

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **201991762** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2020.01.23

(51) Int. Cl. *A61K 39/12* (2006.01)  
*A61K 39/00* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2018.01.26

(54) **ВАКЦИНЫ ПРОТИВ КОРОНАВИРУСА СВИНЕЙ**

(31) 62/452,026

(32) 2017.01.30

(33) US

(86) PCT/US2018/015507

(87) WO 2018/140766 2018.08.02

(88) 2018.08.23

(71) Заявитель:

**БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ  
ЭНИМАЛ ХЕЛС Ю-ЭС-ЭЙ ИНК.  
(US)**

(72) Изобретатель:

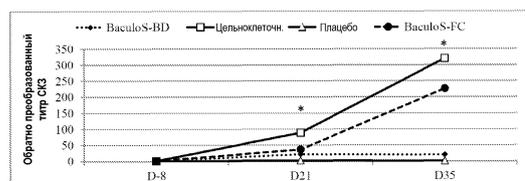
**Экермен Скотт, Херманн Джозеф  
Ральф, Эрнандес Луис Алехандро,  
Хоббс Лиа Энн, Ийер Арун В.,  
О'Коннер Шон, Паттерсон Эбби Рэй,  
Вон Эрик Мартин, Виктория Джозеф  
Гилберт (US)**

(74) Представитель:

**Веселицкая И.А., 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)**

(57) Настоящее изобретение относится к вакцине для защиты свиньи от заболеваний, связанных с инфицированием коронавирусом, включая вирус эпидемической диареи свиней (PEDV) и/или дельта-коронавирус свиней (PDCoV). Вакцина в общем случае включает инактивированный/убитый PEDV (например, химически инактивированный вирус PED), и/или рекомбинантный антиген PEDV, и/или адъювантный инактивированный/убитый PDCoV (например, химически инактивированный вирус PDCoV), и/или рекомбинантный антиген PDCoV и адъювант. Также обеспечиваются способы защиты свиней от заболеваний, ассоциированных с PEDV и/или PDCoV, и способы получения вакцины против вируса эпидемической диареи свиней и/или дельта-коронавируса свиней.

Серологическая реакция после вакцинации, как определено с помощью ИФА



\*Указывает, что значение достоверно отличается от группы плацебо (метод Дуннетта)

**A1**

**201991762**

**201991762**

**A1**

## ВАКЦИНЫ ПРОТИВ КОРОНАВИРУСА СВИНЕЙ

### 5 СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Данная заявка содержит список последовательностей в соответствии с 37 C.F.R. 1.821 – 1.825. Содержание текстового файла ASCII списка последовательностей под названием 10-0176-WO-SEQ, который имеет размер 480 кбит, был создан 23 января 2017 г. и в электронном виде был подан через 10 EFS-Web, таким образом, включен полностью в заявку в качестве ссылки.

### ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

#### **Область техники, к которой относится изобретение:**

Настоящее изобретение относится к иммуногенным композициям, которые защищают свиней от заболевания, вызываемого вакциноспецифическим вирусом 15 эпидемической диареи свиней (PEDV) и дельтакоронавирусом свиней (PDCoV), и комбинированным вакцинам, обеспечивающим оба PEDV и PDCoV антигена. По причине высокой смертности (вплоть до 100%) у поросят в возрасте меньше 10 дней, преимущественно кишечные заболевания, часто присутствующие вместе, представляют основной экономический интерес для промышленного 20 свиноводства в США.

#### **Описание предшествующего уровня техники:**

Вирус эпидемической диареи свиней представляет собой вирус с положительно полярной одноцепочечной РНК, который имеет оболочку. Он вызывает острую диарею, рвоту и обезвоживание у свиней. Впервые этот вирус 25 был выявлен в Европе, но создает большое количество проблем во многих азиатских странах, в том числе Корее, Китае, Японии, на Филиппинах и в Таиланде. В апреле 2013 года PEDV появился у свиней в США на Среднем Западе и стремительно распространился по всей стране. К октябрю 2013 года PEDV был обнаружен в стаде свиней в 18 государствах. Экономические 30 последствия от инфекции PEDV уже являются существенными. Были идентифицированы североамериканские изоляты PEDV (Huang, 2013 и др.; Stevenson и др., 2013), однако ни одна полностью лицензированная вакцина не является коммерчески доступной в Соединенных Штатах. Соответственно, существует постоянная потребность в разработке вакцин, способных защитить

свиней от болезней, ассоциированных с PEDV. Было бы полезно разработать вакцину, которая является эффективной против североамериканских штаммов PEDV, которая может вводиться через слизистые оболочки (перорально или интраназально), а также с помощью парентеральных способов (например, внутримышечно, подкожно или внутривенно).

PEDV представляет собой члена подсемейства *Coronavirinae* рода *Alphacoronavirus* (Bridgen и др. 1993), он был первоначально идентифицирован в Англии в 1971 и позднее в других странах, таких, как Бельгия, Китай, Венгрия, Италия, Япония, Корея и Таиланд (Oldham J. 1972; Pensaert и De Bouck P. 1978; Chen и др. 2008; Nagy и др. 1996; Martelli и др. 2008; Takahashi и др. 1983; Chae и др. 2000; и Puranaveja и др. 2009). Другие члены семейства включают респираторный вирус свиней (PRCV), гемагглютинирующий коронавирус энцефаломиелита (PHE) и вирус трансмиссивного гастроэнтерита (TGEV). Несмотря на то, что вирусы PEDV и TGEV являются родственными и их клинические симптомы подобны, для них не существует перекрестной иммунной защиты.

PEDV представляет собой вирус с оболочкой, который содержит геном на основе положительно полярной одноцепочечной РНК размером 28 кб с 5' кэпом и 3' полиаденилированным хвостом (Pensaert и De Bouck P. 1978). Геном включает 5' нетранслируемый участок (UTR), 3' UTR и, по крайней мере, семь открытых рамок считывания (ORF), которые кодируют четыре структурных белка (шиловидный отросток (S), оболочка (E), мембрана (M) и нуклеокапсид (N)) и три неструктурных белка (репликазы 1a и 1b и ORF3); таковые располагаются в геноме в следующем порядке 5' - репликаза (1a/1b)-S-ORF3-E-M-N - 3' (Oldham J. 1972; Bridgen и др. 1993). Первые три охарактеризованные геномные последовательности появившихся PEDV, Minnesota MN (GenBank: KF468752.1), Iowa IA1 (GenBank: KF468753.1) и Iowa IA2 (GenBank: KF468754.1), имели один и тот же размер 28038 нуклеотидов (нт), за исключением полиаденозинового хвоста, и имели общую организацию генома с прототипным штаммом PEDV CV777 (GenBank: AF353511.1). Эти последовательности трех североамериканских PEDV имели от 99,8 до 99,9% идентичности нуклеотидов. В частности, штаммы MN и IA2 имели отличия только 11 нуклеотидов в полном геноме.

S белок PEDV представляет собой гликопротеин типа I, который состоит из 1383 аминокислот (aa). S белок может быть разделен на S1 (1-789 aa) и S2 (790-1383 aa) домены на основе их гомологии с S белком других коронавирусов (Chang и др.; 2002; Cruz и др., 1994; Godet, и др. 1994; Jackwood и др. 2001; 5 Sturman и Holmes; 1984; и Sun и др. 2008). S белок в коронавирусах представляет собой поверхностный антиген, который играет определенную роль в регуляции взаимодействия с рецептором гликопротеинов клетки-хозяина для опосредования поступления вируса в клетку и для стимуляции индукции нейтрализующих антител в природном хозяине. Таким образом, S гликопротеин 10 представляет собой первичную мишень для разработки эффективных вакцин против PEDV.

M белок PEDV представляет собой наиболее распространенный компонент оболочки, который играет важную роль в процессе сборки вируса, а также индуцирует выработку антител, нейтрализующих вирус. Подобно этому, белок N 15 PEDV, который связывается с РНК вириона и обеспечивает структурную основу для нуклеокапсида, также может быть важным для индукции клеточного иммунитета (Saif, L. 1993).

Единственный вспомогательный ген в PEDV представляет собой ORF3. Принимая во внимание, что вспомогательные гены, как правило, 20 поддерживаются в диких штаммах, изменение ORF3, как полагают, влияет на вирулентность; адаптация клеточной культуры была использована для изменения гена ORF3 с целью снижения его вирулентности (Song и др. 2003). Действительно, путем изучения гена ORF3, исследователи картировали появившиеся новые геногруппы PEDV в иммунизированных стадах свиней в 25 Китае с 2006 года. Филогенетические исследования этих штаммов и географического повторного появления PEDV в Китае показали, что эти полевые штаммы, которые вызывают изнуряющее кишечное заболевание, генетически отличаются по ORF3 от европейских штаммов и вакцинных штаммов.

Является хорошо известным, что существуют различные штаммы PEDV с 30 различными уровнями вирулентности. В 1980-е и 1990-е годы PEDV был широко распространен по всей Европе, в таких странах, как Бельгия, Англия, Германия, Франция, Нидерланды и Швейцария. Частота зарегистрированных случаев в Европе последовательно сокращалась, и заболевание, вызываемое PEDV, не имело достаточного экономического значения для того, чтобы начать

промышленную разработку вакцины (Song и Park 2012). В то время как вспышки PEDV были зарегистрированы в Китае с 1980 года, варианты штаммов PEDV, возникающих с 2010 года, ассоциировались с крупномасштабными вспышками диареи, которая была более острой и тяжелой. Таким образом, разработка вакцины, в основном, осуществлялась в азиатских странах (Song и Park 2012).  
5  
Варианты, которые возникли с 2010 года, были описаны как такие, которые имеют показатели 80-90% заболеваемости и 50-90% смертности у подсосных поросят ((Vi и др. 2012; Pan и др. 2012; и Li и др. 1012). Последние данные свидетельствуют о том, что новые вирулентные формы PEDV в Китае могут  
10  
быть результатом эволюции штаммов живых вакцин (Chen и др. 2010).

Как кишечное заболевание, поражающее кишечник свиньи, PEDV распространяется фекально-оральным путем. Загрязненный транспорт и оборудование являются частыми источниками инфекции для интактных животных. Клинические симптомы инфекции PEDV похожи на инфекцию вируса трансмиссивного гастроэнтерита (TGEV) ((Pijpers и др. 1993). У свиней трехнедельного возраста и более молодого возраста клинические симптомы (в том числе острый водянистый понос, рвота и обезвоживание) могут появляться через 24 часа после инфекции PEDV, что приводит к 100% смертности. Инфицированные PEDV подсосные поросята и поросята постарше, а также свиноматки и хряки, могут развить понос и рвоту. Животные также могут проявляют признаки анорексии и могут быть вялыми. Полное воздействие на взрослых свиней еще предстоит определить, но вероятным является снижение эффективности кормления, дополнительные дни выхода на рынок, а также восприимчивость инфицированных животных к вторичным инфекциям. Для свиноматок ухудшение состояния организма может отрицательно сказаться на репродуктивности. Отчеты показали, что существуют признаки того, что PEDV может стать эндемическим в североамериканских стадах, что приводит к упорной диарее и другим проблемам.  
15  
20  
25

Массовые гистологические изменения в кишечнике животных, инфицированных PEDV, в Соединенных Штатах сходны с теми, которые наблюдаются в Китае; по существу, вирус разрушает ворсинки кишечника свиньи, и, таким образом, возникает неспособность усваивать питательные вещества. Huang и др. 2012 сообщили, что животные, которые подверглись заболеванию в очагах Миннесоты и Айовы, имели грубые патологические  
30

повреждения, ограничивающиеся тонкой кишкой, и тонкая кишка характеризовалась истонченными полупрозрачными стенками, растянутыми желтой жидкостью. Гистологическая оценка выявила участки тонкого кишечника с затупленными и слитыми ворсинками, а также минимальную лимфобластную инфильтрацию ворсинок собственно пластинки слизистой оболочки (*lamia propria*).

Huang и др. 2013 охарактеризовал три различных штамма PEDV, которые имеют происхождение от вспышек в Соединенных Штатах - один из Миннесоты и два из штата Айова, которые обозначили как MN (деPOSITный номер GenBank: KF468752), IA1 (деPOSITный номер GenBank: KF468753) и IA2 (деPOSITный номер GenBank: KF48754), соответственно. Филогенетическое исследование Huang позволило сгруппировать штаммы PEDV как такие, которые попадают в две различные геногруппы, которые обозначаются как геногруппа 1 (G1) и геногруппа 2 (G2). На основе значительных изменений в N-терминальном домене (NTD) гена шиловидного отростка различают геногруппу 1 и 2. Huang и др. 2013 предположили, что второй делетированный участок (DR2) в N-терминальном домене (NTD) выявляется как такой, который имеет более высокую степень антигенных изменений, чем DR1, и это дает возможность предположить, что появившиеся североамериканские штаммы являются менее «антигенными» по сравнению с G1a вакцинными штаммами.

Геногруппа 1 включает, по крайней мере, три кластера 1a, 1b и R. Подгруппа 1a включает ранние европейские, китайские и корейские изоляты, например, прототипный штамм CV777 (Belgium, 1978, GenBank: AF353511.1) и штаммы LZC (Gansu, Китай, 2006; GenBank: EF185992) и SM98 (Korea, 1998; GenBank: GU937797.1). Подгруппа 1b содержит пять штаммов - один из Южной Кореи (DR13 аттенуированный вакцинный штамм, GenBank: JQ023162.1) и другие из Китая, которые являются связанными с помощью общей «генетической сигнатуры» 8-аа делеции в *nsp3* и большой делеции ORF3 на C-терминальном конце. Группа «R» ассоциируется с рекомбинантами других геногрупп. Однако, вновь возникшие штаммы PEDV, включая те, которые появились в Китае с 2010 года и в Северной Америке с 2013 года, принадлежат к геногруппе G2a. Китайский штамм AH2012 (деPOSITный номер GenBank: KC210145) и североамериканские штаммы имеют несколько общих уникальных изменений нуклеотидов и являются кластеризованными в геногруппе 2a.

Нуклеотидная идентичность по сравнению с АН2012 для штаммов MN и IA2 составляла 99,6%, а для штамма IA1 составляла 99,5%. Исследователи предположили, что подобный АН2012 вирус, возможно, был перенесен в восточные области Китая и транспортирован в Соединенные Штаты, а также, наиболее вероятно, является предшественником североамериканских штаммов. Члены геногруппы 2a имели только приблизительно 96,9% подобия с CV777 прототипным штаммом PEDV геногруппы 1a (Bridgen, и др. 1993; Huang и др. 2013; GenBank: AF353511.1). Как таковые, аттенуированные вакцины PEDV на основе исторических G1a штаммов, которые имеют происхождение от CV777, или на основе G1b штаммов, которые происходят от DR13, могут быть антигенно менее родственными с вновь возникшими G2a китайскими и североамериканскими штаммами PEDV и, таким образом, могут быть слабыми в качестве вакцинных кандидатов.

Близко родственный североамериканский изолят US/Colorado/2013 (деPOSITный номер GenBank: KF272920.1) также был описан Marthaler и др., 2013. Подобно североамериканским изолятам, описанным выше, полный PEDV геном CO/13 имеет нуклеотидную идентичность от 96,5 до 99,5% с другими полными геномами PEDV, которые являются доступными в GenBank, с самой высокой нуклеотидной идентичностью (99,5%) с китайским штаммом АН2012 (деPOSITный номер GenBank. KC210145). Он представляет собой члена 2a геногруппы. Сравнение полного генома CO/13 с таковым PEDV эталонного штамма CV77, демонстрирует, что CO/13 содержит инсерцию одного нуклеотида (в положении 48) и делеции пяти нуклеотидов в 5' UTR (в положениях 73 и от 83 до 86). Этот североамериканский вирус демонстрирует повышенную дивергенцию в S1 в положениях генома 20696 и 21125, демонстрируя только идентичность нуклеотидов на уровне 82% с некоторыми инсерциями/делециями.

Было разработано несколько вакцин PEDV, которые различаются по своей геномной последовательности, способу доставки и эффективности. Адаптация к культуре клеток европейского штамма CV777 была использована в азиатских странах, где вспышки PEDV были весьма тяжелыми. Kusanagi и др. 1989. Адаптация европейского штамма CV777 к клеточной культуре была использована в азиатских странах, где вспышки PEDV оказались очень серьезными. Таковые использовались с 1990-ых годов.

В начале 1980-х годов японские исследователи выделили штамм 83P-5 вируса PED, который вызывает диарею, от зараженной свиньи. Kusanagi и др. в 1989 году изолировали и адаптировали штамм к клеткам Vero. Атенуированную вирусную вакцину на основе адаптированного к клеточной культуре вируса PEDV (P-5V) (83P-5) использовали в Японии у свиноматок с 1997 года. Прошедший 100 пассажей штамм 83P-5 был лицензирован для использования в качестве аттенуированной вакцины PEDV в Японии компанией Nisseiken Co., Ltd. (Sato и др. 2011). Было сообщено, что адаптация и аттенуирование штамма 83P-5 показало мутации во внеклеточной части S белка с подобием последовательности таковой для аттенуированного штамма DR13 (Sato и др. 2011; См. Strain 83P-5 Spike gene sequence at 100<sup>th</sup> passage, GenBank: AB548621.1). Несмотря на то, что более поздняя японская вакцина считается эффективной, не все свиноматки были способными передавать иммунитет своим поросятам (Usami и др. 1998). Японские штаммы и европейские штаммы являются членами геногруппы G1A или G1B. Как уже было указано выше, эти аттенуированные вакцинные штаммы являются менее родственными с дивергентными североамериканскими штаммами, чем недавно появившиеся китайские штаммы геногруппы 2a.

Пероральная вакцинация при использовании аттенуированного корейского штамма PEDV, DR13 (число пассажей 100) (GenBank: JQ023162.1), члена геногруппы G1B, была продемонстрирована как эффективная в качестве вакцины. Штамм вируса был лицензирован и использовался в качестве пероральной вакцины в Южной Корее с 2004 года, а также зарегистрирован и коммерциализирован на Филиппинах в 2011 году (Song и Park 2012). Тем не менее, было сообщено, что аттенуированный DR13 не приводит к существенному изменению продолжительности выделения вируса у зараженных поросят - признак того, что иммунная защита является неполной. Кроме того, пероральная иммунизации с помощью высоко аттенуированного PEDV обеспечивает защиту только при очень высоких дозах вакцины (Song и Park 2012).

Другие известные вакцины включают SUISHOT® PT-100 (ChoongAng Vaccine Laboratories, Южная Корея) вакцины на основе комбинации убитого PEDV и TGEV, и SUISHOT® PED вакцину на основе и убитого PEDV. Штаммы и подтипы, которые предлагаются через ChoonAng Vaccine Laboratories,

являются неизвестными. Кроме того, Komipharm International Co., другая южнокорейская компания, предлагает серии живых, убитых или комбинационных вакцин, которые продаются под торговым наименованием PRO-VAC®, и которые включают SM98P штамм PEDV геногруппы G1a.

5 Китайская компания Qilu Animal Health Products Factory также продает в Китае комбинационную убитую вакцину, которая содержит PEDV и TGEV, штаммы и подтипы для которой являются неизвестными.

Недавно обнаруженный дельтакоронавирус свиней (PDCoV), также известный как свиной дельтакоронавирус SDCoV или SDCV и используемый

10 взаимозаменяемо в настоящей заявке, является сходным с вирусом эпидемической диареи свиней (PEDV), и часто вовлечен в заболеваемость новорожденных животных и способствует глобальному распространению и влиянию заболевания на промышленное свиноводство. PDCoV распространился в США в течение короткого времени после PEDV со сходными структурами

15 заболеваемости. В США, в отличие от PEDV, дельтакоронавирусы предположительно не вызывают смертности поросят, но вызывают острые заболевания, включая тяжелую диарею, рвоту и потерю веса у поросят. Несмотря на то, что эта инфекция является слабее, чем PEDV инфекция, инфицирование PDCoV может приводить к 30-40% показателям смертности у

20 новорожденных. Более тяжелое заболевание может наблюдаться при совместных инфицированиях с PEDV, ротавирусами и TGEV (Marthaler и др., 2014a; и Wang и др., 2014). Дополнительно, в мае 2015 г, в США был обнаружен третий новые агент, ортореовирус свиней (PORV), потенциально способствующий тяжелому заболеванию, когда присутствует при коинфицировании. Несмотря на то, что

25 необходимо еще подробно изучить патогенез и клиническое вовлечение PDCoV и других коинфицирующих агентов, это недавнее совместное проявление PEDV и PDCoV потенциально усиливает тяжесть и воздействие заболевания на стада.

Дельтакоронавирус свиней (PDCoV) является представителем семейства *Coronaviridae*, рода *deltacoronavirus*. Вирус впервые был идентифицирован в

30 Специальном Административном Районе Гонконга среди образцов ректальных тампонов свиней, собранных в 2009 г. (Woo, P.C., и др., Discovery of seven novel Mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus. J Virol,

2012. 86(7): сс. 3995-4008), но было неизвестно о связи с любым заболеванием. SDCV, обозначаемый в настоящей заявке как PDCoV, впервые был идентифицирован в стадах свиней в США в феврале 2014 г. в Огайо и Индиане, и он быстро распространился в другие штаты (Hu, H., и др., Isolation and  
 5 Characterization of Porcine Deltacoronavirus from Pigs with Diarrhea in the United States. J Clin Microbiol, 2015. 53(5): сс. 1537-1548; Chen, Q., и др., Pathogenicity and pathogenesis of a United States porcine deltacoronavirus cell culture isolate in 5-day-old neonatal piglets. Virology, 2015. 482: сс. 51-59; Li, G., и др., Full-Length Genome Sequence of Porcine Deltacoronavirus Strain USA/IA/2014/8734. Genome  
 10 Announc, 2014. 2(2); Marthaler, D., и др., Rapid detection, complete genome sequencing, and phylogenetic analysis of porcine deltacoronavirus. Emerg Infect Dis, 2014a. 20(8): сс. 1347-50; Marthaler, D., и др., Complete Genome Sequence of Strain SDCV/USA/Illinois121/2014, a Porcine Deltacoronavirus from the United States. Genome Announc, 2014b. 2(2); Wang, L., B. Byrum, and Y. Zhang, Detection and  
 15 genetic characterization of deltacoronavirus in pigs, Ohio, USA, 2014. Emerg Infect Dis, 2014. 20(7): сс. 1227-30; Jung, K., и др., Pathogenicity of 2 porcine deltacoronavirus strains in gnotobiotic pigs. Emerg Infect Dis, 2015. 21(4): сс. 650-4). PDCoV также был обнаружен в Корее в апреле 2014 г. (Lee, S. and C. Lee, Complete Genome Characterization of Korean Porcine Deltacoronavirus Strain  
 20 KOR/KNU14-04/2014. Genome Announc, 2014. 2(6)), в материковом Китае (Dong, N., и др., Porcine Deltacoronavirus in Mainland China. Emerg Infect Dis, 2015. 21(12): сс. 2254-5; и Song, D., и др., N Newly Emerged Porcine Deltacoronavirus Associated With Diarrhoea in Swine in China: Identification, Prevalence and Full-Length Genome Sequence Analysis. Transbound Emerg Dis, 2015. 62(6): p. 575-80),  
 25 и в Японии (ISERPD 2015).

После идентификации тремя группами исследователей было подтверждено, что инфицирование с применением материала, имеющего происхождение из клеточной культуры и/или гомогената ткани из клинических случаев приводит к  
 развитию острых желудочно-кишечных признаков у гнотобиологических и/или  
 30 обычных поросят (Chen и др., 2015; Ma, Y., и др., *Origin, evolution, and virulence of porcine deltacoronaviruses in the United States*. MBio, 2015. 6(2); и Vitosh-Sillman, S., и др. *Histopathological and immunohistochemical characterization of pigs experimentally infected with porcine deltacoronavirus*. в *American Association of Swine Veterinarians*. 2015. Orlando, FL). Было показано, что PDCoV вызывает

острую диарею у свиноматок и поросят в комнатах для опороса через 8-9 дней после начала клинических признаков (Li и др., 2014), а также рвоту и дегидратацию (Ma, и др., 2015). Вирус имеет сходные клинические признаки и симптомы с вирусом эпидемической диареи свиней (PEDV), коронавирусным трансмиссивным гастроэнтеритом (TGEV) и орторевовирусом свиней (PORV).

В недавно опубликованной заявке изобретателя *Magx и др.* (WO201600757A2) описали иммуногенные композиции, которые, по неподтвержденной информации, защищают свиней от заболевания, вызываемого вирусом эпидемической диареи свиней (PEDV) и PDCoV. Тем не менее, является очевидным, что PEDV вакцина от *Magx и др.*, на основании штамма вируса североамериканский Colorado, только частично защищает (например, при сравнение с незначительными уменьшениями клинических симптомов смертности, потери веса или диареи) при заражении ослабленным Европейским INDEL-штаммом Calaf14 (вызывая только 23,8% смертность у контрольных животных). Кроме того, несмотря на то, что *Magx и др.* также описывали вакцину дельтакоронавируса, защита или уменьшение клиническим симптомов заболевания не были продемонстрирована ни для моновалентной PDCoV вакцины или бивалентной PEDV и PDCoV вакцины.

Таким образом, существует необходимость в PEDV и PDCoV вакцине, способной уменьшать клинические признаки заболевания, вызываемого PEDV и PDCoV, и индуцировать защитный иммунитет у иммунизированных животных, включая снижение выделения вируса у иммунизированных животных.

### **Сущность изобретения**

Настоящее изобретение обеспечивает иммуногенные композиции, вакцины и соответствующие способы, которые преодолевают существующие недостатки уровня техники. Настоящее изобретение относится к иммуногенным композициям, которые включают инактивированные/убитые и/или рекомбинантные формы вирусов с (+) одноцепочечной РНК с оболочкой семейства *Coronaviridae*: вирус эпидемической диареи свиней, или PEDV и/или дельтакоронавирус свиней, или PDCoV. В частности, заявка обеспечивает иммуногенные композиции, уменьшающие клинические симптомы у свиней при заболеваниях, ассоциированных с PEDV и PDCoV инфекцией. Настоящие PDCoV изоляты (NSVL) (SEQ ID NO:1 и 2) и изоляты PDCoV 2.0307 и PDCoV 5.0327(SEQ ID NO: 5, 6, 9, и 10, соответственно) имеют генетические профили,

сходные с таковыми североамериканских и азиатских штаммов. Настоящий PEDV изолят BI1251-125-10 (далее в настоящей заявке обозначается как “125-10”) (SEQ ID NO:29, 32) представляет собой вирулентный североамериканский РНК-содержащий вирусный штамм с генетическим профилем, подобным  
5 такому для других североамериканских PEDV, описанных для геногруппы 2a. Изолят PEDV производного “125-10 р30” (SEQ ID NO:34, 36). представляет собой пассивированный ослабленный вирус, также с генетическим профилем, согласующимся с североамериканской геногруппой 2a.

Иммуногенные композиции и вакцины согласно изобретению включают  
10 инактивированный/убитый PDCoV (например, химически инактивированный NSVL изолят (SEQ ID NO:1 и 2) и/или изоляты PDCoV 2.0307 и PDCoV 5.0.327 (SEQ ID NO:5 и 6 и SEQ ID NO:9 и 10, соответственно), и/или инактивированный/убитый PEDV (например, химически инактивированный PEDV изолят “125-10” или “125-10 р30”(SEQ ID NO:29 или 32 и SEQ ID NO:33  
15 или 36, соответственно)) и обычно также включают адъювант. Вакцина может также включать другие компоненты, такие как консервант (ы), антимикробные агенты, стабилизатор (ы), например, стабилизатор, который может повышать длительность хранения вакцины, эмульсии, и антигены для защиты от других патогенов свиней.

Иммуногенные композиции и вакцины согласно изобретению включают  
20 антиген шиловидного отростка, который экспрессируется в одном неограничивающем примере в клетках насекомых с помощью рекомбинантного бакуловируса, экспрессирующего белок шиловидного отростка PDCoV и/или PEDV, например, белок шиловидного отростка PDCoV (например, содержащий  
25 последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:3, 7, 11, 17 или 27 кодирующая аминокислотные последовательности SEQ ID NO:4, 8, 12, 18 или 28), и/или последовательность нуклеиновой кислоты шиловидного отростка PEDV (содержащий SEQ ID NO:30, 34, 46 или 52), кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31, 35, 47, или 53), и обычно также включает  
30 адъювант. Вакцина может также включать другие компоненты, такие как консервант(ы), стабилизатор(ы) и антигены для защиты от других патогенов свиней.

Предпочтительная последовательность нуклеиновой кислоты шиловидного отростка PDCoV и/или PEDV, приемлемая для использования в изобретении,

представляет собой полинуклеотид, кодирующий полипептид шиловидного отростка, где указанный полинуклеотид, имеющий по крайней мере по крайней мере, будет иметь по крайней мере по крайней мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, или 89%, более предпочтительно по крайней мере 90%, 91%, 92%, 93%, или 94%, и наиболее предпочтительно по крайней мере 95%, 96%, 96,1%, 96,2%, 96,3%, 96,4%, 96,5%, 96,6%, 96,7%, 96,8%, 96,9%, 97%, 97,1%, 97,2%, 97,3%, 97,4%, 97,41%, 97,42%, 97,43%, 97,44%, 97,45%, 97,46%, 97,47%, 97,48%, 97,49%, 97,5%, 97,51%, 97,52%, 97,53%, 97,54%, 97,55%, 97,56%, 97,57%, 97,58%, 97,59%, 97,6%, 97,61%, 97,62%, 97,63%, 97,64%, 10 97,65%, 97,66%, 97,67%, 97,68%, 97,69%, 97,7%, 97,71%, 97,72%, 97,73%, 97,74%, 97,75%, 97,76%, 97,77%, 97,78%, 97,79%, 97,8%, 97,81%, 97,82%, 97,83%, 97,84%, 97,85%, 97,86%, 97,87%, 97,88%, 97,89%, 97,9%, 97,91%, 97,92%, 97,93%, 97,94%, 97,95%, 97,96%, 97,97%, 97,98%, 97,99%, 98%, 98,01%, 98,02%, 98,03%, 98,04%, 98,05%, 98,06%, 98,07%, 98,08%, 98,09%, 98,1%, 98,11%, 15 98,12%, 98,13%, 98,14%, 98,15%, 98,16%, 98,17%, 98,18%, 98,19%, 98,2%, 98,21%, 98,22%, 98,23%, 98,24%, 98,25%, 98,26%, 98,27%, 98,28%, 98,29%, 98,3%, 98,31%, 98,32%, 98,33%, 98,34%, 98,35%, 98,36%, 98,37%, 98,38%, 98,39%, 98,4%, 98,41%, 98,42%, 98,43%, 98,44%, 98,45%, 98,46%, 98,47%, 98,48%, 98,49%, 98,5%, 98,51%, 98,52%, 98,53%, 98,54%, 98,55%, 98,56%, 98,57%, 20 98,58%, 98,59%, 98,6%, 98,61%, 98,62%, 98,63%, 98,64%, 98,65%, 98,66%, 98,67%, 98,68%, 98,69%, 98,7%, 98,71%, 98,72%, 98,73%, 98,74%, 98,75%, 98,76%, 98,77%, 98,78%, 98,79%, 98,8%, 98,81%, 98,82%, 98,83%, 98,84%, 98,85%, 98,86%, 98,87%, 98,88%, 98,89%, 98,9%, 98,91%, 98,92%, 98,93%, 98,94%, 98,95%, 98,96%, 98,97%, 98,98%, 98,99%, 99%, 99,01%, 99,02%, 99,03%, 25 99,04%, 99,05%, 99,06%, 99,07%, 99,08%, 99,09%, 99,1% , 99,11%, 99,12%, 99,13%, 99,14%, 99,15%, 99,16%, 99,17%, 99,18%, 99,19%, 99,2%, 99,21%, 99,22%, 99,23%, 99,24%, 99,25%, 99,26%, 99,27%, 99,28%, 99,29%, 99,3%, 99,31%, 99,32%, 99,33%, 99,34%, 99,35%, 99,36%, 99,37%, 99,38%, 99,39%, 99,4%, 99,41%, 99,42%, 99,43%, 99,44%, 99,45%, 99,46%, 99,47%, 99,48%, 30 99,49%, 99,5%, 99,51%, 99,52%, 99,53%, 99,54%, 99,55%, 99,56%, 99,57%, 99,58%, 99,59%, 99,6%, 99,61%, 99,62%, 99,63%, 99,64%, 99,65%, 99,66%, 99,67%, 99,68%, 99,69%, 99,7%, 99,71%, 99,72%, 99,73%, 99,74%, 99,75%, 99,76%, 99,77%, 99,78%, 99,79%, 99,8%, 99,81%, 99,82%, 99,83%, 99,84%, 99,85%, 99,86%, 99,87%, 99,88%, 99,89%, 99,9%, 99,91%, 99,92%, 99,93%, 99,94%, 99,95%,

99,96%, 99,97%, 99,98% и 99,99% идентичности последовательности с полипептидами шиловидного отростка PDCoV SEQ ID NO:3, 7, 11, 17 или 27, или их функциональными фрагментами, и/или шиловидного отростка PEDV SEQ ID NO:30, 34, 46 или 52, или их функциональными фрагментами. Как  
5 используется в настоящей заявке, является понятным, что термин “идентичности последовательности с SEQ ID NO:X” или “идентичная SEQ ID NO:X”, соответственно, является эквивалентным термину “идентичность последовательности с последовательностью SEQ ID NO:X по длине SEQ ID NO: X” или “идентичная последовательности SEQ ID NO:X по длине SEQ ID NO: X”,  
10 соответственно.

Предпочтительный полипептид шиловидного отростка, приемлемый для использования в изобретении, представляет собой полипептид, который имеет последовательность, как определено для шиловидного отростка PDCoV SEQ ID NO: 4, 8, 12, 18 или 28 и/или шиловидного отростка PEDV SEQ ID NO: 31, 35,  
15 47, или 53, имеет по крайней мере 80% гомологии с SEQ ID NO: 4, 8, 12, 18, 28, 31, 35, 47, и/или 53, например по крайней мере 85% гомологии с SEQ ID NO: 4, 8, 12, 18, 28, 31, 35, 47, и/или 53, такую, как, по крайней мере, 85% гомологии с SEQ ID NO: 4, 8, 12, 18, 28, 31, 35, 47, и/или 53, такую, как, по крайней мере, 90% гомологии с SEQ ID NO: 4, 8, 12, 18, 28, 31, 35, 47, и/или 53, например по  
20 крайней мере 95%, по крайней мере 98% или по крайней мере 99% гомологии с SEQ ID NO: 4, 8, 12, 18, 28, 31, 35, 47, и/или 53.

