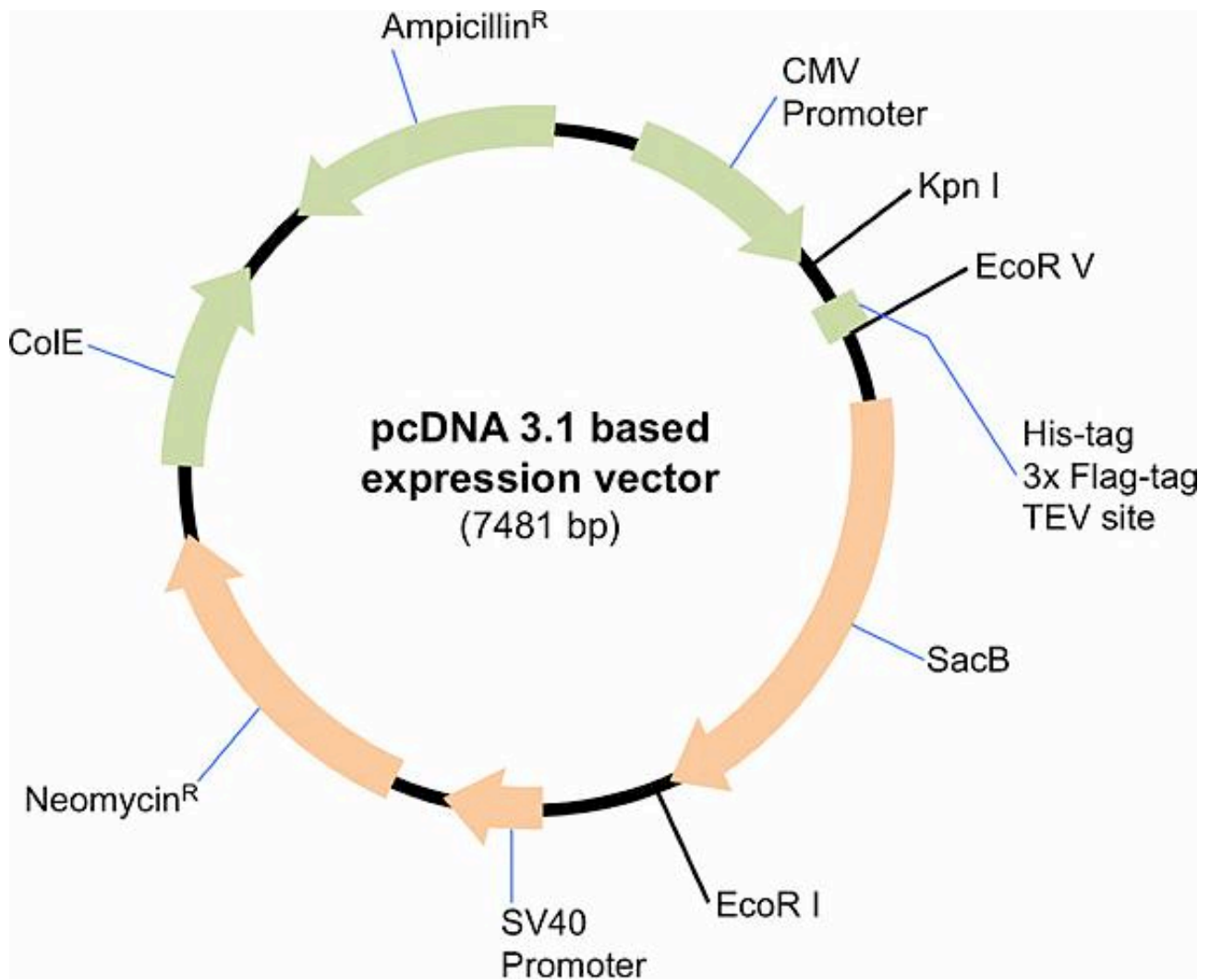
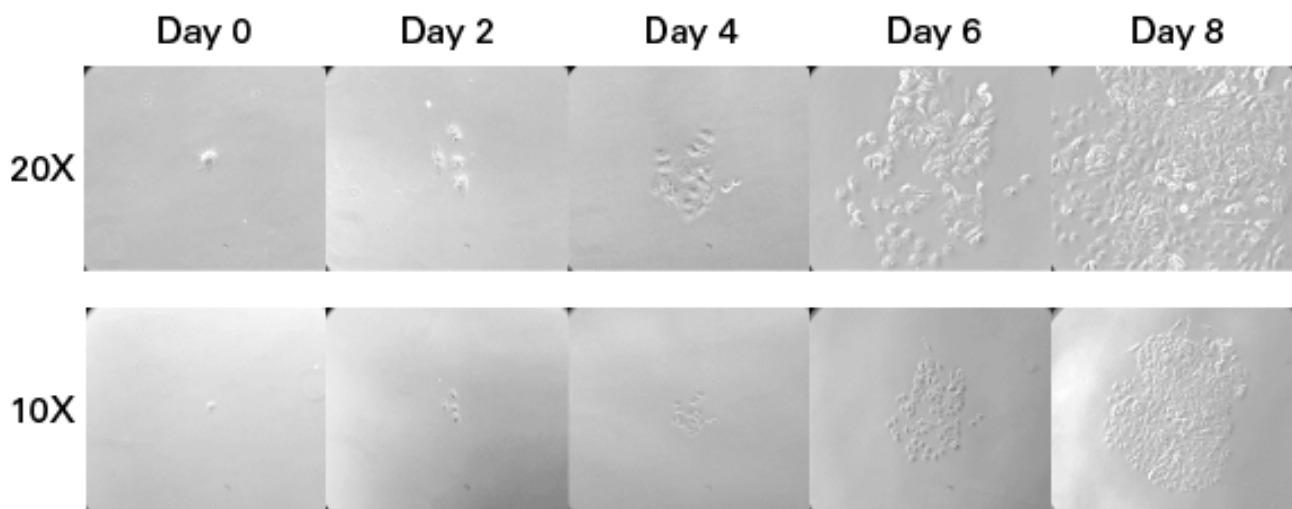


