	(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)		(71) 출원인 메리얼 리미티드 미국 30096 조지아주 델루스 새털라이트 블러바드 3239 빌딩 500
(21) 출원번호 10-2012-7020029 (22) 출원일자(국제) 2010년12월28일 심사청구일자 없음		(72) 발명자 귀 쉬안 미국 30024 조지아주 스와니 레이놀드스톤 웨이 233
(85) 번역문제출일자 2012년07월27일 (86) 국제출원번호 PCT/US2010/062209 (87) 국제공개번호 WO 2011/090708 국제공개일자 2011년07월28일		트루프 캐롤린 마리 미국 30605 조지아주 애션스 제미건 드라이브 166 (뒷면에 계속)
(30) 우선권주장 61/290,297 2009년12월28일 미국(US)		(74) 대리인 특허법인코리아나

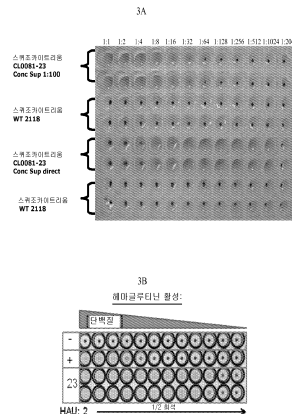
전체 청구항 수 : 총 23 항

(54) 발명의 명칭 재조합 NDV 항원 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 NDV 백신을 포함한다. 백신은 NDV의 HN에 근거한 서브유닛 백신일 수 있다. NDV HN는 미 세조류를 비롯한 식물 또는 조류에서 발현될 수 있다. 본 발명은 또한 NDV에 대하여 동물을 보호하는데 사용될 수 있는 NDV 항원, 에피토프 또는 면역원을 코딩 및 발현하는 재조합 벡터에 관한 것이다. 또한 본 발명은 바이러스 벡터 또는 비활성화된 백신 및 서브유닛 백신을 사용하는 프라임-부스트 계획을 비롯한, DIVA 전략과 상용성인 백신화 섭생을 포함한다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

페일메이어 브래들리 제이

미국 30677 캘리포니아주 왓킨스빌 윈디 크릭 드라이브 1170

프리차드 조이스 애니타

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: 헤마글루티닌-뉴라미니다아제) 폴리펩티드 또는 항원 및 약학적 또는 수의학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 비히클 또는 아쥘반트를 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 20 에 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 23 에 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 아쥘반트가 유-중-수 에멀전 또는 수-중-유 에멀전인 조성물.

청구항 9

제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 따른 조성물의 1 이상의 투여를 포함하는 NDV 에 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 벡터를 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 좁개구리밥 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 좁개구리밥 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 좁개구리밥 식물.

청구항 19

하기 단계를 포함하는 NDV HN 폴리펩티드의 제조 방법: (a) 미세조류 배양물 또는 좁개구리밥 식물을 미세조류 또는 좁개구리밥 배양 배지 내에서 배양하는 단계, 미세조류 배양물 또는 좁개구리밥 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 펩티드에 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 펩티드가 SEQ ID NO:13, 또는 21 에 언급된 서열을 갖는 방법.

청구항 21

SEQ ID NO:13, 또는 21 에 언급된 서열을 갖는 신호 펩티드를 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

[0002] 본 출원은 2009 년 12 월 28 일에 출원된 미국 가출원 일련 번호 61/290,297 의 우선권을 주장한다.

[0003] 기술 분야

[0004] 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 파라믹소비리나에에는 5 가지 속, 즉 모르빌바이러스 (*Morbillivirus*), 헤니파바이러스 (*Henipavirus*), 루블라바이러스 (*Rubulavirus*), 레스피로바이러스 (*Respirovirus*) 및 아볼라바이러스 (*Avulavirus*) 가 포함되며, 뉴모비리나에에는 뉴모바이러스 (*Pneumovirus*) 및 메타뉴모바이러스 (*Metapneumovirus*) 가 포함된다 (Mayo, 2002, *Arch Virol* 147:1655-63). 조류 (새) 파라믹소바이러스 (APMV) 는 속 아볼라바이러스 (*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 흥미로운 형태의 NDV 는 메소제닉 및 렌토제닉 단리물로서 지칭되는데, 렌토제닉 형태는 국내 가금류에서 증상이 거의 없다. NDV 의 게놈 RNA 는 하기 6 개의 단백질을 코딩하는 유전자를 함유한다: HN (헤마글루티닌-뉴라미니다아제), NP (뉴클레오캡시드 단백질), P (인단백질), M (매트릭스 단백질), F (융합 단백질), 및 L (RNA-의존성 RNA 폴리머라아제).

[0006] 바이러스 벡터 백신은 백신 개발에서 가장 빠르게 성장하고있는 부문 중 하나를 대표한다. 주요 글로벌한 감염병, HIV, 결핵 및 말라리아에 대한 임상 개발에서의 많은 백신은 바이러스 벡터이다. 현재 사용되고 있는 바이러스 벡터의 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 생성물 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. NDV 의 F 및 HN 단백질은 NDV 에 대항하는 식용가능한 백신을 개발하고자 감자 식물에서 발현되었다 (Berinstein A., et al., 2005, *Vaccine* 23: 5583-6689). W02004/098533 에는 담배 식물에서의 NDV HN 항원 및 조류 인플루엔자 바이러스 (Avian Influenza Virus) HA 항원의 발현이 기재되어 있다. 미국 특허 출원 공개 제 US2010/0189731 호에는 좁개구리밥 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, 생성물 품질의 비일관성 (Schillberg et al., *Vaccine* 2005, 23, 1764-1769), 및 예상된 크기 및 면역원성의 바이러스-유사 생성물을 제조하기 위한 불충분한 역량 (Arntzen et al., *Vaccine* 2005, 23, 1753-1756) 이 포함된다. 상기 문제들을 해결하기 위해, 코돈 최적화, 식물 또는 조류 생성물의 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 NDV 의 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, NDV 의 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 1 은 폴리뉴클레오티드 및 단백질 서열에 대해 지정된 SEQ ID NO 를 보여주는 표를 제공한다.
- 도 2 는 NDV HN 유전자의 DNA 및 단백질 서열 및 글리코실화 부위를 제공한다.
- 도 3 은 96 웰 플레이트 포맷 내 HA 분석을 보여준다.
- 도 4 는 발현된 NDV HN 유전자의 SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯 분석을 보여준다.
- 도 5 는 코마시 염색, 과요오드산 염색, 글리코실화 분석에 대한 면역블롯 및 글리코실화 부위 분석의 사진을 보여준다.
- 도 6a 및 6b 는 상이한 균주 및 성숙 단백질 서열 (신호 펩티드 없이)로부터 NDV HN 의 단백질 서열 정렬을 제공한다.
- 도 7a 는 상이한 NDV 균주로부터의 DNA 의 서열 정렬을 제공한다. 도 7b 는 NDV HN 에 대해 코딩하는 야생형과 코돈-최적화된 (미세조류-바람직한) DNA 및 NDV HN 에 대해 코딩하는 야생형과 코돈-최적화된 (좀개구리밥-바람직한) DNA 사이의 DNA 서열 정렬을 보여준다. 도 7c 는 좀개구리밥 식물 형질전환에 대한 플라스미드 맵을 묘사한다.
- 도 8 은 HN 선형 에피토프 영역을 보여주는 NDV HN 단백질의 서열 정렬을 제공한다.
- 도 9 는 상이한 균주의 NDV HN 내의 글리코실화 부위의 위치 및 존재를 보여주는 표를 제공한다.
- 도 10 은 NDV HN CA/02 단백질의 글리코실화 부위 및 HN 선형 에피토프 영역의 그래프 특징 맵을 제공한다 (SEQ ID NO:3).
- 도 11 은 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 실시예에 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 삼입체를 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 생합성 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 하거나 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 보존성일 것이다 (즉, 아미노산 계통 내에서 일어나는 치환).

예를 들어, 아미노산은 일반적으로 하기 네 가지 계통으로 나뉜다: (1) 산성 -- 아스파르트레이트 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 분자와 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 면역학적검정 방법으로 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, 핀치, 매, 까마귀, 타조, 예뽕 및 화식조), 영장류 (예를 들어, 원숭이, 안경원숭이, 원숭이, 긴팔원숭이, 유인원), 및 생선으로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있다. "동물" 이라는 용어에는 또한 배아 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, 알팔파 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, 좁게구리밥, 잔디 등이 포함되나 이에 제한되지 않는다. 용어 "식물" 에는 또한 양치식물, 속새류, 석송, 이끼, 우산이끼, 붕어마름, 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 군주가 포함된다. 조류에는 예를 들어, 적조류, 갈조류 및 녹조류, 배우체 등이 포함될 수 있다. 조류는 미세조류일 수 있다. 미세조류는 트라우스토카이트리아세아에 (*Thraustochytriaceae*), 예를 들어, 스킨조카이트리움 (*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. 또다른 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 또다른 구현예에서, 조류는 스킨조카이트리움 (*Schizochytrium*) 으로부터 선택된다. 하나의 구현예에서, 재조합 NDV HN 항원은 예를 들어, US 7,001,772, US 2008/0022422, US 2006/0275904, US 2006/0286650 에 기재된 바와 같이 스킨조카이트리움 단백질 발현 시스템에서 발현될 수 있다.
- [0033] 구현예에서, 본원에 기재된 주제는 좀개구리밥 발현 시스템에 의해 제조된 재조합 NDV HN 폴리펩티드 또는 항원 및, 램나 (*Lemna*) 속을 비롯한 좀개구리밥으로부터의 식물 물질, 및 약학적 또는 수의학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 비히클을 포함하는 조성물에 관한 것이다. 또다른 구현예에서, 본원에 기재된 주제는 NDV HN 폴리펩티드 또는 항원을 포함하는 좀개구리밥 발현 시스템에 의해 생성된 임의의 글리코실화된 단백질에 관한 것이다. 재조합 NDV HN 폴리펩티드 또는 항원은 Biolex's LEX systemSM 과 같은 램나 마이너 (*Lemna minor*) 단백질 발현 시스템에서 발현될 수 있다.
- [0034] 하나의 구현예에서, 약학적으로 또는 수의학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 또는 비히클은 유-중-수 에멀전일 수 있다. 또다른 구현예에서, 유-중-수 에멀전은 수/유/수 (W/O/W) 3 중 에멀전일 수 있다. 더욱 또다른 구현예에서, 약학적으로 또는 수의학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 또는 비히클은 수-중-유 에멀전일 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 폴리뉴클레오타이드를 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 또다른 양상에서, NDV HN 유전자는 SEQ ID NO: 1, 2, 4, 6, 8, 12, 14, 16, 18, 22 또는 23 에 언급된 서열과 70% 이상의 일치성을 갖는다. 본 구현예의 또다른 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 28 에 언급된 서열과 80% 이상의 일치성을 갖는다. 본 구현예의 또다른 양상에서, HN 폴리펩티드 또는 이의 절편 또는 변이체는 HN 선형 에피토프 영역을 포함한다. 본 구현예의 또다른 양상에서, 에피토프 영역은 SEQ ID NO: 10, 11, 또는 28 에 언급된 서열과 80% 이상의 일치성을 갖는다.
- [0037] 구현예에서, NDV 항원은 부분적으로 정제되고; 또는, 또다른 구현예에서, NDV 항원은 실질적으로 정제된다. 더욱 또다른 구현예에서, NDV 항원은 수확된 미세조류 내에 전부 존재한다. 더욱 또다른 구현예에서, NDV

항원은 저속 현탁액 내에 존재한다.

- [0038] 합성 항원, 예를 들어, 폴리에피토프, 측면 에피토프, 및 기타 재조합 또는 합성적으로 유도된 항원이 또한 정의의 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, 에컨대 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 실시예에 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 획득될 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, 데옥시리보뉴클레오티드, 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. 또다른 양상에서, 본 발명은 SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 10, 11, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 또는 28 에 언급된 서열 및 이의 변이체 또는 절편을 갖는 NDV HN 폴리펩티드를 제공한다.
- [0048] 게다가, 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 2 개의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드를 말한다. "오르소로그"라는 용어는 상이한 종으로부터 유래되지만, 종 분화에 의해 공통의 조상 유전자로부터 진화한 2 개의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드를 말한다. 보통, 오르소로그는 동일한 또는 유사한 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩한다. "파라로그"라는 용어는 게놈 내에서 복제에 의해 관련된 2 개의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드를 말한다. 파라로그는 일반적으로 상이한 기능을 갖지만, 이들 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] 또다른 양상에서, 본 발명은 SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 10, 11, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 또는 28 에 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. 또다른 양상에서, 본 발명은 SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, 또는 SEQ ID NO:28 에 언급된 서열을 갖는 면역원성 절편을 포함하는 NDV HN 폴리펩티드를 제공하고, 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 15, 17, 19, or 20 에 언급된 서열을 갖는 폴리펩티드와 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 일치성을 갖는다.
- [0050] 더욱 또다른 양상에서, 본 발명은 잘 알려진 분자 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 28 에 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 다형성을 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 다형성 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 돌연변이생성에 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 또다른 생물학적으로 유사한 잔기에 의한 대체, 또는 코딩된 아미노산 잔기가 변화하지 않거나 또다른 생물학적으로 유사한 잔기가 되도록 하는 핵산 서열 내 뉴클레오타이드의 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 28 에 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. 또다른 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:28 에 언급된 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함한다.

[0056] 또다른 양상에서, 본 발명은 NDV HN 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 예컨대 SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 10, 11, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 또는 28 에 언급된 서열을 갖는 NDV HN 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다. 더욱 또다른 양상에서, 본 발명은 SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 10, 11, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 또는 28 에 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 폴리뉴클레오타이드를 제공한다. 또다른 양상에서, 본 발명은 SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, 또는 SEQ ID NO:28 에 언급된 서열을 갖는 면역원성 절편을 포함하는 NDV HN 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 제공하고, 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 15, 17, 19, 또는 20 에 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] 또다른 양상에서, 본 발명은 SEQ ID NO: 1, 2, 4, 6, 8, 12, 14, 16, 18, 22, 또는 23 에 언급된 뉴클레오타이드 서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드, 또는 이의 변이체를 제공한다. 또다른 양상에서, 본 발명은 SEQ ID NO: 1, 2, 4, 6, 8, 12, 14, 16, 18, 22, 또는 23 에 언급된 서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드 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 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.

[0058] 본 명세서의 폴리뉴클레오타이드에는 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 폴리뉴클레오타이드를 말한다. NDV 폴리펩티드를 코딩하는 최적화된 폴리뉴클레오타이드를 제공하기 위해, NDV 단백질 유전자의 DNA 서열은 1) 특정 종에서 고도로 발현된 유전자에 의해 바람직한 코돈을 포함하고; 2) 상기 종에서 상당히 발견되는 함량에 대해 뉴클레오타이드 염기 조성물 내 A+T 또는 G+C 함량을 포함하고; 3) 상기 종의 개시 서열을 형성하고; 또는 4) 불안정화, 부적합한 폴리아데닐화, RNA 의 분해 및 종결을 일으키거나, 2 차 구조 헤어핀 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 빈도 분포를 사용함으로써 달성될 수 있다. "바람직한 코돈 사용 빈도" 라는 용어는 제시된 아미노산을 구체화하기 위한 뉴클레오타이드 코돈의 사용에서 특이적 숙주 세포에 의해 나타내지는 바람직함을 말한다. 20 개의 자연적인 아미노산이 있고, 이들 대부분은 1 개 초과 코돈에 의해 구체화된다. 그러므로, 모든 축퇴성 뉴클레오타이드 서열은, 뉴클레오타이드 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 뉴클레오타이드 또는 아미노산의 수로 나뉘어진 일치하는 뉴클레오타이드 또는 아미노산과의 위치의 수를 말할 수 있고, 2 개의 서열의 정렬은 예를 들어, 20 개 뉴클레오타이드의 윈도우 사이즈, 4 개의 뉴클레오타이드의 단어 길이, 및 4 의 갭 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 뉴클레오타이드 서열 사이의 서열 일치성은 Vector NTI 소프트웨어 패키지 (Invitrogen, 1600 Faraday Ave., Carlsbad, CA) 를 사용하여 측정될 수 있다.
- [0062] 혼성화 반응은 상이한 엄격함 조건 하에서 수행될 수 있다. 혼성화 반응의 엄격함을 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 폴리뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0064] "벡터" 는 시험관 내 또는 생체 내에서 표적 세포에 전달하고자 하는 이중 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 DNA 또는 RNA 플라스미드 또는 바이러스를 말한다. 이중 폴리뉴클레오타이드는 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 폴리뉴클레오타이드에 연결되거나 자연에서 발생하지 않는 반합성, 또는 합성 기원의 폴리뉴클레오타이드를 의미한다.
- [0066] "이중" 이라는 용어는 비교되어 지는 실제의 나머지와 일반적으로 구별되는 실제로부터 유래하는 것을 의미한다. 예를 들어, 폴리뉴클레오타이드는 유전자 조작 기술에 의해 상이한 근원으로부터 유래된 플라스미드 또는 벡터 내로 도입될 수 있고, 그러므로 이중 폴리뉴클레오타이드이다. 고유의 코딩 서열로부터 제거되고 고유의 서열 이외의 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터는 이중 프로모터이다.
- [0067] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 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. 폴리뉴클레오타이드가 (유리하게는, 벡터에서) 폴리펩티드 분질, 예를 들어, NDV 펩티드를 코딩하는 경우, ATG 는 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 폴리뉴클레오타이드를 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 폴리뉴클레오타이드 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. 또다른 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 신호 펩티드 서열을 포함할 수 있다. 실시에서 상의되거나 사용될 수 있는 DNA 플라스미드에 대한 추가적인 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 쥐와 기원의, 또는 임의로 래트 또는 기니아 피그와 같은 또다른 기원을 갖는 즉각적인 초기 사이토메갈로바이러스 프로모터(CMV-IE)이다.

[0073] 더욱 일반적인 용어로, 프로모터는 바이러스, 식물 또는 세포 기원의 것이다. 본 발명의 실시예 통상적으로 사용될 수 있는 CMV-IE 이외의 강한 바이러스 프로모터는 SV40 바이러스의 초기/후기 프로모터 또는 Rous 육종 바이러스의 LTR 프로모터이다. 본 발명의 실시예 통상적으로 사용될 수 있는 강한 세포 프로모터는 세포골격의 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(W01989/01036), 토끼 β-글로빈 유전자의 인트론 II(van Ooyen et al., 1979)를 도입하는 것이 특히 유리하다. 또다른 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 성장 호르몬(bGH) 유전자의 poly(A) 신호(U.S. 5,122,458호를 참조함), 또는 토끼 β-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. 또다른 구현예에서, 재조합 NDV HN 항원은 유전자도입 조류에서 발현된다. 더욱 또다른 구현예에서, 유전자도입 조류는 스킨조카이트리움(*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 좁개구리밥에서 NDV 폴리펩티드를 발현하는 방법

[0079] 본 발명의 일부 구현예에서, NDV HN 폴리펩티드, 또는 이의 분절 또는 변이체는 미세조류 또는 좁개구리밥에서 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 좁개구리밥에서 항원성 NDV HN 폴리펩티드, 또는 이의 분절 또는 변이체의 향상된 발현에 대해 개질될 수 있다.

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

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

리펩티드, 또는 이의 분절 또는 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 카세트로의 미세조류 또는 좁개구리밥의 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 좁개구리밥 내로 도입된다.

[0082] 일부 구현예에서, NDV HN 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 또는 이의 분절 또는 변이체를 포함하는 발현 카세트에 형질전환된 미세조류 또는 좁개구리밥은 또한 관심의 또다른 이종 폴리펩티드, 예를 들어, 또다른 NDV 폴리펩티드, 이의 분절, 또는 변이체의 발현을 위해 제공되는 발현 카세트에 형질전환된다. 관심의 또다른 이종 폴리펩티드의 발현을 위해 제공되는 발현 카세트는 미세조류 또는 좁개구리밥 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 좁개구리밥 내로의 도입을 위해 상이한 폴리뉴클레오티드 상에 (예를 들어, 상이한 형질전환 벡터 상에) 제공될 수 있다.

[0083] 미세조류 또는 좁개구리밥의 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 III 를 유도할 수 있는 TATA 박스를 통상 포함하는 DNA 의 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 좁개구리밥 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 좁개구리밥 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 좁개구리밥에서 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, 오픈 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 7,001,772 에는 아세토라테이트 합성효소, 아세토라테이트 합성효소 프로모터 및 터미네이터 영역, α -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 US2006/0286650 에는 스킨조카이트리움 (*Schizochytrium*) 액틴, 신장 인자 1 알파 및 글리세르알데히드 3-포스페이트 디히드로게나아제 각각에 대한 프로모터 및 터미네이터 뿐 아니라 이들의 스킨조카이트리움 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 시듦 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, 사이토키닌 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*) 옥토펜 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*) 옥토펜 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 또다른 기원으로부터 유래될 수 있다. 편리한 종결 영역은 옥토펜 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 솔포닐우레아 제초제에 대한 저항성은 돌연변이 표적 효소, 5-에놀피루빌쉬키메이트-3-포스페이트 합성효소 (EPSPS) 및 아세토티라테이트 합성효소 (ALS)에 대한 코딩 유전자를 사용하여 획득된다. 글루포시네이트 암모늄, 보로복시닐, 및 2,4-디클로로페녹시아세테이트 (2,4-D)에 대한 저항성은 각각의 제초제를 해독하는, 포스포노트리신 아세틸트랜스페라아제, 니트릴라아제, 또는 2,4-디클로로페녹시아세테이트 모노옥시게나아제를 코딩하는 박테리아 유전자를 사용하여 획득되었다.

[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); 아세토티라테이트 합성효소 (ALS, Li, et al. (1992) *Plant Physiol.* 100:662-668);

아스파테이트 키나아제; 디히드로디피콜리네이트 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); 트립토판 데카르복실라아제 (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); 포스포노트리신 아세틸트랜스페라아제 (DeBlock et al. (1987) *EMBO J.* 6:2513); 2,2-디클로로프로피온산 데할로게나아제 (Buchanan-Wollaston 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-쉬키메이트-포스페이트 합성효소 (aroA; Comai et al. (1985) *Nature* 317:741); 할로 아틸니트릴라아제 (WO 87/04181); 아세틸-조효소 A 카르복실라아제 (Parker et al. (1990) *Plant Physiol.* 92:1220); 디히드로프테로에이트 합성효소 (sulI; Guerinneau 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); 메토티렉세이트 (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. Bio.* 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); 숄폰아미드 (Guerinneau et al. (1990) *Plant Mol. Bio.* 15:127); 브로목시닐 (Stalker et al. (1988) *Science* 242:419); 2,4-D (Streber et al. (1989) *BioTechnology* 7:811); 포스포노트리신 (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 포스포노트리신 (PPT) 또는 비알라포스 등에 대해 제초제 저항성을 부여한다. 상기 명시된 바와 같이, 벡터 구축물에 사용될 수 있는 다른 선별가능한 마커에는 또한 비알라포스 및 포스포노트리신 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.

