

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202193039** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2022.04.15

(51) Int. Cl. *A61K 39/12* (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.05.06

(54) **МОДИФИЦИРОВАННАЯ СУБЪЕДИНИЦА S1 ШИПОВИДНОГО БЕЛКА
КОРОНАВИРУСА**

(31) 19173821.0; 19212627.4

(32) 2019.05.10; 2019.11.29

(33) EP

(86) PCT/EP2020/062526

(87) WO 2020/229248 2020.11.19

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

(72) Изобретатель:

**Кремер-Кюль Анника, Штефан Томас
Мин, 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) Изобретение среди прочего относится к рекомбинантному шиповидному белку птичьего коронавируса или к его фрагменту, содержащему мутацию в аминокислотном положении 267 на цистеин. Кроме того, настоящее изобретение относится к иммуногенной композиции, содержащей птичий коронавирус с таким шиповидным белком.

A1

202193039

202193039

A1

МОДИФИЦИРОВАННАЯ СУБЪЕДИЦА S1 ШИПОВИДНОГО БЕЛКА КОРОНАВИРУСА

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.

10

Предпосылки создания изобретения

Вирус инфекционного бронхита (ВИБ) птичьего коронавируса является прототипом гаммакоронавируса семейства *Coronaviridae*, отряда *Nidovirales*. Вирус инфекционного бронхита в основном поражает эпителий верхних дыхательных путей кур, вызывая респираторное заболевание, обычно осложняемое вторичными бактериальными патогенами (Cook и соавт. 2012. Avian Pathol. 41:239-250). Некоторые штаммы ВИБ дополнительно поражают почечные каналцы, 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

25

30

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, тогда как белок N вместе с вирусной РНК образует

ядро рибонуклеопротеина. Шиповидный белок коронавируса определяет тропизм вида хозяина (Kuo 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. 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). Для производства указанные вакцинные штаммы также необходимо культивировать в зародышевых куриных яйцах. Сегодня вакцины против ВИБ (как инактивированные, так и живые) по-прежнему размножают в куриных яйцах с эмбрионами, что обременительно и дорого.

Единственный описанный на данный момент ВИБ, адаптированный к клеточной линии, представляет собой штамм ВИБ Beaudette, который эффективно реплицируется в клетках Vero и ВНК. Casais и соавт. 2003 (J. Virol. 77; 9084-9089) демонстрируют, что S белок Beaudette является детерминантой тропизма клеточной линии путем создания рекомбинантных ВИБ с использованием последовательностей эктодомена шиповидного белка Beaudette, которые были способны передавать расширенный тропизм клеточной линии другому ВИБ (M41). В заявке WO 2011/004146 описано, что субъединица S2 от Beaudette отвечает за расширенный тропизм ткани. Последовательность в субъединице S2, сайте связывания гепаран-сульфата от Beaudette, была идентифицирована как ответственная за расширенный тропизм клеточной линии. Кроме того, Bickerton и соавт. 2018 (Journal of Virology 92 (19)) раскрывают специфический для Beaudette мотив из восьми аминокислот. Однако рекомбинантные ВИБ с субъединицей S2 шиповидного белка Beaudette не подходят в качестве вакцин. У Ellis и соавт. 2018 (J. Virol. 92(23)) описано, что рекомбинантный Beaudette с химерными шипами с гетерологичными субъединицами S1 из M41 или QX в сочетании с субъединицей S2 шипа

Beaudette не обеспечивает достаточной защиты от гомологичных S1 контрольных заражений. Кроме того, Beaudette дикого типа не обеспечивает защиту от гомологичного контрольного заражения, как другие лицензированные вакцины, принадлежащие к серотипу Массачусетс (Hodgson et al 2004: J Virol 78:13804–13811 или Geilhausen и соавт. 1973: Archiv für die gesamte Virusforschung 40: 285-290).

У Fang и соавт. 2005 (Biochemical and Biophysical Research Communication 336; сс. 417 - 423) описано, что адаптация Beaudette для размножения в клетках Vero привела к 49 аминокислотным модификациям, 26 из которых расположены в шиповидном белке.

В целом, обеспечение вакцин против ВИБ, имеющих расширенный клеточный или тканевый тропизм, путем замены шиповидного белка на гетерологичный шиповидный белок Beaudette не приведет к получению вакцин против ВИБ, обеспечивающих достаточную эффективность, а с последовательностью Beaudette Spike будет ограничиваться защитой от заражения штаммом серотипа Массачусетс и отсутствием перекрестной защиты от других генотипов. Кроме того, мотивы или сайты из предшествующего уровня техники, идентифицированные в Beaudette, не были перенесены в вакцины против ВИБ, демонстрируя как расширенный тропизм клеточных культур или ткани, так и эффективность защиты (не было показано никакого взаимодействия между расширенным тропизмом и эффективностью вакцины).

Следовательно, существует потребность в отдельных аминокислотах или коротких мотивах, которые можно перенести в вакцины против ВИБ, не влияя на эффективность вакцины, но позволяя продуцировать расширенный клеточный или тканевой тропизм.

Подробное описание изобретения

Перед описанием аспектов настоящего изобретения следует отметить, что используемые в настоящем описании и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если контекст явно не требует иное. Таким образом, например, ссылка на «антиген» включает множество антигенов, ссылка на «вирус» представляет собой ссылку на один или несколько вирусов и их эквивалентов, известных специалистам в данной области, и 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 обеспечивают явный прогресс в уровне техники.

В целом, настоящее изобретение относится к шиповидному белку птичьего коронавируса или его фрагменту, где по меньшей мере часть субъединицы S1 происходит от птичьего коронавируса с ограниченным тропизмом клетки или ткани, и где в положении 267 аминокислоты находится цистеин.

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает рекомбинантный шиповидный белок птичьего коронавируса или его фрагмент, содержащий мутацию в положении 267 аминокислоты на цистеин.

Как правило, настоящее изобретение также обеспечивает шиповидный белок ВИБ или его фрагмент, где по меньшей мере часть субъединицы S1 происходит от ВИБ с ограниченным тропизмом клетки или ткани, и где в положении 267 аминокислоты находится цистеин.

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает рекомбинантный шиповидный белок ВИБ или его фрагмент, содержащий мутацию в положении 267 аминокислоты на цистеин.

Преимущественно экспериментальные данные показывают, что штаммы коронавируса (такие как, например, штаммы H52, QX SP2013-01478 и CR88 IBV) обладают расширенным тропизмом клетки или ткани после модификации одного положения, положения 267, на цистеин в шиповидном белке.

Термин «коронавирус» хорошо известен специалисту в данной области. В целом коронавирусы представляют собой вирусы подсемейства Coronavirinae в

семействе Coronaviridae в отряде Nidovirales. Коронавирусы представляют собой оболочечные вирусы и имеют геном одноцепочечной РНК с положительным смыслом с нуклеокапсидом спиралевидной симметрии. Термин «коронавирус» охватывает все штаммы, генотипы, протектотипы и серотипы вируса
5 инфекционного бронхита. Примерами птичьих коронавирусов являются вирус инфекционного бронхита (ВИБ); коронавирус цесарки (GfCoV) и коронавирус индейки (TCoV; вирус энтерита индейки и вирус болезни синего гребня).

Термин «ВИБ» относится к вирусу инфекционного бронхита, который хорошо известен специалистам в данной области. Термин «ВИБ» охватывает все
10 штаммы, генотипы, протектотипы и серотипы вируса инфекционного бронхита.

Термин «мутация» включает в себя модификации белков, кодирующих вирусную РНК, приводящие к изменению указанного кодируемого белка. Кроме того, термин «мутация» охватывает генно-инженерные мутации. Термин мутация относится, но не ограничивается, заменами (заменой одного или
15 нескольких нуклеотидов/пар оснований), делециями (удалением одного, нескольких или всех нуклеотидов/пар оснований) и/или вставками (добавлением одного или нескольких нуклеотидов/пар оснований). В данном контексте мутация может представлять собой единственную мутацию или несколько мутаций, поэтому часто используется термин «мутация(и)» и относится как к
20 одной мутации, так и к нескольким мутациям. Термин «мутация» хорошо известен специалисту в данной области, и специалист в данной области может генерировать мутации без каких-либо затруднений.

Термин «шиповидный» относится к специфическому белку птичьего коронавируса или ВИБ, который хорошо известен специалисту в данной
25 области. Шиповидный белок является основным индуктором антител и защитного иммунного ответа. Кроме того, шиповидный (S) белок облегчает проникновение птичьего коронавируса или 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
30 тропизм штамма вируса.

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).

5 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.

Мутация 267

В одном аспекте птичьего коронавируса или шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением цистеин в аминокислотном положении 267 вводится путем мутации. Формулировка «вводится» означает, что мутация была внесена с помощью генной инженерии (искусственно, например, вмешательством человека).

В другом конкретном аспекте птичьего коронавируса или шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением мутация представляет собой аминокислотную замену, делецию или вставку.

20 В другом конкретном аспекте птичьего коронавируса или шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением гидрофобная аминокислота в аминокислотном положении 267 мутирована на цистеин; или фенилаланин или лейцин в аминокислотном положении 267 мутируют на цистеин.

Расширенный клеточный или тканевый тропизм

25 В другом конкретном аспекте птичьего коронавируса или шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением цистеин в аминокислотном положении 267 или указанная мутация в аминокислотном положении 267 на цистеин приводит к расширенному клеточному или тканевому тропизму птичьего коронавируса или ВИБ.

30 Термин «клетка или ткань» известен специалисту в данной области. Термин «клетка» охватывает линии клеток, такие как линии клеток, перечисленные в данной заявке, а также первичные клетки. Термин «ткань» охватывает клетки из тканей, таких как перечисленные в другом месте данной заявки, например, такие

как первичные клетки куриного эмбриона из легких или печени или первичные куриные фибробласты. Термин охватывает размножение клеток или ткани (клеток) в культуре вне организма. Термин «культура» относится к размножению клеток (таких как клетки линии клеток или первичные клетки или
5 клетки ткани) вне организма в определенных условиях культивирования, известных специалисту в данной области.

Термин «расширенный тропизм» означает, что птичий коронавирус или ВИБ в соответствии с изобретением может размножаться в клетках (таких как
10 клеточные линии) или тканевых клетках (в дополнение к первичным клеткам куриного эмбриона из почек). Напротив, вакцины против коронавируса (такие как вакцины против ВИБ) или коронавирусы дикого типа, не адаптированные к культуре клеток или ВИБ (описаны штаммы ВИБ Beaudette, адаптированные к клеточной линии) могут быть размножены только в куриных яйцах с эмбрионами или в первичных клетках куриного эмбриона из почек (после
15 адаптации). Соответственно, коронавирус (такой как ВИБ) в соответствии с изобретением с расширенным тропизмом клетки или ткани обладает способностью инфицировать и/или реплицироваться в одной или нескольких клеточных линиях или тканевых клетках, отличных от первичных клеток куриного эмбриона из почек. Предпочтительно коронавирус (такой как ВИБ) в
20 соответствии с изобретением с расширенным тропизмом клетки или ткани обладает способностью инфицировать и/или реплицироваться в одной или нескольких клеточных линиях, перечисленных в данной заявке. Соответственно, коронавирус или ВИБ с расширенным тропизмом клетки или ткани может, например, обладать способностью инфицировать и/или реплицироваться в
25 клетках PBS-12SF, EB66 или НЕК 293Т.

Термин «ограниченный тропизм» означает, что птичий коронавирус или ВИБ можно выращивать, если вообще возможно, только на первичных клетках куриного эмбриона из почек. Соответственно, коронавирус или ВИБ с
ограниченным тропизмом клеток или тканей не обладают способностью
30 инфицировать и/или реплицироваться, например, в клетках PBS-12SF, EB66 или НЕК 293Т.

Преимущественно экспериментальные данные показывают, что штаммы ВИБ, такие как, например, H52 и CR88 обладают расширенным тропизмом клетки или ткани после модификации одного положения, положения 267, на

цистеин в шиповидном белке. Кроме того, было показано, что модификация на цистеин в положении 267 является генетически стабильной.

В другом конкретном аспекте птичьего коронавируса или шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением птичий
5
коронавирус или ВИБ инфицирует и/или реплицируется по меньшей мере в одной клеточной линии или клетке, выбранной из перечня, включающего в себя: первичные клетки куриного эмбриона из легких или печени или первичные фибробласты курицы, клеточную линию фибробластов куриного эмбриона, клеточную линию эмбриональных стволовых клеток утки, клеточную линию
10
почки эмбриона человека, клеточную линию почки детеныша хомяка, клеточную линию почки африканской зеленой обезьяны, клеточную линию почки кролика, клеточную линию почки собаки, клеточную линию печени курицы, клеточную линию почки крупного рогатого скота, клеточную линию почки свиньи и клеточную линию насекомых.

В другом конкретном аспекте птичьего коронавируса или шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением птичий
15
коронавирус инфицирует и/или реплицируется по меньшей мере в одной клеточной линии, выбранной из перечня, включающего в себя: DF-1 (Douglas Foster), EB66 (линия эмбриональных стволовых клеток утки), PBS-12, PBS-12SF
20
(без сыворотки PBS-12), ВНК21 (почка детеныша хомячка), НЕК 293Т (эмбриональная почка человека), Vero (Verda Reno), MA104, RK13 (почка кролика), LMH (гепатома самцов леггорна), MDCK собачья почка (Madin-Darby), MDBK (бычья почка Madin-Darby), PK15 (свиная почка), PK2A (свиная почка), SF9, SF21 и SF+ (*Spodoptera frugiperda*).

В другом конкретном аспекте птичьего коронавируса или шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением птичий
25
коронавирус или ВИБ инфицирует и/или реплицируется по меньшей мере в одной клеточной линии, выбранной из перечня, включающего в себя: DF-1, EB66, PBS-12, PBS-12SF, ВНК, НЕК 293Т, Vero, MA104 и RK13.

Предпочтительно, ВИБ инфицирует и/или реплицируется в клеточной
30
линии EB66, PBS-12SF или НЕК 293Т.

Все упомянутые клеточные линии хорошо известны специалистам в данной области и являются коммерчески и/или общедоступными. Например, клетки MDCK задепонированы в качестве образцов в Американской коллекции культур

тканей под регистрационным номером ATCC CCL-34 или ATCC CRL-2285. Клетки DF-1 задепонированы в качестве образцов в Американской коллекции культур тканей под регистрационным номером ATCC CRL-12203). Клетки PBS-12SF задепонированы в качестве образцов в Американской коллекции культур тканей под регистрационным номером ATCC PTA-8565 или задепонированы в RRID под CVCL_1K17. Клетки ВНК-21 задепонированы в качестве образцов в Американской коллекции культур тканей под регистрационным номером ATCC CCL-10. Клетки НЕК 293Т задепонированы в качестве образцов в Американской коллекции культур тканей под регистрационным номером ATCC CRL- 3216. Клетки Vero задепонированы в качестве образцов в Американской коллекции культур тканей под регистрационным номером ATCC CCL-81. Клетки MA104 задепонированы в качестве образцов в Американской коллекции культур тканей под регистрационным номером ATCC CRL-2378. Клетки RK13 задепонированы в качестве образцов в Американской коллекции культур тканей под регистрационным номером ATCC CCL-37.

Нумерация аминокислотного положения 267

В другом конкретном аспекте птичьего коронавируса или шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением нумерация аминокислотного положения 267 относится к аминокислотному положению 267 в шиповидном белке IBV H52, IBV H120 или M41.

В другом конкретном аспекте птичьего коронавируса или шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением нумерация аминокислотного положения 267 относится к аминокислотному положению 267 в шиповидном белке IBV H52.

В другом конкретном аспекте птичьего коронавируса или шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением нумерация аминокислотного положения 267 относится к аминокислотному положению 267 в шиповидном белке в качестве образца, указанного в SEQ ID NO:1.

В другом конкретном аспекте птичьего коронавируса или шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1 используют для определения нумерации положения в шиповидном белке.

В другом конкретном аспекте птичьего коронавируса или шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением для определения аминокислотного положения 267 в шиповидном белке аминокислотная последовательность выровнена с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1.

В другом конкретном аспекте птичьего коронавируса или шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением аминокислотное положение 267 находится в субъединице S1 шиповидного белка.

В другом конкретном аспекте птичьего коронавируса или шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением аминокислотное положение 267 соответствует аминокислотному положению 269 последовательности шиповидного белка IBV CR88.

В другом конкретном аспекте птичьего коронавируса или шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением аминокислотное положение 267 соответствует аминокислотному положению 270 последовательности шиповидного белка IBV QX.

В другом конкретном аспекте птичьего коронавируса или шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением аминокислотное положение 267 соответствует аминокислотному положению 271 последовательности шиповидного белка IBV Q1.

В другом конкретном аспекте птичьего коронавируса или шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением аминокислотное положение 267 соответствует аминокислотному положению 270 последовательности шиповидного белка IBV Var2.

В другом конкретном аспекте птичьего коронавируса или шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением аминокислотное положение 267 соответствует аминокислотному положению 274 последовательности шиповидного белка IBV Бразилия.

В другом конкретном аспекте птичьего коронавируса или шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением аминокислотное положение 267 соответствует аминокислотному положению 274 последовательности шиповидного белка IBV Ark99.

В другом конкретном аспекте птичьего коронавируса или шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением шиповидный белок имеет одну или несколько из следующих аминокислот, выбранных из группы, включающей в себя:

- 5 264 представляет собой аспарагин и/или
- 265 представляет собой треонин и/или
- 269 представляет собой лейцин и/или
- 271 представляет собой аспарагин и/или
- 272 представляет собой фенилаланин.

10 Нумерация указанных аминокислотных положений относится к аминокислотным положениям в шиповидном белке, как, например, приведено в SEQ ID NO:1.

Шиповидный белок

15 Настоящее изобретение также обеспечивает шиповидный белок или его фрагмент, описанные выше, причем шиповидный белок или его фрагмент выбирают из группы, включающей в себя: вирус инфекционного бронхита (IBV);
коронавирус цесарок (GfCoV), коронавирус индейки (TCoV; вирус энтерита индейки и вирус болезни синего гребня), вирус инфекционного перитонита кошек (FIPV), кишечный коронавирус кошек (FECV); вирус трансмиссивного
20 гастроэнтерита (TGEV), респираторный коронавирус свиней (PRCoV), вирус эпидемической диареи свиней (PEDV), вирус гемагглютинирующего энцефаломиелита свиней (PHEV); коронавирус тяжёлого острого респираторного синдрома (SARS-CoV), коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV) коронавирус человека 229E (HCoV-
25 229E), коронавирус человека NL63 (HCoV-NL63), коронавирус человека HKU1 (HCoV-HKU1), коронавирус человека OC43 (HCoV-OC43); коронавирус собаки (CCoV), респираторный коронавирус собак (CRCoV), вирус гепатита мышей (MHV), коронавирус крупного рогатого скота (BCV). Таким образом, настоящее изобретение также обеспечивает шиповидный белок коронавируса или его
30 фрагмент, где по меньшей мере часть субъединицы S1 происходит от коронавируса с ограниченным тропизмом клетки или ткани, и где в аминокислотном положении 267 находится цистеин, а также где шиповидный белок выбирают из группы, включающей в себя: вирус инфекционного бронхита (IBV); коронавирус цесарок (GfCoV), коронавирус индейки (TCoV; вирус

энтерита индейки и вирус болезни синего гребня), вирус инфекционного перитонита кошек (FIPV), кишечный коронавирус кошек (FECV); вирус трансмиссивного гастроэнтерита (TGEV), респираторный коронавирус свиней (PRCoV), вирус эпидемической диареи свиней (PEDV), вирус гемагглютинирующего энцефаломиелита свиней (PHEV);
5 коронавируса тяжёлого острого респираторного синдрома (SARS-CoV), коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV) коронавирус человека 229E (HCoV-229E), коронавирус человека NL63 (HCoV-NL63), коронавирус человека HKU1 (HCoV-HKU1), коронавирус человека OC43 (HCoV-OC43);
10 коронавируса собаки (CCoV), респираторный коронавирус собак (CRCoV), вирус гепатита мышей (MHV), коронавирус крупного рогатого скота (BCV). Кроме того, настоящее изобретение также обеспечивает рекомбинантный шиповидный белок коронавируса или его фрагмент, содержащий мутацию в положении 267 аминокислоты на цистеин, причем шиповидный белок выбирают из группы,
15 включающей в себя: вирус инфекционного бронхита (IBV); коронавирус цесарок (GfCoV), коронавирус индейки (TCoV; вирус энтерита индейки и вирус болезни синего гребня), вирус инфекционного перитонита кошек (FIPV), кишечный коронавирус кошек (FECV); вирус трансмиссивного гастроэнтерита (TGEV), респираторный коронавирус свиней (PRCoV), вирус эпидемической диареи свиней (PEDV), вирус гемагглютинирующего энцефаломиелита свиней (PHEV);
20 коронавирус тяжёлого острого респираторного синдрома (SARS-CoV), коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV) коронавирус человека 229E (HCoV-229E), коронавирус человека NL63 (HCoV-NL63), коронавирус человека HKU1 (HCoV-HKU1), коронавирус человека OC43 (HCoV-OC43);
25 коронавируса собаки (CCoV), респираторный коронавирус собак (CRCoV), вирус гепатита мышей (MHV), коронавирус крупного рогатого скота (BCV).

В другом конкретном аспекте шиповидного белка птичьего коронавируса или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением шиповидный белок
30 птичьего коронавируса или его фрагмент выбирают из группы, включающей в себя: вирус инфекционного бронхита (ВИБ); коронавирус цесарок (GfCoV) и коронавирус индейки (TCoV; вирус энтерита индейки и вирус болезни синего гребня).

В другом конкретном аспекте шиповидного белка птичьего коронавируса или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением птичий коронавирус представляет собой ВИБ (вирус инфекционного бронхита).

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

10 Первым идентифицированным серотипом ВИБ был Массачусетс, и он оставался единственным серотипом до открытия другого серотипа ВИБ в 1956 году. В настоящее время в Соединенных Штатах Америки идентифицировано несколько дополнительных серотипов, включая Арканзас и Делавэр, в дополнение к первоначально идентифицированному типу Массачусетс. Сегодня
15 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
20 типа Массачусетс, помимо Beaudette являются H120, H52 и M41. Штамм H120 был пассирован 120 раз в куриных яйцах с эмбрионами.

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
25 Нидерландах, а также в Германии, Франции, Бельгии, Дании и Великобритании. К тому же, генотип или серотип QX был описан в нескольких странах Азии и Африки.

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

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

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

10 Специалист в данной области знает, где получить любые штаммы ВИБ. Штаммы ВИБ имеются в продаже, могут быть получены в научных институтах или геномы могут быть синтезированы синтетическим путем в виде комплементарной ДНК, поскольку штаммы ВИБ были секвенированы и последовательности были опубликованы и, таким образом, они являются доступны. Более того, штаммы ВИБ могут быть выделены на месте. Способы выделения штаммов ВИБ и характеристики штаммов ВИБ хорошо известны специалистам в данной области. Valter Leonardo de Quadros 2011 (Dissertation, 15 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) 20 описывают как выделить и дифференцировать различные штаммы ВИБ.

Штаммы ВИБ обычно дифференцируются по кодирующей последовательности субъединицы S1 шиповидного белка (Valastro и соавт. 2016. Infect Genet Evol. 39:349-364), но также могут быть дифференцированы по их 25 полной нуклеотидной последовательности или последовательностям конкретных белков, таких как шиповидный белок, нуклеокапсидный белок, оболочечный (E) белок или мембранный (M) гликопротеин. Поскольку шиповидный белок определяет тропизм хозяина и антигенность ВИБ, то генотипы ВИБ классифицируют по кодирующей последовательности субъединицы 1 30 шиповидных белков. В качестве альтернативы, штаммы ВИБ можно дифференцировать по их серотипу. Классификация серотипов включает серологические анализы вируса с участием серотип-специфических антител.

В другом конкретном аспекте шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением шиповидный белок или его фрагмент

происходит от ВИБ с генотипом или серотипом или штамма, выбранного 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), 5 Флорида, Джорджия (такой как Джорджия GA-07, GA-08, GA-12, GA-13), Грей, Холт, Айова (такой как Айова 97 и Айова 69), Италия02), JMK, LDT3, Мэн (такой как Мэн 209), Массачусетс (такой как M41, H52, H120; за исключением Beaudette), Пенсильвания (такой как Пенсильвания 1220/98, Пенсильвания 10 Wolg/98), PL84084, Qu (такой как Qu-mv), QX (такой как GB341/96), Q1, SE 17, Вариант 2 (такой как IS/1494/06, IBV/Ck/EG/CU/4/2014, гаммаCoV/Ck/Польша/G052/2016) и 4/91 (793B, CR88).

В другом конкретном аспекте шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением шиповидный белок или его фрагмент 15 не происходят от штамма Beaudette.

В другом конкретном аспекте шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением шиповидный белок или его фрагмент происходит от ВИБ, выбранного из перечня генотипов или серотипов или штаммов, включающих в себя: Массачусетс (не Beaudette), 4/91, QX, Q1, Италия 20 02, Арканзас, Коннектикут, Джорджия, LDT3, PL84084, Вариант 2 и Бразилия.

Формулировку «не Beaudette» используют эквивалентно выражению «за исключением Beaudette». Таким образом, формулировка «Массачусетс (не Beaudette)» означает, что шиповидные белки или их фрагменты из штаммов Массачусетс, таких как M41, H52 и H120 включены, но шиповидные белки или 25 их фрагменты из штаммов Beaudette исключены.

В другом конкретном аспекте шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением шиповидный белок или его фрагмент происходит от ВИБ, выбранного из перечня генотипов или серотипов, включающих в себя: Массачусетс (не Beaudette), 4/91, QX, Q1, Арканзас, 30 Вариант 2 и Бразилия.

В другом конкретном аспекте шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением шиповидный белок или его фрагмент происходит от ВИБ, выбранного из перечня генотипов или серотипов, включающих в себя Массачусетс (не Beaudette) и 4/91.

В другом конкретном аспекте шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением штамм Массачусетс выбирают из перечня, включающего в себя: Н120, Н52, Испания/98/308, IBMA5-1, SD/97/01, Испания/96/334 и М41-М21883.

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

10 В другом конкретном аспекте шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением штамм QX выбирают из перечня, включающего в себя: FR-L1450T-05, FR-L1450L-05, NL-L1449T-04, NL-L1449K-04, IBV/Ck/SP/170/09, IBV/Ck/SP/79/08, IBV/Ck/SP/248/09, HBN, IBVQX, LX4, BJQ, CK/CH/LGD/03, SP2013-01470, SP2013-014171, SP2013-01478 и GB341/96.

15 В другом конкретном аспекте шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением штамм Q1 выбирают из перечня, включающего в себя: CK/CH/LDL/98I, CK/CH/LSD/08-10, J2, Q1, AR08ER22, AR08BA21, 12.185, 12.124, 12.216 и Чили-295-10.

