

发 明 专 利 请 求 书

用户案卷号L25010038F		此框内容由国家知识产权局填写					
④ 发 明 名 称	一种预防沙门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	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						
	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1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17页 3. 说明书附图 共6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 15 项</p>	<p>㉒ 附加文件清单</p> <p>1. 实质审查请求书 共1页 2. S26 标准核苷酸或氨基酸序列表计算机可读载体 共0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: 200px;">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 一种预防沙门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沙门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。本发明选取能够在真核细胞中顺利表达的 PstS-LpfB、PstS-YidR、LpfB-SinH 三种融合蛋白设计进行动物免疫实验，验证保护效果。本发明发现 PstS-LpfB 等融合蛋白分子可减弱沙门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，高效预防沙门氏菌感染，具有广泛的应用前景。

摘要附图

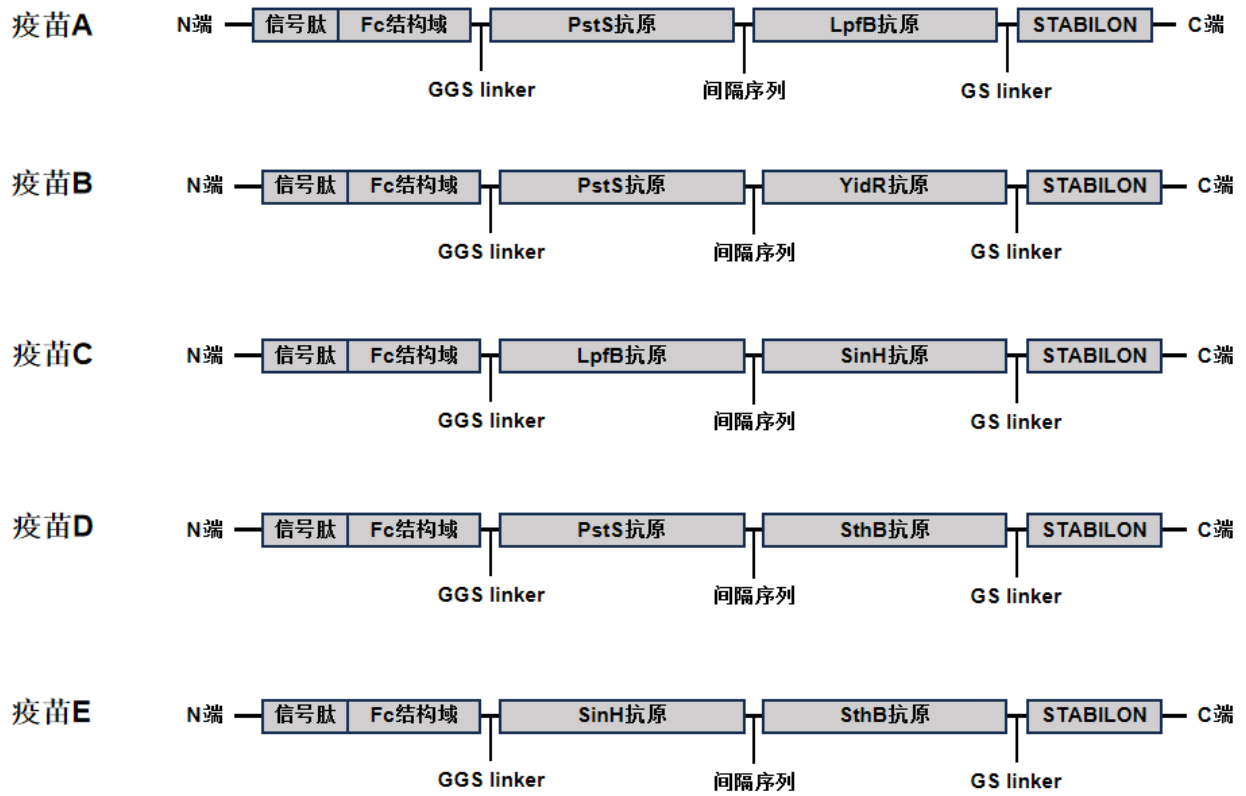


图 1

权利要求书

1.一种融合蛋白，其特征在于，为选自以下（1）-（3）任一项的融合蛋白：

（1）融合蛋白 A；所述融合蛋白 A 包含包含磷酸结合蛋白 PstS（Phosphate-binding protein PstS）抗原或其片段；优选地，所述融合蛋白还包含分子伴侣 LpfB（molecular chaperone LpfB）抗原或其片段；

（2）融合蛋白 B：所述融合蛋白 B 包含所述 PstS 抗原或其片段和 YidR 抗原或其片段；

（3）融合蛋白 C：所述融合蛋白 C 包含所述 LpfB 抗原或其片段和 SinH 抗原或其片段。

2.根据权利要求 1 所述的融合蛋白，其特征在于，所述 PstS、LpfB、YidR、SinH 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沙门氏菌。

3.根据权利要求 1 和 2 所述的融合蛋白，其特征在于，所述融合蛋白 A 从 N 端到 C 端依次包含所述 PstS 抗原或其片段、所述 LpfB 抗原或其片段；所述融合蛋白 B 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；所述融合蛋白 C 从 N 端到 C 端依次包含所述 LpfB 抗原或其片段、所述 SinH 抗原或其片段；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 LpfB 抗原或其片段的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示，所述 YidR 抗原或其片段的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示，所述 SinH 抗原或其片段的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 10 所示。

4.根据权利要求 1-3 任一项所述的融合蛋白，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 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。

5.根据权利要求 4 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: 3 所示；所述 IGHG1 的 Fc 结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示；所述 STABILON 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示。

6.根据权利要求 1-5 任一项所述的融合蛋白，其特征在于，不同元件之间任选地通过 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: 6 所示，所述 GGS linker 序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示，所述 GS linker 序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 8 所示。

7.根据权利要求 1-6 任一项所述的融合蛋白，其特征在于，包含以下 5 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

原蛋白或其片段、间隔序列、LpfB 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、PstS 抗原蛋白或其片段、间隔序列、YidR 抗原蛋白或其片段、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、LpfB 抗原蛋白或其片段、间隔序列、SinH 抗原蛋白或其片段、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 抗原蛋白或其片段、间隔序列、SthB 抗原蛋白或其片段、GS linker、STABILON;

(5) 融合蛋白 E: 从 N 端到 C 端依次包含: 信号肽、Fc 结构域、GGs linker、SinH 抗原蛋白或其片段、间隔序列、SthB 抗原蛋白或其片段、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 LpfB 抗原或其片段的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示, 所述 YidR 抗原或其片段的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示, 所述 SinH 抗原或其片段的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 10 所示, 所述 SthB 抗原或其片段的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示, 所述信号肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示, 所述 Fc 结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示; 所述 STABILON 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示, 所述间隔序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 6 所示, 所述 GGs linker 序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示, 所述 GS linker 序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 8 所示。

8. 一种重组核酸分子, 其特征在于, 包含编码权利要求 1-7 任一项所述融合蛋白的核酸。

9. 一种重组基因表达盒, 其特征在于, 包含权利要求 8 所述重组核酸分子。

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

11. 一种重组宿主细胞, 其特征在于, 包含权利要求 8 所述重组核酸分子、或权利要求 9 所述重组基因表达盒、或权利要求 10 所述重组载体。

12. 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 1-7 任一项融合蛋白, 和/或一种或多种权利要求 8 所述重组核酸分子, 和/或一种或多种权利要求 9 所述重组基因表达盒, 和/或一种或多种权利要求 10 所述重组载体, 和/或一种或多种权利要求 11 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沙门氏菌引起的疾病的药物; 最优选地, 所述其他用于预防沙门氏菌引起的疾病的药物包含抗生素。