新冠病毒無法像流感病毒那樣利用雞胚繁殖，必須養在Vero cell。要養出大量病毒去製造疫苗，病毒與細胞最好能有一段和平共存的時間，即細胞不斷生長，病毒不斷繁殖，病毒不會造成細胞死亡，如此達到最大的病毒產量。比方說，一個Vero cell可乘載1000個病毒顆粒，超過1000顆病毒，細胞就會死亡。若要增加病毒的承載量，可以改變病毒或改變細胞的Genome，使細胞承載10-100倍的病毒量才會死亡，這需要一些技巧，歐美藥廠早就不做滅活疫苗，都是找中國與印度代工，因此沒有這些技巧，中國的疫苗藥廠可能有數百種Vero cell的Subline可試，因此很快就能養出大量病毒來製造疫苗。

台灣的高端公司(Medigen)研發的Subunit vaccine是先把新冠病毒的Spike protein cDNA接進Plasmid，送進CHO cell(Chinese hamster ovary cell)，由一個強的Promoter驅動Spike protein mRNA表現，如下圖：

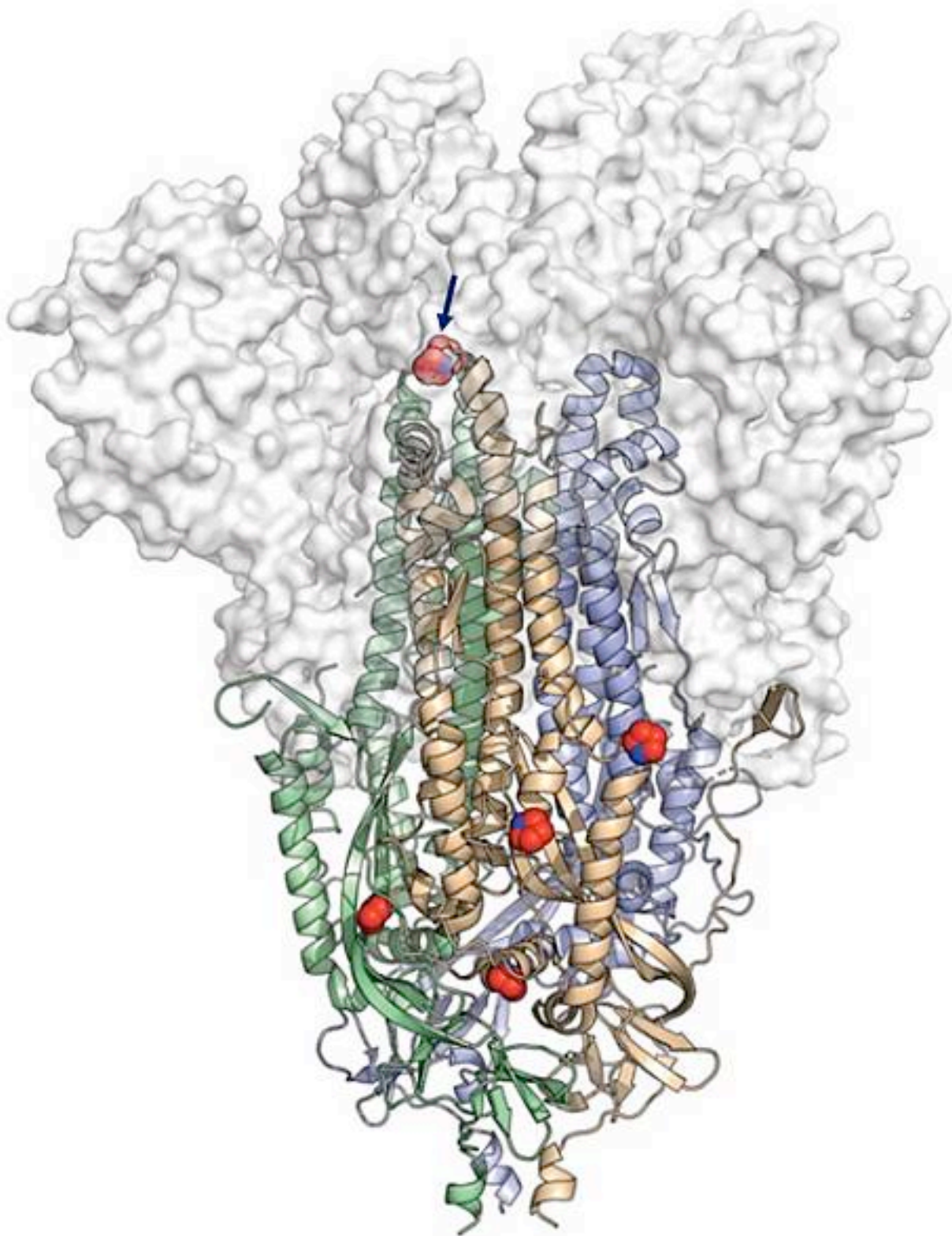


圖一: Spike protein cDNA接在CMV promoter後面。Plasmid送進CHO cell後，可用G418(Neomycin的衍生物)強迫Plasmid與CHO cell的Genomic DNA進行重組，Plasmid就隨機嵌進CHO cell的Genomic DNA。然後把CHO cell打散，讓它們從單一細胞長出許許多多的Single colonies(圖二)，挑選Single colonies擴大培養，用Western blot測Spike protein，挑出Spike protein表現量高的Colonies。



圖二: Single colony

Spike protein對於CHO cell是垃圾，用上述方式來製造Spike protein會遇到表現量差及Spike protein不穩定的問題。解決此問題可在Spike protein folding二級結構的轉彎處從cDNA就用人工插入兩個Proline codon，如下圖所示：

