

SUBUNIDAD S1 MODIFICADA DE LA PROTEÍNA DE ESPÍCULA DE CORONAVIRUS

LISTADO DE SECUENCIAS

[0001] La presente solicitud contiene un listado de secuencias de acuerdo con 37 C.F.R. 1.821 – 1.825. El listado de secuencias que se adjunta a esta solicitud se incorpora en la presente en su totalidad por referencia.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] El virus de la bronquitis infecciosa (IBV) del coronavirus aviar es el prototipo gammacoronavirus de la familia Coronaviridae, orden Nidovirales. El virus de la bronquitis infecciosa infecta principalmente el epitelio respiratorio superior de las gallinas, causando una enfermedad respiratoria, que en general se complica por patógenos bacterianos secundarios (Cook *et al.* 2012. Avian Pathol. 41:239-250). De manera adicional, algunas cepas de IBV afectan los túbulos renales, oviducto y partes del tubo gastrointestinal, lo que produce lesiones patológicas y síntomas clínicos en estos sistemas de órganos. El virus está presente a nivel global en gallinas comerciales y de traspatio. Debido a su alta variabilidad genómica, el IBV se divide en una amplia variedad de genotipos, serotipos y protectotipos. En la actualidad, el IBV se considera uno de los patógenos virales más relevantes económicamente en la industria de las aves de corral.

[0003] El virus de la bronquitis infecciosa es un virus envuelto con un genoma de ARN monocatenario de sentido positivo de 27,6 kb (Cavanagh 2007. Vet. Res. 38:281-297). Los primeros dos tercios del genoma viral comprenden una región codificante extensa (también denominada gen 1), dividida en dos marcos de lectura abiertos 1a y 1b, que codifican al menos 15 proteínas no estructurales implicadas en la replicación de ARN, edición y transcripción. El último tercio del genoma viral codifica proteínas estructurales: la proteína de espícula (S, codificada por el gen 2), la proteína de envoltura (E, codificada por el gen 3c), la proteína de membrana (M, codificada por el gen 4) y la proteína de nucleocápside (N, codificada por el gen 6). Las proteínas S, E y M forman parte de la envoltura viral, mientras que la proteína N forma la ribonucleoproteína nuclear junto con el ARN viral. La proteína de espícula del coronavirus determina el tropismo de las especies huésped (Kuo *et al.* 2000. J. Virol. 74:1393-1406). Es una proteína transmembrana dimérica o trimérica, que se escinde proteolíticamente en dos subunidades, S1 y S2. El dominio S1 glucosilado forma la

“cabeza” de la proteína de espícula y contiene el dominio de fijación al receptor que interactúa con ácidos siálicos con uniones 2,3 en la superficie de la célula huésped (Promkuntod *et al.* 2014. *Virology*. 448:26-32). El dominio S2 contiene la parte restante del ectodominio (el “tallo”), el dominio transmembrana y el endodominio ubicado en el citoplasma.

[0004] Las cepas H52 y H120 de la vacuna de IBV vivo atenuado ampliamente usadas en la actualidad se desarrollaron en la década de 1960 en los Países Bajos, mediante el pasaje en serie de una cepa Massachusetts de IBV en huevos embrionados de gallina (Bijlenga *et al.* 2004; *Avian Pathol.* 33:550-557). Dichas cepas de vacuna también se cultivaron en huevos embrionados de gallina para su producción. En la actualidad, las vacunas de IBV (vacunas inactivadas y vivas) aún se propagan en huevos embrionados de gallina, lo que resulta complejo y costoso.

[0005] El único IBV de línea celular adaptada descrito hasta la actualidad es la cepa Beaudette de IBV, que se replica eficazmente en células Vero y BHK. Casais *et al* 2003 (*J. Virol.* 77; 9084-9089) muestran que la proteína S de Beaudette es determinante del tropismo de la línea celular al generar IBV recombinantes usando secuencias de ectodominios de la espícula de Beaudette, que fueron capaces de transferir el tropismo extendido de la línea celular a otro IBV (M41). WO 2011/004146 divulga que la subunidad S2 de Beaudette es responsable del tropismo tisular extendido. Una secuencia dentro de la subunidad S2, un sitio de fijación a heparina-sulfato de Beaudette, se identificó como la responsable del tropismo extendido de la línea celular. Además, Bickerton *et al* 2018 (*Journal of Virology* 92 (19)) divulgan un motivo específico para Beaudette de ocho aminoácidos. No obstante, los IBV recombinantes con una subunidad S2 de espícula de Beaudette no son adecuados como vacunas. Ellis *et al* 2018 (*J. Virol.* 92(23)) describen que Beaudette recombinante con espículas quiméricas con subunidades S1 heterólogas de M41 o QX en combinación con la subunidad S2 de espícula de Beaudette no otorgan suficiente protección contra exposiciones homólogas a S1. Asimismo, Beaudette tipo silvestre no proporciona protección contra exposición homóloga como otras vacunas autorizadas que pertenecen al serotipo Massachusetts (Hodgson *et al* 2004: *J Virol* 78:13804–13811 o Geilhausen *et al* 1973: *Archiv für die gesamte Virusforschung* 40: 285-290).

[0006] Fang *et al* 2005 (*Biochemical and Biophysical Research Communication* 336; páginas 417 a 423) divulgan que la adaptación de Beaudette para la propagación en células Vero dio como resultado 49 modificaciones de aminoácidos, 26 ubicadas en la proteína de espícula.

[0007] En conjunto, la administración de vacunas de IBV que tienen un tropismo celular o tisular extendido mediante el intercambio de la proteína de espícula por una proteína de espícula de Beaudette heteróloga no daría como resultado vacunas de IBV que proporcionen una eficacia suficiente, y con la secuencia de espícula de Beaudette se limitarían a la protección contra una exposición a la cepa serotipo Massachusetts y no tendrían protección cruzada contra otro genotipo. Además, los motivos o sitios del arte previo identificados en Beaudette no se transfirieron en vacunas de IBV que presenten tropismo tisular y de cultivo celular extendidos y eficacia en la protección (no se demostró interferencia entre el tropismo extendido y la eficacia de la vacuna).

[0008] En consecuencia, persiste la necesidad de aminoácidos simples o motivos cortos que puedan transferirse en IBV o vacunas de IBV sin que afecten la eficacia de la vacuna pero que permitan un tropismo celular o tisular extendido para la producción.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0009] Antes de describir los aspectos de la presente invención, cabe destacar que, como se usa en la presente y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen la referencia al plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De este modo, por ejemplo, la referencia a "un antígeno" incluye varios antígenos, y la referencia a "virus" incluye la referencia a uno o más virus y equivalentes de estos conocidos por las personas del oficio de nivel medio, etc. A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos que se usan en la presente tienen el mismo significado que le otorga habitualmente una persona del oficio de nivel medio al cual pertenece la invención. Si bien los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente pueden usarse en la práctica o en pruebas de la presente invención, a continuación se describen los métodos, dispositivos y materiales preferidos. Todas las publicaciones que se mencionan en la presente se incorporan en la presente por referencia, a fin de describir las líneas celulares, los vectores y las metodologías indicadas en las publicaciones que se pueden usar en relación con la invención. La presente no debe interpretarse como un reconocimiento de que la invención no tiene derecho a preceder a esa divulgación en virtud de la invención previa.

Composición de interés

[0010] La presente invención soluciona los problemas inherentes del arte previo y proporciona un progreso notable en el estado de la técnica.

[0011] En general, la presente invención proporciona una proteína de espícula de coronavirus aviar o fragmento de esta, en donde al menos una parte de la subunidad

S1 pertenece a un coronavirus aviar con un tropismo celular o tisular restringido, y en donde en la posición de aminoácido 267 se encuentra una cisteína.

[0012] Además, la presente invención proporciona una proteína de espícula de coronavirus aviar recombinante o fragmento de esta que comprende una mutación en la posición de aminoácido 267 en cisteína.

[0013] En general, la presente invención también proporciona una proteína de espícula de IBV o fragmento de esta, en donde al menos una parte de la subunidad S1 pertenece a un IBV con un tropismo celular o tisular restringido, y en donde en la posición de aminoácido 267 se encuentra una cisteína.

[0014] Además, la presente invención proporciona una proteína de espícula de IBV recombinante o fragmento de esta que comprende una mutación en la posición de aminoácido 267 en cisteína.

[0015] Ventajosamente, los datos experimentales muestran que las cepas de coronavirus (cepas tales como cepas H52, QX SP2013-01478 y CR88 de IBV) tienen un tropismo celular o tisular extendido después de modificar una única posición, posición 267, en una cisteína dentro de la proteína de espícula.

[0016] El término “coronavirus” es conocido por la persona del oficio de nivel medio. En general, los coronavirus son virus de la subfamilia Coronavirinae en la familia Coronaviridae, en el orden Nidovirales. Los coronavirus son virus envueltos y tienen un genoma de ARN monocatenario de sentido positivo con una nucleocápside de simetría helicoidal. El término “coronavirus” abarca todas las cepas, genotipos, protectotipos, y serotipos del virus de bronquitis infecciosa. Los ejemplos de coronavirus aviares son virus de la bronquitis infecciosa (IBV); coronavirus de la gallina de Guinea (GfCoV) y coronavirus del pavo (TCoV; virus de enteritis del pavo y virus de la enfermedad de la cresta azul).

[0017] El término “IBV” se refiere al virus de bronquitis infecciosa conocido por la persona del oficio de nivel medio. El término “IBV” abarca todas las cepas, genotipos, protectotipos, y serotipos del virus de bronquitis infecciosa.

[0018] El término “mutación” comprende modificaciones en el ARN viral que codifican proteínas, lo que produce una alteración de dicha proteína codificada. Además el término “mutación” comprende mutaciones modificadas por ingeniería genética. El término mutación se refiere a, entre otros, sustituciones (reemplazo de uno o varios nucleótidos/pares de base), eliminaciones (remoción de uno, varios o todos los nucleótidos/pares de base), y/o inserciones (adición de uno o varios nucleótidos/pares de base). Como se usa en la presente, una mutación puede ser una única mutación o

varias mutaciones, por ende, en general, el término “mutaciones” se refiere tanto a una sola mutación como a varias. Sin embargo, el término mutación es conocido por la persona del oficio de nivel medio y la persona del oficio de nivel medio puede generar mutaciones fácilmente.

[0019] El término “espícula” se refiere a una proteína específica del coronavirus aviar o IBV que es conocida por la persona del oficio de nivel medio. La proteína de espícula es el principal inductor de anticuerpos y una respuesta inmunitaria protectora. Además, la proteína de espícula (S) facilita la entrada celular del coronavirus aviar o IBV al unir los receptores celulares en la célula huésped y al mediar la fusión virus-membrana celular con las membranas de la célula huésped. Asimismo, determina el tropismo tisular y celular de la cepa del virus.

[0020] Los términos “proteína”, “aminoácido” y “polipéptido” se usan de manera indistinta. El término “proteína” se refiere a una secuencia de aminoácidos compuesta por los aminoácidos naturales así como derivados de estos. Los aminoácidos naturales son conocidos en el estado de la técnica y se describen en libros de texto estándar de bioquímica. Dentro de la secuencia de aminoácidos, los aminoácidos están conectados por enlaces peptídicos. Asimismo, los dos extremos de la secuencia de aminoácidos se denominan terminal carboxilo (terminal C) y terminal amino (terminal N). El término “proteína” comprende proteínas esencialmente purificadas o preparaciones de proteínas que comprenden además otras proteínas. Asimismo, el término también se refiere a fragmentos de proteínas. Además, incluye proteínas modificadas químicamente. Tales modificaciones pueden ser modificaciones artificiales o modificaciones naturales tales como fosforilación, glucosilación, miristilación, y similares.

Mutación 267

[0021] En un aspecto de la proteína de espícula de coronavirus aviar o IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, la cisteína en la posición de aminoácido 267 se introduce a través de una mutación. El término “introducida” implica que la mutación se introdujo mediante ingeniería genética (de manera artificial, por ejemplo, por intervención humana).

[0022] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de coronavirus aviar o IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, la mutación es una sustitución, eliminación o inserción de aminoácidos.

[0023] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de coronavirus aviar o IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, un aminoácido

hidrófobo en la posición de aminoácido 267 muta en una cisteína; o una fenilalanina o leucina en la posición de aminoácido 267 muta en una cisteína.

Tropismo celular o tisular extendido

[0024] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de coronavirus aviar o IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, la cisteína en la posición de aminoácido 267 o dicha mutación en la posición de aminoácido 267 en cisteína produce un tropismo celular o tisular extendido del coronavirus aviar o IBV.

[0025] La persona del oficio de nivel medio conoce la expresión “celular o tisular”. El término celular comprende líneas celulares, tales como las líneas celulares enumeradas en cualquier parte de la presente, así como células primarias. El término tisular comprende células de tejidos, tales como los enumerados en cualquier parte de la presente, a modo ejemplificativo, tales como células primarias de embriones de pollo de pulmón o hígado o fibroblastos de gallina primarios. El término abarca la propagación de células o tejido (células) en el cultivo fuera del organismo. El término “cultivo” se refiere a la propagación de células (tales como células de líneas celulares o células primarias o células tisulares) fuera del organismo en determinadas condiciones de cultivo conocidas por la persona del oficio de nivel medio.

[0026] La expresión “tropismo extendido” significa que el coronavirus aviar o IBV de la invención puede propagarse en células (tales como líneas celulares) o células tisulares (además de células primarias de embriones de pollo de riñón). En contraste, las vacunas contra coronavirus (tales como vacunas de IBV) o coronavirus tipo silvestre no adaptados al cultivo celular o IBV (se describen cepas Beaudette de IBV adaptadas a líneas celulares) solo pueden propagarse en huevos embrionados de gallina o células primarias de embriones de pollo de riñón (después de la adaptación). En consecuencia, un coronavirus (tal como IBV) de la invención con tropismo celular o tisular extendido tiene la capacidad de infectar y/o replicarse en una o más líneas celulares o células tisulares distintas a las células primarias de embriones de pollo de riñón. Preferentemente, el coronavirus (tal como IBV) de la invención con tropismo celular o tisular extendido tiene la capacidad de infectar y/o replicarse en una o más líneas celulares enumeradas en la presente. En consecuencia, un coronavirus o IBV con tropismo celular o tisular extendido puede, por ejemplo, infectar y/o replicarse en células PBS-12SF, EB66 o HEK 293T.

[0027] La expresión “tropismo restringido” significa que el coronavirus aviar o IBV solo puede cultivarse, de ser posible, en células primarias de embriones de pollo de riñón. En consecuencia, un coronavirus o IBV con tropismo celular o tisular restringido no

puede infectar y/o replicarse en células PBS-12SF, EB66 o HEK 293T.

[0028] Ventajosamente, los datos experimentales muestran que las cepas de IBV, tales como H52 y CR88, tienen un tropismo celular o tisular extendido después de modificar una única posición, posición 267, en una cisteína dentro de la proteína de espícula. Asimismo, se demostró que la modificación en una cisteína en la posición 267 resulta genéticamente estable.

[0029] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de coronavirus aviar o IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, el coronavirus aviar o IBV infecta y/o se replica en al menos una línea celular o célula seleccionadas de la lista que consiste en: células primarias de embriones de pollo de pulmón o hígado o fibroblastos de gallina primarios, una línea celular de fibroblastos de embriones de pollo, una línea de células madre embrionarias de pato, una línea de células de riñón embrionario humano, una línea de células de riñón de hámster bebé, una línea de células de riñón de mono verde africano, una línea de células de riñón de conejo, una línea de células de riñón canino, una línea de células de hígado de gallina, una línea de células de riñón bovino, una línea de células de riñón porcino y una línea de células de insecto.

[0030] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de coronavirus aviar o IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, el coronavirus aviar infecta y/o se replica en al menos una línea celular seleccionada de la lista que consiste en: DF-1 (Douglas Foster), EB66 (línea de células madre embrionarias de pato), PBS-12, PBS-12SF (PBS-12 libre de suero), BHK21 (riñón de hámster bebé), HEK 293T (riñón embrionario humano), Vero (Verda Reno), MA104, RK13 (riñón de conejo), LMH (hepatoma de leghorn macho), MDCK (riñón canino Madin-Darby), MDBK (riñón bovino Madin-Darby), PK15 (riñón porcino), PK2A (riñón porcino), SF9, SF21 y SF+ (*Spodoptera frugiperda*).

[0031] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de coronavirus aviar o IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, el coronavirus aviar o IBV infecta y/o se replica en al menos una línea celular seleccionada de la lista que consiste en: DF-1, EB66, PBS-12, PBS-12SF, BHK, HEK 293T, Vero, MA104 y RK13.

[0032] Preferentemente, el IBV infecta y/o se replica en la línea celular EB66, PBS-12SF o HEK 293T.

[0033] Todas las líneas celulares mencionadas son conocidas por la persona del oficio de nivel medio y se encuentran disponibles en el comercio y/o al público. Las células MDCK están depositadas, por ejemplo, en la American Tissue Culture Collection con

el número de acceso ATCC CCL-34 o ATCC CRL-2285. Las células DF-1 están depositadas, por ejemplo, en la American Tissue Culture Collection con el número de acceso ATCC CRL-12203). Las células PBS-12SF están depositadas, por ejemplo, en la American Tissue Culture Collection con el número de acceso ATCC PTA-8565 o depositadas en RRID bajo CVCL_1K17. Las células BHK-21 están depositadas, por ejemplo, en la American Tissue Culture Collection con el número de acceso ATCC CCL-10. Las células HEK 293T están depositadas, por ejemplo, en la American Tissue Culture Collection con el número de acceso ATCC CRL- 3216. Las células Vero están depositadas, por ejemplo, en la American Tissue Culture Collection con el número de acceso ATCC CCL-81. Las células MA104 células están depositadas, por ejemplo, en la American Tissue Culture Collection con el número de acceso ATCC CRL-2378. Las células RK13 están depositadas, por ejemplo, en la American Tissue Culture Collection con el número de acceso ATCC CCL-37.

Numeración de la posición de aminoácido 267

[0034] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de coronavirus aviar o IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, la numeración de la posición de aminoácido 267 se refiere a la posición de aminoácido 267 en la proteína de espícula de un IBV H52, un IBV H120 o un M41.

[0035] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de coronavirus aviar o IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, la numeración de la posición de aminoácido 267 se refiere a la posición de aminoácido 267 en la proteína de espícula de un IBV H52.

[0036] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de coronavirus aviar o IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, la numeración de la posición de aminoácido 267 se refiere a la posición de aminoácido 267 en la proteína de espícula como, por ejemplo, en SEQ ID NO:1.

[0037] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de coronavirus aviar o IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 se usa para determinar la numeración de la posición en la proteína de espícula.

[0038] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de coronavirus aviar o IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, a fin de determinar la posición de amino 267 en una proteína de espícula, la secuencia de aminoácidos se alinea con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1.

[0039] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de coronavirus aviar o

IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, la posición de aminoácido 267 se encuentra dentro de la subunidad S1 de la proteína de espícula.

[0040] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de coronavirus aviar o IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, la posición de aminoácido 267 corresponde a la posición de aminoácido 269 de la secuencia de espículas de IBV CR88.

[0041] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de coronavirus aviar o IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, la posición de aminoácido 267 corresponde a la posición de aminoácido 270 de la secuencia de espículas de IBV QX.

[0042] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de coronavirus aviar o IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, la posición de aminoácido 267 corresponde a la posición de aminoácido 271 de la secuencia de espículas de IBV Q1.

[0043] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de coronavirus aviar o IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, la posición de aminoácido 267 corresponde a la posición de aminoácido 270 de la secuencia de espículas de IBV Var2.

[0044] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de coronavirus aviar o IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, la posición de aminoácido 267 corresponde a la posición de aminoácido 274 de la secuencia de espículas de IBV Brazil.

[0045] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de coronavirus aviar o IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, la posición de aminoácido 267 corresponde a la posición de aminoácido 274 de la secuencia de espículas de IBV Ark99.

[0046] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de coronavirus aviar o IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, la proteína de espícula tiene uno o más de los siguientes aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en:

- 264 es una asparagina, y/o
- 265 es una treonina, y/o
- 269 es una leucina, y/o
- 271 es una asparagina, y/o
- 272 es una fenilalanina.

La numeración de dichas posiciones de aminoácidos se refiere a las posiciones de aminoácidos dentro de la proteína de espícula como, por ejemplo, en SEQ ID NO:1.

Espícula

[0047] La presente invención también proporciona una proteína de espícula o fragmento de esta como se describió anteriormente, en donde la proteína de espícula o fragmento de esta se selecciona del grupo que consiste en: virus de la bronquitis infecciosa (IBV); coronavirus de la gallina de Guinea (GfCoV), coronavirus del pavo (TCoV; virus de enteritis del pavo y virus de la enfermedad de la cresta azul), virus de la peritonitis infecciosa felina (FIPV), coronavirus entérico felino (FECV); virus de la gastroenteritis transmisible (TGEV), coronavirus respiratorio porcino (PRCoV), virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV), virus de la encefalomiелitis de la hemaglutinación porcina (PHEV); coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV), coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV) coronavirus humano 229E (HCoV-229E), coronavirus humano NL63 (HCoV-NL63), coronavirus humano HKU1 (HCoV-HKU1), coronavirus humano OC43 (HCoV-OC43); coronavirus canino (CCoV), coronavirus respiratorio canino (CRCoV), virus de la hepatitis de ratón (MHV), coronavirus bovino (BCV). Por lo tanto, la presente invención también proporciona una proteína de espícula del coronavirus o fragmento de esta, en donde al menos una parte de la subunidad S1 pertenece a un coronavirus con un tropismo celular o tisular restringido, y en donde en la posición de aminoácido 267 es una cisteína, y en donde la proteína de espícula se selecciona del grupo que consiste en: virus de la bronquitis infecciosa (IBV); coronavirus de la gallina de Guinea (GfCoV), coronavirus del pavo (TCoV; virus de enteritis del pavo y virus de la enfermedad de la cresta azul), virus de la peritonitis infecciosa felina (FIPV), coronavirus entérico felino (FECV); virus de la gastroenteritis transmisible (TGEV), coronavirus respiratorio porcino (PRCoV), virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV), virus de la encefalomiелitis de la hemaglutinación porcina (PHEV); coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV), coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV) coronavirus humano 229E (HCoV-229E), coronavirus humano NL63 (HCoV-NL63), coronavirus humano HKU1 (HCoV-HKU1), coronavirus humano OC43 (HCoV-OC43); coronavirus canino (CCoV), coronavirus respiratorio canino (CRCoV), virus de la hepatitis de ratón (MHV), coronavirus bovino (BCV). Además, la presente invención también proporciona una proteína de espícula del coronavirus recombinante o fragmento de esta que comprende una mutación en la posición de aminoácido 267 en cisteína, en donde la proteína de espícula se

selecciona del grupo que consiste en: virus de la bronquitis infecciosa (IBV); coronavirus de la gallina de Guinea (GfCoV), coronavirus del pavo (TCoV; virus de enteritis del pavo y virus de la enfermedad de la cresta azul), virus de la peritonitis infecciosa felina (FIPV), coronavirus entérico felino (FECV); virus de la gastroenteritis transmisible (TGEV), coronavirus respiratorio porcino (PRCoV), virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV), virus de la encefalomiелitis de la hemaglutinación porcino (PHEV); coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV), coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV) coronavirus humano 229E (HCoV-229E), coronavirus humano NL63 (HCoV-NL63), coronavirus humano HKU1 (HCoV-HKU1), coronavirus humano OC43 (HCoV-OC43); coronavirus canino (CCoV), coronavirus respiratorio canino (CRCoV), virus de la hepatitis de ratón (MHV), coronavirus bovino (BCV).

[0048] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de coronavirus aviar o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, la proteína de espícula de coronavirus aviar o fragmento de esta se selecciona del grupo que consiste en: virus de la bronquitis infecciosa (IBV); coronavirus de la gallina de Guinea (GfCoV) y coronavirus del pavo (TCoV; virus de enteritis del pavo y virus de la enfermedad de la cresta azul).

[0049] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de coronavirus aviar o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, el coronavirus aviar es IBV (virus de la bronquitis infecciosa).

[0050] Las cepas de IBV se pueden clasificar según serotipo y genotipo. La clasificación de serotipos implica el tratamiento del virus con anticuerpos neutralizantes, mientras que la clasificación de genotipos por lo general implica el análisis de la secuencia de la proteína S1 (espícula). Sin embargo, las diferentes cepas de IBV son conocidas por las personas del oficio de nivel medio. El virus de la bronquitis infecciosa se descubrió en Estados Unidos en la década de 1930.

[0051] El primer serotipo de IBV identificado fue Massachusetts, y fue el único serotipo hasta el descubrimiento de un serotipo de IBV diferente en 1956. En la actualidad, en Estados Unidos de América se identificaron varios serotipos distintos, que incluyen Arkansas y Delaware, además del tipo Massachusetts identificado originalmente. En la actualidad, los virus IBV Mass pueden identificarse en muchos países del mundo.

[0052] La cepa Beaudette de IBV es de tipo Massachusetts, y se derivó siguiendo al menos 150 pasajes en embriones de pollo. La cepa Beaudette de IBV fue aislada por primera vez por Beaudette y Hudson (J. Am. Vet. Med. A. 90, 51-60, 1937) y

transferida en embriones de pollo. Otras cepas tipo Massachusetts de IBV, además de Beaudette son H120, H52 y M41. La cepa H120 se transfirió 120 veces en huevos embrionados de gallina.

[0053] IBV QX se describe como un aislado de campo virulento de IBV que se aisló por primera vez en China. No obstante, el virus se extendió hacia Europa y se identificó en partes de Europa Occidental, principalmente en los Países Bajos, pero también en Alemania, Francia, Bélgica, Dinamarca y en el Reino Unido. Además, el genotipo o serotipo QX se describió en diversos países en Asia y África.

[0054] Las cepas denominadas “Italien-02” o “Italy-02” se aislaron a fines de la década de 1990 en Italia. El análisis de la secuencia de uno de estos aislados se publicó en 2002 (NCBI-BLAST, número AJ457137). No obstante, diversos estudios demostraron que esta cepa Italian-02 se encuentra ampliamente extendida en Europa y que, además de la cepa 4/91 variante de IBV, se volvió uno de los principales genotipos en el Reino Unido, España, Francia y los Países Bajos.

[0055] Desde 1996 un nuevo genotipo del virus de la bronquitis infecciosa (IBV), denominado Q1, circula en China, y se informó en Italia por primera vez en 2011. Q1 se asocia con un aumento de la mortalidad, lesiones renales y proventriculitis.

[0056] Además, en Europa también se identificaron cepas D274, B1648/D8880, D1466, V1397 y Arkansas.

[0057] Una persona del oficio de nivel medio sabe dónde obtener cualquier cepa de IBV. Las cepas de IBV se pueden adquirir en el comercio, obtenerse de instituciones científicas, o los genomas pueden sintetizarse sintéticamente como ADN complementario, dado que las cepas de IBV fueron secuenciadas, y las secuencias fueron publicadas y, por ende, se encuentran disponibles. Además, las cepas de IBV se pueden aislar del campo. Los métodos para aislar cepas de IBV y para caracterizar las cepas de IBV son conocidos por la persona del oficio de nivel medio. Valter Leonardo de Quadros 2011 (Dissertation, Das Infektiöse Bronchitis Virus (IBV): Molekularbiologische Untersuchungen zur Diagnostik und zum Vorkommen sowie zur Pathogenität des Genotyps IBV QX in spezifisch pathogenfreien (SPF) Broilern, Freie Universität Berlín), Worthington et al. 2009 (Avian Pathology 37(3), 247-257), Liu et al. 2009 (Virus Genes 38: 56-65), Dolz et al. 2006 (Avian Pathology 35 (2): 77-85), Farsang et al. 2002 (Avian Pathology 31: 229-236) y Feng et al. 2014 (Virus Genes 49: 292-303) describen cómo aislar y diferenciar distintas cepas de IBV.

[0058] Las cepas de IBV se diferencian normalmente mediante la secuencia de codificación de la subunidad S1 de la proteína de espícula (Valastro et al. 2016. Infect

Genet Evol. 39:349-364), pero también pueden diferenciarse por su secuencia de nucleótidos completa o las secuencias de proteínas específicas, tales como la proteína de espícula, proteína de nucleocápside, proteína de envoltura (E) o glucoproteína de membrana (M). Dado que la proteína de espícula determina el tropismo del huésped y la antigenicidad de IBV, los genotipos de IBV se clasifican según la secuencia codificante de la subunidad 1 de las proteínas de espícula. De manera alternativa, las cepas de IBV se pueden diferenciar por sus serotipos. La clasificación de serotipos incluye ensayos serológicos del virus que incluyen anticuerpos específicos de serotipo.

[0059] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, la proteína de espícula o fragmento de esta es de un IBV con un genotipo o serotipo o cepa seleccionada de una lista que consiste en: Arkansas (tal como Arkansas 99), Brazil (tal como BR-1, BR-2, 23/2013, IBV/Brasil/351/1984), California (tal como California 1734/04, California 99), Connecticut, Delaware (tal como Delaware 98), Dutch (tal como D207, D212, D274, D3128, D3896, D8880, D1466), Florida, Georgia (tal como Georgia GA-07, GA-08, GA-12, GA-13), Gray, Holte, Iowa (tal como Iowa 97 y Iowa 69), Italy02, JMK, LDT3, Maine (tal como Maine 209), Massachusetts (tal como M41, H52, H120; excluyendo Beaudette), Pennsylvania (tal como Pennsylvania 1220/98, Pennsylvania Wolg/98), PL84084, Qu (tal como Qu-mv), QX (tal como GB341/96), Q1, SE 17, Variant 2 (tal como IS/1494/06, IBV/Ck/EG/CU/4/2014, gammaCoV/Ck/Poland/G052/2016) y 4/91 (793B, CR88).

[0060] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, la proteína de espícula o fragmento de esta no es de la cepa Beaudette.

[0061] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, la proteína de espícula o fragmento de esta es de un IBV seleccionado de una lista de genotipos o serotipos o cepas que consisten en: Massachusetts (no Beaudette), 4/91, QX, Q1, Italy 02, Arkansas, Connecticut, Georgia, LDT3, PL84084, Variant 2 y Brazil.

