



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0101572  
(43) 공개일자 2012년09월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*A61K 39/17* (2006.01) *C12N 15/45* (2006.01)  
*C12N 15/82* (2006.01) *C12N 1/13* (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2012-7020029  
(22) 출원일자(국제) 2010년12월28일  
심사청구일자 없음  
(85) 번역문제출일자 2012년07월27일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2010/062209  
(87) 국제공개번호 WO 2011/090708  
국제공개일자 2011년07월28일  
(30) 우선권주장  
61/290,297 2009년12월28일 미국(US)

(71) 출원인  
메리얼 리미티드  
미국 30096 조지아주 덜루스 세틸라이트 블러바드  
3239 벌딩 500  
(72) 발명자  
퀴 쉬안  
미국 30024 조지아주 스와니 레이놀드스톤 웨이  
233  
트루프 캐롤린 마리  
미국 30605 조지아주 애선스 제미건 드라이브 166  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
특허법인코리아나

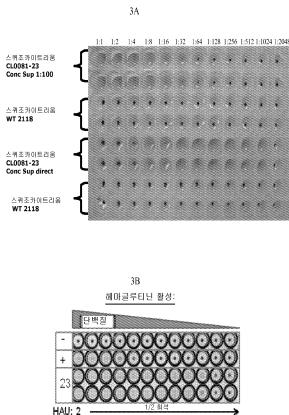
전체 청구항 수 : 총 23 항

(54) 발명의 명칭 재조합 NDV 항원 및 이의 용도

### (57) 요 약

본 발명은 NDV 백신을 포함한다. 백신은 NDV 의 HN 에 근거한 서브유닛 백신일 수 있다. NDV HN 는 미 세조류를 비롯한 식물 또는 조류에서 발현될 수 있다. 본 발명은 또한 NDV 에 대항하여 동물을 보호하는데 사용될 수 있는 NDV 항원, 에피토프 또는 면역원을 코딩 및 발현하는 재조합 백터에 관한 것이다. 또한 본 발명은 바이러스 백터 또는 비활성화된 백신 및 서브유닛 백신을 사용하는 프라임-부스트 계획을 비롯한, DIVA 전략과 상용성인 백신화 섭생을 포함한다.

### 대 표 도 - 도3



(72) 발명자

페일메이어 브래들리 제이

미국 30677 캘리포니아주 왓킨스빌 원디 크릭 드라  
이브 1170

프리차드 조이스 앤ита

미국 60504 조지아주 게인스빌 프린스턴 코트 3804

크루즈코이 홀리오 세르지오

미국 30501 조지아주 게인스빌 힐사이드 드라이브  
749

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

NDV (Newcastle Disease Virus: 뉴캐슬 질환 바이러스) HN (Hemagglutinin-Neuraminidase: 해마글루티닌-뉴라미니다아제) 폴리펩티드 또는 항원 및 약학적 또는 수의학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 비히클 또는 아쥬반트를 포함하는 조성물.

### 청구항 2

제 1 항에 있어서, NDV HN 폴리펩티드 또는 항원이 NDV HN 선형 에피토프 영역을 포함하는 면역원성 절편을 포함하는 조성물.

### 청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, NDV HN 폴리펩티드 또는 항원이 미세조류 또는 식물에서 발현되는 조성물.

### 청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, NDV HN 폴리펩티드 또는 항원이 부분적으로 정제된 조성물.

### 청구항 5

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, NDV HN 폴리펩티드 또는 항원이 실질적으로 정제된 조성물.

### 청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서, NDV HN 폴리펩티드 또는 항원이 SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 15, 17, 19, 또는 20에 언급된 서열과 80% 이상의 서열 일치성을 갖는 조성물.

### 청구항 7

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, NDV 폴리펩티드 또는 항원이 SEQ ID NO: 1, 2, 4, 6, 8, 14, 16, 18, 22, 또는 23에 언급된 서열과 70% 이상의 서열 일치성을 갖는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 조성물.

### 청구항 8

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서, 약학적 또는 수의학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 비히클, 또는 아쥬반트가 유-중-수 에멀젼 또는 수-중-유 에멀젼인 조성물.

### 청구항 9

제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 따른 조성물의 1 이상의 투여를 포함하는 NDV에 걸리기 쉬운 동물의 백신화 방법.

### 청구항 10

제 9 항에 있어서, 프라임-부스트 투여 섭생을 포함하는 방법.

### 청구항 11

제 10 항에 있어서, 프라임-부스트 섭생이 NDV 감염으로부터 대상을 보호하기 위해 및/또는 감염된 대상에서 질환 전개를 방지하기 위해, 제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 따른 조성물의 프라임-투여, 및 생체 내에서 NDV HN 폴리펩티드, 이의 변이체 또는 절편을 발현하기 위한 폴리뉴클레오티드를 함유하는 재조합 바이러스 백터를 약학적 또는 수의학적으로 허용가능한 비히클 또는 부형제 내에 포함하는 조성물의 부스트 투여를 포함하는 방법.

### 청구항 12

제 10 항에 있어서, 프라임-부스트 섭생이 NDV 감염으로부터 대상을 보호하기 위해 및/또는 감염된 대상에서 질환 전개를 방지하기 위해, 생체 내에서 NDV HN 폴리펩티드, 이의 변이체 또는 절편을 발현하기 위한 폴리뉴클레오티드를 함유하는 재조합 바이러스 벡터를 약학적 또는 수의학적으로 허용가능한 비히클, 희석제 또는 부형제 내에 포함하는 조성물의 프라임-투여, 및 제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 따른 조성물의 부스트 투여를 포함하는 방법.

### 청구항 13

제 10 항에 있어서, 프라임-부스트 섭생이 제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 따른 조성물의 프라임-투여, 및 NDV 항원을 포함하는 비활성화된 바이러스 조성물 또는 백신의 부스트 투여를 포함하는 방법.

### 청구항 14

제 10 항에 있어서, 프라임-부스트 섭생이 NDV로부터 대상을 보호하기 위해 및/또는 감염된 대상에서 질환 전개를 방지하기 위해, NDV 항원을 포함하는 비활성화된 바이러스 조성물 또는 백신의 프라임-투여 및 제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 따른 조성물의 부스트 투여를 포함하는 방법.

### 청구항 15

제 9 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항에 있어서, 동물이 조류 (鳥), 말류, 개류, 고양이류 또는 돼지류인 방법.

### 청구항 16

폴리펩티드가 SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 15, 17, 19, 또는 20 에 언급된 서열을 갖는 폴리펩티드와 80% 이상의 서열 일치성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 미세조류 또는 좀개구리밥 식물에서 발현되는 실질적으로 정제된 NDV 폴리펩티드 또는 항원.

### 청구항 17

NDV HN 폴리펩티드 또는 이의 절편 또는 변이체를 발현하는 유전자로 안정하게 형질전환된 미세조류 배양물 또는 좀개구리밥 식물.

### 청구항 18

제 17 항에 있어서, NDV HN 폴리펩티드 또는 이의 절편 또는 변이체가 SEQ ID NO:3, 5, 7, 9, 15, 17, 19, 또는 20 에 언급된 서열과 80% 이상의 서열 일치성을 갖는 미세조류 배양물 또는 좀개구리밥 식물.

### 청구항 19

하기 단계를 포함하는 NDV HN 폴리펩티드의 제조 방법: (a) 미세조류 배양물 또는 좀개구리밥 식물을 미세조류 또는 좀개구리밥 배양 배지 내에서 배양하는 단계, 미세조류 배양물 또는 좀개구리밥 식물은 NDV HN 폴리펩티드를 발현하도록 안정적으로 형질전환되고, NDV HN 폴리펩티드는 NDV HN 폴리펩티드에 대한 코딩 서열 및 상기 배양 배지 내로 폴리펩티드의 분비를 지시하는 신호 웨პ티드에 대한 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열로부터 발현됨; 및 (b) 배양 배지로부터 NDV HN 폴리펩티드를 수집하는 단계.

### 청구항 20

제 19 항에 있어서, 신호 웨პ티드가 SEQ ID NO:13, 또는 21 에 언급된 서열을 갖는 방법.

### 청구항 21

SEQ ID NO:13, 또는 21 에 언급된 서열을 갖는 신호 웨პ티드를 코딩하는 DNA 분절을 포함하는 플라스미드.

### 청구항 22

제 21 항에 있어서, DNA 분절이 NDV HN 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연결된 플라스미드.

### 청구항 23

제 21 항 또는 제 22 항에 있어서, 식물 또는 조류 형질전환을 위한 것인 플라스미드.

## 명세서

### 기술 분야

#### [0001] 관련 출원에 대한 교차-참조

본 출원은 2009년 12월 28일에 출원된 미국 가출원 일련 번호 61/290,297의 우선권을 주장한다.

#### [0003] 기술 분야

본 발명은 NDV 항원을 포함하는 약학 조성물, 특히 NDV HN 항원을 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다.

## 배경 기술

[0005] 바이러스 파라믹소비리다에 (*Paramyxoviridae*) 족은 공중 위생뿐 아니라 세계적인 경제에 유의한 영향을 미치는 인간(홍역, 볼거리, paraNDV 및 호흡기 세포융합 바이러스)과 동물 병원체(뉴캐슬 질환 바이러스 및 우역 바이러스)를 포함한다 (Lamb et al., 2007, *Paramyxoviridae: The viruses and Their Replication*, p. 1449-1496). 상기 바이러스 족의 구성원은 1부분으로 나뉜 (monopartite) 네거티브 센스, 단일-가닥의 RNA 게놈을 갖는 것으로 정의된다. 파라믹소비리다에 족은 두 아족, 즉 파라믹소비리나에 (*Paramyxovirinae*) 및 뉴모비리나에 (*Pneumovirinae*)로 이루어진다. 최신 재분류에 의하면, 아족 파라믹소비리나에는 5 가지 속, 즉 모르빌리바이러스 (*Morbillivirus*), 헤니파바이러스 (*Henipavirus*), 루불라바이러스 (*Rubulavirus*), 레스피로바이러스 (*Respirovirus*) 및 아불라바이러스 (*Avulavirus*)가 포함되며, 뉴모비리나에는 뉴모바이러스 (*Pneumovirus*) 및 메타뉴모바이러스 (*Metapneumovirus*)가 포함된다 (Mayo, 2002, *Arch Virol* 147:1655-63). 조류(새) 파라믹소바이러스 (APMV)는 속 아불라바이러스 (*Avulavirus*)로 분류되며 적혈구응집반응 억제 (HI) 테스트를 이용하여 정의된 바 있는 9 가지의 항원과 관련해 구별되는 혈청형을 포함한다 (Alexander, 1988, *Newcastle disease*, p. x, 378 p.). 9 가지의 혈청형 중에서, APMV-1 서브타입에 속하는 단리물은 시중의 가금류에 치명적인 질환을 야기할 수 있고 위장염형 뉴캐슬 질병 바이러스 (NDV)로서 분류된다. 더욱 경미한 형태의 NDV는 메소제닉 및 렌토제닉 단리물로서 지칭되는데, 렌토제닉 형태는 국내 가금류에서 증상이 거의 없다. NDV의 게놈 RNA는 하기 6 개의 단백질을 코딩하는 유전자를 함유한다: HN(헤마글루터닌-뉴라미니다아제), NP(뉴클레오캡시드 단백질), P(인단백질), M(매트릭스 단백질), F(융합 단백질), 및 L(RNA-의존성 RNA 폴리머라아제).

[0006] 바이러스 백터 백신은 백신 개발에서 가장 빠르게 성장하고 있는 부문 중 하나를 대표한다. 주요 글로벌한 감염병, HIV, 결핵 및 말라리아에 대한 임상 개발에서의 많은 백신은 바이러스 백터이다. 현재 사용되고 있는 바이러스 백터의 단점은, 과거 감염으로 인해 획득된 항체 또는 모체에서 유래된 이의 존재이다.

[0007] 최근, 식물 및 조류 (algae)는 백신, 항체, 및 생물약제학과 같은 치료제의 제조를 위한 공급원으로서 연구되었다. 상기 식물 및 조류 발현 시스템은 여러 가지 장점을 제공한다. 예를 들어, 식물 또는 조류 발현 생물 유래의 백신은 동물 병원체로의 오염 위험을 감소시킬 수 있고, 열-안정한 환경을 제공하고, 식용가능한 제제로서 투여되는 경우 주사-관련 위험을 피할 수 있다 (Thanavala et al., *Expert Rev. Vaccines* 2006, 5, 249-260). 또한, 식물 또는 조류는 대규모로 성장될 수 있고, 현존하는 배양, 수확 및 저장 설비를 이용할 수 있다. 게다가, 식물 (Giddings et al., *Nature Biotech.* 2000, 18, 1151-1155) 또는 조류로부터 치료제를 가공 및 제조하는 비용이 적다. NDV의 F 및 HN 단백질은 NDV에 대항하는 식용가능한 백신을 개발하고자 갑자 식물에서 발현되었다 (Berinstein A., et al., 2005, *Vaccine* 23: 5583-6689). WO2004/098533에는 담배 식물에서의 NDV HN 항원 및 조류 인플루엔자 바이러스 (Avian Influenza Virus) HA 항원의 발현이 기재되어 있다. 미국 특히 출원 공개 제 US2010/0189731 호에는 좀개구리밥 식물에서의 조류 인플루엔자 바이러스 HA 항원의 발현이 기재되어 있다.

[0008] 식물 또는 조류로부터의 백신, 항체, 단백질, 및 생물약제학의 개발은 치료 과정과는 멀고, 이러한 백신 제조와 통상 관련되어 있는 수 많은 장애물이 있다. 식물 백신을 성공적으로 제조하는 것에 대한 제한에는 생물생성물 또는 발현된 항원의 낮은 수율 (Chargelegue et al., *Trends in Plant Science* 2001, 6, 495-496), 단백질 불안정성, 생물생성물 품질의 비일관성 (Schillberg et al., *Vaccine* 2005, 23, 1764-1769), 및 예상된 크기 및 면역원성의 바이러스-유사 생물생성을 제조하기 위한 불충분한 역량 (Arntzen et al., *Vaccine* 2005, 23, 1753-1756)이 포함된다. 상기 문제들을 해결하기 위해, 코돈 최적화, 식물 또는 조류 생물생성물의 수확 및 정제에

대한 조심스러운 접근, 물질의 섭취를 증가시키기 위한 엽록체와 같은 식물 일부의 사용, 및 개선된 세포이하의 표적화가 모두 잠재적인 전략으로서 간주되는 것이다 (Koprowski, Vaccine 2005, 23, 1757-1763).

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0009]

공중 보건 및 경제에 대한 동물 병원체, 예컨대 NDV의 잠재적인 영향을 고려하면, 감염 예방 및 동물 보호 방법이 필요하다. 게다가, 병원체에 대항하는 효과적인 백신 및 백신의 적합한 제조 방법에 대한 요구가 있다.

### 과제의 해결 수단

[0010]

NDV (Newcastle Disease Virus: 뉴캐슬 질환 바이러스) 항원 및 이의 분절 및 변이체를 포함하는 조성물이 제공된다. NDV 항원 및 이의 분절 및 변이체는 면역원성 및 보호적 특성을 소유한다. 바람직하게는, NDV 항원은 NDV HN (hemagglutinin-neuraminidase: 헤마글루티닌-뉴라미니다아제) 항원 또는 이의 분절 또는 변이체를 포함한다. NDV 항원은 식물 또는 조류에서 생성될 수 있다.

[0011]

NDV 항원 및 이의 분절 및 변이체는 백신 및/또는 약학 조성물로 제형화될 수 있다. 이러한 백신 또는 조성물은 동물을 백신화하는데 사용될 수 있고, NDV의 하나 이상의 형태에 대항하는 보호를 제공할 수 있다.

[0012]

본 발명의 방법에는 식물 또는 조류에서의 NDV 항원 및 이의 분절 및 변이체의 제조 방법이 포함된다. 방법에는 또한 동물에게 유효량의 NDV 항원성 폴리펩티드(들) 및 이의 분절 및 변이체를 투여하여 보호적 면역원성 반응을 도출하는 것을 포함하는 사용 방법이 포함된다. 식물 또는 조류에서의 생성 후, NDV 항원성 폴리펩티드 및 이의 분절 및 변이체는 백신 또는 조성물로서 사용하기 위해 부분적으로 또는 실질적으로 정제될 수 있다.

[0013]

하나 이상의 NDV 항원 폴리펩티드 또는 이의 절편 또는 변이체 및 사용 지침을 포함하는 키트가 또한 제공된다.

### 도면의 간단한 설명

[0014]

예시로 제시되나 본 발명을 기재된 특정 구현예에 단독으로 제한시키는 것으로 의도되지 않는 하기 상세한 설명이 다음과 같은 첨부 도면과 함께 잘 이해될 것이다:

도 1은 폴리뉴클레오티드 및 단백질 서열에 대해 지정된 SEQ ID NO를 보여주는 표를 제공한다.

도 2는 NDV HN 유전자의 DNA 및 단백질 서열 및 글리코실화 부위를 제공한다.

도 3은 96 웰 플레이트 포맷 내 HA 분석을 보여준다.

도 4는 발현된 NDV HN 유전자의 SDS-PAGE 및 웨스턴 블로트 분석을 보여준다.

도 5는 코마시 염색, 과요오드산 염색, 글리코실화 분석에 대한 면역블로트 및 글리코실화 부위 분석의 사진을 보여준다.

도 6a 및 6b는 상이한 균주 및 성숙 단백질 서열 (신호 펩티드 없이)로부터 NDV HN의 단백질 서열 정렬을 제공한다.

도 7a는 상이한 NDV 균주로부터의 DNA의 서열 정렬을 제공한다. 도 7b는 NDV HN에 대해 코딩하는 야생형과 코톤-최적화된 (미세조류-바람직한) DNA 및 NDV HN에 대해 코딩하는 야생형과 코톤-최적화된 (좀개구리밥-바람직한) DNA 사이의 DNA 서열 정렬을 보여준다. 도 7c는 좀개구리밥 식물 형질전환에 대한 플라스미드 맵을 묘사한다.

도 8은 HN 선형 에피토프 영역을 보여주는 NDV HN 단백질의 서열 정렬을 제공한다.

도 9는 상이한 균주의 NDV HN 내의 글리코실화 부위의 위치 및 존재를 보여주는 표를 제공한다.

도 10은 NDV HN CA/02 단백질의 글리코실화 부위 및 HN 선형 에피토프 영역의 그래프 특징 맵을 제공한다 (SEQ ID NO:3).

도 11은 조류에서 발현된 NDV HN (SEQ ID NO:3)의 펩티드 서열 분석을 제공한다.

도 12 는 HI 적정농도 시험 결과 및 사망률 시험 결과를 제공한다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015]

동물에서 면역원성 반응을 도출하는 NDV (Newcastle Disease Virus) 항원 및 이의 분절 및 변이체를 포함하는 조성물이 제공된다. NDV 항원 또는 이의 분절 또는 변이체는 조류에서 제조될 수 있다. NDV 항원 또는 분절 또는 변이체는 백신 또는 약학 조성물로 제형화될 수 있고, 동물에서 보호적 반응을 도출 또는 자극하는데 사용된다. 하나의 구현예에서, NDV 항원은 NDV 헤마글루티닌-뉴라미니다아제 (HN) 폴리펩티드 또는 이의 활성 분절 또는 변이체이다.

[0016]

본 발명의 항원성 폴리펩티드는 전장 폴리펩티드 또는 이의 활성 분절 또는 변이체일 수 있는 것으로 인지된다. "활성 분절" 또는 "활성 변이체"는 분절 또는 변이체가 폴리펩티드의 항원 특성을 보유하는 것을 의도한다. 그러므로, 본 발명은 동물에서 면역원성 반응을 도출하는 임의의 NDV 폴리펩티드, 항원, 에피토프 또는 면역원을 포함한다. NDV 폴리펩티드, 항원, 에피토프 또는 면역원은 동물에서 반응을 도출, 유도 또는 자극하는 임의의 NDV 폴리펩티드, 항원, 에피토프 또는 면역원일 수 있다.

[0017]

관심의 특정 항원성 폴리펩티드는 헤마글루티닌-뉴라미니다아제 (HN) 이다. 당단백질, 헤마글루티닌-뉴라미니다아제 (HN) 는 이것을 시알산 수용체를 통해 세포에 대한 바이러스 부착에 관여하는 유형 II 통합 막 단백질로 만들게 하는 아미노-말단 영역에 위치하는 막통과 영역을 갖는다. HN 단백질은 외피로부터 돌출되어 바이러스가 헤마글루티닌 및 뉴라미니다아제 활성을 모두 갖게 할 수 있다 (Yusoff K, Tan WS, 2001, Avian Pathol 30:439-455).

[0018]

그러나, 상이한 항원이 있고, 이 중 임의의 것이 본 발명의 실시에 사용될 수 있다. 상기 항원 중 임의의 것의 전구체가 사용될 수 있다는 것이 추가로 인지된다.

[0019]

본 발명의 항원성 폴리펩티드는 NDV 에 대항하여 보호할 수 있다. 즉, 이들은 동물에서 면역 반응을 자극할 수 있다. "항원" 또는 "면역원"은 숙주 동물에서 특이적 면역 반응을 유도하는 물질을 의미한다. 항원은 전체 유기체 (치사된, 약화된 또는 살아있는 것); 유기체의 일부; 면역원성 특성을 갖는 삽입체를 함유하는 재조합 벡터; 숙주 동물에 제시되었을 때 면역 반응을 유도할 수 있는 DNA 의 조각 또는 절편; 폴리펩티드, 에피토프, 합텐, 또는 이의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 대안적으로는, 면역원 또는 항원은 독소 또는 항독소를 포함할 수 있다.

[0020]

"단백질", "펩티드", "폴리펩티드" 및 "폴리펩티드 절편"이라는 용어는 임의의 길이의 아미노산 잔기의 중합체를 말하는 것으로 본원에서 호환되게 사용된다. 중합체는 선형 또는 분지형일 수 있고, 개질 아미노산 또는 아미노산 유사체를 포함할 수 있고, 아미노산 이외의 화학적 부분이 삽입될 수 있다. 상기 용어는 또한 자연적으로 또는 하기와 같은 개입에 의해 개질된 아미노산 중합체를 포함한다; 예를 들어 디설피드 결합 형성, 글리코실화, 지질화, 아세틸화, 인산화, 또는 임의의 다른 조작 또는 개질, 예컨대 표지 또는 생활성 성분과의 공액.

[0021]

본원에서 사용되는 바와 같은 "면역원성 또는 항원성 폴리펩티드"라는 용어에는 또한 일단 숙주에 투여된다는 의미에서 면역학적으로 활성인 폴리펩티드가 포함되고, 이것은 단백질에 대해 체액성 및/또는 세포성 유형의 면역 반응을 유발시킬 수 있다. 바람직하게는 단백질 절편은 총 단백질과 실질적으로 동일한 면역학적 활성을 갖는 것이다. 그러므로, 본 발명에 따른 단백질 절편은 하나 이상의 에피토프 또는 항원 결정소를 포함하거나, 이들로 본질적으로 이루어지거나, 이들로 이루어진다. 본원에서 사용되는 바와 같은 "면역원성" 단백질 또는 폴리펩티드에는 단백질의 전장 서열, 이의 유사체, 또는 이의 면역원성 절편이 포함된다. "면역원성 절편"은 하나 이상의 에피토프가 포함되므로 상기 기재된 면역학적 반응을 도출하는 단백질의 절편을 의미한다. 이러한 절편은 당업계에 잘 알려진 많은 에피토프 맵핑 기술을 사용하여 확인될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996)]를 참조한다. 예를 들어, 선형 에피토프는 예를 들어, 고체 지지체 상에 다수의 펩티드를 동시에 합성하고 (펩티드는 단백질 분자의 일부에 상응함), 펩티드가 지지체 상에 여전히 부착될 동안 펩티드와 항체를 반응시킴으로써 결정될 수 있다. 이러한 기술은 당업계에 알려져 있고, 예를 들어, 전체가 참조로서 본원에 모두 인용된 미국 특허 제 4,708,871 호에 기재되어 있다. 유사하게는, 형태적 에피토프는 예를 들어, x-선 결정학 및 2-차원 핵 자기 공명에 의해 아미노산의 공간적 형태를 측정함으로써 쉽게 확인된다. 예를 들어, 상기 문헌 [Epitope Mapping Protocols, supra] 을 참조한다.

[0022]

본원에 기재된 바와 같이, 본 발명은 항원성 폴리펩티드의 활성 분절 및 변이체를 포함한다. 그러므로, "면

역원성 또는 항원성 폴리펩티드" 라는 용어는 폴리펩티드가 본원에 정의된 바와 같은 면역학적 반응을 생성하는 기능을 하기만 한다면, 서열에 대한 결실, 부가 및 치환을 추가로 포함한다. "보존성 변이" 라는 용어는 아미노산 잔기의 또다른 생물학적으로 유사한 잔기에 의한 대체, 또는 코딩된 아미노산 잔기가 변화하지 않거나 또다른 생물학적으로 유사한 잔기가 되도록 하는 핵산 서열 내 뉴클레오티드의 대체를 의미한다. 이와 관련하여, 특히 바람직한 치환은 일반적으로 사실상 보전성일 것이다 (즉, 아미노산 계통 내에서 일어나는 치환).

예를 들어, 아미노산은 일반적으로 하기 네 가지 계통으로 나뉜다: (1) 산성 -- 아스파르테이트 및 글루타메이트; (2) 염기성 -- 리신, 아르기닌, 히스티딘; (3) 무극성 -- 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판; 및 (4) 비전하 극성 -- 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 시스틴, 세린 트레오닌, 티로신. 페닐알라닌, 트립토판, 및 티로신은 종종 방향족 아미노산으로 분류된다. 보존성 변이의 예에는 이소류신, 발린, 류신 또는 메티오닌과 같은 하나의 소수성 잔기의 또다른 소수성 잔기로의 치환, 또는 하나의 극성 잔기의 또다른 극성 잔기에 대한 치환, 예컨대 아르기닌의 리신에 대한 치환, 글루탐산의 아스파르트산에 대한 치환, 또는 글루타민의 아스파라긴에 대한 치환, 등; 또는 생물학적 활성에 주요한 영향을 가지지 않을 것인, 아미노산을 구조적으로 관련된 아미노산으로 유사한 보존적 대체가 포함된다. 참조 문자와 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖지만, 단백질의 면역원성에 실질적으로 영향을 주지 않는 미미한 아미노산 치환을 갖는 단백질은 그러므로, 참조 폴리펩티드의 정의 내에 있다. 상기 개질에 의해 제조된 모든 폴리펩티드가 본원에 포함된다. "보존성 변이" 라는 용어에는 또한 치환된 폴리펩티드에 대해 생성된 항체가 또한 비치환된 폴리펩티드와 면역반응을 한다면, 비치환된 모체 아미노산 대신의 치환된 아미노산의 사용을 포함한다.

[0023] "에피토프" 라는 용어는 특정 B 세포 및/또는 T 세포가 반응하는 항원 또는 합텐 상의 부위를 말한다. 상기 용어는 또한 "항원 결정소" 또는 "항원 결정소 부위" 와 호환적으로 사용된다. 동일한 에피토프를 인지하는 항체는 하나의 항체가 표적 항원에 대한 또다른 항체의 결합을 차단하는 능력을 보여주는 간단한 면역학적 검정법으로 확인될 수 있다.

[0024] 조성물 또는 백신에 대한 "면역학적 반응"은 관심의 조성물 또는 백신에 대한 세포성 및/또는 항체-매개 면역 반응의 숙주에서의 전개이다. 통상, "면역학적 반응"에는 관심의 조성물 또는 백신에 포함되는 항원(들)에게 특이적으로 대항하는, 항체, B 세포, 조력자 T 세포, 및/또는 세포독성 T 세포의 생성이라는 효과 중 하나 이상이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 바람직하게는, 숙주는 새로운 감염에 대한 저항성이 향상될 것이고/거나 질환의 임상적 심각성이 감소되는 식의, 치료적 또는 보호적 면역학적 반응을 나타낼 것이다. 이러한 보호는 감염된 숙주에 의해 정상적으로 나타나는 증상의 감소 또는 결핍, 감염된 숙주에서 보다 빠른 회복 시간 및/또는 보다 낮은 바이러스 적정 농도에 의해 증명될 것이다.

[0025] "동물"은 포유류, 새 등을 의미한다. 동물 또는 숙주에는 포유류 및 인간이 포함된다. 동물은, 말류(예를 들어, 말), 개류(예를 들어, 개, 늑대, 여우, 코요테, 자칼), 고양이류(예를 들어, 사자, 호랑이, 집고양이, 들고양이, 기타 큰 고양이, 및 치타 및 스라소니를 비롯한 기타 고양이과), 양류(예를 들어, 양), 소류(예를 들어, 소), 돼지류(예를 들어, 돼지), 조류(예를 들어, 닭, 오리, 거위, 칠면조, 메추라기, 꿩, 앵무새, 펜치, 매, 까마귀, 타조, 애류 및 화식조), 영장류(예를 들어, 원원류, 안경원숭이, 원숭이, 긴팔원숭이, 유인원), 및 생선으로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있다. "동물"이라는 용어에는 또한 베아 및 태아 단계를 비롯한, 모든 발달 단계의 개개의 동물이 포함된다.

[0026] 본원에서 사용되는 용어 "식물"은 쌍떡잎(dicot) 식물 및 외떡잎(monocot) 식물 모두를 포함한다. 쌍떡잎 식물에는 완두, 알팔과 및 대두와 같은 콩과식물, 당근, 셀러리, 토마토, 감자, 담배, 후추, 평지씨, 비트, 양배추, 콜리플라워, 브로콜리, 상추, 땅콩 등이 포함되나 이에 제한되지 않는다. 외떡잎 식물에는 밀, 보리, 수수 및 피와 같은 곡물류, 호밀, 라이밀, 옥수수, 쌀 또는 귀리, 사탕수수, 콤개구리밥, 잔디 등이 포함되나 이에 제한되지 않는다. 용어 "식물"에는 또한 양치식물, 속새류, 석송, 이끼, 우산이끼, 봉어마름, 조류를 포함하는 비-개화 식물이 포함되나 이에 제한되지 않는다. 본원에서 사용되는 용어 "조류"에는 폴리펩티드 또는 이의 절편 또는 변이체를 생성할 수 있는 임의의 조류 균주가 포함된다. 조류에는 예를 들어, 적조류, 갈조류 및 녹조류, 배우체 등이 포함될 수 있다. 조류는 미세조류일 수 있다. 미세조류는 트라우스토카이트리아세아에 (*Thraustochytriaaceae*), 예를 들어, 스퀴조카이트리움 (*Schizochytrium*), 트라우스토카이트리움 (*Thraustochytrium*), 라바린톨로이데스 (*Labyrinthuloides*), 및 자포노카이트리움 (*Japonochytrium*) 일 수 있다.

[0027] 다르게 설명되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술 과학적 용어는 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자에게 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 단수형 관사에는 문맥상 명백하게 다르게 언급되지 않는 한 복수의 지시대상이 포함된다. 유사하게는, "또는"이라는 단어는 문맥상 명백하게 다르게 언급되지

않는 한 "및" 이 포함되는 것으로 의도된다.

[0028] 본 명세서에서, 특히 청구항 및/또는 단락에서, "~을 포함한다", "~이 포함되는", "~을 포함함" 등과 같은 용어는 미국 특허법에서 이에 부여된 의미를 가질 수 있으며; 예를 들어, 이들은 "~에 포함된다", "~에 포함되는", "~에 포함됨" 등을 의미할 수 있고; "~로 본질적으로 이루어지는" 및 "~로 본질적으로 이루어지다"와 같은 용어는 미국 특허법에서 이에 부여된 의미를 갖고, 예를 들어, 이들은 명백하게 언급되지 않은 요소를 포함하나, 선행 기술에서 발견되거나 본 발명의 기본적인 또는 신규한 특성에 영향을 미치는 요소는 배제한다는 점에 유의한다.

[0029] 조성물

[0030] 본 발명은 유효량의 재조합 NDV 폴리펩티드 또는 항원 및 약학적으로 또는 수의학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 또는 비히클을 포함할 수 있는 NDV 백신 또는 조성물에 관한 것이다. NDV 폴리펩티드, 항원, 에피토프 또는 면역원은 동물에서 반응을 도출, 유도 또는 자극하는 임의의 NDV 폴리펩티드, 항원, 에피토프 또는 면역원일 수 있다. 하나의 구현예에서, NDV 폴리펩티드, 항원, 에피토프 또는 면역원은 헤마글루티닌-뉴라미니다아제 (HN), RNA 폴리머라아제, 융합 단백질 (F), 매트릭스 단백질, 인단백질 및 핵단백질이다. 또 다른 구현예에서, NDV 항원은 헤마글루티닌-뉴라미니다아제 (HN) 일 수 있다.

[0031] 본 발명은 일부분 식물 또는 조류 단백질 발현 시스템에서 발현된 재조합 NDV HN 유전자가 고도로 면역원성이었고, 상동 및 이종 NDV 균주로부터의 유발에 대해 동물을 보호한다는 본 출원인의 놀라운 발견에 근거한다.

[0032] 본 발명은 유효량의 재조합 NDV HN 폴리펩티드 또는 항원 및 약학적으로 또는 수의학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 또는 비히클을 포함할 수 있는 NDV 백신 또는 조성물에 관한 것이다. 하나의 구현예에서, 재조합 NDV HN 항원은 조류에서 발현된다. 더욱 또 다른 구현예에서, 조류는 스퀴조카이트리움 (*Schizochytrium*)으로부터 선택된다. 하나의 구현예에서, 재조합 NDV HN 항원은 예를 들어, US 7,001,772, US 2008/0022422, US 2006/0275904, US 2006/0286650에 기재된 바와 같이 스퀴조카이트리움 단백질 발현 시스템에서 발현될 수 있다.

[0033] 구현예에서, 본원에 기재된 주체는 좀개구리밥 발현 시스템에 의해 제조된 재조합 NDV HN 폴리펩티드 또는 항원 및, 렘나 (*Lemna*) 속을 비롯한 좀개구리밥으로부터의 식물 물질, 및 약학적 또는 수의학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 비히클을 포함하는 조성물에 관한 것이다. 또 다른 구현예에서, 본원에 기재된 주체는 NDV HN 폴리펩티드 또는 항원을 포함하는 좀개구리밥 발현 시스템에 의해 생성된 임의로 글리코실화된 단백질에 관한 것이다. 재조합 NDV HN 폴리펩티드 또는 항원은 Biolex's LEX systemSM과 같은 렘나 마이너 (*Lemna minor*) 단백질 발현 시스템에서 발현될 수 있다.

[0034] 하나의 구현예에서, 약학적으로 또는 수의학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 또는 비히클은 유-중-수 에멀젼일 수 있다. 또 다른 구현예에서, 유-중-수 에멀젼은 수/유/수 (W/O/W) 3 중 에멀젼일 수 있다. 더욱 또 다른 구현예에서, 약학적으로 또는 수의학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 또는 비히클은 수-중-유 에멀젼일 수 있다.

[0035] 구현예에서, 조성물 또는 백신은 재조합 벡터 및 약학적으로 또는 수의학적으로 허용가능한 부형제, 담체 또는 비히클을 포함한다. 재조합 벡터는 NDV 폴리펩티드, 항원, 에피토프 또는 면역원을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있는 식물 또는 조류 발현 벡터이다. 하나의 구현예에서, NDV 폴리펩티드, 항원, 에피토프 또는 면역원은 NDV 또는 조류 (鳥) NDV 균주로 감염된 조류로부터 유도될 수 있다.

[0036] 구현예에서, NDV 폴리펩티드 또는 이의 항원 또는 분절 또는 변이체는 NDV HN 폴리펩티드 또는 이의 절편 또는 변이체를 포함한다. 본 구현예의 양상에서, HN 폴리펩티드 또는 이의 절편 또는 변이체는 NDV HN 유전자에 의해 생성된 재조합 폴리펩티드이다. 본 구현예의 또 다른 양상에서, NDV HN 유전자는 SEQ ID NO: 1, 2, 4, 6, 8, 12, 14, 16, 18, 22 또는 23에 언급된 서열과 70% 이상의 일치성을 갖는다. 본 구현예의 또 다른 양상에서, NDV HN 폴리펩티드 또는 이의 절편 또는 변이체는 SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 10, 11, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 또는 28에 언급된 서열과 80% 이상의 일치성을 갖는다. 본 구현예의 또 다른 양상에서, HN 폴리펩티드 또는 이의 절편 또는 변이체는 HN 선형 에피토프 영역을 포함한다. 본 구현예의 또 다른 양상에서, 에피토프 영역은 SEQ ID NO: 10, 11, 또는 28에 언급된 서열과 80% 이상의 일치성을 갖는다.

[0037] 구현예에서, NDV 항원은 부분적으로 정제되고; 또는, 또 다른 구현예에서, NDV 항원은 실질적으로 정제된다. 더욱 또 다른 구현예에서, NDV 항원은 수확된 미세조류 내에 전부 존재한다. 더욱 또 다른 구현예에서, NDV

항원은 저속 혼탁액 내에 존재한다.

[0038] 합성 항원, 예를 들어, 폴리에피토프, 측면 에피토프, 및 기타 재조합 또는 합성적으로 유도된 항원이 또한 정의 내에 포함된다. 예를 들어, 문헌 [Bergmann et al., 1993; Bergmann et al., 1996; Suhrbier, 1997; Gardner et al., 1998] 을 참조한다. 본 발명의 목적을 위해 면역원성 절편은 통상 분자의, 약 3 개 아미노산 이상, 약 5 개 아미노산 이상, 약 10-15 개 아미노산 이상, 또는 약 15-25 개 아미노산 또는 그 이상의 아미노산을 포함할 것이다. 단백질 서열의 전장을 거의 포함할 수 있는 분절의 길이, 또는 심지어 단백질의 하나 이상의 에피토프를 포함하는 융합 단백질에 결정적인 상한은 없다.

[0039] 따라서, 에피토프를 발현하는 폴리뉴클레오티드의 최소 구조는 NDV 폴리펩티드의 에피토프 또는 항원 결정소를 코딩하는 뉴클레오티드를 포함하거나 이것으로 본질적으로 이루어지거나 이것으로 이루어지는 것이다. NDV 폴리펩티드의 분절을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 폴리펩티드를 코딩하는 서열의 최소 15 개 뉴클레오티드, 약 30-45 개 뉴클레오티드, 약 45-75 개, 또는 57 개, 87 개 또는 150 개 이상의 연속 또는 인접 뉴클레오티드를 포함하거나 이것으로 본질적으로 이루어지거나 이것으로 이루어질 수 있다. 에피토프 결정 절차, 예컨대 중복 펩티드 라이브러리 생성 (Hemmer et al., 1998), 펩스캔 (Pepscan) (Geysen et al., 1984; Geysen et al., 1985; Van der Zee R. et al., 1989; Geysen, 1990; Multipin.RTM. Peptide 합성 Kits de Chiron) 및 알고리즘 (De Groot et al., 1999; PCT/US2004/022605) 이 본 발명의 실시에 사용될 수 있다.

[0040] 단백질의 글리코실화는 단백질의 면역원성에 복합적인 영향을 줄 수 있다. NDV 의 경우, 글리코실화는 단백질의 적합한 폴딩 및 형태적 에피토프 형성에 필요한 것으로 보인다 (McGinnes, L. W., and T. G. Morrison. 1995, *Virology* 212:398-410.). McGinnes, et al.에 따르면, 글리코실화 부위 433 및 481 (도 8-10 참조) 에서의 HN 단백질의 글리코실화는 단백질 결합 활성 및 형태적 에피토프 형성에 필요하다. HN 단백질의 적합한 글리코실화는 단백질 기능 및 본 발명의 조성물에 대한 숙주의 면역 반응에 필요할 수 있다.

[0041] HN 단백질의 형태적 에피토프 및 주요 선형 에피토프는 문헌 [Gotoh, BT, et al., 1988, *Virology* 163:174-82, Iorio, R. M., J. B. et al., 1986, *J Gen Virol* 67:1393-403, Iorio, RM, et al., 1989, *Virus Res* 13:245-61]에 기재되어 있다. 선형 에피토프 중의 변이는 신생 균주에 의한 백신 회피의 원인일 수 있는 것으로 보인다 (Cho, SH, et al., 2008, *J Clin Microbiol* 46:1541-4). 도 8 은 선형 에피토프 영역 내 변이 수준을 보여주기 위한 4 개의 NDV 균주로부터의 HN 단백질의 정렬을 제공한다.

[0042] 용어 "핵산" 및 "폴리뉴클레오티드" 는 선형 또는 분지형, 단일 또는 이중 가닥, 또는 이의 혼성체인 RNA 또는 DNA 를 말한다. 용어는 또한 RNA/DNA 혼성체를 포함한다. 하기는 폴리뉴클레오티드의 비-제한적인 예이다: 유전자 또는 유전자 분절, 엑손, 인트론, mRNA, tRNA, rRNA, 리보솜, cDNA, 재조합 폴리뉴클레오티드, 분지형 폴리뉴클레오티드, 플라스미드, 벡터, 임의의 서열의 단리된 DNA, 임의의 서열의 단리된 RNA, 핵산 탐침 및 프라이머. 폴리뉴클레오티드는 개질된 뉴클레오티드, 예컨대 메틸화된 뉴클레오티드 및 뉴클레오티드 유사체, 우라실, 기타 당 및 연결기, 예컨대 플루오로리보오스 및 티올레이트, 및 뉴클레오티드 분지를 포함할 수 있다. 뉴클레오티드의 서열은 공액에 의한 것과 같은 중합 후에, 표지화 성분으로 추가로 개질될 수 있다. 본 정의에 포함되는 다른 유형의 개질은 캡, 하나 이상의 자연 발생적 뉴클레오티드의 유사체로의 치환, 및 폴리뉴클레오티드를 단백질, 금속 이온, 표지화 성분, 기타 폴리뉴클레오티드 또는 고체 지지체에 부착시키는 수단의 도입이다. 폴리뉴클레오티드는 화학적 합성으로부터 수득될 수 있거나 또는 미생물로부터 유도될 수 있다.

[0043] 용어 "유전자" 는 생물학적 기능과 연관되는 폴리뉴클레오티드의 임의의 분절을 언급하는데 폭넓게 사용된다. 따라서, 유전자에는 게놈 서열에서와 같은 인트론 및 엑손, 또는 단지 cDNA 에서와 같은 코딩 서열, 및/또는 발현에 필요한 조절 서열이 포함된다. 예를 들어, 유전자는 또한 mRNA 또는 기능적 RNA 를 발현하는, 또는 조절 서열을 포함하는 특정 단백질을 코드화하는 핵산 분절을 말한다.

