



(51) МПК  
*A61K 39/12* (2006.01)  
*C12N 15/33* (2006.01)  
*C12N 15/869* (2006.01)  
*A61P 31/12* (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

(52) СПК

*A61K 39/12 (2022.01); A61P 31/12 (2022.01); C12N 15/11 (2022.01); C12N 15/869 (2022.01)*

(21)(22) Заявка: **2019102170, 28.06.2017**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
**28.06.2017**

Дата регистрации:  
**27.04.2022**

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
**29.06.2016 EP 16176834.6**

(43) Дата публикации заявки: **29.07.2020** Бюл. № 22

(45) Опубликовано: **27.04.2022** Бюл. № 12

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на  
 национальной фазе: **29.01.2019**

(86) Заявка РСТ:  
**EP 2017/065987 (28.06.2017)**

(87) Публикация заявки РСТ:  
**WO 2018/002133 (04.01.2018)**

Адрес для переписки:  
**101000, Москва, ул. Мясницкая, 13, стр. 5, ООО  
 "Союзпатент"**

(72) Автор(ы):

**ЮКАРИ Саэки (JP),  
 САИТО Судзи (JP)**

(73) Патентообладатель(и):

**СЕВА САНТЭ АНИМАЛЬ (FR)**

(56) Список документов, цитированных в отчете  
 о поиске: CN 102373180 A, 14.03.2012. CN  
 104480142 A, 01.04.2015. WO 2015011261 A1,  
 29.01.2015. WANG J. et al. Construction of a  
 recombinant duck enteritis virus (DEV)  
 expressing hemagglutinin of H5N1 avian  
 influenza virus based on an infectious clone of  
 DEV vaccine strain and evaluation of its efficacy  
 in ducks and chickens // *Virology journal*. - 2015.  
 - (см. прод.)

**(54) ВИРУС УТИНОГО ЭНТЕРИТА И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ**

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к области биохимии и ветеринарии. 1 объект представляет собой вирус утинового энтерита (DEV), предназначенный для экспрессии чужеродной нуклеиновой кислоты или белка у домашней птицы, который содержит неактивные гены US4 и US5 и содержит чужеродную нуклеиновую кислоту, где гены US4 и US5 являются, независимо друг от друга, мутированными, deletированными или прерванными, и где чужеродная нуклеиновая кислота кодирует белок VP2 вируса инфекционного бурсита (IBDV) и

находится в вирусном геноме. 2 объект – молекулу нуклеиновой кислоты для продуцирования DEV. 3 объект – клетку хозяина для продуцирования или репликации DEV. 4 объект – способ получения или репликации DEV, включающий инфицирование компетентных клеток молекулой нуклеиновой кислоты или вирусом DEV и извлечение DEV. Технический результат заключается в пригодности вирусных конструкций по изобретению для экспрессии гена и белка VP2 IBDV у домашних птиц. 4 н. и 11 з.п. ф-лы, 3 табл., 10 пр., 10 ил.

(56) (продолжение):

Vol. 12. - No. 126. - P. 1-14. ZHAO Y. et al. Molecular analysis of duck enteritis virus US3, US4, and US5 gene // *Virus Genes*. - 2009. - Vol. 38. - No. 2. - P. 289-294. LI Y. et al. Molecular characterization of the genome of duck enteritis virus // *Virology*. - 2009. - Vol. 391. - No. 2. - P. 151-161. LIU X. et al. Recombinant duck enteritis virus expressing the HA gene from goose H5 subtype avian influenza virus // *Vaccine*. - 2013. - Vol. 31. - No. 50. - P. 5953-5959. WO 2005049794 A2, 02.06.2005.

R U 2 7 7 1 1 6 5 C 2

R U 2 7 7 1 1 6 5 C 2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*A61K 39/12* (2006.01)  
*C12N 15/33* (2006.01)  
*C12N 15/869* (2006.01)  
*A61P 31/12* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*A61K 39/12 (2022.01); A61P 31/12 (2022.01); C12N 15/11 (2022.01); C12N 15/869 (2022.01)*(21)(22) Application: **2019102170, 28.06.2017**(24) Effective date for property rights:  
**28.06.2017**Registration date:  
**27.04.2022**

Priority:

(30) Convention priority:  
**29.06.2016 EP 16176834.6**(43) Application published: **29.07.2020 Bull. № 22**(45) Date of publication: **27.04.2022 Bull. № 12**(85) Commencement of national phase: **29.01.2019**(86) PCT application:  
**EP 2017/065987 (28.06.2017)**(87) PCT publication:  
**WO 2018/002133 (04.01.2018)**Mail address:  
**101000, Moskva, ul. Myasnitskaya, 13, str. 5, OOO  
"Soyuzpatent"**

(72) Inventor(s):

**YUKARI Saeki (JP),  
SAITO Sudzi (JP)**

(73) Proprietor(s):

**SEVA SANTE ANIMAL (FR)**(54) **DUCK ENTERITIS VIRUS AND ITS APPLICATION**

(57) Abstract:

FIELD: biochemistry; veterinary medicine.

SUBSTANCE: object 1 is a duck enteritis virus (hereinafter – DEV) intended for the expression of foreign nucleic acid or protein in the poultry, which contains inactive genes US4 and US5 and contains foreign nucleic acid, where genes US4 and US5 are independently mutated, deleted or interrupted, and where foreign nucleic acid encodes protein VP2 of infectious bursal disease virus (hereinafter – IBDV) and is present in a viral genome. Object 2 is a nucleic

acid molecule for the DEV production. Object 3 is a host cell for the DEV production and replication. Object 4 is a method for the DEV production or replication, including infection of competent cells with a nucleic acid molecule or DEV virus, and DEV extraction.

EFFECT: suitability of viral constructions, according to the invention, for the expression of gene and VP2 IBDV protein in the poultry.

15 cl, 3 tbl, 10 ex, 10 dwg

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение касается новых вирусов и их применения. Более конкретно, изобретение касается новых конструкций вируса утинового энтерита и их применения для экспрессии или доставки представляющих интерес полипептидов животным, особенно домашним птицам. Изобретение особенно подходит для вакцинации домашней птицы против патогенов птиц.

Уровень техники

Мясо и яйца птицы являются важными источниками пищи, потребление которых постоянно возрастает из-за роста численности населения и высокого соотношения цены и качества. Недавняя эпидемия птичьего гриппа обратила общественное мнение на здоровье птиц, а также на безопасность и сохранность пищевых продуктов, а технология вакцинации птиц стала общемировой проблемой.

В качестве вакцины для домашней птицы против целевых патогенов обычно применяются рекомбинантные вирусы, экспрессирующие белки патогенов. Вакцины, содержащие такие вирусы, вызывают экспрессию чужеродных белков патогена или их фрагментов в инфицированных клетках, которые впоследствии могут индуцировать специфичный и защитный гуморальный иммунитет, а также клеточный иммунитет.

В связи с этим был разработан целый ряд вирусов, в которые был встроен чужеродный ген из патогена, для применения в качестве вакцин на основе вирусных векторов. Эти вирусные векторы (или рекомбинантные вирусы) обычно основываются на авиопоксвирусах типа вируса оспы птиц (EP-A-0,517,292), герпесвирусах, в частности HVT (например, WO-A-87/04463, 5,980,906, 5,853,733), вирусе болезни Ньюкасл (NDV) или птичьих аденовирусах. Эти рекомбинантные вирусы птиц проявляют различные уровни защиты в зависимости от заболевания и/или животного.

Например, поскольку поксвирусы, NDV и аденовирусы не персистируют у кур, они считаются не лучшими кандидатами для продолжительного иммунитета у кур. Рекомбинантные HVT, экспрессирующие антигены, проявляли преимущества и в настоящее время коммерчески доступны для вакцинации кур (например, Vectormune® IBD, Vectormune® ND или Vectormune® LT).

Однако, учитывая все возрастающее количество и разнообразие патогенов и непрерывный рост потребления домашней птицы, существует потребность в альтернативных стратегиях и/или системах вакцинации, которые можно использовать для выработки эффективного защитного иммунитета у домашних птиц. В частности, существует потребность в эффективных системах для обеспечения иммунитета у очень молодых животных (3 дня или меньше) либо *in ovo*.

В связи с этим изучались новые серотипы вирусов с целью поиска альтернативных совместимых вирусных векторов для улучшения вакцинации животных, в особенности домашних птиц, обеспечивающих стабильную экспрессию белка и эффективную защиту.

В WO 2014/0036735 обсуждается возможное применение вируса утинового энтерита у кур. В природе DEV инфицирует уток или гусей, но не обладает никаким известным тропизмом для кур. В этом документе предполагается, что конструкции с DEV можно вводить внутримышечно 1-недельным цыплятам. Однако в этом документе сообщается только о позднем введении.

Тем не менее, при проведении дальнейших экспериментов с DEV авторы изобретения обнаружили, что такой вирус летален при введении молодым цыплятам (3 дня или меньше) либо *in ovo*. Вне ожидания, хотя введение цыплятам DEV дикого типа (или конструкции DEV, содержащей все нативные гены, как предложено в WO 2014/0036735) через 1 неделю после вылупления как будто хорошо переносится, однако введение

такой конструкции в 1-й день после вылупления либо *in ovo* вызывает очень массовую гибель животных (т.е. от 80 до 100%). Еще более неожиданно авторы изобретения смогли модифицировать структуру DEV и получить такие конструкции DEV, которые могут использоваться у домашних птиц, в том числе на очень ранней стадии (3 дня или меньше) либо *in ovo*, причем они могут вызывать существенную экспрессию белка *in vivo* на ранней стадии. Следовательно, такие вирусы представляют собой новые мощные векторы для вакцинации домашней птицы.

#### Сущность изобретения

Изобретением предусмотрены новые вирусные конструкции, пригодные для экспрессии генов или белков *in vivo* у животных, в особенности у домашней птицы, в том числе на очень ранней стадии (то есть на 3-й день после вылупления или раньше, а также *in ovo*). В частности, изобретением предусмотрены новые DEV, полученные путем инактивации генов US4 и US5, и показано, что такие DEV (i) подвергаются аттенуации *in vivo*, особенно у кур, и (ii) являются стабильными и способны экспрессировать чужеродные гены подходящим образом для выработки защитного иммунитета. Кроме того, эти дефектные и аттенуированные DEV сохраняют высокую скорость роста, что позволяет их получать с высоким титром. Поскольку такие DEV не обладают никаким известным природным тропизмом, например, для кур, то применение таких конструкций DEV для вакцинации цыплят не связано с риском распространения или заражения невакцинированных животных. Кроме того, у кур не вырабатываются материнские антитела или иммунитет против DEV, и вирусы по изобретению могут применяться для выработки очень раннего иммунитета у вакцинированных животных. Вне ожидания, как уже сказано ранее, хотя DEV дикого типа летален для молодых цыплят или *in ovo*, однако вирусы DEV по изобретению безопасны и могут эффективно экспрессировать представляющие интерес гены *in vivo*. Следовательно, такие новые DEV представляют собой очень мощные векторы для вакцинации животных, в особенности домашних птиц, и для выработки раннего защитного иммунитета.

Более конкретно, предметом изобретения является такой вирус утиного энтерита (DEV), который содержит неактивные гены US4 и US5. Так, изобретение показало, что при инактивации этих генов могут быть получены жизнеспособные, стабильные и репликативные DEV, причем такие вирусы могут применяться для получения рекомбинантных DEV путем введения чужеродного генетического материала. Результаты также показывают, что такой чужеродный генетический материал экспрессируется на высоком уровне у таких вирусов при инфицировании клеток, причем такая экспрессия остается стабильной во времени. Более того и вне ожидания, хотя нативные DEV, а также многие другие конструкции DEV с делециями, полученные авторами изобретения, оказались патогенными или летальными для молодых цыплят (на 3-й день после вылупления или раньше) и *in ovo*, однако при инактивации US4 и US5 возникают аттенуированные вирусы, которые можно безопасно использовать для экспрессии белков и антигенов у молодых животных, в том числе *in ovo*. Такой результат был совершенно неожиданным и дает данным вирусам большие преимущества и применимость.

Другим предметом изобретения является такой вирус утиного энтерита (DEV), который имеет неактивные гены US4 и US5 и содержит чужеродную нуклеиновую кислоту.

Согласно конкретным воплощениям, гены US4 и US5 подвергались мутации или делеции или прерыванию; и/или взамен всех или части последовательностей генов US4

и US5 располагается чужеродная нуклеиновая кислота, причем чужеродная нуклеиновая кислота кодирует птичий патоген.

В другом конкретном воплощении DEV по изобретению дополнительно содержит неактивный ген UL4, UL23 или US7.

5 Следующим предметом изобретения являются молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие геном DEV с неактивными генами US4 и US5.

Изобретение также касается клеток хозяина, содержащих DEV или нуклеиновую кислоту, как определено выше.

10 Изобретением также предусмотрен способ получения или репликации DEV, как определено выше, включающий инфицирование компетентных клеток молекулой нуклеиновой кислоты или самим DEV, как определено выше, и извлечение DEV.

Изобретение также касается способа получения рекомбинантного DEV, включающего вставку чужеродной нуклеиновой кислоты вместо всех или по меньшей мере 20% последовательностей генов US4 и US5.

15 Изобретением также предусмотрены композиции, содержащие DEV, нуклеиновую кислоту или клетки хозяина, как определено выше, фармацевтически или ветеринарно приемлемый эксципиент или носитель и, необязательно, адъювант.

Изобретением также предусмотрены вакцины, содержащие DEV, нуклеиновую кислоту или клетки хозяина, как определено выше, фармацевтически или ветеринарно 20 приемлемый эксципиент или носитель и, необязательно, адъювант.

Следующим предметом изобретения являются композиции, DEV, нуклеиновые кислоты или клетки хозяина, как определено выше, для применения для вакцинации или иммунизации птиц, в особенности домашних птиц, более конкретно кур, более конкретно молодых птиц (на 3-й день после вылупления или раньше либо *in ovo*).

25 Следующим предметом изобретения являются композиции, DEV, нуклеиновые кислоты или клетки хозяина, как определено выше, для применения для выработки защитного иммунитета у птиц, в особенности домашних птиц, более конкретно кур, более конкретно молодых птиц (на 3-й день после вылупления или раньше либо *in ovo*).

Изобретение также касается способа вакцинации животных, в особенности домашних 30 птиц, более конкретно кур, более конкретно молодых птиц (на 3-й день после вылупления или раньше либо *in ovo*), включающего введение данным животным композиции или вируса, как определено выше

Предпочтительным предметом изобретения является способ вакцинации домашних птиц, включающий введение *in ovo* композиции или вируса, как определено выше.