[0062] La expresión “no Beaudette” se usa como equivalente para “excluyendo Beaudette”. Por ende, la expresión “Massachusetts (no Beaudette)” significa que se incluyen las proteínas de espícula o fragmentos de estas de cepas Massachusetts, tales como M41, H52 y H120, pero que se excluyen las proteínas de espícula o fragmentos de estas de cepas Beaudette.

[0063] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de IBV o fragmento de

esta de acuerdo con la presente invención, la proteína de espícula o fragmento de esta es de un IBV seleccionado de una lista de genotipos o serotipos que consisten en: Massachusetts (no Beaudette), 4/91, QX, Q1, Arkansas, Variant 2 y Brazil.

[0064] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, la proteína de espícula o fragmento de esta es de un IBV seleccionado de una lista de genotipos o serotipos que consisten en Massachusetts (no Beaudette) y 4/91.

[0065] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, la cepa Massachusetts se selecciona de una lista que consiste en: H120, H52, Spain/98/308, IBMA5-1, SD/97/01, Spain/96/334 y M41-M21883.

[0066] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, la cepa 4/91 se selecciona de una lista que consiste en: Spain/98/328, Spain/92/35, IR-3654-VM, FR-CR88061-88, FR-85131-85, UK-1233-95, UK/3/91, Spain/00/336, UK/7/91, 4/91-patógena, 4/91 atenuada e IB4-91.

[0067] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, la cepa QX se selecciona de una lista que consiste en: FR-L1450T-05, FR-L1450L-05, NL-L1449T-04, NL-L1449K-04, IBV/Ck/SP/170/09, IBV/Ck/SP/79/08, IBV/Ck/SP/248/09, HBN, IBVQX, LX4, BJQ, CK/CH/LGD/03, SP2013-01470, SP2013-014171, SP2013-01478 y GB341/96.

[0068] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, la cepa Q1 se selecciona de una lista que consiste en: CK/CH/LDL/98I, CK/CH/LSD/08-10, J2, Q1, AR08ER22, AR08BA21, 12.185, 12.124, 12.216 y Chile-295-10.

[0069] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, la cepa Italy 02 se selecciona de una lista que consiste en: Spain/99/316, Italy-02, UK-L633-04, It-497-02, Spain/05/866, Spain/04/221, Spain/00/337, Spain/155/09 y Spain/03/08.

[0070] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, la cepa Arkansas se selecciona de una lista que consiste en: Ark99, ArkGA, ArkDPI, AL/5364/00, ARKDPI11, AL/0803/01, AL/7149/00, ArkDPI101, AL/1221/01, AL/1793/01 y AL/4614/98.

[0071] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, la cepa Variant 2 se selecciona de una lista que consiste en: IS/1494/06, IBV/Ck/EG/CU/4/2014,

gammaCoV/Ck/Poland/G052/2016, Eg/CLEVB-2/IBV/012, D1344/2/4/10_EG, TR8 e IB VAR2-06.

[0072] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, la cepa Brazil se selecciona de una lista que consiste en: BR-1, BR-2, 23/2013 e IBV/Brasil/351/1984.

[0073] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, la proteína de espícula o fragmento de esta es de un IBV de genotipo o serotipo Massachusetts (no Beaudette), QX o 4/91.

[0074] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, la proteína de espícula o fragmento de esta es de un IBV de genotipo o serotipo Massachusetts (no Beaudette).

[0075] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, la proteína de espícula o fragmento de esta es de un IBV de genotipo o serotipo QX.

[0076] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, la proteína de espícula o fragmento de esta es de un IBV de genotipo o serotipo 4/91.

[0077] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, la cepa de IBV es H52, H120, QX SP2013-01478 o CR88.

[0078] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, la proteína de espícula de IBV o fragmento de esta consiste en o comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 77 o una secuencia que tiene al menos 80 %, 85 %, 90 %, 93 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 %, 99,95 %, 99,98 % o 99,99 % de identidad de secuencia con esta.

[0079] Las expresiones “identidad” o “identidad de secuencia” son conocidas en el estado de la técnica y se refieren a una relación entre dos o más secuencias de polipéptidos o dos o más secuencias de polinucleótidos, a saber, una secuencia de referencia y una secuencia dada para compararla con la secuencia de referencia. La identidad de secuencia se determina comparando la secuencia dada con la secuencia de referencia después de que las secuencias se alinearon en forma óptima para obtener el mayor grado de similitud de secuencia, según se determina mediante la coincidencia de las cadenas de estas secuencias. Luego de la alineación, la identidad de secuencia se determina sobre la base de cada posición, por ejemplo, las

secuencias son “idénticas” en una posición particular si, en esa posición, los nucleótidos o residuos de aminoácidos son idénticos. La cantidad total de esas identidades de posición luego se divide por la cantidad total de nucleótidos o residuos en la secuencia de referencia para obtener el % de identidad de secuencia. La identidad de secuencia se puede calcular fácilmente mediante los métodos conocidos, por ejemplo, los descritos en *Computational Molecular Biology*, Lesk, A. N., ed., Oxford University Press, Nueva York (1988), *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D.W., ed., Academic Press, Nueva York (1993); *Computer Analysis of Sequence Data, Part I*, Griffin, A.M., y Griffin, H. G., eds., Humana Press, Nueva Jersey (1994); *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinge, G., Academic Press (1987); *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M. Stockton Press, Nueva York (1991); y Carillo, H., y Lipman, D., *SIAM J. Applied Math.*, 48: 1073 (1988), que se incorporan en la presente por referencia. Los métodos preferidos para determinar la identidad de secuencia están diseñados para obtener la mayor coincidencia entre las secuencias evaluadas. Los métodos para determinar la identidad de secuencia se encuentran codificados en programas informáticos disponibles al público, que determinan la identidad de secuencia entre las secuencias dadas. Los ejemplos de estos programas incluyen, entre otros, el paquete del programa GCG (Devereux, J., et al., *Nucleic Acids Research*, 12(1):387 (1984)), BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul, S. F. et al., *J. Molec. Biol.*, 215:403-410 (1990)). El programa BLASTX está disponible al público de NCBI y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul, S. et al., NCVI NLM NIH Bethesda, MD 20894, Altschul, S. F. et al., *J. Molec. Biol.*, 215:403-410 (1990), que se incorporan en la presente por referencia). Estos programas alinean secuencias óptimamente usando ponderaciones de espacios predeterminados, a fin de lograr el mayor nivel de identidad de secuencia entre las secuencias dadas y las de referencia. A modo ilustrativo, un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene al menos, por ejemplo, 85 %, preferentemente, 90 %, con mayor preferencia, 95 % de “identidad de secuencia” con respecto a una secuencia de nucleótidos de referencia significa que la secuencia de nucleótidos del polinucleótido dado es idéntica a la secuencia de referencia, excepto que la secuencia de polinucleótidos dada puede incluir hasta 15, preferentemente, hasta 10, con mayor preferencia, hasta 5 mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de referencia. En otras palabras, en un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 85 %, preferentemente, 90 %, aun con mayor preferencia, 95 % de identidad con la

secuencia de nucleótidos de referencia, se puede eliminar o sustituir con otro nucleótido hasta 15 %, preferentemente, 10 %, aun con mayor preferencia 5 % de los nucleótidos en la secuencia de referencia, o se pueden insertar, en la secuencia de referencia, varios nucleótidos hasta 15 %, preferentemente, 10 %, aun con mayor preferencia, 5 % del total de nucleótidos en la secuencia de referencia. Estas mutaciones de la secuencia de referencia pueden ocurrir en las posiciones del terminal 5' o 3' de la secuencia de nucleótidos de referencia o en cualquier lugar entre esas posiciones del terminal, intercaladas de manera individual entre los nucleótidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. De manera similar, un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos dada que tiene al menos, por ejemplo, 85 %, preferentemente, 90 %, con mayor preferencia, 95 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de referencia significa que la secuencia de aminoácidos dada del polipéptido es idéntica a la secuencia de referencia, excepto que la secuencia de polipéptidos dada puede incluir hasta 15, preferentemente, hasta 10, incluso con mayor preferencia, hasta 5 alteraciones de aminoácidos por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de referencia. En otras palabras, para obtener una secuencia de polipéptidos dada que tiene al menos 85 %, preferentemente, 90 %, con mayor preferencia, 95 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de referencia, se pueden eliminar o sustituir con otro aminoácido hasta 15 %, preferentemente, hasta 10 %, con mayor preferencia, hasta 5 % de los residuos de aminoácidos en la secuencia de referencia o, en la secuencia de referencia, se pueden insertar varios aminoácidos hasta 15 %, preferentemente, hasta 10 %, con mayor preferencia, hasta 5 % de la cantidad total de residuos de aminoácidos en la secuencia de referencia. Estas alteraciones de la secuencia de referencia pueden ocurrir en las posiciones del terminal amino o carboxi de la secuencia de aminoácidos de referencia o en cualquier lugar entre esas posiciones del terminal, intercaladas de manera individual entre los residuos en la secuencia de referencia o en el uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. Preferentemente, las posiciones de residuos que no son idénticas difieren en las sustituciones conservadoras de aminoácidos. Sin embargo, las sustituciones conservadoras no se incluyen como coincidencias cuando se determina la identidad de secuencia.

[0080] Las expresiones "identidad", "identidad de secuencia" y "porcentaje de identidad" se usan en la presente de manera indistinta. A los fines de la presente invención, se define en la presente que, para determinar el porcentaje de identidad de

dos secuencias de aminoácidos o dos secuencias de ácido nucleico, las secuencias se alinean para lograr una comparación óptima (por ejemplo, se pueden introducir espacios en la secuencia de un primer aminoácido o ácido nucleico para lograr una alineación óptima con una segunda secuencia de aminoácidos o ácido nucleico). Luego se comparan los residuos de aminoácidos o nucleótidos en las posiciones de aminoácidos o nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia es ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función de la cantidad de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, $\% \text{ de identidad} = \text{cantidad de posiciones idénticas} / \text{cantidad total de posiciones (por ejemplo, posiciones superpuestas)} \times 100$). Preferentemente, las dos secuencias tienen la misma longitud.

[0081] Una comparación de secuencias se puede realizar sobre las longitudes completas de las dos secuencias que se comparan o sobre fragmentos de las dos secuencias. En general, la comparación se realiza sobre la longitud completa de las dos secuencias que se comparan. Sin embargo, la identidad de secuencia se puede realizar sobre una región de, por ejemplo, 20, 50, 100 o más residuos de aminoácidos contiguos.

[0082] La persona del oficio de nivel medio estará al tanto del hecho de que diversos programas de computadora se encuentran disponibles para determinar la homología entre dos secuencias. Por ejemplo, se puede lograr una comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias usando un algoritmo matemático. En una forma de realización preferida, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos se determina usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. (48): 444-453 (1970)) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG de Accelrys (disponible en <http://www.accelrys.com/products/gcg/>), usando una matriz Blosum 62 o una matriz PAM250, y un peso de espacio de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6. La persona del oficio de nivel medio comprenderá que todos estos parámetros distintos arrojarán resultados ligeramente diferentes pero que el porcentaje de identidad general de dos secuencias no se modifica significativamente cuando se utilizan algoritmos diferentes.

[0083] Las secuencias de proteínas o las secuencias de ácidos nucleicos de la presente invención se pueden usar adicionalmente como una "secuencia de consulta"

para realizar una búsqueda en bases de datos públicas con el fin de, por ejemplo, identificar otros miembros de la familia o secuencias relacionadas. Dichas búsquedas pueden llevarse a cabo con los programas BLASTN y BLASTP (versión 2.0) de Altschul, *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Las búsquedas de proteínas con BLAST pueden llevarse a cabo con el programa BLASTP, calificación=50, longitud de palabra=3, para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a moléculas de la proteína de la invención. A fin de obtener alineaciones espaciadas para fines comparativos, se puede utilizar Gapped BLAST como se describe en Altschul *et al.* (1997) Nucleic Acids Res. 25(17): 3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden usar los parámetros predeterminados de los respectivos programas (por ejemplo, BLASTP y BLASTN). Ver la página del National Center for Biotechnology Information en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

[0084] Como se usa en la presente, cabe destacar que la expresión "idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: X" equivale a la expresión "idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: X a lo largo de SEQ ID NO: X" o a la expresión "idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: X a lo largo de la totalidad de SEQ ID NO: X", respectivamente. En este contexto, "X" es cualquier entero seleccionado de 1 a 84, de modo que "SEQ ID NO: X" representa cualquiera de las SEQ ID NO mencionadas en la presente.

[0085] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, la proteína de espícula de IBV o fragmento de esta consiste en o comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 2 o una secuencia que tiene al menos 80 %, 85 %, 90 %, 93 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 %, 99,95 %, 99,98 % o 99,99 % de identidad de secuencia con esta.

[0086] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, la proteína de espícula de IBV o fragmento de esta consiste en o comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 3 o una secuencia que tiene al menos 80 %, 85 %, 90 %, 93 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 %, 99,95 %, 99,98 % o 99,99 % de identidad de secuencia con esta.

[0087] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, la proteína de espícula de IBV o fragmento de esta consiste en o comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 4 o una secuencia que tiene al menos 80 %, 85 %, 90 %, 93 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 %, 99,95 %, 99,98 % o

99,99 % de identidad de secuencia con esta.

[0088] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, la proteína de espícula de IBV o fragmento de esta consiste en o comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 5 o una secuencia que tiene al menos 80 %, 85 %, 90 %, 93 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 %, 99,95 %, 99,98 % o 99,99 % de identidad de secuencia con esta.

[0089] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, la proteína de espícula de IBV o fragmento de esta consiste en o comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 6 o una secuencia que tiene al menos 80 %, 85 %, 90 %, 93 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 %, 99,95 %, 99,98 % o 99,99 % de identidad de secuencia con esta.

[0090] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, la proteína de espícula de IBV o fragmento de esta consiste en o comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 7 o una secuencia que tiene al menos 80 %, 85 %, 90 %, 93 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 %, 99,95 %, 99,98 % o 99,99 % de identidad de secuencia con esta.

[0091] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, la proteína de espícula de IBV o fragmento de esta consiste en o comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 8 o 77 o una secuencia que tiene al menos 80 %, 85 %, 90 %, 93 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 %, 99,95 %, 99,98 % o 99,99 % de identidad de secuencia con esta.

[0092] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, la proteína de espícula de IBV o fragmento de esta se selecciona de una lista de genotipos que consiste en: GI-2 a 27, GII-1, GIII-1, GIV-1, GV-1, GVI-1.

[0093] Valastro et al 2016 (Infection, Genetics and Evolution 39; 349–364) describen un sistema de clasificación con base en la filogenia combinado con una nomenclatura de linaje para la asignación de cepas de IBV. Se definen 6 genotipos (GI a GVI) que en conjunto comprenden 32 linajes virales distintos.

[0094] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, la proteína de espícula o fragmento de esta

no es del genotipo GI-1. El genotipo GI-1 se refiere al genotipo/serotipo Massachusetts.

[0095] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de coronavirus aviar o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, dicha al menos una parte de la subunidad S1 de un coronavirus aviar con un tropismo celular o tisular restringido se selecciona del grupo que consiste en: virus de la bronquitis infecciosa (IBV); coronavirus de la gallina de Guinea (GfCoV) y coronavirus del pavo (TCoV; virus de enteritis del pavo y virus de la enfermedad de la cresta azul).

[0096] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de coronavirus aviar o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, dicha al menos una parte de la subunidad S1 de un coronavirus aviar con un tropismo celular o tisular restringido es de IBV (virus de la bronquitis infecciosa).

[0097] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, dicha al menos una parte de la subunidad S1 es de un IBV seleccionado de una lista de genotipos o serotipos o cepas que consisten en: Arkansas (tal como Arkansas 99), Brazil (tal como BR-1, BR-2, 23/2013, IBV/Brasil/351/1984), California (tal como California 1734/04, California 99), Connecticut, Delaware (tal como Delaware 98), Dutch (tal como D207, D212, D274, D3128, D3896, D8880, D1466), Florida, Georgia (tal como Georgia GA-07, GA-08, GA-12, GA-13), Gray, Holte, Iowa (tal como Iowa 97 y Iowa 69), Italy02, JMK, LDT3, Maine (tal como Maine 209), Massachusetts (tal como M41, H52, H120; excluyendo Beaudette), Pennsylvania (tal como Pennsylvania 1220/98, Pennsylvania Wolg/98), PL84084, Qu (tal como Qu-mv), QX (tal como GB341/96), Q1, SE 17, Variant 2 (tal como IS/1494/06, IBV/Ck/EG/CU/4/2014, gammaCoV/Ck/Poland/G052/2016) y 4/91 (793B, CR88).

[0098] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, dicha al menos una parte de la subunidad S1 es de un IBV seleccionado de una lista de genotipos o serotipos o cepas que consisten en Massachusetts (no Beaudette), 4/91, QX, Q1, Italy 02, Arkansas, Connecticut, Georgia, LDT3, PL84084, Variant 2 y Brazil.

[0099] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, dicha al menos una parte de la subunidad S1 es de un IBV seleccionado de una lista de genotipos o serotipos que consisten en Massachusetts (no Beaudette), 4/91, QX, Q1, Arkansas, Variant 2 y Brazil.

[00100] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de IBV o

fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, la cepa Massachusetts se selecciona de una lista que consiste en: H120, H52, Spain/98/308, IBMA5-1, SD/97/01, Spain/96/334 y M41-M21883.

[00101] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, la cepa 4/91 se selecciona de una lista que consiste en: Spain/98/328, Spain/92/35, IR-3654-VM, FR-CR88061-88, FR-85131-85, UK-1233-95, UK/3/91, Spain/00/336, UK/7/91, 4/91-patógena, 4/91 atenuada e IB4-91.

[00102] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, la cepa QX se selecciona de una lista que consiste en: FR-L1450T-05, FR-L1450L-05, NL-L1449T-04, NL-L1449K-04, IBV/Ck/SP/170/09, IBV/Ck/SP/79/08, IBV/Ck/SP/248/09, HBN, IBVQX, LX4, BJQ, CK/CH/LGD/03 y GB341/96.

[00103] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, la cepa Q1 se selecciona de una lista que consiste en: CK/CH/LDL/98I, CK/CH/LSD/08-10, J2, Q1, AR08ER22, AR08BA21 y Chile-295-10.

[00104] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, la cepa Italy 02 se selecciona de una lista que consiste en: Spain/99/316, Italy-02, UK-L633-04, It-497-02, Spain/05/866, Spain/04/221, Spain/00/337, Spain/155/09 y Spain/03/08.

[00105] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, la cepa Arkansas se selecciona de una lista que consiste en: Ark99, ArkGA, ArkDPI, AL/5364/00, ARKDPI11, AL/0803/01, AL/7149/00, ArkDPI101, AL/1221/01, AL/1793/01 y AL/4614/98.

[00106] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, la cepa Variant 2 se selecciona de una lista que consiste en: IS/1494/06, IBV/Ck/EG/CU/4/2014, gammaCoV/Ck/Poland/G052/2016, Eg/CLEVB-2/IBV/012, D1344/2/4/10_EG, TR8 e IB VAR2-06.

[00107] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, la cepa Brazil se selecciona de una lista que consiste en: BR-1, BR-2, 23/2013 e IBV/Brasil/351/1984.

[00108] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de IBV o

fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, dicha al menos una parte de la subunidad S1 es de un IBV seleccionado de una lista de genotipos o serotipos que consisten en Massachusetts (no Beaudette), QX y 4/91.

[00109] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, dicha al menos una parte de la subunidad S1 es de un IBV de genotipo o serotipo Massachusetts (no Beaudette).

[00110] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, dicha al menos una parte de la subunidad S1 es de un IBV de genotipo o serotipo QX.

[00111] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, dicha al menos una parte de la subunidad S1 es de un IBV de genotipo o serotipo 4/91.

[00112] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, dicha al menos una parte de la subunidad S1 es de una cepa H120, H52, QX SP2013-01478 o CR88 de IBV.

[00113] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, dicha al menos una parte de la subunidad S1 es de una cepa H120 o H52 de IBV.

[00114] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de coronavirus aviar o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, la al menos una parte de la subunidad S1 tiene al menos 1, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 o 500 aminoácidos contiguos de una secuencia de la subunidad S1 de un coronavirus aviar o IBV con un tropismo celular o tisular restringido o una secuencia que tiene al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad de secuencia con esta.

[00115] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de coronavirus aviar o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, la al menos una parte de la subunidad S1 tiene al menos 1, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 o 500 aminoácidos contiguos de una secuencia de la subunidad S1 de un coronavirus aviar o IBV descrito en la presente o una secuencia que tiene al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad de secuencia con esta.

[00116] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, dicha al menos una parte de la subunidad S1 de un IBV con un tropismo celular o tisular restringido tiene al menos 1, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 o 500 aminoácidos

contiguos de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 77 o una secuencia que tiene al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad de secuencia con esta.

[00117] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de coronavirus aviar o IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, el coronavirus o IBV con tropismo celular o tisular restringido se restringe a la infección y/o replicación en huevos embrionados de gallina y/o células de riñón de gallina primarias.

[00118] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de coronavirus aviar o IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, el coronavirus o IBV con tropismo celular o tisular restringido no infecta ni se replica en células EB66.

[00119] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de coronavirus aviar o IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, el coronavirus o IBV con tropismo celular o tisular restringido no infecta ni se replica en células PBS-12SF y/o HEK 293T.

Fragmento

[00120] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de coronavirus aviar o IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, el fragmento del coronavirus aviar o proteína de espícula de IBV tiene una longitud de al menos 500, 750, 1000 o 1077 aminoácidos.

[00121] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de coronavirus aviar o IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, el fragmento del coronavirus aviar o proteína de espícula de IBV tiene una longitud de al menos 1000 aminoácidos.

[00122] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de coronavirus aviar o IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, el fragmento del coronavirus aviar o proteína de espícula de IBV tiene una longitud de al menos 500, 750, 1000 o 1075 aminoácidos desde el terminal N.

[00123] La expresión “terminal N” es conocida por la persona del oficio de nivel medio. El terminal N también se denomina terminal amino, terminal NH₂, extremo terminal N o terminal amina. Cuando la proteína se traduce de un ARN mensajero, se crea desde el terminal N al terminal C. Por lo tanto, el terminal N es el inicio de una cadena de aminoácidos (proteína o polipéptido) que comprende dicho grupo amina (-NH₂).

[00124] En otro aspecto específico de la proteína de espícula de coronavirus aviar o IBV o fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, el fragmento

del coronavirus aviar o proteína de espícula de IBV es el ectodominio de la proteína de espícula.

[00125] El término “ectodominio” es conocido por la persona del oficio de nivel medio. La proteína de espícula comprende partes funcionales diferentes, la secuencia de señal, el ectodominio, el dominio transmembrana y el endodominio (del terminal N al terminal C). Por ende, después de la escisión de la secuencia de señal, el terminal N de la proteína de espícula inicia con el ectodominio. Los ectodominios de espícula de IBV tienen una longitud de alrededor de 1075 aminoácidos y difieren en algunos aminoácidos de longitud según la cepa de IBV.

[00126] En otro aspecto específico del coronavirus aviar o proteína de espícula de IBV de acuerdo con la presente invención, la cisteína en la posición de aminoácido 267 o la mutación en la posición de aminoácido 267 en cisteína es genéticamente estable. Ventajosamente, los datos experimentales muestran que la cisteína en la posición de aminoácido 267 o la mutación en la posición de aminoácido 267 en cisteína es genéticamente estable y permanece estable en el tiempo (durante el pasaje).

[00127] La expresión “genéticamente estable” significa que la cisteína en la posición de aminoácido 267 o la mutación en la posición de aminoácido 267 en cisteína permanece estable en el tiempo (durante el pasaje). Preferentemente, dicha cisteína en la posición de aminoácido 267 o la mutación en la posición de aminoácido 267 en cisteína continúa presente después de al menos 3 pasajes, más preferentemente, después de al menos 6 pasajes, aun más preferentemente, después de al menos 9 pasajes, aun más preferentemente, después de al menos 12 pasajes, con máxima preferencia, después de 15 pasajes en el cultivo celular o cultivo tisular de un IBV que tiene dicho coronavirus aviar o proteína de espícula de IBV de acuerdo con la presente invención.

Secuencias de nucleótidos y plásmidos

[00128] Además, la presente invención proporciona una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de espícula o fragmento de esta como se describe en la presente.

[00129] Asimismo, la presente invención proporciona un plásmido que comprende una secuencia de nucleótidos como se describe en la presente.

[00130] Las expresiones “ácido nucleico” o “secuencia de ácido nucleico” o “secuencia de nucleótidos” se refieren a polinucleótidos que incluyen moléculas de ADN, moléculas de ARN, moléculas de cADN o derivados. La expresión comprende

polinucleótidos tanto monocatenarios como bicatenarios. El ácido nucleico de la presente invención comprende polinucleótidos aislados (es decir, aislados de su contexto natural) y formas modificadas genéticamente. Además, también comprende polinucleótidos modificados químicamente, que incluyen polinucleótidos modificados naturales, tales como polinucleótidos glucosilados o metilados o modificados artificialmente, tales como polinucleótidos biotinilados. Además, las expresiones "ácido nucleico" y "polinucleótido" son intercambiables y se refieren a cualquier ácido nucleico. Las expresiones "ácido nucleico" y "polinucleótido" también incluyen específicamente ácidos nucleicos compuestos por nucleótidos con nucleobases distintas de las cinco bases biológicas (adenina, guanina, timina, citosina y uracilo).

[00131] El término "plásmido" se refiere a un ADN citoplasmático que se replica independientemente del cromosoma bacteriano dentro de una célula huésped bacteriana. En un aspecto específico de la presente invención, las expresiones "plásmido" y/o "plásmido de transferencia" y/o "plásmido donante" se refieren a un elemento de la tecnología de ADN recombinante que es útil para la elaboración de, por ejemplo, virus recombinantes o un casete de expresión para la inserción en un vector viral. En otro aspecto específico, el término "plásmido" puede usarse para especificar un plásmido útil para los fines de vacunación de ADN.

Célula

[00132] Además, la presente invención proporciona una célula que comprende un plásmido como se describe en la presente. La célula puede ser una célula procariota o eucariota.

Partícula viral, coronavirus aviar e IBV

[00133] Además, la presente invención proporciona una partícula viral que comprende una proteína de espícula o fragmento de esta como se describe en la presente.

[00134] Además, la presente invención proporciona un coronavirus aviar que comprende la proteína de espícula o fragmento de esta como se describe en la presente.

[00135] Además, la presente invención proporciona un IBV (virus de la bronquitis infecciosa) que comprende la proteína de espícula como se describe en la presente.

[00136] En otro aspecto específico del coronavirus aviar o IBV de acuerdo con la presente invención, el coronavirus aviar o IBV se encuentra atenuado.

[00137] El término "atenuado" se refiere a un patógeno que tiene una virulencia

reducida en comparación con el aislado de tipo silvestre. En la presente invención, un IBV atenuado es uno en el que se redujo la virulencia, de manera que no produce signos clínicos de una infección por IBV, pero es capaz de inducir una respuesta inmunitaria en el animal diana; pero también puede significar que los signos clínicos se reducen en cuanto a la incidencia o gravedad en animales infectados con IBV atenuado en comparación con un “grupo de control” de animales infectados con IBV no atenuado y que no reciben el virus atenuado. En este contexto, el término “reducir/reducido” se refiere a una reducción de al menos 10 %, preferentemente, 25 %, aun más preferentemente, 50 %, con mayor preferencia, 60 %, aun más preferentemente, 70 %, con mayor preferencia, 80 %, con mayor preferencia, 90 %, aun más preferentemente, 95 % y, con la máxima preferencia, de 100 % en comparación con el grupo de control infectado con el IBV no atenuado descrito anteriormente. Por ende, una cepa de IBV atenuada es una que es adecuada para incorporar en una composición inmunógena que comprende un IBV vivo modificado.

[00138] En otro aspecto específico del coronavirus aviar o IBV de acuerdo con la presente invención, el coronavirus aviar o IBV se encuentra inactivo.

[00139] A los fines de la presente invención, se puede usar cualquier método de inactivación convencional. Por ello, la inactivación se puede llevar a cabo mediante tratamientos químicos y/o físicos conocidos por las personas del oficio de nivel medio. Los métodos de inactivación preferidos incluyen la adición de etilenimina binaria ciclizada (BEI), que incluye la adición de una solución de bromhidrato de 2-bromoetilenamina (BEA), que se ciclizó en etilenimina binaria (BEI). Otros agentes de inactivación química preferidos comprenden, entre otros, Triton X-100, desoxicolato de sodio, bromuro de cetiltrimetilamonio, β -propiolactona, timerosal, fenol y formaldehído (formalina). Sin embargo, la inactivación también puede comprender una etapa de neutralización. Los agentes de neutralización preferidos incluyen, entre otros, tiosulfato de sodio, bisulfito de sodio y similares.

[00140] Las condiciones de inactivación de formalina preferidas incluyen una concentración de formalina de entre alrededor de 0,02 % (v/v) – 2,0 % (v/v), con mayor preferencia, alrededor de 0,1 % (v/v) – 1,0 % (v/v), aun con mayor preferencia, alrededor de 0,15 % (v/v) – 0,8 % (v/v), aun con mayor preferencia, alrededor de 0,16 % (v/v) – 0,6 % (v/v) y, con máxima preferencia, alrededor de 0,2 % (v/v) – 0,4 % (v/v). El tiempo de incubación depende de la resistencia del IBV. En general, el proceso de inacción se realiza hasta que ya no se detecte el crecimiento de IBV en un sistema de cultivo adecuado.

[00141] Preferentemente, el IBV inactivado de la presente invención es inactivado con formalina, preferentemente, usando las concentraciones descritas en la presente con anterioridad.

[00142] El IBV inactivado de la invención se puede incorporar en los liposomas usando la tecnología conocida, por ejemplo, como se describe en Nature, 1974, 252, 252-254 o Journal of Immunology, 1978, 120, 1109-13. En otra forma de realización de la invención, el IBV inactivado de la invención se puede conjugar con compuestos biológicos adecuados, tales como polisacáridos, péptidos, proteínas o similares, o una combinación de estos.