[0095] 미세조류 숙주 또는 좁개구리밥 식물에서의 향상된 발현을 위한 뉴클레오티드 서열의 개질

[0096] NDV HN 폴리펩티드 또는 이의 절편 또는 변이체가 미세조류 또는 좁개구리밥 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 A 에 나열된다.

[0097] 표 A 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)	

[0098]

[0099] 본 발명의 목적을 위해, "미세조류-바람직한 코돈" 은 17% 초과인 미세조류 내 코돈 사용 빈도를 갖는 코돈을 말한다. 본원에 기재된 바와 같은 "미세조류-바람직한 코돈" 은 17% 초과인 트라우스토카이트리아세아에 (*Thraustochytriaceae*) 속 내 코돈 사용 빈도를 갖는 코돈을 말한다. 본원에 기재된 바와 같은 "스퀴조카이트리움 (*Schizochytrium*)-바람직한 코돈" 은 17% 초과인 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 취득된다.

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

[0101] 표 B. *렘나 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]

[0103] 표 C *스퀴조카이트리움* 중 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, "좁개구리밥-바람직한 코돈"은 17% 초과인 좁개구리밥 내 코돈 사용 빈도를 갖는 코돈을 말한다. 본원에 기재된 바와 같은 "렘나 (*Lemna*)-바람직한 코돈"은 17% 초과인 렘나 (*Lemna*) 속 내 코돈 사용 빈도를 갖는 코돈을 말한다. 본원에 기재된 바와 같은 "렘나 마이너 (*Lemna minor*)-바람직한 코돈"은 17% 초과인 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 취득된다.
- [0106] 관심의 항원성 NDV 폴리펩티드, 또는 이의 분절 또는 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 모든 또는 일부가 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 좁개구리밥-바람직한 코돈일 수 있다. 하나의 구현예에서, 코돈의 90% 내지 96%가 미세조류-바람직한 또는 좁개구리밥-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 (*Thraustochytriaceae*)-바람직한 또는 스킨조카이트리움 (*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 스킨조카이트리움-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 스킨조카이트리움-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 이중 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 예상된 헤어핀 이차 mRNA 구조를 피하기 위해 개질될 수 있다.
- [0108] 동물 및 식물에서의 번역 개시 코돈에 대한 최적 번역 개시 문맥 뉴클레오티드 서열 사이에는 알려진 차이가 있다. 본원에 사용된 바와 같은 "번역 개시 문맥 뉴클레오티드 서열"은 번역 개시 코돈의 5' 방향의 3개의 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 3개의 뉴클레오티드가 "ACC"이도록 개질된다. 두번째 구현예에서, 상기 뉴클레오티드는 "ACA"이다.
- [0109] 미세조류 또는 좁개구리밥 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 아라비도시스 (*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 뉴클레오타이드 1222-1775 에 상응하는 뉴클레오타이드 서열은 번역 효율을 향상시키기 위해 NDV HN 폴리펩티드, 또는 이의 분절 또는 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드의 업스트림에 삽입된다. 또다른 구현예에서, 발현 카세트는 램나 (Lemna) 지바 리볼로오스-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 뉴클레오타이드 서열 개질 중 임의의 것은 본 발명에 사용될 수 있는 것이 인지된다. 본원에 기재된 바와 같이 미세조류 또는 좁개구리밥에서 "향상된 발현을 위해 개질됨" 이라는 구절은 상기 개질의 임의의 하나 또는 임의의 조합을 함유하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 말한다.

[0112] 신호 펩티드.

[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 펩티드" 가 포함되는 전구체 폴리펩티드로부터 통상적으로 번역된다. 상기 신호 펩티드는 신호 펩티드가 결합된 "성숙" 폴리펩티드를 생성하기 위해 전구체 폴리펩티드로부터 분할될 수 있다. 신호 펩티드는 분할될 수 없고, 신호 펩티드를 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 지지하는 신호 펩티드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 폴리뉴클레오타이드 서열로부터 미세조류 또는 좁개구리밥에서 발현된다. 소포체 (세포의 외부 분비를 위해) 로 단백질 전위를 표적하는 식물 또는 조류 신호 펩티드가 당업계에서 알려져 있다. 예를 들어, U.S. Patent No. 6,020,169 를 참조한다. 본 발명에서, 임의의 식물 또는 조류 신호 펩티드는 발현된 폴리펩티드를 ER 로 표적하는데 사용될 수 있다.

[0114] 일부 구현예에서, 신호 펩티드는 아라비도시스 탈리아나 (*Arabidopsis thaliana*) 염기성 엔도키티나아제 신호 펩티드 (NCBI 단백질 접근 번호 BAA82823 의 아미노산 14-34), 엑스텐신 신호 펩티드 (Stiefel et al. (1990) *Plant Cell* 2:785-793), 쌀 α-아밀라아제 신호 펩티드 (NCBI 단백질 접근 번호 AAA33885 의 아미노산 1-31; 또한 GenBank M24286 참조) 이다. 또다른 구현예에서, 신호 펩티드는 분비된 미세조류 단백질의 신호 펩티드에 상응한다.

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

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

[0117] 하나의 구현예에서, 신호 펩티드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 관심의 폴리뉴클레오타이드 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.

[0119] 형질전환된 미세조류 또는 좁개구리밥

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

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

[0121] 용어 "좀개구리밥" 은 램나세아에 (*Lemnaceae*) 속의 일원을 말한다. 상기 속은 현재 하기와 같이 5 개의 속 및 좀개구리밥의 38 개의 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. 폰크타타 (S. punctata)); 속 울피아 (*Wolffia*) (Wa. 안구스타 (Wa. angusta), Wa. 아리자 (Wa. arrhiza), Wa. 오우스트랄리나 (Wa. australina), Wa. 보레알리스 (Wa. borealis), Wa. 브라질리엔시스 (Wa. brasiliensis), Wa. 콜롬비아나 (Wa. columbiana), Wa. 엘롱가타 (Wa. elongata), Wa. 글로보사 (Wa. globosa), Wa. 미크로스코피카 (Wa. microscopica), Wa. 네글렉타 (Wa. neglecta)); 속 울피아 (*Wolffiella*) (Wl. 카우다타 (Wl. caudata), Wl. 덴티쿨라타 (Wl. denticulata), Wl. 글라디아타 (Wl. gladiata), Wl. 히알리나 (Wl. hyalina), Wl. 린굴라타 (Wl. lingulata), Wl. 레폰다 (Wl. repunda), Wl. 로툰다 (Wl. rotunda), 및 Wl. 네오토포피카 (Wl. neotropica)) 및 속 란돌티아 (*Landoltia*) (L. 폰타타 (L. punctata)). 램나 (*Lemna*) 종은 Landolt (1986) Biosystematic Investigation on the Family of Duckweeds: The family of Lemnaceae-A Monograph Study (Geobotanischen 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 이룰 수 있는 예를 들어, 식물 세포, 식물 원형질, 식물이 재생될 수 있는 식물 세포 조직 배양물, 조직, 식물 칼리 (calli), 배아 뿐 아니라 꽃, 배주, 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 획득될 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. 1 개 초과 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 계능 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 계능 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 게놈 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 번식된 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 핵 내로 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 (Paszowski 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 2002/0088027 에 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 핵산 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 핵산 서열 및 선별 작용제에 대한 저항성을 부여하는 유전자 모두로 미세조류 또는 식물 세포를 형질전환시킨 후, 선별 작용제를 함유하는 배지에서 형질전환된 세포를 배양함으로써 분리될 수 있다. 예를 들어, U.S. Patent No. 6,040,498 을 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 핵산의 단일 카피를 함유하고, 수송된 핵산은 내부에 눈에 띄는 재배열을 갖지 않는다. 본 발명의 형질전환된 미세조류는 저 카피 수 (즉, 형질전환된 세포 당 핵산의 12 개 이하의 카피, 8 개 이하의 카피, 5 개 이하의 카피, 대안적으로는, 3 개 이하의 카피, 추가의 대안으로서, 3 개 미만의 카피) 로 존재하는 수송된 핵산을 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 분리 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.

[0132] NDV 폴리펩티드의 제조 방법

[0133] 본원에 완전히 기재된 바와 같이, 구현예에서, 재조합 NDV HN 폴리펩티드의 제조 방법은 하기 단계를 포함한다: (a) 미세조류 또는 좁개구리밥 식물을 미세조류 또는 좁개구리밥 배양 배지 내에서 배양하는 단계, 미세조류 또는 좁개구리밥 식물은 NDV 폴리펩티드를 발현하도록 안정적으로 형질전환되고, NDV 폴리펩티드는 상기 재조합 NDV 폴리펩티드에 대한 코딩 서열 및 배양 배지 내로 NDV 폴리펩티드의 분비를 지시하는 신호 펩티드에 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 분리되는 분리된 단백질일 수 있고, 신호 펩티드를 포함할 수 있다. 상기 신호 펩티드는 분리 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 분리되거나 또는 2 개의 세포막 사이에 공간 내로 분리될 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 세포의 공간 내로 분리된 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 음이온-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, 폐쇄성 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 허용가능한 담체, 부형제, 또는 비히클을 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 후두기관지염 바이러스, 고양이 헤르페스바이러스, 후두기관지염 바이러스 (ILTV), 소 헤르페스바이러스, 돼지 헤르페스바이러스), 베쿨로바이러스, 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 또다른 양상에서, 본 발명의 NDV 항원을 포함하는 조성물을 투여한 후 NDV 항원 및/또는 변이체 또는 이의 분절을 생체 내에서 포함 및 발현하는 재조합 바이러스 벡터 또는 플라스미드 벡터를 투여한다. 마찬가지로, 프라임-부스트 프로토콜은 재조합 바이러스 벡터 또는 플라스미드 벡터의 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 벡터와 함께 임의의 순서로 투여될 수 있고 또는 대안적으로는 일차 및 이차 조성물 모두로서 단독으로 사용될 수 있다.
- [0142] 본 발명의 프라임-부스트 프로토콜의 또다른 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 벡터에 기반한 조류 (새) 조성물의 투여량 부피 (예를 들어, 비-폭스바이러스-바이러스-벡터-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 비히클, 희석제 또는 부형제에 함유된다. 본 발명의 프로토콜은 NDV 로부터 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 악성 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} EID₅₀ (부피) 일 수 있다. 예를 들어, 투여가 분무에 의한 경우, 바이러스 현탁액은 약 1 내지 100 μ m 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 폴리머라아제 연쇄 반응 (qRRT-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 경구 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 또다른 접근법은 전기천공을 사용하는 것이다 (예를 들어,

Tollefsen et al., 2002; Tollefsen et al., 2003; Babiuk et al., 2002; PCT Application No. W099/01158 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 보조역할의 새를 정기적으로 모니터링하는 것이나, 이것은 특히 큰 무리에서 보조역할의 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 면역확산법 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 면역원성검출 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.

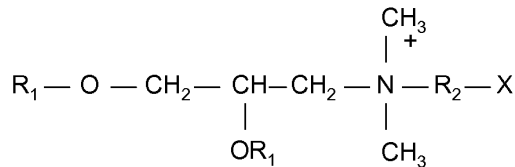
[0157] 본 발명의 또다른 양상은 상기 기재된 본 발명에 따른 프라이م-부스트 백신화에 대한 키트에 관한 것이다. 키트는 2 개 이상의 바이알을 포함할 수 있다: 본 발명에 따른 프라이م-백신화를 위한 백신 또는 조성물을 함유하는 제 1 바이알, 및 본 발명에 따른 부스트-백신화에 대한 백신 또는 조성물을 함유하는 제 2 바이알. 키트는 유리하게는 부가적인 프라이م-백신화 또는 부가적인 부스트-백신화를 위한 부가적인 제 1 또는 제 2 바이알을 함유할 수 있다.

[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 정당한 실용적 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 부위는 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]

[0162] (식 중, R1 은 탄소수 12 내지 18 의 포화 또는 불포화 직쇄 지방족 라디칼이고, R2 는 탄소수 2 또는 3 의 또 다른 지방족 라디칼이고, X 는 아민 또는 히드록실기임) 을 갖는, 예를 들어, DMRIE 인 사차 암모늄 염을 함유한다. 또다른 구현예에서, 양이온성 지질은 중성 지질, 예를 들어, DOPE 와 관련될 수 있다.

[0163] 상기 양이온성 지질 중에서, DMRIE (N-(2-히드록시에틸)-N,N-디메틸-2,3-비스(테트라테실옥시)-1-프로판 암모늄; W096/34109), 유리하게는 중성 지질과 관련된 것, 유리하게는 DOPE (디올레오일-포스파티딜-에탄올 아민; Behr, 1994), DMRIE-DOPE 을 형성하는 것이 바람직하다.

[0164] DOPE 가 존재하는 경우, DMRIE:DOPE 몰비는 유리하게는 약 95: 약 5 내지 약 5: 약 95, 더욱 유리하게는 약 1: 약 1, 예를 들어, 1:1 이다.

[0165] 또다른 구현예에서, 약학적으로 또는 수의학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 비히클, 또는 아쥘반트는 유-중-수 에멀전일 수 있다. 적합한 유-중-수 에멀전의 예에는 하기를 포함하는 4℃ 에서 유체이고 안정한 오일계 유-중-수 백신 에멀전이 포함된다: 6 내지 50 v/v % 의 항원-함유 수상, 바람직하게는 12 내지 25 v/v %, 전체 적으로 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)리시놀레에이트, 또는 폴리옥시에틸렌 리신 오일 또는 그 밖의 수소화된 폴리옥시에틸렌 리신 오일이다. 유-중-수 에멀전에 사용될 수 있는 계면활성제의 예에는 에톡실화 소르비탄 에스테르 (예를 들어, 폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노올레에이트 (TWEEN 80®) (AppliChem, Inc., Cheshire, CT 에서 이용가능) 및 소르비탄 에스테르 (예를 들어, 소르비탄 모노올레에이트 (SPAN 80®) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO 에서 이용가능) 가 포함된다. 또한, 유-중-수 에멀전과 관련해서는, 또한 US 6,919,084 를 참조한다. 유-중-수 에멀전은 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 에멀전은 수/유/수 (W/O/W) 3 중 에멀전일 수 있다 (U.S. 6,358,500). WOW 3 중 에멀전은 광유 및 6% SPAN 80® 을 함유하는 60% 유상 및 1.6% TWEEN 80® 을 함유하는 40% 수상을 포함할 수 있다. 기타 적합한 에멀전의 예는 U.S. 7,371,395 에 기재된다.

[0166] 본 발명에 따른 면역학적 조성물 및 백신은 하나 이상의 약학적으로 또는 수의학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 비히클, 또는 아쥘반트를 포함하거나 이것으로 본질적으로 이루어진다. 본 발명의 실시에서 사용하기 위한 적합한 담체 또는 아쥘반트는 (1) 아크릴산 또는 메타크릴산의 중합체, 말레 무수물 및 알케닐 유도체 중합체, (2) 면역자극 서열 (ISS), 예컨대 하나 이상의 비-메틸화 CpG 단위를 갖는 올리고데옥시리보뉴클레오타이드 서열 (Klinman et al., 1996; W098/16247), (3) 수중유 에멀전, 예컨대 M. Powell, M. Newman, Plenum Press 1995 에 공개된 "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach" 의 페이지 147 에 기재된 SPT 에멀전,

및 동일 논문의 페이지 183 에 기재된 에멀전 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 아조반트, 또는 (9) 이의 임의의 조합 또는 혼합물이다.

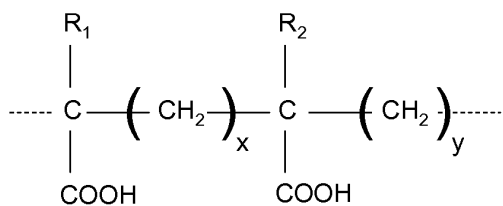
[0167] 바이러스 벡터에 특히 적합한 수용성 에멀전 (3) 은: 경질 액체 파라핀 오일 (유류 약전 유형), 이소프레노이드 오일, 예컨대 스쿠알렌, 스쿠알렌, 알켄, 예를 들어, 이소부텐 또는 데센의 올리고머화로부터 수득되는 오일, 직쇄 알킬기를 갖는 산 또는 알코올의 에스테르, 예컨대 식물성 오일, 에틸 올레에이트, 프로필렌 글리콜, 디 (카프릴레이트/카프레이트), 글리세롤 트리 (카프릴레이트/카프레이트) 및 프로필렌 글리콜 디올레에이트, 또는 분지형, 지방 알코올 또는 산의 에스테르, 특히 이소스테아르산 에스테르-계일 수 있다.

[0168] 오일은 유화제와 조합되어 사용되어 에멀전을 형성한다. 유화제는 비이온성 계면활성제, 예컨대: 한편으로는 소르비탄, 만나이드 (예를 들어, 무수만니톨 올레에이트), 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, L121 이다.

[0169] 유형 (1) 아조반트 중합체 중에서, 가교된 아크릴산 또는 메타크릴산의 중합체 (특히 당 또는 폴리알코올의 폴리알케닐 에테르에 의해 가교된) 가 바람직하다. 상기 화합물은 카르보머라는 명칭으로 알려져 있다 (Pharmeuropa, vol. 8, no. 2, June 1996). 당업자는 또한 3 개 이상의 히드록실기, 바람직하게는 8 개 이하의 상기 기를 갖는 폴리히드록실 화합물에 의해 가교결합된 아크릴 중합체를 제공하는 U.S. 2,909,462 를 언급하고, 3 개 이상의 히드록실기의 수소 원자는 2 개 이상의 탄소 원자를 갖는 불포화된, 지방족 라디칼로 대체된다. 바람직한 라디칼은 탄소수 2 내지 4 의 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. 이 중에서, 카르보폴 (Carbopol) 974P, 934P 및 971P 가 바람직하다.

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

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



[0172]

(식 중:

[0173]

- R1 및 R2 는 동일 또는 상이할 수 있고, H 또는 CH3 을 나타내고,

[0174]

- x = 0 또는 1, 바람직하게는 x = 1 이고,

[0175]

- y = 1 또는 2 이며, x + y = 2 임).

[0176]

EMA 의 경우, x = 0 및 y = 2 이고, 카르보머의 경우 x = y = 1 이다.

[0177]

[0178] 상기 중합체는 물 및 식염수 (20 g/l NaCl) 에 가용성이고, pH 는 예를 들어, 소다 (NaOH) 에 의해 7.3 내지 7.4 로 조정되어, 발현 벡터(들) 가 도입될 수 있는 아조반트 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 숙주에서 동시발현될 수 있다. 이의 면역원(들) 또는 에피토프(들) 발현하는 동일한

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

[0180] 본 발명은 예를 들어, 활성 성분을, 유리하게는 아유반트, 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 α (IFN- α), 인터페론 β (IFN- β), 인터페론 γ (IFN- γ), 인터류킨-1 α -(IL-1- α), 인터류킨-1 β (IL-1- β), 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 α (TNF α), 종양 괴사 인자 β (TNF- β), 및 형질전환 성장 인자 β (TGF- β)가 포함되나 이에 제한되지 않는다. 사이토카인이 본 발명의 면역학적 또는 백신과 동시 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.

[0183] 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 방식으로든 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 백터의 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 백터의 구축 및 형질전환

[0187] 백터 pAB0018 (ATCC 수탁 번호 PTA9616)을 BamHI 및 NdeI로 소화시켜, 838 bp 및 9879 bp의 2개의 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- α 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 백터가 Sanger 서열분석에 의해 입증되었고 pCL0081로 지정되었다. NDV HN 유전자의 구체적인 핵산 서열은 스킨조카이트리움 종 (*Schizochytrium* sp.)에서의 발현에 대해 최적화되었다. 부가적으로는, 백터 pCL0081에는 술포메투론 메틸의 존재 하에서 성장한 스킨조카이트리움 형질전환체에 대해 저항성을 부여하는 선별 마커 카세트, HN 이식유전자의 발현을 지시하는 스킨조카이트리움 신장 인자-1 유전자 (EF1)로부터의 프로모터, 및 HN 이식유전자 다음, 및 OrfC 터미네이터 (또한 PFA3 터미네이터로서 공지됨)가 포함된다.

[0188] 스킨조카이트리움 종 (*Schizochytrium* sp.) (ATCC 20888)을 전기천공 방법을 사용하여 백터 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 CaCl₂ (pH 5.5)에 최종 농도 2 OD₆₀₀ 유닛으로 재현탁하였다. 5 mL의 세포를 0.25 mg/mL Protease XIV (Sigma Chemical)와 혼합하고, 4 시간 동안 진탕기에서 인큐베이션하였다. 세포를 10% 빙냉 글리세롤로 2회 세정하고, 500 μ L의 냉각 10% 글리세롤에 재현탁하였다. 90 μ L을 미리냉동된 0.2 cm 겹전기-큐벳 (Biorad 165-2086) 내로 분취하였다. 10 μ L의 DNA (1-5 μ g)를 큐벳에 첨가하고, 부드럽게 혼합하고 빙상에 유지하였다. 세포를 200 ohms (저항), 25 μ F, 250V (0.1 cm 겹) 500V (0.2 cm 겹)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 플레이트팅하고, 29°C에서 인큐베이션하였다.

[0189] 실시예 2 조류형질전환체의 HA 분석

[0190] 스킨조카이트리움 (*Schizochytrium*) (pCL0081 로 형질전환됨) 유전자도입 균주의 동결스탁을 M50-20 (US 2008/0022422 에 기재됨) 에서 컨플루언시하게 성장시킨 다음, 50 mL 배플 진탕 플라스크에 (리터 당) 13.62 g Na₂SO₄, 0.72 g K₂SO₄, 0.56 g KCl, 2.27 g MgSO₄ · 7H₂O, 3 g (NH₄)₂SO₄, 0.19 g CaCl₂ · 2H₂O, 3 g MSG 일수화물, 21.4 g MES, 및 0.4 g KH₂PO₄ 를 함유하는 배지에서 48 시간 동안 27°C, 200 rpm 에서 증식시켰다. 부피를 탈이온화 H₂O 로 900 mL 로 맞추고, pH 를 35 분 동안 오토클레이브 전 6 으로 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 FeSO₄ · 7H₂O, 1.55 g/L MnCl₂ · 4H₂O, 1.55 g/L ZnSO₄ · 7H₂O, 0.02 g/L CoCl₂ · 6H₂O, 0.02 g/L Na₂MoO₄ · 2H₂O, 1.035 g/L CuS₄ · 5H₂O, 1.035 g/L NiS₄ · 6H₂O 를 함유하였다. 모든 시약은 시판된다.

