

发 明 专 利 请 求 书

用户案卷号L25020071F		此框内容由国家知识产权局填写		
④	发明名称	一种预防大肠埃希氏菌感染的疫苗及其应用	①申请号 ②分案提交日 ③申请日	
⑤	发明人	发明人 1 韩悌云 <input type="checkbox"/> 不公布姓名		
		发明人 2 徐实 <input type="checkbox"/> 不公布姓名		
		发明人 3 李静 <input type="checkbox"/> 不公布姓名		
第一发明人国籍 CN		身 份 证 件 号 码 620121198801195012		
⑥	申 请 人 (1)	姓名或名称: 江西澄实生物科技有限公司 用户代码	申请人类型 3	
		身份证件号码或统一社会信用代码91360301MACKY2N8XJ <input checked="" type="checkbox"/> 请求费减且已完成费减资格备案		电子邮箱
		国籍或注册国家(地区) CN		
		省、自治区、直辖市 360000		
		市县 360300		
		城区(乡)、街道、门牌号安源区经济技术开发区苏州东街60号208室		
		经常居所地或营业所所在地 CN	邮政编码337000	电话
	申 请 人 (2)	姓名或名称:	用户代码	申请人类型
		身份证件号码或统一社会信用代码 <input type="checkbox"/> 请求费减且已完成费减资格备案		
		国籍或注册国家(地区)		
		省、自治区、直辖市		
		市县		
		城区(乡)、街道、门牌号		
	经常居所地或营业所所在地	邮政编码	电话	
	申 请 人 (3)	姓名或名称:	用户代码	申请人类型
		身份证件号码或统一社会信用代码 <input type="checkbox"/> 请求费减且已完成费减资格备案		
		国籍或注册国家(地区)		
		省、自治区、直辖市		
		市县		
		城区(乡)、街道、门牌号		
	经常居所地或营业所所在地	邮政编码	电话	
⑦	姓 名	电 话		

发 明 专 利 请 求 书

<p>⑱ 请求实质审查</p>	<p><input type="checkbox"/> 根据专利法第 35 条的规定, 请求对该专利申请进行实质审查。 请求对本申请延迟审查, 延迟期限为 <input type="checkbox"/>1 年 <input type="checkbox"/>2 年 <input type="checkbox"/>3 年</p> <p><input type="checkbox"/> 申请人声明, 放弃专利法实施细则第 57 条规定的主动修改的权利。</p>
<p>⑲ 摘要附图</p>	<p>指定说明书附图中的图2为摘要附图。</p>
<p>⑳ 援引加入声明</p>	<p>本申请在递交日要求了优先权, 声明以援引加入方式补交缺少或者错误提交的文件。</p>
<p>㉑ 申请文件清单</p> <p>1. 权利要求书 共3页 2. 说明书 共16页 3. 说明书附图 共5页 4. 说明书摘要 共1页 5. 发明专利请求书 共5页 权利要求的项数 16 项</p>	<p>㉒ 附加文件清单</p> <p>1. S26 标准核苷酸或氨基酸序列表计算机可读载体 共0页 2. 实质审查请求书 共1页 总委托书(编号 ZW0125008550)</p>
<p>㉓ 代表人或专利代理机构</p> <p>北京纪凯知识产权代理有限公司</p> <p style="text-align: right; margin-top: 100px;">2025年03月04日</p>	

发 明 专 利 请 求 书 外 文 信 息 表

发明名称		
发明人姓名	发明人 1	
	发明人 2	
	发明人 3	
申请人名称及地址	申请人 1	名称 地址
	申请人 2	名称 地址
	申请人 3	名称 地址

附页

【发明人】

发明人 4	许梦微	<input type="checkbox"/> 不公布姓名
-------	-----	--------------------------------

发明人 5	费才溢	<input type="checkbox"/> 不公布姓名
-------	-----	--------------------------------

【发明人外文信息】

发明人 4	
-------	--

发明人 5	
-------	--

实质审查请求书

请按照“注意事项”正确填写本表各栏

① 专 利 申 请	申请号
	发明创造名称 一种预防大肠埃希氏菌感染的疫苗及其应用
	申请人（第一署名人）江西澄实生物科技有限公司
②请求内容： 根据专利法第 35 条的规定，请求对上述专利申请进行实质审查。	
③放弃主动修改权利 <input type="checkbox"/> 申请人声明，放弃专利法实施细则第 57 条规定的主动修改的权利。	
④请求延迟审查 请求对本申请延迟审查，延迟期限为 <input type="checkbox"/> 1 年 <input type="checkbox"/> 2 年 <input type="checkbox"/> 3 年	
⑤附件清单 已备案的证明文件备案编号：	
⑥备注 <input type="checkbox"/> 该申请为 PCT 国际申请，已由中国专利局作出国际检索报告及专利性国际初步报告，实质审查费减免 100% <input type="checkbox"/>	
⑦代表人或专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司	
2025年03月04日	

说明书摘要

本发明涉及一种预防大肠埃希氏菌感染的融合蛋白、免疫原性组合物、重组疫苗等。本发明提供一种可用于大肠埃希氏菌疫苗设计的新靶点 PstS，并且从 PstS、YidR 的蛋白分子三级结构出发，结合免疫表位等，最终筛选得到 PstS 蛋白和 YidR 蛋白及其变体的稳定结构域，构建得到融合蛋白。本发明的 PstS 单抗原蛋白分子或 PstS-YidR 融合蛋白分子均具有良好的免疫原性，可减弱大肠埃希氏菌感染引起的组织病变，具有良好的免疫原性，高效预防大肠埃希氏菌感染，具有广泛的应用前景。

摘要附图

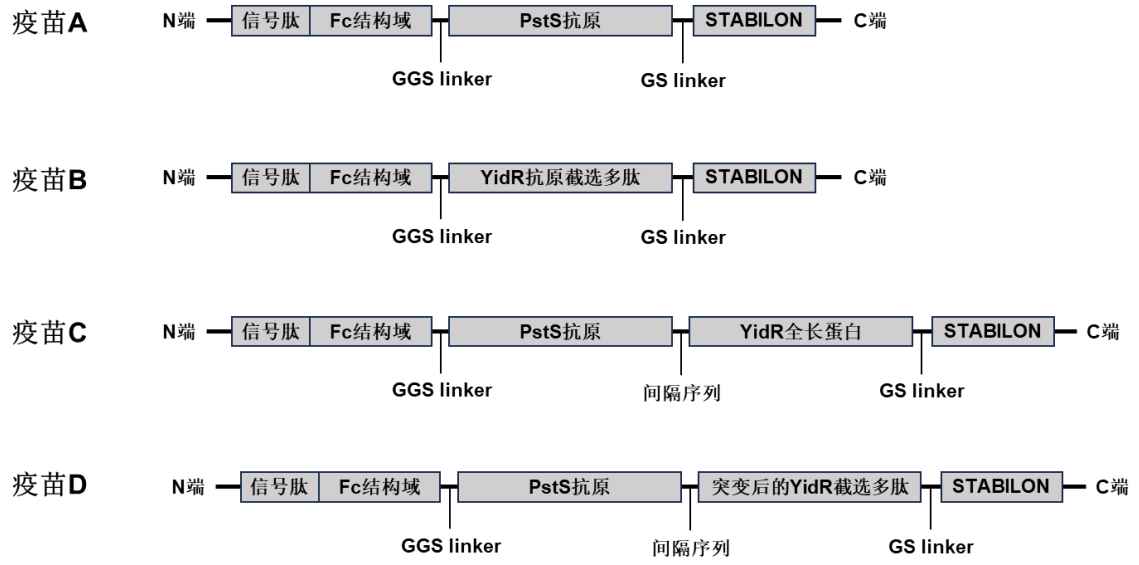


图 2

权利要求书

1. 一种用于预防大肠埃希氏菌感染的融合蛋白，其特征在于，包含磷酸结合蛋白 PstS (Phosphate-binding protein PstS) 抗原或其片段，所述 PstS 抗原蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示。

2. 根据权利要求 1 所述的融合蛋白，其特征在于，还包含 YidR 抗原 (DUF3748 domain-containing protein) 或其片段，所述 YidR 抗原或其片段包含 YidR 抗原全长蛋白，YidR 抗原截选多肽，或者突变后的 YidR 抗原截选多肽。

3. 根据权利要求 1 和 2 所述的融合蛋白，所述抗原或其片段来源于细菌；优选地，所述细菌为革兰氏阴性菌；优选地，所述革兰氏阴性菌为肠杆菌科细菌；优选地，所述肠杆菌科细菌为大肠埃希氏菌。

4. 根据权利要求 2 和 3 所述的融合蛋白，其特征在于，所述融合蛋白从 N 端到 C 端依次包含：所述 PstS 抗原或其片段、所述 YidR 抗原或其片段，其中，所述 YidR 抗原或其片段为 YidR 抗原全长蛋白，YidR 抗原截选多肽，或者突变后的 YidR 抗原截选多肽中的任意一种；优选地，所述 PstS 抗原或其片段的氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示，所述 YidR 抗原全长蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO.11 所示，所述 YidR 抗原截选多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO.2 所示，所述突变后的 YidR 抗原截选多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO.3 所示。

