(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 120554532 A
(43)申请公布日 2025.08.29

(21)申请号 202510700970.0

(22)申请日 2025.05.28

(71)申请人 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

(72)发明人 韩悌云　徐实　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 11245
专利代理师 陆惠中

(51)Int.Cl.
C07K 19/00(2006.01)
C12N 15/62(2006.01)
C12N 15/70(2006.01)
C12N 1/21(2006.01)
A61K 39/09(2006.01)
A61K 39/385(2006.01)
A61P 31/04(2006.01)
C12R 1/19(2006.01)

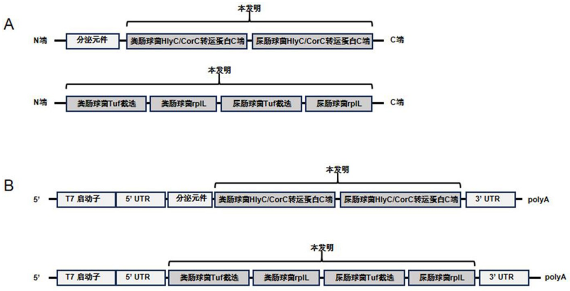
权利要求书2页　说明书15页
序列表（电子公布）　附图8页

(54)发明名称

一种预防致病性肠球菌感染的融合蛋白及其应用

(57)摘要

本发明涉及一种预防致病性肠球菌感染的融合蛋白、免疫原性组合物、重组疫苗及其应用等。本发明选取屎肠球菌和粪肠球菌的HlyC/CorC转运蛋白(HlyC/CorC family transporter)抗原构建得到融合蛋白A,选取屎肠球菌和粪肠球菌的延伸因子Tu(Elongation factor Tu,Tuf)抗原、50S核糖体蛋白L7/L12(50S ribosomal protein L7/L12,rplL)抗原构建得到融合蛋白B。基于两种融合蛋白的疫苗均可显著减弱屎肠球菌和粪肠球菌引发的组织感染,具有良好的免疫原性,起到有效预防和免疫保护作用,可高效预防致病性肠球菌感染,具有广阔的应用前景。



1.一种融合蛋白,其特征在于,选自以下(1)-(3)中任一种:

融合蛋白A,所述融合蛋白A包含粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)和/或屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)来源的HlyC/CorC转运蛋白(HlyC/CorC family transporter)抗原;优选地,所述HlyC/CorC转运蛋白抗原截选自HlyC/CorC转运蛋白的C端结构域;更优选地,所述HlyC/CorC转运蛋白抗原包含针对糖基化位点的突变;最优选地,所述糖基化位点的突变包含N68Q和/或T56A;

融合蛋白B,所述融合蛋白B包含粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)和/或屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)来源的延伸因子Tu(Elongation factor Tu,Tuf)抗原、50S核糖体蛋白L7/L12(50S ribosomal protein L7/L12,rplL)抗原;

所述融合蛋白A和所述融合蛋白B的组合。

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从N端到C端依次包含粪肠球菌来源的HlyC/CorC转运蛋白抗原、屎肠球菌来源的HlyC/CorC转运蛋白抗原;所述融合蛋白B从N端到C端依次包含粪肠球菌来源的延伸因子Tu抗原、粪肠球菌来源的50S核糖体蛋白L7/L12抗原、屎肠球菌来源的延伸因子Tu抗原、屎肠球菌来源的50S核糖体蛋白L7/L12抗原。

3.根据权利要求1或2任一项所述的融合蛋白,其特征在于,所述粪肠球菌来源的HlyC/CorC转运蛋白抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO: 1所示,所述屎肠球菌来源的HlyC/CorC转运蛋白抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO: 2所示,所述粪肠球菌来源的延伸因子Tu抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO: 3所示,所述粪肠球菌来源的50S核糖体蛋白L7/L12抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO: 4所示,所述屎肠球菌来源的延伸因子Tu抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO: 5所示,所述屎肠球菌来源的50S核糖体蛋白L7/L12抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO: 6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,所述抗原之间可以任选地通过linker序列或间隔序列连接;优选地,所述linker序列为GGS linker序列;更优选地,所述GGS linker序列的氨基酸序列如SEQ ID NO: 11所示,所述间隔序列的氨基酸序列如SEQ ID NO: 12所示。

5.根据权利要求1-4任一项所述的融合蛋白,其特征在于,所述融合蛋白A的氨基酸序列如SEQ ID NO: 7所示,所述融合蛋白B的氨基酸序列如SEQ ID NO: 8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,所述融合蛋白A的N端还包含信号肽和/或任意促进分泌的元件;优选地,所述信号肽来源于人的蓝啶(Azurocidin)蛋白,所述促进分泌的元件来源于免疫球蛋白重链恒定区γ1蛋白(Immunoglobulin Heavy Constant Gamma 1,IGHG1)的Fc结构域;更优选地,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: 9所示,所述来源于免疫球蛋白重链恒定区γ1蛋白的Fc结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO: 10所示。

7.一种重组核酸分子,其特征在于,编码权利要求1-6任一项所述融合蛋白;优选地,所述重组核酸分子为mRNA或DNA。

8.一种重组基因表达盒,其特征在于,包含权利要求7所述重组核酸分子;优选地,所述重组基因表达盒还包括调控序列(Regulatory sequence)中的一种或多种;更优选地,所述调控序列包含启动子、增强子、终止子。

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

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

11.一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1-6任一项所述融合蛋白,和/或一种或多种权利要求7所述重组核酸分子,和/或一种或多种权利要求8所述重组基因表达盒,和/或一种或多种权利要求9所述重组载体,和/或一种或多种权利要求10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。

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,或所述免疫原性组合物或药物组合物中包含表达所述融合蛋白A和融合蛋白B的重组核酸分子;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。

13.一种重组疫苗,其特征在于,包含一种或多种权利要求1-6任一项所述融合蛋白,和/或一种或多种权利要求7所述重组核酸分子,和/或一种或多种权利要求8所述重组基因表达盒,和/或一种或多种权利要求9所述重组载体,和/或一种或多种权利要求10所述重组宿主细胞,和/或一种或多种权利要求11或12所述免疫原性组合物或药物组合物;优选地,所述重组疫苗包含所述融合蛋白A和融合蛋白B,或所述重组疫苗包含表达所述融合蛋白A和融合蛋白B的重组核酸分子;更优选地,所述融合蛋白A和融合蛋白B的质量比为1:1。

14.一种或多种权利要求1-6任一项所述融合蛋白,和/或一种或多种权利要求7所述重组核酸分子,和/或一种或多种权利要求8所述重组基因表达盒,和/或一种或多种权利要求9所述重组载体,和/或一种或多种权利要求10所述重组宿主细胞,和/或一种或多种权利要求11或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。

15.根据权利要求14所述的用途,其特征在于,所述药物用于预防和/或治疗肠球菌引起的感染或疾病;优选地,所述肠球菌为致病性和/或耐药性肠球菌;优选地,所述肠球菌为粪肠球菌和/或屎肠球菌;优选地,所述肠球菌引起的感染或疾病为尿路感染、腹腔感染、伤口感染、菌血症、心内膜炎、脑膜炎、其他类型的感染;优选地,其他类型的感染包含呼吸道感染、皮肤软组织感染、妇科感染。

一种预防致病性肠球菌感染的融合蛋白及其应用

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,具体涉及一种预防致病性肠球菌感染的融合蛋白、疫苗及其应用等。

背景技术

[0002] 致病性肠球菌(*Enterococcus spp.*)是临床上重要的条件致病菌,主要包括粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)和屎肠球菌(*Enterococcus faecium*),感染免疫力低下人群,如医院重症患者、术后患者及长期使用抗生素者。二者可引起尿路感染、腹腔感染、菌血症、心内膜炎等多种疾病,其中医院获得性感染占比高达 80% 以上。近年来,由于万古霉素耐药肠球菌(VRE)的全球流行,其感染治疗面临严峻挑战,特别是屎肠球菌对多种抗生素的耐药率已超过 60%。据CHINET监测数据,屎肠球菌的临床分离比例已从5%-10%上升至40%-50%,其耐药性普遍高于粪肠球菌,进一步加剧了治疗难度。肠球菌感染常与其他病原菌协同致病,如与大肠杆菌混合感染可加剧腹腔脓肿的形成,且其生物膜形成能力增强了对宿主免疫系统和抗生素的抵抗。据世界卫生组织(WHO)统计,全球每年因肠球菌感染导致的死亡病例超过 10 万例,尤其在新生儿和老年患者中病死率高达 20%-30%。

[0003] 安全有效的疫苗被认为是预防和控制致病性肠球菌感染的最佳措施。然而,目前尚无针对致病性肠球菌的商业化疫苗。主要原因在于肠球菌的血清型多样性、耐药基因的高度可塑性(如CRISPR-Cas系统的缺失导致基因水平转移频繁)、表面毒力因子多样性高、以及传统多糖疫苗对革兰氏阳性菌的免疫原性较弱。此外,与肺炎链球菌类似,肠球菌的荚膜多糖和细胞壁成分存在显著菌株差异,难以通过单一抗原覆盖主要致病型别。因此,基于保守蛋白抗原的疫苗设计成为突破方向。保守抗原在不同菌株中高度同源,可避免血清型替代问题,且能激发细胞免疫和体液免疫的协同保护作用。