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

[0192] 스킨조카이트리움에 의한 HN 단백질의 발현은 먼저 활성 어세이에 의해 평가하였다. 기능적 HN 단백질은 표준 헤마글루티닌 활성 어세이에 의해 쉽게 침출되었던 헤마글루티닌 활성을 나타낸다. 간략하게는, PBS 중의 저속 상청액의 50 uL 의 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 30 분 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 HAU 의 크기인 것으로 밝혀졌다 (도 3B). PBS 또는 유전자도입 균주와 동일한 방식으로 성장 및 제조된 스킨조카이트리움 종 (*Schizochytrium* sp.) 의 야생형 균주 ATCC 20888 이 음성 대조군으로서 사용되었고, 임의의 헤마글루티닌 활성을 나타내지 않았다. NDV 헤마글루티닌 (HA) 재조합 단백질이 양성 대조군으로서 사용되었다. 샘플 적정농도를 정의된 버튼이 관찰되기 전에 최고 희석물에서 점수매겼다. HA 활성은 미정제 상청액에서 관찰되었다 (도 3A). 농축된 상청액 샘플 중의 HAU 는 3200 HAU/50uL 이다. 헤마글루티닌 활성은 동결/해동의 수 회 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 닭으로부터의 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 4 에 제시된다. 코마시 블루-염색 젤 및 상응하는 항-NDV 면역블롯을 패널 B 및 C 에 제시한다. 재조합 HN 단백질은 저속 상청액 (패널 B) 그리고 불용성 분획 (패널 C) 에서 검출되었다. 음성 대조군 (-Ctrl) 은 스킨조카이트리움 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 PBS 에 재현탁하고, 제조자의 지침에 따라 EndoH 또는 PNGase F 로 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, 스퀴조카 이트리움 (*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 mm³) 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℃ 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 트리핀 용액 (40 mM Ambic 중의 트리핀) 으로 재팽창시키고, 단백질 소화를 37℃ 에서 밤새 실행하였다. 상청액을 또다른 튜브로 옮겼다. 펩티드 및 글리코펩티드를 5% 포름산 중의 20% 아세토니트릴, 5% 포름산 중의 50% 아세토니트릴 이후 5% 포름산 중의 80% 아세토니트릴을 연속으로 겔로부터 추출하였다. 샘플 용액을 건조시키고 하나의 튜브에 수합하였다. 추출된 트리핀 소화액을 C18 sep-pak 카트리지를 통과시키고, 오염물 (염, SDS 등) 을 제거하기 위해 5% 아세트산으로 세정하였다. 펩티드 및 글리코펩티드를 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℃ 에서 5 분 동안 가열하여 트리핀을 불활성화시켰다. 트리핀 소화액을 PNGase F 과 함께 37℃ 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 올리고당을 Anumula and Taylor (Anumula and Taylor, 1992) 의 방법에 근거해 페메틸화시키고 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_n 을 사용하여 측정하였다. 간략하게는, 페메틸화된 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 윈도우와 중복되는 연속 2.8 질량 유닛 윈도우에서 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 펩티드 분석

[0198] 불용성 분획을 SDS-PAGE 에 의해 분리하여 코마시 블루로 염색하거나, PVDF 로 이동시키고 상기 기재된 바와 같이 담으로부터 항-NDV 항혈청으로 면역블롯하였다. 면역블롯 중의 교차-반응에 상응하는 밴드를 코마시 염색된 젤로부터 절단하여 펩티드 서열 분석을 위해 제출하였다. 절차는 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 트리핀을 첨가하여 트리핀으로 소화시키고 실온에서 밤새 소화 인큐베이션시켰다. 형성되었던 펩티드를 폴리악릴아미드를 5% 포름산이 있는 30 μl 50% 아세토니트릴의 2 개 분취액 내로 추출하였다. 상기 추출물을 조합하고, Speed-vac 에서 <10μl 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 75μm 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 펩티드를 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 펩티드의 분절화 패턴을 크로마토그램을 생성하는데 사용한다. 각각의 펩티드에 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 피크 비를 비교함으로써 결정된다. 이후 증돌 유도 해리 스펙트럼을 ncbi 데이터베이스에 대해 조사하였다. HN 단백질은단백질 서열의 68%에 달하는 총 32개의 펩티드에 의해 확인되었다. 서열분석된 특정 펩티드로의 결과를 도 11에 제시한다.

[0199] 실시예 6 닭의 백신화

[0200] 아주반트 중에서 NDV HN 단백질을 발현하는 스킨조카이트리움 (*Schizochytrium*)으로 3 내지 4 주령에 접종된 특정 병원체가 없는 (SPF) 닭으로 접종 연구를 수행하였다. 12 마리의 닭을 각각의 백신 그룹에 지정하였다. 동일한 아주반트 중의 스킨조카이트리움 야생형 물질로 백신화된 A 그룹을 음성 대조군 그룹으로서 포함하였다. 상기 그룹의 닭은 3 가지 투여량 수준 (100 HAU, 1000 HAU, 및 10000 HAU)에서 1 샷 계획으로 시험하였다. 스킨조카이트리움 배양 배지의 유-중-수 에멀전은 다리 중 근육내 투여 (부위 당 0.5 ml x 2)에 의해 제공되었다. 제 27 일에, 헤마글루티닌 억제 시험을 위해 혈액 샘플을 수집하고, 이후 닭을 뉴캐슬 질환 바이러스 (Newcastle Disease Virus) GB Texas 균주를 닭 당 $10^{4.0}$ EID₅₀으로 근육내 접종하였다 (도 12). 접종받은 닭의 건강 상태를 확실히 하기 위해 닭을 매일 관찰하였다. 접종 후, 닭을, 극도의 신경과민, 호흡 곤란, 신경적 징후 또는 치사를 포함하나 이에 제한되지 않는 NDV의 중증 임상적 징후에 대해 14 일 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 좁개구리밥에서 생성되는 NDV HN 단백질의 발현, 특징분석, 면역원성 및 효율

[0202] NDV HN 폴리펩티드 (SEQ ID NO:17, NDV 균주 YZCQ/Liaoning/08)를 발현하기 위해 램나 마이너 (*Lemna minor*) 단백질 발현 시스템을 사용하였다. L. 마이너 최적화된 HN 유전자 (SEQ ID NO:22 및 23)를 개질된 A. 투메파시엔스 이원 벡터 내로 클로닝하였다 (Gaskask, J., et al., Bioprocessing J. 3, 50-56, 2003). 여러 개의 벡터 구축물이 제조되었다. 벡터는 Super 프로모터, 램나 지바 (*Lemna gibba*) RBCS SSU1 로부터의 5' 리더, 및 노팔린 (Nopaline) 합성효소 (Nos) 터미네이터를 함유한다. 구축물 MerH01은 고유의 신호 서열 (플라스미드 맵에서 제시되는 바와 같은 신호 양커)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 식물들 [Yamamoto, Y. et al., In Vitro Cell. Dev. Biol. 37, 349-353 (2001)]에 기재된 빠르게 성장하는 L. 마이너 홀로부터 발생시켰다.

[0203] 유전자도입 라인을 발생시킨 후, 이들을 배지 및 조직 내의 NDV HN의 발현에 대해 스크리닝하였다. 식물들을 작은 연구 용기에서 2 주 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 블롯, 및 면역국부화와 같은 추가의 특징분석을 위해 대략 1 kg의 바이오매스를 제공하기 위해 규모를 키웠다.

[0204] 미정제 식물 추출물을 3-4 주령의 특정 병원체가 없는 (SPF) 닭에서 면역원성 및 효율의 평가를 위해 유전자도입 램나 (*Lemna*) 라인으로부터 조제하였다. 12 마리의 닭을 재조합 NDV HN 폴리펩티드 및 아주반트를 포함하는 조성물로 백신화된 각각의 백신 그룹으로 할당한다. 동일한 아주반트 중의 램나 (*Lemna*) 야생형 물질로 백신화된 그룹을 음성 대조군으로서 포함시켰다. 다른 그룹의 닭을 상이한 투여량 수준의 1 샷 계획으로 시험하였다. 제 21 일에, 헤마글루티닌 억제 시험을 위해 혈액 샘플을 수집하고, 이후 닭을 상이한 뉴캐슬 질환 바이러스 균주로 접종하였다. 접종 후, 닭을, 극도의 신경과민, 호흡 곤란, 신경적 징후 또는 치사를 포함하나 이에 제한되지 않는 NDV의 중증 임상적 징후에 대해 14 일 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) (투게 /US(CA)/212676/2002 균주)
3	단백질	NDV HN 단백질 (ABS84265) (투게 /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 에피토프 영역 1
11	단백질	NDV HN 선형 에피토프 영역 2
12	DNA	NDV HN 신호 서열
13	단백질	NDV HN 신호 펩티드 (SEQ ID NO:3 유래, 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:3의 27aa-571aa) (EF520717) (투게 /US(CA)/212676/2002 균주)
16	DNA	NDV HN DNA (FJ608369) (NDV 균주 닭 YZCQ/Liaoning/08)
17	단백질	NDV HN 단백질 (ACM67348) (NDV 균주 닭 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:17의 47aa-571aa, ACM67348)
21	단백질	NDV HN 신호 펩티드 (SEQ ID NO:17 유래, 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:22의 139bp-1713bp, NDV 균주 닭 YZCQ/Liaoning/08)
24	단백질	ER 보유 서열 (KDEL)
25	DNA	알파 아밀라아제 신호 서열
26	단백질	알파 아밀라아제 신호 펩티드
27	DNA	NDV HN 신호 서열, 코돈-최적화된 (종개구리밥-바람직한 코돈-최적화) (SEQ ID NO:22의 1-138bp)
28	단백질	NDV HN 선형 에피토프 영역 3

도면2

NDV의 LaSota, CA/02 및 TX/GB 균주의 HN 서열
글리코실화 부위는 밑줄져 있다.

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

```

1 MDRVVSRRVL ENEEREAKNT WRLVFRVAVL SLIVMTLAIS VAALVYSMEA STPNDLAIGS
61 TVISRAREDV TSLLSNQDV VDRVYKQVAL ESPLALLNTE SIIMNAITSL SYQINGAANS
121 SGGGAPVHDP DYIGGVGKEL IVDDTSDATS FYPSAYQEHL NFIPAPTTGS GCTRIPSFDM
181 SATHYCYTHN VILSGCRDHS HSHQYLALGV LRSTATGRVF FSTLRSINLD DTQNRKSCSV
241 SATPLGCDML CSKVTETEEE DYKSVTPPTSM VHGRLGFDGQ YHEKDLDVTV LFEDWVANYP
301 GVGGGSLIDD RVWFPVYGG LKPNSPSDTAQ EGKYVIYKRY NDTCPDEQDY QVRMAKSSYK
361 PGRFGGKRVQ QAILSIKYST SLGEDPVLTV PPNTVTLMGA EGRILTVGTS HFLYQRGSSY
421 FSPALLYPMT VSNKTTATLHS PYTFNAFTRP GSVPCQASAR CPNSCITGVY TDPYPVVFHR
481 NHTLRGVFGT MLDNEQARLN PVSAIFDYTS RSRITRVSS STKAAATTST CFKVVKTNKV
541 YCLSLAEISN TLFGEFRIVP LLVEILKDDR V

```

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

```

1 MDRVVSQVAL ENDEREAKNT WRLIFRIAIL LLTVVTLATS VASLVYSMGA STPSDLVGIP
61 TRISRAEKI TSALGSNDV VDRIYKQVAL ESPLALLNTE TTIMNAITSL SYQINGAANN
121 SGWGAPIHDP DFIGGIGKEL IVDDASDVTS FYPSAFQEH NFIPAPTTGS GCIRIPSFDM
181 SATHYCYTHN IISGCRDHS HSYQYLALGV LRSTATGRIF FSTLRSINLD DTQNRKSCSV
241 SATPLGCDML CSKVTETEEE DYNSAVPTLM VHGRLGFDGQ YHEKDLDVTT LFEDWVANYP
301 GVGGGSFIDS RVWFSVYGG LKPNSPSDTVQ EEKYVIYKRY NDTCPDEQDY QIRMAKSSYK
361 PGRFGGKRIQ QAILSIKYST SLGEDPVLTV PPNTVTLMGA EGRILTVGTS HFLYQRGSSY
421 FSPALLYPMT VSNKTTATLHS PYTFNAFTRP GSIPQASAR CPNSCVTGVY TDPYPLIFYR
481 NHTLRGVFGT MLDGEQARLN PASAVFDSTS RSRITRVSS STKAAATTST CFKVVKTNKT
541 YCLSLAEISN TLFGEFRIVP LLVEILKNDG VREARSG

```

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

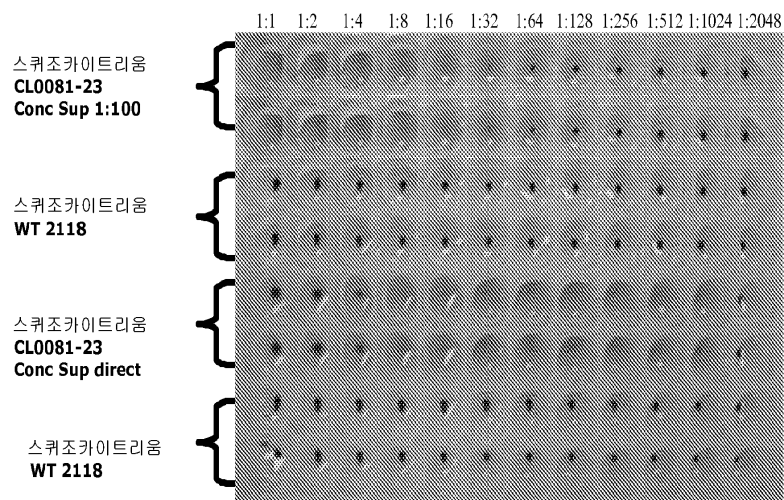
```

MDRAVSQVAL ENDEREAKNT WRLIFRIAIL FLTVVTLAIS VASLLYSMGA STPSDLVGIP 60
TRISRAEKI TSTLGSNDV VDRIYKQVAL ESPLALLKTE TTIMNAITSL SYQINGAANN 120
SGWGAPIHDP DYIGGIGKEL IVDDASDVTS FYPSAFQEH NFIPAPTTGS GCTRIPSFDM 180
SATHYCYTHN VILSGCRDHS HSYQYLALGV LRSTATGRVF FSTLRSINLD DTQNRKSCSV 240
SATPLGCDML CSKVTETEEE DYNSAVPTRM AHGRLGFDGQ YHEKDLDVTT LFEDWVANYP 300
GVGGGSFIDG RVWFSVYGG LKPNSPSDTVQ EGKYVIYKRY NDTCPDEQDY QIRMAKSSYK 360
PGRFGGKRIQ QAILSIKYST SLGEDPVLTV PPNTVTLMGA EGRILTVGTS HFLYQRGSSY 420
FSPALLYPMT VSNKTTATLHS PYTFNAFTRP GSIPQASAR CPNPCVTGVY TDPYPLIFYR 480
NHTLRGVFGT MLDGVQARLN PTAFAVDSTS RSRITRVSS STKAAATTST CFKVVKTNKT 540
YCLSLAEISN TLFGEFRIVP LLVEILKDDG VREARSG 577

```

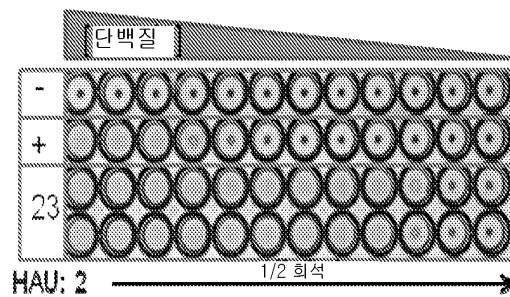
도면3

3A



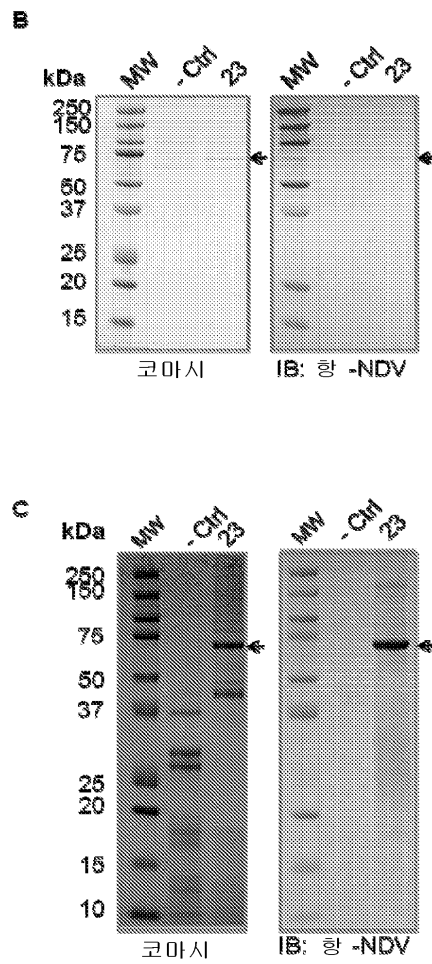
3B

헤마글루티닌 활성:

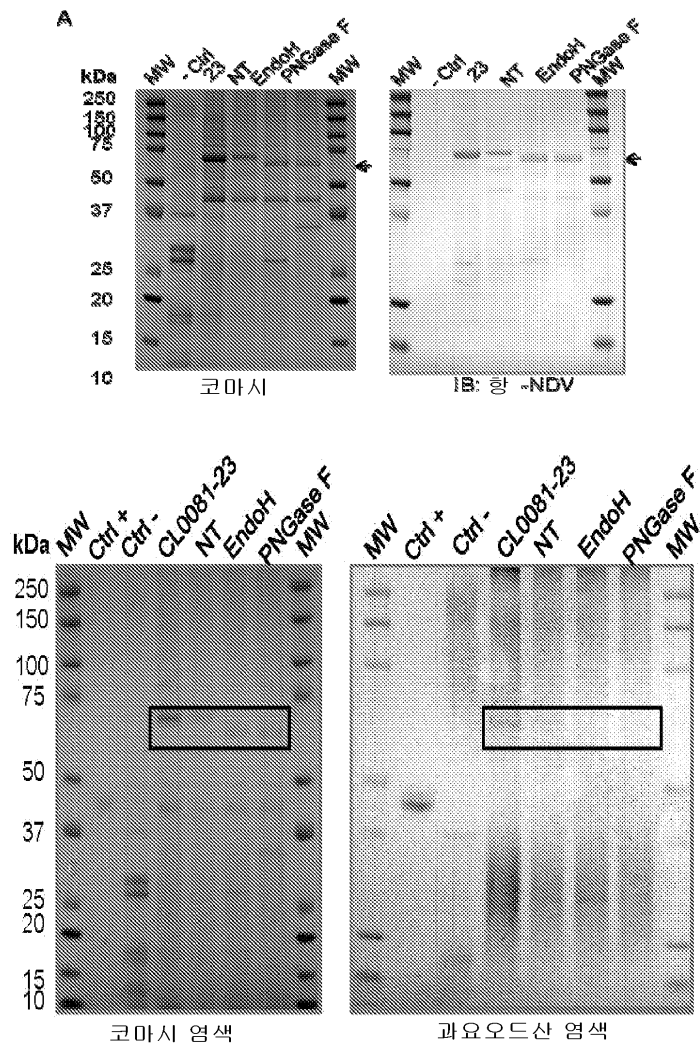


도면4

유전자도입 스퀴조카이트리움에 의한 HN 단백질의 분비
- 면역블롯 분석



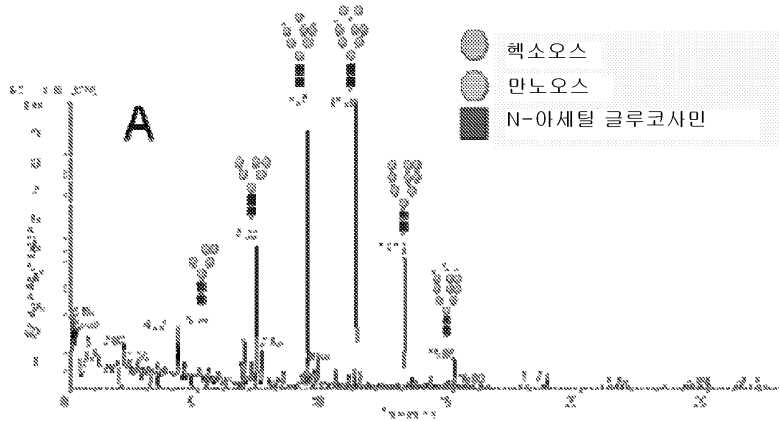
도면5a



도면5b



퍼메틸화된 N-글루칸의 NSI-종 이온 맵핑



C

제안된 구조	질량 [M+Na]	전하 상태 [Z]	23
Hex ₅ HexNAc ₂	1579 802	1 2	4
Hex ₅ HexNAc ₂	1783 903	1 2	4
Hex ₇ HexNAc ₂	1987 1005	1 2	4
Hex ₃ HexNAc ₂	1106	2	4
Hex ₅ HexNAc ₂	1210	2	4
Hex ₁₀ HexNAc ₂	1312	2	4