权 利 要 求 书

13.一种重组疫苗，其特征在于，包含一种或多种权利要求 1-7 任一项融合蛋白，和/或一种或多种权利要求 8 所述重组核酸分子，和/或一种或多种权利要求 9 所述重组基因表达盒，和/或一种或多种权利要求 10 所述重组载体，和/或一种或多种权利要求 11 所述重组宿主细胞，和/或一种或多种权利要求 12 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。

14.一种或多种权利要求 1-7 任一项融合蛋白，和/或一种或多种权利要求 8 所述重组核酸分子，和/或一种或多种权利要求 9 所述重组基因表达盒，和/或一种或多种权利要求 10 所述重组载体，和/或一种或多种权利要求 11 所述重组宿主细胞，和/或一种或多种权利要求 12 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 13 所述重组疫苗在制备预防沙门氏菌引起的疾病的药物中的用途。

15.根据权利要求 14 所述的用途，其特征在于，所述沙门氏菌引起的疾病包括但不限于胃肠炎、伤寒、菌血症、局部化脓性感染、反应性关节炎、肠热症、血管内感染、局灶性感染；优选地，所述局灶性感染包含骨髓炎、关节炎、脑膜炎、心内膜炎、肝脓肿、胆囊炎、肾盂肾炎。

一种预防沙门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，具体涉及一种预防沙门氏菌感染的体液免疫疫苗及其应用等。

背景技术

沙门氏菌 (*Salmonella*) 是一种革兰氏阴性杆菌，广泛分布于自然界，也存在于健康人与动物的肠道中。当机体免疫力下降或长期使用抗生素导致菌群失调时，可引起感染。感染类型主要包括食物中毒、肠炎、伤寒、副伤寒、败血症等。近年来，沙门氏菌已成为重要的食源性病原体，是引起社区获得性感染与医院院内感染不可忽视的潜在病原体。

沙门氏菌根据其菌体表面的抗原成分进行分型，主要包括 O 抗原（脂多糖抗原）和 H 抗原（鞭毛抗原）。目前已发现沙门氏菌有 2600 多种血清型。其中，肠炎沙门氏菌 (*Salmonella enteritidis*) 和鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 是与人类疾病相关的最常见的两种血清型。这两种血清型在全球人类沙门氏菌病的比例超过 40%，在中国比例超过 30%。

世界卫生组织 (WHO) 将沙门氏菌列为全球公共卫生的重要威胁之一。据 WHO 报道，沙门氏菌每年导致全球 9380 多万例胃肠炎，以及 155,000 多人死亡。WHO 还强调了沙门氏菌耐药性的问题，指出其耐药性不断增强，已成为严重的公共卫生问题。因此，开发有效的沙门氏菌疫苗对于控制其传播和感染具有重要意义。

由于缺乏商品化疫苗，当前临床上的沙门氏菌感染仍旧主要依赖于抗生素治疗。然而，抗生素治疗恰恰成为了高耐药、高毒力株系产生、传播的主要推动力。为了能够打破当前的困境，研究人员正在积极开发新疫苗，例如，现有技术专利 CN104736171B（公开日 2018-11-06）公开了一种沙门氏菌灭活疫苗，通过灭活处理 C1 或 C2-3 血清型的肠道沙门氏菌，制备出三价或四价疫苗，提供一定的交叉免疫保护效果；专利 CN119241728A（公开日 2024-11-14）公开了一种鼠伤寒沙门氏菌鞭毛蛋白与塞内卡病毒抗原的融合蛋白的制备方法，但未提供疫苗效果测试的相关数据。致病性沙门氏菌的分型太多，靠传统灭活、弱毒疫苗进行防治，保护效力有限，且难以迭代。虽然已有部分研究提出了候选靶点可用于亚单位疫苗开发，但大多未通过动物实验验证候选靶点及亚单位疫苗的效力。因此，沙门氏菌疫苗开发仍旧处于较为初级的阶段，无法应对当前市场的庞大需求。

说明书

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 可作为沙门氏菌的保护性抗原, 应用于疫苗开发。

分子伴侣 LpfB (molecular chaperone LpfB) 是一种伴侣蛋白, 其主要功能是协助长极毛 (long polar fimbriae, Lpf) 的合成。lpf 是沙门氏菌表面的一种菌毛结构, 对于沙门氏菌的黏附和定植具有重要作用。有研究证明 LpfB 蛋白能够协助 Lpf 的组装和运输, 使得沙门氏菌能够更好地黏附在宿主细胞上, 特别是在小肠的 Peyer's patch 区域的 M 细胞 (microfold cells) 上, 从而促进沙门氏菌在宿主体内的定植和感染。虽然有研究尝试单独用 LpfB 作为疫苗抗原, 验证发现单独的 LpfB 没有免疫保护效果, 但并没有研究证明该蛋白和其他抗原融合的情况下, 是否能够辅助提高疫苗的免疫保护效力。

综上所述, 开发一种能够针对沙门氏菌提供广谱保护、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, 旨在减少沙门氏菌引起的感染发生率, 对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、广谱的沙门氏菌感染预防疫苗, 有望同时应对多种不同血清型的沙门氏菌感染。

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沙门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。本发明从反向疫苗学角度出发, 筛选沙门氏菌高度保守的靶点结合免疫表位, 确定候选抗原, 用于融合蛋白设计。经体外表达验证, 选取能够在真核细胞中顺利表达的 PstS-LpfB、PstS-YidR、LpfB-SinH 三种融合蛋白设计进行动物免疫实验, 验证保护效果。本发明发现 PstS-LpfB 等融合蛋白分子可减弱沙门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, 高效预防沙门氏菌感染。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, 为选自以下 (1) - (3) 任一项的融

合蛋白：

(1)融合蛋白 A: 所述融合蛋白 A 包含包含磷酸结合蛋白 PstS(Phosphate-binding protein PstS)抗原或其片段; 优选地, 所述融合蛋白还包含分子伴侣 LpfB(molecular chaperone LpfB)抗原或其片段;

(2)融合蛋白 B: 所述融合蛋白 B 包含所述 PstS 抗原或其片段和 YidR 抗原或其片段;

(3)融合蛋白 C: 所述融合蛋白 C 包含所述 LpfB 抗原或其片段和 SinH 抗原或其片段。

进一步地, 所述 PstS、LpfB、YidR、SinH 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沙门氏菌。

进一步地, 所述融合蛋白 A 从 N 端到 C 端依次包含所述 PstS 抗原或其片段、所述 LpfB 抗原或其片段; 所述融合蛋白 B 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; 所述融合蛋白 C 从 N 端到 C 端依次包含所述 LpfB 抗原或其片段、所述 SinH 抗原或其片段。

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 LpfB 抗原或其片段的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示, 所述 YidR 抗原或其片段的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示, 所述 SinH 抗原或其片段的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 10 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 $\gamma 1$ 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。

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: 3 所示; 所述 IGHG1 的 Fc 结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示; 所述 STABILON 的氨基酸序列如 SEQ ID NO.5 所示。

