



## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
2023.12.22

(21) Номер заявки  
202191147

(22) Дата подачи заявки  
2019.10.28

(51) Int. Cl. *A61K 39/12* (2006.01)  
*A61K 39/215* (2006.01)  
*C07K 14/005* (2006.01)  
*A61K 39/00* (2006.01)  
*A61P 31/12* (2006.01)

## (54) ВАКЦИНА ВИБ Н52 С ГЕТЕРОЛОГИЧНЫМ ШИПОВИДНЫМ БЕЛКОМ

(31) 18203637.6

(32) 2018.10.31

(33) EP

(43) 2021.08.23

(86) PCT/EP2019/079393

(87) WO 2020/089166 2020.05.07

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ  
ВЕТМЕДИКА ГМБХ (DE)**

(72) Изобретатель:  
**Кремер-Кюль Анника, Мундт Эгберт  
Зигфрид, Филипп Ханс-Кристиан  
(DE)**

(74) Представитель:  
**Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,  
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов  
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,  
Кузнецова Т.В. (RU)**

(56) STEVEN J. VAN BEURDEN ET AL.: "A reverse genetics system for avian coronavirus infectious bronchitis virus based on targeted RNA recombination", VIROLOGY JOURNAL, vol. 14, № 1, 12 December 2017 (2017-12-12), XP055658209, DOI: 10.1186/S12985-017-0775-8, see "Methods", abstract, fig. 1

MARIA ARMESTO ET AL.: "A Recombinant Avian Infectious Bronchitis Virus Expressing a Heterologous Spike Gene Belonging to the 4/91 Serotype", PLOS ONE, vol. 6, № 8, 30 August 2011 (2011-08-30), p. e24352, XP055215311, DOI: 10.1371/journal.pone.0024352, cited in the application, abstract

ERICA BICKERTON ET AL.: "Recombinant infectious bronchitis viruses expressing heterologous S1 subunits: potential for a new generation of vaccines that replicate in Vero cells", JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 99, № 12, 9 April 2018 (2018-04-09), p. 1681-1685, XP055580342, GB, ISSN: 0022-1317, DOI: 10.1099/jgv.0.001167, abstract

SAMANTHA ELLIS ET AL.: "Recombinant Infectious Bronchitis Viruses Expressing Chimeric Spike Glycoproteins Induce Partial Protective Immunity against Homologous Challenge despite Limited Replication In

Vivo", JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 92, № 23, 12 September 2018 (2018-09-12), XP055580575, US, ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.01473-18, cited in the application, abstract

DAVID CAVANAGH ET AL.: "Variation in the spike protein of the 793/B type of infectious bronchitis virus, in the field and during alternate passage in chickens and embryonated eggs", AVIAN PATHOLOGY, vol. 34, № 1, 1 February 2005 (2005-02-01), p. 20-25, XP055661136, GB, ISSN: 0307-9457, DOI: 10.1080/03079450400025414, table 1

T. HODGSON ET AL.: "Recombinant Infectious Bronchitis Coronavirus Beaudette with the Spike Protein Gene of the Pathogenic M41 Strain Remains Attenuated but Induces Protective Immunity", JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 78, № 24, 15 December 2004 (2004-12-15), p. 13804-13811, XP055580363, US, ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.78.24.13804-13811.2004, cited in the application, fig. 1, 3, 4

ZHOU YINGSHUN ET AL.: "The establishment and characteristics of cell-adapted IBV strain H120", ARCHIVES OF VIROLOGY, SPRINGER WIEN, AT, vol. 161, № 11, 24 August 2016 (2016-08-24), p. 3179-3187, XP036061703, ISSN: 0304-8608, DOI: 10.1007/S00705-016-3008-3 [retrieved on 2016-08-24], cited in the application, fig. 1, table 1

YAN-QUAN WEI ET AL.: "Development and characterization of a recombinant infectious bronchitis virus expressing the ectodomain region of S1 gene of H120 strain", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 98, № 4, 1 February 2014 (2014-02-01), p. 1727-1735, XP055132063, ISSN: 0175-7598, DOI: 10.1007/S00253-013-5352-5, cited in the application, fig. 1, table 1

WO-A2-2004078203

CASAI R. ET AL.: "Recombinant avian infectious bronchitis virus expressing a heterologous spike gene demonstrates that the spike protein is a determinant of cell tropism", JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 77, № 16, 1 August 2003 (2003-08-01), p. 9084-9089, XP002296941, ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.77.16.9084-9089.2003

VALASTRO VIVIANA ET AL.: "S1 gene-based phylogeny of infectious bronchitis virus: An attempt to harmonize virus classification", INFECTION, GENETICS AND EVOLUTION, vol. 39, 12 February 2016 (2016-02-12), p. 349-364, XP029457163, ISSN: 1567-1348, DOI: 10.1016/J.MEEGID.2016.02.015

- 
- (57) Изобретение, в частности, относится к ВИБ Н52 (вирусу инфекционного бронхита), кодирующему гетерологичный S (шиповидный) белок или его фрагмент. Кроме того, изобретение относится к иммуногенной композиции, содержащей указанный ВИБ Н52, кодирующий гетерологичный S (шиповидный) белок или его фрагмент. Помимо этого, настоящее изобретение относится к способам иммунизации субъекта, включающим в себя введение такому субъекту иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением. Кроме того, изобретение относится к способам лечения или предотвращения клинических признаков, вызванных ВИБ у нуждающегося в этом субъекта, причем способ включает в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением.

045753 B1

045753 B1

---

### Перечень последовательностей

Данное изобретение содержит перечень последовательностей в соответствии с 37 C.F.R. 1.821-1.825. Тем самым прилагаемый к данному изобретению перечень последовательностей полностью включен в нее посредством ссылки.

### Предпосылки создания изобретения

Вирус инфекционного бронхита (ВИБ) птичьего коронавируса является прототипом гаммакоронавируса семейства Coronaviridae, отряда Nidovirales. Вирус инфекционного бронхита в основном поражает эпителий верхних дыхательных путей кур, вызывая респираторное заболевание, обычно осложняемое вторичными бактериальными патогенами (Cook и соавт., 2012, *Avian Pathol.*, 41:239-250). Некоторые штаммы ВИБ дополнительно поражают почечные канальцы, яйцеводы и части желудочно-кишечного тракта, приводя к патологическим поражениям и клиническим симптомам в этих системах органов. Вирус присутствует во всем мире как у кур для промышленного выращивания, так и кур для домашнего разведения. Из-за своей высокой геномной изменчивости ВИБ различают по большому количеству гено-, серо- и протектотипов. В настоящее время ВИБ рассматривают как один из наиболее экономически релевантных вирусных патогенов в птицеводстве.

Вирус инфекционного бронхита представляет собой оболочечный вирус, имеющий геном с положительным смыслом одноцепочечной РНК размером 27,6 т.п.н. (Cavanagh, 2007, *Vet. Res.*, 38:281-297). Первые две трети вирусного генома содержат большую кодирующую область (также обозначаемую как ген 1), разделенную на две открытые рамки считывания 1a и 1b, которые кодируют 15 неструктурных белков, участвующих в репликации, редактировании и транскрипции РНК. Последняя треть вирусного генома кодирует структурные белки: шиповидный белок (S, кодируется геном 2), оболочечный белок (E, кодируется геном 3с), мембранный белок (M, кодируется геном 4) и нуклеокапсидный белок (N, кодируется геном 6). Белки S, E и M являются частью вирусной оболочки, а белок N вместе с вирусной РНК образует ядро рибонуклеопротеида. Шиповидный белок коронавируса определяет тропизм вида хозяина (Кюо и соавт., 2000, *J. Virol.*, 74:1393-1406). Он представляет собой димерный или тримерный трансмембранный белок, который протеолитически расщепляется на две субъединицы, S1 и S2. Сильно гликозилированный домен S1 образует "голову" шиповидного белка и содержит рецептор-связывающий домен, который взаимодействует с 2,3-связанными сиаловыми кислотами на поверхности клетки-хозяина (Promkuntod и соавт. 2014. *Virology.* 448:26-32). Домен S2 содержит оставшуюся часть эктодомена ("ножку"), трансмембранный домен и эндодомен, расположенные в цитоплазме.

На сегодняшний день наиболее широко используемые штаммы живых аттенуированных вакцин против ВИБ были разработаны в 1960-х гг. в Нидерландах путем серийного пассирования штамма ВИБ типа Массачусетс (Bijlenga и соавт., 2004, *Avian Pathol.*, 33:550-557). Тем не менее с 1970-х годов появились новые серотипы ВИБ, от которых традиционные вакцины против типа Массачусетс, не обеспечивали достаточной защиты (Cook и соавт., 2012, *Avian Pathol.*, 41:239-250). Следовательно, существует потребность в новых и высокоэффективных вакцинах против других серотипов ВИБ.

ВИБ Beaudette (Geilhausen и соавт., 1973, *Arch Gesamte Virusforsch.*, 40(3) (1973), с. 285-290) и H120 (G. Bijlenga и соавт., 2004, *Avian Pathol.*, 33(6), с. 550-557) являются аттенуированными ВИБ. Однако аттенуирование может привести к потере иммуногенности.

Кроме того, были получены рекомбинантные ВИБ. У Zhou и соавт. 2016 (*Arch Virol.*, 161:3179-3187) описан ВИБ H120 (генотип Массачусетс) с шиповидным белком Beaudette (генотип Массачусетс). У Hodgson и соавт., 2004 (*J. Virol.*, 78:13804-13811) описан ВИБ Beaudette (генотип Массачусетс) с шиповидным белком M41 (генотип Массачусетс). Кроме того, у Armesto и соавт., 2011 (*PLoS One*, 6(8):e24352) раскрыт ВИБ Beaudette (генотип Массачусетс) с гетерологичным шиповидным белком из 4/91 (генотип 4/91).

Тем не менее рекомбинантные ВИБ, описанные у Zhou и соавт., 2016; и Hodgson и соавт., 2004, нельзя рассматривать как ВИБ с гетерологичным шиповидным белком, поскольку и ВИБ, и вставленный шиповидный белок принадлежат к одному и тому же генотипу/серотипу (Массачусетс). Кроме того, все упомянутые вакцины основаны на остове на основе Beaudette или имеют шиповидный белок от Beaudette.

Кроме того, ни вакцины на основе Beaudette, ни такие рекомбинантные вакцины (с гетерологичными шиповидными белками) не являются коммерчески доступными, хотя Beaudette уже был описан много десятилетий назад, а рекомбинантные подходы с использованием Beaudette известны более одного десятилетия, соответственно. Рекомбинантные ВИБ на основе Beaudette не подходят в качестве вакцин. У Wei и соавт., 2014 (*Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98) описан ВИБ Beaudette, имеющий субъединицу S1 из H120.

Ellis и соавт., 2018 (*J. Virol.*, 92(23)), Hodgson и соавт. (*J. Virol.* 78(24)); и Armesto и соавт., 2011 (*PLoS One*, 6(8):e24352) все раскрывают ВИБ Beaudette с шиповидным белком M41 или 4/91. Однако Ellis и соавт. 2018 (*J. Virol.* 92(23)) описывают, что рекомбинантный Beaudette с химерными шиповидными белками с гетерологичными субъединицами S1 из M41 или QX в сочетании с субъединицей S2 шиповидного белка Beaudette не обеспечивает достаточной защиты от гомологичных S1 контрольных заражений ("Однократная вакцинация цыплят без специфических патогенов рВИБ, экспрессирующим S1 вирусных штаммов M41 или QX, BeauR-M41 (S1) и BeauR-QX (S1), дала неполную защиту от гомологич-

ного заражения на основании активности ресничек и клинических признаков"; реферат). Кроме того, Ellis и соавт., 2018 (J. Virol., 92(23)) описывают, что полноразмерный ген S (S1 и S2 из M41) давал только частичную защиту от контрольного заражения посредством ВИБ гомологичного серотипа (с. 12), предполагая, что штамм Beaudette ВИБ не подходит в качестве остова для рекомбинантных вакцин против ВИБ. Hodgson и соавт. (J. Virol., 78(24)) далее раскрывают, что штамм Vaudette "также считается слабо иммуногенным", и, следовательно, "он никогда не был использован в качестве вакцинного штамма" (с. 13802, левый столбец, второй пункт). Поэтому существует потребность в создании новых и высокоэффективных вакцин против ВИБ и рекомбинантных вакцин против ВИБ, соответственно. Кроме того, имеется потребность в высокоэффективных векторах для вакцины против ВИБ.

#### **Подробное описание изобретения**

Перед описанием аспектов настоящего изобретения следует отметить, что используемые в настоящем описании и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если контекст явно не требует иное. Таким образом, например, ссылка на "антиген" включает множество антигенов, ссылка на "вирус" представляет собой ссылку на один или несколько вирусов и их эквивалентов, известных специалистам в данной области и т.д. Если не указано иное, то все технические и научные термины, используемые в настоящем изобретении, имеют те же значения, которые обычно понимаются специалистом в области, к которой относится данное изобретение. Хотя любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в настоящем изобретении, могут быть использованы на практике или при тестировании настоящего изобретения, в данном случае описаны предпочтительные способы, устройства и материалы. Все публикации, упомянутые в настоящем изобретении, включены в нее посредством ссылки с целью описания и раскрытия клеточных линий, векторов и методологий, как указано в публикациях, которые могут быть использованы в связи с изобретением. Ничто в настоящем изобретении не должно быть истолковано как признание того, что изобретение не имеет права датировать такое раскрытие задним числом на основании предшествующего изобретения.

#### **Сущность изобретения**

В настоящем изобретении решают проблемы, присущие предшествующему уровню техники, и обеспечивает существенный прогресс в уровне техники.

В общем настоящее изобретение обеспечивает ВИБ H52 (вирус инфекционного бронхита), кодирующий гетерологичный S (шиповидный) белок ВИБ или его фрагмент.

Термин "ВИБ H52" хорошо известен специалисту в данной области. Термин "ВИБ" относится к вирусу инфекционного бронхита. Термин "H52" определяет конкретный штамм ВИБ. Штамм H52 хорошо известен специалисту в данной области и относится к генотипу Массачусетс. Штаммы ВИБ обычно дифференцируются по кодирующей последовательности субъединицы S1 шиповидного белка (Valastro и соавт., 2016, Infect. Genet. Evol., 39:349-364), а также могут быть дифференцированы по их полной нуклеотидной последовательности или последовательностям конкретных белков, таких как шиповидный белок, нуклеокапсидный белок, оболочечный (E) белок или мембранный (M) гликопротеин. Поскольку шиповидный белок определяет тропизм хозяина и антигенность ВИБ, то генотипы ВИБ классифицируют по кодирующей последовательности субъединицы 1 шиповидных белков. В качестве альтернативы, штаммы ВИБ можно дифференцировать по их серотипу.

Классификация серотипов включает в себя обработку вируса нейтрализующими антителами.

Кроме того, H52 можно отличить от H120 по более высокой патогенности при применении на молодых цыплятах.

Специалист в данной области техники знает, где получить ВИБ H52. Штаммы ВИБ H52 можно приобрести коммерческим путем, как, например, Nobilis IB H52 (MSD Animal Health), AviPro IB H52 (Lohmann Animal Health GmbH & Co. KG), Bronchovac (Ceva) и т.п. Кроме того, у McDonald и соавт., 1980 (Avian Pathology, 9:245-259) описано, что ВИБ H52 может быть получен в Центральной ветеринарной лаборатории Роттердама, у Kusters (J. gen Virol., 68:343-352) описано, что ВИБ H52 IBV может быть получен в Poultry Health Institute Dorn в Нидерландах (который теперь называется GD Animal Health), а Chen и соавт., 2007 (Avian Pathology, 36(4):269-274) описывают, что ВИБ H52 может быть получен в China Institute of Veterinary Drug Control. Помимо этого, ВИБ H52 используют в качестве вакцинного штамма в течение десятилетий (Bijlenga и соавт., 2004, Avian Pathology, 33(6):550-557) и, следовательно, могут быть выделены соответствующими специалистами. Способы выделения штаммов ВИБ H52 и характеристики штаммов ВИБ H52 хорошо известны специалистам в данной области техники. К примеру, штаммы ВИБ H52 могут быть охарактеризованы, как описано у Zwaagstra и соавт., 1992 (J. Clin. Microbiol., 30 (1):79-84), Handberg и соавт., 1999 (Avian Pathology, 28:327-335) или Callison и соавт. 2006 (Journal of Virological Methods, 138:60-65). Zwaagstra и соавт., 1992 и Handberg и соавт., 1999, например, описывают специфические праймеры Массачусетс (для белков S и N соответственно) для ОТ-ПЦР и секвенирования, эталонные последовательности для сравнения. Кроме того, ВИБ H52 IBV были секвенированы, и доступны геномные последовательности, такие как EU817497. Таким образом, геном вируса можно сгенерировать путем синтеза его последовательности и сгенерировать с применением обратных генетических систем.

Термин "шиповидный" относится к специфическому белку ВИБ, который хорошо известен специа-

листу в данной области. шиповидный белок является основным индуктором антител и защитного иммунного ответа. Кроме того, шиповидный (S) белок облегчает проникновение ВИБ в клетки, связывая клеточные рецепторы клетки-хозяина, а также опосредуя слияние вирус-клеточной мембраны с клеткой-хозяином. Кроме того, он определяет тканевой и клеточный тропизм штамма вируса.

Термин "гетерологичный S (шиповидный)" означает, что шиповидный белок или его фрагмент, который был введен в ВИБ H52, принадлежит к другому генотипу или серотипу, нежели ВИБ H52. Таким образом, гетерологичный шиповидный имеет генотип или серотип, отличный от H52. Поскольку H52 является генотипом и серотипом Массачусетс, гетерологичный шиповидный белок относится к генотипу или серотипу, отличному от Массачусетс.

Термины "белок", "аминокислота" и "полипептид" используют взаимозаменяемо. Термин "белок" относится к последовательности аминокислот, состоящей из встречающихся в природе аминокислот, а также их производных. Встречающиеся в природе аминокислоты хорошо известны в данной области и описаны в стандартных учебниках по биохимии. В аминокислотной последовательности аминокислоты связаны пептидными связями. Кроме того, два конца аминокислотной последовательности называются карбоксильным концом (С-конец) и амино-концом (N-концом). Термин "белок" охватывает, по существу, очищенные белки или белковые препараты, содержащие, кроме того, другие белки. Помимо этого, термин также относится к фрагментам белка. Сверх того, в его состав входят химически модифицированные белки. Такие модификации могут быть искусственными или встречающимися в природе модификациями, такими как фосфорилирование, гликозилирование, миристилирование и т.п.

Кроме того, настоящее изобретение также обеспечивает иммуногенную композицию, содержащую ВИБ H52 (вирус инфекционного бронхита), кодирующий гетерологичный S (шиповидный) белок или его фрагмент.

Помимо этого, в настоящем изобретении также предложена иммуногенная композиция, содержащая ВИБ (вирус инфекционного бронхита), как описано в настоящем изобретении. Таким образом, предложена иммуногенная композиция, содержащая ВИБ H52 (вирус инфекционного бронхита), кодирующий гетерологичный S (шиповидный) белок ВИБ или его фрагмент.

