



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 118480136 B

(45) 授权公告日 2025. 01. 14

(21) 申请号 202410795314.9

C12N 15/62 (2006.01)

(22) 申请日 2024.06.19

A61K 39/085 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 118480136 A

(56) 对比文件

CN 118108860 A, 2024.05.31

CN 103097399 A, 2013.05.08

(43) 申请公布日 2024.08.13

(73) 专利权人 南京澄实生物医药科技有限公司

地址 210000 江苏省南京市江北新区探秘

路73号树屋十六栋A-4栋2层201室

审查员 张天祺

(72) 发明人 韩悌云 徐实 费才溢 李静

许梦微

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

公司 11245

专利代理师 陆惠中

(51) Int. Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

权利要求书2页 说明书15页

序列表(电子公布) 附图6页

(54) 发明名称

一种预防和治疗金黄色葡萄球菌感染的免疫原性组合物

(57) 摘要

本发明涉及一种新的预防和治疗金黄色葡萄球菌感染的免疫原性组合物、融合蛋白、重组疫苗,以及分子架构设计 and 应用。本发明提供了新的融合分子架构,其包含Tuf、SpxA、Hu三种基因编码的融合蛋白,或包含H1a_H35L、EsxB两种基因编码的融合蛋白,本发明发现新的融合分子具有良好的免疫原性,并且能够提供有效的免疫保护效果,且在部分个体中可以清除金黄色葡萄球菌定植,可用于核酸疫苗或亚单位疫苗的研发。本发明新的分子架构能够有效提高融合蛋白的表达水平,从而进一步提高免疫保护效果。本发明可应用于人和动物的金葡菌核酸疫苗免疫药物的生产和研发,具有广阔的应用前景。



1. 一种融合蛋白,其特征在于,为融合蛋白A或融合蛋白B,所述融合蛋白A的氨基酸序列如SEQ ID NO: 12所示,所述融合蛋白B的氨基酸序列如SEQ ID NO: 13所示。

2. 根据权利要求1所述的融合蛋白,其特征在于,所述融合蛋白A包含延伸因子Tu抗原、转录调节因子SpxA抗原和HU家族DNA结合蛋白抗原;所述融合蛋白B包含 α 毒素H35L突变体抗原和类ESAT-6蛋白EsxB抗原。

3. 根据权利要求1或2所述的融合蛋白,其特征在于,所述融合蛋白B的N端还包含信号肽和/或任意物种来源的免疫球蛋白重链恒定区 γ 1蛋白的Fc结构域。

4. 根据权利要求3所述的融合蛋白,其特征在于,所述信号肽来源于人的蓝啶蛋白或牛的免疫球蛋白重链恒定区 γ 1蛋白,所述免疫球蛋白重链恒定区 γ 1蛋白的Fc结构域来源于人或牛。

5. 根据权利要求4所述的融合蛋白,其特征在于,所述来源于人的蓝啶蛋白的信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO: 6所示,所述来源于牛的免疫球蛋白重链恒定区 γ 1蛋白的信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO: 7所示,所述来源于人的免疫球蛋白重链恒定区 γ 1蛋白的Fc结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO: 8所示,所述来源于牛的免疫球蛋白重链恒定区 γ 1蛋白的Fc结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO: 9所示。

6. 一种重组核酸分子,其特征在于,编码权利要求1-5任一项所述融合蛋白。

7. 一种重组基因表达盒,其特征在于,包含权利要求6所述重组核酸分子。

8. 一种重组载体,其特征在于,包含权利要求6所述重组核酸分子、或权利要求7所述重组基因表达盒。

9. 一种重组宿主细胞,其特征在于,包含权利要求6所述重组核酸分子、或权利要求7所述重组基因表达盒、或权利要求8所述重组载体。

10. 一种免疫原性组合物或药物组合物,其特征在于,包含一种或多种权利要求1-5任一项所述融合蛋白,和/或一种或多种权利要求6所述重组核酸分子,和/或一种或多种权利要求7所述重组基因表达盒,和/或一种或多种权利要求8所述重组载体,和/或一种或多种权利要求9所述重组宿主细胞。

11. 根据权利要求10所述的免疫原性组合物或药物组合物,其特征在于,所述免疫原性组合物或药物组合物还包含药学上可接受的载体。

12. 根据权利要求11所述的免疫原性组合物或药物组合物,其特征在于,所述免疫原性组合物或药物组合物中包含所述融合蛋白A和融合蛋白B。

13. 根据权利要求12所述的免疫原性组合物或药物组合物,其特征在于,所述免疫原性组合物或药物组合物中的所述融合蛋白A和融合蛋白B的质量比为1:1。

14. 一种重组疫苗,其特征在于,包含一种或多种权利要求1-5任一项所述融合蛋白,和/或一种或多种权利要求6所述重组核酸分子,和/或一种或多种权利要求7所述重组基因表达盒,和/或一种或多种权利要求8所述重组载体,和/或一种或多种权利要求9所述重组宿主细胞,和/或一种或多种权利要求10-13任一项所述免疫原性组合物或药物组合物。

15. 一种或多种权利要求1-5任一项所述融合蛋白,和/或一种或多种权利要求6所述重组核酸分子,和/或一种或多种权利要求7所述重组基因表达盒,和/或一种或多种权利要求8所述重组载体,和/或一种或多种权利要求9所述重组宿主细胞,和/或一种或多种权利要求10-13任一项所述免疫原性组合物或药物组合物,和/或一种或多种权利要求14所述重组

疫苗在制备用于预防、治疗和/或接种的疫苗或生物免疫的药物中的用途;所述药物用于预防和/或治疗金黄色葡萄球菌引起的组织感染。

16. 根据权利要求15所述的用途,其特征在于,所述组织感染为皮肤组织感染、乳腺感染、或腹腔感染。

一种预防和治疗金黄色葡萄球菌感染的免疫原性组合物

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药技术领域,特别是免疫药物技术领域,具体涉及一种能诱导免疫保护的金黄色葡萄球菌的免疫原性组合物及应用等。

背景技术

[0002] 葡萄球菌是一种常见的革兰阳性球菌,广泛存在于人体的皮肤和黏膜上。当前致病性葡萄球菌主要包括:金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)、凝固酶阴性葡萄球菌、肠道球菌等。其中,金黄色葡萄球菌,简称金葡菌,是最常见的病原性葡萄球菌,可广泛感染人和多种动物,引起如乳腺炎、皮肤软组织感染、肺炎、骨髓炎、心内膜炎等多种疾病,不仅危害人类健康,而且会给畜牧业带来严重经济损失。

[0003] 金葡菌的致病性来源于其复制过程中产生的多种毒力因子,如 α 毒素(Alpha-hemolysin,Hla)、免疫球蛋白G结合蛋白A(Immunoglobulin G-binding protein A,SpA)、凝集因子(Clumping factor,Clf)等,它们能够在感染后溶解宿主细胞、引起炎症、造成组织损伤,并且引起免疫逃逸。针对金葡菌感染的个体,常规方法是利用抗生素进行治疗,然而金葡菌容易产生抗药性,目前已存在耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*,MRSA)、泛耐药株(Multi-drug resistant,MDR)等多种耐药株系,给临床治疗带来极大挑战。

[0004] 接种疫苗是一种更好的解决方案。相较于抗生素治疗,疫苗可以通过主动免疫,使机体产生针对金葡菌的特异性抗体和免疫细胞,从而获得更为持久的保护,预防感染的发生。同时,有保护效果的疫苗能够替代抗生素治疗,大幅减少抗生素的使用需求,有助于抑制新型耐药菌株出现和进一步传播,缓解临床治疗压力。然而由于金葡菌的强大免疫逃逸机制,且具备多种血清型,亚单位疫苗保护效力不足,目前没有任何一款疫苗成功应用于临床治疗。

[0005] 核酸疫苗(Nucleic acid vaccine),也称基因疫苗(Genetic vaccine),是指将含有编码抗原蛋白核酸序列的载体,经肌肉注射等方法导入宿主体内,通过宿主细胞表达抗原蛋白,诱导宿主细胞产生对该抗原蛋白的免疫应答,以达到预防和治疗疾病的目的。核酸疫苗是利用现代生物技术免疫学、生物化学、分子生物学等研制成的,分为DNA疫苗和RNA疫苗两种。与传统的灭活疫苗、亚单位疫苗和基因工程疫苗相比,核酸疫苗具有多项优势:(1)核酸疫苗不携带毒力病毒颗粒,安全性更高;(2)核酸疫苗可以在细胞内完成抗原蛋白表达,从而诱发机体对该蛋白的体液免疫和细胞免疫,能够增强免疫效果,延长有效保护的持续时间;(3)核酸疫苗接种后,抗原蛋白在细胞内表达,能够直接与组织相容性复合物MHC I或II类分子结合,不受母源抗原干扰。

[0006] 目前已有研究基于金葡菌主要毒力因子和免疫显性蛋白进行疫苗开发,主要为多价重组蛋白疫苗和多糖疫苗。例如,SA4Ag是一种4价疫苗,组成成分包括葡萄球菌荚膜多糖类型5和8(CP5/8)、凝集因子A(C1fA)以及新的重组P305A,其中P305A是一种来自脂蛋白锰

