



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106029091 B

(45)授权公告日 2020.02.11

---

(21)申请号 201580008406.7	A61K 36/02(2006.01)
(22)申请日 2015.02.12	C12N 15/87(2006.01)
(65)同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 106029091 A	C12N 15/79(2006.01)
(43)申请公布日 2016.10.12	C12N 1/13(2006.01)
(30)优先权数据 61/938,707 2014.02.12 US	C07K 14/255(2006.01)
(85)PCT国际申请进入国家阶段日 2016.08.12	C07K 14/175(2006.01)
(86)PCT国际申请的申请数据 PCT/IL2015/050166 2015.02.12	(56)对比文件
(87)PCT国际申请的公布数据 W02015/121863 EN 2015.08.20	WO 0198335 A2,2001.12.27,
(73)专利权人 特朗萨格以色列有限公司 地址 以色列雷霍沃特	WO 0198335 A2,2001.12.27,
(72)发明人 奥芙拉·陈	Khan Imran等.《Using storage organelles for the accumulation and encapsulation of recombinant proteins》. 《BIOTECHNOLOGY JOURNAL》.2012,第7卷(第9 期),第1-11页.
(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理 有限公司 11262 代理人 王玮玮 郑霞	Hempel Franziska等.《Algae as Protein Factories: Expression of a Human Antibody and the Respective Antigen in the Diatom Phaeodactylum tricornutum》.《PLOS ONE》 .2011,第6卷(第12期),第1-7页.
(51)Int.Cl. A61K 39/12(2006.01)	审查员 王斯奇

---

(54)发明名称

基于藻类的可食性疫苗

(57)摘要

本发明提供包含表达至少一种外源抗原的转基因微藻或包含该转基因微藻的介入生物的可食性疫苗。表达抗原的微藻被用于所述抗原以其完整和功能形式向靶生物的口服递送。在微藻中表达的外源抗原以在采食该疫苗的受试者中施加至少一种免疫原性反应为特征。

1. 一种包含转基因真核微藻的可食性疫苗,所述转基因真核微藻包含表达盒,所述表达盒包含编码外源抗原的至少一种多核苷酸,还包含编码液泡靶向肽的多核苷酸,其中所编码的外源抗原定位在所述微藻细胞的液泡内,其中所述液泡靶向肽由SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:9的氨基酸序列组成。

2. 根据权利要求1所述的可食性疫苗,其中所编码的外源抗原在采食所述可食性疫苗的靶受试者中诱导针对由病原体引起的疾病的免疫反应。

3. 根据权利要求2所述的可食性疫苗,其中所编码的外源抗原来源于选自由细菌、病毒、真菌和寄生虫组成的组的病原体微生物。

4. 根据权利要求3所述的可食性疫苗,其中所编码的外源抗原来源于病原体病毒。

5. 根据权利要求2所述的可食性疫苗,其中所编码的外源抗原来源于朊病毒。

6. 根据权利要求2-5中任一项所述的可食性疫苗,其中所述可食性疫苗包含摄取所述转基因真核微藻的介入生物。

7. 根据权利要求2-5中任一项所述的可食性疫苗,其中所述靶受试者是鱼。

8. 根据权利要求6所述的可食性疫苗,其中所述靶受试者是鱼。

9. 根据权利要求7所述的可食性疫苗,其中所述病原体选自由以下组成的组:海豚链球菌(*Streptococcus iniae*)、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)、β野田村病毒(*Betanodavirus*)和传染性鲑鱼贫血病毒。

10. 根据权利要求8所述的可食性疫苗,其中所述病原体选自由以下组成的组:海豚链球菌(*Streptococcus iniae*)、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)、β野田村病毒(*Betanodavirus*)和传染性鲑鱼贫血病毒。

11. 根据权利要求9或权利要求10所述的可食性疫苗,其中所述病原体是β野田村病毒,并且所述多核苷酸编码SEQ ID NO:3的氨基酸序列。

12. 根据权利要求2-5中任一项所述的可食性疫苗,其中所述靶受试者是家禽受试者。

13. 根据权利要求6所述的可食性疫苗,其中所述靶受试者是家禽受试者。

14. 根据权利要求12所述的可食性疫苗,其中所述病原体是肠道沙门氏菌(*salmonella enterica*)。

15. 根据权利要求13所述的可食性疫苗,其中所述病原体是肠道沙门氏菌(*salmonella enterica*)。

16. 根据权利要求14或权利要求15所述的可食性疫苗,其中所述多核苷酸编码SEQ ID NO:4的氨基酸序列。

17. 根据权利要求1所述的可食性疫苗,其中所述微藻是海藻。

18. 根据权利要求1所述的可食性疫苗,其中所述微藻选自由以下组成的组:三角褐指藻(*Phaeodactylum tricorutum*);杜氏藻属物种(*Dunaliella* spp.);微拟球藻属物种(*Nannochloropsis* spp.);微绿球藻属物种(*Nannochloris* spp.);扁藻属物种(*Tetraselmis* spp.);球等鞭金藻(*Isochrysis galbana*);巴夫藻属物种(*Pavlova* spp.);透明茧形藻(*Amphiprora hyaline*);牟氏角毛藻(*Chaetoceros muelleri*);和富油新绿藻(*Neochloris oleoabundans*)。

19. 根据权利要求18所述的可食性疫苗,其中所述微藻是三角褐指藻。

20. 根据权利要求1所述的可食性疫苗,其中所述外源抗原具有最高达100kDa的分子

量。

21. 一种包含根据权利要求1所述的可食性疫苗的可食性组合物。

22. 根据权利要求21所述的可食性组合物,其中所述可食性组合物是动物食品组合物,所述动物食品组合物选自自由用于喂养水生动物的可食性组合物和用于喂养陆地农场动物的可食性组合物组成的组。

23. 一种包含根据权利要求6所述的可食性疫苗的可食性组合物。

24. 根据权利要求23所述的可食性组合物,其中所述介入生物选自自由卤虫和轮虫组成的组。

25. 转基因真核微藻在制备疫苗中的用途,所述转基因真核微藻包含表达盒,所述表达盒包含编码外源抗原的至少一种多核苷酸,还包含编码液泡靶向肽的多核苷酸,其中所编码的外源抗原定位在液泡内,且其中所述疫苗将向有相应需要的受试者口服施用,从而口服递送所述编码的外源抗原,其中所述液泡靶向肽由SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:9的氨基酸序列组成。

26. 根据权利要求25所述的用途,其中所编码的外源抗原在受试者中引发针对由病原体引起的疾病的免疫反应。

27. 根据权利要求26所述的用途,其中所编码的外源抗原增强所述受试者对病原体的抗性。

28. 根据权利要求26-27中任一项所述的用途,其中所编码的外源抗原来源于选自自由细菌、病毒、真菌和寄生虫组成的组的病原体微生物。

29. 根据权利要求28所述的用途,其中所编码的外源抗原来源于病原体病毒。

30. 根据权利要求26-27中任一项所述的用途,其中所编码的外源抗原来源于朊病毒。

31. 根据权利要求26-27和29中任一项所述的用途,其中所述受试者选自自由水生动物、陆地农场动物和人类组成的组。

32. 根据权利要求28所述的用途,其中所述受试者选自自由水生动物、陆地农场动物和人类组成的组。

33. 根据权利要求30所述的用途,其中所述受试者选自自由水生动物、陆地农场动物和人类组成的组。

34. 根据权利要求31所述的用途,其中所述受试者是鱼。

35. 根据权利要求32或权利要求33所述的用途,其中所述受试者是鱼。

36. 根据权利要求34所述的用途,其中所述病原体选自自由以下组成的组:海豚链球菌、无乳链球菌、 $\beta$ 野田村病毒和传染性鲑鱼贫血病毒。

37. 根据权利要求35所述的用途,其中所述病原体选自自由以下组成的组:海豚链球菌、无乳链球菌、 $\beta$ 野田村病毒和传染性鲑鱼贫血病毒。

38. 根据权利要求36或37所述的用途,其中所述病原体是 $\beta$ 野田村病毒且所述多核苷酸编码SEQ ID NO:3的氨基酸序列。

39. 根据权利要求31所述的用途,其中所述受试者是家禽受试者。

40. 根据权利要求32或33所述的用途,其中所述受试者是家禽受试者。

41. 根据权利要求39所述的用途,其中所述病原体是肠道沙门氏菌。

42. 根据权利要求40所述的用途,其中所述病原体是肠道沙门氏菌。

43. 根据权利要求41或权利要求42所述的用途,其中所述多核苷酸编码SEQ ID NO:4的氨基酸序列。

44. 根据权利要求25所述的用途,其中所述微藻是海藻。

45. 根据权利要求25所述的用途,其中所述微藻选自自由以下组成的组:三角褐指藻;杜氏藻属物种;微拟球藻属物种;微绿球藻属物种;扁藻属物种;球等鞭金藻;巴夫藻属物种;透明茧形藻;牟氏角毛藻;和富油新绿藻。

46. 根据权利要求45所述的用途,其中所述微藻是三角褐指藻。

47. 根据权利要求25所述的用途,其中所编码的外源抗原具有最高达100kDa的分子量。

48. 根据权利要求25所述的用途,其中所述疫苗还包含可食用的稀释剂、赋形剂或载体。

49. 根据权利要求48所述的用途,其中所述疫苗被配制成动物食品组合物,所述动物食品组合物选自自由用于喂养水生动物的组合物和用于喂养陆地农场动物的组合物组成的组。

50. 根据权利要求26-27和29中任一项所述的用途,其中所述疫苗包含摄取所述转基因真核微藻的介入生物。

51. 根据权利要求28所述的用途,其中所述疫苗包含摄取所述转基因真核微藻的介入生物。

52. 根据权利要求30所述的用途,其中所述疫苗包含摄取所述转基因真核微藻的介入生物。

53. 根据权利要求50所述的用途,其中所述介入生物选自自由卤虫和轮虫组成的组。

54. 根据权利要求51或权利要求52所述的用途,其中所述介入生物选自自由卤虫和轮虫组成的组。

## 基于藻类的可食性疫苗

### 发明领域

[0001] 本发明大体上涉及可食性疫苗的领域。特别地,本发明涉及包含表达重组抗原的转基因微藻的疫苗,该重组抗原在直接采食该疫苗或经由介入生物(intervening organism)采食该疫苗的动物中引发针对病原体的免疫反应。

### [0002] 发明背景

[0003] 对开发安全和有效的用于控制疾病的疫苗存在全球性需要。疫苗旨在唤起免疫反应,导致抗体的产生(体液免疫)或将反击特定疾病的细胞介导的反应。理想的疫苗引发具有适当的免疫持续时间的有效的免疫原性反应,具有最小不利副作用,是经济上可行的且生产和使用是相对简单的。

[0004] 疫苗接种领域集中在不同类型的疫苗和有效的递送方法上。存在许多类型的疫苗,包括灭活的、活性减弱的、诸如病毒和细菌载体的重组疫苗、类毒素、DNA疫苗和合成的多肽组合的疫苗。疫苗可被口服地或胃肠外地递送。胃肠外施用疫苗由于涉及的风险以及进一步由于接受者的疼痛和恐惧是不方便的。另外,当靶生物是水生动物或大量的陆地动物时,胃肠外施用是几乎不可能的。

