中的結果表明，未觀測到所測試病毒之間存在交叉中和。

HFMD疫苗之免疫原性

AG129小鼠在第0天及第28天接種1.5 μg單價疫苗之一或1.5 μg EV71、CVA6及CVA16中之每一者之三價混合物。第42天自小鼠收集血清樣品。三價免疫血清係針對EV71、CVA16及CVA6加以測試。各單價免疫血清係針對其同源病毒加以測試。各疫苗之幾何平均效價描繪於圖17中。

在小鼠模型中針對EV71及CVA16之疫苗功效

接著測試三價疫苗在EV71及CVA16感染之鼠類模型中之功效。四週齡AG129小鼠群組(n=5-6)肌肉內(IM)接種疫苗。上述單價及三價疫苗係以相等體積之明礬(Alhydrogel 85)為佐劑，其藉由在旋轉器上、在4℃混合4小時來達成，如實例2中所述。小鼠接種每隻動物1.5 μg劑量之單價疫苗、每隻動物4.5 μg總劑量之三價疫苗混合物(每隻動

物1.5 μg各種單價疫苗)，或明礬佐劑作為對照物。小鼠經由腹膜內(IP)注射9.8×10^5 $TCID_{50}$/400 μl病毒之攻擊劑量的病毒來攻擊。各小鼠組之處理及攻擊以及處理及攻擊之時程描繪於**圖18**中。

如**圖19**所示，接種EV71單價疫苗或三價疫苗之六隻小鼠中之六隻在小鼠適應性EV71攻擊後均存活至少25天。然而，在EV71攻擊後，接種CVA16疫苗之六隻小鼠中僅有兩隻存活20天，且接種CVA6疫苗之小鼠均未存活20天，指示未觀測到交叉保護。

亦測試疫苗抑制EV71病毒血症之能力。EV71攻擊後第1、3及5天量測病毒效價(**圖20**)。EV71攻擊後第1、3及5天收集得自所接種小鼠的血清樣品且使用SYBR Green套組(Qiagen)、藉由即時RT-PCR測定病毒效價。利用連續稀釋之小鼠適應性病毒儲備液產生標準曲線。正常小鼠血清用作陰性對照物，以測定截止值。結果表明EV71單價疫苗與三價疫苗均能夠使血清中之病毒效價降低至約零，如根據$TCID_{50}$/ml等效物所量測(**圖20**)。

如**圖21**中所示，接種CVA16單價疫苗或三價疫苗之五隻小鼠中有五隻在小鼠適應性CVA16攻擊後存活至少20天。然而，接種CVA6疫苗的小鼠在EV71攻擊後未存活15天，指示未觀測到交叉保護。

亦測試疫苗抑制CVA16病毒血症之能力。CVA16攻擊後第1、3及5天量測病毒效價(**圖22**)。CVA16攻擊後第1、3及5天收集得自所接種小鼠的血清樣品且使用SYBR Green套組(Qiagen)、藉由即時RT-PCR測定病毒效價。利用連續稀釋之小鼠適應性病毒儲備液產生標準曲線。正常小鼠血清用作陰性對照物，以測定截止值。結果表明CVA16單價疫苗與三價疫苗均能夠使血清中之病毒效價降低至約零，如根據$TCID_{50}$/ml等效物所量測(**圖22**)。

針對CVA6的疫苗功效(使用被動轉移)

接著測試三價疫苗在CVA6感染之鼠類模型中之功效。經由腹膜

內(IP)注射中和抗體血清而使三週齡A129小鼠群組(n=5-6)被動免疫。藉由用每隻動物1.5 μg劑量之CVA6單價疫苗或用每隻動物4.5 μg總劑量之三價疫苗混合物(每隻動物1.5 μg之各種單價疫苗)接種小鼠而在小鼠中產生中和抗體血清。接著在疫苗接種後第42天收集各組的含有中和抗體之血清樣品且根據群組合併且藉由微量中和測試進行測試。在三價血清中，針對EV71之幾何平均抗體效價為640，針對CVA16之幾何平均抗體效價為1280，且針對CVA6之幾何平均抗體效價為1280。在CVA6單價血清中，針對CVA6之幾何平均抗體效價為5120。小鼠經由腹膜內(IP)注射2.31×10^4 $TCID_{50}$/200 μl CVA6之攻擊劑量而用小鼠適應性CVA6病毒攻擊。各小鼠群組之被動轉移及攻擊以及處理及攻擊之時程描繪於**圖23**中。

圖24描述使用三價血清或CVA6單價血清進行被動免疫接種的結果。經三價血清或CVA6單價血清免疫之六隻小鼠中有六隻在CVA6攻擊後存活20天，而經得自正常小鼠之對照血清免疫的六隻小鼠中僅有一隻小鼠在CVA6攻擊後存活20天(**圖24**)。結果表明，得自經三價疫苗接種之小鼠之血清的被動轉移具有針對CVA6同源病毒攻擊的保護性。

亦測試保護性血清抑制CVA6病毒血症的能力。CVA6攻擊後第1、3及5天量測病毒效價(**圖25**)。CVA6攻擊後第1、3及5天收集得自所接種小鼠的血清樣品且使用SYBR Green套組(Qiagen)、藉由即時RT-PCR測定病毒效價。利用連續稀釋之小鼠適應性病毒儲備液產生標準曲線。正常小鼠血清用作陰性對照物，以測定截止值。結果表明，得自CVA6單價疫苗或三價疫苗接種之小鼠的血清能夠使血清中的病毒效價降低至約零，如根據$TCID_{50}$/ml等效物所量測(**圖25**)。

結論

結果證明，針對HFMD病毒EV71、CVA16或CVA6的抗體不能發

生活體外交叉中和或交叉保護小鼠以防致死性攻擊，且EV71、CVA16及CVA6之不活化製劑當以單價或多價疫苗調配物形式投與時在小鼠中具有免疫原性。結果亦表明，EV71、CVA16及CVA6之不活化製劑100%有效抵禦EV71及CVA16在AG129小鼠模型中及CVA6在A129小鼠模型中之同源性攻擊。

【符號說明】

無

【序列表】

<110> 美商武田疫苗公司(Takeda Vaccines, INC.)

<120> 手、足及口疫苗及其製備及使用方法

<140> TW 104136745
<141> 2015-11-06

<150> US 62/077,139
<151> 2014-11-07

<160> 44

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 297
<212> PRT
<213> 腸病毒71

<400> 1

Gly	Asp	Arg	Val	Ala	Asp	Val	Ile	Glu	Ser	Ser	Ile	Gly	Asp	Ser	Val
1				5				10						15	
Ser	Arg	Ala	Leu	Thr	Gln	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Thr	Gly	Gln	Asn	Thr
			20					25					30		
Gln	Val	Ser	Ser	His	Arg	Leu	Asp	Thr	Gly	Glu	Val	Pro	Ala	Leu	Gln
		35					40					45			
Ala	Ala	Glu	Ile	Gly	Ala	Ser	Ser	Asn	Thr	Ser	Asp	Glu	Ser	Met	Ile
	50					55					60				
Glu	Thr	Arg	Cys	Val	Leu	Asn	Ser	His	Ser	Thr	Ala	Glu	Thr	Thr	Leu
65					70					75					80
Asp	Ser	Phe	Phe	Ser	Arg	Ala	Gly	Leu	Val	Gly	Glu	Ile	Asp	Leu	Pro
				85					90					95	
Leu	Glu	Gly	Thr	Thr	Asn	Pro	Asn	Gly	Tyr	Ala	Asn	Trp	Asp	Ile	Asp
			100					105					110		
Ile	Thr	Gly	Tyr	Ala	Gln	Met	Arg	Arg	Lys	Val	Glu	Leu	Phe	Thr	Tyr
		115					120					125			
Met	Arg	Phe	Asp	Ala	Glu	Phe	Thr	Phe	Val	Ala	Cys	Thr	Pro	Thr	Gly
	130					135					140				
Glu	Val	Val	Pro	Gln	Leu	Leu	Gln	Tyr	Met	Phe	Val	Pro	Pro	Gly	Ala
145					150					155					160
Pro	Lys	Pro	Glu	Ser	Arg	Glu	Ser	Leu	Ala	Trp	Gln	Thr	Ala	Thr	Asn
				165					170					175	
Pro	Ser	Val	Phe	Val	Lys	Leu	Thr	Asp	Pro	Pro	Ala	Gln	Val	Ser	Val
			180					185					190		
Pro	Phe	Met	Ser	Pro	Ala	Ser	Ala	Tyr	Gln	Trp	Phe	Tyr	Asp	Gly	Tyr
		195					200					205			

Pro Thr Phe Gly Glu His Lys Gln Glu Lys Asp Leu Glu Tyr Gly Ala
210 215 220
Cys Pro Asn Asn Met Met Gly Thr Phe Ser Val Arg Thr Val Gly Ser
225 230 235 240
Ser Lys Ser Lys Tyr Pro Leu Val Val Arg Ile Tyr Met Arg Met Lys
245 250 255
His Val Arg Ala Trp Ile Pro Arg Pro Met Arg Asn Gln Asn Tyr Leu
260 265 270
Phe Lys Ala Asn Pro Asn Tyr Ala Gly Asn Ser Ile Lys Pro Thr Gly
275 280 285
Thr Ser Arg Asn Ala Ile Thr Thr Leu
290 295

<210> 2
<211> 305
<212> PRT
<213> 柯沙奇病毒A6

<400> 2
Asn Asp Pro Ile Ser Asn Ala Ile Glu Asn Ala Val Ser Thr Leu Ala
1 5 10 15
Asp Thr Thr Ile Ser Arg Val Thr Ala Ala Asn Thr Ala Ala Ser Ser
20 25 30
His Ser Leu Gly Thr Gly Arg Val Pro Ala Leu Gln Ala Ala Glu Thr
35 40 45
Gly Ala Ser Ser Asn Ala Ser Asp Glu Asn Leu Ile Glu Thr Arg Cys
50 55 60
Val Met Asn Arg Asn Gly Val Asn Glu Ala Ser Val Glu His Phe Tyr
65 70 75 80
Ser Arg Ala Gly Leu Val Gly Val Val Glu Val Lys Asp Ser Gly Thr
85 90 95
Ser Gln Asp Gly Tyr Thr Val Trp Pro Ile Asp Val Met Gly Phe Val
100 105 110
Gln Gln Arg Arg Lys Leu Glu Leu Ser Thr Tyr Met Arg Phe Asp Ala
115 120 125
Glu Phe Thr Phe Val Ser Asn Leu Asn Asp Ser Thr Thr Pro Gly Met
130 135 140
Leu Leu Gln Tyr Met Tyr Val Pro Pro Gly Ala Pro Lys Pro Asp Gly
145 150 155 160
Arg Lys Ser Tyr Gln Trp Gln Thr Ala Thr Asn Pro Ser Ile Phe Ala
165 170 175
Lys Leu Ser Asp Pro Pro Pro Gln Val Ser Val Pro Phe Met Ser Pro
180 185 190
Ala Ser Ala Tyr Gln Trp Phe Tyr Asp Gly Tyr Pro Thr Phe Gly Glu
195 200 205
His Lys Gln Ala Thr Asn Leu Gln Tyr Gly Gln Cys Pro Asn Asn Met
210 215 220
Met Gly His Phe Ala Ile Arg Thr Val Ser Glu Ser Thr Thr Gly Lys
225 230 235 240
Asn Val His Val Arg Val Tyr Met Arg Ile Lys His Val Arg Ala Trp
245 250 255
Val Pro Arg Pro Phe Arg Ser Gln Ala Tyr Met Val Lys Asn Tyr Pro
260 265 270
Thr Tyr Ser Gln Thr Ile Ser Asn Thr Ala Ala Asp Arg Ala Ser Ile

```
        275                 280                 285
Thr Thr Thr Asp Tyr Glu Gly Gly Val Pro Ala Asn Pro Gln Arg Thr
    290                 295                 300
Phe
305
```

<210> 3
<211> 256
<212> PRT
<213> 柯沙奇病毒A6

<400> 3

```
Ser Pro Ser Val Glu Ala Cys Gly Tyr Ser Asp Arg Val Ala Gln Leu
 1               5                  10                  15
Thr Val Gly Asn Ser Thr Ile Thr Thr Gln Glu Ala Ala Asn Ile Val
            20                  25                  30
Leu Ser Tyr Gly Glu Trp Pro Gly Tyr Cys Pro Ser Thr Asp Ala Thr
        35                  40                  45
Ala Val Asp Lys Pro Thr Arg Pro Asp Val Ser Val Asn Arg Phe Tyr
    50                  55                  60
Thr Leu Ser Thr Lys Ser Trp Lys Thr Glu Ser Thr Gly Trp Tyr Trp
65                  70                  75                  80
Lys Phe Pro Asp Val Leu Asn Asp Thr Gly Val Phe Gly Gln Asn Ala
                85                  90                  95
Gln Phe His Tyr Leu Tyr Arg Ser Gly Phe Cys Met His Val Gln Cys
            100                 105                 110
Asn Ala Ser Lys Phe His Gln Gly Ala Leu Leu Val Val Val Ile Pro
        115                 120                 125
Glu Phe Val Val Ala Ala Ser Ser Pro Ala Met Lys Pro Asn Gly Gln
    130                 135                 140
Gly Leu Tyr Pro Asp Phe Ala His Thr Asn Pro Gly Lys Glu Gly Gln
145                 150                 155                 160
Val Phe Arg Asp Pro Tyr Val Leu Asp Ala Gly Ile Pro Leu Ser Gln
                165                 170                 175
Ala Leu Val Phe Pro His Gln Trp Ile Asn Leu Arg Thr Asn Asn Cys
            180                 185                 190
Ala Thr Ile Ile Met Pro Tyr Val Asn Ala Leu Pro Phe Asp Ser Ala
        195                 200                 205
Leu Asn His Ser Asn Phe Gly Leu Ala Val Ile Pro Ile Ser Pro Leu
    210                 215                 220
Lys Tyr Cys Asn Gly Ala Thr Thr Glu Val Pro Ile Thr Leu Thr Ile
225                 230                 235                 240
Ala Pro Leu Asn Ser Glu Phe Ser Gly Leu Arg Gln Ala Ile Lys Gln
                245                 250                 255
```

<210> 4
<211> 240
<212> PRT
<213> 柯沙奇病毒A6

<400> 4

```
Gly Leu Pro Thr Glu Leu Lys Pro Gly Thr Asn Gln Phe Leu Thr Thr
 1               5                  10                  15
```

```
Asp Asp Gly Thr Ser Pro Pro Ile Leu Pro Gly Phe Glu Pro Thr Pro
            20                  25                  30
Leu Ile His Ile Pro Gly Glu Phe Thr Ser Leu Leu Asp Leu Cys Arg
        35                  40                  45
Ile Glu Thr Ile Leu Glu Val Asn Asn Thr Thr Gly Thr Thr Gly Val
    50                  55                  60
Asn Arg Leu Leu Ile Pro Val Arg Ala Gln Asn Asn Val Asp Gln Leu
65                  70                  75                  80
Cys Ala Ser Phe Gln Val Asp Pro Gly Arg Asn Gly Pro Trp Gln Ser
                85                  90                  95
Thr Met Val Gly Gln Ile Cys Arg Tyr Tyr Thr Gln Trp Ser Gly Ser
            100                 105                 110
Leu Lys Val Thr Phe Met Phe Thr Gly Ser Phe Met Ala Thr Gly Lys
        115                 120                 125
Met Leu Ile Ala Tyr Thr Pro Pro Gly Ser Ala Gln Pro Thr Thr Arg
    130                 135                 140
Glu Ala Ala Met Leu Gly Thr His Ile Val Trp Asp Phe Gly Leu Gln
145                 150                 155                 160
Ser Ser Val Thr Leu Val Ile Pro Trp Ile Ser Asn Thr His Phe Arg
                165                 170                 175
Ala Val Lys Thr Gly Gly Val Tyr Asp Tyr Tyr Ala Thr Gly Ile Val
            180                 185                 190
Thr Ile Trp Tyr Gln Thr Asn Phe Val Val Pro Pro Asp Thr Pro Ser
        195                 200                 205
Glu Ala Asn Ile Ile Ala Leu Gly Ala Ala Gln Glu Asn Phe Thr Leu
    210                 215                 220
Lys Leu Cys Lys Asp Thr Asp Glu Ile Arg Gln Thr Ala Glu Tyr Gln
225                 230                 235                 240
```

<210> 5
<211> 150
<212> PRT
<213> 柯沙奇病毒A16

<400> 5

```
Gly Lys Phe Gly Gln Gln Ser Gly Ala Ile Tyr Val Gly Asn Tyr Arg
 1               5                  10                  15
Val Val Asn Arg His Leu Ala Thr His Asn Asp Trp Ala Asn Leu Val
            20                  25                  30
Trp Glu Asp Ser Ser Arg Asp Leu Leu Val Ser Ser Thr Thr Ala Gln
        35                  40                  45
Gly Cys Asp Thr Ile Ala Arg Cys Asp Cys Gln Thr Gly Ile Tyr Tyr
    50                  55                  60
Cys Ser Ser Lys Arg Lys His Tyr Pro Val Ser Phe Thr Lys Pro Ser
65                  70                  75                  80
Leu Ile Phe Val Glu Ala Ser Glu Tyr Tyr Pro Ala Arg Tyr Gln Ser
                85                  90                  95
His Leu Met Leu Ala Val Gly His Ser Glu Pro Gly Asp Cys Gly Gly
            100                 105                 110
Ile Leu Arg Cys Gln His Gly Val Val Gly Ile Val Ser Thr Gly Gly
        115                 120                 125
Asn Gly Leu Val Gly Phe Ala Asp Val Arg Asp Leu Leu Trp Leu Asp
    130                 135                 140
Glu Glu Ala Met Glu Gln
```

145 150

<210> 6
<211> 254
<212> PRT
<213> 柯沙奇病毒A16

<400> 6
Ser Pro Ser Ala Glu Ala Cys Gly Tyr Ser Asp Arg Val Ala Gln Leu
1 5 10 15
Thr Ile Gly Asn Ser Thr Ile Thr Thr Gln Glu Ala Ala Asn Ile Val
20 25 30
Ile Ala Tyr Gly Glu Trp Pro Glu Tyr Cys Pro Asp Thr Asp Ala Thr
35 40 45
Ala Val Asp Lys Pro Thr Arg Pro Asp Val Ser Val Asn Arg Phe Phe
50 55 60
Thr Leu Asp Thr Lys Ser Trp Ala Lys Asp Ser Lys Gly Trp Tyr Trp
65 70 75 80
Lys Phe Pro Asp Val Leu Thr Glu Val Gly Val Phe Gly Gln Asn Ala
85 90 95
Gln Phe His Tyr Leu Tyr Arg Ser Gly Phe Cys Val His Val Gln Cys
100 105 110
Asn Ala Ser Lys Phe His Gln Gly Ala Leu Leu Val Ala Val Leu Pro
115 120 125
Glu Tyr Val Leu Gly Thr Ile Ala Gly Gly Thr Gly Asn Glu Asn Ser
130 135 140
His Pro Pro Tyr Ala Thr Thr Gln Pro Gly Gln Val Gly Ala Val Leu
145 150 155 160
Met His Pro Tyr Val Leu Asp Ala Gly Ile Pro Leu Ser Gln Leu Thr
165 170 175
Val Cys Pro His Gln Trp Ile Asn Leu Arg Thr Asn Asn Cys Ala Thr
180 185 190
Ile Ile Val Pro Tyr Met Asn Thr Val Pro Phe Asp Ser Ala Leu Asn
195 200 205
His Cys Asn Phe Gly Leu Leu Val Ile Pro Val Val Pro Leu Asp Phe
210 215 220
Asn Ala Gly Ala Thr Ser Glu Ile Pro Ile Thr Val Thr Ile Ala Pro
225 230 235 240
Met Cys Ala Glu Phe Ala Gly Leu Arg Gln Ala Val Lys Gln
245 250

<210> 7
<211> 297
<212> PRT
<213> 柯沙奇病毒A16

<400> 7
Gly Asp Pro Ile Ala Asp Met Ile Asp Gln Thr Val Asn Asn Gln Val
1 5 10 15
Asn Arg Ser Leu Thr Ala Leu Gln Val Leu Pro Thr Ala Ala Asn Thr
20 25 30
Glu Ala Ser Ser His Arg Leu Gly Thr Gly Val Val Pro Ala Leu Gln
35 40 45

```
Ala Ala Glu Thr Gly Ala Ser Ser Asn Ala Ser Asp Lys Asn Leu Ile
    50                  55                  60
Glu Thr Arg Cys Val Leu Asn His His Ser Thr Gln Glu Thr Ala Ile
65                  70                  75                  80
Gly Asn Phe Phe Ser Arg Ala Gly Leu Val Ser Ile Ile Thr Met Pro
                85                  90                  95
Thr Thr Asp Thr Gln Asn Thr Asp Gly Tyr Val Asn Trp Asp Ile Asp
            100                 105                 110
Leu Met Gly Tyr Ala Gln Leu Arg Arg Lys Cys Glu Leu Phe Thr Tyr
        115                 120                 125
Met Arg Phe Asp Ala Glu Phe Thr Phe Val Val Ala Lys Pro Asn Gly
    130                 135                 140
Val Leu Val Pro Gln Leu Leu Gln Tyr Met Tyr Val Pro Pro Gly Ala
145                 150                 155                 160
Pro Lys Pro Thr Ser Arg Asp Ser Phe Ala Trp Gln Thr Ala Thr Asn
                165                 170                 175
Pro Ser Val Phe Val Lys Met Thr Asp Pro Pro Ala Gln Val Ser Val
            180                 185                 190
Pro Phe Met Ser Pro Ala Ser Ala Tyr Gln Trp Phe Tyr Asp Gly Tyr
        195                 200                 205
Pro Thr Phe Gly Glu His Leu Gln Ala Asn Asp Leu Asp Tyr Gly Gln
    210                 215                 220
Cys Pro Asn Asn Met Met Gly Thr Phe Ser Ile Arg Thr Val Gly Thr
225                 230                 235                 240
Glu Lys Ser Pro His Ser Ile Thr Leu Arg Val Tyr Met Arg Ile Lys
                245                 250                 255
His Val Arg Ala Trp Ile Pro Arg Pro Leu Arg Asn Gln Pro Tyr Leu
            260                 265                 270
Phe Lys Thr Asn Pro Asn Tyr Lys Gly Asn Asp Ile Lys Cys Thr Ser
        275                 280                 285
Thr Ser Arg Asp Lys Ile Thr Thr Leu
    290                 295
```

<210> 8
<211> 745
<212> DNA
<213> 柯沙奇病毒A6

<400> 8

```
ttaaaacagc tagtgggttg cacccactca cagggcccac tgggcgctag cacactgatt 60
tcccggaatc cttgtgcgcc tgttttatat cccctccccc atgcgcaact tagaagcaat 120
ctacaccttc gatcaatagc aggcgtggcg cgccagccat gtctagatca agcacttctg 180
tttccccgga ctgagtatca ataaactgct cacgcggttg aaggagaaaa tgttcgttac 240
ccggctaact acttcgagaa acctagtagc accatgaaaa ttgcagagcg tttcgctcag 300
cgcttccccc gcgtagatca ggctgatgag tcactgcatt cctcacgggc gaccgtggca 360
gtggctgcgt tggcggcctg cccatggggt aacccatggg acgctctaat atggacatgg 420
tgtgaagagt ctattgagct agttagtagt cctccggccc ctgaatgcgg ctaatcctaa 480
ctgcggagca cataccccca aaccaggggg cggtgtgtcg taacgggcaa ctctgcagcg 540
gaaccgacta ctttgggtgt ccgtgtttcc ttttattctt atattggctg cttatggtga 600
caattgaaag attgttacca tatagctatt ggattggcca tccggtgaat aacagagcct 660
tgatatacct ttttgtaggg tttataccac ttactcttcg cgttgttgag actctaaagt 720
acattctaat cttgaacact agaaa                                      745
```

