

19



Octrooiraad
Nederland

11

Publikatienummer: **9301272**

12 A TERINZAGELEGGING

21

Aanvraagnummer: **9301272**

22

Indieningsdatum: **20.07.93**

51

Int.Cl.⁶:
**C12N 15/48, C12N 15/86,
C12N 7/01, A61K 35/76,
A61K 39/42, C07K 15/04,
G01N 33/53**

43

Ter inzage gelegd:
16.02.95 I.E. 95/04

71

Aanvrager(s):
Aesculaap B.V. te Boxtel

72

Uitvinder(s):
**Dr. Matheus Hubertus Maria Noteborn te Leiden.
Dr. Guus Koch te Lelystad**

74

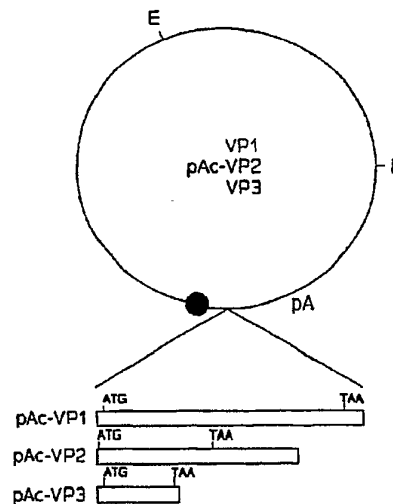
Gemachtigde:
**Ir. Th.A.H.J. Smulders c.s.
Vereenigde Octrooibureaux
Nieuwe Parklaan 97
2587 BN 's-Gravenhage**

54

Chicken Anemia Virus mutanten en vaccins en toepassingen gebaseerd op de virale eiwitten VP1, VP2 en VP3 of daarvoor coderende sequenties van dat virus

57

Nieuwe eiwitten van het Chicken Anemia Virus worden beschreven, alsmede composities ter voorkoming of behandeling van infecties met dat virus (CAV), in het bijzonder vaccins minder pathogeen dan het CAV zelf, maar toch leidend tot neutraliserende antilichamen in het geïmmuniseerde dier. Daarnaast worden composities die antilichamen tegen onderdelen van het CAV bevatten ter bestrijding van infecties met CAV en anti-idiotypen antilichamen beschreven. De uitvinding voorziet ook in antilichamen en testkits voor de detectie van CAV. Van CAV afgeleide recombinante DNA moleculen en gastheercellen daarmee getransfecteerd en vaccins gebaseerd op deze gastheercellen worden door deze uitvinding mogelijk gemaakt. Ook levend-virus vaccins waarbij een stuk DNA in een voor de gastheer infectueus virus wordt gebracht, horen tot de uitvinding. Daarnaast wordt voorzien in toepassingen van eiwitten van CAV in de inductie van apoptose, in het bijzonder bij tumorcellen. Verder wordt voorzien in de inductie van celdood middels genterapie.



● = polyhedrine promotor
ATG = initiatiecodon
TAA = stopcodon
pA = polyadenyleringssignaal
E = EcoRI

NL A 9301272

De aan dit blad gehechte afdruk van de beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en) bevat afwijkingen ten opzichte van de oorspronkelijk ingediende stukken; deze laatste kunnen bij de Octrooiraad op verzoek worden ingezien.

Titel: Chicken Anemia Virus mutanten en vaccins en
toepassingen gebaseerd op de virale eiwitten VP1, VP2
en VP3 of daarvoor coderende sequenties van dat virus.

De uitvinding heeft betrekking op nieuwe eiwitten en/of
polypeptides van het Chicken Anemia Virus. Daarnaast heeft zij
betrekking op vaccins en composities ter voorkoming of
behandeling van virusinfecties bij pluimvee, in het bijzonder
5 infecties met het Chicken Anemia Virus (CAV).

In het bijzonder heeft de uitvinding betrekking op
vaccins die minder pathogeen zijn dan het CAV zelf, maar toch
leiden tot het opwekken van neutraliserende antilichamen in
het geïmmuniseerde dier.

10 Daarnaast heeft de uitvinding betrekking op composities
die antilichamen tegen onderdelen van het CAV bevatten ter
bestrijding van infecties met CAV. Ook anti-idiotypen
antilichamen, die een met het antigeen overeenkomende
immunogeniciteit bezitten zijn een onderwerp van de
15 uitvinding.

De uitvinding heeft ook betrekking op antilichamen voor
de detectie of bestrijding van CAV-infecties. Ook
diagnostische testkits voor de detectie van CAV worden
beschreven.

20 Verder heeft de uitvinding betrekking op van CAV
afgeleide recombinante DNA moleculen die coderen voor
tenminste een immunogeen deel van een CAV-eiwit en
gastheercellen getransfecteerd met dergelijke recombinante DNA
moleculen. Vaccins gebaseerd op deze gastheercellen worden
25 door deze uitvinding mogelijk gemaakt.

Ook zogenaamde levend-virus vaccins waarbij een stuk DNA
coderend voor tenminste een immunogeen deel van een CAV-eiwit
in een voor de gewenste gastheer infectieus virus wordt
gebracht, zijn een onderwerp van de uitvinding.

30 Werkwijzen voor de prophylaxis of bestrijding van CAV-
infecties, in het bijzonder bij kippen, alsmede werkwijzen

9301272

voor de bereiding van recombinante delen van CAV omvattende sequenties en werkwijzen voor de bereiding van vaccins zijn eveneens onderwerpen van de onderhavige uitvinding.

Daarnaast heeft de uitvinding betrekking op toepassingen van de eiwitten van het CAV in de inductie van apoptose (geprogrammeerde celdood). In het bijzonder kunnen de eiwitten (polypeptides) worden toegepast bij inductie van apoptose bij tumorcellen.

Daarnaast kunnen de eiwitten volgens de uitvinding ook gebruikt worden bij de uitschakeling van andere ongewenste celpopulaties, zoals auto-immuun reactieve T-cellen in auto-immuun ziektes, zoals rheumatoïde arthritis, Lupus, etc.

Verder wordt middels de uitvinding ook voorzien in de inductie van celdood middels genterapie. Werkwijzen voor het maken van deze therapeutica en werkwijzen voor de behandeling daarmee zijn eveneens onderwerpen van de uitvinding.

Het chicken anemia virus (CAV) is een recent gekarakteriseerd DNA-virus (Noteborn en De Boer, 1990). Het behoort tot een nieuwe virus-familie. CAV veroorzaakt in jonge kippen anemie door destructie van erythroblastoïde voorlopercellen en immuundeficientie door depletie van thymocyten. Lesies treden op in de milt en lever (Jeurissen et al., 1989). Recent onderzoek heeft aangetoond dat de depletie van thymocyten ontstaat via apoptose, die door CAV wordt geïnduceerd (Jeurissen et al., 1992b).

Gelderblom et al. (1989) en Todd et al. (1990) hebben met behulp van elektronen-microscopische studies aangetoond dat CAV-deeltjes een T3-icosahedron symmetrie hebben en een diameter van 23-25 nm. De CAV-deeltjes concentreren na evenwichtssedimentatie bij een dichtheid van 1.33-1.34 g/ml in CsCl.

Todd et al. (1990) hebben aangetoond, dat geïsoleerde virusdeeltjes slechts één eiwit met een molecuulgewicht van 50 kDa bevatten. Het enkelstrengs-DNA in de CAV-deeltjes is in de vorm van een circulaire minusstreng (Gelderblom et al.; Todd et al., 1990; Noteborn et al., 1991). Het replicatieve DNA-

9301272

intermediair werd gecloneerd en volledig gesequenced. Het CAV-
genoom is 2319 nucleotiden lang. Op basis van de genom-
structuur en de DNA-sequentie kan het virus niet worden
ingedeeld in één van de bekende virusfamilies (Noteborn et
5 al., 1991; Todd et al., 1991). Het CAV-genoom bevat drie
grote, gedeeltelijk of geheel overlappende leesramen die
coderen voor mogelijke eiwitten met molecuulgewichten van
51.6, 24.0 en 13.3 kDa. Het CAV-genoom bevat bovendien één
evident promotor/enhancer-gebied en slechts één
10 polyadenyleringssignaal. Transcriptie van het replicatieve
DNA-intermediair levert een gepolyadenyleerd polycistronisch
RNA molecuul van ongeveer 2100 nucleotiden op (Noteborn et
al., 1992b).

Eendagskuikens zijn het meest gevoelig voor CAV-
15 infecties. Bij deze dieren wordt letargie, anorexia en anemie
waargenomen vanaf 10 dagen na inokulatie met CAV. Sterfte kan
na infectie oplopen tot maximaal 50%. Met het toenemen van de
leeftijd neemt ook de resistentie toe. Jeurissen et al. (1992)
hebben gerapporteerd dat alleen de haematocriet-waarden van
20 kuikens, die op een leeftijd van 1-3 dagen waren geïnfecteerd
met CAV, verlaagd zijn. CAV-infecties van 1-21 dagen-oude
kuikens resulteert in depletie van met name de thymus cortex.
Echter, in oudere kippen kan CAV zich subklinisch
vermenigvuldigen. CAV-infectie bij oudere kippen kan worden
25 vastgesteld door het optreden van serumconversie (McIlroy et
al., 1992).

De verspreiding van CAV binnen een koppel kippen vindt
voornamelijk plaats via contactbesmetting. Het meest
waarschijnlijk is ingestie van faeces of ander materiaal dat
30 gecontamineerd is met faeces van CAV-besmette dieren.
Besmetting via de lucht kan echter niet worden uitgesloten.
Overdracht van virus op nakomelingen via het ei wordt door
Yuasa et al., (1979) gesuggereerd, maar experimenteel kon door
ons verticale overdracht van CAV van moederdieren op kuikens
35 niet worden aangetoond.

9301272

Immuundeficientie als gevolg van de CAV-geïnduceerde depletie van de thymus cortex wordt gezien als oorzaak van ziekteverschijnselen die optreden na secundaire infecties van normaal niet-pathogene agentia. (De Boer et al., 1992; Engström, 1988; Rosenberger and Cloud, 1989; Von Bülow et al., 1986; Yuasa et al., 1980). Zo is CAV geïsoleerd bij dieren met pseudovogelpest (Newcastle disease), met ziekte van Marek, met infectieuze bursitis (Gumboro) en bij dieren met 'blue-wing disease' in associatie met reovirussen. CAV-infecties leiden tot verhoogde ent-reacties, bijvoorbeeld tegen Newcastle disease virus.

Maternale antilichamen blijken een belangrijke bescherming te bieden tegen CAV infectie. In recent onderzoek werd onder laboratoriumomstandigheden aangetoond dat maternaal-immune ééndagskuikens geen CAV-infectie ontwikkelen. Ééndagskuikens kunnen ook passief beschermd worden door intraveneus inspuiten van antistoffen afkomstig van eidooiers van immune moederdieren (De Boer et al., niet gepubliceerde data).

CAV kan vermeerderd worden in weefselkweek. De titers die daarbij worden bereikt zijn in het algemeen laag. Momenteel worden daarvoor MDCC-MSB1 cellen (Yuasa, 1983; Yuasa et al., 1983) gebruikt waarin CAV 48 tot 72 uur na infectie een cytopathogeen effect induceert. MDCC-MSB1 cellen worden ook gebruikt voor het bepalen van neutraliserende antistoffen en antistoffen gericht tegen CAV met behulp van immunofluorescentie (Von Bülow et al., 1985; Chettle et al., 1991). Het is tot nu toe niet mogelijk gebleken de virulentie van CAV te verzwakken door seriële passage in MDCC-MSB1 cellen.

Oudere dieren ontwikkelen geen ziekteverschijnselen na CAV-infectie en kuikens met maternale antistoffen zijn beschermd. Deze gegevens werden in Duitsland gebruikt in een vaccinatieprogramma, dat gebaseerd is op gecontroleerde blootstelling aan CAV van 14-16 weken oude moederdieren. In Nederland is deze wijze van vaccinatie behalve op

experimenteel niveau niet toegestaan vanwege de risico's, die hieraan zijn verbonden. Zoals boven vermeld is niet volledig uitgesloten, dat CAV via het bevruchte ei kan worden overgedragen op nakomelingen. McNulty et al. (1991) hebben onlangs aangetoond dat koppels die CAV-seropositief zijn, 5 slechtere produktiegetallen hebben dan CAV-seronegatieve koppels. Bovendien heeft Adair (persoonlijke communicatie) immuundeficientie aangetoond bij kippen met een subklinische CAV infectie. De mogelijke verticale virusverspreiding en de 10 door CAV veroorzaakte immuundeficiëntie bij (sub)klinische infecties maakt een bestrijdingsprogramma, dat gebaseerd is op een onschadelijk vaccin, zeer wenselijk.

In het algemeen zijn geïnactiveerde vaccins en subunit-vaccins de veiligste vaccins. Het feit, dat CAV onder 15 weefselkweekcondities alleen tot lage titers vermeederd, maakt de bereiding van een geïnactiveerd vaccin relatief duur en bewerkelijk. Voor de bereiding van een sub-unit-vaccin tegen CAV-infecties zijn die CAV-eiwitten nodig, die een beschermende immuunrespons induceren in gevaccineerde kippen. 20 Tot nu toe is slechts één eiwit (dat VP1 genoemd is) gevonden in opgezuiverde CAV-deeltjes.