5. 根据权利要求 1-4 所述的融合蛋白，其特征在于，所述融合蛋白的 N 端还包含信号肽和/或人的免疫球蛋白重链恒定区 $\gamma 1$ 蛋白 (IGHG1) 的 Fc 结构域；或者，所述融合蛋白的 C 端还包含人 S5a/PSMD4 蛋白酶体亚基的 C 端多肽片段 STABILON。

6. 根据权利要求 5 所述的融合蛋白，其特征在于，所述信号肽来源于人的蓝啉 (Azurocidin) 蛋白，其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示；所述 IGHG1 的 Fc 结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示；所述 STABILON 的氨基酸序列如 SEQ ID NO.6 所示。

7. 根据权利要求 5 或 6 所述的融合蛋白，其特征在于，所述融合蛋白的不同元件之间可任选地通过 GGS linker 序列、间隔序列、和/或 GS linker 序列连接；优选地，所述间隔序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示，所述 GGS linker 序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 8 所示，所述 GS linker 序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示。

8. 根据权利要求 1-7 任一项所述的融合蛋白，其特征在于，包含以下 4 种融合蛋白的任意一种：

(1) 融合蛋白 A: 从 N 端到 C 端依次包含：信号肽、Fc 结构域、GGS linker、PstS 抗

权利要求书

原或其片段、GS linker、STABILON;

(2) 融合蛋白 B: 从 N 端到 C 端依次包含: 信号肽、Fc 结构域、GGs linker、YidR 抗原筛选多肽、间隔序列、YidR 抗原筛选多肽、GS linker、STABILON;

(3) 融合蛋白 C: 从 N 端到 C 端依次包含: 信号肽、Fc 结构域、GGs linker、PstS 抗原或其片段、间隔序列、YidR 抗原全长蛋白、GS linker、STABILON;

(4) 融合蛋白 D: 从 N 端到 C 端依次包含: 信号肽、Fc 结构域、GGs linker、PstS 抗原或其片段、间隔序列、突变后的 YidR 抗原筛选多肽、GS linker、STABILON;

优选地, 所述 PstS 抗原或其片段的氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示, 所述 YidR 抗原全长蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO.11 所示, 所述 YidR 抗原筛选多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO.2 所示, 所述突变后的 YidR 抗原筛选多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO.3 所示, 所述信号肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示, 所述 Fc 结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示, 所述 STABILON 的氨基酸序列如 SEQ ID NO.6 所示, 所述间隔序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示, 所述 GGs linker 序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 8 所示, 所述 GS linker 序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示;

更优选地, 所述融合蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO.10 所示。

9. 一种重组核酸分子, 其特征在于, 包含编码权利要求 1-8 任一项所述融合蛋白的核酸。

10. 一种重组基因表达盒, 其特征在于, 包含权利要求 9 所述重组核酸分子。

11. 一种重组载体, 其特征在于, 包含权利要求 9 所述重组核酸分子、或权利要求 10 所述重组基因表达盒。

12. 一种重组宿主细胞, 其特征在于, 包含权利要求 9 所述重组核酸分子、或权利要求 10 所述重组基因表达盒、或权利要求 11 所述重组载体。

13. 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 1-8 任一项融合蛋白, 和/或一种或多种权利要求 9 所述重组核酸分子, 和/或一种或多种权利要求 10 所述重组基因表达盒, 和/或一种或多种权利要求 11 所述重组载体, 和/或一种或多种权利要求 12 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; 更优选地, 所述免疫原性组合物或药物组合物还包含其他用于预防大肠埃希氏菌引起的疾病的药物; 最优选地, 所述其他用于预防大肠埃希氏菌引起的疾病的药物包含抗生素。

权 利 要 求 书

14. 一种重组疫苗，其特征在于，包含一种或多种权利要求 1-8 任一项融合蛋白，和/或一种或多种权利要求 9 所述重组核酸分子，和/或一种或多种权利要求 10 所述重组基因表达盒，和/或一种或多种权利要求 11 所述重组载体，和/或一种或多种权利要求 12 所述重组宿主细胞，和/或一种或多种权利要求 13 所述免疫原性组合物或药物组合物；优选地，所述重组疫苗为核酸疫苗或亚单位疫苗；更优选地，所述重组疫苗为核酸疫苗。

15. 一种或多种权利要求 1-8 任一项融合蛋白，和/或一种或多种权利要求 9 所述重组核酸分子，和/或一种或多种权利要求 10 所述重组基因表达盒，和/或一种或多种权利要求 11 所述重组载体，和/或一种或多种权利要求 12 所述重组宿主细胞，和/或一种或多种权利要求 13 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预防大肠埃希氏菌引起的疾病和/或继发性感染的药物中的用途。

16. 根据权利要求 15 所述的用途，其特征在于，所述大肠埃希氏菌引起的疾病和/或继发性感染包括肠道感染、尿路感染、败血症、菌血症、脑膜炎、腹膜炎、肺炎、乳腺炎、溶血性尿毒综合征；优选地，所述肠道感染包含肠炎和/或腹泻；优选地，所述尿路感染包含膀胱炎和/或肾盂肾炎。

一种预防大肠埃希氏菌感染的疫苗及其应用

技术领域

本发明属于生物医药技术领域，特别是免疫药物技术领域，具体涉及一种预防大肠埃希氏菌感染的体液免疫疫苗及其应用等。

背景技术

大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*)，又称大肠杆菌，是人类和动物肠道中最常见的共生细菌之一，也是引起多种感染性疾病的重要病原体，致病性大肠杆菌可引起严重的肠道和肠道外感染，对公共健康构成重大威胁。

致病性大肠杆菌可以侵染多种组织，并引起不同类型的感染和疾病，包括：肠道感染、尿路感染、败血症、菌血症、脑膜炎、腹膜炎、肺炎、乳腺炎、溶血性尿毒综合征等。临床上的大肠埃希氏菌感染主要依赖于抗生素治疗，然而随着细菌抗生素耐药性的不断增加，这些致病性大肠埃希氏菌的防控面临严峻挑战。

目前，市面上尚未出现针对大肠埃希氏菌感染的预防性疫苗，研究人员正在积极开发相关疫苗。例如，现有技术专利 CN106535927B（公开日 2017-03-22）公开了一种大肠埃希氏菌的多糖 O25B，专利 CN108430500B（公开日 2018-08-21）公开了一种预防肠外致病性大肠埃希氏菌感染的多糖缀合物。这些多糖疫苗旨在开发一种可针对单一类型致病性大肠埃希氏菌的疫苗，然而致病性大肠埃希氏菌的血清型（O 血清型）已超过 180 种，多糖疫苗迭代困难，交叉免疫保护程度低，无法满足当前市场对于大肠埃希氏菌疫苗的需求。

磷酸结合蛋白 PstS (Phosphate-binding protein PstS) 是磷酸盐特异性转运 (Pst) 系统的一部分，位于细菌周质空间，对磷酸盐具有较高亲和力。已有研究证明 PstS 可作为磷酸盐污染的生物传感器。例如，专利 CN114965403A（公开日 2022-08-30）公开了一种利用铜绿假单胞菌 PstS 蛋白构建磷酸盐生物传感器的方法。此外，在某些致病菌中，PstS 的表达与毒力因子产生相关，参与生物膜形成和宿主细胞黏附，然而尚未有研究报导 PstS 可作为大肠埃希氏菌的保护性抗原，应用于疫苗开发。

综上所述，开发一种能够针对多种致病性大肠埃希氏菌提供广谱保护、安全有效、易于生产的疫苗具有重要的科学意义和应用价值。这种疫苗不仅可以预防人类的多种感染，还可能应用于动物疾病预防，如预防奶牛乳腺炎，从而在公共卫生和经济层面带来显著益

处。因此，本发明针对上述问题，提出了一种新型融合蛋白设计方案，旨在开发一种高效、广谱的大肠埃希氏菌感染预防疫苗，有望同时应对 EHEC、MPEC、UPEC 等多种致病菌株的感染。

发明内容

针对现有技术的不足，本发明的目的是提供一种新的预防大肠埃希氏菌感染的融合蛋白、免疫原性组合物、重组疫苗以及分子架构设计和应用等。本发明提供一种可用于大肠埃希氏菌疫苗设计的新靶点 PstS，并且从大肠埃希氏菌高度保守的靶点 PstS、YidR 的蛋白分子三级结构出发，结合免疫表位等，设计融合蛋白。经创造性地筛选，最终选取 PstS 蛋白和 YidR 蛋白及其变体的稳定结构域构建得到融合蛋白，再进一步添加 Fc 结构域、STABILON 等元件。本发明发现新的融合蛋白分子可减弱大肠埃希氏菌感染引起的组织病变，具有良好的免疫原性，起到有效预防和免疫保护作用，高效预防大肠埃希氏菌感染，具有广阔的应用前景，可用于预防由大肠埃希氏菌引起的多种感染性疾病，如尿路感染、肠道感染、乳腺炎、败血症等。此外，本发明提供的分子设计策略也可为开发针对其他细菌病原体的疫苗提供参考。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。