35 Другим предпочтительным предметом изобретения является способ вакцинации домашних птиц, включающий введение композиции или вируса, как определено выше, в день 1 (т.е. примерно в пределах 24 часов) после вылупления.

В следующем аспекте изобретением предусмотрен способ выработки иммуногенного или защитного ответа у животных против одного или нескольких патогенов птиц, 40 включающий введение данным животным, в особенности домашним птицам, более конкретно курам, более конкретно молодым птицам (на 3-й день после вылупления или раньше либо *in ovo*) композиции, вакцины или вируса, как определено выше.

Вирусы или композиции по изобретению можно вводить любым способом. Предпочтительно их вводят *in ovo* или подкожно (например, п/к) через 1 или 2 дня после 45 вылупления, чтобы иммунитет вырабатывался очень рано.

Кроме того, изобретением предусмотрены вакцинационные наборы для иммунизации птиц, которые включают следующие компоненты:

а) эффективное количество композиции, как указано выше, и

б) средство для введения данной композиции данным птицам.

Изобретение может применяться для экспрессии полипептидов у любых животных, предпочтительно для вакцинации птиц, причем оно подходит для экспрессии одного или нескольких полипептидов или пептидов, в особенности иммуногенных пептидов из патогенов птиц.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 представлена схематическая диаграмма генома вируса утиного энтерита (DEV) и расположения генов US.

На фиг. 2 представлены схематические диаграммы расположения сайта вставки в исходном геноме DEV и структуры геномов pUC18-КАРЕVAC-US4US5del-BacVP2 и DEV/US4US5del/BacVP2. Показано расположение стыковочного участка (стыка) 1, стыка 2 и стыка 3, используемых для амплификации при реакциях ПЦР.

На фиг. 3 представлена экспрессия VP2 в клетках CEF, инфицированных DEV/US5del/BacVP2, при анализе методом черных бляшек.

На фиг. 4 представлены схематические диаграммы расположения сайта вставки в исходном геноме DEV и структуры геномов pUC18-КАРЕVAC-US4US5del и DEV/US5del. Показано расположение стыка 1, используемого для амплификации при реакциях ПЦР.

На фиг. 5 представлены схематические диаграммы расположения сайта вставки в исходном геноме DEV и структуры геномов pUC18-КАРЕVAC-UL23del-Coa5VP2 и DEV/US5del/UL23/Coa5VP2. Показано расположение стыка 1, стыка 2 и стыка 3, используемых для амплификации при реакциях ПЦР.

На фиг. 6 представлены схематические диаграммы расположения сайта вставки в исходном геноме DEV и структуры геномов pUC18-КАРЕVAC-UL26-Coa5VP2 и DEV/US5del/UL26/Coa5VP2. Показано расположение стыка 1, стыка 2 и стыка 3, используемых для амплификации при реакциях ПЦР.

На фиг. 7 представлены схематические диаграммы расположения сайта вставки в исходном геноме DEV и структуры геномов pUC18-КАРЕVAC-UL45-Coa5VP2 и DEV/US5del/UL45/Coa5VP2. Показано расположение стыка 1, стыка 2 и стыка 3, используемых для амплификации при реакциях ПЦР.

На фиг. 8 представлены схематические диаграммы расположения сайта вставки в исходном геноме DEV и структуры геномов pUC18-КАРЕVAC-UL50-Coa5VP2 и DEV/US5del/UL50/Coa5VP2. Показано расположение стыка 1, стыка 2 и стыка 3, используемых для амплификации при реакциях ПЦР.

На фиг. 9 представлена экспрессия VP2 в клетках CEF, инфицированных DEV/US5del/UL23/Coa5VP2, DEV/US4US5del/UL26/Coa5VP2, DEV/US4US5del/UL45/Coa5 или DEV/US4US5del/UL50/Coa5VP2, при анализе методом черных бляшек.

На фиг. 10 представлен анализ методом вестерн-блот экспрессии белка VP2 вирусом DEV/US4US5del/UL23/Coa5VP2, DEV/US4US5del/UL26/Coa5VP2, DEV/US4US5del/Coa5VP2 или DEV/US4US5del/UL50/Coa5VP2. 1 – DEV/US4US5del/UL23/Coa5VP2; 2 – DEV/US4US5del/UL26/Coa5VP2; 3 – DEV/US4US5del/UL45/Coa5VP2; 4 – DEV/US4US5del/UL50/Coa5VP2; 5 – исходный DEV; 6 – CEF.

Раскрытие сущности изобретения

Настоящее изобретение в целом касается аттенуированных вирусов DEV, содержащих последовательности чужеродных генов. Настоящее изобретение также касается композиций, содержащих такие DEV, а также их применения для вакцинации животных, в особенности домашних птиц, более конкретно молодых птиц (на 3-й день после вылупления или раньше либо *in ovo*).

Настоящее описание станет более понятным с учетом следующих определений.

## Определения

Термин “вирус” обозначает, в частности, вирусные частицы, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты (например, геном), инкапсулированную в капсиде или капсуле. Термин “вирус” также означает вирусный вектор или выделенный вирусный геном.

5 Термин “рекомбинантный” обозначает молекулы, которые были созданы, разработаны или модифицированы с использованием генетических технологий. В отношении вирусов термин “рекомбинантный” более конкретно обозначает вирусы, у которых геном (или геном предка) был модифицирован путем вставки или делеции по меньшей мере одной последовательности нуклеиновой кислоты.

10 Термин “чужеродная нуклеиновая кислота” по отношению к вирусам обозначает нуклеиновые кислоты, которые в природе не встречаются в геноме вируса или же встречаются в природе в данном геноме, но в другой форме или в другом положении.

В настоящем описании термин “нуклеиновая кислота” или “нуклеиновые кислоты” обозначает любые молекулы или последовательности нуклеиновых кислот типа  
15 дезоксирибонуклеотидов (ДНК) или рибонуклеотидов (РНК), которые могут быть, например, одноцепочечными или двухцепочечными. Нуклеиновые кислоты могут содержать ORF или нет. Молекулы нуклеиновой кислоты могут быть получены методами, известными *per se* в данной области, как-то методами искусственного синтеза, рекомбинантными методами, энзиматическими методами, репликации в клетках хозяина  
20 либо их комбинациями.

“Ген” означает молекулу или последовательность нуклеиновой кислоты, которая содержит открытую рамку считывания, кодирующую продукт типа полипептида (например, пептид, белок и т.д.) или РНК.

В контексте изобретения DEV, содержащий “неактивный” ген, означает такой DEV,  
25 который не может экспрессировать функциональный белок или РНК, кодируемую данным геном. Так, неактивный ген US4 означает ген US4 с мутацией, делецией и/или прерыванием, который не может кодировать белок US4 дикого типа. Неактивный ген US5 означает ген US5 с мутацией, делецией и/или прерыванием, который не может кодировать белок US5 дикого типа. Если ген US5 содержит кодирующую  
30 последовательность 5'US5 и 3'US5, то неактивный US5 означает ген US5 с мутацией, делецией и/или прерыванием, который не может кодировать какой-либо белок дикого типа, кодируемый указанными последовательностями 5'US5 и 3'US5, например, 5'US5 и 3'US5 оба содержат мутацию, делецию или прерывание (разрыв).

Термин “аттенуированный” в настоящем изобретении означает такой вирус, который  
35 практически не вызывает заболевания на модели у животных. Аттенуированный вирус обычно может реплицироваться у хозяина, не вызывая его гибели. Более конкретно, аттенуированный вирус означает такой вирус, который не является вирулентным у эмбрионов при инъекции в дозе  $1 \times 10^3$  бляшкообразующих единиц (pfu) на яйцо. Наиболее  
40 предпочтительные аттенуированные вирусы безопасны в дозе  $1 \times 10^3$  pfu на 1 яйцо по меньшей мере у 70% инъецированных яиц, более предпочтительно по меньшей мере у 80% инъецированных яиц, еще более предпочтительно по меньшей мере у 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или больше. Аттенуированные вирусы по изобретению также безопасны для введения после вылупления, в том числе в день 0 (т.е. между 0,1 и 48 часами после  
45 вылупления).

Термин “птичий” должен охватывать все виды птиц типа птиц из класса Aves, то есть позвоночных животных, которые являются пернатыми, крылатыми, двуногими, эндотермическими и яйцекладущими. В контексте изобретения птицы или виды птиц, в частности, означают птиц, представляющих экономический и/или агрономический

интерес типа домашних птиц, более предпочтительно кур и индеек; или декоративных птиц типа лебедей и попугаев.

Термин “вакцина” в настоящем изобретении обозначает средства, которые могут применяться для выработки, стимуляции или усиления иммунного ответа у организма.

5 “Иммунный ответ” означает развитие у хозяина клеточной и/или антительной иммунной реакции на определенную композицию или вакцину. Обычно “иммунный ответ” включает выработку антител, В-клеток, хелперных Т-клеток и/или цитотоксических Т-клеток, направленных конкретно на антиген или антигены, включенные в данную композицию или вакцину. Предпочтительно иммунный ответ  
10 является защитным, т.е. должна повышаться устойчивость к новой инфекции и/или уменьшаться клиническая тяжесть заболевания.

Термин введение или инъекция “in ovo” обычно означает инокуляцию или инъекцию в эмбрион, содержащийся в яйце. Введение in ovo предпочтительно проводят в любое время между 5-м и 1-м днем до вылупления.

15 Вирус утинового энтерита

Вирус утинового энтерита (DEV), также известный как вирус утинового вирусного энтерита (DVEV), в природе инфицирует уток и гусей. Полная нуклеотидная последовательность DEV уже установлена и доступна онлайн (к примеру, см. JQ673560). Вирусный геном содержит примерно 162 т.н., кодирующих около 80 различных белков.

20 Было выделено несколько серотипов и штаммов DEV, как-то штамм Jansen, штамм CSC, штамм CHv, штамм VAC и штамм 2085. Полные последовательности нескольких штаммов DEV доступны в Genbank, как-то штамма VAC – ID EU082088.2; изолята Anatid C-KCE – ID KF263690.1; штамма Anatid CHv – ID JQ647509.1; штамма Anatid 2085 – ID JF999965; штамма Anatid CV – ID KJ549663.1 или штамма Anatid CSC – ID JQ673560.1.

25 DEV остается плохо изученным, а его применение в качестве вектора для экспрессии генов не подвергалось глубокому изучению. Например, Liu et al. (2013) и WO 2014/0036735 пытались использовать рекомбинантный DEV для экспрессии генов у кур. Они использовали конструкцию DEV, в которой нуклеиновая кислота была клонирована между генами US7 и US8 вирусного генома без изменения экспрессии нативных генов.  
30 Хотя и сообщалось, что такая конструкция может передаваться при внутримышечной инъекции 1-недельным цыплятам, однако в этом документе или в любом другом документе предшествующего уровня техники не раскрыто какое-либо возможное применение DEV для вакцинации in ovo домашних птиц или для вакцинации молодых птиц, т.е. в день 3 после вылупления или раньше, особенно в день 1 или день 2 после  
35 вылупления.

При проведении дальнейших экспериментов с DEV авторы изобретения обнаружили, что данный вирус летален при введении молодым цыплятам (3 дня или меньше) либо in ovo. Вне ожидания, хотя введение цыплятам DEV дикого типа (или конструкции DEV, содержащей все нативные гены, как предложено в WO 2014/0036735) через 1 неделю  
40 после вылупления как будто хорошо переносится, однако введение такой конструкции в 1-й день после вылупления либо in ovo вызывает очень массовую гибель животных (т.е. от 80 до 100%), как отмечено в примере 1.

Еще более неожиданно авторы изобретения смогли модифицировать структуру DEV и получить такие конструкции DEV, которые могут применяться у домашних птиц, в  
45 том числе на очень ранней стадии (3 дня или меньше) либо in ovo, причем они могут вызывать существенную экспрессию белка in vivo на ранней стадии. В частности, авторы настоящего изобретения провели дальнейшие исследования с DEV и получили различные рекомбинанты с различными делециями или изменениями генов. Авторы изобретения

неожиданно обнаружили, что при инактивации обоих генов US4 и US5 можно получить такие рекомбинантные DEV, которые (i) подвергаются аттенуации *in vivo*, особенно у кур, и (ii) стабильны и способны экспрессировать чужеродные гены подходящим образом для вырабатывания защитного иммунитета. Результаты также показывают, что такой чужеродный генетический материал сильно экспрессируется такими вирусами при инфицировании клеток, причем такая экспрессия остается стабильной во времени. Более того и вне ожидания, при инактивации US4 и US5 получают аттенуированные DEV, которые можно безопасно использовать для экспрессии белков или антигенов у молодых домашних птиц и *in ovo*, тогда как DEV с одним лишь неактивным геном US4 или одним лишь неактивным геном US5 остаются патогенными или летальными для молодых цыплят (в возрасте менее 3 дней либо *in ovo*). Поскольку такие DEV не обладают никаким известным природным тропизмом, например, для кур, то применение конструкций DEV по изобретению для вакцинации цыплят не связано с риском распространения или заражения невакцинированных животных. Кроме того, у кур не вырабатываются материнские антитела или иммунитет против DEV, и вирусы по изобретению могут применяться для вырабатывания очень раннего иммунитета у вакцинированных животных.

Итак, предметом изобретения является такой вирус утинового энтерита (DEV), который содержит неактивные гены US4 и US5.

Другим предметом изобретения является такой вирус утинового энтерита (DEV), который имеет неактивные гены US4 и US5 и содержит чужеродную нуклеиновую кислоту.

Вирусы DEV по изобретению могут быть получены из любых видов или штаммов DEV. Сообщалось о ряде штаммов DEV, которые доступны из общедоступных коллекций, как-то штамм Jansen, штамм VAC (ID EU082088.2), штамм C-KCE (ID KF263690.1), штамм CHv (ID JQ647509.1), штамм 2085 (ID JF999965), штамм CV (ID KJ549663.1) или штамм CSC (ID JQ673560.1).

В предпочтительном воплощении DEV по изобретению происходит или получен из исходного штамма, выбранного из штамма Jansen или штамма CSC, или любого штамма DEV, идентичного последовательности штамма Jansen или штамма CSC по меньшей мере на 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%.

Изобретение показало, что при инактивации (т.е. превращении в нефункциональные или удалении) генов US4 и US5 можно получить аттенуированные DEV, которые безопасны даже при введении *in ovo* или молодым птицам и могут реплицироваться и экспрессировать белки у домашних птиц. В частности, как показано в примерах, конструкции DEV с неактивными генами US4 и US5 являются стабильными, могут реплицироваться в культуре и их можно безопасно вводить в яйца домашних птиц или молодым птицам. Следовательно, такие вирусы можно использовать для получения рекомбинантных DEV, содержащих чужеродный материал нуклеиновой кислоты, в частности генов, кодирующих антигены, для экспрессии таких генов у домашних птиц.