[0044] 본 발명은 NDV 항원, 에피토프 또는 면역원을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 대한 상보적 가닥을 추가로 포함한다. 상보적 가닥은 중합체성이고 임의의 길이일 수 있고, 테옥시리보뉴클레오티드, 리보뉴클레오티드, 및 임의의 조합의 유사체를 함유할 수 있다.

[0045] "단리된" 생물학적 성분 (예컨대 핵산 또는 단백질 또는 세포기관) 은 성분이 자연 발생하는 유기체의 세포에서 다른 생물학적 성분으로부터 실질적으로 분리된 또는 정제되어지는 성분, 예를 들어, 다른 염색체 및 염색체-외 DNA 및 RNA, 단백질, 및 세포기관을 말한다. "단리된" 핵산 및 단백질에는 표준 정제 방법에 의해 정제된 핵산 및 단백질이 포함된다. 용어에는 또한 재조합 기술 뿐 아니라 화학적 합성에 의해 제조된 핵산 및 단

백질이 포함된다.

[0046]

본원에 사용된 바와 같은 용어 "정제된"은 절대적인 정제를 필요로 하지는 않으며, 그보다는, 이것은 상대적인 용어로서 의도된다. 그러므로, 예를 들어, 부분적으로 정제된 폴리펩티드 제제는 폴리펩티드가 자연 환경에 있는 것보다 폴리펩티드가 더욱 풍부한 제제이다. 이것은 폴리펩티드가 세포 성분으로부터 분리된 것이다.

"실질적으로 정제된"은 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 또는 98% 이상, 또는 그 이상의 세포 성분 또는 물질이 제거되는 것을 의도한다. 마찬가지로, 폴리펩티드는 부분적으로 정제될 수 있다.

"부분적으로 정제된"은 세포 성분 또는 물질의 60% 미만이 제거된 것을 의도한다. 동일한 것이 폴리뉴클레오티드에 적용된다. 본원에 기재된 폴리펩티드는 당업계에 공지된 수단 중 임의의 것에 의해 정제될 수 있다.

[0047]

하나의 양상에서, 본 발명은 NDV HN 폴리펩티드를 제공한다. 또 다른 양상에서, 본 발명은 SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 10, 11, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 또는 28에 언급된 서열 및 이의 변이체 또는 절편을 갖는 NDV HN 폴리펩티드를 제공한다.

[0048]

제다가, NDV HN 폴리펩티드의 상동은 본 발명의 범주 내에 있는 것으로 의도된다. 본원에서 사용되는 바와 같은, "상동"이라는 용어에는 오르소로그, 아날로그 및 파라로그가 포함된다. "아날로그"라는 용어는 동일한 또는 유사한 기능을 갖지만, 미관련 유기체에서 개별적으로 진화한 2개의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드를 말한다. "오르소로그"라는 용어는 상이한 종으로부터 유래되지만, 종 분화에 의해 공통의 조상 유전자로부터 진화한 2개의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드를 말한다. 보통, 오르소로그는 동일한 또는 유사한 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩한다. "파라로그"라는 용어는 게놈 내에서 복제에 의해 관련된 2개의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드를 말한다. 파라로그는 일반적으로 상이한 기능을 갖지만, 이를 기능은 관련이 있을 수 있다. 야생형 NDV 폴리펩티드의 아날로그, 오르소로그, 및 파라로그는 야생형 NDV 폴리펩티드와 번역후 개질, 아미노산 서열 차이, 또는 둘 다에 의해 차이가 있을 수 있다. 특히, 본 발명의 상동은 야생형 NDV 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 서열 모두 또는 일부와 일반적으로 80-85%, 85-90%, 90-95%, 또는 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 일치성을 나타낼 것이며, 유사한 기능을 나타낼 것이다.

[0049]

또 다른 양상에서, 본 발명은 SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 10, 11, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 또는 28에 언급된 서열을 갖는 NDV HN 폴리펩티드와 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 일치성을 갖는 폴리펩티드를 제공한다. 또 다른 양상에서, 본 발명은 SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, 또는 SEQ ID NO: 28에 언급된 서열을 갖는 면역원성 절편을 포함하는 NDV HN 폴리펩티드를 제공하고, 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 15, 17, 19, or 20에 언급된 서열을 갖는 폴리펩티드와 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 일치성을 갖는다.

[0050]

더욱 또 다른 양상에서, 본 발명은 잘 알려진 문자 생물학 기술을 사용하여 당업자에 의해 쉽게 제조될 수 있는 상기 확인된 NDV HN 폴리펩티드의 분절 및 변이체 (SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 10, 11, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 또는 28)를 제공한다.

[0051]

변이체는 SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 10, 11, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 또는 28에 언급된 아미노산 서열과 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 일치성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 상동 폴리펩티드이다.

[0052]

변이체에는 대립형질 변이체가 포함된다. "대립형질 변이체"라는 용어는 단백질의 아미노산 서열에 변화를 일으키고, 자연적인 집단 (예를 들어, 바이러스 종 또는 변종) 내에 존재하는 다양성을 함유하는 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드를 말한다. 이러한 자연적인 대립형질 변이는 전형적으로는 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 내 1-5% 변화를 산출할 수 있다. 대립형질 변이체는 다수의 상이한 종에서 관심의 핵산 서열을 서열분석하여 확인될 수 있으며, 이것은 상기 종에서 동일한 유전자 유전적 좌를 확인하기 위한 혼성화 탐침의 사용에 의해 쉽게 수행될 수 있다. 자연적인 대립형질 변이의 결과이고, 관심이 있는 경우 유전자의 기능적 활성을 변경하지 않는 임의의 및 모든 이러한 핵산 변이 및 수득되는 아미노산 다양성 또는 변이가 본 발명의 범주 내에 있는 것으로 의도된다.

[0053]

본원에서 사용되는 바와 같은, "유도체" 또는 "변이체"라는 용어는 (1) 상응하는 폴리펩티드는 야생형 폴리펩티드와 비교하였을 때 실질적으로 동등한 기능을 갖도록 하는 또는 (2) 폴리펩티드에 대해 발생된 항체가 야생형 폴리펩티드와 면역반응성이도록 하는 1 이상의 보존적 아미노산 변이 또는 다른 미미한 개질을 갖는 폴리펩티드, 또는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 말한다. 상기 변이체 또는 유도체에는 비개질 대응부 폴리펩티드

와 비교하여 실질적으로 동등한 활성을 갖는 펩티드를 산출할 수 있는 NDV 폴리펩티드 1 차 아미노산 서열의 미미한 개질을 갖는 폴리펩티드가 포함된다. 이러한 개질은 부위-지정 돌연변이 생성에 의한 바와 같이 의도적으로 이루어질 수 있고, 또는 자발적으로 이루어질 수 있다. "변이체"라는 용어는 폴리펩티드가 본원에 기재된 면역 반응을 산출하는 기능을 하는 한, 서열에 대한 결실, 부가 및 치환이 추가로 고려된다.

[0054] 용어 "보존성 변이"는 아미노산 잔기의 또 다른 생물학적으로 유사한 잔기에 의한 대체, 또는 코딩된 아미노산 잔기가 변화하지 않거나 또 다른 생물학적으로 유사한 잔기가 되도록 하는 핵산 서열 내 뉴클레오티드의 대체를 의미한다. 이와 관련하여, 특히 바람직한 치환은 일반적으로 상기 기재된 바와 같이 성질이 보존성일 것이다.

[0055] NDV HN 폴리펩티드의 면역원성 절편에는 SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 10, 11, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 또는 28에 언급된 서열을 갖는 NDV HN 폴리펩티드, 또는 이의 변이체의 적어도 8 개, 10, 13, 14, 15, 또는 20 개의 연속 아미노산, 21 개 이상의 아미노산, 23 개 이상의 아미노산, 25 개 이상의 아미노산, 또는 30 개 이상의 아미노산이 포함된다. 다른 구현예에서, NDV HN 폴리펩티드의 분절에는 전장 NDV HN 폴리펩티드 상에서 발견되는 특정한 항원성 에피토프가 포함된다. 면역원성 절편은 NDV HN 선형 에피토프 영역을 함유하는 분절을 포함할 수 있다. 하나의 구현예에서, 면역원성 절편은 SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, 또는 SEQ ID NO:28에 언급된 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함한다.

[0056] 또 다른 양상에서, 본 발명은 NDV HN 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 예컨대 SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 10, 11, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 또는 28에 언급된 서열을 갖는 NDV HN 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 더욱 또 다른 양상에서, 본 발명은 SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 10, 11, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 또는 28에 언급된 서열을 갖는 폴리펩티드, 또는 상기 폴리펩티드 중 하나의 8 개 이상의 또는 10 개 이상의 연속 아미노산을 포함하는 보존성 변이체, 대립유전자 변이체, 상동 또는 면역원성 절편, 또는 상기 폴리펩티드의 조합과 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 일치성을 갖는 NDV HN 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 또 다른 양상에서, 본 발명은 SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, 또는 SEQ ID NO:28에 언급된 서열을 갖는 면역원성 절편을 포함하는 NDV HN 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공하고, 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 15, 17, 19, 또는 20에 언급된 서열을 갖는 폴리펩티드와 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 일치성을 갖는다.

[0057] 또 다른 양상에서, 본 발명은 SEQ ID NO: 1, 2, 4, 6, 8, 12, 14, 16, 18, 22, 또는 23에 언급된 뉴클레오티드 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드, 또는 이의 변이체를 제공한다. 또 다른 양상에서, 본 발명은 SEQ ID NO: 1, 2, 4, 6, 8, 12, 14, 16, 18, 22, 또는 23에 언급된 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드 중 하나, 또는 이의 변이체와 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 일치성을 갖는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0058] 본 명세서의 폴리뉴클레오티드에는 예를 들어, 특이적 숙주에 대한 최적화된 코돈 사용과 같은 유전적 코드의 결과로서 축퇴되는 서열이 포함된다. 본원에 사용되는 바와 같은, "최적화된"이라는 용어는 제시된 종에서의 발현을 증가시키기 위해 유전적으로 엔지니어링된 폴리뉴클레오티드를 말한다. NDV 폴리펩티드를 코딩하는 최적화된 폴리뉴클레오티드를 제공하기 위해, NDV 단백질 유전자의 DNA 서열은 1) 특정 종에서 고도로 발현된 유전자에 의해 바람직한 코돈을 포함하고; 2) 상기 종에서 상당히 발견되는 함량에 대해 뉴클레오티드 염기 조성을 내 A+T 또는 G+C 함량을 포함하고; 3) 상기 종의 개시 서열을 형성하고; 또는 4) 불안정화, 부적합한 폴리아데닐화, RNA의 분해 및 종결을 일으키거나, 2 차 구조 헤이핀 또는 RNA 스플라이스 부위를 형성하는 서열을 제거하기 위해 개질될 수 있다. 상기 종에서의 NDV 단백질의 증가된 발현은 진핵생물 및 원핵생물에서, 또는 특정 종에서의 코돈 사용 분포 빈도를 사용함으로써 달성될 수 있다. "바람직한 코돈 사용 빈도"라는 용어는 제시된 아미노산을 구체화하기 위한 뉴클레오티드 코돈의 사용에서 특이적 숙주 세포에 의해 나타내지는 바람직함을 말한다. 20 개의 자연적인 아미노산이 있고, 이를 대부분은 1 개 초과의 코돈에 의해 구체화된다. 그러므로, 모든 축퇴성 뉴클레오티드 서열은, 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된 NDV HN 폴리펩티드의 아미노산 서열이 기능적으로 변화되지 않는다면, 본 명세서에 포함된다.

[0059] 2 개의 아미노산 서열 사이의 서열 일치성은 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 쌍방식 블라스트 및 표준 파라미터를 사용하는 blosum62 매트릭스 (예를 들어, "National Center for Biotechnology Information" (NCBI, Bethesda, Md., USA) 서버에서 이용가능한 BLAST 또는 BLASTX 알고리즘 참조)에 의해 성립될 수 있다.

[0060] 서열과 관련하여 "일치성"은 더 짧은 2 개의 서열 내 뉴클레오티드 또는 아미노산의 수로 나뉘어진 일치하는 뉴클레오티드 또는 아미노산과의 위치의 수를 말할 수 있고, 2 개의 서열의 정렬은 예를 들어, 20 개 뉴클레오티드의 윈도우 사이즈, 4 개의 뉴클레오티드의 단어 길이, 및 4 의 캡 패널티를 사용하는 Wilbur and Lipman 알고리즘 (Wilbur and Lipman)에 따라 측정될 수 있고, 정렬을 포함하는 서열 데이터의 컴퓨터-보조 분석 및 해석은 시판 프로그램 (예를 들어, Intelligenetics™ Suite, Intelligenetics Inc. CA)을 사용하여 편리하게 수행될 수 있다. RNA 서열이 유사한 것으로 여겨지는 경우, 또는 DNA 서열과 서열 일치성 또는 상동 정도를 갖는 경우, DNA 서열 내 티미딘 (T)은 RNA 서열 내 우라실 (U)과 동일한 것으로 고려된다. 그러므로, RNA 서열은 본 발명의 범주 내에 있고, DNA 서열 내 티미딘 (T)이 RNA 서열 내 우라실 (U)과 동일한 것으로 간주됨으로써 DNA 서열로부터 유래될 수 있다.

[0061] 2 개의 아미노산 서열의 서열 일치성 또는 서열 유사성, 또는 2 개의 뉴클레오티드 서열 사이의 서열 일치성은 Vector NTI 소프트웨어 패키지 (Invitrogen, 1600 Faraday Ave., Carlsbad, CA)를 사용하여 측정될 수 있다.

[0062] 혼성화 반응은 상이한 염격함 조건 하에서 수행될 수 있다. 혼성화 반응의 염격함을 증가시키는 조건은 잘 알려져 있다. 예를 들어, 문헌 "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 제 2 판 (Sambrook et al., 1989)을 참조한다.

[0063] 본 발명은 추가로 벡터 분자 또는 발현 벡터에 함유되고 프로모터 요소에 작동가능하게 연결된 NDV 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0064] "벡터"는 시험관 내 또는 생체 내에서 표적 세포에 전달하고자 하는 이종 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 DNA 또는 RNA 플라스미드 또는 바이러스를 말한다. 이종 폴리뉴클레오티드는 예방 또는 치료 목적으로 관심의 서열을 포함할 수 있고, 임의로 발현 카세트의 형태일 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같은, 벡터는 궁극적인 표적 세포 또는 대상에서 복제하는 능력이 있을 필요가 없다. 상기 용어는 클로닝 벡터 및 바이러스 벡터를 포함한다.

[0065] "재조합체"라는 용어는 자연에서 발견되지 않는 배열로 또다른 폴리뉴클레오티드에 연결되거나 자연에서 발생하지 않는 반합성, 또는 합성 기원의 폴리뉴클레오티드를 의미한다.

[0066] "이종"이라는 용어는 비교되어 지는 실재의 나머지와 일반적으로 구별되는 실재로부터 유래하는 것을 의미한다. 예를 들어, 폴리뉴클레오티드는 유전자 조작 기술에 의해 상이한 근원으로부터 유래된 플라스미드 또는 벡터 내로 도입될 수 있고, 그러므로 이종 폴리뉴클레오티드이다. 고유의 코딩 서열로부터 제거되고 고유의 서열 이외의 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터는 이종 프로모터이다.

[0067] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 부가적인 서열, 예컨대 동일한 전사 단위 내의 부가적인 코딩 서열, 조절 요소, 예컨대 프로모터, 리보솜 결합 부위, 5'UTR, 3'UTR, 전사 터미네이터, 폴리아데닐화 부위, 동일 또는 상이한 프로모터의 조절 하의 부가적인 전사 단위, 숙주 세포의 클로닝, 발현, 상동 재조합, 및 형질전환을 가능하게 하는 서열, 및 본 발명의 구현예를 제공하는데 바람직할 수 있는 임의의 이러한 구축물을 포함할 수 있다.

[0068] NDV 폴리펩티드, 항원, 에피토프 또는 면역원의 발현을 위한 요소가 유리하게는 본 발명의 벡터 내에 존재한다. 최소의 방식으로, 이것은 플라스미드 및 특정 바이러스 벡터, 예를 들어, 폭스바이러스 이외의 바이러스 벡터와 같은 특정 벡터에 대한 개시 코돈 (ATG), 중지 코돈 및 프로모터, 및 임의로 또한 폴리아데닐화 서열을 포함한다. 폴리뉴클레오티드가 (유리하게는, 벡터에서) 폴리펩티드 분절, 예를 들어, NDV 펩티드를 코딩하는 경우, ATG는 해독 프레임의 5'에 놓여있고, 중지 코돈은 3'에 놓여있다. 발현 조절을 위한 다른 요소, 예컨대 인핸서 서열, 안정화 서열, 예컨대 인트론 및 또는 미번역된 5' 또는 3' 서열 및 단백질의 분비를 가능하게 하는 신호 서열이 존재할 수 있다.

[0069] 본 발명은 또한 벡터, 예컨대 발현 벡터를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 조성물은 하나 이상의 NDV 폴리펩티드, 항원, 에피토프 또는 면역원을 포함하고 발현하는 하나 이상의 벡터, 예를 들어, 발현 벡터 예컨대 생체 내 발현 벡터를 포함할 수 있다. 하나의 구현예에서, 벡터는 약학적으로 또는 수의학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 비히클 중에 NDV 폴리펩티드, 항원, 에피토프 또는 면역원을 코딩 및/또는 발현하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0070] 본 발명의 또다른 구현예에 따르면, 발현 벡터는 플라스미드 벡터, 특히 생체 내 발현 벡터이다. 구체적인, 비-제한적인 예에서, pVR1020 또는 1012 플라스미드 (VICAL Inc.; Luke et al., 1997; Hartikka et al., 1996, see, 예를 들어, U.S. Patent Nos. 5,846,946 및 6,451,769)는 폴리뉴클레오티드 서열의 삽입을 위한 벡터로

서 이용될 수 있다. pVR1020 플라스미드는 pVR1012로부터 유래되고, 인간 tPA 신호 서열을 함유한다. 하나의 구현예에서, 인간 tPA 신호는 GenBank 접근 번호 HUMTPA14의 아미노산 M(1)에서 아미노산 S(23)을 포함한다. 또 다른 구체적인, 비-제한적인 예에서, 폴리뉴클레오티드 서열의 삽입용 벡터로서 이용되는 플라스미드는 GenBank 접근 번호 U28070의 아미노산 M(24)에서 아미노산 A(48)까지의 말 (equine) IGF1의 신호펩티드 서열을 포함할 수 있다. 실시에서 상의되거나 사용될 수 있는 DNA 플라스미드에 대한 부가적인 정보는 예를 들어, 미국 특허 번호 6,852,705; 6,818,628; 6,586,412; 6,576,243; 6,558,674; 6,464,984; 6,451,770; 6,376,473 및 6,221,362에서 발견된다.

[0071] 플라스미드라는 용어는 원하는 숙주 또는 표적의 세포(들)에서 생체 내 발현에 필요한 요소 및 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드를 포함하는 임의의 DNA 전사 단위를 포함하고; 이와 관련하여, 플라스미드의 선형 형태뿐 아니라, 슈퍼코일 또는 비-슈퍼코일, 원형 플라스미드가 본 발명의 범주 내에 있는 것으로 의도된다는 것을 유념한다.

[0072] 각각의 플라스미드는 프로모터에 작동가능하게 연결되어 있거나, 프로모터의 조절하에 있거나, 프로모터와는 독립적으로, NDV 폴리펩티드, 항원, 에피토프 또는 면역원을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일반적으로, 진핵 세포에서 기능하는 강한 프로모터를 사용하는 것이 유리하다. 강한 프로모터는 인간 또는 췄파기원의, 또는 임의로 래트 또는 기니아 피그와 같은 또 다른 기원을 갖는 즉각적인 초기 사이토메갈로바이러스 프로모터 (CMV-IE)이다.

[0073] 더욱 일반적인 용어로, 프로모터는 바이러스, 식물 또는 세포 기원의 것이다. 본 발명의 실시에 통상적으로 사용될 수 있는 CMV-IE 이외의 강한 바이러스 프로모터는 SV40 바이러스의 초기/후기 프로모터 또는 Rous 육종 바이러스의 LTR 프로모터이다. 본 발명의 실시에 통상적으로 사용될 수 있는 강한 세포 프로모터는 세포콜격의 유전자의 프로모터, 예컨대 예를 들어, 데스민 프로모터 (Kwissa et al., 2000), 또는 액틴 프로모터 (Miyazaki et al., 1989)이다.

[0074] 플라스미드는 다른 발현 조절 요소를 포함할 수 있다. 안정화 서열(들), 예를 들어, 인트론 서열(들), 예를 들어, 옥수수 알코올 디히드로게나아제 인트론 (옥수수 ADHI 인트론), hCMV-IE의 첫번째 인트론 (WO1989/01036), 토끼  $\beta$ -글로빈 유전자의 인트론 II (van Ooyen et al., 1979)를 도입하는 것이 특히 유리하다. 또 다른 구현예에서, 플라스미드는 3' UTR을 포함할 수 있다. 3' UTR은 아그로박테리움 노팔린 합성효소 (Nos) 3' UTR일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 플라스미드는 OrfC 터미네이터 (또한 PFA3 터미네이터로서 공지됨)를 추가로 포함할 수 있다.

[0075] 폭스바이러스 이외의 플라스미드 및 바이러스 벡터에 대한 폴리아데닐화 신호 (poly A)에 대해서는, 소 성장호르몬 (bGH) 유전자의 poly(A) 신호 (U.S. 5,122,458호를 참조함), 또는 토끼  $\beta$ -글로빈 유전자의 poly(A) 신호 또는 SV40 바이러스의 poly(A) 신호가 더욱 사용될 수 있다.

[0076] "숙주 세포"는 유전학적으로 변형된 원핵 또는 진핵 세포를 나타내거나, 재조합 플라스미드 또는 벡터와 같은 외생 폴리뉴클레오티드의 투여에 의해 유전학적으로 변형될 수 있다. 유전학적으로 변형된 세포를 언급할 때, 용어는 본래 변형된 세포와 이의 자손까지 모두 언급한다.

[0077] 하나의 구현예에서, 재조합 NDV HN 항원은 유전자도입 식물에서 발현된다. 또 다른 구현예에서, 재조합 NDV HN 항원은 유전자도입 조류에서 발현된다. 더욱 또 다른 구현예에서, 유전자도입 조류는 스퀴조카이트리움 (*Schizochytrium*)이다. 조류 단백질 발현 시스템의 상세 사항은 예를 들어, US 7,001,772, US 2008/0022422에서 발견될 수 있다. 구현예에서 NDV HN 폴리펩티드 또는 항원은 본원에 기재된 임의의 폴리펩티드, 또는 본원에 기재된 임의의 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩된 폴리펩티드일 수 있다.

[0078] 미세조류 또는 좀개구리밥에서 NDV 폴리펩티드를 발현하는 방법

[0079] 본 발명의 일부 구현예에서, NDV HN 폴리펩티드, 또는 이의 분절 또는 변이체는 미세조류 또는 좀개구리밥에서 발현된다. 상기 방법은 당업계에 공지된 임의의 적합한 형질전환 방법을 사용하여 조류 또는 식물 내로 도입된 발현 카세트의 사용을 포함한다. 상기 발현 카세트 내의 폴리뉴클레오티드는 하기와 같이, 미세조류 또는 좀개구리밥에서 항원성 NDV HN 폴리펩티드, 또는 이의 분절 또는 변이체의 향상된 발현에 대해 개질될 수 있다.

[0080] 항원성 NDV 폴리펩티드의 미세조류 또는 좀개구리밥 발현을 위한 카세트

[0081] NDV HN 폴리펩티드, 또는 이의 분절 또는 변이체를 발현하는 유전자도입 미세조류 또는 좀개구리밥은 NDV HN 폴

리펩티드, 또는 이의 분절 또는 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 카세트로의 미세조류 또는 좀개구리밥의 형질전환에 의해 수득된다. 이러한 방식으로, NDV HN 폴리펩티드, 또는 이의 분절 또는 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 발현 카세트 내에서 구축되고 당업계에 공지된 임의의 적합한 형질전환 방법에 의해 미세조류 또는 좀개구리밥 내로 도입된다.

[0082] 일부 구현예에서, NDV HN 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 또는 이의 분절 또는 변이체를 포함하는 발현 카세트로 형질전환된 미세조류 또는 좀개구리밥은 또한 관심의 또다른 이종 폴리펩티드, 예를 들어, 또다른 NDV 폴리펩티드, 이의 분절, 또는 변이체의 발현을 위해 제공되는 발현 카세트로 형질전환된다. 관심의 또다른 이종 폴리펩티드의 발현을 위해 제공되는 발현 카세트는 미세조류 또는 좀개구리밥 내로의 도입을 위해 동일한 폴리뉴클레오티드 상에 (예를 들어, 동일한 형질전환 벡터 상에), 또는 동시에 또는 상이한 시간에, 동일 또는 상이한 도입 방법에 의해, 예를 들어, 동일 또는 상이한 형질전환 방법에 의해 미세조류 또는 좀개구리밥 내로의 도입을 위해 상이한 폴리뉴클레오티드 상에 (예를 들어, 상이한 형질전환 벡터 상에) 제공될 수 있다.

[0083] 미세조류 또는 좀개구리밥의 형질전환에 사용하기 위한 발현 카세트는 관심의 폴리뉴클레오티드, 즉, NDV HN 폴리펩티드, 이의 분절, 또는 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연결된 전사 개시 영역 (예를 들어, 프로모터)을 적어도 포함하는 발현 조절 요소를 포함한다. 뉴클레오티드 서열과 관해 본원에 사용되는 바와 같은 "작동가능하게 연결된"은 서로 기능적으로 관련성이 있는 다중 뉴클레오티드 서열을 말한다. 일반적으로, 작동가능하게 연결된 DNA 서열은 인접하고, 해독 프레임 내에 2 개의 단백질 코딩 영역을 연결시킬 때 필요하다. 이러한 발현 카세트는 프로모터 및 기타 발현 조절 요소의 전사 조절 하에 있도록 폴리뉴클레오티드 또는 관심의 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, 관심의 1 개의 폴리뉴클레오티드, 관심의 2 개의 폴리뉴클레오티드, 등)의 삽입에 대한 다수의 제한 부위와 함께 제공된다. 본 발명의 특정 구현예에서, 이동하고자 하는 폴리뉴클레오티드는 2 개 이상의 발현 카세트를 포함하고, 이들 각각은 관심의 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0084] "발현 조절 요소"는 RNA 폴리머라아제 II, 또는 일부 구현예에서, 특정 코딩 서열에 대한 적합한 전사 개시 부위에서 RNA 합성을 개시하는 RNA 폴리머라아제 III를 유도할 수 있는 TATA 박스를 통상 포함하는 DNA의 조절 영역으로 의도된다. 발현 조절 요소는 전사 개시 속도에 영향을 주는 (예를 들어, 향상시키는) 일반적으로 TATA 박스에 대해 업스트림 또는 5'에 위치한 다른 인지 서열을 부가적으로 포함할 수 있다. 게다가, 발현 조절 요소는 전사 개시 속도에 영향을 주는 (예를 들어, 향상시키는) 일반적으로 TATA 박스의 다운스트림 또는 3'에 위치한 서열을 부가적으로 포함할 수 있다.

[0085] 전사 개시 영역 (예를 들어, 프로모터)은 마이크로조류 숙주 또는 좀개구리밥 식물에 대해 고유 또는 상동 또는 외래 또는 이종일 수 있고, 또는 천연 서열 또는 합성 서열일 수 있다. 외래의 것으로는, 전사 개시 영역이 전사 개시 영역이 도입되는 야생형 마이크로조류 숙주 또는 좀개구리밥 식물에서 발견되지 않는 것으로 의도된다. "작용 프로모터"는 프로모터가 NDV HN 폴리펩티드, 또는 이의 분절 또는 변이체를 코딩하는 서열에 작동가능하게 연결되었을 때 코딩된 폴리펩티드, 분절, 또는 변이체의 발현 (즉, 전사 및 번역)을 유도할 수 있는 것으로 의도된다. 프로모터는 원하는 결과에 근거하여 선택될 수 있다. 그러므로, 본 발명의 발현 카세트는 미세조류 또는 좀개구리밥에서 발현을 위한 구성요소적, 유도가능한, 조직-바람직한, 또는 또는 기타 프로모터를 포함할 수 있다.

[0086] 당업계에 알려진 임의의 적합한 프로모터는 박테리아, 효모, 진균, 곤충, 포유류, 조류 및 식물 프로모터를 비롯하여 본 발명에 따른 발현 카세트에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 미세조류 프로모터를 비롯한 식물 또는 조류 프로모터가 사용될 수 있다. 예시적 프로모터에는 콜리플라워 모자이크 바이러스 (Cauliflower Mosaic Virus) 35S 프로모터, 오펀 합성효소 프로모터 (예를 들어, nos, mas, ocs, 등), 유비퀴틴 프로모터, 액틴 프로모터, 리볼로오스 비스포스페이트 (RubP) 카르복실라아제 소형 서브유닛 프로모터, 및 알코올 디히드로게나아제 프로모터가 포함되나 이에 제한되지 않는다. 미국 특허 번호 7,001,772에는 아세토락테이트 합성효소, 아세토락테이트 합성효소 프로모터 및 터미네이터 영역,  $\alpha$ -튜불린 프로모터, 트라우스토카이트리알레스 (*Thraustochytriales*) 폴리케티드 합성효소 (PKS) 시스템으로부터의 프로모터, 및 각각 트라우스토카이트리알레스 (*Thraustochytriales*) 미생물로부터의 지방산 불포화화효소 프로모터에 대한 핵산 및 아미노산 서열이 기재되어 있다. 미국 특허 출원 공개 US2006/0275904 및 US2006/0286650에는 스퀴조카이트리움 (*Schizochytrium*) 액틴, 신장 인자 1 알파 및 글리세르알데히드 3-포스페이트 디히드로게나아제 각각에 대한 프로모터 및 터미네이터 뿐 아니라 이들의 스퀴조카이트리움 숙주 세포에서의 발현 유전자에 대한 벡터에서의 용도가 기재되어 있다. 미세조류 RubP 카르복실라아제 소형 서브유닛 프로모터는 당업계에 공지되어 있다 (Silverthorne et al. (1990) *Plant Mol. Biol.* 15:49). 식물 또는 조류를 감염시키는 바이러스로부터의

다른 프로모터는 또한 타로토란 (Dasheen) 모자이크 바이러스, 콜레라 (Chlorella) 바이러스 (예를 들어, 콜레라 (Chlorella) 바이러스 아데닌 메틸트랜스페라아제 프로모터; Mitra et al. (1994) *Plant Mol. Biol.* 26:85), 토마토 반점 시듭 바이러스, 담배 얼룩 바이러스, 담배 괴사 바이러스, 담배 고리반점 바이러스, 토마토 고리반점 바이러스, 오이 모자이크 바이러스, 땅콩 그루터기 바이러스, 알팔파 모자이크 바이러스, 사탕수수 바실리형태 바드나바이러스 등으로부터 단리된 프로모터를 포함하나 이에 제한되지 않는 것이 적합하다.

[0087] 프로모터를 포함하는 발현 조절 요소는 원하는 조절 수준을 제공하기 위해 선택될 수 있다. 예를 들어, 일부 예에서, 구성요소 발현 (예를 들어, 아그로박테리움 투메파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*)로부터의 만노핀 합성효소 프로모터)를 부여하는 프로모터를 사용하는 것이 유리할 수 있다. 대안적으로는, 다른 경우에서, 특정 환경 자극 (예를 들어, 열 쇼크 유전자 프로모터, 가뭄-유도성 유전자 프로모터, 병원균-유도성 유전자 프로모터, 상처-유도성 유전자 프로모터, 및 광/암-유도성 유전자 프로모터) 또는 식물 성장 조절자 (예를 들어, 아브시스산, 옥신, 사이토카인 및 지베렐린산에 의해 유도되는 유전자로부터의 프로모터)에 대한 반응에서 활성인 프로모터를 사용하는 것이 유리할 수 있다. 추가의 대안으로서, 프로모터는 조직-특이적 발현 (예를 들어, 뿌리, 잎 및 꽃-특이적 프로모터)를 산출하도록 선택될 수 있다.

[0088] 제시된 프로모터의 전반적인 강도는 업스트림 활성화 서열과 같은 시스-작용 뉴클레오티드 서열의 조합 및 공간 조직에 의해 영향을 받을 수 있다. 예를 들어, 아그로박테리움 투메파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*) 옥토핀 합성효소 유전자로부터 유래된 활성화 뉴클레오티드 서열은 아그로박테리움 투메파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*) 만노핀 합성효소 프로모터 (U.S. Patent 5,955,646 참조)로부터의 전사를 향상시킬 수 있다. 본 발명에서, 발현 카세트는 관심의 항원성 NDV 폴리펩티드, 또는 이의 분절 또는 변이체의 발현을 향상시키는 프로모터 서열의 업스트림에 삽입된 활성화 뉴클레오티드 서열을 함유할 수 있다. 하나의 구현예에서, 발현 카세트에는 아그로박테리움 투메파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*) 만노핀 합성효소 유전자 (U.S Patent 5,955,646 참조)로부터 유도된 프로모터에 작동가능하게 연결된 아그로박테리움 투메파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*) 옥토핀 합성효소 유전자로부터 유도된 3 개의 업스트림 활성화 서열을 포함한다.

[0089] 그러므로 발현 카세트에는 전사의 5'-3' 방향으로, 전사 및 번역 개시 영역, NDV HN 폴리펩티드 (또는 이의 분절 또는 변이체)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 식물 또는 조류에서 기능적인 전사 및 번역 종결 영역을 포함하는 발현 조절 요소를 포함하는 것이 포함된다. 당업계에 공지된 임의의 적합한 종결 서열이 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 종결 영역은 전사 개시 영역이 있는 고유의 것일 수 있거나, 관심의 코딩 서열이 있는 고유의 것일 수 있거나, 또는 또 다른 기원으로부터 유래될 수 있다. 편리한 종결 영역은 옥토핀 합성효소 및 노팔린 합성효소 종결 영역과 같은 A. 투메파시엔스 (*A. tumefaciens*)의 Ti-플라스미드로부터 이용가능하다. 또한 문헌 [Guerineau et al. (1991) *Mol. Gen. Genet.* 262:141; Proudfoot (1991) *Cell* 64:671; Sanfacon et al. (1991) *Genes Dev.* 5:141; Mogen et al. (1990) *Plant Cell* 2:1261; Munroe et al. (1990) *Gene* 91:151; Ballas et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:7891; 및 Joshi et al. (1987) *Nucleic Acids Res.* 15:9627] 을 참조한다. 부가적인 예시적 종결 서열은 완두콩 RubP 카르복실라아제 소형 서브유닛 종결 서열 및 콜리플라워 모자이크 바이러스 (Cauliflower Mosaic Virus) 35S 종결 서열이다.

[0090] 일반적으로, 발현 카세트는 형질전환된 미세조류 세포 또는 조직의 선별을 위한 선별 마커 유전자를 포함할 것이다. 선별 마커 유전자에는 항생제 저항성을 코딩하는 유전자, 예컨대 네오마이신 포스포트랜스페라아제 II (NEO) 및 하이그로마이신 포스포트랜스페라아제 (HPT)를 코딩하는 유전자, 뿐 아니라 제초제 화합물에 대한 저항성을 부여하는 유전자가 포함된다. 제초제 저항성 유전자는 일반적으로 제초제에 비민감한 개질된 표적 단백질에 대해 또는 식물에서 제초제를 작용하기 전에 분해하거나 해독하는 효소에 대해 코딩한다. 문헌 [DeBlock et al. (1987) *EMBO J.* 6:2513; DeBlock et al. (1989) *Plant Physiol.* 91:691; Fromm et al. (1990) *BioTechnology* 8:833; Gordon-Kamm et al. (1990) *Plant Cell* 2:603] 을 참조한다. 예를 들어, 글리포스페이트 또는 술포닐우레아 제초제에 대한 저항성을 돌연변이 표적 효소, 5-에놀피루빌쉬카메이트-3-포스페이트 합성효소 (EPSPS) 및 아세토락테이트 합성효소 (ALS)에 대한 코딩 유전자를 사용하여 수득된다. 글루포시네이트 암모늄, 보로목시닐, 및 2,4-디클로로페녹시아세테이트 (2,4-D)에 대한 저항성은 각각의 제초제를 해독하는, 포스피노트리신 아세틸트랜스페라아제, 니트릴라아제, 또는 2,4-디클로로페녹시아세테이트 모노옥시게나아제를 코딩하는 박테리아 유전자를 사용하여 수득되었다.

[0091] 본 발명의 목적을 위해, 선별 마커 유전자에는 네오마이신 포스포트랜스페라아제 II (Fraley et al. (1986) *CRC Critical Reviews in Plant Science* 4:1); 신나미드 히드라타아제 (Maier-Greiner et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4250); 아세토락테이트 합성효소 (ALS, Li, et al. (1992) *Plant Physiol.* 100:662-668);

아스파테이트 키나아제; 디히드로디페롤리네이트 합성효소 (Perl et al. (1993) *BioTechnology* 11:715); bar 유전자 (Toki et al. (1992) *Plant Physiol.* 100:1503; Meagher et al. (1996) *Crop Sci.* 36:1367); 트립토판데카르복실라아제 (Goddijn et al. (1993) *Plant Mol. Biol.* 22:907); 네오마이신 포스포트랜스페라아제 (NEO; Southern et al. (1982) *J. Mol. Appl. Gen.* 1:327); 하이그로마이신 포스포트랜스페라아제 (HPT 또는 HYG; Shimizu et al. (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6:1074); 디히드로폴레이트 리덕타아제 (DHFR; Kwok et al. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:4552); 포스피노트리신 아세틸트랜스페라아제 (DeBlock et al. (1987) *EMBO J.* 6:2513); 2,2-디클로로프로파온산 데할로게나아제 (Buchanan-Wollatron et al. (1989) *J. Cell. Biochem.* 13D:330); 아세토히드록시산 합성효소 (U.S. Pat. No. 4,761,373; Haughn et al. (1988) *Mol. Gen. Genet.* 221:266); 5-에놀피루빌-쉬카메이트-포스페이트 합성효소 (aroA; Comai et al. (1985) *Nature* 317:741); 할로아릴니트릴라아제 (WO 87/04181); 아세틸-조효소 A 카르복실라아제 (Parker et al. (1990) *Plant Physiol.* 92:1220); 디히드로프테로에이트 합성효소 (sulI; Guerineau et al. (1990) *Plant Mol. Biol.* 15:127); 및 32 kDa 포토시스템 II 폴리펩티드 (psbA; Hirschberg et al. (1983) *Science* 222:1346 (1983) 를 코딩하는 유전자를 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0092] 또한 포함되는 것은 젠타마이신 (예를 들어, aacC1, Wohlleben et al. (1989) *Mol. Gen. Genet.* 217:202-208); 클로르암페니콜 (Herrera-Estrella et al. (1983) *EMBO J.* 2:987); 메토트렉세이트 (Herrera-Estrella et al. (1983) *Nature* 303:209; Meijer et al. (1991) *Plant Mol. Biol.* 16:807); 하이그로마이신 (Waldron et al. (1985) *Plant Mol. Biol.* 5:103; Zhijian et al. (1995) *Plant Science* 108:219; Meijer et al. (1991) *Plant Mol. Biol.* 16:807); 스트렙토마이신 (Jones et al. (1987) *Mol. Gen. Genet.* 210:86); 스펙티노마이신 (Bretagne-Sagnard et al. (1996) *유전자도입 Res.* 5:131); 블레오마이신 (Hille et al. (1986) *Plant Mol. Biol.* 7:171); 술폰아미드 (Guerineau et al. (1990) *Plant Mol. Biol.* 15:127); 브로목시닐 (Stalker et al. (1988) *Science* 242:419); 2,4-D (Streber et al. (1989) *BioTechnology* 7:811); 포스피노트리신 (DeBlock et al. (1987) *EMBO J.* 6:2513); 스펙티노마이신 (Bretagne-Sagnard and Chupeau, *유전자도입 Research* 5:131)에 대한 저항성을 코딩하는 유전자이다.

[0093] bar 유전자는 글루포시네이트-유형 제초제, 예컨대 포스피노트리신 (PPT) 또는 비알라포스 등에 대해 제초제 저항성을 부여한다. 상기 명시된 바와 같이, 벡터 구축물에 사용될 수 있는 다른 선별가능한 마커에는 또한 비알라포스 및 포스피노트리신 저항성을 위한 pat 유전자, 이미다졸리논 저항성을 위한 ALS 유전자, 하이그로마이신 저항성을 위한 HPH 또는 HYG 유전자, 글리포세이트 저항성을 위한 EPSP 합성효소 유전자, Hc-독소에 대한 저항성을 위한 Hm1 유전자, 및 당업자에게 정규적으로 사용되고 알려진 기타 선별제가 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 문헌 [Yarranton (1992) *Curr. Opin. Biotech.* 3:506; Chistopherson et al. (1992) *PNAS USA* 89:6314; Yao et al. (1992) *Cell* 71:63; Reznikoff (1992) *Mol. Microbiol.* 6:2419; Barkley et al. (1980) *The Operon* 177-220; Hu et al. (1987) *Cell* 48:555; Brown et al. (1987) *Cell* 49:603; Figge et al. (1988) *Cell* 52:713; Deuschle et al. (1989) *PNAS USA* 86:5400; Fuerst et al. (1989) *PNAS USA* 86:2549; Deuschle et al. (1990) *Science* 248:480; Labow et al. (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10:3343; Zambretti et al. (1992) *PNAS USA* 89:3952; Baim et al. (1991) *PNAS USA* 88:5072; Wyborski et al. (1991) *Nuc. Acids Res.* 19:4647; Hillenand-Wissman (1989) *Topics in Mol. And Struc. Biol.* 10:143; Degenkolb et al. (1991) *Antimicrob. Agents Chemother.* 35:1591; Kleinschmidt et al. (1988) *Biochemistry* 27:1094; Gatz et al. (1992) *Plant J.* 2:397; Gossen et al. (1992) *PNAS USA* 89:5547; Oliva et al. (1992) *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:913; Hlavka et al. (1985) *Handbook of Experimental Pharmacology* 78; 및 Gill et al. (1988) *Nature* 334:721] 을 참조한다.

