



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.11.15

(21) Номер заявки
201790296

(22) Дата подачи заявки
2015.08.06

(51) Int. Cl. *C12N 15/861* (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
A61K 39/145 (2006.01)
A61K 39/245 (2006.01)
A61K 39/215 (2006.01)
A61K 39/112 (2006.01)

(54) ВАКЦИНА В ВИДЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ВЕКТОРА НА ОСНОВЕ ПТИЧЬЕГО АДЕНОВИРУСА СЕРОТИПА 9

(31) PCT/IB2014/063809

(32) 2014.08.08

(33) IB

(43) 2017.06.30

(86) PCT/IB2015/055994

(87) WO 2016/020885 2016.02.11

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ГРУПО ИНДУСТРИАЛЬ
ПЕКУАРИО, С.А. ДЕ К.В. (MX)**

(72) Изобретатель:
**Лосано-Дубернанд Бернардо, Сото-
Прианте Эрнесто, Сарфати-Мизрахи
Давид (MX)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) CORREDOR, J.C. et al. Antibody response and virus shedding of chickens inoculated with left end deleted fowl adenovirus 9-based recombinant viruses. *Avian Dis.*, 2011, vol. 55 (3), 443-446. DOI: 10.1637/9710-031311-Reg.1 the whole document

YANG, D.H. et al. Development of fowl adenovirus 9 based vector vaccine expressing the hemagglutinin gene of an H5N1 influenza

virus. Programme and Proceedings, p. 48. Oral presentations - Vaccines and viral immunology. ESW - 8th International Congress of Veterinary Virology - August 2009 - Budapest - Hungary the whole document

WO-A1-2010058236

US-B2-6296852

CORREDOR, J.C. et al. The non-essential left end region of the fowl adenovirus 9 genome is suitable for foreign gene insertion/replacement. *Virus Research*, 2010, vol. 149 (2):167-174. ISSN: 0168-1702 "cited in the application" the whole document

DENG, L. et al. Oral inoculation of chickens with a candidate fowl adenovirus 9 vector. *Clin. Vaccine Immunol.* 2013, vol. 20 (8), 1189-1196. DOI: 10.1128/0162-1429.00187-13 the whole document

JOHNSON, M.A. et al. A recombinant fowl adenovirus expressing S1 gene of infectious bronchitis virus protects against challenge with infectious bronchitis virus. *Vaccine*, 2003, vol. 21 (21-22): 2730-2736. ISSN: 0264-40X. the whole document

SHEPPARD, M. et al. Fowl adenovirus recombinant expressing VP2 of infectious bursal disease virus induces protective immunity against bursal disease. *Archives of virology*, 1998, vol. 143 (5): 915-930. ISSN: 0304-8608, the whole document

(57) Рекомбинантная вакцина, содержащая вектор на основе птичьего аденовируса серотипа 9 (FAdV-9), имеющий по меньшей мере одну встроенную экзогенную нуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере один антиген, связанный с представляющим интерес заболеванием, и заменяющую несущественную область генома аденовируса, и фармацевтически приемлемый носитель, вспомогательное вещество и/или наполнитель, где по меньшей мере одна экзогенная нуклеотидная последовательность, кодирующая по меньшей мере один антиген, связанный с представляющим интерес заболеванием, и заменяющая несущественную область генома аденовируса, расположена между нуклеотидами 491 и 2782. Вектор для этой вакцины является стабильным при производстве в промышленном масштабе. Аналогичным образом, даже если эту вакцину вводят в комбинации с вакциной против болезни Марека, обе вакцины вызывают должный иммунный ответ, на который не оказывает влияния подавление действия друг друга. Таким же образом, эффективность рекомбинантной вакцины не нарушается материнскими антителами, и она способна индуцировать одновременно ранний и устойчивый защитный ответ в случае всего лишь одного применения.

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к вакцинам на основе вирусных векторов, и более конкретно, оно относится к вакцине, основанной на рекомбинантном векторе на основе птичьего аденовируса серотипа 9.

Предпосылки изобретения

Аденовирусы представляют собой линейные двухцепочечные ДНК-содержащие вирусы диаметром от 70-90 нм, не имеющие оболочки и имеющие капсид в форме икосаэдра, который образован с помощью 240 гексонов, 12 пентонов и фибр, которые отходят от каждой вершины икосаэдра. Эти гексоны, пентоны и фибры представляют собой главные антигены аденовируса и те, которые определяют его серотип.

Геном аденовируса имеет размер приблизительно 30-45 т.п.н. и характеризуется четырьмя областями ранних генов (E1, E2, E3 и E4) и пятью областями поздних генов (L1-L5).

Аденовирусы были выделены из различных видов, при этом два основных рода представляют собой *Aviadenovirus*, выделенный из птиц, и *Mastadenovirus*, выделенный из млекопитающих.

Аденовирусы рассматриваются как хорошие кандидаты в качестве рекомбинантных векторов для получения вакцин, поскольку они являются высокоинфекционными, и многие из них не являются патогенными. Кроме того, аденовирусные векторы могут эффективно переносить гены большого размера и вызывать расширенный иммунный ответ у животных. Тем не менее, также известно, что специфическая структура аденовирусов требует изучения специфических сайтов встраивания гетерологичных генов для каждого вида, и что практически невозможно обобщить биологическое поведение различных известных аденовирусов при их преобразовании в рекомбинантный вирусный вектор.

К настоящему времени аденовирусы человека, обезьян, птиц, свиней, среди прочего, были использованы в качестве векторов для возможного применения в виде рекомбинантных вакцин. В частности, известно, что птичий аденовирус (FAdV) являются потенциальными кандидатами для разработки рекомбинантных вакцин. Тем не менее, как будет описано ниже, возможность их успешного использования на коммерческом уровне, особенно в ветеринарии, была в целом заблокирована из-за неспособности достичь их крупномасштабного производства с требуемой стабильностью, так как производство аденовирусов осуществляется в клеточных линиях, выходы из которых, как правило, очень низкие, или природа которых препятствует достижению стабильности вирусного вектора в последовательных пассажах, в результате чего легко понять, что в настоящее время нет векторных вакцин в виде птичьих аденовирусов.

Например, в международной публикации № WO 94/24268 описаны рекомбинантные векторы на основе FAdV, имеющие по меньшей мере одну встроенную гетерологичную нуклеотидную последовательность, которые пригодны для вызова иммунного ответа у птиц, восприимчивых к болезням. Согласно этому документу несущественными областями генома аденовируса, которые могут быть пригодны для замены или встраивания гетерологичного гена, являются те, которые расположены с правого конца генома, предпочтительно область, расположенная между 0,0038 и 0,0039 in (97% и 99,9% карты генома). Рекомбинантная вакцина в соответствии с этим документом, по-видимому, может быть использована в комбинации с вакцинами против других вирусов, таких как вирус болезни Марека или болезни Ньюкасла, без наличия свидетельства этому. В дополнение к этому в данном документе не проиллюстрировано поведение аденовируса, полученного в результате последовательных пассажей в клеточных линиях для крупномасштабного производства.

Кроме того, в патенте США № 6296852 описаны векторы на основе FAdV серотипа 9 (FAdV-9), в которых выполнено встраивание нуклеотидных гетерологичных последовательностей в несущественные области вирусного генома. Эти области могут представлять собой некодирующие области, располагающиеся на левом и/или правом конце генома, предпочтительно в области, расположенной на правом конце (3') между 0,0023 и 0,0039 in (60% и 100% карты генома).

Что касается документа WO 94/24268, хотя этот патент идентифицирует другую широкую область для потенциального встраивания экзогенных генов, он не иллюстрирует его поведения и, в частности, его целостности после последовательных пассажей в клеточных линиях.

В другом документе (Corrector J.C. and Nagy E., The non-essential left end region of the fowl adenovirus 9 genome is suitable for foreign gene insertion/replacement. *Virus Research*. Vol. 149, 167-174; 2010) раскрыто, что несущественная область с 5'-конца генома FAdV-9 также может быть подходящим сайтом для встраивания или замены экзогенными генами с получением рекомбинантных векторов. Например, один из таких векторов получили заменой несущественной области, расположенной между нуклеотидами 491-2782, геном, кодирующим усиленный зеленый флуоресцентный белок (EGFP). Однако в данном документе, как и в других, не показано, будут ли вирусные векторы при создании стабильными, когда в них встраивают экзогенный ген, кодирующий антиген, связанный с заболеванием, и при репликации их в подходящих вирусных системах с получением рекомбинантной вакцины, поскольку документ показывает только экспрессию гена-репортера и не содержит анализа *in vivo*; к тому же в нем не упоминается композиция или степень защиты против представляющего интерес заболевания.

Как можно видеть, известно, что несущественные области генома FAdV представляют собой потенциальные сайты, в которых можно встроить или заменить экзогенную нуклеотидную последовательность. Тем не менее, векторы, описанные в известном уровне техники, имеют недостаток, заключающийся

ся в нестабильности в момент получения рекомбинантных вакцин на промышленном уровне из-за потери встроенного гетерологичного гена после множества пассажей в клеточных культурах.

Кроме того, в известном уровне техники использования аденовирусных векторов в лечении птиц, главным образом домашней птицы, избегали из-за их подавления действия вакцин против болезни Марек-ка, вакцин, которые широко используются в птицеводстве. Болезнь Марек-ка (ЕМ) представляет собой состояние, вызванное вирусом герпеса, поражающим домашних птиц, который вызывает лимфопролиферативное заболевание, что приводит к параличу ног или крыльев и лимфоидных опухолей, а также к гибели. Для того чтобы предотвратить это заболевание, используют моновалентные или поливалентные активные вакцины, в основном, подкожно или *in-ovo*.

Для того чтобы снизить затраты и достичь большей эффективности в момент применения, иногда предпочтительным является совместное введение по меньшей мере двух вакцин. Однако несмотря на то, что документы, подобные вышеупомянутой международной публикации № WO 94/24268, демонстрируют возможность использования аденовирусов в комбинации с вакцинами против болезни Марек-ка, последующие исследования показали, что аденовирусные вакцины характеризуются серьезным подавлением действия вакцин против вируса Марек-ка при использовании, когда анализировали уровень смертности и повреждения, образованные обоими заболеваниями, у птиц, предпочтительно долго живущих, таких как куры коммерческой значимости.

В настоящее время известно, что при одновременном использовании цельновирионной вакцины против ЕМ с рекомбинантной вакциной в виде аденовирусного вектора, вакцина против ЕМ может подавлять действие рекомбинантной вакцины благодаря следующим механизмам: а) разная кинетика репликации; б) вакцины конкурируют за один и тот же тип клеток для своей репликации у птиц и в) вирус ЕМ вызывает иммуносупрессию у птиц. По-видимому, для того, чтобы преодолеть данное подавление действия, и для достижения эффективной вакцинации против заболевания, связанного с экзогенным геном в рекомбинантной вакцине, было бы необходимо вводить более высокие дозы указанной рекомбинантной вакцины или сниженные дозы вакцины против ЕМ (Breedlove et al., Avian influenza adenovirus-vectored *in-ovo* vaccination; target embryo tissues and combination with Marek's disease vaccine. Avian Disease. Vol. 55, 667-673; 2011). Однако в этой же ссылке Breedlove et al. показано, что повышенные дозы аденовирусной рекомбинантной вакцины могут приводить к временному подавлению действия вакцины против ЕМ, что делает ее неэффективной, вызывая серьезные проблемы в этой области. Это означает, что до настоящего времени не возможно было составить вакцину, основанную на рекомбинантном аденовирусном векторе с экзогенным геном, который не подавляет защиту, обеспечиваемую вакциной против болезни Марек-ка, или наоборот.

Кроме того, материнские антитела являются еще одним фактором, который потенциально может приводить к подавлению действия вакцины. Хотя материнские антитела обеспечивают защиту для новорожденных животных, их присутствие может ингибировать или снижать эффекты вакцин, в результате чего иммунный ответ, полученный таким образом, будет неоптимальным.

Еще одной задачей, с которой сталкиваются при разработке вакцин в целом, является время, за которое достигается защита, и продолжительность указанной защиты в зависимости от формулы, используемой для вакцины.

Вакцина, которая обеспечивает раннюю защиту, т.е. в очень короткий промежуток времени, начиная с применения, также будет иметь краткосрочный эффект, так как уровень защиты будет быстро падать, делая необходимой периодическую ревакцинацию. В противоположность этому вакцина, которая обеспечивает надежную или длительную защиту, потребует больше времени для достижения защиты (поздняя защита), хотя указанная защита будет продолжаться в течение более длительного времени, как правило, требуя меньше ревакцинаций для достижения желаемого защитного эффекта. Как правило, для достижения устойчивой защиты в группе животных необходимо применять вакцины ранней защиты в сочетании с вакцинами поздней защиты, чтобы избежать возможности того, что животные заболеют на протяжении всего их развития.

Из известного уровня техники известно, что активная вирусная вакцина обычно обеспечивает быструю или раннюю защиту, так как она достигает приемлемого, но не устойчивого уровня защиты в коротком промежутке времени, начиная с ее применения. С другой стороны, также известно, что инаktivированные вирусные вакцины обеспечивают более устойчивую защиту, чем защита активного вируса, но не требуют длительного времени для ее достижения, т.е. защита является поздней и во многих случаях она также требует ревакцинации, хотя и намного реже.

Например, Stine et al. (Evaluation of inactivated newcastle disease, avian diseases, Vol. 24, No. 1 (Jan. - Mar., 1980), pp. 99-111) оценивали три вакцины против NDV: инаktivированную вакцину в эмульсии, инаktivированную вакцину, адсорбированную на $Al(OH)_3$, и живую коммерческую вакцину, обнаружив, что живая вакцина производит титры HI у цыплят на неделю раньше, чем инаktivированные вакцины, тогда как инаktivированная вакцина в эмульсии дает устойчивый иммунный ответ.

Аналогичным образом, Folitse et al. (Efficacy of combined killed-in-oil emulsion and alive newcastle disease vaccines in chickens, Avian Diseases, Vol. 42, No. 1 (Jan. - Mar., 1998), pp. 173-178) отмечают, что имеются сообщения о том, что инаktivированные вакцины против NDV, эмульгированные в масле, вы-

зывают высокий и устойчивый уровень циркулирующих антител у птиц, которых ранее прививали активными вакцинами. Кроме того, ими упоминается, что причина, по которой получают высокий ответ антител при введении инактивированной вакцины против NDV в сочетании с активной вакциной против этой же болезни, может быть связана с тем, что в начале живой вирус быстро размножается, вызывая первичный иммунный ответ, который сопровождается непрерывным, но медленным высвобождением антигена инактивированной вакцины, ведущей себя как усиливающая доза.