本发明的一方面提供一种融合蛋白，其特征在于，包含磷酸结合蛋白 PstS (Phosphate-binding protein PstS) 抗原或其片段。

进一步地，所述融合蛋白还包含 YidR 抗原 (DUF3748 domain-containing protein) 或其片段，所述 YidR 抗原或其片段包含 YidR 抗原全长蛋白，YidR 抗原截选多肽，或者突变后的 YidR 抗原截选多肽。

进一步地，所述抗原或其片段来源于细菌。

进一步地，所述细菌为革兰氏阴性菌。

进一步地，所述革兰氏阴性菌为肠杆菌科细菌。

进一步地，所述肠杆菌科细菌为大肠埃希氏菌。

进一步地，所述融合蛋白从 N 端到 C 端依次包含：所述 PstS 抗原或其片段、所述 YidR 抗原或其片段，其中，所述 YidR 抗原或其片段为 YidR 抗原全长蛋白，YidR 抗原截选多肽，或者突变后的 YidR 抗原截选多肽中的任意一种。

进一步地，所述 PstS 抗原或其片段的氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示，所述 YidR 抗

说明书

原全长蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO.11 所示, 所述 YidR 抗原截选多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO.2 所示, 所述突变后的 YidR 抗原截选多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO.3 所示。

进一步地, 所述融合蛋白的 N 端还包含信号肽和/或人的免疫球蛋白重链恒定区 γ 1 蛋白 (IGHG1) 的 Fc 结构域; 或者, 所述融合蛋白的 C 端还包含人 S5a/PSMD4 蛋白酶体亚基的 C 端多肽片段 STABILON。

进一步地, 所述信号肽来源于人的蓝啉 (Azurocidin) 蛋白, 其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示; 所述 IGHG1 的 Fc 结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示; 所述 STABILON 的氨基酸序列如 SEQ ID NO.6 所示。

进一步地, 所述融合蛋白的不同元件之间可任选地通过 GGS linker 序列、间隔序列、和/或 GS linker 序列连接。

进一步地, 所述间隔序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示, 所述 GGS linker 序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 8 所示, 所述 GS linker 序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示。

进一步地, 包含以下 4 种融合蛋白的任意一种:

(1) 融合蛋白 A: 从 N 端到 C 端依次包含: 信号肽、Fc 结构域、GGS linker、PstS 抗原或其片段、GS linker、STABILON;

(2) 融合蛋白 B: 从 N 端到 C 端依次包含: 信号肽、Fc 结构域、GGS linker、YidR 抗原截选多肽、间隔序列、YidR 抗原截选多肽、GS linker、STABILON;

(3) 融合蛋白 C: 从 N 端到 C 端依次包含: 信号肽、Fc 结构域、GGS linker、PstS 抗原或其片段、间隔序列、YidR 抗原全长蛋白、GS linker、STABILON;

(4) 融合蛋白 D: 从 N 端到 C 端依次包含: 信号肽、Fc 结构域、GGS linker、PstS 抗原或其片段、间隔序列、突变后的 YidR 抗原截选多肽、GS linker、STABILON;

进一步地, 所述 PstS 抗原或其片段的氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示, 所述 YidR 抗原全长蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO.11 所示, 所述 YidR 抗原截选多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO.2 所示, 所述突变后的 YidR 抗原截选多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO.3 所示, 所述信号肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示, 所述 Fc 结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示, 所述 STABILON 的氨基酸序列如 SEQ ID NO.6 所示, 所述间隔序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示, 所述 GGS linker 序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 8 所示, 所述 GS linker 序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示;

进一步地, 所述融合蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO.10 所示。

说明书

本发明的另一方面提供一种重组核酸分子，其特征在于，包含编码本发明任一项所述融合蛋白的核酸。

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。

进一步地，所述重组基因表达盒还包括启动子、终止子、调控序列中的一种或多种。

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。

进一步地，所述重组载体包含原核载体或真核载体。

进一步地，所述原核载体包含但不限于大肠杆菌载体。

进一步地，所述大肠杆菌载体包含但不限于 pET 载体、pGEX 载体、pMAL 载体、pBAD 载体、pUC 载体、pBR 载体。

进一步地，所述真核载体包含但不限于酵母表达载体、昆虫表达载体、哺乳动物细胞表达载体。

进一步地，所述酵母表达载体包含但不限于 pPICZ 载体、pGAPZ 载体、pYES 载体、pGAP 载体、pAO815 载体、pPIC9 载体。

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。

进一步地，所述重组宿主细胞包含真核细胞或原核细胞。

进一步地，所述真核细胞包含哺乳动物细胞、昆虫细胞、酵母细胞。

进一步地，所述酵母细胞包含但不限于酿酒酵母、毕赤酵母、汉逊酵母。

进一步地，所述原核细胞包含但不限于大肠杆菌细胞、枯草芽孢杆菌细胞、假单胞菌细胞。

进一步地，所述大肠杆菌细胞包含但不限于 BL21 (DE3)、DH5 α 、TOP10、Rosetta。

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任一项融合蛋白，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。

进一步地，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。

进一步地，所述免疫原性组合物或药物组合物还包含其他用于预防大肠埃希氏菌引起

的疾病的药物。

进一步地，所述其他用于预防大肠埃希氏菌引起的疾病的药物包含抗生素。

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任一项融合蛋白，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。

进一步地，所述重组疫苗为核酸疫苗或亚单位疫苗。

进一步地，所述重组疫苗为核酸疫苗。

本发明的另一方面提供一种或多种本发明任一项融合蛋白，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预防大肠埃希氏菌引起的疾病和/或继发性感染的药物中的用途。

本发明的另一方面提供一种预防大肠埃希氏菌引起的疾病和/或继发性感染的方法，其特征在于，包括向受试者给予一种或多种本发明任一项融合蛋白，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。

进一步地，所述大肠埃希氏菌引起的疾病和/或继发性感染包括肠道感染、尿路感染、败血症、菌血症、脑膜炎、腹膜炎、肺炎、乳腺炎、溶血性尿毒综合征。

进一步地，所述肠道感染包含肠炎和/或腹泻。

进一步地，所述尿路感染包含膀胱炎和/或肾盂肾炎。

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：

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，可针对大肠埃希氏菌的感染提供有效的免疫保护。

2. 本发明可作为核酸疫苗或亚单位疫苗的通用抗原架构，具有强免疫原性，相较于传统疫苗，能够不受血清型限制，诱导广谱的免疫保护。

3. 本发明采用反向疫苗学策略来筛选大肠埃希氏菌的潜在抗原，最终鉴定出包含 PstS、

YidR 在内的多个候选抗原。基于免疫表位预测分析,评估确定 PstS、YidR 为最佳候选抗原。此外,为了改善候选抗原的表达情况、提高抗原的免疫原性等特性,对已知 PstS、YidR 抗原进行了 N 端截短或者个别位点的氨基酸突变。

4. 本发明从 PstS、YidR 的蛋白分子三级结构出发,结合免疫表位,设计能够稳定表达的融合蛋白。经创造性地筛选,最终选取 PstS 蛋白和 YidR 蛋白及其变体的稳定结构域构建得到融合蛋白,筛选后的多肽片段具有完整、稳定的 3D 结构。

5. 本发明实施例 6 表明,基于本发明的融合分子能够有效促进细菌蛋白在真核细胞中高丰度表达、分泌,且表达的蛋白结构正确、稳定,有利于免疫表位呈递,从而进一步提高免疫保护效果,为大肠埃希氏菌多价疫苗的免疫药物设计领域提供新技术。

6. 本发明实施例 7 中的小鼠灌胃感染模型实验表明,在回肠和结肠组织中,接种本发明疫苗的小鼠组相比 PBS 对照组,细菌载量显著降低。统计分析显示,这种降低具有显著性差异 ($P < 0.001$)。这一结果证明,基于本发明的疫苗能够有效减少肠道中的大肠埃希氏菌定植,提供有效的局部免疫保护。

7. 本发明实施例 7 通过组织切片和 HE 染色的方法进行深入检测,结果进一步证实了本发明疫苗的保护效果。具体表现如下: a) 在结肠组织中,正常对照组(未经感染和免疫处理)的小鼠肠绒毛结构完整,未出现明显病变和炎症浸润。这为评估其他组的病理变化提供了基准。b) PBS 对照组(即接受细菌攻击但未接种疫苗的组)的小鼠肠道表现出严重的病理变化,肠黏膜下层出现大量炎性细胞浸润聚集。这反映了大肠埃希氏菌感染对肠道组织的显著损害。c) 接种本发明疫苗的小鼠组虽然出现了轻微的病理改变(肠绒毛少量溶解,粘膜层出现炎性细胞浸润聚集),但与 PBS 对照组相比,其病变程度明显较轻。这表明本发明的疫苗能够显著减轻大肠埃希氏菌感染引起的组织病变。

