



(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 I867291 B

(45) 公告日：中華民國 113 (2024) 年 12 月 21 日

- (21) 申請案號：111113933 (22) 申請日：中華民國 111 (2022) 年 04 月 12 日
- (51) Int. Cl. : **C07K14/165 (2006.01)** **A61K39/12 (2006.01)**
A61K39/215 (2006.01) **A61P31/14 (2006.01)**
- (30) 優先權：2021/04/12 美國 63/173,752
2021/05/18 美國 63/190,199
- (71) 申請人：中央研究院 (中華民國) ACADEMIA SINICA (TW)
臺北市南港區研究院路 2 段 128 號
- (72) 發明人：馬徹 MA, CHE (TW)；翁 啟惠 WONG, CHI-HUEY (US)；黃菡頤 HUANG, HAN-YI (TW)
- (74) 代理人：陳長文
- (56) 參考文獻：
期刊 GALILI. "Amplifying immunogenicity of prospective Covid-19 vaccines by glycoengineering the coronavirus glycan-shield to present α -gal epitopes." Vaccine 38 ELSEVIER. 19 August 2020. p. 6487-6499.
- 審查人員：蒲孝如
- 申請專利範圍項數：19 項 圖式數：13 共 97 頁

(54) 名稱

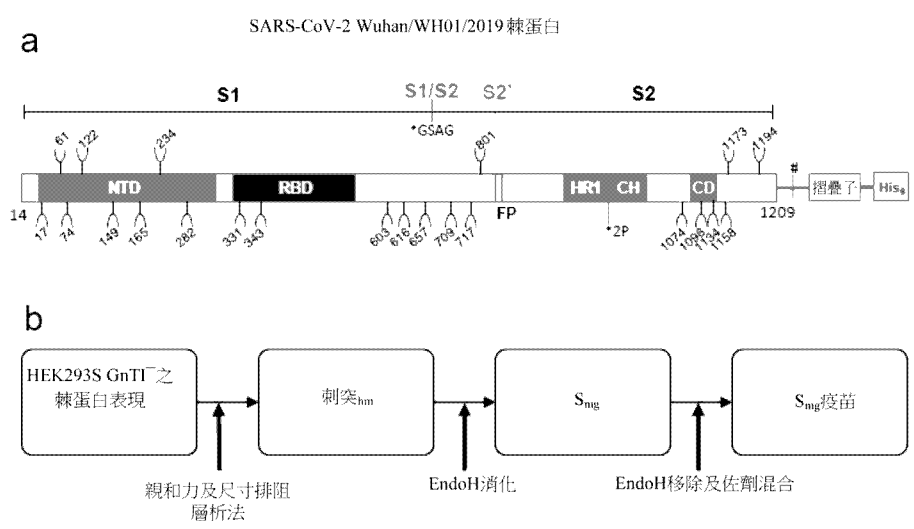
經改良之冠狀病毒疫苗

(57) 摘要

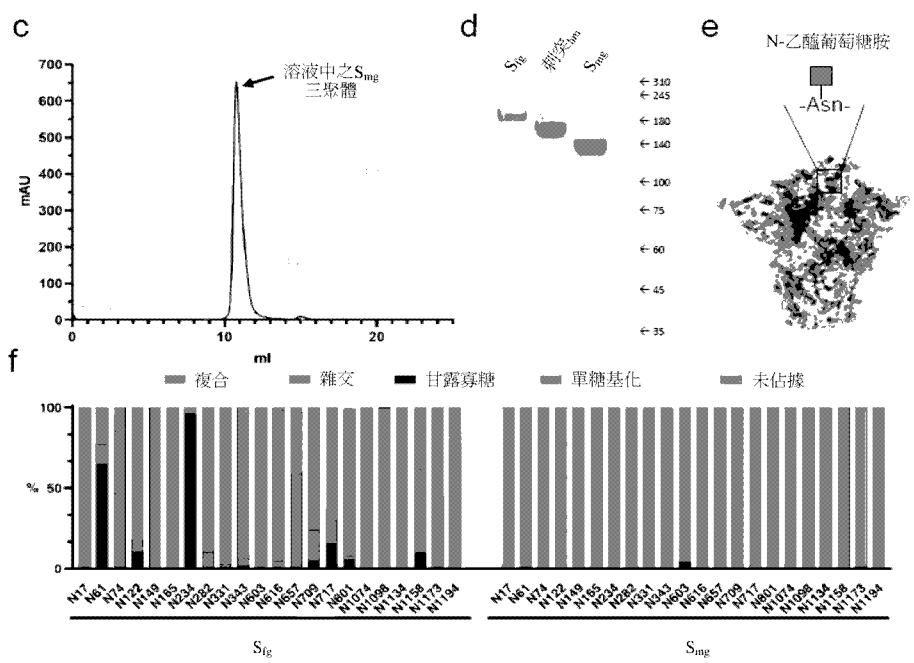
本發明提供一種經醣化工程改造之 SARS-CoV-2 棘蛋白，其相對於 SARS-CoV-2 及其變異體之天然棘蛋白，能夠引發增強之免疫反應。該經醣化工程改造之棘蛋白暴露醣基化位點且同時保持該棘蛋白之三級結構。因此，本發明提供用於更好地預防及治療新出現之冠狀病毒感染的經改良之免疫原、疫苗及方法。

The present disclosure provides a glycoengineered SARS-CoV-2 spike protein which is capable of eliciting an enhanced immune response relative to a native spike protein of SARS-CoV-2 and its variants. The glycoengineered spike protein exposes the glycosylation sites and at the same time preserves the tertiary structure of the spike protein. The present disclosure therefore provides improved immunogens, vaccines, and methods for better prevention and treatment of the emerging coronavirus infections.

指定代表圖：



【圖1】



【圖1】(續)



I867291

【發明摘要】

【中文發明名稱】

經改良之冠狀病毒疫苗

【英文發明名稱】

IMPROVED CORONAVIRUS VACCINE

【中文】

本發明提供一種經醣化工程改造之SARS-CoV-2棘蛋白，其相對於SARS-CoV-2及其變異體之天然棘蛋白，能夠引發增強之免疫反應。該經醣化工程改造之棘蛋白暴露醣基化位點且同時保持該棘蛋白之三級結構。因此，本發明提供用於更好地預防及治療新出現之冠狀病毒感染的經改良之免疫原、疫苗及方法。

【英文】

The present disclosure provides a glycoengineered SARS-CoV-2 spike protein which is capable of eliciting an enhanced immune response relative to a native spike protein of SARS-CoV-2 and its variants. The glycoengineered spike protein exposes the glycosylation sites and at the same time preserves the tertiary structure of the spike protein. The present disclosure therefore provides improved immunogens, vaccines, and methods for better prevention and treatment of the emerging coronavirus infections.

【指定代表圖】

圖1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

經改良之冠狀病毒疫苗

【英文發明名稱】

IMPROVED CORONAVIRUS VACCINE

【技術領域】

【先前技術】

【0001】 自2019年12月報導第一個病例以來，Covid-19之爆發已在全世界引起超過三百萬例死亡。當前若干針對SARS-CoV-2感染之COVID-19疫苗正在開發中，處於臨床試驗階段，且已授權一些疫苗供人類使用。儘管許多經批准之疫苗展現出高功效，但SARS-CoV-2之基因變異體已出現且在整個COVID-19大流行中在全世界傳播。

【0002】 因此，迫切需要經改良之COVID-19疫苗以更好地預防新出現之冠狀病毒感染及/或降低危及生命之冠狀病毒感染的嚴重程度。

【發明內容】

【0003】 SARS-CoV-2之棘蛋白廣泛醮基化。本發明基於如下認識：與SARS-CoV-2或其變異體之天然棘蛋白相比，用經修飾之缺乏聚醮遮蔽或較少地被聚醮遮蔽之SARS-CoV-2棘蛋白進行免疫接種誘發增強之針對SARS-CoV-2及其需要關注之變異體(例如Alpha、Gamma、Delta及Omicron)之免疫反應。依據全球共享流感數據倡議組織(GISAID)之超過六百萬個S蛋白序列的比對，可鑑別位於受體結合域(receptor-binding domain, RBD)及包括七肽重複2域(heptad repeat 2, HR2)之S蛋白質第二次單元(S2)中的12個高度保守抗原決定基(SEQ ID: 41-52)。藉由N-

聚醣修整來移除聚醣遮蔽以更好地暴露此等高度保守抗原決定基提供一種研發針對SARS-CoV-2及變異體之廣效保護性疫苗的有效方法。棘蛋白之N-聚醣修整可藉由活體外醣化工程改造來實現。藉此，經醣化工程改造之棘蛋白暴露經聚醣覆蓋之高度保守抗原決定基，且同時保持棘蛋白之三級結構。因此，本發明提供用於更好地預防及治療新出現之冠狀病毒(例如SARS-CoV-2)感染的經改良之免疫原、疫苗及方法。

【0004】 因此，本發明提供一種免疫原，其包含經醣化工程改造之冠狀病毒棘蛋白，該經醣化工程改造之冠狀病毒棘蛋白包含複數個截短N-聚醣及未經修飾之O-聚醣(例如O連接之寡醣)。在一些實施例中，複數個截短N-聚醣位於受體結合域(RBD)中，藉此暴露具有以下胺基酸序列之複數個高度保守抗原決定基：TESIVRFPNITNL (SEQ ID NO.: 41)、NITNLCPFGEVFNATR (SEQ ID NO: 42)、LYNSASFSTFK (SEQ ID NO: 43)、LDSKVGGNYN (SEQ ID NO: 44)、KSNLKPFERDIST (SEQ ID NO: 45)、KPFERDISTEIYQAG (SEQ ID NO: 46)及/或GPKKSTNLVKNKC (SEQ ID NO: 47)。在一些實施例中，複數個截短N-聚醣位於七肽重複2 (HR2)域中，藉此暴露具有以下胺基酸序列之複數個高度保守抗原決定基：NCDVVIGIVNNTVY (SEQ ID NO: 48)、PELDSFKEELDKYFKNHTS (SEQ ID NO: 49)、VNIQKEIDRLNEVA (SEQ ID NO: 50)、NLNESLIDLQ (SEQ ID NO: 51)及/或LGKYEQYIKWP (SEQ ID NO: 52)。

【0005】 在一些實施例中，複數個截短N-聚醣位於受體結合域(RBD)及七肽重複2 (HR2)域中，藉此暴露具有以下胺基酸序列之複數個高度保守抗原決定基：TESIVRFPNITNL (SEQ ID NO.: 41)、

NITNLCPFGEVFNATR (SEQ ID NO: 42)、LYNSASFSTFK (SEQ ID NO: 43)、LDSKVGGNYN (SEQ ID NO: 44)、KSNLKPFERDIST (SEQ ID NO: 45)、KPFERDISTEIYQAG (SEQ ID NO: 46)、GPKKSTNLVKNKC (SEQ ID NO: 47)、NCDVVIGIVNNTVY (SEQ ID NO: 48)、PELDSFKEELDKYFKNHTS (SEQ ID NO: 49)、VNIQKEIDRLNEVA (SEQ ID NO: 50)、NLNESLIDLQ (SEQ ID NO: 51)及/或 LGKYEQYIKWP (SEQ ID NO: 52)。

【0006】 本文所述之經醣化工程改造之冠狀病毒棘蛋白包含SEQ ID NO: 1之胺基酸序列或與SEQ ID NO: 1之胺基酸序列具有至少90%序列一致性之其變異體或該胺基酸序列或該變異體之免疫活性片段組成。

【0007】 在一些實施例中，經醣化工程改造之冠狀病毒棘蛋白包含由SEQ ID NO: 1之胺基酸序列組成的多肽，其中該多肽由22個截短N-聚醣組成，各截短N-聚醣具有GlcNAc部分。

【0008】 在一些實施例中，經醣化工程改造之冠狀病毒棘蛋白包含由SEQ ID NO: 2之胺基酸序列組成的多肽，其中該多肽由21個截短N-聚醣組成，各截短N-聚醣具有GlcNAc部分。

【0009】 在一些實施例中，截短N-聚醣為單醣、雙醣或三醣。在一些實施例中，截短N-聚醣為單醣。在較佳實施例中，單醣為N-乙醯葡萄糖胺(GlcNAc)。

【0010】 在較佳實施例中，本文所述之截短N-聚醣實質上為均質的。術語「均質」意指由一種期望之聚醣物種表示之醣化圖譜。本文所用之術語「實質上均質」意指組合物中存在至少80%、至少85%、至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少99%之醣

蛋白由一種預期之醣基型式(例如經GlcNAc修飾)表示，並伴隨存在痕量之非預期之醣基型式。「痕量」意指醣蛋白組合物中存在之任何既定非預期醣基型式以小於總醣蛋白之5%、較佳小於4%、小於3%、小於2%、小於1%及甚至小於0.5%或甚至小於0.1%的量存在。

【0011】 如本文所述，術語「棘蛋白」及「棘狀醣蛋白」及「冠狀病毒棘蛋白」可互換使用。本文所述之經醣化工程改造之棘蛋白可自天然冠狀病毒棘蛋白藉由醣化工程改造(例如：活體外或活體內之醣化工程改造)而產生。在一些實施例中，經醣化工程改造之棘蛋白係使用一或多種化學或酵素方法產生。在一些實施例中，經醣化工程改造之棘蛋白係使用醣苷內切酶H(Endo H)產生。

【0012】 在一些實施例中，本文所述之天然冠狀病毒棘蛋白為嚴重急性呼吸道症候群冠狀病毒2 (SARS-CoV-2)或其變異體之棘蛋白。本文所述之 SARS-CoV-2 為 SARS-CoV-2 之武漢病毒株 (hCoV/Wuhan/WH01/2019)。本文所述之SARS-CoV-2之變異體包括但不限於 D614G、Alpha (B.1.1.7及Q譜系)、Beta (B.1.351及後代譜系)、Gamma (P.1及後代譜系)、Epsilon (B.1.427及B.1.429)、Eta (B.1.525)、Iota (B.1.526)、Kappa (B.1.617.1)、1.617.3、Mu (B.1.621、B.1.621.1)、Zeta (P.2)、Delta (B.1.617.2及AY譜系)及 Omicron (B.1.1.529及BA譜系)。在一些實施例中，天然冠狀病毒棘蛋白為蝙蝠冠狀病毒RaTG13或其變異體之棘蛋白。

【0013】 如本文所述，術語「天然冠狀病毒棘蛋白」、「天然冠狀病毒棘狀醣蛋白」、「天然棘狀醣蛋白」及「天然棘蛋白」係可互換的。

【0014】 在一些實施例中，本文所述之經醣化工程改造之棘蛋白呈

三聚體(例如溶液中之三聚體)形式存在。本文所述之經醱化工程改造之棘蛋白可保留與其天然冠狀病毒棘蛋白相同的三級結構。

【0015】 如本文所述，經醱化工程改造之棘蛋白能夠引發相對於其天然冠狀病毒棘蛋白增強之免疫反應。增強之免疫反應為增加之IgG力價、增加之IgM力價、增加之CD4 T細胞反應、增加之CD8 T細胞反應、增加之中和力價或其組合。

【0016】 在另一態樣中，本發明提供一種免疫原性組合物，其包含：(a)本發明之免疫原，及(b)視情況選用的佐劑。

【0017】 如本文所述，佐劑可包括但不限於氫氧化鋁、磷酸鋁、不完全弗氏佐劑(incomplete Freund's adjuvant, IFA)、角鯊烯、明礬、鋁膠、MF59、QS-21、CpG 1018、AS03、AS37、Matrix-M或其組合。

【0018】 本文所述之冠狀病毒可包括SARS-CoV-2及其變異體，且可包括蝙蝠冠狀病毒RaTG13或其變異體。在較佳實施例中，冠狀病毒感染由SARS-CoV-2及其變異體引起。

【0019】 如本文所述，相對於使用其天然SARS-CoV-2棘蛋白之疫苗，免疫原性組合物能夠引發增強之免疫反應，藉此用作針對由SARS-CoV-2或其變異體引起之冠狀病毒感染的經改良之COVID-19疫苗。

【0020】 在另一態樣中，本發明提供一種用於在有需要之個體中引發針對SARS-CoV-2或變異體之免疫反應的方法，其包含向該個體投與有效量之本發明之免疫原性組合物。

【0021】 在另一態樣中，本發明提供一種用於保護有需要之個體避免感染SARS-CoV-2或變異體的方法，其包含向該個體投與有效量之本發明之免疫原性組合物。

【0022】 在另一態樣中，本發明提供一種用於預防有需要之個體感染COVID-19疾病的方法，該方法包含向該個體投與有效量之本發明之免疫原性組合物。

【0023】 在另一態樣中，本發明提供本發明之免疫原性組合物之用途，其用於在有需要之個體中引發針對SARS-CoV-2之免疫反應。

【0024】 在另一態樣中，本發明提供本發明之免疫原性組合物之用途，其用於保護有需要之個體避免感染SARS-CoV-2。

【0025】 在另一態樣中，本發明提供本發明之免疫原性組合物之用途，其用於預防有需要之個體感染COVID-19疾病。

【0026】 此等及其他態樣由以下較佳實施例之描述結合以下附圖而將變得顯而易見，但其中可進行變化及修改而不背離本發明之新穎構思的精神及範疇。

【圖式簡單說明】

【0027】 以下圖式形成本說明書的一部分且包括在內以進一步展示本發明之某些態樣，其中可藉由參考此等圖式中之一或多者且結合本文中呈現之特定實施例的詳細描述更好地理解本發明。

【0028】 **圖1 (a)至(f). 經醣化工程改造之棘蛋白與單GlcNAc裝飾(S_{MG})之蛋白疫苗之設計及表徵。** (a)重組SARS-CoV-2棘狀醣蛋白構築體之示意圖。蛋白質結構區域圖示為N端域(NTD)、受體結合域(RBD)、融合肽(FP)、七肽重複1(HR1)、中心螺旋(CH)及連接域(CD)。可溶性棘蛋白之C端與摺疊子序列及His標籤(His₆)連接。弗林蛋白酶裂解位點經GSAG(SEQ ID NO: 9)殘基取代且兩個脯胺酸突變(K986P及V987P)將棘蛋白固定在融合前狀態。N連接之醣基化序列子(N-X-S/T，

其中X ≠ P)之位置展示為分支(N, Asn; X, 任何殘基; S, Ser; T, Thr; P, Pro)。井號位點(#)表示凝血酶切割位點。(b)單GlcNAc裝飾之棘蛋白疫苗產生之示意性概述。S_{HM}, 具有高甘露糖類型N-聚醣之棘蛋白; S_{MG}, 在其N-醣基化位點處具有GlcNAc之棘蛋白。(c)經純化之S_{MG}之粒徑篩析層析法(size-exclusion chromatography)。黑色曲線表示S_{MG}且灰色曲線展示蛋白質分子量標記物。(d)S_{FG}(具有典型複合型N-聚醣之棘蛋白)、S_{HM}及S_{MG}之SDS-PAGE分析。(e)S_{MG}之結構模型。藉由使用Wincootm添加聚醣, 利用蛋白質資料庫(PDB) ID代碼7CN9建立模型, 且用程式ChimeraX顯示。(f)S_{FG}及S_{MG}之N-聚醣組合物之質譜分析。

【0029】 圖2 (A)至(S). S_{MG}疫苗接種增強活體內對SARS-CoV-2感染之預防。(A)展示敘利亞倉鼠(Syrian hamster)之免疫接種時程。S_{FG}(藍色)、S_{MG}(紅色)及對照(灰色)。(B)在敘利亞倉鼠中在WT SARS-CoV-2攻擊之後量測體重變化。(C)展示經攻擊之倉鼠的肺病毒力價。虛線指示偵測下限。(D)展示來自受感染倉鼠(3 dpi)之肺之病理組織學、免疫組織化學及免疫螢光的代表性圖像。第一列: 蘇木精及伊紅(H&E)染色; 比例尺, 50 μm。第二列: 免疫組織化學(IHC)染色; 比例尺, 50 μm。第三列: 免疫螢光(IF)染色; 比例尺, 100 μm。SARS-CoV-2 N特異性多株抗體用於偵測病毒, 在IHC中呈棕色點且在IF染色中呈綠色點。藍色: 4,6-二甲脒基-2-苯基吲哚(DAPI)。(E)展示CAG-hACE2或K18-hACE2轉殖基因小鼠之免疫接種時程。(F至I)展示自經免疫接種之CAG-hACE2轉殖基因小鼠(n= 7)收集之血清樣品的抗S IgG力價(F)、SARS-CoV-2 WT微量中和力價(G)及亞型IgG分析, 包括IgG1、IgG2c (H)及IgG2c:IgG1比率(I)。(J)展示受感染小鼠肺部(7 dpi)之代表性病理組織學、免疫組織化學及免

疫螢光。比例尺與(D)中相同。(K)受感染CAG-hACE2小鼠($n=3$)之肺病毒力價。虛線指示偵測下限。(L及M)展示經WT-SARS-CoV-2攻擊之CAG-hACE2轉殖基因小鼠($n=4$)之體重變化(L)及存活分析(M)。(N及O)展示經SARS-CoV-2 Alpha變異體攻擊之CAG-hACE2轉殖基因小鼠($n=5$)的體重變化(N)及存活分析(O)。(P及Q)展示經SARS-CoV-2 Gamma變異體攻擊之CAG-hACE2轉殖基因小鼠($n=5$)的體重變化(P)及存活分析(Q)。(R及S)展示經SARS-CoV-2 Delta變異體攻擊之K18-hACE2轉殖基因小鼠($n=4$)的體重變化(R)及存活分析(S)。資料展示為平均值 \pm SEM且藉由雙側曼-惠特尼U檢驗(two-sided Mann-Whitney U test)進行分析以比較兩個實驗組。ns, 不顯著; $*P<0.05$ 。

【0030】 圖3. S_{MG}疫苗接種在轉殖基因hACE2小鼠中提供更好的對致死劑量SARS-CoV-2感染之預防。(a)轉殖基因小鼠之免疫接種及攻擊時程。(b)對在初始疫苗接種之後28天及42天收集的血清檢查抗棘蛋白特異性IgG。(c)藉由CPE分析對在初始疫苗接種之後42天收集的血清檢查中和抗體力價。(d)在攻擊之後轉殖基因小鼠之體重變化($n=3$)。(e)在攻擊之後的轉殖基因小鼠存活率($n=3$)。資料為平均值 \pm SEM(平均值之標準誤差)。比較藉由t試驗(Student's t -test)(未配對, 雙尾)進行。條柱上方之數值指示相對於S_{FG}疫苗由S_{MG}疫苗引發之抗體之結合及中和的增加倍數。藍色正方形, 經S_{FG}免疫接種之轉殖基因小鼠; 紅色三角形, 經S_{MG}免疫接種之轉殖基因小鼠; 灰色點, 對照組動物(僅明礬組)。

【0031】 圖4. 小鼠中由S_{MG}疫苗誘發之抗體增強針對SARS-CoV-2變異體之結合及中和的廣度及效力。(a)示出SARS-CoV-2棘蛋白結構之示意性圖示及在此研究中使用之變異體的突變分布圖。RBD, 受體結合域。

在突變圖中，點(.)指示該位置中與野生型相同之胺基酸且短劃線(-)指示缺失。(b)藉由ELISA來測定SARS-CoV-2特異性IgG抗體力價。條柱上方之數值指示相對於S_{FG}疫苗由S_{MG}疫苗引發之抗體之結合的增加倍數。(c)展示SARS-CoV-2變異體假病毒中和曲線。(d)繪製實現SARS-CoV-2變異體50%假病毒中和(pNT₅₀)之力價。條柱上方之數值指示相對於S_{FG}疫苗由S_{MG}疫苗引發之抗體之中和的增加倍數。(e)展示感染性SARS-CoV-2變異體中和曲線，其藉由病毒溶斑抑制中和試驗法(PRNT)測定。(f)繪製實現SARS-CoV-2變異體50%中和(PRNT50)之力價。資料為平均值 ± SEM(平均值之標準誤差)。藉由非線性回歸，使用GraphPrism 9.0擬合曲線，且藉由多重t-試驗(配對，雙尾)進行比較。力價比較藉由t試驗(Student's t-test)(未配對，雙尾)進行。條柱上方之數值指示相對於S_{FG}疫苗由S_{MG}疫苗引發之抗體之中和的增加倍數。藍色正方形，經S_{FG}免疫接種之轉殖基因小鼠；紅色三角形，經S_{MG}免疫接種之轉殖基因小鼠；灰色點，對照組動物(PBS組)。

【0032】 圖5 (A)至(G). S蛋白糖基化影響ACE2受體結合及SARS-CoV-2感染。(A至C)對來自BEAS-2B細胞(A)、HEK293T細胞(B)及未進行或進行Endo H分解之HEK293S (GnT1⁻)細胞(C)的以不同方式糖基化之S蛋白胞外域(S_{FG}，原始完全糖基化，藍色；deS，未唾液酸化，淡藍色；S_{HM}，高甘露糖，黃色；及S_{MG}，單GlcNAc裝飾，紅色)量測ACE2結合親合力。三個技術重複實驗之資料展示為平均值 ± SD，且針對EC₅₀值，藉由非線性回歸進行曲線擬合。(D)對相同輸入量(0.3 μg/ml p24同等物)之攜帶以不同方式糖基化之S蛋白的假病毒量測病毒感染性，著色相應地如(C)中。RLU，相對發光單位。六個技術重複實驗之資料展示為平均值 ± SD

且先後用一般單因子ANOVA檢驗及杜凱氏多重比較檢驗(Tukey's multiple comparisons test)進行分析。ns，不顯著；**** $P < 0.0001$ 。(E)展示SARS-CoV-2 S蛋白[野生型(WT)]之示意圖，按區域著色，包括N端域(NTD；14-306；橙色)、受體結合域(RBD；319-541；紅色)、兩個亞域(SD1/2；542-685；黃色)、融合肽近端區(FPPR；816-856；綠色)、七肽重複1(HR1；912-984；藍綠色)、連接域(CD；1063-1162；藍色)、七肽重複2(HR2；1163-1211；紫色)及跨膜域(TM；1214-1234；白色)。N-聚醣(繪成分支)及O-聚醣(圓圈)位點用殘基編號標記。上方展示S1及S2域。(F)展示攜帶野生型(WT)之S蛋白或移除所示各醣位點處之聚醣之突變體的假病毒的病毒力價，藉由p24定量標準化，且著色相應地如(E)中。(G)在五種表現hACE2之細胞株中測試的如(F)中之相同假病毒組的感染性。以三個獨立實驗之平均值 \pm SD，針對WT值(被定義為100%，深灰色)標準化(F)及(G)中之值。