В контексте изобретения DEV с неактивным геном означает такой DEV, который не может экспрессировать функциональный белок или РНК, кодируемые данным геном. Таким образом, неактивный ген, в частности, означает ген с мутацией, делецией и/или прерыванием, который не может кодировать белок дикого типа.

В одном конкретном воплощении ген неактивен в результате одной или нескольких мутаций в кодирующей последовательности, в особенности точечных мутаций в кодирующей последовательности, предотвращающих экспрессию полноразмерного

белка. Такие мутации могут вводить стоп-кодоны или нонсенс-кодоны в последовательность или вызывать замены остатков незаменимых аминокислот в кодируемом белке, при этом получается неактивный белок.

В другом воплощении ген неактивен в результате делеции по меньшей мере части (кодирующей) последовательности данного гена, предпочтительно по меньшей мере 20% (кодирующей) последовательности гена, более предпочтительно по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 85% и вплоть до 100%. В предпочтительном примере DEV по изобретению имеет делецию по меньшей мере 300 п.н. из (кодирующей последовательности) гена, подлежащего инактивации. При такой делеции удаляется кодирующая последовательность и тем самым предотвращается экспрессия белка дикого типа или даже любого белка.

В этом отношении одно конкретное воплощение изобретения касается такого вируса утинового энтерита (DEV), который имеет делеции генов US4 и US5, в частности, кодирующей последовательности генов US4 и US5.

Предполагается, что гены US4 и US5 вируса DEV кодируют белки. Однако действительная функция этих генов остается неясной. Вплоть до настоящего изобретения способность получать вдвойне дефектные по US4-US5 вирусы DEV не была известна, а способность таких вирусов DEV реплицироваться и экспрессировать чужеродные гены без летальности у птиц была полностью неизвестна.

Ген US4 обычно состоит из 1380 п.н. генома DEV и кодирует белок, содержащий примерно 459 аминокислотных остатков. US4 сильно консервативен между штаммами DEV. Обращаясь к штамму CSC, ген US4 соответствует нт. 141123-142502 в геноме. Предполагается, что специалисты в данной области смогут легко установить точное местоположение гена US4 у любого штамма DEV, используя информацию, содержащуюся в настоящей заявке и общие познания, или же путем совмещения последовательностей. У предпочтительного DEV по изобретению делеция составляет по меньшей мере 20% (кодирующей) последовательности гена US4, более предпочтительно по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% и вплоть до 100%. В предпочтительном примере DEV по изобретению имеет делецию по меньшей мере 500 п.н. из (кодирующей) последовательности гена US4, более предпочтительно по меньшей мере 600, 700, 800, 900, 1000 или больше. В одном конкретном воплощении DEV по изобретению имеет делецию, охватывающую по меньшей мере нт. 200-1000 последовательности гена US4, более предпочтительно по меньшей мере нт. 150-1150, еще более предпочтительно по меньшей мере нт. 100-1300. В одном конкретном примере DEV по изобретению имеет делецию от нт. 51 до нт. 1330 (т.е. более 90%) последовательности гена US4. В другом конкретном воплощении DEV по изобретению имеет делецию всей последовательности гена US4 (нт. 1-1380).

Ген US5 вируса DEV кодирует гликопротеин, функция которого остается неизвестной. У большинства штаммов DEV (например, VAC, CSC, C-KCE, CHv, CV) ген US5 состоит примерно из 1620 п.н. и кодирует белок примерно из 539 аминокислотных остатков. У некоторых штаммов DEV типа штамма 2085 и штамма Jansen (или Kapevac) ген US5 содержит две более короткие кодирующие области: 5'US5 примерно в 396 п.н. и 3'US5 примерно в 1197 п.н., разделенные небольшим межгенным участком примерно в 25 п.н. (см. фиг. 1). Обращаясь к штамму CSC, ген US5 соответствует нт. 142662-144281 в геноме. Предполагается, что специалисты в данной области смогут легко установить точное местоположение гена US5 у любого штамма DEV, используя информацию,

содержащуюся в настоящей заявке и общие познания, или же путем совмещения последовательностей. У предпочтительного DEV по изобретению делеция составляет по меньшей мере 20% (кодирующей) последовательности гена US5, более предпочтительно по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% и вплоть до 100%. В предпочтительном примере DEV по изобретению имеет делецию по меньшей мере 500 п.н. из (кодирующей) последовательности гена US5, более предпочтительно по меньшей мере 600, 700, 800, 900, 1000 или больше. В одном конкретном воплощении DEV по изобретению имеет делецию, охватывающую по меньшей мере нт. 200-1000 последовательности гена US5, более предпочтительно по меньшей мере нт. 100-1100, еще более предпочтительно по меньшей мере нт. 80-1120. Когда ген US5 содержит две ORF, то предпочтительно обе ORF являются неактивными. В этом отношении, если DEV получают из вирусного штамма с последовательностью гена US5, содержащей одну ORF, то DVE предпочтительно имеет делецию по меньшей мере 90% данной ORF типа делеции по меньшей мере от нт. 51 до нт. 1570 последовательности гена US5, более предпочтительно делецию всего гена US5. Если DEV получают из вирусного штамма с последовательностью гена US5, содержащей две ORF, то DEV предпочтительно имеет делецию по меньшей мере 90% каждой из этих ORF, более предпочтительно делецию, включающую по меньшей мере 90% первой ORF, весь межгенный участок и по меньшей мере 90% второй ORF.

В одном конкретном воплощении DEV по изобретению содержит делецию непрерывной области, охватывающей по меньшей мере часть гена US4, весь межгенный участок US4-US5 и часть гена US5.

В другом конкретном воплощении DEV содержит делецию нуклеотидной области, включающей по меньшей мере 50% гена US4, весь межгенный участок между геном US4 и геном US5 и по меньшей мере 50% гена US5.

В более предпочтительном воплощении DEV содержит делецию нуклеотидной области, включающей весь ген US4, весь межгенный участок между геном US4 и геном US5 и весь ген US5. Конкретным примером такой конструкции является, к примеру, DEV/US4US5/BacVP2.

Как указано выше, DEV по изобретению могут содержать одну или несколько представляющих интерес чужеродных нуклеиновых кислот. Как правило, чужеродная нуклеиновая кислота находится под контролем транскрипционного промотора. Предпочтительно промотор клонируют с чужеродной нуклеиновой кислотой. Промотором может быть любой природный или синтетический промотор, полученный из клеточных или вирусных генов. Примеры подходящих промоторов включают, к примеру, промотор  $\beta$ -актина курицы (Bac) или его производные типа Coa5, промотор P<sub>es</sub>, самый ранний промотор (ie)1 цитомегаловируса мыши (Mcmv), промотор цитомегаловируса человека (Hcmv), промотор обезьяньего вируса (SV)40 и промотор вируса саркомы Рауса (RSV) либо такие их фрагменты, которые сохраняют активность промотора. В одном варианте чужеродная нуклеиновая кислота клонируется ниже и под транскрипционным контролем промотора транскрипции, присутствующего в геноме DEV.

В одном конкретном воплощении чужеродная нуклеиновая кислота располагается в последовательности гена US4 вирусного генома DEV, либо в дополнение к существующей последовательности гена US4 (что делает ген неактивным путем прерывания последовательности гена), либо взамен удаленной последовательности гена US4, либо в мутированной последовательности гена US4. В альтернативном

воплощении чужеродная нуклеиновая кислота располагается в последовательности гена US5 вирусного генома DEV, либо в дополнение к существующей последовательности гена US5 (что делает ген неактивным путем прерывания последовательности гена), либо взамен удаленной последовательности гена US5, либо в мутированной последовательности гена US5.

В предпочтительном воплощении DEV по изобретению имеет делецию в последовательностях генов US4 и US5 и содержит чужеродную нуклеиновую кислоту, расположенную вместо удаленных нуклеотидов.

В альтернативном воплощении DEV по изобретению имеет неактивные гены US4 и US5 и содержит чужеродную нуклеиновую кислоту, расположенную в другом сайте клонирования типа сайта, выбранного из гена UL4, гена UL44, межгенного участка UL27-UL26, гена UL23, межгенного участка UL45-UL46, межгенного участка UL50-UL51, гена US7, межгенного участка US7-US8 или гена US10. В этом случае чужеродная нуклеиновая кислота может быть клонирована с заменой всего или части указанного гена или может быть вставлена в данный ген.

Кроме того, DEVs по изобретению могут содержать несколько чужеродных нуклеиновых кислот. При этом несколько чужеродных нуклеиновых кислот могут быть вставлены в одно и то же положение у вируса, например, в области US4/US5, как описано выше, под контролем одного или нескольких различных промоторов. С другой стороны, чужеродные нуклеиновые кислоты могут быть вставлены в разные сайты клонирования вируса, как-то одна в районе US4/US5, как описано выше, и по меньшей мере одна в другом участке, предпочтительно выбранном из гена UL4, гена UL44, межгенного участка UL27-UL26, гена UL23, межгенного участка UL45-UL46, межгенного участка UL50-UL51, гена US7, межгенного участка US7-US8 или гена US10, как правило, с заменой всего или части эндогенного гена или участка.

Ген UL4 обычно состоит из 717 п.н. генома DEV. Обращаясь к штамму CSC, ген UL4 соответствует нт. 142662-144281 в геноме. Предполагается, что специалисты в данной области смогут легко установить точное местоположение гена UL4 у любого штамма DEV, используя информацию, содержащуюся в настоящей заявке и общие познания, или же путем совмещения последовательностей. В одном конкретном воплощении изобретение касается такого вируса утинового энтерита (DEV), который содержит неактивные гены US4, US5 и UL4. Более предпочтительно изобретение касается такого вируса DEV, который имеет неактивные гены US4, US5 и UL4 и содержит первую чужеродную нуклеиновую кислоту, клонированную в гены US4/US5 или в ген UL4, предпочтительно с заменой по меньшей мере 20% данного гена. У предпочтительного DEV по изобретению делеция составляет по меньшей мере 20% последовательности гена UL4, более предпочтительно по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% и вплоть до 100%. В предпочтительном примере DEV по изобретению имеет делецию по меньшей мере 500 п.н. из последовательности гена UL4, более предпочтительно по меньшей мере 600, 700, 800, 900, 1000 или больше.

Ген UL23 обычно состоит из 1077 п.н. генома DEV. Обращаясь к штамму CSC, ген UL23 соответствует нт. 77997-79073 в геноме. Предполагается, что специалисты в данной области смогут легко установить точное местоположение гена UL23 у любого штамма DEV, используя информацию, содержащуюся в настоящей заявке и общие познания, или же путем совмещения последовательностей. В одном конкретном воплощении изобретение касается такого вируса утинового энтерита (DEV), который содержит неактивные гены US4, US5 и UL23. Более предпочтительно изобретение касается такого

вируса DEV, который имеет неактивные гены US4, US5 и UL23 и содержит первую чужеродную нуклеиновую кислоту, клонированную в гены US4/US5 или в ген UL23, предпочтительно с заменой по меньшей мере 20% данного гена. У предпочтительного DEV по изобретению делеция составляет по меньшей мере 20% последовательности гена UL23, более предпочтительно по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% и вплоть до 100%. В предпочтительном примере DEV по изобретению имеет делецию по меньшей мере 500 п.н. из последовательности гена UL23, более предпочтительно по меньшей мере 600, 700, 800, 900, 1000 или больше. В одном конкретном воплощении DEV по изобретению имеет делецию, охватывающую по меньшей мере нт. 200-900 из последовательности гена UL23, более предпочтительно по меньшей мере нт. 100-1000, еще более предпочтительно по меньшей мере нт. 80-1000. В одном конкретном примере DEV по изобретению имеет делецию от нт. 51 до нт. 1027 (т.е. около 90%) из последовательности гена UL23.

Ген US7 обычно состоит из 1116 п.н. генома DEV. Обращаясь к штамму CSC, ген US7 соответствует нт. 145769-146884 в геноме. Предполагается, что специалисты в данной области смогут легко установить точное местоположение гена US7 у любого штамма DEV, используя информацию, содержащуюся в настоящей заявке и общие познания, или же путем совмещения последовательностей. В одном конкретном воплощении изобретение касается такого вируса утинового энтерита (DEV), который содержит неактивные гены US4, US5 и US7. Более предпочтительно изобретение касается такого вируса DEV, который имеет неактивные гены US4, US5 и US7 и содержит первую чужеродную нуклеиновую кислоту, клонированную в гены US4/US5 или в ген US7, предпочтительно с заменой по меньшей мере 20% данного гена. У предпочтительного DEV по изобретению делеция составляет по меньшей мере 20% последовательности гена US7, более предпочтительно по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% и вплоть до 100%. В предпочтительном примере DEV по изобретению имеет делецию по меньшей мере 500 п.н. из последовательности гена US7, более предпочтительно по меньшей мере 600, 700, 800, 900, 1000 или больше.

Изобретение также касается такого вируса DEV, который содержит первую чужеродную нуклеиновую кислоту, клонированную в гены US4/US5, и вторую чужеродную нуклеиновую кислоту, клонированную в межгенный участок, расположенный между генами UL27 и UL26, предпочтительно с заменой по меньшей мере 20% данного гена. Изобретение также касается такого вируса DEV, который содержит неактивные гены US4 и US5 и при этом содержит чужеродную нуклеиновую кислоту, клонированную в межгенный участок, расположенный между генами UL27 и UL26. Обращаясь к штамму CSC, межгенный участок, расположенный между UL27 и UL26, соответствует нт. 72195-72646 в геноме. Клонирование может проводиться в любом положении в пределах этого района, более предпочтительно между нт. 72300-72500, более предпочтительно между нт. 72350-72450. В одном конкретном воплощении клонирование проводится между нт. 72431-72432.

Изобретение также касается такого вируса DEV, который содержит неактивный ген UL4 и при этом содержит чужеродную нуклеиновую кислоту, клонированную в межгенный участок, расположенный между генами US7 и US8 или между генами UL45 и UL46 или между генами UL50 и UL51. Обращаясь к штамму CSC, межгенный участок, расположенный между UL45 и UL46, соответствует нт. 25132-25352 в геноме. Клонирование может проводиться в любом положении в пределах этого района, более

предпочтительно между нт. 25200-25300. В одном конкретном воплощении клонирование проводится между нт. 25275-25276. Обращаясь к штамму CSC, межгенный участок, расположенный между UL50 и UL51, соответствует нт. 15914-16063 в геноме.

