

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：96131328

C07K14/125 (2006.01)

※申請日期：96.8.24

※IPC 分類：

C12N15/63 (2006.01)

A61K39/17 (2006.01)

A61K39/1295 (2006.01)

一、發明名稱：

禽類新城病病毒(Newcastle disease virus, NDV)凝血素-神經氨酸苷酶(haemagglutinin-neuraminidase, HN)重組融合蛋白及含彼之疫苗

二、申請人：(共1人)

姓名或名稱：高生製藥股份有限公司

代表人：林家修

住居所或營業所地址：高雄縣湖內鄉田尾村中山路一段634號

國籍：中華民國

三、發明人：(共3人)

姓名：1. 朱純燕

2. 黃繼平

3. 王祥宇

國籍：1-3 中華民國

四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項第一款或第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種禽類新城病病毒(NDV)凝血素-神經氨酸苷酶(HN)重組融合蛋白及含彼之疫苗，特別是指一種以原核生物表達系統產生之穀胱甘肽硫轉移酶(Glutathione S-transferase, GST)-凝血素-神經氨酸苷酶(HN)重組融合蛋白，以及含有該重組融合蛋白之抗新城病疫苗。

【先前技術】

新城病病毒(Newcastle disease virus, NDV)屬於副黏病毒科(Paramyxoviridae)中第一型鳥類副黏病毒(Type 1 Avian Paramyxovirus)，依毒性可分為強毒內臟型(Velogenic Viscerotropic Newcastle Disease, VVND)、強毒神經型(Velogenic)、中間毒型(Mesogenic)、弱毒型(Lentogenic)，以及無毒腸道型；不同毒性的新城病病毒會造成不同程度的禽類呼吸道傳染疾病，其中強毒內臟型甚至可以造成禽類胃腸道的損害，死亡率接近90%；在台灣，新城病病毒曾經造成三次重大疫情以及嚴重的經濟損失，因此，提升雞隻對於新城病病毒的免疫力，對禽類養殖業來說是非常重要的。

新城病病毒(NDV)為一種具有鞘膜的RNA病毒，該鞘膜係由雙層脂質構成，其上具有兩種突出之醣蛋白(glycoprotein)—凝血素-神經氨酸苷酶(haemagglutinin-neuraminidase，簡稱HN蛋白)以及融合蛋白(fusion protein，簡稱F蛋白)，禽類抗體可對該病毒醣蛋白產生反應；凝血素-神經氨酸苷酶(HN蛋白)，可使新城病病毒具有凝血功能以及神經氨酸苷酶(neuraminidase, NA)兩種活性，HN蛋白並可與含有唾液酸的受體(sialic acid containing

receptor)結合；而融合蛋白(F 蛋白)則可使新城病病毒鞘膜與宿主細胞膜產生融合，並使新城病病毒穿透宿主細胞膜而進入宿主細胞內。新城病病毒的感染力(infectivity)可以被 NH 蛋白的單株抗體或單一特異性抗血清(monospecific antisera)給中和掉；除了兩個無毒性的病毒株(Ulster strain 以及 Queensland strain)之外，一般認為 NH 蛋白不需要經過轉譯後切割處理(post-translational cleavage)來進行修飾(modification)。

在新城病病毒 NH 蛋白中，大多數誘導中和的抗體之抗原決定位置(neutralizing epitopes)，以及大多數可能的醣類附著位置(carbohydrate attachment sites)是位於該蛋白分子靠近 C 端之部份；HN 蛋白主要的疏水區域則接近其 N 端，係為第 27~54 個胺基酸，因此第 1~26 個胺基酸為相對親水性；推測 HN 蛋白係以其靠近 N 端的位置附著在新城病病毒的鞘膜上，且不具有被切割的訊號序列(signal sequence)；NH 蛋白辨認寄主細胞表面含有唾液酸的受體，促進 F 蛋白的融合能力，因此可使病毒穿透細胞表面，並且具有神經氨酸苷酶(NA)的作用，會將唾液酸自子代病毒(progeny virus)粒子移除，以避免子代病毒自身凝結(self-agglutination)；所以，HN 蛋白決定了病毒的感染趨性(tropism)及毒性(virulence)，在新城病病毒感染過程中扮演關鍵角色；因此，HN 蛋白為發展基因疫苗主要的目標。

習用禽類新城病疫苗係包含活毒疫苗及死毒疫苗兩種，活毒疫苗係使用弱毒型或無毒腸道型之新城病病毒株作為疫苗，而死毒疫苗則以強毒性或中間毒性之新城病病毒株經不活化處理後作為疫苗；因此，病毒的大量培養是禽類新城病疫苗生產中極為重要的部分；習用強毒性或中間毒性之

新城病病毒的製造，係將強毒性或中間毒性病毒株接種至禽類受精卵之尿囊腔內以大量繁殖病毒，然而此方式需大量取得適當禽類受精卵作為製造材料，且需要大量操作人工，以及較長時間的培養，不但費工、耗時且成本高。

由此可見，上述習用禽類新城病疫苗的製作仍有諸多缺失，實非一良善之設計者，而亟待加以改良。

本案發明人鑑於上述習用禽類新城病疫苗的製作所衍生的各項缺點，乃亟思加以改良創新，並經多年苦心孤詣潛心研究後，終於成功研發完成本件禽類新城病病毒(NDV)凝血素-神經氨酸苷酶(HN)重組融合蛋白及含彼之疫苗。

【發明內容】

本發明之目的即在於提供一種禽類新城病病毒(NDV)凝血素-神經氨酸苷酶(HN)重組融合蛋白，該重組融合蛋白係以原核生物表達系統大量生產所得，其製程較真核生物表達系統簡便、產量大，生產速度快，安全性高，成本低廉，具有經濟效益。

本發明之次一目的係在於提供一種含有該禽類新城病病毒(NDV)凝血素-神經氨酸苷酶(HN)重組融合蛋白的疫苗，係將該重組融合蛋白直接添加於傳統疫苗之基本配方中，以提高禽類之免疫效力。

本發明之另一目的係在於提供一種含有該禽類新城病病毒(NDV)凝血素-神經氨酸苷酶(HN)重組融合蛋白的疫苗，該疫苗除了可以增加禽類之免疫效力外，並可減少傳統疫苗的全病毒使用之比例，以節省成本。

可達成上述發明目的之禽類新城病病毒(NDV)凝血素-神經氨酸苷酶(HN)重組融合蛋白，係由一穀胱甘肽硫轉移酶(Glutathione S-transferase, GST)以及一禽類新城病病毒凝血素-神經氨酸苷酶(HN)蛋白片段所組成。

該禽類新城病病毒凝血素-神經氨酸苷酶(HN)蛋白片段係選自該凝血素-神經氨酸苷酶(HN)蛋白靠近 C 端之片段；於一較佳實施例中，該凝血素-神經氨酸苷酶(HN)蛋白片段係為如 SEQ ID No: 1 所示之凝血素-神經氨酸苷酶(HN)蛋白基因第 796 個鹽基以後所編碼之蛋白質部分，係具有如 SEQ ID No: 5 所示之胺基酸序列。

該禽類新城病病毒凝血素-神經氨酸苷酶(HN)重組融合蛋白係藉由基因轉殖方式而得，係將禽類新城病病毒凝血素-神經氨酸苷酶(HN)蛋白片段之基因選殖到含有穀胱甘肽硫轉移酶(GST)基因之表現載體中，形成含有穀胱甘肽硫轉移酶(GST)-凝血素-神經氨酸苷酶(HN)蛋白片段之基因序列的載體，再將該載體經轉殖到原核生物後大量表現而得之重組融合蛋白；於一較佳實施例中，該穀胱甘肽硫轉移酶(GST)-凝血素-神經氨酸苷酶(HN)蛋白片段之基因序列為具有如 SEQ ID No: 5 所示之核苷酸序列，該穀胱甘肽硫轉移酶(GST)係具有如 SEQ ID No: 7 所示之胺基酸序列，該重組融合蛋白(GST-HNs)則為具有如 SEQ ID No: 9 所示之胺基酸序列。

該含有穀胱甘肽硫轉移酶(GST)基因之表現載體包含但不限於 pGEX 載體系統以及 pET 載體系統等；於一較佳實施例中，該表現載體係為 pGEX-4T-3；該原核生物表現系統包含但不限於大腸桿菌(*Escherichia coli*)以及沙門氏桿菌(*Salmonella*)等，於一較佳實施例中，該原核生物表現系統