<210> 9

<211> 739
<212> DNA
<213> 柯沙奇病毒A16

<400> 9
agcctgtggg ttgttcccac ccacagggcc cagtgggcgc tagcacactg attctgcggg 60
atctttgtgc gcctgtttta taacccctte cctaagcagc aacttagaag tttcacacaa 120
tcacgaccag tagtgggcgt ggcgcgccag tcacgtcttg gtcaagcact tctgttcccc 180
cggactgagt atcaatagac tgctcacgcg gttgaaggag aaaacgttcg ttatccggct 240
aactacttcg agaaacctag tagcaccgtg aaagttgcgg agtgtttcgc tcagcacttc 300
ccccgtgtag atcaggtcga tgagtcactg taaaccccac gggcgaccgt gacagtggct 360
gcgttggcgg cctgcccatg gggtaaccca tgggacgctc taatacagac atggtgtgaa 420
gagtctattg agctagttag tagtcctccg gcccctgaat gcggctaatc ctaactgcgg 480
agcacgcacc ctcaacccag ggggcggcgt gtcgtaatgg gtaactctgc agcggaaccg 540
actactttgg gtgtccgtgt ttcctttttat tccttattgg ctgcttatgg tgacaattga 600
aaagttgtta ccatatagct attggattgg ccatccggtg tctaacagag ctattgttta 660
cctatttatt ggatacgtcc ctcttaatct caaggccatt caaactcttg attatatatt 720
gctccttaac tgtaagaaa 739

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> 未知

<220>
<223> 合成構築體

<400> 10
tccatgacgt tcctgacgtt 20

<210> 11
<211> 18
<212> DNA
<213> 未知

<220>
<223> 合成構築體

<400> 11
tctcccagcg tgcgccat 18

<210> 12
<211> 30
<212> DNA
<213> 未知

<220>
<223> 合成構築體

<400> 12
accgatgacg tcgccggtga cggcaccacg 30

<210> 13
<211> 24
<212> DNA
<213> 未知

<220>
<223> 合成構築體

<400> 13
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> 未知

<220>
<223> 合成構築體

<400> 14
tccatgacgt tcctgatgct 20

<210> 15
<211> 291
<212> PRT
<213> 柯沙奇病毒A6

<400> 15
Asn Asp Pro Ile Ala Ser Ala Val Glu Ser Ala Val Asn Ala Phe Ala
1 5 10 15
Asp Thr Thr Ilc Ser Arg Val Thr Ala Ala Asn Thr Ala Ala Ser Thr
20 25 30
His Ser Leu Gly Thr Gly Arg Val Pro Ala Leu Gln Ala Ala Glu Thr
35 40 45
Gly Ala Ser Ser Asn Ala Ser Asp Glu Asn Leu Ile Glu Thr Arg Cys
50 55 60
Val Met Asn Arg Asn Gly Ile Asn Glu Ala Ser Val Glu His Phe Tyr
65 70 75 80
Ser Arg Ala Gly Leu Val Gly Val Val Glu Val Lys Asp Ser Gly Thr
85 90 95
Asn Gln Asp Gly Tyr Thr Val Trp Pro Ile Asp Val Met Gly Phe Val
100 105 110
Gln Gln Arg Arg Lys Leu Glu Leu Ser Thr Tyr Met Arg Phe Asp Ala
115 120 125
Glu Phe Thr Phe Val Scr Asn Leu Asn Asp Ser Thr Thr Pro Gly Met
130 135 140
Leu Leu Gln Tyr Met Tyr Val Pro Pro Gly Ala Pro Lys Pro Asp Gly
145 150 155 160
Arg Lys Ser Tyr Gln Trp Gln Thr Ala Thr Asn Pro Ser Ile Phe Ala
165 170 175
Lys Leu Ser Asp Pro Pro Pro Gln Val Tyr Val Pro Phe Met Ser Pro
180 185 190
Ala Ser Ala Tyr Gln Trp Phe Tyr Asp Gly Tyr Pro Thr Phe Gly Glu

```
        195                 200                 205
His Lys Gln Ala Thr Asn Leu Gln Tyr Gly Gln Cys Pro Asn Asn Met
    210                 215                 220
Met Gly His Phe Ala Ile Arg Thr Val Ser Glu Ser Thr Thr Gly Lys
225                 230                 235                 240
Asn Ile His Val Arg Val Tyr Met Arg Ile Lys His Val Arg Ala Trp
                245                 250                 255
Val Pro Arg Pro Leu Arg Ser Gln Ala Tyr Met Val Lys Asn Tyr Pro
            260                 265                 270
Thr Tyr Asn Gln Thr Ile Thr Asn Ser Ala Thr Asp Arg Ala Ser Ile
        275                 280                 285
Thr Thr Thr
    290
```

<210> 16
<211> 291
<212> PRT
<213> 柯沙奇病毒A6

<400> 16

```
Asn Asp Pro Ile Ala Asn Ala Val Glu Gly Ala Val Gly Thr Leu Ala
 1               5                  10                  15
Asp Ala Thr Ile Ser Arg Val Thr Ala Ala Asn Thr Ile Ala Ser Thr
            20                  25                  30
His Ser Leu Gly Thr Gly Arg Val Pro Ala Leu Gln Ala Ala Glu Thr
        35                  40                  45
Gly Ala Ser Ser Asn Ala Ser Asp Glu Asn Leu Ile Glu Thr Arg Cys
    50                  55                  60
Val Met Asn Arg Asn Gly Ile Asn Glu Ala Ser Val Glu His Phe Tyr
65                  70                  75                  80
Ser Arg Ala Gly Leu Val Gly Val Val Glu Val Lys Asp Ser Gly Thr
                85                  90                  95
Ser Gln Asp Gly Tyr Thr Val Trp Pro Ile Asp Val Met Gly Phe Val
            100                 105                 110
Gln Gln Arg Arg Lys Leu Glu Leu Ser Thr Tyr Met Arg Phe Asp Ala
        115                 120                 125
Glu Phe Thr Phe Val Ser Asn Leu Asn Asp Ser Thr Thr Pro Gly Met
    130                 135                 140
Leu Leu Gln Tyr Met Tyr Val Pro Pro Gly Ala Pro Lys Pro Asp Gly
145                 150                 155                 160
Arg Lys Ser Tyr Gln Trp Gln Thr Ala Thr Asn Pro Ser Ile Phe Ala
                165                 170                 175
Lys Leu Ser Asp Pro Pro Pro Gln Val Ser Val Pro Phe Met Ser Pro
            180                 185                 190
Ala Ser Ala Tyr Gln Trp Phe Tyr Asp Gly Tyr Pro Thr Phe Gly Glu
        195                 200                 205
His Lys Gln Ala Thr Asn Leu Gln Tyr Gly Gln Cys Pro Asn Asn Met
    210                 215                 220
Met Gly His Phe Ala Ile Arg Thr Val Ser Glu Ser Thr Thr Gly Lys
225                 230                 235                 240
Asn Ile His Val Arg Val Tyr Met Arg Ile Lys His Val Arg Ala Trp
                245                 250                 255
Val Pro Arg Pro Phe Arg Ser Gln Ala Tyr Met Val Lys Asn Tyr Pro
            260                 265                 270
```

Thr Tyr Asn Gln Thr Ile Thr Asn Ser Ala Thr Asp Arg Ala Asn Ile
275 280 285
Thr Thr Thr
290

<210> 17
<211> 305
<212> PRT
<213> 柯沙奇病毒A6

<400> 17
Asn Asp Pro Ile Ser Asn Ala Ile Glu Asn Ala Val Ser Thr Leu Ala
1 5 10 15
Asp Thr Thr Ile Ser Arg Val Thr Ala Ala Asn Thr Ala Ala Ser Ser
20 25 30
His Ser Leu Gly Thr Gly Arg Val Pro Ala Leu Gln Ala Ala Glu Thr
35 40 45
Gly Ala Ser Ser Asn Ala Ser Asp Glu Asn Leu Ile Glu Thr Arg Cys
50 55 60
Val Met Asn Arg Asn Gly Val Asn Glu Ala Ser Val Glu His Phe Tyr
65 70 75 80
Ser Arg Ala Gly Leu Val Gly Val Val Glu Val Lys Asp Ser Gly Thr
85 90 95
Ser Gln Asp Gly Tyr Thr Val Trp Pro Ile Asp Val Met Gly Phe Val
100 105 110
Gln Gln Arg Arg Lys Leu Glu Leu Ser Thr Tyr Met Arg Phe Asp Ala
115 120 125
Glu Phe Thr Phe Val Ser Asn Leu Asn Asp Ser Thr Thr Pro Gly Met
130 135 140
Leu Leu Gln Tyr Met Tyr Val Pro Pro Gly Ala Pro Lys Pro Asp Gly
145 150 155 160
Arg Lys Ser Tyr Gln Trp Gln Thr Ala Thr Asn Pro Ser Ile Phe Ala
165 170 175
Lys Leu Ser Asp Pro Pro Pro Gln Val Ser Val Pro Phe Met Ser Pro
180 185 190
Ala Ser Ala Tyr Gln Trp Phe Tyr Asp Gly Tyr Pro Thr Phe Gly Glu
195 200 205
His Lys Gln Ala Thr Asn Leu Gln Tyr Gly Gln Cys Pro Asn Asn Met
210 215 220
Met Gly His Phe Ala Ile Arg Thr Val Ser Glu Ser Thr Thr Gly Lys
225 230 235 240
Asn Val His Val Arg Val Tyr Met Arg Ile Lys His Val Arg Ala Trp
245 250 255
Val Pro Arg Pro Phe Arg Ser Gln Ala Tyr Met Val Lys Asn Tyr Pro
260 265 270
Thr Tyr Ser Gln Thr Ile Ser Asn Thr Ala Ala Asp Arg Ala Ser Ile
275 280 285
Thr Thr Thr Asp Tyr Glu Gly Gly Val Pro Ala Asn Pro Gln Arg Thr
290 295 300
Phe
305

<210> 18

<211> 305
<212> PRT
<213> 柯沙奇病毒A6

<400> 18
Asn Asp Pro Ile Ser Asn Ala Ile Glu Asn Ala Val Ser Thr Leu Ala
1 5 10 15
Asp Thr Thr Ile Ser Arg Val Thr Ala Ala Asn Thr Ala Ala Ser Ser
20 25 30
His Ser Leu Gly Thr Gly Arg Val Pro Ala Leu Gln Ala Ala Glu Thr
35 40 45
Gly Ala Ser Ser Asn Ala Ser Asp Glu Asn Leu Ile Glu Thr Arg Cys
50 55 60
Val Met Asn Arg Asn Gly Val Asn Glu Ala Ser Val Glu His Phe Tyr
65 70 75 80
Ser Arg Ala Gly Leu Val Gly Val Val Glu Val Lys Asp Ser Gly Thr
85 90 95
Ser Gln Asp Gly Tyr Thr Val Trp Pro Ile Asp Val Met Gly Phe Val
100 105 110
Gln Gln Arg Arg Lys Leu Glu Leu Ser Thr Tyr Met Arg Phe Asp Ala
115 120 125
Glu Phe Thr Phe Val Ser Asn Leu Asn Asp Ser Thr Thr Pro Gly Met
130 135 140
Leu Leu Gln Tyr Met Tyr Val Pro Pro Gly Ala Pro Lys Pro Asp Gly
145 150 155 160
Arg Lys Ser Tyr Gln Trp Gln Thr Ala Thr Asn Pro Ser Ile Phe Ala
165 170 175
Lys Leu Ser Asp Pro Pro Pro Gln Val Ser Val Pro Phe Met Ser Pro
180 185 190
Ala Ser Ala Tyr Gln Trp Phe Tyr Asp Gly Tyr Pro Thr Phe Gly Glu
195 200 205
His Lys Gln Ala Thr Asn Leu Gln Tyr Gly Gln Cys Pro Asn Asn Met
210 215 220
Met Gly His Phe Ala Ile Arg Thr Val Ser Glu Ser Thr Thr Gly Lys
225 230 235 240
Asn Val His Val Arg Val Tyr Met Arg Ile Lys His Val Arg Ala Trp
245 250 255
Val Pro Arg Pro Phe Arg Ser Gln Ala Tyr Met Val Lys Asn Tyr Pro
260 265 270
Thr Tyr Ser Gln Thr Ile Ser Asn Thr Ala Ala Asp Arg Ala Ser Ile
275 280 285
Thr Thr Thr Asp Tyr Glu Gly Gly Val Pro Ala Asn Pro Gln Arg Thr
290 295 300
Phe
305

<210> 19
<211> 305
<212> PRT
<213> 柯沙奇病毒A6

<400> 19
Asn Asp Pro Ile Ser Asn Ala Ile Glu Asn Ala Val Ser Thr Leu Ala
1 5 10 15

Asp Thr Thr Ile Ser Arg Val Thr Ala Ala Asn Thr Ala Ala Ser Ser
20 25 30
His Ser Leu Gly Thr Gly Arg Val Pro Ala Leu Gln Ala Val Glu Thr
35 40 45
Gly Ala Ser Ser Asn Ala Ser Asp Glu Asn Leu Ile Glu Thr Arg Cys
50 55 60
Val Met Asn Arg Asn Gly Val Asn Glu Ala Ser Val Glu His Phe Tyr
65 70 75 80
Ser Arg Ala Gly Leu Val Gly Val Val Lys Val Lys Asp Ser Gly Ala
85 90 95
Ser Gln Asp Gly Tyr Thr Val Trp Pro Ile Asp Val Met Gly Phe Val
100 105 110
Gln Gln Arg Arg Lys Leu Glu Leu Ser Thr Tyr Met Arg Phe Asp Ala
115 120 125
Glu Phe Thr Phe Val Ser Asn Leu Asn Asp Ser Thr Thr Pro Gly Met
130 135 140
Leu Leu Gln Tyr Met Tyr Val Pro Pro Gly Ala Pro Lys Pro Asp Gly
145 150 155 160
Arg Lys Ser Tyr Gln Trp Gln Thr Ala Thr Asn Pro Ser Ile Phe Ala
165 170 175
Lys Leu Ser Asp Pro Pro Pro Gln Val Ser Val Pro Phe Met Ser Pro
180 185 190
Ala Ser Ala Tyr Gln Trp Phe Tyr Asp Gly Tyr Pro Thr Phe Gly Glu
195 200 205
His Lys Gln Ala Thr Asn Leu Gln Tyr Gly Gln Cys Pro Asn Asn Met
210 215 220
Met Gly His Phe Ala Ile Arg Thr Val Ser Glu Ser Thr Thr Gly Lys
225 230 235 240
Asn Val His Val Arg Val Tyr Met Arg Ile Lys His Val Arg Ala Trp
245 250 255
Val Pro Arg Pro Phe Arg Ser Gln Ala Tyr Met Ile Lys Asn Tyr Pro
260 265 270
Thr Tyr Ser Gln Thr Ile Ser Asn Thr Ala Ala Asp Arg Ala Ser Ile
275 280 285
Thr Thr Thr Asp Tyr Glu Gly Gly Val Pro Ala Asn Pro Gln Arg Thr
290 295 300
Phe
305

<210> 20
<211> 305
<212> PRT
<213> 柯沙奇病毒A6

<400> 20
Asn Asp Pro Ile Ala Asn Ala Val Glu Ser Ala Val Ser Ala Leu Ala
1 5 10 15
Asp Thr Thr Ile Tyr Arg Val Thr Ala Ala Ser Thr Ala Ala Ser Thr
20 25 30
His Ser Leu Gly Thr Gly Arg Val Pro Ala Leu Gln Ala Ala Glu Thr
35 40 45
Gly Ala Ser Ser Asn Ala Ser Asp Glu Asn Leu Ile Glu Thr Arg Cys
50 55 60
Val Met Asn Arg Asn Gly Val Asn Glu Ala Ser Val Glu His Phe Tyr

65 70 75 80
Ser Arg Ala Gly Leu Val Gly Val Val Glu Val Lys Asp Ser Gly Thr
85 90 95
Ser Leu Asp Gly Tyr Thr Val Trp Pro Ile Asp Val Met Gly Phe Val
100 105 110
Gln Gln Arg Arg Lys Leu Glu Leu Ser Thr Tyr Met Arg Phe Asp Ala
115 120 125
Glu Phe Thr Phe Val Ser Asn Leu Asn Asp Ser Thr Thr Pro Gly Met
130 135 140
Leu Leu Gln Tyr Met Tyr Val Pro Pro Gly Ala Pro Lys Pro Asp Ser
145 150 155 160
Arg Lys Ser Tyr Gln Trp Gln Thr Ala Thr Asn Pro Ser Val Phe Ala
165 170 175
Lys Leu Ser Asp Pro Pro Pro Gln Val Ser Val Pro Phe Met Ser Pro
180 185 190
Ala Thr Ala Tyr Gln Trp Phe Tyr Asp Gly Tyr Pro Thr Phe Gly Glu
195 200 205
His Lys Gln Ala Thr Asn Leu Gln Tyr Gly Gln Cys Pro Asn Asn Met
210 215 220
Met Gly His Phe Ala Ile Arg Thr Val Ser Glu Ser Thr Thr Gly Lys
225 230 235 240
Asn Val His Val Arg Val Tyr Met Arg Ile Lys His Val Arg Ala Trp
245 250 255
Val Pro Arg Pro Leu Arg Ser Gln Ala Tyr Met Val Lys Asn Tyr Pro
260 265 270
Thr Tyr Ser Gln Thr Ile Thr Asn Thr Ala Thr Asp Arg Ala Ser Ile
275 280 285
Thr Thr Thr Asp Tyr Glu Gly Gly Val Pro Ala Asn Ser Gln Arg Thr
290 295 300
Ser
305

<210> 21
<211> 291
<212> PRT
<213> 柯沙奇病毒A6

<400> 21
Asn Asp Pro Ile Thr Asn Ala Val Glu Ser Ala Val Ser Ala Leu Ala
1 5 10 15
Asp Thr Thr Ile Ser Arg Val Thr Ala Ala Asn Thr Ala Val Ser Thr
20 25 30
His Ser Leu Gly Thr Gly Arg Val Pro Ala Leu Gln Ala Ala Glu Thr
35 40 45
Gly Ala Ser Ser Asn Ala Ser Asp Glu Asn Leu Ile Glu Thr Arg Cys
50 55 60
Val Met Asn Arg Asn Gly Val Asn Glu Ala Ser Val Glu His Phe Tyr
65 70 75 80
Ser Arg Ala Gly Leu Val Gly Val Val Glu Val Lys Asp Ser Gly Thr
85 90 95
Ser Leu Asp Gly Tyr Thr Val Trp Pro Ile Asp Val Met Gly Phe Val
100 105 110
Gln Gln Arg Arg Lys Leu Glu Leu Ser Thr Tyr Met Arg Phe Asp Ala
115 120 125

Glu Phe Thr Phe Val Ser Asn Leu Asn Asp Ser Thr Thr Pro Gly Met
130 135 140
Leu Leu Gln Tyr Met Tyr Val Pro Pro Gly Ala Pro Lys Pro Asp Ser
145 150 155 160
Arg Lys Ser Tyr Gln Trp Gln Thr Ala Thr Asn Pro Ser Val Phe Ala
165 170 175
Lys Leu Ser Asp Pro Pro Pro Gln Val Ser Val Pro Phe Met Ser Pro
180 185 190
Ala Thr Ala Tyr Gln Trp Phe Tyr Asp Gly Tyr Pro Thr Phe Gly Glu
195 200 205
His Lys Gln Ala Thr Asn Leu Gln Tyr Gly Gln Cys Pro Asn Asn Met
210 215 220
Met Gly His Phe Ala Ile Arg Thr Val Ser Glu Ser Thr Thr Gly Lys
225 230 235 240
Asn Val His Val Arg Val Tyr Met Arg Ile Lys His Val Arg Ala Trp
245 250 255
Val Pro Arg Pro Leu Arg Ser Gln Ala Tyr Met Val Lys Asn Tyr Pro
260 265 270
Thr Tyr Ser Gln Thr Ile Thr Asn Thr Ala Thr Asp Arg Ala Ser Ile
275 280 285
Thr Ile Thr
290

<210> 22
<211> 305
<212> PRT
<213> 柯沙奇病毒A6

<400> 22
Asn Asp Pro Ile Thr Asn Ala Val Glu Ser Ala Val Ser Ala Leu Ala
1 5 10 15
Asp Thr Thr Ile Ser Arg Val Thr Ala Ala Asn Thr Ala Ala Ser Thr
20 25 30
His Ser Leu Gly Thr Gly Arg Val Pro Ala Leu Gln Ala Ala Glu Thr
35 40 45
Gly Ala Ser Ser Asn Ser Ser Asp Glu Asn Leu Ile Glu Thr Arg Cys
50 55 60
Val Met Asn Arg Asn Gly Val Asn Glu Ala Ser Val Glu His Phe Tyr
65 70 75 80
Ser Arg Ala Gly Leu Val Gly Val Val Glu Val Lys Asp Ser Gly Thr
85 90 95
Ser Leu Asp Gly Tyr Thr Val Trp Pro Ile Asp Val Met Gly Phe Val
100 105 110
Gln Gln Arg Arg Lys Leu Glu Leu Ser Thr Tyr Met Arg Phe Asp Ala
115 120 125
Glu Phe Thr Phe Val Ser Asn Leu Asn Asp Ser Thr Thr Pro Gly Met
130 135 140
Leu Leu Gln Tyr Met Tyr Val Pro Pro Gly Ala Pro Lys Pro Asp Ser
145 150 155 160
Arg Lys Ser Tyr Gln Trp Gln Thr Ala Thr Asn Pro Ser Val Phe Ala
165 170 175
Lys Leu Ser Asp Pro Pro Pro Gln Val Ser Val Pro Phe Met Ser Pro
180 185 190
Ala Thr Ala Tyr Gln Trp Phe Tyr Asp Gly Tyr Pro Thr Phe Gly Glu

```
        195                 200                 205
His Lys Gln Ala Thr Asn Leu Gln Tyr Gly Gln Cys Pro Asn Asn Met
    210                 215                 220
Met Gly His Phe Ala Ile Arg Thr Val Ser Glu Ser Thr Thr Gly Lys
225                 230                 235                 240
Asn Ile His Val Arg Val Tyr Met Arg Ile Lys His Val Arg Ala Trp
                245                 250                 255
Val Pro Arg Pro Leu Arg Ser Gln Ala Tyr Met Val Lys Asn Tyr Pro
            260                 265                 270
Thr Tyr Ser Gln Thr Ile Thr Asn Thr Ala Thr Asp Arg Ala Ser Ile
        275                 280                 285
Thr Thr Thr Asp Tyr Glu Gly Gly Val Pro Ala Asn Pro Gln Arg Thr
    290                 295                 300
Ser
305
```

