

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202191145** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2021.08.23

(22) Дата подачи заявки
2019.10.28

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

(54) **ВАКЦИНА ВИБ 4/91 С ГЕТЕРОЛОГИЧНЫМ ШИПОВИДНЫМ БЕЛКОМ**

(31) **18203626.9**

(32) **2018.10.31**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2019/079389**

(87) **WO 2020/089164 2020.05.07**

(71) Заявитель:
**БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ
ВЕТМЕДИКА ГМБХ (DE)**

(72) Изобретатель:

Кремер-Кюль Анника, Филипп Ханс-Кристиан (DE)

(74) Представитель:

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

(57) Настоящее изобретение, в частности, относится к ВИБ 4/91 (вирусу инфекционного бронхита), кодирующему гетерологичный S (шиповидный) белок или его фрагмент. Кроме того, настоящее изобретение относится к иммуногенной композиции, содержащей указанный ВИБ 4/91, кодирующий гетерологичный S (шиповидный) белок или его фрагмент. Помимо этого, настоящее изобретение относится к способам иммунизации субъекта, включающим в себя введение такому субъекту иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением. Кроме того, настоящее изобретение относится к способам лечения или предотвращения клинических признаков, вызванных ВИБ у нуждающегося в этом субъекта, включающим в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением.

A1

202191145

202191145

A1

ВАКЦИНА ВИБ 4/91 С ГЕТЕРОЛОГИЧНЫМ ШИПОВИДНЫМ БЕЛКОМ

5 Перечень последовательностей

Данная заявка содержит перечень последовательностей в соответствии с 37 С.F.R. 1.821 – 1.825. Тем самым прилагаемый к данной заявке перечень последовательностей полностью включен в нее посредством ссылки.

Предпосылки создания изобретения

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

20 Вирус инфекционного бронхита представляет собой оболочечный вирус, имеющий геном с положительным смыслом одноцепочечной РНК размером 27,6 т.п.н. (Cavanagh 2007. Vet. Res. 38:281-297). Первые две трети вирусного генома содержат большую кодирующую область (также обозначаемую как ген 1), разделенную на две открытые рамки считывания 1a и 1b, которые кодируют 15 неструктурных белков, участвующих в репликации, редактировании и транскрипции РНК. Последняя треть вирусного генома кодирует структурные белки: шиповидный белок (S, кодируется геном 2), оболочечный белок (Е, кодируется геном 3с), мембранный белок (М, кодируется геном 4) и нуклеокапсидный белок (N, кодируется геном 6). Белки S, Е и М являются частью вирусной оболочки, а белок N вместе с вирусной РНК образует ядро рибонуклеопротеина. Шиповидный белок коронавируса определяет тропизм

вида хозяина (Куо и соавт. 2000. *J. Virol.* 74:1393-1406). Он представляет собой димерный или тримерный трансмембранный белок, который протеолитически расщепляется на две субъединицы, S1 и S2. Сильно гликозилированный домен S1 образует «голову» шиповидного белка и содержит рецептор-связывающий домен, который взаимодействует с 2,3-связанными сиаловыми кислотами на поверхности клетки-хозяина (Promkuntod и соавт. 2014. *Virology.* 448:26-32). Домен S2 содержит оставшуюся часть эктодомена («ножку»), трансмембранный домен и эндодомен, расположенные в цитоплазме.

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

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

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

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

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

Ellis и соавт. 2018 (J. Virol. 92(23)), Hodgson и соавт. (J. Virol. 78(24)) и Argemesto и соавт. 2011 (PLoS One: 6(8):e24352) все раскрывают ВИБ Beaudette с шиповидным белком M41 или 4/91. Тем не менее, Ellis и соавт. 2018 (J. Virol. 92(23)) описывают, что рекомбинантный Beaudette с химерными шиповидными белками с гетерологичными субъединицами S1 из M41 или QX в сочетании с субъединицей S2 шиповидного белка Beaudette не обеспечивает достаточной защиты от гомологичных S1 контрольных заражений (*«Однократная вакцинация цыплят без специфических патогенов рВИБ, экспрессирующим S1 вирулентных штаммов M41 или QX, BeauR-M41 (S1) и BeauR-QX (S1), дала неполную защиту от гомологичного заражения на основании активности ресничек и клинических признаков»*; реферат). Кроме того, Ellis и соавт. 2018 (J. Virol. 92(23)) описывают, что полноразмерный ген S (S1 и S2 из M41) давал только частичную защиту от контрольного заражения посредством ВИБ гомологичного серотипа (стр. 12), предполагая, что штамм Beaudette ВИБ не подходит в качестве остова для рекомбинантных вакцин против ВИБ. Hodgson и соавт. (J. Virol. 78(24)) далее раскрывают, что штамм Beaudette *«также считается слабо иммуногенным»*, и, следовательно, *«он никогда не был использован в качестве вакцинного штамма»* (стр. 13802, левый столбец, второй пункт). Вследствие этого существует потребность в создании новых и высокоэффективных вакцин против ВИБ и рекомбинантных вакцин против ВИБ, соответственно. Кроме того, существует потребность в высокоэффективных векторах для вакцины против ВИБ.

Подробное описание изобретения

Перед описанием аспектов настоящего изобретения необходимо отметить, что используемые в настоящем описании и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если

контекст явно не требует иного. Таким образом, ссылка на «антиген» включает множество антигенов, ссылка на «вирус» представляет собой ссылку на один или несколько вирусов и их эквивалентов, известных специалистам в данной области, и так далее. Если не указано иное, то все технические и научные термины, используемые в настоящей заявке, имеют те же значения, которые обычно понимаются специалистом в области, к которой относится данное изобретение. Хотя любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в настоящей заявке, могут быть использованы на практике или при тестировании настоящего изобретения, в данном случае описаны предпочтительные способы, устройства и материалы. Все публикации, упомянутые в настоящей заявке, включены в нее посредством ссылки с целью описания и раскрытия клеточных линий, векторов и методологий, как указано в публикациях, которые могут быть использованы в связи с изобретением. Ничто в настоящей заявке не должно быть истолковано как признание того, что изобретение не имеет права датировать такое раскрытие задним числом на основании предшествующего изобретения.

Сущность изобретения

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

В общем, настоящее изобретение обеспечивает ВИБ 4/91 (вирус инфекционного бронхита), кодирующий гетерологичный S (шиповидный) белок ВИБ или его фрагмент.

Термин «ВИБ 4/91» хорошо известен специалисту в данной области. Термин «ВИБ» относится к вирусу инфекционного бронхита. Термин «4/91» используют взаимозаменяемо с термином «793В» и он определяет конкретный серотип или генотип ВИБ. Серотип или генотип 4/91 хорошо известен специалисту в данной области и включает штаммы, такие как UK/4/91, UK/793В/91 и CR88. Штаммы ВИБ обычно дифференцируют по кодирующей последовательности субъединицы S1 шиповидного белка (Valastro и соавт. 2016. Infect Genet Evol. 39:349-364), а также могут быть дифференцированы по их полной нуклеотидной последовательности или последовательностям конкретных белков, таких как шиповидный белок, нуклеокапсидный белок, оболочечный (Е) белок или мембранный (М) гликопротеин. Поскольку шиповидный белок

определяет тропизм хозяина и антигенность ВИБ, то генотипы ВИБ классифицируют по кодирующей последовательности субъединицы 1 шиповидных белков. В качестве альтернативы, штаммы ВИБ можно дифференцировать по их серотипу. Классификация серотипов включает в себя
5 обработку вируса нейтрализующими антителами.

Специалист в данной области техники знает, где получить ВИБ 4/91. Штаммы ВИБ 4/91 IBV можно приобрести коммерческим путем, как, например, NOBILIS® IB 4-91 (MSD Animal Health), CEVAC IBird® (CEVA; штамм 1/96), или Gallivac IB88 (Boehringer Ingelheim; штамм CR88121). Кроме того,
10 специфические вакцинные штаммы ВИБ 4/91 используют в течение десятилетий (Jones 2010 Rev. Bras. Cienc. Avic. Том 12 № 2) и, следовательно, могут быть выделены соответствующими специалистами. Способы выделения штаммов ВИБ 4/91 и характеристики штаммов ВИБ 4/91 хорошо известны специалистам в данной области техники. К примеру, штаммы ВИБ 4/91 можно охарактеризовать,
15 как описано у SHIMAZAKI и соавт. 2008 (J. Vet. Med. Sci. 71(5): 583–588), Martin и соавт. 2014 (Avian Pathology том 43, № 3, 264–268), Zanaty и соавт. 2016 (World J Virol; 5(3): 125-134) или Stenzel и соавт. 2017 (Polish Journal of Veterinary Sciences том 20, № 3, 599-601). Кроме того, были секвенированы ВИБ 4/91, и доступными являются геномные последовательности, такие как
20 KF377577. Таким образом, геном вируса может быть создан путем синтеза его последовательности и сгенерирован с применением обратных генетических систем.

Термин «шиповидный» относится к специфическому белку ВИБ, который хорошо известен специалисту в данной области. Шиповидный белок является
25 основным индуктором антител и защитного иммунного ответа. Кроме того, шиповидный (S) белок облегчает проникновение ВИБ в клетки, связывая клеточные рецепторы клетки-хозяина, а также опосредуя слияние вирус-клеточной мембраны с клеткой-хозяином. Кроме того, он определяет тканевой и клеточный тропизм штамма вируса.

Термин «гетерологичный S (шиповидный)» означает, что шиповидный белок или его фрагмент, который был введен в ВИБ 4/91, принадлежит к
30 другому генотипу или серотипу, нежели ВИБ 4/91. Таким образом, гетерологичный шиповидный имеет генотип или серотип, отличный от 4/91.

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

Кроме того, настоящее изобретение также обеспечивает иммуногенную композицию, содержащую ВИБ 4/91 (вирус инфекционного бронхита), кодирующий гетерологичный S (шиповидный) белок или его фрагмент.

Помимо этого, настоящее изобретение также обеспечивает иммуногенную композицию, содержащую ВИБ (вирус инфекционного бронхита), как описано в настоящей заявке. Таким образом, предложена иммуногенная композиция, содержащая ВИБ 4/91 (вирус инфекционного бронхита), кодирующий гетерологичный S (шиповидный) белок ВИБ или его фрагмент.

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

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

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

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

ВИБ 4/91 – Определение по последовательностям, кодирующим белок

В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением ВИБ 4/91 имеет нуклеотидную последовательность, как показано для KF377577 (SEQ ID NO 53) или последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности с ней.

В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением ВИБ 4/91 имеет нуклеотидную последовательность, как показано для SEQ ID NO 1 или последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности с ней.

Термин «нуклеиновая кислота» или «последовательность нуклеиновой кислоты», или «нуклеотидная последовательность» относится к полинуклеотидам, включая молекулы ДНК, молекулы РНК, молекулы кДНК или производные. Термин охватывает как одноцепочечные, так и двухцепочечные

полинуклеотиды. Нуклеиновая кислота в соответствии с настоящим изобретением охватывает выделенные полинуклеотиды (т.е. выделенные из их природной среды) и генетически модифицированные формы. Кроме того, включены также химически модифицированные полинуклеотиды, включая встречающиеся в природе модифицированные полинуклеотиды, такие как гликозилированные или метилированные полинуклеотиды, или искусственно модифицированные, такие как биотинилированные полинуклеотиды. К тому же, термины «нуклеиновая кислота» и «полинуклеотид» являются взаимозаменяемыми и относятся к любой нуклеиновой кислоте. Термины «нуклеиновая кислота» и «полинуклеотид» также конкретно включают нуклеиновые кислоты, состоящие из оснований, отличных от пяти биологически встречающихся оснований (аденина, гуанина, тимина, цитозина и урацила).

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

В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением штамм ВИБ 4/91 имеет шиповидный (S) белок, имеющий аминокислотную последовательность, как показано для AGY56140 (SEQ ID NO 54) или последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности с ней.

В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением штамм ВИБ 4/91 имеет шиповидный (S1) белок, имеющий аминокислотную последовательность, как показано для AF093793 (SEQ ID NO 60) или последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности с ней.

В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением штамм ВИБ 4/91 имеет шиповидный (S1) белок, имеющий аминокислотную последовательность, как показано для EU914938 (SEQ ID NO 55) или последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности с ней.

В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением штамм ВИБ 4/91 имеет шиповидный (S1) белок, имеющий аминокислотную последовательность, как показано для KM067900 (SEQ ID NO 56) или последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности с ней.

Следует понимать, что последовательность шиповидного белка или нуклеиновой кислоты может быть использована для определения того, имеет ли штамм ВИБ происхождение 4/91. Тем не менее, поскольку ВИБ 4/91 IBV используют в качестве остова, а последовательность шиповидного белка 4/91 или последовательность нуклеиновой кислоты заменена гетерологичным шиповидным белком или его фрагментом, то конечный ВИБ с гетерологичным шиповидным белком больше не содержит или содержит только оставшиеся части шиповидного белка 4/91.

В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением штамм ВИБ 4/91 имеет шиповидный (S) белок, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:2 или последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности с ней.

В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением ВИБ 4/91 имеет нуклеокапсидный (N) белок, имеющий аминокислотную последовательность, как показано для EU780081 (SEQ ID NO 57) или последовательность, имеющую по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности с ней по меньшей мере с одной из вышеупомянутых последовательностей.

В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением ВИБ 4/91 имеет нуклеокапсидный (N) белок, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:3 или последовательность, имеющую по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности с ней.

В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением ВИБ 4/91 имеет оболочечный (E) белок, имеющий аминокислотную последовательность, как показано для AGY56143 (SEQ ID NO 58) или последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности с ней.

В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением ВИБ 4/91 имеет оболочечный (E) белок, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:4 или последовательность, имеющую по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности с ней.

В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением ВИБ 4/91 имеет мембранный гликопротеиновый (M) белок, имеющий аминокислотную последовательность, как показано для AGY56144 (SEQ ID NO 59) или последовательность, имеющую по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности с ней.

В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением ВИБ 4/91 IBV имеет мембранный гликопротеиновый (M) белок, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:5 или последовательность, имеющую по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности с ней.