离子转运蛋白 (Manganese transporter C, MntC) 的蛋白。SA4Ag目前已推进至Ⅲ期临床试验,虽然疫苗诱导了特异性抗体的产生,但这些抗体未能显示出显著的保护效果。例如, PentaStaph是一种多价疫苗,组成成分包括CP5、CP8、 α 毒素、瓦伦丁嗜白细胞素 (Valentine Leukocidin S, LukSPV) 和细胞壁酸,该疫苗在I期临床试验后被葛兰素史克 (GSK) 接手,后与丹麦技术大学 (DTU) 联合开发,更改为基于Vaccia Ankara (MVA) 的免疫。此外,Novartis (现为GSK) 基于金黄色葡萄球菌表面蛋白SdrE、IsdA、SdrD和IsdB开发了一种多价疫苗,仍处于动物研究阶段。

[0007] 上述亚单位疫苗均能够诱导体液免疫反应,但当前最新研究表明,体液免疫所提供的保护不足以应对金黄色葡萄球菌感染,在针对金黄色葡萄球菌感染的长期保护中,T细胞介导的免疫反应起着更重要的作用。亚单位疫苗受到自身属性及免疫原理限制,很难诱导细胞免疫,而核酸疫苗可以有效解决这一点。上述亚单位疫苗都在动物实验阶段取得了良好效果,但到临床试验均以失败告终。原因是人和动物对金黄色葡萄球菌感染存在非保护性体液免疫印记,亚单位疫苗激活的抗体是人体内早已存在的、非保护性抗体。非保护性体液免疫印记会导致中和抗体效价虚高,产生误导性的结果。在金黄色葡萄球菌mRNA疫苗设计中,选用毒素抗原和亚显性细胞壁抗原 (Cell wall antigens, CWAs) 抗原融合表达,可避免体液免疫印记的不利影响,是开发金黄色葡萄球菌疫苗或致病性葡萄球菌疫苗的有效方式。

[0008] 现有技术公开了多种金黄色葡萄球菌疫苗。专利文献1 (CN115975865A, 公开日2023-04-18) 公开了一种抗原载体菌株、重组菌株及其在制备金黄色葡萄球菌口服疫苗中的应用,菌株为LR076,于2022年9月27日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为CGMCC No. 25845;重组菌株由携带有外源金黄色葡萄球菌抗原片段的重组质粒转化至LR076菌株中形成;所述抗原片段包括HlaH35L、IsdB、MntC。将重组菌株应用于制备金黄色葡萄球菌口服疫苗中,能有效缓解感染后肺脏的病变及减少金黄色葡萄球菌在肺脏的定植量。专利文献2 (CN117355328A, 公开日2024-01-05) 公开了用于诱导对象免疫应答以治疗和/或预防金黄色葡萄球菌感染的免疫原性组合物,所述免疫原性组合物包含金黄色葡萄球菌蛋白A (SpA) 多肽和金黄色葡萄球菌杀白细胞素A (LukA) 和/或杀白细胞素B (LukB) 变体多肽。专利文献3 (WO2024040363A1, 公开日2024-02-29) 公开了金黄色葡萄球菌疫苗及其制备方法、PLGA-PEG共聚物在制备疫苗中的用途;所述疫苗含有佐剂纳米颗粒,所述佐剂纳米颗粒含有PLGA或者PLGA-PEG共聚物,和金黄色葡萄球菌抗原,所述金黄色葡萄球菌抗原与所述佐剂纳米颗粒共价相连。然而,上述金黄色葡萄球菌疫苗仍然存在免疫原性与T细胞免疫应答不足等缺陷。

[0009] 虽然已有上述亚单位疫苗以及现有技术公开的金黄色葡萄球菌疫苗,但是本领域仍亟需一种更好免疫原性,并且能够提供有效免疫保护效果的金黄色葡萄球菌疫苗。

发明内容

[0010] 针对现有技术的不足,本发明的目的是提供一种新的预防和治疗金黄色葡萄球菌感染的免疫原性组合物、融合蛋白、重组疫苗,以及分子架构设计和应用。本发明提供了新的融合分子架构,其包含Tuf、SpxA、Hu三种基因编码的融合蛋白,或包含Hla_H35L、EsxB两种基因编码的融合蛋白,可用于核酸疫苗或亚单位疫苗的研发。本发明发现新的融合分子具有良好的免疫原性,并且能够提供有效的免疫保护效果,且在部分个体中可以清除金黄

色葡萄球菌定植。本发明还发现,新的分子架构能够有效提高融合蛋白的表达水平,从而进一步提高免疫保护效果。本发明还提供相应的重组核酸、基因表达盒、载体、宿主细胞、药物组合物、疫苗、用途等。

[0011] 本发明的一方面提供一种融合蛋白,其特征在于,选自如下(1)或(2):

[0012] (1)融合蛋白A,所述融合蛋白A包含延伸因子Tu(Elongation factor Tu,Tuf)抗原、转录调节因子SpxA(Transcriptional regulator SpxA,SpxA)抗原和HU家族DNA结合蛋白(HU familyDNA-binding protein,DNA-binding protein Hu)抗原;

[0013] (2)融合蛋白B,所述融合蛋白B包含 α 毒素H35L突变体(H1a_H35L)抗原和类ESAT-6蛋白EsxB(ESAT-6-like protein EsxB,EsxB)抗原。

[0014] 进一步地,其特征在于,所述抗原来自于球菌;优选地,来自于葡萄球菌;最优选地,来自于金黄色葡萄球菌。

[0015] 进一步地,其特征在于,所述延伸因子Tu抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO: 1所示,所述转录调节因子SpxA抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO: 2所示,所述HU家族DNA结合蛋白抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO: 3所示,所述 α 毒素H35L突变体抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO: 4所示,所述类ESAT-6蛋白EsxB抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO: 5所示。

[0016] 进一步地,其特征在于,所述融合蛋白A从N端到C端依次包含延伸因子Tu抗原、转录调节因子SpxA抗原、HU家族DNA结合蛋白抗原;所述融合蛋白B从N端到C端依次包含 α 毒素H35L突变体抗原和类ESAT-6蛋白EsxB抗原。

[0017] 进一步地,其特征在于,所述融合蛋白A的氨基酸序列如SEQ ID NO: 12所示,所述融合蛋白B的氨基酸序列如SEQ ID NO: 13所示。

[0018] 进一步地,其特征在于,所述融合蛋白B的N端还包含信号肽、任意物种来源的免疫球蛋白重链恒定区 γ 1蛋白(Immunoglobulin Heavy Constant Gamma 1,IGHG1)的Fc结构域;优选地,信号肽来源于人的蓝啉(Azurocidin)蛋白或牛的IGHG1蛋白,更优选地,所述来源于人的蓝啉蛋白的信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO: 6所示,所述来源于牛的免疫球蛋白重链恒定区 γ 1蛋白的信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO: 7所示;优选地,所述免疫球蛋白重链恒定区 γ 1蛋白的Fc结构域来源于人或牛,更优选地,所述来源于人的免疫球蛋白重链恒定区 γ 1蛋白的Fc结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO: 8所示,所述来源于牛的免疫球蛋白重链恒定区 γ 1蛋白的Fc结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO: 9所示。

[0019] 任选地,所述融合蛋白的各个元件之间通过连接肽连接;优选地,所述连接肽为间隔序列或linker序列;更优选地,所述间隔序列的氨基酸序列如SEQ ID NO: 10所示,所述linker序列的氨基酸序列如SEQ ID NO: 11所示。

[0020] 本发明的另一方面提供一种重组核酸分子,其特征在于,编码本发明所述融合蛋白。

[0021] 本发明的另一方面提供一种重组基因表达盒,其特征在于,包含本发明所述重组核酸分子。

[0022] 本发明的另一方面提供一种重组载体,其特征在于,包含本发明所述重组核酸分子、或本发明所述重组基因表达盒。

[0023] 本发明的另一方面提供一种重组宿主细胞,其特征在于,包含本发明所述重组核酸分子、或本发明所述重组基因表达盒、或本发明所述重组载体。

[0024] 本发明的另一方面提供一种免疫原性组合物或药物组合物,其特征在于,包含一种或多种本发明所述融合蛋白,和/或一种或多种本发明所述重组核酸分子,和/或一种或多种本发明所述重组基因表达盒,和/或一种或多种本发明所述重组载体,和/或一种或多种本发明所述重组宿主细胞;优选地,所述免疫原性组合物或药物组合物还包含药学上可接受的载体。

[0025] 进一步地,其特征在于,所述免疫原性组合物或药物组合物中包含所述融合蛋白A和融合蛋白B;优选地,所述免疫原性组合物或药物组合物中的所述融合蛋白A和融合蛋白B的质量比为1:1。

[0026] 本发明的另一方面提供一种重组疫苗,其特征在于,包含一种或多种本发明所述融合蛋白,和/或一种或多种本发明所述重组核酸分子,和/或一种或多种本发明所述重组基因表达盒,和/或一种或多种本发明所述重组载体,和/或一种或多种本发明所述重组宿主细胞,和/或一种或多种本发明所述免疫原性组合物或药物组合物。

