(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0051499
(43) 공개일자 2020년05월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/86 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 39/145 (2006.01) *A61K 39/17* (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/86 (2013.01)
A61K 39/145 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0139208
(22) 출원일자 2019년11월04일
심사청구일자 2019년11월04일
(30) 우선권주장
1020180134495 2018년11월05일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
박만성
서울특별시 강남구 삼성로 417, 104동 704호 (대치동, 대치포스코더샵아파트)
김진일
서울특별시 동대문구 왕산로 244, 1동 502호 (전농동)
(74) 대리인
특허법인 무한

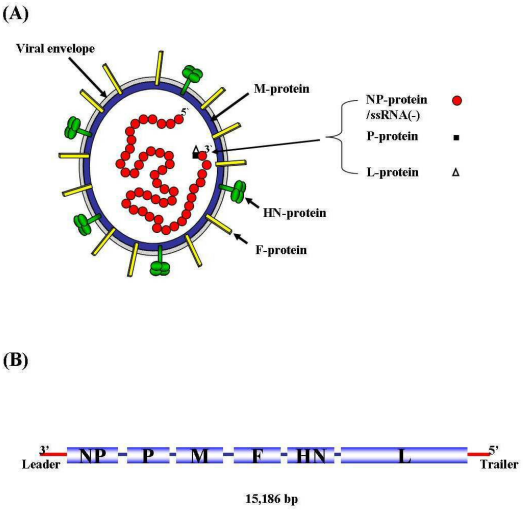
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **H9 헤마글루티닌을 포함하는 뉴캐슬병 재조합 벡터 및 이로부터 제조된 재조합 바이러스**

(57) 요 약

본 발명은 H9 헤마글루티닌을 포함하는 뉴캐슬병 재조합 벡터 및 이로부터 제조된 재조합 바이러스에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 39/17 (2013.01)
C07K 14/005 (2013.01)
A61K 2039/552 (2013.01)
C12N 2760/16134 (2013.01)
C12N 2760/18134 (2013.01)
C12N 2760/18141 (2013.01)
C12N 2760/18151 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 716002-7
부처명 농림축산식품부
연구관리전문기관 농림식품기술기획평가원
연구사업명 농림축산식품연구센터지원
연구과제명 바이러스성 가금질병 예방용 재조합 마커백신 개발 및 산업화
기 여 율 1/1
주관기관 고려대학교 산학협력단
연구기간 2016.02.29 ~ 2018.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

약병원성 뉴캐슬병(Newcastle disease) B1 바이러스의 뉴클레오캡시드 단백질(NP), 인단백질(P), 매트릭스(M), 융합 단백질(F), 헤마글루티닌 뉴라미니다제(HN), 폴리머라제(L) 단백질 코딩 서열을 포함하고,

상기 P 단백질과 M 단백질 사이에, 조류 인플루엔자(Avian influenza) 바이러스 H9 아형의 헤마글루티닌(HA) 단백질 코딩 서열이 삽입된, 재조합 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 조류 인플루엔자 바이러스 H9 아형은 A/chicken/Cheongju/ADL0401/2004 (H9N2 subtype; Genebank accession No. DQ464352) 또는 A/guineafowl/HongKong/WF10/99 (H9N2 subtype; Genebank accession No. AY206676)인, 재조합 벡터.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 조류 인플루엔자 바이러스 H9의 아형의 헤마글루티닌(HA) 단백질 코딩 서열은 유전자은행 등록번호(Genebank accession No. AY206676)의 염기서열을 가지는 것인, 재조합 벡터.

청구항 4

제3항의 재조합 벡터로부터 제조된, 재조합 바이러스.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 재조합 바이러스는 상기 재조합 벡터로 형질전환 된 동물 세포의 상층액을 발육란에 접종한 후 요막액으로부터 수득 되는 것인, 재조합 바이러스.

청구항 6

제5항의 재조합 바이러스를 포함하는, 뉴캐슬병 바이러스 및 H9 조류 인플루엔자 바이러스의 예방용 백신.

청구항 7

제6항에 있어서,

조류 및 포유동물에서 뉴캐슬병 바이러스 및 H9 조류 인플루엔자 바이러스에 대하여 2가(divalent) 면역능력을 나타내는, 뉴캐슬병 바이러스 및 H9 조류 인플루엔자 바이러스의 예방용 백신.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 조류는 닭, 오리, 거위, 메추리, 꿩 및 칠면조를 포함하는, 뉴캐슬병 바이러스 및 H9 조류 인플루엔자 바이러스의 예방용 백신.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 포유동물은 소, 말, 돼지, 양, 염소 또는 사람을 포함하는, 뉴캐슬병 바이러스 및 H9 조류 인플루엔자 바이러스의 예방용 백신.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 H9 헤마글루티닌을 포함하는 뉴캐슬병 재조합 벡터 및 이로부터 제조된 재조합 바이러스에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 뉴캐슬병 바이러스(NDV, Newcastle disease virus)는 음성(negative sense) 단일가닥 RNA 바이러스로 파라믹소비리다에(Paramyxoviridae) 과, 모노네가바이랄러스(Mononegavirales) 목, 아불라바이러스(Avulavirus) 속에 속하는 전염성 바이러스이다. 이 바이러스는 가금류, 특히 닭이나 오리에서 잘 발생하는 전염성이 강한 바이러스이며, 한국에서도 발병률이 높고 전 세계적으로 NDV에 대한 백신은 각국 정부가 의무적으로 접종도록 권고하고 있다. 유전체의 길이는 15,186 뉴클레오티드이다. NDV는 유전체 내에 다른 바이러스 단백질을 코딩하는 6개의 전사 단위체, 즉 뉴클레오캡시드 단백질(NP), 인단백질(P), 매트릭스 (M), 융합 단백질(F), 헤마글루티닌 뉴라미니다제(HN), 폴리머라제(L)를 가지고 있다. 이들 전사 단위체에 의하여 코딩되는 mRNA의 합성은 감염된 세포의 세포질에서 바이러스 RNA-의존성 RNA 폴리머라제가 촉매작용한다. 모든 전사 단위체는 보존된 유전자 개시점과 유전자 말단 서열에 플랭킹된다. 바이러스 복제 과정에서, mRNA 합성은 mRNA 전사의 기울기를 야기하는데, NP와 같은 3' 말단에 근접한 유전자가 L과 같은 3' 말단에서 멀리 위치한 유전자보다 더 많이 전사된다. 따라서, 새로운 전사 단위체의 발현 수준은 3' 말단에 대한 그것의 위치에 의존할 것이다.

[0004] 뉴캐슬병 바이러스는 외피(envelope)을 가지고 있으며 외피에는 바이러스가 숙주 세포에 결합할 수 있도록 해주는 HN 단백질과 외피와 숙주 세포의 융합을 일으키는 F 단백질이 있다. F 단백질과 HN 단백질은 글리코단백질(glycoprotein)로서 외피의 표면에 분포되어 있다.

[0005] F 단백질은 ° 형 막 글리코단백질(type 컂lycoprotein)로써 삼합체(trimeric) 구조를 형성한다. F 단백질은 비활성 전구체 형태(F0)로 만들어지고 골지막(Golgi membranes)을 통해 이동하는 동안 활성 형태인 F1과 F2로 절단된다. 이러한 과정은 F1 소단위체(subunit)의 아미노 말단에서 소수성 도메인을 노출시키고 이것은 성숙한 단백질의 생물학적 활성에 중요한 역할을 한다. 융합 펩티드(fusion peptide)라 불리는 소수성 도메인은 파라믹소바이러스(paramyxovirus) F 단백질에서 매우 보존되어 있고 막 융합을 매개하는데 직접적으로 관여하고 있을 것이라 여겨지고 있다. 파라믹소바이러스 F 단백질은 7개 반복(heptad repeats)을 포함하고 알파 헬릭스 구조를 형성할 가능성이 있는 두 지역을 포함하는 여러 개의 공통된 구조 형태를 갖고 있다. 두 반복중 가장 긴 7개 반복 A(heptad repeat A)는 F1의 아미노 말단에서 소수성 융합 펩티드와 인접해 있으며, 7개 반복 B는 막관통(transmembrane) 지역의 윗부분에 밀착하여 있다. 7개 반복 B는 매 7개 잔기마다 매우 보존된 류신 또는 이소류신의 연속으로 구성되어 있다.

[0006] NDV는 다양한 가금류 종들을 감염시킨다. 많은 종류의 가금류 종에 중증 호흡기 및 신경계 질환을 야기한다. NDV의 균주는 병독성(virulence)에 따라 분류되었다: 조류에 징후없는 감염을 야기시키는 약병원성 균주

(lentogenic strain); 조류에 호흡기 질환을 야기시키는 중간병원성 균주(mesogenic strain); 조류에 종종 신경계 징후를 동반한 전격성 감염을 야기하는 강병원성 균주(velogenic strain). NDV의 몇몇 약병원성 균주는 최근 닭에 생약독화된 백신으로 사용되고 있다.

[0007] 감염질환으로부터 일반 대중 또는 가금류를 보호하기 위한 이상적인 백신은 쉽게 제조되고 강한 보호성 면역반응을 신속하게 야기하는 백신이다. 생바이러스 백신은 다양한 바이러스 질환에 대하여 효과적인 것으로 입증되었으며, 강한 지속성 체액성 면역반응 및 세포성 면역반응을 유도하였다. 재조합 NDV는 사람에 병원성이 없고, 사람은 그것에 대하여 전에 존재한 면역성을 가지고 있지 않으며, 대규모 생산을 위한 발육란(embryonated egg)에서 쉽게 자라기 때문에 생바이러스 백신 벡터로 사용하기 위한 좋은 후보이다.

[0008] 최근, 국내 가금류는 종 장벽을 넘어 사람을 감염시키는 능력을 가진 신규 인플루엔자 균주를 생산하는 주공급원으로 알려지고 있다. 따라서, 가금류 백신접종을 가금류로부터 사람, 야생 조류에까지 조류 인플루엔자 바이러스(AI)의 전염을 차단하기 위한 합리적이고 중요한 전략으로 간주해야 한다.

[0009] 조류인플루엔자바이러스를 초래하는 바이러스는 오르소믹소비리대 (Ortomixoviridae) 과에 속한다. 인플루엔자 바이러스는 바이러스를 이루고 있는 뉴클레오캡시드(Nucleocapsid ; NP) 단백질 및 매트릭스(Matrix; M) 단백질의 항원성의 차이에 따라 A형, B형, C형으로 분류하며, 조류에서는 A형 인플루엔자 바이러스만이 분리 보고되고 있다.

[0010] A형 인플루엔자 바이러스는 표면당단백질로 헤마글루티닌(Hemagglutinin; HA)과 뉴라미니다제(Neuraminidase; NA)를 가지고 있는데, 현재까지 분리된 A형 인플루엔자 바이러스의 경우 HA는 15종류, NA는 9종류의 혈청형이 보고되어 있으며, 이들의 조합에 따라 아형(subtype)으로 구분되고, 따라서 다양한 혈청형의 인플루엔자 바이러스가 존재하게 된다. HA 단백질은 세포성 수용체로의 결합 단백질이며 이는 표적 세포로의 바이러스 침투를 위해 중요한, 세포성 막과 바이러스 외피의 융합을 매개한다. 이 단백질은 중화 항체의 반응을 유도한다.

