



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 (11)證書號數：TW I597363 B

(45)公告日：中華民國 106 (2017) 年 09 月 01 日

(21)申請案號：105115687

(22)申請日：中華民國 105 (2016) 年 05 月 20 日

(51)Int. Cl. : C12N7/00 (2006.01)

C12N15/45 (2006.01)

A61K39/17 (2006.01)

(71)申請人：國年實業有限公司(中華民國) (TW)

臺北市中正區忠孝東路2段112號8樓

(72)發明人：林建宏(TW)

(74)代理人：何秋遠

(83)生物材料寄存：

財團法人食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心 BCRC 970070 2016 年 03 月 24 日

財團法人食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心 BCRC 970071 2016 年 03 月 24 日

財團法人食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心 BCRC 970072 2016 年 03 月 24 日

(56)參考文獻：

CN 105543180A

萬洪全，鵝源新城疫病毒部份生物學特徵鑑定及其囊膜蛋白基因序列分析，揚州大學，博士論文，發表時間，2002/5/1。

EMBL: Sequence: AF234032.1, 2000/8/16, 網址: <http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/AF234032>。EMBL: Sequence: AF234033.1, 2000/8/16, 網址: <http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/AF234033>。EMBL: Sequence: DQ898535.1, 2007/8/31, 網址: <http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/DQ898535>。EMBL: Sequence: AF400505.1, 2001/8/21, 網址: <http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/AF400505>。EMBL: Sequence: EU526297.1, 2009/8/30, 網址: <http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/EU526297>。EMBL: Sequence: EU526302.1, 2009/8/30, 網址: <http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/EU526302>。EMBL: Sequence: EU296513.1, 2008/12/16, 網址: <http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/EU296513>。EMBL: Sequence: EU296514.1, 2008/12/16, 網址: <http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/EU296514>。EMBL: Sequence: EU296503.1, 2008/12/16, 網址: <http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/EU296503>。

審查人員：黃教威

申請專利範圍項數：8 項 圖式數：1 共 34 頁

(54)名稱

適用於Ⅶ型新城病疫苗之病毒株

(57)摘要

本發明為一種適用於Ⅶ型新城病疫苗之病毒株及其編碼基因，其係該病毒株之生物寄存號碼為 BCRC 970070、名稱為禽類七型新城病病毒(Genotype VII Newcastle disease virus)VII NDV/TW-CB-ND02 的病毒株；生物寄存號碼為 BCRC 970071、名稱為禽類七型新城病病毒 VII NDV/TW-CB-ND04 的病毒株；或生物寄存號碼為 BCRC 970072、名稱為禽類七型新城病病毒 VII NDV/TW-CB-ND06 的病毒株。該病毒株具有符合能夠有效提高宿主對新城病病毒的免疫力反應、及在禽類體內產生抗體免疫持續力之防疫功效，適合於生產預防新城病疫苗的研究及開發，也可用於製造活毒型、去活化型或減毒型疫苗。

**公告本**

106年07月11日 修正

申請日: 105/05/20

【發明摘要】IPC分類: C12N 7/00 (2006.01)
C12N 15/45 (2006.01)
A61K 39/17 (2006.01)**【中文發明名稱】** 適用於Ⅶ型新城病疫苗之病毒株**【中文】**

本發明為一種適用於Ⅶ型新城病疫苗之病毒株及其編碼基因，其係該病毒株之生物寄存號碼為BCRC 970070、名稱為禽類七型新城病病毒（Genotype VII Newcastle disease virus）VII NDV/TW-CB-ND02的病毒株；生物寄存號碼為BCRC 970071、名稱為禽類七型新城病病毒 VII NDV/TW-CB-ND04的病毒株；或生物寄存號碼為BCRC 970072、名稱為禽類七型新城病病毒 VII NDV/TW-CB-ND06的病毒株。該病毒株具有符合能夠有效提高宿主對新城病病毒的免疫力反應、及在禽類體內產生抗體免疫持續力之防疫功效，適合於生產預防新城病疫苗的研究及開發，也可用於製造活毒型、去活化型或減毒型疫苗。

【指定代表圖】 無**【代表圖之符號簡單說明】** 無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 適用於Ⅶ型新城病疫苗之病毒株

【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種Ⅶ型新城病疫苗之病毒株及其基因編碼，特別是關於一種適用於Ⅶ型新城病疫苗之病毒株及其編碼基因及其編碼基因。

【先前技術】

【0002】 根據研究報告指出：新城病(Newcastle disease, ND) 是各型禽病中最常見之一種惡性傳染病，自 1926 年新城病被發現以來，已傳播至世界上大部分國家，此新城病在各地區之流行不大相同。

【0003】 雞新城病，1926 年首先發現於印尼，不久又在英國新城發現，之後世界各國均有流行記載。新城病(ND)是由新城病毒(NDV)引起的一種急性傳染病，1926 年首次爆發于印度尼西亞和英國的新城，故名新城病毒(Alexander DJ, 1982)。它屬於副粘病毒科(*Paramyxoviridae*)，腮腺炎病毒屬(*Rubulavirus*)家族的成員(Rima BK et al., 1995)，屬於禽類第一型副黏液病毒。其新城病毒之基因組為一條單股負鏈 RNA，包含約 15kb 鹼基，六個主要結構蛋白：3'-NP-P-M-F-HN-L-5'。

【0004】 近年來，由於禽類副黏液病毒 (*Avian Paramyxovirus*，APMV) 時常被發現於許多種類之家禽、信鴿等禽類間；當感染此種病毒時，經常對於禽鳥造成各種不同之臨床症狀，例如，造成禽類呼吸、消化和神經系統之障礙等。由於各類型新城病毒之毒性強弱差異大，所以新城病發生率、致病症狀、病變徵候、及致死率等亦都隨著病毒類型不同而明顯差異。雖然輕微時病徵不顯著，然而嚴重時則會導致死亡，因而晚近已

引起世界各國特別地關注、重視並且不斷進行此類病原群相關之研究及調查。

【0005】 根據感染能力和感染後所引起的臨床症狀的嚴重性差別，新城病毒可分為強毒(velogenic)、中毒(mesogenic)和弱毒(lentogenic)三類(Alexander D J, 1997)。NDV 強毒株感染力很強，通常以引起強烈性感染為特徵；而 NDV 弱毒株的感染力和致病力很弱，一般無急性感染病症，事實上，包括 La Sota 等在內的多株弱毒 NDV 通常在生產上被用做活毒疫苗。

【0006】 然而，因為若被新城病之強毒力型感染的死亡率高，對養雞業危害嚴重。尚無有效治療藥物，只能依靠嚴格消毒、隔離，活毒疫苗和去活化疫苗的協同使用預防接種。目前防止新城病之疫苗主要使用 LaSota 和 Hitchner B1 兩種弱毒株疫苗或其滅活毒株疫苗，並且這兩株病毒作為疫苗毒株已經應用了幾十年。LaSota 和 Hitchner B1 兩病毒株都屬於基因 II 型，而當前流行亞洲地區的病毒株主要是基因 VII 型 NDV。因此，上述兩種疫苗不能在臨床應用上提供堅強的免疫保護，此狀況也可以解釋了新城病依舊在一些地區爆發流行的原因。

【0007】 此外，基於現有疫苗品質問題、免疫接種方式方法、免疫程式、雞場飼養管理水準、雞群抗體水準良莠不齊的現狀，使新城病免疫失敗屢見不鮮。可以當作一個好的疫苗候選之病毒株需同時具有毒力弱、和遺傳穩定性好的特點，而目前國內外分離到的新城病毒普遍存在強毒株之裂解位點、效價低和容易發生變異等缺點。大部分新城病毒之 F 蛋白裂解位點序列為強毒特徵，但對雞的致病力較弱，推測這種毒力的差異可能由於病毒的複製能力的差異而引起。為解決這一難題，有賴於對本地區流行的毒株的流行特點、變異特點進行研究以及篩選分離出合適的優勢疫苗之病毒株，以使新城病的防控更具有針對性和有效性。

【0008】 因此，各界莫不期待以及殷切期盼開發出一種能夠解決免疫力反應低、感染力弱、防疫效果持續力弱等之傳統技術的問題點的Ⅶ型新城病疫苗之病毒株。

【發明內容】

【0009】 有鑑於此，本發明人等經由潛心研究及尋找用於解決傳統技術問題點之各種可能方案，進而篩選出一種不但能夠改善上述習用技術之問題點，而且具有不會危害飼養環境及禽類健康、且具有符合能夠有效提高宿主對新城病病毒的免疫力反應、對宿主的感染力在安全範圍內、產生抗體免疫持續力長等之防疫功效、以及能夠製成具有長效防治新城病效能之疫苗之新穎的適用於Ⅶ型新城病疫苗之病毒株及其編碼基因，至此乃完成本發明。