Термин "иммуногенная композиция" относится к композиции, которая содержит по меньшей мере один антиген, который вызывает иммунологический ответ у хозяина, которому вводят иммуногенную композицию. Такой иммунологический ответ может быть клеточным и/или опосредованным антителами иммунным ответом на иммуногенную композицию в соответствии с изобретением. Предпочтительно иммуногенная композиция индуцирует иммунный ответ и более предпочтительно обеспечивает защитный иммунитет против одного или нескольких клинических признаков инфекции ВИБ. Хозяин также описывается как "субъект". Предпочтительно любой из хозяев или субъектов, описанных или упомянутых в настоящем изобретении представляет собой птицу или сельскохозяйственную птицу.

Обычно "иммунологический ответ" включает, но не ограничивается одним или несколькими из следующих эффектов: выработку или активацию антител, хелперных Т-клеток, супрессорных Т-клеток и/или цитотоксических Т-клеток, и/или гамма-дельта-Т-клеток, специально направленных на антиген или антигены, включенных в предлагаемую в изобретении иммуногенную композицию. Предпочтительно, чтобы хозяин проявлял либо защитный иммунологический ответ, либо терапевтический ответ.

"Защитный иммунологический ответ" или "защитный иммунитет" будет продемонстрирован либо уменьшением, либо отсутствием клинических признаков, которые обычно проявляются у инфицированного хозяина, более быстрым временем выздоровления и/или уменьшением продолжительности инфекционности, или снижением титра патогенов в тканях или биологических жидкостях, или выделениях инфицированного хозяина.

В случае, когда хозяин проявляет защитный иммунологический ответ, такой, что устойчивость к новой инфекции будет увеличиваться и/или уменьшаться клиническая тяжесть заболевания, то иммуногенная композиция описывается как "вакцина".

ВИБ H52 - определение по последовательностям, кодирующим белок.

В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением ВИБ H52 имеет нуклеотидную последовательность, как показано для EU817497 (SEQ ID NO: 78) или последовательность, имеющую по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99, 99,2, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9, 99,95, 99,98 или 99,99% идентичности с ней.

Термин "нуклеиновая кислота" или "последовательность нуклеиновых кислот", или "нуклеотидная последовательность" относится к полинуклеотидам, включая молекулы ДНК, молекулы РНК, молекулы кДНК или производные.

Термин охватывает как одноцепочечные, так и двуцепочечные полинуклеотиды. Нуклеиновая кислота в соответствии с настоящим изобретением охватывает выделенные полинуклеотиды (т.е. выделенные из их природной среды) и генетически модифицированные формы. Кроме того, включены также химически модифицированные полинуклеотиды, включая встречающиеся в природе модифицированные полинуклеотиды, такие как гликозилированные или метилированные полинуклеотиды, или искусственно модифицированные, такие как биотинилированные полинуклеотиды. К тому же, термины "нуклеиновая кислота" и "полинуклеотид" являются взаимозаменяемыми и относятся к любой нуклеиновой кислоте.

Термины "нуклеиновая кислота" и "полинуклеотид" также конкретно включают нуклеиновые кислоты, состоящие из оснований, отличных от пяти биологически встречающихся оснований (аденина, гуанина, тимина, цитозина и урацила).

Термин "РНК" относится к любой рибонуклеиновой кислоте. Термин охватывает как одноцепочечные, так и двуцепочечные РНК. РНК в соответствии с настоящим изобретением включает выделенную РНК (т.е. выделенную из ее природной среды) и генетически модифицированные формы. Кроме того, сюда входят также химически модифицированные РНК, включая природные модифицированные РНК, такие как метилированная РНК, или искусственно модифицированные, такие как биотинилированная РНК. Термин "РНК" также в особенности включает РНК, состоящую из оснований, отличных от четырех биологически встречающихся нуклеотидов/оснований (аденина, гуанина, цитозина и урацила).

В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением штамм ВИБ H52 имеет шиповидный (S) белок, имеющий аминокислотную последовательность, как показано для AF352315 (SEQ ID NO: 79) или последовательность, имеющую по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99, 99,2, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9, 99,95, 99,98 или 99,99% идентичности с ней.

Следует понимать, что последовательность шиповидного белка или нуклеиновой кислоты может быть использована для определения того, имеет ли штамм ВИБ происхождение H52. Тем не менее поскольку ВИБ H52 используют в качестве остова, а последовательность шиповидного белка H52 или последовательность нуклеиновых кислот заменена гетерологичным шиповидным белком или его фрагментом, то конечный ВИБ с гетерологичным шиповидным белком больше не содержит или содержит только оставшиеся части шиповидного белка H52.

В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением штамм ВИБ H52 имеет шиповидный (S) белок, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO: 1 или последовательность, имеющую по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99, 99,2, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9, 99,95, 99,98 или 99,99% идентичности с ней.

В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением ВИБ H52 имеет нуклеокапсидный (N) белок, имеющий аминокислотную последовательность, как показано для AY044185 (SEQ ID NO: 80) или последовательность, имеющую по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99, 99,2, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9, 99,95, 99,98 или 99,99% идентичности по меньшей мере с одной из вышеупомянутых последовательностей.

В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением ВИБ H52 имеет нуклеокапсидный (N) белок, имеющий аминокислотную последовательность, как показано для AF352310 (SEQ ID NO: 81) или последовательность, имеющую по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99, 99,2, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9, 99,95, 99,98 или 99,99% идентичности с ней.

В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением ВИБ H52 имеет нуклеокапсидный (N) белок, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO: 2 или последовательность, имеющую по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99, 99,2, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9, 99,95, 99,98 или 99,99% идентичности с ней.

В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением ВИБ H52 имеет оболочечный (E) белок, имеющий аминокислотную последовательность, как показано для AF317210 (SEQ ID NO: 82) или последовательность, имеющую по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99, 99,2, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9, 99,95, 99,98 или 99,99% идентичности с ней.

В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением ВИБ H52 имеет оболочечный (E) белок, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO: 3 или последовательность, имеющую по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99, 99,2, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9, 99,95, 99,98 или 99,99% идентичности с ней.

В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением ВИБ H52 имеет мембранный гликопротеиновый (M) белок, имеющий аминокислотную последовательность, как показано для AF286185 (SEQ ID NO: 83) или последовательность, имеющую по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99, 99,2, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9, 99,95, 99,98 или 99,99% идентичности с ней.

В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением ВИБ H52 имеет мембранный гликопротеиновый (M) белок, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO: 4 или последовательность, имеющую по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99, 99,2, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9, 99,95, 99,98 или 99,99% идентичности с ней.

Термин "идентичность" или "идентичность последовательностей" известен в данной области техники и относится к взаимосвязи между двумя или более полипептидными последовательностями или двумя, или более полинуклеотидными последовательностями, а именно эталонной последовательностью и данной последовательностью, которую нужно сравнить с эталонной последовательностью. Идентичность последовательностей определяется путем сравнения данной последовательности с эталонной последовательностью после того, как последовательности были оптимально выровнены для получения наивысшей степени сходства последовательностей, что определяется соответствием между строками таких последовательностей. После такого выравнивания идентичность последовательностей подтверждается на основе положения за положением, например, последовательности являются "идентичными" в конкретном поло-

жении, если в этом положении нуклеотиды или аминокислотные остатки идентичны. Общее количество таких идентичностей положений затем делится на общее количество нуклеотидов или остатков в эталонной последовательности, чтобы получить % идентичности последовательности. Идентичность последовательностей можно легко вычислить известными методами, включая, но не ограничиваясь ими, методы, описанные в *Computational Molecular Biology*, Lesk, A.N., ed., Oxford University Press, New York (1988), *Bioinformatics: Informatics and Genome Projects*, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York (1993); *Computer Analysis of Sequence Data, Part I*, Griffin, A.M., Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey (1994); *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heine, G., Academic Press (1987); *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York (1991); и Carillo, H., and Lipman, D., *SIAM J. Applied Math.*, 48: 1073 (1988), содержание которых включено в настоящую заявку путем ссылки. Предпочтительные способы определения идентичности последовательности предназначены для обеспечения наибольшего соответствия между исследуемыми последовательностями. Способы определения идентичности последовательностей кодируются в общедоступных компьютерных программах, которые определяют идентичности с ней между заданными последовательностями. Примеры таких программ включают, но не ограничиваются такими, как пакет программ GCG (Devereux, J. и соавт., *Nucleic Acids Research*, 12(1):387 (1984)), BLASTP, BLASTN и FASTA (Altschul, S.F. и соавт., *J. Molec. Biol.*, 215:403-410 (1990)). Программа BLASTX общедоступна из NCBI и других источников (BLAST Manual, Altschul, S. и соавт., NCVI NLM NIH Bethesda, MD 20894, Altschul, S.F. и соавт., *J. Molec. Biol.*, 215:403-410 (1990), содержание которых включено в настоящую заявку путем ссылки). Эти программы оптимально выравнивают последовательности при использовании веса пробела по умолчанию для получения самого высокого уровня идентичности последовательности между заданной и эталонной последовательностями. В качестве примера, под полинуклеотидом с нуклеотидной последовательностью, имеющей по меньшей мере, например, 85%, предпочтительно 90%, даже более предпочтительно 95% "идентичности последовательности" с эталонной нуклеотидной последовательностью, предполагается, что нуклеотидная последовательность заданного полинуклеотида идентична эталонной последовательности, за исключением того, что последовательность заданного полинуклеотида может содержать вплоть до 15, предпочтительно до 10, еще более предпочтительно вплоть до 5 точечных мутаций на каждые 100 нуклеотидов эталонной нуклеотидной последовательности. Другими словами, в полинуклеотиде с нуклеотидной последовательностью, имеющей по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, еще более предпочтительно 95% идентичности относительно эталонной нуклеотидной последовательности, вплоть до 15%, предпочтительно 10%, еще более предпочтительно 5% нуклеотидов в эталонной последовательности могут быть удалены или заменены другими нуклеотидами, или количество нуклеотидов вплоть до 15%, предпочтительно 10%, еще более предпочтительно 5% от общего количества нуклеотидов в эталонной последовательности могут быть вставлены в эталонную последовательность. Эти мутации эталонной последовательности могут присутствовать в 5'- или 3'-концевых положениях эталонной нуклеотидной последовательности или где-нибудь между этими концевыми положениями, распределяясь или отдельно среди нуклеотидов в эталонной последовательности, или в одной или нескольких смежных группах в эталонной последовательности. Аналогично, под полипептидом с заданной аминокислотной последовательностью, имеющей по меньшей мере, например, 85%, предпочтительно 90%, еще более предпочтительно 95% идентичности последовательности с эталонной аминокислотной последовательностью, предполагают, что данная аминокислотная последовательность полипептида идентична эталонной последовательности, за исключением того, что заданная последовательность полипептида может содержать вплоть до 15, предпочтительно вплоть до 10, еще более предпочтительно до 5 аминокислотных изменений на каждые 100 аминокислот эталонной аминокислотной последовательности. Другими словами, для получения заданной полипептидной последовательности, которая имеет по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, еще более предпочтительно 95% идентичности последовательности с эталонной аминокислотной последовательностью, вплоть до 15%, предпочтительно вплоть до 10%, еще более предпочтительно вплоть до 5% аминокислотных остатков в эталонной последовательности могут быть удалены или заменены другой аминокислотой, или число аминокислот вплоть до 15%, предпочтительно вплоть до 10%, еще более предпочтительно вплоть до 5% от общего количества аминокислотных остатков в эталонной последовательности могут быть вставлены в эталонную последовательность. Эти изменения эталонной последовательности могут происходить в амино- или карбоксиконцевых положениях эталонной аминокислотной последовательности или в любом месте между этими концевыми положениями, перемежаясь либо индивидуально среди остатков в эталонной последовательности, либо в одной или нескольких смежных группах в эталонной последовательности. Предпочтительно положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. Тем не менее консервативные замены не включены в качестве совпадения при определении идентичности последовательности.

Термины "идентичность", "идентичность последовательности" или "процент идентичности" используют в настоящем изобретении как взаимозаменяемые. Для осуществления настоящего изобретения в данном случае определено, что для определения процента идентичности двух аминокислотных последовательностей или двух последовательностей нуклеиновых кислот, последовательности выравнивают с целью оптимального сравнения (например, пробелы могут быть введены в последовательность первой

аминокислотной или нуклеиновокислотной последовательности для оптимального выравнивания со второй аминокислотной последовательностью или последовательностью нуклеиновой кислоты). Затем остатки аминокислот или нуклеотидов в соответствующих положениях аминокислот или нуклеотидов сравнивают. Когда положение в первой последовательности занято той же аминокислотой или нуклеотидным остатком, что и соответствующее положение во второй последовательности, то молекулы являются идентичными в этом положении. Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией количества идентичных положений, общих для последовательностей (т.е. % идентичности=количество идентичных положений/общее количество положений (т.е. перекрывающиеся положения) $\times 100$ ). Предпочтительно две последовательности имеют одинаковую длину.

Сравнение последовательностей может быть проведено по всей длине двух последовательностей, которые подвергают сравнению, или по фрагментам двух последовательностей. Как правило, сравнение будет проведено по всей длине двух сравниваемых последовательностей. Однако идентичность с ней может быть осуществлена по области, например, двадцати, пятидесяти, ста или более смежных аминокислотных остатков.

Специалисту в данной области техники известно, что доступно несколько различных компьютерных программ для определения идентичности между двумя последовательностями. Например, сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя последовательностями может быть выполнено с использованием математического алгоритма. В предпочтительном варианте осуществления процент идентичности между двумя аминокислотными или последовательностями нуклеиновых кислот определяют, используя алгоритм Нидлмана - Вунша (J. Mol. Biol., (48):444-453 (1970)), который был включен в программу GAP в пакете программного обеспечения Accelrys GCG (доступно на <http://www.accelrys.com/products/gcg/>), с использованием либо матрицы Blosom 62 или матрицы PAM250, и штрафа за открытие пробела 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и штрафа за продолжение пробела 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Специалисту в данной области будет понятно, что все эти разные параметры будут давать немного разные результаты, но общая процентная идентичность двух последовательностей существенно не изменится при использовании разных алгоритмов.

Кроме того, последовательности белков или последовательности нуклеиновых кислот в соответствии с настоящим изобретением могут быть использованы в качестве "запрашиваемой последовательности" для осуществления поиска по доступным базам данных, например, для идентификации других членов семейства или родственных последовательностей. Такие поиски могут быть выполнены с использованием программ BLASTN и BLASTP (версия 2.0) от Altschul, и соавт. (1990), J. Mol. Biol., 215:403-10. Поиски белков BLAST можно осуществлять с помощью программы BLASTP, счет=50, длина слова=3 для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных молекулам белков в соответствии с изобретением. Для получения выравниваний с пробелами с целью сравнения, Gapped BLAST можно использовать как описано у Altschul и соавт. (1997), Nucleic Acids Res., 25(17):3389-3402. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST можно применять параметры по умолчанию соответствующих программ (например, BLASTP и BLASTN). См. домашнюю страницу Национального центра биотехнологической информации по адресу <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

В контексте настоящего изобретения, в частности, следует понимать, что термин "идентичный последовательности SEQ ID NO: X" эквивалентен термину "идентичный последовательности SEQ ID NO: X по длине SEQ ID NO: X" или термину "идентичный последовательности SEQ ID NO: X по всей длине SEQ ID NO: X" соответственно. В этом контексте "X" представляет собой любое целое число от 1 до 85, так что "SEQ ID NO: X" представляет собой любую из SEQ ID NO, упомянутых в настоящем изобретении.

Гетерологичный S белок.

Штаммы ВИБ.

Штаммы ВИБ можно классифицировать по серотипу и генотипу. Классификация серотипов включает обработку вируса нейтрализующими антителами, тогда как классификация генотипов обычно включает изучение последовательности S1 (шиповидного) белка. Тем не менее различные штаммы ВИБ хорошо известны специалистам в данной области. Вирус инфекционного бронхита был впервые обнаружен в США в 1930-х гг. Первым идентифицированным серотипом ВИБ был Массачусетс, но в Соединенных Штатах было идентифицировано несколько серотипов, включая Арканзас и Делавэр, в дополнение к первоначально идентифицированному типу Массачусетс.

Штамм ВИБ Beaudette относится к типу Массачусетс и был получен после по меньшей мере 150 пассажей в куриных эмбрионах. Штамм ВИБ Beaudette был первоначально выделен в исполнении Beaudette and Hudson (J. Am. Vet. Med. A., 90, 51-60, 1937) и пассирован в куриных эмбрионах. Другими штаммами ВИБ типа Массачусетс, помимо Beaudette являются H120, H52 и M41. Штамм H120 был пассирован 120 раз.

IBV QX описан как вирулентный полевой изолят ВИБ, который первоначально был выделен в Китае. Однако вирус распространился в Европу и был обнаружен в некоторых частях Западной Европы, преимущественно в Нидерландах, а также в Германии, Франции, Бельгии, Дании и Великобритании. К тому же, генотип или серотип QX был описан в нескольких странах Азии и Африки.

IBV 4/91, который обычно также называют 793В, впервые был зарегистрирован в Великобритании

в начале девяностых годов и теперь распространяется во многих частях мира. CR88 представляет собой аттенуированный штамм, принадлежащий к этому генотипу и коммерчески доступный в качестве вакцины.

Штаммы, обозначенные как "Итальянский-02" или "Италия-02", были выделены в конце 1990-х гг. в Италии. Анализ последовательностей одного из этих изолятов был опубликован в 2002 году (NCBI-BLAST, номер AJ457137).

Тем не менее исследования показали, что этот штамм Итальянский-02 широко распространен в Европе и что, помимо варианта штамма ВИБ 4/91, он стал одним из наиболее преобладающих генотипов в Великобритании, Испании, Франции и Нидерландах.

С 1996 г. новый генотип вируса инфекционного бронхита (ВИБ), обозначаемый как Q1, циркулировал в Китае и впервые был зарегистрирован в Италии в 2011 году. Q1 связан с увеличением смертности, поражением почек и провентрикулитом.

Кроме того, в Европе были идентифицированы штаммы D274, B1648/D8880, D1466, V1397 и Арканзас.

Специалист в данной области знает, где получить любые штаммы ВИБ. Штаммы ВИБ имеются в продаже, могут быть получены в научных институтах или геномы могут быть синтезированы синтетическим путем в виде комплементарной ДНК, поскольку штаммы ВИБ были секвенированы и последовательности были опубликованы и, таким образом, они являются доступными. Более того, штаммы ВИБ могут быть выделены на месте. Способы выделения штаммов ВИБ и характеристики штаммов ВИБ хорошо известны специалистам в данной области. Valter Leonardo de Quadros, 2011 (Диссертация, Das Infektiöse Bronchitis Virus (IBV): Molekularbiologische Untersuchungen zur Diagnostik und zum Vorkommen sowie zur Pathogenität des Genotyps IBV QX in spezifisch pathogenfreien (SPF) Broilern, Freie Universität Berlin), Worthington и соавт., 2009 (Avian Pathology, 37(3), 247-257), Liu и соавт., 2009 (Virus Genes, 38:56-65), Dolz и соавт., 2006 (Avian Pathology, 35(2):77-85), Farsang и соавт., 2002 (Avian Pathology, 31:229-236) и Feng и соавт., 2014 (Virus Genes, 49:292-303) описывают как выделить и дифференцировать различные штаммы ВИБ.