Verrassenderwijze is nu gebleken dat dit eiwit alleen, zoals in de voorbeelden nader zal blijken, niet in staat is om een immuunrespons te geven die bescherming biedt tegen CAV 25 infecties. Het blijkt dat ondanks dat VP1 het enige eiwit lijkt te zijn dat in het virusdeeltje aanwezig is, het door ons nu voor het eerst tot expressie gebrachte VP2 eiwit essentieel is voor het opwekken van virus neutraliserende antilichamen en dat ook het door ons voor het eerst tot 30 expressie gebrachte VP3 eiwit daar een wezenlijke bijdrage aan levert. Het is daarom eerst nu mogelijk een effectief vaccin op basis van delen van het virus te ontwikkelen.

Wij hebben de drie open leesramen, aanwezig op het CAV-genoom gecloneerd in baculovirus vectoren. De drie CAV- 35 eiwitten VP1, VP2 en VP3 werden alleen, in combinatie met een van de andere CAV-eiwitten, of alle drie tegelijk tot

9301272

expressie gebracht in Sf9-cellen d.m.v. (co)-infectie met recombinant-CAV baculovirussen. Moederdieren werden ingespoten met ruwe cellysaten die één of meerdere CAV-eiwitten bevatten. Alleen na immunisatie van kippen met antigeenpreparaten die

5 evenredige hoeveelheden van alle drie CAV-eiwitten bevatten, of die voornamelijk VP1 en VP2 en ook wat VP3 bevatten, ontwikkelden zich neutraliserende antilichamen. Eieren van zulke dieren bevatten maternale antilichamen tegen CAV. Besmettingsproeven met nakomelingen van gevaccineerde

10 moederdieren toonden aan, dat minimaal de CAV-eiwitten VP1 en VP2 nodig zijn voor de inductie van een beschermende immuunrespons. Nakomelingen van moederdieren die waren ingespoten met alle 3 CAV-eiwitten, waren nog beter beschermd tegen infecties met CAV. Injectie bij kippen met alle 3 CAV

15 eiwitten, die ieder afzonderlijk waren geproduceerd in Sf9 cellen, induceerde weinig neutraliserende antilichamen tegen CAV. Dit impliceert, dat voor een optimale inductie van neutraliserende antilichamen tegen CAV, 2 of 3 CAV eiwitten tezamen in een (insecte)cel gesynthetiseerd moeten worden.

20 Het is mogelijk, dat fragmenten van 2 of 3 CAV eiwitten al voldoende zijn om een beschermende immuunrespons tegen CAV-infecties te weeg te brengen.

De recombinant-CAV-produkten, VP1 + VP2, of VP1 + VP2 + VP3, die gebruikt zullen worden voor vaccinatie van leghennen,

25 kunnen worden gesynthetiseerd met behulp van het baculovirus-systeem. De CAV-eiwitten kunnen ook worden gesynthetiseerd met behulp van andere systemen, zoals bacterie- of gistcellen, via retro-(virale) infectie of gen-amplificatie (CHO-dhfr-systeem).

30 Het feit dat 2 of 3 eiwitten, die gecodeerd worden door de open leesramen van het CAV-genoom, een beschermende immuunrespons kunnen induceren in kippen, is ook toepasbaar voor de ontwikkeling van levend-virus vectoren. De coderende sequenties voor VP1 + VP2, of VP1 + VP2 + VP3, worden dan

35 gecloneerd in levend-virus-vectoren.

9301272

Het is ook mogelijk, dat één van de CAV-eiwitten VP2 of VP3, afzonderlijk, maar dan in de context van een levend-virus-vector ook geschikt is voor de inductie van een beschermende immuunrespons tegen CAV-infecties.

5 De expressie van fragmenten van één of meerdere bovengenoemde CAV-eiwitten door levend-virus vectoren kan voldoende zijn voor de inductie van een beschermende immuunrespons.

10 Bij gevogelte kunnen alleen levend-virus-vectoren worden gebruikt, die zelf een goede replicatie in het aviaire systeem vertonen. Voor de toepassing van virale vectoren bij de kip komen in aanmerking; onder andere: Vogelpokkenvirus, retrovirale vectoren, herpesvirusvectoren (Marek's virus en kalkoen-herpes-virus), adenovirussen en laryngotrachitisvirus.
15 Het blijkt dat de inductie van celdood, zoals die geïnduceerd wordt door CAV voornamelijk te wijten is aan VP3 en voor een deel aan VP2.

Door deletie van de C-terminale 11 aminozuren van VP3, wordt de inductie van apoptose door VP3 sterk gereduceerd. De
20 pathogene activiteit van CAV kan dus drastisch verminderd worden door introductie van een stopcodon in het C-terminale gebied van VP3. Het extra stopcodon in het coderende gebied voor VP3 wordt geïntroduceerd in de CAV-cloon pCAV/EcoRI (Noteborn en De Boer), dat het complete CAV genoom bevat. Het
25 gehele CAV-mutant genoom wordt uit de vector geknipt en gerecirculariseerd. MDCC-MSB1 cellen worden met het gerecirculariseerde CAV-mutant DNA getransfecteerd en de virusnakomelingen die minder pathogeen zijn, worden geoogst. Kippen worden met de verzwakte CAV-mutant virussen
30 gevaccineerd. Aangezien het VP2 eiwit ook een effect op de inductie van apoptose heeft, is het mogelijk om ook geattenuëerd CAV te maken dat een mutatie in het coderende gebied voor VP2 of VP2 en VP3 bevat.

De bovengenoemde introductie van een stopcodon in het
35 coderende gebied voor VP2 en/of VP3 kan ook worden toegepast bij de produktie van CAV-recombinant levend-virus vectoren.

9301272

Dieren, die op oudere leeftijd besmet raken met CAV, ontwikkelen geen klinische verschijnselen. Toch lijken dergelijke infecties te kunnen leiden tot grote economische verliezen voor de pluimvee-industrie. Immunisatie van dieren met de boven beschreven recombinant-CAV producten zal leiden tot een actieve protectie tegen de genoemde subklinische symptomen.

De drie CAV-eiwitten, die apart of in combinatie met één of twee andere CAV-eiwitten tot expressie werden gebracht in het baculovirus-systeem, kunnen gebruikt worden voor het opsporen van antistoffen gericht tegen CAV. Op deze wijze kunnen met CAV besmette of gevaccineerde kippen worden opgespoord. Eén of meer CAV-eiwitten kunnen worden toegepast in immuno-assays, zoals 'enzyme-linked immuno-sorbent assay' (ELISA), immunoperoxidasekleuring en immuunfluorescentie-assay. Voor het meten van neutraliserende antistoffen zijn twee of meer CAV eiwitten nodig.

Immunisatie van muizen met de 3 CAV-recombinant-producten, die gesynthetiseerd waren in insectecellen met CAV-recombinant baculovirussen, leverde uiteindelijk monoclone antilichamen op specifiek voor VP2 en VP3. Deze monoclonalen reageerden met specifieke structuren in CAV-geïnfecteerde cellen en niet met ongeïnfecteerde cellen.

Met behulp van de antilichamen, opgewekt met recombinant-CAV eiwitten, kunnen in orgaanpreparaten van met CAV besmette kippen CAV-eiwitten worden opgespoord. Op basis van deze gegevens kunnen betrouwbare diagnostische tests worden ontwikkeld. De monoclonale en polyclonale antilichamen volgens de uitvinding kunnen eventueel tezamen met een of meerdere CAV eiwitten of fragmenten daarvan, ook worden gebruikt in andere diagnostische assays, zoals ELISA's, RIA's, SPIA's, immuunfluorescentie-assays en immuunperoxidase kleuring.

In principe zijn alle bekende uitvoeringen van immunologische diagnostische tests mogelijk met alle beschikbare labels en zal de vakman afhankelijk van de test die uitgevoerd dient te worden en de omstandigheden waaronder

zij uitgevoerd moet worden, kunnen kiezen welke uitvoering het meest geschikt is. Overigens worden onder antilichamen en/ of andere eiwitten/polypeptiden voor deze uitvinding ook derivaten en/of fragmenten daarvan begrepen, voor zover die de
5 gewenste activiteit bezitten. In het geval van antilichamen houdt dat in dat zij tenminste het antigeen moeten kunnen herkennen.

De antilichamen volgens de uitvinding kunnen ook worden toegepast voor de passieve immunisatie van pluimvee. Tegen de
10 antilichamen volgens de uitvinding kunnen antilichamen worden opgewekt die een zogenaamd "internal image" van het antigeen zijn en dus weer als zodanig gebruikt kunnen worden, met name in passieve immunisaties en diagnostiek.

CAV induceert in geïnfecteerde thymocyten apoptose.
15 Mogelijk resulteert een CAV-infectie van (humane) tumoren ook tot celdood van de tumorcellen.

Het CAV-eiwit VP3 is op zich in staat om apoptose te induceren in kippe T-cellen.

Expressie van het CAV-eiwit VP3 kan ook gebruikt worden
20 voor de inductie van celdood in (humane) tumoren. Het VP3 eiwit kan in tumoren (transiënt) tot expressie worden gebracht door middel van DNA-transfectie. Expressie van VP3 in (tumor)cellen kan ook gebeuren door de cellen te infecteren met (retro)virale vectoren, die een coderende sequentie voor
25 VP3 bevatten. Toediening aan cellen van niet-virale componenten (bijv. liposomen of transferrine-afgeleide vectoren) die VP3 eiwitten en/of coderende sequenties voor VP3 bevatten, vormen een verdere mogelijkheid voor de expressie/presentie van VP3 in (tumor)cellen.

30 De bovengenoemde toepassingen kunnen ook dienen voor de mogelijke inductie van celdood door expressie in (tumor)cellen van VP2 of VP2 samen met VP3.

De CAV-eiwitten VP2 en/of VP3 kunnen worden toegepast in behandelingen om (humane) tumorformatie te verminderen. Dit
35 kan bijvoorbeeld door de eiwitten volgens de uitvinding direct in een solide tumor te injecteren of door de eiwitten te

koppelen aan een ligand met affiniteit voor een tumor geassocieerde antiligand. Deze koppeling kan zowel chemisch als (in het geval dat het ligand ook een eiwit is) via het recombinant maken van een fusie-eiwit.

5 De chemische koppeling kan direct of via een spacer groep geschieden. Eventueel kan er gekozen worden voor een inert dragermolecule zoals een indifferant serumeiwit waaraan zowel het ligand als het virale eiwit gebonden worden, al dan niet via een spacer groep.

10 Voorbeelden van veel voorgestelde combinaties van ligand-antiligand interacties zijn ligand-receptor paren zoals EGF/receptor, IL-2/receptor, /T-cel receptor, antilichaam/tumorantigeen, etc.

Het verdient de voorkeur te kiezen voor een
15 ligand/antiligand combinatie die door de cel geïnternaliseerd kan worden. Wanneer gekozen wordt voor een conjugaat, kan het voordelig zijn om een intrinsiek labiele groep als koppeling tussen het virale eiwit en het ligand aan te brengen, zodat het virale eiwit in de cel weer in natieve vorm terug keert.
20 In niet alle gevallen zal het nodig zijn om te kiezen voor een internaliserende combinatie. Tumorcellen zijn metabool actief en zullen via fagocytose en/of pinocytose stoffen, dus ook de eiwitten volgens de uitvinding, actief of passief opnemen.

Het ligand waaraan de eiwitten volgens de uitvinding op
25 wat voor wijze dan ook gekoppeld worden, hoeft geen compleet ligand te zijn. Het is over het algemeen voldoende wanneer het antiligand bindende deel wordt gebruikt. Ook derivaten van de bedoelde liganden zullen bruikbaar zijn zolang zij de antiligand bindende activiteit bezitten.

30 In het geval het ligand een antilichaam is, moet rekening gehouden worden met het feit dat antilichamen van andere oorsprong dan de soort waaraan ze toegediend worden in de meeste gevallen tot een immunorespons zullen leiden. Dit geldt overigens ook voor een aantal andere eiwitliganden.

Het is inmiddels genoegzaam bekend dat antilichamen zo gemanipuleerd kunnen worden dat zij geen immuunrespons opwekken, maar nog wel het gewenste antigeen herkennen.

In het kort wordt hieronder weergegeven hoe dierlijke antilichamen voor humane toepassing geschikt gemaakt kunnen worden (humaniseren), maar het moge duidelijk zijn dat ook andere soort aanpassingen mogelijk zijn.

In de eerste plaats is het mogelijk om het te humaniseren antilichaam chemisch te ontdoen van het constante deel ter bereiding van FAB, FAB'2 of nog kleinere fragmenten (Winter et al., 1990). Over het algemeen zullen deze fragmenten tenminste minder immunogeen zijn. Ook door recombinant DNA technologie kunnen dergelijke fragmenten bereid worden.

Daarnaast is het mogelijk om middels recombinant DNA technologie de constante delen van dierlijke antilichamen te vervangen door hun humane tegenhangers (Cabilly et al., 1984; Boss et al., 1984).

Daarnaast is het nog mogelijk om de antigeen bindende domeinen van dierlijke antilichamen te enten in antilichamen van humane oorsprong (Winter et al., 1987).