Также Toro et al. (Avian influenza mucosal vaccination in chickens with replication-defective recombinant adenovirus vaccine, *Avian Diseases* 55:43-47, 2011) оценили защиту, предоставляемую рекомбинантной аденовирусной вакциной без аденовируса, способного к репликации, которая экспрессировала бы кодон-оптимизированный ген H5 птичьего гриппа, которую применяли у 5-дневных яйценоских птиц, и в некоторых случаях с ревакцинацией, когда они достигали 15-дневного возраста. Результаты показали, что только у птиц, которых ревакцинировали, развивались высокие титры антител. Эти титры обнаруживались, начиная с 9-дневного возраста, достигая своего максимума в возрасте 32 дней.

Подобным образом, есть некоторые активные вирусы, которые необычным образом обеспечивают одновременно раннюю и устойчивую защиту, так же как вирус болезни Марека. При этом вирус болезни Марека можно использовать в качестве вектора, и в известном уровне техники было продемонстрировано достижение ранней и устойчивой защиты против болезни Марека всего с одним применением, но в случае встроенного экзогенного антигена не достигается ранняя защита, а наблюдается только поздняя и устойчивая защита.

Как видно из известного уровня техники, не удалось успешно использовать аденовирусы и, в частности, птичий аденовирус серотипа 9 FAdV-9, в существующем уровне техники в качестве рекомбинантной вакцины для птиц с экзогенным геном в промышленном масштабе, хотя и были описаны различные сайты встраивания, с одной стороны, из-за того факта, что не обеспечивается должная стабильность их репродукции в клеточных линиях после последовательных пассажей, и с другой стороны, из-за того факта, что вакцина против болезни Марека подавляет механизм действия аденовирусов или наоборот, причина, по которой явно избегали применения аденовирусов в комбинации с вакцинами против болезни Марека в существующем уровне техники. Кроме того, не было возможности получить вирусную рекомбинантную вакцину, которая позволяет одновременно достичь ранней и устойчивой защиты для экзогенного антигена, встроенного в вирусный вектор, используемый только с одним применением.

Задачи изобретения

С учетом недостатков известного уровня техники задачей настоящего изобретения является получение рекомбинантной вакцины на основе птичьего аденовируса серотипа 9, где указанный вектор является стабильным при получении в промышленных масштабах.

Другой задачей настоящего изобретения является получение такой рекомбинантной вакцины, что даже при введении в комбинации с вакциной против болезни Марека обе вакцины вызывали бы должный иммунный ответ, на который не оказывает влияния подавление действия друг друга.

Дополнительной задачей настоящего изобретения является получение рекомбинантной вакцины, на эффективность которой не влияют материнские антитела, и которая индуцирует оптимальный иммунный ответ.

Еще одной задачей настоящего изобретения является расчет рекомбинантной вакцины, которая вызывает как защитный, т.е. в течение первых 19 дней, начиная с ее применения, так и устойчивый, т.е. вплоть до по меньшей мере 90 дней после ее применения, защитный ответ.

Еще одной задачей настоящего изобретения является расчет рекомбинантной вакцины, которая достигает всего одним применением как ранней, так и устойчивой защиты от заболевания, связанного с экзогенным антигеном, встроенным в вирусный вектор, содержащийся в указанной вакцине.

Краткое описание графических материалов

Новые аспекты рассматриваемых признаков настоящего изобретения будут подробно установлены в прилагаемой формуле изобретения. Тем не менее, некоторые варианты осуществления, признаки и некоторые объекты и их преимущества будут более понятны из подробного описания при чтении в связи с прилагаемыми графическими материалами, на которых

фиг. 1А представляет собой рестрикционную карту ДНК рекомбинантного вируса FAdV-9 со вставкой последовательности НА вируса птичьего гриппа, построенного в соответствии с настоящим изобретением,

фиг. 1В - агарозный гель, в котором показаны фрагменты ДНК рекомбинантного вируса FAdV-9 со вставкой последовательности НА вируса птичьего гриппа, построенного в соответствии с настоящим изобретением, полученные при расщеплении рестриктазой,

фиг. 1С представляет неинфицированную культуру клеток CeLi и культуру, инфицированную рекомбинантным вирусом FAdV-9 со вставкой последовательности НА вируса птичьего гриппа, построенным в соответствии с настоящим изобретением,

на фиг. 2А показана рестрикционная карта ДНК рекомбинантного вируса FAdV-9 со вставкой последовательности фибры-4 вируса гепатита с тельцами включения, построенного в соответствии с настоящим изобретением,

фиг. 2В представляет собой агарозный гель, в котором показаны фрагменты ДНК рекомбинантного вируса FAdV-9 со вставкой последовательности фибры-4 вируса гепатита с тельцами включения, построенного в соответствии с настоящим изобретением, полученные при расщеплении рестриктазой,

фиг. 2С представляет неинфицированную культуру клеток CeLi и культуру, инфицированную рекомбинантным вирусом FAdV-9 со вставкой последовательности фибры-4 вируса гепатита с тельцами включения, построенным в соответствии с настоящим изобретением,

на фиг. 3А показана рестрикционная карта ДНК рекомбинантного вируса FAdV-9 со вставкой последовательности гликопротеина В вируса инфекционного ларинготрахеита птиц, построенного в соответствии с настоящим изобретением,

фиг. 3В - агарозный гель, в котором показаны фрагменты ДНК рекомбинантного вируса FAdV-9 со вставкой последовательности гликопротеина В вируса инфекционного ларинготрахеита птиц, построенного в соответствии с настоящим изобретением, полученные при расщеплении рестриктазой,

фиг. 3С - неинфицированную культуру клеток CeLi и культуру, инфицированную рекомбинантным вирусом FAdV-9 со вставкой последовательности гликопротеина В вируса инфекционного ларинготрахеита птиц, построенным в соответствии с настоящим изобретением,

фиг. 4А - рестрикционную карту ДНК рекомбинантного вируса FAdV-9 со вставкой последовательности белка HN вируса болезни Ньюкасла, построенного в соответствии с настоящим изобретением,

фиг. 4В - агарозный гель, в котором показаны фрагменты ДНК рекомбинантного вируса FAdV-9 со вставкой последовательности белка HN вируса болезни Ньюкасла, построенного в соответствии с настоящим изобретением, полученные при расщеплении рестриктазой,

фиг. 4С - неинфицированную культуру клеток CeLi и культуру, инфицированную рекомбинантным вирусом FAdV-9 со вставкой последовательности белка HN вируса болезни Ньюкасла, построенным в соответствии с настоящим изобретением,

фиг. 5А - рестрикционную карту ДНК рекомбинантного вируса FAdV-9 со вставкой последовательности белка HN вируса болезни Ньюкасла, встроенной между 38807 и 40561 нуклеотидами генома,

фиг. 5В - агарозный гель, в котором показаны фрагменты ДНК рекомбинантного вируса FAdV-9 со вставкой последовательности белка HN вируса болезни Ньюкасла, встроенной между 38807 и 40561 нуклеотидами генома, полученные при расщеплении рестриктазой,

фиг. 5С - агарозный гель, в котором показаны фрагменты ДНК рекомбинантного вируса FAdV-9 со вставкой последовательности белка HN вируса болезни Ньюкасла, встроенной между 38807 и 40561 нуклеотидами генома, после 2 пассажей в культуре клеток CeLi, полученные при расщеплении рестриктазой,

фиг. 6 - график, показывающий результаты торможения гемагглютинации (ИГ) коммерческих цыплят легкой породы (CRL), иммунизированных in-ovo сывороткой, взятой в возрасте 1 дня (DE),

фиг. 7 - график, показывающий результаты ИГ цыплят CRL, иммунизированных in-ovo сывороткой, взятой при 10 DE,

фиг. 8 - график, показывающий результаты ИГ цыплят CRL, иммунизированных in ovo через 18 дней инкубации (DI) или при 1 DE сывороткой, взятой при 19 DE,

фиг. 9 - график, показывающий результаты ИГ цыплят CRL, иммунизированных in-ovo при 18 DI или при 1 DE и ревакцинированных при 10 DE сывороткой, взятой при 19 DE,

фиг. 10 - график, показывающий результаты ИГ цыплят CRL, иммунизированных in-ovo при 18 DI или при 1 DE сывороткой, взятой при 31 DE,

фиг. 11 - график, показывающий результаты ИГ цыплят CRL, иммунизированных in-ovo при 18 DI или при 1 DE и ревакцинированных при 10 DE сывороткой, взятой при 31 DE,

фиг. 12 - график, показывающий результаты ИГ цыплят CRL, иммунизированных in-ovo при 18 DI или при 1 DE сывороткой, взятой при 38 DE,

фиг. 13 - график, показывающий результаты ИГ цыплят CRL, иммунизированных in-ovo при 18 DI или при 1 DE и ревакцинированных при 10 DE сывороткой, взятой при 38 DE,

фиг. 14 - график, показывающий результаты ИГ цыплят CRL, иммунизированных in-ovo при 18 DI или при 1 DE сывороткой, взятой при 45 DE,

фиг. 15 - график, показывающий результаты ИГ цыплят CRL, иммунизированных in-ovo при 18 DI или при 1 DE и ревакцинированных при 10 DE сывороткой, взятой при 45 DE,

фиг. 16 - график, показывающий результаты эффективности у цыплят CRL, иммунизированных при 1 DE с ревакцинацией или без нее при 10 DE и с контрольным заражением при 19 DE,

фиг. 17 - график, показывающий результаты эффективности у цыплят CRL, иммунизированных при 1 DE с ревакцинацией или без нее при 10 DE и с контрольным заражением при 31 DE,

фиг. 18 - график, показывающий результаты эффективности у цыплят CRL, иммунизированных при 1 DE с ревакцинацией или без нее при 10 DE и с контрольным заражением при 93 DE,

фиг. 19 - график, показывающий результаты ИГ цыплят CRL, иммунизированных при 1 DE с ревакцинацией или без нее при 10 DE сывороткой, взятой при 19 DE,

фиг. 20 - график, показывающий результаты ИГ цыплят CRL, иммунизированных при 1 DE с ревакцинацией или без нее при 10 DE сывороткой, взятой при 31 DE,

фиг. 21 - график, показывающий результаты ИН цыплят CRL, иммунизированных при 1 DE с ревакцинацией или без нее при 10 DE сывороткой, взятой при 93 DE,

фиг. 22 - график, показывающий результаты эффективности у цыплят, свободных от конкретных патогенных микроорганизмов (LPE), иммунизированных при 1 и 10 DE и с контрольным заражением при 31 DE,

фиг. 23 - график, показывающий результаты ИН цыплят LPE, иммунизированных при 1 и 10 DE сывороткой, взятой при 31 DE.

Подробное описание изобретения

При разработке настоящего изобретения было обнаружено, что рекомбинантная вакцина, содержащая вектор на основе птичьего аденовируса серотипа 9 (FAdV-9), имеющий по меньшей мере одну встроенную экзогенную нуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере один антиген, связанный с представляющим интерес заболеванием, и которая заменяет несущественную область генома аденовируса, в частности, расположенную между нуклеотидами 491-2782, и фармацевтически приемлемый носитель, вспомогательное вещество и/или наполнитель, обеспечивает соответствующую защиту против указанного представляющего интерес заболевания, давая в результате также стабильность при производстве в промышленном масштабе, поскольку аденовирусный вектор не теряет встроенную экзогенную нуклеотидную последовательность при выполнении последовательных пассажей в клеточных культурах. Точно так же удивительно, что эта рекомбинантная вакцина не теряет эффективности у вакцинированных птиц даже при введении в комбинации с цельновирионной вакциной против болезни Марека, и что вакцина против болезни Марека также не теряет эффективности при введении с этой рекомбинантной вакциной. Таким же образом, рекомбинантная вакцина по настоящему изобретению обладает тем преимуществом, что на ее эффективность не влияют материнские антитела у новорожденных животных, и она обеспечивает всего лишь с одним применением раннюю и устойчивую защиту.

В этом смысле для целей настоящего изобретения считается, что ранняя защита представляет собой защиту, которая обеспечивается в течение 19 дней, начиная с момента применения вакцины, в то время как устойчивая защита представляет собой защиту, которая обеспечивается вплоть до по меньшей мере 90 дней после применения вакцины.

Используемый аденовирусный вектор может быть живым (активным) или инактивированным. Выражение живой или активный означает, что рекомбинантный вектор сохраняет свою способность к репликации, в то время как инактивированный означает, что аденовирусный рекомбинантный вектор, имеющий экзогенную нуклеотидную последовательность, утратил способность к репликации. Инактивацию рекомбинантного вектора осуществляют с использованием физических или химических процедур, которые хорошо известны в данной области техники, таких как химическая инактивация с формальдегидом или β-пропиолактоном (Office International des Epizooties 2008). Newcastle Disease. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Office International des Epizooties. France, p. 576-589).

Как указано выше, используемый вектор представляет собой птичий аденовирус серотипа 9 (FAdV-9), который включает в себя любой штамм. Предпочтительно FAdV-9 выбирают из штаммов с инвентарными номерами в GenBank EU979376, AF083975, HQ697594, AF508958, AF339923, EU847634, EU847629, EU847628, DQ323986, AY683550, EU847635, NC_000899 и AC_000013.

Что касается экзогенной нуклеотидной последовательности, она кодирует по меньшей мере один антиген, связанный с представляющим интерес заболеванием, предпочтительно указанный антиген связан по меньшей мере с одним заболеванием, выбранным из птичьего гриппа, гепатита с тельцами включения, инфекционного ларинготрахеита птиц, болезни Ньюкасла, инфекции сумки Фабрициуса, инфекционного бронхита, заболевания, вызванного метапневмовирусом (MPNV), болезни Марека, инфекционной анемии птиц, или любой другой ген, размер которого допускает встраивание в аденовирусный вектор. Более предпочтительно используют ген птичьего гриппа.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения экзогенная нуклеотидная последовательность состоит из гена, кодирующего группу, включающую гемагглютинин (HA) вируса птичьего гриппа, выбранный из 18 подтипов гемагглютинина или иммуногенного варианта вируса гриппа, который более предпочтительно кодирует по меньшей мере один из подтипов H1, H2, H3, H5, H6, H7 или H9 указанного белка; фибру и гексон вируса гепатита с тельцами включения, относящегося к серотипам 4 и 8; гликопротеин В (gB) и гликопротеин D (gD) вируса инфекционного ларинготрахеита птиц (LTI); белки HN и F вируса болезни Ньюкасла; белок VP2 вирусной инфекции сумки Фабрициуса; белок S1 и S2 вируса инфекционного бронхита; белок F метапневмовируса (MPNV) и белок VP1, VP2 и VP3 вируса инфекционной анемии птиц.