Термины “вакцина” и “иммуногенная композиция” определяются в данной заявке в широком смысле для обозначения любого типа биологического агента в форме, приемлемой для введения, способного стимулировать иммунный ответ у  
25 животного, которого инокулировали с помощью вакцины. Вакцины в целом могут основываться либо на самом вирусе (например, убитом/инактивированном или аттенуированном) или на иммуногенном (антигенном) компоненте вируса. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения вакцина (иммуногенная композиция) предпочтительно включает вирусный агент в  
30 убитой/неактивированной форме или антигенную часть вируса, которая представлена в виде субъединичной вакцины. В настоящей заявке, термин “уменьшение клинических симптомов”, когда он используется по отношению к иммуногенной композиции, относится к снижению или ослаблению (либо частичному, либо полному) любого из симптомов, ассоциированных с

состоянием или заболеванием, представляющим интерес. Таким образом, уменьшение клинических симптомов у свиней, инфицированных PDCoV и/или PEDV с помощью иммуногенных композиций согласно изобретению в целом и обычно приводит к уменьшению выделения вируса и/или одного или более клинических симптомов, ассоциированных с инфекцией PDCoV и/или PEDV (например, острой водянистой диареей, острой рвоты, обезвоживания, потери аппетита, вялости, депрессии и высокой смертности у свиней в возрасте менее чем 10 дней). Аналогичным образом, уменьшение клинических симптомов у свиней, инфицированных PDCoV и/или PEDV с помощью иммуногенных композиций согласно изобретению обычно приводит к уменьшению выделения вируса и/или одного или более клинических симптомов, ассоциированных с инфекцией PDCoV и/или PEDV (например, острой водянистой диареей, острой рвоты, обезвоживания, потери аппетита, вялости, депрессии и высокой смертности у свиней в возрасте менее чем 10 дней)

15 Специалистам в данной области техники должно быть понятным, что композиции, которые используются в настоящей заявке, могут включать известные инъекционные, физиологически приемлемые стерильные растворы. Для приготовления готового к употреблению раствора для парентеральной инъекции или инфузии, водные изотонические растворы, например, физиологический раствор или растворы белка плазмы крови, являются легко доступными. Кроме того, иммуногенные и вакцинные композиции в соответствии с данным изобретением могут включать ветеринарно приемлемые носители, разбавители, изотонические агенты, стабилизаторы или адъюванты.

20 Способы в соответствии с изобретением включают, но не ограничены таковыми, способ стимуляции иммунного ответа против инфекции PDCoV и/или инфекции PEDV, либо индивидуально или в комбинации друг с другом или другими совместными инфекциями, у субъекта, включающий стадию введения субъекту иммуногенной композиции, содержащей инактивированный/убитый PDCoV и/или PEDV, аттенуированный PDCoV и/или PEDV, и/или рекомбинантные антигены шиловидного отростка, имеющие происхождение из PDCoV и/или PEDV. Предпочтительно, когда иммунный ответ вызывается против более чем одного серотипа или штамма PDCoV или PEDV. Композиции в соответствии с изобретением могут быть использованы для предотвращения инфекции PDCoV, инфекции PEDV и/или совместной инфекции PEDV/PDCoV.

Предпочтительно, такой иммунный ответ уменьшает частоту или тяжесть одного или более клинических признаков, ассоциированных с или вызванных инфекцией одним или более генотипами PDCoV и/или генотипами/геногруппами PEDV.

5 В данной заявке подходящие субъекты и субъекты, нуждающиеся в этом, которым могут быть введены композиции в соответствии с изобретением, включают животных, нуждающихся в профилактическом лечении инфекции, заболевания или состояния, ассоциированного с вирусом. Животные, у которых иммунная реакция стимулируется при использовании композиций или способов  
10 в соответствии с изобретением, включают сельскохозяйственных животных, таких, как свиньи, крупный рогатый скот, птицы (например, куры, утки, гуси или индюки), козы и овцы, и домашних животных, таких, как мыши, кролики, собаки, кошки и лошади. Предпочтительные животные включают свиней, муридовых, непарнокопытных, зайцеобразных и полорогих. Наиболее  
15 предпочтительно, когда иммунный ответ стимулируют у свиней.

Изобретение также обеспечивает способ снижения частоты возникновения или тяжести одного или более клинических признаков, ассоциированных с или вызванных инфекцией PDCoV, и/или инфекцией PEDV, включающий стадию введения иммуногенной композиции согласно изобретению, которая включает  
20 инактивированную/убитую вакцину PDCoV, инактивированную/убитую вакцину PEDV, и/или в комбинации с рекомбинантным антигеном шиловидного отростка, имеющим происхождение из PDCoV и/или PEDV, как обеспечивается в настоящей заявке, и предпочтительно молекулу носителя, таким образом, что частота возникновения или тяжесть клинического симптома инфекции PDCoV  
25 и/или PEDV снижается по крайней мере на 10%, предпочтительно по крайней мере на 20%, еще более предпочтительно по крайней мере на 30%, еще более предпочтительно по крайней мере на 50%, еще более предпочтительно по крайней мере на 70%, наиболее предпочтительно 100% по сравнению с субъектом, который не получал иммуногенной композиции, которая  
30 обеспечивается в настоящей заявке. Такие клинические признаки включают водянистую диарею, рвоту и обезвоживание организма. Любой из этих клинических признаков может быть результатом инфекции PEDV, имеющей геногруппу 2a или любую другую геногруппу PEDV, включая G1a, G1b, или G2b. Аналогичным образом, любой из этих клинических признаков может быть

результатом инфекции и/или совместной инфекции с помощью различных генотипов PDCoV.

В одном варианте осуществления, иммуногенные композиции в соответствии с настоящим изобретением включают химически инактивированную форму PEDV. Вакцины, которые включают химически инактивированный вирус PDCoV (SEQ ID NO: 1 или 2, 5 или 6, 9 или 10), являются особенно желательными. Дополнительно, иммуногенные композиции в соответствии с настоящим изобретением могут включать химически инактивированную форму PEDV. Вакцины, которые включают химически инактивированный вирус PEDV (SEQ ID NO:29 или 32 или SEQ ID NO:33 или 36), являются особенно желательными. Разнообразные химические инактивирующие агенты, известные специалистам в данной области техники, могут быть использованы для инактивации вируса. Этиленимин и родственные производные, такие как бинарный этиленимин (“BEI”) и ацетилэтиленимин, являются примерами подходящих химических инактивирующих агентов для использования в инактивации вируса SDCo и/или PED. Другие химические инактивирующие агенты, например, бета-пропиолактон или альдегиды (такие, как формальдегид и глутаровый альдегид), также могут быть использованы для инактивации вируса.

Иммуногенные композиции и/или вакцины в соответствии с изобретением, в общем случае включают в себя адъювант, который желательно может обладать биоадгезивными свойствами, в частности, тогда, когда вирус предназначен для интраназального введения. Примеры подходящих вспомогательных веществ включают поперечно-сшитые олефиновые ненасыщенные полимеры карбоновых кислот, такие, как поперечно-сшитые полимеры акриловой кислоты. Используемый в данном описании термин «поперечно-сшитый полимер акриловой кислоты» относится к полимеру и сополимерам, которые образуются из смеси мономеров, которая включает акриловую кислоту в качестве основного мономера в смеси. Примеры подходящих поперечно-сшитых полимеров акриловой кислоты включают коммерчески доступные под торговыми наименованиями CARBOPOL® 934P и CARBOPOL® 971 (доступен от V.B.F. Goodrich Co., Cleveland, Ohio). Особенно приемлемый адъювант для применения в вакцинах в соответствии с изобретением представляет собой поперечно-сшитый полимер акриловой кислоты, имеющий вязкость по

Брукфильду не более чем около 20000 сП (измеряется при 20 оборотах в минуту как 1,0 мас.% водный раствор при рН 7,5). Там, где желательным является биоадгезивный адъювант, может быть предпочтительным использовать в качестве адъюванта такой, который имеет биоадгезивные свойства, по крайней мере, около 50 дин/см<sup>2</sup>, измеренные между двумя кусками свежесрезанной ткани желудка кролика (как определено в соответствии с процедурой, описанной в патенте США № 4,615,697).

Данное изобретение также относится к способу иммунизации субъекта, включающему введение субъекту любой из иммуногенных композиций, как описано в данной заявке.

Термин «иммунизация» относится к активной иммунизации путем введения иммуногенной композиции субъекту, который подвергается иммунизации, вызывая, таким образом, иммунный ответ против антигена, включенного в состав такой иммуногенной композиции.

Предпочтительно, иммунизация приводит к снижению частоты заболеваемости конкретной инфекцией PDCoV в стаде, отдельно или в комбинации с инфекцией PEDV, или к уменьшению тяжести клинических признаков, вызванных или ассоциированных с конкретной инфекцией PDCoV и/или PEDV.

Кроме того, иммунизация субъекта, который нуждается в иммуногенных композициях, как обеспечивается в настоящей заявке, приводит к предотвращению инфицирования субъекта PDCoV и/или PEDV инфекцией. Еще более предпочтительно, когда иммунизация приводит к эффективному, долгосрочному, иммунологическому ответу против инфекции PDCoV и/или PEDV. Следует понимать, что указанный период времени будет длиться более 2-х месяцев, предпочтительно более 3-х месяцев, более предпочтительно более 4-х месяцев, более предпочтительно более 5-ти месяцев, более предпочтительно более 6-ти месяцев. Следует понимать, что иммунизация может не быть эффективной у всех иммунизированных субъектов.

Предпочтительно, в этом контексте предполагается стадо субъектов, которые в норме, то есть без иммунизации, будут развивать клинические признаки, как правило, вызванные или ассоциированные с PDCoV инфекцией и/или PEDV инфекцией. Являются ли субъекты стада эффективно иммунизированными, может быть определено без дополнительных исследований

специалистом в данной области техники. Предпочтительно, иммунизация должна быть эффективной, если клинические признаки по крайней мере на 20%, по крайней мере на 30%, по крайней мере на 40%, по крайней мере на 50%, по крайней мере на 60%, по крайней мере на 70%, по крайней мере на 80%, по крайней мере на 90%, еще более предпочтительно по крайней мере на 95% и наиболее предпочтительно на 100% субъектов данного стада уменьшены по частоте встречаемости или тяжести по крайней мере на 10%, более предпочтительно по крайней мере на 20%, еще более предпочтительно по крайней мере на 30%, еще более предпочтительно по крайней мере на 40%, еще более предпочтительно по крайней мере на 50%, еще более предпочтительно по крайней мере на 60%, еще более предпочтительно по крайней мере на 70%, еще более предпочтительно по крайней мере на 80%, еще более предпочтительно по крайней мере на 90%, еще более предпочтительно по крайней мере на 95% и наиболее предпочтительно на 100% по сравнению с субъектами, которые либо не были иммунизированы или были иммунизированы с применением иммуногенной композицией, которая была доступна из уровня техники до появления настоящего изобретения, но впоследствии были инфицированы конкретным PDCoV и/или PEDV.

Способы предотвращения клинических признаков, вызванных PDCoV и/или PEDV у субъекта, который в этом нуждается, или способы защиты свиней от заболеваний, ассоциированных с PDCoV и/или PEDV, включают введение иммуногенной композиции и/или вакцины, содержащий инактивированный /убитый PDCoV, и/или инактивированный /убитый PEDV, и/или антигены шиловидного отростка, имеющие происхождение из PDCoV и/или PEDV, свиньям. Вакцина может вводиться при использовании различных способов, включая интраназальное, пероральное и/или парентеральное (например, внутримышечное) введение. В одном из вариантов осуществления способа, например, иммуногенную композицию, содержащую инактивированный PDCoV и/или инактивированный PEDV, вводят внутримышечно один или несколько раз (например, с интервалом в 2-4 недели). В другом варианте осуществления способа, например, вакцину, содержащую инактивированный PDCoV и/или инактивированный PEDV, вводят перорально один или несколько раз (например, с интервалом в 2-4 недели). В альтернативном варианте осуществления, пероральное введение может следовать за и/или предшествовать введению

вакцины по крайней мере один раз, внутримышечно (например, через 2-4 недели после и/или перед парентеральным введением вакцины). В идеале, все свиньи в данном стаде подвергаются вакцинации при заданных интервалах, чтобы обеспечить защиту от распространения симптомов заболевания.

5 Также обеспечивается способ получения инактивированной/убитой PDCoV вакцины, инактивированной/убитой PEDV вакцины, или комбинированной иммуногенной композиции PDCoV/PEDV. Для получения PDCoV, способ, как правило, включает инокуляцию свинных тестикулярных клеток с PDCo вирусом, например, с PDCo вирусом SEQ ID NO:1 или 2, 5 или 6, и 9 или 10.

10 Инокулированные свинные тестикулярные клетки инкубировали, обычно по крайней мере до тех пор, пока наблюдается CPE, а затем вирус PED собирали из инкубированных клеток. Собранные содержащие вирус культуральные жидкости могут быть обработаны с помощью химического инактивирующего агента, такие как бинарный этиленмин, чтобы получить инактивированный/убитый PDCo

15 вирус. Как правило, инактивированный вирус подвергают дальнейшей обработке, например, путем концентрирования и смешивания с другими компонентами, чтобы получить коммерческий препарат. Например, жидкости, содержащие инактивированный вирус, могут подвергаться концентрированию и смешиваться с адьювантом и/или антигеном (ами) к одному или нескольким

20 другим патогенам свиньи. Для получения PEDV, способ, как правило, включает инокуляцию клеток обезьян с вирусом PED, например, с PED вирусом SEQ ID NO:29 или SEQ ID NO:33. Инокулированные клетки обезьян инкубировали, обычно по крайней мере до тех пор, пока наблюдается CPE, а затем вирус PED собирали из инкубированных клеток. Собранные содержащие вирус

25 культуральные жидкости могут быть обработаны с помощью химического инактивирующего агента, такие как бинарный этиленмин, чтобы получить инактивированный/убитый PED вирус. Как правило, инактивированный вирус подвергают дальнейшей обработке, например, путем концентрирования и смешивания с другими компонентами, чтобы получить коммерческий препарат.

30 Например, жидкости, содержащие инактивированный вирус, могут подвергаться концентрированию и смешиваться с адьювантом и/или антигеном (ами) к одному или нескольким другим патогенам свиньи.

Также обеспечивается способ получения вакцин на основании рекомбинантно экспрессируемого антигена шиловидного отростка, которые

получают в клетках насекомых при использовании рекомбинантного бакуловируса, экспрессирующего белки шиловидного отростка PDCoV и/или PEDV. Способ в соответствии с одним типичным вариантом осуществления включает клонирование кодирующих последовательностей шиловидного отростка PDCoV (например, SEQ ID NO: 3, 7, 11, 17 или 27) и или/или кодирующих последовательностей шиловидного отростка PEDV (SEQ ID NO:30, 34, 46 или 52), включая, например, конструкцию шиловидный отросток PDCoV-Fc антиген (SEQ ID NO:17), и/или конструкцию шиловидный отросток PDCoV Бакулодисплей (SEQ ID NO:27), и/или конструкцию шиловидного отростка PEDV 2a (SEQ ID NO:46), и/или конструкцию шиловидного отростка PEDV 2b (SEQ ID NO:52), в бакуловирусном векторе, и котрансфекцию клеток насекомых Sf9.

Настоящая заявка также относится к набору, который включает в комбинации, (1) дозирующее устройство, обеспечивающее введения вакцины свинье; и (2) вакцину, содержащую химически инактивированный PDCoV, и/или химически инактивированный PEDV, и/или рекомбинантные антигены шиловидного отростка, имеющие происхождение из PDCoV и/или PEDV, способные защитить от заболеваний, ассоциированных с PDCoV и/или PEDV. Набор может включать в себя дозирующее устройство, способное дозировать его содержимого в виде капель, например, в виде аэрозоля, тонкораспыляемого спрея и/или капель жидкости, а также форму вакцины, которая способна защитить от заболеваний, ассоциированных с PDCoV и/или PEDV, например при введении интраназально и/или внутримышечно.

В данной заявке текст относится к различным вариантам осуществления настоящих композиций и/или к связанным с ними способам. Различные описанные варианты осуществления предназначены для обеспечения различных иллюстративных примеров, и их не следует рассматривать как описание альтернативных видов. Следует отметить, что описания различных вариантов осуществления настоящего изобретения, которые обеспечиваются в данной заявке, скорее могут быть такими, которые перекрываются по объему. Рассматриваемые в настоящей заявке варианты осуществления являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения.

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

Следующие фигуры представляют собой часть настоящего описания и включены для дополнительной демонстрации определенных аспектов настоящего изобретения. Изобретение может быть лучше понято со ссылкой на одну или несколько из этих фигур в комбинации с подробным описанием конкретных вариантов, представленных в настоящей заявке.

Фигура. 1 Полная схема нуклеотидов генома для PDCoV изолятов/штаммов по методу прилегающих нуклеотидов. Шкала указывает р-расстояние. Номера доступа GenBank представлены с двухбуквенным указанием структуры или с трехбуквенным кодом страны (CHN – Китай, TJK – Таиланд, LAO – Лаос).

Фигура 2 Полная схема нуклеотидов генома для PDCoV изолятов/штаммов по методу прилегающих нуклеотидов. Шкала указывает р-расстояние. Номера доступа GenBank представлены с двухбуквенным указанием структуры или с трехбуквенным кодом страны (CHN – Китай, TJK – Таиланд, LAO – Лаос).

Фигура 3А Схематическая диаграмма PDCoV S1-IgG2a Fc Бакуловирус-Карта белка PDCoV S1-IgG2a Fc.

Фигура 3В Схематическая диаграмма PDCoVS BD Бакулодисплей Бакуловирус- Карта белка PDCoVS BD.

Фигура 4 Серологическое исследование с PDCoV Прототипами (Группы 1, 2, и 4, VaculoS-BD-PDCoV, Цельноклеточный PDCoV, и VaculoS-FC-PDCoV, соответственно) по сравнению с плацебо (Группа 3).

Фигура 5 Серологическая реакция после вакцинации с применением PDCoV Прототипов, как обнаружено с помощью ELISA на основании S1-IgG2a-Fc: (Группы 1, 2, и 4, VaculoS-BD-PDCoV, Цельноклеточный PDCoV, и VaculoS-FC-PDCoV, соответственно) по сравнению с плацебо (Группа 3).

Фигура 6А Схематическая диаграмма PEDV 2a BD Бакулодисплей Бакуловирус Карта белка.

Фигура 6В Схематическая диаграмма PEDV 2b BD Бакулодисплей Бакуловирус - Карта белка.

Фигура 7 Выживаемость для группы и дня после контрольного заражения BD PEDV.

Фигура 8 Уровни IgA у вакцинированных животных.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение обеспечивает иммуногенные композиции, включающие инактивированные/убитые, формы PDCoV и/или PEDV и/или рекомбинантно экспрессируемые PDCoV и/или PEDV-антигены шиловидного отростка. Иммуногенные композиции предназначены для защиты свиней от заболеваний, ассоциированных с PDCoV и/или PEDV. Иммуногенные композиции, как правило, включают химически инактивированную форму PDCoV и/или PEDV, при этом те, которые и включают химически инактивированный/ убитый вирус PDCoV и/или PEDV, являются особенно желательными. В другом варианте осуществления иммуногенные композиции включают рекомбинантные экспрессируемые PDCoV и/или PEDV антигены шиловидного отростка, которые получены например, в клетках насекомых с помощью рекомбинантного бакуловируса, экспрессирующего белки шиловидного отростка PDCoV и/или PEDV.

В общем, настоящее изобретение обеспечивает иммуногенную композицию, содержащую один или несколько антигенов дельтакоронавируса свиней (PDCoV) и адъювант, где в дельтакоронавирусе свиней (PDCoV) является любым PDCoV: а.) который кодируется SEQ ID NO:1, 5 или 9 и/или включает последовательность SEQ ID NO:1, 5 или 9 и/или включает РНК эквивалент SEQ ID NO:1, 5 или 9; б.) где последовательность является, по крайней мере, на 99% идентичной SEQ ID NO:1, 5 или 9 и/или является, по крайней мере, на 99% идентичной РНК эквиваленту SEQ ID. NO:1; 5 или 9; в.) где белок шиловидного отростка кодируется последовательностями нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:3, 7 или 11; г.) где белок шиловидного отростка кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая является, по крайней мере, на 90% идентичной SEQ ID NO:3, 7 или 11; д.) который кодируется SEQ ID NO:2, 6 или 10; или е.) где последовательность является, по крайней мере, на 99% идентичной SEQ ID NO:2, 6 или 10.

В специфическом аспекте иммуногенная композиция в соответствии с вышеуказанной формулировкой, где адъювант представляет собой эмульсию масло-в-воде.

В другом специфическом аспекте осуществления изобретения, иммуногенная композиция является такой, как описано в любой из вышеуказанных формулировок, где иммуногенная композиция представляет

собой рекомбинантный антиген или инактивированный полный дельтакоронавирус свиней PDCoV антиген.

5 В другом специфическом аспекте осуществления изобретения, иммуногенная композиция является такой, как описано в любой из вышеуказанных формулировок, где антиген представляет собой инактивированный полный PDCoV антиген.

10 В другом специфическом аспекте осуществления изобретения, иммуногенная композиция является такой, как описано в любой из вышеуказанных формулировок, где антиген PDCoV является химически инактивированным.

15 В другом специфическом аспекте осуществления изобретения, иммуногенная композиция является такой, как описано в любой из вышеуказанных формулировок, где антиген PDCoV является химически инактивированным путем обработки с помощью химического инактивирующего агента, который включает соединение, выбранное из группы, включающей этиленимин, бинарный этиленимин, ацетилэтиленимин и их смеси.

20 В другом специфическом аспекте осуществления изобретения, иммуногенная композиция является такой, как описано в любой из вышеуказанных формулировок, где PDCoV является химически инактивированным путем обработки бинарным этиленимином.

В другом специфическом аспекте осуществления изобретения, иммуногенная композиция является такой, как описано в любой из вышеуказанных формулировок, где адъювант представляет собой адъювант EMULSIGEN® на основе эмульсии масло-в-воде.

25 В другом специфическом аспекте осуществления изобретения, иммуногенная композиция является такой, как описано в любой из вышеуказанных формулировок, где инактивированный дельтакоронавирус свиней (PDCoV) включает SEQ ID NO:1, 5 или 9 и/или включает РНК эквивалент SEQ ID NO:1, 5 или 9.

30 В другом специфическом аспекте осуществления изобретения, иммуногенная композиция является такой, как описано в любой из вышеуказанных формулировок, где антиген PDCoV представляет собой рекомбинантный антиген.

В другом специфическом аспекте осуществления изобретения, иммуногенная композиция является такой, как описано в любой из вышеуказанных формулировок, где рекомбинантный антиген включает один или более иммуногенных компонентов, выбранных из группы, включающей: а.) 5 изолированную нуклеиновую кислоту, которая кодирует антиген белка шиловидного отростка дельтакоронавируса свиней (PDCoV), где рекомбинантный полипептид шиловидного отростка имеет, по крайней мере, 90% гомологии с SEQ ID NO:4, 8, 12, 18 или 28; б.) рекомбинантный вектор, включающий изолированную нуклеиновую кислоту в соответствии с а); в.) 10 рекомбинантный белок шиловидного отростка PDCoV, который кодируется нуклеиновой кислотой в соответствии с а); и г.) любую их комбинацию.

В другом специфическом аспекте осуществления изобретения, иммуногенная композиция является такой, как описано в любой из вышеуказанных формулировок, где такая иммуногенная композиция включает 15 фармацевтически приемлемый носитель и/или наполнитель.

В другом специфическом аспекте осуществления изобретения, иммуногенная композиция является такой, как описано в любой из вышеуказанных формулировок, где эмульсия масло-в-воде представляет собой адъювант EMULSIGEN® на основе эмульсии масло-в-воде.

20 В другом специфическом аспекте осуществления изобретения, иммуногенная композиция является такой, как описано в любой из вышеуказанных формулировок, где иммуногенная композиция дополнительно включает один или более дополнительных антигенов.

В другом специфическом аспекте осуществления изобретения, 25 иммуногенная композиция является такой, как описано в любой из вышеуказанных формулировок, где дополнительный антиген представляет собой антиген вируса эпидемической диареи свиней (PEDV), где вирус эпидемической диареи свиней (PEDV) представляет собой любой PEDV: а.) который кодируется SEQ ID NO:29 или 33, и/или включает последовательность SEQ ID NO:29 или 33 30 и/или включает РНК эквивалент SEQ ID NO:29 или 33; б.) где последовательность является, по крайней мере, на 99% идентичной SEQ ID NO:29 или 33 и/или является, по крайней мере, на 99% идентичной РНК эквиваленту SEQ ID. NO:29 или 33; в.) где белок шиловидного отростка кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:30, 34, 46

или 52; г.) где белок шиловидного отростка кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая является, по крайней мере, на 90% идентичной SEQ ID NO:30, 34, 46 или 52; д.) который кодируется SEQ ID NO:32 или 36; или е.) который кодируется последовательностью, которая является, по крайней мере, на 99% идентичной SEQ ID NO:32 или 36.

5 В другом специфическом аспекте осуществления изобретения, иммуногенная композиция является такой, как описано в любой из вышеуказанных формулировок, где дополнительный антиген PEDV представляет собой рекомбинантный антиген или инактивированный полный вирус эпидемической диареи свиней (PEDV).  
10

В другом специфическом аспекте осуществления изобретения, иммуногенная композиция является такой, как описано в любой из вышеуказанных формулировок, где антиген представляет собой инактивированный полный вирус эпидемической диареи свиней (PEDV).

15 В другом специфическом аспекте осуществления изобретения, иммуногенная композиция является такой, как описано в любой из вышеуказанных формулировок, где антиген представляет собой рекомбинантный антиген PEDV.

В другом специфическом аспекте осуществления изобретения, иммуногенная композиция является такой, как описано в любой из вышеуказанных формулировок, где рекомбинантный антиген включает один или более иммуногенных компонентов, выбранных из группы, включающей: а.) изолированную нуклеиновую кислоту, кодирующую антиген белка шиловидного отростка вируса эпидемической диареи свиней (PEDV), где антиген имеет, по крайней мере, 90% гомологии с SEQ ID NO:31, 35, 47, или 53; б.) рекомбинантный вектор, включающий изолированную нуклеиновую кислоту в соответствии с а); в.) рекомбинантный белок шиловидного отростка PEDV, который кодируется нуклеиновой кислотой в соответствии с а); и г.) любую их комбинацию.  
20  
25

30 В другом специфическом аспекте осуществления изобретения, иммуногенная композиция является такой, как описано в любой из вышеуказанных формулировок, где рекомбинантный антиген включает один или более иммуногенных компонентов, выбранных из группы, включающей: структурный белок M, E, или N вируса эпидемической диареи свиней (PEDV).

В другом специфическом аспекте осуществления изобретения, иммуногенная композиция является такой, как описано в любой из вышеуказанных формулировок, где иммуногенный компонент представляет собой изолированную нуклеиновую кислоту.

5 В другом специфическом аспекте осуществления изобретения, иммуногенная композиция является такой, как описано в любой из вышеуказанных формулировок, где иммуногенный компонент представляет собой рекомбинантный вектор.

10 В другом специфическом аспекте осуществления изобретения, иммуногенная композиция является такой, как описано в любой из вышеуказанных формулировок, где иммуногенный компонент представляет собой рекомбинантный вирус эпидемической диареи свиней (PEDV) Белок шиловидного отростка.

15 В другом специфическом аспекте осуществления изобретения, иммуногенная композиция является такой, как описано в любой из вышеуказанных формулировок, где иммуногенный компонент представляет собой комбинацию.

20 Настоящее изобретение дополнительно охватывает способ уменьшения клинических симптомов заболевания, связанного с дельтакоронавирусом свиней (PDCoV), который включает введение свинье иммуногенной композиции, где иммуногенная композиция является такой, как описано в любой из вышеуказанных формулировок.

25 В другом специфическом аспекте осуществления изобретения, способ является таким, как описано в любой из вышеуказанных формулировок, который включает введение свинье иммуногенной композиции, содержащей инактивированный полный PDCoV антиген.

30 В другом специфическом аспекте осуществления изобретения, способ является таким, как описано в любой из вышеуказанных формулировок, который включает введение свинье иммуногенной композиции, содержащей антиген PDCoV в качестве рекомбинантного антигена.

В другом специфическом аспекте осуществления изобретения, способ является таким, как описано в любой из вышеуказанных формулировок, где такая вводимая иммуногенная композиция включает один или более иммуногенных компонентов, выбранных из группы, включающей: а.) который

кодируется SEQ ID NO:1, и/или включает последовательность SEQ ID NO: 1, 5 или 9 и/или включает РНК эквивалент SEQ ID NO:1, 5 или 9; б.) где последовательность является, по крайней мере, на 99% идентичной SEQ ID NO:1, 5 или 9, и/или является, по крайней мере, на 99% идентичной РНК эквиваленту SEQ ID. NO:1, 5 или 9; в.) где белок шиловидного отростка кодируется последовательностями нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:3, 7, 11, 17, 27; г.) где белок шиловидного отростка кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая является, по крайней мере, на 90% идентичной SEQ ID NO:3, 7, 11, 17 или 27; д.) который кодируется SEQ ID NO:2, 6 или 10; и е.) где последовательность является, по крайней мере, на 99% идентичной SEQ ID NO:2, 6 или 10.

В другом специфическом аспекте осуществления изобретения, способ является таким, как описано в любой из вышеуказанных формулировок, где такая вводимая иммуногенная композиция включает один или более иммуногенных компонентов, выбранных из группы, включающей: а.) который кодируется или включает последовательность SEQ ID NO:1, 5 или 9; б.) где последовательность является, по крайней мере, на 99% идентичной SEQ ID NO:1, 5 или 9; г.) где белок шиловидного отростка кодируется последовательностями нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:3, 7, 11, 17 или 27; и е.) где белок шиловидного отростка кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая является, по крайней мере, на 90% идентичной SEQ ID NO:3, 7, 11, 17 или 27.

В другом специфическом аспекте осуществления изобретения, способ является таким, как описано в любой из вышеуказанных формулировок, где такая вводимая иммуногенная композиция включает рекомбинантный антиген, содержащий один или более иммуногенных компонентов, выбранных из группы, включающей: а.) изолированную нуклеиновую кислоту, кодирующую антиген белка шиловидного отростка вируса эпидемической диареи свиней дельтакоронавирус свиней (PDCoV), где рекомбинантный полипептид шиловидного отростка имеет, по крайней мере, 90% гомологии с SEQ ID NO:4, 8, 12, 18 или 28; б.) рекомбинантный вектор, включающий изолированную нуклеиновую кислоту в соответствии с а); в.) рекомбинантный белок шиловидного отростка дельтакоронавируса свиней (PDCoV), который

кодируется нуклеиновой кислотой в соответствии с а); и г.) любую их комбинацию.

Настоящее изобретение дополнительно охватывает способ уменьшения клинических симптомов заболевания, связанного с дельтакоронавирусом свиней (PDCoV) и вирусом эпидемической диареи свиней (PEDV) который включает введение свинье иммуногенной композиции из любой из иммуногенных композиций, как описано в любой из вышеуказанных формулировок, предпочтительно где иммуногенная композиция содержит один или несколько антигенов PDCoV и один или несколько дополнительных антигенов, где дополнительный антиген представляет собой антиген вируса эпидемической диареи свиней (PEDV).

В другом специфическом аспекте осуществления изобретения, способ является таким, как описано в вышеуказанной формулировке, который включает введение такой свинье иммуногенной композиции, где дополнительный антиген PEDV представляет собой рекомбинантный антиген или инактивированный полный вирус эпидемической диареи свиней (PEDV).

В другом специфическом аспекте осуществления изобретения, способ является таким, как описано в вышеуказанной формулировке, который включает введение свинье такой иммуногенной композиции, как описано в любой из вышеуказанных формулировок.

Настоящее изобретение дополнительно охватывает набор для индуцирования иммуногенного ответа у свиньи против заболеваний, ассоциированных с дельтакоронавирусом свиней (PDCoV), который включает: а.) дозирующее устройство, способное вводить свинье иммуногенную композицию; и б.), где иммуногенная композиция является такой, как описано в любой из вышеуказанных формулировок.

Настоящее изобретение дополнительно охватывает набор для индуцирования иммуногенного ответа у свиньи против заболеваний, ассоциированных с дельтакоронавирусом свиней (PDCoV), который включает: а.) дозирующее устройство, способное вводить свинье иммуноген; и б.), где иммуногенная композиция является такой, как описано в любой из вышеуказанных формулировок, более специфически, где антиген представляет собой инактивированный полный PDCoV антиген, еще более специфически, где антиген PDCoV является химически инактивированным; более специфически,

где антиген PDCoV является химически инактивированным путем обработки с помощью химического инактивирующего агента, который включает соединение, выбранное из группы, включающей этиленимин, бинарный этиленимин, ацетилэтиленимин и их смеси; предпочтительно, где PDCoV является химически инактивированным путем обработки бинарным этиленимином. более специфически, где адъювант представляет собой адъювант EMULSIGEN® на основе эмульсии масло-в-воде; и еще более предпочтительно, где инактивированный дельтакоронавирус свиней (PDCoV) включает SEQ ID NO:1, 5 или 9, и/или включает РНК эквивалент SEQ ID NO:1, 5 или 9.

10 Настоящее изобретение дополнительно охватывает набор для индуцирования иммуногенного ответа у свиньи против заболеваний, ассоциированных с дельтакоронавирусом свиней (PDCoV), который включает:

а.) дозирующее устройство, способное вводить свинье иммуногенную композицию; и б.), где иммуногенная композиция является такой, как описано в

15 любой из вышеуказанных формулировок, более специфически, где антиген PDCoV представляет собой рекомбинантный антиген, еще более специфически, где рекомбинантный антиген включает один или более иммуногенных компонентов, выбранных из группы, включающей: а.) изолированную нуклеиновую кислоту, которая кодирует антиген белка шиловидного отростка дельтакоронавируса свиней (PDCoV), где рекомбинантный полипептид

20 шиловидного отростка имеет, по крайней мере, 90% гомологии с SEQ ID NO:4, 8, 12, 18 или 28; б.) рекомбинантный вектор, включающий изолированную нуклеиновую кислоту в соответствии с а); в.) рекомбинантный белок шиловидного отростка PDCoV, который кодируется нуклеиновой кислотой в соответствии с а); и г.) любую их комбинацию, еще более специфически, где такая иммуногенная композиция включает фармацевтически приемлемый носитель и/или наполнитель; и еще более специфически, где эмульсия масло-в-воде представляет собой адъювант EMULSIGEN® на основе эмульсии масло-в-воде.