係為大腸桿菌(*E. coli*) DH5 α 。

本發明進一步提供一種含有該禽類新城病病毒凝血素-神經氨酸苷酶(HN)重組融合蛋白之疫苗，該疫苗係為在傳統抗禽類新城病病毒疫苗或含有抗禽類新城病病毒之混合型疫苗中，加入上述之禽類新城病病毒凝血素-神經氨酸苷酶(HN)重組融合蛋白；該疫苗係包括如上述之禽類新城病病毒凝血素-神經氨酸苷酶(HN)重組融合蛋白，禽類新城病病毒及/或一種以上之其他禽類病原菌，以及適當之載劑或佐劑。

該禽類新城病病毒凝血素-神經氨酸苷酶(HN)重組融合蛋白係先經去活性反應處理；該去活性反應係為以福馬林(formalin)或抗生素 kanamycin 於 37°C 下進行反應 1-16 小時；於一較佳實施例中，該去活性反應係為以福馬林於 37°C 下進行反應 16 小時。

該傳統抗禽類新城病病毒疫苗係為含有弱毒型或無毒腸道型之新城病病毒株的活病毒之疫苗，或為含有經去活性反應處理之強毒性或中間毒性之新城病病毒株之疫苗；於一較佳實施例中，該傳統抗禽類新城病病毒疫苗係含有去活性後之新城病病毒石井株。

該含有抗禽類新城病病毒之混合型疫苗係為含有新城病病毒以及一種以上之其他禽類病原菌的疫苗；該新城病病毒係為弱毒型或無毒腸道型之新城病病毒株的活病毒，或是經去活性反應處理之強毒性或中間毒性之新城病病毒株；該其他禽類病原菌包含但不限於禽類傳染性鼻炎桿菌(Infectious coryza, IC)，家禽霍亂桿菌(Fowl cholera, FC)，傳染性支氣管炎病毒(Infectious bronchitis, IB)，禽類產卵下降症病毒(Egg drop syndrome,

EDS)，以及傳染性華氏囊病毒(Infectious bursal disease, IBD)等；於一較佳實施例中，該混合型疫苗係為含有新城病病毒石井株以及禽類傳染性鼻炎桿菌 A 型(IC-A)之疫苗。

該佐劑包含但不限於水性氫氧化鋁膠，明礬，Freund 氏不完全佐劑，油狀佐劑，水溶性佐劑，或水包油包水雙相佐劑(water-in-oil-in-water, W/O/W)；於一較佳實施例中，該佐劑為水性氫氧化鋁膠。

【實施方式】

實施例一 材料與方法

1. 新城病病毒(NDV)凝血素-神經氨酸苷酶(HN)基因的選殖

將新城病病毒石井株(Isizi)的病毒 RNA (viral RNA)以 Trizol[®] 萃取，萃取的方法係按照其操作手冊進行(Life Technologies, USA)，萃取出之病毒 RNA 係進行反轉錄聚合酶連鎖反應(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)；RT-PCR 係使用 RT-PCR 試劑套組(RT-PCR Reagent Kit, Invitrogen, USA)來進行，反應內容物包含：RT-PCR buffer (最終反應濃度為 50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 75 mM KCl, 3mM MgCl₂)、SuperScript™ RNase H-Reverse Transcriptase、1mM dNTP、0.5 μM primer、2.5 U Taq DNA polymerase，以及 5 μl 病毒 RNA；將上述 50 μl 混合物置於 60°C 5 分鐘以將 RNA 變性(denature)，42°C 45 分鐘以合成 cDNA，接著進行聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)進行擴增反應(amplification)以及定序(sequencing)。

以 PCR 對 HN 蛋白的 cDNA 序列進行擴增反應，PCR 所用之引子 (primers) 序列如 SEQ ID No: 1 (正向引子) 及 SEQ ID No: 2 (反向引子) 所示，係自其 DNA 序列設計而來 (Genbank accession number Y18898 以及 Y19021)；PCR 反應條件為：94°C 1 分鐘、55°C 1 分鐘、72°C 1 分鐘，共 40 個循環，最後以 70°C 反應 10 分鐘以進行延伸反應 (elongation) (Thermocycler, TaKaRa, Japan)；擴增之產物以 1.5% 瓊脂凝膠 (agarose gel) 電泳分析，以溴化乙錠 (ethidium bromide, EtBr) 染色後，置於紫外光下照射觀察。

PCR 擴增所得之 HN 蛋白的 cDNA 序列如 SEQ ID No: 3 所示，以限制酶 *Not I* 進行酶切後，將該 cDNA 片段選殖到 pGEM-T-Easy 載體 (Invitrogen, USA) 以形成 pGEM-T-Easy-HN 質體 (plasmid) (如圖 1 (a) 所示)，其後再以 DNA 定序套組 (Rhodamine Terminator Cycle Sequence Ready Reaction Kit, PE Applied Biosystems, USA) 進行定序確認序列無誤；如序列表 SEQ ID NO: 3 所示，經新城病病毒石井株選殖出的 HN 蛋白的 cDNA 序列，其中轉譯區域 (coding region) 由 1731 個核苷酸所組成，將該轉譯區域命名為 HNC，如圖 1 (b) 所示，經演譯 (deduced) 後得到具有 577 個胺基酸之 HN 蛋白，其 HN 蛋白序列如 SEQ ID NO: 4 所示。

再將該 pGEM-T-Easy-HN 質體以限制酶 *Not I* 以及 *Alu I* 進行酶切，將 HN 基因之 cDNA 自該質體切下，如圖 1 (b) 所示，HN 基因會被限制酶 *Alu I* 切成三個片段，分別為第 1 至第 349 個鹼基對、第 350 個鹼基對至第 793 個鹼基對、以及第 794 個鹼基對之後，將第 794 個鹼基對之後的基因片段

命名為 HNs，HNs 基因片段所編碼之蛋白質序列如 SEQ ID NO: 5 所示(其開放讀碼框架(open reading frame, ORF)不變)；並以凝膠電泳將 HNs 基因片段之 DNA 與其他基因片段和 pGEM-T-Easy 載體之 DNA 分離，再以膠體純化套組(gel purification kit, Amersham Pharmacia Biotech, USA)純化酶切後之 HNs 基因片段之 DNA，將該 DNA 選殖到表現載體 pGEX-4T-3 (Amersham Pharmacia Biotech, USA)之穀胱甘肽硫轉移酶(Glutathione S-transferase, GST)基因序列之 3'端之後(GST 基因序列如 SEQ ID No: 6 所示，其編碼之 GST 胺基酸序列如 SEQ ID No: 7 所示)，以形成 pGEX-4T-3-HNs 質體，如圖 2 所示，pGEX-4T-3-HNs 質體上具有 GST-HNs 重組融合蛋白之 DNA 序列(SEQ ID No: 8)，並以 DNA 定序確認 HNs 基因片段之 DNA 已插入該表現載體；再將上述接合後的 pGEX-4T-3-HNs 質體利用轉殖作用(transformation)送入大腸桿菌(*E. coli* DH5 α)中。

2. 新城病病毒 HN 重組融合蛋白的表現

將上述經轉殖作用而含有 pGEX-4T-3-HNs 質體之大腸桿菌 DH5 α ，以含有 100 μ g/ml ampicillin 之 LB 固體培養基於 37 $^{\circ}$ C 下培養隔夜，挑選單一菌落(a single colony)至 5 ml 含有 100 μ g/ml ampicillin 之 LB 液體培養基內，於 37 $^{\circ}$ C 下培養隔夜；取前述 1 ml 之隔夜培養液至 50 ml 含有 100 μ g/ml ampicillin 之 LB 液體培養基內，於 37 $^{\circ}$ C 下以 120 rpm 振盪培養 4 小時後，再加入 2 mM IPTG 以誘導 HNs 重組融合蛋白(即 GST-HNs 蛋白，其胺基酸序列如 SEQ ID No: 9 所示)表現，加入 2 mM IPTG 後繼續培養 2-4 小時；每隔 1 小時取一樣本，並進行去活性試驗。

3. 新城病病毒 HN 重組融合蛋白的去活性(inactivation)試驗

將經過 IPTG 誘導 4 小時的轉殖 pGEX-4T-3-HNs 質體之大腸桿菌 DH5 α 進行去活性試驗，去活性試驗共分為三種處理方法：(a)熱處理；(b)福馬林 (formalin)處理；(c)抗生素 kanamycin 處理；熱處理係於 60°C 水浴進行去活性(inactivation) 15、30、45 以及 60 分鐘，或於 55°C 水浴進行去活性 30 分鐘；福馬林處理之方法為使用 0.128 %福馬林(Sigma, USA)於 37°C 下進行去活性 16 小時；抗生素處理則是以 200 μ g kanamycin 於 37°C 下震盪 1 小時；去活性後，以 SDS-PAGE 檢驗蛋白質狀態，並取 100 μ l 去活性之大腸桿菌 DH5 α 於 LB 固體培養基上培養，以檢驗剩餘活菌數(remaining viable bacteria)。

