



(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 I571512 B

(45)公告日：中華民國 106 (2017) 年 02 月 21 日

(21)申請案號：101140538

(22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 11 月 01 日

(51)Int. Cl. : C12N15/41 (2006.01)

C12N15/85 (2006.01)

A61K39/125 (2006.01)

(30)優先權：2011/11/03 馬來西亞

PI2011005318

(71)申請人：辛提奈斯特治療公司 (馬來西亞) SENTINEXT THERAPEUTICS SDN BHD (MY)
馬來西亞(72)發明人：卡朵莎 瑪莉 CARDOSA, MARY JANE (MY)；潔米露汀 穆罕默德 JAMILUDDIN,
MOHAMAD FAKRUDDIN (US)；哈密得 雪利法 HAMID, SHARIFAH BINTI
(MY)

(74)代理人：林志剛

(56)參考文獻：

CHUNG, Yao-Chi, et al. Immunization with virus-like particles of enterovirus 71 elicits potent immune responses and protects mice against lethal challenge. Vaccine, 2008, 26.15: 1855-1862.

鍾曜吉，腸病毒 71 型類病毒顆粒的表現、特性分析及其應用為抗腸病毒疫苗之評估，國立清華大學化學工程學系博士論文，2008 年。電子全文詳見 <http://140.113.39.130/cgi-bin/gs32/hugsweb.cgi/ccd=ZHE1vv/search?s=id=%22GH000917615%22.&searchmode=basic>

Chung Y-C, et al. Expression, purification and characterization of enterovirus 71 virus-like particles. World J Gastroenterol 2006;12:921-7.

審查人員：林佳慧

申請專利範圍項數：8 項 圖式數：25 共 102 頁

(54)名稱

抗原類及針對人腸病毒之疫苗類

ANTIGENS AND VACCINES DIRECTED AGAINST HUMAN ENTEROVIRUSES

(57)摘要

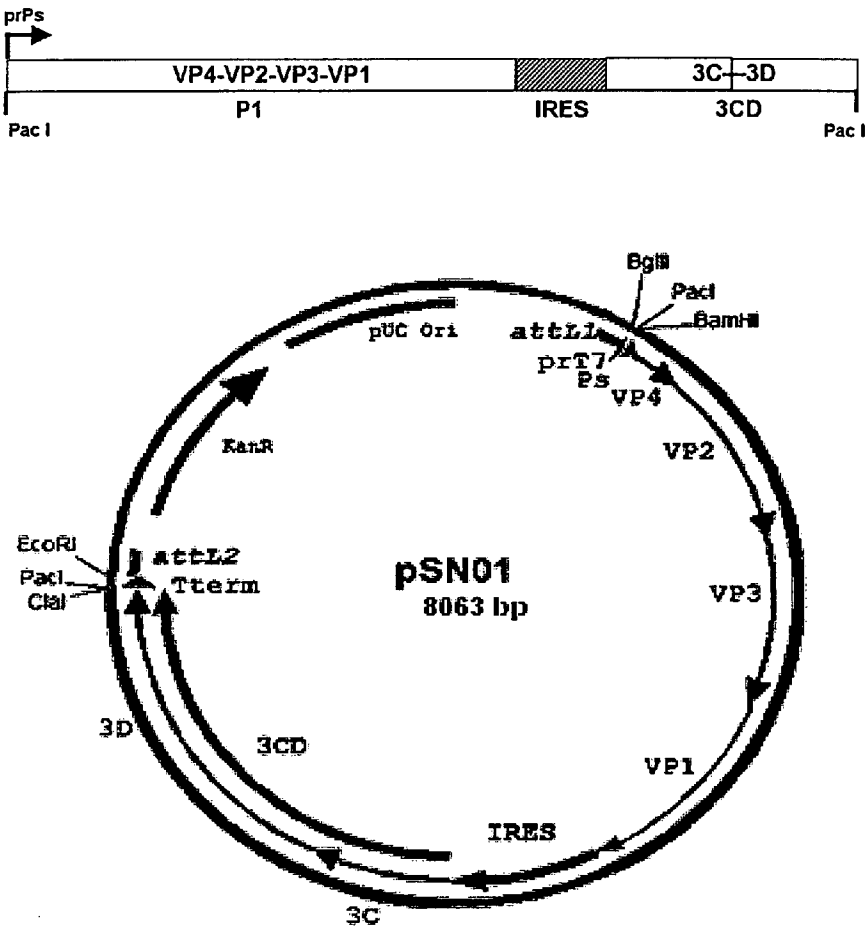
本發明提供用於產製源自小核糖核酸病毒科(Picornaviridae)成員之免疫活性抗原類之材料及方法。本發明之小核糖核酸病毒抗原類可呈現作為疫苗之形式，藉以投予至個體以治療性治療或預防小核糖核酸病毒感染。本發明之小核糖核酸病毒抗原類可呈現免疫原性組成物之形式，藉以用於經投予以預防腸病毒感染之疫苗。本發明另包含免疫原性組成物，其包含人腸病毒 A 型、人腸病毒 B 型、人腸病毒 C 型、人腸病毒 D 型抗原類，及彼等作為疫苗以預防腸病毒感染之用途。

The instant invention provides materials and methods for producing immunologically active antigens derived from members of the Picornaviridae virus family. The picornavirus antigens of the invention may be in a form for use as a vaccine administered to a subject in a therapeutic treatment or for the prevention of a picornavirus infection. The picornavirus antigens of the invention may be in the form of an immunogenic composition for use in vaccines which are administered for the prevention of an Enterovirus infection. The

instant invention further encompasses immunogenic compositions comprising Human enterovirus A, Human enterovirus B, Human enterovirus C, Human enterovirus D antigens and their use in vaccines for the prevention of an Enterovirus infection.

指定代表圖：

圖 1



發明專利說明書

(本申請書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：101140538

※申請日：101 年 11 月 01 日

※IPC 分類：

C12N 15/41 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

A61K 39/125 (2006.01)

一、發明名稱：(中文／英文)

抗原類及針對人腸病毒之疫苗類

Antigens and vaccines directed against human enteroviruses

二、中文發明摘要：

本發明提供用於產製源自小核糖核酸病毒科 (*Picornaviridae*) 成員之免疫活性抗原類之材料及方法。本發明之小核糖核酸病毒抗原類可呈現作為疫苗之形式，藉以投予至個體以治療性治療或預防小核糖核酸病毒感染。本發明之小核糖核酸病毒抗原類可呈現免疫原性組成物之形式，藉以用於經投予以預防腸病毒感染之疫苗。本發明另包含免疫原性組成物，其包含人腸病毒 A 型、人腸病毒 B 型、人腸病毒 C 型、人腸病毒 D 型抗原類，及彼等作為疫苗以預防腸病毒感染之用途。

三、英文發明摘要：

The instant invention provides materials and methods for producing immunologically active antigens derived from members of the *Picornaviridae* virus family. The picornavirus antigens of the invention may be in a form for use as a vaccine administered to a subject in a therapeutic treatment or for the prevention of a picornavirus infection. The picornavirus antigens of the invention may be in the form of an immunogenic composition for use in vaccines which are administered for the prevention of an *Enterovirus* infection. The instant invention further encompasses immunogenic compositions comprising *Human enterovirus A*, *Human enterovirus B*, *Human enterovirus C*, *Human enterovirus D* antigens and their use in vaccines for the prevention of an *Enterovirus* infection.

四、指定代表圖：

(一) 本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二) 本代表圖之元件符號簡單說明：無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：無

六、發明說明

【發明所屬之技術領域】

本發明關於小核糖核酸病毒科(*Picornaviridae*)之病毒，特別是可能有效預防及治療由該等病毒引起之感染之抗原類及疫苗類。

【先前技術】

小核糖核酸病毒(picornavirus)係多樣化之病毒家族，其造成許多常見疾病。在小核糖核酸病毒科中之腸病毒(*Enterovirus*)屬皆具有密切相關性，它們的重要性在於所造成之疾病數量。

腸病毒屬(*Enterovirus*)之病毒每年影響全世界數百萬計之人，其常見於受感染人之呼吸道分泌物(例如唾液、痰或鼻涕)及糞便中。腸病毒會影響腸道，它們的名稱即是源自「腸(enteric)」之字根。過去，小兒麻痺症(poliomyelitis)係由腸病毒即脊髓灰白質炎病毒(poliovirus)所引起之最重要之疾病。共有 62 種非脊髓灰白質炎腸病毒可在人造成疾病：23 種柯沙奇(Coxsackie) A 型病毒、6 種柯沙奇 B 型病毒、28 種伊科病毒及 5 種其他腸病毒。脊髓灰白質炎病毒以及柯沙奇病毒和伊科病毒皆經由糞口途徑傳播。感染可造成廣泛症狀，從輕微的呼吸道疾病(感冒)、手足口症、急性出血性結膜炎、無菌性腦膜炎、心肌炎、嚴重新生兒敗血症樣疾病到急性弛緩性麻痺。

在小核糖核酸病毒中，腸病毒代表一屬為數眾多且變化廣泛之小 RNA 病毒，其特徵為單正鏈基因組 RNA。所有腸病毒皆包含大約 7,500 個鹼基之基因組，且以具有因低信度複製及經常重組所致之高突變率而聞名。在感染宿主細胞後，病毒之基因組係以帽蓋非依賴性方式被轉譯成單一多聚蛋白，接著被病毒編碼之蛋白酶處理成結構性殼體蛋白及非結構性蛋白，該等非結構性蛋白主要負責病毒之複製。

腸病毒係與許多人及哺乳動物之疾病有關。以抗體中和測試為基礎之血清學試驗已鑑別出 66 種人腸病毒血清型。其他抗原性變異體也根據變異株之間減少或非交互之交叉中和反應被定義於數種血清型之內。根據彼等對人及動物之致病機轉，腸病毒原本被分成四種，即脊髓灰白質炎病毒、柯沙奇病毒 A 型(CA)、柯沙其病毒 B 型(CB)及伊科病毒，但科學界很快發現不同種類之病毒之間的生物特性有顯著重疊。

腸病毒屬包括下列 10 種：

- 牛腸病毒 (*Bovine enterovirus*)
- 人腸病毒 A 型 (*Human enterovirus A*)
- 人腸病毒 B 型 (*Human enterovirus B*)
- 人腸病毒 C 型 (*Human enterovirus C*)
- 人腸病毒 D 型 (*Human enterovirus D*)
- 人鼻病毒 A 型 (*Human rhinovirus A*)

- 人鼻病毒 B 型 (*Human rhinovirus B*)
- 人鼻病毒 C 型 (*Human rhinovirus C*)
- 豬腸病毒 B 型 (*Porcine enterovirus B*)
- 猴腸病毒 A 型 (*Simian enterovirus A*)

這十種病毒之內包含許多血清型，例如：

腸病毒血清型 HEV71、EV-76、EV-89、EV-90、EV-91、EV-92 及柯沙奇病毒 A16 係見於人腸病毒 A 型之下。

血清型柯沙奇病毒 B1 (CV-B1)、CV-B2、CV-B3、CV-B4、CV-B5 (包括豬水泡病病毒 [SVDV])、CV-B6、CV-A9、伊科病毒 1 型 (E-1；包括 E-8)、E-2、E-3、E-4、E-5、E-6、E-7、E-9 (包括 CV-A23)、E-11、E-12、E-13、E-14、E-15、E-16、E-17、E-18、E-19、E-20、E-21、E-24、E-25、E-26、E-27、E-29、E-30、E-31、E-32、E-33、腸病毒 B69 (EV-B69)、EV-B73、EV-B74、EV-B75、EV-B77、EV-B78、EV-B79、EV-B80、EV-B81、EV-B82、EV-B83、EV-B84、EV-B85、EV-B86、EV-B87、EV-B88、EV-B93、EV-B97、EV-B98、EV-B100、EV-B101、EV-B106、EV-B107、EV-B110 (源自黑猩猩) 及猴腸病毒 SA5 係見於人腸病毒 B 型之下。

血清型 EV-95、EV-96、EV-99、EV-102、EV-104、EV-105 及 EV-109 係見於人腸病毒 C 型之下。

血清型 EV-68、EV-70 及 EV-94 係見於人腸病毒 D 型之下。

脊髓灰白質炎病毒血清型 PV-1、PV-2 及 PV-3 係見於人腸病毒 C 型之下。

腸病毒感染所造成之疾病包括小兒麻痺症，其為最受到注意之由腸病毒感染造成之疾病。然而，非特定之發熱疾病係腸病毒感染最常見之表現。

腸病毒係兒童無菌性腦膜炎最常見之病因。在美國，腸病毒造成 30,000 至 50,000 例之腦膜炎。腦炎係腸病毒感染之罕見表徵；當發生時，最常被發現造成腦炎之腸病毒係伊科病毒 9 型。

由腸病毒引起之肋肌痛的特徵在於胸腹部之嚴重陣發性疼痛，伴隨發燒，有時出現噁心、頭痛及嘔吐。

心包炎及 / 或心肌炎通常係由腸病毒引起。心律不整、心臟衰竭及心肌梗塞亦有報告。

急性出血性結膜炎可由腸病毒引起。

手足口症係兒童疾病，最常由柯沙奇病毒 A 型或 HEV71 感染造成。

一項 2007 年之研究指出，與腸病毒有關之急性呼吸道或胃腸道感染可能是慢性疲倦症候群之因素。

腸病毒屬之所有成員(包括 HEV71、脊髓灰白質炎病毒及柯沙奇病毒 A16)皆具有單股正鏈 RNA 基因組，該基因組具有編碼多聚蛋白 P1 (由殼體蛋白 VP4、VP2、VP3 及 VP1 組成)及數個非結構性蛋白之單一開放閱讀框，該

等非結構性蛋白包括病毒蛋白酶 3C 及 3CD，負責將多聚蛋白 P1 切割成個別之殼體蛋白 VP1、VP3 及 VP0，該 VP0 最後再被切割成 VP2 及 VP4。該等殼體蛋白可能組裝成病毒樣顆粒 (VLP)。

人腸病毒 71 型 (HEV71) 及柯沙奇病毒 A16 型係值得注意的造成手足口症 (HFMD) 之主要致病性腸病毒血清型，HEV71 有時會造成嚴重的中樞神經系統疾病。HEV71 最先是在 1969 年加州的神經疾病病例中被分離及特徵化。到目前為止，我們對於 HEV71 感染之宿主反應之分子機轉所知甚少，但認為與編碼趨化激素之 mRNA、與蛋白質降解之有關之蛋白質、補體蛋白及促細胞凋亡蛋白質之量增加有關。

手足口症 (HFMD) 係兒童常見之自限性疾病，由一群 A 型腸病毒 (小核糖核酸病毒科 (Picornaviridae)) 諸如人柯沙奇病毒 A16 型 (CVA16)、柯沙奇病毒 A10 型 (CVA10) 及人腸病毒 A 71 型 (HEV71) 造成。該病毒被分泌於糞便中，亦可見於咽喉分泌物。傳染與兒童近距離接觸及環境污染有關。疾病之特徵為急性發燒伴隨手掌、腳掌、臀部及膝蓋起疹，及通常於 7 至 10 天內消退之口腔水泡。僅少部分感染 HFMD 之兒童會發展成嚴重疾病。

嚴重疾病通常僅發生於 HEV71 感染，其主要與神經系統及心血管系統有關，以諸如腦膜炎、腦炎、急性弛緩性麻痺、肺水腫及心臟衰竭之症候群表現。在亞太地區，最嚴重之神經系統症候群係腦幹腦炎，其死亡率可達 40

至 80%。罹患嚴重 HFMD 之兒童可能需要數月恢復，有些病例可能有永久神經損害。目前，並無針對 HFMD 之特定抗病毒療法，亦無疫苗可預防除小兒麻痺症以外之腸病毒感染。