[0011] 최근, H9 아형의 인플루엔자 바이러스에 의해 야기된 가금류의 발생은 유럽, 남아프리카, 미국, 한국, 홍콩, 중국, 중동에서 보고되었다. H9 인플루엔자 바이러스의 인수공통(zoonotic) 잠재력은 1999년 홍콩에서 사람에게 전염된 것을 통해 주목되었다. 한국에서는, 저병원성 H9 아형 조류 인플루엔자 바이러스가 가금류에서 계속적으로 전염되어, 계란 생산의 감소 및 닭의 치사를 야기시켰다. 1996년도에 우리나라에서 H9N2 혈청형 저병원성 조류인플루엔자가 최초 발생한 이후 국립수의과학검역원의 통계에 따르면 1997 및 1998년에는 분리보고가 없었으나 1999년에서 2004년까지 연평균 15건 정도씩 지속적으로 발생되고 있으며 국내 계군의 30% 이상이 H9 혈청형에 대하여 항체 양성반응을 보이고 있는 것으로 보고되고 있으며(대한수의학회지, 2004, 44권 3호 부록, 216p) 실제로 산란율 저하나 높은 폐사율을 보이는 등 양계산업에 상당한 피해를 입히고 있다.

[0012] 현재 상용화 된 뉴캐슬병 (ND) 불활화 오일백신은 약병원성 NDV인 클론 30 또는 라소타주를 사용하여 생산된 것이며, 강병원성 NDV를 이용한 불활화 백신은 안전성 문제 때문에 제조가 금지되어 있다. 따라서 보다 안전하고, 경제적이며, 야생주와 유사한 항원성을 보이는 ND 백신 생산기술의 필요성이 증대되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 본 발명의 목적은 약병원성 뉴캐슬병(Newcastle disease) B1 바이러스의 뉴클레오캡시드 단백질(NP), 인단백질(P), 매트릭스(M), 융합 단백질(F), 헤마글루티닌 뉴라미니다제(HN), 폴리머라제(L) 단백질 코딩 서열을 포함하고, 상기 P 단백질과 M 단백질 사이에, 조류 인플루엔자(Avian influenza) 바이러스 H9 아형의 헤마글루티닌(HA) 단백질 코딩 서열이 삽입된 재조합 벡터를 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 다른 목적은 상기 상기 재조합 벡터로부터 제조된 재조합 바이러스 및 이를 유효성분으로 포함하는 백신을 제공하는 것이다.

[0016] 그러나, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 해당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0018] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 약병원성 뉴캐슬병(Newcastle disease) B1 바이러스의 뉴클레오캡시드 단백질(NP), 인단백질(P), 매트릭스(M), 융합 단백질(F), 헤마글루티닌 뉴라미니다제(HN), 폴리머라제(L) 단백질 코딩 서열을 포함하고, 상기 P 단백질과 M 단백질 사이에, 조류 인플루엔자(Avian influenza) 바이러스 H9 아형의 헤마글루티닌(HA) 단백질 코딩 서열이 삽입된, 재조합 벡터가 제공된다.

[0019] 일 측에 따르면, 상기 조류 인플루엔자 바이러스 H9 아형은 A/chicken/Cheongju/ADL0401/2004 (H9N2 subtype; Genebank accession No. DQ464352) 또는 A/guineafowl/HongKong/WF10/99 (H9N2 subtype; Genebank accession No. AY206676)일 수 있다.

[0020] 일 측에 따르면, 상기 조류 인플루엔자 바이러스 H9의 아형의 헤마글루티닌(HA) 단백질을 코딩하는 유전자는 유전자은행 등록번호(Genebank accession No. AY206676)의 염기서열을 가지는 것일 수 있다.

[0021] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 상기 재조합 벡터로부터 제조된, 재조합 바이러스가 제공된다.

[0022] 일 측에 따르면, 상기 재조합 바이러스는 상기 재조합 벡터로 형질전환 된 동물 세포의 상층액을 발육란에 접종한 후 요막액으로 부터 수득 되는 것일 수 있다.

[0023] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따르면, 상기 재조합 바이러스를 포함하는, 뉴캐슬병 바이러스 및 H9 조류 인플루엔자 바이러스의 예방용 백신이 제공된다.

[0024] 일 측에 따르면, 조류 및 포유동물에서 뉴캐슬병 바이러스 및 H9 조류 인플루엔자 바이러스에 대하여 2가(divalent) 면역능력을 나타낼 수 있다.

[0025] 일 측에 따르면, 상기 조류는 닭, 오리, 거위, 메추리, 꿩 및 칠면조를 포함할 수 있다.

[0026] 일 측에 따르면, 상기 포유동물은 소, 말, 돼지, 양, 염소 또는 사람을 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0028] 본 발명의 재조합 바이러스 벡터는 NDV와 함께 H9 HA 유전자를 포함함으로써, NDV와 H9 조류 인플루엔자에 대한 2가(divalent) 백신을 제조할 수 있다.

[0029] 본 발명의 재조합 바이러스 백신의 H9 HA는 국내에서 유행하는 H9 저병원성 조류 인플루엔자로부터 유래된 것이므로, 국내에서 발생하는 H9 조류 인플루엔자과 뉴캐슬병을 동시에 예방할 수 있다.

[0030] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0032] 도 1은 뉴캐슬병 바이러스(NDV)의 구조(A) 및 유전체의 구성(B)을 도식적으로 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명에서 사용된 NDV의 역유전학적 방법을 도식적으로 나타낸 것이다.

도 3은 클로닝된 NDV cDNA로부터 재조합 NDV를 제조하는 방법을 도식적으로 나타낸 것이다.

도 4(A)는 wild type H9 HA 유전자가 rNDV/B1/F3aa의 P 유전자와 M 유전자 사이에 삽입된 full-length NDV 벡터(rNDV B1 F3aa-H9HA)의 구조를 도식화한 것이다. 도4(B)는 HA단백질의 HA 단백질의 ecto domain과 NDV fusion gene의 transmembrane domain (TM)과 cytoplasmic tail (Cy)과 연결된 full-length pNDV의 구조를 도식화한 것이다.

도 5는 H9 HA를 삽입한 재조합 NDV의 제조를 특정 제한효소를 처리하여 확인한 것이다. (A)는 pGEM-T HK H9 HA 클론을 NheI으로 처리한 것이다. (B)는 pT7 NDV/B1/F3aa-HK H9 HA 클론을 SpeI으로 처리한 것이다. (C)는 pT7 NDV/B1/F3aa-HK H9 HA가 올바른 방향으로 있는지를 확인하기 위하여, 정방향 프라이머(3013P) 및 역방향 프라이머(H9-781)을 이용하여 PCR을 수행한 것이다.

도 6은 rNDV/B1/F3aa-H9 HA 바이러스의 제조여부를 RT-PCR을 통해 확인한 것이다.

도 7은 rNDV/B1/F3aa-H9HA의 성장특성(growth kinetics)을 분석하기 위해 세포주에 감염시킨 뒤 TCID50을 측정

한 것으로, 감염초기에는 rNDV/B1 및 rNDV/B1/F3aa 바이러스 보다 성장 속도가 떨어지나 72hr에서는 거의 동일한 역가를 나타낸다.

도 8은 웨스턴 블롯(A)과 Immunofluorescence assay(B)를 통하여 rNDV/B1/F3aa-H9HA 로부터 HA 단백질의 발현을 확인한 것으로, 대조군 바이러스인 rNDV/B1/F3aa 가 감염된 세포에서는 NDV에 대한 단백질의 발현만이 확인되고, rNDV/B1/F3aa-H9HA가 감염된 세포에서는 HA 단백질이 발현이 확인되었다.

도 9은 마우스-적응된 조류인플루엔자바이러스 H9N2 (A/chicken/Korea/04)로 마우스를 공격접종(challenge)한 후 마우스의 체중(A)과 생존율(B)을 측정한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033] 이하에서, 첨부된 도면을 참조하여 실시예들을 상세하게 설명한다. 각 도면에 제시된 동일한 참조 부호는 동일한 부재를 나타낸다.

[0034] 아래 설명하는 실시예들에는 다양한 변경이 가해질 수 있다. 아래 설명하는 실시예들은 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 이들에 대한 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[0035] 실시예에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 실시예를 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성 요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성 요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[0036] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[0037] 또한, 첨부 도면을 참조하여 설명함에 있어, 도면 부호에 관계없이 동일한 구성 요소는 동일한 참조 부호를 부여하고 이에 대한 중복되는 설명은 생략하기로 한다. 실시예를 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 실시예의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0038] NDV에 대한 생백신으로 가금류를 접종하는 것이 많은 국가에서 의무이기 때문에, 2가 백신의 개발이 우선적으로 이뤄져야 한다. 2가 백신은 개별적인 백신접종에 비해서 백신 생산 및 투여의 부담을 줄일 것이다. 조류 인플루엔자 바이러스에 대한 불활성화된 백신 또는 NDV에 대한 생 약독화 된 바이러스 백신의 사용은 백신 접종된 가금류가 자연적으로 감염된 조류와 구별될 수 없다는 한계가 있다. 따라서, 이 경우에 혈청학적 감시를 수행하는 것이 어렵다. 그러나, 닭에 rNDV/F3aa-키메라 H9와 같은 2가 백신을 접종하면 조류 인플루엔자 바이러스, 특히 H9 HA와 NDV에 대해서 모두 면역반응을 유도할 수 있다. 이 경우, 두 항체에 대한 혈청학적 감시를 할 수 있게 될 것이다. 따라서, 본 발명의 2가 백신은 "백신접종한 동물과 감염된 동물의 구별(differentiating infected from vaccinated animals (DIVA))" 전략으로 사용하기에 적합할 것이라고 기대된다. 이러한 이유로, 본 발명자들은 주요 병원균인 조류 인플루엔자 바이러스와 NDV에 대한 백신으로서 잠재력을 보여주는 생 2가 바이러스를 개발하였다.

[0039] 바이러스 개발을 위해 본 발명자들은 NDV를 백신 벡터로 선택하였는데, 이는 NDV가 바이러스 백신 개발에 적합한 몇 가지 특성을 가지고 있기 때문이다. 첫 번째로, 상기 바이러스의 RNA 유전체는 숙주 세포 DNA에 통합될 수 없다. 또한, rNDV 벡터는 다수의 계대 동안 삽입된 외래 유전자를 포함할 수 있으며, 호흡기 바이러스로서, 가금류의 신속하고, 효율적이며 경제적인 대량 면역화를 위한 편리한 플랫폼을 제공할 수 있다. 이러한 장점들은 한 번의 면역화가 2가지 이상의 병원균으로부터 보호를 유도할 수 있기 때문에 다가 백신의 경우에 배가될 수 있다. 한 바이러스의 존재가 다른 바이러스의 성장 또는 병원성을 방해하면, 다수의 생 약독화 된 바이러스를 사용한 동시적 백신접종이 합병증을 유도할 수 있는데, 이러한 문제점은 단일 2가 바이러스 백신의 사용으로 완전히 회피할 수 있다.

[0040] 현재 상용화 된 뉴캐슬병 (ND) 불활화 오일백신은 약병원성 NDV인 클론 30 또는 라소타주를 사용하여 생산된 것이며, 강병원성 NDV를 이용한 불활화 백신은 안전성 문제 때문에 제조가 금지되어 있다. 따라서 보다 안전하고, 경제적이며, 야생주와 유사한 항원성을 보이는 ND 백신 생산기술의 필요성이 증대되고 있는데 현재

역유전학 (Reverse Genetics) 기술을 이용한 백신 개발이 이러한 요구에 가장 근접한 기술이다.