[0005] 水产养殖业是持续增长的食品生产部门。疾病预防是保持水产养殖业的可持续发展的关键问题。包括生物安全(针对传染性病原体的保护)、营养、遗传、系统管理和水质的优化畜牧业和一般管理实践对于使水生动物健康最大化是至关重要的。但是,所有的设施易爆发疾病,因为许多病原性生物是机会型的且存在于环境中。另外,当物种被以高密度培养时,传染性疾病的病原体易于在个体间传播。迄今治疗主要包括施用抗生素和疫苗。消费者的健康、食品安全问题和关于耐药细菌的发展的考虑减少了抗生素在水产养殖业中的使用。此外,病毒性疾病不能用可用抗生素治疗。另外的鱼类疫苗和有效的递送方式的开发将导致抗生素在水产养殖业中的使用显著下降。

[0006] 海豚链球菌(*Streptococcus iniae*)是革兰氏阳性细菌的一个物种,其在水产养殖操作中是主要的鱼类病原体。其感染多种培养的和野生鱼类,导致严重的经济损失。通过疫苗接种控制海豚链球菌已经遇到的成功有限,因此抗生素的使用是目前用于减少死亡率以及随之而来的经济损失的主要的实践。

[0007] 美国专利第6,379,677号公开了从海豚链球菌的甲醛灭活的细胞和浓缩的细胞外产物制备的针对海豚链球菌的多价疫苗。

[0008] 无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)是另一种重要的病原体,其影响水生物种和动物以及人类。其已经在世界范围的多种鱼类物种中被发现,尤其那些生活在温水中的。例如,其在中国四川省的雅鱼(ya-fish)(齐口裂腹鱼(*Schizothorax prenanti*))渔场中被发现(Geng Y. *Transboundary and Emerging Diseases* 59(4):369-375,2012, Abstract)。美国专利号7,204,993公开了包含分离的无乳链球菌的灭活细胞的组合物作为用于鱼类的疫苗。建议通过腹腔内或肌内注射、浴浸、口服施用或鼻腔给药施用该组合物。

[0009] 传染性鲑鱼贫血(ISA)病毒是正粘病毒科(Orthomyxoviridae),传染性鲑鱼贫血病毒属(Isavirus)的。ISA是饲养的大西洋鲑鱼的一种严重疾病。ISA在1984年首次在挪威

被检测到,并且以严重的贫血和循环障碍为特征。与其他用于鱼类的病毒疫苗一样,基于灭活的完整病毒的针对ISA的商用可得的疫苗具有可疑的现场效果。

[0010] 病毒性神经坏死病(VNN)是由神经坏死病病毒(NNV)引起的,神经坏死病病毒在世界范围是若干种经济上重要的鱼类物种的主要病原体。NNV是无包膜的、小单链正义RNA病毒。 $\beta$ 野田村病毒(Betanodaviruses)引起病毒性神经坏死病(VNN)或病毒性脑病和视网膜病(VER)。超过40种鱼类物种,其中的大多数是海产的,被报道对 $\beta$ 野田村病毒易感(Nakai T.等The Israeli journal of aquaculture,61(3):198-207 2009)。建议使用灭活的 $\beta$ 野田村病毒免疫接种作为针对VNN对石斑鱼仔鱼保护的有效策略。有效的NVV疫苗必须在前期幼体阶段在被NNV感染发生前施用。由于幼体的小尺寸和其对胁迫的敏感性,口服疫苗相比于注射或浸入是更适合的免疫接种的方式。

[0011] 沙门氏菌(Salmonella)感染在世界范围人口中是胃肠炎的主要原因,并且其通常与生的或未煮过的家禽产品的摄入有关。被肠道沙门氏菌(Salmonella enterica)血清型肠炎污染的蛋与显著数量的人类疾病相关且继续成为公共健康问题。基本减少肠道沙门氏菌血清型肠炎的肠道群体是疫苗接种的期望目标。活性减弱的疫苗在家禽产业、育种和下蛋家畜(layers stock)中被广泛使用。使用这种类型的疫苗具有一些劣势,主要由于存在减弱形式的病原体可恢复为危险形式的小风险,且,另外,病原体可以传染其他动物。不含有会刺激肠道免疫反应的病原体的任何活性形式的疫苗对于家禽产业可以有巨大的优势。

[0012] 对向水产养殖场和陆地动物施用疫苗的不贵且不需费力的努力的途径存在需要。疫苗的口服施用对于这些目的将是理想的。向人类口服递送疫苗也是期望的,由于这种施用的模式不需要专业人力且防止与胃肠外施用有关的不适。对于成功的口服递送,抗原应该被保护免受在将抗原加工成食品或饲料组合物以及通过经由动物或人类胃肠道的递送期间可发生的化学和酶促降解。另外,抗原应该克服阻止进入到动物或接近靶目的地的结构屏障。

[0013] 微藻(单细胞藻类或浮游植物)代表地球上的最大、但是最不被充分地理解的微生物领域。像植物对于陆地动物一样,微藻代表水生食物链中天然的营养基础和所有的植物营养物的主要来源。使用藻类用于疫苗生产提供了若干优势诸如低成本、安全和易于按比例放大。

[0014] 已经报道了在藻类中表达重组蛋白,且多种方法可用于在藻类细胞内特别是在细胞质体内产生外源蛋白。国际(PCT)申请公布号W0 2011/063284公开了在包括原核生物诸如蓝细菌和真核生物诸如藻类和植物的光合生物中表达治疗性蛋白的方法。真核生物的转化优选地进入质体基因组,通常进入叶绿体基因组。

[0015] 美国专利第7,410,637号和第8,282,915号公开了用于向宿主动物递送生物活性蛋白的递送系统和方法。提供的系统和方法包括获得用表达载体转化的藻类细胞,该表达载体包含编码生物活性蛋白、可操作地连接到启动子的核苷酸序列。在一个示出的实施方案中,生物活性蛋白是抗原表位,且当向动物施用,该藻类细胞诱导宿主动物中的免疫反应。

[0016] 国际(PCT)申请公布第W0 2002/076391号公开了在水产养殖业或农业中被用作饲料组分,且还含有外源肽、蛋白和/或抗体的微生物细胞的使用,其将传递对病毒或细菌病原体的抗性或免疫力或以其他方式改善采食所述微生物细胞的物种的健康和表现。微生物

细胞可以是酵母、真菌、细菌或藻类。蛋白和/或抗体可以通过微生物自身的直接遗传修饰，或通过用已被改变以表达感兴趣的蛋白的病毒感染微生物来在微生物细胞内表达。

[0017] 国际(PCT)申请公布第W0 2008/027235号公开了通过直接地喂养水生动物或间接地用表达特异地靶向感染水生动物的病原体的一个或多个关键表位的重组分子的遗传修饰的微藻,用于预防、改善或治疗水生动物中的疾病或紊乱的方法。

[0018] 美国专利申请公布第2011/0014708号公开了在藻类中产生外源期望的基因产物的方法和包含转基因藻类或其后代的饲料组合物,该方法包括通过蛋白酶溶液减弱或移除藻类细胞壁以有利于基因转移。该发明还提供修饰的核酸用于在藻类中表达牛乳铁蛋白素(LFB)。

[0019] 本发明的发明人的国际(PCT)申请公布第W0 2014/030165号,在本发明的优先权日期之后公布,公开了表达外源生物活性蛋白的转基因微藻及其用于向动物和人类口服递送生物活性蛋白的用途。

[0020] 但是,对用于疫苗接种的有效的口服递送系统仍存在未满足的需要,且具有该口服递送系统将会是高度有利地,该口服递送系统易于用于生产和使用、保持抗原的免疫原性活性、且有利于抗原被生物体的吸收。

[0021] 发明概述

[0022] 本发明提供了基于藻类的可食性疫苗,所述可食性疫苗提供靶生物对病原体的有效的免疫。本发明提供了包含转基因微藻的疫苗,所述转基因微藻表达定位在预定的亚细胞区室内呈免疫原性形式的至少一种外源抗原。表达抗原的微藻被用作适用于喂养水生动物和陆地动物以及人类的食品或食品添加剂。可食性疫苗以以下为特征:是免疫原性活性的,诱发至少一种免疫反应,导致靶生物对抗原的增加的抗性。靶生物可直接地或经由介入生物间接地采食转基因微藻。

[0023] 本发明公开了,表达的抗原保持活性且在口服采食转基因微藻或采食用转基因微藻喂养的动物的动物中施加其免疫原性活性。通常,抗原保持其完整的形式。出乎意料地,当转基因微藻经由介入生物被间接采食时,抗原在靶生物中也引发免疫原性反应。不希望受限于任何特别的理论或作用机制,抗原的保留的免疫原性活性可归因于其在完整的微藻内的定位使得微藻细胞充当天然的包裹材料,保护抗原在动物的胃肠道和/或胃中免受降解。根据本发明的某些典型的实施方案,抗原定位在微藻的亚细胞区室中,特别地在液泡中。在微藻液泡中的定位提供另外的保护免于蛋白酶降解以及抗原从肠到靶动物的血流的有效转移,在靶动物的血流中免疫原性反应被引发。

[0024] 因此,根据一个方面,本发明提供包含转基因真核微藻的可食用的疫苗,所述转基因真核微藻包含表达盒,所述表达盒包含编码外源抗原的至少一种多核苷酸,其中所编码的外源抗原定位在所述微藻细胞的亚细胞区室内。

[0025] 抗原定位于其中的转基因微藻的亚细胞区室取决于微藻种类、表达的抗原的类型以及要喂养的动物物种。根据某些实施方案,亚细胞区室选自由以下组成的组:液泡、内质网、高尔基体系、溶酶体和过氧化物酶体。每种可能性代表本发明的单独实施方案。

[0026] 根据某些示例性实施方案,外源抗原定位在微藻细胞液泡内。根据这些实施方案,表达盒还包含编码液泡靶向肽的多核苷酸。根据某些实施方案,多核苷酸编码液泡靶向肽,该肽与SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:9的任一个中列出的氨基酸序列具有至少80%同源性,典

型地至少90%同源性,更典型地至少98%同源性。根据某些实施方案,多核苷酸编码在SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列。根据某些示例性实施方案,编码液泡靶向肽的多核苷酸具有在SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:10的任一个中列出的核酸序列。每种可能性代表本发明的单独实施方案。

[0027] 根据某些其他示例性实施方案,外源抗原定位在微藻细胞内质网(ER)中。根据这些实施方案,表达盒还包含编码ER靶向肽的多核苷酸。根据某些实施方案,多核苷酸编码ER靶向肽,该肽与三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)内质网(Bip)前导序列具有至少80%同源性、典型地至少90%同源性、更典型地至少98%同源性。根据某些实施方案,多核苷酸编码具有在SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的三角褐指藻内质网(Bip)前导序列。根据某些示例性实施方案,编码ER靶向肽的多核苷酸具有在SEQ ID NO:5中列出的核酸序列。