В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением гетерологичный шиповидный белок имеет генотип или серотип, отличный от Массачусетс.

В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением гетерологичный S белок или его фрагмент принадлежит к ВИБ с генотипом или серотипом, выбранным из списка, состоящего из: Арканзас (такой как Арканзас 99), Бразилия (такой как BR-1, BR-2, 23/2013, IBV/Бразилия/351/1984), Калифорния (такой как Калифорния 1734/04, Калифорния 99), Коннектикут, Делавэр (такой как Делавэр 98), Нидерландский (такой как D207, D212, D274, D3128, D3896, D8880, D1466), Флорида, Джорджия (такой как Джорджия GA-07, GA-08, GA-12, GA-13), Грей, Холт, Айова (такой как Айова 97 и Айова 69), Италия (такой как Италия 02), JMK, LDT3, Мэн (такой как Мэн 209), Пенсильвания (такой как Пенсильвания 1220/98, Пенсильвания Wolg/98), PL84084, Qu (такой как Qu-mv), QX (такой как GB341/96), Q1, SE 17, Вариант 2 (такой как IS/1494/06, IBV/Ck/EG/CU/4/2014, гаммаCoV/Ck/Польша/G052/2016) и 4/91 (793B, CR88).

В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением гетерологичный S белок или его фрагмент происходит из ВИБ, выбранного из перечня генотипов или серотипов, включающих в себя 4/91, QX, Q1, Италия 02, Арканзас, Коннектикут, Джорджия, LDT3, PL84084, Вариант 2 или Бразилия.

В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением гетерологичный S белок или его фрагмент происходит из ВИБ, выбранного из перечня генотипов или серотипов, включающих в себя 4/91, QX, Q1, Арканзас, Вариант 2 и Бразилия.

В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением штамм 4/91 выбирают из перечня, включающего в себя Испания/98/328, Испания/92/35, IR-3654-VM, FR-CR88061-88, FR-85131-85, UK-1233-95, UK/3/91, Испания/00/336, UK/7/91, 4/91-патогенный, 4/91-аттенуированный, IB4- 91 и CR88.

В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением штамм QX выбирают из перечня, включающего в себя FR-L1450T- 05, FR-L1450L-05, NL-L1449T-04, NL-L1449K-04, IBV/Ck/SP/170/09, IBV/Ck/SP/79/08, IBV/Ck/SP/248/09, HBN, IBVQX, LX4, BJQ, CK/CH/LGD/03 и GB341/96.

В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением штамм Q1 выбирают из перечня, включающего в себя CK/CH/LDL/98I, CK/CH/LSD/08- 10, J2, Q1, AR08ER22, AR08BA21 и Чили- 295-10.

В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением штамм Арканзас выбирают из перечня, включающего в себя Ark99, ArkGA, ArkDPI, AL/5364/00, ARKDPI11, AL/0803/01, AL/7149/00, ArkDPI101, AL/1221/01, AL/1793/01 и AL/4614/98.

В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением штамм Вариант 2 выбирают из перечня, включающего в себя: IS/1494/06, IBV/Ck/EG/CU/4/2014, гаммаCoV/Ck/Польша/ G052/2016, Eg/CLEVB-2/IBV/012, D1344/2/4/10\_EG, TR8 и IB VAR2-06.

В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением штамм Бразилия выбирают из перечня, включающего в себя: BR1, BR-2, 23/2013 и IBV/Бразилия/351/1984.

В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением гетерологичный S белок или его фрагмент происходит от генотипа или серотипа 4/91.

В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением гетерологичный S белок или его фрагмент имеет генотип или серотип 4/91, имеющий по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,2, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9, 99,95, 99,98 или 99,99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 5 или 6.

В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением гетерологичный S белок или его фрагмент имеет генотип или серотип QX, имеющий по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,2, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9, 99,95, 99,98 или 99,99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 7 или 8.

В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением гетерологичный S белок или его фрагмент имеет генотип или серотип Q1, имеющий по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,2, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9, 99,95, 99,98 или 99,99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 9 или 10.

В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением гетерологичный S белок или его фрагмент имеет генотип или серотип Арканзас, имеющий по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,2, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9, 99,95, 99,98 или 99,99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 11 или 12.

В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением гетерологичный S белок или его фрагмент имеет генотип или серотип Вариант 2, имеющий по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,2, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9, 99,95, 99,98 или 99,99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 13 или 14.

В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением гетерологичный S белок или его фрагмент имеет генотип или серотип Бразилия, имеющий по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,2, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9, 99,95, 99,98 или 99,99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 15 или 16.

В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением гетерологичный S белок или его фрагмент выбирают из перечня, включающего в себя SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16.

В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением гетерологичный S белок представляет собой полноразмерный шиповидный белок.

Настоящие экспериментальные данные показывают, что можно использовать фрагменты последовательности шиповидного белка, как например, эктодомен шиповидного белка. Однако можно также использовать последовательности полноразмерного шиповидного белка.

В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением фрагмент гетерологичного S (шиповидного) белка имеет длину по меньшей мере 500, 750, 1000 или 1077 аминокислот.

В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением фрагмент гетерологичного S (шиповидного) белка имеет длину по меньшей мере 500, 750, 1000 или 1077 аминокислот от N-конца.

Термин "N-конец" хорошо известен специалисту в данной области. N-конец также называют аминоконцом, NH<sub>2</sub>-концом, N-концевой областью или аминным концом. Когда белок транслируется с информационной РНК, он создается от N-конца к С-концу. Таким образом, N-конец является началом аминокислотной цепи (белка или полипептида), содержащей указанную аминокислотную группу (-NH<sub>2</sub>).

В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением фрагмент гетерологичного S (шиповидного) белка имеет длину по меньшей мере 1000 аминокислот.

В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением фрагмент гетерологичного S (шиповидного) белка представляет собой эктодомен шиповидного белка.

Термин "эктодомен" хорошо известен специалисту в данной области. шиповидный белок состоит из различных функциональных частей, сигнальной последовательности, эктодомена, трансмембранного домена и эндодомена (от N-конца к С-концу). Таким образом, после расщепления сигнальной последовательности N-конец шиповидного белка начинается с эктодомена. Эктодомен шиповидного ВИБ имеет длину приблизительно 1077 аминокислот и отличается по длине на несколько аминокислот в зависимости от штамма ВИБ.

В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением гетерологичный S (шиповидный) белок или его фрагмент заменяет гомологичный S белок или его фрагмент.

В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением гетерологичный S (шиповидный) белок или его фрагмент заменяет существующий в природе S белок или его фрагмент.

В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением гетерологичный S (шиповидный) белок или его фрагмент заменяет S белок или его фрагмент в ВИБ H52.

В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением ВИБ является аттенуированным.

Термин "аттенуированный" относится к патогену, имеющему пониженную вирулентность по сравнению с изолятом дикого типа. В настоящем изобретении аттенуированный ВИБ представляет собой вирус, вирулентность которого снижена, так что он не вызывает клинических признаков инфекции ВИБ, но способен вызывать иммунный ответ у целевого животного, а также может означать, что клинические признаки уменьшаются по частоте или тяжести у животных, инфицированных аттенуированным ВИБ по сравнению с "контрольной группой" животных, инфицированных неаттенуированным ВИБ и не получавших аттенуированный вирус. В этом контексте термин "понизить/пониженный" означает уменьшение по меньшей мере на 10%, предпочтительно на 25%, еще более предпочтительно на 50%, еще более предпочтительно на 60%, еще более предпочтительно на 70%, еще более предпочтительно на 80%, еще более предпочтительно на 90%, еще более предпочтительно на 95% и наиболее предпочтительно на 100% по сравнению с контрольной группой, инфицированной неаттенуированным ВИБ, как определено выше. Таким образом, аттенуированный штамм ВИБ является штаммом, который подходит для включения в иммуногенную композицию, содержащую модифицированный живой ВИБ.

В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением ВИБ является инактивированным.

В целях настоящего изобретения можно использовать любой стандартный способ инактивации. Таким образом, инактивацию можно проводить с помощью химических и/или физических обработок, которые известны специалисту в данной области. Предпочтительные способы инактивации включают добавление циклизованного бинарного этиленимина (ВЕI), включая добавление раствора гидробромида 2-бромэтиленамина (ВЕА), который был циклизован до бинарного этиленимина (ВЕI). Другие предпочтительные химические средства инактивации содержат, но не ограничиваются ими тритон X-100, дезоксихолат натрия, бромид цетилтриметиламмония, β-пропиолактон, тимеросал, фенол и формальдегид (формалин). Тем не менее инактивация может также включать стадию нейтрализации. Предпочтительные нейтрализующие средства включают, но не ограничиваются ими, тиосульфат натрия, бисульфит натрия и т.п.

Предпочтительно условия инактивации формалином включают концентрацию формалина между приблизительно 0,02-2,0% (об./об.), более предпочтительно от приблизительно 0,1-1,0% (об./об.), еще более предпочтительно от приблизительно 0,15-0,8% (об./об.), еще более предпочтительно от приблизительно 0,16-0,6% (об./об.) и наиболее предпочтительно приблизительно 0,2-0,4% (об./об.). Время инкубации зависит от устойчивости ВИБ. В целом, процесс инактивации осуществляют до тех пор, пока рост ВИБ не будет обнаружен в подходящей системе культивирования.

Предпочтительно инактивированный ВИБ в соответствии с настоящим изобретением является инактивированным формалином, предпочтительно с использованием концентраций, описанных выше.

Инактивированный ВИБ в соответствии с изобретением может быть включен в липосомы с использованием известной технологии, такой как описанная в Nature, 1974, 252, 252-254 или Journal of Immunology, 1978, 120, 1109-13. В другом варианте осуществления изобретения предлагаемый в изобретении инактивированный ВИБ может быть конъюгирован с подходящими биологическими соединениями, такими как полисахариды, пептиды, белки и т.п., или их комбинацией.

В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением ВИБ является генно-инженерным.

Термин "генно-инженерный" относится к ВИБ, который был мутирован с использованием подходов "обратной генетики". Предпочтительно, чтобы ВИБ в соответствии с настоящим изобретением был получен с помощью генной инженерии. Метод обратной генетики включает получение синтетических рекомбинантных вирусных РНК. Тем не менее методы "обратной генетики" хорошо известны специалистам в данной области.

В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением ВИБ является рекомбинантным ВИБ.

Используемый в настоящем изобретении термин "рекомбинантный" относится к геному РНК (или последовательности РНК, последовательности кДНК или белку), имеющим любые модификации, которые не происходят в природе в соответствующем геноме РНК (или последовательности РНК, последовательности кДНК или белке). Например, геном РНК (или последовательность РНК, последовательность кДНК или белок) считается "рекомбинантным", если он содержит вставку, делецию, инверсию, перемещение или точечную мутацию, введенную искусственно, например, вмешательством человека. Следовательно, геномная последовательность РНК (или последовательность РНК, последовательность кДНК или

белок) не связана со всеми или частью последовательностей (или последовательности РНК, последовательности кДНК или белка), с которыми она связана в природе.

Термин "рекомбинантный", используемый в отношении вируса, означает вирус, полученный путем искусственного манипулирования вирусным геномом. Термин "рекомбинантный вирус" охватывает генетически модифицированные вирусы.

В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением ВИБ является химерным.

Термин "химерный" относится к ВИБ, содержащему одну или несколько нуклеотидных последовательностей от другого коронавируса, предпочтительно от другого штамма ВИБ. Например, ВИБ H52, кодирующий гетерологичный S (шиповидный) белок или его фрагмент представляет собой химерный ВИБ.

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением иммуногенная композиция представляет собой вакцину. Термин "вакцина" уже был описан в другом месте в настоящем изобретении. Тем не менее, в случае когда хозяин проявляет защитный иммунологический ответ, такой, что устойчивость к новой инфекции будет увеличиваться и/или уменьшаться клиническая тяжесть заболевания, иммуногенная композиция описывается как "вакцина".

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением иммуногенная композиция содержит фармацевтически приемлемый носитель.

Термин "фармацевтически приемлемый носитель" охватывает любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, стабилизирующие средства, разбавители, консерванты, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические средства, средства, замедляющие адсорбцию, адъюванты, иммуностимуляторы и их комбинации.

К "разбавителям" относят воду, физиологический раствор, декстрозу, этанол, глицерин и т.п. Изотонические средства могут включать, среди прочего, хлорид натрия, декстрозу, маннит, сорбит и лактозу. Стабилизаторы включают, среди прочего, альбумин и щелочные соли этилендиаминтетрауксусной кислоты.

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением фармацевтически приемлемый носитель представляет собой забуференный фосфатом физиологический раствор.

Предпочтительно иммуногенная композиция дополнительно содержит стабилизатор сахарозы и желатина.

Предпочтительно фармацевтически приемлемым носителем является хитозан.

Хитозан представляет собой природный деацетилованный полисахарид из хитина ракообразных (например, креветок, крабов), насекомых и других беспозвоночных. Недавно Rauw и соавт., 2009 (Vet. Immunol. Immunop., 134:249-258) продемонстрировали, что хитозан усиливает клеточный иммунный ответ живой вакцины против болезни Ньюкасла и усиливает ее защитный эффект. Кроме того, Wang и соавт., 2012 (Arch Virol (2012), 157:1451-1461) показали результаты, раскрывающие потенциал хитозана в качестве адъюванта для использования в живой аттенуированной вакцине против гриппа.

Предпочтительно иммуногенная композиция может дополнительно включать один или несколько других иммуномодулирующих средств, таких как, например, интерлейкины, интерфероны или другие цитокины. Количества и концентрации адъювантов и добавок, применимых в контексте настоящего изобретения, могут быть легко определены квалифицированным специалистом в данной области.

В некоторых аспектах иммуногенная композиция в соответствии с настоящим изобретением содержит адъювант. Используемое в настоящем изобретении понятие "адъюванты" может охватывать гидроксид алюминия и фосфат алюминия, сапонины, например, Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL), эмульсию типа "вода-в-масле", эмульсию типа "масло-в-воде", эмульсию типа "вода-в-масле-в-воде". Эмульсия может быть основана, в частности, на легком жидком парафиновом масле (тип Европейской Фармакопеи); изопреноидном масле, таком как сквалан или сквален; масле, полученном после олигомеризации алкенов, в частности, изобутила или децена; сложных эфирах кислот или спиртов, содержащих линейную алкильную группу, более конкретно растительных маслах, этилолеате, ди-(каприлат/капрат) пропиленгликоле, три-(каприлат/капрат) глицериле или диолеате пропиленгликоля; сложных эфирах разветвленных жирных кислот или спиртов, в частности, сложных эфирах изостеариновой кислоты. Для получения эмульсии масло используют в сочетании с эмульгаторами. Эмульгаторы предпочтительно представляют собой неионные поверхностно-активные вещества, в частности, сложные эфиры сорбитана, маннита (например, олеат ангидроманнита), гликоля, полиглицерина, пропиленгликоля и олеиновой, изостеариновой, рицинолевой или гидроксистеариновой кислоты, которые необязательно являются этоксилированными, и блок-сополимеры полиоксипропилен-полиоксиэтилена, в частности, продукты плуроник, в частности L121. См., Hunter и соавт., *The Theory and Practical Application of Adjuvants* (Ed. Stewart-Tull, D. E. S.), JohnWiley and Sons, NY, p. 51-94 (1995); и Todd и соавт., *Vaccine*, 15:564-570 (1997). Примерными адъювантами являются эмульсия SPT, описанная на с. 147 в "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach", под ред. M. Powell, M. Newman, Plenum Press, 1995, и эмульсия MF59, описанная на с. 183 этой же книги.

Дополнительным примером адъюванта является соединение, выбранное из полимеров акриловой

или метакриловой кислоты и сополимеров малеинового ангидрида и производного алкенила. Предпочтительными адьювантными соединениями являются полимеры акриловой или метакриловой кислоты, которые сшиты, особенно с простыми полиалкениловыми эфирами Сахаров или многоатомных спиртов. Эти соединения являются известны под термином карбомер (Phameugora том 8, № 2 июнь 1996). Специалисты в данной области техники могут обратиться также к патенту США № 2909462, в котором описаны такие акриловые полимеры, перекрестно сшитые с полигидроксиллированным соединением, которое имеет по меньшей мере 3 гидроксильные группы, предпочтительно не более 8, где атомы водорода по меньшей мере трех гидроксиллов заменены ненасыщенными алифатическими радикалами, содержащими по меньшей мере 2 атома углерода. Предпочтительными радикалами являются радикалы, содержащие от 2 до 4 атомов углерода, например, винилы, аллилы и другие этиленненасыщенные группы. Ненасыщенные радикалы могут сами содержать другие заместители такие, как метил. В особенности пригодны продукты, которые продаются под названием Carbopol; (BF Goodrich, Огайо, США). Они являются перекрестно сшитыми с аллилсахарозой или аллилпентаэритритолом. Среди них можно упомянуть Carbopol 974P, 934P и 971P. Наиболее предпочтительным является применение Carbopol 971P. Среди сополимеров малеинового ангидрида и алкенильного производного находятся сополимеры ЕМА (Monsanto), которые являются сополимерами малеинового ангидрида и этилена. Растворение этих полимеров в воде обеспечивает кислый раствор, который будет нейтрализован, предпочтительно до физиологического рН, чтобы получить раствор адьюванта, в который будет включена сама иммуногенная, иммунологическая или вакцинальная композиция.

Кроме того, пригодные адьюванты охватывают, но не ограничиваются ими, адьювантную систему RIBI (Ribi Inc.), блок-сополимер (CytRx, Atlanta GA), SAF-M (Chiron, Emeryville CA), монофосфорил липид А, липидно-аминный адьювант авридин, термолабильный энтеротоксин из *E. coli* (рекомбинантный или другой), холерный токсин, IMS 1314 или мурамилдипептид, или встречающиеся в природе или рекомбинантные цитокины или их аналоги, или стимуляторы высвобождения эндогенных цитокинов, среди многих других.

Предполагают, что адьювант можно добавлять в количестве приблизительно от 100 мкг до приблизительно 10 мг на дозу, предпочтительно в количестве приблизительно от 100 мкг до приблизительно 10 мг на дозу, более предпочтительно в количестве приблизительно от 500 мкг до приблизительно 5 мг на дозу, еще более предпочтительно в количестве приблизительно от 750 мкг до приблизительно 2,5 мг на дозу, и наиболее предпочтительно в количестве приблизительно от 1 мг на дозу. Альтернативно, адьювант может находиться в концентрации приблизительно от 0,01 до 50%, предпочтительно в концентрации приблизительно от 2 до 30%, более предпочтительно в концентрации приблизительно от 5 до 25%, еще более предпочтительно в концентрации приблизительно от 7 до 22%, и наиболее предпочтительно в концентрации от 10 до 20% по объему конечного продукта.

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением иммуногенная композиция эффективна при лечении и/или профилактике клинических признаков, вызванных посредством ВИБ у нуждающегося субъекта. Термины "лечение и/или профилактика", "клинические признаки" и "нуждающийся" были определены в других местах.

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением иммуногенная композиция защищает от заражения штаммом ВИБ генотипа или серотипа гетерологичного шиповидного белка.