《發明功效》

【0010】 具體而言，根據本發明之一觀點可以提供一種適用於Ⅶ型新城病疫苗之病毒株及其編碼基因，其係該病毒株之生物寄存號碼為BCRC 970070、名稱為禽類七型新城病病毒（Genotype VII Newcastle disease virus）VII NDV/TW-CB-ND02的病毒株；該病毒株之生物寄存號碼為BCRC 970071、名稱為禽類七型新城病病毒（Genotype VII Newcastle disease virus）VII NDV/TW-CB-ND04的病毒株；或該病毒株之生物寄存號碼為BCRC 970072、名稱為禽類七型新城病病毒（Genotype VII Newcastle disease virus）VII NDV/TW-CB-ND06的病毒株，這三株病毒株於2016年3月24日生物寄存於位於中華民國、財團法人食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心(Bioresource Collection and Research Center, BCRC)。

【0011】 在某些具體實施例中，本發明之適用於Ⅶ型新城病疫苗之病毒株及其編碼基因，其中該病毒株係具有F₀蛋白之核苷酸序列為SEQ ID NO：1～SEQ ID NO：3，分別依次對應禽類Ⅶ型新城病病毒ⅦNDV/TW-0CB-ND02、禽類Ⅶ型新城病病毒ⅦNDV/TW-CB-ND04、禽類Ⅶ型新城疫病毒ⅦNDV/CB-ND06。

【0012】 在某些具體實施例中，本發明之適用於Ⅶ型新城病疫苗之病毒株及其編碼基因，其中該病毒株係具有HN蛋白之核苷酸序列為SEQ ID NO：4～SEQ ID NO：6，分別依次對應禽類Ⅶ型新城病病毒ⅦNDV/TW-0CB-ND02、禽類Ⅶ型新城病病毒ⅦNDV/TW-CB-ND04、禽類Ⅶ型新城疫病毒ⅦNDV/CB-ND06。

【0013】 具體而言，根據本發明之在某些具體實施例中，本發明之適用於Ⅶ型新城病疫苗之病毒株及其編碼基因，其中該病毒株係具有P蛋白之核苷酸序列為SEQ ID NO：7～SEQ ID NO：9，分別依次對應禽類Ⅶ型新城病病毒ⅦNDV/TW-0CB-ND02、禽類Ⅶ型新城病病毒ⅦNDV/TW-CB-ND04、禽類Ⅶ型新城疫病毒ⅦNDV/CB-ND06。

【0014】 另外，在某些具體實施例中，本發明之適用於Ⅶ型新城病疫苗之病毒株及其編碼基因，其中該病毒株係具有F₀蛋白之切割點氨基酸序列(112～117)為SEQ ID NO：12、SEQ ID NO：13、SEQ ID NO：14、SEQ ID NO：15中之任一種。

【0015】 再者，在某些具體實施例中，本發明之適用於Ⅶ型新城病疫苗之病毒株及其編碼基因，其中該病毒株感染SPF雞胚之平均致死時間在20～40小時；經過弱化後，該病毒株之平均致死時間超過60小時。

【0016】 又，在某些具體實施例中，本發明之適用於Ⅶ型新城病疫苗之病毒株及其編碼基因，其中該病毒株感染SPF雞隻之腦內致病性指數之

平均數值在1.7~2；經過弱化後，該病毒株之腦內致病性指數之平均數值在0.4以下。

【0017】 其中，在某些具體實施例中，本發明之適用於Ⅶ型新城病疫苗之病毒株及其編碼基因，其中該病毒株係用於感染雞胚胎培養、動物接種、或組織培養中之至少一種。

【0018】 根據某些具體實施例，本發明之適用於Ⅶ型新城病疫苗之病毒株及其編碼基因，其中該病毒株係用於感染Vero細胞、BHK-21細胞、或MDCK細胞中之至少一種。

【0019】 又，根據某些具體實施例，本發明之適用於Ⅶ型新城病疫苗之病毒株及其編碼基因，其中該病毒株之核苷酸序列，而該核苷酸序列中一個或多個核苷酸可進一步被其他的核苷酸所置換。

【0020】 此外，根據某些具體實施例，本發明之適用於Ⅶ型新城病疫苗之病毒株及其編碼基因，更進一步可以用於一種致免疫性組成物，其該致免疫性組成物係可以包含在藥學上可接受之載體。

【0021】 再者，根據某些具體實施例，本發明之適用於Ⅶ型新城病疫苗之病毒株及其編碼基因，更進一步可以用於一種疫苗組成物，其該疫苗組成物係可以包含在藥學上可接受之載體。

【0022】 其，根據某些具體實施例，本發明之適用於Ⅶ型新城病疫苗之病毒株及其編碼基因，更進一步可以用於一種疫苗組成物，其該疫苗組成物為單價疫苗組成物。

【0023】 根據某些具體實施例，本發明之適用於Ⅶ型新城病疫苗之病毒株及其編碼基因，更進一步可以用於一種疫苗組成物，其該疫苗組成物為多價疫苗組成物。

《發明之詳細說明》

【0024】 首先，對於本說明書中所使用的特定用語或名詞進行描述性的說明；然而，下列說明僅為例示性說明，非作為限制本發明說明書及申請專利範圍。除非本說明書另有定義以外，在本文中所用的科學與技術詞彙之含義與本發明所屬技術領域中具有通常知識者所理解與慣用的意義相同。

【0025】 在本文中，所謂「適用於Ⅶ型新城病疫苗之病毒株及其編碼基因」係指病毒株能夠用來引起宿主免疫反應之特異性抗原，其包括但不限於全病毒、表面血球凝集抗原(hemagglutinin surface antigen)、表面神經胺酸酶抗原(neuraminidase surface antigen)、及內部核白衣抗原(internal nucleocapsid antigen)、或衍生物等。

【0026】 本文術語中關於禽類 Ⅶ 基因型新城病感染之“預防”係指抑制禽類 Ⅶ 基因型新城病病毒株複製、抑制禽類 Ⅶ 基因型新城病病毒株傳輸、或為預防禽類 Ⅶ 基因型新城病病毒株在其宿主中生長、以及緩和禽類 Ⅶ 基因型新城病病毒株感染引起的疾病或病症之症狀。本發明方法，例如可有效的預防以及降低禽類呼吸道及神經系統之損害。

【0027】 本文術語之“禽類 Ⅶ 型新城病去活化疫苗”意指用於預防因若感染禽類 Ⅶ 型新城病病毒株引起的病症或疾病之疫苗。禽類 Ⅶ 基因型新城病去活化疫苗可包括任何有效治療或預防禽類經禽類 Ⅶ 基因型新城病感染之疫苗。本發明方法使用之較佳禽類 Ⅶ 基因型新城病去活化疫苗為病毒株疫苗。

【0028】 本文術語之“動物”意指所有非人類動物，包括哺乳動物。

【0029】 本文術語之“禽類”意指小雞、雞、火雞、鴨、母雞、雌雞、闖雞、土雞、公雞、山雞及禽類屬之成員。

【0030】 較佳者，本發明方法係施用於非人類之哺乳動物；最佳者為禽類。

【0031】 本文術語之“病毒株疫苗”意指適用於作為疫苗之去活化的全部或部分的禽類 VII 基因型新城病病毒株，可以系為雞胚尿囊及/或細胞製劑。

【0032】 本文術語之“有效量”意指於投用後可充分引起禽類免疫反應的禽類 VII 基因型新城病去活化疫苗量。免疫反應包含(而未限制)先天誘發的、細胞的及/或體液免疫反應。

【0033】 在本文中，對於用以界定本發明範圍的數值與參數，本質上不可避免地含有因個別測試方法所致的標準偏差，因而大多是以約略的數量值來表示，然而於具體實施例中則盡可能精確呈現的相關數值。在本文中，「約」通常視本發明所屬技術領域中具有通常知識者的考量而定，一般係指代表實際數值落在平均值的可接受標準誤差之內，例如，該實際數值為在一特定數值或範圍的 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 1\%$ 、或 $\pm 0.5\%$ 以內。

【0034】 本發明為自野外田間採樣分離出一種適用於VII型新城病疫苗之病毒株及其編碼基因。

【0035】 具體而言，根據本發明之一觀點可以提供一觀點可以提供一種適用於VII型新城病疫苗之病毒株及其編碼基因，其係該病毒株之生物寄存號碼為 BCRC 970070、名稱為禽類七型新城病病毒（Genotype VII Newcastle disease virus）VII NDV/TW-CB-ND02 的病毒株；該病毒株之生物寄存號碼為 BCRC 970071、名稱為禽類七型新城病病毒（Genotype VII Newcastle disease virus）VII NDV/TW-CB-ND04 的病毒株；或該病毒株之生物寄存號碼為 BCRC 970072、名稱為禽類七型新城病病毒（Genotype VII Newcastle disease virus）VII NDV/TW-CB-ND06 的病毒株，這三株病毒株於 2016 年 3 月 24 日生物寄存於位於中華民國、財團法人食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心(Bioresource Collection and Research Center, BCRC)。