[00143] En otro aspecto específico del coronavirus aviar o IBV de acuerdo con la presente invención, el coronavirus aviar o IBV está modificado por ingeniería genética.

[00144] La expresión "modificado por ingeniería genética" se refiere a un coronavirus aviar o IBV que fue mutado mediante técnicas de "genética inversa". Preferentemente, el coronavirus aviar o IBV de acuerdo con la presente invención fue modificado por ingeniería genética. La técnica de genética inversa implica la preparación de ARN virales recombinantes sintéticos. Sin embargo, las técnicas de "genética inversa" son conocidas por las personas del oficio de nivel medio.

[00145] En otro aspecto específico del coronavirus aviar o IBV de acuerdo con la presente invención, el coronavirus aviar o IBV es un recombinante.

[00146] Como se usa en la presente, el término "recombinante" se refiere a un genoma de ARN (o secuencia de ARN, secuencia de cADN o proteína) que tiene modificaciones que no son naturales en el correspondiente genoma de ARN (o secuencia de ARN, secuencia de cADN o proteína). Por ejemplo, un genoma de ARN (o secuencia de ARN, secuencia de cADN o proteína) se considera "recombinante" si contiene una inserción, eliminación, inversión, reubicación o una mutación puntual introducidas de manera artificial, por ejemplo, por intervención humana. Por lo tanto, la secuencia genómica de ARN (o secuencia de ARN, secuencia de cADN o proteína) no está asociada con la totalidad de o una parte de las secuencias (o secuencia de ARN, secuencia de cADN o proteína) con las que se asocia en la naturaleza. El término "recombinante", utilizado con respecto a un virus, significa un virus producido por una manipulación artificial del genoma viral. La expresión "virus recombinante" comprende virus modificados genéticamente.

[00147] En otro aspecto específico del coronavirus aviar o IBV de acuerdo con la presente invención, el coronavirus aviar o IBV es quimérico.

[00148] El término “quimérico” se refiere a un coronavirus aviar o IBV que comprende una o más secuencias de nucleótidos de otro coronavirus o IBV. Preferentemente, el término se refiere a un virus IBV que comprende una o más secuencias de nucleótidos de otra cepa de IBV.

[00149] En otro aspecto específico del IBV de acuerdo con la presente invención, el IBV es de un IBV con un genotipo o serotipo o cepa seleccionados de una lista que consiste en: Arkansas (tal como Arkansas 99), Brazil (tal como BR-1, BR-2, 23/2013, IBV/Brasil/351/1984), California (tal como California 1734/04, California 99), Connecticut, Delaware (tal como Delaware 98), Dutch (tal como D207, D212, D274, D3128, D3896, D8880, D1466), Florida, Georgia (tal como Georgia GA-07, GA-08, GA-12, GA-13), Gray, Holte, Iowa (tal como Iowa 97 y Iowa 69), Italy 02, JMK, LDT3, Maine (tal como Maine 209), Massachusetts (M41, H52, H120, Beaudette), Pennsylvania (tal como Pennsylvania 1220/98, Pennsylvania Wolg/98), PL84084, Qu (tal como Qu-mv), QX (tal como GB341/96), Q1, SE 17, Variant 2 (tal como IS/1494/06, IBV/Ck/EG/CU/4/2014, gammaCoV/Ck/Poland/G052/2016) y 4/91 (793B, CR88).

[00150] En otro aspecto específico del IBV de acuerdo con la presente invención, el IBV se selecciona de una lista de genotipos o serotipos o cepas que consisten en: Massachusetts, 4/91, QX, Q1, Italy 02, Arkansas, Connecticut, Georgia, LDT3, PL84084, Variant 2 y Brazil.

[00151] En otro aspecto específico del IBV de acuerdo con la presente invención, el IBV se selecciona de una lista de genotipos o serotipos que consisten en: Massachusetts, 4/91, QX, Q1, Arkansas, Variant 2 y Brazil.

[00152] En otro aspecto específico del BV de acuerdo con la presente invención, la cepa Massachusetts se selecciona de una lista que consiste en: H120, H52, Spain/98/308, IBMA5-1, SD/97/01, Beaudette, Spain/96/334 y M41-M21883.

[00153] En otro aspecto específico del IBV de acuerdo con la presente invención, la cepa 4/91 se selecciona de una lista que consiste en: Spain/98/328, Spain/92/35, IR-3654-VM, FR-CR88061-88, FR-85131-85, UK-1233-95, UK/3/91, Spain/00/336, UK/7/91, 4/91-patógena, 4/91 atenuada e IB4-91.

[00154] En otro aspecto específico del IBV de acuerdo con la presente invención la cepa QX se selecciona de una lista que consiste en: FR-L1450T-05, FR-L1450L-05, NL-L1449T-04, NL-L1449K-04, IBV/Ck/SP/170/09, IBV/Ck/SP/79/08, IBV/Ck/SP/248/09, HBN, IBVQX, LX4, BJQ, CK/CH/LGD/03 y GB341/96.

[00155] En otro aspecto específico del IBV de acuerdo con la presente invención

la cepa Q1 se selecciona de una lista que consiste en: CK/CH/LDL/98I, CK/CH/LSD/08-10, J2, Q1, AR08ER22, AR08BA21 y Chile-295-10.

[00156] En otro aspecto específico del IBV de acuerdo con la presente invención la cepa Italy 02 se selecciona de una lista que consiste en: Spain/99/316, Italy-02, UK-L633-04, It-497-02, Spain/05/866, Spain/04/221, Spain/00/337, Spain/155/09 y Spain/03/08.

[00157] En otro aspecto específico del IBV de acuerdo con la presente invención la cepa Arkansas se selecciona de una lista que consiste en: Ark99, ArkGA, ArkDPI, AL/5364/00, ARKDPI11, AL/0803/01, AL/7149/00, ArkDPI101, AL/1221/01, AL/1793/01 y AL/4614/98.

[00158] En otro aspecto específico del IBV de acuerdo con la presente invención la cepa Variant 2 se selecciona de una lista que consiste en: IS/1494/06, IBV/Ck/EG/CU/4/2014, gammaCoV/Ck/Poland/G052/2016, Eg/CLEVB-2/IBV/012, D1344/2/4/10_EG, TR8 e IB VAR2-06.

[00159] En otro aspecto específico del IBV de acuerdo con la presente invención la cepa Brazil se selecciona de una lista que consiste en: BR-1, BR-2, 23/2013 e IBV/Brasil/351/1984.

[00160] En otro aspecto específico del IBV de acuerdo con la presente invención, la proteína de espícula o fragmento de esta es de un IBV de genotipo o serotipo Massachusetts o 4/91.

[00161] En otro aspecto específico del IBV de acuerdo con la presente invención, la proteína de espícula o fragmento de esta es de un IBV de genotipo o serotipo Massachusetts.

[00162] En otro aspecto específico del IBV de acuerdo con la presente invención la proteína de espícula o fragmento de esta es de un IBV de genotipo o serotipo 4/91.

[00163] En otro aspecto específico del IBV de acuerdo con la presente invención, la cepa de IBV es H120, H52 o CR88.

[00164] En otro aspecto específico del IBV de acuerdo con la presente invención la cepa de IBV es H120 o H52.

[00165] En otro aspecto específico del IBV de acuerdo con la presente invención, el IBV tiene una proteína de espícula de IBV o fragmento de esta que consiste en o comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 77 o una secuencia que tiene al menos 80 %, 85 %, 90 %, 93 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 %, 99,95 %, 99,98 % o 99,99 % de identidad de secuencia con esta.

[00166] En otro aspecto específico del IBV de acuerdo con la presente invención, el IBV tiene un tropismo celular o tisular extendido.

[00167] En otro aspecto específico del IBV de acuerdo con la presente invención, el IBV infecta y/o se replica en al menos una línea celular o célula descritas en la presente. Preferentemente, el IBV infecta y/o se replica en al menos una línea celular descrita en la presente.

[00168] Además, la presente invención proporciona una célula que comprende:

- la partícula viral descrita en la presente, o
- el coronavirus aviar o IBV descritos en la presente.

[00169] En otro aspecto específico de la célula de acuerdo con la presente invención, la célula es una línea celular o célula seleccionadas de la lista que consiste en: células primarias de embriones de pollo, una línea celular de fibroblastos de embriones de pollo, una línea de células madre embrionarias de pato, una línea de células de riñón embrionario de ser humano, una línea de células de riñón de hámster bebé, una línea de células de riñón de mono verde africano, una línea de células de riñón de conejo, una línea de células de riñón canino, una línea de células de hígado de gallina, una línea de células de riñón bovino, una línea de células de riñón porcino y una línea de células de insecto.

[00170] En otro aspecto específico de la célula de acuerdo con la presente invención, la célula es una línea celular seleccionada de la lista que consiste en: DF-1 (Douglas Foster), EB66 (línea de células madre embrionarias de pato), PBS-12, PBS-12SF (PBS-12 libre de suero), BHK21 (riñón de hámster bebé), HEK 293T (riñón embrionario humano), Vero (Verda Reno), MA104, RK13 (riñón de conejo), LMH (hepatoma de leghorn macho), MDCK (riñón canino Madin-Darby), MDBK (riñón bovino Madin-Darby), PK15 (riñón porcino), PK2A (riñón porcino), SF9, SF21 y SF+ (Spodoptera frugiperda).

[00171] En otro aspecto específico de la célula de acuerdo con la presente invención, la célula es una línea celular seleccionada de la lista que consiste en: DF-1, EB66, PBS-12, PBS-12SF, BHK, HEK 293T, Vero, MA104 y RK13.

[00172] En otro aspecto específico de la célula de acuerdo con la presente invención, la célula primaria de embriones de pollo es un fibroblasto o una célula derivada de tejido de hígado o pulmón.

[00173] Además, la presente invención proporciona una composición inmunógena que comprende:

- la proteína de espícula descrita en la presente, o

- la partícula viral descrita en la presente, o
- el coronavirus aviar o IBV descrito en la presente.

[00174] De este modo, la presente invención también proporciona una composición inmunógena que comprende un coronavirus aviar o IBV que comprende una proteína de espícula de coronavirus aviar o IBV o un fragmento de esta, en donde al menos una parte de la subunidad S1 es de un coronavirus aviar o IBV con un tropismo celular o tisular restringido, y en donde la posición de aminoácido 267 es una cisteína. Además, la presente invención también proporciona una composición inmunógena que comprende un coronavirus aviar o IBV que comprende una proteína de espícula de coronavirus aviar o IBV recombinante o fragmento de esta que comprende una mutación en la posición de aminoácido 267 en la cisteína. Además, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 se usa para determinar la numeración de la posición en la proteína de espícula. Preferentemente, la secuencia de aminoácidos de la proteína de espícula se alinea con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1

[00175] Además, la presente invención proporciona una vacuna que comprende:

- la proteína de espícula descrita en la presente, o
- la partícula viral descrita en la presente, o
- el coronavirus o IBV descrito en la presente.

[00176] Además, la presente invención proporciona una vacuna de virus vivo modificado con un tropismo celular o tisular extendido que comprende:

- la proteína de espícula descrita en la presente, o
- la partícula viral descrita en la presente, o
- el coronavirus o IBV descrito en la presente.

[00177] La expresión "composición inmunógena" se refiere a una composición que comprende al menos un antígeno, que provoca una respuesta inmunitaria en el huésped al que se le administra la composición inmunógena. La respuesta inmunológica puede ser una respuesta inmunitaria celular y/o mediada por anticuerpos, a la composición inmunógena de la invención. Preferentemente, la composición inmunógena induce una respuesta inmunitaria y, con mayor preferencia, confiere inmunidad protectora contra uno o más de los signos clínicos de una infección por IBV. El huésped también se describe como "sujeto". Preferentemente, cualquiera de los huéspedes o sujetos descritos o mencionados en la presente es un ave o un ave de corral.

[00178] En general, una "respuesta inmunitaria" incluye, por ejemplo, uno o más de los siguientes efectos: la producción o activación de anticuerpos, linfocitos B,

linfocitos T colaboradores, linfocitos T supresores y/o linfocitos T citotóxicos y/o linfocitos T gamma-delta, dirigidos específicamente a un antígeno o antígenos incluidos en la composición inmunógena de la invención. Preferentemente, el huésped mostrará una respuesta inmunitaria protectora o una respuesta terapéutica.

[00179] Una "respuesta inmunitaria protectora" o "inmunidad protectora" se manifestará mediante una reducción o ausencia de los signos clínicos que generalmente exhibe un huésped infectado, un tiempo de recuperación más corto y/o una menor duración de la infectividad o un menor título de patógeno en los tejidos, fluidos corporales o excreciones del huésped infectado.

[00180] Cuando el huésped muestra una respuesta inmunitaria protectora tal que se mejora la resistencia a una nueva infección y/o se reduce la gravedad clínica de la enfermedad, la composición inmunógena se describe como una "vacuna".

[00181] Las expresiones "virus vivo modificado" y "atenuado" se usan de manera indistinta en la presente.

[00182] En otro aspecto específico de la composición inmunógena o vacuna de acuerdo con la presente invención, la composición inmunógena o vacuna comprende un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

[00183] La expresión "portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico" incluye cualquier solvente, medio de dispersión, recubrimiento, agente estabilizante, diluyente, conservante, agente antibacteriano y antifúngico, agente isotónico, agente de retraso de la adsorción, adyuvante, estimulante inmunitario y combinaciones de estos.

[00184] Los "diluyentes" pueden incluir agua, solución salina, dextrosa, etanol, glicerol y similares. Los agentes isotónicos pueden incluir cloruro de sodio, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa, entre otros. Los estabilizantes incluyen albúmina y sales alcalinas de ácido etilendiamintetracético, entre otros.

[00185] En otro aspecto específico de la composición inmunógena o vacuna de acuerdo con la presente invención, el portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico es solución salina amortiguada con fosfato.

[00186] Preferentemente, la composición inmunógena comprende también estabilizante de gelatina de sacarosa.

[00187] Preferentemente, el portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico es quitosano.

[00188] Quitosano es un polisacárido desacetilado natural de la quitina en crustáceos (por ejemplo, camarón, cangrejo), insectos, y otros invertebrados.

Recientemente, Rauw *et al.* 2009 (Vet Immunol Immunop 134:249–258) demostraron que el quitosano mejoró la respuesta inmunitaria celular de la vacuna de la enfermedad viva de Newcastle y promovió su efecto protector. Además, Wang *et al.*, 2012 (Arch Virol (2012) 157:1451–1461) mostraron resultados que revelan el potencial de quitosano como un adyuvante para el uso de la vacuna de influenza atenuada viva.

[00189] Preferentemente, la composición inmunógena además puede incluir uno o más agentes inmunomoduladores distintos tales como, por ejemplo, interleucinas, interferones, u otras citocinas. Las cantidades y concentraciones de adyuvantes y aditivos útiles en el contexto de la presente invención pueden ser determinadas fácilmente por una persona del oficio de nivel medio.

[00190] En algunos aspectos, la composición inmunógena de la presente invención contiene un adyuvante. Como se usa en la presente, el término “adyuvantes” puede incluir hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio, saponinas, por ejemplo, Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL), emulsiones de agua en aceite, emulsiones de aceite en agua y emulsiones de agua en aceite en agua. En particular, la emulsión puede ser a base de aceite ligero de parafina líquida (tipo Farmacopea Europea); aceite de isoprenoide, tal como escualano o escualeno; aceite obtenido de la oligomerización de alquenos, en particular, isobuteno o deceno, ésteres de ácidos o de alcoholes que contienen un grupo alquilo lineal, más en particular, aceites vegetales, oleato de etilo, propilenglicol di-(caprilato/caprato), gliceril tri-(caprilato/caprato) de glicerol o propilenglicol dioleato; ésteres de alcoholes o ácidos grasos ramificados, en particular, ésteres de ácido isoesteárico. El aceite se usa en combinación con emulgentes para formar la emulsión. Preferentemente, los emulgentes son tensioactivos no iónicos, en particular, ésteres de sorbitán, de manida (por ejemplo, oleato de anhidromanitol), de glicol, de poliglicerol, de propilenglicol y de ácido oleico, isosterárico, ricinoleico o hidroxiesteárico, que opcionalmente son etoxilados, y bloques de copolímeros de polioxipropileno-polioxietileno, en particular, los productos de Pluronic, en especial, L121. Ver Hunter *et al.*, The Theory and Practical Application of Adjuvants (Ed. Stewart-Tull, D. E. S.), JohnWiley and Sons, NY, pp. 51-94 (1995) y Todd *et al.*, Vaccine 15:564-570 (1997). Los ejemplos de adyuvantes son la emulsión SPT descrita en la página 147 de “Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach” editado por M. Powell y M. Newman, Plenum Press, 1995, y la emulsión MF59 descrita en la página 183 del mismo libro.

[00191] Otro ejemplo de un adyuvante es un compuesto seleccionado de los

polímeros de ácido acrílico o metacrílico y los copolímeros de anhídrido maleico y derivados de alqueno. Los compuestos adyuvantes convenientes son los polímeros de ácido acrílico o metacrílico que se reticular, en especial, con éteres de polialqueno de azúcares o polialcoholes. Estos compuestos se conocen con el término carbómero (Pharmeuropa vol. 8, N.º 2, junio de 1996). Las personas del oficio de nivel medio también pueden remitirse a la patente estadounidense N.º 2.909.462, que describe dichos polímeros acrílicos reticulados con un compuesto polihidroxiado que tiene al menos 3 grupos hidroxilo, preferentemente, no más de 8; los átomos de hidrógeno de al menos 3 hidroxilos se reemplazan por radicales alifáticos insaturados que tienen al menos 2 átomos de carbono. Los radicales preferidos son los que contienen de 2 a 4 átomos de carbono, por ejemplo, vinilos, alilos y otros grupos etilénicamente insaturados. Los radicales insaturados pueden contener en sí mismos otros sustituyentes, tales como metilo. Son particularmente adecuados los productos comercializados con el nombre Carbopol; (BF Goodrich, Ohio, EEUU). Se reticular con una sacarosa de alilo o con pentaeritritol de alilo. Entre ellos, se pueden mencionar Carbopol 974P, 934P y 971P. Es de máxima preferencia el uso de Carbopol 971P. Entre los copolímeros de anhídrido maleico y derivados de alqueno, se encuentran los copolímeros EMA (Monsanto), que son copolímeros de anhídrido maleico y etileno. La disolución de estos polímeros en agua genera una solución ácida que se neutraliza, preferentemente, a un pH fisiológico, a fin de obtener la solución adyuvante en la que se incorporará la composición inmunógena, inmunitaria o vacunal.

[00192] Otros adyuvantes adecuados incluyen, entre otros, el sistema de adyuvantes RIBI (Ribi Inc.), copolímero en bloque (CytRx, Atlanta GA), SAF-M (Chiron, Emeryville CA), lípido A monofosforilo, adyuvante de lípido-amina Avridine, enterotoxina termolábil de *E. coli* (recombinante u otra), toxina del cólera, IMS 1314 o dipéptido de muramilo, o citocinas naturales o recombinantes, o análogos de estas, o estimulantes de liberación de citocina endógena, entre muchos otros.

[00193] Se prevé la adición de un adyuvante en una cantidad de alrededor de 100 µg a alrededor de 10 mg por dosis, preferentemente, en una cantidad de alrededor de 100 µg a alrededor de 10 mg por dosis, con mayor preferencia, en una cantidad de alrededor de 500 µg a alrededor de 5 mg por dosis, aun con mayor preferencia, en una cantidad de alrededor de 750 µg a alrededor de 2,5 mg por dosis y, con máxima preferencia, en una cantidad de alrededor de 1 mg por dosis. De manera alternativa, el adyuvante puede estar en una concentración de alrededor de 0,01 a 50 %, preferentemente, una concentración de alrededor de 2 % a 30 %, con mayor

preferencia, una concentración de alrededor de 5 % a 25 %, aun con mayor preferencia, una concentración de alrededor de 7 % a 22 % y, con máxima preferencia, una concentración de 10 % a 20 % en volumen del producto final.

[00194] En otro aspecto específico de la composición inmunógena o vacuna de acuerdo con la presente invención, la composición inmunógena o vacuna es eficaz para el tratamiento y/o la profilaxis de signos clínicos generados por IBV en un sujeto que lo necesita. Las expresiones “tratamiento y/o profilaxis”, “signos clínicos” y “que lo necesita” se definen en otra parte en la presente.

[00195] En otro aspecto específico de la composición inmunógena o vacuna de acuerdo con la presente invención, dicha composición inmunógena o vacuna se formula para una administración de dosis única.

[00196] El volumen de una dosis única se define en otra parte en la presente.

[00197] Asimismo, se ha demostrado que una dosis de la composición inmunógena de la presente invención es eficaz después de la administración de dicha dosis única de dicha composición inmunógena o vacuna.

[00198] En otro aspecto específico de la composición inmunógena o vacuna de acuerdo con la presente invención, la composición inmunógena o vacuna se administra por vía subcutánea, intramuscular, oral, *in ovo*, por pulverización, mediante agua potable o por medio de gotas oculares.

[00199] En otro aspecto específico de la composición inmunógena o vacuna de acuerdo con la presente invención, la composición inmunógena o vacuna comprende 1 a $10 \log_{10}$ EID50 por dosis de IBV.

[00200] En otro aspecto específico de la composición inmunógena o vacuna de acuerdo con la presente invención, la composición inmunógena o vacuna comprende 2 a $5 \log_{10}$ EID50 por dosis de IBV.

[00201] En otro aspecto específico de la composición inmunógena o vacuna de acuerdo con la presente invención, la composición inmunógena o vacuna comprende 2 a $4 \log_{10}$ EID50 por dosis de IBV.

Método para elaborar, cultivo y modificación

[00202] Además, la presente invención proporciona un método para alterar el tropismo celular o tisular de un coronavirus aviar que comprende el uso de la proteína de espícula de coronavirus aviar o fragmento de esta como se describe en la presente.

[00203] Además, la presente invención proporciona un método para extender el tropismo celular o tisular de un coronavirus aviar que comprende el uso de la proteína de espícula de coronavirus aviar o fragmento de esta como se describe en la presente.

[00204] Además, la presente invención proporciona un método para la producción o elaboración de un coronavirus aviar con un tropismo celular o tisular extendido que comprende el uso de la proteína de espícula de coronavirus aviar o fragmento de esta como se describe en la presente.

[00205] Además, la presente invención proporciona un método para cultivar un coronavirus aviar en un cultivo celular o tisular que comprende el uso de la proteína de espícula de coronavirus aviar o fragmento de esta como se describe en la presente.

[00206] Además, la presente invención proporciona un método para modificar un coronavirus aviar que comprende modificar la posición de aminoácido 267 en la proteína de espícula de dicho coronavirus aviar.

[00207] Además, la presente invención proporciona un método para mutar la posición de aminoácido 267 en una proteína de espícula de coronavirus aviar que comprende:

- a) proporcionar una secuencia de proteínas o nucleótidos de espícula de coronavirus aviar,
- b) identificar la posición 267 en la proteína de espícula mediante la alineación con una secuencia de referencia,
- c) mutar la posición 267 de la proteína de espícula de la Etapa b) en una cisteína,
- d) obtener la proteína de espícula mutada de la Etapa c).

[00208] Además, la presente invención proporciona un método para mutar la posición de aminoácido 267 en una proteína de espícula de coronavirus aviar de un coronavirus aviar que comprende:

- a) proporcionar un coronavirus aviar,
- b) identificar la posición 267 en la proteína de espícula mediante la alineación con una secuencia de referencia,
- c) mutar la posición 267 de la proteína de espícula de la Etapa b) en una cisteína,
- d) obtener el coronavirus aviar mutado de la Etapa c).

[00209] El término “obtención” comprende la recolección, el aislamiento, la purificación y/o la formulación (por ejemplo, finalización, inactivación y/o mezcla) de dicha proteína de espícula o fragmento de esta. El término “recolectar” se refiere a recolectar o recuperar dicho coronavirus aviar o IBV con la proteína de espícula modificada de la célula transfectada o infectada o línea celular. Se puede usar cualquier método convencional conocido en el estado de la técnica, por ejemplo,

cualquier método de separación. Los métodos conocidos en el estado de la técnica comprenden la centrifugación o filtración, por ejemplo, usando una membrana semipermeable que tiene un cierto tamaño de poro. El término “aislamiento” comprende una etapa de aislamiento de dicho coronavirus aviar o IBV con la proteína de espícula modificada. Los métodos para el aislamiento de las células transfectadas o infectadas o la línea celular son conocidos por la persona del oficio de nivel medio. Estos métodos comprenden métodos físicos y/o químicos, que incluyen, entre otros, ciclos de congelación-descongelación, tratamiento con ultrasonido y similares. Los métodos para la “purificación” de dicho coronavirus aviar o IBV con la proteína de espícula modificada del aislado son conocidos por la persona del oficio de nivel medio, por ejemplo, mediante aquellos métodos descritos en *Protein purification methods - a practical approach* (E.L.V. Harris y S. Angel, eds., IRL Press at Oxford University Press). Estos métodos incluyen, entre otros, separación mediante centrifugación y/o filtración, precipitación, cromatografía de exclusión por tamaño (filtración en gel), cromatografía por afinidad, cromatografía con quelatos metálicos, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía covalente, cromatografía de interacción hidrófoba y similares. El vector se puede obtener en una forma pura purificada, o libre o sustancialmente libre de otros materiales celulares o medio de cultivo, etc. Después del aislamiento y/o de la purificación, el antígeno exhibe una pureza de al menos 80 %, preferentemente, 80 %-90 %, con mayor preferencia, 90 %-97 %, con máxima preferencia, más de 97 % hasta una forma pura absoluta sin ninguna contaminación.

[00210] De acuerdo con otro aspecto, como se usa en la presente, “obtención” también puede incluir otras etapas de finalización como parte del proceso de formulación final, por ejemplo, la adición de amortiguadores, inactivación, etapas de neutralización y similares.

[00211] En otro aspecto específico del método, de acuerdo con la presente invención, la proteína de espícula o fragmento de esta tiene una posición de aminoácido 267 en cisteína.

[00212] En otro aspecto específico del método, de acuerdo con la presente invención, la cisteína en la posición de aminoácido 267 se introduce a través de una mutación.

[00213] En otro aspecto específico del método, de acuerdo con la presente invención, la mutación es una sustitución, eliminación o inserción de aminoácidos.

[00214] En otro aspecto específico del método, de acuerdo con la presente invención, una fenilalanina o leucina se modifica o se muta en una cisteína en la

posición de aminoácido 267.

[00215] En otro aspecto específico del método, de acuerdo con la presente invención, el coronavirus aviar es un IBV como se describe en la presente.

De este modo, la presente invención proporciona un método para alterar el tropismo celular o tisular de un IBV que comprende el uso de la proteína de espícula de coronavirus aviar o fragmento de esta como se describe en la presente.

De este modo, la presente invención proporciona un método para extender el tropismo celular o tisular de un IBV que comprende el uso de la proteína de espícula de IBV o un fragmento de esta como se describe en la presente.

De este modo, la presente invención proporciona un método para la producción o elaboración de un IBV con un tropismo celular o tisular extendido que comprende el uso de la proteína de espícula de IBV o un fragmento de esta como se describe en la presente.

De este modo, la presente invención proporciona un método para cultivar un IBV en un cultivo celular o tisular que comprende el uso de la proteína de espícula de IBV o un fragmento de esta como se describe en la presente.

De este modo, la presente invención proporciona un método para modificar un IBV que comprende modificar la posición de aminoácido 267 en la proteína de espícula de dicho IBV.

De este modo, la presente invención proporciona un método para mutar la posición de aminoácido 267 en una proteína de espícula de IBV que comprende:

- a) proporcionar una secuencia de proteínas o nucleótidos de espícula de IBV,
- b) identificar la posición 267 en la proteína de espícula mediante la alineación con una secuencia de referencia,
- c) mutar la posición 267 de la proteína de espícula de la Etapa b) en una cisteína,
- d) obtener la proteína de espícula mutada de la Etapa c).

De este modo, la presente invención proporciona un método para mutar la posición de aminoácido 267 en una proteína de espícula de IBV de un IBV que comprende:

- a) proporcionar un IBV,
- b) identificar la posición 267 en la proteína de espícula mediante la alineación con una secuencia de referencia,
- c) mutar la posición 267 de la proteína de espícula de la Etapa b) en una cisteína,

d) obtener el IBV mutado de la Etapa c).

[00216] En otro aspecto específico del método, de acuerdo con la presente invención, la proteína de espícula de coronavirus es una proteína de espícula de IBV (virus de bronquitis infecciosa) como se describe en la presente.

[00217] En otro aspecto específico del método, de acuerdo con la presente invención, la cisteína en la posición de aminoácido 267 o dicha mutación en la posición de aminoácido 267 en cisteína produce un tropismo celular o tisular extendido.

[00218] En otro aspecto específico del método, de acuerdo con la presente invención, el coronavirus aviar o IBV se infecta y/o se replica en una línea celular o célula como se describe en la presente.

[00219] En otro aspecto específico del método, de acuerdo con la presente invención, la numeración de la posición de aminoácido 267 se realiza como se describe en la presente.

Kits

[00220] Si se desea, la composición se puede presentar en un envase o dispositivo dosificador que puede contener una o más formas de dosis unitarias que contienen el ingrediente activo. Por ejemplo, el envase puede comprender una lámina de metal o de plástico, tal como un blíster. El envase o el dispositivo dosificador pueden tener instrucciones para la administración, preferentemente, para la administración a sujetos, en especial, a un ave de corral. Asociado al recipiente, puede haber un aviso prescrito por una agencia gubernamental que regula la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos o biológicos, en donde el aviso contiene la aprobación de la agencia de fabricar, usar o vender para la administración.

[00221] La presente invención proporciona un kit que comprende la partícula viral, el coronavirus aviar, el IBV, la composición inmunógena o vacuna como se describe en la presente.