8. 基于本发明实施例 7 综合细菌载量和组织病理学结果显示,本发明的疫苗展现出双重保护效果:一方面显著降低了肠道中的细菌数量,另一方面有效减轻了感染引起的组织病变。这种全面的保护作用为本发明疫苗的潜在临床应用奠定了坚实的基础。

9. 本发明提供的融合蛋白疫苗展现出优异的免疫原性和保护效果,在预防大肠埃希氏菌感染方面具有巨大潜力。这种新型疫苗设计策略为开发针对其他细菌病原体的疫苗提供了参考。

附图说明

图 1A-图 1B 为本发明 PstS 两种融合蛋白 3D 结构示意图；其中，图 1A 为 PstS-YidR 全长蛋白的融合蛋白 3D 结构示意图，图 1B 为 PstS-YidR 截选多肽的融合蛋白 3D 结构示意图。

图 2 为本发明实施例中对比实验所用疫苗 A、疫苗 B、疫苗 C、疫苗 D 的分子结构示意图。

图 3 为含有本发明融合蛋白分子架构的环状质粒示意图。

图 4A-D 为本发明实施例中对比实验所用核酸疫苗的质量控制峰图以及纯度检测结果；其中，图 4A 为疫苗 A 的质量控制峰图以及纯度检测结果，图 4B 为疫苗 B 的质量控制峰图以及纯度检测结果，图 4C 为疫苗 C 的质量控制峰图以及纯度检测结果，图 4D 为疫苗 D 的质量控制峰图以及纯度检测结果。

图 5A-图 5C 为本发明疫苗 A、B、C、D 转染 HEK293 细胞的体外表达 WB(Western blot) 检测结果，其中图 5A 为疫苗 A 转染 HEK293 细胞的体外表达 WB 检测结果，图 5B 为疫苗 B 转染 HEK293 细胞的体外表达 WB 检测结果，图 5C 为疫苗 C 和疫苗 D 转染 HEK293 细胞的体外表达 WB 检测结果。。

图 6 为本发明小鼠灌胃感染实验的免疫、攻毒、取样流程示意图。

图 7A-图 7B 为本发明免疫、攻毒后各实验组的小鼠回肠、结肠组织的细菌载量检测结果；其中，图 7A 为免疫攻毒后小鼠的回肠组织载菌量（平板菌落数量）对比分析图，图 7B 为免疫攻毒后小鼠的结肠组织载菌量（平板菌落数量）对比分析图。

图 8 为免疫、攻毒后小鼠结肠组织的病理组织切片染色结果。

具体实施方式

术语和定义

术语"大肠埃希氏菌"指 *Escherichia coli*，又称大肠杆菌，是一种革兰氏阴性、杆状、兼性厌氧菌，属于肠杆菌科。

术语"大肠埃希氏菌感染"指由大肠埃希氏菌引起的各种疾病，包括尿路感染、腹泻、败血症、脑膜炎等。

术语"PstS"指磷酸盐特异性转运系统底物结合蛋白（Phosphate-specific transport system substrate-binding protein），是大肠埃希氏菌磷酸盐转运系统的重要组成部分。优选地，PstS

的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示。

术语"YidR"指大肠埃希氏菌中的一种保守蛋白，含有 DUF3748 结构域（DUF3748 domain-containing protein），其功能尚未完全阐明，但可能参与细菌的应激反应和生物膜形成。优选地，YidR 或其变体的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11、2 或 3 所示。

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。

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）、淋巴结内、真皮内、腹膜内、直肠或阴道给药，或通过联用的途径。

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。

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。

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。

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。

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。

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。

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。

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）。

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。

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。

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。

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。

本发明公开了一种新的大肠埃希氏菌疫苗的制备方法及应用。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进行改动或适当变更与组合，来实现和应用本发明技术。

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。根据本领域常规的分子克隆、表达构建、疫苗制备、免疫等基础知识，本领域技术人员均可以实施实现本发明的实施例方法。

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。

实施例 1 PstS 抗原筛选

由于大肠埃希氏菌抗原具有血清型的局限性，因此本发明采用反向疫苗学策略来筛选大肠埃希氏菌的潜在抗原。筛选的主要目标是寻找在转录组中高丰度表达，且在不同大肠埃希氏菌亚型中高度保守的抗原。

具体筛选步骤如下：

- (1) 收集不同亚型大肠埃希氏菌菌株的转录组数据。
- (2) 对转录组数据进行生物信息学分析，鉴定高丰度表达的基因。

(3) 通过比较基因组学方法，分析这些高表达基因在不同亚型间的保守性。

经过上述系统性筛选，本发明最终鉴定出包含 PstS、YidR 在内的多个候选抗原。随后，基于免疫表位预测分析，评估确定 PstS、YidR 为最佳候选抗原。

此外，为了改善候选抗原的表达情况、提高抗原的免疫原性等特性，对已知 PstS、YidR 抗原进行了 N 端截短或者个别位点的氨基酸突变。

实施例 2 PstS-YidR 蛋白的融合蛋白设计

实施例 1 中的筛选结果，对 PstS、YidR 做融合蛋白设计，与 PstS 单抗原疫苗做对比，以期获得免疫保护效果更佳的疫苗。

基于多抗原疫苗设计需求，PstS-YidR 融合蛋白需要具备稳定三维构象，才能更好地表达、分泌，并且提供更多的表位信息，提高抗原的免疫原性。因此，本发明从 PstS-YidR 融合蛋白的三级结构出发，结合免疫表位筛选，构建出两种融合蛋白分子：

- (1) PstS 抗原蛋白与 YidR 抗原全长蛋白融合；
- (2) PstS 抗原蛋白与 YidR 抗原截选稳定结构域多肽融合。

如图 1A (PstS-YidR 全长蛋白的融合蛋白 3D 结构示意图) 和图 1B (PstS-YidR 截选多肽的融合蛋白 3D 结构示意图) 所示，两种方式构建的融合蛋白均具有稳定、完整的空间构象，且两个抗原的结构互不干扰。理论上均符合融合分子表达需求。因此，将两种融合蛋白作为抗原序列，用于本发明后续实施例的疫苗设计及对比试验。

实施例 3 重组核酸疫苗的构建

为了制备包含本发明抗原的重组核酸疫苗，并对比基于本发明的疫苗是否具有良好的体外表达效果，示例性的，实施例中涉及的疫苗分子架构示意图如图 2 所示，从 N 端到 C 端依次包含如下元件：信号肽、Fc 结构域、目标抗原区、STABILON，各元件可直接相连，也可通过不同的 linker 相连，比如 GGS linker、间隔序列或 GS linker。图 2 示意的疫苗 A、疫苗 B、疫苗 C、疫苗 D 四种疫苗区别在于目标抗原区不同，目标抗原分别为 PstS 抗原、PstS 抗原和 YidR 抗原全长蛋白（二者之间可通过间隔序列相连）、PstS 抗原和 YidR 抗原截选多肽（二者之间可通过间隔序列相连）、PstS 抗原和突变后的 YidR 抗原截选多肽（二者之间可通过间隔序列相连）。为了制备能够产生如图 2 所示蛋白的重组核酸疫苗，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，如图 3 所示，得到用于制备重组核酸疫苗的载体质粒。

根据上述方法，制备用于后续实施例的载体：

（1）基于本发明的重组核酸疫苗 A 制备载体

步骤 a：合成“信号肽-人 IGHG 的 Fc 结构域-PstS 抗原-STABILON”融合基因片段，人 IGHG 的 Fc 结构域、PstS 抗原之间通过氨基酸序列如 SEQ ID NO: 8 所示的 GGS linker 序列连接，PstS 抗原、STABILON 之间通过氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示的 GS linker 序列连接，信号肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示，人 IGHG 的 Fc 结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示，PstS 抗原的氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示，STABILON 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 6 所示。

步骤 b：构建核酸疫苗架构载体。

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。

步骤 c：制备重组质粒。

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（图 3 所示）。

（2）基于本发明的重组核酸疫苗 B 制备载体

步骤 a：合成“信号肽-人 IGHG 的 Fc 结构域-YidR 抗原截选多肽-STABILON”融合基因片段，人 IGHG 的 Fc 结构域、YidR 抗原截选多肽之间通过氨基酸序列如 SEQ ID NO: 8 所示的 GGS linker 序列连接，YidR 抗原截选多肽、STABILON 之间通过氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示的 GS linker 序列连接，信号肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示，人 IGHG 的 Fc 结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示，YidR 抗原截选多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO.2 所示，STABILON 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 6 所示。