[0004] 为了克服现有疫苗的局限性,研究人员正在积极开发新型致病性肠球菌疫苗。例如,现有技术专利WO2023205627A1(公开日2023-10-26)公开了一种粪肠球菌疫苗及其用途,可以在一定程度上降低组织菌载量。尽管现有技术展示了研发人员在致病性肠球菌疫苗开发过程中所做出的努力,但仍面临许多挑战。致病性肠球菌分为粪肠球菌和屎肠球菌,现有技术大多是针对粪肠球菌,但是对于耐药性和感染率逐年增加的屎肠球菌没有投入足够的关注。此外,疫苗的免疫机制研究仍需深入,以更好地理解如何通过疫苗诱导机体产生持久、有效的免疫反应,包括体液免疫和细胞免疫的协同作用。在疫苗研发过程中,还需考虑安全性、生产成本、质量控制等问题,以确保疫苗能够大规模生产和广泛应用。

[0005] 综上所述,新一代致病性肠球菌疫苗的研发迫在眉睫,其将成为解决当前传统疫苗各项问题的关键。新型疫苗不仅有望提供更广泛的保护,还可能降低生产成本,使疫苗更容易在全球范围内推广使用。这些研究不仅对控制致病性肠球菌感染至关重要,还为其他细菌性疫苗的开发提供了新的思路和方法。因此,本领域仍亟需一种能够有效预防和免疫保护致病性肠球菌感染,特别是对粪肠球菌和屎肠球菌感染均可提供有效保护的疫苗。

发明内容

[0006] 针对现有技术的不足,本发明提供一种预防致病性肠球菌感染的融合蛋白、编码核酸、包含其的表达载体、重组细胞、免疫原性组合物、重组疫苗、治疗方法以及医药用途等。本发明选取屎肠球菌和粪肠球菌的HlyC/CorC转运蛋白(HlyC/CorC family transporter)抗原构建得到融合蛋白A,选取屎肠球菌和粪肠球菌的延伸因子Tu(Elongation factor Tu,Tuf)抗原、50S核糖体蛋白L7/L12(50S ribosomal protein L7/L12,rplL)抗原构建得到融合蛋白B。基于两种融合蛋白的疫苗均可显著减弱屎肠球菌和粪肠球菌引发的组织感染,具有良好的免疫原性,起到有效预防和免疫保护作用,高效预防致病性肠球菌感染,具有广阔的应用前景

本发明的一方面提供一种融合蛋白,其特征在于,选自以下(1)-(3)中任一种:

(1)融合蛋白A,所述融合蛋白A包含粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)和/或屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)来源的HlyC/CorC转运蛋白(HlyC/CorC family transporter)抗原;优选地,所述HlyC/CorC转运蛋白抗原截选自HlyC/CorC转运蛋白的C端结构域;更优选地,所述HlyC/CorC转运蛋白抗原包含针对糖基化位点的突变;最优选地,所述糖基化位点的突变包含N68Q和/或T56A;

(2)融合蛋白B,所述融合蛋白B包含粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)和/或屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)来源的延伸因子Tu(Elongation factor Tu,Tuf)抗原、50S核糖体蛋白L7/L12(50S ribosomalprotein L7/L12,rplL)抗原;

(3)所述融合蛋白A和所述融合蛋白B的组合。

[0007] 进一步地,所述融合蛋白A从N端到C端依次包含粪肠球菌来源的HlyC/CorC转运蛋白抗原、屎肠球菌来源的HlyC/CorC转运蛋白抗原;所述融合蛋白B从N端到C端依次包含粪肠球菌来源的延伸因子Tu抗原、粪肠球菌来源的50S核糖体蛋白L7/L12抗原、屎肠球菌来源的延伸因子Tu抗原、屎肠球菌来源的50S核糖体蛋白L7/L12抗原。

[0008] 进一步地,所述粪肠球菌来源的HlyC/CorC转运蛋白抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO: 1所示,所述屎肠球菌来源的HlyC/CorC转运蛋白抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO: 2所示,所述粪肠球菌来源的延伸因子Tu抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO: 3所示,所述粪肠球菌来源的50S核糖体蛋白L7/L12抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO: 4所示,所述屎肠球菌来源的延伸因子Tu抗原的氨基酸序列如SEQID NO: 5所示,所述屎肠球菌来源的50S核糖体蛋白L7/L12抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO: 6所示。

[0009] 进一步地,所述抗原之间可以任选地通过linker序列或间隔序列连接;优选地,所述linker序列为GGS linker序列;更优选地,所述GGS linker序列的氨基酸序列如SEQ ID NO: 11所示,所述间隔序列的氨基酸序列如SEQ ID NO: 12所示。

[0010] 进一步地,所述融合蛋白A的氨基酸序列如SEQ ID NO: 7所示,所述融合蛋白B的氨基酸序列如SEQ ID NO: 8所示。

[0011] 进一步地,所述融合蛋白A的N端还包含信号肽和/或任意促进分泌的元件;优选地,所述信号肽来源于人的蓝啶(Azurocidin)蛋白,所述促进分泌的元件来源于免疫球蛋白重链恒定区γ1蛋白(Immunoglobulin Heavy Constant Gamma 1,IGHG1)的Fc结构域;更优选地,所述来源于人的蓝啶蛋白的信号肽的氨基酸序列如SEQID NO: 9所示,所述来源于免疫球蛋白重链恒定区γ1蛋白的Fc结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO: 10所示。

[0012] 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;优选地,所述重组核酸分子为mRNA或DNA。

[0013] 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;;优选地,所述重组基因表达盒还包括调控序列(Regulatory sequence)中的一种或多种;更优选地,所述调控序列包含启动子、增强子、终止子。

[0014] 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。

[0015] 进一步地,所述重组载体包含原核载体或真核载体。

[0016] 进一步地,所述原核载体包含但不限于大肠杆菌载体。

[0017] 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。

[0018] 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。

[0019] 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。

[0020] 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。

[0021] 进一步地,所述重组宿主细胞包含真核细胞或原核细胞。

[0022] 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。

[0023] 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。

[0024] 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。

[0025] 进一步地,所述大肠杆菌细胞包含但不限于BL21(DE3)、DH5α、TOP10、Rosetta。

[0026] 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。

[0027] 进一步地,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,或所述免疫原性组合物或药物组合物中包含表达所述融合蛋白A和融合蛋白B的重组核酸分子;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。

[0028] 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;优选地,所述重组疫苗包含所述融合蛋白A和融合蛋白B,或所述重组疫苗包含表达所述融合蛋白A和融合蛋白B的重组核酸分子;更优选地,所述重组疫苗中的所述融合蛋白A和融合蛋白B的质量比为1:1。

[0029] 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。

[0030] 进一步地,所述药物用于预防和/或治疗肠球菌引起的感染或疾病;优选地,所述肠球菌为致病性和/或耐药性肠球菌;优选地,所述肠球菌为粪肠球菌和/或屎肠球菌;优选地,所述肠球菌引起的感染或疾病为尿路感染、腹腔感染、伤口感染、菌血症、心内膜炎、脑膜炎、其他类型的感染;优选地,其他类型的感染包含呼吸道感染、皮肤软组织感染、妇科感染。

[0031] 本发明的另一方面提供一种预防和/或治疗肠球菌引起的感染或疾病的方法,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;优选地,所述肠球菌为致病性和/或耐药性肠球菌;优选地,所述肠球菌为粪肠球菌和/或屎肠球菌;优选地,所述肠球菌引起的感染或疾病为尿路感染、腹腔感染、伤口感染、菌血症、心内膜炎、脑膜炎、其他类型的感染;优选地,其他类型的感染包含呼吸道感染、皮肤软组织感染、妇科感染。

[0032] 本发明的融合蛋白、重组疫苗等具有如下有益技术效果:

1、本发明借助反向疫苗学的分析方式,结合前期研发经验,选定HlyC/CorC转运蛋白抗原(Hly)、延伸因子Tu抗原(Tuf)、50S核糖体蛋白L7/L12抗原(rplL)作为疫苗开发的候选抗原。

[0033] 2、本发明采用抗原截选和融合表达的方式来进行疫苗设计。对于分子量较大的Hly抗原需要进行结构域和表位截选,通过多种截选与多种表位组合,进行正交、单因素等实验进行筛选,最终获得本发明选择的截选的Hly,然后将屎肠球菌和粪肠球菌截选的Hly进行融合表达,作为融合蛋白A。将屎肠球菌和粪肠球菌的Tuf、rplL抗原融合表达,作为融合蛋白B。两种融合蛋白分子均可显著减弱屎肠球菌和粪肠球菌引发的组织感染,具有良好的免疫原性,起到有效预防和免疫保护作用,高效预防致病性肠球菌感染。

[0034] 3、本发明对截选Hly抗原的糖基化位点突变,为了避免原核蛋白在真核细胞中表达的时候发生糖基化,影响表位正确呈递。突变后的截选Hly抗原,可改善候选抗原的表达情况、提高抗原的免疫原性。

[0035] 4、实施例5表明,疫苗A(基于融合蛋白A)在上清和细胞裂解物中均检测到目的蛋白显著表达,且分子量大小均符合预期。这证明基于本发明的融合蛋白A不仅能够在真核细胞中顺利翻译、正确折叠,而且结构稳定、能够高效分泌到胞外,可以用于后续动物试验,验证免疫保护效果。疫苗B(基于融合蛋白B)在细胞裂解物中检测到目的蛋白显著表达,且分子量大小符合预期。这证明基于本发明的融合蛋白B能够在真核细胞中顺利翻译、正确折叠、高丰度表达,可以用于后续动物试验,验证免疫保护效果。