<210> 23
<211> 305
<212> PRT
<213> 柯沙奇病毒A6

<400> 23

```
Asn Asp Pro Ile Thr Asn Ala Val Glu Ser Ala Val Ser Ala Leu Ala
 1               5                  10                  15
Asp Thr Thr Ile Ser Arg Val Thr Ala Ala Asn Thr Ala Ala Ser Thr
            20                  25                  30
His Ser Leu Gly Thr Gly Arg Val Pro Ala Leu Gln Ala Ala Glu Thr
        35                  40                  45
Gly Ala Ser Ser Asn Ala Ser Asp Glu Asn Leu Ile Glu Thr Arg Cys
    50                  55                  60
Val Met Asn Arg Asn Gly Val Asn Glu Ala Ser Val Glu His Phe Tyr
65                  70                  75                  80
Ser Arg Ala Gly Leu Val Gly Val Val Glu Val Lys Asp Ser Gly Thr
                85                  90                  95
Ser Leu Asp Gly Tyr Thr Val Trp Pro Ile Asp Val Met Gly Phe Val
            100                 105                 110
Gln Gln Arg Arg Lys Leu Glu Leu Ser Thr Tyr Met Arg Phe Asp Ala
        115                 120                 125
Glu Phe Thr Phe Val Ser Asn Leu Asn Asn Ser Thr Thr Pro Gly Met
    130                 135                 140
Leu Leu Gln Tyr Met Tyr Val Pro Pro Gly Ala Pro Lys Pro Asp Ser
145                 150                 155                 160
Arg Lys Ser Tyr Gln Trp Gln Thr Ala Thr Asn Pro Ser Val Phe Ala
                165                 170                 175
Lys Leu Ser Asp Pro Pro Pro Gln Val Ser Val Pro Phe Met Ser Pro
            180                 185                 190
Ala Thr Ala Tyr Gln Trp Phe Tyr Asp Gly Tyr Pro Thr Phe Gly Glu
        195                 200                 205
His Lys Gln Ala Thr Asn Leu Gln Tyr Gly Gln Cys Pro Asn Asn Met
    210                 215                 220
Met Gly His Phe Ala Ile Arg Thr Val Ser Glu Ser Thr Thr Gly Lys
225                 230                 235                 240
Asn Val His Val Arg Val Tyr Met Arg Ile Lys His Val Arg Ala Trp
                245                 250                 255
```

Val Pro Arg Pro Leu Arg Ser Gln Ala Tyr Met Val Lys Asn Tyr Pro
260 265 270
Thr Tyr Ser Gln Thr Ile Thr Asn Thr Ala Thr Asp Arg Ala Ser Ile
275 280 285
Thr Thr Thr Asp Tyr Glu Gly Gly Val Pro Ala Ser Pro Gln Arg Thr
290 295 300
Ser
305

<210> 24
<211> 305
<212> PRT
<213> 柯沙奇病毒A6

<400> 24
Asn Asp Pro Ile Thr Asn Ala Val Glu Ser Ala Val Ser Ala Leu Ala
1 5 10 15
Asp Thr Thr Ile Ser Arg Val Thr Ala Ala Asn Thr Ala Ala Ser Thr
20 25 30
His Ser Leu Gly Thr Gly Arg Val Pro Ala Leu Gln Ala Ala Glu Thr
35 40 45
Gly Ala Ser Ser Asn Ala Ser Asp Glu Asn Leu Ile Glu Thr Arg Cys
50 55 60
Val Met Asn Arg Asn Gly Val Asn Glu Ala Ser Val Glu His Phe Tyr
65 70 75 80
Ser Arg Ala Gly Leu Val Gly Val Val Glu Val Lys Asp Ser Gly Thr
85 90 95
Ser Leu Asp Gly Tyr Thr Val Trp Pro Ile Asp Val Met Gly Phe Val
100 105 110
Gln Gln Arg Arg Lys Leu Glu Leu Ser Thr Tyr Met Arg Phe Asp Ala
115 120 125
Glu Phe Thr Phe Val Ser Asn Leu Asn Asp Ser Thr Thr Pro Gly Met
130 135 140
Leu Leu Gln Tyr Met Tyr Val Pro Pro Gly Ala Pro Lys Pro Asp Ser
145 150 155 160
Arg Lys Ser Tyr Gln Trp Gln Thr Ala Thr Asn Pro Ser Val Phe Ala
165 170 175
Lys Leu Ser Asp Pro Pro Pro Gln Val Ser Val Pro Phe Met Ser Pro
180 185 190
Ala Thr Ala Tyr Gln Trp Phe Tyr Asp Gly Tyr Pro Thr Phe Gly Glu
195 200 205
His Lys Gln Ala Thr Asn Leu Gln Tyr Gly Gln Cys Pro Asn Asn Met
210 215 220
Met Gly His Phe Ala Ile Arg Thr Val Ser Glu Ser Thr Thr Gly Lys
225 230 235 240
Asn Val His Val Arg Val Tyr Met Arg Ile Lys His Val Arg Ala Trp
245 250 255
Val Pro Arg Pro Leu Arg Ser Gln Ala Tyr Met Val Lys Asn Tyr Pro
260 265 270
Thr Tyr Ser Gln Thr Ile Thr Asn Thr Ala Thr Asp Arg Ala Ser Ile
275 280 285
Thr Thr Thr Asp Tyr Glu Gly Gly Val Pro Ala Asn Pro Gln Arg Thr
290 295 300
Ser

305

<210> 25
<211> 262
<212> PRT
<213> 柯沙奇病毒A16

<400> 25
Gly Asp Ser Ile Ala Asp Met Ile Asp Gln Thr Val Asn Asn Gln Val
1 5 10 15
Asn Arg Ser Leu Thr Ala Leu Gln Val Leu Pro Thr Ala Ala Asn Thr
20 25 30
Glu Ala Ser Ser His Arg Leu Gly Thr Gly Val Val Pro Ala Leu Gln
35 40 45
Ala Ala Glu Thr Gly Ala Ser Ser Asn Ala Ser Asp Lys Asn Leu Ile
50 55 60
Glu Thr Arg Cys Val Leu Asn His His Ser Thr Gln Glu Thr Ala Ile
65 70 75 80
Gly Asn Phe Phe Ser Arg Ala Gly Leu Val Ser Ile Ile Thr Met Pro
85 90 95
Thr Thr Gly Thr Gln Asn Thr Asp Gly Tyr Val Asn Trp Asp Ile Asp
100 105 110
Leu Met Gly Tyr Ala Gln Leu Arg Arg Lys Cys Glu Leu Phe Thr Tyr
115 120 125
Met Arg Phe Asp Ala Glu Phe Thr Phe Val Val Ala Lys Pro Asn Gly
130 135 140
Glu Leu Val Pro Gln Leu Leu Gln Tyr Met Tyr Val Pro Pro Gly Ala
145 150 155 160
Pro Lys Pro Thr Ser Arg Asp Ser Phe Ala Trp Gln Thr Ala Thr Asn
165 170 175
Leu Ser Val Phe Val Lys Met Thr Asp Pro Pro Ala Gln Ala Ser Val
180 185 190
Pro Phe Met Ser Pro Ala Ser Ala Tyr Gln Trp Phe Tyr Asp Gly Tyr
195 200 205
Pro Thr Phe Gly Glu His Leu Gln Ala Asn Asp Leu Asp Tyr Gly Gln
210 215 220
Cys Pro Asn Asn Met Met Gly Thr Phe Ser Val Arg Thr Val Gly Ala
225 230 235 240
Glu Lys Ser Pro His Ser Ile Thr Leu Arg Val Tyr Met Arg Ile Lys
245 250 255
His Val Arg Ala Trp Ile
260

<210> 26
<211> 297
<212> PRT
<213> 柯沙奇病毒A16

<400> 26
Gly Asp Ser Ile Ala Asp Met Ile Asp Gln Thr Val Asn Asn Gln Val
1 5 10 15
Asn Arg Ser Leu Thr Ala Leu Gln Val Met Pro Thr Ser Ala Asn Thr
20 25 30

```
Glu Ala Ser Ser His Arg Leu Gly Thr Gly Val Val Pro Ala Leu Gln
        35                  40                  45
Ala Ala Glu Thr Gly Ala Ser Ser Asn Ala Ser Asp Lys Asn Leu Ile
    50                  55                  60
Glu Thr Arg Cys Val Leu Asn His His Ser Thr Gln Glu Thr Ala Ile
65                  70                  75                  80
Gly Asn Phe Phe Ser Arg Ala Gly Leu Val Ser Ile Ile Thr Met Pro
                85                  90                  95
Thr Thr Gly Thr Gln Asn Thr Asp Gly Tyr Val Asn Trp Asp Ile Asp
            100                 105                 110
Leu Met Gly Tyr Ala Gln Leu Arg Arg Lys Cys Glu Leu Phe Thr Tyr
        115                 120                 125
Met Arg Phe Asp Ala Glu Phe Thr Phe Val Val Ala Lys Pro Asn Gly
    130                 135                 140
Glu Leu Val Pro Gln Leu Leu Gln Tyr Met Tyr Val Pro Pro Gly Ala
145                 150                 155                 160
Pro Lys Pro Thr Ser Arg Asp Ser Phe Ala Trp Gln Thr Ala Thr Asn
                165                 170                 175
Pro Ser Val Phe Val Lys Met Thr Asp Pro Pro Ala Gln Val Ser Val
            180                 185                 190
Pro Phe Met Ser Pro Ala Ser Ala Tyr Gln Trp Phe Tyr Asp Gly Tyr
        195                 200                 205
Pro Thr Phe Gly Glu His Leu Gln Ala Asn Asp Leu Asp Tyr Gly Gln
    210                 215                 220
Cys Pro Asn Asn Met Met Gly Thr Phe Ser Val Arg Thr Val Gly Ala
225                 230                 235                 240
Glu Lys Ser Pro His Ser Ile Thr Leu Arg Val Tyr Met Arg Ile Lys
                245                 250                 255
His Val Arg Ala Trp Ile Pro Arg Pro Leu Arg Asn Gln Pro Tyr Leu
            260                 265                 270
Phe Lys Thr Asn Pro Asn Tyr Lys Gly Asn Asp Ile Lys Cys Thr Ser
        275                 280                 285
Thr Ser Arg Asp Lys Ile Thr Thr Leu
    290                 295
```

<210> 27
<211> 297
<212> PRT
<213> 柯沙奇病毒A16

<400> 27

```
Gly Asp Pro Ile Ala Asp Met Ile Asp Gln Thr Val Asn Asn Gln Val
 1               5                  10                  15
Asn Arg Ser Leu Ser Ala Leu Gln Val Leu Pro Thr Ala Ala Asn Thr
            20                  25                  30
Glu Ala Ser Ser His Arg Leu Gly Thr Gly Val Val Pro Ala Leu Gln
        35                  40                  45
Ala Ala Glu Thr Gly Ala Ser Ser Asn Ala Ser Asp Lys Asn Leu Ile
    50                  55                  60
Glu Thr Arg Cys Val Leu Asn His His Ser Thr Gln Glu Thr Ala Ile
65                  70                  75                  80
Gly Asn Phe Phe Ser Arg Ala Gly Leu Val Ser Ile Ile Thr Met Pro
                85                  90                  95
Thr Thr Gly Thr Gln Asn Thr Asp Gly Tyr Val Asn Trp Asp Ile Asp
```

```
                100                 105                 110
Leu Met Gly Tyr Ala Gln Leu Arg Arg Lys Cys Glu Leu Phe Thr Tyr
            115                 120                 125
Met Arg Phe Asp Ala Glu Phe Thr Phe Val Val Ala Lys Pro Asn Gly
    130                 135                 140
Glu Leu Val Pro Gln Leu Leu Gln Tyr Met Tyr Val Pro Pro Gly Ala
145                 150                 155                 160
Pro Lys Pro Thr Ser Arg Asp Ser Phe Ala Trp Gln Thr Ala Thr Asn
                165                 170                 175
Pro Ser Val Phe Val Lys Met Thr Asp Pro Pro Ala Gln Val Ser Val
            180                 185                 190
Pro Phe Met Ser Pro Ala Ser Ala Tyr Gln Trp Phe Tyr Asp Gly Tyr
        195                 200                 205
Pro Thr Phe Gly Glu His Leu Gln Ala Asn Asp Leu Asp Tyr Gly Gln
    210                 215                 220
Cys Pro Asn Asn Met Met Gly Thr Phe Ser Val Arg Thr Val Gly Thr
225                 230                 235                 240
Glu Lys Ser Pro His Ser Ile Thr Leu Arg Val Tyr Met Arg Ile Lys
                245                 250                 255
His Val Arg Ala Trp Ile Pro Arg Pro Leu Arg Asn Gln Pro Tyr Leu
            260                 265                 270
Phe Lys Thr Asn Pro Asn Tyr Lys Gly Asn Asp Ile Lys Cys Thr Ser
        275                 280                 285
Thr Ser Arg Asp Lys Ile Thr Thr Leu
    290                 295
```

<210> 28
<211> 297
<212> PRT
<213> 柯沙奇病毒A16

<400> 28

```
Gly Asp Pro Ile Ala Asp Met Ile Asp Gln Thr Val Asn Asn Gln Val
 1               5                  10                  15
Asn Arg Ser Leu Thr Ala Leu Gln Val Leu Pro Thr Ala Ala Asn Thr
            20                  25                  30
Glu Ala Ser Ser His Arg Leu Gly Thr Gly Val Val Pro Ala Leu Gln
        35                  40                  45
Ala Ala Glu Thr Gly Ala Ser Ser Asn Ala Ser Asp Lys Asn Leu Ile
    50                  55                  60
Glu Thr Arg Cys Val Leu Asn His His Ser Thr Gln Glu Thr Ala Ile
65                  70                  75                  80
Gly Asn Phe Phe Ser Arg Ala Gly Leu Val Ser Ile Ile Thr Met Pro
                85                  90                  95
Thr Thr Asp Thr Gln Asn Thr Asp Gly Tyr Val Asn Trp Asp Ile Asp
            100                 105                 110
Leu Met Gly Tyr Ala Gln Leu Arg Arg Lys Cys Glu Leu Phe Thr Tyr
        115                 120                 125
Met Arg Phe Asp Ala Glu Phe Thr Phe Val Val Ala Lys Pro Asn Gly
    130                 135                 140
Val Leu Val Pro Gln Leu Leu Gln Tyr Met Tyr Val Pro Pro Gly Ala
145                 150                 155                 160
Pro Lys Pro Thr Ser Arg Asp Ser Phe Ala Trp Gln Thr Ala Thr Asn
                165                 170                 175
```

Pro Ser Val Phe Val Lys Met Thr Asp Pro Pro Ala Gln Val Ser Val
180 185 190
Pro Phe Met Ser Pro Ala Ser Ala Tyr Gln Trp Phe Tyr Asp Gly Tyr
195 200 205
Pro Thr Phe Gly Glu His Leu Gln Ala Asn Asp Leu Asp Tyr Gly Gln
210 215 220
Cys Pro Asn Asn Met Met Gly Thr Phe Ser Ile Arg Thr Val Gly Thr
225 230 235 240
Glu Lys Ser Pro His Ser Ile Thr Leu Arg Val Tyr Met Arg Ile Lys
245 250 255
His Val Arg Ala Trp Ile Pro Arg Pro Leu Arg Asn Gln Pro Tyr Leu
260 265 270
Phe Lys Thr Asn Pro Asn Tyr Lys Gly Asn Asp Ile Lys Cys Thr Ser
275 280 285
Thr Ser Arg Asp Lys Ile Thr Thr Leu
290 295

<210> 29
<211> 277
<212> PRT
<213> 柯沙奇病毒A16

<400> 29
Gly Asp Pro Ile Ala Asp Met Ile Asp Gln Thr Val Asn Asn Gln Val
1 5 10 15
Asn Arg Ser Leu Thr Ala Leu Gln Val Leu Pro Thr Ala Ala Asn Thr
20 25 30
Glu Ala Ser Ser His Arg Leu Gly Thr Gly Val Val Pro Ala Leu Gln
35 40 45
Ala Ala Glu Thr Gly Ala Ser Ser Asn Ala Ser Asp Lys Asn Leu Ile
50 55 60
Glu Thr Arg Cys Val Leu Asn His His Ser Thr Gln Glu Thr Ala Ile
65 70 75 80
Gly Asn Phe Phe Ser Arg Ala Gly Leu Val Ser Ile Ile Thr Met Pro
85 90 95
Thr Thr Gly Thr Gln Asn Thr Asp Gly Tyr Val Asn Trp Asp Ile Asp
100 105 110
Leu Met Gly Tyr Ala Gln Leu Arg Arg Lys Cys Glu Leu Phe Thr Tyr
115 120 125
Met Arg Phe Asp Ala Glu Phe Thr Phe Val Val Ala Lys Pro Asn Gly
130 135 140
Glu Leu Val Pro Gln Leu Leu Gln Tyr Met Tyr Val Pro Pro Gly Ala
145 150 155 160
Pro Lys Pro Thr Ser Arg Asp Ser Phe Ala Trp Gln Thr Ala Thr Asn
165 170 175
Pro Ser Val Phe Val Lys Met Thr Asp Pro Pro Ala Gln Val Ser Val
180 185 190
Pro Phe Met Ser Pro Ala Ser Ala Tyr Gln Trp Phe Tyr Asp Gly Tyr
195 200 205
Pro Thr Phe Gly Glu His Leu Gln Ala Asp Asp Leu Asp Tyr Gly Gln
210 215 220
Cys Pro Asn Asn Met Met Gly Thr Phe Ser Ile Arg Thr Val Gly Thr
225 230 235 240
Glu Lys Ser Pro His Ser Ile Thr Leu Arg Val Tyr Met Arg Ile Lys

245 250 255
His Val Arg Ala Trp Ile Pro Arg Pro Leu Arg Asn Gln Pro Tyr Leu
260 265 270
Phe Lys Thr Asn Pro
275

<210> 30
<211> 283
<212> PRT
<213> 柯沙奇病毒A16

<400> 30
Gly Asp Ser Ile Ala Asp Met Ile Asp Gln Thr Val Asn Asn Gln Val
1 5 10 15
Asn Arg Ser Leu Thr Ala Met Gln Val Leu Pro Thr Ala Ala Asn Thr
20 25 30
Glu Ala Ser Ser His Arg Leu Gly Thr Gly Val Val Pro Ala Leu Gln
35 40 45
Ala Ala Glu Thr Gly Ala Ser Ser Asn Ala Ser Asp Lys Asn Leu Ile
50 55 60
Glu Thr Arg Cys Val Leu Asn His His Ser Thr Gln Glu Thr Ala Ile
65 70 75 80
Gly Asn Phe Phe Ser Arg Ala Gly Leu Val Ser Ile Ile Thr Met Pro
85 90 95
Thr Thr Gly Thr Gln Asn Thr Asp Gly Tyr Val Asn Trp Asp Ile Asp
100 105 110
Leu Met Gly Tyr Ala Gln Leu Arg Arg Lys Cys Glu Leu Phe Thr Tyr
115 120 125
Met Arg Phe Asp Ala Glu Phe Thr Phe Val Val Ala Lys Pro Asn Gly
130 135 140
Glu Leu Val Pro Gln Leu Leu Gln Tyr Met Tyr Val Pro Pro Gly Ala
145 150 155 160
Pro Lys Pro Thr Ser Arg Asp Ser Phe Ala Trp Gln Thr Ala Thr Asn
165 170 175
Pro Ser Val Phe Val Lys Met Thr Asp Pro Pro Ala Gln Val Ser Val
180 185 190
Pro Phe Met Ser Pro Ala Ser Ala Tyr Gln Trp Phe Tyr Asp Gly Tyr
195 200 205
Pro Thr Phe Gly Glu His Leu Gln Ala Asn Asp Leu Asp Tyr Gly Gln
210 215 220
Cys Pro Asn Asn Met Met Gly Thr Phe Ser Ile Arg Thr Val Gly Thr
225 230 235 240
Glu Lys Ser Pro His Ser Ile Thr Leu Arg Val Tyr Met Arg Ile Lys
245 250 255
His Val Arg Ala Trp Ile Pro Arg Pro Leu Arg Asn Gln Pro Tyr Leu
260 265 270
Phe Lys Thr Asn Pro Asn Tyr Lys Gly Asn Asp
275 280

<210> 31
<211> 297
<212> PRT
<213> 柯沙奇病毒A16

<400> 31
Gly Asp Pro Ile Ala Asp Met Ile Asp Gln Thr Val Asn Asn Gln Val
1 5 10 15
Asn Arg Ser Leu Thr Ala Leu Gln Val Leu Pro Thr Ala Ala Asn Thr
20 25 30
Glu Ala Ser Ser His Arg Leu Gly Thr Gly Val Val Pro Ala Leu Gln
35 40 45
Ala Ala Glu Thr Gly Ala Ser Ser Asn Ala Ser Asp Lys Asn Leu Ile
50 55 60
Glu Thr Arg Cys Val Leu Asn His His Ser Thr Gln Glu Thr Ala Ile
65 70 75 80
Gly Asn Phe Phe Ser Arg Ala Gly Leu Val Ser Ile Ile Thr Met Pro
85 90 95
Thr Thr Gly Thr Gln Asn Ala Asp Gly Tyr Val Asn Trp Asp Ile Asp
100 105 110
Leu Met Gly Tyr Ala Gln Leu Arg Arg Lys Cys Glu Leu Phe Thr Tyr
115 120 125
Met Arg Phe Asp Ala Glu Phe Thr Phe Val Val Ala Lys Pro Asn Gly
130 135 140
Glu Leu Val Pro Gln Leu Leu Gln Tyr Met Tyr Val Pro Pro Gly Ala
145 150 155 160
Pro Lys Pro Thr Ser Arg Asp Ser Phe Ala Trp Gln Thr Ala Thr Asn
165 170 175
Pro Ser Val Phe Val Lys Met Thr Asp Pro Pro Ala Gln Val Ser Val
180 185 190
Pro Phe Met Ser Pro Ala Ser Ala Tyr Gln Trp Phe Tyr Asp Gly Tyr
195 200 205
Pro Thr Phe Gly Glu His Leu Gln Ala Asn Asp Leu Asp Tyr Gly Gln
210 215 220
Cys Pro Asn Asn Met Met Gly Thr Phe Ser Ile Arg Thr Val Gly Thr
225 230 235 240
Glu Lys Ser Pro His Ser Ile Thr Leu Arg Val Tyr Met Arg Ile Lys
245 250 255
His Val Arg Ala Trp Ile Pro Arg Pro Leu Arg Asn Gln Pro Tyr Leu
260 265 270
Phe Lys Thr Asn Pro Asn Tyr Lys Gly Asn Asp Ile Lys Cys Thr Ser
275 280 285
Thr Ser Arg Asp Lys Ile Thr Thr Leu
290 295