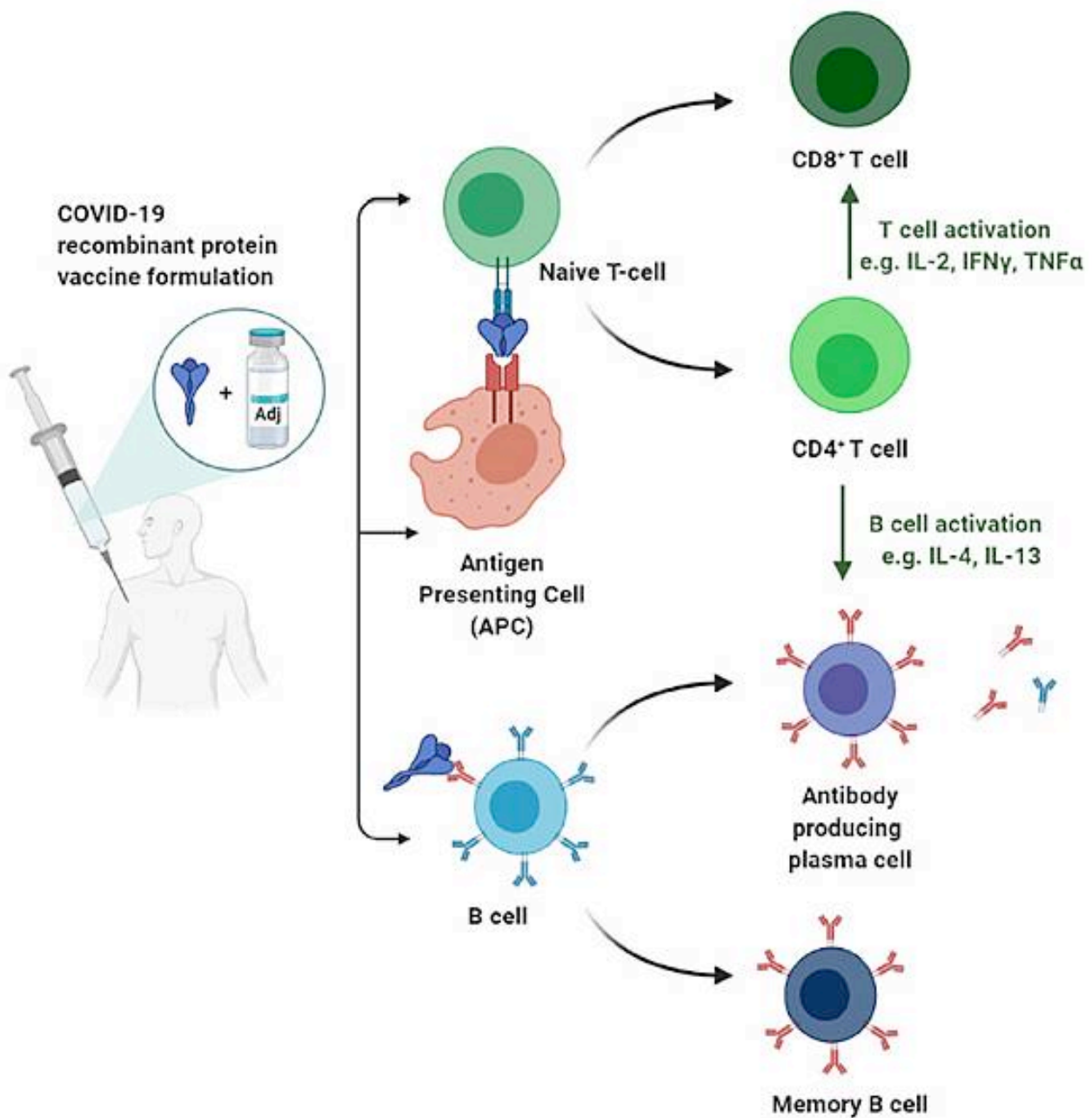


圖三: 高端Subunit vaccine的S-2P(proline)-Spike protein，兩個Proline加在藍箭頭的位置。

接下來是純化的問題，新冠病毒約0.5 μ m，純化病毒顆粒很容易。CHO cell製造出來的S-2P spike protein純化成本是純化病毒顆粒的5-10倍。為了簡化S-2P Spike protein純化，可在蛋白尾巴加上Tag，如圖一中的3x Flag-tag或His-tag。