[0094] 선별 마커 유전자의 상기 목록은 제한인 것으로 의미되지 않는다. 임의의 선별 마커 유전자가 본 발명에서 사용될 수 있다.

#### 미세조류 속주 또는 좀개구리밥 식물에서의 향상된 발현을 위한 뉴클레오티드 서열의 개질

[0095] NDV HN 폴리펩티드 또는 이의 절편 또는 변이체가 미세조류 또는 좀개구리밥 내에서 발현되는 경우, NDV HN 폴리펩티드 또는 이의 절편 또는 변이체를 코딩하는 발현된 폴리뉴클레오티드 서열은 미세조류에서의 발현을 향상시키기 위해 개질될 수 있다. 하나의 이러한 개질은 식물- 또는 조류-바람직한 코돈, 특히 미세조류-바람직한 코돈을 사용하는 폴리뉴클레오티드의 합성이다. 방법은 식물- 또는 조류-바람직한 코돈이 있는 뉴클레오티드 서열을 합성하기 위해 당업계에서 이용가능하다. 예를 들어, [미국 특허 5,380,831 및 5,436,391; EP 0 359 472; EP 0 385 962; WO 91/16432; Perlak et al. (1991) *PNAS USA* 15:3324; Iannacome et al. (1997) *Plant Mol. Biol.* 34:485; 및 Murray et al. (1989) *Nucleic Acids. Res.* 17:477] 을 참조한다. 합성은

당업자에게 알려진 임의의 방법을 사용해 달성될 수 있다. 바람직한 코돈은 미세조류에서 발현된 단백질에서 최고 빈도의 코돈으로부터 결정될 수 있다. 예를 들어, 미세조류에 대한 코돈 사용 빈도는 표 A에 나열된다.

[0097] 표 A 스퀴조카이트리움 종 ATCC\_20888 [gbpIn]: 3 CDS's (6473 코돈)

장: [삼중선] [빈도: 천 회당] ([수])					
UUU 12.2(79)	UCU 7.0(45)	UAU 1.1(7)	UGU 0.8(5)		
UUC 19.9(129)	UCC 23.8(154)	UAC 21.5(139)	UGC 15.3(99)		
UUA 0.0(0)	UCA 0.5(3)	UAA 0.5(3)	UGA 0.0(0)		
UUG 0.6(4)	UCG 18.8(122)	UAG 0.0(0)	UGG 8.3(54)		
CUU 12.7(82)	CCU 11.7(76)	CAU 2.3(15)	CGU 7.1(46)		
CUC 61.2(396)	CCC 23.8(154)	CAC 12.8(83)	CGC 42.9(278)		
CUA 0.0(0)	CCA 1.5(10)	CAA 2.3(15)	CGA 0.3(2)		
CUG 7.4(48)	CCG 16.2(105)	CAG 27.7(179)	CGG 0.8(5)		
AUU 13.9(90)	ACU 9.1(59)	AAU 1.9(12)	AGU 1.5(10)		
AUC 33.5(217)	ACC 29.2(189)	AAC 32.4(210)	AGC 15.6(101)		
AUA 0.0(0)	ACA 1.5(10)	AAA 2.2(14)	AGA 0.2(1)		
AUG 27.8(180)	ACG 9.6(62)	AAG 54.5(353)	AGG 0.0(0)		
GUU 8.3(54)	GCU 24.4(158)	GAU 13.4(87)	GGU 13.0(84)		
GUC 53.0(343)	GCC 86.0(557)	GAC 45.0(291)	GGC 54.5(353)		
GUA 0.2(1)	GCA 4.0(26)	GAA 7.3(47)	GGA 3.9(25)		
GUG 14.4(93)	GCG 15.9(103)	GAG 62.3(403)	GGG 0.5(3)		

[0098] 본 발명의 목적을 위해, "미세조류-바람직한 코돈"은 17% 초파의 미세조류 내 코돈 사용 빈도를 갖는 코돈을 말한다. 본원에 기재된 바와 같은 "미세조류-바람직한 코돈"은 17% 초파의 트라우스토카이트리아세아에 (*Thraustochytriaeae*) 족 내 코돈 사용 빈도를 갖는 코돈을 말한다. 본원에 기재된 바와 같은 "스퀴조카이트리움 (*Schizochytrium*)-바람직한 코돈"은 17% 초파의 스퀴조카이트리움 내 코돈 사용 빈도를 갖는 코돈을 말하고, 스퀴조카이트리움 내 코돈 사용 빈도는 코돈 사용 데이터베이스 (Codon Usage Database) (GenBank Release 160.0, June 15, 2007)로부터 수득된다.

[0100] 램나 마이너 (*Lemna minor*)에 대한 코돈 사용 빈도는 표 B에 나열되고, 스퀴조카이트리움 (*Schizochytrium*)에 대한 코돈 사용 빈도는 표 C에 나열된다.

[0101]

표 B. 템나 마이너 [gbp1n]: 4 CDS's (1597 코돈)

장: [삼중선] [빈도: 천 회당] ([수])					
UUU 17.5(28)	UCU 13.8(22)	UAU 8.8(14)	UGU 5.0(8)		
UUC 36.3(58)	UCC 17.5(28)	UAC 15.7(25)	UGC 14.4(23)		
UUA 5.6(9)	UCA 14.4(23)	UAA 0.0(0)	UGA 1.9(3)		
UUG 13.8(22)	UCG 13.8(22)	UAG 0.6(1)	UGG 16.3(26)		
CUU 15.7(25)	CCU 11.9(19)	CAU 6.9(11)	CGU 4.4(7)		
CUC 25.7(41)	CCC 15.7(25)	CAC 16.9(27)	CGC 18.2(29)		
CUA 5.0(8)	CCA 11.3(18)	CAA 10.0(16)	CGA 6.3(10)		
CUG 21.3(34)	CCG 14.4(23)	CAG 22.5(36)	CGG 10.6(17)		
AUU 18.8(30)	ACU 9.4(15)	AAU 13.8(22)	AGU 10.0(16)		
AUC 19.4(31)	ACC 17.5(28)	AAC 21.9(35)	AGC 15.0(24)		
AUA 1.9(3)	ACA 5.0(8)	AAA 15.7(25)	AGA 20.7(33)		
AUG 20.7(33)	ACG 10.0(16)	AAG 35.7(57)	AGG 17.5(28)		
GUU 15.0(24)	GCU 25.0(40)	GAU 20.0(32)	GGU 8.1(13)		
GUC 25.0(40)	GCC 22.5(36)	GAC 26.3(42)	GGC 21.9(35)		
GUA 6.3(10)	GCA 14.4(23)	GAA 26.3(42)	GGA 16.9(27)		
GUG 30.7(49)	GCG 18.2(29)	GAG 40.1(64)	GGG 18.2(29)		

[0102]

표 C 스퀴조카이트리움 종 ATCC\_20888 [gbp1n]: 3 CDS's (6473 코돈)

장: [삼중선] [빈도: 천 회당] ([수])					
UUU 12.2(79)	UCU 7.0(45)	UAU 1.1(7)	UGU 0.8(5)		
UUC 19.9(129)	UCC 23.8(154)	UAC 21.5(139)	UGC 15.3(99)		
UUA 0.0(0)	UCA 0.5(3)	UAA 0.5(3)	UGA 0.0(0)		
UUG 0.6(4)	UCG 18.8(122)	UAG 0.0(0)	UGG 8.3(54)		
CUU 12.7(82)	CCU 11.7(76)	CAU 2.3(15)	CGU 7.1(46)		
CUC 61.2(396)	CCC 23.8(154)	CAC 12.8(83)	CGC 42.9(278)		
CUA 0.0(0)	CCA 1.5(10)	CAA 2.3(15)	CGA 0.3(2)		
CUG 7.4(48)	CCG 16.2(105)	CAG 27.7(179)	CGG 0.8(5)		
AUU 13.9(90)	ACU 9.1(59)	AAU 1.9(12)	AGU 1.5(10)		
AUC 33.5(217)	ACC 29.2(189)	AAC 32.4(210)	AGC 15.6(101)		
AUA 0.0(0)	ACA 1.5(10)	AAA 2.2(14)	AGA 0.2(1)		
AUG 27.8(180)	ACG 9.6(62)	AAG 54.5(353)	AGG 0.0(0)		
GUU 8.3(54)	GCU 24.4(158)	GAU 13.4(87)	GGU 13.0(84)		
GUC 53.0(343)	GCC 86.0(557)	GAC 45.0(291)	GGC 54.5(353)		
GUA 0.2(1)	GCA 4.0(26)	GAA 7.3(47)	GGA 3.9(25)		
GUG 14.4(93)	GCG 15.9(103)	GAG 62.3(403)	GGG 0.5(3)		

[0104]

[0105] 본 발명의 목적을 위해, "좀개구리밥-바람직한 코돈"은 17% 초과의 좀개구리밥 내 코돈 사용 빈도를 갖는 코돈을 말한다. 본원에 기재된 바와 같은 "렘나 (*Lemna*)-바람직한 코돈"은 17% 초과의 렘나 (*Lemna*) 속 내 코돈 사용 빈도를 갖는 코돈을 말한다. 본원에 기재된 바와 같은 "렘나 마이너 (*Lemna minor*)-바람직한 코돈"은 17% 초과의 렘나 마이너 내 코돈 사용 빈도를 갖는 코돈을 말하고, 렘나 마이너 내 코돈 사용 빈도는 코돈 사용 데이터베이스 (Codon Usage Database) (GenBank Release 160.0, June 15, 2007)로부터 수득된다.

[0106] 관심의 항원성 NDV 폴리펩티드, 또는 이의 분절 또는 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 모든 또는 일부분이 최적화 또는 합성될 수 있음이 추가로 인지된다. 즉, 완전히 최적화된 또는 부분적으로 최적화된 서열이 또한 사용될 수 있다. 예를 들어, 코돈의 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 87%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%가 미세조류-바람직한 또는 좀개구리밥-바람직한 코돈일 수 있다. 하나의 구현예에서, 코돈의 90% 내지 96%가 미세조류-바람직한 또는 좀개구리밥-바람직한 코돈이다. 하나의 구현예에서, NDV 폴리펩티드는 NDV HN 폴리펩티드, 예를 들어, SEQ ID NO:3 또는 15에 언급된 NDV HN 폴리펩티드이고, 발현 카세트는 상기 NDV HN 폴리펩티드에 대해 최적화된 코딩 서열을 포함하며, 코딩 서열은 미세조류-바람직한 코돈, 예를 들어, 트라우스토카이트리아세아에 (*Thraustochytriaaceae*)-바람직한 또는 스퀴조카이트리움 (*Schizochytrium*)-바람직한 코돈을 포함한다. 하나의 이러한 구현예에서, 발현 카세트는 SEQ ID NO:1 또는 14를 포함하고, 이것은 SEQ ID NO:3 또는 15에 언급된 HN 폴리펩티드를 코딩하는 스퀴조카이트리움-바람직한 코돈을 함유한다. 또다른 이러한 구현예에서, 발현 카세트는 SEQ ID NO:22 또는 23을 포함하고, 이것은 SEQ ID NO: 17, 또는 20에 언급된 HN 폴리펩티드를 코딩하는 스퀴조카이트리움-바람직한 코돈을 함유한다.

[0107] 다른 개질은 또한 미세조류에서의 이의 발현을 향상시키기 위해 관심의 항원성 NDV 폴리펩티드, 또는 이의 분절 또는 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 이뤄질 수 있다. 상기 개질은 또한 기생 폴리아데닐화 신호, 엑손-인트론 스플라이스 부위 서열, 트랜스포손-유사 반복, 및 유전자 발현에 유해할 수 있는 기타 이러한 잘 특징화된 서열을 코딩하는 서열의 제거를 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다. 가능한 경우, 관심의 이종 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 예상된 헤어핀 이차 mRNA 구조를 피하기 위해 개질될 수 있다.

[0108] 동물 및 식물에서의 번역 개시 코돈에 대한 최적 번역 개시 문맥뉴클레오티드 서열 사이에는 알려진 차이가 있다. 본원에 사용된 바와 같은 "번역 개시 문맥 뉴클레오티드 서열"은 번역 개시 코돈의 5' 방향의 3 개의 뉴클레오티드의 확인을 말한다. "번역 개시 코돈"은 관심의 뉴클레오티드 서열로부터 전사된 mRNA의 번역을 개시하는 코돈을 말한다. 상기 번역 개시 문맥 뉴클레오티드 서열의 조성은 번역 개시의 효율에 영향을 줄 수 있다. 예를 들어, Lukaszewicz et al. (2000) *Plant Science* 154:89-98; 및 Joshi et al. (1997); *Plant Mol. Biol.* 35:993-1001을 참조한다. 본 발명에서, 관심의 항원성 NDV 폴리펩티드, 또는 이의 분절 또는 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 번역 개시 코돈에 대한 번역 개시 문맥 뉴클레오티드 서열은 미세조류에서 발현을 향상시키기 위해 개질될 수 있다. 하나의 구현예에서, 뉴클레오티드 서열은 번역 개시 코돈의 업스트림 방향의 3 개의 뉴클레오티드가 "ACC" 이도록 개질된다. 두번째 구현예에서, 상기 뉴클레오티드는 "ACA"이다.

[0109] 미세조류 또는 좀개구리밥 내의 항원성 NDV 폴리펩티드의 발현은 또한 5' 리더 서열의 사용에 의해 향상될 수 있다. 이러한 리더 서열은 번역을 향상시키기 위해 작용할 수 있다. 번역 리더는 당업계에 알려져 있고, 피코르나바이러스 리더, 예를 들어, EMCV 리더 (Encephalomyocarditis 5' 비-코딩 영역; Elroy-Stein et al. (1989) *PNAS USA* 86:6126); 포티바이러스 리더, 예를 들어, TEV 리더 (Tobacco Etch Virus; Allison et al. (1986) *Virology* 154:9); 인간 면역글로불린 중쇄 결합 단백질 (BiP; Macajak and Sarnow (1991) *Nature* 353:90); 알팔파 모자이크 바이러스의 코트 단백질 mRNA로부터의 미번역된 리더 (AMV RNA 4; Jobling and Gehrke (1987) *Nature* 325:622); 담배 모자이크 바이러스 리더 (TMV; Gallie (1989) *Molecular Biology of RNA*, 23:56); 감자 부식 바이러스 리더 (Tomashevskaya et al. (1993) *J. Gen. Virol.* 74:2717-2724); Fed-1 5' 미번역된 영역 (Dickey (1992) *EMBO J.* 11:2311-2317); RbcS 5' 미번역된 영역 (Silverthorne et al. (1990) *J. Plant. Mol. Biol.* 15:49-58); 및 옥수수 위황 반점 바이러스 리더 (MCMV; Lommel et al. (1991) *Virology* 81:382)가 포함되나 이에 제한되지 않는다. 또한 문헌, Della-Cioppa et al. (1987) *Plant Physiology* 84:965을 참조한다. 옥수수 알코올 디히드로게나아제 1 (ADH1) 유전자, 아주까리 카탈라아제 유전자, 또는 아라비돕시스 (*Arabidopsis*) 트립토판 경로 유전자 PAT1로부터의 인트론 서열을 포함하는 식물 인트론 서열을 포함하는 리더 서열은 또한 식물에서 번역 효율을 증가시키는 것으로 제시되었다 (Callis et al. (1987) *Genes Dev.* 1:1183-1200; Mascarenhas et al. (1990) *Plant Mol. Biol.* 15:913-920).

[0110] 본 발명의 일부 구현예에서, 옥수수 알코올 디히드로게나아제 1 유전자 (ADH1; GenBank Accession Number

X04049) 의 뉴클레오티드 1222-1775 에 상응하는 뉴클레오티드 서열은 번역 효율을 향상시키기 위해 NDV HN 폴리펩티드, 또는 이의 분절 또는 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 업스트림에 삽입된다. 또 다른 구현 예에서, 발현 카세트는 렘나 (Lemna) 지바 리불로오스-비스-포스페이트 카르복실라아제 소형 서브유닛 5B 유전자로부터의 리더를 함유한다 (RbcS 리더; Buzby et al. (1990) *Plant Cell* 2:805-814 참조).

[0111] 임의의 단일 개질 또는 임의의 가능한 개질 조합을 비롯하여 상기 기재된 발현-향상 뉴클레오티드 서열 개질 중 임의의 것은 본 발명에 사용될 수 있는 것이 인지된다. 본원에 기재된 바와 같이 미세조류 또는 좀개구리밥에서 "향상된 발현을 위해 개질됨" 이라는 구절은 상기 개질의 임의의 하나 또는 임의의 조합을 함유하는 폴리뉴클레오티드 서열을 말한다.

#### 신호 웨პ티드.

[0113] 관심의 NDV 폴리펩티드는 분비된 단백질로서 정상적으로 또는 유리하게 발현될 수 있다. 분비된 단백질은 통상적으로, 성장하는 폴리펩티드 사슬의 전위 (translocation) 를 막을 건너 그리고 세포로부터 분비를 위해 소포체 내로 이동시키기 위한 소포체 (ER) 의 막 상의 수용체 단백질과 상호작용하는 "신호 웨პ티드" 가 포함되는 전구체 폴리펩티드로부터 통상적으로 번역된다. 상기 신호 웨პ티드는 신호 웨პ티드가 결핍된 "성숙" 폴리펩티드를 생성하기 위해 전구체 폴리펩티드로부터 분할될 수 있다. 신호 웨პ티드는 분할될 수 없고, 신호 웨პ티드를 포함하는 전체 폴리펩티드는 세포로부터 분비된다. 본 발명의 구현예에서, NDV HN 폴리펩티드, 또는 이의 분절 또는 변이체는 NDV HN 폴리펩티드, 또는 이의 분절 또는 변이체의 분비를 배양 배지 내로 지시하는 신호 웨პ티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드 서열로부터 미세조류 또는 좀개구리밥에서 발현된다. 소포체 (세포의 외부 분비를 위해) 로 단백질 전위를 표적하는 식물 또는 조류 신호 웨პ티드가 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, U.S. Patent No. 6,020,169 를 참조한다. 본 발명에서, 임의의 식물 또는 조류 신호 웨პ티드는 발현된 폴리펩티드를 ER 로 표적하는데 사용될 수 있다.

[0114] 일부 구현예에서, 신호 웨პ티드는 아라비돕시스 탈리아나 (*Arabidopsis thaliana*) 염기성 엔도키티나아제 신호 웨პ티드 (NCBI 단백질 접근 번호 BAA82823 의 아미노산 14-34), 엑스텐신 신호 웨პ티드 (Stiefel et al. (1990) *Plant Cell* 2:785-793), 쌀  $\alpha$ -아밀라아제 신호 웨პ티드 (NCBI 단백질 접근 번호 AAA33885 의 아미노산 1-31; 또한 GenBank M24286 참조) 이다. 또 다른 구현예에서, 신호 웨პ티드는 분비된 미세조류 단백질의 신호 웨პ티드에 상응한다.

[0115] 하나의 구현예에서, 본 발명의 신호 웨პ티드는 SEQ ID NO:13 (SEQ ID NO:12 에 언급된 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩됨), 또는 SEQ ID NO:21 (SEQ ID NO:27 에 언급된 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩됨) 에 언급된 NDV HN 신호 웨პ티드이다. 바이러스 기원의 NDV HN 신호 웨პ티드는 미세조류에서 NDV 단백질의 발현에서 놀라운 결과를 보여주었으며, 이것은 세포로부터 분비를 위해 막을 가로지르고 소포체 내로 폴리펩티드 사슬의 전위를 지시한다.

[0116] 대안적으로는, 포유류 신호 웨პ티드는 미세조류로부터의 분비를 위해 재조합으로 생성된 항원성 NDV 폴리펩티드를 표적하는데 사용될 수 있다. 식물 세포가 소포체에 표적하는 포유류 신호 웨პ티드를 인지하고, 상기 신호 웨პ티드가 원형질 막을 통해서 뿐 아니라 식물 세포벽을 통해서 폴리펩티드의 분비를 지시할 수 있다는 것이 입증되었다. 미국 특허 번호 5,202,422 및 5,639,947 을 참조한다.

[0117] 하나의 구현예에서, 신호 웨პ티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 관심의 폴리뉴클레오티드 서열에 대해 상기 기재된 임의의 개질 또는 개질의 조합을 이용하는, 미세조류에서의 향상된 발현에 대해 개질된다.

[0118] 분비된 NDV HN 폴리펩티드, 또는 이의 분절 또는 변이체는 크로마토그래피, 전기영동, 투석, 용매-용매 추출, 등을 포함하나 이에 제한되지 않는 당업계에 공지된 임의의 통상적인 수단에 의해 배양 배지로부터 수확될 수 있다. 이렇게 함으로써, 부분적으로 또는 실질적으로 정제된 항원성 NDV 폴리펩티드, 또는 이의 분절 또는 변이체가 배양 배지로부터 수득될 수 있다.

#### 형질전환된 미세조류 또는 좀개구리밥

[0120] 본 발명은 NDV HN 폴리펩티드, 또는 이의 분절 또는 변이체를 발현하는 형질전환된 미세조류 또는 좀개구리밥 식물을 제공한다. "미세조류" 라는 용어는 트라우스토카이트리아세아에 (*Thraustochytriaaceae*) 족의 일원을 말한다. 상기 족은 현재 4 개의 속으로 나뉜다: 스퀴조카이트리움 (*Schizochytrium*), 트라우스토카이트리움 (*Thraustochytrium*), 라바린톨로이데스 (*Labyrinthuloides*), 및 자포노카이트리움 (*Japonochytrium*). 예시적 스퀴조카이트리움 (*Schizochytrium*) 에는 스퀴조카이트리움 아그레가툼 (*Schizochytrium aggregatum*), 스퀴조카이트리움 리막시눔 (*Schizochytrium limacinum*), 스퀴조카이트리움 종 (*Schizochytrium sp.*) (S31) (ATCC

20888), 스퀴조카이트리움 종 (*Schizochytrium sp.*) (S8) (ATCC 20889), 스퀴조카이트리움 (*Schizochytrium sp.*) (LC-RM) (ATCC 18915), 스퀴조카이트리움 종 (*Schizochytrium sp.*) (SR21) (ATCC 28209) 및 수탁된 스퀴조카이트리움 리마시눔 (*Schizochytrium limacinum*) 균주 IFO 32693 (Honda et Yokochi) 이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0121] 용어 "좀개구리밥"은 램나세아에 (*Lemnaceae*) 족의 일원을 말한다. 상기 족은 현재 하기와 같이 5개의 속 및 좀개구리밥의 38개의 종으로 나뉜다: 속 램나 (*Lemna*) (L. 아에퀴녹티알리스 (*L. aequinoctialis*), L. 디스페르마 (*L. disperma*), L. 에쿠아도리엔시스 (*L. ecuadoriensis*), L. 지바 (*L. gibba*), L. 자포니카 (*L. japonica*), L. 미노르 (*L. minor*), L. 미니스쿨라 (*L. miniscula*), L. 오브스쿠라 (*L. obscura*), L. 페르푸실라 (*L. perpusilla*), L. 테네라 (*L. tenera*), L. 트리술카 (*L. trisulca*), L. 투리오니페라 (*L. turionifera*), L. 발디비아나 (*L. valdiviana*)); 속 스피로델라 (*Spirodela*) (*S. 인테메디아* (*S. intermedia*), *S. 폴리리자* (*S. polyrrhiza*), *S. 퐁크타타* (*S. punctata*)); 속 울피아 (*Wolffia*) (*Wa. 안구스타* (*Wa. angusta*), *Wa. 아리자* (*Wa. arrhiza*), *Wa. 오우스트랄리나* (*Wa. australina*), *Wa. 보레알리스* (*Wa. borealis*), *Wa. 브라실리엔시스* (*Wa. brasiliensis*), *Wa. 콜롬비아나* (*Wa. columbiana*), *Wa. 엘론가타* (*Wa. elongata*), *Wa. 글로보사* (*Wa. globosa*), *Wa. 미크로스코피카* (*Wa. microscopica*), *Wa. 네글렉타* (*Wa. neglecta*)); 속 울피엘라 (*Wolfiella*) (*Wl. 카우다타* (*Wl. caudata*), *Wl. 덴티쿨라타* (*Wl. denticulata*), *Wl. 글라디아타* (*Wl. gladiata*), *Wl. 히알리나* (*Wl. hyalina*), *Wl. 린굴라타* (*Wl. lingulata*), *Wl. 레푼다* (*Wl. repunda*), *Wl. 로툰다* (*Wl. rotunda*), 및 *Wl. 네오토로피카* (*Wl. neotropica*)) 및 속 란돌티아 (*Landoltia*) (*L. 퐁타타* (*L. punctata*)). 램나 (*Lemna*) 종은 Landolt (1986) Biosystematic Investigation on the Family of Duckweeds: The family of Lemnaceae-A Monograph Study (Geobatanischen Institut ETH, Stiftung Rubel, Zurich)에 기재된 분류학 도식을 사용하여 분류될 수 있다.

[0122] 본원에 사용된 바와 같이, "식물"에는 전체 식물, 식물 기관 (예를 들어, 엽상체 (잎), 줄기, 뿌리 등), 종자, 식물 세포, 및 이의 자손이 포함된다. 유전자도입 식물은 관심의 폴리뉴클레오티드로 미리 형질전환된 유전자도입 식물 또는 이들의 자손으로부터 기원하여 형질도입 세포의 적어도 일부를 이를 수 있는 예를 들어, 식물 세포, 식물 원형질, 식물이 재생될 수 있는 식물 세포 조직 배양물, 조직, 식물 칼리 (calli), 배아 뿐 아니라 꽃, 배추, 줄기, 과일, 잎, 뿌리, 근단, 혹, 등을 포함하도록 본 발명의 범주 내에 있다고 이해된다.

[0123] 본 발명의 형질전환된 미세조류 또는 좀개구리밥 식물은 NDV HN 폴리펩티드, 또는 이의 분절 또는 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 구축물을, 관심의 미세조류 또는 좀개구리밥 식물 내로 도입함으로써 수득될 수 있다.

[0124] 폴리뉴클레오티드, 예를 들어, 항원성 NDV 폴리펩티드, 또는 이의 분절 또는 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 구축물의 문맥에서 용어 "~을 도입하는"는 폴리뉴클레오티드 습득물이 미세조류 또는 좀개구리밥의 세포의 내부에 접근하는 방식으로 폴리뉴클레오티드를 미세조류 또는 좀개구리밥 식물에 대해 제시하는 것으로 의도된다. 1개 초과의 폴리뉴클레오티드가 도입되는 경우, 상기 폴리뉴클레오티드는 단일 뉴클레오티드 구축물의 일부로서, 또는 개별 뉴클레오티드 구축물로서 어셈블리될 수 있고, 동일 또는 상이한 형질전환 벡터 상에 위치할 수 있다. 따라서, 상기 폴리뉴클레오티드는 단일 형질전환 사건으로, 개별 형질전환 사건으로, 또는, 예를 들어, 육종 프로토콜의 일부로서 관심의 미세조류 또는 좀개구리밥 숙주 세포 내로 도입될 수 있다. 본 발명의 조성물 및 방법은 폴리뉴클레오티드(들) 습득물이 미세조류 또는 좀개구리밥 식물의 하나 이상의 세포의 내부에 접근하는 것을 제외하고는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 미세조류 내로 도입하는 특정 방법에 의존하지 않는다. 폴리뉴클레오티드의 식물 또는 조류 내로의 도입 방법은 일시적 형질전환 방법, 안정적 형질전환 방법, 및 바이러스-매개 방법을 포함하나 이에 제한되지 않고 당업계에 공지된다.

[0125] NDV HN 폴리펩티드, 또는 이의 분절 또는 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드와 같은 폴리뉴클레오티드의 문맥에서 "일시적 형질전환"은 폴리뉴클레오티드가 미세조류 또는 좀개구리밥 내로 도입되고, 미세조류 또는 좀개구리밥의 계놈 내로 통합되지 않은 것을 의미하는 것으로 의도된다.

[0126] 미세조류 또는 좀개구리밥 내에 도입된 폴리뉴클레오티드의 문맥에서 (예컨대 NDV HN 폴리펩티드, 또는 이의 분절 또는 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드) "안정하게 도입되는" 또는 "안정하게 도입된"은 도입된 폴리뉴클레오티드가 미세조류 또는 좀개구리밥 계놈 내에 안정하게 포함되고, 그러므로 미세조류 또는 좀개구리밥 식물이 폴리뉴클레오티드로 안정하게 형질전환된 것으로 의도된다.

[0127] "안정한 형질전환" 또는 "안정하게 형질전환된"은 미세조류 또는 좀개구리밥 식물 내에 도입된 폴리뉴클레오티드, 예를 들어, NDV HN 폴리펩티드, 또는 이의 분절 또는 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 미세조류 또는

식물의 계놈 내로 통합되고 이의 자손에 의해, 더욱 특히, 다중 연속 세대의 자손에 의해 유전될 수 있는 것으로 의도된다. 일부 구현예에서, 연속 세대는 영양적으로 (즉, 무성 생식), 예를 들어, 클론 증식으로 생성된 자손을 포함한다. 다른 구현예에서, 연속 세대는 유성 생식을 통해 변식된 자손을 포함한다.

[0128] NDV HN 폴리펩티드, 또는 이의 분절 또는 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 구축물은, 당업자에게 공지된 임의의 형질전환 프로토콜을 사용하여 관심의 미세조류 또는 식물 내로 도입될 수 있다. 뉴클레오티드 서열을 미세조류 또는 식물 세포 또는 혹내로 도입하는 적합한 방법에는 마이크로주사 (Crossway et al. (1986) *Biotechniques* 4:320-334), 전기천공 (Riggs et al. (1986) *PNAS USA* 83:5602-5606), 아그로박테리움 (*Agrobacterium*)-매개 형질전환 (U.S. Patent Nos. 5,563,055 및 5,981,840), 직접 유전자 수송 (Paszkowski et al. (1984) *EMBO J.* 3:2717-2722), 발리스틱 입자 가속 (예를 들어, U.S. Patent Nos. 4,945,050; 5,879,918; 5,886,244; 및 5,932,782 참조); 및 Tomes et al. (1995) "Direct DNA Transfer into Intact Plant Cells via Microprojectile Bombardment," *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture: Fundamental Methods*, ed. Gamborg and Phillips (Springer-Verlag, Berlin); McCabe et al. (1988) *Biotechnology* 6:923-926) 이 포함된다. 형질전환된 세포는 통상의 방식에 따른 식물 또는 조류 내에서 성장될 수 있다.

[0129] 상기 명시된 바와 같이, 안정하게 형질전환된 미세조류 또는 식물은 당업계에 공지된 임의의 유전자 수송 방법, 예컨대 U.S. Patent No. 6,040,498 또는 미국 특허 출원 공개 번호 2003/0115640, 2003/0033630 또는 2002/0088027에 기재된 유전자 수송 방법 중 하나에 의해 제조될 수 있다. 미세조류 또는 식물은 아그로박테리움 (*Agrobacterium*)-매개 유전자 수송, 발리스틱 폭격 또는 전기천공을 포함하는 다수의 방법 중 임의의 하나에 의해 본원에 기재된 바와 같은 혼산 서열을 함유하는 발현 카세트로 효과적으로 형질전환될 수 있다. 사용되는 아그로박테리움 (*Agrobacterium*)은 아그로박테리움 투메파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*) 또는 아그로박테리움 리조게네스 (*Agrobacterium rhizogenes*)일 수 있다. 안정한 미세조류 또는 식물 형질전환체는 관심의 혼산 서열 및 선별 작용제에 대한 저항성을 부여하는 유전자 모두로 미세조류 또는 식물 세포를 형질전환시킨 후, 선별 작용제를 함유하는 배지에서 형질전환된 세포를 배양함으로써 단리될 수 있다. 예를 들어, U.S. Patent No. 6,040,498을 참조한다.

[0130] 상기 방법에서 이용되는 안정하게 형질전환된 미세조류 또는 식물은 정상 형태학을 나타내고, 유성 생식에 의해 수정되고 및/또는 영양적으로 (즉, 무성 생식), 예를 들어, 클론 증식으로 재생될 수 있어야만 한다. 바람직하게는, 본 발명의 형질전환된 미세조류 또는 식물은 NDV HN 폴리펩티드, 또는 이의 분절 또는 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 수송된 혼산의 단일 카페를 함유하고, 수송된 혼산은 내부에 눈에 띄는 재배열을 갖지 않는다. 본 발명의 형질전환된 미세조류는 저 카페 수 (즉, 형질전환된 세포 당 혼산의 12개 이하의 카페, 8개 이하의 카페, 5개 이하의 카페, 대안적으로는, 3개 이하의 카페, 추가의 대안으로서, 3개 미만의 카페)로 존재하는 수송된 혼산을 함유할 수 있는 것으로 인지된다.

[0131] NDV HN 폴리펩티드, 또는 이의 분절 또는 변이체를 발현하는 형질전환된 식물 또는 조류는 NDV HN 폴리펩티드, 또는 이의 분절 또는 변이체를 발현하기 위한 적합한 조건 하에서 배양될 수 있다. NDV HN 폴리펩티드, 또는 이의 분절 또는 변이체는 이후 미세조류, 배양 배지, 또는 미세조류 및 배양 배지로부터 수확될 수 있고, 원한다면 임의의 크로마토그래피, 전기영동, 투석, 용매-용매 추출, 등을 포함하는, 당업계에 공지된 임의의 통상적인 단리 및 정제 방법을 사용하여 정제된다. NDV HN 폴리펩티드, 또는 이의 분절 또는 변이체는 본원에 그밖에 기재된 바와 같은 치료 적용을 위해 백신으로서 제형화될 수 있다.

#### NDV 폴리펩티드의 제조 방법

[0132] 본원에 완전히 기재된 바와 같이, 구현예에서, 재조합 NDV HN 폴리펩티드의 제조 방법은 하기 단계를 포함한다: (a) 미세조류 또는 좀개구리밥 식물을 미세조류 또는 좀개구리밥 배양 배지 내에서 배양하는 단계, 미세조류 또는 좀개구리밥 식물은 NDV 폴리펩티드를 발현하도록 안정적으로 형질전환되고, NDV 폴리펩티드는 상기 재조합 NDV 폴리펩티드에 대한 코딩 서열 및 배양 배지 내로 NDV 폴리펩티드의 분비를 지시하는 신호 웨프티드에 대한 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열로부터 발현됨; 및 (b) 상기 배양 배지로부터 NDV 폴리펩티드를 수집하는 단계. 수집이라는 용어는 배양 배지로부터의 수확 또는 정제를 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0134] 미세조류 또는 식물 중의 재조합 폴리펩티드의 제조 후, 당업계에서 이용가능한 임의의 방법이 단백질 정제를 위해 사용될 수 있다. 다양한 단계에는 비단백질 또는 조류 또는 식물로부터의 단백질의 유리 후, 다른 단백질로부터의 관심의 단백질의 정제가 포함된다. 재조합 단백질은 세포에 의한 이의 생성 후 배양 배지로부터

터 단리되는 분비된 단백질일 수 있고, 신호 펩티드를 포함할 수 있다. 상기 신호 펩티드는 분비 후에 분할되어, 성숙 단백질 생성물을 생성할 수 있다. 생성에 사용되는 벡터 및 숙주 시스템에 따라, 본 발명의 산출되는 재조합 NDV 폴리펩티드는 재조합 세포 내에 남아있거나 발효 배지 내로 분비되거나 또는 2 개의 세포막 사이에 공간 내로 분비될 수 있고; 또는 세포 막의 외부 표면 상에 남아있을 수 있다. 정제 과정 중의 초기 단계에는 원심분리, 여과 또는 이의 조합이 포함된다. 저속의 초기 원심분리 후, 저속 상청액은 약학 조성물 또는 백신 제조에 사용될 수 있다. 저속 상청액은 하기 기재된 다양한 방법을 사용하는 추가의 정제를 겪을 수 있다. 조직의 세포외 공간 내로 분비된 단백질은 진공 또는 원심분리 추출을 사용하여 수득될 수 있다. 최소 가공은 또한 미정제 생성물의 제조를 포함할 것이다. 다른 방법에는 추출물의 직접 사용을 허용하기 위한 해리 및 추출이 포함된다.

[0135] 본 발명의 방법에 의해 제조된 재조합 단백질은 원심분리, 여과, 친화성 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 전기영동, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 젤 여과 크로마토그래피, 역상 크로마토그래피, 콘카나발린 A 크로마토그래피, 크로마토포커싱 및 차등 가용화와 같은, 그러나 이에 제한되지 않는 다양한 표준 단백질 정제 기술을 사용하여 정제될 수 있다. 관심의 단백질의 정제 방법은 단백질 크기, 물리-화학적 특성, 및 결합 친화성의 차이를 활용할 수 있다. 이러한 방법에는 프로카인아미드 친화성, 크기 배제, 고압 액체, 역상, 및 음으온-교환 크로마토그래피, 친화성 태그 등을 포함하는 크로마토그래피가 포함된다. 특히, 부동화된 Ni-이온 친화성 크로마토그래피는 발현된 단백질을 정제하는데 사용될 수 있다. 문헌, Favacho et al. (2006) *Protein expression and purification* 46:196-203. See also, Zhou et al. (2007) *The Protein J* 26:29-37; Wang et al. (2006) *Vaccine* 15:2176-2185; 및 WO/2009/076778 을 참조한다. 보호제, 예컨대 삼투물질, 항산화제, 페놀성 산화 억제제, 프로테아제 억제제 등이 정제 과정에 사용될 수 있다.

#### [0136] 사용 방법 및 제조품

[0137] 본 발명은 하기 방법 구현예를 포함한다. 구현예에서, NDV 항원성 폴리펩티드(들) 또는 이의 분절 또는 변이체 및 약학적 또는 수의학적으로 허용 가능한 담체, 부형제, 또는 비허클을 포함하는 조성물을 동물에게 투여하는 것을 포함하는 동물의 백신화 방법이 기재된다. 상기 구현예의 하나의 양상에서, 동물은 조류 (새), 말, 개, 고양이, 또는 돼지이다.

[0138] 더욱 또다른 구현예에서, 백신 또는 조성물은 1 일령 이상의 닭에게 투여될 수 있다.

[0139] 본 발명의 하나의 구현예에서, 프라임-부스트 섭생이 사용될 수 있는데, 이는 하나 이상의 공통의 폴리펩티드, 항원, 에피토프 또는 면역원을 사용하는 하나 이상의 프라임 투여 및 하나 이상의 부스트 투여로 구성된다. 전형적으로는 프라임 투여에 사용되는 면역학적 조성물 또는 백신은 부스트로서 사용되는 것과 특성이 상이하다. 그러나, 동일한 조성물이 프라임 투여 및 부스트 투여로서 사용될 수 있음이 주지된다. 상기 투여 프로토콜은 "프라임-부스트"로 불린다.

[0140] 본 발명에서, 재조합 바이러스 벡터는 항원성 NDV 폴리펩티드 또는 이의 절편 또는 변이체를 코딩하는 NDV 코딩 서열 또는 이의 분절을 발현하는데 사용된다. 구체적으로는, 바이러스 벡터는 NDV 서열, 더욱 구체적으로는 항원성 폴리펩티드를 코딩하는 NDV HN 유전자 또는 이의 분절을 발현할 수 있다. 본원에 고려된 바이러스 벡터에는 폭스바이러스 [예를 들어, 백시니아 바이러스 또는 약독화된 백시니아 바이러스, 아비폭스 바이러스 또는 약독화된 아비폭스 바이러스 (예를 들어, 카나리아폭스, 계두, 구두 (dovepox), 구두 (pigeonpox), 메추라기폭스, ALVAC, TROVAC; 예를 들어, US 5,505,941, US 5,494,8070 참조), 라쿤폭스 바이러스, 돼지폭스 바이러스 등], 아데노바이러스 (예를 들어, 인간 아데노바이러스, 개 아데노바이러스), 헤르페스바이러스 (예를 들어, 개 헤르페스바이러스, 칠면조 헤르페스바이러스, 마렉 질환 (Marek's disease) 바이러스, 감염성 후두기판지염 바이러스, 고양이 헤르페스바이러스, 후두기판지염 바이러스 (ILTV), 소 헤르페스바이러스, 돼지 헤르페스 바이러스), 베클로바이러스, 레트로바이러스, 등이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 또다른 구현예에서, 아비폭스 발현 벡터는 카나리아폭스 벡터, 예컨대, ALVAC 일 수 있다. 더욱 또다른 구현예에서, 아비폭스 발현 벡터는 계두 벡터, 예컨대, TROVAC 일 수 있다. NDV 폴리펩티드, 항원, 에피토프 또는 면역원은 NDV HN 일 수 있다. 예를 들어, NDV HN 또는 F 를 포함하는 TROVAC 벡터는 US 7,144,578 및 US 2008/0188640 에 기재된 벡터일 수 있고, HN 및 F 를 포함하는 NDV 항원을 포함하는 ILTV 벡터는 US 6,306,400 및 US 6,153,199 에 기재된 벡터일 수 있다. 바이러스 벡터에서 발현하고자 하는 본 발명의 NDV 폴리펩티드 또는 항원은 특이적 폭스바이러스 프로모터, 예를 들어, 백시니아 프로모터 7.5 kDa (Cochran et al., 1985), 백시니아 프로모터 I3L (Riviere et al., 1992), 백시니아 프로모터 HA (Shida, 1986), 우두 프로모터 ATI (Funahashi et al., 1988), 백시니아 프로모터 H6 (Taylor et al., 1988b; Guo et al., 1989; Perkus et al.,

1989), 등의 조절 하에 삽입된다.

[0141] 본 발명의 프라임-부스트 프로토콜 또는 섭생의 또 다른 양상에서, 본 발명의 NDV 항원을 포함하는 조성물을 투여한 후 NDV 항원 및/또는 변이체 또는 이의 분절을 생체 내에서 포함 및 발현하는 재조합 바이러스 백터 또는 플라스미드 백터를 투여한다. 마찬가지로, 프라임-부스트 프로토콜은 재조합 바이러스 백터 또는 플라스미드 백터의 투여 후 본 발명의 재조합 NDV 항원의 투여를 포함할 수 있다. 일차 및 이차 투여 모두가 본 발명의 재조합 NDV 항원을 포함할 수 있다는 것이 추가로 명시된다. 그러므로, 본 발명의 재조합 NDV 항원은 바이러스 백터와 함께 임의의 순서로 투여될 수 있고 또는 대안적으로는 일차 및 이차 조성물 모두로서 단독으로 사용될 수 있다.