HEV71 首先在 1969 年加州一名死於腦炎之病童身上分離出來，1974 年首先被報告。雖然自此世界各地均檢測到該病毒，最近 HFMD 於亞洲之地區性流行令人憂心該區域可能出現更具致病性之 HEV71。首次發現造成高死亡病例數之 HFMD 爆發於 1997 年馬來西亞沙勞越 (Sarawak)。當時造成該爆發之病毒係 HEV71。台灣在 1998 年報告 129,106 例之 HFMD 流行，其中 405 例發生嚴重疾病，造成 78 例死亡。新加坡在 2000- 2001 年報告 9000 個流行病例，其中 7 例死亡，自此每二至三年發生復發性流行。在 2008 年的前 8 個月，新加坡報告 19,530 個 HFMD 病例及一例死亡。之後 HEV71 爆發規律地出現在新加坡、泰國、馬來西亞、台灣、日本、韓國及越南。

中國在 2007 年報告 83,344 例，其中 17 例死亡，2008 年在安徽省阜陽市出現大型爆發並擴散至中國許多地區。這些大型爆發受到媒體之廣泛報導，最引人注意的是家長對兒童健康之擔憂，以及公衛部門爲了阻斷疫情擴散下令停課及關閉日托中心所造成之社會擾亂。自此中國每年都發生大型爆發。

至於小核糖核酸病毒科之其他成員所造成之疾病，自古小兒麻痺這種感染性疾病之天然感染及盛行僅發生在

人類。在開發中國家每年仍有許多人受到脊髓灰白質炎病毒感染。因此，根除脊髓灰白質炎仍須持續進行。

脊髓灰白質炎病毒(Polioviruses)先前被分類在小核糖核酸病毒科之腸病毒屬。現在脊髓灰白質炎病毒已自腸病毒屬除名。脊髓灰白質炎病毒依血清型分類為人脊髓灰白質炎病毒 1 型(PV-1)、人脊髓灰白質炎病毒 2 型(PV-2)及人脊髓灰白質炎病毒 3 型(PV-3)，其被認為是小核糖核酸病毒科腸病毒屬中之人腸病毒 C 型之亞型。腸病毒屬下之模式種於 2008 年自脊髓灰白質炎病毒改變成人腸病毒 C 型。

人腸病毒 C 型之三個亞型 PV-1、PV-2 及 PV-3 的特徵係稍微不同之殼體蛋白。殼體蛋白定義細胞性受體專一性及病毒抗原性。PV-1 係天然最常見之形式，然而所有三種形式皆極具感染性，可感染脊髓造成脊髓灰白質炎。

人腸病毒 C 型之感染已成為廣泛問題，失活之全病毒疫苗被用於大眾免疫接種且為目前所用。失活之脊髓灰白質炎疫苗獲得良好的結果，其係根據沙克(Salk)發展之方法製備，後來也在多方面加以改善。通常，這些疫苗包含失活脊髓灰白質炎病毒株 Mahoney、MEF1 及 Saukett 之混合物。

儘管減毒之人腸病毒 C 型已被產製並用來作為減毒口服脊髓灰白質炎疫苗，該經減毒之人腸病毒 C 型可能具有危險性，因為在經投予或接觸全病毒之人其致病性可能反轉(麻痺基底之神經毒性)。因此，需要沒有該致病性之安

全且有效之脊髓灰白質炎疫苗。

就像所有腸病毒，四種不同的人腸病毒 C 型外套 / 殼體多肽已被鑑別及命名為 VP1、VP2、VP3 及 VP4，彼等相連以形成二十面體病毒殼體。通常，以人腸病毒 C 型之個別多肽免疫顯示該經分離之多肽無法在人或動物引起中和抗體 (Meloan, et al., J. Gen. Virol. 45:761-763, 1979)。

美國專利第 4,508,708 號揭示脊髓灰白質炎病毒及手足口症病毒之個別多肽 VP1、VP2、VP3 及 VP4 無法在人及動物引起中和抗體，且在手足口症病毒之個別多肽中僅 VP1 具有此能力。美國專利第 4,508,708 號顯示在人腸病毒 C 型第 2 類 MEF1 病毒粒子 VP1、VP2 及 VP3 多肽中，僅 VP3 可誘發中和抗體，雖然該抗體力價低。然而研究發現，VP1、VP2 及 VP3 只有在以含有阿立酮 (arildone) 之製劑進行免疫接種時方能誘發中和抗體，阿立酮經顯示係能選擇性抑制小核糖核酸病毒複製之廣效性抗病毒劑 (Langford, et al. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 28:578-580, 1985)。

因此，所欲解決之問題係製備有效之疫苗，其提供對人腸病毒感染之保護免疫性，且不需使用抗病毒化合物。希望加以防範之人腸病毒係例如人腸病毒 A 型 (包括柯沙奇病毒 A16 及人腸病毒 71 型)、人腸病毒 B 型 (包括柯沙奇病毒 B 型、伊科病毒及腸病毒血清型)、人腸病毒 C 型 (包括人脊髓灰白質炎病毒 1 型、人脊髓灰白質炎病毒 2 型及人脊髓灰白質炎病毒 3 型) 及人腸病毒 D 型 (包括 EV

68)。

以本發明之目的而言，疫苗係該領域之技藝人士所理解，可進一步被定義為含有源自一或多種致病性有機體之抗原的預防性或治療性材料，當該材料被投予至人個體或動物時將刺激主動免疫及防範這些或相關有機體之感染（即產生保護性免疫作用）。

另外，保護性免疫作用可為該領域之技藝人士所廣為了解。然而，保護性免疫作用至少包含誘導或誘發將中和該病毒之中和性抗體及/或 T 細胞免疫反應。

在疫苗領域所公認了解的是，並不清楚源自病原體之抗原是否能誘發保護性免疫作用。Ellis (Vaccines, Plotkin, et al. (eds) WB Saunders, Philadelphia 第 29 章 571 頁，1998) 在下列引文中說明此一問題：「解決(疫苗發展)問題的關鍵在於識別本身即可誘發產生保護抗體之病毒或微生物病原體之蛋白成份…，藉以保護宿主不受該病原體之攻擊。」

製備經改善之小核糖核酸病毒疫苗之方法為模擬可能誘發保護性抗體之病毒殼體結構或彼之成份，其誘發之保護性抗體就像由死全病毒疫苗所產製者。此種方法比死疫苗、失活疫苗或減毒疫苗來得安全，因為其致病性沒有機會反轉。

所有小核糖核酸病毒分享相同之基因組結構，包括 4 個在 P1 基因內之結構基因 (VP1、VP2、VP3 及 VP4，該 VP4 及 VP2 係一起表現為 VP0)，及在 3C 及 3D 基因內之

病毒蛋白酶。該病毒蛋白酶將切割 P1 基因，藉以允許病毒組裝成腸病毒之病毒樣顆粒(VLP)、病毒次蛋白衣、複合體及/或抗原類。

目前關於疫苗之提議並無成效上的差異。有提議指出利用包含腸病毒之主要殼體蛋白 VP1 之次單位疫苗作為疫苗基礎，以預防及治療腸病毒感染，包括 HEV71 感染(Wu, et al., 2001)。

就預防腸病毒感染方面，可能設想死病毒疫苗之方法，其已經顯示能誘發保護性抗體。但通常僅達成低病毒力價，使得製造該種腸病毒疫苗成為挑戰。

本發明關於疫苗類，該等疫苗包括小核糖核酸病毒科之病毒的抗原性外套/殼體蛋白，且該等疫苗不具有可能造成神經毒性之病毒 RNA。本發明之疫苗可能包含抗原類、多肽 P1 或 VP0 或殼體蛋白(VP) (被稱為 VP1、VP2、VP3 及/或 VP4)或彼之免疫或生物活性片段，其誘發拮抗腸病毒之中和性抗體。

本發明關於疫苗類，其中小核糖核酸病毒抗原類係以一或多種小核糖核酸病毒多肽(特別是人腸病毒肽 VP2、VP3 或 VP0)、彼等之免疫原性片段及/或彼等之抗原性決定簇之形式存在。該小核糖核酸病毒多肽可能藉由化學合成，或利用已知之人腸病毒胺基酸或核酸序列之重組 DNA 技術獲得。

【發明內容】

一種疫苗，其包含一或多種免疫活性抗原，該等免疫活性抗原包含一或多種選自 VP0、VP1、VP2、VP3、VP4 之人腸病毒 (*Enterovirus*) 多肽或彼等之免疫活性片段。

如上述疫苗，其誘發針對人腸病毒之保護性及 / 或中和性免疫反應。

如上述疫苗，其中該人腸病毒係選自人腸病毒 A 型、人腸病毒 B 型、人腸病毒 C 型或人腸病毒 D 型。

如上述疫苗，其中該人腸病毒 A 型係選自人腸病毒 71 型 (HEV71) 或柯沙奇病毒 (*Coxsackievirus*) A16 型，其中該人腸病毒 B 型係選自柯沙奇病毒 B 型或伊科病毒 (*echovirus*)，其中該人腸病毒 C 型係選自人脊髓灰白質炎病毒 1 型、人脊髓灰白質炎病毒 2 型或人脊髓灰白質炎病毒 3 型，且其中人腸病毒 D 型係 EV68。

如上述疫苗，其中該疫苗包含免疫活性腸病毒 VP0 多肽。

如上述疫苗，其中該疫苗包含免疫活性腸病毒 VP2 多肽。

如上述疫苗，其中該疫苗包含免疫活性腸病毒 VP3 多肽。

如上述疫苗，其中該疫苗包含免疫活性腸病毒 VP1 多肽。

如上述疫苗，其中該疫苗包含源自一或多個腸病毒物種或血清型之多肽。

如上述疫苗，其中該物種或血清型可為選自 HEV71

或柯沙奇病毒 A16 型之人腸病毒 A 型。

如上述疫苗，其中該物種或血清型可為選自 PV-1、PV-2 或 PV-3 之人腸病毒 C 型。

如上述疫苗，其中該一或多種包含一或多種選自 VP0、VP1、VP2、VP3、VP4 之人腸病毒多肽或彼等之免疫活性片段之免疫活性抗原係呈病毒樣顆粒、次蛋白衣(capsomer)、複合體及/或聚集體。

如上述疫苗，其中該病毒樣顆粒包含免疫活性腸病毒 VP0 多肽。

如上述疫苗，其中該病毒樣顆粒包含免疫活性腸病毒 VP2 多肽。

如上述疫苗，其中該病毒樣顆粒包含免疫活性腸病毒 VP3 多肽。

如上述疫苗，其中該病毒樣顆粒包含免疫活性腸病毒 VP1 多肽。

一種針對腸病毒感染之免疫個體之方法，該方法包含對該個體投予包含一或多種免疫活性抗原之疫苗，該一或多種免疫活性抗原包含一或多種選自 VP0、VP1、VP2、VP3、VP4 之人腸病毒多肽或彼等之免疫活性片段，當對個體投予時該疫苗之量能有效誘發保護性及/或中和性免疫反應。

如上述方法，其中該疫苗包含免疫活性腸病毒 VP0 多肽。

如上述方法，其中該疫苗包含免疫活性腸病毒 VP1

多肽。

如上述方法，其中該疫苗包含免疫活性腸病毒 VP3 多肽。

如上述方法，其中該疫苗包含免疫活性腸病毒 VP2 多肽。

如上述方法，其中該一或多種包含一或多種選自 VP0、VP1、VP2、VP3、VP4 之人腸病毒多肽或彼等之免疫活性片段之免疫活性抗原係呈病毒樣顆粒、次蛋白衣 (capsomer)、複合體及/或聚集體。

如上述方法，其中該病毒樣顆粒包含免疫活性腸病毒 VP0 多肽。

如上述方法，其中該病毒樣顆粒包含免疫活性腸病毒 VP2 多肽。

如上述方法，其中該病毒樣顆粒包含免疫活性腸病毒 VP3 多肽。

如上述方法，其中該病毒樣顆粒包含免疫活性腸病毒 VP1 多肽。

如上述方法，其中該疫苗包含源自一或多個腸病毒物種或血清型之多肽。

如上述方法，其中該腸病毒物種或血清型可為選自 HEV71 或柯沙奇病毒 A16 型之人腸病毒 A 型。

如上述方法，其中該腸病毒物種或血清型可為選自 PV-1、PV-2 或 PV-3 之人腸病毒 C 型。

一種表現卡匣，其包含與編碼人腸病毒 P1 多肽之核

酸可操作性能連接之啟動子、內部核糖體進入位點(IRES)及編碼人腸病毒 3CD 蛋白酶之核酸。

如上述表現卡匣，其中該多肽係人腸病毒 P1。

如上述表現卡匣，其中該人腸病毒 3CD 蛋白酶處理該人腸病毒 P1 多肽。

如上述表現卡匣，其中該經處理之人腸病毒 P1 多肽相連以形成病毒樣顆粒、次蛋白衣、複合體及/或聚集體。

如上述表現卡匣，其中該人腸病毒 P1 多肽包含選自 VP0、VP1、VP2、VP3、VP4 之多肽或彼等之免疫活性片段的組合。

如上述表現卡匣，其中該人腸病毒係選自人腸病毒 A 型及人腸病毒 C 型。

如上述表現卡匣，其中該人腸病毒 A 型係選自 HEV71 及柯沙奇病毒 A16。

如上述表現卡匣，其中該人腸病毒 C 型係選自人脊髓灰白質炎病毒 1 型(PV-1)、人脊髓灰白質炎病毒 2 型(PV-2)或人脊髓灰白質炎病毒 3 型(PV-3)。

如上述表現卡匣，其中該 IRES 係源自腦心肌炎病毒(EMCV)。

如上述表現卡匣，其中該源自腦心肌炎病毒(EMCV)之 IRES 係經基因改質以減少 IRES 活性。

如上述表現卡匣，其中該源自 EMCV 之 IRES 已藉由添加一個核苷酸(A7)至 JK 區段之 A6 雙歧圈環經基因改

質。

如上述表現卡匣，其中該 IRES 係源自人腸病毒。

如上述表現卡匣，其中該啟動子係真核細胞啟動子。

如上述表現卡匣，其中該真核細胞啟動子係多角體蛋白啟動子。

如上述表現卡匣，其中該啟動子係與編碼人腸病毒 A 型 P1 多肽、EMCV IRES 及人腸病毒 A 型 3CD 蛋白酶之核酸可操作性連接。

如上述表現卡匣，其中該 EMCV IRES 係經突變以減少 IRES 活性。

如上述表現卡匣，其中該啟動子係與編碼人腸病毒 A 型 P1 多肽、HEV71 IRES 及人腸病毒 A 型 3CD 蛋白酶之核酸可操作性連接。

如上述表現卡匣，其中該啟動子係與編碼人腸病毒 A 型 P1 多肽、人腸病毒 C 型 IRES 及人腸病毒 A 型 3CD 蛋白酶之核酸可操作性連接。

如上述表現卡匣，其中該啟動子係與編碼人腸病毒 C 型 P1 多肽、人腸病毒 C 型 IRES 及人腸病毒 C 型 3CD 蛋白酶之核酸可操作性連接。

如上述表現卡匣，其中該啟動子係與編碼人腸病毒 C 型 P1 多肽、HEV71 IRES 及人腸病毒 C 型 3CD 蛋白酶之核酸可操作性連接。

如上述表現卡匣，其中該啟動子係與編碼人腸病毒 C 型 P1 多肽、EMCV IRES 及人腸病毒 C 型 3CD 蛋白酶之

核酸可操作性連接。

一種製備疫苗之方法，該方法包含導入 VLP 表現卡匣至宿主細胞，培養該宿主細胞經一段足以產製該表現卡匣之多肽之時間，及自該宿主細胞及/或培養上清液回收該人腸病毒多肽。

如上述方法，其中該宿主細胞係真核細胞。

如上述方法，其中該真核細胞係選自昆蟲細胞、哺乳動物細胞系或酵母菌細胞。

如上述方法，其中該昆蟲細胞係選自草地夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*)、粉紋夜蛾 (*Trichoplusia ni*)、果蠅 (*drosophila*) 或源自白線斑蚊 (*Aedes albopictus*) 之蚊子細胞。