[0036] 5、实施例6、7分别证明了基于本发明的重组核酸疫苗在小鼠屎肠球菌、粪肠球菌

灌胃感染模型中的预防效果。结果表明,基于本发明的重组核酸疫苗A、疫苗B均能够在小鼠模型中提供针对屎肠球菌、粪肠球菌的有效免疫保护,接种疫苗的小鼠能够产生显著的保护性免疫,预防屎肠球菌、粪肠球菌感染。并且,将重组核酸疫苗A和疫苗B组合后,相对于疫苗A、疫苗B单独使用,取得了协同增效的效果,极显著地降低了免疫攻毒后各组织载菌量,有效预防屎肠球菌、粪肠球菌感染。

[0037] 6、本发明提供的重组疫苗能够诱导模式动物小鼠产生有效的保护性免疫,针对两种主要的致病性肠球菌感染有良好的预防效果,并且两种融合蛋白共同免疫时,效果最佳,具有协同增效作用。因此,本发明能够应用于免疫药物的生产和研发,填补当前肠球菌疫苗研发领域的空白,具有广泛的应用前景。

附图说明

[0038] 图1为Hly抗原截选前、后的蛋白结构示意图;其中,A示例性地展示了肠球菌Hly抗原的全长蛋白结构,B示例性地展示了截选的肠球菌Hly抗原蛋白结构。

[0039] 图2为含有本发明的疫苗非限制性分子结构示意图;其中,A为疫苗所表达蛋白的分子示意图;B为核酸疫苗的分子示意图。

[0040] 图3为包含本发明的模板质粒示意图。

[0041] 图4A-图4B分别为包含本发明的疫苗A、疫苗B质量控制峰图以及纯度检测结果。

[0042] 图5A-图5B分别展示了本发明的疫苗A、疫苗B转染HEK293细胞的体外表达WB(Western blot)检测结果。。

[0043] 图6为本发明疫苗在小鼠屎肠球菌灌胃感染模型中的免疫及取样流程。

[0044] 图7A-图7D分别为小鼠免疫攻毒屎肠球菌后的肝脏组织、脾脏组织、空肠组织、粪便组织的载菌量对比。

[0045] 图8为本发明疫苗在小鼠粪肠球菌灌胃感染模型中的免疫及取样流程。

[0046] 图9A-图9D分别为小鼠免疫攻毒粪肠球菌后的肝脏组织、脾脏组织、空肠组织、粪便组织的载菌量对比。

具体实施方式

[0047] 术语和定义

术语“屎肠球菌”指*Enterococcus faecium*,是一种革兰氏阳性菌,属于肠球菌属(*Enterococcus*),具备γ-溶血性或非溶血性,对多种常用抗生素具有耐药性,是导致医院获得性感染的重要病原体之一。

[0048] 术语“粪肠球菌”指*Enterococcus faecalis*,与屎肠球菌一样,同属于肠球菌属(*Enterococcus*),对多种常用抗生素具有耐药性,是导致医院获得性感染的重要病原体之一。

[0049] 术语“肠球菌感染”指由屎肠球菌和/或粪肠球菌引起的各种疾病,包括但不限于尿路感染、菌血症、心内膜炎、腹腔感染、伤口感染、脑膜炎、其他类型的感染等,其他类型的感染包含呼吸道感染、皮肤软组织感染、妇科感染等。

[0050] 术语“HlyC/CorC family transporter”即HlyC/CorC转运蛋白(简称Hly),指一类在多种细菌中广泛存在的膜转运蛋白家族成员。该家族成员通常包含溶血素C(HlyC)和钴

抗性蛋白(CorC)转运域,与镁离子和钴离子的外排功能相关。该家族蛋白可能还涉及离子底物转运的调节,但其确切机制尚未完全明确。本发明对Hly进行结构域和表位截选,获得HlyC/CorC转运蛋白抗原。所述HlyC/CorC转运蛋白抗原来源于任意物种,优选地,来源于粪肠球菌、屎肠球菌。所述粪肠球菌来源的HlyC/CorC转运蛋白抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO: 1所示,所述屎肠球菌来源的HlyC/CorC转运蛋白抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO: 2所示。

[0051] 术语"Tuf"指延伸因子Tu(Elongation Factor Tu),缩写为EF-Tu或Tuf,是一种在蛋白质合成过程中发挥关键作用的GTP结合蛋白,广泛存在于原核生物和真核生物的细胞质以及线粒体和叶绿体中,是翻译延伸过程中必不可少的因子,负责在核糖体上将氨酰-tRNA(氨酰化的转运RNA)正确地转移到核糖体的A位点(氨酰-tRNA结合位点)。所述Tuf来源于任意物种,优选地,来源于粪肠球菌、屎肠球菌。所述粪肠球菌来源的Tuf的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示,所述屎肠球菌来源的Tuf的氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示。

[0052] 术语"rplL"指50S核糖体蛋白L7/L12(50S ribosomal protein L7/L12),是构成核糖体的重要组成部分。所述rplL来源于任意物种,优选地,来源于粪肠球菌、屎肠球菌。所述粪肠球菌来源的rplL的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示,所述屎肠球菌来源的rplL的氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示。

[0053] 术语"C端结构域"指蛋白质分子中靠近羧基末端(C端)的一个功能或结构单元,与N端结构域相对,处于蛋白质的另一端,通常具有独立的三维结构,或包含特定的氨基酸序列或保守区域,从而具备特定的生物学功能。

[0054] 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。

[0055] 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。

[0056] 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。

[0057] 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。

[0058] 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。

[0059] 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。

[0060] 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。

[0061] 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。

[0062] 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。

[0063] 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。

[0064] 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)。

[0065] 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。

[0066] 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、抗粘合剂、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。

[0067] 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。

[0068] 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相同含义。

[0069] 本发明公开了一种新的预防致病性肠球菌感染的疫苗、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进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

[0070] 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。

[0071] 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。

[0072] 实施例1肠球菌通用疫苗设计思路

为了设计出能够同时预防屎肠球菌和粪肠球菌的疫苗,本发明采用融合蛋白的方式来构建用于生产疫苗的分子。具体思路如下:

首先,借助反向疫苗学的分析方式,结合前期研发经验,选定HlyC/CorC转运蛋白抗原(Hly)、延伸因子Tu抗原(Tuf)、50S核糖体蛋白L7/L12抗原(rplL)作为疫苗开发的候选抗原。由于屎肠球菌和粪肠球菌的抗原序列同源性较低,因此本发明采用抗原截选和融合表达的方式来进行疫苗设计。对于分子量较大的Hly抗原需要进行结构域和表位截选,通过多种截选与多种表位组合,进行正交、单因素等实验进行筛选,最终获得本发明选择的截选的Hly,然后将两种肠球菌中截选的Hly进行融合表达,作为融合蛋白A;将两种肠球菌的Tuf、rplL抗原融合表达,作为融合蛋白B。

[0073] 图1为展示Hly抗原截选前、后的蛋白结构示意图。如图1中A示例性地展示了肠球菌Hly抗原的全长蛋白结构,从N端到C端具有3个较为独立的结构域。考虑到融合蛋白的稳定性以及尽可能多地纳入抗原表位,本实施例截选了结构域2和结构域3作为构建融合蛋白的Hly抗原序列。

[0074] 如图1中B所示,示例性地展示了截选的Hly抗原蛋白结构,截选后的抗原仍旧保留了结构域2和结构域3的原本构象,证明这两个结构域是相对稳定的,可以用于融合蛋白的设计。

[0075] 按照上述方式,最终设计出如图2所示两种疫苗分子,其中A为疫苗所表达蛋白的分子示意图;B为核酸疫苗的分子示意图。由于Hly抗原原本具备的N端信号肽元件在截选后丢失,因此在N端额外增加分泌元件,用于促进抗原在宿主细胞中正确表达。此外,本发明对截选Hly抗原的糖基化位点突变,为了避免原核蛋白在真核细胞中表达的时候发生糖基化,影响表位正确呈递。突变后的截选Hly抗原,可改善候选抗原的表达情况、提高抗原的免疫原性。

[0076] 实施例2包含本发明的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,并验证基于本发明的疫苗是否具有良好的体外表达效果,实施例中涉及的疫苗分子架构如图2中的B所示。为了制备能够产生如图2中的B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、含有本发明的编码序列(Coding sequence,CDS)、3’UTR、PolyA。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,本发明的模板质粒示意图如图3所示,得到用于制备重组核酸疫苗的载体质粒。

[0077] 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-IGHG的Fc结构域-粪肠球菌HlyC/CorC转运蛋白抗原-屎肠球菌HlyC/CorC转运蛋白抗原”融合基因片段,IGHG的Fc结构域(即“免疫球蛋白重链恒定区γ1蛋白的Fc结构域”)和粪肠球菌HlyC/CorC转运蛋白抗原之间通过氨基酸序列如SEQ ID NO: 11所示的GGS linker序列连接,粪肠球菌HlyC/CorC转运蛋白抗原和屎肠球菌HlyC/CorC转运蛋白抗原之间通过氨基酸序列如SEQ ID NO: 12所示的间隔序列连接,信号肽(即“人的蓝啶蛋白的信号肽”)的氨基酸序列如SEQID NO: 9所示,IGHG的Fc结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO: 10所示,粪肠球菌的HlyC/CorC转运蛋白抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO: 1所示,屎肠球菌的HlyC/CorC转运蛋白抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO: 2所示。其中,粪肠球菌的HlyC/CorC转运蛋白抗原包含N68Q的糖基化突变位点。屎肠球菌的HlyC/CorC转运蛋白抗原包含T56A的糖基化突变位点。其中,融合蛋白A为核心元件,即由粪肠球菌HlyC/CorC转运蛋白抗原-间隔序列-屎肠球菌HlyC/CorC转运蛋白抗原组成,所述融合蛋白A的氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示。