步骤 b：构建核酸疫苗架构载体。

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。

步骤 c: 制备重组质粒。

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 B 制备载体 (图 3 所示)。

(3) 基于本发明的重组核酸疫苗 C 制备载体

步骤 a: 合成“信号肽-人 IGHG 的 Fc 结构域-PstS 抗原-YidR 全长蛋白-STABILON”融合基因片段, 人 IGHG 的 Fc 结构域、PstS 抗原之间通过氨基酸序列如 SEQ ID NO: 8 所示的 GGS linker 序列连接, PstS 抗原、YidR 全长蛋白之间通过氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示的间隔序列连接, YidR 全长蛋白、STABILON 之间通过氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示的 GS linker 序列连接, 信号肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示, 人 IGHG 的 Fc 结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示, PstS 抗原的氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示, YidR 全长蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示, STABILON 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 6 所示。

步骤 b: 构建核酸疫苗架构载体。

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。

步骤 c: 制备重组质粒。

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 (图 3 所示)。

(4) 基于本发明的重组核酸疫苗 D 制备载体

步骤 a: 合成“信号肽-人 IGHG 的 Fc 结构域-PstS 抗原-突变后的 YidR 抗原截选多肽-STABILON”融合基因片段, 人 IGHG 的 Fc 结构域、PstS 抗原之间通过氨基酸序列如 SEQ ID NO: 8 所示的 GGS linker 序列连接, PstS 抗原、突变后的 YidR 抗原截选多肽之间通过氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示的间隔序列连接, 突变后的 YidR 抗原截选多肽、STABILON 之间通过氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示的 GS linker 序列连接, 信号肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示, 人 IGHG 的 Fc 结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示, PstS 抗原的氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示, 突变后的 YidR 抗原截选多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示, STABILON 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 6 所示。

步骤 b: 构建核酸疫苗架构载体。

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

说明书

载体或生产 DNA 疫苗的载体。

步骤 c: 制备重组质粒。

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 D 制备载体 (图 3 所示)。

表 1 本发明所涉及的蛋白氨基酸序列

	氨基酸序列以及序列编号
PstS 抗原	EASLTGAGATFPAPVYAKWADTYQKETGNKVNYQGIGSSGGVKQII ANTVDFGASDAPLSDEKLAQEGLFQFPTVIGGVVLA VNPGLKSGEL VLDGKTLGDIYLGKIKKWDDEAIAKLNPLKLP SQNIAVRRADGS GTSFVFTSYLAKVNEEWKNNVGTGSTVKWP IGLGGKGNDGIAAFV QRLPGAIGYVEYAYAKQNNLAYTKLISADGKPVSPTEENFANA AKG ADWSKTFAQDLTNQKGEDAWPITSTTFILHKDQKKPEQGTEVLKFF DWAYKTGAKQANDLDYASLPDSVVEQVRAAWKTNIKDSSGKPLY (SEQ ID NO: 1)
YidR 抗原截选多肽片段	RAMKQITFAPRNHLLTNTNTWTPDSQWL VFDVRPSGASFTGETIERV NIHTGEVEVIYRASQGAHVGVVTVHPKSEKYVFIHG PENPDETWY DFHHRGVIAEGGKVS NLDAMDITAPYTPGALRGGSHVHV FSPNGE RVSFTYNDHVMHELD PALDLRNVGVAAPFGPVNVQKQHPREYSGS HWCVLVSKTTPTPQGSDEINRAYEEGWVGNHALAFIGDTLSPKGE KVPELFIVELPQDEAGWKAAGDAPLSGTETTL PAPPRGVVQRRLTFT HHRAYPGLVNVPRHWVRCNPQGTQIAFLMRDDNGIMQLWLISPQG GEPRLTHQKTDIQSAFNWHPSGEWLGFVLDNR IACAHAQS GEVEY LTENHANPPSADAVV FSPDGQWLAWMEGGQLWITETDR (SEQ ID NO: 2)
突变后的 YidR 抗原截选多肽	RAMKQITFAPRNHLLTNTNTWTPDSQWL VFDVRPSGASFTGETIERV NIHTGEVEVIYRASQGAHVGVVTVHPKSEKYVFIHG PENPDETWY DFHHRGVIAEGGKVS NLDAMDITAPYTPGALRGGSHVHV FSPNGE RVSFTYNDHVMHELD PALDLRNVGVAAPFGPVNVQKQHPREYSGS HWCVLVSKATPAPQGSDEINRAYEEGWVGNHALAFIGDTLSPKGE KVPELFIVELPQDEAGWKAAGDAPLSGTEATL PAPPRGVVQRRLTFA HHRAYPGLVNVPRHWVRCNPQGTQIAFLMRDDNGIMQLWLISPQG GEPRLTHNKTDIQSAFNWHPSGEWLGFVLDNR IACAHAQS GEVEY LTENHANPPSADAVV FSPDGQWLAWMEGGQLWITETDR (SEQ ID NO: 3)
信号肽	MTRLTVLALLAGLASSRA (SEQ ID NO: 4)
人 IGHG 的 Fc 结构域	EPKSCDKTHTCPPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 5)
STABILON	KDGKDKKEEDKK (SEQ ID NO: 6)
间隔序列	GGSGGGSGG (SEQ ID NO: 7)
GGs linker	GGSGSGSGG (SEQ ID NO: 8)
GS linker	GSGSGG (SEQ ID NO: 9)
PstS-截短 YidR 融合蛋白	EASLTGAGATFPAPVYAKWADTYQKETGNKVNYQGIGSSGGVKQII ANTVDFGASDAPLSDEKLAQEGLFQFPTVIGGVVLA VNPGLKSGEL VLDGKTLGDIYLGKIKKWDDEAIAKLNPLKLP SQNIAVRRADGS GTSFVFTSYLAKVNEEWKNNVGTGSTVKWP IGLGGKGNDGIAAFV

	<p>QRLPGAIGYVEYAYAKQNNLAYTKLISADGKPVSPTEENFANAAGK ADWSKTFAQDLTNQKGEDAWPITSTTFILIHKDQKKPEQGTEVLKFF DWAYKTGAKQANDLDYASLPDSVVEQVRAAWKTNIKDSSGKPLYG GSGGGGSGGRAMKQITFAPRNHLLTNTNTWTPDSQWLVDVVRPSGA SFTGETIERVNIHTGEVEVIYRASQGAHVGVVTVHPKSEKYVFIHGPE NPDETWHYDFHHRGVIAEGGKVS NLDAMDITAPYTPGALRGGSH VHVFPNGERVSFTYNDHVMHELDPALDLRNVGVAAPFGPVNVQK QHPREYSGSHWCVLVSKTTPTPQPGSDEINRAYEEGWVGNHALAFI GDTLSPKGEKVPPELVLPQDEAGWKAAGDAPLSGTETTLPPRGRG VVQRRLTFTHHRAYPGLVNVPRHWVRCNPQGTQIAFLMRDDNGIM QLWLISPQGGEPQLTHQKTDIQSAFNWHPSGEWLGFVLDNRIACA HAQSGEVEYL TENHANPPSADAVVFPDGGQWLAWMEGGQLWITET DR (SEQ ID NO: 10)</p>
YidR 抗原全长蛋白	<p>MMAGPVLYQDRAMKQITFAPRNHLLTNTNTWTPDSQWLVDVVRPS GASFTGETIERVNIHTGEVEVIYRASQGAHVGVVTVHPKSEKYVFIH GPE NPDETWHYDFHHRGVIAEGGKVS NLDAMDITAPYTPGALRG GSHVHVFPNGERVSFTYNDHVMHELDPALDLRNVGVAAPFGPVN VQKQHPREYSGSHWCVLVSKTTPTPQPGSDEINRAYEEGWVGNHAL AFIGDTLSPKGEKVPPELVLPQDEAGWKAAGDAPLSGTETTLPPR RGVVQRRLTFTHHRAYPGLVNVPRHWVRCNPQGTQIAFLMRDDNGI MQLWLISPQGGEPQLTHQKTDIQSAFNWHPSGEWLGFVLDNRIAC AHAQSGEVEYL TENHANPPSADAVVFPDGGQWLAWMEGGQLWITE TDR (SEQ ID NO: 11)</p>

实施例 4 本发明重组核酸疫苗制备

(1) 加帽 mRNA 疫苗制备

步骤 a: 将实施例 3 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。

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。

(2) 非加帽 mRNA 疫苗制备

步骤 a: 将实施例 3 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。

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。

(3) DNA 疫苗制备

步骤 a: 将实施例 3 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。

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。

实施例 5 本发明重组核酸体外转录质量控制及疫苗制备

以实施例 4 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）、疫苗 D（基于本发明的重组核酸疫苗 D）。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等于 85%，基于本发明的重组核酸质量控制峰图如图 4A、图 4B、图 4C、图 4D 所示。具体描述为：（1）基于本发明的重组核酸疫苗 A，纯度为 90.3%，质量控制峰图以及纯度检测结果如图 4A；（2）基于本发明的重组核酸疫苗 B，纯度为 88.5%，质量控制峰图以及纯度检测结果如图 4B；（3）基于本发明的重组核酸疫苗 C，纯度为 88.5%，质量控制峰图以及纯度检测结果如图 4C；（4）基于本发明的重组核酸疫苗 D，纯度为 85%，质量控制峰图以及纯度检测结果如图 4D。上述纯度均符合细胞转染实验和生产疫苗的质量要求。