[0027] 本发明的另一方面提供一种或多种本发明所述融合蛋白,和/或一种或多种本发明所述重组核酸分子,和/或一种或多种本发明所述重组基因表达盒,和/或一种或多种本发明所述重组载体,和/或一种或多种本发明所述重组宿主细胞,和/或一种或多种本发明所述免疫原性组合物或药物组合物,和/或一种或多种本发明所述重组疫苗在制备用于预防、治疗和/或接种的疫苗或生物免疫的药物中的用途。

[0028] 进一步地,其特征在于,所述药物用于预防和/或治疗葡萄球菌引起的组织感染;优选地,所述葡萄球菌为金黄色葡萄球菌;优选地,所述组织感染为皮肤组织感染、乳腺感染、腹腔感染等;更优选地,所述组织感染为乳腺感染。

[0029] 本发明的另一方面提供一种疾病的预防和/或治疗方法,其特征在于,向受试者接种本发明所述免疫原性组合物或药物组合物,或者本发明所述重组疫苗。

[0030] 进一步地,其特征在于,所述疾病为葡萄球菌引起的组织感染;优选地,所述葡萄球菌为金黄色葡萄球菌;优选地,所述组织感染为皮肤组织感染、乳腺感染、腹腔感染等;更优选地,所述组织感染为乳腺感染。

[0031] 本发明的融合蛋白、免疫原性组合物、重组疫苗等具有如下有益技术效果::

[0032] 1. 本发明发现新的融合分子具有良好的免疫原性,并且能够提供免疫保护效果,可用于核酸疫苗或亚单位疫苗的研发。本发明的免疫原性组合物,可针对金黄色葡萄球菌的感染提供有效的免疫保护。

[0033] 2. 本发明还发现新的分子架构能够有效提高融合蛋白的表达水平,从而进一步提高免疫保护效果。本发明的疫苗A涉及的Tuf-SpxA-Hu融合蛋白、疫苗B涉及的H1a_H35L-EsxB融合蛋白,其分泌表达的分子架构有效提高融合蛋白的表达水平,从而提高免疫效果,为金葡菌多价疫苗的免疫药物设计领域提供新技术。

[0034] 3. 本发明实施例4表明,基于本发明设计的疫苗,均能够在真核细胞中正确表达,且表达的蛋白结构正确、稳定,有利于免疫表位呈递。

[0035] 4. 本发明实施例5表明,在小鼠乳腺炎模型中,基于本发明的疫苗A,能够提供良好的免疫治疗效果,在33.3%的个体中可以清除细菌定植。通过组织切片和HE染色的方法检测,疫苗A治疗组的炎性细胞浸润明显缓解,组织结构清晰完整。

[0036] 5. 本发明实施例5还表明,单一抗原的疫苗C免疫效果显著低于多抗原的疫苗A。

原因可能在于,金黄色葡萄球菌具有多重免疫逃逸机制,能够通过自身分泌的多种毒力蛋白逃避宿主的免疫系统,因此单个抗原靶点无法提供良好的免疫保护。而基于本发明的多抗原靶点组合的疫苗,能够提供更多的免疫表位,有利于提高免疫治疗效果,在部分个体中实现定植细菌的清除。

[0037] 6. 本发明实施例6表明,在小鼠腹腔感染模型中,基于本发明的疫苗A和疫苗B免疫后,均产生良好的预防效果。其中,疫苗A和疫苗B共同免疫具有最佳的预防效果:相较于对照组,血液载菌量(中位数)降低约18倍,腹腔液载菌量(中位数)降低约20倍,脾脏载菌量(中位数)降低约7000倍;疫苗B单独免疫的预防效果次之:相较于对照组,血液载菌量(中位数)降低约6倍,腹腔液载菌量(中位数)降低约12倍,脾脏载菌量(中位数)降低约3500倍;疫苗A单独免疫的预防效果再次之:相较于对照组,血液载菌量(中位数)降低约4倍,腹腔液载菌量(中位数)降低约5倍,脾脏载菌量(中位数)降低约2300倍。然而,不管是疫苗A还是疫苗B单独免疫,都提供了强大的免疫保护。

[0038] 7. 本发明实施例4、实施例5、实施例6共同表明,基于本发明的疫苗能够诱导模式动物小鼠产生有效的免疫,针对金葡菌感染有治疗和预防的效果。本发明能够应用于人和动物免疫药物的生产和研发,填补当前金葡菌核酸疫苗研发领域的空白,具有极高的商业价值及广阔的应用前景。

附图说明

[0039] 图1为本发明疫苗A和疫苗B所表达融合蛋白的分子结构示意图。

[0040] 图2A-图2C为包含本发明抗原序列的核酸疫苗A、B、C的质量控制峰图以及纯度检测结果;其中图2A为疫苗A的质量控制峰图以及纯度检测结果,图2B为疫苗B的质量控制峰图以及纯度检测结果,图2C为疫苗C的质量控制峰图以及纯度检测结果。

[0041] 图3A-图3C为本发明疫苗A、B、C在体外转染HEK293T细胞后的表达效果;其中图3A为疫苗A的体外表达结果,图3B为疫苗B的体外表达结果,图3C为疫苗C的体外表达结果。

[0042] 图4为本发明疫苗A、C在小鼠乳腺炎模型中的免疫及取样流程。

[0043] 图5A-图5B为本发明疫苗C、疫苗A治疗后,乳腺炎小鼠的乳腺载菌量;其中图5A为疫苗C治疗后乳腺炎小鼠的乳腺载菌量,图5B为疫苗A治疗后乳腺炎小鼠的乳腺载菌量。

[0044] 图6为本发明疫苗A治疗后,乳腺炎小鼠的乳腺组织切片HE染色图。

[0045] 图7为本发明疫苗A、疫苗B、疫苗A和B共同免疫在小鼠腹腔感染模型中的免疫及取样流程。

[0046] 图8A-图8C为本发明疫苗A、疫苗B、疫苗A和B共同免疫后,在小鼠腹腔感染模型中的预防保护效果;其中图8A为小鼠免疫攻毒后的血液载菌量,图8B为小鼠免疫攻毒后的腹腔液载菌量,图8C为小鼠免疫攻毒后的脾脏载菌量。

具体实施方式

[0047] 术语和定义

[0048] 术语“金葡菌”指金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*),是一种革兰阳性的球菌,属于葡萄球菌属。呈球形,单独存在、成对、短链或不规则团聚状。

[0049] 术语“葡萄球菌感染”指包括由金黄色葡萄球菌和/或表皮葡萄球菌以及能够引起

哺乳动物中优选人宿主中感染的其它葡萄球菌菌株所引起的感染。

[0050] 术语“H1a_H35L”指来自葡萄球菌属细菌的 α 毒素的突变体,即野生型H1a的第35位氨基酸由组氨酸Histidine (His)突变为亮氨酸Leucine (Leu)。包含H1a_H35L多肽及其区段的蛋白质和能刺激针对葡萄球菌属细菌H1a_H35L蛋白的免疫应答的变体。优选地,所述H1a_H35L的氨基酸序列如SEQ ID NO: 4所示。

[0051] 术语“EsxB”指来自葡萄球菌属细菌的ESAT-6-like protein EsxB蛋白。包含细菌的分离的野生型EsxB多肽及其区段的蛋白质和能刺激针对葡萄球菌属细菌EsxB蛋白的免疫应答的变体。优选地,所述EsxB的氨基酸序列如SEQ ID NO: 5所示。

[0052] 术语“Tuf”指来自葡萄球菌属细菌的Elongation factor Tu蛋白。包含细菌的分离的野生型Tuf多肽及其区段的蛋白质和能刺激针对葡萄球菌属细菌Tuf蛋白的免疫应答的变体。优选地,所述Tuf的氨基酸序列如SEQ ID NO: 1所示。

[0053] 术语“SpxA”指来自葡萄球菌属细菌的Global transcriptional regulator Spx蛋白。包含细菌的分离的野生型SpxA多肽及其区段的蛋白质和能刺激针对葡萄球菌属细菌SpxA蛋白的免疫应答的变体。优选地,所述SpxA的氨基酸序列如SEQ ID NO: 2所示。

[0054] 术语“DNA-binding protein Hu”或“HU家族DNA结合蛋白”或“Hu”指来自葡萄球菌属细菌的HU family DNA-binding protein蛋白。包含细菌的分离的野生型DNA-binding protein Hu多肽及其区段的蛋白质和能刺激针对葡萄球菌属细菌DNA-binding protein Hu蛋白的免疫应答的变体。优选地,所述DNA-binding protein Hu的氨基酸序列如SEQ ID NO: 3所示。

[0055] 术语“PmtC”指来自葡萄球菌属细菌的酚溶性调节ABC转运体ATP结合蛋白PmtC (Phenol-soluble modulins export ABC transporter ATP-binding protein PmtC, PmtC)。包含细菌的分离的野生型PmtC多肽及其区段的蛋白质和能刺激针对葡萄球菌属细菌PmtC蛋白的免疫应答的变体。优选地,所述PmtC的氨基酸序列如SEQ ID NO: 14所示。