[0078] 步骤b:构建核酸疫苗架构载体。

[0079] 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。

[0080] 步骤c:制备重组质粒。

[0081] 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。

[0082] (2) 基于本发明的重组核酸疫苗B制备载体

步骤a:合成“粪肠球菌延伸因子Tu抗原-粪肠球菌50S核糖体蛋白L7/L12抗原-屎肠球菌延伸因子Tu抗原-屎肠球菌50S核糖体蛋白L7/L12抗原”融合基因片段,四个抗原之间通过氨基酸序列如SEQ ID NO: 12所示的间隔序列连接,粪肠球菌延伸因子Tu抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示,粪肠球菌50S核糖体蛋白L7/L12抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示,屎肠球菌延伸因子Tu抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示,屎肠球菌50S核糖体蛋白L7/L12抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示。融合蛋白B为核心元件,即由粪肠球菌延伸因子Tu抗原-间隔序列-粪肠球菌50S核糖体蛋白L7/L12抗原-间隔序列-屎肠球菌延伸因子Tu抗原-间隔序列-屎肠球菌50S核糖体蛋白L7/L12抗原组成,所述融合蛋白B的氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示。

[0083] 步骤b:构建核酸疫苗架构载体。

[0084] 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。

[0085] 步骤c:制备重组质粒。

[0086] 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。

[0087] 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
粪肠球菌的HlyC/CorC转运蛋白抗原	DSKMTRDEMRYMLETEGVLENEELEMLQGVFSLDTKVAREVMVPRTDAFMVDIQDDVQENINLILGEQYSRIPVYSEDKDKIVGILHTKTLLKAARNLGFENIELGAIIQEPLFVPETIFIDDLLYELKRTQNQMAILLDEYGGVVGLATLEDLLEEIVGEIDDETDEVENLYTQVADNEYLVQGRMLIDEFNEVFETDLHMSDVDTMAGYLITALGTIPDEGEKPSFEVGNIKLTAEEMEGTRLLVLRVHFYDEETVDEEPEENRRFFRKEMEDDEPRR(SEQ ID NO:1)
屎肠球菌的HlyC/CorC转运蛋白抗原	DSKMTRDEMRYMLENEGVLNNEELEMLQGVFSLDTKVAREVMVPRTDAFMIDINDAVEENVNEVLSENYSRIPVYNEDKDKVVGILHTKNLLKAAHKFGFDNLDIKKIMQEPLFVPETVFIDDLLYEMKKTQNQMAILLDEYGGVVGLATLEDLLEEIVGEIDDESDEVENLYEKIDEHEYIIQGRMLIDEFNEAFDSDLHMSDVDTMAGYLITALGMIPDEGEKLSFDVDNITLVSEEMEGSRILKIRVIFHDPEE(SEQ ID NO:2)
粪肠球菌延伸因子Tu抗原	DRSKSHVNIGTIGHVDHGKTTLTAAIATVLSKHGGGEAQSYDSIDNAPEEKERGITINTSHIEYETETRHYAHVDCPGHADYVKNMITGAAQMDGAILVVSAADGPMPQTREHILLSRNVGVPYIVVFLNKMDMVDDEELLELVEMEVRDLLSEYDFPGDDVPVIAGSALKALEGDESYEEKILELMAAVDEYIPTPE(SEQ ID NO:3)
粪肠球菌50S核糖体蛋白L7/L12抗原	MALNIENIVAELETATILELSELVKAIEEKFDVSAAAPVAVAGPAAGGAAEEQTEFTVELTAAGDQKVKVIKAVREATGLGLKEAKAVVDGAPAPVKEAVSKEEAEALKAALEEVGASVTVK(SEQ ID NO:4)
屎肠球菌延伸因子Tu抗原	DRSKPHVNIGTIGHVDHGKTTLTAAITTVLSKKNGGQAMAYDQIDGAPEERERGITISTAHVEYETDTRHYAHVDCPGHADYVKNMITGAAQMDGAILVVSAADGPMPQTREHILLSRQVGVPYIVVFLNKVDMVDDEELLELVEMEVRDLLTEYEFPGDDVPVVAGSALKALEGDASYEEKILELMAAVDEYIPTPE(SEQ ID NO:5)
屎肠球菌50S核糖体蛋白L7/L12抗原	MALNIENIVAELKEATILELNDLVKAIEEEFGVSAAAPVAVAAAGGAAAAEEQTEFTVELTAAGDQKVKVIKAVREATGLGLKEAKAVVDGAPAPVKEGVSKEEAEELKAKLEEVGASVTVK(SEQ ID NO:6)

融合蛋白A	DSKMTRDEMRYMLETEGVLENEELEMLQGVFSLDTKVAREVMVPRTDAFMVDIQDDVQENINLILGEQYSRIPVYSEDKDKIVGILHTKTLLKAARNLGFENIELGAIIQEPLFVPETIFIDDLLYELKRTQNQMAILLDEYGGVVGLATLEDLLEEIVGEIDDETDEVENLYTQVADNEYLVQGRMLIDEFNEVFETDLHMSDVDTMAGYLITALGTIPDEGEKPSFEVGNIKLTAEEMEGTRLLVLRVHFYDEETVDEEPEENRRFFRKEMEDDEPRRGGSGGGGSGGDSKMTRDEMRYMLENEGVLNNEELEMLQGVFSLDTKVAREVMVPRTDAFMIDINDAVEENVNEVLSENYSRIPVYNEDKDKVVGILHTKNLLKAAHKFGFDNLDIKKIMQEPLFVPETVFIDDLLYEMKKTQNQMAILLDEYGGVVGLATLEDLLEEIVGEIDDESDEVENLYEKIDEHEYIIQGRMLIDEFNEAFDSDLHMSDVDTMAGYLITALGMIPDEGEKLSFDVDNITLVSEEMEGSRILKIRVIFHDPEE(SEQ ID NO:7)
融合蛋白B	DRSKSHVNIGTIGHVDHGKTTLTAAIATVLSKHGGGEAQSYDSIDNAPEEKERGITINTSHIEYETETRHYAHVDCPGHADYVKNMITGAAQMDGAILVVSAADGPMPQTREHILLSRNVGVPYIVVFLNKMDMVDDEELLELVEMEVRDLLSEYDFPGDDVPVIAGSALKALEGDESYEEKILELMAAVDEYIPTPEGGSGGGGSGGMALNIENIVAELETATILELSELVKAIEEKFDVSAAAPVAVAGPAAGGAAEEQTEFTVELTAAGDQKVKVIKAVREATGLGLKEAKAVVDGAPAPVKEAVSKEEAEALKAALEEVGASVTVKGGSGGGGSGGDRSKPHVNIGTIGHVDHGKTTLTAAITTVLSKKNGGQAMAYDQIDGAPEERERGITISTAHVEYETDTRHYAHVDCPGHADYVKNMITGAAQMDGAILVVSAADGPMPQTREHILLSRQVGVPYIVVFLNKVDMVDDEELLELVEMEVRDLLTEYEFPGDDVPVVAGSALKALEGDASYEEKILELMAAVDEYIPTPEGGSGGGGSGGMALNIENIVAELKEATILELNDLVKAIEEEFGVSAAAPVAVAAAGGAAAAEEQTEFTVELTAAGDQKVKVIKAVREATGLGLKEAKAVVDGAPAPVKEGVSKEEAEELKAKLEEVGASVTVK(SEQ ID NO:8)
人的蓝啶蛋白的信号肽	MTRLTVLALLAGLLASSRA(SEQ ID NO:9)
免疫球蛋白重链恒定区γ1蛋白的Fc结构域	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:10)
GGS linker序列	GGSGGSGGSG(SEQ ID NO:11)
间隔序列	GGSGGGGSGG(SEQ ID NO:12)

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。

[0088] 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。

[0089] (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。

[0090] 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。

[0091] (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。

[0092] 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。

[0093] 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(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)。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疫苗A、疫苗B质量控制峰图如图4A、图4B所示。具体描述为:(1)基于本发明的重组核酸疫苗A，纯度为94%，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87.8%，质量控制峰图以及纯度检测结果如图4B。上述纯度均符合细胞转染实验和生产疫苗的质量要求。

[0094] 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所表达蛋白的预估分子量，如表2所示。

[0095] 表2 疫苗A、疫苗B表达蛋白的预估分子量

疫苗	蛋白分子量(kDa)
A	94
B	81

图5A-图5B分别展示了疫苗A、B转染HEK293细胞的体外表达WB(Western blot)检测结果，曝光时间均为1秒。疫苗A所表达的抗原含有分泌相关元件，理论上能够在上清和裂解蛋白中检测到显著表达;疫苗B所表达的抗原不含有分泌相关元件，理论上能够在裂解蛋白中检测到显著表达。

[0096] 如图5A所示，疫苗A在上清和细胞裂解物中均检测到目的蛋白显著表达，且分子量大小均符合预期。这证明基于本发明的融合蛋白A不仅能够在真核细胞中顺利翻译、正确折叠，而且结构稳定、能够高效分泌到胞外，可以用于后续动物试验，验证免疫保护效果。

[0097] 如图5B所示，疫苗B在细胞裂解物中检测到目的蛋白显著表达，且分子量大小符合预期。这证明基于本发明的融合蛋白B能够在真核细胞中顺利翻译、正确折叠、高丰度表达，可以用于后续动物试验，验证免疫保护效果。

[0098] 实施例6基于本发明的重组核酸疫苗在小鼠屎肠球菌灌胃感染模型中的预防效果

为了验证基于本发明的重组核酸疫苗是否具备针对屎肠球菌的免疫保护效果，本

实施例将疫苗免疫小鼠(实验组,即疫苗A和疫苗B)与未进行免疫的小鼠(空白对照组)进行免疫、攻毒对比实验。

[0099] 实验选用20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4组,每组5只,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。