30 Настоящее изобретение дополнительно охватывает набор для индуцирования иммуногенного ответа у свиньи против заболеваний, ассоциированных с дельтакоронавирусом свиней (PDCoV) и вирусом эпидемической диареи свиней (PEDV), содержащий а.) дозирующее устройство, способное вводить свинье иммуногенную композицию; и б.) иммуногенную

композицию, как описано в любой из формулировок выше, специфически, где дополнительный антиген представляет собой вирус эпидемической диареи свиней (PEDV) и представляет собой любой антиген PEDV, как описано в любой из формулировок выше.

5 Настоящее изобретение дополнительно охватывает набор для индуцирования иммуногенного ответа у свиньи против заболеваний, ассоциированных с дельтакоронавирусом свиней (PDCoV) и вирусом эпидемической диареи свиней (PEDV), который включает: а.) дозирующее устройство, способное вводить свинье иммуногенную композицию; и б.) и  
10 иммуногенную композицию, как описано в любой из формулировок выше, специфически, где дополнительный антиген представляет собой вирус эпидемической диареи свиней (PEDV) представляет собой любой рекомбинантный антиген PEDV или любой инактивированный цельный вирус эпидемической диареи свиней (PEDV), как описано в любой из формулировок  
15 выше.

Настоящее изобретение дополнительно охватывает набор для индуцирования иммуногенного ответа у свиньи против заболеваний, ассоциированных с дельтакоронавирусом свиней (PDCoV) и вирусом эпидемической диареи свиней (PEDV), который включает: а.) дозирующее  
20 устройство, способное вводить свинье иммуногенную композицию; и б.) иммуногенную композицию, как описано в любой из формулировок выше, специфически, где дополнительный антиген представляет собой любой рекомбинантный антиген PEDV, как описано в любой из формулировок выше.

Настоящее изобретение дополнительно охватывает способ получения  
25 иммуногенной композиции дельтакоронавируса свиней (PDCoV), как описано в любой из формулировок выше, который дополнительно включает: а.) инокуляцию свиных тестикулярных клеток дельтакоронавирусом свиней (PDCoV); б.) инкубацию инокулированных свиных тестикулярных клеток; в.) получение дельтакоронавируса свиней (PDCoV) из инкубированных клеток; и г.)  
30 обработку собранных клеток с помощью химического инактивирующего агента, предпочтительно с помощью соединения, выбранного из группы, включающей этиленимин, бинарный этиленимин, ацетилэтиленимин или их смесь, с получением инактивированного антигена дельтакоронавируса свиней (PDCoV).

В другом специфическом аспекте осуществления изобретения, способ является таким, как описано в вышеуказанной формулировке, где дельтакоронавирус свиней (PDCoV) включает дополнительные характерные свойства: а.) последовательность, которая кодируется или включает  
5 последовательность SEQ ID NO:1, 5 или 9, б.) последовательность, которая является, по крайней мере, на 99% идентичной SEQ ID NO:1, 5 или 9, в.) белок шиловидного отростка, который кодируется последовательностями нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:3, 7, 11, 17 или 27; г.) белок шиловидного отростка,  
10 который кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая является, по крайней мере, на 90% идентичной SEQ ID NO:3, 7, 11, 17 или 27.

В другом специфическом аспекте осуществления изобретения, способ является таким, как описано в любой из вышеуказанных формулировок, где дельтакоронавирус свиней (PDCoV) включает дополнительные характерные свойства SEQ ID NO:1, 5 или 9 и/или РНК эквивалент SEQ ID NO:1, 5 или 9.

15 В другом специфическом аспекте осуществления изобретения, способ является таким, как описано в любой из вышеуказанных формулировок, где свиные тестикулярные клетки представляют собой AI-ST клетки.

В другом специфическом аспекте осуществления изобретения, способ является таким, как описано в любой из вышеуказанных формулировок, где  
20 химический инактивирующий агент включает бинарный этиленимин.

В другом специфическом аспекте осуществления изобретения, способ является таким, как описано в любой из вышеуказанных формулировок, который дополнительно включает дополнительный характерный признак добавление адьюванта на основе эмульсии масло-в-воде EMULSIGEN® к антигену  
25 дельтакоронавируса свиней (PDCoV).

Настоящее изобретение дополнительно охватывает способ получения иммуногенной композиции, содержащей рекомбинантный антиген дельтакоронавируса свиней (PDCoV), как описано в любой из вышеуказанных формулировок, который включает: а.) экспрессию антигена дельтакоронавируса  
30 свиней (PDCoV) в клетке-хозяине, б.) получение антигена дельтакоронавируса свиней (PDCoV) из клеток; и в.) добавление адьюванта на основе эмульсии масло-в-воде к антигену дельтакоронавируса свиней (PDCoV) со стадии б).

В другом специфическом аспекте осуществления изобретения, способ является таким, как описано в вышеуказанной формулировке, где антиген

дельтакоронавируса свиней (PDCoV) включает: а.) изолированную нуклеиновую кислоту, которая кодирует антиген белка шиповидного отростка дельтакоронавируса свиней (PDCoV), где рекомбинантный полипептид шиповидного отростка имеет, по крайней мере, 90% гомологии с SEQ ID NO: 3, 7, 11, 17 или 27; б.) рекомбинантный вектор, включающий изолированную нуклеиновую кислоту в соответствии с а); в.) рекомбинантный белок шиповидного отростка дельтакоронавируса свиней (PDCoV), который кодируется нуклеиновой кислотой в соответствии с а); и г.) любую их комбинацию.

10 В другом специфическом аспекте осуществления изобретения, способ является таким, как описано в любой из вышеуказанных формулировок, где антиген дельтакоронавируса свиней (PDCoV) экспрессируется с помощью рекомбинантного бакуловирусного вектора.

15 В другом специфическом аспекте осуществления изобретения, способ является таким, как описано в любой из вышеуказанных формулировок, где антиген дельтакоронавируса свиней (PDCoV) экспрессируется в клетках насекомых.

20 В другом специфическом аспекте осуществления изобретения, способ является таким, как описано в любой из вышеуказанных формулировок, где, как дополнительный характерный признак, адьювант на основе эмульсии масло-в-воде представляет собой адьювант EMULSIGEN® на основе эмульсии масло-в-воде.

25 Настоящее изобретение дополнительно охватывает иммуногенную композицию, содержащую PDCoV, как описано в любой из вышеуказанных формулировок, для применения для уменьшения симптомов заболевания, связанного с дельтакоронавирусом свиней (PDCoV).

30 Настоящее изобретение дополнительно охватывает иммуногенную композицию, содержащую PDCoV и по крайней мере один дополнительный антиген, где по крайней мере один дополнительный антиген представляет собой антиген вируса эпидемической диареи свиней (PEDV) для применения для уменьшения симптомов заболевания, связанного с дельтакоронавирусом свиней (PDCoV) и/или вирусом эпидемической диареи свиней (PEDV).

В другом специфическом аспекте осуществления изобретения, иммуногенная композиция является такой, как описано в любой из

вышеуказанных формулировок, которая дополнительно включает один или несколько антигенов генотипа PEDV 2a, специфически PEDV является североамериканского происхождения.

5 В другом специфическом аспекте осуществления изобретения, иммуногенная композиция является такой, как описано в любой из вышеуказанных формулировок, которая дополнительно включает один или несколько антигенов PDCoV, где PDCoV является североамериканского происхождения.

10 Более обобщенно, разнообразие химических инактивирующих агентов, известных специалистам в данной области техники, может использоваться для инактивации вируса. Этиленмин и его родственные производные, такие, как бинарный этиленмин (BEI) и ацетилэтиленмин, представляют собой примеры приемлемых химических инактивирующих агентов для применения при инактивации вируса PED. Другие химические инактивирующие агенты, 15 например, бета-пропиолактон, альдегиды (такие, как формальдегид) и/или детергенты (например, Твин® детергент, Тритон® X или соли алкилтриметиламмония) могут также использоваться для инактивации вируса. Инактивация может осуществляться при использовании стандартных способов, известных специалисту в данной области техники. Образцы могут отбираться 20 через определенные периоды времени и подвергаться анализу на остаточный живой вирус. Мониторинг цитопатического эффекта на приемлемой линии клеток и/или флуоресцентное окрашивание при использовании приемлемого специфического моноклонального или поликлонального антитела может использоваться для определения присутствия остаточного живого вируса.

25 Инактивация с помощью BEI может быть достигнута путем соединения маточного раствора BEI (например, раствора, который получают путем прибавления 0,1–0,2 М гидробромида 2-бромэтиламина к 0,1–0,2 н. водному раствору NaOH) с содержащими вирус жидкостями до получения заключительной концентрации приблизительно 1–5 мМ BEI. Инактивацию 30 обычно осуществляют путем выдерживания смеси BEI-вирус при температуре 35–40°C (например, 37°C) при постоянном перемешивании в течение 24–72 часов. Инактивация вируса может быть остановлена путем прибавления раствора тиосульфата натрия до получения заключительной концентрации, превышающей концентрацию BEI (например, прибавление тиосульфата натрия в

количестве 17% от объема ВЕI для нейтрализации избытка ВЕI), после чего осуществляют перемешивание.

Иммуногенные композиции в соответствии с изобретением обычно включают адъювант и, если это является желательным, один или более эмульгаторов, таких, как Твин® детергент, введенный с инактивированным/убитым PEDV. Приемлемые адъюванты включают, например, солюбилизат ацетата витамина Е, гидроксид алюминия, фосфат алюминия или оксид алюминия, эмульсии (минерального) масла, неионные детергенты, сквален и сапонины. Другие адъюванты, которые могут использоваться, включают адъюванты на основе масла, такие, как полный адъювант Фрейнда (FCA) и неполный адъювант Фрейнда (FIA). Было обнаружено, что перекрестно-сшитые полимеры олефиновой ненасыщенной карбоновой кислоты, такие, как полимер CARBOPOL® 971, представляют собой особенно приемлемые адъюванты для применения в иммуногенных композициях инактивированного PEDV в соответствии с изобретением.

Примеры приемлемых эмульсий масло-в-воде представляют собой адъюванты на основе EMULSIGEN®, такие, как EMULSIGEN® (эмульсия масло-в-воде), EMULSIGEN-D® (масло-в-воде) с бромидом диметилдиоктадециламмония (DDA)), EMULSIGEN-P® (масло-в-воде) с приемлемым иммуностимулятором), EMULSIGEN-75® (двойной адъювант, включающий масло-в-воде) с перекрестно-сшитым полимером), и EMULSIGEN® - BCL (эмульсия масло-в-воде, которая не содержит компонентов животного происхождения) (MVP Technologies, Inc. Omaha, Nebr., США). Фармацевтические/вакцинные композиции, которые включают белки инактивированного PEDV или рекомбинантного PEDV, были эффективно дополнены адъювантами на основе эмульсий масло-в-воде, предпочтительно адъювантами на основе EMULSIGEN®, более предпочтительно EMULSIGEN® (эмульсия масло-в-воде, которая не содержит компонентов животного происхождения) и EMULSIGEN®-BCL (эмульсия масло-в-воде, которая не содержит компонентов животного происхождения).

Является предпочтительным рецептировать данные композиции в форме единичной дозы для облегчения введения и единообразия дозировки. Единичная дозированная форма, как используется в данной заявке, относится к физически дискретным единицам, пригодным в качестве единичных доз для субъектов-

млекопитающих, которых подвергают обработке; при этом каждая единица содержит заданное количество активного материала, рассчитанное на получение желаемого терапевтического эффекта, в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем. Характеристики для дозированных форм инактивированного/убитого PDCoV и/или PEDV, и/или рекомбинантно экспрессированных антигенов PDCoV и/или PEDV продиктованы и зависят от, среди прочих факторов, (а) уникальных свойств активного вещества и конкретного терапевтического эффекта, который должен быть достигнут; (б) ограничений, которые приняты в области приготовления смесей такого активного материала для лечения заболевания; и (в) способа предполагаемого введения лекарственной единичной дозированной формы.

Основной активный ингредиент, как правило, готовится в виде смеси для удобного и эффективного введения в эффективных количествах с подходящим фармацевтически приемлемым носителем в виде стандартной лекарственной формы, как описано в данной заявке. Стандартная лекарственная форма может, например, содержать антиген PDCoV и/или PEDV в количестве от 1 до приблизительно 5 единиц относительной активности («RPU»). Это количество антигена обычно присутствует в количестве от приблизительно 1 до приблизительно 25/мл носителя. В случае композиций, содержащих дополнительные активные ингредиенты, дозировки определяются путем ссылки на обычные дозы и способы введения дополнительных активных ингредиентов.

Вакцины в соответствии с настоящим изобретением типично включают инактивированный PDCoV и/или PEDV, рецептированный с фармацевтически приемлемым носителем. Фармацевтические формы, пригодные для инъекционного применения, обычно включают стерильные водные растворы (в случае растворимых в воде) или дисперсии и стерильные порошки для приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий непосредственно перед введением. Препарат желательно должен быть стерильным и жидким до такой степени, чтобы легко вводился с помощью простого шприца. Лекарственная форма должна быть стабильной в условиях производства и хранения и, как правило, защищена от загрязняющего воздействия микроорганизмов, таких, как бактерии и грибы. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий

полиэтиленгликоль и т. п.), их подходящие смеси и растительные масла. Один возможный носитель представляет собой физиологический раствор. Присущая раствору текучесть может поддерживаться, например, за счет использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и при использовании поверхностно-активных веществ. Предотвращение действия микроорганизмов может быть достигнуто с помощью различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты, тимеросалов (этил ртуть-тиосалицилат натрия), деомицина, гентамицина и подобных им. Во многих случаях может быть предпочтительным включать в композицию изотонические агенты, например, сахара или хлорид натрия. Пролонгированное поглощение инъеклируемых композиций, при желании, может быть достигнуто за счет использования в композициях агентов, задерживающих абсорбцию, например, моностеарата алюминия и желатина.

Стерильные инъекционные растворы могут быть приготовлены путем введения инактивированного вируса в необходимом количестве в соответствующем растворителе с различными другими ингредиентами, как перечислено выше, в случае необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. Как правило, дисперсии могут быть приготовлены путем включения различных активных ингредиентов в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и требуемые другие ингредиенты из тех, которые перечислены выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов предпочтительными способами получения являются вакуумная сушка и метод сушки вымораживанием, которые обеспечивают получение порошка активного ингредиента плюс любой дополнительный желательный ингредиент из предварительно стерилизованного фильтрованием раствора.

Также может быть предпочтительным добавление стабилизатора к композициям в соответствии с настоящим изобретением для улучшения стабильности инактивированного вируса. Подходящие стабилизаторы включают, например, глицерин/ЭДТА, углеводы (такие, как сорбит, маннит, трегалоза, крахмал, сахароза, декстран или глюкоза), белки (такие, как альбумин или казеин) и продукты разложения белка (например, частично гидролизированный желатин). Если это является желательным, то препарат может забуферен с

помощью способов, известных в данной области техники, при использовании реагентов, таких, как фосфаты щелочных металлов, например, вторичный кислый фосфат натрия, первичный кислый фосфат натрия, вторичный кислый фосфат калия и или первичный кислый фосфат калия. Другие растворители, такие, как этанол или пропиленгликоль, могут быть использованы для увеличения растворимости ингредиентов в составе вакцинного препарата и/или стабильности раствора. Дополнительные добавки, которые могут быть использованы в препарате в соответствии с настоящей заявкой, включают обычные антиоксиданты и обычные хелатирующие агенты, такие, как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА).

Композиции и способы в соответствии с настоящим изобретением могут быть проиллюстрированы следующими примерами, которые приводятся для иллюстрации настоящего изобретения, и для того, чтобы помочь обычному специалисту осуществить и использовать то же самое. Эти примеры не предназначены каким-либо образом для сужения или иного ограничения объема настоящего изобретения.

Осуществление данного изобретения будет использовать, если не указано иное, традиционные методики молекулярной биологии, микробиологии, методику рекомбинантной ДНК, белковой химии и иммунологии, которые являются известными специалисту в данной области техники. Такие методики полностью объясняются в литературе. Смотри, например, Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, тома I, II и III, второе изд. (1989); *DNA Cloning*, тома I и II (D. N. Glover ред. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait ред. 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B. D. Hames & S. J. Higgins ред. 1984); *Animal Cell Culture* (R. K. Freshney, ред., 1986); *Immobilized Cells and Enzymes* (IRL press, 1986); Perbal, B., *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); серии *Methods In Enzymology* (S. Colowick и N. Kaplan ред., Academic Press, Inc.); *Protein purification methods – a practical approach* (E.L.V. Harris и S. Angal, ред., IRL Press at Oxford University Press); и *Handbook of Experimental Immunology*, тома I-IV (D. M. Weir и C. C. Blackwell ред., 1986, Blackwell Scientific Publications).

Следует понимать, что данное изобретение не ограничивается конкретными ДНК, РНК, полипептидными последовательностями, и параметры процесса как таковые, конечно, также могут варьировать. Кроме того, следует понимать, что

терминология, используемая в настоящей заявке, предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления изобретения и не предназначена для ограничения изобретения. Следует отметить, что, как используется в данном описании и прилагаемой формуле изобретения, формы единственного числа  
5 включают в себя множественное число, если содержание ясно не указывает на иное. Таким образом, например, ссылка на «антиген» включает в себя смесь двух или более антигенов; ссылка на «инертный наполнитель» включает смеси двух или более вспомогательных веществ и тому подобное.

**Определения:**

10 Если не указано иное, то все технические и научные термины, используемые в данной заявке, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области техники, к которой это изобретение относится, на момент подачи заявки. Смысл и объем применения терминов должен быть понятным; однако, в случае какой-либо скрытой неопределенности,  
15 определения, приведенные в настоящей заявке, имеют преимущества по отношению к любому словарю или внешнему определению. Дополнительно, если иное не требуется по контексту, то термины в единичном числе будут включать в себя множества, и множественные термины будут включать в себя единственное число. При этом использование союзов «или» означает «и/или»,  
20 если не указано иное. Кроме того, использование термина «включая», а также другие формы такие, как «включает» и «включающий» не является ограничивающими. Все патенты и публикации, упомянутые в данной заявке, включены в данное описание в качестве ссылки.

«Защита от заболевания», «протективный иммунитет», «функциональный  
25 иммунитет» и подобные фразы, означают реакцию против заболевания или состояния, полученную путем введения одного или более терапевтических композиций в соответствии с настоящим изобретением или их комбинацию, что приводит к меньшему количеству вредных эффектов, чем можно было бы ожидать у неиммунизированного субъекта, который подвергся воздействию  
30 болезни или инфекции. То есть, тяжесть пагубных последствий инфекции уменьшается у вакцинированного субъекта. Инфекция может быть уменьшена, замедлена или, возможно, полностью предотвращена, у вакцинированного субъекта. При этом когда подразумевается полное предотвращение инфекции,

оно конкретно указывается. Если полное предотвращение не указано, то термин включает в себя частичное предотвращение.

В данной заявке термин «снижение частоты возникновения и/или тяжести клинических признаков» или «снижение клинических симптомов» означает, но не ограничивается такими, как сокращение числа инфицированных субъектов в группе, уменьшение или устранение количества субъектов, которые проявляют клинические признаки инфекции, или снижение тяжести каких-либо клинических симптомов, которые присутствуют у одного или нескольких субъектов, по сравнению с инфекцией дикого типа. Например, это должно относиться к любому снижению патогенной нагрузки, выделению патогена, снижению передачи патогена или уменьшению любого клинического признака и симптоматики PEDV. Предпочтительно, чтобы эти клинические признаки снижались у одного или более субъектов, получающих терапевтическую композицию в соответствии с настоящим изобретением, по крайней мере, на 10% по сравнению с субъектами, которые не получают композицию и становятся зараженными. Более предпочтительно, когда клинические признаки снижаются у пациентов, которые получают композицию в соответствии с настоящим изобретением, по крайней мере, на 20%, предпочтительно, по крайней мере, на 30%, более предпочтительно, по крайней мере, на 40%, а еще более предпочтительно, по крайней мере, на 50%.

Термин «повышенная защита» в данной заявке означает, но не ограничивается таким, как статистически значимое снижение одного или более клинических симптомов, которые связаны с инфекцией или инфекционным агентом, предпочтительно PDCoV и/или PEDV, в группе вакцинированных субъектов против невакцинированной контрольной группы субъектов. Термин «статистически значимое снижение клинических симптомов» означает, но не ограничивается таким, как тот случай, когда частота возникновения, по крайней мере, одного клинического симптома в группе вакцинированных субъектов является, по крайней мере, на 10%, предпочтительно, на 20%, более предпочтительно на 30%, еще более предпочтительно на 50%, и еще более предпочтительно на 70% ниже, чем в невакцинированной контрольной группе после заражения инфекционным агентом.

«Длительная защита» относится к «улучшенной эффективности», которая сохраняется в течение, по крайней мере, 3-х недель, еще более предпочтительно,

по крайней мере, 3 месяцев, еще более предпочтительно, по крайней мере, 6 месяцев. В случае домашнего скота наиболее предпочтительно, когда длительная защита будет сохраняться до достижения среднего возраста, в котором животные продаются на мясо.

5 “Иммуногенная или иммунологическая композиция” относится к рассматриваемой композиции, которая включает по крайней мере один дельтакоронавирус свиней и/или вирус эпидемической диареи свиней и/или их иммуногенные части, которая вызывает иммунологический ответ у хозяина (опосредованный клетками или антителами иммунный ответ на композицию. В  
10 предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, иммуногенная композиция индуцирует иммунный ответ и, более предпочтительно, обеспечивает протективный иммунитет против одного или более клинических признаков инфекции PDCoV и/или PEDV.

Иммуногенная композиция, как используется в настоящей заявке, также  
15 относится к композиции, которая включает любой из полипептидов шиловидного отростка PDCoV и/или PEDV, описанных в настоящей заявке. В соответствии с дальнейшим вариантом осуществления, такая иммуногенная композиция дополнительно включает по крайней мере часть вирусного вектора, экспрессирующего указанный белок шиловидного отростка PDCoV и/или PEDV,  
20 предпочтительно рекомбинантного бакуловируса. Кроме того, иммуногенная композиция может включать I) любой из белков PDCoV или PEDV, описанных выше, предпочтительно в концентрациях, описанных выше, II) по крайней мере часть вирусного вектора, экспрессирующего указанный белок шиловидного отростка PDCoV и/или PEDV, предпочтительно рекомбинантного бакуловируса,  
25 и III) часть клеточного супернатанта.

Таким образом, в соответствии с одним аспектом, настоящее изобретение относится к способу снижения процента инфекции PDCoV и/или PEDV в стаде свиней, который включает стадию введения указанной свинье (свиньям) эффективного количества антигена шиловидного отростка PDCoV и/или PEDV  
30 или иммуногенной композиции, содержащей PDCoV и/или антиген PEDV, где PDCoV и/или антиген PEDV представляет собой рекомбинантный антиген шиловидного отростка PDCoV и/или PEDV, предпочтительно бакуловирус, экспрессирующий белок шиловидного отростка PDCoV и/или PEDV. Предпочтительно, когда такой рекомбинантный или экспрессируемый

бакуловирусом шиловидный отросток PDCoV и/или PEDV имеет последовательности, как описано в настоящей заявке.

«Иммунный ответ» или «иммунологический ответ» означает, но не ограничиваясь таким, как развитие опосредованного клетками и/или антителами иммунного ответа на представляющую интерес композицию или вакцину. Как правило, иммунный или иммунологический ответ включает, но не ограничиваясь таким, как один или несколько из следующих эффектов: выработка или активация антител, В-клеток, Т-клеток хелперов, Т-клеток супрессоров и/или цитотоксических Т-клеток, специфически направленных на антиген или антигены, который(ые) включен(ы) в представляющую интерес композицию или вакцину. Предпочтительно организм хозяина должен вырабатывать либо терапевтический, либо протективный иммунологический (вторичный иммунный ответ) ответ так, чтобы повышалась устойчивость к новой инфекции и/или снижалась клиническая тяжесть заболевания. Такое защитное действие может быть продемонстрировано либо снижением количества симптомов, тяжести симптомов, либо отсутствием описанных одного или более симптомов, ассоциированных с инфекцией патогеном, замедлением начала вирусемии, снижением персистенции вируса, снижением общей вирусной нагрузки и/или снижением экскреции вируса.

"Иммунологически защитное количество" или "иммунологически эффективное количество" или "эффективное количество для продуцирования иммунного ответа" антигена представляет собой количество, эффективное для индуцирования иммуногенного ответа у реципиента. Иммуногенный ответ может быть достаточным для диагностических целей или другого тестирования, или может быть адекватным для предотвращения признаков или симптомов заболевания, включая неблагоприятные воздействия на здоровье или их осложнения, вызываемые инфицированием возбудителя заболевания. Может быть индуцирован либо гуморальный иммунитет или клеточно-опосредованный иммунитет, или оба варианта. Иммуногенный ответ животного на иммуногенную композицию может быть оценен, например, опосредованно путем измерения титров антител, исследований пролиферации лимфоцитов, или непосредственно путем мониторинга признаков и симптомов после контрольного заражения штаммом дикого типа, в то время как защитный иммунитет, придаваемый вакциной, может быть оценен, например, путем

измерения уменьшения клинических признаков, таких как смертность, заболеваемость, температурные показатели, общее физическое состояние, и общее состояние здоровья и общие показатели у субъекта. Иммунный ответ может включать, но не ограничиваясь только ими, индукцию клеточного и/или гуморального иммунитета. "Иммуногенный" обозначает индуцирование иммунного или антигенного ответа. Таким образом, иммуногенной композицией будет являться любая композиция, которая индуцирует иммунный ответ.

"Терапевтически эффективное количество" относится к количеству антигена или вакцины, которое будет индуцировать иммунный ответ у субъекта, получившего антиген или вакцину, который является адекватным для предотвращения или уменьшения клинических признаков или симптомов заболевания, включая неблагоприятные воздействия на здоровье или их осложнения, вызываемых инфицированием патогеном, таким как вирус или бактерия. Может быть индуцирован гуморальный иммунитет или клеточно-опосредованный иммунитет, или оба типа, как гуморальный, так и клеточно-опосредованный иммунитет. Иммуногенный ответ животного на вакцину может быть оценен, например, опосредованно путем определения титров антител, исследования пролиферации лимфоцитов, или непосредственно путем мониторинга признаков и симптомов после контрольного заражения штаммом дикого типа. Защитный иммунитет, придаваемый вакциной, может быть оценен путем измерения, например, уменьшения клинических признаков, таких как смертность, заболеваемость, температурные показатели, общее физическое состояние, и общее состояние здоровья и общие показатели у субъекта. Количество вакцины, которое является терапевтически эффективным, может изменяться в зависимости от конкретного используемого адъюванта, конкретного используемого антигена, или состояния субъекта, и может быть определено квалифицированным специалистом в данной области техники.

Как используется в данной заявке, термин «фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель» включает, но не ограничивается такими, как любой или все растворители, дисперсионные среды, материалы для покрытия, адъюванты, стабилизирующие агенты, разбавители, консерванты, антибактериальные и противогрибковые агенты, агенты для придания изотоничности, замедляющие адсорбцию агенты и подобные им. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления изобретения, а в частности, в

случае лиофилизированных иммуногенных композиций стабилизирующие агенты для применения в данном изобретении включают стабилизаторы для лиофилизации или высушивания замораживанием.

5 В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция в соответствии с данным изобретением содержит адъювант. «Адъюванты», как используется в данной заявке, могут включать гидроксид алюминия и фосфат алюминия, сапонины, например, Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL), эмульсию вода-в-масле, эмульсию масло-в-воде, эмульсию вода-в-масле-в-воде.

10 Основой эмульсии может являться, в частности, легкое жидкое парафиновое масло (соответствующее Европейской Фармакопеи); изопреноидное масло, такое как сквалан или сквален; масло, образовавшееся в результате олигомеризации алкенов, в частности, изобутена или децена; эстеры кислот или спиртов, содержащие линейную алкильную группу, в частности, растительные масла, этилолеат, ди(каприлат/капрат) пропиленгликоля, три-  
15 (каприлат/капрат) глицерина или диолеат пропиленгликоля; эстеры разветвленных жирных кислот или спиртов, в частности, эстеры изостеариновой кислоты. Масла применяют в сочетании с эмульгаторами для получения эмульсии. Эмульгаторы предпочтительно представляют собой неионогенные  
20 поверхностно-активные вещества, в частности, сложные эстеры сорбитана, маннида (например, безводный маннитолеат), гликоля, полиглицерина, пропиленгликоля и олеиновой, изостеариновой, рицинолеиновой или гидроксистеариновой кислоты, которые необязательно являются этоксилированными, и блок-сополимеры полиоксипропилена-полиоксиэтилена,  
25 в частности, продукты типа Pluronic, в частности, L121. Смотри Hunter и др., The Theory and Practical Application of Adjuvants, под ред. Stewart-Tull D. E. S., изд-во John Wiley and Sons, NY, с.51-94, 1995 и Todd и др., Vaccine 15, стр. 564-570 (1997).

30 Примеры приемлемых эмульсий масло-в-воде представляют собой адъюванты на основе EMULSIGEN®, такие, как EMULSIGEN® (эмульсия масло-в-воде (м/в)), EMULSIGEN-D® (масло-в-воде (м/в) с бромидом диметилдиоктадециламмония (DDA)), EMULSIGEN-P® (масло-в-воде (м/в) с приемлемым иммуностимулятором), EMULSIGEN-75® (двойной адъювант, который включает масло-в-воде (м/в) с перекрестно-сшитым полимером), и

EMULSIGEN®-BCL (эмульсия масло-в-воде, которая является свободной от компонентов животного происхождения) (MVP Laboratories, Inc. Omaha, Nebr., USA). Фармацевтические/вакцинные композиции, которые включают белки инактивированного PDCoV, инактивированного PEDV и/или рекомбинантного PDCoV и/или PEDV, были эффективно дополнены адъювантами эмульсий масло-в-воде, предпочтительно адъювантами на основе EMULSIGEN®, более предпочтительно EMULSIGEN® (эмульсия масло-в-воде (м/в)) и/или EMULSIGEN®-BCL (эмульсия масло-в-воде, которая не содержит компонентов животного происхождения).

10           Примеры приемлемых гелей адсорбента на основе гидроксида алюминия для применения в ветеринарных вакцинах включают REHYDRAGEL®, REHYDRAGEL-CG®;           REHYDRAGEL-LV;           REHYDRAGEL-HPA; REHYDRAPHOS (General Chemical, Berkeley Heights, Нью Джерси, США)

15           Другим примером адъюванта является соединение, выбранное из полимеров акриловой или метакриловой кислоты и сополимеров малеинового ангидрида и алкенильной производной. Предпочтительными адъювантами являются полимеры акриловой или метакриловой кислоты, в частности, сшитые с простыми полиалкениловыми эфирами сахаров или многоатомными спиртами. Эти соединения являются известными под названием карбомеры (Pharmeuropa  
20           том 8, №. 2, июнь 1996). Специалистов в данной области техники также можно отослать к патенту США № 2909462, в котором описаны указанные акриловые полимеры, перекрестно сшитые с полигидроксилированным соединением, которое имеет, по крайней мере, 3 гидроксильные группы, предпочтительно не более 8, при этом атомы водорода, по крайней мере, трех гидроксильных групп  
25           замещены ненасыщенными алифатическими радикалами, которые имеют, по крайней мере, 2 атома углерода. Предпочтительными являются радикалы, которые содержат от 2 до 4 атомов углерода, например, винильные, аллильные и другие ненасыщенные группы ряда этилена. Ненасыщенные радикалы могут сами по себе содержать другие заместители, такие, как метил. Наиболее  
30           предпочтительными являются продукты, поступающие в продажу под названием CARBOPOL.RTM. (также являются известными как полиакриловая кислота) (BF Goodrich, Огайо, США). Их сшивают с аллилсахарозой или аллилпентаэритритолом. Среди них, прежде всего, следует упомянуть CARBOPOL.RTM. 974P (также является известным как полиакриловая кислота),

CARBOPOL.RTM. 934P (также является известным как полиакриловая кислота) и CARBOPOL.RTM. 971P (также является известным как полиакриловая кислота). Наиболее предпочтительным для применения является CARBOPOL.RTM. 971P (также является известным как полиакриловая кислота).

5 Среди сополимеров малеинового ангидрида и производной алкенила следует упомянуть сополимеры ЕМА (Monsanto), которые представляют собой сополимеры малеинового ангидрида и этилена. Растворение этих полимеров в воде приводит к получению кислого раствора, который будет подвергаться  
10 нейтрализации, предпочтительно физиологического значения рН, для того, чтобы получить раствор адьюванта, в который будет вводиться иммуногенная, иммунологическая или вакцинная композиция, предпочтительно в количествах от приблизительно 500 мкг до приблизительно 5 мг на дозу, еще более предпочтительно в количестве от приблизительно 750 мкг до приблизительно 2,5 мг на дозу и наиболее предпочтительно в количестве приблизительно 1 мг на  
15 дозу.

Дополнительно приемлемые адьюванты включают, но не ограничены такими, как адьювантная система RIBI (Ribi Inc.), блок-сополимер (CytRx, Atlanta Ga.), SAF-M (Chiron, Emeryville Calif.), монофосфорил липид А, адьювант на основе авридин липид амина, термолабильный энтеротоксин из E.  
20 coli (рекомбинантной или иной), холерный токсин или мурамил дипептид, среди многих других.

Предполагается, что адьювант может быть добавлен в количестве от приблизительно 100 мкг до приблизительно 10 мг на дозу, предпочтительно в количестве от приблизительно 100 мкг до приблизительно 10 мг на дозу, более  
25 предпочтительно в количестве от приблизительно 500 мкг до приблизительно 5 мг на дозу, даже более предпочтительно в количестве от приблизительно 750 мкг до приблизительно 2,5 мг на дозу, и наиболее предпочтительно в количестве приблизительно 1 мг на дозу. В альтернативном варианте адьювант может использоваться в концентрации от приблизительно 0,01 до 50%,  
30 предпочтительно при концентрации от приблизительно 2% до 30%, более предпочтительно при концентрации от приблизительно 5% до 25%, еще более предпочтительно при концентрации от приблизительно 7% до 22% и наиболее предпочтительно при концентрации от 10% до 20% от объема заключительного продукта.

«Разбавители» могут включать воду, физиологический раствор, декстрозу, этанол, глицерин и т. п. Агенты для придания изотоничности могут представлять собой, среди прочих, хлорид натрия, декстрозу, маннит, сорбит и лактозу. Стабилизаторы включают, среди прочих, альбумин и соли щелочных металлов и этилендиамин тетрауксусной кислоты.

«Изолированный» означает измененный «рукой человека» по сравнению с природным состоянием, то есть, если он существует в природе, то он является измененным или выделенным из своего природного окружения или и то, и другое. Например, полинуклеотид или полипептид, который в природе присутствует в живом организме, не является «изолированным», но тот же полинуклеотид или полипептид, отделенный от существующих с ним вместе материалов его природного состояния является «изолированным», так, как этот термин используется в данной заявке.