도면6aa

		1	50
NDV HN ABS84265 (CA2002)	(1)	MGRVVERVLENEEREAKNTWRLVFTVAVLSIVMTLAIQVAALVYSMEA	
NDV HN MEX96 (AAQ54638)	(1)	MGRVVERVLENEEREAKNTWRLVFTVAVLSIVMTLAIQVAALVYSMEA	
NDV HN LaSota (AAA46659)	(1)	MGRVVERVLENEEREAKNTWRLVFTVAVLSIVMTLAIQVAALVYSMEA	
NDV HN Texas (P12553)	(1)	MGRVVERVLENEEREAKNTWRLVFTVAVLSIVMTLAIQVAALVYSMEA	
NDV HN Liaoning (ACM67348)	(1)	MGRVVERVLENEEREAKNTWRLVFTVAVLSIVMTLAIQVAALVYSMEA	
NDV HN ZJ1 (AAL18936)	(1)	MGRVVERVLENEEREAKNTWRLVFTVAVLSIVMTLAIQVAALVYSMEA	
		51	100
NDV HN ABS84265 (CA2002)	(51)	STPNMLAGISTVISRAEDRVTSLSLNSQDVVDREYKQVALESPLALLNTE	
NDV HN MEX96 (AAQ54638)	(51)	STPNMLAGISTVISRAEDRVTSLSLNSQDVVDREYKQVALESPLALLNTE	
NDV HN LaSota (AAA46659)	(51)	STPNMLAGISTVISRAEDRVTSLSLNSQDVVDREYKQVALESPLALLNTE	
NDV HN Texas (P12553)	(51)	STPNMLAGISTVISRAEDRVTSLSLNSQDVVDREYKQVALESPLALLNTE	
NDV HN Liaoning (ACM67348)	(51)	STPNMLAGISTVISRAEDRVTSLSLNSQDVVDREYKQVALESPLALLNTE	
NDV HN ZJ1 (AAL18936)	(51)	STPNMLAGISTVISRAEDRVTSLSLNSQDVVDREYKQVALESPLALLNTE	
		101	150
NDV HN ABS84265 (CA2002)	(101)	STIMNATLSYQINGAANSQCCAPVHDPPYIGGCKELIVDTSDATS	
NDV HN MEX96 (AAQ54638)	(101)	STIMNATLSYQINGAANSQCCAPVHDPPYIGGCKELIVDTSDATS	
NDV HN LaSota (AAA46659)	(101)	STIMNATLSYQINGAANSQCCAPVHDPPYIGGCKELIVDTSDATS	
NDV HN Texas (P12553)	(101)	STIMNATLSYQINGAANSQCCAPVHDPPYIGGCKELIVDTSDATS	
NDV HN Liaoning (ACM67348)	(101)	STIMNATLSYQINGAANSQCCAPVHDPPYIGGCKELIVDTSDATS	
NDV HN ZJ1 (AAL18936)	(101)	STIMNATLSYQINGAANSQCCAPVHDPPYIGGCKELIVDTSDATS	
		151	200
NDV HN ABS84265 (CA2002)	(151)	FYPSAQEHLNFIAPPTTSGGCTRIPIFSDMSATHYCYTHNVLGGCRDHS	
NDV HN MEX96 (AAQ54638)	(151)	FYPSAQEHLNFIAPPTTSGGCTRIPIFSDMSATHYCYTHNVLGGCRDHS	
NDV HN LaSota (AAA46659)	(151)	FYPSAQEHLNFIAPPTTSGGCTRIPIFSDMSATHYCYTHNVLGGCRDHS	
NDV HN Texas (P12553)	(151)	FYPSAQEHLNFIAPPTTSGGCTRIPIFSDMSATHYCYTHNVLGGCRDHS	
NDV HN Liaoning (ACM67348)	(151)	FYPSAQEHLNFIAPPTTSGGCTRIPIFSDMSATHYCYTHNVLGGCRDHS	
NDV HN ZJ1 (AAL18936)	(151)	FYPSAQEHLNFIAPPTTSGGCTRIPIFSDMSATHYCYTHNVLGGCRDHS	
		201	250
NDV HN ABS84265 (CA2002)	(201)	RSRQYLALGVLRTSATGRVFFSTLRSINLDDPTQNRKSCSVSATPLGCDML	
NDV HN MEX96 (AAQ54638)	(201)	RSRQYLALGVLRTSATGRVFFSTLRSINLDDPTQNRKSCSVSATPLGCDML	
NDV HN LaSota (AAA46659)	(201)	RSRQYLALGVLRTSATGRVFFSTLRSINLDDPTQNRKSCSVSATPLGCDML	
NDV HN Texas (P12553)	(201)	RSRQYLALGVLRTSATGRVFFSTLRSINLDDPTQNRKSCSVSATPLGCDML	
NDV HN Liaoning (ACM67348)	(201)	RSRQYLALGVLRTSATGRVFFSTLRSINLDDPTQNRKSCSVSATPLGCDML	
NDV HN ZJ1 (AAL18936)	(201)	RSRQYLALGVLRTSATGRVFFSTLRSINLDDPTQNRKSCSVSATPLGCDML	
		251	300
NDV HN ABS84265 (CA2002)	(251)	CSKVTEEREEDYKSVTPTEWAGRLCPDQGYHEKDLDTTLKQWVANYF	
NDV HN MEX96 (AAQ54638)	(251)	CSKVTEEREEDYKSVTPTEWAGRLCPDQGYHEKDLDTTLKQWVANYF	
NDV HN LaSota (AAA46659)	(251)	CSKVTEEREEDYKSVTPTEWAGRLCPDQGYHEKDLDTTLKQWVANYF	
NDV HN Texas (P12553)	(251)	CSKVTEEREEDYKSVTPTEWAGRLCPDQGYHEKDLDTTLKQWVANYF	
NDV HN Liaoning (ACM67348)	(251)	CSKVTEEREEDYKSVTPTEWAGRLCPDQGYHEKDLDTTLKQWVANYF	
NDV HN ZJ1 (AAL18936)	(251)	CSKVTEEREEDYKSVTPTEWAGRLCPDQGYHEKDLDTTLKQWVANYF	
		301	350
NDV HN ABS84265 (CA2002)	(301)	GVGGGSLIDRVVWFVYVYGLKFNPSFSDTAQESKYVIYKRNNTCPDEQDY	
NDV HN MEX96 (AAQ54638)	(301)	GVGGGSLIDRVVWFVYVYGLKFNPSFSDTAQESKYVIYKRNNTCPDEQDY	
NDV HN LaSota (AAA46659)	(301)	GVGGGSLIDRVVWFVYVYGLKFNPSFSDTAQESKYVIYKRNNTCPDEQDY	
NDV HN Texas (P12553)	(301)	GVGGGSLIDRVVWFVYVYGLKFNPSFSDTAQESKYVIYKRNNTCPDEQDY	
NDV HN Liaoning (ACM67348)	(301)	GVGGGSLIDRVVWFVYVYGLKFNPSFSDTAQESKYVIYKRNNTCPDEQDY	
NDV HN ZJ1 (AAL18936)	(301)	GVGGGSLIDRVVWFVYVYGLKFNPSFSDTAQESKYVIYKRNNTCPDEQDY	
		351	400
NDV HN ABS84265 (CA2002)	(351)	QIRMAKSSYKPGRFGGKRVQAILSIKVSTSLGDPVLITPENTVTLMSA	
NDV HN MEX96 (AAQ54638)	(351)	QIRMAKSSYKPGRFGGKRVQAILSIKVSTSLGDPVLITPENTVTLMSA	
NDV HN LaSota (AAA46659)	(351)	QIRMAKSSYKPGRFGGKRVQAILSIKVSTSLGDPVLITPENTVTLMSA	
NDV HN Texas (P12553)	(351)	QIRMAKSSYKPGRFGGKRVQAILSIKVSTSLGDPVLITPENTVTLMSA	
NDV HN Liaoning (ACM67348)	(351)	QIRMAKSSYKPGRFGGKRVQAILSIKVSTSLGDPVLITPENTVTLMSA	
NDV HN ZJ1 (AAL18936)	(351)	QIRMAKSSYKPGRFGGKRVQAILSIKVSTSLGDPVLITPENTVTLMSA	

도면6ab

```

                                401                                450
NDV HN ABS84265 (CA2002) (401) EGRILTVGTSHFPLYQRGSSYFSPALLYPMTVNRKKTATLHSPYTFNAPTRP
NDV HN MEX96 (AAQ54638) (401) EGRILTVGTSHFPLYQRGSSYFSPALLYPMTVNRKKTATLHSPYTFNAPTRP
NDV HN LaSota (AAA46659) (401) EGRILTVGTSHFPLYQRGSSYFSPALLYPMTVNRKKTATLHSPYTFNAPTRP
NDV HN Texas (P12553) (401) EGRILTVGTSHFPLYQRGSSYFSPALLYPMTVNRKKTATLHSPYTFNAPTRP
NDV HN Liaoning (ACM67348) (401) EGRILTVGTSHFPLYQRGSSYFSPALLYPMTVNRKKTATLHSPYTFNAPTRP
NDV HN ZJ1 (AAL18936) (401) EGRILTVGTSHFPLYQRGSSYFSPALLYPMTVNRKKTATLHSPYTFNAPTRP

                                451                                500
NDV HN ABS84265 (CA2002) (451) GGVPCQASARCPNSCTGVYTDPEYFVFRNHTLAGVFOTMLDNGQARLN
NDV HN MEX96 (AAQ54638) (451) GGVPCQASARCPNSCTGVYTDPEYFVFRNHTLAGVFOTMLDNGQARLN
NDV HN LaSota (AAA46659) (451) GGVPCQASARCPNSCTGVYTDPEYFVFRNHTLAGVFOTMLDNGQARLN
NDV HN Texas (P12553) (451) GGVPCQASARCPNSCTGVYTDPEYFVFRNHTLAGVFOTMLDNGQARLN
NDV HN Liaoning (ACM67348) (451) GGVPCQASARCPNSCTGVYTDPEYFVFRNHTLAGVFOTMLDNGQARLN
NDV HN ZJ1 (AAL18936) (451) GGVPCQASARCPNSCTGVYTDPEYFVFRNHTLAGVFOTMLDNGQARLN

                                501                                550
NDV HN ABS84265 (CA2002) (501) PMSAIFDYTSRGRITRVSSSTKAAYTTSTCPKVVETNKKVYCLSIARISN
NDV HN MEX96 (AAQ54638) (501) PMSAIFDYTSRGRITRVSSSTKAAYTTSTCPKVVETNKKVYCLSIARISN
NDV HN LaSota (AAA46659) (501) PMSAIFDYTSRGRITRVSSSTKAAYTTSTCPKVVETNKKVYCLSIARISN
NDV HN Texas (P12553) (501) PMSAIFDYTSRGRITRVSSSTKAAYTTSTCPKVVETNKKVYCLSIARISN
NDV HN Liaoning (ACM67348) (501) PMSAIFDYTSRGRITRVSSSTKAAYTTSTCPKVVETNKKVYCLSIARISN
NDV HN ZJ1 (AAL18936) (501) PMSAIFDYTSRGRITRVSSSTKAAYTTSTCPKVVETNKKVYCLSIARISN

                                551                                577
NDV HN ABS84265 (CA2002) (551) TLFGEFRIVPLLVLEILKDDV-----
NDV HN MEX96 (AAQ54638) (551) TLFGEFRIVPLLVLEILKDDV-----
NDV HN LaSota (AAA46659) (551) TLFGEFRIVPLLVLEILKDDGVREARSG
NDV HN Texas (P12553) (551) TLFGEFRIVPLLVLEILKDDGVREARSG
NDV HN Liaoning (ACM67348) (551) TLFGEFRIVPLLVLEILKDDV-----
NDV HN ZJ1 (AAL18936) (551) TLFGEFRIVPLLVLEILKDDV-----

```

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)	-----SAGASTPHDLAGISTVISKTEDKVTSLSS		
SEQ ID NO:15	(1)	VAVLSLIVMTLAISVAALVYSMEASTFNDLAGISTVISRARDKVTSLNS		
		51		100
SEQ ID NO:20	(31)	SQDVLDRIYKQVALESPLALNTESIMNAITSLSYQINGAANSSGCGAP		
SEQ ID NO:15	(51)	NQDVLDRIYKQVALESPLALNTESIMNAITSLSYQINGAANSSGCGAP		
		101		150
SEQ ID NO:20	(81)	VHDPDYIGGIGKELIVDDISDVTSFYPSAYQEHNFIPAPTTGSGCTRIP		
SEQ ID NO:15	(101)	VHDPDYIGGIGKELIVDDTSDATSFYPSAYQEHNFIPAPTTGSGCTRIP		
		151		200
SEQ ID NO:20	(131)	SFDMSATHRYCYTHNVILSGCRDHSQYLAIGVLRISATGRVFFSTLRS		
SEQ ID NO:15	(151)	SFDMSATHRYCYTHNVILSGCRDHSQYLAIGVLRISATGRVFFSTLRS		
		201		250
SEQ ID NO:20	(181)	INLDDTQNRKSCSVSATPLGCDMLCSKVTEEEEDYKSVAPTPMVHGRLG		
SEQ ID NO:15	(201)	INLDDTQNRKSCSVSATPLGCDMLCSKVTEEEEDYKSVTPSMVHGRLG		
		251		300
SEQ ID NO:20	(231)	FDGQYHEKDLETTVLFRDQVANYPGVGGGSFIDNRVWFVYGGGLKPNSPS		
SEQ ID NO:15	(251)	FDGQYHEKDLETTVLFRDQVANYPGVGGGSLIDRVWFVYGGGLKPNSPS		
		301		350
SEQ ID NO:20	(281)	DTAQEGKYVIYKRINNTCPDKQDYQIRMAKSSYKPRFGGKRVQQAILSI		
SEQ ID NO:15	(301)	DTAQEGKYVIYKRINNTCPDEQDYQIRMAKSSYKPRFGGKRVQQAILSI		
		351		400
SEQ ID NO:20	(331)	KVSTSLGKDPVLTIPFNTITLMGAEGRIITVGTSHFLYQBGSSYFSPALL		
SEQ ID NO:15	(351)	KVSTSLGEDPVLTIPFNTITLMGAEGRIITVGTSHFLYQBGSSYFSPALL		
		401		450
SEQ ID NO:20	(381)	YPMTVNNKTATLHSPYTFNATRPGSAPCQASARCPNSCITGVYTDPPYI		
SEQ ID NO:15	(401)	YPMTVRNKTATLHSPYTFNATRPGSVPCQASARCPNSCITGVYTDPPYV		
		451		500
SEQ ID NO:20	(431)	IFHRNHTLRGVFGTMLDDEQARLNPVSAVFDNISRSRVTRVSSSTKAAY		
SEQ ID NO:15	(451)	IFHRNHTLRGVFGTMLDNEQARLNPVSAVFDYTSRSRVTRVSSSTKAAY		
		501		546
SEQ ID NO:20	(481)	TTSTCFKVVKTNKAYCLSAEISNTLFGFEFRIVPLLVEILKDDRV-		
SEQ ID NO:15	(501)	TTSTCFKVVKTNRVYCLSAEISNTLFGFEFRIVPLLVEILKDDRV-		

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)	ACGGGTAGACGGTAAGAGAGGCCGCCCTCAATTGCGAGCCAGGCTTCA
NDV HN texas (M21409)	(1)	-----
NDV HN CA02 (EF520717)	(1)	-----
NDV HN MEX (AY288999)	(1)	-----
	51	100
NDV HN (FJ608369)	(1)	-----ATGGGAAGG
NDV HN (ZJ1 strain)	(1)	-----ATCGAGCGG
NDV HN LaSota (M24709)	(51)	CAACCTCCGTTCCTACCGCTTCACCGACAACAGTCCCTCAATCAATGAGCGG
NDV HN texas (M21409)	(1)	-----GTCTCAGTCAATGAGCGG
NDV HN CA02 (EF520717)	(1)	-----ATCGATCGT
NDV HN MEX (AY288999)	(1)	-----ATCGATCGT
	101	150
NDV HN (FJ608369)	(10)	CGCTTAACAGAGTCCGCTGGAGAAATGAGGAAGAGAGACCAAGAACAC
NDV HN (ZJ1 strain)	(10)	CGCTTAACAGAGTCCGCTGGAGAAATGAGGAAGAGAGACCAAGAACAC
NDV HN LaSota (M24709)	(101)	CGCTTAACAGAGTCCGCTGGAGAAATGAGGAAGAGAGACCAAGAACAC
NDV HN texas (M21409)	(20)	CGCTTAACAGAGTCCGCTGGAGAAATGAGGAAGAGAGACCAAGAACAC
NDV HN CA02 (EF520717)	(10)	GTAGTTAGCAGAGTCCGCTAGAGAAACGAGAAAGAGAGACCAAGAACAC
NDV HN MEX (AY288999)	(10)	GTAGTTAGCAGAGTCCGCTAGAGAAACGAGAAAGAGAGACCAAGAACAC
	151	200
NDV HN (FJ608369)	(60)	ATGGGCGCTGCTTTTCGGATCCAGTCTTACTTTAAAGGTAAATGACTC
NDV HN (ZJ1 strain)	(60)	ATGGGCGCTGCTTTTCGGATCCAGTCTTACTTTAAAGGTAAATGACTC
NDV HN LaSota (M24709)	(151)	ATGGGCGCTGCTTTTCGGATCCAGTCTTACTTTAAAGGTAAATGACTC
NDV HN texas (M21409)	(70)	ATGGGCGCTGCTTTTCGGATCCAGTCTTACTTTAAAGGTAAATGACTC
NDV HN CA02 (EF520717)	(60)	ATGGGCGCTGCTTTTCGGATCCAGTCTTACTTTAAAGGTAAATGACTC
NDV HN MEX (AY288999)	(60)	TTGGGCGCTGCTTTTCGGATCCAGTCTTACTTTAAAGGTAAATGACTC
	201	250
NDV HN (FJ608369)	(110)	TAGCTATCTCCGAGCTGCGCTGCTATGAGTGGCGGCGCCAGTAGGCGG
NDV HN (ZJ1 strain)	(110)	TAGCTATCTCCGAGCTGCGCTGCTATGAGTGGCGGCGCCAGTAGGCGG
NDV HN LaSota (M24709)	(201)	TGGCTATATCTTAGCTTCCCTTTTATATAGCATGGCGGTAGCAACCT
NDV HN texas (M21409)	(120)	TAGCTACACCTGATGCTTCCCTTATATAGCATGGCGGTAGCAACCT
NDV HN CA02 (EF520717)	(110)	TAGCTATCTCTAGCGCGCTGCTTATATAGCATGGCGGTAGCAACCT
NDV HN MEX (AY288999)	(110)	TAGCTATCTCTTAGCGCGCTGCTTATATAGCATGGCGGTAGCAACCT
	251	300
NDV HN (FJ608369)	(160)	CACGAGCTCCGACCATATCCAGCTGTGATCTCTAAGACAGAGGATAGCT
NDV HN (ZJ1 strain)	(160)	CACGAGCTCCGACCATATCCAGCTGTGATCTCTAAGACAGAGGATAGCT
NDV HN LaSota (M24709)	(251)	ACCGATCTCTAAGCATACCGAGTAGGAATTCGAGCCAGAGAGAAAGAT
NDV HN texas (M21409)	(170)	ACCGAGCTCTAAGCATACCGAGTAGGAATTCGAGCCAGAGAGAAAGAT
NDV HN CA02 (EF520717)	(160)	ACCGAGCTCTGCGGTATATCCGAGCTGTGATCTCTAAGACAGAGGATAGCT
NDV HN MEX (AY288999)	(160)	ACCGAGCTCTGCGGTATATCCGAGCTGTGATCTCTAAGACAGAGGATAGCT
	301	350
NDV HN (FJ608369)	(210)	TACGTCTTTACTCAGTTGAGTCAAGATGTGATAGATAGCATATCAAGC
NDV HN (ZJ1 strain)	(210)	TACGTCTTTACTCAGTTGAGTCAAGATGTGATAGATAGCATATCAAGC
NDV HN LaSota (M24709)	(301)	TACGTCTACACTTGCTTCCATCAAGATGTGATAGATAGCATATCAAGC
NDV HN texas (M21409)	(220)	TACGTCTGCACTTGCTTCCATCAAGATGTGATAGATAGCATATCAAGC
NDV HN CA02 (EF520717)	(210)	TACGTCTTTACTCAATTCAATCAAGATGTGATAGATAGCATATCAAGC
NDV HN MEX (AY288999)	(210)	TACGTCTTTACTCAATTCAATCAAGATGTGATAGATAGCATATCAAGC
	351	400
NDV HN (FJ608369)	(260)	AGGTGGCTCTTGAATCCCAATGGCGCTACTTAAGACTGAATTAATGATT
NDV HN (ZJ1 strain)	(260)	AGGTGGCTCTTGAATCCCGCTGGCGCTACTTAAGACTGAATTAATGATT
NDV HN LaSota (M24709)	(351)	AAATGGCGCTTGAATCTCGTTGGCAATTTTAAATCTGAACACCAATTT
NDV HN texas (M21409)	(270)	AGTGGCGCTTGAATCTCGTTGGCAATTTTAAATCTGAACACCAATTT
NDV HN CA02 (EF520717)	(260)	AGGTGGCGCTTGAATCTCGCTGGCGCTTTTGAATCTGAATTAATGATT
NDV HN MEX (AY288999)	(260)	AGGTGGCGCTTGAATCTCGCTGGCGCTTTTGAATCTGAATTAATGATT