Аналогичным образом, экзогенная нуклеотидная последовательность может включать в себя ген, кодирующий по меньшей мере один антиген птичьего аденовируса, отличного от FAdV-9, используемого в качестве вирусного вектора.

Аденовирусный вектор вакцины, содержащий экзогенный ген, представляющий интерес, по настоящему изобретению можно получить с помощью PCR-амплификации нуклеотидной последовательности, представляющей интерес, для того, чтобы иметь возможность встроить ее впоследствии, уже амплифицированную, внутрь аденовирусного вектора, в котором была удалена несущественная область

генома, расположенная между нуклеотидами 491-2782. Вставку экзогенного гена и делецию несущественной области аденовируса выполняют с использованием стандартных методов клонирования в молекулярной биологии. Инфекционный клон, полученный таким образом, трансфицируют в клеточную культуру для получения рекомбинантного вируса.

Вирус реплицируется в любой системе, подходящей для его роста, такой как иммортализованные клетки печени птичьего происхождения (CeLi), коммерческие клеточные линии или специально разработанные для выращивания аденовируса, до достижения по меньшей мере концентрации вируса, требуемой для обеспечения ответа на антиген, предпочтительно по меньшей мере $10^{5,0}$ DICC50% на дозу, более предпочтительно по меньшей мере $10^{6,0}$ DICC50% на дозу.

Например, рекомбинантный вирус можно реплицировать в клетках линии CeLi, выращенных на определенной культуральной среде с использованием статических систем роста, в бутылках для клеточной среды, на микроносителях, в крупномасштабных системах для производства клеток или в системах на основе роллер-флаконов до достижения титров в иммунопероксидазных тестах минимум $10^{6,0}$ DICC50% на дозу. Это титрование может быть достигнуто после проведения от 5 до 10 слепых пассажей в одном виде клеток. Кроме того, сбор можно центрифугировать, фракционировать и поддерживать замороженным, получив таким образом так называемый маточный посевной материал (MS).

С использованием маточного посевного материала выполняют дополнительный пассаж на тех же клетках для получения производственного посевного материала (SP) и еще один из него для получения вакцин.

Таким образом, настоящее изобретение включает в себя маточный посевной материал рекомбинантного вируса, представляющий собой птичий аденовирус серотипа 9 (FAdV-9), который имеет встроенную экзогенную нуклеотидную последовательность, кодирующую антиген, связанный с представляющим интерес заболеванием, и заменяющую несущественную область генома аденовируса, в частности, расположенную между нуклеотидами 491-2782; указанный маточный посевной материал получают после 6-11 пассажей в клеточной культуре.

Итак, в варианте осуществления, где вакцина является живой или активной, она представляет собой активный вирус, предпочтительно выбранный из природного непатогенного птичьего аденовируса с низкой патогенностью или ослабленный с помощью процедур, уже известных из уровня техники. С другой стороны, если вакцина инактивирована, после того, как достигнута концентрация вируса, требуемая для обеспечения ответа на антиген, он протекает с инактивацией вируса. Предпочтительно инактивацию выполняют с помощью физических или химических процедур, хорошо известных из уровня техники, предпочтительно с помощью химической инактивации формальдегидом или β -пропиолактоном.

В случае, когда вакцина по настоящему изобретению является живой или активной, фармацевтически приемлемые носители представляют собой водные растворы, предпочтительно выбранные из группы, состоящей из водных растворов, содержащих стабилизатор TPGA (трегалоза, фосфат, глутамат, альбумин); водных растворов, содержащих пептонный стабилизатор, и водных растворов, содержащих обезжиренное молоко.

Когда вакцина по настоящему изобретению является инактивированной, фармацевтически приемлемыми носителями предпочтительно являются водные растворы или эмульсии. Более конкретно, используемым носителем предпочтительно является эмульсия типов вода-в-масле, масло-в-воде или вода-в-масле-в-воде (WOW), предпочтительно эмульсия типа вода-в-масле-в-воде.

Что касается введения живой или активной вакцины, это можно выполнить внутримышечно, интраназально, подкожно, путем разбрызгивания, распыления, перорально с питьевой водой или *in ovo* с использованием подходящих средств и путей в каждом случае. Если это инактивированная вакцина, ее вводят внутримышечно или подкожно, предпочтительно подкожно.

Аналогичным образом, рекомбинантную вакцину по настоящему изобретению можно вводить в виде однократной дозы, в виде двух или более доз, либо отдельно, либо совместно с другими рекомбинантными или нереккомбинантными вакцинами, живыми (активными) или инактивированными, такими как вакцина против болезни Марека.

Аналогичным образом, даже если вакцину по настоящему изобретению вводят в виде однократной дозы или применения, она обеспечивает как раннюю, так и устойчивую защиту от представляющего интерес заболевания, связанного с антигеном, кодируемым встроенной экзогенной нуклеотидной последовательностью в вирусном векторе, содержащемся в указанной вакцине.

В дополнительном варианте осуществления описана поливалентная рекомбинантная вакцина, содержащая вектор на основе птичьего аденовируса серотипа 9 (FAdV-9), в соответствии с настоящим изобретением, имеющий по меньшей мере две встроенные экзогенные нуклеотидные последовательности, кодирующих по меньшей мере два антигена, связанные либо с одним представляющим интерес заболеванием, либо с разными представляющими интерес заболеваниями, и заменяющих несущественную область генома аденовируса, в частности, расположенную между нуклеотидами 491-2782.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения описана поливалентная вакцина, содержащая первую вакцину, основанную на векторе на основе птичьего аденовируса серотипа 9 (FAdV-9), в соответствии с настоящим изобретением, имеющего по меньшей мере одну встроенную экзогенную

нуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере один антиген, связанный с представляющим интерес заболеванием, и заменяющую несущественную область генома аденовируса, в частности, расположенную между нуклеотидами 490-2782; и по меньшей мере вторую вакцину, основанную на векторе на основе птичьего аденовируса серотипа 9 (FAdV-9), в соответствии с настоящим изобретением, имеющем по меньшей мере одну экзогенную нуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере один антиген, отличный от антигена первой вакцины, связанный либо с тем же представляющим интерес заболеванием, либо с другим заболеванием, и заменяющую несущественную область генома аденовируса, в частности, расположенную между нуклеотидами 491-2782. Поливалентная вакцина может находиться в живой или активной либо инактивированной форме.

Аналогичным образом, настоящее изобретение предусматривает поливалентную вакцину, содержащую цельновирионную вакцину против болезни Марека в комбинации по меньшей мере с одной вакциной, основанной на векторе на основе птичьего аденовируса серотипа 9 (FAdV-9), в соответствии с настоящим изобретением, имеющем встроенную экзогенную нуклеотидную последовательность, кодирующую антиген, связанный с представляющим интерес заболеванием, и которая заменяет несущественную область генома аденовируса, в частности, расположенную между нуклеотидами 491-2782. Поливалентная вакцина может находиться в живой или активной либо инактивированной форме.

Кроме того, в другом аспекте настоящего изобретения раскрыт способ вакцинации против заболевания у животных, который включает снабжение животного рекомбинантной вакциной в соответствии с настоящим изобретением, содержащей вектор на основе птичьего аденовируса серотипа 9 (FAdV-9), имеющий встроенную экзогенную нуклеотидную последовательность, кодирующую антиген, связанный с представляющим интерес заболеванием, и которая заменяет несущественную область генома аденовируса, в частности, расположенную между нуклеотидами 491-2782; и фармацевтически приемлемый носитель, вспомогательное вещество и/или наполнитель, где указанная вакцина способна вызывать иммунный ответ у животных.

Экзогенная нуклеотидная последовательность кодирует антиген, связанный с представляющим интерес заболеванием, предпочтительно связанным по меньшей мере с одним заболеванием, выбранным из птичьего гриппа, гепатита с тельцами включения, инфекционного ларинготрахеита птиц, болезни Ньюкасла, инфекции сумки Фабрициуса, инфекционного бронхита, заболевания, вызванного метапневмовирусом (MPNV), болезни Марека, инфекционной анемии птиц, или любой другой ген, размер которого допускает встраивание в аденовирусный вектор. Предпочтительно используют антиген птичьего гриппа.

Предпочтительно экзогенная нуклеотидная последовательность состоит из гена, кодирующего группу, включающую гемагглютинин (HA) вируса птичьего гриппа, выбранный из 18 подтипов гемагглютинина или иммуногенного варианта вируса гриппа, который более предпочтительно кодирует по меньшей мере один из подтипов H1, H2, H3, H5, H6, H7 или H9 указанного белка; фибру и гексон вируса гепатита с тельцами включения, относящегося к серотипам 4 и 8; гликопротеин В (gB) и гликопротеин D (gD) вируса инфекционного ларинготрахеита птиц (LTI); белки HN и F вируса болезни Ньюкасла; белок VP2 вирусной инфекции сумки Фабрициуса; белок S1 и S2 вируса инфекционного бронхита; белок F метапневмовируса (MPNV) и белок VP1, VP2 и VP3 вируса инфекционной анемии птиц.

Аналогичным образом, необходимая концентрация рекомбинантной вакцины для обеспечения соответствующей защиты составляет по меньшей мере $10^{5,0}$ DICC50% на дозу, более предпочтительно по меньшей мере $10^{6,0}$ DICC50% на дозу.

Живую или активную рекомбинантную вакцину можно вводить внутримышечно, интраназально, подкожно, путем разбрызгивания, распыления, перорально с питьевой водой или *in ovo* с использованием подходящих средств и путей в каждом случае. Если это инактивированная вакцина, ее вводят внутримышечно или подкожно, предпочтительно подкожно. Аналогичным образом, рекомбинантную вакцину по настоящему изобретению можно вводить в виде однократной дозы или в виде двух или более доз либо отдельно, либо в комбинации с другими рекомбинантными или нереккомбинантными вакцинами, живыми (активными) или инактивированными, такими как вакцина против болезни Марека.

Аналогичным образом, даже если вакцину по настоящему изобретению вводят в виде однократной дозы или применения, она обеспечивает как раннюю, так и устойчивую защиту от представляющего интерес заболевания, связанного с антигеном, кодируемым встроенной экзогенной нуклеотидной последовательностью в вирусном векторе, содержащемся в указанной вакцине.

Настоящее изобретение будет лучше понято из следующих примеров, которые представлены только в иллюстративных целях, чтобы обеспечить правильное понимание предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения, не подразумевая, что нет никаких других непроиллюстрированных вариантов осуществления, которые могут быть осуществлены на основе раскрытого выше подробного описания.

Примеры

Пример 1. Получение вектора на основе FAdV-9.

Сначала геном FAdV-9 размером 45 т.п.н., включающий SEQ ID NO: 1, создают методами обратной генетики с включением области FV1 (содержащейся между нуклеотидами 1-491) и FV2 (содержащейся между нуклеотидами 2782-7453), с удалением несущественной области из 2291 п.н., содержащейся меж-

ду нуклеотидами 491-2782, т.е. с 5'-конца генома; дополнительно сайт *SwaI*, уникальный для генов, представляющих интерес, встроили в сайт 491. Данный геном субклонировали в плазмиде *pBg* для приобретения уникальных сайтов рестрикции на его концах, чтобы дать возможность получения живого вируса в культуре.

Затем сайт *EcoRV* вводили в FV-2 с использованием олигонуклеотида методом PCR, получая таким образом промежуточную *pAL2.4*. В этом промежуточном продукте исходный фрагмент генома, содержащийся между нуклеотидами 4391 и 7453, удалили, оставляя рекомбинантное плечо из 2100 п.н. Кроме того, фрагмент PCR *EcoRV*-*EcoRV* клонировали, переводя в *pShuttle* из *AdEASY*, вырезая с *EcoRV*-*PmeI*. Сайт *EcoRI* сохранили.

В сайте *SwaI* в 491 нуклеотиде клонировали кассету экспрессии из *pVAX* с использованием *CMV*, полилинкера и *PoliA*, которая также содержала сайт *PmeI*, уникальный для клонирования представляющего интерес гена, тем самым получая инфекционный клон, представляющий интерес. При трансфекции инфекционного клона в клеточную культуру получают рекомбинантный вирус, представляющий интерес.

Пример 2. Получение рекомбинантного вируса rFAdV9-435 в клеточной культуре.

В соответствии с методикой, описанной в примере 1, получили инфекционный клон FAdV-9 со вставкой гена H5 из вируса птичьего гриппа с низкой патогенностью VIABP-H5N2, штамм 435 (rFAdV9-435), с инвентарный номером GenBank FJ864690, который содержит последовательность под SEQ ID NO: 2.

Сначала для получения маточного посевного материала (SM) rFAdV9-435 реплицировали в клетках линии CeLi, выращенных на культуральной среде DMEM F12+Glutamax в бутылках для клеточной культуры (статическая система). После проведения 7 слепых пассажей на одном и том же типе клеток в иммунопероксидазных тестах был достигнут титр $10^{6.0}$ DICC50%. Сбор центрифугировали при 500 g в течение 20 мин и фракционировали в криопробирках на 1,5 мл, которые хранили в глубокой заморозке при температуре от -70 до -80°C.

Тесты проводили на SM, чтобы исключить присутствие бактерий, птичьей микоплазмы, грибов и дрожжей, а также для подтверждения того, что указанный SM не содержит птичьих вирусов.

Кроме того, SM тестировали на цыплятах, свободных от конкретных патогенных микроорганизмов (SPF), для того, чтобы определить его безвредность, мощность, иммуногенность и минимальную дозу, необходимую для создания соответствующей защиты и иммуногенности.

Дополнительный пассаж выполнили с маточным посевным материалом на тех же клетках (CeLi) для получения производственного посевного материала.

Пример 3. Получение других рекомбинантных вирусов.

Следуя той же методике, описанной выше, получили дополнительные рекомбинантные вирусы FAdV-9 в соответствии с тем, что показано в табл. 1.