[0041] 따라서, 본 발명의 일 실시예에 따르면, 약병원성 뉴캐슬병(Newcastle disease) B1 바이러스의 뉴클레오캡시드 단백질(NP), 인단백질(P), 매트릭스(M), 융합 단백질(F), 헤마글루티닌 뉴라미니다제(HN), 폴리머라제(L) 단백질 코딩 서열을 포함하고, 상기 F 단백질의 112번째 아미노산이 아르기닌; 114번째 아미노산이 아르기닌; 117번째 아미노산이 페닐알라닌으로 치환되며, 상기 P 단백질과 M 단백질 사이에, 조류 인플루엔자(Avian influenza) 바이러스 H9 아형의 헤마글루티닌(HA) 단백질 코딩 서열이 삽입된, 재조합 벡터가 제공된다. 상기 F 단백질의 코딩 서열은 rNDV B1주(strain) F 단백질의 cleavage site를 강독주의 염기서열로 변경한 것이다.

[0042] 뉴캐슬병 B1 바이러스의 단백질을 코딩하는 서열은 다음과 같다: NP단백질(서열번호 1), P 단백질(서열번호 2), M 단백질(서열번호 3), F 단백질(서열번호 4), HN 단백질(서열번호 5), L 단백질(서열번호 6).

[0043] 상기 조류 인플루엔자 바이러스 H9 아형은 A/chicken/Cheongju/ADL0401/2004 (H9N2 subtype; Genebank accession No. DQ464352) 또는 A/guineafowl/HongKong/WF10/99 (H9N2 subtype; Genebank accession No. AY206676)로서, 한국에서 발병하고 있는 저 병원성 H9 avian influenza(AI) 바이러스에 해당한다.

[0044] 본 명세서에서, "rNDV/B1/F3aa-HK H9 HA" 또는 "rNDV/B1/F3aa-HK H9"은 재조합 벡터에 삽입된 H9 바이러스의 아형이 A/guineafowl/HongKong/WF10/99인 경우를 의미하며, "rNDV/B1/F3aa-Kor H9 HA" 또는 "rNDV/B1/F3aa-Kor H9"은 재조합 벡터에 삽입된 H9 바이러스의 아형이 A/chicken/Cheongju/ADL0401/2004 (H9N2)인 경우를 의미한다.

[0045] 상기 조류 인플루엔자 바이러스 H9의 아형의 헤마글루티닌(HA) 단백질을 코딩하는 유전자는 유전자은행 등록번호(Genebank accession No. AY206676)의 염기서열을 가지는 것일 수 있다.

[0046] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 상기 재조합 벡터로부터 제조된, 재조합 바이러스가 제공된다.

[0047] 상기 재조합 바이러스는 상기 재조합 벡터로 형질전환 된 동물 세포의 상층액을 발육란(embryonated egg)에 접종한 후 요막액(allantoic fluid)으로 부터 수득 되는 것일 수 있다.

[0048] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 상기 재조합 바이러스를 유효성분으로 포함하는, 뉴캐슬병 바이러스 및 H9 조류 인플루엔자 바이러스의 예방용 백신이 제공된다.

[0049] 또한, 상기 백신은 상기 재조합 바이러스를 유효성분으로 포함하기 때문에 그 자체만으로도 우수한 면역원성을 구현할 수 있으나, 그 효과를 더욱 강화시키기 위해 면역증강제(adjuvant)를 더 포함할 수 있다.

[0050] 본 발명의 백신은 H9 HA를 발현하는 재조합 뉴캐슬병 바이러스 벡터로부터 제조된 재조합 바이러스를 포함하므로, 조류 및 포유동물에서 뉴캐슬병 바이러스 및 H9 조류 인플루엔자 바이러스에 대하여 2가(divalent) 면역능력을 나타낼 수 있다.

[0051] 상기 조류는 닭, 오리, 거위, 메추리, 꿩 및 칠면조를 포함할 수 있고, 상기 포유동물은 소, 말, 돼지, 양, 염소 또는 사람을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0052] 상기 면역증강제는 완전 프로인트 면역증강제(CFA, Complete Freund's Adjuvant), 불완전 프로인트 면역증강제(IFA, Incomplete Freund's Adjuvant), 스쿠알렌(Squalene), 스쿠알란(Squalane), 수산화알루미늄(Aluminium hydroxide), 인산알루미늄(Aluminium phosphate) 및 사포닌(Saponin)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있고, 바람직하게는 수산화알루미늄과 인산알루미늄이 겔 상으로 혼합된 것(Alum)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0053] 나아가, 상기 백신 조성물은 상기 면역증강제 뿐만 아니라, 약학적으로 허용가능한 담체를 더 포함할 수 있다. 상기 담체는 상기 백신 조성물을 제형화하기 위해 사용하는 것으로 통상 희석제, 부형제, 안정화제, 방부제 등을 포함할 수 있다.

[0054] 상기 희석제로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브유, 땅콩유와 같은 식물성유 등의 비수성 용매나 염수(바람직하게는 0.8%의 염수), 완충 매질을 포함한 물(바람직하게는 0.05M의 인산염 완충액) 등의 수성 용매 등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0055] 상기 부형제로는 전분, 글루코스, 락토스, 수크로스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 백악, 실리카 겔, 나트륨 스테아레이트, 글리세롤 모노스테아레이트, 활석, 나트륨 클로라이드, 무수 탈지유, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물, 에탄올 등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0056] 상기 안정화제로는 소르비톨, 만니톨, 전분, 수크로스, 덱스트란, 글루타메이트, 글루코스 등의 탄수화물이나 분유, 혈청 알부민, 카제인 등의 동물성, 식물성 또는 미생물성 단백질 등의 단백질을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0057] 상기 방부제로는 티메로살, 메르티올레이트, 젠타마이신, 네오마이신, 니스타틴, 암포테리신 B, 테트라사이클린, 페니실린, 스트렙토마이신, 폴리믹신 B 등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0058] 상기 백신은 경구, 직장, 국소, 정맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 경피, 비강내, 흡입, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.

[0059] 비경구 투여는 정맥내, 근육내, 복강내, 흉골내, 경피 및 동맥내 주사 및 주입을 포함하는 투여 방식을 의미한다. 상기 백신의 비경구 투여는 바람직한 순도 하에 약제학적으로 허용 가능한 담체, 즉 사용되는 농도와 투여량에서 수용체에 비독성이고 다른 제제 성분과 혼화될 수 있는 것을 혼합하여 단위 투여량의 제형으로 조제하는 것이 바람직할 수 있다.

[0060] 상기 백신의 제형은 어떠한 제형으로도 적용가능하며, 제조한 제형은 경구용, 주사용, 도포용으로 사용할 수 있다. 상기 백신의 제형은 정제, 캅셀제, 연질캅셀제, 수액제, 과립제, 환제 또는 주사용 형태(용액, 현탁액 또는 유탁액)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0061] 본 발명에서 사용된 용어 "예방"은 조성물의 투여에 의해 뉴캐슬병 바이러스 및 H9 조류 인플루엔자 바이러스의 감염을 억제하거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0062] 이하에서는, 본 발명의 실시예에서 사용된 실험 재료 및 방법에 대해 상세히 기술한다. 그러나 하기 실시예들은 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 발명의 범위가 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0064] **실시예 1: 야생형 H9 HA 유전자를 가진 pNDV의 제작**

[0065] A549, HEP-2, DF-1 및 Vero 세포를 10% 우태아 혈청(FBS)(HyClone, 미국)이 있는 DMEM(Dulbecco`s modified Eagle`s medium)(GIBCO, 미국)에서 생육했다. 10일 된 특정 병원균 부재(specific-pathogen-free) 배아(KNBP, 한국)에서 얻은 CEF 세포와 MDCK (ATCC, 미국)을 10% FBS가 있는 Eagle`s MEM(Lonza, 미국)에서 생육했다. 본 발명자들은 다음과 같은 제조방법을 통해 제조된 pT7NDV/B1 및 pT7NDV/lasota f3aa의 전장 클론을 사용하였다. 먼저 NDV/B1, NDV/lasota f3aa의 전장 유전자를 각각 7개의 유전자 절편(절편 1, T7 promoter 부터 뉴클레오타이드 1,755번째 염기서열 까지; 절편 2, 뉴클레오타이드 1번 염기서열 부터 3,321번째 서열 까지; 절편 3, 뉴클레오타이드 1,755번째 염기서열 부터 6,580번째 서열 까지; 절편 4, 뉴클레오타이드 6,151번째 염기서열 부터 10,210번째 서열 까지; 절편 5, 뉴클레오타이드 7,381번째 염기서열 부터 11,351번째 서열 까지; 절편 6, 뉴클레오타이드 11,351번째 염기서열 부터 14,995번째 서열 까지; 절편 7, 뉴클레오타이드 14,701번째 염기서열 부터 15,186번째 서열 까지)으로 차례로 나누어 PCR 방법으로 얻어낸 뒤, hepatitis delta virus ribozyme, T7 pterminator 유전자 서열을 절편 7 유전자에 이어 삽입하였다. 이 후, 전체 유전자 서열을 pSL1180(Amersham Parmacia Biotech, 영국) 플라스미드에 삽입하여 완성하였다.

[0066] 변형된 백시니아 안카라(MVA; Modified vaccinia Ankara)를 CEF 세포에서 증식시켰다. 마우스에 적합화 된 H9N2와 강독주 병원성 NDV를 10일 된 발육란(embryonated egg)에서 증식시켰다.

[0067] A/guinea fowl/Hong Kong/Wf10/99(HK H9 HA - Geneback No. AY206676, 1680 염기서열(bp))의H9 HA 단백질을 발현하는 rNDV/B1/F3aa를 제작하기 위하여, H9 HA 유전자를 pNDV/B1/F3aa 벡터의 P 유전자와 M 유전자 사이의 특정 제한효소 부위에 삽입하였다. NDV/F3aa의 XbaI 부위에 전사 단위체로서 H9 HA 유전자를 제작하기 위하여 하기에 나타낸 프라이머 및 주형으로서 주형으로서 A/guinea fowl/Hong Kong/WF10/99에서 얻은 H9 HA 유전자로 PCR을 통하여 H9 HA를 증폭하였다.

[0068] Nhe HK H9 Forward: 5`-CCGCTAGC TTAGAAAAAA T ACGGGTAGAA CACTAGTCCGCCACC ATGGAAACAATATCACTAATAA-3'

[0069] Nhe HK H9 Reverse: 5`-CCGCTAGCTATTTATATACAAATGTTGCATCTG-3'

[0070] PCR 후, HK H9 HA PCR 산물을 pGEM T 벡터에 삽입하였다. 이 PCR 산물을 NheI으로 분해한 후(도 5-(A)), pT7NDV/B1/F3aa의 P 유전자와 M 유전자 사이에 삽입하여 pT7NDV/B1/F3aa-H9 HA을 제조하였다. pNDV/B1/F3aa-H9 HA를 특정 제한효소(pNDV/B1/F3aa-H9 HA에서 SpeI 부위; 총 4개의 단편, 각 단편의 대략적 크기는 200bp, 800bp, 5.5kb 및 13.5kb, 도 5-(B))로 확인하고, H9 유전자가 NDV 유전체의 특정 부위에 올바른 방향으로 위치

해 있는지 3013P (forward 방향; 5′ '), 3430M (reverse 방향; 5′ ' for the anti-sense primer) 프라이머를 사용하여 PCR 방법으로 분석하였다. 예상된 밴드 크기인 약 1 Kb를 확인하였다(도 5-(C)). 마지막으로, 서열분석을 통하여 rNDV가 H9 HA를 가지는 pNDV/B1/F3aa의 cDNA에서 유래한 것임을 확인하였다.