【0033】 圖6 (A)至(E). S蛋白聚醣圖譜證明兩種細胞株之差異且與序列保守相關。(A及B)展示自BEAS-2B肺上皮細胞(A)及HEK293T腎上皮細胞(B)表現之重組S蛋白之N-醣基化圖譜的比較。將聚醣分組且相應地著色：複合-S(唾液酸化複合型；深藍色)、複合(未唾液酸化複合型；淡藍色)、雜交-S(唾液酸化雜交型；深黃色)及雜交(非唾液酸化雜交型；淡黃色)、高甘露糖(綠色)及未佔據(灰色)。以圓餅圖展示各醣位點之各組百分比，且以長條圖展示各醣型(第1至27號)之比例。條形圖表示三個生物重複實驗之平均值 \pm SD。F雜交指示岩藻醣基化之雜交型聚醣。(C)在S胞外域之3D結構(自6VSB模型)上映射來自(A)及(B)之聚醣圖譜。如所標記，依據BEAS-2B(左)或HEK293T(右)資料之最高含量組別對聚醣著色

(複合型，藍色；雜交型，黃色；及高甘露糖，綠色)。用殘基編號標記非複合型N-醣位點。(D)展示模型化S結構蛋白上相對表面可及性(relative surface accessibility,RSA)之映射，其中埋入之殘基呈深黃色，遮蔽之聚醣呈黃色，且暴露之部分呈淡黃色。(E)展示模型化S蛋白結構上序列變異之映射，在熱圖中著色，其中較深紅色表明較高突變率。其中更顯示若干高度保守聚醣遮蔽區。(D)及(E)之更多細節可見於圖S9及資料檔案S1。

【0034】 圖7 (A)至(S). 在BALB/c小鼠中，與S_{FG}相比，S_{MG}疫苗接種引發更強體液免疫反應及細胞免疫反應。(A)展示S_{FG}及S_{MG}蛋白疫苗之結構模型(根據圖2C)。藍色：聚醣；灰色：蛋白質。S_{FG}為由HEK293E表現無進一步修飾之棘蛋白。S_{MG}藉由酶分解以截斷HEK293S G_nT_I⁻表現之S_{HM}之所有N-聚醣，形成單個GlcNAc來獲得，而O-聚醣未經修飾。(B)在BALB/c小鼠(各實驗中n= 5)中使用如(A)中之蛋白質作為免疫原之免疫接種時程。S_{FG} (藍色)、S_{HM} (黃色)、S_{MG} (紅色)及對照物(灰色)。明礬，氫氧化鋁。(C)藉由ELISA分析血清樣品之抗S蛋白IgG力價。(D)使用具有WT S蛋白之假病毒來量測血清樣品之中和力價。(E至G)血清之IgG亞型分析，包括IgG1 (E)、IgG2a (F)及IgG2a:IgG1比率(G)。(H至K)藉由流動式細胞測量術，BALB/c小鼠之淋巴結(LN)中活化非調節CD4⁺ T細胞中之Tfh百分比(H)及表現IFN- γ (I)、IL-4 (J)及IL-21 (K)之Tfh細胞(CD4⁺CD19⁻CD44^{hi}Foxp3⁻PD-1⁺CXCR5⁺)的百分比。(L)藉由流動式細胞測量術分析的BALB/c小鼠之LN中產生顆粒酶B之CD8⁺ T細胞(CD3⁺B220⁻CD8⁺CD49b⁻)的百分比。(M)展示脾中相對於螢光扣除對照(FMO)染色(無S蛋白下染色)(百分比)標準化之S蛋白特異性B細胞(CD3⁻CD19⁺S蛋白⁺)(百分比)的比率。(N)展示 κ 及 λ 輕鏈之使用。(O及P) B細胞庫分析

之重(O)及 κ (P)鏈分佈。小於5%之使用以白色展示。(Q至S)展示在三劑針對SARS-CoV-2 WT (或D614G)及變異體之所指示疫苗之後自BALB/c小鼠分離之血清的抗S蛋白IgG力價(Q)、假病毒中和力價(R)及可靠病毒中和力價(S) (各條柱上方之數值指示與S_{FG}組相比S_{MG}之增加倍數)。pNT₅₀表示實現50%中和之稀釋倒數。條形圖中之點線表示偵測下限。資料展示為平均值± SEM且藉由雙側曼-惠特尼U檢驗分析以比較兩個實驗組，(N)除外，其中五種樣品彙集在一起且使用卡方檢驗。P值展示在各條柱上方。* $P < 0.05$ ；** $P < 0.01$ 。

【0035】 圖8 (A)至(L). 藉由S_{MG}疫苗接種引發之抗體m31A7的功能、預防性及結構表徵指示交叉中和能力。(A) m31A7對S1、S2、RBD或整個S胞外域之ELISA結合。(B) m31A7與表現SARS-CoV-2 WT及變異體之S蛋白之HEK293T細胞的結合之流動式細胞測量術分析。(C) m31A7針對攜帶WT或變異S蛋白之假病毒的中和活性。(A)、(B)及(C)之三個技術重複實驗之資料展示為平均值± SD，且針對EC₅₀值，藉由非線性回歸進行曲線擬合。(D)展示K18-hACE2轉殖基因小鼠($n = 3$)之抗體注射及攻擊時程。(E及F)展示用m31A7或PBS處理之小鼠的體重變化(E)及體溫變化(F)。資料呈現為平均值± SEM。(G)呈現m31A7 IgG及Fab與S蛋白之結合動力學，其中解離常數(K_d)展示在上方。(H)以時程展示藉由m31A7之HDX-MS進行的抗原決定基定位，揭露兩種候選肽419-433及471-482，其中在15秒 Δ HDX大於10%。資料展示為平均值± SD且在各時間點藉由多個t檢驗分析。* $P < 0.05$ ；** $P < 0.01$ ；*** $P < 0.001$ ；**** $P < 0.0001$ 。(I)展示符合m31A7-Fab/S蛋白複合物結構之cryo-EM圖。重鏈，深綠色；輕鏈，淡綠色；RBD，紅色；NTD，橙色；S1其餘部分，淡灰色；S2，

深灰色；及N-聚醣，藍色。(J)展示RBD-m31A7界面之放大視圖。星號標記m31A7輕鏈與N165-聚醣之間的附近區域。(K)先前報導之mAb S2E12 (洋紅色)、COV253 (粉色)及B1-182.1 (淡藍色) (PDB 7BEN、7K4N及7MLZ)重疊至m31A7結合之RBD (灰色)上。已顯示受體結合模體及RBD尖端。(L) RBD (灰色)上COV253 (粉色)及m31A7 (綠色)之佔據面積比較顯示相似性，其中高關注變異株(VOC)之殘基經標記且繪製為紅色球體。

【0036】 圖9 (A)至(C). Delta S_{MG}疫苗接種引發更多的針對SARS-CoV-2變異假病毒之中和抗體。(A)疫苗接種之流程。在第0週及第2週用Delta S_{FG}或S_{MG}疫苗對BALB/c小鼠(n=5)進行免疫接種。在第6週收集血清且隨後使用假病毒分析測試中和能力。(B)針對SARS-CoV-2變異假病毒，其中包括野生型(WH01)及高關注變異株(VOC)(包括Alpha、Beta、Gamma、Delta及Omicron之變異株)，血清之50%中和力價倒數(50 percent reciprocal neutralization titer, pNT50)。資料展示為平均值(在各條柱上方指示) \pm SEM且藉由雙側曼-惠特尼U檢驗分析以比較兩個實驗組。 $*P < 0.05$ 。(C)藉由以不同方式稀釋之血清提供的SARS-CoV-2變異假病毒細胞感染之抑制(%)。資料展示為平均值 \pm SEM且曲線藉由非線性回歸使用Graph Prism 9.0擬合。

【0037】 圖10 (A)及(B). Delta或WT S_{MG}疫苗接種引發更多的針對SARS-CoV-2 Omicron變異假病毒之中和抗體。(A)疫苗接種之流程。在第0週及第2週用Delta/WT S_{FG}或S_{MG}疫苗對BALB/c小鼠(n=5)進行免疫接種。在第6週收集血清且隨後使用假病毒分析測試中和能力。(B)藉由以不同方式稀釋之血清提供的SARS-CoV-2變異假病毒細胞感染之抑制(%)。資料展示為平均值 \pm SEM且曲線藉由非線性回歸使用Graph Prism 9.0擬合。

【0038】 圖11 (A)至(C). Delta S_{MG}蛋白可呈溶液或呈粉末儲存於室溫下。(A及B)具有兩種胺基酸(pbs-aa)、50 mM L-精胺酸及50 mM L-麩胺酸之磷酸鹽緩衝鹽水添加劑中Delta S_{MG}蛋白經0.22 μm過濾器過濾且儲存於室溫(RT)或4°C下。在包括3天、7天、14天、21天及3個月之不同時間點收集蛋白質。將所收集之樣品與5X SDS-PAGE裝載染料混合，在100°C下加熱5分鐘且儲存於4°C下，直至跑膠。(C)在不同緩衝液及凍乾條件中之Delta S_{MG}蛋白儲存測試。針對在4°C下儲存Delta S_{HM}或S_{MG} (前3個泳道)，測試有或無50 mM L-精胺酸及50 mM L-麩胺酸之PBS。測試在有或無賦形劑下凍乾的Delta S_{MG}且在室溫下儲存超過2週(後2個泳道)。

【0039】 圖12展示SARS-CoV-2棘蛋白之受體結合域(RBD)中存在之高度保守抗原決定基(E1、E2、E3、E4、E5、E6及E7) (SEQs ID NO: 41-47) 之示意圖，該棘蛋白含有N端域(NTD)、受體結合域(RBD)、融合肽(FP)、七肽重複序列1 (HR1)、七肽重複序列2 (HR2)、跨膜域(TM)、細胞質域(CD)及S2次單元。

【0040】 圖13展示SARS-CoV-2棘蛋白之七肽重複序列2 (HR2)中存在之高度保守抗原決定基(E8、E9、E10、E11、E12) (SEQs ID NO: 48-52) 之示意圖。

【實施方式】

【0041】 在本發明之實施例的以下詳細描述中，參考附圖，在附圖中相同的元件符號指示相似的元件，且藉助於圖示，展示可實踐本發明之特定實施例。詳細描述此等實施例到足以使熟習此項技術者能夠實踐本發明，且應理解，可利用其他實施例，且可在不脫離本發明之範疇的情況下作出其他改變。因此，不應在限制性意義上看待以下詳細描述。

【0042】 除非以下另外定義，否則本文中所有技術及科學術語均意欲具有與一般技術者通常所理解相同之含義。對本文中所採用之技術之提及意欲指代如在此項技術中通常理解之技術，包括熟習此項技術者將顯而易見的對彼等技術之變化或等效技術或後來開發之技術的取代。另外，為更清晰且簡明地描述本發明之主題，提供本說明書及所附申請專利範圍中所使用之某些術語的以下定義。

【0043】 除非上下文另外明確規定，否則如本文中及所附申請專利範圍中所使用，單數形式「一(a)」、「一(an)」及「該」包括複數個提及物。因此，舉例而言，提及「蛋白質」可指一種蛋白質或此類蛋白質之混合物，且提及「該方法」包括提及熟習此項技術者已知之同等步驟及/或方法等等。

【0044】 如本文所用，術語「突變」係指病毒基因體(遺傳密碼)之單個變化。突變頻繁發生，但僅有時會改變病毒特徵。

【0045】 如本文所用，術語「譜系」係指一組具有共同祖先之緊密相關病毒。SARS-CoV-2具有許多譜系；均引起COVID-19。

【0046】 如本文所用，術語「變異體」係指可含有一或多個突變之病毒基因體(遺傳密碼)。在一些情況下，具有相似遺傳變化之一組變異體，諸如譜系或一組譜系，可因可能需要公共衛生行動的共享屬性及其特徵而被公共衛生組織稱為高關注變異株(VOC)或需留意變異株(VOI)。

【0047】 如本文所用，術語「佐劑」係指當與免疫原組合使用時加強或以其他方式改變或調節針對免疫原誘導之免疫反應的化合物。免疫反應之調節可包括加強或拓寬任一種或兩種抗體之特異性及細胞免疫反應。

【0048】 如本文所用，術語「約」或「大約」在位於數值之前時指

示該值加或減10%之範圍。舉例而言，「約100」涵蓋90及110。

【0049】如本文所用，「免疫原性組合物」為一種包含抗原之組合物，其中向個體投與該組合物引起個體中對該抗原發展體液及/或細胞免疫反應。

【0050】如本文所述，術語「棘蛋白」及「棘狀醣蛋白」及「冠狀病毒棘蛋白」可互換使用。

【0051】本文所用之術語「實質上均質」意欲意謂組合物中存在之至少80%、至少85%、至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少99%之醣蛋白由一種期望醣型(例如經單GlcNAc裝飾)表示，組合物中存在痕量非期望醣型。「痕量」意欲醣蛋白組合物中存在之任何既定非期望醣型以小於總醣蛋白之5%、較佳小於4%、小於3%、小於2%、小於1%及甚至小於0.5%或甚至小於0.1%存在。

【0052】如本文所用，術語「治療(treat)」、「治療(treatment)」及「治療(reating)」係指一種獲得有益或期望結果，例如臨床結果之方法。出於本發明之目的，有益或期望結果可包括抑制或遏制感染或疾病之起始或進展；改善感染或疾病之症狀或減少其發展；或該等結果之組合。

【0053】如本文所用，術語「預防(preventing)」及「預防(prevention)」可與「預防(prophylaxis)」互換使用，且可意謂完全預防感染，或預防感染症狀之發展；延遲感染或其症狀之發作；或降低隨後發展之感染或其症狀的嚴重程度。

【0054】如本文所用，「有效量」係指免疫原足以誘導免疫反應，減少病原體感染之至少一種症狀的量。有效劑量或有效量可藉由例如用斑塊中和、補體結合、酶聯結免疫吸附劑(ELISA)或微量中和分析法量測中和

分泌抗體及/或血清抗體之量來確定。

【0055】 如本文所用，術語「疫苗」係指一種免疫原性組合物(有或無佐劑)，諸如來源於冠狀病毒之免疫原，其用於誘導針對冠狀病毒之免疫反應，提供保護性免疫(例如保護個體避免感染冠狀病毒及/或降低由感染冠狀病毒所引起之病狀之嚴重程度的免疫性)。保護性免疫反應可包括形成抗體及/或細胞介導之反應。視上下文而定，術語「疫苗」亦可指向個體投與以產生保護性免疫的免疫原之懸浮液或溶液。

【0056】 如本文所用，術語「個體」包括人類及其他動物。通常，個體為人類。舉例而言，個體可為成人、少年、兒童(2歲至14歲)、嬰兒(出生至2歲)或新生兒(至多2個月)。在特定態樣中，個體至多4月齡或至多6月齡。在一些態樣中，成人為約65歲以上或約60歲以上之老年人。在一些態樣中，個體為孕婦或欲懷孕之女性。在其他態樣中，個體不為人類；例如非人類靈長類動物；例如狒狒、黑猩猩、大猩猩或獼猴。在某些態樣中，個體可為寵物，諸如狗或貓。

【0057】 如本文所用，術語「醫藥學上可接受」意謂經美國聯邦政府或州政府之監管機構批准或在美國藥典、歐洲藥典或其他公認之藥典中列出用於動物，且更具體用於人類。此等組合物可用作用於在脊椎動物中誘導保護性免疫反應之疫苗及/或抗原組合物。

【0058】 嚴重急性呼吸道症候群冠狀病毒2 (SARS-CoV-2)係一種引起冠狀病毒疾病2019 (COVID-19)之正單鏈RNA包膜病毒。病毒粒子包括侵入宿主細胞所需之RNA遺傳物質及結構蛋白。一旦在細胞內部，感染RNA用於編碼構成病毒粒子之結構蛋白、引導病毒組裝、轉錄、複製及宿主控制之非結構蛋白及功能尚未確定之輔助蛋白。SARS-CoV-2之結構

蛋白包括包膜蛋白(E)、棘蛋白或表面醣蛋白(S)、膜蛋白(M)及核衣殼蛋白(N)。在病毒粒子之外部發現棘狀醣蛋白且其使冠狀病毒呈王冠樣外觀。此醣蛋白介導病毒粒子之附接及進入宿主細胞。

【0059】 藉由肺上皮細胞產生之S蛋白具有與感染性增加相關聯之醣型。與完全醣基化之S蛋白相比，用N-聚醣修整為單GlcNAc裝飾狀態之S蛋白(S_{MG})進行免疫接種引發針對高關注變異株(VOC)之更強免疫反應且更好地保護人類血管收縮素轉化酶2 (hACE2)轉殖基因小鼠。另外，自經S_{MG}免疫接種之小鼠鑑別廣泛中和單株抗體，其可以低於皮莫耳之效力中和野生型SARS-CoV-2及高關注變異株(VOC)。

【0060】 本發明之經醣化工程改造之棘蛋白包含具有SEQ ID NO: 1之胺基酸序列或與SEQ ID NO: 1之胺基酸序列具有至少90%序列一致性之其變異體或該胺基酸序列或該變異體之免疫活性片段的多肽。下文展示SEQ ID NO: 1之胺基酸序列。

SEQ ID NO: 1

QCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHV
SGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIRGWI FGTTLD SKTQSLLI VNNATNVV
IKVCEFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQG
NFKNLRE FVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDL PQGFSALEPLVDLP IGINITRFQTL
LALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSE
TKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLC PFGEVFNATRFASVYAWNR
KRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSP TKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEV RQIAP
GQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNLYRLFRKSNLKP FERDIS
TEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCG
PKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLE
ILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGS
NVFQTRAGCLIGAEHVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSPRRARSVASQSI IAYTM
SLGAENSVAYSNNNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECNLLL
QYGSFCTQLNRALTGI AVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSK
PSKRSFIEDLLFNKVTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLT VLPPLL TDE
MIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIAN
QFNSAIGKIQDSLSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILS
RLDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKR
VDFCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHGDKAHFPREGV FV
SNGTHWFVTQRNFYEPQIITTDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELD
KYFKNHTSPDVLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQY

【0061】 在一個實施例中，本發明之經醣化工程改造之棘蛋白包含具有如以下SEQ ID NO: 2中所示之胺基酸的多肽。

SEQ ID NO: 2

QCVNLRTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVERSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWEHAIHVSGTNGTK
 RFDNPFVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTLLDSKTQSLLIVNNATNVVIKVCEFQFCNDPFL
 DVYYHKNNKSWMESGVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKH
 TPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYVGYLQ
 PRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNL
 CPFGEVFNATRFASVYAWNRKRI SNCVADYSVLVNSASFSTFKCYGVSPTKLNLDLCFTNVYADS
 FVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDEFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNRYRFRKSNLKP
 FERDISTEIIYQAGSKPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGP
 KKSTNLVKNKCVNFENGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTEILDITPCS
 FGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQGVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAETH
 VNNSYECDIPIGAGICASYQTQTSNRGSAGSVASQSI IAYTMSLGAENSVAYSNNNSIAIPTNFT
 ISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSSTECNLLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFA
 QVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTLADAGFIKQYGDCLGDIAAR
 DLICAQKFNGLTVLPLLLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGV
 TQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSTASALGKLQNVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISS
 VLNDILSRLLDPPEAEVQIDRLITGRLOSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKR
 VDFCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTVVPAQEKNFTTAPAICHGKAHFPREGVFVSNGTHWF
 VTQRNFYEPQIIITDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLG
 DISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQ

【0062】 如本文所述，SARS-CoV-2或其變異體之經醣化工程改造之棘蛋白可包括包含如下胺基酸序列之棘蛋白：(i)與SEQ ID NO: 1中所示之胺基酸序列實質上一致(例如與SEQ ID NO: 1至少90%、95%或97%一致，諸如SEQ ID NO: 2)；及(ii)由能夠在至少中度嚴格條件下與編碼本文所闡述之棘蛋白之任何核酸序列雜交或能夠在至少中度嚴格條件下與編碼本文所闡述之棘蛋白之任何核酸序列雜交但使用同義密碼子(例如不具有一致核苷酸序列但編碼一致胺基酸之密碼子)的核酸序列編碼。

【0063】 對細胞特異性醣型分佈之分析、序列保守、聚醣遮蔽及其相互相關性引起設計上移除實質上所有遮蔽之聚醣的S_{MG}疫苗。SARS-

CoV-2 S蛋白糖基化對病毒感染、蛋白質完整性及免疫反應具有重大影響。來自肺上皮細胞之S蛋白含有更多唾液酸化複合型聚醣以促進受體結合，且醣位點N801及N1194顯示係S蛋白摺疊及病毒感染所不可或缺的。此使得保守抗原決定基更好地暴露於免疫系統，因此可針對病毒及變異體引發更有效且具有廣泛保護性之B細胞及T細胞反應。

【0064】 本發明之經醣化工程改造之冠狀病毒棘蛋白靶向整個S蛋白胞外域，尤其由聚醣遮蔽之保守域，刺激RBD與非RBD中和抗體及對於交叉保護而言至關重要之CD8 T細胞反應的誘發。

【0065】 在某些態樣中，本發明提供一種包含如本文所述之免疫原的疫苗或醫藥組合物。本發明亦提供一種用於治療或預防冠狀病毒感染之方法，其中該方法包含向有需要之個體(例如哺乳動物)投與有效量之如本文所述之免疫原、醫藥組合物或疫苗。

【0066】 在一個實施例中，疫苗可包括佐劑。示例性佐劑包括但不限於氫氧化鋁、磷酸鋁、不完全弗氏佐劑(IFA)、角鯊烯、明礬、鋁膠、MF59、QS-21、CpG 1018、AS03、AS37、Matrix-M或其組合。

【0067】 疫苗或醫藥組合物可使用任何適合之方法調配。可使用醫藥領域中之常規方法，用標準醫藥學上可接受之載劑及/或賦形劑進行調配。調配物之確切性質將視若干因素而定，包括待投與之疫苗及所需投與途徑。適合類型之調配物充分描述於Remington's Pharmaceutical Sciences, 第19版, Mack Publishing Company, Eastern Pennsylvania, USA 中。

【0068】 如本文所述之疫苗或醫藥組合物可藉由任何途徑投與。此類方法包含例如非經腸，諸如經由注射至皮膚中或穿過皮膚之所有途徑施

用：例如肌肉內、靜脈內、腹膜內、皮內、經黏膜、黏膜下層或皮下。此外，其可藉由以液滴、噴霧、凝膠或軟膏形式局部施用至眼部、鼻、口、肛門或陰道之黏膜上皮，或局部施用至身體之任一部分處之外表皮上進行施用。其他可能之施用途徑係經由呼吸道吸入來施用噴霧、氣溶膠或散劑。或者，可經由消化道途徑施用。疫苗組合物之有效量可視許多變數而定，包括(但不限於)物種、品種、體型、身高、體重、年齡、患者之整體健康狀況、調配物之類型或投藥模式或方式。適當有效量通常可由熟習此項技術者使用常規最佳化技術及行醫者之知情判斷及熟習此項技術者顯而易見之其他因素確定。

【0069】 在一個實施例中，組合物可包含額外治療劑，諸如抗病毒劑。所提供之醫藥組合物適用於治療冠狀病毒感染。額外抗病毒劑之實例包括但不限於利巴韋林(ribavirin)、噴昔洛韋(penciclovir)、硝唑尼特(nitazoxanide)、萘莫司他(nafamostat)、氯奎寧(chloroquine)、瑞德西韋(remdesivir, GS-5734)及法匹拉韋(favipiravir, T-705)、干擾素(interferon)、阿德福韋(adefovair)、替諾福韋(tenofovir)、阿克洛韋(acyclovir)、布立夫定(brivudin)、西多福韋(cidofovir)、福米韋生(fomivirsen)、膦甲酸(foscarnet)、更昔洛韋(ganciclovir)、金剛胺(amantadine)、金剛烷乙胺(rimantadine)、紮那米韋(zanamivir)、瑞德西韋(remdesivir)、莫努拉韋(molnupiravir)及帕克洛維德(paxlovid)。

【0070】 除非另外定義，否則本文所用之所有技術及科學術語均具有與一般技術者通常理解相同之含義。儘管與本文所述之彼等方法及材料類似或同等之方法及材料可用於實踐或測試本發明，但下文描述適合方法及材料。本文中提及之所有公開案、專利申請案、專利及其他參考文獻均

以全文引用的方式併入本文中。在有矛盾的情況下，將以本說明書(包括定義)為準。另外，材料、方法及實例僅為說明性的且並不意欲為限制性的。

實例

實例1：基因構築體

【0071】 基於自GISAID資料庫下載之基因序列設計SARS-CoV-2棘蛋白序列。自全球全球共享流感數據倡議組織(Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data, GISAID)資料庫(版本：2021年4月18日)擷取所有可用SARS-CoV-2病毒株之總共1,117,474個S蛋白序列。

【0072】 來自SARS-CoV-2 Wuhan/WH01/2019及Delta變異體之棘蛋白的DNA序列用針對人類細胞表現最佳化之密碼子合成。弗林蛋白酶裂解位點(furine cleavage site)替換為GSAG(SEQ ID NO: 9)且為蛋白質設計2P替代物以停留在融合前狀態。在棘蛋白C端，跨膜域替換為凝血酶裂解位點(thrombin cleavage site)、摺疊子(foldon)及組胺酸標籤(histidine-tag)。將經修飾之HA序列選殖至pTT載體中以表現蛋白質及純化。

實例2：SARS-CoV-2 S蛋白表現及純化

【0073】 藉由使用轉染試劑(聚伸乙基亞胺或FectoPRO)，將編碼分泌之SARS-CoV-2棘蛋白之質體轉染至HEK293EBNA (ATCC編號CRL-10852)或HEK293S GnTI⁻細胞之人類胚胎腎細胞株中，且在補充有0.5%胎牛血清之Freestyle 293表現培養基(Invitrogen)中培養。在轉染之後5天收集上清液且藉由離心清除。接著，棘蛋白用鎳螯合層析法純化且藉由Millipore Amicon超濾器(100 kDa)濃縮溶離部分，且裝載至在基於tris之緩衝液(20 mM tris/HCl、20 mM NaCl、50 mM麩胺酸、50 mM精胺酸)中

預平衡的superpose™ 6凝膠過濾管柱(10/300 GL ; GE)上，且收集對應三聚體部分。在室溫下將經純化之S_{HM}用Endo H (NEB)處理隔夜以產生在醣基化位點具有單個GlcNAc之棘蛋白S_{MG}。對於EndoH移除，藉由緩衝液交換，使用Millipore Amicon超濾器(100 kDa)進一步純化S_{MG}。自PNAS中公開之實驗室先前研究修改表現及純化方法。