实施例 6 本发明重组核酸的体外表达效果

通过细胞转染试剂，将实施例 5 中的疫苗转染至 HEK293T 细胞中，体外培养 48 小时后收集蛋白，进行 Western blot 检测，并计算疫苗 A、疫苗 B、疫苗 C、疫苗 D 的蛋白分子量，如表 2 所示。

表 2 疫苗 A、疫苗 B、疫苗 C、疫苗 D 的蛋白分子量

疫苗	蛋白分子量 (kDa)
A	66.6
B	77.3
C	112.8
D	111.7

图 5A-图 5C 展示了疫苗 A、B、C、D 转染 HEK293 细胞的体外表达 WB (Western blot) 检测结果，其中图 5A 为疫苗 A 转染 HEK293 细胞的体外表达 WB 检测结果，图 5B 为疫苗 B 转染 HEK293 细胞的体外表达 WB 检测结果，图 5C 为疫苗 C 和疫苗 D 转染 HEK293 细胞的体外表达 WB 检测结果。结果可见，所表达的抗原均为体液免疫抗原，理论上能够在上清中检测到显著表达。

如图 5A-图 5C 所示，疫苗 A、B、C、D 均在上清中检测到目的蛋白信号，且分子量大小均符合预期。这证明基于本发明的融合蛋白不仅能够真核细胞中顺利翻译、正确折叠，

而且结构稳定、能够分泌到胞外。

对比图 5A、图 5B 的结果，疫苗 A 在上清中的表达量显著高于疫苗 B，证明 PstS 抗原单独表达的情况下，分泌效果优于 YidR 抗原；根据图 5C 展示的结果，疫苗 D 在上清中的表达量显著高于疫苗 C，证明两种 PstS-YidR 融合蛋白设计中，疫苗 D 的设计方式更优，选择本发明的突变后的 YidR 抗原截选多肽比 YidR 抗原全长蛋白，能够显著提高 PstS-YidR 融合蛋白的分泌效率。

由上述的对比分析可知，表达 PstS 抗原蛋白的疫苗 A 和表达“PstS 抗原-突变后的 YidR 抗原截选多”融合蛋白的疫苗 D 是疫苗设计的更优选择，更有利于抗原呈递和体液免疫的激活。因此，后续采用疫苗 A、疫苗 D 进行动物试验，验证免疫保护效果。同时，比较单抗原和多抗原融合蛋白的免疫保护效果是否存在差异。

实施例 7 基于本发明的重组核酸疫苗在小鼠灌胃感染模型中的预防效果

为了验证基于本发明的核酸疫苗是否具备免疫保护效果，本实施例分别将疫苗 A 免疫小鼠（实验组）、疫苗 D 免疫小鼠（实验组）与未进行免疫的小鼠（空白对照组，即 PBS 处理）进行免疫、攻毒对比实验。

实验选取 15 只 6-8 周龄雄性 BALB/C 小鼠，体重 18-25g，均饲养于恒温恒湿的独立饲养笼内，并且提前适应环境 7 天，饲养室温度 20-26℃，湿度 40-70%，昼夜明暗交替，早上 8 点到晚上 8 点光照，晚上 8 点到次日早上 8 点黑暗；持续供给足量饲料，不限量自由摄取，饮用无菌水，饮水瓶不间断供水，自由摄取。小鼠适应性饲养后将小鼠随机分为 3 组，每组 5 只，并每只小鼠使用耳标标记。具体如表 3 所示，本表以及下文中剂量指活性成分量。

表 3 实施例 5 小鼠免疫实验分组及免疫流程

组别	疫苗	动物数量	免疫剂量	免疫程序
1	基于本发明的重组核酸疫苗 A	5	5 μ g (100 μ L) /只/次	Day0 , Day21 左腹股沟皮下接种
2	基于本发明的重组核酸疫苗 D	5	5 μ g (100 μ L) /只/次	Day0 , Day21 左腹股沟皮下接种
3	PBS (空白对照)	5	100 μ L/只/次	Day0 , Day21 左腹股沟皮下接种

将各组小鼠按照表 3 的免疫流程进行两次免疫，Day32 时，小鼠使用 100 μ l 的 50mg/ml 的青霉素、链霉素抗生素混合液灌胃，每天 1 次，持续 3 天。Day35 时，细菌攻毒前禁食过夜，小鼠使用 100 μ l 大肠埃希氏菌菌液（肠出血性大肠杆菌 EHEC， 1×10^9 CFU）灌胃，灌胃后正常饲养，每天观察监测记录小鼠的临床表现，Day40 时处死小鼠取材，免疫、攻毒及取样流程如图 6 所示。收集小鼠回肠、结肠组织，检测组织细菌载量、组织病理切片，综合评估疫苗的免疫保护效果。

取每只小鼠的回肠、结肠组织，分别无菌切取 10mg 回肠、结肠组织，加入无菌 PBS 缓冲液冰上研磨至无明显沉淀。使用无菌 PBS 缓冲液将血液按照 1:1000 稀释，混匀后取 100 μ l 稀释溶液均匀涂在 LB 固体培养基上，将培养皿置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养。细菌培养 24h 后，取出培养皿对细菌克隆进行计数和拍照，观察疫苗对小鼠保护作用，结果如图 7A-图 7B 所示。图 7A 为免疫攻毒后小鼠的回肠组织载菌量（平板菌落数量）对比分析图，结果显示，相较于空白对照组小鼠（PBS 免疫），疫苗免疫组小鼠（疫苗 A、疫苗 D 免疫）的大肠埃希氏菌载量显著下降，空白对照组小鼠回肠组织的细菌载量约为疫苗免疫组小鼠的 5 倍。图 7B 为免疫攻毒后小鼠的结肠组织载菌量（平板菌落数量）对比分析图，结果显示，相较于空白对照组小鼠（PBS 免疫），疫苗免疫组小鼠（疫苗 A、疫苗 D 免疫）的大肠埃希氏菌载量显著下降，空白对照组小鼠结肠组织的细菌载量约为疫苗免疫组小鼠的 4 倍。

取每只小鼠结肠组织，多聚甲醛固定后，使用石蜡包埋，切片后使用苏木素伊红分别染色，显微镜下观察结肠、肾脏、脾脏组织中病理变化，结果如图 8 所示。图 8 为小鼠免疫攻毒后的结肠组织切片（HE 染色）对比照片，结果显示，正常小鼠的肠绒毛结构完整，未出现明显病变和炎症浸润；空白对照组小鼠（PBS 免疫）肠黏膜下层出现大量炎性细胞浸润聚集，表现为大肠埃希氏菌侵染后的症状；疫苗免疫组小鼠（疫苗 A、疫苗 D 免疫）组小鼠肠绒毛少量断裂、溶解，粘膜层出现部分炎性细胞浸润聚集。分析上述结果，基于本发明的疫苗 A、疫苗 D 免疫后的小鼠，均表现出对大肠埃希氏菌侵染的抗性，证明基于本发明的疫苗能够诱导小鼠产生针对大肠埃希氏菌的免疫保护，预防大肠埃希氏菌感染。

综上所述，本发明提供的新抗原 PstS 和 PstS-YidR 融合蛋白均能够诱导模式动物小鼠产生有效的保护性免疫，针对大肠埃希氏菌感染有良好的预防效果。因此，本发明能够应