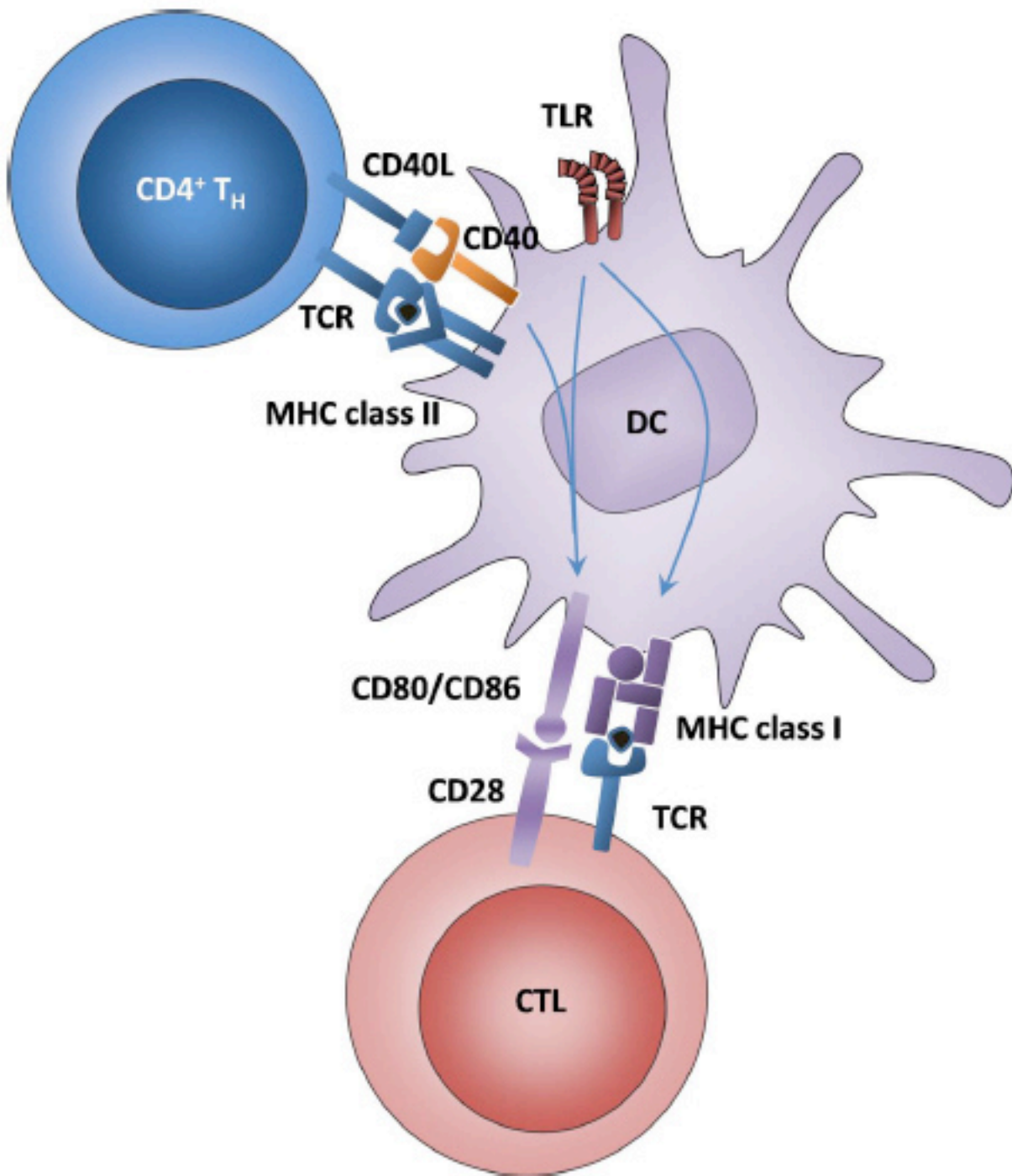
滅活疫苗(死亡的新冠病毒顆粒)與Subunit疫苗(純化的Spike protein)都要加入佐劑(Adjuvant)，最好的佐劑是鋁鹽 + CpG oligo-dNTP。Dendritic cell吞食鋁鹽就像你吃飯時咬到一粒沙石會生氣一樣，會反射性出現防衛措施。CpG oligo-dNTP是細胞內Toll-like receptor(TLR)的Ligand，例如高端的Subunit vaccine加入的CpG 1018是TLR-9的Ligand，兩者結合後會活化Dendritic cell的IRF7及NF- κ B signaling→活化T cell。

A-Z疫苗已有70萬劑抵達台灣，Moderna疫苗可能也將引進台灣，但數量都太少。台灣不準備買中國的滅活疫苗，大部分的台灣人只能打高端的Subunit vaccine，版主只推薦中國的滅活疫苗及高端的Subunit vaccine。Subunit vaccine誘導的T cell與B cell immunity如下圖：