도면7ab

		401	450
NDV HN (FJ608369)	(310)	ATGAATGCAATAAACCTCTCTTCTCTATCAATTAACGGGCTCGGCAACAA	
NDV HN (ZJ1 strain)	(310)	ATGAATGCAATAAACCTCTCTTCTCTATCAATTAACGGGCTCGGCAACAA	
NDV HN LaSota (M24709)	(401)	ATGAATGCAATAAACCTCTCTTCTCTATCAGATTAATGGAACTSCAAGAA	
NDV HN texas (M21409)	(320)	ATGAATGCAATAAACCTCTCTTCTCTATCAGATTAATGGAACTSCAAGAA	
NDV HN CA02 (EF520717)	(310)	ATGAATGCAATAAACCTCTCTTCTCTATCAATTAATGGGCTCGCAAAATG	
NDV HN MEX (AY288999)	(310)	ATGAATGCAATAAACCTCTCTTCTCTATCAATTAATGGGCTCGCAAAATG	
		451	500
NDV HN (FJ608369)	(360)	TACGGGATCTGGGGCGGCTGTTCTATGACCCGATTTATATGGGGGGTAG	
NDV HN (ZJ1 strain)	(360)	TACGGGATCTGGGGCGGCTGTTCTATGACCCGATTTATATGGGGGGTAG	
NDV HN LaSota (M24709)	(451)	CAGCGGCTGGGGGGGACCTATCCATGACCCGATTTATATAGGGGGTAG	
NDV HN texas (M21409)	(370)	CAGCGGCTGGGGGGGACCTATCCATGACCCGATTTATATAGGGGGTAG	
NDV HN CA02 (EF520717)	(360)	TACTGGCTTGGGGGACCTGTTCTATGACCCGATTTATATGGGGGGTAG	
NDV HN MEX (AY288999)	(360)	TACTGGCTTGGGGGACCTGTTCTATGACCCGATTTATATGGGGGGTAG	
		501	550
NDV HN (FJ608369)	(410)	GGAAGAACTCATATGGACGAATCACTGATCTCAATCATTTTATCC	
NDV HN (ZJ1 strain)	(410)	GGAAGAACTCATATGGACGAATCACTGATCTCAATCATTTTATCC	
NDV HN LaSota (M24709)	(501)	GGAAGAACTCATTTCTAGATGATGCTAGTGATCTCAATCATTTTATCC	
NDV HN texas (M21409)	(420)	GGAAGAACTCATTTCTAGATGATGCTAGTGATCTCAATCATTTTATCC	
NDV HN CA02 (EF520717)	(410)	GTAAGAGCTCATATCTAGATGACAGGAGTGATGCCATTCATTTATCC	
NDV HN MEX (AY288999)	(410)	GTAAGAGCTCATATCTAGATGACAGGAGTGATGCCATTCATTTATCC	
		551	600
NDV HN (FJ608369)	(460)	TCTGGCATTCAGAGAACCTTGAATTTTCATCCCGGGCCCTACACAGGATC	
NDV HN (ZJ1 strain)	(460)	TCTGGCATTCAGAGAACCTTGAATTTTCATCCCGGGCCCTACACAGGATC	
NDV HN LaSota (M24709)	(551)	TCTGGCATTCAGAGAACCTTGAATTTTCATCCCGGGCCCTACACAGGATC	
NDV HN texas (M21409)	(470)	TCTGGCATTCAGAGAACCTTGAATTTTCATCCCGGGCCCTACACAGGATC	
NDV HN CA02 (EF520717)	(460)	TCTGGCATTCAGAGAACCTTGAATTTTCATCCCGGGCCCTACACAGGATC	
NDV HN MEX (AY288999)	(460)	TCTGGCATTCAGAGAACCTTGAATTTTCATCCCGGGCCCTACACAGGATC	
		601	650
NDV HN (FJ608369)	(510)	GGCTTGCATCTCGATACCTTCATTTGACATGAGCAACCCCAATATTTCT	
NDV HN (ZJ1 strain)	(510)	GGCTTGCATCTCGATACCTTCATTTGACATGAGCAACCCCAATATTTCT	
NDV HN LaSota (M24709)	(601)	GGCTTGCATCTCGATACCTTCATTTGACATGAGCAACCCCAATACTGCC	
NDV HN texas (M21409)	(520)	GGCTTGCATCTCGATACCTTCATTTGACATGAGCAACCCCAATACTGCC	
NDV HN CA02 (EF520717)	(510)	GGCTTGCATCTCGATACCTTCATTTGACATGAGCAACCCCAATATTTCT	
NDV HN MEX (AY288999)	(510)	GGCTTGCATCTCGATACCTTCATTTGACATGAGCAACCCCAATATTTCT	
		651	700
NDV HN (FJ608369)	(560)	ATACTCAGAAATGATATCTATCCGCTTGCAGAGATCACTCAGACTCAAT	
NDV HN (ZJ1 strain)	(560)	ATACTCAGAAATGATATCTATCCGCTTGCAGAGATCACTCAGACTCAAT	
NDV HN LaSota (M24709)	(651)	ACACCCATAATGATATATGCTCGGATGCAAGAGATCACTCAGACTCAAT	
NDV HN texas (M21409)	(570)	ACACCCATAATGATATATGCTCGGATGCAAGAGATCACTCAGACTCAAT	
NDV HN CA02 (EF520717)	(560)	ATACTCAGAAATGATATCTATCCGCTTGCAGAGATCACTCAGACTCAAT	
NDV HN MEX (AY288999)	(560)	ATACTCAGAAATGATATCTATCCGCTTGCAGAGATCACTCAGACTCAAT	
		701	750
NDV HN (FJ608369)	(610)	CAATACCTTAGCACTTGGTGTGCTTGGGACATCTGCAACAGGGAGGTATT	
NDV HN (ZJ1 strain)	(610)	CAATACCTTAGCACTTGGTGTGCTTGGGACATCTGCAACAGGGAGGTATT	
NDV HN LaSota (M24709)	(701)	CAGTATTTAGCACTTGGTGTGCTCGGGACATCTGCAACAGGGAGGTATT	
NDV HN texas (M21409)	(620)	CAGTATTTAGCACTTGGTGTGCTCGGGACATCTGCAACAGGGAGGTATT	
NDV HN CA02 (EF520717)	(610)	CAGTATTTGGCACTAGGTGTGCTTGGGACATCTGCAACAGGGAGGTATT	
NDV HN MEX (AY288999)	(610)	CAGTATTTGGCACTAGGTGTGCTTGGGACATCTGCAACAGGGAGGTATT	
		751	800
NDV HN (FJ608369)	(660)	CTTTTCTACTCTGGGCTCCCATCAATTTTGAATGACACCCCAATCGGAGGT	
NDV HN (ZJ1 strain)	(660)	CTTTTCTACTCTGGGCTCCCATCAATTTTGAATGACACCCCAATCGGAGGT	
NDV HN LaSota (M24709)	(751)	CTTTTCTACTCTGGGCTCCCATCAACCTGGGACGACCCCAATCGGAGGT	
NDV HN texas (M21409)	(670)	CTTTTCTACTCTGGGCTCCCATCAACCTGGGACGACCCCAATCGGAGGT	
NDV HN CA02 (EF520717)	(660)	CTTTTCTACTCTGGGCTCCCATCAATTTTGAATGACACCCCAATCGGAGGT	
NDV HN MEX (AY288999)	(660)	CTTTTCTACTCTGGGCTCCCATCAATTTTGAATGACACCCCAATCGGAGGT	

도면7ac

NDV HN (FJ608369)	(710)	801	850
NDV HN (ZJ1 strain)	(710)	CCGCGAGTGTGAGTGCACCCCTTTTAAAGTTGTGATATGCTGTCTCTCAG	
NDV HN LaSota (M24709)	(801)	CTTTCAGTGTGAGTGCACCTTTCCTGAGTTGTGATATGCTGTCTCTCAG	
NDV HN texas (M21409)	(720)	CTTTCAGTGTGAGTGCACCTTTCCTGAGTTGTGATATGCTGTCTCTCAG	
NDV HN CA02 (EF520717)	(710)	CTTTCAGTGTGAGTGCACCTTTCCTGAGTTGTGATATGCTGTCTCTCAG	
NDV HN MEX (AY288999)	(710)	CTTTCAGTGTGAGTGCACCTTTCCTGAGTTGTGATATGCTGTCTCTCAG	
NDV HN (FJ608369)	(760)	851	900
NDV HN (ZJ1 strain)	(760)	GTCAAGGGAGCTGAAGAGGATTAACAAGTCAAGTTCGCCCCACACCAAT	
NDV HN LaSota (M24709)	(851)	GTCAAGGGAGCTGAAGAGGATTAACAAGTCAAGTTCGCCCCACACCAAT	
NDV HN texas (M21409)	(770)	GTCAAGGGAGCTGAAGAGGATTAACAAGTCAAGTTCGCCCCACACCAAT	
NDV HN CA02 (EF520717)	(760)	GTCAAGGGAGCTGAAGAGGATTAACAAGTCAAGTTCGCCCCACACCAAT	
NDV HN MEX (AY288999)	(760)	GTCAAGGGAGCTGAAGAGGATTAACAAGTCAAGTTCGCCCCACACCAAT	
NDV HN (FJ608369)	(810)	901	950
NDV HN (ZJ1 strain)	(810)	GGTGACGCGAGGCTAGGGTTTGAAGTTCACATACCATTAAGAGGACTTAG	
NDV HN LaSota (M24709)	(901)	GGTGACGCGAGGCTAGGGTTTGAAGTTCACATACCATTAAGAGGACTTAG	
NDV HN texas (M21409)	(820)	GGTGACGCGAGGCTAGGGTTTGAAGTTCACATACCATTAAGAGGACTTAG	
NDV HN CA02 (EF520717)	(810)	GGTGACGCGAGGCTAGGGTTTGAAGTTCACATACCATTAAGAGGACTTAG	
NDV HN MEX (AY288999)	(810)	GGTGACGCGAGGCTAGGGTTTGAAGTTCACATACCATTAAGAGGACTTAG	
NDV HN (FJ608369)	(860)	951	1000
NDV HN (ZJ1 strain)	(860)	ACACCAAGGCTTTATTATTAAGGATTTGGGTTCGAANTTACCCGAGAGCGGA	
NDV HN LaSota (M24709)	(951)	ATGTACACACATTTATTCGGGAGCTGGGTTCGAANTTACCCGAGAGCGGA	
NDV HN texas (M21409)	(870)	ACGTACACACATTTATTCGGGAGCTGGGTTCGAANTTACCCGAGAGCGGA	
NDV HN CA02 (EF520717)	(860)	ACGTACACACATTTATTAAGGATTTGGGTTCGAANTTACCCGAGAGCGGA	
NDV HN MEX (AY288999)	(860)	ACGTACACACATTTATTAAGGATTTGGGTTCGAANTTACCCGAGAGCGGA	
NDV HN (FJ608369)	(910)	1001	1050
NDV HN (ZJ1 strain)	(910)	GGTGGGCTCTTTATTGACACCCCTATAGGTTCCAGTTTACCGGGGGCT	
NDV HN LaSota (M24709)	(1001)	GGTGGGCTCTTTATTGACACCCCTATAGGTTCCAGTTTACCGGGGGCT	
NDV HN texas (M21409)	(920)	GGTGGGCTCTTTATTGACACCCCTATAGGTTCCAGTTTACCGGGGGCT	
NDV HN CA02 (EF520717)	(910)	GGTGGGCTCTTTATTGACACCCCTATAGGTTCCAGTTTACCGGGGGCT	
NDV HN MEX (AY288999)	(910)	GGTGGGCTCTTTATTGACACCCCTATAGGTTCCAGTTTACCGGGGGCT	
NDV HN (FJ608369)	(960)	1051	1100
NDV HN (ZJ1 strain)	(960)	CAAAAGCCATTTCACCACTGACACAGAGGGAATATATATATAT	
NDV HN LaSota (M24709)	(1051)	CAAAAGCCATTTCACCACTGACACAGAGGGAATATATATATATAT	
NDV HN texas (M21409)	(970)	CAAAAGCCATTTCACCACTGACACAGAGGGAATATATATATATAT	
NDV HN CA02 (EF520717)	(960)	CAAAAGCCATTTCACCACTGACACAGAGGGAATATATATATATAT	
NDV HN MEX (AY288999)	(960)	CAAAAGCCATTTCACCACTGACACAGAGGGAATATATATATATAT	
NDV HN (FJ608369)	(1010)	1101	1150
NDV HN (ZJ1 strain)	(1010)	ATAAGCGCCATACACACATGCCCCATATAACAGATTACCAATTCGG	
NDV HN LaSota (M24709)	(1101)	ATAAGCGCCATACACACATGCCCCATATAACAGATTACCAATTCGG	
NDV HN texas (M21409)	(1020)	ATAAGCGCCATACACACATGCCCCATATAACAGATTACCAATTCGG	
NDV HN CA02 (EF520717)	(1010)	ATAAGCGCCATACACACATGCCCCATATAACAGATTACCAATTCGG	
NDV HN MEX (AY288999)	(1010)	ATAAGCGCCATACACACATGCCCCATATAACAGATTACCAATTCGG	
NDV HN (FJ608369)	(1060)	1151	1200
NDV HN (ZJ1 strain)	(1060)	ATGGCTAAGTCTTCATATAAACCAGGCGGATTGGTGGAAAGCGGCTACA	
NDV HN LaSota (M24709)	(1151)	ATGGCTAAGTCTTCATATAAACCAGGCGGATTGGTGGAAAGCGGCTACA	
NDV HN texas (M21409)	(1070)	ATGGCTAAGTCTTCATATAAACCAGGCGGATTGGTGGAAAGCGGCTACA	
NDV HN CA02 (EF520717)	(1060)	ATGGCTAAGTCTTCATATAAACCAGGCGGATTGGTGGAAAGCGGCTACA	
NDV HN MEX (AY288999)	(1060)	ATGGCTAAGTCTTCATATAAACCAGGCGGATTGGTGGAAAGCGGCTACA	

도면7ad

		1201	1250
NDV HN (FJ608369)	(1110)	GCAGGCGATCCTATCCATCAAACTTCTCAACATCCTTGGGTANGACCCCG	
NDV HN (ZJ1 strain)	(1110)	GCAGGCGATCCTATCCATCAAACTTCTCAACATCCTTGGGTANGACCCCG	
NDV HN LaSota (M24709)	(1201)	GCAGGCGATCCTATCCTATCAAGTGTCTCAACATCCTTAGCCGACAGCCCG	
NDV HN texas (M21409)	(1120)	GCAGGCGTATCCTATCCTATCAAGTGTCTCAACATCCTTGGCGACAGCCCG	
NDV HN CA02 (EF520717)	(1110)	GCAGGCGATCCTATCCTATCAAACTATCAACATCCTTGGCGACAGCCCG	
NDV HN MEX (AY288999)	(1110)	GCAGGCGATCCTATCCTATCAAACTATCAACATCCTTGGCGACAGCCCG	
		1251	1300
NDV HN (FJ608369)	(1160)	TCTTGACTATTCCACCTTAATACAAATACACTCATGGGAGCCGAGGCGAGA	
NDV HN (ZJ1 strain)	(1160)	TCTTGACTATTCCACCTTAATACAAATACACTCATGGGAGCCGAGGCGAGA	
NDV HN LaSota (M24709)	(1251)	TACTTGACTGTACCCGCCAACACAGTGCACACTCATGGGAGCCGAGGCGAGA	
NDV HN texas (M21409)	(1170)	TACTTGACTGTACCCGCCAACACAGTGCACACTCATGGGAGCCGAGGCGAGA	
NDV HN CA02 (EF520717)	(1160)	TCTTGACTGTACCCGCCAAATACAGTTACACTCATGGGAGCCGAGGCGAGA	
NDV HN MEX (AY288999)	(1160)	TCTTGACTGTACCCGCCAAATACAGTTACACTCATGGGAGCCGAGGCGAGA	
		1301	1350
NDV HN (FJ608369)	(1210)	ATCTCTCACAGTAGGACATCTCACTCTTGTATCCACAGAGGCTCTTCATA	
NDV HN (ZJ1 strain)	(1210)	ATCTCTCACAGTAGGACATCTCACTCTTGTGTACACAGAGGCTCTTCATA	
NDV HN LaSota (M24709)	(1301)	ATCTCTCACAGTAGGACATCTCACTCTTGTGTATCCACAGAGGCTCTTCATA	
NDV HN texas (M21409)	(1220)	ATCTCTCACAGTAGGACATCTCACTCTTGTGTATCCACAGAGGCTCTTCATA	
NDV HN CA02 (EF520717)	(1210)	ATCTCTCACAGTAGGACATCTCACTCTTGTGTACACAGAGGCTCTTCATA	
NDV HN MEX (AY288999)	(1210)	ATCTCTCACAGTAGGACATCTCACTCTTGTGTACACAGAGGCTCTTCATA	
		1351	1400
NDV HN (FJ608369)	(1260)	TTTCTCCCGTGGCTTATTATATCCCATGACAGTAAATACACAAAAGGCTA	
NDV HN (ZJ1 strain)	(1260)	TTTCTCCCGTGGCTTATTATATCCCATGACAGTAAATACACAAAAGGCTA	
NDV HN LaSota (M24709)	(1351)	CTTTCTCTCCCGGTTATTATATCTTATGACAGTCAAGAACAAAACAGCGCA	
NDV HN texas (M21409)	(1270)	CTTTCTCTCCCGGTTATTATATCTTATGACAGTCAAGAACAAAACAGCGCA	
NDV HN CA02 (EF520717)	(1260)	CTTTCTCTCCCGCTTACTATACCTTATGACAGTGCACACAAAACAGCGCA	
NDV HN MEX (AY288999)	(1260)	CTTTCTCTCCCGCTTACTATACCTTATGACAGTGCACACAAAACAGCGCA	
		1401	1450
NDV HN (FJ608369)	(1310)	CACCTCCATAGTCCCTATACGTTTAATGCTTTCACTCGGCCAGTACTGCC	
NDV HN (ZJ1 strain)	(1310)	CACCTCCATAGTCCCTATACGTTTAATGCTTTCACTCGGCCAGTACTGCC	
NDV HN LaSota (M24709)	(1401)	CCCTTCCATAGTCCCTATACATTCATAGCCTTCACTCGGCCAGTACTGCC	
NDV HN texas (M21409)	(1320)	CCCTTCCATAGTCCCTATACATTCATAGCCTTCACTCGGCCAGTACTGCC	
NDV HN CA02 (EF520717)	(1310)	CCCTTCCATAGTCCCTATACATTCATAGCCTTCACTCGGCCAGTACTGCC	
NDV HN MEX (AY288999)	(1310)	CCCTTCCATAGTCCCTATACATTCATAGCCTTCACTCGGCCAGTACTGCC	
		1451	1500
NDV HN (FJ608369)	(1360)	CCTTGGCCAGGCGATCAGCAAGATGCCCGAAGCTATGCATCACTGCATCTA	
NDV HN (ZJ1 strain)	(1360)	CCTTGGCCAGGCGATCAGCAAGATGCCCGAAGCTATGCATCACTGCATCTA	
NDV HN LaSota (M24709)	(1451)	CCTTGGCCAGGCGATCAGCAAGATGCCCGAAGCCGTGTACTGTGCACTCTA	
NDV HN texas (M21409)	(1370)	CCTTGGCCAGGCGATCAGCAAGATGCCCGAAGCCGTGTGTACTGTGCACTCTA	
NDV HN CA02 (EF520717)	(1360)	CCTTGGCCAGGCGATCAGCAAGATGCCCGTAACTATCTATCACTGCATCTA	
NDV HN MEX (AY288999)	(1360)	CCTTGGCCAGGCGATCAGCAAGATGCCCGTAACTATCTATCACTGCATCTA	
		1501	1550
NDV HN (FJ608369)	(1410)	TACTGATCCGTATCCCTTAATCTTCCATAGGAATCATACTCTACGAGGGGG	
NDV HN (ZJ1 strain)	(1410)	TACTGATCCGTATCCCTTAATCTTCCATAGGAATCATACTCTACGAGGGGG	
NDV HN LaSota (M24709)	(1501)	TACAGATCCGTATCCCTTAATCTTCTATAGAAACCAACCTTTCGAGGGGG	
NDV HN texas (M21409)	(1420)	TACAGATCCGTATCCCTTAATCTTCTATAGAAACCAACCTTTCGAGGGGG	
NDV HN CA02 (EF520717)	(1410)	TACTGATCCGTATCCCTGTAGTCTTCCATAGGAATCATACTCTACGAGGGG	
NDV HN MEX (AY288999)	(1410)	TACTGATCCGTATCCCTGTAGTCTTCCATAGGAATCATACTCTACGAGGGG	
		1551	1600
NDV HN (FJ608369)	(1460)	TCTTGGGGAGGATGCTTGTATATGACAAAGGAGACCTTAACCCCTATCT	
NDV HN (ZJ1 strain)	(1460)	TCTTGGGGAGGATGCTTGTATATGACAAAGGAGACCTTAACCCCTATCT	
NDV HN LaSota (M24709)	(1551)	TATTGGGGACATGCTTGTATGGTATACAAAGCAAGCTTAATCTTACGACT	
NDV HN texas (M21409)	(1470)	TATTGGGGACATGCTTGTATGGTATACAAAGCAAGCTTAATCTTACGACT	
NDV HN CA02 (EF520717)	(1460)	TGTTGGGGACATGCTTGTATATGACAAAGCAAGGCTCAATCCCTATCT	
NDV HN MEX (AY288999)	(1460)	TGTTGGGGACATGCTTGTATATGACAAAGCAAGGCTCAATCCCTATCT	