【0074】 經聚醣工程改造之假病毒(圖1D)之產生遵循先前研究(Y. Watanabe, J. D. Allen, D. Wrapp, J. S. McLellan, M. Crispin, Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike. *Science* **369**, 330-333 (2020) ; Q. Yang, T. A. Hughes, A. Kelkar, X. Yu, K. Cheng, S. Park, W.-C. Huang, J. F. Lovell, S. Neelamegham, Inhibition of SARS-CoV-2 viral entry upon blocking N- and O-glycan elaboration. *eLife* **9**, e61552 (2020))。為產生醣位點特異性S突變假病毒(圖1F)，將HEK293T細胞用在各醣位點攜帶突變之pVax-nCoV-SΔ19構築體及表現螢光素酶之HIV-1基因體質體(pNL4-3.luc.RE)短暫轉染。

實例3：S_{MG}蛋白表徵

【0075】 為表徵 S_{MG} 蛋白，使用在基於 tris 之緩衝液(20mM tris/HCl、20mM NaCl、50mM麩胺酸、50mM精胺酸)中預平衡的ENrich™ SEC 650 (10×300管柱；Biorad)進行粒徑篩析層析法。接著，為檢驗蛋白質樣品之純度，將樣品與裝載緩衝液組合，藉由7.5% SDS-PAGE分離且藉由考馬斯亮藍-Plus (EBL)染色。

實例4：藉由質譜分析進行糖肽分析

【0076】 使來自兩個生物學重複實驗之兩個20 μg SARS-CoV-2棘蛋白等分試樣在含有10 mM參(2-羧基乙基)膦之50 mM三乙銨碳酸氫鹽緩衝

液中以55°C下變性1小時。隨後，還原棘蛋白，且藉由添加18 mM碘乙醯胺(IAA)烷基化，且在黑暗中培育30分鐘。使用比率為1:10 (w/w)之胰凝乳蛋白酶或 α 溶解蛋白酶或比率為1:20 (w/w)之胰蛋白酶的不同組合，分開消化烷基化Env蛋白。(質譜法級別，Promega)在消化隔夜之後，樣品在SpeedVac濃縮器中乾燥且經加工用於測定LC-MS/MS。根據由Graphpad Prism 9.0.0偵測及目測之組成，遵循先前研究進行聚醣分類。

實例5：疫苗接種及攻擊實驗

【0077】 在第0天及第14天，將雌性6至7週齡金色絨利亞倉鼠($n= 5$)在肌肉內用與250 μg 氫氧化鋁混合的25 μg 經純化之 S_{FG} 或 S_{MG} 蛋白進行免疫接種。在第一次免疫接種之後28天及42天收集血液，且自各倉鼠收集血清樣品。在第二次免疫接種之後4週，用 1×10^4 PFU SARS-CoV-2 TCDC#4 (hCoV-19/Taiwan/4/2020，GISAID寄存ID：EPI_ISL_411927)以每隻倉鼠100 μL 之體積鼻內攻擊倉鼠。在感染之後每日記錄各倉鼠之體重。在攻擊後第3天，藉由二氧化碳對倉鼠施以安樂死。收集右肺以用於病毒負荷測定(TCID₅₀分析)。將左肺固定於4%三聚甲醛中以用於組織病理學檢驗。所有動物實驗均經中央研究院(Academia Sinica)之實驗動物照護及使用委員會(Institutional Animal Care and Use Committee)評估及批准。

【0078】 或者，對於利用兩劑時程之小鼠疫苗接種，在第0天及第14天，將雌性6至8週齡BALB/c小鼠($n= 5$)在肌肉內用與氫氧化鋁(50 μg)混合的10 μg 經純化之 S_{FG} 、 S_{HM} 或 S_{MG} 進行免疫接種。在第一次疫苗接種之後第28天收集血清，用於評估抗S IgG豐度、IgG亞型及中和力價(補充材料及方法中描述)。在第一次疫苗接種之後第21天收集經 S_{FG} 或 S_{MG} 免疫接

種之小鼠之淋巴結，用於T細胞反應分析(補充材料及方法中描述)。對於B細胞庫分析及針對變異體之血清力價，在第0、14及56天，將雌性6至8週齡BALB/c小鼠($n=5$)在肌肉內經與氫氧化鋁($20\ \mu\text{g}$)混合的 $20\ \mu\text{g}$ 經純化之 S_{FG} 或 S_{MG} 進行免疫接種；在第84天對小鼠施以安樂死以收集全血，用於抗S IgG及中和力價評估，且收集脾，用於分選S蛋白特異性B細胞(補充材料及方法中描述)。

【0079】對於倉鼠疫苗接種及病毒攻擊研究，在第0天及第14天將雄性6至7週齡金色絨利亞倉鼠($n=5$)在肌肉內用與氫氧化鋁($250\ \mu\text{g}$)混合的 $25\ \mu\text{g}$ 經純化之 S_{FG} 或 S_{MG} 進行免疫接種。在第二次免疫接種之後四週，用 $100\ \mu\text{l}$ PBS中 1×10^4 TCID₅₀ SARS-CoV-2 (hCoV-19/Taiwan/4/2020)鼻內攻擊各倉鼠。在感染之後每日記錄體重。在攻擊後第3天，藉由二氧化碳對倉鼠施以安樂死。將左肺上葉固定於10%三聚甲醛中以用於組織病理學檢查，且收集其餘肺以用於病毒負荷測定(TCID₅₀分析)。

【0080】對於轉殖基因小鼠疫苗接種及病毒攻擊研究，在第0及14天將雄性6至8週齡CAG-hACE2轉殖基因小鼠或雄性12週齡K18-hACE2轉殖基因小鼠(購自the Jackson Laboratory)在肌肉內用與氫氧化鋁($50\ \mu\text{g}$)混合的 $10\ \mu\text{g}$ 經純化之 S_{FG} 或 S_{MG} 進行免疫接種。在第二次免疫接種之後4週，用 1×10^3 TCID₅₀ WT SARS-CoV-2鼻內攻擊CAG-hACE2轉殖基因小鼠。在第一次試驗($n=3$)中，在7 dpi對所有小鼠施以安樂死以對左肺上葉進行組織病理學檢查；在第二個試驗($n=7$)中，在4 dpi對三隻小鼠施以安樂死以獲得肺病毒力價，且保持四隻小鼠直至14 dpi，以進行存活分析。在病毒攻擊之前1天收集血清。

【0081】對於使用高關注變異株(VOC)之攻擊研究，用每隻小鼠50

μl PBS中 1×10^3 TCID₅₀ Alpha變異體(hCoV-19/Taiwan/792/2020) ($n = 5$) 或 Gamma 變異體(hCoV-19/Taiwan/906/2021) SARS-CoV-2攻擊CAG-hACE2小鼠。另外，在第二次免疫接種之後4週，用每隻小鼠50 μl PBS中 1×10^4 TCID₅₀ Delta SARS-CoV-2 (hCoV-19/Taiwan/1144/2021) ($n = 4$) 鼻內攻擊K18-hACE2小鼠。對於所有SARS-CoV-2變異體攻擊模型，每日記錄各小鼠之體重直至14 dpi。

【0082】對於抗體之預防性保護測試，向雄性8週齡K18-hACE2轉殖基因小鼠($n = 3$)腹膜內注射m31A7 (15 mg/kg)或PBS，1天後用 1×10^3 TCID₅₀ WT SARS-CoV-2 (hCoV-19/Taiwan/4/2020)鼻內攻擊。每日記錄體重及體溫直至5 dpi。所有動物實驗均經中央研究院之實驗動物照護及使用委員會評估及批准(批准編號21-10-1716、18-12-1272及20-10-1522)。

實例6：組織學及免疫組織化學(IHC)染色

【0083】在3 dpi立即收集倉鼠肺且置放於10%中性緩衝福馬林中，固定24小時，隨後轉移至70%乙醇中，保持72小時。將石蠟包埋之肺組織修整至5 mm之厚度。對於組織學染色，將組織用蘇木精及伊紅(H&E)染色。對於免疫組織化學(IHC)染色，用二甲苯將切片之組織去石蠟且用乙醇梯度再水合。藉由在微波烘箱中在10 mM檸檬酸鈉緩衝液(pH 6.0)中將載片加熱至95°C持續10分鐘進行抗原修復。在室溫下冷卻且用PBS洗滌後，施加3% H₂O₂以消除內源過氧化酶活性。將切片之組織用含5%正常山羊血清及1% BSA之1X PBST阻斷1小時，隨後與1:50稀釋之兔抗N及抗S初級抗體(抗SARS-CoV-2多株抗體)在4°C下一起培育隔夜。隨後將組織與1:500稀釋之山羊抗兔HRP二級抗體一起培育1小時且藉由與3,3'-二胺基

聯苯胺(DAB)受質一起培育且用蘇木精對比染色進行目測。

實例7：免疫螢光(IF)染色

【0084】對於免疫螢光染色，在抗原修復步驟之後，用含Triton X-100之PBS滲透組織。將切片之組織用含5%正常山羊血清及1% BSA之1X PBST阻斷1小時。接著，與自體螢光猝滅劑一起培育5分鐘。隨後將樣品與1:50稀釋之兔抗N及抗S初級抗體(抗SARS-CoV-2多株抗體)在4°C下一起培育隔夜，與二級抗體Alexa Fluor-488 (1:500, Thermo Fisher)在室溫下一起培育1小時，且與核染料4,6-二甲脒基-2-苯基吲哚(DAPI)在室溫下一起培育3分鐘。將蓋玻片安裝在顯微鏡載片上且在具有HC PL APO CS2 10x/1.40鏡片之Leica TCS SP8X共焦顯微鏡(Leica AG, Wetzlar, Germany)下成像。

實例8：轉殖基因小鼠疫苗接種及攻擊實驗

【0085】 在第0天及第14天，將雄性8週齡CAG-hACE2轉殖基因小鼠(n= 3)在肌肉內經與50 μg 氫氧化鋁混合的10 μg 經純化之S_{FG}或S_{MG}蛋白進行免疫接種。¹⁴在第一次免疫接種之後28天及42天收集血液，且自各轉殖基因小鼠收集血清樣品。在第二次免疫接種之後6週，用 1×10^3 PFU SARS-CoV-2 TCDC#4 (hCoV-19/Taiwan/4/2020, GISAID寄存ID: EPI_ISL_411927)以每隻小鼠100 μL 之體積鼻內攻擊倉鼠。感染後每日記錄各轉殖基因小鼠之體重及存活率。在攻擊之後第7天，藉由二氧化碳對所有轉殖基因小鼠施以安樂死。將肺固定於4%三聚甲醛中以用於組織病理學檢驗。所有動物實驗均經中央研究院之實驗動物照護及使用委員會評估及批准。

實例9：藉由細胞培養感染分析對肺組織中之病毒力價進行定量(TCID50)

【0086】 使用均質器，使倉鼠之中腔、下腔及後腔肺葉於600 μ l具有2% FBS及1%青黴素/鏈黴素之DMEM中均質化。以15,000 rpm將組織均質物離心5分鐘且收集上清液以用於活病毒滴定。簡言之，將各樣品之10倍連續稀釋液添加於Vero E6細胞單層上，一式四份，且培育4天。細胞隨後用10%甲醛固定且用0.5%結晶紫染色20分鐘。用自來水洗滌培養盤且對感染進行評分。藉由李-明法(Reed and Muench method)計算50%組織培養物感染劑量(TCID₅₀)/mL。

實例10：小鼠疫苗接種研究

【0087】 在第0天、第14天及第56天，將雌性6至8週齡BALB/c小鼠(n= 5)在肌肉內經與20 μ g氫氧化鋁混合的20 μ g經純化之S_{FG}或S_{MG}蛋白免疫接種。在第三次免疫接種之後14天收集血液，且自各小鼠收集血清樣品。所有動物實驗均經中央研究院之實驗動物照護及使用委員會評估及批准。

實例11：血清抗體力價評估

【0088】 抗S ELISA用於測定血清IgG力價。將培養盤用5%脫脂乳阻斷，且依次添加小鼠多株抗S初級抗體及HRP結合之二級抗體。使用過氧化酶受質溶液(TMB)及1M H₂SO₄終止溶液且藉由微定量盤式讀數器讀取吸光度(OD 450 nm)。測試病毒株包括SARS-CoV-2 (野生型、變異體B.1.1.7及B.1.135)、RnGT13及SARS-CoV-1。

【0089】 藉由單一B細胞篩選分析分離m31A7抗體且隨後使特徵化。基於先前出版物設計引子(T. Tiller, C. E. Busse, H. Wardemann, Cloning and expression of murine Ig genes from single B cells. *J. Immunol. Methods* **350**, 183-193 (2009))。聚合酶鏈式反應(PCR)在50°C

下進行30分鐘，在95°C下進行15分鐘，接著進行94°C下培育30秒、50°C下培育30秒及72°C下培育1分鐘之循環40個，最終延伸在72°C下進行10分鐘。使用KOD One PCR主混合物(TOYOBO)利用1 µl未純化之第一輪PCR產物進行半巢式第二輪PCR，在98°C下2分鐘，接著進行98°C下培育10秒、55°C下培育10秒及68°C下培育10秒之循環45個，最終延伸在68°C下進行1分鐘。隨後藉由電泳及定序分析PCR產物。在國際ImMunoGeneTics資訊系統(http://imgt.org/IMGT_vquest/input)上鑑別IgV及L基因。接著利用單一基因特異性V及L基因引子，自第二輪PCR產物擴增基因，該等引子含有用於選殖至含有人類IgH或IgL表現主鏈之載體中之限制位點。將嵌合IgH及IgL表現構築體共轉染至Expi293中以產生抗體。在分離m31A7之後，隨後藉由ELISA及螢光活化細胞分選對抗體評估S蛋白結合、假病毒中和效力、結合動力學、抗原決定基定位及結構測定。

實例12：假病毒中和分析

【0090】為確定假型慢病毒載體之感染單位，在感染前1天，吾人在96孔(每孔100 µL)組織培養盤中以適當密度接種293T-ACE2細胞。在培育隔夜(37°C、5% CO₂)之後，將100 mL三個預混合之假病毒上清液及免疫接種小鼠血清之四倍連續稀釋液添加在塗鋪之細胞中。將細胞在37°C/5% CO₂下培育48小時以允許表現Nano-Luciferase報導基因。藉由ELISA讀數器量測螢光素酶活性。藉由以下等式 $100 \times [1 - (RLU_{\text{樣品}} / RLU_{\text{模擬處理}})]$ 計算抑制百分比。使用Graphpad Prism分析數據且藉由獲取所有樣品之50%抑制濃度值計算pNT₅₀值。

實例13：蝕斑減少分析

【0091】在感染前1天，將Vero E6細胞於具有10% FBS及抗生素之DMEM中接種至24孔培養盤中。將SARS-CoV-2與抗體在37°C下一起培育1小時，隨後再添加至細胞單層中，保持一小時。隨後，移除病毒-抗體混合物，且用PBS洗滌細胞單層一次，隨後用含有1%甲基纖維素之培養基覆蓋5-7天。將細胞用10%甲醛固定隔夜。在移除上覆培養基之後，將細胞用0.7%結晶紫染色且計數蝕斑。抑制百分比計算為 $[1 - (VD/VC)] \times 100\%$ ，其中VD及VC分別係指在血清存在及不存在下之病毒力價。

【0092】對於基於CPE之中和分析，將Vero E6細胞以 2×10^5 個細胞/孔塗鋪至6孔盤上隔夜，90%細胞覆蓋率。將血清及病毒混合，隨後再添加至細胞單層上，保持一小時。使培養盤在室溫下固化30分鐘，接著在37°C下培育，直至觀測到細胞病變作用(CPE)。

【0093】統計分析：所有數據均表示為平均值±平均值之標準誤差。對於所有分析，除使用t試驗(Student's t-test)(配對，雙尾)進行曲線比較以外，自t試驗(Student's t-test)(未配對，雙尾)獲得P值。所有圖皆用GraphPad Prism版本9.0.0軟體產生。

實例14：經醣化工程改造之經單GlcNAc修飾之棘蛋白(S_{MG})疫苗的設計及特徵

【0094】具有來自原始SARS-CoV-2武漢病毒株(hCoV/Wuhan/WH01/2019)之序列(胺基酸14-1209)的重組天然蛋白經密碼子最佳化以用於人類細胞表現，其中GSAG(SEQ ID NO: 9)殘基替換原始弗林蛋白酶裂解位點且進行2個脯胺酸突變以將棘蛋白之天然蛋白固定在其融合前狀態，且在其C端處添加摺疊子三聚序列及His標籤，且用人類HEK293S細胞表現(圖1)。首先獲得中間物高甘露醣型棘蛋白重組天然

蛋白(S_{HM})且純化，其中由分支符號(圖1a)指示之所有N-聚醣均係Man5 N-聚醣。隨後使用內切醣基化酶EndoH移除過量聚醣且產生終產物單醣基化棘蛋白天然蛋白(圖1b)。經純化之 S_{MG} 為在溶液中表觀分子量為約520 kDa且具有高純度之三聚體(圖1c及圖1d)。與普通 S_{FG} 及中間物 S_{HM} 相比，藉由SDS-PAGE分析由N-聚醣之移除所致之尺寸減小(圖1d)。關於 S_{MG} 之質譜分析指示，大部分N-醣基化位點具有靠近100%單糖，亦即N-乙醯基葡萄糖胺(GlcNAc)，N603及N1194除外，GlcNAc>90% (圖1f)。相比之下，原始完全醣基化棘蛋白天然蛋白在所有其N-醣基化位點上具有非均質N-聚醣，含有複合型、雜交型及其他類型。

實例15： S_{MG} 疫苗在活體內提供對SARS-CoV-2及變異體之優良防護

【0095】為評估 S_{MG} 疫苗針對SARS-CoV-2之活體內防護功效，首先在經 S_{MG} 或 S_{FG} 疫苗接種之敘利亞倉鼠中進行WT SARS-CoV-2攻擊(圖2A)。與 S_{FG} 及磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)組相比，經 S_{MG} 疫苗接種之倉鼠($n=5$)展示體重減少較少(圖2B)，而在經 S_{FG} 及 S_{MG} 疫苗接種之倉鼠之肺中觀測到相似病毒力價減少(圖2C)。另外，根據組織病理學染色及抗核衣殼(N)蛋白質免疫染色數據，在經免疫接種之倉鼠之肺中觀測到較少病變(圖2D)。因為倉鼠在SARS-CoV-2感染之後僅展示輕度至中度噁心，接著使用嚴重疾病模型，高感CAG-hACE2 (C.-Y. Tsai, C.-Y. Chen, J.-T. Jan, Y.-C. Chou, M.-L. Chang, L. A. Lu, P.-Y. Huang, M. F. C. Chu, T.-T. Hsu, Y.-P. Hsueh, *Sex-biased response to and brain cell infection by SARS-CoV-2 in a highly susceptible human ACE2 transgenic model*. bioRxiv, 2021)或K18-hACE2 (E. S. Winkler, A. L. Bailey, N. M. Kafai, S. Nair, B. T. McCune, J. Yu, J. M. Fox, R. E. Chen, J. T. Earnest, S. P. Keeler, J. H.

Ritter, L.-I. Kang, S. Dort, A. Robichaud, R. Head, M. J. Holtzman, M. S. Diamond, SARS-CoV-2 infection of human ACE2-transgenic mice causes severe lung inflammation and impaired function. *Nat. Immunol.* **21**, 1327-1335 (2020)轉殖基因小鼠(圖2E)。對CAG-hACE2小鼠中抗S IgG結合價、中和力價、抗S亞型IgG及IgG2c:IgG1比率(圖2, F至I)之分析均展示與BALB/c小鼠相似的結果(圖6, C至G)。在用WT SARS-CoV-2鼻內攻擊之後, 在感染後第7天(dpi)藉由抗N染色(圖2J)或在4 dpi藉由中值組織培養物感染劑量(TCID₅₀)分析(圖2K)在經S_{FG}及S_{MG}疫苗接種之CAG-hACE2小鼠($n = 3$)之肺中無法偵測到病毒, 而在對照組中觀測到超過1,000 TCID₅₀之病毒力價(圖2K)。在14 dpi, S_{MG}組($n = 4$)展現比S_{FG} (50%)更佳之存活率(75%) (圖2, L及M)。接著評估CAG-hACE2小鼠($n = 5$)中由S_{MG}疫苗接種賦予的對Alpha變異體攻擊之防護程度。發現S_{MG}疫苗接種提供100%存活率, 直至14 dpi (圖2, N及O)。經S_{MG}疫苗接種之小鼠亦展示在CAG-hACE2小鼠($n = 5$)中Gamma變異體攻擊中60%存活率(圖22 P及Q)及在K18-hACE2小鼠($n = 4$)中Delta變異體攻擊中75%存活率(圖4, R及S), 而在Gamma及Delta變異體攻擊中, 少於50%經S_{FG}疫苗接種之小鼠存活, 直至14 dpi (圖2, Q至S)。由S_{MG}疫苗接種賦予之經改良之活體內防護進一步證明自免疫原移除聚醣遮蔽係引發優良免疫反應之有利策略。

實例16：S_{MG}疫苗接種在轉殖基因hACE2小鼠中提供更好的對致死劑量SARS-CoV-2感染之預防

【0096】 CAG-hACE2轉殖基因小鼠在感染SARS-CoV-2病毒時可能發展嚴重疾病且死亡。在第0及14天在肌肉內給與兩劑S_{FG}、S_{MG}疫苗或僅佐劑, 在第28及42天收集血清, 使用 1×10^3 TCID₅₀ SARS-CoV-2經鼻內

感染各小鼠(圖3a)。經S_{MG}免疫接種之小鼠的棘蛋白特異性抗體IgG力價比S_{FG}組高1.9倍(40,000對比20,000)，且S_{MG}之中和力價比S_{FG}組高2.8倍(圖3b及圖3c)。意外地，在此嚴重疾病模型中，如觀測到體重迅速下降且所有小鼠在病毒感染之後第7天前全部死亡，S_{FG}疫苗接種未能保護CAG-hACE2轉殖基因小鼠免於嚴重疾病。經S_{FG}疫苗接種之組之疾病進展僅比僅佐劑組略好(圖3d及圖3e)。相比之下，經S_{MG}疫苗接種之組展現重量略微減輕，且所有小鼠均經受住SARS-CoV-2感染。此結果證明SARS-CoV-2嚴重疾病轉殖基因小鼠模型中S_{MG}疫苗接種之優越性。

實例17：小鼠中由S_{MG}疫苗誘發之抗體增強針對SARS-CoV-2變異體之結合及中和的廣度及效力

【0097】 接著關於中和新出現之需要關注之SARS-CoV-2變異體的能力，分析由具有來自武漢病毒株之棘蛋白天然序列的S_{FG}或S_{MG}之任一疫苗接種引發的抗體反應是否存在差異(圖4)。與S_{FG}相比，S_{MG}免疫接種引發更佳的棘蛋白特異性抗體IgG與來自WT之棘蛋白天然蛋白(武漢病毒株)的結合，且亦引發與變異體D614G、B.1.1.7、B.1.351、蝙蝠CoV RnGT13及SARS-CoV-1之結合(圖4b)。使用SARS-CoV-2變異體之假型病毒(pseudotyped viruse)測量中和經疫苗免疫接種之血清中之感染的能力。此外，來自S_{MG}免疫接種之血清對D614G、B.1.1.7及B.1.351假病毒具有優良的中和能力，且其分別比S_{FG}誘發之血清優良1.4、2.7及1.5倍(圖4c及圖4d)。最終，在蝕斑中和分析中使用SARS-CoV-2實際病毒D614G及B.1.1.7(圖4e及圖4f)。與S_{FG}疫苗接種相比，S_{MG}疫苗接種對D614G及B.1.1.7變異體引發更佳的中和抗體反應，且其分別優良2.0及1.4倍。

實例18：醣基化影響假病毒S蛋白與若干細胞類型上之ACE2的相互作用

【0098】為瞭解醣基化之重要性，自肺上皮細胞(用於感染之初級細胞)表現S蛋白，且發現對受體之較高親合力需要S蛋白之唾液酸化(圖5A)。對HEK293T細胞產生之S蛋白亦觀測到相似模式(圖5B)，且對僅具有高甘露糖聚醣或呈所有N-聚醣修整為單一N-乙醯基葡萄糖胺(GlcNAc)之醣型之S蛋白的親合力亦減少(圖5C)。藉由表現人類血管收縮素轉化酶2(hACE2)之HEK293T細胞中的假病毒感染進一步測試其醣基化之影響，揭露當施加相同量之病毒時一致之傾向(圖5D)。此使吾人得出結論，複合型聚醣及唾液酸化在功能上對於S蛋白介導之感染性為重要的。亦產生一組完整24種基於慢病毒之假病毒變異體(包含22個N-醣位點及2個O-醣位點)，用於評估五種表現hACE2之細胞株(包括HEK293T、Vero-E6及三種人類肺細胞株A549、Calu-1及Calu-3細胞)中的病毒進入效率(圖5，E至G)。此等假病毒係基於具有C端19個胺基酸缺失之S構築體，其產生最高病毒力價。藉由p24免疫分析定量假病毒產生，且結果相對於各突變病毒株之力價標準化(圖5F)。由於化學相似性，每個N-醣位點之天冬醯胺(Asn)經取代為麩醯胺酸(Gln)以最小化結構影響，且各O-醣位點之蘇胺酸(Thr)或絲胺酸(Srn)經取代為丙胺酸(Ala)。因為突變誘發改變胺基酸，所以所引起之感染性變化將來自共有的因素，包括影響受體接合的醣基化相關之構形變化，及受蛋白質表現、摺疊及運輸影響之S蛋白表面豐度。結果表明S蛋白醣基化之破壞降低感染性。對於受體結合域(RBD)中之兩個突變N331Q及N343Q以及對於兩個O-醣位點(T323A及S325A)之突變，觀測到實質性降低，儘管後者的佔有率低(圖5G)。另外，N端域(NTD)中之N122醣基化缺失引起感染性降低及低蛋白質表現(圖5G)。兩個NTD突變N149Q及N165Q分別在Vero-E6及Calu-1細胞中增加感染性，不過在其他

細胞中觀測到感染減少(圖5G)。應注意，附接於此N165殘基之聚醣在結構上接近三聚S蛋白中之相鄰RBD，且其突變減少ACE2結合，很可能由於RBD之構形變化至「向下」狀態。鑑別兩種突變體N801Q及N1194Q(圖5F)，其在所有五種細胞中普遍消除病毒感染性。醣位點N801位置靠近融合肽近端區(FPPR)，且N1194靠近七肽重複2 (HR2)螺旋之中心且為跨膜域前的最後一個N-醣位點(圖5E)。此等突變均引起低產率表現。N801Q突變體更傾向於降解，且N1194Q突變體破壞S蛋白三聚體，此可能部分地解釋了攜帶此等突變體之假病毒感染性之降低。