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением иммуногенная композиция защищает от заражения штаммами генотипа 4/91, QX, Q1, Арканзас, Вариант 2 или Бразилия.

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением иммуногенная композиция защищает от заражения штаммами генотипа 4/91.

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением указанная иммуногенная композиция составлена для однократного введения.

Объем для однократной дозы был определен в другом месте настоящего изобретения.

Кроме того, было показано, что одна доза иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением эффективна после введения такой однократной дозы указанной иммуногенной композиции.

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением иммуногенную композицию вводят подкожно, внутримышечно, перорально, *in ovo*, в виде спрея, с питьевой водой или в виде глазных капель.

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением иммуногенная композиция содержит от 1 до 10  $\log_{10}$  EID<sub>50</sub> на дозу ВИБ.

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением иммуногенная композиция содержит от 2 до 5  $\log_{10}$  EID<sub>50</sub> на дозу ВИБ.

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением иммуногенная композиция содержит от 2 до 4  $\log_{10}$  EID<sub>50</sub> на дозу ВИБ.

Наборы.

При желании композиции могут быть представлены в упаковке или дозирующем устройстве, кото-

рые могут содержать одну или несколько стандартных дозированных форм, содержащих действующее вещество. Упаковка может содержать, например, металлическую или пластиковую фольгу, такую как блистерная упаковка. К упаковке или дозирующему устройству могут быть приложены инструкции по применению, предпочтительно для введения субъектам, особенно домашней птице. С такой емкостью(ями) может быть связано уведомление в форме, предписанной государственным органом, регулирующим производство, использование или продажу фармацевтических, или биологических продуктов, при этом уведомление отражает одобрение органом производства, использования или продажи для введения человеку.

Таким образом, настоящее изобретение обеспечивает набор, содержащий ВИБ или иммуногенную композицию как описано в настоящем изобретении.

В одном конкретном аспекте набора в соответствии с настоящим изобретением набор дополнительно содержит инструкцию по лечению и/или профилактике болезней птиц.

В одном конкретном аспекте набора в соответствии с настоящим изобретением набор дополнительно содержит инструкцию по лечению и/или профилактике болезней домашних птиц.

В одном конкретном аспекте набора в соответствии с настоящим изобретением набор дополнительно содержит инструкцию по лечению и/или профилактике ИБ (инфекционного бронхита).

Способ лечения.

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает способ иммунизации субъекта, включающий в себя введение такому субъекту иммуногенной композиции, как описано в настоящем изобретении.

Термин "иммунизация" относится к активной иммунизации путем введения иммуногенной композиции субъекту, который должен быть иммунизирован, тем самым вызывая иммунологический ответ против антигена, включенного в такую иммуногенную композицию.

Предпочтительно иммунизация приводит к снижению заболеваемости конкретной инфекцией ВИБ в стае или к снижению тяжести клинических признаков, вызванных или связанных с конкретным инфицированием ВИБ.

Кроме того, иммунизация нуждающегося в ней субъекта иммуногенными композициями, как предусмотрено в настоящем изобретении, приводит к предотвращению инфицирования субъекта посредством ВИБ. Еще более предпочтительно иммунизация приводит к эффективному, продолжительному иммунологическому ответу против инфицирования посредством ВИБ. Следует понимать, что указанный период времени будет длиться более 1 месяца, предпочтительно более 2 месяцев, предпочтительно более 3 месяцев, более предпочтительно более 4 месяцев, более предпочтительно более 5 месяцев, более предпочтительно более 6 месяцев. Следует понимать, что иммунизация не может быть эффективной у всех иммунизированных субъектов. Тем не менее термин подразумевает, чтобы значительная часть животных была иммунизирована.

Предпочтительно в этом контексте рассматривается стая субъектов, у которых обычно, то есть без иммунизации, развиваются клинические признаки, обычно вызываемые или связанные с инфицированием ВИБ. Специалист в данной области техники без особых усилий может определить, эффективно ли иммунизированы животные в стае. Предпочтительно иммунизация должна быть эффективной, если клинические признаки по меньшей мере у 33%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере в 95% и наиболее предпочтительно у 100% особей данной стаи уменьшились по частоте или степени тяжести по меньшей мере на 10%, более предпочтительно по меньшей мере на 20%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 30%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 40%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 50%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 60%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 70%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 95% и наиболее предпочтительно на 100% по сравнению с субъектами, которые либо не были иммунизированы, либо иммунизированы иммуногенной композицией, которая была доступна до настоящего изобретения, но впоследствии были инфицированы конкретным ВИБ.

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает способ лечения или профилактики клинических симптомов, вызванных ВИБ, у нуждающегося субъекта, при этом способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции, как описано в настоящем изобретении.

Термин ""лечение или профилактика" относится к снижению заболеваемости конкретной инфекцией ВИБ в стае или снижению тяжести клинических признаков, вызванных или связанных с конкретной инфекцией ВИБ. Таким образом, термин "лечение или профилактика" также относится к уменьшению количества субъектов в стае, инфицированных конкретным ВИБ (=уменьшение заболеваемости конкретной инфекцией ВИБ) или к снижению тяжести клинических признаков, обычно связанных с инфекцией ВИБ или вызванных ею, или уменьшению выделения вируса после инфицирования ВИБ, или предотвращению или уменьшению снижения яйценоскости у кур-несушек после заражения конкретным ВИБ в группе субъектов, где субъекты получили эффективное количество иммуногенной композиции, как предусмотрено в настоящем изобретении, по сравнению с группой субъектов, которые не получали такую иммуногенную композицию.

Понятие "лечение или профилактика" обычно включает введение эффективного количества иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением субъекту или группе субъектов, нуждающихся в таком лечении/профилактике или которым могло бы помочь такое лечение/профилактика. Термин "лечение" относится к введению эффективного количества иммуногенной композиции после того, как субъект или, по крайней мере, некоторые субъекты стали уже инфицированы таким ВИБ и у таких субъектов уже проявляются некоторые клинические признаки, вызванные или связанные с таким инфицированием ВИБ. Термин "профилактика" относится к введению субъекту до любого заражения такого субъекта посредством ВИБ или по меньшей мере когда такой субъект или ни один из субъектов в группе субъектов не проявляет каких-либо клинических признаков, вызванных или связанных с инфицированием таким ВИБ. Термины "профилактика" и "предотвращение" взаимозаменяемы в этом изобретении.

Термин "эффективное количество", используемый в настоящем изобретении, означает, но не ограничивается этим, количество антигена, которое вызывает или способно вызвать иммунный ответ у субъекта. Такое эффективное количество способно снизить частоту конкретного инфицирования ВИБ в стае или уменьшить тяжесть клинических признаков конкретного инфицирования ВИБ.

Предпочтительно клинические признаки уменьшаются по частоте или тяжести по меньшей мере на 10%, более предпочтительно по меньшей мере на 20%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 30%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 40%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 50%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 60%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 70%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 95% и наиболее предпочтительно на 100% по сравнению с субъектами, которых либо не лечили, либо лечили иммуногенной композицией, которая была доступна до настоящего изобретения, но впоследствии инфицированных конкретным ВИБ.

Термин "клинические признаки", используемый в настоящем изобретении относится к признакам инфицирования субъекта посредством ВИБ. Клинические признаки инфекции зависят от выбранного возбудителя. Примеры таких клинических признаков включают, помимо прочего, респираторный дистресс синдром, нефрит, сальпингит, аномальную яйценоскость, взъерошенность перьев, депрессию, снижение скорости роста и снижение аппетита. Признаки респираторного дистресса охватывают респираторные признаки, включая удушье, кашель, чихание, хрипы в трахее, выделения из носа и глаз, поражения трахеи и цилиостаза в трахее. Признаки нефрита включают поражения почек и водянистую диарею. Признаки аномальной яйценоскости включают снижение яйценоскости, яйца меньшего размера, плохая скорлупа, снижение качества внутреннего яйца, яйца с тонким белком и цилиостаз в яйцевом. Тем не менее клинические признаки также включают, но не ограничиваются ими, клинические признаки, которые непосредственно наблюдаются у живого животного. Примеры клинических признаков, которые непосредственно наблюдаются у живого животного, включают выделения из носа и глаз, кашель, затрудненное дыхание, чихание, хрипы в трахее, взъерошенные перья, конъюнктивит, потерю массы, снижение скорости роста, снижение аппетита, обезвоживание, водянистую диарею, хромоту, вялость, истощение и худосочность и т.п.

Предпочтительно клинические признаки, уменьшившиеся по частоте или степени тяжести у пролеченного субъекта по сравнению с субъектами, которые либо не получали лечения, либо лечились иммуногенной композицией, которая была доступна до настоящего изобретения, но впоследствии инфицированных конкретным ВИБ, относятся к уменьшению цилиостаза, уменьшению хрипов, повышению яйценоскости, уменьшению поражения почек, уменьшению водянистой диареи, уменьшению потери массы, снижению вирусной нагрузки, уменьшению выделения вирусов или их комбинаций.

Термин "нуждающийся" или "необходимый", используемый в настоящем изобретении, означает, что введение/лечение связано с усилением или улучшением состояния здоровья или клинических признаков, или любым другим положительным лечебным эффектом на здоровье субъектов, которые получают иммуногенную композицию в соответствии с настоящим изобретением.

Термин "уменьшение", или "уменьшенный", или "снижение", или "более низкий" используют в этом изобретении взаимозаменяемо. Термин "снижение" означает, что клинический признак снижается по меньшей мере на 10%, более предпочтительно по меньшей мере на 20%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 30%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 40%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 50%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 60%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 70%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 95% наиболее предпочтительно на 100% по сравнению с субъектами, которые не получают лечения (не иммунизированы), но впоследствии инфицированы конкретным ВИБ.

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает способ уменьшения цилиостаза у нуждающегося субъекта по сравнению с субъектом из неиммунизированной контрольной группы того же вида, способ, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции, как описано в настоящем изобретении.

Как показано в примерах, было доказано, что иммуногенная композиция, представленная в настоящем документе, является эффективной в снижении цилиостаза.

Термин "цилиостаз" относится к уменьшенному движению ресничек в трахее. Таким образом, ци-лиостаз можно определить, исследуя внутреннюю выстилку трахеальных колец на предмет движения ресничек. Специалист в данной области знает, как определить движение ресничек в трахее.

Предпочтительно движение ресничек не снижается с 10 дня после 10 заражения или инфицирова-ния, более предпочтительно с 5 дня после заражения или инфицирования, более предпочтительно с 4 дня после заражения или инфицирования, более предпочтительно с 3 дня после заражения или инфицирова-ния и наиболее предпочтительно с 1 или 2 дня после заражения или инфицирования ВИБ по сравнению с субъектом неиммунизированной контрольной группы того же вида.

Термин "уменьшение цилюостаза" означает, что цилюостаз уменьшается по меньшей мере на 10%, предпочтительно по меньшей мере на 20%, более предпочтительно по меньшей мере на 30%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 40%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 50%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 60%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 70%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 95% и наиболее предпочтительно на 100% по сравнению с субъектом неиммунизированной контрольной группы того же вида. Специалист в данной области знает, как измерить уменьшение цилюостаза.

В одном аспекте настоящего изобретения указанный субъект представляет собой птицу.

Понятие "птица" хорошо известен специалисту в данной области. Понятие "птица" охватывает всех птиц, включая домашнюю птицу.

В одном аспекте настоящего изобретения указанный субъект представляет собой домашнюю птицу.

Понятие "домашняя птица" хорошо известен специалисту в данной области. Понятие "домашняя птица" включает кур, индеек, перепелов, фазанов, цесарок, гусей и уток. Кроме того, термин "курица" включает бройлеров, кур-несушек и репродуктивное поголовье для обоих поскольку они также считаются племенными птицами.

В одном аспекте настоящего изобретения указанный субъект выбирают из списка, включающего в себя курицу, индейку, перепела или фазана.

В одном аспекте настоящего изобретения указанный субъект представляет собой курицу.

В одном аспекте настоящего изобретения иммуногенную композицию вводят однократно.

Понятно, что разовую дозу вводят только один раз. Как показано в примерах, иммуногенная компо-зиция, представленная в настоящем документе, оказалась эффективной после введения разовой дозы ну-ждающемуся субъекту.

Объем дозы на птицу зависит от способа вакцинации и возраста птицы.

Обычно вакцины в виде глазных капель вводят в объеме от 1 до 100 мкл на дозу в любом возрасте. Предпочтительно однократная доза вакцин в виде глазных капель имеет общий объем от примерно 5 до 70 мкл и более предпочтительно от примерно 20 до 50 мкл с предпочтительной однократной дозой в 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 мкл. Наиболее предпочтительно, чтобы разовая доза вакцин в виде глазных капель имела общий объем от примерно 30 до 50 мкл, при этом предпочтительна разовая доза в 30, 35, 40, 45 или 50 мкл.

Вакцины-спреи могут содержать дозу в объеме от 25 до 1000 мкл для домашней птицы в возрасте одного дня. Предпочтительно разовая доза для вакцин-спреев имеет общий объем от приблизительно 50 до 5000 мкл, более предпочтительно от приблизительно 75 до 2000 мкл, более предпочтительно от приблизительно 100 до 1000 мкл, еще более предпочтительно от приблизительно 200 до 900 мкл, еще более предпочтительно приблизительно от 300 до 800 мкл и еще более предпочтительно от приблизи-тельно 400 до 700 мкл с предпочтительной одноразовой дозой в 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600, 625, 650, 675 или 700 мкл. Наиболее предпочтительно разовая доза имеет общий объем 400, 450, 500, 550, 600, 650 или 700 мкл.

Вакцина для вакцинации *in ovo* может содержать дозу в объеме от 50 до 100 мкл, предпочтительно 50 мкл. Предпочтительно одноразовая доза для вакцин *in ovo* имеет общий объем приблизительно от 10 до 250 мкл, более предпочтительно приблизительно от 15 до 200 мкл, еще более предпочтительно приблизительно от 20 до 150 мкл, еще более предпочтительно приблизительно от 30 до 100 мкл, еще бо-лее предпочтительно приблизительно от 30 до 75 мкл и с предпочтительной одноразовой дозой в 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 или 75 мкл. Наиболее предпочтительно одноразовая доза имеет общий объем в 40, 45, 50, 55 или 60 мкл.

Вакцина для внутримышечной или подкожной вакцинации, или одна доза вакцины для питьевой воды может содержать дозу в объеме от 30 до 1000 мкл. Предпочтительно общий объем разовой дозы составляет примерно от 30 до 1000 мкл, более предпочтительно приблизительно от 50 до 500 мкл, более предпочтительно приблизительно от 75 до 250 мкл и еще более предпочтительно приблизительно от 100 до 200 мкл с наиболее предпочтительной одноразовой дозой в 100, 110, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 160, 170, 175, 180, 190, 155 или 200 мкл.

В одном аспекте настоящего изобретения иммуногенную композицию вводят в двух или более дозах.

Тем не менее иммуногенную композицию можно вводить двумя или несколькими дозами, причем первую дозу вводят до введения второй (бустерной) дозы.

В предпочтительном аспекте схемы двукратного введения как первая, так и вторая дозы иммуногенной композиции вводят в одинаковом количестве. Предпочтительно каждая доза находится в предпочтительных количествах, указанных выше. В дополнение к первому и второму режимам дозирования альтернативный вариант осуществления включает дополнительные последующие дозы. Например, в этих аспектах может быть введена третья, четвертая или пятая доза. Предпочтительно последующие третий, четвертый и пятый режимы дозирования вводят в том же количестве, что и первая доза, при этом временные рамки между дозами соответствуют времени между первой и второй дозами, упомянутыми выше.

Предпочтительно первое введение вакцины проводят в течение первых трех недель жизни, более предпочтительно в течение первой недели жизни и наиболее предпочтительно в возрасте одного дня с помощью способов, описанных ниже. Второе введение можно проводить в возрасте первых 20 недель, предпочтительно в возрасте 16-18 недель, более предпочтительно в возрасте 6-12 недель. Например, первоначальную (первую) вакцинацию проводят в возрасте 1-10 дней, а вторую вакцинацию (ревакцинацию) проводят живой или инактивированной вакциной в возрасте 6-12 или 16-18 недель. Более предпочтительно первоначальную (первую) вакцинацию проводят в возрасте одного дня, а вторую вакцинацию (повторную вакцинацию) проводят живой или инактивированной вакциной в возрасте 6-12 или 16-18 недель.

В случае применения вакцинации *in ovo* предпочтительно первое введение проводят, когда эмбрионам от 15 до 19 дней, предпочтительно на 17, 18 или 19 день, наиболее предпочтительно на 18 день эмбриона. Второе введение может быть осуществлено в течение первых трех недель жизни, предпочтительно в течение первых 10 дней жизни.

В одном аспекте настоящего изобретения указанную иммуногенную композицию вводят подкожно, внутримышечно, перорально, *in ovo*, в виде спрея, с питьевой водой или в виде глазных капель.

Иммуногенную композицию предпочтительно вводят местно или системно. Подходящими способами введения, обычно используемыми, являются пероральное или парентеральное введение, такое как интраназальное, внутривенное, внутрикожное, трансдермальное, внутримышечное, внутрибрюшинное, подкожное, а также в виде ингаляции, *in ovo*, в виде спрея, через питьевую воду или в виде глазных капель. Тем не менее в зависимости от природы и способа действия соединения иммуногенная композиция также может быть введена другими путями. Например, такие другие пути включают введение внутрикожно, внутривенно, внутрисосудисто, внутриартериально, внутрибрюшинно, интратекально, интратрахеально, внутрикожно, интракардиально, внутривисцерально, внутривисцерально, интрамедуллярно, внутривисцерально, интратекально и внутривисцерально. Тем не менее наиболее предпочтительно иммуногенную композицию вводят подкожно, внутримышечно, перорально, *in ovo*, в виде спрея, с питьевой водой или в виде глазных капель.

Живые вакцины против ВИБ предпочтительно вводят индивидуально в виде глазных капель, интраназально, внутримышечно или подкожно.

Более предпочтительно использовать способы массового применения, включая вакцинацию с использованием питьевой воды и аэрозольного распыления. Также предпочтительно использование вакцин в качестве эмбриональных вакцин (так называемые вакцины *in ovo*), как описано ниже.

Например, бройлеров можно вакцинировать в возрасте одного дня или 1-3 недель, особенно бройлеров с высоким уровнем MDA. Первоначально поголовье несушек или птицу репродуктивного направления можно вакцинировать в возрасте 1-10 дней и усиленно вакцинировать в возрасте 7-12 или 16-18 недель.

Введение *in ovo*.

Как указано выше, настоящее изобретение также обеспечивает вакцину против ВИБ, которую можно безопасно вводить путем "*in ovo*" и в то же время она способна вызывать защитный иммунный ответ. Введение *in ovo* хорошо известно специалисту в данной области и этот специалист может без особых усилий осуществить введение *in ovo*. Введение вакцины *in ovo* заключается во введении вакцины птичьему эмбриону, находящемуся в яйце (обзор вакцинации *in ovo* см. Ricks и соавт., *Advances in Vet. Med.*, 495-515, 1999). Вакцину можно вводить в любую пригодную часть яйца (например, аллантоисную жидкость, желточный мешок, амнион, воздушную клетку или в эмбрион), как описано в известном уровне техники (Sharma, *Am. J. Vet. Res.*, 45, 1619-1623, 1984). Предпочтительно вакцину вводят под оболочечную (воздушную полость) мембрану и хориоаллантоисную мембрану.