Таблица 1

Рекомбинантные вирусы FAdV-9, полученные с различными вставками

Вставка	Название рекомбинантного вируса
H7 вируса птичьего гриппа H7N3	rFAdV9-H7IA
Фибра вируса гепатита с тельцами включения серотипа 4	rFAdV9-Fib HCI
Гликопротеин В (gB) вируса птичьего ларинготрахеита	rFAdV9-gBLT
HN вируса болезни Ньюкасла	rFAdV9-HN
S1 и S2 вируса инфекционного бронхита	rFAdV9-S1S2BI
H5 и H7 вируса птичьего гриппа	rFAdV9-H5H7IA
ORF2 свиного цирковируса	rFAdV9-ORF2PCV2
VP1 и VP2 вируса инфекционной анемии птиц	rFAdV9-VP2VP1CAV
Гликопротеин D (gD) вируса птичьего ларинготрахеита	rFAdV9-gDLT
Флагеллин <i>C Salmonella enterica</i>	rFAdV9-FliC

Эти рекомбинантные векторы характеризовали путем расщепления с помощью *XhoI*. На фиг. 1A показана рестрикционная карта ДНК рекомбинантного вектора rFAdV9-H7IA; полоска 4,7 т.п.н. показывает на рестрикционный фрагмент, в котором клонирован гетерологичный ген. На фиг. 1B можно наблюдать 3629 п.н., которые соответствуют гену HA птичьего гриппа, демонстрируя, что этот ген на самом деле встроен в рекомбинантный вектор rFAdV9-H7IA, и, более того, указанный вектор является стабильным после 10 пассажей в клеточной культуре. На фиг. 1C с левой стороны можно наблюдать неинфицированную клеточную культуру CeLi, тогда как с правой стороны можно наблюдать цитопатический эффект, вызванный размножением рекомбинантного вектора rFAdV9-H7IA в клетках CeLi с вирусным титром $1,1 \times 10^6$ UFP, указывающим, что он генерирует хороший цитопатический эффект в связи с тем,

что указанный рекомбинантный вектор ведет себя стабильно и нормально в клеточной культуре CeLi.

Кроме того, на фиг. 2А показана рестрикционная карта ДНК рекомбинантного вектора rFAdV9-Fib HCl; полоска 1,4 т.п.н. показывает на рестрикционный фрагмент, в котором клонирован гетерологичный ген, тогда как на фиг. 2В видна полоска 1652 п.н., соответствующая гену Fib4 вируса гепатита с тельцами включения серотипа 4, показывая, что этот ген на самом деле встроен в рекомбинантный вектор rFAdV9-Fib HCl, и, кроме того, что указанный вектор является стабильным после 10 пассажей в клеточной культуре. В заключение, на фиг. 2С с левой стороны можно наблюдать неинфицированную клеточную культуру CeLi, тогда как с правой стороны можно наблюдать цитопатический эффект, вызванный размножением рекомбинантного вектора rFAdV9-Fib HCl в клетках CeLi с вирусным титром $1,4 \times 10^5$ UFP, указывающим, что он генерирует хороший цитопатический эффект в связи с тем, что указанный рекомбинантный вектор ведет себя стабильно и нормально в клеточной культуре CeLi.

На фиг. 3А показана рестрикционная карта ДНК рекомбинантного вектора rFAdV9-gBLT; полоска 5,6 т.п.н. показывает на рестрикционный фрагмент, в котором клонирован гетерологичный ген. На фиг. 3В показана полоска 4573 т.н., соответствующая гену gB вируса инфекционного ларинготрахеита птиц, демонстрируя, что этот ген на самом деле встроен в рекомбинантный вектор rFAdV9-gBLT, и что указанный вектор является стабильным после 10 пассажей в клеточной культуре. На фиг. 3С с левой стороны можно наблюдать неинфицированную клеточную культуру CeLi, тогда как с правой стороны можно наблюдать цитопатический эффект, вызванный размножением рекомбинантного вектора rFAdV9-gBLT в клетках CeLi с вирусным титром $2,6 \times 10^6$ UFP. Вышеупомянутое указывает, что этот рекомбинантный вектор является стабильным в клеточной культуре CeLi.

На фиг. 4А показана рестрикционная карта ДНК рекомбинантного вектора rFAdV9-HN; полоска 4,8 т.п.н. показывает на рестрикционный фрагмент, в котором клонирован гетерологичный ген. На фиг. 4В показана полоска 996 п.н., соответствующая гену HN вируса болезни Ньюкасла, которая показывает, что этот ген на самом деле встроен в рекомбинантный вектор rFAdV9-HN, и что указанный вектор является стабильным после 10 пассажей в клеточной культуре. На фиг. 4С с левой стороны можно наблюдать неинфицированную клеточную культуру CeLi, тогда как с правой стороны можно наблюдать цитопатический эффект, вызванный размножением рекомбинантного вектора rFAdV9-HN в клетках CeLi с вирусным титром $1,3 \times 10^6$ UFP. Вышеупомянутое указывает, что этот рекомбинантный вектор является стабильным в клеточной культуре CeLi.

Пример 4. Получение рекомбинантного вектора на основе FAdV-2 в соответствии с другими известными аденовирусными векторами.

Геном FAdV-9 размером 45 т.п.н. клонировали в плазмиде pWE-15; этот геном имеет два повторяющихся блока в тандеме под названием TR-1 (расположен между нуклеотидами 37648 и 37812) и TR-2 (расположен между нуклеотидами 38707 и 40561, т.е. между 0,0023 и 0,0039 in (60% и 100% карты генома) с 3'-конца, которые не требуются для его вирусной репликации. После этого данный геном в pWE-15 субклонировали в плазмиде pBg для того, чтобы добавить сайты PstI на концах генома, которые полезны для линейаризации ДНК в процессе получения вируса в клеточной культуре.

Для того чтобы получить промежуточный продукт, область TR-2 амплифицировали с помощью PCR и клонировали в бактериальной плазмиде pTRE-2 с уникальными сайтами I-CeuI и PI-SceI на обоих концах. После этого встраивали экспрессии, содержащие CMV-полилинкер, для управления экспрессией гена HN вируса болезни Ньюкасла, получая таким образом инфекционный клон pFATR2-CMV HN.

Рекомбинантный вирус rFATR2-CMV HN получали путем трансфекции инфекционного клона в клеточной культуре CeLi.

На фиг. 5А можно наблюдать рестрикционную карту ДНК рекомбинантного вектора rFATR2-CMV HN; полоска 3473 т.п.н. показывает рестрикционный фрагмент, в котором клонирован гетерологичный ген. На фиг. 5В показана полоска расщепления ДНК с использованием XhoI, помечающая 3473 п.н., соответствующие гену HN вируса болезни Ньюкасла, с помощью которой продемонстрировано, что этот ген на самом деле встроен в рекомбинантный вектор rFATR2-CMV HN. Тем не менее, на фиг. 5С можно заметить, что полоска 3473 п.н., соответствующая гену HN, исчезла после 2 пассажей в клеточной культуре CeLi с вирусным титром $1,1 \times 10^4$ UFP, демонстрируя, что вектор rFATR2-CMV HN утратил встроенный экзогенный ген в пассажах в клеточной культуре, что приводит к нестабильности и не подходит для промышленного получения рекомбинантных вакцин.

Пример 5. Способ получения активной вакцины с рекомбинантным вирусом FAdV-9 со вставкой последовательности H5 вируса птичьего гриппа: rFAdV9-435.

Клетки линии CeLi непрерывно культивировали в системе на основе роллер-флаконов. С этой целью флакон пассажа 32 из Рабочего банка клеток (ВСТ) подвергали оттаиванию в флаконе T25. Проводили 3 последовательных пассажа в соотношении 1:3 каждые 2-3 дня для того, чтобы восстановить скорость роста (TD=24 ч). После восстановления скорости роста клетки размножали в боксах T75 и T225 (в соотношении 1:3) и когда получили 80% слияния, их инфицировали производственным посевным материалом, полученным в соответствии с примером 2, с множественностью заражения (moi) 0,1 DICC50%/мл. На 5-й день после заражения сосуды с их содержимым заморозили при -70°C на 24 ч. За-

тем их оттаили, содержимое извлекли и центрифугировали при 500 g в течение 20 мин. Их запаковали в соответствии с полученным объемом.

Сбор титровали с помощью иммунопероксидазы и составили путем добавления собранной жидкости плюс TPGA sbr в качестве стабилизатора для того, чтобы достичь $10^{5,3}$ DICC50%/дозу. Экспериментальную вакцину хранили замороженной при температуре от -20 до -30°C до применения.

Пример 6. Оценка *in vivo* рекомбинантной активной вакцины rFAdV9-435, примененной с вакциной против болезни Марека, или без нее.

Исследование проводили с целью определения эффективности активной вакцины по настоящему изобретению и демонстрации того, что она не поражается и не поражает при введении птицам в комбинации с вакциной против болезни Марека. Вакцину вводили *in ovo* и подкожно.

С этой целью использовали 270 1-дневных (DE) коммерческих цыплят легкой породы Leghorn (CRL), разделенных на 9 групп по 30 цыплят в каждой, в соответствии с тем, что показано в табл. 2.

Активную вакцину на основе rFAdV9-435 применяли *in ovo* через 18 дней инкубации (DI) через полость аллантоиса (Ai) из расчета $10^{6,1}$ DICC50%/0,2 мл только для групп 2 и 6, а также смешивали и применяли в комбинации с вакциной против штамма HVT болезни Марека для групп 1 и 5. С другой стороны, эксперименты выполняли с применением вакцины на следующий день после рождения (DE) подкожно (SC) в среднюю и верхнюю части шеи для иммунизации вакциной на основе rFAdV9-435 из расчета $10^{6,1}$ DICC50%/0,2 мл. Отдельно вакцину вводили группам 4 и 8 и смешивали и применяли в комбинации с вакциной против штамма HVT болезни Марека в группах 3 и 7. Наконец, при 10 DE группы 5-8 ревакцинировали SC с использованием $10^{6,5}$ DICC50%/0,5 мл вакцины на основе rFAdV9-435.

Таблица 2

Группы лечения вакциной на основе rFAdV9-435

Группа	Вакцины	Дни применения и пути введения вакцин			Контрольное заражение с VIAAP-H5N2 в дни после рождения (DE)		
		18-DI	1-DE	10-DE	19 DE	31 DE	45 DE
G1	rFAdV9-435+HVT	Ai			10	10	10
G2	rFAdV9-435	Ai			10	10	10
G3	rFAdV9-435+HVT		SC		10	10	10
G4	rFAdV9-435		SC		10	10	10
G5	rFAdV9-435+HVT+rFAdV9-435	Ai		SC	10	10	10
G6	rFAdV9-435+rFAdV9-435	Ai		SC	10	10	10
G7	rFAdV9-435+HVT+rFAdV9-435		SC	SC	10	10	10
G8	rFAdV9-435+rFAdV9-435		SC	SC	10	10	10
G9	Контроль (не вакцинирован)	----	-----	----	10	10	10

Животных содержали в изолированных боксах, где им проводили контрольное заражение при 19, 31 и 45 DE, подразделяя группы на три подгруппы по 10 цыплят в каждой, для каждого контрольного заражения.

Вирус контрольного заражения представлял собой высокопатогенный вирус птичьего гриппа VIAAP-H5N2 штамма A/chicken/Querétaro, который отрегулировали с помощью PBS до pH 7,2 для того, чтобы применить $10^{7,5}$ DIER50% в 0,3 мл каждому цыпленку, объем, который получил каждый цыпленок при применении 0,06 мл (две капли) на каждый глаз и 0,09 мл (3 капли) в каждую ноздрю.

Пример 6А. Оценка эффективности.

Все группы наблюдали ежедневно в течение 10 дней после контрольного заражения для оценки клинических данных; каждого цыпленка индивидуально проверяли и оценивали в цифровых значениях в соответствии с данными в табл. 3.

Таблица 3

Ежедневная оценка клинических данных после контрольного заражения с VIAAP-H5N2

Клинические признаки	Средние	Тяжелые
Конъюнктивит	1	2
Конъюнктивит+взъерошенные перья	3	4
Конъюнктивит+взъерошенные перья+вялость	5	6
Смерть	7	—

Максимальное значение для тяжести клинических данных (MCDS) каждой экспериментальной группы соответствовало среднему суммарному значению. Смертность (M) оценивали на накопительной основе в течение 10 дней наблюдения, устанавливая максимальное значение клинических сигналов на 100%.

Максимальная заболеваемость в группе (MM) равна максимальному проценту больных птиц в один из 10 дней наблюдения. Показатель заболеваемости (IMb) рассчитывали следующим образом:

$$IMb = \frac{(SMCC) (MM)}{100}$$

Например

$$IMb = \frac{(56 \%) (80 \%) }{100} \quad IMb = 44.8 \%$$

Результаты защиты относительно смертности (PM) и IMb цыплят, зараженных VIAAP-H5N2 при 19, 31 и 45 DE, представлены в табл. 4.

Таблица 4

Результаты эффективности у цыплят CRL, вакцинированных с rFAdV9-435 и зараженных VIAAP-H5N2

Группа	PM (%)			IMb (%)		
	19 DE	31 DE	45 DE	19 DE	31 DE	45 DE
G1	90	100	100	16,8	12,7	8,2
G2	90	100	100	26,7	6,5	7,1
G3	100	100	100	3,9	1,5	1,0
G4	100	100	100	1,2	1,2	0,9
G5	100	100	100	9,1	9,7	7,6
G6	100	100	100	10,2	8,8	5,0
G7	100	100	100	0,1	1,2	0,6
G8	100	100	100	0,5	0,6	0,1
G9	0	0	0	100	100	100

Как можно видеть, результаты эффективности подтверждают эффективность вакцины на основе rFAdV9-435 по настоящему изобретению при ее применении для борьбы с птичьим гриппом P5N2, и они свидетельствуют, что ее можно использовать для контроля других подтипов птичьего гриппа.

Кроме того, эти результаты подтверждают, что смешивание и применение вакцины против болезни Марека не подавляет действие активной вакцины на основе rFAdV9-435 при применении в комбинации.

Пример 6B. Оценка иммуногенности.

Результаты тестов на торможение гемагглютинации (IH) показали, что уровни антител против антигена (Ag) VIA-435 как в вакцинированной, так и в контрольной группе демонстрировали очень высокие уровни материнских антител, от $2^{9,0}$ до $2^{9,3}$ в сыворотке птиц, полученной при 1 DE (фиг. 6), и от $2^{8,6}$ до $2^{8,8}$ для сыворотки, полученной при 10 DE (фиг. 7).

В случае сыворотки, полученной при 19 DE из всех групп (как контрольной, так и вакцинированных групп, включая иммунизированные in ovo или при DE с ревакцинацией rFAdV9-435 при 10 DE), выявленные уровни антител находились в диапазоне от $2^{3,6}$ до $2^{4,6}$ (фиг. 8 и 9).