[0100] 表3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	疫苗A	5	5μg (100 μl)/只/次	Day0 , Day21 左腹股沟皮下接种
2	疫苗B	5	5μg (100 μl)/只/次	Day0 , Day21 左腹股沟皮下接种
3	疫苗A+疫苗B	5	5μg (100 μl)疫苗A和5μg (100 μl)疫苗B混合/只/次	Day0 , Day21 左腹股沟皮下接种
4	PBS (对照组)	5	100 μl/只/次	Day0 , Day21 左腹股沟皮下接种

[0101] 将各组小鼠按照表3的免疫流程进行两次免疫,D32-34天时,小鼠使用100μl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。D35天时,细菌攻毒前4h禁食,小鼠使用100 μl屎肠球菌菌液(BNCC336951,1×10^{10}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,D38天处死小鼠取材,收集小鼠粪便、空肠、肝脏和脾脏,检测各组织细菌载量,评估疫苗的免疫保护效果。免疫、攻毒及取样流程如图6所示。

[0102] 取每只小鼠的空肠、肝脏和脾脏组织,均切取10 mg,分别研磨后使用无菌PBS缓冲液将样本稀释后,混匀后取100μl稀释溶液均匀涂在BHI固体培养基上;D38小鼠处死前无菌收集小鼠粪便,称重后加入无菌PBS,研磨至无明显沉淀,溶液稀释后,在BHI固体培养皿中涂布。将培养皿置于37℃培养箱中培养。细菌厌氧培养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。

[0103] 结果如图7A-图7D所示,图7A-图7D分别为小鼠免疫攻毒屎肠球菌后的肝脏组织、脾脏组织、空肠组织、粪便组织的载菌量对比。其中,图7A为小鼠免疫攻毒后的肝脏组织载菌量对比,结果显示本发明疫苗免疫过的小鼠,屎肠球菌载量显著低于对照组小鼠($p<0.001$):相较于对照组,疫苗A免疫后的小鼠每mg组织中的细菌CFU平均计数下降约7.7倍,计数最大差值下降约24倍;疫苗B免疫后的小鼠每mg组织中的细菌CFU平均计数下降约12.7倍,计数最大差值下降约118倍;疫苗A和疫苗B混合免疫后的小鼠每mg组织中的细菌CFU平均计数下降约11倍,计数最大差值下降约31倍。

[0104] 图7B为小鼠免疫攻毒后的脾脏组织载菌量对比,结果显示本发明疫苗免疫过的小鼠,屎肠球菌载量显著低于对照组小鼠($p<0.001$):相较于对照组,疫苗A免疫后的小鼠每mg组织中的细菌CFU平均计数下降约4.5倍,计数最大差值下降约41倍;疫苗B免疫后的小鼠每mg组织中的细菌CFU平均计数下降约11倍,计数最大差值下降约35倍;疫苗A和疫苗B混合免疫后的小鼠每mg组织中的细菌CFU平均计数下降约9.2倍,计数最大差值下降约42倍。

[0105] 图7C为小鼠免疫攻毒后的空肠组织载菌量对比,结果显示本发明疫苗免疫过的小鼠,屎肠球菌载量显著低于对照组小鼠($p<0.001$):相较于对照组,疫苗A免疫后的小鼠每mg

组织中的细菌CFU平均计数下降约4倍，计数最大差值下降约13.5倍；疫苗B免疫后的小鼠每mg组织中的细菌CFU平均计数下降约6.8倍，计数最大差值下降约27.5倍；疫苗A和疫苗B混合免疫后的小鼠每mg组织中的细菌CFU平均计数下降约13.7倍，计数最大差值下降约30.7倍。

[0106] 图7D为小鼠免疫攻毒后的粪便组织载菌量对比，结果显示本发明疫苗免疫过的小鼠，屎肠球菌载量显著低于对照组小鼠($p<0.001$)：相较于对照组，疫苗A免疫后的小鼠每mg组织中的细菌CFU平均计数下降约4.4倍，计数最大差值下降约8.3倍；疫苗B免疫后的小鼠每mg组织中的细菌CFU平均计数下降约10倍，计数最大差值下降约72倍；疫苗A和疫苗B混合免疫后的小鼠每mg组织中的细菌CFU平均计数下降约16倍，计数最大差值下降约173倍。

[0107] 上述结果证明，基于本发明的重组核酸疫苗A、疫苗B均能够在小鼠模型中提供针对屎肠球菌的有效免疫保护，接种疫苗的小鼠能够产生显著的保护性免疫，预防屎肠球菌感染。并且，将重组核酸疫苗A和疫苗B组合后，相对于疫苗A、疫苗B单独使用，取得了协同增效的效果，极显著地降低了免疫攻毒后各组织载菌量，有效预防屎肠球菌感染。

[0108] 实施例7基于本发明的重组核酸疫苗在小鼠粪肠球菌灌胃感染模型中的预防效果

为了验证基于本发明的重组核酸疫苗是否具备针对粪肠球菌的免疫保护效果，本实施例将疫苗免疫小鼠(实验组，即疫苗A和疫苗B)与未进行免疫的小鼠(空白对照组)进行免疫、攻毒对比实验。

[0109] 实验选用20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4组，每组5只，每只小鼠使用耳标标记。具体如表3所示。

[0110] 将各组小鼠按照表3的免疫流程进行两次免疫，D32-34天时，小鼠使用100μl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。D35天时，细菌攻毒前4h禁食，小鼠使用100 μl粪肠球菌菌液(BNCC186300，1×10^{10}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，D38天处死小鼠取材，收集小鼠粪便、空肠、肝脏和脾脏，检测各组织细菌载量，评估疫苗的免疫保护效果。免疫、攻毒及取样流程如图8所示。

[0111] 取每只小鼠的空肠、肝脏和脾脏组织，均切取10 mg，分别研磨后使用无菌PBS缓冲液将样本稀释后，混匀后取100μl稀释溶液均匀涂在BHI固体培养基上；D38小鼠处死前无菌收集小鼠粪便，称重后加入无菌PBS，研磨至无明显沉淀，溶液稀释后，在BHI固体培养皿中涂布。将培养皿置于37℃培养箱中培养。细菌厌氧培养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。

[0112] 结果如图9A-图9D所示，图9A-图9D分别为小鼠免疫攻毒粪肠球菌后的肝脏组织、脾脏组织、空肠组织、粪便组织的载菌量对比。图9A为小鼠免疫攻毒后的肝脏组织载菌量对比，结果显示本发明疫苗免疫过的小鼠，屎肠球菌载量显著低于对照组小鼠($p<0.001$)：相较于对照组，疫苗A免疫后的小鼠每mg组织中的细菌CFU平均计数下降约2.2倍，计数最大差值下降约4.3倍；疫苗B免疫后的小鼠每mg组织中的细菌CFU平均计数下降约2倍，计数最大差值下降约3.4倍；疫苗A和疫苗B混合免疫后的小鼠每mg组织中的细菌CFU平均计数下降约10倍，计数最大差值下降约42倍。

[0113] 图9B为小鼠免疫攻毒后的脾脏组织载菌量对比，结果显示本发明疫苗免疫过的小鼠，屎肠球菌载量显著低于对照组小鼠（p<0.001）：相较于对照组，疫苗A免疫后的小鼠每mg组织中的细菌CFU平均计数下降约2.7倍，计数最大差值下降约6.4倍；疫苗B免疫后的小鼠每mg组织中的细菌CFU平均计数下降约2.2倍，计数最大差值下降约11倍；疫苗A和疫苗B混合免疫后的小鼠每mg组织中的细菌CFU平均计数下降约19倍，计数最大差值下降约100倍。

[0114] 图9C为小鼠免疫攻毒后的空肠组织载菌量对比，结果显示本发明疫苗免疫过的小鼠，屎肠球菌载量显著低于对照组小鼠（p<0.001）：相较于对照组，疫苗A免疫后的小鼠每mg组织中的细菌CFU平均计数下降约3.5倍，计数最大差值下降约13.4倍；疫苗B免疫后的小鼠每mg组织中的细菌CFU平均计数下降约3倍，计数最大差值下降约6倍；疫苗A和疫苗B混合免疫后的小鼠每mg组织中的细菌CFU平均计数下降约16倍，计数最大差值下降约78.7倍。

[0115] 图9D为小鼠免疫攻毒后的粪便组织载菌量对比，结果显示本发明疫苗免疫过的小鼠，屎肠球菌载量显著低于对照组小鼠（p<0.001）：相较于对照组，疫苗A免疫后的小鼠每mg组织中的细菌CFU平均计数下降约3.6倍，计数最大差值下降约5倍；疫苗B免疫后的小鼠每mg组织中的细菌CFU平均计数下降约3.4倍，计数最大差值下降约4.8倍；疫苗A和疫苗B混合免疫后的小鼠每mg组织中的细菌CFU平均计数下降约13倍，计数最大差值下降约41倍。

[0116] 上述结果证明，基于本发明的重组核酸疫苗A和疫苗B均能够在小鼠模型中提供针对粪肠球菌的有效免疫保护，接种疫苗的小鼠能够产生显著的保护性免疫，预防粪肠球菌感染。并且，将重组核酸疫苗A和疫苗B组合后，相对于疫苗A、疫苗B单独使用，取得了协同增效的效果，极显著地降低了免疫攻毒后各组织载菌量，有效预防粪肠球菌感染。