[0072] **실시예 2: 야생형 H9 HA 단백질을 발현하는 rNDV /B1/F3aa 및 이를 포함하는 혼합백신 제조**

[0073] 역유전학(reverse genetics)법을 이용하여 제작된 cDNA로부터 rNDV/B1/F3aa-HK H9 HA 를 제작하였다(도 2, 3). MVA T7으로 감염시킨 A549 또는 Hep2 세포에 각 NDV 전장유전체 플라스미드와 pTM 벡터의 NDV 및 NDV의 RNA 중합효소 단백질을 발현하는 3개의 플라스미드(NP, P. L)를 동시에 형질도입 시켰다. 형질도입한 24시간 후 CEF(chicken embryo fibroblast) 세포와 형질도입된 세포를 동시배양(co-culture) 시켰다. 48시간 이상 배양한 후, 형질도입된 세포로부터 얻은 상층액을 10일 된 SPF 발육란(embryonated egg)에 접종하였다. 접종 후 3일에 요막액(Allantoic fluid, 계란 흰자)을 수확하였다.

[0074] 바이러스가 요막액에 존재하는지 확인하기 위하여, HA(Hemaggulutination assay) 분석을 수행하였다. 0.5% 닭 RBC를 사용하여 2배 연속 희석한 바이러스로 HA 분석을 수행하였다. 감염된 숙주의 면역반응에 핵심적인 rNDV와 H9 HA 단백질에 대한 항체 생산을 평가하기 위하여, 바이러스의 4 HA 유닛으로 HI 분석을 수행하였다.

[0075] 그 다음, H9 HA를 발현하는 제작된 rNDV/B1/F3aa가 그것의 cDNA로부터 발생했는지 확인하기 위하여, RT-PCR을 수행하였다. TRIzol (Invitrogen, 미국)을 이용하여 RNA를 추출한 다음, 추출한 RNA에 Superscript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen, 미국)를 이용한 역전사를 수행하여 1차 cDNA를 합성하였다. 3013P (forward 방향; 5′ '), 3430M (reverse 방향; 5′ ' for the anti-sense primer) 프라이머로 특정 부위를 증폭하기 위하여 RT-PCR을 하였다.

[0076] 그 결과, 도 6에 나타낸 바와 같이 본 실시예를 통하여 야생형 H9 HA 단백질을 발현하는 rNDV/B1/F3aa이 제조된 것을 확인 할 수 있었다.

[0078] **실시예 3: 성장 특성 및 H9 HA 단백질 발현**

[0079] **3-1. 성장 특성**

[0080] 발육란(embryonated egg)에서 HK H9를 발현하는 rNDV/F3aa의 성장 특성을 rNDV/B1 및 rNDV/B1/F3aa와 비교하였다. rNDV를 10일 된 배아상태의 계란에 100 pfu/egg로 접종하고, 태액(Allantoic fluid)를 수확하여 24 시간, 48 시간, 72 시간의 각 다른 시점에 바이러스 역가를 측정하였다. 각 바이러스의 조직 배양액 50%를 면역형광검사(IFA; Immunofluorescence assay)로 분석하였다. 그 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이 H9 HA를 발현하는 바이러스의 성장 속도가 야생형 NDV/B1/F3aa보다 더 느린 것을 확인하였다.

[0082] **3-2. H9 HA 단백질 발현**

[0083] rNDV/B1/F3aa-H9 HA로부터 삽입된 H9 HA 단백질의 발현은 감염 후 30 시간 된 Vero 세포의 웨스턴 블롯과 IFA를 통하여 확인하였다 (도 8-(A), (B)).

[0084] Vero 세포에 rNDV를 M.O.I.(multiplicity of infection) 1로 감염시켰다. 감염 후 36시간에 IP 용해 버퍼로 세포 파쇄물(Cell lysate)을 준비하였다. 환원 조건 하에 10% SDS-PAGE 아크릴아미드 겔에서 H9 HA 및 NDV-유래 단백질을 분리하여, 니트로셀룰로스 멤브레인으로 옮겼다. H9 HA 또는 NDV 특이적 일차 항체를 결합시켰다. 그 다음, 항-마우스 또는 항-토끼 IgG 퍼옥시다제 컨쥬게이트(DAKO, 덴마크, Jackson immunoresearch, 영국)를 처리하였다. 웨스턴 블롯 데이터에서, NDV와 연관된 단백질을 검출하였다. 또한, H9 HA 단백질은 560 아미노산을 함유하는 61.1 KDa 크기의 단백질인데, rNDV/B1/F3aa로 감염시킨 세포로부터 H9 HA 단백질을 검출하였다(도 9-(A)).

[0085] rNDV가 H9 HA 단백질을 발현하는지를 IFA를 통하여 확인하기 위하여, Vero 세포를 rNDV/B1/F3aa-H9 HA로 감염시켰다. 감염 후 30시간에, 감염된 세포를 0.1% 트리톤 X-100을 포함한 2.5% 포름알데히드로 고정하였다. 고정된 세포를 항-토끼 NDV 폴리클로날 항체 및 항-H9 HA 펩티드 폴리클로날 항체로 처리하였다. 그 다음, 감염된

세포를 세척하고 텍사스 레드-컨쥬게이트된 항-토끼 면역글로불린(Jackson immunoresearch, 영국) 및 FITC-컨쥬게이트된 항-마우스 면역글로불린(DAKO, 덴마크)로 염색하였다. IFA 데이터에서, 각 Vero 세포로부터 적색 형광 단백질 및 녹색 형광 단백질을 검출하였다. HK H9 HA를 발현하는 rNDV/B1/F3aa가 감염된 Vero 세포로부터 NDV 단백질 및 조류인플루엔자바이러스 HA 단백질을 검출하였다(도 8-(B)).

[0086] 이들 결과를 통하여, rNDV/B1/F3aa-H9 HA 백신 바이러스가 올바르게 제작되었음을 확인하였고, 이 바이러스로부터 H9 HA 단백질이 발현된다는 것을 확인하였다.

[0088] **실시예 4: SPF 발육란의 평균 치사 시간(MDT) 분석**

[0089] 발육란(embryonated egg)에서 rNDV의 병독성을 분석하기 위하여, MDT를 수행하였다. MDT는 NDV 균주를 분류하는데 사용되는 것으로, 강독성 병원성(v) NDV 균주는 배아를 죽이는데 <60 hr 걸리고, 중간병원성 NDV 균주는 60-90 hr, 약병원성 NDV 균주는 >90 hr 걸린다.

[0090] MDT 수행을 위해서 본 발명자들은 본 발명의 rNDV/B1/F3aa-H9 HA(rNDV/B1/F3aa-HK H9 HA, rNDV/B1/F3aa-Kor H9 HA), rNDV/B1 또는 rNDV/F2aa, rNDV/F3aa를 사용하여 10일령 된 유정란을 동량의 바이러스로 감염시켰다. 유정란을 37℃ 인큐베이터에 놓고 1주일 동안 매 8시간 마다 모니터링하여 배아의 죽는 시간을 기록하였다. 그 결과, 하기 표 1에 나타낸 바와 같이 rNDV/B1/F3aa-H9 HA의 병원성이 약독주의 NDV와 같은 특성을 보이는 것을 알 수 있으며, rNDV/B1/F3aa-H9 HA로 백신화한 그룹은 120시간 이상 생존하거나 살아있어 rNDV/B1/F3aa 바이러스의 병원성보다 현저히 떨어짐을 알 수 있다. 이러한 결과는 제조된 rNDV/B1/F3aa-H9 HA가 생백신 벡터로도 사용될 수 있음을 시사한다.

표 1

[0091]

Virus	Innoculation $TCID_{50}$	MDT, Hr
rNDV/B1	10	112
	100	104
rNDV/F2aa	10	112
	100	128
rNDV/F3aa	10	88
	100	80
rNDV/F3aa/HK H9 HA	10	alive
	100	128
rNDV/F3aa/ Kor H9 HA	10	Alive
	100	120
vNDV/Manhattan	10	56
	100	48

[0092] **실시예 5: 마우스 모델의 면역화 및 공격접종(challenge)**

[0093] H9 HA 단백질을 발현하는 본 발명의 재조합 바이러스(rNDV)로 면역화된 숙주가 접종 바이러스에 대응하여 생존할 수 있는지를 조사하기 위하여, 공격접종을 수행하였다.

[0094] 4주 된 암컷 BLAB/C 마우스(NARA BIOTEC, 한국)를 케타민과 자일라진의 혼합물로 복강투여하여 마취시키고, 제작된 rNDV를 마우스에 비강으로 2회 백신접종 하였다. 백신접종 바이러스는 rNDV/B1/F3aa-HK H9(A/guineafowl/HongKong/WF10/99 (H9N2)의 HA 유전자 사용) 및 rNDV/B1/F3aa-Kor H9(A/chicken/Cheongju/ADL0401/2004 (H9N2)의 HA 사용)이고, 대조군 백신은 PBS 샴(sham)이었다. 구체적으로, 1차 백신접종 3주 후, 동일한 바이러스 백신으로 2차 접종(boosting)을 하였다. 바이러스 백신 역가는 $1X10^6$ PFU/50 ul이었다. 바이러스 백신 접종에 따른 항체 활성 여부를 확인하기 위해, 감염된 숙주의 혈청으로 항체가 시험(hemagglutination assay)을 수행하였다. 그 결과, 표 2에 나타낸 바와rNDV/B1/F3aa-HK H9, rNDV/B1/F3aa-Kor H9를 2회 백신 접종한 마우스는 H9 AIV에 대한 적혈구 응집반응 억제(HI, hemmagglutination inhibition) 역가를 가졌으나, 샴(sham)으로 백신화한 마우스는 H9 AIV에 대한 HI 역가가 없었다. 특히, rB1/F3aa:Kor-HA는 rB1/F3aa:HK-HA에 비해 1차, 2차 접종 후 항체가가 더 높은 것으로 확인되

었다.

표 2

[0095]

	항체가			
백신접종	Sham	rB1/F3aa	rB1/F3aa:HK-HA	rB1/F3aa:Kor-HA
1차	n.d.[§]	n.d.	15.16	31.74
2차	n.d.	n.d.	69.64	105.56

[0096] [§]n.d., not detected.

[0097] 감염시험 바이러스, vNDV(virulent Newcastle Disease Virus) 및 인플루엔자 바이러스 H9N2 형으로 1차 백신접종 4주에 공격접종을 개시하였다. 공격접종 조류인플루엔자바이러스 역가는 1 LD_{50}=-1X10^6 이었다. 공격접종 2주 후, 마우스의 체중 및 생존율을 측정하였다. 즉, 마우스 생존율 및 감소한 체중을 통하여 사망률(Mortality) 및 발병률(morbidity)을 기록하였다. 죽은 마우스의 폐 조직(균질화하고 PBS 200ul에 재현탁함)에서의 공격접종 바이러스의 존재는 MDCK 세포를 이용한 플라크 검사(plaque assay)를 통하여 확인하였다. 공격접종 후 8일까지 모든 그룹에서 마우스 체중이 감소하였는데, 본 발명의 rNDV로 백신접종한 그룹의 마우스는 100% 회복된 반면 PBS 샴(sham)으로 백신접종한 그룹은 회복되지 않았다 (도 9(A)).

[0098] 또한, 본 발명의 rNDV/B1/F3aa-HK H9HA로 면역화한 마우스는 마우스-적응 H9N2 AIV의 감염으로부터 100% 방어되었다 (도 9(B)). 공격접종 후 14일째, PBS 샴으로 백신화한 마우스의 경우 생존한 개체는 없었다. 따라서, 이들 결과는 본 발명의 rNDV/B1/F3aa-H9HA로 백신화한 마우스 그룹이 샴으로 백신화한 마우스 그룹에 비해서 마우스에 적응된 H9 인플루엔자 바이러스의 감염에도 죽지 않는다는 것을 증명해준다.