Вышеприведенные результаты показывают, что данные уровни антител, как выявлено, соответствовали материнским антителам, которые не были индуцированы введением вакцины на основе rFAdV9-435. Однако, как уже было сказано выше, PM, предоставляемая при раннем контрольном заражении при 19 DE, для разных групп составила от 90 до 100%, указывая, что эффективность вакцины по настоящему изобретению не подвергалась воздействию материнских антител против VIA-435. Кроме того, это свидетельствует о том, что она способна стимулировать специфический иммунный ответ клеточного типа, создавая защиту до контрольного заражения, которая соответствует научной литературе, подчеркивающей, что клеточный иммунитет важен для контроля вирусных заболеваний.

Кроме того, как можно видеть на фиг. 10 для сыворотки, полученной при 31 DE, результаты указывают, что группы, иммунизированные in ovo, не представляют выявляемого ответа антител в тесте IH, в то время как для групп, иммунизированных при DE, уровни антител, относимые к вакцине на основе rFAdV9-435, выявляли с титром $2^{6,3}$ и $2^{5,8}$ для групп 5 и 6 в отличие от невакцинированной контрольной группы, которая дала в результате среднее значение $2^{2,1}$.

Как показано на фиг. 11, в случае групп, иммунизированных in ovo с ревакцинацией при 10 DE, средние уровни индуцированных вакциной на основе rFAdV9-435 антител выявляли с титрами $2^{4,4}$ и $2^{4,0}$ для групп 5 и 6 соответственно. Для сравнения, в невакцинированной контрольной группе получены уровни антител в IH в среднем $10^{2,1}$, что технически рассматривается как отрицательные титры. В случае групп, иммунизированных при DE с ревакцинацией при 10 DE, результат составил $2^{6,9}$ и $2^{6,8}$ для групп 7 и 8 соответственно, свидетельствуя, что присутствовал анамнестический иммунный ответ.

В случае сывороток, полученных при 38 DE, результаты в фиг. 12 для групп, иммунизированных in ovo, указывают, что вакцина на основе rFAdV9-435 впервые позволила выявить указанные группы антител против Ag VIA-435; более конкретно для группы 1 $2^{4,4}$ и для группы 2 $2^{4,1}$. С другой стороны, для групп, иммунизированных при DE, уровни антител дают в результате титр $2^{8,8}$ и $2^{8,4}$ для групп 3 и 4 соответственно, в отличие от невакцинированной контрольной группы, которая дала в среднем $2^{1,2}$.

Так, по отношению к группе, иммунизированной in ovo с ревакцинацией при 10 DE (фиг. 13), выявляли уровни индуцированных антител для вакцины на основе rFAdV9-435 с титрами $2^{5,5}$ и $2^{6,1}$ для групп

3 и 4 соответственно, сравнительно с невакцинированной контрольной группой, которая дала в среднем $10^{1,2}$. В случае групп, иммунизированных при DE с ревакцинацией при 10 DE, результат составил $2^{8,9}$ и $2^{8,4}$ для групп 7 и 8 соответственно, указывая, что даже при 38 DE уровень антител продолжал расти для всех групп.

Наконец, для сывороток, полученных при 45 DO, результаты указывают, как можно оценить на фиг. 14 для групп, иммунизированных *in ovo*, что вакцина на основе rFAdV9-435 позволяет выявить антитела против Ag VIA-435 для группы 1 с титром $2^{4,3}$ и для группы 2 $2^{4,6}$, тогда как для групп 3 и 4 уровни антител получены с титрами $2^{8,4}$ и $2^{8,1}$ соответственно, в отличие от невакцинированной контрольной группы, которая дала в среднем $2^{0,8}$.

В группах, иммунизированных *in ovo* с ревакцинацией при 10 DE (фиг. 15), уровни антител, индуцированные вакциной на основе rFAdV9-435, выявляли с титрами $2^{6,6}$ и $2^{6,8}$ для группы 5 и группы 6, соответственно, относительно невакцинированной контрольной группы, которая дала в среднем $10^{0,8}$. В случае групп, иммунизированных при DE с ревакцинацией при 10 DE, результат составил $2^{9,6}$ и $2^{10,0}$ для групп 7 и 8 соответственно; это указывает, что даже при 45 DE уровень антител сохраняется на том же уровне для групп 5 и 6, тогда как для групп 7 и 8 этот уровень антител продолжает повышаться.

Как видно из вышеприведенного, эти результаты указывают, что вакцина на основе rFAdV9-435, полученная в соответствии с настоящим изобретением, обладает способностью индуцировать выявляемые в тесте ИН уровни антител в группах, вакцинированных *in ovo*, с выявлением, начиная с 31 DE, в группах, иммунизированных *in ovo* с ревакцинацией при 10 DE. В то время как в группах, вакцинированных при DE без ревакцинации, выявление также имело место, начиная с 31 DE, но с более высоким титром, чем титр для группы, вакцинированной *in ovo* и ревакцинированной при 10 DE; для группы, вакцинированной при DE и ревакцинированной при 10 DE, выявленные уровни антител не обнаружили в это время важного анамнестического ответа.

Уровни антител в группе 1 выявили впервые при 38 DE (вакцинация *in ovo*), а в группе 3 (вакцинация при DE) выявляется повышение уровня антител, указывая, что вакцина на основе rFAdV9-435 продолжает повышать гуморальный ответ даже при 38 DE. Аналогичным образом, при 38 DE для группы, вакцинированной *in ovo* с ревакцинацией при 10 DE, отмечено большее повышение уровня антител, чем повышение в группе, которая получала только дозу *in ovo*; в то время как для группы, вакцинированной при DE с ревакцинацией при 10 DE, повышение антител при 38 DE было не значительным по сравнению с группой, которая получала только одну дозу при DE.

При 45 DE как для группы с однократной дозой вакцины *in ovo*, так и для группы с однократной дозой вакцины при DE, уровни антител сохраняются практически теми же, как при 38 DE, указывая на то, что эти группы достигли максимального уровня выявляемых в тесте ИН циркулирующих антител при 38 DE. В то же время для групп, вакцинированных *in ovo* и через день после рождения с ревакцинацией при 10 DE, еще выявлялось важное повышение уровней антител.

Пример 7. Оценка *in vivo* рекомбинантной активной вакцины rFAdV9-435, примененной отдельно или в комбинации с вакциной против болезни Марека, с контрольным заражением при 93 DE.

Второе исследование проводили для оценки эффективности активной вакцины по настоящему изобретению.

Вакцину вводили SC 180 цыплятам CRL, разделенным на 6 групп по 30 цыплят в каждой, в соответствии с тем, что показано в табл. 5; HVT-вакцина против болезни Марека, использованная в комбинации с вакциной по настоящему изобретению, представляла собой коммерческую вакцину с титром 4200 UFP/мл и была использована в соответствии с указаниями коммерческой лаборатории.

Для целей нижеследующих примеров считается, что 1 доза на цыпленка (DP) соответствует экспоненте дозы в логарифмической шкале, вводимой каждой птице, выраженной в DIC50%; например, если вводят одну дозу $10^{7,1}$ DIC50%, это эквивалентно 7,1 DP.

Животных содержали в изолированных блоках, где им проводили контрольное заражение при 19, 31 и 93 DE через глаза и ноздри с помощью 0,3 мл VIAAP-H5N2 (штамм A/chicken/Querétaro/14588-19/95), применяя по $10^{8,0}$ DIEP50% в 0,3 мл на каждого цыпленка.

Таблица 5

Группы лечения вакциной на основе rFAdV9-435

Группа	Вакцины	Дни применения, дозы и путь введения вакцин		Контрольное заражение VIAAP-H5N2 при разном DE		
		1 DE	10 DE	19 DE	31 DE	93 DE
G1	rFAdV9-435 +HVT	SC (7,1 DP/ 0,2 мл)		10	10	10
G2	rFAdV9-435	SC (7,1 DP/ 0,2 мл)		10	10	10
G3	rFAdV9-435	SC (7,1 DP/ 0,2 мл)	SC (7,5 DP/ 0,5 мл)	10	10	10
G4	rFAdV9-435	SC (6,1 DP/ 0,2 мл)		10	10	10
G5	rFAdV9-435	SC (6,1 DP/ 0,2 мл)	IM (6,5 DP/ 0,5 мл)	10	10	10
G6	Невакциниро- ванный контроль	-	-	10	10	10

Пример 7А. Оценка эффективности.

Все группы наблюдали ежедневно в течение 10 дней после каждого контрольного заражения. Для того, чтобы выполнить клиническую оценку, каждого цыпленка проверяли индивидуально и присваивали ему числовое значение в соответствии с наблюдаемыми клиническими изменениями, согласно табл. 3.

М и IMb рассчитывали в соответствии с тем, как указано в примере 6А. Результаты показаны на фиг. 16-18.

Результаты эффективности перед ранним контрольным заражением при 19 DE указывают, что векторная вакцина на основе rFAdV9-435, применяемая SC из расчета 0,2 мл с 7,1 DP в комбинации с HVT-вакциной в подходящем разбавителе для вакцины против болезни Марека или отдельно, создавала защиту от гибели (PM) 70% с низким IMb 18,4% и 19,3% соответственно. Эти результаты подтверждают, что иммуногенный потенциал вакцины на основе rFAdV9-435 не повреждается HVT-вакциной против болезни Марека.

Результаты эффективности перед ранним контрольным заражением при 19 DE показывают, что векторная вакцина на основе rFAdV9-435, примененная вместе с HVT-вакциной против болезни Марека или отдельно, создает PM от 70 до 90% с низким IMb (см. фиг. 16). Эти результаты подтверждают, что иммуногенный потенциал вакцины на основе rFAdV9-435 не повреждается HVT-вакциной против болезни Марека.

Аналогичным образом, эти результаты указывают, что только одно применение 6,1 DP вакцины на основе rFAdV9-435 на следующий день после рождения предоставляет защиту, аналогичную защите при введении 7,1 DP с однократным применением или защите при введении второй дозы при 10 DE.

В случае контрольного заражения при 31 DE результаты, наблюдаемые в фиг. 17, указывают, что векторная вакцина на основе rFAdV9-435, применяемая SC отдельно или в комбинации с HVT-вакциной против болезни Марека, создавала 100% PM с практически нулевым IMb во всех иммунизированных группах, что также подтверждает тот факт, что иммуногенный потенциал вакцины rFAdV9-435 не повреждается HVT-вакциной против болезни Марека.

Аналогичным образом, следует отметить, что однократное применение 6, 1 DP вакцины на основе rFAdV9-435 является достаточным для предоставления превосходной защиты от контрольного заражения при 31 DE.

Таким же образом, на фиг. 18 результаты эффективности перед поздним контрольным заражением при 93 DE указывают, что векторная вакцина по настоящему изобретению, применяемая отдельно или в комбинации с HVT-вакциной против болезни Марека, создает 100% PM и практически нулевой IMb. При этом показано, что вакцина на основе rFAdV9-435 сохраняет тот же иммуногенный потенциал по меньшей мере вплоть до 93 DE даже с использованием однократной дозы 6,1 DP, введенной на следующий день после рождения.

Пример 7В. Оценка иммуногенности.

Образцы сыворотки получали из всех групп при 19, 31 и 03 DE, которые хранили при -20°C до применения. Последовательные двойные разведения сыворотки подвергали воздействию 4 единиц гемагглютинации (УНА) VIAAP-435 в тесте ИН.

Результаты обобщены на фиг. 19-21, где можно наблюдать аналогичные результаты PM и IMb, так как уровни антител, измеренные в иммунизированных группах для контрольных заражений, выполненных при 19, 31 и 93 DE, аналогичны для всех проверенных вакцин.

Пример 8. Эффективность рекомбинантной активной вакцины на основе rFAdV9-435, применяемой IM, по сравнению с применением SC, и выявление HVT-вируса болезни Марека в фолликулах перьев.

Использовали 330 цыплят LPE, разделенных на 22 группы по 15 птиц в каждой, в соответствии с тем, что показано в табл. 6. Вакцины вводили при 1 DE, а также в различные часы после рождения (HE) и DE (за исключением невакцинированной контрольной группы) отдельно или в комбинации с коммерче-

ской HVT-вакциной против болезни Марека, которая имела титр 4200 UFP/мл и использовалась в соответствии с указаниями коммерческой лаборатории.

Птиц содержали в изолированных боксах, где им проводили контрольное заражение при 31 DE через глаза и через ноздри с 0,3 мл VIAAP-H5N2 (штамм A/chicken/Querétaro/14588-19/95), применяя в дозе $10^{8,0}$ DIER50% на каждого цыпленка.

Таблица 6

Группы лечения вакциной на основе rFAdV9-435 и/или HVT

Группа	Вакцины, пути введения и доза, применяемая в различные HE и DE					Контрольные заражения при 31 DE
	1 DE	2 HE	4 DE	10 DE	14 DE	
G1	SC rFAdV9-435 (7,1 DP)+HVT (смешанная)					10
G2	SC rFAdV9-435 (7,1 DP)+SC HVT					10
G3	SC rFAdV9-435 (6,1 DP)+HVT (смешанная)					10
G4	SC rFAdV9-435 (6,1 DP)+SC HVT					10
G5	SC HVT	SC rFAdV9-435 (7,1 DP)				10
G6	SC HVT		SC rFAdV9-435 (7,1 DP)			10
G7	SC HVT			SC rFAdV9-435 (7,1 DP)		10
G8	SC HVT			SC rFAdV9-435 (6,1 DP)		10
G9	SC HVT				SC rFAdV9-435 (7,1 DP)	10
G10	SC HVT					10
G11	SC rFAdV9-435 (7,1 DP)					10
G12	SC rFAdV9-435 (6,1)					10
G13	IM rFAdV9-435 (7,1 DP)+SC HVT					10
G14	IM rFAdV9-435 (6,1)+SC HVT					10
G15	SC HVT	IM rFAdV9-				10

		435 (7,1 DP)				
G16	SC HVT		IM rFAdV9-435 (7,1 DP)			10
G17	SC HVT			IM rFAdV9-435 (7,1 DP)		10
G18	SC HVT			IM rFAdV9-435 (6,1 DP)		10
G19	SC HVT				IM rFAdV9-435 (7,1 DP)	10
G20	IM rFAdV9-435 (7,1)					10
G21	IM rFAdV9-435 (6,1)					10
G22	Невакцинированный контроль					10

Пример 8А. Выявление штамма HVT-вируса болезни Марека.

Через 15 дней после вакцинации (PV) получили по три перьевых фолликула от пяти цыплят каждой из иммунизированных групп и из невакцинированной контрольной группы и использовали для приготовления мацерированной массы в соотношении 1:5 с PBS при pH 7,2 и провели на образцах тесты PCR и PCR.tr. Результаты тестов показаны в табл. 7.