20 В другом конкретном аспекте шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением штамм Италия 02 выбирают из перечня, включающего в себя: Испания/99/316, Италия-02, UK-L633-04, It-497-02, Испания/05/866, Испания/04/221, Испания/00/337, Испания/155/09 и Испания/03/08.

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

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

В другом конкретном аспекте шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением штамм Бразилия выбирают из перечня, включающего в себя: BR-1, BR-2, 23/2013 и IBV/Бразилия/351/1984.

5 В другом конкретном аспекте шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением шиповидный белок или его фрагмент происходит от ВИБ Массачусетса (не Beaudette), генотип или серотип QX или 4/91.

10 В другом конкретном аспекте шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением шиповидный белок или его фрагмент происходит от ВИБ генотипа или серотипа Массачусетс (не Beaudette).

В другом конкретном аспекте шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением шиповидный белок или его фрагмент происходит от ВИБ генотипа или серотипа QX.

15 В другом конкретном аспекте шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением шиповидный белок или его фрагмент происходит от ВИБ генотипа или серотипа 4/91.

В другом конкретном аспекте шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением штамм ВИБ представляет собой H52, H120, QX SP2013-01478 или CR88.

20 В другом конкретном аспекте шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением шиповидный белок ВИБ или его фрагмент состоит из или содержит аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 77 или последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,6%, 25 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности с ней.

30 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., изд., 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., изд., Humana Press, New Jersey (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinge, G., Academic Press (1987); Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York (1991); and Carillo, H., and Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988), содержание которых включено в настоящую заявку путем ссылки. Предпочтительные способы определения идентичности последовательности предназначены для обеспечения наибольшего соответствия между исследуемыми последовательностями. Способы определения идентичности последовательностей кодируются в общедоступных компьютерных программах, которые определяют идентичности с ней между заданными последовательностями. Примеры таких программ включают, но не ограничиваются такими, как пакет программ GCG (Devereux, J., *и соавт.*, Nucleic Acids Research, 12(1):387 (1984)), BLASTP, BLASTN и FASTA (Altschul, S. F. *и соавт.*, J. Molec. Biol., 215:403-410 (1990)). Программа BLASTX общедоступна из NCBI и других источников (BLAST Manual, Altschul, S. *и соавт.*, NCVI NLM NIH Bethesda, MD 20894, Altschul, S. F. *и соавт.*, J. Molec. Biol., 215:403-410 (1990), содержание которых включено в настоящую заявку путем ссылки). Эти программы оптимально выравнивают последовательности при использовании веса пробела по умолчанию для получения самого высокого уровня идентичности последовательности между заданной и эталонной последовательностями. В качестве примера, под полинуклеотидом с нуклеотидной последовательностью, имеющей по меньшей мере, например, 85%, предпочтительно 90%, даже более предпочтительно 95%

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

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

Термины «идентичность», «идентичность последовательности» или «процент идентичности» используют в 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) x 100). Предпочтительно, две последовательности имеют одинаковую длину.

Сравнение последовательностей может быть проведено по всей длине двух последовательностей, которые подвергают сравнению, или по фрагментам двух

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

5 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
10 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
15 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
20 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
25 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,
30 гомологичных молекулам белков в соответствии с изобретением. Для получения выравниваний с пробелами с целью сравнения, Gapped BLAST можно использовать как описано у Altschul и соавт. (1997) Nucleic Acids Res. 25(17): 3389-3402. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST можно применять параметры по умолчанию соответствующих программ (например,

BLASTP и BLASTN). См. домашнюю страницу Национального центра биотехнологической информации по адресу <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

В контексте 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 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 84, так что «SEQ ID NO: X» представляет собой любую из SEQ ID NO, упомянутых в настоящей заявке.

В другом конкретном аспекте шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением шиповидный белок ВИБ или его фрагмент состоит из или содержит аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO: 2 или последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности с ней.

В другом конкретном аспекте шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением шиповидный белок ВИБ или его фрагмент состоит из или содержит аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO: 3 или последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности с ней.

В другом конкретном аспекте шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением шиповидный белок ВИБ или его фрагмент состоит из или содержит аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO: 4 или последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности с ней.

В другом конкретном аспекте шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением шиповидный белок ВИБ или его фрагмент состоит из или содержит аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO: 5 или последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности с ней.

В другом конкретном аспекте шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением шиповидный белок ВИБ или его фрагмент состоит из или содержит аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO: 6 или последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности с ней.

В другом конкретном аспекте шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением шиповидный белок ВИБ или его фрагмент состоит из или содержит аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO: 7 или последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности с ней.

В другом конкретном аспекте шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением шиповидный белок ВИБ или его фрагмент состоит из или содержит аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO: 8 или 77 или последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности с ней.

В другом конкретном аспекте шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением шиповидный белок ВИБ или его фрагмент выбирают из перечня генотипов, включающего в себя: GI-2 - 27, GII-1, GIII-1, GIV-1, GV-1, GVI-1.

Valastro и соавт. 2016 (*Infection, Genetics and Evolution* 39; 349–364) описывают основанную на филогенезе систему классификации в сочетании с номенклатурой клонов для отнесения штаммов ВИБ. Определено 6 генотипов (GI - GVI), которые вместе составляют 32 различных вирусных линии.

В другом конкретном аспекте шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением шиповидный белок или его фрагмент не происходит от генотипа GI-1. Генотип GI-1 относится к генотипу/серотипу Массачусетс.

В другом конкретном аспекте шиповидного белка птичьего коронавируса или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением указанную по меньшей мере часть субъединицы S1 от птичьего коронавируса с ограниченным тропизмом клетки или ткани выбирают из группы, включающей в себя: вирус

инфекционного бронхита (IBV); коронавирус цесарок (GfCoV) и коронавирус индейки (TCoV; вирус энтерита индейки и вирус болезни синего гребня).

В другом конкретном аспекте шиповидного белка птичьего коронавируса или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением указанная по меньшей мере часть субъединицы S1 от птичьего коронавируса с ограниченным тропизмом клетки или ткани происходит от ВИБ (вирус инфекционного бронхита).

В другом конкретном аспекте шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением указанная по меньшей мере часть субъединицы S1 происходит от ВИБ, выбранного из перечня генотипов или серотипов, или штаммов, включающих 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), Италия02, JMK, LDT3, Мэн (такой как Мэн 209), Массачусетс (такой как M41, H52, H120; за исключением Beaudette), Пенсильвания (такой как Пенсильвания 1220/98, Пенсильвания Wolg/98), PL84084, Qu (такой как Qu-mv), QX (такой как GB341/96), Q1, SE 17, Вариант 2 (такой как IS/1494/06, IBV/Ck/EG/CU/4/2014, гаммаCoV/Ck/Польша/G052/2016) и 4/91 (793B, CR88).

В другом конкретном аспекте шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением указанная по меньшей мере часть субъединицы S1 происходит от ВИБ, выбранного из перечня генотипов или серотипов, или штаммов, включающих в себя Массачусетс (не Beaudette), 4/91, QX, Q1, Италия 02, Арканзас, Коннектикут, Джорджия, LDT3, PL84084, Вариант 2 и Бразилия.

В другом конкретном аспекте шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением указанная по меньшей мере часть субъединицы S1 происходит от ВИБ, выбранного из перечня генотипов или серотипов, включающих в себя Массачусетс (не Beaudette), 4/91, QX, Q1, Арканзас, Вариант 2 и Бразилия.

В другом конкретном аспекте шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением штамм Массачусетс выбирают из

перечня, включающего в себя: H120, H52, Испания/98/308, IBMA5-1, SD/97/01, Испания/96/334 и M41-M21883.

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

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

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

В другом конкретном аспекте шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением штамм Италия 02 выбирают из перечня, включающего в себя: Испания/99/316, Италия-02, UK-L633-04, It-497-02, Испания/05/866, Испания/04/221, Испания/00/337, Испания/155/09 и Испания/03/08.

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

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

В другом конкретном аспекте шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением штамм Бразилия выбирают из перечня, включающего в себя: BR-1, BR-2, 23/2013 и IBV/Бразилия/351/1984.

В другом конкретном аспекте шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением указанная по меньшей мере часть субъединицы S1 происходит от ВИБ, выбранного из перечня генотипов или серотипов, включающих в себя Массачусетс (не Beaudette), QX и 4/91.

5 В другом конкретном аспекте шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением указанная по меньшей мере часть субъединицы S1 происходит от генотипа или серотипа Массачусетс (не Beaudette) ВИБ.

10 В другом конкретном аспекте шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением указанная по меньшей мере часть субъединицы S1 происходит от генотипа или серотипа QX ВИБ.

В другом конкретном аспекте шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением указанная по меньшей мере часть субъединицы S1 происходит от генотипа или серотипа 4/91 ВИБ.

15 В другом конкретном аспекте шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением указанная по меньшей мере часть субъединицы S1 происходит от ВИБ штаммов H120, H52, QX SP2013-01478 или CR88.

20 В другом конкретном аспекте шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением указанная по меньшей мере часть субъединицы S1 происходит от ВИБ штаммов H120 или H52.

25 В другом конкретном аспекте шиповидного белка птичьего коронавируса или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением по меньшей мере часть субъединицы S1 составляет по меньшей мере 1, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 или 500 смежных аминокислот из последовательности субъединицы S1 птичьего коронавируса или ВИБ с ограниченным тропизмом клетки или ткани или последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности с ней.

30 В другом конкретном аспекте птичьего коронавируса или шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением по меньшей мере часть субъединицы S1 составляет по меньшей мере 1, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 или 500 смежных аминокислот из последовательности субъединицы S1 птичьего коронавируса или ВИБ, как

описано в настоящей заявке или последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности с ней.

5 В другом конкретном аспекте шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением указанная по меньшей мере часть субъединицы S1 от ВИБ с ограниченным тропизмом клетки или ткани имеет по меньшей мере 1, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 или 500 смежных аминокислот аминокислотной последовательности, как показано в SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 77 или последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности с ней.

10 В другом конкретном аспекте птичьего коронавируса или шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением коронавирус или ВИБ с ограниченным тропизмом клетки или ткани ограничивается инфекцией и/или репликацией в куриных яйцах с зародышем и/или первичных клетках куриных почек.

15 В другом конкретном аспекте птичьего коронавируса или шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением коронавирус или ВИБ с ограниченным тропизмом клетки или ткани не является инфицирующим и/или реплицирующимся в клетках EB66.

20 В другом конкретном аспекте птичьего коронавируса или шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением коронавирус или ВИБ с ограниченным тропизмом клетки или ткани не является инфицирующим и/или реплицирующимся в клетках PBS-12SF и/или НЕК 293Т.

Фрагмент

25 В другом конкретном аспекте птичьего коронавируса или шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением фрагмент птичьего коронавируса или шиповидный белок ВИБ имеет длину по меньшей мере 500, 750, 1000 или 1077 аминокислот.

30 В другом конкретном аспекте птичьего коронавируса или шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением фрагмент птичьего коронавируса или шиповидный белок ВИБ имеет длину по меньшей мере 1000 аминокислот.

В другом конкретном аспекте птичьего коронавируса или шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением

фрагмент птичьего коронавируса или шиповидный белок ВИБ имеет длину по меньшей мере 500, 750, 1000 или 1075 аминокислот от N-конца.

5 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

10 В другом конкретном аспекте птичьего коронавируса или шиповидного белка ВИБ или его фрагмента в соответствии с настоящим изобретением фрагмент птичьего коронавируса или шиповидный белок ВИБ представляет собой эктодомен шиповидного белка.

15 Термин «эктодомен» хорошо известен специалисту в данной области. Шиповидный белок состоит из различных функциональных частей, сигнальной последовательности, эктодомена, трансмембранного домена и эндодомена (от N-конца к С-концу). Таким образом, после расщепления сигнальной последовательности N-конец шиповидного белка начинается с эктодомена. Эктодомен шиповидного белка ВИБ имеет длину приблизительно 1075 аминокислот и отличается по длине на несколько аминокислот в зависимости от

20 штамма ВИБ. В другом конкретном аспекте птичьего коронавируса или шиповидного белка ВИБ в соответствии с настоящим изобретением цистеин в аминокислотном положении 267 или мутация в аминокислотном положении 267 на цистеин является генетически стабильным. Преимущественно экспериментальные данные показывают, что цистеин в аминокислотном

25 положении 267 или мутация в аминокислотном положении 267 на цистеин является генетически стабильным и остаются стабильным с течением времени (при пассаже). Термин «генетически стабильный» означает, что цистеин в

30 аминокислотном положении 267 или мутация в аминокислотном положении 267 на цистеин остаются стабильными с течением времени (при пассаже). Предпочтительно, указанный цистеин в аминокислотном положении 267 или мутация в аминокислотном положении 267 на цистеин все еще присутствует после по меньшей мере 3 пассажей, более предпочтительно после по меньшей

мере 6 пассажиров, еще более предпочтительно после по меньшей мере 9 пассажиров, еще более предпочтительно после по меньшей мере 12 пассажиров, наиболее предпочтительно после 15 пассажиров в культуре клеток или культуре ткани ВИБ, имеющей указанный птичий коронавирус или шиповидный белок ВИБ в соответствии с настоящим изобретением.

Нуклеотидная последовательность и плазмиды

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает нуклеотидную последовательность, кодирующую шиповидный белок или его фрагмент как описано в настоящей заявке.

10 Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает плазмиду, содержащую нуклеотидную последовательность, как описано в настоящей заявке.

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

15 Термин охватывает как одноцепочечные, так и двуцепочечные полинуклеотиды. Нуклеиновая кислота в соответствии с настоящим изобретением охватывает выделенные полинуклеотиды (т.е. выделенные из их природной среды) и генетически модифицированные формы. Кроме того, включены также химически модифицированные полинуклеотиды, включая встречающиеся в природе
20 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»
25 также конкретно включают нуклеиновые кислоты, состоящие из оснований, отличных от пяти биологически встречающихся оснований (аденина, гуанина, тимина, цитозина и урацила).

Термин «плазида» относится к цитоплазматической ДНК, которая реплицируется независимо от бактериальной хромосомы в бактериальной
30 клетке-хозяине. В конкретном аспекте настоящего изобретения термин «плазида», и/или «переносящая плазида», и/или «донорская плазида» относится к элементу технологии рекомбинантной ДНК, пригодной для конструирования, например, рекомбинантные вирусы или кассета экспрессии для вставки в вирусный вектор. В другом конкретном аспекте термин

«плаزمида» может быть использован для определения плазмиды, пригодной для целей вакцинации ДНК.

Клетка

5 Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает клетку, содержащую плазмиду, как описано в настоящей заявке. Клетка может быть эукариотической или прокариотической.

Вирусная частица, птичий коронавирус и ВИБ

10 Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает вирусную частицу, содержащую шиповидный белок или его фрагмент, как описано в настоящей заявке.

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает птичий коронавирус, содержащий шиповидный белок или его фрагмент, как описано в настоящей заявке.

15 Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает ВИБ (вирус инфекционного бронхита), содержащий шиповидный белок как описано в настоящей заявке.

В другом конкретном аспекте птичьего коронавируса или ВИБ в соответствии с настоящим изобретением птичий коронавирус или ВИБ является аттенуированным.

20 Термин «аттенуированный» относится к патогену, имеющему пониженную вирулентность по сравнению с изолятом дикого типа. В настоящем изобретении аттенуированный ВИБ представляет собой вирус, вирулентность которого снижена, так что он не вызывает клинических признаков инфекции ВИБ, но способен вызывать иммунный ответ у целевого животного, а также может означать, что клинические признаки уменьшаются по частоте или тяжести у животных, инфицированных аттенуированным ВИБ по сравнению с «контрольной группой» животных, инфицированных неаттенуированным ВИБ и не получавших аттенуированный вирус. В этом контексте термин «понижить/пониженный» означает уменьшение по меньшей мере на 10%,
25 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 предпочтительно 95% и наиболее предпочтительно на 100% по сравнению с контрольной группой, инфицированной неаттенуированным ВИБ, как
30

определено выше. Таким образом, аттенуированный штамм ВИБ является штаммом, который подходит для включения в иммуногенную композицию, содержащую модифицированный живой ВИБ.

5 В другом конкретном аспекте птичьего коронавируса или ВИБ в соответствии с настоящим изобретением птичий коронавирус или ВИБ является инактивированным.

10 В целях настоящего изобретения можно использовать любой стандартный способ инактивации. Таким образом, инактивацию можно проводить с помощью химических и/или физических обработок, которые известны специалисту в данной области. Предпочтительные способы инактивации включают добавление циклизованного бинарного этиленмина (ВЕI), включая добавление раствора гидробромида 2-бромэтиленамина (ВЕА), который был циклизован до бинарного этиленмина (ВЕI). Другие предпочтительные химические средства инактивации содержат, но не ограничиваются ими тритон Х-100, дезоксихолат натрия, 15 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.

20 Предпочтительно условия инактивации формалином включают концентрацию формалина между приблизительно 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 25 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.

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

Инактивированный ВИБ в соответствии с изобретением может быть включен в липосомы с использованием известной технологии, такой как

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

В другом конкретном аспекте птичьего коронавируса или ВИБ в соответствии с настоящим изобретением птичий коронавирус или ВИБ является генно-инженерным.

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

В другом конкретном аспекте птичьего коронавируса или ВИБ в соответствии с настоящим изобретением птичий коронавирус или ВИБ является рекомбинантным.

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 птичьего коронавируса или ВИБ в соответствии с настоящим изобретением птичий коронавирус или ВИБ является химерным.

5 Термин «химерный» относится к птичьему коронавирусу или ВИБ, содержащему одну или несколько нуклеотидных последовательностей от другого коронавируса или ВИБ. Предпочтительно, термин относится к ВИБ, содержащему одну или несколько нуклеотидных последовательностей от другого штамма ВИБ.

10 В другом конкретном аспекте ВИБ в соответствии с настоящим изобретением ВИБ происходит от ВИБ с генотипом или серотипом, или штаммом, 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 02, JMK, LDT3, Мэн (такой как Мэн 209), Массачусетс (M41, H52, H120, Beaudette), Пенсильвания (такой как Пенсильвания 1220/98, Пенсильвания Wolg/98), PL84084, Qu (такой как Qu-mv), QX (такой как GB341/96), Q1, SE 17, 20 Вариант 2 (такой как IS/1494/06, IBV/Ck/EG/CU/4/2014, гаммаCoV/Ck/Польша/G052/2016) и 4/91 (793B, CR88).

В другом конкретном аспекте ВИБ в соответствии с настоящим изобретением ВИБ выбирают из перечня генотипов или серотипов, или штаммов, включающих в себя: Массачусетс, 4/91, QX, Q1, Италия 02, Арканзас, 25 Коннектикут, Джорджия, LDT3, PL84084, Вариант 2 и Бразилия.

В другом конкретном аспекте ВИБ в соответствии с настоящим изобретением ВИБ выбирают из перечня генотипов или серотипов, включающих в себя: Массачусетс, 4/91, QX, Q1, Арканзас, Вариант 2 и Бразилия.

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

В другом конкретном аспекте ВИБ в соответствии с настоящим изобретением штамм 4/91 выбирают из перечня, включающего в себя:

Испания/98/328, Испания/92/35, IR-3654-VM, FR-CR88061-88, FR-85131-85, UK-1233-95, UK/3/91, Испания/00/336, UK/7/91, 4/91-патогенный, 4/91-аттенуированный и IB4-91.

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

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

15 В другом конкретном аспекте ВИБ в соответствии с настоящим изобретением штамм Италия 02 выбирают из перечня, включающего в себя: Испания/99/316, Италия-02, UK-L633-04, It-497-02, Испания/05/866, Испания/04/221, Испания/00/337, Испания/155/09 и Испания/03/08.

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

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

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

30 В другом конкретном аспекте ВИБ в соответствии с настоящим изобретением шиповидный белок или его фрагмент происходит от ВИБ Массачусетса или генотипа или серотипа 4/91.

В другом конкретном аспекте ВИБ в соответствии с настоящим изобретением шиповидный белок или его фрагмент происходит от ВИБ генотипа или серотипа Массачусетса.

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

5 В другом конкретном аспекте ВИБ в соответствии с настоящим изобретением штамм ВИБ представляет собой H120, H52 или CR88.

В другом конкретном аспекте ВИБ в соответствии с настоящим изобретением штамм ВИБ представляет собой H120 или H52.

10 В другом конкретном аспекте ВИБ в соответствии с настоящим изобретением ВИБ имеет шиповидный белок ВИБ или его фрагмент, состоящий из или содержащий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 77 или последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности с ней.

15 В другом конкретном аспекте ВИБ в соответствии с настоящим изобретением ВИБ имеет расширенный клеточный или тканевый тропизм.

В другом конкретном аспекте ВИБ в соответствии с настоящим изобретением ВИБ инфицирует и/или реплицируется в по меньшей мере одной клеточной линии или клетке, как описано в настоящей заявке. Предпочтительно, ВИБ инфицирует и/или реплицируется в по меньшей мере одной клеточной
20 линии, как описано в настоящей заявке.

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает клетку, содержащую:

- вирусную частицу, как описано в настоящей заявке, или
- птичий коронавирус или ВИБ как описано в настоящей заявке.

25 В другом конкретном аспекте клетки в соответствии с настоящим изобретением клетка представляет собой клеточную линию или клетку, выбранную из перечня, включающего в себя: первичные клетки куриного эмбриона, клеточную линию фибробластов куриного эмбриона, клеточную линию эмбриональных стволовых клеток утки, клеточную линию почки эмбриона человека, клеточную линию почки детеныша хомяка, клеточную
30 линию почки африканской зеленой обезьяны, клеточную линию почки кролика, клеточную линию почки собаки, клеточную линию печени курицы, клеточную линию почки крупного рогатого скота, клеточную линию почки свиньи и клеточную линию насекомых.

В другом конкретном аспекте клетки в соответствии с настоящим изобретением клетка представляет собой клеточную линию, выбранную из перечня, включающего в себя: DF-1 (Douglas Foster), EB66 (клеточную линию эмбриональных стволовых клеток утки), PBS-12, PBS-12SF (без сыворотки PBS-12), ВНК21 (почка детеныша хомяка), НЕК 293Т (эмбриональная почка человека), Vero (Verda Reno), MA104, RK13 (почки кролика), LMH (гепатома самцов леггорна), MDCK (собачья почка Madin-Darby), MDBK (бычья почка Madin-Darby), PK15 (свиная почка), PK2A (свиная почка), SF9, SF21 и SF+ (*Spodoptera frugiperda*).

10 В другом конкретном аспекте клетки в соответствии с настоящим изобретением клетка представляет собой клеточную линию, выбранную из перечня, включающего в себя: DF-1, EB66, PBS-12, PBS-12SF, ВНК, НЕК 293Т, Vero, MA104 и RK13.

15 В другом конкретном аспекте клетки в соответствии с настоящим изобретением первичная клетка куриного эмбриона представляет собой фибробласт или клетку, полученную из ткани печени или легкого.

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает иммуногенную композицию, содержащую:

- 20 - шиповидный белок, как описано в настоящей заявке, или
- вирусную частицу, как описано в настоящей заявке, или
- птичий коронавирус или ВИБ, как описано в настоящей заявке.

Таким образом, настоящее изобретение также обеспечивает иммуногенную композицию, содержащую птичий коронавирус или ВИБ, содержащий птичий коронавирус или шиповидный белок ВИБ или его фрагмент, где по меньшей мере часть субъединицы S1 происходит от птичьего коронавируса или ВИБ с ограниченным тропизмом клетки или ткани, и где в аминокислотном положении 267 находится цистеин. Кроме того, настоящее изобретение также обеспечивает иммуногенную композицию, содержащую птичий коронавирус или ВИБ, содержащий рекомбинантный птичий коронавирус или шиповидный белок ВИБ или его фрагмент, содержащий мутацию в положении 267 аминокислоты на цистеин. Кроме того, аминокислотная последовательность SEQ ID NO:1 используют для определения нумерации положения в шиповидном белке. Предпочтительно, аминокислотная последовательность шиповидного белка выровнена к аминокислотной последовательности SEQ ID NO:1

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает вакцину, содержащую:

- шиповидный белок, как описано в настоящей заявке, или
- вирусную частицу, как описано в настоящей заявке, или
- коронавирус или ВИБ, как описано в настоящей заявке.

5 Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает модифицированную живую вакцину с расширенным тропизмом клетки или ткани, содержащую:

- шиповидный белок, как описано в настоящей заявке, или
- вирусную частицу, как описано в настоящей заявке, или
- коронавирус или ВИБ, как описано в настоящей заявке.

10 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
15 изобретением. Предпочтительно, иммуногенная композиция индуцирует иммунный ответ и, более предпочтительно, обеспечивает защитный иммунитет против одного или нескольких клинических признаков инфицирования посредством ВИБ. Хозяин описывается как «субъект». Предпочтительно, любой из хозяев или субъектов, описанных или упомянутых в данной заявке, был
20 птицей или домашней птицей.

Обычно «иммунологический ответ» включает, но не ограничивается одним или несколькими из следующих эффектов: продукцию или активацию антител, В-клеток, хелперных Т-клеток, супрессорных Т-клеток и/или цитотоксических Т-клеток и/или гамма-дельта Т-клеток, специфически направленных на антиген
25 или антигены, включенные в иммуногенную композицию в соответствии с изобретением. Предпочтительно, чтобы хозяин проявлял либо защитный иммунологический ответ, либо терапевтический ответ.

«Защитный иммунологический ответ» или «защитный иммунитет» будет демонстрироваться либо уменьшением, либо отсутствием клинических
30 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, иммуногенная композиция описывается как «вакцина».

5 Термины «модифицированный живой» и «аттенуированный» используют в настоящей заявке взаимозаменяемо.

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

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

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

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

Предпочтительно иммуногенная композиция дополнительно содержит стабилизатор сахарозы и желатина.

25 Предпочтительно фармацевтически приемлемым носителем является хитозан.

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–
30 258) продемонстрировали, что хитозан усиливает клеточный иммунный ответ живой вакцины против болезни Ньюкасла и усиливает ее защитный эффект. Кроме того, Wang *и соавт.*, 2012 (*Arch Virol* (2012) 157:1451–1461) показали результаты, раскрывающие потенциал хитозана в качестве адъюванта для использования в живой аттенуированной вакцине против гриппа.

Предпочтительно иммуногенная композиция может дополнительно включать в себя 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 (Pharmеигора 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 полигидроксилорированным 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 Carborol; (BF Goodrich, Огайо, США). Они являются перекрестно сшитыми с аллилсахарозой или аллилпентаэритритолом. Среди них можно упомянуть Carborol 974P, 934P и 971P. Наиболее предпочтительным является применение Carborol 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 адъюванта, в который будет включена сама иммуногенная, иммунологическая или вакцинная композиция.