如上述方法，其中該哺乳動物細胞系係選自 CHO、HEK 293、COS-1、HeLa、Vero 或 NIH3T3。

本發明之詳細說明

本發明提供源自小核糖核酸病毒科 (Picornaviridae) 之病毒的抗原之病毒樣顆粒 (VLP)、病毒次蛋白衣、聚集體及複合體，以作為預防及/或治療小核糖核酸病毒感染之免疫原性組成物及/或疫苗。代表性實例可包括腸病毒、柯沙奇病毒及脊髓灰白質炎病毒。

本發明之另一態樣提供病毒蛋白，例如 P1 蛋白或小核糖核酸病毒 VP0 蛋白、VP1 蛋白、VP2 蛋白、VP3 蛋白及/或 VP4 蛋白或彼等之免疫或生物活性片段之組合，其

誘發中和性抗體。本發明包括融合蛋白，其包含前述之病毒蛋白及/或彼之片段，該融合蛋白具免疫活性或生物活性以誘發具保護性之中和性抗體之產製。

在一實施態樣中，腸病毒抗原可為腸病毒外套/殼體蛋白或彼等之免疫活性片段之組合。該病毒外套/殼體蛋白可為 VP0、VP1、VP2、VP3 及/或 VP4 蛋白之任何組合，可能呈現病毒樣顆粒(VLP)、次蛋白衣、複合體及/或聚集體之形式。該組合可能呈融合蛋白之形式。

本發明之其他態樣包括製備小核糖核酸病毒科病毒樣顆粒(VLP)、次蛋白衣、複合體及/或聚集體之方法，該方法包含下列步驟：(i)建構與啟動子可操作性連接之表現卡匣，該表現卡匣包含一或多種各自編碼小核糖核酸病毒蛋白之核酸，例如 P1 蛋白或小核糖核酸病毒 VP0 蛋白、VP1 蛋白、VP2 蛋白、VP3 蛋白及/或 VP4 蛋白之組合，該一或多種核酸係與內部核糖體進入位點(IRES)可操作性相連，該 IRES 係與 3C 或 3CD 蛋白酶可操作性連接；(ii)以該表現卡匣轉染或轉型適當之宿主細胞；(iii)在該宿主細胞表現該卡匣內所包含之核酸後可產製病毒樣顆粒(VLP)及/或次蛋白衣及/或抗原之條件下培養該細胞。

核酸或重組 DNA 分子可能獲得，其中編碼柯沙奇病毒 A16、HEV71、人腸病毒 C 型(人脊髓灰白質炎病毒 PV1、PV2 及/或 PV3)、EV68 或任何其他小核糖核酸病毒蛋白及蛋白酶之開放閱讀框可藉由 PCR 擴增放大，其利用經適當設計之與柯沙奇病毒 A16、HEV71 或人腸病毒 C

型或任何其他小核糖核酸病毒之核酸序列互補之引子。適當引子可根據標準技術自公眾可用之腸病毒核酸序列設計，包括柯沙奇病毒 A16、HEV71 及人腸病毒 C 型或任何其他小核糖核酸病毒。完整基因組序列可得自 GenBank，可於美國國家生物技術資料中心 (National Center for Biotechnology Information) (NCBI) 取得。

在一實施態樣中，小核糖核酸病毒 P1 蛋白或任何腸病毒 P1 蛋白係以多肽表現，其接著被 3C 或 3CD 蛋白酶切割成 VP0、VP1 及 VP3 病毒蛋白或彼之免疫或生物活性片段，該等腸病毒蛋白誘發針對腸病毒之中和性抗體。VP0 蛋白可進一步被切割成 VP2 及 VP4 蛋白，或彼等之誘發針對腸病毒之中和性抗體之免疫或生物活性片段。該等病毒蛋白可能自行組裝成 VLP、次蛋白衣及/或腸病毒蛋白之聚集體。另外將了解的是，該蛋白酶基因可能被包含在 VLP 表現卡匣之相同 DNA 重組分子或不同 DNA 重組分子內，及/或自不同的啟動子或轉譯元件表現。

該 VLP 表現卡匣之重組 DNA 分子及核酸可能經設計，藉以利用經適當設計之與人小核糖核酸病毒之核酸序列互補之引子進行 PCR 擴增以獲得編碼小核糖核酸病毒之結構蛋白或蛋白酶之開放閱讀框。

在其他實施態樣中，該重組 DNA 分子可能編碼具有至少二種腸病毒結構蛋白或彼等之部分之融合蛋白，該融合蛋白係以單一多肽抗原表現。

本發明包含 VLP 表現卡匣，其具有腸病毒結構蛋白

之基因序列(P1 區)，與處理 P1 蛋白成為病毒殼體之蛋白質所需之蛋白酶(3CD)，因此允許腸病毒 VLP 之自行組裝。該表現卡匣係雙順反子載體，其使用在腸病毒 P1 蛋白之核酸編碼序列上游之啟動子。在編碼該 P1 蛋白之順反子下游係內部核糖體進入位點(IRES)序列，然後是含有編碼該 3CD 蛋白酶之核苷酸序列的順反子。

P1 區及 3CD 蛋白酶之表現係自單一雙順反子信號開始，其中該 3CD 蛋白酶基因係於 IRES 之控制下經帽蓋非依賴性方式轉譯。我們觀察到蛋白酶 3CD 之表現可能具有會導致宿主細胞提前死亡之毒性，因此降低腸病毒殼體蛋白及 VLP 之產率。蛋白酶之活性可被減少但仍維持該卡匣 P1 蛋白 1 之高量表現。不同的 IRES 及含突變之 IRES 序列被插入該表現卡匣以控制該 3CD 蛋白酶之表現/活性及識別有效 IRES 以適當處理 P1 而不對細胞產生毒性。為了有效產製 VLP，測試數種重組桿狀病毒以求有效之 VLP 產製，其中該重組桿狀病毒具有完整 P1 編碼序列及完整 3CD 蛋白酶編碼序列，其表現係由源自不同病毒物種或血清型之 IRES 控制。

舉例來說，本發明之表現卡匣可能包含與編碼人腸病毒 A 型 P1 多肽、EMCV IRES 及人腸病毒 A 型 3CD 蛋白酶之核酸可操作性連接之啟動子。

本發明之表現卡匣可能包含與編碼人腸病毒 A 型 P1 多肽、人腸病毒 C 型 IRES 及人腸病毒 A 型 3CD 蛋白酶之核酸可操作性連接之啟動子。

本發明之表現卡匣可能包含與編碼人腸病毒 C 型 P1 多肽、HEV71 IRES 及人腸病毒 C 型 3CD 蛋白酶之核酸可操作性連接之啟動子。

另外，本發明之表現卡匣可能包含與編碼人腸病毒 C 型 P1 多肽、EMCV IRES 及人腸病毒 C 型 3CD 蛋白酶之核酸可操作性連接之啟動子。

另外，在包含有效 IRES 之表現卡匣內製備 3CD 蛋白酶之截短及突變可能達成最大 VLP 產率。例如，HEV71 3C 蛋白酶之甘胺酸 (GenBank 編號 DQ341362.1 之胺基酸 1671) 利用點突變形成被改變成丙胺酸以表現突變之 HEV71 3C 及後續處理 HEV71 P1 多肽。

與該領域一般欲達成表現卡匣之蛋白質的高表現及高活性之目標的習知智慧不同的是，在一實施態樣中，本發明實際上尋求減少蛋白質之活性以達到最大蛋白質產率。該減少活性之 IRES 或 3C 蛋白酶核酸之突變非預期地導致腸病毒殼體蛋白及 VLP 之產量增加。

該表現卡匣可被選殖至適當載體，並經轉形/轉染至適當宿主細胞以表現及純化作爲疫苗之抗原以防範小核糖核酸病毒包括腸病毒之感染。

該編碼小核糖核酸病毒抗原類之表現卡匣可能被包含於質體內，該質體可能經轉染至真核宿主細胞並於適當生長條件下表現。適當之真核表現系統係該領域之技藝人士所知，包括可誘導之表現系統及適當之真核宿主細胞。

包含本發明之表現卡匣之哺乳動物細胞表現載體包括

該些可被過渡性轉染至宿主細胞及細胞系者。另外，哺乳動物細胞表現載體可為在轉染後穩定維持在宿主細胞內之載體。

另外，哺乳動物細胞表現載體可能包括經穩定或過渡性轉染至哺乳動物宿主細胞或細胞系中之載體，其中感興趣之蛋白質之表現係藉由添加誘導劑至培養基中誘導。哺乳動物宿主細胞及細胞系包括例如 CHO、HEK 293、COS-1、HeLa、Vero 及 NIH3T3 細胞。亦將了解的是，其他真核宿主細胞可能包括酵母菌細胞或其他哺乳動物細胞系。

表現卡匣可能包含於會轉染宿主細胞之重組病毒中。可能用於此目的之適當病毒包括桿狀病毒、牛痘病毒、辛德比斯(sindbis)病毒、SV40、仙台(Sendai)病毒、反轉錄病毒及腺病毒。適當之宿主細胞可能包括相容於上述病毒之宿主細胞，包括昆蟲細胞像是草地夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)細胞(例如 Sf9 細胞)、粉紋夜蛾(*Trichoplusia ni*)細胞、CHO 細胞、雞胚胎纖維母細胞、BHK 細胞、人 SW13 細胞、果蠅細胞、源自白線斑蚊(*Aedes albopictus*)之蚊子細胞。

包含腸病毒核酸之表現卡匣可能藉由該領域之技藝人士已知之手段被導入適當之宿主細胞中。該等宿主細胞在允許腸病毒基因及蛋白質表現之條件下增殖及培養。

編碼腸病毒 VP2 蛋白質或彼之誘發針對腸病毒之中性抗體之免疫或生物活性片段之基因可能被插入含有適當啟動子之質體中並於宿主細胞中表現。該經產製之腸病

毒 VP2 蛋白質將被分離並用來作為疫苗或診斷性用途之免疫原性組成物之基礎。

編碼腸病毒 VP4 蛋白質或彼之誘發針對腸病毒之中和性抗體之免疫或生物活性片段之基因可能被插入含有適當啟動子之質體中並於宿主細胞中表現。該經產製之腸病毒 VP4 蛋白質將被分離並用來作為疫苗或診斷性用途之免疫原性組成物之基礎。

編碼腸病毒 VP0 蛋白質或彼之誘發針對腸病毒之中和性抗體之免疫或生物活性片段之基因可能被插入含有適當啟動子之質體中並於宿主細胞中表現。該經產製之腸病毒 VP0 蛋白質將被分離並用來作為疫苗或診斷性用途之免疫原性組成物之基礎。

編碼腸病毒 VP0 蛋白之基因可能與適當之啟動子可操作相連並插入質體中，該質體展現與適當啟動子相連之腸病毒蛋白酶以提供雙重組質體，該雙重組質體最終可能於真核或原核細胞表現系統中表現。

用於選殖基因及表現腸病毒多肽抗原類之適當載體包括黏質體或質體。適當表現系統包括該領域之技藝人士已知之原核細胞表現系統及原核宿主細胞，包括經黏質體或質體轉形以於原核細胞中表現蛋白質之大腸桿菌 (*E. coli*)。

適當表現系統包括該領域之技藝人士已知之真核表現系統及經質體轉形以於各種真核宿主細胞及細胞系中表現蛋白質之真核宿主細胞。

另外，腸病毒多肽抗原類可能藉由該領域之技藝人士已知之手段得自宿主細胞或培養上清液。

腸病毒 VLP、次蛋白衣、抗原類、彼等之免疫活性成份及/或彼等之聚集體可能藉由該領域之技藝人士所知之任何適當純化手段得自經轉染及/或轉形之宿主細胞或宿主細胞之培養基、上清液及溶解物。分離經釋放至培養基中之蛋白質係獲得腸病毒 VLP、次蛋白衣、抗原類及/或聚集體之輕便方法。腸病毒 VLP、次蛋白衣、抗原類、彼等之免疫活性成份及/或彼等之聚集體可能藉由該領域之技藝人士已知之方法進一步濃縮及純化。

本發明之另一態樣包括疫苗，該疫苗包含小核糖核酸病毒抗原類諸如腸病毒抗原類、VLP 及/或次蛋白衣與適當佐劑之組合。該等小核糖核酸病毒抗原類、彼等之免疫活性片段、VLP 及/或次蛋白衣可能與任何適當之佐劑組合，諸如經修飾之牛痘病毒、ISCOMS、明礬、氫氧化鋁、磷酸鋁、弗氏(Freund's)不完全或完全佐劑、Quil A 及其他皂素或任何其他例如於 Vanselow (1987) S. Vet. Bull. 57 881-896 中所述之佐劑。

此處使用之用語「磷酸鋁」及「氫氧化鋁」的意義包括所有形式之適合用來佐劑化疫苗之氫氧化鋁或磷酸鋁。

另外，小核糖核酸病毒抗原類可藉由化學合成根據公眾可得之人小核糖核酸病毒之核酸或蛋白質序列之多肽或藉由化學合成製備。

在一態樣中，本發明提供包含一或多種人腸病毒 C 型

抗原類之疫苗。此處所使用之「脊髓灰白質炎病毒抗原」或「人腸病毒 C 型抗原」係指能刺激針對人腸病毒 C 型之中和性抗體的任何抗原。該病毒抗原可能包含外套/殼體蛋白或彼之片段、抗原性決定簇及/或其他人腸病毒 C 型蛋白。

本發明之一態樣包括人腸病毒 C 型病毒次單位疫苗，其包含作為抗原之單一人腸病毒 C 型病毒外套/殼體蛋白。更特別地，本發明關於包含人腸病毒 C 型 VP2 外套/殼體蛋白或彼之免疫原性片段作為抗原之疫苗類。

本發明之另一態樣包括含有人腸病毒 C 型病毒樣顆粒 (VLP)、次蛋白衣、複合體及/或聚集體之疫苗，其包含人腸病毒 C 型 VP1、VP2、VP3 及/或 VP4 或 VP0 蛋白。

重組 DNA 分子可能獲得，其中包含編碼人腸病毒 C 型結構蛋白及蛋白酶之開放閱讀框之核酸可藉由 PCR 擴增獲得，其利用經適當設計之與人腸病毒 C 型之核酸序列互補之引子。適當引子可根據標準技術自公眾可用之人腸病毒 C 型核酸序列設計，諸如該些 GenBank 之完整基因組序列且可由美國國家生物技術資料中心 (NCBI) 取得。人腸病毒 C 型脊髓灰白質炎病毒第一型基因組之完整基因組標號包括 V01149 及 V01150。

本發明之表現卡匣可能包含編碼人腸病毒 C 型 P1 多肽之核酸。該 P1 多肽係由在該表現卡匣之 IRES 的控制下所轉譯之 3CD 蛋白酶處理(切割)以產生 VP1、VP3 及/或 VP0 多肽。VP0、VP1 及 VP3 之組合可能自行相連成病

毒樣顆粒。

人腸病毒 C 型多肽抗原可能包含人腸病毒 C 型外套 / 殼體 VP2 蛋白、VP0 進一步處理之產物及與另一脊髓灰白質炎病毒 VP0、VP1、VP3 及 / 或 VP4 外套 / 殼體蛋白之組合。人腸病毒 C 型外套 / 殼體蛋白之組合可能採取病毒樣顆粒 (VLP)、次蛋白衣、複合體及 / 或聚集體之形式。

編碼人腸病毒 C 型外套 / 殼體 VP2 蛋白之基因可能被插入含有適當啟動子之質體並於宿主細胞中表現，該蛋白質可能經分離及使用為免疫原性組成物之基礎以作為疫苗。另外，編碼人脊髓灰白質炎病毒 VP2 蛋白之基因可能被插入含有適當啟動子之質體並於宿主細胞中表現，該蛋白質可能經分離及使用為免疫原性組成物之基礎以作為疫苗。

編碼人腸病毒 C 型外套 / 殼體 VP4 蛋白之基因可能被插入含有適當啟動子之質體並於宿主細胞中表現，該蛋白質可能經分離及使用為免疫原性組成物之基礎以作為疫苗。另外，編碼人脊髓灰白質炎病毒 VP4 蛋白之基因可能被插入含有適當啟動子之質體並於宿主細胞中表現，該蛋白質可能經分離及使用為免疫原性組成物之基礎以作為疫苗。