«Безопасность» относится к отсутствию вредных последствий у вакцинированного животного после вакцинации, включающих, но без ограничения таковыми, как: потенциальная реверсия вакцины на основе вируса до вирулентной, клинически значимые побочные эффекты такие, как стойкое, системное заболевание или неприемлемое воспаление в месте введения вакцины.

Термины «вакцинация» или «вакцинирование» или их варианты, как используется в данной заявке, означают, но без ограничения таковыми, как процесс, который включает введение иммуногенной композиции в соответствии с изобретением так, что при введении животному она вызывает или является способной вызвать - непосредственно или опосредованно - иммунный ответ у животного против PDCoV и/или PEDV.

«Смертность» в контексте настоящего изобретения относится к гибели, вызванной инфекцией PDCoV, инфекцией PEDV, и/или совместной инфекцией PDCoV и PEDV и включает ситуацию, когда инфекция является настолько тяжелой, что животное подвергается эвтаназии для того, чтобы предотвратить страдания и обеспечить гуманный конец его жизни.

В данной заявке «эффективная доза» означает, но не ограничено таким, количество антигена, которое вызывает или способно вызвать иммунный ответ, который приводит к снижению клинических симптомов у животного, которому был введен антиген.

«Идентичность последовательности», как является известным в данной области техники, относится к отношению между двумя или более полипептидными последовательностями или двумя или более полинуклеотидными последовательностями, а именно между эталонной последовательностью и данной последовательностью, которая сравнивается с эталонной последовательностью. Идентичность последовательности определяется путем сравнения данной последовательности с эталонной последовательностью после того, как последовательности будут оптимально выровнены, чтобы получить самую высокую степень сходства последовательностей, как это определяется путем сравнения строк между такими цепочками последовательностей. При таком выравнивании идентичность последовательности определяют на основе сравнения позиция-к-позиции, например последовательности являются «идентичными» в определенном положении, если в этом положении нуклеотиды или аминокислотные остатки являются идентичными. Общее число таких идентичных положений затем делится на общее число нуклеотидов или остатков в эталонной последовательности, чтобы получить % идентичности последовательности. Идентичность последовательностей можно легко рассчитать с помощью известных способов, которые включают, но не ограничиваются такими, как те, которые описаны в Computational Molecular Biology, Lesk, A. N., ред., Oxford University Press, New York (1988), Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ред., Academic Press, New York (1993); Computer Analysis of Sequence Data, Часть I, Griffin, A.M., и Griffin, H. G., ред., Humana Press, New Jersey (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinge, G., Academic Press (1987); Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. и Devereux, J., ред., M. Stockton Press, New York (1991); и Carillo, H., и Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988), описание которых является введенным в данную заявку в качестве ссылки. Предпочтительные способы определения идентичности последовательностей предназначены для того, чтобы обеспечить самое большое совпадение между исследуемыми последовательностями. Способы определения идентичности последовательности кодифицированы в общедоступных компьютерных программах, определяющих идентичность последовательности между заданными последовательностями. Примерами таких программ включают, но не ограничены такими, как пакет программ GCG (Devereux, J., и др. Nucleic

Acids Research, 12(1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN и FASTA (Altschul, S. F. и др. J. Molec. Biol., 215: 403-410 (1990). BLAST является доступной от NCBI и других источников (BLAST Manual, Altschul, S. и др. NCVI NLM NIH Bethesda, MD 20894, Altschul, S. F. и др. J. Molec. Biol., 215: 403-410 (1990), описание которых является введенным в данную заявку в качестве ссылки). Эти программы позволяют осуществлять оптимальное выравнивание последовательностей с помощью параметров по умолчанию, таких как вес пробела, для того, что получать наиболее высокий уровень идентичности последовательностей для рассматриваемой последовательности и эталонной последовательности. В качестве иллюстрации: когда упоминается полинуклеотид, нуклеотидная последовательность которого является, по меньшей мере, на 85%, предпочтительно на 90%, еще более предпочтительно на 95% «идентичной последовательности» эталонной нуклеотидной последовательности, то подразумевается, что нуклеотидная последовательность данного полинуклеотида является идентичной эталонной последовательности за исключением того, что данная полинуклеотидная последовательность может включать вплоть до 15, предпочтительно вплоть до 10, еще более предпочтительно вплоть до 5 точечных мутаций на каждые 100 нуклеотидов нуклеотидной эталонной последовательности. Другими словами, для того, чтобы полинуклеотид имел нуклеотидную последовательность, идентичную, по крайней мере, на 85%, предпочтительно на 90%, еще более предпочтительно на 95% нуклеотидной эталонной последовательности, вплоть до 15%, предпочтительно 10%, еще более предпочтительно 5% нуклеотидов в эталонной последовательности можно удалять путем делеции или заменять на другой нуклеотид, или вплоть до 15% нуклеотидов, предпочтительно 10%, еще более предпочтительно 5% от общего количества нуклеотидов в эталонной последовательности можно встраивать в эталонную последовательность. Эти мутации эталонной последовательности могут иметь место на 5'- или 3'-конце эталонной нуклеотидной последовательности или в любом положении между этими концами, либо могут находиться индивидуально среди нуклеотидов в эталонной последовательности, либо в виде одной, либо нескольких смежных групп в эталонной последовательности. Аналогично этому, под полипептидом, который имеет данную аминокислотную последовательность, идентичную, по крайней мере, на 85%, предпочтительно на 90%, еще более

предпочтительно на 95%, эталонной аминокислотной последовательности, подразумевают то, что рассматриваемая аминокислотная последовательность полипептида является идентичной эталонной последовательности за исключением того, что рассматриваемая полипептидная последовательность может включать вплоть до 15, предпочтительно вплоть до 10, еще более предпочтительно вплоть до 5 аминокислотных замен на каждые 100 аминокислот аминокислотной эталонной последовательности. Другими словами, для получения данной полипептидной последовательности, которая является, по крайней мере, на 85%, предпочтительно на 90%, еще более предпочтительно на 95% идентичной эталонной аминокислотной последовательности, вплоть до 15%, предпочтительно вплоть до 10%, еще более предпочтительно вплоть до 5% аминокислотных остатков в эталонной последовательности можно удалять путем делеции или заменять на другие аминокислоты, или вплоть до 15% аминокислот, предпочтительно вплоть до 10%, еще более предпочтительно вплоть до 5% от общего количества аминокислотных остатков в эталонной последовательности можно встраивать в эталонную последовательность. Эти изменения эталонной последовательности могут иметь место на амино- или карбокситерминальном конце эталонной аминокислотной последовательности или в любом положении между этими концевыми положениями, либо могут находиться индивидуально среди остатков в эталонной последовательности, либо в виде одной или нескольких смежных групп в эталонной последовательности. Предпочтительно, положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. Однако консервативные замены не включаются как совпадения при определении гомологии последовательностей.

«Консервативная замена» относится к замене аминокислотного остатка или нуклеотида на другой аминокислотный остаток или нуклеотид, имеющий сходные характеристики или свойства, включая размер, гидрофобность и т.д., в результате чего общая функциональность не изменяется существенно.

«Гомология последовательности» в контексте настоящего описания относится к способу определения родства двух последовательностей. Для определения гомологии последовательностей две или большее количество последовательностей подвергают оптимальному выравниванию и, при необходимости, вводят пробелы. Другими словами, для того чтобы полипептид

или полинуклеотид имел 95% гомологии последовательности с эталонной последовательностью, 85%, предпочтительно 90%, еще более предпочтительно 95% аминокислотных остатков или нуклеотидов в эталонной последовательности должны соответствовать или содержать консервативную замену на другую аминокислоту или нуклеотид, или количество аминокислот или нуклеотидов, составляющее вплоть до 15%, предпочтительно вплоть до 10%, еще более предпочтительно вплоть до 5% от общего количества аминокислотных остатков или нуклеотидов, не включая консервативные замены, в эталонной последовательности можно встраивать в эталонную последовательность. Предпочтительно гомологичная последовательность содержит, по крайней мере, участок, который состоит из 50, еще более предпочтительно из 100, еще более предпочтительно из 250, еще более предпочтительно из 500 нуклеотидов.

Термины «идентичность последовательности» или «процент идентичности» используются в данной заявке попеременно. Для целей настоящего изобретения, в данной заявке определено, что для того, чтобы определить процент идентичности двух аминокислотных последовательностей или двух последовательностей нуклеиновых кислот, последовательности выравнивают с целью оптимального сравнения (например, могут быть введены пробелы в последовательность первой аминокислотной или нуклеиновокислотной последовательностей для оптимального выравнивания со второй аминокислотной или нуклеиновокислотной последовательностью). Аминокислотные остатки или нуклеотиды в соответствующих аминокислотных или нуклеотидных положениях затем подвергают сравнению. Когда положение в первой последовательности занимает тот же аминокислотный остаток или нуклеотид, что и в соответствующем положении во второй последовательности, то молекулы являются идентичными в этом положении. Процент идентичности между двумя последовательностями представляет собой функцию количества идентичных положений, которые являются общими для последовательностей (т.е., % идентичности = количество идентичных положений / общее количество положений (т.е. перекрывающихся положений) x 100). Предпочтительно, когда две последовательности имеют одинаковую длину. Когда идентичность последовательности используется по отношению к белкам, то признается, что положения остатков, которые не являются идентичными, часто отличаются

консервативными аминокислотными заменами, где аминокислотные остатки замещены на другие аминокислотные остатки со сходными химическими свойствами (например, заряда или гидрофобности), и поэтому не изменяют функциональные свойства молекулы. Когда последовательности различаются консервативными заменами, то процент идентичности последовательности может быть скорректирован в сторону повышения для коррекции консервативного характера замещения. О последовательностях, которые отличаются такими консервативными заменами, говорят, что они имеют «подобие последовательностей» или «подобие».

Сравнение последовательности может быть осуществлено по всей длине двух последовательностей, которые подвергаются сравнению, или на фрагменте двух последовательностей. Как правило, сравнение будет осуществляться по всей длине двух последовательностей, которые подвергаются сравнению. Тем не менее, идентичность последовательности может проводиться на участке, который содержит, например, двадцать, пятьдесят, сто или более смежных аминокислотных остатков.

Специалист в данной области техники сможет оценить тот факт, что несколько различных компьютерных программ доступны для определения гомологии между двумя последовательностями. Например, сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя последовательностями может быть выполнено при использовании математического алгоритма. В предпочтительном воплощении процент идентичности между двумя аминокислотными или нуклеиновокислотными последовательностями определяется при использовании алгоритма Needleman и Wunsch (J. Mol. Biol. (48): 444-453 (1970)), который является введенным в программу GAP в пакете программного обеспечения Accelrys GCG (является доступным на <http://www.accelrys.com/products/gcg/>), при использовании либо Blosum 62 матрикса, либо PAM250 матрикса, веса пробела 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и веса длины 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Специалисту в данной области техники будет понятно, что все эти различные параметры будут давать несколько различающиеся результаты, но что общий процент идентичности двух последовательностей существенно не изменяется при использовании различных алгоритмов.

Белковые последовательности или последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с данным изобретением могут дополнительно использоваться в качестве «последовательности поискового запроса» для осуществления поиска в общедоступных базах данных, например, для 5 идентификации других членов семейства или родственных последовательностей. Такие поиски могут осуществляться при использовании программ BLASTN и BLASTP (версия 2.0) от Altschul, и др. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. BLAST поиски белка могут осуществляться при использовании программы BLASTP, балл = 50, длина слова = 3 для получения аминокислотных последовательностей, 10 гомологичных молекулам белка в соответствии с изобретением. Для получения выравниваний с пробелами для целей сравнения, может использоваться Gapped BLAST, как описано у Altschul и др. (1997) Nucleic Acids Res. 25(17): 3389-3402. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST могут использоваться параметры по умолчанию соответствующих программ (например, BLASTP и 15 BLASTN). Смотри домашнюю страницу Национального центра по биотехнологической информации на <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Заявленный PEDV в соответствии с изобретением будет также охватывать варианты изолята PEDV 1251-125-10 («125-10») и варианты его субфрагментов. Такие варианты имеют существенно такие же иммунологические свойства, 20 которые являются характерными для штамма Oklahoma (SEQ ID NO 29 и 34). Термин «имеющий существенно такие же иммунологические свойства» охватывает (но не ограничен таковыми) те указанные варианты, которые являются существенно эффективными в лечении или предотвращении клинических признаков, которые вызваны PEDV, как описывается ниже, или в 25 улучшении параметров так, как описано ниже.

Заявленный PDCoV в соответствии с изобретением будет также охватывать варианты PDCoV изолятов NSVL, PDCoV 2.0307, и PDCoV 5.0327 и варианты их субфрагментов. Такие варианты имеют по существу такие же иммунологические свойства, как и характерные свойства штамма NSVL (SEQ ID NO: 1 и 2), и 30 изоляты PDCoV 2.0307 (SEQ ID NO:5 и 6) и PDCoV 5.0327 (SEQ ID NO:9 и 10). Термин “имеющий существенно такие же иммунологические свойства” охватывает (но не ограничиваясь ими) те указанные варианты, которые являются существенно эффективными для лечения или предотвращения клинических признаков, вызываемых PDCoV, как описано в настоящей заявке, или для

улучшения параметров эффективности, как описано в настоящей заявке. Кроме различных штаммов PDCoV, которые могут использоваться в вакцине, также в вакцине могут использоваться антигены рекомбинантного белка шиловидного отростка, включая их субфрагменты. Аналогичным образом, типичные последовательности белка шиловидного отростка включают, но не ограничены таковыми, те, которые по существу имеют такие же иммунологические свойства, что и изоляты PDCoV или 'варианты', перечисленные ниже.

Термин "вариант" по отношению к последовательностям PDCoV (SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12,17, 18, 27 и 28) или последовательностям PEDV SEQ ID NO:29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 46, 47, 52, и 53) (например, последовательности полипептида или нуклеиновой кислоты) предназначен для понимания существенно подобных последовательностей. Для нуклеотидных последовательностей, которые включают открытую рамку считывания, варианты включают те последовательности, которые благодаря вырожденности генетического кодируют идентичные аминокислотные последовательности нативного белка. Вариант нуклеотидных последовательностей также включает нуклеотидные последовательности, которые имеют синтетическое происхождение, такие, как те, которые получены, например, при использовании сайт-направленного мутагенеза, и для открытых рамок считывания кодирующих нативный белок, а также те, которые кодируют полипептид, который имеет аминокислотные замены, родственные с нативным белком с целью оптимизации кодонов. В общем случае варианты нуклеотидной последовательности в соответствии с изобретением будут иметь, по крайней мере по крайней мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, или 89%, более предпочтительно по крайней мере 90%, 91%, 92%, 93%, или 94%, и наиболее предпочтительно по крайней мере 95%, 96%, 96,1%, 96,2%, 96,3%, 96,4%, 96,5%, 96,6%, 96,7%, 96,8%, 96,9%, 97%, 97,1%, 97,2%, 97,3%, 97,4%, 97,41%, 97,42%, 97,43%, 97,44%, 97,45%, 97,46%, 97,47%, 97,48%, 97,49%, 97,5%, 97,51%, 97,52%, 97,53%, 97,54%, 97,55%, 97,56%, 97,57%, 97,58%, 97,59%, 97,6%, 97,61%, 97,62%, 97,63%, 97,64%, 97,65%, 97,66%, 97,67%, 97,68%, 97,69%, 97,7%, 97,71%, 97,72%, 97,73%, 97,74%, 97,75%, 97,76%, 97,77%, 97,78%, 97,79%, 97,8%, 97,81%, 97,82%, 97,83%, 97,84%, 97,85%, 97,86%, 97,87%, 97,88%, 97,89%, 97,9%, 97,91%, 97,92%, 97,93%, 97,94%, 97,95%, 97,96%, 97,97%, 97,98%, 97,99%, 98%, 98,01%, 98,02%, 98,03%, 98,04%, 98,05%, 98,06%, 98,07%,

98,08%, 98,09%, 98,1%, 98,11%, 98,12%, 98,13%, 98,14%, 98,15%, 98,16%,  
 98,17%, 98,18%, 98,19%, 98,2%, 98,21%, 98,22%, 98,23%, 98,24%, 98,25%,  
 98,26%, 98,27%, 98,28%, 98,29%, 98,3%, 98,31%, 98,32%, 98,33%, 98,34%,  
 98,35%, 98,36%, 98,37%, 98,38%, 98,39%, 98,4%, 98,41%, 98,42%, 98,43%,  
 5 98,44%, 98,45%, 98,46%, 98,47%, 98,48%, 98,49%, 98,5%, 98,51%, 98,52%, 98,53%,  
 98,54%, 98,55%, 98,56%, 98,57%, 98,58%, 98,59%, 98,6%, 98,61%, 98,62%,  
 98,63%, 98,64%, 98,65%, 98,66%, 98,67%, 98,68%, 98,69%, 98,7%, 98,71%,  
 98,72%, 98,73%, 98,74%, 98,75%, 98,76%, 98,77%, 98,78%, 98,79%, 98,8%,  
 98,81%, 98,82%, 98,83%, 98,84%, 98,85%, 98,86%, 98,87%, 98,88%, 98,89%,  
 10 98,9%, 98,91%, 98,92%, 98,93%, 98,94%, 98,95%, 98,96%, 98,97%, 98,98%,  
 98,99%, 99%, 99,01%, 99,02%, 99,03%, 99,04%, 99,05%, 99,06%, 99,07%, 99,08%,  
 99,09%, 99,1% , 99,11%, 99,12%, 99,13%, 99,14%, 99,15%, 99,16%, 99,17%,  
 99,18%, 99,19%, 99,2%, 99,21%, 99,22%, 99,23%, 99,24%, 99,25%, 99,26%,  
 99,27%, 99,28%, 99,29%, 99,3%, 99,31%, 99,32%, 99,33%, 99,34%, 99,35%,  
 15 99,36%, 99,37%, 99,38%, 99,39%, 99,4%, 99,41%, 99,42%, 99,43%, 99,44%,  
 99,45%, 99,46%, 99,47%, 99,48%, 99,49%, 99,5%, 99,51%, 99,52%, 99,53%,  
 99,54%, 99,55%, 99,56%, 99,57%, 99,58%, 99,59%, 99,6%, 99,61%, 99,62%, 99,63%,  
 99,64%, 99,65%, 99,66%, 99,67%, 99,68%, 99,69%, 99,7%, 99,71%, 99,72%,  
 99,73%, 99,74%, 99,75%, 99,76%, 99,77%, 99,78%, 99,79%, 99,8%, 99,81%,  
 20 99,82%, 99,83%, 99,84%, 99,85%, 99,86%, 99,87%, 99,88%, 99,89%, 99,9%, 99,91%,  
 99,92%, 99,93%, 99,94%, 99,95%, 99,96%, 99,97%, 99,98% и 99,99% идентичности  
 последовательности по сравнению с эталонной последовательностью при  
 использовании одной из описанных программ выравнивания при использовании  
 стандартных параметров.

25 Термин "вариант" по отношению к последовательностям PDCoV (SEQ ID  
 NO:1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 17, 18, 27 и 28) (например,  
 последовательности полипептида или нуклеиновой кислоты) предназначен для  
 понимания существенно подобных последовательностей. Таким образом,  
 иммуногенные композиции согласно изобретению могут эффективно  
 30 инкорпорировать все распознанные штаммы или изоляты PDCoV, включая,  
 предпочтительно, но не обязательно ограничиваясь только ими, все штаммы,  
 которые имеют по крайней мере приблизительно 90% суммарной идентичности  
 последовательности к изоляту NSVL-SCDV (штамм дельтакоронавируса свиней  
 USA/IL/2014/026PDV\_P11), депонированный под депозитным номером

GenBank KP981395,1; изолят CHN-AH-2004, задепонированный под депозитным номером GenBank KP757890; изолят CHN-HB-2014, задепонированный под депозитным номером GenBank KP757891; изолят CHN-JS-2014, задепонированный под депозитным номером GenBank KP757892; изолят  
5 PDCoV/CHJXNI2/2015, задепонированный под депозитным номером GenBank KR131621; штамм USA/Arkansas61/2015, задепонированный под депозитным номером GenBank KR150443; штамм USA/Minnesota442/2014, задепонированный под депозитным номером GenBank KR265847; штамм USA/Minnesota214/2014, задепонированный под депозитным номером GenBank KR265848; штамм  
10 USA/Michigan447/2014, задепонированный под депозитным номером GenBank KR265849; штамм USA/Michigan448/2014, задепонированный под депозитным номером GenBank KR265850; штамм USA/Indiana453/2014, задепонированный под депозитным номером GenBank KR265851; штамм USA/Illinois449/2014, задепонированный под депозитным номером GenBank KR265852; штамм  
15 USA/Minnesota/2013, задепонированный под депозитным номером GenBank KR265853; штамм USA/Minnesota454/2014, задепонированный под депозитным номером GenBank KR265854; штамм USA/Minnesota455/2014, задепонированный под депозитным номером GenBank KR265855; штамм USA/Illinois272/2014, задепонированный под депозитным номером GenBank KR265856; штамм  
20 USA/Illinois273/2014, задепонированный под депозитным номером GenBank KR265857; штамм USA/NorthCarolina452/2014, задепонированный под депозитным номером GenBank KR265858; штамм USA/Minnesota159/2014, задепонированный под депозитным номером GenBank KR265859; штамм  
25 USA/Nebraska209/2014, задепонированный под депозитным номером GenBank KR265860; штамм USA/Nebraska210/2014, задепонированный под депозитным номером GenBank KR265861; штамм USA/Ohio444/2014, задепонированный под депозитным номером GenBank KR265862; штамм USA/Ohio445/2014, задепонированный под депозитным номером GenBank KR265863; штамм  
30 USA/Minnesota292/2014, задепонированный под депозитным номером GenBank KR265864; штамм USA/Iowa459/2014, задепонированный под депозитным номером GenBank KR265865; штамм CH/SXD1/2015, задепонированный под депозитным номером GenBank KT021234; штамм CH/Sichuan/S27/2012, задепонированный под депозитным номером GenBank KT266822; изолят CHN-HN-2014, задепонированный под депозитным номером GenBank KT336560;

штамм PDCoV/Swine/Таиланд/S5011/2015, задепонированный под депозитным номером GenBank KU051641; штамм PDCoV/Swine/Таиланд/S5015L/2015, задепонированный под депозитным номером GenBank KU051649; штамм NH, задепонированный под депозитным номером GenBank KU981059; штамм NH  
 5 изолят пассаж 0, задепонированный под депозитным номером GenBank KU981060; NH изолят пассаж 5, задепонированный под депозитным номером GenBank KU981061; штамм NH изолят пассаж 10, задепонированный под депозитным номером GenBank KU981062; изолят TT\_1115, задепонированный под депозитным номером GenBank KU984334; штамм  
 10 PDCoV/USA/Iowa136/2015, задепонированный под депозитным номером GenBank KX022602; штамм PDCoV/USA/Minnesota140/2015, задепонированный под депозитным номером GenBank KX022603; штамм PDCoV/USA/Nebraska137/2015, задепонированный под депозитным номером GenBank KX022604; штамм PDCoV/USA/Nebraska145/2015, задепонированный  
 15 под депозитным номером GenBank KX022605; и изолят P1\_16\_BTL\_0115/PDCoV/2016/Lao, задепонированный под депозитным номером GenBank KX118627.

Термин «геногруппа», в том виде, в котором он является известным в области техники, относится к родственным вирусам в пределах рода; который  
 20 может быть дополнительно подразделяться на генетические кластеры. Идентифицированные геногруппы PEDV включают группу G1, которая включает подгруппы G1a, G1b, R (аттенуированные/адаптированные); и G2, которая включает подгруппы G2a и G2b. Члены геногруппы G2a включают китайский штамм AH2012 (депозитный номер GenBank: KC210145) и североамериканские  
 25 штаммы, которые имеют несколько общих уникальных изменений нуклеотидов. Штаммы MN и IA2 имеют 99,6%, а штамм IA1 имеет 99,5% нуклеотидной идентичности с AH2012, соответственно. Исследователи предположили, что подобный AH2012 вирус, возможно, передавался в восточных районах Китая и затем был завезен в Соединенные Штаты и стал наиболее вероятным  
 30 ближайшим предком североамериканских штаммов. Члены геногруппы 2a имеют только 96,9% подобия с прототипным штаммом PEDV CV777 геногруппы 1a (Bridgen, и др. 1993; Huang и др. 2013; GenBank: AF353511.1). Как таковые аттенуированные вакцины PEDV, которые основываются на исторических штаммах G1b, которые имеют происхождение от CV777, или G1b штаммах,

которые имеют происхождение от DR13, могут быть антигенно менее родственными с вновь образовавшимися китайскими и североамериканскими G2a штаммами PEDV.

Близко родственный североамериканский изолят PEDV US/Colorado/2013 (деPOSITный номер GenBank: KF272920,1) также был описан Marthaler и др. 2013. Подобно североамериканским изолятам, описанным выше, полный геном PEDV CO/13 имеет нуклеотидную идентичность от 96,5 до 99,5% с другими полными геномами PEDV, которые являются доступными от GenBank, с самой высокой нуклеотидной идентичностью (99,5%) с китайским штаммом AN2012 (деPOSITный номер GenBank KC210145). Китайский штамм AN2012 представляет собой члена геногруппы 2a. Сравнение полного генома североамериканского изолята CO/13 с таковым CV777 эталонного штамма показало, что CO/13 имеет инсерцию в одном нуклеотиде (в положении 48) и делецию 5 нуклеотидов в 5' UTR (в положениях 73 и от 83 до 86), в то время как ген шиловидного отростка содержит инсерцию 16 нуклеотидов (положения 20804, от 20810 до 20820, 20843 и от 21053 до 21055) и делецию 7 нуклеотидов (положения 20853 и от 21118 до 21124).

Были обнаружены другие варианты PEDV, обозначаемые как 'INDEL' штаммы, которые представляют собой часто природно аттенуированные по сравнению с более старыми протитипными штаммами. Они также могут использоваться в качестве вакцины, где вирус является живым аттенуированным или инактивированным. В таком случае, может быть необходимо только минимальное дальнейшее пассивирование для обеспечения безопасного вакцинного аттенуата. Таким образом, примеры вакцинных вирусов согласно изобретению также включают те, которые имеют по крайней мере 95%, 96%, 96,1%, 96,2%, 96,3%, 96,4%, 96,5%, 96,6%, 96,7%, 96,8%, 96,9%, 97%, 97,1%, 97,2%, 97,3%, 97,4%, 97,41%, 97,42%, 97,43%, 97,44%, 97,45%, 97,46%, 97,47%, 97,48%, 97,49%, 97,5%, 97,51%, 97,52%, 97,53%, 97,54%, 97,55%, 97,56%, 97,57%, 97,58%, 97,59%, 97,6%, 97,61%, 97,62%, 97,63%, 97,64%, 97,65%, 97,66%, 97,67%, 97,68%, 97,69%, 97,7%, 97,71%, 97,72%, 97,73%, 97,74%, 97,75%, 97,76%, 97,77%, 97,78%, 97,79%, 97,8%, 97,81%, 97,82%, 97,83%, 97,84%, 97,85%, 97,86%, 97,87%, 97,88%, 97,89%, 97,9%, 97,91%, 97,92%, 97,93%, 97,94%, 97,95%, 97,96%, 97,97%, 97,98%, 97,99%, 98%, 98,01%, 98,02%, 98,03%, 98,04%, 98,05%, 98,06%, 98,07%, 98,08%, 98,09%, 98,1%, 98,11%, 98,12%,

98,13%, 98,14%, 98,15%, 98,16%, 98,17%, 98,18%, 98,19%, 98,2%, 98,21%,  
 98,22%, 98,23%, 98,24%, 98,25%, 98,26%, 98,27%, 98,28%, 98,29%, 98,3%,  
 98,31%, 98,32%, 98,33%, 98,34%, 98,35%, 98,36%, 98,37%, 98,38%, 98,39%,  
 98,4%, 98,41%, 98,42%, 98,43%, 98,44%, 98,45%, 98,46%, 98,47%, 98,48%,  
 5 98,49%,98,5%, 98,51%, 98,52%, 98,53%, 98,54%, 98,55%, 98,56%, 98,57%, 98,58%,  
 98,59%, 98,6%, 98,61%, 98,62%, 98,63%, 98,64%, 98,65%, 98,66%, 98,67%,  
 98,68%, 98,69%, 98,7%, 98,71%, 98,72%, 98,73%, 98,74%, 98,75%, 98,76%,  
 98,77%, 98,78%, 98,79%, 98,8%, 98,81%, 98,82%, 98,83%, 98,84%, 98,85%,  
 98,86%, 98,87%, 98,88%, 98,89%, 98,9%, 98,91%, 98,92%, 98,93%, 98,94%,  
 10 98,95%, 98,96%, 98,97%, 98,98%, 98,99%, 99%, 99,01%, 99,02%, 99,03%, 99,04%,  
 99,05%, 99,06%, 99,07%, 99,08%, 99,09%, 99,1% , 99,11%, 99,12%, 99,13%,  
 99,14%, 99,15%, 99,16%, 99,17%, 99,18%, 99,19%, 99,2%, 99,21%, 99,22%,  
 99,23%, 99,24%, 99,25%, 99,26%, 99,27%, 99,28%, 99,29%, 99,3%, 99,31%,  
 99,32%, 99,33%, 99,34%, 99,35%, 99,36%, 99,37%, 99,38%, 99,39%, 99,4%,  
 15 99,41%, 99,42%, 99,43%, 99,44%, 99,45%, 99,46%, 99,47%, 99,48%, 99,49%,  
 99,5%, 99,51%, 99,52%, 99,53%, 99,54%, 99,55%, 99,56%, 99,57%, 99,58%,  
 99,59%, 99,6%,99,61%, 99,62%, 99,63%, 99,64%, 99,65%, 99,66%, 99,67%, 99,68%,  
 99,69%, 99,7%, 99,71%, 99,72%, 99,73%, 99,74%, 99,75%, 99,76%, 99,77%,  
 99,78%, 99,79%, 99,8%, 99,81%, 99,82%, 99,83% 99,84%, 99,85%, 99,86%, 99,87%,  
 20 99,88%, 99,89%, 99,9%, 99,91%, 99,92%, 99,93%, 99,94%, 99,95%, 99,96%,  
 99,97%, 99,98% и 99,99% идентичности последовательности или более высокую  
 идентичность последовательности с такими штаммами, независимо от того,  
 измеряли ли аминокислотную или кодирующую нуклеотидную  
 последовательность, для белок шиловидного отростка или основанную на  
 25 полной вирусной последовательности.

Термин “PEDV, который имеет североамериканское происхождение”  
 обозначает PEDV изолят, содержащий SEQ ID NO:29 и/или 33 и/или SEQ ID  
 NO:32 и/или 36, и/или любые PEDV изоляты, имеющие по крайней мере 99%  
 идентичности последовательности с SEQ ID NO:29 и/или 33, и/или является, по  
 30 крайней мере, на 99% идентичной РНК эквиваленту SEQ ID. NO:29 и/или 33,  
 и/или а PEDV изолят, в котором белок шиловидного отростка кодируется SEQ  
 ID NO:30, 34, 46 или 52, и/или любой PEDV изолят, в котором белок  
 шиловидного отростка имеет по крайней мере 98% идентичности  
 последовательности с SEQ ID:30, 34, 46 или 52, и/или любой PEDV изолят, в

котором экспрессируемый белок шиловидного отростка имеет, по крайней мере, 90% гомологии с SEQ ID NO:31, 35, 47, 53.

Термин «монофилетический таксон», как это является известным в данной области техники, относится к группе, которая состоит из предшественника и  
 5 всех его наследников, к одной «ветви» в филогенетическом древе. Предшественник может представлять собой, например, индивидуума, популяцию или виды. Геногруппа может включать многочисленные монофилетические таксоны, например, АН2012 находится в монофилетическом таксоне, отличном от такового для североамериканских изолятов.

10 В соответствии с дополнительным вариантом осуществления данное изобретение также относится к вектору, который включает какую-либо из молекул нуклеиновой кислоты, как описано в данной заявке. Другими словами, данное изобретение относится к вектору, который включает кодирующую последовательность любого из таких, как белок шиловидного отростка, М, Е, N  
 15 белки PEDV или их части. Предпочтительно, когда указанный вектор представляет собой экспрессионный вектор, который позволяет осуществлять экспрессию любого такого белка шиловидного отростка, М, Е и/или N PEDV белков или частей этих белков. Векторы в соответствии с изобретением являются такими, которые приемлемы для трансфекции или инфекции  
 20 бактериальных клеток, клеток грибов или животных клеток *in vitro* или *in vivo*.

Векторы и способы получения и/или применения векторов (или рекомбинантов) для экспрессии могут представлять собой или быть аналогичными способам, раскрытым в: патентах США №№ 4,603,112, 4,769,330, 5,174,993, 5,505,941, 5,338,683, 5,494,807, 4,722,848, 5,942,235, 5,364,773,  
 25 5,762,938, 5,770,212, 5,942,235, 382,425, публикации заявок PCT WO 94/16716, WO 96/39491, WO 95/30018; Paoletti, «Applications of pox virus vectors to vaccination»: новая информация, «PNAS USA 93: 11349-11353, октябрь 1996 года; Moss, «Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety» PNAS USA 93: 11341-11348, октябрь 1996; Smith и др., патенте США № 4,745,051 (рекомбинантный бакуловирус); Richardson, C. D.  
 30 (редактор), Methods in Molecular Biology 39, «Baculovirus Expression Protocols» (1995 Humana Press Inc.); Smith и др., «Production of Human Beta Interferon in Insect Cells Infected with a Baculovirus Expression Vector», Molecular and Cellular Biology, декабрь 1983 года, том 3, № 12, стр. 2156-2165; Pennock и др., «Strong

and Regulated Expression of Escherichia coli B-Galactosidase in Infect Cells with a Baculovirus Vector «Molecular and Cellular Biology March 1984, том 4, № 3, стр. 406; EPA 0 370 573; патентная заявка США № 920,197, поданная 16 октября 1986 года; публикация заявки EP № 265785; патент США № 4,769,331 (рекомбинантный вирус герпеса); Roizman, «The function of herpes simplex virus genes: A primer for genetic engineering of novel vectors,» PNAS USA 93:11307-11312, октябрь 1996 года; Andreansky и др., «The application of genetically engineered herpes simplex viruses to the treatment of experimental brain tumors,» PNAS USA 93: 11313-11318, октябрь 1996 года; Robertson и др., «Epstein-Barr virus vectors for gene delivery to B lymphocytes», PNAS USA 93: 11334-11340, октябрь 1996 года; Frolov и др., «Alphavirus-based expression vectors: Strategies and applications,» PNAS USA 93: 11371-11377, октябрь 1996 года; Kitson и др., J. Virol. 65, 3068-3075, 1991; патенты США № 5,591,439, 5,552,143; WO 98/00166; акцептованные заявки США №№ 08/675,556 и 08/675,56, обе поданы 3 июля 1996 года (рекомбинантный аденовирус); Grunhaus и др., 1992, «Adenovirus as cloning vectors», Seminars in Virology (том 3) стр. 237-52, 1993; Ballay и др. EMBO Journal, том 4, стр. 3861-65, Graham, Tibtech 8, 85-87, апрель 1990 года; Prevec и др., J. Gen Virol. 70, 42434; PCT WO 91/11525; Felgner и др. (1994), J. Biol. Chem. 269, 2550-2561, Science, 259: 1745-49, 1993; и McClements и др., «Immunization with DNA vaccine encoding glycoprotein D or glycoprotein B, alone or in combination, induces protective immunity in animal models of herpes simplex virus-2 disease», PNAS USA 93: 11414-11420, октябрь 1996 года; и патенты США № 5,591,639, 5,589,466, и 5,580,859, а также публикациях WO 90/11092, WO93/19183, WO94/21797, WO95/11307, WO95/20660; Tang и др., Nature, и Furth и др., Analytical Biochemistry, которые относятся к экспрессионным векторам на основе ДНК, среди прочих. Смотри также WO 98/33510; Ju и др., Diabetologia, 41: 736-739, 1998 (лентивирусная экспрессионная система); Sanford и др., атент США № 4,945,050; Fischbachi др. (Intracel); WO 90/01543; Robinson и др., Seminars in Immunology том 9, стр. 271-283 (1997), (векторные системы на основе ДНК); Szoka и др., патент США № 4,394,448 (метод встраивания ДНК в живые клетки); McCormick и др., патент США № 5,677,178 (применение цитопатических вирусов); и патент США № 5,928,913 (векторы для генной доставки); а также другие документы, которые упоминаются в данной заявке.