5 Клонирование может проводиться в любом положении в пределах этого района, более предпочтительно между нт. 15970-16010. В одном конкретном воплощении клонирование проводится между нт. 15979-15980.

Конструирование и клонирование вирусов может осуществляться методами, известными *per se* в данной области. Клонирование генов и конструирование плазмид хорошо известно рядовым специалистам в данной области и может в основном  
10 проводиться стандартными методами молекулярной биологии (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4<sup>th</sup> Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA, 2012). Как правило, рекомбинантные вирусы получают путем гомологической рекомбинации между вирусным геномом и конструкцией (например, гомологической плазмидой), содержащей нуклеиновую кислоту для вставки, фланкированную  
15 нуклеотидами из сайта вставки для обеспечения рекомбинации. Клонирование может осуществляться с удалением или без удаления эндогенных последовательностей. В конкретном воплощении рекомбинантная последовательность клонируется с заменой по крайней мере части последовательности генома типа по меньшей мере 50 нуклеотидов или больше. Такая делеция повышает клонирующую способность вируса.

20 Для конструирования последовательность, содержащую целевой участок вставки, обычно сначала клонируют в подходящий вектор, получая вектор с гомологией. Примеры векторов включают плазмиды типа pBR322, pBR325, pBR327, pBR328, pUC18, pUC19, pUC7, pUC8 или pUC9; такие фаги, как фаг лямбда и фаг M13; или космиды типа pHC79. Последовательность целевого участка встраивают в вектор стандартными  
25 методами клонирования. Предпочтительно используемая последовательность целевого участка имеет достаточную длину с тем, чтобы обеспечить последующую гомологическую рекомбинацию *in vivo* с вирусным геномом DEV. Предпочтительно клонируемая последовательность целевого участка должна иметь длину по меньшей мере в 100 нуклеотидов, обычно более 300, как-то от 500 до 2000 нуклеотидов. Затем  
30 в целевой участок, клонированный в вектор, вставляют чужеродную нуклеиновую кислоту (которая обычно содержит ген и промотор). Вставка предпочтительно проводится таким образом, чтобы на каждой стороне от клонированной вставки оставалась часть последовательности целевого участка с длиной, достаточной для обеспечения гомологической рекомбинации (например, по меньшей мере 50 нуклеотидов,  
35 предпочтительно по меньшей мере 100 нуклеотидов). Чужеродная нуклеиновая кислота вводится в клонированный целевой участок классическими методами, как-то с помощью рестрикционных ферментов и процедуры лигирования. При необходимости в определенный сайт целевого участка можно вводить мутации для создания нового сайта расщепления для рестрикционного фермента. Для этой цели можно использовать  
40 стандартные методы мутагенеза, хорошо известные специалистам в данной области, такие, например, как мутагенез *in vitro* или ПЦР. Затем векторы с гомологией, у которых в целевой участок была вставлена чужеродная нуклеиновая кислота, можно вводить в инфицированные DEV клетки или клетки, трансфицированные геномом DEV, используя  
45 такие известные методы, как электропорация, фосфат кальция, метод на основе липофектина и т.п. При этом в данных клетках при рекомбинации между вирусом и вектором возникают рекомбинантные вирусы. Полученные рекомбинантные вирусы можно подвергнуть отбору по генотипу или по фенотипу с помощью известных методов, например, посредством гибридизации, секвенирования, ПЦР или функционального

анализа для обнаружения любых продуктов, кодируемых чужеродной нуклеиновой кислотой, как описано в примерах. Выбранный рекомбинантный вирус можно культивировать в большом объеме в клеточной культуре, после чего можно выделить рекомбинантные вирусы.

#### 5 Чужеродный ген

DEV по изобретению может содержать любую чужеродную нуклеиновую кислоту, предпочтительно какой-либо чужеродный ген. Чужеродный ген может кодировать любой представляющий интерес продукт, как-то РНК или биологически активные и/или иммуногенные (например, антигенные) белки, полипептиды или пептиды. В  
10 предпочтительном воплощении чужеродный ген кодирует антиген, еще более предпочтительно пептид или полипептид, происходящий из антигена патогенного организма, способного вызывать инфекции у животных, в особенности птиц. Примеры патогенов, вызывающих инфекции у птиц, включают вирусы, бактерии, грибки, простейшие и т.д. Иммуногенный (поли)пептид предпочтительно может (происходить  
15 из) поверхностного белка, секретируемого белка или структурного белка данного патогена либо их фрагментов. Полипептид может происходить из любого источника, например, вирусного, прокариотического, эукариотического или синтетического.

В предпочтительном воплощении чужеродный ген кодирует антигенный пептид возбудителя болезни птиц.

20 Конкретные примеры возбудителей болезней включают, без ограничения, вирус птичьего гриппа, птичий парамиксовирус типа 1, который также называют вирусом болезни Newcastle (NDV), птичий метапневмовирус, вирус болезни Марека, вирус болезни Gumboro, который также называют вирусом инфекционного бурсита (IBDV), вирус инфекционного ларинготрахеита (ILT), вирус инфекционного бронхита (IBV),  
25 *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Pasteurella multocida*, *Riemerella anatipestifer*, *Ornithobacterium rhinotracheale*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, различные микоплазмы, инфицирующие птиц, или кокцидии.

Предпочтительно чужеродный ген кодирует антиген, выбранный из F-белка NDV, белка HN NDV, белка VP2 IBDV, белка gB ILTV, белка 40K *Mycoplasma galisepticum* или  
30 поверхностного белка гемагглютинина (HA) вируса птичьего гриппа либо их иммуногенных фрагментов. В контексте изобретения термин “фрагмент” белка предпочтительно означает фрагмент, содержащий по меньшей мере 5 последовательных аминокислотных остатков данного белка, еще более предпочтительно от 5 до 100. В предпочтительном воплощении такой фрагмент содержит по меньшей мере один эпитоп  
35 и/или является иммуногенным *in vivo*, то есть может вызывать выработку антител, связывающих полноразмерный белок.

Конкретные примеры иммуногенных пептидов включают, к примеру, пептид, содержащий аминокислотные остатки 1-453 из VP2, 1-469 из gB или 1-540 из F-белка.

#### Предпочтительные вирусы DEV

40 Предпочтительные DEV по изобретению содержат делецию целых генов US4 и US5.

Определенные DEV по изобретению содержат делецию непрерывной области, включающей по меньшей мере 50% последовательности нуклеотидов гена US4, весь межгенный участок US4-US5 и по меньшей мере 50% последовательности нуклеотидов гена US5.

45 Другие предпочтительные DEV по изобретению содержат делецию непрерывной области, включающей всю последовательность нуклеотидов гена US4, весь межгенный участок US4-US5 и всю последовательность нуклеотидов гена US5.

У предпочтительных DEV по изобретению чужеродная нуклеиновая кислота кодирует

птичий антиген, более предпочтительно VP2, HN или F-белок либо его иммуногенный фрагмент.

Другие предпочтительные DEV по изобретению содержат неактивные гены US4 и US5 и по меньшей мере еще одну делецию, выбранную из:

- 5 – делеции по меньшей мере нт. 100-1000 из последовательности гена US7,
- делеции по меньшей мере нт. 100-1200 из последовательности гена UL4 и/или
- делеции по меньшей мере нт. 100-1000 из последовательности гена UL23.

Другие предпочтительные DEV по изобретению содержат неактивные гены US4 и US5 и по меньшей мере одну чужеродную нуклеиновую кислоту, клонированную в  
10 отдельный участок, предпочтительно выбранный из гена UL4, гена UL44, межгенного участка UL27-UL26, гена UL23, межгенного участка UL45-UL46, межгенного участка UL50-UL51, гена US7, межгенного участка US7-US8 или гена US10.

#### Нуклеиновые кислоты

Изобретение также касается молекул нуклеиновой кислоты, содержащей геном DEV  
15 с неактивными генами US4 и US5. Такая нуклеиновая кислота может быть одноцепочечной или двухцепочечной, ДНК или РНК. В предпочтительном воплощении нуклеиновая кислота представлена молекулой ДНК, содержащей геном DEV, как определено выше.

Нуклеиновая кислота может находиться в свободном виде или в векторе типа  
20 плазмиды, ВАС и т.п. Нуклеиновая кислота может быть выделенной или содержаться в клетках хозяина.

#### Клеточные культуры

Рекомбинантные вирусы настоящего изобретения можно размножить в любых  
культурах компетентных клеток. После достижения необходимого роста вирусов клетки  
25 можно отделить от лунок с помощью скребка или трипсина, а инфицированные клетки выделить из супернатанта центрифугированием.

Примеры компетентных клеток включают СЕФ, яйца с эмбрионами, почечные клетки кур и т.п. Клетки или вирусы можно культивировать в культуральной среде типа среды MEM Игля, среды Leibowitz-L-15/McCoy 5A (смесь 1:1) при температуре около 37°C в  
30 течение 3-6 дней. Инфицированные клетки обычно суспендируют в культуральной среде, содержащей 10% диметилсульфоксида (DMSO), и хранят в замороженном виде в жидком азоте.

#### Композиции и вакцины

Изобретение также касается композиций типа вакцин, содержащих один или  
35 несколько DEV по изобретению.

Композиции и вакцины по изобретению могут содержать DEV в фармацевтически или ветеринарно приемлемом носителе или наполнителе. Кроме того, композиции и вакцины также могут содержать подходящий адъювант.

Композиции и вакцины по настоящему изобретению могут содержать подходящий  
40 растворитель, такой, к примеру, как водный буфер или фосфатный буфер. Предпочтительно композиции и вакцины также содержат добавки, как-то стабилизирующие вещества, консерванты, красители, поверхностно-активные вещества и др.

Например, композиции или вакцины по настоящему изобретению могут быть  
45 составлены с одной или несколькими дополнительными добавками для поддержания изотоничности, физиологического рН и стабильности, к примеру, с таким буфером, как физиологический солевой раствор (0,85%), физраствор с фосфатным буфером (PBS) цитратный буфер, трис(гидроксиметиламинометан) (TRIS), физраствор с трис-буфером

и т.п., или с антибиотиком, к примеру, неомицином или стрептомицином и т.п.).

В одном конкретном воплощении композиция по изобретению содержит консервант.

В другом конкретном воплощении композиция по изобретению содержит солюбилизирующее средство.

5 В другом конкретном воплощении композиция по изобретению содержит адъювант. Адъюванты могут быть получены из целого ряда источников, включая различные белки и пептиды, происходящие из животных (например, гормоны, цитокины, костимулирующие факторы), и новые нуклеиновые кислоты, происходящие из вирусов и других источников (например, двухцепочечной РНК, CpG) и т.п., которые сами по себе или в комбинации достаточны для усиления иммунного ответа.

10 Композиции по изобретению могут быть жидкими (растворы, суспензии, эмульсии) или твердыми (порошки, гели, пасты, масла) и могут быть составлены для любого способа введения. Предпочтительно они составляются для инъекций типа инъекций *in ovo* или же, например, для внутривенного, подкожного, внутримышечного, 15 внутриглазничного, внутриглазного, внутрикожного и/или внутрибрюшинного введения. С другой стороны, они могут быть составлены для перорального, глазного (например, с помощью глазных капель), интраназального или окуло-назального введения, например, с помощью аэрозоля или спрея.

Каждая доза вакцины может содержать подходящую дозу, достаточную для 20 выработки защитного иммунитета у данного вида птиц. Оптимизация таких доз хорошо известна в данной области. Количество антигена на 1 дозу может быть установлено известными методами с использованием реакций антиген/антитело, к примеру, методом ELISA.

25 Вакцины по изобретению можно вводить в виде однократных или многократных доз, в зависимости от методики вакцинации.

В одном конкретном воплощении изобретение касается вакцин, содержащих вирус, нуклеиновую кислоту или клетки, как определено выше, и подходящий эксципиент или адъювант.

30 В другом конкретном воплощении изобретение касается вакцин, содержащих жидкие композиции вируса, нуклеиновой кислоты или клеток, как определено выше, и подходящий эксципиент или адъювант.

Настоящее изобретение также касается применения вирусов, композиций, вакцин, нуклеиновой кислоты или клеток, как описано выше, для иммунизации птиц типа домашних птиц, и способа иммунизации птиц путем введения иммунологически 35 эффективного количества вируса, композиции, вакцины, нуклеиновой кислоты или клеток, как описано выше.

Следующим предметом изобретения являются композиции, DEV, нуклеиновые кислоты или клетки хозяина, как определено выше, для применения для вакцинации или иммунизации птиц, в особенности домашних птиц, более предпочтительно кур, 40 более предпочтительно молодых птиц (на 3-й день после вылупления или раньше) либо *in ovo*.

Следующим предметом изобретения являются композиции, вакцины, DEV, нуклеиновые кислоты или клетки хозяина, как определено выше, для применения для выработки защитного иммунитета у птиц, в особенности домашних птиц, более 45 предпочтительно кур, более предпочтительно молодых птиц (на 3-й день после вылупления или раньше) либо *in ovo*.

Изобретение также касается способа вакцинации животных, в особенности домашних птиц, более предпочтительно кур, более предпочтительно молодых птиц (на 3-й день

после вылупления или раньше либо *in ovo*), включающего введение данным животным композиции вакцины, DEV, нуклеиновой кислоты или клеток хозяина, как определено выше.

Предпочтительным предметом изобретения является способ вакцинации домашних птиц, включающий введение композиции, вакцины, DEV, нуклеиновой кислоты или клеток хозяина, как определено выше, *in ovo*.

Другим предпочтительным предметом изобретения является способ вакцинации домашних птиц, включающий введение композиции, вакцины, DEV, нуклеиновой кислоты или клеток хозяина, как определено выше, в 1-й день или на 2-й день после вылупления.

В следующем аспекте изобретения предусмотрен способ выработки иммуногенного или защитного ответа у животных против одного или нескольких птичьих патогенов, включающий введение данным животным, в особенности домашним птицам, более предпочтительно курам, более предпочтительно молодым птицам (на 3-й день после вылупления или раньше) либо *in ovo* композиции, вакцины, DEV, нуклеиновой кислоты или клеток хозяина, как определено выше.

Как указано в экспериментальном разделе, вирусы по изобретению особенно выгодны для вакцинации молодых птиц (в 1 день, 2 день или 3 день после вылупления) либо для вакцинации *in ovo*. Так, вне ожидания изобретение показало, что вирусы по изобретению безопасны при таком раннем введении, тогда как нативный DEV или DEV дикого типа летален. Такое раннее введение, в сочетании с ранним возникновением иммунитета, вызванного этими вирусами, особенно выгодно для выработки раннего защитного иммунитета еще до того, как домашняя птица может подвергнуться значительному воздействию патогенов.