[00222] En un aspecto específico del kit de acuerdo con la presente invención, el kit también comprende una nota de instrucciones para el tratamiento y/o la profilaxis de enfermedades aviares o una nota de instrucciones para el tratamiento y/o la profilaxis de enfermedades de aves de corral o una nota de instrucciones para el tratamiento y/o la profilaxis de IB.

[00223] En un aspecto específico del kit de acuerdo con la presente invención, el kit también comprende un dosificador que puede administrar una vacuna a dicho animal.

Método de tratamiento

[00224] La presente invención también proporciona un método para inmunizar un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto una composición inmunógena como se describe en la presente.

[00225] El término "inmunizar" se refiere a la inmunización activa mediante la administración de una composición inmunógena a un sujeto que se inmunizará, lo cual genera una respuesta inmunitaria contra el antígeno incluido en la composición inmunógena.

[00226] Preferentemente, la inmunización provoca una disminución de la incidencia de la infección por coronavirus aviar o IBV particular en un averío o una reducción de la gravedad de los signos clínicos causados por la infección por coronavirus aviar o IBV particular o asociados a ella.

[00227] Además, la inmunización de un sujeto que lo necesita con las composiciones inmunógenas proporcionadas en la presente, da como resultado la prevención de la infección de un sujeto por infección por coronavirus aviar o IBV. Aun con mayor preferencia, la inmunización provoca una respuesta inmunológica duradera y eficaz contra la infección por IBV. Cabe destacar que este período durará más de 1 mes, preferentemente, más de 2 meses, preferentemente, más de 3 meses, con mayor preferencia, más de 4 meses, con mayor preferencia, más de 5 meses, con mayor preferencia, más de 6 meses. Cabe destacar que la inmunización puede no ser eficaz en todos los sujetos inmunizados. Sin embargo, el término requiere que una porción considerable de sujetos de un averío sean inmunizados eficazmente.

[00228] Con preferencia, en este contexto, se prevé un averío de sujetos que normalmente, es decir, sin inmunización, desarrollaría signos clínicos generalmente causados por una infección por coronavirus aviar o IBV o asociados a ella. Una persona del oficio de nivel medio puede determinar fácilmente si los sujetos de un averío están eficazmente inmunizados. Preferentemente, la inmunización será eficaz si la incidencia o gravedad de los signos clínicos en al menos 33 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, aun con mayor preferencia, al menos 95 % y, con máxima preferencia, 100 % de los sujetos de un averío determinada disminuyen en al menos 10 %, con mayor preferencia, al menos 20 %, aun con mayor preferencia, al menos 30 %, aun con mayor preferencia, al menos 40 %, aun con mayor preferencia, al menos 50 %, aun con mayor preferencia, al menos 60 %, aun con mayor preferencia, al menos 70 %, aun con mayor preferencia, al menos 80 %, aun con mayor preferencia, al menos 90 %, aun con mayor preferencia, al menos 95 % y, con máxima preferencia, 100 % en comparación

con los sujetos no inmunizados o inmunizados con una composición inmunógena que estaba disponible antes de la presente invención, pero que posteriormente fueron infectados por el coronavirus aviar o IBV particular.

[00229] Además, la presente invención proporciona un método para tratar o prevenir signos clínicos causados por un IBV en un sujeto que lo necesita, en donde el método comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición inmunógena o vacuna como se describe en la presente.

[00230] Como se muestra en los ejemplos, se demostró que la composición inmunógena o vacuna proporcionada en la presente es eficaz para tratar o prevenir signos clínicos causados por IBV en un sujeto. Por lo tanto, los datos experimentales muestran que la modificación del aminoácido en la posición de aminoácido 267 en una cisteína no tiene ningún impacto en la eficacia de la vacuna.

[00231] La expresión "tratar o prevenir" se refiere a disminuir la incidencia de la infección por IBV particular en un averío o a reducir la gravedad de los signos clínicos causados por la infección por IBV particular o asociados a ella. De este modo, la expresión "tratar o prevenir" también se refiere a la reducción de la cantidad de sujetos en un averío que se infectan por el IBV en particular (= disminución de la incidencia de la infección por IBV particular) o a la reducción de la gravedad de signos clínicos asociados normalmente a o causados por una infección por IBV o a la reducción de la diseminación del virus después de la infección por IBV particular o a la prevención o disminución de descenso de puesta en gallinas ponedoras después de la infección por IBV particular en un grupo de sujetos que recibieron una cantidad eficaz de la composición inmunógena que se proporciona en la presente en comparación con un grupo de sujetos que no recibieron dicha composición inmunógena.

[00232] En general, "tratar y/o prevenir" incluye la administración de una cantidad eficaz de la composición inmunógena de la presente invención a un sujeto o un averío de sujetos que la necesita o que podría beneficiarse del tratamiento/profilaxis. El término "tratamiento" se refiere a la administración de una cantidad eficaz de la composición inmunógena una vez que el sujeto o al menos algunos sujetos del averío ya están infectados por IBV, y en donde estos sujetos ya muestran algunos signos clínicos causados o asociados a la infección por IBV. El término "profilaxis" se refiere a la administración de un sujeto antes de que sea infectado por IBV o al menos cuando el sujeto o ninguno de los sujetos en un grupo de sujetos muestra signos clínicos causados o asociados a la infección por IBV. Los términos "profilaxis" y "prevención" se usan de manera indistinta en la presente

solicitud.

[00233] Como se usa en la presente, la expresión "una cantidad eficaz" significa, por ejemplo, una cantidad de antígeno que provoca o es capaz de provocar una respuesta inmunitaria en un sujeto. La cantidad eficaz puede disminuir la incidencia de la infección por IBV particular en un ave o reducir la gravedad de los signos clínicos de la infección por IBV particular.

[00234] Preferentemente, la incidencia o gravedad de los signos clínicos disminuyen en al menos 10 %, con mayor preferencia, al menos 20 %, aun con mayor preferencia, al menos 30 %, aun con mayor preferencia, al menos 40 %, aun con mayor preferencia, al menos 50 %, aun con mayor preferencia, al menos 60 %, aun con mayor preferencia, al menos 70 %, aun con mayor preferencia, al menos 80 %, aun con mayor preferencia, al menos 90 %, aun con mayor preferencia, al menos 95 % y con máxima preferencia, 100 % en comparación con los sujetos no tratados o tratados con una composición inmunógena que estaba disponible antes de la presente invención, pero que posteriormente fueron infectados por IBV particular.

[00235] Como se usa en la presente, la expresión "signos clínicos" se refiere a signos de una infección en un sujeto causada por IBV. Los signos clínicos de la infección dependen del patógeno seleccionado. Los ejemplos de dichos signos clínicos incluyen, entre otros, dificultad respiratoria, nefritis, salpingitis, producción anormal de huevos, plumas erizadas, depresión, tasas de crecimiento reducidas y pérdida del apetito. Los signos de dificultad respiratoria incluyen jadeo, tos, estornudo, estertores traqueales, secreción nasal y ocular, lesiones traqueales y ciliostasis traqueal. Los signos de nefritis incluyen lesiones renales y diarrea líquida. Los signos de producción anormal de huevos incluyen descenso de puesta, huevos de menor tamaño, cáscara inferior, calidad interna del huevo reducida, huevos con albúmina fina, y ciliostasis en el oviducto. Sin embargo, los signos clínicos también incluyen, entre otros, los signos clínicos que se pueden observar directamente en un animal vivo. Los ejemplos signos clínicos que se pueden observar directamente en un animal vivo incluyen secreción nasal y ocular, tos, jadeo, estornudo, estertores traqueales, conjuntivitis, pérdida de peso, tasas de crecimiento reducidas, pérdida del apetito, deshidratación, diarrea líquida, cojera, letargo, desmedro y deterioro del aspecto físico y similares.

[00236] Preferentemente, los signos clínicos que se redujeron en incidencia o gravedad en un sujeto tratado en comparación con sujetos no tratados o tratados con una composición inmunógena que estuvo disponible antes de la presente invención, pero infectados posteriormente por IBV particular, se refieren a una reducción de

ciliostasis, una reducción de estertores, una reducción de descenso de puesta, una reducción de lesiones renales, una reducción de diarrea líquida, una reducción en la pérdida de peso, una menor carga viral, una diseminación viral reducida, o combinaciones de estas.

[00237] Como se usa en la presente, la expresión “que lo necesita” significa que la administración/el tratamiento está asociado al refuerzo o a la mejora de la salud o los signos clínicos o cualquier otro efecto medicinal positivo en la salud de los sujetos que reciben la composición inmunógena de acuerdo con la presente invención.

[00238] Además, la presente invención proporciona un método para reducir la ciliostasis en un sujeto que lo necesita, en comparación con un sujeto de un grupo de control no inmunizado de la misma especie, en donde el método comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición o vacuna inmunógena descrita en la presente.

[00239] Como se muestra en los ejemplos, se demostró que la composición inmunógena o vacuna proporcionada en la presente es eficaz para reducir la ciliostasis.

[00240] El término “ciliostasis” se refiere a un movimiento reducido de los cilios en la tráquea. De este modo, la ciliostasis se puede determinar examinando el recubrimiento interno de los anillos traqueales para el movimiento de los cilios. Una persona del oficio de nivel medio sabe cómo determinar el movimiento de los cilios en la tráquea.

[00241] Preferentemente, el movimiento de los cilios no se reduce a partir del Día 10 después de la exposición o infección, con mayor preferencia, a partir del Día 5 después de la exposición o infección, con mayor preferencia, a partir del Día 4 después de la exposición o infección, con mayor preferencia, a partir del Día 3 después de la exposición o infección y con máxima preferencia, a partir del Día 1 o 2 después de la exposición o infección por IBV en comparación con un sujeto de un grupo de control no inmunizado de la misma especie.

[00242] El término “reducción de ciliostasis” significa que la ciliostasis se reduce en al menos 10 %, preferentemente, en al menos 20 %, con mayor preferencia, en al menos 30 %, aun con mayor preferencia, en al menos 40 %, aun con mayor preferencia, en al menos 50 %, aun con mayor preferencia, en al menos 60 %, aun con mayor preferencia, en al menos 70 %, aun con mayor preferencia, en al menos 80 %, aun con mayor preferencia, en al menos 90 %, aun con mayor preferencia, en al menos 95 %, y con máxima preferencia en 100 %, en comparación con un sujeto de

un grupo de control no inmunizado de la misma especie. Una persona del oficio de nivel medio sabe cómo medir la reducción de la ciliostasis.

[00243] Además, la presente invención proporciona la composición inmunógena o vacuna como se describe en la presente para usar en un método para inmunizar a un sujeto, en donde el método comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha composición inmunógena o vacuna.

[00244] Además, la presente invención proporciona la composición inmunógena o vacuna descrita en la presente para usar en un método para tratar o prevenir signos clínicos causados por IBV en un sujeto que lo necesita, en donde el método comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha composición inmunógena o vacuna.

[00245] Además, la presente invención proporciona la composición inmunógena o vacuna como se describe en la presente para usar en un método para reducir la ciliostasis en un sujeto que lo necesita, en comparación con un sujeto de un grupo de control no inmunizado de la misma especie, en donde el método comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha composición inmunógena o vacuna.

[00246] En un aspecto específico del método o uso de acuerdo con la presente invención, dicho sujeto es un ave.

[00247] El término “aviar” es conocido por la persona del oficio de nivel medio. El término “aviar” abarca a todas las aves que incluyen aves de corral.

[00248] En un aspecto específico del método o uso de acuerdo con la presente invención, dicho sujeto es ave de corral.

[00249] La expresión “ave de corral” es conocida por la persona del oficio de nivel medio. La expresión “ave de corral” incluye gallinas, pavos, perdices, faisanes, gallinas de guinea, gansos, y patos. Además, el término “gallina” incluye pollos de engorde, gallinas ponedoras y los stock reproductores para ambos también se denominan reproductores.

[00250] En un aspecto específico del método o uso de acuerdo con la presente invención, dicho sujeto se selecciona de la lista que consiste en gallina, pavo, perdiz o faisán.

[00251] En un aspecto específico del método o uso de acuerdo con la presente invención, dicho sujeto es una gallina.

[00252] En un aspecto específico del método o uso de acuerdo con la presente invención, la composición inmunógena o vacuna se administra una vez.

[00253] Se entiende que una dosis única se administra una sola vez. Como se indica en los ejemplos, la composición inmunógena provista en la presente demostró ser eficaz después de la administración de una dosis única a un sujeto que la necesita.

[00254] El volumen de dosis por ave de corral depende de la vía de vacunación y de la edad del ave de corral.

[00255] Por lo general, las vacunas de gotas oculares se administran en un volumen de 1 a 100 µl por dosis en cualquier edad. Preferentemente, la dosis única para vacunas de gotas oculares tiene un volumen total de entre alrededor de 5 µl y 70 µl y, con mayor preferencia, de entre alrededor de 20 µl y 50 µl en donde se prefiere una dosis única de 20 µl, 25 µl, 30 µl, 35µl, 40 µl, 45 µl o 50 µl. Con máxima preferencia, la dosis única para vacunas de gotas oculares tiene un volumen total de entre alrededor de 30 µl y 50 µl en donde se prefiere una dosis única de 30 µl, 35 µl, 40 µl, 45 µl o 50 µl.

[00256] Las vacunas en aerosol pueden contener la dosis en un volumen de 25 a 1000 µl para aves de corral de 1 día de vida. Preferentemente, la dosis única para vacunas en aerosol tiene un volumen total de entre alrededor de 50 µl y 5000 µl, con mayor preferencia, de entre alrededor de 75 µl y 2000 µl, con mayor preferencia, de entre alrededor de 100 µl y 1000 µl, aun con mayor preferencia, de entre alrededor de 200 µl y 900 µl, aun con mayor preferencia, de entre alrededor de 300 µl y 800 µl y aun con mayor preferencia, de entre alrededor de 400 µl y 700 µl en donde se prefiere una dosis única de 400 µl, 425 µl, 450 µl, 475µl, 500 µl, 525 µl, 550 µl, 575 µl, 600 µl, 625 µl, 650µl, 675 µl o 700 µl. Con máxima preferencia, la dosis única tiene un volumen total de 400 µl, 450 µl 500 µl, 550 µl, 600 µl, 650 µl o 700 µl.

[00257] La vacuna para la vacunación *in ovo* puede contener la dosis en un volumen de 50 a 100 µl, preferentemente, 50 µl. Preferentemente, la dosis única para vacunas *in ovo* tiene un volumen total de entre alrededor de 10 µl y 250 µl, con mayor preferencia, de entre alrededor de 15 µl y 200 µl, aun con mayor preferencia, de entre alrededor de 20 µl y 150 µl, aun con mayor preferencia, de entre alrededor de 30 µl y 100 µl, aun con mayor preferencia, de entre alrededor de 30 µl y 75 µl y en donde se prefiere una dosis única de 30 µl, 35 µl, 40 µl, 45µl, 50 µl, 55 µl, 60 µl, 65 µl, 70 µl o 75 µl. Con máxima preferencia, la dosis única tiene un volumen total de 40 µl, 45 µl, 50 µl, 55 µl o 60 µl.

[00258] La vacuna para la vacunación intramuscular o subcutánea o una dosis de una vacuna mediante agua potable puede contener la dosis en un volumen de 30 µl a 1000 µl. Preferentemente, la dosis única tiene un volumen total de entre alrededor de

30 µl y 1000 µl, con mayor preferencia, de entre alrededor de 50 µl y 500 µl, con mayor preferencia, de entre alrededor de 75 µl y 250 µl y aun con mayor preferencia, de entre alrededor de 100 µl y 200 µl en donde una dosis única de 100 µl, 110µl, 120 µl, 125 µl, 130 µl, 135 µl, 140 µl, 145 µl, 150 µl, 160 µl, 170 µl, 175 µl, 180 µl, 190 µl, 155 µl, o 200 µl es de máxima preferencia.

[00259] En un aspecto específico del método o uso de acuerdo con la presente invención, la composición inmunógena o vacuna se administra en dos o más dosis.

[00260] Sin embargo, la composición inmunógena se puede administrar en dos o más dosis; la primera dosis se administra antes de una segunda dosis (refuerzo).

[00261] En un aspecto preferido del régimen de administración de dos veces, la primera y la segunda dosis de la composición inmunógena se administran en la misma cantidad. Preferentemente, cada dosis está en las cantidades preferidas especificadas anteriormente. Además del régimen con una primera y segunda dosis, una forma de realización alternativa también comprende dosis posteriores. Por ejemplo, en estos aspectos, se puede administrar una tercera, una cuarta o una quinta dosis. Preferentemente, los regímenes con una tercera, cuarta y quinta dosis posteriores se administran en la misma cantidad que la primera dosis; el lapso de tiempo entre las dosis debe ser coherente con el tiempo que transcurre entre la primera y la segunda dosis mencionadas anteriormente.

[00262] Preferentemente, la primera administración de la vacuna se lleva a cabo en las primeras tres semanas de vida, con mayor preferencia, en la primera semana de vida, y con máxima preferencia, en un día de vida mediante los métodos descritos a continuación. Se puede llevar a cabo una segunda administración dentro de las primeras 20 semanas de vida, preferentemente, dentro de las 16-18 semanas de vida, con mayor preferencia, entre 6-12 semanas de vida. Por ejemplo, la vacuna inicial (primera) se lleva a cabo a los 1-10 días de vida y la segunda vacuna (refuerzo) se lleva a cabo con una vacuna viva o inactivada a las 6-12 o 16-18 semanas de vida. Con mayor preferencia, la vacuna inicial (primera) se lleva a cabo a 1 día de vida y la segunda vacuna (refuerzo) se lleva a cabo con una vacuna viva o inactivada a las 6-12 o 16-18 semanas de vida.

[00263] En caso que se use vacunación *in ovo*, la primera administración se lleva a cabo preferentemente cuando los embriones tienen entre 15 a 19 días de vida, preferentemente, en el día 17, 18 o 19, con máxima preferencia, en el día 18 de vida. Se puede llevar a cabo una segunda administración dentro de las primeras tres semanas de vida, preferentemente dentro de los primeros 10 días de vida.

[00264] En un aspecto específico del método o el uso de acuerdo con la presente invención, dicha composición inmunógena o vacuna se administra por vía subcutánea, intramuscular, oral, *in ovo*, por pulverización, mediante agua potable o por medio de gotas oculares.

[00265] La composición inmunógena se administra, preferentemente, por vía tópica o sistémica. Las vías adecuadas de administración que se usan habitualmente son de administración oral o parenteral, tal como intranasal, intravenosa, intradérmica, transdérmica, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, así como por inhalación, *in ovo*, mediante pulverización, agua potable o por medio de gotas oculares. Sin embargo, según la naturaleza y el modo de acción de un compuesto, la composición inmunógena también se puede administrar por otras vías. Por ejemplo, estas otras vías incluyen la vía intracutánea, intravenosa, intravascular, intraarterial, intraperitoneal, intratecal, intratraqueal, intracutánea, intracardiaca, intralobulillar, intralobar, intramedular, intrapulmonar, intrarrectal e intravaginal. Sin embargo, la composición inmunógena de máxima preferencia se administra por vía subcutánea, intramuscular, oral, *in ovo*, mediante pulverización, agua potable o por medio de gotas oculares.

[00266] Las vacunas de IBV vivo se administran preferentemente de manera individual, por medio de gotas oculares, por vía intranasal, intramuscular o subcutánea.

[00267] Con mayor preferencia, se usan los métodos de aplicación en masa, que incluyen la vacunación mediante pulverización en aerosol y agua potable. También se prefiere el uso de vacunas como vacunas en embriones (las llamadas vacunas *in ovo*) como se describe más adelante.

[00268] Por ejemplo, se vacunará a los pollos de engorde al día uno de vida o a las 1-3 semanas de vida, en particular para los pollos de engorde con altos niveles de MDA. El stock ponedor o reproductor se puede vacunar inicialmente a los 1-10 días de vida y se puede dar un refuerzo de vacuna a las 7-12 o 16-18 semanas de vida.

Administración *in ovo*

[00269] Como se detalló anteriormente, la presente invención también proporciona una vacuna de IBV que se puede administrar de manera segura por vía *in ovo* y al mismo tiempo puede inducir una respuesta inmunitaria protectora. La administración *in ovo* es conocida por la persona del oficio de nivel medio y la persona del oficio de nivel medio puede llevar a cabo la administración *in ovo* con facilidad. La administración *in ovo* de la vacuna incluye la administración de la vacuna en un

embrión aviar mientras está contenido en el huevo (para una análisis sobre vacunación *in ovo* ver: Ricks *et al.*, Advances in Vet. Med. 495-515, 1999). La vacuna se puede administrar en cualquier compartimento adecuado del huevo (por ejemplo, fluido alantoideo, saco vitelino, amnios, cámara de aire o en el embrión) como se describe en el estado de la técnica (Sharma; Am. J. Vet. Res. 45 1619-1623, 1984). Preferentemente, la vacuna se administra por debajo de la membrana de la cáscara (cámara de aire) y la membrana corioalantoidea.

[00270] Preferentemente, la vacuna se inyecta en huevos embrionados durante las últimas etapas de la embrionación, en general, durante el último cuatrimestre del período de incubación, preferentemente, 3-4 días antes de la eclosión. Preferentemente, la administración se lleva a cabo cuando los embriones tienen entre 15 a 19 días de vida, preferentemente, en el día 17, 18 o 19, con máxima preferencia, en el día 18 de vida. Posteriormente, los huevos embrionados vacunados se transfieren a una incubadora para eclosión. El proceso de la administración *in ovo* se puede automatizar con un proceso de inyección robótica como se describe en el arte previo.

[00271] Las vacunas normalmente convencionales para la vacunación posterior a la eclosión de aves de corral no se pueden usar para la vacunación *in ovo*, dado que los embriones en última etapa son altamente susceptibles a la infección con la mayor parte de los virus de las vacunas examinados. Sin embargo, la solicitud de patente internacional WO 01/64244 divulga que las vacunas de IBV pueden usarse para la administración *in ovo* siempre que se apliquen en dosis muy bajas. Además, Wakenell *et al.* 1986 (Am. J. Vet. Res., 47 933-938) divulgaron que el pasaje de un virus de vacuna contra IB en el cultivo tisular representa el virus apatógeno para embriones.

[00272] En un aspecto específico del método o uso de acuerdo con la presente invención, dicha composición inmunógena o vacuna se administra por medio de gotas oculares.

[00273] Normalmente, la vacuna viva para la administración posterior a la eclosión comprende el IBV atenuado en una concentración de 10^1 a 10^8 EID₅₀ (50 % de la dosis infecciosa en huevos) por dosis, preferentemente, en una concentración de 10^2 a 10^5 EID₅₀ por dosis y, con mayor preferencia, en una concentración de 10^2 a 10^4 EID₅₀ por dosis unitaria y, aun con mayor preferencia, en una concentración de 10^2 a 10^3 EID₅₀ por dosis.

[00274] La vacuna viva para la administración *in ovo* comprende normalmente una cantidad del IBV atenuado de 10^2 a 10^7 EID₅₀ /embrión, preferentemente, 10^2 a

10^3 EID₅₀ /embrión en un volumen de 50 a 100 µl, preferentemente, 50 µl.

[00275] Preferentemente, la composición inmunógena de la presente invención comprende el IBV de la presente invención en cantidades de alrededor de 1 a alrededor de $10 \log_{10}$ EID (dosis infecciosa en huevos)₅₀/ml por dosis, preferentemente, alrededor de 2 a alrededor de $8 \log_{10}$ EID₅₀ por dosis, preferentemente, en una cantidad de alrededor de 2 a alrededor de $7 \log_{10}$ EID₅₀ por dosis, con mayor preferencia, en una cantidad de alrededor de 2 a alrededor de $6 \log_{10}$ EID₅₀ por dosis, aun con mayor preferencia, en una cantidad de alrededor de 2 a alrededor de $5 \log_{10}$ EID₅₀ por dosis, aun con mayor preferencia, en una cantidad de alrededor de 2 a alrededor de $4 \log_{10}$ EID₅₀ por dosis, con máxima preferencia, en una cantidad de alrededor de 2 a alrededor de $3 \log_{10}$ EID₅₀ por dosis. Con mayor preferencia, la composición inmunógena de la presente invención comprende el IBV de la presente invención en cantidades de alrededor de 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5 o $\log_{10}$ EID₅₀ por dosis.

[00276] En un aspecto específico del método o uso de acuerdo con la presente invención, la composición inmunógena o vacuna comprende 1 a $10 \log_{10}$ EID₅₀ por dosis del IBV.

[00277] En un aspecto específico del método o uso de acuerdo con la presente invención, la composición inmunógena o vacuna comprende 2 a $5 \log_{10}$ EID₅₀ por dosis del IBV.

[00278] En un aspecto específico del método o uso de acuerdo con la presente invención, la composición inmunógena o vacuna comprende 2 a $4 \log_{10}$ EID₅₀ por dosis del IBV.

[00279] En un aspecto específico del método o uso de acuerdo con la presente invención, la composición inmunógena o vacuna se administra a sujetos dentro de la primera semana de vida, dentro de los primeros tres días de vida, dentro de los primeros dos días de vida, o dentro del primer día de vida.

[00280] Preferentemente, el sujeto que se desea inmunizar tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 21 días de vida. Con mayor preferencia, dicho sujeto que se desea inmunizar tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 días de vida. Con máxima preferencia, dicho sujeto que se desea inmunizar tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días de vida.

[00281] Sin embargo, cabe destacar que después de la vacunación del sujeto que tiene algunos días de vida, se necesitan varios días para que el sistema inmunitario del ave de corral desarrolle inmunidad contra una infección por IBV. Por lo

tanto, preferentemente, los sujetos se inmunizan dentro de las primeras 24 horas de vida.

[00282] En un aspecto específico del método o uso de acuerdo con la presente invención, la composición inmunógena o vacuna se administra a sujetos dentro del primer día de vida. Como se muestra en los ejemplos, la composición inmunógena proporcionada en la presente demostró ser segura y eficaz cuando se administra a un ave de corral de 1 día de vida.

[00283] En un aspecto específico del método o uso de acuerdo con la presente invención, dicho método produce una mejora en un parámetro de eficacia seleccionado del grupo que consiste en: prevención o reducción de ciliostasis, prevención o reducción de estertores, prevención o reducción de descenso de puesta, prevención o reducción de lesiones renales, prevención o reducción de diarrea líquida, prevención o reducción de la pérdida de peso, menor carga viral, diseminación viral reducida o combinaciones de estos, en comparación con un sujeto de un grupo de control no tratado de la misma especie.

[00284] Las expresiones “tratamiento y/o profilaxis” se definieron en otra parte, en donde los términos “profilaxis” y “prevenir” o “prevención” se usan de forma indistinta en esta solicitud. Además, el término “diseminación” se definió también en otra parte.

[00285] El término “reducir”, “reducido”, “reducción” o “menor” significa que el parámetro de eficacia (ciliostasis, estertores, descenso de puesta, lesiones renales, diarrea líquida, pérdida de peso, carga viral, diseminación viral) se reduce en al menos 10 %, preferentemente, en al menos 20 %, con mayor preferencia, en al menos 30 %, aun con mayor preferencia, en al menos 40%, aun con mayor preferencia, en al menos 50 %, aun con mayor preferencia, en al menos 60 %, aun con mayor preferencia, en al menos 70 %, aun con mayor preferencia, en al menos 80 %, aun con mayor preferencia, en al menos 90 %, aun con mayor preferencia, en al menos 95 % y con máxima preferencia, en 100 % en comparación con un sujeto de un grupo de control no inmunizado de la misma especie. Una persona del oficio de nivel medio sabe cómo medir la mejora en los parámetros de eficacia.

[00286] La expresión “carga viral” o “título viral” es una medida de la gravedad de una infección viral activa, y se puede determinar mediante métodos conocidos por la persona del oficio de nivel medio. La expresión “título viral” es una medida de unidades infecciosas por volumen de una preparación de virus. El título viral es un criterio de valoración en un procedimiento biológico y se define como la dilución a la

cual una determinada proporción de pruebas realizadas en paralelo muestran un efecto (Reed and Muench, 1938). La determinación puede ser en función de la detección de proteínas virales, tal como mediante la fijación del anticuerpo a las proteínas virales y detección adicional o, de manera alternativa, mediante detección de ARN virales mediante métodos de amplificación, tales como RT-PCR. El control del ARN viral asociado al virión en plasma mediante métodos de amplificación de ácidos nucleicos es un parámetro usado ampliamente para evaluar el estado y la progresión de la enfermedad retroviral, y para evaluar la eficacia de intervenciones terapéuticas y profilácticas. Por ejemplo, la carga viral o el título viral se pueden calcular estimando la cantidad de virus vivo en un fluido corporal involucrado, tal como una cantidad de copias de ARN por mililitro de plasma en sangre.

[00287] La expresión “ciliostasis” es conocida por la persona del oficio de nivel medio. La superficie de la tráquea se cubre con células epiteliales especializadas, que se alinean con numerosas estructuras móviles similares al pelo denominadas cilios. El término “ciliostasis” incluye la reducción o la pérdida de cilios y/o la pérdida o pérdida parcial de actividad ciliar. La persona del oficio de nivel medio puede determinar fácilmente la ciliostasis.

[00288] El término “estertores” es conocido por la persona del oficio de nivel medio. Sin embargo, el término “estertores” incluye los estertores traqueales y se refiere a los sonidos que surgen de los bronquios. La persona del oficio de nivel medio puede determinar fácilmente los estertores.

[00289] La expresión “descenso de puesta” es conocida por la persona del oficio de nivel medio. La expresión “descenso de puesta” incluye un descenso en la producción de huevos.

[00290] En un aspecto específico del método o uso de acuerdo con la presente invención, el tratamiento o prevención produce una prevención o reducción de la ciliostasis en comparación con sujetos de un grupo de control no tratado de la misma especie

[00291] En un aspecto específico del método o uso de acuerdo con la presente invención, el tratamiento o prevención produce una prevención o reducción de lesiones renales en comparación con sujetos de un grupo de control no tratado de la misma especie.

[00292] En un aspecto específico del método o uso de acuerdo con la presente invención, el tratamiento o prevención produce una prevención o reducción de descenso de puesta en comparación con sujetos de un grupo de control no tratado de

la misma especie.