Предпочтительные вирусные векторы включают бакуловирусные векторы, такие, как VaculoGold (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, Calif.), в частности, при условии, что клетки-продуценты представляют собой клетки насекомых. Несмотря на то, что экспрессионная система на основе бакуловирусов является предпочтительной, квалифицированному специалисту в данной области техники будет понятно, что другие экспрессионные системы также будут работать для целей в соответствии с настоящим изобретением, в частности, экспрессия НГ в супернатанте клеточных культур. Такие другие экспрессионные системы могут требовать применения сигнальной последовательности для того, чтобы обеспечить экспрессию Н5 в среду.

***Эффективная доза:***

Соединения, описанные в данной заявке, могут вводиться субъекту при терапевтически эффективных дозах для предотвращения ассоциированных с PDCoV и/или PEDV заболеваний. Дозировка будет зависеть от хозяина, который получает вакцину, а также от таких факторов, как размер, вес и возраст хозяина.

Точное количество иммуногенной композиции в соответствии с изобретением, которое используется в рецептуре, будет зависеть от способа введения и природы субъекта (например, возраста, размера, стадии/уровня заболевания), и будет определяться в соответствии с выводами практикующего врача и обстоятельств каждого субъекта в соответствии со стандартными клиническими методиками. Эффективное количество для иммунизации представляет собой количество, достаточное для лечения или предотвращения инфекционного заболевания PDCoV и/или PEDV у субъекта.

Иммуногенность композиции может быть определена путем мониторинга иммунного ответа исследуемого субъекта после иммунизации с помощью композиции при использовании любого иммуноанализа, известного в уровне техники. Получение гуморального (антитела) ответа и/или опосредованного клетками иммунитета может быть взято в качестве индикатора иммунного ответа. Исследуемые субъекты могут включать животных, таких, как свиньи, мыши, хомяки, собаки, кошки, кролики, коровы, лошади, овцы, домашняя птица (например, куры, утки, гуси и индюки), а также люди.

Иммунный ответ исследуемых субъектов может подвергаться анализу при использовании различных подходов, таких как: реактивность полученной иммунной сыворотки к иммуногенному конъюгату, как может быть оценено с

помощью различных методик, например, твердофазного иммуносорбентного анализа (ELISA), иммуноблотов, иммунопреципитации, нейтрализации вируса, и т. д.; или путем защиты иммунизированных хозяев от инфекции патогеном и/или ослабления симптомов, вызванных инфекцией патогеном у иммунизированных хозяев, как определяется в соответствии с любым из способов, известных в данной области техники, для оценки уровней агента инфекционного заболевания, например, уровней вируса (например, путем культивирования образца, полученного от субъекта) или другой методики, известной в данной области техники. Уровни агента инфекционного заболевания могут быть определены также путем измерения уровней антигена, против которого направлен иммуноглобулин. Снижение уровней агента инфекционного заболевания или облегчения симптомов инфекционного заболевания указывает на то, что композиция является эффективной.

Терапевтические средства в соответствии с изобретением могут быть проанализированы *in vitro* на желаемую терапевтическую или профилактическую активность перед использованием *in vivo* у животных. Например, анализы *in vitro*, которые могут быть использованы для определения, является ли введение специфического терапевтического агента показанным, включают *in vitro* анализы на основе клеточных культур, в которых соответствующие клетки из линии клеток или культивируемые клетки, полученные от субъекта, имеющего конкретное заболевание или расстройство, подвергаются воздействию или введению иным образом терапевтического средства, и наблюдают за влиянием терапевтического агента на клетки.

Альтернативно, терапевтическое средство может подвергаться анализу путем приведения в контакт терапевтического средства с клетками (культивированными клетками, полученными от субъекта или из культивированных линий клеток), которые являются восприимчивыми к инфекции, вызванной агентом инфекционного заболевания, но которые не были инфицированы агентом инфекционного заболевания, и с последующим определением, будет ли показатель инфекции клеток, контактировавших с терапевтическим средством ниже, чем показатель инфицирования клеток, которые не контактировали с терапевтическим средством. Заражение клеток инфекционным агентом заболевания может быть оценено с помощью любого способа, известного в данной области техники.

Кроме того, терапевтическое средство может быть оценено путем измерения уровня молекулы, против которой направлено антитело в модели субъекта, который представляет собой животное или человека, через определенные промежутки времени до, во время или после лечения. Любое изменение или отсутствие изменения количества молекулы может быть идентифицировано и коррелирует с эффектом лечения в отношении указанного субъекта. Уровень молекулы можно определить с помощью любого способа, известного в данной области техники.

После вакцинации животного против PDCoV и/или PEDV при использовании способов и композиций в соответствии с настоящим изобретением любой анализ связывания, известный в данной области техники, может быть использован для оценки связывания между полученным антителом и конкретной молекулой. Эти анализы могут быть выполнены также для селекции антител, которые обладают более высокой аффинностью или специфичностью в отношении конкретного антигена.

***Введение субъекту:***

Предпочтительные способы введения включают, но не ограничиваются такими, как интраназальное, пероральное, внутрикожное и внутримышечное. Специалисту в данной области техники будет понятно, что композиции в соответствии с изобретением могут быть введены также в виде одной, двух или более доз, а также другими путями введения. Например, такие другие пути введения включают подкожный, внутрикожный, внутривенный, интраваскулярный, внутриартериальный, интраперитонеальный, интратекальный, трахеальный, внутрикожный, внутрисердечный, интралобальный, интрамедуллярный, внутрилегочный и интравагинальный. В зависимости от желаемой эффективности и продолжительности лечения композиции в соответствии с изобретением могут вводиться один или несколько раз, а также с перерывами, например, ежедневно в течение нескольких дней, недель или месяцев и в разных дозировках.

Приведенные ниже примеры являются включенными для демонстрации предпочтительных вариантов реализации изобретения. Специалист в данной области техники сможет оценить, что методики, раскрытые в данных примерах, которые приведены ниже, представляют собой методики, раскрытые авторами изобретения для хорошего осуществления изобретения на практике и, таким

образом, могут считаться такими, которые составляют предпочтительные модели для их практической реализации. Тем не менее, в свете настоящего описания специалистам в данной области техники должно быть понятно, что можно внести множество изменений в конкретные варианты осуществления, которые раскрыты, и все же получить похожий или аналогичный результат без отступления от духа и объема изобретения.

## ПРИМЕРЫ

### ПРИМЕР 1: Изоляция и получение штамма PEDV

Для получения вакцины вируса эпидемической диареи свиней сначала получали убитый вирус и производственную культуру PEDV (изолят). Из производственной культуры выращивали культуру PEDV, которую потом инактивировали. Культуру инактивированного вируса потом смешивали с адьювантом для того, чтобы получить вакцину вируса эпидемической диареи свиней. Следующий способ использовали для получения вакцины вируса эпидемической диареи свиней.

Животных или ткани животных, которые проявляли крайнюю диарею, были получены в 2013 г. Гомогенаты из соскобов слизистой оболочки, полученные от этих животных, фильтровали через шприцевой фильтр 0,2 микрона, и фильтрат использовали для инокуляции клеток почки африканской зеленой мартышки (Vero). Вирус выращивали в присутствии среды для поддержания PEDV, содержащей модифицированную среду MEM, трипсин свиньи, триптоза-фосфатный бульон, дрожжевой экстракт и NEPES буфер. Рост вируса оценивали и визуализировали путем проверки характерного формирования синцития и слияние клеток монослоя. Положительный по ЦПЭ материал подвергали секвенированию при использовании технологии секвенатора Illumina MISEQ®.

Для того, чтобы получить исходную культуру вакцинного вируса культуру PEDV («PEDV MSV») штамм вируса эпидемической диареи свиней (изолят) (PEDV изолят) изолировали из BI VERO клеток и в общей сложности 19 раз пассировали в BI VERO клетках, а потом вирус выращивали в клетках 2013 EU VERO до пассажа 30. 30-ый пассаж вируса разводили и высаживали в качестве исходного вакцинного вируса, который обозначали как PEDV KV-1251-125-10-OK.

Из исходного вакцинного вируса получали культуру PEDV (KV-1251-125-10-OK которая в настоящей заявке упоминается как «125-10»), путем

инфицирования клеток 2013 EU VERO с помощью PEDV KV-1251-125-10-OK MSV в поддерживающей среде для PEDV, содержащей модифицированную минимальную эссенциальную среду (MEM), свиной трипсин (10 мкг/мл), триптоза фосфатный бульон (0,3%), дрожжевой экстракт (0,02%) и 1M HEPES 5 буфера (2,5%). Клетки 2013 EU VERO, как правило, инфицировали при использовании PEDV (125-10) MSV при минимальной дозе  $10^4$  TCID<sub>50</sub>/круглодонная колба на 850 см<sup>2</sup>. Такие культуры могут быть выращены в стерильных одноразовых флаконах с круглым дном или на частицах микроносителей. Культуру инкубировали при 36°C ± 2°C в течение от 24 до 48 10 часов, пока не наблюдали цитопатический эффект («ЦПЭ»). Как правило, характерный синцитий можно увидеть через 12 часов после инфекции, синцитии расширялись и клетки монослоя сливались в течение 24-48 часов с последующим разрушением клеток. Во время инкубации культуры контролировали на индуцированный PEDV ЦПЭ, чтобы обеспечить чистую 15 нагрузку PEDV. Если наблюдали атипичный ЦПЭ или любые макроскопические или микроскопические признаки загрязнения, культуру выбрасывали. Чистый вирус культуры асептически собирали в стерильные полипропиленовые флаконы. Вирус подвергали замораживанию-оттаиванию для высвобождения ассоциированных с клетками вирионов, и осветляли центрифугированием или 20 фильтровали через фильтры 0,45 мкм, после чего 0,2 мкм. Собирали жидкость, содержащую вирусный материал, и подвергали анализу, чтобы гарантировать отсутствие микоплазм перед инактивацией. Полученные жидкости, которые не подвергались немедленной инактивации хранили при температуре -70°C или ниже.

25 Определяли объем собранных жидкостей и температуру жидкостей доводили до 36 ± 2°C. 0,4 М раствор 2-бромозтиленамина (BEA) смешивали с маточным раствором 0,3 н. NaOH для получения маточного раствора бинарного этиленимина (BEI), который потом прибавляли к собранным жидкостям для получения заключительной концентрации BEI 5 мМ. Жидкости подвергали 30 постоянному перемешиванию в течение минимум 24 часов. Прибавляли раствор 1,0 М тиосульфата натрия для получения заключительной минимальной концентрации 5 мМ для нейтрализации любого остаточного BEI. Инактивированные жидкости можно хранить при температуре -70 ± 3°C в

течение длительного периода времени или при  $4 \pm 3^{\circ}\text{C}$  в течение короткого периода времени.

После обработки с помощью BEI культуры подвергали анализу на их способность индуцировать ЦПЭ, типичный для PEDV, для того, чтобы убедиться в инактивации вируса. Эту задачу решали путем пропускания вирусной жидкости, обработанной BEI над клетками Vero и проверяли клетки Vero на какую-либо вирусную инфекцию. Обработанные BEI культуральные жидкости обычно хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$  или ниже до завершения анализа инактивации.

Инактивированный вирус рецептировали в виде вакцины с адьювантом путем тщательного перемешивания культуры инактивированного PEDV с адьювантом EMULSIGEN®-BCL при скорости введения 20% для образования серийных партий. Серийные партии поддерживали при температуре  $2-8^{\circ}\text{C}$  до момента переноса во флаконы, содержащие либо одну, либо десять доз (2,0 мл на дозу).

## **ПРИМЕР 2: Выделение и получение Штамма дельтакоронавируса свиней**

Дельтакоронавирус свиней (PDCoV) получали из Лаборатории национальной ветеринарной службы (National Veterinary Service laboratory (NVSL)), Ames, IA. Этот вирус был выделен в NVSL из образца кишечника свиньи из Иллинойса в 2014 году. Вирус был выделен в свиных тестикулярных клетках (ST) в бессывороточной среде в присутствии 5 мкг/мл TPCK трипсина. Исходный вирус пропускали через два цикла клонирования путем метода бляшкообразования в NVSL и десятый пассаж вируса использовали в качестве исходного вещества.

Вирусный пассаж 10 инокулировали и адаптировали к свиным тестикулярным клеткам (ST) в ВІ с PDCoV поддерживающей средой, которая содержала Модифицированную минимальную питательную среду с NEPES, триптозо-фосфатный бульон, дрожжевой экстракт и свиной трипсин. Клетки инкубировали в течение 24-48 часов при  $37^{\circ}\text{C}$  с 5%  $\text{CO}_2$  и наблюдали для выявления PDCoV-индуцированного цитопатического эффекта. Когда ЦПЭ был полным и клетки были отброшены, колбы один раз замораживали-оттаивали и лизат собирали. После этого собранный материал инокулировали в свежий монослой для продолжения пассажа. Пассаж продолжали таким образом до пассажа 12. Вирус, собранный из 12 пассажа, инокулировали и адаптировали к

альтернированной, производной линии свиных тестикулярных клеток (ST), обозначенной как "AI-ST 2015" клетки. Осуществляли еще четыре пассажа вируса в клетках AI-ST 2015 аналогичным образом, как и пассажи 11 и 12 для получения P16 вируса. Вирус P16 инокулировали во вращающиеся флаконы, получая конечный "P17" исходный вакцинный вирусный изолят, который собирали, фильтровали через фильтр 0,2 мкм, объединяли для получения суммарного вирусного маточного материала для хранения и хранили ниже -60°C. Определяли средний титр исходного вакцинного вируса "P17", который составлял  $4,91 \log_{10}$  FAID50 на мл.

### **Пример 3: Анализ геномной последовательности изолята PEDV и изолята PDCoV**

#### ***Приготовление образцов и анализ:***

Перед экстракцией супернатанты тканевых культур для выращивания вируса подвергали предварительной обработке с помощью смеси ДНКазы и РНКазы для удаления остаточных нуклеиновых кислот генома клетки. Вирусную геномную РНК потом экстрагировали из образцов, обработанных нуклеазой, при использовании RNEASY® набора для экстракции вирусной РНК (Qiagen, кат. номер 52906). После экстракции образцы снова обрабатывали ДНКазой для дополнительного обогащения геномной РНК вируса. После этого геномную РНК вируса превращали в двухцепочечную кДНК (дц кДНК) с помощью произвольно праймированной обратной транскрипции и обработки при использовании фрагмента Кленова. Дц кДНК продукты потом использовали для получения библиотеки для Illumina секвенирования на основе секвенатора MISEQ® при использовании набора для получения NEXTERA®XT библиотеки (кат. номер FC-131-1024). Каждый образец потом маркировали штрих-кодом с помощью уникальных меток на обоих 5'- и 3'-концах при использовании набора MISEQ® для осуществления 500 циклов (кат. номер MS-102-2003), и данные подвергали анализу при использовании комбинации NextGene (версия 2.3.4) и программного обеспечения Sequencher (версия 5.1). Последовательности высокого качества отбирали как такие, которые имеют среднее значение Q-показателя более чем 25 и выравнивали путем отрезания не более чем трех не востребуемых оснований на 3'-конце или трех смежных оснований с Q-показателем, измеренным как такой, который был менее 16. Последовательности потом объединяли *de novo*

при использовании критерия 85% или более совпадения на протяжении цепочки размером 35 пар оснований для получения путативного полного генома для каждого изолята. Последовательность путативного полного генома для каждого из них потом проверяли путем матричного выравнивания для подтверждения 5 однонуклеотидного полиморфизма (SNP) или переменных малых инсерций/делеций.

Для PEDV изолята 1251-125-10 в общей сложности было получено 570253 последовательностей со средней длиной 136 пар оснований после отсечения данных низкого качества. Из этих последовательностей; 484247 (84,9%) 10 объединяли в один контиг длиной 27995 пар оснований, которые при BLASTn анализе выявили высокую степень идентичности с одноцепочечной РНК альфа коронавируса PEDV. В общей сложности 11 положений продемонстрировали полиморфизм либо в одном нуклеотиде, либо в небольшой делеции/инсерции, эти положения являются приведенными в Таблице 1.

15 **ТАБЛИЦА 1: Полиморфные остатки в изоляте 1251-125-10 “125-10”**

| Положение   | Частота встречаемости остатка | Ген                 |
|-------------|-------------------------------|---------------------|
| 3315        | T (51%)<br>A (49%)            | ORF1A/B             |
| 3423 - 3426 | DEL (50%)<br>TTA (50%)        | ORF1A/B             |
| 9425        | C (64%)<br>T (36%)            | ORF1A/B             |
| 10136       | T (52%)<br>A (48%)            | ORF1A/B             |
| 14416       | A (69%)<br>G (31%)            | ORF1A/B             |
| 18179       | C (73%)<br>T (27%)            | ORF1A/B             |
| 19100       | C (73%)<br>T (27%)            | ORF1A/B             |
| 23101       | G (63%)<br>A (37%)            | Шиловидный отросток |
| 25057       | T (59%)<br>10 п.о. INS (41%)  | Шиловидный отросток |
| 25165-25169 | TTATG (74%)<br>DEL (26%)      | ORF3                |
| 27510       | C (73%)<br>T (27%)            | ORF3                |

Путативный полный/почти полный геном PEDV 1251-125-10 (SEQ ID NO:29) выравнивали с самым близким китайским изолятом AH2012 (деPOSITный номер GenBank: KC210145) и североамериканским изолятом PEDV

Colorado 2013 (депозитный номер GenBank: AGO58924). Идентичности обоих изолятов превышали 99,2%, что свидетельствовало об очень высоком родстве по отношению к обоим штаммам, которые оба относятся к геногруппе 2a.

После этого последовательность иммуногенного белка шиловидного отростка проверяли на идентичность/подобие белка по отношению к большим депонированным в GenBank структурам белка шиловидного отростка PEDV. И вновь, представленный на рассмотрение изолят GenBank, имеющий происхождение от североамериканского штамма Colorado 2013, который был депонирован в ветеринарной диагностической лаборатории Университета Миннесоты (депозитный номер GenBank: AGO58924), демонстрировал более чем 99,5% идентичности (1380/1386 идентичных аминокислот) (SEQ ID NO:X). Из 6 изменений аминокислот 1 была такой по причине полиморфизма в положении 23101, она кодировала либо CGA (Arg) у большинства, либо CAA (Gln) у меньшинства в положении 838. Североамериканский штамм Colorado 2013 содержит Gln в этом положении.

Для PDCoV, секвенировали индивидуально 12 изолированных образцов. Материалы экстрагировали после того, как вирусная частица была защищена расщеплением нуклеиновой кислоты (РНКаза + ДНКаза) для обогащения вирусной РНК. После экстрагирования, нуклеиновые кислоты обрабатывали ДНКазой, для обогащения вирусной РНК. Создавали двухцепочечную кДНК путем обратной транскрипции и обрабатывали фрагментами Кленова, используя примирование со случайными гексамерами. Затем эти продукты использовали для создания библиотеки.

Образцы обрабатывали для секвенатора MISEQ® на основании секвенирования путем создания библиотеки, используя набор для получения библиотеки NEXTERA® XT (Illumina, кат. номер FC-131-1024). Каждый образец маркировали штрих-кодом с помощью уникальных меток на обоих 5'- и 3'-концах для минимизации случаев неправильного группирования. Библиотеку прогоняли на секвенаторе MISEQ™, используя набор для осуществления 500 циклов (Illumina, кат. номер MS-102-2003) и данные анализировали, используя комбинации NEXTGENE® программного обеспечения для секвенирования (SoftGenetics, LLC, версия 2.3.4.2) и SEQUENCER® программного обеспечения (Gene Codes Corp., версия 5.1). Последовательности высокого качества отбирали как такие, которые имеют среднее значение Q-показателя более чем 25 и

выравнивали путем отрезания не более чем трех неостребованных оснований на 3'-конце или трех смежных оснований с Q-показателем, измеренным как такой, который был менее 16. Эти обе последовательности потом объединяли *de novo* и выравнивали при использовании критерия 85% или больше совпадения на протяжении цепочки размером 35 пар оснований. Сравнительные последовательности для выравнивания были от собранных последовательностей *de novo* или секвенаторе MISEQ®, имеющим ссылки на Carthage и NVSL PDCoV штаммы (NSVL, штамм дельтакоронавируса свиней USA/IL/2014/026PDV\_P11, номер доступа Genbank KP981395.1).

В целом, генетическое сходство между каждым из BI вирусных изолятов и другими штаммами (“Carthage” оригинальный изолят и NVSL штамм) было высоким (>99,8% идентичность) и различия между вариантами NVSL и BI-ST вирусами клеточного роста проявляли даже еще меньшую изменчивость (>99,95% идентичность) (Таблица 2) См. также Фигуры 1 и 2, где схематически представлено полная схема нуклеотидов генома по методу прилегающих нуклеотидов для PDCoV изолятов/штаммов, и филогенетическое дерево методом ближайших соседей аминокислот белка шиловидного отростка для PDCoV изолятов/штаммов, соответственно. Шкала указывает p-расстояние.

Сходства между вариантами NVSL и BI-ST вирусами клеточного роста обусловлены, наиболее вероятно, общим происхождением некоторых образцов. Одним из заметных отличий последовательностей является присутствие внутри рамки делеции 9 пар оснований в шиловидном отростке (аминокислотные положения 229-231) в пределах культивируемых PDCoV\_2201-1 изолятов; но не наблюдаемые ни в исходном гомогенате, ни в материалах от свиней. Полагают, что это положение является “горячей точкой” для IN/DEL вариабельности, так как BI PDCoV-5.0327 изолят, для которого неизвестна связь с “Carthage” изолятом, также проявляет идентичную делецию в “BI-ST” клеточной линии, но не в NVSL-ST клеточной линии. Эти изменения могут указывать для адаптацию вируса к тканевой культуре.

Таблица 2: Генетическое сходство между каждым из изолятов В1 вируса.

|              | Расстояние между нуклеотидами полного генома |                 |                  | Аминокислотное расстояние белка шиловидного отростка |                 |                  |
|--------------|--|-----------------|------------------|--|-----------------|------------------|
|              | PDCoVST0 2.0307                              | PDCoVST0 5.0327 | BIVI_NVSL изолят | PDCoVST0 2.0307                                      | PDCoVST0 5.0327 | BIVI_NVSL изолят |
| KP757890_CHN | 98,97%                                       | 99,05%          | <b>98,89%</b>    | 98,97%   | 99,05%          | 98,62%           |
| KP757891_CHN | 99,22%                                       | 99,40%          | 99,25%           | 99,22%   | 99,40%          | 98,88%           |
| KP757892_CHN | 99,14%                                       | 99,22%          | 99,19%           | 99,14%   | 99,22%          | 98,79%           |
| KP981395_IL  | 99,22%                                       | 99,48%          | 99,94%           | 99,22%   | 99,48%          | 99,91%           |
| KR131621_CHN | 98,79%                                       | 98,88%          | <b>98,91%</b>    | 98,79%   | 98,88%          | 98,45%           |
| KR150443_AR  | 99,66%                                       | 99,74%          | 99,76%           | 99,66%   | 99,74%          | 99,31%           |
| KR265847_MN  | 99,57%                                       | 99,66%          | 99,82%           | 99,57%   | 99,66%          | 99,22%           |
| KR265848_MN  | 99,66%                                       | 99,74%          | 99,83%           | 99,66%   | 99,74%          | 99,31%           |
| KR265849_MI  | 99,57%                                       | 99,66%          | 99,85%           | 99,57%   | 99,66%          | 99,22%           |
| KR265850_MI  | 99,57%                                       | 99,66%          | 99,85%           | 99,57%   | 99,66%          | 99,22%           |
| KR265851_IN  | 99,66%                                       | 99,74%          | 99,84%           | 99,66%   | 99,74%          | 99,31%           |
| KR265852_IL  | 99,66%                                       | 99,74%          | 99,84%           | 99,66%   | 99,74%          | 99,31%           |
| KR265853_MN  | 99,48%                                       | 99,57%          | 99,84%           | 99,48%   | 99,57%          | 99,14%           |
| KR265854_MI  | 99,57%                                       | 99,66%          | 99,83%           | 99,57%   | 99,66%          | 99,22%           |
| KR265855_MN  | 99,31%                                       | 99,40%          | 99,79%           | 99,31%   | 99,40%          | 98,97%           |
| KR265856_IL  | 99,66%                                       | 99,74%          | 99,80%           | 99,66%   | 99,74%          | 99,31%           |
| KR265857_IL  | 99,66%                                       | 99,74%          | 99,80%           | 99,66%   | 99,74%          | 99,31%           |
| KR265858_NC  | 99,48%                                       | 99,57%          | 99,79%           | 99,48%   | 99,57%          | 99,14%           |
| KR265859_MN  | 99,74%                                       | 99,83%          | 99,85%           | 99,74%   | 99,83%          | 99,40%           |
| KR265860_NE  | 99,66%                                       | 99,74%          | 99,84%           | 99,66%   | 99,74%          | 99,31%           |
| KR265861_NE  | 99,66%                                       | 99,74%          | 99,84%           | 99,66%   | 99,74%          | 99,31%           |
| KR265862_OH  | 99,66%                                       | 99,74%          | 99,80%           | 99,66%   | 99,74%          | 99,31%           |
| KR265863_OH  | 99,40%                                       | 99,48%          | 99,80%           | 99,40%   | 99,48%          | 99,05%           |
| KR265864_MN  | 99,66%                                       | 99,74%          | 99,83%           | 99,66%   | 99,74%          | 99,31%           |
| KR265865_IA  | 99,40%                                       | 99,48%          | 99,78%           | 99,40%   | 99,48%          | 99,05%           |
| KT021234_CHN | <b>97,50%</b>                                | <b>97,59%</b>   | <b>98,82%</b>    | <b>97,50%</b>  | <b>97,59%</b>   | <b>97,16%</b>    |
| KT266822_CHN | 99,14%                                       | 99,22%          | <b>98,90%</b>    | 99,14%   | 99,22%          | 98,79%           |
| KT336560_NE  | 98,88%                                       | 98,97%          | 99,00%           | 98,88%   | 98,97%          | 98,53%           |
| KU051641_TJK | <b>97,59%</b>                                | <b>97,59%</b>   | <b>97,37%</b>    | <b>97,59%</b>  | <b>97,59%</b>   | <b>97,16%</b>    |
| KU051649_TJK | <b>97,50%</b>                                | <b>97,50%</b>   | <b>97,36%</b>    | <b>97,50%</b>  | <b>97,50%</b>   | <b>97,07%</b>    |
| KU981059_CHN | 98,97%                                       | 99,05%          | 98,96%           | 98,97%   | 99,05%          | 98,62%           |
| KU981060_CHN | 98,97%                                       | 99,05%          | 98,96%           | 98,97%   | 99,05%          | 98,62%           |
| KU981061_CHN | 98,71%                                       | 98,79%          | <b>98,96%</b>    | 98,71%   | 98,79%          | 98,36%           |
| KU981062_CHN | 98,71%                                       | 98,79%          | <b>98,95%</b>    | 98,71%   | 98,79%          | 98,36%           |
| KU984334_TJK | <b>97,67%</b>                                | <b>97,67%</b>   | <b>97,39%</b>    | <b>97,67%</b>  | <b>97,67%</b>   | <b>97,24%</b>    |
| KX022602_IA  | 99,57%                                       | 99,74%          | 99,75%           | 99,57%   | 99,74%          | 99,22%           |

|                       | Расстояние между нуклеотидами полного генома |                    |                       | Аминокислотное расстояние белка шиловидного отростка |                    |                     |
|-----------------------|--|--------------------|-----------------------|--|--------------------|---------------------|
|                       | PDCoVST0<br>2.0307                           | PDCoVST0<br>5.0327 | BIVI_NVSL<br>L изолят | PDCoVST0<br>2.0307                                   | PDCoVST0<br>5.0327 | BIVI_NVSL<br>изолят |
| KX022603_MN           | 99,66%                                       | 99,83%             | 99,76%                | 99,66%   | 99,83%             | 99,31%              |
| KX022604_NE           | 99,66%                                       | 99,83%             | 99,74%                | 99,66%   | 99,83%             | 99,31%              |
| KX022605_NE           | 99,66%                                       | 99,83%             | 99,76%                | 99,66%   | 99,83%             | 99,31%              |
| KX118627_LAO          | 97,76%                                       | 97,76%             | <b>97,43%</b>         | 97,76%   | 97,76%             | 97,33%              |
| PDCoV-NVSL-0307-pig2  | 99,57%                                       | 99,48%             | 99,83%                | 99,57%   | 99,48%             | 99,05%              |
| PDCoV-NVSL-033-pig442 | 99,57%                                       | 99,66%             | 99,83%                | 99,57%   | 99,66%             | 99,22%              |
| PDCoV-ST-0307-pig2    |  | 99,57%             | 99,84%                |  | 99,57%             | 99,14%              |
| PDCoV-ST-0327-pig5    |  |                    | 99,94%                |  |                    | 99,40%              |

нижние 10% наименее низкие значения по идентичности (наибольшая дивергенция).

Верхние 10% наиболее идентичны (минимальная дивергенция).

#### Пример 4: Инактивация цельных изолятов PEDV и PDCoV

Каждую партию вируса PEDV или пул подвергали анализу на инактивацию путем пассивирования в клетках VERO. Семьдесят пять см<sup>2</sup> 24-часовой культуры клеток инокулировали при использовании 2,0 мл жидкостей инактивированного PEDV поддерживали при температуре  $36 \pm 3^\circ\text{C}$  в течение 48 часов. Один флакон клеток VERO оставляли без инокуляции. Для позитивного контроля вируса одну культуру клеток VERO инокулировали при использовании положительного контроля PEDV. В конце периода инкубации монослои клеток проверяли на ЦПЭ, типичный для PEDV. Материал трижды замораживали и оттаивали и потом 2 мл каждого материала инокулировали однодневные клетки VERO. Культуры следует поддерживать при температуре  $37 \pm 2^\circ\text{C}$  в течение 48 часов. После второго пассажа осуществляли третий пассаж. После инкубации и пассажа отсутствие инфицированных вирусом клеток в вирусных жидкостях, обработанных BEI, как определяли при отсутствии иммунофлуоресцентного окрашивания, представляет собой удовлетворительный тест на инактивацию. Контрольные клетки, которые были инокулированы с помощью позитивного контрольного вируса, будут демонстрировать ЦПЭ, типичный для PEDV, а

неинокулированные флаконы не будут демонстрировать никакого доказательства ЦПЭ PEDV.

Собранный PDCoV вирусный материал инактивировали с применением 5 мМ ВЕI в течение 24 часов при 37°C. После инактивации, собранный материал  
 5 нейтрализовали с помощью тиосульфата натрия. Инактивацию подтверждали путем оценки TCID<sub>50</sub> собранного инактивированного материала. Бы было обнаружено живого вируса в инактивированном материале. Инактивированный, нетрализованный собранный вирусный материал концентрировали с использованием PES картриджа 10 кДа на полых волокнах (номер каталога GC  
 10 Healthcare UFP-10-C-3MA). Концентрированный антиген асептически разводили с помощью модифицированной минимальной питательной средой (конечная концентрация = 10X). Порцию разведенного антигена комбинировали в EMULSIGEN D® (MVP Laboratories, номер партии 10005408) для получения 12,5% препарата.

15

### Пример 5:

#### **Конструирование рекомбинантных бакуловирусов, кодирующих и экспрессирующих антигены шиловидного отростка PDCoV**

##### *Приготовление PDCoV S1-IgG2a Fc Бакуловируса*

20 S1 участок шиловидного отростка дельтакоронавируса свиней (PDCoV) (ак 1-673) амплифицировали с помощью ПЦР из плазмидной ДНК, используя праймеры P2967167A (SEQ ID NO:13) и P2967167B (SEQ ID NO:14). Fc участок свиного IgG2a, включая короткий GGS линкер и шарнирную область амплифицировали из плазмидной ДНК, используя праймеры P2967167C (SEQ ID  
 25 NO:15) и P2968014E (SEQ ID NO:16). Два фрагмента сливали с помощью ПЦР с перекрывающимися праймерами, используя праймеры P2967167A (SEQ ID NO:13) и P2968014E (SEQ ID NO:16) для создания PDCoV S1-IgG2a Fc кодирующей последовательности (SEQ ID NO:17), содержащей консенсусную последовательность Козака непосредственно на 5' старт-кодоне. См.  
 30 схематическую диаграмму на Фигуре 3.A. Конечную кодирующую последовательность фланкировали с помощью BamHI и NotI рестрикционных сайтов для облегчения клонирования в бакуловирусной трансферной плазмиде pVL1393. После завершения, использовали плазмидный pVL1393-PDCoV S1-

IgG2a Fc с линейризованной бакуловирусной ДНК VaculoGold для трансфекции клеток насекомых Sf9 для продуцирования рекомбинантного бакуловируса.