<210> 32
<211> 297
<212> PRT
<213> 柯沙奇病毒A16

<400> 32
Gly Asp Ser Ile Ala Asp Met Ile Asp Gln Thr Val Asn Asn Gln Val
1 5 10 15
Asn Arg Ser Leu Thr Ala Leu Gln Val Leu Pro Thr Ala Ala Asn Thr
20 25 30
Glu Ala Ser Ser His Arg Leu Gly Thr Gly Val Val Pro Ala Leu Gln
35 40 45
Ala Ala Glu Thr Gly Ala Ser Ser Asn Ala Ser Asp Lys Asn Leu Ile

```
     50                  55                  60
Glu Thr Arg Cys Val Leu Asn His His Ser Thr Gln Glu Thr Ala Ile
65                  70                  75                  80
Gly Asn Phe Phe Ser Arg Ala Gly Leu Val Ser Ile Ile Thr Met Pro
                85                  90                  95
Thr Thr Gly Thr Gln Asn Thr Asp Gly Tyr Val Asn Trp Asp Ile Asp
            100                 105                 110
Leu Met Gly Tyr Ala Gln Leu Arg Arg Lys Cys Glu Leu Phe Thr Tyr
        115                 120                 125
Met Arg Phe Asp Ala Glu Phe Thr Phe Val Val Ala Lys Pro Asn Gly
    130                 135                 140
Glu Leu Val Pro Gln Leu Leu Gln Tyr Met Tyr Val Pro Pro Gly Ala
145                 150                 155                 160
Pro Lys Pro Thr Ser Arg Asp Ser Phe Ala Trp Gln Thr Ala Thr Asn
                165                 170                 175
Pro Ser Val Phe Val Lys Met Thr Asp Pro Pro Ala Gln Val Ser Val
            180                 185                 190
Pro Phe Met Ser Pro Ala Ser Ala Tyr Gln Trp Phe Tyr Asp Gly Tyr
        195                 200                 205
Pro Thr Phe Gly Glu His Leu Gln Ala Asn Asp Leu Asp Tyr Gly Gln
    210                 215                 220
Cys Pro Asn Asn Met Met Gly Thr Phe Ser Ile Arg Thr Val Gly Thr
225                 230                 235                 240
Glu Lys Ser Pro His Ser Ile Thr Leu Arg Val Tyr Met Arg Ile Lys
                245                 250                 255
His Val Arg Ala Trp Ile Pro Arg Pro Leu Arg Asn Gln Pro Tyr Leu
            260                 265                 270
Phe Lys Thr Asn Pro Asn Tyr Lys Gly Asn Asp Ile Lys Cys Thr Ser
        275                 280                 285
Thr Ser Arg Asp Lys Ile Thr Thr Leu
    290                 295
```

<210> 33
<211> 297
<212> PRT
<213> 柯沙奇病毒A16

<400> 33

```
Gly Asp Pro Ile Ala Asp Met Ile Asp Gln Thr Val Asn Asn Gln Val
 1               5                  10                  15
Asn Arg Ser Leu Thr Ala Leu Gln Val Leu Pro Thr Ala Ala Asn Thr
            20                  25                  30
Glu Ala Ser Ser His Arg Leu Gly Thr Gly Val Val Pro Ala Leu Gln
        35                  40                  45
Ala Ala Glu Thr Gly Ala Ser Ser Asn Ala Ser Asp Lys Asn Leu Ile
    50                  55                  60
Glu Thr Arg Cys Val Leu Asn His His Ser Thr Gln Glu Thr Ala Ile
65                  70                  75                  80
Gly Asn Phe Phe Ser Arg Ala Gly Leu Val Ser Ile Ile Thr Met Pro
                85                  90                  95
Thr Thr Gly Thr Gln Asn Thr Asp Gly Tyr Val Asn Trp Asp Ile Asp
            100                 105                 110
Leu Met Gly Tyr Ala Gln Leu Arg Arg Lys Cys Glu Leu Phe Thr Tyr
        115                 120                 125
```

Met Arg Phe Asp Ala Glu Phe Thr Phe Val Val Ala Lys Pro Asn Gly
130 135 140
Glu Leu Val Pro Gln Leu Leu Gln Tyr Met Tyr Val Pro Pro Gly Ala
145 150 155 160
Pro Lys Pro Thr Ser Arg Asp Ser Phe Ala Trp Gln Thr Ala Thr Asn
165 170 175
Pro Ser Val Phe Val Lys Met Thr Asp Pro Pro Ala Gln Val Ser Val
180 185 190
Pro Phe Met Ser Pro Ala Ser Ala Tyr Gln Trp Phe Tyr Asp Gly Tyr
195 200 205
Pro Thr Phe Gly Glu His Leu Gln Ala Asn Asp Leu Asp Tyr Gly Gln
210 215 220
Cys Pro Asn Asn Met Met Gly Thr Phe Ser Ile Arg Thr Val Gly Thr
225 230 235 240
Lys Lys Ser Pro His Ser Ile Thr Leu Arg Val Tyr Met Arg Ile Lys
245 250 255
His Val Arg Ala Trp Ile Pro Arg Pro Leu Arg Asn Gln Pro Tyr Leu
260 265 270
Phe Lys Thr Asn Pro Asn Tyr Lys Gly Asn Asp Ile Lys Cys Thr Ser
275 280 285
Thr Ser Arg Asp Lys Ile Thr Thr Leu
290 295

<210> 34
<211> 297
<212> PRT
<213> 柯沙奇病毒A16

<400> 34
Gly Asp Pro Ile Ala Asp Met Ile Asp Gln Thr Val Asn Asn Gln Val
1 5 10 15
Asn Arg Ser Leu Thr Ala Leu Gln Val Leu Pro Thr Ala Ala Asn Thr
20 25 30
Glu Ala Ser Ser His Arg Leu Gly Thr Gly Val Val Pro Ala Leu Gln
35 40 45
Ala Ala Glu Thr Gly Ala Ser Ser Asn Ala Ser Asp Lys Asn Leu Ile
50 55 60
Glu Thr Arg Cys Val Leu Asn His His Ser Thr Gln Glu Thr Ala Ile
65 70 75 80
Gly Asn Phe Phe Ser Arg Ala Gly Leu Val Ser Ile Ile Thr Met Pro
85 90 95
Thr Ala Gly Thr Gln Asn Thr Asp Gly Tyr Val Asn Trp Asp Ile Asp
100 105 110
Leu Met Gly Tyr Ala Gln Leu Arg Arg Lys Cys Glu Leu Phe Thr Tyr
115 120 125
Met Arg Phe Asp Ala Glu Phe Thr Phe Val Val Ala Lys Pro Asn Gly
130 135 140
Glu Leu Val Pro Gln Leu Leu Gln Tyr Met Tyr Val Pro Pro Gly Ala
145 150 155 160
Pro Lys Pro Thr Ser Arg Asp Ser Phe Ala Trp Gln Thr Ala Thr Asn
165 170 175
Pro Ser Val Phe Val Lys Met Thr Asp Pro Pro Ala Gln Val Ser Val
180 185 190
Pro Phe Met Ser Pro Ala Ser Ala Tyr Gln Trp Phe Tyr Asp Gly Tyr

195 200 205
Pro Thr Phe Gly Glu His Leu Gln Ala Asn Asp Leu Asp Tyr Gly Gln
210 215 220
Cys Pro Asn Asn Met Met Gly Thr Phe Ser Ile Arg Thr Val Gly Thr
225 230 235 240
Glu Lys Ser Pro His Ser Ile Thr Leu Arg Val Tyr Met Arg Ile Lys
245 250 255
His Val Arg Ala Trp Ile Pro Arg Pro Leu Arg Asn Gln Pro Tyr Leu
260 265 270
Phe Lys Thr Asn Pro Asn Tyr Lys Gly Asn Asp Ile Lys Cys Thr Ser
275 280 285
Thr Ser Arg Asp Lys Ile Thr Thr Leu
290 295

<210> 35
<211> 297
<212> PRT
<213> 柯沙奇病毒A16

<400> 35
Gly Asp Pro Ile Ala Asp Met Ile Asp Gln Thr Val Asn Asn Gln Val
1 5 10 15
Asn Arg Ser Leu Thr Ala Leu Gln Val Leu Pro Thr Ala Ala Asn Thr
20 25 30
Glu Ala Ser Ser His Arg Leu Gly Thr Gly Val Val Pro Ala Leu Gln
35 40 45
Ala Ala Glu Thr Gly Ala Ser Ser Asn Ala Ser Asp Lys Asn Leu Ile
50 55 60
Glu Thr Arg Cys Val Leu Asn His His Ser Thr Gln Glu Thr Ala Ile
65 70 75 80
Gly Asn Phe Phe Ser Arg Ala Gly Leu Val Ser Ile Ile Thr Met Pro
85 90 95
Thr Ala Gly Thr Gln Asn Thr Asp Gly Tyr Val Asn Trp Asp Ile Asp
100 105 110
Leu Met Gly Tyr Ala Gln Leu Arg Arg Lys Cys Glu Leu Phe Thr Tyr
115 120 125
Met Arg Phe Asp Ala Glu Phe Thr Phe Val Val Ala Lys Pro Asn Gly
130 135 140
Glu Leu Val Pro Gln Leu Leu Gln Tyr Met Tyr Val Pro Pro Gly Ala
145 150 155 160
Pro Lys Pro Thr Ser Arg Asp Ser Phe Ala Trp Gln Thr Ala Thr Asn
165 170 175
Pro Ser Val Phe Val Lys Met Thr Asp Pro Pro Ala Gln Val Ser Val
180 185 190
Pro Phe Met Ser Pro Ala Ser Ala Tyr Gln Trp Phe Tyr Asp Gly Tyr
195 200 205
Pro Thr Phe Gly Glu His Leu Gln Ala Asn Asp Leu Asp Tyr Gly Gln
210 215 220
Cys Pro Asn Asn Met Met Gly Thr Phe Ser Ile Arg Thr Val Gly Thr
225 230 235 240
Glu Lys Ser Pro His Ser Ile Thr Leu Arg Val Tyr Met Arg Ile Lys
245 250 255
His Val Arg Ala Trp Ile Pro Arg Pro Leu Arg Asn Gln Pro Tyr Leu
260 265 270

Phe Lys Thr Asn Pro Asn Tyr Lys Gly Asn Asp Ile Lys Cys Thr Ser
275 280 285
Thr Ser Arg Asp Lys Ile Thr Thr Leu
290 295

<210> 36
<211> 297
<212> PRT
<213> 柯沙奇病毒A16

<400> 36
Gly Asp Pro Ile Ala Asp Met Ile Asp Gln Thr Val Asn Asn Gln Val
1 5 10 15
Asn Arg Ser Leu Thr Ala Leu Gln Val Leu Pro Thr Ala Ala Asn Thr
20 25 30
Glu Ala Ser Ser His Arg Leu Gly Thr Gly Val Val Pro Ala Leu Gln
35 40 45
Ala Ala Glu Thr Gly Ala Ser Ser Asn Ala Ser Asp Lys Asn Leu Ile
50 55 60
Glu Thr Arg Cys Val Leu Asn His His Ser Thr Gln Glu Thr Ala Ile
65 70 75 80
Gly Asn Phe Phe Ser Arg Ala Gly Leu Val Ser Ile Ile Thr Met Pro
85 90 95
Thr Thr Gly Thr Gln Asn Thr Asp Gly Tyr Val Asn Trp Asp Ile Asp
100 105 110
Leu Met Gly Tyr Ala Gln Leu Arg Arg Lys Cys Glu Leu Phe Thr Tyr
115 120 125
Met Arg Phe Asp Ala Glu Phe Thr Phe Val Val Ala Lys Pro Asn Gly
130 135 140
Glu Leu Val Pro Gln Leu Leu Gln Tyr Met Tyr Val Pro Pro Gly Ala
145 150 155 160
Pro Lys Pro Thr Ser Arg Asp Ser Phe Ala Trp Gln Thr Ala Thr Asn
165 170 175
Pro Ser Val Phe Val Lys Met Thr Asp Pro Pro Ala Gln Val Ser Val
180 185 190
Pro Phe Met Ser Pro Ala Ser Ala Tyr Gln Trp Phe Tyr Asp Gly Tyr
195 200 205
Pro Thr Phe Gly Glu His Leu Gln Ala Asn Asp Leu Asp Tyr Gly Gln
210 215 220
Cys Pro Asn Asn Met Met Gly Thr Phe Ser Ile Arg Thr Val Gly Thr
225 230 235 240
Glu Lys Ser Pro His Ser Ile Thr Leu Arg Val Tyr Met Arg Ile Lys
245 250 255
His Val Arg Ala Trp Ile Pro Arg Pro Leu Arg Asn Gln Pro Tyr Leu
260 265 270
Phe Lys Thr Asn Pro Asn Tyr Lys Gly Asn Asp Ile Lys Cys Thr Ser
275 280 285
Thr Ser Arg Asp Lys Ile Thr Thr Leu
290 295

<210> 37
<211> 297
<212> PRT

<213> 柯沙奇病毒A16

<400> 37
Gly Asp Pro Ile Ala Asp Met Ile Asp Gln Thr Val Asn Asn Gln Val
1 5 10 15
Asn Arg Ser Leu Thr Ala Leu Gln Val Leu Pro Thr Ala Ala Asn Thr
20 25 30
Glu Ala Ser Ser His Arg Leu Gly Thr Gly Val Val Pro Ala Leu Gln
35 40 45
Ala Ala Glu Thr Gly Ala Ser Ser Asn Ala Ser Asp Lys Asn Leu Ile
50 55 60
Glu Thr Arg Cys Val Leu Asn His His Ser Thr Gln Glu Thr Ala Ile
65 70 75 80
Gly Asn Phe Phe Ser Arg Ala Gly Leu Val Ser Ile Ile Thr Met Pro
85 90 95
Thr Thr Gly Thr Gln Asn Thr Asp Gly Tyr Val Asn Trp Asp Ile Asp
100 105 110
Leu Met Gly Tyr Ala Gln Leu Arg Arg Lys Cys Glu Leu Phe Thr Tyr
115 120 125
Met Arg Phe Asp Ala Glu Phe Thr Phe Val Val Ala Lys Pro Asn Gly
130 135 140
Glu Leu Val Pro Gln Leu Leu Gln Tyr Met Tyr Val Pro Pro Gly Ala
145 150 155 160
Pro Lys Pro Thr Ser Arg Asp Ser Phe Ala Trp Gln Thr Ala Thr Asn
165 170 175
Pro Ser Val Phe Val Lys Met Thr Asp Pro Pro Ala Gln Val Ser Val
180 185 190
Pro Phe Met Ser Pro Ala Ser Ala Tyr Gln Trp Phe Tyr Asp Gly Tyr
195 200 205
Pro Thr Phe Gly Glu His Leu Gln Ala Asn Asp Leu Asp Tyr Gly Gln
210 215 220
Cys Pro Asn Asn Met Met Gly Thr Phe Ser Ile Arg Thr Val Gly Thr
225 230 235 240
Glu Lys Ser Pro His Ser Ile Thr Leu Arg Val Tyr Met Arg Ile Lys
245 250 255
His Val Arg Ala Trp Ile Pro Arg Pro Leu Arg Asn Gln Pro Tyr Leu
260 265 270
Phe Lys Thr Asn Pro Asn Tyr Lys Gly Asn Asp Ile Lys Cys Thr Ser
275 280 285
Thr Ser Arg Asp Lys Ile Thr Thr Leu
290 295

<210> 38
<211> 297
<212> PRT
<213> 柯沙奇病毒A16

<400> 38
Gly Asp Pro Ile Ala Asp Met Ile Asp Gln Thr Val Asn Asn Gln Val
1 5 10 15
Asn Arg Ser Leu Thr Ala Leu Gln Val Leu Pro Thr Ala Ala Asn Thr
20 25 30
Glu Ala Ser Ser His Arg Leu Gly Thr Gly Val Val Pro Ala Leu Gln
35 40 45

Ala Ala Glu Thr Gly Ala Ser Ser Asn Ala Ser Asp Lys Asn Leu Ile
50 55 60
Glu Thr Arg Cys Val Leu Asn His His Ser Thr Gln Glu Thr Ala Ile
65 70 75 80
Gly Asn Phe Phe Ser Arg Ala Gly Leu Val Ser Ile Ile Thr Met Pro
85 90 95
Thr Thr Gly Thr Gln Asn Thr Asp Gly Tyr Val Asn Trp Asp Ile Asp
100 105 110
Leu Met Gly Tyr Ala Gln Leu Arg Arg Lys Cys Glu Leu Phe Thr Tyr
115 120 125
Met Arg Phe Asp Ala Glu Phe Thr Phe Val Val Ala Lys Pro Asn Gly
130 135 140
Glu Leu Val Pro Gln Leu Leu Gln Tyr Met Tyr Val Pro Pro Gly Ala
145 150 155 160
Pro Lys Pro Thr Ser Arg Asp Ser Phe Ala Trp Gln Thr Ala Thr Asn
165 170 175
Pro Ser Val Phe Val Lys Met Thr Asp Pro Pro Ala Gln Val Ser Val
180 185 190
Pro Phe Met Ser Pro Ala Ser Ala Tyr Gln Trp Phe Tyr Asp Gly Tyr
195 200 205
Pro Thr Phe Gly Glu His Leu Gln Ala Asn Asp Leu Asp Tyr Gly Gln
210 215 220
Cys Pro Asn Asn Met Met Gly Thr Phe Ser Ile Arg Thr Val Gly Thr
225 230 235 240
Glu Lys Ser Pro His Ser Ile Thr Leu Arg Val Tyr Met Arg Ile Lys
245 250 255
His Val Arg Ala Trp Ile Pro Arg Pro Leu Arg Asn Gln Pro Tyr Leu
260 265 270
Phe Lys Thr Asn Pro Asn Tyr Lys Gly Asn Asp Ile Lys Cys Thr Ser
275 280 285
Thr Ser Arg Asp Lys Ile Thr Thr Leu
290 295

<210> 39
<211> 297
<212> PRT
<213> 柯沙奇病毒A16

<400> 39
Gly Asp Pro Ile Ala Asp Met Ile Asp Gln Thr Val Asn Asn Gln Val
1 5 10 15
Asn Arg Ser Leu Thr Ala Leu Gln Val Leu Pro Thr Ala Ala Asn Thr
20 25 30
Glu Ala Ser Ser His Arg Leu Gly Thr Gly Val Val Pro Ala Leu Gln
35 40 45
Ala Ala Glu Thr Gly Ala Ser Ser Asn Ala Ser Asp Lys Asn Leu Ile
50 55 60
Glu Thr Arg Cys Val Leu Asn His His Ser Thr Gln Glu Thr Ala Ile
65 70 75 80
Gly Asn Phe Phe Ser Arg Ala Gly Leu Val Ser Ile Ile Thr Met Pro
85 90 95
Thr Thr Gly Thr Gln Asn Thr Asp Gly Tyr Val Asn Trp Asp Ile Asp
100 105 110
Leu Met Gly Tyr Ala Gln Leu Arg Arg Lys Cys Glu Leu Phe Thr Tyr

```
        115                 120                 125
Met Arg Phe Asp Ala Glu Phe Thr Phe Val Val Ala Lys Pro Asn Gly
    130                 135                 140
Glu Leu Val Pro Gln Leu Leu Gln Tyr Met Tyr Val Pro Pro Gly Ala
145                 150                 155                 160
Pro Lys Pro Thr Ser Arg Asp Ser Phe Ala Trp Gln Thr Ala Thr Asn
                165                 170                 175
Pro Ser Val Phe Val Lys Met Thr Asp Pro Pro Ala Gln Val Ser Val
            180                 185                 190
Pro Phe Met Ser Pro Ala Ser Ala Tyr Gln Trp Phe Tyr Asp Gly Tyr
        195                 200                 205
Pro Thr Phe Gly Glu His Leu Gln Ala Asn Asp Leu Asp Tyr Gly Gln
    210                 215                 220
Cys Pro Asn Asn Met Met Gly Thr Phe Ser Ile Arg Thr Val Gly Thr
225                 230                 235                 240
Glu Lys Ser Pro His Ser Ile Thr Leu Arg Val Tyr Met Arg Ile Lys
                245                 250                 255
His Val Arg Ala Trp Ile Pro Arg Pro Leu Arg Asn Gln Pro Tyr Leu
            260                 265                 270
Phe Lys Thr Asn Pro Asn Tyr Lys Gly Asn Asp Ile Lys Cys Thr Ser
        275                 280                 285
Thr Ser Arg Asp Lys Ile Thr Thr Leu
    290                 295
```

<210> 40
<211> 297
<212> PRT
<213> 柯沙奇病毒A16

<400> 40

```
Gly Asp Pro Ile Ala Asp Met Ile Asp Gln Thr Val Asn Asn Gln Val
 1               5                  10                  15
Asn Arg Ser Leu Thr Ala Leu Gln Val Leu Pro Thr Ala Ala Asn Thr
            20                  25                  30
Glu Ala Ser Ser His Arg Leu Gly Thr Gly Val Val Pro Ala Leu Gln
        35                  40                  45
Ala Ala Glu Thr Gly Ala Ser Ser Asn Ala Ser Asp Lys Asn Leu Ile
    50                  55                  60
Glu Thr Arg Cys Val Leu Asn His His Ser Thr Gln Glu Thr Ala Ile
65                  70                  75                  80
Gly Asn Phe Phe Ser Arg Ala Gly Leu Val Ser Ile Ile Thr Met Pro
                85                  90                  95
Thr Thr Gly Thr Gln Asn Thr Asp Gly Tyr Val Asn Trp Asp Ile Asp
            100                 105                 110
Leu Met Gly Tyr Ala Gln Leu Arg Arg Lys Cys Glu Leu Phe Thr Tyr
        115                 120                 125
Met Arg Phe Asp Ala Glu Phe Thr Phe Val Val Ala Lys Pro Asn Gly
    130                 135                 140
Glu Leu Val Pro Gln Leu Leu Gln Tyr Met Tyr Val Pro Pro Gly Ala
145                 150                 155                 160
Pro Lys Pro Thr Ser Arg Asp Ser Phe Ala Trp Gln Thr Ala Thr Asn
                165                 170                 175
Pro Ser Val Phe Val Lys Met Thr Asp Pro Pro Ala Gln Val Ser Val
            180                 185                 190
```

Pro Phe Met Ser Pro Ala Ser Ala Tyr Gln Trp Phe Tyr Asp Gly Tyr
195 200 205
Pro Thr Phe Gly Glu His Leu Gln Ala Asn Asp Leu Asp Tyr Gly Gln
210 215 220
Cys Pro Asn Asn Met Met Gly Thr Phe Ser Ile Arg Thr Val Gly Thr
225 230 235 240
Glu Lys Ser Pro His Ser Ile Thr Leu Arg Val Tyr Met Arg Ile Lys
245 250 255
His Val Arg Ala Trp Ile Pro Arg Pro Leu Arg Asn Gln Pro Tyr Leu
260 265 270
Phe Lys Thr Asn Pro Asn Tyr Lys Gly Asn Asp Ile Lys Cys Thr Ser
275 280 285
Thr Ser Arg Asp Lys Ile Thr Thr Leu
290 295

<210> 41
<211> 297
<212> PRT
<213> 柯沙奇病毒A16

<400> 41
Gly Asp Pro Ile Ala Asp Met Ile Asp Gln Thr Val Asn Asn Gln Val
1 5 10 15
Asn Arg Ser Leu Thr Ala Leu Gln Val Leu Pro Thr Ala Ala Asn Thr
20 25 30
Glu Ala Ser Ser His Arg Leu Gly Thr Gly Val Val Pro Ala Leu Gln
35 40 45
Ala Ala Glu Thr Gly Ala Ser Ser Asn Ala Ser Asp Lys Asn Leu Ile
50 55 60
Glu Thr Arg Cys Val Leu Asn His His Ser Thr Gln Glu Thr Ala Ile
65 70 75 80
Gly Asn Phe Phe Ser Arg Ala Gly Leu Val Ser Ile Ile Thr Met Pro
85 90 95
Thr Thr Gly Thr Gln Asn Thr Asp Gly Tyr Val Asn Trp Asp Ile Asp
100 105 110
Leu Met Gly Tyr Ala Gln Leu Arg Arg Lys Cys Glu Leu Phe Thr Tyr
115 120 125
Met Arg Phe Asp Ala Glu Phe Thr Phe Val Val Ala Lys Pro Asn Gly
130 135 140
Glu Leu Val Pro Gln Leu Leu Gln Tyr Met Tyr Val Pro Pro Gly Ala
145 150 155 160
Pro Lys Pro Thr Ser Arg Asp Ser Phe Ala Trp Gln Thr Ala Thr Asn
165 170 175
Pro Ser Val Phe Val Lys Met Thr Asp Pro Pro Ala Gln Val Ser Val
180 185 190
Pro Phe Met Ser Pro Ala Ser Ala Tyr Gln Trp Phe Tyr Asp Gly Tyr
195 200 205
Pro Thr Phe Gly Glu His Leu Gln Ala Asn Asp Leu Asp Tyr Gly Gln
210 215 220
Cys Pro Asn Asn Met Met Gly Thr Phe Ser Ile Arg Thr Val Gly Thr
225 230 235 240
Glu Lys Ser Pro His Ser Ile Thr Leu Arg Val Tyr Met Arg Ile Lys
245 250 255
His Val Arg Ala Trp Ile Pro Arg Pro Leu Arg Asn Gln Pro Tyr Leu

```
            260                 265                 270
Phe Lys Thr Asn Pro Asn Tyr Lys Gly Asn Asp Ile Lys Cys Thr Ser
        275                 280                 285
Thr Ser Arg Asp Lys Ile Thr Thr Leu
    290                 295
```