圖四: 高端的 Subunit vaccine 即是 S-2P Spike protein 加上佐劑 (Adj--鋁鹽+CpG 1018)。打進人體後，會被 Dendritic cell (APC) 吞食，活化 Naive T cell，免疫反應的主角是 T cell。Spike protein 進入血液中可與 Naive B cell 胞膜上的 IgM 結合而活化產生抗體，但若要持久產生抗體，必須靠 CD4⁺ T cell 幫忙。CD4⁺ T cell (Th)，Dendritic cell (DC 如圖三的 APC)，CD8⁺ T

cell(Tc or CTL)三者Cross presentation (Th-->DC-->Tc)可活化CD8⁺ T cell。



圖五: Th-->DC-->Tc(CTL)的Cross presentation.

古代名將練成的要件是隨時要知道敵人在哪裡，因此要訓練一批有獨立作戰能力的偵察兵，能跑、能鑽、能打、能逃，

只剩一口氣都能從百里之外帶回敵情的不死戰士，CD8⁺ T cell就是這樣的偵察兵。新冠病毒之所以引發肺炎，主因是沒有CD8⁺ T cell偵察到新冠病毒入侵，等到病毒悄悄進入肺臟時，已經來不及了！

陳時中失敗的主因就是不知道新冠病毒躲在哪裡。