【0036】 根據某些具體實施例，在本發明之適用於Ⅶ型新城病疫苗之病毒株及其編碼基因，其該病毒株係應用於疫苗製作，F₀蛋白之核苷酸序列的長度並未特別加以限定，只要是在不違背或脫離本發明之精神以及能夠達成引起宿主免疫反應效果之範圍內即可。舉例來說，對於適用於Ⅶ型新城病疫苗之病毒株及其編碼基因而言，該 F₀蛋白之核苷酸序列可以是例如第 1 個核苷酸至約第 900 個核苷酸之範圍；在某些具體實施例中，較佳為約 20 個核苷酸至約第 800 個核苷酸之範圍；更佳為在約 50 個核苷酸至約第 700 個核苷酸之範圍；特佳為在約 60 個核苷酸至約第 600 個核苷酸之範圍；最佳為在約 100 個核苷酸至約第 500 個核苷酸之範圍。

【0037】 根據某些具體實施例，在本發明之適用於Ⅶ型新城病疫苗之病毒株及其編碼基因，其該病毒株係應用於疫苗製作，HN蛋白之核苷酸序列的長度並未特別加以限定，只要是在不違背或脫離本發明之精神以及能夠達成引起宿主免疫反應效果之範圍內即可。舉例來說，對於適用於Ⅶ型新城病疫苗之病毒株及其編碼基因而言，該HN蛋白之核苷酸序列可以是例如第1個核苷酸至約第900個核苷酸之範圍；在某些具體實施例中，較佳為約20個核苷酸至約第 800個核苷酸之範圍；更佳為在約50個核苷酸至約第 700個核苷酸之範圍；特佳為在約60個核苷酸至約第 600個核苷酸之範圍；最佳為在約100個核苷酸至約第 500個核苷酸之範圍。

【0038】 根據某些具體實施例，在本發明之適用於Ⅶ型新城病疫苗之病毒株及其編碼基因，其該病毒株係應用於疫苗製作，P蛋白之核苷酸序列的長度並未特別加以限定，只要是在不違背或脫離本發明之精神以及能夠達成引起宿主免疫反應效果之範圍內即可。舉例來說，對於適用於Ⅶ型新城病疫苗之病毒株及其編碼基因而言，該P蛋白之核苷酸序列可以是例如第 1 個核苷酸至約第1188個核苷酸之範圍；在某些具體實施例中，較佳為約 20 個核苷酸至約第1100個核苷酸之範圍；更佳為在約50個核苷酸至約第

900個核苷酸之範圍；特佳為在約60個核苷酸至約第850個核苷酸之範圍；最佳為在約100個核苷酸至約第800個核苷酸之範圍。

【0039】 根據某些具體實施例，在本發明之適用於Ⅶ型新城病疫苗之病毒株及其編碼基因，其該病毒株係具有F₀蛋白之切割點氨基酸序列並未特別加以限定，只要是在不違背或脫離本發明之精神，以及能夠達到引起宿主致病力之F₀蛋白之切割點氨基酸序列即可。舉例來說，對於適用於Ⅶ型新城病疫苗之病毒株及其編碼基因而言，該病毒株係具有F₀蛋白之切割點氨基酸序列，例如可以是¹¹²RRQKRF¹¹⁷、¹¹²RRQRRF¹¹⁷、¹¹²KRQKRF¹¹⁷、或¹¹²KRQRRF¹¹⁷至少其中一種；在某些具體實施例中，較佳為¹¹²RRQKRF¹¹⁷、¹¹²RRQRRF¹¹⁷、¹¹²KRQKRF¹¹⁷、或¹¹²KRQRRF¹¹⁷至少其中一種；更佳為¹¹²RRQKRF¹¹⁷、¹¹²RRQRRF¹¹⁷、或¹¹²KRQKRF¹¹⁷至少其中一種；特佳為¹¹²RRQKRF¹¹⁷、或¹¹²RRQRRF¹¹⁷。

【0040】 根據某些具體實施例，在本發明之適用於Ⅶ型新城病疫苗之病毒株及其編碼基因，其宿主平均死亡時間(MDT)之病原性鑑定的效果並未特別加以限定，只要是在不違背或脫離本發明之精神以及能夠達到引起宿主平均死亡時間之範圍內即可。舉例來說，對於適用於Ⅶ型新城病疫苗之病毒株及其編碼基因而言，該病毒株使宿主平均死亡時間，例如可以是約1個小時至約120個小時之範圍；在某些具體實施例中，較佳為約5個小時至約110個小時之範圍；更佳為在約10個小時至約90個小時之範圍；特佳為在約20個小時至約80個小時之範圍；最佳為在約30個小時至約60個小時之範圍。

【0041】 具體而言，根據本發明之一觀點可以提供一種適用於Ⅶ型新城病疫苗之病毒株及其編碼基因，其係該病毒株經過弱化後，其該病毒株之平均致死時間超過60小時。

【0042】 根據某些具體實施例，在本發明之適用於Ⅶ型新城病疫苗之病毒株及其編碼基因，其宿主腦內致病性指數(ICPI)之病原性鑑定的效果並未特別加以限定，只要是在不違背或脫離本發明之精神以及能夠達到引起宿主大腦內接種致病性指數之範圍內即可。舉例來說，對於適用於Ⅶ型新城病疫苗之病毒株及其編碼基因而言，該病毒株使宿主大腦內接種致病性指數，例如可以是平均值約 0 至約 2 之範圍；在某些具體實施例中，較佳為平均值約 0.5 至約 1.99 之範圍；更佳為平均值約 0.6 至約 1.95 之範圍；特佳為平均值約 0.7 至約 1.9 之範圍；最佳為平均值約 0.9 至約 1.85 之範圍。

【0043】 具體而言，根據本發明之一觀點可以提供一種適用於Ⅶ型新城病疫苗之病毒株及其編碼基因，其係該病毒株經過弱化後，其該病毒株之腦內致病性指數之平均數值在 0.4 以下。

【0044】 其中，在某些具體實施例中，本發明之適用於Ⅶ型新城病疫苗之病毒株及其編碼基因，其中該病毒株係用於感染培養方式並未特別加以限定，只要是在不違背或脫離本發明之精神即可。舉例來說，例如可以是雞胚胎培養、動物接種、或組織培養。根據本發明之某些具體實施例，該病毒株係用於感染培養方式例如可以是自雞胚胎培養、動物接種、或組織培養中之至少一種；適用於本發明之適用於Ⅶ型新城病疫苗之病毒株及其編碼基因係用於感染培養方式較佳使用來源為雞胚胎培養、動物接種、或組織培養；更佳使用來源為雞胚胎培養、或組織培養；特佳使用來源為雞胚胎培養。

【0045】 依據本發明之一觀點，本發明之適用於Ⅶ型新城病疫苗之病毒株及其編碼基因，其中該病毒株係用於感染細胞種類並未特別加以限定，只要是在不違背或脫離本發明之精神即可。舉例來說，例如可以是 Vero 細胞、BHK-21 細胞、或 MDCK 細胞。根據本發明之某些具體實施例，該

感染細胞種類之細胞株來源例如可以是自 Vero 細胞、BHK-21 細胞、或 MDCK 細胞中之至少一種；適用於本發明之適用於Ⅶ型新城病疫苗之病毒株及其編碼基因之感染細胞種類較佳使用來源為 Vero 細胞、BHK-21 細胞、或 MDCK 細胞；更佳使用來源為 Vero 細胞、或 BHK-21 細胞；特佳使用來源為 Vero 細胞。

【0046】 具體而言，根據本發明之一觀點可以提供一種適用於Ⅶ型新城病疫苗之病毒株及其編碼基因，其中該病毒株之核苷酸序列，而該核苷酸序列中一或多個核苷酸可進一步被其他的核苷酸所置換。

【0047】 此外，具體而言，根據本發明之一觀點可以提供一種適用於Ⅶ型新城病疫苗之病毒株及其編碼基因，更進一步用於一種致免疫性組成物，其包含在藥學上可接受之載體。