В этом отношении, в более общем аспекте изобретение также касается способа вакцинации или иммунизации птиц, предпочтительно домашних птиц, более предпочтительно кур, который включает введение данным птицам *in ovo* аттенуированного DEV, кодирующего антиген. Изобретение также касается способа экспрессии чужеродного гена у птиц, предпочтительно домашних птиц, более предпочтительно кур, который включает введение данным птицам *in ovo* аттенуированного DEV, содержащего данный чужеродный ген. Изобретение также касается применения аттенуированного DEV, содержащего чужеродный ген, для экспрессии данного гена у птиц путем введения данного DEV *in ovo*. Изобретение также касается аттенуированных DEV, кодирующих антигены, для применения для индукции иммунного ответа или для вакцинации птиц путем введения данного DEV *in ovo*. DEV предпочтительно содержит неактивный эндогенный ген, что делает данный DEV аттенуированным и хорошо переносимым при инъекции *in ovo*.

Настоящее изобретение также касается вакцинационных наборов для иммунизации птиц, которые содержат эффективное количество поливалентной вакцины, как описано выше, и средство для введения данных компонентов данному виду птиц. Например, такой набор содержит инъекционное устройство, заполненное вакциной по изобретению, а также инструкции для внутрикожного, подкожного, внутримышечного введения или введения *in ovo*. В качестве альтернативы набор содержит устройство для распыления/аэрозоля или глазных капель, заполненное вакциной по изобретению, а также инструкции по окуло-назальному введению, пероральному или мукозальному введению.

Другие аспекты и преимущества изобретения будут раскрыты в нижеследующем экспериментальном разделе, который раскрывает заявленное изобретение.

Примеры

### Пример 1. Вирулентность DEV дикого типа у яиц или молодых птиц

Проводили клиническое исследование для изучения патогенности или вирулентности DEV у цыплят при введении по различным временным схемам. В частности, проводили введение in ovo (за 3 дня до вылупления), в день 1 после вылупления или в день 4 после вылупления. Использовали DEV дикого типа штамма Jansen. Вводимая доза составляла 100 либо 1000 pfu на 1 дозу. В качестве контроля вводили раствор PBS. Патогенность определяли путем измерения смертности каждый день после вылупления.

Результаты представлены в следующей таблице.

Группа	Вакцина	Доза (pfu)	Способ	День1	n	Количество погибших птиц в каждом возрасте											Смертность (%)
						D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	>D92		
1	PBS	-	in ovo	-3	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	12
2	DEV	100	in ovo	-3	16	3	2	9	1	1	-	-	-	-	-	-	100
3	DEV	1000	in ovo	-3	17	5	2	9	1	-	-	-	-	-	-	-	100
4	DEV	1000	п/к	1	17	0	0	0	0	0	6	4	2	1	1	82	
5	DEV	1000	п/к	4	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

(1) Возраст в днях при инокуляции;

(2) Количество погибших птиц в возрасте от 9 до 19 дней.

Приведенные выше результаты показывают, что введение DEV дикого типа в день 4 после вылупления безопасно при 100% выживаемости (см. группу 5). В отличие от этого, после введения DEV in ovo 100% птиц погибли в возрасте до 4 дней, тогда как введение PBS in ovo было безопасным. Эти результаты показывают, что, хотя DEV дикого типа может подходить для введения взрослым животным, но вне ожидания он оказался летальным для молодых животных (3-й день или меньше после вылупления) либо при введении in ovo.

Пример 2. Вирулентность DEV с неактивным геном US4 или US5

2.1. Конструирование DEV, содержащих неактивный ген US4 или ген US5

Стремясь уменьшить вирулентность для куриных эмбрионов, конструировали DEV с неактивным US4 или US5.

Конструирование кассеты gpsLneo-DsRed2

Конструировали фрагмент ДНК в 2,8 т.н. из кассеты gpsLneo-DsRed2 с помощью реакций ПЦР. Вкратце, проводили три реакции ПЦР. Первую реакцию ПЦР проводили с помощью пары праймеров SEQ ID NO: 1 (5'-GGCCTGGTGTATGATGGCGGGATCGTTGTAT-3') и SEQ ID NO: 2 (5'-CCATGGTGCTGCGCTCAGAAGAACTCGTCA-3') с матрицей из синтезированного фрагмента gpsLneo (SEQ ID NO: 3). Вторую реакцию ПЦР проводили с помощью пары праймеров SEQ ID NO: 4 (5'-ACGAGTTCTTCTGAGCGCAGCACCAT') и SEQ ID NO: 5 (5'-TCGGAGGAGGCCATCCTTAAGAGCTGTAAT-3') с матричной плазмидой pSI типа экспрессирующего вектора для млекопитающих (Promega, кат. № E1721). Третью реакцию ПЦР проводили с помощью пары праймеров SEQ ID NO: 6 (5'-TACAGCTCTTAAGGATGGCCTCCTCCGAGA-3') и SEQ ID NO: 7 (5'-GCAGTGAA') с матричной плазмидой pIRES2-DsRed2 (Clontech, кат. № 632420). Проводили еще одну реакцию ПЦР, используя смесь продуктов ПЦР из первой и второй реакции ПЦР в качестве матрицы и SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 5 в качестве праймеров. Этот продукт ПЦР смешивали с продуктом ПЦР из третьей реакции и использовали для последней реакции ПЦР с парой праймеров SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 7, получая кассету gpsLneo-DsRed2.

Конструирование кассеты со вставкой

Конструировали фрагмент ДНК из кассеты gpsLneo-DsRed2 с добавлением

гомологичных 5'- и 3'-концам области US4 или US5 DEV последовательностей (по 50 п.н.) на оба конца с помощью реакций ПЦР. Реакции ПЦР проводили, используя кассету rpsLneo-DsRed2 в качестве матрицы. Использовали следующие пары праймеров: SEQ ID NO: 8 (5'-

5 ATGGCAACAATGATAGCTGTGGTGTAGTTTTTTTTGGGACGCGTTTTAGGGGCCT  
GGTGATGATGGCGGG-3') и SEQ ID NO: 9 (5'-TTAAACTAATGGAACGCGTTGGAATT  
TCAAGTCTTGGCGCCCAAACATCGGCAGTGAAAAAATGCTTTA-3') для DEV с  
неактивным US4 и SEQ ID NO: 10 (5'-

10 ATGTATACAGACGTTACGGTCATGTGGGTAGCCGT  
GATTTTATTTACTATGGCCTGGTGATGATGGCGGG-3') и SEQ ID NO: 11 (5'-TCATACC  
ATACAAAGGCATAGGTACAGCCCACAGGTTAAAAACAAAGAAAGCAGTGAAAAAA  
ATGCTTTA-3') для DEV с неактивным US5. Полученные ПЦР-фрагменты (кассеты  
US4-rpsLneo-DsRed2 и US5-rpsLneo-DsRed2) подвергали электрофорезу и очищали.

Конструирование рекомбинантного DEV, несущего ген rpsLneo-DsRed2

15 Конструирование рекомбинантного DEV, несущего ген rpsLneo-DsRed2 в районе US4  
или US5, проводили путем гомологической рекомбинации в несущем геном DEV штамме  
E. coli, трансфицированном 0,5 мкг US4-rpsLneoDsRed2 или US5-rpsLneoDsRed2.

Трансфекцию проводили методом электропорации с помощью Gene Pulser Xcell (Bio-  
Rad Laboratories) при 1,75 кВ, 25 мкФ и 200 Ом. После трансфекции E. coli высевали на  
20 чашки с агаром Luria-Bertani (LB) и инкубировали в течение ночи при 30°C. Клоны E.  
coli, несущие соответствующую вставку, содержащую ген rpsLneo-DsRed2 в районе US4  
или US5, идентифицировали методом ПЦР с помощью пары праймеров,  
амплифицирующей участок между геном rpsLneo-DsRed2 и районом сайта вставки в  
геноме DEV (стык 1). Использовали праймеры SEQ ID NO: 12 (5'-

25 AAGTGTATAAATTAGACAAGTAGCTATG') и SEQ ID NO: 13 (5'-  
TCAGAAGAAGTTCGTCGAAGAAGGC-3') для DEV с неактивным US4 и SEQ ID NO: 13 и  
SEQ ID NO: 14 (5'-GTTTATATTGACGCGGAATGTTGAC-3') для DEV с неактивным US5.

Из клонов E. coli, несущих соответствующие вставки, выделяли ДНК DEV и  
трансфицировали в клетки CEF с помощью Nucleofector II (Lonza, Basel, Швейцария).

30 Трансфицированные клетки вносили в среду Leibovitz's L-15 (Life Technologies Corp.,  
кат. № 41300-39) со средой McCoy's 5A (Life Technologies Corp., кат. № 21500-061) (1:1)  
и 4% телячьей сыворотки [среда LM(+)], высевали в 96-луночные планшеты для  
тканевых культур, а затем инкубировали при 37°C в 4-5% CO<sub>2</sub> в течение 5-7 дней, пока  
не проявлялся цитопатический эффект (CPE) DEV. После этого выделяли DEVs, несущие  
35 ген rpsLneo-DsRed2 в районе US4 или US5 (DEV/US4/rpsLneo-DsRed2 или DEV/US5/  
rpsLneo-DsRed2).

Проверка структуры генома

Структуру генома у рекомбинантного DEV/US4/rpsLneo-DsRed2 или DEV/US5/rpsLneo-  
DsRed2 проверяли при помощи трех реакций ПЦР, амплифицирующих стыковочные  
40 участки (стык 1, стык 2 и стык 3) на каждом конце вставленного гена. Пары праймеров,  
использовавшиеся в реакциях ПЦР для стыка 1, описаны выше. В реакциях ПЦР с DEV/  
US4/rpsLneo-DsRed2 использовали пары праймеров SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 15 (5'-  
CATTTTAACCGTTTAAGTCAACATTCGCG-3') для стыка 2 и SEQ ID NO: 12 и SEQ ID  
NO: 15 для стыка 3. В реакциях ПЦР с DEV/US5/rpsLneo-DsRed2 использовали пары  
45 праймеров SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 16 (5'-ACTGAGATGTTGGACCATACCATCAAA')  
для стыка 2 и SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 16 для стыка 3. Наблюдались ожидаемые  
размеры продуктов ПЦР, подтверждающие, что DEV/US4/rpsLneo-DsRed2 и DEV/US5/  
rpsLneo-DsRed2 имеют ожидаемые структуры генома.

2.2. Экспрессия чужеродного гена рекомбинантными DEV с неактивным геном US4 или US5

Экспрессию белка DsRed2 у DEV/US4/rpsLneo-DsRed2 или DEV/US5/rpsLneo-DsRed2 проверяли по флуоресценции DsRed2. Возбуждение флуоресценции DsRed2 проводили на клетках CEF, инфицированных DEV/US4/rpsLneo-DsRed2 или DEV/US5/DsRed2. Вкратце, клетки CEF в 6-луночной планшете инфицировали с помощью DEV/US4/rpsLneo-DsRed2, DEV/US5/rpsLneo-DsRed2 или исходного штамма DEV при множественности заражения примерно 0,01. Через 3 дня после инокуляции клетки возбуждали при 563 нм и наблюдали красную флуоресценцию в бляшках рекомбинантных DEV/US4/rpsLneo-DsRed2 или DEV/US5/rpsLneo-DsRed2, что подтверждает действительность экспрессии белка рекомбинантными DEV.

2.3. Жизнеспособность и стабильность рекомбинантных DEV с неактивным геном US4 или US5

DEV/US4/rpsLneo-DsRed2 или DEV/US5/rpsLneo-DsRed2 пассировали в клетках CEF по 15 раз и проверяли стабильность встроенного гена rpsLneo-DsRed2. Пересевы проводили через каждые 3-4 дня. После каждой 5 пассажей бляшки DEV/US4/rpsLneo-DsRed2 или DEV/US5/rpsLneo-DsRed2 проверяли на красную флуоресценцию под флуоресцентным микроскопом и проверяли структуру их генома методом ПЦР, амплифицируя стыковочные участки (стык 1, стык 2 и стык 3) с помощью праймеров, приведенных в примере 2. У всех исследуемых вирусов наблюдалась красная флуоресценция и ожидаемые размеры продуктов ПЦР, подтверждая, что ген rpsLneo-DsRed2 сохранялся у DEV/US4/rpsLneo-DsRed2 и DEV/US5/rpsLneo-DsRed2 на протяжении по меньшей мере 15 пассажей.

2.4. Вирулентность DEV с неактивным геном US4 или US5 при введении in ovo

Инокулировали DEV/US4/rpsLneo-DsRed2 или DEV/US5/rpsLneo-DsRed2 18-дневным эмбрионам цыплят SPF для исследования их патогенности или вирулентности для куриных эмбрионов. В куриные эмбрионы вводили in ovo примерно 1000 pfu в 0,1 мл DEV/US4/rpsLneo-DsRed2, DEV/US5/rpsLneo-DsRed2, исходного DEV либо 0,1 мл PBS через иглу 20 размера в 1,5 дюйма. Цыплят наблюдали ежедневно на наличие связанных с DEV клинических признаков типа депрессии и смерти в течение 11 дней. Результаты представлены в следующей таблице.

Вакцина	n	Не вылуп.	Количество погибших птиц в каждом возрасте							Смертность (%)
			D0	D1	D2	D3	D4	D5	>D61	
PBS	22	2	0	0	0	0	2	0	0	18
DEV/US4/rpsLneo-DsRed2	22	5	3	1	6	5	2	-	-	100
DEV/US5/rpsLneo-DsRed2	22	2	6	0	6	4	4	-	-	100
DEV	22	0	6	1	8	4	2	0	0	95

(1) Количество погибших птиц в возрасте от 6 до 11 дней.

Все цыплята, инокулированные in ovo DEV с неактивным US4 или US5, умерли через 4 дня после вылупления, тогда как умерли 95% цыплят, инокулированных исходным DEV. Эти результаты показывают, что DEV с неактивным US4 или US5 по-прежнему обладает патогенностью и вирулентностью для куриных эмбрионов при введении in ovo.

Пример 3. Конструирование DEV, содержащих неактивные гены US4 и US5

Для получения DEV с неактивными US4 и US5 сначала конструировали вектор с гомологией, который затем использовали для получения вируса путем гомологической рекомбинации в *E. coli*. Плазмидные конструкции и манипуляции с ДНК в основном проводились в соответствии со стандартными методами молекулярной биологии

(Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 4th Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA, 2012).