도면7ae

		1601	1650
NDV HN (FJ608369)	(1510)	GCAATATTGGACAAATATCCCGCAGTCGGTGTCAACCGCGGTGAGTTCAG	
NDV HN (ZJ1 strain)	(1510)	GCAATATTGGACAAATATCCCGCAGTCGGTGTCAACCGGTGAGTTCAG	
NDV HN LaSota (M24709)	(1601)	GCAATATTGGATGCAATATCCCGCAGTCGGTAACTCCAGTGGAGTTCAG	
NDV HN texas (M21409)	(1520)	GCAATATTGGATGCAATATCCCGCAGTCGGTAACTCCAGTGGAGTTCAG	
NDV HN CA02 (EF520717)	(1510)	GCAATATTGGATGCAATATCCCGCAGTCGGTAACTCCAGTGGAGTTCAG	
NDV HN MEX (AY288999)	(1510)	GCAATATTGGATGCAATATCCCGCAGTCGGTAACTCCAGTGGAGTTCAG	
		1651	1700
NDV HN (FJ608369)	(1560)	CAGCACCAAGCGCAGCATACACACATCGACATGTTTTAAAGTTGTCAGGA	
NDV HN (ZJ1 strain)	(1560)	CAGCACCAAGCGCAGCATACACACATCGACATGTTTTAAAGTTGTCAGGA	
NDV HN LaSota (M24709)	(1651)	CAGCACCAAGCGCAGCATACACACATCAACTGTTTTAAAGTTGTCAGGA	
NDV HN texas (M21409)	(1570)	CAGCACCAAGCGCAGCATACACACATCAACTGTTTTAAAGTTGTCAGGA	
NDV HN CA02 (EF520717)	(1560)	CAGCACCAAGCGCAGCATACACACATCGACATGTTTTAAAGTTGTCAGGA	
NDV HN MEX (AY288999)	(1560)	CAGCACCAAGCGCAGCATACACACATCGACATGTTTTAAAGTTGTCAGGA	
		1701	1750
NDV HN (FJ608369)	(1610)	CCATAAAGCTTTATTGTCCTTAGTATTGCGAAATATCCATACCCCTATT	
NDV HN (ZJ1 strain)	(1610)	CCATAAAGCTTTATTGTCCTTAGTATTGCGAAATATCCATACCCCTATT	
NDV HN LaSota (M24709)	(1701)	CCATAAAGCTTTATTGTCCTTAGTATTGCGAAATATCCATACCCCTATT	
NDV HN texas (M21409)	(1620)	CCATAAAGCTTTATTGTCCTTAGTATTGCGAAATATCCATACCCCTATT	
NDV HN CA02 (EF520717)	(1610)	CCATAAAGCTTTATTGTCCTTAGTATTGCGAAATATCCATACCCCTATT	
NDV HN MEX (AY288999)	(1610)	CCATAAAGCTTTATTGTCCTTAGTATTGCGAAATATCCATACCCCTATT	
		1751	1800
NDV HN (FJ608369)	(1660)	GCGCAATTGAGGATCGTTCCTTATTAGTTGAGATCTCAAGGATGATAG	
NDV HN (ZJ1 strain)	(1660)	GCGCAATTGAGGATCGTTCCTTATTAGTTGAGATCTCAAGGATGATAG	
NDV HN LaSota (M24709)	(1751)	GCGCAATTGAGGATCGTTCCTTATTAGTTGAGATCTCAAGGATGATAG	
NDV HN texas (M21409)	(1670)	GCGCAATTGAGGATCGTTCCTTATTAGTTGAGATCTCAAGGATGATAG	
NDV HN CA02 (EF520717)	(1660)	GCGCAATTGAGGATCGTTCCTTATTAGTTGAGATCTCAAGGATGATAG	
NDV HN MEX (AY288999)	(1660)	GCGCAATTGAGGATCGTTCCTTATTAGTTGAGATCTCAAGGATGATAG	
		1801	1850
NDV HN (FJ608369)	(1710)	AGTT-----	
NDV HN (ZJ1 strain)	(1710)	AGTT-----	
NDV HN LaSota (M24709)	(1801)	AGTTAGGAGCCAGGCTCTGGCTAGTTGAGTCAATTATAAAGGAGTTGGA	
NDV HN texas (M21409)	(1720)	AGTTAGGAGCCAGGCTCTGGTTAGTTGAGTCAACTATGAAGAGCTGGA	
NDV HN CA02 (EF520717)	(1710)	AGTT-----	
NDV HN MEX (AY288999)	(1710)	AGTT-----	
		1851	1900
NDV HN (FJ608369)	(1714)	-----	
NDV HN (ZJ1 strain)	(1717)	-----	
NDV HN LaSota (M24709)	(1851)	AAGATGGCATTGTATCACCTATCTTCTGGACATCAAGAATCAACCGAA	
NDV HN texas (M21409)	(1770)	AAGATGGCATTGTATCACCTATCTTCTGGACACCAAGAATCAAACTGAA	
NDV HN CA02 (EF520717)	(1717)	-----	
NDV HN MEX (AY288999)	(1717)	-----	
		1901	1950
NDV HN (FJ608369)	(1714)	-----	
NDV HN (ZJ1 strain)	(1717)	-----	
NDV HN LaSota (M24709)	(1901)	TGCCGGCGCGCTGCTCGAATTCATGTTGCCAGTTGACCACAATCAGCCAG	
NDV HN texas (M21409)	(1820)	TGCCGGTGGAGCTCGAATTCATGTCGCCAGTTGACCACAATCAGCCAG	
NDV HN CA02 (EF520717)	(1717)	-----	
NDV HN MEX (AY288999)	(1717)	-----	
		1951	2000
NDV HN (FJ608369)	(1714)	-----	
NDV HN (ZJ1 strain)	(1717)	-----	
NDV HN LaSota (M24709)	(1951)	TGCTCATGCGATCAGATTAAGCCTTGTCATAGTCTCTTGATTAAGAAAA	
NDV HN texas (M21409)	(1870)	TGCTCATGCGATCAGATCAAGCTTGTCATAGTCTCTTGATTAAG----	
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 균주): 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

		1	50
SEQ ID NO:1	(1)	ATGGACCGTGTCTCTCCCGCTGCTCTCCAGAACGAGGAGCTGAGGC	
SEQ ID NO:2	(1)	ATGGATCTGTGTAGTTAGTAAAGTCTGTAATAGAAACGAGAAATAGAGC	
		51	100
SEQ ID NO:1	(51)	CAAGAACACCTGGGCGCTTGTCTTTCTGTGTGGCCCTCTCTCCCTTATG	
SEQ ID NO:2	(51)	AAAGAAATACATGGGCGCTGTTTTCGGGTGGCAGTCTTAATCTTAATAG	
		101	150
SEQ ID NO:1	(101)	TCAATGACCCCTCGCCCATCTCCCTCGCCGCCCTCTCTACAGCATEGAGGCT	
SEQ ID NO:2	(101)	TAATGACATTAGCTATCTCTCTAGCCGCCCTGCTATACAGCNTGGAGGCT	
		151	200
SEQ ID NO:1	(151)	AGCACCCCAACGATCTCGCCGGAATCTCGACTGTATCTCCGCCGCCGA	
SEQ ID NO:2	(151)	AGCACGCCGAAACGACCTTCGGGTATATCGACCGGTATCTCCAGGCCAA	
		201	250
SEQ ID NO:1	(201)	GGACCGCTCACTCTCCCTCTCTCAACTCCACCGAGGATCTCTTATCTCCG	
SEQ ID NO:2	(201)	GGATAGGGTTACATCTTTACTCAATTCAAATCAAGATCTGTAGCTAGGG	
		251	300
SEQ ID NO:1	(251)	TCTACAGCAGGTCTCGCCCTCGACTCCCTCTCTGCCCTCTCTTACACCCAG	
SEQ ID NO:2	(251)	TATATTAACAGGTGGCCCTTGAATCCCTCTGGCGTTGTTGAAATCTAG	
		301	350
SEQ ID NO:1	(301)	AGCTTCATTATGAACGCCATTAGCTCCCTCAGCTACCGAGATTACGGCSC	
SEQ ID NO:2	(301)	TCTATTAATATGAATGCATAAATCTCTCTTTCCTATCTCAATTAATGGGC	
		351	400
SEQ ID NO:1	(351)	CGCCAACTCGTCCGCTCGCCGCCGCCCTCTCTCACTGACCTTATTAATCG	
SEQ ID NO:2	(351)	TGCAAAATAGTAGTGGGTCTGGGCCACTCTCTCATGACCCGATTATATG	
		401	450
SEQ ID NO:1	(401)	CGCGCTTCGCAAGAGCTCATCTCTCAAGCACTAGCAATGCCACGTTC	
SEQ ID NO:2	(401)	GGGGGTAGGTAAAGGCTCATAGTAGATGACACGGTATGCACTTCA	
		451	500
SEQ ID NO:1	(451)	TTCTACCTTAGCCTCAACAGGAGCACTCACTCTCTCTCTCTCTCTCTCT	
SEQ ID NO:2	(451)	TTCTATCTCTCAACATATCAAGAACCTCTCACTTATCTCTCTCTCTCTCT	
		501	550
SEQ ID NO:1	(501)	TACCGCTCTCGCTCGACCGCCTTCTCAAGCTTCGACATCTCTCTCTCT	
SEQ ID NO:2	(501)	CACAGCTTCAGGCTGCACTCGGATACCTCATTCGACATCAGGCTTACCC	
		551	600
SEQ ID NO:1	(551)	ACTACTCTACACCCATACGTCATCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT	
SEQ ID NO:2	(551)	ACTATCTTTATCTACCAATCTGATATTAATCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT	
		601	650
SEQ ID NO:1	(601)	CACAGCCACCAGTACCTCTCGCCCTCGGAGTTCTCTCTCTCTCTCTCTCT	
SEQ ID NO:2	(601)	CACTCACATCAGTATTTGGCACTAGGTCTGCTCTCGGACATCTGCAACAGG	
		651	700
SEQ ID NO:1	(651)	CGCGCTCTTTTTTTCACCCCTCGGAGATCAACCTCGACATCTCTCTCTCT	
SEQ ID NO:2	(651)	GAGGTTATCTTTTCTACTCTGCTTTCATCAATTAAGATGACGCCCAAA	
		701	750
SEQ ID NO:1	(701)	ACCGCAAGAGCTCTCTCGCTCTCGCCCAACCCCGCTCGGCTCGACATCTCT	
SEQ ID NO:2	(701)	ATCGGAGTCTCTCTAGTCTGAGTCAACTCTTTAGGTCTGTATATGCTG	
		751	800
SEQ ID NO:1	(751)	TGCTCCAGGTCAACGACGAGGAGGAGGATTAACAACTCTCTCTCTCTCTCT	
SEQ ID NO:2	(751)	TGCTCTAAAGTCAACAGACTGAGGAGGAGGATTAAGTCACTTACCCC	
		801	850
SEQ ID NO:1	(801)	CACTTCGATGCTCCACGCCCGCTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT	
SEQ ID NO:2	(801)	CACATCAATGGTGCATGGAAGTTAGGTTTACGCTTCACTACCTTGA	
		851	900
SEQ ID NO:1	(851)	AGGACCTCGACCTCACTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT	
SEQ ID NO:2	(851)	AGGACTTAGACCTCACTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT	
		901	950
SEQ ID NO:1	(901)	GGCTTCGCGCGCGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT	
SEQ ID NO:2	(901)	GGATGGGAGGAGGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT	
		951	1000
SEQ ID NO:1	(951)	CGGTCTCTCAGGCTTAACAGCCCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT	
SEQ ID NO:2	(951)	TGGAAGGCTTAACCAATTCACCTTAGCGACACTGCAACAGGAGGGAAAT	

도면7bb

			1001		1050
SEQ ID NO:1	(1001)	ACGSGATCTACAAAGCGCTACAAACAACCTCGCCCTGACGAGGAGTATAC			
SEQ ID NO:2	(1001)	ATCTAATAATACAAAGCGCTATAATAACACATGCCCCGATGGAACAGATTAC			
		1051			1100
SEQ ID NO:1	(1051)	CAGTCCCGCATGGCCCAAGTCTCTCTACAAAGCGCTCTTTTGGCCGCAAA			
SEQ ID NO:2	(1051)	CAAGATTCGAGATGGCTAATATCTCTGTATAAAGCTTGAACGGCTTGTTGGGAA			
		1101			1150
SEQ ID NO:1	(1101)	CGCGCTCCACAGCGGCCATTCTCTCGNTCAGGCTCTCGACAGCGCTCGAC			
SEQ ID NO:2	(1101)	CGCGCTTACACCAAGCCATCTTATCTATCAAAATATCAACACTCTTTGACGC			
		1151			1200
SEQ ID NO:1	(1151)	AGGACGCGCTCTCTACCCGCTTCCCTTAACACCTTCACCTTATGGCGCGC			
SEQ ID NO:2	(1151)	AGGACGCGCTCTGACTCTACCGCCAAANTACAGTTACACTCATGGGCGCC			
		1201			1250
SEQ ID NO:1	(1201)	GAGGGCCGCATCTCTCAACGCTCGGTACCTCCCACTTCTCTTACCAGGCGG			
SEQ ID NO:2	(1201)	GAGGGCAGAAATCTCTCAAGTAGGAACTATCTTTCTTGTACACAGGACAG			
		1251			1300
SEQ ID NO:1	(1251)	CTCGAGCTACTTTTCCCTGCCCTCTTTTACCCCTGACTGTTGGCAACA			
SEQ ID NO:2	(1251)	GTTTTCATACCTTTTCTCCGCTTTACTATACCTTATGACAGTGGCCACA			
		1301			1350
SEQ ID NO:1	(1301)	AGATCTCTACCTCCACAGCCCTACACCTTTTAAAGCGCTTCACGCGCCG			
SEQ ID NO:2	(1301)	AACAGGCACTCTTCTATAGTCTTTATCATTTATGCTGGTTCACTGGCG			
		1351			1400
SEQ ID NO:1	(1351)	GGATCTCCCGCTGCCAGGCGATCGCGCCCTCGCCCTATCTCTCTGCATAC			
SEQ ID NO:2	(1351)	GTAGTCTCTCCCTCGCGGATCCAGAGGCGCCCTCACTCAACATATCAC			
		1401			1450
SEQ ID NO:1	(1401)	CGCGCTCTACACCGACCTTACCCCTGCTCTTTTTCACCCACCATACCG			
SEQ ID NO:2	(1401)	TGCACTCTATACTGATCCGTAACCTCTTAGCTCTTCCATAGGATACACCT			
		1451			1500
SEQ ID NO:1	(1451)	TTTCCGCTCTCTCTGCTATCTATCTCTGATTAACAGCAGCGCCCTCTCAAC			
SEQ ID NO:2	(1451)	TGCGAAGGGTGTTTCGGCAATCGCTTATGATTAACACAGCAAGGCTCAT			
		1501			1550
SEQ ID NO:1	(1501)	CGCGCTCCGCCCTTTTCGACTACTCTTCCCGCTCCCGTATACCGCGCT			
SEQ ID NO:2	(1501)	CCCGTATCTCCATATTTGCTACACATCTCGCAGTGGCATACCGCGGT			
		1551			1600
SEQ ID NO:1	(1551)	CTCCCTCCACTCCACCAAGCGCGCTCAACACACCTCCCACTCTTTAAG			
SEQ ID NO:2	(1551)	AAGTTCGACAGCAACCAAGGCAACATACAGCAATCGATGATGTTTAAAG			
		1601			1650
SEQ ID NO:1	(1601)	TTCTCAAGACTAACAGTCTACTGCTCTCCCTCTCCCGCCAGATTAGCAAC			
SEQ ID NO:2	(1601)	TTCTCAAGACTAATAAGATGTATTCTCTTAGCATTTGCAGAAATATCAAT			
		1651			1700
SEQ ID NO:1	(1651)	ACCTCTCTCGGAGAGTTCGCCATTCTCCCGCTGCTCTCGAGATCTCTCA			
SEQ ID NO:2	(1651)	ACTCTATTTGGGCAATCAAGATCTCTCTTACTGCTGCGATCTCTCA			
		1701			1716
SEQ ID NO:1	(1701)	GGACATAGCGCTTTAA			
SEQ ID NO:2	(1701)	AGATGATAGCGCTTTAA			

SEQ ID NO :1 과 2 사이의 서열 일치성% : 72.4%

도면7bc

SEQ ID NO:16 과 SEQ ID NO:22 의 정렬

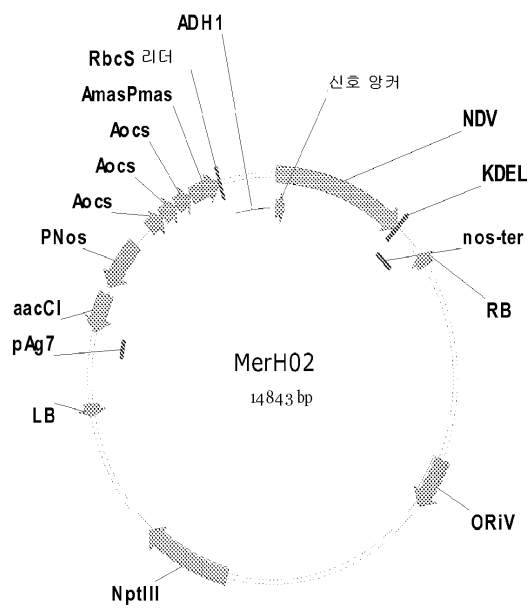
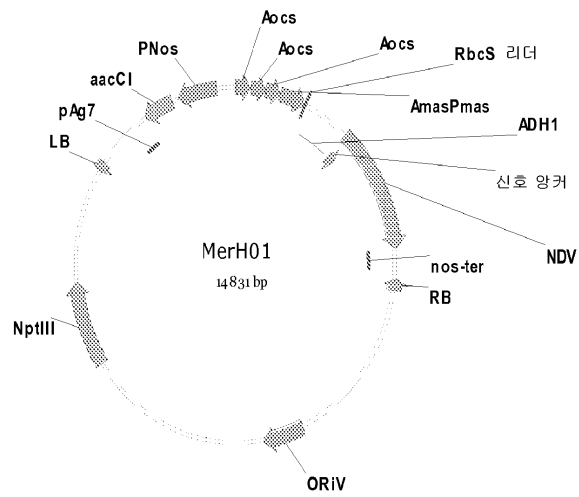
		1	50
SEQ ID NO:16	(1)	ATGGGACCGCGGTTAACAAGATCAGCTGCGGAGGAAATGAGGAAAGAGAAAC	
SEQ ID NO:22	(1)	ATGGGCGCGGCGCTCAACCCGCTGCGCTTGGAGAACGAGGAGCGGAGCGC	
		51	100
SEQ ID NO:16	(51)	AAGGAACACACAGGCGCCTGGTTTTCGGATCGCAATCTTACTTTAATGG	
SEQ ID NO:22	(51)	CAAGAACACCTGGCAAGCTCGTGTTCCCATCGCCCTGCTCCTGCTCATGG	
		101	150
SEQ ID NO:16	(101)	TAATGACTCTTAGCTATCTCCCAAGCTGCGCTGGCATATCACTGGGGGGCC	
SEQ ID NO:22	(101)	TCATGACCTTGGCGATCTCGCCGCGCGCTGCGCTACTCCGCGCTGGC	
		151	200
SEQ ID NO:16	(151)	AGTAGCGCGCACGACCTCGCAGGCATATCGACTGTGATCTCTAAGACAGA	
SEQ ID NO:22	(151)	AGCAACCGCGCACGACCTGCGCGGATCAGCACCCGTCATCTCGAAGACCA	
		201	250
SEQ ID NO:16	(201)	GGATAAGGTTACGCTTTACTCACTTCGAGTCAAGATCTGATAGATAGGA	
SEQ ID NO:22	(201)	GGCAAGGTGACGTCCTGCTCGCTCTCCCGGACCTTATCGACCCCA	
		251	300
SEQ ID NO:16	(251)	TATCAAGCAGGTGGCTCTTGAATCCCCACTGGCGTAATAAACAATGAA	
SEQ ID NO:22	(251)	TCTACAAGCAATTCGCGCTTGGAGAGCCCTTGGGCTGCTCAACAGGAG	
		301	350
SEQ ID NO:16	(301)	TCTATGATTATGAATGCAATACCTCTCTTCTTATCAATTAACGGGGC	
SEQ ID NO:22	(301)	AGCATGATCATGAACCGGATCACTCTCTGAGCTACAGATCAACGGGGC	
		351	400
SEQ ID NO:16	(351)	TGCGAACAAATAGCGGATGTGGGGCGCTGTTCATGACCAAGATTATATCG	
SEQ ID NO:22	(351)	CGCGAACCAATTCGGGTGCGCGCGCCCGTGACACCCCTGACTACATCG	
		401	450
SEQ ID NO:16	(401)	GGGGATAGGCAAGAACTCATAGTGAACGACATCAATATGTCACATCA	
SEQ ID NO:22	(401)	CGCGATCGCGAAGGAATCATCTGTTACGACATCAAGCCGTGACGTGC	
		451	500
SEQ ID NO:16	(451)	TTTTATCTTCTGCATATCAAGAACACTTGAATTTCTATCCCGCGCTAC	
SEQ ID NO:22	(451)	TTCTACCCCTCCCGCTACAGGAGCACTCAACTTCATCCCGCCCGGAC	
		501	550
SEQ ID NO:16	(501)	TACAGGATCCGCTTGGACTCGGATACCCCTCAATTGACATAGACCAACC	
SEQ ID NO:22	(501)	CACGGGGAGCGGCTGCAACCGGATCCCGTCTTCACATATCCACCAAGC	
		551	600
SEQ ID NO:16	(551)	ATTATTTGTATTAATCAATGTGATTAATATCCGTTGCAAGATCATCTCA	
SEQ ID NO:22	(551)	ACTATTGCTACACCCACAACGTGATCTGTGGGCTGCCCGGACCAAGC	
		601	650
SEQ ID NO:16	(601)	CACTCAACATCAATACTTAGCACTTGGTGTGCTCGGACATCTCAACAGG	
SEQ ID NO:22	(601)	CACTCGCACCACTAGTACCTGGCGTGGGCTCCCAAGGACCTCCGGACCGG	
		651	700
SEQ ID NO:16	(651)	GAGGTTAATCTTTCTACTCTGGGCTCCATCAATTAAGATACACCCAAA	
SEQ ID NO:22	(651)	CCCGTGTCTCTCTCACTCTCCGCTCCATCAACCTGACGATACGGAGA	
		701	750
SEQ ID NO:16	(701)	ATCGGAATCCTGCACTGTGAGTGCACCCCTTTAGGTTGTGATATGCTG	
SEQ ID NO:22	(701)	ACCGCAAGTCTCTGACCGTGTCCGCCACGCCCCCTCGGCTCGACATGCTC	
		751	800
SEQ ID NO:16	(751)	TGCTCTAAGGTCACAGGACTGAGAGGAGGATTACAACTCACTTGGCCC	
SEQ ID NO:22	(751)	TGCTCAAGGTGACCGGCACCGAGGAGGAGGACTACAAGTCTGTGCCCC	
		801	850
SEQ ID NO:16	(801)	CACACCAATGCTGACCGGAAGGCTAGGGTTTACGGTCAATACCTTGAGA	
SEQ ID NO:22	(801)	CACCCCGATGCTGACCGGCGGCTCGGCTTCGATGCTCAGTACCAAGGA	
		851	900
SEQ ID NO:16	(851)	AGGCTTAGACACCAAGGCTCTAATTAAGGATTGGGTGGCAATTAATCCA	
SEQ ID NO:22	(851)	AGGACCTGGACACGACCTGCTCTTCAGGACTGGGTGGGAACTACCCC	