Таблица 7

Результаты, полученные в группах лечения с rFAdV9-435 и/или HVT-вакциной

Группа	PCR/HVT через 15 дней PV	PCRtr/HVT через 15 дней PV	Защита от контрольного заражения VIAAP при 31 DE	ИМЬ
G1	Положительный	1,6×10 ⁶	100%	1,2
G2	Положительный	6,4×10 ⁶	100%	2,3
G3	Положительный	3,1×10 ⁶	100%	0,8
G4	Положительный	5,5×10 ⁶	100%	1,2
G5	Положительный	7,1×10 ⁶	100%	0,7
G6	Положительный	7,8×10 ⁶	100%	2,1
G7	Положительный	5,9×10 ⁶	100%	0,0
G8	Положительный	5,0×10 ⁶	100%	0,1
G9	Положительный	8,3×10 ⁶	100%	2,3
G10	Положительный	9,7×10 ⁶	0%	100%
G11	Отрицательный	Отрицательный	100%	1,0
G12	Отрицательный	Отрицательный	100%	2,3
G13	Положительный	2,4×10 ⁶	100%	1,2
G14	Положительный	3,4×10 ⁶	100%	2,6
G15	Положительный	3,2×10 ⁶	100%	1,3
G16	Положительный	5,7×10 ⁶	100%	2,4
G17	Положительный	1,3×10 ⁶	100%	2,0
G18	Положительный	2,6×10 ⁶	100%	1,7
G19	Положительный	4,9×10 ⁶	100%	2,0
G20	Отрицательный	Отрицательный	100%	1,8
G21	Отрицательный	Отрицательный	100%	2,6
G22	Отрицательный	Отрицательный	0%	100%

Как можно заметить, все группы, вакцинированные HVT-штаммом вакцины против болезни Марека отдельно или с rFAdV9-435 с различными календарями вакцинации, дали положительный результат в тесте PCR, специфичном для обнаружения вируса HVT на перьевом фолликуле. В отличие от этого, группы, иммунизированные только rFAdV9-435, и невакцинированный контроль дали отрицательный результат в этом же тесте PCR/HVT.

Что касается результатов PCR.tr, эти результаты в группе, вакцинированной только HVT-вакциной, составили $9,7 \times 10^{6,0}$, тогда как для всех вакцинированных групп с различными календарями вакцинации с применением HVT и rFAdV9-435 результаты находились в диапазоне от $1,6 \times 10^{6,0}$ до $8,3 \times 10^{6,0}$. В случае группы, вакцинированной исключительно rFAdV9-435, и группы невакцинированного контроля, результаты были отрицательными.

Согласно пути введения вакцины на основе rFAdV9-435 (SC или IM) и патогенезу вируса HVT болезни Марека (SC) результаты как для PCR, так и для PCRtr указывают, что вирус HVT-вакцины может реплицироваться соответствующим образом в различных органах и в конечном итоге поселяется в перьевых фолликулах, в результате чего различия (недостовверные) логарифма по основанию 10, выявляемые в тесте PCRtr, не являются показателем того, что вакцина на основе rFAdV9-435 подавляет репликацию HVT-вируса или его вирусную нагрузку или циркуляцию в организме до такой степени, которая отменяет подходящий иммунный ответ на HVT-вакцину.

Пример 8В. Оценка эффективности.

Все группы наблюдали ежедневно в течение 10 дней после контрольного заражения (PD). Для того чтобы выполнить клиническую оценку, каждого цыпленка проверяли индивидуально и присваивали ему числовое значение в соответствии с наблюдаемыми клиническими изменениями, согласно табл. 3.

PM и IMb рассчитывали в соответствии с тем, как указано в примере 6А. Результаты также показаны в табл. 7.

Результаты эффективности указывают, что вакцина на основе rFAdV9-435, применяемая SC или IM, с HVT-вакциной или без нее и с различными календарями вакцинации, способна создавать превосходную 100% PM и практически нулевой IMb во всех случаях в отличие от невакцинированного контроля, для которого PM составила 0% с максимальным IMb 100%.

На основании результатов из примеров 8А и 8В можно сказать, что вакцина против штамма HVT болезни Марека и вакцина на основе rFAdV9-435 против IAAP-H5N2 могут использоваться совместно без нарушения иммунного ответа любой из этих вакцин.

Пример 9. Эффективность рекомбинантной активной вакцины на основе rFAdV9-435, применяемой IM, по сравнению с применением SC.

Сформировали 5 групп по 10 цыплят LPE в каждой, 4 из которых вакцинировали и 1 оставили в качестве невакцинированного контроля в соответствии с табл. 8.

Цыплят содержали в изолированных блоках и проводили контрольное заражение при 31 DE через глаза и через ноздри с 0,3 мл VIAAP-H5N2 (штамм A/chicken/Querétaro/14588-19/95), применяя 7,5 DP на каждого цыпленка.

Таблица 8

Группы лечения вакциной на основе rFAdV9-435

Группа	Вакцины	Дни применения, дозы и путь введения вакцин		Контрольные заражения с VIAAP-H5N2
		1 DE	10 DE	
G1	rFAdV9-435	IM (6,1 DP/ 0,2 мл)		10
G2	rFAdV9-435		IM (6,5 DP/ 0,5 мл)	10
G3	rFAdV9-435	SC (6,1 DP/ 0,2 мл)		10
G4	rFAdV9-435		SC (6,5 DP/ 0,5 мл)	10
G5	Невакцини- рованный контроль	----	-----	10

Пример 9А. Оценка эффективности.

Все группы наблюдали ежедневно в течение 10 дней PD. Для того чтобы выполнить клиническую оценку, каждого цыпленка проверяли индивидуально и присваивали ему числовое значение в соответствии с наблюдаемыми клиническими изменениями, согласно табл. 3.

PM и IMb рассчитывали в соответствии с тем, как указано в примере 6А. Результаты показаны на фиг. 22.

Результаты эффективности перед контрольным заражением в 31 DE с VIAAP-H5N2 указывают, что векторная вакцина на основе rFAdV9-435, применяемая IM на следующий день после рождения в G1 и G2, предоставляет 100% PM с IMb 1,2 и 2,3 соответственно. Результаты G3 и G4, иммунизированных SC, составили 100% PM и IMb 1,3 и 2,6, что подтверждает целесообразность применения SC пути, а также IM пути для введения вакцины rFAdV9-435.

Пример 9В. Оценка иммуногенности.

Образцы сыворотки получали из всех групп при 31 DE, которые хранили при -20°C до применения. Последовательные двойные разведения сыворотки подвергали воздействию 4 единиц гемагглютинации (УНА) VIABP-435 в тесте ИН.

Результаты тестов ИН показаны на фиг. 23. Сыворотка, взятая при 31 DE, отражает среднее значение $2^{4,6}$, $2^{5,1}$, $2^{4,5}$ и $2^{4,8}$ для G1, G2, G3 и G4 соответственно, указывая на высокую корреляцию с защитой птиц перед контрольным заражением.

Эти результаты подтверждают, что вакцина по настоящему изобретению одинаково эффективна для индукции циркулирующих антител как при IM введении, так и при SC введении.

Пример 10. Оценка *in vivo* рекомбинантной активной вакцины rFAdV9-gB против инфекционного ларинготрахеита птиц.

Аналогично тому, что описано в примере 5, изготавливали рекомбинантную вакцину в виде вектора на основе птичьего аденовируса со вставкой последовательности гликопротеина В инфекционного ларинготрахеита птиц (LTI), названную вакциной rFAdV9-gB, и тестировали ее эффективность.

Использовали 90 цыплят LPE, разделенных на 9 групп по 10 птиц в каждой, 1 невакцинированная контрольная группа, 1 группа невакцинированная контрольная и без заражения и 7 групп, иммунизированных следующими вакцинами: а) вакцина rFAdV9-gB и б) коммерческая вакцина с активным модифицированным вирусом куриного эмбриона (CEP-LTI). Группы иммунизировали в соответствии с тем, что показано в табл. 9.

Животных содержали в изолированных боксах и провели контрольное заражение при 31 DE вирусом LTI с высокой вирусной нагрузкой (vvLTI), штамм USA 63140, который применяли каждому цыпленку в дозировке 3,9 DP в 0,3 мл, нанося две капли в каждый глаз и 3 капли в каждую ноздрю.

Таблица 9

Группы лечения вакциной FAdV9-gB

Группа	Дозы и нанесение вакцин против LTI подкожно (SC) и через глаз (O) при 1, 4 и 10 DE			Контрольное заражение cvvLTI
	1 DE	4 DE	10 DE	
G1	SC rFAdV9-gB (7,1 DP/0,2 мл)			10
G2			SC rFAdV9-gB (7,5 DP/0,5 мл)	10
G3	SC rFAdV9-gB (7,1 DP/0,2 мл)		SC rFAdV9-gB (7,5 DP/0,5 мл)	10
G4	SC rFAdV9-gB (6,1 DP/0,2 мл)			10
G5			SC rFAdV9-gB (6,5 DP/0,5 мл)	10
G6	SC rFAdV9-gB (6,1 DP/0,2 мл)		SC rFAdV9-gB (6,5 DP/0,5 мл)	10
G7			O CEP-LTI (3,1 DP/0,03 мл)	10
G8	Невакцинированный контроль			10
G9	Невакцинированный и без контрольного заражения			10

Пример 10А. Оценка эффективности.

Все группы наблюдали ежедневно в течение 9 дней PD. Для того чтобы выполнить клиническую оценку, каждого цыпленка проверяли индивидуально и присваивали ему числовое значение в соответствии с наблюдаемыми клиническими изменениями, согласно табл. 3.

М и IMb рассчитывали в соответствии с тем, как указано в примере 6А. Результаты приведены в табл. 10.

Результаты IMb, полученные в различных группах вакцинированных цыплят LPI, указывают, что в течение 9 дней PD с vvLTI клинические признаки в целом были от низкой до умеренной интенсивности, ниже, чем признаки, наблюдаемые в G8, невакцинированном контроле.

В G1, G2 и G3, иммунизированных SC с 7,1 и/или 7,5 DP вакцины rFAd9-gB, IMb составили 6,2, 6,1 и 3,5 соответственно, в то время как в группах G4, G5 и G6, иммунизированных в 10 раз более низкой дозой вакцины rFAdV9-gB (6,1 и/или 6,5 DP), получили аналогичные IMb, 6,5, 6,3 и 5,2 соответственно (табл. 10). Эти результаты указывают на то, что применение в 10 раз более низкой дозы векторной вакцины rFAdV9-gB не представляет значительной разницы в защите вакцинированных птиц против возникновения клинических признаков LT у иммунизированных птиц. С другой стороны, они показывают, что рекомбинантная вакцина по настоящему изобретению со вставкой гена gB из вируса LTI, rFAdV9-gB продемонстрировала результат по профилактике повреждений гортани и трахеи, немного уступающий коммерческой вакцине CEP-LTI.

Что касается М, она не наблюдалась ни в одной группе.

Таблица 10

Эффективность вакцины rFAdV-gB

Группа	IMb	Степень макроскопических повреждений в группе
G1	6, 2	++
G2	6, 1	++
G3	3, 5	++
G4	6, 5	++
G5	6, 3	++
G6	5, 2	++
G7	2, 4	+
G8	37, 0	+++++
G9	0	-

Пример 10В. Оценка эффективности профилактики макроскопических повреждений.

Через девять дней после контрольных заражений птиц из всех групп умерщвляли, гортани и трахеи птиц в каждой группе проверяли, чтобы определить наличие макроскопических повреждений (присутствие серозного экссудата и петехиальных геморрагий на подслизистой гортани и трахеи), сравнивая степень макроскопических изменений с невакцинированной, но с контрольным заражением G8, которой присвоили число пять (+++++), и невакцинированной и без контрольного заражения контрольной группой (названной G9), которой присвоили число ноль (-).

Результаты профилактики макроскопических повреждений, наблюдаемые в различных группах вакцинированных цыплят LPE, также показанные в табл. 10, указывают, что все группы, иммунизированные вакциной rFAdV9-gB (даже G4, G5 и G6, в которых применили в 10 раз более низкую дозу данной вакцины), показали аналогичные индексы защиты от макроскопических повреждений, очень близкие к защите, создаваемой с помощью коммерческой вакцины CEP-LTI.

Эти результаты подтверждают, что применение в 10 раз более низкой дозы rFAdV9-gB не представляет значительной разницы в снижении появления макроскопических поражений у иммунизированных птиц, и что с ней можно получить результаты, близкие к полученным с коммерческой вакциной, полученной с полным вирусом и размножаемой в куриных эмбрионах, не принимая риски, которые это влечет за собой.

В соответствии с вышеописанным, можно видеть, что рекомбинантная вакцина в виде вектора на основе птичьего аденовируса серотипа 9 была разработана для получения стабильной рекомбинантной вакцины, остающейся эффективной даже при введении в комбинации с вакциной против болезни Марекка, и эффективность которой не повреждается присутствием материнских антител, и для любого специалиста в данной области будет очевидным, что варианты осуществления рекомбинантной вакцины в векторе на основе птичьего аденовируса серотипа 9 и ее применение в соответствии с вышеописанным и проиллюстрированным в прилагаемых графических материалах являются лишь иллюстративными и неограничивающими настоящее изобретение, так как некоторые изменения рассмотрения в деталях возможны без выхода за рамки объема настоящего изобретения. Например, было экспериментально показано, что можно достичь стабильности в последовательных пассажах клеточных культур с различными экзогенными генами и что можно использовать различные типы приемлемых носителей для вакцинного состава.

Таким образом, настоящее изобретение следует рассматривать как не ограниченное ничем, кроме требований предшествующего уровня техники и объема прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантная вакцина для индукции иммунного ответа против представляющего интерес заболевания, содержащая вектор на основе птичьего аденовируса серотипа 9 (FAdV-9), имеющий по меньшей мере одну встроенную экзогенную нуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере один антиген, связанный с представляющим интерес заболеванием, и заменяющую несущественную область генома аденовируса, и фармацевтически приемлемый носитель, адъювант и/или эксципиент, причем вакцина индуцирует адекватный иммунный ответ даже при введении в комбинации с вакциной против болезни Марекка, эффективность которой не изменяется материнскими антителами, причем экзогенная нуклеотидная последовательность расположена между нуклеотидами 491 и 2782, отличающаяся тем, что вектор на основе FAdV-9 содержит последовательность SEQ ID NO: 1.