編碼人腸病毒 C 型外套 / 殼體 VP0 蛋白之基因可能被插入含有適當啟動子之質體並於宿主細胞中表現，該蛋白質可能經分離及使用為免疫原性組成物之基礎以作為疫苗。另外，編碼人脊髓灰白質炎病毒 VP0 蛋白之基因可

能被插入含有適當啟動子之質體並於宿主細胞中表現，該蛋白質可能經分離及使用為免疫原性組成物之基礎以作為疫苗。

本發明包含疫苗，該疫苗包含一或多種免疫活性抗原，該等免疫活性抗原包含一或多種人腸病毒 C 型 VP0、VP1、VP2、VP3、VP4 多肽或彼等之免疫活性片段，該疫苗誘發針對人腸病毒之保護性及/或中和性免疫反應。

在一實施態樣中，該表現卡匣實質上係由編碼人腸病毒 C 型 P1 多聚蛋白之核酸、IRES 及在該 IRES 之轉譯控制下之腸病毒 3CD 蛋白酶組成，該蛋白酶處理該人腸病毒 C 型 P1 多聚蛋白成為結構殼體蛋白。

在另一態樣中，本發明提供包含源自 P1 多聚蛋白之人腸病毒 A 型抗原類之疫苗，該 P1 多肽包括 VP2、VP4 及/或 VP0 蛋白及/或彼等之生物或免疫活性片段。該等人腸病毒 A 型抗原類可能源自 HEV71 及/或柯沙奇病毒 A16。該 HEV71 抗原可能為單一人腸病毒外套/殼體蛋白。特別是，該 HEV71 抗原可能為 HEV71 P1 多聚蛋白、VP4、VP2 或 VP0 多肽或彼等之片段，其在投予至人時誘發免疫反應。

在一實施態樣中，該人腸病毒 A 型抗原可為人腸病毒 A 型外套/殼體蛋白之組合或彼等之免疫活性片段。舉例來說，該人腸病毒 A 型抗原可能包含脊髓灰白質炎病毒 VP2 蛋白與選自 VP1、VP3 及/或 VP4 多聚蛋白之另一脊髓灰白質炎病毒外套/殼體蛋白之組合。VP2 多肽與另

一脊髓灰白質炎病毒外套/殼體蛋白之組合可能採取病毒樣顆粒(VLP)、次蛋白衣、複合體及/或聚集體之形式。該組合可能呈融合蛋白之形式。

更特別地，本發明關於包含人腸病毒 A 型 VP2 外套/殼體蛋白或彼之免疫原性片段作為抗原之疫苗類。

本發明之另一態樣包括含有人腸病毒 A 型病毒樣顆粒(VLP)及/或次蛋白衣之疫苗，其包含 VP1、VP2、VP3 及/或 VP4 或 VP0 人腸病毒 A 型蛋白。

重組 DNA 分子可能獲得，其中編碼人腸病毒 A 型結構蛋白及/或蛋白酶之開放閱讀框可藉由 PCR 擴增獲得，其利用經適當設計之與人腸病毒 A 型之核酸序列互補之引子。經適當設計之引子可根據標準技術自公眾可得之 HEV71 核酸序列設計。HEV71 之完整基因組的編號包括 DQ341362、AB204852、AF302996 及 AY465356。

重組 DNA 分子可能獲得，其中編碼人腸病毒 A 型 P1、VP1、VP2、VP3 及/或 VP4 或 VP0 蛋白及彼等之免疫活性片段及蛋白酶之開放閱讀框可藉由 PCR 擴增獲得，其利用經適當設計之與人腸病毒 A 型之核酸序列互補之引子。

在本發明之一態樣中，人腸病毒 A 型 P1 蛋白係經表現以形成多聚蛋白或多肽，該多聚蛋白或多肽接著被 3C 或 3CD 蛋白酶分解成 VP0、VP1 及 VP3 蛋白。VP0 蛋白可被進一步分解成 VP2 及 VP4 蛋白。該等腸病毒蛋白可能自組成 VLP、次蛋白衣、複合體及/或腸病毒蛋白之聚

集體。另外將了解的是，該非結構基因及蛋白酶基因可能被包含在相同之 DNA 重組分子或不同之 DNA 重組分子內，及/或自不同的啓動子或轉譯元件表現。

本發明之表現卡匣可能包含編碼人腸病毒 A 型 P1 多肽之核酸。該 P1 多肽係由在該表現卡匣之 IRES 的控制下所轉譯之 3CD 蛋白酶處理(切割)以產生 VP1、VP3 及 VP0 多肽及彼等之免疫活性片段。VP0、VP1 及 VP3 多肽之組合可能自行相連成病毒樣顆粒。

編碼人腸病毒 A 型 VP2 蛋白質或彼之免疫活性片段之基因可能被插入含有適當啓動子之質體中並於宿主細胞中表現。該經分離之人腸病毒 A 型抗原例如 HEV71 VP2 蛋白質可被分離並作為免疫原性組成物之基礎以用於疫苗或診斷性用途。

編碼人腸病毒 A 型 VP4 蛋白質或彼之免疫活性片段之基因可能被插入含有適當啓動子之質體中並於宿主細胞中表現。該經分離之 VP4 蛋白質可被分離並用來作為免疫原性組成物之基礎以用於疫苗或診斷性用途。

編碼人腸病毒 A 型 VP0 蛋白質或彼之免疫活性片段之基因可能被插入含有適當啓動子之質體中並於宿主細胞中表現。該經分離之 VP0 蛋白質可被分離並用來作為免疫原性組成物之基礎以用於疫苗或診斷性用途。

編碼人腸病毒 A 型 VP0 蛋白或彼之免疫活性片段之基因可能與適當之啓動子可操作性相連並插入質體中，該質體展現與適當啓動子相連之人腸病毒 A 型蛋白酶以提

供雙重組質體，該雙重組質體最終可能於真核或原核細胞表現系統中表現。

包含人腸病毒 A 型基因及核酸之表現卡匣可能藉由該領域之技藝人士已知之手段被導入適當之宿主細胞中。該等宿主細胞在允許人腸病毒 A 型基因及蛋白質表現之條件下增殖及培養。

本發明包含疫苗，該疫苗包含一或多種免疫活性抗原，該等免疫活性抗原包含一或多種人腸病毒 A 型 VP0、VP1、VP2、VP3、VP4 多肽或彼等之免疫活性片段，該疫苗誘發針對人腸病毒之保護性及/或中和性免疫反應。

在一實施態樣中，該表現卡匣實質上係由編碼人腸病毒 A 型 P1 多聚蛋白之核酸、IRES 及在該 IRES 之轉譯控制下之腸病毒 3CD 蛋白酶組成，該蛋白酶處理該人腸病毒 P1 多聚蛋白成為腸病毒結構殼體蛋白。該等結構蛋白可採取 VLP、次蛋白衣、複合體及/或聚集體之形式。

事實上，如此處所述之一或多種腸病毒蛋白之表現提供誘發抗體類之抗原類，該等抗體類具功能性且能以高力價中和選自 HEV71、柯沙奇病毒 A16、人腸病毒 C 型或任何其他小核糖核酸病毒之腸病毒。

該一或多種腸病毒蛋白之表現顯示 VP2 及/或 VP0 多肽包含被中和性抗血清辨識之表位。

這些功能性抗體意外地與腸病毒 VP2 及 VP0 多肽較強結合相較於 VP1 多肽，該 VP1 多肽係該領域已知之產製中和性抗體所需之主要殼體蛋白。我們並未預期到 VP2

多肽事實上在產製針對 HEV71 感染之中和性抗體上係為重要。

因此，令人意外的是腸病毒 VP2 多肽係產製針對腸病毒感染之中和性抗體的殼體蛋白之顯性表位或抗原性決定簇。單獨之 HEV71 VP2 多肽或與其他 HEV71 殼體蛋白例如 VP0 多肽之組合係顯性抗原，其誘發針對 HEV71 之中和性抗體。

在本發明之態樣中，用於預防腸病毒感染之預防性疫苗係經考慮，該等疫苗納入人腸病毒之 VP0 及/或 VP2 結構蛋白至免疫原性組成物中。該免疫原性組成物或疫苗可能包含源自人腸病毒 A 型包括 HEV71 及柯沙奇病毒 A16 之 VP0 或 VP2 結構蛋白或彼等之組合。該免疫原性組成物可能被投予至個體以誘發針對人腸病毒之中和性抗體。該免疫原性組成物可能被包含於經投予至個體之疫苗中，以預防由人腸病毒 A 型諸如 HEV71 及/或柯沙奇病毒 A16 造成之手足口症感染。

在本發明之另一態樣中，治療性疫苗係經提供以預防及/或緩解 HEV71 及/或柯沙奇病毒 A16 感染之併發症，例如以症候群表現之神經系統及心血管系統併發症，諸如腦膜炎、腦炎、急性弛緩性麻痺、肺水腫及心衰竭。

在本發明之態樣中，用於預防腸病毒感染之預防性疫苗係經考慮，該疫苗納入源自人腸病毒 C 型之 VP0 或 VP2 結構蛋白，例如 PV1、PV2、PV3 結構蛋白或彼等之組合或彼等之生物或免疫活性片段。該免疫原性組成物可

能被包含於經投予至個體之疫苗中，以預防由人腸病毒 C 型包括 PV1、PV2 及 PV3 造成之小兒麻痺感染。

另外，該免疫原性組成物或疫苗可能包含源自人腸病毒 C 型及人腸病毒 A 型兩種抗原類之組合。

以下可參照本發明隨附圖式中說明之各種實施態樣。在這些實施態樣中，應注意的是腸病毒 VLP、次蛋白衣、抗原類及聚集體及 DNA 重組分子之特定建構體系僅供示範。

可能得到的結論是腸病毒 VP2 多肽在達成中和性抗體上係為重要。VP2 多肽可能足以被調製成針對小核糖核酸病毒感染之疫苗，諸如人腸病毒 A 型 HEV71 及柯沙奇病毒 A16、人腸病毒 C 型第 1、2 及 3 型及人腸病毒 D 型 EV68。

在本發明之態樣中，用於預防腸病毒感染之預防性疫苗係經考慮，該等疫苗納入該病毒之至少 VP0 及 / 或 VP2 及 VP4 結構蛋白至免疫原性組成物中。該免疫原性組成物可能被投予至個體以誘發針對小核糖核酸病毒之中和性抗體。該免疫原性組成物可能被包含於疫苗中，該疫苗係經投予至個體以預防小核糖核酸病毒感染。

在本發明之另一態樣中，治療性疫苗係經提供以預防及 / 或緩解小核糖核酸病毒感染之併發症，例如以症候群表現之神經系統及心血管系統併發症，諸如腦膜炎、腦炎、急性弛緩性麻痺、肺水腫及心衰竭。

在本發明之其他態樣中，本發明之疫苗組成物係經提

供以用於醫藥。

在另一態樣中，本發明提供雙價或多價疫苗，其包含腸病毒 VP0 及/或 VP2 及/或 VP4 抗原類。舉例來說，人腸病毒 A 型 VP0 及/或 VP2 及/或 VP4 抗原類可能經組合。另外，源自人腸病毒 A 型之不同血清型的前述抗原類諸如柯沙奇病毒 A16 及 HEV71 之抗原類可能被組合於例如針對人手足口症之疫苗中。

該等雙價或多價疫苗之腸病毒抗原類可能自此處描述之表現卡匣產製。該等腸病毒抗原類可採取病毒樣顆粒、次蛋白衣、複合體及/或聚集體之形式。

在另一態樣中，本發明提供包含腸病毒抗原類及提供針對下列一或多種病原體之免疫性之抗原之雙價或多價疫苗：白喉(D)、破傷風(T)、百日咳(P)、B 型流感嗜血桿菌(Hib)、A 型肝炎(HA)、B 型肝炎(HB)及人腸病毒 71 型。

在小兒疫苗中，其他相容抗原類亦可被包含，例如已知能有效對抗 B 型腦膜炎、A 型腦膜炎、C 型腦膜炎及中耳炎之抗原類。

在每疫苗劑量內小核糖核酸病毒抗原之量係經選擇為於典型接種過疫苗者體內能引起免疫保護反應且無顯著不利之副作用的量。該量將隨所採用之特定免疫原種類而定。特定疫苗之理想量可由觀察受試者之抗體力價及其他反應之標準試驗確定。初次疫苗接種療程可能包括間隔投予 2 或 3 劑疫苗，該間隔能提供理想之免疫保護反應。

因此本發明提供一種預防人之小核糖核酸病毒感染之

方法，該方法包含以免疫有效劑量之本發明任何上述態樣之疫苗治療需要治療之人個體。

如此處及申請專利範圍中所使用，下列用語及用詞具有以下意義。

「抗體」係指由 B 淋巴樣細胞產製之免疫球蛋白分子，其具有由抗原(免疫原)在人或其他動物中引起之特定胺基酸序列。這些分子具有與該抗原專一性反應之特徵。

「抗體反應」或「體液反應」係指一種免疫反應，其中抗體因應抗原性刺激而由 B 淋巴樣細胞產製及分泌至血液及/或淋巴液。在功能適當之免疫反應中，該抗體與細胞(例如病原體)表面之抗原專一性結合，使該細胞成為吞噬細胞及/或補體媒介性機轉摧毀之標靶。

「抗原」係指任何物質，當其與適當細胞接觸導致誘導敏感及/或免疫反應性之狀態，且在體內或試管內與該經致敏之個體的抗體及/或免疫細胞以可顯現之方式反應。

「表位」係指在複合抗原分子上最簡單形式之抗原性決定簇。此為免疫球蛋白或 T 細胞受體所辨識之抗原的特定部分。

「融合蛋白」係指藉由表現組合二或多種源自不同腸病毒結構蛋白之基因序列所製備之多肽而形成之蛋白抗原。

「免疫活性片段」或「生物活性片段」係指腸病毒結構蛋白之片段，其誘發針對腸病毒之中和性抗體類。因此，在本發明之上下文中，該等免疫活性片段係經呈現給有機體之免疫系統以影響或更佳地誘導特定免疫反應，藉以免疫

或預防性保護該有機體以防範腸病毒之感染。

中和性抗體免疫反應係指免疫系統之特化細胞辨識該等異源性蛋白、肽或表位之存在並發動特定免疫反應。

在一實施態樣中，本發明之疫苗抗原可誘導保護性免疫反應。此處使用之用語「保護性免疫反應」及/或「中和性免疫反應」係意圖表示該經免疫之個體本身可能不受該疫苗免疫所防範之致病性劑之感染。

「細胞性反應」或「細胞性宿主反應」係指一種由能直接清除病毒感染或癌細胞之特定助手及殺手 T 細胞所媒介之免疫反應。

「抗原呈現細胞」係指抗原誘導事件之附屬細胞，其主要功能為處理及呈現抗原給淋巴細胞。抗原呈現細胞 (APC) 與抗原之交互作用係免疫誘導中之關鍵步驟，因為其使淋巴細胞能面對及辨識抗原性分子並變得活化。示範性 APC 包括巨噬細胞、蘭氏 (Langerhans) 樹突細胞、濾泡樹突細胞及 B 細胞。

「B 細胞」係指一種產製與抗原交互反應之免疫球蛋白或抗體之淋巴細胞。

「細胞毒性 T 淋巴細胞」係一種特化之淋巴細胞，其能摧毀外來細胞及受到感染劑感染之宿主細胞，該等細胞產製病毒性抗原。

用語「實質上由...組成」係指除了該些必備成份以外，其他成份亦可能存在於組成物中，惟其該等組成物之實質、基本及/或新穎特徵不受彼等存在之實質影響。

用語「可操作性連接」係指該等所述成份之間的關係允許它們以它們應該進行之方式作用。因此舉例來說，與核酸「可操作性連接」之啟動子表示該啟動子與順反子或超過一個順反子之核酸係以可產製單一順反子、單一雙順反子或單一多順反子信使 RNA (mRNA) 之方式組合。信使 RNA 之蛋白質表現可能根據該核酸序列之轉錄/轉譯元件調節。以順反子上游(5')之方向將 IRES 序列插入表現卡匣中係指該 IRES 序列與該順反子之核酸之連結方式使得該順反子 mRNA 之轉譯受到 IRES 控制之調節。