[00293] La presente invención también proporciona la partícula viral, el coronavirus aviar, el IBV, la composición inmunógena o vacuna como se describe en la presente para uso terapéutico.

[00294] La presente invención también proporciona la partícula viral, el coronavirus aviar, el IBV, la composición inmunógena o vacuna como se describe en la presente para usar como un inmunógeno o vacuna.

[00295] La presente invención también proporciona la partícula viral, el coronavirus aviar, el IBV, la composición inmunógena o vacuna como se describe en la presente para usar como un medicamento.

[00296] La presente invención también proporciona el use de la partícula viral, el coronavirus aviar, el IBV, la composición inmunógena o vacuna como se describe en la presente para la elaboración de un medicamento.

[00297] La presente invención también proporciona el use de la partícula viral, el coronavirus aviar, el IBV, la composición inmunógena o vacuna como se describe en la presente para el tratamiento y/o la profilaxis de infecciones por IBV en un sujeto.

CLÁUSULAS

En la presente también se describen las siguientes cláusulas:

1. Una proteína de espícula de coronavirus aviar o fragmento de esta, en donde al menos una parte de la subunidad S1 pertenece a un coronavirus aviar con un tropismo celular o tisular restringido, y en donde en la posición de aminoácido 267 se encuentra una cisteína.
2. Una proteína de espícula de coronavirus aviar recombinante o fragmento de esta que comprende una mutación en la posición de aminoácido 267 en cisteína.
3. Una proteína de espícula de IBV o fragmento de esta, en donde al menos una parte de la subunidad S1 pertenece a un IBV con un tropismo celular o tisular restringido, y en donde en la posición de aminoácido 267 se encuentra una cisteína.
4. Una proteína de espícula de IBV recombinante o fragmento de esta que comprende una mutación en la posición de aminoácido 267 en cisteína.

Mutación 267

5. La proteína de espícula de coronavirus aviar o IBV o fragmento de esta de la cláusula 1 o 3, en donde la cisteína en la posición de aminoácido 267 se introduce a través de una mutación.
6. La proteína de espícula de coronavirus aviar o IBV o fragmento de esta de la cláusula 2, 4 o 5, en donde la mutación es una sustitución, eliminación o inserción de

aminoácidos.

7. La proteína de espícula de coronavirus aviar o IBV o fragmento de esta de cualquiera de las cláusulas 2 y 4 a 6, en donde un aminoácido hidrófobo en la posición de aminoácido 267 se muta en una cisteína; o una fenilalanina o leucina en la posición de aminoácido 267 se muta en una cisteína.

Tropismo celular o tisular extendido

8. La proteína de espícula de coronavirus aviar o IBV o fragmento de esta de cualquiera de las cláusulas 1 a 7, en donde la cisteína en la posición de aminoácido 267 o dicha mutación en la posición de aminoácido 267 en cisteína produce un tropismo celular o tisular extendido del coronavirus aviar o IBV.

9. La proteína de espícula de coronavirus aviar o IBV o fragmento de esta de cualquiera de las cláusulas 1 a 8, en donde el coronavirus aviar o IBV infecta y/o se replica en al menos una línea celular o célula seleccionadas de la lista que consiste en: células primarias de embriones de pollo de pulmón o hígado o fibroblastos de gallina primarios, una línea celular de fibroblastos de embriones de pollo, una línea de células madre embrionarias de pato, una línea de células de riñón embrionario humano, una línea de células de riñón de hámster bebé, una línea de células de riñón de mono verde africano, una línea de células de riñón de conejo, una línea de células de riñón canino, una línea de células de hígado de gallina, una línea de células de riñón bovino, una línea de células de riñón porcino y una línea de células de insecto.

10. La proteína de espícula de coronavirus aviar o IBV o fragmento de esta de cualquiera de las cláusulas 1 a 9, en donde el coronavirus aviar o IBV infecta y/o se replica en al menos una línea celular seleccionada de la lista que consiste en: DF-1 (Douglas Foster), EB66 (línea de células madre embrionarias de pato), PBS-12, PBS-12SF (PBS-12 libre de suero), BHK21 (riñón de hámster bebé), HEK 293T (riñón embrionario humano), Vero (Verda Reno), MA104, RK13 (riñón de conejo), LMH (hepatoma de leghorn macho), MDCK (riñón canino Madin-Darby), MDBK (riñón bovino Madin-Darby), PK15 (riñón porcino), PK2A (riñón porcino), SF9, SF21 y SF+ (*Spodoptera frugiperda*).

11. La proteína de espícula de coronavirus aviar o IBV o fragmento de esta de cualquiera de las cláusulas 1 a 10, en donde el coronavirus aviar o IBV infecta y/o se replica en al menos una línea celular seleccionada de la lista que consiste en: DF-1, EB66, PBS-12, PBS-12SF, BHK, HEK 293T, Vero, MA104 y RK13.

Numeración de la posición de aminoácido 267

12. La proteína de espícula de coronavirus aviar o IBV o fragmento de esta de

cualquiera de las cláusulas 1 a 11, en donde la numeración de la posición de aminoácido 267 se refiere a la posición de aminoácido 267 en la proteína de espícula de un IBV H52, un IBV H120 o un M41.

13. La proteína de espícula de coronavirus aviar o IBV o fragmento de esta de cualquiera de las cláusulas 1 a 12, en donde la numeración de la posición de aminoácido 267 se refiere a la posición de aminoácido 267 en la proteína de espícula de un IBV H52.

14. La proteína de espícula de coronavirus aviar o IBV o fragmento de esta de cualquiera de las cláusulas 1 a 12, en donde la numeración de la posición de aminoácido 267 se refiere a la posición de aminoácido 267 en la proteína de espícula como, por ejemplo, en SEQ ID NO: 1.

15. La proteína de espícula de coronavirus aviar o IBV o fragmento de esta de cualquiera de las cláusulas 1 a 12, en donde la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 se usa para determinar la numeración de la posición en la proteína de espícula.

16. La proteína de espícula de coronavirus aviar o IBV o fragmento de esta de cualquiera de las cláusulas 1 a 12, en donde a fin de determinar la posición de aminoácido 267 en una proteína de espícula, la secuencia de aminoácidos se alinea con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

17. La proteína de espícula de coronavirus aviar o IBV o fragmento de esta de cualquiera de las cláusulas 1 a 16, en donde la posición de aminoácido 267 se encuentra dentro de la subunidad S1 de la proteína de espícula.

18. La proteína de espícula de coronavirus aviar o IBV o fragmento de esta de cualquiera de las cláusulas 1 a 17, en donde la proteína de espícula tiene uno o más de los siguientes aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en:

- 264 es una asparagina, y/o
- 265 es una treonina, y/o
- 269 es una leucina, y/o
- 271 es una asparagina, y/o
- 272 es una fenilalanina.

Espícula

19. La proteína de espícula de coronavirus aviar o fragmento de esta de cualquiera de las cláusulas 1 y 2 y 5 a 18, en donde la proteína de espícula de coronavirus aviar o fragmento de esta se selecciona del grupo que consiste en: virus de bronquitis infecciosa (IBV); coronavirus de la gallina de Guinea (GfCoV) y coronavirus del pavo (TCoV; virus de enteritis del pavo y virus de la enfermedad de la cresta azul).

20. La proteína de espícula de coronavirus aviar o fragmento de esta de cualquiera de las cláusulas 1 y 2 y 5 a 19, en donde el coronavirus aviar es IBV (virus de bronquitis infecciosa).
21. La proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de cualquiera de las cláusulas 3 a 20, en donde la proteína de espícula es de un IBV con un genotipo o serotipo o cepa seleccionada de una lista que consiste en: Arkansas (tal como Arkansas 99), Brazil (tal como BR-1, BR-2, 23/2013, IBV/Brasil/351/1984), California (tal como California 1734/04, California 99), Connecticut, Delaware (tal como Delaware 98), Dutch (tal como D207, D212, D274, D3128, D3896, D8880, D1466), Florida, Georgia (tal como Georgia GA-07, GA-08, GA-12, GA-13), Gray, Holte, Iowa (tal como Iowa 97 y Iowa 69), Italy 02, JMK, LDT3, Maine (tal como Maine 209), Massachusetts (tal como M41, H52, H120; excluyendo Beaudette), Pennsylvania (tal como Pennsylvania 1220/98, Pennsylvania Wolg/98), PL84084, Qu (tal como Qu-mv), QX (tal como GB341/96), Q1, SE 17, Variant 2 (tal como IS/1494/06, IBV/Ck/EG/CU/4/2014, gammaCoV/Ck/Poland/G052/2016) y 4/91 (793B, CR88).
22. La proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de cualquiera de las cláusulas 3 a 21, en donde la proteína de espícula no es de una cepa Beaudette.
23. La proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de cualquiera de las cláusulas 3 a 22, en donde la proteína de espícula o fragmento de esta es de un IBV seleccionado de una lista de genotipos o serotipos o cepas que consisten en Massachusetts (no Beaudette), 4/91, QX, Q1, Italy 02, Arkansas, Connecticut, Georgia, LDT3, PL84084, Variant 2 y Brazil.
24. La proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de cualquiera de las cláusulas 3 a 23, en donde la proteína de espícula o fragmento de esta es de un IBV seleccionado de una lista de genotipos o serotipos que consisten en Massachusetts (no Beaudette), 4/91, QX, Q1, Arkansas, Variant 2 y Brazil.
25. La proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de cualquiera de las cláusulas 3 a 24, en donde la proteína de espícula o fragmento de esta es de un IBV seleccionado de una lista de genotipos o serotipos que consiste en Massachusetts (no Beaudette) y 4/91.
26. La proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de la cláusula 24, en donde la cepa Massachusetts se selecciona de una lista que consiste en: H120, H52, Spain/98/308, IBMA5-1, SD/97/01, Spain/96/334 y M41-M21883.
27. La proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de la cláusula 24, en donde la cepa 4/91 se selecciona de una lista que consiste en: Spain/98/328, Spain/92/35,

IR-3654-VM, FR-CR88061-88, FR-85131-85, UK-1233-95, UK/3/91, Spain/00/336, UK/7/91, 4/91-patógena, 4/91 atenuada e IB4-91.

28. La proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de la cláusula 24, en donde la cepa QX se selecciona de una lista que consiste en: FR-L1450T-05, FR-L1450L-05, NL-L1449T-04, NL-L1449K-04, IBV/Ck/SP/170/09, IBV/Ck/SP/79/08, IBV/Ck/SP/248/09, HBN, IBVQX, LX4, BJQ, CK/CH/LGD/03, SP2013-01470, SP2013-014171, SP2013-01478 y GB341/96.

29. La proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de la cláusula 24, en donde la cepa Q1 se selecciona de una lista que consiste en: CK/CH/LDL/98I, CK/CH/LSD/08-10, J2, Q1, AR08ER22, AR08BA21, 12.185, 12.124, 12.216 y Chile-295-10.

30. La proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de la cláusula 24, en donde la cepa Arkansas se selecciona de una lista que consiste en: Ark99, ArkGA, ArkDPI, AL/5364/00, ARKDPI11, AL/0803/01, AL/7149/00, ArkDPI101, AL/1221/01, AL/1793/01 y AL/4614/98.

31. La proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de la cláusula 24, en donde la cepa Italy 02 se selecciona de una lista que contiene: Spain/99/316, Italy-02, UK-L633-04, It-497-02, Spain/05/866, Spain/04/221, Spain/00/337, Spain/155/09 y Spain/03/08.

32. La proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de la cláusula 24, en donde la cepa Variant 2 se selecciona de una lista que consiste en: IS/1494/06, IBV/Ck/EG/CU/4/2014, gammaCoV/Ck/Poland/G052/2016, Eg/CLEVB-2/IBV/012, D1344/2/4/10_EG, TR8 e IB VAR2-06.

33. La proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de la cláusula 24, en donde la cepa Brazil se selecciona de una lista que consiste en: BR-1, BR-2, 23/2013, e IBV/Brasil/351/1984.

34. La proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de cualquiera de las cláusulas 3 a 24, en donde la proteína de espícula o fragmento de esta es de un IBV de genotipo o serotipo Massachusetts (no Beaudette), 4/91 o QX.

35. La proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de cualquiera de las cláusulas 3 a 24, en donde la cepa de IBV es H52, H120, QX SP2013-01478 o CR88.

36. La proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de cualquiera de las cláusulas 3 a 35, en donde la proteína de espícula de IBV o un fragmento de esta consiste en o comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 77 o una secuencia que tiene al menos 80 %, 85 %, 90 %, 93

%, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 %, 99,95 %, 99,98 % o 99,99 % de identidad de secuencia con esta.

37. La proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de cualquiera de las cláusulas 3 a 36, en donde la proteína de espícula de IBV o un fragmento de esta se selecciona de una lista de genotipos que consiste en: GI-2 a 27, GII-1, GIII-1, GIV-1, GV-1, GVI-1.

38. La proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de cualquiera de las cláusulas 3 a 37, en donde la proteína de espícula o fragmento de esta no es de genotipo GI-1.

39. La proteína de espícula de coronavirus aviar o fragmento de esta de cualquiera de las cláusulas 1 y 5 a 38, en donde dicha al menos una parte de la subunidad S1 de un coronavirus aviar con un tropismo celular o tisular restringido se selecciona del grupo que consiste en: Virus de la bronquitis infecciosa (IBV); coronavirus de la gallina de Guinea (GfCoV) y coronavirus del pavo (TCoV; virus de enteritis del pavo y virus de la enfermedad de la cresta azul).

40. La proteína de espícula de coronavirus aviar o fragmento de esta de cualquiera de las cláusulas 1 y 5 a 38, en donde dicha al menos una parte de la subunidad S1 de un coronavirus aviar con un tropismo celular o tisular restringido es de IBV (virus de bronquitis infecciosa).

41. La proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de cualquiera de las cláusulas 3 y 5 a 40, en donde dicha al menos una parte de la subunidad S1 es de un IBV seleccionado de una lista de genotipos o serotipos o cepas que consisten en: Arkansas (tal como Arkansas 99), Brazil (tal como BR-1, BR-2, 23/2013, IBV/Brasil/351/1984), California (tal como California 1734/04, California 99), Connecticut, Delaware (tal como Delaware 98), Dutch (tal como D207, D212, D274, D3128, D3896, D8880, D1466), Florida, Georgia (tal como Georgia GA-07, GA-08, GA-12, GA-13), Gray, Holte, Iowa (tal como Iowa 97 y Iowa 69), Italy 02, JMK, LDT3, Maine (tal como Maine 209), Massachusetts (tal como M41, H52, H120; excluyendo Beaudette), Pennsylvania (tal como Pennsylvania 1220/98, Pennsylvania Wolg/98), PL84084, Qu (tal como Qu-mv), QX (tal como GB341/96), Q1, SE 17, Variant 2 (tal como IS/1494/06, IBV/Ck/EG/CU/4/2014, gammaCoV/Ck/Poland/G052/2016) y 4/91 (793B, CR88).

42. La proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de cualquiera de las cláusulas 3 y 5 a 41, en donde dicha al menos una parte de la subunidad S1 es de un IBV seleccionado de una lista de genotipos o serotipos o cepas que consisten en

Massachusetts (no Beaudette), 4/91, QX, Q1, Italy 02, Arkansas, Connecticut, Georgia, LDT3, PL84084, Variant 2 y Brazil.

43. La proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de cualquiera de las cláusulas 3 y 5 a 41, en donde dicha al menos una parte de la subunidad S1 es de un IBV seleccionado de una lista de genotipos o serotipos que consiste en Massachusetts, 4/91, QX, Q1, Arkansas, Variant 2 y Brazil.

44. La proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de la cláusula 43, en donde la cepa Massachusetts se selecciona de una lista que consiste en: H120, H52, Spain/98/308, IBMA5-1, SD/97/01, Spain/96/334 y M41-M21883.

45. La proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de la cláusula 43, en donde la cepa 4/91 se selecciona de una lista que consiste en: Spain/98/328, Spain/92/35, IR-3654-VM, FR-CR88061-88, FR-85131-85, UK-1233-95, UK/3/91, Spain/00/336, UK/7/91, 4/91-patógena, 4/91 atenuada e IB4-91.

46. La proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de la cláusula 43, en donde la cepa QX se selecciona de una lista que consiste en: FR-L1450T-05, FR-L1450L-05, NL-L1449T-04, NL-L1449K-04, IBV/Ck/SP/170/09, IBV/Ck/SP/79/08, IBV/Ck/SP/248/09, HBN, IBVQX, LX4, BJQ, CK/CH/LGD/03 y GB341/96.

47. La proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de la cláusula 43, en donde la cepa Q1 se selecciona de una lista que consiste en: CK/CH/LDL/98I, CK/CH/LSD/08-10, J2, Q1, AR08ER22, AR08BA21 y Chile-295-10.

48. La proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de la cláusula 43, en donde la cepa Arkansas se selecciona de una lista que consiste en: Ark99, ArkGA, ArkDPI, AL/5364/00, ARKDPI11, AL/0803/01, AL/7149/00, ArkDPI101, AL/1221/01, AL/1793/01 y AL/4614/98.

49. La proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de la cláusula 43, en donde la cepa Variant 2 se selecciona de una lista que consiste en: IS/1494/06, IBV/Ck/EG/CU/4/2014, gammaCoV/Ck/Poland/G052/2016, Eg/CLEVB-2/IBV/012, D1344/2/4/10_EG, TR8 e IB VAR2-06.

50. La proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de la cláusula 43, en donde la cepa Brazil se selecciona de una lista que consiste en: BR-1, BR-2, 23/2013 e IBV/Brasil/351/1984.

51. La proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de cualquiera de las cláusulas 3 y 5 a 43, en donde dicha al menos una parte de la subunidad S1 es de un IBV seleccionado de una lista de genotipos o serotipos que consiste en Massachusetts (no Beaudette), QX y 4/91.

52. La proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de cualquiera de las cláusulas 3 y 5 a 43, en donde dicha al menos una parte de la subunidad S1 es de una cepa H120, H52, QX SP2013-01478 o CR88 de IBV.

53. La proteína de espícula de coronavirus aviar o fragmento de esta de cualquiera de las cláusulas 1 y 3 y 5 a 52, en donde la al menos una parte de la subunidad S1 tiene al menos 1, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 o 500 aminoácidos contiguos de una secuencia de la subunidad S1 de un coronavirus aviar o IBV con un tropismo celular o tisular restringido o una secuencia que tiene al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de secuencia de identidad con esta.

54. La proteína de espícula de coronavirus aviar o IBV o fragmento de esta de cualquiera de las cláusulas 1 y 3 y 5 a 52, en donde la al menos una parte de la subunidad S1 tiene al menos 1, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 o 500 aminoácidos contiguos de una secuencia de la subunidad S1 de un coronavirus aviar o IBV de cualquiera de las cláusulas 36 a 50 o una secuencia que tiene al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad de secuencia con esta.

55. La proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de cualquiera de las cláusulas 3 y 5 a 52, en donde dicha al menos una parte de la subunidad S1 de un IBV con un tropismo celular o tisular restringido tiene al menos 1, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 o 500 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 77 o una secuencia que tiene al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad de secuencia con esta.

56. La proteína de espícula de coronavirus aviar o IBV o fragmento de esta de cualquiera de las cláusulas 1 y 3 y 5 a 55, en donde el coronavirus aviar o IBV con un tropismo celular o tisular restringido se restringe a una infección y/o replicación en huevos embrionados de gallina y/o células de riñón de gallina primarias.

57. La proteína de espícula de coronavirus aviar o IBV o fragmento de esta de cualquiera de las cláusulas 1 y 3 y 5 a 56, en donde el coronavirus aviar o IBV con un tropismo celular o tisular restringido no infecta y/o no se replica en células EB66.

58. La proteína de espícula de coronavirus aviar o IBV o fragmento de esta de cualquiera de las cláusulas 1 y 3 y 5 a 56, en donde el coronavirus aviar o IBV con un tropismo celular o tisular restringido no infecta y/o no se replica en células PBS-12 y/o HEK 293T.

Fragmento

59. La proteína de espícula de coronavirus aviar o IBV o fragmento de esta de cualquiera de las cláusulas 1 a 58, en donde el fragmento del coronavirus aviar o proteína de espícula de IBV tiene una longitud de al menos 500, 750, 1000 o 1077 aminoácidos.
60. La proteína de espícula de coronavirus aviar o IBV o fragmento de esta de cualquiera de las cláusulas 1 a 59, en donde el fragmento del coronavirus aviar o proteína de espícula de IBV tiene una longitud de al menos 1000 aminoácidos.
61. El coronavirus aviar o proteína de espícula de IBV de cualquiera de las cláusulas 1 a 60, en donde la cisteína en la posición de aminoácido 267 o la mutación en la posición de aminoácido 267 en cisteína es genéticamente estable.
62. Una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de espícula o fragmento de esta de cualquiera de las cláusulas 1 a 61.
63. Un plásmido que comprende una secuencia de nucleótidos de la cláusula 62.
64. Una célula que comprende un plásmido de la cláusula 63.
65. Una partícula viral que comprende una proteína de espícula o fragmento de esta de cualquiera de las cláusulas 1 a 61.
66. Un coronavirus aviar que comprende la proteína de espícula o fragmento de esta de cualquiera de las cláusulas 1 a 61.
67. Un IBV (virus de bronquitis infecciosa) que comprende la proteína de espícula de cualquiera de las cláusulas 3 a 61.
68. El coronavirus aviar o IBV de las cláusulas 66 o 67, en donde el coronavirus aviar o IBV se encuentra atenuado.
69. El coronavirus aviar o IBV de cualquiera de las cláusulas 66 a 68, en donde el coronavirus aviar o IBV está modificado por ingeniería genética.
70. El coronavirus aviar o IBV de cualquiera de las cláusulas 66 a 69, en donde el coronavirus aviar o IBV es recombinante.
71. El coronavirus aviar o IBV de cualquiera de las cláusulas 66 a 70, en donde el coronavirus aviar o IBV es quimérico.
72. El IBV de cualquiera de las cláusulas 67 a 71, en donde el IBV es de un IBV con un genotipo seleccionado de una lista de cepas que consiste en: Arkansas (tal como Arkansas 99), Brazil (tal como BR-1, BR-2, 23/2013, IBV/Brasil/351/1984), California (tal como California 1734/04, California 99), Connecticut, Delaware (tal como Delaware 98), Dutch (tal como D207, D212, D274, D3128, D3896, D8880, D1466), Florida, Georgia (tal como Georgia GA-07, GA-08, GA-12, GA-13), Gray, Holte, Iowa (tal como Iowa 97 y Iowa 69), Italy 02, JMK, LDT3, Maine (tal como Maine 209),

Massachusetts (M41, H52, H120, Beaudette), Pennsylvania (tal como Pennsylvania 1220/98, Pennsylvania Wolg/98), PL84084, Qu (tal como Qu-mv), QX (tal como GB341/96), Q1, SE 17, Variant 2 (tal como IS/1494/06, IBV/Ck/EG/CU/4/2014, gammaCoV/Ck/Poland/G052/2016) y 4/91 (793B, CR88).

73. El IBV de cualquiera de las cláusulas 67 a 72, en donde el IBV se selecciona de una lista de genotipos o serotipos que consiste en Massachusetts, 4/91, QX, Q1, Italy 02, Arkansas, Conneticut, Georgia, LDT3, PL84084, Variant 2 y Brazil.

74. El IBV de cualquiera de las cláusulas 67 a 73, en donde el IBV se selecciona de una lista de genotipos o serotipos que consiste en Massachusetts, 4/91, QX, Q1, Arkansas, Variant 2 y Brazil.

75. El IBV de la cláusula 74, en donde la cepa Massachusetts se selecciona de una lista que consiste en: H120, H52, Spain/98/308, IBMA5-1, SD/97/01, Beaudette, Spain/96/334 y M41-M21883.

76. El IBV de la cláusula 74, en donde la cepa 4/91 se selecciona de una lista que consiste en: Spain/98/328, Spain/92/35, IR-3654-VM, FR-CR88061-88, FR-85131-85, UK-1233-95, UK/3/91, Spain/00/336, UK/7/91, 4/91-patógena, 4/91 atenuada e IB4-91.

77. El IBV de la cláusula 74, en donde la cepa QX se selecciona de una lista que consiste en: FR-L1450T-05, FR-L1450L-05, NL-L1449T-04, NL-L1449K-04, IBV/Ck/SP/170/09, IBV/Ck/SP/79/08, IBV/Ck/SP/248/09, HBN, IBVQX, LX4, BJQ, CK/CH/LGD/03 y GB341/96.

78. El IBV de la cláusula 74, en donde la cepa Q1 se selecciona de una lista que consiste en: CK/CH/LDL/98I, CK/CH/LSD/08-10, J2, Q1, AR08ER22, AR08BA21 y Chile-295-10.

79. El IBV de la cláusula 74, en donde la cepa 02 se selecciona de una lista que consiste en: Spain/99/316, Italy-02, UK-L633-04, It-497-02, Spain/05/866, Spain/04/221, Spain/00/337, Spain/155/09 y Spain/03/08.

80. El IBV de la cláusula 74, en donde la cepa Arkansas se selecciona de una lista que consiste en: Ark99, ArkGA, ArkDPI, AL/5364/00, ARKDPI11, AL/0803/01, AL/7149/00, ArkDPI101, AL/1221/01, AL/1793/01 y AL/4614/98.

81. El IBV de la cláusula 74, en donde la cepa Variant 2 se selecciona de una lista que consiste en: IS/1494/06, IBV/Ck/EG/CU/4/2014, gammaCoV/Ck/Poland/G052/2016, Eg/CLEVB-2/IBV/012, D1344/2/4/10_EG, TR8 e IB VAR2-06.

82. El IBV de la cláusula 74, en donde la cepa Brazil se selecciona de una lista que consiste en: BR-1, BR-2, 23/2013 e IBV/Brasil/351/1984.

83. El IBV de cualquiera de las cláusulas 67 a 74, en donde la proteína de espícula o fragmento de esta es de un IBV de genotipo o serotipo Massachusetts o 4/91.
84. El IBV de cualquiera de las cláusulas 67 a 74, en donde la cepa de IBV es H120, H52 o CR88.
85. El IBV de cualquiera de las cláusulas 67 a 84, en donde el IBV tiene una proteína de espícula de IBV o fragmento de esta que consiste en o que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 77 o una secuencia que tiene al menos 80 %, 85 %, 90 %, 93 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 %, 99,95 %, 99,98 % o 99,99 % de identidad de secuencia con esta.
86. El IBV de cualquiera de las cláusulas 67 a 85, en donde el IBV tiene un tropismo celular o tisular extendido.
87. El IBV de cualquiera de las cláusulas 67 a 86, en donde el IBV infecta y/o se replica en al menos una línea celular o célula de cualquiera de las cláusulas 9 a 11.
88. Una célula que comprende:
- la partícula viral de la cláusula 65, o
 - el coronavirus aviar o IBV de cualquiera de las cláusulas 66 a 87.
89. La célula de la cláusula 88, en donde la célula es una línea celular o célula seleccionada de la lista que consiste en: células primarias de embriones de pollo, una línea celular de fibroblastos de embriones de pollo, una línea de células madre embrionarias de pato, una línea de células de riñón embrionario humano, una línea de células de riñón de hámster bebé, una línea de células de riñón de mono verde africano, una línea de células de riñón de conejo, una línea de células de riñón canino, una línea de células de hígado de gallina, una línea de células de riñón bovino, una línea de células de riñón porcino y una línea de células de insecto.
90. Las células de las cláusulas 88 o 89, en donde la célula es una línea celular seleccionada de la lista que consiste en: DF-1 (Douglas Foster), EB66 (línea de células madre embrionarias de pato), PBS-12, PBS-12SF (PBS-12 libre de suero), BHK21 (riñón de hámster bebé), HEK 293T (riñón embrionario humano), Vero (Verda Reno), MA104, RK13 (riñón de conejo), LMH (hepatoma de leghorn macho), MDCK (riñón canino Madin-Darby), MDBK (riñón bovino Madin-Darby), PK15 (riñón porcino), PK2A (riñón porcino), SF9, SF21 y SF+ (*Spodoptera frugiperda*).
91. La célula de cualquiera de las cláusulas 88 a 89, en donde la célula es una línea celular seleccionada de la lista que consiste en: DF-1, EB66, PBS-12, PBS-12SF, BHK, HEK 293T, Vero, MA104 y RK13.

92. La célula de la cláusula 89, en donde la célula de embrión de pollo es un fibroblasto o una célula derivada de tejido de hígado o pulmón.
93. Una composición inmunógena que comprende:
- la proteína de espícula de cualquiera de las cláusulas 1 a 61, o
 - la partícula viral de la cláusula 65, o
 - el coronavirus aviar o IBV de cualquiera de las cláusulas 66 a 87.
94. Una vacuna que comprende:
- la proteína de espícula de cualquiera de las cláusulas 1 a 61, o
 - la partícula viral de la cláusula 65, o
 - el coronavirus o IBV de cualquiera de las cláusulas 66 a 87.
95. Una vacuna de virus vivo modificado con un tropismo celular o tisular extendido que comprende:
- la proteína de espícula de cualquiera de las cláusulas 1 a 61, o
 - la partícula viral de la cláusula 65, o
 - el coronavirus o IBV de cualquiera de las cláusulas 66 a 87.
96. La composición inmunógena o vacuna de cualquiera de las cláusulas 93 a 95, en donde la composición inmunógena o vacuna comprende un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico.
97. La composición inmunógena o vacuna de la cláusula 96, en donde el portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico es solución salina amortiguada con fosfato.
98. La composición inmunógena o vacuna de cualquiera de las cláusulas 93 a 97, en donde la composición inmunógena o vacuna es eficaz para el tratamiento y/o la profilaxis de signos clínicos causados por IBV en un sujeto que lo necesita.
99. La composición inmunógena o vacuna de cualquiera de las cláusulas 93 a 98, en donde la composición inmunógena o vacuna comprende 1 a $10 \log_{10}$ EID₅₀ del IBV.
100. La composición inmunógena o vacuna de cualquiera de las cláusulas 93 a 99, en donde la composición inmunógena o vacuna comprende 2 a $5 \log_{10}$ EID₅₀ del IBV.
101. La composición inmunógena o vacuna de cualquiera de las cláusulas 93 a 100, en donde la composición inmunógena o vacuna comprende 2 a $4 \log_{10}$ EID₅₀ del IBV.
102. Un método para alterar el tropismo celular o tisular de un coronavirus aviar que comprende el uso de la proteína de espícula de coronavirus aviar o fragmento de esta de cualquiera de las cláusulas 1 a 61.
103. Un método para extender el tropismo celular o tisular de un coronavirus aviar que comprende el uso de la proteína de espícula de coronavirus aviar o fragmento de

esta de cualquiera de las cláusulas 1 a 61.