进一步地, 不同元件之间任选地通过 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: 6 所示, 所述 GGS linker 序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示, 所述 GS linker 序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO:8 所示。

进一步地, 所述融合蛋白包含以下 5 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

说明书

原蛋白或其片段、间隔序列、LpfB 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、PstS 抗原蛋白或其片段、间隔序列、YidR 抗原蛋白或其片段、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、LpfB 抗原蛋白或其片段、间隔序列、SinH 抗原蛋白或其片段、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 抗原蛋白或其片段、间隔序列、SthB 抗原蛋白或其片段、GS linker、STABILON;

(5) 融合蛋白 E: 从 N 端到 C 端依次包含: 信号肽、Fc 结构域、GGs linker、SinH 抗原蛋白或其片段、间隔序列、SthB 抗原蛋白或其片段、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 LpfB 抗原或其片段的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示, 所述 YidR 抗原或其片段的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示, 所述 SinH 抗原或其片段的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 10 所示, 所述 SthB 抗原或其片段的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示, 所述信号肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示, 所述 Fc 结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示; 所述 STABILON 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示, 所述间隔序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 6 所示, 所述 GGs linker 序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示, 所述 GS linker 序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 8 所示。

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沙门氏菌引起的疾病的药物。

进一步地，所述其他用于预防沙门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沙门氏菌引起

的疾病的药物中的用途。

本发明的另一方面提供一种预防沙门氏菌引起的疾病的方法，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，所述沙门氏菌引起的疾病包含但不限于胃肠炎、伤寒、菌血症、局部化脓性感染、反应性关节炎、肠热症、血管内感染、局灶性感染。

进一步地，所述局灶性感染包含骨髓炎、关节炎、脑膜炎、心内膜炎、肝脓肿、胆囊炎、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，可针对沙门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. 本发明经过系统性筛选，结合免疫表位预测分析，最终鉴定出 PstS、LpfB、YidR、SthB、SinH 共计 5 个候选抗原，进行融合蛋白设计及实验验证。并且，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，对已知的 PstS、LpfB、YidR、SthB、SinH 抗原进行了 N 端截短或者个别位点的氨基酸突变。

4. 本发明利用反向疫苗学技术，筛选具有广谱保护效果的候选靶点，优选出 PstS 抗原、LpfB 抗原用于疫苗设计，并通过对比实验验证两个抗原构成的融合蛋白可以诱导小鼠产生针对沙门氏菌的免疫保护。

5. 本发明实施例 5 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，为沙门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 6 中的小鼠灌胃感染模型实验表明，在肺组织中，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沙门氏菌在肠道、脾脏、肝

脏的定植，提供有效的多组织免疫保护。

7. 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，在预防沙门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 1 为实施例中对比实验所用疫苗的分子结构示意图，包含疫苗 A、疫苗 B、疫苗 C、疫苗 D、疫苗 E 的分子结构示意图。

图 2 为含有本发明融合蛋白分子架构的环状质粒示意图。

图 3A-图 3E 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 3A 为疫苗 A 的质量控制峰图以及纯度检测结果，图 3B 为疫苗 B 的质量控制峰图以及纯度检测结果，图 3C 为疫苗 C 的质量控制峰图以及纯度检测结果，图 3D 为疫苗 D 的质量控制峰图以及纯度检测结果，图 3E 为疫苗 E 的质量控制峰图以及纯度检测结果。

图 4A-图 4D 为本发明疫苗 A、B、C、D、E 转染 HEK293 细胞的体外表达 WB (Western blot) 检测结果；其中，图 4A 对应疫苗 A 转染 HEK293 细胞的体外表达 WB 检测结果，图 4B 对应疫苗 B 转染 HEK293 细胞的体外表达 WB 检测结果，图 4C 对应疫苗 C 和疫苗 D 转染 HEK293 细胞的体外表达 WB 检测结果，图 4D 对应疫苗 E 转染 HEK293 细胞的体外表达 WB 检测结果。

图 5 为小鼠感染实验的免疫、攻毒、取样流程示意图。

图 6A-图 6B 为免疫、攻毒后各实验组的小鼠粪便的细菌载量检测结果；其中图 6A 为免疫攻毒后各实验组的小鼠粪便载菌量涂板照片，图 6B 为免疫攻毒后各实验组的小鼠粪便载菌量分析对比图。

图 7A-图 7B 为免疫、攻毒后各实验组的小鼠脾脏组织的细菌载量检测结果；其中图 7A 为免疫攻毒后各实验组的小鼠脾脏组织的细菌载量涂板照片，图 7B 为免疫攻毒后各实验组的小鼠脾脏组织的细菌载量的分析对比图。

图 8A-图 8B 为免疫、攻毒后各实验组的小鼠肝组织的细菌载量检测结果；其中图 8A 为免疫攻毒后各实验组的小鼠肝组织的细菌载量涂板照片，图 8B 为免疫攻毒后各实验组的小鼠肝组织的细菌载量的分析对比图。

具体实施方式

术语和定义

术语"沙门氏菌"指 *Salmonella*，是一种常见的食源性致病菌，属于肠杆菌科，革兰氏阴性杆菌，具有周身鞭毛，能运动，多数有菌毛。沙门氏菌广泛寄生于人和家禽、家畜的肠道中，主要通过污染的食物传播，如生禽肉、鸡蛋、牛肉以及某些水果和蔬菜。

术语"沙门氏菌感染"指由沙门氏菌引起的各种疾病，包括但不限于胃肠炎、伤寒、菌血症、局部化脓性感染、反应性关节炎等。

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，简称 PstS），是沙门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"LpfB"指分子伴侣 LpfB（molecular chaperone LpfB，简称 LpfB），是一种伴侣蛋白，其主要功能是协助长极毛（long polar fimbriae, Lpf）的合成。lpf 是沙门氏菌表面的一种菌毛结构，对于沙门氏菌的黏附和定植具有重要作用。优选地，LpfB 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示。

术语"YidR"指沙门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 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示。

术语"SinH"指沙门氏菌中的一种蛋白，可能参与调控细菌的毒力和适应性反应。该蛋白在细菌与宿主相互作用中发挥重要作用，可能通过调节生物膜形成或影响特定的应激响应途径来促进细菌的生存和致病性，优选地，SinH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 10 所示。

术语"SthB"指沙门氏菌中的一种蛋白，可能与细菌的稳态调节和环境适应性相关。其具体功能尚未完全明确，可能在应激响应、细胞代谢调控或病原体适应性方面发挥一定作用。优选地，SthB 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 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相同含义。

本发明公开了一种新的沙门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。

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 抗原筛选

由于沙门氏菌疫苗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沙门氏菌潜在的交叉免疫保护抗原。筛选的主要目标是寻找在转录组中高丰度表达，且在不同沙门氏菌亚型中高度保守的抗原。

具体筛选步骤如下：

- (1) 收集不同血清型沙门氏菌的转录组数据。
- (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血清型间的保守性。

经过上述系统性筛选，结合免疫表位预测分析，本发明最终鉴定出 PstS、LpfB、YidR、SthB、SinH，一共 5 个抗原进行后续融合蛋白设计及实验验证。

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、LpfB、YidR、SthB、SinH 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 融合蛋白疫苗设计及重组核酸疫苗构建