<210> 42
<211> 297
<212> PRT
<213> 柯沙奇病毒A16

<400> 42

```
Gly Asp Pro Ile Ala Asp Met Ile Asp Gln Thr Val Asn Asn Gln Val
 1               5                  10                  15
Asn Arg Ser Leu Thr Ala Leu Gln Val Leu Pro Thr Ala Ala Asn Thr
            20                  25                  30
Glu Ala Ser Ser His Arg Leu Gly Thr Gly Val Val Pro Ala Leu Gln
        35                  40                  45
Ala Ala Glu Thr Gly Ala Ser Ser Asn Ala Ser Asp Lys Asn Leu Ile
    50                  55                  60
Glu Thr Arg Cys Val Leu Asn His His Ser Thr Gln Glu Thr Ala Ile
65                  70                  75                  80
Gly Asn Phe Phe Ser Arg Ala Gly Leu Val Ser Ile Ile Thr Met Pro
                85                  90                  95
Thr Thr Gly Thr Gln Asn Thr Asp Gly Tyr Val Asn Trp Asp Ile Asp
            100                 105                 110
Leu Met Gly Tyr Ala Gln Leu Arg Arg Lys Cys Glu Leu Phe Thr Tyr
        115                 120                 125
Met Arg Phe Asp Ala Glu Phe Thr Phe Val Val Ala Lys Pro Asn Gly
    130                 135                 140
Glu Leu Val Pro Gln Leu Leu Gln Tyr Met Tyr Val Pro Pro Gly Ala
145                 150                 155                 160
Pro Lys Pro Thr Ser Arg Asp Ser Phe Ala Trp Gln Thr Ala Thr Asn
                165                 170                 175
Pro Ser Val Phe Val Lys Met Thr Asp Pro Pro Ala Gln Val Ser Val
            180                 185                 190
Pro Phe Met Ser Pro Ala Ser Ala Tyr Gln Trp Phe Tyr Asp Gly Tyr
        195                 200                 205
Pro Thr Phe Gly Glu His Leu Gln Ala Asn Asp Leu Asp Tyr Gly Gln
    210                 215                 220
Cys Pro Asn Asn Met Met Gly Thr Phe Ser Ile Arg Thr Val Gly Thr
225                 230                 235                 240
Glu Lys Ser Pro His Ser Ile Thr Leu Arg Val Tyr Met Arg Ile Lys
                245                 250                 255
His Val Arg Ala Trp Ile Pro Arg Pro Leu Arg Asn Gln Pro Tyr Leu
            260                 265                 270
Phe Lys Thr Asn Pro Asn Tyr Lys Gly Asn Asp Ile Lys Cys Thr Ser
        275                 280                 285
Thr Ser Arg Asp Lys Ile Thr Thr Leu
    290                 295
```

<210> 43
<211> 297

<212> PRT
<213> 柯沙奇病毒A16

<400> 43
Gly Asp Pro Ile Ala Asp Met Ile Asp Gln Thr Val Ser Asn Gln Val
1 5 10 15
Asn Arg Ser Leu Thr Ala Leu Gln Val Leu Pro Thr Ala Ala Asn Thr
20 25 30
Glu Ala Ser Ser His Arg Leu Gly Thr Gly Val Val Pro Ala Leu Gln
35 40 45
Ala Ala Glu Thr Gly Ala Ser Ser Asn Ala Ser Asp Lys Asn Leu Ile
50 55 60
Glu Thr Arg Cys Val Leu Asn His His Ser Thr Gln Glu Thr Ala Ile
65 70 75 80
Gly Asn Phe Phe Ser Arg Ala Gly Leu Val Ser Ile Ile Thr Met Pro
85 90 95
Thr Thr Gly Thr Gln Asn Thr Asp Gly Tyr Val Asn Trp Asp Ile Asp
100 105 110
Leu Met Gly Tyr Ala Gln Leu Arg Arg Lys Cys Glu Leu Phe Thr Tyr
115 120 125
Met Arg Phe Asp Ala Glu Phe Thr Phe Val Val Ala Lys Pro Asn Gly
130 135 140
Glu Leu Val Pro Gln Leu Leu Gln Tyr Met Tyr Val Pro Pro Gly Ala
145 150 155 160
Pro Lys Pro Thr Ser Arg Asp Ser Phe Ala Trp Gln Thr Ala Thr Asn
165 170 175
Pro Ser Val Phe Val Lys Met Thr Asp Pro Pro Ala Gln Val Ser Val
180 185 190
Pro Phe Met Ser Pro Ala Ser Ala Tyr Gln Trp Phe Tyr Asp Gly Tyr
195 200 205
Pro Thr Phe Gly Glu His Leu Gln Ala Asn Asp Leu Asp Tyr Gly Gln
210 215 220
Cys Pro Asn Asn Met Met Gly Thr Phe Ser Ile Arg Thr Val Gly Thr
225 230 235 240
Glu Lys Ser Pro His Ser Ile Thr Leu Arg Val Tyr Met Arg Ile Lys
245 250 255
His Val Arg Ala Trp Ile Pro Arg Pro Leu Arg Asn Gln Pro Tyr Leu
260 265 270
Phe Lys Thr Asn Pro Asn Tyr Lys Gly Asn Asp Ile Lys Cys Thr Ser
275 280 285
Thr Ser Arg Asp Lys Ile Thr Thr Leu
290 295

<210> 44
<211> 297
<212> PRT
<213> 柯沙奇病毒A16

<400> 44
Gly Asp Pro Ile Ala Asp Met Ile Asp Gln Thr Val Asn Asn Gln Val
1 5 10 15
Asn Arg Ser Leu Thr Ala Leu Gln Val Leu Pro Thr Ala Ala Asn Thr
20 25 30
Glu Ala Ser Ser His Arg Leu Gly Thr Gly Val Val Pro Ala Leu Gln

```
          35                  40                  45
Ala Ala Glu Thr Gly Ala Ser Ser Asn Ala Ser Asp Lys Asn Leu Ile
    50                  55                  60
Glu Thr Arg Cys Val Leu Asn His His Ser Thr Gln Glu Thr Ala Ile
65                  70                  75                  80
Gly Asn Phe Phe Ser Arg Ala Gly Leu Val Ser Ile Ile Thr Met Pro
                85                  90                  95
Thr Thr Gly Thr Gln Asn Thr Asp Gly Tyr Val Asn Trp Asp Ile Asp
            100                 105                 110
Leu Met Gly Tyr Ala Gln Leu Arg Arg Lys Cys Glu Leu Phe Thr Tyr
        115                 120                 125
Met Arg Phe Asp Ala Glu Phe Thr Phe Val Val Ala Lys Pro Asn Gly
    130                 135                 140
Glu Leu Val Pro Gln Leu Leu Gln Tyr Met Tyr Val Pro Pro Gly Ala
145                 150                 155                 160
Pro Lys Pro Thr Ser Arg Asp Ser Phe Ala Trp Gln Thr Ala Thr Asn
                165                 170                 175
Pro Ser Val Phe Val Lys Met Thr Asp Pro Pro Ala Gln Val Ser Val
            180                 185                 190
Pro Phe Met Ser Pro Ala Ser Ala Tyr Gln Trp Phe Tyr Asp Gly Tyr
        195                 200                 205
Pro Thr Phe Gly Glu His Leu Gln Ala Asn Asp Leu Asp Tyr Gly Gln
    210                 215                 220
Cys Pro Asn Asn Met Met Gly Thr Phe Ser Ile Arg Thr Val Gly Thr
225                 230                 235                 240
Glu Lys Ser Pro His Ser Ile Thr Leu Arg Val Tyr Met Arg Ile Lys
                245                 250                 255
His Val Arg Ala Trp Ile Pro Arg Pro Leu Arg Asn Gln Pro Tyr Leu
            260                 265                 270
Phe Lys Thr Asn Pro Asn Tyr Lys Gly Asn Asp Ile Lys Cys Thr Ser
        275                 280                 285
Thr Ser Arg Asp Lys Ile Thr Thr Leu
    290                 295
```

申請專利範圍

1. 一種手、足及口免疫原性組合物，其包含一或多種來自不活化腸病毒71 (EV71)的抗原，其中該一或多種抗原包含EV71之VP1多肽，其中該VP1多肽包含四個突變，該等突變包含：

(i)當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 1比對時，於SEQ ID NO: 1之位置7或與SEQ ID NO: 1之位置7對應之位置為纈胺酸經甲硫胺酸取代；

(ii)當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 1比對時，於SEQ ID NO: 1之位置14或與SEQ ID NO: 1之位置14對應之位置為天冬胺酸經天冬醯胺酸取代；

(iii)當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 1比對時，於SEQ ID NO: 1之位置145或與SEQ ID NO: 1之位置145對應之位置為麩胺酸經麩醯胺酸取代；及

(iv)當使用成對比對演算法與SEQ ID NO: 1比對時，與SEQ ID NO: 1之位置282對應之位置為天冬醯胺酸經天冬胺酸取代。

2. 如請求項1之免疫原性組合物，其中EV71在化學上用以下一或多者不活化：

a. β-丙內酯(BPL)；

b.福馬林(formalin)；

c. BPL與福馬林之組合；或

d.二元伸乙基亞胺(BEI)。

3. 如請求項2之免疫原性組合物，其中該藉由BPL不活化的病毒包含一或多個修飾，其中：

a.該一或多個修飾包含經修飾之核酸，其中該經修飾之核酸為烷基化核酸；及/或

b.該一或多個修飾包含經修飾之多肽，其中該經修飾之多肽包含經修飾之胺基酸殘基，該等胺基酸殘基包含半胱胺酸、甲硫胺酸、組胺酸、天冬胺酸、麩胺酸、酪胺酸、離胺酸、絲胺酸及蘇胺酸中之一或多者。

4. 如請求項2之免疫原性組合物，其中該藉由福馬林不活化的病毒包含一或多個修飾，其中該一或多個修飾包含交聯多肽。

5. 如請求項4之免疫原性組合物，其中該免疫原性組合物進一步包含福馬林。

6. 如請求項2之免疫原性組合物，其中該藉由BEI不活化的病毒包含一或多個修飾，其中該一或多個修飾包含經修飾之核酸，其中該經修飾之核酸為烷基化核酸。

7. 如請求項6之免疫原性組合物，其中任何未反應之BEI係使用硫代硫酸鈉水解。

8. 如請求項2之免疫原性組合物，其中該免疫原性組合物進一步包含：

a.有效濃度之清潔劑，其中該清潔劑包含聚山梨醇酯[80]；及/或

b.佐劑，其中該佐劑係選自由以下組成之群：鋁鹽、鐸(toll)樣受體(TLR)促效劑、單磷醯基脂質A (MLA)、合成脂質A、脂質A模擬物或類似物、MLA衍生物、細胞激素、皂素、胞壁醯二肽(MDP)衍生物、CpG寡核苷酸(oligos)、革蘭氏陰性細菌(gram-negative bacteria)之脂多醣(LPS)、聚膦氮烯、乳液、病毒顆粒(virosomes)、脂質捲(cochleates)、聚(丙交酯-共-乙交酯) (PLG)微粒、泊洛沙姆顆粒(poloxamer particles)、微粒、脂質體、完全弗氏佐劑(Complete Freund's Adjuvant，CFA)，及不完全弗氏佐劑(IFA)。

9. 如請求項8之免疫原性組合物，其中該免疫原性組合物進一步包含鋁鹽佐劑，其中至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%之該抗原吸附至該鋁鹽佐劑。

10. 如請求項9之免疫原性組合物，其中該鋁鹽佐劑係選自明礬、磷酸鋁、氫氧化鋁、硫酸鉀鋁及Alhydrogel 85。

11. 如請求項2之免疫原性組合物，其中該一或多種抗原係由在無血清培養基中培養非人類細胞產生。

12. 如請求項11之免疫原性組合物，其中該非人類細胞為Vero細胞株。

13. 如請求項2之免疫原性組合物，其中該該VP1多肽包含SEQ ID NO: 1之胺基酸序列，其具：

(i)在位置7為纈胺酸經甲硫胺酸取代；

(ii)在位置14為天冬胺酸經天冬醯胺酸取代；

(iii)在位置145為麩胺酸經麩醯胺酸取代；及

(iv)在位置282為天冬醯胺酸經天冬胺酸取代。

14. 如請求項1至13中任一項之免疫原性組合物，其中該免疫原性組合物為疫苗，且其中該疫苗為經純化之抗原疫苗、次單位疫苗或不活化完整病毒疫苗。

15. 一種製備手、足及口疫苗的方法，其包含：

(a)將如請求項1至13中任一項之免疫原性組合物與鋁鹽佐劑混合；及

(b)將該混合物在適合條件下培育約16小時至約24小時範圍內之時間段，

其中至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%之該抗原吸附至該鋁鹽佐劑。

16. 如請求項15之方法，其中該混合物係在約2℃至約8℃範圍內的溫度培育。

圖式

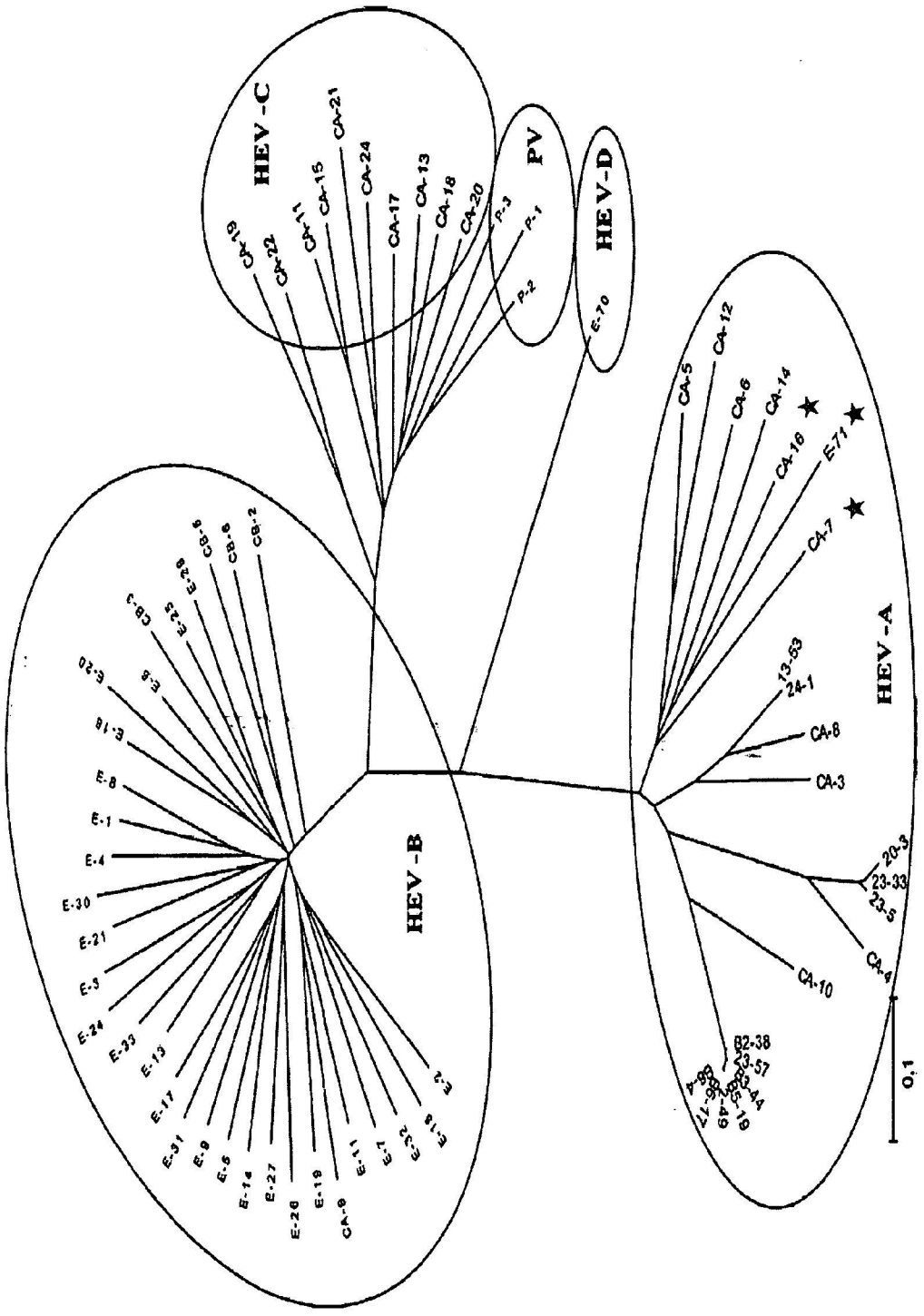

HEV-C
CA-19
CA-22
CA-11
CA-15
CA-21
CA-24
CA-17
CA-13
CA-18
CA-20
PV
P-3
P-1
P-2
HEV-D
E-70
HEV-A
CA-5
CA-12
CA-6
CA-14
CA-16
E-71
CA-7
13-53
24-1
CA-8
CA-3
20-3
23-33
23-5
CA-4
CA-10
B2-38
B3-57
HEV-B
CB-2
CB-6
CB-5
E-25
E-28
CB-3
E-6
E-20
B1-3
E-8
E-1
E-4
E-30
E-21
E-9
E-24
E-33
E-13
E-17
E-31
E-9
E-5
E-14
E-27
E-26
E-19
CA-9
E-11
E-7
E-2
E-18
0.1

圖1

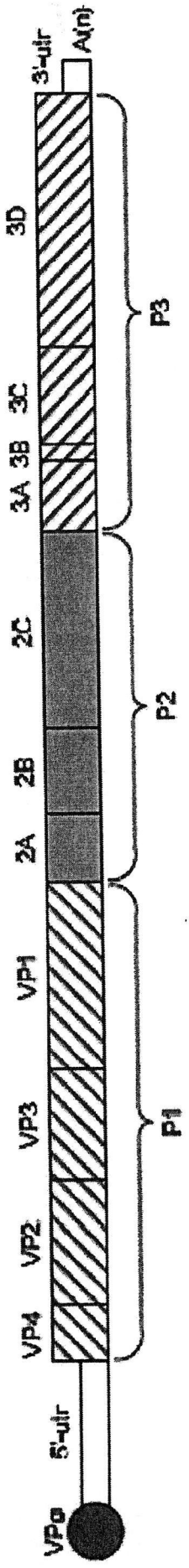


圖2

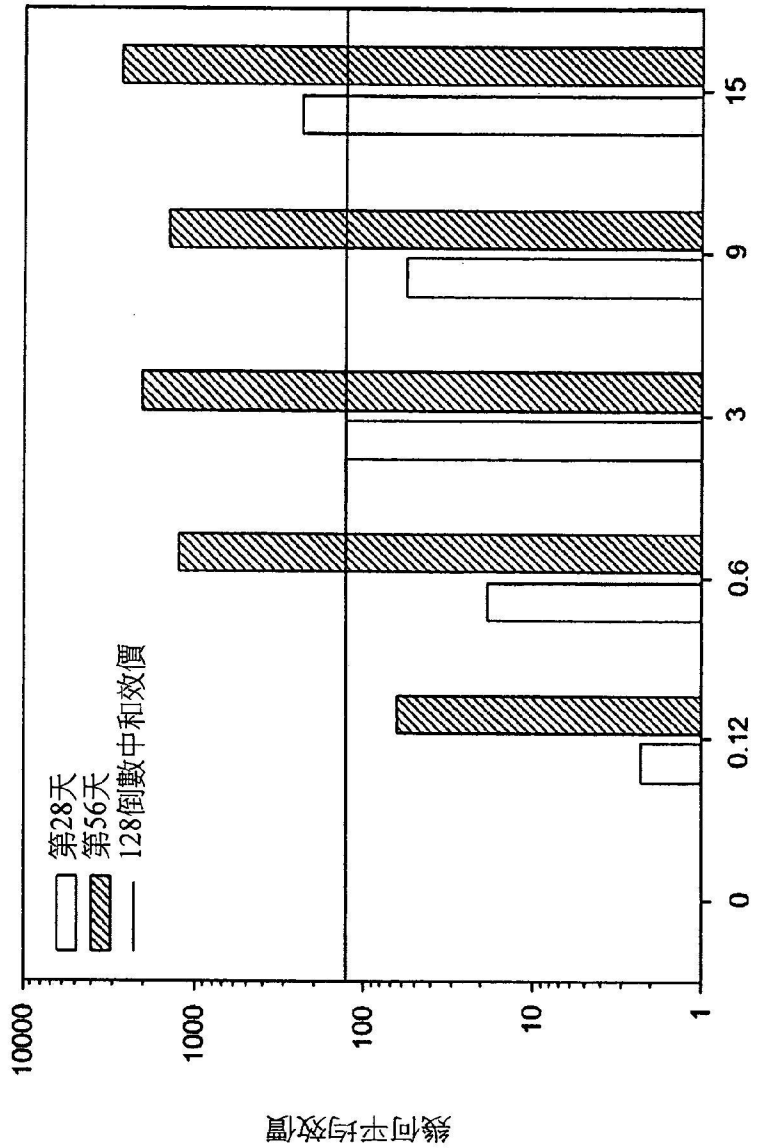

幾何平均效價
10000
1000
100
10
1
第28天
第56天
128倒數中和效價
0
0.12
0.6
3
9
15
劑量(μg)