[0099] 다음으로, 항체 생산(면역글로불린 G; IgG)은 HI 분석으로 확인하였다. 공격접종 바이러스에 대한 항체 활성 여부를 확인하기 위해, 공격감염 전, 후에 채취한 숙주의 혈청으로 항체가 시험(hemagglutination assay)을 수행하였다. 그 결과, 표 3에 나타낸 바와 같이 rNDV/B1/F3aa-HK H9 및 rNDV/B1/F3aa-Kor H9로 면역화한 마우스에서만 항체 활성이 나타났고, 공격접종 후 GMT(Geometric Mean Titer) 값은 rNDV/B1/F3aa-Kor H9에서 더 높았다.

표 3

[0100]

	HI serology before challenge (GMT)			HI Serology 14days after challenge(GMT)
Vaccine group	AIV/H9 Antigen	Challenge virus	No.of survivors	AIV/H9 Antigen
rNDV/B1/F3aa- Kor H9 2X	5/5(10)	H9N2	5/5	4/5(91.58)
rNDV/B1/F3aa-HK H9 2X	5/5(≤10)	H9N2	5/5	5/5(62.27)
Sham 2X	0/5	H9N2	0/5	NA

2X: 2회 접종

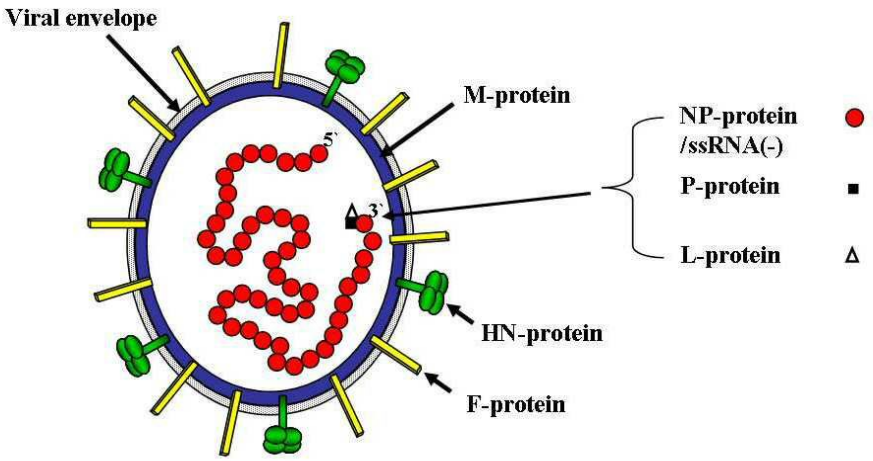
[0101] 이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 실시예와 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기의 기재로부터 다양한 수정 및 변형이 가능하다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

[0102] 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 특허청구범위의 범위에 속한다.

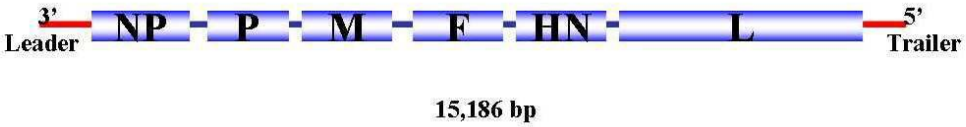
도면

도면1

(A)

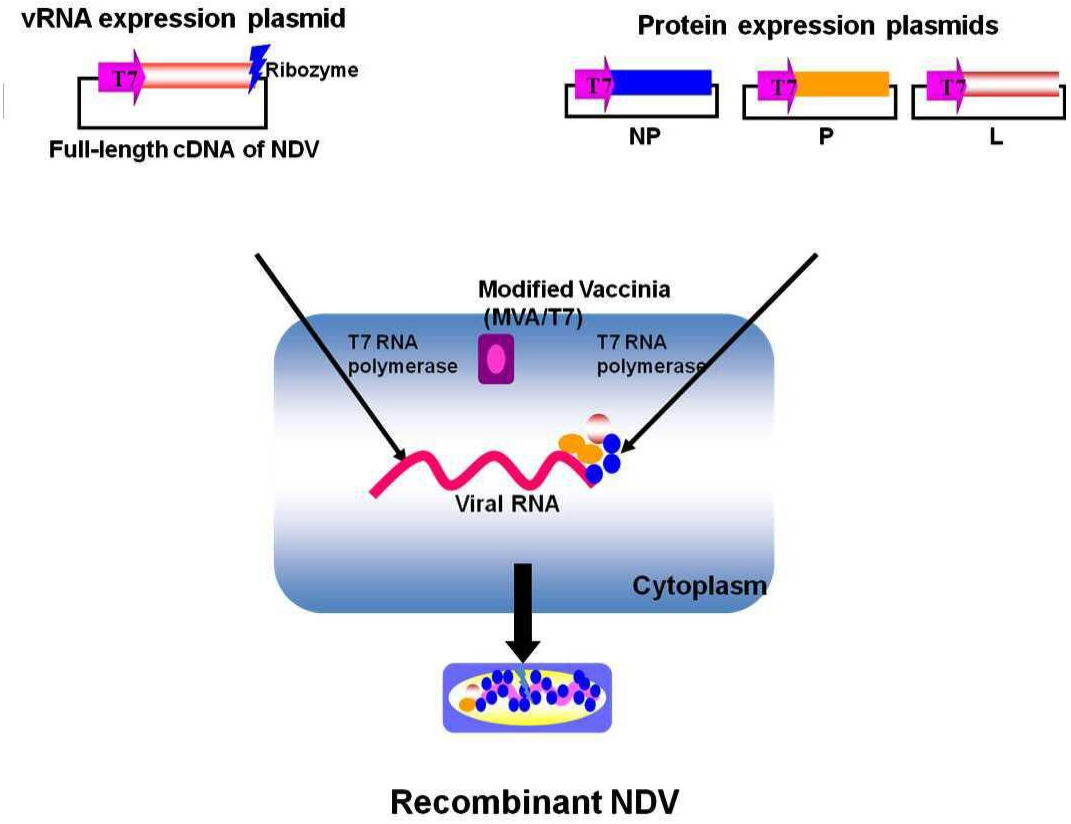


(B)

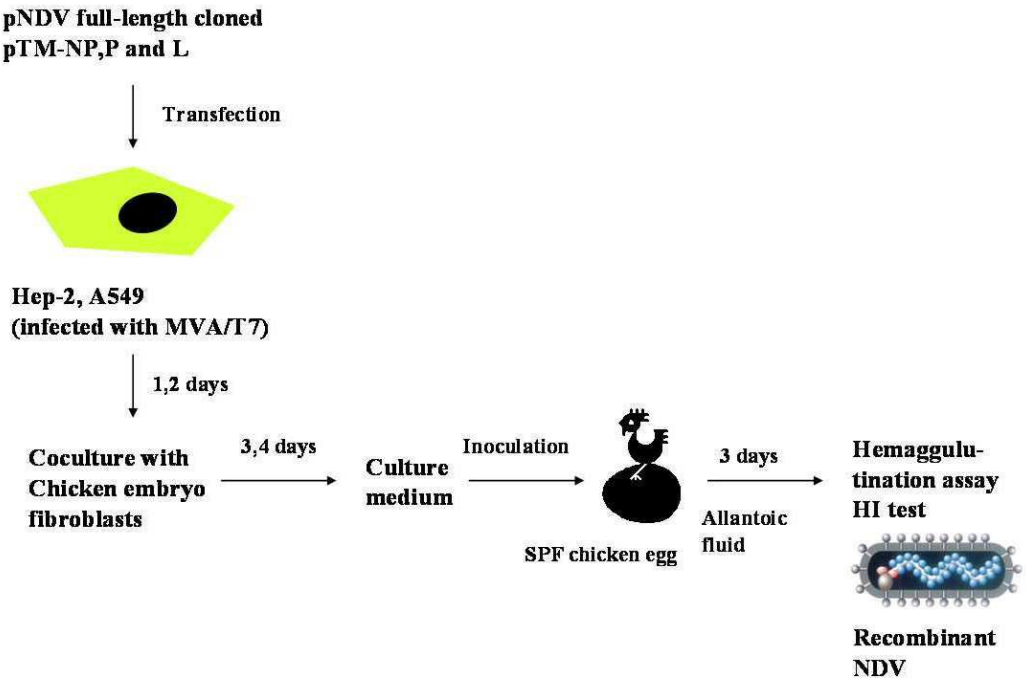


15,186 bp

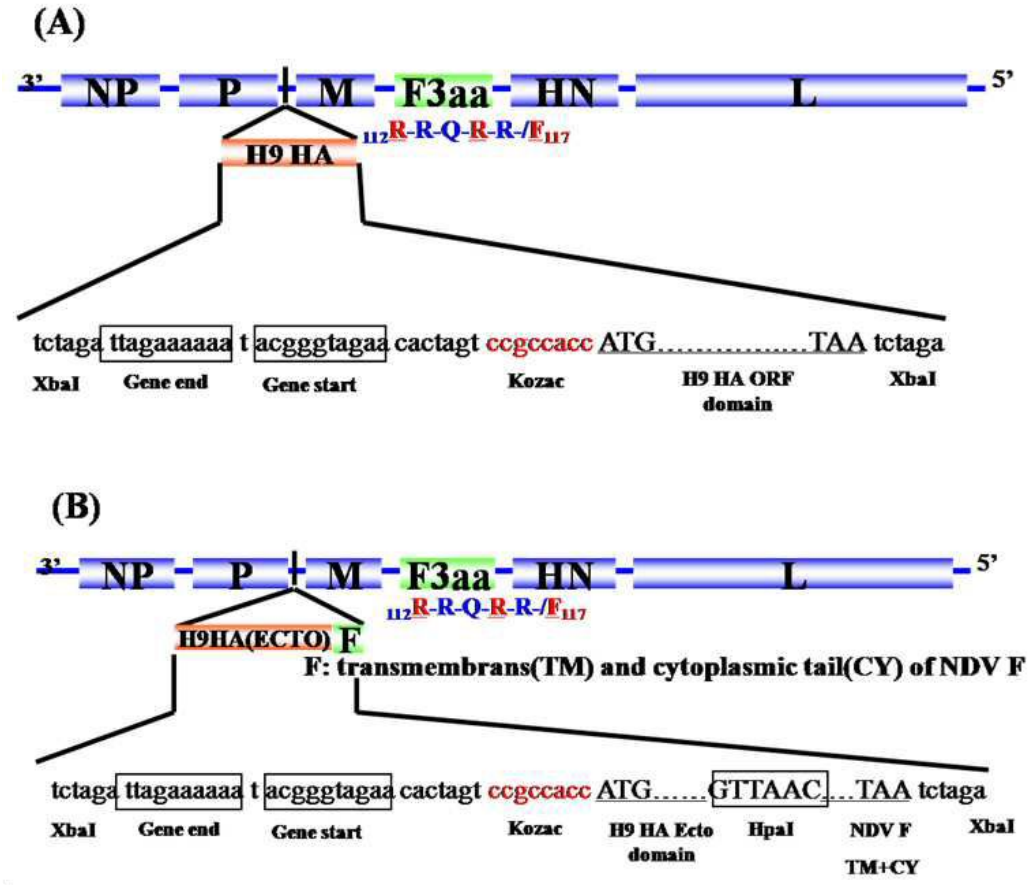
도면2


vRNA expression plasmid
T7
Ribozyme
Full-length cDNA of NDV
Protein expression plasmids
T7
NP
T7
P
T7
L
Modified Vaccinia
(MVA/T7)
T7 RNA
polymerase
T7 RNA
polymerase
Viral RNA
Cytoplasm
Recombinant NDV