【0048】 另外，具體而言，根據本發明之一觀點可以提供一種適用於Ⅶ型新城病疫苗之病毒株及其編碼基因，更進一步用於一種疫苗組成物，其包含在藥學上可接受之載體。

【0049】 再者，具體而言，根據本發明之一觀點可以提供一種適用於Ⅶ型新城病疫苗之病毒株及其編碼基因，更進一步用於一種疫苗組成物，其為單價疫苗組成物。

【0050】 又，具體而言，根據本發明之一觀點可以提供一種適用於Ⅶ型新城病疫苗之病毒株及其編碼基因，更進一步用於一種疫苗組成物，其為多價疫苗組成物。

【圖式簡單說明】

【0051】 圖 1 係概略顯示在本發明的一具體實施例中之Ⅶ型新城病疫苗病毒株的採集步驟之流程圖：

在該圖 1 中，步驟 S1 係表示自感染新城疫（NDV）的家禽飼養場採集病毒株之步驟；

步驟 S2 係表示將在步驟 1 所採集到的病毒株於 SPF 雞胚尿囊胚中培養之步驟；

步驟 S3 係表示觀測感染細胞有無出現病毒斑點之步驟；

步驟 S4 係表示量測感染雞胚之平均致死時間之步驟；

步驟 S5 係表示量測感染雞胚之腦內致病性指數之步驟；

步驟 S6 係表示對於 S1 步驟採集到的Ⅶ型新城病疫苗病毒株進行其 F₀ 蛋白、HN 蛋白及 P 蛋白的核苷酸定序之步驟；

W 係表示檢體 V1～V5；

Y 係表示病毒株 TW-CB-ND01、TW-CB-ND02、TW-CB-ND03、TW-CB-ND04、TW-CB-ND06。

【實施方式】

【0052】 以下，進一步列舉實施例來說明本發明之病毒株之分離與篩選方法。

《實施例1~實施例5》

《野外田間病例採集病毒株》

【0053】 首先，依照如圖 1 所示之Ⅶ型新城病疫苗之病毒株的採集步驟，自台灣曾感染新城病(NVD)之家禽類飼養場，從已感染之雞隻的肺、氣管、腸、及腦部採集組織病理樣本，共採集 5 個樣本，每個樣本各 10 克重。於室溫，將該 5 個組織病理樣本分別置放於含有 2%胎牛血清的 MEM 培養基(modified minimal essential medium)中，以組織研磨機(homogenizer)充分磨碎；分別取其懸浮液，接著以 1,500 rpm 離心 15 分鐘後，再以 0.2 μ m 濾膜過濾；取其上清液做為檢體 V1-V5。

《雞胚尿囊腔培養病毒株》

【0054】 接著，取 50ml 之該檢體 V1-V5 接種在 9 日齡無特定病原 (specific pathogen free；SPF) 之雞胚尿囊腔中，然後放置於 37℃ 的孵卵器中培養，繼續培養 7 日並觀察每日雞胚死亡的情形。對於死亡的雞胚進行病理解剖並收集尿囊腔中的液體做為病毒株樣本，編碼 TW-CB-ND01、TW-CB-ND02、TW-CB-ND03、TW-CB-ND04、TW-CB-ND06。

《含有新城病病毒之感染檢體有產生病毒斑點》

【0055】 首先，用病毒株樣本分別和 Vero 細胞株(綠猴腎細胞，ATCC：CCL81)在 6 孔培養盤中一起培養，於含有 10% 胎牛血清(fetal bovine serum，FBS)的 DMEM 培養基(Dulbecco's modified Eagle medium)(5 毫升/孔)、5%CO₂ 及 37℃ 的培養環境下培養。

【0056】 使上述細胞，長到細胞密度(confluence)達到約 80% 左右，稱作為成單層 Vero 細胞後。將上述單層 Vero 細胞去除原先之培養基，以磷酸緩衝溶液(phosphate-buffered saline；PBS，pH=7.2)清洗一次後，每孔置入 0.5ml 含病毒株樣本的培養液，其進行培養液稀釋，倍數分別為 10¹ 倍、10² 倍、10³ 倍、10⁴ 倍、10⁵ 倍、10⁶ 倍，最後一孔為 0.5ml 細胞培養液對照組。

【0057】 把培養盤放置於 5%CO₂ 及 37℃ 的環境下培養，作用一個小時；在作用期間每 15 分鐘輕搖培養盤，讓含病毒株樣本的培養液可以均勻覆蓋細胞層。

【0058】 再來，移除含病毒株樣本的培養液，每孔加入 4ml 含 1% 洋菜膠(agar)的維持培養液，放置於 5%CO₂ 及 37℃ 的培養環境下培養，培養後經過 48 小時，挑選培養細胞中有因病毒感染而產生明顯 CPE，且於每個孔加入 0.5ml 濃度為 0.1% 的中性紅溶液，在以錫箔紙包住，置於 5%CO₂

及 37℃ 的培養環境下培養，培養至隔夜後，進行觀察病毒斑點產生的狀況。

【0059】 根據本發明之實施例 1~實施例 5 之 NDV 的病毒株樣本在感染細胞後，有無產生 CPE 結果，統計如《表 1》所示。

【0060】 《表 1》

	實施例 1	實施例 2	實施例 3	實施例 4	實施例 5
病毒株樣本	TW-CB-ND01	TW-CB-ND02	TW-CB-ND03	TW-CB-ND04	TW-CB-ND06
感染宿主細胞	Vero	Vero	Vero	Vero	Vero
CPE	N	Y	N	Y	Y

《新城病病毒之鑑定》

1. 平均致死時間 (Mean death time，MDT)

【0061】 在室溫下，從以 PBS 稀釋 10⁶ 倍、10⁷ 倍、10⁸ 倍、10⁹ 倍之含有實施例 1~實施例 5 的病毒株樣本 TW-CB-ND01~ TW-CB-ND06 的稀釋液中，各取 0.1ml，分別接種於各 5 個 9~10 日齡 SPF 雞胚，然後放置於 37℃ 的孵卵器中培養，以每日 2 次之頻率實施照蛋檢查，記錄雞胚死亡時間，總計連續實施 7 日，並求出最小致死劑量(the minimum lethal dose，MDT)。

【0062】 實施例 6~實施例 10 之 NDV 的 MDT 鑑定結果記載於表 3。

【0063】 表 3

	實施例 6	實施例 7	實施例 8	實施例 9	實施例 10
病毒株樣本	TW-CB-ND01	TW-CB-ND02	TW-CB-ND03	TW-CB-ND04	TW-CB-ND06
感染宿主	SPF 雞胚	SPF 雞胚	SPF 雞胚	SPF 雞胚	SPF 雞胚
MDT(hr)	120	40	125	44	48
病毒鑑定	Vw	Vs	Vw	Vs	Vs

【0064】根據表 3 之實施例 6 至實施例 10 之 TW-CB-ND02、TW-CB-ND04、TW-CB-ND06 新城病病毒株的 MDT 試驗結果，可以確認的 MDT 皆在 44 小時至 48 小時之間，因而 TW-CB-ND02、TW-CB-ND04、TW-CB-ND06 之三株病毒株為強毒株，而且可以確認本發明之病毒株的病毒力價明顯優於目前市售疫苗之病毒株，例如，BC 病毒株(MDT:62 小時)、LaSota 病毒株(MDT: 90 小時)等。

【0065】另一方面，實施例 6 之 TW-CB-ND01、實施例 8 之 TW-CB-ND03 之 MDT 都超過 120 小時以上，因而 TW-CB-ND01、TW-CB-ND03 為弱病毒株。

《腦內致病性指數》(Intracerebral pathogenicity index ; ICPI)

【0066】首先，要測量出 1 單位(1HAU)之抗原最高稀釋倍數仍有血球凝集作用者為 HA 之力價；先在 U 型平盤每孔加入 50 μ L HI 緩衝液(3.25 g KH_2PO_4 、10.8 g Na_2HPO_4 、170 g NaCl 、 D_3W 加至 2,000 mL)。

【0067】第一孔加入待測血清病毒抗原 50 μ l，與生理鹽水充分混合後吸取 25 μ l 注入第二孔中，如此進行二倍連續稀釋，最後一孔棄置 25 μ l 混合液。

【0068】最後每孔加 50 μ L 1% 雞紅血球液(cRBC)，並於室溫作用 30 分鐘後判讀；以抗原最高稀釋倍數仍有血球凝集作用者為其 HA 之力價，此即為 1 單位(1HAU)之抗原最高稀釋倍數仍有血球凝集作用者為 HA 之力價。

【0069】抽取病毒株樣本且 HA 力價高於 16 者，以生理鹽水稀釋 10 倍，在於每組 10 隻，1 日齡 SPF 雞腦內接種，每隻 0.05ml，接種後每 24 小時觀察一次，連續觀察 8 日，正常雞記錄值為 0，病雞 1，死亡雞 2，ICPI 即為全部 8 日內每日每隻雞的平均數值。

【0070】實施例 11~實施例 15 之 NDV 的 ICPI 鑑定結果記載於表 4。

【0071】 表 4

	實施例 11	實施例 12	實施例 13	實施例 14	實施例 15
病毒株樣本	TW-CB-ND01	TW-CB-ND02	TW-CB-ND03	TW-CB-ND04	TW-CB-ND06
感染宿主	SPF 雞隻	SPF 雞隻	SPF 雞隻	SPF 雞隻	SPF 雞隻
ICPI	0.1	1.79	0.3	1.75	1.74
病毒鑑定	Vw	Vs	Vw	Vs	Vs