4. 西方墨漬法

SDS-PAGE 電泳分析之後，以西方墨漬法來決定蛋白質專一性(protein specificity)，首先，將蛋白質轉移到尼龍膜(Hybond-P, Amersham, HK)上，並以 1%小牛血清蛋白(bovine serum albumin, BSA，係由 10% BSA diluent/blocking solution kit (KPL, USA)稀釋 10 倍而來)填平(blocking)該尼龍膜上的空位，再以抗-新城病病毒 Ishi 株的兔血清(rabbit serum anti-Ishi strain NDV，稀釋 2560 倍，Kaohsiung Biological Product Co., 台灣)作為初級抗體(primary antibody)，並以辣根過氧化物酶標記山羊抗兔抗體(HRP goat anti-rabbit antibody, KPL, USA)作為次級抗體來偵測新城病病毒 HN 蛋白，最後以 ECL 試劑(ECL reagent)反應，並偵測其化學螢光訊號(chemi-luminescent signal)。

5. 疫苗抗原及疫苗的製備

將新城病病毒石井株接種至受精 11 天之雞胚胎中，孵化 96 小時後採收該病毒，分析該病毒之 50% 胚胎感染劑量 (50% embryonic infectivity dose, EID₅₀)，然後將病毒以最終濃度為 0.2% 的福馬林 (formalin, Sigma, USA) 去活性；禽類傳染性鼻炎桿菌 A 型 (Infectious coryza, IC-A) (即嗜血桿菌 *Haemophilus paragallinarum*, HP，係為造成禽類傳染性鼻炎之病原菌) 或家禽霍亂桿菌 (Fowl cholera, FC) (即巴斯德桿菌 *Pasteurella multocida*，係為造成家禽霍亂之病原菌) 則以 3% 血清培養基 (serum broth) 培養 18-20 小時後採收，並以 0.2% 福馬林去活性；疫苗中的活性成分分別為：10^{9.0} EID₅₀ 新城病病毒、1x10⁹ CFU/ml (colony forming unit) 的 IC-A、1x10⁹ CFU/ml 的巴斯德桿菌 (*P. multocida*) 以及 10μg/ml HNs 重組融合蛋白；並分別將上述各活性成分與佐劑 (adjuvant) -- 30% 鋁膠或 25% 雙相佐劑 (water-in-oil-in-water, W/O/W) 混合製成疫苗。

6. 雞隻免疫試驗設計 1

共有 3 組試驗組及 1 組對照組，每組各包含 5 隻 5 週大無特定病原 (Specific-pathogen-free, SPF) 雞隻；將 3 組試驗組之雞隻以肌肉內注射 (intramuscular injection, i.m.) 分別接種 1/2 劑量 (1 ml) 的新城病病毒石井株、(NDV+HNs 重組融合蛋白) 以及 HNs 重組融合蛋白疫苗，對照組則未注射任何疫苗；所有雞隻進行為期 2 週的觀察，以確認是否有負面效果產生；接種疫苗後 1 至 4 週內，以 7 天為一間隔，所有的雞隻皆進行採血，以測量雞新城病之凝血抑制抗體效價 (Hemagglutinin inhibition antibody titers, HI

titers)。

7. 雞隻免疫試驗設計 2

共有 3 組試驗組及 1 組對照組，每試驗組各包含 10 隻 5 週大無特定病原(SPF)雞隻，而對照組包含 5 隻 5 週大無特定病原(SPF)雞隻；將 3 組試驗組之雞隻以肌肉內注射(i.m.)分別接種 1/2 劑量(1 ml)的(NDV+IC)、(NDV+IC+FC)以及(NDV+IC+HNs 重組融合蛋白)疫苗，對照組則未注射任何疫苗；接種疫苗 2 週後，再以肌肉注射(i.m.)感染 1,000 MLD ($10^{3.75}$ EID)新城病病毒強毒株 Sato strain；所有雞隻再進行為期 2 週的觀察，觀察新城病的臨床症狀以及計算存活率，並於接種疫苗後 1 週及 2 週時進行採血，以測量雞新城病之凝血抑制抗體效價(Hemagglutinin inhibition antibody titers)。

8. 凝血抑制抗體測試(Hemagglutinin inhibition antibody test)

在接種疫苗後每週收集血清樣本，將各樣本置於 56°C 去活化 30 分鐘，儲存於 -20°C 並同時進行凝血抑制抗體測試：將血清樣本置於 96 孔 V 形盤內進行連續 2 倍稀釋，再與 4 個凝血單位(HA units)的新城病病毒混合並置於 25°C 30 分鐘之後，加入 1% 雞紅血球以進行接續之培養，並觀察各樣本凝血狀況；能完全抑制紅血球凝集之最高稀釋倍數的倒數即為凝血抑制抗體效價。

實施例二 新城病病毒 HN 重組融合蛋白的表現

HNs 重組融合蛋白(GST-HNs)的分子量為 60.4 kDa，包含 26 kDa 的穀胱甘肽硫轉移酶(Glutathione S-transferase, GST)以及 34.4 kDa 的 HNs 蛋白；以新城病病毒超免疫血清(NDV hyperimmune serum)進行西方墨漬法分析，結果如圖 3 所示，圖 3 第 2 道箭頭標示處即為本發明 HNs 重組融合蛋白，其蛋白質大小經西方墨漬法分析後證實為 60.4 kDa。

經 IPTG 誘導之大腸桿菌(*E. coli* DH5 α)的蛋白質表現量如圖 4 所示，圖 4 (a)為陰性對照組(negative control)，係為經轉殖而含有表現載體 pGEX-4T-3 之大腸桿菌(*E. coli* DH5 α)的蛋白質表現量，不論有無 IPTG 誘導，在 SDS-PAGE 上皆偵測不到 HNs 重組融合蛋白；圖 4 (b)則為經轉殖而含有 pGEX-4T-3-HNs 質體之大腸桿菌(*E. coli* DH5 α)的蛋白質表現量，經 IPTG 誘導 1.5 小時後，在 SDS-PAGE 上可偵測到 60.4 kDa 大小的 HNs 重組融合蛋白(如圖 4 (b)第 8 道所示)，HNs 重組融合蛋白的表現量隨著 IPTG 誘導時間的增加(3 小時)而增加(如圖 4 (b)第 9 道所示)，未經 IPTG 誘導者，則皆偵測不到 HNs 重組融合蛋白(如圖 4 (b)第 10-12 道所示)。

實施例三 新城病病毒 HN 重組融合蛋白的去活性試驗

在去活性試驗方面，以 55-65°C 加熱後，HNs 重組融合蛋白會被降解(如圖 5 (a)、(b)所示)，以福馬林或 kanamycin 於 37°C 下進行去活性反應 16 小時後，則仍可在 SDS-PAGE 上看到清楚的 HNs 重組融合蛋白條帶(bands)(如

圖 5 (c)、表 1 所示)；因此，以大腸桿菌表現之 HN_s 重組融合蛋白並不建議以加熱方式來進行去活性。

表 1 不同去活性方法之結果

去活性方法	剩餘活菌數	HN _s 重組融合蛋白條帶 在 SDS-PAGE 上的分析
60°C > 15 分鐘	0	蛋白嚴重降解
65°C, 15 分鐘	0	蛋白條帶消失
55°C, 15 分鐘	100	蛋白條帶清楚呈現
0.128% 福馬林, 37°C, 16 小時	0	蛋白條帶清楚呈現
200µg kanamycin, 37°C, 1 小時	110	蛋白條帶清楚呈現
200µg kanamycin, 37°C, 16 小時	0	蛋白條帶清楚呈現

實施例四 雞隻免疫試驗 1

所有的雞隻皆保持臨床上正常的狀態，且對疫苗沒有產生局部反應；表 2 顯示施打 NDV 疫苗或 HN_s 重組融合蛋白疫苗之雞隻的凝血抑制抗體效價(HI titers)，其中反應最高者來自接種 NDV+HN_s 疫苗後 2 週之雞隻，其凝血抑制抗體效價(HI titers)為 1:194，明顯較其他組別的效價(1:2 至 1:16)高。

表 2 新城病疫苗效價測試

疫苗	雞隻數 ³	凝血抑制抗體效價(GMT) ⁴ (接種後週數)			
		1 週	2 週	3 週	4 週
ND Lot 870 ¹	5	4	16	11	7
ND+HNs ²	5	2	194	97	32
HNs ²	5	2	2	2	2
對照組	5	2	2	2	2