Термин «идентичность» или «идентичность последовательностей» известен в данной области техники и относится к взаимосвязи между двумя или более полипептидными последовательностями или двумя или более полинуклеотидными последовательностями, а именно эталонной

последовательностью и данной последовательностью, которую нужно сравнить с эталонной последовательностью. Идентичность последовательностей определяется путем сравнения данной последовательности с эталонной последовательностью после того, как последовательности были оптимально выровнены для получения наивысшей степени сходства последовательностей, что определяется соответствием между строками таких последовательностей. После такого выравнивания идентичность последовательностей подтверждается на основе положения за положением, например, последовательности являются «идентичными» в конкретном положении, если в этом положении нуклеотиды или аминокислотные остатки идентичны. Общее количество таких идентичностей положений затем делится на общее количество нуклеотидов или остатков в эталонной последовательности, чтобы получить % идентичности последовательности. Идентичность последовательностей можно легко вычислить известными методами, включая, но не ограничиваясь ими, методы, описанные в Computational Molecular Biology, Lesk, A. N., ed., Oxford University Press, New York (1988), Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York (1993); Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinge, G., Academic Press (1987); Sequence Analysis Праймер, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York (1991); и Carillo, H., and Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988), содержание которых включено в настоящую заявку путем ссылки. Предпочтительные способы определения идентичности последовательности предназначены для обеспечения наибольшего соответствия между исследуемыми последовательностями. Способы определения идентичности последовательностей кодируются в общедоступных компьютерных программах, которые определяют идентичности с ней между заданными последовательностями. Примеры таких программ включают, но не ограничиваются такими, как пакет программ GCG (Devereux, J., и соавт., Nucleic Acids Research, 12(1):387 (1984)), BLASTP, BLASTN and FASTA (Altschul, S. F. и соавт., J. Molec. Biol., 215:403-410 (1990)). Программа BLASTX общедоступна из NCBI и других источников (BLAST Manual, Altschul, S. и соавт., NCVI NLM NIH Bethesda, MD 20894, Altschul, S. F. и соавт., J. Molec. Biol., 215:403-410 (1990), содержание которых включено в настоящую заявку путем ссылки). Эти программы оптимально выравнивают

последовательности при использовании веса пробела по умолчанию для получения самого высокого уровня идентичности последовательности между заданной и эталонной последовательностями. В качестве примера, под полинуклеотидом с нуклеотидной последовательностью, имеющей по меньшей мере, например, 85%,
5 предпочтительно 90%, даже более предпочтительно 95% «идентичности последовательности» с эталонной нуклеотидной последовательностью, предполагается, что нуклеотидная последовательность заданного полинуклеотида идентична эталонной последовательности, за исключением того, что последовательность заданного полинуклеотида может содержать вплоть до 15,
10 предпочтительно до 10, еще более предпочтительно вплоть до 5 точечных мутаций на каждые 100 нуклеотидов эталонной нуклеотидной последовательности. Другими словами, в полинуклеотиде с нуклеотидной последовательностью, имеющей по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, еще более предпочтительно 95% идентичности относительно эталонной нуклеотидной
15 последовательности, вплоть до 15%, предпочтительно 10%, еще более предпочтительно 5% нуклеотидов в эталонной последовательности могут быть удалены или заменены другими нуклеотидами, или количество нуклеотидов вплоть до 15%, предпочтительно 10%, еще более предпочтительно 5% от общего количества нуклеотидов в эталонной последовательности могут быть вставлены
20 в эталонную последовательность. Эти мутации эталонной последовательности могут присутствовать в 5'- или 3'-концевых положениях эталонной нуклеотидной последовательности или где-нибудь между этими концевыми положениями, распределяясь или отдельно среди нуклеотидов в эталонной последовательности, или в одной или нескольких смежных группах в эталонной последовательности.
25 Аналогично, под полипептидом с заданной аминокислотной последовательностью, имеющей по меньшей мере, например, 85%, предпочтительно 90%, еще более предпочтительно 95% идентичности последовательности с эталонной аминокислотной последовательностью, предполагают, что данная аминокислотная последовательность полипептида идентична эталонной последовательности, за
30 исключением того, что заданная последовательность полипептида может содержать вплоть до 15, предпочтительно вплоть до 10, еще более предпочтительно до 5 аминокислотных изменений на каждые 100 аминокислот эталонной аминокислотной последовательности. Другими словами, для получения заданной полипептидной последовательности, которая имеет по меньшей мере

85%, предпочтительно 90%, еще более предпочтительно 95% идентичности последовательности с эталонной аминокислотной последовательностью, вплоть до 15%, предпочтительно вплоть до 10%, еще более предпочтительно вплоть до 5% аминокислотных остатков в эталонной последовательности могут быть удалены или заменены другой аминокислотой, или число аминокислот вплоть до 5% от общего количества аминокислотных остатков в эталонной последовательности могут быть вставлены в эталонную последовательность. Эти изменения эталонной последовательности могут происходить в амино- или карбоксиконцевых положениях эталонной аминокислотной последовательности или в любом месте между этими концевыми положениями, перемежаясь либо индивидуально среди остатков в эталонной последовательности, либо в одной или нескольких смежных группах в эталонной последовательности. Предпочтительно положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. Тем не менее, консервативные замены не включены в качестве совпадения при определении идентичности последовательности.

Термины «идентичность», «идентичность последовательности» или «процент идентичности» используют в настоящей заявке как взаимозаменяемые. Для осуществления настоящего изобретения в данном случае определено, что для определения процента идентичности двух аминокислотных последовательностей или двух последовательностей нуклеиновых кислот, последовательности выравнивают с целью оптимального сравнения (например, пробелы могут быть введены в последовательность первой аминокислотной или нуклеиновокислотной последовательности для оптимального выравнивания со второй аминокислотной последовательностью или последовательностью нуклеиновой кислоты). Затем остатки аминокислот или нуклеотидов в соответствующих положениях аминокислот или нуклеотидов сравнивают. Когда положение в первой последовательности занято той же аминокислотой или нуклеотидным остатком, что и соответствующее положение во второй последовательности, то молекулы являются идентичными в этом положении. Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией количества идентичных положений, общих для последовательностей (т.е., % идентичности = количество идентичных положений/общее количество положений

(т.е. перекрывающиеся положения) \times 100). Предпочтительно, две последовательности имеют одинаковую длину.

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

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

Кроме того, последовательности белков или последовательности нуклеиновых кислот в соответствии с настоящим изобретением могут быть использованы в качестве «запрашиваемой последовательности» для осуществления поиска по доступным базам данных, например, для идентификации других членов семейства или родственных последовательностей. Такие поиски могут быть выполнены с использованием программ BLASTN и BLASTP (версия 2.0) от Altschul, и соавт. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Поиски белков BLAST можно осуществлять с помощью программы BLASTP, счет = 50, длина слова = 3 для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных молекулам белков в соответствии с изобретением. Для получения выравниваний с пробелами

с целью сравнения, Gapped BLAST можно использовать как описано у Altschul и соавт. (1997) Nucleic Acids Res. 25(17): 3389-3402. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST можно применять параметры по умолчанию соответствующих программ (например, BLASTP и BLASTN). См. домашнюю
5 страницу Национального центра биотехнологической информации по адресу <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

В контексте настоящей заявки, в частности, следует понимать, что термин «идентичный последовательности SEQ ID NO: X» эквивалентен термину «идентичный последовательности SEQ ID NO: X по длине SEQ ID NO: X» или
10 термину «идентичный последовательности SEQ ID NO: X по всей длине SEQ ID NO: X», соответственно. В этом контексте «X» представляет собой любое целое число от 1 до 61, так что «SEQ ID NO: X» представляет собой любую из SEQ ID NO, упомянутых в настоящей заявке.

В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в
15 соответствии с настоящим изобретением ВИБ 4/91 выбран из списка штаммов, состоящего из Испания/98/328, Испания/92/35, IR-3654-VM, FR-CR88061-88, FR-85131-85, UK-1233-95, UK/3/91, Испания/00/336, UK/4/91, UK/7/91, UK/793B/91, 4/91-патогенный, 4/91-аттенуированный, IB4-91 и CR88.

Гетерологичный S белок

Штаммы ВИБ

Штаммы ВИБ можно классифицировать по серотипу и генотипу. Классификация серотипов включает обработку вируса нейтрализующими антителами, тогда как классификация генотипов обычно включает изучение
25 последовательности S1 (шиповидного) белка. Тем не менее, различные штаммы ВИБ хорошо известны специалистам в данной области. Вирус инфекционного бронхита был впервые обнаружен в США в 1930-х годах.

Первым идентифицированным серотипом ВИБ был Массачусетс и он оставался единственным серотипом до открытия другого серотипа ВИБ в 1956 г. В настоящее время в Соединенных Штатах Америки идентифицировано
30 несколько дополнительных серотипов, включая Арканзасс и Делавер, в дополнение к первоначально идентифицированному типу Массачусетс. Сегодня вирусы ВИБ Mass можно идентифицировать во многих странах мира.

Штамм ВИБ Beaudette относится к типу Массачусетс и был получен после по меньшей мере 150 пассажей в куриных эмбрионах. Штамм ВИБ Beaudette был

первоначально выделен в исполнении Beaudette and Hudson (J. Am. Vet. Med. A. 90, 51-60, 1937) и пассирован в куриных эмбрионах. Другими штаммами ВИБ типа Массачусетс, помимо Beaudette являются Н120, Н52 и М41. Штамм Н120 был пассирован 120 раз.

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

 Штаммы, обозначенные как «Итальянский-02» или «Италия-02», были выделены в конце 1990-х годов в Италии. Анализ последовательностей одного из этих изолятов был опубликован в 2002 году (NCBI-BLAST, номер AJ457137). Тем не менее исследования показали, что этот штамм Итальянский-02 широко
15 распространен в Европе и что, помимо варианта штамма ВИБ 4/91, он стал одним из наиболее преобладающих генотипов в Великобритании, Испании, Франции и Нидерландах.

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

 Кроме того, в Европе были идентифицированы штаммы D274, V1648/D8880, D1466, V1397 и Арканзас.

 Специалист в данной области знает, где получить любые штаммы ВИБ.
25 Штаммы ВИБ имеются в продаже, могут быть получены в научных институтах или геномы могут быть синтезированы синтетическим путем в виде комплементарной ДНК, поскольку штаммы ВИБ были секвенированы и последовательности были опубликованы и, таким образом, они являются доступны. Более того, штаммы ВИБ могут быть выделены на месте. Способы
30 выделения штаммов ВИБ и характеристики штаммов ВИБ хорошо известны специалистам в данной области. Valter Leonardo de Quadros 2011 (Диссертация, Das Infektiöse Bronchitis Virus (IBV): Molekularbiologische Untersuchungen zur Diagnostik und zum Vorkommen sowie zur Pathogenität des Genotyps IBV QX in spezifisch pathogenfreien (SPF) Broilern, Freie Universität Berlin), Worthington и

соавт. 2009 (*Avian Pathology* 37(3), 247-257), Liu и соавт. 2009 (*Virus Genes* 38: 56-65), Dolz и соавт. 2006 (*Avian Pathology* 35 (2): 77-85), Farsang и соавт. 2002 (*Avian Pathology* 31: 229-236) и Feng и соавт. 2014 (*Virus Genes* 49: 292-303) описывают как выделить и дифференцировать различные штаммы ВИБ.

5 В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением гетерологичный шиповидный белок имеет генотип или серотип, отличный от 4/91.

10 В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением гетерологичный S белок или его фрагмент происходит от ВИБ с генотипом или серотипом, выбранным из перечня, включающего в себя: Арканзас (такой как Арканзас 99), Бразилия (такой как BR-1, BR-2, 23/2013, IBV/Бразилия/351/1984), Калифорния (такой как Калифорния 1734/04, Калифорния 99), Коннектикут, Делавер (такой как Делавер 98), Нидерландский (такой как D207, D212, D274, D3128, D3896, D8880, D1466),
15 Флорида, Джорджия (такой как Джорджия GA-07, GA-08, GA-12, GA-13), Грей, Холт, Айова (такой как Айова 97 и Айова 69), Италия (такой как Италия 02), JMK, LDT3, Мэн (такой как Мэн 209), Массачусетс (M41, H52, H120), Пенсильвания (такой как Пенсильвания 1220/98, Пенсильвания Wolg/98), PL84084, Qu (такой как Qu-mv), QX (такой как GB341/96), Q1, SE 17 и Вариант 2
20 (такой как IS/1494/06, IBV/Ск/EG/CU/4/2014, гаммаСoV/Ск/Польша/G052/2016).

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

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

30 В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением штамм Массачусетс выбран из перечня, включающего в себя: H120, H52, Испания/98/308, IBMA5-1, SD/97/01, Испания/96/334, M41-M21883.

В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением штамм QX выбран из перечня, включающего в себя: FR-L1450T-05, FR-L1450L-05, NL-L1449T-04, NL-L1449K-04, IBV/Ck/SP/170/09, IBV/Ck/SP/79/08, IBV/Ck/SP/248/09, HBN, IBVQX, LX4, 5 BJQ, CK/CH/LGD/03 и GB341/96.

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

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

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

20 В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением штамм Бразилия выбран из перечня, включающего в себя: BR-1, BR-2, 23/2013 и IBV/Бразилия/351/1984.

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

25 В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением гетерологичный S белок или его фрагмент происходит от генотипа или серотипа Массачусетс, имеющего по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности 30 последовательности с SEQ ID NO: 6 или 7.

В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением гетерологичный S белок или его фрагмент происходит от генотипа или серотипа QX, имеющего по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,6%,

99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8 или 9.

5 В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением гетерологичный S белок или его фрагмент происходит от генотипа или серотипа Q1, имеющего по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10 или 11.

10 В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением гетерологичный S белок или его фрагмент происходит от генотипа или серотипа Арканзас, имеющего по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12 или 13.

15 В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением гетерологичный S белок или его фрагмент происходит от генотипа или серотипа Вариант 2, имеющего по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 14 или 15.

20 В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением гетерологичный S белок или его фрагмент происходит от генотипа или серотипа Бразилия, имеющего по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 16 или 17.

30 В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением гетерологичный S белок или его фрагмент выбран из перечня, включающего в себя SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 или 17.

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

Настоящие экспериментальные данные показывают, что можно использовать последовательности полноразмерного шиповидного белка. Тем не менее, хорошо известно, что также можно использовать фрагменты последовательности шиповидного белка, как например, эктодомен шиповидного

5 белка.

В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением фрагмент гетерологичного S (шиповидного) белка имеет длину по меньшей мере 500, 750, 1000 или 1075 аминокислот.

10 В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением фрагмент гетерологичного S (шиповидного) белка имеет длину по меньшей мере 500, 750, 1000 или 1075 аминокислот от N-конца.

Термин «N-конец» хорошо известен специалисту в данной области. N-конец также называют аминоконцом, NH₂-концом, N-концевой областью или аминным концом. Когда белок транслируется с информационной РНК, он создается от N-конца к С-концу. Таким образом, N-конец является началом аминокислотной цепи (белка или полипептида), содержащей указанную

15 аминокислотную группу (-NH₂).

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

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

25

Термин «эктодомен» хорошо известен специалисту в данной области. Шиповидный белок состоит из различных функциональных частей, сигнальной последовательности, эктодомена, трансмембранного домена и эндодомена (от N-конца к С-концу). Таким образом, после расщепления сигнальной

30 последовательности N-конец шиповидного белка начинается с эктодомена. Эктодомен шиповидного ВИБ имеет длину приблизительно 1075 аминокислот и отличается по длине на несколько аминокислот в зависимости от штамма ВИБ.

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

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

В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением гетерологичный S (шиповидный) белок или его фрагмент заменяет S белок или его фрагмент в ВИБ 4/91.

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

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

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

Для целей настоящего изобретения можно использовать любой обычный метод инактивации. Таким образом, инактивацию можно проводить с помощью химических и/или физических обработок, которые известны специалисту в

данной области. Предпочтительные методы инактивации включают добавление циклизованного бинарного этиленимина (ВЕИ), включая добавление раствора гидробромида 2-бромэтиленамина (ВЕА), который был циклизован до бинарного этиленимина (ВЕИ). Другие предпочтительные химические средства инактивации содержат, но не ограничиваются ими тритон X-100, дезоксихолат натрия, бромид цетилтриметиламмония, β -пропиолактон, тимеросал, фенол и формальдегид (формалин). Тем не менее, инактивация может также включать стадию нейтрализации. Предпочтительные нейтрализующие средства включают, но не ограничиваются ими, тиосульфат натрия, бисульфит натрия и тому подобное.