【0072】 根據表 4 之實施例 11～實施例 15 之 TW-CB-ND02、TW-CB-ND04、TW-CB-ND06 新城病病毒株的 ICPI 試驗結果，可以確認 ICPI 的平均數值皆在 1.7 至 1.8 之間，因而 TW-CB-ND02、TW-CB-ND04、TW-CB-ND06 之三株病毒株為強毒株，而且可以確認本發明之病毒株的病毒力價明顯優於目前市售疫苗之病毒株，例如，BC 病毒株(ICPI：0.25)、LaSota 病毒株(ICPI：0.5)等。

【0073】 另一方面，實施例 11 之 TW-CB-ND01、實施例 13 之 TW-CB-ND03 之 ICPI 都在 0.3 以下，因而 TW-CB-ND01、TW-CB-ND03 為弱病毒株。

《新城病病毒之定序》

【0074】 首先，要對本發明的新城病病毒株萃取 RNA，但為避免 RNase 污染實驗器具及消化病毒 RNA 而影響結果，所有使用於接觸 RNA 的溶液均以焦碳酸二乙酯(diethylpyrocarbonate，DEPC)處理過的蒸餾水配製。其他塑膠性材料經高壓滅菌後，也應置於操作 RNA 病毒專用之特定保存處，以避免與操作非 RNA 之材料混用。

【0075】 再來，把上述從尿囊腔中收集到的感染檢體 V1-V5，取 250 μL 尿囊液與 750 μL TriZole(Invitrogen)混合靜置 5 分鐘，加入 200 μL 氯仿(chloroform)混合至乳糜狀，於室溫靜置 10 分鐘後再以 13,000 rpm，4

℃離心 10 分鐘，取上層水液約 500 μL 至新的離心管，加入等量異丙醇 (isopropanol)均勻混合，於 4℃ 以 13,000 rpm 離心 10 分鐘後倒棄上層液，加入 1 mL 70％酒精洗去鹽類，再以 4℃ 13,000 rpm 離心 10 分鐘，倒棄上層液，將沈澱物置 50-60℃烘箱烘乾，以 DEPC 處理過的水 50 μL 懸浮沈澱物，感染樣本(I1～I5)。

【0076】再者，將感染樣本(I1～I5)先和 Vero 細胞株在含有 2%胎牛血清之 DMEM 培養基中一起培養，再利用市售購得的核糖核苷酸(RNA)萃取組合套件(QIAamp viral RNA mini kit, Qiagen Inc., Santa Clara, CA)，將感染樣本(I1～I5)中的 RNA，自感染細胞株中萃取出來為感染病毒之 RNA 樣本(R1～R5)。

【0077】以 RNA 樣本(R1～R5)為模板，利用一般實驗室習知常用的反轉錄-聚合酵素鏈反應(Rreverse Transcription-PCR，簡稱 RT-PCR)技術，將病毒全長基因複製成若干片段後，以進行第一股 cDNA 合成。

【0078】隨後進行聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction；PCR)，利用表 5 中的引子序列 SEQ ID NO：10、SEQ ID NO：11 當作聚合酶連鎖反應之引物，反應條件為先加熱 94℃、5 分鐘，破壞反應混合液中所存在的蛋白酵素，再進行 35 個溫度循環反應。每個反應為 94℃、1 分鐘的變性反應，55℃、1 分鐘的煉合反應，72℃、每 1Kb 使用 1 分鐘的 DNA 合成反應。經 35 個循環反應後，再作用 72℃、10 分鐘，將 PCR 合成產物的兩端補齊，其反應結束後，其可以得到目標基因之 F 蛋白的產物。

【0079】PCR 反應後。取 5 μL 在 1％瓊脂糖(agarose)膠片中電泳，分析 PCR 產物中 DNA 片段大小為《表 6》。

【0080】《表 5》

引子	核苷酸序列(5'-3')	目標核苷酸位置	目標基因
SEQ ID NO：10	ATGGGCTCCA GATCTTCTAC	47-66	F

SEQ ID NO : 11	CTGCCACTGCTAGTTGTGATAATCC	581-557	F
----------------	---------------------------	---------	---

【0081】 《表 6》

	實施例 16	實施例 17	實施例 18	實施例 19	實施例 20
病毒株樣本	TW-CB-ND01	TW-CB-ND02	TW-CB-ND03	TW-CB-ND04	TW-CB-ND06
感染細胞	Vero	Vero	Vero	Vero	Vero
感染樣本	I1	I2	I3	I4	I5
RNA 樣本	R1	R2	R3	R4	R5
DNA 片段 (bp)	X	535	X	535	535

【0082】 接下來，將上面實施例 16～實施例 20 後的產物放置在冰上，取 45 μL PCR 產物於 1%瓊脂糖膠片中進行電泳。完成電泳後的膠體置於含 5 μg/mL EB (ethidium bromide)染色液內，浸泡 5 分鐘，再以二次蒸餾水褪染 10 分鐘。

【0083】 在波長 320 nm 紫外燈下，以手術刀片切下該特定 DNA 片段的膠片。放入已預先秤重的微量離心管，再秤其總重量，求出膠片重量。

【0084】 利用瓊脂糖凝膠回收套組(VIOGENE Gel Extraction System)，自瓊脂糖凝膠體中回收 DNA。首先於裝有膠體的微量離心管中加入 0.5 mL buffer GEX。置於 60℃ 水浴 10 分鐘，每隔 2 分鐘反轉離心管，使 GEX 均勻懸浮於溶液中。將凝膠回收柱子(Gel extraction column)套入收集管，將溶解的膠及 GEX 混合液加入濃縮柱子(column) 13000 rpm 離心 30 秒，去除濾液；加入 0.5 mL 洗滌緩衝液(Washing Buffer) 於 13000 rpm 離心 30 秒，棄除濾過液體；再加入 0.7 mL 洗滌緩衝液(Washing Buffer)，於 13000 rpm 離心 30 秒後棄除過濾液；將濃縮柱子(column) 放入一新的收集管，加入 30 μL 經處理過的二次蒸餾水(DEPC)，靜置 1 分鐘後 13000 rpm 離心 2 分鐘，收集濾過液達到本發明新城病病毒株遺傳物

質的純化，直接進行新城病病毒株的 F₀ 蛋白之切割點氨基酸序列、及全基因核苷酸序列分析(用全自動分析儀)，結果記載表 7 及表 8。

【0085】 表 7

實施例	病毒株樣本	F ₀ 蛋白之切割點氨基酸序列	病毒鑑定
21	TW-CB-ND01	¹¹² GKQGRL ¹¹⁷	V _w
22	TW-CB-ND02	¹¹² RRQKRF ¹¹⁷	V _s
23	TW-CB-ND03	¹¹² ERQERL ¹¹⁷	V _w
24	TW-CB-ND04	¹¹² RRQKRF ¹¹⁷	V _s
25	TW-CB-ND06	¹¹² RRQKRF ¹¹⁷	V _s

【0086】 表 7 係顯示實施例 21～實施例 25 的 NDV 之 F₀ 蛋白之切割點氨基酸序列之分析結果。根據表 7 所記載之的 F₀ 蛋白之切割點氨基酸序列資料，可以確認實施例 22 之 TW-CB-ND02、實施例 24 之 TW-CB-ND04、實施例 26 之 TW-CB-ND06 為強毒株；而且可以確認本發明之病毒株具有強病毒株 F₀ 蛋白之切割點氨基酸序列，明顯不同於目前市售疫苗之病毒株，例如，BC 病毒株(¹¹²GRQGRL¹¹⁷)、LaSota 病毒株(¹¹²GRQGRL¹¹⁷)等。

【0087】 另外，可以確認實施例 21 之 CB-ND01、實施例 23 之 TW-CB-ND03 為弱毒株。

【0088】 因此， TW-CB-ND02、TW-CB-ND04、TW-CB-ND06 之新城病強毒株具有由 Q 隔開的兩對鹼性氨基酸，且容易被宿主的蛋白水解酶(furin)識別和裂解；而 TW-CB-ND01、TW-CB-ND03 之新城病弱毒株不具有由 Q 隔開的兩對鹼性氨基酸，而以非活性前體 F₀ 蛋白的形式傳遞到子代，不易被宿主的蛋白水解酶(furin)識別和裂解，感染活性降低或喪失。

【0089】 綜上，實施例 1～實施例 25 例示的本發明之適用於Ⅶ型新城病疫苗之病毒株及其編碼基因 TW-CB-ND01、TW-CB-ND02、TW-CB-ND03、TW-CB-ND04、TW-CB-ND06 中，其係為 TW-CB-ND02、