[0056] 术语“免疫应答”指有机体中的体液应答、细胞应答或体液和细胞应答两者。免疫应答可以通过测定进行测量,所述测定包括但不限于测量特异性识别蛋白质或细胞表面蛋白的抗体的存在或量的测定、测量T细胞活化或增殖的测定和/或测量一种或更多种细胞因子活性调节或表达调节的测定。

[0057] 术语“给药”或“接种”指基于本发明核酸疫苗或疫苗组合物优选地经肌内的或皮下的途径给予,尽管其他的给药途径也能被使用,例如,口服、鼻内(例如气雾剂或其他非针剂给药)、淋巴节内、真皮内、腹膜内、直肠或阴道给药,或通过联用的途径。在动物的颈部肌内的给药是优选的。可采用加速方案(boosting regimens)将给药方案调节为提供最佳免疫。

[0058] 术语“表达”包括涉及多肽产生的任何步骤,包括但不限于:转录、转录后修饰、翻译、翻译后修饰和分泌。

[0059] 术语“重组核酸分子”指具有在自然界中不连接在一起的序列的多核苷酸。重组多核苷酸可包括在合适的载体中,且该载体可用于转化至合适的宿主细胞。然后多核苷酸在重组宿主细胞中表达以产生例如“重组多肽”“重组蛋白”“融合蛋白”等。

[0060] 术语“重组表达载体”指用于表达例如编码所需多肽的多核苷酸的DNA结构。重组表达载体可包括,例如包含(1)对基因表达具有调控作用的遗传元素的集合,例如启动子和

增强子；(2) 转录成mRNA并翻译成蛋白质的结构或编码序列；以及(3) 适当的转录和翻译起始和终止序列的转录亚单位。重组表达载体以任何合适的方式构建、可以使用任何载体，包括质粒、病毒、噬菌体和转座子。用于本公开的可能载体包括但不限于染色体、非染色体和合成的DNA序列，例如病毒质粒、细菌质粒、噬菌体DNA、酵母质粒以及从质粒和噬菌体DNA的组合中衍生的载体，来自如慢病毒、逆转录病毒、牛痘、腺病毒、鸡痘、杆状病毒、SV40和伪狂犬病等病毒的DNA。包括自复制型载体和非自复制型载体。

[0061] 术语“mRNA”，指信使RNA、Messenger RNA，中文译名“信使核糖核酸”，是由DNA的一条链作为模板转录而来的、携带遗传信息能指导蛋白质合成的一类单链核糖核酸。

[0062] 术语“5' -UTR”，指“5' 非翻译区”或“5' UTR”，为转录成初级RNA转录本(前体mRNA)并位于编码序列上游的一部分基因。初级转录本是初始RNA产物，包含内含子和外显子，由DNA转录产生。许多初级转录本必须经过RNA加工以形成具有生理活性的RNA。形成成熟mRNA的加工过程包括修饰末端、切除内含子、加帽和/或从前体RNA上剪切出各rRNA分子。因此，mRNA的5' UTR是不会被翻译成蛋白质并位于编码序列上游的一部分mRNA。在基因组序列中，5' UTR通常被定义为位于转录起始点和起始密码子之间的区域。脊椎动物mRNA的5' 非翻译区(5' UTR)长度可以是几十个碱基到几百个碱基。

[0063] 术语“3' -UTR”，指“3' -非翻译区”或“3' UTR”，涉及位于基因的3' 端，在蛋白质编码区的终止密码子下游，并且被转录但不翻译成氨基酸序列的区域，或涉及RNA分子中的对应区域。3' -非翻译区通常从翻译产物的终止密码子延伸至通常在转录过程之后附着的多聚(A)序列。哺乳动物mRNA的3' -非翻译区通常具有已知为AAUAAA六核苷酸序列的同源区。该序列可能是多聚(A)附着信号并且经常位于多聚(A)附着位点上游的10至30个碱基处。3' -非翻译区可以包含一个或更多个反向重复，可以折叠产生茎环结构，所述结构充当核糖核酸外切酶的屏障或与已知提高RNA稳定性的蛋白质(例如，RNA结合蛋白)相互作用。

[0064] 术语“宿主细胞”指已经向其中引入外源多核苷酸的细胞，包括这类细胞的子代。宿主细胞包括“转化体”和“转化的细胞”，这包括原代转化的细胞和从其衍生的子代。宿主细胞是可以用来产生基于本发明的重组疫苗的任何类型的细胞系统，包括真核细胞，例如，哺乳动物细胞、昆虫细胞、酵母细胞；和原核细胞，例如，大肠杆菌细胞。宿主细胞包括培养的细胞。

[0065] 术语“个体”、“患者”或者“受试者”包括哺乳动物。哺乳动物包括但不限于，家养动物(例如，猪、牛、羊、猫、狗和马等)，灵长类动物(例如，人和非人灵长类动物如猴)，以及啮齿类动物(例如，兔、小鼠和大鼠等)。

[0066] 术语“转化、转染、转导”具有本领域技术人员普遍理解的意思，即将外源性的DNA、RNA导入宿主的过程。

[0067] 术语“药物组合”或“药物组合物”是指包含在药物生产领域中广泛采用的辅助物料。使用载体的主要目的在于提供一种使用安全、性质稳定和/或具有特定功能性的药物组合物，还在于提供一种方法，以便在为受试者体内得到有效吸收。药学上可接受的载体可以是具有惰性的填充剂，也可以是为药用组合提供某种功能(例如稳定组合物的整体pH值或防止组合物中活性成分的降解)的功效成分。药学上可接受的载体的非限制性实例包括但不限于粘合剂、助悬剂、乳化剂、稀释剂(或填充剂)、成粒剂、粘胶剂、崩解剂、润滑剂、抗粘剂、助流剂、胶凝剂、吸收延迟剂、溶解抑制剂、增强剂、吸附剂、缓冲剂、螯合剂、防腐剂、

着色剂、矫味剂和甜味剂等。

[0068] 术语“治疗”是指在罹患疾病之后,使受试者接触(例如给药)基于本发明的重组疫苗、组合物等,从而与不接触时相比使该疾病的症状减轻,并不意味着必需完全抑制疾病的症状。罹患疾病是指身体出现了疾病症状。

[0069] 术语“预防”是指在罹患疾病之前,通过使受试者接触(例如给药)基于本发明的重组疫苗、组合物等,从而与不接触时相比减轻罹患疾病后的症状,并不意味着必需完全抑制患病。

[0070] 除非另外定义或由背景清楚指示,否则在本公开中的全部技术与科学术语具有如本公开所述领域的普通技术人员通常理解的不同含义。

[0071] 本发明公开了一种有效提高细胞的抗原呈递效率的融合分子架构、基于该架构的重组疫苗制备方法及应用。本领域技术人员可以借鉴本文内容,适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,都被视为包括在本发明以内。本发明的方法及应用已经通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法和应用程序进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

[0072] 本发明提供的融合蛋白和编码核酸及其元件,制备方法及应用中,所用原料及试剂均可由市售获得。

[0073] 下面结合实施例,进一步阐明本发明。其中,作为一种优选,选用核酸疫苗架构用于制备重组疫苗。

[0074] 实施例1 本发明重组核酸疫苗的构建

[0075] 为了制备包含本发明抗原的重组核酸疫苗,本发明的核酸疫苗非限制性架构示意图如图1所示,示例性的图1为本发明疫苗A和疫苗B所表达融合蛋白的分子结构示意图。为了制备能够产生如图1所示的分子结构的重组核酸疫苗,首先构建一个基因表达盒,用于表达本发明所述的抗原序列。表达盒从5'端到3'端依次包含:5' UTR、CDS区、3' UTR、PolyA,其中,CDS区包含本发明所述的融合分子架构。随后,基于密码子简并性对完整的基因表达盒序列做优化,通过基因合成的方式直接获得DNA序列(委托金斯瑞公司合成)。最后,将合成的基因表达盒DNA序列插入至可用于体外RNA转录的表达载体中,得到用于制备重组核酸疫苗的载体质粒。

[0076] 根据上述方法,制备用于后续实施例的载体:

[0077] (1) 基于本发明的重组核酸疫苗A制备载体

[0078] 步骤a:合成“Tuf-SpxA-Hu”三基因的融合片段,之间通过氨基酸序列如SEQ ID NO: 11所示的linker序列连接,Tuf-SpxA-Hu融合基因编码的融合蛋白氨基酸序列如SEQ ID NO: 12所示。其中,Tuf抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO: 1所示,SpxA抗原的氨基酸如SEQ ID NO: 2所示,Hu(即HU家族DNA结合蛋白,DNA-binding protein Hu)抗原的氨基酸如SEQ ID NO: 3所示。