根据实施例 1 中的筛选结果，通过融合蛋白设计，一共获得 5 种融合蛋白的疫苗：

PstS-LpfB、PstS-YidR、LpfB-SinH、PstS-SthB、SinH-SthB。

为了制备上述 5 种重组核酸疫苗，示例性的，实施例中所涉及的疫苗分子架构示意图如图 1 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 1 示意的疫苗 A、疫苗 B、疫苗 C、疫苗 D、疫苗 E 五种疫苗区别在于目标抗原区不同，疫苗 A 的目标抗原为 PstS-LpfB（二者之间可通过间隔序列相连），疫苗 B 的目标抗原为 PstS-YidR（二者之间可通过间隔序列相连），疫苗 C 的目标抗原为 LpfB-SinH（二者之间可通过间隔序列相连），疫苗 D 的目标抗原为 PstS-SthB（二者之间可通过间隔序列相连），疫苗 E 的目标抗原为 SinH-SthB（二者之间可通过间隔序列相连）。为了制备能够产生如图 1 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融合蛋白分子架构抗原序列。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蛋白分子架构。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 2 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) 含有 PstS-LpfB 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-LpfB 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: 7 所示的 GGS linker 序列连接，PstS 抗原-LpfB 抗原之间通过氨基酸序列如 SEQ ID NO: 6 所示的间隔序列连接，LpfB 抗原、STABILON 之间通过氨基酸序列如 SEQ ID NO: 8 所示的 GS linker 序列连接，信号肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示，人 IGHG 的 Fc 结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示，PstS 抗原的氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示，LpfB 抗原的氨基酸序列如 SEQ ID NO.2 所示，STABILON 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 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，得到含有 PstS-LpfB 的重组核酸疫苗 A

制备载体（图 2 所示）。

（2）含有 PstS-YidR 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-PstS 抗原-YidR 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: 7 所示的 GGS linker 序列连接，PstS 抗原、YidR 抗原之间通过氨基酸序列如 SEQ ID NO: 6 所示的间隔序列连接，YidR 抗原、STABILON 之间通过氨基酸序列如 SEQ ID NO: 8 所示的 GS linker 序列连接，信号肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示，人 IGHG 的 Fc 结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示，PstS 抗原的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示，YidR 抗原的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示，STABILON 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 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，得到含有 PstS-YidR 的重组核酸疫苗 B 制备载体（图 2 所示）。

（3）含有 LpfB-SinH 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-LpfB 抗原-SinH 抗原-STABILON”融合基因片段，人 IGHG 的 Fc 结构域、LpfB 抗原之间通过氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示的 GGS linker 序列连接，LpfB 抗原、SinH 抗原之间通过氨基酸序列如 SEQ ID NO: 6 所示的间隔序列连接，SinH 抗原、STABILON 之间通过氨基酸序列如 SEQ ID NO: 8 所示的 GS linker 序列连接，信号肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示，人 IGHG 的 Fc 结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示，LpfB 抗原的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示，SinH 抗原的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 10 所示，STABILON 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 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，得到含有 LpfB-SinH 的重组核酸疫苗 C 制备载体（图 2 所示）。

说明书

(4) 含有 PstS-SthB 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-SthB 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: 7 所示的 GGS linker 序列连接, PstS 抗原、SthB 抗原之间通过氨基酸序列如 SEQ ID NO: 6 所示的间隔序列连接, SthB 抗原、STABILON 之间通过氨基酸序列如 SEQ ID NO: 8 所示的 GS linker 序列连接, 信号肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示, 人 IGHG 的 Fc 结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示, PstS 抗原的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示, SthB 抗原的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示, STABILON 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 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, 得到含有 PstS-SthB 的重组核酸疫苗 D 制备载体 (图 2 所示)。

(5) 含有 SinH-SthB 的重组核酸疫苗 E 制备载体

步骤 a: 合成“信号肽-人 IGHG 的 Fc 结构域-SinH 抗原-SthB 抗原-STABILON”融合基因片段, 人 IGHG 的 Fc 结构域、SinH 抗原之间通过氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示的 GGS linker 序列连接, SinH 抗原、SthB 抗原之间通过氨基酸序列如 SEQ ID NO: 6 所示的间隔序列连接, SthB 抗原、STABILON 之间通过氨基酸序列如 SEQ ID NO: 8 所示的 GS linker 序列连接, 信号肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示, 人 IGHG 的 Fc 结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示, SinH 抗原的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 10 所示, SthB 抗原的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示, STABILON 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 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, 得到含有 SinH-SthB 的重组核酸疫苗 E 制备载体 (图 2 所示)。

表 1 本发明所涉及的蛋白氨基酸序列

说明书

	氨基酸序列以及序列编号
PstS 抗原	AASLTGAGATFPAPVYAKWADTYQKETGNKVNYQGIGSSGGVKQII ANTVDFGASDAPLADDKLTQEGLFQFPTVIGGVVLAVNLPGVKSGE LVLDGKTLGDIYLGKIKKWDDEAIAKLNPLGLKLPSONIAVRRADGS GTSFVFTSYLSKVNEEWKSKIGAGATVNWPTGLGGKGNDAIAAFVQ RLPGSIGYVEYAYAKQNNLAYTKLVSADGKPVSPTEDNFANAAGV DWSKSFAQDLTNQKGENAWPITSTTFILVHKATNKPEQTAEVLFKFFD WAYKNGGKEANALDYATLPESVVEQVRAAWKTNVKDSSGKALY (S EQ ID NO: 1)
LpfB 抗原	GGVALSSTRVIYDGRKEASLTVNQKSTTDEFLLIQSWIDDANGNKKT PFIITPPLFKLSPTKNNVLRIVQTTNTLPQDRESVYWINVKAIPAKSED AEAKNVLQIAVCTRLKLFYRPAGLKGNSMDGWNKLQFTSAGANQI KVEQPSAFNLA FNKFYANGRDIEKTGMVPAKGS LNIELPAGTGK VSE VKYNIINDFGTAGDMLTQRVN (SEQ ID NO: 2)
信号肽	MTRLTVLALLAGLLASSRA (SEQ ID NO: 3)
人 IGHG 的 Fc 结构域	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 4)
STABILON	KDGKKDKKEEDKK (SEQ ID NO: 5)
间隔序列	GGSGGGGGSG (SEQ ID NO: 6)
GS linker	GGSGGGGGSG (SEQ ID NO: 7)
GS linker	GSGSGSG (SEQ ID NO: 8)
YidR 抗原	MKQITFTPRHHQLTNTNTWTPDSQWLVDVRPSGASFTGKTIERVNV HTGDVEVIYRAVQGAHVGVVTVHPADNHVYVFIHGPNPDETWHYD FHRRRGVIATSEGVTNLDAMDITAPYTPGALRGGSHVHVFPNGELV SFTYNDHVLHERDPALDLRNVGVAAPYGPVTVPVQHPREYSGSYW CVLVSRTTPAPRPGSDDINRAYEEGWVGNRQIAFIGDRTLSTGKKVPE LFIVDLPCHENGWKQAGDTPLTGTESTMPSPLGVVQRRLTFTHQRV YPGLTNEPRHWVRSNPQATAIAFLMRDDNGVAQLWLISPQGGEPQR LTHHATGVQSAFNWHPSGKWLGLVLENRIACCDASGKIDFLTARH DNPPSADAVVFPDGRHVAVMEEVKGFRQLWVTETGR (SEQ ID N O: 9)
SinH 抗原	DPLDVTLWLKADATNEHPECVIEDTPEAAVGLEKCKWTVNALINHH YKIISASWQAKNNAARTLVMPVVKANALTEGNNNSWNLVLPWVNV ADTEEQRTALNTWKVRMTLEDEKGNKQNSGVVEITVQQDRKIELIV DNIADTDRSDHSHEASALADGEDGVVMDLLITDSFGDSTDRNGNEL VDDAMTPVLYDSNDKKVTLAQTPTTETPCVFIASRDKEAGTVTSL STLPGTFRWKAKADAYGDSNYVDVTFIGNLSALNAVYQVKAANP VNLIGKEDKHPTVNNAYRFLWRDKNKDGVFQMSQLTEEMALY DYQWEFTGQSTNGHTGALANTMNEDLVPVTNKEAAQKFAANVE DGVQGYGIRVTYSQK (SEQ ID NO: 10)
SthB 抗原	PMDDTIILVKAPGAAGVPVNNETGVDTDFRGYAVVPYASPYHRNEV SLDTTGIRKNIELIDTSKTLVPTRGAVVRAEYKTNIGYKALMVLTRIN NLPVPFGATVSSLTQPDQHSSVFGDAGQAWLTGLEKQGRLLVKWGP TAADRCQVSYRIPSSPSASGVEILHEQCQ (SEQ ID NO: 11)