¹ 新城病死毒(inactivated)鋁膠疫苗

² 含有 10 µg/ml HN₂ 重組融合蛋白

³ 將 5 週大無特定病原(SPF)雞隻以肌肉內注射(i.m.)接種 1/2 劑量(1 ml)的疫苗，每週採血並測量雞新城病之凝血抑制抗體效價

⁴ 幾何平均抗體效價(Geometric Mean Titer, GMT)

實施例五 雞隻免疫試驗 2

表 3 所示為雞隻接種疫苗後的新城病病毒凝血抑制抗體效價(HI titers)反應，以及接種 1,000 MLD ($10^{3.75}$ EID)新城病病毒強毒株 Sato strain 後的存活率；接種 NDV+IC+HN₂ 以及 NDV+IC+FC (O/W/O)疫苗的雞隻，在接種不同株(strain)新城病病毒之後，仍維持臨床上正常的狀態；而在接種 NDV+IC 以及 NDV+IC+FC (以鋁膠為佐劑者)疫苗的組別中，則分別有 1 隻及 2 隻雞隻產生局部反應；所有未接種疫苗的對照組雞隻在接種新城病病毒之後，則皆發病死亡，且具有強毒神經型新城病(Velogenic ND)的損害症

狀；具有最高的凝血抑制抗體效價(HI titers)之雞隻群組為接種 NDV+IC+HNs 疫苗者，接種該疫苗 2 週後，其凝血抑制抗體效價(HI titers) 為 1:64，較其他組別的效價(1:24 至 1:42)高。

表 3 新城病多價疫苗效價測試

疫苗	佐劑	雞隻數 ⁵	凝血抑制抗體效價(GMT) ⁶ (接種後週數)		感染後 存活率 ⁷
			1 週	2 週	
ND+IC ¹	鋁膠	10	2	42	90%
ND+IC+HNs ²	鋁膠	10	2	64	100%
ND+IC+FC ³	鋁膠	10	2	24	80%
ND+IC+FC	w/o/w ⁴	10	4	37	100%
對照組	無	5	2	2	0%

¹ 新城病死毒+禽類傳染性鼻炎(IC)死毒鋁膠合併疫苗

² 含有 10 µg/ml HN_s 重組融合蛋白

³ 新城病死毒+禽類傳染性鼻炎(IC)死毒+家禽霍亂(FC)死毒合併疫苗

⁴ 水包油包水(water-in-oil-in-water)雙相佐劑

⁵ 將 5 週大無特定病原(SPF)雞隻以肌肉內注射(i.m.)接種 1/2 劑量(1 ml)的疫苗，每週採血並測量雞新城病之凝血抑制抗體效價

⁶ 幾何平均抗體效價(Geometric Mean Titer, GMT)

⁷ 接種疫苗 2 週後，感染 1,000 MLD ($10^{3.75}$ EID)新城病病毒強毒株 Sato strain

由此可知，以原核生物表現之 HN_s 重組融合蛋白疫苗可以保護雞隻免於強毒神經型新城病的侵害。由上述實施例可知，本發明 HN_s 重組融合蛋

白可以增進傳統全毒疫苗(包括活毒疫苗及死毒疫苗)以及多價疫苗(即新城病病毒與其他禽類病毒合併之疫苗)的免疫效果。

本發明所提供之禽類新城病病毒(NDV)凝血素-神經氨酸苷酶(HN)重組融合蛋白及含彼之疫苗，與其他習用技術相互比較時，更具有下列之優點：

1. 由於完整的禽類新城病病毒表面抗原分子 HN 蛋白表現困難，本發明利用基因重組及轉殖技術，只取 HN 蛋白近 C 端之蛋白質片段的基因來表現，不會有表現困難的問題產生。

2. 本發明之重組融合蛋白係以原核生物來大量生產，其製程簡便，產量大，生產速度快，安全性高，成本低廉。

3. 本發明之重組融合蛋白可直接添加於傳統疫苗之基本配方中，即可明顯提升免疫效果。

4. 相對於傳統疫苗，含有本發明之重組融合蛋白的疫苗，其主要成份沒有變動，對消費者而言沒有抗原改變而可能使免疫失敗的疑慮。

上列詳細說明係針對本發明之一可行實施例之具體說明，惟該實施例並非用以限制本發明之專利範圍，凡未脫離本發明技藝精神所為之等效實施或變更，均應包含於本案之專利範圍中。

綜上所述，本案不但在方法上確屬創新，並能較習用疫苗增進上述多項功效，應已充分符合新穎性及進步性之法定發明專利要件，爰依法提出申請，懇請 貴局核准本件發明專利申請案，以勵發明，至感德便。

【圖式簡單說明】

圖 1 (a)為 pGEM-T-Easy-HN 質體構築圖；圖 1 (b)為編碼 HN 蛋白之基因結構示意圖。

圖 2 為 pGEX-4T-3-HNs 質體構築圖。

圖 3 為 HNs 重組融合蛋白(GST-HNs)西方墨漬法分析結果；第 1 道：轉殖 pGEX-4T-3 載體之大腸桿菌 DH5 α 的蛋白質萃取物；第 2 道：轉殖 pGEX-4T-3-HNs 質體之大腸桿菌 DH5 α 的蛋白質萃取物，箭頭標示處即為本發明 HNs 重組融合蛋白(60.4 kDa)；第 3 道：新城病病毒蛋白質萃取物。

圖 4 為以 SDS-PAGE 電泳後經 coomassie blue 染色分析大腸桿菌 DH5 α 的蛋白質表現量；圖 4 (a)為轉殖 pGEX-4T-3 載體之大腸桿菌 DH5 α 的蛋白質萃取物；第 1-3 道：分別經 IPTG 誘導 0、1.5、3 小時；第 4-6 道：無 IPTG 誘導；圖 4 (b)為轉殖 pGEX-4T-3-HNs 質體之大腸桿菌 DH5 α 的蛋白質萃取物；第 7-9 道：分別經 IPTG 誘導 0、1.5、3 小時，方框標示處即為本發明 HNs 重組融合蛋白(60.4 kDa)；第 10-12 道：無 IPTG 誘導。

圖 5 為以 SDS-PAGE 電泳後經 coomassie blue 染色分析 HNs 重組融合蛋白去活性試驗之結果；圖 5 (a)第 1-3 道：分別為小牛血清蛋白(BSA) 125、250、500 μ g；第 4 道：無 IPTG 誘導之轉殖 pGEX-4T-3-HNs 質體的大腸桿菌 DH5 α 的蛋白質萃取物；第 5 道：經 IPTG 誘導 4 小時之轉殖 pGEX-4T-3-HNs 質體的大腸桿菌 DH5 α 的蛋白質萃取物；第 6-8 道：分別為以 60 $^{\circ}$ C 進行去活化 30、45、60 分鐘後之轉殖 pGEX-4T-3-HNs 質體的大腸桿菌 DH5 α 的蛋白質萃取物；圖 5 (b)為轉殖 pGEX-4T-3-HNs 質體之大腸

桿菌 DH5 α 的蛋白質萃取物；第 1 道：無 IPTG 誘導；第 2 道：經 IPTG 誘導 4 小時；第 3 道：以 65 $^{\circ}$ C 進行去活化 15 分鐘；圖 5 (c) 為轉殖 pGEX-4T-3-HNs 質體之大腸桿菌 DH5 α 的蛋白質萃取物；第 1 道：無 IPTG 誘導；第 2-3 道：分別經 IPTG 誘導 2、4 小時；第 4 道：以 60 $^{\circ}$ C 進行去活化 15 分鐘；第 5 道：以 55 $^{\circ}$ C 進行去活化 30 分鐘；第 6-7 道：分別以 kanamycin 於 37 $^{\circ}$ C 下進行去活性 1、16 小時；第 8 道：以福馬林(fomalin)於 37 $^{\circ}$ C 下進行去活性 16 小時。

【主要元件符號說明】

無

五、中文發明摘要：

一種禽類新城病病毒(NDV)凝血素-神經氨酸苷酶(HN)重組融合蛋白，係由一穀胱甘肽硫轉移酶(Glutathione S-transferase, GST)以及一禽類新城病病毒凝血素-神經氨酸苷酶(HN)蛋白片段所組成，該重組融合蛋白(GST-HNs)具有如 SEQ ID No: 9 所示之胺基酸序列，係為將含有 HN 蛋白片段之基因選殖到含有 GST 基因之表現載體中，再將該載體經轉殖到原核生物後大量表現而得之重組融合蛋白；將該重組融合蛋白經去活性處理後，與含有禽類新城病病毒及/或一種以上之其他禽類病原菌以及適當之載劑或佐劑混合後，製得可提升禽類免疫力之含有禽類新城病病毒凝血素-神經氨酸苷酶(HN)重組融合蛋白之疫苗。