Bekende tumorantigenen waartegen antilichamen zijn opgewekt zijn bijvoorbeeld CEA (carcino embryonic antigen) en dergelijke.

De uitvinding wordt nader toegelicht aan de hand van het volgende experimentele gedeelte. Dit dient alleen ter illustratie en dient niet als een beperking van de beschermingsomvang te worden geïnterpreteerd.

30 EXPERIMENTEEL

Baculovirus, insectecellen en kippe T-cellen

Het recombinant baculovirus pACRP23-lacZ (Bishop, 1992) werd verkregen van Dr. R. Possee, NERC Institute of Virology, Oxford, Engeland en het genomische DNA werd opgezuiverd zoals beschreven door Summers en Smith (1987). *Spodoptera frugiperda*

(Sf9)-cellen werden verkregen van de American Tissue Culture Collection (no. CRL 1711). Baculovirus stocks werden opgegroeid in confluenta monolayers en suspensiecultures in TC-100 medium (Gibco/BRL), dat 10% foetaal kalfserum bevat, zoals beschreven door Summers en Smith (1987).

De met Marek's disease virus getransformeerde T-cel lijn MDCC-MSB1 (Yuasa, 1983; Yuasa et al., 1983) werd opgekweekt in RPMI-1680 medium (Gibco/BRL), dat 10% foetaal kalfs serum bevat; de cellen werden gebruikt voor DNA-transfectie experimenten.

VOORBEELD I

1.1 Cloneren van CAV-DNA.

Alle CAV-DNA sequenties zijn oorspronkelijk afgeleid van het plasmide DNA pIc-20H/CAV-EcoRI (Noteborn en De Boer, 1990). Alle cloneringsstappen met plasmide-DNA werden in principe uitgevoerd volgens de methoden beschreven door Maniatis et al. (1982).

De coderende sequenties van de drie CAV eiwitten VP1, VP2 en VP3 werden gecloneerd in de baculovirus transfer vector pAcYM1 (Matsuura et al., 1987), die werd verkregen van Dr. D.H.L. Bishop, NERC Institute of Virology, Oxford, Engeland. De coderende sequentie voor het CAV eiwit VP3 en een hiervan afgeleide mutant werden gecloneerd in de expressievector pRSV-H20 (Offringa et al.).

DNA-transformaties werden uitgevoerd in de E. coli-stam HB101. Alle plasmides werden vermenigvuldigd in grote schudkweken opgezuiverd op CsCl-gradiënten, en vervolgens door filtratie over Sephacryl S-500 kolommen.

1.2 DNA-transfectie

DNA van het recombinant baculovirus AcRP23-lacZ werd geïsoleerd uit extracellulaire baculovirussen volgens een methode beschreven door Summers en Smith (1987). Het lacZ gen bevat een unieke knipplaats voor het restrictie-enzym Bsu361.

Het AcRP23-lacZ werd door digestie met Bsu361 gelineariseerd. Sf9-cellen werden getransfecteerd met calciumfosfaat precipitaten van gelineariseerd baculovirus AcRP23-lacZ DNA en recombinant-transfervector DNA volgens de methode van Smith et al. (1983); dit is een aanpassing van het transfectieprotocol van Graham en Van der Eb (1973) voor Sf9-cellen.

Voor de transfectie van MDCC-MSB1 cellen werd 10 microgram pRSV-VP3 of pRSV-tr DNA geresuspendeerd in 25 microliter Milli-Q water en gemengd met 260 microliter TBS-buffer. 15 microliter 10 mg/ml DEAE-dextran werd toegevoegd aan het DNA mengsel, dat 30 minuten bij kamertemperatuur werd geïncubeerd. Ongeveer 10^7 MDCC-MSB1 cellen werden met 1500 rpm gecentrifugeerd in een tafelcentrifuge. Het medium werd vervangen door 5 ml TBS-buffer, en de cellen werden voorzichtig geresuspendeerd. De cellen werden afgedraaid en de TBS-buffer werd verwijderd. Het celpellet werd voorzichtig geresuspendeerd in 300 microliter DEAE-dextran/DNA-mix, en gedurende 30 minuten bij kamertemperatuur geïncubeerd. 0.5 ml 25% DMSO/TBS werd toegevoegd en de suspensie werd gedurende 30 minuten geïncubeerd bij kamertemperatuur. 5 ml TBS werd toegevoegd en de cellen werden met 1500 rpm in een tafelcentrifuge gecentrifugeerd. Het supernatant werd verwijderd en 5 ml weefselmedium toegevoegd. De cellen werden geresuspendeerd, gecentrifugeerd, opgenomen in 5 ml weefselkweek-medium en geïncubeerd bij 37°C-5% CO₂.

1.3 Selectie van recombinant-CAV baculovirus

De supernatanten, die extracellulaire baculovirussen bevatten, werden geanalyseerd in een plaque-assay met neutraal-rood (Brown en Faulkner, 1977) en X-gal (Brown et al., 1991). De lacZ-negatieve plaques werden geïnoculeerd op een monolayer van Sf9-cellen in micro-titer-schaaltjes. Vijf dagen na infectie werden de supernatanten geoogst en bewaard bij 4°C. De cellysaten werden geanalyseerd in een dot-slot hybridisatie assay met 32P-gemerkt pIc-20H/CAV-EcoRI DNA als probe.

9301272

Monolayers van Sf9-cellen werden geïnoculeerd met supernatanten van cel-lysaten die sterk hybridiseerden met de gemerkte CAV-DNA probe. Twee dagen na infectie werden de cellen gemerkt met 3H-leucine. De eiwitten werden gescheiden op 14% polyacrylamide(PAA)-SDS-gels (Laemmli, 1970), zichtbaar gemaakt met behulp van een fluorografie-methode en getest op de aanwezigheid van specifiek recombinant-CAV eiwit en afwezigheid van het β -galactosidase eiwit.

10 1.4 Synthese van ruwe CAV-eiwit preparaten

Recombinant-CAV baculovirussen die het verwachte CAV-eiwit tot expressie brachten in geïnfecteerde Sf9-cellen, werden opgeschaald volgens de methode beschreven door Summers en Smith (1983). Monolayers van Sf9-cellen werden geïnfecteerd met één type recombinant-CAV baculovirus met een multiplicititeit van infectie (moi) van ongeveer 5 plaque-vormende eenheden (pfu) per cel. Co-infecties van 2 of 3 verschillende CAV-recombinant baculovirussen werden uitgevoerd op Sf9-celmonolayers met een moi van 10 pfu van elk recombinant-CAV baculovirus per cel. Drie dagen na infectie werden de geïnfecteerde Sf9-cellen geoogst. De ruwe cellysaten werden gesuspendeerd in PBS-buffer.

25 VOORBEELD II

2.1 Immunisatie van kippen met CAV-specifieke eiwitten

Groepen van 6-weeken oude kippen werden intraperitoneaal en subcutaan ingespoten met ruwe lysaten geëmulgeerd in compleet Freund's adjuvans van 10^6 of 10^8 Sf9-cellen, die geïnfecteerd waren met één of meerdere recombinant-CAV baculovirussen. Als controle werden per immunisatie-experiment een groep van 8 dieren ingespoten met PBS-buffer geëmulgeerd in compleet Freund's adjuvans. Op verschillende dagen na immunisatie werd bloed verzameld en het serum geanalyseerd op neutraliserende antilichamen gericht tegen CAV.

2.2 Immunisatie van moederdieren tegen CAV

Vier groepen van elk 16 hennen werden ingespoten met ruwe lysaten van 2×10^7 Sf9 cellen, die tegelijk waren geïnfecteerd met VP1-, VP2-, en VP3-recombinant baculovirussen; of met VP1- en VP2-; of met VP1- en VP3-; of met VP2- en VP3-recombinant baculovirussen. De cellysaten werden geëmulgeerd in een gelijk volume aan compleet Freund's adjuvans. Als controle werd een groep van 16 hennen ingespoten met PBS-buffer in compleet Freund's adjuvans. Dooiermateriaal van eieren van hennen ingespoten met deze lysaten of met PBS-buffer werd geëxtraheerd met chloroform en geanalyseerd op de aanwezigheid van neutraliserende antilichamen.

15 VOORBEELD III

3.1 Productie en karakterisatie van monoclonale antilichamen specifiek gericht tegen CAV-eiwitten

Het monoclonaal antilichaam CVI-CAV-85.1 werd verkregen door muizen intraperitoneaal in te spuiten met CAV-geïnfecteerde MDCC-MSB1 cellen met incompleet Freund's adjuvans. Uiteindelijk werden miltcellen van de geïmmuniseerde muizen gefuseerd met P3X63-Ag8.653 myeloma cellen (Noteborn et al., 1991).

De andere monoclonale antilichamen gericht tegen CAV-antigenen werden verkregen door ruwe extracten van Sf9 cellen, die geïnfecteerd waren met de drie CAV-recombinant baculovirussen, in te spuiten in de milt van 4 BALB/c muizen. De sera van de geïmmuniseerde muizen werden 7 weken na immunisatie getest op neutraliserende antilichamen tegen CAV. De miltcellen van de geïmmuniseerde muizen werden gefuseerd met P3X63-Ag8.653 myeloma-cellen. Antilichamen gericht tegen CAV-antigenen werden langs verschillende wegen getest: een serumneutralisatie test; ELISA's gebaseerd op gezuiverd CAV en op ruwe lysaten van Sf9 cellen geïnfecteerd met CAV-recombinant baculovirus; immunofluorescentietesten op met CAV-geïnfecteerde MDCC-MSB1 of op Sf9-cellen geïnfecteerd met CAV-

recombinant-baculovirus; Western-blots van ruwe lysaten van Sf9 cellen geïnfecteerd met CAV-recombinant-baculovirus, en immunoperoxidase-kleuring op thymus-coupes van met CAV geïnfecteerde kippen.

5

VOORBEELD IV

4.1 In-vitro neutralisatie test

De sera van kippen en muizen, die waren ingespoten met
10 ruwe Sf9-cellysaten of PBS-buffer, werden 1:2 of 1:4 verdund
en vervolgens werd een tweevoudige verdunningsreeks gemaakt.
De verdunde sera werden 1 uur geïncubeerd met 104-105 TCID₅₀
CAV-Cux-1 (Von Bülow et al., 1983; Von Bülow, 1985). Ongeveer
honderdduizend cellen van de door Marek's disease virus
15 getransformeerde T-cellijn MDCC-MSB1 werden geïnfecteerd met
dit mengsel van verdunde sera en virus. Als controles werden
MDCC-MSB1 cellen besmet met CAV, dat werd geneutraliseerd met
een positief CAV-antiserum en een negatief serum afkomstig van
specifiek-pathogeenvrije kippen.

20

4.2 CAV-challenge experimenten

Bevruchte eieren werden uitgebroed van de vijf groepen
geïmmuniseerde hennen. De kuikens werden op dag 1
intramusculair ingespoten met 10^{5.5} TCID₅₀ CAV-Cux-1. Op 6 en
25 op 14 dagen na infectie werden 5 kuikens per groep geseceerd.
De thymus werd macroscopisch en immunohistologisch
geanalyseerd. Tevens werd heparinebloed afgenomen en de
bloedcellen getest in een virus-reïsolatie assay. Veertien
dagen na infectie werd bij alle dieren heparinebloed verzameld
30 om de haematocriet te bepalen.

VOORBEELD V

5.1 Immunohistologie en immunofluorescentie

35 Vriescoupes van thymus en beenmerg werden gemaakt en
gebruikt voor immunoperoxidase kleuring met CAV-specifieke

9301272

monoclonale antilichamen, zoals beschreven door Jeurissen et al. (1988).

Cellen werden gefixeerd met 80% aceton en gebruikt voor immuunfluorescentie-tests met CAV-specifieke monoclonale antilichamen en geit anti-muis IgG geconjugeerd met fluoresceïne-isothiocyanaat (Notelborn et al., 1990).

5.2 Detectie van CAV in bloedmonsters

Bloedmonsters van CAV-geïnfecteerde kuikens werden driemaal gewassen met PBS en opgenomen in 1 ml. Twintig microliter van de verkregen celsuspensie werd toegevoegd aan 105 MDCC-MSB1 cellen. De MDCC-MSB1 cellen werden iedere 4-5 dagen 10 maal verdund doorgezet in vers kweekmedium net zolang tot een CAV-specifiek cytopathogeen effect zichtbaar werd. Was na 10 passages nog geen cytopathogeen effect waarneembaar, dan werd de virusisolatie als negatief beschouwd. Het aantal keren passeren is een maat voor de hoeveelheid infectieus CAV, dat in het bloed van de besmette kuikens aanwezig was.

20

Resultaten en Discussie

Constructie van recombinant-CAV transfervectoren

Het CAV-genoom bevat drie grote open leesramen die elkaar gedeeltelijk of geheel overlappen. Door gebruik te maken van startcodons in verschillende leesramen codeert het CAV-genoom voor 3 unieke eiwitten. De coderende sequenties voor de CAV-eiwitten werden afzonderlijk (VP1, Fig. 1; VP2, Fig. 2; en VP3, Fig. 3) gecloneerd in de baculovirus transfervector pAcYM1. Omdat het VP3-leesraam geheel binnen het VP2-leesraam valt, wordt bij expressie van VP2, zij het duidelijk minder, ook altijd VP3 gesynthetiseerd. De transfervector pAcYM1 mist de coderende sequenties voor polyhedrine, bevat de polyhedrine-promotor inclusief het A-residu van het startcodon voor het polyhedrine-gen en de 3'-niet-coderende sequenties inclusief het poly-adenyleringssignaal. Aan weerszijden van de polyhedrine-sequenties liggen flankerende virale sequenties.