圖3

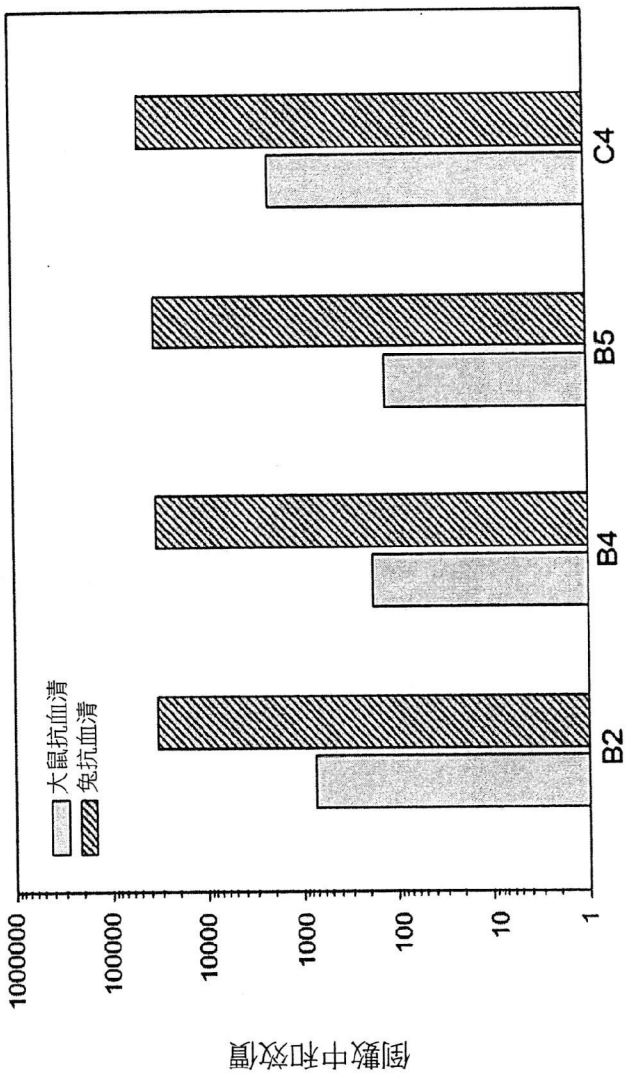

大鼠抗血清
兔抗血清
1000000
100000
10000
1000
100
10
1
B2
B4
B5
C4
倒數中和效價
EV71子基因組

圖4

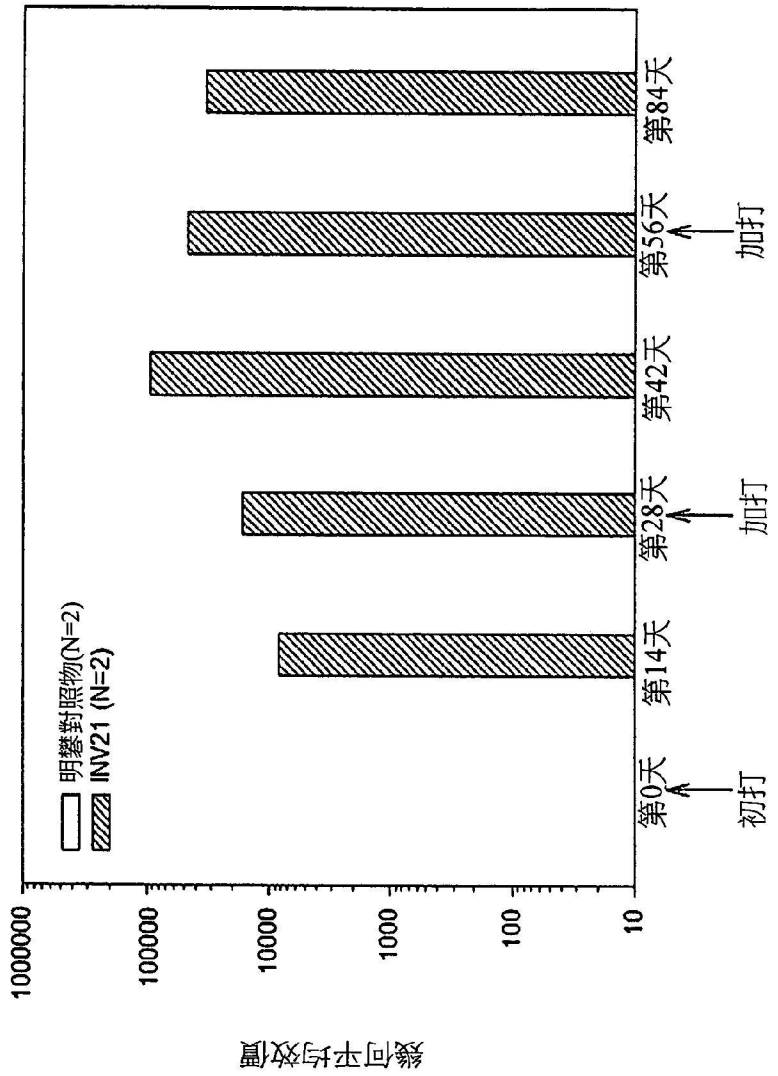

明蠻對照物(N=2)
INV21 (N=2)
1000000
100000
10000
1000
100
10
幾何平均效價
第0天
第14天
第28天
第42天
第56天
第84天
初打
加打
加打

圖5

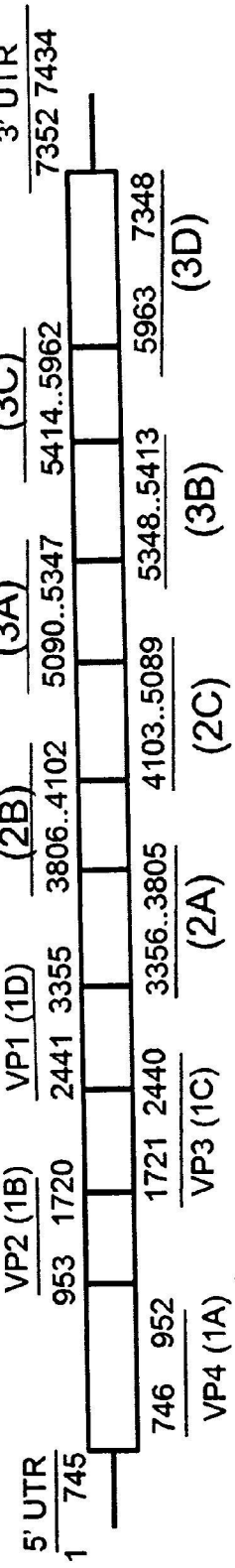

5' UTR
1 745
VP4 (1A)
746 952
VP2 (1B)
953 1720
VP3 (1C)
1721 2440
VP1 (1D)
2441 3355
(2A)
3356..3805
(2B)
3806..4102
(2C)
4103..5089
(3A)
5090..5347
(3B)
5348..5413
(3C)
5414..5962
(3D)
5963 7348
3' UTR
7352 7434
CVA6 (7434 bp)

圖6

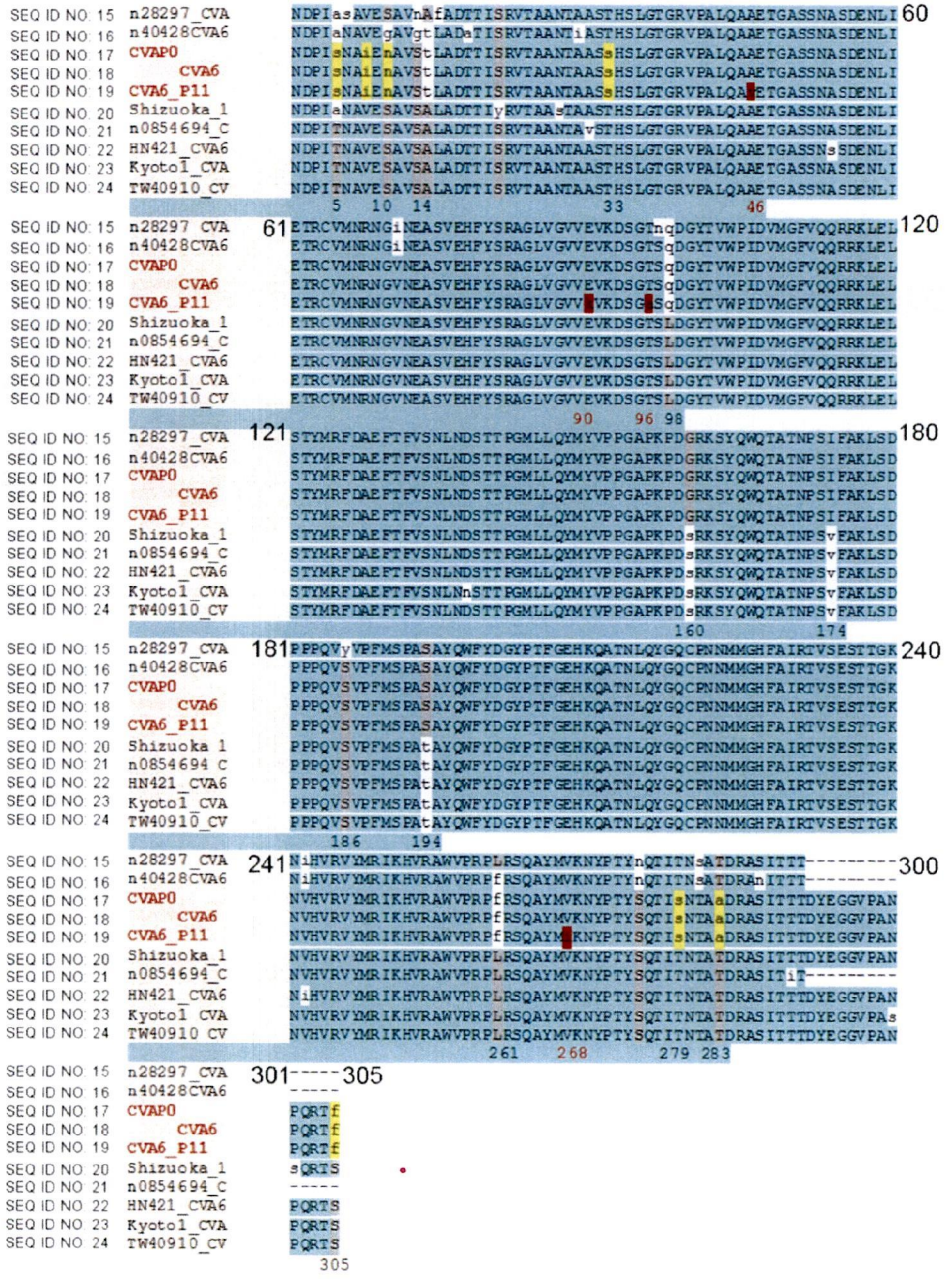
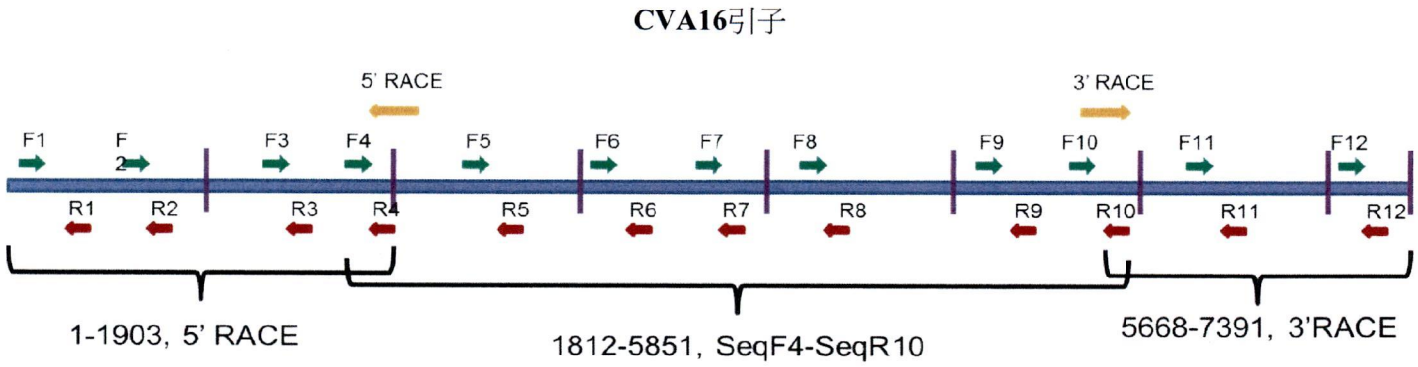


圖7

C1936DA.ipd



圖解

= CVA16序列

= 正向引子，1-12

=逆向引子，1-12

= RACE引子

= 斷裂成1 kb片段之序列

引子	片段	大小
5' RACE	1-1903	1903 bp
3' RACE	5668-7391	1724 bp
SeqF4-SeqR10	1812-5851	4040 bp

15

圖8

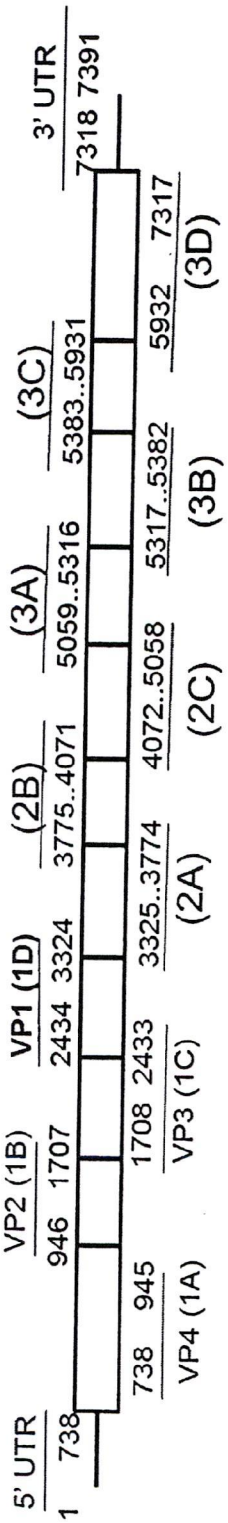

5' UTR
1 738
VP2 (1B)
946 1707
VP1 (1D)
2434 3324
(2B)
3775..4071
(3A)
5059..5316
(3C)
5383..5931
3' UTR
7318 7391
738 945
VP4 (1A)
1708 2433
VP3 (1C)
3325..3774
(2A)
4072..5058
(2C)
5317..5382
(3B)
5932 7317
(3D)
CVA16 (7391 bp)

圖9

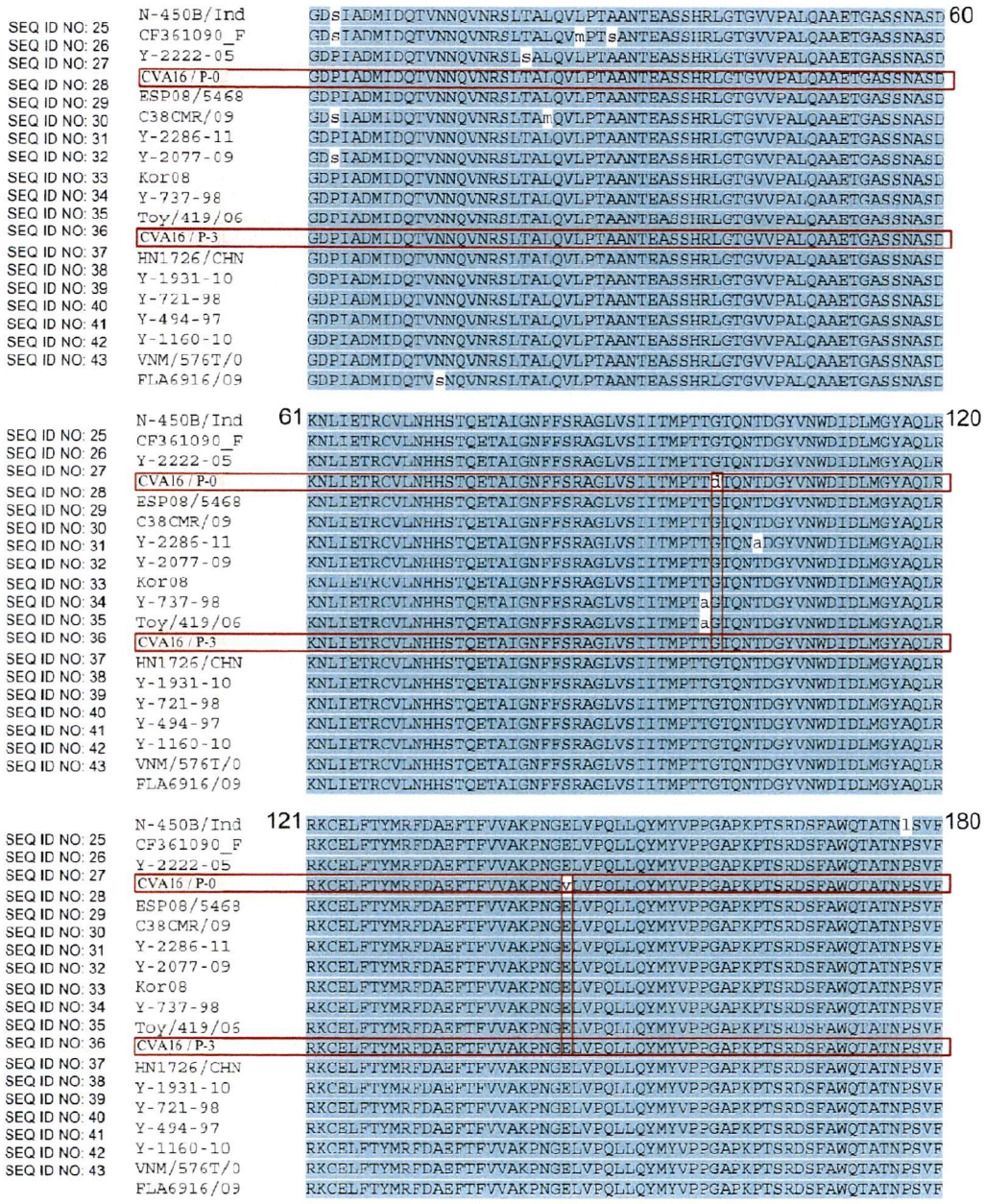

N-450B/Ind GDsIADMIDQTVNNQVNRSLTALQVLPTAANTEASSHRLGTGVVPALQAAETGASSNASD 60
SEQ ID NO: 25 CF361090_F GDsIADMIDQTVNNQVNRSLTALQVmPTsANTEASSHRLGTGVVPALQAAETGASSNASD
SEQ ID NO: 26 Y-2222-05 GDPIADMIDQTVNNQVNRSLsALQVLPTAANTEASSHRLGTGVVPALQAAETGASSNASD
SEQ ID NO: 27 CVA16/P-0 GDPIADMIDQTVNNQVNRSLTALQVLPTAANTEASSHRLGTGVVPALQAAETGASSNASD
SEQ ID NO: 28 ESP08/5468 GDPIADMIDQTVNNQVNRSLTALQVLPTAANTEASSHRLGTGVVPALQAAETGASSNASD
SEQ ID NO: 29 C38CMR/09 GDsIADMIDQTVNNQVNRSLTAmQVLPTAANTEASSHRLGTGVVPALQAAETGASSNASD
SEQ ID NO: 30 Y-2286-11 GDPIADMIDQTVNNQVNRSLTALQVLPTAANTEASSHRLGTGVVPALQAAETGASSNASD
SEQ ID NO: 31 Y-2077-09 GDsIADMIDQTVNNQVNRSLTALQVLPTAANTEASSHRLGTGVVPALQAAETGASSNASD
SEQ ID NO: 32 Kor08 GDPIADMIDQTVNNQVNRSLTALQVLPTAANTEASSHRLGTGVVPALQAAETGASSNASD
SEQ ID NO: 33 Y-737-98 GDPIADMIDQTVNNQVNRSLTALQVLPTAANTEASSHRLGTGVVPALQAAETGASSNASD
SEQ ID NO: 34 Toy/419/06 GDPIADMIDQTVNNQVNRSLTALQVLPTAANTEASSHRLGTGVVPALQAAETGASSNASD
SEQ ID NO: 35 CVA16/P-3 GDPIADMIDQTVNNQVNRSLTALQVLPTAANTEASSHRLGTGVVPALQAAETGASSNASD
SEQ ID NO: 36 HN1726/CHN GDPIADMIDQTVNNQVNRSLTALQVLPTAANTEASSHRLGTGVVPALQAAETGASSNASD
SEQ ID NO: 37 Y-1931-10 GDPIADMIDQTVNNQVNRSLTALQVLPTAANTEASSHRLGTGVVPALQAAETGASSNASD
SEQ ID NO: 38 Y-721-98 GDPIADMIDQTVNNQVNRSLTALQVLPTAANTEASSHRLGTGVVPALQAAETGASSNASD
SEQ ID NO: 39 Y-494-97 GDPIADMIDQTVNNQVNRSLTALQVLPTAANTEASSHRLGTGVVPALQAAETGASSNASD
SEQ ID NO: 40 Y-1160-10 GDPIADMIDQTVNNQVNRSLTALQVLPTAANTEASSHRLGTGVVPALQAAETGASSNASD
SEQ ID NO: 41 VNM/576T/0 GDPIADMIDQTVNNQVNRSLTALQVLPTAANTEASSHRLGTGVVPALQAAETGASSNASD
SEQ ID NO: 42 FLA6916/09 GDPIADMIDQTVsNQVNRSLTALQVLPTAANTEASSHRLGTGVVPALQAAETGASSNASD
SEQ ID NO: 43
N-450B/Ind 61 KNLIETRCVLNHHSTQETAIGNFFSRAGLVSIITMPTTGTQNTDGYVNWDIDLMGYAQLR 120
CF361090_F KNLIETRCVLNHHSTQETAIGNFFSRAGLVSIITMPTTGTQNTDGYVNWDIDLMGYAQLR
Y-2222-05 KNLIETRCVLNHHSTQETAIGNFFSRAGLVSIITMPTTGTQNTDGYVNWDIDLMGYAQLR
CVA16/P-0 KNLIETRCVLNHHSTQETAIGNFFSRAGLVSIITMPTTdTQNTDGYVNWDIDLMGYAQLR
ESP08/5468 KNLIETRCVLNHHSTQETAIGNFFSRAGLVSIITMPTTGTQNTDGYVNWDIDLMGYAQLR
C38CMR/09 KNLIETRCVLNHHSTQETAIGNFFSRAGLVSIITMPTTGTQNTDGYVNWDIDLMGYAQLR
Y-2286-11 KNLIETRCVLNHHSTQETAIGNFFSRAGLVSIITMPTTGTQNaDGYVNWDIDLMGYAQLR
Y-2077-09 KNLIETRCVLNHHSTQETAIGNFFSRAGLVSIITMPTTGTQNTDGYVNWDIDLMGYAQLR
Kor08 KNLIETRCVLNHHSTQETAIGNFFSRAGLVSIITMPTTGTQNTDGYVNWDIDLMGYAQLR
Y-737-98 KNLIETRCVLNHHSTQETAIGNFFSRAGLVSIITMPTaGTQNTDGYVNWDIDLMGYAQLR
Toy/419/06 KNLIETRCVLNHHSTQETAIGNFFSRAGLVSIITMPTaGTQNTDGYVNWDIDLMGYAQLR
CVA16/P-3 KNLIETRCVLNHHSTQETAIGNFFSRAGLVSIITMPTTGTQNTDGYVNWDIDLMGYAQLR
HN1726/CHN KNLIETRCVLNHHSTQETAIGNFFSRAGLVSIITMPTTGTQNTDGYVNWDIDLMGYAQLR
Y-1931-10 KNLIETRCVLNHHSTQETAIGNFFSRAGLVSIITMPTTGTQNTDGYVNWDIDLMGYAQLR
Y-721-98 KNLIETRCVLNHHSTQETAIGNFFSRAGLVSIITMPTTGTQNTDGYVNWDIDLMGYAQLR
Y-494-97 KNLIETRCVLNHHSTQETAIGNFFSRAGLVSIITMPTTGTQNTDGYVNWDIDLMGYAQLR
Y-1160-10 KNLIETRCVLNHHSTQETAIGNFFSRAGLVSIITMPTTGTQNTDGYVNWDIDLMGYAQLR
VNM/576T/0 KNLIETRCVLNHHSTQETAIGNFFSRAGLVSIITMPTTGTQNTDGYVNWDIDLMGYAQLR
FLA6916/09 KNLIETRCVLNHHSTQETAIGNFFSRAGLVSIITMPTTGTQNTDGYVNWDIDLMGYAQLR
N-450B/Ind 121 RKCELFTYMRFDAEFTFVVAKPNGELVPQLLQYMYVPPGAPKPTSRDSFAWQTATN1SVF 180
CF361090_F RKCELFTYMRFDAEFTFVVAKPNGELVPQLLQYMYVPPGAPKPTSRDSFAWQTATNPSVF
Y-2222-05 RKCELFTYMRFDAEFTFVVAKPNGELVPQLLQYMYVPPGAPKPTSRDSFAWQTATNPSVF
CVA16/P-0 RKCELFTYMRFDAEFTFVVAKPNGvLVPQLLQYMYVPPGAPKPTSRDSFAWQTATNPSVF
ESP08/5468 RKCELFTYMRFDAEFTFVVAKPNGELVPQLLQYMYVPPGAPKPTSRDSFAWQTATNPSVF
C38CMR/09 RKCELFTYMRFDAEFTFVVAKPNGELVPQLLQYMYVPPGAPKPTSRDSFAWQTATNPSVF
Y-2286-11 RKCELFTYMRFDAEFTFVVAKPNGELVPQLLQYMYVPPGAPKPTSRDSFAWQTATNPSVF
Y-2077-09 RKCELFTYMRFDAEFTFVVAKPNGELVPQLLQYMYVPPGAPKPTSRDSFAWQTATNPSVF
Kor08 RKCELFTYMRFDAEFTFVVAKPNGELVPQLLQYMYVPPGAPKPTSRDSFAWQTATNPSVF
Y-737-98 RKCELFTYMRFDAEFTFVVAKPNGELVPQLLQYMYVPPGAPKPTSRDSFAWQTATNPSVF
Toy/419/06 RKCELFTYMRFDAEFTFVVAKPNGELVPQLLQYMYVPPGAPKPTSRDSFAWQTATNPSVF
CVA16/P-3 RKCELFTYMRFDAEFTFVVAKPNGELVPQLLQYMYVPPGAPKPTSRDSFAWQTATNPSVF
HN1726/CHN RKCELFTYMRFDAEFTFVVAKPNGELVPQLLQYMYVPPGAPKPTSRDSFAWQTATNPSVF
Y-1931-10 RKCELFTYMRFDAEFTFVVAKPNGELVPQLLQYMYVPPGAPKPTSRDSFAWQTATNPSVF
Y-721-98 RKCELFTYMRFDAEFTFVVAKPNGELVPQLLQYMYVPPGAPKPTSRDSFAWQTATNPSVF
Y-494-97 RKCELFTYMRFDAEFTFVVAKPNGELVPQLLQYMYVPPGAPKPTSRDSFAWQTATNPSVF
Y-1160-10 RKCELFTYMRFDAEFTFVVAKPNGELVPQLLQYMYVPPGAPKPTSRDSFAWQTATNPSVF
VNM/576T/0 RKCELFTYMRFDAEFTFVVAKPNGELVPQLLQYMYVPPGAPKPTSRDSFAWQTATNPSVF
FLA6916/09 RKCELFTYMRFDAEFTFVVAKPNGELVPQLLQYMYVPPGAPKPTSRDSFAWQTATNPSVF