Кроме того, пригодные адъюванты охватывают, но не ограничиваются ними, адъювантную систему RIBI (Ribi Inc.), блок-сополимер (CytRx, Atlanta GA), SAF-M (Chiron, Emeryville CA), монофосфорил липид А, липидно-аминный адъювант 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 адъювант 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 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 или вакцины в соответствии с настоящим изобретением иммуногенная композиция или вакцина эффективна при лечении и/или профилактике клинических признаков, вызванных посредством ВИБ у нуждающегося субъекта. Термины «лечение и/или профилактика», «клинические признаки» и «нуждающийся» были определены в других местах.

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

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.

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

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

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

Способ производства, культивирования и модификации

10 Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает способ изменения клеточного или тканевого тропизма птичьего коронавируса, включающий в себя применение шиповидного белка птичьего коронавируса или его фрагмента как описано в настоящей заявке.

15 Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает способ расширения клеточного или тканевого тропизма птичьего коронавируса, включающий в себя применение шиповидного белка птичьего коронавируса или его фрагмента как описано в настоящей заявке.

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает способ производства или изготовления птичьего коронавируса с расширенным тропизмом клетки или ткани, включающий в себя применение шиповидного белка птичьего коронавируса или его фрагмента как описано в настоящей заявке.

20 Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает способ культивирования птичьего коронавируса в культуре клеток или ткани, включающий в себя применение шиповидного белка птичьего коронавируса или его фрагмента как описано в настоящей заявке.

25 Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает способ модификации птичьего коронавируса, включающий в себя модификацию аминокислотного положения 267 в шиповидном белке указанного птичьего коронавируса.

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает способ мутации аминокислотного положения 267 в шиповидном белке птичьего коронавируса, включающий в себя:

- 30
- а) обеспечение нуклеотидной или белковой последовательности шиповидного белка птичьего коронавируса,
 - б) определение положения 267 в шиповидном белке путем выравнивания с эталонной последовательностью,
 - в) мутацию положения 267 шиповидного белка из стадии б) на цистеин,

г) получение мутированного шиповидного белка из стадии в).

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает способ мутации аминокислотного положения 267 в шиповидном белке птичьего коронавируса, содержащий:

- 5 а) обеспечение птичьего коронавируса,
 б) определение положения 267 в шиповидном белке путем выравнивания с эталонной последовательностью,
 в) мутацию положения 267 шиповидного белка из стадии б) на цистеин,
 г) получение мутированного шиповидного белка из стадии в).

10 Термин «получение» включает в себя сбор, выделение, очистку и/или составление (например, завершение, инактивацию и/или смешивание) указанного шиповидного белка или его фрагмента. Термин «сбор» относится к сбору или выделению указанного птичьего коронавируса или ВИБ с модифицированным шиповидным белком из трансфецированных или
15 инфицированных клеток или клеточной линии. Можно использовать любой обычный метод, известный в данной области, например любой метод разделения. Хорошо известные в данной области методы включают центрифугирование или фильтрацию, например использование полупроницаемой мембраны с определенным размером пор. Термин
20 «выделение» включает в себя стадию выделения указанного птичьего коронавируса или ВИБ с модифицированным шиповидным белком. Способы выделения из трансфецированных или инфицированных клеток или клеточной линии известны специалисту в данной области. Эти способы включают физические и/или химические способы, включая, помимо прочего, циклы
25 замораживания-оттаивания, обработку ультразвуком и тому подобное. Способы «очистки» указанного птичьего коронавируса или ВИБ с модифицированным шиповидным белком из изолята известны специалисту в данной области, например, способами, описанными в разделе «Способы очистки белков - практический подход» (E.L.V. Harris and S. Angel, изд., IRL Press at Oxford
30 University Press). Эти способы включают в себя, но не ограничиваются ими, разделение центрифугированием и/или фильтрацией, осаждение, эксклюзионную хроматографию (гель-фильтрационную) хроматографию, аффинную хроматографию, металлохелатную хроматографию, ионообменную хроматографию, ковалентную хроматографию, хроматографию с гидрофобным

взаимодействием и 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 5 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 в себя дополнительные стадии окончательной обработки как часть конечного процесса приготовления, такие как добавление буфера, этапы инактивации, нейтрализации и т.п. 10

В другом конкретном аспекте способа в соответствии с настоящим изобретением шиповидный белок или его фрагмент имеет в аминокислотном положении 267 цистеин.

В другом конкретном аспекте способа в соответствии с настоящим изобретением цистеин в аминокислотном положении 267 вводится мутацией. 15

В другом конкретном аспекте способа в соответствии с настоящим изобретением мутация представляет собой аминокислотную замену, делецию или вставку.

В другом конкретном аспекте способа в соответствии с настоящим изобретением фенилаланин или лейцин модифицирован или мутирован на цистеин в аминокислотном положении 267. 20

В другом конкретном аспекте способа в соответствии с настоящим изобретением птичий коронавирус представляет собой ВИБ, как описано в настоящей заявке.

Таким образом, настоящее изобретение обеспечивает способ изменения клеточного или тканевого тропизма ВИБ, включающий в себя применение шиповидного белка птичьего коронавируса или его фрагмента как описано в настоящей заявке. 25

Таким образом, настоящее изобретение обеспечивает способ расширения клеточного или тканевого тропизма ВИБ, включающий в себя применение шиповидного белка ВИБ или его фрагмента, как описано в настоящей заявке. 30

Таким образом, настоящее изобретение обеспечивает способ производства или изготовления ВИБ с расширенным тропизмом клетки или ткани,

включающий в себя применение шиповидного белка ВИБ или его фрагмента как описано в настоящей заявке.

Таким образом, настоящее изобретение обеспечивает способ культивирования ВИБ в культуре клеток или ткани, включающий применение шиповидного белка ВИБ или его фрагмента как описано в настоящей заявке.

Таким образом, настоящее изобретение обеспечивает способ модификации ВИБ, включающий в себя модификацию аминокислотного положения 267 в шиповидном белке указанного ВИБ.

Таким образом, настоящее изобретение обеспечивает способ мутации аминокислотного положения 267 в шиповидном белке ВИБ, включающий в себя:

а) обеспечение нуклеотидной или белковой последовательности шиповидного белка ВИБ,

б) определение положения 267 в шиповидном белке путем выравнивания с эталонной последовательностью,

в) мутацию положения 267 шиповидного белка из стадии б) на цистеин,

г) получение мутированного шиповидного белка из стадии в).

Таким образом, настоящее изобретение обеспечивает способ мутации аминокислотного положения 267 в шиповидном белке ВИБ, включающий в себя:

а) обеспечение ВИБ,

б) определение положения 267 в шиповидном белке путем выравнивания с эталонной последовательностью,

в) мутацию положения 267 шиповидного белка из стадии б) на цистеин,

г) получение мутированного ВИБ из стадии в).

В другом конкретном аспекте способа в соответствии с настоящим изобретением шиповидный белок коронавируса представляет собой шиповидный белок ВИБ (вируса инфекционного бронхита), как описано в настоящей заявке.

В другом конкретном аспекте способа в соответствии с настоящим изобретением цистеин в аминокислотном положении 267 или указанная мутация в аминокислотном положении 267 на цистеин приводит к расширенному клеточному или тканевому тропизму.

В другом конкретном аспекте способа в соответствии с настоящим изобретением птичий коронавирус или ВИБ инфицирует и/или реплицируется в клеточной линии или клетке, как описано в настоящей заявке.

В другом конкретном аспекте способа в соответствии с настоящим изобретением нумерация аминокислотного положения 267 произведена, как описано в настоящей заявке.

Наборы

5 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 блистерная упаковка. К упаковке или дозирующему устройству могут быть
10 приложены инструкции по применению, предпочтительно для введения субъектам, особенно домашней птице. С такой емкостью(ями) может быть связано уведомление в форме, предписанной государственным органом, регулирующим производство, использование или продажу фармацевтических, или биологических продуктов, при этом уведомление отражает одобрение
15 органом производства, использования или продажи для введения.

Настоящее изобретение обеспечивает набор, содержащий вирусную частицу, птичий коронавирус, ВИБ, иммуногенную композицию или вакцину, как описано в настоящей заявке.

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

В одном конкретном аспекте набора в соответствии с настоящим изобретением набор дополнительно содержит дозирующее устройство, способное вводить вакцину указанному животному.
25

Способ лечения

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

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

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

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

Предпочтительно в этом контексте рассматривается стая субъектов, у которых обычно, то есть без иммунизации, развиваются клинические признаки, обычно вызываемые или связанные с инфицированием птичьим коронавирусом или ВИБ. Специалист в данной области техники без особых усилий может
20 определить, эффективно ли иммунизированы животные в стае. иммунизация должна быть эффективной, если клинические признаки по меньшей мере у 33%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере в
25 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
30 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 птичьим коронавирусом или ВИБ.

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

Как показано в Примерах, иммуногенная композиция или вакцина, представленные в настоящей заявке, оказались эффективными при лечении или
10 предупреждении клинических признаков, вызванных посредством ВИБ у субъекта. Таким образом, экспериментальные данные показывают, что модификация аминокислоты в аминокислотном положении 267 на цистеин не оказывает влияния на эффективность вакцины.

Термин «лечение или профилактика» относится к снижению
15 заболеваемости конкретной инфекцией ВИБ в стае или снижению тяжести клинических признаков, вызванных или связанных с конкретной инфекцией ВИБ. Таким образом, термин «лечение или профилактика» также относится к уменьшению количества субъектов в стае, инфицированных конкретным ВИБ (= уменьшение заболеваемости конкретной инфекцией ВИБ), или к снижению
20 тяжести клинических признаков, обычно связанных с или вызванных посредством инфицирования ВИБ или снижению распространения вирусов после инфицирования конкретным ВИБ или предотвращения или уменьшения яйценоскости у кур-несушек после инфицирования конкретным ВИБ в группе субъектов, которые получили эффективное количество иммуногенной
25 композиции, представленной 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 посредством ВИБ. Термин «профилактика» относится к введению субъекту до любого заражения такого субъекта посредством ВИБ или по меньшей мере когда такой субъект или ни один из субъектов в группе субъектов не проявляет каких-либо клинических признаков, вызванных или связанных с инфицированием таким ВИБ. Термины «профилактика» и «предотвращение» взаимозаменяемы в этой заявке.

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

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

Термин «клинические признаки», используемый в настоящей заявке 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 яйценоскость, взъерошенность перьев, депрессию, снижение скорости роста и снижение аппетита. Признаки респираторного дистресса охватывают респираторные признаки, включая удушье, кашель, чихание, хрипы в трахее, выделения из носа и глаз, поражения трахеи и цилиостаз в трахее. Признаки нефрита включают поражения почек и водянистую диарею. Признаки аномальной яйценоскости включают снижение яйценоскости, яйца меньшего размера, плохая скорлупа, снижение качества

внутреннего яйца, яйца с тонким белком и цилиостаз в яйцевом. Тем не менее, клинические признаки также включают, но не ограничиваются ими, клинические признаки, которые непосредственно наблюдаются у живого животного. Примеры клинических признаков, которые непосредственно наблюдаются у живого животного, включают выделения из носа и глаз, кашель, затрудненное дыхание, чихание, хрипы в трахее, взъерошенные перья, конъюнктивит, потерю массы, снижение скорости роста, снижение аппетита, обезвоживание, водянистую диарею, хромоту, вялость, истощение и худосочность и тому подобное.

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

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

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 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 посредством 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.

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает иммуногенную композицию или вакцину как описано в настоящей заявке для применения в способе иммунизации субъекта, способ включает в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества указанной иммуногенной композиции или вакцины.

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает иммуногенную композицию или вакцину как описано в настоящей заявке для применения в способе лечения или предотвращения клинических признаков, вызванных посредством ВИБ, у нуждающегося субъекта, способ включает в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества указанной иммуногенной композиции или вакцины.

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает иммуногенную композицию или вакцину как описано в настоящей заявке для применения в способе уменьшения цилиостаза у нуждающегося субъекта, по сравнению с субъектом неиммунизированной контрольной группы того же вида, способ включает в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества указанной иммуногенной композиции или вакцины.

В одном конкретном аспекте способа или применения в соответствии с настоящим изобретением указанный субъект представляет собой птицу.

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

5 В одном конкретном аспекте способа или применения в соответствии с настоящим изобретением указанный субъект представляет собой домашнюю птицу.

10 Понятие «домашняя птица» хорошо известно специалисту в данной области. Понятие «домашняя птица» включает в себя 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.

15 В одном конкретном аспекте способа или применения в соответствии с настоящим изобретением указанный субъект выбирают из перечня, включающего в себя курицу, индейку, перепела или фазана.

В одном конкретном аспекте способа или применения в соответствии с настоящим изобретением указанный субъект представляет собой курицу.

20 В одном конкретном аспекте способа или применения в соответствии с настоящим изобретением иммуногенную композицию или вакцину вводят однократно.

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.

25 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
30 предпочтительно, чтобы разовая доза вакцин в виде глазных капель имела общий объем от примерно 30 мкл до 50 мкл, при этом предпочтительна разовая доза в 30 мкл, 35 мкл, 40 мкл, 45 мкл или 50 мкл.

Вакцины-спреи могут содержать дозу в объеме от 25 до 1000 мкл для домашней птицы в возрасте одного дня. Предпочтительно разовая доза для

вакцин-спреев имеет общий объем от приблизительно 50 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 от 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.

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 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.

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 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 конкретном аспекте способа или применения в соответствии с настоящим изобретением иммуногенную композицию или вакцину вводят в двух или более дозах.

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

5 В предпочтительном аспекте схемы двукратного введения как первую, так и вторую дозы иммуногенной композиции вводят в одинаковом количестве. Предпочтительно каждая доза находится в предпочтительных количествах, указанных выше. В дополнение к первому и второму режимам дозирования альтернативный вариант осуществления включает дополнительные последующие дозы. Например, в этих аспектах может быть введена третья, 10 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 15 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 20 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.

25 В случае применения вакцинации *in ovo* предпочтительно первое введение проводят, когда эмбрионы имеют возраст 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.

30 В одном конкретном аспекте способа или применения в соответствии с настоящим изобретением указанную иммуногенную композицию или вакцину 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, 5 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 10 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 15 глазных капель.

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

Более предпочтительно использовать способы массового применения, включая вакцинацию с использованием питьевой воды и аэрозольного 20 распыления. Также предпочтительно использование вакцин в качестве эмбриональных вакцин (так называемые вакцины *in ovo*), как дополнительно описано ниже.

Например, бройлеров можно вакцинировать в возрасте одного дня или 1-3 недель, особенно бройлеров с высоким уровнем MDA. Первоначально поголовье 25 несушек или птицу репродуктивного направления можно вакцинировать в возрасте 1-10 дней и усиленно вакцинировать в возрасте 7-12 или 16-18 недель.

Введение *in ovo*

Как указано выше, настоящее изобретение также обеспечивает вакцину против ВИБ, которую можно безопасно вводить путем «*in ovo*» и в то же время 30 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* заключается во введении вакцины птичьему эмбриону, находящемуся в яйце (обзор вакцинации *in ovo* см.: Ricks и соавт., *Advances in Vet. Med.* 495-515,

1999). Вакцину можно вводить в любую пригодную часть яйца (например, аллантоисную жидкость, желточный мешок, амнион, воздушную клетку или в эмбрион), как описано в известном уровне техники (Sharma; Am. J. Vet. Res. 45 1619-1623,1984). Предпочтительно вакцину вводят под оболочечную (воздушную полость) мембрану и хориоаллантоисную мембрану.

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

Как правило, обычные вакцины для вакцинации домашней птицы после вылупления не могут быть использованы для вакцинации *in ovo*, поскольку эмбрионы на поздних стадиях очень чувствительны к инфицированию большинством исследованных вакцинных вирусов. Тем не менее, в международной патентной заявке WO 01/64244 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 конкретном аспекте способа или применения в соответствии с настоящим изобретением указанную иммуногенную композицию или вакцину 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 $10 \log_{10} \text{EID}_{50}$ (доза для заражения яйца)₅₀/мл на дозу, предпочтительно приблизительно от 2 до приблизительно $8 \log_{10} \text{EID}_{50}$ на дозу, предпочтительно в количестве приблизительно от 2 до приблизительно $7 \log_{10} \text{EID}_{50}$ на дозу, более предпочтительно в количестве приблизительно от 2 до приблизительно $6 \log_{10} \text{EID}_{50}$ на дозу, еще более предпочтительно в количестве приблизительно от 2 до приблизительно $5 \log_{10} \text{EID}_{50}$ на дозу, еще более предпочтительно в количестве приблизительно от 2 до приблизительно $4 \log_{10} \text{EID}_{50}$ на дозу, наиболее предпочтительно в количестве приблизительно от 2 до приблизительно $3 \log_{10} \text{EID}_{50}$ 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 конкретном аспекте способа или применения в соответствии с настоящим изобретением иммуногенная композиция или вакцина содержит от 1 до $10 \log_{10} \text{EID}_{50}$ на дозу ВИБ.

В одном конкретном аспекте способа или применения в соответствии с настоящим изобретением иммуногенная композиция или вакцина содержит от 2 до $5 \log_{10} \text{EID}_{50}$ на дозу ВИБ.

В одном конкретном аспекте способа или применения в соответствии с настоящим изобретением иммуногенная композиция или вакцина содержит от 2 до $4 \log_{10} \text{EID}_{50}$ на дозу ВИБ. В одном конкретном аспекте способа или применения в соответствии с настоящим изобретением иммуногенную композицию или вакцину вводят субъектам в течение первой недели жизни, в течение первых трех дней жизни, в течение первых двух дней жизни или в течение первого дня жизни.

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

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

В одном конкретном аспекте способа или применения в соответствии с настоящим изобретением иммуногенную композицию или вакцину вводят субъектам в течение первого дня жизни. Как показано в Примерах иммуногенная композиция, предложенная в настоящей заявке, оказалась безопасной и эффективной при введении домашней птице в возрасте одного дня.

В одном конкретном аспекте способа или применения в соответствии с настоящим изобретением 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 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.

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 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.

5 Термин «вирусная нагрузка» хорошо известен специалисту в данной области. В настоящей заявке термин «вирусная нагрузка» используют взаимозаменяемо с термином «титр вируса». Вирусная нагрузка или титр вируса являются мерой тяжести активной вирусной инфекции и могут быть определены методами, известными специалисту в данной области. Определение может быть основано на обнаружении вирусных белков, например, на связывании антител с вирусными белками и дальнейшем обнаружении или, альтернативно, на обнаружении вирусной РНК методами амплификации, такими как ОТ-ПЦР. 10 Мониторинг вирусной РНК, ассоциированной с вирионом, в плазме с помощью методов амплификации нуклеиновых кислот является широко используемым параметром для оценки статуса и прогрессирования ретровирусного заболевания, а также для оценки эффективности профилактических и терапевтических вмешательств. Например, вирусная нагрузка или титр вируса 15 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. 20 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. 25

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.

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

В одном конкретном аспекте способа или применения в соответствии с настоящим изобретением лечение или профилактика приводит к

предупреждению или сокращению цилиостаза по сравнению с субъектами необработанной контрольной группы того же вида.

5 В одном конкретном аспекте способа или применения в соответствии с настоящим изобретением лечение или профилактика приводит к предупреждению или сокращению поражений почек по сравнению с субъектами необработанной контрольной группы того же вида.

10 В одном конкретном аспекте способа или применения в соответствии с настоящим изобретением 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 предложены вирусная частица, птичий коронавирус, ВИБ, иммуногенная композиция или вакцина как описано в настоящей заявке для терапевтического применения.

15 Кроме того, в настоящем изобретении предложены вирусная частица, птичий коронавирус, ВИБ, иммуногенная композиция или вакцина как описано в настоящей заявке для применения в качестве иммуногена или вакцины.

Кроме того, в настоящем изобретении предложены вирусная частица, птичий коронавирус, ВИБ, иммуногенная композиция или вакцина как описано в настоящей заявке для применения в качестве лекарственного средства.

20 Помимо этого, в настоящем изобретении предусмотрено применение вирусной частицы, птичьего коронавируса, ВИБ, иммуногенной композиции или вакцины как описано в настоящей заявке для изготовления лекарственного средства.

25 Помимо этого, в настоящем изобретении предусмотрено применение вирусной частицы, птичьего коронавируса, ВИБ, иммуногенной композиции или вакцины как описано в настоящей заявке для лечения и/или профилактики инфекций ВИБ у субъекта.

ПУНКТЫ

30 Нижеследующие пункты также описаны в настоящей заявке:

1. Шиповидный белок птичьего коронавируса или его фрагмент, где по меньшей мере часть субъединицы S1 происходит от птичьего коронавируса с ограниченным тропизмом клетки или ткани, и где в аминокислотном положении 267 находится цистеин.

2. Рекомбинантный шиповидный белок птичьего коронавируса или его фрагмент, содержащий мутацию в положении 267 аминокислоты на цистеин.

3. Шиповидный белок ВИБ или его фрагмент, где по меньшей мере часть субъединицы S1 происходит от ВИБ с ограниченным тропизмом клетки или
5 ткани, и где в аминокислотном положении 267 находится цистеин.

4. Рекомбинантный шиповидный белок ВИБ или его фрагмент, содержащий мутацию в положении 267 аминокислоты на цистеин.

Мутация 267

5. Птичий коронавирус или шиповидный белок ВИБ или его фрагмент по п.
10 1 или 3, где цистеин в аминокислотном положении 267 вводится мутацией.

6. Птичий коронавирус или шиповидный белок ВИБ или его фрагмент по п.
2, 4 или 5, где мутация представляет собой аминокислотную замену, делецию
или вставку.

7. Птичий коронавирус или шиповидный белок ВИБ или его фрагмент по
15 одному из пп. 2 и 4 - 6, где гидрофобная аминокислота в аминокислотном
положении 267 мутирует на цистеин; или фенилаланин или лейцин в
аминокислотном положении 267 мутирует на цистеин.

Расширенный клеточный или тканевый тропизм

8. Птичий коронавирус или шиповидный белок ВИБ или его фрагмент по
20 одному из пп. 1 - 7, где цистеин в аминокислотном положении 267 или указанная
мутация в аминокислотном положении 267 на цистеин приводит к
расширенному клеточному или тканевому тропизму птичьего коронавируса или
IBV.

9. Птичий коронавирус или шиповидный белок ВИБ или его фрагмент по
25 одному из пп. 1 - 8, где птичий коронавирус или ВИБ инфицирует и/или
реплицируется по меньшей мере в одну клеточную линию или клетку,
выбранную из перечня, включающего в себя: первичные клетки куриного
эмбриона из легких или печени или первичные фибробласты курицы, клеточную
линию фибробластов куриного эмбриона, клеточную линию эмбриональных
30 стволовых клеток утки, клеточную линию почки эмбриона человека, клеточную
линию почки детеныша хомяка, клеточную линию почки африканской зеленой
обезьяны, клеточную линию почки кролика, клеточную линию почки собаки,
клеточную линию печени курицы, клеточную линию почки крупного рогатого
скота, клеточную линию почки свиньи и клеточную линию насекомых.

10. Птичий коронавирус или шиповидный белок ВИБ или его фрагмент по одному из пп. 1 - 9, где птичий коронавирус или ВИБ инфицирует и/или реплицируется в по меньшей мере одной клеточной линии, выбранной из перечня, включающего в себя: DF-1 (Douglas Foster), EB66 (линия эмбриональных стволовых клеток утки), PBS-12, PBS-12SF (без сыворотки PBS-12), ВНК21 (почка детеныша хомячка), НЕК 293Т (эмбриональная почка человека), Vero (Verda Reno), MA104, RK13 (почка кролика), LMH (гепатома самцов леггорна), MDCK (собачья почка Madin-Darby), MDBK (бычья почка Madin-Darby), PK15 (свиная почка), PK2A (свиная почка), SF9, SF21 и SF+ (Spodoptera frugiperda).

11. Птичий коронавирус или шиповидный белок ВИБ или его фрагмент по одному из пп. 1 - 10, где птичий коронавирус или ВИБ инфицирует и/или реплицируется в по меньшей мере одной клеточной линии, выбранной из перечня, включающего в себя: DF-1, EB66, PBS-12, PBS-12SF, ВНК, НЕК 293Т, Vero, MA104 и RK13.

Нумерация аминокислотного положения 267

12. Птичий коронавирус или шиповидный белок ВИБ или его фрагмент по одному из пп. 1 - 11, где нумерация аминокислотного положения 267 относится к аминокислотному положению 267 в шиповидном белке ВИБ Н52, ВИБ Н120 или М41.

13. Птичий коронавирус или шиповидный белок ВИБ или его фрагмент по одному из пп. 1 - 12, где нумерация аминокислотного положения 267 относится к аминокислотному положению 267 в шиповидном белке ВИБ Н52.

14. Птичий коронавирус или шиповидный белок ВИБ или его фрагмент по одному из пп. 1 - 12, где нумерация аминокислотного положения 267 относится к аминокислотному положению 267 в шиповидном белке как примерно приведено в SEQ ID NO:1.

15. Птичий коронавирус или шиповидный белок ВИБ или его фрагмент по одному из пп. 1 - 12, где аминокислотная последовательность SEQ ID NO:1 используют для определения нумерации положения в шиповидном белке.

16. Птичий коронавирус или шиповидный белок ВИБ или его фрагмент по одному из пп. 1 - 12, где для определения аминокислотного положения 267 в шиповидном белке аминокислотная последовательность выровнена с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1.

17. Птичий коронавирус или шиповидный белок ВИБ или его фрагмент по одному из пп. 1 - 16, где аминокислотное положение 267 находится в субъединице S1 шиповидного белка.

5 18. Птичий коронавирус или шиповидный белок ВИБ или его фрагмент по одному из пп. 1 - 17, где шиповидный белок имеет одну или несколько следующих аминокислот, выбранных из группы, включающей в себя:

- 264 представляет собой аспарагин, и/или

- 265 представляет собой треонин, и/или

- 269 представляет собой лейцин, и/или

10 - 271 представляет собой аспарагин, и/или

- 272 представляет собой фенилаланин.

Шиповидный белок

15 19. Шиповидный белок птичьего коронавируса или его фрагмент по одному из пп. 1 и 2 и 5 - 18, где шиповидный белок птичьего коронавируса или его фрагмент выбирают из группы, включающей в себя: вирус инфекционного бронхита (IBV); коронавирус цесарок (GfCoV) и коронавирус индейки (TCoV; вирус энтерита индейки и вирус болезни синего гребня).

20 20. Шиповидный белок птичьего коронавируса или его фрагмент по одному из пп. 1 и 2 и 5 - 19, где птичий коронавирус представляет собой ВИБ (вирус инфекционного бронхита).

25 21. Шиповидный белок ВИБ или его фрагмент по одному из пп. 3 - 20, где шиповидный белок происходит от ВИБ с генотипом или серотипом, или штаммом, 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 02, JMK, LDT3, Мэн (такой как Мэн 209), Массачусетс (такой как M41, H52, H120; за исключением Beaudette), Пенсильвания (такой как Пенсильвания 1220/98, Пенсильвания Wolg/98), PL84084, Qu (такой как Qu-mv), QX (такой как GB341/96), Q1, SE 17, Вариант 2 (такой как IS/1494/06, IBV/Ck/EG/CU/4/2014, гаммаCoV/Ck/Польша/G052/2016) и 4/91 (793B, CR88).