Клонировали фрагмент ДНК в 1,1 т.н. из генома DEV, фланкирующий гены US3 и US6, при помощи реакций ПЦР с добавлением сайта распознавания SfiI в месте вставки. Вкратце, используя ДНК, выделенную из DEV в качестве матрицы, проводили 2 реакции ПЦР. Использовали следующие пары праймеров: SEQ ID NO: 17 (5'-GCGCATGCTAGC') и SEQ ID NO: 18 (5'-GGTGGCCAATAAGGCCTGACGGCAATA'), SEQ ID NO: 19 (5'-TCAGgccttattggccACCAGCTACACAAG-3') и SEQ ID NO: 20 (5'-GCGAATTCGATTAATTCTCCCGAAGTGTG-3'). Проводили еще одну реакцию ПЦР, используя смесь продуктов ПЦР из двух предыдущих реакций ПЦР в качестве матрицы и SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 20 в качестве праймеров. Полученный ПЦР-фрагмент клонировали в вектор pUC18 (GenBank Acc. L09136) после расщепления EcoRI и SphI, получая pUC18-КАРЕVAC-US4US5del-SfiI, который содержит часть области US3 и US6 из генома DEV. Затем, используя плазмиду pUC18-КАРЕVAC-US4US5del-SfiI, конструировали вектор с гомологией, содержащий промотор и ген VP2 IBDV из стандартного провоцирующего штамма (VP2-STC). Сначала расщепляли pUC18-КАРЕVAC-US4US5del-SfiI с помощью SfiI и дефосфорилировали рекомбинантной щелочной фосфатазой S1B1 из *Shewanella* sp. (PAP) (Funakoshi, № DE110). Затем получали промотор β-актина (Bac) курицы (SEQ ID NO: 21) и гены VP2-STC путем расщепления p45/46bacVP2-STC#11 (U.S. Pat. No. 6,764,684) с помощью BglI. Наконец, эту кассету с промотором Bac и VP2-STC вставляли в расщепленную SfiI pUC18-КАРЕVAC-US4US5del-SfiI, получая pUC18-КАРЕVAC-US4US5del-BacVP2stc (фиг. 2). Эту плазмиду – pUC18-КАРЕVAC-US4US5del-BacVP2stc использовали для конструирования DEV/US4US5del/BacVP2stc (фиг. 2).

25 Конструирование DEV/US4US5del/BacVP2

Конструирование DEV, несущего ген BacVP2 в области US4-US5, проводили путем гомологической рекомбинации в несущем геном DEV штамме *E. coli*, трансфицированном 0,5 мкг pUC18-КАРЕVAC-US4US5del-BacVP2stc. Условия трансфекции были описаны в примере 2. Клоны *E. coli*, несущие соответствующую вставку, содержащую ген BacVP2, идентифицировали методом ПЦР с помощью пары праймеров, амплифицирующих участок между геном BacVP2 и районом сайта вставки в геноме DEV (стык 1, фиг. 2). Использовали праймеры SEQ ID NO: 22 (5'-GTCCACTATGCCATGACATAGGTG-3') и SEQ ID NO: 23 (5'-GAGCAACTTCGAGCTGATCC-3'). Из клонов *E. coli*, несущих соответствующую вставку, выделяли ДНК DEV и трансфицировали в клетки CEF. Трансфицированные клетки инкубировали до тех пор, пока не проявлялся цитопатический эффект (CPE) DEV. При этом получали DEV/US4US5del/BacVP2 с нокаутом генов US4 и US5, который содержит ген BacVP2.

Проверка структуры генома

Структуру генома DEV/US4US5del/BacVP2 проверяли при помощи 3 реакций ПЦР, амплифицирующих стыковочные участки (стык 1, стык 2 и стык 3; фиг. 2) на каждом конце вставленного гена. Пары праймеров, использовавшиеся в реакциях ПЦР для стыка 1, описаны выше. В реакциях ПЦР для стыка 2 использовали пару праймеров SEQ ID NO: 24 (5'-GCCAGGGAATCCAGGGA AAAAGAC-3') и SEQ ID NO: 12. Для стыка 3 использовали SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 12. Наблюдались ожидаемые размеры продуктов ПЦР, подтверждающие, что DEV/US4US5del/BacVP2 имеет ожидаемую структуру генома.

Пример 4. Экспрессия гена VP2 при помощи DEV/US4US5del/BacVP2

Экспрессию белка VP2 рекомбинантным DEV/US4US5del/BacVP2 проверяли методом

черных бляшек. Вкратце, инфицированные DEV/US4US5del/BacVP2 клетки CEF фиксировали смесью метанол:ацетон (1:2) и инкубировали с моноклональным антителом R63 против VP2 IBDV (ATCC № HB-9490). Затем инкубировали с биотинилированным антителом против IgG мыши (Vector Laboratories, кат. № BA-9200), а затем с набором VECTASTAIN ABC-AP (Vector Laboratories, кат. № АК-5000), и окрашивали бляшки, экспрессирующие белок VP2, добавлением раствора NBT/BCIP (Roche Applied Science, кат. № 1681451). Как видно из фиг. 3, в инфицированных DEV/US4US5del/BacVP2 клетках наблюдалась экспрессия белка VP2.

#### Пример 5. Введение DEV/US4US5del/BacVP2 in ovo

Инокулировали DEV/US4US5del/BacVP2 18-дневным эмбрионам цыплят SPF. Все группы эмбрионов вакцинировали in ovo примерно по 1000 pfu в 0,1 мл рекомбинантного DEV/US4US5del/BacVP2, исходного DEV либо 0,1 мл PBS через иглы 20 калибра в 1,5 дюйма. Цыплят наблюдали ежедневно на наличие связанных с DEV клинических признаков типа депрессии и смерти в течение 35 дней. Через 5 недель после вылупления цыплят проверяли на прибавку в весе, вскрывали и обследовали на наличие макроскопических повреждений. Результаты представлены в следующей таблице.

Вакцина	n	Невылуп.	Количество погибших птиц в каждом возрасте								Смертность (%)	Птицы с депрессией	Средний вес (г)
			D0	D1	D2	D3-D81	D9	D10	D11	>D122			
PBS	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0	433,3
DEV/US4US5del/BacVP2	17	0	0	0	0	0	1	0	1	0	11,8	0	468,3
DEV	17	7	4	0	6	-	-	-	-	-	100,0	-	-

(1) Количество погибших птиц в возрасте от 3 до 8 дней;

(2) Количество погибших птиц в возрасте от 12 до 35 дней.

Смертность у птиц, инокулированных DEV/US4US5del/BacVP2 с нокаутом обоих генов US4 и US5, составила 11,8%, тогда как смертность при исходном DEV составила 100%, свидетельствуя о том, что вирулентность и патогенность DEV существенно снижалась при инактивации (например, делеции) обоих генов US4 и US5. Кроме того, средний вес тела у выживших птиц, инокулированных DEV/US4US5del/BacVP2, был сравним с весом при PBS. Эти результаты свидетельствуют об эффективности DEV по изобретению для вакцинации in ovo.

#### Пример 6. Конструирование DEV/Coa5VP2, содержащих неактивные гены US4 и US5

В этом разделе конструировали DEV с делецией обоих генов US4 и US5, которые содержат ген VP2, управляемый центральной частью промотора Bac (промотор Coa5; SEQ ID NO: 25). Для конструирования этих DEV сначала конструировали векторы с гомологией, которые затем использовали для получения вирусов путем гомологической рекомбинации в *E. coli*.

#### Конструирование pUC18-KAPEVAC-US4US5del

Клонировали фрагмент ДНК в 1,1 т.н. из генома DEV, фланкирующий гены US3 и US6, посредством реакций ПЦР (фиг. 4). Вкратце, используя ДНК, выделенную из DEV в качестве матрицы, проводили 2 реакции ПЦР. Использовали следующие пары праймеров: SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 26 (5'-GCTTGTGTAGCTGGTTGACGGCAATATG-3'), SEQ ID NO: 27 (5'-CATATTGCCGTCAACCAGCTACACAAGC-3') и SEQ ID NO: 20 (5'-gcGAA'). Проводили еще одну реакцию ПЦР, используя смесь продуктов ПЦР из двух предыдущих реакций ПЦР в качестве матрицы и SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 20 в качестве праймеров. Полученный ПЦР-фрагмент клонировали в вектор pUC18 после расщепления EcoRI и SphI, получая pUC18-KAPEVAC-US4US5del (фиг. 4).

### Конструирование DEV/US4US5del

Конструирование рекомбинантного DEV/US4US5del с делецией обоих генов US4 и US5, проводили путем гомологической рекомбинации в несущих геном DEV клетках *E. coli*, трансфицированных 0,5 мкг pUC18-КАРЕVAC-US4US5del. Клоны *E. coli*, несущие соответствующую делецию (DH10B/DEV/US4US5del), идентифицировали методом ПЦР с помощью пары праймеров, амплифицирующих участок между US3 и US6 (стык 1, фиг. 4). Использовали праймеры SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 20. Из клонов *E. coli* выделяли ДНК DEV и трансфицировали в клетки CEF, получая DEV/US4US5del.

### Конструирование pUC18-КАРЕVAC-UL23del-Coa5VP2

Клонировали фрагмент ДНК в 1,0 т.н. из генома DEV, фланкирующий гены UL24 и UL22, при помощи реакций ПЦР с добавлением сайта распознавания SfiI в месте вставки (фиг. 5). Вкратце, используя ДНК, выделенную из DEV в качестве матрицы, проводили 2 реакции ПЦР. Использовали следующие пары праймеров: SEQ ID NO: 28 (5'-GCGCATG') и SEQ NO: 29 (5'-CCCGGCCAATAAGGCCACAGAAAAA'), SEQ ID NO: 30 (5'-CTGTGGCCTTATTGGCCGGGATCTGGAAC-3') и SEQ ID NO: 31 (5'-GCGAATTCATGTGCTACGCCAG-3'). Проводили еще одну реакцию ПЦР, используя смесь продуктов ПЦР из двух предыдущих реакций ПЦР в качестве матрицы и SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 31 в качестве праймеров. Полученный ПЦР-фрагмент клонировали в вектор pUC18 после расщепления EcoRI и SphI, получая pUC18-КАРЕVAC-UL23del-SfiI. Затем, используя плазмиду pUC18-КАРЕVAC-UL23del-SfiI, конструировали вектор с гомологией, содержащий промотор и VP2-СТС. Сначала расщепляли pUC18-КАРЕVAC-UL23del-SfiI с помощью SfiI и дефосфорилировали с помощью PAP. Промотор Coa5 получали из плазмиды pGICOA (U.S. Pat. No. 6,866,852) путем расщепления BglII и XbaI и лигировали с фрагментом XbaI-EcoRI (6,3 т.н.) и фрагментом EcoRI-BglII (0,1 т.н.) из p45/46bacVP2-СТС#11 (U.S. Pat. No. 6764684), получая p45/VP2-СТС#11. Затем из p45/46COA5VP2-СТС#11 вырезали кассету с промотором Coa5 и VP2-СТС путем расщепления BglII и лигировали с расщепленной SfiI pUC18-КАРЕVAC-UL23del-SfiI, получая pUC18-КАРЕVAC-UL23del-Coa5VP2. Эту плазмиду использовали для конструирования DEV/US4US5del/UL23/Coa5VP2.

### Конструирование pUC18-КАРЕVAC-UL26-Coa5VP2

Клонировали фрагмент ДНК в 1,0 т.н. из генома DEV, фланкирующий гены UL26 и UL27, при помощи реакций ПЦР с добавлением сайта распознавания SfiI в месте вставки (фиг. 6). Вкратце, используя ДНК, выделенную из DEV в качестве матрицы, проводили 2 реакции ПЦР. Использовали следующие пары праймеров: SEQ ID NO: 32 (5'-CGGTGCG') и SEQ ID NO: 33 (5'-CGGCCAATAAGGCCAAGAATG'), SEQ ID NO: 34 (5'-TGGCCTTATTGGCCGCCGTATGAATTGCGC-3') и SEQ ID NO: 35 (5'-GCGAGTCTCTGCAACCACAGACCGC-3'). Проводили еще одну реакцию ПЦР, используя смесь продуктов ПЦР из двух предыдущих реакций ПЦР в качестве матрицы и SEQ ID NO: 32 и SEQ ID NO: 35 в качестве праймеров. Полученный ПЦР-фрагмент клонировали в вектор pUC18 после расщепления SalI и SacI, получая pUC18-КАРЕVAC-UL26-SfiI. Затем, используя плазмиду pUC18-КАРЕVAC-UL26-SfiI, конструировали вектор с гомологией, содержащий промотор и ген VP2 IBDV из стандартного провоцирующего штамма. Сначала расщепляли pUC18-КАРЕVAC-UL26-SfiI с помощью SfiI и дефосфорилировали с помощью PAP. Затем из pUC18-КАРЕVAC-UL23del-Coa5VP2 вырезали кассету с промотором Coa5 и VP2-СТС путем расщепления SfiI и лигировали с расщепленной SfiI pUC18-КАРЕVAC-UL26-SfiI, получая pUC18-КАРЕVAC-UL26-Coa5VP2. Эту плазмиду использовали для конструирования DEV/US5del/UL26/Coa5VP2.

### Конструирование pUC18-КАРЕVAC-UL45-Coa5VP2

Клонировали фрагмент ДНК в 1,0 т.н. из генома DEV, фланкирующий гены UL45 и UL46, при помощи реакций ПЦР с добавлением сайта распознавания SfiI в месте вставки (фиг. 7). Вкратце, используя ДНК, выделенную из DEV в качестве матрицы, проводили 2 реакции ПЦР. Использовали следующие пары праймеров: SEQ ID NO: 36 (5'-CGGTTCGACGCGCTTCATCTAA-3') и SEQ ID NO: 37 (5'-TGGCCAATAAGGCCGTTT'), SEQ ID NO: 38 (5'-CGGCCTTATTGGCCAATCTGATTCATCCAA-3') и SEQ ID NO: 39 (5'-GCGAGTCCCGCСТААТСАСААТCGGTATTG-3'). Проводили еще одну реакцию ПЦР, используя смесь продуктов ПЦР из двух предыдущих реакций ПЦР в качестве матрицы и SEQ ID NO: 36 и SEQ ID NO: 39 в качестве праймеров. Полученный ПЦР-фрагмент клонировали в вектор pUC18 после расщепления SalI и SacI, получая pUC18-KAPEVAC-UL45-SfiI. Затем, используя плазмиду pUC18-KAPEVAC-UL45-SfiI, конструировали вектор с гомологией, содержащий промотор и ген VP2 IBDV из стандартного провоцирующего штамма. Сначала расщепляли pUC18-KAPEVAC-UL45-SfiI с помощью SfiI и дефосфорилировали с помощью PAP. Затем из pUC18-KAPEVAC-UL23del-Coa5VP2 вырезали кассету с промотором Coa5 и VP2-STC путем расщепления SfiI и лигировали с расщепленной SfiI pUC18-KAPEVAC-UL45-SfiI, получая pUC18-KAPEVAC-UL45-Coa5VP2. Эту плазмиду использовали для конструирования DEV/US5del/UL45/Coa5VP2.