[0028] 根据某些实施方案,抗原在采食包含转基因微藻的疫苗的靶受试者中诱导针对由抗原引起的疾病的免疫反应。

[0029] 根据某些实施方案,疫苗包含摄取转基因微藻的介入生物。根据这些实施方案,抗原在采食包含介入生物的疫苗的靶受试者中诱导免疫反应。根据某些示例性实施方案,介入生物被用微藻喂养。根据另外的实施方案,已知介入生物被用作靶动物受试者的食物来源。根据一些实施方案,靶动物是鱼。根据某些示例性实施方案,鱼呈其幼体或后期幼体形式。根据一些实施方案,摄取转基因微藻的介入生物选自由卤虫(*Artemia*)和轮虫(rotifer)组成的组。

[0030] 根据一些实施方案,诱导的免疫反应赋予或增加靶受试者对抗原的抗性。

[0031] 根据某些实施方案,靶受试者选自由水生动物、陆地动物和人类组成的组。

[0032] 根据某些示例性实施方案,靶水生动物是鱼。

[0033] 根据某些实施方案,表达的抗原给采食针对由病原体引起的疾病的所述疫苗的鱼接种疫苗。根据某些实施方案,所述病原体选自由以下组成的组:海豚链球菌、无乳链球菌、β野田村病毒和传染性鲑鱼贫血病毒。每种可能性代表本发明的独立的实施方案。

[0034] 根据一些示例性实施方案,抗原是β野田村病毒属(神经坏死病毒,NNV)的衣壳蛋白或其片段。根据另外的实施方案,本发明的多核苷酸编码与神经坏死病毒(NNV)衣壳蛋白的序列包含至少80%同源性,典型地至少90%同源性,更典型地至少98%同源性的氨基酸序列。根据某些示例性实施方案,NNV衣壳蛋白具有在SEQ ID NO:3中列出的氨基酸序列。根据某些示例性实施方案,编码NNV衣壳蛋白的多核苷酸包含在SEQ ID NO:7中列出的核酸序列。

[0035] 根据一些实施方案,表达的抗原给采食针对由病原体引起的疾病的所述疫苗的家禽接种疫苗。根据某些其他实施方案,病原体是肠道沙门氏菌(*salmonella enterica*)。

[0036] 根据又另外的实施方案,表达的抗原给采食针对由病原体引起的疾病的所述疫苗的人受试者接种疫苗。根据某些实施方案,病原体选自由肠道沙门氏菌和无乳链球菌组成的组。

[0037] 根据其他示例性实施方案,抗原是鞭毛蛋白或其片段。在另外的实施方案中,鞭毛蛋白是肠道沙门氏菌血清型肠炎的。根据某些实施方案,本发明的多核苷酸编码与肠道沙门氏菌血清型肠炎鞭毛蛋白的序列包含至少80%同源性,典型地至少90%同源性,更典型地至少98%同源性的氨基酸序列。根据示例性实施方案,鞭毛蛋白具有在SEQ ID NO:4中列

出的氨基酸序列。根据某些示例性实施方案,编码鞭毛蛋白的多核苷酸包含在SEQ ID NO:8中列出的核酸序列。

[0038] 多种微藻物种可根据本发明的教导被使用。根据某些实施方案,根据本发明的教导使用的微藻是海产微藻。根据某些实施方案,微藻选自以下组成的组,但不限于由以下组成的组:三角褐指藻(*Phaeodactylum tricorutum*);杜氏藻属物种(*Dunaliella* spp.);微拟球藻属物种(*Nannochloropsis* spp.),包括眼点微拟球藻(*Nannochloropsis oculata*)、*Nannochloropsis salina*、富油微拟球藻(*Nannochloropsis gaditana*);微绿球藻属物种(*Nannochloris* spp.)、扁藻属物种(*Tetraselmis* spp.),包括肩突四鞭藻(*Tetraselmis suecica*)、周氏扁藻(*Tetraselmis chuii*)、球等鞭金藻(*Isochrysis galbana*);巴夫藻属物种(*Pavlova* spp.);透明茧形藻(*Amphiprora hyaline*);牟氏角毛藻(*Chaetoceros muelleri*);和富油新绿藻(*Neochloris oleoabundans*)。每种可能性代表本发明的单独实施方案。

[0039] 根据某种具体的实施方案,微藻选自以下组成的组:三角褐指藻、微绿球藻属物种、微拟球藻属物种和杜氏藻属物种。

[0040] 根据其他具体的实施方案,微藻是三角褐指藻。

[0041] 本发明的转基因微藻可被转化以表达在采食转基因微藻的靶受试者中唤起免疫原性反应的任何抗原。

[0042] 根据某些实施方案,表达的抗原的分子量最高达100kDa。根据其他实施方案,表达的抗原的分子量最高达90kDa、80kDa、70kDa或60kDa。根据其他的实施方案,表达的抗原的分子量在1-50kDa的范围内。

[0043] 根据另外的实施方案,本发明提供了包含本发明的疫苗的可食性组合物。根据一些实施方案,可食性组合物是动物食品组合物。根据示例性实施方案,动物食品组合物用于喂养水生动物。根据一些实施方案,动物食品组合物用于喂养陆地农场动物。根据其他实施方案,动物食品组合物用于喂养家禽。如在上文描述的,可食性组合物被用于口服递送疫苗。

[0044] 根据另外的方面,本发明提供用于向有相应需要的受试者口服递送抗原的方法,所述方法包括向所述受试者口服施用有效量的疫苗,所述疫苗包含转基因真核微藻,所述转基因真核微藻包含表达盒,所述表达盒包含编码外源抗原的至少一种多核苷酸,其中所编码的外源抗原定位在所述微藻细胞的亚细胞区室内。根据某些实施方案,亚细胞区室选自以下组成的组:液泡、内质网、高尔基体系、溶酶体和过氧化物酶体。每种可能性代表本发明的单独实施方案。

[0045] 根据某些具体的实施方案,编码的外源抗原定位在微藻细胞液泡内。根据其他的具体的实施方案,外源抗原定位在微藻细胞内质网内。

[0046] 根据某些实施方案,疫苗在食品组合物中被施用。组合物是如上文描述的食品组合物的任何一种。

[0047] 微藻是如上文描述的任何一种。

[0048] 根据某些实施方案,外源抗原在采食疫苗的受试者中引发免疫反应。根据一些实施方案,外源抗原针对由病原体引起的疾病给受试者接种疫苗。

[0049] 根据某些实施方案,受试者选自水生动物、陆地动物和人类组成的组。每种可能

性代表本发明的单独实施方案。根据一些实施方案,受试者是鱼。

[0050] 根据某些实施方案,动物受试者是水生动物或陆地动物。任选地,陆地动物可以是为了食物或非食物目的生长的任何动物(后者包括但不限于役畜、宠物等等),包括但不限于牛、猪、马、狗、猫、小鼠、大鼠、兔、豚鼠、家禽等等。任选地,水生动物可以是为了食物或非食物目的生长的任何动物(后者包括但不限于观赏性动物等等)。

[0051] 根据另外的方面,本发明提供用于向动物受试者口服递送抗原的方法,所述方法包括以下的步骤:

[0052] (a) 向介入生物口服施用有效量的包含表达盒的转基因微藻,所述表达盒包含编码外源抗原的至少一种多核苷酸,其中所编码的外源抗原定位在微藻细胞的亚细胞区室内,从而获得已经摄取转基因微藻的介入生物;和

[0053] (b) 向动物受试者口服施用有效量的已经摄取转基因微藻的介入生物。

[0054] 根据某些实施方案,动物受试者选自自由水生动物和陆地动物组成的组。每种可能性代表本发明的单独实施方案。

[0055] 根据某些实施方案,抗原在受试者中唤起免疫原性反应,该免疫原性反应有效地针对由抗原引起的疾病。

[0056] 根据一些实施方案,受试者是鱼。根据某些实施方案,介入生物选自自由卤虫和轮虫组成的组。

[0057] 本发明的其他目的、特征和优势从下文的描述和附图将变得清楚。

[0058] 附图简述

[0059] 图1阐明NNV衣壳蛋白在藻类细胞中的表达。在表达加HA标签的液泡靶向NNV衣壳蛋白(命名为642)和加HA标签的液泡靶向NNV衣壳蛋白且还包含膜转位序列(MTS)(命名为643)的转化的藻类的提取物中检测表达。通过SDS-PAGE分析总蛋白提取物,且使用抗HA抗体对总蛋白提取物进行蛋白质印迹分析。阴性对照是从野生型(未转化的)藻类获得的提取物。

[0060] 图2表明,在藻类中表达的液泡靶向蛋白以其完整尺寸被递送到采食该藻类的卤虫。用WT或用液泡靶向GFP表达藻类喂养卤虫(图2A)或用两个藻类株系喂养卤虫,每个藻类株系表达用血凝素抗原表位标签(HA)加标签的液泡靶向的鱼生长激素(图2B;A和B),持续如所示的若干小时。然后,洗涤卤虫且提取总蛋白,加载到SDS-PAGE上并进行蛋白质印迹分析。使膜与抗GFP(图2A)或与抗HA抗体(图2B)反应。

[0061] 图3示出了,在藻类中表达的液泡靶向GFP以其功能形式被递送到卤虫。用WT(图3A)或用表达GFP(图3B)的藻类喂养卤虫,然后喂养4h后在荧光双目镜下分析GFP荧光。

[0062] 发明详述

[0063] 本发明提供用于向有相应需要的生物口服递送疫苗的组合物和方法。特别地,本发明提供表达抗原的转基因微藻和包含该转基因微藻的可食性组合物。本发明公开了,抗原可直接地或经由介入生物从微藻被转化进入采食微藻的受试者中,且此外保持其活性并在所述受试者的细胞或组织中唤起免疫原性反应。根据本发明的某些典型的实施方案,抗原定位在微藻的亚细胞区室中,特别地在液泡中。

[0064] 在上文提到的大多数针对动物疾病的和在世界范围使用的疫苗是完整的生物疫苗,是活性和减弱的或灭活形式。但是,存在减弱形式的病原体可恢复到危险形式且在免疫

妥协的疫苗接受者中(诸如)患有AIDS的那些)可能仍能够引起疾病以及渗漏到环境的小风险。如根据本发明的原理使用的,当疫苗是基于单一抗原或若干特定抗原表位时,该风险不存在。另外,对这些类型的疫苗的不利反应的可能性较低。

[0065] 定义

[0066] 术语“微藻(microalga)”或“微藻类(microalgae)”以其最广范围在本文使用,且指单细胞微观真核藻类,通常发现于淡水和海水系统。取决于物种,微藻的尺寸可从几微米( $\mu\text{m}$ )到几百微米的范围。根据某些目前地具体的实施方案,该术语指海产真核微藻或微藻类。