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

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

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

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

Термин «генно-инженерный» относится к ВИБ, который был мутирован с использованием подходов «обратной генетики». Предпочтительно, чтобы ВИБ в

соответствии с настоящим изобретением был получен с помощью генной инженерии. Метод обратной генетики включает получение синтетических рекомбинантных вирусных РНК. Тем не менее, методы «обратной генетики» хорошо известны специалистам в данной области.

5 В другом конкретном аспекте ВИБ или иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением ВИБ представляет собой рекомбинантный ВИБ.

Используемый в настоящей заявке термин «рекомбинантный» относится к геному РНК (или последовательности РНК, последовательности кДНК или белку), имеющим любые модификации, которые не происходят в природе в соответствующем геноме РНК (или последовательности РНК, последовательности кДНК или белке). Например, геном РНК (или последовательность РНК, последовательность кДНК или белок) считается «рекомбинантным», если он содержит вставку, делецию, инверсию, перемещение или точечную мутацию, введенную искусственно, например, вмешательством человека. Следовательно, геномная последовательность РНК (или последовательность РНК, последовательность кДНК или белок) не связана со всеми или частью последовательностей (или последовательности РНК, последовательности кДНК или белка), с которыми она связана в природе. Термин «рекомбинантный», используемый в отношении вируса, означает вирус, полученный путем искусственного манипулирования вирусным геномом. Термин «рекомбинантный вирус» охватывает генетически модифицированные вирусы.

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

Термин «химерный» относится к ВИБ, содержащему одну или несколько нуклеотидных последовательностей от другого коронавируса, предпочтительно от другого штамма ВИБ. Например, ВИБ 4/91, кодирующий гетерологичный S (шиповидный) белок или его фрагмент представляет собой химерный ВИБ.

30 В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением иммуногенная композиция представляет собой вакцину. Термин «вакцина» уже был описан в другом месте в настоящей заявке. Тем не менее, в случае, когда хозяин проявляет защитный иммунологический ответ, такой, что устойчивость к новой инфекции будет увеличиваться и/или

уменьшаться клиническая тяжесть заболевания, иммуногенная композиция описывается как «вакцина».

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

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

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

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

Предпочтительно, иммуногенная композиция дополнительно содержит стабилизатор сахарозы и желатина.

20 Предпочтительно, фармацевтически приемлемым носителем является хитозан.

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

30 Предпочтительно иммуногенная композиция может дополнительно включать один или несколько других иммуномодулирующих средств, таких как, например, интерлейкины, интерфероны или другие цитокины. Количества и концентрации адъювантов и добавок, применимых в контексте настоящего

изобретения, могут быть легко определены квалифицированным специалистом в данной области.

В некоторых аспектах иммуногенная композиция в соответствии с настоящим изобретением содержит адъювант. Используемое в настоящей заявке понятие «адъюванты» может охватывать гидроксид алюминия и фосфат алюминия, сапонины, например, Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL), эмульсию типа «вода-в-масле», эмульсию типа «масло-в-воде», эмульсию типа «вода-в-масле-в-воде». Эмульсия может быть основана, в частности, на легком жидком парафиновом масле (тип Европейской Фармакопеи); изопреноидном масле, таком как сквалан или сквален; масле, полученном после олигомеризации алкенов, в частности, изобутила или децена; сложных эфирах кислот или спиртов, содержащих линейную алкильную группу, более конкретно растительных маслах, этилолеате, ди-(каприлат/капрат) пропиленгликоле, три-(каприлат/капрат) глицериле или диолеате пропиленгликоля; сложных эфирах разветвленных жирных кислот или спиртов, в частности, сложных эфирах изостеариновой кислоты. Для получения эмульсии масло используют в сочетании с эмульгаторами. Эмульгаторы предпочтительно представляют собой неионные поверхностно-активные вещества, в частности, сложные эфиры сорбитана, маннита (например, олеат ангидроманнита), гликоля, полиглицерина, пропиленгликоля и олеиновой, изостеариновой, рицинолевой или гидроксистеариновой кислоты, которые необязательно являются этоксилированными, и блок-сополимеры полиоксипропилен-полиоксиэтилена, в частности, продукты плуроник, в частности L121. См., Hunter и соавт., *The Theory and Practical Application of Adjuvants* (Ed. Stewart-Tull, D. E. S.), John Wiley and Sons, NY, pp51-94 (1995) и Todd и соавт., *Vaccine* 15:564-570 (1997). Примерными адъювантами являются эмульсия SPT, описанная на стр. 147 в «*Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach*», под ред. M. Powell and M. Newman, Plenum Press, 1995, и эмульсия MF59, описанная на стр. 183 этой же книги.

Дополнительным примером адъюванта является соединение, выбранное из полимеров акриловой или метакриловой кислоты и сополимеров малеинового ангидрида и производного алкенила. Предпочтительными адъювантными соединениями являются полимеры акриловой или метакриловой кислоты, которые

сшиты, особенно с простыми полиалкениловыми эфирами сахаров или многоатомных спиртов. Эти соединения являются известны под термином карбомер (Pharmеuropa том 8, № 2 июнь 1996). Специалисты в данной области техники могут обратиться также к патенту США № 2,909,462, в котором описаны такие акриловые полимеры, перекрестно сшитые с полигидроксилированным соединением, которое имеет по меньшей мере 3 гидроксильные группы, предпочтительно не более 8, где атомы водорода по меньшей мере трех гидроксильных заменены ненасыщенными алифатическими радикалами, содержащими по меньшей мере 2 атома углерода. Предпочтительными радикалами являются радикалы, содержащие от 2 до 4 атомов углерода, например, винилы, аллилы и другие этиленненасыщенные группы. Ненасыщенные радикалы могут сами содержать другие заместители такие, как метил. В особенности пригодны продукты, которые продаются под названием Carbopol; (BF Goodrich, Огайо, США). Они являются перекрестно сшитыми с аллилсахарозой или аллилпентаэритритолом. Среди них можно упомянуть Carbopol 974P, 934P и 971P. Наиболее предпочтительным является применение Carbopol 971P. Среди сополимеров малеинового ангидрида и алкенильного производного находятся сополимеры ЕМА (Monsanto), которые являются сополимерами малеинового ангидрида и этилена. Растворение этих полимеров в воде обеспечивает кислый раствор, который будет нейтрализован, предпочтительно до физиологического рН, чтобы получить раствор адьюванта, в который будет включена сама иммуногенная, иммунологическая или вакцинная композиция.

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

Предполагают, что адьювант можно добавлять в количестве приблизительно от 100 мкг до приблизительно 10 мг на дозу, предпочтительно в количестве приблизительно от 100 мкг до приблизительно 10 мг на дозу, более предпочтительно в количестве приблизительно от 500 мкг до приблизительно 5 мг на дозу, еще более предпочтительно в количестве приблизительно от 750 мкг

до приблизительно 2,5 мг на дозу, и наиболее предпочтительно в количестве приблизительно от 1 мг на дозу. Альтернативно, адъювант может находиться в концентрации приблизительно от 0,01 до 50%, предпочтительно в концентрации приблизительно от 2% до 30%, более предпочтительно в концентрации 5 5 приблизительно от 5% до 25%, еще более предпочтительно в концентрации приблизительно от 7% до 22%, и наиболее предпочтительно в концентрации от 10% до 20% по объему конечного продукта.

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением иммуногенная композиция эффективна при лечении 10 и/или профилактике клинических признаков, вызванных посредством ВИБ у нуждающегося субъекта. Термины «лечение и/или профилактика», «клинические признаки» и «нуждающийся» были определены в других местах.

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением иммуногенная композиция защищает от заражения 15 штаммом ВИБ генотипа или серотипа гетерологичного шиповидного белка.

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

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с 20 настоящим изобретением иммуногенная композиция защищает от заражения штаммами генотипа Массачусетс.

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

25 Объем для однократной дозы был определен в другом месте настоящей заявки.

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

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

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением иммуногенная композиция содержит от 1 до $10 \log_{10}$ EID₅₀ на дозу ВИБ.

5 В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением иммуногенная композиция содержит от 2 до $5 \log_{10}$ EID₅₀ на дозу ВИБ.

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением иммуногенная композиция содержит от 2 до $4 \log_{10}$ EID₅₀ на дозу ВИБ.

10 Наборы

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

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

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

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

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

Способ лечения

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

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

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

15 Кроме того, иммунизация нуждающегося в ней субъекта иммуногенными композициями, как предусмотрено в настоящей заявке, приводит к предотвращению инфицирования субъекта посредством ВИБ. Еще более предпочтительно иммунизация приводит к эффективному, продолжительному иммунологическому ответу против инфицирования посредством ВИБ. Следует понимать, что указанный период времени будет длиться более 1 месяца, предпочтительно более 2 месяцев, предпочтительно более 3 месяцев, более предпочтительно более 4 месяцев, более предпочтительно более 5 месяцев, 20 более предпочтительно более 6 месяцев. Следует понимать, что иммунизация не может быть эффективной у всех иммунизированных субъектов. Тем не менее, термин подразумевает, чтобы значительная часть животных была иммунизирована.

25 Предпочтительно в этом контексте рассматривается стая субъектов, у которых обычно, то есть без иммунизации, развиваются клинические признаки, обычно вызываемые или связанные с инфицированием ВИБ. Специалист в данной области без лишних слов может определить, эффективно ли иммунизированы животные в стае. Предпочтительно иммунизация должна быть эффективной, если клинические признаки по меньшей мере у 33%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, 30 по меньшей мере 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере в 95% и наиболее предпочтительно у 100% особей данной стаи уменьшились по частоте или степени тяжести по меньшей мере на 10%, более предпочтительно по меньшей мере на 20%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 30%, еще

более предпочтительно по меньшей мере на 40%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 50%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 60%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 70%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 95% и наиболее предпочтительно на 100% по сравнению с субъектами, которые либо не были иммунизированы, либо иммунизированы иммуногенной композицией, которая была доступна до настоящего изобретения, но впоследствии были инфицированы конкретным ВИБ.

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

15 Термин «лечение или профилактика» относится к снижению заболеваемости конкретной инфекцией ВИБ в стае или снижению тяжести клинических признаков, вызванных или связанных с конкретной инфекцией ВИБ. Таким образом, термин «лечение или профилактика» также относится к уменьшению количества субъектов в стае, инфицированных конкретным ВИБ (= 20 уменьшение заболеваемости конкретной инфекцией ВИБ) или к снижению тяжести клинических признаков, обычно связанных с инфекцией ВИБ или вызванных ею, или уменьшению выделения вируса после инфицирования ВИБ, или предотвращению или уменьшению снижения яйценоскости у кур-несушек после заражения конкретным ВИБ в группе субъектов, где субъекты получили 25 эффективное количество иммуногенной композиции, как предусмотрено в настоящей заявке, по сравнению с группой субъектов, которые не получали такую иммуногенную композицию.

Понятие «лечение или профилактика» обычно включает введение эффективного количества иммуногенной композиции в соответствии с 30 настоящим изобретением субъекту или группе субъектов, нуждающихся в таком лечении/профилактике или которым могло бы помочь такое лечение/профилактика. Термин «лечение» относится к введению эффективного количества иммуногенной композиции после того, как субъект или, по крайней мере, некоторые субъекты стаи уже инфицированы таким ВИБ и у таких

субъектов уже проявляются некоторые клинические признаки, вызванные или связанные с таким инфицированием ВИБ. Термин «профилактика» относится к введению субъекту до любого заражения такого субъекта посредством ВИБ или по меньшей мере когда такой субъект или ни один из субъектов в группе 5 субъектов не проявляет каких-либо клинических признаков, вызванных или связанных с инфицированием таким ВИБ. Термины «профилактика» и «предотвращение» взаимозаменяемы в этой заявке.

Термин «эффективное количество», используемый в настоящей заявке, означает, но не ограничивается этим, количество антигена, которое вызывает 10 или способно вызвать иммунный ответ у субъекта. Такое эффективное количество способно снизить частоту конкретного инфицирования ВИБ в стае или уменьшить тяжесть клинических признаков конкретного инфицирования ВИБ.

Предпочтительно, клинические признаки уменьшаются по частоте или 15 тяжести по меньшей мере на 10%, более предпочтительно по меньшей мере на 20%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 30%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 40%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 50%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 60%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 70%, еще более предпочтительно по 20 меньшей мере на 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 95% и наиболее предпочтительно на 100% по сравнению с субъектами, которых либо не лечили, либо лечили иммуногенной композицией, которая была доступна до настоящего изобретения, но впоследствии инфицированных конкретным ВИБ.

Термин «клинические признаки», используемый в настоящей заявке 25 относится к признакам инфицирования субъекта посредством ВИБ. Клинические признаки инфекции зависят от выбранного возбудителя. Примеры таких клинических признаков включают, помимо прочего, респираторный дистресс синдром, нефрит, сальфингит, аномальную яйценокость, взъерошенность 30 перьев, депрессию, снижение скорости роста и снижение аппетита. Признаки респираторного дистресса охватывают респираторные признаки, включая удушье, кашель, чихание, хрипы в трахее, выделения из носа и глаз, поражения трахеи и цилиостаза в трахее. Признаки нефрита включают поражения почек и водянистую диарею. Признаки аномальной яйценокости включают снижение

яйценоскости, яйца меньшего размера, плохая скорлупа, снижение качества внутреннего яйца, яйца с тонким белком и цилиостаз в яйцеводе. Тем не менее, клинические признаки также включают, но не ограничиваются ими, клинические признаки, которые непосредственно наблюдаются у живого животного. Примеры

5 клинических признаков, которые непосредственно наблюдаются у живого животного, включают выделения из носа и глаз, кашель, затрудненное дыхание, чихание, хрипы в трахее, взъерошенные перья, конъюнктивит, потерю массы, снижение скорости роста, снижение аппетита, обезвоживание, водянистую диарею, хромоту, вялость, истощение и худосочность и тому подобное.

10 Предпочтительно клинические признаки, уменьшившиеся по частоте или степени тяжести у пролеченного субъекта по сравнению с субъектами, которые либо не получали лечения, либо лечились иммуногенной композицией, которая была доступна до настоящего изобретения, но впоследствии инфицированных конкретным ВИБ, относятся к уменьшению цилиостаза, уменьшению хрипов,

15 повышению яйценоскости, уменьшению поражения почек, уменьшению водянистой диареи, уменьшению потери массы, снижению вирусной нагрузки, уменьшению выделения вирусов или их комбинаций.

Термин «нуждающийся» или «необходимый», используемый в настоящей заявке, означает, что введение/лечение связано с усилением или улучшением

20 состояния здоровья или клинических признаков или любым другим положительным лечебным эффектом на здоровье субъектов, которые получают иммуногенную композицию в соответствии с настоящим изобретением.