9301272

De transfervector bevat prokaryote sequenties voor vermenigvuldiging in bacteriën (Matsuura et al., 1987).

Het plasmide pEP-51.6 (Noteborn et al., niet-gepubliceerde gegevens) bevat CAV-DNA sequenties van positie
5 791 tot 2319. De CAV-DNA insertie bevat het gehele coderende gebied voor het eiwit VP1, dat wordt geflankeerd door 62 bp 5'- en 117 bp 3'-niet-coderende DNA sequenties. Het plasmide pEP-51.6 werd partieel geknipt met HindIII, vervolgens volledig geknipt met EcoRI, en de 'sticky-ends' werden
10 opgevuld met behulp van Klenow-polymerase. Een 1.53-kb CAV-DNA fragment werd geïsoleerd. Plasmide pAcYM1 werd gelineariseerd met BamHI, de sticky-ends opgevuld met behulp van Klenow polymerase en uiteindelijk behandeld met alkalische fosfatase (CIP). Het 1.53-kb CAV-DNA-fragment werd geligeerd aan het
15 gelineariseerde pAcYM1 DNA. De oriëntatie van VP1 in pAcYM1 DNA werd bepaald door restrictie-enzym analyse en het uiteindelijke construct pAcVP1 is weergegeven in Fig. 4.

Plasmide pEP-24.0 (Noteborn et al., niet gepubliceerde data) bevat het 1.15-kb BamHI DNA-fragment met CAV-DNA
20 sequenties van positie 354 tot 1508 (Noteborn en De Boer, 1990). Dit CAV-DNA-fragment bevat het coderende gebied voor VP2 dat geflankeerd is door 26 bp 5'- en 484 bp 3'-niet-coderende DNA sequenties. 106 bp stroomafwaarts van het startcodon voor VP2 vindt men het start codon voor VP3 in een
25 ander leesraam, en de overige coderende volgorde voor VP3. Het plasmide pEP-24.0 werd behandeld met BamHI; het 1.15-kb DNA-fragment werd geïsoleerd en geligeerd aan het met BamHI-gelineariseerde en met CIP behandelde 9.3-kb pAcYM1 plasmide. Het uiteindelijke DNA-construct pAcVP2 werd gekarakteriseerd
30 met restrictie enzymen en is weergegeven in Fig. 4.

Plasmide pEP-13.3 (Noteborn et al., niet-gepubliceerde data) bevat het 0.46-kb BamHI-EcoRI DNA-fragment met CAV-DNA sequenties vanaf positie 427 tot 868 (Noteborn en De Boer, 1990). Het CAV-DNA-fragment bevat het coderende gebied voor
35 VP3, 58 bp 5'- en 25 bp 3'-niet-coderende DNA sequenties. Plasmide pEP-13.3 werd geknipt met de restrictie-enzymen BamHI

en EcoRI en een 0.46-kb BamHI-EcoRI fragment werd geïsoleerd. Transfervector pACYM1 DNA werd gelineariseerd met BamHI en behandeld met CIP en een 9.3-kb fragment werd geïsoleerd. De twee synthetische DNA-oligomeren 5'-GATCCAACCCGGGTTG-3' en 5'-
5 AATTCAACCCGGGTTG-3' werden aan elkaar gehybridiseerd en vormen samen een BamHI-EcoRI DNA-linker. De DNA-linker werd geligeerd aan het 0.46-kb BamHI-EcoRI en het 9.3-kb BamHI DNA-fragment. Het uiteindelijke construct pAc-VP3 werd geanalyseerd door restrictie-enzym-digesties en is weergegeven in Fig. 4.

10

Constructie van recombinant-CAV baculovirus

Ieder van de drie recombinant-CAV transfervectoren werd afzonderlijk getransfecteerd, samen met het recombinant-baculovirus AcRP23-lacZ DNA, in Sf9-cellen. Transfectie
15 geschiedde met "naakt" baculovirus DNA en transfervector DNA. Dit baculovirusgenoom bevat in plaats van het polyhedrine-gen, het lacZ-gen, onder de regulatie van de polyhedrine promoter. Na homologe recombinatie werden baculovirussen verkregen, die steeds één van de drie CAV-genen hadden ingebouwd in plaats
20 van het lacZ gen en dus onder regulatie van de promoter van het polyhedrine gen. De baculovirussen die het CAV-gen correct ingebouwd hebben, bevatten het lacZ-gen niet meer. In eerste instantie werden de recombinant-CAV virussen gekarakteriseerd op afwezigheid van β -galactosidase-activiteit in plaques van
25 baculovirus-geïnfecteerde insecte cellen. Verder werd de integratie van CAV-DNA-sequenties in het baculovirus-genoom vastgesteld met behulp van een CAV-specifieke DNA probe in een hybridisatie-experiment.

30 Expressie van de CAV eiwitten in Sf9 cellen

De expressie van de specifieke CAV-eiwitten in met recombinant-CAV geïnfecteerde Sf9-cellen werd geanalyseerd door eiwit-labeling met ³H-leucine en PAA-SDS gelelektroforese.

35 Het CAV-eiwit VP1 heeft een berekend molecuulgewicht van 51.6 kDa (Noteborn en De Boer, 1990). Lysaten van

insectecellen die werden geïnfecteerd met recombinant-VP1 baculovirus bevatten naast baculovirale en cellulaire produkten een eiwit van 52 kDa. Het 52-kDa eiwit was afwezig in lysaten van insectecellen geïnfecteerd met het baculovirus ACRP23-lacZ en in niet-geïnfecteerde cellen. In-vitro expressie van de coderende sequentie van VP1 resulteerde in een eiwit van 52 kDa (Noteborn et al., 1992). VP1 is naar alle waarschijnlijkheid niet geglycosyleerd, omdat VP1, dat is gesynthetiseerd in een konijne-reticulocyten lysaat en VP1, gesynthetiseerd in insectecellen, hetzelfde molecuulgewicht hebben.

Translatie van het gen, dat codeert voor VP2, maar dat ook alle coderende sequenties voor VP3 bevat, leverde in een in-vitro systeem specifieke CAV-eiwitten van 30 en 28 kDa op en een geringe hoeveelheid van een 16-kDa eiwitprodukt. Translatie van alléén het open leesraam, dat codeert voor VP3, in een in-vitro systeem leverde daarentegen alleen een eiwit op van 16 kDa. Expressie van VP2 door recombinant-VP2 baculovirus in geïnfecteerde insectecellen leverde specifieke produkten op van ongeveer 28 kDa en 30 kDa. Sf9-cellen geïnfecteerd met een recombinant-lacZ baculovirus bevatten deze CAV-specifieke eiwitten niet. Het CAV-specifieke produkt van 16 kDa was meestal in slechts zeer geringe hoeveelheden aantoonbaar. Deze gegevens tonen aan dat het recombinant-VP2 baculovirus het eiwit VP2 sterk tot expressie brengt en slechts in zeer geringe mate VP3. Een mogelijke verklaring hiervoor is, dat een intern startcodon in een gen, dat ligt op het baculovirus-genoom, zeer inefficiënt wordt gebruikt.

Recombinant-VP3 baculovirus synthetiseerde in geïnfecteerde insectecellen een hoofdprodukt van 16 kDa en geringe hoeveelheden van enige eiwitten met molecuulgewichten van ongeveer 21.000 en 12.000-14.000. Het CAV-specifieke monoclonale antilichaam CVI-CAV-85.1 reageerde in een immunofluorescentie-assay specifiek met Sf9 cellen die VP3 tot expressie brachten. Dit monoclonale antilichaam precipiteerde specifiek alleen een eiwit met een molecuulgewicht van 16.000

uit lysaten van radioactief-gelabelde Sf9 cellen, die waren geïnfecteerd met VP3-recombinant baculovirus. In een pepscan-analyse (Geysen et al., 1984) werd het epitoom van het monoclonale antilichaam CVI-CAV-85.1 gelokaliseerd op de N-terminus van VP3. De pepscan-analyse is weergegeven in Fig. 5.

Inductie van neutraliserende antilichamen bij kippen geïmmuniseerd met recombinant-CAV eiwitten

Bij kippe-anemie is vastgesteld dat neutraliserende antistoffen goed correleren met bescherming. Het CAV-eiwit of meerdere CAV-eiwitten, dat neutraliserende antistoffen induceert bij de kippen, vormen dus de basis van een sub-unit vaccin.

Wij hebben in eerste instantie onderzocht welk CAV-eiwit in staat is bij de kip neutraliserende antilichamen tegen CAV te induceren. Groepen van 8 kippen met een leeftijd van ongeveer 6 weken werden ingespoten met lysaten 10^6 of 10^8 recombinant-CAV-geïnfecteerde Sf9-cellen geëmulgeerd in compleet Freund's adjuvans. Als controle werd een groep van 8 kippen ingespoten met PBS-buffer geëmulgeerd in compleet Freund's adjuvans. Voor de immunisatie en 2, 4 en 6 weken na immunisatie werden bloed monsters genomen. Geen van de controle dieren gespoten met PBS in compleet Freund's adjuvans ontwikkelde neutraliserende antistoffen tegen CAV (Tabel 1). Ook kippen ingespoten met lysaten van 10^6 of 10^8 insectecellen, die waren geïnfecteerd met recombinant-VP2 of recombinant-VP3 baculovirussen, ontwikkelden geen neutraliserende antilichamen tegen CAV. Van de kippen ingespoten met lysaat van 10^6 geïnfecteerde recombinant-VP1 baculovirus insectecellen ontwikkelden drie kippen, en van de kippen ingespoten met een dosis van 10^8 geïnfecteerde cellen ontwikkelden twee kippen lage titers variërend tussen 1:8 en 1:32.

Wij concluderen, dat de drie recombinant CAV eiwitten, indien afzonderlijk ingespoten bij de kip, geen of slechts zeer gering neutraliserende antilichamen tegen CAV induceren.

! 9301272

Vervolgens hebben we onderzocht of de combinatie van de drie recombinant-CAV eiwitten in staat waren bij de kip neutraliserende antilichamen te induceren. Sf9-cellen werden daarvoor tegelijk geïnfecteerd met de drie recombinant-CAV
5 baculovirussen. Ruwe lysaten van 10^6 of 10^8 van de geïnfecteerde cellen, die dus recombinant VP1 + VP2 + VP3 bevatten, werden bereid. Groepen van acht kippen op een leeftijd van 6-8 weken werden ingespoten met deze lysaten geëmulgeerd in compleet Freund's adjuvans. Als controle werd
10 een groep van acht kippen ingespoten met PBS-buffer geëmulgeerd in compleet Freund's adjuvans. Vijf weken na immunisatie, bleek, dat de kippen die geïmmuniseerd waren met lysaat van 10^6 geïnfecteerde cellen, alle acht neutraliserende titers tussen de 32 en 256, terwijl zeven van de acht dieren
15 die geïmmuniseerd waren met 10^8 cellen, titers hadden tussen 16 en 512 (Tabel 2a). Zeven weken na immunisatie bleken alle dieren van beide groepen een neutraliserende titer tegen CAV ontwikkeld te hebben. De groep kippen ingespoten met PBS-buffer bleek geen aantoonbare neutraliserende immuunrespons
20 ontwikkeld te hebben tegen CAV.

Is het daadwerkelijk nodig voor de inductie van neutraliserende antilichamen tegen CAV, dat de drie CAV eiwitten tegelijkertijd in insectecellen worden gesynthetiseerd? Om deze vraag te beantwoorden, werden Sf9
25 cellen apart geïnfecteerd met VP1-, VP2-, en VP3-recombinant baculovirussen. De ruwe cellysaten werden vervolgens bijeengevoegd, gemengd met Freund's adjuvans en ingespoten in een groep van 8 kippen. Als controle-preparaten werd een ruw lysaat van Sf9 cellen, die alle de 3 CAV eiwitten tegelijk
30 synthetiseerden, en PBS-buffer gebruikt. Beide preparaten werden geëmulgeerd in compleet Freund's adjuvans en vervolgens ingespoten in afzonderlijke groepen van ieder 8 kippen.

Sera van de groep kippen die waren ingespoten met ruwe lysaten van Sf9-cellen, waarin de 3 CAV-eiwitten afzonderlijk
35 waren gesynthetiseerd, bleken geen of slechts zeer weinig neutraliserende antilichamen tegen CAV te bevatten. Echter, de

dieren van de controle groep, ingespoten met ruwe lysaten van Sf9 cellen die de 3 CAV-eiwitten tezamen synthetiseerden, bleken zoals verwacht wel een neutraliserende immuunrespons ontwikkeld te hebben. De dieren ingespoten met PBS-buffer
5 bleven negatief (Tabel 2b).