[0142] 본 발명의 프라임-부스트 프로토콜의 또 다른 양상에서, 본 발명의 NDV 항원을 포함하는 조성물을 투여한 후 NDV 항원을 포함하는 비활성화된 바이러스 조성물 또는 백신의 투여가 후속된다. 마찬가지로, 프라임-부스트 프로토콜은 비활성화된 바이러스 조성물 또는 백신의 투여를 포함할 수 있고, 본 발명의 재조합 NDV 항원의 투여가 후속된다. 일차 및 이차 투여 모두가 본 발명의 재조합 항원성 폴리펩티드를 포함할 수 있다는 것이 추가로 명시된다. 본 발명의 항원성 폴리펩티드는 비활성화된 바이러스 조성물 또는 백신과 함께 임의의 순서로 투여될 수 있고 또는 대안적으로는 일차 및 이차 조성물 모두로서 단독으로 사용될 수 있다.

[0143] 프라임-부스트 섭생은 하나 이상의 공통 폴리펩티드 및/또는 이의 변이체 또는 분절을 사용하는 하나 이상의 프라임-투여 및 하나 이상의 부스트 투여를 포함한다. 프라임-투여에 사용되는 백신은 후속 부스트 백신으로서 사용되는 것과 특성이 상이할 수 있다. 프라임-투여는 하나 이상의 투여를 포함할 수 있다. 유사하게는, 부스트 투여는 하나 이상의 투여를 포함할 수 있다.

[0144] 포유류인 표적 종에 대한 조성물의 투여량 부피, 예를 들어, 바이러스 백터에 기반한 조류 (새) 조성물의 투여량 부피 (예를 들어, 비-폭스바이러스-바이러스-백터-기반 조성물) 는 일반적으로 약 0.1 내지 약 2.0 ml, 약 0.1 내지 약 1.0 ml, 약 0.5 ml 내지 약 1.0 ml 이다.

[0145] 프라임-부스트 프로토콜에 사용되는 본 발명의 재조합 항원성 폴리펩티드를 포함하는 조성물은 약학적 또는 수의학적으로 허용가능한 비허클, 희석제 또는 부형제에 함유된다. 본 발명의 프로토콜은 NDV로부터 동물을 보호하고 및/또는 감염된 동물로부터 질환 전개를 보호한다.

[0146] 다양한 투여는 바람직하게는 1 내지 6 주 간격으로 실행된다. 하나의 구현예에 따르면, 연간 부스트가 또한 계획된다. 동물은 첫번째 투여 시점에 적어도 1 일령이다.

[0147] 백신의 효율은 NDV 의 약성 균주로 동물 (예컨대 새) 를 접종함으로써 최종 면역화 후 약 2 내지 4 주에 시험되었다. 동종 및 이종 균주 모두는 백신의 효율을 시험하기 위해 접종에 사용된다. 동물은 분무, 비강내, 안내, 기관내 및/또는 경구로 접종될 수 있다. 접종 바이러스는 투여 경로에 따라 약  $10^{5-8}$  EID<sub>50</sub> (부피) 일 수 있다. 예를 들어, 투여가 분무에 의한 경우, 바이러스 혼탁액은 약 1 내지 100  $\mu$ l 액적을 발생시키기 위해 연무되고, 투여가 비강내, 기관내 또는 구강인 경우, 접종 바이러스의 부피는 각각 약 0.5 ml, 1-2 ml, 및 5-10 ml 이다. 동물은 접종 후 14 일 동안 매일 임상적 징후, 예를 들어, 탈수 및 창백한 항문에 대해 관찰하였다. 또한, 동물 그룹을 안락사시키고 폐 및 늑막 출혈, 기관염, 기관지염, 세기관지염, 및 기관지폐렴의 병리학적 발견에 대해 평가하였다. 바이러스 단리를 위해 접종 후 모든 동물로부터 입인두 면봉표본을 수집하였다. 호흡 조직 내의 바이러스 항원의 존재 또는 부재는 정량적 실시간 역 전사효소 폴리미라아제 연쇄 반응 (qRT-PCR) 에 의해 평가될 수 있다. 접종 전 후에 혈액 샘플을 수집할 수 있고, NDV-특이적 항체의 존재에 대해 분석할 수 있다.

[0148] 당업자에게는 본원에 기재된 설명이 예로서 제시되며, 본 발명이 이에 제한되지 않는 것으로 이해되어야만 한다. 본원의 설명 및 당업계의 지식으로부터, 당업자는 투여 횟수, 투여 경로, 및 각각의 주사 프로토콜에 대해 사용되는 투여량을, 임의의 과도한 실험 없이 결정할 수 있다.

[0149] 본 발명은 본 발명에 따라 제조된 유효량의 치료 조성물의 동물에 대한 하나 이상의 투여를 계획한다. 동물은 남성 (수컷), 여성 (암컷), 임신 여성 (암컷) 및 신생아 (새끼) 일 수 있다. 상기 투여는 근육내 (IM), 피내 (ID) 또는 경피 (SC) 주사 또는 비강내 또는 경우 투여를 포함하나 이에 제한되지 않는 다양한 경로를 통해 이뤄질 수 있다. 본 발명에 따른 치료 조성물은 또한 바늘없는 장치 (예를 들어 Pigjet, Dermojet, Biojector, Avijet (Merial, GA, USA), Vetjet 또는 Vitajet 장치 (Bioject, Oregon, USA)) 에 의해 투여될 수 있다. 플라스미드 조성물의 투여를 위한 또 다른 접근법은 전기천공을 사용하는 것이다 (예를 들어,

Tollefson et al., 2002; Tollefson et al., 2003; Babiuk et al., 2002; PCT Application No. WO99/01158 참조). 또다른 구현예에서, 치료 조성물은 유전자 총 또는 금 입자 충격에 의해 동물에게 전달된다.

[0150] 하나의 구현예에서, 본원에 기재된 주제는 백신화 섭생 및 감염된 동물과 백신화된 동물 사이의 차이의 검출 방법 (DIVA) 을 제공한다.

[0151] "감염된 동물과 백신화된 동물의 차이" (DIVA) 를 가능하게 하는 전략은, 특히 개발도상국가에서 새의 대량 도살 및 결과적인 경제적 손해를 수반하지 않으면서 바이러스의 궁극적인 근절에 대한 가능한 해법으로서 앞당겨졌다 (Food and Agriculture Organization of the United (FAO) (2004). FAO, OIE & WHO Technical consultation on the Control of NDV. Animal health special report). 상기 전략은 살처분 방식을 포함하는 다른 통제 측정 실행을 허용하게 하는 감염된 무리를 확인하는 능력으로 백신화 (환경 중에 적은 바이러스) 의 이점을 갖는다. 무리 수준에서, 단순한 접근법은 각각의 백신화된 무리에서 비백신화된 채로 남아있는 보초역할의 새를 정규적으로 모니터링하는 것이나, 이것은 특히 큰 무리에서 보초역할의 새를 확인하는데 일부 관리 문제를 일으킬 수 있다. 대안으로서, 야외 노출에 대한 시험이 백신화된 새에 수행될 수 있다. 대안적으로는 오직 NDV HN 서브유닛 (단백질) 만을 함유하는 백신의 사용은 기존의 AGID 및 NP-또는 매트릭스-기반 ELISA 를 백신화된 새에서 감염을 검출하는데 사용할 수 있게 할 것이다.

[0152] 본 발명의 백신 또는 조성물의 사용은 아가 젤 면역화산법 또는 NP-기반 ELISA 와 같은 HA 이외의 NDV 단백질에 대항하는 항체 반응 검출을 목적으로 하는 이용가능한 진단 시험을 사용하여 백신화된 동물에서 NDV 감염의 검출을 가능하게 하는 것으로 본원에 기재된다. 본 발명의 백신 또는 조성물의 사용은 감염된 동물과 백신화된 동물 사이의 차이에 의해 (DIVA) 동물에서 감염의 검출을 가능하게 하는 것으로 본원에 기재된다. NP-기반 면역원성 검출 방법, 예컨대, NP-기반 ELISA 를 사용하여 동물에서 NDV 의 감염을 진단하기 위한 방법이 본원에 기재된다. 하나의 구현예에서, 본원에 기재된 주제는 하기 단계를 포함하는, 동물에서의 NDV 감염의 진단 방법에 관한 것이다: a) 핵단백질 (NP) 을 포함하는 고체 기질을 동물로부터 수득되는 샘플과 접촉시키는 단계; b) 고체 기질을 NP 에 대항하는 일클론 항체 (MAb) 와 접촉시키는 단계; 및 c) 고체 기질 상의 NP 에 의해 포획된 샘플에 대한 MAb 의 결합을 검출하는 단계, 음성 대조군에 대한 시험 샘플의 억제 백분율은 대상이 NDV 로 감염된 것을 나타내어, 대상에서의 NDV 감염을 진단함.

[0153] 본 발명의 또다른 구현예는 재조합 NDV HN 면역학적 조성물 또는 백신 및 동물에서 면역 반응을 도출하기 위한 유효량으로 전달 방법을 수행하기 위한 지침을 포함하는, 동물에서 NDV 에 대항하는 면역학적 또는 보호성 반응을 도출 또는 유도하는 방법을 수행하기 위한 키트이다.

[0154] 구현예에서, 본원에 기재된 주제는 재조합 NDV 면역학적 조성물 또는 백신, 또는 비활성화된 NDV 면역학적 조성물 또는 백신, 재조합 NDV 바이러스 조성물 또는 백신 중 임의의 것, 및 방법을 수행하기 위한 지침을 포함할 수 있는 면역 반응을 도출 또는 유도하는 방법을 수행하기 위한 키트에 관한 것이다.

[0155] 본 발명의 또다른 구현예는 본 발명의 NDV 항원을 포함하는 조성물 또는 백신 및 재조합 NDV 바이러스 면역학적 조성물 또는 백신, 및 동물에서 면역 반응을 도출하기 위한 유효량으로 전달 방법을 수행하기 위한 지침을 포함하는 동물에서 NDV 에 대항하는 면역학적 또는 보호성 반응을 유도하는 방법을 수행하기 위한 키트이다.

[0156] 본 발명의 또다른 구현예는 본 발명의 NDV 항원을 포함하는 조성물 또는 백신 및 비활성화된 NDV 면역학적 조성물 또는 백신, 및 동물에서 면역 반응을 도출하기 위한 유효량으로 전달 방법을 수행하기 위한 지침을 포함하는 동물에서 NDV 에 대항하는 면역학적 또는 보호성 반응을 유도하는 방법을 수행하기 위한 키트이다.

[0157] 본 발명의 또다른 양상은 상기 기재된 본 발명에 따른 프라임-부스트 백신화에 대한 키트에 관한 것이다. 키트는 2 개 이상의 바이알을 포함할 수 있다: 본 발명에 따른 프라임-백신화를 위한 백신 또는 조성물을 함유하는 제 1 바이알, 및 본 발명에 따른 부스트-백신화에 대한 백신 또는 조성물을 함유하는 제 2 바이알. 키트는 유리하게는 부가적인 프라임-백신화 또는 부가적인 부스트-백신화를 위한 부가적인 제 1 또는 제 2 바이알을 함유할 수 있다.

[0158] 하나의 구현예에서, 본 발명은 표적 세포에서 NDV HN 항원 또는 에피토프의 전달 및 발현을 위한 치료적 유효량의 백신 또는 조성물의 투여를 위해 제공된다. 치료적 유효량의 결정은 당업자에게는 정규적인 실험이다.

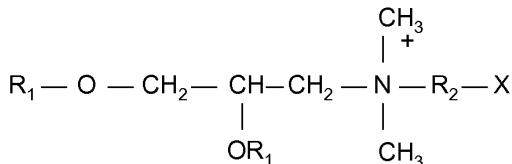
하나의 구현예에서, 백신 또는 조성물은 재조합 NDV HN 폴리펩티드, 항원 또는 에피토프 및 약학적으로 또는 수의학적으로 허용가능한 담체, 비히클 또는 부형제를 포함한다. 또다른 구현예에서, 약학적으로 또는 수의학적으로 허용가능한 담체, 비히클 또는 부형제는 트랜스펙션 또는 감염을 용이하게 하고/거나 벡터 또는 단백질의 보존을 개선한다.

[0159]

약학적으로 또는 수의학적으로 허용가능한 담체 또는 비히클 또는 부형제는 당업자에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, 약학적으로 또는 수의학적으로 허용가능한 담체 또는 비히클 또는 부형제는 0.9% NaCl (예를 들어, 식염수) 용액 또는 포스페이트 완충액일 수 있다. 본 발명의 방법에 사용될 수 있는 기타 약학적으로 또는 수의학적으로 허용가능한 담체 또는 비히클 또는 부형제에는 폴리-(L-글루타메이트) 또는 폴리비닐피롤리돈이 포함되나 이에 제한되지 않는다. 약학적으로 또는 수의학적으로 허용가능한 담체 또는 비히클 또는 부형제는 벡터 또는 재조합 단백질의 투여를 용이하게 하는 임의의 화합물 또는 화합물의 조합일 수 있고; 유리하게는, 담체, 비히클 또는 부형제는 트랜스펙션을 용이하게 하고/거나 벡터 또는 단백질의 보존을 개선할 수 있다. 투여량 및 투여 부피는 일반적인 설명으로 본원에 기재되며, 또한 임의의 과도한 실험 없이, 본 발명을 당업계의 지식과 함께 판독함으로써 당업자에 의해 결정될 수 있다.

[0160]

양이온성 지질은, 플라스미드에만 단독으로 적합하지 않은, 하기 화학식:



[0161]

(식 중, R1은 탄소수 12 내지 18의 포화 또는 불포화 직쇄 지방족 라디칼이고, R2는 탄소수 2 또는 3의 또 다른 지방족 라디칼이고, X는 아민 또는 히드록실기임)을 갖는, 예를 들어, DMRIE인 사차 암모늄 염을 함유한다. 또 다른 구현예에서, 양이온성 지질은 중성 지질, 예를 들어, DOPE와 관련될 수 있다.

[0163]

상기 양이온성 지질 중에서, DMRIE (N-(2-히드록시에틸)-N,N-디메틸-2,3-비스(테트라데실옥시)-1-프로판암모늄; WO96/34109), 유리하게는 중성 지질과 관련된 것, 유리하게는 DOPE (디올레오일-포스파티딜-에탄올아민; Behr, 1994), DMRIE-DOPE을 형성하는 것이 바람직하다.

[0164]

DOPE가 존재하는 경우, DMRIE:DOPE 몰비는 유리하게는 약 95: 약 5 내지 약 5: 약 95, 더욱 유리하게는 약 1: 약 1, 예를 들어, 1:1이다.

[0165]

또 다른 구현예에서, 약학적으로 또는 수의학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 비히클, 또는 아쥬반트는 유-중-수 에멀젼일 수 있다. 적합한 유-중-수 에멀젼의 예에는 하기를 포함하는 4°C에서 유체이고 안정한 오일계 유-중-수 백신 에멀젼이 포함된다: 6 내지 50 v/v %의 항원-함유 수상, 바람직하게는 12 내지 25 v/v %, 전체적으로 또는 부분적으로 비-대사성 오일 (예를 들어, 광유, 예컨대 파라핀 오일) 및/또는 대사성 오일 (예를 들어, 식물유, 또는 지방산, 폴리올 또는 알코올 에스테르)을 함유하는 50 내지 94 v/v %의 유상, 0.2 내지 20 p/v %의 계면활성제, 바람직하게는 3 내지 8 p/v %, 계면활성제는 전체적으로 또는 부분적으로 또는 혼합물인 폴리글리세롤 에스테르이고, 상기 폴리글리세롤 에스테르는 바람직하게는 폴리글리세롤 (폴리)리시놀레이트, 또는 폴리옥시에틸렌 리신 오일 또는 그 밖의 수소화된 폴리옥시에틸렌 리신 오일이다. 유-중-수 에멀젼에 사용될 수 있는 계면활성제의 예에는 에톡실화 소르비탄 에스테르 (예를 들어, 폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노올레이트 (TWEEN 80®) (AppliChem, Inc., Cheshire, CT에서 이용가능) 및 소르비탄 에스테르 (예를 들어, 소르비탄 모노올레이트 (SPAN 80®) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO에서 이용가능)가 포함된다. 또한, 유-중-수 에멀젼과 관련해서는, 또한 US 6,919,084를 참조한다. 유-중-수 에멀젼은 광유 및 4% SPAN 80®을 함유하는 75% 유상 및 0.4% TWEEN 80®을 함유하는 25% 수상을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 항원-함유 수상은 하나 이상의 완충제를 포함하는 식염수 용액을 포함한다. 적합한 완충액의 예는 포스페이트 완충 식염수이다. 하나의 구현예에서, 유-중-수 에멀젼은 수/유/수 (W/O/W) 3중 에멀젼일 수 있다 (U.S. 6,358,500). WOW 3중 에멀젼은 광유 및 6% SPAN 80®을 함유하는 60% 유상 및 1.6% TWEEN 80®을 함유하는 40% 수상을 포함할 수 있다. 기타 적합한 에멀젼의 예는 U.S. 7,371,395에 기재된다.

[0166]

본 발명에 따른 면역학적 조성물 및 백신은 하나 이상의 약학적으로 또는 수의학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 비히클, 또는 아쥬반트를 포함하거나 이것으로 분질적으로 이루어진다. 본 발명의 실시에서 사용하기 위한 적합한 담체 또는 아쥬반트는 (1) 아크릴산 또는 메타크릴산의 중합체, 말레 무수물 및 알케닐 유도체 중합체, (2) 면역자극 서열 (ISS), 예컨대 하나 이상의 비-메틸화 CpG 단위를 갖는 올리고데옥시리보뉴클레오티드 서열 (Klinman et al., 1996; WO98/16247), (3) 수중유 에멀젼, 예컨대 M. Powell, M. Newman, Plenum Press 1995에 공개된 "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach"의 페이지 147에 기재된 SPT 에멀젼,

및 동일 논문의 페이지 183에 기재된 에멀젼 MF59, (4) 사차 암모늄 염을 함유하는 양이온 지질, 예를 들어, DDA (5) 사이토카인, (6) 수산화알루미늄 또는 인산화알루미늄, (7) 사포닌 또는 (8) 본 출원에 참조로서 언급되고 인용된 임의의 문헌에 논의된 기타 아쥬반트, 또는 (9) 이의 임의의 조합 또는 혼합물이다.

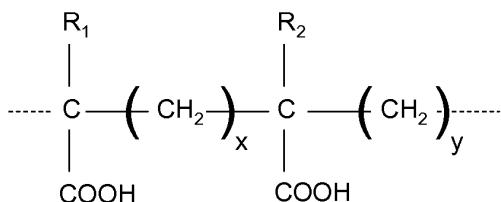
[0167] 바이러스 백터에 특히 적합한 수중유 에멀젼 (3)은: 경질 액체 파라핀 오일 (유럽 약전 유형), 이소프레노이드 오일, 예컨대 스쿠알란, 스쿠알렌, 알켄, 예를 들어, 이소부텐 또는 테센의 올리고머화로부터 수득되는 오일, 적쇄 알킬기를 갖는 산 또는 알코올의 에스테르, 예컨대 식물성 오일, 에틸 올레아이트, 프로필렌 글리콜, 디(카프릴레이트/카프레이트), 글리세롤 트리(카프릴레이트/카프레이트) 및 프로필렌 글리콜 디올레아이트, 또는 분지형, 지방 알코올 또는 산의 에스테르, 특히 이소스테아르산 에스테르-계일 수 있다.

[0168] 오일은 유화제와 조합되어 사용되어 에멀젼을 형성한다. 유화제는 비이온성 계면활성제, 예컨대: 한편으로는 소르비탄, 만나이드 (예를 들어, 무수만니톨 올레아이트), 글리세롤, 폴리글리세롤 또는 프로필렌 글리콜 및 다른 한편으로는 올레산, 이소스테아르산, 리시놀레산 또는 히드록시스테아르산의 에스테르이고, 상기 에스테르는 임의로 에톡실화되거나, 폴리옥시프로필렌-폴리옥시에틸렌 공중합체 블록, 예컨대 Pluronic, 예를 들어, L121이다.

[0169] 유형 (1) 아쥬반트 중합체 중에서, 가교된 아크릴산 또는 메타크릴산의 중합체 (특히 당 또는 폴리알코올의 폴리알케닐 에테르에 의해 가교된) 가 바람직하다. 상기 화합물은 카르보머라는 명칭으로 알려져 있다 (Pharneuropa, vol. 8, no. 2, June 1996). 당업자는 또한 3개 이상의 히드록실기, 바람직하게는 8개 이하의 상기 기를 갖는 폴리히드록실 화합물에 의해 가교결합된 아크릴 중합체를 제공하는 U.S. 2,909,462를 언급하고, 3개 이상의 히드록실기의 수소 원자는 2개 이상의 탄소 원자를 갖는 불포화된, 지방족 라디칼로 대체된다. 바람직한 라디칼은 탄소수 2 내지 4의 것들, 예를 들어, 비닐, 알릴 및 기타 에틸렌성으로 불포화된 기이다. 불포화된 라디칼은 또한 기타 치환기, 예컨대 메틸을 함유할 수 있다. 카르보폴 (Carbopol) (BF Goodrich, Ohio, USA)이라는 명칭으로 시판되는 제품이 특히 적합하다. 이들은 알릴 사카로오스에 의해 또는 알릴 펜타에리트리톨에 의해 가교결합된다. 이중에서, 카르보폴 (Carbopol) 974P, 934P 및 971P가 바람직하다.

[0170] 말레 무수물-알케닐 유도체 공중합체로서, 적쇄 또는 가교된 에틸렌-말레 무수물 공중합체인 EMA (Monsanto)가 바람직하고, 이들은, 예를 들어, 디비닐 에테르에 의해 가교결합된다. 또한 J. Fields et al., 1960을 참조한다.

[0171] 구조와 관련하여, 아크릴산 또는 메타크릴산 중합체 및 EMA는 바람직하게는 하기 화학식을 갖는 기본 단위에 의해 형성된다:



[0172]

(식 종):

[0174] - R1 및 R2는 동일 또는 상이할 수 있고, H 또는 CH<sub>3</sub>을 나타내고,

[0175] - x = 0 또는 1, 바람직하게는 x = 1이고,

[0176] - y = 1 또는 2이며, x + y = 2임).

[0177] EMA의 경우, x = 0 및 y = 2이고, 카르보머의 경우 x = y = 1이다.

[0178] 상기 중합체는 물 및 식염수 (20 g/l NaCl)에 가용성이고, pH는 예를 들어, 소다 (NaOH)에 의해 7.3 내지 7.4로 조정되어, 발현 백터(들)가 도입될 수 있는 아쥬반트 용액을 제공할 수 있다. 최종 면역학적 또는 백신 조성물 중의 중합체 농도는 약 0.01 내지 약 1.5% w/v, 약 0.05 내지 약 1% w/v, 및 약 0.1 내지 약 0.4% w/v 범위일 수 있다.

[0179] 사이토카인(들) (5)은 면역학적 또는 백신 조성물 중에 단백질 형태로 있을 수 있거나, 이의 면역원(들) 또는 에피토프(들)과 함께 속주에서 동시발현될 수 있다. 이의 면역원(들) 또는 에피토프(들) 발현하는 동일한

벡터에 의한, 또는 이의 개별 벡터에 의한 사이토카인(들)의 동시발현이 바람직하다.

[0180] 본 발명은 예를 들어, 활성 성분을, 유리하게는 아쥬반트, 담체, 사이토카인, 및/또는 희석제와 함께 혼련시킴으로써 이러한 조합 조성물을 제조하는 것으로 이해된다.

[0181] 본 발명에 사용될 수 있는 사이토카인에는 과립구 콜로니 자극 인자 (G-CSF), 과립구/대식구 콜로니 자극 인자 (GM-CSF), 인터페론  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ), 인터페론  $\beta$  (IFN- $\beta$ ), 인터페론  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), 인터류킨-1 $\alpha$ -(IL-1- $\alpha$ ), 인터류킨-1-b (IL-1-b), 인터류킨-2 (IL-2), 인터류킨-3 (IL-3), 인터류킨-4 (IL-4), 인터류킨-5 (IL-5), 인터류킨-6 (IL-6), 인터류킨-7 (IL-7), 인터류킨-8 (IL-8), 인터류킨-9 (IL-9), 인터류킨-10 (IL-10), 인터류킨-11 (IL-11), 인터류킨-12 (IL-12), 종양 괴사 인자  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ), 종양 괴사 인자  $\beta$  (TNF  $\beta$ ), 및 형질전환 성장 인자  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 가 포함되나 이에 제한되지 않는다. 사이토카인이 본 발명의 면역학적 또는 백신과 동시에 투여 및/또는 연속 투여될 수 있다는 것으로 이해된다. 그러므로, 예를 들어, 본 발명의 백신은 또한 적합한 사이토카인, 예를 들어, 백신화하고자 하는 또는 면역학적 반응을 도출하고자 하는 (예를 들어, 조류 (새)에게 투여하고자 하는 제제를 위한 조류 (새) 사이토카인) 상기 숙주에 매칭된 사이토카인을 생체 내에서 발현하는 외생 핵산 분자를 함유할 수 있다.

[0182] 이제 본 발명은 하기 비-제한적인 실시예에 의해 추가로 기술될 것이다.

### 실시예

[0184] 추가의 정교화 없이, 당업자는 하기 설명을 사용하여 본 발명을 최대 범위로 실시할 수 있다는 것으로 여겨진다. 하기 설명된 실시예는 단지 설명적인 것으로 간주되며, 어떠한 방식으로도 본 명세서를 제한하는 것은 아니다. 당업자는 반응물 및 반응 조건 및 기술 모두로서 절차로부터 적합한 변형을 즉시 인지할 것이다.

[0185] DNA 삽입체, 플라스미드 및 재조합체 미세조류 또는 식물 벡터의 구축은 [J. Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989)]에 기재된 표준 분자 생물학 기술을 사용하여 수행되었다.

[0186] 실시예 1 NDV HN 유전자에 대한 벡터의 구축 및 형질전환

[0187] 벡터 pAB0018 (ATCC 수탁 번호 PTA9616) 을 BamHI 및 NdeI로 소화시켜, 838 bp 및 9879 bp의 2 개의 분절을 산출하였다. 둘 중 큰 분절을 아가 젤에서 표준 전기영동 기술에 의해 분획화하고, 시판 DNA 정제 키트를 사용하여 정제하였다. 상기 9879 bp 분절을 또한 BamHI 및 NdeI로 미리 소화되었던 코돈-최적화된 NDV HN 유전자 (SEQ ID NO:1)에 라이게이션하였다. 이후 라이게이션을 사용하여 제조자의 프로토콜을 사용하여 적격 E. 콜라이 DH5- $\alpha$  세포 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)의 시판 공급 균주를 형질전환하였다. 이후 상기 플라스미드를 제한 소화 또는 PCR에 의해 스크리닝하여 라이게이션이 예상된 플라스미드 구조를 발생시키는 것을 확인하였다. 상기 절차로부터 수득되는 하나의 이러한 플라스미드 벡터가 Sanger 서열분석에 의해 입증되었고 pCL0081로 지정되었다. NDV HN 유전자의 구체적인 핵산 서열은 스퀴조카이트리움 종 (*Schizochytrium* sp.)에서의 발현에 대해 최적화되었다. 부가적으로는, 벡터 pCL0081에는 술포메투론 메틸의 존재 하에서 성장한 스퀴조카이트리움 형질전환체에 대해 저항성을 부여하는 선별 마커 카세트, HN 이식유전자의 발현을 지시하는 스퀴조카이트리움 신장 인자-1 유전자 (EF1)로부터의 프로모터, 및 HN 이식유전자 다음, 및 OrfC 터미네이터 (또한 PFA3 터미네이터로서 공지됨)가 포함된다.

[0188] 스퀴조카이트리움 종 (*Schizochytrium* sp.) (ATCC 20888)을 전기천공 방법을 사용하여 벡터 pCL0081로 형질전환을 위한 숙주로서 사용하였다. 세포를 M50-20 배지에서 200 rpm의 진탕기에서 48 시간 동안 29°C에서 성장시켰다. 세포를 신선한 배지 내에 1:100로 희석하고 밤새 성장시켰다. 세포를 원심분리하고 1 M 만니톨, 10 mM CaCl<sub>2</sub> (pH 5.5)에 최종 농도 2 OD<sub>600</sub> 유닛으로 재현탁하였다. 5 mL의 세포를 0.25 mg/mL Protease XIV (Sigma Chemical)와 혼합하고, 4 시간 동안 진탕기에서 인큐베이션하였다. 세포를 10% 냉동 글리세롤로 2 회 세정하고, 500  $\mu$ L의 냉각 10% 글리세롤에 재현탁하였다. 90  $\mu$ L을 미리 냉동된 0.2 cm 캡 전기-큐벳 (Biorad 165-2086) 내로 분취하였다. 10  $\mu$ L의 DNA (1-5  $\mu$ g)를 큐벳에 첨가하고, 부드럽게 혼합하고 냉장에 유지하였다. 세포를 200 ohms (저항), 25  $\mu$ F, 250V (0.1 cm 캡) 500V (0.2 cm 캡)에서 전기천공시켰다. 0.5 mL의 배지를 큐벳에 직접 첨가하였다. 이후 세포를 4.5 mL의 M50-20 배지로 옮기고 2-3 시간 동안 100 rpm 진탕기에서 인큐베이션하였다. 세포를 원심분리하고, 0.5 mL의 배지에 재현탁시키고, 2-5 M2B 플레이트 상에 적합한 선별 (필요한 경우)로 플레이팅하고, 29°C에서 인큐베이션하였다.

[0189] 실시예 2 조류형질전환체의 HA 분석

[0190] 스퀴조카이트리움 (*Schizochytrium*) (pCL0081로 형질전환됨) 유전자도입 균주의 동결스탁을 M50-20 (US 2008/0022422에 기재됨)에서 컨플루언시하게 성장시킨 다음, 50 mL 배플 진탕 플라스크에 (리터 당) 13.62 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.72 g K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.56 g KCl, 2.27 g MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 3 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.19 g CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 3 g MSG 일수화물, 21.4 g MES, 및 0.4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>를 함유하는 배지에서 48시간 동안 27°C, 200 rpm에서 증식시켰다. 부피를 탈이온화 H<sub>2</sub>O로 900 mL로 맞추고, pH를 35분 동안 오토클레이브 전 6으로 조절하였다. 이후 필터-살균된 글루코오스 (50 g/L), 비타민 (2 mL/L) 및 미량 금속 (2 mL/L)을 배지에 첨가하고 부피를 1 리터로 조정하였다. 비타민 용액은 0.16 g/L 비타민 B12, 9.75 g/L 티아민, 3.33 g/L Ca-펜토테네이트를 함유하였다. 미량 금속 용액 (pH 2.5)은 1.00 g/L 시트르산, 5.15 g/L FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 1.55 g/L MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 1.55 g/L ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.02 g/L CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 0.02 g/L Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 1.035 g/L CuS<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O, 1.035 g/L NiS<sub>4</sub> · 6H<sub>2</sub>O를 함유하였다. 모든 시약은 시판된다.

[0191] 스퀴조카이트리움 (*Schizochytrium*) 배양물을 50 mL 원뿔 투브로 옮기고, 3000 g에서 15분 동안 원심분리하였다. 상기 저속 혼탁액을, 헤마글루티닌 활성 어세이를 위해 그대로 사용하였다. 저속 혼탁액의 일부는 100,000 g에서 1시간 동안 추가로 원심분리하였다. HN 단백질을 함유하는 불용성 분획인 산출된 펠릿을 포스페이트 완충 식염수 (PBS)에 재현탁하고 웨티드 서열 분석 뿐 아니라 글리코실화 분석에 대해 사용하였다.

[0192] 스퀴조카이트리움에 의한 HN 단백질의 발현은 먼저 활성 어세이에 의해 평가하였다. 기능적 HN 단백질은 표준 헤마글루티닌 활성 어세이에 의해 쉽게 첨출되었던 헤마글루티닌 활성을 나타낸다. 간략하게는, PBS 중의 저속 상청액의 50 uL의 이중 희석액을 96-웰 마이크로티터 플레이트에서 조제하였다. PBS 중의 칠면조 적혈구 세포의 동일 부피의 대략 1% 용액 (Fitzgerald Industries, Acton, MA, USA)을 이후 각각의 웰에 첨가한 다음, 실온에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 이후 응집 정도를 시각적으로 분석하였다. 헤마글루티닌 활성 유닛 (HAU)은 웰에서 가시적인 헤마글루티닌을 야기하는 저속 상청액의 최고 희석액으로서 정의된다. 전형적인 활성은 유전자도입 균주 "CL0081-23"에서 512 HAU의 크기인 것으로 밝혀졌다 (도 3B). PBS 또는 유전자도입 균주와 동일한 방식으로 성장 및 제조된 스퀴조카이트리움 종 (*Schizochytrium* sp.)의 야생형 균주 ATCC 20888이 음성 대조군으로서 사용되었고, 임의의 헤마글루티닌 활성을 나타내지 않았다. NDV 헤마글루티닌 (HA) 재조합 단백질이 양성 대조군으로서 사용되었다. 샘플 적정농도를 정의된 베트이 관찰되기 전에 최고 희석물에서 점수매겼다. HA 활성은 미정제 상청액에서 관찰되었다 (도 3A). 농축된 상청액 샘플 중의 HAU는 3200 HAU/50uL이다. 헤마글루티닌 활성은 동결/해동의 수회 반복을 통해 안정적인 것으로 밝혀졌다.

[0193] 실시예 3 조류 형질전환체의 발현 분석

[0194] HN 단백질의 발현을 또한 표준 면역블롯 절차에 따라 면역블롯 분석에 의해 입증하였다. 4-12% 비스-트리스 젤 (Invitrogen) 상의 나트륨 도데실 술페이트-폴리아크릴아미드 젤 전기영동 (SDS-PAGE)에 의해 단백질을 분리하였다. 이후 단백질을 코마시 블루 (SimplyBlue Safe Stain, Invitrogen)로 염색시키거나, 폴리비닐리덴 플루오라이드 멤브레인 상으로 이동시키고 HN 단백질의 존재 하에서 1:1000 희석액의 닦으로부터의 항-NDV 항혈청 (Charles River laboratories, Wilmington, MA, USA)으로 탐침시킨 후, 1:5000 희석액의 알칼린 포스파타아제에 커플링된 항-닭 이차 항체 (AP-AffiniPure Goat Anti-Chicken #103-055-155, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA)로 탐침시켰다. 이후 막을 제조자의 지침 (KPL, Gaithersburg, MD)에 따라 5-브로모-4-클로로-3-인돌릴-포스페이트/니트로블루 테트라졸륨 용액 (BCIP/NBT)으로 처리하였다. 예는 유전자도입 균주 "CL0081-23"에 대해 도 4에 제시된다. 코마시 블루-염색 젤 및 상응하는 항-NDV 면역블롯을 패널 B 및 C에 제시한다. 재조합 HN 단백질은 저속 상청액 (패널 B) 그리고 불용성 분획 (패널 C)에서 검출되었다. 음성 대조군 (-Ctrl)은 스퀴조카이트리움 종 (*Schizochytrium* sp.)의 야생형 균주 ATCC 20888 또는 유전자도입 균주 "AB0018"였다.

[0195] 실시예 4 글리코실화 분석

[0196] HN 단백질 상의 글리칸의 존재를 먼저 효소 처리에 의해 평가하였다. 유전자도입 균주 "CL0081-23"의 불용성 분획을 PBS에 재현탁하고, 제조자의 지침에 따라 EndoH 또는 PNGase F로 소화시켰다 (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). 이후 글리칸의 제거를 코마시 블루, 과요오드산으로 염색된, 또는 항-NDV 항혈청으로 면역블롯된 12% SDS-PAGE 상의 단백질을 분리하는 경우 이동성에서 예상된 이동에 의해 확인하였다 (도 5,

패널 A). 면역블롯의 음성 대조군 (-Ctrl) 은 유전자도입 균주 "AB0018" 였다. 효소 처리에 대한 음성 대조군은 효소 없이 인큐베이션된 유전자도입 균주 "CL0081-23" (비-처리된 NT) 였다. 두번째로, 스퀴조카이트리움 (*Schizochytrium*) 에서 제조된 HN 단백질의 글리코실화 프로파일을 매트릭스-조력 레이저-탈착 이온화 비행-시간 질량 분광분석 및 나노분무 이온화-선형 이온 트랩 질량 분광분석 (Complex Carbohydrate Research Center, Georgia) 에 의해 분석하였다. 관심의 단백질의 코마시 블루-염색된 젤 슬라이스를 작은 조각 (~1 mm<sup>3</sup>) 으로 절단하고 색상이 맑게 변할 때까지 40 mM 암모늄 비카보네이트 (AmBic) 및 100% 아세토니트릴로 교대로 탈색시켰다. 탈색된 젤을 40 mM AmBic 중의 10 mM DTT 내에서 55°C 에서 1 시간 동안 재팽창시켰다. DTT 용액을 55 mM 요오드아세타미드 (IAM) 로 교환하고 45 분 동안 어둠에서 인큐베이션시켰다. 인큐베이션 후, 40 mM AmBic 및 100% 아세토니트릴로 2 회 교대로 세정하였다. 탈수된 젤을 빙상에서 45 분 동안 처음 트립신 용액 (40 mM AmBic 중의 트립신) 으로 재팽창시키고, 단백질 소화를 37°C 에서 밤새 실행하였다. 상청액을 또다른 투브로 옮겼다. 웨티드 및 글리코웨티드를 5% 포름산 중의 20% 아세토니트릴, 5% 포름산 중의 50% 아세토니트릴 이후 5% 포름산 중의 80% 아세토니트릴을 연속으로 젤로부터 추출하였다. 샘플 용액을 건조시키고 하나의 투브에 수합하였다. 추출된 트립신 소화액을 C18 sep-pak 카트리지를 통과시키고, 오염물 (염, SDS 등) 을 제거하기 위해 5% 아세트산으로 세정하였다. 웨티드 및 글리코웨티드를 5% 아세트산 중의 20% 이소-프로판올, 5% 아세트산 중의 40% 이소-프로판올 및 100% 이소-프로판올로 연속으로 용리하고, 속도 진공 농축기에서 건조시켰다. 건조된 샘플을 수합한 다음, 50 mM 나트륨 포스페이트 완충액 (pH 7.5) 으로 재구성하고 100°C 에서 5 분 동안 가열하여 트립신을 불활성화시켰다. 트립신 소화액을 PNGase F 과 함께 37°C 에서 밤새 인큐베이션시켜 N-글리칸을 방출시켰다. 소화 후, 샘플을 C18 sep-pak 카트리지를 통과시키고, 탄수화물 분획을 5% 아세트산으로 용리하고 동결건조에 의해 건조시켰다. 방출된 N-연결 올리고당 을 Anumula and Taylor (Anumula and Taylor, 1992) 의 방법에 근거해 퍼메틸화시키고 질량 분광분석에 의해 프로파일을 분석하였다. 질량 분광분석을 Complex Carbohydrates Research Center (Aoki K, Perlman M, Lim JM, Cantu R, Wells L, Tiemeyer M. J Biol Chem. 2007 Mar 23;282(12):9127-42.) 에서 개발된 방법에 따라 수행하였다. 질량 분석을 NSI-LTQ/MS<sub>n</sub> 을 사용하여 측정하였다. 간략하게는, 퍼메틸화된 글루칸을 50% 메탄올 중의 1 mM NaOH 에 용해하고, 0.4 μl/분의 일정한 유속으로 기기 (LTQ, Thermo Finnigan) 내로 직접 인퓨전시켰다. MS 분석은 포지티브 이온 방식으로 수행하였다. 총 이온 맵핑, 자동화 MS/MS 분석 (35 충돌 에너지로) 을 위해, 500 내지 2000 범위의 m/z 를 2 질량 유닛에 의해 이전 원도우와 중복되는 연속 2.8 질량 유닛 원도우에서 스캔하였다. 글리칸의 분절 이온 지표의 존재를 시험하기 위해 총 이온 맵핑을 수행하였다. m/z 500 에서 m/z 2000 까지의 모든 MS/MS 데이터를 수집하고, 원 데이터를 수작업으로 분석하였다. NSI-총 이온 맵핑에 의해 수득된 종류의 크로마토그램 및 표는 도 5 (패널 B 및 C) 에 제시된다. 상기 크로마토그램은 고-만노오스 유형 글리칸의 특징적인 중립 손실 중 하나인, m/z 139 의 중립 손실, 스캔 필터에 의해 가공되었다. 총 이온 맵핑은 상기 샘플이 긴 만노오스 사슬을 갖는 고-만노오스 유형 글리칸을 함유한다는 것을 밝혔다.

#### [0197] 실시예 5 NDV HN 의 웨티드 분석

불용성 분획을 SDS-PAGE 에 의해 분리하여 코마시 블루로 염색하거나, PVDF 로 이동시키고 상기 기재된 바와 같이 닦으로부터 항-NDV 항혈청으로 면역블롯하였다. 면역블롯 중의 교차-반응에 상응하는 밴드를 코마시 염색된 젤로부터 절단하여 웨티드 서열 분석을 위해 제출하였다. 절자는 관심의 밴드의 50% 에탄올, 5% 아세트산 중의 세정/탈색으로 이루어졌다. 이후 젤 조각을 아세토니트릴 중에 탈수시키고, Speed-vac 로 건조시키고, 50 mM 암모늄 비카보네이트 중에 5 μl 의 10 ng/μl 트립신을 첨가하여 트립신으로 소화시키고 실온에서 밤새 소화 인큐베이션시켰다. 형성되었던 웨티드를 폴리아크릴아미드를 5% 포름산이 있는 30 μl 50% 아세토니트릴의 2 개 분취액 내로 추출하였다. 상기 추출물을 조합하고, Speed-vac 에서 <10 μl 로 증발시킨 다음, 1% 아세트산 중에 재현탁시켜 LC-MS 분석을 위해 대략 30 μl 의 최종 부피로 제조하였다. LC-MS 시스템은 Finnigan LTQ 선형 이온 트랩 질량 분광분석 시스템이었다. HPLC 컬럼은 자가-패킹된 9 cm x 75 μm id Phenomenex Jupiter C18 역상 모세관 크로마토그래피 컬럼이었다. 이후 추출물의 μl 부피를 주입하고, 0.25 μl/분의 유속의 아세토니트릴/0.1% 포름산 구배에 의해 컬럼으로부터 용리된 웨티드를 질량 분광분석 온-라인 공급원 내에 도입하였다. 마이크로전기분무 이온 공급원을 2.5kV 에서 작동시켰다. 소화물을 선별적 반응 (SRM) 실험을 사용하여 분석하였고, 질량 분광분석이 LC 실험의 전체 과정 동안 일련의 m/z 비를 분절화한다. 이후 관심의 웨티드의 분절화 패턴을 크로마토그램을 생성하는데 사용한다. 각각의 웨티드에 대한 피크 영역을 측정하고 내부 표준에 대해 표준화하였다. 상기 분석에 사용된 내부 표준은 연구되는 샘플 사이의 풍부함이 변하지 않는 단백질이다. 2 개의 시스템 사이의 최종 비교는 각각의 단백질에 대한

표준화된 퍼크 비를 비교함으로써 결정된다. 이후 충돌 유도 해리 스펙트럼을 ncbi 데이터베이스에 대해 조사하였다. HN 단백질은 단백질 서열의 68%에 달하는 총 32개의 펩티드에 의해 확인되었다. 서열분석된 특정 펩티드로의 결과를 도 11에 제시한다.