도면3

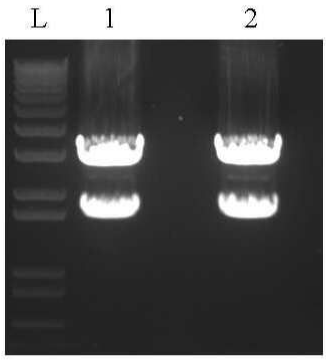

pNDV full-length cloned
pTM-NP,P and L
Transfection
Hep-2, A549
(infected with MVA/T7)
1,2 days
Coculture with
Chicken embryo
fibroblasts
3,4 days
Culture
medium
Inoculation
SPF chicken egg
3 days
Allantoic
fluid
Hemaggulu-
tination assay
HI test
Recombinant
NDV

도면4


(A)
3'
NP
P
M
F3aa
HN
L
5'
H9 HA
112R-R-Q-R-R-/F117
tctaga ttagaaaaaa t acgggtagaa cactagt ccgccacc ATG.....TAA tctaga
XbaI
Gene end
Gene start
Kozac
H9 HA ORF domain
XbaI
(B)
3'
NP
P
M
F3aa
HN
L
5'
112R-R-Q-R-R-/F117
H9HA(ECTO) F
F: transmembrans(TM) and cytoplasmic tail(CY) of NDV F
tctaga ttagaaaaaa t acgggtagaa cactagt ccgccacc ATG.....GTTAAC...TAA tctaga
XbaI
Gene end
Gene start
Kozac
H9 HA Ecto domain
HpaI
NDV F TM+CY
XbaI

도면5

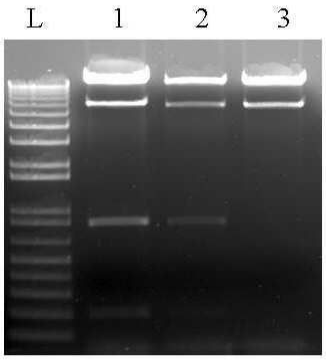
(A)



(A)-1. pGEM-T HK H9HA clones digested with NheI

1, 2 : pGEM-T HK H9HA

(B)



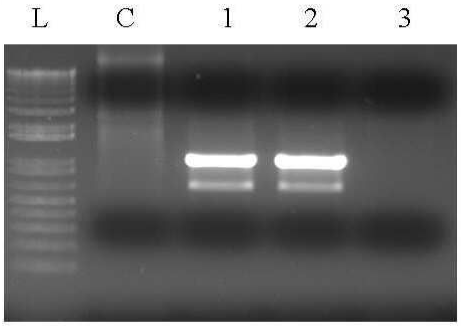
(A)-2 pT7 NDV/B1/F3aa- HK H9HA clones digested with SpeI

1 : pT7 NDV/B1/F3aa-HK H9HA #5

2 : pT7 NDV/B1/F3aa-HK H9HA #7

3 : pT7 NDV/B1/F3aa-HK H9HA #10

(C)



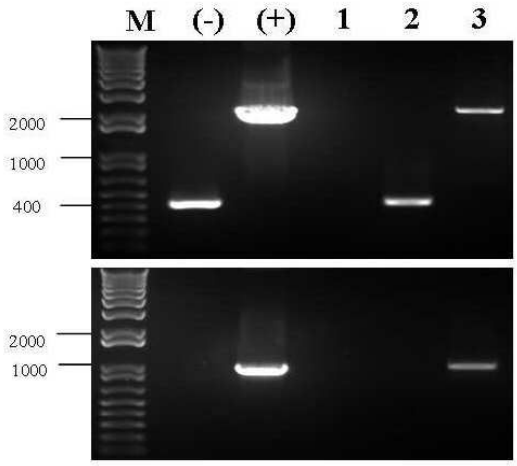
1 : pT7 NDV/B1/F3aa-HK H9HA #5

2 : pT7 NDV/B1/F3aa-HK H9HA #7

3 : pT7 NDV/B1/F3aa-HK H9HA #10

C : pT7 NDV/B1/F3aa - This is control

도면6

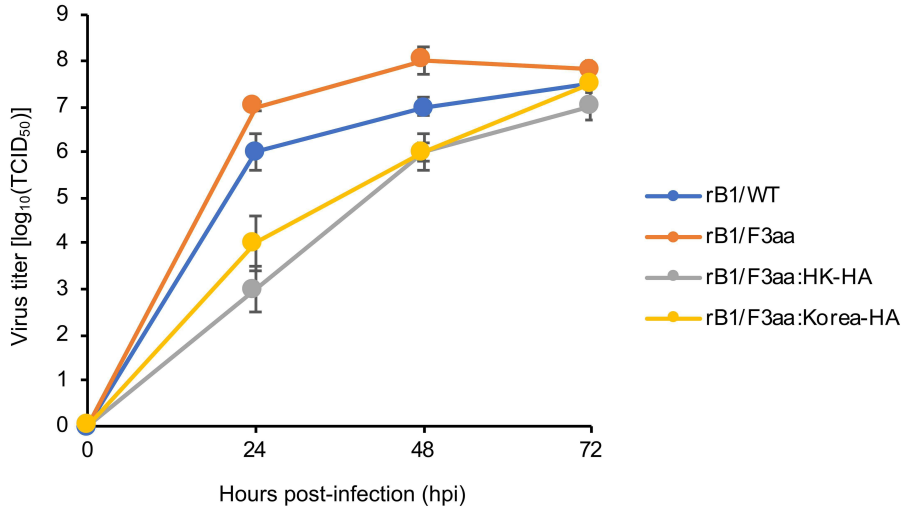


1. Elution buffer
2. rNDV/B1/F3aa
3. rNDV/B1/F3aa-Hk H9HA

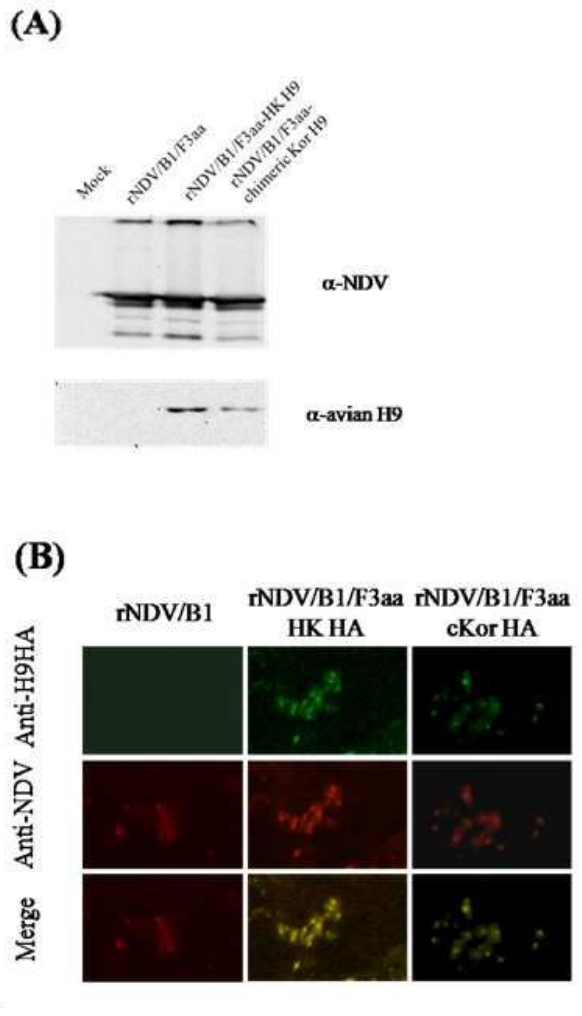
(-) cont` : pNDV B1 f3aa

(+) cont` : pNDV B1 f3aa - HK H9HA

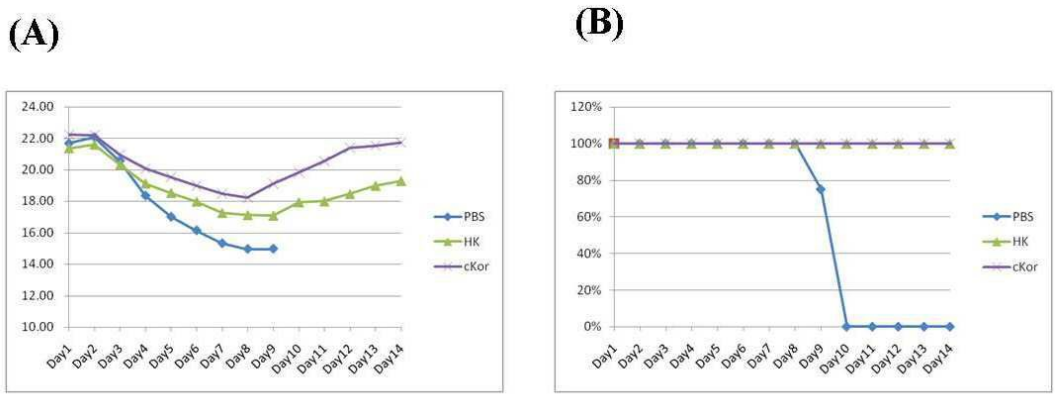
도면7



도면8



도면9



서 열 목 록

<110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION

<120> Recombinant Newcastle Disease Virus vector including H9 hemaglutinin and recombinant virus made therefrom