[0117] 综上所述，本发明提供的融合蛋白、免疫原性组合物，能够诱导模式动物小鼠产生有效的保护性免疫，针对两种主要的致病性肠球菌感染有良好的预防效果，并且两种融合蛋白共同免疫时，效果最佳，具有协同增效作用。因此，本发明能够应用于免疫药物的生产和研发，填补当前肠球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。

[0118] 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。

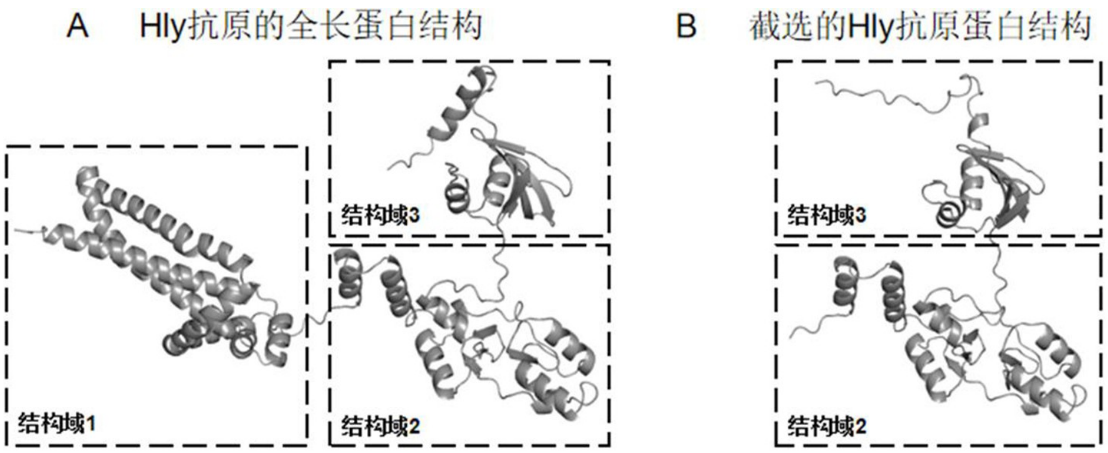

A Hly抗原的全长蛋白结构
B 截选的Hly抗原蛋白结构
结构域3
结构域1
结构域2
结构域3
结构域2

图 1

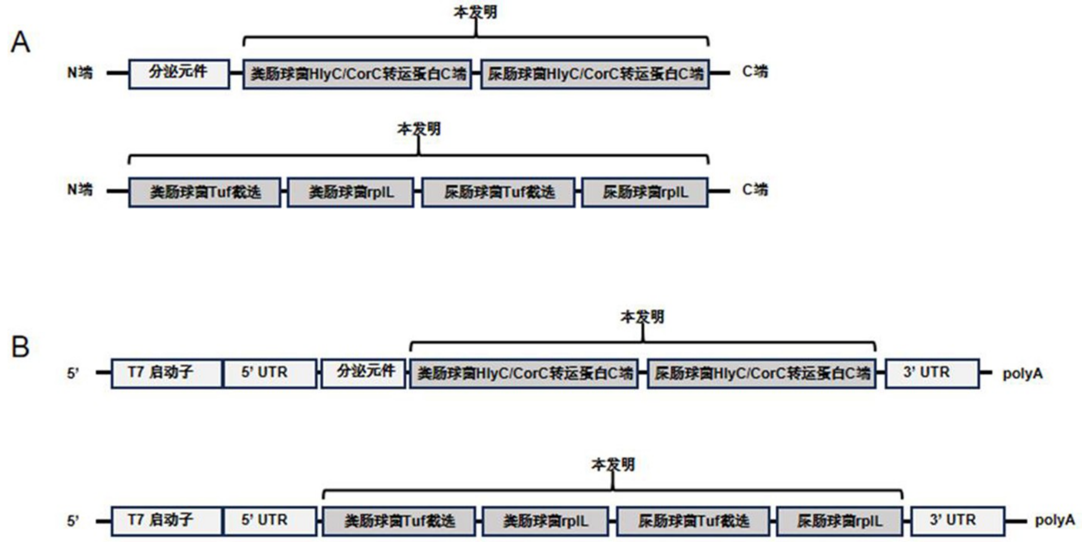

A
本发明
N端
分泌元件
粪肠球菌HlyC/CorC转运蛋白C端
尿肠球菌HlyC/CorC转运蛋白C端
C端
本发明
N端
粪肠球菌Tuf截选
粪肠球菌rplL
尿肠球菌Tuf截选
尿肠球菌rplL
C端
B
本发明
5'
T7 启动子
5' UTR
分泌元件
粪肠球菌HlyC/CorC转运蛋白C端
尿肠球菌HlyC/CorC转运蛋白C端
3' UTR
polyA
本发明
5'
T7 启动子
5' UTR
粪肠球菌Tuf截选
粪肠球菌rplL
尿肠球菌Tuf截选
尿肠球菌rplL
3' UTR
polyA

图 2

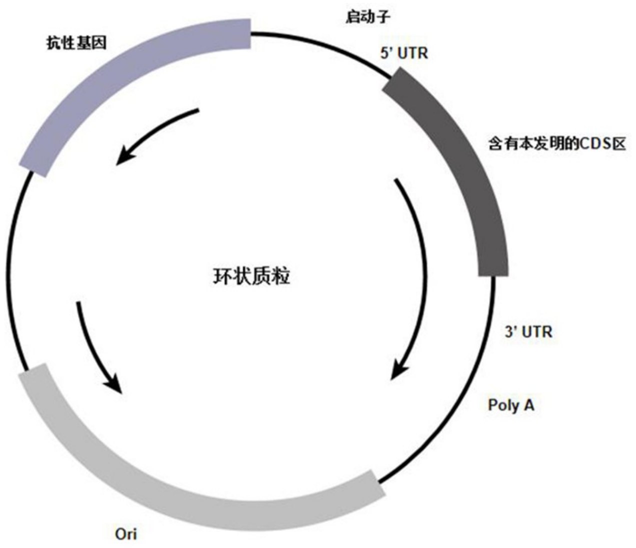

启动子
5' UTR
抗性基因
含有本发明的CDS区
环状质粒
3' UTR
Poly A
Ori

图 3

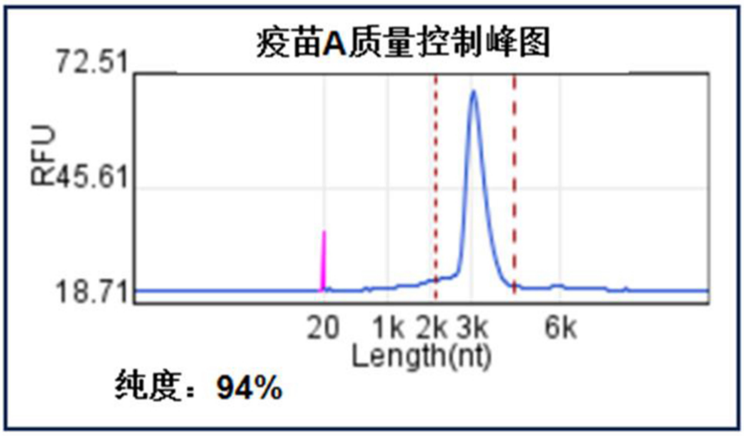

疫苗A质量控制峰图
72.51
RFU
45.61
18.71
20
1k 2k 3k
6k
Length(nt)
纯度：94%

图 4A

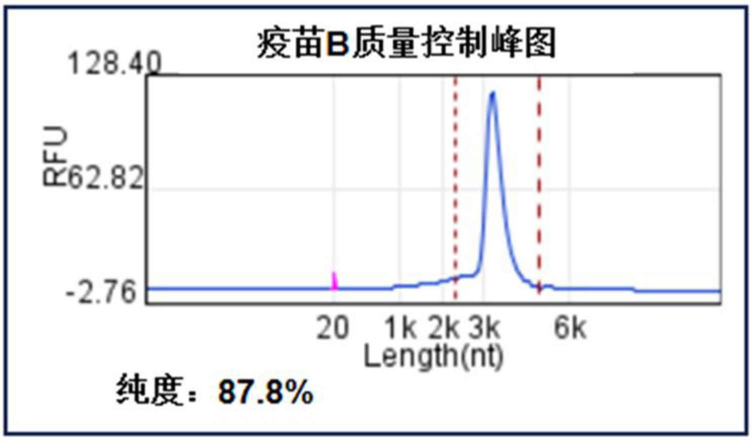
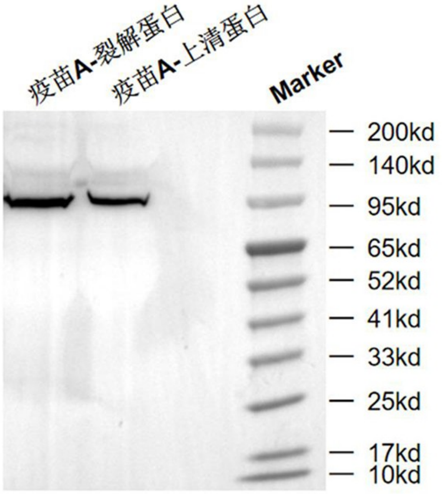
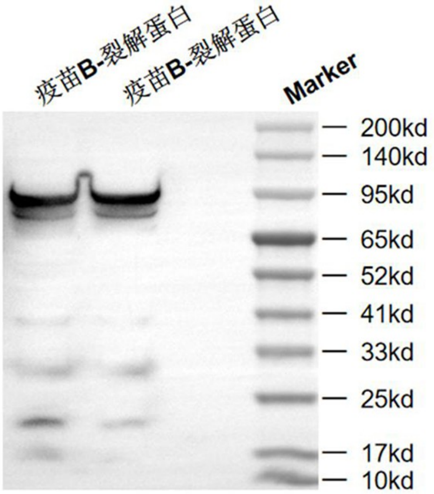