30

22. Шиповидный белок ВИБ или его фрагмент по одному из пп. 3 - 21, где шиповидный белок является не из штамма *Beaudette*.

23. Шиповидный белок ВИБ или его фрагмент по одному из пп. 3 - 22, где шиповидный белок или его фрагмент происходит от ВИБ, выбранного из
5 перечня генотипов или серотипов, или штаммов, включающих в себя Массачусетс (не *Beaudette*), 4/91, QX, Q1, Италия 02, Арканзас, Коннектикут, Джорджия, LDT3, PL84084, Вариант 2 и Бразилия.

24. Шиповидный белок ВИБ или его фрагмент по одному из пп. 3 - 23, где шиповидный белок или его фрагмент происходит от ВИБ, выбранного из
10 перечня генотипов или серотипов, включающих в себя Массачусетс (не *Beaudette*), 4/91, QX, Q1, Арканзас, Вариант 2 и Бразилия.

25. Шиповидный белок ВИБ или его фрагмент по одному из пп. 3 - 24, где шиповидный белок или его фрагмент происходит от ВИБ, выбранного из
15 перечня генотипов или серотипов, включающих в себя Массачусетс (не *Beaudette*) и 4/91.

26. Шиповидный белок ВИБ или его фрагмент по п. 24, где штамм Массачусетс выбирают из перечня, включающего в себя: Н120, Н52, Испания/98/308, IBMA5-1, SD/97/01, Испания/96/334 и M41-M21883.

27. Шиповидный белок ВИБ или его фрагмент по п. 24, где штамм 4/91
20 выбирают из перечня, включающего в себя: Испания/98/328, Испания/92/35, IR-3654-VM, FR-CR88061-88, FR-85131-85, UK-1233-95, UK/3/91, Испания/00/336, UK/7/91, 4/91-патогенный, 4/91-аттенуированный и IB4-91.

28. Шиповидный белок ВИБ или его фрагмент по п. 24, где штамм QX
25 выбирают из перечня, включающего в себя: FR-L1450T-05, FR-L1450L-05, NL-L1449T-04, NL-L1449K-04, IBV/Ck/SP/170/09, IBV/Ck/SP/79/08, IBV/Ck/SP/248/09, HBN, IBVQX, LX4, BJQ, СК/CH/LGD/03, SP2013-01470, SP2013-014171, SP2013-01478 и GB341/96.

29. Шиповидный белок ВИБ или его фрагмент по п. 24, где штамм Q1
30 выбирают из перечня, включающего в себя: СК/CH/LDL/98I, СК/CH/LSD/08-10, J2, Q1, AR08ER22, AR08BA21, 12.185, 12.124, 12.216 и Чили-295-10.

30. Шиповидный белок ВИБ или его фрагмент по п. 24, где штамм Арканзас выбирают из перечня, включающего в себя: Ark99, ArkGA, ArkDPI, AL/5364/00, ARKDPI11, AL/0803/01, AL/7149/00, ArkDPI101, AL/1221/01, AL/1793/01 и AL/4614/98.

31. Шиповидный белок ВИБ или его фрагмент по п. 24, где штамм Италия 02 выбирают из перечня, включающего в себя: Испания/99/316, Италия-02, UK-L633-04, It-497-02, Испания/05/866, Испания/04/221, Испания/00/337, Испания/155/09 и Испания/03/08.

5 32. Шиповидный белок ВИБ или его фрагмент по п. 24, где штамм Вариант 2 выбирают из перечня, включающего в себя: IS/1494/06, IBV/Ck/EG/CU/4/2014, гаммаCoV/Ck/Польша/G052/2016, Eg/CLEVB-2/IBV/012, D1344/2/4/10_EG, TR8 и IB VAR2-06.

10 33. Шиповидный белок ВИБ или его фрагмент по п. 24, где штамм Бразилия выбирают из перечня, включающего в себя: BR-1, BR-2, 23/2013 и IBV/Бразилия/351/1984.

34. Шиповидный белок ВИБ или его фрагмент по одному из пп. 3 - 24, где шиповидный белок или его фрагмент происходит от ВИБ генотипа или серотипа Массачусетс (не Beaudette), 4/91 или QX.

15 35. Шиповидный белок ВИБ или его фрагмент по одному из пп. 3 - 24, где штамм ВИБ представляет собой H52, H120, QX SP2013-01478 или CR88.

20 36. Шиповидный белок ВИБ или его фрагмент по одному из пп. 3 - 35, где шиповидный белок ВИБ или его фрагмент состоит из или содержит аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 77 или последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности с ней.

25 37. Шиповидный белок ВИБ или его фрагмент по одному из пп. 3 - 36, где шиповидный белок ВИБ или его фрагмент выбирают из перечня генотипов, включающего в себя: GI-2 - 27, GII-1, GIII-1, GIV-1, GV-1, GVI-1.

38. Шиповидный белок ВИБ или его фрагмент по одному из пп. 3 - 37, где шиповидный белок или его фрагмент происходит из генотипа GI-1.

30 39. Шиповидный белок птичьего коронавируса или его фрагмент по одному из пп. 1 и 5 - 38, где указанная по меньшей мере часть субъединицы S1 от птичьего коронавируса с ограниченным тропизмом клетки или ткани выбирают из группы, включающей в себя: вирус инфекционного бронхита (IBV); коронавирус цесарок (GfCoV) и коронавирус индейки (TCoV; вирус энтерита индейки и вирус болезни синего гребня).

40. Шиповидный белок птичьего коронавируса или его фрагмент по одному из пп. 1 и 5 - 38, где указанная по меньшей мере часть субъединицы S1 из птичьего коронавируса с ограниченным тропизмом клетки или ткани происходит от ВИБ (вирус инфекционного бронхита).

5 41. Шиповидный белок ВИБ или его фрагмент по одному из пп. 3 и 5 - 40, где указанная по меньшей мере часть субъединицы S1 происходит от ВИБ, выбранного из перечня генотипов или серотипов, или штаммов, включающих 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 02, JMK, LDT3, Мэн (такой как Мэн 209), Массачусетс (такой как M41, H52, H120; за исключением Beaudette), 15 Пенсильвания (такой как Пенсильвания 1220/98, Пенсильвания Wolg/98), PL84084, Qu (такой как Qu-mv), QX (такой как GB341/96), Q1, SE 17, Вариант 2 (такой как IS/1494/06, IBV/Ck/EG/CU/4/2014, гаммаCoV/Ck/Польша/G052/2016) и 4/91 (793B, CR88).

20 42. Шиповидный белок ВИБ или его фрагмент по одному из пп. 3 и 5 - 41, где указанная по меньшей мере часть субъединицы S1 происходит от ВИБ, выбранного из перечня генотипов или серотипов, или штаммов, включающих в себя Массачусетс (не Beaudette), 4/91, QX, Q1, Италия 02, Арканзас, Коннектикут, Джорджия, LDT3, PL84084, Вариант 2 и Бразилия.

25 43. Шиповидный белок ВИБ или его фрагмент по одному из пп. 3 и 5 - 41, где указанная по меньшей мере часть субъединицы S1 происходит от ВИБ, выбранного из перечня генотипов или серотипов, включающих в себя Массачусетс, 4/91, QX, Q1, Арканзас, Вариант 2 и Бразилия.

30 44. Шиповидный белок ВИБ или его фрагмент по п. 43, где штамм Массачусетс выбирают из перечня, включающего в себя: H120, H52, Испания/98/308, IBMA5-1, SD/97/01, Испания/96/334 и M41-M21883.

45. Шиповидный белок ВИБ или его фрагмент по п. 43, где штамм 4/91 выбирают из перечня, включающего в себя: Испания/98/328, Испания/92/35, IR-3654-VM, FR-CR88061-88, FR-85131-85, UK-1233-95, UK/3/91, Испания/00/336, UK/7/91, 4/91-патогенный, 4/91-аттенуированный и IB4-91.

46. Шиповидный белок ВИБ или его фрагмент по п. 43, где штамм QX выбирают из перечня, включающего в себя: FR-L1450T-05, FR-L1450L-05, NL-L1449T-04, NL-L1449K-04, IBV/Ck/SP/170/09, IBV/Ck/SP/79/08, IBV/Ck/SP/248/09, HBN, IBVQX, LX4, BJQ, СК/CH/LGD/03 и GB341/96.

5 47. Шиповидный белок ВИБ или его фрагмент по п. 43, где штамм Q1 выбирают из перечня, включающего в себя: СК/CH/LDL/98I, СК/CH/LSD/08-10, J2, Q1, AR08ER22, AR08BA21 и Чили-295-10.

10 48. Шиповидный белок ВИБ или его фрагмент по п. 43, где штамм Арканзас выбирают из перечня, включающего в себя: Ark99, ArkGA, ArkDPI, AL/5364/00, ARKDPI11, AL/0803/01, AL/7149/00, ArkDPI101, AL/1221/01, AL/1793/01 и AL/4614/98.

15 49. Шиповидный белок ВИБ или его фрагмент по п. 43, где штамм Вариант 2 выбирают из перечня, включающего в себя: IS/1494/06, IBV/Ck/EG/CU/4/2014, гаммаCoV/Ck/Польша/G052/2016, Eg/CLEVB-2/IBV/012, D1344/2/4/10_EG, TR8 и IB VAR2-06.

50. Шиповидный белок ВИБ или его фрагмент по п. 43, где штамм Бразилия выбирают из перечня, включающего в себя: BR-1, BR-2, 23/2013 и IBV/Бразилия/351/1984.

20 51. Шиповидный белок ВИБ или его фрагмент по одному из пп. 3 и 5 - 43, где указанная по меньшей мере часть субъединицы S1 происходит от ВИБ, выбранного из перечня генотипов или серотипов, включающих в себя Массачусетс (не Beaudette), QX и 4/91.

25 52. Шиповидный белок ВИБ или его фрагмент по одному из пп. 3 и 5 - 43, где указанная по меньшей мере часть субъединицы S1 происходит от штамма ВИБ H120, H52, QX SP2013-01478 или CR88.

30 53. Шиповидный белок птичьего коронавируса или его фрагмент по одному из пп. 1 и 3 и 5 - 52, где по меньшей мере часть субъединицы S1 составляет по меньшей мере 1, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 или 500 смежных аминокислот из последовательности субъединицы S1 птичьего коронавируса или ВИБ с ограниченным тропизмом клетки или ткани или последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности с ней.

54. Птичий коронавирус или шиповидный белок ВИБ или его фрагмент по одному из пп. 1 и 3 и 5 - 52, где по меньшей мере часть субъединицы S1

составляет по меньшей мере 1, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 или 500 смежных аминокислот из последовательности субъединицы S1 птичьего коронавируса или ВИБ по одному из пп. 36 - 50 или последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности с ней.

55. Шиповидный белок ВИБ или его фрагмент по одному из пп. 3 и 5 - 52, где указанная по меньшей мере часть субъединицы S1 от ВИБ с ограниченным тропизмом клетки или ткани имеет по меньшей мере 1, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 или 500 смежных аминокислот аминокислотной последовательности, как показано в SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 77 или последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности с ней.

56. Птичий коронавирус или шиповидный белок ВИБ или его фрагмент по одному из пп. 1 и 3 и 5 - 55, где птичий коронавирус или ВИБ с ограниченным тропизмом клетки или ткани ограничивается инфекцией и/или репликацией в куриных яйцах с зародышем и/или первичных клетках куриных почек.

57. Птичий коронавирус или шиповидный белок ВИБ или его фрагмент по одному из пп. 1 и 3 и 5 - 56, где птичий коронавирус или ВИБ с ограниченным тропизмом клетки или ткани не инфицирует и/или реплицируется в клетках EB66.

58. Птичий коронавирус или шиповидный белок ВИБ или его фрагмент по одному из пп. 1 и 3 и 5 - 56, где птичий коронавирус или ВИБ с ограниченным тропизмом клетки или ткани не инфицирует и/или реплицируется в клетках PBS-12 и/или НЕК 293Т.

25 Фрагмент

59. Птичий коронавирус или шиповидный белок ВИБ или его фрагмент по одному из пп. 1 - 58, где фрагмент птичьего коронавируса или шиповидный белок ВИБ имеет длину по меньшей мере 500, 750, 1000 или 1077 аминокислот.

60. Птичий коронавирус или шиповидный белок ВИБ или его фрагмент по одному из пп. 1 - 59, где фрагмент птичьего коронавируса или шиповидный белок ВИБ имеет длину по меньшей мере 1000 аминокислот.

61. Птичий коронавирус или шиповидный белок ВИБ по одному из пп. 1 - 60, где цистеин в аминокислотном положении 267 или мутация в аминокислотном положении 267 на цистеин является генетически стабильной.

62. Нуклеотидная последовательность, кодирующая шиповидный белок или его фрагмент по одному из пп. 1 - 61.

63. Плаزمид, содержащая нуклеотидную последовательность по п. 62.

64. Клетка, содержащая плазмиду по п. 63.

5 65. Вирусная частица, содержащая шиповидный белок или его фрагмент по одному из пп. 1 - 61.

66. Птичий коронавирус, содержащий шиповидный белок или его фрагмент по одному из пп. 1 - 61.

10 67. ВИБ (вирус инфекционного бронхита), содержащий шиповидный белок по одному из пп. 3 - 61.

68. Птичий коронавирус или ВИБ по пп. 66 или 67, где птичий коронавирус или ВИБ является аттенуированным.

69. Птичий коронавирус или ВИБ по одному из пп. 66 - 68, где птичий коронавирус или ВИБ является генно-инженерным.

15 70. Птичий коронавирус или ВИБ по одному из пп. 66 - 69, где птичий коронавирус или ВИБ является рекомбинантным.

71. Птичий коронавирус или ВИБ по одному из пп. 66 - 70, где птичий коронавирус или ВИБ является химерным.

20 72. ВИБ по одному из пп. 67 - 71, где ВИБ происходит от ВИБ с генотипом, выбранным из перечня штаммов, 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, 25 GA-08, GA-12, GA-13), Грей, Холт, Айова (такой как Айова 97 и Айова 69), Италия 02, JMK, LDT3, Мэн (такой как Мэн 209), Массачусетс (M41, H52, H120, Beaudette), Пенсильвания (такой как Пенсильвания 1220/98, Пенсильвания Wolg/98), PL84084, Qu (такой как Qu-mv), QX (такой как GB341/96), Q1, SE 17, 30 Вариант 2 (такой как IS/1494/06, IBV/Ck/EG/CU/4/2014, гаммаCoV/Ck/Польша/G052/2016) и 4/91 (793B, CR88).

73. ВИБ по одному из пп. 67 - 72, где ВИБ выбирают из перечня генотипов или серотипов, включающего в себя Массачусетс, 4/91, QX, Q1, Италия 02, Арканзас, Коннектикут, Джорджия, LDT3, PL84084, Вариант 2 и Бразилия.

74. ВИБ по одному из пп. 67 - 73, где ВИБ выбирают из перечня генотипов или серотипов, включающего в себя Массачусетс, 4/91, QX, Q1, Арканзас, Вариант 2 и Бразилия.

5 75. ВИБ по п. 74, где штамм Массачусетс выбирают из перечня, включающего в себя: Н120, Н52, Испания/98/308, IBMA5-1, SD/97/01, Beaudette, Испания/96/334 и M41-M21883.

10 76. ВИБ по п. 74, где штамм 4/91 выбирают из перечня, включающего в себя: Испания/98/328, Испания/92/35, IR-3654-VM, FR-CR88061-88, FR-85131-85, UK-1233-95, UK/3/91, Испания/00/336, UK/7/91, 4/91-патогенный, 4/91аттенуированный и IB4-91.

77. ВИБ по п. 74, где штамм QX выбирают из перечня, включающего в себя: FR-L1450T-05, FR-L1450L-05, NL-L1449T-04, NL-L1449K-04, IBV/Ck/SP/170/09, IBV/Ck/SP/79/08, IBV/Ck/SP/248/09, HBN, IBVQX, LX4, BJQ, СК/СН/LGD/03 и GB341/96.

15 78. ВИБ по п. 74, где штамм Q1 выбирают из перечня, включающего в себя: СК/СН/LDL/98I, СК/СН/LSD/08-10, J2, Q1, AR08ER22, AR08BA21 и Чили-295-10.

20 79. ВИБ по п. 74, где штамм Италия 02 выбирают из перечня, включающего в себя: Испания/99/316, Италия-02, UK-L633-04, It-497-02, Испания/05/866, Испания/04/221, Испания/00/337, Испания/155/09 и Испания/03/08.

80. ВИБ по п. 74, где штамм Арканзас выбирают из перечня, включающего в себя: Ark99, ArkGA, ArkDPI, AL/5364/00, ARKDPI11, AL/0803/01, AL/7149/00, ArkDPI101, AL/1221/01, AL/1793/01 и AL/4614/98.

25 81. ВИБ по п. 74, где штамм Вариант 2 выбирают из перечня, включающего в себя: IS/1494/06, IBV/Ck/EG/CU/4/2014, гаммаCoV/Ck/Польша/G052/2016, Eg/CLEVB-2/IBV/012, D1344/2/4/10_EG, TR8 и IB VAR2-06.

82. ВИБ по п. 74, где штамм Бразилия выбирают из перечня, включающего в себя: BR-1, BR-2, 23/2013 и IBV/Бразилия/351/1984.

30 83. ВИБ по одному из пп. 67 - 74, где шиповидный белок или его фрагмент происходит от ВИБ генотипа или серотипа Массачусетс или 4/91.

84. ВИБ по одному из пп. 67 - 74, где штамм ВИБ представляет собой Н120, Н52 или CR88.

85. ВИБ по одному из пп. 67 - 84, где ВИБ имеет шиповидный белок ВИБ или его фрагмент, состоящий из или содержащий аминокислотную

последовательность, как показано в SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 77 или последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности с ней.

5 86. ВИБ по одному из пп. 67 - 85, где ВИБ имеет расширенный клеточный или тканевый тропизм.

87. ВИБ по одному из пп. 67 - 86, где ВИБ инфицирует и/или реплицируется в по меньшей мере одну клеточную линию или клетку по одному из пп. 9 - 11.

10 88. Клетка, содержащая:

- вирусную частицу по п. 65, или

- птичий коронавирус или ВИБ по одному из пп. 66 - 87.

89. Клетка по п. 88, где клетка представляет собой клеточную линию или клетку, выбранную из перечня, включающего в себя: первичные клетки
15 куриного эмбриона, клеточную линию фибробластов куриного эмбриона, линию эмбриональных стволовых клеток утки, клеточную линию почки эмбриона человека, клеточную линию почки детеныша хомяка, клеточную линию почки африканской зеленой обезьяны, клеточную линию почки кролика, клеточную
линию почки собаки, клеточную линию печени курицы, клеточную линию почки
20 крупного рогатого скота, клеточную линию почки свиньи и клеточную линию насекомых.

90. Клетка по пп. 88 или 89, где клетка представляет собой клеточную
линию, выбранную из перечня, включающего в себя: DF-1 (Douglas Foster), EB66
(линия эмбриональных стволовых клеток утки), PBS-12, PBS-12SF (Без
25 сыворотки PBS-12), ВНК21 (почка детеныша хомяка), НЕК 293Т (эмбриональная почка человека), Vero (Verda Reno), MA104, RK13 (почка кролика), LMH (гепатома самцов леггорна), MDCK (собачья почка Madin-Darby), MDBK (бычья почка Madin-Darby), PK15 (свиная почка), PK2A (свиная почка), SF9, SF21 и SF+ (*Spodoptera frugiperda*).

30 91. Клетка по одному из пп. 88 - 89, где клетка представляет собой клеточную линию, выбранную из перечня, включающего в себя: DF-1, EB66, PBS-12, PBS-12SF, ВНК, НЕК 293Т, Vero, MA104 и RK13.

92. Клетка по п. 89, где первичная клетка куриного эмбриона представляет собой фибробласт или клетку, полученную из ткани печени или легкого.

93. Иммуногенная композиция, содержащая:

- шиповидный белок по одному из пп. 1 - 61, или
- вирусную частицу по п. 65, или
- птичий коронавирус или ВИБ по одному из пп. 66 - 87.

5 94. Вакцина, содержащая:

- шиповидный белок по одному из пп. 1 - 61, или
- вирусную частицу по п. 65, или
- коронавирус или ВИБ по одному из пп. 66 - 87.

10 95. Модифицированная живая вакцина с расширенным тропизмом клетки или ткани, содержащая:

- шиповидный белок по одному из пп. 1 - 61, или
- вирусную частицу по п. 65, или
- коронавирус или ВИБ по одному из пп. 66 - 87.

15 96. Иммуногенная композиция или вакцина по одному из пп. 93 - 95, где иммуногенная композиция или вакцина содержит фармацевтически приемлемый носитель.

97. Иммуногенная композиция или вакцина по п. 96, где фармацевтически приемлемый носитель представляет собой забуференный фосфатом физиологический раствор.

20 98. Иммуногенная композиция или вакцина по одному из пп. 93 - 97, где иммуногенная композиция или вакцина эффективна при лечении и/или профилактике клинических признаков, вызванных ВИБ, у нуждающегося субъекта.

25 99. Иммуногенная композиция или вакцина по одному из пп. 93 - 98, где иммуногенная композиция или вакцина содержит от 1 до $10 \log_{10} \text{EID}_{50}$ ВИБ.

100. Иммуногенная композиция или вакцина по одному из пп. 93 - 99, где иммуногенная композиция или вакцина содержит от 2 до $5 \log_{10} \text{EID}_{50}$ ВИБ.

101. Иммуногенная композиция или вакцина по одному из пп. 93 - 100, где иммуногенная композиция или вакцина содержит от 2 до $4 \log_{10} \text{EID}_{50}$ ВИБ.

30 102. Способ изменения клеточного или тканевого тропизма птичьего коронавируса, включающий в себя применение шиповидного белка птичьего коронавируса или его фрагмента по одному из пп. 1 - 61.

103. Способ расширения клеточного или тканевого тропизма птичьего коронавируса, включающий в себя применение шиповидного белка птичьего коронавируса или его фрагмента по одному из пп. 1 - 61.

5 104. Способ производства или изготовления птичьего коронавируса с расширенным тропизмом клетки или ткани, включающий в себя применение шиповидного белка птичьего коронавируса или его фрагмента по одному из пп. 1 - 61.

10 105. Способ культивирования птичьего коронавируса в культуре клеток или ткани, включающий в себя применение шиповидного белка птичьего коронавируса или его фрагмента по одному из пп. 1 - 61.

106. Способ модификации птичьего коронавируса, включающий в себя модификацию аминокислотного положения 267 в шиповидном белке указанного птичьего коронавируса.

15 107. Способ мутации аминокислотное положение 267 в шиповидном белке птичьего коронавируса, включающий в себя:

а) обеспечение нуклеотидной или белковой последовательности шиповидного белка птичьего коронавируса,

б) определение положения 267 в шиповидном белке путем выравнивания с эталонной последовательностью,

20 в) мутацию положения 267 шиповидного белка из стадии б) на цистеин,

г) получение мутированного шиповидного белка из стадии в).

108. Способ по одному из пп. 102 - 106, где шиповидный белок или его фрагмент в аминокислотном положении 267 имеет цистеин.

25 109. Способ по одному из пп. 106 - 108, где цистеин в аминокислотном положении 267 вводится мутацией.

110. Способ по п. 109, где мутация представляет собой аминокислотную замену, делецию или вставку.

30 111. Способ по одному из пп. 106 - 111, где фенилаланин или лейцин модифицируется или мутирует на цистеин в аминокислотном положении 267.

112. Способ по одному из пп. 102 - 111, где птичий коронавирус представляет собой ВИБ по одному из пп. 67 - 87.

113. Способ по одному из пп. 102 - 112, где шиповидный белок коронавируса представляет собой шиповидный белок ВИБ (вируса инфекционного бронхита) по одному из пп. 3 - 61.

5 114. Способ по одному из пп. 102 - 113, где цистеин в аминокислотном положении 267 или указанная мутация в аминокислотном положении 267 на цистеин приводит к расширенному клеточному или тканевому тропизму.

115. Способ по одному из пп. 102 - 114, где птичий коронавирус или ВИБ инфицирует и/или реплицируется по меньшей мере в одной клеточной линии или клетке по одному из пп. 9 - 11.

10 116. Способ по одному из пп. 106 - 115, где нумерацию аминокислотного положения 267 осуществляют по одному из пп. 12 - 18.

Пункты, относящиеся к набору

117. Набор, содержащий вирусную частицу, птичий коронавирус, ВИБ, иммуногенную композицию или вакцину по одному из пп. 65 - 88 и 93 - 101.

15 118. Набор по п. 117, где набор, кроме того, содержит инструкцию по лечению и/или профилактике заболеваний птиц или инструкцию по лечению и/или профилактике заболеваний домашней птицы или инструкцию по лечению и/или профилактике ИБ.

20 119. Набор по пп. 117 или 118, где набор, кроме того, содержит дозирующее устройство, пригодное для введения вакцины указанному млекопитающему.

Пункты, относящиеся к способу лечения

120. Способ иммунизации субъекта, включающий в себя введение такому субъекту иммуногенной композиции или вакцины по одному из пп. 93 - 101.

25 121. Способ лечения или предупреждения клинических признаков, вызванных посредством ВИБ у нуждающегося субъекта, способ включает в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции или вакцины по одному из пп. 93 - 101.

30 122. Способ уменьшения цилиостаза у нуждающегося субъекта, по сравнению с субъектом неиммунизированной контрольной группы того же вида, способ содержит введение субъекту терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции или вакцины по одному из пп. 93 - 101.

123. Иммуногенная композиция или вакцина по одному из пп. 93 - 101 для применения в способе иммунизации субъекта, способ содержит введение

субъекту терапевтически эффективного количества указанной иммуногенной композиции или вакцины.

124. Иммуногенная композиция или вакцина по одному из пп. 93 - 101 для применения в способе лечения или предупреждения клинических признаков, вызванных посредством ВИБ у нуждающегося субъекта, способ содержит введение субъекту терапевтически эффективного количества указанной иммуногенной композиции или вакцины.

125. Иммуногенная композиция или вакцина по одному из пп. 93 - 101 для применения в способе уменьшения цилиостаза у нуждающегося субъекта, по сравнению с субъектом неиммунизированной контрольной группы того же вида, способ содержит введение субъекту терапевтически эффективного количества указанной иммуногенной композиции или вакцины.

126. Способ или применение по одному из пп. 120 - 125, где указанный субъект представляет собой птицу.

127. Способ или применение по одному из пп. 120 - 126, где указанный субъект представляет собой домашнюю птицу.

128. Способ или применение по одному из пп. 120 - 127, где указанный субъект выбирают из перечня, включающего в себя курицу, индейку, перепела, или фазана.

129. Способ или применение по одному из пп. 120 - 128, где указанный субъект представляет собой курицу.