Термин «уменьшение», или «уменьшенный», или «снижение», или «более низкий» используются взаимозаменяемо в этой заявке. Термин «снижение»

25 означает, что клинический признак снижается по меньшей мере на 10%, более предпочтительно по меньшей мере на 20%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 30%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 40%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 50%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 60%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 70%, еще

30 более предпочтительно по меньшей мере на 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 95% наиболее предпочтительно на 100% по сравнению с субъектами, которые не получают лечения (не иммунизированы), но впоследствии инфицированы конкретным ВИБ.

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

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

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

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

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

В одном аспекте настоящего изобретения указанный субъект представляет собой птицу.

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

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

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

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

10 В одном аспекте настоящего изобретения указанный субъект представляет собой курицу.

В одном аспекте настоящего изобретения иммуногенную композицию вводят однократно.

15 Понятно, что разовую дозу вводят только один раз. Как показано в примерах, иммуногенная композиция, представленная в настоящем документе, оказалась эффективной после введения разовой дозы нуждающемуся субъекту.

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

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

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

625 мкл, 650 мкл, 675 мкл или 700 мкл. Наиболее предпочтительно разовая доза имеет общий объем 400 мкл, 450 мкл 500 мкл, 550 мкл, 600 мкл, 650 мкл или 700 мкл.

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

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

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

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

В предпочтительном аспекте схемы двукратного введения как первая, так и вторая дозы иммуногенной композиции вводят в одинаковом количестве.
30 Предпочтительно каждая доза находится в предпочтительных количествах, указанных выше. В дополнение к первому и второму режимам дозирования альтернативный вариант осуществления включает дополнительные последующие дозы. Например, в этих аспектах может быть введена третья, четвертая или пятая доза. Предпочтительно последующие третий, четвертый и

пятый режимы дозирования вводят в том же количестве, что и первая доза, при этом временные рамки между дозами соответствуют времени между первой и второй дозами, упомянутыми выше.

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

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

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

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

предпочтительно иммуногенную композицию вводят подкожно, внутримышечно, перорально, *in ovo*, в виде спрея, с питьевой водой или в виде глазных капель.

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

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

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

Введение *in ovo*

15 Как указано выше, настоящее изобретение также обеспечивает вакцину против ВИБ, которую можно безопасно вводить путем «*in ovo*» и в то же время она способна вызывать защитный иммунный ответ. Введение *in ovo* хорошо известно специалисту в данной области и этот специалист может без особых усилий может осуществить введение *in ovo*. Введение вакцины *in ovo* 20 заключается во введении вакцины птичьему эмбриону, находящемуся в яйце (обзор вакцинации *in ovo* см.: Ricks и соавт., *Advances in Vet. Med.* 495-515, 1999). Вакцину можно вводить в любую пригодную часть яйца (например, аллантоисную жидкость, желточный мешок, амнион, воздушную клетку или в эмбрион), как описано в известном уровне техники (Sharma; *Am. J. Vet. Res.* 45 25 1619-1623, 1984). Предпочтительно вакцину вводят под оболочечную (воздушную полость) мембрану и хориоаллантоисную мембрану.

Предпочтительно вакцину впрыскивают в яйца с зародышем на поздних стадиях эмбриона, обычно в течение последней четверти инкубационного периода, предпочтительно за 3-4 дня до вылупления. Предпочтительно введение 30 проводят, когда эмбрионам от 15 до 19 дней, предпочтительно на 17, 18 или 19 день, наиболее предпочтительно в возрасте 18 дней. Впоследствии вакцинированные яйца с эмбрионами переносят в инкубатор для вылупления. Процесс введения *in ovo* можно автоматизировать с помощью

роботизированного процесса инъекции, как описано в предшествующем уровне техники.

Как правило, обычные вакцины для вакцинации домашней птицы после вылупления не могут быть использованы для вакцинации *in ovo*, поскольку эмбрионы на поздних стадиях очень чувствительны к инфицированию большинством исследованных вакцинных вирусов. Тем не менее, в международной патентной заявке WO 01/64244 раскрыто, что вакцины против ВИБ можно использовать для введения *in ovo* при условии, что их применяют в очень низких дозах. Кроме того, Wakenell и соавт. 1986 (Am. J. Vet. Res., 47 933-938) описывает, что пассирование вируса вакцины против ИБ в культуре ткани сделало вирус апатогенным для эмбрионов.

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

Обычно живая вакцина для пост-инкубационного введения содержит аттенуированный ВИБ в концентрации от 10^1 до 10^8 EID₅₀ (50%-ная доза для заражения яиц) на дозу, предпочтительно в концентрации от 10^2 до 10^5 EID₅₀ на дозу и более предпочтительно, в концентрации от 10^2 до 10^4 EID₅₀ на единицу дозы и, еще более предпочтительно, в концентрации от 10^2 до 10^3 EID₅₀ на дозу.

Живая вакцина для введения *in ovo* обычно содержит количество аттенуированного ВИБ от 10^2 до 10^7 EID₅₀ /эмбрион, предпочтительно от 10^2 до 10^3 EID₅₀ /эмбрион в объеме от 50 до 100 мкл, предпочтительно 50 мкл.

Предпочтительно иммуногенная композиция в соответствии с настоящим изобретением содержит ВИБ в соответствии с настоящим изобретением в количествах приблизительно от 1 до приблизительно $10 \log_{10}$ EID (доза для заражения яйца)₅₀/мл на дозу, предпочтительно приблизительно от 2 до приблизительно $8 \log_{10}$ EID₅₀ на дозу, предпочтительно в количестве приблизительно от 2 до приблизительно $7 \log_{10}$ EID₅₀ на дозу, более предпочтительно в количестве приблизительно от 2 до приблизительно $6 \log_{10}$ EID₅₀ на дозу, еще более предпочтительно в количестве приблизительно от 2 до приблизительно $5 \log_{10}$ EID₅₀ на дозу, еще более предпочтительно в количестве приблизительно от 2 до приблизительно $4 \log_{10}$ EID₅₀ на дозу, наиболее предпочтительно в количестве приблизительно от 2 до приблизительно $3 \log_{10}$ EID₅₀ на дозу. Более предпочтительно иммуногенная композиция в соответствии с настоящим изобретением содержит ВИБ в соответствии с настоящим

изобретением в количествах приблизительно от 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5 или $\log_{10} \text{EID}_{50}$ на дозу.

В одном аспекте настоящего изобретения иммуногенная композиция содержит от 1 до 10 $\log_{10} \text{EID}_{50}$ на дозу ВИБ.

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

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

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

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

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

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

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

Термины «лечение и/или профилактика» были определены в другом месте, где термины «профилактика» и «предотвращение» или «предупреждение» используют взаимозаменяемо в этой заявке. Кроме того, термин «выделение» также был определен в другом месте.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10 Кроме того, в настоящем изобретении предложена иммуногенная композиция, содержащая ВИБ 4/91 (вирус инфекционного бронхита), кодирующий гетерологичный S (шиповидный) белок или его фрагмент, где указанный ВИБ 4/91 содержит нуклеокаспидный (N) белок, оболочечный (E) белок или мембранный (M) гликопротеин, имеющий аминокислотную последовательность, как показано для SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, EU780081 (SEQ ID NO 57), AGY56143 (SEQ ID NO 58), AGY56144 (SEQ ID NO 59) или последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 88%, 90%, 91%, 15 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности с ней, и, причем гетерологичный S белок или его фрагмент выбирают из генотипов или серотипов, включающих в себя Массачусетс, QX, Q1, Арканзас, Вариант 2 и Бразилия или из аминокислотной последовательности, как показано в SEQ ID 20 NO: 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 или 17 или последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности с ней.

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

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением фрагмент гетерологичного S (шиповидного) белка имеет длину по меньшей мере 500, 750, 1000 или 1075 аминокислот от N-конца.

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

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

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением ВИБ 4/91 выбирают из перечня генотипов или серотипов, включающих в себя CR88 и 793В.

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает способ получения иммуногенной композиции для лечения и/или профилактики инфекций ВИБ у субъектов, включающий в себя:

а.) обеспечение ВИБ 4/91, содержащего шиповидный (S) белок, нуклеокапсидный (N) белок, оболочечный (E) белок или мембранный (M) гликопротеин, имеющий аминокислотную последовательность, как показано для SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, AGY6140 (SEQ ID NO 54), AF093793 (SEQ ID NO 60), EU914938 (SEQ ID NO 55), KM067900 (SEQ ID NO 56), EU780081 (SEQ ID NO 57), AGY56143 (SEQ ID NO 58), AGY56144 (SEQ ID NO 59) или последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности с ней; и

б.) обеспечение гетерологичного S белка или его фрагмента, выбранного из генотипов или серотипов, включающих в себя Массачусетс, QX, Q1, Арканзас, Вариант 2 и Бразилия или из аминокислотной последовательности, как показано в SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 или 17 или последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности с ней; и

в.) замену шиповидного белка или его фрагмента ВИБ 4/91 из а) указанным гетерологичным S (шиповидным) белком или его фрагментом из б), чтобы получить ВИБ 4/91 с гетерологичным S белком или его фрагментом; и

г.) получение указанного ВИБ 4/91 с гетерологичным S белком или его фрагментом; и

д.) добавление фармацевтически приемлемого носителя.

Термин «получение» включает сбор, выделение, очистку и/или составление (например, завершение, инактивацию и/или смешивание) указанного ВИБ 4/91 с гетерологичным S белком или его фрагментом.

Термин «сбор» относится к сбору или выделению указанного ВИБ 4/91 с гетерологичным S белком или его фрагментом из трансфецированных или

инфицированных клеток или клеточной линии. Можно использовать любой
обычный метод, известный в данной области, например любой метод
разделения. Хорошо известные в данной области методы включают
центрифугирование или фильтрацию, например использование
5 полупроницаемой мембраны с определенным размером пор.

Термин «выделение» включает в себя стадию выделения указанного ВИБ
4/91 с гетерологичным S белком или его фрагментом. Способы выделения из
трансфецированных или инфицированных клеток или клеточной линии известны
специалисту в данной области. Эти методы включают физические и/или
10 химические методы, включая, помимо прочего, циклы замораживания-
оттаивания, обработку ультразвуком и тому подобное.

Способы «очистки» указанного ВИБ 4/91 с гетерологичным S белком или
его фрагментом из изолята известны специалисту в данной области, например,
методами, описанными в разделе «Способы очистки белков - практический
15 подход» (E.L.V. Harris and S. Angel, eds., IRL Press at Oxford University Press).
Эти методы включают, но не ограничиваются ими, разделение
центрифугированием и/или фильтрацией, осаждение, эксклюзионную
хроматографию (гель-фильтрационную) хроматографию, аффинную
хроматографию, металлохелатную хроматографию, ионообменную
20 хроматографию, ковалентную хроматографию, хроматографию с гидрофобным
взаимодействием и тому подобное. Вектор может быть получен в очищенной
чистой форме или без или практически без других клеточных материалов или
культуральной среды и т.д. После указанного выделения и/или очистки антиген
проявляет чистоту по меньшей мере 80%, предпочтительно 80%-90%, более
25 предпочтительно 90%-97%, наиболее предпочтительно более 97% до абсолютно
чистой формы без какого-либо загрязнения.

Согласно дополнительному аспекту понятие «получение», используемое в
настоящей заявке, может также включать дополнительные этапы окончательной
обработки как часть конечного процесса приготовления, такие как добавление
30 буфера, этапы инактивации, нейтрализации и т.п.

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

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

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

В другом конкретном аспекте способа получения иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением ВИБ 4/91 выбирают из перечня штаммов, состоящего из Испания/98/328, Испания/92/35, IR-3654-VM, FR-CR88061-88, FR-85131-85, UK-1233-95, UK/3/91, Испания/00/336, UK/4/91, UK/7/91, UK/793B/91, 4/91-патогенный, 4/91-аттенуированный, IB4-91 и CR88.

Кроме того, настоящее изобретение относится к плазмиде, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую частичный геном ВИБ 4/91 (вируса инфекционного бронхита), включая гетерологичный S (шиповидный) белок ВИБ или его фрагмент, такой как донорская плаزمида pUC57-s CR88 rIBV H52 S (SEQ ID NO:21).

ПУНКТЫ

Нижеследующие пункты также описаны в настоящей заявке:

1. ВИБ 4/91 (вирус инфекционного бронхита), кодирующий гетерологичный S (шиповидный) белок ВИБ или его фрагмент.

2. Иммуногенная композиция, содержащая ВИБ 4/91 (вирус инфекционного бронхита), кодирующий гетерологичный S (шиповидный) белок или его фрагмент.

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

ВИБ 4/91 – Определение по последовательностям, кодирующим белок

4. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пунктов 1 - 3, где ВИБ 4/91 имеет или состоит из или содержит нуклеотидную последовательность, как показано для KF377577 (SEQ ID NO 53) или последовательность, имеющую по

меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности с ней.

5 5. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пунктов 1 - 4, где ВИБ 4/91 имеет или состоит из или содержит нуклеотидную последовательность, как показано для SEQ ID NO 1 или последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности с ней.

10 6. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пунктов 1 - 5, где штамм ВИБ 4/91 имеет или состоит из или содержит шиповидный (S) белок, имеющий аминокислотную последовательность, как показано для AGY56140 (SEQ ID NO 54) или последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности с ней.

15 7. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пунктов 1 - 6, где штамм ВИБ 4/91 имеет или состоит из или содержит шиповидный (S1) белок, имеющий аминокислотную последовательность, как показано для AF093793 (SEQ ID NO 60) или последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности с ней.

20 8. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пунктов 1 - 7, где штамм ВИБ 4/91 имеет или состоит из или содержит шиповидный (S1) белок, имеющий аминокислотную последовательность, как показано для EU914938 (SEQ ID NO 55) или последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности с ней.

30 9. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пунктов 1 - 8, где штамм ВИБ 4/91 имеет или состоит из или содержит шиповидный (S1) белок, имеющий аминокислотную последовательность, как показано для KM067900 (SEQ ID NO 56) или последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности с ней.

10. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пунктов 1 - 9, где штамм ВИБ 4/91 имеет или состоит из или содержит шиповидный (S) белок,

имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:2 или последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности с ней.

5 11. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пунктов 1 - 10, где ВИБ 4/91 имеет или состоит из или содержит нуклеокапсидный (N) белок, имеющий аминокислотную последовательность, как показано для EU780081 (SEQ ID NO 57) или последовательность, имеющую по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 10 99,99% идентичности последовательности с по меньшей мере одной из указанных выше последовательностей.

12. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пунктов 1 - 11, где ВИБ 4/91 имеет или состоит из или содержит нуклеокаспидный (N) белок, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:3 или 15 последовательность, имеющую по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности с ней.

13. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пунктов 1 - 12, где ВИБ 4/91 имеет или состоит из или содержит оболочечный (E) белок, имеющий 20 аминокислотную последовательность, как показано для AGY56143 (SEQ ID NO 58) или последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности с ней.

14. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пунктов 1 - 13, где 25 ВИБ 4/91 имеет или состоит из или содержит an оболочечный (E) белок, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:4 или последовательность, имеющую по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности с ней.

30 15. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пунктов 1 - 14, где ВИБ 4/91 имеет или состоит из или содержит мембранный гликопротеин (M) белок, имеющий аминокислотную последовательность, как показано для AGY56144 (SEQ ID NO 59) или последовательность, имеющую по меньшей мере

95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности с ней.

16. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пунктов 1 - 15, где ВИБ 4/91 имеет или состоит из или содержит мембранный гликопротеин (М) белок, имеющий аминоклотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:5 или последовательность, имеющую по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности с ней.

17. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пунктов 1 - 16, где ВИБ 4/91 выбирают из перечня штаммов, состоящего из Испания/98/328, Испания/92/35, IR-3654-VM, FR-CR88061-88, FR-85131-85, UK-1233-95, UK/3/91, Испания/00/336, UK/4/91, UK/7/91, UK/793B/91, 4/91-патогенный, 4/91-аттенуированный, IB4-91 и CR88.

15 Гетерологичный S белок

18. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пунктов 1 - 17, где гетерологичный шиповидный белок имеет генотип или серотип, отличный от 4/91.

19. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пунктов 1 - 18, где гетерологичный S белок или его фрагмент принадлежит к ВИБ с генотипом или серотипом, выбранным из перечня, включающего в себя: Арканзас (такой как Арканзас 99), Бразилия (такой как BR-1, BR-2, 23/2013, ВИБ/Бразилия/351/1984), Калифорния (такой как Калифорния 1734/04, Калифорния 99), Коннектикут, Делавэр (такой как Делавэр 98), Нидерландский (такой как D207, D212, D274, D3128, D3896, D8880, D1466), Флорида, Джорджия (такой как Джорджия GA-07, GA-08, GA-12, GA-13), Грей, Холт, Айова (такой как Айова 97 and Айова 69), Италия (такой как Италия 02), JMK, LDT3, Мэн (такой как Мэн 209), Массачусетс (M41, H52, H120), Пенсильвания (такой как Пенсильвания 1220/98, Пенсильвания Wolg/98), PL84084, Qu (такой как Qu-mv), QX (такой как GB341/96), Q1, SE 17 и Вариант 2 (такой как IS/1494/06, IBV/Ck/EG/CU/4/2014, гаммаCoV/Ck/Польша/G052/2016).

20. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пунктов 1 - 19, где гетерологичный S белок или его фрагмент происходит из ВИБ, выбранного из списка генотипов или серотипов, включающих в себя Массачусетс, QX, Q1,

Италия 02, Арканзас, Коннектикут, Джорджия, LDT3, PL84084, Вариант 2 или Бразилия.

21. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пунктов 1 - 20, где гетерологичный S белок или его фрагмент происходит из ВИБ, выбранного из списка генотипов или серотипов, включающих в себя Массачусетс, QX, Q1, Арканзас, Вариант 2 и Бразилия.

22. ВИБ или иммуногенная композиция по п. 21, где штамм Массачусетс выбран из перечня, включающего в себя: H120, H52, Испания/98/308, IBMA5-1, SD/97/01, Испания/96/334, M41-M21883.

23. ВИБ или иммуногенная композиция по п. 21, где штамм QX выбран из перечня, включающего в себя: FR-L1450T-05, FR-L1450L-05, NL-L1449T-04, NL-L1449K-04, IBV/Ck/SP/170/09, IBV/Ck/SP/79/08, IBV/Ck/SP/248/09, HBN, IBVQX, LX4, BJQ, CK/CH/LGD/03 и GB341/96.

24. ВИБ или иммуногенная композиция по п. 21, где штамм Q1 выбран из перечня, включающего в себя: CK/CH/LDL/98I, CK/CH/LSD/08-10, J2, Q1, AR08ER22, AR08BA21 и Чили-295-10.

25. ВИБ или иммуногенная композиция по п. 21, где штамм Арканзас выбран из перечня, включающего в себя: Ark99, ArkGA, ArkDPI, AL/5364/00, ARKDPI11, AL/0803/01, AL/7149/00, ArkDPI101, AL/1221/01, AL/1793/01 и AL/4614/98.

26. ВИБ или иммуногенная композиция по п. 21, где штамм Вариант 2 выбран из перечня, включающего в себя: IS/1494/06, IBV/Ck/EG/CU/4/2014, гаммаCoV/Ck/Польша/G052/2016, Eg/CLEVB-2/IBV/012, D1344/2/4/10_EG, TR8 и IB VAR2-06.

27. ВИБ или иммуногенная композиция по п. 21, где штамм Бразилия выбран из перечня, включающего в себя: BR-1, BR-2, 23/2013 и IBV/Бразилия/351/1984.

28. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пунктов 1 - 27, где гетерологичный S белок или его фрагмент имеет генотип или серотип Массачусетс.

29. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пунктов 1 - 28, где гетерологичный S белок или его фрагмент имеет генотип или серотип Массачусетс, имеющий по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или

99,99% идентичности с ней с SEQ ID NO: 6 или 7 или гетерологичный S белок или его фрагмент состоит из или содержит аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO: 6 или 7 или последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности с ней.

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

31. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пунктов 1 - 30, где гетерологичный S белок или его фрагмент имеет генотип или серотип Q1, имеющий по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности с ней с SEQ ID NO: 10 или 11 или гетерологичный S белок или его фрагмент состоит из или содержит аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO: 10 или 11 или последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности с ней.

32. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пунктов 1 - 31, где гетерологичный S белок или его фрагмент имеет генотип или серотип Арканзас, имеющий по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности с ней с SEQ ID NO: 12 или 13 или гетерологичный S белок или его фрагмент состоит из или содержит аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO: 12 или 13 или последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,2%,

99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности с ней.

33. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пунктов 1 - 32, где гетерологичный S белок или его фрагмент имеет генотип или серотип Вариант 2, 5 имеющий по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности с ней с SEQ ID NO: 14 или 15 или гетерологичный S белок или его фрагмент состоит из или содержит аминокислотную последовательность, как 10 показано в SEQ ID NO: 14 или 15 или последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности с ней.

34. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пунктов 1 - 33, где гетерологичный S белок или его фрагмент имеет генотип или серотип Бразилия, 15 имеющий по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности с ней с SEQ ID NO:16 или 17 или гетерологичный S белок или его фрагмент состоит из или содержит аминокислотную последовательность, как 20 показано в SEQ ID NO: 16 или 17 или последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности с ней.

35. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пунктов 1 - 34, где гетерологичный S белок или его фрагмент выбран из перечня, включающего в 25 себя SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10, 11,12, 13, 14, 15, 16 или 17.

36. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пунктов 1 - 35, где гетерологичный S белок представляет собой полноразмерный шиповидный белок.

37. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пунктов 1 - 36, где 30 фрагмент гетерологичного S (шиповидного) белка имеет длину по меньшей мере 500, 750, 1000 или 1075 аминокислот.

38. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пунктов 1 - 37, где фрагмент гетерологичного S (шиповидного) белка имеет длину по меньшей мере 500, 750, 1000 или 1075 аминокислот от N-конца.

39. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пунктов 1 - 38, где фрагмент гетерологичного S (шиповидного) белка имеет длину по меньшей мере 1000 аминокислот.

5 40. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пунктов 1 - 39, где фрагмент гетерологичного S (шиповидного) белка представляет собой эктодомен шиповидного белка.

41. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пунктов 1 - 40, где гетерологичный S (шиповидный) белок или его фрагмент заменяет гомологичный S белок или его фрагмент.

10 42. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пунктов 1 - 41, где гетерологичный S (шиповидный) белок или его фрагмент заменяет встречающиеся в природе S белок или его фрагмент.

15 43. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пунктов 1 - 42, где гетерологичный S (шиповидный) белок или его фрагмент заменяет S белок или его фрагмент в 4/91.

44. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пунктов 1 - 43, где ВИБ является аттенуированным.

45. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пунктов 1 - 43, где ВИБ является инактивированным.

20 46. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пунктов 1 - 45, где ВИБ является генно-инженерным.

47. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пунктов 1 - 46, где ВИБ является рекомбинантным ВИБ.

25 48. Иммуногенная композиция по любому из пунктов 2 - 47, где иммуногенная композиция представляет собой вакцину.

49. Иммуногенная композиция по любому из пунктов 2 - 48, где иммуногенная композиция содержит фармацевтически приемлемый носитель.

30 50. Иммуногенная композиция по п. 49, где фармацевтически приемлемый носитель представляет собой забуференный фосфатом физиологический раствор..

51. Иммуногенная композиция по любому из пунктов 2 - 50, где иммуногенная композиция является эффективной в лечении и/или профилактике клинических признаков, вызванных ВИБ, у нуждающегося субъекта.

52. Иммуногенная композиция по любому из пунктов 2 - 51, где иммуногенная композиция защищает от заражения штаммом ВИБ генотипа или серотипа гетерологичного шиповидного белка.

53. Иммуногенная композиция по любому из пунктов 2 - 52, где
5 иммуногенная композиция защищает от заражения штаммами генотипа Массачусетс, QX, Q1, Арканзас Вариант 2 или Бразилия.

54. Иммуногенная композиция по любому из пунктов 2 - 53, где иммуногенная композиция защищает от заражения штаммами генотипа Массачусетс.

10 55. Иммуногенная композиция по любому из пунктов 2 - 54, где указанная иммуногенная композиция составлена для однократного введения.

56. Иммуногенная композиция по любому из пунктов 2 - 55, где указанную иммуногенную композицию вводят подкожно, внутримышечно, перорально, *in ovo*, в виде спрея, с питьевой водой или в виде глазных капель.

15 57. Иммуногенная композиция по любому из пунктов 2 - 56, где иммуногенная композиция содержит от 1 до $10 \log_{10} \text{EID}_{50}$ на дозу ВИБ.

58. Иммуногенная композиция по любому из пунктов 2 - 57, где иммуногенная композиция содержит от 2 до $5 \log_{10} \text{EID}_{50}$ на дозу ВИБ.

20 59. Иммуногенная композиция по любому из пунктов 2 - 58, где иммуногенная композиция содержит от 2 до $4 \log_{10} \text{EID}_{50}$ на дозу ВИБ.

60. Набор, содержащий ВИБ или иммуногенную композицию по любому из пунктов 1 - 59.

61. Набор по п. 60, где набор дополнительно содержит инструкцию по лечению и/или профилактике болезней птиц.

25 62. Набор по п. 60, где набор дополнительно содержит инструкцию по лечению и/или профилактике болезней домашних птиц.

63. Набор по п. 60, где набор дополнительно содержит инструкцию по лечению и/или профилактике ИБ.

30 64. Способ иммунизации субъекта, включающий в себя введение такому субъекту иммуногенной композиции по любому из пп. 2 - 59.

65. Способ лечения или предотвращения клинических признаков, вызванных ВИБ у нуждающегося в этом субъекта, способ, включает в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции по любому из пп. 2 - 59.

66. Способ уменьшения цилиостаза у нуждающегося в этом субъекта, по сравнению с субъектом неиммунизированной контрольной группы того же вида, способ, включающий в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции по любому из пп. 2 - 59.

5 67. Иммуногенная композиция по любому из пп. 2 - 59 для применения в способе иммунизации субъекта, способ, включает в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества указанной иммуногенной композиции.

10 68. Иммуногенная композиция по любому из пп. 2 - 59 для применения в способе лечения или предотвращения клинических признаков, вызванных ВИБ у нуждающегося в этом субъекта, способ, включает в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества указанной иммуногенной композиции.

15 69. Иммуногенная композиция по любому из пп. 2 - 59 для применения в способе уменьшения цилиостаза у нуждающегося в этом субъекта, по сравнению с субъектом неиммунизированной контрольной группы того же вида, способ, включает в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества указанной иммуногенной композиции.

70. Способ или применение по любому из пунктов 64 - 69, где указанный субъект представляет собой птицу.

20 71. Способ или применение по любому из пунктов 64 - 70, где указанный субъект представляет собой домашнюю птицу.

72. Способ или применение по любому из пунктов 64 - 71, где указанный субъект выбирают из списка, включающего в себя курицу, индейку, перепела или фазана.

25 73. Способ или применение по любому из пунктов 64 - 72, где указанный субъект представляет собой курицу.

74. Способ или применение по любому из пунктов 64 - 73, где иммуногенную композицию вводят однократно.

75. Способ или применение по любому из пунктов 64 - 73, где иммуногенную композицию вводят в двух или более дозах.

30 76. Способ или применение по любому из пунктов 64 - 75, где указанную иммуногенную композицию вводят подкожно, внутримышечно, перорально, *in ovo*, в виде спрея, с питьевой водой или в виде глазных капель.

77. Способ или применение по любому из пунктов 64 - 76, где указанную иммуногенную композицию вводят в виде глазных капель.

78. Способ или применение по любому из пунктов 64 - 77, где иммуногенная композиция содержит от 1 до $10 \log_{10} \text{EID}_{50}$ на дозу ВИБ.

79. Способ или применение по любому из пунктов 64 - 78, где иммуногенная композиция содержит от 2 до $5 \log_{10} \text{EID}_{50}$ на дозу ВИБ.

5 80. Способ или применение по любому из пунктов 64 - 79, где иммуногенная композиция содержит от 2 до $4 \log_{10} \text{EID}_{50}$ на дозу ВИБ.

10 81. Способ или применение по любому из пунктов 64 - 80, где иммуногенную композицию вводят субъектам в течение первой недели жизни, в течение первых трех дней жизни, в течение первых двух дней жизни или в течение первого дня жизни.

82. Способ или применение по любому из пунктов 64 - 81, где иммуногенную композицию вводят субъектам в течение первого дня жизни.

15 83. Способ или применение по любому из пунктов 64 - 82, где указанный способ приводит к улучшению параметра эффективности, выбранного из группы, состоящей из: предотвращения или уменьшения цилиостаза, предотвращения или уменьшения хрипов, предотвращения или уменьшения снижения яйценоскости, предотвращения или уменьшения поражения почек, предотвращения или уменьшения водянистой диареи, предотвращения или снижения потери веса, снижения вирусной нагрузки, снижения выделения вируса или их комбинации, по сравнению с субъектом необработанной контрольной группы того же вида.

20 84. Способ или применение по любому из пунктов 64 - 83, где лечение или профилактика приводит к предупреждению или сокращению цилиостаза по сравнению с субъектами необработанной контрольной группы того же вида.

25 85. Способ или применение по любому из пунктов 64 - 84, где лечение или профилактика приводит к предупреждению или сокращению поражений почек по сравнению с субъектами необработанной контрольной группы того же вида.

30 86. Способ или применение по любому из пунктов 64 - 85, где лечение или профилактика приводит к предупреждению или сокращению снижения яйценоскости по сравнению с субъектами необработанной контрольной группы того же вида.

87. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пунктов 1 - 59 для терапевтического использования.

88. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пунктов 1 - 59 для использования в качестве иммуногена или вакцины.

89. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пунктов 1 - 59 для использования в качестве лекарственного средства.

5 90. Применение ВИБ или иммуногенной композиции по любому из пунктов 1 - 59 для изготовления лекарственного средства.

91. Применение ВИБ или иммуногенной композиции по любому из пунктов 1 - 59 для лечения и/или профилактики инфекций ВИБ у субъекта.