***Приготовление PDCoVS BD Бакулодисплейного Бакуловируса***

Ген шиловидного отростка PDCoV из дельтакоронавируса свиней (PDCoV) клонировали в двух перекрывающихся фрагментах (N-конец и C-конец) из плазмидной ДНК. N-концевой фрагмент амплифицировали, используя праймеры P2967002C (SEQ ID NO:23) и P2967002D (SEQ ID NO:24), в то время как C-концевой фрагмент амплифицировали, используя праймеры P2967002E (SEQ ID NO:25) и P2967002F (SEQ ID NO:26). N-концевой и C-концевой фрагменты амплифицировали таким образом, чтобы удалить природную сигнальную последовательность и C-концевой хвост. N-концевой фрагмент сливали с gp64 сигнальной последовательностью вируса ядерного полиэдроза совки калифорнийской люцерновой (AcNPV) (O2967002A) (SEQ ID NO:21) с помощью ПЦР с перекрывающимися праймерами (OE-PCR), используя праймеры P290194A (SEQ ID NO:19) и P2967002D (SEQ ID NO:20). C-концевой фрагмент сливали с AcNPV gp64 C-концевой хвостовой кодирующей последовательностью (O2967002B) (SEQ ID NO:22) с помощью OE-PCR, используя праймеры P290194B (SEQ ID NO:20) и P2967002E (SEQ ID NO:25). Два полученных фрагмента сливали с помощью OE-PCR, используя праймеры P290194A (SEQ ID NO:19) и P290194B (SEQ ID NO:20) для получения кодирующей последовательности бакулодисплея шиловидного отростка PDCoV (PDCoVS BD) (SEQ ID NO:27), содержащей консенсусную последовательность Козака непосредственно на 5' старт-кодоне. См. схематическую диаграмму на Фигуре 3В. Конечную кодирующую последовательность фланкировали с помощью BamHI и NotI рестрикционных сайтов для облегчения клонирования в бакуловирусной трансферной плазмиде pVL1393. После завершения, плазмидную pVL1393-PDCoVS BD использовали с линейризованной бакуловирусной ДНК VaculoGold для трансфекции клеток насекомых Sf9 для продуцирования рекомбинантного бакуловируса.

**Пример 6:****Получение фармацевтических композиций (вакцин),  
которые включают антигены шиловидного отростка PEDV:**

Для инактивированного материала PEDV, полученный вирусный материал  
5 PEDV инактивировали в течение минимум 24 часов при использовании 5 мМ  
BEI, осветляли и фильтровали через фильтр 0,45 мкм.

После нейтрализации добавляли различные адъюванты и получали  
следующие вакцинные/фармацевтические композиции.

10

**ПРИМЕР 7:****Получение фармацевтических композиций (вакцин),  
которые включают антигены шиловидного отростка PDCoV:**

Партии PDCoV антигена (BaculoS-BD-PDCoV и BaculoS-FC-PDCoV)  
выращивали во вращающихся колбах объемом 3 л. Для инфицирования, SF+  
15 клетки инокулировали вирусом приблизительно при MOI в диапазоне 1,0-2,1.  
Колбы инкубировали при 27°C при перемешивании, установленном на 100  
об./мин. Сбор инициировали через пять дней после инфицирования. Во время  
сбора, жизнеспособность клеток находилась в диапазоне от 24% до 26% и  
количество жизнеспособных клеток /мл составляло от  $0,31 \times 10^6$  до  $0,36 \times 10^6$ .  
20 Собранные жидкости осветляли путем центрифугирования при 10 тыс. г в  
течение 10 минут и фильтровали через фильтр 0,2 мкм. Осветлённые собранные  
жидкости объединяли с EMULSIGEN® D для получения 12,5% препарата.

**Пример 8:****Инокуляция свиней с помощью инактивированного PDCoV  
и вакцины на основании бакуловирусного шиловидного отростка, а также  
оценка серологической реакции**

Задачей исследования являлось оценка серологической реакции протитипов  
вакцины PDCoV у обычных поросят. Были созданы несколько прототипов  
вакцин, в которых белок шиловидного отростка PDCoV экспрессируется в  
30 различных каркасах. Дополнительно, был создан цельноклеточный  
инактивированный вирусный препарат .

См. таблице 3 ниже для пояснения экспериментальных групп. Группы 1-4  
были рандомизированы и содержали в одном и том же помещении.  
Дополнительно, в настоящее исследование было включено строгое контрольное

животное (Группа 5), которое было отлучено от материнского молока в возрасте четырех недель. В D0, свиньи были рандомизированы на четыре группы и их вводили в дозе 2 мл каждой их прототипных вакцин PDCoV или плацебо. В D21, свиньи получали второе, или бустерное введение каждой из прототипных вакцин. Сыворотку и жидкости ротовой полости собирали у свиней перед введением лечения при каждой вакцинации и в D35. Образцы исследовали для обнаружения подтверждения сероконверсии. Наблюдения за общим состоянием здоровья записывали для помещения ежедневно. За участками инъекций наблюдали для обнаружения реакций минимум в течение трех дней после введения вакцины.

**Таблица 3: Экспериментальные группы**

| Группа | N (Свиньи) | Вакцина               |
|--------|------------|-----------------------|
| 1      | 10         | VaculoS-BD-PDCoV      |
| 2      | 11         | Цельноклеточный PDCoV |
| 3      | 11         | Плацебо               |
| 4      | 10         | VaculoS-FC-PDCoV      |

### **Серологическая реакция после вакцинации, как определено с помощью ИФА**

#### **15 Непрямой иммунофлуоресцентный анализ (ИФА)**

Для каждого образца были приготовлены двукратные серийные разведения от 1:40 до 1:320 в 1x фосфатно-солевом буферном растворе (PBS; Gibco c#10010-023). 100 мкл каждого разведенного образца добавляли к PDCoV инфицированным планшетам и инкубировали в течение одного час при 37°C. После инкубирования, сыворотку удаляли и монослои промывали два раза с помощью 1xPBS. После этого клетки окрашивали с применением 10 мкл/лунку 1:100 разведения FITC-конъюгированного-козьего-анти-свиного-IgG антитела. Титры записывали в виде наибольшего разведения сыворотки, проявляющего PDCoV окрашивание по сравнению с неинфицированным контрольным лунками.

25 Серологическая реакция в D-8, D21 и D35 представлена на группу в Таблице 4 ниже. Средние значения, полученные методом наименьших квадратов, и частота обнаружения в динамике по дням и на группу представлены в Таблице 5. У животных не было обнаружено серологической реакции перед вакцинацией. (см. также фигуру 4).

После сигнальной вакцинации, 20-73% животных имели ответную реакцию с животными, вакцинированными с применением VaculoS-BD прототипа. В день D35, все животные, вакцинированные с применением либо цельноклеточного или VaculoS-FC протитипов, имели обнаружимую ответную реакцию. Только 50% животных, вакцинированных с применением VaculoS-BD прототипа имели обнаружимую ответную реакцию в день D35.

Не было обнаружено существенных отличий в D-8 между серологическими реакциями у свиней, вакцинированных с помощью прототипа или плацебо. В D21 и 35, серологическая реакция была более высокой у животных, получающих прототипную вакцину ( $p < 0,002$  для всех групп во все дни). В количественном выражении, полагают, что VaculoS-FC и цельноклеточные прототипные вакцины стимулируют более высокие IgG ответные реакции в D35 по сравнению с VaculoSBD конструкцией.

**Таблица 4:** Серологические данные по дням и группам, как измерено с помощью ИФА

| Группа | N (Свиньи) | Вакцина               | D-8 |   | D21 |    | D35  |     |
|--------|------------|-----------------------|-----|---|-----|----|------|-----|
|        |            |                       | СКЗ | % | СКЗ | %  | СКЗ  | %   |
| 1      | 10         | VaculoS-BD-PDCoV      | 1   | 0 | 22* | 20 | 20*  | 50  |
| 2      | 11         | Цельноклеточный PDCoV | 1   | 0 | 89* | 73 | 320* | 100 |
| 3      | 11         | Плацебо               | 1   | 0 | 1   | 0  | 2    | 0   |
| 4      | 10         | VaculoS-FC-PDCoV      | 1   | 0 | 36* | 40 | 226* | 100 |

\*Указывает, что значения достоверно отличается от группы плацебо (метод Дуннетта)

#### Серологическая реакция после вакцинации, как обнаружено с помощью ELISA на основании S1-IgG2a-Fc PDCoV IgG ELISA

Очищенный PDCoV-S1-IgG2aFc антиген (BIVI L № 3091-141; 0,2 мг/мл) разводили 1:6666,67 в карбонатном буфере (BIVI L № 3144-180). ELISA планшеты (планшеты с высоким связыванием на 96 лунок; номер кат. Greiner 655061) покрывали в количестве 100 мкл/лунку разведенным антигеном и инкубировали в течение ночи при 4°C. Планшеты промывали пять раз с помощью 300 мкл/лунку TBST (0,05% Tween 20), используя автоматизированное устройство для отмывки планшетов. После стадии промывки, добавляли 150 мкл

блокирующего раствора (блокатор казеина, кат. номер Thermo 37532) на лунку и планшеты инкубировали при 15-30°C в течение одного часа. Исходные разведения сыворотки приготавливали в блокаторе казеина при разведении 1:200 (отрицательный контроль и тестируемые образцы). После инкубирования, блокатор казеина удаляли из планшета и готовили двукратные серийные разведения (приготовленные в блокаторе казеина) тестируемых образцов от 1:200 до 12800. Серийные двукратные разведения отрицательного контроля готовили от 1:200 до 1:204800. Разведения приготавливали на планшеты с конечным объемом 100 мкл/лунку. Планшеты инкубировали при 37°C в течение одного часа со встряхиванием (100 об./мин). После инкубирования, планшеты промывали, как было описано ранее. Приготавливали 1:2000 разведение (в блокаторе казеина) HRP конъюгированного козьего-анти-свиного-IgG (H+L) (кат. номер Jackson ImmunoResearch 114-035-003) и 100 мкл добавляли в каждую лунку. Планшеты инкубировали при 37°C в течение одного часа со встряхиванием при 100 об./мин, затем промывали, как было описано ранее. Для обнаружения, 100 мкл/лунку приготовленного ТМВ субстрата (номер кат. KPL 50-76-00) добавляли на лунку. Планшеты инкубировали при 15-30°C в течение 10 минут. Реакцию останавливали с помощью 100 мкл/лунку 1 н. HCl и сразу анализировали при 450 нм с помощью автоматизированного планшет-ридера.

Результаты получали с помощью следующих расчетов. Сначала, рассчитывали среднее значение и стандартную погрешность оптической плотности (ОП) для полученных данных с лунок с конечными пяти отрицательными разведениями сыворотки. Затем устанавливали пороговое значения в виде среднего значения плюс три стандартных отклонения. Полученное значение оптической плотности для каждого образца (при их начальных разведениях) разделяли на фоновое пороговое значения для этого планшета. Данные записывали в виде отношения сигнала:фон.

Серологическая реакция в дни D-8, D21 и D35 представлена для группы. Средние значения полученные методом наименьших квадратов и частота обнаружения в динамике по дням и группам представлены в Таблице 5 (см. также фигуру 5). У животных не было обнаружимой серологической реакции перед вакцинацией.

После следующей вакцинации, 40-45% животных имели ответную реакцию, независимо от группы. В день D35, все животные, вакцинированные либо с

применением цельноклеточных или VaculoS-FC протитипов, имели обнаружимую ответную реакцию. Не было обнаружено существенных отличий в дни D8 или D21 между серологическими реакциями у свиней, вакцинированных с помощью прототипа или плацебо. В день D35, серологическая реакция была более высокой у животных, получивших прототипную вакцину ( $p=0,0039$ ,  $<0,0001$  или  $<0,0001$  для групп 1, 2 и 4 соответственно). Подобно результатам ИФА, VaculoS-FC и цельноклеточные прототипные вакцины стимулировали более высокие IgG ответные реакции в день D35 по сравнению с конструкцией VaculoS-BD.

10 **Таблица 5:** Серологические данные по дням и группам, как измерено с помощью IgG ELISA

| Группа | N (Свиньи) | Вакцина               | D-8    |   | D21    |    | D35     |     |
|--------|------------|-----------------------|--------|---|--------|----|---------|-----|
|        |            |                       | СКЗ    | % | СКЗ    | %  | СКЗ     | %   |
| 1      | 10         | VaculoS-BD-PDCoV      | 1,2840 | 0 | 1,5068 | 40 | 1,8965* | 70  |
| 2      | 11         | Цельноклеточный PDCoV | 1,3275 | 0 | 1,8040 | 45 | 2,5857* | 100 |
| 3      | 11         | Плацебо               | 1,1350 | 0 | 1,3409 | 9  | 1,6487  | 9   |
| 4      | 10         | VaculoS-FC-PDCoV      | 1,0997 | 0 | 1,4120 | 40 | 2,5857* | 100 |

\* Указывает, что значения достоверно отличается от группы плацебо (метод Дуннетта)

### Пример 9:

#### 15 **Эффективность Бакуловирусных вакцин PEDV**

В следующем исследовании изучали серологическую реакцию на вакцинацию с применением двух доз 2 мл убитой вакцины вируса эпидемической диареи свиней (PEDV), или вакцины на основании бакуловирусной конструкции, которую измеряли после введения одной из этих вакцин свиньям на третьей неделе жизни. Первичный исход подвергали серологическому анализу путем флуоресцентного определения очагов нейтрализации (FFN) для образцов сыворотки, собранных после вакцинации у свиней, которые подвергались обработке.

25 Группы исследования включали: T01 = PBS (n=10); T02 =  $6,93 \log$  TCID<sub>50</sub>/мл BEI PEDV + 20% EMULSIGEN®-BCL (n=20); T03 = бакуловирус с Ag шиловидного отростка PEDV (n=9); 6-кратно концентрированный бакуловирус с Ag шиловидного отростка PEDV (n=10); Трипсин бакуловирус с Ag

шиловидного отростка PEDV (n =10); и условно лицензированная убитая вакцина позитивного контроля (POS CON) (n=10). В день D0, свиньям вводили по 2 мл вакцины внутримышечно в правую мышцу шеи. Вторую обработку осуществляли в день D14 в левую мышцу шеи для T01-T05 и в день D21 для T06.

### 5 *Приготовление PEDV2a-BD*

В этом исследовании, ген шиловидного отростка из вируса эпидемической диареи свиней (PEDV) 2a клонировали в двух перекрывающихся фрагментах (N-конец и С-конец) из плазмидной ДНК. N-концевой фрагмент амплифицировали, используя праймеры P1360110A (SEQ ID NO:37 и PEDV-S2-R (SEQ ID NO:38), в то время как С-концевой фрагмент амплифицировали, используя праймеры PEDV-S1-F (SEQ ID NO:39) и P1360110B (SEQ ID NO:40). N-концевой и С-концевой фрагменты амплифицировали таким образом, чтобы удалить природную сигнальную последовательность и С-концевой хвост. N-концевой фрагмент сливали с gp64 сигнальной последовательностью вируса ядерного полиедроза совки калифорнийской люцерновой (AcNPV) (O1360110C) (SEQ ID NO:41) с помощью ПЦР с перекрывающимися праймерами (OE-PCR), используя праймеры P290194A (SEQ ID NO:45) и PEDV-S2-R (SEQ ID NO:38). С-концевой фрагмент сливали с gp64 С-концевой хвостовой кодирующей последовательностью AcNPV (O1360110D) (SEQ ID NO:42) с помощью OE-PCR, используя праймеры P290194B (SEQ ID NO:43) и PEDV-S1-F (SEQ ID NO:44). Два полученных фрагмента сливали с помощью OE-PCR, используя праймеры P290194A (SEQ ID NO:45) и P290194B (SEQ ID NO:43) для получения кодирующей последовательности бакулодисплея шиловидного отростка PEDV (PEDVS BD) (SEQ ID NO:46), содержащей консенсусную последовательность Козака непосредственно на 5' старт-кодоне. Конечную кодирующую последовательность фланкировали с помощью BamHI и NotI рестрикционных сайтов для облегчения клонирования в бакуловирусной трансферной плазмиде pVL1393. После завершения, использовали плазмидную pVL1393-PEDVS BD с линейаризованной бакуловирусной ДНК VaculoGold для трансфекции клеток насекомых Sf9 для продуцирования рекомбинантного бакуловируса. См. фигуру 6А. Схематическая диаграмма Бакуловируса Бакулодисплея PEDV 2a BD.

Таблица 6: PEDV Прототипные препараты и контроли

| Обработка |                                | Описание  |
|-----------|--------------------------------|---|
| T01       | Отрицательный контроль (NC)    | Физиологический раствор (PBS 1x)  |
| T02       | Экспериментальная вакцина (EV) | Вирус эпидемической диареи свиней в количестве $6,93 \log_{10}$ TCID <sub>50</sub> /мл PEDV инактивированный с помощью BEI, с добавлением в качестве адъюванта 20% EMULSIGEN® BCL.  |
| T03       | EV                             | Рекомбинантный бакуловирус PEDV2a-BD (Гликопротеин шиловидного отростка PEDV, который размещается на оболочке вируса.)*   |
| T04       | EV                             | Рекомбинантный бакуловирус PEDV2a-BD (Гликопротеин шиловидного отростка PEDV, который размещается на оболочке вируса.)* Осветленный инактивированный материал концентрировали ~6X перед приготовлением препарата.   |
| T05       | EV                             | Рекомбинантный бакуловирус PEDV2a-BD (Гликопротеин шиловидного отростка PEDV, который размещается на оболочке вируса.)* Рекомбинантный шиловидный отросток PEDV-Бакуловирусный дисплей получали в клетках насекомых при использовании 10 мк/мл трипсина, который добавляли во время инфекции. |
| T06       | Положительный контроль (PC)    | iPED+ (Вакцина Харриса - условно лицензированная)   |

BEI = бинарный этиленмин

\*Сигнальную последовательность шиловидного отростка и С-концевой хвост PEDV заменяли эквивалентом бакуловируса gr64. Рекомбинантный шиловидный отросток PEDV-

5 бакуловирусный дисплей получали в клетках насекомых. Инфицированные культуры собирали и осветляли с помощью центрифугирования и фильтрации через фильтр 0,2 мкм. Светленный собранный материал инактивировали с помощью 5 мМ BEI в течение 72 часов при 37°C, затем осветляли с помощью центрифугирования и фильтрации через фильтр 0,2 мкм.

## 10 Серология:

Сероконверсия после вакцинации (D28 и D35) происходила у 20% свиней, вакцинированных с помощью PEDV вакцины с добавлением в качестве адъюванта 20% EMULSIGEN® BCL (T02; Таблица 7) и 60% свиней, вакцинированных с помощью трипсин-выращенный шиловидный отросток PEDV- бакуловирус (T05; Таблица 7). Среднее геометрическое значение титра для серопозитивных свиней  $\geq 1:20$  для всех обработанных групп представлены

ниже в Таблице 7. Эмпирическая плотность распределения титров в группе обработки для всех свиней представлена в Таблице 8.

Таблица 7: Доля, которую составляют серопозитивные свиньи, и среднее геометрическое значение титров для группы свиней, которые отвечали серологически

| Группа | Свиньи с $\geq 1:20$ ответа | Среднее геометрическое значение титра |
|--------|-----------------------------|---------------------------------------|
| T01    | 0/10 (0%)                   | Не применяется                        |
| T02    | 4/20 (20%)                  | 1:30,7                                |
| T03    | 0/9 (0%)                    | Не применяется                        |
| T04    | 0/10 (0%)                   | Не применяется                        |
| T05    | 6/10 (60%)                  | 1:35,5                                |
| T06    | 7/10 (70%)                  | 1:41,9                                |

Таблица 8: Эмпирическая плотность распределения титров для группы

| Группа | n  | Нейтрализующие PEDv антитела* |          |          |          |          |          |          |          |
|--------|----|-------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
|        |    | <1:20                         | 1:20     | 1:28     | 1:40     | 1:57     | 1:80     | 1:113    | 1:160    |
| T01    | 10 | 10 (100%)                     | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) |
| T02    | 20 | 16 (80%)                      | 1 (5%)   | 2 (10%)  | 0 (0,0%) | 1 (5%)   | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) |
| T03    | 9  | 9 (100%)                      | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) |
| T04    | 10 | 10 (100%)                     | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) |
| T05    | 10 | 4 (40%)                       | 2 (20%)  | 2 (20%)  | 1 (10%)  | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | 1 (10%)  |
| T06    | 10 | 3 (30%)                       | 2 (20%)  | 2 (20%)  | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | 2 (20%)  | 1 (10%)  | 0 (0,0%) |

#### Вывод:

- 10 Сероконверсия происходила у 20% T02 свиней после двух введений экспериментальной вакцины, рецептированной с  $6,93 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/мл PEDV, инактивированного при использовании ВЕI и с добавлением в качестве адьюванта 20% EMULSIGEN® BCL. Сероконверсия происходила у 60% T05
- 15 свиней после двух введений экспериментальной рекомбинантной выращенной с трипсином бакуловиральной вакцины, рецептированной с гликопротеином шиловидного отростка PEDV.

**Пример 10:****Эффективность бакуловиральных вакцин PEDV 2a VD**

Основной задачей этого исследования являлась оценка эффективности прототипных PEDV бакуловиральных вакцин на общепринятой модели у свиноматок. Тридцать шесть свиноматок были рандомизированы на пять групп. Свиноматки были внутримышечно вакцинированы за пять и две недели до опороса с помощью экспериментальной PEDV вакцины, плацебо, коммерчески доступного положительного контроля или оставались невакцинированными (строгий контроль). Краткое описание групп и используемых вакцин представлено в Таблице 9 ниже. Во время беременности, опороса и периода заражения, у свиноматок и свиней отбирали образцы сыворотки и фекалий для мониторинга присутствия антител к PEDV и РНК PEDV. Клинические признаки записывали один раз в сутки.

Параметром первичного исхода исследования являлась смертность свиней. На основании 69% смертности свиней, наличия клинических признаков и идентификации РНК PEDV в фекальных материалах от свиней с группы плацебо, модель заражения, используемая в этом исследовании, считалась валидной. Применение двух доз VaculoS-NT конструкции у свиноматок было способным существенно уменьшить смертность свиней. По сравнению с этим, PEDV вакцина, доступная в настоящее время в продаже, также способна уменьшить смертность свиней; тем не менее, уменьшение не является достоверным. Поскольку VaculoS-NT прототип не выращивали в присутствии трипсина и он был с добавлением в качестве адъюванта 12,5% EMULSIGEN® D, то полагают, что этот прототип будет представлять собой предпочтительный формат для получения и имеет период отмены 21 день.

Параметром вторичного исхода исследования было способность прототипов вакцин предотвращать клинические признаки у свиней. Максимально 93% всех свиней имели чистый жидкий понос минимум в течение двух последовательных дней, ни прототипы вакцины, ни коммерчески доступный продукт не были способны предотвращать начало тяжелых клинических признаков. Аналогичным образом, ни одна из вакцин не были способны уменьшать продолжительность клинических признаков у свиней.

Таблица 9. Схема исследования:

| Группа | N<br>(свиноматки) | N<br>(свиньи) | Вакцина                                   | Зараженные<br>свиньи<br>(Да/Нет) |
|--------|-------------------|---------------|---|----------------------------------|
| 1      | 8                 | 82            | PEDV2a-BD Vaculo S-T (12,5% EMULSIGEN®D)  | Да                               |
| 2      | 8                 | 87            | PEDV2a-BD Vaculo S-NT (12.% EMULSIGEN® D) | Да                               |
| 5      | 8                 | 81            | Плацебо (1x PBS)                          | Да                               |
| 4      | 8                 | 70            | Положительный контроль                    | Да                               |
| 5      | 4                 | 46            | Строгий контроль                          | Нет                              |

Свиноматок внутримышечно вакцинировали за пять и недели до опороса экспериментальной PEDV вакциной, плацебо, коммерчески доступным положительным контролем или оставляли невакцинированными (строгий контроль). Во время беременности, собирали образцы крови и фекалий перед каждой вакцинацией и исследовали для выявления наличия сероконверсии и выделения вируса, соответственно. Клинические наблюдения записывали для каждой свиноматки ежедневно.

#### 10 **Смертность свиней:**

Смертность свиней после заражения при использовании вирулентного PEDV изолята являлась параметром первичного исхода, используемого для оценки эффективности вакцины. Краткая информация о смертности для группы во время периода заражения представлена в Таблице 10 ниже. Вживаемость для групп и по дням исследования представлена на Фигуре 7. 'Процент выживших свиней на группу и день исследования'). В день D0, вакцину в дозе 2 мл вводили здоровым свиноматкам в правую мышцу шеи, используя стерильную иглу подходящего размера и шприц. В день D21, процесс был идентичным, за исключением того, что инъекцию осуществляли в левую сторону шеи.

Материал для заражения представлял собой вирулентный PEDV исходный материал (PEDV 1251-140-4; p5; номер партии 2842-174; титр =  $2,02 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/мл), который разводили до титра  $1,0 \times 10^3$  в PEDV вирусной ростовой среде (модифицированная минимальная питательная среда с HEPES, триптозо-фосфатный бульон и дрожжевой экстракт). Аналогично предыдущим исследованиям, большинство смертельных исходов наблюдались в течение восьми дней от введения материала для заражения.

В целом, все группы имели сходные тенденции проявления клинических признаков у большинства свиней в течение 48 часов инфицирования.

Клинические признаки присутствовали более, чем у 50% свиней во всех группы группах до DPC6. С DPC7 до DPC11 клинические признаки устранились. В день DPC13, клинические признаки не наблюдались у любых свиней.

*Анализ:*

5 Биологическая статистика. Все данные импортировали в SAS® версия 9.4 для анализа. Генерировали перечни данных и обобщенные статистики на экспериментальную группу, включая частоты распределения. Анализы осуществляли, включая помет и слияние содержания, если это является подходящим. Представляли смертность свиней после заражения на группу и помет и использовали описательные статистические средние, медиану, минимум и максимум в итоге на группу. Смертность на группу и помет анализировали с использованием обобщенной линейной модели с критерием Пирсона в качестве избыточной дисперсии. После этого оценивали фракцию предотвращения на основе модели и 95% доверительный интервал для каждой опытной группы по сравнению с группой с плацебо. Обобщенная линейная модель с критерием Пирсона в качестве избыточной дисперсии пригодна для анализа данных смертности в сочетании с возрастом, оценкой обработки и паритета в качестве фиксированных эффектов для анализа того, будут ли иметь эти факторы какое-либо влияние на смертность. Представлены данные рандомизации исследования.

10 Представлена оценка фекалий и обобщена на группу и день исследования, используя частоту распределения. Итоговое обобщение осуществляли перед и во время заражения отдельно. Представлена оценка клинических признаков для свиноматок (фекалии, рвотные массы, поражения участка инъекции, агалактия и лечения) и обобщены отдельно перед и после опороса на группу и день исследования, используя частоту распределения. Представлены данные веса свиней и обобщены, используя описательные статистики медианы, минимума и максимума на помет, группу и день. Анализировали среднесуточный прирост веса (ADWG) с помощью смешанной модели с группой и весом при опоросе в качестве фиксированных эффектов; помет и помещение для содержания в качестве случайных эффектов. Оценивали средние значения, полученные методом наименьших квадратов и их отличия между группами; оценивали соответствующие стандартные погрешности и 95% доверительные интервалы. Представлены данные некроскопии для свиней, включая патологические данные для органа и содержимого для слепой кишки, ободочной кишки, тонкого

15

20

25

30

кишечника, и очагов в легких и содержимого желудка, и обобщены, используя подсчеты для каждой переменной на группу, разделенные на смертность. Если где-нибудь существует какое-либо поражение, то оно также обобщено, используя подсчёты и процентное содержание на группу. Лабораторные данные, включая титр антител к вирусу PED в сыворотке (FFN) для свиноматок, сывороточные IgA цельноклеточные ELISA для свиней и свиноматок отдельно, IgA и IgG baculos ELISA для свиноматок, IgA и IgG IDEXX ELISA и PCR для свиноматок и свиней, перечислены сначала. После этого, рассчитывали описательные статистические средние, минимум, максимум и стандартное отклонение на группу и день, используя либо средние геометрические значения (FFN) (хотя для FFN, стандартное отклонение не обеспечивается) или средние значения (ELISA, PCR). После этого, оценивали средние значения, полученные методом наименьших квадратов, стандартные погрешности и 95% доверительные интервалы на группу и день, используя смешанную модель с пометом и помещением для содержания в качестве рандомных эффектов. Оценивали различия между средними значениями, полученными методом наименьших квадратов, между парами групп группы и соответствующие 95% доверительные интервалы.

Таблица 10: Смертность свиней на группу

| Группа | Описание               | % Смертности свиней |            |         |          |                      |
|--------|------------------------|---------------------|------------|---------|----------|----------------------|
|        |                        | Среднее             | Серединное | Минимум | Максимум | PF                   |
| 1      | VaculoS-T              | 59,03               | 59,60      | 8,33    | 100,00   | 0,17 (-0,244, 0,444) |
| 2      | VaculoS-NT             | 36,31               | 44,16      | 0,00    | 58,33    | 0,48 (0,103, 0,695)  |
| 3      | Плацебо                | 68,95               | 69,32      | 45,45   | 91,67    | Не применяется       |
| 4      | Положительный контроль | 42,83               | 32,47      | 9,09    | 100,00   | 0,39 (-0,037, 0,642) |

Параметром первичного исхода исследования была смертность свиней. На основании этого параметра, применение двух доз конструкции VaculoS-NT у свиноматок было способным существенно уменьшить смертность свиней (PF=0,48). По сравнению с этим, PEDV вакцина, доступная в настоящее время на рынке, также была способна уменьшить смертность свиней; тем не менее, это снижение не было достоверным (Группа 4). Поскольку VaculoS-NT прототип не выращивали в присутствии трипсина и он был с добавлением в качестве

адьюванта 12,5% EMULSIGEN® D, то полагают, что это прототип будет представлять собой предпочтительный формат и имеет период отмены 21 день.

5 Параметрами вторичного исхода исследования были способность прототипов вакцин предотвращать клинические признаки у свиней и свиноматок. Максимально 93% всех свиней имели чистый жидкий понос минимум в течение двух последовательных дней, ни прототипы вакцин, ни коммерчески доступный продукт не были способны предотвратить начало тяжелых клинических признаков. Сходным образом, ни она из вакцин не были способны уменьшить положительность клинических признаков у свиней. После 10 урегулирования клинических признаков, РНК PEDV была идентифицирована у 12-33% животных в день DPC14. Это свидетельствует о том, что вакцинация не защищает от колонизации. У 1-3 свиноматок на группу, наблюдали тяжелый понос по крайней мере в течение двух последовательных дней. Это указывает на то, что вакцины не способны полностью защитить свиноматок от воздействия 15 высоких количеств вируса, выделяемого зараженными свиньями. Дополнительно, большинство свиноматок (14/16) имели обнаружимые количества вируса, присутствующего в брыжеечных лимфатических узлах, указывая на то, что вакцинация не предотвращает колонизацию.

Большинство вакцинированных свиноматок имели обнаружимый IgG (и 20 FFN) ответ после введения двух доз вакцины; титры были более высокими по сравнению с вакцинированными плацебо контролями (данные не представлены). Поскольку IgG ELISA и FFN результаты являются очень сходными, то представляется вероятным, что FFN анализ главным образом обнаруживает IgG. Несмотря на то, что IgG может нейтрализовать вирус, маловероятно, что он 25 является единственным фактором, определяющим эффективность PEDV вакцины, как четких различий между группами не было обнаружено .

На основании уровней IgA, как измерено IgA ELISA (IDEXX), невакцинированные и вакцинированные свиноматки имели сходные титры IgA в сыворотке и молоке в день DPC13/14. Тем не менее, повышенные титры IgA в 30 сыворотке, молозиве и молоке, собранных в день DPC3, были отмечены у вакцинированных животных. Поскольку выжившие свиньи от вакцинированных свиноматок также имели наивысшие титры IgA, то эти данные подтверждают ранее опубликованные литературные данные, подчеркивающие важность IgA при кишечных инфекциях. (См. Фигуру 8).

**ПРИМЕР 11:****Приготовление PEDV2b бакуловирусных вакцин**

Ген шиловидного отростка из вируса эпидемической диареи свиней (PEDV) 2b приготавливали в двух перекрывающихся фрагментах (N-конец и C-конец). N-концевой фрагмент амплифицировали из синтезированной ДНК, содержащей слияние gp64 сигнальной последовательности вируса множественного ядерного полиэдроса совки калифорнийской люцерновой (AcNPV) с аминокислотами 22-400 шиловидного отростка PEDV 2b, используя праймеры P290194A (SEQ ID NO:48) и P3183131B (SEQ ID NO:49). C-концевой фрагмент амплифицировали из pVL1393-PEDVS BD плазмидной ДНК, которая уже содержит AcNPV gp64 C-концевую хвостовую кодирующую последовательность, используя праймеры P3183131A (SEQ ID NO:50) и P290194B (SEQ ID NO:51). Два полученных фрагмента сливали с помощью OE-PCR, используя праймеры P290194A (SEQ ID NO:48) и P290194B (SEQ ID NO:51) для получения кодирующей последовательности шиловидный отросток PEDV 2b Бакулодисплей (PEDVS 2b BD) (SEQ ID NO:52), содержащий консенсусную последовательность Козака непосредственно на 5' старт-кодоне. Конечную кодирующую последовательность фланкировали с помощью BamHI и NotI рестрикционных сайтов для облегчения клонирования в бакуловирусной трансферной плазмиде pVL1393. После завершения, плазмиду pVL1393-PEDVS 2b BD использовали с линейаризованной бакуловирусной ДНК VaculoGold для трансфекции клеток насекомых Sf9 для продуцирования рекомбинантного бакуловируса. См. фигуру 6B. Схематическая диаграмма Карта белка PEDV 2b BD Бакулодисплей Бакуловирус.

**Пример 12: Исследования эффективности PEDV и PDCoV**

Приведенное ниже исследование было предназначено для оценки эффективности убитой PEDV вакцины и/или убитой PDCoV вакцины или других прототипных вакцин у свиней. Параметр первичного исхода представлял собой смертность поросят после заражения вирусом эпидемической диареи свиней (PEDV) и/или PDCoV. Параметр вторичного исхода представлял собой серологию свиноматок. Другие измеряемые параметры включали: клинические признаки (включая ISL) у свиноматок после вакцинации; выделение вируса у

свиноматок после вакцинации (оценивали с помощью количественной ОТ-ПЦР); клинические признаки у поросят; и серологию PEDV и/или PDCoV у поросят.