[0067] 术语“疫苗”指在受试者中改善对特定疾病的免疫或诱导对特定疾病的免疫的免疫原性组合物。通常,疫苗含有类似或组成引起疾病的生物的至少一个组分(抗原)的免疫原性剂。该剂刺激免疫系统以使得免疫系统能够更容易地识别其后来遇到的相应的抗原。由抗原引发的免疫反应或防御反应在宿主动物中是保护性的,在这个意义上,宿主动物被抗原所源自的病原性生物的后续感染将被阻止,将不会引起疾病,或如果已引起疾病,该疾病或与该疾病相关的症状将被改善。优选地,抗原自身在靶动物中不会引起疾病或其他任何不利症状。有利地,本发明的疫苗包含在转基因微藻的亚细胞区室内的外源抗原。

[0068] 术语“免疫原性”或“免疫原性的”涉及物质刺激或引发免疫反应的能力。例如,通过确定对该物质特异的抗体的存在测定免疫原性。通过本领域已知的方法,例如使用ELISA测定,检测抗体的存在。

[0069] 如本文使用的术语“抗原”指是宿主动物的免疫原性反应系统的靶且能够引发宿主动物中的免疫反应或防御反应的剂。根据本发明,抗原是蛋白或肽。根据某些实施方案,蛋白或肽需要另外的修饰。根据本发明的某些实施方案,抗原至少部分来源于选自由细菌、病毒、真菌或寄生虫(例如原生动物或蛔虫)组成的组的病原体微生物。根据另外的实施方案,抗原至少部分来源于朊病毒。

[0070] 如本文使用的术语“肽”指氨基酸残基的聚合物。“肽”意指由2到50个氨基酸组成的氨基酸序列。“蛋白”意指由50个或更多个氨基酸残基组成的氨基酸序列。遍及说明书,术语肽和蛋白可互换使用。

[0071] 术语“多核苷酸”、“多核苷酸序列”和“核酸序列”在本文可互换地使用。这些术语包括核苷酸序列等等。多核苷酸可以是RNA或DNA或其杂交体的聚合物,其是单链的或双链的,线性或分支的,且任选地含有合成的、非天然的或改变的核苷酸碱基。这些术语还包括RNA/DNA杂合体。根据目前某些示例性实施方案,基于感兴趣的蛋白的氨基酸序列,采用待转化的特定微藻物种的密码子使用,设计本发明的多核苷酸。

[0072] 术语“表达盒”和“构建体”或“DNA构建体”在本文可互换使用且指人工组装的或分离的核酸分子,其包括编码感兴趣的蛋白的多核苷酸且被组装以使得该蛋白被表达。构建体可以还包括标记基因,标记基因在一些情况下也可以编码感兴趣的蛋白。根据本发明的某些实施方案,感兴趣的蛋白是可操作地连接到亚细胞定位肽的抗原。表达盒还包含可操作地连接到编码感兴趣的蛋白的多核苷酸的合适的调控序列。应该领会,构建体中对调控序列的包括是任选的,例如在要使用宿主细胞的调控序列的情况中,可以不需要此类序列。

[0073] 根据某些实施方案,微藻包含表达盒,所述表达盒包含可操作地连接的元件,包括启动子序列、编码抗原的多核苷酸和液泡靶向序列、以及终止序列。

[0074] 术语“可操作地连接的”指在单一核酸片段上核酸序列的缔合以使得一个核酸序列的功能被另一个核酸序列调控。例如，当启动子能够调控编码序列的表达时（即所述编码序列在启动子的转录控制下），启动子可操作地与所述编码序列连接。编码序列可以有义或反义方向可操作地连接到调控序列。

[0075] 如本文使用的术语“启动子元件”、“启动子”或“启动子序列”指定位在DNA聚合物的蛋白编码区域的5'末端的上游（即在其前面）的DNA序列。自然界中大多数已知的启动子的位置在被转录的区域的前面。启动子作为开关发挥作用，激活基因或其部分的表达。如果基因被激活，认为其为被转录或参与转录。转录包括从基因合成mRNA。因此，启动子用作转录调控元件并且还提供用于起始基因向mRNA转录的位点。启动子可完全源自天然基因，或包括源自自然界中发现的不同启动子的不同元件，或甚至包括合成的DNA区段。本领域技术人员应理解，不同的启动子可指导基因或其部分在不同的组织或细胞类型中，在发育的不同阶段和/或响应不同的环境条件表达。进一步认识到，由于在大多数情况调控序列的确切边界尚未被完全地界定，一些变化的DNA片段可具有相同的启动子活性。引起基因在大多数细胞类型中在大多数时间表达的启动子通常被称为“组成型启动子”。

[0076] 根据一些实施方案，启动子是生物的天然启动子或异源启动子。根据另外的实施方案，启动子是组成型启动子或诱导型启动子。

[0077] 本领域已知的在微藻中有活性的任何启动子可根据本发明的教导使用。非限制性实例是墨角藻黄素叶绿素蛋白A (fcpA) ; B (fcpB) ; C (fcpC) 和E (fcpE) 启动子和任何集光复合体 (Lhc) 启动子。还可以使用非集光相关启动子，包括但不限于，胭脂碱合酶启动子；来自根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 的Ti质粒的多腺苷酰化序列；tubB2的启动子区域；来自噬菌体λ的PL启动子；巨细胞病毒 (PCMV) 的启动子；劳氏肉瘤病毒长末端重复 (PRSV-LTR) 启动子；花椰菜花叶病毒35s (PCaMV35s) 启动子；细菌  $\tau\phi$  启动子；热休克蛋白70A启动子 (HSP70A)；叶绿体碳酸酐酶 (Pptca1) 的CO<sub>2</sub>响应启动子序列和二磷酸核酮糖羧化酶小亚基2 (RBCS2) 的启动子。

[0078] 如本文使用的，术语“食品”是指用于包括动物采食的食品，该动物陆地动物和水生动物。

[0079] 如本文使用的术语“水产养殖”指在控制的条件下培育的水生生物。“水生生物”或“水生动物”在本文可互换使用，且指在水（淡水或海水）中生长的生物。水生生物包括但不限于鱼例如罗非鱼、黑鲈 (sea bass)、石斑鱼 (grouper)、大马哈鱼、条纹鲈鱼、鲈鱼、海鲷、虹鳟鱼、盲曹鱼 (barramundi)、红鼓鱼、金鱼、锦鲤鱼、天使鱼和鲤鱼。术语“鱼”包括鱼发育的所有阶段，包括幼体和后期幼体形式。

[0080] 本发明的教导在下面关于动物，特别地是在水产养殖中生长的动物和模式陆地动物，来阐明，作为用于实施本发明的至少一些方面的非限制性实例。

[0081] 目前可用的水产养殖系统通常被分为开放或封闭的。开放系统通常通过在诸如湖泊或溪流的水体中建筑网栏 (net-pen) 来建立。封闭系统通常使封闭的水槽中的水再循环，从水槽中泵出的水通过处理循环并回到水槽。

[0082] 水产养殖系统被用于生长水生动物，诸如鱼、甲壳类和软体动物，以达到对于多种用途，主要作为食物产品，但也作为装饰品，适销需要的尺寸。根据一些实施方案，本发明提供用于鱼或其他水生动物的改进的疫苗。

[0083] 口服施用包含抗原的可食性组合物在水产养殖中和在农业中具有重大的经济价值,消除了向每个动物单独地施用包含抗原的组合物的需要。

[0084] 根据另一个方面,本发明提供包含表达盒的转基因真核微藻,所述表达盒包含至少一种编码外源抗原的可转录的多核苷酸,其中表达的外源抗原定位在微藻细胞的亚细胞区室内。

[0085] 根据本发明的教导,可以使用多种藻类物种。根据某些实施方案,藻类是海产微藻。根据本发明的教导,可被使用的海产微藻的示例性列表包括但不限于:三角褐指藻;杜氏藻属物种;微拟球藻属物种,包括眼点微拟球藻、*Nannochloropsis salina*、富油微拟球藻;微绿球藻属物种;扁藻属物种,包括肩突四鞭藻、周氏扁藻;球等鞭金藻;巴夫藻属物种;透明茧形藻;牟氏角毛藻;和富油新绿藻。藻类来自且代表物种的一个大的分类学横截面(cross section)(表1)。

[0086] 表1:真核藻类中的一些的系统发生

属	科	目	门	界
褐指藻属 ( <i>Phaeodactylum</i> )	褐指藻科 ( <i>Phaeodactylaceae</i> )	舟形藻目 ( <i>Naviculales</i> )	硅藻门 ( <i>Bacillariophyta</i> )	囊泡藻界 ( <i>Chromalveolata</i> )
杜氏藻属 ( <i>Dunaliella</i> )	杜氏藻科 ( <i>Dunaliellaceae</i> )	衣藻目 ( <i>Chlamydomonadales</i> )	绿藻门 ( <i>Chlorophyta</i> )	绿色植物亚界 ( <i>Viridiplantae</i> )
[0087] 微绿球藻属 ( <i>Nannochloris</i> )	胶球菌藻科 ( <i>Coccomyxaceae</i> )	绿球藻目 ( <i>Chlorococcales</i> )	绿藻门 ( <i>Chlorophyta</i> )	绿色植物亚界 ( <i>Viridiplantae</i> )
扁藻属 ( <i>Tetraselmis</i> )	<i>Chlorodendraceae</i>	<i>Chlorodendrales</i>	绿藻门 ( <i>Chlorophyta</i> )	绿色植物亚界 ( <i>Viridiplantae</i> )
微拟球藻属 ( <i>Nannochloropsis</i> )	单株藻科 ( <i>Monodopsidaceae</i> )	真眼藻目 ( <i>Eustigmatales</i> )	不等鞭毛门 ( <i>Heterokontophyta</i> )	色物亚界 ( <i>Chromobiota</i> )
[0088] 巴夫藻属 ( <i>Pavlova</i> )	巴夫藻科 ( <i>Pavlovaceae</i> )	巴夫藻目 ( <i>Pavlovales</i> )	定鞭藻门 ( <i>Haptophyta</i> )	色物亚界 ( <i>Chromobiota</i> )
等鞭金藻属 ( <i>Isochrysis</i> )	等鞭金藻科 ( <i>Isochrysidaceae</i> )	等鞭藻目 ( <i>Isochrysidales</i> )	定鞭藻门 ( <i>Haptophyta</i> )	色物亚界 ( <i>Chromobiota</i> )

[0089] 系统发生根据Guiry, M D和Guiry G M. 2013. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway.