130. Способ или применение по одному из пп. 120 - 129, где иммуногенную композицию или вакцину вводят однократно.

131. Способ или применение по одному из пп. 120 - 129, где иммуногенную композицию или вакцину вводят двумя или несколькими дозами.

132. Способ или применение по одному из пп. 120 - 131, где указанную иммуногенную композицию или вакцину вводят подкожно, внутримышечно, перорально, *in ovo*, в виде спрея, с питьевой водой или в виде глазных капель.

133. Способ или применение по одному из пп. 120 - 132, где указанную иммуногенную композицию или вакцину вводят в виде глазных капель.

134. Способ или применение по одному из пп. 120 - 133, где иммуногенная композиция или вакцина содержит $1 - 10 \log_{10} \text{EID}_{50}$ на дозу ВИБ.

135. Способ или применение по одному из пп. 120 - 134, где иммуногенная композиция или вакцина содержит $2 - 5 \log_{10} \text{EID}_{50}$ на дозу ВИБ.

136. Способ или применение по одному из пп. 120 - 135, где иммуногенная композиция или вакцина содержит $2 - 4 \log_{10} \text{EID}_{50}$ на дозу ВИБ.

137. Способ или применение по одному из пп. 120 - 136, где иммуногенную композицию или вакцину 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.

138. Способ или применение по одному из пп. 120 - 137, где иммуногенную композицию или вакцину вводят субъектам в течение первого дня жизни.

139. Способ или применение по одному из пп. 120 - 138, 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 из необработанной контрольной группы того же вида.

140. Способ или применение по одному из пп. 120 - 139, где лечение или предупреждение приводит к предупреждению или уменьшению цилиостаза по сравнению с субъектами необработанной контрольной группы того же вида.

141. Способ или применение по одному из пп. 120 - 140, где лечение или предупреждение приводит к предупреждению или уменьшению поражения почек по сравнению с субъектами необработанной контрольной группы того же вида.

142. Способ или применение по одному из пп. 120 - 141, где лечение или предупреждение приводит к предупреждению или уменьшению снижения яйценоскости по сравнению с субъектами необработанной контрольной группы того же вида.

143. Вирусная частица, птичий коронавирус, ВИБ, иммуногенная композиция или вакцина по одному из пп. 65 - 87 и 93 - 101 для терапевтического применения.

144. Вирусная частица, птичий коронавирус, IBV, иммуногенная композиция или вакцина по одному из пп. 65 - 87 и 93 - 101 для применения в качестве иммуногена или вакцины.

145. Вирусная частица, птичий коронавирус, IBV, иммуногенная композиция или вакцина по одному из пп. 65 - 87 и 93 - 101 101 для применения в качестве лекарственного средства.

5 146. Применение вирусной частицы, птичьего коронавируса, ВИБ, иммуногенной композиции или вакцины по одному из пп. 65 - 87 и 93 - 101 для изготовления лекарственного средства.

147. Применение вирусной частицы, птичьего коронавируса, ВИБ, иммуногенной композиции или вакцины по одному из пп. 65 - 87 и 93 - 101 для лечения и/или профилактики инфекций ВИБ у субъекта.

10

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

15 Фигура 1. Кинетика *in ovo* для H52 rIBV S F267C по сравнению с вирусом дикого типа H52 rIBV, оцененная путем определения вирусной нагрузки с помощью RT-qPCR. Точка данных представляет собой среднее значение 5 выборок на момент времени. Планки погрешностей указывают стандартное отклонение.

20 Фигура 2. Пассирование H52 rIBV S F267C в клетках EB66®. Значения RT-qPCR СТ определяют в момент инфицирования (t=0) и сбора (t=72) каждого пассажира. P1 - P5 образуются в результате заражения с 1/10 разведением исходного вирусного материала предыдущего пассажира. P6 и P7 получают путем инокуляции с разведением 1/1000 предыдущего пассажира. Эксперимент повторяют с MOI 0,001 для первого пассажира и получают аналогичные результаты.

25 Фигура 3. Кинетика репликации H52 rIBV S F267C в клетках EB66®. Клетки инфицированы посредством rIBV при MOI 0,001 на основании титров TCID50 от третьего пассажира вирусов, размноженного EB66®. Нуклеиновые кислоты выделяют в 0, 8, 24, 48 и 72 ч.п.и. и анализируют с помощью специфической для ВИБ RT-qPCR. Каждая точка данных представляет собой среднее значение ст трех независимых экспериментов. Планки погрешностей 30 указывают на стандартную ошибку среднего (SEM).

Фигура 4. Кинетика репликации H52 rIBV S F267C в клетках EB66®. Образцы временных точек 0, 8, 24, 48 и 72 ч.п.и. анализируют титрованием TCID50. Показаны результаты одного эксперимента.

Фигура 5. Сводная шкала оценки цилиостаза для защиты с помощью H52 гIBV S F267C против заражения M41. Подсчитывают сумму 10 индивидуальных оценок для 10 колец одного животного, которая отображается 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 6. Сводные показатели результатов RT-qPCR тканей почек через 7 дней после заражения для исследования эффективности H52 гIBV S F267C. Каждая отдельная птица обозначена одной точкой.

Фигура 7. Репликация H52 гIBV S F267C в клетках PBS-12SF, определенная с помощью иммунофлуоресцентного анализа. Показан один из трех независимых экспериментов.

Фигура 8: Репликация H52 гIBV S F267C в клетках PBS-12SF, определенная путем экстракции нуклеиновой кислоты из супернатанта и последующего анализа RT-qPCR. Показан один из двух независимых экспериментов.

Фигура 9. Репликация H52 гIBV S F267C в клетках НЕК 293Т, определенная с помощью иммунофлуоресцентного анализа. Показан один из трех независимых экспериментов.

Фигура 10. Кинетика *in ovo* для CR88 гIBV S L269C по сравнению с вирусом дикого типа CR88 гIBV, оцененная путем определения вирусной нагрузки с помощью RT-qPCR. Точка данных представляет собой среднее значение 5 выборок на момент времени. Планки погрешностей указывают стандартное отклонение.

Фигура 11. Пассирование CR88 гIBV S L269C в клетках Eb66®. Значения RT-qPCR СТ определяют в момент инфицирования ($t=0$) и сбора ($t=72$) соответствующего пассажа. CR88 гIBV дикого типа включен в качестве отрицательного контроля. Для CR88 гIBV S L269C показаны данные для P2, P5 и P8. CR88 гIBV, включенный в тот же эксперимент по пассированию, имеет на один пассаж меньше в начальном пассаже (P1) и последнем пассаже (P7). Каждый пассаж вызван заражением 1/100 разведением предыдущего пассажа.

Фигура 12. Кинетика репликации CR88 гIBV S L269C в клетках EB66®. Клетки инфицированы посредством гIBV при MOI 0,001 на основании титров TCID₅₀ от третьего пассажа вирусов, размноженного EB66®. Нуклеиновые

кислоты выделяют в 0, 8, 24, 48 и 72 ч.п.и. и анализируют с помощью специфической к ВИБ RT-qPCR. Каждая точка данных представляет собой среднее значение ст трех независимых экспериментов. Планки погрешностей указывают на стандартную ошибку среднего (SEM).

5 Фигура 13. Кинетика репликации CR88 rIBV S L269C в клетках EB66®. Образцы временных точек 0, 8, 24, 48 и 72 ч.п.и. анализируют титрованием TCID₅₀. Показаны результаты одного эксперимента.

10 Фигура 14. Сводная шкала оценки цилиостаза для защиты с помощью CR88 rIBV S L269C против контрольного заражения 793B. Подсчитывают сумму 10 индивидуальных оценок для 10 колец одного животного, которая отображается 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<0.02, **p<0.007).

15 Фигура 15. Сводные показатели результатов RT-qPCR тканей почек через 7 дней после заражения для исследования эффективности CR88 rIBV S L269C. Каждая отдельная птица обозначена одной точкой.

20 Фигура 16. Кинетика in ovo для H52 rIBV QX S L270C и CR88 rIBV QX S L270C по сравнению с IBV QX, H52 rIBV и CR88 rIBV, оцененная путем определения вирусной нагрузки с помощью RT-qPCR. Точка данных представляет собой среднее значение 5 выборок на момент времени. Планки погрешностей указывают стандартное отклонение.

25 Фигура 17. Пассирование CR88 rIBV QX S L270C в клетках Eb66®. Значения RT-qPCR CT определяют в момент инфицирования (t=0) и сбора (t=72) соответствующего пассажа.

Фигура 18. Пассирование H52 rIBV QX S L270C в клетках Eb66®. Значения RT-qPCR CT определяют в момент инфицирования (t=0) и сбора (t=72) соответствующего пассажа.

30 Фигура 19. Кинетика репликации H52 rIBV QX S L270C и CR88 rIBV QX S L270C в клетках EB66®. Клетки инфицированы посредством rIBV при MOI 0,001 на основании титров TCID₅₀ от третьего пассажа вирусов, размноженного EB66®. Нуклеиновые кислоты выделяют в 0, 8, 24 и 48 ч.п.и. и анализируют с помощью специфической к IBV RT-qPCR. Каждая точка данных представляет собой среднее значение ст трех независимых экспериментов, каждый из которых

был проведен в трех повторностях. Планки погрешностей указывают на стандартную ошибку среднего (SEM).

5 Фигура 20. Сводная шкала оценки цилиостаза для защиты с помощью CR88
rIBV QX S L270C и H52 rIBV QX S L270C против контрольного заражения D388
10 QX. Подсчитывают сумму 10 индивидуальных оценок для 10 колец одного
животного, которая отображается 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
(*** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

Фигура 21. Сводные показатели результатов RT-qPCR тканей почек через 7
дней после заражения для исследования эффективности CR88 rIBV QX S L270C
и H52 rIBV QX S L270C. Каждая отдельная птица обозначена одной точкой.

ОБЗОР ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

	SEQ ID NO:1	шиповидный белок IBV H52
	SEQ ID NO:2	шиповидный белок IBV H52 с мутацией F267C
	SEQ ID NO:3	шиповидный белок IBV CR88 с мутацией L269C
5	SEQ ID NO:4	шиповидный белок IBV QX с мутацией L270C
	SEQ ID NO:5	шиповидный белок IBV Q1 с мутацией L271C
	SEQ ID NO:6	шиповидный белок IBV Var 2 с мутацией L270C
	SEQ ID NO:7	шиповидный белок IBV BR-I с мутацией L274C
	SEQ ID NO:8	шиповидный белок IBV Ark с мутацией L274C
10	SEQ ID NO:9	донорская плазмида pUC57-s H52 rIBV
	SEQ ID NO:10	донорская плазмида pUC57-s H52 rIBV S F267C
	SEQ ID NO:11	IBV CR88 шиповидная последовательность
	SEQ ID NO:12	донорская плазмида pUC57-s CR88 mIBV
	SEQ ID NO:13	pGEM-T IBV CR88 шиповидная плазмида
15	SEQ ID NO:14	донорская плазмида pUC57-s CR88 rIBV S L269C
	SEQ ID NO:15	pGEM-T IBV CR88 шиповидный с мутацией L269C
	SEQ ID NO:16 - 64	праймеры
	SEQ ID NO:65	шиповидный белок IBV QX
	SEQ ID NO:66	плазмида pGEM-T IBV QX S L270C
20	SEQ ID NO:68	донорская плазмида pUC57-s CR88 rIBV QX S L270C
	SEQ ID NO:69	донорская плазмида pUC57-s H52 rIBV QX S L270C
	SEQ ID NO:70 - 75	праймеры
	SEQ ID NO:76	шиповидный белок IBV ArkDPI
	SEQ ID NO:77	шиповидный белок IBV ArkDPI с мутацией L274C
25	SEQ ID NO:78	pUC57-s IBV ArkDPI S L274C
	SEQ ID NO:79	донорская плазмида pUC57-s H52 rIBV ArkDPI S Ecto L274C
	SEQ ID NO:80 - 84	праймеры

ПРИМЕРЫ

Следующие ниже примеры представлены для иллюстрации конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения. Эти примеры являются просто иллюстративными, и их следует понимать как неограничивающие объем или основные принципы настоящего изобретения.

ПРИМЕР 1:

ОБРАЗОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТА IBV H52 В КОТОРОМ АМИНОКИСЛОТА 267 ШИПОВИДНОГО БЕЛКА МУТИРОВАНА НА ЦИСТЕИН

Для создания рекомбинантного ВИБ применяют способ целевой рекомбинации РНК, как описано у van Beurden и соавт. (Virol J. 2017;14(1):109).

Конструирование донорской плазмиды

Донорская плазида pUC57-s IBV-5-1b-S-SIR-3T, далее именуемая как pUC57-s H52 rIBV донорская плазида (SEQ ID NO:9), используется в качестве матрицы для конструирования донорской плазмиды H52 rIBV с шипом H52, в котором аминокислота 267 шипа H52 (SEQ ID NO:1) субъединица S1 мутирована с фенилаланина на цистеин (SEQ ID NO:2) который называется pUC57-s H52 rIBV S F267C (SEQ ID NO:10). Мутация последовательности дикого типа достигается с помощью набора Q5® Site-Directed Mutagenesis (NEB) с праймерами PO1942 и PO1943 (Таблица 1) и в соответствии с протоколом набора, с температурой отжига 58°C и временем элонгации 5 минут и 30 секунд. Положительные клоны идентифицируют рестрикционным гидролизом EcoRV и XhoI, последовательным секвенированием по Сэнгеру с праймерами PO618 и PO633 (Таблица 1). После этого целостность последовательности шипа и донорской области подтверждается секвенированием с праймерами от SEQ ID NO:19 до SEQ ID NO: 40 в Таблице 1.

Таблица 1: Праймеры для SDM и секвенирование

SEQ ID NO:	Название	Последовательность
64	M13-24F	ccagggttttcccagtcacg
16	M13-24R	cggataacaatttcacacagg
17	PO1942	aaacactattttcacgatagac
18	PO1943	aatactactgtgtacggttacacaatttc
19	PO618	taaatggtgatctgttt
20	PO632	gcattcactgctgtacaa
21	PO633	cgctcttagtaacataaac
22	PO636	ctgaggtcaatgctttatc

SEQ ID NO:	Название	Последовательность
23	PO706	gacagagcacaagtttgatc
24	PO709	acttcaagcatttgtagagg
25	PO710	ggtcaacaatgtaattttgct
26	PO713	gcagatgctaaaacagaaag
27	PO714	tcacctgaacaatcttcagc
28	PO715	ggtcaccagtatatttctgc
29	PO718	aaagaagcaggatgatgaag
30	PO726	aagagatgttggaacacct
31	PO728	ctaaaccggctggtttaat
32	PO729	ccatagctttgccaactatt
33	PO731	cgcttgtaaatagaaggctc
34	PO732	acataccaaggccaactaat
35	PO733	ggctcctgtccagtagta
36	PO734	cttgctctgcttgtaaga
37	PO756	gtggatcgtcttataactgg
38	PO759	ctcgcattacaaaggctaag
39	PO766	ccagttataggacaccatc
40	PO767	gttggttctctggaatgt

Нацеленная рекомбинация РНК и спасение рекомбинантного ВИБ

Муринизированный (м)ВИБ Н52 хелперный вирус и рекомбинантный ВИБ получают, как описано у van Beurden и соавт. (Virol J. 2017;14(1):109). Вкратце, для создания Н52 rIBV S F267C, клетки LR7 инфицируют посредством мВИБ Н52 и подвергают электропорации транскриптом *in vitro*, полученным из донорской плазмиды pUC57-s Н52 S F267C (SEQ ID NO:10) и затем впрыскивают в 8-дневные куриные яйца SPF с эмбрионами (VALO BioMedia). После 8 дней инкубации аллантоисные жидкости всех яиц анализируют отдельно для спасения рекомбинантного ВИБ после выделения РНК с помощью набора MagMAX™ Core Nucleic Acid Purification Kit (ThermoFisher) и KingFisher™ Duo Prime Purification System (ThermoFisher) и с использованием SuperScript™ III One-Step RT-PCR System с Platinum™ Taq DNA Polymerase (ThermoFisher). Праймеры PO1323 и PO1324 (Таблица 2), связывающие в Н52 IBV lab и Н52 IBV S spike используют для отличия рекомбинантного ВИБ от мВИБ. Положительные образцы дополнительно анализируют для подтверждения наличия предполагаемой шиповидной мутации F267C с использованием одностадийной системы SuperScript™ III One-Step RT-PCR с ДНК-полимеразой Platinum™ Taq с праймерами PO618 и PO633 (Таблица 2) с последующей очисткой QIAquick PCR и секвенированием по Сэнгеру с теми же самыми праймерами. Положительную аллантоисную жидкость яйца, инокулированного

клетками LR7 с наибольшим разведением, используют для конечного разведения в 8-дневных яйцах SPF. Выделение нуклеиновых кислот и анализ образцов проводят, как описано выше. Ту же процедуру применяют для разведения второй конечной точки. После этого одну аллантаисную жидкость с положительным результатом используют для размножения в 10-дневных куриных яйцах с SPF эмбрионами. Аллантаисную жидкость разводят 1:1000 в 1xPBS и впрыскивают 100 мкл на яйцо, которое затем инкубируют при 37,5 °С и 60% влажности. Аллантаисную жидкость собирают через 48 часов после инокуляции, объединяют, очищают от дебриса хранят при -80 °С.

10 Таблица 2 Праймеры для ПЦР и секвенирования, используемые для идентификации спасенного H52 rIBV и подтверждения целевой мутации S F267C.

SEQ ID NO:	Название	Последовательность
41	PO1323	tcagcatggacgtgtgggta
42	PO1324	ccccatgtaaатgccaacca
19	PO618	taaатggtgatcttgttt
21	PO633	cgctcttagtaacataaac

Характеристика рекомбинантного ВИБ *in vitro* и *in ovo*

15 Определение инфекционной дозы эмбриона 50% (EID₅₀)

Аликвоту исходного вируса размораживают и подвергают 10-кратному разведению в 1xPBS для определения 50%-ной инфекционной дозы эмбриона (EID₅₀) путем инокуляции 100 мкл в аллантаисную полость пяти куриных яиц с 8-дневными эмбрионами на разведение. Яйца инкубируют при 36,5 °С, 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 считаются 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).

25 Инфекционная доза тканевой культуры 50% (TCID₅₀)

Жизнеспособность клеток Eb66® анализируют с помощью BioRad TC20 и трипанового синего с параметрами настройки 6-13 мкм. На 96 лунок высевают 2x10⁶ живых Eb66® клеток/мл в бессывороточной среде EX-CELL® EBx™ GRO-I + 2.5 mM L-глутамин за 1 день до инокуляции и инкубируют при 37°С и 7,5%

CO₂. Осуществляют 10-кратное серийное разведение вируса в клеточной среде Eb66®, и после удаления культуральной среды к клеткам Eb66® добавляют 100 мкл на разведение (по меньшей мере 4 повтора на разведение). Если для инфицирования используют аллантаоисную жидкость, перед разбавлением ее пропускают через фильтр с размером пор 0,45 мкм. Инфицированные клетки инкубируют в течение 72 часов с последующим иммунофлуоресцентным окрашиванием для выявления положительных лунок. Среду отсасывают из всех лунок, которые затем промывают посредством 1xPBS перед добавлением 100 мкл этанола на лунку для фиксации клеток в течение 10 мин. при комнатной температуре с последующей сушкой клеток на воздухе. Клетки инкубируют со 100 мкл первичной куриной сыворотки против ВИБ Mass (Boehringer Ingelheim), разведенной 1:250 в 1xPBS, в течение 45 мин. при комнатной температуре. После удаления первичного антитела каждую лунку трижды промывают посредством 1xPBS. 100 мкл вторичного козьего антитела против IgG курицы Alexa Fluor 488 (ThermoFisher Scientific, разведение 1:500 в 1xPBS) и инкубируют в течение 45 мин. при комнатной температуре в темноте. После удаления вторичного антитела каждую лунку трижды промывают посредством 1xPBS, оставляя последнюю промывку на клетках. Положительные лунки идентифицируют с помощью флуоресцентной микроскопии и записывают для расчета TCID₅₀/мл по формуле Рида и Мюнча (Am J Epidemiol, 1938; 27(3):493–497).

Кинетика репликации *in ovo*

Восьмидневные куриные яйца с эмбрионами и соответствующие контрольные инокулируют посредством 10² EID₅₀ pВИБ. Яйца 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 в 4 °С в течение по меньшей мере 2 часов. Впоследствии аллантаоисную жидкость собирают и хранят при -80 °С. Для анализа образцы размораживают и разбавляют 1:10 в 1xPBS 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 у 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 ABI™ 7900HT Fast Real-Time (Thermo Fisher Scientific). Все образцы нуклеиновых кислот анализируют в трех экземплярах с использованием серии 10-кратных разведений ВИБ Н52 в качестве сравнения.

Сходную кинетику репликации *in ovo* наблюдают для Н52 гIBV дикого типа и Н52 гIBV S F267C (фигура 1). Это указывает на отсутствие недостатков мутации фенилаланина на цистеин в положении 267 шиповидного белка для эффективности репликации *in ovo* мутированного гIBV по сравнению с гIBV дикого типа.

Пассирование гIBV в клетки Eb66®

Клетки Eb66® высевают при плотности 4×10^5 клеток/мл в EX-CELL® EBx™ GRO-I Serum-Free Media + 2,5 мМ L-Glutamine в колбы T25 общим объемом 5 мл и заражают посредством гIBV и контрольных вариантов. Культуры инкубируют в течение 72 часов при 37 °С и 7,5% CO₂ и встряхивают при 100 об./мин. Культуру собирают и хранят при -80°С. Для пассажей 1, 2, 5, 6 и 7 репликацию вируса оценивают с помощью RT-qPCR. Для этого 250 мкл суспензии удаляют сразу после инокуляции (момент времени 0 ч.) и после сбора (момент времени 72 ч.) для выделения нуклеиновой кислоты. Нуклеиновые кислоты выделяют с помощью набора для очистки нуклеиновых кислот MagMAX™ Core (ThermoFisher) и системы очистки KingFisher™ Duo Prime (ThermoFisher). RT-qPCR осуществляют как описано выше.

Чтобы проанализировать, способен ли Н52 гIBV S F267C реплицироваться в клетках, клетки Eb66® инокулировали посредством разбавленного 1/10 исходного раствора аллантаиной жидкости. Размножение вируса определяют по уменьшению значения *ct* через 72 часа в первом и последующих пассажах. Из-за разбавления вируса для следующего пассажа значение *ct* увеличивается по сравнению со значением *ct*, измеренным при сборе инокулята, прежде чем снова снижаться в течение 72 часов культивирования из-за репликации вируса. Репликация становится еще более очевидной в более высоких пассажах 6 и 7, для которых проводят инокуляцию с разведением 1/1000 предыдущего пассажа (Фигура 2). Результаты ясно показывают репликацию Н52 гIBV F267C в течение 7 пассажей в клетках Eb66®. Таким образом, очевидно, что модификация на

цистеин в положении 267 является генетически стабильной, поскольку ВИБ все еще имеет расширенный тропизм клеточной культуры/ткани после 7 пассажей.

Кроме того, определяют инфекционные титры для исходной аллантоисной жидкости ($10^{6.33}$ TCID₅₀/мл, $10^{7.22}$ EID₅₀/мл) и Eb66® пассажей P1 ($10^{4.67}$ TCID₅₀/мл), P5 ($10^{5.33}$ TCID₅₀/мл) и P7 (10^6 TCID₅₀/мл, $10^{5.84}$ EID₅₀/мл). Они подтверждают эффективную репликацию H52 rIBV S F267C во время процесса пассирования Eb66® и устойчивую инфекционность в яйцах SPF. Таким образом, мутация F267C обеспечивает репликацию в клеточных линиях без нарушения способности к репликации *in ovo*.

10 Кинетика репликации клеток Eb66®

Пассаж 3, собранный из клеток Eb66®, используют для осуществления кинетики репликации в клетках Eb66®. Клетки Eb66® высевают и инкубируют, как описано для пассирования, и заражают посредством MOI 0,001 на основании титра TCID₅₀. Образцы отбирают сразу после инокуляции, а также через 8, 24, 48 и 72 ч.п.и. (часы после инфицирования). Образцы анализируют на содержание вирусной РНК, как описано для эксперимента по пассированию (фигура 3). Кроме того, образцы анализируют на их инфекционность с помощью анализа TCID₅₀ (фигура 4). Эффективная репликация обнаруживается обоими методами, и фаза плато для репликации достигается уже через 48 часов после инфицирования. Безусловно, цикл репликации в клетках Eb66® столь же эффективен, как и в куриных яйцах с эмбрионами.

20 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. Три цыпленка служат в качестве группы строгого отрицательного контроля (SNC), пять цыплят включены в группу контрольного заражения (CC) и по меньшей мере 10 включены в группы, которые вакцинированы посредством Eb66®-адаптированного рекомбинантного ВИБ 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 предоставлены без ограничений. После переноса в изолятор цыплят (суточного возраста) вакцинируют посредством 10^3 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 CC и вакцинированных групп заражают посредством от 10^3 до 10^4 EID₅₀ на цыпленка гомологичного контрольного штамма 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 набор измельчителей 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 3). 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). Животное считается защищенным, если не менее 9 из 10 колец показывают нормальную активность ресничек.

Для ВИБ-специфичного анализа RT-qPCR кусочки ткани почек нагревают до комнатной температуры и переносят в отдельные пробирки Precellys 2 мл, которые заполнены средой и PBS, соответственно. Почки гомогенизируют с помощью гомогенизатора тканей Precellys® (Bertin Instruments) в течение 1x 20 сек. 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).

Таблица 3: Оценка цилиостаза в трахеальных кольцах

Активность ресничек [%]	Оценка цилиостаза
100	0
75-99	1
50-74	2
25-49	3
0-25	4

Цель исследования заключается в том, чтобы продемонстрировать, что адаптированная культура клеток H52 rIBV S F267C, восемь раз пассированная в клетках Eb66®, способна обеспечить защиту от заражения вирулентным штаммом M41. За всеми цыплятами ежедневно наблюдают для выявления клинических признаков, и после вакцинации или контрольного заражения никаких клинических признаков не регистрируют. Обратное титрование вакцины с помощью H52 rIBV и H52 rIBV S F267C в возрасте 1 дня определяет титр $10^{3.2}$ EID₅₀/животное и $10^{2.87}$ EID₅₀/животное (цель 10^3 EID₅₀/животное), соответственно, и 10^3 EID₅₀/животное (цель 10^3 EID₅₀/животное) для заражения посредством ВИБ M41 через 21 день после вакцинации. Цилиостаз оценивают, как описано в Таблице 3, а результаты показаны на фигуре 5.

Среднее значение цилиостаза по сумме 10 индивидуальных оценок для каждого животного и степени защиты суммированы в таблице 4. Все животные строгого отрицательного контроля демонстрируют нормальные движения ресничек (100% защита), в то время как все животные контрольной группы положительными по цилиостазу (0% защита). Напротив, 93% животных, вакцинированных посредством H52 rIBV защищены, и столь же хорошо защищены животные, вакцинированные посредством Eb66®-пассированного H52 rIBV S F267C.