實例19：來自肺上皮細胞之S蛋白含有更多唾液酸化複合型聚醣且S蛋白中之高度保守抗原決定基主要經聚醣遮蔽

【0099】 S蛋白之聚醣圖譜分析顯示與人類腎上皮細胞細胞株HEK293T中產生之S蛋白(分別61%及23%) (圖6B)相比，人類肺上皮細胞細胞株BEAS-2B中產生之S蛋白中複合型聚醣豐度較高(78%)且雜交型聚醣較少(小於1%)(圖6A)。在高甘露醣型聚醣中，N連接之甘露糖-5聚醣(man5)係在HEK293T表現之S蛋白中發現的主要類型，儘管僅在來自BEAS-2B細胞之位點N61處看到。另外，在來自BEAS-2B細胞之位點N74、N149、N282及N1194處的複合型聚醣比來自HEK293T細胞之聚醣更多樣地進行加工(多個觸角、半乳糖基化、岩藻糖基化或唾液酸化)。相比之下，在位點N122、N331、N1098及N1134處之聚醣多樣化程度較低。此外，在BEAS-2B中N149及N17無核心岩藻糖。觀測到來自BEAS-2B之所有22個N-醣位點上的唾液酸化程度(53%)總體上高於來自HEK293T (35%)、HEK293E (26%)或先前報導之HEK293F細胞(15%) (Y. Watanabe, J. D. Allen, D. Wrapp, J. S. McLellan, M. Crispin, Site-specific

glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike. *Science* **369**, 330-333 (2020)。詳言之，BEAS-2B中RBD之兩個N-醣位點(N331及N343) (99%及39%)比HEK293T (49%及15%)更多唾液酸化。儘管有差異，但來自所有細胞類型之S蛋白均含有位於S2域之中間區段周圍的非複合型聚醣帶(圖6C)，其中N-醣位點N801對於感染很重要(圖5G)，N1074含有多樣化聚醣，且N717係S蛋白表現不可或缺的。

【0100】自模型化SARS-CoV-2 S蛋白結構及來自BEAS-2B細胞之聚醣圖譜，對蛋白質表面積上之聚醣覆蓋度進行結構分析，且與使用1,117,474個S蛋白序列的多個比對結果重疊(S. Elbe, G. Buckland-Merrett, Data, disease and diplomacy: GISAID's innovative contribution to global health. *Global Chall.* **1**, 33-46 (2017))。其揭露高度保守但經聚醣遮蔽之若干區域，包括RBD之下側面、具有非複合型聚醣帶之S2莖區及涉及連接域(CD)及HR2之S2 C端部分(圖6，D及E)。在一級序列上，此等區域展示為保守抗原決定基。序列保守分析亦展示，大部分醣位點區域高度保守，且大部分保守醣位點(突變率低於0.02%)包括NTD (N61、N122、N165及N234)、RBD (S325、N331及N343)、亞域1/2 (SD1/2) (N603及N657)、次單元2 (S2)之莖區(N709、N1098、N1134、N1158、N1173及N1194)及靠近FPPR之N801中的彼等醣位點。此等區域中的大部分含有約20%至40%保守表面殘基，且其中一定百分比之殘基經聚醣遮蔽，RBD中36%及其他區域中約50%。儘管不具有N-醣位點，但HR1區69%之保守表面殘基被源於相鄰域之聚醣覆蓋。此等結果突出顯示S蛋白醣基化在結構上及進化上之重要性，從而產生以下想法：暴露經聚醣遮蔽之保守區可能引發針對保守抗原決定基之免疫反應。(將12個保守抗原決

定基描述為疫苗設計之目標係更重要的。12個抗原決定基中之10個經聚醣遮蔽；且所遮蔽聚醣之移除暴露保守抗原決定基，從而引起廣泛保護反應)

實例20：研發S_{MG}作為疫苗且S_{MG}疫苗使用不同抗體子類引發更好免疫反應

【0101】最初嘗試使多個醣位點突變，導致S蛋白之表現明顯減少。然而，當自GnTI HEK293S細胞表現前述之S蛋白時，能夠產生一種具有良好產率及純度之高甘露醣型S蛋白(S_{HM})。接著在各N-醣位點處使用醣苷內切酶H (Endo H)將聚醣修整成單一GlcNAc，產生一種可溶性的經單GlcNAc修飾之修整S蛋白，稱為S_{MG} (圖7A)。藉由質譜分析證實S_{MG}，所有N-醣位點大部分經單一GlcNAc佔據，且未處理O-聚醣之佔有率太低而未偵測到。將此經修飾之S_{MG}及S_{HM}以及原始完全醣基化S蛋白(S_{FG})與作為佐劑之氫氧化鋁(明礬)混合，且隨後用於藉由肌肉內注射對BALB/c小鼠($n = 5$)進行免疫接種(圖7B)。在此研究中用於比較之S_{FG}由HEK293E細胞表現且含有多樣化聚醣；此類似於許多當前經批准或處於臨床試驗中之COVID-19疫苗中使用的免疫原，包括來自Sanofi及Novavax之昆蟲細胞表現之S蛋白疫苗(P. J. Klasse, D. F. Nixon, J. P. Moore, Immunogenicity of clinically relevant SARS-CoV-2 vaccines in nonhuman primates and humans. *Sci. Adv.* **7**, eabe8065 (2021))、來自Medigen之中國倉鼠卵巢(CHO)細胞表現之重組S疫苗(T.-Y. Kuo, M.-Y. Lin, R. L. Coffman, J. D. Campbell, P. Traquina, Y.-J. Lin, L. T.-C. Liu, J. Cheng, Y.-C. Wu, C.-C. Wu, W.-H. Tang, C.-G. Huang, K.-C. Tsao, C. Chen, Development of CpG-adjuvanted stable prefusion SARS-CoV-2 spike antigen as a subunit vaccine against COVID-19. *Sci. Rep.* **10**, 20085 (2020))、來自AstraZeneca

及Johnson&Johnson之基於腺病毒之疫苗及來自Pfizer-BioNTech及Moderna之mRNA疫苗(P. J. Klasse, D. F. Nixon, J. P. Moore, Immunogenicity of clinically relevant SARS-CoV-2 vaccines in nonhuman primates and humans. *Sci. Adv.* **7**, eabe8065 (2021))。藉由陰性染色分析，S_{FG}與S_{MG}蛋白展現在溶液中基本上相同之三聚結構。

【0102】與S_{FG}相比，經S_{MG}免疫接種之小鼠在第二次免疫接種之後誘發優良體液免疫反應，針對S蛋白之免疫球蛋白G (IgG)力價顯著較高，高1.44倍(終點力價：S_{FG}，39,408 ± 1,619；S_{MG}，56,957 ± 5,091；P = 0.0079) (圖7C)且基於SARS-CoV-2假病毒感染之抑制，抗體中和效力強3.6倍(半最大中和力價倒數pNT₅₀：S_{FG}，1346 ± 285；S_{MG}，4791 ± 767；P = 0.0159) (圖6D)，而經S_{HM}免疫接種之組展示相似抗S IgG力價(39,086 ± 11,654)且與S_{FG}組相比pNT₅₀力價無差異。對IgG亞型力價及T濾泡輔助(Tfh)細胞之干擾素- γ (IFN- γ)或介白素-4 (IL-4)產生的分析揭露，與經S_{FG}及S_{HM}疫苗接種之組相比，S_{MG}疫苗誘導BALB/c小鼠中更多IgG2a (其為T輔助1細胞(TH1)淋巴球之標記物)、更平衡之T_{H1}/T_{H2}反應及更多表現IFN- γ 之Tfh細胞(圖7，E至J)。此外，S_{MG}疫苗誘導更高頻率之IL-21⁺ Tfh細胞(圖7K)及升高頻率之產生顆粒酶B之CD8⁺ T細胞(圖7L)。此等資料表明，由S_{MG}引發之體液及細胞適應性免疫反應比由S_{FG}誘發之體液及細胞適應性免疫反應更有效。接著檢查來自經第三劑S_{FG}或S_{MG}免疫接種之小鼠之脾臟的S蛋白特異性B細胞(CD3⁻CD19⁺S⁺)的頻率(圖6A)且發現經S_{MG}免疫接種之小鼠產生更多S蛋白特異性B細胞(圖6M)。來自經S_{FG}及S_{MG}免疫接種之小鼠($n = 5$)之B細胞庫分析表明，與S_{FG}組中相比，S_{MG}組中使用更多 λ 輕鏈基因(S_{FG}，1.92%；S_{MG}，9.68%) (圖7N)。另外，與S_{FG}組中相

比，來源於Ig重鏈可變區(*IGHV*)之若干特定基因座(圖7O)及Ig κ 鏈可變區(*IGKV*)基因(圖7P)之抗體在S_{MG}組中過度表現，尤其*IGHV1-18*基因(圖7O)。此發現表明在此兩組中B細胞抗原決定基可以不同方式加工，且仍然進一步探索此差異是否及為何具有免疫益處。另外，針對野生型(WT)S蛋白，三劑S_{MG}疫苗接種引發之終點力價IgG比兩劑疫苗接種高(終點力價：S_{FG}，208,911 ± 50,092；S_{MG}，376,410 ± 80,873)。觀測到藉由酶聯免疫吸附分析(ELISA)針對來自SARS-CoV-2 高關注變異株(VOC)之S蛋白量測的血清IgG結合曲線中S_{MG}與S_{FG}組之間的差異(P. R. Krause, T. R. Fleming, I. M. Longini, R. Peto, S. Briand, D. L. Heymann, V. Beral, M. D. Snape, H. Rees, A.-M. Roper, R. D. Balicer, J. P. Cramer, C. Muñoz-Fontela, M. Gruber, R. Gaspar, J. A. Singh, K. Subbarao, M. D. Van Kerkhove, S. Swaminathan, M. J. Ryan, A.-M. Henao-Restrepo, SARS-CoV-2 variants and vaccines. *N. Engl. J. Med* **385**, 179-186 (2021))，包括Alpha (B.1.1.7；P = 0.0488)、Beta (B.1.351；P = 0.0010)、Gamma (P.1；P = 0.0068)及Delta (B.1.617.2；P = 0.0068)，但終點力價分析無統計差異(圖7Q)。藉由假病毒中和曲線，亦觀測到針對高關注變異株(VOC)之中和抗體反應之差異，包括Alpha (P = 0.0156)、Beta (P = 0.0156)及Delta (P = 0.0078)，但與S_{FG}相比，在假病毒或可靠病毒中和之pNT₅₀力價的值中未觀測到差異(圖7，R及S)。

實例21：自經S_{MG}免疫接種之小鼠之B細胞分離廣泛中和抗體

【0103】 自經S_{MG}免疫接種之小鼠分選之S蛋白特異性B細胞可自*IGHV1-18*擴增純系鑑別單株抗體(mAb) m31A7，該等B細胞係經S_{MG}免疫接種之B細胞庫中特別豐富之子集(圖8O)。此mAb與全長S蛋白、S1及

RBD相互作用，但不與S2相互作用(圖8A)，且結合於表現來自不同SARS-CoV-2變異株之S蛋白的HEK293T細胞(圖8B)。另外，展示在低於皮莫耳半抑制濃度(IC₅₀)下m31A7中和各種假病毒變異體(WT、D614G、Alpha、Beta及Delta)，比報導之人類mAb EY6A高多達1000倍(圖8C)。預防性研究亦證實在用WT SARS-CoV-2攻擊之K18-hACE2小鼠($n = 3$)中m31A7之良好活體內功效(圖8D)。預防性處理之小鼠維持體重及溫度(圖8，E及F)。生物層干涉術(Biolayer interferometry, BLI)分析用於量測分別在70.9 pM及4.66 nM下m31A7及其Fab結合於S蛋白之解離常數(圖8G)。藉由氫-氘交換質譜法(HDX-MS)之抗原決定基定位揭露其潛在結合區在RBD上(圖8H)，與在與m31A7-Fab之複合物中RBD之晶體結構中觀測到之抗原決定基重疊。冷凍電子顯微法(EM)結構進一步闡明m31A7僅與「向上」狀態之RBD結合(圖8I)，其中來自相鄰NTD之N165-聚醣在RBD-m31A7界面附近(圖8J)。m31A7在RBD上之佔據面積類似於人類VH1-58類別mAb (圖8K)，但其自不同角度接近RBD，在尖端環上之局部接觸面積變化，繞過高關注變異株(VOC)大部分關鍵突變殘基，諸如E484 K417，但不繞過T478 (圖8L)。此S_{MG}引發之mAb的詳細RBD-m31A7界面及抑制機制在進一步研究中。

實例22：Delta S_{MG}疫苗接種引發更多的針對SARS-CoV-2變異假病毒之中和抗體

SARS-CoV-2 Delta變異體之S_{MG}蛋白表現構築體

SEQ ID NO:3

MKVKLLVLLCTFTATYAGTQCENLRTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTW
 FHAIHVSGTNGTKREFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWI FGTTLD SKTQSL LIVN NATNVV IKVCE FQ
 FCNDPFLDVVYHKNNKSWMESGVYSSANNCTFEYVSQPF LMDLE GKQGNFKN LREFVFKNIDGYFKIYSK
 HTPINLVRDL PQQGFSALEPLVDLP IGINITRFQ TLLALHRSY LTPGDSSSGWTAGAAAYVGYLQPRTEFL
 LKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVENATR
 FASVYAWNRRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNLDLCTNVYADSFVIRGDEV RQIAPGQTG
 KIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNRYRLEFRKSNLKPFERDISTEIQAGSKPCNGVEGF
 NCYFPLQSYGFQPTNGVGYQP YRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESN
 KKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQ TLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQGVNCTEVPVAIHA
 DQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNSYECDIPIGAGICASYQTQ TNSRGSAGSVASQSIIAYT
 MSLGAENSVAYSNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTEC SNLLLQYGSFCTQLNRA
 LTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDP SKPSKRSFIEDLLFNKVTIADAGFIKQ
 YGDCLGDIAARDLICAQKFENGLTVL PPLL TDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRF
 NGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSL S STASALGKLQNVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSV
 LNDILSR LDPPEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKG
 YHLSFPQSAPHGVVFLHVTVVPAQEKNFTTAPAI CHDGAHF PREGVFVSN GTHWFVTQRNFYEPQIIT
 TDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVLDGDISGINASVVNIQKEIDRL
 NEVAKNLNESLIDLQELGKYEQDIRSLVPRGSPGSGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFLGGSGSLEV
 LFQGP HHHHHH

來自A/Brisbane/59/2007 (H1N1))之信號肽：

MKVKLLVLLCTFTATYAGT (SEQ ID NO: 4)

凝血酶裂解位點：LVPRGS (SEQ ID NO: 5)

T4摺疊子：PGSGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFLG (SEQ ID NO: 6)

HRV3C裂解位點：GSGSLEVLFQGP (SEQ ID NO: 7)

His標籤：HHHHHH (SEQ ID NO: 8)

【0104】 在第0週及第2週將BALB/c小鼠(n=5)用Delta S_{FG}或S_{MG}疫苗免疫接種兩次。在第6週收集血清且隨後使用假病毒分析測試中和能力(圖9A)。使用SARS-CoV-2 Delta變異體之假型病毒(pseudotyped viruse)測量中和經疫苗免疫接種之血清中之感染的能力。此外，來自S_{MG}免疫接種之血清對WT、Alpha、Beta、Gamma、Delta及Omicron假病毒具有優良中和能力。Delta S_{FG}對比S_{MG}之相應力價(pNT₅₀，愈高愈好)分別為1018對比3336(針對野生型WT假病毒)、1396對比2680(針對

Alpha假病毒)、337對比2282 (針對Beta假病毒)、814對比4424 (針對Gamma假病毒)、1138對比6680 (針對Delta假病毒)及144對比2628 (針對Omicron假病毒)。

實例23：Delta或WT S_{MG}疫苗接種引發更多的針對SARS-CoV-2 Omicron變異假病毒之中和抗體

【0105】 在第0週及第2週將BALB/c小鼠(n=5)用Delta/WT S_{FG}或S_{MG}疫苗免疫接種兩次。在第6週收集血清且隨後使用假病毒分析測試中和能力(圖10A)。使用SARS-CoV-2 Omicron變異體之假型病毒(pseudotyped virus)測量中和經WT S_{FG}/S_{MG}或Delta S_{FG}/S_{MG}疫苗免疫接種之血清中之感染的能力。WT S_{FG}疫苗接種未引發針對Omicron假病毒之中和，而WT S_{MG}提供輕微保護。類似地，Delta S_{FG}疫苗接種引發極少的針對Omicron假病毒感染之中和，然而，Delta S_{MG}提供極佳中和。

實例24：Delta S_{MG}蛋白可呈溶液或呈粉末儲存於室溫下

【0106】 具有兩種胺基酸(pbs-aa)、50 mM L-精胺酸及50 mM L-麩胺酸之磷酸鹽緩衝鹽水添加劑中Delta S_{MG}蛋白經0.22 μm過濾器過濾且儲存於室溫(RT)或4°C下。在包括3天、7天、14天、21天及3個月之不同時間點收集蛋白質。將所收集之樣品與5X SDS-PAGE裝載染料混合，在100°C下加熱5分鐘且儲存於4°C下，直至跑膠(圖11 A及B)。針對在4°C下儲存Delta S_{HM}或S_{MG} (前3個泳道)，測試有或無50 mM L-精胺酸及50 mM L-麩胺酸之PBS。測試在有或無賦形劑下凍乾的Delta S_{MG}且在室溫下儲存超過2週(後2個泳道) (圖11 C)。穩定性測試指示Delta S_{MG}蛋白可儲存於溶液中且在室溫或4°C下穩定至少21天。此外，Delta S_{MG}可經凍乾且在室溫下儲存且保持穩定至少3個月。

SEQ ID NO: 1

QCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHV
 SGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSTQSLIVNNATNVV
 IKVCEFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQG
 NFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPOGFSALEPLVDLPIGINITRFQTL
 LALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTEFLLYNENGTITDAVDCALDPLSE
 TKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNR
 KRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAP
 GQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDIS
 TEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCG
 PKKSTNLVKNKCVNFNFENGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTL
 ILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGS
 NVFQTRAGCLIGAEHVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNsprrarsvasqsiIAYTM
 SLGAENSVAYSNNsIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECsnlll
 QYGSECTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNESQILPDPSK
 PSKRSFIEDLLFNKVTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDE
 MIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIAN
 QFNsAIGKIQDLSSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILS
 RLDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKR
 VDFCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVITYVPAQEKNFTTAPAICHGKAHFPREGVfV
 SNGTHWFVTQRNFYEPQIIITDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELD
 KYFKNHTSPDVLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQY

SEQ ID NO: 2

QCVNLRTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHVSGTNGTK
 RFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLIVN NATNVVIKVCEFQFCNDPFL
 DVYYHKNNKSWMESGVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKH
 TPINLVRDLPPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLALHRSYLT PGDSSSGWTAGAAAYVGYLQ
 PRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNL
 CPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNLDLCFTNVYADS
 FVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYRYRLFRKSNLKP
 FERDISTEIQAGSKPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGP
 KKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQFGRDIADTTDAVRDPQTL EILDITPCS
 FGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQGVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGA EH
 VNNSYECDIPIGAGICASYQTQTSNRGSAGSVASQSI IAYTMSLGAENSVAYSNN SIAIPTNFT
 ISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTEC SNLLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFA
 QVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVT LADAGFIKQYGDCLGDIAAR
 DLICAQKFENGLTVLPPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGV
 TQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSTASALGKLQNVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISS
 VLNDILSRLDPPEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKR
 VDFCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTVPAQEKNFTTAPAICH DGKAHFPREGV FVSNGTHWF
 VTQRNFYEPQIITDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLG
 DISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQ

SARS-CoV-2 Delta變異體之S_{MG}蛋白表現構築體**SEQ ID NO:3**

MKVKLLVLLCTFTATYAGTQCVNLRTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTW
 FHAIHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLIVN NATNVVIKVCEFQ
 FCNDPFLDVYYHKNNKSWMESGVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSK
 HTPINLVRDLPPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLALHRSYLT PGDSSSGWTAGAAAYVGYLQPRTF L
 LKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATR
 FASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNLDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTG
 KIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYRYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSKPCNGVEGF
 NCFYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESN
 KKFLPFQFGRDIADTTDAVRDPQTL EILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQGVNCTEVPVAIHA
 DQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGA EHVNNNSYECDIPIGAGICASYQTQTSNRGSAGSVASQSI IAYT
 MSLGAENSVAYSNN SIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTEC SNLLLQYGSFCTQLNRA
 LTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVT LADAGFIKQ
 YGDCLGDIAARDLICAQKFENGLTVLPPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRF
 NGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSTASALGKLQNVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSV
 LNDILSRLDPPEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGK
 YHLMSFPQSAPHGVVFLHVTVPAQEKNFTTAPAICH DGKAHFPREGV FVSNGTHWFVTQRNFYEPQIIT
 TDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINASVVNIQKEIDRL
 NEVAKNLNESLIDLQELGKYEQDIRSLVPRGSPGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGGSGSLEV
 LFQGPHHHHHH

A/Brisbane/59/2007(H1N1)經修飾之信號肽

MKVKLLVLLCTFTATYAGT (SEQ ID NO: 4)

凝血酶裂解位點

LVPRGS (SEQ ID NO: 5)

T4摺疊子

PGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFLG (SEQ ID NO: 6)

HRV3C裂解位點

GSGSLEVLFGQP (SEQ ID NO: 7)

His標籤

HHHHHH (SEQ ID NO: 8)

替換原始弗林蛋白酶裂解位點的殘基

GSAG (SEQ ID NO: 9)

高度保守抗原決定基

TESIVRFPNITNL (SEQ ID NO.: 41)

NITNLCPFGEVFNATR (SEQ ID NO: 42)

LYNSASFSTFK (SEQ ID NO: 43)

LDSKVGGNYN (SEQ ID NO: 44)

KSNLKPFERDIST (SEQ ID NO: 45)

KPFERDISTEIYQAG (SEQ ID NO: 46)

GPKKSTNLVKKNC (SEQ ID NO: 47)

NCDVVIGIVNNTVY (SEQ ID NO: 48)

PELDSFKEELDKYFKNHTS (SEQ ID NO: 49)

VNIQKEIDRLNEVA (SEQ ID NO: 50)

NLNESLIDLQ (SEQ ID NO: 51)

LGKYEQYIKWP (SEQ ID NO: 52)

【序列表】

<110> 中央研究院(ACADEMIA SINICA)

<120> 經改良之冠狀病毒疫苗

<130> A21893-246717

<140> 111113933

<141> 2022-04-12

<150> US 63/173,752

<151> 2021-04-12

<150> US 63/190,199

<151> 2021-05-18

<160> 52

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1196

<212> PRT

<213> SARS-CoV-2

<400> 1

Gln Cys Val Asn Leu Thr Thr Arg Thr Gln Leu Pro Pro Ala Tyr Thr
1 5 10 15

Asn Ser Phe Thr Arg Gly Val Tyr Tyr Pro Asp Lys Val Phe Arg Ser
 20 25 30

Ser Val Leu His Ser Thr Gln Asp Leu Phe Leu Pro Phe Phe Ser Asn
 35 40 45

Val Thr Trp Phe His Ala Ile His Val Ser Gly Thr Asn Gly Thr Lys
 50 55 60

Arg Phe Asp Asn Pro Val Leu Pro Phe Asn Asp Gly Val Tyr Phe Ala
65 70 75 80

Ser Thr Glu Lys Ser Asn Ile Ile Arg Gly Trp Ile Phe Gly Thr Thr

I867291

85

90

95

Leu Asp Ser Lys Thr Gln Ser Leu Leu Ile Val Asn Asn Ala Thr Asn
100 105 110

Val Val Ile Lys Val Cys Glu Phe Gln Phe Cys Asn Asp Pro Phe Leu
115 120 125

Gly Val Tyr Tyr His Lys Asn Asn Lys Ser Trp Met Glu Ser Glu Phe
130 135 140

Arg Val Tyr Ser Ser Ala Asn Asn Cys Thr Phe Glu Tyr Val Ser Gln
145 150 155 160

Pro Phe Leu Met Asp Leu Glu Gly Lys Gln Gly Asn Phe Lys Asn Leu
165 170 175

Arg Glu Phe Val Phe Lys Asn Ile Asp Gly Tyr Phe Lys Ile Tyr Ser
180 185 190

Lys His Thr Pro Ile Asn Leu Val Arg Asp Leu Pro Gln Gly Phe Ser
195 200 205

Ala Leu Glu Pro Leu Val Asp Leu Pro Ile Gly Ile Asn Ile Thr Arg
210 215 220

Phe Gln Thr Leu Leu Ala Leu His Arg Ser Tyr Leu Thr Pro Gly Asp
225 230 235 240

Ser Ser Ser Gly Trp Thr Ala Gly Ala Ala Ala Tyr Tyr Val Gly Tyr
245 250 255

Leu Gln Pro Arg Thr Phe Leu Leu Lys Tyr Asn Glu Asn Gly Thr Ile
260 265 270

Thr Asp Ala Val Asp Cys Ala Leu Asp Pro Leu Ser Glu Thr Lys Cys
275 280 285

Thr Leu Lys Ser Phe Thr Val Glu Lys Gly Ile Tyr Gln Thr Ser Asn
 290 295 300

Phe Arg Val Gln Pro Thr Glu Ser Ile Val Arg Phe Pro Asn Ile Thr
 305 310 315 320

Asn Leu Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Arg Phe Ala Ser
 325 330 335

Val Tyr Ala Trp Asn Arg Lys Arg Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp Tyr
 340 345 350

Ser Val Leu Tyr Asn Ser Ala Ser Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr Gly
 355 360 365

Val Ser Pro Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Thr Asn Val Tyr Ala
 370 375 380

Asp Ser Phe Val Ile Arg Gly Asp Glu Val Arg Gln Ile Ala Pro Gly
 385 390 395 400

Gln Thr Gly Lys Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro Asp Asp Phe
 405 410 415

Thr Gly Cys Val Ile Ala Trp Asn Ser Asn Asn Leu Asp Ser Lys Val
 420 425 430

Gly Gly Asn Tyr Asn Tyr Leu Tyr Arg Leu Phe Arg Lys Ser Asn Leu
 435 440 445

Lys Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Thr Glu Ile Tyr Gln Ala Gly Ser
 450 455 460

Thr Pro Cys Asn Gly Val Glu Gly Phe Asn Cys Tyr Phe Pro Leu Gln
 465 470 475 480

Ser Tyr Gly Phe Gln Pro Thr Asn Gly Val Gly Tyr Gln Pro Tyr Arg

I867291

485

490

495

Val Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu His Ala Pro Ala Thr Val Cys
500 505 510