[0090] 根据某些具体的实施方案,根据本发明的教导使用的转基因微藻是三角褐指藻。藻类三角褐指藻是硅藻的单细胞藻类,其形成部分的浮游植物且起源于温带气候。该藻类易于适用于转化且转化的藻类在水产养殖中生长良好。另外,该藻类是无毒的且不致病的,且可被用作动物,特别是鱼和海产无脊椎动物,但也用于陆地动物的食物来源。三角褐指藻是海产藻类,并且因此在海洋培养基上生长,其与淡水中生长的微藻像衣藻属(*Chlamydomonas*)不同,对病原体感染不易感得多。三角褐指藻因其积累为高水平的二十碳五烯酸(EPA)的能力而闻名,二十碳五烯酸(EPA)是高度重要的 $\Omega$ -3多不饱和脂肪酸(PUFA)(Patil等, *Aquacult Int.*, 2007, 15:1-9)。在已进行的评价三种微藻作为用于单胃的动物饮食中潜在营养来源的研究中,得到以下结论:在研究的微藻中,三角褐指藻是可消化营养

的优选来源 (Skrede A.等, J of Animal and Feed Sci., 2011, 20:131-142)。因此, 根据本发明的教导包含转基因三角褐指藻的疫苗对于口服施用是高度胜任的。

[0091] 本发明的转基因微藻的主要用途是作为组成可食性组合物的疫苗媒介物。在藻类细胞中表达的外源抗原应该以其免疫原性形式到达采食组合物的受试者的靶细胞或组织, 其中受试者是水生动物或陆地动物。在口服递送抗原中的主要障碍之一是抗原贯穿制备口服递送产品及其储存的过程以及其后在靶受试者的体内的胃肠道中对环境条件的易感性。

[0092] 本发明现在公开了, 定位在微藻的亚细胞区室内的外源抗原当被水生动物和被陆地动物采食时保持其免疫原性活性。不希望受限于任何特定的理论或作用机制, 抗原活性可被完整的微藻细胞, 特别被细胞壁保持, 细胞壁可作为包裹的形式保护抗原免受贯生长和加工藻类生物质的外部严酷的环境及此外免受采食藻类的受试者动物的胃肠道的环境。此外, 本发明公开了, 外源抗原当经由介入生物递送时, 保持其免疫原性活性, 该介入生物首先用转基因微藻喂养且然后用作靶动物的食物。

[0093] 可根据本发明使用多种外源抗原。抗原被用于在采食根据本发明的微藻的生物中或用采食微藻的那些生物(介入生物)喂养的生物中引发免疫反应。

[0094] 根据一些示例性实施方案, 靶生物是鱼且抗原是神经性坏死病毒 (NNV) 衣壳蛋白或其片段。根据另外的实施方案, 本发明的多核苷酸编码与神经坏死病毒 (NNV) 衣壳蛋白的序列包含至少80%同源性, 典型地至少90%同源性, 更典型地至少98%同源性的氨基酸序列。根据某些示例性实施方案, NNV衣壳蛋白具有在SEQ ID NO:3中列出的氨基酸序列。根据某些示例性实施方案, 编码NNV衣壳蛋白的多核苷酸包含在SEQ ID NO:7中列出的核酸序列。用表达NNV衣壳蛋白的微藻对鱼接种疫苗在所述鱼中赋予病毒抗性。NNV衣壳蛋白在微藻中表达且定位到其液泡。不希望受限于任何特定理论或作用机制, 规定, NNV蛋白的液泡储存保护其免于被鱼消化系统降解且促进其递送到鱼以引发免疫反应。

[0095] 根据其他示例性实施方案, 抗原是鞭毛蛋白或其片段。在另外的实施方案中, 鞭毛蛋白是肠道沙门氏菌血清型肠炎的。根据某些实施方案, 本发明的多核苷酸编码与肠道沙门氏菌血清型肠炎鞭毛蛋白的序列包含至少80%同源性, 典型地至少90%同源性, 更典型地至少98%同源性的氨基酸序列。根据示例性实施方案, 鞭毛蛋白具有在SEQ ID NO:4中列出的氨基酸序列。根据某些示例性实施方案, 编码鞭毛蛋白的多核苷酸包含在SEQ ID NO:8中列出的核酸序列。根据某些实施方案, 用表达鞭毛蛋白的微藻疫苗接种家禽赋予所述家禽中对沙门氏菌的抗性。

[0096] 根据某些实施方案, 亚细胞区室选自以下组成的组: 液泡、内质网、高尔基体系、溶酶体和过氧化物酶体。每种可能性代表本发明的单独实施方案。根据某些目前具体的实施方案, 外源抗原定位在微藻细胞液泡内。

[0097] 另一个在口服递送疫苗中要解决的问题是抗原通过靶动物受试者的严格限制其穿透的胃肠道表皮细胞膜的穿透。需要最小水平的亲脂性, 用于抗原分割进入上皮细胞膜用于跨细胞吸收。出乎意料地, 本发明公开了, 靶向抗原到微藻液泡中导致表达的抗原从采食转基因微藻的动物的胃肠道进入血流的有效吸收。液泡是细胞的内膜系统的一部分; 因此, 不希望被单一假设或作用机制限制, 靶向抗原于为内膜系统的一部分的微藻细胞液泡可增加当藻类被采食且其壁被动物受试者降解后, 通过动物的胃肠道的吸收。此类吸收的增加可以归因于增加抗原分子被上皮细胞膜“感知的”亲脂性, 导致通过肠的有效吸收。另

外,通过液泡提供抗原增加抗原的储存稳定性也是可能的。以上的多种组合也可以发挥作用。在任何情况,靶向抗原到液泡明确地增加口服施用的疫苗的功能功效。

[0098] 另外,由微藻表达的外源抗原可被如此设计以增强其被采食转基因藻类的动物受试者的上皮细胞膜吸收。根据一些实施方案,本发明的表达盒还包含编码蛋白结构域的多核苷酸,该蛋白结构域增强表达的外源抗原被异种的细胞或组织吸收。

[0099] 具体的吸收增强结构域根据异种细胞的类型被选择,其取决于采食转基因微藻的受试者动物的物种。根据某些实施方案,表达盒还包含编码细胞穿透肽(CPP)的多核苷酸。根据一些实施方案, CPP选自由以下组成的组,但不限于:根据三角褐指藻密码子使用或其部分合成的来自人类免疫缺陷病毒1的反式激活转录激活因子(TAT);和根据三角褐指藻密码子使用或其部分合成的成纤维细胞生长因子的膜转位序列(MTS)。每种可能性代表本发明的单独实施方案。

[0100] 如本领域已知的用于转化微藻的任何方法可根据本发明的教导被使用。转化方法包括粒子轰击、电穿孔、微孔化(microporation)、在外源DNA的存在下涡旋细胞、酸洗珠和聚乙二醇介导的转化。用于转化真核藻类的方法和工具可见于,例如国际(PCT)申请公布第WO 1997/039106号中。

[0101] 通常,为了制备用于制成转基因藻类的载体,编码外源抗原的多核苷酸首先被克隆到表达载体中,表达载体是可以整合进入藻类基因组的质粒。在此类表达载体中,编码外源抗原的DNA序列可操作地连接到表达控制序列即指导mRNA合成的启动子。如在上文描述的,启动子可以是内源启动子即指导通常存在于藻类中的基因的转录的启动子。根据某些实施方案,载体还包含编码抗性基因的多核苷酸以使得能够选择转化的藻类。根据某些目前示例性实施方案,载体包含编码赋予对博莱霉素和腐草霉素抗性的蛋白的多核苷酸。

[0102] 转化的藻类的培养条件取决于使用的藻类物种,如熟练的技术人员已知的和在下文示例的。通常,藻类在能够进行光合作用的条件下生长。由于光合作用需要阳光和CO<sub>2</sub>以及微藻进一步需要与适当的肥料混合的淡水、含盐的水或海水来生长,可以在例如开放的池塘和湖泊中培养微藻。但是,开放系统比封闭系统更易污染,并且此外,在开放水库中生长的遗传修饰的微藻可被看作对环境有危险的。另外,在开放系统中,对水温、CO<sub>2</sub>浓度和光照条件存在较少控制。除了热带地区以外,生长季节主要取决于位置且限于一年的较温暖的月份。但是,建立和/或保持开放系统比封闭系统更便宜。

[0103] 因此,另一个生长微藻的方法是使用半封闭系统,诸如用结构例如“温室型”结构覆盖池塘或水塘。虽然这样可导致较小的系统,其解决了与开放系统相关的许多问题。半封闭系统的优势是,其可以通过允许感兴趣的微藻在对其生长所需的营养方面胜过入侵生物,允许需要的微藻比入侵生物占优势,并且其可以延长生长季节。例如,如果系统被加热或冷却,微藻可以整年生长。

[0104] 可选地,微藻可生长在封闭的结构中诸如光生物反应器,其环境相比于开放系统或半封闭系统在更严格的控制下。光生物反应器是并入一些类型的光源以向反应器中提供光子能量输入的生物反应器。术语光生物反应器可指对环境是封闭的且与环境不具有直接的气体和污染物交换的系统。光生物反应器可被描述为密闭的、照明培养容器,其被设计用于光营养的液体细胞悬浮培养物的控制的生物质产生。光生物反应器的实例包括例如玻璃容器、塑料/玻璃管、水槽、塑料套筒和袋。可被用于提供维持光合作用所需的能量的光源的

实例包括例如荧光灯、LED、和天然的阳光。由于这些系统是密闭的,生物生长需要的一切(例如二氧化碳、营养、水和光)必须被引入到生物反应器中。光生物反应器,不管建立及维持其的成本如何,具有超过开放系统的若干优势,例如其可防止污染或使污染最小化,提供对培养条件(例如pH、光、二氧化碳和温度)的较好控制,防止水分蒸发,降低二氧化碳由于排气的丢失,以及允许较高的细胞浓度。在另一方面,光生物反应器的某些需要诸如冷却、混合、控制氧气积累和生物积垢,使得建立和操作这些系统比开放系统或半封闭系统更贵。可建立光生物反应器以持续地收获(如用较大体积的培养系统的大多数),或一次收获一个批次(例如,当用聚乙烯袋培养时)。例如,用营养、微藻和水建立批量光生物反应器,且允许微藻生长直到收获该批次。例如,可以持续地每天或在固定的时间间隔收获持续的光生物反应器。

[0105] CO<sub>2</sub>可被递送到本文描述的任何系统,例如,通过从在含有微藻的液体的表面下鼓泡CO<sub>2</sub>。还可以使用喷雾以将CO<sub>2</sub>注入液体。喷雾器是例如也被称作起泡器、碳酸化器、充气机、多孔石头和扩散器的多孔盘组件或管组件。

[0106] 可在本文描述的系统使用的营养包括例如氮(呈NO<sub>3</sub><sup>-</sup>或NH<sub>4</sub><sup>+</sup>的形式)、磷和微量元素(Fe、Mg、K、Ca、Co、Cu、Mn、Mo、Zn、V和B)。例如,营养可以固体形式或液体形式得到。如果营养是呈固体形式,其在被递送到含有微藻的液体之前或在被递送到光生物反应器之前可与例如淡水或盐水混合。

[0107] 微藻可生长在大规模培养物中,其中大规模培养物指在大于约6升、或大于约10升或大于约20升的体积中的培养物的生长。大规模生长还可以是在100升或更多、500升或更多或1000升及以上的体积中的培养物的生长。

[0108] 通常最佳生长温度是约20℃至25℃,但是其是物种依赖的。根据某些实施方案,微藻细胞在收获前达到10<sup>6</sup>到10<sup>8</sup>细胞/ml的密度。