实施例 3 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 2 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 2 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 2 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 4 本发明重组核酸体外转录质量控制及疫苗制备

以实施例 3 中的加帽 mRNA 疫苗制备的方法制备获得疫苗 A (含有 PstS-LpfB 的重组核酸疫苗 A)、疫苗 B (含有 PstS-YidR 的重组核酸疫苗 B)、疫苗 C (含有 LpfB-SinH 的重组核酸疫苗 C)、疫苗 D (含有 PstS-SthB 的重组核酸疫苗 D)、疫苗 E (含有 SinH-SthB 的重组核酸疫苗 E)。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 3A-图 3E 所示。具体描述为: (1) 含有 PstS-LpfB 的重组核酸疫苗 A, 纯度为 90.1%, 质量控制峰图以及纯度检测结果如图 3A; (2) 含有 PstS-YidR 的重组核酸疫苗 B, 纯度为 85.1%, 质量控制峰图以及纯度检测结果如图 3B; (3) 含有 LpfB-SinH 的重组核酸疫苗 C, 纯度为 89.3%, 质量控制峰图以及纯度检测结果如图 3C; (4) 含有 PstS-SthB 的重组核酸疫苗 D, 纯度为 85.4%, 质量控制峰图以及纯度检测结果如图 3D; (5) 含有 SinH-SthB 的重组核酸疫苗 E, 纯度为 90.7%, 质量控制峰图以及纯度检测结果如图 3E。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 5 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 4 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、疫苗 E 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	89.3
B	111.8
C	84.6
D	97
E	92.3

图 4A-图 4D 展示了疫苗 A、B、C、D、E 转染 HEK293 细胞的体外表达 WB (Western blot) 检测结果 (其中, 图 4A 对应疫苗 A 转染 HEK293 细胞的体外表达 WB 检测结果, 图 4B 对应疫苗 B 转染 HEK293 细胞的体外表达 WB 检测结果, 图 4C 对应疫苗 C 和疫苗 D 转染 HEK293 细胞的体外表达 WB 检测结果, 图 4D 对应疫苗 E 转染 HEK293 细胞的体外表达 WB 检测结果), 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 4 所示, 疫苗 A、B、C 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。疫苗 D、E 未在上清中检测到目的蛋白信号, 证明 PstS-SthB、SinH-SthB 两种融合蛋白设计无法正常分泌表达。

因此, 排除无法正常表达、分泌的疫苗 D 和疫苗 E, 选择疫苗 A、疫苗 B、疫苗 C 用于后续动物实验, 验证免疫保护效果。

实施例 6 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 (疫苗 A 免疫组)、疫苗 B 免疫小鼠 (疫苗 B 免疫组)、疫苗 C 免疫小鼠 (疫苗 C 免疫组) 与未进行免疫的小鼠 (PBS 组) 进行免疫、攻毒对比实验。有 1 只小鼠不进行免疫, 也不进行攻毒, 作为阴性对照组。

实验选取 21 只 6-8 周龄 BALB/C 小鼠, 体重 18-25g, 均饲养于恒温恒湿的独立饲养笼

说明书

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组，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	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	重组核酸疫苗 B	5	5 μ g (100 μ L) /只/次	Day0 , Day21 左腹股沟皮下接种
3	重组核酸疫苗 C	5	5 μ g (100 μ L) /只/次	Day0 , Day21 左腹股沟皮下接种
4	PBS	5	100 μ L/只/次	Day0 , Day21 左腹股沟皮下接种
5	无 (阴性对照组)	1	无	无

将各组小鼠按照表 3 的免疫流程进行两次免疫,Day34 时小鼠使用 100 μ L(200mg/mL) 的链霉素溶液灌胃增强细菌攻毒效果,Day35 时攻毒。细菌攻毒前 4h 禁食,小鼠使用 100 μ L 沙门氏菌菌液 (1×10^7 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 处死小鼠取材,检测不同组织的载菌量,评估疫苗的免疫保护效果。免疫、攻毒及取样日程如图 5 所示。

取每只小鼠等量的粪便、脾脏、肝脏组织,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 稀释溶液均匀涂在固体培养基上培养 24h,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 6、图 7、图 8 所示。

图 6 为小鼠免疫攻毒后各实验组的粪便载菌量对比,其中图 6A 为免疫攻毒后各实验组的小鼠粪便载菌量涂板照片,图 6B 为免疫攻毒后各实验组的小鼠粪便载菌量分析对比图。结果显示阴性对照组载菌量为 0,对比实验成立。相较于 PBS 组小鼠,疫苗 A 免疫组小鼠

的沙门氏菌载量显著下降，约下降 3 倍；疫苗 B、疫苗 C 免疫组小鼠的载菌量没有出现下降。

图 7 为小鼠免疫攻毒后各实验组的脾脏组织载菌量对比，其中图 7A 为免疫攻毒后各实验组的小鼠脾脏组织的细菌载量涂板照片，图 7B 为免疫攻毒后各实验组的小鼠脾脏组织的细菌载量的分析对比图。结果显示，阴性对照组载菌量为 0，对比实验成立。相较于 PBS 组小鼠，疫苗 A 免疫组小鼠的沙门氏菌载量显著下降，约下降 7 倍；疫苗 B 免疫组小鼠的载菌量没有出现下降；疫苗 C 免疫组小鼠的载菌量出现下降。

图 8 为小鼠免疫攻毒后各实验组的肝脏载菌量对比，其中图 8A 为免疫攻毒后各实验组的小鼠肝组织的细菌载量涂板照片，图 8B 为免疫攻毒后各实验组的小鼠肝组织的细菌载量的分析对比图。结果显示，阴性对照组载菌量为 0，对比实验成立。相较于 PBS 组小鼠，疫苗 A 免疫组小鼠的沙门氏菌载量显著下降，约下降 50 倍；疫苗 B 免疫组小鼠的载菌量没有出现下降；疫苗 C 免疫组小鼠的载菌量出现下降。