以下可參照本發明隨附圖式中說明之各種實施態樣。在這些實施態樣中，應注意的是小核糖核酸病毒 VLP、次蛋白衣、抗原類及聚集體及 DNA 重組分子之特定建構體係僅供示範。

【實施方式】

實施例 1：HEV71 VLP 表現卡匣及載體之說明

表現卡匣可經由該領域已知之方法建構。

1.1 HEV71 VLP 表現卡匣 [P1+IRES+3CD]

特徵：

卡匣大小：5172 bp

prPs：痘病毒強早/晚合成性啟動子，43 bp

P1：源自 EV71-SB12736-SAR-03 (GenBank 編號：DQ341362) 之 P1 蛋白編碼序列，添加終止密碼子，

2588 bp

IRES： 內部核糖體結合位點，585 bp

3CD： 源自 EV71-SB12736-SAR-03 (GenBank 編號：DQ341362)之 P3 的 C 及 D 蛋白編碼序列，添加 ATG 起始密碼子及終止密碼子，1940 bp

Pac I： 罕見切割者，使卡匣能被選殖至 pSNX01 中 (MVA del 3 整合載體)

該卡匣係經選殖至 pDONR221 Gateway 進入載體 (Invitrogen)以產製 pSN01。

見圖 1 之表現卡匣及 pSN01 質體。

1.2 HEV71 VLP 表現卡匣 [P1+IRES+3C]

特徵：

卡匣大小： 3773 bp

prPS： 痘病毒強早/晚合成性啟動子，43 bp

P1： 源自 EV71-SB12736-SAR-03 (GenBank 編號：DQ341362)之 P1 蛋白編碼序列，添加終止密碼子，2588 bp

IRES： 內部核糖體結合位點，585 bp

3CD： 源自 EV71-SB12736-SAR-03 (GenBank 編號：DQ341362)之 P3 的 C 蛋白編碼序列，添加 ATG 起始密碼子及終止密碼子，551 bp

Pac I： 罕見切割者，使卡匣能被選殖至 pSNX01 中 (MVA del 3 整合載體)

該卡匣係經選殖至 pDONR221 Gateway 進入載體 (Invitrogen)以產製 pSN03。

見圖 2 之表現卡匣及 pSN03 質體。

1.3 獲得包含該插入物 HEV71[P1+IRES+3CD] 或 [P1+IRES+3C]之重組桿狀病毒之方法

HEV71 P1 加 3CD 之來源材料係 pSN01，P1 加 3C 之來源材料係 pSN03。目標係將源自 pSN01 及 pSN03 (進入載體)之 HEV71-VLP 卡匣藉由利用 LR CLONASE®之 attL/aaR 試管內重組導入桿狀病毒表現質體 pDEST8 (目的載體)中，遵照 Invitrogen BAC-TO-BAC®手冊(2009)中之說明進行。

建立二種重組酶反應：

1. pSN01 (EV71-P1+3CD) x pDEST8 以產製 pSN07；
2. pSN03 (EV71-P1+3C) x pDEST8 以產製 pSN08

pSN07 及 pSN08 被用於藉由轉形 DH10bac 以產製重組桿狀病毒質體 (bacmid) bacSN07 及 bacSN08，根據 Invitrogen BAC-TO-BAC®手冊所述進行。該重組桿狀病毒質體係經轉染至 Sf9 細胞以救援重組桿狀病毒 SN07 及 SN08。

該重組桿狀病毒 SN07 及 SN08 被用於另行感染 6 孔盤中之 Sf9 細胞以評估經處理之殼體蛋白之表現。對 VP1 具專一性之多株兔抗血清被用於西方墨點法中以識別自重組桿狀病毒感染之 Sf9 細胞的溶解物及上清液中之 VP1 蛋

白。

1.4 VP1 於經 SN07 感染之 Sf9 細胞之上清液中之表現

在感染後第 3 至 7 天每天收集經感染之 Sf9 細胞的上清液，蛋白質係於 12% SDS-PAGE 上分離並轉移至硝化纖維素膜上，接著利用多株兔抗 VP1 抗血清 (1:4000 稀釋) 隔夜偵測，然後以經 HRP 共軛之抗兔血清 (1:1000 稀釋) 於室溫中作用 1 小時。西方墨點接著利用 TMB 呈色。結果顯示於圖 3。觀察到 HEV71 VP1 係經處理，該蛋白之表現在感染後第 3 及 4 天之上清液中被觀察到，且該 VP1 之表現量在之後減少。重組桿狀病毒 SN07 感染 Sf9 細胞產生抗原，該抗原係於上清液發現。

實施例 2：上清液及溶解物中經處理之 VP1

Sf9 細胞係經不同之重組桿狀病毒分離株以 10 之感染複數 (MOI) 感染，包括 SN07、SN08、對照桿狀病毒 bacGUS 及空白感染。上清液及溶解物係於感染後第 3 及 4 天收集，並利用兔抗 VP1 抗血清 (1:4000 稀釋) 進行西方墨點分析以評估蛋白質之表現，藉以比較由 SN07 及 SN08 所產製之蛋白質的產率。如圖 4 所示，表現建構體 SN07 相較於表現建構體 SN08 在感染後第 3 及 4 天之上清液及溶解物中皆產製較多經切割之 VP1。

實施例 3：VP1 及 VP0 在經 100kD 分子量截留 (MWCO) 膜

超過濾後出現於滯留物中

使感染後第 3 天收集之經 SN07 感染之 Sf9 細胞的上清液變澄清並通過 AMICON®過濾器 (Millipore Corp.) 之 100 kDa MWCO。測試該滯留物有無經處理之 VP1 及 VP0 存在。由於 VP1 之分子量大約為 33 kDa，VP0 之分子量為 36 kDa，因此不預期這些蛋白質會留在滯留物中除非它們呈現寡聚體之形式。如圖 5 所示，這些抗原在上清液通過 100kDa MWCO 超過濾膜後維持在滯留物中。這顯示該等抗原係相連成寡聚體形式。因此，可以得到 VP1 及 VP0 係經處理且與其他殼體蛋白相連成寡聚體之結論。

實施例 4：該滯留物用於免疫小鼠時誘發強烈之針對 HEV71 之中和性抗體

二組遠交系白色小鼠係以實施例 3 所製備之經 SN07 感染之 Sf9 上清液濃縮物免疫。該使用之免疫計劃係如圖 6 所示。

所有免疫組之小鼠產生中和 HEV71 之抗體，如表 1 所示。該滯留物用於免疫小鼠時誘發強烈之針對 HEV71 之中和性抗體。

表 1 針對 HEV71 之中和性抗體

小鼠編號	中和倒數力價
m1-1	160
m1-2	640
m1-3	≥ 2560
m1-4	640
m2-1	80
m2-2	640
m2-3	640
m2-4	160
對照 1	< 10
對照 2	< 10

因此，結論是寡聚體蛋白能在小鼠誘發中和性抗體。

該等寡聚體蛋白可能被用於免疫原性組成物中及/或包含於疫苗內以用於預防腸病毒感染。

實施例 5：VP0 係於經 SN07 感染之 Sf9 細胞的溶解物中表現

Sf9 細胞係經 SN07 感染，且該溶解物係於 72、96 及 120 小時收集。利用針對 EV71 VP0 之兔多株抗血清檢測免疫轉漬，結果顯示 VP0 係於感染後 72 小時表現。如圖 7 所示，自感染後 96 小時開始，VP0 被部分切割成 VP2。因此 VP0 及 VP2 皆存在於 SN07 感染細胞之溶解物中。

實施例 6：以經 SN07 感染之 Sf9 細胞的上清液中之寡聚體抗原免疫之小鼠的集合中和血清在 ELISA 中對重組 VP2 具有高力價

ELISA 孔盤係以等量之重組 VP1 及 VP2 包覆，並用於檢測集合中和性小鼠抗血清。圖 8 顯示接受該上清液滯留物抗原製劑之小鼠與 VP2 之結合優於 VP1。因此，結論是該等抗體具有功能性且能以高力價中和 HEV71。

實施例 7：以經 SN07 感染之 Sf9 細胞的上清液中之寡聚體抗原免疫之小鼠的集合中和血清與 VP2 及 VP0 之結合強過與 VP1 之結合

圖 9 之西方墨點分析顯示中和性集合小鼠抗血清與 VP2 及 VP0 之結合強過與 VP1 之結合，即使添加至各孔槽之總蛋白之量相同。這顯示 VP2 及 VP0 包含中和性抗血清所識別之表位。

這些功能性抗體意外地與 VP2 及 VP0 較強地結合，相較於被認為是產製中和性抗體所需之主要殼體蛋白 VP1。因此可以推斷 VP2 事實上在產製中和性抗體上具有重要性。

可以結論認為在疫苗調製劑中 VP2 之存在對於產生中和性抗體具有重要性。VP2 可能足以被調製成針對 HEV71 及其他腸病毒 A 型、B 型或 C 型物種之疫苗，包括人柯沙奇病毒 A16、伊科病毒 30 型及脊髓灰白質炎病毒 1 型、2 型或 3 型。

進一步將了解的是，本發明之範圍包括一種產生針對脊髓灰白質炎病毒之免疫反應之方法，該方法包括投予有效量之包含脊髓灰白質炎病毒抗原之疫苗之步驟。

實施例 8：比較中和性抗體之量

包含 HEV71 VP1 之免疫原性組成物係用於免疫小鼠。類似地，包含 HEV71 VP2 及 /或 VP0 之免疫原性組成物係用於免疫小鼠。經 HEV71 VP2 及 /或 VP0 免疫之小鼠的中和性抗體量係與經 HEV71 VP1 免疫之小鼠的中和性抗體量比較。該經 HEV71 VP2 及 /或 VP0 免疫之小鼠的中和性抗體量係顯著高於經 HEV71 VP1 免疫之小鼠的中和性抗體量。

實施例 9：建構重組桿狀病毒載體以自單一雙順反子信息表現人腸病毒 C 型 P1 區及蛋白酶 3CD

此實施例提供一種藉由減少蛋白酶 3CD 媒介之殺滅桿狀病毒感染細胞，而導致有效產製人腸病毒 C 型(脊髓灰白質炎病毒)之 VLP 之方法。

建構自單一雙順反子信息表現 P1 區及蛋白酶 3CD 之重組桿狀病毒載體係於例如圖 1 所示。該 3CD 蛋白酶基因係於 EMCV IRES 之控制下以帽蓋非依賴性方式轉譯。此系統提供調節蛋白酶 3CD 表現之工具，即評估該突變 IRES 序列以找出最弱之 IRES，以使得相較於 P1 蛋白較少量之蛋白酶係經產製。

雙順反子載體係經建構，其中該質體在 P1 編碼序列之上游包含多角體蛋白啟動子。編碼 P1 之順反子下游係腦心肌炎病毒(EMCV) 內部核糖體進入位點(IRES)序列

(GenBank 編號 AF113968.2；核苷酸 1666 至 2251)，然後是包含編碼蛋白酶 3CD 之核苷酸序列的順反子。人腸病毒 C 型 P1 與 3CD 之來源物質可自美國菌種保存中心(ATCC)取得，並自己知之人腸病毒 C 型序列合成(GenBank 可自美國國家生物技術資料中心(NCBI)獲得)。

重組桿狀病毒係利用 BAC-TO-BAC®系統根據廠商說明(Invitrogen)製備。簡言之，LR CLONASE®係用於將人腸病毒 C 型 VLP 卡匣藉由 attL/aaR 試管內重組導入桿狀病毒表現質體 pDEST8 (目的載體)。該 LR CLONASE®反應係於 25℃ 進行 1 小時，然後與蛋白酶 K 一起培養。該 LR CLONASE®反應混合物係經轉形至 Library Efficiency DH5 α 勝任細胞以獲得表現株。DNA 係自該形成之表現株分離，並藉由限制酶分析證實人腸病毒 C 型卡匣之存在。重組桿狀病毒質體係藉由導入該表現卡匣至藉由 T7 轉位重組酶於 DH10bac 細胞所獲取之桿狀病毒基因組中建構。該重組桿狀病毒質體係藉由彼等在添加 50 $\mu\text{g/ml}$ 卡那黴素(kanamycin)、7 $\mu\text{g/ml}$ 健他黴素(gentamicin)、10 $\mu\text{g/ml}$ 四環素、100 $\mu\text{g/ml}$ X-gal 及 40 $\mu\text{g/ml}$ IPTG 之 LB 洋菜膠板上的白色表型確認。PureLink HiPure 質體 DNA 微量製備套組(Invitrogen)係用於自 DH10Bac *E. coli* 純化高品質之桿狀病毒質體 DNA。源自該插入物之 M13 前置引子、M13 反置引子及內部引子被用於證實人腸病毒 C 型卡匣之存在。EFFECTENE®轉染試劑(Qiagen)被用於藉由轉染 DNA 至 Sf9 昆蟲細胞以救援重組桿狀病毒。簡言

之，Sf9 細胞係以每個 T25 角瓶 2 百萬個細胞接種，並於 28℃ 培養 6 小時以黏附。一微克之重組桿狀病毒質體 DNA 係經重懸於 150 μ l 之 DNA 凝聚緩衝液，8 μ l 之增強溶液係經混合並於室溫中培養 5 分鐘。接著將 25 μ l 之 EFFECTENE® 試劑添加至該 DNA 混合物，於室溫中培養 10 分鐘。一毫升之培養基被添加於含有該轉染複合物之試管中，然後轉移並均勻散佈至細胞培養角瓶中。在第 3 天，以 500g 離心 5 分鐘以收集上清液。在轉染後製備高力價之病毒保存液。一旦獲得高力價病毒保存液，使用該保存液以測定標靶蛋白表現之理想時間。

實施例 10：藉由減少蛋白酶 3CD 媒介之殺滅經桿狀病毒感染之細胞製備 HEV71 及人腸病毒 C 型之 VLP

此實驗描述建構重組桿狀病毒載體以自單一雙順反子信息表現 P1 區及蛋白酶 3CD。該蛋白酶基因 3CD 係於 EMCV IRES 之控制下以帽蓋非依賴性方式轉譯，如圖 10 所示。此系統提供調節蛋白酶 3CD 表現之工具，即評估該突變 IRES 序列以找出最弱之 IRES，以使得相較於 P1 蛋白較少量之蛋白酶係經產製。

雙順反子載體係經建構，其中質體在 P1 編碼序列之上游包含多角體蛋白啟動子。編碼 P1 之順反子下游係腦心肌炎病毒 (*Encephalomyocarditis virus*) (EMCV) 內部核糖體進入位點 (IRES) 序列及包含編碼該蛋白酶 3CD 之核苷酸序列的順反子，見圖 1。實施例 1 所使用之 IRES 包

含天然之 EMCV IRES 序列，另外有經改變之序列形式。圖 10 所示之天然 EMCV IRES 序列顯示在 JK 區段之 A6 雙岐圈環。添加一個核苷酸例如腺嘌呤(A7)減少其表現。同樣地，在實施例 1 所使用之建構體中，該 3CD 蛋白酶之胺基端係與腦心肌炎病毒 IRES 融合。重要地以 3CD 蛋白酶編碼序列改變 EMCV 起始密碼子之讀框應顯著減少下游基因之表現，見圖 11。兩種修飾皆被納入 pSN01 之 EMCV IRES 序列中，其命名為 pSN01-M1 且由 DNA2.0 合成，如圖 12 所示。