圖10

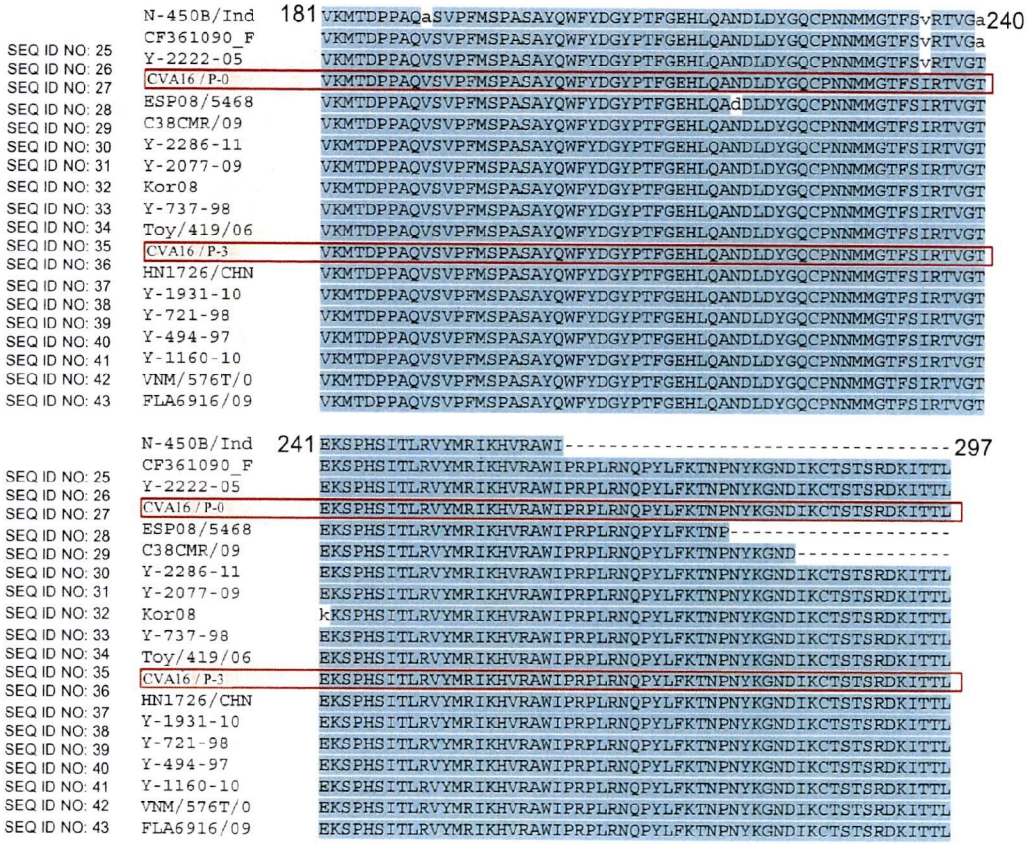

N-450B/Ind 181 VKMTDPPAQaSVPFMSPASAYQWFYDGYPTFGEHLQANDLDYGQCPNNMMGTFSvRTVGa 240
CF361090_F VKMTDPPAQVSVPFMSPASAYQWFYDGYPTFGEHLQANDLDYGQCPNNMMGTFSvRTVGa
SEQ ID NO: 25 Y-2222-05 VKMTDPPAQVSVPFMSPASAYQWFYDGYPTFGEHLQANDLDYGQCPNNMMGTFSvRTVGT
SEQ ID NO: 26 CVA16/P-0 VKMTDPPAQVSVPFMSPASAYQWFYDGYPTFGEHLQANDLDYGQCPNNMMGTFSIRTVGT
SEQ ID NO: 27 ESP08/5468 VKMTDPPAQVSVPFMSPASAYQWFYDGYPTFGEHLQAdDLDYGQCPNNMMGTFSIRTVGT
SEQ ID NO: 28 C38CMR/09 VKMTDPPAQVSVPFMSPASAYQWFYDGYPTFGEHLQANDLDYGQCPNNMMGTFSIRTVGT
SEQ ID NO: 29 Y-2286-11 VKMTDPPAQVSVPFMSPASAYQWFYDGYPTFGEHLQANDLDYGQCPNNMMGTFSIRTVGT
SEQ ID NO: 30 Y-2077-09 VKMTDPPAQVSVPFMSPASAYQWFYDGYPTFGEHLQANDLDYGQCPNNMMGTFSIRTVGT
SEQ ID NO: 31 Kor08 VKMTDPPAQVSVPFMSPASAYQWFYDGYPTFGEHLQANDLDYGQCPNNMMGTFSIRTVGT
SEQ ID NO: 32 Y-737-98 VKMTDPPAQVSVPFMSPASAYQWFYDGYPTFGEHLQANDLDYGQCPNNMMGTFSIRTVGT
SEQ ID NO: 33 Toy/419/06 VKMTDPPAQVSVPFMSPASAYQWFYDGYPTFGEHLQANDLDYGQCPNNMMGTFSIRTVGT
SEQ ID NO: 34 CVA16/P-3 VKMTDPPAQVSVPFMSPASAYQWFYDGYPTFGEHLQANDLDYGQCPNNMMGTFSIRTVGT
SEQ ID NO: 35 HN1726/CHN VKMTDPPAQVSVPFMSPASAYQWFYDGYPTFGEHLQANDLDYGQCPNNMMGTFSIRTVGT
SEQ ID NO: 36 Y-1931-10 VKMTDPPAQVSVPFMSPASAYQWFYDGYPTFGEHLQANDLDYGQCPNNMMGTFSIRTVGT
SEQ ID NO: 37 Y-721-98 VKMTDPPAQVSVPFMSPASAYQWFYDGYPTFGEHLQANDLDYGQCPNNMMGTFSIRTVGT
SEQ ID NO: 38 Y-494-97 VKMTDPPAQVSVPFMSPASAYQWFYDGYPTFGEHLQANDLDYGQCPNNMMGTFSIRTVGT
SEQ ID NO: 39 Y-1160-10 VKMTDPPAQVSVPFMSPASAYQWFYDGYPTFGEHLQANDLDYGQCPNNMMGTFSIRTVGT
SEQ ID NO: 40 VNM/576T/0 VKMTDPPAQVSVPFMSPASAYQWFYDGYPTFGEHLQANDLDYGQCPNNMMGTFSIRTVGT
SEQ ID NO: 41 FLA6916/09 VKMTDPPAQVSVPFMSPASAYQWFYDGYPTFGEHLQANDLDYGQCPNNMMGTFSIRTVGT
SEQ ID NO: 42
SEQ ID NO: 43
N-450B/Ind 241 EKSPHSITLRVYMRIKHVRAWI---------- 297
CF361090_F EKSPHSITLRVYMRIKHVRAWIPRPLRNQPYLFKTNPNYKGNDIKCTSTSRDKITTL
SEQ ID NO: 25 Y-2222-05 EKSPHSITLRVYMRIKHVRAWIPRPLRNQPYLFKTNPNYKGNDIKCTSTSRDKITTL
SEQ ID NO: 26 CVA16/P-0 EKSPHSITLRVYMRIKHVRAWIPRPLRNQPYLFKTNPNYKGNDIKCTSTSRDKITTL
SEQ ID NO: 27 ESP08/5468 EKSPHSITLRVYMRIKHVRAWIPRPLRNQPYLFKTNP----------
SEQ ID NO: 28 C38CMR/09 EKSPHSITLRVYMRIKHVRAWIPRPLRNQPYLFKTNPNYKGND----------
SEQ ID NO: 29 Y-2286-11 EKSPHSITLRVYMRIKHVRAWIPRPLRNQPYLFKTNPNYKGNDIKCTSTSRDKITTL
SEQ ID NO: 30 Y-2077-09 EKSPHSITLRVYMRIKHVRAWIPRPLRNQPYLFKTNPNYKGNDIKCTSTSRDKITTL
SEQ ID NO: 31 Kor08 kKSPHSITLRVYMRIKHVRAWIPRPLRNQPYLFKTNPNYKGNDIKCTSTSRDKITTL
SEQ ID NO: 32 Y-737-98 EKSPHSITLRVYMRIKHVRAWIPRPLRNQPYLFKTNPNYKGNDIKCTSTSRDKITTL
SEQ ID NO: 33 Toy/419/06 EKSPHSITLRVYMRIKHVRAWIPRPLRNQPYLFKTNPNYKGNDIKCTSTSRDKITTL
SEQ ID NO: 34 CVA16/P-3 EKSPHSITLRVYMRIKHVRAWIPRPLRNQPYLFKTNPNYKGNDIKCTSTSRDKITTL
SEQ ID NO: 35 HN1726/CHN EKSPHSITLRVYMRIKHVRAWIPRPLRNQPYLFKTNPNYKGNDIKCTSTSRDKITTL
SEQ ID NO: 36 Y-1931-10 EKSPHSITLRVYMRIKHVRAWIPRPLRNQPYLFKTNPNYKGNDIKCTSTSRDKITTL
SEQ ID NO: 37 Y-721-98 EKSPHSITLRVYMRIKHVRAWIPRPLRNQPYLFKTNPNYKGNDIKCTSTSRDKITTL
SEQ ID NO: 38 Y-494-97 EKSPHSITLRVYMRIKHVRAWIPRPLRNQPYLFKTNPNYKGNDIKCTSTSRDKITTL
SEQ ID NO: 39 Y-1160-10 EKSPHSITLRVYMRIKHVRAWIPRPLRNQPYLFKTNPNYKGNDIKCTSTSRDKITTL
SEQ ID NO: 40 VNM/576T/0 EKSPHSITLRVYMRIKHVRAWIPRPLRNQPYLFKTNPNYKGNDIKCTSTSRDKITTL
SEQ ID NO: 41 FLA6916/09 EKSPHSITLRVYMRIKHVRAWIPRPLRNQPYLFKTNPNYKGNDIKCTSTSRDKITTL
SEQ ID NO: 42
SEQ ID NO: 43

圖10 (續)

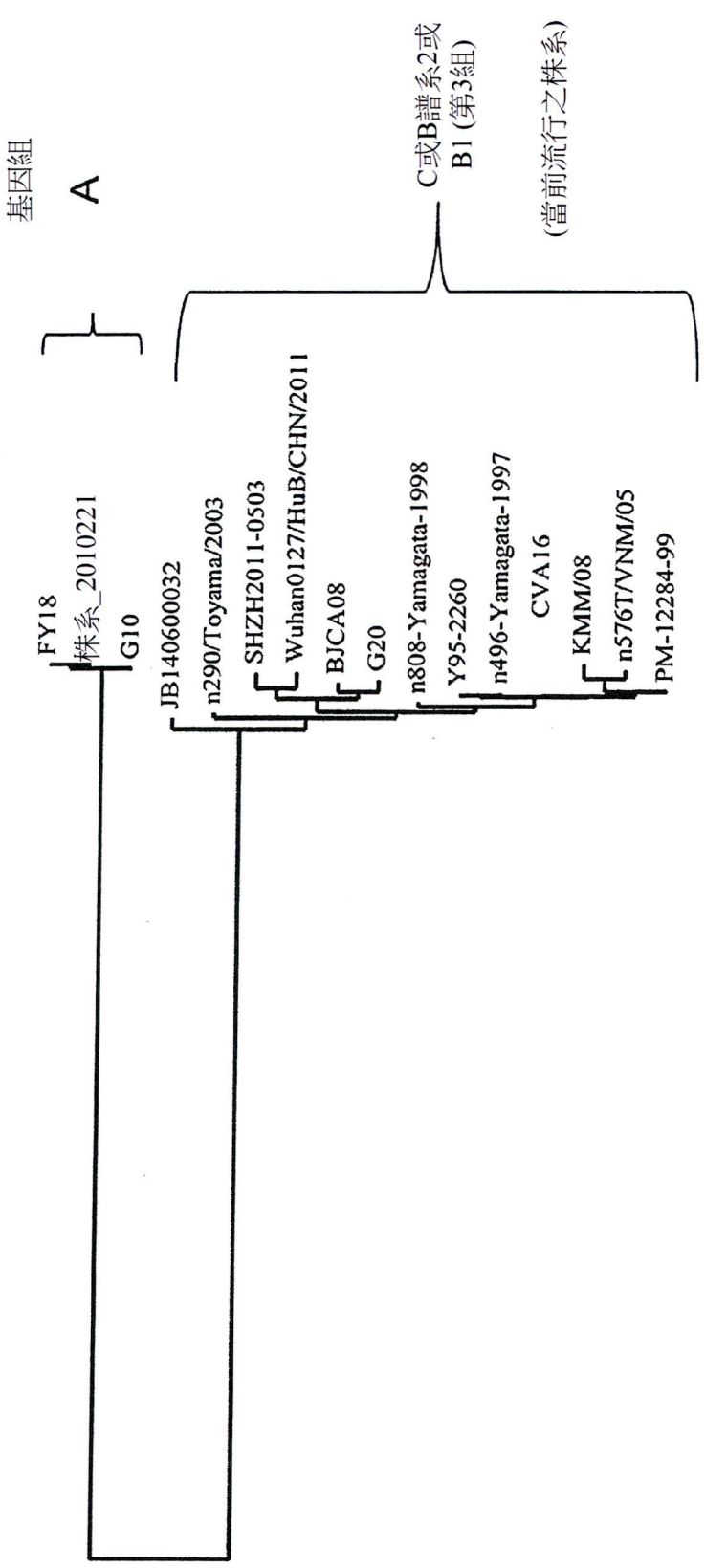

基因組
A
C或B譜系2或
B1 (第3組)
(當前流行之株系)
FY18
株系_2010221
G10
JB140600032
n290/Toyama/2003
SHZH2011-0503
Wuhan0127/HuB/CHN/2011
BJCA08
G20
n808-Yamagata-1998
Y95-2260
n496-Yamagata-1997
CVA16
KMM/08
n576T/VNM/05
PM-12284-99
0.7

圖11

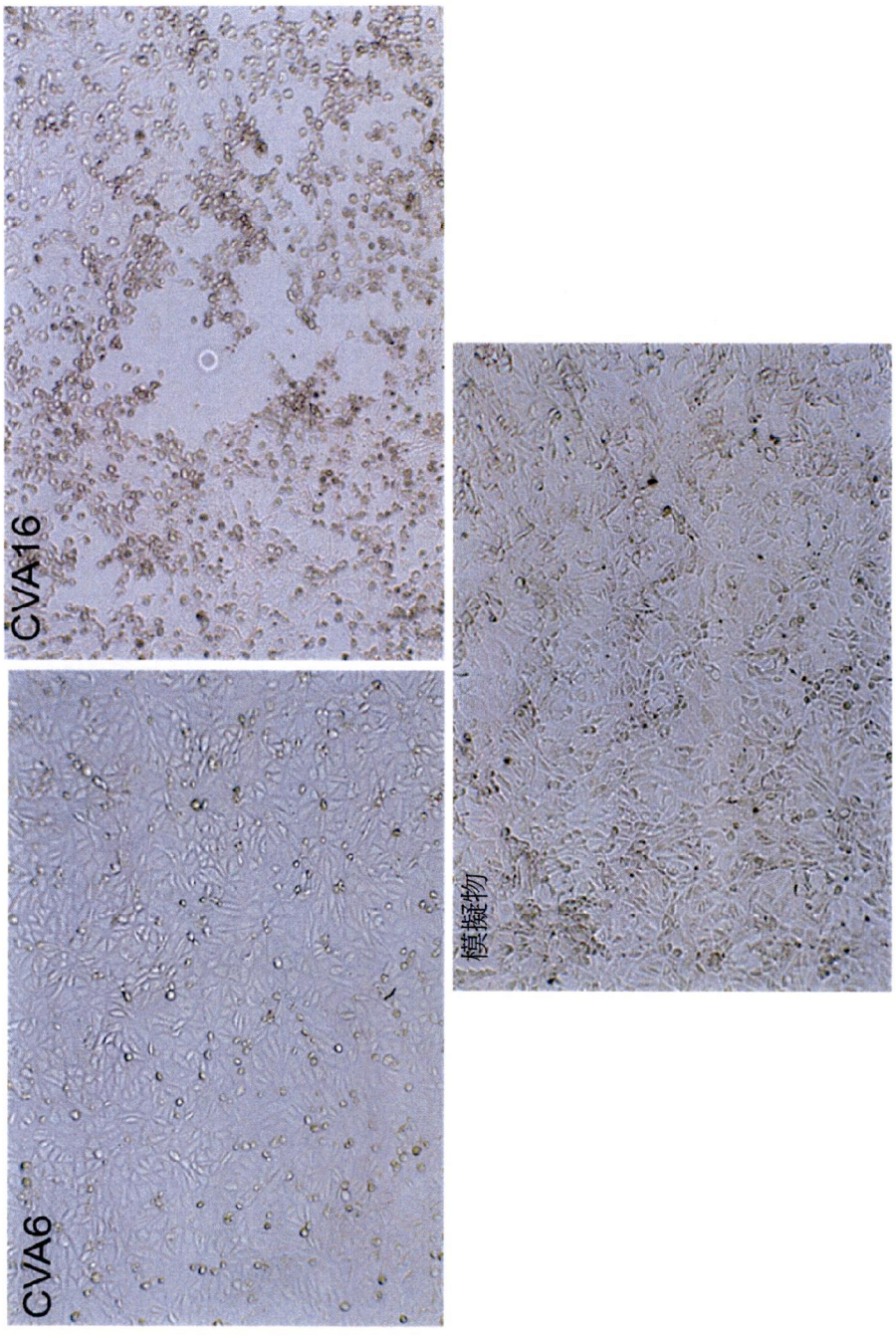


圖12

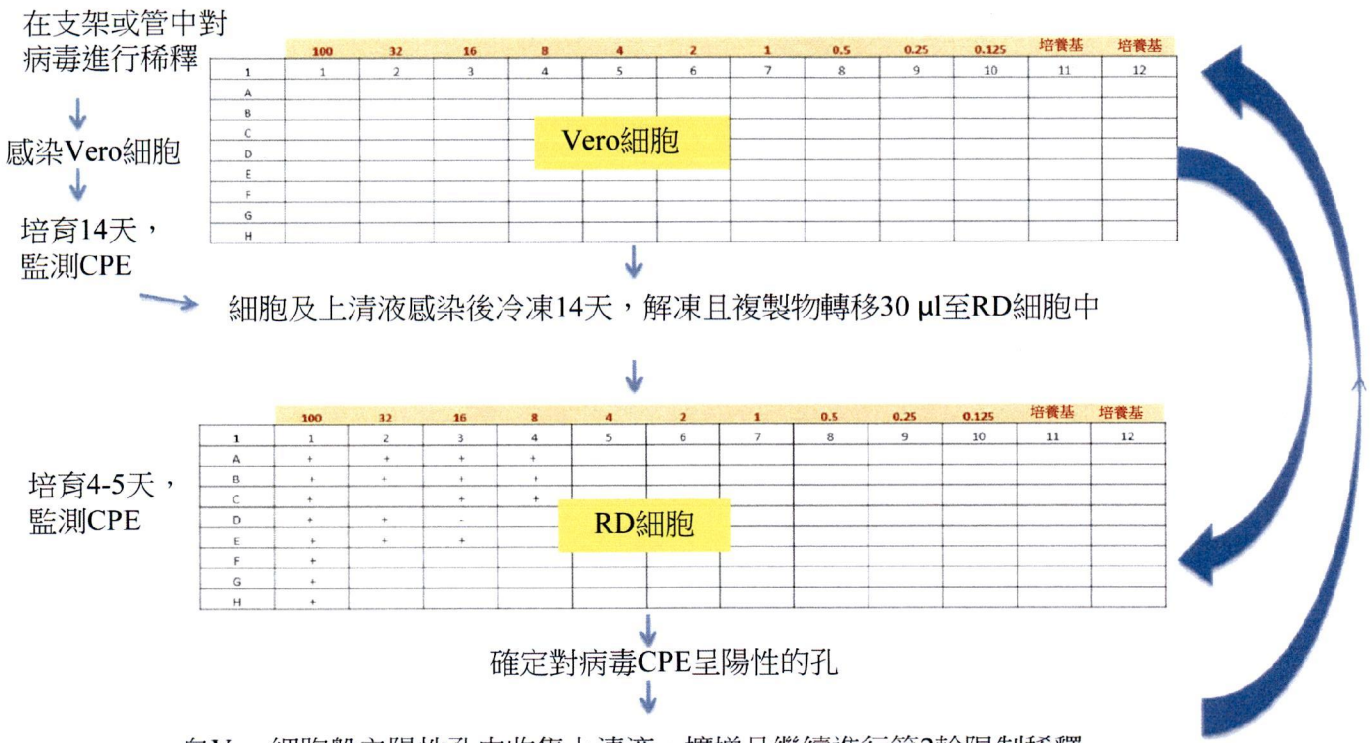
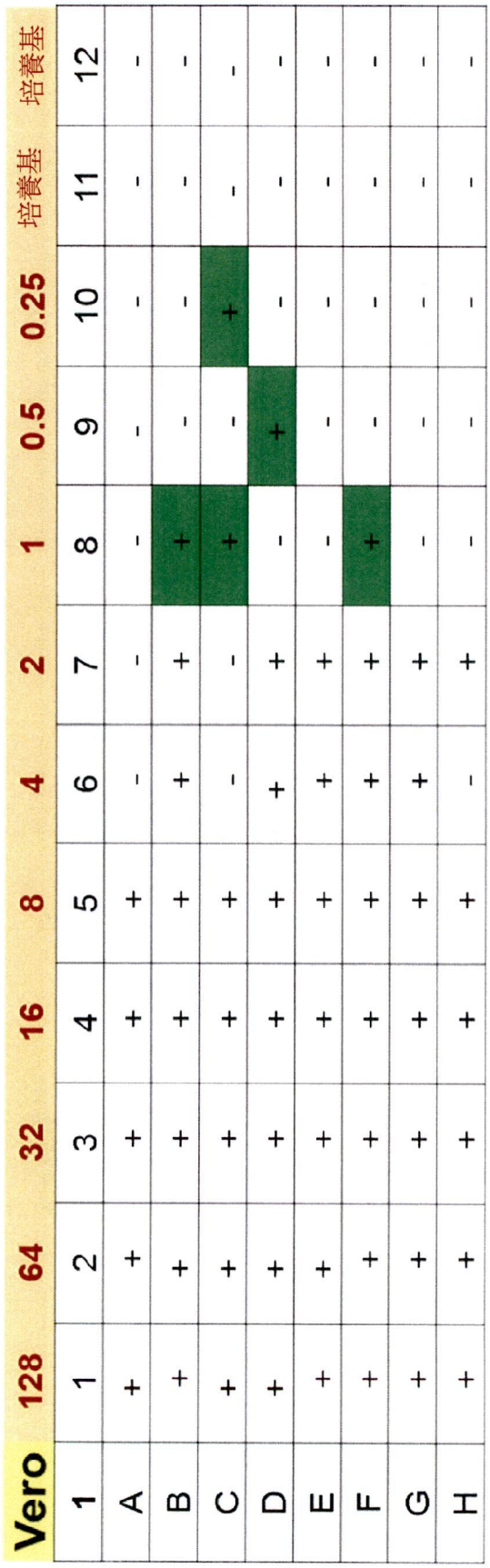