104. Un método para la producción o elaboración de un coronavirus aviar con un tropismo celular o tisular extendido que comprende el uso de la proteína de espícula de coronavirus aviar o fragmento de esta de cualquiera de las cláusulas 1 a 61.

105. Un método para cultivar un coronavirus aviar en un cultivo celular o tisular que comprende el uso de la proteína de espícula de coronavirus aviar o fragmento de esta de cualquiera de las cláusulas 1 a 61.

106. Un método para modificar un coronavirus aviar que comprende modificar la posición de aminoácido 267 en la proteína de espícula de dicho coronavirus aviar.

107. Un método para mutar la posición de aminoácido 267 en una proteína de espícula de coronavirus aviar que comprende:

- a) proporcionar una secuencia de proteínas o nucleótidos de espícula de coronavirus aviar,
- b) identificar la posición 267 en la proteína de espícula mediante la alineación con una secuencia de referencia,
- c) mutar la posición 267 de la proteína de espícula de la Etapa b) en una cisteína,
- d) obtener la proteína de espícula mutada de la Etapa c).

108. El método de cualquiera de las cláusulas 102 a 106, en donde la proteína de espícula o fragmento de esta tiene en una posición de aminoácido 267 en una cisteína.

109. El método de cualquiera de las cláusulas 106 a 108, en donde la cisteína en posición de aminoácido 267 se introduce por medio de una mutación.

110. El método de acuerdo con la cláusula 109, en donde la mutación es una sustitución, eliminación o inserción de aminoácidos.

111. El método de cualquiera de las cláusulas 106 a 111, en donde una fenilalanina o leucina se modifica o se muta en una cisteína en la posición de aminoácido 267.

112. El método de cualquiera de las cláusulas 102 a 111, en donde el coronavirus aviar es un BV de cualquiera de las cláusulas 67 a 87.

113. El método de cualquiera de las cláusulas 102 a 112, en donde la proteína de espícula de coronavirus es una proteína de espícula de IBV (virus de la bronquitis infecciosa) de cualquiera de las cláusulas 3 a 61.

114. El método de cualquiera de las cláusulas 102 a 113, en donde la cisteína en posición de aminoácido 267 o dicha mutación en la posición de aminoácido 267 en cisteína produce un tropismo celular o tisular extendido.

115. El método de cualquiera de las cláusulas 102 a 114, en donde el coronavirus aviar o IBV infecta y/o se replica en al menos una línea celular o célula de cualquiera de las cláusulas 9 a 11.

116. El método de cualquiera de las cláusulas 106 a 115, en donde la numeración de la posición de aminoácido 267 se realiza de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 12 a 18.

Cláusulas del kit

117. Un kit que comprende la partícula viral, el coronavirus aviar, el IBV, la composición inmunógena o la vacuna de cualquiera de las cláusulas 65 a 88 y 93 a 101.

118. El kit de la cláusula 117, en donde el kit también comprende una nota de instrucciones para el tratamiento y/o la profilaxis de enfermedades aviares o una nota de instrucciones para el tratamiento y/o la profilaxis de enfermedades de aves de corral o una nota de instrucciones para el tratamiento y/o la profilaxis de IB.

119. El kit de las cláusulas 117 o 118, en donde el kit también comprende un dosificador que puede administrar una vacuna a dicho animal.

Cláusulas del método de tratamiento

120. Un método para inmunizar a un sujeto, que comprende administrarle al sujeto una composición inmunógena o vacuna de cualquiera de las cláusulas 93 a 101.

121. Un método para tratar o prevenir signos clínicos causados por IBV en un sujeto que lo necesita, en donde el método comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición inmunógena o vacuna de cualquiera de las cláusulas 93 a 101.

122. Un método para reducir la ciliostasis en un sujeto que lo necesita, en comparación con un sujeto de un grupo de control no inmunizado de la misma especie, en donde el método comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición inmunógena o vacuna de cualquiera de las cláusulas 93 a 101.

123. La composición inmunógena o vacuna de cualquiera de las cláusulas 93 a 101 para usar en un método para inmunizar a un sujeto, en donde el método comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha composición inmunógena o vacuna.

124. La composición inmunógena o vacuna de cualquiera de las cláusulas 93 a 101 para usar en un método para tratar o prevenir signos clínicos causados por IBV en un sujeto que lo necesita, en donde el método comprende administrar al sujeto una

cantidad terapéuticamente eficaz de dicha composición inmunógena o vacuna.

125. La composición inmunógena o vacuna de cualquiera de las cláusulas 93 a 101 para usar en un método para reducir la ciliostasis en un sujeto que lo necesita, en comparación con un sujeto de un grupo de control no inmunizado de la misma especie, en donde el método comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha composición inmunógena o vacuna.

126. El método o uso de cualquiera de las cláusulas 120 a 125, en donde dicho sujeto es un ave.

127. El método o uso de cualquiera de las cláusulas 120 a 126, en donde dicho sujeto es un ave de corral.

128. El método o uso de cualquiera de las cláusulas 120 a 127, en donde dicho sujeto se selecciona de la lista que consiste en gallina, pavo, perdiz o faisán.

129. El método o uso de cualquiera de las cláusulas 120 a 128, en donde dicho sujeto es una gallina.

130. El método o uso de cualquiera de las cláusulas 120 a 129, en donde la composición inmunógena o vacuna se administra una vez.

131. El método o uso de cualquiera de las cláusulas 120 a 129, en donde la composición inmunógena o vacuna se administra en dos o más dosis.

132. El método o uso de cualquiera de las cláusulas 120 a 131, en donde dicha composición inmunógena o vacuna se administra por vía subcutánea, intramuscular, oral, *in ovo*, por pulverización, mediante agua potable o por medio de gotas oculares.

133. El método o uso de cualquiera de las cláusulas 120 to 132, en donde dicha composición inmunógena o vacuna se administra por medio de gotas oculares.

134. El método o uso de cualquiera de las cláusulas 120 a 133, en donde la composición inmunógena o vacuna comprende 1 a $10 \log_{10}$ EID₅₀ por dosis del IBV.

135. El método o uso de cualquiera de las cláusulas 120 a 134, en donde la composición inmunógena o vacuna comprende 2 a $5 \log_{10}$ EID₅₀ por dosis del IBV.

136. El método o uso de cualquiera de las cláusulas 120 a 135, en donde la composición inmunógena o vacuna comprende 2 a $4 \log_{10}$ EID₅₀ por dosis del IBV.

137. El método o uso de cualquiera de las cláusulas 120 a 136, en donde la composición inmunógena o vacuna se administra a los sujetos dentro de la primera semana de vida, dentro de los primeros tres días de vida, dentro de los primeros dos días de vida, o dentro del primer día de vida.

138. El método o uso de cualquiera de las cláusulas 120 a 137, en donde la composición inmunógena o vacuna se administra a los sujetos dentro del primer día de

vida.

139. El método o uso de cualquiera de las cláusulas 120 a 138, en donde dicho método produce una mejora en un parámetro de eficacia seleccionado del grupo que consiste en: prevención o reducción de ciliostasis, prevención o reducción de estertores, prevención o reducción de descenso de puesta, prevención o reducción de lesiones renales, prevención o reducción de diarrea líquida, prevención o reducción de la pérdida de peso, menor carga viral, diseminación viral reducida o combinaciones de estos, en comparación con un sujeto de un grupo de control no tratado de la misma especie.

140. El método o uso de cualquiera de las cláusulas 120 a 139, en donde el tratamiento o prevención produce una prevención o reducción de la ciliostasis en comparación con sujetos de un grupo de control no tratado de la misma especie.

141. El método o uso de cualquiera de las cláusulas 120 a 140, en donde el tratamiento o prevención produce una prevención o reducción de las lesiones renales en comparación con sujetos de un grupo de control no tratado de la misma especie.

142. El método o uso de cualquiera de las cláusulas 120 a 141, en donde el tratamiento o prevención produce una prevención o reducción del descenso de puesta en comparación con sujetos de un grupo de control no tratado de la misma especie.

143. La partícula viral, coronavirus aviar, IBV, composición inmunógena o vacuna de cualquiera de las cláusulas 65 a 87 y 93 a 101 para uso terapéutico.

144. La partícula viral, coronavirus aviar, IBV, composición inmunógena o vacuna de cualquiera de las cláusulas 65 a 87 y 93 a 101 para su uso como un inmunógeno o vacuna.

145. La partícula viral, coronavirus aviar, IBV, composición inmunógena o vacuna de cualquiera de las cláusulas 65 a 87 y 93 a 101 para su uso como un medicamento.

146. El uso de la partícula viral, coronavirus aviar, IBV, composición inmunógena o vacuna de cualquiera de las cláusulas 65 a 87 y 93 a 101 para la elaboración de un medicamento.

147. El uso de la partícula viral, coronavirus aviar, IBV, composición inmunógena o vacuna de cualquiera de las cláusulas 65 a 87 y 93 a 101 para el tratamiento y/o profilaxis de infecciones por IBV en un sujeto.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Cinética *in ovo* para H52 rIBV S F267C en comparación con virus H52 rIBV de tipo silvestre evaluada mediante detección de carga viral por medio de RT-qPCR. Los puntos de datos representan la media de 5 muestras por punto temporal. Las

barras de error indican la desviación estándar.

Figura 2. Pasaje de H52 rIBV S F267C en células Eb66®. Los valores CT de RT-qPCR se determinan en el punto temporal de infección ($t=0$) y recolección ($t=72$) de cada pasaje. P1 a P5 se generan mediante infección con una dilución 1/10 de la reserva de virus del pasaje anterior. P6 y P7 se generan mediante inoculación con una dilución 1/1000 del pasaje anterior. El experimento se repite con una MOI de 0,001 para el primer pasaje y se obtienen resultados similares.

Figura 3. Cinética de replicación de H52 rIBV S F267C en células Eb66®. Las células se infectan con rIBV a una MOI de 0,001 con base en títulos de TCID₅₀ del tercer pasaje propagado en EB66® de los virus. Los ácidos nucleicos se aíslan a 0, 8, 24, 48 y 72 hpi y se analizan mediante RT-qPCR específica para IBV. Cada punto de datos representa la media del valor ct de tres experimentos independientes. Las barras de error indican el error estándar de la media (SEM).

Figura 4. Cinética de replicación de H52 rIBV S F267C en células Eb66®. Las muestras de puntos temporales 0, 8, 24, 48 y 72 hpi se analizan mediante titulación de TCID₅₀. Se muestran los resultados de un experimento.

Figura 5. Síntesis del índice de ciliostasis para protección mediante H52 rIBV S F267C contra exposición a M41. Se calcula la suma de las 10 calificaciones individuales para los 10 anillos de un animal, y se representa por medio de un punto en el gráfico. La ciliostasis máxima corresponde a una calificación de 40, mientras que la ciliostasis nula se representa por medio de una calificación de 0. La media y la significación se calculan usando GraphPad Prism y una prueba ANOVA de un factor habitual ($p<0,0001$).

Figura 6. Síntesis de resultados de RT-qPCR de tejidos de riñón 7 días después de exposición para el estudio de eficacia de H52 rIBV S F267C. Cada ave individual se indica con un punto.

Figura 7. Replicación de H52 rIBV S F267C en células PBS-12SF según se determina mediante análisis de inmunofluorescencia. Se muestra uno de tres experimentos independientes.

Figura 8: Replicación de H52 rIBV S F267C en células PBS-12SF determinada mediante extracción de ácido nucleico del sobrenadante y posterior análisis RT-qPCR. Se muestra uno de dos experimentos independientes.

Figura 9. Replicación de H52 rIBV S F267C en células HEK 293T según se determina mediante análisis de inmunofluorescencia. Se muestra uno de tres experimentos independientes.

Figura 10. Cinética *in ovo* para CR88 rIBV S L269C en comparación con virus CR88 rIBV de tipo silvestre evaluada mediante detección de carga viral por medio de RT-qPCR. Los puntos de datos representan la media de 5 muestras por punto temporal. Las barras de error indican la desviación estándar.

Figura 11. Pasaje de CR88 rIBV S L269C en células Eb66®. Los valores CT de RT-qPCR se determinan en el punto temporal de infección (t=0) y recolección (t=72) del pasaje respectivo. CR88 rIBV de tipo silvestre se incluye como control negativo. Se muestran datos CR88 rIBV S L269C para P2, P5 y P8. El CR88 rIBV incluido en el mismo experimento de pasaje tiene un pasaje menos en el pasaje inicial (P1) y el pasaje final (P7). Cada pasaje se genera mediante infección con una dilución 1/100 del pasaje anterior.

Figura 12. Cinética de replicación de CR88 rIBV S L269C en células Eb66®. Las células se infectan con rIBV a una MOI de 0,001 con base en títulos de TCID₅₀ del tercer pasaje propagado en EB66® de los virus. Los ácidos nucleicos se aíslan a 0, 8, 24, 48 y 72 hpi y se analizan mediante RT-qPCR específica para IBV. Cada punto de datos representa la media del valor ct de tres experimentos independientes. Las barras de error indican el error estándar de la media (SEM).

Figura 13. Cinética de replicación de CR88 rIBV S L269C en células Eb66®. Las muestras de puntos temporales 0, 8, 24, 48 y 72 hpi se analizan mediante titulación de TCID₅₀. Se muestran los resultados de un experimento.

Figura 14. Síntesis del índice de ciliostasis para protección mediante CR88 rIBV S L269C contra exposición a 793B. Se calcula la suma de las 10 calificaciones individuales para los 10 anillos de un animal, y se representa por medio de un punto en el gráfico. La ciliostasis máxima corresponde a una calificación de 40, mientras que la ciliostasis nula se representa por medio de una calificación de 0. La media y la significación se calculan usando GraphPad Prism y una prueba ANOVA de un factor habitual (*p<0,02, **p<0,007).

Figura 15. Síntesis de resultados de RT-qPCR de tejidos de riñón 7 días después de exposición para el estudio de eficacia de CR88 rIBV S L269C. Cada ave individual se indica con un punto.

Figura 16. Cinética *in ovo* para H52 rIBV QX S L270C y CR88 rIBV QX S L270C en comparación con IBV QX, H52 rIBV y CR88 rIBV, evaluada mediante detección de carga viral por medio de RT-qPCR. Los puntos de datos representan la media de 5 muestras por punto temporal. Las barras de error indican la desviación estándar.

Figura 17. Pasaje de CR88 rIBV QX S L270C en células Eb66®. Los valores CT de

RT-qPCR se determinan en el punto temporal de infección (t=0) y recolección (t=72) del pasaje respectivo.

Figura 18. Pasaje de H52 rIBV QX S L270C en células Eb66®. Los valores CT de RT-qPCR se determinan en el punto temporal de infección (t=0) y recolección (t=72) del pasaje respectivo.

Figura 19. Cinética de replicación de H52 rIBV QX S L270C y CR88 rIBV QX S L270C en células Eb66®. Las células se infectan con rIBV a una MOI de 0,001 con base en títulos de TCID₅₀ del tercer pasaje propagado en EB66® de los virus. Los ácidos nucleicos se aíslan a 0, 8, 24 y 48 hpi y se analizan mediante RT-qPCR específica para IBV. Cada punto de datos representa la media del valor ct de tres experimentos independientes, en donde cada uno se realizó por triplicado. Las barras de error indican el error estándar de la media (SEM).

Figura 20. Síntesis del índice de ciliostasis para protección mediante CR88 rIBV QX S L270C y H52 rIBV QX S L270C contra exposición a D388 QX. Se calcula la suma de las 10 calificaciones individuales para los 10 anillos de un animal, y se representa por medio de un punto en el gráfico. La ciliostasis máxima corresponde a una calificación de 40, mientras que la ciliostasis nula se representa por medio de una calificación de 0. La media y la significación se calculan usando GraphPad Prism y una prueba ANOVA de un factor habitual (***p<0,001, ****p<0,0001).

Figura 21. Síntesis de resultados de RT-qPCR de tejidos de riñón 7 días después de exposición para el estudio de eficacia de CR88 rIBV QX S L270C y H52 rIBV QX S L270C. Cada ave individual se indica con un punto.

RESEÑA DE LAS SECUENCIAS

SEQ ID NO:1	proteína de espícula de IBV H52
SEQ ID NO:2	proteína de espícula de IBV H52 con mutación F267C
SEQ ID NO:3	espícula de IBV CR88 con mutación L269C
SEQ ID NO:4	proteína de espícula de IBV QX con mutación L270C
SEQ ID NO:5	proteína de espícula de IBV Q1 con mutación L271C
SEQ ID NO:6	proteína de espícula de IBV Var 2 con mutación L270C
SEQ ID NO:7	proteína de espícula de IBV BR-I con mutación L274C
SEQ ID NO:8	proteína de espícula de IBV Ark con mutación L274C
SEQ ID NO:9	plásmido donante pUC57-s H52 rIBV
SEQ ID NO:10	plásmido donante pUC57-s H52 rIBV S F267C
SEQ ID NO:11	secuencia de espícula de IBV CR88
SEQ ID NO:12	plásmido donante pUC57-s CR88 mIBV

SEQ ID NO:13	plásmido de espícula de pGEM-T IBV CR88
SEQ ID NO:14	plásmido donante pUC57-s CR88 rIBV S L269C
SEQ ID NO:15	espícula de pGEM-T IBV CR88 con mutación L269C
SEQ ID NO:16 a 64	cebadores
SEQ ID NO:65	proteína de espícula de IBV QX
SEQ ID NO:66	plásmido pGEM-T IBV QX S L270C
SEQ ID NO:67	plásmido donante pUC57-s CR88 rIBV
SEQ ID NO:68	plásmido donante pUC57-s CR88 rIBV QX S L270C
SEQ ID NO:69	plásmido donante pUC57-s H52 rIBV QX S L270C
SEQ ID NO:70 a 75	cebadores
SEQ ID NO:76	proteína de espícula de IBV ArkDPI
SEQ ID NO:77	proteína de espícula de IBV ArkDPI con mutación L274C
SEQ ID NO:78	pUC57-s IBV ArkDPI S L274C
SEQ ID NO:79	plásmido donante pUC57-s H52 rIBV ArkDPI S Ecto L274C
SEQ ID NO:80 a 84	cebadores

EJEMPLOS

[0298] Los siguientes ejemplos se indican a continuación para ilustrar formas de realización específicas de la presente invención. Estos ejemplos son meramente ilustrativos y no limitan el alcance o los principios fundamentales de la presente invención.

EJEMPLO 1:

GENERACIÓN DE IBV H52 RECOMBINANTE EN DONDE EL AMINOÁCIDO 267 DE LA PROTEÍNA DE ESPÍCULA SE MUTA EN UNA CISTEÍNA

[0299] Para la generación de IBV recombinante se aplicó el método de recombinación de ARN dirigida descrito por van Beurden et al. (Virol J. 2017;14(1):109).

Construcción de plásmido donante

[0300] El plásmido donante pUC57-s IBV-5-1b-S-SIR-3T, en adelante denominado plásmido donante pUC57-s H52 rIBV (SEQ ID NO:9), se usó como plantilla para la construcción del plásmido donante H52 rIBV con una espícula H52 en donde el aminoácido 267 de la subunidad S1 de espícula H52 (SEQ ID NO:1) se mutó de una fenilalanina a una cisteína (SEQ ID NO:2) que se denomina pUC57-s H52 rIBV S F267C (SEQ ID NO:10). La mutación de la secuencia de tipo silvestre se logró mediante el uso del kit de mutagénesis dirigida al sitio Q5® (NEB) con los cebadores

PO1942 y PO1943 (Tabla 1) y de acuerdo con el protocolo del kit, con una temperatura de apareamiento de 58 °C y un tiempo de elongación de 5 minutos y 30 segundos. Los clones positivos se identificaron mediante digestión de restricción con EcoRV y XhoI, y luego secuenciación Sanger con cebadores PO618 y PO633 (Tabla 1). Luego, la integridad de la secuencia de la región donante y la espícula se confirmó mediante secuenciación con cebadores SEQ ID NO:19 a SEQ ID NO: 40 en la Tabla 1.

Tabla 1: Cebadores para SDM y secuenciación

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
64	M13-24F	ccagggtttccagtcacg
16	M13-24R	cggataacaatttcacacagg
17	PO1942	aacactattttcacgatagac
18	PO1943	aatactactgtacgttacacaatttc
19	PO618	taaatgggtgatcttgtt
20	PO632	gcattcactgctgtacaa
21	PO633	cgctcttagtaacataaac
22	PO636	ctgagggtcaatgctttatc
23	PO706	gacagagcacaagtttgatc
24	PO709	acttcaagcatttgtagagg
25	PO710	gggtcaacaatgtaattttgct
26	PO713	gcagatgctaaaacagaaag
27	PO714	tcacctgaacaatcttcagc
28	PO715	ggtcaccagtattttctgc
29	PO718	aaagaagcaggatgatgaag
30	PO726	aagagatgttggttaacacct
31	PO728	ctaaaccgggctggtttta
32	PO729	ccatagcttttgccactatt
33	PO731	cgcttgtaaatagaagggtct
34	PO732	acataccaaggccactta
35	PO733	gggtcctgttccagtatagta
36	PO734	cttgtcctgctttgttaaga
37	PO756	gtggatcgtcttataactgg
38	PO759	ctcgattacaaaggctaag
39	PO766	ccagttataggacacccatc
40	PO767	gttggttcttctggaaatgt

Recombinación de ARN dirigida y rescate de IBV recombinante

[0301] El virus auxiliar (m)IBV murinizado H52 e IBV recombinante se generó como describieron van Beurden et al. (Virol J. 2017;14(1):109). Brevemente, para la generación de H52 rIBV S F267C, las células LR7 se infectaron con H52 mIBV y se electroporaron con transcripto *in vitro* generado a partir del plásmido donante pUC57-s H52 S F267C (SEQ ID NO:10), y posteriormente se inyectaron en huevos embrionados de gallina SPF de 8 días de vida (VALO BioMedia). Después de hasta 8 días de incubación, los fluidos alantoideos de todos los huevos se analizaron por

separado para el rescate de IBV recombinante después del aislamiento de ARN con el kit de purificación de ácido nucleico MagMAX™ Core (ThermoFisher) y el sistema de purificación KingFisher™ Duo Prime (ThermoFisher) y mediante el sistema de RT-PCR en una etapa SuperScript™ III con ADN polimerasa Taq Platinum™ (ThermoFisher). Los cebadores PO1323 y PO1324 (Tabla 2) unidos en espícula H52 IBV 1ab y H52 IBV S se usaron para distinguir el IBV recombinante de mIBV. Las muestras positivas se analizaron adicionalmente para confirmar la presencia de la mutación F267C de espícula deseada usando el sistema de RT-PCR en una etapa SuperScript™ III con ADN polimerasa Taq Platinum™ con cebadores PO618 y PO633 (Tabla 2), y luego mediante purificación PCR QIAquick y secuenciación Sanger con los mismos cebadores. El fluido alantoideo positivo del huevo inoculado con la dilución más alta de células LR7 se usó para una dilución de valor extremo en huevos SPF de 8 días de vida. El aislamiento de ácidos nucleicos y el análisis de muestras se llevaron a cabo como se describió anteriormente. El mismo procedimiento se aplica para una segunda dilución de valor extremo. Luego, un fluido alantoideo de resultado positivo se usó para propagación en huevos embrionados de gallina SPF de 10 días de vida. El fluido alantoideo se diluyó 1:1000 en 1xPBS y se inyectaron 100 µl por huevo, que se incubaron posteriormente a 37,5 °C y 60 % de humedad. El fluido alantoideo se recolectó 48 horas después de la inoculación, se agrupó, se libró de residuos y se almacenó a -80 °C.

Tabla 2. Cebadores de PCR y secuenciación usados para identificar el H52 rIBV rescatado y para confirmar la mutación S F267C diana.

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
41	PO1323	tcagcatggacgtgtggta
42	PO1324	cccatgtaaatgccaacca
19	PO618	taaatggatgctctgtt
21	PO633	cgctcttagtaacataaac

Caracterización *in vitro* e *in ovo* de IBV recombinante

Determinación de dosis infecciosa al 50 % en embrión (EID₅₀)

[0302] Una alícuota de la reserva de virus se descongeló y se diluyó 10 veces en 1xPBS para determinar la dosis infecciosa al 50 % en embrión (EID₅₀) mediante inoculación de 100 µl en la cavidad alantoidea de cinco huevos embrionados de gallina de 8 días de vida por dilución. Los huevos se incubaron a 36,5 °C, 60 % de humedad hasta 7 días después de la inoculación. Se excluyeron del experimento los huevos con embriones muertos después de 24 horas. Todos los demás huevos con embriones muertos a los 7 días después de la inoculación se consideraron positivos. Todos los

huevos con embriones vivos se iluminaron desde la parte inferior 7 días después de la inoculación para identificar a los que tenían enanismo, que se consideraron positivos. La EID₅₀/ml se calculó mediante la fórmula de Reed y Muench (Am J Epidemiol, 1938; 27(3):493–497).

Dosis infecciosa al 50 % en cultivo tisular (TCID₅₀)

[0303] La viabilidad de la célula Eb66® se analizó con BioRad TC20 y azul de tripano con un límite establecido en 6-13 μm . 2×10^6 células vivas Eb66®/ml cada 96 cavidades en medio libre de suero EX-CELL® EBx™ GRO-I + L-glutamina 2,5 mM se sembraron 1 día antes de la inoculación y se incubaron a 37 °C y 7,5 % de CO₂. Se llevó a cabo una dilución en serie de 10 veces del virus en medio de célula Eb66®, y 100 μl por dilución (al menos 4 réplicas por dilución) se agregaron a células Eb66® después de retirar el medio de cultivo. Si se usó fluido alantoideo para infección, se hizo pasar a través de un filtro de 0,45 μm de tamaño de poro antes de la dilución. Las células infectadas se incubaron durante 72 horas, y luego se sometieron a tinción de inmunofluorescencia para identificar cavidades positivas. El medio se aspiró de todas las cavidades, que posteriormente se lavaron con 1xPBS antes de la adición de 100 μl etanol por cavidad para la fijación de las células durante 10 min a RT y el posterior secado al aire de las células. Las células se incubaron con 100 μl de suero anti-IBV Mass de gallina primario (Boehringer Ingelheim), se diluyeron 1:250 en 1xPBS, durante 45 min a temperatura ambiente. Después de la eliminación del anticuerpo primario, cada cavidad se lavó 3 veces con 1xPBS. Se agregaron 100 μl de anticuerpo caprino anti-IgG de gallina Alexa Fluor 488 secundario (ThermoFisher Scientific, dilución 1:500 en 1xPBS), y se incubaron durante 45 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Después de la eliminación del anticuerpo secundario, cada cavidad se lavó 3 veces con 1xPBS, y se dejó el lavado final en las células. Las cavidades positivas se identifican mediante microscopía de fluorescencia y se registraron para calcular la TCID₅₀/ml con la fórmula de Reed y Muench (Am J Epidemiol, 1938; 27(3):493–497).

Cinética de replicación *in ovo*

[0304] Los huevos embrionados de gallina de 8 días de vida se inocularon con 10^2 EID₅₀ de rIBV y los controles respectivos. Los huevos se iluminaron a diario después de 0, 8, 24, 34, 48 y 72 horas de incubación, y se registró la mortalidad embrionaria. Se retiraron 5 huevos preseleccionados por muestra, y se transfirieron a 4 °C durante al menos 2 horas. Posteriormente, el fluido alantoideo se recolectó y se almacenó a -80 °C. Para el análisis, las muestras se descongelaron y se diluyeron 1:10 en 1xPBS sin Ca y Mg, y los ácidos nucleicos se extrajeron con el minikit de sangre de ADN

QIAamp (Qiagen) y se agregó ARN portador usando el robot con pipeta Hamilton Starlet. Los ácidos nucleicos extraídos se analizaron mediante RT-qPCR para determinar la cantidad relativa de ARN de IBV con un protocolo adaptado de Callison *et al.* (J Virol Methods. 2006;138(1-2):60-5). Brevemente, se usaron los mismos cebadores y sonda, y el termoperfil se adaptó para el uso de mezcla maestra en una etapa de virus rápida TaqMan® (ThermoFisher) y el sistema de PCR en tiempo real rápido ABI™ 7900HT (Thermo Fisher Scientific). Todas las muestras de ácido nucleico se analizaron por triplicado usando una dilución en serie de 10 veces de IBV H52 como referencia.

[0305] Una cinética de replicación *in ovo* similar se observó para H52 rIBV de tipo silvestre y H52 rIBV S F267C (Figura 1). Esto sugiere que no se presentan desventajas por parte de la mutación de fenilalanina en cisteína en la posición 267 de la espícula para la eficacia de replicación *in ovo* del rIBV mutado en comparación con el rIBV de tipo silvestre.

Pasaje de rIBV en células Eb66®

[0306] Las células Eb66® se sembraron en una densidad de 4×10^5 células/ml en medio libre de suero EX-CELL® EBx™ GRO-I + L-glutamina 2,5 mM en matraces T25 con un volumen total de 5 ml, y se infectaron con rIBV y controles. Los cultivos se incubaron durante 72 horas a 37 °C y 7,5 % de CO₂ y con agitación a 100 rpm. El cultivo se recolectó y se almacenó a -80 °C. Para los pasajes 1, 2, 5, 6 y 7, la replicación del virus se evaluó mediante RT-qPCR. Para esto, 250 µl de la suspensión se retiraron directamente después de la inoculación (punto temporal 0 h) y después de la recolección (punto temporal 72 h) para el aislamiento del ácido nucleico. Los ácidos nucleicos se aislaron con el kit de purificación de ácido nucleico MagMAX™ Core (ThermoFisher) y el sistema de purificación KingFisher™ Duo Prime (ThermoFisher). La RT-qPCR se llevó a cabo como se describió anteriormente.