設計實驗以了解自 pSN01-M1 之突變 EMCV IRES 所表現之 VLP 之特徵。重組桿狀病毒係利用 BAC-TO-BAC® 系統根據廠商說明 (Invitrogen) 製備。簡言之，LR CLONASE®係用於將 HEV71 VLP 卡匣藉由 attL/aaR 試管內重組導入桿狀病毒表現質體 pDEST8 (目的載體)。該 LR CLONASE®反應係於 25°C 進行 1 小時，然後與蛋白酶 K 一起培養。該 LR CLONASE®反應混合物係經轉形至 Library Efficiency DH5 α 勝任細胞以獲得表現株。DNA 係自該形成之表現株分離，並藉由限制酶分析證實 HEV71/脊髓灰白質炎病毒卡匣之存在。重組桿狀病毒質體係藉由導入 pSN07-M1 之表現卡匣至藉由 T7 轉位重組酶於 DH10bac 細胞所獲取之桿狀病毒基因組中建構以得到 bacSN07-M1。該重組桿狀病毒質體係藉由彼等在添加 50 $\mu\text{g/ml}$ 卡那黴素 (kanamycin)、7 $\mu\text{g/ml}$ 健他黴素 (gentamicin)、10 $\mu\text{g/ml}$ 四環素、100 $\mu\text{g/ml}$ X-gal 及 40

$\mu\text{g/ml}$ IPTG 之 LB 洋菜膠板上的白色表型確認。PureLink HiPure 質體 DNA 微量製備套組 (Invitrogen) 係用於自 DH10Bac *E. coli* 純化高品質之桿狀病毒質體 DNA。源自該插入物之 M13 前置引子、M13 反置引子及內部引子被用於證實 HEV71/脊髓灰白質炎病毒卡匣之存在。EFFECTENE®轉染試劑 (Qiagen) 被用於藉由轉染 DNA 至 Sf9 昆蟲細胞以救援重組桿狀病毒。簡言之，Sf9 細胞係以每個 T25 角瓶 2 百萬個細胞接種，並於 28°C 培養 6 小時以黏附。一微克之重組桿狀病毒質體 DNA 係經重懸於 150 μl 之 DNA 凝聚緩衝液，8 μl 之增強溶液係經混合並於室溫中培養 5 分鐘。接著將 25 μl 之 EFFECTENE®試劑添加至該 DNA 混合物，於室溫中培養 10 分鐘。一毫升之培養基被添加於含有該轉染複合物之試管中，然後轉移並均勻散佈至細胞培養角瓶中。在第 3 天，以 500g 離心 5 分鐘以收集上清液。在轉染後製備高力價之病毒保存液。一旦獲得高力價病毒保存液，使用該保存液以測定標靶蛋白表現之理想時間。要分析感興趣之蛋白質，生長於 10% Grace's 昆蟲細胞培養基 (Invitrogen) 中之 Sf9 細胞係經重懸於 1% FBS Sf900-II SFM 培養基 (Invitrogen) 以得到單一細胞，以每毫升一百萬之密度接種於角瓶並於 28°C 培養 4 小時。病毒保存液係以 10 之 MOI 被添加至 PBS 清洗細胞，輕搖 1 小時。用 PBS 清洗該經感染之細胞三次，使細胞生長於 Sf900II-SFM 不同時間期間。細胞以低張勻漿緩衝液 / 1% TRITON® X-100 (TX-100) (1.5mM MgCl_2 ，

50mM KCl, 20mM HEPES, 1% TX-100)溶解, 於室溫中搖晃角瓶 30 分鐘, 藉由自該角瓶收集經溶解之細胞並於 4 °C 以 7000 rpm 離心 30 分鐘以製備細胞溶解物。該細胞溶解物及上清液之成份係藉由免疫轉漬及 ELISA 利用特定抗體分析。

實施例 11: 藉由減少蛋白酶 3CD 媒介之殺滅經桿狀病毒感染之細胞有效製備 HEV71 及人腸病毒 C 型(脊髓灰白質炎病毒)之 VLP

建構自單一雙順反子信息表現 P1 區及蛋白酶 3CD 之重組桿狀病毒載體係如圖 1 所示。該 3CD 蛋白酶基因係於 EMCV IRES 之控制下以帽蓋非依賴性方式轉譯, 如圖 10 所示。此系統提供調節 3CD 蛋白酶表現之工具, 即評估該突變 IRES 序列以找出最弱之 IRES, 以使得相較於 P1 蛋白較少量之蛋白酶係經產製。

雙順反子載體係經建構, 該質體在 P1 編碼序列之上游包含多角體蛋白啟動子。編碼 P1 之順反子下游係腦心肌炎病毒(EMCV)內部核糖體進入位點(IRES)序列及包含編碼該 3CD 蛋白酶之核苷酸序列的順反子, 見圖 1。實施例 1 所使用之 IRES 包含天然之 EMCV IRES 序列, 另外有經改變之序列形式。該天然 EMCV IRES 序列具有在 JK 區段之 A6 雙岐圈環, 藉由添加一個核苷酸(A7)已知能減少其表現, 見圖 10。該 pSN01 之 EMCV IRES 序列中之 A6 雙岐圈環係經基因改質為 A7 並命名為 pSN01-M2, 見

圖 13，其係藉由 DNA2.0 合成。

由 pSN01-M2 之突變 EMCV IRES 所表現之 VLP 係經特徵化。重組桿狀病毒係利用 BAC-TO-BAC®系統根據廠商說明 (Invitrogen) 製備。簡言之，LR CLONASE®係用於將 HEV71 VLP 卡匣藉由 attL/aaR 試管內重組導入桿狀病毒表現質體 pDEST8 (目的載體)。該 LR CLONASE®反應係於 25°C 進行 1 小時，然後與蛋白酶 K 一起培養。該 LR CLONASE®反應混合物係經轉形至 Library Efficiency DH5 α 勝任細胞以獲得表現株。DNA 係自該形成之表現株分離，並藉由限制酶分析證實 HEV71/脊髓灰白質炎病毒卡匣之存在。重組桿狀病毒質體係藉由導入 pSN07-M2 之表現卡匣至藉由 T7 轉位重組酶於 DH10bac 細胞所獲取之桿狀病毒基因組中建構以得到 bacSN07-M2。該重組桿狀病毒質體係藉由彼等在添加 50 $\mu\text{g/ml}$ 卡那黴素 (kanamycin)、7 $\mu\text{g/ml}$ 健他黴素 (gentamicin)、10 $\mu\text{g/ml}$ 四環素、100 $\mu\text{g/ml}$ X-gal 及 40 $\mu\text{g/ml}$ IPTG 之 LB 洋菜膠板上的白色表型確認。PureLink HiPure 質體 DNA 微量製備套組 (Invitrogen) 係用於自 DH10Bac *E. coli* 純化高品質之桿狀病毒質體 DNA。源自該插入物之 M13 前置引子、M13 反置引子及內部引子被用於證實 HEV71/脊髓灰白質炎病毒卡匣之存在。EFFECTENE®轉染試劑 (Qiagen) 被用於藉由轉染 DNA 至 Sf9 昆蟲細胞以救援重組桿狀病毒。簡言之，Sf9 細胞係以每個 T25 角瓶 2 百萬個細胞接種，並於 28°C 培養 6 小時以黏附。一微克之重組桿狀病毒質

體 DNA 係經重懸於 150 μ l 之 DNA 凝聚緩衝液，8 μ l 之增強溶液係經混合並於室溫中培養 5 分鐘。接著將 25 μ l 之 EFFECTENE®試劑添加至該 DNA 混合物，於室溫中培養 10 分鐘。一毫升之培養基被添加於含有該轉染複合物之試管中，然後轉移並均勻散佈至細胞培養角瓶中。在第 3 天，以 500g 離心 5 分鐘以收集上清液。在轉染後製備高力價之病毒保存液。一旦獲得高力價病毒保存液，使用該保存液以測定標靶蛋白表現之理想時間。要分析感興趣之蛋白質，生長於 10% Grace's 昆蟲細胞培養基 (Invitrogen) 中之 Sf9 細胞係經重懸於 1% FBS Sf900-II SFM 培養基 (Invitrogen) 以得到單一細胞，以每毫升一百萬之密度接種於角瓶並於 28°C 培養 4 小時。病毒保存液係以 10 之 MOI 被添加至 PBS 清洗細胞，輕搖 1 小時。用 PBS 清洗該經感染之細胞三次，使細胞生長於 Sf900II-SFM 不同時間期間。細胞以低張勻漿緩衝液 / 1% TX-100 (1.5mM MgCl₂, 50mM KCl, 20mM HEPES, 1% TX-100) 溶解，於室溫中搖晃角瓶 30 分鐘，藉由自該角瓶收集經溶解之細胞並於 4°C 以 7000 rpm 離心 30 分鐘以製備細胞溶解物。該細胞溶解物及上清液之成份係藉由免疫轉漬及 ELISA 利用特定抗體分析。

實施例 12：藉由減少蛋白酶 3CD 媒介之殺滅經桿狀病毒感染之細胞有效製備 HEV71 及人腸病毒 C 型 (脊髓灰白質炎病毒) 之 VLP

建構自單一雙順反子信息表現 P1 區及蛋白酶 3CD 之重組桿狀病毒載體係如圖 1 所示。該 3CD 蛋白酶基因係於 EMCV IRES 之控制下以帽蓋非依賴性方式轉譯，如圖 10 所示。此系統提供調節蛋白酶 3CD 表現之工具，即評估該突變 IRES 序列以找出最弱之 IRES，以使得相較於 P1 蛋白較少量之蛋白酶係經產製。

雙順反子載體係經建構，其中質體在 P1 編碼序列之上游包含多角體蛋白啟動子。編碼 P1 之順反子下游係腦心肌炎病毒 (EMCV) 內部核糖體進入位點 (IRES) 序列及包含編碼該蛋白酶 3CD 之核苷酸序列的順反子 (圖 1)。實施例 1 所使用之 IRES 包含天然之 EMCV IRES 序列，另外有經改變之序列形式。在 pSN01 建構體中，該 3CD 蛋白酶之胺基端係與腦心肌炎病毒多聚蛋白融合。以 3CD 蛋白酶編碼序列改變 EMCV 起始密碼子之讀框應顯著減少下游基因之表現，見圖 11。此改質被納入 pSN01 之 EMCV IRES 序列並命名為 pSN01-M3，見圖 14，其係由 DNA2.0 合成。

由 pSN01-M3 之突變 EMCV IRES 所表現之 VLP 係經分析。重組桿狀病毒係利用 BAC-TO-BAC® 系統根據廠商說明 (Invitrogen) 製備。簡言之，LR CLONASE® 係用於將 HEV71 VLP 卡匣藉由 attL/aaR 試管內重組導入桿狀病毒表現質體 pDEST8 (目的載體)。該 LR CLONASE® 反應係於 25°C 進行 1 小時，然後與蛋白酶 K 一起培養。該 LR CLONASE® 反應混合物係經轉形至 Library Efficiency

DH5 α 勝任細胞以獲得表現株。DNA 係自該形成之表現株分離，並藉由限制酶分析證實 HEV71/脊髓灰白質炎病毒卡匣之存在。重組桿狀病毒質體係藉由導入 pSN07-M3 之表現卡匣至藉由 T7 轉位重組酶於 DH10bac 細胞所獲取之桿狀病毒基因組中建構以得到 bacSN07-M3。該重組桿狀病毒質體係藉由彼等在添加 50 $\mu\text{g/ml}$ 卡那黴素 (kanamycin)、7 $\mu\text{g/ml}$ 健他黴素 (gentamicin)、10 $\mu\text{g/ml}$ 四環素、100 $\mu\text{g/ml}$ X-gal 及 40 $\mu\text{g/ml}$ IPTG 之 LB 洋菜膠板上的白色表型確認。PureLink HiPure 質體 DNA 微量製備套組 (Invitrogen) 係用於自 DH10Bac *E. coli* 純化高品質之桿狀病毒質體 DNA。源自該插入物之 M13 前置引子、M13 反置引子及內部引子被用於證實 HEV71/脊髓灰白質炎病毒卡匣之存在。EFFECTENE® 轉染試劑 (Qiagen) 被用於藉由轉染 DNA 至 Sf9 昆蟲細胞以救援重組桿狀病毒。簡言之，Sf9 細胞係以每個 T25 角瓶 2 百萬個細胞接種，並於 28°C 培養 6 小時以黏附。一微克之重組桿狀病毒質體 DNA 係經重懸於 150 μl 之 DNA 凝聚緩衝液，8 μl 之增強溶液係經混合並於室溫中培養 5 分鐘。接著將 25 μl 之 EFFECTENE® 試劑添加至該 DNA 混合物，於室溫中培養 10 分鐘。一毫升之培養基被添加於含有該轉染複合物之試管中，然後轉移並均勻散佈至細胞培養角瓶中。第 3 天後，以 500g 離心 5 分鐘以收集上清液。在轉染後製備高力價之病毒保存液。一旦獲得高力價病毒保存液，使用該保存液以測定標靶蛋白表現之理想時間。

要分析感興趣之蛋白質，生長於 10% Grace's 昆蟲細胞培養基 (Invitrogen) 中之 Sf9 細胞係經重懸於 1% FBS Sf900-II SFM 培養基 (Invitrogen) 以得到單一細胞，以每毫升一百萬之密度接種於角瓶並於 28℃ 培養 4 小時。病毒保存液係以 10 之 MOI 被添加至 PBS 清洗細胞，輕搖 1 小時。用 PBS 清洗該經感染之細胞三次，使細胞生長於 Sf900II-SFM 不同時間期間。細胞以低張勻漿緩衝液 / 1% TX-100 (1.5mM MgCl₂，50mM KCl，20mM HEPES，1% TX-100) 溶解，於室溫中搖晃角瓶 30 分鐘，藉由自該角瓶收集經溶解之細胞並於 4℃ 以 7000 rpm 離心 30 分鐘以製備細胞溶解物。該細胞溶解物及上清液之成份係藉由免疫轉漬及 ELISA 利用特定抗體分析。

實施例 13：突變 IRES 建構體 M2 在上清液中表現較高量之 VP1

在野生型或突變 EMCV IRES 之控制下所表現之重組桿狀病毒表現 HEV71 殼體蛋白係就自該 EMCV IRES 之 HEV71 殼體蛋白的表現量方面經過評估。桿狀病毒在實施例 1 之 SN07 的野生型 EMCV IRES 及分別在實施例 10、11 及 12 之 3 個突變 IRES M1、M2 及 M3 之控制下所表現的 VLP 係就該桿狀病毒表現 HEV71 殼體蛋白之量方面經過分析。不同啟動子 (F) 及對照重組桿狀病毒表現 bacGUS (G) 下之重組桿狀病毒表現 P1 及 3CD 亦包含於本實驗中。Sf9 細胞係以 MOI 5 感染，溶解物及上清液皆如

上實施例 10 至 12 所述於第 3 天收集。該溶解物及上清液係利用抗 VP1 抗體偵測以檢測 HEV71 殼體蛋白之表現。

圖 15 之免疫轉漬顯示當溶解物係以抗 VP1 之抗體偵測時，該突變物 M1 及 M2 相較於突變物 M3 或由 2 個啟動子啟動之建構體表現較高量之 VP1。然而，突變物 M2 在上清液中產生較多 VP1。這些資料係顯示於上方之圖。

圖 15 下方之圖顯示利用抗 gp64 抗體偵測之免疫轉漬，抗 gp64 抗體係針對桿狀病毒之外套蛋白。該免疫轉漬顯示每個樣本皆產製等量之桿狀病毒。

實施例 14：利用桿狀病毒表現系統選殖、表現及純化次單位疫苗

本發明意圖產製及使用融合成單一免疫原之重組 HEV71 及脊髓灰白質炎病毒結構蛋白以於經免疫之個體中誘發保護性免疫反應。本發明大致關於製備重組 HEV71 及/或脊髓灰白質炎病毒融合蛋白疫苗組成物，其包含 HEV71 及/或脊髓灰白質炎病毒次單位蛋白或彼等之免疫原性片段及與該重組 HEV71 及/或脊髓灰白質炎病毒次單位融合蛋白組合之佐劑。HEV71 及脊髓灰白質炎病毒次單位融合蛋白可能包含選自 VP1、VP2、VP3、VP4、彼等之組合或彼等之免疫原性片段之組合之殼體蛋白。在本實施態樣之一態樣中，該重組 HEV71 及/或脊髓灰白質炎病毒融合蛋白包含 HEV71 或脊髓灰白質炎病毒次單位蛋白及與該 HEV71 或脊髓灰白質炎病毒次單位蛋白基因