综上所述，本发明提供的 PstS-LpfB、PstS-YidR、LpfB-SinH 三种融合蛋白中，PstS-LpfB 是最佳组合，能够诱导模式动物小鼠产生有效的保护性免疫，针对沙门氏菌感染有良好的预防效果。PstS-LpfB 融合蛋白是优选的疫苗靶点。因此，本发明提供了优选的抗原组合，能够应用于疫苗研发，填补当前沙门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。

说明书附图

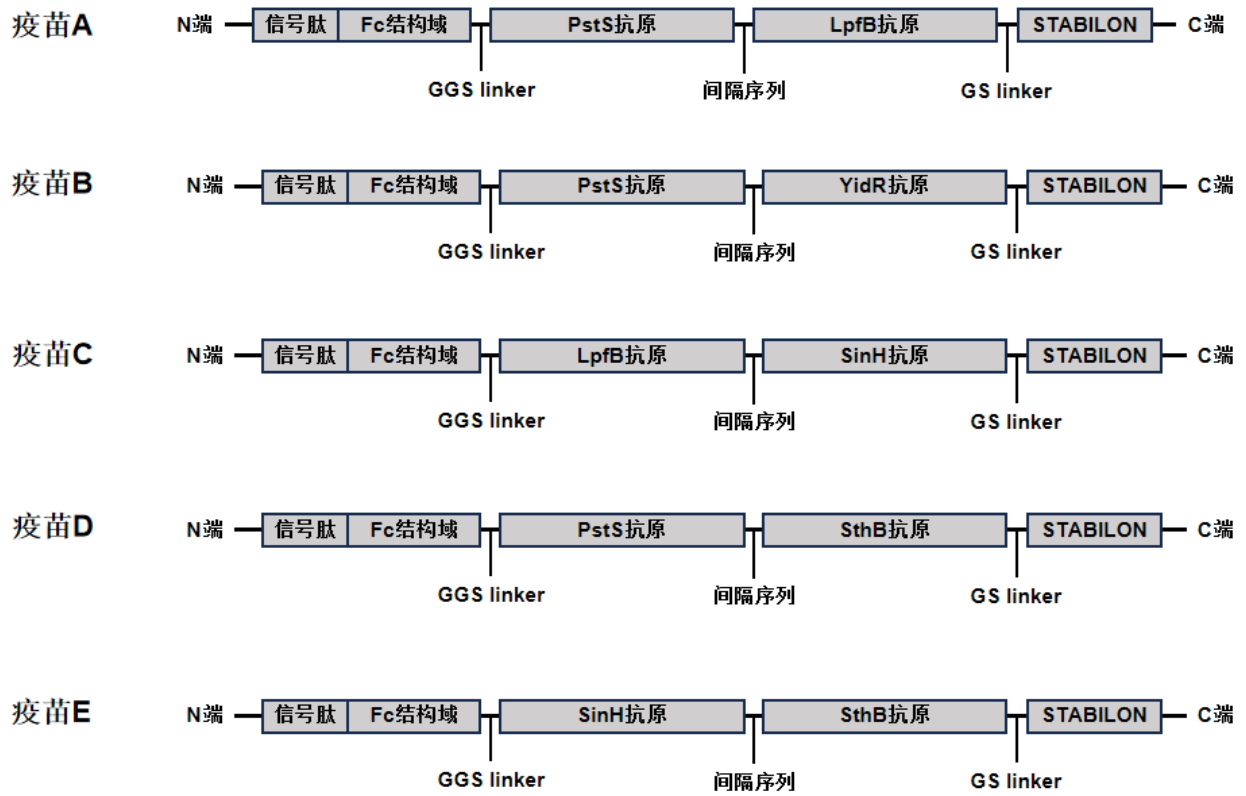


图 1

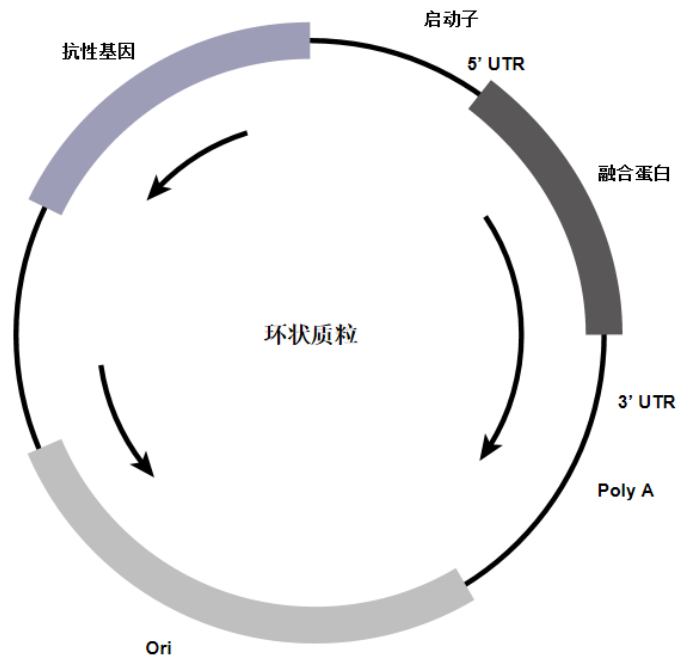


图 2

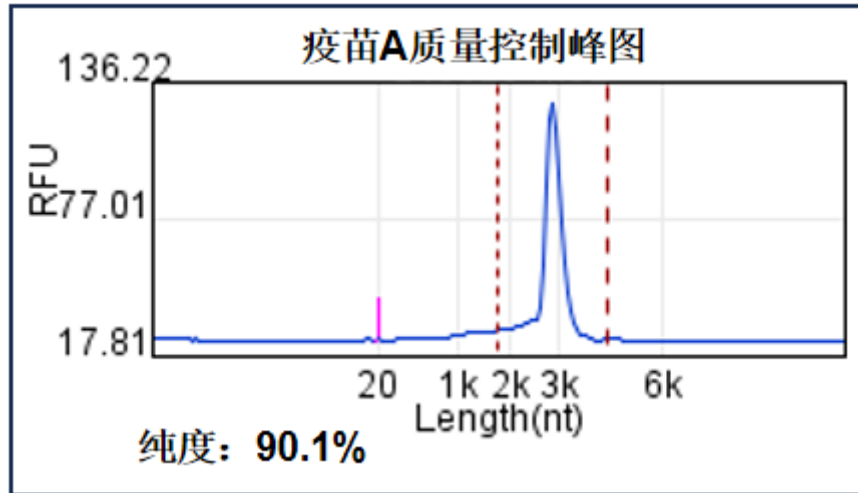


图 3A