说明书

用于免疫药物的生产和研发，填补当前大肠埃希氏菌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。

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。

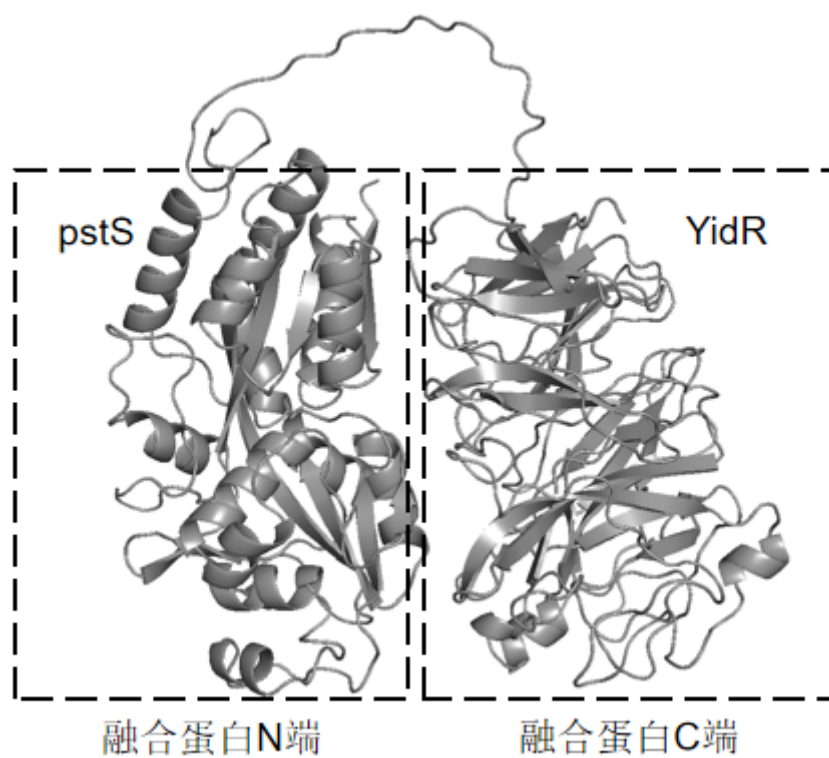


图 1A

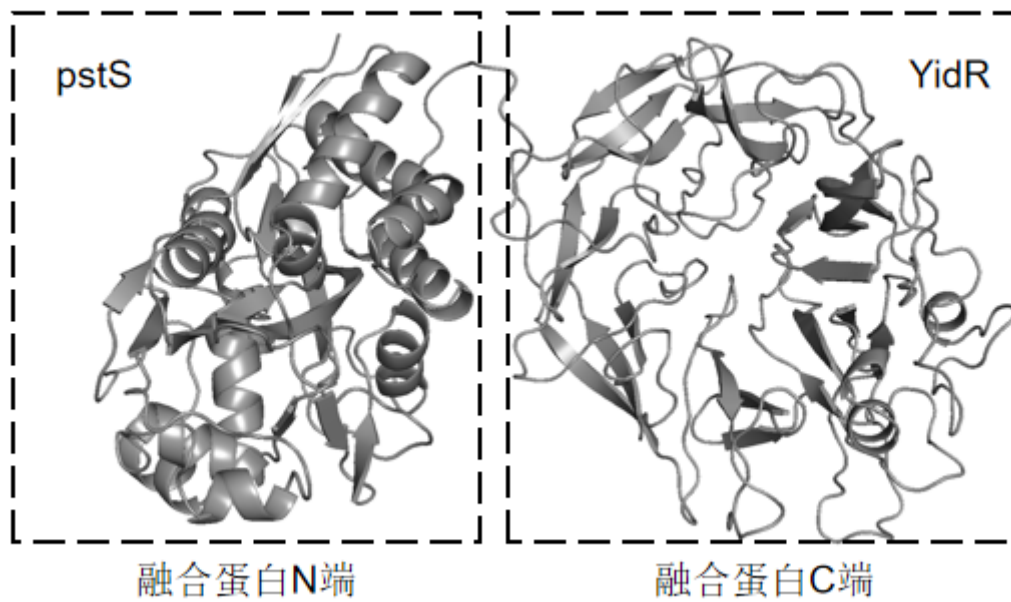


图 1B

说明书附图

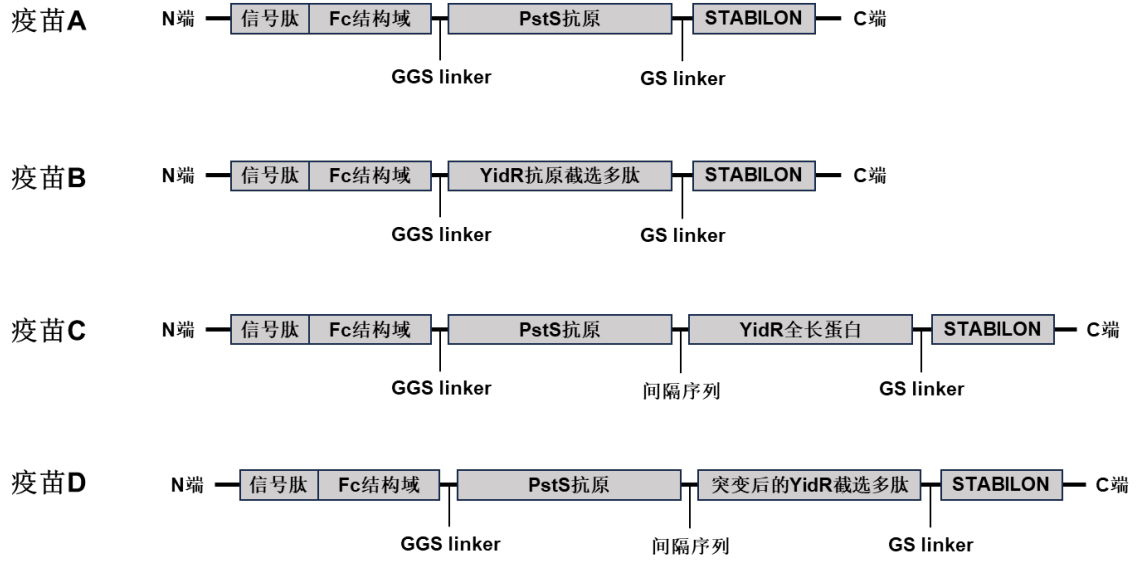


图 2

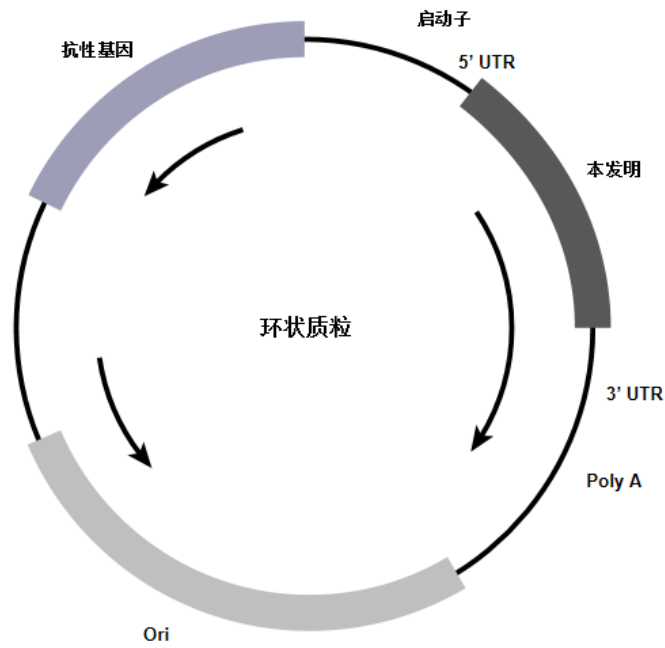


图 3

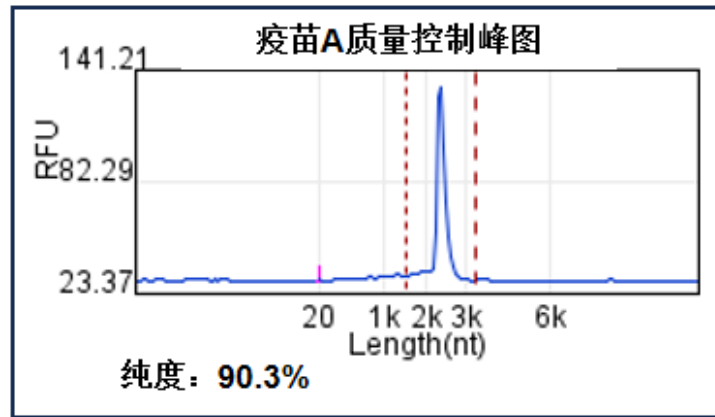


图 4A

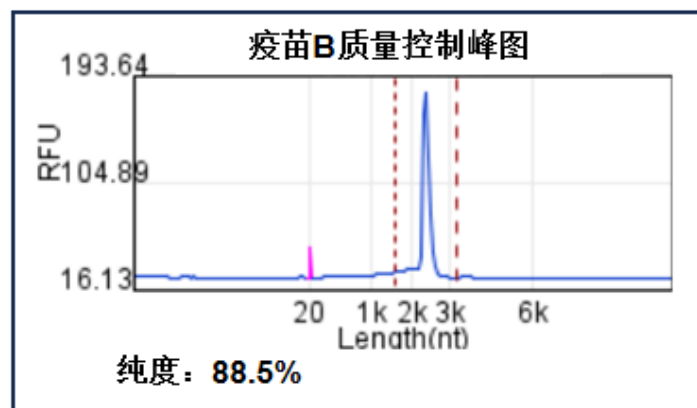


图 4B