#### Конструирование pUC18-KAPEVAC-UL50-Coa5VP2

Клонировали фрагмент ДНК в 1,0 т.н. из генома DEV, фланкирующий гены UL50 и UL51, при помощи реакций ПЦР с добавлением сайта распознавания SfiI в месте вставки (фиг. 8). Вкратце, используя ДНК, выделенную из DEV в качестве матрицы, проводили 2 реакции ПЦР. Использовали следующие пары праймеров: SEQ ID NO: 40 (5'-CCGCAT') и SEQ ID NO: 41 (5'-GGGCCAATAAGGCCCAAAA'), SEQ ID NO: 42 (5'-GGGCCTTATTGGCCCAATTTATTТАСТАТТ-3') и SEQ ID NO: 43 (5'-GCGAATTCTGGATATGATATACCGTTGC-3'). Проводили еще одну реакцию ПЦР, используя смесь продуктов ПЦР из двух предыдущих реакций ПЦР в качестве матрицы и SEQ ID NO: 40 и SEQ ID NO: 43 в качестве праймеров. Полученный ПЦР-фрагмент клонировали в вектор pUC18 после расщепления EcoRI и SphI, получая pUC18-KAPEVAC-UL50-SfiI. Затем, используя плазмиду pUC18-KAPEVAC-UL50-SfiI, конструировали вектор с гомологией, содержащий промотор и ген VP2 IBDV из стандартного провоцирующего штамма. Сначала расщепляли pUC18-KAPEVAC-UL50-SfiI с помощью SfiI и дефосфорилировали с помощью PAP. Затем из pUC18-KAPEVAC-UL23del-Coa5VP2 вырезали кассету с промотором Coa5 и VP2-STC путем расщепления SfiI и лигировали с расщепленной SfiI pUC18-KAPEVAC-UL50-SfiI, получая pUC18-KAPEVAC-UL50-Coa5VP2. Эту плазмиду использовали для конструирования DEV/US5del/UL50/Coa5VP2.

#### Конструирование DEV/US4US5del/Coa5VP2stc

Конструирование рекомбинантных DEV с делецией генов US4 и US5 и несущих ген Coa5VP2 в районе UL23, UL26/UL27, UL45/UL46 или UL50/UL51 проводили путем гомологической рекомбинации в штамме E. coli, трансфицированном DEV/US4US5del и 0,5 мкг одной из pUC18-KAPEVAC-UL23del-Coa5VP2, pUC18-KAPEVAC-UL26-Coa5VP2, pUC18-KAPEVAC-UL45-Coa5VP2 или pUC18-KAPEVAC-UL50-Coa5VP2. Условия трансфекции были описаны в примере 2. После трансфекции клоны E. coli, несущие соответствующие вставки, содержащие ген Coa5VP2, идентифицировали методом ПЦР с помощью пары праймеров, амплифицирующих участок между геном Coa5VP2 и районом сайта вставки в геноме DEV (стык 1, фиг. 5-8). Использовали праймеры SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 28 для сайта вставки UL23, SEQ ID NO: 32 для сайта вставки UL26/UL27, SEQ ID NO: 36 для сайта вставки UL45/UL46 или SEQ ID NO: 40 для сайта вставки UL50/UL51. Из клонов E. coli, несущих соответствующие вставки, выделяли

модифицированные ДНК DEV и трансфицировали в клетки CEF с помощью Nucleofector II. Трансфицированные клетки вносили в среду LM(+), высевали в 96-луночные планшеты для тканевых культур, а затем инкубировали при 37°C в 4-5% CO<sub>2</sub> в течение 5-7 дней, пока не проявлялся цитопатический эффект (CPE) DEV. После этого выделяли DEVs с неактивными генами US4 и US5, которые несут ген Coa5VP2 (DEV/US4US5del/Coa5VP2, DEV/US4US5del/UL26/Coa5VP2, DEV/US4US5del/UL45/Coa5VP2 и DEV/US5del/UL50/Coa5VP2).

#### Проверка структуры генома

Структуры геномов у DEV/US4US5del/UL23/Coa5VP2, DEV/US4US5del/UL26/VP2, DEV/US4US5del/UL45/Coa5VP2 и DEV/US4US5del/UL50/Coa5VP2 проверяли при помощи 3 реакций ПЦР, амплифицирующих стыковочные участки (стык 1, стык 2 и стык 3; фиг. 5-8) на каждом конце вставленных генов. Пары праймеров, использовавшиеся в реакциях ПЦР для стыка 1, описаны выше. В реакциях ПЦР для стыка 2 использовали пары праймеров SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 31 (сайт вставки UL23), SEQ ID NO: 35 (сайт вставки UL26/UL27), SEQ ID NO: 39 (сайт вставки UL45/UL46) или SEQ ID NO: 43 (сайт вставки UL50/UL51). Для стыка 3 использовали пары праймеров SEQ ID NO: 28/SEQ ID NO: 31 (сайт вставки UL23), SEQ ID NO: 32/SEQ ID NO: 35 (сайт вставки UL26/UL27), SEQ ID NO: 36/SEQ ID NO: 39 (сайт вставки UL45/UL46) или SEQ ID NO: 40/SEQ ID NO: 43 (сайт вставки UL50/UL51). Наблюдались ожидаемые размеры продуктов ПЦР, подтверждающие, что DEV/US4US5del/UL23/Coa5VP2, DEV/US4US5del/Coa5VP2, DEV/US4US5del/UL45/Coa5VP2 и DEV/US4US5del/UL50/Coa5VP2 имеют ожидаемые структуры генома.

Пример 7. Экспрессия гена VP2 при помощи DEV/Coa5VP2, содержащих неактивные гены US4 и US5

Экспрессию белка VP2 под действием DEV/US4US5del/UL23/Coa5VP2, DEV/US5del/UL26/Coa5VP2, DEV/US4US5del/UL45/Coa5VP2 и DEV/US4US5del/UL50/VP2 проверяли методом черных бляшек и методом вестерн-блот. Метод черных бляшек был описан в примере 4. Как видно из фиг. 9, в клетках, инфицированных DEV/US4US5del/UL23/Coa5VP2, DEV/US4US5del/UL26/Coa5VP2, DEV/US4US5del/UL45/VP2 или DEV/US4US5del/UL50/Coa5VP2, наблюдалась экспрессия белка VP2. Вестерн-блоттинг проводили, используя клетки CEF, инфицированные DEV/US4US5del/Coa5VP2, DEV/US4US5del/UL26/Coa5VP2, DEV/US4US5del/UL45/Coa5VP2 или DEV/US4US5del/UL50/Coa5VP2, и моноклональное антитело R63 против VP2 IBDV. Вкратце, CEF в 12-луночных планшетах инфицировали одним из рекомбинантных вирусов или исходным DEV. Через 4 дня после инокуляции клетки собирали с помощью трипсина и центрифугировали при 913×g в течение 5 минут. Осадок промывали PBS и ресуспендировали в 25 мкл PBS. После добавления такого же объема буфера для образца 2×SDS (130 мМ трис-Cl (pH 6,8), 6% SDS, 20% глицерина, 10% 2-меркаптоэтанола и 0,01% бромфенолового синего) клеточную суспензию кипятили в течение 5 мин. Образцы разделяли методом SDS-PAGE в 12,5% полиакриламидном геле и переносили на PVDF-мембрану (Immobilon-P, Millipore). Мембрану полностью высушивали, а затем инкубировали с моноклональным антителом R63. После отмывки антитела R63 добавляли биотинилированное антитело против IgG мыши, а затем с помощью набора VECTASTAIN ABC-AP. Связавшийся с моноклональным антителом R63 белок визуализировали добавлением раствора NBT/BCIP. На всех дорожках с рекомбинантными клетками наблюдались полосы белка в 40 кД, что является ожидаемым размером белка VP2 (фиг. 10), подтверждая, что клетки, инфицированные рекомбинантными вирусами, экспрессируют белок VP2.

Пример 9. Стабильность DEV/Coa5VP2, содержащих неактивные гены US4 и US5

DEV/US4US5del/UL23/Coa5VP2, DEV/US4US5del/UL26/Coa5VP2, DEV/US4US5del//  
 Coa5VP2 и DEV/US4US5del/UL50/Coa5VP2 пассировали в клетках CEF по 15 раз и  
 проверяли стабильность встроенного гена VacVP2. Пересевы проводили через каждые  
 3-4 дня. После каждых 5 пассажей клетки, инфицированные DEV/US4US5del/UL23/  
 5 Coa5VP2, DEV/US4US5del/UL26/Coa5VP2, DEV/US4US5del/UL45/Coa5VP2 или DEV/  
 US4US5del//Coa5VP2, проверяли на экспрессию гена VP2 методом черных бляшек и  
 проверяли структуру их генома методом ПЦР, амплифицируя стыковочные участки  
 (стык 1, стык 2 и стык 3; фиг. 5-8) с помощью праймеров, приведенных в примере 7.  
 При этом не наблюдалось реверсии генов US4 и US5 и делеции по гену Coa5VP2,  
 10 свидетельствуя, что эти вирусы стабильны в клетках CEF.

Пример 10. Введение *in ovo* DEV/Coa5VP2, содержащих неактивные гены US4 и US5

В этом исследовании изучали безопасность и эффективность защиты *in ovo* от  
 вирулентного IBDV.

Инокулировали DEV/US4US5del/UL23/Coa5VP2, DEV/US4US5del/UL26/Coa5VP2,  
 15 DEV/US4US5del/UL45/Coa5VP2 или DEV/US4US5del/UL50/Coa5VP2 либо исходный DEV  
 18-дневным эмбрионам цыплят SPF. Все группы эмбрионов вакцинировали *in ovo*  
 примерно по 1000 pfu в 0,1 мл рекомбинантных вирусов, исходного DEV или 0,1 мл PBS  
 через иглы 20 калибра в 1,5 дюйма. Цыплят наблюдали ежедневно на наличие связанных  
 с DEV клинических признаков типа депрессии и смерти в течение 42 дней. Каждую  
 20 неделю в возрасте от 1 до 5 недель у них брали кровь и проверяли вес для оценки  
 гуморального иммунитета против IBDV и для проверки вирулентности вирусов.  
 Определяли антитела против IBDV с помощью коммерческого набора IBDV ELISA kit  
 (ID SCREEN IBD VP2; IDVet). Всем цыплятам, кроме группы 1, вводили перорально  
 103 средних инфекционных доз для эмбрионов (EID50) стандартного провоцирующего  
 25 штамма (STC) вирулентного вируса IBDV. Цыплят наблюдали ежедневно на наличие  
 связанных с IBD клинических признаков типа депрессии и смерти. Через 7 дней после  
 заражения цыплят вскрывали и обследовали на наличие макроскопических повреждений  
 бursы типа отека, изменения окраски, атрофии, кровоизлияния и желтых или  
 желатинозных экссудатов. Также при вскрытии измеряли вес тела и бursы для расчета  
 30 индекса В/В, то есть соотношения между весом бursы и весом тела у зараженных птиц,  
 деленного на такое же соотношение у не подвергавшихся заражению птиц.

Результаты этого исследования свидетельствуют о безопасности, стабильности и  
 эффективности экспрессии *in vivo*.

Список последовательностей

35 SEQ ID NO: 1. F-rpsL

5'-GGCCTGGTGATGATGGCGGGATCGTTGTAT-3'

SEQ ID NO: 2. R-промотопSV40-neoR-rpsL

5'-CCATGGTGCTGCGCTCAGAAGAAGCTCGTCA-3'

SEQ ID NO: 3. rpsLneo

40 5'-GGCCTGGTGATGATGGCGGGATCGTTGTATATTTCTTGACACCTTTTCGGC ATC  
 GCCCTAAAATTCGGCGTCCTCATATTTGTGTGAGGACGTTTTATTACGTGTTTACG AA  
 GCAAAAGCTAAAACCAGGAGCTATTTAATGGCAACAGTTAACCAGCTGGTACGC A  
 AACCACGTGCTCGCAAAGTTGCGAAAAGCAACGTGCCTGCGCTGGAAGCATGCCC G  
 CAAAAACGTGGCGTATGTACTCGTGTATATACTACCACTCCTAAAAAACCGAACTC  
 45 CGCGCTGCGTAAAGTATGCCGTGTTCTGTCTGACTAACGGTTTCGAAGTACTTCCTA  
 CATCGGTGGTGAAGGTCACAACCTGCAGGAGCACTCCGTGATCCTGATCCGTGGCG  
 GTCGTGTTAAAGACCTCCCGGGTGTTCGTTACCACACCGTACGTGGTGGCGCTTGACT  
 GCTCCGGCGTTAAAGACCGTAAGCAGGCTCGTTCCAAGTATGGCGTGAAGCGTCCT

AAGGCTTAAGGAGGACAATCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCG  
 GCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTG  
 CTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAA  
 GACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGT  
 5 GGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGG  
 GAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCAC  
 CTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGGCGGCTGCATACG  
 CTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGC  
 ACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATC  
 10 AGGGGCTCGCGCCAGCCGA ACTGTTCCG CAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGC  
 GAGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAAT  
 GGCCGCTTTTCTGGATTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAG  
 GACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGA  
 CCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGCAGCGCATCGCCTTCTAT  
 15 CGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGA-3'

SEQ ID NO: 4. F-neoR-промоторSV40

5'-ACGAGTTCTTCTGAGCGCAGCACCATGGCC-3'

SEQ ID NO: 5. R-dsRed-промоторSV40-интрон

5'-TCGGAGGAGGCCATCCTTAAGAGCTGTAAT-3'

20 SEQ ID NO: 6. F-промоторSV40-интрон-dsRed

5'-TACAGCTCTTAAGGATGGCCTCCTCCGAGA-3'

SEQ ID NO: 7. R-SV40полиА-dsRed

5'-GCAGTGAAAAAAATGCTTTATTTGTGAAAT-3'

SEQ ID NO: 8. F-DEV-US4-rpsLneo

25 5'-ATGGCAACAATGATAGCTGTGGTGTAGTTTTTTTTGGGACGCGTTTTAGGG  
 GCCTGGTGATGATGGCGGG-3'