Gly Pro Lys Lys Ser Thr Asn Leu Val Lys Asn Lys Cys Val Asn Phe
515 520 525

Asn Phe Asn Gly Leu Thr Gly Thr Gly Val Leu Thr Glu Ser Asn Lys
530 535 540

Lys Phe Leu Pro Phe Gln Gln Phe Gly Arg Asp Ile Ala Asp Thr Thr
545 550 555 560

Asp Ala Val Arg Asp Pro Gln Thr Leu Glu Ile Leu Asp Ile Thr Pro
565 570 575

Cys Ser Phe Gly Gly Val Ser Val Ile Thr Pro Gly Thr Asn Thr Ser
580 585 590

Asn Gln Val Ala Val Leu Tyr Gln Asp Val Asn Cys Thr Glu Val Pro
595 600 605

Val Ala Ile His Ala Asp Gln Leu Thr Pro Thr Trp Arg Val Tyr Ser
610 615 620

Thr Gly Ser Asn Val Phe Gln Thr Arg Ala Gly Cys Leu Ile Gly Ala
625 630 635 640

Glu His Val Asn Asn Ser Tyr Glu Cys Asp Ile Pro Ile Gly Ala Gly
645 650 655

Ile Cys Ala Ser Tyr Gln Thr Gln Thr Asn Ser Pro Arg Arg Ala Arg
660 665 670

Ser Val Ala Ser Gln Ser Ile Ile Ala Tyr Thr Met Ser Leu Gly Ala
675 680 685

I867291

Glu Asn Ser Val Ala Tyr Ser Asn Asn Ser Ile Ala Ile Pro Thr Asn
690 695 700

Phe Thr Ile Ser Val Thr Thr Glu Ile Leu Pro Val Ser Met Thr Lys
705 710 715 720

Thr Ser Val Asp Cys Thr Met Tyr Ile Cys Gly Asp Ser Thr Glu Cys
725 730 735

Ser Asn Leu Leu Leu Gln Tyr Gly Ser Phe Cys Thr Gln Leu Asn Arg
740 745 750

Ala Leu Thr Gly Ile Ala Val Glu Gln Asp Lys Asn Thr Gln Glu Val
755 760 765

Phe Ala Gln Val Lys Gln Ile Tyr Lys Thr Pro Pro Ile Lys Asp Phe
770 775 780

Gly Gly Phe Asn Phe Ser Gln Ile Leu Pro Asp Pro Ser Lys Pro Ser
785 790 795 800

Lys Arg Ser Phe Ile Glu Asp Leu Leu Phe Asn Lys Val Thr Leu Ala
805 810 815

Asp Ala Gly Phe Ile Lys Gln Tyr Gly Asp Cys Leu Gly Asp Ile Ala
820 825 830

Ala Arg Asp Leu Ile Cys Ala Gln Lys Phe Asn Gly Leu Thr Val Leu
835 840 845

Pro Pro Leu Leu Thr Asp Glu Met Ile Ala Gln Tyr Thr Ser Ala Leu
850 855 860

Leu Ala Gly Thr Ile Thr Ser Gly Trp Thr Phe Gly Ala Gly Ala Ala
865 870 875 880

Leu Gln Ile Pro Phe Ala Met Gln Met Ala Tyr Arg Phe Asn Gly Ile

885

890

895

Gly Val Thr Gln Asn Val Leu Tyr Glu Asn Gln Lys Leu Ile Ala Asn
 900 905 910

Gln Phe Asn Ser Ala Ile Gly Lys Ile Gln Asp Ser Leu Ser Ser Thr
 915 920 925

Ala Ser Ala Leu Gly Lys Leu Gln Asp Val Val Asn Gln Asn Ala Gln
 930 935 940

Ala Leu Asn Thr Leu Val Lys Gln Leu Ser Ser Asn Phe Gly Ala Ile
 945 950 955 960

Ser Ser Val Leu Asn Asp Ile Leu Ser Arg Leu Asp Lys Val Glu Ala
 965 970 975

Glu Val Gln Ile Asp Arg Leu Ile Thr Gly Arg Leu Gln Ser Leu Gln
 980 985 990

Thr Tyr Val Thr Gln Gln Leu Ile Arg Ala Ala Glu Ile Arg Ala Ser
 995 1000 1005

Ala Asn Leu Ala Ala Thr Lys Met Ser Glu Cys Val Leu Gly Gln
 1010 1015 1020

Ser Lys Arg Val Asp Phe Cys Gly Lys Gly Tyr His Leu Met Ser
 1025 1030 1035

Phe Pro Gln Ser Ala Pro His Gly Val Val Phe Leu His Val Thr
 1040 1045 1050

Tyr Val Pro Ala Gln Glu Lys Asn Phe Thr Thr Ala Pro Ala Ile
 1055 1060 1065

Cys His Asp Gly Lys Ala His Phe Pro Arg Glu Gly Val Phe Val
 1070 1075 1080

I867291

Ser Asn Gly Thr His Trp Phe Val Thr Gln Arg Asn Phe Tyr Glu
1085 1090 1095

Pro Gln Ile Ile Thr Thr Asp Asn Thr Phe Val Ser Gly Asn Cys
1100 1105 1110

Asp Val Val Ile Gly Ile Val Asn Asn Thr Val Tyr Asp Pro Leu
1115 1120 1125

Gln Pro Glu Leu Asp Ser Phe Lys Glu Glu Leu Asp Lys Tyr Phe
1130 1135 1140

Lys Asn His Thr Ser Pro Asp Val Asp Leu Gly Asp Ile Ser Gly
1145 1150 1155

Ile Asn Ala Ser Val Val Asn Ile Gln Lys Glu Ile Asp Arg Leu
1160 1165 1170

Asn Glu Val Ala Lys Asn Leu Asn Glu Ser Leu Ile Asp Leu Gln
1175 1180 1185

Glu Leu Gly Lys Tyr Glu Gln Tyr
1190 1195

<210> 2

<211> 1193

<212> PRT

<213> SARS-CoV-2

<400> 2

Gln Cys Val Asn Leu Arg Thr Arg Thr Gln Leu Pro Pro Ala Tyr Thr
1 5 10 15

Asn Ser Phe Thr Arg Gly Val Tyr Tyr Pro Asp Lys Val Phe Arg Ser
20 25 30

Ser Val Leu His Ser Thr Gln Asp Leu Phe Leu Pro Phe Phe Ser Asn
35 40 45

Val Thr Trp Phe His Ala Ile His Val Ser Gly Thr Asn Gly Thr Lys
 50 55 60

Arg Phe Asp Asn Pro Val Leu Pro Phe Asn Asp Gly Val Tyr Phe Ala
 65 70 75 80

Ser Thr Glu Lys Ser Asn Ile Ile Arg Gly Trp Ile Phe Gly Thr Thr
 85 90 95

Leu Asp Ser Lys Thr Gln Ser Leu Leu Ile Val Asn Asn Ala Thr Asn
 100 105 110

Val Val Ile Lys Val Cys Glu Phe Gln Phe Cys Asn Asp Pro Phe Leu
 115 120 125

Asp Val Tyr Tyr His Lys Asn Asn Lys Ser Trp Met Glu Ser Gly Val
 130 135 140

Tyr Ser Ser Ala Asn Asn Cys Thr Phe Glu Tyr Val Ser Gln Pro Phe
 145 150 155 160

Leu Met Asp Leu Glu Gly Lys Gln Gly Asn Phe Lys Asn Leu Arg Glu
 165 170 175

Phe Val Phe Lys Asn Ile Asp Gly Tyr Phe Lys Ile Tyr Ser Lys His
 180 185 190

Thr Pro Ile Asn Leu Val Arg Asp Leu Pro Gln Gly Phe Ser Ala Leu
 195 200 205

Glu Pro Leu Val Asp Leu Pro Ile Gly Ile Asn Ile Thr Arg Phe Gln
 210 215 220

Thr Leu Leu Ala Leu His Arg Ser Tyr Leu Thr Pro Gly Asp Ser Ser
 225 230 235 240

I867291

Ser Gly Trp Thr Ala Gly Ala Ala Ala Tyr Tyr Val Gly Tyr Leu Gln
245 250 255

Pro Arg Thr Phe Leu Leu Lys Tyr Asn Glu Asn Gly Thr Ile Thr Asp
260 265 270

Ala Val Asp Cys Ala Leu Asp Pro Leu Ser Glu Thr Lys Cys Thr Leu
275 280 285

Lys Ser Phe Thr Val Glu Lys Gly Ile Tyr Gln Thr Ser Asn Phe Arg
290 295 300

Val Gln Pro Thr Glu Ser Ile Val Arg Phe Pro Asn Ile Thr Asn Leu
305 310 315 320

Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Arg Phe Ala Ser Val Tyr
325 330 335

Ala Trp Asn Arg Lys Arg Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp Tyr Ser Val
340 345 350

Leu Tyr Asn Ser Ala Ser Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr Gly Val Ser
355 360 365

Pro Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Thr Asn Val Tyr Ala Asp Ser
370 375 380

Phe Val Ile Arg Gly Asp Glu Val Arg Gln Ile Ala Pro Gly Gln Thr
385 390 395 400

Gly Lys Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro Asp Asp Phe Thr Gly
405 410 415

Cys Val Ile Ala Trp Asn Ser Asn Asn Leu Asp Ser Lys Val Gly Gly
420 425 430

Asn Tyr Asn Tyr Arg Tyr Arg Leu Phe Arg Lys Ser Asn Leu Lys Pro
435 440 445

Phe Glu Arg Asp Ile Ser Thr Glu Ile Tyr Gln Ala Gly Ser Lys Pro
 450 455 460

Cys Asn Gly Val Glu Gly Phe Asn Cys Tyr Phe Pro Leu Gln Ser Tyr
 465 470 475 480

Gly Phe Gln Pro Thr Asn Gly Val Gly Tyr Gln Pro Tyr Arg Val Val
 485 490 495

Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu His Ala Pro Ala Thr Val Cys Gly Pro
 500 505 510

Lys Lys Ser Thr Asn Leu Val Lys Asn Lys Cys Val Asn Phe Asn Phe
 515 520 525

Asn Gly Leu Thr Gly Thr Gly Val Leu Thr Glu Ser Asn Lys Lys Phe
 530 535 540

Leu Pro Phe Gln Gln Phe Gly Arg Asp Ile Ala Asp Thr Thr Asp Ala
 545 550 555 560

Val Arg Asp Pro Gln Thr Leu Glu Ile Leu Asp Ile Thr Pro Cys Ser
 565 570 575

Phe Gly Gly Val Ser Val Ile Thr Pro Gly Thr Asn Thr Ser Asn Gln
 580 585 590

Val Ala Val Leu Tyr Gln Gly Val Asn Cys Thr Glu Val Pro Val Ala
 595 600 605

Ile His Ala Asp Gln Leu Thr Pro Thr Trp Arg Val Tyr Ser Thr Gly
 610 615 620

Ser Asn Val Phe Gln Thr Arg Ala Gly Cys Leu Ile Gly Ala Glu His
 625 630 635 640

I867291

Val Asn Asn Ser Tyr Glu Cys Asp Ile Pro Ile Gly Ala Gly Ile Cys
645 650 655

Ala Ser Tyr Gln Thr Gln Thr Asn Ser Arg Gly Ser Ala Gly Ser Val
660 665 670

Ala Ser Gln Ser Ile Ile Ala Tyr Thr Met Ser Leu Gly Ala Glu Asn
675 680 685

Ser Val Ala Tyr Ser Asn Asn Ser Ile Ala Ile Pro Thr Asn Phe Thr
690 695 700

Ile Ser Val Thr Thr Glu Ile Leu Pro Val Ser Met Thr Lys Thr Ser
705 710 715 720

Val Asp Cys Thr Met Tyr Ile Cys Gly Asp Ser Thr Glu Cys Ser Asn
725 730 735

Leu Leu Leu Gln Tyr Gly Ser Phe Cys Thr Gln Leu Asn Arg Ala Leu
740 745 750

Thr Gly Ile Ala Val Glu Gln Asp Lys Asn Thr Gln Glu Val Phe Ala
755 760 765

Gln Val Lys Gln Ile Tyr Lys Thr Pro Pro Ile Lys Asp Phe Gly Gly
770 775 780

Phe Asn Phe Ser Gln Ile Leu Pro Asp Pro Ser Lys Pro Ser Lys Arg
785 790 795 800

Ser Phe Ile Glu Asp Leu Leu Phe Asn Lys Val Thr Leu Ala Asp Ala
805 810 815

Gly Phe Ile Lys Gln Tyr Gly Asp Cys Leu Gly Asp Ile Ala Ala Arg
820 825 830

Asp Leu Ile Cys Ala Gln Lys Phe Asn Gly Leu Thr Val Leu Pro Pro
835 840 845

Leu Leu Thr Asp Glu Met Ile Ala Gln Tyr Thr Ser Ala Leu Leu Ala
850 855 860

Gly Thr Ile Thr Ser Gly Trp Thr Phe Gly Ala Gly Ala Ala Leu Gln
865 870 875 880

Ile Pro Phe Ala Met Gln Met Ala Tyr Arg Phe Asn Gly Ile Gly Val
885 890 895

Thr Gln Asn Val Leu Tyr Glu Asn Gln Lys Leu Ile Ala Asn Gln Phe
900 905 910

Asn Ser Ala Ile Gly Lys Ile Gln Asp Ser Leu Ser Ser Thr Ala Ser
915 920 925

Ala Leu Gly Lys Leu Gln Asn Val Val Asn Gln Asn Ala Gln Ala Leu
930 935 940

Asn Thr Leu Val Lys Gln Leu Ser Ser Asn Phe Gly Ala Ile Ser Ser
945 950 955 960

Val Leu Asn Asp Ile Leu Ser Arg Leu Asp Pro Pro Glu Ala Glu Val
965 970 975

Gln Ile Asp Arg Leu Ile Thr Gly Arg Leu Gln Ser Leu Gln Thr Tyr
980 985 990

Val Thr Gln Gln Leu Ile Arg Ala Ala Glu Ile Arg Ala Ser Ala Asn
995 1000 1005

Leu Ala Ala Thr Lys Met Ser Glu Cys Val Leu Gly Gln Ser Lys
1010 1015 1020

Arg Val Asp Phe Cys Gly Lys Gly Tyr His Leu Met Ser Phe Pro
1025 1030 1035

I867291

Gln Ser Ala Pro His Gly Val Val Phe Leu His Val Thr Tyr Val
1040 1045 1050

Pro Ala Gln Glu Lys Asn Phe Thr Thr Ala Pro Ala Ile Cys His
1055 1060 1065

Asp Gly Lys Ala His Phe Pro Arg Glu Gly Val Phe Val Ser Asn
1070 1075 1080

Gly Thr His Trp Phe Val Thr Gln Arg Asn Phe Tyr Glu Pro Gln
1085 1090 1095

Ile Ile Thr Thr Asp Asn Thr Phe Val Ser Gly Asn Cys Asp Val
1100 1105 1110

Val Ile Gly Ile Val Asn Asn Thr Val Tyr Asp Pro Leu Gln Pro
1115 1120 1125

Glu Leu Asp Ser Phe Lys Glu Glu Leu Asp Lys Tyr Phe Lys Asn
1130 1135 1140

His Thr Ser Pro Asp Val Asp Leu Gly Asp Ile Ser Gly Ile Asn
1145 1150 1155

Ala Ser Val Val Asn Ile Gln Lys Glu Ile Asp Arg Leu Asn Glu
1160 1165 1170

Val Ala Lys Asn Leu Asn Glu Ser Leu Ile Asp Leu Gln Glu Leu
1175 1180 1185

Gly Lys Tyr Glu Gln
1190

<210> 3

<211> 1271

<212> PRT

<213> SARS-CoV-2 (δ病毒株)

<400> 3

I867291

Met Lys Val Lys Leu Leu Val Leu Leu Cys Thr Phe Thr Ala Thr Tyr
1 5 10 15

Ala Gly Thr Gln Cys Val Asn Leu Arg Thr Arg Thr Gln Leu Pro Pro
20 25 30

Ala Tyr Thr Asn Ser Phe Thr Arg Gly Val Tyr Tyr Pro Asp Lys Val
35 40 45

Phe Arg Ser Ser Val Leu His Ser Thr Gln Asp Leu Phe Leu Pro Phe
50 55 60

Phe Ser Asn Val Thr Trp Phe His Ala Ile His Val Ser Gly Thr Asn
65 70 75 80

Gly Thr Lys Arg Phe Asp Asn Pro Val Leu Pro Phe Asn Asp Gly Val
85 90 95

Tyr Phe Ala Ser Thr Glu Lys Ser Asn Ile Ile Arg Gly Trp Ile Phe
100 105 110

Gly Thr Thr Leu Asp Ser Lys Thr Gln Ser Leu Leu Ile Val Asn Asn
115 120 125

Ala Thr Asn Val Val Ile Lys Val Cys Glu Phe Gln Phe Cys Asn Asp
130 135 140

Pro Phe Leu Asp Val Tyr Tyr His Lys Asn Asn Lys Ser Trp Met Glu
145 150 155 160

Ser Gly Val Tyr Ser Ser Ala Asn Asn Cys Thr Phe Glu Tyr Val Ser
165 170 175

Gln Pro Phe Leu Met Asp Leu Glu Gly Lys Gln Gly Asn Phe Lys Asn
180 185 190

Leu Arg Glu Phe Val Phe Lys Asn Ile Asp Gly Tyr Phe Lys Ile Tyr

I867291

195

200

205

Ser Lys His Thr Pro Ile Asn Leu Val Arg Asp Leu Pro Gln Gly Phe
210 215 220

Ser Ala Leu Glu Pro Leu Val Asp Leu Pro Ile Gly Ile Asn Ile Thr
225 230 235 240

Arg Phe Gln Thr Leu Leu Ala Leu His Arg Ser Tyr Leu Thr Pro Gly
245 250 255

Asp Ser Ser Ser Gly Trp Thr Ala Gly Ala Ala Ala Tyr Tyr Val Gly
260 265 270

Tyr Leu Gln Pro Arg Thr Phe Leu Leu Lys Tyr Asn Glu Asn Gly Thr
275 280 285

Ile Thr Asp Ala Val Asp Cys Ala Leu Asp Pro Leu Ser Glu Thr Lys
290 295 300

Cys Thr Leu Lys Ser Phe Thr Val Glu Lys Gly Ile Tyr Gln Thr Ser
305 310 315 320

Asn Phe Arg Val Gln Pro Thr Glu Ser Ile Val Arg Phe Pro Asn Ile
325 330 335

Thr Asn Leu Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Arg Phe Ala
340 345 350

Ser Val Tyr Ala Trp Asn Arg Lys Arg Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp
355 360 365

Tyr Ser Val Leu Tyr Asn Ser Ala Ser Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr
370 375 380

Gly Val Ser Pro Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Thr Asn Val Tyr
385 390 395 400

Ala Asp Ser Phe Val Ile Arg Gly Asp Glu Val Arg Gln Ile Ala Pro
 405 410 415

Gly Gln Thr Gly Lys Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro Asp Asp
 420 425 430

Phe Thr Gly Cys Val Ile Ala Trp Asn Ser Asn Asn Leu Asp Ser Lys
 435 440 445

Val Gly Gly Asn Tyr Asn Tyr Arg Tyr Arg Leu Phe Arg Lys Ser Asn
 450 455 460

Leu Lys Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Thr Glu Ile Tyr Gln Ala Gly
 465 470 475 480

Ser Lys Pro Cys Asn Gly Val Glu Gly Phe Asn Cys Tyr Phe Pro Leu
 485 490 495

Gln Ser Tyr Gly Phe Gln Pro Thr Asn Gly Val Gly Tyr Gln Pro Tyr
 500 505 510

Arg Val Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu His Ala Pro Ala Thr Val
 515 520 525

Cys Gly Pro Lys Lys Ser Thr Asn Leu Val Lys Asn Lys Cys Val Asn
 530 535 540

Phe Asn Phe Asn Gly Leu Thr Gly Thr Gly Val Leu Thr Glu Ser Asn
 545 550 555 560

Lys Lys Phe Leu Pro Phe Gln Gln Phe Gly Arg Asp Ile Ala Asp Thr
 565 570 575

Thr Asp Ala Val Arg Asp Pro Gln Thr Leu Glu Ile Leu Asp Ile Thr
 580 585 590

Pro Cys Ser Phe Gly Gly Val Ser Val Ile Thr Pro Gly Thr Asn Thr

I867291

595

600

605

Ser Asn Gln Val Ala Val Leu Tyr Gln Gly Val Asn Cys Thr Glu Val
610 615 620

Pro Val Ala Ile His Ala Asp Gln Leu Thr Pro Thr Trp Arg Val Tyr
625 630 635 640

Ser Thr Gly Ser Asn Val Phe Gln Thr Arg Ala Gly Cys Leu Ile Gly
645 650 655

Ala Glu His Val Asn Asn Ser Tyr Glu Cys Asp Ile Pro Ile Gly Ala
660 665 670

Gly Ile Cys Ala Ser Tyr Gln Thr Gln Thr Asn Ser Arg Gly Ser Ala
675 680 685

Gly Ser Val Ala Ser Gln Ser Ile Ile Ala Tyr Thr Met Ser Leu Gly
690 695 700

Ala Glu Asn Ser Val Ala Tyr Ser Asn Asn Ser Ile Ala Ile Pro Thr
705 710 715 720

Asn Phe Thr Ile Ser Val Thr Thr Glu Ile Leu Pro Val Ser Met Thr
725 730 735

Lys Thr Ser Val Asp Cys Thr Met Tyr Ile Cys Gly Asp Ser Thr Glu
740 745 750

Cys Ser Asn Leu Leu Leu Gln Tyr Gly Ser Phe Cys Thr Gln Leu Asn
755 760 765

Arg Ala Leu Thr Gly Ile Ala Val Glu Gln Asp Lys Asn Thr Gln Glu
770 775 780

Val Phe Ala Gln Val Lys Gln Ile Tyr Lys Thr Pro Pro Ile Lys Asp
785 790 795 800

Phe Gly Gly Phe Asn Phe Ser Gln Ile Leu Pro Asp Pro Ser Lys Pro
 805 810 815

Ser Lys Arg Ser Phe Ile Glu Asp Leu Leu Phe Asn Lys Val Thr Leu
 820 825 830

Ala Asp Ala Gly Phe Ile Lys Gln Tyr Gly Asp Cys Leu Gly Asp Ile
 835 840 845

Ala Ala Arg Asp Leu Ile Cys Ala Gln Lys Phe Asn Gly Leu Thr Val
 850 855 860

Leu Pro Pro Leu Leu Thr Asp Glu Met Ile Ala Gln Tyr Thr Ser Ala
 865 870 875 880

Leu Leu Ala Gly Thr Ile Thr Ser Gly Trp Thr Phe Gly Ala Gly Ala
 885 890 895

Ala Leu Gln Ile Pro Phe Ala Met Gln Met Ala Tyr Arg Phe Asn Gly
 900 905 910

Ile Gly Val Thr Gln Asn Val Leu Tyr Glu Asn Gln Lys Leu Ile Ala
 915 920 925

Asn Gln Phe Asn Ser Ala Ile Gly Lys Ile Gln Asp Ser Leu Ser Ser
 930 935 940

Thr Ala Ser Ala Leu Gly Lys Leu Gln Asn Val Val Asn Gln Asn Ala
 945 950 955 960

Gln Ala Leu Asn Thr Leu Val Lys Gln Leu Ser Ser Asn Phe Gly Ala
 965 970 975

Ile Ser Ser Val Leu Asn Asp Ile Leu Ser Arg Leu Asp Pro Pro Glu
 980 985 990

Ala Glu Val Gln Ile Asp Arg Leu Ile Thr Gly Arg Leu Gln Ser Leu

I867291

995

1000

1005

Gln Thr Tyr Val Thr Gln Gln Leu Ile Arg Ala Ala Glu Ile Arg
1010 1015 1020

Ala Ser Ala Asn Leu Ala Ala Thr Lys Met Ser Glu Cys Val Leu
1025 1030 1035

Gly Gln Ser Lys Arg Val Asp Phe Cys Gly Lys Gly Tyr His Leu
1040 1045 1050

Met Ser Phe Pro Gln Ser Ala Pro His Gly Val Val Phe Leu His
1055 1060 1065

Val Thr Tyr Val Pro Ala Gln Glu Lys Asn Phe Thr Thr Ala Pro
1070 1075 1080

Ala Ile Cys His Asp Gly Lys Ala His Phe Pro Arg Glu Gly Val
1085 1090 1095

Phe Val Ser Asn Gly Thr His Trp Phe Val Thr Gln Arg Asn Phe
1100 1105 1110

Tyr Glu Pro Gln Ile Ile Thr Thr Asp Asn Thr Phe Val Ser Gly
1115 1120 1125

Asn Cys Asp Val Val Ile Gly Ile Val Asn Asn Thr Val Tyr Asp
1130 1135 1140

Pro Leu Gln Pro Glu Leu Asp Ser Phe Lys Glu Glu Leu Asp Lys
1145 1150 1155

Tyr Phe Lys Asn His Thr Ser Pro Asp Val Asp Leu Gly Asp Ile
1160 1165 1170

Ser Gly Ile Asn Ala Ser Val Val Asn Ile Gln Lys Glu Ile Asp
1175 1180 1185

I867291

Arg Leu Asn Glu Val Ala Lys Asn Leu Asn Glu Ser Leu Ile Asp
1190 1195 1200

Leu Gln Glu Leu Gly Lys Tyr Glu Gln Asp Ile Arg Ser Leu Val
1205 1210 1215

Pro Arg Gly Ser Pro Gly Ser Gly Tyr Ile Pro Glu Ala Pro Arg
1220 1225 1230

Asp Gly Gln Ala Tyr Val Arg Lys Asp Gly Glu Trp Val Leu Leu
1235 1240 1245

Ser Thr Phe Leu Gly Gly Ser Gly Ser Leu Glu Val Leu Phe Gln
1250 1255 1260

Gly Pro His His His His His His
1265 1270

<210> 4
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 多肽

<400> 4

Met Lys Val Lys Leu Leu Val Leu Leu Cys Thr Phe Thr Ala Thr Tyr
1 5 10 15

Ala Gly Thr

<210> 5
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 多肽

<400> 5

Leu Val Pro Arg Gly Ser
1 5

<210> 6

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多肽

<400> 6

Pro Gly Ser Gly Tyr Ile Pro Glu Ala Pro Arg Asp Gly Gln Ala Tyr
1 5 10 15

Val Arg Lys Asp Gly Glu Trp Val Leu Leu Ser Thr Phe Leu Gly
20 25 30

<210> 7

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多肽

<400> 7

Gly Ser Gly Ser Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro
1 5 10

<210> 8

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多肽

<400> 8

His His His His His His

I867291

1

5

<210> 9

<211> 4

<212> PRT

<213> SARS-CoV-2

<400> 9

Gly Ser Ala Gly

1

<210> 10

<400> 10

000

<210> 11

<400> 11

000

<210> 12

<400> 12

000

<210> 13

<400> 13

000

<210> 14

<400> 14

000

<210> 15

<400> 15

000

<210> 16

<400> 16

000

<210> 17

I867291

<400> 17
000

<210> 18

<400> 18
000

<210> 19

<400> 19
000

<210> 20

<400> 20
000

<210> 21

<400> 21
000

<210> 22

<400> 22
000

<210> 23

<400> 23
000

<210> 24

<400> 24
000

<210> 25

<400> 25
000

<210> 26

<400> 26
000

<210> 27

I867291

<400> 27

000

<210> 28

<400> 28

000

<210> 29

<400> 29

000

<210> 30

<400> 30

000

<210> 31

<400> 31

000

<210> 32

<400> 32

000

<210> 33

<400> 33

000

<210> 34

<400> 34

000

<210> 35

<400> 35

000

<210> 36

<400> 36

000

<210> 37

I867291

<400> 37
000

<210> 38

<400> 38
000

<210> 39

<400> 39
000

<210> 40

<400> 40
000

<210> 41

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多肽

<400> 41

Thr Glu Ser Ile Val Arg Phe Pro Asn Ile Thr Asn Leu

1 5 10

<210> 42

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多肽

<400> 42

Asn Ile Thr Asn Leu Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Arg

1 5 10 15

<210> 43

<211> 11

<212> PRT

I867291

<213> 人工序列

<220>

<223> 多肽

<400> 43

Leu Tyr Asn Ser Ala Ser Phe Ser Thr Phe Lys
1 5 10

<210> 44

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多肽

<400> 44

Leu Asp Ser Lys Val Gly Gly Asn Tyr Asn
1 5 10

<210> 45

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多肽

<400> 45

Lys Ser Asn Leu Lys Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Thr
1 5 10