Таблица 4: 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 по меньшей мере 9 из 10 эксплантатов трахеи показывают нормальную активность ресничек.

Вакцина	Заражение	#животных/ не повреждено	Средняя оценка цилиостаза	Не повреждено [%]
-	-	3/3	3	100
-	M41	5/0	40	0
H52 rIBV	M41	14/13	8.9	93
H52 rIBV S F267C	M41	14/13	11.8	93

Кроме того, вирусная нагрузка в почках животных, вакцинированных посредством H52 rIBV S F267C, снижается так же эффективно, как и для H52 rIBV и по сравнению с контрольным заражением M41 (Фигура 6). В заключение, H52 rIBV S F267C, размноженный в клетках Eb66®, защищает от вирулентного заражения M41 так же эффективно, как и H52 rIBV дикого типа. Кроме того, модификация на цистеин в положении 267 является генетически стабильной.

Инфицирование клеток PBS-12SF посредством rIBV

Способность инфицировать клетки PBS-12SF анализируют для исходных растворов аллантоисной жидкости H52 rIBV S F267C и H52 rIBV в качестве отрицательного контроля. Клетки PBS-12SF высевают в среде OptiPRO SFM (ThermoFisher Scientific) + 10% GlutaMAX (ThermoFisher Scientific) в 12-луночные планшеты для достижения 80-90% слияния на следующий день. Клетки инкубируют при 37 °C и 5% CO₂. Перед заражением исходные вирусные растворы аллантоисной жидкости пропускают через фильтр с размером пор 0,45 мкм. Клетки PBS-12SF инфицируют посредством 10^{5.74} EID₅₀ каждого вируса на лунку в течение 4 часов при 37 °C и 5% CO₂ перед удалением супернатанта и добавлением свежей среды для дальнейшей инкубации. Через 72 часа супернатант удаляют, клетки промывают посредством 1xPBS и добавляют 50 мкл TrypLE Select (ThermoFisher Scientific) для отделения клеток. Клетки ресуспендируют в супернатанте и переносят в колбу T25 с 80-90% конфлюэнтных клеток PBS-12SF (P2), которые инкубируют в течение 72 часов. Опять же, супернатант и клетки собирают и переносят в колбу T75 с 80-90% конфлюэнтных клеток PBS-12SF, которую инкубируют в течение 72 часов (P3). Супернатант собирают. Клетки отделяют обработкой трипсином и высевают в 12-луночные планшеты в соотношении от 1 к 3 в свежей среде и инкубируют до следующего дня. Среду отсасывают, клетки промывают посредством 1xPBS, фиксируют ледяным 100% этанолом и сушат на воздухе. Затем клетки повторно

гидратируют с помощью 1xPBS и после этого добавляют первичную куриную сыворотку против ВИБ Mass (Boehringer Ingelheim) в разведении от 1 к 200 и инкубируют в течение 45 минут при комнатной температуре. После удаления антитела клетки промывают и добавляют вторичное козье антитело против IgG курицы Alexa Fluor 488 (ThermoFisher Scientific, разведение 1:500 в 1xPBS) в течение 45 минут при комнатной температуре в темноте. В заключение, клетки трижды промывают посредством 1xPBS и анализируют с помощью флуоресцентной микроскопии (Фигура 7). Инфицированные клетки обнаруживают для H52 rIBV S F267C, тогда как клетки, инфицированные посредством H52 rIBV дикого типа и неинфицированный отрицательный контроль, остаются отрицательными, как и ожидалось. Кроме того, 250 мкл супернатанта хранили после каждого из пассажей 1, 2 и 3 для экстракции нуклеиновой кислоты и RT-qPCR, как описано выше. Непрерывное снижение значения ct (соответствующее репликации и размножению вируса) можно наблюдать для H52 rIBV S F267C в процессе пассирования, в то время как значение ct для H52 rIBV дикого типа увеличивается, как и ожидали (Фигура 8).

Таким образом, эти данные подтверждают, что одиночная мутация фенилаланина на цистеин в положении 267 шиповидного белка H52 делает вирус способным к репликации в клетках PBS12-SF, в то время как вирус дикого типа H52 лишен этой способности.

Инфицирование НЕК-293Т клеток посредством rIBV

Способность инфицировать клетки НЕК 293Т анализируют для исходных растворов аллантоисной жидкости H52 rIBV S F267C и H52 rIBV в качестве отрицательного контроля. Клетки 293Т высевают в среде DMEM (Lonza) + 10% FCS (SAFC) + L-глутамин (Lonza) + 1% P/S (Gibco) в 12-луночные планшеты для достижения 80-90% слияния на следующий день. Клетки инкубируют при 37 °C и 5% CO₂. Перед заражением исходные вирусные растворы аллантоисной жидкости пропускают через фильтр с размером пор 0,45 мкм. Клетки НЕК 293Т инфицируют посредством приблизительно 10⁶ EID₅₀ каждого вируса на лунку. Через 72 часа супернатант удаляют и клетки промывают посредством 1xPBS и добавляют 50 мкл TrypLE Select (ThermoFisher Scientific) для отделения клеток. Клетки ресуспендируют в супернатанте и переносят в колбу T25 с 80-90% конфлюэнтных клеток НЕК 293Т и 5 мл свежей среды (P2), которую инкубируют в течение 72 часов. Опять же, супернатант и клетки собирают и переносят в

колбу T75 с 80-90% конфлюэнтных клеток НЕК 293Т и 10 мл свежей среды, которую инкубируют в течение 72 часов (P3). Супернатант собирают. Клетки отделяют обработкой трипсином и высевают в 12-луночные планшеты в соотношении от 1 к 3 в свежей среде и инкубируют до следующего дня. Среду отсасывают, клетки промывают посредством 1xPBS, фиксируют ледяным 100% этанолом и сушат на воздухе. Затем клетки повторно гидратируют с помощью 1xPBS и после этого добавляют первичную куриную сыворотку против ВИБ Mass (Boehringer Ingelheim) в разведении от 1 к 200 и инкубируют в течение 45 минут при комнатной температуре. После удаления антитела клетки промывают и добавляют вторичное козье антитело против IgG курицы Alexa Fluor 488 (ThermoFisher Scientific, разведение 1:500 в 1xPBS) в течение 45 минут при комнатной температуре в темноте. В заключение, клетки трижды промывают посредством 1xPBS и анализируют с помощью флуоресцентной микроскопии (Фигура 9). Инфицированные клетки обнаруживают для положительного контроля, а также для H52 rIBV S F267C, в то время как клетки, инфицированные посредством H52 rIBV дикого типа и неинфицированный отрицательный контроль, остаются отрицательными, как и ожидали.

Таким образом, эти данные подтверждают, что одиночная мутация фенилаланина на цистеин в положении 267 шиповидного белка H52 делает вирус способным к репликации в клетках НЕК 293Т, в то время как вирус дикого типа H52 лишен этой способности.

Заключительный пример 1: Данные показывают, что мутация цистеина в положении 267 последовательности шиповидного белка (контрольная последовательность для нумерации представляет собой SEQ ID NO:1) в ВИБ приводит к расширенному тропизму культуры клеток и тканей. Рекомбинантный H52 ВИБ, имеющий мутацию F267C в шиповидном белке, можно эффективно культивировать в различных клеточных линиях, таких как клетки EB66, PBS-12SF и НЕК 293Т. Предполагается, что указанный ВИБ можно культивировать в других клеточных линиях. Кроме того, указанная мутация не влияет на репликацию вируса *in ovo*, а кинетика репликации *in ovo* и *in vitro* являются схожими. Наконец, эффективность вакцины сохраняется даже после пассирования в клеточной линии, что закладывает основу для успешной разработки вакцины против ВИБ без необходимости культивирования *in ovo*, но с использованием вместо этого клеточных линий.

ПРИМЕР 2:

СОЗДАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО IBV CR88, В КОТОРОМ
АМИНОКИСЛОТА 269 ШИПОВИДНОГО БЕЛКА МУТИРОВАНА НА
ЦИСТЕИН

5 Чтобы определить, может ли изменение цистеина в положении 267 в
шиповидном белке ВИБ быть также применено к другим генотипам или
серотипам, аминокислотная последовательность шиповидного белка (SEQ ID
NO:11) штамма CR88 IBV была выровнена с аминокислотной
10 последовательностью шиповидного белка H52 (SEQ ID NO:1) для определения
положения, эквивалентного положению 267 шиповидного белка H52 для
шиповидного белка IBV CR88, которое было определено как лейцин в
положении 269 шиповидного белка CR88.

Конструирование донорской мурилизированной плазмиды IBV CR88

15 Для создания мурилизированной CR88 (m) IBV донорской плазмиды
донорскую последовательность синтезирует коммерческий поставщик: 497
оснований 5' UTR генома CR88 сливаются с 3'-частью области 1ab (752
основания) и первыми 72 основаниями, кодирующими шиповидный белок CR88
IBV, за которыми следуют 3753 основания шиповидного эктодомена MHV,
20 продолжающиеся концевыми 210 основаниями шиповидного белка CR88 IBV и
следующей последовательностью до 3'-конца генома. К тому же, сайт
рестрикции SacI и последовательность промотора T7 добавляют к 5'-концу
донорской области, а также последовательность 100x polyA, за которой следует
сайт рестрикции Not I для линеаризации на 3'-конце, соответственно. Молчащая
25 мутация от А до С в положении 5634 собранной последовательности вводится
для создания сайта рестрикции XhoI. Синтезированную последовательность
вставляют в pUC57-simple с получением донорской плазмиды pUC57-s CR88
mIBV (SEQ ID NO:12).

Спасение CR88 mIBV

30 CR88 mIBV спасают по аналогии с H52 mIBV (van Beurden и соавт. Virol J.
2017;14(1):109) с некоторыми изменениями: исходный вирусный раствор
аллантаиной жидкости концентрируют с помощью ультрацентрифугирования
перед выделением вирусной РНК для электропорации. 18 мл вирусной
аллантаиной жидкости центрифугируют при 50,000 x g в течение 2 часов через
2 мл 20%-ной подушки сахарозы в буфере TNE (Tris, NaCl, EDTA). Супернатант

отбрасывают, а осадок ресуспендируют в 150 мкл буфера TNE с последующим выделением РНК с помощью мини-набора для 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

Последовательность нуклеиновой кислоты шиповидного белка CR88 с фланкирующими последовательностями синтезируется коммерческим поставщиком и клонируется в pGEM-T (SEQ ID NO:13). Ее используют в качестве матрицы для сайт-направленного мутагенеза для замены лейцина в аминокислотном положении 269 шиповидного белка IBV CR88 (SEQ ID NO:11) на цистеин (SEQ ID NO:3). Для этого используют набор QuikChangeMulti Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) в соответствии с протоколом производителя и праймер PO1886 (Таблица 5), разработанный соответствующим онлайн-инструментом. Положительные клоны идентифицируют рестрикционным гидролизом и анализируют на наличие желаемой мутации путем секвенирования по Сэнгеру с праймерами PO618 и PO1410 (Таблица 5). Для создания донорской плазмиды pUC57-s CR88 rIBV S L269C (SEQ ID NO:14), плазида pGEM-T CR88 S L269C, содержащая мутированную последовательность шиповидного белка CR88 (SEQ ID NO:15) расщепляется с помощью PacI, XhoI и PvuI. Полосу, соответствующую шиповидному белку, вырезают из геля и очищают с помощью набора для экстракции геля QIAquick (Qiagen). Кроме того, донорскую плазмиду CR88 mIBV (SEQ ID NO:12) расщепляют посредством PacI, XhoI и KpnI для получения остова донорской плазмиды. Полосу с наивысшей молекулярной массой вырезают из геля и очищают с помощью набора для экстракции геля QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Очищенную вставку шиповидного белка и остов донорской плазмиды CR88 лигируют с использованием ДНК-лигазы T4 (ThermoFisher Scientific) при 16 °C в течение ночи. Смесь для лигирования трансформируется в NEB 5-α компетентную *E. coli* (NEB) посредством теплового шока. После набора GeneJET Plasmid Miniprep Kit (ThermoFisher Scientific) положительные клоны идентифицируют рестрикционным гидролизом и охарактеризовывают в отношении целевой мутации с помощью секвенирования по Сэнгеру с праймерами PO618, PO1014 (Таблица 5).

Нацеленная рекомбинация РНК и спасение рекомбинантного ВИБ

Для спасения CR88 rIBV S L269C, клетки LR7 инфицируют посредством CR88 mIBV и подвергают электропорации транскриптом *in vitro*, полученным из NotI линейаризованной донорской плазмиды pUC57-s CR88 S L269C, и затем
5 впрыскивают в 8-дневные куриные яйца SPF с эмбрионами (VALO BioMedia). После 8 дней инкубации, аллантаисные жидкости всех яиц анализируют отдельно для спасения рекомбинантного ВИБ после выделения РНК с помощью MagMAX™ Core Nucleic Acid Purification Kit (ThermoFisher) и KingFisher™ Duo Prime Purification System (ThermoFisher) и с использованием SuperScript™ III
10 One-Step RT-PCR System с Platinum™ Taq DNA Polymerase (ThermoFisher). Используют праймеры PO1728 и PO1729 (Таблица 5), связывающие в CR88 IBV 1ab и CR88 IBV S шиповидный белок для различения рекомбинантного ВИБ от мВИБ. Положительную аллантаисную жидкость яйца, инокулированного
клетками LR7 с максимальным разведением используют для конечного
15 разведения в 8-дневных яйцах SPF. Выделение нуклеиновых кислот осуществляют, как описано выше. Образцы анализируют с помощью RT-qPCR, осуществляемой в соответствии с протоколом, адаптированным у 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
20 Virus 1-Step Master Mix (ThermoFisher) и систем StepOnePlus или ABI7900 HT Fast Real-Time PCR (ThermoFisher Scientific). После этого одну положительно протестированную аллантаисную жидкость в высоком разведении используют для размножения в куриных яйцах SPF с 8-дневным эмбрионом. Аллантаисную жидкость разбавляют 1:100 в 1xPBS и 100 мкл впрыскивают на каждое яйцо,
25 которое затем инкубируют при 37,5 °C и влажности 60%. Аллантаисную жидкость собирают через 48 часов после инокуляции, очищают от дебриса и хранят при -80 °C.

Таблица 5: Праймер SDM для получения мутации CR88 S L269C и праймеры для секвенирования, чтобы подтвердить целевую мутацию и спасение
30 CR88 rIBV.

SEQ ID NO:	Название	Последовательность
43	PO1886	gtatatcgagaaagtagcaactaactacttgtaagtaactaatttcagtttactaatg
19	PO618	taaatggatcttgttt
44	PO1410	tttgatatacgagagccatca
45	PO1728	tcagcgtggacatgtggta
46	PO1729	ccccatataggtgccaacct

Характеристика рекомбинантного ВИБ *in vitro* и *in ovo*

Инфекционную дозу эмбриона 50% (EID₅₀) и инфекционную дозу культуры ткани 50% (TCID₅₀) для CR88 гIBV S L269С определяют, как описано для H52 гIBV S F267С. Кроме того, кинетику репликации *in ovo* и *in vitro* и пассирование проводили, как описано для H52 гIBV S F267С.

Схожую кинетику репликации *in ovo* наблюдают для CR88 гIBV дикого типа и CR88 гIBV S L269С (фигура 10). Это свидетельствует об отсутствии недостатков мутации цистеина в шиповидном белке CR88 гIBV S L269С для эффективности репликации *in ovo* мутированного гIBV по сравнению с гIBV CR88 дикого типа, как это было показано для H52 гIBV S F267С и H52 гIBV дикого типа.

Чтобы проанализировать, способен ли CR88 гIBV S L269С реплицироваться в клетках, клетки Eb66® инокулируют разбавлением 1/100 исходного раствора аллантоисной жидкости. Размножение вируса определяют по уменьшению значения ст через 72 часа в первом и последующих пассажах. Из-за разбавления вируса для следующего пассажа значение ст увеличивается по сравнению со значением ст, измеренным при сборе инокулята, прежде чем снова снижаться в течение 72 часов культивирования из-за репликации вируса. Репликация CR88 гIBV S L269С четко видна в процессе пассирования по уменьшению значения ст для 72-часовой временной точки по сравнению с 0-часовой временной точкой непосредственно после инфицирования. Напротив, значения ст отрицательного контроля CR88 гIBV дикого типа подтверждают отсутствие репликации этого вируса ни в одном из проанализированных пассажей и разведение исходного инокулята во время процесса пассирования (фигура 11). Результаты ясно показывают репликацию CR88 гIBV L269С на протяжении 7 пассажей в клетках Eb66®, в то время как вирус дикого типа не может реплицироваться, подчеркивая, что мутация L269С в шиповидном белке имеет решающее значение для расширенного клеточного или тканевого тропизма. Эффективная репликация для CR88 гIBV S L269С также выявлена с помощью RT-qPCR (фигура 12) и определения TCID₅₀ (фигура 13) в эксперименте по кинетике репликации в клетках Eb66®.

Кроме того, определяют инфекционные титры для исходного раствора аллантоисной жидкости (10^3 TCID₅₀/мл, 10^8 EID₅₀/мл) и Eb66® пассажей P1 ($10^{3.5}$

TCID₅₀/мл, 10^{5,84} EID₅₀/мл), P5 (10^{5,3} TCID₅₀/мл) и P8 (10⁶ TCID₅₀/мл, 10⁶ EID₅₀/мл). Они подтверждают эффективную репликацию CR88 rIBV S L269C в процессе пассирования Eb66® и устойчивую инфекционность в яйцах SPF. Таким образом, мутация L269C делает возможной репликацию в клеточных линиях без нарушения способности репликации *in ovo*.

Определение эффективности вакцины

Тестирование эффективности CR88 rIBV S L269C против заражения посредством IBV 793B проводили, как описано выше для H52 rIBV S F269C. Цель исследования заключается в том, чтобы продемонстрировать, что адаптированная культура клеток CR88 rIBV S L269C, один раз пассированная в клетках Eb66® способна обеспечить защиту от заражения вирулентным штаммом 793B. За всеми цыплятами ежедневно наблюдают для выявления клинических признаков. После вакцинации или контрольного заражения никаких клинических признаков не регистрируют. Обратное титрование вакцины с помощью CR88 rIBV S L269C в возрасте 1 дня определяет титр 10^{3,6} EID₅₀/животное (цель 10³ EID₅₀/животное), соответственно, и 10^{4,1} EID₅₀/животное (цель 10⁴ EID₅₀/животное) для заражения посредством IBV 793B на 21 день после вакцинации. Цилиостаза оценивают, как описано в Таблице 3 и результаты показаны на Фигуре 14 и приведены в Таблице 6. Все животные строгого отрицательного контроля демонстрируют нормальные движения ресничек, в то время как 4 из 5 животных контрольной группы заражения являются положительными по цилиостазу. Напротив, 80% животных, вакцинированных посредством CR88 rIBV S L269C, являются защищенными.

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 по меньшей мере 9 из 10 эксплантатов трахеи показывают нормальную активность ресничек.

Вакцина	Заражение	#животных/ не повреждено	Средняя оценка цилиостаза	Не повреждено [%]
-	-	3/3	3	100
-	793B	5/1	30.8	20
CR88 rIBV S L269C	793B	10/8	13.2	80

Кроме того, вирусная нагрузка РНК значительно снижена в почках животных, вакцинированных посредством CR88 гIBV, S L269C по сравнению с животными контрольного заражения (фигура 15). Таким образом, CR88 гIBV S L269C, размноженный в клетках Eb66®, эффективно защищает от вирулентного заражения 793В. Мутация шиповидного белка L269C адаптирует вирус к размножению в клетках, в то время как эффективность *in vivo* сохраняется.

Заключительный пример 2: Данные показывают, что мутация цистеина в положении 267 шиповидного белка (контрольная последовательность для нумерации представляет собой SEQ ID NO:1), соответствующая положению 269 в шиповидном белке CR88 также приводит к расширенному клеточному или тканевому тропизму в рекомбинантном IBV CR88. Кроме того, указанная мутация не влияет на репликацию вируса *in ovo*. Наконец, эффективность вакцины сохраняется даже после размножения в клеточной линии, что закладывает основу для успешной разработки вакцины против ВИБ без необходимости культивирования *in ovo*, но с использованием вместо этого клеточных линий.

ПРИМЕР 3:

ОБРАЗОВАНИЕ ХИМЕРНОГО РЕКОМБИНАНТНОГО IBV CR88 ИЛИ H52, В КОТОРЫХ ШИПОВИДНЫЙ CR88 ИЛИ H52 ГЕН ЗАМЕНЕН НА ШИПОВИДНЫЙ QX ГЕН, В КОТОРОМ АМИНОКИСЛОТА 270 ШИПОВИДНОГО БЕЛКА МУТИРОВАНА НА ЦИСТЕИН

Для того, чтобы пояснить подробнее может ли изменение цистеина в положении 267 шиповидного белка для достижения тропизма клеточной культуры быть перенесено на дополнительные генотипы ВИБ, последовательность аминокислот шиповидного белка QX (SEQ ID NO:65) была выровнена с аминокислотной последовательностью H52 шиповидного белка (SEQ ID NO:1) для определения положения, эквивалентного аминокислотному положению 267 шиповидного белка H52 для шиповидного белка QX IBV, который был определен как лейцин в положении 270 шиповидного белка QX.

Чтобы проанализировать потенциал шиповидного белка QX с мутацией в аминокислотном положении 270 на цистеин инфицировать клетки, создают рекомбинантный IBV CR88 и рекомбинантный IBV H52, в которых последовательность, кодирующая шиповидный белок CR88 или шиповидный

белок H52 соответственно, заменена на последовательность, кодирующую шиповидный белок QX с цистеином в положении 270 шиповидного белка (SEQ ID NO:4). Для этого стадии по созданию и спасению H52 mIBV и CR88 mIBV осуществляют, как описано в Примерах 1 и 2.

5 Клонирование и мутация гена шиповидного белка QX

Последовательность шиповидного белка QX амплифицируется из вирусной РНК IBV QX с помощью одностадийной RT-PCR (SuperScript® III One-Step RT-PCR, Platinum® Taq) с использованием праймеров PO1367 и PO1347 (Таблица 7) и клонируется с использованием векторной системы pGEM-T (Promega). Она
10 служит в качестве матрицы для сайт-направленного мутагенеза с использованием праймеров PO2163 и PO2164 (Таблица 7), разработанных с помощью NEBaseChanger для создания плазмиды pGEM-T IBV QX S L270C (SEQ ID NO:66). Для идентификации клонов с плазмидами, несущими желаемую мутацию, после положительного рестрикционного расщепления проводят
15 секвенирование по Сэнгеру с праймерами PO1398 и PO633, расположенными в области, фланкирующей мутацию (Таблица 7).

Таблица 7: Праймеры для клонирования и сайт-направленного мутагенеза последовательности шиповидного белка QX

SEQ ID NO	Название	Последовательность
47	PO1367	cgcggatccgccaccatgttggtgaagtcactg
48	PO1347	gcggcggccgcttaaacagacttttaggtctg
49	PO2163	taatactactgtgtgcgtaactaattttacttttagtaatg
50	PO2164	acactactttcacgatag
51	PO1398	aatttaacagttagcgtatc
21	PO633	cgctcttagtaacataaac

20 Конструирование донорской плазмиды

Донорскую плазмиду pUC57-s H52 rIBV QX S L270C (SEQ ID NO:69) конструируют с использованием NEBuilder® HiFi DNA Assembly Cloning Kit (NEB) и онлайн-инструмента для конструирования праймеров. Для этого донорскую плазмиду pUC57-s H52 rIBV (SEQ ID NO:9) подвергают
25 расщеплению с использованием сайтов рестрикции EcoRV, PmlI и BspI, близких к последовательности, кодирующей шиповидный белок H52, чтобы линейаризовать плазмиду и удалить шиповидную и фланкирующую последовательности H52. Набор для экстракции геля QIAquick (Qiagen) используют для очистки полосы, соответствующей основной цепи pUC57-s IBV

Н52 без последовательности, кодирующей шиповидный белок Н52. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая QX S L270C и фланкирующие последовательности 5' и 3' IBV Н52 амплифицируют в трех отдельных реакциях ПЦР с высокоточной ДНК-полимеразой Q5® High-Fidelity (NEB; праймеры см. в Таблице 8). Продукты ПЦР очищают с помощью экстракции из геля QIAquick (Qiagen) и используют для сборки по Гибсону с помощью набора NEBuilder® HiFi DNA Assembly Cloning Kit (NEB) в соответствии с протоколом набора для создания донорской плазмиды рUC57-s Н52 гIBV QX S L270C (SEQ ID NO:69).

10 Донорскую плазмиду рUC57-s CR88 гIBV QX S L270C (SEQ ID NO:68) конструируют с использованием набора NEBuilder® HiFi DNA Assembly Cloning Kit (NEB) и онлайн-инструмента для конструирования праймеров. Создают два фрагмента ПЦР: один для остова CR88 с использованием рUC57-s CR88 гIBV (SEQ ID NO:67) в качестве матрицы и один для мутированного шиповидного

15 белка QX L270C с использованием рGEM-T IBV CR88 S L270C (SEQ ID NO:66) в качестве матрицы для Q5 PCR с праймерами из Таблицы 8. Продукты ПЦР очищают с помощью набора для экстракции геля QIAquick (Qiagen) перед их использованием для сборки по Гибсону в соответствии с протоколом набора для создания донорской плазмиды рUC57-s CR88 гIBV QX S L270C (SEQ ID NO:68).

20 Таблица 8: Праймеры, разработанные с помощью онлайн-инструмента NEBuilder для сборки по Гибсону донорской плазмиды рUC57-s CR88 гIBV QX L270C (PCR 1, 2) и рUC57-s Н52 гIBV QX L270C (PCR 3, 4, 5)

ПЦР	SEQ ID NO	Название праймера	Продукт	Последовательность
1	52	PO2207	шиповидный белок QX	aagtgtggtaagtactggtaagagatgttggtgaagtcactg
	53	PO2208		agaaaagatgtgggacttttaacattaaacagacttttaggtctg
2	54	PO2209	остов CR88	tgattaaaagtcccacatcttttctaataattattattattcttcttgg
	55	PO2210		ctctaccagtaactaccacacttaattaaattaaagactaagtc
3	70	PO1783	Н52 5' фланкирующий участок	cagagcacaagtttgatcttgatATCTGATATGTATACAGACAATGATTC
	71	PO2062		actcaccacaacatCTCTTACCAGTAACTTACC
4	72	PO2063	QX S L270C	ttactggtaagagATGTTGGTGAAGTCACTG
	73	PO2064		ggactttgatcaTTAAACAGACTTTTTAGGTCTG
5	74	PO2065	Н52 3' фланкирующий участок	aaagtctgttaaTGATCCAAAGTCCCACTAG
	75	PO1788		cttaactcctggaattactaaccacGTGTACCAAAATAACAACAAGC

Успешная сборка pUC57-s CR88 rIBV QX S L270C и pUC57-s H52 rIBV QX S L270C идентифицируется рестрикционным расщеплением плазмиды с помощью NheI и NotI или EcoRV, BlnI и PmlI соответственно и характеризуется секвенированием с праймерами в Таблице 9.