10 92. Иммуногенная композиция, содержащая ВИБ 4/91 (вирус инфекционного бронхита), кодирующий гетерологичный S (шиповидный) белок или его фрагмент, где указанный ВИБ 4/91 содержит нуклеокаспидный (N) белок, оболочечный (E) белок или мембранный гликопротеин (M), имеющий или состоящий из или содержащий аминокислотную последовательность, как показано для SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, EU780081 (SEQ ID NO 57), AGY56143 (SEQ ID NO 58), AGY56144 (SEQ ID NO 59) или
15 последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности с ней, и где гетерологичный S белок или его фрагмент выбирают из генотипов или серотипов, включающих в себя
20 Массачусетс, QX, Q1, Арканзас, Вариант 2 и Бразилия или из аминокислотной последовательности, как показано в SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 или 17 или последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности с ней или гетерологичный S белок или
25 его фрагмент состоит из или содержит аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 или 17 или последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности с ней.

30 93. Иммуногенная композиция по п. 92, где гетерологичный S белок представляет собой полноразмерный шиповидный белок.

94. Иммуногенная композиция по п. 92 или 93, где фрагмент гетерологичного S (шиповидного) белка имеет длину по меньшей мере 500, 750, 1000 или 1075 аминокислот от N-конца.

95. Иммуногенная композиция по любому из пп. 92 - 94, где фрагмент гетерологичного S (шиповидного) белка представляет собой эктодомен шиповидного белка.

5 96. Иммуногенная композиция по любому из пунктов 92 - 95, где ВИБ является аттенуированным.

10 97. Иммуногенная композиция по любому из пунктов 92 - 96, где ВИБ 4/91 выбирают из перечня штаммов, состоящего из Испания/98/328, Испания/92/35, IR-3654-VM, FR-CR88061-88, FR-85131-85, UK-1233-95, UK/3/91, Испания/00/336, UK/4/91, UK/7/91, UK/793B/91, 4/91-патогенный, 4/91-аттенуированный, IB4-91 и CR88.

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

15 а.) обеспечение ВИБ 4/91, содержащего шиповидный (S) белок, нуклеокапсидный (N) белок, оболочечный (E) белок или мембранный (M) гликопротеин, имеющий или состоящий из или содержащий аминокислотную последовательность, как показано для SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, AGY6140 (SEQ ID NO 54), AF093793 (SEQ ID NO 60), EU914938 (SEQ ID NO 55), KM067900 (SEQ ID NO 56), EU780081 (SEQ ID NO 57), AGY56143 (SEQ ID NO 58), AGY56144 (SEQ ID NO 59) или последовательность, 20 имеющую по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности с ней; и

25 б.) обеспечение гетерологичного S белка или его фрагмента, выбранного из генотипов или серотипов, включающих в себя Массачусетс, QX, Q1, Арканзас, Вариант 2 и Бразилия или из аминокислотной последовательности, как показано в SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 или 17 или последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности с ней или обеспечение гетерологичного S 30 белка или его фрагмента, состоящего из или содержащего аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 или 17 или последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности с ней; и

в.) замену шиповидного белка ВИБ 4/91 из а) указанным гетерологичным S (шиповидным) белком или его фрагментом из б), чтобы получить ВИБ 4/91 с гетерологичным S белком или его фрагментом; и

5 г.) получение указанного ВИБ 4/91 с гетерологичным S белком или его фрагмент; и

д.) добавление фармацевтически приемлемого носителя.

99. Способ по п. 98, где фрагмент гетерологичного S (шиповидного) белка представляет собой эктодомен шиповидного белка.

10 100. Способ по п. 98 или 99, где указанный фармацевтически приемлемый носитель выбирают из группы, состоящей из растворителей, дисперсионных сред, покрытий, стабилизирующих агентов, разбавителей, консервантов, антибактериальных и противогрибковых агентов, изотонических агентов, средств, замедляющих адсорбцию, адъювантов, иммуностимуляторов и их комбинаций.

15 101. Способ по п. 98 или 100, где гетерологичный S белок представляет собой полноразмерный шиповидный белок.

20 102. Способ по любому из пунктов 98 - 101, где ВИБ 4/91 выбирают из перечня штаммов, состоящего из Испания/98/328, Испания/92/35, IR-3654-VM, FR-CR88061-88, FR-85131-85, UK-1233-95, UK/3/91, Испания/00/336, UK/4/91, UK/7/91, UK/793B/91, 4/91-патогенный, 4/91-аттенуированный, IB4-91 и CR88.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

25 Фигура 1. Кинетика репликации *in ovo* для CR88 гIBV H52 S по сравнению с рекомбинантными вирусами дикого типа CR88 и H52. Точки данных представляют собой среднее значение 5 образцов на момент времени. Планки погрешностей указывают стандартное отклонение.

30 Фигура 2. Сводные данные оценки цилиостаза. Подсчитывают сумму 10 индивидуальных оценок для 10 колец одного животного и отображают на графике одной точкой. Максимальный цилиостаз соответствует оценке 40, в то время как отсутствие цилиостаза представлено оценкой 0. Среднее значение и значимость рассчитывают с использованием GraphPad Prism и обычного одностороннего теста ANOVA ($p < 0,0001$).

Фигура 3. Сводные данные результатов RT-qPCR тканей почек. Каждая отдельная птица обозначена одной точкой данных.

Фигура 4. Сводные данные оценки цилиостаза. Подсчитывают сумму 10 индивидуальных оценок для 10 колец одного животного, которая отображена на графике одной точкой. Максимальный цилиостаз соответствует оценке 40, в то время как отсутствие цилиостаза представлено оценкой 0. Среднее значение и значимость рассчитывают с использованием GraphPad Prism и обычного одностороннего теста ANOVA ($p < 0,0001$).

ОБЗОР ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

- 10 SEQ ID NO:1 Геном CR88
- SEQ ID NO:2: Шиповидный (S) белок ВИБ CR88.
- SEQ ID NO:3: Нуклеокапсидный (N) белок ВИБ CR88.
- SEQ ID NO:4: Оболочечный (E) белок ВИБ CR88.
- SEQ ID NO:5: Мембранный (M) гликопротеин белок ВИБ CR88.
- 15 SEQ ID NO:6 и 7: Гетерологичный S белок или его фрагмент из генотипа или серотипа Массачусетс.
- SEQ ID NO:8 и 9: Гетерологичный S белок или его фрагмент из генотипа или серотипа QX.
- SEQ ID NO:10 и 11: Гетерологичный S белок или его фрагмент из генотипа или серотипа Q1.
- 20 SEQ ID NO:12 и 13: Гетерологичный S белок или его фрагмент из генотипа или серотипа Арканзас.
- SEQ ID NO:14 и 15: Гетерологичный S белок или его фрагмент из генотипа или серотипа Вариант 2.
- 25 SEQ ID NO:16 и 17: Гетерологичный S белок или его фрагмент из генотипа или серотипа Бразилия.
- SEQ ID NO:18: pUC57-s CR88 мВИБ.
- SEQ ID NO:19: последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая шиповидный белок ВИБ H52
- SEQ ID NO:20: последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая шиповидный белок ВИБ CR88
- 30 SEQ ID NO:21 донорская плаزمида pUC57-s CR88 rIBV.
- SEQ ID NO:22: донорская плазмида pUC57-s CR88 rIBV H52 S.
- SEQ ID NO:23 - SEQ ID NO:52 Праймер.

SEQ ID NO:53 KF377577 (нуклеотидная последовательность ВИБ 4/91)

SEQ ID NO:54 AGY56140 (аминокислотная последовательность шиповидного белка ВИБ 4/91)

5 SEQ ID NO:55 EU914938 (аминокислотная последовательность шиповидного белка ВИБ 4/91)

SEQ ID NO:56 KM067900 (аминокислотная последовательность шиповидного белка ВИБ 4/91)

SEQ ID NO:57 EU780081 (аминокислотная последовательность шиповидного белка ВИБ 4/91)

10 SEQ ID NO:58 AGY56143 (аминокислотная последовательность Е белка ВИБ 4/91)

SEQ ID NO:59 AGY56144 (аминокислотная последовательность М белка ВИБ 4/91)

15 SEQ ID NO:60 AF093793 (аминокислотная последовательность шиповидного белка ВИБ 4/91)

SEQ ID NO:61 Праймер

ПРИМЕРЫ

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

ПРИМЕР 1:

25 Создание рекомбинантного ВИБ CR88, в котором последовательность, кодирующая шиповидный белок CR88 заменена последовательностью, кодирующей гетерологичный шиповидный белок или эктодомен шиповидного белка

Нацеленная рекомбинация РНК и спасение рекомбинантного ВИБ

30 Для создания рекомбинантного ВИБ используют способ нацеленной рекомбинации РНК, описанный у van Beurden и соавт. (Virol J. 2017;14(1):109). Муринизированный вирус-помощник (мВИБ) создают для обеспечения нацеленной рекомбинации ВИБ в культуре клеток.

Конструирование муринизированной донорской плазмиды CR88 ВИБ

Для создания донорской плазмиды CR88 муринизированного мВИБ донорскую последовательность синтезирует коммерческий поставщик: 497 оснований 5' UTR генома CR88 сливаются с 3'-частью области 1ab (752
5 основания) и первыми 72 основаниями, кодирующими шиповидный белок CR88 ВИБ, за которыми следуют 3753 основания шиповидного эктодомена MHV, продолжающиеся концевыми 210 основаниями шиповидного белка CR88 ВИБ и следующей последовательностью до 3'-конца генома. Кроме того, сайт рестрикции SacI и последовательность промотора T7 добавляют к 5'-концу
10 донорской области, а также последовательность 100x polyA, за которой следует сайт рестрикции Not I для линеаризации на 3'-конце, соответственно. Молчащая мутация от А до С в положении 5634 собранной последовательности вводится для создания сайта рестрикции XhoI. Синтезированную последовательность вставляют в pUC57-образец с получением донорской плазмиды pUC57-s CR88
15 мВИБ (SEQ ID NO:18).

Спасение мВИБ CR88

мВИБ CR88 спасают по аналогии с мВИБ Н52 (van Beurden и соавт. Virol J. 2017;14(1):109) с некоторыми изменениями: Раствор вирусной аллантаисной
20 жидкости концентрируют с помощью ультрацентрифугирования перед выделением вирусной РНК для электропорации. 18 мл вирусной аллантаисной жидкости центрифугируют при 50,000 x g в течение 2 часов через 2 мл 20%-ой подушки сахарозы в буфере TNE (Tris, NaCl, EDTA). Супернатант отбрасывают и осадок ресуспендируют в 150 мкл буфера TNE с последующим выделением
25 РНК с помощью мини-набора вирусной РНК QIAamp (Qiagen). Кроме того, для электропорации используют фибробласты куриного эмбриона (CEF) вместо клеток ВНК (2 импульса 250V/300 мкФ, 10-секундный перерыв) и к смеси для электропорации добавляют 1,25% ДМСО.

Конструирование донорской плазмиды ВИБ CR88, в которой
30 последовательность, кодирующая шиповидный белок CR88 заменена последовательностью, кодирующей гетерологичный шиповидный белок или эктодомен шиповидного белка

Описана примерная конструкция для замены шиповидного белка CR88 шиповидным белком Н52. Последовательность нуклеиновой кислоты,

кодирующая шиповидный H52 ВИБ (SEQ ID NO:19) используется в качестве матрицы для замены последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей ВИБ CR88 (SEQ ID NO:20) в донорской плазмиде pUC57-s CR88 rIBV (созданной, как описано выше для плазмиды мВИБ, сохраняя полную последовательность CR88 Spike (SEQ ID NO:21)). Основания 1657 - 5151 последовательности SEQ ID NO:21 заменены соответствующей последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей шиповидный белок ВИБ H52 (SEQ ID NO:19). Это приводит к получению донорской плазмиды pUC57-s CR88 rIBV H52 S (SEQ ID NO:22), в которой шиповидный белок ВИБ H52 кодируется основаниями с 1657 по 5145. Для этого последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая шиповидный белок H52 и pUC57-s CR88 последовательность основной цепи амплифицируют в двух отдельных реакциях ПЦР с использованием высокоточной ДНК-полимеразы Q5® (NEB; праймеры см. в Таблице 1). Продукты ПЦР очищают с помощью набора для гелевой экстракции QIAquick (Qiagen) и затем используют для сборки Гибсона с помощью набора NEBuilder® HiFi DNA Assembly Cloning Kit (NEB) в соответствии с протоколом набора для создания донорской плазмиды pUC57-s CR88 rIBV H52 S (SEQ ID NO:22).

20 Таблица 1 Праймеры для сборки по Гибсону, разработанные с помощью онлайн-инструмента NEBuilder от NEB и используемые для создания продуктов ПЦР для сборки донорской плазмиды pUC57-s CR88 rIBV H52 S (SEQ ID NO:22).

ПЦР	Продукт	Праймер
1	Остов CR88	tgattaaaagtcaccacatcttttctaataattattaattcttctttgg (SEQ ID NO:23)
		ctcttaccagtaacttaccacacttaattaaattaaagactaagtc (SEQ ID NO:24)
2	Шиповидный белок H52	aagtgtggtaagttactggtaagagatgttggtaacacctcttttac (SEQ ID NO:25)
		agaaaagatgtgggacttttaatacattaaacagacttttttaggtctg (SEQ ID NO:26)

25 Нацеленная рекомбинация РНК и спасение рекомбинантного ВИБ

Для спасения рВИБ CR88 с гетерологичным шиповидным белком или эктодоменом шиповидного белка, клетки LR7 инфицировали посредством мВИБ CR88 и подвергали электропорации транскриптом *in vitro*, полученным из донорской плазмиды pUC57-s CR88 rIBV H52 S после линейаризации NotI. Затем

клетки и супернатант вводят в куриные яйца SPF с 8-дневным эмбрионом SPF (VALO BioMedia), которые инкубируют до 9 дней при 37,5 °С и влажности 60%. Аллантаисную жидкость яиц с мертвыми эмбрионами собирают и используют для конечного разведения в 8-дневных яйцах SPF. Выделение нуклеиновых кислот из образцов аллантаисной жидкости в предельном разведении выполняют с использованием набора для очистки нуклеиновых кислот MagMAX™ Core (ThermoFisher) с системой очистки KingFisher™ Duo Prime (ThermoFisher). Затем нуклеиновые кислоты анализируют на наличие и относительное количество рВИБ с помощью специфической для ВИБ RT-qPCR с протоколом, адаптированным из Callison и соавт. (J Virol Methods. 2006;138(1-2):60-5). Вкратце, используют те же праймеры и зонд, а термопрофайл адаптирован для использования TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix (ThermoFisher) и системы ПЦР в реальном времени StepOnePlus™ (ThermoFisher). После этого аллантаисная жидкость яйца, инокулированного с максимальным разведением, была использована для размножения в куриных яйцах SPF с 8-дневным эмбрионом. Аллантаисную жидкость разводят 1:100 в 1xPBS и впрыскивают 100 мкл в яйцо. Аллантаисную жидкость собирают через 48 часов после инокуляции, очищают от дебриса, хранят при -80°С и снова анализируют с помощью RT-qPCR для подтверждения качества исходного материала.

Чтобы подтвердить правильную вставку шиповидного белка в сгенерированный рВИБ, вирусную нуклеиновую кислоту выделяют с помощью мини-набора вирусной РНК QIAamp с последующей одностадийной ОТ-ПЦР SuperScript III с использованием праймеров, перечисленных в таблице 2, очисткой QIAquick PCR и последующим секвенированием по Сэнгеру, выполненным коммерческим поставщиком.