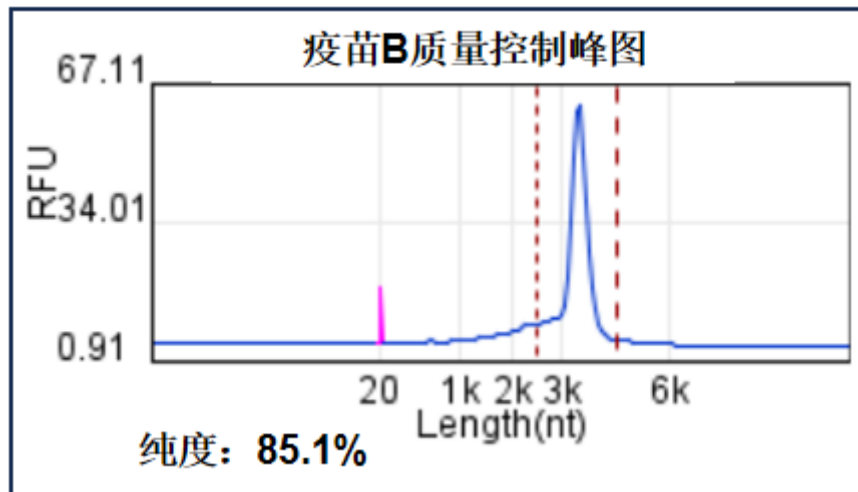


图 3B

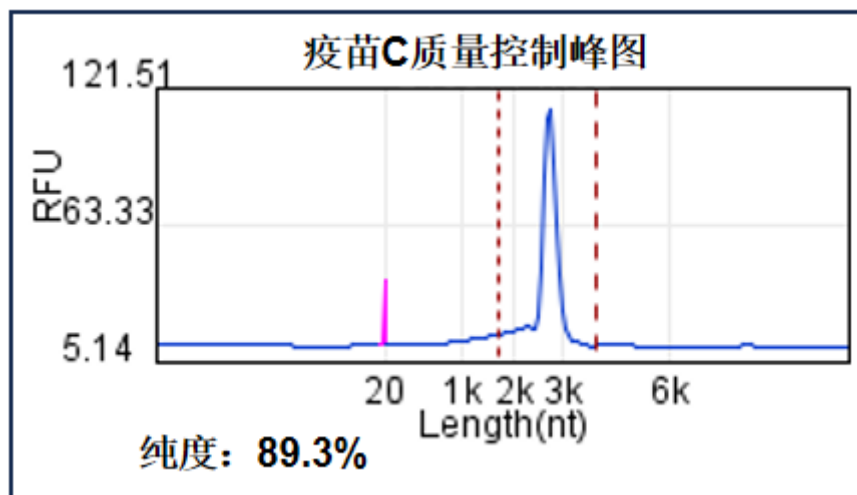


图 3C

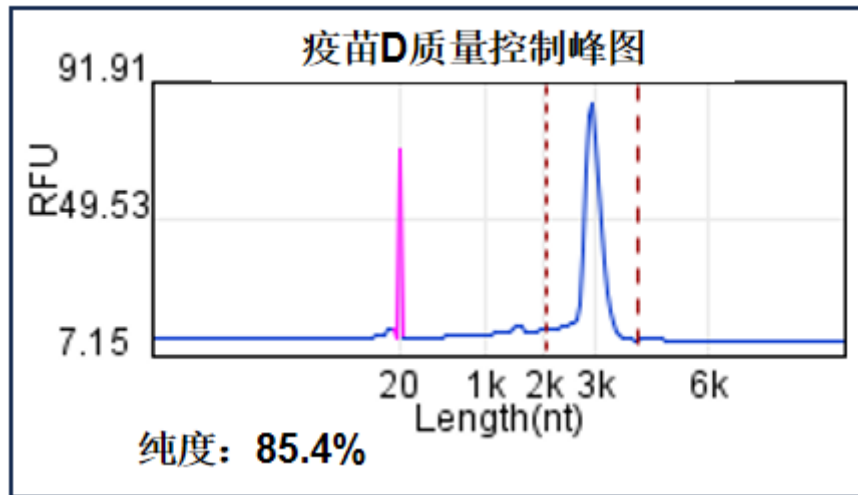


图 3D

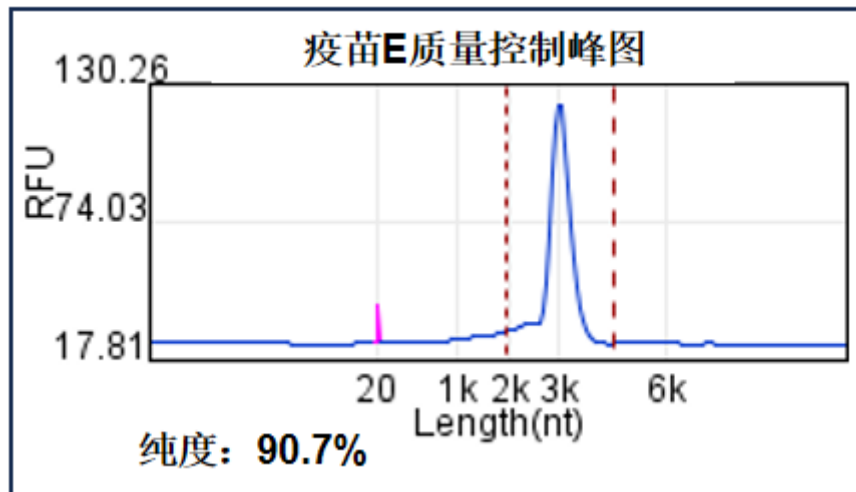


图 3E

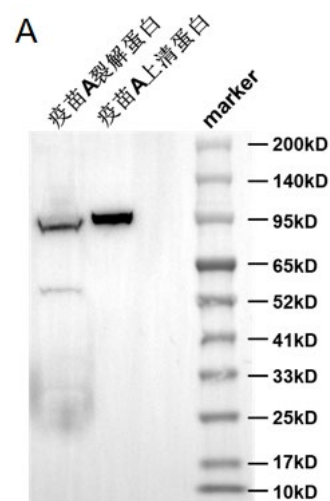


图 4A

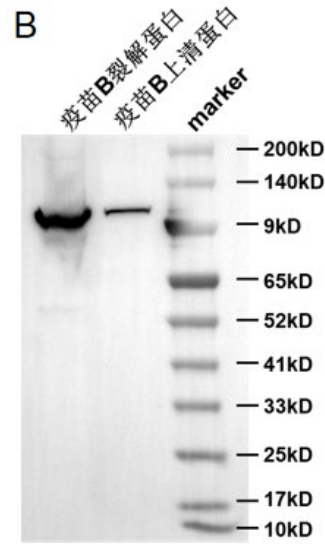


图 4B

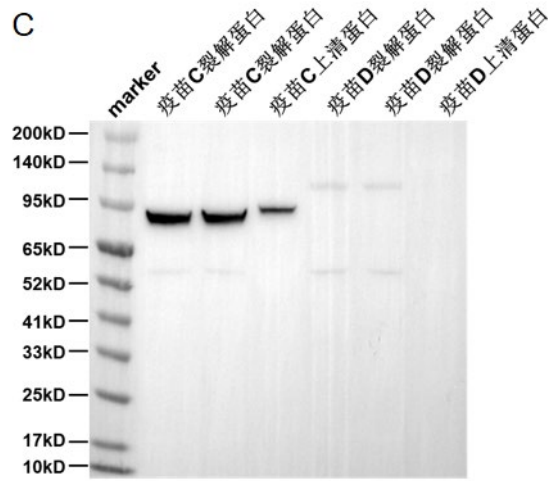


图 4C

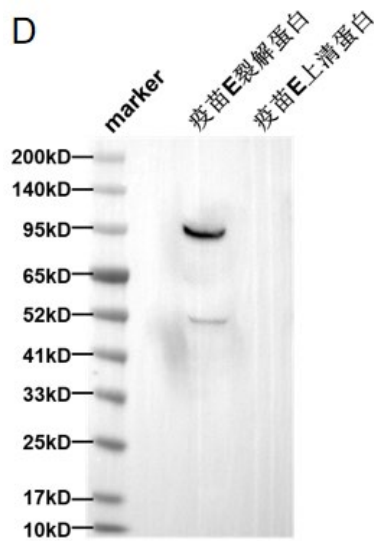