<210> 46

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多肽

<400> 46

Lys Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Thr Glu Ile Tyr Gln Ala Gly

I867291

1 5 10 15

<210> 47
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 多肽

<400> 47

Gly Pro Lys Lys Ser Thr Asn Leu Val Lys Asn Lys Cys
1 5 10

<210> 48
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 多肽

<400> 48

Asn Cys Asp Val Val Ile Gly Ile Val Asn Asn Thr Val Tyr
1 5 10

<210> 49
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 多肽

<400> 49

Pro Glu Leu Asp Ser Phe Lys Glu Glu Leu Asp Lys Tyr Phe Lys Asn
1 5 10 15

His Thr Ser

<210> 50

I867291

<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 多肽

<400> 50

Val Asn Ile Gln Lys Glu Ile Asp Arg Leu Asn Glu Val Ala
1 5 10

<210> 51
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 多肽

<400> 51

Asn Leu Asn Glu Ser Leu Ile Asp Leu Gln
1 5 10

<210> 52
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 多肽

<400> 52

Leu Gly Lys Tyr Glu Gln Tyr Ile Lys Trp Pro
1 5 10

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種免疫原，其包含經醱化工程改造之冠狀病毒棘蛋白，該經醱化工程改造之冠狀病毒棘蛋白包含複數個截短N-聚醱及一或多個未經修飾之O-聚醱，其中該經醱化工程改造之冠狀病毒棘蛋白由SEQ ID NO: 2或3之胺基酸序列組成，其中該複數個截短N-聚醱為N-乙醱葡萄糖胺(GlcNAc)，且其中經醱化工程改造之冠狀病毒棘蛋白藉由活體外醱化工程改造自天然SARS-CoV-2或其變異體之棘蛋白衍生而來。

【請求項2】

如請求項1之免疫原，其中該複數個截短N-聚醱位於受體結合域(RBD)中，藉此暴露具有以下胺基酸序列之複數個高度保守抗原決定基：TESIVRFPNITNL (SEQ ID NO.: 41)、NITNLCPFGEVFNATR (SEQ ID NO: 42)、LYNSASFSTFK (SEQ ID NO: 43)、LDSKVGGNYN (SEQ ID NO: 44)、KSNLKPFERDIST (SEQ ID NO: 45)、KPFERDISTEIYQAG (SEQ ID NO: 46)及/或GPKKSTNLVKNKC (SEQ ID NO: 47)。

【請求項3】

如請求項1之免疫原，其中該複數個截短N-聚醱位於七肽重複2(HR2)域中，藉此暴露具有以下胺基酸序列之複數個高度保守抗原決定基：NCDVVIGIVNNTVY (SEQ ID NO: 48)、PELDSFKEELDKYFKNHTS (SEQ ID NO: 49)、VNIQKEIDRLNEVA (SEQ ID NO: 50)、NLNESLIDLQ (SEQ ID NO: 51)及/或LGKYEQYIKWP (SEQ ID NO: 52)。

【請求項4】

如請求項1之免疫原，其中該變異體係選自由以下組成之群：

D614G、Alpha (B.1.1.7及Q譜系)、Beta (B.1.351及後代譜系)、Gamma (P.1及後代譜系)、Epsilon (B.1.427及B.1.429)、Eta (B.1.525)、Iota (B.1.526)、Kappa (B.1.617.1)、1.617.3、Mu (B.1.621、B.1.621.1)、Zeta (P.2)、Delta (B.1.617.2及AY譜系)及Omicron(B.1.1.529及BA譜系)。

【請求項5】

如請求項1之免疫原，其中該經醮化工程改造之冠狀病毒棘蛋白呈三聚體形式存在。

【請求項6】

如請求項1之免疫原，其中該經醮化工程改造之冠狀病毒棘蛋白保留與該天然SARS-CoV-2或其變異體之棘蛋白相同的三級結構。

【請求項7】

如請求項2之免疫原，其中相對於該天然SARS-CoV-2或其變異體之棘蛋白，該經醮化工程改造之冠狀病毒棘蛋白能夠引發增強之免疫反應。

【請求項8】

如請求項7之免疫原，其中該增強之免疫反應為增加之IgG力價、增加之IgM力價、增加之中和力價、增加之CD4 T細胞反應、增加之CD8 T細胞反應或其組合。

【請求項9】

如請求項1之免疫原，其中該經醮化工程改造之棘蛋白係使用一或多種化學或酵素方法產生。

【請求項10】

如請求項9之免疫原，其中該經醮化工程改造之棘蛋白係使用醮苷內

切酶H (Endo H)產生。

【請求項11】

如請求項1之免疫原，其中該複數個截短N-聚醣為21個GlcNAc。

【請求項12】

一種免疫原性組合物，其包含：(a)如請求項1至11中任一項之免疫原，及(b)視情況選用的佐劑。

【請求項13】

如請求項12之免疫原性組合物，其中該佐劑為氫氧化鋁、磷酸鋁、不完全弗氏佐劑(incomplete Freund's adjuvant, IFA)、角鯊烯、明礬、鋁膠、MF59、QS-21、CpG 1018、AS03、AS37、Matrix-M或其組合。

【請求項14】

如請求項12之免疫原性組合物，其中該免疫原性組合物為相對於使用天然SARS-CoV-2或其變異體之棘蛋白之疫苗，能夠引發增強之免疫反應的經改良之SARS-CoV-2或其變異體疫苗。

【請求項15】

一種如請求項12至14中任一項之免疫原性組合物之用途，其係用於製備在有需要之個體中引發針對嚴重急性呼吸道症候群冠狀病毒2 (SARS-CoV-2)之免疫反應的藥劑。

【請求項16】

如請求項15之用途，其中該免疫反應包含產生針對SARS-CoV-2或其變異體之中和抗體。

【請求項17】

如請求項16之用途，其中該變異體係選自由以下組成之群：

D614G、Alpha (B.1.1.7及Q譜系)、Beta (B.1.351及後代譜系)、Gamma (P.1及後代譜系)、Epsilon (B.1.427及B.1.429)、Eta (B.1.525)、Iota (B.1.526)、Kappa (B.1.617.1)、1.617.3、Mu (B.1.621、B.1.621.1)、Zeta (P.2)、Delta (B.1.617.2及AY譜系)及Omicron (B.1.1.529及BA譜系)。

【請求項18】

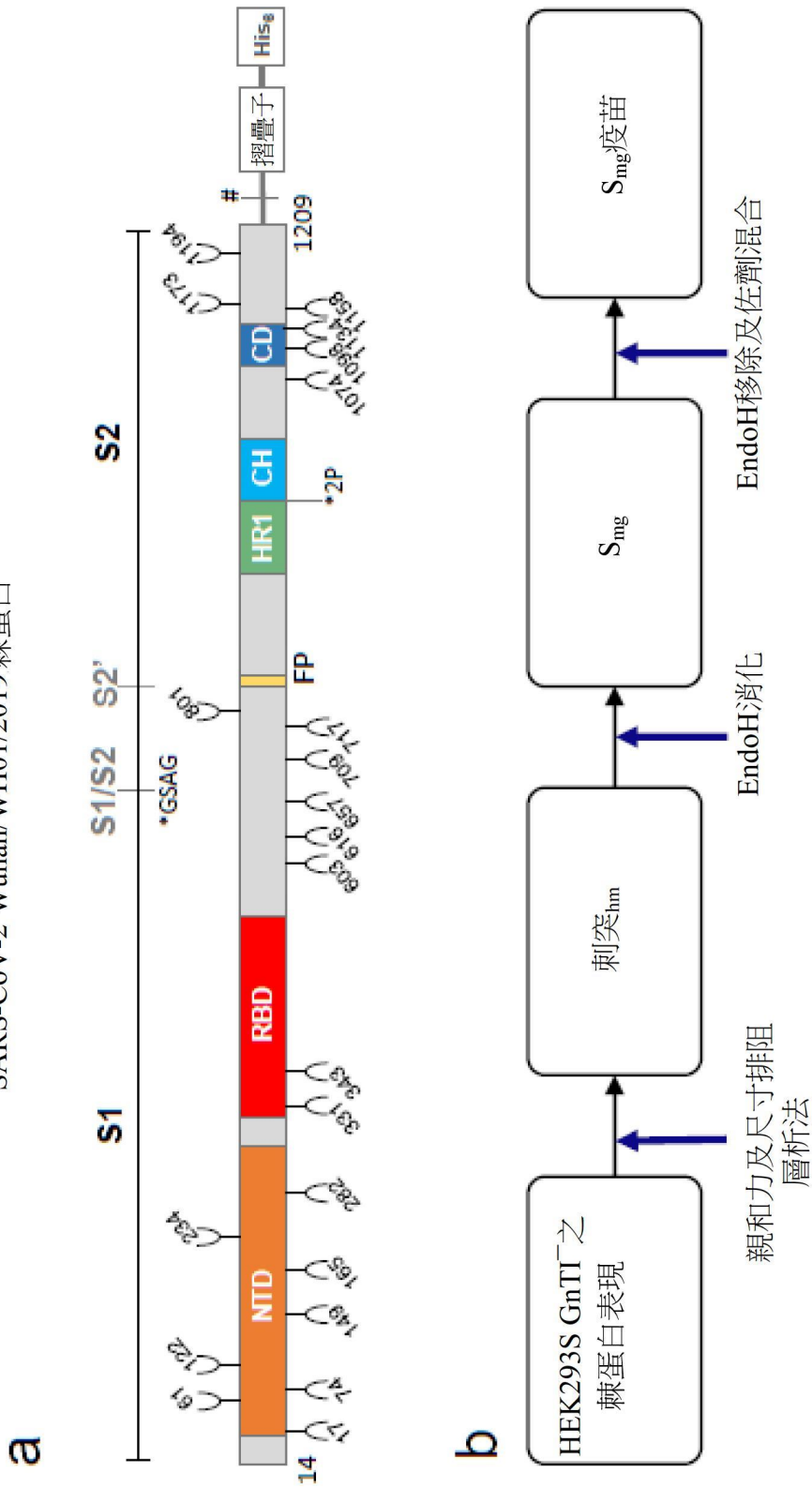
一種如請求項12至14中任一項之免疫原性組合物的用途，其係用於製備保護有需要之個體避免感染SARS-CoV-2或其變異體的藥劑。

【請求項19】

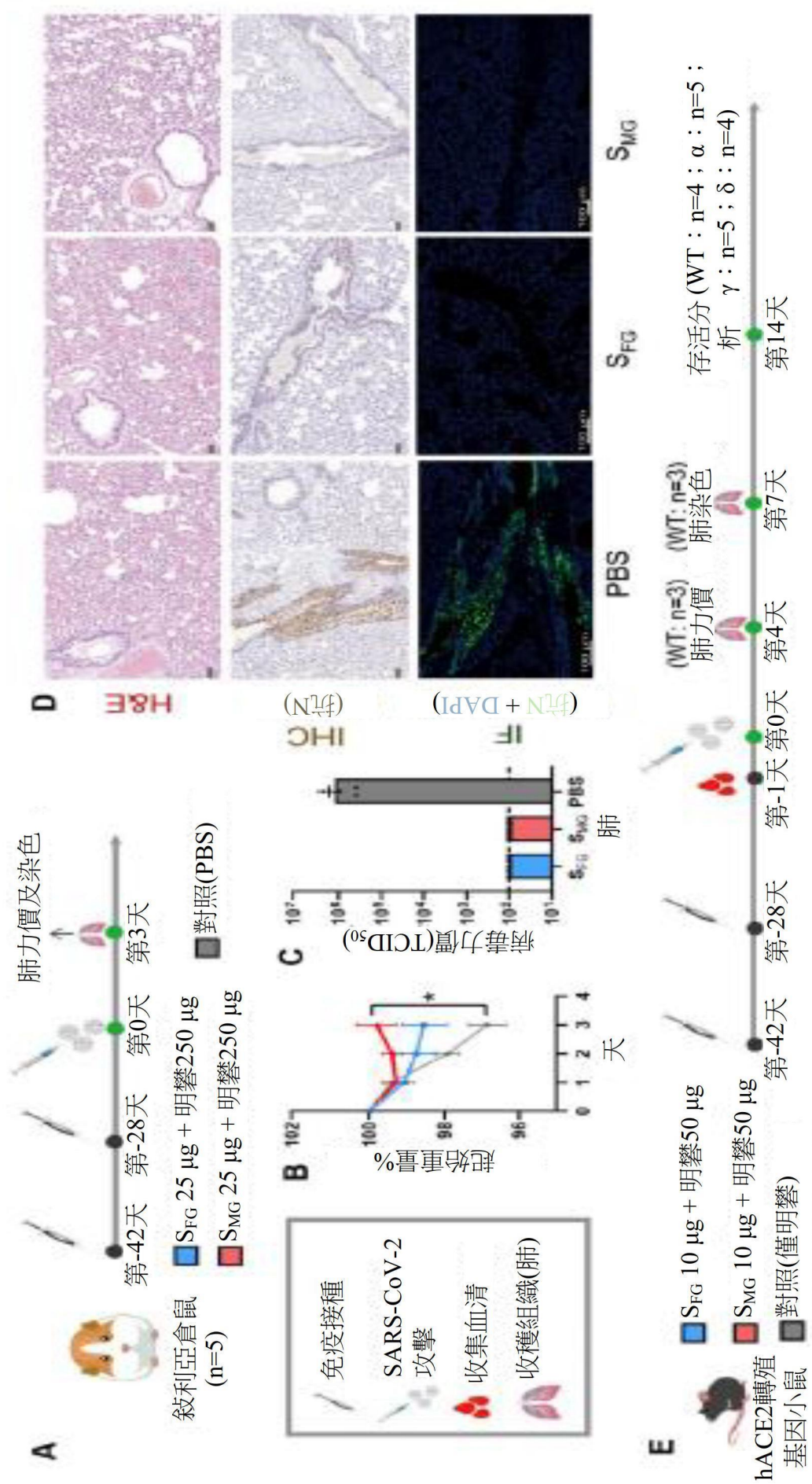
一種如請求項12至14中任一項之免疫原性組合物的用途，其係用於製備預防有需要之個體感染COVID-19疾病的藥劑。

【發明圖式】

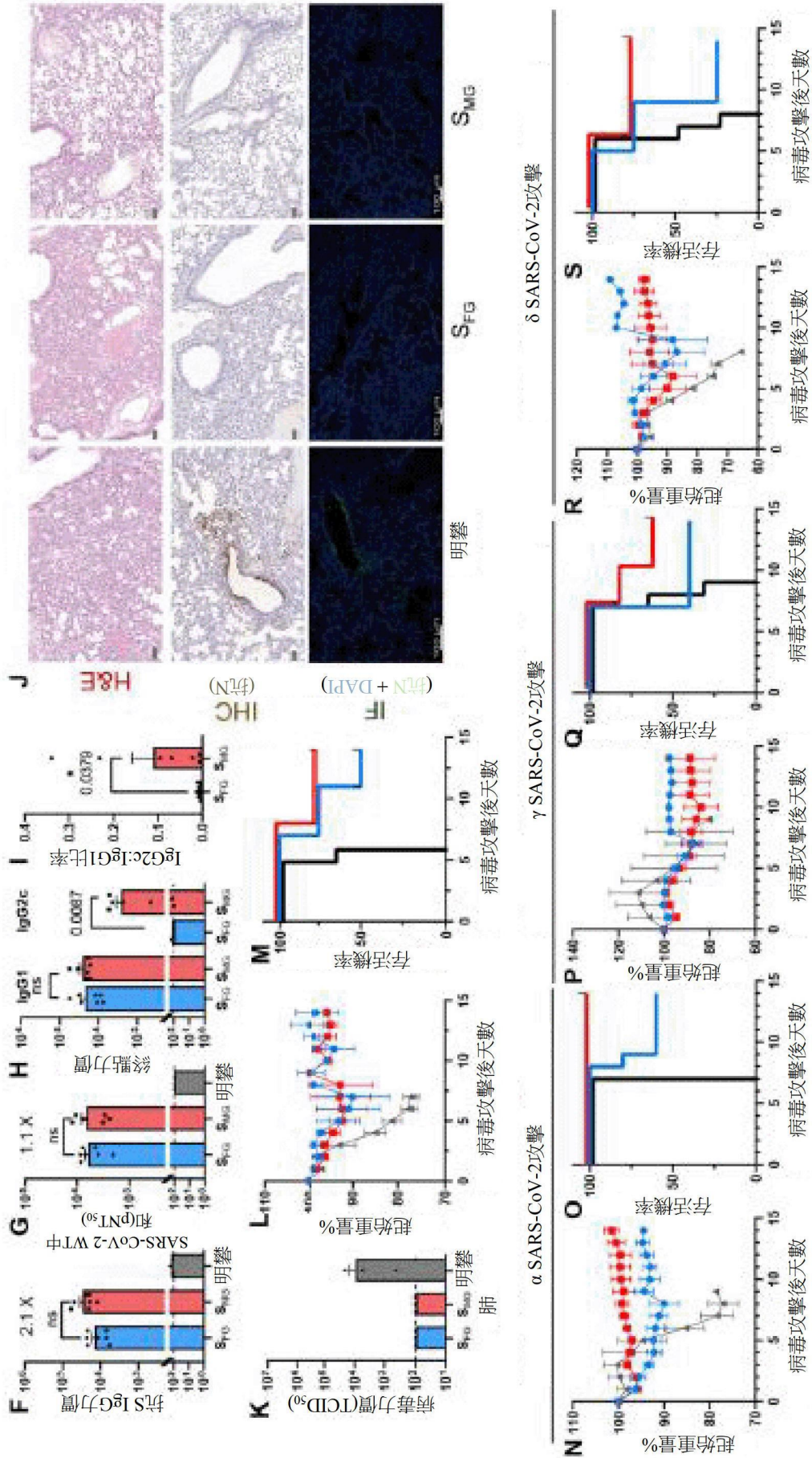
SARS-CoV-2 Wuhan/WH01/2019 棘蛋白



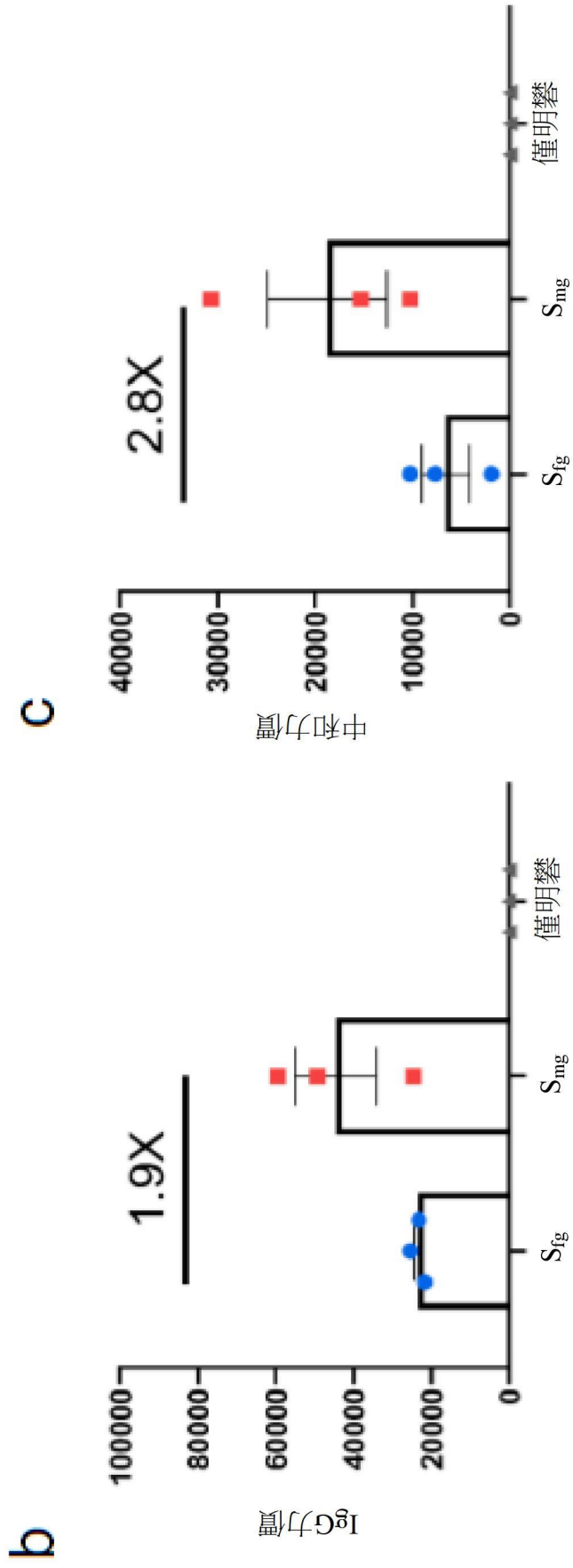
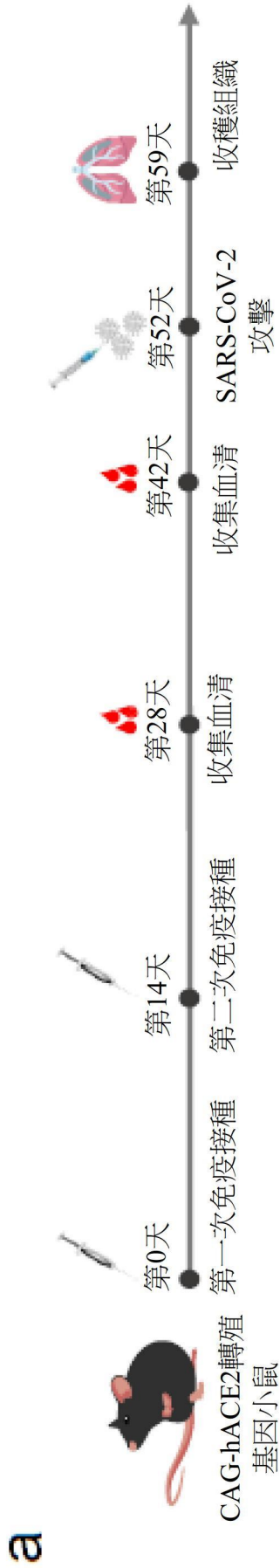
【圖1】



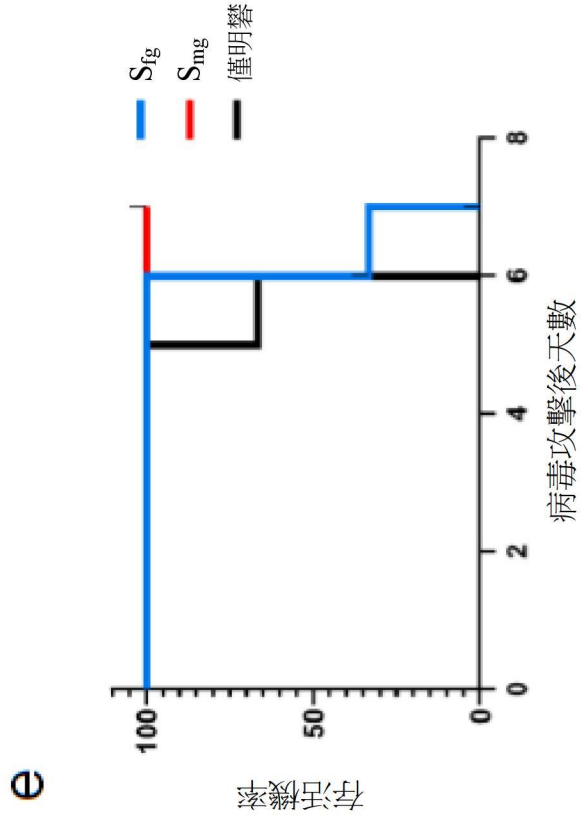
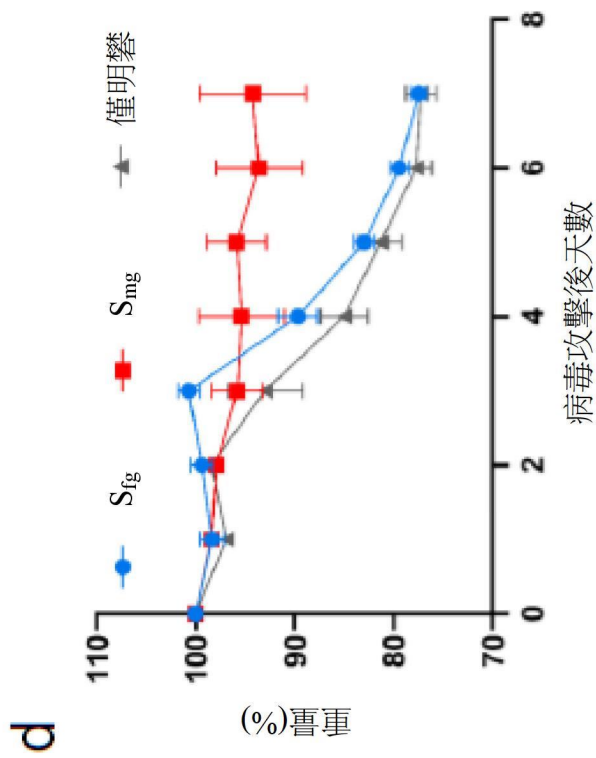
【圖2】