도면7bd

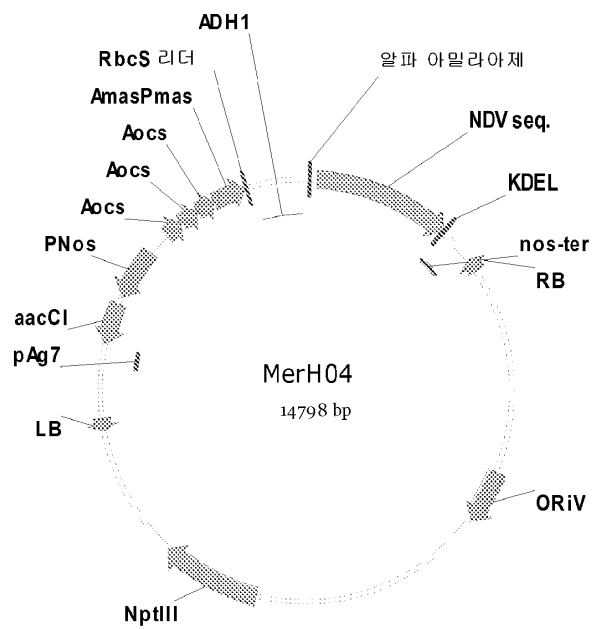
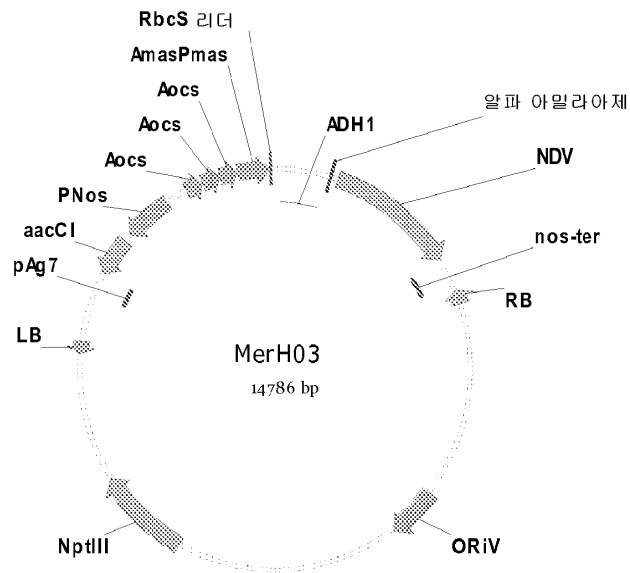
		901	950
SEQ ID NO:16	(901)	GGATGGGGAAGAGGGTCTTTTATGACAAACCTTAAAGGTTCCCAATTA	
SEQ ID NO:22	(901)	GGTGTGGGGGGCGGTAGCTTCATCGACAAACAGATCTGGTTCCCGTGTA	
		951	1000
SEQ ID NO:16	(951)	CGAGGGGCTCAAAACCAATTCAACCAAGTGCACACTGCACAAAGAGGAAAT	
SEQ ID NO:22	(951)	CGGGGGCTTGAGGCCCACTCCCGCTCCGACACGGCCAGGAGGGGAGT	
		1001	1050
SEQ ID NO:16	(1001)	ATCTAATATATAAGGCGCATACCAACACATGCCCGATACAAAGATTAC	
SEQ ID NO:22	(1001)	ACCTCATCTACAGCGGCACACAAACACTGCCCGGACAGCAGCACTAT	
		1051	1100
SEQ ID NO:16	(1051)	CAAAATTGGGATGGCTAAGTCTTAAATAAACCCGGGGGATTGTTGGAAA	
SEQ ID NO:22	(1051)	CAGATCCGGATGGCCAAAGCTCTACAGGCCCGCGCTCCGGGGCAA	
		1101	1150
SEQ ID NO:16	(1101)	GCSCSTACAGCAAGCCATCTTAATCCATCAAAAGTGTCAATATCCTTGGCTA	
SEQ ID NO:22	(1101)	GAGAGTCCAGCAGGGGATGCTCTCCATCAAGGTGAGCAGAGCTTCGCCA	
		1151	1200
SEQ ID NO:16	(1151)	AGGACCCGGTGTGTGACTATTCCACCTAATACAACTCAGCTGGGAGCC	
SEQ ID NO:22	(1151)	AGGACCCGGTCTGTGACCTCCCGCGAACACCATACCCCTATGGGCGCC	
		1201	1250
SEQ ID NO:16	(1201)	GAAAGGCAGGATCTCAGAGTGGGACATCTCACTTCTTGTACCAAGAGG	
SEQ ID NO:22	(1201)	GAGGGGAGGAACTCTCACTTTCGGCAGCTCCCACTTCTGTACCAAGGGG	
		1251	1300
SEQ ID NO:16	(1251)	GTCTTCATATTTCCTCCCTGCTTATTATATCCCATGACAGTAAATACA	
SEQ ID NO:22	(1251)	CAGCTCTGTACTTCAGCGCGGGCTCCTGTACCCGATGACCTCAACACAA	
		1301	1350
SEQ ID NO:16	(1301)	AAAGGGCTACACTCCATAGTCTCTATACGTTAATGCTTCACTCGGCA	
SEQ ID NO:22	(1301)	AGACCGCCAGGTGCTGACTCGGCTCACTTCACAGCGCTTCACCGGCC	
		1351	1400
SEQ ID NO:16	(1351)	GGTAGTGGCCCTTGGCAGGCATCAGCAAGATGCCCCANCTCATGCTCAC	
SEQ ID NO:22	(1351)	GGCAGCGCCCGTGGCAGGCTCCGGCCGCTGCGCGAACTGTGCTATCAC	
		1401	1450
SEQ ID NO:16	(1401)	TGGATCTATAGTGTATCATATCCCTTAATCTTCCATAGGAATCATAGTC	
SEQ ID NO:22	(1401)	CGGGGTCTACACCGACCTTACCGCTGATCTTCCGCCAACCCACAGGC	
		1451	1500
SEQ ID NO:16	(1451)	TACGAGGGGTCTTCGGGACGATGCTTATGATGAAACAGCGAGACTTAAC	
SEQ ID NO:22	(1451)	TCAGGGGGGTGTTCCGGACCATGCTCGACGACGAGGCTCCTCTGAC	
		1501	1550
SEQ ID NO:16	(1501)	CCCGTATCTGCAGTATTGACAAACATATCCCGCAGTGTGTCAACCCGGT	
SEQ ID NO:22	(1501)	CCCGTCAAGCCCTCTTTCGACAAACATCTCCCGCAGCGCGTCAAGAGT	
		1551	1600
SEQ ID NO:16	(1551)	GAGTTCAGGAGCACCAGGCAGCATACACACATCGACATTTTAAAG	
SEQ ID NO:22	(1551)	CTCCCTGTCCTCGACGAGGGCCGCTACACCACTCCACCTGCTTCAAGG	
		1601	1650
SEQ ID NO:16	(1601)	TTGTCAAGACCAATAAAGCTTATGTCTTAGTATGCAAGAAATGCCAAT	
SEQ ID NO:22	(1601)	TGGTTAAGACCAACAAAGCCCTACTGCTCTCCATCGCTGAGATCTCCAAC	
		1651	1700
SEQ ID NO:16	(1651)	ACCCATATCGGGGAATTTAGGATCGTTCCTTATTAAGTTGAGATCTCAA	
SEQ ID NO:22	(1651)	ACCCCTCTTCGGCGAGTCCGATCGTGCCCTCTCTGCTGAGATCTTGAA	
		1701	1713
SEQ ID NO:16	(1701)	GGATGATAGAGTT	
SEQ ID NO:22	(1701)	GGACGACCCCGTG	

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

도면7ca



도면7cb



도면8

HN 선형 에피토프 영역 (박스 부분)

NDV HN - TX/GB (P12553) (330) QSEKYYIYKR YNDTCFDEQD YQIRMAKSSY KPGKFGGRK QQAIIISIKVS
 NDV HN LaSota (AAA46659) (330) QSEKYYIYKR YNDTCFDEQD YQIRMAKSSY KPGKFGGRK QQAIIISIKVS
 NDV HN CA/02 (ABS84265) (330) QSEKYYIYKR YNDTCFDEQD YQIRMAKSSY KPGKFGGRK QQAIIISIKVS
 NDV HN MEX/96 (AAQ54638) (330) QSEKYYIYKR YNDTCFDEQD YQIRMAKSSY KPGKFGGRK QQAIIISIKVS
 NDV HN Liaoning/08 (ACM67348) (330) QSEKYYIYKR YNDTCFDEQD YQIRMAKSSY KPGKFGGRK QQAIIISIKVS
 NDV HN ZJ1 (AAL18936) (330) QSEKYYIYKR YNDTCFDEQD YQIRMAKSSY KPGKFGGRK QQAIIISIKVS

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 에피토프 영역 .1 (SEQ ID NO:10): PDEQDYQIRMAKSS

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

NDV HN 선형 에피토프 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

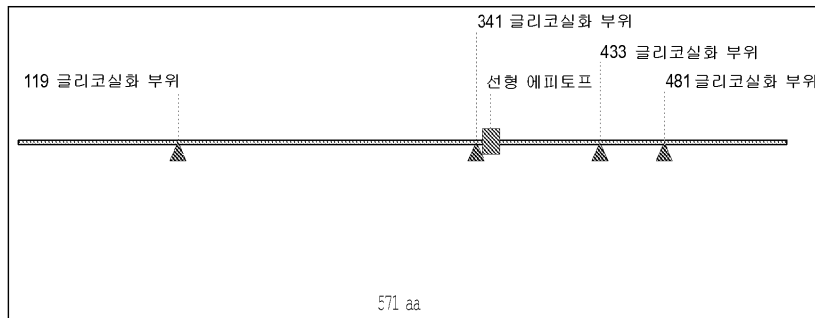
*6 개의 잠재적인 글리코실화 부위가 있다.
 글리코실화 부위는 단백질 서열의 아미노산 위치에 표시된다.