[0199] 실시예 6 닭의 백신화

아쥬반트 중에서 NDV HN 단백질을 발현하는 스퀴조카이트리움 (*Schizochytrium*)으로 3내지 4주령에 접종된 특정 병원체가 없는 (SPF) 닭으로 접종 연구를 수행하였다. 12마리의 닭을 각각의 백신 그룹에 지정하였다. 동일한 아쥬반트 중의 스퀴조카이트리움 야생형 물질로 백신화된 A 그룹을 음성 대조군 그룹으로서 포함하였다. 상기 그룹의 닭은 3가지 투여량 수준 (100 HAU, 1000 HAU, 및 10000 HAU)에서 1샷 계획으로 시험하였다. 스퀴조카이트리움 배지의 유-중-수 에멀젼은 다리 중 근육내 투여 (부위 당 0.5 ml x 2)에 의해 제공되었다. 제 27일에, 헤마글루티닌 억제 시험을 위해 혈액 샘플을 수집하고, 이후 닭을 뉴캐슬 질환 바이러스 (Newcastle Disease Virus) GB Texas 균주를 닭 당  $10^{4.0}$  EID<sub>50</sub>으로 근육내 접종하였다 (도 12). 접종받은 닭의 건강 상태를 확실히 하기 위해 닭을 매일 관찰하였다. 접종 후, 닭을, 극도의 신경파민, 호흡 곤란, 신경적 징후 또는 치사를 포함하나 이에 제한되지 않는 NDV의 중증 임상적 징후에 대해 14일 동안 매일 관찰하였다. 도 12에 제시된 사망률 데이터는 식물 유래 NDV HN으로의 백신화가 대조군에 비해 100 HAU의 투여량 수준에서 33% 보호 증가, 및 1000 HAU 및 9333 HAU의 투여량 수준에서 100% 보호 증가를 도출하였다는 것을 보여준다.

[0201] 실시예 7 좀개구리밥에서 생성되는 NDV HN 단백질의 발현, 특징분석, 면역원성 및 효율

NDV HN 폴리펩티드 (SEQ ID NO:17, NDV 균주 YZCQ/Liaoning/08)를 발현하기 위해 렘나 마이너 (*Lemna minor*) 단백 발현 시스템을 사용하였다. L. 마이너 최적화된 HN 유전자 (SEQ ID NO:22 및 23)를 개질된 A. 투메파시엔스 이원 벡터 내로 클로닝하였다 (Gasdaska, J., et al., Bioprocessing J. 3, 50-56, 2003). 여러 개의 벡터 구축물이 제조되었다. 벡터는 Super 프로모터, 렘나 지바 (*Lemna gibba*) RBCS SSU1로부터의 5' 리더, 및 노팔린 (Nopaline) 합성효소 (Nos) 터미네이터를 함유한다. 구축물 MerH01은 고유의 신호 서열 (플라스미드 맵에서 제시되는 바와 같은 신호 앙커)이 있는 코돈-최적화된 NDV HN 유전자를 함유한다. 구축물 MerH02는 그의 고유의 신호 서열 및 KDEL ER 보유 서열이 있는 코돈-최적화된 NDV HN 유전자를 함유한다. 구축물 MerH03은 알파 아밀라아제 신호 서열로 대체된 고유의 NDV HN 신호 서열이 있는 코돈-최적화된 NDV HN 유전자 (성숙 HN 단백질 코딩)를 함유한다. 구축물 MerH04는 알파 아밀라아제 신호 서열로 대체된 그의 고유의 신호 서열, 및 KDEL ER 보유 서열이 있는 코돈-최적화된 NDV HN 유전자를 함유한다. 4개 구축물의 플라스미드 맵은 도 7c에 제시된다. 구축물은 A. 투메파시엔스 C58Z707 (Hepburn, A.G. et al., J. Gen. Microbiol. 131, 2961-2969, 1985)로 형질전환되었다. 식물 형질전환 벡터 구축물로 형질전환된 A. 투메파시엔스 C58Z707을 사용하여, 개별 클론 라인을 나타내는 유전자도입 식물을 [Yamamoto, Y. et al., In Vitro Cell. Dev. Biol. 37, 349-353 (2001)]에 기재된 빠르게 성장하는 L. 마이너 흑으로부터 발생시켰다.

[0203] 유전자도입 라인을 발생시킨 후, 이들을 배지 및 조직 내의 NDV HN의 발현에 대해 스크리닝하였다. 식물을 작은 연구 용기에서 2주 동안 성장시키고, 산출된 배지 및 조직을 분석을 위해 수집하였다. 조직 분석을 위해, 냉동 조직을 균질화하고, 원심분리하고, 상청액을 표준 헤마글루티닌 어세이를 위해 제거하였다. 초기 스크리닝으로부터의 최대 라인은 헤마글루티닌 어세이, 헤마글루티닌 억제 어세이 (HI), SDS-PAGE, 웨스턴 블로트, 및 면역국부화와 같은 추가의 특징분석을 위해 대략 1kg의 바이오매스를 제공하기 위해 규모를 키웠다.

[0204] 미정제 식물 추출물을 3-4주령의 특정 병원체가 없는 (SPF) 닭에서 면역원성 및 효율의 평가를 위해 유전자도입 렘나 (*Lemna*) 라인으로부터 조제하였다. 12마리의 닭을 재조합 NDV HN 폴리펩티드 및 아쥬반트를 포함하는 조성물로 백신화된 각각의 백신 그룹으로 할당한다. 동일한 아쥬반트 중의 렘나 (*Lemna*) 야생형 물질로 백신화된 그룹을 음성 대조군으로서 포함시켰다. 다른 그룹의 닭을 상이한 투여량 수준의 1샷 계획으로 시험하였다. 제 21일에, 헤마글루티닌 억제 시험을 위해 혈액 샘플을 수집하고, 이후 닭을 상이한 뉴캐슬 질환 바이러스 균주로 접종하였다. 접종 후, 닭을, 극도의 신경파민, 호흡 곤란, 신경적 징후 또는 치사를 포함하나 이에 제한되지 않는 NDV의 중증 임상적 징후에 대해 14일 동안 매일 관찰하였다. 재조합 NDV HN 폴리펩티드를 함유하는 조성물은 NDV 감염 및 질환을 치료, 보호, 및 예방하는데 효능을 나타낸다.

[0205] 출원에 언급된 문헌 내의 언급된 또는 참조된 모든 문헌 ("본원에 언급된 문헌"), 및 본원에 언급된 문헌에 언급된 또는 참조된 모든 문헌은 본원에 참조로서 인용된 임의의 문헌에서 또는 본원에 언급된 임의의 제품에 대한 임의의 제조자의 지침, 설명, 제품 설명서, 및 제품 시트지와 함께, 본원에 참조로서 인용되고, 본 발명의

실시에 사용될 수 있다.

[0206]

본 발명의 바람직한 구현예에 상세히 기재되어 있으므로, 첨부된 단락에 의해 정의되는 본 발명이 본 발명의 취지 또는 범주를 벗어나지 않고 많은 명백한 변형이 가능하므로 상기 명세서에 언급된 특정 세부 사항에 제한되는 것이 아닌 것으로 이해된다.

## 도면

### 도면1

SEQ ID NO:	유형	설명
1	DNA	NDV HN 코돈-최적화된 DNA
2	DNA	NDV HN 야생형 DNA (EF520717) ( 투계 /US(CA)/212676/2002 균주)
3	단백질	NDV HN 단백질 (ABS84265) ( 투계 /US(CA)/212676/2002 균주)
4	DNA	NDV HN DNA (M21409) (Texas GB 균주)
5	단백질	NDV HN 단백질 (P12553) (Texas GB 균주)
6	DNA	NDV HN DNA (M24709) (LaSota 균주)
7	단백질	NDV HN 단백질 (AAA46659) (LaSota 균주)
8	DNA	NDV HN DNA (AY288999) (MEX/96 균주)
9	단백질	NDV HN 단백질 (AAQ54638) (MEX/96 균주)
10	단백질	NDV HN 선형 애피토프 영역 1
11	단백질	NDV HN 선형 애피토프 영역 2
12	DNA	NDV HN 신호 서열
13	단백질	NDV HN 신호 팝티드 (SEQ ID NO:3유래, ABS84265)
14	DNA	성숙 단백질 코딩 NDV HN DNA (신호 서열 없음 ,SEQ ID NO:1의 79bp-1716bp) (코돈-최적화됨)
15	단백질	NDV HN 성숙 단백질 (신호 서열 없음 , SEQ ID NO:3 의 27aa-571aa ) (EF520717) ( 투계 /US(CA)/212676/2002 균주)
16	DNA	NDV HN DNA (FJ608369) (NDV 균주 닝 YZCQ/Liaoning/08)
17	단백질	NDV HN 단백질(ACM67348) (NDV 균주 닝 YZCQ/Liaoning/08)
18	DNA	NDV HN DNA (NDV 균주 ZJ1)
19	단백질	NDV HN 단백질 (AAL18936) (NDV 균주 ZJ1)
20	단백질	NDV HN 성숙 단백질 (신호 서열 없음 , SEQ ID NO:17 의 47aa-571aa , ACM67348)
21	단백질	NDV HN 신호 팝티드 (SEQ ID NO:17유래, ACM67348)
22	DNA	ACM67348 코딩 NDV HN 코돈-최적화된 DNA
23	DNA	NDV HN 코돈-최적화된 DNA 코딩 성숙 단백질 (신호 서열 없음 , SEQ ID NO:22 의 139 bp -1713 bp , NDV 균주 닝 YZCQ/Liaoning/08)
24	단백질	ER 보유 서열 (KDEL)
25	DNA	알파 아밀라아제 신호 서열
26	단백질	알파 아밀라아제 신호 팝티드
27	DNA	NDV HN 신호 서열 , 코돈-최적화된 (종개구리밥- 바람직한 코돈-최적화 ) (SEQ ID NO:22 의 1-138 bp)
28	단백질	NDV HN 선형 애피토프 영역 3

## 도면2

NDV 의 LaSota, CA/02 및 TX/GB 균주의 HN 서열  
글리코실화 부위는 밑줄 친다.

### NDV HN CA/02 (ABS84265) (SEQ ID NO:3)

```

1 MDRVSRVVL ENEEREAKNT WRLVFRVAVL SLIVMTLAIS VAALVYSMEA STPNLAGIS
61 TVISRAEDRV TSLLNSNQDV VDRVYKQVAL ESPLALLNT E SIIMNAITSL SYQINGAANS
121 SGCGAPVHDP DYIGGVGKEL IVDTSQDS FYP SAYQEHL NFIPAPTGS GCTRIPS FDM
181 SATHYCYNH VILSGCRDHS HSHQYLALGV LRTSATGRVF FSTLRSINLD DTQNRKCSV
241 SATPLGCDML CSKVTEEEE DYKSVTPTSM VHGRLGFDGQ YHEKLDVTV LFKDWVANYP
301 GVGGGLIDD RVWFPVYGGI KPNSPSDTAQ EGKYVIYKRY NDTCCPDEQDY QVRMAKSSYK
361 PGRRGGKRVQ QAILSIKVST SLGEDPVLTW PPNTVTLMA EGRILTVGTS HFLYQRGSSY
421 FSPALLYPMI VSNKTATLHS PYTFNAFTRP GSIPCQASAR CPNSCITGVY TDPYPVVFHR
481 NHTLRGVFGT MLDGEQARLN PVAIFDTS RSRITRVSS STKAAYTTST CFKVVKTNKV
541 YCLSLAEISN TLFGEFRIVP LLVEILKDD V

```

### NDV HN TX/GB (P12553) (SEQ ID NO:5)

```

1 MDRAVSQVAL ENDEREAKNT WRLIFRIAIL LLTVVTLATS VASLVYSMGA STPSDLVGIP
61 TRISRAEEDI TSTLGSNQDV VDRIYKQVAL ESPLALLNT TTIMNAITSL SYQINGAANN
121 SGWGAPIHDP DFIGGIGKEL IVDASDVT S FYP SAFQEH NFIPAPTGS GCIRIPS FDM
181 SATHYCYNH IISSGCRDHS HSYQYLALGV LRTSATGRIF FSTLRSINLD DTQNRKCSV
241 SATPLGCDML CSKVTEEEE DYN SAVPTLM VHGRLGFDGQ YHEKLDVTT LFEDWVANYP
301 GVGGGSFIDS RVWFSVYGGI KPNSPSDTVQ EEEKYVIYKRY NDTCCPDEQDY QIRMAKSSYK
361 PGRRGGKRIQ QAILSIKVST SLGEDPVLTW PPNTVTLMA EGRILTVGTS HFLYQRGSSY
421 FSPALLYPMI VSNKTATLHS PYTFNAFTRP GSIPCQASAR CPNSCITGVY TDPYPLIFYR
481 NHTLRGVFGT MLDGEQARLN PASAVFDSTS RSRITRVSS STKAAYTTST CFKVVKTNKT
541 YCLSLAEISN TLFGEFRIVP LLVEILKNDG VREARSG

```

### NDV HN LaSota (AAA46659) (SEQ ID NO:7)

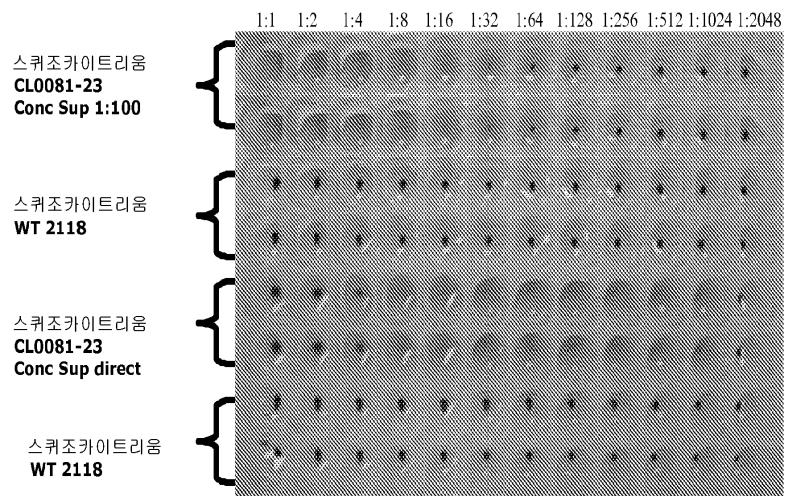
```

MDRAVSQVAL ENDEREAKNT WRLIFRIAIL FLTVVTLAIS VASLLYSMGA STPSDLVGIP 60
TRISRAEEDI TSTLGSNQDV VDRIYKQVAL ESPLALLNT TTIMNAITSL SYQINGAANN 120
SGWGAPIHDP DYIGGIGKEL IVDASDVT S FYP SAFQEH NFIPAPTGS GCTRIPS FDM 180
SATHYCYNH VILSGCRDHS HSYQYLALGV LRTSATGRVF FSTLRSINLD DTQNRKCSV 240
SATPLGCDML CSKVTEEEE DYN SAVPTRM AHGRLGFDGQ YHEKLDVTT LFGDWVANYP 300
GVGGGSFIDS RVWFSVYGGI KPNSPSDTVQ EEEKYVIYKRY NDTCCPDEQDY QIRMAKSSYK 360
PGRRGGKRIQ QAILSIKVST SLGEDPVLTW PPNTVTLMA EGRILTVGTS HFLYQRGSSY 420
FSPALLYPMI VSNKTATLHS PYTFNAFTRP GSIPCQASAR CPNSCITGVY TDPYPLIFYR 480
NHTLRGVFGT MLDGEQARLN PTSAVFDSTS RSRITRVSS STKAAYTTST CFKVVKTNKT 540
YCLSLAEISN TLFGEFRIVP LLVEILKDDG VREARSG 577

```

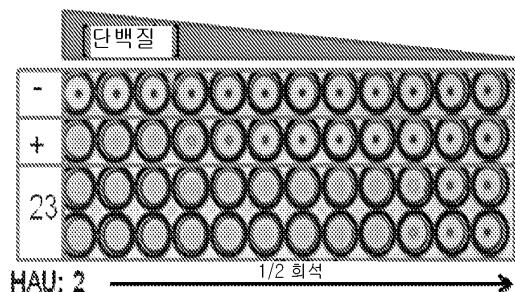
도면3

3A



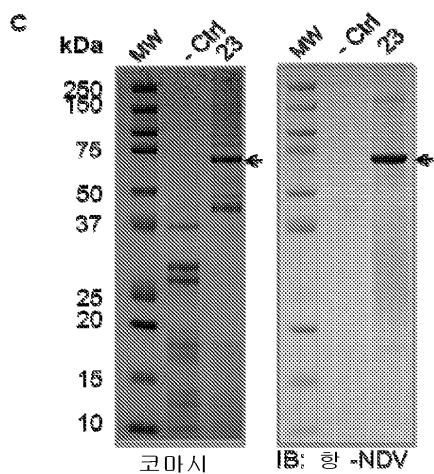
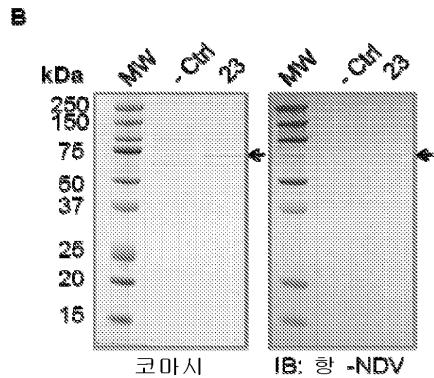
3B

해마글루티닌 활성:

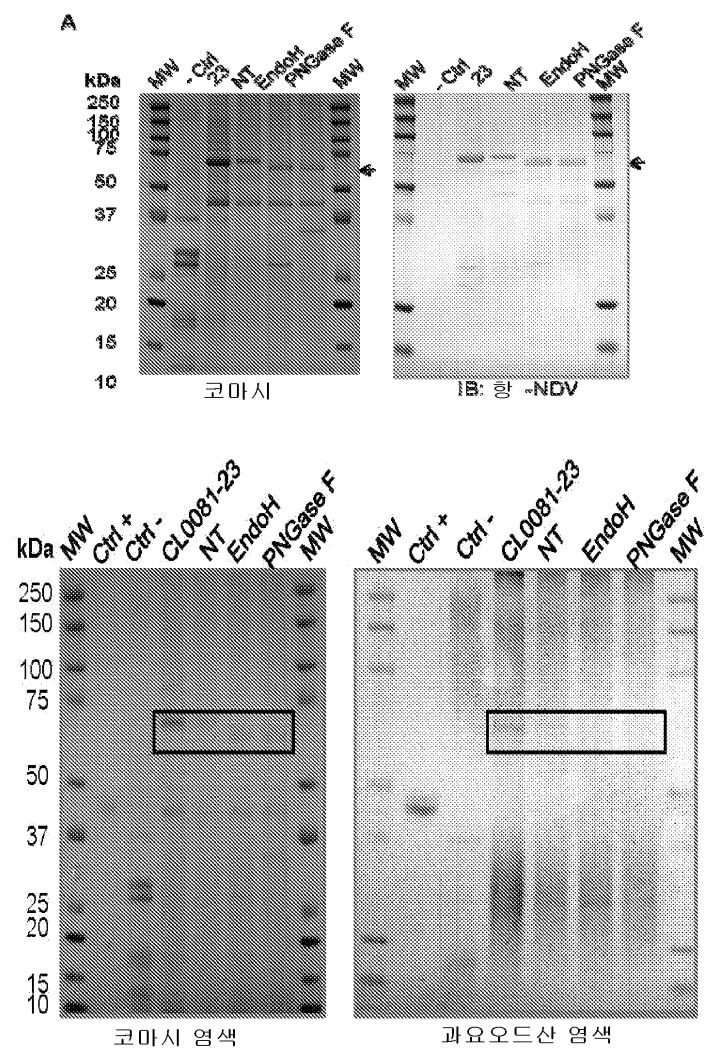


## 도면4

유전자도입 스카조카이트리움에 의한 HN 단백질의 분비  
- 면역블롯 분석



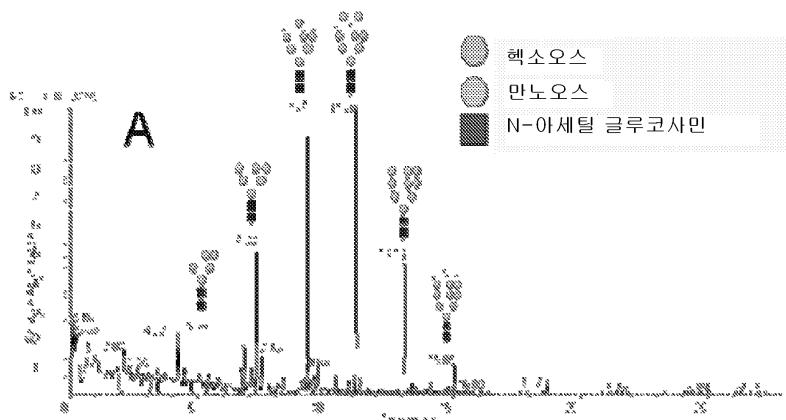
## 도면5a



## 도면5b

B

피메틸화된 N-글루칸의 NSI-총 이온 맵핑



C

제안된 구조	질량 [M+Na] [m/z]	전하 상태 [n]	23
Hex <sub>9</sub> HexNAc <sub>2</sub>	1579 802	1 2	✓
Hex <sub>9</sub> HexNAc <sub>2</sub>	1783 903	1 2	✓
Hex <sub>7</sub> HexNAc <sub>2</sub>	1987 1005	1 2	✓
Hex <sub>8</sub> HexNAc <sub>2</sub>	1106	2	✓
Hex <sub>9</sub> HexNAc <sub>2</sub>	1210	2	✓
Hex <sub>10</sub> HexNAc <sub>2</sub>	1312	2	✓

## 도면6aa

1 50  
 NDV HN ABS84265 (CA2002) (1) MORVVERVLENEERREAKNTWRLVFRIVAVLSIVVNLIAISVARYVTSME  
 NDV HN MEX96 (AAQ54638) (1) MORVVERVLENEERREAKNTWRLVFRIVAVLSIVVNLIAISVARYVTSME  
 NDV HN LaSota (AAA46659) (1) MORVVSVALENDEREAKNTWRLVFRIVAVLSIVVNLIAISVARYVTSME  
 NDV HN Texas (P12553) (1) MORVVSVALENDEREAKNTWRLVFRIVAVLSIVVNLIAISVARYVTSME  
 NDV HN Liaoning (ACM67348) (1) MORVVRVALENDEREAKNTWRLVFRIVAVLSIVVNLIAISVARYVTSME  
 NDV HN ZJ1 (AAL18936) (1) MORVVRVALENDEREAKNTWRLVFRIVAVLSIVVNLIAISVARYVTSME

51 100  
 NDV HN ABS84265 (CA2002) (51) STPNGLAGISTVLSKEDRVISLNSQINVQVDEINQVALESPLALLNTS  
 NDV HN MEX96 (AAQ54638) (51) STENDLAGISTVLSKEDRVISLNSQINVQVDEINQVALESPLALLNTS  
 NDV HN LaSota (AAA46659) (51) STFSDLVGIPTRISRAEERERSTLGSRQDQVNRILYQVALESPLALLNTS  
 NDV HN Texas (P12553) (51) STPSOLVGIPTRISRAEERERSTLGSRQDQVNRILYQVALESPLALLNTS  
 NDV HN Liaoning (ACM67348) (51) STPHDLAGISTVLSKEDRVISLSSQINVQDIXXQVALESPLALLNTS  
 NDV HN ZJ1 (AAL18936) (51) STPHDLAGISTVLSKEDRVISLSSQINVQDIXXQVALESPLALLNTS

101 150  
 NDV HN ABS84265 (CA2002) (101) STIMNAITSLSYQINGGRANSSCGASVHPDIXGGKGELIVDTSQATG  
 NDV HN MEX96 (AAQ54638) (101) STIMNAITSLSYQINGGRANSSCGASVHPDIXGGKGELIVDTSQATG  
 NDV HN LaSota (AAA46659) (101) STIMNAITSLSYQINGGRANSSCGASVHPDIXGGKGELIVDTSQATG  
 NDV HN Texas (P12553) (101) STIMNAITSLSYQINGGRANSSCGASVHPDIXGGKGELIVDTSQATG  
 NDV HN Liaoning (ACM67348) (101) STIMNAITSLSYQINGGRANSSCGASVHPDIXGGKGELIVDTSQATG  
 NDV HN ZJ1 (AAL18936) (101) STIMNAITSLSYQINGGRANSSCGASVHPDIXGGKGELIVDTSQATG

151 200  
 NDV HN ABS84265 (CA2002) (151) FYPGAXQEHNFIPAPTTGSCXTRIPSPDMSTTHYCYTERWILSGCRDHS  
 NDV HN MEX96 (AAQ54638) (151) FYPGAXQEHNFIPAPTTGSCXTRIPSPDMSTTHYCYTERWILSGCRDHS  
 NDV HN LaSota (AAA46659) (151) FYPGAXQEHNFIPAPTTGSCXTRIPSPDMSTTHYCYTERWILSGCRDHS  
 NDV HN Texas (P12553) (151) FYPGAXQEHNFIPAPTTGSCXTRIPSPDMSTTHYCYTERWILSGCRDHS  
 NDV HN Liaoning (ACM67348) (151) FYPGAXQEHNFIPAPTTGSCXTRIPSPDMSTTHYCYTERWILSGCRDHS  
 NDV HN ZJ1 (AAL18936) (151) FYPGAXQEHNFIPAPTTGSCXTRIPSPDMSTTHYCYTERWILSGCRDHS

201 250  
 NDV HN ABS84265 (CA2002) (201) HSQYLAQGVRLRTSATGRVFFSTLRSINLDUTQNRKSCSVSATELGCDML  
 NDV HN MEX96 (AAQ54638) (201) HSQYLAQGVRLRTSATGRVFFSTLRSINLDUTQNRKSCSVSATELGCDML  
 NDV HN LaSota (AAA46659) (201) HSQYLAQGVRLRTSATGRVFFSTLRSINLDUTQNRKSCSVSATELGCDML  
 NDV HN Texas (P12553) (201) HSQYLAQGVRLRTSATGRVFFSTLRSINLDUTQNRKSCSVSATELGCDML  
 NDV HN Liaoning (ACM67348) (201) HSQYLAQGVRLRTSATGRVFFSTLRSINLDUTQNRKSCSVSATELGCDML  
 NDV HN ZJ1 (AAL18936) (201) HSQYLAQGVRLRTSATGRVFFSTLRSINLDUTQNRKSCSVSATELGCDML

251 300  
 NDV HN ABS84265 (CA2002) (251) CSKVTEEREDYKSVTPTGQHGRLGFDQYHEKDLITVLFEDWVANYP  
 NDV HN MEX96 (AAQ54638) (251) CSKVTEEREDYKSVTPTGQHGRLGFDQYHEKDLITVLFEDWVANYP  
 NDV HN LaSota (AAA46659) (251) CSKVTEEREDYNSAVERTRMAGELGLGFDQYHEKDLITVLFEDWVANYP  
 NDV HN Texas (P12553) (251) CSKVTEEREDYNSAVERTRMAGELGLGFDQYHEKDLITVLFEDWVANYP  
 NDV HN Liaoning (ACM67348) (251) CSKVTEEREDYNSAVERTRMAGELGLGFDQYHEKDLITVLFEDWVANYP  
 NDV HN ZJ1 (AAL18936) (251) CSKVTEEREDYNSAVERTRMAGELGLGFDQYHEKDLITVLFEDWVANYP

301 350  
 NDV HN ABS84265 (CA2002) (301) CGGGGSLIDEBNVNSFVYGGSLFNSPSPSDTQGCKYVIVKHNNTTCFDEQY  
 NDV HN MEX96 (AAQ54638) (301) CGGGGSLIDEBNVNSFVYGGSLFNSPSPSDTQGCKYVIVKHNNTTCFDEQY  
 NDV HN LaSota (AAA46659) (301) CGGGGSLIDEBNVNSFVYGGSLFNSPSPSDTQGCKYVIVKHNNTTCFDEQY  
 NDV HN Texas (P12553) (301) CGGGGSLIDEBNVNSFVYGGSLFNSPSPSDTQGCKYVIVKHNNTTCFDEQY  
 NDV HN Liaoning (ACM67348) (301) CGGGGSLIDEBNVNSFVYGGSLFNSPSPSDTQGCKYVIVKHNNTTCFDEQY  
 NDV HN ZJ1 (AAL18936) (301) CGGGGSLIDEBNVNSFVYGGSLFNSPSPSDTQGCKYVIVKHNNTTCFDEQY

351 400  
 NDV HN ABS84265 (CA2002) (351) QERMAKESYKPGFPGKRVQNLILSIVVSTSLGEDPVLTIPNTTFLMGA  
 NDV HN MEX96 (AAQ54638) (351) QERMAKESYKPGFPGKRVQNLILSIVVSTSLGEDPVLTIPNTTFLMGA  
 NDV HN LaSota (AAA46659) (351) QERMAKESYKPGFPGKRVQNLILSIVVSTSLGEDPVLTIPNTTFLMGA  
 NDV HN Texas (P12553) (351) QERMAKESYKPGFPGKRVQNLILSIVVSTSLGEDPVLTIPNTTFLMGA  
 NDV HN Liaoning (ACM67348) (351) QERMAKESYKPGFPGKRVQNLILSIVVSTSLGEDPVLTIPNTTFLMGA  
 NDV HN ZJ1 (AAL18936) (351) QERMAKESYKPGFPGKRVQNLILSIVVSTSLGEDPVLTIPNTTFLMGA

## 도면6ab

		401		450	
NDV HN ABS84265 (CA2002)	(401)	EGRILTVGTCNSHFLYQRGSSYFSPALLYPMIVSRNKTACLHSPTFNAFTP			
NDV HN MEX96 (AAQ54638)	(401)	EGRILTVGTCNSHFLYQRGSSYFSPALLYPMIVSRNKTACLHSPTFNAFTP			
NDV HN LaSota (AAA46659)	(401)	EGRILTVGTCNSHFLYQRGSSYFSPALLYPMIVSRNKTACLHSPTFNAFTP			
NDV HN Texas (P12553)	(401)	EGRILTVGTCNSHFLYQRGSSYFSPALLYPMIVSRNKTACLHSPTFNAFTP			
NDV HN Liaoning (ACM67348)	(401)	EGRILTVGTCNSHFLYQRGSSYFSPALLYPMIVSRNKTACLHSPTFNAFTP			
NDV HN ZJ1 (AAL18936)	(401)	EGRILTVGTCNSHFLYQRGSSYFSPALLYPMIVSRNKTACLHSPTFNAFTP			
		451		500	
NDV HN ABS84265 (CA2002)	(451)	GSYPCQASARCPNSCITGCVTIDPYIIVFHRNHTLNGVFGTMIDNEQARLN			
NDV HN MEX96 (AAQ54638)	(451)	GSYPCQASARCPNSCITGCVTIDPYIIVFHRNHTLNGVFGTMIDNEQARLN			
NDV HN LaSota (AAA46659)	(451)	GSYPCQASARCPNSCITGCVTIDPYIIVFHRNHTLNGVFGTMIDNEQARLN			
NDV HN Texas (P12553)	(451)	GSYPCQASARCPNSCITGCVTIDPYIIVFHRNHTLNGVFGTMIDNEQARLN			
NDV HN Liaoning (ACM67348)	(451)	GSYPCQASARCPNSCITGCVTIDPYIIVFHRNHTLNGVFGTMIDNEQARLN			
NDV HN ZJ1 (AAL18936)	(451)	GSYPCQASARCPNSCITGCVTIDPYIIVFHRNHTLNGVFGTMIDNEQARLN			
		501		550	
NDV HN ABS84265 (CA2002)	(501)	PVSAFPDYGRSRITRVSSESTKAAYTTSTCFKVVVKTKVYCLSIABEISN			
NDV HN MEX96 (AAQ54638)	(501)	PVSAFPDYGRSRITRVSSESTKAAYTTSTCFKVVVKTKVYCLSIABEISN			
NDV HN LaSota (AAA46659)	(501)	PVSAFPDYGRSRITRVSSESTKAAYTTSTCFKVVVKTKVYCLSIABEISN			
NDV HN Texas (P12553)	(501)	PVSAFPDYGRSRITRVSSESTKAAYTTSTCFKVVVKTKVYCLSIABEISN			
NDV HN Liaoning (ACM67348)	(501)	PVSAFPDYGRSRITRVSSESTKAAYTTSTCFKVVVKTKVYCLSIABEISN			
NDV HN ZJ1 (AAL18936)	(501)	PVSAFPDYGRSRITRVSSESTKAAYTTSTCFKVVVKTKVYCLSIABEISN			
		551		577	
NDV HN ABS84265 (CA2002)	(551)	TLFGEFRIVPLVLLVEILKDRV-----			
NDV HN MEX96 (AAQ54638)	(551)	TLFGEFRIVPLVLLVEILKDRV-----			
NDV HN LaSota (AAA46659)	(551)	TLFGEFRIVPLVLLVEILKDRVREARSG			
NDV HN Texas (P12553)	(551)	TLFGEFRIVPLVLLVEILKDRVREARSG			
NDV HN Liaoning (ACM67348)	(551)	TLFGEFRIVPLVLLVEILKDRV-----			
NDV HN ZJ1 (AAL18936)	(551)	TLFGEFRIVPLVLLVEILKDRV-----			

NDV HN ABS84265 (CA2002): SEQ ID NO:3  
 NDV HN MEX96 (AAQ54638): SEQ ID NO:9  
 NDV HN LaSota (AAA46659): SEQ ID NO:7  
 NDV HN Texas (P12553): SEQ ID NO:5  
 NDV HN Liaoning (ACM67348): SEQ ID NO:17  
 NDV HN ZJ1 (AAL18936): SEQ ID NO:19

서열 일치성 %:

SEQ ID NO:	9	3	7	5	17	19
9	100	99	89	88	92	92
3		100	89	88	92	92
7			100	97	88	87
5				100	87	87
17					100	97
19						100

Vector NTI 11.0 (PC) software package (Invitrogen, 1600 Faraday Ave., Carlsbad, CA).

## 도면6b

	1	50
SEQ ID NO:20	(1) -----SAGASTPHDLAGISTVISKTEGVTSLLSS	
SEQ ID NO:15	(1) VAVLSLIVMLAISVAALVYSMEASTPNDLAGISTVISAEDGVTSLLNS	
	51	100
SEQ ID NO:20	(31) SQDVIKDRYKQVALESPLALLNTESIMNAITSLSYQINGAANNSGGAP	
SEQ ID NO:15	(51) NQDVYKDRYKQVALESPLALLNTESIMNAITSLSYQINGAANNSGGAP	
	101	150
SEQ ID NO:20	(81) VRDPDYIGCGKELIVDDISDVTSTYPSAYQEHLNFIAPPTTGSGCTRIP	
SEQ ID NO:15	(101) VRDPDYIGCGKELIVDDTSATSTYPSAYQEHLNFIAPPTTGSGCTRIP	
	151	200
SEQ ID NO:20	(131) SFDMSTTHYCITHNVILSGCRDHSHEHQYLALGVILRTSATGRVFFSTLRS	
SEQ ID NO:15	(151) SFDMMSATHYCITHNVILSGCRDHSHEHQYLALGVILRTSATGRVFFSTLRS	
	201	250
SEQ ID NO:20	(181) INLDQTQNRKSCSVSATPLGCDMLCSKVGTGTEEDYKSVAPTPMVHGRILG	
SEQ ID NO:15	(201) INLDQTQNRKSCSVSATPLGCDMLCSKVTEEEEDYKSVPTPSMVHGRILG	
	251	300
SEQ ID NO:20	(231) FDGGYHEKDLOTVLFKDWWVANYPGVGGGSFIDNNVWFVYGGLKPNNSPS	
SEQ ID NO:15	(251) FDGGYHEKDLOTVLFKDWWVANYPGVGGGSFIDDDRVWFVYGGLKPNNSPS	
	301	350
SEQ ID NO:20	(281) DTAQEGKVIYKRNNTCPDKQDYQPRMAKSSYKPGRGKGKRVQQALISI	
SEQ ID NO:15	(301) DTAQEGKVIYKRNNTCPDEQDYQPRMAKSSYKPGRGKGKRVQQALISI	
	351	400
SEQ ID NO:20	(331) KVSTSLGKDPVLTIPFNTVTLMGAEGRILTVGTSHFLYQRGSSYFSPALL	
SEQ ID NO:15	(351) KVSTSLGEDFVLTIPFNTVTLMGAEGRILTVGTSHFLYQRGSSYFSPALL	
	401	450
SEQ ID NO:20	(381) YPMTVNNKTATLHSPYTTFNAFTRPGSAPCQASARCPNSCITGVYTDYFV	
SEQ ID NO:15	(401) YPMTVRNKTATLHSPYTTFNAFTRPGSVPCCQASARCPNSCITGVYTDYFV	
	451	500
SEQ ID NO:20	(431) FPHRNHTLRGVFGTMILDDEQARILNPVSAYFDNISRSRTRVSSSTKXAY	
SEQ ID NO:15	(451) FPHRNHTLRGVFGTMLDNEQARILNPVSAYFDYTSRSRTRVSSSTKXAY	
	501	546
SEQ ID NO:20	(481) TTSTCFKVVKTNKAYCLSLIAEISNTLFGEFRIVPLIVEILKDDRV-	
SEQ ID NO:15	(501) TTSTCFKVVKTNKVYCLSLIAEISNTLFGEFRIVPLIVEILKDDRV-	

SEQ ID NO:15 와 SEQ ID NO:20 사이의 단백질 일치성% 는 93% 이다.