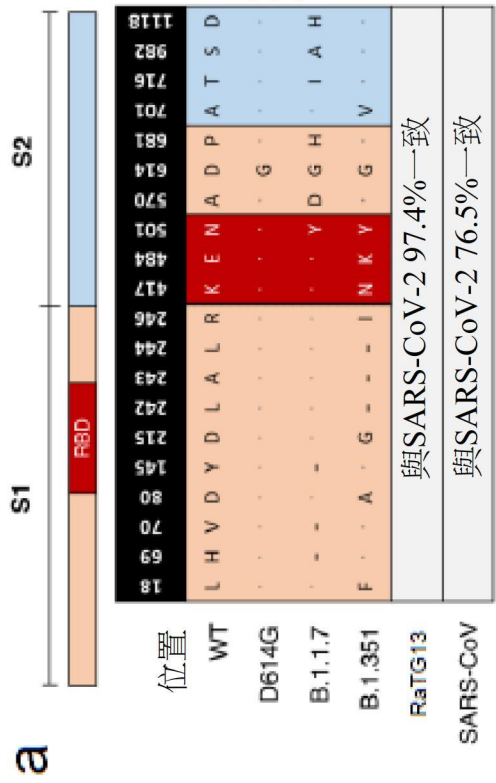
【圖2】(續)



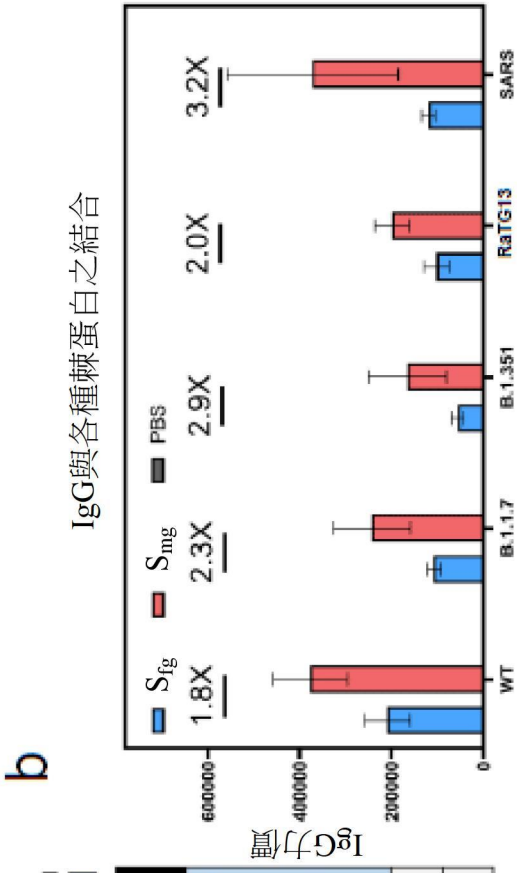
【圖3】

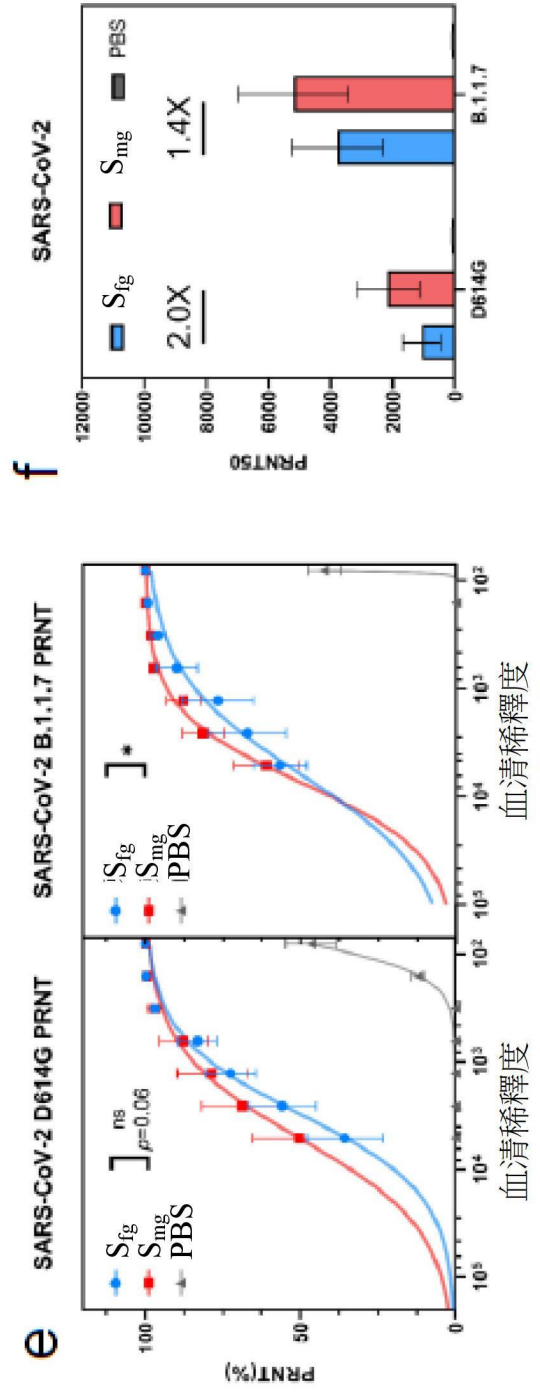
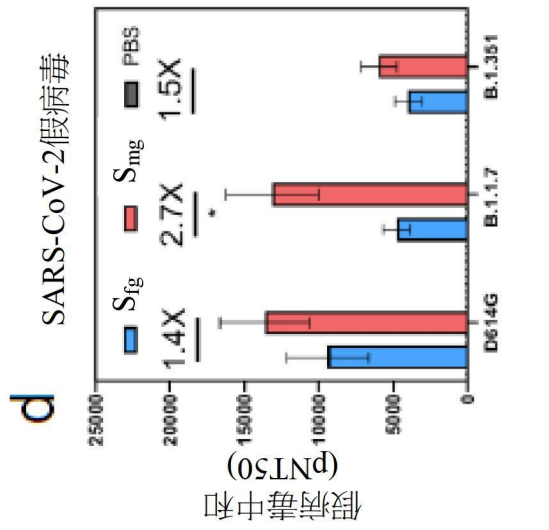
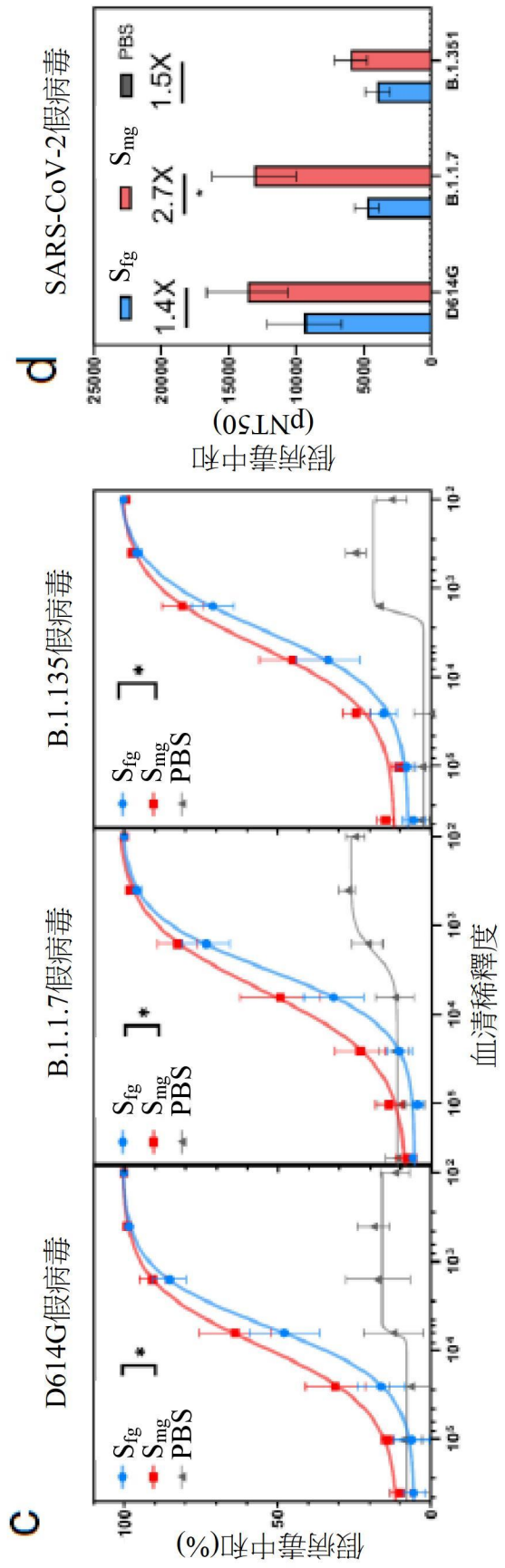


【圖3】(續)

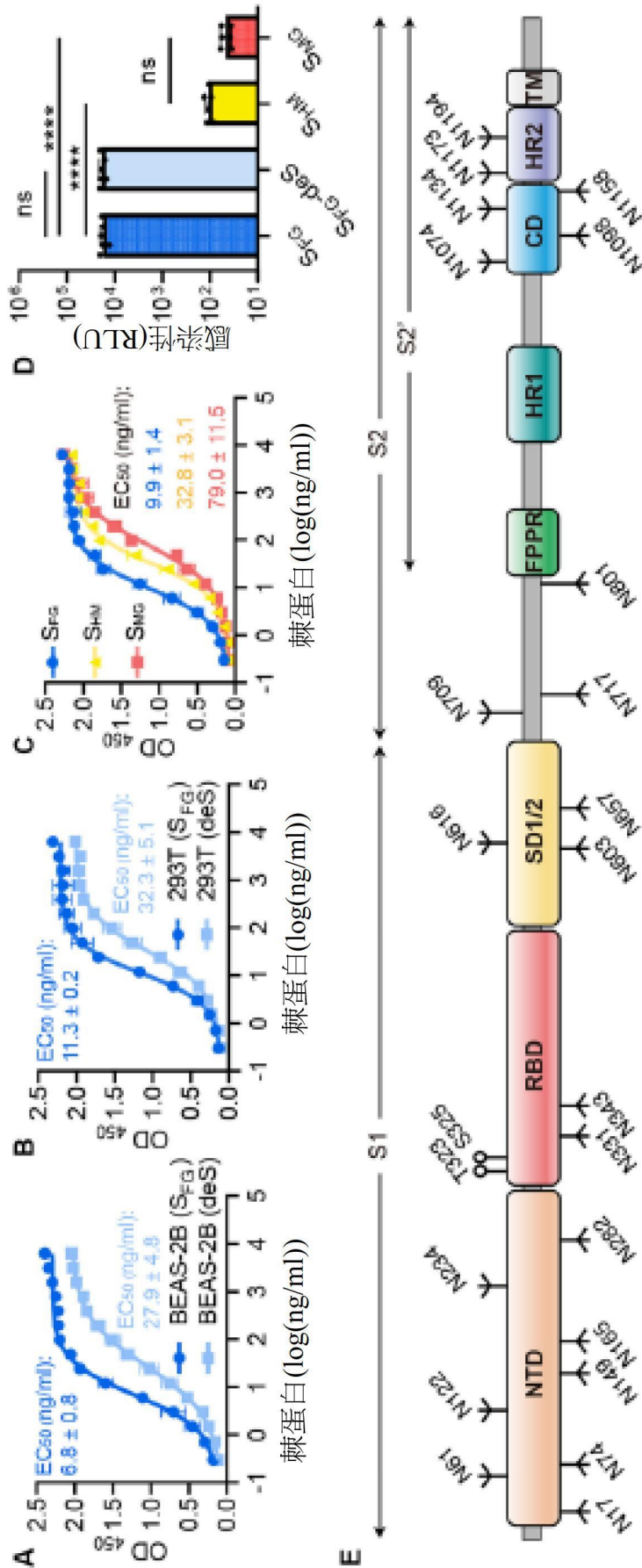


【圖4】

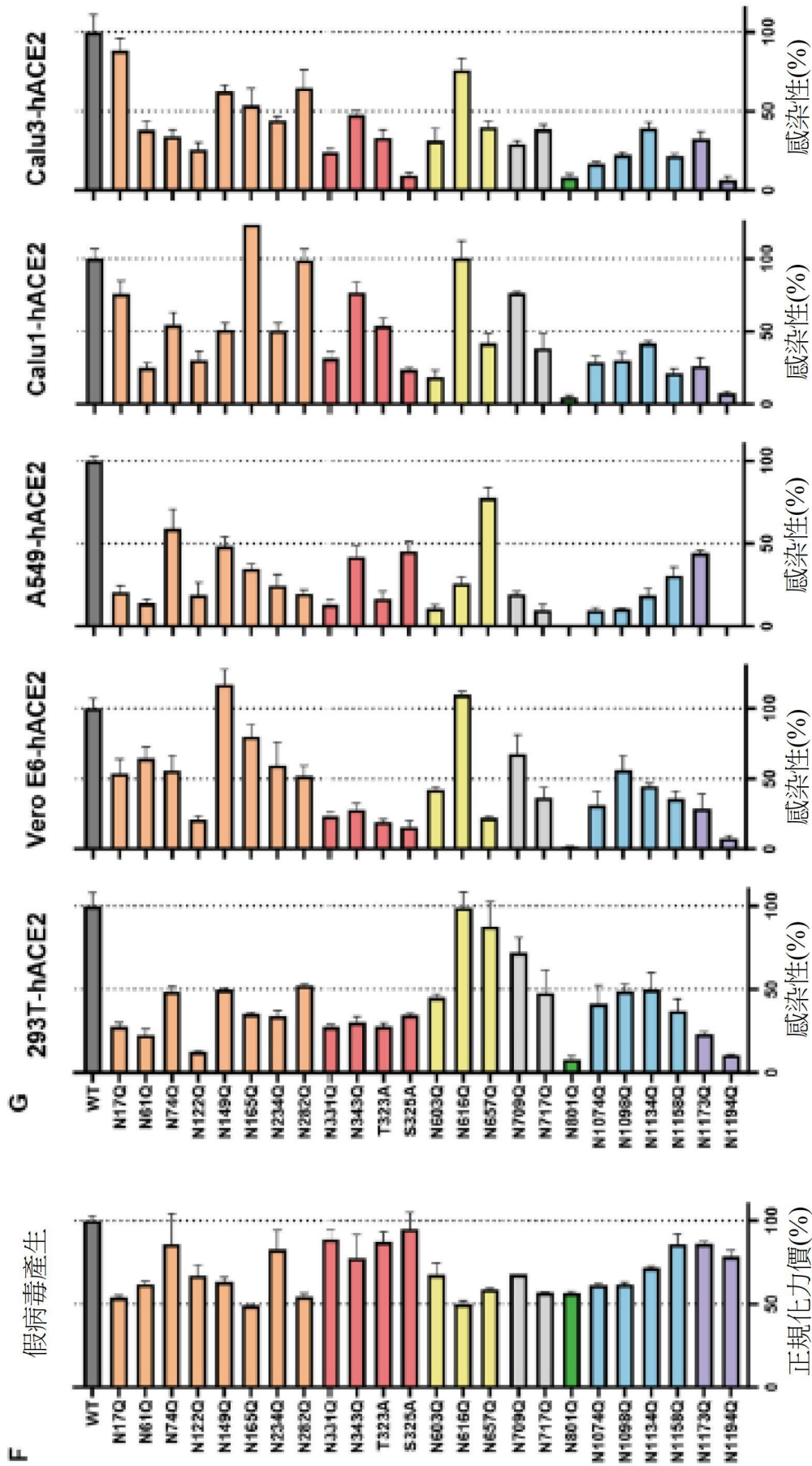




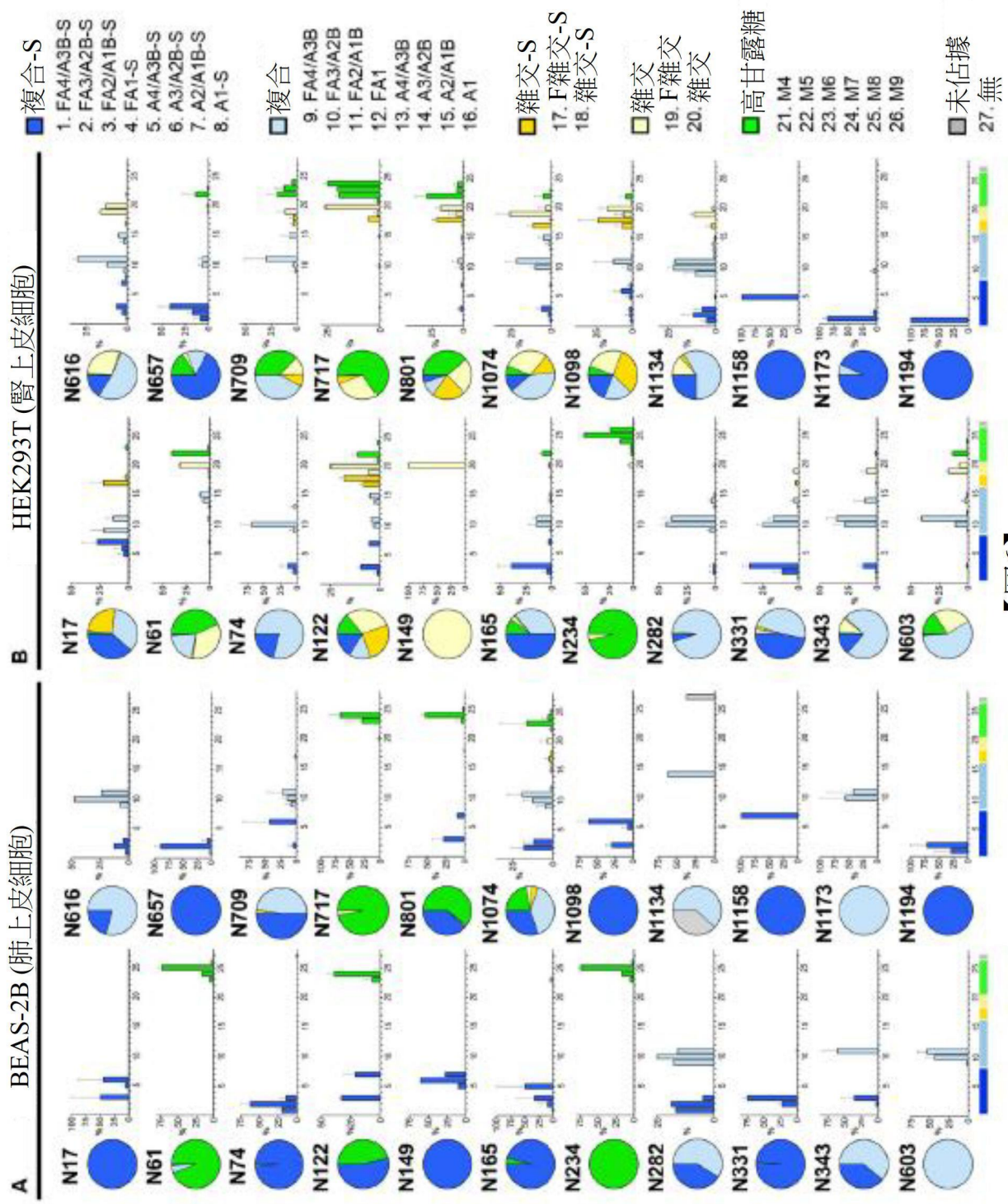
【圖4】(續)



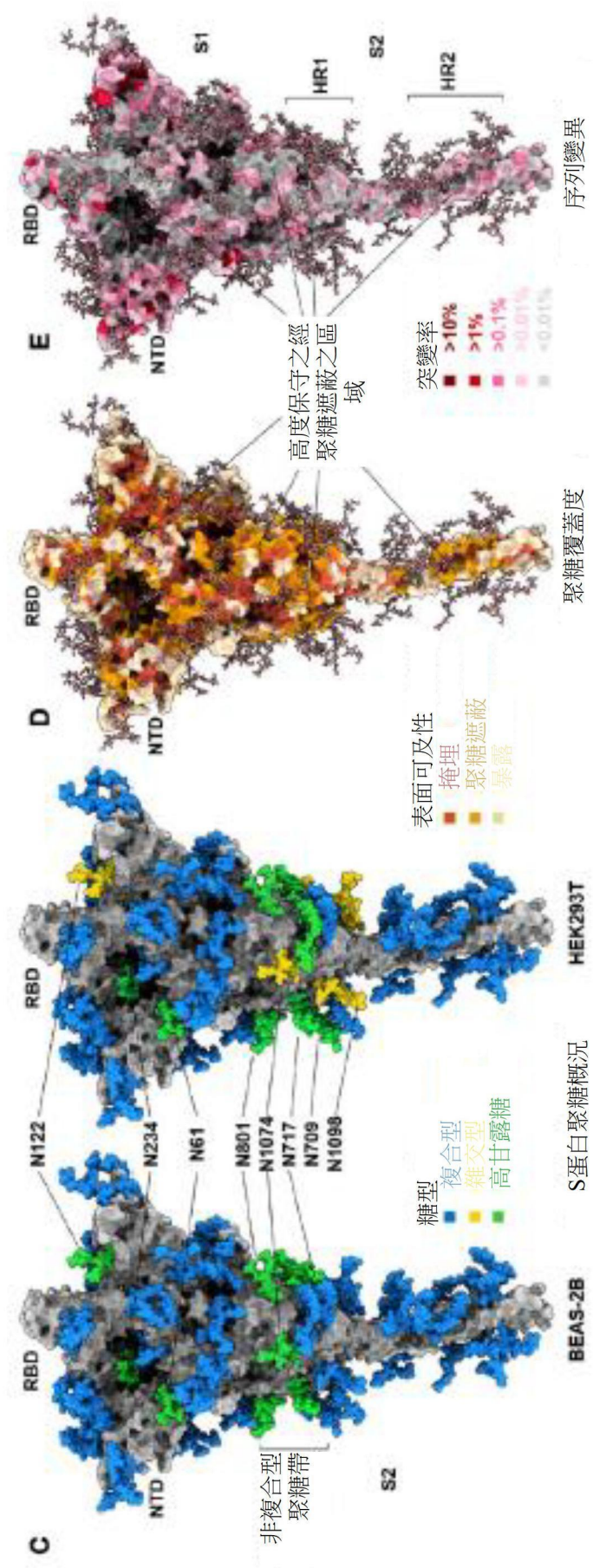
【圖5】



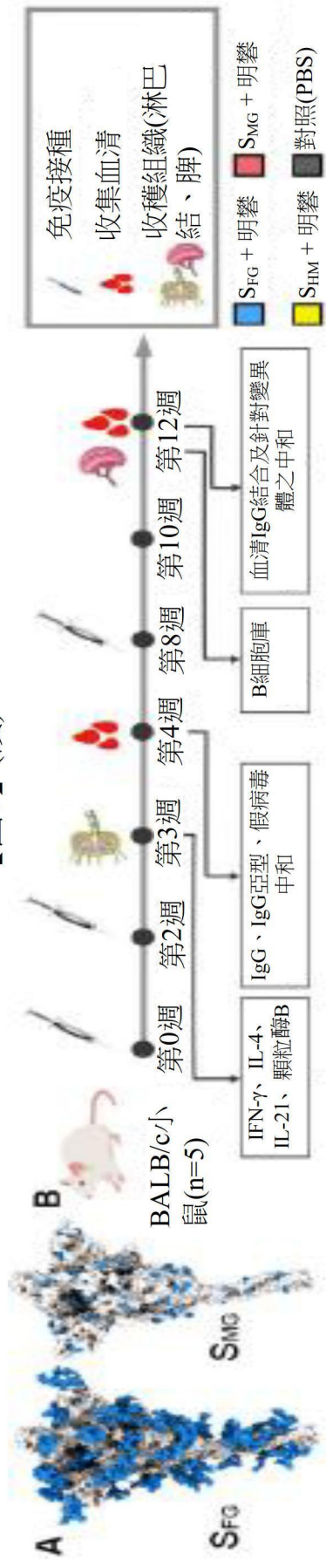
【圖5】(續)