TW-CB-ND04、TW-CB-ND06 為強病毒株；TW-CB-ND01、TW-CB-ND03 係為弱病毒株。

【0090】 從而，可以確認本發明之病毒株能比市售疫苗的病毒株，因為 MDT 的感染效果強 50%，且 ICPI 的平均數值高出接近 2 倍效果。本發明之禽類 VII 基因型新城病病毒株能夠明顯地引起雞隻的免疫反應，進而可以開發為具有對抗 VII 基因型新城病感染之疫苗及其相關應用。

【0091】 綜上所述，本發明的內容已經以如上的實施例舉例說明了，然而本發明並非僅限定於此等實施方式而已。本發明所屬技術領域中具有通常知識者，在不脫離本發明的精神和範圍內，當可再進行各種的更動與修飾；例如，將前述實施例中所例示的各技術內容加以組合或變更而成為新的實施方式，此等實施方式也當然視為本發明所屬內容。因此，本案所欲保護的範圍也包括後述的申請專利範圍及其所界定的範圍。

【符號說明】

【0092】

S1	步驟
S2	步驟
S3	步驟
S4	步驟
S5	步驟
S6	步驟
W	檢體
Y	病毒株

【生物材料寄存】

【0093】 TW中華民國、財團法人食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心(Bioresource Collection and Research Center, BCRC)，寄存日為2016年3月24日，其寄存編號為BCRC 970070、BCRC 970071、BCRC 970072。

【序列表】

〈110〉國年實業有限公司

〈120〉適用於Ⅶ型新城病疫苗之病毒株及其編碼基因

〈160〉15

〈210〉SEQ ID NO：1

〈211〉529

〈212〉DNA

〈213〉雞七型新城病病毒

〈400〉1

```
atgggctcca gatcttctac caggatccca gaacctctga tgctgateac tcggattatg 60
ctgatattga gctgtatccg tctgacaagc tcccttcacg gcaggcctct tgcagctgca 120
ggaattgtag taacaggaga taaggcagtc agtgtataca cctcatctca gacagggtca 180
atcatagtca aattgctccc gaatatgccc aaggataagg aggcgtgtgc aaaagcccca 240
ttagaggcat ataacagaac actgactact ttgtcactc ctcttggcga ttccatccgc 300
aagatccaag ggtctgtgtc cacgtctgga ggaaggagac aaaaacgctt tataggtgcc 360
gttattggca gtgtagctct tggggttgca acagcggcac agataacagc agctgcggcc 420
ctaatacagg ccaaccagaa tgccgccaac atcctccggc ttaaggagag cattgtctga 480
accaatgaag ctgtgcatga agtcaccgac ggattatcac aactagcag 529
```

〈210〉SEQ ID NO：2

〈211〉389

〈212〉DNA

〈213〉雞七型新城病病毒

〈400〉2

```
atgggctcca gatcttctac caggatccca gaacctctga tgctgateac tcggattatg 60
ctgatattga gctgtatccg tctgacaagc tcccttgacg gcaggcctct tgcagctgca 120
gggattgtag taacaggaga taaggcagtc aatatataca cctcatctca gacagggtca 180
atcatagtca aattgctccc gaatatgccc aaggataagg aggcgtgtgc aaaagcccca 240
ttagaggcat ataacagaac actgactact ttgtcactc ctcttggcga ttccatccgc 300
aagatccaag ggtctgtgtc cacgtctgga ggaaggagac aaaaacgctt tataggtgcc 360
gttattggca gtgtagctct tggggttgc 389
```

〈 210 〉 SEQ ID NO : 3

〈 211 〉 374

〈 212 〉 DNA

〈 213 〉 雞七型新城病病毒

〈 400 〉 3

atgggctcca gatcttctac caggatccca gcacctctga tgctgacac tcggattatg 60
ctgatattta gctgcatccg tctgacaagc tcccttgacg gcaggcctct tgcagctgca 120
ggaattgtag taacaggaga taaggcagtc aatgtataca cctcatctca gacaggggtca 180
atcatagtca aattgctccc gaatatgccc aaggataagg aggcgtgtgc aaaagcccca 240
ttagaggcat ataacagaac actgactgct ttgctcactc ctcttggcga ttccatccgc 300
aagatccaag ggtctgtgtc cacgtctgga ggaaggagac aaaaacgctt tataggtgcc 360
gttattggca gtgt 374

〈 210 〉 SEQ ID NO : 4

〈 211 〉 426

〈 212 〉 DNA

〈 213 〉 雞七型新城病病毒

〈 400 〉 4

tgcagtgtga gtgcaactcc tttaggttgt gatatgctgt gctctaaggt cacagagatt 60
gaggaggagg attacaagtc agttaccccc acatcgatgg tgcacgggag gctagggttt 120
gacgggtcaat accatgagaa ggacttagat accacagtct tatttaagga ttgggtggca 180
aattaccag gagtggggggg aggggtcttt atcgatgacc gtgtacggtt cccagtttac 240
ggagggtca aaccaattc acccagtac gctgcacagg aagggaaata tgtaatatac 300
aagcgccata acaacacatg ccccgataga caagattacc aaattcgat ggctaagtct 360
tcataaaac ccaggcgatt tgggtggaag cgcgtacagc aagccatctt atctatcaaa 420
gtgtca 426

〈 210 〉 SEQ ID NO : 5

〈 211 〉 1716

〈 212 〉 DNA

〈213〉雞七型新城病病毒

〈400〉5

atggaccgcg cggttaacag agtcgtgcta gagaatgagg aaagagaagc aaagaacaca 60
tggcgcctgg ttttcggat cgcagtctta cttttaatgg taatgactct agctatctct 120
tcagctgccc tggcatacag cacggggggc agtacgcccc acgacctcgc aggcatatcg 180
actgtgatct ccaagacaga agataagggt acgtctttac tcagttcaag tcaagacgtg 240
atggatagga tatataagca ggtggctctt gaatccccgc tagcgctact aaacactgaa 300
tctataatta tgaatgcaat aacctctctt tcttatcaaa tcaacggggc tgcgaacagc 360
agcgggtgtg gggcgccctgt tcatgacca gactacatcg gggggatagg caaagaactc 420
atagtggacg acattagtga tgteacatca ttttatectt ctgcgtatca agaacacttg 480
aatttcatec cggcacctac tacaggatct ggttgcactc ggataccctc atttgacatg 540
agcaccactc actactgtta tactcacaat gtgatattat ctggttgcag agatcactca 600
cactcacatc aatacttagc acttggtgtg ctteggacat ctgcaacagg gagggtattc 660
ttttctactc tgcgtccat caatttagat gacacccaaa atcggaagtc ctgcagtgtg 720
agtgaacccc ctttaggttg tgatatgctg tgctetaagg tcacagagat tgaggaggag 780
gattacaagt cagttacccc cacatcgatg gtgcacggga ggctaggggt tgacggtcaa 840
taccatgaga aggacttaga taccacagtc ttatttaagg attgggtggc aaattacca 900
ggagtgggag gagggtcttt tatcgatgac cgtgtatggt tcccagttta cggagggtc 960
aaacccaatt caccagtgga cgctgcacag gaagggaat atgtaata caagegccat 1020
aacaacacat gccccgatgg acaagattac caaatcgga tggctaagtc tcatataaa 1080
cccaggcgat ttggtggaaa gcgcgtacag caageccatct tatccatcaa agtgtcaaca 1140
tccttgggta aggaccgggt gctgactatt ccgcctaata caattacact catgggagcc 1200
gaaggcagaa ttctcacagt ggggacatct cacttcttat atcaacgagg gtcttcatat 1260
ttctccctg ccttattata tccatgaca gtaaataaca aaacagctac actccatagt 1320
ccttatacgt ttaatgctt tactcggcca ggtagtatcc ctggccagge atcagcaaga 1380
tgccccaact catgcatcac tggggctctat acggatccat atcccttaat ctccatagg 1440
aatcataccc tacgaggggt cttegggacg atgcttgatg atgaacaagc aagacttaac 1500
cccgtatctg cagtattcga cgacatatcc cgcagtcgtg taacccgggt gaggttcaagc 1560
agcaccaagg cagcatacac gacatcgaca tgttttaaag ttgtcaagac caataaagtt 1620
tattgtctta gtattgcaga aatatccaat accctattcg gggaatttag gattgttccc 1680
ttactagt agatcctcaa ggatgatagg gtttaa 1716