[0307] Para analizar si H52 rIBV S F267C puede replicarse en células, las células Eb66® se inocularon con una dilución 1/10 de la reserva de fluido alantoideo. La propagación del virus se detectó mediante un valor ct disminuido después de 72 horas en el primer pasaje y los siguientes. Debido a la dilución del virus para el siguiente pasaje, el valor ct aumentó en comparación con el valor ct medido en la recolección del inóculo, antes de volver a disminuir durante el cultivo de 72 h debido a la replicación del virus. La replicación se volvió más evidente en los pasajes 6 y 7 más altos, en los que la inoculación se llevó a cabo con una dilución 1/1000 del pasaje anterior (Figura 2). Los resultados mostraron claramente una replicación de H52 rIBV

F267C en 7 pasajes en células Eb66®. Por lo tanto, fue evidente que la modificación en una cisteína en la posición 267 era genéticamente estable, dado que el IBV aún tenía el tropismo de cultivo celular/tisular extendido después de 7 pasajes.

[0308] Además, se determinaron los títulos infecciosos para la reserva de fluido alantoideo ($10^{6,33}$ TCID₅₀/ml, $10^{7,22}$ EID₅₀/ml) y los pasajes de Eb66® P1 ($10^{4,67}$ TCID₅₀/ml), P5 ($10^{5,33}$ TCID₅₀/ml) y P7 (10^6 TCID₅₀/ml, $10^{5,84}$ EID₅₀/ml). Esto confirmó la replicación eficaz de H52 rIBV S F267C durante el proceso de pasaje de Eb66® y la ineficacia sostenida en los huevos SPF. Por lo tanto, la mutación F267C permite la replicación en líneas celulares sin afectar la capacidad de replicación *in ovo*.

Cinética de replicación de célula Eb66®

[0309] El pasaje 3 recolectado de células Eb66® se usó para llevar a cabo cinética de replicación en células Eb66®. Las células Eb66® se sembraron y se incubaron como describió para el pasaje, y se infectaron con una MOI de 0,001 en función del título TCID₅₀. Las muestras se tomaron directamente después de la inoculación, así como 8, 24, 48 y 72 hpi (horas después de la infección). Las muestras se analizaron para determinar el contenido de ARN viral como se describió para el experimento de pasajes (Figura 3). Además, las muestras se analizaron para determinar su ineficacia mediante un ensayo TCID₅₀ (Figura 4). Se detectó una replicación eficaz con ambos métodos, y una fase meseta de replicación se alcanzó a las 48 horas después de la infección. En conclusión, el ciclo de replicación en células Eb66® fue igualmente eficaz que en los huevos embrionados de gallina.

Determinación de la eficacia de la vacuna

[0310] Los huevos SPF fertilizados se incubaron durante 18 días en una incubadora para huevos a 99,7 °F y 50 % de humedad con 1 volteo por hora. En el día 18 de incubación los huevos se iluminaron, y los huevos fértiles se transfirieron a la nacedora y se incubaron a 99 °F y 70 % de humedad hasta la eclosión. Los pollitos sin signos clínicos o deformación se distribuyeron de manera aleatoria en respectivos grupos de tratamiento y se transfirieron en aisladores separados. Tres pollitos se usaron como grupo de control negativo estricto (SNC), cinco pollitos se incluyeron en el grupo de control de exposición (CC) y al menos 10 en grupos que se vacunaron con el IBV recombinante adaptado para Eb66® y se expusieron posteriormente. Los animales se mantuvieron en condiciones de estabulación de acuerdo con los requisitos locales y nacionales de las recomendaciones para el bienestar animal. El régimen de luz se ajustó a 16 horas de luz por día. El alimento y el agua se proporcionaron *ad libitum*. Después de la transferencia al aislador, los pollitos se vacunaron (1 día de vida) con

10^3 EID₅₀ por pollo mediante gotas oculares (volumen total de 50 µl, 25 µl por ojo), mientras que los grupos SNC y CC permanecieron sin tratar. A los 21 días después de la vacunación, los pollos de los grupos CC y vacunados se expusieron a 10^3 a 10^4 EID₅₀ por pollo de la cepa de exposición homóloga mediante gotas oculares (volumen total 50 µl, 25 µl por ojo). A los 7 días después de la exposición, todos los pollos se sometieron a eutanasia, los riñones se retiraron y se almacenaron en solución de estabilización ARNlater (ThermoFisher) a 4 °C para análisis RT-qPCR específico para IBV. Además, las tráqueas se retiraron y se transfirieron en tubos de 50 ml con medio de cultivo celular cálido. Luego, las tráqueas se libraron del tejido conectivo y se purgaron con medio de cultivo celular. Las tráqueas se cortaron en anillos traqueales usando la cortadora de tejido McIlwain con un espesor de rebanada ajustado a 0,6-0,8 mm. Por tráquea se analizaron 3 anillos de la parte superior, 4 anillos de la parte media y 3 anillos de la parte inferior para determinar el latido ciliar mediante microscopía de luz y se calificaron según la ciliostasis (ver Tabla 3). Un anillo se registró como normal si más de 50 % del anillo interno presentaba movimiento ciliar vigoroso (puntaje 2 y menor). Un anillo se registró como positivo para ciliostasis si menos de 50 % de los cilios latían (puntaje 3 y 4). Un animal se consideró protegido si no menos de 9 de 10 anillos presentaba actividad ciliar normal.

[0311] Para el análisis RT-qPCR específico para IBV, las piezas de tejido del riñón se calentaron hasta temperatura ambiente y se transfirieron en tubos Precellys de 2 ml por separado, que se cargaron con medio y PBS, respectivamente. Los riñones se homogeneizaron con el homogeneizador de tejidos Precélulays® (Bertin Instruments) durante 1x 20 s a 6800 rpm. Los hisopados coanales se eluyeron en 2 ml de 1xPBS. Los ácidos nucleicos se aislaron de 200 µl eluato y homogeneizado tisular respectivamente con el kit de purificación de ácido nucleico MagMAX™ Core (ThermoFisher) y el sistema de purificación KingFisher™ Duo Prime (ThermoFisher). La RT-qPCR se llevó a cabo como se describió anteriormente para la cinética *in ovo*, con la excepción de que se usó un sistema de PCR en tiempo real StepOnePlus™ (ThermoFisher).

Tabla 3: Índice de ciliostasis en anillos traqueales

Actividad ciliar [%]	Calificación de ciliostasis
100	0
75-99	1
50-74	2
25-49	3
0 - 25	4

[0312] El objetivo del estudio consiste en demostrar que H52 rIBV S F267C adaptado al cultivo transferido 8 veces en células Eb66® puede otorgar protección contra la exposición con una cepa M41 virulenta. Se observó diariamente a las gallinas para detectar signos clínicos, y no se registraron signos clínicos después de la vacunación o exposición. Las titulaciones por retroceso para la vacunación con H52 rIBV y H52 rIBV S F267C a 1 día de vida determinaron una titulación de $10^{3,2}$ EID₅₀/animal y $10^{2,87}$ EID₅₀/animal (diana de 10^3 EID₅₀/animal), respectivamente, y 10^3 EID₅₀/animal (diana de 10^3 EID₅₀/animal) para exposición con IBV M41 a los 21 días después de la vacunación. La ciliostasis se calificó como se describió en la Tabla 3, y los resultados se ilustran en la Figura 5.

[0313] El valor de ciliostasis promedio de la suma de las 10 calificaciones individuales para cada animal y las tasas de protección se resumen en la Tabla 4. Todos los animales del control negativo estricto presentaron movimiento ciliar normal (100 % de protección) mientras que todos los animales del grupo de control de exposición fueron positivos para ciliostasis (0 % de protección). En contraste 93 % de los animales vacunados con H52 rIBV estaban protegidos, y, de igual manera, los animales vacunados con H52 rIBV S F267C transferido en Eb66® también estaban protegidos.

Tabla 4: Síntesis del índice de ciliostasis de protección a los 28 días después de la vacunación y 7 días después de la exposición. La media de la calificación de ciliostasis por grupo se calculó al sumar el puntaje total de las gallinas individuales por grupo y al dividir la suma del grupo por la cantidad de animales (máximo puntaje posible 40, mínimo puntaje posible 0). Para los animales no afectados, al menos 9 de los 10 explantes traqueales presentaron actividad ciliar normal.

Vacuna	Exposición	N.º animales/ de no afectados	Media Calificación de ciliostasis	No afectados [%]
-	-	3/3	3	100
-	M41	5/0	40	0
H52 rIBV	M41	14/13	8,9	93
H52 rIBV S F267C	M41	14/13	11,8	93

[0314] Además, la carga viral en los riñones de los animales vacunados con H52 rIBV S F267C se redujo tan eficazmente como con H52 rIBV y en comparación con el control de exposición a M41 (Figura 6). En síntesis, H52 rIBV S F267C propagado en células Eb66® protege contra exposición a M41 virulenta de manera tan eficaz como H52 rIBV de tipo silvestre. Asimismo, la modificación en una cisteína en la posición 267 resulta genéticamente estable.

Infección de células PBS-12SF con rIBV

[0315] Se analizó la capacidad para infectar células PBS-12SF de las reservas de fluido alantoideo de H52 rIBV S F267C y H52 rIBV como control negativo. Se sembraron células PBS-12SF en OptiPRO SFM (ThermoFisher Scientific) + 10 % de medio GlutaMAX (ThermoFisher Scientific) en placas de 12 cavidades para lograr 80 a 90 % de confluencia al día siguiente. Las células se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂. Antes de la infección, las reservas de virus de fluido alantoideo se hicieron pasar a través de un filtro de 0,45 µm de tamaño de poro. Las células PBS-12SF se infectaron con 10^{5,74} EID₅₀ de cada virus por cavidad durante 4 horas a 37 °C y 5 % de CO₂ antes de retirar el sobrenadante, y se agregó medio nuevo para incubación adicional. Después de 72 horas, el sobrenadante se retiró, y las células se lavaron con 1xPBS, y se agregaron 50 µl de TrypLE Select (ThermoFisher Scientific) para separar las células. Las células se volvieron a suspender en sobrenadante y se transfirieron a un matraz T25 con células PBS-12SF (P2) con 80-90 % de confluencia, que se incubó durante 72 horas. Nuevamente, el sobrenadante y las células se recolectaron y se transfirieron a un matraz T75 con células PBS-12SF con 80-90 % de confluencia, que se incubó durante 72 horas (P3). El sobrenadante se recolectó. Las células se separaron mediante tratamiento con tripsina y se sembraron en placas de 12 cavidades en una relación de 1 a 3 en medio nuevo y se incubaron hasta el día siguiente. El medio se aspiró, las células se lavaron con 1xPBS, se fijaron con etanol al 100 % helado y se secaron al aire. Posteriormente, las células se volvieron a hidratar con 1xPBS, y luego se agregó suero anti-IBV Mass de gallina primario (Boehringer Ingelheim) en una dilución de 1 a 200 y se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente. Después de la eliminación del anticuerpo, las células se lavaron y se agregó anticuerpo caprino anti-IgG de gallina Alexa Fluor 488 secundario (ThermoFisher Scientific, dilución 1:500 en 1xPBS) durante 45 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Por último, las células se lavaron 3 veces con 1xPBS y se analizaron mediante microscopía de fluorescencia (Figura 7). Se detectaron células infectadas para H52 rIBV S F267C, mientras que las células infectadas con H52 rIBV de tipo silvestre y el control negativo no infectado permanecieron negativos como se esperaba. Además, se almacenaron 250 µl de sobrenadante después de cada uno de los pasajes 1, 2 y 3 para la extracción de ácido nucleico y RT-qPCR como se describió anteriormente. Una disminución continua en el valor ct (correspondiente a la replicación y propagación del virus) pudo observarse para H52 rIBV S F267C durante el proceso de pasajes mientras que el valor ct para H52 rIBV de tipo silvestre aumentó

como se esperaba. (Figura 8).

[0316] En síntesis, estos datos confirmaron que la mutación única de fenilalanina en cisteína en la posición 267 de la espícula H52 vuelve al virus capaz de replicarse en células PBS12-SF, mientras que el virus de tipo silvestre H52 no poseía esta capacidad.

Infección de células HEK-293T con rIBV

[0317] Se analizó la capacidad para infectar células HEK 293T de las reservas de fluido alantoideo de H52 rIBV S F267C y H52 rIBV como control negativo. Se sembraron células 293T en DMEM (Lonza) + 10 % de FCS (SAFC) + L-glutamina (Lonza) + 1 % de medio P/S (Gibco) en placas de 12 cavidades para lograr 80 a 90 % de confluencia al día siguiente. Las células se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂. Antes de la infección, las reservas de virus de fluido alantoideo se hicieron pasar a través de un filtro de 0,45 µm de tamaño de poro. Las células HEK 293T se infectaron con alrededor de 10⁶ EID₅₀ de cada virus por cavidad. Después de 72 horas, el sobrenadante se retiró, y las células se lavaron con 1xPBS, y se agregaron 50 µl de TrypLE Select (ThermoFisher Scientific) para separar las células. Las células se volvieron a suspender en sobrenadante y se transfirieron a un matraz T25 con células HEK 293T con 80-90 % de confluencia y 5 ml de medio nuevo (P2), que se incubó durante 72 horas. Nuevamente, el sobrenadante y las células se recolectaron y se transfirieron a un matraz T75 con células HEK 293T con 80-90 % de confluencia y 10 ml de medio nuevo, que se incubó durante 72 horas (P3). El sobrenadante se recolectó. Las células se separaron mediante tratamiento con tripsina y se sembraron en placas de 12 cavidades en una relación de 1 a 3 en medio nuevo y se incubaron hasta el día siguiente. El medio se aspiró, las células se lavaron con 1xPBS, se fijaron con etanol al 100 % helado y se secaron al aire. Posteriormente, las células se volvieron a hidratar con 1xPBS, y luego se agregó suero anti-IBV Mass de gallina primario (Boehringer Ingelheim) en una dilución de 1 a 200 y se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente. Después de la eliminación del anticuerpo, las células se lavaron y se agregó anticuerpo caprino anti-IgG de gallina Alexa Fluor 488 secundario (ThermoFisher Scientific, dilución 1:500 en 1xPBS) durante 45 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Por último, las células se lavaron 3 veces con 1xPBS y se analizaron mediante microscopía de fluorescencia (Figura 9). Se detectaron células infectadas para el control positivo así como H52 rIBV S F267C, mientras que las células infectadas con H52 rIBV de tipo silvestre y el control negativo no infectado permanecieron negativos como se esperaba.

[0318] En síntesis, estos datos confirmaron que la mutación única de fenilalanina en cisteína en la posición 267 de la espícula H52 vuelve al virus capaz de replicarse en células HEK 293T, mientras que el virus de tipo silvestre H52 no poseía esta capacidad.

[0319] Ejemplo de conclusión 1: Los datos muestran que la mutación en cisteína en la posición 267 de la secuencia de espícula (la secuencia de referencia para la numeración es SEQ ID NO:1) en un IBV produce un tropismo tisular y de cultivo celular extendidos. Un IBV recombinante H52 que tiene mutación F267C en la proteína de espícula puede cultivarse de manera eficaz en diferentes líneas celulares, tales EB66, PBS-12SF y células HEK 293T. Se supone que dicho IBV también puede cultivarse en otras líneas celulares. Asimismo, dicha mutación no afecta la replicación *in ovo* del virus, y las cinéticas de replicación *in ovo* e *in vitro* son similares. Por último, la eficacia de la vacuna se mantiene incluso luego del pasaje en una línea celular, lo que sienta una base para el desarrollo de una vacuna de IBV exitosa que no requiera de cultivo *in ovo* sino que utilice líneas celulares.

EJEMPLO 2:

GENERACIÓN DE IBV CR88 RECOMBINANTE EN DONDE EL AMINOÁCIDO 269 DE LA PROTEÍNA DE ESPÍCULA SE MUTA EN UNA CISTEÍNA

[0320] A fin de determinar si el cambio a una cisteína en la posición 267 en la espícula de IBV también podía aplicarse a otros genotipos o serotipos, la secuencia de aminoácidos de espícula (SEQ ID NO:11) de la cepa CR88 de IBV se alineó con la secuencia de aminoácidos de espícula H52 (SEQ ID NO:1) para determinar la posición equivalente a la posición de aminoácido 267 de espícula H52 para la espícula de IBV CR88, que se determinó como la leucina en la posición 269 de la espícula CR88.

Construcción de un plásmido donante murinizado IBV CR88

[0321] A fin de generar el plásmido donante (m)IBV murinizado CR88, la secuencia donante fue sintetizada por un proveedor comercial: 497 bases de la UTR 5' del genoma CR88 se fusionaron en la parte 3' de la región 1ab (752 bases) y las primeras 72 bases que codificaban la espícula de IBV CR88, y luego 3753 bases del ectodominio de espícula de MHV, y luego 210 bases terminales de la espícula de IBV CR88 y la siguiente secuencia hasta el extremo 3' del genoma. Además, un sitio de restricción SacI y la secuencia del promotor T7 se agregaron al extremo 5' de la región donante, así como una secuencia poliA 100x, y luego un sitio de restricción Not I para la linealización en el extremo 3', respectivamente. Una mutación A a C silenciosa en la posición 5634 de la secuencia ensamblada se introdujo para generar un sitio de

restricción XhoI. La secuencia sintetizada se insertó en pUC57-simple para proporcionar el plásmido donante pUC57-s CR88 mIBV (SEQ ID NO:12).

Rescate de CR88 mIBV

[0322] CR88 mIBV se rescató de manera análoga a H52 mIBV (van Beurden et al. Virol J. 2017;14(1):109) con algunas alteraciones: El virus reserva de fluido alantoideo se concentró mediante ultracentrifugación antes del aislamiento del ARN viral para electroporación. 18 ml de fluido alantoideo viral se centrifugaron a 50.000 x g durante 2 horas a través de un colchón de sacarosa de 2 ml al 20 % en amortiguador TNE (Tris, NaCl, EDTA). El sobrenadante se descartó y el pelet se volvió a suspender en 150 µl de amortiguador TNE, y luego se realizó aislamiento de ARN con minikit de ARN viral QIAamp (Qiagen). Además, se usaron fibroblastos de embriones de pollo (CEF) en lugar de células BHK para electroporación (2 pulsos de 250 V/300 µF, pausa de 10 s), y se agregó 1,25 % de DMSO a la mezcla de electroporación.

Construcción de plásmido donante

[0323] La secuencia de ácido nucleico de espícula CR88 con secuencias flanqueantes fue sintetizada por un proveedor comercial y se clonó en pGEM-T (SEQ ID NO:13). Se usa como a plantilla para la mutagénesis dirigida al sitio para cambiar la leucina en la posición de aminoácido 269 de la espícula de IBV CR88 (SEQ ID NO:11) en una cisteína (SEQ ID NO:3). Para esto, se usaron el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChangeMulti (Agilent Technologies) de acuerdo con el protocolo del fabricante y el cebador PO1886 (Tabla 5) diseñado con la correspondiente herramienta en línea. Se identificaron 5 clones positivos mediante digestión de restricción y se analizaron para determinar la presencia de la mutación deseada mediante secuenciación Sanger con cebador PO618 y PO1410 (Tabla 5). Para la generación del plásmido donante pUC57-s CR88 rIBV S L269C (SEQ ID NO:14), el plásmido pGEM-T CR88 S L269C que contenía la secuencia de espícula CR88 mutada (SEQ ID NO:15) se digirió con PaeI, XhoI y PvuI. La banda correspondiente a la espícula se cortó del gel y se purificó con el kit de extracción de gel QIAquick (Qiagen). Luego, el plásmido donante CR88 mIBV (SEQ ID NO:12) se digirió con PaeI, XhoI y KpnI para obtener la estructura principal del plásmido donante. La banda con el peso molecular más alto se cortó del gel y se purificó con el kit de extracción de gel QIAquick (Qiagen). El inserto de espícula purificado y la estructura principal del plásmido donante CR88 se ligaron usando ADN ligasa T4 (ThermoFisher Scientific) a 16 °C durante la noche. La mezcla de ligación se transformó en *E. coli* competente para NEB 5-α (NEB) mediante choque térmico. Luego del kit de minipreparación de plásmidos GeneJET (ThermoFisher Scientific), los

clones positivos se identifican mediante digestión de restricción y se caracterizaron para mutación dirigida mediante secuenciación Sanger con cebadores PO618, PO1014 (Tabla 5).

Recombinación de ARN dirigida y rescate de IBV recombinante

[0324] Para el rescate de CR88 rIBV S L269C, las células LR7 se infectaron con CR88 mIBV y se electroporaron con transcripto *in vitro* generado a partir de plásmido donante pUC57-s CR88 S L269C alineado a NotI, y posteriormente se inyectaron en huevos embrionados de gallina de 8 días de vida SPF (VALO BioMedia). Después de hasta 8 días de incubación, los fluidos alantoideos de todos los huevos se analizaron por separado para el rescate de IBV recombinante después del aislamiento de ARN con el kit de purificación de ácido nucleico MagMAX™ Core (ThermoFisher) y el sistema de purificación KingFisher™ Duo Prime (ThermoFisher) y mediante el sistema de RT-PCR en una etapa SuperScript™ III con ADN polimerasa Taq Platinum™ (ThermoFisher). Los cebadores PO1728 y PO1729 (Tabla 5) unidos en espícula CR88 IBV 1ab y CR88 IBV S se usaron para distinguir el IBV recombinante de mIBV. El fluido alantoideo positivo del huevo inoculado con la dilución más alta de células LR7 se usó para una dilución de valor extremo en huevos SPF embrionados de 8 días de vida. El aislamiento del ácido nucleico se llevó a cabo como se describió anteriormente. Las muestras se analizaron mediante RT-qPCR desarrollada de acuerdo con el protocolo adaptado de Callison *et al.* (J Virol Methods. 2006;138(1-2):60-5). Brevemente, se usaron los mismos cebadores y sonda, y el termoperfil se adaptó para el uso de mezcla maestra en una etapa de virus rápida TaqMan® (ThermoFisher) y el StepOnePlus o el sistema de PCR en tiempo real rápido ABI7900 (ThermoFisher Scientific). Luego, un fluido alantoideo de resultado positivo de una dilución alta se usó para propagación en huevos embrionados de gallina SPF de 8 días de vida. El fluido alantoideo se diluyó 1:100 en 1xPBS y se inyectaron 100 µl por huevo, que se incubaron posteriormente a 37,5 °C y 60 % de humedad. El fluido alantoideo se recolectó 48 horas después de la inoculación, se libró de residuos y se almacenó a -80 °C.

Tabla 5. Cebador SDM para obtener la mutación CR88 S L269C y cebadores de secuenciación para la confirmación de la mutación dirigida y confirmación del rescate de CR88 rIBV.

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
43	PO1886	gtatatcgagaaagtagcactaacactacttgtaagttaactaatttcagttttactaatg
19	PO618	taaattggatcttggttt

44	PO1410	ttgtatacgagagccatca
45	PO1728	tcagcgtggacatgtggta
46	PO1729	cccatataggtgccaacct

Caracterización *in vitro* e *in ovo* de IBV recombinante

[0325] La dosis infecciosa al 50 % en embrión (EID₅₀) y la dosis infecciosa al 50 % en cultivo tisular (TCID₅₀) para CR88 rIBV S L269C se determinaron como se describió para H52 rIBV S F267C. Además, la cinética de replicación *in ovo* e *in vitro* y el pasaje se llevaron a cabo como se describió para H52 rIBV S F267C.

[0326] Una cinética de replicación *in ovo* similar se observó para CR88 rIBV de tipo silvestre y CR88 rIBV S L269C (Figura 10). Esto sugiere que no se presentan desventajas por parte de la mutación de cisteína en la espícula de CR88 rIBV S L269C para la eficacia de replicación *in ovo* del rIBV mutado en comparación con el rIBV de tipo silvestre CR88, como se demostró para H52 rIBV S F267C y H52 rIBV de tipo silvestre.

[0327] Para analizar si CR88 rIBV S L269C puede replicarse en células, las células Eb66® se inocularon con una dilución 1/100 de la reserva de fluido alantoideo. La propagación del virus se detectó mediante un valor ct disminuido después de 72 horas en el primer pasaje y los siguientes. Debido a la dilución del virus para el siguiente pasaje, el valor ct aumentó en comparación con el valor ct medido en la recolección del inóculo, antes de volver a disminuir durante el cultivo de 72 h debido a la replicación del virus. La replicación de CR88 rIBV S L269C fue claramente evidente durante el proceso de pasajes por un valor ct decreciente para el punto temporal 72 h en comparación con el punto temporal 0 h directamente después de la infección. En contraste, los valores ct del control negativo de CR88 rIBV de tipo silvestre confirmaron que no se produjo replicación para este virus en ninguno de los pasajes analizados y dilución del inóculo inicial durante el proceso de pasaje (Figura 11). Los resultados mostraron claramente una replicación de CR88 rIBV L269C en 7 pasajes en células Eb66® mientras que el virus de tipo silvestre no fue capaz de replicarse, lo que indica que la mutación L269C en la espícula resulta indispensable para el tropismo celular o tisular extendido. También se detectó replicación eficaz para CR88 rIBV S L269C mediante RT-qPCR (Figura 12) y determinación de TCID₅₀ (Figura 13) en un experimento cinético de replicación en células Eb66®.

[0328] Además, se determinaron los títulos infecciosos para la reserva de fluido alantoideo (10³ TCID₅₀/ml, 10⁸ EID₅₀/ml) y los pasajes de Eb66® P1 (10^{3.5} TCID₅₀/ml, 10^{5.84} EID₅₀/ml), P5 (10^{5.3} TCID₅₀/ml) y P8 (10⁶ TCID₅₀/ml, 10⁶ EID₅₀/ml). Esto confirmó

la replicación eficaz de CR88 rIBV S L269C durante el proceso de pasaje de Eb66® y la ineficacia sostenida en los huevos SPF. Por lo tanto, la mutación L269C permite la replicación en líneas celulares sin afectar la capacidad de replicación *in ovo*.

Determinación de la eficacia de la vacuna

[0329] La evaluación de la eficacia de CR88 rIBV S L269C contra la exposición con IBV 793B se llevó a cabo como se describió anteriormente para H52 rIBV S F269C. El objetivo del estudio consiste en demostrar que CR88 rIBV S L269C adaptado al cultivo transferido 1 vez en células Eb66® puede otorgar protección contra una cepa 793B virulenta. Los pollos se observaron a diario para determinar signos clínicos. No se registraron signos clínicos después de la vacunación o exposición. Las titulaciones por retroceso para la vacunación con CR88 rIBV S L269C a 1 día de vida determinaron una titulación de $10^{3,6}$ EID₅₀/animal (diana 10^3 EID₅₀/animal), respectivamente, y $10^{4,1}$ EID₅₀/animal (diana 10^4 EID₅₀/animal) para exposición con IBV 793B a los 21 días después de la vacunación. La ciliostasis se calificó como se describió en la Tabla 3, y los resultados se ilustran en la Figura 14 y se sintetizan en la Tabla 6. Todos los animales del control negativo estricto presentaron movimiento ciliar normal mientras que 4 de 5 animales del grupo de control de exposición fueron positivos para ciliostasis. En contraste, 80 % de los animales vacunados con CR88 rIBV S L269C estaban protegidos.

Tabla 6. Síntesis del índice de ciliostasis de protección a los 28 días después de la vacunación y 7 días después de la exposición. La media de la calificación de ciliostasis por grupo se calculó al sumar el puntaje total de las gallinas individuales por grupo y al dividir la suma del grupo por la cantidad de animales (máximo puntaje posible 40, mínimo puntaje posible 0). Para los animales no afectados, al menos 9 de los 10 explantes traqueales presentaron actividad ciliar normal.

Vacuna	Exposición	N.º animales/ afectados	de no	Media Calificación de ciliostasis	No afectados [%]
-	-	3/3		3	100
-	793B	5/1		30,8	20
CR88 rIBV S L269C	793B	10/8		13,2	80

[0330] Además, la carga de ARN viral se redujo de manera significativa en los riñones de animales vacunados con CR88 rIBV S L269C en comparación con el control de exposición (Figura 15). En síntesis, CR88 rIBV S L269C propagado en células Eb66® protegió de manera eficaz contra exposición a 793B virulenta. La mutación L269C de espícula adaptó el virus a la propagación en células, mientras que la eficacia *in vivo* se

mantuvo.

[0331] Ejemplo de conclusión 2: Los datos muestran que la mutación en cisteína en la posición 267 de la espícula (la secuencia de referencia para la numeración es SEQ ID NO:1) correspondiente a la posición 269 en la espícula CR88 también produce un tropismo celular o tisular extendido en un IBV CR88 recombinante. Además, dicha mutación no afectó la replicación *in ovo* del virus. Por último, la eficacia de la vacuna se mantiene incluso luego de la propagación en una línea celular, lo que sienta una base para el desarrollo de una vacuna de IBV exitosa que no requiera de cultivo *in ovo* sino que utilice líneas celulares.

EJEMPLO 3:

GENERACIÓN DE IBV CR88 RECOMBINANTE QUIMÉRICO O H52 EN DONDE CR88 O GEN DE ESPÍCULA H52 SE REEMPLAZAN POR GEN DE ESPÍCULA QX EN DONDE EL AMINOÁCIDO 270 DE LA PROTEÍNA DE ESPÍCULA SE MUTA EN UNA CISTEÍNA

[0332] A fin de determinar adicionalmente si el cambio a una cisteína en la posición 267 de la espícula para lograr un tropismo de cultivo celular podía transferirse a otros genotipos de IBV, la secuencia de aminoácidos de espícula QX (SEQ ID NO:65) se alineó con la secuencia de aminoácidos de espícula H52 (SEQ ID NO:1) para determinar la posición equivalente a la posición de aminoácido 267 de espícula H52 para la espícula de IBV QX, que se determinó como la leucina en la posición 270 de la espícula QX.