5 Таблица 9: Праймеры для секвенирования донорских плазмид pUC57-s CR88 rIBV QX S L270C и pUC57-s H52 rIBV QX S L270C.

SEQ ID NO	Название праймера	Последовательность
56	PO1565	caggattgtgcatgggtggac
51	PO1398	aatttaacagttagcgtatc
57	PO2090	gaagtgaayacaagatcaccattt
58	PO1420	tgactgattctgctgctaaa
44	PO1410	ttgtatacgagagccatca
59	PO1421	tcttgaaaccccccaagtag
60	PO1425	tatattcagcatcagttggc
61	PO1422	ggattttgtggtagtggaag
62	PO1575	ccactattgcagtaacattaaca
63	PO1567	ctagactgtaagttactattg

Нацеленная рекомбинация РНК и спасение рекомбинантного ВИБ

10 Для спасения CR88 rIBV QX S L270C и H52 rIBV QX S L270C, клетки LR7 инфицируют посредством CR88 mIBV или H52 mIBV соответственно и подвергают электропорации *in vitro* транскриптом, созданным от NotI или MssI линейризованной донорской плазмиды pUC57-s CR88 rIBV QX S L270C или pUC57-s H52 rIBV QX S L270C соответственно, а затем впрыскивают в 8-дневные куриные яйца SPF с эмбрионами (VALO BioMedia). Через 8 дней инкубации аллантоисные жидкости некоторых яиц анализируют отдельно на предмет спасения рекомбинантного ВИБ после выделения РНК с помощью набора для очистки нуклеиновых кислот MagMAX™ Core Nucleic Acid Purification Kit (ThermoFisher) и KingFisher™ Duo Prime Purification System (ThermoFisher) и с помощью системы SuperScript™ III One-Step RT-PCR System с Platinum™ Taq с ДНК-полимеразой (ThermoFisher). Используют праймеры PO1398 и PO633 (Таблица 7), связывающие в последовательности шиповидного QX, для идентификации спасения рекомбинантного вируса. Положительную (определяемую гибелью эмбриона или положительным результатом RT-PCR) аллантоисную жидкость яйца, инокулированного самым высоким разведением клеток LR7 используют для конечного разведения в яйцах SPF с эмбрионами 8-

15

20

25

дневного возраста. Выделение нуклеиновых кислот осуществляют, как описано выше. Образцы анализируют с помощью RT-qPCR, осуществляемой в соответствии с протоколом, адаптированным у 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 систем StepOnePlus или ABI7900 HT Fast Real-Time PCR (ThermoFisher Scientific). После этого одну положительно протестированную аллантаисную жидкость в высоком разведении используют для размножения в куриных яйцах SPF с 8-дневным эмбрионом. Аллантаисную жидкость разбавляют 1:100 в 1xPBS и 100 мкл впрыскивают на каждое яйцо, которое затем инкубируют при 37,5 °C и влажности 60%. Аллантаисную жидкость собирают через 48 часов после инокуляции, очищают от дебриса и хранят при -80°C.

Характеристика рекомбинантного ВИБ *in vitro* и *in ovo*

Инфекционную дозу эмбриона 50% (EID50) и инфекционную дозу культуры ткани 50% (TCID50) для CR88 гIBV QX S L270C и H52 гIBV QX S L270C определяют, как описано для H52 гIBV S F267C. Кроме того, кинетику репликации *in ovo* и *in vitro* и пассирование осуществляли, как описано для H52 гIBV S F267C.

Сходные пиковые значения ct через 48 часов с немного различной кинетикой репликации *in ovo* наблюдают для CR88 гIBV QX S L270C и H52 гIBV QX S L270C (фигура 16). В то время как CR88 гIBV QC L270C реплицируется очень похоже на CR88 гIBV и IBV QX дикого типа, H52 гIBV QX s L270C реплицируется более похоже на H52 гIBV. Это свидетельствует об отсутствии недостатков мутации цистеина в шиповидном белке CR88 гIBV QX S L270C и H52 гIBV QX S L270C для эффективности репликации *in ovo* мутированного гIBV по сравнению с другими гIBV или ВИБ дикого типа.

Чтобы проанализировать, способны ли CR88 гIBV QX S L270C и H52 гIBV QX S L270C реплицироваться в клетках, клетки EB66® инокулируют разбавлением 1/100 исходного раствора аллантаисной жидкости. Размножение вирусов анализируют путем выделения вирусной РНК и последующего анализа RT-qPCR. Репликация CR88 гIBV QX S L270C и H52 гIBV QX S L270C отчетливо видна в процессе пассирования по уменьшающемуся среднему значению ct для 72-часовой временной точки по сравнению с 0-часовой временной точкой непосредственно после инфицирования (Фигура 17 и 18). Из-

за разбавления вируса для следующего пассажа значение st увеличивается по сравнению со значением st , измеренным при сборе инокулята, прежде чем снова снижаться в течение 72 часов культивирования из-за репликации вируса. Эффективную репликацию для CR88 rIBV QX S L270C и H52 rIBV QX S L270C также обнаруживают с помощью RT-qPCR (фигура 19) в эксперименте по кинетике репликации в клетках Eb66®. Оба вируса проявляют схожие паттерны репликации с пиковыми значениями СТ через 48 часов.

Кроме того, определяют инфекционные титры для исходного раствора аллантоисной жидкости CR88 rIBV QX S L270C (10^8 EID₅₀/мл) и Eb66® пассажей P2 (10^6 TCID₅₀/мл, $10^{8.17}$ EID₅₀/мл), P6 (10^6 TCID₅₀/мл, $10^{7.83}$ EID₅₀/мл) и P9 (10^6 TCID₅₀/мл, $10^{8.5}$ EID₅₀/мл). Помимо этого, определяют инфекционные титры для исходного раствора аллантоисной жидкости H52 rIBV QX S L270C (10^8 EID₅₀/мл) и Eb66® пассажей P3 ($10^{4.5}$ TCID₅₀/мл, $10^{8.13}$ EID₅₀/мл) и P6 ($10^{5.5}$ TCID₅₀/мл, $10^{8.13}$ EID₅₀/мл). Они подтверждают эффективную репликацию CR88 rIBV QX S L270C во время процесса пассажа Eb66® и устойчивую инфекционность в яйцах SPF. Таким образом, мутация L270C обеспечивает репликацию в клеточных линиях без нарушения способности репликации *in ovo*.

Определение эффективности вакцины

Тестирование эффективности CR88 rIBV QX S L270C и H52 rIBV QX S L270C против заражения посредством IBV D388 QX проводили, как описано выше для H52 rIBV S F269C. Цель исследования заключается в том, чтобы продемонстрировать, что адаптированная культура клеток CR88 rIBV QX S L270C и H52 rIBV QX S L270C, шесть раз пассированная в клетках EB66®, способна обеспечить защиту от заражения вирулентным штаммом D388 QX. За всеми цыплятами ежедневно наблюдают для выявления клинических признаков. После вакцинации или контрольного заражения никаких клинических признаков не регистрируют. Обратное титрование вакцины с помощью CR88 rIBV QX S L270C и H52 rIBV QX S L270C в возрасте 1 дня определяет титр $10^{4.2}$ EID₅₀/животное и $10^{3.3}$ EID₅₀/животное (цель 10^3 EID₅₀/животное), соответственно, и $10^{3.5}$ EID₅₀/животное (цель 10^3 EID₅₀/животное) для заражения посредством IBV D388 QX на 21 день после вакцинации. Цилиостаз оценивают, как описано в Таблице 3 и результаты показаны на Фигуре 20 и приведены в Таблице 10. Все животные строгого отрицательного контроля демонстрируют нормальные движения ресничек, в то время как все животные контрольной

группы заражения являются положительными по цилиостазу. Напротив, 78% и 91% животных, вакцинированных посредством CR88 rIBV QX S L270C или H52 rIBV QX S L270C, являются защищенными.

5 Таблица 10: 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 по меньшей мере 9 из 10 эксплантатов трахеи показывают нормальную активность ресничек. * одно животное из группы строгого отрицательного контроля погибло, смерть не была связана с клиническими признаками или поражениями ВИБ.

Вакцина	Заражение	#животные/ не повреждено	Средняя оценка цилиостаза	Не повреждено [%]
-	-	3/2*	0	100
-	D388 QX	5/0	38.4	0
CR88 rIBV QX S L270C	D388 QX	9/7	13.9	78
H52 rIBV QX S L270C	D388 QX	11/10	8.1	91

15 Кроме того, вирусная РНК нагрузка значительно снижена в почках животных, вакцинированных посредством CR88 rIBV QX S L270C или H52 rIBV QX L270C, по сравнению с животными контрольного заражения (фигура 21). Таким образом, CR88 rIBV QX S L270C и H52 rIBV QX S L270C, размноженные в клетках EB66®, эффективно защищают от вирулентного заражения D388 QX. Мутация шиповидного белка L270C адаптирует вирус к размножению в клетках, в то время как эффективность *in vivo* сохраняется.

25 Заключительный пример 3: Данные показывают, что мутация цистеина в положении 267 шиповидного белка (контрольная последовательность для нумерации представляет собой SEQ ID NO:1), соответствующая положению 270 в IBV QX в шиповидном белке также приводит к расширенному клеточному или тканевому тропизму. Кроме того, тропизм тканевой культуры шиповидного белка с мутацией цистеина не ограничивается гомологичным генетическим фоном, так как шиповидный белок QX L270C вставлен в генетический остов CR88 и H52, а CR88 rIBV QX S L270C и H52 rIBV QX S L270C эффективно

реплицируются в клетках и эффективно защищают от вирулентного заражения IBV D388 QX.

ПРИМЕР 4:

ОБРАЗОВАНИЕ ХИМЕРНОГО РЕКОМБИНАНТНОГО IBV H52, В
5 КОТОРОМ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ, КОДИРУЮЩАЯ ЭКТОДОМЕН H52
ШИПОВИДНОГО БЕЛКА ЗАМЕНЕНА НА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ,
КОДИРУЮЩУЮ ЭКТОДОМЕН ШИПОВИДНОГО БЕЛКА ARKDPI, ГДЕ
АМИНОКИСЛОТА 274 ШИПОВИДНОГО БЕЛКА МУТИРОВАНА НА
ЦИСТЕИН

10 Для того, чтобы пояснить подробнее может ли изменение цистеина в
положении 267 шиповидного белка для достижения тропизма клеточной
культуры быть перенесено на дополнительные генотипы ВИБ,
последовательность аминокислот шиповидного белка ArkDPI (SEQ ID NO:76)
была выровнена с аминокислотной последовательностью H52 (SEQ ID NO:1) для
15 определения положения, эквивалентного аминокислотному положению 267
шиповидного белка H52 для шиповидного белка ArkDPI IBV, который был
определен как лейцин в положении 274 шиповидного белка ArkDPI.

Чтобы проанализировать потенциал шиповидного белка ArkDPI с мутацией
в аминокислотном положении 274 на цистеин инфицировать клетки,
20 инфицировать клетки IBV H52, в котором последовательность, кодирующая
шиповидный белок H52, заменена на последовательность, кодирующую
шиповидный белок ArkDPI с цистеином в положении 274 шиповидного белка
ArkDPI (SEQ ID NO:77). Для этого стадии по созданию и спасению H52 mIBV
осуществляют, как описано в Примере 1.

25 Конструирование донорской плазмиды

Плазмиду pUC57-s ArkDPI spike L274C (SEQ ID NO:78) синтезируют
коммерческим поставщиком. Донорскую плазмиду pUC57-s H52 rIBV ArkDPI S
Ecto L274C (SEQ ID NO:79) конструируют с использованием NEBuilder® HiFi
DNA Assembly Cloning Kit (NEB) и онлайн-инструмента для конструирования
30 праймеров. Для этого донорскую плазмиду pUC57-s H52 rIBV (SEQ ID NO:9)
подвергают расщеплению с использованием сайтов рестрикции EcoRV, PmlI и
BspI, близких к последовательности, кодирующей шиповидный белок H52,
чтобы линеаризовать плазмиду и удалить шиповидную и фланкирующую
последовательности H52. Набор для экстракции геля QIAquick (Qiagen)

используют для очистки полосы, соответствующей основной цепи pUC57-s IBV H52 без последовательности, кодирующей шиповидный белок H52. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая ArkDPI S Ecto L274C и фланкирующие последовательности 5' и 3' IBV H52 амплифицируют в трех
 5 отдельных реакциях ПЦР с высокоточной ДНК-полимеразой Q5® High-Fidelity (NEB; праймеры см. в Таблице 11). Продукты ПЦР очищают с помощью экстракции из геля QIAquick (Qiagen) и используют для сборки по Гибсону с помощью набора NEBuilder® HiFi DNA Assembly Cloning Kit (NEB) в соответствии с протоколом набора для создания донорской плазмиды pUC57-s
 10 H52 rIBV ArkDPI S Ecto L274C (SEQ ID NO:79).

Таблица 11: Праймеры, разработанные с помощью онлайн инструмента NEBuilder для сборки по Гибсону pUC57-s H52 rIBV ArkDPI S Ecto L274C.

PCR	SEQ ID NO	Название праймера	Продукт	Последовательность
1	70	PO1783	H52 5' фланкирующий участок	cagagcacaagtttgatcttgatctgatatgtatatacagacaatgattc
	80	PO2424		catataaattagcactacatagtgcacac
2	81	PO2425	ArkDPI S	atgtagtgcctaatttatatgacaacgaatcttttg
	82	PO2426	Экто	acacataccaaggccacttaataataagtttg
3	83	PO2427	H52 3' фланкирующий участок	taagtggccttggtatgtgtggctagcc
	75	PO1788		cttaactcctggaattactaaccacgtgtaccsaaataaacaacaagc

Успешная сборка pUC57-s H52 rIBV ArkDPI S Ecto L274C
 15 идентифицируется рестрикционным расщеплением плазмиды с помощью BpI и XhoI.

Нацеленная рекомбинация РНК и спасение рекомбинантного ВИБ

Для спасения H52 rIBV ArkDPI S Ecto L274C, клетки LR7 инфицируют посредством H52 mIBV соответственно и подвергают электропорации транскриптом *in vitro*, полученным из MssI, линейаризованной донорской
 20 плазмиды pUC57-s H52 rIBV ArkDPI S Ecto L274C, и затем впрыскивают в 8-дневные куриные яйца SPF с эмбрионами (VALO BioMedia). После 8 дней инкубации, аллантаисные жидкости всех яиц анализируют отдельно для спасения рекомбинантного ВИБ после выделения РНК с помощью MagMAX™
 25 Core Nucleic Acid Purification Kit (ThermoFisher) и KingFisher™ Duo Prime Purification System (ThermoFisher) и с использованием SuperScript™ III One-Step

RT-PCR System с Platinum™ Taq DNA Polymerase (ThermoFisher). Используют праймеры PO1317 и PO633 (Таблица 12), связывающие в последовательности шиповидного белка ArkDPI для идентификации спасения рекомбинантного вируса. Положительную (определяемую гибелью эмбриона или положительным результатом RT-PCR) аллантоисную жидкость яйца, инокулированного самым высоким разведением клеток LR7 используют для конечного разведения в яйцах SPF с эмбрионами 8-дневного возраста. Выделение нуклеиновых кислот осуществляют, как описано выше. Образцы анализируют с помощью RT-qPCR, осуществляемой в соответствии с протоколом, адаптированным у 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 систем StepOnePlus или ABI7900 HT Fast Real-Time PCR (ThermoFisher Scientific). После этого одну положительно протестированную аллантоисную жидкость в высоком разведении используют для размножения в куриных яйцах SPF с 8-дневным эмбрионом. Аллантоисную жидкость разбавляют 1:100 в 1xPBS и 100 мкл впрыскивают на каждое яйцо, которое затем инкубируют при 37,5 °С и влажности 60%. Аллантоисную жидкость собирают через 48 часов после инокуляции, очищают от дебриса и хранят при -80 °С.

Таблица 12: Праймеры для определения H52 rIBV ArkDPI S Ecto L274C.

SEQ ID NO	Название праймера	Последовательность
84	PO1317	taatactggyaatttttcaga
21	PO633	cgctcttagtaacataaac

Характеристика рекомбинантного ВИБ *in vitro*

Инфекционную дозу эмбриона 50% (EID50) и инфекционную дозу культуры ткани 50% (TCID50) для H52 rIBV ArkDPI S Ecto L274C определяют, как описано для H52 rIBV S F267C. Кроме того, кинетику репликации *in vitro* и пассирование проводили, как описано для H52 rIBV S F267C.

Чтобы проанализировать, способен ли H52 rIBV ArkDPI S Ecto L274C реплицироваться в клетках, клетки EB66® инокулируют разбавленным 1/10 исходным раствором аллантоисной жидкости для первого пассажа и разбавленным 1/10 или 1/100 раствором для последующих пассажей. Размножение вирусов анализируют путем выделения вирусной РНК и

последующего анализа RT-qPCR. Репликация H52 rIBV ArkDPI S Ecto L274C четко видна после трех пассажей по уменьшающемуся среднему значению ct для 72-часовой временной точки (11.59) по сравнению с 0-часовой временной точкой (21.09) непосредственно после инфицирования.

5 Заключительный пример 4: Данные показывают, что мутация цистеина в
положении 267 шиповидного белка (контрольная последовательность для
нумерации представляет собой SEQ ID NO:1), соответствующая положению 274
в шиповидном белке ArkDPI IBV также приводит к расширенному клеточному
или тканевому тропизму. Кроме того, тропизм тканевой культуры шиповидного
10 белка с мутацией цистеина не ограничивается гомологичным генетическим
фоном, так как эктодомен шиповидного белка ArkDPI L274C вставлен в
генетический остов H52 и H52 rIBV ArkDPI S Ecto L274C эффективно
реплицируются в клетках.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Шиповидный белок птичьего коронавируса или его фрагмент, где по меньшей мере часть субъединицы S1 происходит от птичьего коронавируса с ограниченным тропизмом клетки или ткани, и где в аминокислотном положении 267 находится цистеин.

2. Рекомбинантный шиповидный белок птичьего коронавируса или его фрагмент, содержащий мутацию в положении 267 аминокислоты на цистеин.

3. Шиповидный белок птичьего коронавируса или его фрагмент по п. 1 или 2, где птичий коронавирус представляет собой ВИБ (вирус инфекционного бронхита).

4. Шиповидный белок птичьего коронавируса или его фрагмент по п. 1, где цистеин в аминокислотном положении 267 вводится мутацией.

5. Шиповидный белок птичьего коронавируса или его фрагмент по одному из пп. 1 - 4, где цистеин в аминокислотном положении 267 или указанная мутация в аминокислотном положении 267 к цистеину приводит к расширенному клеточному или тканевому тропизму птичьего коронавируса.

6. Шиповидный белок птичьего коронавируса или его фрагмент по одному из пп. 1 - 5, где птичий коронавирус инфицирует и/или реплицируется в по меньшей мере одной клеточной линии, выбранной из перечня, включающего в себя: DF-1 (Douglas Foster), PBS-12, PBS-12SF (без сыворотки PBS-12), ВНК21 (почка детеныша хомячка), НЕК 293Т (эмбриональная почка человека), Vero (Verda Reno), MA104, RK13 (почка кролика), LMH (гепатома самцов леггорна), MDCK (собачья почка Madin-Darby), MDBK (бычья почка Madin-Darby), PK15 (свиная почка), PK2A (свиная почка), SF9, SF21 и SF+ (*Spodoptera frugiperda*).

7. Шиповидный белок птичьего коронавируса или его фрагмент по одному из пп. 1 - 6, где аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1 используют для определения нумерации положения в шиповидном белке.

8. Шиповидный белок птичьего коронавируса или его фрагмент по одному из пп. 1 - 7, где аминокислотное положение 267 находится в субъединице S1 шиповидного белка.

5

9. Шиповидный белок птичьего коронавируса или его фрагмент по одному из пп. 3 - 8, где шиповидный белок происходит не от штамма ВИБ Beaudette.

10. Шиповидный белок ВИБ или его фрагмент по одному из пп. 3 - 9, где шиповидный белок происходит от ВИБ с генотипом или серотипом или штамма, выбранного из перечня, включающего в себя: Арканзас, Бразилия, Калифорния, Коннектикут, Делавэр, Нидерландский, Флорида, Джорджия, Грей, Холт, Айова, Италия-02, JMK, LDT3, Мэн, H52, H120, M41, Пенсильвания, PL84084, Qu, QX, Q1, SE 17, Вариант 2 и 4/91.

15

11. Шиповидный белок ВИБ или его фрагмент по одному из пп. 3 - 10, где шиповидный белок ВИБ или его фрагмент выбирают из перечня генотипов, включающего в себя: GI-2 - 27, GII-1, GIII-1, GIV-1, GV-1, GVI-1.

12. Шиповидный белок ВИБ или его фрагмент по одному из пп. 3 - 11, где шиповидный белок ВИБ или его фрагмент состоит из или содержит аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 77 или последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99% идентичности с ней.

25

13. Шиповидный белок ВИБ или его фрагмент по одному из пп. 3 - 12, где указанная по меньшей мере часть субъединицы S1 происходит от ВИБ, выбранного из перечня генотипов или серотипов, или штаммов, включающих в себя: Арканзас, Бразилия, Калифорния, Коннектикут, Делавэр, Нидерландский, Флорида, Джорджия, Грей, Холт, Айова, Италия-02, JMK, LDT3, Мэн, H52, H120, M41, Пенсильвания, Пенсильвания, PL84084, Qu, QX, Q1, SE 17, Вариант 2 и 4/91.

30

14. Шиповидный белок птичьего коронавируса или его фрагмент по одному из пп. 1 и 3 - 13, где птичий коронавирус или ВИБ с ограниченным тропизмом клетки или ткани ограничивается инфицированием и/или репликацией в куриных яйцах с эмбрионом и/или в первичных клетках куриных почек.

5

15. Нуклеотидная последовательность, кодирующая шиповидный белок или его фрагмент по одному из пп. 1 - 14.

16. Плаزمид, содержащая нуклеотидную последовательность по п. 15.

10

17. Клетка, содержащая плазмиду по п. 16.

18. Вирусная частица, содержащая шиповидный белок или его фрагмент по одному из пп. 1 - 14.

15

19. Птичий коронавирус, содержащий шиповидный белок или его фрагмент по одному из пп. 1 - 14 или ВИБ (вирус инфекционного бронхита), содержащий шиповидный белок по одному из пп. 3 - 14.

20

20. Птичий коронавирус или ВИБ по п. 19, где птичий коронавирус или ВИБ является аттенуированным.

21. Клетка, содержащая:

- вирусную частицу по п. 18, или

25

- птичий коронавирус или ВИБ по п. 19.

22. Иммуногенная композиция, содержащая:

- шиповидный белок по одному из пп. 1 - 14, или

- вирусную частицу по п. 18, или

30

- птичий коронавирус или ВИБ по п. 19.

23. Способ производства или изготовления птичьего коронавируса с расширенным тропизмом клетки или ткани, включающий в себя применение

шиповидного белка птичьего коронавируса или его фрагмента по одному из пп. 1 - 14.

24. Способ культивирования птичьего коронавируса в культуре клеток или ткани, включающий в себя применение шиповидного белка птичьего коронавируса или его фрагмента по одному из пп. 1 - 14.

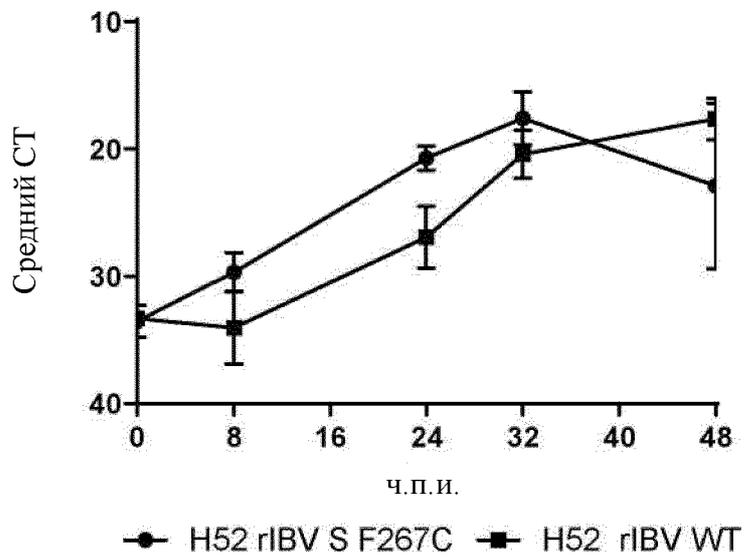
25. Способ по п. 23 или 24, где шиповидный белок коронавируса представляет собой шиповидный белок ВИБ (вируса инфекционного бронхита) по одному из пп. 3 - 14.

26. Способ иммунизации субъекта, включающий в себя введение такому субъекту иммуногенной композиции по п. 22.

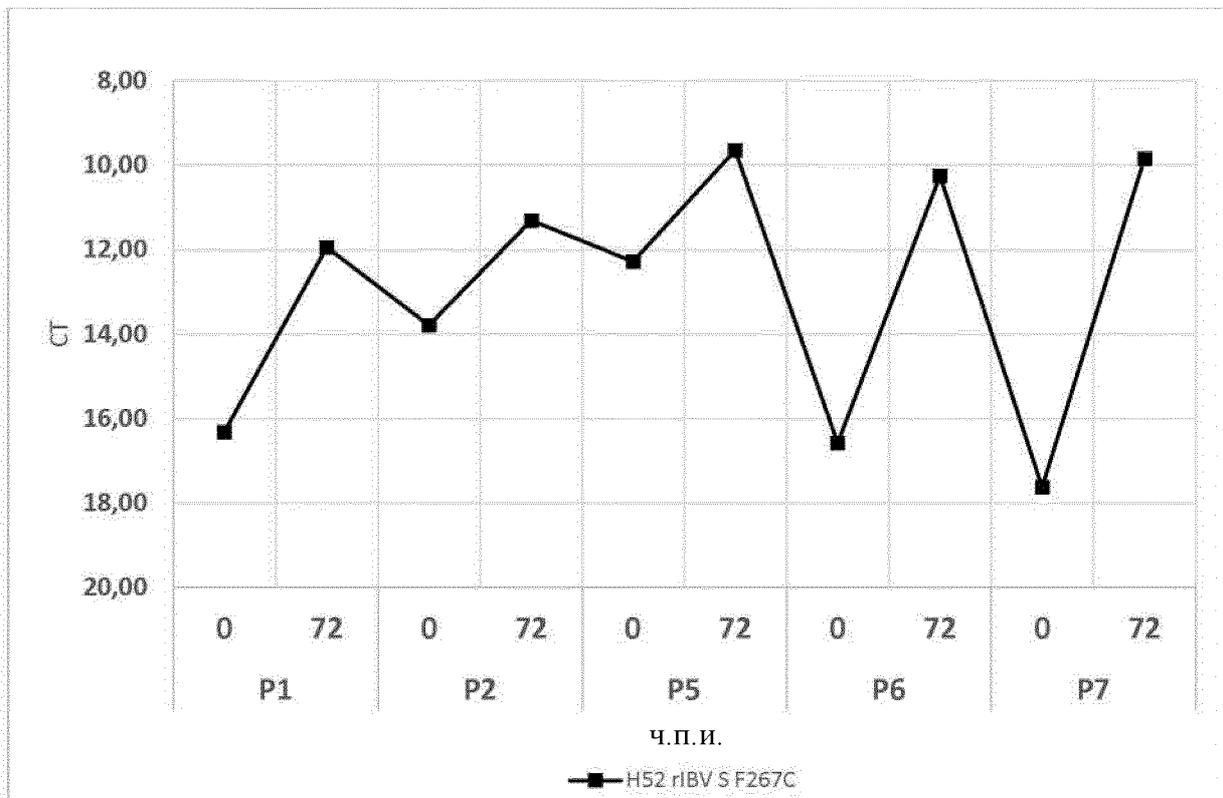
27. Способ лечения или предупреждения клинических признаков, вызванных посредством ВИБ у нуждающегося субъекта, способ включает в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции по п. 22.