[0079] 步骤b:构建核酸疫苗架构载体。

[0080] 所述核酸疫苗架构载体包含5' -UTR和3' -UTR,可以是用于生产任一形式RNA疫苗的载体或生产DNA疫苗的载体。

[0081] 步骤c:制备重组质粒。

[0082] 将步骤a合成的基因插入步骤b的载体架构中,得到基于本发明的重组核酸疫苗C制备载体。

[0083] (2) 基于本发明的重组核酸疫苗B制备载体

[0084] 步骤a:合成“人信号肽-人IGHG1的Fc结构域-H1a_H35L-EsxB”基因片段。其中,人信号肽为人的Azurocidin蛋白信号肽,其氨基酸序列如SEQ ID NO: 6所示,人IGHG1的Fc结构域的氨基酸如SEQ ID NO: 8所示,H1a_H35L抗原的氨基酸如SEQ ID NO:4所示,EsxB抗原的氨基酸如SEQ ID NO: 5所示,人IGHG1的Fc结构域与H1a_H35L之间通过氨基酸序列如SEQ ID NO: 10所示的间隔序列连接,H1a_H35L和EsxB之间通过氨基酸序列如SEQ ID NO: 11所示的linker序列连接,H1a_H35L-EsxB融合基因编码的融合蛋白氨基酸序列如SEQ ID NO: 13所示。

[0085] 步骤b:构建核酸疫苗架构载体。

[0086] 所述核酸疫苗架构载体包含5' -UTR和3' -UTR,可以是用于生产任一形式RNA疫苗的载体或生产DNA疫苗的载体。

[0087] 步骤c:制备重组质粒。

[0088] 将步骤a合成的基因插入步骤b的载体架构中,得到基于本发明的重组核酸疫苗A制备载体。

[0089] (3) 基于本发明的重组核酸疫苗C制备载体

[0090] 步骤a:合成“牛信号肽-牛IGHG1的Fc结构域- PmtC”基因片段。其中,牛信号肽为牛IGHG1蛋白信号肽,其氨基酸序列如SEQ ID NO: 7所示,牛IGHG1的Fc结构域的氨基酸如SEQ ID NO: 9所示,PmtC的氨基酸如SEQ ID NO:14所示。

[0091] 步骤b:构建核酸疫苗架构载体。

[0092] 所述核酸疫苗架构载体包含5' -UTR和3' -UTR,可以是用于生产任一形式RNA疫苗的载体或生产DNA疫苗的载体。

[0093] 步骤c:制备重组质粒。

[0094] 将步骤a合成的基因插入步骤b的载体架构中,得到基于本发明的重组核酸疫苗C制备载体。

[0095] 表1本发明所涉及架构元件的蛋白氨基酸序列

[0096]	氨基酸序列以及序列编号
--------	-------------

Tuf抗原	MAKEKFDRSKEHANIGTIGHVDHGKTTLTAAlA TVLAKNGDSVAQSYDMIDNAPEEKERGITINTS HIEYQTDKRHYAHVDCPGHADYVKNMITGAAQM DGGILVSAADGMPQTRHILLSRNVGVPALV VFLNKVDMVDDEELLELEVMEVRDLLSEYDFPG DDVPVIAGSALKALEGDAQYEEKILELMEAVDT YIPTPERDSKPFMMPVEDVFSITGRGTVATGR VERGQIKVGEEVEIIGLHDTSKTTVTGVEMFRK LLDYAEAGDNIGALLRGVAREDVQRGQVLAAPG SITPHTEFKAEVVLSKDEGGRHTPFFSNYRPQ FYFRITDVTGVVHLPEGTEMVMPGDNVEMTVEL IAPIAIEDGTRFSIREGGRTVGSVVTETI IK (SEQ ID NO: 1)
SpxA抗原	MVTLFTSPSCTSCRKAKAWLQEHDIPTERNIF SEHLTIDEIKQILKMTEDGTDEIISTRKTYQK LNVDIDSLPLQDLYSIIQDNPGLLRPIILDNK RLQVGYNEDEIRRFLPRKVRTFQLQEAQRMVD (SEQ ID NO: 2)
DNA-binding protein Hu抗原	MNKTDLINAVAEQADLTKEAGSAVDVAFESI Q NSLAKGEKVQLIGFGNFEVRERAARKGRNPQTG KEIDIPASKVPAFKAGKALKDAVK (SEQ ID NO: 3)
α 毒素H35L突变体抗原	ADSDINIKTGTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENG MLKKVFYSFIDDKNHKKILVIRTKGTIAGQYR VYSEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLSDNEVAQIS DYYPNRSIDTKEYMSTLTYGFNGNVAGDDSGKI GGLIGAQVSIHTLKYVQPDFKTILESPTDKKV GWKVI FNNMVNQNWGPYDRDSWNPVYGNQLFMK TRNGSMKAADNFDLPNKASSLLSSGFSPDFATV ITMDRKASKQQTNIDVIYERVDDYQLHWTSTN WKGNTKDKWTRSSERYKIDWEKEEMTN (SEQ ID NO: 4)
EsxB抗原	MGGYKGIKADGGKVDQAKQLAAKTAKDIEACQK QTQQLAEYIEGSDWEGQFANKVKDVL L IMAKFQ EELVQPIADHQKAIDQLSQNLAKYDTLSIKQGL DRVNP (SEQ ID NO: 5)
人的Azurocidin蛋白信号肽	MTRLTVLALLAGLLASSRA (SEQ ID NO: 6)
牛IGHG1蛋白信号肽	MNPLWTLFLVLSAPRGVLS (SEQ ID NO: 7)

人IGHG1蛋白Fc结构域	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 8)
牛IGHG1蛋白Fc结构域	DPRCKTTCDCPPPELPGGSPVFI FPPKPKDTL TISGTPEVTCVVVDVGHDDPEVKFSWFVDDVEV NTATTKPREEQFNSTYRVVSALRIHQDWTGGK EFKCKVHNEGLPAPIVRTISRTKGPAREPQVYV LAPPQEELSKSTVSLTCMVT SFYDPYIAVEWQR NGQPESEDKYGTPPQLDADGSYFLYSRLRVDR NSWQEGDITYTCVMHEALHNHYTQKSTSKSAGK (SEQ ID NO: 9)
间隔序列	GGSGGGSGG (SEQ ID NO: 10)
linker序列	GGSGGGSGG (SEQ ID NO: 11)
Tuf-SpxA-Hu融合蛋白	MAKEFDRSKEHANIGTIGHVDHGKTTLTAIA TVLAKNGDSVAQSYDMIDNAPEEKERGITINTS HIEYQTDKRHYAHVDCPGHADYVKNMITGAAQM DGGILVSAADGMPQ TREHILLSRNVGVPALV VFLNKVDMVDDEELLELVEMEV RDLLSEYDFPG DDVPVIAGSALKALEGDAQYEEKILELMEAVDT YIPTPERDSKPFMPVEDVFSITGRGT VATGR VERGQIKVGEEVEI IGLHDTSKTTVTGVEMFRK LLDYAEAGDNIGALLRGVAREDVQRGQVLAAPG SITPHTEFKAEVYVLSKDEGGRHTPFFSNYRPQ FYFRITDVTGVVHLPEGTEMVMPGDNVEMTVEL IAPIAIEDGTRFSIREGGRTVSGGVVTEI IKGG SGGGSGGMVTLFTSPSCTSCRKAKAWLQEHD PYTERNIFSEHLTIDEIKQILKMTEDGTDEIIS TRSKTYQKLNVDIDSLPLQDLYSIIQDNPGLLR RPIILDNKRLQVGYNEDEIRRFLPRKVRTFQLQ EAQRMVDGGSGGGSGGMNKTDL INAVAEQADL TKKEAGSAVD AVFESI QNSLAKGEKVQLIGFN FEVRERAARKGRNPQTGKEIDIPASKVPAFKAG KALKDAVK (SEQ ID NO: 12)

H1a_H35L-EsxB融合蛋白	ADSDINIKTGTTDIGSNTTVKGTGDLVTYDKENG MLKKVFYSFIDDKNHNKKILVIRTKGTIAGQYR VYSEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLSDNEVAQIS DYYPNRSIDTKEYMSTLTYGFNGNVAGDDSGKI GGLIGAQVSIHTLKYVQPDFKTILESPTDKKV GWKVIFNNMVNQNWGPYDRDSWNPVYGNQLFMK TRNGSMKAADNFLDPNKASSLLSSGFSPDFATV ITMDRKASKQQTNIDVIYERVRDDYQLHWTSTN WKGNTKDKWTDRSSERYKIDWEKEEMTNGGSG GGGSGMGGYKGIKADGGKVDQAKQLAAKTAKD IEACQKQTQQLAEYIEGSDWEGQFANKVKDVLL IMAKFQEELVQPIADHQKAIDQLSQNLAKYDTL SIKQGLDRVNP (SEQ ID NO: 13)
PmtC抗原	MKLEHITKKYGSNVVLNDIDDFGDSRIVGLIG KNGVGKTTVMKVMNGNI IKFDGKVDIDNADNIG FLIEHPKLYDQKSGLYNLKLFQVLGKGFDAKAY TDKI IDAFGMRPYIKKKVKKYSMGMKQLAIAV SLMNPKPFLILDEPTNGMPDGSIDVLTITKSL VNELDMRILISSHKLEDIELICDRAVFLRDGHF VQDVNMEEGVASDTTIVTVDHKDFDRTEKYLAE HFQLQNVDKADGHLMINAQKNYQVILKALSELD IYPKYIETRSSLRDTYFNINQRGDK (SEQ ID NO: 14)