<130> APC-2018-0569

<150> KR 10-2018-0134495

<151> 2018-11-05

<160> 6

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 1470

<212> DNA

<213> Newcastle disease virus

<400> 1

atgtcttccg tattcgacga gtacgaacag ctcctcgcgg ctcagactcg ccccaatgga 60

gctcatggag ggggggagaa agggagtacc ttaaaagtag acgtcccggt attcactctt 120

aacagtgatg acccagaaga taggtggagc tttgtggtat tctgcctccg gattgctgtt 180

agcgaagatg ccaacaaacc actcaggcaa ggtgctctca tatctctttt atgctcccac 240

tcacaggtaa tgaggaacca tgttgcccct gcagggaaac agaatgaagc cacattggcc 300

gtgcttgaga ttgatggctt tgccaacggc acgccccagt tcaacaatag gagtggagtg 360

tctgaagaga gagcacagag atttgcgatg atagcaggat ctctccctcg ggcatgcagc 420

aacggcaccc cgttcgtcac agccggggct gaagatgatg caccagaaga catcaccgat 480

accctggaga ggatcctctc tatccaggct caagtatggg tcacagtagc aaaagccatg 540

actgcgtatg agactgcaga tgagtcggaa acaaggcgaa tcaataagta tatgcagcaa 600

ggcagggtcc aaaagaaata catcctctac cccgtatgca ggagcacaat ccaactcacg 660

atcagacagt ctcttgcagt ccgcatcttt ttggttagcg agctcaagag aggccgcaac 720

acggcaggtg gtacctctac ttattataac ctagtagggg acgtagactc atatatcagg 780

aataccgggc ttactgcatt cttcttgaca ctcaagtacg gaatcaacac caagacatca 840

gcccttgcac ttagtagcct ctcaggcgac atccagaaga tgaagcagct catgcgtttg 900

tatcggatga aaggagataa tgcgccgtac atgacattac ttggtgatag tgaccagatg 960

agctttgcgc ctgccgagta tgcacaactt tactcctttg ccatgggtat ggcatcagtc 1020

ctagataaag gtactgggaa ataccaattt gccagggact ttatgagcac atcattctgg 1080

agacttggag tagagtacgc tcaggctcag ggaagtagca ttaacgagga tatggctgcc 1140

gagctaaagc taaccccggc agcaaggagg ggcctggcag ctgctgccca acgagtctcc 1200

gaggtgacca gcagcataga catgcctact caacaagtcg gagtcctcac tgggcttagc 1260

gaggggggat cccaagccct acaaggcgga tcgaatagat cgcaagggca accagaagcc 1320

ggggatgggg agacccaatt cctggatctg atgagagcgg tagcaaatag catgagggag 1380

gcgccaaact ctgcacaggg cactccccaa tcggggcctc ccccaactcc tgggccatcc 1440

caagataacg acaccgactg ggggtattga 1470

<210> 2

<211> 1188

<212> DNA

<213> Newcastle disease virus

<400> 2

atggccacct ttacagatgc agagatcgac gagctatttg agacaagtgg aactgtcatt 60

gacaacataa ttacagccca gggtaaacca gcagagactg ttggaaggag tgcaatccca 120

cagggcaaga ccaaggtgct gagcgcagca tgggagaagc atgggagcat ccagccaccg 180

gccagtcaag acaacctcga tcgacaggac agatctgaca aacaaccatc cacacccgag 240

caaacgaccc cgcacgacag cccgccggcc acatccgctg accagccccc cacccaggcc 300

acagacgaag ccgtcgacac acagctcagg accggagcaa gcaactctct gctgttgatg 360

cttgacaagc tcagcaataa atcgtccaat gctaaaaagg gcccatggtc gagcccccaa 420

gaggggaatc accaacgtcc gactcaacag caggggagtc aacccagtcg cggaaacagc 480

caggaaagac tgcagaacca agtcaaggcc gcccctggaa accagggcac agacgtgaac 540

acagcatatc atggacaatg ggaggagtca caactatcag ctggtgcaac ccctcatgct 600

ctccgatcaa ggcagagcca agacaatacc cttgtatctg cggatcatgt ccagccacct 660

gtagactttg tgcaagcgat gatgtctatg atgggggcga tatcacagag agtaagtaag 720

gttgactatc agctagatct tgtcttgaaa cagacatcct ccatccctat gatgcggtcc 780

gaaatccaac agctgaaaac atctgttgca gtcatggaag ccaacttggg aatgatgaag 840

attctggatc ccggttgtgc caacatttca tctctgagtg atctacgggc agttgcccga 900

tctcacccgg ttttagtttc aggccctgga gacccatctc cctatgtgat acaaggaggc 960

gaaatggcac ttaataaact ttcgcaacca gtgccacatc catctgaatt gattaaaccc 1020

gccactgcat gcgggcctga tataggagtg gagagggaca ctgtccgtgc attgatcatg 1080

tcacgcccaa tgcacccgag ttcttcagcc aagctcctaa gcaagttaga tgcagccggg 1140

tcgatcgagg aaatcaggaa aatcaagcgc cttgctctaa atggctaa 1188

<210> 3

<211> 1095

<212> DNA

<213> Newcastle disease virus

<400> 3

atggactcat ctaggacaat tgggctgtac tttgattctg cccattcttc tagcaacctg 60

ttagcatttc cgatcgtcct acaagacaca ggagatggga agaagcaaat cgccccgcaa 120

tataggatcc agcgccttga ctcgtggact gatagtaagg aagactcagt attcatcacc 180

acctatggat tcatctttca agttgggaat gaggaagcca ctgtcggcat gatcgatgat 240

aaacccaagc gcgagttact ttccgctgcg atgctctgcc taggaagcgt cccaaatacc 300

ggagaccttg ttgagctggc aagggcctgt ctcactatga tggtcacatg caagaagagt 360

gcaactaata ctgagagaat ggttttctca gtagtgcagg caccccaagt gctgcaaagc 420

tgtagggttg tggcaaataa atactcatca gtgaatgcag tcaagcacgt gaaagcgcca 480

gagaagatcc ccgggagtgg aaccctagaa tacaaggtga actttgtctc cttgactgtg 540

gtaccgaaga aggatgtcta caagatccca gctgcagtat tgaagatttc tggctcgagt 600

ctgtacaatc ttgcgctcaa tgtcactatt aatgtggagg tagacccgag gagtcctttg 660

gttaaatctc tgtctaagtc tgacagcgga tactatgcta acctcttctt gcatattgga 720

cttatgacca ccgtagatag gaaggggaag aaagtgacat ttgacaagct ggaaaagaaa 780

ataaggagcc ttgatctatc tgtcgggctc agtgatgtgc tcgggccttc cgtgttggta 840

aaagcaagag gtgcacggac taagcttttg gcacctttct tctctagcag tgggacagcc 900

tgctatccca tagcaaatgc ttctcctcag gtggccaaga tactctggag tcaaaccgcg 960

tgcctgcgga gcgttaaaat cattatccaa gcaggtaccc aacgcgctgt cgcagtgacc 1020

gctgaccacg aggttacctc tactaagctg gagaaggggc acacccttgc caaatacaat 1080

ccttttaaga aataa 1095

<210> 4

<211> 1662

<212> DNA

<213> Newcastle disease virus

<400> 4

atgggctcca gaccttctac caagaaccca gcacctatga tgctgactat ccgggtcgcg 60

ctggtactga gttgcatctg cccggcaaac tccattgatg gcaggcctct tgcagctgca 120

ggaattgtgg ttacaggaga caaagcagtc aacatataca cctcatccca gacaggatca 180

atcatagtta agctcctccc gaatctgccc aaggataagg aggcatgtgc gaaagccccc 240

ttggatgcat acaacaggac attgaccact ttgctcaccc cccttggtga ctctatccgt 300

aggatacaag agtctgtgac tacatctgga ggggggagac aggggcgcct tataggcgcc 360

attattggcg gtgtggctct tggggttgca actgccgcac aaataacagc ggccgcagct 420

ctgatacaag ccaaacaaaa tgctgccaac atcctccgac ttaaagagag cattgccgca 480

accaatgagg ctgtgcatga ggtcactgac ggattatcgc aactagcagt ggcagttggg 540

aagatgcagc agtttgttaa tgaccaattt aataaaacag ctcaggaatt agactgcatc 600

aaaattgcac agcaagttgg tgtagagctc aacctgtacc taaccgaatt gactacagta 660

ttcggaccac aaatcacttc acctgcctta aacaagctga ctattcaggc actttacaat 720

ctagctggtg ggaatatgga ttacttattg actaagttag gtatagggaa caatcaactc 780

agctcattaa tcggtagcgg cttaatcacc ggtaacccta ttctatacga ctcacagact 840

caactcttgg gtatacaggt aactctacct tcagtcggga acctaaataa tatgcgtgcc 900

acctacttgg aaaccttatc cgtaagcaca accaggggat ttgcctcggc acttgtccca 960

aaagtggtga cacaggtcgg ttctgtgata gaagaacttg acacctcata ctgtatagaa 1020

actgacttag atttatattg tacaagaata gtaacgttcc ctatgtcccc tggtatttac 1080

tcctgcttga gcggcaatac atcggcctgt atgtactcaa agaccgaagg cgcacttact 1140

acaccatata tgactatcaa aggctcagtc atcgctaact gcaagatgac aacatgtaga 1200

tgtgtaaacc ccccgggtat catatcgcaa aactatggag aagccgtgtc tctaatagat 1260

aaacaatcat gcaatgtttt atccttaggc gggataactt taaggctcag tggggaattc 1320

gatgtaactt atcagaagaa tatctcaata caagattctc aagtaataat aacaggcaat 1380

cttgatatct caactgagct tgggaatgtc aacaactcga tcagtaatgc tttgaataag 1440

ttagaggaaa gcaacagaaa actagacaaa gtcaatgtca aactgaccag cacatctgct 1500

ctcattacct atatcgtttt gactatcata tctcttgttt ttggtatact tagcctgatt 1560

ctagcatgct acctaatgta caagcaaaag gcgcaacaaa agaccttatt atggcttggg 1620

aataataccc tagatcagat gagagccact acaaaaatgt ga 1662

<210> 5

<211> 1734

<212> DNA

<213> Newcastle disease virus

<400> 5

atggaccgcg ccgttagcca agttgcgtta gagaatgatg aaagagaggc aaaaaataca 60

tggcgcttga tattccggat tgcaatctta ttcttaacag tagtgacctt ggctatatct 120

gtagcctccc ttttatatag catgggggct agcacaccta gcgatcttgt aggcataccg 180

actaggattt ccagggcaga agaaaagatt acatctacac ttggttccaa tcaagatgta 240

gtagatagga tatataagca agtggccctt gagtctccat tggcattgtt aaatactgag 300
accacaatta tgaacgcaat aacatctctc tcttatcaga ttaatggagc tgcaaacaac 360
agcgggtggg gggcacctat tcatgaccca gattatatag gggggatagg caaagaactc 420
attgtagatg atgctagtga tgtcacatca ttctatccct ctgcatttca agaacatctg 480
aattttatcc cggcgcctac tacaggatca ggttgcactc gaataccctc atttgacatg 540
agtgctaccc attactgcta cacccataat gtaatattgt ctggatgcag agatcactca 600
cactcacatc agtatttagc acttggtgtg ctccggacat ctgcaacagg gagggtattc 660

ttttctactc tgcgttccat caacctggac gacacccaaa atcggaagtc ttgcagtgtg 720
agtgcaactc ccctgggttg tgatatgctg tgctcgaaag ccacggagac agaggaagaa 780
gattataact cagctgtccc tacgcggatg gtacatggga ggttagggtt cgacggccaa 840
tatcacgaaa aggacctaga tgtcacaaca ttattcgggg actgggtggc caactaccca 900
ggagtagggg gtggatcttt tattgacagc cgcgtatggt tctcagtcta cggagggtta 960
aaacccaata cacccagtga cactgtacag gaagggaaat atgtgatata caagcgatac 1020
aatgacacat gcccagatga gcaagactac cagattcgaa tggccaagtc ttcgtataag 1080

cctggacggt ttggtgggaa acgcatacag caggctatct tatctatcaa agtgtcaaca 1140
tccttaggcg aagacccggt actgactgta ccgcccaaca cagtcacact catgggggcc 1200
gaaggcagaa ttctcacagt agggacatcc catttcttgt atcagcgagg gtcatcatac 1260
ttctctcccg cgttattata tcctatgaca gtcagcgaca aaacagccac tcttcatagt 1320
ccttatacat tcaatgcctt cactcggcca ggtagtatcc cttgccaggc ttcagcaaga 1380
tgccccaact cgtgtgttac tggagtctat acagatccat atcccctaat cttctataga 1440
aaccacacct tgcgaggggt attcgggaca atgcttgatg gtgaacaagc aagacttaac 1500

cctgcgtctg cagtattcga tagcacatcc cgcagtcgca taactcgagt gagttcaagc 1560
agcatcaaag cagcatacac aacatcaact tgttttaaag tggtcaagac caataagacc 1620
tattgtctca gcattgctga aatatctaat actctcttcg gagaattcag aatcgtcccg 1680
ttactagttg agatcctcaa agatgacggg gttagagaag ccaggtctgg ctag 1734