2. Рекомбинантная вакцина по п.1, где вектор на основе FAdV-9 является живым (активным) или инактивированным.

3. Рекомбинантная вакцина по п.1, где экзогенная нуклеотидная последовательность кодирует по меньшей мере один антиген, связанный с представляющим интерес заболеванием, выбранным из птичьего гриппа, гепатита с тельцами включения, инфекционного ларинготрахеита птиц, болезни Ньюкасла,

инфекции сумки Фабрициуса, инфекционного бронхита, заболевания, вызванного метапневмовирусом (MPNV), болезни Марека, инфекционной анемии птиц, или любой другой ген, размер которого допускает встраивание в вектор на основе FAdV-9.

4. Рекомбинантная вакцина по п.3, где экзогенная нуклеотидная последовательность кодирует антиген из группы, включающей гемагглютинин (HA) вируса птичьего гриппа; фибру и гексон вируса гепатита с тельцами включения, относящегося к серотипам 4 и 8; гликопротеин В (gB) и гликопротеин D (gD) вируса инфекционного ларинготрахеита птиц (LTI); белки HN и F вируса болезни Ньюкасла; белок VP2 вирусной инфекции сумки Фабрициуса; белок S1 и S2 вируса инфекционного бронхита; белок F метапневмовируса (MPNV) и белок VP1, VP2 и VP3 вируса инфекционной анемии птиц.

5. Рекомбинантная вакцина по п.4, где HA вируса птичьего гриппа выбран по меньшей мере из одного из подтипов H1, H2, H3, H5, H6, H7 или H9 указанного белка.

6. Рекомбинантная вакцина по п.1, где экзогенная нуклеотидная последовательность содержит ген, кодирующий по меньшей мере один антиген птичьего аденовируса, отличного от FAdV-9, используемого в качестве вирусного вектора.

7. Рекомбинантная вакцина по п.1, где концентрация вируса, требуемая для обеспечения ответа на антиген, составляет по меньшей мере $10^{5.0}$ DICC50% на дозу.

8. Рекомбинантная вакцина по п.7, где концентрация вируса, требуемая для обеспечения ответа на антиген, составляет по меньшей мере $10^{6.0}$ DICC50% на дозу.

9. Рекомбинантная вакцина по п.2, где в случае, если вакцина является живой (активной), фармацевтически приемлемые носители представляют собой водные растворы, предпочтительно выбранные из группы, состоящей из водных растворов, содержащих стабилизатор TPGA (трегалоза, фосфат, глутамат, альбумин); водных растворов, содержащих пептонный стабилизатор, и водных растворов, содержащих обезжиренное молоко.

10. Рекомбинантная вакцина по п.2, где в случае, если вакцина является инактивированной, фармацевтически приемлемые носители представляют собой водные растворы или эмульсии.

11. Рекомбинантная вакцина по п.10, где фармацевтически приемлемый носитель представляет собой эмульсию типа вода-в-масле; эмульсию типа масло-в-воде или эмульсию типа вода-в-масле-в-воде.

12. Рекомбинантная вакцина по п.2, где живая или активная вакцина получена для введения внутримышечно, интраназально, подкожно, путем разбрызгивания, распыления, перорально с питьевой водой или *in ovo*.

13. Рекомбинантная вакцина по п.2, где инактивированная вакцина получена для введения внутримышечно или подкожно, предпочтительно подкожно.

14. Рекомбинантная вакцина по п.1, причем вакцина получена для совместного введения с цельновирионной вакциной против болезни Марека.

15. Рекомбинантная вакцина по п.1, содержащая вектор на основе FAdV-9, имеющий по меньшей мере две встроенные экзогенные нуклеотидные последовательности, кодирующие по меньшей мере два антигена, связанные либо с одним и тем же представляющим интерес заболеванием, либо с разными представляющими интерес заболеваниями, и заменяющие несущественную область генома аденовируса, расположенную между нуклеотидами 491 и 2782.

16. Рекомбинантная вакцина по п.1, причем вакцина получена для совместного введения со второй вакциной, основанной на векторе на основе FAdV-9, имеющем по меньшей мере одну встроенную экзогенную нуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере один антиген, отличный от антигена первой вакцины, связанный либо с тем же представляющим интерес заболеванием, либо с другим заболеванием, и заменяющую несущественную область генома аденовируса, расположенную между нуклеотидами 491 и 2782.

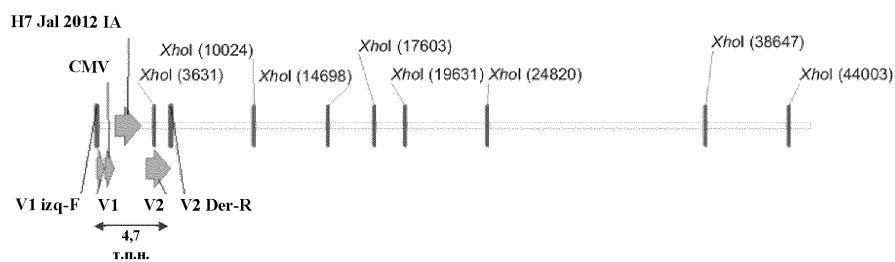
17. Применение вектора на основе птичьего аденовируса серотипа 9 (FAdV-9), который имеет встроенную экзогенную нуклеотидную последовательность, кодирующую антиген, связанный с представляющим интерес заболеванием, и заменяющую несущественную область генома аденовируса, расположенную между нуклеотидами 491 и 2782, причем вектор на основе FAdV-9 содержит последовательность SEQ ID NO: 1, для получения рекомбинантной вакцины, способной вызывать иммунный ответ у животных.

18. Применение по п.17, где рекомбинантная вакцина адаптирована для введения в виде однократной дозы или в виде двух или более доз.

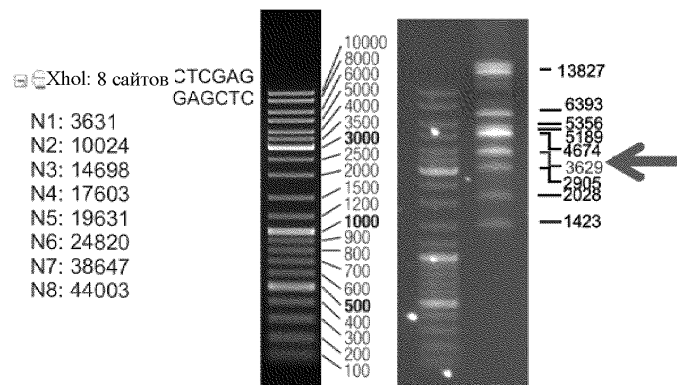
19. Применение по п.18, где рекомбинантная вакцина адаптирована для введения в виде однократной дозы.

20. Применение по п.19, где рекомбинантная вакцина адаптирована для введения отдельно или совместно с другими рекомбинантными или нереккомбинантными, живыми (активными) или инактивированными вакцинами.

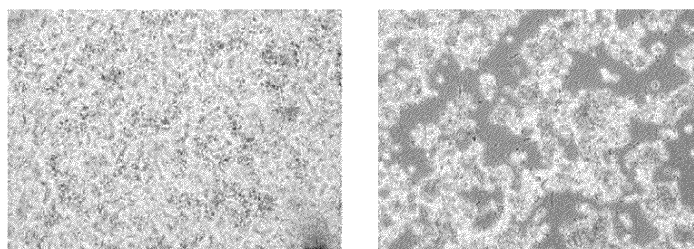
21. Применение по п.20, где рекомбинантная вакцина адаптирована для введения совместно с вакциной против болезни Марека.