[0109] 某类的收获后加工可被用于制备用于口服采食或作为食物组合物的材料。通常,常规的加工包括使藻类生物质与藻类生长在其中的液体培养物至少部分分离。任选地,取决于靶受试者和应用模式,藻类生物质可被均质和/或干燥以形成多种尺寸的小粒。其他制备模式包括喷雾干燥、流化床干燥或提供作为液体悬浮液的材料。

[0110] 收获的本发明的转基因微藻自身可以形成疫苗或疫苗可被进一步配制成还包含可食性稀释剂、赋形剂或载体的可食性组合物。

[0111] 根据本发明的某些示例性实施方案,收获的微藻用作对介入生物的食物。根据这些实施方案,用转基因微藻喂养的介入生物形成疫苗。根据某些示例性实施方案,介入生物是鱼的食物,包括但不限于卤虫和轮虫。取决于生物物种,包含转基因微藻的介入生物可通过本领域已知的任何方法被收获。收获的介入生物可被进一步加工例如通过干燥,以形成可食性疫苗的材料。根据某些实施方案,包含介入生物的疫苗还包含可食性稀释剂、赋形剂或载体。

[0112] 微藻或包含微藻的疫苗可被进一步配制以形成食物组合物或可被用作食物添加剂。根据一些实施方案,可食性组合物是动物食品组合物。根据某些当前地具体的实施方案,动物食品组合物用于喂养水生动物和/或陆地动物。以下实施例为了更充分地说明本发明的一些实施方案而呈现。但是,其不应以任何方式被解释为限制本发明的宽范围。本领域技术人员能够容易地设想本文公开的原理的很多变化和修改,而不背离本发明的范围。

## 实施例

[0113] 这些实施例涉及本发明的实施方案的至少一些方面的特定实施。实施例仅是例证性的并且无论如何都不被意图是限制性的。

### [0114] 方法

#### [0115] NNV衣壳蛋白表达载体的制备

[0116] 根据藻类三角褐指藻的密码子使用,合成编码NNV衣壳蛋白(SEQ ID NO:3)的基因,以获得在SEQ ID NO:7中列出的核酸序列。

[0117] 将对应于编码NNV病毒的37kDa衣壳蛋白(抗原)的1014个核苷酸的合成的序列克隆到pPhaT1载体,编码液泡靶向蛋白的序列(核酸序列:SEQ ID NO:6;氨基酸序列SEQ ID NO:1)、HA标签编码序列(核酸序列:SEQ ID NO:14;氨基酸序列SEQ ID NO:13)和任选地MTS编码序列(核酸序列:SEQ ID NO:12;氨基酸序列SEQ ID NO:11)在之前克隆于该pPhaT1载体中。使用BamHI和KpnI克隆NNV抗原。用EcoRI和SacI将液泡靶向序列克隆到pPhaT1(产生pPhaT1-Vac)。使用XbaI和SalI将HA标签编码序列克隆到pPhaT1-Vac。使用XbaI和BamHI将MTS编码序列克隆到pPhaT1-Vac。

#### [0118] 鞭毛蛋白制备

[0119] 根据藻类三角褐指藻的密码子使用,合成编码肠道沙门氏菌血清型肠炎细菌鞭毛蛋白(SEQ ID NO:4)的基因,以获得在SEQ ID NO:8中列出的核酸序列。将合成的对应于细菌鞭毛蛋白的序列克隆到pPhaT1载体,液泡靶向序列和HA标签在之前亚克隆于该pPhaT1载体中。使用BamHI和KpnI克隆细菌鞭毛蛋白。

[0120] 本发明的多种多核苷酸和构建体被进一步克隆在质粒pPhaT1(登录号AF219942)中在fcpA启动子和fcpA终止子的控制下。

[0121] 已知fcpA启动子在三角褐指藻中是有效的。但是,明确地理解,其他启动子可在三角褐指藻中和其他藻类中使用。

[0122] 载体含有:

[0123] • fcpA(墨角藻黄素叶绿素蛋白A)启动子,在感兴趣的基因的克隆位点的上游。

[0124] • MCP-多克隆位点。

[0125] • fcpB(墨角藻黄素叶绿素蛋白B)启动子,其控制sh ble基因的转录,sh ble基因来自Streptoalloteichus hindustanus,编码赋予博莱霉素和腐草霉素抗性的蛋白。

[0126] • fcpA终止子,其出现在感兴趣的基因之后(下游)且在博莱霉素抗性基因之后。

[0127] • 氨苄青霉素抗性基因。

[0128] • 来自大肠杆菌的复制起点。

#### [0129] 藻类培养和收获

[0130] 藻类培养和收获如在本发明的申请人的美国专利申请公布第2011/0081706号中描述的进行。简而言之,在过滤的富含用于生长硅藻的F/2营养的海水中培养藻类(修改自Andersen R等2005.Recipes for freshwater and seawater media.In:Algal Culturing Techniques(R.A.Andersen,Eds.),429-538页.Elsevier,Amsterdam)。每72h以1:1000于终培养体积的剂量添加F/2。保持在21℃的恒定的温度状况。光:暗被设定为16:8小时,100 $\mu$ mol光子每m<sup>2</sup>s<sup>1</sup>的光强。将CO<sub>2</sub>与空气混合且以控制的比例经由通气系统递送到培养物。在接近其最大培养密度时收获要在实验中使用的藻类。为了帮助藻类的絮凝,向培养物中添加

氢氧化钙,作为在含有0.15g/ml  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 的水中的细颗粒悬浮液,并且然后将培养物过滤或离心。冻干得到的藻类沉淀物。

#### [0131] 通过粒子轰击的藻类转化

[0132] (根据Apt等1996.Mol.Gen Genet.252,572-579进行)。

[0133] 新鲜的藻类培养物在如以上描述的人工海水(ASW)F/2培养基中生长到指数中期( $2-5 \times 10^6$ 细胞/ml)。在轰击前24小时收获细胞,用新鲜的ASW+F/2洗涤两次,并且重悬在1/10原始细胞体积的ASW+F/2中。将0.5ml的细胞悬浮液点在含有固化的ASW+F/2培养基的55mm陪替培养皿的中央。在正常生长条件下静置板至干燥。使用PDS 1000/He基因枪转化系统,根据生产商说明(BioRad Laboratories Inc.,Hercules,CA USA)进行轰击,对直径大于2微米的细胞使用M17钨粉(BioRad Laboratories Inc.),对于较小的细胞使用包括小于0.6微米的颗粒的钨粉(FW06,Canada Fujian Jinxin Powder Metallurgy Co.,Markham,ON,Canada)。钨被用线性DNA包被。使用1100psi或1350psi破裂盘。所有一次性用品购买自BioRad Laboratories Inc.。轰击后,在正常生长条件下孵育板持续24小时,之后将细胞铺板到选择性固体培养基上并且在正常生长条件下孵育,直到出现单克隆。

#### [0134] 通过电穿孔转化

[0135] 藻类培养物在如以上描述的人工海水(ASW)+F/2培养基中生长到指数中期。然后收获细胞并且用新鲜的培养基洗涤两次。在1/50的原始体积中重悬细胞后,通过添加等体积的在ASW中的4%半纤维素(Sigma)和2%崩溃酶(Sigma),和在37°C孵育4小时,制备原生质体。通过Calcofluor white非染色(non-staining)测试原生质体的形成。将原生质体用含有0.6M D-甘露醇和0.6M D-山梨醇的ASW洗涤两次,且重悬在相同的培养基中,之后添加DNA(每100 $\mu$ l原生质体用10 $\mu$ g线性DNA)。将原生质体转移到冷的电穿孔小槽中且在冰上孵育7分钟,然后在ECM830电穿孔装置(BTX,Harvard Apparatus,Holliston,MA,USA)中被施以脉冲。通常施加多种脉冲,范围从1000到1500伏特,10-20毫秒每脉冲。每个小槽被脉冲5-10次。紧接脉冲之后,将小槽放置在冰上持续5分钟,然后将原生质体添加到250 $\mu$ l的新鲜生长培养基(非选择性)。在弱光在25°C孵育原生质体持续24小时后,将细胞铺板到选择性固体培养基上并且在正常生长条件下孵育,直到出现单克隆。

#### [0136] 通过微孔化转化

[0137] 新鲜藻类培养物在ASW+F/2培养基中生长到指数中期。收获10ml的培养物的样品,用Dulbecco's磷酸盐缓冲盐水(DPBS,Gibco,Invitrogen,Carslbad,CA,USA)洗涤两次,并且重悬在250 $\mu$ l的缓冲液R(由Digital Bio,NanoEnTek Inc.,Seoul,Korea(微孔化装置和试剂盒的生产商)提供)中。向每100 $\mu$ l细胞添加8 $\mu$ g线性DNA后,细胞被施以脉冲。通常需要多种脉冲,取决于细胞的类型,范围从700到1700伏特,10-40毫秒脉冲长度;每个样品被脉冲1-5次。紧接脉冲之后,将细胞转移到200 $\mu$ l新鲜培养基中(非选择性的)。在弱光在25°C孵育持续24小时后,将细胞铺板到选择性固体培养基上并且在正常生长条件下孵育,直到出现单克隆。

#### [0138] 蛋白表达分析

[0139] 通过如下的SDS-PAGE和蛋白印记分析进行蛋白表达的分析:使20mg藻类粉末在500 $\mu$ l补充有蛋白酶抑制剂混合物(Sigma;Cat#P9599)和100 $\mu$ l酸洗玻璃珠(Sigma;Cat#G8772)的裂解缓冲液(50mM Tris pH 7,1mM EDTA,100mM NaCl,1.4mM CHAPS)中裂解。根据

制造商的说明使用BCA蛋白测定试剂盒(Pierce;Cat#23225)确定蛋白浓度,根据制造商的说明通过SDS-PAGE(4-20%;Tris-Glicine,Bio-Rad Cat#456-1095)分析20 $\mu$ g的各个样品。根据制造商的说明使用TransBlot Turbo RTA转移试剂盒(Bio-Rad;Cat#170-4237),将凝胶转移到PVDF膜。在环境温度用封闭缓冲液(5%脱脂牛奶)将膜封闭持续1小时,且在环境温度与小鼠单克隆抗HA抗体(Covance;Cat#MMS-101P-1000)孵育持续2小时,然后用TBS-T(Bio-Rad;Cat#170-6435)+0.02%Tween-20(Sigma;Cat#P1379)洗涤3次。然后,将膜与过氧化物酶缀合的AffiniPure山羊抗兔IgG(Jackson immunochemicals;Cat#115-035-003)孵育持续1小时,然后在环境温度下用TBS-T洗涤持续5分钟,3次。根据制造商的说明使用EZ-ECL(Biological Industries;Cat#20-500-120)使膜经历化学发光,且暴露于Fuji医用X光胶片。