Таблица 2: ПЦР и секвенирование праймеров для подтверждения правильности вставки и последовательности шиповидного белка в CR88 рВИБ H52 S.

ПЦР	Название	Последовательность	Область	Назначение	Ампликон [bp]
1	PO1565	caggattgtgcatggtggac (SEQ ID NO:27)	lab	ПЦР+ Секвенирование	2468
	PO764	agaaaacctaaaggtcctgc (SEQ ID NO:28)	S	ПЦР+ Секвенирование	
	PO618	taaatggtgatcttgttt (SEQ ID NO:29)	S	Секвенирование	n/a
	PO1410	tttgtatacgagagccatca (SEQ ID NO:30)	S	Секвенирование	
2	PO1400	ttgccttcagtatgtttgtg (SEQ ID NO:31)	S	ПЦР+ Секвенирование	2531

ПЦР	Название	Последовательность	Область	Назначение	Ампликон [bp]
	PO635	ctgcgacaagacctcctg (SEQ ID NO: 32)	M	ПЦР+ Секвенирование	n/a
	PO619	tgctgcttcctttaataag (SEQ ID NO: 33)	S	Секвенирование	
	PO1183	cgctgttgtagacactctatg (SEQ ID NO: 34)	S	Секвенирование	

Создание и характеристика рекомбинантного ВИБ CR88, в котором последовательность, кодирующая шиповидный белок CR88 или эктодомен шиповидного белка заменена последовательностью, кодирующей шиповидный белок из другого генотипа ВИБ.

Те же методы, что описаны для создания рВИБ CR88 H52 S, применяются для создания и характеристики рекомбинантного ВИБ CR88, в котором последовательность, кодирующая шиповидный белок CR88 (основания с 1657 по 5151 в SEQ ID NO:21) или последовательность, кодирующая эктодомен шиповидного белка CR88 (основания 1711 - 4941 в SEQ ID NO:21) заменена последовательностями, кодирующими шиповидный белок ВИБ или эктодомен шиповидного белка серотипов и генотипов, приведенных в Таблице 3.

Таблица 3 Праймеры, используемые для сборки по Гибсону донорских плазмид рВИБ H52 с гетерологичными шиповидными белками или эктодоменами шиповидных белков

Шиповидный белок	ПЦР	Продукт	Праймер
H52 S Экто SEQ ID NO: 6	1	CR88 остов	tggccttggtatgtgtgg (SEQ ID NO:35) agcactacatagtgcatagc (SEQ ID NO:36)
	2	H52 S Экто	tctttggtatgcaactatgtagtgctgctttgtatgactcgagtcc (SEQ ID NO:37) tggcaagccacacataccaaggccacttaataataagttttgagtattgaaagtttttc (SEQ ID NO:38)
QX S SEQ ID NO: 7	1	CR88 остов	tgattaaaagtcccacatcttttctaataattattaattcttctttgg (SEQ ID NO:23) ctcttaccagtaacttaccacacttaattaataaagactaagtc (SEQ ID NO:24)
	2	QX S	aagtgtggttaagtactggttaagagatggttggaagtcactg (SEQ ID NO:39) agaaaagatgtgggacttttaataacagacttttttaggtctg (SEQ ID NO:26)
QX S Экто SEQ ID NO: 8	1	CR88 остов	tggccttggtatgtgtgg (SEQ ID NO:35) agcactacatagtgcatagc (SEQ ID NO:36)
	2	QX S Экто	tctttggtatgcaactatgtagtgctaattgtttgattctgataataattatg (SEQ ID NO:40) tggcaagccacacataccaaggccacttaataataagttttaattattgaaagttcttc (SEQ ID NO:41)
Q1 S SEQ ID NO: 9	1	CR88 остов	tgattaaaagtcccacatcttttctaataattattaattcttctttgg (SEQ ID NO:23) ctcttaccagtaacttaccacacttaattaataaagactaagtc (SEQ ID NO:24)
	2	Q1 S	aagtgtggttaagtactggttaagagatggttggaagtcactg (SEQ ID NO:42) agaaaagatgtgggacttttaataacagacttttttaggtctg (SEQ ID NO:26)
Q1 S Экто SEQ ID	1	CR88 остов	tggccttggtatgtgtgg (SEQ ID NO:35) agcactacatagtgcatagc (SEQ ID NO:36)

Шиповидный белок	ПЦР	Продукт	Праймер
NO:10	2	Q1 S Экто	tctttgggatgcaactatgtagtgctgctttgtttgataataatgaaac (SEQ ID NO:43)
			tggcaagccacacataccaaggccatttaataataagtccttgagtattgaaag (SEQ ID NO:44)
Ark S SEQ ID NO 11	1	CR88 остов	ggtaacttaacaatacagacctaataaaagtctg (SEQ ID NO:61) ctcttaccagtaacttaccacacttaattaataagactaagtc (SEQ ID NO:24)
	2	Ark S	aagtgtggtaagttactggttaagagatggttggaagtcactg (SEQ ID NO:39) gtctgtattgttaagttaccacatcgttatc (SEQ ID NO:45)
Ark S Экто SEQ ID NO 12	1	CR88 остов	tggccttgggatgtgtgg (SEQ ID NO:35) agcactacatagtgcatac (SEQ ID NO:36)
	2	Ark S Экто	tctttgggatgcaactatgtagtgctaatatgatgacaacgaatcttttg (SEQ ID NO:46) tggcaagccacacataccaaggccacttaataataagttttgagtattgaaag (SEQ ID NO:47)
Вариант 2 S SEQ ID NO 13	1	CR88 остов	ggtaacttaacaatacagacctaataaaagtctg (SEQ ID NO:61) ctcttaccagtaacttaccacacttaattaataagactaagtc (SEQ ID NO:24)
	2	Вариант 2 S	aagtgtggtaagttactggttaagagatggttggaagtcactg (SEQ ID NO:39) gtctgtattgttaagttaccacatcattatcaaaag (SEQ ID NO:48)
Вариант 2 S Экто SEQ ID NO 14	1	CR88 остов	tggccttgggatgtgtgg (SEQ ID NO:35) agcactacatagtgcatac (SEQ ID NO:36)
	2	Вариант 2 S Экто	tctttgggatgcaactatgtagtgctgctgtttgataataatcag (SEQ ID NO:49) tggcaagccacacataccaaggccacttaataataagtttttaattattgaaagttcttc (SEQ ID NO:41)
Бразилия S SEQ ID NO 15	1	CR88 остов	tgatataaaagtcacacatcttttctaataattattaattcttctttgg (SEQ ID NO:23) ctcttaccagtaacttaccacacttaattaataagactaagtc (SEQ ID NO:24)
	2	Бразилия S	aagtgtggtaagttactggttaagagatggttggtcaacctcttttac (SEQ ID NO:50) agaaaagatgtgggacttttaatacattaacagacttttttaggtctg (SEQ ID NO:26)
Бразилия S Экто SEQ ID NO 16	1	CR88 остов	tggccttgggatgtgtgg (SEQ ID NO:35) agcactacatagtgcatac (SEQ ID NO:36)
	2	Бразилия S Экто	tctttgggatgcaactatgtagtgcttctttgtacaataatgatagctatg (SEQ ID NO:51) tggcaagccacacataccaaggccatttaataataagtttttaataatagaaagtgttc (SEQ ID NO:52)

5 Праймеры для характеристики и идентификации различных последовательностей шиповидных белков в рекомбинантном ВИБ при необходимости адаптируют к соответствующей последовательности шиповидных белков.

ПРИМЕР 2:

КИНЕТИКА РЕПЛИКАЦИИ *IN OVO*

10 Восемь восьмидневных куриных яиц с эмбрионами инокулируют посредством 10^2 50% инфекционной дозы для эмбрионов (EID₅₀) рекомбинантного ВИБ и соответствующих контролей. Яйца инкубируют при 37,5°C, влажности 60% и ежедневно просвечивают через 0, 8, 24, 34, 48 и 72 часа инкубации и регистрируют гибель эмбрионов. Пять заранее отобранных яиц на

образец и в определенный момент времени вынимают и переносят при 4 °С в течение по меньшей мере 2 часов. Впоследствии аллантоисную жидкость собирают и хранят при -80 °С. Для анализа образцы размораживают и разбавляют 1:10 в 1хPBS без Ca и Mg, а нуклеиновые кислоты экстрагируют с помощью набора QIAamp DNA Blood Mini (Qiagen) с добавлением носителя РНК, используя робот-пипетку Hamilton Starlet. Экстрагированные нуклеиновые кислоты анализируют с помощью RT-qPCR на относительное количество РНК ВИБ с протоколом, адаптированным из Callison и соавт. (J Virol Methods. 2006;138(1-2):60-5). Вкратце, используют те же праймеры и зонд, а термопрофайл адаптирован для использования TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix (ThermoFisher) и системы ПЦР в реальном времени ABI 7900HT (Thermo Fisher Scientific). Все образцы нуклеиновых кислот анализируют в трех экземплярах с использованием серии 10-кратных разведений ВИБ Н52 в качестве сравнения.

Репликацию рВИБ CR88 Н52 S по сравнению с рекомбинантными вирусами дикого типа CR88 и Н52 анализируют путем впрыскивания яйцам SPF 8-дневного возраста посредством 100 EID₅₀ в момент времени 0. В ранние моменты времени наблюдают несколько иные кинетики репликации. Тем не менее, через 32 часа все вирусы достигают сопоставимых контрольных значений. Все эмбрионы живы через 32 часа после инокуляции, в то время как через 48 часов после заражения все оставшиеся эмбрионы для контрольных животных дикого типа мертвы. Напротив, от 60 до 80% эмбрионов, инфицированных посредством рВИБ CR88 Н52 S, были все еще живы в моменты времени 48 и 72 часа после инокуляции. Репликация рВИБ CR88 Н52 S считается равноэффективной по сравнению с вирусами дикого типа, поскольку все вирусы достигают плато через 32 часа (см. Фигуру 1).

ПРИМЕР 3:

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ВАКЦИНЫ И ВИРУСА ДЛЯ ЗАРАЖЕНИЯ

Чтобы продемонстрировать эффективность рВИБ CR88 с гетерологичным шиповидным белком или эктодоменом шиповидного белка у цыплят, аликвоту исходного вируса размораживают и разводят 10-кратно в 1хPBS, чтобы определить 50% инфекционную дозу эмбриона (EID₅₀) путем инокуляции 100 мкл на пять 8-дневных куриных яиц с эмбрионами на разведение. Яйца

инкубируют при 37,5 °С и влажности 60% до 7 дней после инокуляции. Яйца с мертвыми эмбрионами через 24 часа исключают из эксперимента. Все остальные яйца с мертвыми эмбрионами через 7 дней после инокуляции считают положительными. Все яйца с живыми эмбрионами просвечивают снизу через 7 дней после инокуляции для выявления карликов, которых считают положительными. EID₅₀/мл рассчитывают по формуле Рида и Мюнча (Am J Epidemiol, 1938; 27(3):493–497). Для вакцинации исходный вирусный материал разводят в 1хPBS для получения титра 10^{4.3} EID₅₀/мл (10³ EID₅₀ на цыпленка в 50 мкл).

10 Вирусы для контрольного заражения M41, QX, Q1, Ark, Вариант 2 и Бразилия размножаются в яйцах SPF с 10-дневными эмбрионами. Через 24 часа после инокуляции яйца переводят при 4 °С по меньшей мере на 2 часа. Аллантаоисную жидкость собирают, разделяют на аликвоты и хранят при -80°С. Титр вируса определяют, как описано выше. Титр устанавливают от 10^{4.3} до 10^{5.3} EID₅₀/мл путем разбавления с 1хPBS (от 10³ до 10⁴ EID₅₀ на цыпленка в 50 мкл).

ПРИМЕР 4:

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ВАКЦИНЫ

Оплодотворенные яйца SPF инкубируют в течение 18 дней в инкубационном шкафу при температуре 99,7 °F и влажности 50% с частотой 1 оборот в час. На 18 день инкубации яйца просвечивают, оплодотворенные яйца переносят в выводной шкаф и инкубируют при 99 °F и влажности 70% до вылупления. Цыплят без клинических признаков или деформации случайным образом распределяют по соответствующим группам лечения и переводят в отдельные изоляторы. По меньшей мере два цыпленка служат в качестве группы строгого отрицательного контроля (SNC), пять цыплят включены в группу контрольного заражения (CC) и по меньшей мере 10 цыплят включены в группы, которые вакцинированы рекомбинантным ВИБ с гетерологичным шиповидным белком или эктодоменом шиповидного белка и впоследствии заражены. Животных содержат в условиях содержания в соответствии с местными и национальными требованиями по защите животных. Световой режим настроен на 16 часов света в сутки. Корм и вода предоставляются без ограничений. После переноса в изолятор цыплят (суточного возраста) вакцинируют посредством 10³ EID₅₀ на цыпленка путем капель в глаза (общий объем 50 мкл, 25 мкл в глаз) в то время как группы SNC и CC остаются необработанными. Через 21 день после

вакцинации цыплят из СС и вакцинированных групп заражают посредством от 10^3 до 10^4 EID₅₀ на цыпленка соответствующего штамма заражения с гомологичным шиповидным белком (M41, QX, Q1, Ark, Вариант 2 или Бразилия) путем глазных капель (общий объем 50 мкл, 25 мкл в глаз). Через 7 дней после заражения всех цыплят умерщвляют, берут мазки из хоан, удаляют почки и хранят в стабилизирующем растворе RNAlater (ThermoFisher) при 4°C для ВИБ-специфичного анализа RT-qPCR. Кроме того, удаляют трахеи и переносят в пробирки объемом 50 мл с теплой средой для культивирования клеток. После этого трахеи очищают от соединительных тканей и промывают средой для культивирования клеток. Трахеи разрезают на трахеальные кольца, используя измельчитель ткани McIlwain, установленный на толщину среза 0,6-0,8 мм. На трахею три кольца в верхней части, четыре кольца в средней части и три кольца в нижней части анализируют на биение ресничек с помощью световой микроскопии и оценивают цилиостаз (см. Таблицу 4). Кольцо считается нормальным, если более 50% внутреннего кольца демонстрируют сильное движение ресничек (оценка 2 и ниже). Кольцо считается положительным для цилиостаза, если бьются менее 50% ресничек (оценка 3 и 4).

Для ВИБ-специфичного анализа RT-qPCR кусочки ткани почек нагревают до комнатной температуры и переносят в отдельные пробирки Precellys на 2 мл, которые заполнены средой и PBS, соответственно. Почки гомогенизируют с помощью гомогенизатора тканей Precellys® (Bertin Instruments) в течение 1x 20 секунд при 6800 об./мин. Хоанальные мазки элюируют в 2 мл 1xPBS. Нуклеиновые кислоты выделяют из 200 мкл элюата и гомогената ткани соответственно с использованием набора для очистки ядра нуклеиновой кислоты MagMAX™ (ThermoFisher) и системы очистки KingFisher™ Duo Prime (ThermoFisher). RT-qPCR осуществляют как описано выше для кинетики *in ovo*, за исключением использования системы ПЦР в реальном времени StepOnePlus™ (ThermoFisher) для анализа в дубликатах.