〈210〉SEQ ID NO : 6

〈211〉1716

〈212〉DNA

〈213〉雞七型新城病病毒

〈400〉6

atggaccgcg cggttaacag agtcgtgcta gagaatgagg aaagagaagc aaagaacaca 60

第3頁，共8頁(序列表)

tggcgcctag tttccggat cgcagtttta cttttaatgg taatgactct agctatctct 120
tcagctgccc tggcatacag cacggggggc agtacgcccc acgacctgc aggcatatcg 180
actgtgatct ccaagacaga agataaggtt acgtctttac tcagttcaag tcaagacgtg 240
atggatagga tatataagca ggtggctctt gaateccccg tagcgctact aaacactgaa 300
tctataatta tgaatgcaat aacctctctt cttatcaaa tcaacggggc tgcgaacagc 360
agcgggtgtg gggcgctgt tcatgacca gactacatcg gggggatagg caaagaacte 420
atagtagacg acattagtga tgteacatca ttttatctt ctgcgtatca agaacacttg 480
aatttcatec cggcacctac cacaggatct ggttgcactc ggataccctc atttgacatg 540
agcaccacte actactgtta tactcacaat gtgatattat ctggttgcaa agatcactta 600
cactcacatc aatacttagc acttggtgtg ctteggacat ctgcaacagg gagggtatct 660
tttttacte tgcgtccat caatttagat gacacccaaa atcggaagtc ctgcagtgtg 720
agtgcacccc ctttaggttg tgatatgctg tgctctaagg tcacagagat tgaggaggag 780
gattacaagt cagttacccc cacatcgatg gtgcacggga ggctaggggt tgacggtcaa 840
taccatgaga aggacttaga taccacagtc ttatttaagg attgggtggc aaattacca 900
ggagtgggag gagggctttt tatcgatgac cgtgtatggt tcccagttta cggagggtc 960
aaacccaatt caccagtgga cgctgcacag gaagggaat atgtaata caagcgccat 1020
aacaacacat gccccgatgg acaagattac caaactcgga tggctaagtc tcatataaa 1080
cccaggcgat ttggtggaaa gcgcgtacag caagccatct tatccatcaa agtgtcaaca 1140
tccttgggta aggaccgggt gctgactatt ccgcctaata caattacact catgggagcc 1200
gaaggcagaa ttctcacagt ggggacatct cacttcttat atcaacgagg gtcttcatat 1260
tttcccttg cttattata tccatgaca gtaaataaca aaacagctac actccatagt 1320
cttatacgt ttaatgctt tactcggcca ggtagtatcc cttgccaggc atcagcaaga 1380
tgecccaact catgcatcac tggggtctat acggatccat atcccttaat ctccatagg 1440
aatcataccc tacgaggggt cttegggacg atgcttgatg atgaacaagc aagacttaac 1500
cccgtatctg cagtattega cgacatatcc cgcagtcgtg taaccegggt gaggttcaagc 1560
agcaccaagg cagcatacac gacatcgaca tgttttaaag ttgtcaagac caataaagtt 1620
tattgtctta gtattgcaga aatatccaat accctattcg gggaatttag gattgttccc 1680
ttactagt agatcctcaa ggacgatagg gtttaa 1716

〈210〉 SEQ ID NO : 7

〈211〉 1188

〈212〉 DNA

〈213〉 雞七型新城病病毒

〈400〉 7

atggccacct ttacagatgc ggagatagat gacatatttg agaccagtgg gactgtcatt 60
gacagcgtaa ttacggccca gggcaaatca gctgagaccg tcggaagaag cgcaatcccc 120
caaggaaaga ctaaagctct gatcgatca tgggagaaac acggggggcgt caagcctcac 180
gccagccagg acgctcctga ccaacaagac agaacagaga aacagccatc catacctgag 240
caggcgaatt tacacgacaa cccgccgatc acatccaccg aaccgcctcc caccagggcc 300

gcaagcgaga ccagcgacac acagctcaag accggagcaa gcaactccct tctgtccatg 360
 ctcgacaaac tgagcaataa atcgtccaat gctaaaaagg gcccatggtc ggggtccccag 420
 gaagggcatt accaacctcc ggcccaacaa cacgggaacc agccgagcct tggaagcaac 480
 caggggaaac cgcagcacca ggccaaggcc gtccctggaa gccggggcac agacgagaac 540
 acagcatatc atggacaatg gaaggagtca caaccatcag ctggtgcaac cctcatgtg 600
 ctccagtcag ggcagagccg agacaatact cctgtacctg tggatcgtgt ccaactacct 660
 gccgactttg tgcaagcgat gatgtctatg atggaggcat taccacagaa ggtaagtaaa 720
 gttgatcatt agctatacct agtcttaaaa cagacatcct ccattcctat gatgcgatct 780
 gagatccaac agctcaaaac atctgttgcg atcatggaag ccaacttagg catgatgaaa 840
 attgtggacc ctggttgtgc taacgtttca tcttaagtgt atctccgggc ggtagcccg 900
 tcccacccag tctagtttc agtccccgga gacctatctc cttacgtgac acaaggggggt 960
 gaaatgacgc tcaataaact ctcacaaccg gtacagcacc cctctgaatt aattaagtgt 1020
 gccactgcaa gcgggcctga tatgggagtg gagaaggaca ctgtccgcgc attaatcacc 1080
 tcgcgtccga tgcaccaag tctctgggt aggtcctga gcaagctaga tgcagccaag 1140
 tcaattgaag agatcaggaa gatcaaacgc ctgtctataa atgggtaa 1188

〈210〉 SEQ ID NO : 8

〈211〉 1188

〈212〉 DNA

〈213〉 雞七型新城病病毒

〈400〉 8

atggccacct ttacagatgc ggagatagat gacatatttg agaccagtgg gactgtcatt 60
 gacagcataa ttacggccca gggcaaatca gctgagaccg tcggaagaag cgcaatcccc 120
 caaggcaaga ctaaagctct gagegcagca tgggagaagc acgggggcgt ccaacctcac 180
 gccagccagg acgtcctga ccaacaagac agaacagaga aacagccatt catacctgag 240
 caggcgactt tacacaacaa cccgccgac acatccaccg aaccgctcc caccaggcc 300
 gcaagcgaga ccagcgacac acagctcaag accggagcaa gcaactccct tctgtccatg 360
 ctcgacaaac tgagcaataa atcgtccaat gctaaaaagg gcccatggtc ggggtccccag 420
 gaagggcatt accaacctcc ggcccaacaa cacgggaacc agccgagcca tggaagcaac 480
 caggggaaac cgcagcacca ggccaaggcc gtccctggaa gccggggcac agacgagaac 540
 acagcatatc atggacaatg gaaggagtca caaccatcag ctggtgcaac cctcatgtg 600
 ctccagtcag ggcagagcca agacaatact cctgtacctg tggatcgtgt ccaactacct 660
 gccgactttg tgcaagcgat gatgtctatg atggaggcat taccacagaa ggtaagtaaa 720
 gttgatcatt ggctagacct agtcttaaaa cagacatcct ccattcctat gatgcgatct 780
 gagatccaac agctcaaaac atctgttgcg atcatggaag ccaacttagg catgatgaaa 840
 attctggacc ctggttgtgc taacgtttca tcttaagtgt atctccgggc agtagcccg 900
 tcccacccag tctagtttc aggtccccgga gacctatctc cttacgtgac acaaggggggt 960
 gaaatgacgc tcaataaact ctcacaaccg gtacagcacc cctctgaatt aattaagtct 1020
 gccactgcaa gcgggcctga tatgggagtg gagaaggaca ctgtccgcgc attaatcacc 1080

tcgcgtccga tgcacccaag ctctctggct aggctcctga gcaagctaga tgcagccaag 1140
tcaattgaag agatcaggaa gatcaaacgc ctgtctctaa atggggtaa 1188

〈210〉 SEQ ID NO : 9

〈211〉 1188

〈212〉 DNA

〈213〉 雞七型新城病病毒

〈400〉 9

atggccacct ttacagatgc ggagatagat gacatatttg agaccagtgg gaccgtcatt 60
gacagcataa ttacggccca gggcaaatca gctgagaccg tcggaagaag cgcaatcccc 120
caaggcaagg ctaaagctct gagegcagca tgggagaagc acggggggt ccaacctcat 180
gccagccagg acgtctctga ccaacaagac agaacagaga aacagccatc catactgag 240
caggcgactt tacacaacaa cccgccgac acgtccaccg aaccgcccc caccaggcc 300
gcaagcgaga ccagcgacac acagctcaag accggagcaa gcaactccct tctgtccatg 360
ctcgacaaac tgagcaataa atcgtccaat gctaaaaagg gcccatggtc ggggtccccag 420
gaagggcac accaacctec ggcccaacaa cacgggaacc agccgagcca tggaagcaac 480
caggggaaac agcagcacca ggccaaggct gtccttgaa gccggggcac agacgagaac 540
acagcatatc atggacaatg gaaggagtca caaccatcag ctggtgcaac cctcatgtg 600
ctccagtcag ggcagagcca agacaatact cctgcacctg cggatcgtgt ccaactacct 660
gccgactttg tgcaagegat gatgtcaatg atggaggeat taccacagaa ggtaagtaaa 720
gttgatcacc agctagacct agtcttaaaa cagacatcct ccattcctat gatgcgatct 780
gagatccaac agctcaaaac atctgttgcg atcatggaag ccaacttagg catgatgaaa 840
attctggacc ccggttgtgc taacgtttca tcttaagtgt atctccgggc agtagccccg 900
tcccacccag tctagtttc aggccccgga gacctatct cttacgtgac acaaggggggt 960
gaaatgacac tcaataaaact ctcaaacccg gtacagcacc cctctgaatt aattaagtct 1020
gccactgcaa gcgggcctga tatgggagtg gagaaggaca ctgtccgcgc attaatcacc 1080
tcgcgccccga tgcacccaag ctctctggct aggctcctga gcaagctaga tgcagctaag 1140
tcaattgaag agatcaggaa gatcaaacgc ctgtctctaa atggggtaa 1188