六、英文發明摘要：

十、申請專利範圍：

1. 一種禽類新城病病毒凝血素-神經氨酸苷酶(haemagglutinin-neuraminidase, HN)重組融合蛋白，係由一穀胱甘肽硫轉移酶(Glutathione S-transferase, GST)以及一禽類新城病病毒凝血素-神經氨酸苷酶(HN)蛋白片段所組成。
2. 如申請專利範圍第1項所述之禽類新城病病毒凝血素-神經氨酸苷酶(HN)重組融合蛋白，其中該重組融合蛋白係具有如 SEQ ID No: 9 所示之胺基酸序列。
3. 如申請專利範圍第1項所述之禽類新城病病毒凝血素-神經氨酸苷酶(HN)重組融合蛋白，其中該穀胱甘肽硫轉移酶(GST) 係具有如 SEQ ID No: 7 所示之胺基酸序列，以及該禽類新城病病毒凝血素-神經氨酸苷酶(HN)蛋白係具有如 SEQ ID No: 5 所示之胺基酸序列。
4. 如申請專利範圍第1項所述之禽類新城病病毒凝血素-神經氨酸苷酶(HN)重組融合蛋白，其係為將禽類新城病病毒凝血素-神經氨酸苷酶(HN)蛋白片段之基因選殖到含有穀胱甘肽硫轉移酶(GST)基因之表現載體中，形成含有穀胱甘肽硫轉移酶(GST)-凝血素-神經氨酸苷酶(HN)蛋白片段之基因序列的載體，再將該載體經轉殖到原核生物後大量表現而得之重組融合蛋白。
5. 如申請專利範圍第4項所述之禽類新城病病毒凝血素-神經氨酸苷酶(HN)重組融合蛋白，其中該含有穀胱甘肽硫轉移酶(GST)基因之表現載體包含 pGEX 載體系統以及 pET 載體系統等。

6. 如申請專利範圍第 4 項所述之禽類新城病病毒凝血素-神經氨酸苷酶(HN)重組融合蛋白，其中該原核生物包含大腸桿菌(*Escherichia coli*)以及沙門氏桿菌(*Salmonella*)等。
7. 一種含有禽類新城病病毒凝血素-神經氨酸苷酶(HN)重組融合蛋白之疫苗，包括如申請專利範圍第 1 項所述之禽類新城病病毒凝血素-神經氨酸苷酶(HN)重組融合蛋白，禽類新城病病毒，以及適當之載劑或佐劑。
8. 如申請專利範圍第 7 項所述之含有禽類新城病病毒凝血素-神經氨酸苷酶(HN)重組融合蛋白之疫苗，其中該禽類新城病病毒凝血素-神經氨酸苷酶(HN)重組融合蛋白係經去活性反應處理。
9. 如申請專利範圍第 8 項所述之含有禽類新城病病毒凝血素-神經氨酸苷酶(HN)重組融合蛋白之疫苗，其中該去活性反應係為以福馬林(formalin)或抗生素 kanamycin 於 37°C 下進行反應 16 小時。
10. 如申請專利範圍第 7 項所述之含有禽類新城病病毒凝血素-神經氨酸苷酶(HN)重組融合蛋白之疫苗，其中該禽類新城病病毒係為弱毒型或無毒腸道型之新城病病毒株的活病毒。
11. 如申請專利範圍第 7 項所述之含有禽類新城病病毒凝血素-神經氨酸苷酶(HN)重組融合蛋白之疫苗，其中該禽類新城病病毒係為經去活性反應處理之強毒性或中間毒性之新城病病毒株。
12. 如申請專利範圍第 7 項所述之含有禽類新城病病毒凝血素-神經氨酸苷酶(HN)重組融合蛋白之疫苗，其中該佐劑為水性氫氧化鋁膠，明礬，Freund 氏不完全佐劑，油狀佐劑，水溶性佐劑，或水包油包水雙相佐劑

(water-in-oil-in-water, W/O/W)。

13. 一種含有禽類新城病病毒凝血素-神經氨酸苷酶(HN)重組融合蛋白之疫苗，包括如申請專利範圍第 1 項所述之禽類新城病病毒凝血素-神經氨酸苷酶(HN)重組融合蛋白，禽類新城病病毒，一種以上之其他禽類病原菌，以及適當之載劑或佐劑。
14. 如申請專利範圍第 13 項所述之含有禽類新城病病毒凝血素-神經氨酸苷酶(HN)重組融合蛋白之疫苗，其中該禽類新城病病毒凝血素-神經氨酸苷酶(HN)重組融合蛋白係經去活性反應處理。
15. 如申請專利範圍第 14 項所述之含有禽類新城病病毒凝血素-神經氨酸苷酶(HN)重組融合蛋白之疫苗，其中該去活性反應係為以福馬林(formalin)或抗生素 kanamycin 於 37°C 下進行反應 16 小時。
16. 如申請專利範圍第 13 項所述之含有禽類新城病病毒凝血素-神經氨酸苷酶(HN)重組融合蛋白之疫苗，其中該禽類新城病病毒係為弱毒型或無毒腸道型之新城病病毒株的活病毒。
17. 如申請專利範圍第 13 項所述之含有禽類新城病病毒凝血素-神經氨酸苷酶(HN)重組融合蛋白之疫苗，其中該禽類新城病病毒係為經去活性反應處理之強毒性或中間毒性之新城病病毒株。
18. 如申請專利範圍第 13 項所述之含有禽類新城病病毒凝血素-神經氨酸苷酶(HN)重組融合蛋白之疫苗，其中該其他禽類病原菌包含禽類傳染性鼻炎桿菌(Infectious coryza, IC)，家禽霍亂桿菌(Fowl cholera, FC)，傳染性支氣管炎病毒(Infectious bronchitis, IB)，禽類產卵下降症病毒(Egg drop

syndrome, EDS), 以及傳染性華氏囊病毒(Infectious bursal disease, IBD)。

19. 如申請專利範圍第 13 項所述之含有禽類新城病病毒凝血素-神經氨酸苷酶(HN)重組融合蛋白之疫苗，其中該佐劑為水性氫氧化鋁膠，明礬，Freund 氏不完全佐劑，油狀佐劑，水溶性佐劑；或水包油包水雙相佐劑 (water-in-oil-in-water, W/O/W)。

序列表

<110> 高生製藥股份有限公司

<120> 禽類新城病病毒(NDV)凝血素-神經氨酸苷酶(HN)重組融合蛋白及含彼之疫苗

<160> 9

<210> 1

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引子, ND-HN F'

<400> 1

ATAAGCTTAT GGACCGCGCC GTTAGCCA

28

<210> 2

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引子, ND-HN R'

<400> 2

ATATCTAGAA CGCGCCGGCA TTCGGTTTG

29

<210> 3

<211> 1894

<212> DNA

<213> 新城病病毒(Newcastle disease virus, NDV)