Таблица 5: Оценка цилиостаза в трахеальных кольцах

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

ПРИМЕР 5:

ЭФФЕКТИВНОСТЬ РЕКОМБИНАНТНОГО ВИБ 4/91, КОДИРУЮЩЕГО
ГЕТЕРОЛОГИЧНЫЙ ШИПОВИДНЫЙ БЕЛОК ИЛИ ЭКТОДОМЕН
5 ШИПОВИДНОГО БЕЛКА

Целью исследований является демонстрация того, что вакцинация
рекомбинантным ВИБ CR88 (генотип и серотип 4/91), кодирующим
гетерологичный гетерологичный шиповидный белок или его фрагмент, способна
обеспечить защиту от заражения штаммом с гомологичным шиповидным
10 белком.

Проводят анализ на предмет того, может ли рекомбинантный ВИБ CR88
(генотип 4/91), кодирующий эктодомен шиповидного белка ВИБ Н52 (массовый
генотип), обеспечивать защиту от заражения вирулентным штаммом М41
(массовый генотип), который рассматривают как гомологичное заражение для
15 кодируемого шиповидного белка ВИБ Н52 и как гетерологичное заражение,
учитывая остов ВИБ CR88. Всех цыплят ежедневно обследуют на предмет
выявления клинических признаков. После вакцинации или заражения никаких
клинических признаков не регистрируют. Обратное титрование для вакцинации
посредством CR88 рВИБ Н52 S и Н52 рВИБ дикого типа в возрасте 1 дня
20 определяет титр $10^{4.38}$ EID₅₀/мл и $10^{4.5}$ EID₅₀/мл, соответственно (цель $10^{4.3}$
EID₅₀/мл), а также $10^{4.32}$ EID₅₀/мл (цель $10^{4.3}$ EID₅₀/мл) для вируса контрольного
заражения М41, примененного через 21 день после вакцинации. Цилиостаз
оценивают, как описано выше, и результаты показаны на Фигуре 2 и обобщены в
Таблице 5.

25 Таблица 5 Сводные данные оценки цилиостаза для защиты через 28 дней
после вакцинации и через 7 дней после заражения. Среднюю оценку цилиостаза
для каждой группы рассчитывают путем сложения суммы оценок отдельных
цыплят на группу и деления суммы группы на количество животных (наивысшая
возможная оценка 40, наименьшая возможная оценка 0). Животное считается
30 здоровым, если не менее 9 из 10 колец показывают нормальную активность
ресничек

Группа	Вакцина	Заражение	Средняя оценка цилиостаза	Не повреждено [%]
1	-	-	3,0	100
2	-	М41	40,0	0

Группа	Вакцина	Заражение	Средняя оценка цилиостаза	Не повреждено [%]
3	H52	M41	8,9	93
4	CR88 pВИБ H52 S	M41	8,6	93

Все животные из группы строгого отрицательного контроля демонстрируют нормальные движения ресничек, в то время как все животные из контрольной группы с заражением имеют положительный эффект цилиостаза. Напротив, 93% животных, вакцинированных посредством CR88 pВИБ H52 S или H52 pВИБ дикого типа, защищены. Кроме того, вирусная нагрузка в почках животных, вакцинированных посредством CR88 rIBV H52 S, снижена по сравнению с животными из группы контрольного заражения (Фигура 3).

Кроме того, анализируют, может ли рекомбинантный ВИБ CR88, кодирующий шиповидный белок ВИБ QX, обеспечивать защиту от заражения вирулентным штаммом D388 QX, который рассматривают как гомологичное заражение для кодируемого шиповидного белка ВИБ QX и как гетерологичное заражение, учитывая остов ВИБ CR88. Всех цыплят ежедневно обследуют на предмет выявления клинических признаков. После вакцинации или заражения никаких клинических признаков не регистрируют. Обратное титрование для вакцинации посредством CR88 pВИБ QX S и вакцины QX в возрасте 1 дня определяет титр, что превысило 10^5 EID₅₀/мл (цель $10^{4.3}$ EID₅₀/мл), так же как и $10^{4.83}$ EID₅₀/мл (цель $10^{4.3}$ EID₅₀/мл) для для вируса контрольного заражения D388 QX, примененного через 21 день после вакцинации, соответственно. Цилиостаз оценивают, как описано выше, и результаты показаны на Фигуре 4 и обобщены в Таблице 6.

Таблица 6. Сводные данные оценки цилиостаза для защиты через 28 дней после вакцинации и через 7 дней после заражения. Среднюю оценку цилиостаза для каждой группы рассчитывают путем сложения суммы оценок отдельных цыплят на группу и деления суммы группы на количество животных (наивысшая возможная оценка 40, наименьшая возможная оценка 0). Животное считается здоровым, если не менее 9 из 10 колец показывают нормальную активность ресничек.

Группа	Вакцина	Заражение	Средняя оценка цилиостаза	Не поражено [%]
1	-	-	0	100
2	-	D388 QX	38,4	0

Группа	Вакцина	Заражение	Средняя оценка целиостаза	Не поражено [%]
3	Вакцина QX	D388 QX	3,5	100
3	CR88 pВИБ QX S	D388 QX	8,9	100

5 Все животные из группы строгого отрицательного контроля демонстрируют нормальное движение ресничек, в то время как все животные из контрольной группы с заражением являются положительными по целиостазу. Напротив, 100% животных, вакцинированных CR88 rIBV QX S или вакциной QX защищены.

Аналогичные результаты получены с другими pВИБ CR88 с гетерологичными шиповидными белками или эктодоменами шиповидных белков.

10 Результаты подчеркивают пригодность ВИБ Н52 в качестве сильного остова для создания рекомбинантного ВИБ с гетерологичным шиповидным белком и показывают отличные результаты, в частности, по сравнению с данными предшествующего уровня техники для остова ВИБ Beaudette.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. ВИБ 4/91 (вирус инфекционного бронхита), кодирующий гетерологичный S (шиповидный) белок ВИБ или его фрагмент.

5

2. Иммуногенная композиция, содержащая ВИБ 4/91 (вирус инфекционного бронхита), кодирующий гетерологичный S (шиповидный) белок или его фрагмент.

10

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

15

4. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пп. 1 - 3, где гетерологичный S белок или его фрагмент принадлежит к ВИБ с генотипом или серотипом, выбранным из перечня, включающего в себя: Арканзас (такой как Арканзас 99), Бразилия (такой как BR-1, BR-2, 23/2013, IBV/Бразилия/351/1984), Калифорния (такой как Калифорния 1734/04, Калифорния 99), Коннектикут, Делавэр (такой как Делавэр 98), Нидерландский (такой как D207, D212, D274, D3128, D3896, D8880, D1466), Флорида, Джорджия (такой как Джорджия GA-07, GA-08, GA-12, GA-13), Грей, Холт, Айова (такой как Айова 97 и Айова 69), Италия (такой как Италия 02), JMK, LDT3, Мэн (такой как Мэн 209), Массачусетс (M41, H52, H120), Пенсильвания (такой как Пенсильвания 1220/98, Пенсильвания Wolg/98), PL84084, Qu (такой как Qu-mv), QX (такой как GB341/96), Q1, SE 17 и Вариант 2 (такой как IS/1494/06, IBV/Ck/EG/CU/4/2014, гаммаCoV/Ck/Польша/G052/2016).

20

25

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

30

6. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пп. 1 - 5, где гетерологичный S белок или его фрагмент выбирают из генотипов или серотипов, включающих в себя Массачусетс, QX, Q1, Арканзас, Вариант 2 и

Бразилия или состоит из или содержит аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 или 17 или последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности с ней.

7. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пп. 1 - 6, где гетерологичный S белок представляет собой полноразмерный шиповидный белок или где фрагмент гетерологичного S (шиповидного) белка имеет длину по меньшей мере 500, 750, 1000 или 1075 аминокислот.

8. ВИБ или иммуногенная композиция по любому из пп. 1 - 7, где ВИБ является аттенуированным или ВИБ представляет собой рекомбинантный ВИБ.

9. Иммуногенная композиция по любому из пп. 2 - 8, где иммуногенная композиция представляет собой вакцину.

10. Набор, содержащий ВИБ или иммуногенную композицию по любому из пп. 1 - 9.

11. Способ для иммунизации субъекта, включающий в себя введение такому субъекту иммуногенной композиции по любому из пп. 2 - 9.

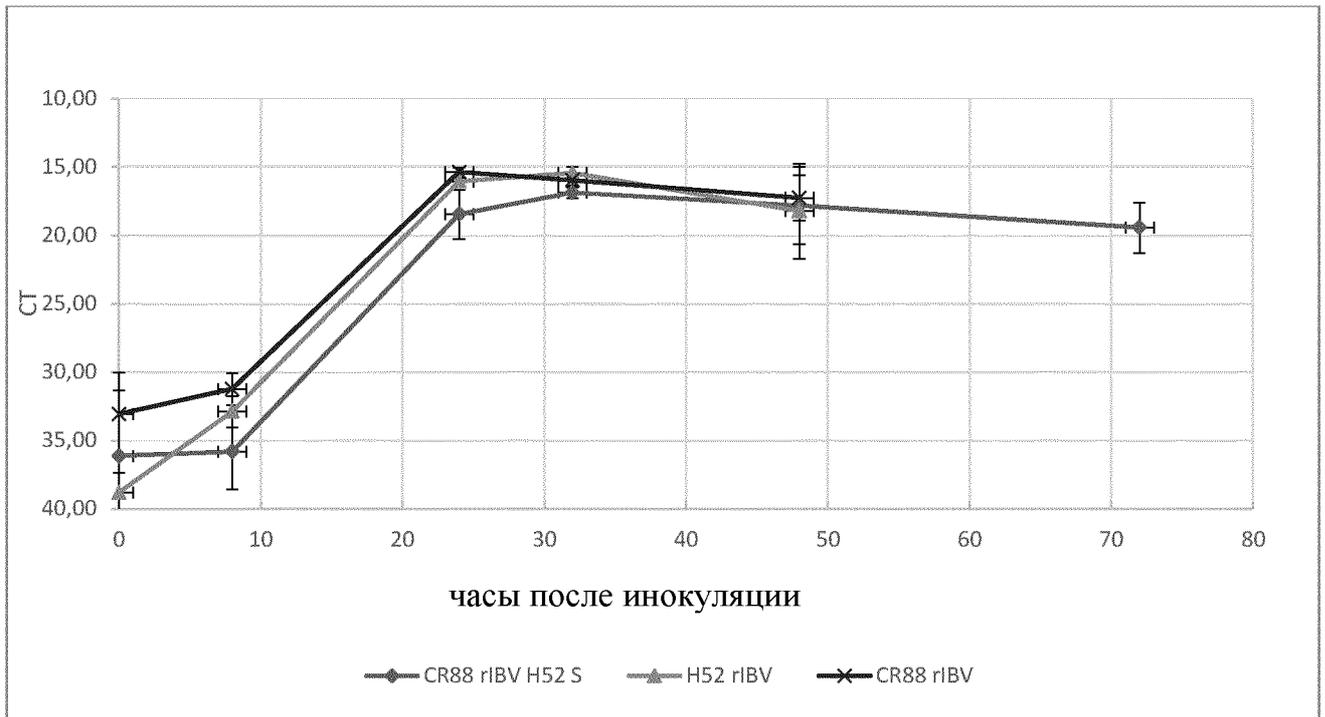
12. Способ лечения или предотвращения клинических признаков, вызванных ВИБ у нуждающегося в этом субъекта, способ, включает в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции по любому из пп. 2 - 9.

13. Способ уменьшения цилиостаза у нуждающегося в этом субъекта, по сравнению с субъектом неиммунизированной контрольной группы того же вида, способ, включает в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции по любому из пп. 2 - 9.

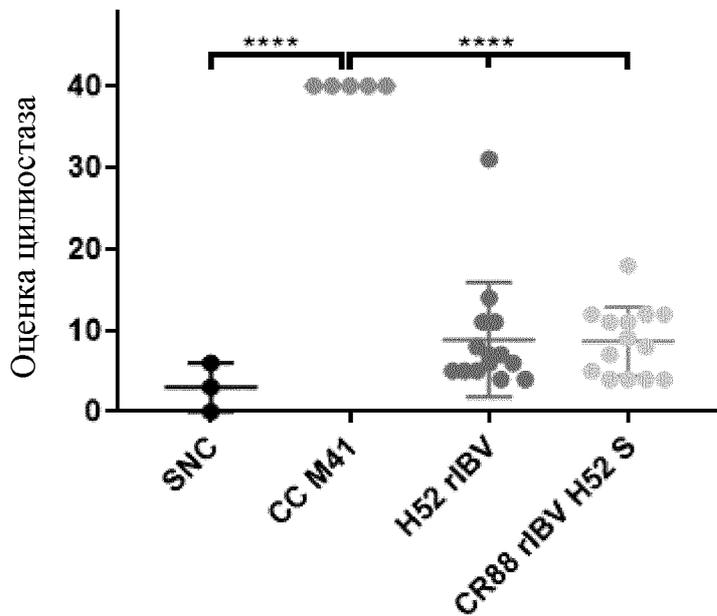
14. Способ по любому из пп. 11 - 13, в котором указанный субъект представляет собой домашнюю птицу.

5 15. Способ по любому из пп. 11 - 14, где указанный способ приводит к
улучшению параметра эффективности, выбранного из группы, состоящей из:
предотвращения или уменьшения цилиостаза, предотвращения или уменьшения
хрипов, предотвращения или уменьшения снижения яйценоскости,
предотвращения или уменьшения поражения почек, предотвращения или
уменьшения водянистой диареи, предотвращения или снижения потери веса,
10 снижения вирусной нагрузки, снижения выделения вируса или их комбинации,
по сравнению с субъектом необработанной контрольной группы того же вида.

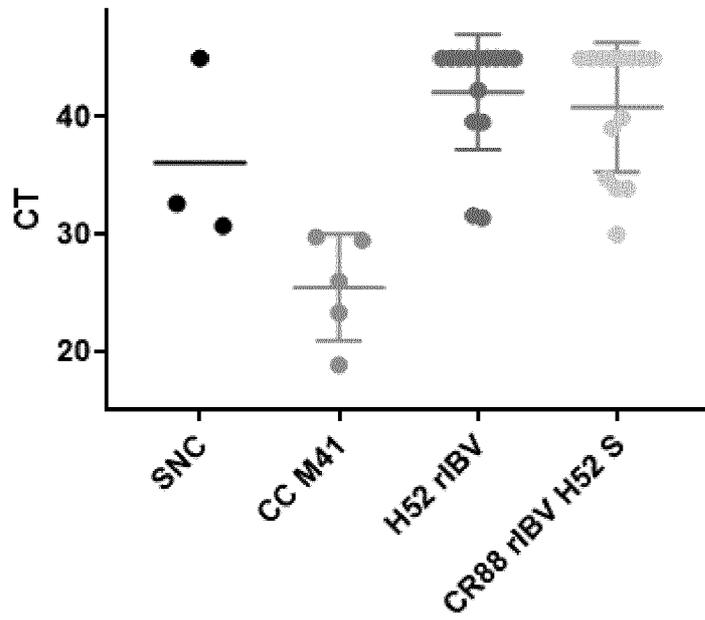
Фигура 1



Фигура 2



Фигура 3



Фигура 4