Предпочтительно вакцину впрыскивают в яйца с зародышем на поздних стадиях эмбриона, обычно в течение последней четверти инкубационного периода, предпочтительно за 3-4 дня до вылупления. Предпочтительно введение проводят, когда эмбрионам от 15 до 19 дней, предпочтительно на 17, 18 или 19 день, наиболее предпочтительно в возрасте 18 дней. Впоследствии вакцинированные яйца с эмбрионами переносят в инкубатор для вылупления. Процесс введения *in ovo* можно автоматизировать с помощью роботизированного процесса инъекции, как описано в предшествующем уровне техники.

Как правило, обычные вакцины для вакцинации домашней птицы после вылупления не могут быть использованы для вакцинации *in ovo*, поскольку эмбрионы на поздних стадиях очень чувствительны к инфицированию большинством исследованных вакцинных вирусов. Тем не менее в международной патентной заявке WO 01/64244 описано, что вакцины против ВИБ можно использовать для введения *in ovo* при условии, что их применяют в очень низких дозах. Кроме того, Wakenell и соавт., 1986 (*Am. J. Vet.*

Res., 47 933-938) описывает, что пассирование вируса вакцины против ИБ в культуре ткани сделало вирус апатогенным для эмбрионов.

В одном аспекте настоящего изобретения указанную иммуногенную композицию вводят в виде глазных капель.

Обычно живая вакцина для пост-инкубационного введения содержит аттенуированный ВИБ в концентрации от  $10^1$  до  $10^8$  EID<sub>50</sub> (50%-ная доза для заражения яиц) на дозу, предпочтительно в концентрации от  $10^2$  до  $10^5$  EID<sub>50</sub> на дозу и более предпочтительно в концентрации от  $10^2$  до  $10^4$  EID<sub>50</sub> на единицу дозы и еще более предпочтительно в концентрации от  $10^2$  до  $10^3$  EID<sub>50</sub> на дозу.

Живая вакцина для введения *in ovo* обычно содержит количество аттенуированного ВИБ от  $10^2$  до  $10^7$  EID<sub>50</sub>/эмбрион, предпочтительно от  $10^2$  до  $10^3$  EID<sub>50</sub>/эмбрион в объеме от 50 до 100 мкл, предпочтительно 50 мкл.

Предпочтительно иммуногенная композиция в соответствии с настоящим изобретением содержит ВИБ в соответствии с настоящим изобретением в количествах приблизительно от 1 до приблизительно  $10 \log_{10}$  EID (доза для заражения яйца)<sub>50</sub>/мл на дозу, предпочтительно приблизительно от 2 до приблизительно  $8 \log_{10}$  EID<sub>50</sub> на дозу, предпочтительно в количестве приблизительно от 2 до приблизительно  $7 \log_{10}$  EID<sub>50</sub> на дозу, более предпочтительно в количестве приблизительно от 2 до приблизительно  $6 \log_{10}$  EID<sub>50</sub> на дозу, еще более предпочтительно в количестве приблизительно от 2 до приблизительно  $5 \log_{10}$  EID<sub>50</sub> на дозу, еще более предпочтительно в количестве приблизительно от 2 до приблизительно  $4 \log_{10}$  EID<sub>50</sub> на дозу, наиболее предпочтительно в количестве приблизительно от 2 до приблизительно  $3 \log_{10}$  EID<sub>50</sub> на дозу. Более предпочтительно иммуногенная композиция в соответствии с настоящим изобретением содержит ВИБ в соответствии с настоящим изобретением в количествах приблизительно от 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5 или  $\log_{10}$  EID<sub>50</sub> на дозу.

В одном аспекте настоящего изобретения иммуногенная композиция содержит от 1 до  $10 \log_{10}$  EID<sub>50</sub> на дозу ВИБ.

В одном аспекте настоящего изобретения иммуногенная композиция содержит от 2 до  $5 \log_{10}$  EID<sub>50</sub> на дозу ВИБ.

В одном аспекте настоящего изобретения иммуногенная композиция содержит от 2 до  $4 \log_{10}$  EID<sub>50</sub> на дозу ВИБ.

В одном аспекте настоящего изобретения иммуногенную композицию вводят субъектам в течение первой недели жизни, в течение первых трех дней жизни, в течение первых двух дней жизни или в течение первого дня жизни.

Предпочтительно возраст подлежащего иммунизации субъекта составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 день. Более предпочтительно возраст указанного подлежащего иммунизации субъекта составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 дней. Наиболее предпочтительно возраст указанного подлежащего иммунизации субъекта составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней.

Тем не менее следует понимать, что после вакцинации субъекта, достигшего возраста нескольких дней, иммунной системе домашней птицы действительно требуется несколько дней, чтобы сформировать иммунитет против инфекции ВИБ. Следовательно, предпочтительно, чтобы субъекты были иммунизированы в течение первых 24 ч жизни.

В одном аспекте настоящего изобретения иммуногенную композицию вводят субъектам в течение первого дня жизни. Как показано в примерах иммуногенная композиция, предложенная в настоящем изобретении, оказалась безопасной и эффективной при введении домашней птице в возрасте одного дня.

В одном аспекте настоящего изобретения указанный способ приводит к улучшению параметра эффективности, выбранного из группы, состоящей из: предотвращения или уменьшения цилюстаза, предотвращения или уменьшения хрипов, предотвращения или уменьшения снижения яйценоскости, предотвращения или уменьшения поражения почек, предотвращения или уменьшения водянистой диареи, предотвращения или снижения потери веса, снижения вирусной нагрузки, снижения выделения вируса или их комбинации, по сравнению с субъектом необработанной контрольной группы того же вида.

Термины "лечение и/или профилактика" были определены в другом месте, где термины "профилактика" и "предотвращение" или "предупреждение" используют в этом изобретении взаимозаменяемо. Кроме того, термин "выделение" также был определен в другом месте.

Термин "снижение", "сниженный", "уменьшение" или "более низкий" означает, что параметр эффективности (цилюстаз, хрипы, снижение яйценоскости, поражения почек, водянистая диарея, потеря веса, вирусная нагрузка, выделение вируса) снижается по меньшей мере на 10%, предпочтительно по меньшей мере на 20%, более предпочтительно по меньшей мере на 30%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 40%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 50%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 60%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 70%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 95% и наиболее предпочтительно на 100% по сравнению с субъектом неиммунизированной контрольной группы того же вида. Специалист в данной области в основном знает, как измерить улучшение параметров эффективности.

Термин "вирусная нагрузка" хорошо известен специалисту в данной области. В настоящем изобре-

тении термин "вирусная нагрузка" используют взаимозаменяемо с термином "титр вируса". Вирусная нагрузка или титр вируса являются мерой тяжести активной вирусной инфекции и могут быть определены методами, известными специалисту в данной области. Определение может быть основано на обнаружении вирусных белков, например, на связывании антител с вирусными белками и дальнейшем обнаружении или, альтернативно, на обнаружении вирусной РНК методами амплификации, такими как ОТ-ПЦР. Мониторинг вирусной РНК, ассоциированной с вирионом, в плазме с помощью методов амплификации нуклеиновых кислот является широко используемым параметром для оценки статуса и прогрессирования ретровирусного заболевания, а также для оценки эффективности профилактических и терапевтических вмешательств. Например, вирусная нагрузка или титр вируса могут быть рассчитаны путем оценки количества живого вируса в пораженной жидкости организма, такого как количество копий РНК на миллилитр плазмы крови.

Термин "цилиостаз" хорошо известен специалистам в данной области. Поверхность трахеи покрыта специальными эпителиальными клетками, которые выстланы многочисленными подвижными волосковидными структурами, называемыми ресничками. Термин "цилиостаз" включает уменьшение или потерю ресничек и/или потерю или частичную потерю активности ресничек. Цилиостаз без особых сложностей может быть определен специалистом в данной области.

Термин "хрипы" хорошо известен специалисту в данной области. Тем не менее термин "хрипы" охватывает хрипы в трахее и относится к звукам, исходящим из бронхов. Хрипы могут быть определены без особых проблем специалистом в данной области.

Термин "снижение яйценоскости" хорошо известен специалисту в данной области. Термин "снижение яйценоскости" означает уменьшение производства яиц.

В одном аспекте настоящего изобретения лечение или профилактика приводит к предупреждению или сокращению цилиостаза по сравнению с субъектами необработанной контрольной группы того же вида.

В одном аспекте настоящего изобретения лечение или профилактика приводит к предупреждению или сокращению поражений почек по сравнению с субъектами необработанной контрольной группы того же вида.

В одном аспекте настоящего изобретения лечение или профилактика приводит к предупреждению или сокращению снижения яйценоскости по сравнению с субъектами необработанной контрольной группы того же вида.

Кроме того, в настоящем изобретении предложен ВИБ или иммуногенная композиция как описано в настоящем изобретении для терапевтического использования.

Кроме того, в настоящем изобретении предложен ВИБ или иммуногенная композиция как описано в настоящем изобретении для использования в качестве иммуногена или вакцины.

Кроме того, в настоящем изобретении предложен ВИБ или иммуногенная композиция как описано в настоящем изобретении для использования в качестве лекарственного средства.

Помимо этого, в настоящем изобретении предусмотрено применение ВИБ или иммуногенной композиции, как описано в настоящем изобретении для изготовления лекарственного средства.

Помимо этого, в настоящем изобретении предусмотрено применение ВИБ или иммуногенной композиции, как описано в настоящем изобретении для лечения и/или профилактики инфекций ВИБ у субъекта.

Кроме того, в настоящем изобретении предложена иммуногенная композиция, содержащая ВИБ H52 (вирус инфекционного бронхита), кодирующий гетерологичный S (шиповидный) белок или его фрагмент, где указанный ВИБ H52 содержит нуклеокаспидный (N) белок, оболочечный (E) белок или мембранный (M) гликопротеин, имеющий аминокислотную последовательность, как показано для SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, AY044185 (SEQ ID NO: 80), AF352310 (SEQ ID NO: 81), AF317210 (SEQ ID NO: 82) или AF286185 (SEQ ID NO: 83) или последовательность, имеющую по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99, 99,2, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9, 99,95, 99,98 или 99,99% идентичности с ней, и где гетерологичный S белок или его фрагмент выбирают из перечня генотипов или серотипов, включающих в себя 4/91, QX, Q1, Арканзас, Вариант 2 и Бразилия или из аминокислотной последовательности, как показано в SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 или последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95, 96, 97, 98, 99, 99,2, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9, 99,95, 99,98 или 99,99% идентичности с ней.

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением гетерологичный S белок представляет собой полноразмерный шиповидный белок.

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением фрагмент гетерологичного S (шиповидного) белка имеет длину по меньшей мере 500, 750, 1000 или 1077 аминокислот от N-конца.

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением фрагмент гетерологичного S (шиповидного) белка представляет собой эктодомен шиповидного белка.

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением ВИБ является аттенуированным.

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает способ получения иммуногенной композиции для

лечения и/или профилактики инфекций ВИБ у субъекта, включающий в себя

а) обеспечение ВИБ Н52, содержащего шиповидный (S) белок, нуклеокапсидный (N) белок, оболочечный (E) белок или мембранный (M) гликопротеин, имеющий аминокислотную последовательность, как показано для SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, AF352315 (SEQ ID NO: 79), AY044185 (SEQ ID NO: 80), AF352310 (SEQ ID NO: 81), AF317210 (SEQ ID NO: 82) или AF286185 (SEQ ID NO: 83) или последовательность, имеющую по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99, 99,2, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9, 99,95, 99,98 или 99,99% идентичности с ней; и

б) обеспечение гетерологичного S белка или его фрагмента, выбранного из перечня генотипов или серотипов, включающих в себя 4/91, QX, Q1, Арканзас, Вариант 2 и Бразилия или из аминокислотной последовательности, как показано в SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 или последовательности, имеющую по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,2, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9, 99,95, 99,98 или 99,99% идентичности с ней; и

в) замену шиповидного белка или его фрагмента ВИБ Н52 из а) указанным гетерологичным S (шиповидным) белком или его фрагментом из б), чтобы получить ВИБ Н52 с гетерологичным S белком или его фрагментом; и

г) получение указанного ВИБ Н52 с гетерологичным S белком или его фрагментом; и

д) добавление фармацевтически приемлемого носителя.

Термин "получение" включает сбор, выделение, очистку и/или составление (например, завершение, инактивацию и/или смешивание) указанного ВИБ Н52 с гетерологичным S белком или его фрагментом.

Термин "сбор" относится к сбору или выделению указанного ВИБ Н52 с гетерологичным S белком или его фрагментом из трансфицированных или инфицированных клеток или клеточной линии. Можно использовать любой обычный метод, известный в данной области, например любой метод разделения. Хорошо известные в данной области методы включают центрифугирование или фильтрацию, например использование полупроницаемой мембраны с определенным размером пор.

Термин "выделение" включает в себя стадию выделения указанного ВИБ Н52 с гетерологичным S белком или его фрагментом. Способы выделения из трансфицированных или инфицированных клеток или клеточной линии известны специалисту в данной области. Эти методы включают физические и/или химические методы, включая, помимо прочего, циклы замораживания-оттаивания, обработку ультразвуком и т.п.

Способы "очистки" указанного ВИБ Н52 с гетерологичным S белком или его фрагментом из изолята известны специалисту в данной области, например, методами, описанными в разделе "Способы очистки белков - практический подход" (E.L.V. Harris, S. Angel, eds., IRL Press at Oxford University Press). Эти методы включают, но не ограничиваются ими, разделение центрифугированием и/или фильтрацией, осаждение, эксклюзионную хроматографию (гель-фильтрационную) хроматографию, аффинную хроматографию, металлохелатную хроматографию, ионообменную хроматографию, ковалентную хроматографию, хроматографию с гидрофобным взаимодействием и т.п. Вектор может быть получен в очищенной чистой форме или без или практически без других клеточных материалов или культуральной среды и т.д. После указанного выделения и/или очистки антиген проявляет чистоту по меньшей мере 80%, предпочтительно 80-90%, более предпочтительно 90-97%, наиболее предпочтительно более 97% до абсолютно чистой формы без какого-либо загрязнения.

Согласно дополнительному аспекту, понятие "получение", используемое в настоящем изобретении, может также включать дополнительные этапы окончательной обработки как часть конечного процесса приготовления, такие как добавление буфера, этапы инактивации, нейтрализации и т.п.

В другом конкретном аспекте способа получения иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением, фрагмент гетерологичного S (шиповидного) белка представляет собой эктодомен шиповидного белка.

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением указанный фармацевтически приемлемый носитель выбирают из группы, состоящей из растворителей, дисперсионных сред, покрытий, стабилизирующих агентов, разбавителей, консервантов, антибактериальных и противогрибковых агентов, изотонических агентов, средств, замедляющих адсорбцию, адъювантов, иммуностимуляторов и их комбинаций.

В другом конкретном аспекте способа получения иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением, гетерологичный S белок представляет собой эктодомен шиповидного белка.

Кроме того, настоящее изобретение относится к плазмиде, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую частичный геном ВИБ Н52 (вируса инфекционного бронхита), включая гетерологичный S (шиповидный) белок ВИБ или его фрагмент, такой как донорская плаزمиды pUC57-s H52 rIBV CR88 S Экто (SEQ ID NO: 21).

### Пункты

Нижеследующие пункты также описаны в настоящем изобретении.

1. ВИБ Н52 IBV (вирус инфекционного бронхита), кодирующий гетерологичный S (шиповидный) белок ВИБ или его фрагмент.

2. Иммуногенная композиция, содержащая ВИБ Н52 (вирус инфекционного бронхита), кодирую-

ший гетерологичный S (шиповидный) белок или его фрагмент.

3. Иммуногенная композиция, содержащая ВИБ (вирус инфекционного бронхита) по п.1.

ВИБ H52- Определение по последовательностям, кодирующим белок

4. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пп.1-3, где ВИБ H52 имеет или состоит из или содержит нуклеотидную последовательность, как показано для EU817497 (SEQ ID NO: 78) или последовательность, имеющую по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99, 99,2, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9, 99,95, 99,98 или 99,99% идентичности с ней.

5. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пп.1-4, где штамм ВИБ H52 имеет или состоит из или содержит шиповидный (S1) белок, имеющий аминокислотную последовательность, как показано для AF352315 (SEQ ID NO: 79) или последовательность, имеющую по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99, 99,2, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9, 99,95, 99,98 или 99,99% идентичности с ней.

6. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пп.1-5, где штамм ВИБ H52 имеет или состоит из или содержит шиповидный (S) белок, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO: 1 или последовательность, имеющую по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99, 99,2, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9, 99,95, 99,98 или 99,99% идентичности с ней.

7. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пп.1-6, где ВИБ H52 имеет или состоит из или содержит нуклеокаспидный (N) белок, имеющий аминокислотную последовательность, как показано для AY044185 (SEQ ID NO: 80) или AF352310 (SEQ ID NO: 81) последовательность, имеющую по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99, 99,2, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9, 99,95, 99,98 или 99,99% идентичности с ней.

8. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пп.1-7, где ВИБ H52 имеет или состоит из или содержит нуклеокаспидный (N) белок, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO: 2 или последовательность, имеющую по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99, 99,2, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9, 99,95, 99,98 или 99,99% идентичности с ней.

9. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пп.1-8, где ВИБ H52 имеет или состоит из или содержит оболочечный (E) белок, имеющий аминокислотную последовательность, как показано для AF317210 (SEQ ID NO: 82) или последовательность, имеющую по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99, 99,2, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9, 99,95, 99,98 или 99,99% идентичности с ней.

10. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пп.1-9, где ВИБ H52 имеет или состоит из или содержит оболочечный (E) белок, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO: 3 или последовательность, имеющую по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99, 99,2, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9, 99,95, 99,98 или 99,99% идентичности с ней.

11. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пп.1-10, где ВИБ H52 имеет или состоит из или содержит мембранный гликопротеиновый (M) белок, имеющий аминокислотную последовательность, как показано для AF286185 (SEQ ID NO: 83) или последовательность, имеющую по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99, 99,2, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9, 99,95, 99,98 или 99,99% идентичности с ней.

12. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пп.1-11, где ВИБ H52 имеет или состоит из или содержит мембранный гликопротеиновый (M) белок, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO: 4 или последовательность, имеющую по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99, 99,2, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9, 99,95, 99,98 или 99,99% идентичности с ней.

Гетерологичный S белок.

13. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пп.1-12, где гетерологичный шиповидный белок имеет генотип или серотип, отличный от Массачусетс.

14. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пп.1-13, где гетерологичный S белок или его фрагмент принадлежит к ВИБ с генотипом или серотипом, выбранным из списка, состоящего из Арканзас (такой как Арканзас 99), Бразилия (такой как BR-1, BR-2, 23/2013, IBV/Бразилия/351/1984), Калифорния (такой как Калифорния 1734/04, Калифорния 99), Коннектикут, Делавэр (такой как Делавэр 98), Нидерландский (такой как D207, D212, D274, D3128, D3896, D8880, D1466), Флорида, Джорджия (такой как Джорджия GA-07, GA-08, GA-12, GA-13), Грей, Холт, Айова (такой как Айова 97 и Айова 69), Италия (такой как Италия 02), JMK, LDT3, Мэн (такой как Мэн 209), Пенсильвания (такой как Пенсильвания 1220/98, Пенсильвания Wolg/98), PL84084, Qu (такой как Qu-mv), QX (такой как GB341/96), Q1, SE 17, Вариант 2 (такой как IS/1494/06, IBV/Ck/EG/CU/4/2014, гаммаСоV/Ck/Польша/G052/2016) и 4/91 (793B, CR88).

15. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пп.1-14, где гетерологичный S белок или его фрагмент происходит из ВИБ, выбранного из перечня генотипов или серотипов, включающих в себя 4/91, QX, Q1, Италия 02, Арканзас, Коннектикут, Джорджия, LDT3, PL84084, Вариант 2 или Бразилия.

16. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пп.1-15, где гетерологичный S белок или его фрагмент происходит из ВИБ, выбранного из перечня генотипов или серотипов, включающих в себя 4/91, QX, Q1, Арканзас, Вариант 2 и Бразилия.

17. ВИБ или иммуногенная композиция по п.16, где штамм 4/91 выбирают из перечня, включающего в себя Испания/98/328, Испания/92/35, IR-3654-VM, FR-CR88061-88, FR-85131-85, UK-1233-95, UK/3/91, Испания/00/336, UK/7/91, 4/91-патогенный, 4/91-аттенуированный, IB4- 91 и CR88.

18. ВИБ или иммуногенная композиция по п.16, где штамм QX выбирают из перечня, включающего в себя FR-L1450T-05, FR-L1450L-05, NL-L1449T-04, NL-L1449K-04, IBV/Ck/SP/170/09, IBV/Ck/SP/79/08,

IBV/Ck/SP/248/09, HBN, IBVQX, LX4, BJQ, CK/CH/LGD/03 и GB341/96.

19. ВИБ или иммуногенная композиция по п.16, где штамм Q1 выбирают из перечня, включающего в себя CK/CH/LDL/98I, CK/CH/LSD/08-10, J2, Q1, AR08ER22, AR08BA21 и Чили-295-10.

20. ВИБ или иммуногенная композиция по п.16, причем штамм Арканзас выбирают из перечня, включающего в себя Ark99, ArkGA, ArkDPI, AL/5364/00, ARKDPI11, AL/0803/01, AL/7149/00, ArkDPI101, AL/1221/01, AL/1793/01 и AL/4614/98.

21. ВИБ или иммуногенная композиция по п.16, где штамм Вариант 2 выбирают из перечня, включающего в себя IS/1494/06, IBV/Ck/EG/CU/4/2014, гаммаCoV/Ck/Польша/G052/2016, Eg/CLEVB-2/IBV/012, DI344/2/4/10\_EG, TR8 и IB VAR2-06.

22. ВИБ или иммуногенная композиция по п.16, где штамм Бразилия выбирают из перечня, включающего в себя: BR-1, BR-2, 23/2013 и IBV/Бразилия/351/1984.

23. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пп.1 - 22, где гетерологичный S белок или его фрагмент относится к генотипу или серотипу.

24. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пп.1-23, где гетерологичный S белок или его фрагмент имеет генотип или серотип 4/91, имеющий по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,2, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9, 99,95, 99,98 или 99,99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 5 или 6 или гетерологичный S белок или его фрагмент состоит из или содержит аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO: 5 или 6 или последовательность, имеющую по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,2, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9, 99,95, 99,98 или 99,99% идентичности с ней.

25. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пп.1-24, где гетерологичный S белок или его фрагмент имеет генотип или серотип QX, имеющий по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,2, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9, 99,95, 99,98 или 99,99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 7 или 8 или гетерологичный S белок или его фрагмент состоит из или содержит аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO: 7 или 8 или последовательность, имеющую по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,2, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9, 99,95, 99,98 или 99,99% идентичности с ней.

26. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пп.1-25, где гетерологичный S белок или его фрагмент имеет генотип или серотип Q1, имеющий по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,2, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9, 99,95, 99,98 или 99,99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 9 или 10 или гетерологичный S белок или его фрагмент состоит из или содержит аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO: 9 или 10 или последовательность, имеющую по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,2, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9, 99,95, 99,98 или 99,99% идентичности с ней.

27. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пп.1-26, где гетерологичный S белок или его фрагмент имеет генотип или серотип Арканзас, имеющий по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,2, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9, 99,95, 99,98 или 99,99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 11 или 12 или гетерологичный S белок или его фрагмент состоит из или содержит аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO: 11 или 12 или последовательность, имеющую по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,2, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9, 99,95, 99,98 или 99,99% идентичности с ней.

28. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пп.1-27, где гетерологичный S белок или его фрагмент имеет генотип или серотип Вариант 2, имеющий по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,2, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9, 99,95, 99,98 или 99,99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 13 или 14 или гетерологичный S белок или его фрагмент состоит из или содержит аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO: 13 или 14 или последовательность, имеющую по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,2, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9, 99,95, 99,98 или 99,99% идентичности с ней.

29. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пп.1-28, где гетерологичный S белок или его фрагмент имеет генотип или серотип Бразилия, имеющий по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,2, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9, 99,95, 99,98 или 99,99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 15 или 16 или гетерологичный S белок или его фрагмент состоит из или содержит аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO: 15 или 16 или последовательность, имеющую по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,2, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9, 99,95, 99,98 или 99,99% идентичности с ней.

30. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пп.1-29, где гетерологичный S белок или его фрагмент выбирают из перечня, включающего в себя SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11,12, 13, 14, 15 или 16.

31. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пп.1-30, где гетерологичный S белок представляет собой полноразмерный шиповидный белок.

32. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пп.1-31, где фрагмент гетерологичного S (шиповидного) белка имеет длину по меньшей мере 500, 750, 1000 или 1077 аминокислот.

33. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пп.1-32, где фрагмент гетерологичного S (шиповидного) белка имеет длину по меньшей мере 500, 750, 1000 или 1077 аминокислот от N-конца.

34. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пп.1-33, где фрагмент гетерологичного S (шиповидного) белка имеет длину по меньшей мере 1000 аминокислот.

35. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пп.1-34, где фрагмент гетерологичного S (шиповидного) белка представляет собой эктодомен шиповидного белка.
36. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пп.1-35, где гетерологичный S (шиповидный) белок или его фрагмент заменяет гомологичный S белок или его фрагмент.
37. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пп.1-36, где гетерологичный S (шиповидный) белок или его фрагмент заменяет существующий в природе S белок или его фрагмент.
38. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пп.1-37, где гетерологичный S (шиповидный) белок или его фрагмент заменяет S белок или его фрагмент в H52.
39. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пп.1-38, где ВИБ является аттенуированным.
40. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пп.1-39, где ВИБ является инактивированным.
41. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пп.1-40, где ВИБ является генно-инженерным.
42. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пп.1-41, где ВИБ является рекомбинантным ВИБ.
43. Иммуногенная композиция по любому из пп.2-42, где иммуногенная композиция представляет собой вакцину.
44. Иммуногенная композиция по любому из пп.2-43, где иммуногенная композиция содержит фармацевтически приемлемый носитель.
45. Иммуногенная композиция по п.44, где фармацевтически приемлемый носитель представляет собой забуференный фосфатом физиологический раствор.
46. Иммуногенная композиция по любому из пп.2-45, где иммуногенная композиция является эффективной в лечении и/или профилактике клинических признаков, вызванных ВИБ, у нуждающегося субъекта.
47. Иммуногенная композиция по любому из пп.2-46, где иммуногенная композиция защищает от заражения штаммом ВИБ генотипа или серотипа гетерологичного шиповидного белка.
48. Иммуногенная композиция по любому из пп.2-47, где иммуногенная композиция защищает от заражения штаммами генотипа 4/91, QX, Q1, Арканзас Вариант 2 или Бразилия.
49. Иммуногенная композиция по любому из пп.2-48, где иммуногенная композиция защищает от заражения штаммами генотипа 4/91.
50. Иммуногенная композиция по любому из пп.2-49, где указанная иммуногенная композиция составлена для однократного введения.
51. Иммуногенная композиция по любому из пп.2-50, где указанную иммуногенную композицию вводят подкожно, внутримышечно, перорально, *in ovo*, в виде спрея, с питьевой водой или в виде глазных капель.
52. Иммуногенная композиция по любому из пп.2-51, где иммуногенная композиция содержит от 1 до  $10 \log_{10}$  EID<sub>50</sub> на дозу ВИБ.
53. Иммуногенная композиция по любому из пп.2-52, где иммуногенная композиция содержит от 2 до  $5 \log_{10}$  EID<sub>50</sub> на дозу ВИБ.
54. Иммуногенная композиция по любому из пп.2-53, где иммуногенная композиция содержит от 2 до  $4 \log_{10}$  EID<sub>50</sub> на дозу ВИБ.
55. Набор, содержащий ВИБ или иммуногенную композицию по любому из пп.1-54.
56. Набор по п.55, где набор дополнительно содержит инструкцию по лечению и/или профилактике болезней птиц.
57. Набор по п.55, где набор дополнительно содержит инструкцию по лечению и/или профилактике болезней домашних птиц.
58. Набор по п.55, где набор дополнительно содержит инструкцию по лечению и/или профилактике ИБ.
59. Способ иммунизации субъекта, включающий в себя введение такому субъекту иммуногенной композиции по любому из пп.2-54.
60. Способ лечения или предотвращения клинических признаков, вызванных ВИБ у нуждающегося в этом субъекта, способ, включает в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции по любому из пп.2-54.
61. Способ уменьшения цитолиза у нуждающегося в этом субъекта, по сравнению с субъектом неиммунизированной контрольной группы того же вида, способ, включает в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции по любому из пп.2-54.
62. Иммуногенная композиция по любому из пп.2-54 для применения в способе иммунизации субъекта, включающем в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества указанной иммуногенной композиции.
63. Иммуногенная композиция по любому из пп.2-54 для применения в способе лечения или предотвращения клинических признаков, вызванных ВИБ у нуждающегося в этом субъекта, причем способ включает в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества указанной иммуногенной композиции.
64. Иммуногенная композиция по любому из пп.2-54 для применения в способе уменьшения цитолиза у нуждающегося в этом субъекта по сравнению с субъектом неиммунизированной контрольной

группы того же вида, причем способ включает в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества указанной иммуногенной композиции.

65. Способ или применение по любому из пп.59-64, где указанный субъект представляет собой птицу.

66. Способ или применение по любому из пп.59-65, где указанный субъект представляет собой домашнюю птицу.

67. Способ или применение по любому из пп.59-66, где указанный субъект выбирают из списка, включающего в себя курицу, индейку, перепела или фазана.

68. Способ или применение по любому из пп.59-67, где указанный субъект представляет собой курицу.

69. Способ или применение по любому из пп.59-68, где иммуногенную композицию вводят однократно.

70. Способ или применение по любому из пп.59-68, где иммуногенную композицию вводят в двух или более дозах.

71. Способ или применение по любому из пп.59-70, где указанную иммуногенную композицию вводят подкожно, внутримышечно, перорально, *in ovo*, в виде спрея, с питьевой водой или в виде глазных капель.

72. Способ или применение по любому из пп.59-71, где указанную иммуногенную композицию вводят в виде глазных капель.

73. Способ или применение по любому из пп.59-72, где иммуногенная композиция содержит от 1 до  $10 \log_{10}$  EID<sub>50</sub> на дозу ВИБ.

74. Способ или применение по любому из пп.59-73, где иммуногенная композиция содержит от 2 до  $5 \log_{10}$  EID<sub>50</sub> на дозу ВИБ.

75. Способ или применение по любому из пп.59-74, где иммуногенная композиция содержит от 2 до  $4 \log_{10}$  EID<sub>50</sub> на дозу ВИБ.

76. Способ или применение по любому из пп.59-75, где иммуногенную композицию вводят субъектам в течение первой недели жизни, в течение первых трех дней жизни, в течение первых двух дней жизни или в течение первого дня жизни.

77. Способ или применение по любому из пп.59-76, где иммуногенную композицию вводят субъектам в течение первого дня жизни.

78. Способ или применение по любому из пп.59-77, где указанный способ приводит к улучшению параметра эффективности, выбранного из группы, состоящей из предотвращения или уменьшения цилиостаза, предотвращения или уменьшения хрипов, предотвращения или уменьшения снижения яйценоскости, предотвращения или уменьшения поражения почек, предотвращения или уменьшения водянистой диареи, предотвращения или снижения потери веса, снижения вирусной нагрузки, снижения выделения вируса или их комбинации, по сравнению с субъектом необработанной контрольной группы того же вида.

79. Способ или применение по любому из пп.59-78, где лечение или профилактика приводит к предупреждению или сокращению цилиостаза по сравнению с субъектами необработанной контрольной группы того же вида.

80. Способ или применение по любому из пп.59-79, где лечение или профилактика приводит к предупреждению или сокращению поражений почек по сравнению с субъектами необработанной контрольной группы того же вида.

81. Способ или применение по любому из пп.59-80, где лечение или профилактика приводит к предупреждению или сокращению снижения яйценоскости по сравнению с субъектами необработанной контрольной группы того же вида.

82. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пп.1-54 для терапевтического использования.

83. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пп.1-54 для использования в качестве иммуногена или вакцины.

84. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пп.1-54 для использования в качестве лекарственного средства.

85. Применение ВИБ или иммуногенной композиции по любому из пп.1-54 для изготовления лекарственного средства.

86. Применение ВИБ или иммуногенной композиции по любому из пп.1-54 для лечения и/или профилактики инфекций ВИБ у субъекта.

87. Иммуногенная композиция, содержащая H52 IBV (вирус инфекционного бронхита), кодирующий гетерологичный S (шиповидный) белок или его фрагмент, где указанный ВИБ H52 содержит нуклеокаспидный (N) белок, оболочечный (E) белок или мембранный гликопротеин (M), имеющий или содержащий аминокислотную последовательность, как показано для SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, AY044185 (SEQ ID NO: 80), AF352310 (SEQ ID NO: 81), AF317210 (SEQ ID NO: 82) или AF286185 (SEQ ID NO: 83) или последовательность, имеющую по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99, 99,2, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9, 99,95, 99,98 или 99,99% идентичности с ней, и где гетерологичный S белок или его фрагмент выбирают из перечня генотипов или серотипов, включающих в

себя 4/91, QX, Q1, Арканзас, Вариант 2 и Бразилия или из аминокислотной последовательности, как показано в SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 или последовательность, имеющую по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,2, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9, 99,95, 99,98 или 99,99% идентичности с ней или гетерологичный S белок или его фрагмент состоит из или содержит аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 или последовательность, имеющую по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,2, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9, 99,95, 99,98 или 99,99% идентичности с ней.

88. Иммуногенная композиция по п.87, где гетерологичный S белок представляет собой эктодомен шиповидного белка.

89. Иммуногенная композиция по п.87, где фрагмент гетерологичного S (шиповидного) белка имеет длину по меньшей мере 500, 750, 1000 или 1077 аминокислот от N-конца.

90. Иммуногенная композиция по п.87 или 89, где фрагмент гетерологичного S (шиповидного) белка представляет собой эктодомен шиповидного белка.

91. Иммуногенная композиция по любому из пп.87-90, где ВИБ является аттенуированным.

92. Способ получения иммуногенной композиции для лечения и/или профилактики инфекций ВИБ у субъекта, включающий в себя

а) обеспечение ВИБ Н52, содержащего шиповидный (S) белок, нуклеокапсидный (N) белок, оболочечный (E) белок или мембранный гликопротеин (M), имеющий или состоящий из или содержащий аминокислотную последовательность, как показано для SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, AF352315 (SEQ ID NO: 79), AY044185 (SEQ ID NO: 80), AF352310 (SEQ ID NO: 81), AF317210 (SEQ ID NO: 82) или AF286185 (SEQ ID NO: 83) или последовательность, имеющую по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99, 99,2, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9, 99,95, 99,98 или 99,99% идентичности с ней; и

б) обеспечение гетерологичного S белка или его фрагмента, выбранного из перечня генотипов или серотипов, включающих в себя 4/91, QX, Q1, Арканзас, Вариант 2 и Бразилия или из аминокислотной последовательности, как показано в SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 или последовательность, имеющую по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,2, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9, 99,95, 99,98 или 99,99% идентичности с ней или обеспечение гетерологичного S белка или его фрагмента, состоящего из или содержащего аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 или последовательность, имеющую по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,2, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9, 99,95, 99,98 или 99,99% идентичности с ней; и

в) замену шиповидного белка ВИБ Н52 из а) указанным гетерологичным S (шиповидным) белком или его фрагментом из б), чтобы получить ВИБ Н52 с гетерологичным S белком или его фрагментом; и

г) получение указанного ВИБ Н52 с гетерологичным S белком или его фрагментом; и

д) добавление фармацевтически приемлемого носителя.

93. Способ по п.92, где фрагмент гетерологичного S (шиповидного) белка представляет собой эктодомен шиповидного белка.

94. Способ по п.92 или 93, где указанный фармацевтически приемлемый носитель выбирают из группы, состоящей из растворителей, дисперсионных сред, покрытий, стабилизирующих агентов, разбавителей, консервантов, антибактериальных и противогрибковых агентов, изотонических агентов, средств, замедляющих адсорбцию, адъювантов, иммуностимуляторов и их комбинаций.

95. Способ по любому из пп.92 или 94, где гетерологичный S белок представляет собой эктодомен шиповидного белка.

#### Краткое описание фигур

На фиг. 1 показана кинетика репликации *in ovo* для Н52 гIBV CR88 S экто по сравнению с рекомбинантными вирусами дикого типа Н52 и CR88. Точки данных представляют собой среднее значение 5 образцов на момент времени. Планки погрешностей указывают стандартное отклонение.

На фиг. 2 показаны сводные данные оценки цилиостаза. Подсчитывают сумму 10 индивидуальных оценок для 10 колец одного животного и отображают на графике одной точкой. Максимальный цилиостаз соответствует оценке 40, в то время как отсутствие цилиостаза представлено оценкой 0. Среднее значение и значимость рассчитывают с использованием GraphPad Prism и обычного одностороннего теста ANOVA ( $p < 0,007$ ).

На фиг. 3 показаны сводные данные результатов RT-qPCR тканей почек. Каждая отдельная птица обозначена одной точкой данных.

На фиг. 4 показаны сводные данные результатов RT-qPCR элюатов хоанальных мазков. Каждая отдельная птица обозначена одной точкой данных.

На фиг. 5 показаны сводные данные оценки цилиостаза. Подсчитывают сумму 10 индивидуальных оценок для 10 колец одного животного, которая отображена на графике одной точкой. Максимальный цилиостаз соответствует оценке 40, в то время как отсутствие цилиостаза представлено оценкой 0. Среднее значение и значимость рассчитывают с использованием GraphPad Prism и обычного одностороннего теста ANOVA ( $p < 0,0001$ ).

#### Обзор последовательностей

SEQ ID NO: 1: шиповидный (S) белок ВИБ Н52.