Neutraliserende antistoffen in eieren van geïmmuniseerde moederdieren

Uit bovengenoemde immunisatie-experimenten was gebleken
10 dat 3 recombinant-CAV eiwitten, tezamen tot expressie gebracht in Sf9 cellen, neutraliserende antistoffen tegen CAV induceren. In een volgend experiment werd onderzocht of combinaties van 2 CAV eiwitten ook in staat zijn neutraliserende antistoffen te induceren. Daarbij zijn de
15 antistoffen in de dooier van eieren van geïmmuniseerde moederdieren gemeten.

Vier groepen van 16 kippen werden op een leeftijd van 33 weken ingespoten met ruwe lysaten van Sf9 cellen die tegelijk waren geïnfecteerd met verschillende combinaties van
20 recombinant-CAV baculovirussen. De preparaten die of VP1 + VP2 + VP3, of VP1 + VP2 bevatten, induceerden in de meeste dieren neutraliserende antilichamen die in hun eieren duidelijk aantoonbaar waren (Tabel 3). De eieren van kippen die waren ingespoten met preparaten die VP1 + VP3, of VP2 + VP3
25 bevatten, bleken geen duidelijke neutraliserende antilichaamtiter in de dooier te hebben. Slechts de dooier van eieren van één van de onderzochte kippen, bleken lage titers aan neutraliserende antilichamen te bevatten. De eieren van de controle-groep van 16 kippen, die waren ingespoten met PBS-
30 buffer, bleken geen neutraliserende antistoffen te bevatten.

De gegevens van de bovengenoemde experimenten met recombinant-CAV eiwitten tonen aan dat VP1 + VP2 tezamen nodig en voldoende zijn voor de inductie van neutraliserende antilichamen tegen CAV infecties. Echter, een geringe
35 hoeveelheid VP3 in de VP1 + VP2 preparaten kan niet worden uitgesloten.

Bescherming tegen CAV challenge in nakomelingen van geïmmuniseerde kippen

Maternale antilichamen beschermen jonge kuikens tegen klinische verschijnselen, die worden veroorzaakt door een CAV-
5 infectie. Wij hebben bestudeerd welke groep(en) kippen die met bepaalde recombinant-CAV eiwitten waren geïmmuniseerd, nakomelingen kregen die beschermd waren tegen CAV challenge. Daarbij werd virus geïsoleerd en gekeken naar klinische
10 verschijnselen karakteristiek voor CAV: atrofie van de thymus, verlaagde haematocriet en verhoogde sterfte.

Groepen van tussen de 23 en 35 één-dag-oude nakomelingen werden gechallengeerd met een hoge dosis CAV. Zes dagen na infectie bleken 5 dieren die werden geseceerd en waarvan de moederdieren waren ingespoten met PBS-buffer, allen een
15 macroscopisch zichtbaar verkleinde thymus te hebben. Bij nakomelingen van moederdieren ingespoten met recombinant VP2 + VP3 hadden 4 van de 5 dieren een kleine thymus. De 5 geseceerde nakomelingen van moederdieren, ingespoten met de 3 recombinant-CAV eiwitten tezamen, bleken daarentegen allemaal
20 een normale thymus te hebben. In de groep nakomelingen van moederdieren behandeld met VP1 + VP2 bleek slechts 1 van de 5 onderzochte dieren een verkleinde thymus te bezitten (Tabel 4). Veertien dagen na infectie werden weer 5 dieren per groep geseceerd. Alle nakomelingen afkomstig van moederdieren,
25 die waren geïmmuniseerd met recombinant VP2 + VP3, of PBS-buffer leden aan thymus-atrofie. De onderzochte nakomelingen van de groep dieren die was ingespoten met de 3 recombinant-CAV eiwitten tezamen bleken allemaal normale thymussen te bezitten. Slechts 1 van de 5 onderzochte kuikens van de dieren
30 ingespoten met recombinant VP1 + VP2 bleek een verkleinde thymus te hebben (Tabel 4). In een onafhankelijk experiment werd aangetoond dat nakomelingen van moederdieren, die waren ingespoten met recombinant VP1 en VP3 verkleinde thymussen hadden, zoals beschreven voor de nakomelingen van moederdieren
35 ingespoten met recombinant VP2 en VP3 (Koch, niet gepubliceerde resultaten). Veertien dagen na infectie werd van

9301272

alle CAV-geïnfecteerde nakomelingen de haematocriet bepaald. Een haematocriet van 27% werd als grens voor anemie gekozen. De nakomelingen van de moederdieren ingespoten met PBS-buffer bleken allemaal een sterk-verlaagde haematocriet te hebben, met waarden variërend tussen 7 en 19% (Tabel 5). Nakomelingen van de met recombinant VP2 + VP3 ingespoten moederdieren hebben een gemiddeld iets hogere haematocriet. In deze groepen hadden slechts een enkel dier een haematocriet hoger dan 27. In een onafhankelijk experiment werd aangetoond dat ook nakomelingen van moederdieren ingespoten met recombinant VP1 en VP3 een verlaagde haematocriet bleken te hebben (Koch, niet-gepubliceerde resultaten). Van de 35 onderzochte nakomelingen van de dieren, ingespoten met preparaten die VP1, VP2 en VP3 bevatten, had slechts één dier een afwijkende haematocriet, terwijl in de VP1 + VP2-groep 2 van de 29 onderzochte dieren een haematocriet beneden de 27% hadden.

De hoogste sterfte werd waargenomen bij nakomelingen van moederdieren die waren ingespoten met recombinant VP2 + VP3, 50.9% en met PBS, 48.3%. In de groep nakomelingen van moederdieren, die waren ingespoten met VP1 + VP2 + VP3 is de sterfte 9% en met VP1 + VP2, 15.4%. Echter, de meeste dieren stierven binnen 5 dagen na challenge. De sterfte ten gevolge van een CAV infectie is in het algemeen wat later. Daarom hebben we in Tabel 6 een onderscheid gemaakt in sterfte voor dag 14 en na dag 14 na challenge. De sterfte voor dag 14 is vaak specifiek, onder andere als gevolg van het spuiten. De sterfte na dag 14 is in de groep dieren met maternale met maternale antistoffen tegen VP1 + VP2 + VP3, 7%; tegen VP1 + VP2, 0%, VP2 + VP3, 27.4% en in de controle groep 20.7%. In de VP2 + VP3 groep stierven 8 dieren na het nemen van bloedmonsters voor het bepalen van de haematocriet door de slechte conditie van de kuikens, zeer waarschijnlijk als gevolg van de anemie. In de PBS groep stierven bij het bloedtappen 2 dieren. Al deze dieren hadden een duidelijk verkleinde thymus.

De viraemie in de CAV-geïnfecteerde nakomelingen werd onderzocht door een virusisolatie op bloedcellen uit te voeren. Heparine-bloed monsters van 5 dieren per groep werden afgenomen op 6 en 14 dagen na challenge. De nakomelingen van moederdieren gespoten met VP2 + VP3 of PBS, en die vrijwel geen bescherming hadden tegen CAV-infecties, bleken relatief hoge virus titers te bevatten 6 en 14 dagen na infectie. Zes dagen na infectie bleken de nakomelingen van dieren, die waren ingespoten met VP1 + VP2 + VP3, of VP1 + VP2 een duidelijk lagere virustiter te bevatten dan de bovengenoemde nakomelingen. Veertien dagen na infectie hadden alleen de groep nakomelingen van dieren, die met VP1 + VP2 + VP3 waren ingespoten, een duidelijk lagere virus titer dan de andere 3 groepen.

De resultaten van de inductie van neutraliserende antilichamen in moederdieren tonen aan dat de recombinant-CAV eiwitten VP1 en VP2 zeer belangrijk zijn voor de inductie van een neutraliserende immuunrespons. De besmettingsexperimenten tonen aan dat het recombinant-CAV eiwit VP3 een aanvullende bescherming verleent bovenop het door VP1 + VP2 bereikte effect.

De productie en karakterisatie van monoclonale antilichamen tegen CAV

Voor de produktie van monoclonale antilichamen tegen CAV werden muizen ingespoten met ruwe lysaten van Sf9 cellen, die werden gecoïnfecteerd met VP1-, VP2-, en VP3-recombinant baculovirussen. In totaal werden 9 verschillende hybridoma cellijnen verkregen die monoclonale antilichamen tegen CAV-antigenen produceren.

Western-blots met CAV-antigenen, die geproduceerd werden met het baculovirus expressie systeem, toonde aan dat de monoclonale antilichamen 111.1, 111.2, 111.4, 112.1, 112.2, 120.1 en 120.2 sterk zijn gericht tegen VP2, en de monoclonale antilichamen 111.3 en 120.3 sterk tegen VP3. De monoclonale antilichamen die sterk reageren met VP2, vertonen allemaal een

zwakke kruisreactie met VP3. Omgekeerd, kruisreageren de monoclonale antilichamen gericht tegen VP3 zwak met VP2.

In een serum-neutralisatie test werd aangetoond dat geen van de verkregen monoclonale antilichamen een neutraliserende
5 aktiviteit tegen CAV bezitten. Dit ondanks het feit dat de sera van de geïmmuniseerde muizen, die voor de bereiding van de hybridoma's werden gebruikt, wel een neutraliserende aktiviteit tegen CAV hadden.

In een pepscan-analyse (Geysen et al., 1984) werd het
10 epitoom van de monoclonale antilichaam 111.2 gelokaliseerd in het midden van VP2 (Fig.6). Het monoclonale antilichaam 111.3 bleek gericht te zijn tegen een epitoom aan het N-terminale uiteinde van VP3 (Fig. 7), en wel naast het VP3-epitoom dat wordt herkend door het monoclonale antilichaam CVI-CAV-85.1
15 (Fig. 5).

Immuunfluorescentie toonde aan dat monoclonale antilichamen gericht tegen VP2 en VP3 specifieke structuren herkennen in CAV-geïnfekteerde MDCC-MSB1 cellen. Geen van de monoclonale antilichamen gericht tegen CAV antigenen
20 reageerden met ongeïnfekteerde MDCC-MSB1 cellen. De VP2-specifieke monoclonale antilichamen herkennen andere structuren dan VP3-specifieke monoclonale antilichamen in CAV-geïnfekteerde cellen.

25 Expressie van VP3 in kippecellen induceert apoptose

Jeurissen et al. (1992) hebben aangetoond dat CAV apoptose veroorzaakt in geïnfekteerde thymocyten. Wij hebben bestudeerd of 1 van de CAV-eiwitten, met name het VP3, in staat is zelfstandig apoptose te induceren in kippe T-cellen.

30 De coderende sequenties voor VP3 werden gecloneerd in de expressie-vector pRSV-20H. Het 0.46-kb BamHI-EcoRI fragment met CAV-DNA sequenties van posities 427-868 (Notelborn et al., 1991) werd geïsoleerd uit plasmide pEP-13.3. Het CAV-DNA fragment bevat de coderende sequenties voor VP3, en bovendien
35 58 bp 5'-en 25 bp 3'-flankerende sequenties. De vector pRSV-H20 werd gelineariseerd met BglIII, behandeld met CIP, en een

9301272

4.3-kb fragment werd geïsoleerd. Twee synthetische DNA oligomeren 5'-GATCCAACCCGGGTTG-3' en 5'-AATCAACCCGGGTTG-3' werden gehybridiseerd, en vormden zo een dubbelstrengs BamHI-EcoRI-linker. De BamHI-EcoRI DNA-linker en het 0.46-kb BamHI-EcoRI DNA fragment werden geligeerd aan het 4.3-kb BglIII DNA fragment. Het uiteindelijke construct pRSV-VP3 bevat het coderende gebied voor VP3 onder regulatie van de Rous sarcoma virus promotor werd en gecontroleerd door restrictie-enzym analyse (Fig. 8a; Noteborn et al., 1993).

10 MDCC-MSB1-cellen werden getransfecteerd met DNA van pRSV-VP3. Tweeënveertig uur na transfectie werden de cellen gefixeerd en geanalyseerd op VP3-expressie door kleuring met monoclonaal CVI-CAV-85.1. De cellen werden ook gekleurd met propidium-jodide, dat DNA van intacte kernen zeer sterk
15 kleurt, maar DNA van apoptotische kernen zwak (Telford et al., 1992). Meer dan 90% van de getransfecteerde cellen bevatten een fijn-granulaire verdeling van VP3 in de kern, die aangekleurd werd door propidium jodide. Twee dagen na infectie bleek dat 40% van de cellen die VP3 tot expressie heeft
20 gebracht, kernen te bevatten die zwak aangekleurd werden met propidium-jodide, en was VP3 aanwezig als aggregaten. Drie dagen en later na infectie bleek meer dan 90% van de VP3-bevattende cellen VP3-aggregaten te bevatten en DNA dat zeer zwak aankleurde met propidium jodide (Fig. 9). Drie dagen na
25 transfectie vertoonde het DNA van de VP3-getransfecteerde cellen het voor apoptose karakteristieke oligonucleosomale ladderpatroon.

De VP3-verdeling die werd waargenomen in getransfecteerde cellen komt geheel overeen met die in met CAV-geïnfecteerde
30 MDCC-MSB1 cellen. Vroeg na infectie (na 1-1.5 dag) is VP3 fijn-granulair verdeeld in de kern: het cellulaire DNA is in dit stadium nog intact. Laat in infectie (na ongeveer 3 dagen) vormt VP3 aggregaten in de kern (Koch, niet-gepubliceerde gegevens). Het DNA van de met CAV-geïnfecteerde cellen is
35 gefragmenteerd (Jeurissen et al., 1992).