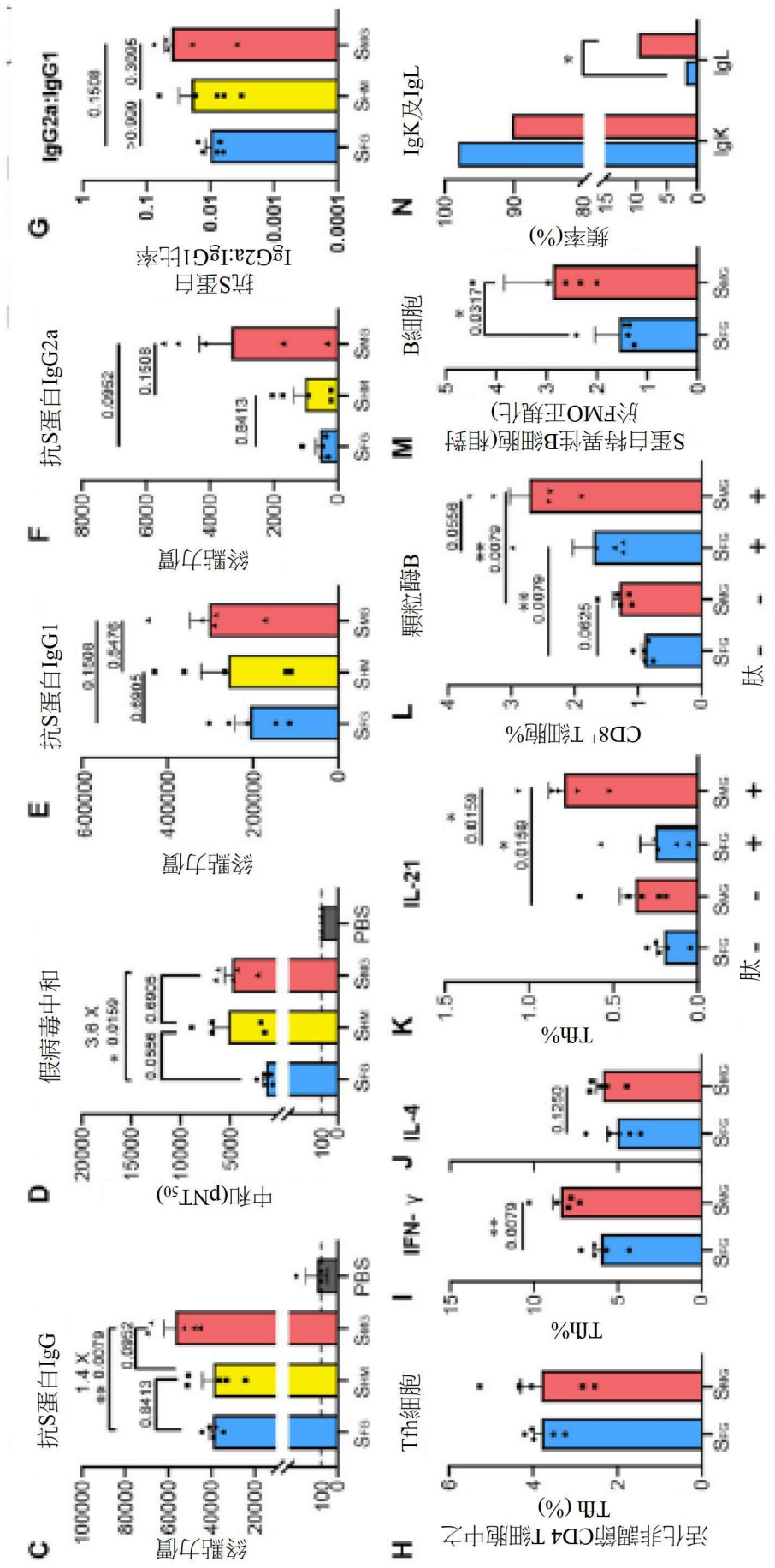
【圖6】



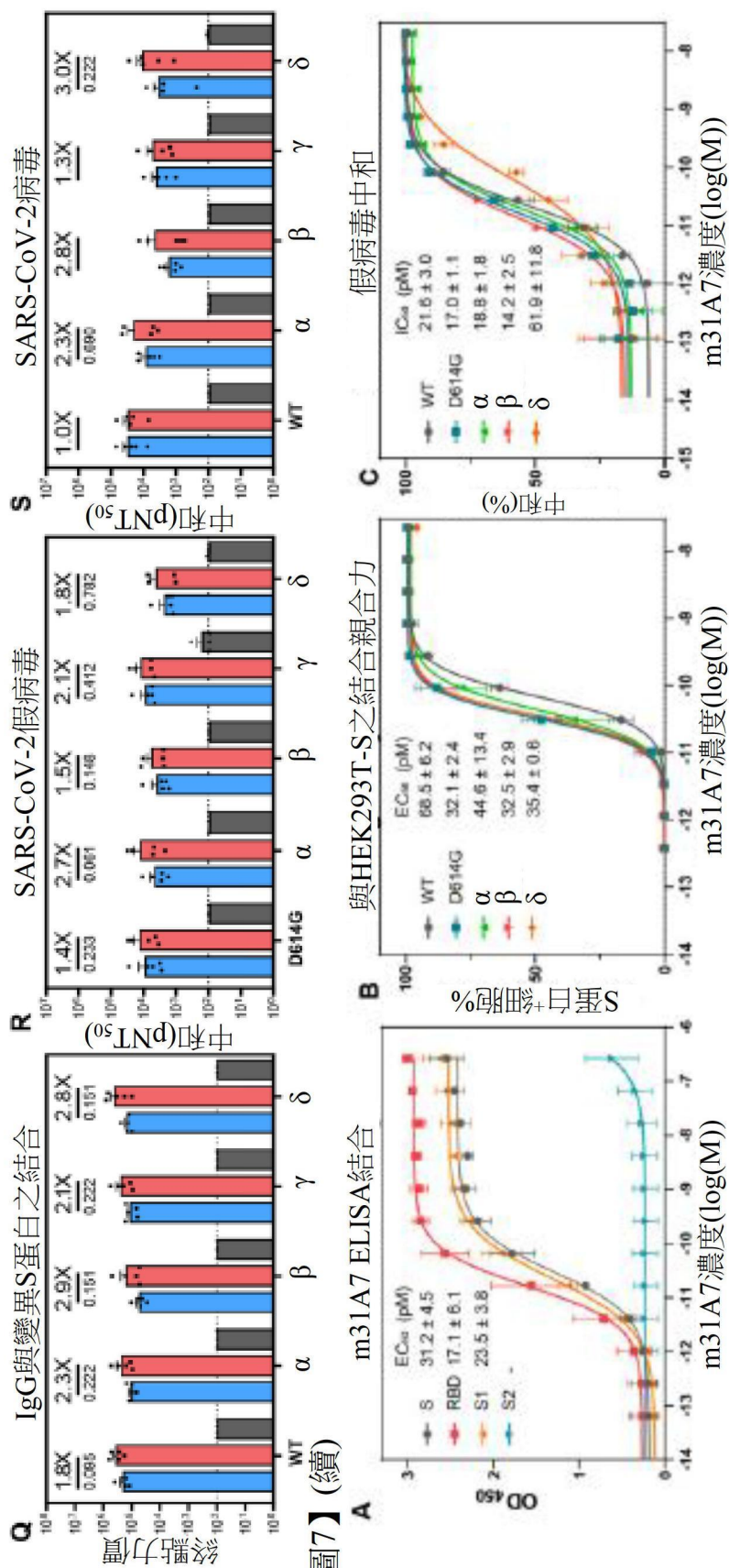
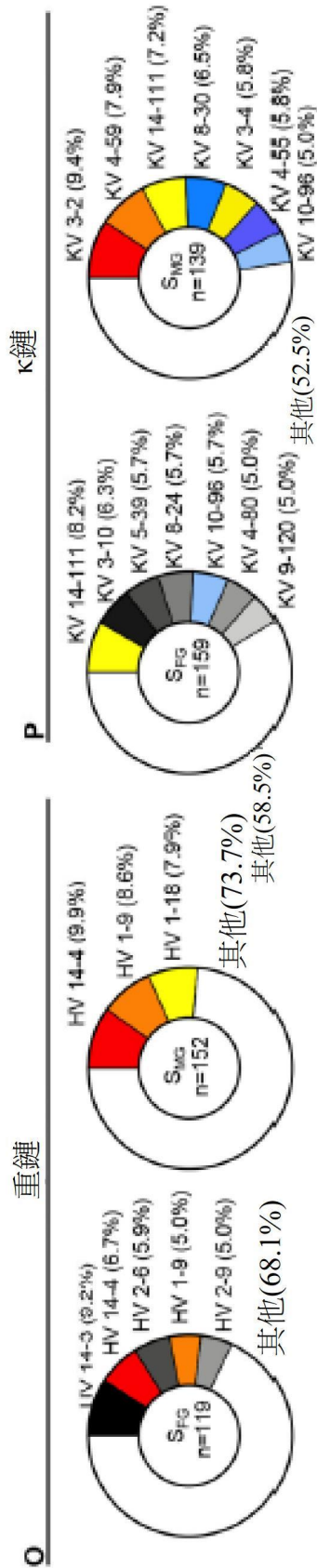
【圖6】(續)



【圖7】

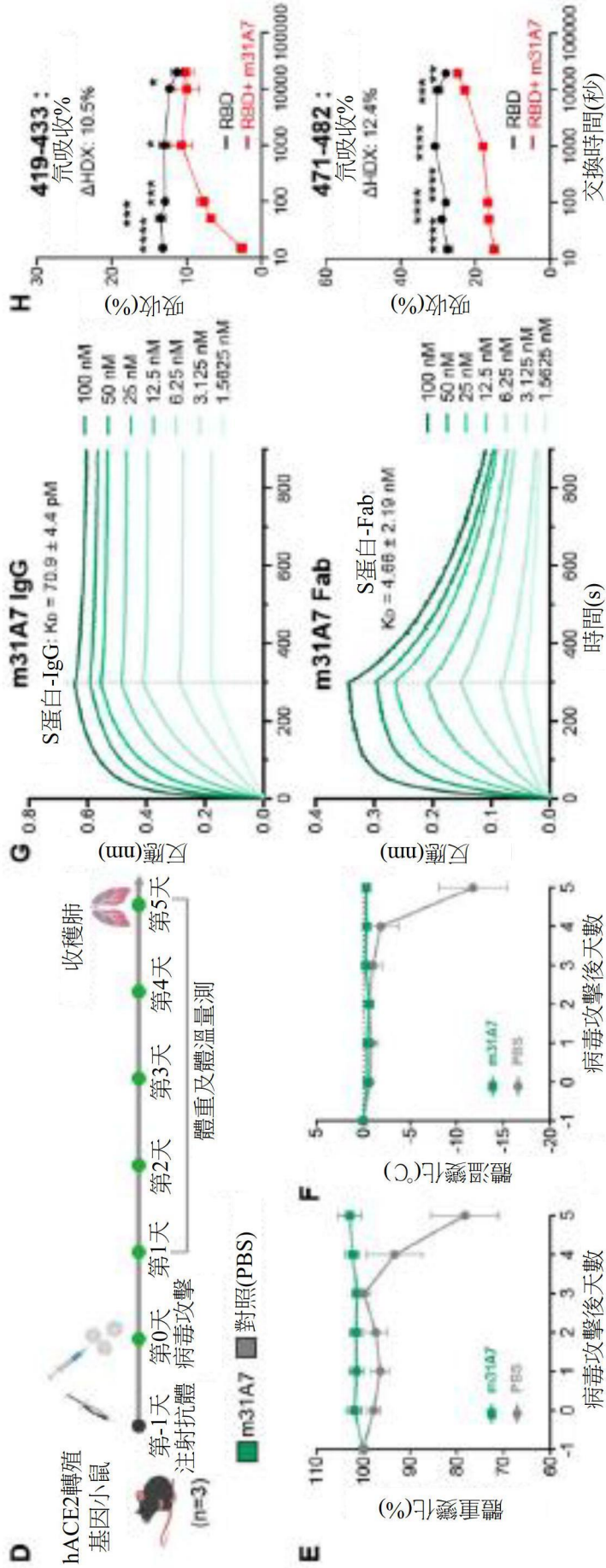


【圖7】(續)

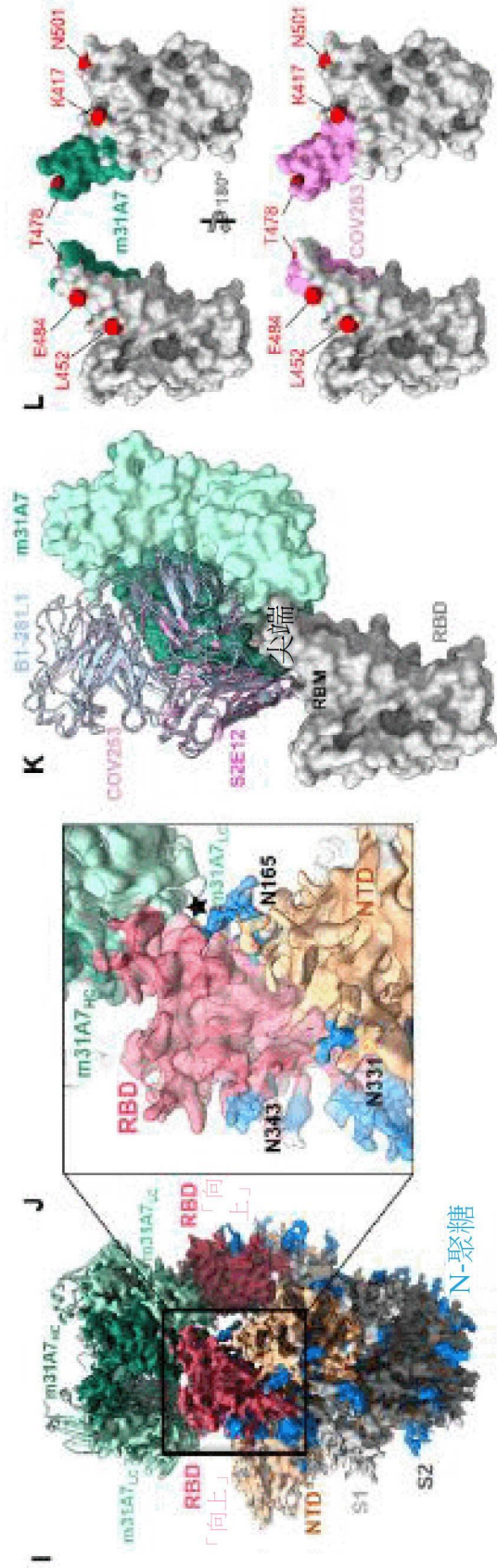


【圖7】(續)

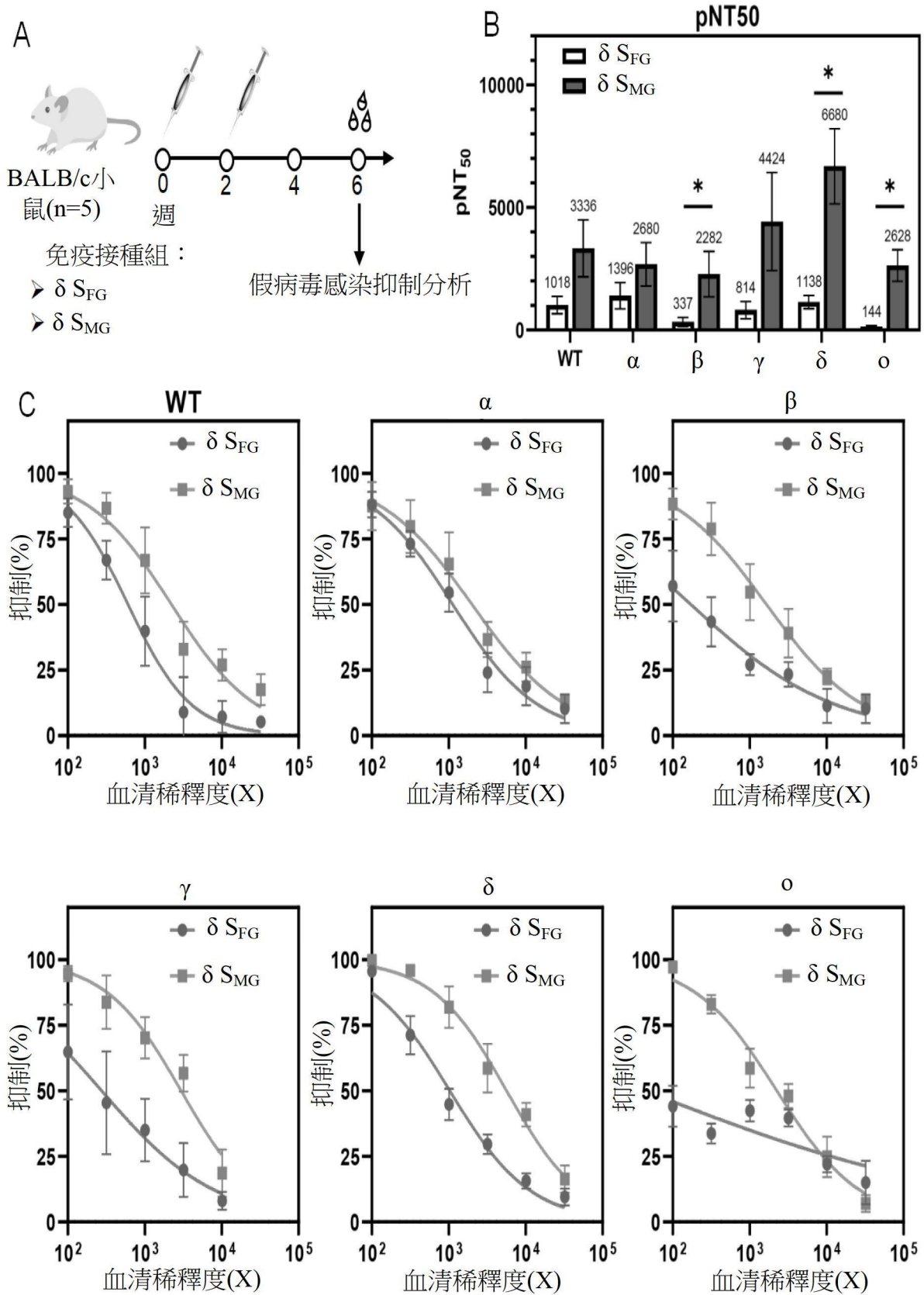
【圖8】



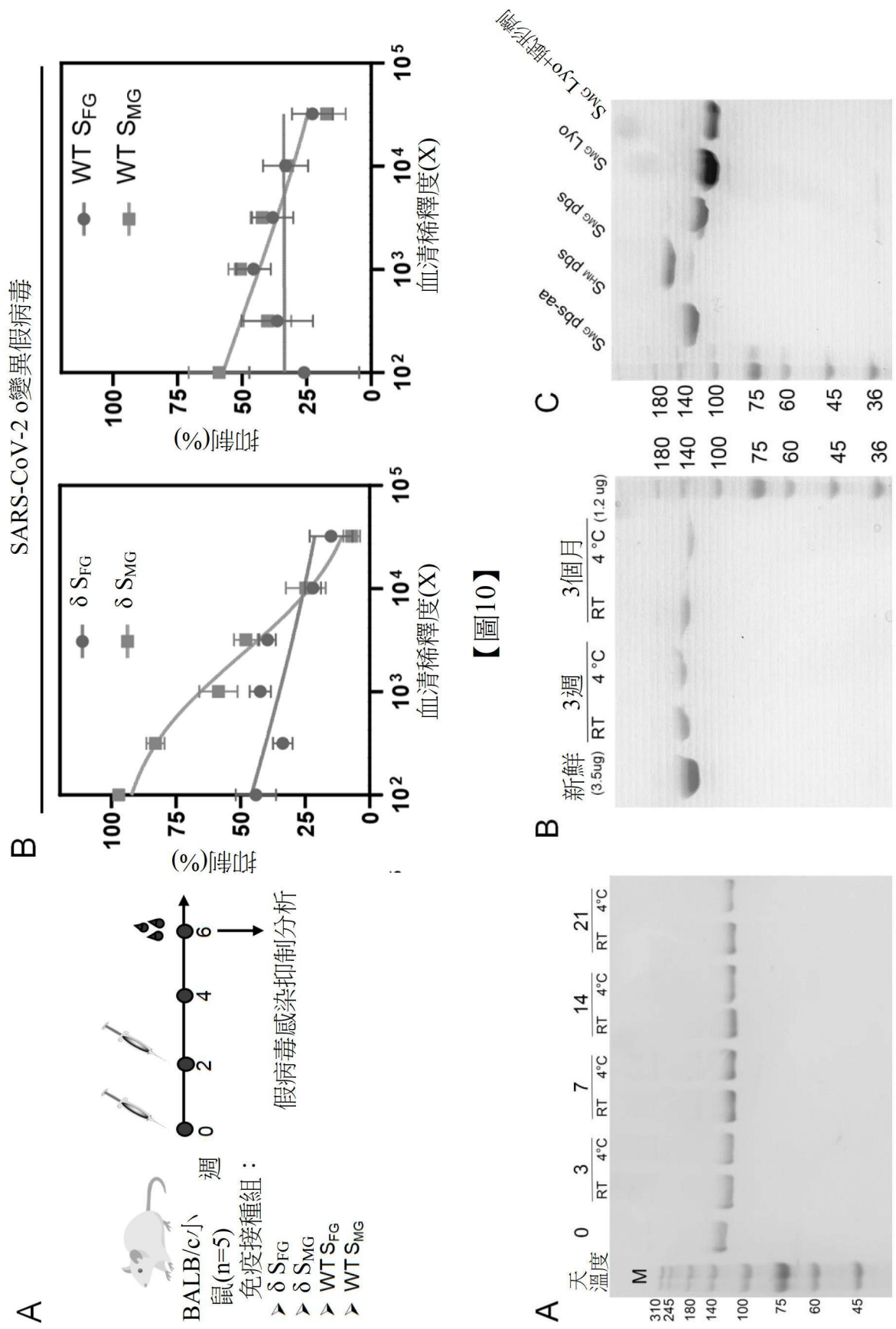
【圖8】(續)

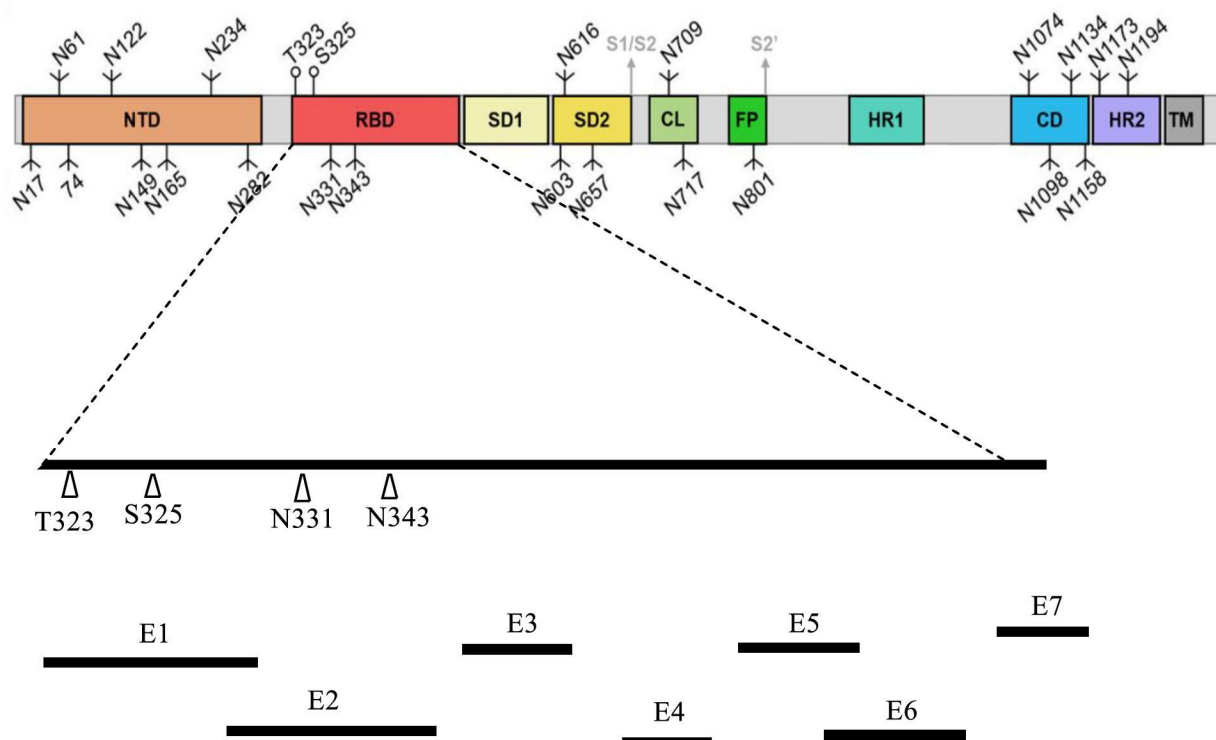


【圖8】(續)



【圖9】





E1: TESIVRFPNITNL (SEQ ID NO.: 41)

E2: NITNLCPFGEVFNATR (SEQ ID NO: 42)

E3: LYNSASFSTFK (SEQ ID NO: 43)

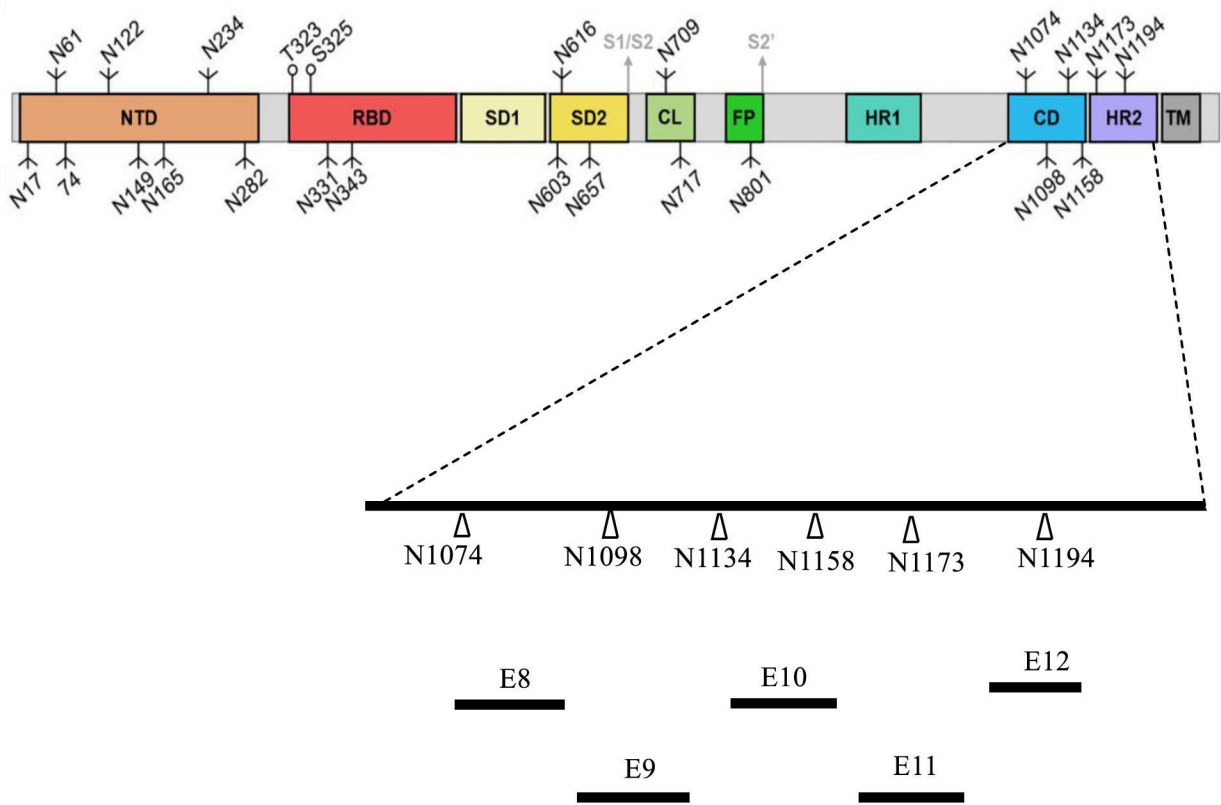
E4: LDSKVGGNYN (SEQ ID NO: 44)

E5: KSNLKPFERDIST (SEQ ID NO: 45)

E6: KPFERDISTEIYQAG (SEQ ID NO: 46)

E7: GPKKSTNLVKNKC (SEQ ID NO: 47)

【圖12】



E8: NCDVVIGIVNNTVY (SEQ ID NO: 48)

E9: PELDSFKEELDKYFKNHTS (SEQ ID NO: 49)

E10: VNIQKEIDRLNEVA (SEQ ID NO: 50)

E11: NLNESLIDLQ (SEQ ID NO: 51)

E12: LGKYEQYIKWP (SEQ ID NO: 52)

【圖13】