[0097] 实施例2 本发明重组核酸疫苗制备

[0098] (1) 加帽mRNA疫苗制备

[0099] 步骤a:将实施例1中用于生产加帽mRNA疫苗的载体质粒进行酶切线性化,获得用于体外转录的线性化质粒。

[0100] 步骤b:将线性化的质粒进行体外共转录加帽反应,将7-甲基化鸟苷酸帽结构加至转录的mRNA的5'端,并对模板DNA进行降解。

[0101] (2) 非加帽mRNA疫苗制备

[0102] 步骤a:将实施例1中用于生产非加帽mRNA疫苗的载体质粒进行酶切线性化,获得用于体外转录的线性化质粒。

[0103] 步骤b:将线性化的质粒进行体外非加帽的转录反应,并对模板DNA进行降解。

[0104] (3) DNA疫苗制备

[0105] 步骤a:将实施例1中用于生产DNA疫苗的载体质粒进行扩增,获得大量用于纯化的目的质粒。

[0106] 步骤b:用去内毒素质粒提取及纯化试剂盒对目的质粒进行提取纯化。

[0107] 实施例3 本发明重组核酸体外转录质量控制及疫苗制备

[0108] 以实施例2中的加帽mRNA疫苗制备的方法制备获得疫苗A(基于本发明的重组核酸

疫苗A)、疫苗B(基于本发明的重组核酸疫苗B)、疫苗C(基于本发明的重组核酸疫苗C)。对生产的重组核酸进行纯度检测,用于实验的重组核酸纯度均大于85%,基于本发明的重组核酸质量控制峰图如图2A、图2B、图2C所示。具体描述为:(1)基于本发明的重组核酸疫苗A,纯度为90.8%;(2)基于本发明的重组核酸疫苗B,纯度为89.1%;(3)基于本发明的重组核酸疫苗C,纯度为91.5%。上述纯度均符合细胞转染实验和生产疫苗的质量要求。

[0109] 实施例4 本发明重组核酸的体外表达效果

[0110] 通过细胞转染试剂,将实施例3中的疫苗A、B转染至HEK293T细胞中,体外培养48小时后收集蛋白,进行Western blot检测。

[0111] 图3A、图3B、图3C展示了疫苗A、B、C转染HEK293细胞的体外表达WB(Western blot)检测结果,其中疫苗A所表达的抗原为细胞免疫抗原,理论上能够在细胞裂解物中检测到显著表达;疫苗B、C所表达的抗原为体液免疫抗原,理论上能够在上清中检测到显著表达。含有多个细胞免疫抗原的疫苗能够在细胞裂解物中检测到蛋白显著表达;含有多个体液免疫抗原的疫苗能够在上清中检测到蛋白显著表达。疫苗A、B、C的蛋白分子量如表2所示。

[0112] 其中,疫苗A能够在细胞内显著表达,证明本发明所提供的促使抗原融合表达的分子架构可以使多个抗原在真核细胞中顺利翻译、正确折叠,并且结构稳定、半衰期长。疫苗B能够在上清中显著表达,证明本发明提供的促进融合蛋白分泌表达的分子架构能够使多个抗原在真核细胞中顺利翻译、正确折叠、分泌到胞外。疫苗C能够在上清中显著表达,证明本发明所提供的体液免疫抗原靶点可以在真核细胞中顺利翻译、正确折叠、分泌到胞外。因此,基于本发明设计的疫苗,无论是单个抗原还是抗原组合,均能够在真核细胞中正确表达,且表达的蛋白结构正确、稳定,有利于免疫表位呈递。

[0113] 表2 疫苗A、B、C的蛋白分子量

名称	蛋白分子量(kDa)
疫苗A	82.9
疫苗B	77.5
疫苗C	65.2

[0115] 实施例5 基于本发明的重组核酸疫苗在小鼠乳腺炎模型中的治疗效果

[0116] 为了验证细胞免疫抗原融合分子是否具备免疫保护效果,本实施例选用疫苗A、疫苗C进行免疫治疗实验。

[0117] 实验选用8周龄的Balb/c品系雌性小鼠共16只,体型体重相似,适应性饲养3~7天后,合笼产仔。在泌乳第4-5天,用低剂量*S. aureus*对母鼠进行乳腺炎造模,用于免疫治疗实验。具体如表3所示。

[0118] 表3 实施例5小鼠乳腺炎模型建模方式

组别	只数	攻毒建模	
		菌种	攻毒剂量
1	6	<i>S. aureus</i>	50 MI/teat 10 CFU/mL
2	6		
3	4		

[0120] 按上述方式建立小鼠乳腺炎模型,共3组。免疫及治疗流程如表4所示,本表以及下

文中剂量指活性成分量。

[0121] 表4 实施例5免疫实验动物的治疗日程

组别	免疫流程		
	疫苗	剂量	日程
1	PBS	100 μ L/只/次	Day0: 首免 Day4: 二免 Day7: 三免 Day10: 四免 Day14: 五免
2	A	10 μ g (100 μ L) /只/次	
3	C		

[0123] 注:PBS指用PBS溶液替代疫苗,是对照组(非治疗组),作为免疫治疗实验的对照组。

[0124] 将上述各组小鼠按照表4的免疫流程进行五次免疫治疗,第17天(Day17)采集样品,检测组织载菌量。免疫及取样流程如图4所示。

[0125] 疫苗C治疗后的乳腺炎小鼠,其乳腺载菌量如图5A所示。由实验结果可知,疫苗C有治疗效果,但效果不显著($p>0.05$)。由此证明,基于本发明的含有单个抗原靶点的重组疫苗能够提供一定程度上的免疫治疗作用,但无法清除细菌定植。

[0126] 疫苗A治疗后的乳腺炎小鼠,其乳腺载菌量如图5B所示,结果显示,经过疫苗A治疗的小鼠,其乳腺载菌量显著降低($p<0.05$)。相较于对照组(~ 10000 CFU/g)的细菌载量,治疗组(疫苗A)有5/6(83.3%)的小鼠细菌载量在500 CFU/g以下,其中2只小鼠(33.3%)的细菌载量为0 CFU/g,代表其体内的金葡菌已被完全清除。由此证明,基于本发明的细胞免疫重组疫苗能够提供优秀的免疫治疗效果,在33.3%的个体中可以清除细菌定植。

[0127] 此外,通过组织切片和HE染色的方法,检测对照组和疫苗A治疗组小鼠的乳腺组织恢复情况(图6),以此评估疫苗A的治疗效果。由结果图可知,对照组的乳腺组织腺泡结构破坏严重,腺泡壁明显增厚,炎性细胞聚集在乳腺腺泡腔内。而疫苗A治疗组的炎性细胞浸润明显缓解,组织结构清晰完整。这一结果证明,对于金葡菌感染引起的乳腺炎,疫苗A能够提供良好的治疗效果。

[0128] 分析产生上述结果的原因,在于金黄色葡萄球菌具有多重免疫逃逸机制,能够通过自身分泌的多种毒力蛋白逃避宿主的免疫系统,因此单个抗原靶点无法提供良好的免疫保护。而基于本发明的多抗原靶点组合的疫苗,能够提供更多的免疫表位,有利于提高免疫治疗效果,在部分个体中实现定植细菌的清除。

[0129] 实施例6基于本发明的重组核酸疫苗在小鼠腹腔感染模型中的预防效果

[0130] 为了验证本发明的体液和细胞免疫重组核酸疫苗在免疫后是否能够具有预防金葡菌感染的效果,本实施例选用疫苗A、B进行实验。实验选用7周龄的Balb/c品系雄性小鼠共20只,体型体重相似。适应性饲养后,将小鼠随机分为4组,每组5只,用于免疫治疗实验。具体如表5所示。

[0131] 表5 实施例6免疫实验动物的免疫流程

组别	免疫流程		
	疫苗	剂量	注射方式
[0132] 6	A	5 μ g (100 μ L) /只/次	左腹股沟皮下注射
7	B	5 μ g (100 μ L) /只/次	左腹股沟皮下注射
8	A+B	疫苗 D: 5 μ g (100 μ L) /只/次 疫苗 E: 5 μ g (100 μ L) /只/次	疫苗 D: 左腹股沟皮下注射 疫苗 E: 右腹股沟皮下注射
9	PBS	100 μ L/只/次	左腹股沟皮下注射

[0133] 注:PBS指用PBS溶液替代疫苗,是对照组(非免疫组),作为免疫实验的对照组。

[0134] 将上述各组小鼠按照表5的免疫流程,分别在第0天(Day0)和第21天(Day21)进行两次免疫。第35天(Day35)时,小鼠腹腔注射500 μ l金黄色葡萄球菌菌液(1×10^8 CFU),注射后正常饲养,每天观察监测记录小鼠的临床表现。第38天(Day38)处死小鼠,采集样品,检测血液、腹腔液、脾脏载菌量。免疫及取样流程如图7所示。