相連之融合伴蛋白。本發明考慮產製建構體藉以在大腸桿菌及桿狀病毒中表現下列次單位疫苗之方法：VP0、VP4-VP2-VP3 融合、VP2-VP3-VP1 融合。

爲了自 HEV71 及 / 或脊髓灰白質炎病毒製備編碼 VP0、VP4-VP2-VP3 融合或 VP2-VP3-VP1 之 cDNA，利用經純化之基因組病毒 RNA 進行逆轉錄 / 聚合酶連鎖反應 (High Pure 核酸套組；Roche)。前置因子及反置引子係自該等基因之 5' 及 3' 端製備，且該等引子納入起始及終止密碼子。該經擴增之 PCR 產物係以 EcoRI 及 NotI 限制酶消化，並經選殖至如圖 16 所示之 pFastBac HT 載體 (Invitrogen)。Invitrogen 之 BAC-TO-BAC® 表現系統係供商用，使用根據廠商說明。該等融合基因被選殖至 pFastBac HT 捐贈質體，重組蛋白質之產製係根據 BAC-TO-BAC® 桿狀病毒表現系統 (Invitrogen)。攜帶該等融合基因之 pFastBac HT 捐贈質體係藉由 T7 轉位重組酶之定點重組經轉移至桿狀病毒穿梭載體 (桿狀病毒質體)。此係於大腸桿菌株 DH10Bac 中完成。該等 DH10Bac 細胞包含授予卡那黴素 (kanamycin) 抗藥性之桿狀病毒質體，及編碼轉位酶和授予四環素抗藥性之輔助質體。該含有感興趣基因之重組 pFastBac HT 質體係經轉形至 DH10Bac 細胞以轉位產製重組桿狀病毒質體。該經轉形之細胞係經連續稀釋，各稀釋液被接種於添加 50 µg/ml 卡那黴素、7 µg/ml 健他黴素、10 µg/ml 四環素、100 µg/ml X-gal 及 40 µg/ml IPTG 之 LB 洋菜板上，於 37°C 培養至少 48 小時。

挑選白色菌株並再劃線以確認白色表型。重組桿狀病毒質體係藉由 PureLink HiPure 質體 DNA 微量製備套組 (Invitrogen) 分離，DNA 樣本被溶解於 40 μ l 之 TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA) 並用於轉染。

該經分離之桿狀病毒質體 DNA 係經 PCR 篩選以找出感興趣之插入基因。EFFECTENE®轉染試劑 (Qiagen) 被用於藉由轉染 DNA 至 Sf9 昆蟲細胞以救援重組桿狀病毒。簡言之，Sf9 細胞係以每個 T25 角瓶 2 百萬個細胞接種，並於 28°C 培養 6 小時以黏附。一微克之重組桿狀病毒質體 DNA 係經重懸於 150 μ l 之 DNA 凝聚緩衝液，8 μ l 之增強溶液係經混合並於室溫中培養 5 分鐘。接著將 25 μ l 之 EFFECTENE®試劑添加至該 DNA 混合物，於室溫中培養 10 分鐘。一毫升之培養基被添加於含有該轉染複合物之試管中，然後轉移並均勻散佈至細胞培養角瓶中。在第 3 天，以 500g 離心 5 分鐘以收集上清液。在轉染後製備高力價之病毒保存液。一旦獲得高力價病毒保存液，使用該保存液以測定標靶蛋白表現之理想時間。要分析感興趣之蛋白質，生長於 10% Grace's 昆蟲細胞培養基 (Invitrogen) 中之 Sf9 細胞係經重懸於 1% FBS Sf900-II SFM 培養基 (Invitrogen) 以得到單一細胞，以每毫升一百萬之密度接種於角瓶並於 28°C 培養 4 小時。病毒保存液係以 10 之 MOI 被添加至 PBS 清洗細胞，輕搖 1 小時。用 PBS 清洗該經感染之細胞三次，使細胞生長於 Sf900II-SFM 不同時間期間。細胞以低張勻漿緩衝液 / 1%TX-100 (1.5mM

MgCl₂ , 50mM KCl , 20mM HEPES , 1% TX-100)溶解 , 於室溫中搖晃角瓶 30 分鐘 , 藉由自該角瓶收集經溶解之細胞並於 4℃ 以 7000 rpm 離心 30 分鐘以製備細胞溶解物。該等異源性蛋白於細胞中之表現係藉由 SDS 聚丙醯胺膠體電泳 (SDS-PAGE) 及西方墨漬確認 , 西方墨漬使用 His 探針 -HRP 抗體 (Thermo Scientific) 作為探針。一旦桿狀病毒之產製及蛋白質之表現經過確認 , 該病毒保存液係經擴增以產製攜帶該感興趣基因之桿狀病毒的濃縮保存液。同時建立最適當之感染昆蟲細胞之病毒濃度及產製該所欲蛋白之理想時間點。要在變性條件下純化 , 將細胞溶於含有 6 M 胍基 -HCl 於 100 mM NaH₂PO₄ 中、10 mM Tris、300mM NaCl、10 mM 咪唑 pH 8.0 (溶胞緩衝液) 之溶胞緩衝液中。將該懸浮液置於冰上超音波震盪 5 次脈衝 , 每次脈衝 1 分鐘功率設定 60 瓦 , 於室溫中混合 1 小時。該溶解物以 27K g 離心 30 分鐘以去除細胞殘渣。該上清液被加入預先經溶胞緩衝液平衡之 HisTrap (GE healthcare life sciences) 管柱。在加入上清液後 , 用 20 倍管柱體積之 6 M 胍基 -HCl 於 100 mM NaH₂PO₄ 中、10 mM Tris、300 mM NaCl、40 mM 咪唑 pH 8.0 (清洗緩衝液 1) 清洗該管柱 , 然後用 20 倍管柱體積之 8 M 尿素於 100 mM NaH₂PO₄ 中、10 mM Tris、300 mM NaCl、40 mM 咪唑 pH 8.0 (清洗緩衝液 2) 清洗該管柱。經結合之蛋白質係以含有 8 M 尿素、100 mM NaH₂PO₄、10 mM Tris、300 mM NaCl、250 mM 咪唑 pH 8 之緩衝液 (洗脫液) 洗脫。集合含

有蛋白質之組分，並以 PBS 於 4° C 隔夜透析。TEV 蛋白酶被用於在蛋白質純化後移除組胺酸標籤，根據廠商說明使用。

實施例 15：於大腸桿菌表現及純化人腸病毒 A 型及人腸病毒 C 型(脊髓灰白質炎病毒)次單位疫苗

Champion™ pET SUMO 表現系統(Invitrogen)在大腸桿菌 (*E. coli*)能產製最高量之可溶性蛋白。其利用小泛素相關修飾因子(SUMO)融合以增進經表現之融合蛋白之可溶性。在表現後，該 11 kD SUMO 基團可藉由具高度特異性及活性之 SUMO (ULP-1)蛋白酶切割其羧基端，以產生原本蛋白質。其亦包含 N 端 6xHis 標籤以用於蛋白檢測及純化。

用於表現 HEV71 及脊髓灰白質炎病毒之抗原性融合蛋白之 pET SUMO-VP0、pET SUMO-VP4-VP2-VP3 及 pET SUMO-VP2-VP3-VP1 表現載體(如圖 17)的建構係於下說明。VP0、VP4-VP2-VP3 融合及 VP2-VP3-VP1 融合之片段被用來作為 HEV71 及脊髓灰白質炎病毒次單位疫苗之抗原。SUMO 模體及 6XHistag 係與融合蛋白之 N 端共軛以分別協助該蛋白質之溶解及該蛋白質之純化。該等抗原性融合蛋白係藉由基因選殖技術產製，包含選殖編碼個別蛋白質之 cDNA 序列至表現載體以形成 pET SUMO- VP0、pET SUMO- VP0、pET SUMO- VP4-VP2-VP3 及 pET SUMO-VP2-VP3-VP1 之表現載體。編碼融合伴之 DNA 片

段係利用分別由位於前置引子及反置引子之起始密碼子及終止密碼子組成之特定引子經 PCR 擴增。PCR 產物之接合係如下進行：新鮮 PCR 產物、10X 接合緩衝液、pET SUMO 載體 (25 ng/ μ l) 2 μ l、無菌水加至總體積 9 μ l 及加入 1 μ l T4 DNA 接合酶 (4.0 Weiss 單位)，該接合反應係於 15°C 隔夜培養，然後用於轉形 One Shot® Mach1™ -T1R (Invitrogen) 勝任細胞。挑選十株 (10) 細胞，利用 PureLink™ HQ Mini 質體純化套組 (Invitrogen) 自該等細胞株分離質體 DNA。該等質體係藉由限制酶分析確認存在正確方向性之插入物。質體 DNA 係如稍早所述自重組細胞分離，且該等質體被轉形至 BL21 (DE3) One Shot® 細胞 (Invitrogen)。該等轉形細胞係經生長，並於數個時間點利用 IPTG 誘導表現以決定最佳表現時間。在每個時間點，自該經誘導及未經誘導之培養液中取出 500 μ l，所得之各細胞團塊以 80 μ l 之 SDS-PAGE 樣本緩衝液重懸。在離心該經煮沸之樣本後，取各樣本 10 μ l 加至 SDS-PAGE 膠體並加以電泳。

爲了大量純化重組融合蛋白使用 HisTrap 鎳管柱 (GE Healthcare Life Sciences)，採用下列步驟。隔夜細胞培養液 (5%) 被接種於添加 50 μ g/ml 卡那黴素之 100 至 300 ml LB 中，並在 2 小時後以 1mM IPTG 誘導。經 2 小時後，以 3000g 離心 10 分鐘以收集細胞。該細胞團塊被重懸於 10% (該培養之總體積) 結合緩衝液中 (20mM 磷酸鈉、0.5M NaCl 及 20mM 咪唑 pH7.4)。細胞係經 Misonic

UltraSonicate 液體處理器超音波震盪 5 次每次 1 分鐘，間隔時置於冰桶中 1 分鐘。該經超音波震盪之樣本藉由在 4℃ 以 4000 rpm 離心 1 小時分成可溶及不可溶形式。不可溶組分係以含有 6M 尿素之結合緩衝液重懸。可溶及不可溶組分皆於 4℃ 以 4000 rpm 離心 1 小時，然後經 0.22 μ m 過濾單位過濾。HisTrap 管柱係以結合緩衝液平衡，然後加入過濾樣本置該管柱。接著，以含有 40mM 咪唑之結合緩衝液清洗管柱，以含有 0.5M 咪唑 (6M 尿素用於不可溶組分) 之結合緩衝液洗脫該重組蛋白質。所有收集樣本係利用考馬斯藍蛋白質染色法測試。含有純的重組蛋白之經洗脫組分係利用於 Tris-HCl 中之 Merck 透析管透析。在透析後，蛋白質濃度係利用布拉德福德 (Bradford) 試劑預測。根據廠商說明，使用 SUMO 蛋白酶切割含有 6xHis 標籤及 SUMO 之 N 端肽以產製該天然蛋白。

實施例 16：源自經 SN07 滯留物免疫之小鼠的集合中和血清之抗體與 EV71VLP 之所有成份結合

VP1、VP2 及 VP0 係如實施例 15 所述被分開選殖至 pET SUMO 載體。各殼體蛋白係如實施例 15 所述於大腸桿菌中表現及純化。該經純化之蛋白質 VP0、VP1、VP2 及 VP3 係進行西方墨點分析，並利用實施例 4 所使用之集合中和血清稀釋 1000 倍後偵測。實施例 4 所使用之對照小鼠血清亦包括於本試驗中。

圖 18 之西方墨點試驗結果顯示，以經 SN07 感染之

Sf9 細胞的上清液中之寡聚體抗原免疫小鼠所得到之集合中和血清能與所有 VLP 成份 VP0、VP1、VP2 及 VP3 結合。

實施例 17：HEV71 VLP 之特徵，下拉展開源自培養上清液之 HEV71 VLP

20ml 之源自經重組桿狀病毒 SN07 感染之細胞的上清液係與 10ml 之中和性單株抗體 (EV18/4/D6-1/F1/G9) 混合，靜置於室溫中 1 小時。該混合物被緩慢添加經過 1ml 之 MabSelect SuRe™ (GE Health Care) 重組蛋白 A、85um 洋菜糖珠大小管柱，該管柱係經 PBS 預平衡，然後以 20ml PBS 清洗，再以 0.5 ml 之 0.1M 甘胺酸-HCl，pH3.0 洗脫。組分係 30μl 之 Tris-HCl，pH8.8 中和。洗脫液組分進行 SDS-PAGE 分析，然後進行考馬斯藍染色及脫色。

圖 19 顯示所有 VLP 成份 (VP0、VP1 及 VP3) 皆可於經考馬斯藍染色之 SDS-PAGE 膠體中看見。

實施例 18：經親和性管柱 (AFC) 純化之 HEV71 VLP 之分析

親和性管柱 (AFC) 係利用中和性單株抗體 (EV18/4/D6-1/F1/G9) 製備，該單株抗體係利用桿狀病毒 SN07 上清液滯留物發展。該經洗脫之組分係藉由西方墨點法分析，結果顯示於圖 20。在第 1 及 2 行經洗脫之組分係利用抗 VP1 抗體偵測，顯示 VP1 存在於經 AFC 純化之 VLP 中。

在第 3 及 4 行經洗脫之組分係利用抗 VP2 抗體偵測，顯示 VP2 亦存在於經 AFC 純化之 VLP 中。在第 5 及 6 行經洗脫之組分係利用抗 VP2 單株抗體偵測，顯示 VP2 存在於經 AFC 純化之 VLP 中。

實施例 19：經 AFC 純化之 HEV71 VLP 之電子顯微圖

自實施例 18 之親和性管柱(AFC)洗脫之組分係藉由電子顯微鏡評估。經 AFC 純化之 VLP 的電子顯微鏡圖係顯示於圖 21。該電子顯微鏡之結果證實 HEV71 結構蛋白係組裝成 VLP。

實施例 20：利用滯留物之小鼠保護試驗

使用之抗原係經 20 倍濃縮之如上述製備之重組桿狀病毒 SN07 之粗製滯留物。在交配隔天早上藉由陰道栓塞判斷是否懷孕，定該天為胚胎日 E0.5。二劑 100 μ L 之滯留物係與 IMJECT® (明礬)混合，第一劑於 E3.5 經 i.p.注射至懷孕母鼠，在測量體重證實懷孕後，於 E17.5 給予第二劑。在投予第一劑疫苗之前自各鼠收集初期血液樣本，之後每周收集一次樣本直到以病毒攻毒幼鼠後 14 天。共三組 Balb/c 小鼠，20 隻小鼠係經免疫然後攻毒(20 隻小鼠)，20 隻小鼠係經空白免疫然後攻毒(20 隻小鼠)，5 隻小鼠未經免疫、未經攻毒。五日齡之幼鼠係以 50 μ l 之 MP-26M 病毒(含有 100 x HD₅₀ 之 MP-26M)感染。每天觀察所有經感染之動物是否出現疾病臨床症狀二次，直到感

染後 14 天。異常徵兆包括生長遲緩、體重減輕、體型瘦小、胃中無乳、疲倦、歪頭、弓背、翹毛、脫水、低體溫、肢體麻痺。麻痺係根據下列分級系統評分：

- 0 - 正常
- 1 - 肢體無力但仍可移動肢體
- 2 - 無法移動受影響之肢體
- 3 - 四肢癱瘓即無法移動之四肢

被評分爲第 3 級癱瘓之動物在麻醉 (HD₅₀) 下施以頸椎脫臼予以安樂死。對多種目標器官之切片進行組織病理學研究。

該保護性試驗之結果係顯示於下表 2。

表 2

於被動保護中提供 83% 之保護

疫苗	交配小鼠數量	懷孕小鼠數量	出生幼鼠數量	幼鼠總數	存活幼鼠數量	存活率	存活中位數(天數)
滯留物	20	2	1,5	6	5*	83%	14
明礬/PBS	20	2	5,7	12	0	0%	5
無疫苗/無攻毒	5+5	2+1	5,7,6	18	18	100%	14