[0140] 鱼饲料-藻类混合物

[0141] 将鱼饲料与干藻类(野生型或转基因的)粉末混合。将100ml的5%明胶溶液倒入藻类-鱼饲料混合物,随后风干。

[0142] 鱼IgM滴度ELISA

[0143] 将Maxisorp 96孔板(Thermo Scientific;Cat#442404)用100 $\mu$ l的溶解于涂覆缓冲液(0.03M g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.07M NaHCO<sub>3</sub>pH 9.6)中的5 $\mu$ g/ml的纯化的NNV衣壳蛋白涂覆。4 $^{\circ}$ C过夜孵育后,用PBS(Biological industries;(Cat#0.2-0.23-5A)+0.05%Tween-20(Sigma;Cat#P1379))将板洗涤3次,且在环境温度用封闭缓冲液(PBS+1%牛血清白蛋白(Sigma;Cat#A7888))封闭持续1小时。将鱼血清在PBS中连续稀释,且将100 $\mu$ l的各个样品添加到各个孔且在4 $^{\circ}$ C孵育过夜。将板在室温用洗涤缓冲液洗涤3次。然后,使板与小鼠抗鱼IgM抗体(LifeSpan Bioscience;Cat#LS-C58989)在4 $^{\circ}$ C孵育过夜。用洗涤缓冲液将板洗涤3次且在环境温度与过氧化物酶缀合的AffiniPure山羊抗小鼠IgG(Jackson immunoresearch;Cat#115-035-003)孵育持续1小时。然后,将板用洗涤缓冲液在室温洗涤3次且与过氧化物酶底物(TMBE;Millipore;Cat#ES001)在环境温度孵育。显色后,用终止溶液(2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)终止反应。在450nm进行光密度分析。测定被以两份重复进行。

[0144] 感染 $\beta$ 野田村病毒后的细胞因子诱导

[0145] 当接种 $\beta$ 野田村病毒后,使用定量实时PCR(qPCR)测试干扰素诱导的Mx蛋白的表达水平。将鱼处死,然后无菌地去除脑、头和肾且被冷冻用于RNA和cDNA制备。如以前在Poisa-Beiro等(Molecular Immunology,2008,45:218-225)描述的,进行qPCR。

[0146] 鸡IgG滴度ELISA

[0147] 将Maxisorp 96孔板(Thermo Scientific;Cat#442404)用100 $\mu$ l的溶解于涂覆缓冲液(0.03M g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>,0.07M NaHCO<sub>3</sub>pH 9.6)中的5 $\mu$ g/ml的纯化的NNV鞭毛蛋白涂覆。4 $^{\circ}$ C过夜孵育后,将板用PBS(Biological industries;(Cat#0.2-0.23-5A)+0.05%Tween-20(Sigma;Cat#P1379))洗涤3次,且用封闭缓冲液(PBS+1%牛血清白蛋白(Sigma;Cat#A7888))在环境温度封闭持续1小时。将鸡血清在PBS中连续稀释,且将100 $\mu$ l的各个样品添加到各个孔且在4 $^{\circ}$ C孵育过夜。将板在室温用洗涤缓冲液洗涤3次。然后,将板与缀合至辣根过氧化物酶的兔抗鸡IgG抗体(Sigma;Cat#A9046)在4 $^{\circ}$ C孵育过夜。将板用洗涤缓冲液洗涤3次且与过氧化物酶底物(TMBE;Millipore;Cat#ES001)在环境温度孵育。显色后,用终止溶液(2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)终止反应。在450nm进行光密度分析。测定被以两份重复进行。

[0148] 实施例1:NNV衣壳蛋白在藻类细胞中的表达

[0149] 将NNV衣壳蛋白与液泡靶向序列融合并且与HA标签融合以有利于在进一步的分析中检测特定的蛋白。任选地,除了液泡前导序列和HA标签外,衣壳蛋白被融合到膜转位序列(MTS)。本发明的发明人以前展示,MTS有利于在被鱼类采食的藻类中表达的蛋白从鱼肠进入其血液循环系统的吸收。筛选藻类转化体的NNV重组蛋白表达(图1)。如以上所述的,进一步培养阳性藻类克隆,且收获藻类材料以在疫苗接种试验中使用。

[0150] 实施例2:用表达NVV衣壳蛋白的藻类疫苗接种白石斑鱼Epinephelus aeneus或欧洲黑鲈Dicentrarchus labrax幼体鱼

[0151] 孵出的幼体的三个重复被用于疫苗接种实验(测定组)并且三个重复被用作对照。将鱼幼体饲养在水槽中,该水槽被供以呈开放循环的过滤的且UV处理的海水(环境温度和盐度)。幼体被用含有轮虫的live fry starter饲料喂养持续10天,并且然后将该食物换成卤虫无节幼体(Artemia nauplii)如下用于另外20天(1)用表达液泡靶向衣壳蛋白的转基因藻类喂养的卤虫被用于喂养测定组的幼体;(2)用野生型藻类喂养的卤虫被用于喂养对照组的幼体。

[0152] 如在图2和图3中表明的,在转基因藻类中表达的液泡靶向蛋白可在喂养后至少持续6小时,在卤虫体内以其完整且功能的形式被检测到。因此,卤虫被用表达液泡靶向NVV衣壳蛋白的转基因藻类或用野生型藻类喂养持续2小时,且然后立即被用于喂养如以上描述的测定组和对照组的鱼幼体。当鱼达到约1克体重且仍易受NVV影响时,其被转移到实验室水族馆用于攻击试验。各组(测定和对照)的约50%的幼体被用病毒以预定的LD60剂量通过浸入攻击,且另外50%用L-15培养基伪攻击。如下文实施例4中所述进行攻击。

[0153] 实施例3:用表达NVV衣壳蛋白的藻类疫苗接种白石斑鱼Epinephelus aeneus或欧洲黑鲈Dicentrarchus labrax幼鱼

[0154] 将幼体饲养在水槽中,该水槽被供以呈开放循环的过滤的且UV处理的海水(环境温度和盐度)。孵出的幼体的三个重复被用于疫苗接种实验并且三个被用作对照(非疫苗接种处理)。幼体被用含有轮虫的live fry starter饲料喂养。10天后,用表达NVV衣壳蛋白的转基因微藻喂养的卤虫无节幼体被用于喂养幼体持续另外20天(疫苗接种实验,测定组)。以用野生型藻类喂养的卤虫无节幼体喂养的幼体用作对照组。

[0155] 当幼体被断奶后(可用干鱼饲料喂养),表达NVV衣壳蛋白的藻类或野生型藻类被埋入鱼饲料,且饲料小粒被用于喂养后期幼体的鱼直到小鱼达到10克尺寸。疫苗接种后1个月,约50%的疫苗接种的鱼被用病毒通过腹腔内注射以预定的LD60剂量进行攻击,且另外50%用L-15培养基(Invitrogen)进行伪攻击。如同疫苗接种组,对照组(用野生型藻类喂养)也被分成两组以用病毒或用L-15培养基攻击。如在下文实施例4中所述的进行攻击。

[0156] 实施例4:用NNV攻击疫苗接种的幼体和幼鱼

[0157] 疫苗接种组(用转基因微藻喂养)和非疫苗接种组(用野生型微藻喂养)的10条小鱼或幼鱼的三个重复通过浸入或通过用 $10^7$ 、 $10^5$ 、 $10^3$ 或 $10^1$ TCID<sub>50</sub>腹腔内(IP)注射进行攻击。阴性对照用补充有5%胎牛血清(Invitrogen)的L-15培养基伪攻击。引起60%死亡率的剂量(LD60)被用于后续攻击。来自各个重复的3条鱼的取样在攻击后0天、15天和30天进行。疫苗的功效由病毒攻击后鱼的存活率、血清中IgM滴度的水平和细胞因子Mx RNA表达的水平确定。

[0158] 实施例5:用表达肠道沙门氏菌血清型肠炎鞭毛蛋白的藻类疫苗接种鸡和攻击试验

[0159] 20只37天龄的健康鸡被分配成两组。一组用表达鞭毛蛋白的藻类喂养,同时对照组用野生型藻类喂养。三个独立的重复平行进行。鸡组在免疫接种后26天用 $10^9$ CFU的肠炎沙门氏菌口服攻击。在攻击后第3天、第7天和第14天收集盲肠粪便且如以前在Okamura等(Poultry Science91:2444-2449,2012)中描述的,检验细菌排泄物。在攻击后18天,对鸡进行尸体解剖,且肝脏、脾和盲肠内容物被检验沙门氏菌。在用于特异的抗肠道沙门氏菌血清型肠炎鞭毛蛋白抗体滴度分析的疫苗接种之前和之后,还收集血清。

[0160] 具体实施方案的以上描述将如此完全地揭示本发明的一般性质,以致其他人可通过应用现有的知识,容易地为各种应用修改和/或调整此类具体实施方案而不需要过度实验且不偏离一般概念,且因此,此类调整和修改应当并且预期被包含在公开的实施方案的等同物的含义和范围内。应理解的是,本文采用的措辞或术语是为了说明而非限制的目的。用于进行各种公开的功能的手段、材料和步骤可采取多种替代形式而不偏离本发明。



```

Arg Gly Ala Val Val Ala Lys Trp Trp Glu Ser Arg Thr Val Arg Pro
145                      150                      155                      160
Gln Tyr Thr Arg Thr Leu Leu Trp Thr Ser Ser Gly Lys Glu Gln Arg
                      165                      170                      175
Leu Thr Ser Pro Gly Arg Leu Ile Leu Leu Cys Val Gly Asn Asn Thr
                      180                      185                      190
Asp Val Val Asn Val Ser Val Leu Cys Arg Trp Ser Val Arg Leu Ser
                      195                      200                      205
Val Pro Ser Leu Glu Thr Pro Glu Glu Thr Thr Ala Pro Ile Met Thr
                      210                      215                      220
Gln Gly Pro Leu Tyr Asn Asp Ser Leu Ser Thr Asn Asp Phe Lys Ser
225                      230                      235                      240
Ile Leu Leu Gly Ser Thr Pro Leu Asp Ile Ala Pro Asp Gly Ala Val
                      245                      250                      255
Phe Gln Leu Asp Arg Pro Leu Ser Ile Asp Tyr Ser Leu Gly Thr Gly
                      260                      265                      270
Asp Val Asp Arg Ala Val Tyr Trp His Leu Lys Lys Phe Ala Gly Asn
                      275                      280                      285
Thr Gly Thr Pro Ala Gly Trp Phe Arg Trp Gly Ile Trp Asp Asn Phe
                      290                      295                      300
Asn Lys Thr Phe Thr Asp Gly Val Ala Tyr Tyr Ser Asp Glu Gln Pro
305                      310                      315                      320
Arg Gln Ile Leu Leu Pro Val Gly Thr Val Cys Thr Arg Val Asp Ser
                      325                      330                      335
Glu Asn