- SEQ ID NO: 2: нуклеокапсидный (N) белок ВИБ Н52.  
 SEQ ID NO: 3: оболочечный (E) белок ВИБ Н52.  
 SEQ ID NO: 4: мембранный (M) гликопротеин белок ВИБ Н52.  
 SEQ ID NO: 5 и 6: гетерологичный S белок или его фрагмент из генотипа или серотипа 4/91.  
 SEQ ID NO: 7 и 8: гетерологичный S белок или его фрагмент из генотипа или серотипа QX.  
 SEQ ID NO: 9 и 10: гетерологичный S белок или его фрагмент из генотипа или серотипа Q1.  
 SEQ ID NO: 11 и 12: гетерологичный S белок или его фрагмент из генотипа или серотипа Арканзас.  
 SEQ ID NO: 13 и 14: гетерологичный S белок или его фрагмент из генотипа или серотипа Вариант 2.  
 SEQ ID NO: 15 и 16: гетерологичный S белок или его фрагмент из генотипа или серотипа Бразилия.  
 SEQ ID NO: 17: последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая шиповидный белок ВИБ CR88.  
 SEQ ID NO: 18: последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая шиповидный эктодомен ВИБ Н52  
 SEQ ID NO: 19: донорская плаزمида pUC57-s Н52 гIBV.  
 SEQ ID NO: 20: последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая шиповидный эктодомен ВИБ CR88.  
 SEQ ID NO: 21: донорская плаزمида pUC57-s Н52 гIBV CR88 S Экто.  
 SEQ ID NO: 22 - SEQ ID NO: 77: праймер.  
 SEQ ID NO: 78: EU817497 (нуклеотидная последовательность ВИБ Н52).  
 SEQ ID NO: 79: AF352315 (аминокислотная последовательность S белка ВИБ Н52).  
 SEQ ID NO: 80: AY044185 (аминокислотная последовательность N белка ВИБ Н52).  
 SEQ ID NO: 81: AF352310 (аминокислотная последовательность N белка ВИБ Н52).  
 SEQ ID NO: 82: AF317210 (аминокислотная последовательность E белка ВИБ Н52).  
 SEQ ID NO: 83: AF286185 (аминокислотная последовательность M белка ВИБ Н52).  
 SEQ ID NO: 84 и SEQ ID NO: 85: праймер.

### Примеры

Нижеследующие примеры представлены для пояснения конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения. Эти примеры являются просто иллюстративными и не считаются ограничивающими объем или основные принципы настоящего изобретения.

Пример 1. Создание рекомбинантного ВИБ Н52, в котором последовательность, кодирующую шиповидный белок Н52 или эктодомен шиповидного белка, заменяют последовательностью, кодирующей гетерологичный шиповидный белок или эктодомен шиповидного белка.

Конструирование донорской плазмиды.

Пример замены эктодомена шиповидного белка Н52 эктодоменом CR88 описан подробно: последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая шиповидный белок ВИБ CR88 (SEQ ID NO: 17) синтезирована коммерческим поставщиком. Ее используют в качестве образца для замены последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей эктодомен шиповидного белка ВИБ Н52 (SEQ ID NO: 18) в донорской плазмиде pUC57-s IBV-5-1b-S-SIR-3T, описанной у van Beurden и соавт. (Virology, 2017, 14(1):109), именуемую в дальнейшем донорской плазмидой pUC57-s Н52 гIBV (SEQ ID NO: 19). Основания 1717-4941 из SEQ ID NO: 19 заменены соответствующей последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей эктодомен шиповидного белка ВИБ CR88 (SEQ ID NO: 20), которая соответствует основаниям 55-3285 из SEQ ID NO 15 соответственно. Это создает донорскую плазмиду pUC57-s Н52 гIBV CR88 S Экто (SEQ ID NO: 21), в которой эктодомен шиповидного белка ВИБ CR88 кодируется основаниями 1717-4947. Для этого донорская плаزمида pUC57-s Н52 гIBV (SEQ ID NO: 19) расщепляется с использованием уникальных сайтов рестрикции 5' (EcoRV) и 3' (PmlI), близких к последовательности, кодирующей шиповидный белок Н52, для линейаризации плазмиды и удаления шиповидного белка Н52 и фланкирующих последовательностей. Набор для гелевой экстракции QIAquick (Qiagen) используют для очистки полосы, соответствующей остову pUC57-s IBV Н52, без последовательности, кодирующей шиповидный белок Н52. Последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая эктодомен шиповидного белка CR88 и фланкирующие последовательности 5' и 3' ВИБ Н52 амплифицируют в трех отдельных реакциях ПЦР с использованием высокоточной ДНК-полимеразы Q5® (NEB; см. праймеры в табл. 1). Продукты ПЦР очищают с помощью гелевой экстракции QIAquick (Qiagen) и используют для сборки по Гибсону с помощью NEBuilder® HiFi DNA Assembly Cloning Kit (NEB) в соответствии с протоколом для набора, чтобы создать донорскую плазмиду pUC57-s Н52 гIBV CR88 S Экто.

Таблица 1

Праймеры для сборки по Гибсону, разработанные NEB с помощью онлайн-инструмента NEBuilder и используемые для создания продуктов ПЦР для сборки донорской плазмиды pUC57-s Н52 гIBV CR88 S Экто

ПЦР	Продукт	Праймер
1	Н52 5' фланкирующий участок	cagagcacacaagtttgatctgtgatctgatctgatacagacaatgattc (SEQ ID NO:22) tatcatagagcaaagcactacatagtcacac (SEQ ID NO:23)

2	Эктодомен шиповидного белка CR88	actatgtagtgctttgctctatgataataataacttacg (SEQ ID NO:24)
		cataccaaggccatttaataataagttttgagaattgagag (SEQ ID NO:25)
3	H52 3' фланкирующий участок	aacttataattaaatggccttggtatgtgtgg (SEQ ID NO:26)
		cttaactcctggaattactaaccacgtgtaccaaaataaacaacaagc (SEQ ID NO:27)

Нацеленная рекомбинация РНК и спасение рекомбинантного ВИБ Для создания рекомбинантного ВИБ применяют способ нацеленной рекомбинации РНК, как описано у van Beurden и соавт. (Virol J., 2017, 14(1): 109). Вкратце, мураинизированный (м)ВИБ H52 получают, как описано. Для создания H52 rIBV CR88 S Экто, клетки LR7 инфицируют посредством мВИБ H52 и подвергают электропорации транскриптом *in vitro*, полученным из донорской плазмиды pUC57-s H52 rIBV CR88 S Экто и затем впрыскивали в 8-дневные куриные яйца SPF с эмбрионами SPF (VALO BioMedia). После 9 дней инкубации при 37,5°C и влажности 60% аллантаиновые жидкости всех яиц анализируют отдельно для спасения рекомбинантного ВИБ после выделения РНК с помощью мини-набора для вирусной РНК e QIAamp (Qiagen) и с помощью Superscript™ III One-Step ОТ-ПЦР System с Platinum™ Taq DNA Polymerase (ThermoFisher). Используют праймеры PO1323 и PO1729, связывающие в H52 IBV lab и CR88 IBV S эктодомен (табл. 2), специфичные для рекомбинантного ВИБ, но не для мВИБ. Положительную аллантаиновую жидкость яйца, инокулированного клетками LR7 с максимальным разведением, отбирают для двух серий конечного разведения в 8-дневных яйцах SPF. Выделение нуклеиновых кислот в образцах предельного разведения проводят с использованием набора для очистки ядра нуклеиновых кислот MagMAX™ (ThermoFisher) с системой очистки KingFisher™ Duo Prime (ThermoFisher), а затем анализируют на присутствие рВИБ с помощью ОТ-ПЦР, описанной выше. После второго предельного разведения аллантаиновую жидкость яиц, инокулированных с максимальным разведением, используют для размножения в 10-дневных куриных яйцах с SPF с эмбрионами. Аллантаиновую жидкость разбавляют 1:1000 в 1×PBS и впрыскивают 100 мкл на яйцо. Аллантаиновую жидкость собирают через 48 ч после инокуляции, очищают от дебриса и хранят при -80°C. Для подтверждения последовательности, полученной из донорской плазмиды в созданном рВИБ, вирусные нуклеиновые кислоты выделяют с помощью мини-набора для вирусной РНК QIAamp с последующей одностадийной ОТ-ПЦР Superscript III, с использованием праймеров, перечисленных в табл. 3, очисткой ПЦР QIAquick и последующим секвенированием по Сэнгеру с теми же праймерами, выполненным коммерческим поставщиком.

Таблица 2

## Праймеры для идентификации рекомбинантного ВИБ после спасения

Название	Последовательность	Область	Ампликон [п.о.]
PO1323	TCAGCATGGACGTGTGGTTA (SEQ ID NO:28)	lab	~970
PO1729	aggttgccacctatatatgggg (SEQ ID NO:29)	Шиповидный белок	

Таблица 3

## Праймеры для секвенирования, чтобы подтвердить последовательность донорской области в H52 rIBV CR88 S Экто

ПЦР	Название	Последовательность	Область	Ампликон [п.о.]
1	PO765	tgacttggtttgaagatggc (SEQ ID NO:30)	Pol lab	904
	PO730	aagagatggttgtaacacct (SEQ ID NO:31)	Pol lab	
2	PO706	gacagagcacaagtttgatc (SEQ ID NO:32)	Pol lab	1044
	PO1409	ggagtgaaaacaagatcacc (SEQ ID NO:33)	S	
3	PO1398	aatttaacagttagcgtatc (SEQ ID NO:34)	S	801
	PO1410	tttgatatacagagccatca (SEQ ID NO:35)	S	
4	PO1399	ggtcctactagatgtaagg (SEQ ID NO:36)	S	809
	PO1411	ctctctttgacctacacct (SEQ ID NO:37)	S	
5	PO1400	ttgccttcagtatgtttgtg (SEQ ID NO:38)	S	803
	PO1412	agtgaagaaagtctacctgt (SEQ ID NO:39)	S	
6	PO1401	atttctcctcgtacttcaaga (SEQ ID NO:40)	S	786
	PO1413	tgaagataataatggcaaaagc (SEQ ID NO:41)	S	
7	PO1402	tcttgaaacactctcaattct (SEQ ID NO:42)	S	1471
	PO715	ggtcaccagtataatttctgc (SEQ ID NO:43)	M	
8	PO710	ggtcaacaatgtaattttgct (SEQ ID NO:44)	5ab	958
	PO734	cttgcctgctttgttaaga (SEQ ID NO:45)	5ab	
9	PO1405	ttataggttgctgtacgc (SEQ ID NO:46)	5ab	1025
	PO716	gcccatccttaataccttcc (SEQ ID NO:47)	N	
10	PO759	ctcgcattacaaaggctaag (SEQ ID NO:48)	N	1123
	PO719	gctctaactctatactagcct (SEQ ID NO:49)	3'-UTR	

Создание и характеристика рекомбинантного ВИБ H52, в котором последовательность, кодирующая шиповидный белок или эктодомен шиповидного белка H52 заменена последовательностью, кодирующей

рующей шиповидный белок или эктодомен шиповидного белка из другого генотипа ВИБ.

Те же способы, что описаны для создания H52 rIBV CR88 S Экто, применяют для создания и характеристики рекомбинантного ВИБ H52, в котором последовательность, кодирующая шиповидный белок (основания с 1663 по 5151 в SEQ ID NO: 19) или эктодомен шиповидного белка H52 (основания с 1717 по 4941 SEQ ID NO: 19) заменена последовательностями, кодирующими шиповидные белки или эктодомены шиповидных белков ВИБ серотипов и генотипов, перечисленных в табл. 4.

Таблица 4

Праймеры, используемые для сборки по Гибсону донорских плазмид  
pВИБ H52 с гетерологичным шиповидным белком или эктодоменом шиповидного белка

Шиповидный белок	ПЦР	Продукт	Праймер
CR88 S SEQ ID NO:5	1	H52 5' фланкирующий участок	cagagcacaagtttgatcttgtgatatctgatattgtatacagacaatgattc (SEQ ID NO:22)
			gtttgtccaacatctcttaccagtaacttacc (SEQ ID NO:50)
	2	CR88 S	ttactggtaagagatggtggacaaccgcttttac (SEQ ID NO:51) ggactttggatcattaaacagacttttttaggtctgtattg (SEQ ID NO:52)
QX S SEQ ID NO:7	1	H52 5' фланкирующий участок	aaagtctgttttaaatgatccaaagtcccactag (SEQ ID NO:53)
			cttaactcctggaattactaaccacgtgtacaaaataaacaacaagc (SEQ ID NO:27)
	2	QX S	cagagcacaagtttgatcttgtgatatctgatattgtatacagacaatgattc (SEQ ID NO:22) acttcaccaacatctcttaccagtaacttacc (SEQ ID NO:54) ttactggtaagagatggtggtaagtcactg (SEQ ID NO:55) ggactttggatcattaaacagacttttttaggtctg (SEQ ID NO:52)
QX S Экто SEQ ID NO:8	1	H52 5' фланкирующий участок	aaagtctgttttaaatgatccaaagtcccactag (SEQ ID NO:53)
			cttaactcctggaattactaaccacgtgtacaaaataaacaacaagc (SEQ ID NO:27)
	2	QX S Экто	aatcaaaacaaattagcactacatagtgacac (SEQ ID NO:56) actatgtagtgtctaatttgtttgattcttgataataattatg (SEQ ID NO:57) cataccaaggccacttaataataagttttaattattgaaagtctctc (SEQ ID NO:58)
Q1 S SEQ ID NO:9	1	H52 5' фланкирующий участок	aaagtctgttttaaatgatccaaagtcccactag (SEQ ID NO:53)
			cttaactcctggaattactaaccacgtgtacaaaataaacaacaagc (SEQ ID NO:27)
	2	Q1 S	aacttatattaagtggccttggtatgtgtgg (SEQ ID NO:59) cttaactcctggaattactaaccacgtgtacaaaataaacaacaagc (SEQ ID NO:27)
Q1 S Экто SEQ ID NO:10	1	H52 5' фланкирующий участок	cagagcacaagtttgatcttgtgatatctgatattgtatacagacaatg (SEQ ID NO:60)
			acttcccccaacatctcttaccagtaacttacc (SEQ ID NO:61)
	2	Q1 S Экто	ttactggtaagagatggtgggaagtcactg (SEQ ID NO:62) ggactttggatcattaaacagacttttttaggtctg (SEQ ID NO:52) aaagtctgttttaaatgatccaaagtcccactag (SEQ ID NO:53)
Ark S SEQ ID NO 11	1	H52 5' фланкирующий участок	cttaactcctggaattactaaccacgtgtacaaaataaacaacaagc (SEQ ID NO:63)
			gacttatattaagtggccttggtatgtgtgg (SEQ ID NO:67)
	2	Ark S	cagagcacaagtttgatcttgtgatatctgatattgtatacagacaatg (SEQ ID NO:60) tatcaaaacaaagcagcactacatagtgacac (SEQ ID NO:64) actatgtagtgtctgcttggataataatgaaac (SEQ ID NO:65) cataccaaggccatttaataataagtccttgagtattgaaag (SEQ ID NO:66)
Ark S Экто SEQ ID NO 12	1	H52 5' фланкирующий участок	gacttatattaagtggccttggtatgtgtgg (SEQ ID NO:67)
			cttaactcctggaattactaaccacgtgtacaaaataaacaacaagc (SEQ ID NO:27)
	2	Ark S Экто	cttaactcctggaattactaaccacgtgtacaaaataaacaacaagc (SEQ ID NO:27) gtctgttttaaatgatccaaagtcccactag (SEQ ID NO:85) cttaactcctggaattactaaccacgtgtacaaaataaacaacaagc (SEQ ID NO:63) cagagcacaagtttgatcttgtgatatctgatattgtatacagacaatgattc (SEQ ID NO:22) tgtcatataaattagcactacatagtgacac (SEQ ID NO:68) actatgtagtgtctaatttatatgacaacgaatcttttg (SEQ ID NO:69) cataccaaggccacttaataataagttttgagtattgaaag (SEQ ID NO:69)

			NO:70)
	3	H52 3' фланкирующий участок	aacttatattaagtgcccttggtatgtgtgg (SEQ ID NO:59) cttaactcctggaattactaaccacggtgtaccaaaataaacaacaagc (SEQ ID NO:27)
Вариант 2 S SEQ ID NO 13	1	H52 5' фланкирующий участок	cagagcacaagtttgatcttgtgatctgatatgtatacagacaatg (SEQ ID NO:60) acttcaccaacatctcttaccagtaacttacc (SEQ ID NO:54)
	2	Вариант 2 S	ttactggtaagagatgttgggtgaagtcactg (SEQ ID NO:55) ggactttggatcattaacagacttttttaggtctg (SEQ ID NO:52)
	3	H52 3' фланкирующий участок	aaagtctgtttaatgatccaaagtcccactag (SEQ ID NO:53) cttaactcctggaattactaaccacggtgtaccaaaataaacaacaag (SEQ ID NO:63)
Вариант 2 S Экто SEQ ID NO 14	1	H52 5' фланкирующий участок	cagagcacaagtttgatcttgtgatctgatatgtatacagacaatgattc (SEQ ID NO:22) tatcaaacagagcagcactacatagtgcacac (SEQ ID NO:71)
	2	Вариант S Экто	actatgtagtgtctgctctgtttgataataatcag (SEQ ID NO:72) cataccaaggccacttaataataagttttaattattgaaagtctctc (SEQ ID NO:58)
	3	H52 3' фланкирующий участок	aacttatattaagtgcccttggtatgtgtgg (SEQ ID NO:59) cttaactcctggaattactaaccacggtgtaccaaaataaacaacaagc (SEQ ID NO:27)
Бразилия S SEQ ID NO 15	1	H52 5' фланкирующий участок	cagagcacaagtttgatcttgtgatctgatatgtatacagacaatg (SEQ ID NO:60) gttgaaccaacatctcttaccagtaacttacc (SEQ ID NO:73)
	2	BR-1 S	ttactggtaagagatgttgggtcaacctcttttac (SEQ ID NO:74) ggactttggatcattaacagacttttttaggtctg (SEQ ID NO:52)
	3	H52 3' фланкирующий участок	aaagtctgtttaatgatccaaagtcccactag (SEQ ID NO:53) cttaactcctggaattactaaccacggtgtaccaaaataaacaacaag (SEQ ID NO:63)
Бразилия S Экто SEQ ID NO 16	1	H52 5' фланкирующий участок	cagagcacaagtttgatcttgtgatctgatatgtatacagacaatgattc (SEQ ID NO:22) tattgtacaaagaagcactacatagtgcacac (SEQ ID NO:75)
	2	BR-1 S Экто	actatgtagtgtcttcttgtacaataatgatagctatg (SEQ ID NO:76) cataccaaggccatttaataataagtttttaaaatagaaagtgtttc (SEQ ID NO:77)
	3	H52 3' фланкирующий участок	aacttatattaatggccttggtatgtgtgg (SEQ ID NO:26) cttaactcctggaattactaaccacggtgtaccaaaataaacaacaagc (SEQ ID NO:27)

Праймеры в табл. 2 и 3 используют для идентификации и секвенирования различных рекомбинантных вирусов и при необходимости адаптируют к соответствующей последовательности шиповидного белка.