SEQ ID NO: 9. R-DEV-US4-rpsLneoSV40DsRed

5'-TTAAACTAATGGAACGCGTTGGAATTTCAAGTCTTGGCGCCCAAACATCGG  
 CAGTGAAAAAAATGCTTTA-3'

30 SEQ ID NO: 10. F-DEV-US5-rpsLneo

5'-ATGTATACAGACGTTACGGTCATGTGGGTAGCCGTGATTTTATTTACTATG  
 GCCTGGTGATGATGGCGGG-3'

SEQ ID NO: 11. R-DEV-US5-rpsLneoSV40DsRed

35 5'-TCATACCATACAAAGGCATAGGTACAGCCCACAGGTTAAAAACAAAGAAA  
 GCAGTGAAAAAAATGCTTTA-3'

SEQ ID NO: 12. F-VAC-136981

5'-AAGTGTATAAATTAGACAAGTAGCTATGCG-3'

SEQ ID NO: 13. R-neo

5'-TCAGAAGA ACTCGTCAAGAAGGC-3'

40 SEQ ID NO: 14. F-VAC-138520

5'-GTTTATATTGACGCGGAATGTTGAC-3'

SEQ ID NO: 15. R-VAC-138560

5'-CATTTTAACCGTTTAAGTCAACATTCGCG-3'

SEQ ID NO: 16. R-VAC-140339

45 5'-ACTGAGATGTTGGACCATCAAATCCTG-3'

SEQ ID NO: 17. F-SphI-KAPEVAC-138500

5'-gcGCATGCTAGCTGATCTAACTTTAC-3'

SEQ ID NO: 18. R-KAPE-US45del-вставкаSfiI



5'-GCGAATTCATGTGCTACGCCCAG-3'  
 SEQ ID NO: 32. F-SalI-VAC68400  
 5'-CGGTTCGACACTCCCAGGGGTGAAGC-3'  
 SEQ ID NO: 33. R-SfiI-UL26-27-вставка  
 5'-CGGCCAATAAGGCCAAGAATGCATTCGGCC-3'  
 SEQ ID NO: 34. F-SfiI-UL26-27-вставка  
 5'-TGGCCTTATTGGCCGCCGTATGAATTGCGC-3'  
 SEQ ID NO: 35. R-SacI-VAC69400  
 5'-GCGAGCTCCTGCAACCACAGACCGC-3'  
 SEQ ID NO: 36. F-SalI-VAC21300  
 5'-CGGTTCGACATAGAACGCGCTTCATCTAA-3'  
 SEQ ID NO: 37. R-SfiI-UL45-46-вставка  
 5'-TGGCCAATAAGGCCGTTTATTGTTTATTAT-3'  
 SEQ ID NO: 38. F-SfiI-UL45-46-вставка  
 5'-CGGCCTTATTGGCCAATCTGATTCATCCAA-3'  
 SEQ ID NO: 39. R-SacI-VAC22300  
 5'-GCGAGCTCCGCCTAATCACAATCGGTATTG-3'  
 SEQ ID NO: 40. F-SphI-VAC12000  
 5'-CCGCATGCGCAACTATATATGTCGGTC-3'  
 SEQ ID NO: 41. R-SfiI-UL50-51-вставка  
 5'-GGGCCAATAAGGCCCAAAGTACATTTTGT-3'  
 SEQ ID NO: 42. F-SfiI-UL50-51-вставка  
 5'-GGGCCTTATTGGCCCAATTTATTTACTATT-3'  
 SEQ ID NO: 43. R-EcoRI-VAC13000  
 5'-GCGAATTCTGGATATGATATACCGTTGC-3'

## (57) Формула изобретения

1. Вирус утинового энтерита (DEV), предназначенный для экспрессии чужеродной нуклеиновой кислоты или белка у домашней птицы, который содержит неактивные гены US4 и US5 и содержит чужеродную нуклеиновую кислоту, где гены US4 и US5 являются, независимо друг от друга, мутированными, делетированными или прерванными, и где чужеродная нуклеиновая кислота кодирует белок VP2 вируса инфекционного бурсита (IBDV) и находится в вирусном геноме.

2. DEV по п. 1, в котором имеется делеция по меньшей мере 20% кодирующей последовательности каждого из генов US4 и US5, более предпочтительно по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90%.

3. DEV по любому из пп. 1-3, в котором имеется делеция межгенного участка между генами US4 и US5.

4. DEV по любому из предыдущих пунктов, который содержит делецию нуклеотидной области, включающей по меньшей мере 50% гена US4, весь межгенный участок между геном US4 и геном US5 и по меньшей мере 50% гена US5.

5. DEV по любому из предыдущих пунктов, который дополнительно содержит неактивный ген UL23, US7 и/или UL4.

6. DEV по п. 5, который содержит (i) делецию нуклеотидной области, включающей по меньшей мере 50% гена US4, весь межгенный участок между геном US4 и геном US5 и по меньшей мере 50% гена US5, а также (ii) делецию по меньшей мере 50% последовательности гена UL23.

7. DEV по п. 5, который содержит (i) делецию нуклеотидной области, включающей по меньшей мере 50% гена US4, весь межгенный участок между геном US4 и геном US5 и по меньшей мере 50% гена US5, а также (ii) делецию по меньшей мере 50% последовательности гена US7.

5 8. DEV по п. 5, который содержит (i) делецию нуклеотидной области, включающей по меньшей мере 50% гена US4, весь межгенный участок между геном US4 и геном US5 и по меньшей мере 50% гена US5, а также (ii) делецию по меньшей мере 50% последовательности гена UL4.

9. DEV по любому из пп. 1-8, в котором чужеродная нуклеиновая кислота  
10 располагается в неактивном гене US4 или US5.

10. DEV по п. 9, который содержит делецию нуклеотидной области, включающей по меньшей мере 50% гена US4, весь межгенный участок между геном US4 и геном US5 и по меньшей мере 50% гена US5, а чужеродная нуклеиновая кислота располагается на месте делеции данной области.

15 11. DEV по любому из пп. 1-8, в котором чужеродная нуклеиновая кислота располагается в сайте вставки, выбранном из гена UL4, гена UL44, межгенного участка UL27-UL26, гена UL23, межгенного участка UL45-UL46, межгенного участка UL50-UL51, гена US7, межгенного участка US7-US8 или гена US10.

12. DEV по любому из пп. 1-11, в котором домашняя птица представляет собой  
20 курицу.

13. Молекула нуклеиновой кислоты для продуцирования DEV по любому из пп. 1-11, содержащая геном DEV по любому из пп. 1-11.

14. Клетка хозяина для продуцирования или репликации DEV по любому из пп. 1-11, содержащая DEV по любому из пп. 1-11 или молекулу нуклеиновой кислоты по п. 13.

25 15. Способ получения или репликации DEV по любому из пп. 1-11, включающий инфицирование компетентных клеток молекулой нуклеиновой кислоты по п. 13 или вирусом DEV по п. 1 и извлечение DEV.

30

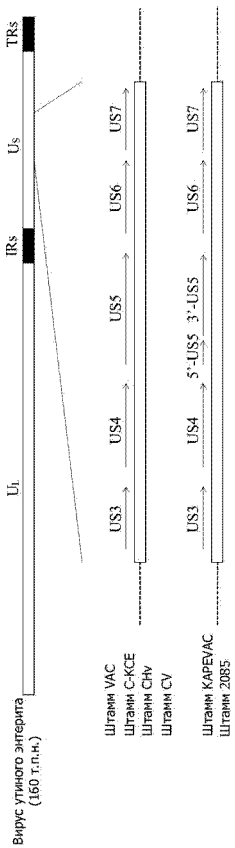
35

40

45

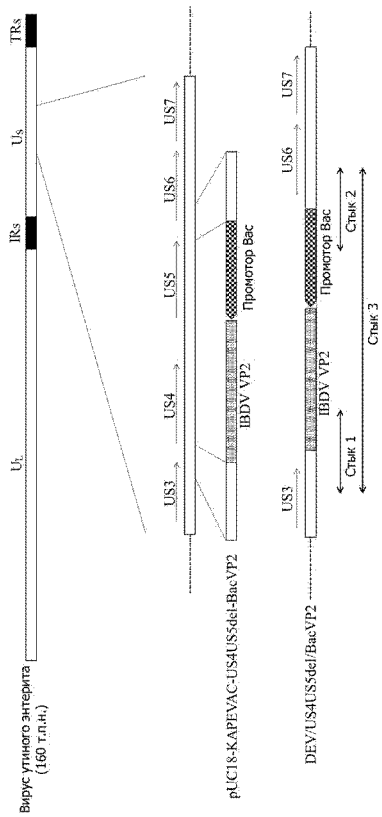
1

1/9

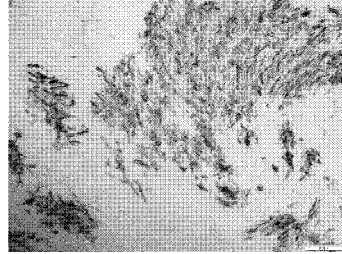


ФИГ. 1

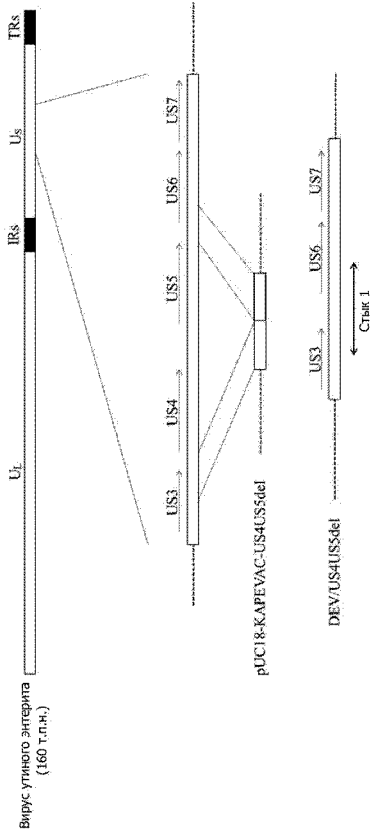
2



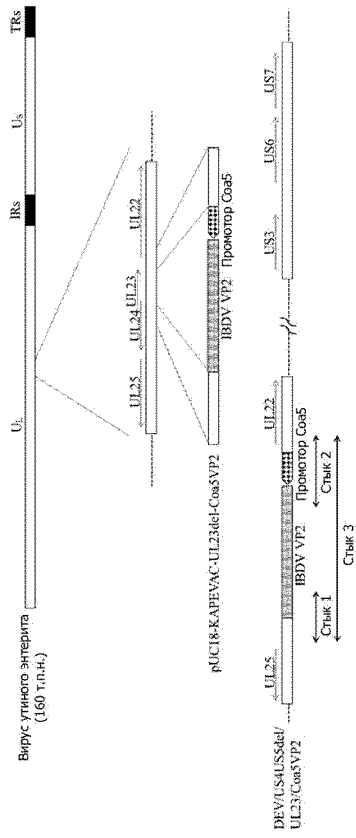
ФИГ. 2



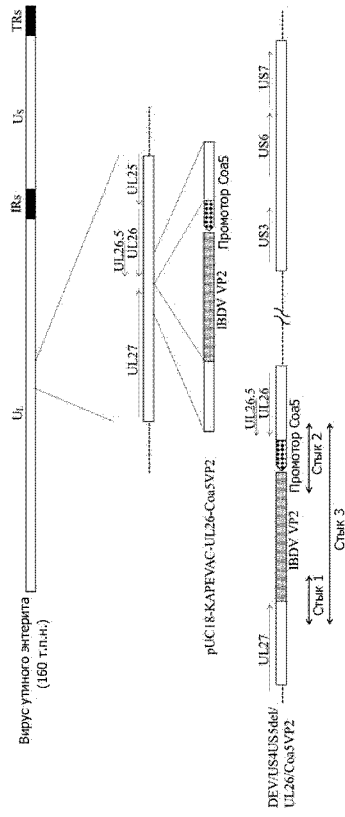
ФИГ. 3



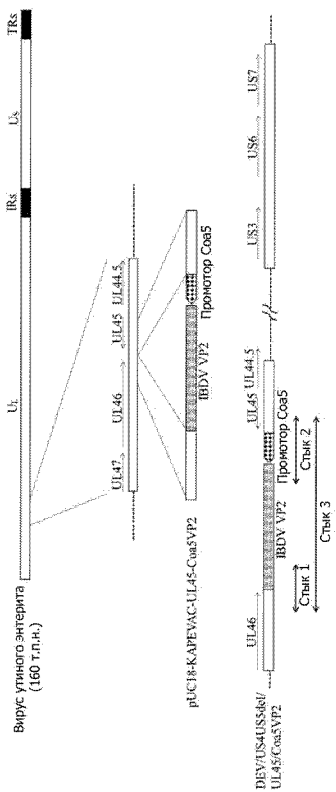
Фиг. 4



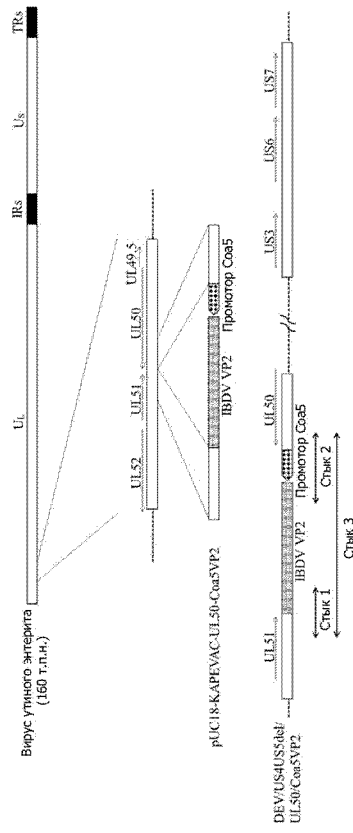
ФИГ. 5



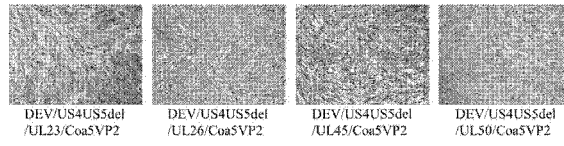
ФИГ. 6



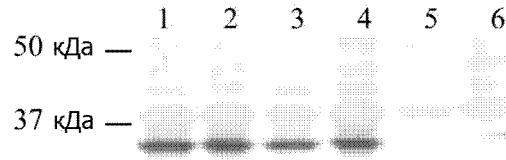
ФИГ. 7



ФИГ. 8



Фиг. 9



Фиг. 10