疫苗B质量控制峰图
128.40
RFU
62.82
-2.76
20
1k 2k 3k
6k
Length(nt)
纯度：87.8%

图 4B



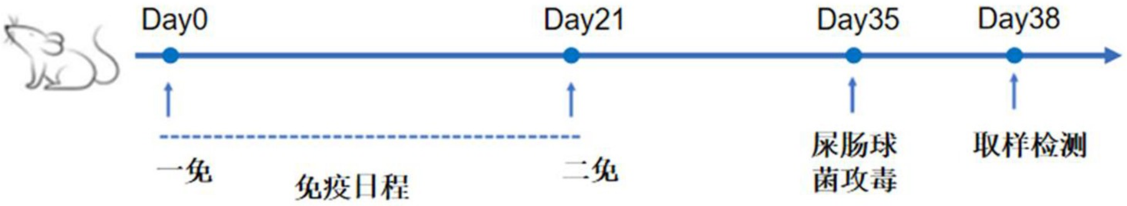
疫苗A-裂解蛋白
疫苗A-上清蛋白
Marker
200kd
140kd
95kd
65kd
52kd
41kd
33kd
25kd
17kd
10kd

图 5A



疫苗B-裂解蛋白
疫苗B-裂解蛋白
Marker
200kd
140kd
95kd
65kd
52kd
41kd
33kd
25kd
17kd
10kd

图 5B



Day0
Day21
Day35
Day38
一免
免疫日程
二免
尿肠球菌攻毒
取样检测

图 6

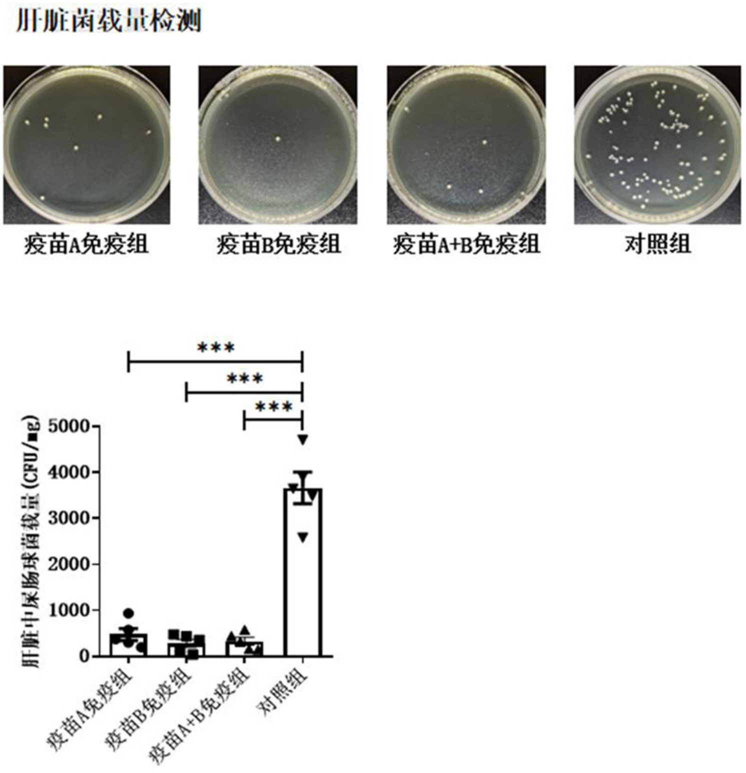

肝脏菌载量检测
疫苗A免疫组
疫苗B免疫组
疫苗A+B免疫组
对照组
***
***
***
肝脏中屎肠球菌载量 (CFU/mg)
5000
4000
3000
2000
1000
0
疫苗A免疫组
疫苗B免疫组
疫苗A+B免疫组
对照组

图 7A

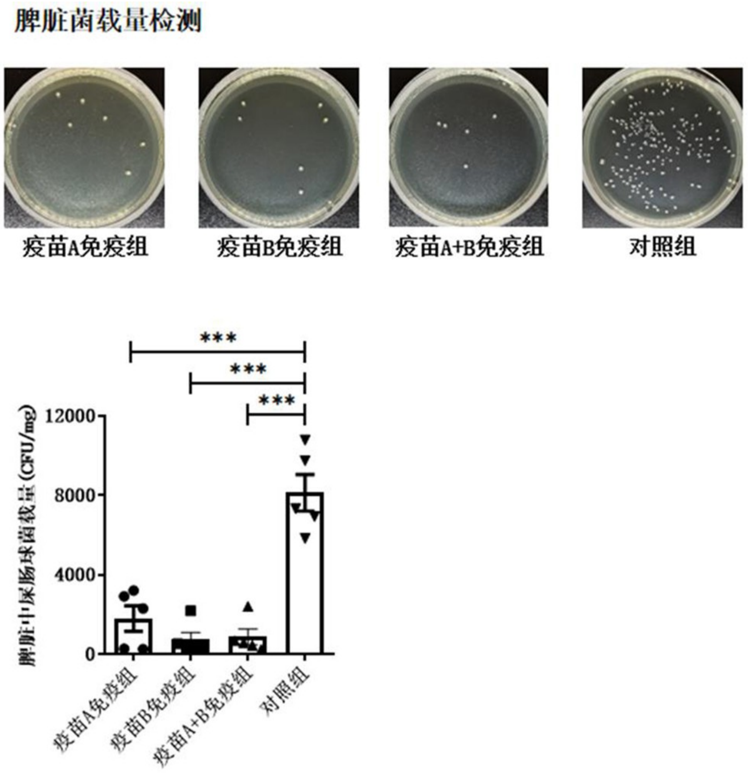

脾脏菌载量检测
疫苗A免疫组
疫苗B免疫组
疫苗A+B免疫组
对照组
***
***
***
脾脏中屎肠球菌载量 (CFU/mg)
12000
8000
4000
0
疫苗A免疫组
疫苗B免疫组
疫苗A+B免疫组
对照组

图 7B

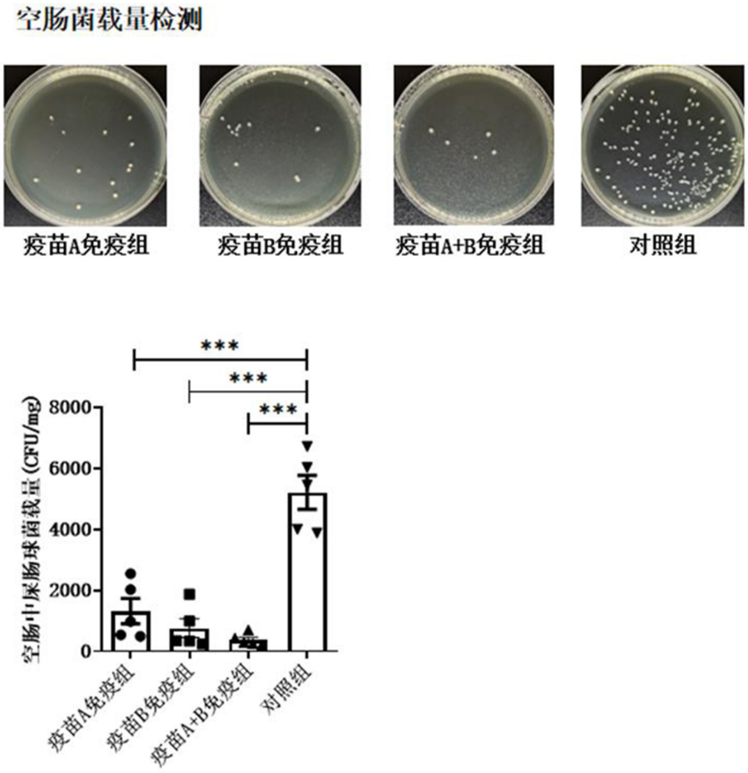

空肠菌载量检测
疫苗A免疫组
疫苗B免疫组
疫苗A+B免疫组
对照组
***
***
***
空肠中尿肠球菌载量 (CFU/mg)
8000
6000
4000
2000
0
疫苗A免疫组
疫苗B免疫组
疫苗A+B免疫组
对照组

图 7C

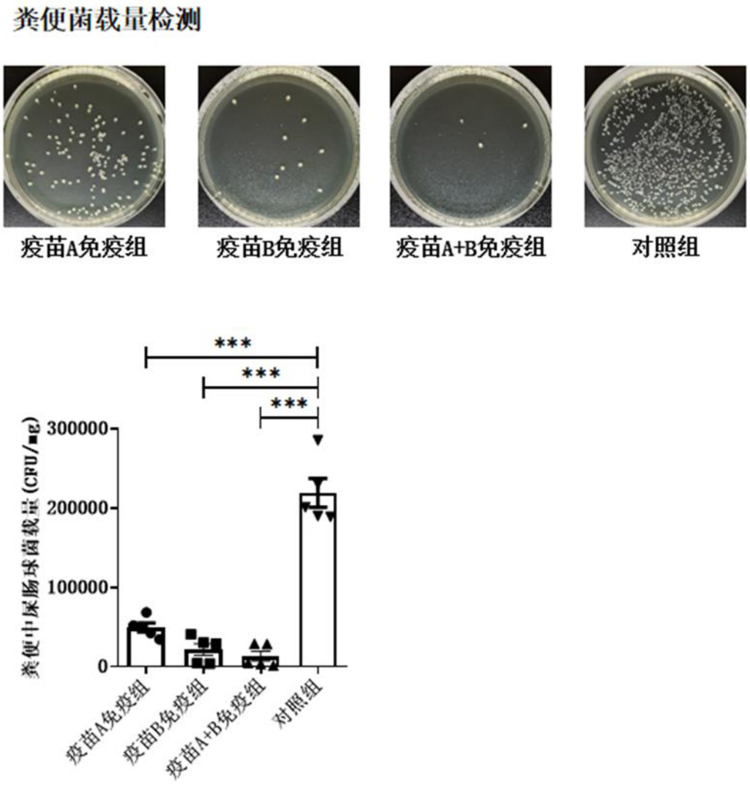

粪便菌载量检测
疫苗A免疫组
疫苗B免疫组
疫苗A+B免疫组
对照组
***
***
***
粪便中尿肠球菌载量 (CFU/mg)
300000
200000
100000
0
疫苗A免疫组
疫苗B免疫组
疫苗A+B免疫组
对照组