## 도면7aa

1	50
NDV HN (FJ608369)	(1) -----
NDV HN (ZJ1 strain)	(1) -----
NDV HN LaSota (M24709)	(1) ACGGGTAGAACGGTAAGAGAGGCCGCCCTCAATTGGGAGCCAGGCTTC
NDV HN texas (M21409)	(1) -----
NDV HN CA02 (EF520717)	(1) -----
NDV HN MEX (AY288999)	(1) -----
51	100
NDV HN (FJ608369)	(1) -----
NDV HN (ZJ1 strain)	(1) -----
NDV HN LaSota (M24709)	(51) CAAACCTCGTTCTACCGCTTACCGACAACAGTCCTCAATCAGGAGCC
NDV HN texas (M21409)	(1) -----
NDV HN CA02 (EF520717)	(1) -----
NDV HN MEX (AY288999)	(1) -----
101	150
NDV HN (FJ608369)	(10) GCGGTTAACGACTCCGCGCTTGCGAGGATGGGAGAGGAACTCCAGAAGACG
NDV HN (ZJ1 strain)	(10) GCGGTTAACGACTCCGCGCTTGCGAGGATGGGAGAGGAACTCCAGAAGACG
NDV HN LaSota (M24709)	(101) GCGGTTAACGACTCCGCGCTTGCGAGGATGGGAGAGGAACTCCAGAAGACG
NDV HN texas (M21409)	(20) GCGGTTAACGACTCCGCGCTTGCGAGGATGGGAGAGGAACTCCAGAAGACG
NDV HN CA02 (EF520717)	(10) GCGGTTAACGACTCCGCGCTTGCGAGGATGGGAGAGGAACTCCAGAAGACG
NDV HN MEX (AY288999)	(10) GCGGTTAACGACTCCGCGCTTGCGAGGATGGGAGAGGAACTCCAGAAGACG
151	200
NDV HN (FJ608369)	(60) ATGGGGGCTTGTTTCGCGGTTTCTAGCTTACCTTTTAACTGGTATTTGACTC
NDV HN (ZJ1 strain)	(60) ATGGGGGCTTGTTTCGCGGTTTCTAGCTTACCTTTTAACTGGTATTTGACTC
NDV HN LaSota (M24709)	(151) ATGGGGGCTTGTTTCGCGGTTTCTAGCTTACCTTTTAACTGGTATTTGACTC
NDV HN texas (M21409)	(70) ATGGGGGCTTGTTTCGCGGTTTCTAGCTTACCTTTTAACTGGTATTTGACTC
NDV HN CA02 (EF520717)	(60) ATGGGGGCTTGTTTCGCGGTTTCTAGCTTACCTTTTAACTGGTATTTGACTC
NDV HN MEX (AY288999)	(60) ATGGGGGCTTGTTTCGCGGTTTCTAGCTTACCTTTTAACTGGTATTTGACTC
201	250
NDV HN (FJ608369)	(110) TGCCTCTTCCTCCGAGCTGCCCTTGCGTTCCTTGCGCGGCCGTCACCG
NDV HN (ZJ1 strain)	(110) TGCCTCTTCCTCCGAGCTGCCCTTGCGTTCCTTGCGCGGCCGTCACCG
NDV HN LaSota (M24709)	(201) TGCCTCTTCCTCCGAGCTGCCCTTGCGTTCCTTGCGCGGCCGTCACCG
NDV HN texas (M21409)	(120) TGCCTCTTCCTCCGAGCTGCCCTTGCGTTCCTTGCGCGGCCGTCACCG
NDV HN CA02 (EF520717)	(110) TGCCTCTTCCTCCGAGCTGCCCTTGCGTTCCTTGCGCGGCCGTCACCG
NDV HN MEX (AY288999)	(110) TGCCTCTTCCTCCGAGCTGCCCTTGCGTTCCTTGCGCGGCCGTCACCG
251	300
NDV HN (FJ608369)	(160) CAGGAGCTCCCGGCTTACGACTTGATCTTACGACAGAGGAACTGGT
NDV HN (ZJ1 strain)	(160) CAGGAGCTCCCGGCTTACGACTTGATCTTACGACAGAGGAACTGGT
NDV HN LaSota (M24709)	(251) AGCGATTTTCTTGCTTACGACTTGATCTTACGACAGAGGAACTGGT
NDV HN texas (M21409)	(170) AGCGATTTTCTTGCTTACGACTTGATCTTACGACAGAGGAACTGGT
NDV HN CA02 (EF520717)	(160) AGCGATTTTCTTGCTTACGACTTGATCTTACGACAGAGGAACTGGT
NDV HN MEX (AY288999)	(160) AGCGATTTTCTTGCTTACGACTTGATCTTACGACAGAGGAACTGGT
301	350
NDV HN (FJ608369)	(210) TACGGCTTACGCTTACGCTTGAGTCGATAGATGCTTATACGAG
NDV HN (ZJ1 strain)	(210) TACGGCTTACGCTTACGCTTGAGTCGATAGATGCTTATACGAG
NDV HN LaSota (M24709)	(301) TACGGCTTACGCTTACGCTTGAGTCGATAGATGCTTATACGAG
NDV HN texas (M21409)	(220) TACGGCTTACGCTTACGCTTGAGTCGATAGATGCTTATACGAG
NDV HN CA02 (EF520717)	(210) TACGGCTTACGCTTACGCTTGAGTCGATAGATGCTTATACGAG
NDV HN MEX (AY288999)	(210) TACGGCTTACGCTTACGCTTGAGTCGATAGATGCTTATACGAG
351	400
NDV HN (FJ608369)	(260) AGCTGGCTTCTGGATTCGCCATGGCTACTTACGCTTACGCTTACGAG
NDV HN (ZJ1 strain)	(260) AGCTGGCTTCTGGATTCGCCATGGCTACTTACGCTTACGCTTACGAG
NDV HN LaSota (M24709)	(351) AGCTGGCTTCTGGATTCGCCATGGCTACTTACGCTTACGCTTACGAG
NDV HN texas (M21409)	(270) AGCTGGCTTCTGGATTCGCCATGGCTACTTACGCTTACGCTTACGAG
NDV HN CA02 (EF520717)	(260) AGCTGGCTTCTGGATTCGCCATGGCTACTTACGCTTACGCTTACGAG
NDV HN MEX (AY288999)	(260) AGCTGGCTTCTGGATTCGCCATGGCTACTTACGCTTACGCTTACGAG

### 도면7ab

## 도면7ac

801 850

NDV HN (FJ608369) (710) CCTGCGACTGTCAGTCACCCCTTTGGTTGTCATTCGCTTTCCTCTAG  
 NDV HN (ZJ1 strain) (710) CCTTCAGTCAGTCACCCCTTTGGTTGTCATTCGCTTTCCTCTAG  
 NDV HN LaSota (M24709) (801) CTTCAGTCAGTCACCCCTTTGGTTGTCATTCGCTTTCCTCTAG  
 NDV HN texas (M21409) (720) CTTCAGTCAGTCACCCCTTTGGTTGTCATTCGCTTTCCTCTAG  
 NDV HN CA02 (EF520717) (710) CTTCAGTCAGTCACCCCTTTGGTTGTCATTCGCTTTCCTCTAG  
 NDV HN MEX (AY288999) (710) CTTCAGTCAGTCACCCCTTTGGTTGTCATTCGCTTTCCTCTAG

851 900

NDV HN (FJ608369) (760) GTCACAGGGACTGTCACCCCTTTGGTTGTCATTCGCTTTCCTCTAG  
 NDV HN (ZJ1 strain) (760) GTCACAGGGACTGTCACCCCTTTGGTTGTCATTCGCTTTCCTCTAG  
 NDV HN LaSota (M24709) (851) GTCACAGGGACTGTCACCCCTTTGGTTGTCATTCGCTTTCCTCTAG  
 NDV HN texas (M21409) (770) GTCACAGGGACTGTCACCCCTTTGGTTGTCATTCGCTTTCCTCTAG  
 NDV HN CA02 (EF520717) (760) GTCACAGGGACTGTCACCCCTTTGGTTGTCATTCGCTTTCCTCTAG  
 NDV HN MEX (AY288999) (760) GTCACAGGGACTGTCACCCCTTTGGTTGTCATTCGCTTTCCTCTAG

901 950

NDV HN (FJ608369) (810) GTCACAGGGACTGTCACCCCTTTGGTTGTCATTCGCTTTCCTCTAG  
 NDV HN (ZJ1 strain) (810) GTCACAGGGACTGTCACCCCTTTGGTTGTCATTCGCTTTCCTCTAG  
 NDV HN LaSota (M24709) (901) GTCACAGGGACTGTCACCCCTTTGGTTGTCATTCGCTTTCCTCTAG  
 NDV HN texas (M21409) (820) GTCACAGGGACTGTCACCCCTTTGGTTGTCATTCGCTTTCCTCTAG  
 NDV HN CA02 (EF520717) (810) GTCACAGGGACTGTCACCCCTTTGGTTGTCATTCGCTTTCCTCTAG  
 NDV HN MEX (AY288999) (810) GTCACAGGGACTGTCACCCCTTTGGTTGTCATTCGCTTTCCTCTAG

951 1000

NDV HN (FJ608369) (860) AGACACAGGGACTTTCATTCGTTGTCACCCCTTTGGTTGTCATTCGCTTTCCTCTAG  
 NDV HN (ZJ1 strain) (860) AGACACAGGGACTTTCATTCGTTGTCACCCCTTTGGTTGTCATTCGCTTTCCTCTAG  
 NDV HN LaSota (M24709) (951) ATTCACAGGGACTTTCATTCGTTGTCACCCCTTTGGTTGTCATTCGCTTTCCTCTAG  
 NDV HN texas (M21409) (870) ATTCACAGGGACTTTCATTCGTTGTCACCCCTTTGGTTGTCATTCGCTTTCCTCTAG  
 NDV HN CA02 (EF520717) (860) ATTCACAGGGACTTTCATTCGTTGTCACCCCTTTGGTTGTCATTCGCTTTCCTCTAG  
 NDV HN MEX (AY288999) (860) ATTCACAGGGACTTTCATTCGTTGTCACCCCTTTGGTTGTCATTCGCTTTCCTCTAG

1001 1050

NDV HN (FJ608369) (910) GCGCGTCCTTTATTCGACCCCTTTGGTTGTCATTCGCTTTCCTCTAG  
 NDV HN (ZJ1 strain) (910) GCGCGTCCTTTATTCGACCCCTTTGGTTGTCATTCGCTTTCCTCTAG  
 NDV HN LaSota (M24709) (1001) GTCGACAGGGACTTTCATTCGTTGTCACCCCTTTGGTTGTCATTCGCTTTCCTCTAG  
 NDV HN texas (M21409) (920) GTCGACAGGGACTTTCATTCGTTGTCACCCCTTTGGTTGTCATTCGCTTTCCTCTAG  
 NDV HN CA02 (EF520717) (910) GTCGACAGGGACTTTCATTCGTTGTCACCCCTTTGGTTGTCATTCGCTTTCCTCTAG  
 NDV HN MEX (AY288999) (910) GTCGACAGGGACTTTCATTCGTTGTCACCCCTTTGGTTGTCATTCGCTTTCCTCTAG

1051 1100

NDV HN (FJ608369) (960) CAAACCCGATTTCACCACTGACACTGACACCCGTTGTCATTCGCTTTCCTCTAG  
 NDV HN (ZJ1 strain) (960) CAAACCCGATTTCACCACTGACACCCGTTGTCATTCGCTTTCCTCTAG  
 NDV HN LaSota (M24709) (1051) GAAACCCGATTTCACCACTGACACCCGTTGTCATTCGCTTTCCTCTAG  
 NDV HN texas (M21409) (970) GAAACCCGATTTCACCACTGACACCCGTTGTCATTCGCTTTCCTCTAG  
 NDV HN CA02 (EF520717) (960) AARACCCGATTTCACCACTGACACCCGTTGTCATTCGCTTTCCTCTAG  
 NDV HN MEX (AY288999) (960) AARACCCGATTTCACCACTGACACCCGTTGTCATTCGCTTTCCTCTAG

1101 1150

NDV HN (FJ608369) (1010) ATGAGCGTCATTCATTCGACACCCGTTGTCATTCGCTTTCCTCTAG  
 NDV HN (ZJ1 strain) (1010) ATGAGCGTCATTCATTCGACACCCGTTGTCATTCGCTTTCCTCTAG  
 NDV HN LaSota (M24709) (1101) ATGAGCGTCATTCATTCGACACCCGTTGTCATTCGCTTTCCTCTAG  
 NDV HN texas (M21409) (1020) ATGAGCGTCATTCATTCGACACCCGTTGTCATTCGCTTTCCTCTAG  
 NDV HN CA02 (EF520717) (1010) ATGAGCGTCATTCATTCGACACCCGTTGTCATTCGCTTTCCTCTAG  
 NDV HN MEX (AY288999) (1010) ATGAGCGTCATTCATTCGACACCCGTTGTCATTCGCTTTCCTCTAG

1151 1200

NDV HN (FJ608369) (1060) ATGGCGTCAGCTTCATTCATTCGACACCCGTTGTCATTCGCTTTCCTCTAG  
 NDV HN (ZJ1 strain) (1060) ATGGCGTCAGCTTCATTCATTCGACACCCGTTGTCATTCGCTTTCCTCTAG  
 NDV HN LaSota (M24709) (1151) ATGGCGTCAGCTTCATTCATTCGACACCCGTTGTCATTCGCTTTCCTCTAG  
 NDV HN texas (M21409) (1070) ATGGCGTCAGCTTCATTCATTCGACACCCGTTGTCATTCGCTTTCCTCTAG  
 NDV HN CA02 (EF520717) (1060) ATGGCGTCAGCTTCATTCATTCGACACCCGTTGTCATTCGCTTTCCTCTAG  
 NDV HN MEX (AY288999) (1060) ATGGCGTCAGCTTCATTCATTCGACACCCGTTGTCATTCGCTTTCCTCTAG

## 도면7ad

		1201		1250
NDV HN (FJ608369)	(1110)	GCAGGCGCTTCTTATGCCATGAACTGCTGACACCTTGGCTAGCTAGGCGCGCG		
NDV HN (ZJ1 strain)	(1110)	GCAGGCGCTTCTTATGCCATGAACTGCTGACACCTTGGCTAGCTAGGCGCGCG		
NDV HN LaSota (M24709)	(1201)	CGAGGCTATCGCTTCTTATGCCATGAACTGCTGACACCTTGGCTAGCTAGGCGCG		
NDV HN Texas (M21409)	(1120)	CGAGGCTATCGCTTCTTATGCCATGAACTGCTGACACCTTGGCTAGCTAGGCGCG		
NDV HN CA02 (EF520717)	(1110)	CGAGGCGCTTCTTATGCCATGAACTGCTGACACCTTGGCTAGCTAGGCGCGCG		
NDV HN MEX (AY288999)	(1110)	CGAGGCGCTTCTTATGCCATGAACTGCTGACACCTTGGCTAGCTAGGCGCGCG		
		1251		1300
NDV HN (FJ608369)	(1160)	TCTGACTATTCACCTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAA		
NDV HN (ZJ1 strain)	(1160)	TCTGACTATTCACCTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAA		
NDV HN LaSota (M24709)	(1251)	TACCTGACTATTCACCTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAA		
NDV HN Texas (M21409)	(1170)	TACCTGACTATTCACCTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAA		
NDV HN CA02 (EF520717)	(1160)	TCTGACTATTCACCTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAA		
NDV HN MEX (AY288999)	(1160)	TCTGACTATTCACCTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAA		
		1301		1350
NDV HN (FJ608369)	(1210)	ATCTCTCGCTGAGCGACATCTCACTTCTTGTACCTACCGAGGGTTTCATA		
NDV HN (ZJ1 strain)	(1210)	ATCTCTCGCTGAGCGACATCTCACTTCTTGTACCTACCGAGGGTTTCATA		
NDV HN LaSota (M24709)	(1301)	ATCTCTCGCTGAGCGACATCTCACTTCTTGTACCTACCGAGGGTTTCATA		
NDV HN Texas (M21409)	(1220)	ATCTCTCGCTGAGCGACATCTCACTTCTTGTACCTACCGAGGGTTTCATA		
NDV HN CA02 (EF520717)	(1210)	ATCTCTCGCTGAGCGACATCTCACTTCTTGTACCTACCGAGGGTTTCATA		
NDV HN MEX (AY288999)	(1210)	ATCTCTCGCTGAGCGACATCTCACTTCTTGTACCTACCGAGGGTTTCATA		
		1351		1400
NDV HN (FJ608369)	(1260)	TTCCTGCGCTGGCTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAA		
NDV HN (ZJ1 strain)	(1260)	TTCCTGCGCTGGCTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAA		
NDV HN LaSota (M24709)	(1351)	TTCCTGCGCTGGCTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAA		
NDV HN Texas (M21409)	(1270)	TTCCTGCGCTGGCTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAA		
NDV HN CA02 (EF520717)	(1260)	TTCCTGCGCTGGCTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAA		
NDV HN MEX (AY288999)	(1260)	TTCCTGCGCTGGCTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAA		
		1401		1450
NDV HN (FJ608369)	(1310)	CACTCCATCTGCTCTTCTTACCTGTTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAA		
NDV HN (ZJ1 strain)	(1310)	CACTCCATCTGCTCTTCTTACCTGTTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAA		
NDV HN LaSota (M24709)	(1401)	CACTCCATCTGCTCTTCTTACCTGTTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAA		
NDV HN Texas (M21409)	(1320)	CACTCCATCTGCTCTTCTTACCTGTTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAA		
NDV HN CA02 (EF520717)	(1310)	CACTCCATCTGCTCTTCTTACCTGTTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAA		
NDV HN MEX (AY288999)	(1310)	CACTCCATCTGCTCTTCTTACCTGTTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAA		
		1451		1500
NDV HN (FJ608369)	(1360)	CTTCTGCCAGGCCTACGCGAGCTGGCTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAA		
NDV HN (ZJ1 strain)	(1360)	CTTCTGCCAGGCCTACGCGAGCTGGCTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAA		
NDV HN LaSota (M24709)	(1451)	CTTCTGCCAGGCCTACGCGAGCTGGCTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAA		
NDV HN Texas (M21409)	(1370)	CTTCTGCCAGGCCTACGCGAGCTGGCTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAA		
NDV HN CA02 (EF520717)	(1360)	CTTCTGCCAGGCCTACGCGAGCTGGCTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAA		
NDV HN MEX (AY288999)	(1360)	CTTCTGCCAGGCCTACGCGAGCTGGCTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAA		
		1501		1550
NDV HN (FJ608369)	(1410)	TACCTGATCTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAA		
NDV HN (ZJ1 strain)	(1410)	TACCTGATCTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAA		
NDV HN LaSota (M24709)	(1501)	TACCTGATCTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAA		
NDV HN Texas (M21409)	(1420)	TACCTGATCTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAA		
NDV HN CA02 (EF520717)	(1410)	TACCTGATCTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAA		
NDV HN MEX (AY288999)	(1410)	TACCTGATCTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAA		
		1551		1600
NDV HN (FJ608369)	(1460)	TCTTCGGGGCGGCGACGCTTCTTACCTGCTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAA		
NDV HN (ZJ1 strain)	(1460)	TCTTCGGGGCGGCGACGCTTCTTACCTGCTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAA		
NDV HN LaSota (M24709)	(1551)	TCTTCGGGGCGGCGACGCTTCTTACCTGCTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAA		
NDV HN Texas (M21409)	(1470)	TCTTCGGGGCGGCGACGCTTCTTACCTGCTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAA		
NDV HN CA02 (EF520717)	(1460)	TCTTCGGGGCGGCGACGCTTCTTACCTGCTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAA		
NDV HN MEX (AY288999)	(1460)	TCTTCGGGGCGGCGACGCTTCTTACCTGCTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAA		

## 도면7ae

NDV HN (FJ608369) (1510)	1601	GCAGATTTGACAGATATCCCGAGCTGTGCAACCGCTGTTGAG
NDV HN (ZJ1 strain) (1510)		GCAGATTTGACAGATATCCCGAGCTGTGCAACCGCTGTTGAG
NDV HN LaSota (M24709) (1601)		GCAGATTTGACAGATATCCCGAGCTGTGCAACCGCTGTTGAG
NDV HN texas (M21409) (1520)		GCAGATTTGACAGATATCCCGAGCTGTGCAACCGCTGTTGAG
NDV HN CA02 (EF520717) (1510)		GCAGATTTGACAGATATCCCGAGCTGTGCAACCGCTGTTGAG
NDV HN MEX (AY288999 ) (1510)		GCAGATTTGACAGATATCCCGAGCTGTGCAACCGCTGTTGAG
NDV HN (FJ608369) (1560)	1651	CAGCAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
NDV HN (ZJ1 strain) (1560)		CAGCAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
NDV HN LaSota (M24709) (1651)		CAGCAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
NDV HN texas (M21409) (1570)		CAGCAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
NDV HN CA02 (EF520717) (1560)		CAGCAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
NDV HN MEX (AY288999 ) (1560)		CAGCAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
NDV HN (FJ608369) (1610)	1700	CGAATGATTTGATTTGACAGATATCCCGAGCTGTGCAACCGCTG
NDV HN (ZJ1 strain) (1610)		CGAATGATTTGATTTGACAGATATCCCGAGCTGTGCAACCGCTG
NDV HN LaSota (M24709) (1701)		CGAATGATTTGATTTGACAGATATCCCGAGCTGTGCAACCGCTG
NDV HN texas (M21409) (1620)		CGAATGATTTGATTTGACAGATATCCCGAGCTGTGCAACCGCTG
NDV HN CA02 (EF520717) (1610)		CGAATGATTTGATTTGACAGATATCCCGAGCTGTGCAACCGCTG
NDV HN MEX (AY288999 ) (1610)		CGAATGATTTGATTTGACAGATATCCCGAGCTGTGCAACCGCTG
NDV HN (FJ608369) (1660)	1750	CGAATGATTTGATTTGACAGATATCCCGAGCTGTGCAACCGCTG
NDV HN (ZJ1 strain) (1660)		CGAATGATTTGATTTGACAGATATCCCGAGCTGTGCAACCGCTG
NDV HN LaSota (M24709) (1751)		CGAATGATTTGATTTGACAGATATCCCGAGCTGTGCAACCGCTG
NDV HN texas (M21409) (1670)		CGAATGATTTGATTTGACAGATATCCCGAGCTGTGCAACCGCTG
NDV HN CA02 (EF520717) (1660)		CGAATGATTTGATTTGACAGATATCCCGAGCTGTGCAACCGCTG
NDV HN MEX (AY288999 ) (1660)		CGAATGATTTGATTTGACAGATATCCCGAGCTGTGCAACCGCTG
NDV HN (FJ608369) (1710)	1800	GGGGAAATTAGGAGATGGCTCCCTTATTAGGAGGAGGAGGAGG
NDV HN (ZJ1 strain) (1710)		GGGGAAATTAGGAGATGGCTCCCTTATTAGGAGGAGGAGGAGG
NDV HN LaSota (M24709) (1801)		GGGGAAATTAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
NDV HN texas (M21409) (1720)		GGGGAAATTAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
NDV HN CA02 (EF520717) (1710)		GGGGAAATTAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
NDV HN MEX (AY288999 ) (1710)		GGGGAAATTAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
NDV HN (FJ608369) (1714)	1850	AGTT-----
NDV HN (ZJ1 strain) (1717)		AGTT-----
NDV HN LaSota (M24709) (1851)		GGTAGAGGAAGCCAGGTCTGGCTAGTTGACTCAATTATAAGGAGTTGGA
NDV HN texas (M21409) (1720)		GGTAGAGGAAGCCAGGTCTGGCTAGTTGACTCAATTATAAGGAGTTGGA
NDV HN CA02 (EF520717) (1717)		GGTT-----
NDV HN MEX (AY288999 ) (1717)		GGTT-----
NDV HN (FJ608369) (1714)	1900	-----
NDV HN (ZJ1 strain) (1717)		-----
NDV HN LaSota (M24709) (1851)		AAAGATGGCATTGTATCACCTATCTCTCGGACATCAAGAATCAAACCGAA
NDV HN texas (M21409) (1770)		AAAGATGGCATTGTATCACCTATCTCTCGGACACCAAGAATCAAACGTAA
NDV HN CA02 (EF520717) (1717)		-----
NDV HN MEX (AY288999 ) (1717)		-----
NDV HN (FJ608369) (1714)	1950	-----
NDV HN (ZJ1 strain) (1717)		-----
NDV HN LaSota (M24709) (1901)		TGCCGGCGCGTCTCGAATTCCATGTTGCCAGTTGACCAAAATCAGCCAG
NDV HN texas (M21409) (1820)		TGCCGGTGCAGCTCGAATTCCATGTCAGGCCAGTTGACCAAAATCAGCCAG
NDV HN CA02 (EF520717) (1717)		-----
NDV HN MEX (AY288999 ) (1717)		-----
NDV HN (FJ608369) (1714)	2000	-----
NDV HN (ZJ1 strain) (1717)		-----
NDV HN LaSota (M24709) (1951)		TGCTCATGCGATCAGATTAAGCCTTGTCAATAGTCTCTGATTAAGAAAA
NDV HN texas (M21409) (1870)		TGCTCATGCGATCAGATCAAGTCTGTCAATAGTCCCTGATTAAG-----
NDV HN CA02 (EF520717) (1717)		-----
NDV HN MEX (AY288999 ) (1717)		-----

## 도면7af

2001

NDV HN (FJ608369)	(1714)	--
NDV HN (ZJ1 strain)	(1717)	--
NDV HN LaSota (M24709)	(2001)	AA
NDV HN texas (M21409)	(1916)	--
NDV HN CA02 (EF520717)	(1717)	--
NDV HN MEX (AY288999 )	(1717)	--

NDV HN CA02 (EF520717):	SEQ ID NO:2
NDV HN MEX (AY288999):	SEQ ID NO:8
NDV HN LaSota (M24709):	SEQ ID NO:6
NDV HN texas (M21409):	SEQ ID NO:4
NDV HN (FJ608369):	SEQ ID NO:16
NDV HN (ZJ1 군주 ):	SEQ ID NO:18

서열 일치성 %:

SEQ ID NO:	2	4	6	8	16	18
2	100	83.9%	83.5%	98.9%	87.2%	87.9%
4		100	83.8%	84.2%	82.8%	82.9%
6			100	96.3%	82.1%	82.2%
8				100	87.5%	88.2%
16					100	98.4%
18						100

Vector NTI 11.0 (PC) software package (Invitrogen, 1600 Faraday Ave., Carlsbad, CA).

### 도면7ba

SEQ ID NO:1 과 SEQ ID NO:2 의 정렬

SEQ ID NO:1	(1)	1	50
SEQ ID NO:2	(1)	ANGGACCTGTCCTCTCCCGCTGTCCTCGACGAGGGAGCTGAGGCC 51	100
SEQ ID NO:1	(51)	CAAGAACACCTGKXGKCTTCGCTTCCTGCTGTCCTCGACGAGGGAGCT 51	150
SEQ ID NO:2	(51)	ANAGTCACTGCGCCCGCTTTCGGCTCCACTCTATCTTAATG 101	200
SEQ ID NO:1	(101)	TCATGACCTCGCCCTCTCGCTGCGGCGCTCGTCCTACGGCTGAGGCT 101	250
SEQ ID NO:2	(101)	TAATGCAATTACCTATCTGCTGAGGCGGCTGCTATACAGCTGCGGCT 151	300
SEQ ID NO:1	(151)	GGCACCCTACAGATCTGCCGAGANTCCTGACTGTTCTCCGCGCCG 151	350
SEQ ID NO:2	(151)	ACGCGCGAACACCTCGCGCTATATCGCGGAGACTCCAGGCGAGA 201	400
SEQ ID NO:1	(201)	GGATCCGCTTCACCTCCCTCTCTACCTCCACACGGATTCGTTCTCC 201	450
SEQ ID NO:2	(201)	GGTGTAGGTTTACATTTTACTCTTACTCTTACATCTGAACTGGTACAGGG 251	500
SEQ ID NO:1	(251)	TCCTTCRAGCAGGTTCTCGCGCTGCGCTCTGCGCTCTCTTACACCG 251	550
SEQ ID NO:2	(251)	TATATATACAGGTTGGCGCTTGTGACTCCCCGGTGGCGTGTGTTGATCTG 301	600
SEQ ID NO:1	(301)	AGCCGCATTTGCAACCCGCTTCCTCCCTCAGCTTCCCTCAGGTCCTCGCT 301	650
SEQ ID NO:2	(301)	TCTATATTTGAACTGCAATCTCTCTGTTTCTGATCTTCTATCTATGCGG 351	700
SEQ ID NO:1	(351)	CGGGCACTCGTCCGCCCTCGCGCCCGCCCGCTCCGAACTACCTGTTACACCG 351	750
SEQ ID NO:2	(351)	TGCAATTTAGTAGTGGTGGTGGCTGGCAACTGTTCTATGAACTGGGTTATNTTG 401	800
SEQ ID NO:1	(401)	GGCGCGCTCGCCGAGCTCTCGCTCGCGACGACTACAGCTGATCGGCG 401	850
SEQ ID NO:2	(401)	GGGGGTTAGGTTAAAGGCTCTCTAGTACTGAGTGTGACCGAGTCTGCG 451	900
SEQ ID NO:1	(451)	TCCTTCCTCTAGGCCCTTACCCAGGAGGACCTCTACTCTCTCCCTGCCCG 451	950
SEQ ID NO:2	(451)	TCTATCTCTTCCTACATATGAACTCTGAACTCTGACTTTTACCCGCGCCAC 501	1000
SEQ ID NO:1	(501)	TACCGCCCTCCGGCTCGCCCTCCCTCTAGCTGAGCTGACATCTCCGCT 501	1050
SEQ ID NO:2	(501)	CAACAGTTTCAGGCTCTCTGGTGTGGTGTGGCTCACTTCACAGCTGAGGGCT 551	1100
SEQ ID NO:1	(551)	ACTACTCTGCTACCCATTAACGTCATCCCTTCGGGTTGGCTGCGCACCACCC 551	1150
SEQ ID NO:2	(551)	ACTATTTGCTTACTCTACATGTTGATTTATCTGGCTGGAGAGTCTACAGC 601	1200
SEQ ID NO:1	(601)	CGACGCCACCGTACCTCGCCCTCGAGGTTCTCTCTAGCTGGCCCG 601	1250
SEQ ID NO:2	(601)	CGCTCACATCTGTTATGGCAACTAGCTTGTGCTTCGGAGATCTGACAGC 651	1300
SEQ ID NO:1	(651)	CCCGCTCTCTTCTTCTACCCCTCGAGGCTTCACCTCTGCTCTACCG 651	1350
SEQ ID NO:2	(651)	GAAGGGTTATCTCTTCTACTCTGCGTCTCCATCTTATTAATGCTCC 701	1400
SEQ ID NO:1	(701)	ACCGCCTAGGCTTCCTGCTCTCCCGCTCCTGGCTGCTGCTGCT 701	1450
SEQ ID NO:2	(701)	ATCGGGAACTCTCTGCACTGTTGACTGCACTCTCTTCTGATCTGCT 751	1500
SEQ ID NO:1	(751)	TCCTTCCTGAGGCTTCCTGCTCTCCCGCTCCTGGCTGCTGCTGCT 751	1550
SEQ ID NO:2	(751)	TCCTCTTAACTGCTACAGGACTCTGAGGCTTATTAAGCTTCTACCTAC 801	1600
SEQ ID NO:1	(801)	CGCTCTGAGGCTTCACCGCCGCTTCGCTTCGCTGCTGCTGCT 801	1650
SEQ ID NO:2	(801)	CAACACATGTTGCTGAACTGTTAGGTTGCTGCTGCTGCT 851	1700
SEQ ID NO:1	(851)	AGGGACCTCTGAGGCTTCACCGCCGCTTCGCTTCGCTGCTGCT 851	1750
SEQ ID NO:2	(851)	GGGCTTAACTGCTACAGGACTCTGAGGCTTATTAAGCTTCTACCTAC 901	1800
SEQ ID NO:1	(901)	GGCTCTGAGGCTTCACCGCCGCTTCGCTTCGCTGCTGCT 901	1850
SEQ ID NO:2	(901)	GAATGAGGAGGAGGTTCTATTGACGCGCTGCTGCT 951	1900
SEQ ID NO:1	(951)	CGCTCTGCTCTGAGGCTTCACCGCCGCTTCGCTTCGCTGCT 951	1950
SEQ ID NO:2	(951)	TGAGGAGTAAACCCATTCACTAGGCTACAGCTGAGGAGGAGA 1000	2000

## 도면7bb

SEQ ID NO:1 (1001)	ACGCGATCTACACGGGCTACACACACACCTGGCTTGACCGAGGGATAC	1001	1050
SEQ ID NO:2 (1001)	ATGTAATATACAAAGGGCTATATACACATGGGGGGTGAACAGATTCAC	1051	1100
SEQ ID NO:1 (1051)	CGGNTCCCGCTGGCCGAGTCCTCTCTACAGCCGCTGTTTCGCGCCAC	1101	
SEQ ID NO:2 (1051)	CGATTCGGATGGTAAATCTCTGATAGGCTGGACGGTTGTTGGGA	1150	
SEQ ID NO:1 (1101)	GGCGTCCAGGGGGCGCTCTCTCGNTCAAGGTCRGCGCAGGCCCGAG	1151	
SEQ ID NO:2 (1101)	GGCGCTAAGCRAKCCATCTATCTATCAAATAAAKATCTTGGGC	1200	
SEQ ID NO:1 (1151)	AGGACCCCTGCTCACCGCTTCCCTAAACACCTCACCTTATGGCCGC	1201	
SEQ ID NO:2 (1151)	AGGACCCGCTGCTGACTGTACCCGAANTACACTCACTGGGGCC	1250	
SEQ ID NO:1 (1201)	GAGGCCCGCATCTCACCGCTGGTACCTCCACTTCTTACCCAGGGCG	1251	
SEQ ID NO:2 (1201)	GAGGCCAGANTCCTCAAGAACATCTGTTCTGTACCAAGCCAGG	1300	
SEQ ID NO:1 (1251)	CTCGAGCTACTTTCCCTTCCCTTACCTTACCCCTTGACTGTTGGGAA	1301	
SEQ ID NO:2 (1251)	GTTTCATACTTTTCTCCCTTACTATACCTTAACTACAGTGGGAA	1350	
SEQ ID NO:1 (1301)	AGACTCTACCTCTCACGGCTTACACCTTAAACGCTTCAGGCCCG	1351	
SEQ ID NO:2 (1301)	AAACGGCTCTCTCTCACACTCTTAACTTAACTGGTTCACTGGGCG	1400	
SEQ ID NO:1 (1351)	GGAGCCCTCCCTGGCCAGGGAGCCCGCTGGCTTAACTCTGCCTAC	1401	
SEQ ID NO:2 (1351)	GTTACTGCTCTTCCAGGATTCAGAAAGGNSCCIAACTCANTTACAC	1450	
SEQ ID NO:1 (1401)	CGGCCTTACACGGACCTTACCCCTGTCCTTAAACCAACCTAACCC	1451	
SEQ ID NO:2 (1401)	TGCAAGCTTAACTTATGTTACCCCTTACGTTCTTCATAGGAAATACACT	1500	
SEQ ID NO:1 (1451)	TTGGCCGCTCTTGGCTACTTACCTCTGATAACGAGGAGCCCGCCAC	1551	
SEQ ID NO:2 (1451)	TGGTACGGGTGTTGGACAACTCTGATATGACAACAAAGCTCAAT	1550	
SEQ ID NO:1 (1501)	CGGCGCTCCGGCTTTCGACTACAGCTTCCCGCTTACACCGCC	1601	
SEQ ID NO:2 (1501)	CGCGTACTGCAATATTTCGACTACACATCTGGAGTCGCTAACCGGGT	1650	
SEQ ID NO:1 (1551)	CTCCCTACCTCCACCGAGGGCCCTAACACCCCTTACCTGTTTAAAG	1651	
SEQ ID NO:2 (1551)	AAAGTKGAGGAGAACAAAGGAACTACAGGAAATGNGATGTTTAAAG	1700	
SEQ ID NO:1 (1601)	TTGCGACAGTACACAGGTTCTCTCTCTCTGTCGGAGATGAC	1701	1716
SEQ ID NO:2 (1601)	TTGTCACAGCTAAATTAAGCTTATGTTGTTAGGATTCGAGAAANTATCCAA	1700	
SEQ ID NO:1 (1651)	ACCCCTTCGGAGGGTTCCCTCTGTCGGCCGGTCTGGAGATCTCA	1701	
SEQ ID NO:2 (1651)	ACCTTATTTGGGAAATCAAGATCCGTTCTTACTGTCGAGATCTCA	1701	
SEQ ID NO:1 (1701)	GGACGNTCGGTTTAA	1701	
SEQ ID NO:2 (1701)	AGATGTTAGGTTAA	1701	

SEQ ID NO :1 과 2 사이의 서열 일치성% : 72.4%

### 도면7bc

SEQ ID NO:16 과 SEQ ID NO:22 의 정렬

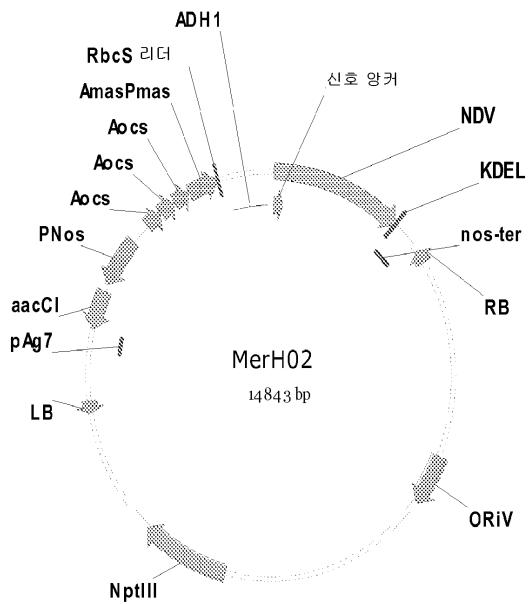
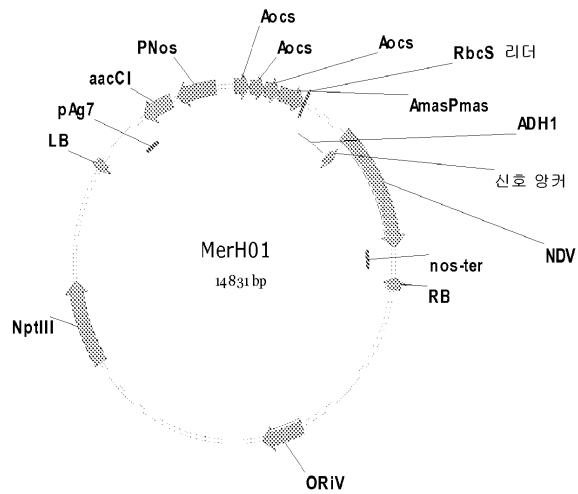
SEQ ID NO:16	(1)	1	50
SEQ ID NO:22	(1)	RTGGGACCCGGCGTTTACAGACGTCSCTCTGGGCGATATGCGAAGACAGAC	
		ATGGCCGGGCGCCCTCAACCGCTGTGCGCTTGGAGAACCGAGGCGCGAGGC	
	51		100
SEQ ID NO:16	(51)	AACGACATATGGCSCCTGTGTTTCGCGATGCGACTCTTAATTTTARTGG	
SEQ ID NO:22	(51)	CAAGACACCTTGCGAGGCTCTGTGCGCATGCCGCGTGCTCGCTGCG	
		101	150
SEQ ID NO:16	(101)	TATGACTCTAECTATCTCCGACGCTSCCTGGCATAGTCGGCGGGCG	
SEQ ID NO:22	(101)	TCATGACCGGGGAGATGCGCCCGSCCTGTGCCCTACTCCCGCTCGG	
		151	200
SEQ ID NO:16	(151)	AGTCGGCCCGGCGAGCTCGCAGGCGTATCGNCTTGNTCTTAAAGACAGA	
SEQ ID NO:22	(151)	ACGACATCCGGGAACTTGCGCGATCAGGACCCCTAACATGAAACCGA	
		201	250
SEQ ID NO:16	(201)	CGATACGTTAACCTTAACTGCTTGGACTAGATTTGAAAGATGAA	
SEQ ID NO:22	(201)	GGCGCAGGTGAGCTCGCTGCTGCTGCTGCGCTTATCGGCCGCA	
		251	300
SEQ ID NO:16	(251)	TATTCGAGGCTGGGGCTCTGATACCGGCGTACTAACATGAA	
SEQ ID NO:22	(251)	TCATACGAAATTCGCTTGGAGAGCTTGGCGCTGCTCACAGCG	
		301	350
SEQ ID NO:16	(301)	TCTTGTGATTGAGTCCAAATANACTCTCTTCTATACATTTACCGGC	
SEQ ID NO:22	(301)	AGCGATGACATGAAACGGGATCACCTCTGTGAGCTCCCGATGAGCG	
		351	400
SEQ ID NO:16	(351)	TGGCGGATACGGGAGACTGGGGGCTTTCATGACCGAATTTATCGG	
SEQ ID NO:22	(351)	CGCGGAGATTCGGGCGGAGGACTCATCGCTTACGCGACGCGACGG	
		401	450
SEQ ID NO:16	(401)	TTCCTGACATAGGGAGACTGGGGGCTTTCATGACCGAATTTATCGG	
SEQ ID NO:22	(401)	CGCGGAGATTCGGGCGGAGGACTCATCGCTTACGCGACGCGACGG	
		451	500
SEQ ID NO:16	(451)	TTCCTTCCTTCGACATTCAGGACACTTGGGATTTCTCGCCGGGCGCTC	
SEQ ID NO:22	(451)	TCATCGCCCTCCGCTACGAGGAGCTCTCACTACCTTCGCGCGCG	
		501	550
SEQ ID NO:16	(501)	TACAGGATCGGGGTTGGCTACTGGGTACCCCTTATTGACATGAGCGACGCG	
SEQ ID NO:22	(501)	CGCGGAGGGGCTGCGCCGGGCTTCCGACATGTCGCGCGCG	
		551	600
SEQ ID NO:16	(551)	ATTTCGCTTCTTCATCAGATGCTCTACATGGGCTTGGAGAGATTCCTCA	
SEQ ID NO:22	(551)	ACGATTCGCTACACCCACAGCTGATCTGTTGGGGTGCGCGCCACAGC	
		601	650
SEQ ID NO:16	(601)	CGCTCGACATGAACTTACCGACCTTCTGTGCTTGGGACATTCGACAGG	
SEQ ID NO:22	(601)	CTACGGCCACGAGTACCTGGGGGCTGCTCTCCAGGACCCGGGACCGG	
		651	700
SEQ ID NO:16	(651)	GAAGGTATTCGCTTCTACCTTGCGCTCCACATTAGACATTCACGAGA	
SEQ ID NO:22	(651)	CCCGCGGAGCTCTCCACATCTCCGCTCTACATACCTGACATGAGCG	
		701	750
SEQ ID NO:16	(701)	ATCGGACGCTTCGACATGTCGACCCGCTTACGCTTCTGATCTGGG	
SEQ ID NO:22	(701)	ACCGCGACTGCTTCAGCGCTTCGGCGCCCTCGGCTGCGCTGCGCG	
		751	800
SEQ ID NO:16	(751)	TCTCTCTGGCTTCAGGAGCTGACAGGAGGATTCAGCTACCTGGG	
SEQ ID NO:22	(751)	TGCTCTCTGGCTGACCCGCGACGGGCTTCAGGAGGACTACATGCTCTGG	
		801	850
SEQ ID NO:16	(801)	CAACACATGGCTCCAGGAAAGGGTACGGGTTTACCGCTTAAACGCTTCTGAG	
SEQ ID NO:22	(801)	CCCGCGGAGGGCTGCGACGGGCGCTGCGCTGCGCTGCGCG	
		851	900
SEQ ID NO:16	(851)	AGGGCTTACGACACCAAGCTTACGGGTTTACCGCTTAAACGCTTCTGAG	
SEQ ID NO:22	(851)	GGGGCTGCGACGGGCTGCTCTTCAGGACGGGCTTACGCTTCTGG	

## 도면 7bd

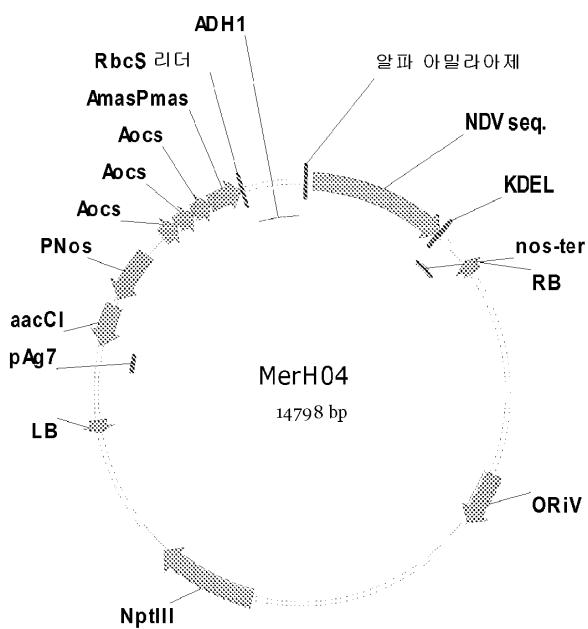
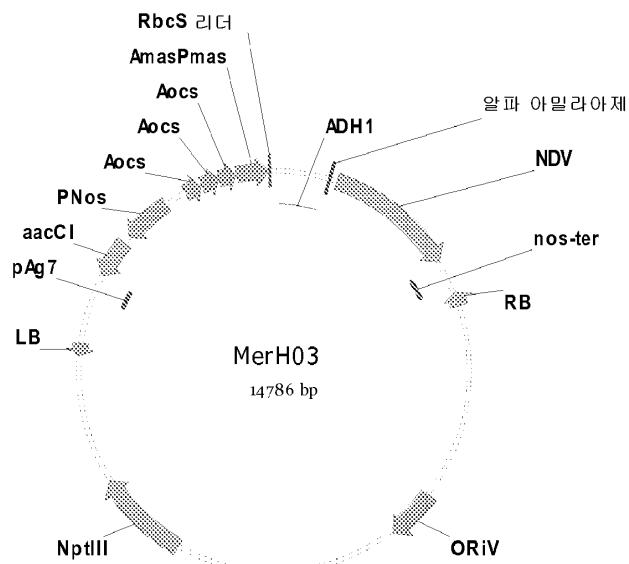
		901	950
SEQ ID NO:16	(901)	GATCTGGGAGCAGGGTCTTATGACACCCSTTATGCTTCCAGCTTAA	
SEQ ID NO:22	(901)	GCTCTGGGGCCGCTAGCTCATGCAACAGAGCTCGCTTCCCGCTGTA	
	951		1000
SEQ ID NO:16	(951)	CGAGGGGTGAAACGCGATTCAGGGAGTCGAGCTCCAAAGAGGAAAT	
SEQ ID NO:22	(951)	CGGGCCCTGGAGGCCAACCTCCCGACACGCCCGAGGGGGCGACT	
	1001		1050
SEQ ID NO:16	(1001)	ATGTATATATTAACCGCCATACACACAGATCCCGGATACAAAGCTTAC	
SEQ ID NO:22	(1001)	ACCTCATCTACACCGCCACACACAGCTCGCCGACAGAGGAC	
	1051		1100
SEQ ID NO:16	(1051)	CGATTCGGGATGCTTGTCTTATATTAACCGGGGATTTGGGAAAT	
SEQ ID NO:22	(1051)	CGATCCGGGATGCGCAGCTTACAGGCGCCCGCTTGGGCGCA	
	1101		1150
SEQ ID NO:16	(1101)	CGCTTACACGGAGCGCTTATCCATCAAGCTGTCACATCTGGGTA	
SEQ ID NO:22	(1101)	CGAGTCCACAGGGCGATCTCTCCCTCAAGGTCAGCGAGCTCGCC	
	1151		1200
SEQ ID NO:16	(1151)	AGCGGGGCTGCTGCTATTCACCTTATACACCTACACTATGAGGCG	
SEQ ID NO:22	(1151)	AGCGGGGCTGCTGACCTCCCGGAGACACACACACCTCTGGCGCG	
	1201		1250
SEQ ID NO:16	(1201)	CGAGGCGGAAATCTTCACAGTAGGGCATCTCACTCTTGTCACAGGAG	
SEQ ID NO:22	(1201)	CGAGGCGGAAATCTTCACAGTAGGGCATCTCACTCTTGTCACAGGAG	
	1251		1300
SEQ ID NO:16	(1251)	GTCCTTAATTTCTCTTCTTCTTATTAATTCACAGCACTTAACTAC	
SEQ ID NO:22	(1251)	CGACTGTACTTCAGCGCGCGCTCCGTACCCGGTACCGTCACACAC	
	1301		1350
SEQ ID NO:16	(1301)	AAAGGCTACATCCCTAGTCCTATAGCTTATGCTTCTCTGGCGA	
SEQ ID NO:22	(1301)	GGCGCCCGCTGTGCACTCGCCCTTCACCGCTTACCGCGCCCG	
	1351		1400
SEQ ID NO:16	(1351)	GCTATGCGCCCTGGCAGGCACTACCGAAAGATGCCCAACTCATGGCTAC	
SEQ ID NO:22	(1351)	GCGCGCGGGGGCTGGCGAGGCTTCGGCGCTGCGGAGACTCGCGTC	
	1401		1450
SEQ ID NO:16	(1401)	TGAACTTATTTCTCTTCTTATGCTTATGCTTATGCTTATGCTTACTCT	
SEQ ID NO:22	(1401)	CGGGCTCTACACCGACCCCTACCGCGTGTATCTCCCGCACCCACCG	
	1451		1500
SEQ ID NO:16	(1451)	TACCGGGGCTTTCGGGACGATGCTTGTATGATGACACCGAGACTTAC	
SEQ ID NO:22	(1451)	TACCGGGGCTTTCGGGACGATGCTTGTATGATGACACCGAGACTTAC	
	1501		1550
SEQ ID NO:16	(1501)	CGCGTATCTCGACTATTGCGACACCTATCCCGCTCTGTCTCCCGGTT	
SEQ ID NO:22	(1501)	CGCGTACAGGCCCTCTTCGCAACATCTCCCGGCGACCGAGCTCGCT	
	1551		1600
SEQ ID NO:16	(1551)	GAGTCGAGCAGCCACAGCGAGCTACACACATCGACACCTTTAAAG	
SEQ ID NO:22	(1551)	CTCCCTGTCCTCGACGAGGGCGCTGACACCTCTCCCGGCGACCGAG	
	1601		1650
SEQ ID NO:16	(1601)	TTCGACAGACCACTTACGCTTCTGCTTACTTACGACATACATGAA	
SEQ ID NO:22	(1601)	TCGGTTACGACCACTACGACCTACTGCTTCTCCCTGAGCTTCAC	
	1651		1700
SEQ ID NO:16	(1651)	ACCGTATTGGGAAATTAGGTCGTTCCCTTATAGTTGAGATCTCA	
SEQ ID NO:22	(1651)	ACCGTTCGGGAGGTTCCCGACAGGCGCCCTGGGAGATCTGAA	
	1701	1713	
SEQ ID NO:16	(1701)	CGATCTTACAGCT	
SEQ ID NO:22	(1701)	GGACGACCGCGTG	

SEQ ID NO:16 과 SEQ ID NO:22 사이의 일치성% 는 73% 이다.