9301272

Onze conclusie is dat VP3 op zich in staat is, in MDCC-MSB1 cellen de CAV-specifieke apoptose te induceren. Expressie van voor VP3-coderend pRSV-VP3 DNA in de monocytene cellijn LSCC-HD11, leidde ook in deze cellen tot apoptose. Echter, 5
 expressie van VP3 in kippe-embryo-fibroblasten liet zien dat in deze cellen VP3 niet in staat was, apoptose te induceren.

Expressie van het VP2 eiwit in MDCC-MSB1 cellen leidt ook tot beschadiging van het cellulaire DNA. Drie dagen na transfectie van MDCC-MSB1 cellen met DNA dat codeert voor VP2, 10
 worden in ongeveer de helft van de getransfecteerde cellen de kernen zwak aangekleurd met propidium-jodide. Dus ook VP2, zij het in mindere mate dan VP3, lijkt betrokken te zijn bij de inductie van de CAV-specifieke celdood.

15 Het effect van ingekort VP3 op de inductie van apoptose in MDCC-MSB1 cellen

VP3 is een eiwit van 121 aminozuren lang, bevat twee prolinerijke stukken, een hydrofoob gebied en twee sterk-positief-geladen gedeelten (Fig. 8b). De positief-geladen 20
 gedeelten zijn mogelijk kern-localisatie-signalen en/of DNA-bindende domeinen (Noteborn et al., 1987; Ramakrishnan, 1993).

Wij hebben bestudeerd of het basische C-terminale uiteinde van VP3 betrokken is bij de apoptotische activiteit van VP3. Hiervoor werd een ingekort VP3 product gemaakt door 25
 deletie van 11 codons aan de C-terminus van de VP3-coderende sequenties. Plasmide pEP-VP3 werd geknipt met de restrictie-enzymen BamHI en HindIII en het 0.38-kb BamHI-HindIII DNA werd geïsoleerd. Twee synthetische DNA oligomeren, 5'-
 AGCTTGATTACCACTACTCCCTGAG-3' en 5'-TCGACTCAGGGAGTAGTGGTAATCA-
 30 3', werden gehybridiseerd en vormden zo samen de dubbelstrengs HindIII-SalI DNA-linker. Plasmide pRSV-H20 werd geknipt met BglII en SalI, behandeld met 'calf intestine phosphatase', en een 4.3-kb DNA-fragment werd geïsoleerd. De HindIII-SalI DNA-linker en het 0.38-kb BamHI-HindIII fragment werden geligeerd 35
 in het 4.3-kb BglII-SalI-fragment. Het uiteindelijke construct pRSV-tr, dat de coderende sequenties voor het ingekorte VP3-

eiwit bevat onder de regulatie van de RSV-promotor (Fig. 8a), werd geanalyseerd met behulp van restrictie-enzyme- en sequentie-analyse.

MDCC-MSB1 cellen werden transient getransfecteerd met
5 pRSV-tr DNA, en op verschillende tijdstippen na transfectie gekleurd met monoclonaal CVI-CAV-85.1 en propidium-jodide. Immunofluorescentie toonde aan, dat 42 uur na transfectie de meeste cellen, die ingekort VP3 tot expressie brengen, fijn-granulair VP3 in hun kernen bevatten. Het cellulaire DNA werd
10 sterk aangekleurd met propidium-jodide. Drie dagen na transfectie had nog 80% van de cellen, die ingekort VP3 tot expressie brachten, kernen die sterk aankleurden met propidium-jodide (Fig. 9). DNA dat op 3 dagen na transfectie met pRSV-tr werd geïsoleerd uit MDCC-MSB1 cellen bleek veel
15 minder afgebroken te zijn dan DNA geïsoleerd uit pRSV-VP3-getransfecteerde MDCC-MSB1 cellen. De fractie van de propidium-jodide-positieve kernen van cellen die ingekort VP3 tot expressie brachten liep langzaam terug tot ongeveer 50% op
20 5 dagen na transfectie. De meeste cellen die ingekort VP3 bevatten en zwak aangekleurd werden door propidium-jodide, hadden een granulaire VP3-verdeling. Slechts een enkele cel bevatte VP3-aggregaten.

De expressie van ingekort VP3 in MDCC-MSB1 cellen induceert kennelijk celdood veel minder efficiënt dan
25 expressie van wild-type VP3. Opmerkelijk is ook, dat de VP3-mutant veel minder aggregaten kan vormen dan wild-type VP3.

Beschrijving van de figuren

Figuur 1 geeft de DNA sequentie en de aminozuurvolgorde
30 van het VP1 eiwit van Chicken Anemia Virus. De nummering van de CAV-DNA sequenties is die weergegeven in het Nederlandse octrooi nr. 9002008.

Figuur 2 geeft de DNA sequentie en de aminozuurvolgorde van het VP2 eiwit van Chicken Anemia Virus. De nummering van
35 de CAV-DNA sequenties is die weergegeven in het Nederlandse octrooi nr. 9002008.

Figuur 3 geeft de DNA sequentie en de aminozuurvolgorde van het VP3 eiwit van Chicken Anemia Virus. De nummering van de CAV-DNA sequenties is die weergegeven in het Nederlandse octrooi nr. 9002008.

5 Figuur 4 beschrijft de schematische weergave van de 3 CAV-recombinant transfervectoren pAc-VP1, pAc-VP2 en pAc-VP3.

 Figuur 5 beschrijft de pepsican-analyse van het monoclonaal antilichaam CVI-CAV-85.1 met peptiden (12-meren), afgeleid van VP3. De core-sequentie PSTVFR, waartegen het
10 monoclonaal CVI-CAV-85.1 is gericht, ligt op positie 12 tot 17 van de VP3-aminozuurvolgorde (Noteborn et al., 1991).

 Figuur 6 beschrijft de pepsican-analyse van het monoclonale antilichaam 111.2 met peptiden (12-meren), afgeleid van VP2. Monoclonaal 111.2 is gericht tegen het
15 epitopo GLEDRSTQ, dat ligt op positie 109 tot 116 van de VP2-aminozuurvolgorde (Noteborn et al., 1991). Alleen de resultaten verkregen met peptides nr. 1 tot en met 140 worden getoond (extinctie van peptides nr. 141 tot en met 206 \leq aan 0,103).

20 Figuur 7 beschrijft de pepsican-analyse van het monoclonale antilichaam 111.3 met peptiden (12-meren) afgeleid van VP3. Monoclonaal 111.3 is gericht tegen het epitop PTSSR, dat ligt op positie 19 tot 23 van de VP3-aminozuurvolgorde (Noteborn et al., 1991).

25 Figuur 8. Panel A beschrijft de schematische weergave van de 2 expressievectoren pRSV-VP3 en pRSV-tr. Panel B beschrijft de aminozuurvolgorde van het CAV-eiwit VP3. De proline-residuen zijn schuin en de basische aminozuren dik gedrukt. De 11 C-terminale aminozuren, waarvan de codons gedeleteerd zijn
30 in de expressie-vector, zijn onderstreept.

 Figuur 9 beschrijft de kinetiek van het apoptotische effect van VP3 of ingekort VP3. MDCC-MSB1 cellen werden getransfecteerd met plasmid pRSV-VP3 (●) of pRSV-tr (○), op verschillende tijdstippen na transfectie gefixeerd en gekleurd
35 met het monoclonaal antilichaam CVI-CAV-85.1. De percentages van de immunofluorescerende cellen met kernen die normaal

kleuren met propidium-jodide zijn gegeven. Per experiment werden tenminste 100 cellen geteld, die VP3 of ingekort VP3 tot expressie hadden gebracht.

Referenties

1. Bishop, D.H.L., Hill-Perkins, M., Jones, I.M., Kitts, P.A., Lopez-Ferber, M., Clarke, A.T., Possee, R.D., Pullen, J., and Weyer, U. 1992. Construction of baculovirus expression vectors in vivo and in cultured insect cells. In: Baculovirus and recombinant protein production processes. 1992. Eds. Vlak, J., Schlaeger E.J., and Bernard, A.R. Editions Roche, F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Switzerland.
2. Boss, M.A., Kenten, J.H., Emtage, J.S. and Wood, C.R.. 1984. EP 0120694.
- 10 3. Brown, C.S., Van Lent, W.M., Vlak, J.M., and Spaan, W.J.M. 1991. Assembly of empty capsids by using baculovirus recombinants expressing human parvovirus B19 structural proteins. Journal of Virology 65, 2702-2706.
4. Brown, M., and Faulkner, P. 1977. A plaque assay for nuclear polyhedrosis viruses using a solid overlay. Journal of 15 General Virology 36, 361-364.
5. Cabilly, S., Holmes, W.E., Wetzell, R.B., Heyneker, H.L. and Riggs, A.D. 1984. EP 0125023.
6. Chettle, N.J., Eddy, R.K., Saunders, J., Wyeth, P.J. 20 1991. A comparison of serum neutralisation, immunofluorescence and immunoperoxidase tests for the detection of antibodies to chicken anaemia agent. The Veterinary Record 128, 304-306.
7. De Boer, G.F., Jeurisssen, S.H.M., Noteborn, M.H.M., and Koch, G. 1992. Biological aspects of Marek's disease virus 25 infections as related to dual infections with chicken anemia. Volume 1, p 262-271. In: Proceedings World's Poultry Congress Symposium, Amsterdam, The Netherlands.
8. Engström, B.E. 1988. Blue wing disease of chickens: isolation of avian reovirus and chicken anaemia agent. Avian 30 Pathology 17, 23-32.
9. Gelderblom, H., Kling, S., Lurz, R., Tischer, I., and Von Bülow, V. 1989. Morphological characterization of chicken anaemia agent (CAA). Archives of Virology 109, 115-120.

10. Geysen, H.M., Barteling, S.J., and Meloen, R. 1985. Small peptides induce antibodies with a sequence and structural requirement for binding antigen comparable to antibodies raised against the native protein. Proceedings of National Academy of Sciences USA 82, 178-182.
- 5
11. Goryo, M., Sugimura, H., Matsumoto, S., Umemura, T., and Itakura, C. 1985. Isolation of an agent inducing chicken anemia. Avian Pathology 14, 483-496.
12. Graham, F.L., and Van der Eb, A.J. 1973. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. Virology 52, 456-467.
- 10
13. Jeurissen, S.H.M., Janse, M.E., Van Roozelaar, D.J., Koch, G., and De Boer, G.F. 1992a. Susceptibility of thymocytes for infection by chicken anemia virus is related to pre and post hatching development. Developmental Immunology 2, 123-129.
- 15
14. Jeurissen, S.H.M., Janse, E.M., Ekino, S., Nieuwenhuis, P., Koch, G., and De Boer, G.F. (1988). Monoclonal antibodies as probes for defining cellular subsets in the bone marrow, thymus, bursa of Fabricius, and spleen of the chicken. Veterinary Immunology and Immunopathology 19, 225-238.
- 20
15. Jeurissen, S.H.M., Pol, J.M.A., and De Boer, G.F. 1989. Transient depletion of cortical thymocytes induced by chicken anaemia agent. Thymus 14, 115-123.
- 25
16. Jeurissen, S.H.M., Wagenaar, F., Pol, J.M.A., Van der Eb, A.J., and Noteborn, M.H.M. 1992b. Chicken anemia virus causes apoptosis of thymocytes after in vivo infection and of cell lines after in vitro infection. Journal of Virology 66, 7383-7388.
- 30
17. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680-685.
18. Lucio, B.K., Schat, K.A., and Shivaprasad, H.L. 1990. Identification of the chicken anemia agent, reproduction of
- 35

9301272

- the disease, and serological survey in the United States. *Avian Diseases* 34, 146-153.
19. Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. 1982. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
20. Matsuura, Y., Possee, R.D., Overton, H.A., and Bishop, D.H.L. 1987. Baculovirus expression vectors: the requirements for high level expression of proteins, including glycoproteins. *Journal of General Virology* 68, 1233-1250.
- 10 21. McIlroy, S.G., McNulty, M.S., Bruce, D.W., Smyth, J.A., Goodall, E.A., and Alcorn, M.J. 1992. Economic effects of clinical chicken anemia agent infection on profitable broiler production. *Avian Diseases* 36, 566-574.
- 15 22. McNulty, M.S., Connor, T.J., McNeilly, F., McLoughlin, M.F., and Kirkpatrick, K.S. 1990. Preliminary characterization of isolates of chicken anemia agent from the United Kingdom. *Avian Pathology* 19, 67-73.
- 20 23. McNulty, M.S., Connor, T.J., McNeilly, F., and Spackman, D. 1989. Chicken anemia agent in the United States: isolation of the virus and detection of antibody in the broiler breeder flocks. *Avian Diseases* 33, 691-694.
24. McNulty, M.S., McIlroy, S.G., Bruce, D.W., and Todd, D. 1991. Economic effects of subclinical chicken anemia agent in broiler chickens. *Avian Diseases* 35, 263-268.
- 25 25. Noteborn, M.H.M., en De Boer, G.F. 1990. *Nederlands Octrooi*, Nr. 9002008.
26. Noteborn, M.H.M., De Boer, G.F., Van Roozelaar, D.J., Karreman, C., Kranenburg, O., Vos, J.G., Jeurissen, S.H.M., Hoeben, R.C., Zantema, A., Koch, G., Van Ormondt, H., and Van
 30 der Eb, A.J. 1991. Characterization of cloned chicken anemia virus DNA that contains all elements for the infectious replication cycle. *Journal of Virology* 65, 3131-3139.
27. Noteborn, M.H.M., Kranenburg, O., Zantema, A., Koch, G., De Boer, G.F., and Van der Eb, A.J. (1992a). Transcription of
 35 the chicken anemia virus (CAV) genome and synthesis of its 52-kDa protein. *Gene* 118, 267-271.