### **Исследование PEDV:**

За четыре и за две недели до опороса (D0 и D14), каждой супоросной свиноматке вводили 2 одной из следующих вакцин для обработки с помощью трех различных путей (внутримышечный, интраназальный и пероральный): T01 (отрицательный контроль, NC) фосфатно-солевой буферный раствор; T02 (BEI-VH) с добавлением в качестве адъюванта 20% EMULSIGEN® BCL; T03 (строгий контроль, SC) служил в качестве контроля без вакцинации/стимуляции. Восемь животных использовали в каждой группе, за исключением T06, которая включала четырех животных. В день D35 или D36, свиной заражали перорально с помощью 1 мл  $2,0 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/мл полученного вирусного материала PEDV. Наблюдали клинические признаки (рвота и понос) у свиноматок и свиной ежедневно во время фазы заражения. Сыворотку собирали от свиноматок за четыре и две недели до опороса (D0 и D14), за день до заражения поросят (D34 или D35) и в день окончания исследования (D57).

В дни D0 и D14, свиноматкам вводили PEDV прототипные иммуногенные композиции. При каждой вакцинации, свиноматки получали в общей сложности 6 мл материала, где 2 мл вводили внутримышечным, интраназальным и пероральным путем. Для внутримышечного введения, осуществляли инъекцию 2 мл в мышцы шеи ниже уха. Сторона шеи для введения изменялась для первичной и бустерной вакцинации. Для перорального введения, 2 мл вакцины вводили над задней частью ротоглотки при использовании полипропиленового катетера 8Fr (диаметр 2,7 мм, длина 254 мм), присоединенного к шприцу. Для интраназального введения, 1 мл инъецировали в каждую ноздрю при использовании катетера размером 4,5 дюймов, присоединенного к шприцу.

Таблица 11: Экспериментальные иммуногенные композиции PEDV и Контрольный продукт

| Обработка | Группа | Серийн. №  | Описание  |
|-----------|--------|------------|---|
| T01       | NC     | 2842-182-D | 1X Фосфатно-солевой буферный раствор; катал. номер Gibco 10010-023; партия № 1510272  |
| T02       | BEI-VH | 2842-182-E | KV-1251-125-10-OK, фильтрование через фильтр 0,2 мкм, пассирование MSV+5, $6,04 \log$ TCID <sub>50</sub> /мл. Полученный вирусный материал инактивировали при использовании 5 мМ BEI в течение 72 часов при 37°C. Для рецептирования, добавляли EMULSIGEN® BCL (MVP партия № 17006, дата производства 2/11/11) при норме включения 20%. |

Таблица 12: Материал для заражения PEDV

|  |   |
|--|---|
| <b>Штамм PEDV для заражения:</b>             | Идентификац. номер изолята 1251-140-4; пассаж 5   |
| <b>Препарат для заражения:</b>               | Размножение в клетках Vero  |
| <b>Доза материала для заражения:</b>         | 1 мл при $2,0 \log_{10}$ TCID <sub>50</sub> /мл   |
| <b>Тестирование материала для заражения:</b> | Вирус для заражения титровали перед введением на клетках 2013 EU Vero (5,03 TCID <sub>50</sub> /мл) и разводили до $2 \log$ TCID <sub>50</sub> /мл. |
| <b>Способ введения:</b>                      | Пероральное введение (с помощью шприца) свиньям при удерживании руками.   |

**Эффективность вакцины:**

- 5           Смертность свиней: Смертность свиней после заражения при использовании вирулентного PEDV изолят представляла собой параметр первичного исхода, используемый для оценки эффективности вакцины. Краткая информация о смертности для группы во время периода заражения представлена ниже. Со значением 55% смертности и всем пометом, зараженным
- 10           в T01 (NC), материал для инфицирования считался в достаточной степени вирулентным. По сравнению с T01 (NC), T02 (BEI-VH) продемонстрировало значительное снижение смертности свиней с PF (95% ДИ) 0,20 (-0,550, 0,586). Снижение не было статистически значимым, поскольку 95% доверительный интервал (-0,550, 0,586) включал 0. (См. Таблицу 13).
- 15           Экста-биномиальная вариация была очевидной в этом исследовании, что приводило к широкому доверительному интервалу для T02 (BEI-VH) PF, когда использовали лежащее в основе этого биномиальное распределение. Смертность значительно варьировала среди пометов в пределах групп, и колебалась в пределах от 0% до 100% для T02 (BEI-VH).
- 20           Образец кишечника или содержимое кишечника отбирали в процессе некропсии и подвергали анализу при использовании количественной ОТ-ПЦР для определения антигена PEDV. Из исследованных образцов животных, взятых во время пика смертности, PEDV определялся в 55,5% образцов.

Таблица 13:

| Группа | Оцененный показатель смертности | Средне-квадратическая ошибка | Фракция предотвращения заболевания* | 95% Доверительный интервал | Средний показатель смертности | Минимум%/Максимум% |
|--------|---------------------------------|------------------------------|-------------------------------------|----------------------------|-------------------------------|--------------------|
| НО     | 0,55                            | 0,11                         | .                                   | .                          | 52,78                         | 12,50 / 100,00     |
| ВЕI-VH | 0,44                            | 0,10                         | 0,20                                | (-0,550, 0,586)            | 34,29                         | 0,00 / 100,00      |

\*На основе T01 (NC) доли пораженных болезнью.

\*\*НО=Не определяли. Доверительный интервал, возможный для T02 (ВЕI-VH), основывался на модели исследования

### Серология свиноматок:

Анализ флуоресцентного определения очагов нейтрализации (FFN): FFN анализ использовали для оценки ответа нейтрализации вируса у свиноматок после вакцинации и контрольного заражения. Средние геометрические значения титров, приведенные по группам, представлены ниже для дней, в которые брали кровь у свиноматок.

После введения двух доз вакцины, 2/8 (25%) свиноматок в T02 (ВЕI-VH) имели обнаружимые уровни нейтрализующего антитела. Обнаружимые уровни нейтрализующего антитела не наблюдали ни в одной из других групп.

После латерального введения PEDV, все свиноматки в группах, которые подвергались обработке, имели обнаружимые уровни нейтрализующего антитела. Животные в T03 (SC) группе оставались серонегативными на протяжении всего исследования. Среднее геометрическое значение титра в день D57 (примерно через 21 день после заражения) показали, что вакцинация приводила к численно более высоким титрам по сравнению с T01 (NC). Свиноматки в T02 (ВЕI-VH) группе имели GMT показатель 613, который является примерно в три раза выше титра по сравнению с GMT 200 для свиноматок в T01 (NC) ( $p=0,005$ ). Поскольку много образцов в T02 (ВЕI-VH) группе имели способные к обнаружению нейтрализующие антитела при самом высоком исследованном разведении (1:640), эти результаты, вероятно, представляют собой консервативную оценку различий между группами.

Таблица 14: Серология свиноматок

| Обработка | Группа | Среднее геометрическое значение титра* |     |             |     |
|-----------|--------|--|-----|-------------|-----|
|           |        | День исследования**                    |     |             |     |
|           |        | D0                                     | D14 | D34 или D35 | D57 |
| T01       | NC     | <20                                    | <20 | <20         | 200 |
| T02       | BEI-VH | <20                                    | <20 | 15          | 613 |
| T03       | SC     | <20                                    | <20 | <20         | <20 |

Там, где все значения были <20, среднее геометрическое значение титра представлено как <20. В ином случае значения <20 устанавливали на уровне 10 для подсчета среднего геометрического значения титра (GMT)

5

\*\*D57 GMT для T01 (NC) и T02 (BEI-VH) представляли собой обратно преобразованные среднеквадратические значения

### Данные ELISA на основе S1:

10 ELISA на основе S1 использовали для оценки ответа свиноматок на белок шиповидного отростка PEDV после вакцинации и контрольного заражения. Результаты анализа для молозива, молока и сыворотки приведены по группам, для тех дней, в которые брали образцы.

15 В момент заражения свиней, свиноматки в T02 (BEI-VH) имели значительно более высокое среднее геометрическое значение титра в сыворотке по сравнению со свиноматками в T01 (NC) ( $p=0,0005$ ). После воздействия PEDV, была отмечена более значительная существенная разница между двумя группами ( $p<0,0001$ ).

20 Значимые отличия в среднегеометрическом значении титров IgA к PEDV в молозиве и в молоке не наблюдались между группами T02 (BEI-VH) и T04 (NC).

Таблица 15:

| Обработка | Группа | Среднее геометрическое значение титра* |                           |                   |                |
|-----------|--------|--|---------------------------|-------------------|----------------|
|           |        | День исследования                      |                           |                   |                |
|           |        | D27 до D32:<br>Молозиво                | D34 или D35:<br>Сыворотка | D57:<br>Сыворотка | D57:<br>Молоко |
| T01       | NC     | 0,186                                  | 0,098                     | 0,504             | 0,220          |
| T02       | BEI-VH | 0,139                                  | 0,256                     | 1,499             | 0,244          |
| T03       | SC     | 0,134                                  | 0,125                     | 0,164             | 0,088          |

\* GMT для T01 (NC) и T02 (BEI-VH) представляли собой обратно преобразованные среднеквадратические значения

### Серология свиней:

5 Сыворотку собирали в момент некропии от свиней, чтобы оценить наличие нейтрализующих антител. В Таблице 16 ниже представлены среднее геометрическое титров FFN позитивных свиней по группам. Таблица 16 также включает частоту обнаружения, выраженную как количество свиней с GMT, большим или равным 20 в зависимости от количества исследуемых животных.  
10 Анализ проводился на всех доступных образцах. Образцы от многочисленных свиней не удалось получить из-за разницы во времени между смертью и аутопсией.

Описательная статистика для титров FFN по статусу смертности (умер: да/нет) и группам (в целом) приведены ниже. В общей сложности подобное соотношение свиней в вакцинированных группах подвергалось сероконверсии (или имели материнские антитела) независимо от времени некропии. Однако в T01 (NC), существовал более высокий процент свиней, которые умерли до того, как имели титры к концу исследования (88%) по сравнению со свиньями, которые жили на протяжении всего периода исследования (43%).  
15

20 При рассмотрении общих титров свиней по группам, оцененный показатель смертности был обратно зависимым от процента общей группы FFN для T02 (BEI-VH).

Таблица 16:

| Группа | Свиньи (умершие = да) | Свиньи (умершие = нет) | Общий показатель | Оцененный показатель смертности |
|--------|-----------------------|------------------------|------------------|---------------------------------|
| NC     | 55 (28/32; 88%)       | 33 (9/21; 43%)         | 63 (37/53; 59%)  | 0,55                            |
| BEI-VH | 44 (23/42; 55%)       | 50 (9/16; 56%)         | 64 (32/58; 55%)  | 0,44                            |

25

\* GMT (количество животных с титром  $\geq 20$  / общее количество свиней, которых подвергали исследованию; процент); следует отметить, что сыворотку получали не от всех свиней.

**Клинические наблюдения после заражения:**

Показатели фекалий свиней: описательная статистика по продолжительности наблюдений аномальных фекалий у свиней FFN по статусу смертности (погибли: да/нет) приведены ниже. В целом, показатель средней продолжительности аномальных фекалий у свиней с таким же статусом смертности был сходным среди групп. У животных, которые погибли или были подвергнуты эвтаназии, была численно короче средняя продолжительность показателей аномальных фекалий. Эта тенденция была наиболее заметной у T01 (NC) свиней и, вероятно, является вторичной по отношению к тому факту, что большинство из этих животных умерли в течение первой недели после заражения.

Таблица 17:

| Длительность (дни) показателей аномальных фекалий |        |               |                  |         |          |                        |
|---|--------|---------------|------------------|---------|----------|------------------------|
| Погибли   | Группа | Кол-во свиней | Среднее значение | Минимум | Максимум | Стандартное отклонение |
| Нет   | NC     | 32            | 5,5              | 3,5     | 7,0      | 0,8                    |
|   | BEI-VH | 42            | 6,0              | 4,5     | 8,5      | 0,8                    |
| Да  | NC     | 39            | 2,3              | 0,5     | 6,0      | 1,3                    |
|   | BEI-VH | 33            | 4,3              | 2,0     | 6,0      | 1,4                    |

Тяжесть показателей фекалий у свиней подытожена в Таблице 18, где приведена частота, представленной ниже. Во всех группах обработки была представлена высокая доля свиней (> 91%) с показателем фекалий 2 в процессе, по крайней мере, одного наблюдения после заражения.

Таблица 18:

| Группа       | Максимальный показатель для фекалий |           |             |       |
|--------------|-------------------------------------|-----------|-------------|-------|
|              | 0                                   | 1         | 2           | Общий |
| NC           | 1<br>1,41                           | 5<br>7,04 | 65<br>91,55 | 71    |
| BEI-VH       | 1<br>1,33                           | 0<br>0,00 | 74<br>98,67 | 75    |
| <b>Общий</b> | 2                                   | 5         | 139         | 146   |

**Выводы:**

20%-ное снижение смертности свиней наблюдали в T02 (BEI-VH) по сравнению с T01 (NC) группой. В этом исследовании испытывали три способа введения. Несмотря на то, что использовали три пути введения, не было

ожидания, что пути введения, отличные от внутримышечного, будут способствовать эффективности T02 (BEI-VH) на основе адьюванта и композиции вакцины. В целом вакцина на основе инактивированного PEDV с добавлением адьюванта 20% EMULSIGEN®-BCL с минимальной предварительной инактивацией и титром  $6,04 \log TCID_{50}/мл$  вызывала лучший иммунный ответ у поросят и свиноматок. Предпочтительный график вакцинации представляет собой внутримышечное введение для поросят 3-недельного возраста или старше трех доз 2 мл вакцины с 2-недельными интервалами. Клинические признаки у свиноматки после вакцинации не наблюдались в T02 (BEI-VH) и были ограничены в других группах обработки. Использование вакцинации, по-видимому, не влияет на процент свиней, которые родились живыми (данные не показаны).

Серологию свиноматок оценивали в качестве вторичного параметра с помощью двух отдельных анализов (нейтрализация очагов флуоресценции, ELISA на основе S1). Оба анализа показали значительное увеличение титра в T02 (BEI-VH) после введения вакцины и заражения по сравнению с T01 (NC). Из-за известных ограничений анализа FFN, образцы были исследованы также с помощью ELISA на основе S1. Этот ELISA был выбран поскольку домен S1 белка шиловидного отростка предполагается как таковой, который содержит нейтрализующие эпитопы.

После латерального введения PEDV все животные в группах, которые подвергались обработке, имели способные к определению уровни нейтрализующих антител. Свиноматки в T02 (BEI-VH) имели примерно в три раза более высокие титры по сравнению с T01 (NC) животными. Это является подтверждением того, что использование вакцины стимулировало начальный первичный ответ и приводило к большему вторичному ответу после заражения вирусом. Поскольку многие образцы в T02 (BEI-VH) группе имели способные к определению уровни нейтрализующих антител при самом высоком исследуемом разведении (1:640), эти результаты, вероятно, представляют собой консервативную оценку различий между группами (BEI-VH) группе имели способные к обнаружению нейтрализующие антитела при самом высоком исследованном разведении (1:640), эти результаты, вероятно, представляют собой консервативную оценку различий между группами.

Таблица 19: Смертность свиней и серологические данные свиноматок обобщены ниже.

| Обработка | Группа | FFN<br>(Сыворотка свиноматок, D21) | IgG ELISA<br>(Сыворотка свиноматок, D21) | Смертность свиней (%) | Фракция с предотвращением (смертность свиней) |
|-----------|--------|------------------------------------|--|-----------------------|---|
| T01       | NC     | 200                                | 0,504                                    | 55%                   | .   |
| T02       | BEI-VH | 613                                | 1,499                                    | 44%                   | 0,20  |
| T03       | SC     | <20                                | 0,164                                    | Не применяется        | Не применяется                                |

### Исследование PDCoV

5           Задачей этого исследования являлось определение эффективности прототипных вакцин PDCoV на животном-хозяине. На основании представленного ниже предварительного исследования для разработки материала для заражения и модели болезни PDCoV, невакцинированные поросята проявляли потерю веса и понос в течение недели заражения и  
10           восстанавливались. Не наблюдали смертности.

Таблица 20: Материал для заражения Дельтакоронавирус свиней (PDCoV):

| Группа | Количество свиноматок | Количество поросят | Вирус для заражения/ обработка       | Титр  | Доза            |
|--------|-----------------------|--------------------|--------------------------------------|---|-----------------|
| 1      | 1                     | 6                  | NVSL-PDCoV P12                       | 6,1 log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> /поросят | 1 мл/перорально |
| 2      | 1                     | 5                  | Плацебо (PDCoV поддерживающая среда) | N/A   | 1 мл/перорально |
| 3      | 1                     | 12                 | BI PDCoV 5.0327                      | 4,6 log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> /поросят | 1 мл/перорально |
| 4      | 1                     | 12                 | BI PDCoV 2.0307                      | 3,9 log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> /поросят | 1 мл/перорально |

15           Для разработки штамм для заражения дельтакоронавируса свиней (PDCoV), два внутренних изолята для заражения (Группы 3 и 4) выращивали на BI-ST клетках и сравнивали с NVSL PDCoV изолятом (Illinois 2014). Изоляты в группах 3 и 4 отбирали на основании мутации, которыми они обладают и их генетическим расстоянием от NVSL (Illinois 2014) изолята. Группа 3 вируса (BI PDCoV-5.0327) имела 3 аминокислотную делецию в гликопротеине шиповидного  
20           отростка и два изменения в ORF1AB гене по сравнению с NSVL PDCoV изолятом. Группа 4 вируса (BI PDCoV 2.0307) имела 4 аминокислотных отличий

в гликопротеине шиловидного отростка и 3 отличия в ORF1AB гене по сравнению с NVSL PDCoV.

Зараженных поросят оценивали относительно наличия поноса по шкале, где 0 = нормальный, 1 = аномальный (но не чистая жидкость) или 2= тяжелый понос (полностью жидкие фекалии) после заражения. Поноса не наблюдали в группе отрицательного контроля. Дополнительно, в группе, зараженной с применением NVSL PDCoV, не проявлялось каких-либо клинических признаков, потери веса, рвоты или поноса после заражения. Поросята в группах 3 и 4 проявляли тяжелые клинические признаки, при этом 100% из них страдали от тяжелого поноса (оценка 2), сопровождаемого рвотой и потерей веса. Дополнительно, свиноматки в группах 3 и 4 страдали от поноса (D6-D8 после заражения) и подвергались лечению. В ранее опубликованных исследованиях было описано пролонгированное инфицирование (и выделение вируса) для поросят, инфицированных PDCoV. Эти наблюдения согласуются с нашими результатами.

Животные в группах NVSL PDCoV и отрицательном контроле прибавили в весе после заражения. По сравнению с этим, животные, зараженные с применением двух изолятов для заражения В1 PDCoV-5.0327 (Группа 3) и В1 PDCoV 2.0307 (Группа 4) проявляли менее выраженную прибавку в весе в течение такого же периода по сравнению с контрольной группой.

#### 20 **Эффективность исследования:**

Таблица 21. Схема исследования PDCoV (группы вакцин, доз и пути введения)

| Группа | Число свиноматок | Основная вакцина                                    | Путь введения вакцины | Доза (за 5 и 2 недели до опороса) |
|--------|------------------|---|-----------------------|-----------------------------------|
| 1      | 4                | ВЕ1 инактивированный PDCoV                          | в/м                   | 2 мл                              |
| 2      | 4                | ВЕ1 инактивированный Vasulo-Шиловидный отросток-FcR | в/м                   | 2 мл                              |
| 3      | 4                | NVSL-PDCoV (живая ослабленная)                      | Перорально            | 2 мл                              |
| 4      | 4                | Плацебо (среда, поддерживающая вирус)               | в/м                   | 2 мл                              |

Для исследования эффективности, четыре группы свиноматок были вакцинированы каждым вакцинным препаратом, как подробно описано в Таблице 21, с помощью подходящего пути за 5 и 2 недели до опороса. Сыворотку собирали от свиноматок перед осуществление обработки при каждой вакцинации для исследования сероконверсии. Образцы фекалий собирали от

свиноматок при каждой вакцинации и анализировали для выявления выделения вакцины.

Поросята от иммунизированных свиноматок включали в исследования во время опороса. Поросят инокулировали приблизительно в возрасте пять - семь 5 дней, с применением 1,0 мл материала для заражения, используя пероральный путь введения.

Как за поросятами, так и за свиньями наблюдали для выявления 10 клинических признаков один раз в сутки с дня заражения (DPC) 0 и до DPC14. После заражения от всех поросят и свиноматок отбирали образцы фекалий и сыворотки. Образцы фекалий тестировали для определения наличия РНК PDCoV, а сыворотку тестировали для определения наличия антител к PDCoV. Молозиво собирали во время опороса или приблизительно в это время от всех свиноматок. Молоко собирали от всех свиноматок в день DPC3 и в 15 определенный момент между DPC10 и DPC14. Молозиво и молоко тестировали для определения наличия антител к PDCoV. За весом поросят наблюдали в дни DPC 0, 7 и 21 с конечным забором сыворотки в день DPC21.

Все композиции и способы, раскрытые и заявленные в данной заявке, могут быть осуществлены без излишних экспериментов в свете настоящего описания. В то время как композиции и способы в соответствии с настоящим изобретением 20 были описаны в контексте предпочтительных воплощений, специалистам в данной области техники будет очевидным, что могут применяться вариации к композициям и способам, а также в стадиях или последовательностях стадий способа, описанной в данной заявке без отступления от концепции, духа и объема изобретения. В частности, будет очевидно, что определенные агенты, 25 которые являются как химически, так и физиологически подобными, могут быть использованы вместо агентов, описанных в данной заявке, если те же или аналогичные результаты будут достигнуты. Все такие подобны замены и модификации, очевидные для специалистов в данной области техники, считаются такими, которые находятся в пределах сущности, объема и концепции 30 в соответствии с изобретением, как это определено в прилагаемой формуле изобретения.

Следующие ссылки, в той степени, в которой они предоставляют типичные процедуры или другие детали, дополняющие те, которые изложены в настоящей заявке, специально включены в данную заявку в качестве ссылки.

## ССЫЛКИ

1. Bridgen A, Duarte M, Tobler K, Laude H, Ackermann M. 1993. Sequence determination of the nucleocapsid protein gene of the porcine epidemic diarrhoea virus confirms that this virus is a coronavirus related to human coronavirus 229E and porcine transmissible gastroenteritis virus. *J. Gen. Virol.* 74 (Pt 9):1795–1804.
2. Duarte M, Gelfi J, Lambert P, Rasschaert D, Laude H. 1993. Genome organization of porcine epidemic diarrhoea virus. *Adv. Exp. Med. Biol.* 342:55–60.
3. Tobler K, Bridgen A, Ackermann M. 1993. Sequence analysis of the nucleocapsid protein gene of porcine epidemic diarrhoea virus. *Adv. Exp. Med. Biol.* 342:49–54.
4. Oldham J. 1972. Letter to the editor. *Pig Farming* 1972(October suppl):72–73.
5. Pensaert MB, de Bouck P. 1978. A new coronavirus-like particle associated with diarrhoea in swine. *Arch. Virol.* 58:243–247.
6. Chen JF, Sun DB, Wang CB, Shi HY, Cui XC, Liu SW, Qiu HJ, Feng L. 2008. Molecular characterization and phylogenetic analysis of membrane protein genes of porcine epidemic diarrhoea virus isolates in China. *Virus Genes* 36:355–364.
7. Nagy B, Nagy G, Meder M, Mocsári E. 1996. Enterotoxigenic *Escherichia coli*, rotavirus, porcine epidemic diarrhoea virus, adenovirus and calici-like virus in porcine postweaning diarrhoea in Hungary *Acta Vet. Hung.* 44:9–19.
8. Martelli P, Lavazza A, Nigrelli AD, Meriardi G, Alborali LG, Pensaert MB. 2008. Epidemic of diarrhoea caused by porcine epidemic diarrhoea virus in Italy. *Vet. Rec.* 162:307–310.
9. Takahashi K, Okada K, Ohshima K. 1983. An outbreak of swine diarrhoea of a new-type associated with coronavirus-like particles in Japan. *Nippon Juigaku Zasshi* 45:829–832.
10. Chae C, Kim O, Choi C, Min K, Cho WS, Kim J, Tai JH. 2000. Prevalence of porcine epidemic diarrhoea virus and transmissible gastroenteritis virus infection in Korean pigs. *Vet. Rec.* 147:606–608.
11. Puranaveja S, Poolperm P, Lertwatcharasarakul P, Kesdaengsakonwut S, Boonsoongnern A, Uairong K, Kitikoon P, Choojai P, Kedkovid R, Teankum K, Thanawongnuwech R. 2009. Chinese-like strain of porcine epidemic diarrhoea virus, Thailand. *Emerg. Infect. Dis.* 15:1112–1115.
12. Stevenson GW, Hoang H, Schwartz KJ, Burrough ER, Sun D, Madson D, Cooper VL, Pillatzki A, Gauger P, Schmitt BJ, Koster LG, Killian ML, Yoon KJ. 2013. Emergence of porcine epidemic diarrhoea virus in the United States: clinical signs, lesions, and viral genomic sequences. *J. Vet. Diagn. Invest.* 25:649–654.

13. Kim SH, Kim IJ, Pyo HM, Tark DS, Song JY, Hyun BH. 2007. Multiplex real-time RT-PCR for the simultaneous detection and quantification of transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus. *J. Virol. Methods* 146:172–177.
14. Hofmann M, Wyler R. 1988. Propagation of the virus of porcine epidemic diarrhea in cell culture. *J. Clin. Microbiol.* 26:2235–2239.
15. Marthaler D, Jiang Y, Otterson T, Goyal S, Rossow K, Collins J. 2013. Complete genome sequence of porcine epidemic diarrhea virus strain USA/Colorado/2013 from the United States. *Genome Announc.* 1(4):e00555-13.10.1128/genomeA.00555-13.
16. Song D, Park B. 2012. Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines. *Virus Genes* 44:167–175.
17. Huang YW, Dickerman AW, Piñeyro P, Li L, Fang L, Kiehne R, Opriessnig T, Meng XJ. 2013. Origin, evolution, and genotyping of emergent porcine epidemic diarrhea virus strains in the United States. *mBio* 4(5):e00737-13.
18. Bi J, Zeng S, Xiao S, Chen H, Fang L. 2012. Complete genome sequence of porcine epidemic diarrhea virus strain AJ1102 isolated from a suckling piglet with acute diarrhea in China. *J. Virol.* 86:10910–10911.
19. Chen J, Wang C, Shi H, Qiu HJ, Liu S, Shi D, Zhang X, Feng L. 2011. Complete genome sequence of a Chinese virulent porcine epidemic diarrhea virus strain. *J. Virol.* 85:11538–11539.
20. Chen J, Liu X, Shi D, Shi H, Zhang X, Feng L. 2012. Complete genome sequence of a porcine epidemic diarrhea virus variant. *J. Virol.* 86:3408.10.1128/JVI.07150-11.
21. Fan H, Zhang J, Ye Y, Tong T, Xie K, Liao M. 2012. Complete genome sequence of a novel porcine epidemic diarrhea virus in south China. *J. Virol.* 86:10248–10249.
22. Gao Y, Kou Q, Ge X, Zhou L, Guo X, Yang H. 2013. Phylogenetic analysis of porcine epidemic diarrhea virus field strains prevailing recently in China. *Arch. Virol.* 158:711–715.
23. Li B, Liu H, He K, Guo R, Ni Y, Du L, Wen L, Zhang X, Yu Z, Zhou J, Mao A, Lv L, Hu Y, Yu Y, Zhu H, Wang X. 2013. Complete genome sequence of a recombinant porcine epidemic diarrhea virus strain from eastern China. *Genome Announc.* 1(2):e00105-13.10.1128/genomeA.00105-13.
24. Luo Y, Zhang J, Deng X, Ye Y, Liao M, Fan H. 2012. Complete genome sequence of a highly prevalent isolate of porcine epidemic diarrhea virus in south China. *J. Virol.* 86:9551–9551.

25. Wang XM, Niu BB, Yan H, Gao DS, Huo JY, Chen L, Chang HT, Wang CQ, Zhao J. 2013. Complete genome sequence of a variant porcine epidemic diarrhea virus strain isolated in central China. *Genome Announc.* 1(1):e00243-12. [10.1128/genomeA.00243-12](https://doi.org/10.1128/genomeA.00243-12).
26. Wei ZY, Lu WH, Li ZL, Mo JY, Zeng XD, Zeng ZL, Sun BL, Chen F, Xie QM, Bee YZ, Ma J-Y. 2012. Complete genome sequence of novel porcine epidemic diarrhea virus strain GD-1 in China. *J. Virol.* 86:13824–13825.
27. Zhao M, Sun Z, Zhang Y, Wang G, Wang H, Yang F, Tian F, Jiang S. 2012. Complete genome sequence of a Vero cell-adapted isolate of porcine epidemic diarrhea virus in eastern China. *J. Virol.* 86:13858–13859.
28. S.H. Chang, J.L. Bae, T.J. Kang, J. Kim, G.H. Chung, C.W. Lim, H. Laude, M.S. Yang, Y.S. Jang. 2002. Identification of the epitope region capable of inducing neutralizing antibodies against the porcine epidemic diarrhea virus. *Mol. Cells* **14**, 295–299.
29. D.J. Cruz, C.J. Kim, H.J. Shin. 2008. The GPRLQPY motif (SEQ ID NO: 20) located at the carboxy-terminal of the spike protein induces antibodies that neutralize Porcine epidemic diarrhea virus. *Virus Res.* **132**, 192–196.
30. M. Godet, J. Grosclaude, B. Delmas, H. Laude. 1994. Major receptor-binding and neutralization determinants are located within the same domain of the transmissible gastroenteritis virus (coronavirus) spike protein. *J. Virol.* **68**, 8008–8016.
31. M.W. Jackwood, D.A. Hilt, S.A. Callison, C.W. Lee, H. Plaza, E. Wade. 2001. Spike glycoprotein cleavage recognition site analysis of infectious bronchitis virus. *Avian Dis.* **45**, 366–372.
32. L.S. Sturman, K.V. Holmes. 1984 Proteolytic cleavage of peplomeric glycoprotein E2 of MHV yields two 90K subunits and activates cell fusion. *Adv. Exp. Med. Biol.* **173**, 25–35.
33. D. Sun, L. Feng, H. Shi, J. Chen, X. Cui, H. Chen, S. Liu, Y. Tong, Y. Wang, G. Tong. 2008. Identification of two novel B cell epitopes on porcine epidemic diarrhea virus spike protein. *Vet. Microbiol.* **131**, 73–81.
34. S.J. Park, H.J. Moon, J.S. Yang, C.S. Lee, D.S. Song, B.K. Kang, B.K. Park. 2007. Sequence analysis of the partial spike glycoprotein gene of porcine epidemic diarrhea viruses isolated in Korea. *Virus Genes* **35**, 321–332.
35. L.J. Saif. 1993. Coronavirus immunogens. *Vet. Microbiol.* 285–297.
36. S.J. Park, H.K. Kim, D.S. Song, H.J. Moon, B.K. Park. 2011 Molecular characterization and phylogenetic analysis of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) field isolates in Korea. *Arch. Virol.* **156**, 577–585.

37. D.S. Song, J.S. Yang, J.S. Oh, J.H. Han, B.K. Park. Differentiation of a Vero cell adapted porcine epidemic diarrhea virus from Korean field strains by restriction fragment length polymorphism analysis of ORF 3. 2003. *Vaccine* 21, 1833–1842.
38. D.S. Song, J.S., B.K. Park. 2012 Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines. *Virus Genes* 44, 167-175.
39. J.F. Chen, D.B. Sun, C.B. Wang, H.Y. Shi, X.C. Cui, S.W. Liu, H.J. Qiu, L. Feng. 2008. Molecular characterization and phylogenetic analysis of membrane protein genes of porcine epidemic diarrhea virus isolates in China. *Virus Genes* 36, 355–364.
40. L. Yuan, S.Y. Kang, L.A. Ward, T.L. To, L.J. Saif. 1998 Antibody-secreting cell responses and protective immunity assessed in gnotobiotic pigs inoculated orally or intramuscularly with inactivated human rotavirus. *J. Virol.* 72, 330–338.
41. C.H. Kweon, B.J. Kwon, J.G. Lee, G.O. Kwon, Y.B. Kang. 1999. Derivation of attenuated porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) as vaccine candidate. *Vaccine* 17, 2546–2553.
42. Y. Usami, O. Yamaguchi, K. Kumanomido, Y. Matsumura. 1998. Antibody response of pregnant sows to porcine epidemic diarrhea virus live vaccine and maternally-derived antibodies of the piglets. *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.* 51, 652–655.
43. L.A. Ward, L. Yuan, B.I. Rosen, T.L. To, L.J. Saif. 1996. Development of mucosal and systemic lymphoproliferative responses and protective immunity to human group A rotaviruses in a gnotobiotic pig model. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 3, 342–350.
44. A. Pijpers, A.P. van Nieuwstadt, C. Terpstra, J.H. Verheijden. 1993. Porcine epidemic diarrhoea virus as a cause of persistent diarrhoea in a herd of breeding and finishing pigs. *Vet. Rec.* 132, 129–131.
45. T. Sato, Takeyama, N., Katsumata, A., Tuchiya, K., Kodama, T., Kusanagi, K. 2011. Mutations in the spike gene of porcine epidemic diarrhea virus associated with growth adaptation in vitro and attenuation of virulence in vivo. *Virus Genes*, 43, 1, 72.
46. Park, S.J., Kim, H.K., Song, D.S., An, D.J. and Park, B.K. 2012. Complete genome sequences of a Korean virulent porcine epidemic diarrhea virus and its attenuated counterpart *J. Virol.* 86 (10), 5964.
47. Kusanagi K, Kuwahara H, Katoh T, Nunoya T, Ishikawa Y, Samejima T, Tajima M. 1992. Isolation and serial propagation of porcine epidemic diarrhea virus in cell cultures and partial characterization of the isolate. *J Vet Med Sci.* 1992 Apr;54(2):313-8.
48. Hofmann M, Wyler R. 1988. Propagation of the virus of porcine epidemic diarrhea in cell culture. *J Clin Microbiol.* Nov;26(11):2235-9.49. de Arriba ML, Carvajal A, Pozo J,

Rubio P. 2002. Mucosal and Systemic Isotype-specific Antibody Responses and Protection in Conventional Pigs Exposed to Virulent or Attenuated Porcine Epidemic Diarrhoea Virus. *Vet Immunol Immunopathol.* 85(1-2): p. 85-97.

50. Woo, P.C., et al., Discovery of seven novel Mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus. *J Virol*, 2012. 86(7): p. 3995-4008.

51. Hu, H., et al., Isolation and Characterization of Porcine Deltacoronavirus from Pigs with Diarrhea in the United States. *J Clin Microbiol*, 2015 53(5): p. 1537-1548.

10 52. Chen, Q., et al., Pathogenicity and pathogenesis of a United States porcine deltacoronavirus cell culture isolate in 5-day-old neonatal piglets. *Virology*, 2015. 482: p. 51-59.