<210> 6
<211> 6615
<212> DNA
<213> Newcastle disease virus
<400> 6

atggcgagct ccggtcctga aagggcagag catcagatta tcctaccaga gtcacacctg 60

tcttcaccat tggtcaagca caaactactc tattattgga aattaactgg gctaccgctt 120

cctgatgaat gtgacttcga ccacctcatt ctcagccgac aatggaaaaa aatacttgaa 180

tcggcctctc ctgatactga gagaatgata aaactcggaa gggcagtaca ccaaactctt 240

aaccacaatt ccagaataac cggagtactc caccccaggt gtttagaaga actggctaat 300

attgaggtcc ctgattcaac caacaaattt cggaagattg agaagaagat ccaaattcac 360

aacacgagat atggagaact gttcacaagg ctgtgtacgc atatagagaa gaaactgctg 420

gggtcatctt ggtctaacaa tgtcccccgg tcagaggagt tcagcagcat tcgtacggat 480

ccggcattct ggtttcactc aaaatggtcc acagccaagt ttgcatggct ccatataaaa 540

cagatccaga ggcatctgat tgtggcagct aggacaaggt ctgcggccaa caaattggtg 600

atgctaaccc ataaggtagg ccaagtcttt gtcactcctg aacttgttgt tgtgacgcat 660

acgaatgaga acaagttcac atgtcttacc caggaacttg tattgatgta tgcagatatg 720

atggagggca gagatatggt caacataata tcaaccacgg cggtgcatct cagaagctta 780

tcagagaaaa ttgatgacat tttgcggtta atagacgctc tggcaaaaga cttgggtaat 840

caagtctacg atgttgtatc actaatggag ggatttgcat acggagctgt ccagctactc 900

gagccgtcag gtacatttgc gggagatttc ttcgcattca acctgcagga gcttaaagac 960

attctaattg gcctcctccc caatgatata gcagaatccg tgactcatgc aatcgctact 1020

gtattctctg gtttagaaca gaatcaagca gctgagatgt tgtgcctgtt gcgtctgtgg 1080

ggtcacccac tgcttgagtc ccgtattgca gcaaaggcag tcaggagcca aatgtgcgca 1140

ccgaaaatgg tagactttga tatgatcctt caggtactgt ctttcttcaa gggaacaatc 1200

atcaacggat acagaaagaa gaatgcaggt gtgtggccgc gagtcaaagt ggatacaata 1260

tatgggaagg tcattgggca actacatgca gattcagcag agatttcaca cgatatcatg 1320

ttgagagagt ataagagttt atctgcactt gaatttgagc catgtataga atacgaccct 1380

gtcactaacc tgagcatgtt cctaaaagac aaggcaatcg cacaccccaa cgataattgg 1440

cttgcctcgt ttaggcggaa ccttctctcc gaagaccaga agaaacatgt aaaggaagcg 1500

acttcgacta accgcctctt gatagagttt ttagagtcaa atgattttga tccatataaa 1560

gagatggaat atctgacgac ccttgagtac cttagagatg acaatgtggc agtatcatac 1620

tcgctcaaag agaaggaagt gaaagttaat ggacggatct tcgctaagct gacaaagaag 1680

ttaaggaact gtcaggtgat ggcggaaggg atcctagccg atcagattgc acctttcttt 1740

cagggaaatg gagtcattca ggatagcata tccttgacca agagtatgct agcgatgagt 1800

caactgtctt ttaacagcaa taagaaacgt atcactgact gtaaagaaag agtatgttca 1860
aaccgcaatc atgatccgaa aagcaagaac cgtcggagag ttgcaacctt cataacaact 1920
gacctgcaaa agtactgtct taattggaga tatcagacga tcaaattgtt cgctcatgcc 1980
atcaatcagt tgatgggcct acctcatttc ttcgagtgga ttcacctaag actgatggac 2040
actacgatgt tcgtaggaga ccctttcaat cctccaagtg accctactga ctgtgacctc 2100
tcaagagtcc ctaatgatga catatatatt gtcagtgcca gaggggggtat cgaaggatta 2160
tgccagaagc tatggacaat gatctcaatt gctgcaatcc aacttgctgc agctagatcg 2220

cattgtcgtg ttgcctgtat ggtacagggt gataatcaag taatagcagt aacgagagag 2280
gtaagatcag atgactctcc ggagatggtg ttgacacagt tgcatcaagc cagtgataat 2340
ttcttcaagg aattaatcca tgtcaatcat ttgattggcc ataatttgaa ggatcgtgaa 2400
accatcaggt cagacacatt cttcatatac agcaaacgaa tcttcaaaga tggagcaatc 2460
ctcagtcaag tcctcaaaaa ttcatctaaa ttagtgctag tgtcaggtga tctcagtgaa 2520
aacaccgtaa tgtcctgtgc caacattgcc tctactgtag cacggctatg cgagaacggg 2580
cttcccaaag acttctgtta ctatttaaac tatataatga gttgtgtgca gacatacttt 2640

gactctgagt tctccatcac caacaattcg caccccgatc ttaatcagtc gtggattgag 2700
gacatctctt ttgtgcactc atatgttctg actcctgccc aattaggggg actgagtaac 2760
cttcaatact caaggctcta cactagaaat atcggtgacc cggggactac tgcttttgca 2820
gagatcaagc gactagaagc agtgggacta ctgagtccta acattaggac taatatctta 2880
actaggccgc ctgggaatgg agattgggcc agtctgtgca acgacccata ctctttcaat 2940
tttgagactg ttgcaagccc aaacattgtt cttaagaaac atacgcaaag agtcctattt 3000
gaaacttgtt caaatccctt attgtctgga gtgcacacag aggataatga ggcagaagag 3060

aaggcattgg ctgaattctt gcttaatcaa gaggtgattc atccccgcgt tgcgcatgcc 3120
atcatggagg caagctctgt aggtaggaga aagcaaattc aagggcttgt tgacacaaca 3180
aacactgtaa ttaagattgc gcttactagg aggccattag gcatcaagag gctgatgcgg 3240
atagtcaatt attctagcat gcatgcaatg ctgtttagag acgatgtttt ttcctctagt 3300
agatccaacc accccttagt ctcttctaat atgtgttctc tgacactggc agactatgca 3360
cggaatagaa gctggtcacc tttgacggga ggcaggaaaa tactgggtgt atctaatcct 3420
gatacgatag aactcgtaga gggtgagatt cttagtgtaa gcggagggtg tacaagatgt 3480

gacagcggag atgaacaatt tacttggttc catcttccaa gcaatataga attgaccgat 3540

gacaccagca agaatcctcc gatgagggta ccatatctcg ggtcaaagac acaggagagg 3600

agagctgcct cacttgcgaa aatagctcat atgtcgccac atgtgaaggc tgccctaagg 3660

gcatcatccg tgttgatctg ggcttatggg gataatgaag taaattggac tgctgctctt 3720

acgattgcaa aatctcggtg taatgtaaac ttagagtatc ttcggttact gtccccttta 3780

cccacggctg ggaatcttca acatagacta gatgatggta taactcagat gacattcacc 3840

cctgcatctc tctacagggt gtcaccttac attcacatat ccaatgattc tcaaaggctg 3900

ttcactgaag aaggagtcaa agaggggaat gtggtttacc aacagatcat gctcttgggt 3960

ttatctctaa tcgaatcgat ctttccaatg acaacaacca gaacatatga tgagatcaca 4020

ctgcacctac atagtaaatt tagttgctgt atcagggaag cacctgttgc ggttcctttc 4080

gagctacttg gggtggcacc ggaactgagg acagtgacct caaataagtt tatgtatgat 4140

cctagccctg tatcggaggg agactttgcg agacttgact tagctatctt caagagttat 4200

gagcttaatc tggagtcata tcccacgata gagctaatga acattctttc aatatccagc 4260

gggaagttga ttggccagtc tgtggtttct tatgatgaag atacctccat aaagaatgat 4320

gccataatag tgtatgacaa tacccgaaat tggatcagtg aagctcagaa ttcagatgtg 4380

gtccgcctat ttgaatatgc agcacttgaa gtgctcctcg actgttctta ccaactctat 4440

tacctgagag taagagacct agacaatatt gtcttatata tgggtgattt atacaagaat 4500

atgccaggaa ttctactttc caacattgca gctacaatat ctcatcctgt cattcattca 4560

aggttacatg cagtgggcct ggtcaaccat gacggatcac accaacttgc agatacggat 4620

tttatcgaaa tgtctgcaaa actgttagta tcttgcaccc gacgtgtgat ctccggctta 4680

tattcaggaa ataagtatga tctgctgttc ccatctgtct tagatgataa cctgaatgag 4740

aagatgcttc agctgatatc ccggttatgc tgtctgtaca cggtactctt tgctacaaca 4800

agagaaatcc cgaaaataag aggcttaact gcagaagaga aatgttcaat actcactgag 4860

tatttactgt cggatgctgt gaaaccatta cttagccccg atcaagtgag ctctatcatg 4920

tctcctaaca taattacatt cccagctaat ctgtactaca tgtctcggaa gagcctcaat 4980

ttgatcaggg aaagggagga cagggatact atcctggcgt tgttgttccc ccaagagcca 5040

ttattagagt tcccttctgt gcaagatatt ggtgctcgag tgaaagatcc attcacccga 5100

caacctgcgg catttttgca agagttagat ttgagtgctc cagcaaggta tgacgcattc 5160

acacttagtc agattcatcc tgaactcaca tctccaaatc cggaggaaga ctacttagta 5220

cgatacttgt tcagagggat agggactgca tcttcctctt ggtataaggc atcccatctc 5280

ctttctgtac ccgaggtaag atgtgcaaga cacgggaact ccttatactt ggctgaagga 5340

agcggagcca tcatgagtct tcttgaactg catgtaccac atgaaactat ctattacaat 5400

acgctctttt caaatgagat gaaccccccg caacgacatt tcgggccgac cccaactcag 5460

tttttgaatt cggttgttta taggaatcta caggcggagg taacatgcaa ggatggattt 5520

gtccaagagt tccgtccatt atggagagaa aatacagagg aaagtgacct gacctcagat 5580

aaagcagtgg ggtatattac atctgcagta ccctacagat ctgtatcatt gctgcattgt 5640

gacattgaaa ttcctccagg gtccaatcaa agcttactag atcaactagc tatcaattta 5700

tctctgattg ccatgcattc tgtaagggag ggcggggtag taatcatcaa agtgttgtat 5760

gcaatgggat actactttca tctactcatg aacttgtttg ctccgtgttc cacaaaagga 5820

tatattctct ctaatggtta tgcatgtcga ggggatatgg agtgttacct ggtatttgtc 5880

atgggttacc tgggcgggcc tacatttgta catgaggtgg tgaggatggc aaaaactctg 5940

gtgcagcggc acggtacgct tttgtctaaa tcagatgaga tcacactgac caggttattc 6000

acctcacagc ggcagcgtgt gacagacatc ctatccagtc ctttaccaag attaataaag 6060

tacttgagga agaatattga cactgcgctg attgaagccg ggggacagcc cgtccgtcca 6120

ttctgtgcgg agagtctggt gagcacgcta gcgaacataa ctcagataac ccagatcatc 6180

gctagtcaca ttgacacagt catccggtct gtgatatata tggaagctga gggtgatctc 6240

gctgacacag tatttctatt taccccttac aatctctcta ctgacgggaa aaagaggaca 6300

tcacttaaac agtgcacgag acagatccta gaggttacaa tactaggtct tagagtcgaa 6360

aatctcaata aaataggcga tataatcagc ctagtgctta aaggcatgat ctccatggag 6420

gaccttatcc cactaaggac atacttgaag catagtacct gccctaaata tttgaaggct 6480

gtcctaggta ttaccaaact caaagaaatg tttacagaca cttctgtact gtacttgact 6540

cgtgctcaac aaaaattcta catgaaaact ataggcaatg cagtcaaagg atattacagt 6600

aactgtgact cctaa 6615