在支架或管中對
病毒進行稀釋
感染Vero細胞
培育14天，
監測CPE
100 32 16 8 4 2 1 0.5 0.25 0.125 培養基 培養基
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
A
B
C
D
E
F
G
H
Vero細胞
細胞及上清液感染後冷凍14天，解凍且複製物轉移30 µl至RD細胞中
培育4-5天，
監測CPE
RD細胞
確定對病毒CPE呈陽性的孔
自Vero細胞盤之陽性孔中收集上清液，擴增且繼續進行第2輪限制稀釋

圖13A



Vero	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	培養基	培養基
1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
B	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
C	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-
D	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
E	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
F	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
G	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
H	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-

圖13B

C193463DA.pdf

Vero	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	培養基
C10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
D	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
G	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
H	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-

Vero	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	培養基
D9	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
C	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
D	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-
E	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
F	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
G	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
H	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

Vero	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	培養基
F8	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-
B	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
C	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
D	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
E	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
G	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
H	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-

圖13C

C193463DA.pdf

	10^-1	10^-2	10^-3	10^-4	10^-5	10^-6	10^-7	10^-8	培養基	培養基	培養基	培養基
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	+	+	-	-	-	-	-					
B	+	+	+	-	+	-	-					
C	+	+	-	-	-	-	-					
D	+	+	-	-	-	-	-					
E	x	x	x	x				x	x	x	x	x
F	x	x	x	x				x	x	x	x	x
G	x	x	x	x				x	x	x	x	
H	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

感染Vero細胞14天之後，將上清液轉移至RD細胞中且記錄CPE

Vero細胞

所計算之效價

TCID50/ml

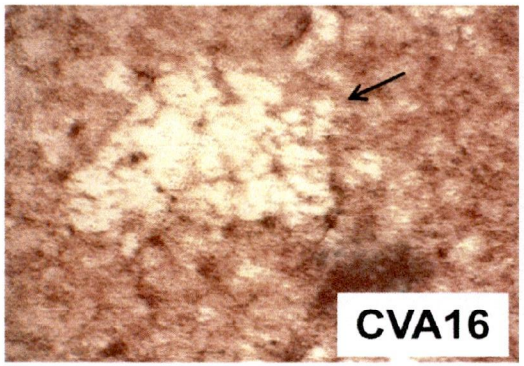
10^4

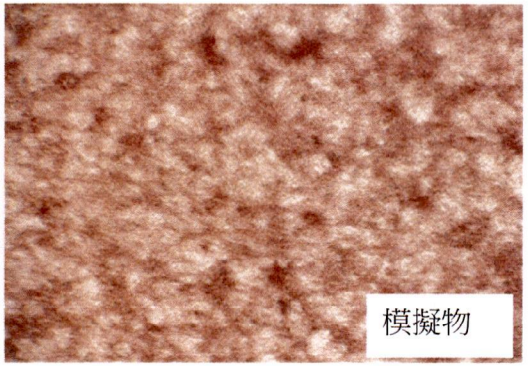
	10^-1	10^-2	10^-3	10^-4	10^-5	10^-6	10^-7	10^-8	培養基	培養基	培養基	培養基
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	+	+	+	+	+	+	-	-				
B	+	+	+	+	+	-	-	-				
C	+	+	+	+	+	+	-	-				
D	+	+	+	+	+	+	-	-				
E	x	x	x	x				x	x	x	x	x
F	x	x	x	x				x	x	x	x	x
G	x	x	x	x				x	x	x	x	
H	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

RD細胞

$1.77x10^7$

圖14



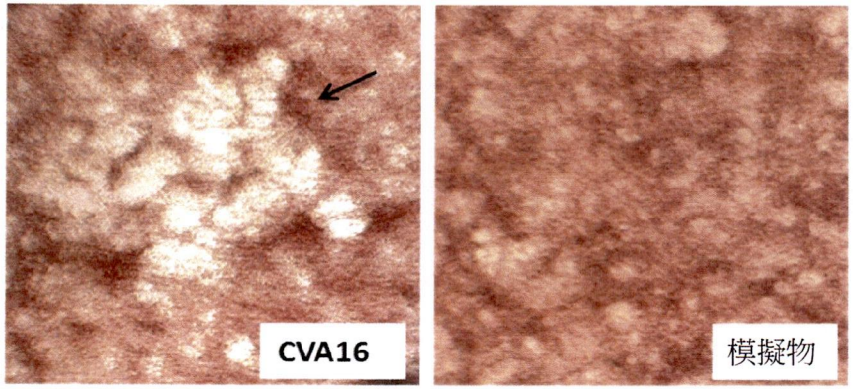


空斑純化病毒之擴增

樣品名稱	TCID50/ml
空斑 1/250ul	1.77E+05
空斑 1/750ul	3.16E+05
空斑 2/250ul	1.00E+05
空斑 2/750ul	1.77E+05
空斑 3/250ul	3.16E+05
空斑 3/750ul	1.77E+06
空斑 4/250ul	1.77E+06
空斑 4/750ul	3.16E+06

圖15A

C193463DA.pdf



空斑純化病毒之擴增

樣品名稱	TCID50/ml (I)
空斑 4/1/250ul	5.6E+05
空斑 4/1/750ul	3.16E+05
空斑 4/2/250ul	3.16E+05
空斑 4/2/750ul	3.16E+05
空斑 4/3/250ul	5.6E+05
空斑 4/3/750ul	5.6E+05
空斑 4/4/250ul	1E+05
空斑 4/4/750ul	1E+05

75 cm2燒瓶中進行之擴增

TCID50/ml

3.16E+06

1.77E+06

圖15B

```
SEQ ID NO: 36    CVA16/P-3          GDPIADMIDQTVNNQVNRSLTALQVLPTAANTEASSHRLGTGVVPALQAAETGASSNASD
SEQ ID NO: 44    CVA16/1-250-中部   GDPIADMIDQTVNNQVNRSLTALQVLPTAANTEASSHRLGTGVVPALQAAETGASSNASD
SEQ ID NO: 28    CVA16/P-0          GDPIADMIDQTVNNQVNRSLTALQVLPTAANTEASSHRLGTGVVPALQAAETGASSNASD
                                    ************************************************************

SEQ ID NO: 36    CVA16/P-3          KNLIETRCVLNHHSTQETAIGNFFSRAGLVSIITMPTTGTQNTDGYVNWDIDLMGYAQLR
SEQ ID NO: 44    CVA16/1-250-中部   KNLIETRCVLNHHSTQETAIGNFFSRAGLVSIITMPTTGTQNTDGYVNWDIDLMGYAQLR
SEQ ID NO: 28    CVA16/P-0          KNLIETRCVLNHHSTQETAIGNFFSRAGLVSIITMPTTDTQNTDGYVNWDIDLMGYAQLR
                                    ************************************.***********************

SEQ ID NO: 36    CVA16/P-3          RKCELFTYMRFDAEFTFVVAKPNGELVPQLLQYMYVPPGAPKPTSRDSFAWQTATNPSVF
SEQ ID NO: 44    CVA16/1-250-中部   RKCELFTYMRFDAEFTFVVAKPNGELVPQLLQYMYVPPGAPKPTSRDSFAWQTATNPSVF
SEQ ID NO: 28    CVA16/P-0          RKCELFTYMRFDAEFTFVVAKPNGVLVPQLLQYMYVPPGAPKPTSRDSFAWQTATNPSVF
                                    ************************* ************************************

SEQ ID NO: 36    CVA16/P-3          VKMTDPPAQVSVPFMSPASAYQWFYDGYPTFGEHLQANDLDYGQCPNNMMGTFSIRTVGT
SEQ ID NO: 44    CVA16/1-250-中部   VKMTDPPAQVSVPFMSPASAYQWFYDGYPTFGEHLQANDLDYGQCPNNMMGTFSIRTVGT
SEQ ID NO: 28    CVA16/P-0          VKMTDPPAQVSVPFMSPASAYQWFYDGYPTFGEHLQANDLDYGQCPNNMMGTFSIRTVGT
                                    ************************************************************

SEQ ID NO: 36    CVA16/P-3          EKSPHSITLRVYMRIKHVRAWIPRPLRNQPYLFKTNPNYKGNDIKCTSTSRDKITTL
SEQ ID NO: 44    CVA16/1-250-中部   EKSPHSITLRVYMRIKHVRAWIPRPLRNQPYLFKTNPNYKGNDIKCTSTSRDKITTL
SEQ ID NO: 28    CVA16/P-0          EKSPHSITLRVYMRIKHVRAWIPRPLRNQPYLFKTNPNYKGNDIKCTSTSRDKITTL
                                    ************************************************************
```

圖16

幾何平均效價(Log10)
4.1
3.6
3.1
2.6
2.1
1.6
EV71
CVA16
CVA6
三價
EV71
CVA16
CVA6

圖17

C193463DA.pdf

疫苗	攻擊
三價	EV71
CVA6	EV71
CVA16	EV71
EV71	EV71
單獨明礬	EV71
三價	CVA16
CVA6	CVA16
CVA16	CVA16
單獨明礬	CVA16

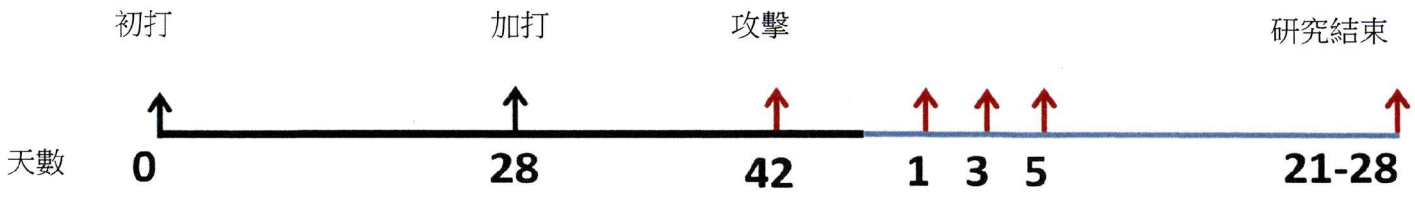


圖18

EV71:CVA16:CVA6 (6/6)
EV71 (6/6)
CVA16 (2/6)
CVA6 (0/6)
單獨明礬(0/5)
存活百分比
100
50
0
0
5
10
15
20
25
攻擊後的天數

圖19

EV71:CVA16:CVA6 (6/6)
單獨明礬(0/5)
EV71 (6/6)
CVA16 (2/6)
CVA6 (0/6)
TCID50/ml等效物(Log10)
6
4
2
0
第1天
第3天
第5天
攻擊後的天數

圖20

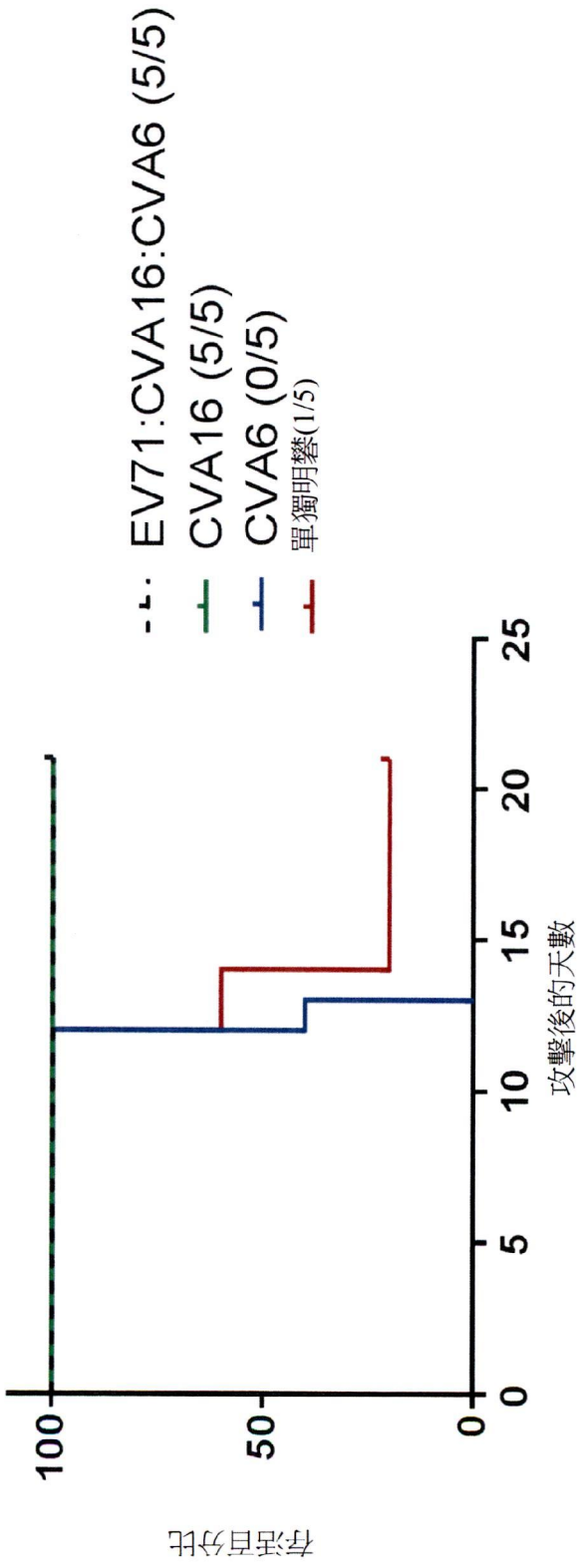

EV71:CVA16:CVA6 (5/5)
CVA16 (5/5)
CVA6 (0/5)
單獨明鑡(1/5)
存活百分比
100
50
0
0
5
10
15
20
25
攻擊後的天數

圖21

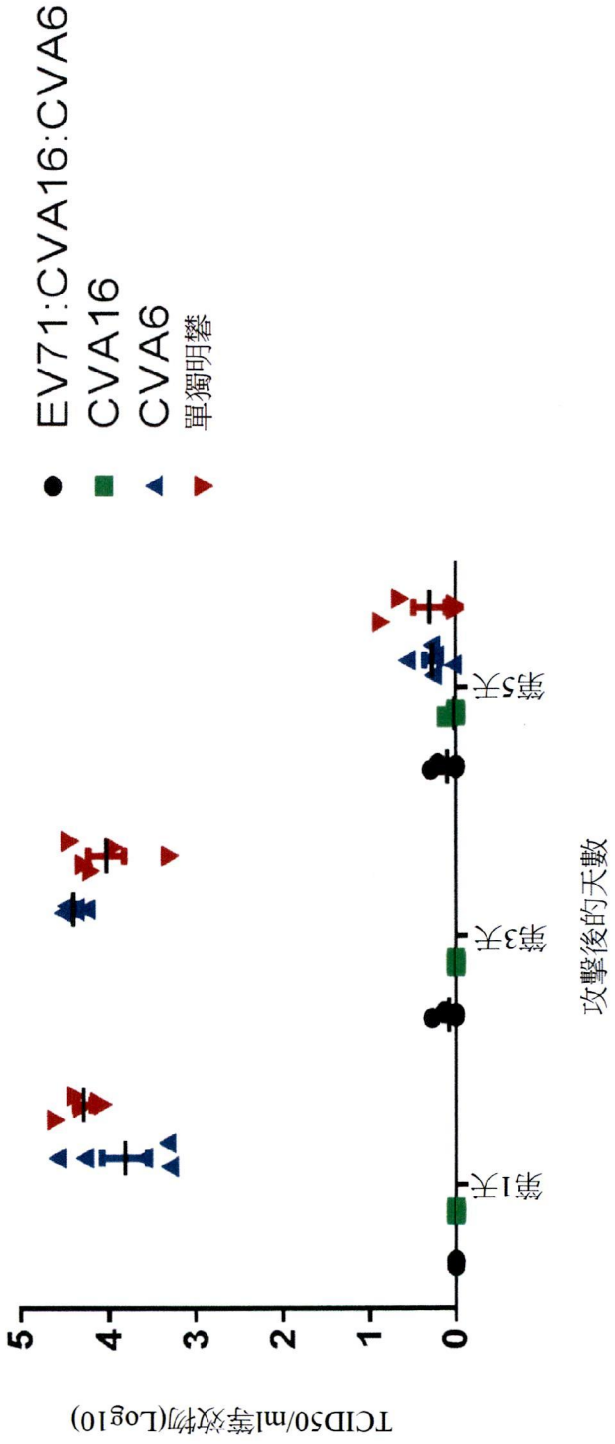

EV71:CVA16:CVA6
CVA16
CVA6
單獨明礬
TCID50/ml等效物(Log10)
5
4
3
2
1
0
第1天
第3天
第5天
攻擊後的天數

圖22

C193463DA.pdf

血清/抗體	攻擊
三價	CVA6
CVA6	CVA6
正常小鼠	CVA6

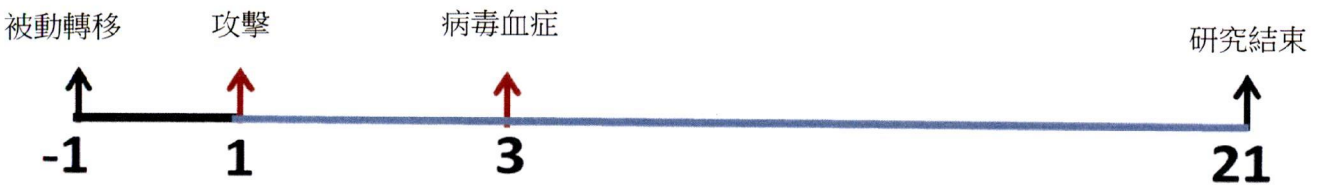


圖23

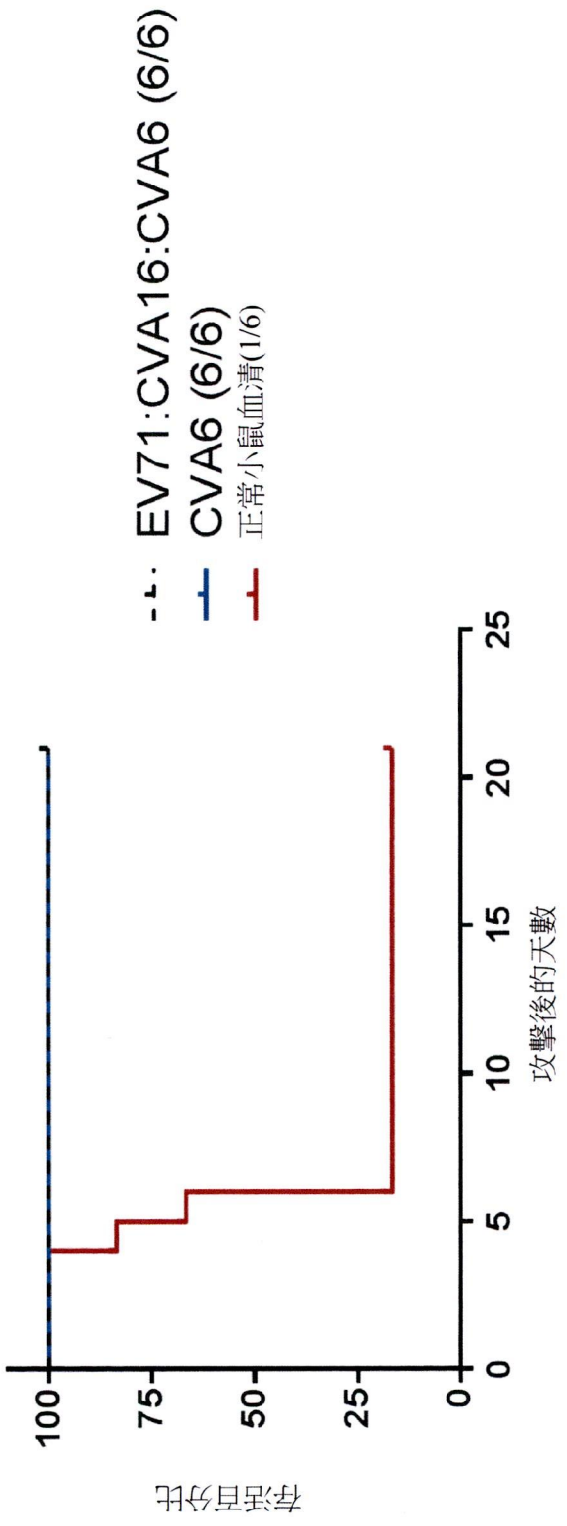

EV71:CVA16:CVA6 (6/6)
CVA6 (6/6)
正常小鼠血清(1/6)
存活百分比
100
75
50
25
0
0
5
10
15
20
25
攻擊後的天數

圖24

EV71:CVA16:CVA6 (6/6)
CVA6 (6/6)
正常小鼠血清(1/6)
TCID50/ml等效物(Log10)
5
4
3
2
1
0
3
攻擊後的天數

圖25