53. Li, G., et al., Full-Length Genome Sequence of Porcine Deltacoronavirus Strain USA/IA/2014/8734. *Genome Announc*, 2014. 2(2).

15 54. Marthaler, D., et al., Rapid detection, complete genome sequencing, and phylogenetic analysis of porcine deltacoronavirus. *Emerg Infect Dis*, 2014a. 20(8): p. 1347-50.

55. Marthaler, D., et al., Complete Genome Sequence of Strain SDCV/USA/Illinois121/2014, a Porcine Deltacoronavirus from the United States. *Genome Announc*, 2014b. 2(2).

56. Wang, L., B. Byrum, and Y. Zhang, Detection and genetic characterization of deltacoronavirus in pigs, Ohio, USA, 2014. *Emerg Infect Dis*, 2014. 20(7): p. 1227-30.

57. Jung, K., et al., Pathogenicity of 2 porcine deltacoronavirus strains in gnotobiotic pigs. *Emerg Infect Dis*, 2015. 21(4): p. 650-4.

25 58. Lee, S. and C. Lee, Complete Genome Characterization of Korean Porcine Deltacoronavirus Strain KOR/KNU14-04/2014. *Genome Announc*, 2014. 2(6).

59. Dong, N., et al., Porcine Deltacoronavirus in Mainland China. *Emerg Infect Dis*, 2015. 21(12): p. 2254-5.

60. Song, D., et al., Newly Emerged Porcine Deltacoronavirus Associated With Diarrhoea in Swine in China: Identification, Prevalence and Full-Length Genome Sequence Analysis. *Transbound Emerg Dis*, 2015. 62(6): p. 575-80.

61. Ma, Y., et al., Origin, evolution, and virulence of porcine deltacoronaviruses in the United States. *MBio*, 2015. 6(2): p. e00064.

62. Vitosh-Sillman, S., et al. Histopathological and immunohistochemical characterization of pigs experimentally infected with porcine deltacoronavirus. in American Association of Swine Veterinarians. 2015. Orlando, FL.

5 63. Ma, Y., et al., Origin, evolution, and virulence of porcine deltacoronaviruses in the United States. MBio, 2015. 6(2).

64. ISERPD 2015. The 7<sup>th</sup> Annual International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases. Kyoto, Japan June 21-24, 2015. (See <http://emerging2015.com/>; [http://emerging2015.com/pdf/ISERPD2015\\_Oral\\_Presentations\\_v8.pdf](http://emerging2015.com/pdf/ISERPD2015_Oral_Presentations_v8.pdf); and [http://emerging2015.com/pdf/ISERPD2015\\_Poster\\_Presentations\\_v5.pdf](http://emerging2015.com/pdf/ISERPD2015_Poster_Presentations_v5.pdf), accessed 10 November 4, 2016).

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Иммуногенная композиция, содержащая один или несколько антигенов дельтакоронавируса свиней (PDCoV) и адъювант, где дельтакоронавирус свиней (PDCoV) представляет собой любой PDCoV:
- а) который кодируется SEQ ID NO:1, 5 или 9, и/или включает последовательность SEQ ID NO:1, 5 или 9 и/или включает РНК эквивалент SEQ ID NO:1, 5 или 9;
- б) где последовательность является, по крайней мере, на 99% идентичной SEQ ID NO:1 и/или является, по крайней мере, на 99% идентичной РНК эквиваленту SEQ ID. NO:1, 5 или 9;
- в) где белок шиповидного отростка кодируется последовательностями нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 3, 7, 11, 17 или 27;
- г) где белок шиповидного отростка кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая является, по крайней мере, на 90% идентичной SEQ ID NO:3, 7, 11, 17 или 27;
- д) который кодируется SEQ ID NO:2, 6 или 10; или
- е) где последовательность является, по крайней мере, на 99% идентичной SEQ ID NO:2, 6 или 10.
2. Иммуногенная композиция в соответствии с пунктом 1, где адъювант представляет собой эмульсию масло-в-воде.
3. Иммуногенная композиция по пунктам 1 или 2, где иммуногенная композиция представляет собой рекомбинантный антиген или инактивированный полный антиген дельтакоронавируса свиней (PDCoV).
4. Иммуногенная композиция по любому из пунктов 1-3, где антиген представляет собой инактивированный полный антиген PDCoV.
5. Иммуногенная композиция по пункту 4, где антиген PDCoV является химически инактивированным.

6. Иммуногенная композиция по пункту 5, где антиген PDCoV является химически инактивированным путем обработки с помощью химического инактивирующего агента, который включает соединение, выбранное из группы, включающей этиленимин, бинарный этиленимин, ацетилэтиленимин и их смеси.
- 5
7. Иммуногенная композиция по пункту 6, где PDCoV является химически инактивированным путем обработки бинарным этиленимином.
8. Иммуногенная композиция по любому из пунктов 1-7, где адъювант представляет собой адъювант EMULSIGEN® на основе эмульсии масло-в-воде.
- 10
9. Иммуногенная композиция по пункту 4, где инактивированный дельтакоронавирус свиней (PDCoV) включает SEQ ID NO:1, 5 или 9, и/или включает РНК эквивалент SEQ ID NO:1, 5 или 9.
- 15
10. Иммуногенная композиция по любому из пунктов 1-3, где антиген PDCoV представляет собой рекомбинантный антиген.
11. Иммуногенная композиция по пункту 10, где рекомбинантный антиген включает один или более иммуногенных компонентов, выбранных из группы, включающей :
- 20
- а) изолированную нуклеиновую кислоту, которая кодирует антиген белка шиловидного отростка дельтакоронавируса свиней (PDCoV), где рекомбинантный полипептид шиловидного отростка имеет, по крайней
  - 25 мере, 90% гомологии с SEQ ID NO: 4, 8, 12, 18 или 28;
  - б) рекомбинантный вектор, включающий изолированную нуклеиновую кислоту в соответствии с а);
  - в) рекомбинантный белок шиловидного отростка PDCoV, который кодируется нуклеиновой кислотой в соответствии с а); и
  - 30 г) любую их комбинацию.
12. Иммуногенная композиция по пунктам 10 или 11, где такая иммуногенная композиция включает фармацевтически приемлемый носитель и/или наполнитель.

13. Иммуногенная композиция по любому из пунктов 10-12, где эмульсия масло-в-воде представляет собой адъювант EMULSIGEN® на основе эмульсии масло-в-воде.

5

14. Иммуногенная композиция по любому из пунктов 1-13, где иммуногенная композиция дополнительно включает один или более дополнительных антигенов.

10 15. Иммуногенная композиция по пункту 14, где дополнительный антиген представляет собой антиген вируса эпидемической диареи свиней (PEDV), где вирус эпидемической диареи свиней (PEDV) представляет собой любой PEDV:

а) который кодируется SEQ ID NO:29, и/или включает последовательность SEQ ID NO:29, или 33 и/или включает РНК эквивалент SEQ ID NO:29, или 33;

15

б) где последовательность является, по крайней мере, на 99% идентичной SEQ ID NO:29 или 33 и/или является, по крайней мере, на 99% идентичной РНК эквиваленту SEQ ID. NO:29 или 33;

в) где белок шиловидного отростка кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:30, 34, 46 или 52;

20

г) где белок шиловидного отростка кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая является, по крайней мере, на 90% идентичной SEQ ID NO:30, 34, 46 или 52;

д) который кодируется SEQ ID NO:32 или 36; или

25

е) который кодируется последовательностью, которая является, по крайней мере, на 99% идентичной SEQ ID NO:32 или 36.

15. Иммуногенная композиция по пункту 15, где дополнительный антиген PEDV представляет собой рекомбинантный антиген или инактивированный полный вирус эпидемической диареи свиней (PEDV).

30

16. Иммуногенная композиция по пункту 16, где антиген представляет собой инактивированный полный вирус эпидемической диареи свиней (PEDV).

17. Иммуногенная композиция по пункту 16, где антиген представляет собой рекомбинантный антиген PEDV.

18. Иммуногенная композиция по любому из пунктов 16 или 18, где рекомбинантный антиген включает один или более иммуногенных компонентов, выбранных из группы, включающей :

- а) изолированную нуклеиновую кислоту, кодирующую антиген белка шиловидного отростка вируса эпидемической диареи свиней (PEDV), где антиген имеет, по крайней мере, 90% гомологии с SEQ ID NO:31, 35, 47 или 52;
- б) рекомбинантный вектор, включающий изолированную нуклеиновую кислоту в соответствии с а);
- в) рекомбинантный белок шиловидного отростка PEDV, который кодируется нуклеиновой кислотой в соответствии с а); и
- г) любую их комбинацию.

19. Иммуногенная композиция по любому из пунктов 14, 15, 16 или 18, где рекомбинантный антиген включает один или более иммуногенных компонентов, выбранных из группы, включающей: структурный белок М, Е, или N вируса эпидемической диареи свиней (PEDV).

20. Иммуногенная композиция по пункту 19, где иммуногенный компонент представляет собой изолированную нуклеиновую кислоту.

21. Иммуногенная композиция по пункту 19, где иммуногенный компонент представляет собой рекомбинантный вектор.

22. Иммуногенная композиция по пункту 19, где иммуногенный компонент представляет собой рекомбинантный белок шиловидного отростка вируса эпидемической диареи свиней (PEDV).

23. Иммуногенная композиция по пункту 19, где иммуногенный компонент представляет собой комбинацию.

24. Способ уменьшения клинических симптомов заболевания, связанного с дельтакоронавирусом свиней (PDCoV), который включает введение свиные иммуногенной композиции по любому из пунктов 1-24.
- 5 25. Способ уменьшения клинических симптомов заболевания, связанного с дельтакоронавирусом свиней (PDCoV), который включает введение свиные иммуногенной композиции по пункту 4.
- 10 26. Способ уменьшения клинических симптомов заболевания, связанного с дельтакоронавирусом свиней (PDCoV), который включает введение свиные иммуногенной композиции по пункту 10.
27. Способ по пункту 25, где такая иммуногенная композиция включает один или более иммуногенных компонентов, выбранных из группы, включающей:
- 15 а) который кодируется SEQ ID NO:1, 5 или 9, и/или включает последовательность SEQ ID NO:1, и/или включает РНК эквивалент SEQ ID NO:1, 5 или 9;
- б) где последовательность является, по крайней мере, на 99% идентичной SEQ ID NO:1, 5 или 9, и/или является, по крайней мере, на 99% идентичной РНК эквиваленту SEQ ID. NO:1, 5 или 9;
- 20 в) где белок шиловидного отростка кодируется последовательностями нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:3, 7, 11, 17 или 27;
- г) где белок шиловидного отростка кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая является, по крайней мере, на 90% идентичной
- 25 SEQ ID NO:3, 7, 11, 17 или 27;
- д) который кодируется SEQ ID NO:2, 6 или 10; и
- е) где последовательность является, по крайней мере, на 99% идентичной SEQ ID NO:2, 6 или 10.
- 30 28. Способ по пункту 26, где такая иммуногенная композиция включает один или более иммуногенных компонентов, выбранных из группы, включающей:
- а) который кодируется или включает последовательность SEQ ID NO:1, 5 или 9;

б) где последовательность является, по крайней мере, на 99% идентичной SEQ ID NO:1, 5 или 9;

в) где белок шиловидного отростка кодируется последовательностями нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 3, 7, 11, 17 или 27; и

5 г) где белок шиловидного отростка кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая является, по крайней мере, на 90% идентичной SEQ ID NO: 3, 7, 11, 17 или 27.

29. Способ по пункту 27, где такой рекомбинантный антиген включает один или более иммуногенных компонентов, выбранных из группы, включающей :

а) изолированную нуклеиновую кислоту, кодирующую антиген белка шиловидного отростка вируса эпидемической диареи свиней дельтакоронавирус свиней (PDCoV) , где рекомбинантный полипептид шиловидного отростка имеет, по крайней мере, 90% гомологии с SEQ ID NO: 4, 8, 12, 18 или 28;

15 б) рекомбинантный вектор, включающий изолированную нуклеиновую кислоту в соответствии с а);

в) рекомбинантный белок шиловидного отростка дельтакоронавируса свиней (PDCoV), который кодируется нуклеиновой кислотой в соответствии с а); и

г) любую их комбинацию.

20

30. Способ уменьшения клинических симптомов заболевания, ассоциированного с дельтакоронавирусом свиней (PDCoV) и вирусом эпидемической диареи свиней (PEDV), который включает введение свиные иммуногенной композиции по любому из пунктов 15-24.

25

31. Способ уменьшения клинических симптомов заболевания, ассоциированного с дельтакоронавирусом свиней (PDCoV) и вирусом эпидемической диареи свиней (PEDV), который включает введение такой свиные иммуногенной композиции по любому из пунктов 14-17.

30

32. Способ уменьшения клинических признаков заболеваний, ассоциированных с дельтакоронавирусом свиней (PDCoV) и вирусом эпидемической диареи свиней (PEDV), который включает введение такой свиные иммуногенной композиции по любому из пунктов 14, 15, 16 или 18-24.

33. Набор для индуцирования иммуногенного ответа у свиньи против заболеваний, ассоциированных с дельтакоронавирусом свиней (PDCoV), который включает:
- 5 а) дозирующее устройство, способное вводить свинье иммуногенную композицию; и  
б) иммуногенную композицию по любому из пунктов 1-14.
34. Набор для индуцирования иммуногенного ответа у свиньи против заболеваний, ассоциированных с дельтакоронавирусом свиней (PDCoV), который включает:
- 10 а) дозирующее устройство, способное вводить свинье иммуноген; и  
б) иммуногенную композицию по любому из пунктов 4-9.
35. Набор для индуцирования иммуногенного ответа у свиньи против заболеваний, ассоциированных с дельтакоронавирусом свиней (PDCoV), который включает:
- 15 а) дозирующее устройство, способное вводить свинье иммуногенную композицию; и  
20 б) иммуногенную композицию по любому из пунктов 10-14.
36. Набор для индуцирования иммуногенного ответа у свиньи против заболеваний, ассоциированных с дельтакоронавирусом свиней (PDCoV) и вирусом эпидемической диареи свиней (PEDV), который включает:
- 25 а) дозирующее устройство, способное вводить свинье иммуногенную композицию; и  
б) иммуногенную композицию по любому из пунктов 15-24.
37. Набор для индуцирования иммуногенного ответа у свиньи против заболеваний, ассоциированных с дельтакоронавирусом свиней (PDCoV) и вирусом эпидемической диареи свиней (PEDV), который включает:
- 30 а) дозирующее устройство, способное вводить свинье иммуногенную композицию; и  
б) иммуногенную композицию по любому из пунктов 15-17.

38. Набор для индуцирования иммуногенного ответа у свиньи против заболеваний, ассоциированных с дельтакоронавирусом свиней (PDCoV) и вирусом эпидемической диареи свиней (PEDV), который включает:

- 5 а) дозирующее устройство, способное вводить свинье иммуногенную композицию; и  
б) иммуногенную композицию по любому из пунктов 18-24.

39. Способ получения иммуногенной композиции дельтакоронавируса свиней (PDCoV) по любому из пунктов 4-9, который включает:

- 10 а) инокуляцию свиных тестикулярных клеток дельтакоронавирусом свиней (PDCoV);  
б) инкубацию инокулированных свиных тестикулярных клеток;  
в) получение дельтакоронавируса свиней (PDCoV) из инкубированных  
15 клеток; и  
г) обработку собранных клеток с помощью химического инактивирующего агента, предпочтительно с помощью соединения, выбранного из группы, включающей этиленимин, бинарный этиленимин, ацетилэтиленимин или их смесь, с получением инактивированного антигена дельтакоронавируса свиней  
20 (PDCoV).

40. Способ по пункту 40, где дельтакоронавирус свиней (PDCoV) включает:

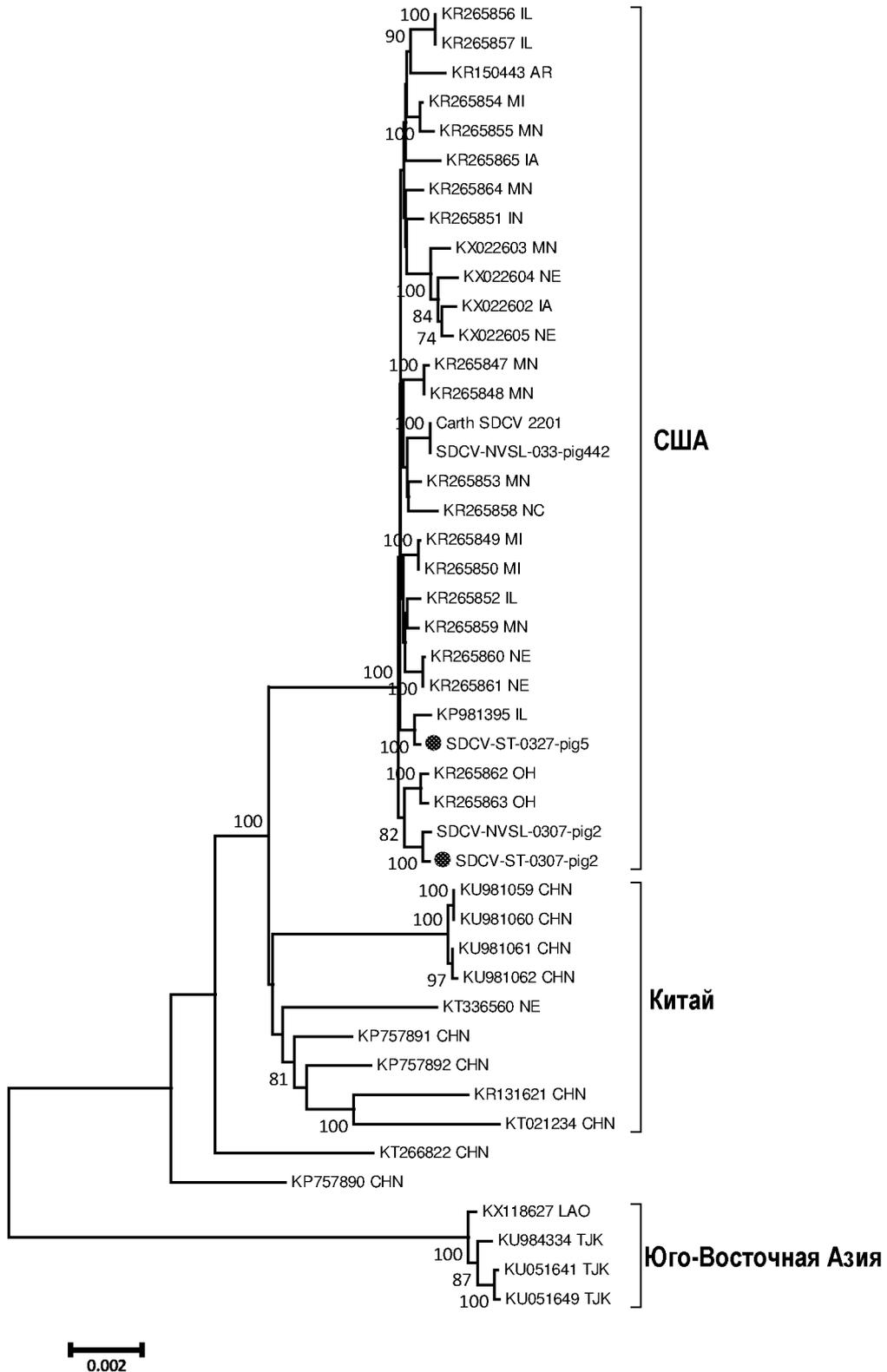
- а) последовательность, которая кодируется или включает последовательность SEQ ID NO:1, 5 или 9;  
25 б) последовательность, которая является, по крайней мере, на 99% идентичной SEQ ID NO:1, 5 или 9;  
в) белок шиповидного отростка, который кодируется последовательностями нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:3, 7, 11, 17 или 27;  
г) белок шиповидного отростка, который кодируется последовательностью  
30 нуклеиновой кислоты, которая является, по крайней мере, на 90% идентичной SEQ ID NO:3, 7, 11, 17 или 27.

41. Способ по пункту 41, где дельтакоронавирус свиней (PDCoV) включает SEQ ID NO:1, 5 или 9 и/или РНК эквивалент SEQ ID NO:1, 5 или 9.

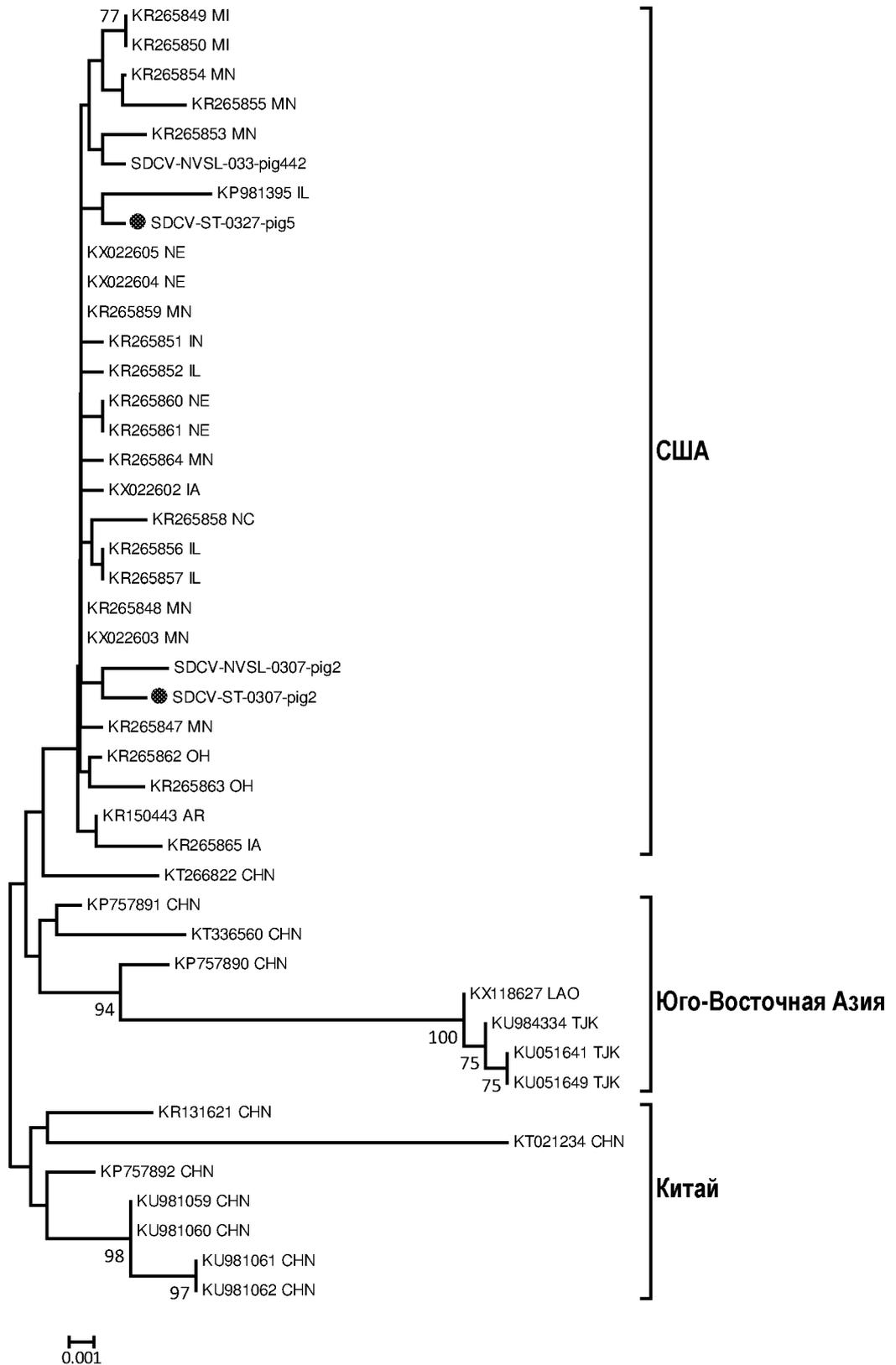
42. Способ по пункту 40, где свиные тестикулярные клетки представляют собой AI-ST клетки.
- 5 43. Способ по пункту 43, где химический инактивирующий агент включает бинарный этиленимин.
44. Способ по пункту 40, который дополнительно включает добавление адъюванта на основе эмульсии масло-в-воде EMULSIGEN® к антигену  
10 дельтакоронавируса свиней (PDCoV).
45. Способ получения иммуногенной композиции, содержащей рекомбинантный антиген дельтакоронавируса свиней (PDCoV) по любому из пунктов 10-24, который включает:
- 15 а) экспрессию антигена дельтакоронавируса свиней (PDCoV) в клетке-хозяине;
- б) получение антигена дельтакоронавируса свиней (PDCoV) из клеток; и
- в) добавление адъюванта на основе эмульсии масло-в-воде к антигену дельтакоронавируса свиней (PDCoV) со стадии б).
- 20 46. Способ по пункту 46, где антиген дельтакоронавируса свиней (PDCoV) включает:
- а) изолированную нуклеиновую кислоту, которая кодирует антиген белка шиловидного отростка дельтакоронавируса свиней (PDCoV), где  
25 рекомбинантный полипептид шиловидного отростка имеет, по крайней мере, 90% гомологии с SEQ ID NO: 4, 8, 12, 18 или 28;
- б) рекомбинантный вектор, включающий изолированную нуклеиновую кислоту в соответствии с а);
- в) рекомбинантный белок шиловидного отростка дельтакоронавируса свиней  
30 (PDCoV), который кодируется нуклеиновой кислотой в соответствии с а); и
- г) любую их комбинацию.
47. Способ по пункту 46, где антиген дельтакоронавируса свиней (PDCoV) экспрессируется с помощью рекомбинантного бакуловирусного вектора.

48. Способ по пункту 48, где антиген дельтакоронавируса свиней (PDCoV) экспрессируется в клетках насекомых.
- 5 49. Способ по пункту 46, где адъювант на основе эмульсии масло-в-воде представляет собой адъювант EMULSIGEN® на основе эмульсии масло-в-воде.
50. Иммуногенная композиция по любому из пунктов 1-14 для применения для уменьшения симптомов заболевания, ассоциированного с  
10 дельтакоронавирусом свиней (PDCoV).
51. Иммуногенная композиция по любому из пунктов 15-24 для применения для уменьшения симптомов заболевания, ассоциированного с  
15 дельтакоронавирусом свиней (PDCoV) и/или вирусом эпидемической диареи свиней (PEDV).

Фигура 1



Фигура 2



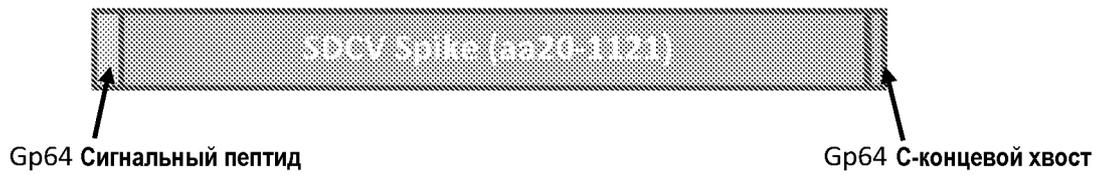
### Фигура 3А

Карта белка SDCV S1-IgG2a Fc



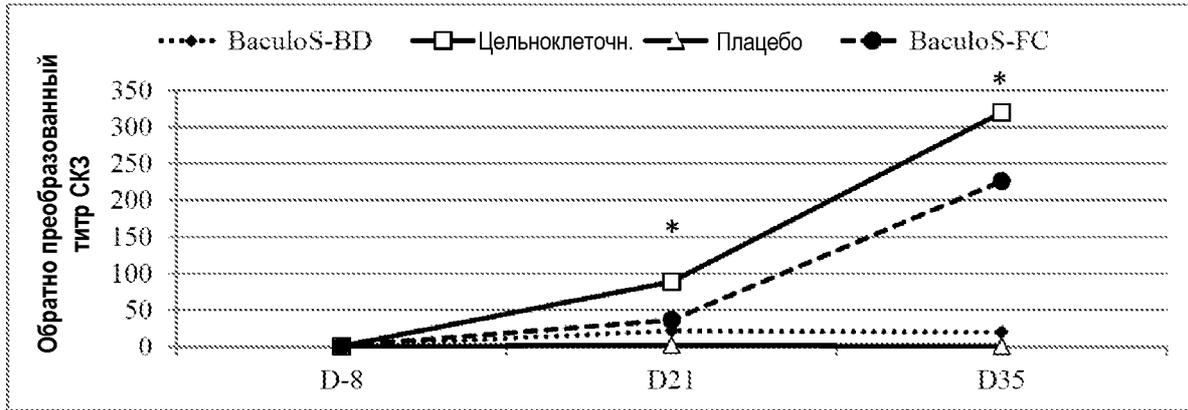
### Фигура 3В

В. Карта белка SDCVS BD



### Фигура 4

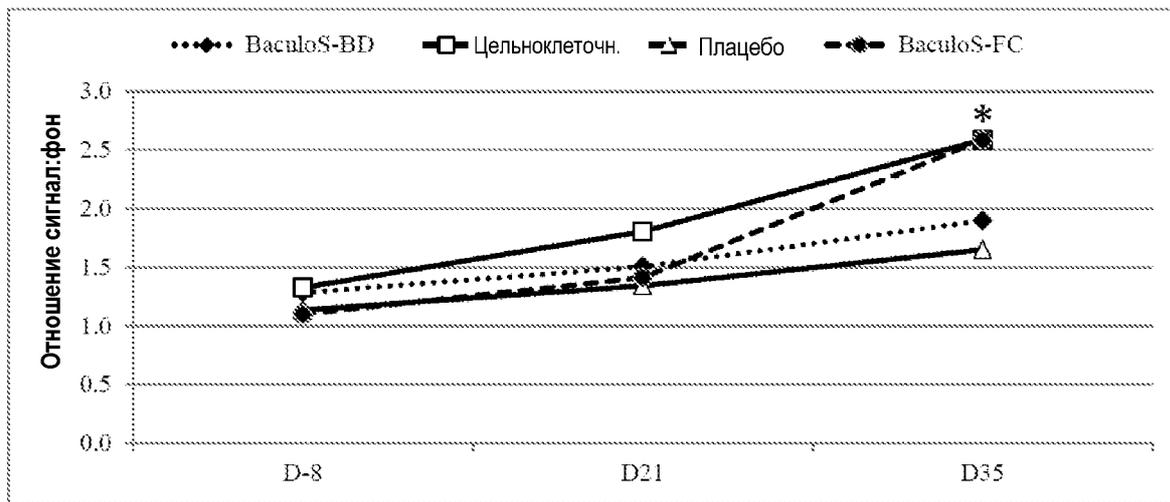
Серологическая реакция после вакцинации, как определено с помощью ИФА



\*Указывает, что значение достоверно отличается от группы плацебо (метод Дуннетта)

Фигура 5

Серологическая реакция после вакцинации, как обнаружено с помощью ELISA на основании S1-IgG2a-Fc



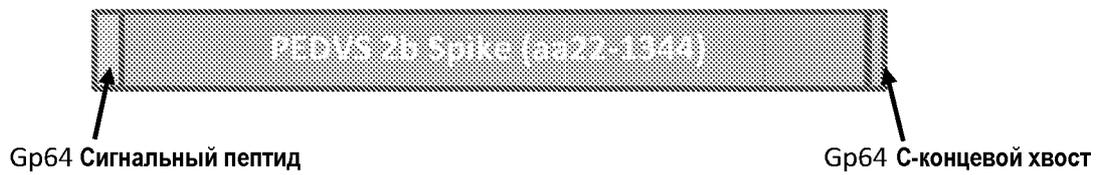
## Фигура 6А

Карта белка PEDV 2a BD Бакулодисплей Бакуловирус



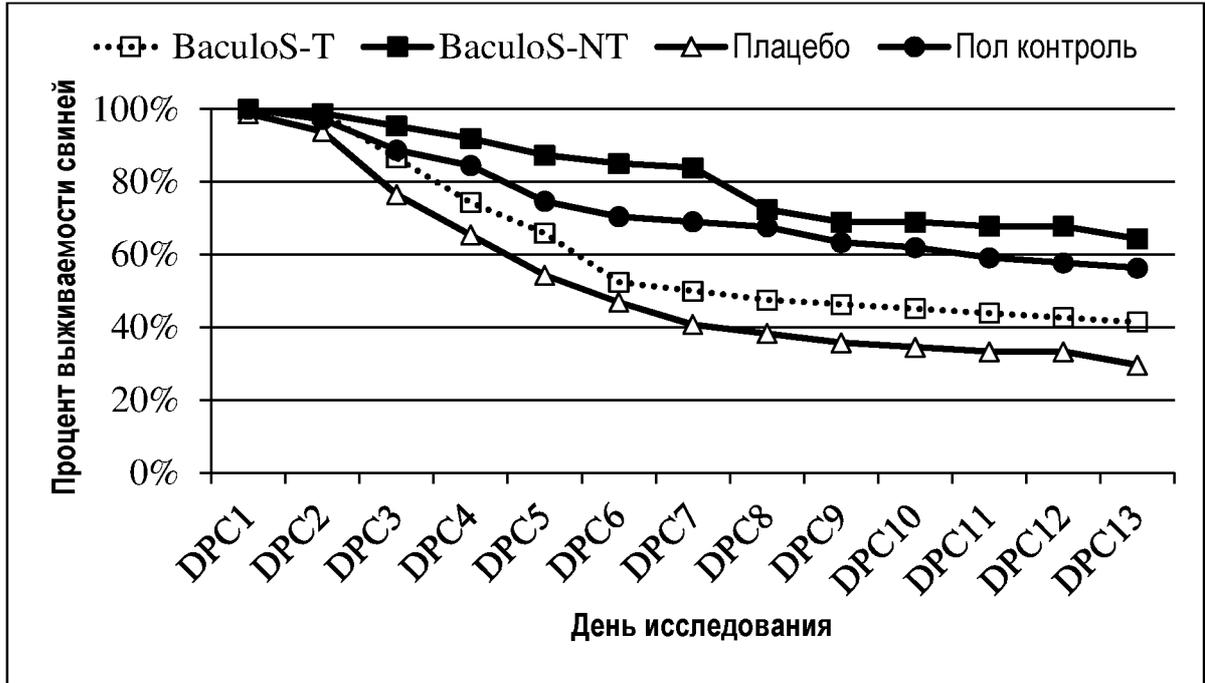
## Фигура 6В

Карта белка PEDV 2b BD Бакулодисплей Бакуловирус



Фигура 7

Процентное значение выживших свиней на группу и день исследования



Фигура 8

Уровни IgA у вакцинированных животных (среднеквадратичное значение IgA к PEDV для группы и образца)