[0135] 不同组别的小鼠攻毒后,血液载菌量如图8A所示,腹腔液载菌量如图8B所示,脾脏载菌量如图8C所示。由实验结果可知,经过疫苗免疫的小鼠,其血液、腹腔液、脾脏载菌量均极显著低于对照组($p < 0.001$)。证明三种免疫方案都能够诱导小鼠产生保护性免疫,且疫苗A和疫苗B均具备良好的预防效果。其中,疫苗A和疫苗B共同免疫具有最佳的预防效果:相较于对照组,血液载菌量(中位数)降低约18倍,腹腔液载菌量(中位数)降低约20倍,脾脏载菌量(中位数)降低约7000倍;疫苗B单独免疫的预防效果次之:相较于对照组,血液载菌量(中位数)降低约6倍,腹腔液载菌量(中位数)降低约12倍,脾脏载菌量(中位数)降低约3500倍;疫苗A单独免疫的预防效果再次之:相较于对照组,血液载菌量(中位数)降低约4倍,腹腔液载菌量(中位数)降低约5倍,脾脏载菌量(中位数)降低约2300倍。然而,不管是疫苗A还是疫苗B单独免疫,都提供了强大的免疫保护。

[0136] 综上所述,本发明提供的抗原和融合分子架构,能够诱导模式动物小鼠产生有效的免疫,针对金葡菌感染有治疗和预防的效果。因此,本发明能够应用于动物免疫药物的生产和研发,填补当前金葡菌核酸疫苗研发领域的空白,具有极高的商业价值及广阔的应用前景。

[0137] 本公开的上述实施例仅是为清楚地说明本公开所作的举例,而并非是对本公开的实施方式的限定。对于所属领域的普通技术人员来说,在上述说明的基础上还可以做出其他不同形式的变化或变动。这里无需也无法对所有的实施方式予以穷举。凡在本公开的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本公开权利要求的保护范围之内。