28. Noteborn, M.H.M., Van der Eb, A.J., Koch, G., and Jeurissen, S.H.M. (1993). VP3 of chicken anemia virus (CAV) causes apoptosis. In: Vaccines'93. CSHL Press. Cold Spring Harbor, USA. P. 299-304
- 5 29. Noteborn, M.H.M., Verschueren, C.A.J., Van Roozelaar, D.J., Veldkamp, S., Van der Eb, A.J., De Boer, G.F. 1992b. Detection of chicken anemia virus by DNA hybridization and polymerase chain reaction. *Avian Pathology* 21, 107-118.
30. Offringa, R., Gebel, S., Van Dam, H., Timmers, M.,
10 Smits, A., Zwart, R., Stein, B., Bos, J.L., Van der Eb, A.J., and Herrlich, P. 1990. A novel function of the transforming domain of E1A: repression of AP-1 activity. *Cell* 62: 527-538.
31. Ramakrishnan, V., Finch, J.T., Graziano, V., Lee, P.L. and Sweet, R.M. 1993. Crystal structure of globular domain of
15 histone H5 and its implications for nucleosome binding. *Nature* 362: 219-223.
32. Rosenberger, J.K., and Cloud, S.S. 1989. The isolation and characterization of chicken anemia agent (CAA) from broilers in the United States. *Avian Diseases* 33, 707-713.
- 20 33. Smith, G.E., and Summers, M.D., and Fraser, M.J. 1983. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Molecular and Cellular Biology* 3, 2156-2165.
34. Summers, M.D., and Smith, G.E. 1987. A Manual of Methods
25 for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures. Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555.
35. Telford, W.G., King, L.E., and Fraker, P.J. 1992. Comparative evaluation of several DNA binding dyes in the detection of apoptosis-associated chromatin degradation by
30 flow cytometry. *Cytometry*: 13: 137-143.
36. Todd, D., Creelan, J.L., Mackie, D.P., Rixon, F., and McNulty, M.S. 1990. Purification and biochemical characterisation of chicken anaemia agent. *Journal of General Virology* 71, 819-823.
- 35 37. Todd, D., Niagro, F.D., Ritchie, B.W., Curran, W., Allan, G.M., Lukert, P.D., Latimer, K.S., Steffens III, W.L.,

- and McNulty, M.S. 1991. Comparison of three animal viruses with circular single-stranded DNA genomes. *Archives of Virology* 117, 129-135.
38. Todd, D., Mawhinney, K.A., and McNulty, M.S. 1992. 5 Detection and differentiation of chicken anemia virus isolates by using the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 30, 1661-1666.
39. Von Bülow, V., Fuchs, B., and Bertram, M. 1985. 10 Untersuchungen über den Erreger der Infektiösen Anämie bei Hühnerküken (CAA) in vitro: Vermehrung, Titration, Serumneutralisationstest und indirekter Immunofluoreszenstest. *Journal of Veterinary Medicine B* 32, 679-693.
40. Von Bülow, V., Fuchs, B., Vielitz, B., and Landgraf, H. 15 mit dem Virus der Marek'schen Krankheit (MDV) und einem Anämie-Erreger (CAA). *Journal of Veterinary Medicine B* 30, 742-750.
41. Von Bülow, V., Rudolph, R., and Fuchs, B. 1986. Folgen der Doppelinfektion von Küken mit Adenovirus oder Reovirus und dem Erreger der aviären infektiösen Anämie (CAA). *Journal of* 20 *Veterinary Medicine B* 33, 717-726.
42. Winter, G.P. 1987. EP 239400.
43. Winter, G.P., Güssow, D. and Ward, E.S. 1990. Europese octrooiaanvraag No. 0368684.
44. Yuasa, N. 1983. Propagation and infectivity titration of 25 the Gifu-1 strain of chicken anaemia agent in a cell line (MDCC-MSB1) derived from Marek's disease lymphoma. *National Institute Animal Health Quaterly* 23, 13-20.
45. Yuasa, N., Taniguchi, T., Goda, M., Shibatanni, M., Imada, T., and Hihara, H. 1983. Isolation of chicken anemia 30 agent with MDCC-MSB1 cells from chickens in the field. *National Institute Animal Health Quaterly* 23, 78-81.
46. Yuasa, N., Taniguchi, T., and Yoshida, I., 1979. Isolation and some properties of an agent inducing anaemia in chicks. *Avian Diseases* 23, 366-385.

: 9301272

47. Yuasa, N., Taniguchi, and Yoshida, I. 1980. Effect of infectious bursal disease virus infection on incidence of anaemia by chicken anaemia agent. *Avian Diseases* 24, 202-209.

CONCLUSIES

1. Polypeptide afgeleid van het Chicken Anemia Virus, vrij van zijn natuurlijke omgeving, welk polypeptide tenminste een deel van een van de figuren 1, 2, of 3 omvat en dat apoptose kan induceren dan wel direct of indirect antilichamen tegen
5 Chicken Anemia Virus kan opwekken.
2. Polypeptide volgens conclusie 1, waarbij in het polypeptide een mutatie is aangebracht die het vermogen tot inductie van apoptose vermindert.
3. Compositie ter voorkoming van Chicken Anemia Virus-
10 infectie die tenminste een polypeptide volgens conclusie 1 of 2, alsmede een adjuvans omvat.
4. Recombinant DNA molecule dat codeert voor een of meer polypeptiden volgens conclusie 1 of 2.
5. DNA molecule volgens conclusie 4 dat tenminste een deel
15 van een van de strengen van de nucleinezuurvolgorde van figuur 1, 2 of 3 omvat , of dat onder stringente omstandigheden met een DNA molecule dat tenminste een deel van een van de strengen van de nucleinezuurvolgorde van figuur 1, 2 of 3 omvat hybridiseert.
- 20 6. Vector die tenminste een DNA molecule volgens conclusie 4 of 5, alsmede gebruikelijke regelementen voor expressie omvat.
7. Vector volgens conclusie 6 die van virale oorsprong is.
8. Vector volgens conclusie 7 die van retrovirale oorsprong
25 is.
9. Vector volgens conclusie 6 die tenminste voor een deel van Baculovirus afkomstig is.
10. Vector volgens conclusie 6 die afkomstig is van een levend virus vector.
- 30 11. Vector volgens conclusie een der conclusies 6-10 die een tweede, ander DNA molecule volgens conclusie 4 of 5 omvat.

. 9301272

12. Vector volgens een der conclusies 6-11 die voor een chimeer eiwit codeert.
13. Gastheercel die getransfecteerd is met een vector volgens een der conclusies 6-12.
- 5 14. Insectecel getransfecteerd met een vector volgens conclusie 9.
15. Compositie ter voorkoming van Chicken Anemia Virus bij pluimvee die een vector volgens conclusie 10, alsmede een adjuvans omvat.
- 10 16. Geattenuerd Chicken Anemia Virus dat een mutatie bezit in haar DNA dat codeert voor tenminste een van de virale eiwitten zodanig dat het vermogen tot inductie van apoptose is verminderd.
17. Virus volgens conclusie 16 waarbij de mutatie zodanig is dat het virus de 11 C-terminale aminozuren van een polypeptide volgens figuur 8b niet tot expressie brengt.
- 15 18. Compositie ter voorkoming van Chicken Anemia Virus infectie bij pluimvee dat een virus volgens conclusie 16 of 17, alsmede een adjuvans omvat.
- 20 19. Antilichaam of een derivaat of een fragment daarvan gericht tegen een polypeptide volgens conclusie 1 of 2.
20. Inrichting voor de detectie van antilichamen tegen Chicken Anemia Virus dat tenminste een polypeptide volgens conclusie 1 of 2 omvat en een middel voor detectie.
- 25 21. Inrichting voor de detectie van polypeptiden volgens conclusie 1 die tenminste een antilichaam of een fragment of een derivaat volgens conclusie 19 omvat , alsmede een middel voor detectie.
22. Toepassing van een polypeptide volgens conclusie 1 bij het induceren van celdood.
- 30 23. Toepassing van een polypeptide volgens conclusie 1 bij de behandeling van tumoren.
24. Werkwijze voor de behandeling van tumoren waarbij een DNA molecule volgens conclusie 4 of 5 in een tumorcel tot expressie wordt gebracht.
- 35

9301272

25. Werkwijze volgens conclusie 24 waarbij het DNA door een virale vector in de tumorcel wordt gebracht.
26. Werkwijze volgens conclusie 24 waarbij het DNA via receptor gemedieerde opname in de tumorcel wordt gebracht.
- 5 27. Werkwijze volgens conclusie 24 waarbij het DNA middels liposomen in de tumorcel wordt gebracht.
28. Conjugaat voor de behandeling van tumoren dat tenminste een polypeptide volgens conclusie 1 en een stof met affiniteit voor tumor geassocieerde eiwitten, suikers of lipiden omvat.
- 10 29. Conjugaat volgens conclusie 28, waarbij de stof met affiniteit voor tumoren een antilichaam of een derivaat of een fragment daarvan is.
30. Werkwijze volgens conclusie 24 waarbij het DNA direct in de tumor wordt geïnjecteerd.
- 15 31. Werkwijze volgens conclusie 24 waarbij het DNA middels electroporatie in de tumorcel wordt gebracht.
32. Werkwijze volgens conclusie 24 waarbij het DNA middels "een deeltjes-bombardement" in de tumorcel wordt gebracht.
33. Werkwijze volgens conclusie 28 en 29 waarbij tenminste
20 een polypeptide middels "een deeltjes-bombardement" in de tumorcel wordt gebracht.

! 9301272

Tabel 1. Inductie van neutraliserende antistoffen na immunisatie met recombinant VP1.

| kip nr. | antigeen dosis [§] | Neutralisatie titer op dag | | | |
|------------|--------------------------------|----------------------------|----|----|----|
| | | 0 | 14 | 28 | 42 |
| 1 | 0 [¶] | ≤4 | ≤4 | ≤4 | ≤4 |
| 2 | 0 | ≤4 | ≤4 | ≤4 | ≤4 |
| 3 | 0 | ≤4 | ≤4 | ≤4 | ≤4 |
| 4 | 0 | ≤4 | ≤4 | ≤4 | ≤4 |
| 5 | 0 | ≤4 | ≤4 | ≤4 | ≤4 |
| 6 | 0 | ≤4 | ≤4 | ≤4 | ≤4 |
| 7 | 0 | ≤4 | ≤4 | ≤4 | ≤4 |
| 8 | 0 | ≤4 | ≤4 | ≤4 | ≤4 |
| 9 | 10 ⁶ | ≤4 | ≤4 | ≤4 | ≤4 |
| 10 | 10 ⁶ | ≤4 | 8 | 32 | 8 |
| 11 | 10 ⁶ | ≤4 | ≤4 | ≤4 | ≤4 |
| 12 | 10 ⁶ | ≤4 | ≤4 | 8 | ≤4 |
| 13 | 10 ⁶ | ≤4 | ≤4 | ≤4 | ≤4 |
| 14 | 10 ⁶ | ≤4 | ≤4 | ≤4 | 16 |
| 15 | 10 ⁶ | ≤4 | ≤4 | ≤4 | ≤4 |
| 16 | 10 ⁶ | ≤4 | ≤4 | ≤4 | ≤4 |
| 17 | 10 ⁸ | ≤4 | ≤4 | ≤4 | ≤4 |
| 18 | 10 ⁸ | ≤4 | ≤4 | ≤4 | ≤4 |
| 19 | 10 ⁸ | ≤4 | ≤4 | 8 | 8 |
| 20 | 10 ⁸ | ≤4 | ≤4 | ≤4 | ≤4 |
| 21 | 10 ⁸ | ≤4 | ≤4 | ≤4 | ≤4 |
| 22 | 10 ⁸ | ≤4 | ≤4 | ≤4 | 8 |
| 23 | 10 ⁸ | ≤4 | ≤4 | ≤4 | ≤4 |
| 24 | 10 ⁸ | ≤4 | ≤4 | ≤4 | ≤4 |

[§] aantal SF9 insectecellen geïnfecteerd met recombinant baculovirus. Geïmmuniseerd werd met cellysaat.