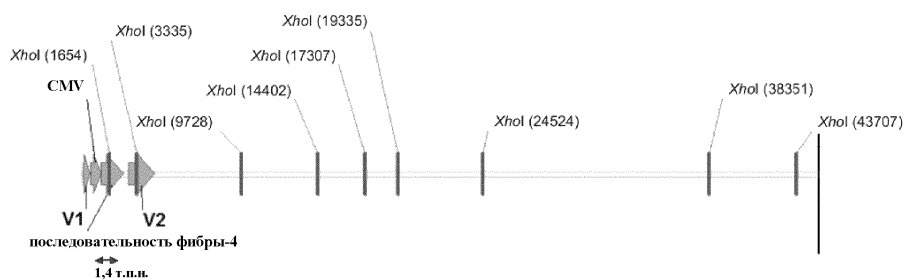
Фиг. 1А



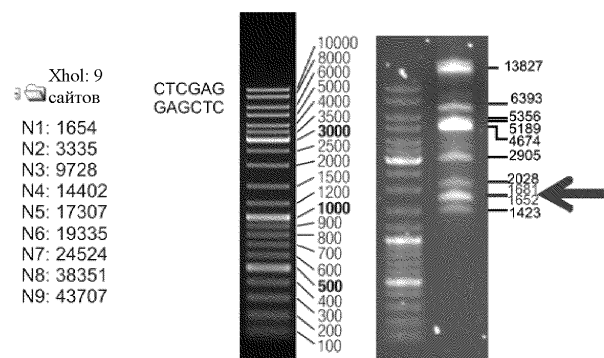
Фиг. 1В



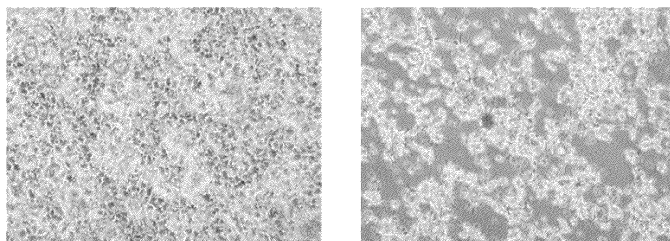
Фиг. 1С



Фиг. 2А

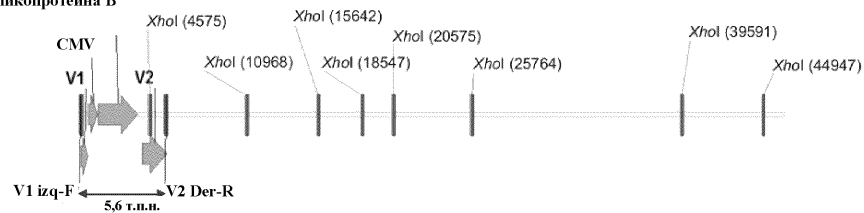


Фиг. 2В

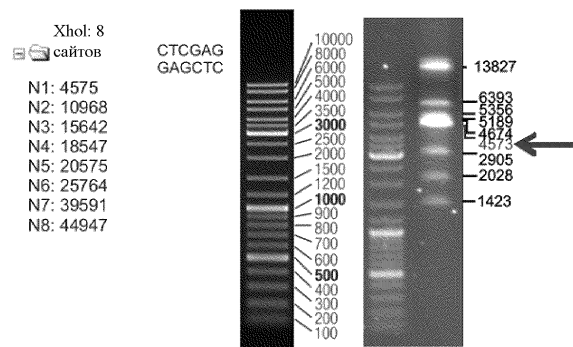


Фиг. 2С

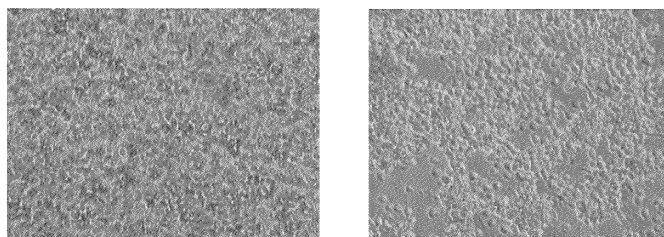
последовательность
гликопротеина В



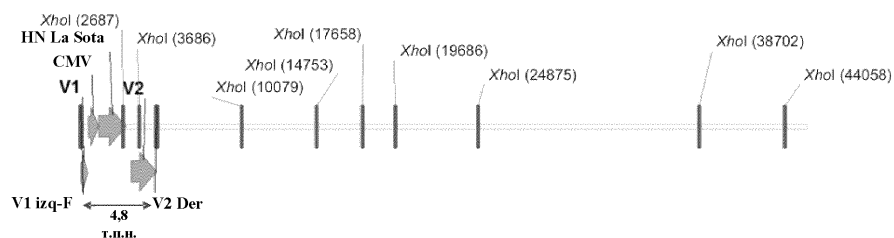
Фиг. 3А



Фиг. 3В

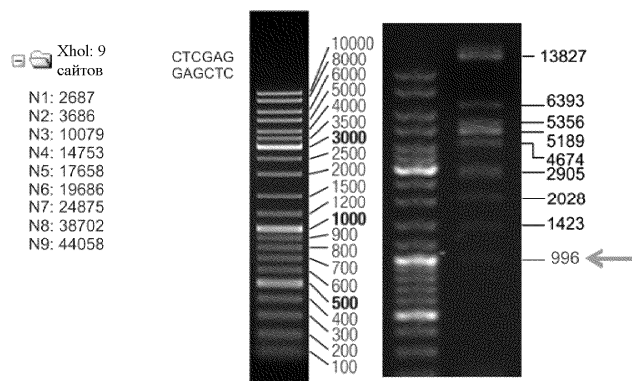


Фиг. 3С

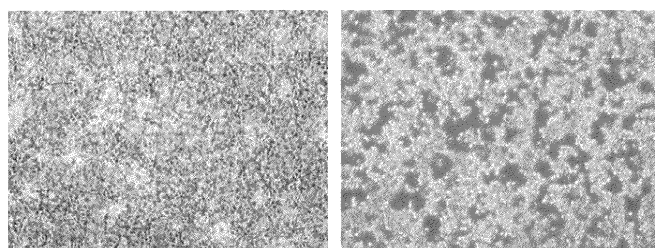


Фиг. 4А

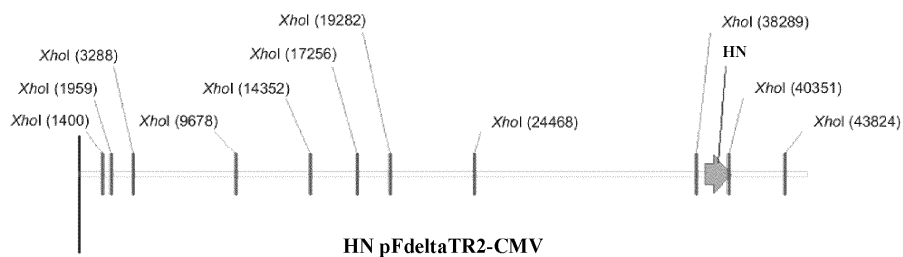
038951



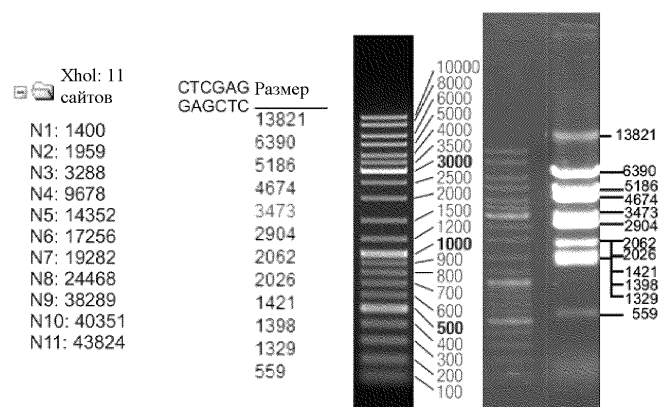
Фиг. 4В



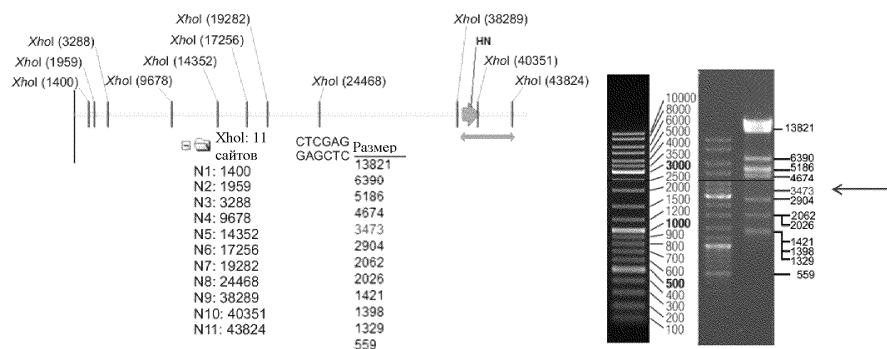
Фиг. 4С



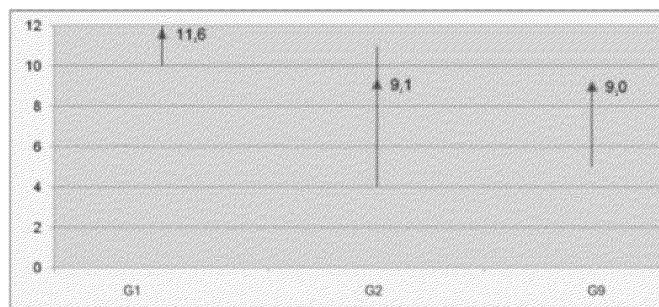
45243 п.н.
Фиг. 5А



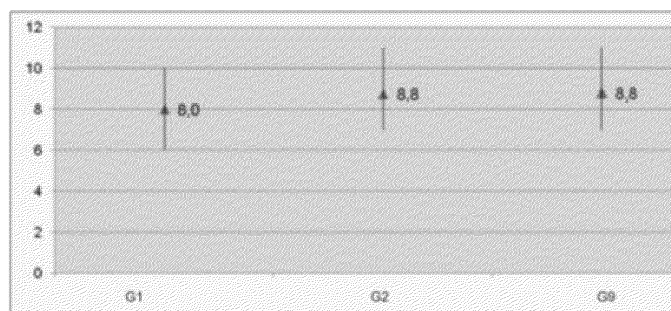
Фиг. 5В



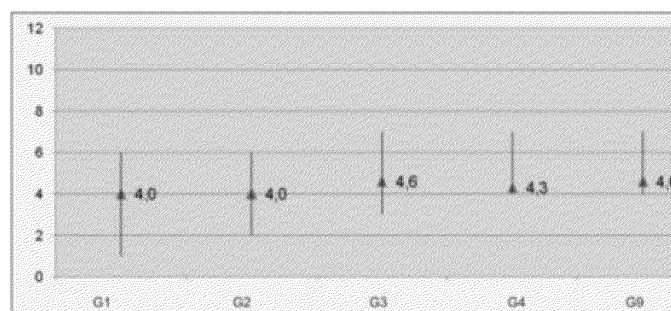
Фиг. 5С



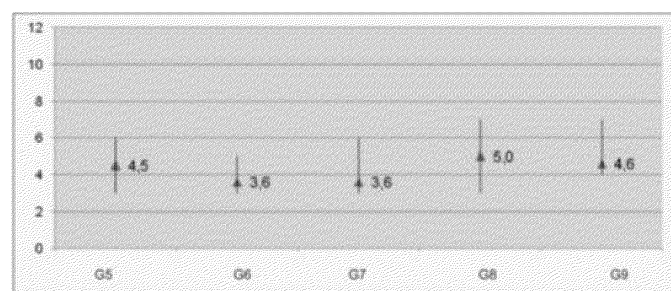
Фиг. 6



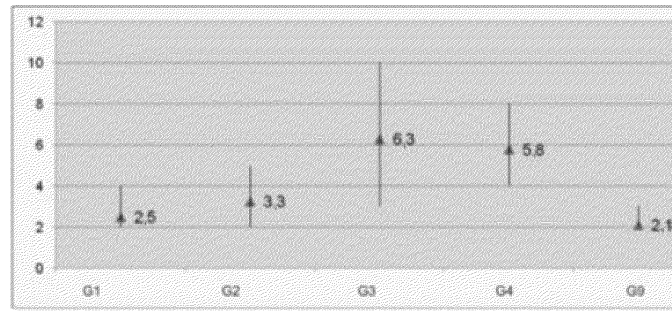
Фиг. 7



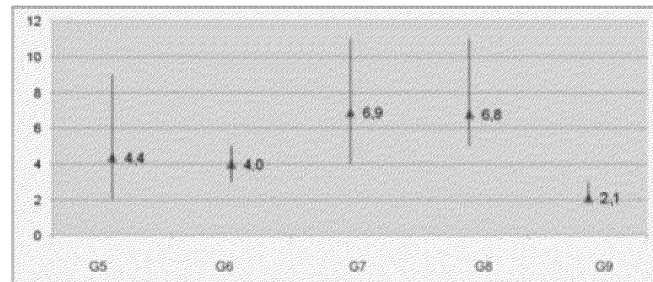
Фиг. 8



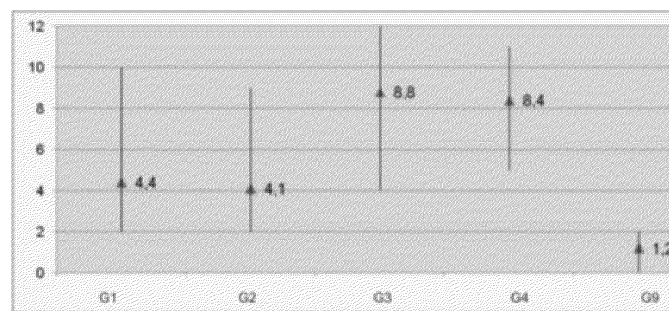
Фиг. 9



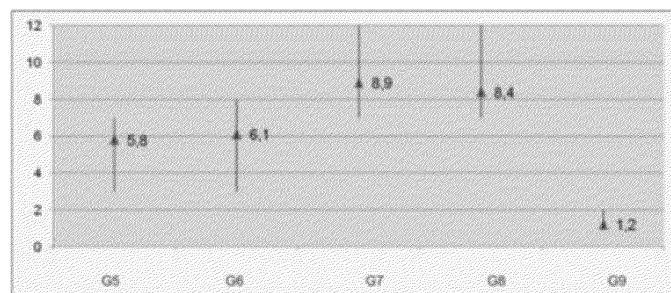
Фиг. 10



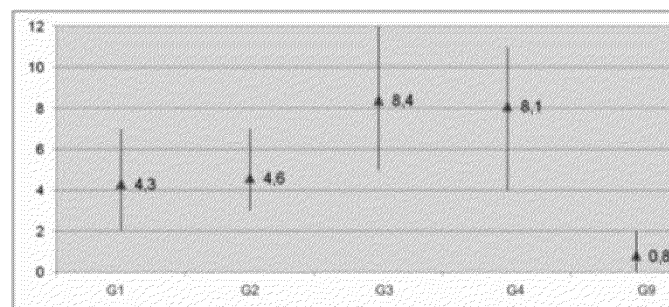
Фиг. 11



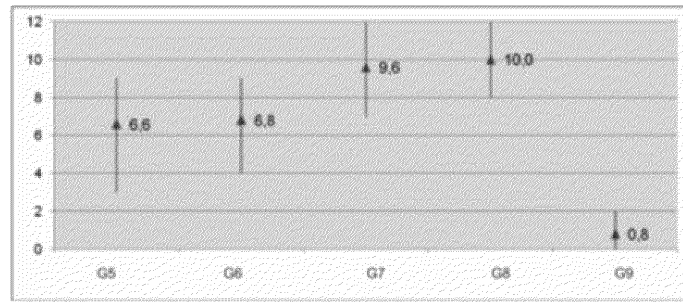
Фиг. 12



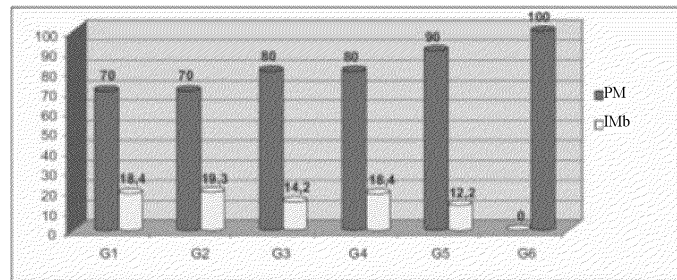
Фиг. 13



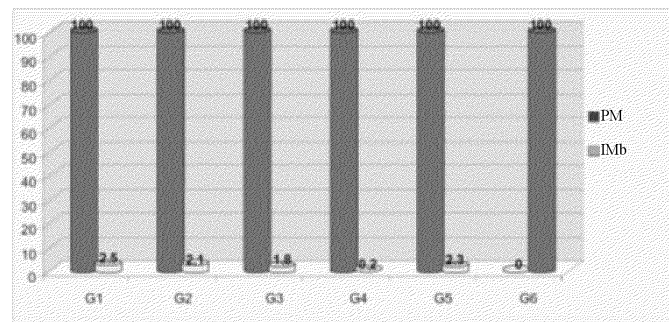
Фиг. 14



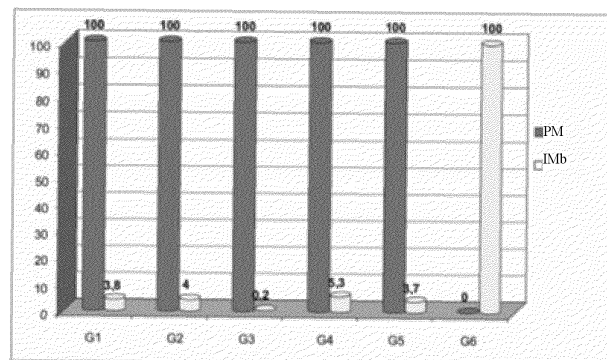
Фиг. 15



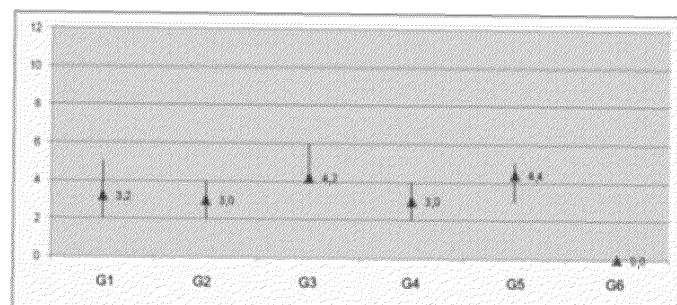
Фиг. 16



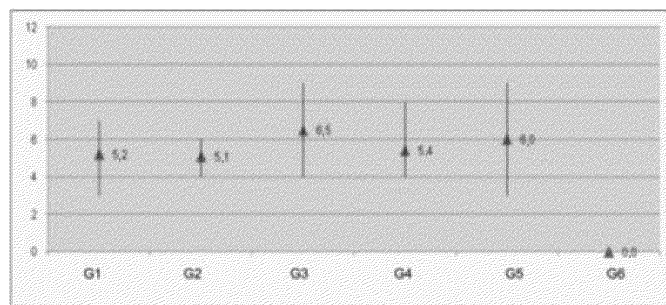
Фиг. 17



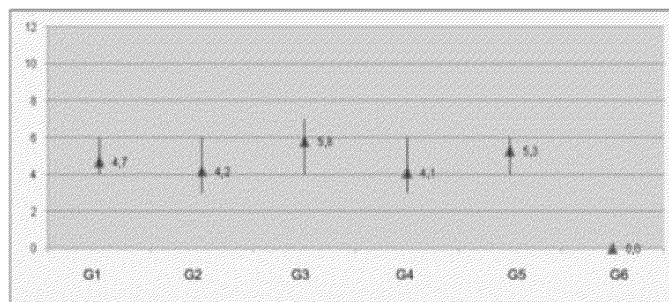
Фиг. 18



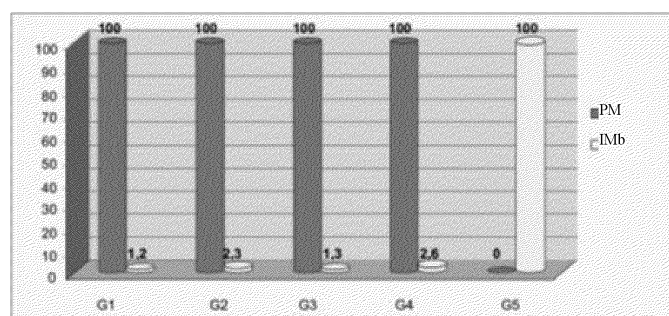
Фиг. 19



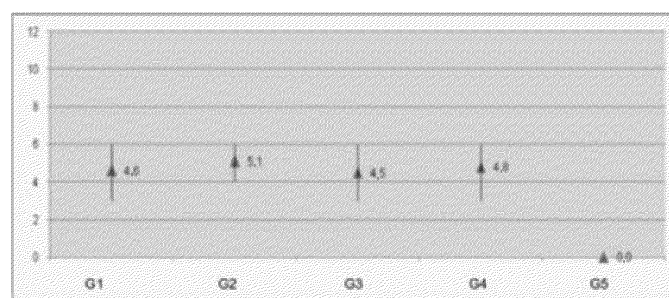
Фиг. 20



Фиг. 21



Фиг. 22



Фиг. 23