** : 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 질한 바이러스

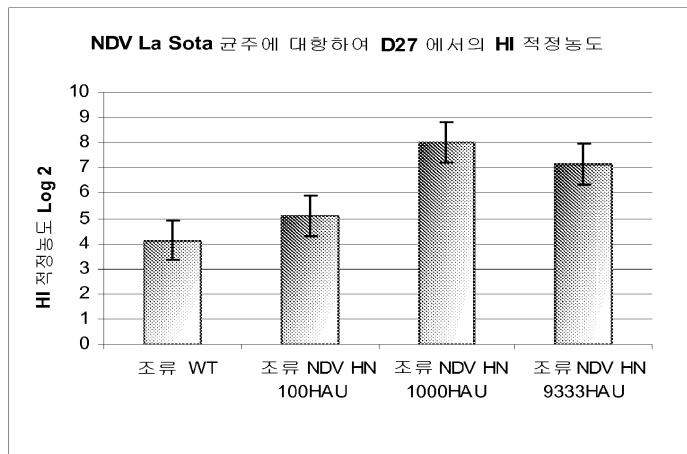
명칭 : 헤마글루티닌-뉴라미니다아제

단백질의 68% 에 달하는 32 개 펩티드에 의해 확인됨.

```

1  MDRVVSRLV ENEEREAKNT WRLVFRVAVL SLIVMTLAIS VAALVYSMEA STPNDLAGIS TVISRAEDRV TSLINSNQDV
81  VORVYKQVAL ESPLALLNTE SIIMNAITSL SYQINGAANS SGCGAPVHDP DYIGGVCKEL IVDDTSDATS PYPAYQBHL
161 NPIPAPTGS GCTRIPSFDM SATHYCYTHN VILSGCRDES HSHQVIALGV LRNTSATGRVF FSTLRSINLD DTQNRKSCSV
241 SATPLGQML CSKVTEBEE DYKSVTEPTM VHGRLAFDQ YHBKDLDTV LEKDWVANYF GVGGSLIDG RVWFVYGGCL
321 RPNPSPDTAQ EGKYVIYKRY NNTCPDEQDY QVRMAKSSYK PGRFGGKRQV QAILSIXVST SLGEDFVLTV PNTFTLMGA
401 EGRILTQGTG HFLYQRCSEY FSPALLYPMT VRNKVATLES PVTFNAPTRF GSVPCQASAR CPNSCITGVY TDPYPVVFHR
481 NHTLRGVFGT MLDNEQARLN PVSALFDYTS RSRITRVSST STKAAVTTST CPKVVKTKV YCLSIARIGN TSGEPRIVP
561 LVEILKDER 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

<110> Merial Limited

Guo, Xuan

Troupe, Carolyn

Feilmeier, Bradley

Pritchard, Joyce

Cruz, Julio

<120> Recombinant NDV antigen and uses thereof

<130> MER 09-139

<150> 61/290,297

<151> 2009-12-28

<160> 28

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1716

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> NDV HN codon-optimized DNA

<400> 1

atggaccgtg tcgtctcccg cgtggctcctc gagaacgagg agcgtgaggc caagaacacc	60
tggcgcccttg tctttcgtgt cgccgtcctc tcccttattg tcatgacct cgccatctcc	120
gtcgcgcgcc tcgtctacag catggaggct agcaccccca acgatctcgc cggaatctcg	180
actgttatct cccgcgcga ggaccgcgtc acctccctcc tcaactcaa ccaggatgtc	240
gttgatcgcg tctacaagca ggctgcctc gagtccctc tcgccctcct taacaccgag	300
agcatcatta tgaacgcat taccctcctc agctaccaga ttaacggcgc cgccaactcg	360
tccggctcgc gcgccccgt ccatgacct gattacatcg gcggcgctcg caaggagctc	420
atcgtcgacg aactagcga tgccacgtcc ttctacccta gcgcctacca ggagcacctc	480
aacttcatcc ctgccccac taccggctcc ggctgcaccc gcattcccag cttcgacatg	540
tccgccaact actactgta caccataac gtcatcttt cgggttgccg cgaccactcc	600
cacagccacc agtacctgc cctcgaggtt cttcgtacgt ccgccaccgg ccgcgtcttt	660
ttttccacc tccgcagcat caacctcgac gataccaga accgcaagag ctgctcggtc	720
tccgcccacc cgtcggctg cgacatgtc tgtccaagg tcaccgagac ggaggaggag	780
gattacaagt ccgttaccac cacttcgatg gtccacggcc gccttggctt cgacggccag	840
taccacgaga aggacctga cgtcaccgtt ctctttaagg actgggttgc caactacccc	900
ggcgtcggcg gcggctcct catcgatgac cgcgtctggt ttctgtcta cggtggtctc	960
aagcctaaca gccctccga taccgccag gagggtagt acgtgatcta caagcgctac	1020
aacaacacct gccctgacga gcaggattac caggctcgca tggccaagtc ctctacaag	1080
cccgtcgtt tcggcggcaa gcgcgtccag caggccattc tctcgatcaa ggtctcgacc	1140
agcctcggag aggacccgt gtcaccgtt cccctaaca ccgtcacct tatgggcgcc	1200
gagggccga tctcaccgt cggtaacct cacttctct accagcgcgg ctcgagctac	1260
ttttccctg ccttcttta cccatgact gtctgcaaca agactgtac cctccacagc	1320
ccctacact ttaacgctt cagcgcccc ggaagcgtcc cctgccaggc gagcgccgc	1380
tgccctaact ctgcattac cggcgtctac accgacctt acctgtcgt ctttaccgc	1440
aaccataccc ttgcggcgt cttcggtaact atgcttgata acgagcaggc ccgcctcaac	1500
ccgtctcgg ccattttca ctacattcc cgtcccgta tcaccgcgt ctctccacc	1560
tccaccaagg ccgcctaac cactccacc tgccttaagg ttgtcaagac taacaaggtc	1620
tactgcctct ccatgccga gattagcaac acctcttcg gagagtccg cattgtcccc	1680

ctgctcgtcg agatcctcaa ggacgatcgc gtttaa 1716

<210> 2

<211> 1716

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> NDV HN wild type DNA

<400> 2

atggatcgtg tagttagcag agtcgtacta gaaaacgaag aaagagaagc aaagaataca 60
 tggcgccctgg ttttccgggt cgcagtccta tctctaataag taatgacatt agctatctct 120
 gtagccgccc tggatatacag catggaggct agcacgccga acgaccttgc gggatatatcg 180
 acggtgatct ccagggcaga ggataggggt acatctttac tcaattcaaa tcaagatgtg 240
 gtagataggg tatataaaca ggtggccctt gagtccccgc tggcgtttgt gaatactgag 300
 tctataatta tgaatgcaat aacttctctt tcctatcaaa ttaatggggc tgcaaatagt 360

agtgggtgtg gggcacctgt tcatgaccgc gattatatgt ggggggtagg taaagagctc 420
 atagtagatg acacgagtga tgccacttca ttctatcctt cagcatatca agaacacctg 480
 aactttatcc cggcgcccac cacaggttca ggctgcactc ggataccctc attcgacatg 540
 agcgctaccc actattgtta tactcacaat gtgatattat ctggctgcag agatcactca 600
 cactcacatc agtatttggc actaggtgtg ctccggacat ctgcaacagg gaggggtattc 660
 ttttctactc tgcgttccat caatttagat gacacccaaa atcggaagtc ttgcagtgtg 720
 agtgcaactc ctttaggttg tgatatgtct tgccttaaag tcacagagac tgaggaggag 780

gattataagt cagttacccc cacatcaatg gtgcatggaa ggtaggggtt tgacggtcag 840
 taccatgaga aggacttaga cgtcacagtc ttatttaagg attgggttgc aaattaccgc 900
 ggagtgggag gaggggtctct tattgacgac cgtgtatggt tcccagtta tggagggcta 960
 aaaccaat cacttagcga cactgcacaa gaagggaat atgtaata caagcgctat 1020
 aataacacat gccccgatga acaagattac caagttcggg tggctaaatc ctctataag 1080
 cctggacggt ttggtgggaa gcgcgtacag caagccatcc tatctatcaa agtatcaaca 1140
 tctttgggag aggaccgggt gctgactgta ccgccaata cagttacact catggggggc 1200

gagggcagaa tcttcacagt aggaacatct catttcttgt accagcgagg gtcttcatac 1260
 ttttctcccg ctttactata ccctatgaca gtgcgcaaca aaacagccac tcttcatagt 1320
 ctttatacat ttaatgcgtt cactcgcccg ggtagtgtcc cttgccaggc atcagcaagg 1380
 tgcctaact catgtatcac tggagtctat actgatccgt accctgtagt cttccatagg 1440

aatcacacct tgcgaggggt gttcgggaca atgcttgata atgaacaagc aaggctcaat 1500
 cccgtatctg caatatttga ctacacatct cgcagtcgca taaccgggt aagttcgacc 1560
 agcaccaagg cagcatacac gacatcgaca tgttttaaag ttgtcaagac taataaagtg 1620

tattgtctta gcattgcaga aatatccaat actctatttg gggaattcag gatcgttcct 1680
 ttactggtcg agatttctcaa agatgatagg gtttaa 1716

<210> 3

<211> 571

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> NDV HN protein (ABS84265)

<400> 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 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		
<210> 4			
<211> 1915			
<212> DNA			
<213> artificial sequence			
<220><223> NDV HN DNa (M21409)			
<400> 4			
gtcctcagtc atggaccgcg cagttagcca agttgcgtta gagaatgatg aaagagaggc			60
aaaaaataca tggcgcttga tattccggat tgcaatctta ctcttaacag tagtgacctt			120
agctacatct gtagcctccc ttgtatatag catgggggct agcacaccta gcgaccttgt			180
aggcataccg accaggattt ccagggcaga agaaaagatt acatctgcac ttggttccaa			240

tcaagatgta gtagatagga tatataagca agtggccctt gagtctccgt tggcattgtt 300
 aaacactgag actacaatta tgaacgcaat aacatctctc tcttatcaga ttaatggagc 360
 tgcgaacaac agcgggtggg gggcacctat ccatgaccca gattttatcg gggggatagg 420
 caaagaactc attgtagatg atgctagtga tgtcacatca ttctatccct ctgcatttca 480
 agaacatcat aattttatcc cggcgcctac tacaggatca ggttgcattc ggataccttc 540
 atttgacatg agtgctaccc attactgcta cactcataat ataatatcgt ctggatgcag 600

 agatcactca cactcatatc agtatattagc acttgggtgtg ctccggactt ctgcaacagg 660
 gaggatattc ttttctactc tgcgttccat caatctggat gacaccaga atcggaagtc 720
 ttgcagtgtg agtgcaactc ccttaggttg tgatatgctg tgctcgaaag tcacggagac 780
 agaggaagaa gattataact cagctgtccc tacgtgatg gtacatggga ggttagggtt 840
 cgacggccaa taccacgaaa aggacctaga cgtcacaaca ttatttgagg actgggtggc 900
 caactaccca ggagtagggg gtggatcttt tattgacagc cgctatggt tctcagtcta 960
 cggagggctg aaaccaatt caccagtga cactgtacag gaagagaaat atgtaatata 1020

 caagcgatac aatgacacat gcccagatga gcaagactac cagatccgaa tggccaagtc 1080
 ttcgtataag cccgggcggt ttgggtgggaa acgcatacag caggctatct tatctatcaa 1140
 ggtgtcaaca tctttgggag aagaccaggt actgactgta ccgccaaca cagtcacact 1200
 catgggggccc gaaggcagaa ttctcacagt agggacatct catttcttgt atcagcgagg 1260
 gtcacatac ttctctcccg cgttattata tcctatgaca gtcagcaaca aaacagccac 1320
 tcttcatagt ccctatacat tcaatgcctt cactcgcca ggtagtatcc cttgccaggc 1380
 ttcagcaaga tgcccaact cgtgtgttac tggagtctat acagatccat atcccctaat 1440

 cttctatagg aaccacacct tgcgaggggt attcgggaca atgcttgatg gtgaacaagc 1500
 aagacttaat cctgcgtctg cagtattcga tagcacatcc cgcagtcgca taaccagagt 1560
 gagttaagc agcaccaaag cagcatacac aacatcaact tgttttaaag ttgtcaagac 1620
 caataagacc tattgtctca gcattgctga aatatctaact actctcttcg gagaattcag 1680
 aatcgtcccc ttactagtgt agatcctcaa aaatgatggg gttagagaag ccaggtctgg 1740
 ttagttgagt caactatgaa agagctggaa agatggcatt gtatcaccta tcttccgca 1800
 caccaagaat caaactgaat gccggtgcga gctcgaattc catgtcgcca gttgaccaca 1860

 atcagccagt gtcacatgca tcagatcaag tcttgtcaat agtcctcga ttaag 1915

<210> 5

<211> 577

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> NDV HN protein (P12553)

<400> 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 Ser 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 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 cggtaagaga ggccgccct caattgcgag ccaggcttca caacctccgt 60
tctaccgctt caccgacaac agtctcaat catggaccgc gccgttagcc aagttgcgtt 120
agagaatgat gaaagagagg caaaaatac atggcgcttg atattccgga ttgcaatctt 180

attcttaaca gtagtgacct tggctataac ttagcctcc cttttatata gcatgggggc 240
tagcacacct agcgatcttg taggcatacc gactaggatt tccagggcag aagaaaagat 300
tacatctaca cttgggtcca atcaagatgt agtagatagg atatataagc aagtggccct 360
tgagtctccg ttggcattgt taaaaactga gaccacaatt atgaacgcaa taacatctct 420
ctcttatcag attaatggag ctgcaaaca cagcgggtgg ggggcaccta tccatgaccc 480
agattatata ggggggatag gcaaagaact cattgtagat gatgctagt atgtcacatc 540
attctatccc tctgcatttc aagaacatct gaattttatc ccggcgcccta ctacaggatc 600

aggttgcaact cgaataccct catttgacat gattgctacc cattactgct acaccataa 660
 tgtaatatgt tctggatgca gagatcactc acattcatat cagtatttag cacttgggtgt 720
 gctccggaca tctgcaacag ggagggtatt cttttctact ctgcgttcca tcaacctgga 780
 cgacacccaa aatcggaagt cttgcagtgt gattgcaact cccctgggtt gtgatatgct 840
 gtgctcgaaa gtcacggaga cagaggaaga agattataac tcagctgtcc ctacgcggat 900
 ggcatatggg aggttagggg tcgacggcca ataccacgaa aaggacctag atgtcacaac 960
 attattcggg gactgggtgg ccaactaccc aggagtaggg ggtggatctt ttattgacgg 1020

ccgcgtatgg ttctcagtct acggagggtc gaaaccaat tcaccagtg aactgtaca 1080
 ggaagggaaa tatgtgatat acaagcgata caatgacaca tgcccagatg agcaagacta 1140
 ccagattcga atggccaagt cttcgtataa gcctggacgg tttgggtgga aacgcatcca 1200
 gcaggctatc ttatctatca aggtgtcaac atccttaggc gaagaccgg tactgactgt 1260
 accgccaac acagtacac tcatgggggc cgaaggcaga attctcacag tagggacatc 1320
 tcatttcttg tatcaacgag ggtcatcata cttctctccc gcgttattat atcctatgac 1380
 agtcagcaac aaaacagcca ctctcatag tccttataca ttcaatgcct tactcggcc 1440

aggtagtata ccttgccagg cttcagcaag atgccccaac ccgtgtgtta ctggagtcta 1500
 tacagatcca tatcccctaa tcttctatag aaaccacacc ttgcgagggg tattcgggac 1560
 aatgcttgat ggtgtacaag caagacttaa tctacgtct gcagtattcg atagcacatc 1620
 ccgcagtcgc ataactcgag tgagttcaag cagcaccaaa gcagcataca caacatcaac 1680
 ttgttttaaa gtggtcaaga ccaataagac ctattgtctc agcattgctg aaatatctaa 1740
 tactctcttc ggagaattca gaatcgtccc gttactagtt gagatcctca aagatgacgg 1800
 ggtagagaa gccaggctctg gctagttgag tcaattataa aggagttgga aagatggcat 1860

tgtatcacct atcttctgcg acatcaagaa tcaaaccgaa tgccggcgcg tgctcgaatt 1920
 ccatgttgcc agttgaccac aatcagccag tgctcatgcg atcagattaa gccttgtcaa 1980
 tagtctcttg attaagaaaa aa 2002

<210> 7

<211> 577

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> NDV HN protein (AAA46659)

<400> 7

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 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 Ser 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 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
 305 310 315 320
 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 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 Pro
 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 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 tagttagcag agttgtacta gagaacgaag aaagagaagc aaagaatact 60

tggcgctgg ttttccggat cgcagtccta tctctaatag taatgacatt agctatctct 120

gtagccgccc tggatatacag catggaggct agcacaccga acgaccttgc gggcatatcg 180

acggtgatct ccagggcaga ggatagggtt acatctttac tcaattcaaa tcaagatgtg 240

gtagataggg tatataaaca ggtggccctt gagtccccgc tggcgttgtt gaatactgag 300

tctataatta tgaatgcaat aacttctctt tcctatcaaa ttaatggggc tgcaaatagt 360

agtgggtgtg gggcacctgt tcatgaccgc gattatatgt ggggggtagg taaagagctc 420

atagtagatg acacaagtga tgccacttca ttctatcctt cagcatatca agaacacctg 480

aactttatcc cggcgcccac cacaggatca ggctgcactc ggataccctc attcgacatg 540

agcgctaccc actattgtta tactcacaat gtgatattat ctggctgcag agatcactca 600

cactcacatc agtatttggc actaggtgtg ctccggacat ctgcaacagg gagggatttc 660

ttttctactc tgcgttccat caatttagat gacacccaaa atcggaagtc ttgcagtgtg 720

agtgcaactt ctttaggttg tgatatgctg tgctctaaag tcacagagac tgaggaggag 780

gattataagt cagttacccc cacatcaatg gtgcatggaa ggttagggtt tgacggtcag 840

taccatgaga aggacttaga cgtcacagtc ttatttaagg attgggttgc aaattaccgc 900

ggagtgggag gaggggtctct tattgacgac cgtgtatggt tcccagttta cggcgggcta 960
aaaccaatt cgcctagcga cactgcacaa gaagggaat atgtaataata caagcgtat 1020
aataacacat gccccgatga acaagattac caagttcgga tggctaagtc ctctataag 1080
cctggacggt ttggtgggaa gcgcgtacag caagccatcc tatctatcaa agtatcaaca 1140
tctttgggcg aggacccggt gctgactgta ccgccaata cagttacact catgggggcc 1200
gaaggcagaa tcttcacagt aggaacatct cttttcttgt accagcgagg gtcttcatac 1260
ttttctctg ccttactata ccctatgaca gtgcgcaaca aaacagccac tcttcatagt 1320

ccttatacat ttaatgcgtt cactcggcca gtagtgtcc cttgccaggc atcagcaagg 1380
tgccctaact catgtatcac tggagtctat actgatccgt accctgtagt cttccatagg 1440
aatcacacct tgcgaggggt gttcgggaca atgcttgata atgaacaagc aaggctcaat 1500
cccgtatctg caatatttga ctacacatct cgcagtcgca taaccgggt aagttcgatc 1560
agcaccaagg cagcatacac gacatcgaca tgttttaag ttgtcaagac caataaagtg 1620
tattgtctta gcattgcaga aatatccaat actctatttg gggaattcag gatcgttcct 1680
ttactggtcg agatttctca ggatgatagg gtttaa 1716

<210> 9

<211> 571

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> NDV HN protein (AAQ54638)

<400> 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
 385 390 395 400
 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 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
 545 550 555 560

Leu Leu Val Glu Ile Leu Lys Asp Asp Arg Val
 565 570

<210> 10

<211> 14

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> NDV HN linear epitope region 1

<400> 10

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

1 5 10

<210> 11

<211> 14

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> NDV HN linear epitope region 2

<400> 11

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

1 5 10

<210> 12

<211> 78

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> NDV HN signal sequence

<400> 12

atggaccgtg tcgtctcccg cgtggctcctc gagaacgagg agcgtgaggc caagaacacc 60

tggcgccttg tctttcgt 78

<210> 13

<211> 26

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> NDV HN signal peptide

<400> 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

<210> 14

<211> 1638

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> NDV HN DNA without signal seq

<400> 14

gtgcgcgtcc tctcccttat tgtcatgacc ctgcceatct ccgtcgccgc cctcgtctac	60
agcatggagg ctagcacccc caacgatctc gccggaatct cgactgttat ctcccgcgcc	120
gaggaccgcg tcacctccct cctcaactcc aaccaggatg tcgttgatcg cgtctacaag	180
caggtcgccc tcgagtcgcc tctcgccctc cttaacaccg agagcatcat tatgaacgcc	240
attacctccc tcagctacca gattaacggc gccgccaact cgtccggctg cggcgccccc	300
gtccatgacc ctgattacat cggcggcgctc ggcaaggagc tcctcgctga cgacactagc	360
gatgccacgt ccttctaccc tagcgccctac caggagcacc tcaacttcat cctcgccccc	420
actaccggct cgggctgcac ccgcattccc agcttcgaca tgtccgccac tcactactgc	480
tacaccata acgtcatcct ttccgggttgc cgcgaccact cccacagcca ccagtacctc	540
gccctcggag ttcttcgtac gtccgccacc ggccgcgtct tttttccac cctccgcagc	600
atcaacctcg acgataccca gaaccgcaag agctgctcgg tctccgccac cccgctcggc	660
tgcgacatgc tctgtccaa gggtaccgag acggaggagg aggattacaa gtccgttacc	720
cccacttcca tgggtccagg ccgccttggc ttcgacggcc agtaccacga gaaggacctc	780
gacgtcaccg ttctctttaa ggactgggtt gccaactacc ccggcgctcg cggcggctcc	840
ctcatcgatg acccgctctg gtttctctgc tacggtggtc tcaagcctaa cagccctcc	900
gataccgccc aggagggtaa gtacgtgatc tacaagcgt acaacaacac ctgccctgac	960
gagcaggatt accaggtcgg catggccaag tcctcgtaca agcccggtcg ttccggcggc	1020
aagcgcgtcc agcaggccat tctctcgatc aagggtctga ccagcctcgg agaggacccc	1080
gtgtcaccg tccccctaa caccgtcacc cttatggcg ccgagggccg catcctcacc	1140
gtcggtacct cccacttct ctaccagcg ggctcgagct acttttccc tgcccttctt	1200
taccccatga ctgttcgcaa caagactgct accctccaca gccctacac cttaacgcc	1260
ttcacgcgcc ccggaagcgt cccctgccag gcgagcgcgc gctgcctaa ctctgcatt	1320
accggcgctt acaccgacc ttacctgtc gtctttcacc gcaaccatac ccttcgcggc	1380
gtcttcggta ctatgcttga taacgagcag gccgcctca acccgtctc cgccattttc	1440
gactacatt cccgctcccg taccaccgc gtctctcca cctccacaa ggccgcctac	1500
accacctcca cctgctttaa gggtgtcaag actaacaagg tctactgcct ctccatcgcc	1560

gagattagca acaccctctt cggagagttc cgcattgtcc cctgctcgt cgagatcctc 1620
aaggacgatc gcgtttaa 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 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 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 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 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
atgggacgcg cggttaacag agtcgcgctg gagaatgagg aaagagaagc aaagaacaca 60
tggcgcctgg ttttccggat cgcagtcctta cttttaatgg taatgactct agctatctcc 120
gcagctgccc tggcatacag tgcgggggcc agtacgccgc acgacctcgc aggcataatcg 180
actgtgatct ctaagacaga ggataagggt acgtctttac tcagttcgag tcaagatgtg 240
atagatagga tatacaagca ggtggctctt gaatccccac tggcgctact aaacactgaa 300

tctatgatta tgaatgcaat aacctctctt tcttatcaaa ttaacggggc tgcgaacaat 360
agcggatgtg gggcgccctgt tcatgaccca gattatatcg gggggatagg caaagaactc 420
atagtggacg acatcagtga tgtcacatca ttttatcctt ctgcatatca agaacacttg 480
aatctcatcc cggcgccctac tacaggatcc ggttgcaact ggataccctc atttgacatg 540
agcaccaccc attattgtta tactcacaat gtgatactat ccggttgacg agatcactca 600
cactcacatc aatacttagc acttggtgtg ctccggacat ctgcaacagg gaggggtattc 660

ttttctactc tgcgctccat caatttagat gacacccaaa atcggaagtc ctgcagtgtg 720

agtgaacccc ctttaggttg tgatatgctg tgctctaagg tcacaggac tgaagaggag 780

gattacaagt cagttgcccc cacaccaatg gtgcacggaa ggctagggtt tgacggtcaa 840

taccatgaga aggacttaga caccacggtc ttatttaagg attgggtggc aaattaccca 900

ggagtgggag gagggctctt tattgacaac cgtgtatggt tcccagtta cggagggtc 960

aaaccaatt caccagtg cactgcacaa gaagggaat atgtaata taagcgccat 1020

aacaacacat gccccgataa acaagattac caaatcgga tggctaagtc ttcataaaa 1080

cccggcgcat ttggtgaaa ggcgtacag caagccatct tatccatcaa agtgtcaaca 1140

tccttgggta aggacccggt gctgactatt ccacctaata caatcacact catgggagcc 1200

gaaggcagaa tcctcacagt agggacatct cacttcttgt accaacgagg gtcttcatat 1260

ttctcccctg cttattata tcccatgaca gtaaataaca aaacggctac actccatagt 1320

ccttatacgt ttaatgcttt cactcggcca ggtagtcccc cttgccaggc atcagcaaga 1380

tgccccaaact catgcatcac tggagtctat actgatccat atcccttaat cttccatagg 1440

aatcatactc tacgaggggt cttcgggacg atgcttgatg atgaacaagc gagacttaac 1500

cccgatctg cagtattcga caacatatcc cgcagtcgtg tcacccgggt gaggttcaagc 1560

agcaccaagg cagcatacac aacatcgaca tgttttaaag ttgtcaagac caataaagct 1620

tattgtctta gtattgcaga aatatccaat accctattcg gggaatttag gatcggtccc 1680

ttattagttg agatcctcaa ggatgataga 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 80
 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

 145 150 155 160
 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 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 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 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	agtcgtgctg	gagaatgagg	aaagagaagc	aaagaacaca						60
tggcgccctgg	ttttccggat	cgcagtcctta	cttttaatgg	taatgactct	agctatctcc						120
gcagctgccc	tggcatacac	tacggggggcc	agtacgccgc	acgacctcgc	aggcatatcg						180
actgtgatct	ccaagacaga	agataagggtt	acatctttac	tcagtttgag	tcaagatgtg						240
atagataaga	tatacaagca	ggtggctctt	gaatccccgc	tggcgctact	aaacactgaa						300
tctataatta	tgaatgcaat	aacctctctt	tcttatcaaa	ttaacggggc	tgcgaacaat						360
agcggatgtg	gggcgcctgt	tcatgacceca	gattatatcg	gggggatagg	caaagaactc						420
atagtggacg	acatcagtga	tgtcacatca	ttttatcctt	ctgcatatca	agaacacttg						480
aatttcaccc	cggcgcctac	tacaggatcc	ggttgcactc	ggataccctc	atttgacatg						540
agcaccaccc	attattgtta	tactcacaat	gtgatactat	ccggttgcag	agatcactca						600
cactcacatc	aatacttagc	acttgggtgtg	cttcggacat	ctgcaacagg	gagggtattc						660
ttttctactc	tgcgctccac	caatttagat	gacacccaaa	atcggaagtc	ctgcagtgtg						720
agtgaacccc	ctttagggtg	tgatatgctg	tgctctaagg	tcacagagac	tgaagaggag						780
gattacaagt	cagttgcccc	cacatcaatg	gtgcacggaa	ggctagggtt	tgacggtcaa						840
taccatgaga	aggacttaga	caccacggtc	ttattttaagg	attgggtggc	aaattaccca						900
ggagcgggag	gagggtcttt	tattgacgac	cgtgtatggt	tcccagttta	cggagggtc						960
aaaccaatt	caccagtga	cactgcacaa	gaagggaat	atgtaatata	caagcgccat						1020
aacaacacat	gccctgatga	acaagattac	caaattcgga	tggctaagtc	ttcatataaa						1080
cccgggcgat	ttggtggaaa	gcgcgtacag	caagccatcc	tatccatcaa	agtgtcaaca						1140
tccttgggta	aggacccggt	gctgactatt	ccaccttaata	caatcacact	catgggagcc						1200
gaaggcagaa	tcctcacagt	agggacatct	cacttcttgt	accaacgagg	gtcttcatat						1260
ttctcccctg	ccttattata	tcccatgaca	gtaaataaca	aaacggctac	actccatagt						1320

ccctatacgt ttaatgcttt cactcggcca ggtagtgtcc cttgccaggc atcagcaaga 1380

tgccccaact catgcatcac tgggggtctat actgatccat atcccttaat cttccatagg 1440

aatcatactc tacgaggggt cttcgggacg atgcttgatg atgaacaagc gagacttaac 1500

cccgatatctg cagtattcga caacatatct cgcagtcgtg tcacccgggt gaggttcaagc 1560

agcaccaagg cagcatacac gacatcgaca tgttttaaag ttgtcaagac caataaaact 1620

tattgtctta gtattgcaga aatatccaat accctattcg gggaatttag 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 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

<210> 20

<211> 525

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> NDV HN mature protein sequence (without signal pepetide of
 ACM67348)

<400> 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
 305 310 315 320
 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
 385 390 395 400
 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
 465 470 475 480
 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 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

atgggcccggg ccgtcaaccg cgtggcgttg gagaacgagg agcgggaggc caagaacacc 60

tggaggctcg tgttcgcat cgccgtgctc ctgctcatgg tcatgacctt ggcgatctcg 120

gccgcggccc tggcctactc cgccggtgcg agcaccgccg acgacctggc cgggatcagc 180

accgtcatct cgaagaccga ggacaagggtg acgtccctgc tcagctcgtc ccaggacgtt 240

atcgaccgca tctacaagca agtcgccttg gagagccctc tggccctgct caacacggag 300

agcatgatca tgaacgcgat caccicccctg agctaccaga tcaacggggc cgcaacaat 360

tccgggtgcg gcgccccgt gcacgacctt gactacatcg gcgggatcgg caaggaactc 420

atcgttgacg acatcagcga cgtgacgtcg ttctaccctt ccgcctacca ggagcacctc 480

aacttcatcc ccgccccgac caccggggagc ggctgcaccc ggatcccgtc cttcgacatg 540

tccaccacgc actattgcta caccacaac gtgatcctgt cggggtgccg cgaccacagc 600

cactgcacc agtacctggc gctgggcgtc ctcaggacct ccgcgaccgg ccgcgtgttc 660

ttctccactc tccgtccat caacctggac gatacgaga accgcaagtc ctgcagcgtg 720

tccgccacgc ccctcggtcg cgacatgctc tgcaccaagg tgaccggcac cgaggaggag 780
gactacaagt ccgtggcccc caccatgatg gtgcacgggc ggctcggtctt cgatggtcag 840
taccacgaga aggacctgga cagcaccgtg ctcttcaagg actgggtggc gaactacccc 900
gggtgtggggg gcggtagctt catcgacaac agagtctggt tccccgtgta cgggggcctg 960
aagcccaact cccctccga cagggcccag gaggggaagt acgtcatcta caagcggcac 1020

aacaacacct gcccgacaa gcaggactat cagatccgga tggccaaaag ctctacaag 1080
cccgccgct tcgggggcaa gagagtccag caggcgatcc tctccatcaa ggtgagcacg 1140
agcctcgga aggacccgtt cctgaccatc cccccgaaca ccatcacctt catgggcgcc 1200
gaggggagaa tctcactgt cggcacctcc cacttctgt accagcgggg cagctcgtac 1260
ttcagcccgg cgctcctgta cccgatgacc gtcaacaaca agaccggcac gctgcactcg 1320
ccctacacct tcaacgcctt caccgcccc ggagcgccc cgtgccaggc ctccgcccgc 1380
tgccgaact cgtgcatcac cggggtctac accgacctt acccgctgat ctccaccgc 1440

aaccacacgc tcaggggggt gttcgggacc atgctcgacg acgagcaggc tcgcctgaac 1500
cccgtagcgc ccgtcttga caacatctcc cgcagccgag tcacgagagt ctctcgtcc 1560
tcgacgaagg ccgctacac cagctccacc tgcttcaagg tggtaagac caacaaagcc 1620
tactgcctct ccacgctga gatctccaac accctcttcg gcgagttccg gatcgtgcc 1680
ctcttggtgg agatcctgaa ggacgaccgc gtg 1713

<210> 23

<211> 1575

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> NDV HN codon-optimized (duckweed) encoding mature protein

(ACM67348)

<400> 23

tccgccggtg cgagcacccc gcacgacctg gccgggatca gcaccgtcat ctgaagacc 60
gaggacaagg tgacgtccct gctcagctcg tcccaggacg ttatcgaccg catctacaag 120
caagtgcct tggagagccc tctggccctg ctcaacacgg agagcatgat catgaacgcg 180
atcacctccc tgagctacca gatcaacggg gccggaaca attccgggtg cggcgcccc 240
gtgcacgacc ctgactacat cggcgggatc ggcaaggaac tcacgttga cgacatcagc 300
gagtgacgt cgttctaccc ctccgcctac caggagcacc tcaacttcat ccccgcccc 360
accacgggga gcggtgcac ccggatcccc tccttcgaca tgtccaccac gcactattgc 420

tacaccaca acgtgatcct gtcggggtgc cgcgaccaca gccactcgca ccagtacctg 480
gcgctgggcg tcctcaggac ctccgcgacc ggccgcgtgt tcttctccac tctccgctcc 540
atcaacctgg acgatacgca gaaccgcaag tcctgcagcg tgtccgccac gccctcggc 600
tgcgacatgc tctgctccaa ggtgaccggc accgaggagg aggactacaa gtccgtggcc 660
cccacccga tggcgcacgg gcggctcggc ttcatgggtc agtaccacga gaaggacctg 720
gacacgaccg tgctcttcaa ggactgggtg gcgaactacc ccggtgtggg gggcggtagc 780
ttcatcgaca acagagtctg gttccccgtg tacggggggc tgaagcccaa ctccccctcc 840

gacacggccc aggaggggaa gtacgtcatc tacaagcggc acaacaacac ctgcccggac 900
aagcaggact atcagatccg gatggccaaa agctcctaca agcccggcgg ctccgggggc 960
aagagagtcc agcaggcgat cctctccatc aaggtgagca cgagcctcgg caaggaccgc 1020
gtcctgacca tcccccgaa caccatcacc ctcatgggcg ccgaggggag aatcctcact 1080
gtcggcacct cccacttctt gtaccagcgg gcgagctcgt acttcagccc ggcgctcctg 1140
taccgatga ccgtcaacaa caagaccgcc acgtgcact cgcctacac ctcaacgcc 1200
ttcacccgcc ccggcagcgc cccgtgccag gcctccgcc gctgcccga ctcgtgcatc 1260

accggggtct acaccgacc ttaccgctg atcttcacc gcaaccacac gtcagggggg 1320
gtgttcggga ccatgctcga cgacgagcag gctgcctga acccgtcag cgcctcttc 1380
gacaacatct cccgcagccg cgtcacgaga gtctcctcgt cctcgacgaa ggccgcgtac 1440
accacgtcca cctgcttcaa ggtggttaag accaacaag cctactgcct ctccatcgt 1500
gagatctcca acacctctt cggcgagttc cggatcgtgc cctcttggg ggagatcctg 1560
aaggacgacc gcgtg 1575

<210> 24

<211> 4

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> ER retention seq

<400> 24

Lys Asp Glu Leu

1

<210> 25

<211> 93

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> alpha amylase signal seq

<400> 25

atgcaggctcc tgaacacgat ggtcaacaag cacttcctct ccctgtccgt cctcatcgctc 60

ctcctcgggc 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

atgggccggg ccgtcaaccg cgtggcgttg gagaacgagg agcgggaggc caagaacacc 60

tggaggtctg tgttcgcat cgccgtgctc ctgctcatgg tcatgacct ggcgatctcg 120

gccgcggccc tggcctac 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
---	---	----