图 7D

Day0
Day21
Day35
Day38
一免
免疫日程
二免
粪肠球
菌攻毒
取样检测

图 8

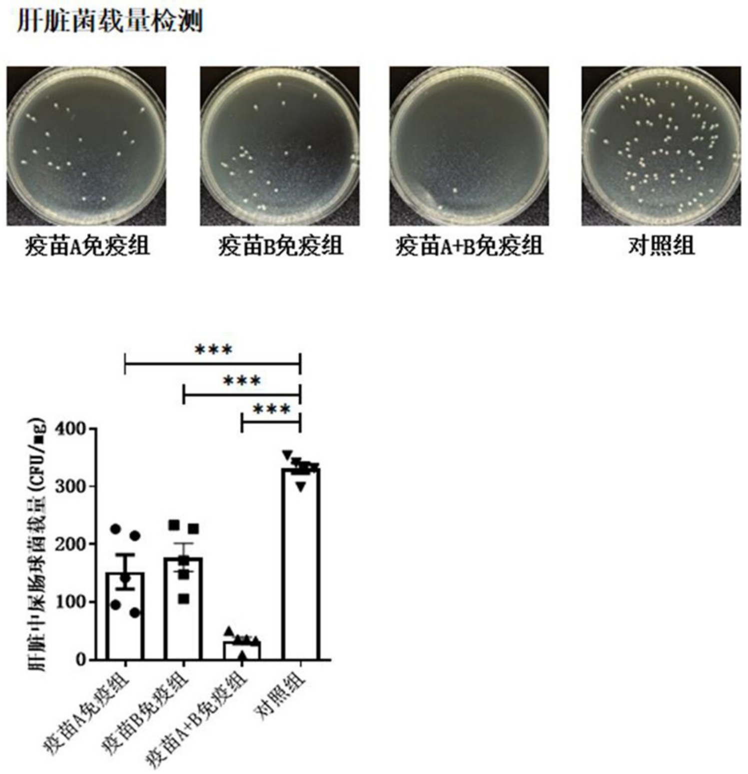

肝脏菌载量检测
疫苗A免疫组
疫苗B免疫组
疫苗A+B免疫组
对照组
***
***
***
肝脏中粪肠球菌载量(CFU/mg)
400
300
200
100
0

图 9A

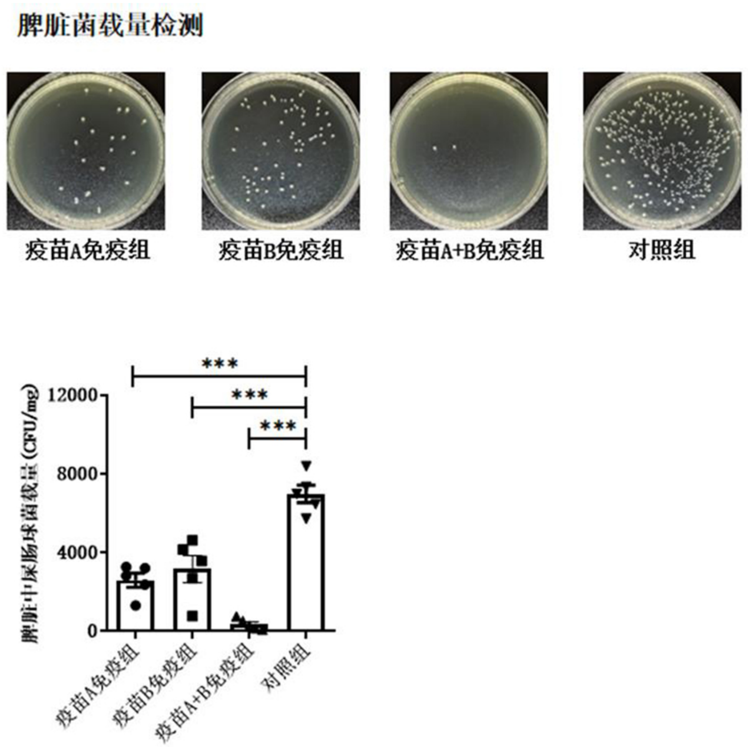

脾脏菌载量检测
疫苗A免疫组
疫苗B免疫组
疫苗A+B免疫组
对照组
***
***
***
12000
8000
4000
0
脾脏中尿肠球菌载量(CFU/mg)
疫苗A免疫组
疫苗B免疫组
疫苗A+B免疫组
对照组

图 9B

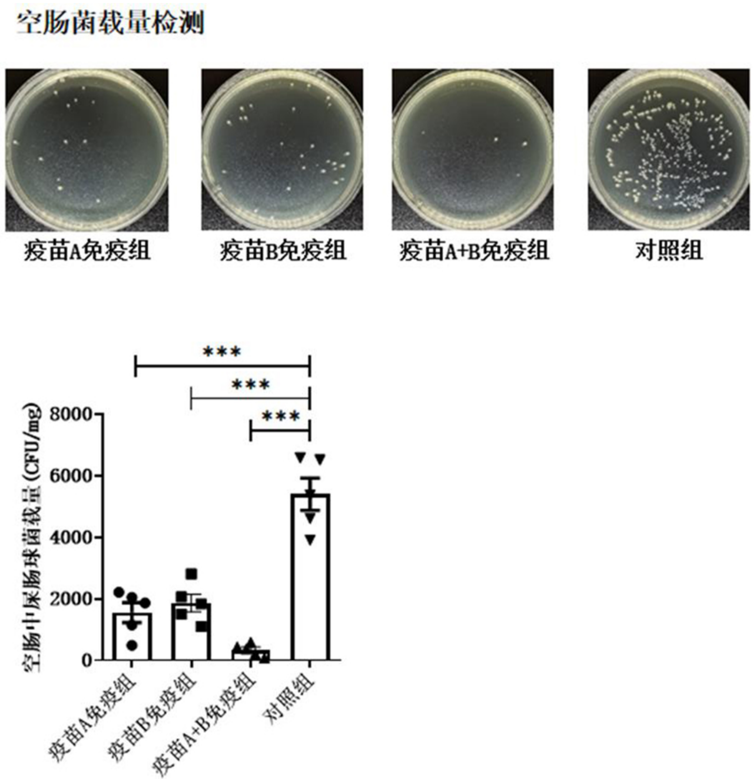

空肠菌载量检测
疫苗A免疫组
疫苗B免疫组
疫苗A+B免疫组
对照组
***
***
***
8000
6000
4000
2000
0
空肠中尿肠球菌载量(CFU/mg)
疫苗A免疫组
疫苗B免疫组
疫苗A+B免疫组
对照组

图 9C

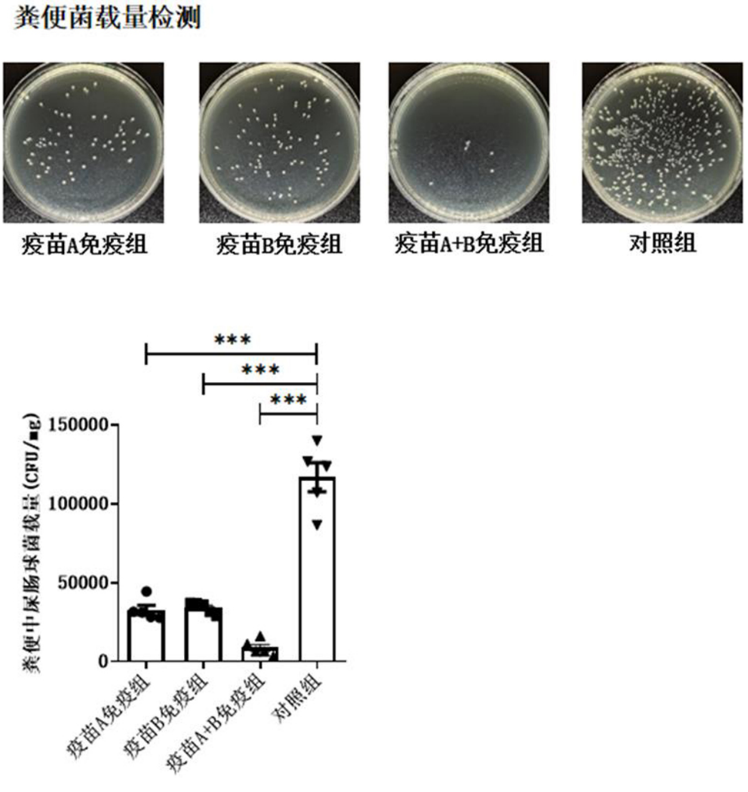

粪便菌载量检测
疫苗A免疫组
疫苗B免疫组
疫苗A+B免疫组
对照组
***
***
***
粪便中屎肠球菌载量 (CFU/mg)
150000
100000
50000
0
疫苗A免疫组
疫苗B免疫组
疫苗A+B免疫组
对照组

图 9D