<400> 3

GGCCGCGGGA ATTCGATTAT AAGCTTATGG ACCGCGCCGT TAGCCAAGTT GCGTTAGAGA 60

ATGATGAAAG AGAGGCAAAA AATACATGGC GCTTGATATT CCGGATTGCA ATCTTATTCT 120

TAACAGTAGT GACCTTGGCT GTATCTGTAG CCTCCCTTTT ATATAGCATG GGGGCTAGCA 180

CACCTAGCGA TCTTGTAGGC ATACCGACTA GGATTCCAG GGCAGAAGAA AAGATTACAT 240

200909445

CTACACTGG TTCCAATCAA GATGTAGTAG ATAGGATATA TAAGCAAGTG GCCCTTGAGT 300
 CTCCGTTGGC ATTGTTAAAA ACTGAGACCA CAATTATGAA CGCAATAACA TCTCTCTCTT 360
 ATCAGATTAA TGGAGCTGCA AACAAACAGTG GGTGGGGGGC ACCTATCCAT GACCCAGATT 420
 ATATAGGGGG GATAGGCAA GAACTCATTG TAGATGATGC TAGTGATGTC ACATCATTCT 480
 ATCCCTCTGC ATTTCAAGAA CATCTGAATT TTATCCCGGC GCCTACTGCA GGATCAGGTT 540
 GCACTCGAAT ACCCTCATT GACATGAGTG CTACCCATTA CTGCTACACC CATAATGTAA 600
 TATTGTCTGG ATGCAGAGGT CACTCACATT CATATCAGTA TTTAGCACTT GGTGTGCTCC 660
 GGACATCTGC AACAGGGAGG GTATTCTTTT CTA CTCTGCG TTCCATCAAC CTGGACGACA 720
 CCCAAAATCG GAAGTCTTGC AGTGTGAGTG CAACTCCCCT GGGTTGTGAT ATGCTGTGCT 780
 CGAAAGTCAC GGAGACAGAG GAAGAAGATT ATA ACTCAGC TGCCCTACG CGGATGGTAC 840
 ATGGGAGGTT AGGGTTTCGAC GGCCAGTACC ACGAAAAGGA CCTAGATGTC ACAACATTAT 900
 TCGGGGACTG GGTGGCCAAC TACCCAGGAG TAGGGGGTGG ATCTTTTATT GACAGCCGCG 960
 TATGGTTCTC AGTCTACGGA GGGTAAAAAC CCAATTCACC CAGTGACACT GTACAGGAAG 1020
 GGAAATATGT GATATAACA CGATACAATG ACACATGCC AGATGAGCAA GACTACCAGA 1080
 TTCGAATGCC CAAGTCTTCG TATAAGCCTG GACGGTTTGG TGGGAAACGC ATACAGCAGG 1140
 CTATCTTATC TATCAAGGTG TCAACATCCT TAGGCGAAGA CCCGGTACTG ACTGTACCGC 1200
 CCAACACAGT CACTCATG GGGGCCGAAG GCAGAATTCT CACAGTAGGG ACATCTCATT 1260
 TCTTGATCA ACGAGGGTCA TCATACTTCT CTCCCGGTT ATTATATCCT ATGACAGTCA 1320
 GCAACAAAAC AGCCACTCTT CATAGTCCTT ATACATTCAA TGCCTTCACT CGGCCAGGTA 1380
 GTATCCCTTG CCAGGCTTCA GCAAGATGCC CCAACCCGTG TGTTACTGGA GTCTATACAG 1440
 ATCCATATCC CCTAATCTTC TATAGAAACC ACACCTGCG AGGGGTATTC GGGACAATGC 1500
 TTGATGGTGT ACAAGCAAGA CTTAACCTG CGTCTGCAGT ATTCGATAGC ACATCCCGCA 1560
 GTCGCATTAC TCGAGTGAGT TCAAGCAGTA CCAAAGCAGC ATACACAACA TCAACTTGTT 1620
 TAAAGTGGT CAAGACTAAT AAGACCTATT GTCTCAGCAT TGCTGAAATA TCTAATACTC 1680
 TCTTCGGAGA ATTCAGAATC GTCCCGTTAC TAGTTGAGAT CCTCAAAGAT GACGGGGTTA 1740
 GAGAAGCCAG GTCTGGCTAG TTGAGTCAAT TATAAAGGAG TTGGAAAGAT GGCATTGTAT 1800
 CACCTATCTT CTGCGACATC AAGAATCAAA CCGAATGCCG GCGCGTTCTA GATATAATCA 1860
 CTAGTGAATT CGCG 1874

<210> 4

<211> 577

<212> PTR

<213> 新城病病毒(Newcastle disease virus, NDV)

<400> 4

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 Val 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 Ala 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 Gly 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 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 Gly 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 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 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 Asp Asp Gly Val Arg Glu Ala Arg Ser
 565 570 575
 Gly
 577

- <210> 5
- <211> 312
- <212> PTR
- <213> 新城病病毒 (Newcastle disease virus, NDV)

<400> 5

Val Pro Thr Arg Met Val His Gly Arg Leu Gly Phe Asp Gly Gln Tyr
 1 5 10 15
 His Glu Lys Asp Leu Asp Val Thr Thr Leu Phe Gly Asp Trp Val Ala
 20 25 30
 Asn Tyr Pro Gly Val Gly Gly Gly Ser Phe Ile Asp Ser Arg Val Trp
 35 40 45
 Phe Ser Val Tyr Gly Gly Leu Lys Pro Asn Ser Pro Ser Asp Thr Val
 50 55 60

Gln Glu Gly Lys Tyr Val Ile Tyr Lys Arg Tyr Asn Asp Thr Cys Pro
 65 70 75 80
 Asp Glu Gln Asp Tyr Gln Ile Arg Met Ala Lys Ser Ser Tyr Lys Pro
 85 90 95
 Gly Arg Phe Gly Gly Lys Arg Ile Gln Gln Ala Ile Leu Ser Ile Lys
 100 105 110
 Val Ser Thr Ser Leu Gly Glu Asp Pro Val Leu Thr Val Pro Pro Asn
 115 120 125
 Thr Val Thr Leu Met Gly Ala Glu Gly Arg Ile Leu Thr Val Gly Thr
 130 135 140
 Ser His Phe Leu Tyr Gln Arg Gly Ser Ser Tyr Phe Ser Pro Ala Leu
 145 150 155 160
 Leu Tyr Pro Met Thr Val Ser Asn Lys Thr Ala Thr Leu His Ser Pro
 165 170 175
 Tyr Thr Phe Asn Ala Phe Thr Arg Pro Gly Ser Ile Pro Cys Gln Ala
 180 185 190
 Ser Ala Arg Cys Pro Asn Pro Cys Val Thr Gly Val Tyr Thr Asp Pro
 195 200 205
 Tyr Pro Leu Ile Phe Tyr Arg Asn His Thr Leu Arg Gly Val Phe Gly
 210 215 220
 Thr Met Leu Asp Gly Val Gln Ala Arg Leu Asn Pro Ala Ser Ala Val
 225 230 235 240
 Phe Asp Ser Thr Ser Arg Ser Arg Ile Thr Arg Val Ser Ser Ser Ser
 245 250 255
 Thr Lys Ala Ala Tyr Thr Thr Ser Thr Cys Phe Lys Val Val Lys Thr
 260 265 270
 Asn Lys Thr Tyr Cys Leu Ser Ile Ala Glu Ile Ser Asn Thr Leu Phe
 275 280 285
 Gly Glu Phe Arg Ile Val Pro Leu Leu Val Glu Ile Leu Lys Asp Asp
 290 295 300
 Gly Val Arg Glu Ala Arg Ser Gly
 305 310 312

<210> 6

<211> 688

<212> DNA

<213> 日本血吸蟲 (*Schistosoma japonicum*)

<400> 6

ATGTCCCCTA TACTAGGTTA TTGAAAATT AAGGGCCTTG TGCAACCCAC TCGACTTCTT 60
 TTGGAATATC TTGAAGAAAA ATATGAAGAG CATTGTATG AGCGGATGA AGGTGATAAA 120

TGGCGAAACA AAAAGTTTGA ATTGGGTTTG GAGTTTCCCA ATCTTCCTTA TTATATTGAT 180
 GGTGATGTTA AATTAACACA GTCTATGGCC ATCATACGTT ATATAGCTGA CAAGCACAAAC 240
 ATGTTGGGTG GTTGTCCAAA AGAGCGTGCA GAGATTTCAA TGCTTGAAGG AGCGGTTTTG 300
 GATATTAGAT ACGGTGTTTC GAGAATTGCA TATAGTAAAG ACTTTGAAAC TCTCAAAGTT 360
 GATTTTCTTA GCAAGCTACC TGAATGCTG AAAATGTTTCG AAGATCGTTT ATGTCATAAA 420
 ACATATTTAA ATGGTGATCA TGTAACCCAT CCTGACTTCA TGTTGTATGA CGCTCTTGAT 480
 GTTGTTTTAT ACATGGACCC AATGTGCCTG GATGCGTTCC CAAAATTAGT TTGTTTTAAA 540
 AAACGTATTG AAGCTATCCC ACAAATTGAT AAGTACTTGA AATCCAGCAA GTATATAGCA 600
 TGGCCTTTGC AGGGCTGGCA AGCCACGTTT GGTGGTGGCG ACCATCCTCC AAAATCGGAT 660
 CTGGTTCCGC GTGGATCCCC GAATTCCC 688

<210> 7

<211> 229

<212> PTR

<213> 日本血吸蟲 (*Schistosoma japonicum*)