經 VLP 免疫之母鼠產下兩胎幼鼠。一隻母鼠產下 5 隻幼鼠，並且會照顧幼鼠。第二隻母鼠產下 1 隻非常虛弱之幼鼠，該母鼠不照顧幼鼠。

我們的結論是經免疫之母鼠產下之幼鼠中 83% 在病毒

攻毒中受到保護。

組織病理學觀察之概要係於表 3 顯示。

表 3 組織病理學觀察概要
(N= 無異常檢測)

疫苗	日齡	天數 P1	小鼠	症狀	脾	肝	心	骨骼肌	脊椎	腦
VLP	19	14	V87P4	無感染之臨床症狀	N	N(1)	N	0.5	N	N
	19	14	V87P5	無感染之臨床症狀	N	N(1)	N	0.5	N	N
	19	14	V87P6	無感染之臨床症狀	N	N(1)	N	N	N	N
明礬/PBS	10	5	DC4	第3級癱瘓	N	N(2)	N	3	N	N
			DC5	第3級癱瘓	N	N(2)	N	3	N	N
			DC6	第3級癱瘓	N	N(2)	N	03	N	N
無疫苗	19	NI	V116P4	無感染之臨床症狀	N	N(0.5)	N	N	N	N
			V116P5	無感染之臨床症狀	N	N(0.5)	N	N	N	N

五隻產下幼鼠之母鼠被納入疫苗保護試驗中(11%懷孕率)。人道終點之量(HD₅₀)係依據 Reed and Muench, 1938 之方法計算為 2.0×10^2 TCID₅₀ 之 MP-26M。經免疫之母鼠所產下之小鼠中 83%在攻毒中受到保護。

組織病理學結果顯示，經 HEV71-VLP 免疫之母鼠所產下之 3 隻幼鼠在以 HEV71 病毒攻毒後顯示無感染之臨床症狀。

然而，經空白免疫(明礬/PBS)之母鼠所產下之 3 隻幼

鼠在以 HEV71 病毒攻毒後受到感染。未經免疫母鼠、未攻毒組之 2 隻小鼠無顯示感染之臨床症狀。

VLP 疫苗保護一胎幼鼠(5/6 經免疫母鼠產下之幼鼠，相較於 0/12 經空白免疫母鼠產下之幼鼠)免於受到 HEV71 之 B3 基因型小鼠適應株之致死性攻毒。

實施例 21：人腸病毒 C 型(脊髓灰白質炎病毒-PV) VLP 表現

不同的脊髓灰白質炎病毒表現卡匣係經建構以產製脊髓灰白質炎病毒 VLP。所有表現卡匣皆包含脊髓灰白質炎病毒 P1 多肽及不同的 IRES，該等 IRES 引導脊髓灰白質炎病毒 3CD 蛋白酶之表現：(PV-P1+HEV71-IRES+PV-3CD)、(PV-P1+EMCV-IRES+PV-3CD)、(PV-P1+PV-IRES+PV-3CD)。獲得該脊髓灰白質炎病毒 VLP 表現卡匣之重組桿狀病毒係經測試。以該桿狀病毒感染細胞後 3 天收集該經感染細胞之溶解物，利用兔抗 PVP3 抗體(1:2000)評估脊髓灰白質炎病毒 VP3 之表現。

只有含 PV-IRES 之建構體產製預期大小之 VP-3 蛋白。和 PV-IRES 建構體不同的是，當 3CD 蛋白酶處於 HEV71-IRES 或 EMCV -RES 之控制下時，該脊髓灰白質炎病毒 VP3 蛋白未經適當處理，因此不良地影響該脊髓灰白質炎病毒 VLP 之產製。因此，獲得 PV-IRES 之脊髓灰白質炎病毒 PV-VLP 表現卡匣能非常有效地產製脊髓灰白質炎病毒 VLP。

實施例 22：ELISA 證實脊髓灰白質炎病毒 PV-VLP 組裝

爲了證實脊髓灰白質炎病毒 VLP 係自該 PV-VLP 表現卡匣產製，利用攜帶 PV-VLP 表現卡匣之重組桿狀病毒的溶解物及上清液進行二位點 ELISA，其中該 PV-3CD 蛋白酶係位於脊髓灰白質炎病毒 IRES 之控制下。Sf9 細胞係經攜帶 PV-VLP 表現卡匣(包括 PV-IRES)之重組桿狀病毒感染。在感染後第 3 天收集溶解物及上清液。脊髓灰白質炎病毒 VLP 之形成係利用二位點 ELISA 評估。

二位點 ELISA 之進行係藉由製備經蛋白 A 純化之兔抗脊髓灰白質炎病毒 VP3 抗體作爲捕捉抗體，將其稀釋於包覆緩衝液(0.05M 碳酸鹽-碳酸氫鹽緩衝液，pH 9.6)至 50 μ g/mL。100 μ l/孔之抗體係分配於 NUNC 免疫孔盤，於 4 $^{\circ}$ C 儲存隔夜。在 PBST (0.05%)清洗後，該免疫孔盤以 200 μ l/孔之封閉液(1%酪蛋白於 PBS 中)於室溫中封閉 2 小時。源自攜帶 PV-VLP 表現卡匣之重組桿狀病毒(其中該 PV-3CD 蛋白酶係位於脊髓灰白質炎病毒 IRES 之控制下)的溶解物及上清液之樣本係經稀釋劑(0.2%酪蛋白於 PBS 中)稀釋，以 100 μ l/孔分配，並於室溫中培養 1 小時然後用 PBST (0.05%)清洗。

爲了檢測 VLP，小鼠單株抗體抗 VP1 (5-D8/1 株；Dako)係以 0.2%酪蛋白於 PBS 中稀釋爲 1:250。該經稀釋之檢測單株抗體係以 100 μ l/孔分配，並於室溫中培養 1 小時。抗小鼠 HRP 共軛之二級抗體係以 0.2%酪蛋白於 PBS

中稀釋為 1:1000。在以 PBST (0.05%)清洗孔盤後，100 μ l/孔之經稀釋之二級抗體係經分配，該孔盤於室溫中培養 1 小時。該孔盤以清洗緩衝液 PBST (0.05%)清洗。SureBlueTM TMB 1(KPL)成份微孔過氧化酶受質係以 100 μ l/孔分配，於室溫中培養 10 分鐘以發色。加入 100 μ l/孔之停止溶液 (5mM NaOH)以停止反應。各孔之吸光度係於 OD 650nm 下讀取。

圖 23 之二位點 ELISA 之結果證實 VP1 及 VP3 蛋白係彼此相連，顯示 VLP 確實係自該 PV-VLP 表現卡匣形成。

實施例 23：建構具有 HEV71 IRES 之 HEV71 VLP 表現卡匣 (P1+HEV71 IRES+3CD)

圖 24 顯示具有 HEV71-IRES 之 HEV71 VLP 表現卡匣的結構。該表現卡匣類似實施例 1 之建構體 (pSN01)，不同的是該 3CD 蛋白酶之表現係由 HEV71 IRES 驅動而非 EMCV IRES。HEV71 IRES 序列可見於 GenBank 編號 DQ341362.1，核苷酸 1 至 747。含有 HEV71 表現卡匣之載體係藉由利用 LR CLONASE®之 attL/aaR 試管內重組導入桿狀病毒表現質體 pDEST8 (目的載體)中，遵照 Invitrogen BAC-TO-BAC®手冊 (2009)中之說明。進入載體與 pDEST8 之間的重組產生表現株。如 Invitrogen BAC-TO-BAC®手冊所述，表現株藉由轉形 DH10bac 以得到重組桿狀病毒質體。使該重組桿狀病毒質體轉染至 Sf9 細胞救援該攜帶具有 P1、HEV71 IRES 及 3CD 之表現卡匣的

重組桿狀病毒。

進一步感染 Sf9 細胞可被用於評估救援重組桿狀病毒於 6 孔盤中表現經處理之殼體蛋白。對 VP1、VP0 及 VP3 具專一性之多株兔抗血清將被用於西方墨點法中以識別自重組桿狀病毒感染之 Sf9 細胞的溶解物及上清液中之組裝 VLP。

實施例 24：建構具有 PV-IRES (P1+PV-IRES+3CD) 之 HEV71 VLP 表現卡匣

該表現卡匣類似實施例 24 之表現卡匣，不同的是該 3CD 蛋白酶之表現係由脊髓灰白質炎病毒 IRES (PV-IRES) 驅動而非 HEV71-IRES。該脊髓灰白質炎病毒 IRES 序列可見於 GenBank 編號 V01150.12，核苷酸 1 至 628。

含有 HEV71 表現卡匣之載體係藉由利用 LR CLONASE®之 attL/aaR 試管內重組導入桿狀病毒表現質體 pDEST8 (目的載體)中，遵照 Invitrogen BAC-TO-BAC®手冊(2009)中之說明進行。進入載體與 pDEST8 之間的重組反應係經建立以產製表現株。如 Invitrogen BAC-TO-BAC®手冊所述，表現株藉由轉形 DH10bac 以得到重組桿狀病毒質體。使該重組桿狀病毒質體轉染至 Sf9 細胞救援該攜帶具有 P1、PV IRES 及 3CD 之表現卡匣的重組桿狀病毒。

進一步感染 Sf9 細胞可被用於評估救援重組桿狀病毒於 6 孔盤中表現經處理之殼體蛋白。對 VP1、VP0 及 VP3

具專一性之多株兔抗血清將被用於西方墨點法中以識別自重組桿狀病毒感染之 Sf9 細胞的溶解物及上清液中之組裝 VLP。

【圖式簡單說明】

圖 1：HEV71 VLP 表現卡匣 [P1+IRES+3CD]及 pSN01 質體。

圖 2：HEV71 VLP 表現卡匣 [P1+IRES+3C]及 pSN03 質體。

圖 3：VP1 於經 SN07 感染之 Sf9 細胞之上清液中之表現。

圖 4：上清液及溶解物中經處理之 VP1。

圖 5：VP1 及 VP0 在經 100kDa 分子量截留 (MWCO)膜超過濾後出現於滯留物中。

圖 6：產製中和性抗體之免疫計劃。

圖 7：在 3 次不同收集時間，以抗 VP0 (箭頭)之兔多株抗血清偵測之免疫轉漬。

圖 8：以經 SN07 感染之 Sf9 細胞的上清液中之寡聚體抗原免疫之小鼠的集合中和血清在 ELISA 中顯示對重組 VP2 具有高力價。

圖 9：以經 SN07 感染之 Sf9 細胞的上清液中之寡聚體抗原免疫之小鼠的集合中和血清與 VP2 及 VP0 之結合強過與 VP1 之結合。

圖 10：EMCV 基因組之 EMCV IRES (SEQ ID NO:1)

區。

圖 11：以 3CD 蛋白酶編碼序列改變 EMCV 起始密碼子之讀框；天然 IRES 序列 (SEQ ID NO:2) 與突變 IRES 序列 (SEQ ID NO:3)。

圖 12：質體 pSN01-M1。

圖 13：質體 pSN01-M2。

圖 14：質體 pSN01-M3。

圖 15：用於表現 HEV71 VLP 之不同重組桿狀病毒設計的表現比較。

圖 16：質體 pFastBac™ HT。

圖 17：人腸病毒 A 型及人腸病毒 C 型之抗原性融合蛋白之原核細胞表現建構體。

圖 18：源自經 SN07 滯留物免疫之小鼠的集合中和血清之抗體與 HEV71 VLP 之所有成份結合。

圖 19：HEV71 VLP 之特徵，下拉展開源自培養上清液之 HEV71 VLP。

圖 20：經親和性管柱 (AFC) 純化之 HEV71 VLP 之分析。

圖 21：經 AFC 純化之 HEV71 VLP 之電子顯微圖。

圖 22：人腸病毒 C 型 (脊髓灰白質炎病毒 -PV) VLP 表現。

圖 23：脊髓灰白質炎病毒 -VLP VP3-VP1 ELISA。

圖 24：具有 HEV71-IRES 及 HEV71 3CD 蛋白酶之 HEV71 VLP 表現卡匣。

圖 25：具有 PV-IRES 及 HEV71 3CD 蛋白酶之 HEV71
VLP 表現卡匣。

序列表

<110> 瑪莉珍卡杜莎
穆哈莫德 賈米路德
沙利方賓丁哈米德

<120> 抗原類及針對人腸病毒之疫苗類

<130> SENTINEXT 1 PCT

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 586
<212> RNA
<213> 腦心肌炎病毒

<220>
<221> misc_feature
<223> 內部核糖體進入位點

<400> 1
gccccucucc ccccccccc ccuaacguua cuggccgaag ccgcuuggaa uaaggccggu 60
guguguuugu cuauauguga uuuuccacca uauugccguc uuuuaggcau gugaggggccc 120
ggaaaccugg ccugucucuc uugacgagca uuccuagggg ucuuucccu cucgccaag 180
gaaugcaagg ucuguugaau gucgugaagg aagcaguucc ucuggaagcu ucugaagac 240
aaacaacguc uguagcgacc cuuugcaggc agcgggaacc cccaccuggc gacaggugcc 300
ucugcggcca aaagccacgu guauaagaua caccugcaaa ggcggcaciaa ccccagugcc 360
acguugugag uuggauaguu guggaaagag ucaaauugcu cuccucaagc guagucaaca 420
aggggcugaa ggaugccag aagguacccc auuguauagg aaucugaucu ggggccucgg 480
ugcacaugcu uuacaugugu uuagucgagg uuaaaaaagc ucuaggcccc ccgaaccacg 540
gggacguggu uuuccuuuga aaaacacgau gaaagcuug ccacaa 586

<210> 2
<211> 38
<212> RNA
<213> 腦心肌炎病毒

<400> 2
augauauau gacuucgaaa guuuauauc cagaacaa 38

<210> 3
<211> 49
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成性突變

<400> 3
augauaagcu ugccacaacc cgggauccuc uagagucgac augacuucg 49

七、申請專利範圍

1. 一種疫苗，其包含人腸病毒 (*Enterovirus*) A 型病毒樣顆粒，該病毒樣顆粒包含人腸病毒 A 型 VP0 多肽、VP1 多肽、VP2 多肽、VP3 多肽及 VP4 多肽，其中該疫苗誘發針對人腸病毒 A 型之保護性及/或中和性免疫反應。

2. 如申請專利範圍第 1 項之疫苗，其中該人腸病毒 A 型係人腸病毒 71 型 (HEV71) 或柯沙奇病毒 A16 型。

3. 如申請專利範圍第 1 至 2 項中任一項之疫苗，其中該病毒樣顆粒係呈聚集體之型式。

4. 一種表現卡匣，其包含與編碼人腸病毒 A 型 P1 多肽之核酸序列可操作性連接之啟動子，其中該編碼人腸病毒 A 型 P1 多肽之核酸序列與編碼腦心肌炎病毒 (EMCV) 內部核糖體進入位點 (IRES) 之核酸序列可操作性連接，其中該編碼 IRES 之核酸序列與編碼人腸病毒 A 型 3CD 蛋白酶之核酸序列可操作性連接，其中該人腸病毒 A 型 3CD 蛋白酶係於該 IRES 之轉譯控制下。

5. 一種製備疫苗之方法，該方法包含培養包含如申請專利範圍第 4 項之表現卡匣的真核宿主細胞達一段足以產製該人腸病毒 A 型 P1 多肽和人腸病毒 A 型 3CD 蛋白酶且形成病毒樣顆粒及/或該病毒樣顆粒的聚集體之時間的步驟。

6. 如申請專利範圍第 5 項之方法，其另包含自該真核宿主細胞及/或培養上清液回收該病毒樣顆粒及/或該病毒樣顆粒的聚集體之步驟。

7. 一種依據如申請專利範圍第 5 至 6 項中任一項之方法所產製之疫苗，該疫苗包含人腸病毒 A 型病毒樣顆粒，該病毒樣顆粒包含人腸病毒 A 型 VP0 多肽、VP1 多肽、VP2 多肽、VP3 多肽及 VP4 多肽。

8. 一種如申請專利範圍第 1 至 3 及 7 項中任一項之疫苗於製備藥物之用途，該藥物係用於接種個體以對抗人腸病毒 A 型感染。