## 도면7ca



## 도면7cb



**도면8**

## HN 선형 애피토프 영역 (박스 부분 )

NDV HN - TX/GB (P12553) (330) QSEKXYVYIYER EENDTCPDQD YQIRMAKSSY KPGREFGKGKRIQQQAILSIKVVS  
 NDV HN LaSota (AAA46659) (330) QRGFYYVYIYER EENDTCPDQD YQIRMAKSSY KPGREFGKGKRIQQQAILSIKVVS  
 NDV HN CA/02 (ABS84265) (330) QRGFYYVYIYER EENDTCPDQD YQIRMAKSSY KPGREFGKGKRIQQQAILSIKVVS  
 NDV HN MEX/96 (AAQ54638) (330) QRGFYYVYIYER EENDTCPDQD YQIRMAKSSY KPGREFGKGKRIQQQAILSIKVVS  
 NDV HN Liaoning/08(ACM67348) (330) QSEKXYVYIYER EENDTCPDQD YQIRMAKSSY KPGREFGKGKRIQQQAILSIKVVS  
 NDV HN ZJ1 (AAL18936) (330) QSEKXYVYIYER EENDTCPDQD YQIRMAKSSY KPGREFGKGKRIQQQAILSIKVVS

정렬은 하기 단백질 서열의 위치 330 과 위치 379 사이의  
아미노산을 보여준다:

NDV HN - TX/GB (P12553): SEQ ID NO:5  
 NDV HN LaSota (AAA46659): SEQ ID NO:7  
 NDV HN CA/02(ABS84265): SEQ ID NO:3  
 NDV HN MEX/96 (AAQ54638): SEQ ID NO:9  
 NDV HN Liaoning/08(ACM67348): SEQ ID NO:17  
 NDV HN ZJ1 (AAL18936) SEQ ID NO:19

NDV HN 선형 애프토프 영역 1 (SEQ ID NO:10): PDEQDYQIRMAKSS

NDV HN 선형 애프토프 영역 2 (SEQ ID NO:11): PDEQDYQVRMAKSS

NDV HN 선형 애프토프 영역 3 (SEQ ID NO: 28): PDKQDYQIRMAKSS

**도면9****NDV** 균주 내 글리코실화 부위의 위치 및 존재

글리코실화 부위*	서열	균주에 의한 글리코실화 부위		
		LaSota (SEQ ID NO:7)	CA/02 (SEQ ID NO:3)	TX/GB (SEQ ID NO:5)
119	NSS/NNS	X**	X	X
341	NNT/NDT	X	X	X
433	NKT	X	X	X
481	NHT	X	X	X
508				
538	NKT	X	***	X

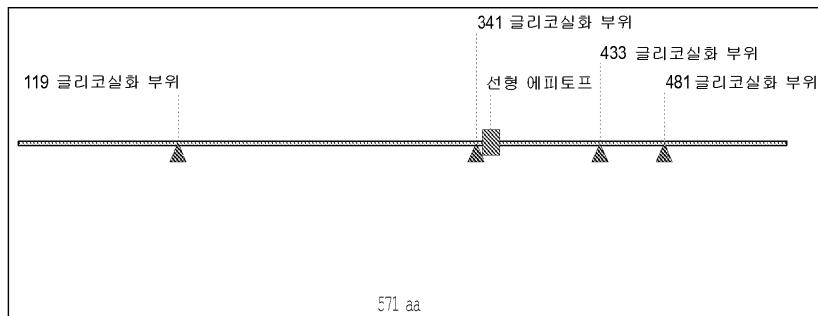
\*6 개의 잠재적인 글리코실화 부위가 있다.  
글리코실화 부위는 단백질 서열의 아미노산 위치에 표시된다.

\*\* : 글리코실화 부위의 존재

\*\*\* : 글리코실화 부위의 부재

## 도면10

NDV HN 단백질의 그래픽 특징 맵 (SEQ ID NO:3)



## 도면11

조류에서 발현된 NDV HN (SEQ ID NO:3)의 펩티드 서열 분석

종류 : 뉴캐슬 질환 바이러스  
 명칭 : 해마글루티닌-뉴라미니다아제

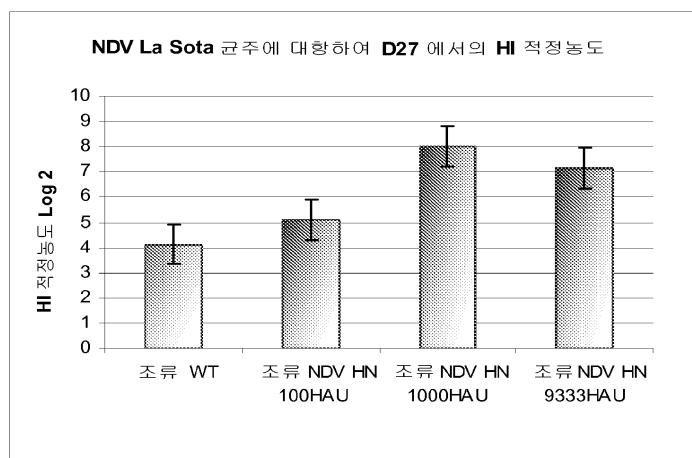
단백질의 68%에 달하는 32개 펩티드에 의해 확인됨.

```

1 MDRVVSRRVVL ENERERERKNT WRLVFRVAVL SLIVMTLAIS VAALVYSMEA STPNNDLAGIS TVISRREDKV TSLLNSNQDV
81 VQRVYKQVAL ESPALLNTE SIIMNAITSL SYQINGAANS SGCGAPVHDP DYIGGVGKEL IVDDNGSDATE FYPSSAYQBSL
161 NFIPAPPTGQ COTRIPSPFDM SATHYCYTHN VILSGCRDHS KSHQYLALSV LRTSATGRVY ESTLNGSINLQ OTQNRKGSQV
241 SATPLGCGML CSKVYIPTBEEV DYKSVYPTPSM VNGRLAGFDGQ YEBKQLDVTVV LFKDNVANYP GVGGGSLIDG KVWFVYIGCL
321 RPNSPSPDQAQ EGKVIYKRY NNTCPDQDY QVRMAKSSYK PGRFGGKRVQ QAILSIKVSF SLGEDPVLTV PPNTVTLRGA
401 RGRILTVGTS RFLYQRGSSY FSPALLYPMI VRNKTATLHS PYTFNAPTRP GSVPCQASAR CPNSCITGVY TDPIYPVVFRR
481 NHTLRGVFGT MLDNEQARLN PVSALFDDYTS RSRITRVSST STKAYTTST CFXVVKRKKY YCLSIAEISN TLFGEPRIVP
561 LLVEILKDRR V

```

## 도면12



그룹	사망률	보호 (%)
조류 WT	12/12	0
조류 NDV HN 100 HAU	8/12	33
조류 NDV HN 1000 HAU	0/12	100
조류 NDV HN 9333HAU	0/12	100

## 서열 목록

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Merial Limited

Guo, Xuan

Troupe, Karolyn

Feilmeier, Bradley

Pritchard, Joyce

Cruz, Julio

&lt;120&gt; Recombinant NDV antigen and uses thereof

&lt;130&gt; MER 09-139

&lt;150&gt; 61/290,297

&lt;151&gt; 2009-12-28

&lt;160&gt; 28

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1716

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; NDV HN codon-optimized DNA

&lt;400&gt; 1

atggaccgtg tcgtctcccg cgtggtcctc gagaacgagg agcgtgaggc caagaacacc	60
tggcgcttg tcttcgtgt cgccgtcctc tcccttattg tcatgaccct cgccatctcc	120
gtcggccccc tcgtctacag catggaggt agcacccca acgatctgc cggaatctcg	180
actgttatct cccgcgcccga ggaccgcgtc acctccctcc tcaactccaa ccaggatgtc	240
gttgatcgcg tctacaagca ggtcgccctc gagtcccctc tcgcctctt taacaccgag	300
agcatcatta tgaacgcccattacccatc agtaccaga ttaacggcgc cgccaaactcg	360
tccggtcgcg ggcggcccggt ccatgaccct gattacatcg gggcgtcgg caaggagctc	420
atcgtcgacg acactagcga tgccacgtcc ttctacccta ggcctacca ggagcaccc	480
aacttcatcc ctgccccac taccggctcc ggctgcaccc gcattcccag cttcgacatg	540
tccggccactc actactgcta cacccataac gtcatcctt cgggttgccg cgaccactcc	600
cacagccacc agtacctcgc cctcgagtt ctgcgtacgt cgccacccgg cgccgtctt	660
ttttccaccc tccgcagcat caacctcgac gataccaga accgcaagag ctgctcggtc	720
tccggccaccc cgctcggtcg cgacatgctc tgctccaagg tcaccgagac ggaggaggag	780
gattacaagt ccgttacccc cacttcgatg gtccacggcc gccttggctt cgacggccag	840
taccacgaga aggacctcga cgtcaccgtt ctcttaagg actgggttgc caactacccc	900
ggcgtcggcg ggggtccct catcgatgac cgctgttgtt ttcctgtcta cggtggctc	960
aagcctaaca gcccctccga taccgcccag gaggtaagt acgtgatcta caagcgctac	1020
aacaacacct gcccgtacga gcaggattac caggtccgca tggccaagtc ctcgtacaag	1080
cccggtcggtt tcggcgcaaa ggcgtccag caggccattc tctcgatcaa ggtctcgacc	1140
agcctcgag aggaccccggt gtcaccgtt ccccttaaca cgtcaccct tatgggcgc	1200
gaggccgca tcctcaccgt cggtacccctc cacttcctt accagcggc ctcgagctac	1260
ttttccctgtt cccttctta cccatgact gttcgcaaca agactgctac cctccacagc	1320
ccctacacct ttaacgcctt cacgcgcccc ggaagcgtcc cttgccaggc gagcgcccc	1380
tgccttaact cctgcattac cggcgtctac accgaccctt accctgtcgt ctgcctccgc	1440
aaccataccc ttgcggcggtt ctgcgtact atgcgtata acgagcaggc cgcctcaac	1500
cccggtcggtt ccatttcga ctacacttcc cgctcccgta tcaccgggtt ctcctccacc	1560
tccaccaagg cgcctacac cacccacc tgcgttaagg ttgtcaagac taacaagggtc	1620
tactgcctt ccatgcccga gattagcaac accctttcg gagagttccg cattgtcccc	1680

ctgctcgctcg agatcctcaa ggacgatcgc gtttaa 1716

<210> 2

<211> 1716

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> NDV HN wild type DNA

<400> 2

atggatcgtag tagtttagcag agtcgtacta gaaaacgaag aaagagaagc aaagaataca	60
tggccctgg tttccgggt cgcagtccta tctctaatacg taatgacatt agctatctct	120
gtagccgccc tggtatacag catggaggct agcacgcccga acgacccatgc gggtatatcg	180
acggtgatct ccagggcaga ggatagggtt acattttac tcaattcaaa tcaagatgtg	240
gtagataggg tatataaaca ggtggccctt gagtccccgc tggcgtgtt gaatactgag	300
tctataatta tgaatgcaat aacttcttt tcctatcaaa ttaatgggc tgcaaatagt	360

agtgggtgtg gggcacctgt tcatgaccgg gattatattt gggggtagg taaagagctc	420
atagtagatg acacgagtga tgccacttca ttctatcctt cagcatatca agaacacctg	480
aactttatcc cggcgccccac cacaggttca ggctgcactc ggataccctc attcgacatg	540
agcgctaccc actattgtta tactcacaat gtgatattat ctggctgcag agatcactca	600
cactcacatc agtatttggc actagggtgtc cttcggacat ctgcaacagg gaggttattc	660
ttttctactc tgcgttccat caattttagat gacacccaaa atcgaaagtc ttgcagtgtg	720
agtgcacatc ctttaggttg tgatatgctg tgctctaaag tcacagagac tgaggaggag	780

gattataagt cagttacccc cacatcaatg gtgcattggaa ggttagggtt tgacggctcag	840
taccatgaga aggacttaga cgtcacagtc ttatthaagg attgggttgc aaattacccg	900
ggagtggag gagggtctct tattgacgac cgtgtatgtt tcccgattttga tggagggcta	960
aaacccaaatt cacctagcga cactgcacaa gaagggaaat atgtaatata caagcgctat	1020
aataacacat gccccgatga acaagattac caagttcgga tggctaaatc ctcgtataag	1080
cctggacggt ttggtggaa ggcgtacag caagccatcc tatctatcaa agtatcaaca	1140
tctttggcgg aggacccggcgt gctgactgta ccgccaataa cagttacact catggggcc	1200

gagggcagaa tcctcacagt aggaacatct catttttgtt accagcgagg gtcttcatac	1260
ttttctcccg ccttactata ccctatgaca gtgcgcaaca aaacagccac tcttcatagt	1320
ccttatacat ttaatgcgtt cactcgccg ggtagtgccc cttgccaggc atcagcaagg	1380
tgccttaact catgtatcac tggagtctat actgatccgtt accctgtatgtt cttccatagg	1440

aatcacacct	tgcgagggtt	gttcggaca	atgctgata	atgaacaagc	aaggctaat	1500
cccgatatcg	caatattga	ctacacatct	cgcagtcgca	taaccgggt	aagttcgacc	1560
agcaccaagg	cagcatacac	gacatcgaca	tgtttaaag	ttgtcaagac	taataaagt	1620

tattgtctta	gcattgcaga	aatatccat	actctattt	ggaaattcag	gatcgttcct	1680
ttactggtcg	agattctcaa	agatgatagg	gtttaa			1716

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 571

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; NDV HN protein (ABS84265)

&lt;400&gt; 3

Met Asp Arg Val Val Ser Arg Val Val Leu Glu Asn Glu Glu Arg Glu

1 5 10 15

Ala Lys Asn Thr Trp Arg Leu Val Phe Arg Val Ala Val Leu Ser Leu

20 25 30

Ile Val Met Thr Leu Ala Ile Ser Val Ala Ala Leu Val Tyr Ser Met

35 40 45

Glu Ala Ser Thr Pro Asn Asp Leu Ala Gly Ile Ser Thr Val Ile Ser

50 55 60

Arg Ala Glu Asp Arg Val Thr Ser Leu Leu Asn Ser Asn Gln Asp Val

65 70 75 80

Val Asp Arg Val Tyr Lys Gln Val Ala Leu Glu Ser Pro Leu Ala Leu

85 90 95

Leu Asn Thr Glu Ser Ile Ile Met Asn Ala Ile Thr Ser Leu Ser Tyr

100 105 110

Gln Ile Asn Gly Ala Ala Asn Ser Ser Gly Cys Gly Ala Pro Val His

115 120 125

Asp Pro Asp Tyr Ile Gly Gly Val Gly Lys Glu Leu Ile Val Asp Asp

130 135 140

Thr Ser Asp Ala Thr Ser Phe Tyr Pro Ser Ala Tyr Gln Glu His Leu

145 150 155 160

Asn Phe Ile Pro Ala Pro Thr Thr Gly Ser Gly Cys Thr Arg Ile Pro  
 165 170 175  
 Ser Phe Asp Met Ser Ala Thr His Tyr Cys Tyr Thr His Asn Val Ile  
 180 185 190  
 Leu Ser Gly Cys Arg Asp His Ser His Gln Tyr Leu Ala Leu  
 195 200 205  
 Gly Val Leu Arg Thr Ser Ala Thr Gly Arg Val Phe Phe Ser Thr Leu  
 210 215 220  
  
 Arg Ser Ile Asn Leu Asp Asp Thr Gln Asn Arg Lys Ser Cys Ser Val  
 225 230 235 240  
 Ser Ala Thr Pro Leu Gly Cys Asp Met Leu Cys Ser Lys Val Thr Glu  
 245 250 255  
 Thr Glu Glu Glu Asp Tyr Lys Ser Val Thr Pro Thr Ser Met Val His  
 260 265 270  
 Gly Arg Leu Gly Phe Asp Gly Gln Tyr His Glu Lys Asp Leu Asp Val  
 275 280 285  
  
 Thr Val Leu Phe Lys Asp Trp Val Ala Asn Tyr Pro Gly Val Gly Gly  
 290 295 300  
 Gly Ser Leu Ile Asp Asp Arg Val Trp Phe Pro Val Tyr Gly Gly Leu  
 305 310 315 320  
 Lys Pro Asn Ser Pro Ser Asp Thr Ala Gln Glu Gly Lys Tyr Val Ile  
 325 330 335  
 Tyr Lys Arg Tyr Asn Asn Thr Cys Pro Asp Glu Gln Asp Tyr Gln Val  
 340 345 350  
  
 Arg Met Ala Lys Ser Ser Tyr Lys Pro Gly Arg Phe Gly Gly Lys Arg  
 355 360 365  
 Val Gln Gln Ala Ile Leu Ser Ile Lys Val Ser Thr Ser Leu Gly Glu  
 370 375 380  
 Asp Pro Val Leu Thr Val Pro Pro Asn Thr Val Thr Leu Met Gly Ala  
 385 390 395 400  
 Glu Gly Arg Ile Leu Thr Val Gly Thr Ser His Phe Leu Tyr Gln Arg

405 410 415

Gly Ser Ser Tyr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Tyr Pro Met Thr Val Arg

420 425 430

Asn Lys Thr Ala Thr Leu His Ser Pro Tyr Thr Phe Asn Ala Phe Thr

435 440 445

Arg Pro Gly Ser Val Pro Cys Gln Ala Ser Ala Arg Cys Pro Asn Ser

450 455 460

Cys Ile Thr Gly Val Tyr Thr Asp Pro Tyr Pro Val Val Phe His Arg

465 470 475 480

Asn His Thr Leu Arg Gly Val Phe Gly Thr Met Leu Asp Asn Glu Gln

485 490 495

Ala Arg Leu Asn Pro Val Ser Ala Ile Phe Asp Tyr Thr Ser Arg Ser

500 505 510

Arg Ile Thr Arg Val Ser Ser Thr Ser Thr Lys Ala Ala Tyr Thr Thr

515 520 525

Ser Thr Cys Phe Lys Val Val Lys Thr Asn Lys Val Tyr Cys Leu Ser

530 535 540

Ile Ala Glu Ile Ser Asn Thr Leu Phe Gly Glu Phe Arg Ile Val Pro

545 550 555 560

Leu Leu Val Glu Ile Leu Lys Asp Asp Arg Val

565 570

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 1915

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; NDV HN DNa (M21409)

&lt;400&gt; 4

gtcctcagtc atggaccgcg cagttagcca agttgcgtta gagaatgtg aaagagaggc 60

aaaaaaataca tggcgcttga tattccggat tgcaatctta ctcttaacag tagtgcac 120

agctacatct gtgcctccc ttgtatatac catggggctt agcacaccta ggcaccttgt 180

aggcataccg accaggattt ccagggcaga agaaaagatt acatctgcac ttgggtccaa 240

tcaagatgt a tagat tagga tatataagca agtggccctt gagtctccgt tggcatttt 300  
aaacactgag actacaatta tgaacgcaat aacatctctc tcttatcaga ttaatggagc 360  
tgcgaacaac agcgggtggg gggcacctat ccatgaccca gatTTtatcg ggggatagg 420  
caaagaactc attgttagatg atgctagtga tgtcacatca ttctatccct ctgcatttca 480  
agaacatcat aattttatcc cggcgcctac tacaggatca ggttgcatc ggataccctc 540  
atttgacatg agtgctaccc attactgcta cactcataat ataatacgt ctggatgcag 600  
  
agatcactca cactcatatc agtatttagc acttgggtgtg ctccggactt ctgcaacagg 660  
gaggatattc ttttctactc tgcgtccat caatctggat gacaccaga atcggaaatc 720  
ttgcagtgtg agtgcaactc ccttaggttg ttagatgctg tgctcgaaag tcacggagac 780  
agaggaagaa gattataact cagctgtccc tacgctgatg gtacatggga ggttagggtt 840  
cgacggccaa taccacgaaa aggacctaga cgtcacaaca ttatttgggg actgggtggc 900  
caactaccca ggagtagggg gtggatcttt tattgacagc cgcgtatggt tctcagtcta 960  
cgaggaggctg aaacccaatt caccagtga cactgtacag gaagagaaat atgtaatata 1020  
  
  
caagcgatac aatgacacat gcccagatga gcaagactac cagatccaa tggccaagtc 1080  
ttcgtataag cccggcggt ttggggaa acgcatacag caggctatct tatctatcaa 1140  
ggtgtcaaca tctttggcg aagaccagt actgactgta cggccaaaca cagtacact 1200  
catgggggccc gaaggcagaa ttctcacagt agggacatct catttttgtt atcagcgagg 1260  
gtcatcatac ttctctcccg cgttattata tcctatgaca gtcagcaaca aaacagccac 1320  
tcttcatagt ccctatacat tcaatgcctt cactcgccaa ggtgtatcc cttgccaggc 1380  
ttcagcaaga tgcccaact cgtgtttac tggagtctat acagatccat atcccctaatt 1440  
  
  
cttctatagg aaccacacct tgcgagggtt attcggaca atgcttgatg gtgaacaagc 1500  
aagacttaat cctgcgtctg cagtattcga tagcacatcc cgcagtcga taacccgagt 1560  
gagttcaagc agcaccaaaag cagcatacac aacatcaact tgTTTaaag ttgtcaagac 1620  
caataagacc tattgtctca gcattgtga aatatctaact ctctcttcg gagaattcag 1680  
aatcgtcccg ttacttagtt agatcctaa aatgtatggg gtttagagaag ccaggtctgg 1740  
tttagttgagt caactatgaa agagctggaa agatggcatt gtatcaccta tcttccgcga 1800  
cacaagaat caaactgaat gcccggcga gctcgaattt catgtcgccaa gttgaccaca 1860  
  
  
atcagccagt gctcatgcga tcagatcaag tcttgcataat agtccctcga ttaag 1915  
<210> 5  
<211> 577  
<212> PRT

&lt;213&gt; artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; NDV HN protein (P12553)

&lt;400&gt; 5

Met Asp Arg Ala Val Ser Gln Val Ala Leu Glu Asn Asp Glu Arg Glu

1 5 10 15

Ala Lys Asn Thr Trp Arg Leu Ile Phe Arg Ile Ala Ile Leu Leu Leu

20 25 30

Thr Val Val Thr Leu Ala Thr Ser Val Ala Ser Leu Val Tyr Ser Met

35 40 45

Gly Ala Ser Thr Pro Ser Asp Leu Val Gly Ile Pro Thr Arg Ile Ser

50 55 60

Arg Ala Glu Glu Lys Ile Thr Ser Ala Leu Gly Ser Asn Gln Asp Val

65 70 75 80

Val Asp Arg Ile Tyr Lys Gln Val Ala Leu Glu Ser Pro Leu Ala Leu

85 90 95

Leu Asn Thr Glu Thr Thr Ile Met Asn Ala Ile Thr Ser Leu Ser Tyr

100 105 110

Gln Ile Asn Gly Ala Ala Asn Asn Ser Gly Trp Gly Ala Pro Ile His

115 120 125

Asp Pro Asp Phe Ile Gly Gly Ile Gly Lys Glu Leu Ile Val Asp Asp

130 135 140

Ala Ser Asp Val Thr Ser Phe Tyr Pro Ser Ala Phe Gln Glu His His

145 150 155 160

Asn Phe Ile Pro Ala Pro Thr Thr Gly Ser Gly Cys Ile Arg Ile Pro

165 170 175

Ser Phe Asp Met Ser Ala Thr His Tyr Cys Tyr Thr His Asn Ile Ile

180 185 190

Ser Ser Gly Cys Arg Asp His Ser His Tyr Gln Tyr Leu Ala Leu

195 200 205

Gly Val Leu Arg Thr Ser Ala Thr Gly Arg Ile Phe Phe Ser Thr Leu

210 215 220

Arg Ser Ile Asn Leu Asp Asp Thr Gln Asn Arg Lys Ser Cys Ser Val

225 230 235 240

Ser Ala Thr Pro Leu Gly Cys Asp Met Leu Cys Ser Lys Val Thr Glu

245 250 255

Thr Glu Glu Glu Asp Tyr Asn Ser Ala Val Pro Thr Leu Met Val His

260 265 270

Gly Arg Leu Gly Phe Asp Gly Gln Tyr His Glu Lys Asp Leu Asp Val

275 280 285

Thr Thr Leu Phe Glu Asp Trp Val Ala Asn Tyr Pro Gly Val Gly Gly

290 295 300

Gly Ser Phe Ile Asp Ser Arg Val Trp Phe Ser Val Tyr Gly Gly Leu

305 310 315 320

Lys Pro Asn Ser Pro Ser Asp Thr Val Gln Glu Glu Lys Tyr Val Ile

325 330 335

Tyr Lys Arg Tyr Asn Asp Thr Cys Pro Asp Glu Gln Asp Tyr Gln Ile

340 345 350

Arg Met Ala Lys Ser Ser Tyr Lys Pro Gly Arg Phe Gly Gly Lys Arg

355 360 365

Ile Gln Gln Ala Ile Leu Ser Ile Lys Val Ser Thr Ser Leu Gly Glu

370 375 380

Asp Pro Val Leu Thr Val Pro Pro Asn Thr Val Thr Leu Met Gly Ala

385 390 395 400

Glu Gly Arg Ile Leu Thr Val Gly Thr Ser His Phe Leu Tyr Gln Arg

405 410 415

Gly Ser Ser Tyr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Tyr Pro Met Thr Val Ser

420 425 430

Asn Lys Thr Ala Thr Leu His Ser Pro Tyr Thr Phe Asn Ala Phe Thr

435 440 445

Arg Pro Gly Ser Ile Pro Cys Gln Ala Ser Ala Arg Cys Pro Asn Ser

450 455 460

Cys Val Thr Gly Val Tyr Thr Asp Pro Tyr Pro Leu Ile Phe Tyr Arg

465 470 475 480

Asn His Thr Leu Arg Gly Val Phe Gly Thr Met Leu Asp Gly Glu Gln

485 490 495

Ala Arg Leu Asn Pro Ala Ser Ala Val Phe Asp Ser Thr Ser Arg Ser

500 505 510

Arg Ile Thr Arg Val Ser Ser Ser Thr Lys Ala Ala Tyr Thr Thr

515 520 525

Ser Thr Cys Phe Lys Val Val Lys Thr Asn Lys Thr Tyr Cys Leu Ser

530 535 540

Ile Ala Glu Ile Ser Asn Thr Leu Phe Gly Glu Phe Arg Ile Val Pro

545 550 555 560

Leu Leu Val Glu Ile Leu Lys Asn Asp Gly Val Arg Glu Ala Arg Ser

565 570 575

Gly

<210> 6

<211> 2002

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> NDV HN DNA (M24709)

<400> 6

acgggtagaa cgtaagaga ggccgcccct caattgcgag ccaggcttca caaccccggt	60
tctaccgctt caccgacaac agtcctcaat catggaccgc gccgttagcc aagtgcgtt	120
agagaatgtat gaaagagagg caaaaaatac atggcgcttg atattccgga ttgcaatctt	180

attcttaaca gtagtgcacct tggctatact tggctccctt cttttatata gcatggggc	240
tagcacacct agcgatcttgcggatcc gactaggatt tccaggcag aagaaaagat	300
tacatctaca cttggttcca atcaagatgt agtagatagg atatataagc aagtggccct	360
ttagtctcg ttggcattgt taaaaactga gaccacaatt atgaacgcaa taacatctct	420
ctcttatcag attaatggag ctgcaaaca cagcgggtgg gggcaccta tccatgaccc	480
agattatata gggggatag gcaaagaact cattgttagat gatgcttagt atgtcacatc	540
attctatccc tctgcatttc aagaacatct gaattttatc ccggcgccctt ctacaggatc	600

aggttgcact cgaataccct catttgcacat gagtgcattc cattactgtc acacccataa	660
tgtatatttgc tctggatgca gagatcactc acattcatat cagtatttag cacttgggt	720
gctccggaca tctgcaacag ggagggtatt cttttctact ctgcgttcca tcaacctgga	780
cgacacccaa aatcgaaatg ctgcagtgatg gagtgcact cccctgggtt gtgatatgtc	840
gtgctcgaaa gtacggaga cagaggaaga agattataac tcagctgtcc ctacgcccgt	900
ggcacatggg aggttagggt tcgacggcca ataccacgaa aaggacctag atgtcacaac	960
attattcggg gactgggtgg ccaactaccc aggagtaggg ggtggatctt ttattgacgg	1020

ccgcgtatgg ttctcagtct acggagggtc gaaacccaaat tcacccagtgc acactgtaca	1080
ggaaggaaa taatgtatatac acaagcgata caatgacaca tgcccgatg agcaagacta	1140
ccagattcga atggccaagt ctgcgtataa gcctggacgg tttggggaa aacgcattca	1200
gcaggtatc ttatctatca aggtgtcaac atccttaggc gaagacccgg tactgactgt	1260
accggccaaac acagtcacac tcatggggc cgaaggcaga attctcacag tagggacatc	1320
tcattttttgc tatcaacgag ggtcatcata ctctctccc gcgttattat atcctatgac	1380
agttagcaac aaaacagcca ctcttcata tccttataca ttcaatgcct tcactcgcc	1440

aggttagtac ctttgcagg cttagcaag atgcggcaac ccgtgttta ctggagtcta	1500
tacagatcca tatccctaa ttttctatag aaaccacacc ttgcggggg tattcgggac	1560
aatgcttgc ggttacaag caagactaa tcctacgtct gcgttattcg atagcacatc	1620
ccgcgtcgc ataactcgag ttagttcaag cagcacaaaa gcagcataca caacatcaac	1680
ttgtttaaa gtggtcaaga ccaataagac ctattgtctc agcattgtc aaatatctaa	1740
tactcttgc ggagaattca gaatgtccc gttactagtt gagatcctca aagatgacgg	1800
gttagagaa gccaggctg gctagtttag tcaattataa aggagttgaa aagatggcat	1860

tgtatcacct atttctcgacatcaagaa tcaaaccgaa tgccggcg tgcgtcaatt	1920
ccatgttgc agttgaccac aatcagccag tgctcatgcg atcagattaa gcctgtcaa	1980
tagtcttgc attaagaaaa aa	2002

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 577

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; NDV HN protein (AAA46659)

&lt;400&gt; 7

Met Asp Arg Ala Val Ser Gln Val Ala Leu Glu Asn Asp Glu Arg Glu

Ala Lys Asn Thr Trp Arg Leu Ile Phe Arg Ile Ala Ile Leu Phe Leu

20 25 30

Thr Val Val Thr Leu Ala Ile Ser Val Ala Ser Leu Leu Tyr Ser Met

35 40 45

Gly Ala Ser Thr Pro Ser Asp Leu Val Gly Ile Pro Thr Arg Ile Ser

50 55 60

Arg Ala Glu Glu Lys Ile Thr Ser Thr Leu Gly Ser Asn Gln Asp Val

65 70 75 80

Val Asp Arg Ile Tyr Lys Gln Val Ala Leu Glu Ser Pro Leu Ala Leu

85 90 95

Leu Lys Thr Glu Thr Thr Ile Met Asn Ala Ile Thr Ser Leu Ser Tyr

100 105 110

Gln Ile Asn Gly Ala Ala Asn Asn Ser Gly Trp Gly Ala Pro Ile His

115 120 125

Asp Pro Asp Tyr Ile Gly Gly Ile Gly Lys Glu Leu Ile Val Asp Asp

130 135 140

Ala Ser Asp Val Thr Ser Phe Tyr Pro Ser Ala Phe Gln Glu His Leu

145 150 155 160

Asn Phe Ile Pro Ala Pro Thr Thr Gly Ser Gly Cys Thr Arg Ile Pro

165 170 175

Ser Phe Asp Met Ser Ala Thr His Tyr Cys Tyr Thr His Asn Val Ile

180 185 190

Leu Ser Gly Cys Arg Asp His Ser His Tyr Gln Tyr Leu Ala Leu

195 200 205

Gly Val Leu Arg Thr Ser Ala Thr Gly Arg Val Phe Phe Ser Thr Leu

210 215 220

Arg Ser Ile Asn Leu Asp Asp Thr Gln Asn Arg Lys Ser Cys Ser Val

225 230 235 240

Ser Ala Thr Pro Leu Gly Cys Asp Met Leu Cys Ser Lys Val Thr Glu

245 250 255

Thr Glu Glu Asp Tyr Asn Ser Ala Val Pro Thr Arg Met Ala His

260	265	270
Gly Arg Leu Gly Phe Asp Gly Gln Tyr His Glu Lys Asp Leu Asp Val		
275	280	285
Thr Thr Leu Phe Gly Asp Trp Val Ala Asn Tyr Pro Gly Val Gly Gly		
290	295	300
Gly Ser Phe Ile Asp Gly Arg Val Trp Phe Ser Val Tyr Gly Gly Leu		
305	310	315
Lys Pro Asn Ser Pro Ser Asp Thr Val Gln Glu Gly Lys Tyr Val Ile		
325	330	335
Tyr Lys Arg Tyr Asn Asp Thr Cys Pro Asp Glu Gln Asp Tyr Gln Ile		
340	345	350
Arg Met Ala Lys Ser Ser Tyr Lys Pro Gly Arg Phe Gly Lys Arg		
355	360	365
Ile Gln Gln Ala Ile Leu Ser Ile Lys Val Ser Thr Ser Leu Gly Glu		
370	375	380
Asp Pro Val Leu Thr Val Pro Pro Asn Thr Val Thr Leu Met Gly Ala		
385	390	395
Glu Gly Arg Ile Leu Thr Val Gly Thr Ser His Phe Leu Tyr Gln Arg		
405	410	415
Gly Ser Ser Tyr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Tyr Pro Met Thr Val Ser		
420	425	430
Asn Lys Thr Ala Thr Leu His Ser Pro Tyr Thr Phe Asn Ala Phe Thr		
435	440	445
Arg Pro Gly Ser Ile Pro Cys Gln Ala Ser Ala Arg Cys Pro Asn Pro		
450	455	460
Cys Val Thr Gly Val Tyr Thr Asp Pro Tyr Pro Leu Ile Phe Tyr Arg		
465	470	475
Asn His Thr Leu Arg Gly Val Phe Gly Thr Met Leu Asp Gly Val Gln		
485	490	495
Ala Arg Leu Asn Pro Thr Ser Ala Val Phe Asp Ser Thr Ser Arg Ser		
500	505	510

Arg Ile Thr Arg Val Ser Ser Ser Ser Thr Lys Ala Ala Tyr Thr Thr

515 520 525

Ser Thr Cys Phe Lys Val Val Lys Thr Asn Lys Thr Tyr Cys Leu Ser

530 535 540

Ile Ala Glu Ile Ser Asn Thr Leu Phe Gly Glu Phe Arg Ile Val Pro

545 550 555 560

Leu Leu Val Glu Ile Leu Lys Asp Asp Gly Val Arg Glu Ala Arg Ser

565 570 575

Gly

<210> 8

<211> 1716

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> NDV HN protein (AY288999)

<400> 8

atggatcgtg tagtttagcag agttgtacta gagaacgaag aaagagaagc aaagaatact 60

tggcgcctgg tttccggat cgcaagtccata tctctaatacg taatgacatt agctatctct 120

gtagccccc tggtagtatacg catggaggct agcacaccga acgacccttgc gggcatatcg 180

acgggtgatct ccagggcaga ggatagggtt acatcttac tcaattcaaa tcaagatgtg 240

gtagataggg tatataaaaca ggtggccctt gagtccccgc tggcgttgtt gaatactgag 300

tctataatta tgaatgcaat aacttcttcc tcttatcaaa ttaatgggc tgcaaatagt 360

agtgggtgtg gggcacctgt tcatgaccgg gattatattg gggggtagg taaagagctc 420

atagtagatg acacaagtga tgccacttca ttctatcctt cagcatatca agaacacctg 480

aactttatcc cgccgcac cacaggatca ggctgcactc ggataccctc attcgacatg 540

agcgctaccc actattgtta tactcacaat gtgatattat ctggctgcag agatcactca 600

cactcacatc agtatttggc actagggtgtc cttcggacat ctgcaacagg gaggttattc 660

ttttctactc tgcgttccat caattttagat gacacccaaa atcgaaatgc ttgcagtgtg 720

agtgcactt cttaggttg tgatatgctg tgctctaaag tcacagagac tgaggaggag 780

gattataagt cagttacccc cacatcaatg gtgcattgaa gtttagggtt tgacggtcag 840

taccatgaga aggacttaga cgtcacagtc ttatthaagg attgggttgc aaattacccg 900

ggagtggag gagggctct tattgacgac cgtgtatgg tcccagttt cggcggctt	960
aaacccaatt cgccctagcga cactgcacaa gaagggaaat atgtaatata caagcgat	1020
aataacacat gccccatga acaagattac caagttcgga tggctaagtc ctcgtataag	1080
cctggacggt ttggtggaa gcgcgtacag caagccatcc tatctatcaa agtatcaaca	1140
tctttggcg aggacccggt gctgactgta ccgccaata cagttacact catggggcc	1200
gaaggcagaa tcctcacagt aggaacatct catttctgt accagcgagg gtcttcatac	1260
ttttctctg ccttactata ccctatgaca gtgcgcaaca aaacagccac tcttcatagt	1320
ccttatacat ttaatgcgtt cactcgccca ggtagtgtcc cttgccaggc atcagcaagg	1380
tgccctaact catgtatcac tggagtctat actgatccgt accctgtagt cttccatagg	1440
aatcacacct tgcgagggt gttcggaca atgcttgata atgaacaagc aaggctaat	1500
cccgatctg caatattga ctacacatct cgcatcgca taacccgggt aagttcgatc	1560
agcaccaagg cagcatacac gacatcgaca tgtttaaag ttgtcaagac caataaagt	1620
tattgtctta gcattgcaga aatatccat actctatttgg ggaattcag gatcgttcct	1680
ttactggtcg agattctcaa ggatgatagg gtttaa	1716