<400> 7

Met Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln Pro
 1 5 10 15
 Thr Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys Tyr Glu Glu His Leu
 20 25 30
 Tyr Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg Asn Lys Lys Phe Glu Leu
 35 40 45
 Gly Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile Asp Gly Asp Val Lys
 50 55 60
 Leu Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr Ile Ala Asp Lys His Asn
 65 70 75 80
 Met Leu Gly Gly Cys Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ile Ser Met Leu Glu
 85 90 95
 Gly Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly Val Ser Arg Ile Ala Tyr Ser
 100 105 110
 Lys Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val Asp Phe Leu Ser Lys Leu Pro Glu
 115 120 125
 Met Leu Lys Met Phe Glu Asp Arg Leu Cys His Lys Thr Tyr Leu Asn
 130 135 140
 Gly Asp His Val Thr His Pro Asp Phe Met Leu Tyr Asp Ala Leu Asp
 145 150 155 160
 Val Val Leu Tyr Met Asp Pro Met Cys Leu Asp Ala Phe Pro Lys Leu
 165 170 175
 Val Cys Phe Lys Lys Arg Ile Glu Ala Ile Pro Gln Ile Asp Lys Tyr
 180 185 190

200909445

Leu Lys Ser Ser Lys Tyr Ile Ala Trp Pro Leu Gln Gly Trp Gln Ala
 195 200 205
 Thr Phe Gly Gly Gly Asp His Pro Pro Lys Ser Asp Leu Val Pro Arg
 210 215 220
 Gly Ser Pro Asn Ser
 225 229

<210> 8

<211> 1789

<212> DNA

<213> 融合 DNA (fusion DNA)

<400> 8

ATGTCCCCTA TACTAGGTTA TTGGA AAAATT AAGGGCCTTG TGCAACCCAC TCGACTTCTT 60
 TTGGAATATC TTGAAGAAAA ATATGAAGAG CATTTGTATG AGCGCGATGA AGGTGATAAA 120
 TGGCGAAACA AAAAGTTTGA ATTGGGTTTG GAGTTTCCCA ATCTTCCTTA TTATATTGAT 180
 GGTGATGTTA AATTAACACA GTCTATGGCC ATCATACGTT ATATAGCTGA CAAGCACAAC 240
 ATGTTGGGTG GTTGTC AAAA AGAGCGTGCA GAGATTTCAA TGCTTGAAGG AGCGGTTTTG 300
 GATATTAGAT ACGGTGTTTC GAGAATTGCA TATAGTAAAG ACTTTGAAAC TCTCAAAGTT 360
 GATTTTCTTA GCAAGCTACC TGAAATGCTG AAAATGTTCG AAGATCGTTT ATGTCATAAA 420
 ACATATTTAA ATGGTGATCA TGTAACCCAT CCTGACTTCA TGTTGTATGA CGCTCTTGAT 480
 GTTGTTTTAT ACATGGACCC AATGTGCCTG GATGCGTTCC CAAAATTAGT TTGTTTTAAA 540
 TGGCCTTTGC AGGGCTGGCA AGCCACGTTT GGTGGTGGCG ACCATCCTCC AAAATCGGAT 660
 CTGGTTCCGC GTGGATCCCC GAATTCCCCT GTCCCTACGC GGATGGTACA TGGGAGGTTA 720
 GGGTTCGACG GCCAGTACCA CGAAAAGGAC CTAGATGTCA CAACATTATT CGGGGACTGG 780
 GTGGCCAAC T ACCCAGGAGT AGGGGGTGGGA TCTTTTATTG ACAGCCGCGT ATGGTTCTCA 840
 GTCTACGGAG GGTAAAAACC CAATTCACCC AGTGACACTG TACAGGAAGG GAAATATGTG 900
 ATATAAAGC GATACAATGA CACATGCCCA GATGAGCAAG ACTACCAGAT TCGAATGGCC 960
 AAGTCTTCGT ATAAGCTGG ACGGTTTGGT GGGAAACGCA TACAGCAGGC TATCTTATCT 1020
 ATCAAGGTGT CAACATCCTT AGGCGAAGAC CCGGTACTGA CTGTACCGCC CAACACAGTC 1080
 ACACTCATGG GGGCCGAAGG CAGAATTCTC ACAGTAGGGA CATCTCATTT CTTGTATCAA 1140
 CGAGGGTCAT CATACTTCTC TCCC GCGTTA TTATATCCTA TGACAGTCAG CAACAAAACA 1200
 GCCACTCTTC ATAGTCCTTA TACATTCAAT GCCTTCACTC GGCCAGGTAG TATCCCTTGC 1260
 CAGGCTTCAG CAAGATGCCC CAACCCGTGT GTTACTGGAG TCTATACAGA TCCATATCCC 1320
 CTAATCTTCT ATAGAAACCA CACCTTGCGA GGGGTATTCTG GGACAATGCT TGATGGTGTA 1380
 CAAGCAAGAC TTAACCCTGC GTCTGCAGTA TTCGATAGCA CATCCCGCAG TCGCATTACT 1440
 CGAGTGAGTT CAAGCAGTAC CAAAGCAGCA TACACAACAT CAACTTGTTT TAAAGTGGTC 1500
 AAGACTAATA AGACCTATTG TCTCAGCATT GCTGAAATAT CTAATACTCT CTTCGGAGAA 1560
 TTCAGAATCG TCCC GTTACT AGTTGAGATC CTCAAAGATG ACGGGGTTAG AGAAGCCAGG 1620
 TCTGGCTAGT TGAGTCAATT ATAAAGGAGT TGGAAAGATG GCATTGTATC ACCTATCTTC 1680
 TGGCAGATCA AGAATCAAAC CGAATGCCCG CGCGTTCTAG ATATAATCAC TAGTGAATTC 1740

<210> 9

<211> 542

<212> PRT

<213> 融合蛋白 (fusion protein)

<400> 9

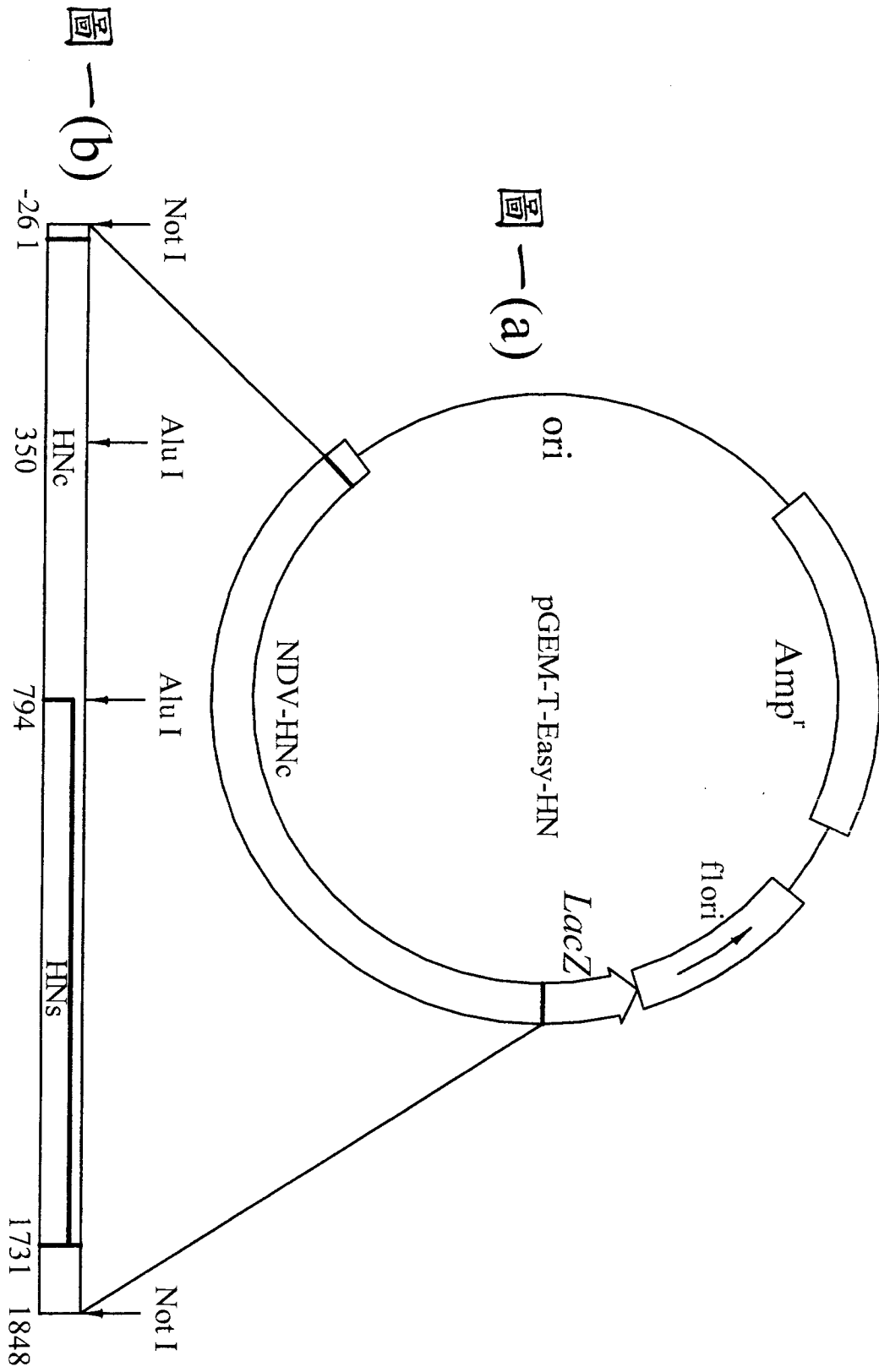
```

Met Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln Pro
1           5           10           15
Thr Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys Tyr Glu Glu His Leu
           20           25           30
Tyr Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg Asn Lys Lys Phe Glu Leu
           35           40           45
Gly Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile Asp Gly Asp Val Lys
           50           55           60
Leu Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr Ile Ala Asp Lys His Asn
65           70           75           80
Met Leu Gly Gly Cys Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ile Ser Met Leu Glu
           85           90           95
Gly Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly Val Ser Arg Ile Ala Tyr Ser
           100          105          110
Lys Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val Asp Phe Leu Ser Lys Leu Pro Glu
           115          120          125
Met Leu Lys Met Phe Glu Asp Arg Leu Cys His Lys Thr Tyr Leu Asn
           130          135          140
Gly Asp His Val Thr His Pro Asp Phe Met Leu Tyr Asp Ala Leu Asp
           145          150          155          160
Val Val Leu Tyr Met Asp Pro Met Cys Leu Asp Ala Phe Pro Lys Leu
           165          170          175
Val Cys Phe Lys Lys Arg Ile Glu Ala Ile Pro Gln Ile Asp Lys Tyr
           180          185          190
Leu Lys Ser Ser Lys Tyr Ile Ala Trp Pro Leu Gln Gly Trp Gln Ala
           195          200          205
Thr Phe Gly Gly Gly Asp His Pro Pro Lys Ser Asp Leu Val Pro Arg
           210          215          220
Gly Ser Pro Asn Ser Pro Val Pro Thr Arg Met Val His Gly Arg Leu
           225          230          235          240
Gly Phe Asp Gly Gln Tyr His Glu Lys Asp Leu Asp Val Thr Thr Leu
           245          250          255