[0333] A fin de analizar el potencial para infectar células de una espícula QX con una mutación en la posición de aminoácido 270 en cisteína, se generaron un IBV CR88 recombinante y un IBV H52 recombinante, en donde la secuencia que codificaba la espícula CR88 o espícula H52 respectivamente se reemplazó por la secuencia que codificaba la espícula QX con una cisteína en la posición 270 de la proteína de espícula (SEQ ID NO:4). Para ello, las etapas de la construcción y rescate de H52 mIBV y CR88 mIBV se llevaron a cabo como se describió en el Ejemplo 1 y 2.

Clonación y mutación del gen de espícula QX

[0334] La secuencia de espícula QX se amplificó de ARN viral de IBV QX mediante RT-PCR en una etapa (RT-PCR en una etapa SuperScript® III, Platinum® Taq) usando los cebadores PO1367 y PO1347 (Tabla 7), y se clonó usando el sistema de vectores pGEM-T (Promega). Sirvió como plantilla para la mutagénesis dirigida al sitio usando los cebadores PO2163 y PO2164 (Tabla 7) diseñados con NEBaseChanger para generar un plásmido pGEM-T IBV QX S L270C (SEQ ID NO:66). A fin de

identificar los clones con plásmidos que tenían la mutación deseada, se llevó a cabo secuenciación Sanger con los cebadores PO1398 y PO633 ubicados en la región que flaqueaba la mutación después de una digestión de restricción positiva (Tabla 7).

Tabla 7: Cebadores para clonación y mutagénesis dirigida al sitio de la secuencia de espícula QX

SEQ ID NO	Nombre	Secuencia
47	PO1367	cgcggtatccgccaccatgttggtgaagtcactg
48	PO1347	gcgggcgccgcttaaacagacttttaggtctg
49	PO2163	taatactacttgtgcttaactaattttacttttagtaatg
50	PO2164	acactactttcacgatag
51	PO1398	aatttaacagtttagcgtatc
21	PO633	cgctcttagtaacataaac

Construcción de plásmido donante

El plásmido donante pUC57-s H52 rIBV QX S L270C (SEQ ID NO:69) se construyó usando el kit de clonación de ensamblaje de ADN NEBuilder® HiFi (NEB) y la herramienta en línea para el diseño del cebador. Para esto, el plásmido donante pUC57-s H52 rIBV (SEQ ID NO:9) se digirió usando los sitios de restricción de EcoRV, PmlI y BplI cercanos a la secuencia codificante de espícula H52 para alinear el plásmido y eliminar la espícula H52 y las secuencias flanqueantes. El kit de extracción de gel QIAquick (Qiagen) se usó para purificar la banda correspondiente a la estructura principal de pUC57-s IBV H52 sin la secuencia codificante de espícula H52. La secuencia codificante de ácido nucleico de QX S L270C y las secuencias flanqueantes 5' y 3' IBV H52 se amplificaron en 3 reacciones PCR separadas con ADN polimerasa de alta fidelidad Q5® (NEB; ver Tabla 8 para cebadores). Los productos de PCR se purificaron mediante extracción de gel QIAquick (Qiagen) y se usaron para ensamblaje Gibson con el kit de clonación de ensamblaje de ADN NEBuilder® HiFi (NEB) de acuerdo con el protocolo del kit para generar el plásmido donante pUC57-s H52 rIBV QX S L270C (SEQ ID NO:69).

El plásmido donante pUC57-s CR88 rIBV QX S L270C (SEQ ID NO:68) se construyó usando el kit de clonación de ensamblaje de ADN NEBuilder® HiFi (NEB) y la herramienta en línea para el diseño del cebador. Se generaron dos fragmentos de PCR: Uno para la estructura principal de CR88 usando pUC57-s CR88 rIBV (SEQ ID NO:67) como plantilla y uno para la espícula QX L270C mutada usando pGEM-T IBV CR88 S L270C (SEQ ID NO:66) como plantilla para PCR de Q5 con los cebadores en la Tabla 8. Los productos de PCR se purificaron en gel con el kit de extracción de gel QIAquick (Qiagen) antes de usarse para el ensamblaje Gibson de acuerdo con el

protocolo del kit para generar el plásmido donante pUC57-s CR88 rIBV QX S L270C (SEQ ID NO:68).

Tabla 8: Los cebadores se diseñaron con la herramienta en línea NEBuilder para ensamblaje Gibson del plásmido donante pUC57-s CR88 rIBV QX L270C (PCR 1, 2) y pUC57-s H52 rIBV QX L270C (PCR 3, 4, 5)

PCR	SEQ ID NO	Nombre del cebador	Producto	Secuencia
1	52	PO2207	Espícula	aagtgtggaagtacttggaagagatgttggaagtcactg
	53	PO2208	QX	agaaaagatgtggactttaacattaaacagacttttaggtctg
2	54	PO2209	Estructura	tgattaaaagtcacacatcttttaataattattattcttcttgg
	55	PO2210	principal de CR88	ctcttaccagtaacttaccacacttaattaaattaagactaagtc
3	70	PO1783	Flanco 5'	cagagcacaagtttgatcttgatATCTGATATGTATACAGACAATGATTC
	71	PO2062	H52	actcaccaacatCTCTTACCAGTAACCTACC
4	72	PO2063	QX S	ttactgtgaagagATGTTGGTGAAGTCACTG
	73	PO2064	L270C	ggactttggatcaTTAAACAGACTTTTTAGGTCTG
5	74	PO2065	Flanco 3'	aaagtctgttaaTGATCCAAAGTCCCCTAG
	75	PO1788	H52	cttaactcctggaattactaaccacGTGTACCAAAATAAACAACAAGC

El ensamblaje exitoso de pUC57-s CR88 rIBV QX S L270C y pUC57-s H52 rIBV QX S L270C se identificó mediante digestión de restricción de plásmidos con NheI y NotI o EcoRV, BlnI y PmlI respectivamente, y se caracterizó mediante secuenciación con los cebadores en la Tabla 9.

Tabla 9: Cebadores para secuenciación de plásmidos donantes pUC57-s CR88 rIBV QX S L270C y pUC57-s H52 rIBV QX S L270C.

SEQ ID NO	Nombre del cebador	Secuencia
56	PO1565	caggattgtgcatggtggac
51	PO1398	aatttaacagtttagcgtatc
57	PO2090	gaagtgaayacaagatcaccattt
58	PO1420	tgactgattctgctgctaaa
44	PO1410	ttgtatagcagagccatca
59	PO1421	tcttgaaacccccaagtag
60	PO1425	tatattcagcatcagttggc
61	PO1422	ggattttgtggtagtgaag
62	PO1575	ccactattgcagtaacattaaca
63	PO1567	ctagactgtaagttactattg

Recombinación de ARN dirigida y rescate de IBV recombinante

[0335] Para el rescate de CR88 rIBV QX S L270C y H52 rIBV QX S L270C, las células LR7 se infectaron con CR88 mIBV o H52 mIBV respectivamente y se electroporaron con transcritto *in vitro* generado a partir del plásmido donante pUC57-s CR88 rIBV QX S L270C o pUC57-s H52 rIBV QX S L270C alineado a MssI o NotI repectivamente, y posteriormente se inyectaron en huevos embrionados de gallina SPF de 8 días de vida (VALO BioMedia). Después de hasta 8 días de incubación, los fluidos alantoideos de

algunos huevos se analizaron por separado para el rescate de IBV recombinante después del aislamiento de ARN con el kit de purificación de ácido nucleico MagMAX™ Core (ThermoFisher) y el sistema de purificación KingFisher™ Duo Prime (ThermoFisher) y mediante el sistema de RT-PCR en una etapa SuperScript™ III con ADN polimerasa Taq Platinum™ (ThermoFisher). Los cebadores PO1398 y PO633 (Tabla 7) que se unieron en la secuencia de espícula QX se usaron para identificar el rescate del virus recombinante. El fluido alantoideo positivo (definido por muerte embrionaria o por un resultado de RT-PCR positivo) del huevo inoculado con la dilución más alta de células LR7 se usó para una dilución de valor extremo en huevos embrionados SPF de 8 días de vida. El aislamiento del ácido nucleico se llevó a cabo como se describió anteriormente. Las muestras se analizaron mediante RT-qPCR desarrollada de acuerdo con el protocolo adaptado de Callison et al. (J Virol Methods. 2006;138(1-2):60-5). Brevemente, se usaron los mismos cebadores y sonda, y el termoperfil se adaptó para el uso de mezcla maestra en una etapa de virus rápida TaqMan® (ThermoFisher) y el StepOnePlus o el sistema de PCR en tiempo real rápido ABI7900 (ThermoFisher Scientific). Luego, un fluido alantoideo de resultado positivo de una dilución preferentemente alta se usó para propagación en huevos embrionados de gallina SPF de 8 días de vida. El fluido alantoideo se diluyó 1:100 en 1xPBS y se inyectaron 100 µl por huevo, que se incubaron posteriormente a 37,5 °C y 60 % de humedad. El fluido alantoideo se recolectó 48 horas después de la inoculación, se libró de residuos y se almacenó a -80 °C.

Caracterización *in vitro* e *in ovo* de IBV recombinante

[0336] La dosis infecciosa al 50 % en embrión (EID50) y la dosis infecciosa al 50 % en cultivo tisular (TCID50) para CR88 rIBV QX S L270C y H52 rIBV QX S L270C se determinó como se describió para H52 rIBV S F267C. Además, las cinéticas de replicación *in ovo* e *in vitro* y el pasaje se llevaron a cabo como se describió para H52 rIBV S F267C.

[0337] Se observaron valores de ct pico similares después de 48 horas con cinéticas de replicación *in ovo* levemente diferentes para CR88 rIBV QX S L270C y H52 rIBV QX S L270C (Figura 16). Si bien CR88 rIBV QC L270C se replica de manera muy similar a CR88 rIBV y IBV QX de tipo silvestre, H52 rIBV QX s L270C se replica de manera más similar a H52 rIBV. Esto sugiere que no se presentan desventajas por parte de la mutación de cisteína en la espícula de CR88 rIBV QX S L270C y H52 rIBV QX S L270C para la eficacia de replicación *in ovo* del rIBV mutado en comparación con otro rIBV o IBV de tipo silvestre.

[0338] Para analizar si CR88 rIBV QX S L270C y H52 rIBV QX S L270C puede replicarse en células, las células Eb66® se inocularon con una dilución 1/100 de la reserva de fluido alantoideo. La propagación de los virus se analizó mediante aislamiento del ARN viral y el posterior análisis RT-qPCR. La replicación de CR88 rIBV QX S L270C y H52 rIBV QX S L270C es claramente visible en el proceso de pasaje mediante la media del valor de ct disminuido para el punto temporal de 72 h en comparación con el punto temporal de 0 h directamente después de la infección (Figura 17 y 18). Debido a la dilución del virus para el siguiente pasaje, el valor ct aumentó en comparación con el valor ct medido en la recolección del inóculo, antes de volver a disminuir durante el cultivo de 72 h debido a la replicación del virus. La replicación eficaz para CR88 rIBV QX S L270C y H52 rIBV QX S L270C también se detectó a través de RT-qPCR (Figura 19) en un experimento cinético de replicación en células Eb66®. Ambos virus exhibieron patrones de replicación similares con valores de CT pico después de 48 horas.

[0339] Además, se determinaron los títulos infecciosos para la reserva de fluido alantoideo de CR88 rIBV QX S L270C (10^8 EID₅₀/ml) y los pasajes de Eb66® P2 (10^6 TCID₅₀/ml, $10^{8.17}$ EID₅₀/ml), P6 (10^6 TCID₅₀/ml, $10^{7.83}$ EID₅₀/ml) y P9 (10^6 TCID₅₀/ml, $10^{8.5}$ EID₅₀/ml). Además, se determinaron los títulos infecciosos para la reserva de fluido alantoideo de H52 rIBV QX S L270C (10^8 EID₅₀/ml) y los pasajes de Eb66® P3 ($10^{4.5}$ TCID₅₀/ml, $10^{8.13}$ EID₅₀/ml) y P6 ($10^{5.5}$ TCID₅₀/ml, $10^{8.13}$ EID₅₀/ml). Esto confirmó la replicación eficaz de CR88 rIBV QX S L270C durante el proceso de pasaje de Eb66® y la ineficacia sostenida en los huevos SPF. Por lo tanto, la mutación L270C permite la replicación en líneas celulares sin afectar la capacidad de replicación *in ovo*.

Determinación de la eficacia de la vacuna

[0340] La evaluación de la eficacia de CR88 rIBV QX S L270C y H52 rIBV QX S L270C contra la exposición con IBV D388 QX se llevó a cabo como se describió para H52 rIBV S F269C anterior. El objetivo del estudio consistió en demostrar que CR88 rIBV QX S L270C y H52 rIBV QX S L270C adaptados al cultivo celular transferidos 6 veces en células Eb66® podían otorgar protección contra una cepa D388 QX virulenta. Los pollos se observaron a diario para determinar signos clínicos. No se registraron signos clínicos después de la vacunación o exposición. Las titulaciones por retroceso para la vacunación con CR88 rIBV QX S L270C y H52 rIBV QX S L270C a 1 día de vida determinaron una titulación de $10^{4.2}$ EID₅₀/animal y $10^{3.3}$ EID₅₀/animal (diana de $10^{3.5}$ EID₅₀/animal), respectivamente, y 10^3 EID₅₀/animal (diana de 10^3 EID₅₀/animal) para exposición con IBV D388 QX a los 21 días después de la vacunación. La

ciliostasis se calificó como se describió en la Tabla 3, y los resultados se ilustran en la Figura 20 y se sintetizan en la Tabla 10. Todos los animales del control negativo estricto presentaron movimiento ciliar normal mientras que todos los animales del grupo de control de exposición fueron positivos para ciliostasis. En contraste 78 % y 91 % de animales vacunados con CR88 rIBV QX S L270C o H52 rIBV QX S L270C estaban protegidos.

Tabla 10: Síntesis del índice de ciliostasis de protección a los 28 días después de la vacunación y 7 días después de la exposición. La media de la calificación de ciliostasis por grupo se calculó al sumar el puntaje total de las gallinas individuales por grupo y al dividir la suma del grupo por la cantidad de animales (máximo puntaje posible 40, mínimo puntaje posible 0). Para los animales no afectados, al menos 9 de los 10 explantes traqueales presentaron actividad ciliar normal. *un animal del control negativo estricto murió, la muerte no se asoció a signos clínicos o lesiones por IBV.

Vacuna	Exposición	N.º animales/ afectados de no	Media Calificación de ciliostasis	No afectados [%]
-	-	3/2*	0	100
-	D388 QX	5/0	38,4	0
CR88 rIBV QX S L270C	D388 QX	9/7	13,9	78
H52 rIBV QX S L270C	D388 QX	11/10	8,1	91

[0341] Además, la carga viral de ARN se redujo significativamente en riñones de los animales vacunados con CR88 rIBV QX S L270C o H52 rIBV QX L270C en comparación con los animales de control de exposición (Figura 21). En síntesis, CR88 rIBV QX S L270C y H52 rIBV QX S L270C propagados en células Eb66® se protegieron eficazmente contra la exposición a D388 QX virulenta. La mutación L270C de espícula adaptó el virus a la propagación en células, mientras que la eficacia *in vivo* se mantuvo.

[0342] Ejemplo de conclusión 3: Los datos muestran que la mutación en cisteína en la posición 267 de la espícula (la secuencia de referencia para la numeración es SEQ ID NO:1) que corresponde a la posición 270 en la espícula de IBV QX también produce un tropismo celular o tisular extendido. Además, el tropismo de cultivo tisular de una espícula con la mutación de cisteína no se restringió a los antecedentes genéticos homólogos, dado que la espícula de QX L270C se insertó en la estructura genética CR88 y H52, y CR88 rIBV QX S L270C y H52 rIBV QX S L270C replicaron

eficazmente en células y se protegieron eficazmente contra la exposición a IBV D388 QX virulenta.

EJEMPLO 4:

GENERACIÓN DE IBV H52 RECOMBINANTE QUIMÉRICO O H52 EN DONDE LA SECUENCIA CODIFICANTE DEL ECTODOMINIO DE ESPÍCULA SE REEMPLAZA POR UNA SECUENCIA CODIFICANTE DEL ECTODOMINIO DE ESPÍCULA ARKDPI EN DONDE EL AMINOÁCIDO 274 DE LA PROTEÍNA DE ESPÍCULA SE MUTA EN UNA CISTEÍNA

[0343] A fin de determinar adicionalmente si el cambio a una cisteína en la posición 267 de la espícula para lograr un tropismo de cultivo celular podía transferirse a otros genotipos de IBV, la secuencia de aminoácidos de espícula ArkDPI (SEQ ID NO:76) se alineó con la secuencia de aminoácidos de espícula H52 (SEQ ID NO:1) para determinar la posición equivalente a la posición de aminoácido 267 de espícula H52 para la espícula de IBV ArkDPI, que se determinó como la leucina en la posición 274 de la espícula ArkDPI.

[0344] A fin de analizar el potencial para infectar células de una espícula ArkDPI con una mutación en la posición de aminoácido 274 en cisteína, se generó un IBV H52 recombinante, en donde la secuencia que codificaba la espícula H52 se reemplazó por la secuencia que codificaba una espícula ArkDPI con una cisteína en la posición 274 de la proteína de espícula ArkDPI (SEQ ID NO:77). Para ello, las etapas de la construcción y rescate de un H52 mIBV se llevaron a cabo como se describió en el Ejemplo 1.

Construcción de plásmido donante

El plásmido L274C de espícula pUC57-s ArkDPI (SEQ ID NO:78) fue sintetizado por un proveedor comercial. El plásmido donante pUC57-s H52 rIBV ArkDPI S Ecto L274C (SEQ ID NO:79) se construyó usando el kit de clonación de ensamblaje de ADN NEBuilder® HiFi (NEB) y la herramienta en línea para el diseño del cebador. Para esto, el plásmido donante pUC57-s H52 rIBV (SEQ ID NO:9) se digirió usando los sitios de restricción de EcoRV, PmlI y BlnI cercanos a la secuencia codificante de espícula H52 para alinear el plásmido y eliminar la espícula H52 y las secuencias flanqueantes. El kit de extracción de gel QIAquick (Qiagen) se usó para purificar la banda correspondiente a la estructura principal de pUC57-s IBV H52 sin la secuencia codificante de espícula H52. La secuencia codificante de ácido nucleico de ArkDPI S Ecto L274C y las secuencias flanqueantes 5' y 3' IBV H52 se amplificaron en

3 reacciones PCR separadas con ADN polimerasa de alta fidelidad Q5® (NEB; ver Tabla 11 para cebadores). Los productos de PCR se purificaron mediante extracción de gel QIAquick (Qiagen) y se usaron para ensamblaje Gibson con el kit de clonación de ensamblaje de ADN NEBuilder® HiFi (NEB) de acuerdo con el protocolo del kit para generar el plásmido donante pUC57-s H52 rIBV ArkDPI S Ecto L274C (SEQ ID NO:79).

Tabla 11: Cebadores diseñados con la herramienta en línea NEBuilder para ensamblaje Gibson de pUC57-s H52 rIBV ArkDPI S Ecto L274C.

PCR	SEQ NO	ID	Nombre del cebador	Producto	Secuencia
1	70	PO1783		Flanco 5' H52	cagagcacaagttgatcttgatctctgatgtatctgatacagacaatgattc
	80	PO2424			catataaattagcactacatagtcacac
2	81	PO2425		ArkDPI S Ecto	atgtagtgcataatttatgacaacgaatctttg
	82	PO2426			acacataccaaggccactaatataagtttg
3	83	PO2427		Flanco 3' H52	taagtggccttggtatgtgtggctagcc
	75	PO1788			cttaactctggaattactaaccacgtgtaccaaataaacaacaagc

El ensamblaje exitoso de pUC57-s H52 rIBV ArkDPI S Ecto L274C se identificó mediante digestión de restricción de plásmido con BlnI y XhoI.

Recombinación de ARN dirigida y rescate de IBV recombinante

Para el rescate de H52 rIBV ArkDPI S Ecto L274C, las células LR7 se infectaron con H52 mIBV respectivamente y se electroporaron con transcripto *in vitro* generado a partir de plásmido donante pUC57-s H52 rIBV ArkDPI S Ecto L274C alineado a Mssl, y posteriormente se inyectaron en huevos embrionados de gallina de 8 días de vida SPF (VALO BioMedia). Después de hasta 8 días de incubación, los fluidos alantoideos de algunos huevos se analizaron por separado para el rescate de IBV recombinante después del aislamiento de ARN con el kit de purificación de ácido nucleico MagMAX™ Core (ThermoFisher) y el sistema de purificación KingFisher™ Duo Prime (ThermoFisher) y mediante el sistema de RT-PCR en una etapa SuperScript™ III con ADN polimerasa Taq Platinum™ (ThermoFisher). Los cebadores PO1317 y PO633 (Tabla 12) que se unieron en la secuencia de espícula ArkDPI se usaron para identificar el rescate del virus recombinante. El fluido alantoideo positivo (definido por muerte embrionaria o por un resultado de RT-PCR positivo) del huevo inoculado con la dilución más alta de células LR7 se usó para una dilución de valor extremo en huevos embrionados SPF de 8 días de vida. El aislamiento del ácido nucleico se llevó a cabo como se describió anteriormente. Las muestras se analizaron mediante RT-qPCR desarrollada de acuerdo con el protocolo adaptado de Callison *et*

al. (J Virol Methods. 2006;138(1-2):60-5). Brevemente, se usaron los mismos cebadores y sonda, y el termoperfil se adaptó para el uso de mezcla maestra en una etapa de virus rápida TaqMan® (ThermoFisher) y el StepOnePlus o el sistema de PCR en tiempo real rápido ABI7900 (ThermoFisher Scientific). Luego, un fluido alantoideo de resultado positivo de una dilución preferentemente alta se usó para la propagación en huevos embrionados de gallina SPF de 8 días de vida. El fluido alantoideo se diluyó 1:100 en 1xPBS y se inyectaron 100 µl por huevo, que se incubaron posteriormente a 37,5 °C y 60 % de humedad. El fluido alantoideo se recolectó 48 horas después de la inoculación, se libró de residuos y se almacenó a -80 °C.

Tabla 12: Cebadores para la detección de H52 rIBV ArkDPI S Ecto L274C.

SEQ ID NO	Nombre del cebador	Secuencia
84	PO1317	taatactgggaattttcaga
21	PO633	cgctcttagtaacataaac

Caracterización *in vitro* de IBV recombinante

[0345] La dosis infecciosa al 50 % en embrión (EID50) y la dosis infecciosa al 50 % en cultivo tisular (TCID50) para H52 rIBV ArkDPI S Ecto L274C se determinó como se describió para H52 rIBV S F267C. Además, las cinéticas de replicación *in vitro* y el pasaje se llevaron a cabo como se describió para H52 rIBV S F267C.

Para analizar si H52 rIBV ArkDPI S Ecto L274C puede replicarse en células, se inocularon células EB66® con una dilución 1/10 de reserva de fluido alantoideo para el primer pasaje y con una dilución 1/10 o 1/100 para los pasajes posteriores. La propagación de los virus se analizó mediante aislamiento del ARN viral y el posterior análisis RT-qPCR. La replicación de H52 rIBV ArkDPI S Ecto L274C fue claramente evidente después de tres pasajes por una media del valor ct decreciente para el punto temporal 72 h (11.59) en comparación con el punto temporal 0 h (21.09) directamente después de la infección.

Ejemplo de conclusión 4: Los datos muestran que la mutación en cisteína en la posición 267 de la espícula (la secuencia de referencia para la numeración es SEQ ID NO:1) que corresponde a la posición 274 en la espícula de IBV ArkDPI también produce un tropismo celular o tisular extendido. Además, el tropismo de cultivo tisular de una espícula con la mutación de cisteína no se restringió a los antecedentes genéticos homólogos, dado que el ectodominio de la espícula ArkDPI L274C se insertó en la estructura genética de H52, y H52 rIBV ArkDPI S Ecto L274C replicó de manera eficaz en las células.

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de espícula de coronavirus aviar o fragmento de esta, en donde al menos una parte de la subunidad S1 pertenece a un coronavirus aviar con un tropismo celular o tisular restringido, y en donde en la posición de aminoácido 267 se encuentra una cisteína.
2. Una proteína de espícula de coronavirus aviar recombinante o fragmento de esta que comprende una mutación en la posición de aminoácido 267 en cisteína.
3. La proteína de espícula de coronavirus aviar o fragmento de esta de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde el coronavirus aviar es IBV (virus de la bronquitis infecciosa).
4. La proteína de espícula de coronavirus aviar o fragmento de esta de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la cisteína en la posición de aminoácido 267 se introduce a través de una mutación.
5. La proteína de espícula de coronavirus aviar o fragmento de esta de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la cisteína en la posición de aminoácido 267 o dicha mutación en la posición de aminoácido 267 en cisteína produce un tropismo celular o tisular extendido del coronavirus aviar.
6. La proteína de espícula de coronavirus aviar o fragmento de esta de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el coronavirus aviar infecta y/o se replica en al menos una línea celular seleccionada de la lista que consiste en: DF-1 (Douglas Foster), PBS-12, PBS-12SF (PBS-12 libre de suero), BHK21 (riñón de hámster bebé), HEK 293T (riñón embrionario humano), Vero (Verda Reno), MA104, RK13 (riñón de conejo), LMH (hepatoma de leghorn macho), MDCK (riñón canino Madin-Darby), MDBK (riñón bovino Madin-Darby), PK15 (riñón porcino), PK2A (riñón porcino), SF9, SF21 y SF+ (*Spodoptera frugiperda*).
7. La proteína de espícula de coronavirus aviar o fragmento de esta de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 se usa para determinar la numeración de la posición en la proteína de espícula.
8. La proteína de espícula de coronavirus aviar o fragmento de esta de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la posición de aminoácido 267 se encuentra dentro de la subunidad S1 de la proteína de espícula.
9. La proteína de espícula de coronavirus aviar o fragmento de esta de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8, en donde la proteína de espícula no es de una cepa Beaudette de IBV.

10. La proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9, en donde la proteína de espícula es de un IBV con un genotipo o serotipo o una cepa seleccionada de una lista que consiste en: Arkansas, Brazil, California, Connecticut, Delaware, Dutch, Florida, Georgia, Gray, Holte, Iowa, Italy-02, JMK, LDT3, Maine, H52, H120, M41, Pennsylvania, PL84084, Qu, QX, Q1, SE 17, Variant 2 y 4/91.
11. La proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 10, en donde la proteína de espícula de IBV o un fragmento de esta se selecciona de una lista de genotipos que consiste en: GI-2 a 27, GII-1, GIII-1, GIV-1, GV-1, GVI-1.
12. La proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 11, en donde la proteína de espícula de IBV o un fragmento de esta consiste en o comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 77 o una secuencia que tiene al menos 80 %, 85 %, 90 %, 93 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 %, 99,95 %, 99,98 % o 99,99 % de identidad de secuencia con esta.
13. La proteína de espícula de IBV o fragmento de esta de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 12, en donde dicha al menos una parte de la subunidad S1 es de un IBV seleccionado de una lista de genotipos o serotipos o cepas que consisten en: Arkansas, Brazil, California, Connecticut, Delaware, Dutch, Florida, Georgia, Gray, Holte, Iowa, Italy-02, JMK, LDT3, Maine, H52, H120, M41, Pennsylvania, Pennsylvania, PL84084, Qu, QX, Q1, SE 17, Variant 2 y 4/91.
14. La proteína de espícula de coronavirus aviar o fragmento de esta de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 13, en donde el coronavirus aviar o IBV con un tropismo celular o tisular restringido se restringe a una infección y/o replicación en huevos embrionados de gallina y/o en células de riñón de gallina primarias.
15. Una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de espícula o fragmento de esta de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.
16. Un plásmido que comprende una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la reivindicación 15.
17. Una célula que comprende un plásmido de la acuerdo con la reivindicación 16.
18. Una partícula viral que comprende una proteína de espícula o fragmento de esta de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.
19. Un coronavirus aviar que comprende la proteína de espícula o fragmento de esta de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 o un IBV (virus de la

bronquitis infecciosa) que comprende la proteína de espícula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 14.

20. El coronavirus aviar o IBV de acuerdo con la reivindicación 19, en donde el coronavirus aviar o IBV se encuentra atenuado.

21. Una célula que comprende:

- la partícula viral de acuerdo con la reivindicación 18, o
- el coronavirus aviar o IBV de acuerdo con la reivindicación 19.

22. Una composición inmunógena que comprende:

- la proteína de espícula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, o

- la partícula viral de acuerdo con la reivindicación 18, o
- el coronavirus aviar o IBV de acuerdo con la reivindicación 19.

23. Un método para la producción o elaboración de un coronavirus aviar con un tropismo celular o tisular extendido que comprende el uso de la proteína de espícula de coronavirus aviar o fragmento de esta de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.

24. Un método para cultivar un coronavirus aviar en un cultivo celular o tisular que comprende el uso de la proteína de espícula de coronavirus aviar o fragmento de esta de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.

25. El método de acuerdo con las reivindicaciones 23 o 24, en donde la proteína de espícula de coronavirus es una proteína de espícula de IBV (virus de la bronquitis infecciosa) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 14.

26. Un método para inmunizar un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto una composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 22.

27. Un método para tratar o prevenir signos clínicos causados por IBV en un sujeto que lo necesita, en donde el método comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 22.

28. Un método para reducir la ciliostasis en un sujeto que lo necesita, en comparación con un sujeto de un grupo de control no inmunizado de la misma especie, en donde el método comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 22.

RESUMEN

La presente invención se refiere, entre otras cosas, a una proteína de espícula de coronavirus aviar recombinante o fragmento de esta que comprende una mutación en la posición de aminoácido 267 en cisteína. Además, la presente invención se refiere a una composición inmunógena que comprende un coronavirus aviar con dicha proteína de espícula.