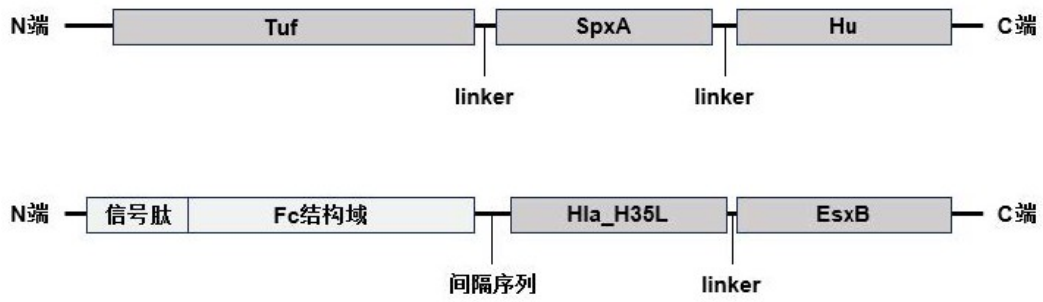


图1

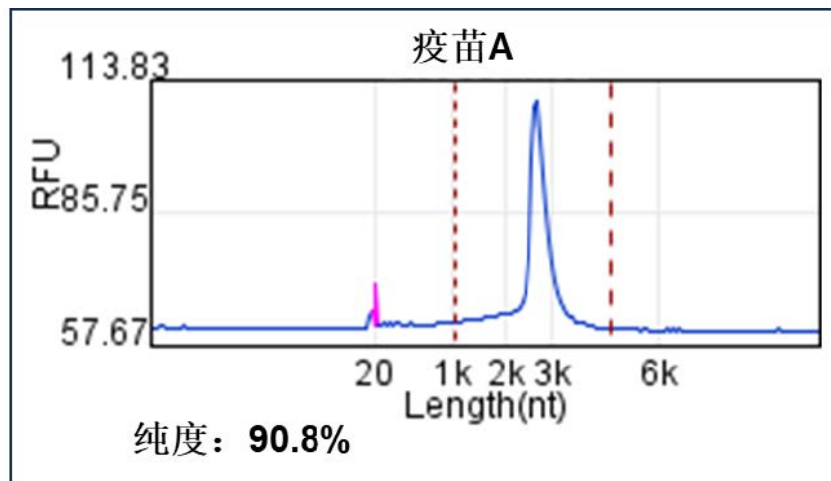


图2A

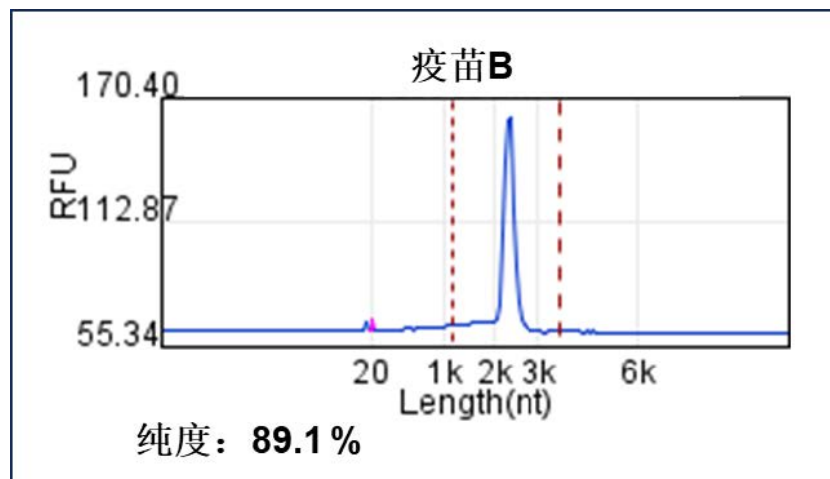


图2B

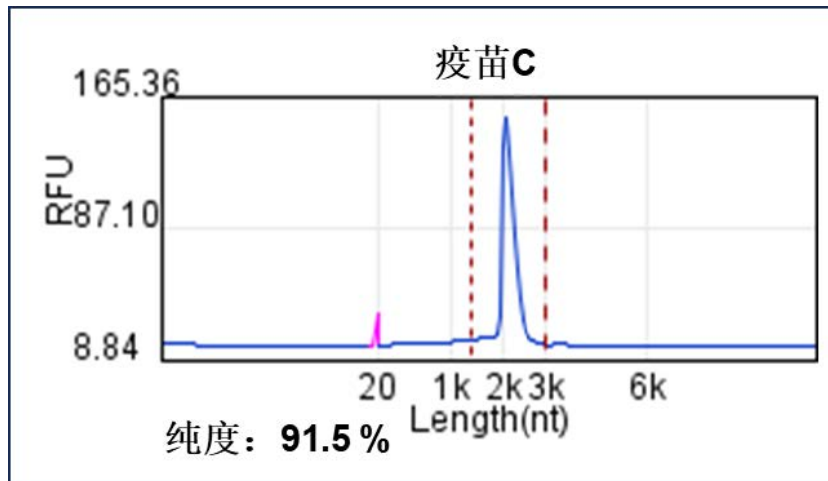


图2C

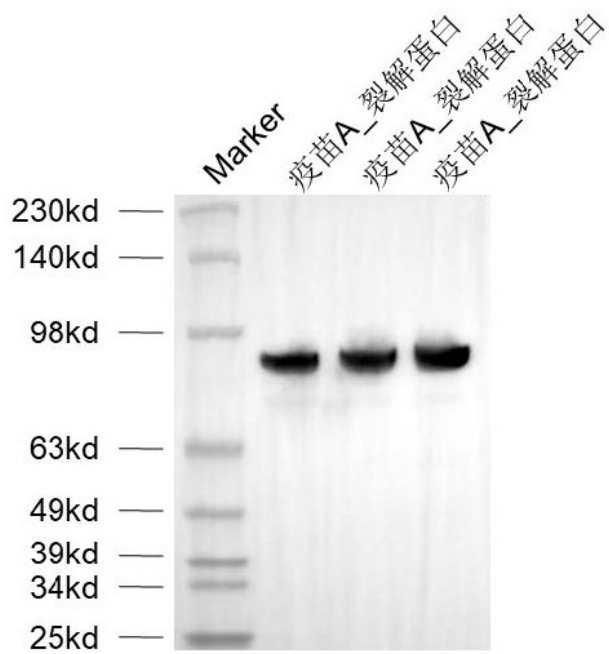


图3A

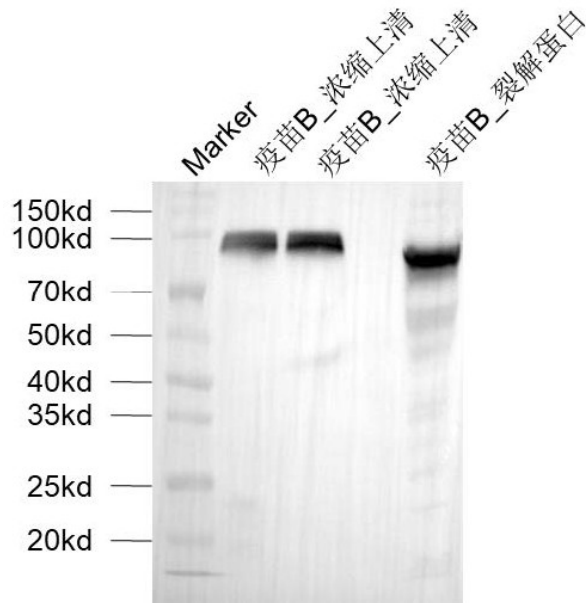


图3B

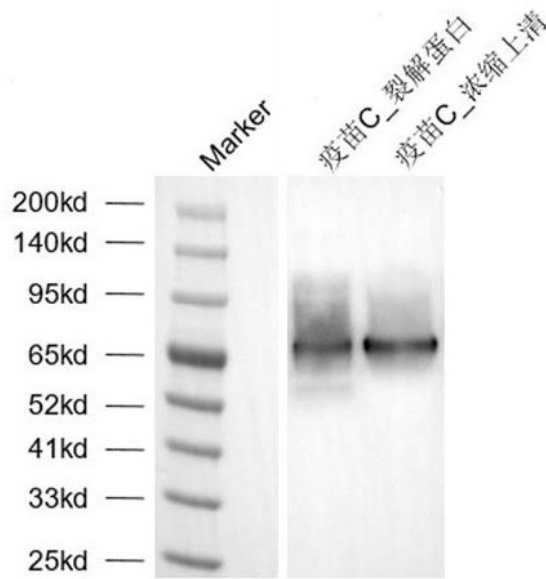


图3C

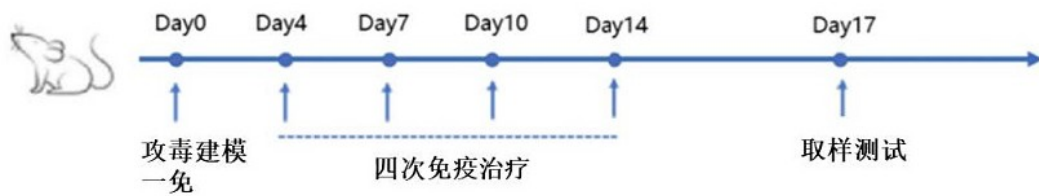


图4

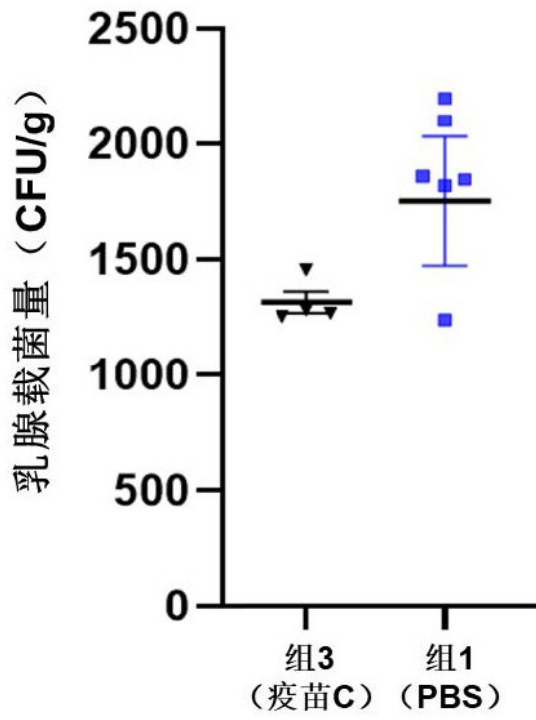


图5A

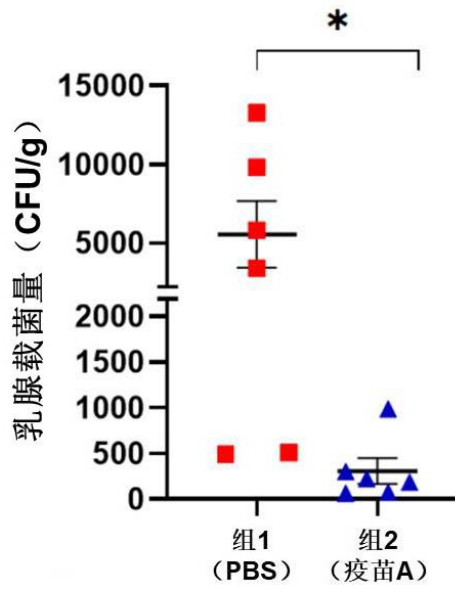
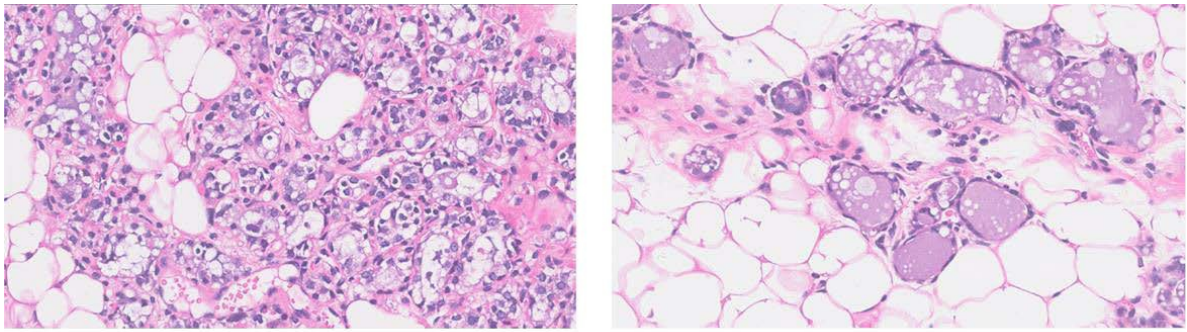


图5B



组1
(PBS)

组2
(疫苗A)

图6

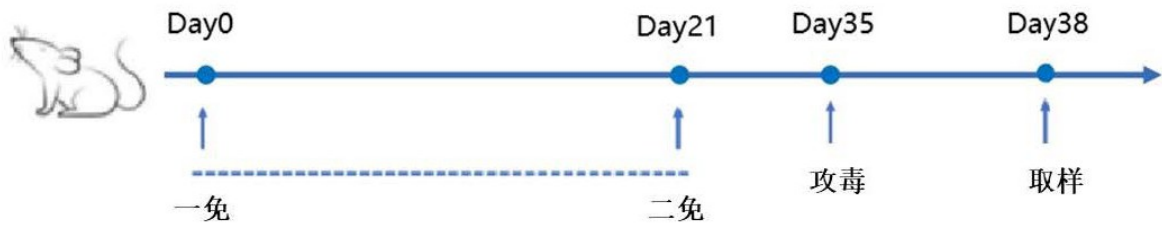


图7

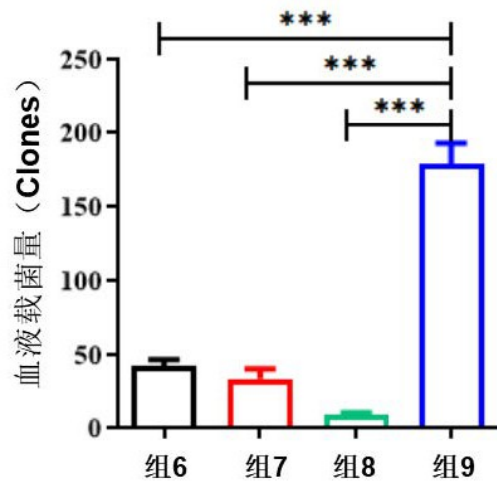


图8A

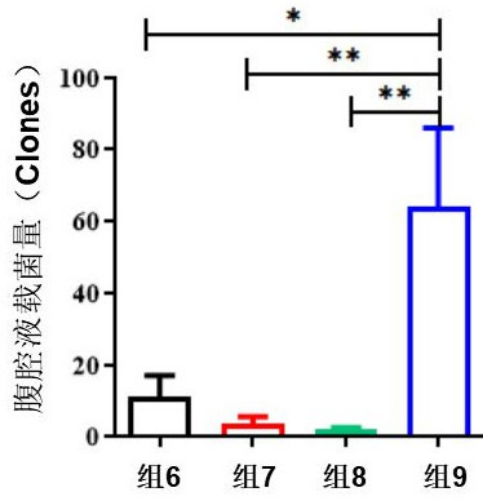


图8B

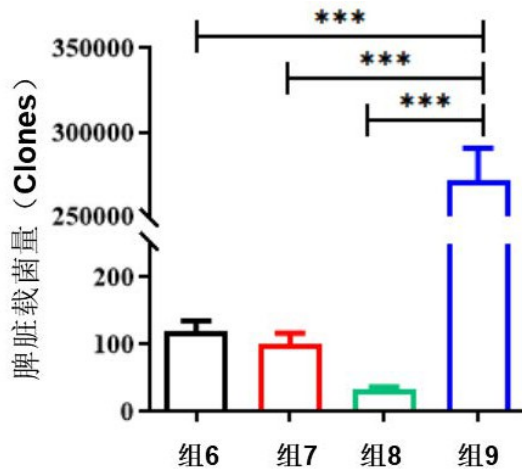


图8C