〈210〉 SEQ ID NO : 10

〈211〉 20

〈212〉 DNA

〈213〉 人工序列

〈400〉 10

atgggctcca gatcttctac 20

〈 210 〉 SEQ ID NO : 11

〈 211 〉 25

〈 212 〉 DNA

〈 213 〉 人工序列

〈 400 〉 11

ctgccactgc tagttgtgat aatcc 25

〈 210 〉 SEQ ID NO : 12

〈 211 〉 6

〈 212 〉 PRT

〈 213 〉 雞七型新城病病毒之F₀蛋白

〈 400 〉 12

ArgArgGlnLysArgPhe

1 5

〈 210 〉 SEQ ID NO : 13

〈 211 〉 6

〈 212 〉 PRT

〈 213 〉 雞七型新城病病毒之F₀蛋白

〈 400 〉 13

Arg Arg Gln Arg Arg Phe

1 5

〈 210 〉 SEQ ID NO : 14

〈 211 〉 6

〈 212 〉 PRT

〈 213 〉 雞七型新城病病毒之F₀蛋白

〈 400 〉 14

Lys Arg Gln Lys Arg Phe

1 5

〈 210 〉 SEQ ID NO : 15

〈 211 〉 6

〈 212 〉 PRT

〈 213 〉 雞七型新城病病毒之F₀蛋白

〈 400 〉 15

Lys Arg Gln Arg Arg Phe

1 5

【發明申請專利範圍】

【第1項】一種適用於Ⅶ型新城病疫苗之病毒株，其係該病毒株之生物寄存號碼為BCRC 970070、名稱為禽類七型新城病病毒（Genotype VII Newcastle disease virus）VII NDV/TW-CB-ND02的病毒株；該病毒株之生物寄存號碼為BCRC 970071、名稱為禽類七型新城病病毒（Genotype VII Newcastle disease virus）VII NDV/TW-CB-ND04的病毒株；或該病毒株之生物寄存號碼為BCRC 970072、名稱為禽類七型新城病病毒（Genotype VII Newcastle disease virus）VII NDV/TW-CB-ND06的病毒株，這三株病毒株於2016年3月24日生物寄存於位於中華民國、財團法人食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心(Bioresource Collection and Research Center, BCRC)；以及

該病毒株係以雞胚胎製程、及細胞培養製程中之任一種培養而得。

【第2項】如請求項1所記載之適用於Ⅶ型新城病疫苗之病毒株，其中該病毒株係具有F₀基因之核苷酸序列為SEQ ID NO：1～SEQ ID NO：3中之任一種。

【第3項】如請求項1所記載之適用於Ⅶ型新城病疫苗之病毒株，其中該病毒株係具有HN基因之核苷酸序列SEQ ID NO：4～SEQ ID NO：6中之任一種。

【第4項】如請求項1所記載之適用於Ⅶ型新城病疫苗之病毒株，其中該病毒株係具有P基因之核苷酸序列SEQ ID NO：7～SEQ ID NO：9中之任一種。

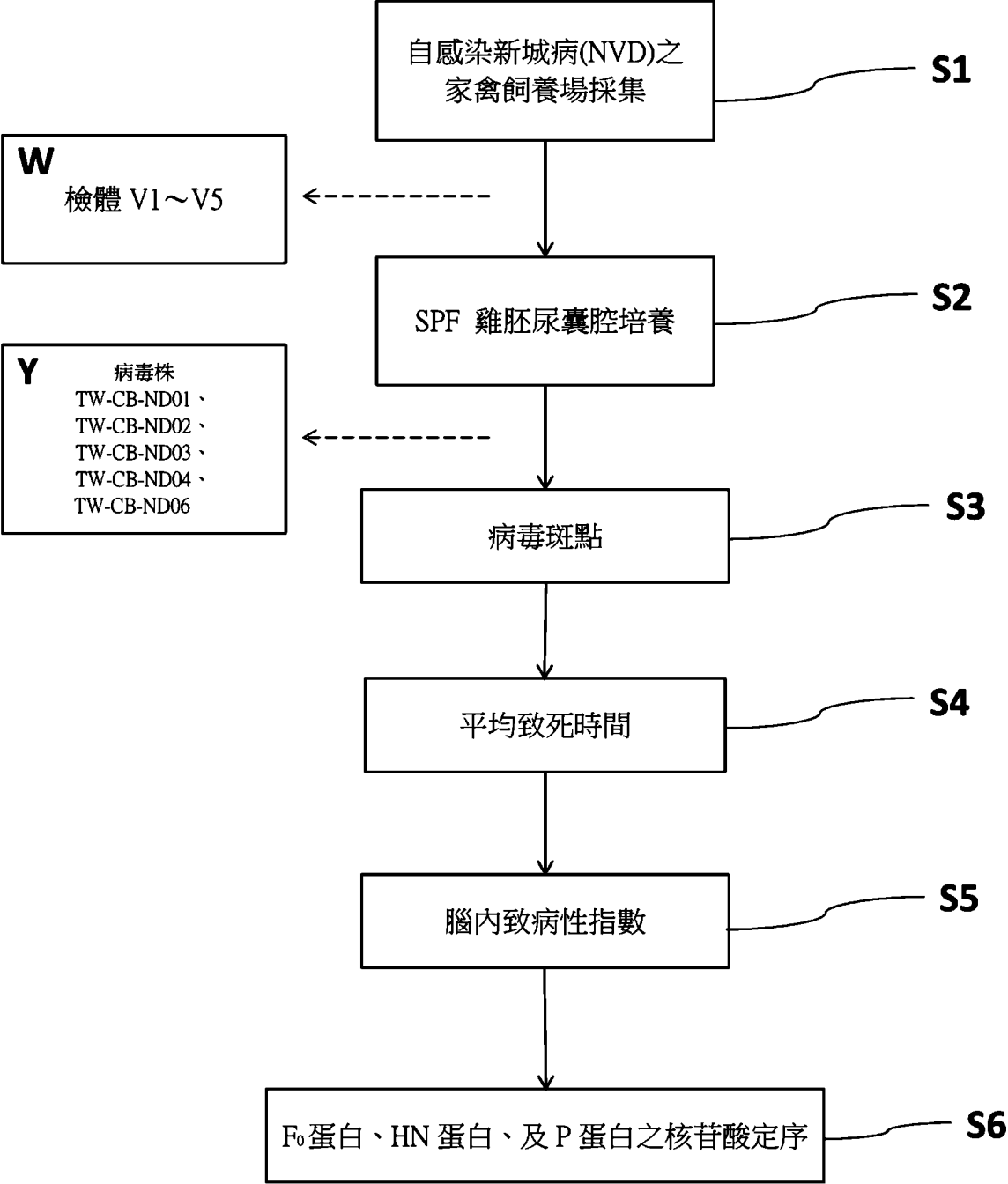
【第5項】如請求項1所記載之適用於Ⅶ型新城病疫苗之病毒株，其中該病毒株係具有F₀蛋白之切割點氨基酸序列，即第112～117位胺基酸為SEQ ID NO：12、SEQ ID NO：13、SEQ ID NO：14中之任一種。

【第6項】 如請求項1所記載之適用於Ⅶ型新城病疫苗之病毒株，其中該病毒株感染SPF雞胚之平均致死時間在20～50小時；經過弱化後，該病毒株之平均致死時間超過60小時。

【第7項】 如請求項1所記載之適用於Ⅶ型新城病疫苗之病毒株，其中該病毒株感染SPF雞隻之腦內致病性指數之平均數值在1.7～2；經過弱化後，該病毒株之腦內致病性指數之平均數值在0.4以下。

【第8項】 請求項2至4中任一項所記載之適用於Ⅶ型新城病疫苗之病毒株，其中該病毒株之核苷酸序列中一或多個核苷酸可進一步被其他的核苷酸所置換。

【發明圖式】



【圖 1】