28. Способ уменьшения цилиостаза у нуждающегося субъекта, по сравнению с субъектом неиммунизированной контрольной группы того же вида, способ включает в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции по п. 22.

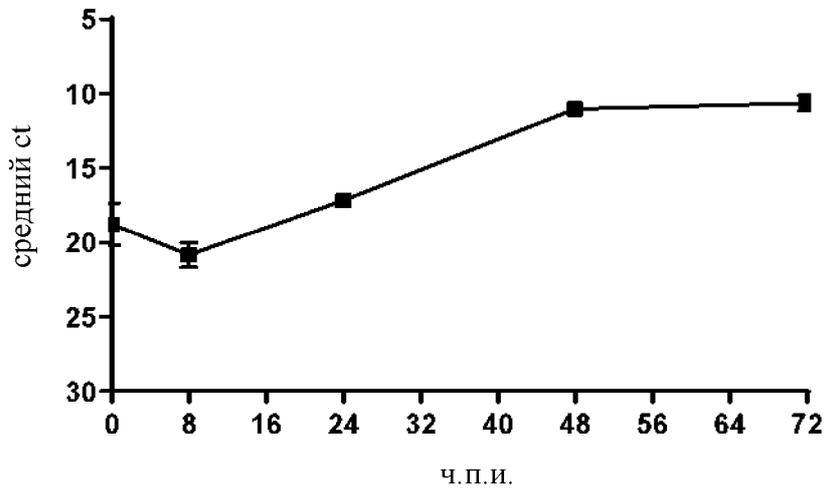
Фигура 1



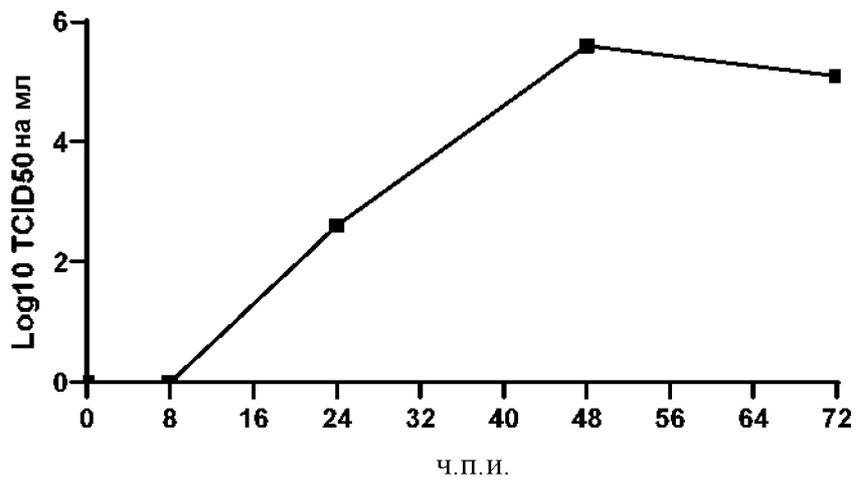
Фигура 2



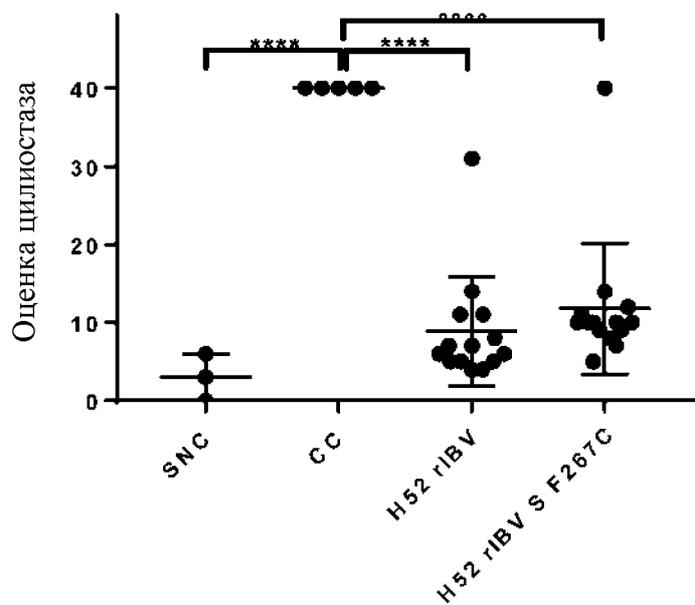
Фигура 3



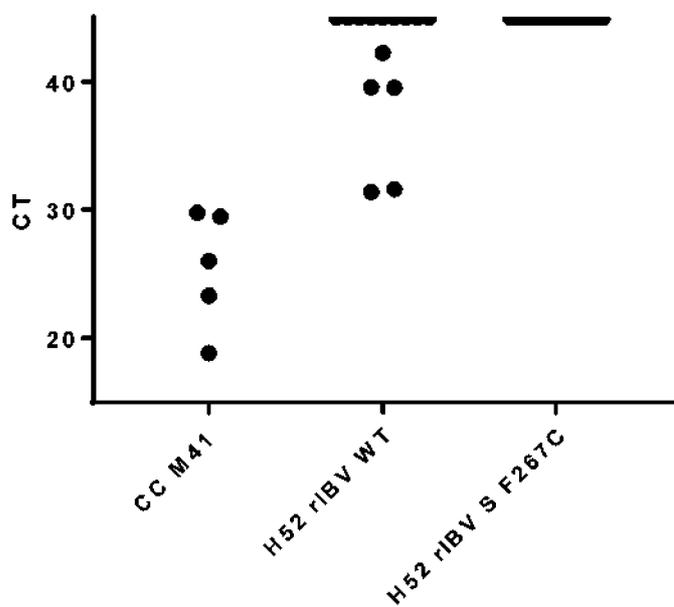
Фигура 4



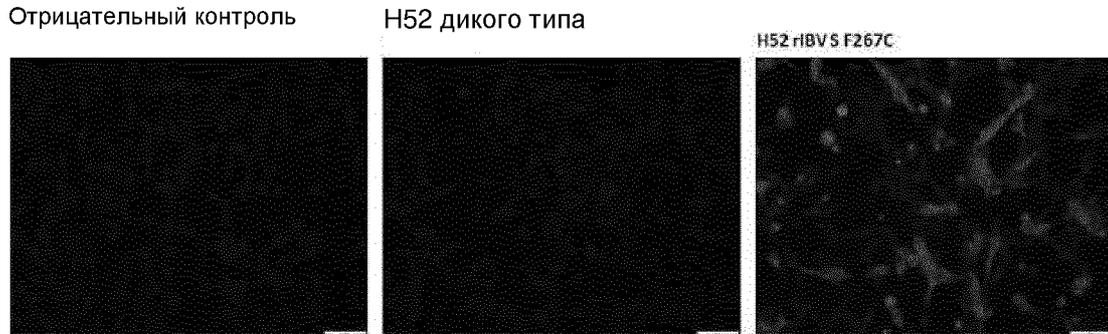
Фигура 5



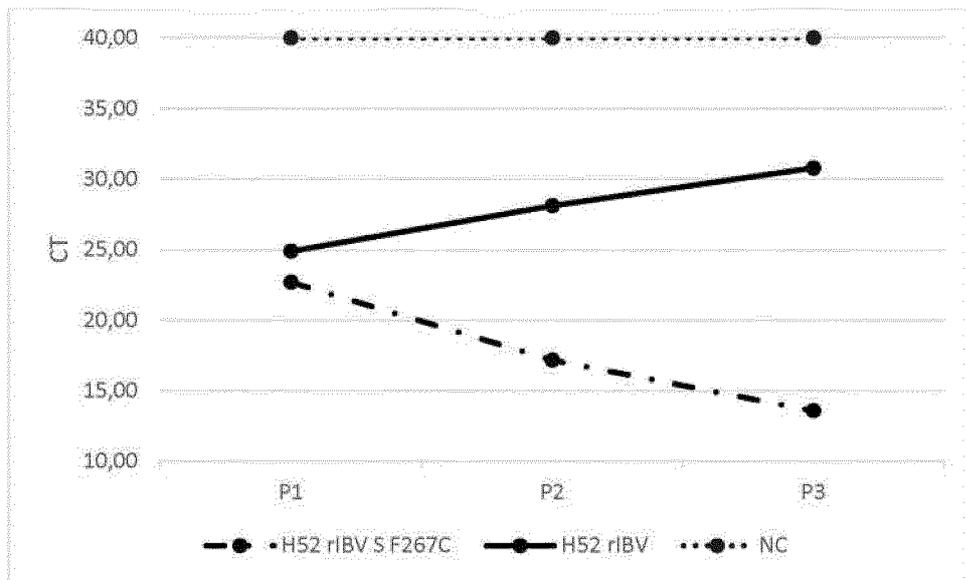
Фигура 5



Фигура 7



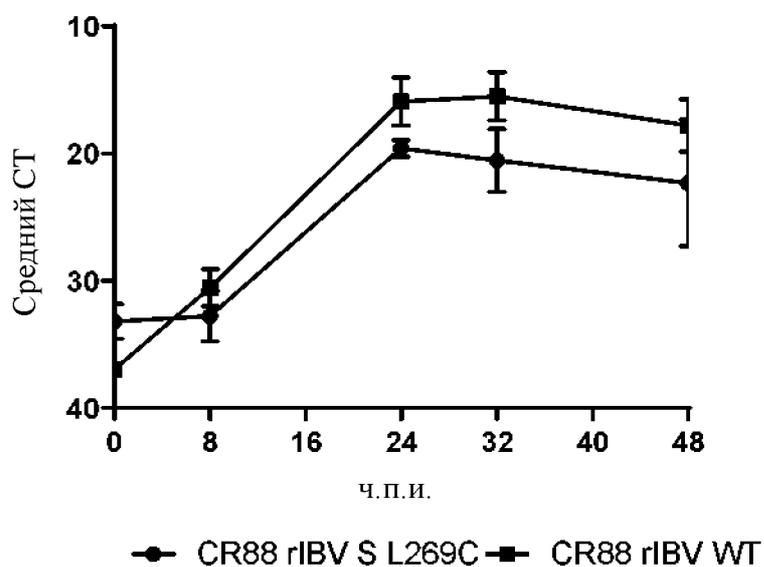
Фигура 8



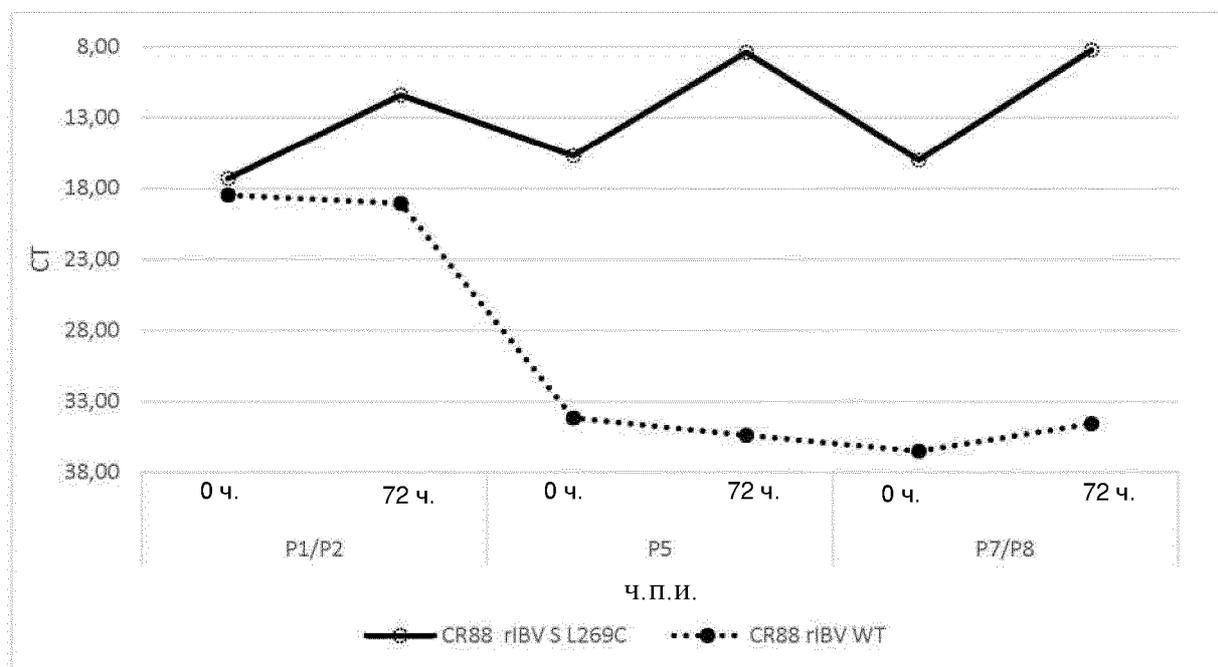
Фигура 9



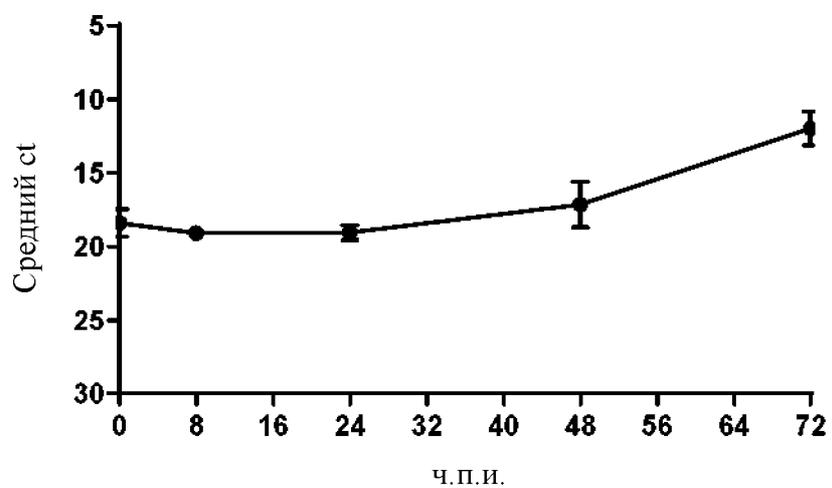
Фигура 10



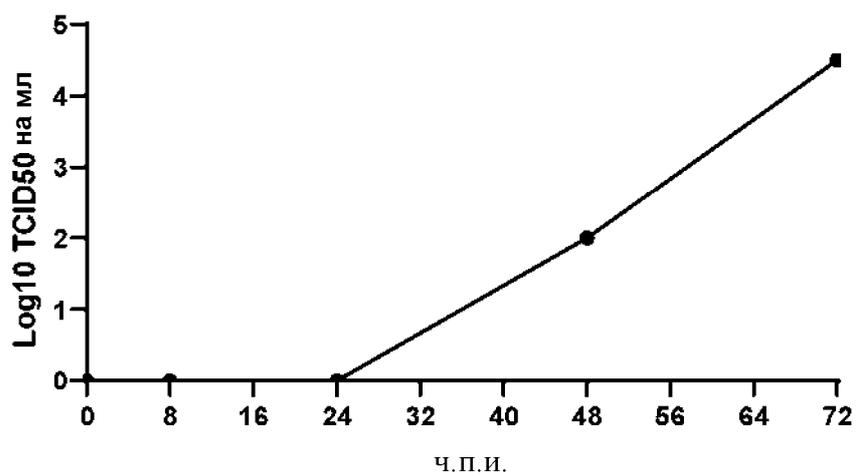
Фигура 11



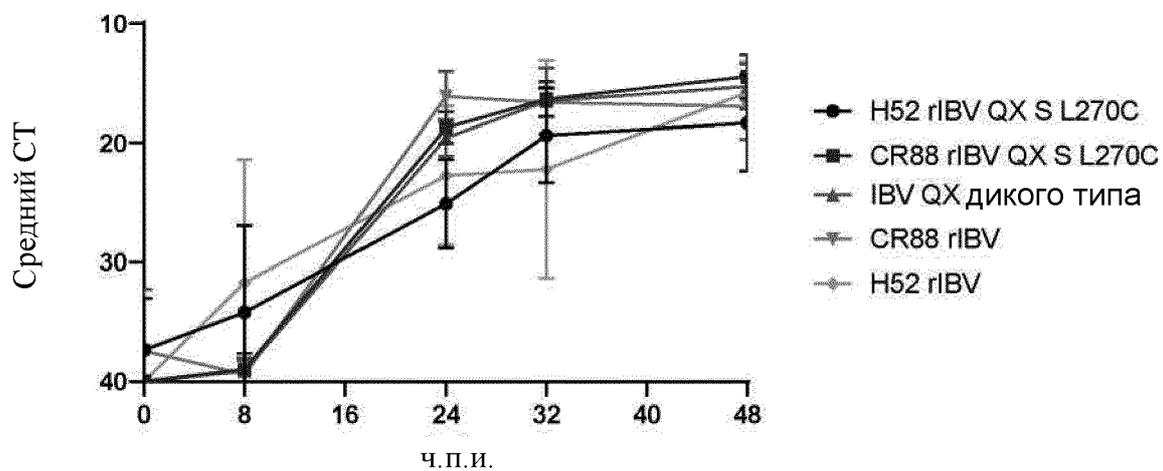
Фигура 12



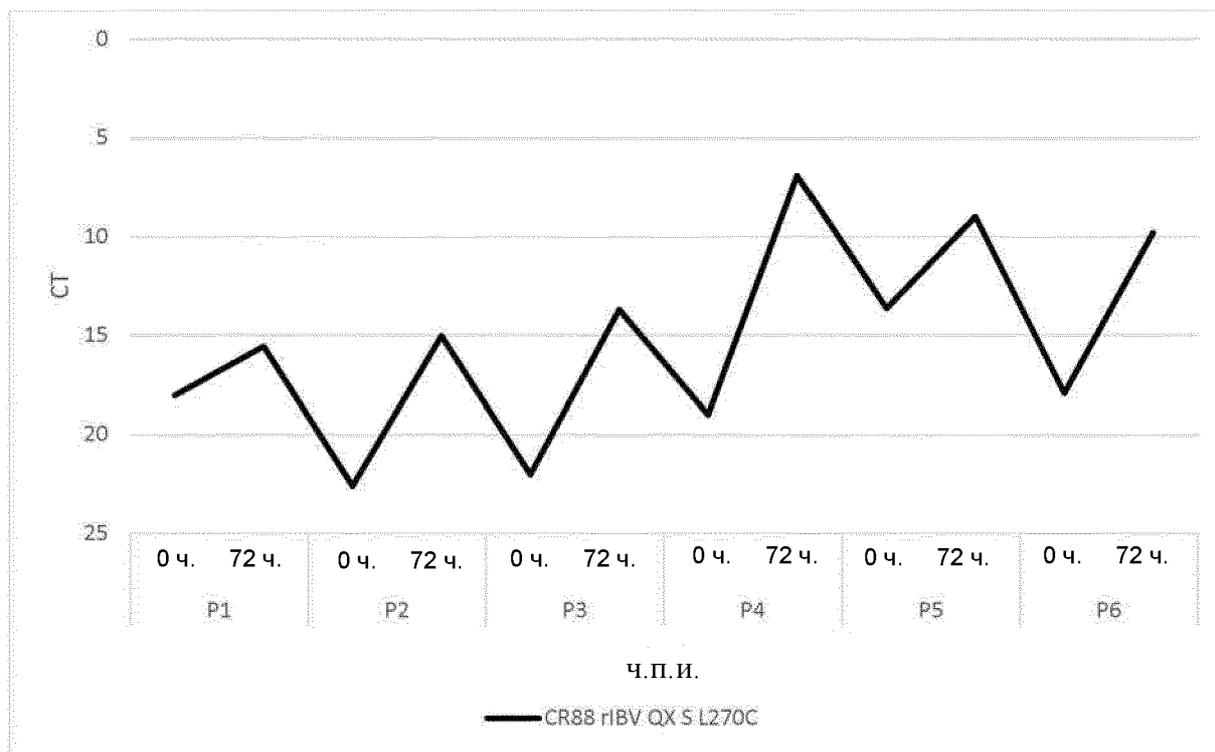
Фигура 13



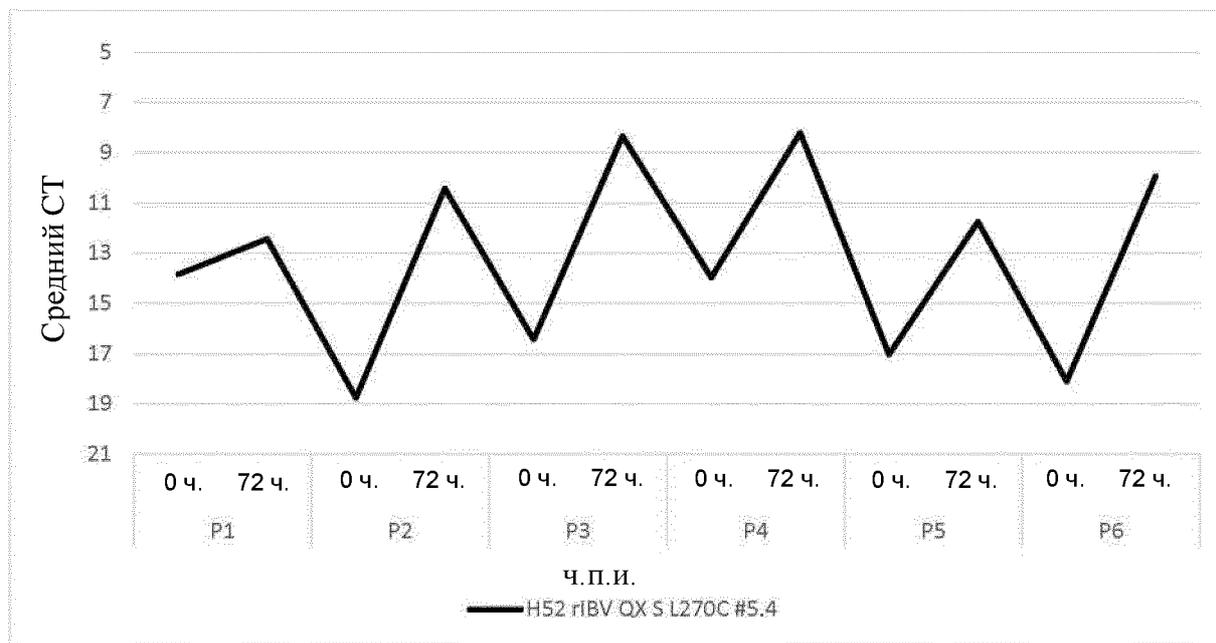
Фигура 16



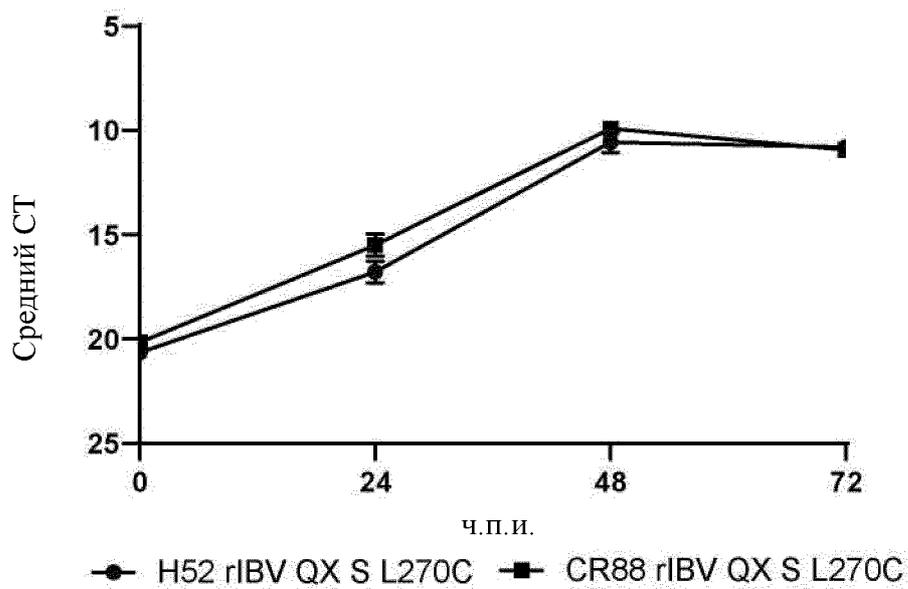
Фигура 17



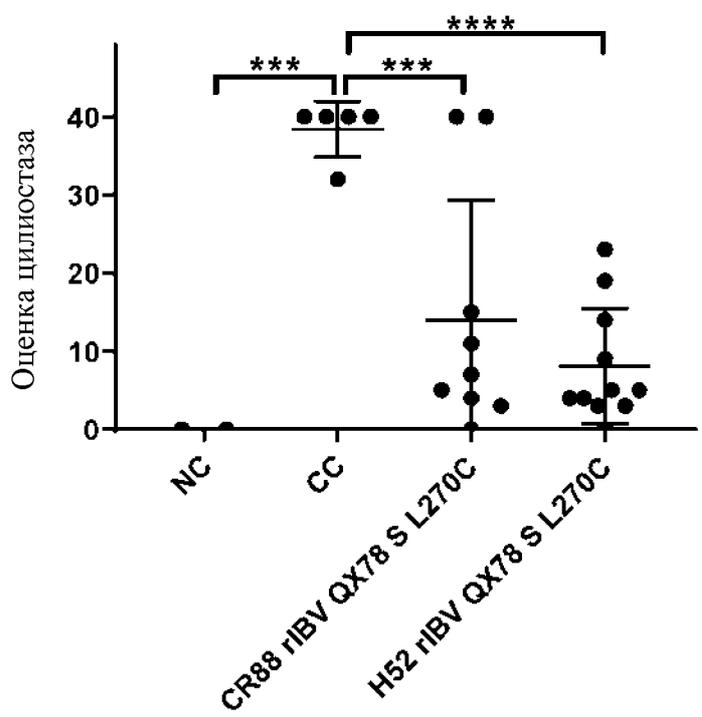
Фигура 18



Фигура 19



Фигура 20



Фигура 21