```

[0002]

```

<210> 4
<211> 251
<212> PRT
<213> 肠道沙门氏菌 (Salmonella enterica)
<400> 4
Met Asp His Ala Ile Tyr Thr Ala Met Gly Ala Ala Ser Gln Thr Leu
1                      5                      10                      15
Asn Gln Gln Ala Val Thr Ala Ser Asn Leu Ala Asn Ala Ser Thr Pro
                      20                      25                      30
Gly Phe Arg Ala Gln Leu Asn Ala Leu Arg Ala Val Pro Val Asp Gly
                      35                      40                      45
Leu Ser Leu Ala Thr Arg Thr Leu Val Thr Ala Ser Thr Pro Gly Ala
                      50                      55                      60
Asp Met Thr Pro Gly Gln Leu Asp Tyr Thr Ser Arg Pro Leu Asp Val
65                      70                      75                      80
Ala Leu Gln Gln Asp Gly Trp Leu Val Val Gln Ala Ala Asp Gly Ala
                      85                      90                      95
Glu Gly Tyr Thr Arg Asn Gly Asn Ile Gln Val Gly Pro Thr Gly Gln
                      100                     105                     110
Leu Thr Ile Gln Gly His Pro Val Ile Gly Glu Gly Gly Pro Ile Thr
                      115                     120                     125
Val Pro Glu Gly Ser Glu Ile Thr Ile Ala Ala Asp Gly Thr Ile Ser
                      130                     135                     140
Ala Leu Asn Pro Gly Asp Pro Pro Asn Thr Val Ala Pro Val Gly Arg
145                      150                      155                      160

```

Leu Lys Leu Val Lys Ala Glu Gly Asn Glu Val Gln Arg Ser Asp Asp  
 165 170 175  
 Gly Leu Phe Arg Leu Thr Ala Glu Ala Gln Ala Glu Arg Gly Ala Val  
 180 185 190  
 Leu Ala Ala Asp Pro Ser Ile Arg Ile Met Ser Gly Val Leu Glu Gly  
 195 200 205  
 Ser Asn Val Lys Pro Val Glu Ala Met Thr Asp Met Ile Ala Asn Ala  
 210 215 220  
 Arg Arg Phe Glu Met Gln Met Lys Val Ile Thr Ser Val Asp Glu Asn  
 225 230 235 240  
 Glu Gly Arg Ala Asn Gln Leu Leu Ser Met Ser  
 245 250

<210> 5

<211> 99

<212> DNA

<213> 三角褐指藻

<400> 5

atgatgttca tgagaattgc cgtagcagca ctggccttgc tggtctctcc ctccattcgt 60  
 gccgaagagg ctggtgaaga ggccaagatg ggtaccgtg 99

<210> 6

<211> 67

<212> DNA

<213> 三角褐指藻

<400> 6

[0003] atgtcgattc gtctcttctc taccgcctta ctagtctgctt gcttagcaaa ggcaactgcc 60  
 caaactg 67

<210> 7

<211> 1023

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 多核苷酸

<400> 7

ggtaccgtcc gtaagggaga caagaagctc getaaacccg ccaccaccaa agctgccaat 60  
 ccccagccgc gtcgccgtgc caacaaccgt cgtcgttcca accgcaccga tgcctccggtc 120  
 tccaaagcct ccaccgtcac cggtttcgga cgcggaacga atgatgtcca cctctccggc 180  
 atgtcccgta tttccaagc tgtcctcccg gctggaacgg gcacggatgg ctacgttgtg 240  
 gttgatgcca ccattgtccc cgacctcttg ccccgctctg gacacgctgc ccgcattttc 300  
 cagcgttacg ccgtcgaac gctcgagttc gaaattcagc ccatgtgccc cgtaaacacc 360  
 ggccgaggtt acgtcgtctg attcctcccc gatcccaccg ataatgacca caccttcgat 420  
 gctttgcagg caaccctgg cgccgtggtc gccaaagtgg gggaaatccc taccgtccgt 480  
 ccgcagtaca cgcgtacctt gctctggacc tctcctggaa aggaacagcg tctcacctcc 540  
 cccggacgtt tgattctctt gtgcgttggc aacaacaccg acgttgtcaa cgtttccgtc 600  
 ctctgccgtt ggtccgttcg tctctccgtc ccgtccctcg aaacccccga agaaaccacc 660  
 gctcccatta tgacgcaagg cccctctac aacgattcct tgtccacgaa cgattttaag 720  
 tccatcctct tgggatccac cccctcgac attgccccg acggtgccgt gttccagttg 780  
 gaccgcccgt tgtccatcga ttactccctc ggaaccggag acgtcgaccg tgccgtctac 840  
 tggcatctca agaagtctgc cggtaatacc ggaacgcccg ctggttggtt tegtgggga 900  
 atttgggaca acttcaacaa gacctttacc gacggagtcg cctactactc cgacgaacaa 960

ccccgcaaaa ttttgcctcc ggtgggtacg gtctgcaccc gctgggactc cgaaaactct 1020  
 aga 1023

<210> 8  
 <211> 759  
 <212> DNA  
 <213> 人工  
 <400> 8

ggtaccgacc acgccatcta caccgccatg ggagccgctt cccagacgct caaccagcag 60  
 gctgtcaccg cctccaatct cgccaatgct tccaccccg gattccgtgc ccagctcaac 120  
 gccctccgtg ctgttcccgt cgatggcttc tccctcgtc cccgtaccct cgtcacggcc 180  
 tccacgccgg gtgccgacat gacccccgga cagctcgact acacctccc tcccctcgat 240  
 gtcgctttgc agcaggacgg atggctcgtc gtccaggetg ccgacggagc tgaaggatac 300  
 acgcgtaacg gaaacatcca ggtcggaccc accggacaac tcaccattca gggacacccc 360  
 attggagagg gaggacccat tacggtgccc gaaggtccg aaattacat tgcccgcgat 420  
 ggaaccattt ccgccctcaa cccgggagac ccccccaaca ccgtggctcc cgtgggacgt 480  
 ctcaagctcg tgaagccga gggaaacgaa gtccagcgtt ccgacgacgg actcttccgt 540  
 ttgaccgccg aagcccaggc cgaacgtgga gccgtcttgg ccgctgacct ctccatccgc 600  
 attatgtccg gagtctcga aggatccaac gtgaagccgg tcgaagctat gacggacatg 660  
 atcgetaacg cccgtcgtt cgagatgcag atgaaggta ttacctccgt tgatgaaaaat 720  
 gagggacgtg ccaaccagtt gctctccatg tcctctaga 759

<210> 9  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> 三角褐指藻  
 <400> 9

[0004]

Met Ser Ile Arg Leu Phe Ser Thr Ala Leu Leu Ala Ala Cys Leu Ala  
 1 5 10 15  
 Lys Ala Thr Ala Gln Thr Cys Pro Thr Leu Ile Trp Ser Asp  
 20 25 30

<210> 10  
 <211> 90  
 <212> DNA  
 <213> 三角褐指藻  
 <400> 10

atgtcgattc gtctcttctc taccgcctta ctagctgctt gcttagcaaa ggcaactgcc 60  
 caaacttgcc ccactcttat ctggagtgc 90

<210> 11  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成的肽  
 <400> 11

Ala Ala Val Leu Leu Pro Val Leu Leu Ala Ala Pro  
 1 5 10

<210> 12  
 <211> 36



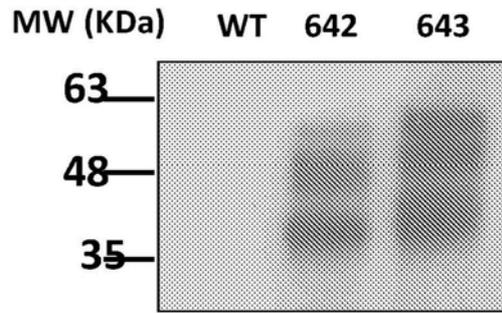


图1

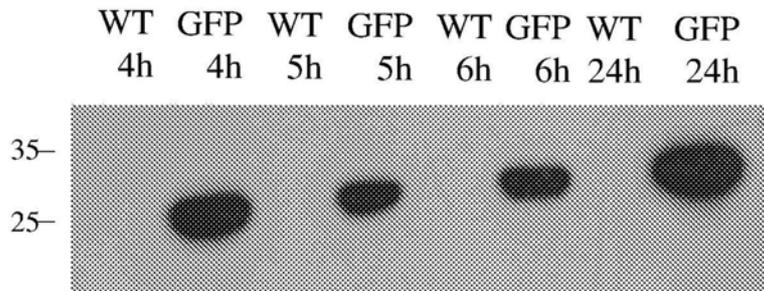


图2A

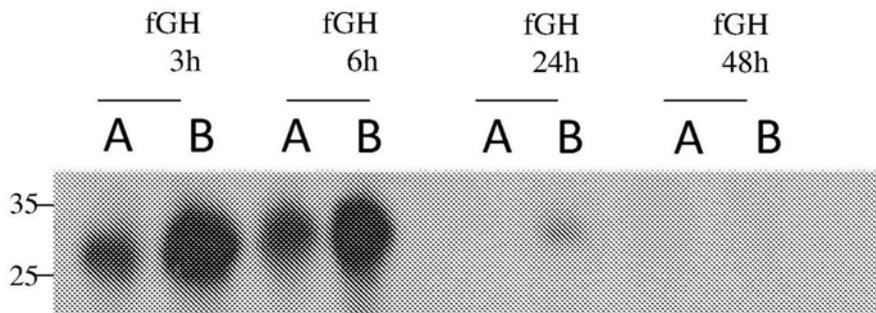


图2B

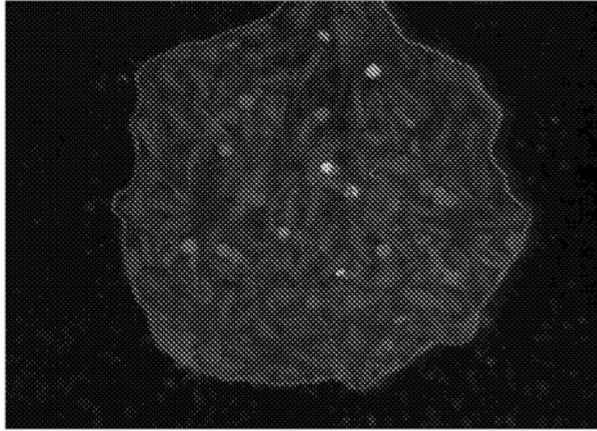


图3A

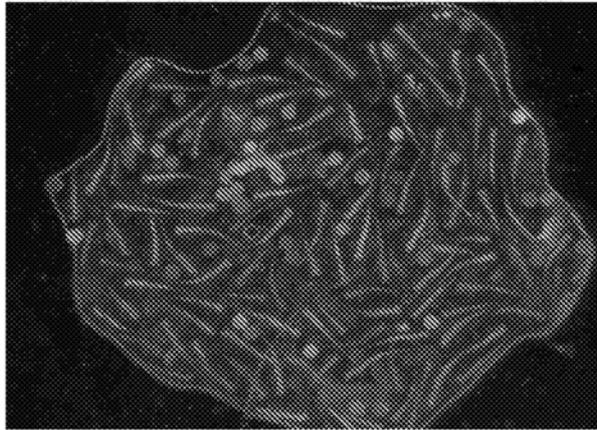


图3B