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 571

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; NDV HN protein (AAQ54638)

&lt;400&gt; 9

Met Asp Arg Val Val Ser Arg Val Val Leu Glu Asn Glu Glu Arg Glu

1 5 10 15

Ala Lys Asn Thr Trp Arg Leu Val Phe Arg Ile Ala Val Leu Ser Leu

20 25 30

Ile Val Met Thr Leu Ala Ile Ser Val Ala Ala Leu Val Tyr Ser Met

35 40 45

Glu Ala Ser Thr Pro Asn Asp Leu Ala Gly Ile Ser Thr Val Ile Ser

50 55 60

Arg Ala Glu Asp Arg Val Thr Ser Leu Leu Asn Ser Asn Gln Asp Val

65 70 75 80

Val Asp Arg Val Tyr Lys Gln Val Ala Leu Glu Ser Pro Leu Ala Leu

85 90 95

Leu Asn Thr Glu Ser Ile Ile Met Asn Ala Ile Thr Ser Leu Ser Tyr

100 105 110

Gln Ile Asn Gly Ala Ala Asn Ser Ser Gly Cys Gly Ala Pro Val His

115 120 125

Asp Pro Asp Tyr Ile Gly Gly Val Gly Lys Glu Leu Ile Val Asp Asp

130 135 140

Thr Ser Asp Ala Thr Ser Phe Tyr Pro Ser Ala Tyr Gln Glu His Leu

145 150 155 160

Asn Phe Ile Pro Ala Pro Thr Thr Gly Ser Gly Cys Thr Arg Ile Pro

165 170 175

Ser Phe Asp Met Ser Ala Thr His Tyr Cys Tyr Thr His Asn Val Ile

180 185 190

Leu Ser Gly Cys Arg Asp His Ser His Ser His Gln Tyr Leu Ala Leu

195 200 205

Gly Val Leu Arg Thr Ser Ala Thr Gly Arg Val Phe Phe Ser Thr Leu

210 215 220

Arg Ser Ile Asn Leu Asp Asp Thr Gln Asn Arg Lys Ser Cys Ser Val

225 230 235 240

Ser Ala Thr Ser Leu Gly Cys Asp Met Leu Cys Ser Lys Val Thr Glu

245 250 255

Thr Glu Glu Glu Asp Tyr Lys Ser Val Thr Pro Thr Ser Met Val His

260 265 270

Gly Arg Leu Gly Phe Asp Gly Gln Tyr His Glu Lys Asp Leu Asp Val

275 280 285

Thr Val Leu Phe Lys Asp Trp Val Ala Asn Tyr Pro Gly Val Gly Gly

290 295 300

Gly Ser Leu Ile Asp Asp Arg Val Trp Phe Pro Val Tyr Gly Gly Leu

305 310 315 320

Lys Pro Asn Ser Pro Ser Asp Thr Ala Gln Glu Gly Lys Tyr Val Ile

325 330 335

Tyr Lys Arg Tyr Asn Asn Thr Cys Pro Asp Glu Gln Asp Tyr Gln Val

340	345	350
Arg Met Ala Lys Ser Ser Tyr Lys Pro Gly Arg Phe Gly Gly Lys Arg		
355	360	365
Val Gln Gln Ala Ile Leu Ser Ile Lys Val Ser Thr Ser Leu Gly Glu		
370	375	380
Asp Pro Val Leu Thr Val Pro Pro Asn Thr Val Thr Leu Met Gly Ala		
385	390	395
Glu Gly Arg Ile Leu Thr Val Gly Thr Ser His Phe Leu Tyr Gln Arg		
405	410	415
Gly Ser Ser Tyr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Tyr Pro Met Thr Val Arg		
420	425	430
Asn Lys Thr Ala Thr Leu His Ser Pro Tyr Thr Phe Asn Ala Phe Thr		
435	440	445
Arg Pro Gly Ser Val Pro Cys Gln Ala Ser Ala Arg Cys Pro Asn Ser		
450	455	460
Cys Ile Thr Gly Val Tyr Thr Asp Pro Tyr Pro Val Val Phe His Arg		
465	470	475
Asn His Thr Leu Arg Gly Val Phe Gly Thr Met Leu Asp Asn Glu Gln		
485	490	495
Ala Arg Leu Asn Pro Val Ser Ala Ile Phe Asp Tyr Thr Ser Arg Ser		
500	505	510
Arg Ile Thr Arg Val Ser Ser Ile Ser Thr Lys Ala Ala Tyr Thr Thr		
515	520	525
Ser Thr Cys Phe Lys Val Val Lys Thr Asn Lys Val Tyr Cys Leu Ser		
530	535	540
Ile Ala Glu Ile Ser Asn Thr Leu Phe Gly Glu Phe Arg Ile Val Pro		
545	550	555
Leu Leu Val Glu Ile Leu Lys Asp Asp Arg Val		
565	570	
<210> 10		
<211> 14		

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; NDV HN linear epitope region 1

&lt;400&gt; 10

Pro Asp Glu Gln Asp Tyr Gln Ile Arg Met Ala Lys Ser Ser

1 5 10

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; NDV HN linear epitope region 2

&lt;400&gt; 11

Pro Asp Glu Gln Asp Tyr Gln Val Arg Met Ala Lys Ser Ser

1 5 10

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 78

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; NDV HN signal sequence

&lt;400&gt; 12

atggaccgtg tcgtctcccg cgtggtcctc gagaacgagg agcgtgaggc caagaacacc 60

tggcgcccttg tctttcg 78

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; NDV HN signal peptide

&lt;400&gt; 13

Met Asp Arg Val Val Ser Arg Val Val Leu Glu Asn Glu Glu Arg Glu

1 5 10 15

Ala Lys Asn Thr Trp Arg Leu Val Phe Arg

20 25

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 1638

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; NDV HN DNA without signal seq

&lt;400&gt; 14

gtcggcggtcc tctcccttat tgtcatgacc ctgcgcacatct ccgtcgccgc cctcggtctac	60
agcatggagg cttagcaccccc caacgatctc gccggaatct cgactgttat ctcccgcc	120
gaggaccgcg tcacccctt cctcaactcc aaccaggatg tcgttgatcg cgttacaag	180
cagggtcgccc tcgagtcccc tctgcgcctc cttAACACCG agagcatcat tatgaacgcc	240
attacccccc tcagctacca gattaacggc gccgcacact cgtccggctg cggcgcccc	300
gtccatgacc ctgattacat cggcgccgtc ggcaaggagc tcatcgatcg cgacactagc	360
gatgccacgt ctttctaccc tagcgctac caggagcacc tcaacttcat ccctgcccc	420
actaccggct cggcgctgcac ccgcattccc agcttcgaca tgccggccac tcactactgc	480
tacacccata acgtcatcct ttgggttgc cgcgaccact cccacagcca ccagtaccc	540
gcccctcgag ttcttcgtac gtccggccacc ggccgcgtct tttttccac cctccgcage	600
atcaacctcg acgataaccca gaaccgcaag agctgctgg tctccggccac cccgctcgcc	660
tgcgacatgc tctgctccaa ggtcaccgag acggaggagg aggattacaa gtccgttacc	720
cccaacttcga tggtccacgg ccgccttggc ttgcacggcc agtaccacga gaaggaccc	780
gacgtcaccg ttctctttaa ggactgggtt gccaactacc ccggcgctgg cgccggctcc	840
ctcatcgatg acccggtctg gttctgtc tacgggtgtc tcaagcctaa cagccctcc	900
gataccgccc aggagggtaa gtacgtgatc tacaaggcgt acaacaacac ctgcctgac	960
gagcaggatt accaggtccg catggcaag tcctcgatc agcccggtcg ttccggggc	1020
aagcgcgtcc agcaggccat tctctcgatc aagggtcgatc ccaggctcg agaggacccc	1080
gtgctcaccg ttcccccataa caccgtcacc cttatggcgcc ccgaggccgc cattccacc	1140
gtcggtaccc cccacttcctt ctaccggcgc ggctcgagct actttttcc tgccttctt	1200
taccccatga ctgttcgaa caagactgtt accctccaca gccctacac cttaacgcc	1260
ttcacggcc ccggaagcgt cccctggccag gcgagccccc gctgcctaa ctccgtcatt	1320
accggcgctt acaccgaccc ttaccctgtc gtcttcacc gcaaccatac cttcgccgc	1380
gtcttcggta ctatgcttga taacgagcag gcccgcctca accccgtctc cgccatttc	1440
gactacactt cccgctcccg tatcacccgc gtctccctca cttccaccaa ggccgcctac	1500
accacccatca cctgctttaa ggttgtcaag actaacaagg tctactgcct ctccatcgcc	1560

gagattagca acacccttt cgagagttc cgcattgtcc ccctgctcgt cgagatcctc 1620  
 aaggacgatc gcgttaa 1638  
 <210> 15  
 <211> 545  
 <212> PRT  
 <213> artificial sequence  
 <220><223> NDV HN mature protein (without signal peptide)  
 <400> 15  
 Val Ala Val Leu Ser Leu Ile Val Met Thr Leu Ala Ile Ser Val Ala  
 1 5 10 15  
 Ala Leu Val Tyr Ser Met Glu Ala Ser Thr Pro Asn Asp Leu Ala Gly  
 20 25 30  
 Ile Ser Thr Val Ile Ser Arg Ala Glu Asp Arg Val Thr Ser Leu Leu  
 35 40 45  
 Asn Ser Asn Gln Asp Val Val Asp Arg Val Tyr Lys Gln Val Ala Leu  
 50 55 60  
 Glu Ser Pro Leu Ala Leu Asn Thr Glu Ser Ile Ile Met Asn Ala  
 65 70 75 80  
 Ile Thr Ser Leu Ser Tyr Gln Ile Asn Gly Ala Ala Asn Ser Ser Gly  
 85 90 95  
 Cys Gly Ala Pro Val His Asp Pro Asp Tyr Ile Gly Gly Val Gly Lys  
 100 105 110  
 Glu Leu Ile Val Asp Asp Thr Ser Asp Ala Thr Ser Phe Tyr Pro Ser  
 115 120 125  
 Ala Tyr Gln Glu His Leu Asn Phe Ile Pro Ala Pro Thr Thr Gly Ser  
 130 135 140  
 Gly Cys Thr Arg Ile Pro Ser Phe Asp Met Ser Ala Thr His Tyr Cys  
 145 150 155 160  
 Tyr Thr His Asn Val Ile Leu Ser Gly Cys Arg Asp His Ser His Ser  
 165 170 175  
 His Gln Tyr Leu Ala Leu Gly Val Leu Arg Thr Ser Ala Thr Gly Arg  
 180 185 190

Val Phe Phe Ser Thr Leu Arg Ser Ile Asn Leu Asp Asp Thr Gln Asn  
 195 200 205  
 Arg Lys Ser Cys Ser Val Ser Ala Thr Pro Leu Gly Cys Asp Met Leu  
 210 215 220  
 Cys Ser Lys Val Thr Glu Thr Glu Glu Asp Tyr Lys Ser Val Thr  
 225 230 235 240  
 Pro Thr Ser Met Val His Gly Arg Leu Gly Phe Asp Gly Gln Tyr His  
 245 250 255  
 Glu Lys Asp Leu Asp Val Thr Val Leu Phe Lys Asp Trp Val Ala Asn  
 260 265 270  
 Tyr Pro Gly Val Gly Gly Ser Leu Ile Asp Asp Arg Val Trp Phe  
 275 280 285  
 Pro Val Tyr Gly Gly Leu Lys Pro Asn Ser Pro Ser Asp Thr Ala Gln  
 290 295 300  
 Glu Gly Lys Tyr Val Ile Tyr Lys Arg Tyr Asn Asn Thr Cys Pro Asp  
 305 310 315 320  
 Glu Gln Asp Tyr Gln Val Arg Met Ala Lys Ser Ser Tyr Lys Pro Gly  
 325 330 335  
 Arg Phe Gly Gly Lys Arg Val Gln Gln Ala Ile Leu Ser Ile Lys Val  
 340 345 350  
 Ser Thr Ser Leu Gly Glu Asp Pro Val Leu Thr Val Pro Pro Asn Thr  
 355 360 365  
 Val Thr Leu Met Gly Ala Glu Gly Arg Ile Leu Thr Val Gly Thr Ser  
 370 375 380  
 His Phe Leu Tyr Gln Arg Gly Ser Ser Tyr Phe Ser Pro Ala Leu Leu  
 385 390 395 400  
 Tyr Pro Met Thr Val Arg Asn Lys Thr Ala Thr Leu His Ser Pro Tyr  
 405 410 415  
 Thr Phe Asn Ala Phe Thr Arg Pro Gly Ser Val Pro Cys Gln Ala Ser  
 420 425 430  
 Ala Arg Cys Pro Asn Ser Cys Ile Thr Gly Val Tyr Thr Asp Pro Tyr

435	440	445	
Pro Val Val Phe His Arg Asn His Thr Leu Arg Gly Val Phe Gly Thr			
450	455	460	
Met Leu Asp Asn Glu Gln Ala Arg Leu Asn Pro Val Ser Ala Ile Phe			
465	470	475	480
Asp Tyr Thr Ser Arg Ser Arg Ile Thr Arg Val Ser Ser Thr Ser Thr			
485	490	495	
Lys Ala Ala Tyr Thr Ser Thr Cys Phe Lys Val Val Lys Thr Asn			
500	505	510	
Lys Val Tyr Cys Leu Ser Ile Ala Glu Ile Ser Asn Thr Leu Phe Gly			
515	520	525	
Glu Phe Arg Ile Val Pro Leu Leu Val Glu Ile Leu Lys Asp Asp Arg			
530	535	540	
Val			
545			
<210> 16			
<211> 1713			
<212> DNA			
<213> artificial sequence			
<220><223> NDV HN DNA (FJ608369)			
<400> 16			
atgggacgca cggtaaacag agtcgcgtg gagaatgagg aaagagaagc aaagaacaca 60			
tggcgcctgg tttccggat cgcagtctta cttaatgg taatgactct agctatctcc 120			
gcagctgccc tggcatacag tgcggggcc agtacgccc acgacctcgc aggcatatcg 180			
actgtgatct ctaagacaga ggataagggtt acgtttac tcaagatgtg 240			
atagatagga tatacaagca ggtggctttt gaatccccac tggcgctact aaacactgaa 300			
tctatgatta tgaatgcaat aacctctttt tcttatcaaa ttaacggggc tgcgaacaat 360			
agcggatgtg gggccctgt tcatgaccca gattatatcg gggggatagg caaagaactc 420			
atagtggacg acatcagtga tgcacatca ttttatcctt ctgcataatca agaacacttg 480			
aatttcatcc cggccctac tacaggatcc ggttgcactc ggataccctc atttgcacatg 540			
agcaccaccc attattgtta tactcacaat gtgatactat ccgggtcag agatcactca 600			
cactcacatc aatacttagc acttgggtgtc cttcgacat ctgcaacagg gaggttattc 660			

ttttctactc tgcgctccat caatttagat gacacccaaa atcgaaagtc ctgcagtgtg 720

agtgcaccc cttaggttg tgatatgctg tgctctaagg tcacaggac tgaagaggag 780  
 gattacaagt cagttcccc cacaccaatg gtgcacggaa ggctagggtt tgacggtaaa 840  
 taccatgaga aggacttaga caccacggtc ttatthaagg attgggtggc aaattaccca 900  
 ggagtgggag gagggtctt tattgacaac cgtgtatggt tccagttt cggagggctc 960  
 aaacccaatt cacccagtga cactgcacaa gaaggaaat atgtaatata taagcgcatt 1020  
 aacaacacat gccccataa acaagattac caaattcgga tggtaagtc ttcatataaa 1080  
 cccggcgat ttggtgaaa gcgcgtacag caagccatct tatccatcaa agtgtcaaca 1140

tccttggta aggacccggt gctgactatt ccacctaata caatcacact catggagcc 1200  
 gaaggcagaa tcctcacagt agggacatct cacttctgt accaacgagg gtcttcatat 1260  
 ttctccctg ctttattata tccatgaca gtaaataaca aaacggctac actccatagt 1320  
 ccttatacgt ttaatgctt cactcgccca ggtagtgcctt cttgccaggc atcagcaaga 1380  
 tgcccaact catgcatcac tggagtctat actgatccat atcccttaat cttccatagg 1440  
 aatcataactc tacgaggggt cttcggacg atgcttgatg atgaacaagc gagacttaac 1500  
 cccgtatctg cagtattcga caacatatcc cgcatcgat tcacccgggt gagttcaagc 1560

agcaccaagg cagcatacac aacatcgaca tgtttaaag ttgtcaagac caataaagct 1620  
 tattgtctta gtattgcaga aatatccat accctattcg gggaaatttag gatcgttccc 1680  
 ttattagttt agatcctcaa ggtatgataga gtt 1713

<210> 17

<211> 571

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> NDV HN protein (ACM67348)

<400> 17

Met Gly Arg Ala Val Asn Arg Val Ala Leu Glu Asn Glu Glu Arg Glu

1 5 10 15

Ala Lys Asn Thr Trp Arg Leu Val Phe Arg Ile Ala Val Leu Leu Leu

20 25 30

Met Val Met Thr Leu Ala Ile Ser Ala Ala Ala Leu Ala Tyr Ser Ala

35 40 45

Gly Ala Ser Thr Pro His Asp Leu Ala Gly Ile Ser Thr Val Ile Ser

50	55	60
Lys Thr Glu Asp Lys Val Thr Ser Leu Leu Ser Ser Ser Gln Asp Val		
65	70	75
Ile Asp Arg Ile Tyr Lys Gln Val Ala Leu Glu Ser Pro Leu Ala Leu		
85	90	95
Leu Asn Thr Glu Ser Met Ile Met Asn Ala Ile Thr Ser Leu Ser Tyr		
100	105	110
Gln Ile Asn Gly Ala Ala Asn Asn Ser Gly Cys Gly Ala Pro Val His		
115	120	125
Asp Pro Asp Tyr Ile Gly Gly Ile Gly Lys Glu Leu Ile Val Asp Asp		
130	135	140
Ile Ser Asp Val Thr Ser Phe Tyr Pro Ser Ala Tyr Gln Glu His Leu		
145	150	155
Asn Phe Ile Pro Ala Pro Thr Thr Gly Ser Gly Cys Thr Arg Ile Pro		
165	170	175
Ser Phe Asp Met Ser Thr Thr His Tyr Cys Tyr Thr His Asn Val Ile		
180	185	190
Leu Ser Gly Cys Arg Asp His Ser His Gln Tyr Leu Ala Leu		
195	200	205
Gly Val Leu Arg Thr Ser Ala Thr Gly Arg Val Phe Phe Ser Thr Leu		
210	215	220
Arg Ser Ile Asn Leu Asp Asp Thr Gln Asn Arg Lys Ser Cys Ser Val		
225	230	235
Ser Ala Thr Pro Leu Gly Cys Asp Met Leu Cys Ser Lys Val Thr Gly		
245	250	255
Thr Glu Glu Glu Asp Tyr Lys Ser Val Ala Pro Thr Pro Met Val His		
260	265	270
Gly Arg Leu Gly Phe Asp Gly Gln Tyr His Glu Lys Asp Leu Asp Thr		
275	280	285
Thr Val Leu Phe Lys Asp Trp Val Ala Asn Tyr Pro Gly Val Gly Gly		
290	295	300

Gly Ser Phe Ile Asp Asn Arg Val Trp Phe Pro Val Tyr Gly Gly Leu  
 305 310 315 320  
 Lys Pro Asn Ser Pro Ser Asp Thr Ala Gln Glu Gly Lys Tyr Val Ile  
 325 330 335  
 Tyr Lys Arg His Asn Asn Thr Cys Pro Asp Lys Gln Asp Tyr Gln Ile  
 340 345 350  
 Arg Met Ala Lys Ser Ser Tyr Lys Pro Gly Arg Phe Gly Gly Lys Arg  
 355 360 365  
 Val Gln Gln Ala Ile Leu Ser Ile Lys Val Ser Thr Ser Leu Gly Lys  
 370 375 380  
 Asp Pro Val Leu Thr Ile Pro Pro Asn Thr Ile Thr Leu Met Gly Ala  
 385 390 395 400  
 Glu Gly Arg Ile Leu Thr Val Gly Thr Ser His Phe Leu Tyr Gln Arg  
 405 410 415  
 Gly Ser Ser Tyr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Tyr Pro Met Thr Val Asn  
 420 425 430  
 Asn Lys Thr Ala Thr Leu His Ser Pro Tyr Thr Phe Asn Ala Phe Thr  
 435 440 445  
 Arg Pro Gly Ser Ala Pro Cys Gln Ala Ser Ala Arg Cys Pro Asn Ser  
 450 455 460  
 Cys Ile Thr Gly Val Tyr Thr Asp Pro Tyr Pro Leu Ile Phe His Arg  
 465 470 475 480  
 Asn His Thr Leu Arg Gly Val Phe Gly Thr Met Leu Asp Asp Glu Gln  
 485 490 495  
 Ala Arg Leu Asn Pro Val Ser Ala Val Phe Asp Asn Ile Ser Arg Ser  
 500 505 510  
 Arg Val Thr Arg Val Ser Ser Ser Thr Lys Ala Ala Tyr Thr Thr  
 515 520 525  
 Ser Thr Cys Phe Lys Val Val Lys Thr Asn Lys Ala Tyr Cys Leu Ser  
 530 535 540  
 Ile Ala Glu Ile Ser Asn Thr Leu Phe Gly Glu Phe Arg Ile Val Pro

545	550	555	560	
Leu Leu Val Glu Ile Leu Lys Asp Asp Arg Val				
565	570			
<210> 18				
<211> 1716				
<212> DNA				
<213> artificial sequence				
<220><223> NDV HN DNA (strain ZJ1)				
<400> 18				
atggaccgcg cggttaacag agtcgtgtg gagaatgagg aaagagaagc aaagaacaca				60
tggcgcctgg tttccggat cgcagtctta cttaatgg taatgactct agctatctcc				120
gcagctgccc tggcatacag tacggggcc agtacgccc acgacctcgc aggcataatcg				
actgtgatct ccaagacaga agataagggtt acatcttac tcaagatgtg				
atagataaga tatacaagca ggtggctttt gaatccccgc tggcgtact aaacactgaa				
tctataatta tgaatgcaat aacctctttt ctatcaaaa ttaacggggc tgcgaacaat				
agcggatgtg gggcgcctgt tcatgaccca gattatatcg gggggatagg caaagaactc				
atagtggacg acatcagtga tgcacatca ttatccctt ctgcataatca agaacacttg				
aatttcatcc cggcgcctac tacaggatcc ggataccctc atttgacatg				
agcaccaccc attattgtta tactcacaat gtgatactat ccgggtgcag agatcactca				
cactcacatc aatacttagc acttgggtgtc ctccggacat ctgcacacagg gaggttattc				
ttttctactc tgcgtccac caattttagat gacacccaaa atcgaaatgc ctgcagtgtg				
agtgcaccc cttaggttg tgcgtatgtc tgctctaagg tcacagagac tgaagaggag				
gattacaagt cagttcccc cacatcaatg gtgcacggaa ggctagggtt tgacggtaa				
taccatgaga aggacttaga caccacggc ttatcaagg attgggtggc aaattacca				
ggagcgggag gagggtctt tattgacgac cgtgtatggt tcccaatgtt cggagggtc				
aaacccaaatt cacccagtga cactgcacaa gaaggaaat atgtatata caagcgcatt				
aacaacacat gcccgtatga acaagattac caaattcgga tggctaaatc ttcatataaa				
cccgccgat ttggggaaa ggcgtacag caagccatcc tatccatcaa agtgcacca				
tcctggta aggacccgt gctgactatt ccacctaata caatcacact catgggagcc				
gaaggcagaa tcctcacagt agggacatct cacttctgtt accaacgagg gtcttcatat				
ttctccctg ctttattata tcccatgaca gtaataaca aaacggctac actccatagt				

ccttatacgt ttaatgctt cactcgcca ggtagtgcc cttgccagc atcagcaaga 1380

tgccccaaact catgcatcac tgggtctat actgatccat atccctaat cttccatagg 1440  
 aatcatactc tacgaggggt cttcggacg atgcttgatg atgaacaagc gagacttaac 1500  
 cccgtatctg cagtattcga caacatatct cgcatcgatc tcacccgggt gagttcaagc 1560  
 agcaccaagg cagcatcac gacatcgaca tgtttaaag ttgtcaagac caataaaact 1620  
 tattgtctta gtattgcaga aatatccat accctattcg gggaaatttag gatcgttccc 1680  
 ttattagttg agatcctcaa ggatgataga gtttaa 1716

<210> 19

<211> 571

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> NDV HN protein (AAL18936)

<400> 19

Met Asp Arg Ala Val Asn Arg Val Val Leu Glu Asn Glu Glu Arg Glu

1 5 10 15

Ala Lys Asn Thr Trp Arg Leu Val Phe Arg Ile Ala Val Leu Leu Leu

20 25 30

Met Val Met Thr Leu Ala Ile Ser Ala Ala Ala Leu Ala Tyr Ser Thr

35 40 45

Gly Ala Ser Thr Pro His Asp Leu Ala Gly Ile Ser Thr Val Ile Ser

50 55 60

Lys Thr Glu Asp Lys Val Thr Ser Leu Leu Ser Leu Ser Gln Asp Val

65 70 75 80

Ile Asp Lys Ile Tyr Lys Gln Val Ala Leu Glu Ser Pro Leu Ala Leu

85 90 95

Leu Asn Thr Glu Ser Ile Ile Met Asn Ala Ile Thr Ser Leu Ser Tyr

100 105 110

Gln Ile Asn Gly Ala Ala Asn Ser Gly Cys Gly Ala Pro Val His

115 120 125

Asp Pro Asp Tyr Ile Gly Gly Ile Gly Lys Glu Leu Ile Val Asp Asp

130 135 140

Ile Ser Asp Val Thr Ser Phe Tyr Pro Ser Ala Tyr Gln Glu His Leu  
 145 150 155 160  
 Asn Phe Ile Pro Ala Pro Thr Thr Gly Ser Gly Cys Thr Arg Ile Pro  
 165 170 175  
 Ser Phe Asp Met Ser Thr Thr His Tyr Cys Tyr Thr His Asn Val Ile  
 180 185 190  
 Leu Ser Gly Cys Arg Asp His Ser His Ser His Gln Tyr Leu Ala Leu  
 195 200 205  
 Gly Val Leu Arg Thr Ser Ala Thr Gly Arg Val Phe Phe Ser Thr Leu  
 210 215 220  
 Arg Ser Thr Asn Leu Asp Asp Thr Gln Asn Arg Lys Ser Cys Ser Val  
 225 230 235 240  
 Ser Ala Thr Pro Leu Gly Cys Asp Met Leu Cys Ser Lys Val Thr Glu  
 245 250 255  
 Thr Glu Glu Glu Asp Tyr Lys Ser Val Ala Pro Thr Ser Met Val His  
 260 265 270  
 Gly Arg Leu Gly Phe Asp Gly Gln Tyr His Glu Lys Asp Leu Asp Thr  
 275 280 285  
 Thr Val Leu Phe Lys Asp Trp Val Ala Asn Tyr Pro Gly Ala Gly Gly  
 290 295 300  
 Gly Ser Phe Ile Asp Asp Arg Val Trp Phe Pro Val Tyr Gly Gly Leu  
 305 310 315 320  
 Lys Pro Asn Ser Pro Ser Asp Thr Ala Gln Glu Gly Lys Tyr Val Ile  
 325 330 335  
 Tyr Lys Arg His Asn Asn Thr Cys Pro Asp Glu Gln Asp Tyr Gln Ile  
 340 345 350  
 Arg Met Ala Lys Ser Ser Tyr Lys Pro Gly Arg Phe Gly Gly Lys Arg  
 355 360 365  
 Val Gln Gln Ala Ile Leu Ser Ile Lys Val Ser Thr Ser Leu Gly Lys  
 370 375 380  
 Asp Pro Val Leu Thr Ile Pro Pro Asn Thr Ile Thr Leu Met Gly Ala

385	390	395	400
Glu Gly Arg Ile Leu Thr Val Gly Thr Ser His Phe Leu Tyr Gln Arg			
405	410	415	
Gly Ser Ser Tyr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Tyr Pro Met Thr Val Asn			
420	425	430	
Asn Lys Thr Ala Thr Leu His Ser Pro Tyr Thr Phe Asn Ala Phe Thr			
435	440	445	
Arg Pro Gly Ser Val Pro Cys Gln Ala Ser Ala Arg Cys Pro Asn Ser			
450	455	460	
Cys Ile Thr Gly Val Tyr Thr Asp Pro Tyr Pro Leu Ile Phe His Arg			
465	470	475	480
Asn His Thr Leu Arg Gly Val Phe Gly Thr Met Leu Asp Asp Glu Gln			
485	490	495	
Ala Arg Leu Asn Pro Val Ser Ala Val Phe Asp Asn Ile Ser Arg Ser			
500	505	510	
Arg Val Thr Arg Val Ser Ser Ser Ser Thr Lys Ala Ala Tyr Thr Thr			
515	520	525	
Ser Thr Cys Phe Lys Val Val Lys Thr Asn Lys Thr Tyr Cys Leu Ser			
530	535	540	
Ile Ala Glu Ile Ser Asn Thr Leu Phe Gly Glu Phe Arg Ile Val Pro			
545	550	555	560
Leu Leu Val Glu Ile Leu Lys Asp Asp Arg Val			
565	570		

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 525

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; NDV HN mature protein sequence (without signal peptide of

ACM67348)

&lt;400&gt; 20

Ser Ala Gly Ala Ser Thr Pro His Asp Leu Ala Gly Ile Ser Thr Val

1 5 10 15

Ile Ser Lys Thr Glu Asp Lys Val Thr Ser Leu Leu Ser Ser Ser Gln

20 25 30

Asp Val Ile Asp Arg Ile Tyr Lys Gln Val Ala Leu Glu Ser Pro Leu

35 40 45

Ala Leu Leu Asn Thr Glu Ser Met Ile Met Asn Ala Ile Thr Ser Leu

50 55 60

Ser Tyr Gln Ile Asn Gly Ala Ala Asn Asn Ser Gly Cys Gly Ala Pro

65 70 75 80

Val His Asp Pro Asp Tyr Ile Gly Gly Ile Gly Lys Glu Leu Ile Val

85 90 95

Asp Asp Ile Ser Asp Val Thr Ser Phe Tyr Pro Ser Ala Tyr Gln Glu

100 105 110

His Leu Asn Phe Ile Pro Ala Pro Thr Thr Gly Ser Gly Cys Thr Arg

115 120 125

Ile Pro Ser Phe Asp Met Ser Thr Thr His Tyr Cys Tyr Thr His Asn

130 135 140

Val Ile Leu Ser Gly Cys Arg Asp His Ser His Ser His Gln Tyr Leu

145 150 155 160

Ala Leu Gly Val Leu Arg Thr Ser Ala Thr Gly Arg Val Phe Phe Ser

165 170 175

Thr Leu Arg Ser Ile Asn Leu Asp Asp Thr Gln Asn Arg Lys Ser Cys

180 185 190

Ser Val Ser Ala Thr Pro Leu Gly Cys Asp Met Leu Cys Ser Lys Val

195 200 205

Thr Gly Thr Glu Glu Glu Asp Tyr Lys Ser Val Ala Pro Thr Pro Met

210 215 220

Val His Gly Arg Leu Gly Phe Asp Gly Gln Tyr His Glu Lys Asp Leu

225 230 235 240

Asp Thr Thr Val Leu Phe Lys Asp Trp Val Ala Asn Tyr Pro Gly Val

245 250 255

Gly Gly Gly Ser Phe Ile Asp Asn Arg Val Trp Phe Pro Val Tyr Gly

260	265	270
Gly Leu Lys Pro Asn Ser Pro Ser Asp Thr Ala Gln Glu Gly Lys Tyr		
275	280	285
Val Ile Tyr Lys Arg His Asn Asn Thr Cys Pro Asp Lys Gln Asp Tyr		
290	295	300
Gln Ile Arg Met Ala Lys Ser Ser Tyr Lys Pro Gly Arg Phe Gly Gly		
305	310	315
Lys Arg Val Gln Gln Ala Ile Leu Ser Ile Lys Val Ser Thr Ser Leu		
325	330	335
Gly Lys Asp Pro Val Leu Thr Ile Pro Pro Asn Thr Ile Thr Leu Met		
340	345	350
Gly Ala Glu Gly Arg Ile Leu Thr Val Gly Thr Ser His Phe Leu Tyr		
355	360	365
Gln Arg Gly Ser Ser Tyr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Tyr Pro Met Thr		
370	375	380
Val Asn Asn Lys Thr Ala Thr Leu His Ser Pro Tyr Thr Phe Asn Ala		
385	390	395
Phe Thr Arg Pro Gly Ser Ala Pro Cys Gln Ala Ser Ala Arg Cys Pro		
405	410	415
Asn Ser Cys Ile Thr Gly Val Tyr Thr Asp Pro Tyr Pro Leu Ile Phe		
420	425	430
His Arg Asn His Thr Leu Arg Gly Val Phe Gly Thr Met Leu Asp Asp		
435	440	445
Glu Gln Ala Arg Leu Asn Pro Val Ser Ala Val Phe Asp Asn Ile Ser		
450	455	460
Arg Ser Arg Val Thr Arg Val Ser Ser Ser Ser Thr Lys Ala Ala Tyr		
465	470	475
Thr Thr Ser Thr Cys Phe Lys Val Val Lys Thr Asn Lys Ala Tyr Cys		
485	490	495
Leu Ser Ile Ala Glu Ile Ser Asn Thr Leu Phe Gly Glu Phe Arg Ile		
500	505	510

Val Pro Leu Leu Val Glu Ile Leu Lys Asp Asp Arg Val  
 515 520 525

<210> 21  
 <211> 46  
 <212> PRT  
 <213> artificial sequence  
 <220><223> NDV HN signal peptide (of ACM67348)  
 <400> 21

Met Gly Arg Ala Val Asn Arg Val Ala Leu Glu Asn Glu Glu Arg Glu  
 1 5 10 15

Ala Lys Asn Thr Trp Arg Leu Val Phe Arg Ile Ala Val Leu Leu

20 25 30

Met Val Met Thr Leu Ala Ile Ser Ala Ala Ala Leu Ala Tyr  
 35 40 45

<210> 22  
 <211> 1713  
 <212> DNA  
 <213> artificial sequence  
 <220><223> NDV HN codon-optimized (duckweed-preferred) DNA (for ACM67348)  
 <400> 22

atggccggg ccgtcaaccg cgtggcgttg gagaacgagg agcgggaggc caagaacacc	60
tggaggctcg tttccgcat cgccgtgctc ctgctatgg tcatgaccct ggcgatctcg	120
gccgcggccc tggctactc cgccggtgcg agcacccgc acgacctggc cgggatcagc	180
accgtcatct cgaagaccga ggacaagggtg acgtccctgc ttagctcgcc ccaggacgtt	240
atcgaccgca tctacaagca agtgcgcctt gagagccctc tggccctgtt caacacggag	300
agcatgatca tgaacgcgtt caccccttg agtaccaga tcaacggggc cgcaacaat	360
tccgggtgctt ggcgcggcgtt gcacgaccctt gactacatcg ggggatcgg caaggaactc	420
atcggttgcgtt acatcagcgtt cgtgacgtcg ttctaccctt ccgcctacca ggagcacctc	480
aacttcatcc cgcgcggcgtt cacggggagc ggctgcaccc ggatccgtt cttcgacatg	540
tccaccacgc actattgttca caccacaaac gtgtatccgtt cgggttgccg cgaccacac	600
cacttcgcacc agtacctggc gctggcgctt ctcaggaccc cccgcggccgg ccgcgtgttc	660
ttctccactc tccgctccat caacctggac gatacgcaga accgcaagtc ctgcagcgtt	720

tccgccacgc ccctcgctg cgacatgctc tgctccaagg tgaccggcac cgaggaggag	780
gactacaagt ccgtggcccc caccccgatg gtgcacggc ggctcggtt cgatggtcag	840
taccacgaga aggacctgga cacgaccgtg ctcttcaagg actgggtggc gaactacccc	900
gtgtgtgggg gcgtagctt catcgacaac agagtcgtt tccccgtgt aaaaaaaaaaaaa	960
aagcccaact cccctccga cacggccag gagggaaagt acgtcatcta caagccgcac	1020

aacaacacct gcccggacaa gcaggactat cagatccgga tggccaaaag ctcctacaag	1080
cccgccgct tcggggcaa gagagtccag caggcgatcc tctccatcaa ggtgagcacg	1140
agcctcgca aggacccggt cctgaccatc ccccgaaaca ccatcaccct catggcgcc	1200
gaggggagaa tcctcactgt cggcacctcc cacttcgtt accaggggg cagtcgtac	1260
ttcagcccg cgctcctgta cccgatgacc gtcaacaaca agaccggcac gtcactcg	1320
ccctacacct tcaacgcctt caccggcccc ggcagcgccc cgtgccagge ctccggccgc	1380
tgccgaact cgtcatcac cgggtctac accgaccctt acccgctgtat cttccaccgc	1440

aaccacacgc tcaggggggt gttcgaccatgctcgacg acgagcaggc tcgcctgaac	1500
cccgctcagcg ccgtttcga caacatctcc cgcagccgcg tcacgagagt ctccctgtcc	1560
tcgacgaagg ccgcgtacac cacgtccacc tgcttcaagg tggtaagac caacaagcc	1620
tactgcctt ccatcgctga gatctccaaaccctttcg gcgagtccg gatcgtgccc	1680
ctcttgggggg agatcctgaa ggacgaccgc gtg	1713

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 1575

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; NDV HN codon-optimized (duckweed) encoding mature protein

(ACM67348)

&lt;400&gt; 23

tccggccgtg cgagcacccc gcacgacctg gccggatca gcaccgtcat ctgcggacc	60
gaggacaagg tgacgtccct gtcagctcg tcccaggacg ttatcgaccg catctacaag	120
caagtgcct tggagagccc tctggccctg ctcaacacgg agagcatgtat catgaacgcg	180
atcacctccc ttagctacca gatcaacggg gccgcgaaca attccgggtg cggccccc	240
gtgcacgacc ctgactacat cggcggtatc ggcaagggac tcatcggtga cgacatcagc	300
gacgtgacgt ctttctaccc ctccgcctac caggaggacc tcaacttcat cccggcccg	360
accacgggaa gcggtgcac cggatcccg tccttcgaca tgtccaccac gcactattgc	420

tacacccaca acgtgatcct gtcgggtgc cgcgaccaca gccactcgca ccagtacctg	480
gcgcgtggcg tcctcaggac ctccgcgacc ggccgcgtgt tcttctccac tctccgtcc	540
atcaacctgg acgatacgca gaaccgcaag tcctgcagcg tgtccgccac gcccctggc	600
tgcgacatgc tcigctccaa ggtgaccggc accgaggagg aggactacaa gtccgtggcc	660
cccaccccgta tggtgcacgg gcggtcggtc ttcatggtc agtaccacga gaaggacctg	720
gacacgaccg tgctttcaa ggactgggtg gcgaactacc ccgggtgtggg gggcggttagc	780
ttcatcgaca acagagtctg gttcccggt tacggggcc tgaagccaa ctccccctcc	840

gacacggccc aggaggggaa gtacgtcatc tacaaggcgc acaacaacac ctgcccggac	900
aagcaggact atcagatccg gatggccaaa agctctaca agcccgccg cttcggggc	960
aagagagtcc agcaggcgat cctctccatc aaggtgagca cgagcctcg caaggacccg	1020
gtcctgacca tcccccgaa caccatcacc ctcatggcgcc cgaggggag aatcctcact	1080
gtcggcacct cccacttcgtt gtaccagcgg ggcagctgt acttcagccc ggcgtctcg	1140
taccatcgatca ccgtcaacaa caagaccgccc acgctgcaact cgcctacac cttcaacgcc	1200
ttcacccgccc cggcagcgc cccgtgccag gcctccgccc gctgcccggaa ctcgtgcata	1260

accgggtct acaccgaccc ttacccgctg atcttccacc gcaaccacac gtcaggggg	1320
gtgttcggga ccatgctcga cgacgagcag gctgcctga accccgtcag cgccgtttc	1380
gacaacatct cccgcagccg cgtcacgaga gtctcctcgt cctcgacgaa ggccgcgtac	1440
accacgttcca cctgcttcaa ggtggtaag accaacaag cctactgcct ctccatcgct	1500
gagatcttcca acaccctt cggcgagttc cggatcgtgc ccctcttggg ggagatcctg	1560
aggacgacc gcgtg	1575

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 4

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; ER retention seq

&lt;400&gt; 24

Lys Asp Glu Leu

1

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 93

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artificial sequence

<220><223> alpha amylase signal seq

<400> 25

atgcagggtcc tgaacacgt ggtcaacaag cacttcctct ccctgtccgt cctcatcg	60
ctcctcggtc tgagcagcaa cctcaccgcc ggc	93

<210> 26

<211> 31

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> alpha amylase signal peptide

<400> 26

Met Gln Val Leu Asn Thr Met Val Asn Lys His Phe Leu Ser Leu Ser

1	5	10	15
---	---	----	----

Val Leu Ile Val Leu Leu Gly Leu Ser Ser Asn Leu Thr Ala Gly

20	25	30
----	----	----

<210> 27

<211> 138

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> NDV HN signal sequence codon-optimized (duckweed)

<400> 27

atggccggg ccgtcaaccg cgtggcgttg gagaacgagg agcggaggc caagaacacc	60
tggaggctcg tttccgcat cggcggtc ctgctatgg tcatgaccct ggcgatctcg	120
gccgcggccc tggctac	138

<210> 28

<211> 14

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> NDV HN linear epitope region 3

<400> 28

Pro Asp Lys Gln Asp Tyr Gln Ile Arg Met Ala Lys Ser Ser

1	5	10
---	---	----