图 4D

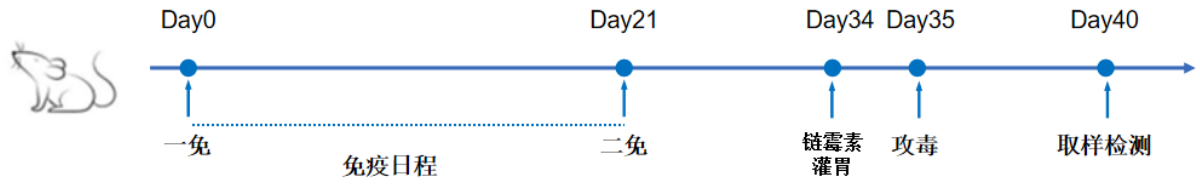


图 5

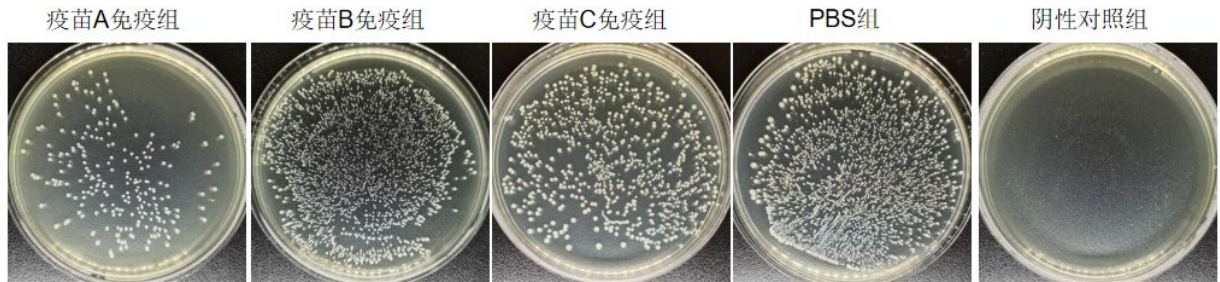


图 6A

粪便载菌量

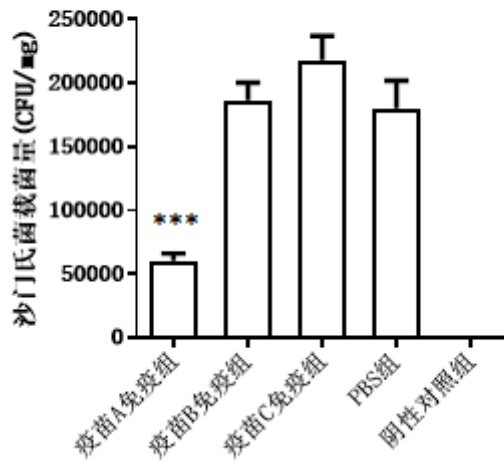


图 6B

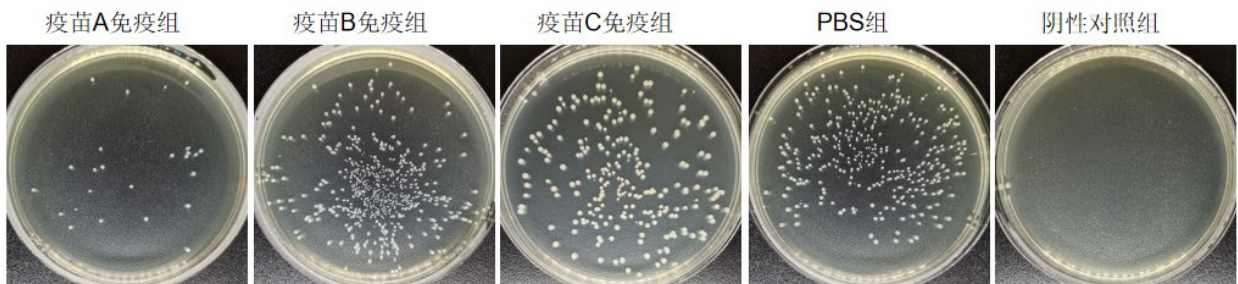


图 7A

脾脏载菌量

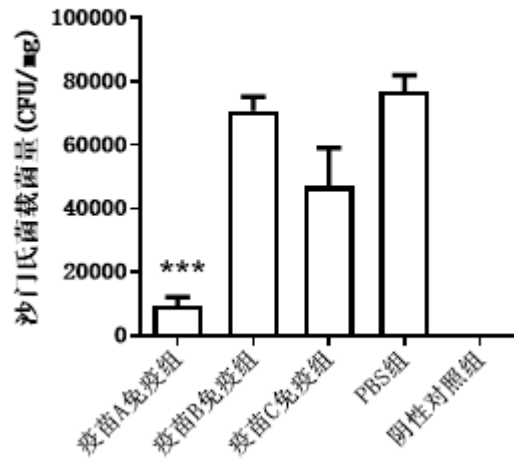


图 7B

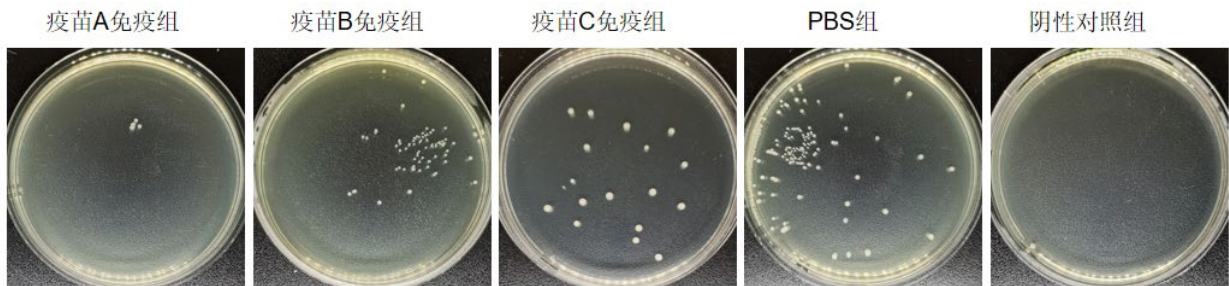


图 8A

肝脏载菌量

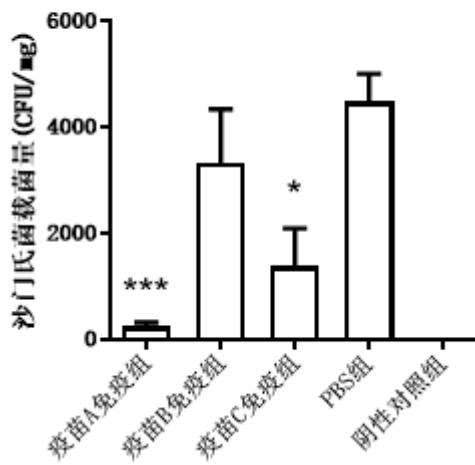


图 8B