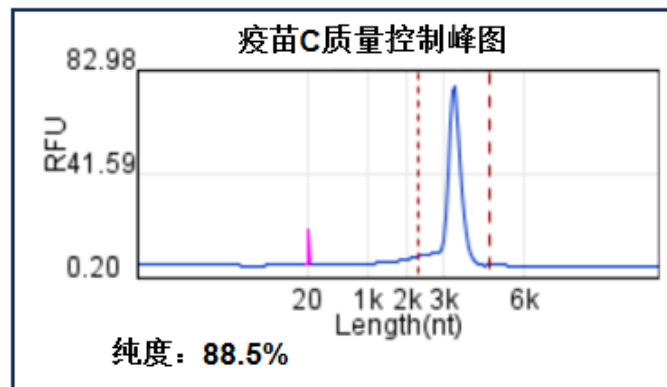


图 4C

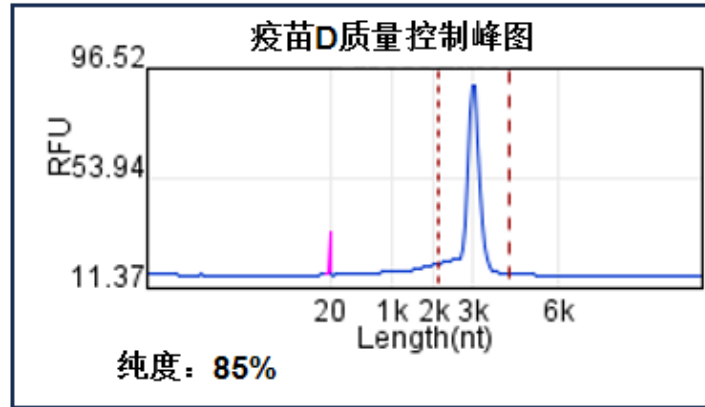


图 4D

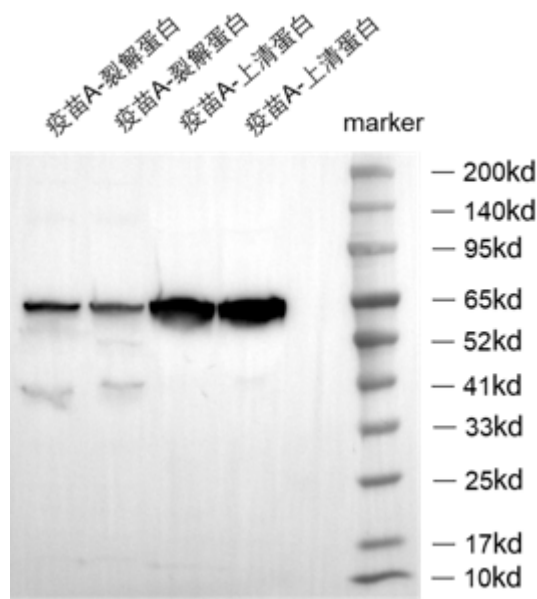


图 5A

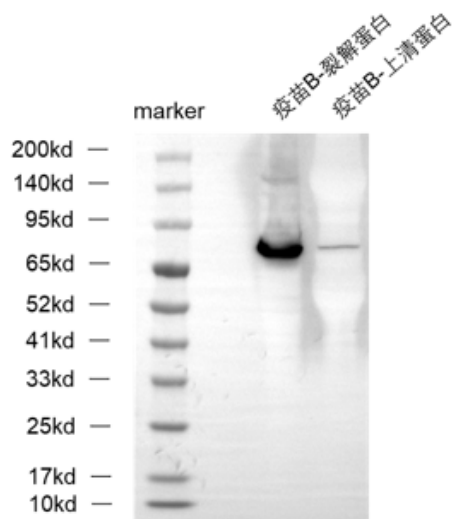


图 5B

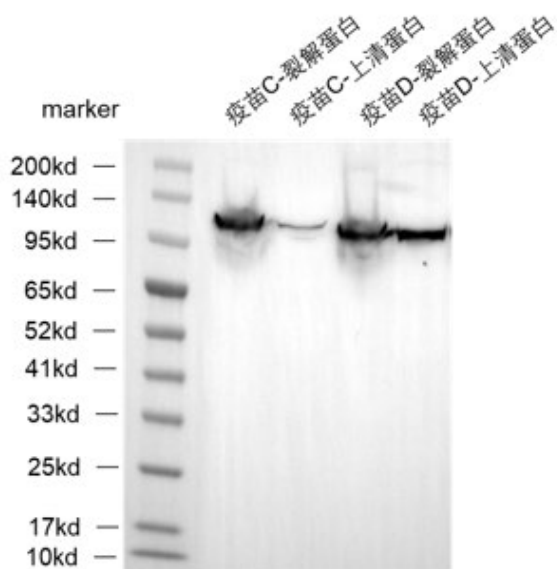


图 5C

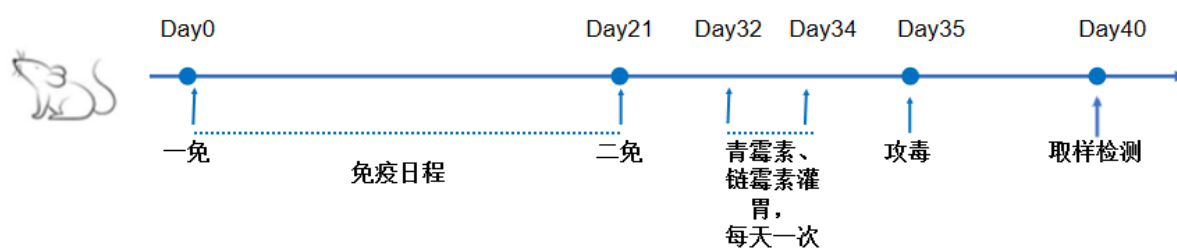


图 6

回肠细菌载量

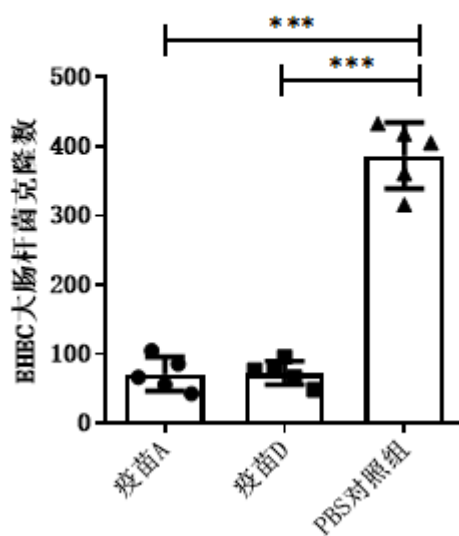


图 7A

结肠细菌载量

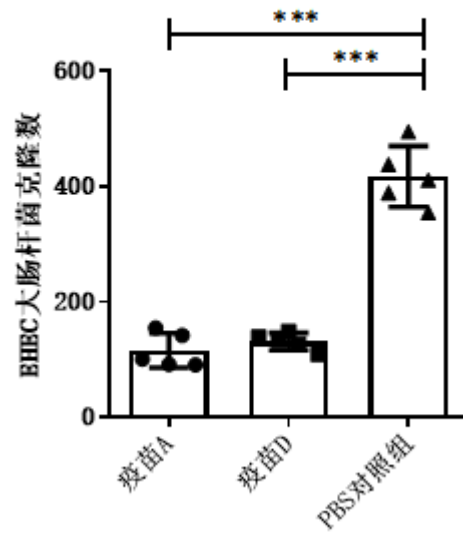


图 7B

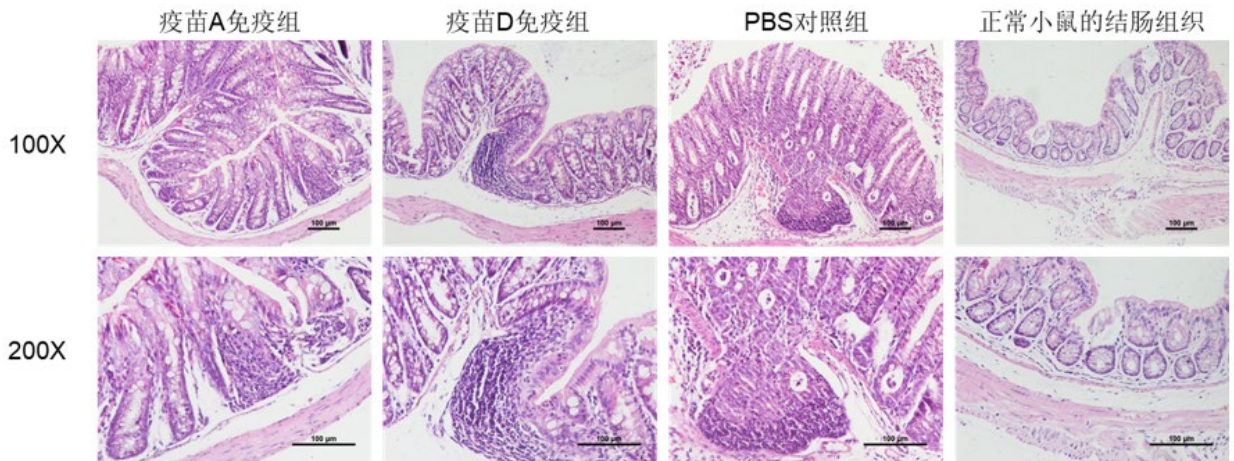


图 8