#### Пример 2. Кинетика репликации IN OVO.

Восемь восьмидневных куриных яиц с эмбрионами инокулируют посредством  $10^2$  EID<sub>50</sub> рВИБ и соответствующих контролей. Яйца инкубируют при 37,5°C, влажности 60% и ежедневно просвечивают через 0, 8, 24, 34, 48 и 72 ч после инокуляции и регистрируют гибель эмбрионов. Пять заранее отобранных яиц на образец и в определенный момент времени вынимают и переносят при 4°C в течение по меньшей мере 2 ч. Впоследствии аллантоисную жидкость собирают и хранят при -80°C. Для анализа образцы размораживают и разбавляют 1:10 в 1×PBS без Ca и Mg, а нуклеиновые кислоты экстрагируют с помощью набора QIAamp DNA Blood Mini (Qiagen) с добавлением носителя РНК, используя робот-пипетку Hamilton Starlet. Экстрагированные нуклеиновые кислоты анализируют с помощью RT-qPCR на относительное количество РНК ВИБ с протоколом, адаптированным из Callison и соавт. (J. Virol. Methods., 2006, 138(1-2):60-5). Вкратце, используют те же праймеры и зонд, а термопрофайл адаптирован для использования TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix (ThermoFisher) и системы ПЦР ABITM 7900HT Fast Real-Time (Thermo Fisher Scientific). Все образцы нуклеиновых кислот анализируют в трех экземплярах с использованием серии 10-кратных разведений ВИБ H52 в качестве сравнения.

Для H52 rIBV CR88 S Экто по сравнению с рекомбинантными вирусами дикого типа H52 и CR88 в ранние моменты времени в ранние моменты времени наблюдают немного схожую кинетику репликации. Однако через 32 ч все вирусы достигают сопоставимых контрольных значений. Все эмбрионы живы через 32 ч после инокуляции, в то время как через 48 ч после заражения все оставшиеся эмбрионы мертвы для всех образцов. Следовательно, репликация H52 rIBV CR88 S экто считается столь же эффективной по сравнению с вирусами дикого типа (см. фиг. 1).

#### Пример 3. Приготовление вакцины и вируса для заражения.

Чтобы продемонстрировать эффективность рВИБ H52 с гетерологичным шиповидным белком или эктодоменом шиповидного белка у цыплят, аликвоту исходного вируса размораживают и разводят 10-кратно в 1×PBS, чтобы определить 50% инфекционную дозу эмбриона (EID<sub>50</sub>) путем инокуляции 100 мкл на пять 8-дневных куриных яиц с эмбрионами на разведение. Яйца инкубируют при 37,5°C,

влажности 60% до 7 дней после инокуляции. Яйца с мертвыми эмбрионами через 24 ч исключают из эксперимента. Все остальные яйца с мертвыми эмбрионами через 7 дней после инокуляции считают положительными. Все яйца с живыми эмбрионами просвечивают снизу через 7 дней после инокуляции для выявления карликов, которых считают положительными. EID<sub>50</sub>/мл рассчитывают по формуле Рида и Мюнча (Am. J. Epidemiol., 1938, 27(3):493-497). Для вакцинации исходный вирусный материал разводят в 1×PBS для получения титра 10<sup>4.3</sup> EID<sub>50</sub>/мл (10<sup>3</sup> EID<sub>50</sub> на цыпленка в 50 мкл).

Вирусы для контрольного заражения генотипов и серотипов 793В, QX, Q1, Ark, Вариант 2 и Бразилия размножаются в яйцах SPF с 10-дневными эмбрионами. Через 24 ч после инокуляции яйца переводят при 4°C по меньшей мере на 2 ч. Аллантоисную жидкость собирают, разделяют на аликвоты и хранят при -80°C. Титр вируса определяют, как описано выше. Титр устанавливают от 10<sup>4.3</sup> до 10<sup>5.3</sup> EID<sub>50</sub>/мл путем разбавления с 1×PBS (от 10 до 10<sup>4</sup> EID<sub>50</sub> на цыпленка в 50 мкл).

Пример 4. Определение эффективности вакцины.

Оплодотворенные яйца SPF инкубируют в течение 18 дней в инкубационном шкафу при температуре 99,7°F и влажности 50% с частотой 1 оборот в час. На 18 день инкубации яйца просвечивают, оплодотворенные яйца переносят в выводной шкаф и инкубируют при 99°F и влажности 70% до вылупления. Цыплят без клинических признаков или деформации случайным образом распределяют по соответствующим группам лечения и переводят в отдельные изоляторы. По меньшей мере два цыпленка служат в качестве группы строгого отрицательного контроля (SNC), пять цыплят включены в группу контрольного заражения (CC) и по меньшей мере 10 цыплят включены в группы, которые вакцинированы рекомбинантным ВИБ с гетерологичным шиповидным белком или эктодоменом шиповидного белка и впоследствии заражены. Животных содержат в условиях содержания в соответствии с местными и национальными требованиями по защите животных. Световой режим настроен на 16 ч света в сутки. Корм и вода предоставляются без ограничений. После переноса в изолятор цыплят (суточного возраста) вакцинируют посредством 10<sup>3</sup> EID<sub>50</sub> на цыпленка путем капель в глаза (общий объем 50 мкл, 25 мкл в глаз, в то время как группы SNC и CC остаются необработанными. Через 21 день после вакцинации цыплят из CC и вакцинированных групп заражают посредством от 10<sup>3</sup> до 10<sup>4</sup> EID<sub>50</sub> на цыпленка соответствующего штамма заражения с гомологичным шиповидным белком (793В, QX, Q1, Ark, Вариант 2 или Бразилия) путем глазных капель (общий объем 50 мкл, 25 мкл в глаз). Через 7 дней после заражения всех цыплят умерщвляют, берут мазки из хоан, удаляют почки и хранят в стабилизирующем растворе RNAlater (ThermoFisher) при 4°C для ВИБ-специфичного анализа RT-qPCR. Кроме того, удаляют трахеи и переносят в пробирки объемом 50 мл с теплой средой для культивирования клеток. После этого трахеи очищают от соединительных тканей и промывают средой для культивирования клеток. Трахеи разрезают на трахеальные кольца, используя измельчитель ткани McIlwain, установленный на толщину среза 0,6-0,8 мм. На трахею три кольца в верхней части, четыре кольца в средней части и три кольца в нижней части анализируют на биение ресничек с помощью световой микроскопии и оценивают цилиостаза (см. табл. 5). Кольцо считается нормальным, если более 50% внутреннего кольца демонстрируют сильное движение ресничек (оценка 2 и ниже). Кольцо считается положительным для цилиостаза, если бьются менее 50% ресничек (оценка 3 и 4). Для ВИБ-специфичного анализа RT-qPCR кусочки ткани почек нагревают до комнатной температуры и переносят в отдельные пробирки Precellys 2 мл, которые заполнены средой и PBS, соответственно. Почки гомогенизируют с помощью гомогенизатора тканей Precellys® (Bertin Instruments) в течение 1×20 с при 6800 об/мин. Хоанальные мазки элюируют в 2 мл 1×PBS. Нуклеиновые кислоты выделяют из 200 мкл элюата и гомогената ткани соответственно с использованием набора для очистки ядра нуклеиновой кислоты MagMAX™ (ThermoFisher) и системы очистки KingFisher™ Duo Prime (ThermoFisher). RT-qPCR осуществляют как описано выше для кинетики in ovo, за исключением использования системы ПЦР в реальном времени StepOnePlus™ (ThermoFisher) для анализа в дубликатах.

Таблица 5

Оценка цилиостаза в трахеальных кольцах

Активность ресничек [%]	Оценка цилиостаза
100	0
< 100 - 75	1
< 75 - 50	2
< 50 - 25	3
< 25 - 0	4

Пример 5. Эффективность рекомбинантного ВИБ H52, кодирующего гетерологичный шиповидный белок или эктодомен шиповидного белка.

Целью исследований является демонстрация того, что вакцинация рекомбинантным ВИБ H52 (генотип Mass), кодирующим гетерологичный шиповидный белок или его фрагмент, спо-

собна обеспечить защиту от заражения штаммом с гомологичным шиповидным белком.

Проводят анализ на предмет того, может ли рекомбинантный ВИБ Н52, кодирующий эктодомен шиповидного белка ВИБ CR88 (генотип 4/9), обеспечивать защиту от заражения вирулентным штаммом 793В (генотип 4/91), который рассматривают как гомологичное заражение для кодируемого эктодомена шиповидного белка ВИБ CR88 и как гетерологичное заражение, учитывая остов ВИБ Н52. Всех цыплят ежедневно обследуют на предмет выявления клинических признаков. После вакцинации или заражения никаких клинических признаков не регистрируют. Обратное титрование для вакцинации посредством Н52 гIBV CR88 S Экто в возрасте 1 дня определяет титр  $10^{4.13}$  EID<sub>50</sub>/мл (цель  $10^{4.3}$  EID<sub>50</sub>/мл) и  $10^{4.69}$  EID<sub>50</sub>/мл (цель  $10^{4.3}$  EID<sub>50</sub>/мл) для вируса контрольного заражения 793В, примененного через 21 день после вакцинации, соответственно. Цилиостаз оценивают, как описано выше, и результаты показаны на фиг. 2 и обобщены в табл. 6.

Таблица 6

Сводные данные оценки цилиостаза для защиты через 28 дней после вакцинации и через 7 дней после заражения

Группа	Вакцина	Заражение	Средняя оценка цилиостаза	Не повреждено [%]
1	-	-	0.83	100
2	-	793В	32.9	20
3	Н52 гIBV CR88 S Экто	793В	10.64	82

Среднюю оценку цилиостаза для каждой группы рассчитывают путем сложения суммы оценок отдельных цыплят на группу и деления суммы группы на количество животных (наивысшая возможная оценка 40, наименьшая возможная оценка 0). Животное считается здоровым, если не менее 9 из 10 колец показывают нормальную активность ресничек.

Все животные из группы строгого отрицательного контроля демонстрируют нормальные движения ресничек, в то время как все животные из контрольной группы с заражением имеют положительный эффект цилиостаза. Напротив, 82% животных, вакцинированных посредством Н52 гIBV CR88 S Экто, защищены. Кроме того, вирусная нагрузка в почках животных, вакцинированных посредством Н52 CR88 S Экто, снижена по сравнению с животными из группы контрольного заражения (фиг. 3 и 4).

Кроме того, анализируют, может ли рекомбинантный ВИБ Н52, кодирующий шиповидный белок ВИБ QX, обеспечивать защиту от заражения вирулентным штаммом D388 QX, который рассматривают как гомологичное заражение для кодируемого шиповидного белка ВИБ QX и как гетерологичное заражение, учитывая остов ВИБ Н52. Всех цыплят ежедневно обследуют на предмет выявления клинических признаков. После вакцинации или заражения никаких клинических признаков не регистрируют. Обратное титрование для вакцинации посредством Н52 гIBV QX S в возрасте 1 дня определяет титр  $10$  EID<sub>50</sub>/мл, в то время как вакцины QX превышают титр  $10^5$  EID<sub>50</sub>/мл (цель  $10$  EID<sub>50</sub>/мл). Титр  $10^{4.83}$  EID<sub>50</sub>/мл (цель  $10^{4.3}$  EID<sub>50</sub>/мл) определяют для вируса контрольного заражения D388 QX, примененного через 21 день после вакцинации, соответственно. Цилиостаз оценивают, как описано выше, и результаты показаны на фиг. 5 и обобщены в табл. 7.

Таблица 7

Сводные данные оценки цилиостаза для защиты через 28 дней после вакцинации и через 7 дней после заражения

Группа	Вакцина	Заражение	Средняя оценка цилиостаза	Не повреждено [%]
1	-	-	0	100
2	-	D388 QX	38.4	0
3	Вакцина QX	D388 QX	3.5	100
3	Н52 гIBV QX S	D388 QX	5.9	100

Среднюю оценку цилиостаза для каждой группы рассчитывают путем сложения суммы оценок отдельных цыплят на группу и деления суммы группы на количество животных (наивысшая возможная оценка 40, наименьшая возможная оценка 0). Животное считается здоровым, если не менее 9 из 10 колец показывают нормальную активность ресничек.

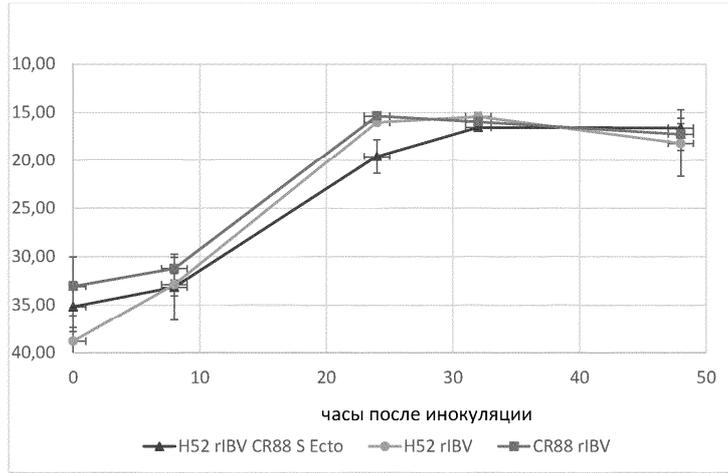
Все животные из группы строгого отрицательного контроля демонстрируют нормальное движение ресничек, в то время как все животные из контрольной группы с заражением являются положительными по цилиостазу. Напротив, 100% животных, вакцинированных Н52 гIBV QX S или вакциной QX защищены.

Аналогичные результаты получены с другими рВИБ Н52 с гетерологичными шиповидными белками или эктодоменами шиповидных белков.

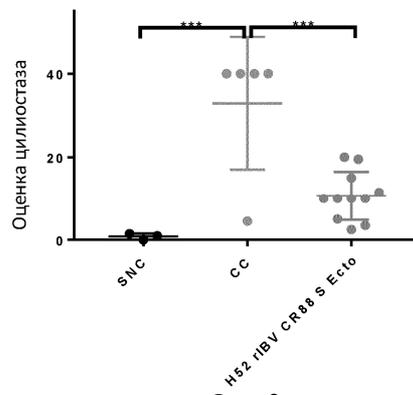
Результаты подчеркивают пригодность штаммов ВИБ 4/91 в качестве сильного остова для создания рекомбинантного ВИБ с гетерологичным шиповидным белком и показывают отличные результаты, в частности, по сравнению с данными предшествующего уровня техники для остова ВИБ Beaudette.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

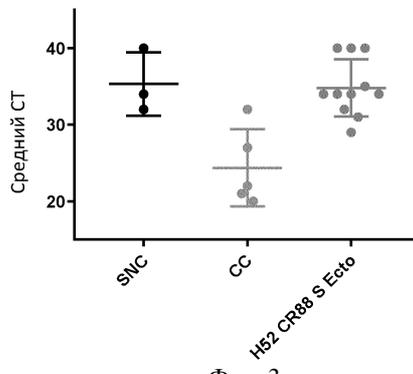
1. Генно-инженерный H52 вирус инфекционного бронхита (ВИБ), кодирующий гетерологичный S (шиповидный) белок ВИБ, по меньшей мере на 90% идентичный последовательностям SEQ ID NO: 5-16.
2. Иммуногенная композиция, содержащая генно-инженерный H52 ВИБ, кодирующий гетерологичный S (шиповидный) белок, по меньшей мере на 90% идентичный последовательностям SEQ ID NO: 5-16.
3. Иммуногенная композиция, содержащая генно-инженерный H52 ВИБ по п. 1.
4. Генно-инженерный H52 ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пп.1-3, где гетерологичный S белок принадлежит к ВИБ с генотипом или серотипом, выбранным из списка, состоящего из Арканзас (такой как Арканзас 99), Бразилия (такой как BR-1, BR-2, 23/2013, IBV/Бразилия/351/1984), Калифорния (такой как Калифорния 1734/04, Калифорния 99), Коннектикут, Делавэр (такой как Делавэр 98), Нидерландский (такой как D207, D212, D274, D3128, D3896, D8880, D1466), Флорида, Джорджия (такой как Джорджия GA-07, GA-08, GA-12, GA-13), Грей, Холт, Айова (такой как Айова 97 и Айова 69), Италия (такой как Италия 02), JMK, LDT3, Мэн (такой как Мэн 209), Пенсильвания (такой как Пенсильвания 1220/98, Пенсильвания Wolg/98), PL84084, Qu (такой как Qu-mv), QX (такой как GB341/96), Q1, SE 17, Вариант 2 (такой как IS/1494/06, IBV/Ck/EG/CU/4/2014, гаммаCoV/Ck/Польша/G052/2016) и 4/91 (793B, CR88).
5. Генно-инженерный H52 ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пп.1-4, где гетерологичный S белок происходит из ВИБ, выбранного из перечня генотипов или серотипов, включающих в себя 4/91, QX, Q1, Арканзас, Вариант 2 и Бразилия.
6. Генно-инженерный H52 ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пп.1-5, где гетерологичный S белок выбирают из перечня генотипов или серотипов, включающих в себя 4/91, QX, Q1, Арканзас, Вариант 2 и Бразилия или состоит из или содержит аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16, или последовательность, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,2, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9, 99,95, 99,98 или 99,99% идентичную с ней.
7. Генно-инженерный H52 ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пп.1-6, где гетерологичный S белок представляет собой полноразмерный шиповидный белок.
8. Генно-инженерный H52 ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пп.1-7, где H52 ВИБ является аттенуированным или H52 ВИБ является рекомбинантным ВИБ.
9. Иммуногенная композиция по любому из пп.2-8, где иммуногенная композиция представляет собой вакцину.
10. Набор для лечения или профилактики инфекционного бронхита, содержащий H52 ВИБ или иммуногенную композицию по любому из пп.1-9.
11. Способ иммунизации субъекта, включающий в себя введение такому субъекту иммуногенной композиции по любому из пп.2-9.
12. Способ лечения или предотвращения клинических признаков, вызванных ВИБ у нуждающегося в этом субъекта, включающий в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции по любому из пп.2-9.
13. Способ уменьшения цилиостаза у нуждающегося в этом субъекта по сравнению с субъектом неиммунизированной контрольной группы того же вида, который включает в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции по любому из пп.2-9.
14. Способ по любому из пп.11-13, где указанный субъект представляет собой домашнюю птицу.
15. Способ по любому из пп.11-14, где указанный способ приводит к улучшению параметра эффективности, выбранного из группы, состоящей из предотвращения или уменьшения цилиостаза, предотвращения или уменьшения хрипов, предотвращения или уменьшения снижения яйценоскости, предотвращения или уменьшения поражения почек, предотвращения или уменьшения водянистой диареи, предотвращения или снижения потери веса, снижения вирусной нагрузки, снижения выделения вируса или их комбинации, по сравнению с субъектом необработанной контрольной группы того же вида.



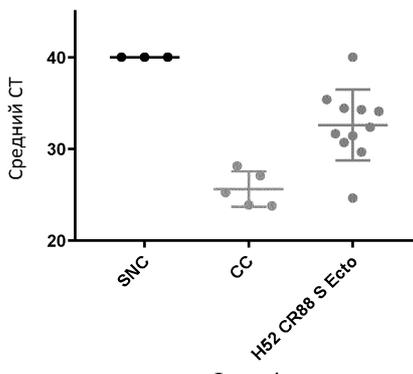
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4