```

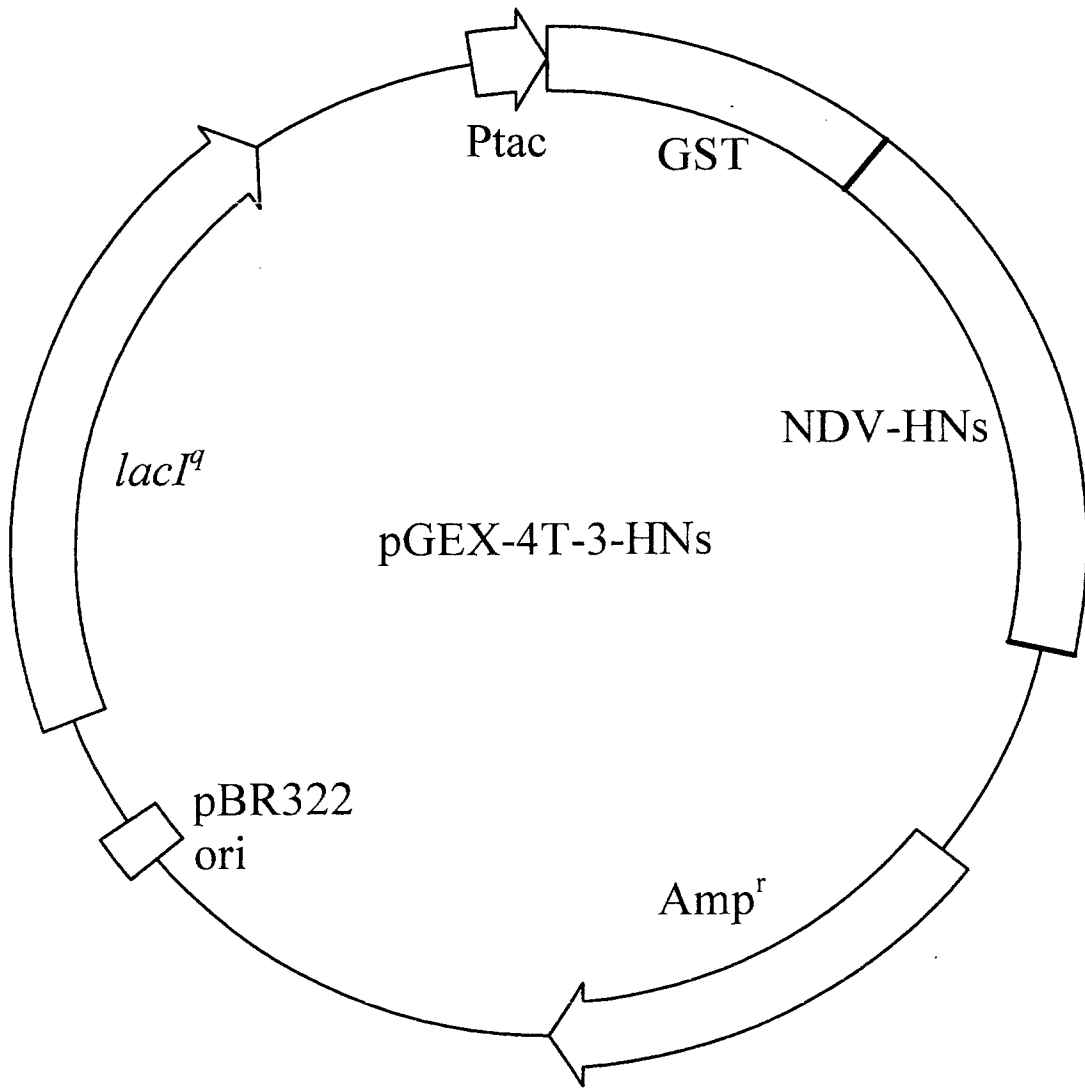
Phe Gly Asp Trp Val Ala Asn Tyr Pro Gly Val Gly Gly Gly Ser Phe
 260 265 270
 Ile Asp Ser Arg Val Trp Phe Ser Val Tyr Gly Gly Leu Lys Pro Asn
 275 280 285
 Ser Pro Ser Asp Thr Val Gln Glu Gly Lys Tyr Val Ile Tyr Lys Arg
 290 295 300
 Tyr Asn Asp Thr Cys Pro Asp Glu Gln Asp Tyr Gln Ile Arg Met Ala
 305 310 315 320
 Lys Ser Ser Tyr Lys Pro Gly Arg Phe Gly Gly Lys Arg Ile Gln Gln
 325 330 335
 Ala Ile Leu Ser Ile Lys Val Ser Thr Ser Leu Gly Glu Asp Pro Val
 340 345 350
 Leu Thr Val Pro Pro Asn Thr Val Thr Leu Met Gly Ala Glu Gly Arg
 355 360 365
 Ile Leu Thr Val Gly Thr Ser His Phe Leu Tyr Gln Arg Gly Ser Ser
 370 375 380
 Tyr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Tyr Pro Met Thr Val Ser Asn Lys Thr
 385 390 395 400
 Ala Thr Leu His Ser Pro Tyr Thr Phe Asn Ala Phe Thr Arg Pro Gly
 405 410 415
 Ser Ile Pro Cys Gln Ala Ser Ala Arg Cys Pro Asn Pro Cys Val Thr
 420 425 430
 Gly Val Tyr Thr Asp Pro Tyr Pro Leu Ile Phe Tyr Arg Asn His Thr
 435 440 445
 Leu Arg Gly Val Phe Gly Thr Met Leu Asp Gly Val Gln Ala Arg Leu
 450 455 460
 Asn Pro Ala Ser Ala Val Phe Asp Ser Thr Ser Arg Ser Arg Ile Thr
 465 470 475 480
 Arg Val Ser Ser Ser Ser Thr Lys Ala Ala Tyr Thr Thr Ser Thr Cys
 485 490 495
 Phe Lys Val Val Lys Thr Asn Lys Thr Tyr Cys Leu Ser Ile Ala Glu
 500 505 510
 Ile Ser Asn Thr Leu Phe Gly Glu Phe Arg Ile Val Pro Leu Leu Val
 515 520 525
 Glu Ile Leu Lys Asp Asp Gly Val Arg Glu Ala Arg Ser Gly
 530 535 540 542

十一、圖式：



圖一(a)

圖一(b)



圖二

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(2)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無