[¶] dieren ingespoten met PBS i.p.v. cellysaat

9301272

Tabel 2A. Inductie van neutraliserende antistoffen na immunisatie met recombinant VP1, VP2 plus VP3.

| kip nr. | antigeen dosis [§] | Neutralisatie titer op dag | | |
|------------|--------------------------------|----------------------------|------|------|
| | | 15 | 35 | 42 |
| 1 | 0 [¶] | ≤4 | ≤4 | ≤4 |
| 2 | 0 | ≤4 | ≤4 | ≤4 |
| 3 | 0 | ≤4 | ≤4 | ≤4 |
| 4 | 0 | ≤4 | ≤4 | ≤4 |
| 5 | 0 | ≤4 | ≤4 | ≤4 |
| 6 | 0 | ≤4 | ≤4 | ≤4 |
| 7 | 0 | ≤4 | ≤4 | ≤4 |
| 8 | 0 | ≤4 | ≤4 | ≤4 |
| 9 | 10 ⁶ | 32 | 256 | 1024 |
| 10 | 10 ⁶ | 8 | 32 | 64 |
| 11 | 10 ⁶ | ≤4 | 64 | 256 |
| 12 | 10 ⁶ | 8 | 64 | 128 |
| 13 | 10 ⁶ | 4 | 64 | 128 |
| 14 | 10 ⁶ | ≤4 | 16 | 256 |
| 15 | 10 ⁶ | 8 | ≥128 | 256 |
| 16 | 10 ⁶ | 4 | ≥128 | 1024 |
| 17 | 10 ⁸ | 32 | ≤4 | 4 |
| 18 | 10 ⁸ | 8 | 512 | 256 |
| 19 | 10 ⁸ | 16 | 64 | 64 |
| 20 | 10 ⁸ | ≤4 | 64 | 256 |
| 21 | 10 ⁸ | ≤4 | 16 | 32 |
| 22 | 10 ⁸ | ≤4 | 32 | 128 |
| 23 | 10 ⁸ | 16 | 64 | 256 |
| 24 | 10 ⁸ | 4 | 64 | 128 |

[§] aantal SF9 insectecellen geïnfecteerd met recombinant baculovirus. Geïmmuniseerd werd met cellysaat.

[¶] dieren ingespoten met PBS i.p.v. cellysaat

9301272

Tabel 2b. Inductie van neutraliserende antistoffen na immunisatie met ruwe lysaten van Sf9 cellen, geïnficeerd met VP1-, VP2-, en VP3- recombinant baculovirus, of mengsels van ruwe lysaten van Sf9 cellen die apart werden geïnficeerd met VP1-, VP2- en VP3-recombinant baculovirus.

| kip nr. | immunisatie | Neutralisatie titer op dag | | | |
|------------|-------------|----------------------------|----|-----|------|
| | | 0 | 14 | 28 | 42 |
| 1042 | PBS | <2 | <2 | <2 | <2 |
| 1044 | PBS | <2 | <2 | <2 | <2 |
| 1046 | PBS | <2 | <2 | <2 | <2 |
| 1048 | PBS | <2 | <2 | <2 | <2 |
| 1051 | PBS | <2 | <2 | <2 | <2 |
| 1053 | PBS | <2 | <2 | <2 | <2 |
| 1056 | PBS | <2 | <2 | <2 | <2 |
| 1084 | PBS | <2 | <2 | <2 | <2 |
| 1058 | samen* | <2 | <2 | 128 | 256 |
| 1060 | samen | <2 | 16 | 512 | 512 |
| 1062 | samen | <2 | 2 | 64 | 128 |
| 1064 | samen | <2 | 16 | 128 | 256 |
| 1066 | samen | <2 | 4 | 64 | 64 |
| 1068 | samen | <2 | 16 | 256 | N.D. |
| 1070 | samen | <2 | 16 | 128 | 512 |
| 1072 | samen | <2 | 16 | 256 | 512 |
| 1074 | apart& | <2 | <2 | 8 | 8 |
| 1078 | apart | <2 | 2 | <2 | <2 |
| 1081 | apart | <2 | 2 | <2 | <2 |
| 1083 | apart | <2 | <2 | <2 | <2 |
| 1085 | apart | <2 | <2 | 2 | 8 |
| 1087 | apart | <2 | <2 | <2 | <2 |
| 1089 | apart | <2 | <2 | <2 | <2 |
| 1091 | apart | <2 | <2 | <2 | <2 |

* Immunisatie met ruwe lysaten van Sf9 cellen die werden geïnficeerd met VP1-, VP2-, en VP3- recombinant baculovirus.

& Immunisatie met mengsels van ruwe lysaten van Sf9 cellen die apart werden geïnficeerd met VP1-, VP2- en VP3-recombinant baculovirus.

9301272

Tabel 3. Neutraliserende antistoffen in eierdooiers van hennen na immunisatie met een combinatie van recombinant VP1, VP2 en VP3.

| dier nr. | immunisatie | aantal eieren | gemiddelde titer |
|----------|-------------|---------------|------------------|
| 1194 | PBS | 1 | ≤4 |
| 1211 | PBS | 3 | ≤4 |
| 1231 | PBS | 3 | ≤4 |
| 1232 | PBS | 4 | ≤4 |
| 1233 | PBS | 4 | ≤4 |
| 1251 | PBS | 4 | ≤4 |
| 1254 | PBS | 2 | ≤4 |
| 1195 | VP1+VP2+VP3 | 5 | ≤4 |
| 1196 | VP1+VP2+VP3 | 3 | 16 |
| 1197 | VP1+VP2+VP3 | 1 | 4 |
| 1199 | VP1+VP2+VP3 | 2 | 64 |
| 1203 | VP1+VP2+VP3 | 4 | 22.6 |
| 1205 | VP1+VP2+VP3 | 1 | 32 |
| 1206 | VP1+VP2+VP3 | 3 | 128 |
| 1207 | VP1+VP2+VP3 | 3 | 32 |
| 1208 | VP1+VP2+VP3 | 3 | 12.6 |
| 1210 | VP1+VP2+VP3 | 4 | 32 |
| 1216 | VP1+VP2 | 3 | 64 |
| 1217 | VP1+VP2 | 4 | 16 |
| 1218 | VP1+VP2 | 3 | 64 |
| 1219 | VP1+VP2 | 4 | 45.2 |
| 1220 | VP1+VP2 | 3 | 32 |
| 1223 | VP1+VP2 | 3 | 50.8 |
| 1224 | VP1+VP2 | 4 | 76 |
| 1226 | VP1+VP2 | 3 | 40.4 |
| 1227 | VP1+VP2 | 4 | 19 |
| 1228 | VP1+VP2 | 2 | 8 |
| 1229 | VP1+VP2 | 3 | 4 |
| 1230 | VP1+VP2 | 3 | 32 |
| 1235 | VP1+VP3 | 3 | ≤4 |
| 1238 | VP1+VP3 | 3 | ≤4 |
| 1239 | VP1+VP3 | 1 | ≤4 |
| 1245 | VP1+VP3 | 3 | ≤4 |
| 1248 | VP1+VP3 | 2 | ≤4 |
| 1249 | VP1+VP3 | 3 | ≤4 |
| 1255 | VP2+VP3 | 3 | ≤4 |
| 1258 | VP2+VP3 | 5 | ≤4 |
| 1259 | VP2+VP3 | 4 | ≤4 |
| 1260 | VP2+VP3 | 4 | ≤4 |
| 1261 | VP2+VP3 | 4 | ≤4 |
| 1263 | VP2+VP3 | 3 | ≤4 |
| 1264 | VP2+VP3 | 4 | 9.6 |
| 1265 | VP2+VP3 | 3 | ≤4 |
| 1266 | VP2+VP3 | 3 | ≤4 |
| 1267 | VP2+VP3 | 2 | ≤4 |
| 1268 | VP2+VP3 | 3 | ≤4 |
| 1269 | VP2+VP3 | 3 | ≤4 |
| 1270 | VP2+VP3 | 4 | ≤4 |

9301272

Tabel 4. Sectiebevindingen na CAV challenge in nakomelingen van moederdieren die waren geïmmuniseerd met recombinant CAV produkten

| Groep 1 VP1+VP2+VP3) | Groep 2 VP1+VP2 | Groep 3 VP2+VP3 | Groep 4 PBS |
|-----------------------------------|--------------------|-------------------------------|----------------|
| | | dag 6 na infectie | |
| 0/5 [#] | 1/5 | 4/5 | 5/5 |
| | | dag 14 na infectie | |
| 0/5 | 1/5 | 5/5 | 5/5 |
| | | meer dan 14 dagen na infectie | |
| 1/3 (nd: 2/2) ^{&} | 0/0 | 13/14 (nd: 1/14) | 6/6 |

[#] aantal dieren met kleine thymus

[&] geen sectie verricht vanwege aspecifieke sterfte

9301272

Tabel 5. Haematocriet waarden in nakomelingen van met combinaties van recombinant-CAV baculoproducten geïmmuniseerde moederdieren

| Immunisatie met combinaties van recombinant baculoproduct: | | | | |
|--|-----------------|---------------|--------------|--------------|
| | VP1+VP2+VP3 | VP1+VP2 | VP2+VP3 | PBS |
| | 37 ¹ | 29 | 14 | 18 |
| | 30 | 31 | 20 | 11 |
| | 33 | 34 | 13 | 16 |
| | 33 | 30 | 28 | 15 |
| | 34 | 35 | 25 | 19 |
| | 28 | 34 | 8 | 13 |
| | 34 | 22 | 28 | 9 |
| | 32 | 34 | 12 | 11 |
| | 29 | 36 | 6 | 17 |
| | 30 | 37 | 7 | 14 |
| | 29 | 32 | 18 | 10 |
| | 36 | 30 | 16 | 17 |
| | 31 | 25 | 19 | 18 |
| | 32 | 36 | 14 | 7 |
| | 28 | 34 | 29 | 8 |
| | 32 | 33 | 13 | 10 |
| | 33 | 32 | 8 | 8 |
| | 31 | 36 | 31 | 12 |
| | 37 | 34 | 14 | 14 |
| | 32 | 28 | 25 | 9 |
| | 38 | 32 | 19 | 11 |
| | 30 | 35 | 15 | 8 |
| | 33 | 36 | 7 | 12 |
| | 23 | | 17 | 17 |
| | 38 | | 14 | 12 |
| | 37 | | 9 | 13 |
| | 31 | | 18 | |
| | 32 | | 8 | |
| | 29 | | 12 | |
| | 32 | | 14 | |
| | 32 | | | |
| | 31 | | | |
| | 32 | | | |
| | 34 | | | |
| | 32 | | | |
| | ----- | ----- | ----- | ----- |
| gemiddeld: | 32,1 | 32,4 | 16,0 | 12,7 |
| stand. dev. | 3,09 | 3,66 | 6,98 | 3,52 |
| max-min. aantal | 23-38 n=35 | 22-37 n=23 | 6-28 n=30 | 7-19 n=26 |

¹ % haematocriet in individuele dieren

9301272

Tabel 6. Sterfte na CAV challenge in nakomelingen van moederdieren geïmmuniseerd met recombinant CAV produkten

| Groep 1 VP1+VP2+VP3) | Groep 2 VP1+VP2 | Groep 3 VP2+VP3 | Groep 4 PBS |
|-------------------------|--------------------|--------------------|-----------------|
| voor dag 14 na infectie | | | |
| 1/43 (2%) | 7/39 (15.4%) | 12/51 (23.5%) | 8/29 (27.6%) |
| na dag 14 na infectie | | | |
| 3/43 (7%) | 0/39 | 14/51 (27.4%) | 6/29 (20.7%) |

9301272

9301272

M H G N G G Q P A A G G S E S A L S R E G Q P G P S G A A Q G Q V I S N E R S P 499
ATGCACGGGAACGGCGGACAAACGGCCCGTGGGGGAGTGAATCGGCCCTTAGCCCGAGAGGGGCAACCTGGGCCCCACGGGAGCCCGCCAGGGGCAAGTAATTTCAAMTGAACCGCTCTCCA
R R Y S T R T I N G V Q A T N K F T A V G N P S L Q R D P D W Y R W N Y N H S I 619
AGAAGATACTCCACCCGGACCATCAACGGTGTTCAGGCCACCAACAAGTTCACGGCCGTTGGAAACCCCTCACTGCAGAGAGATCCGGATTGGTATCGCTGGGAATTTACAATCACTCTATC
A V W L R E C S R S H A K I C N C G Q F R K H W F Q E C A G L E D R S T Q A S L 739
CCTGTGGCTGGCGAATGCTCCCGCTCCACCGTAAGATCTGCAACTGCCGACAATTCAGAAAGCACTGGTTTCAAGAATGTGCCGACTTGAGGACCCGATCAACCCCAAGCCCTCCCTC
E E A I L R P L R V Q G K R A K R K L D Y H Y S Q P T P N R K K A Y K T V R W Q 859
GAAGAACCGATCCTGGACCCCTCCGAGTACAGGGTAAGCGAGCTAAAAGAAAGCTTGATTACCACTACTCCAGCCGACCCCGAAACCCGAAAGGGCGTATAAGACTGTAAGATGGCAA
D E L A D R E A D F T P S E E D G G T T S S D F D E D I N F D I G G D S G I V D 979
GACGAGCTGCAGACCGAGAGGCCGATTTTACTCCTTCAGAGAGGAGCGGTGGCACCACCTCAAGCGACTTCGACCGAAGATATAAATTTTCGACATCGGAGGAGACAGCGGTATCGTAGAC
E L L G R P F T T P A P V R I V *
GAGCTTTAGGAAGGCCTTTCAACAACCCCGCCCGGTACGTATAGTGTGA 1029

FIG.2

9301272

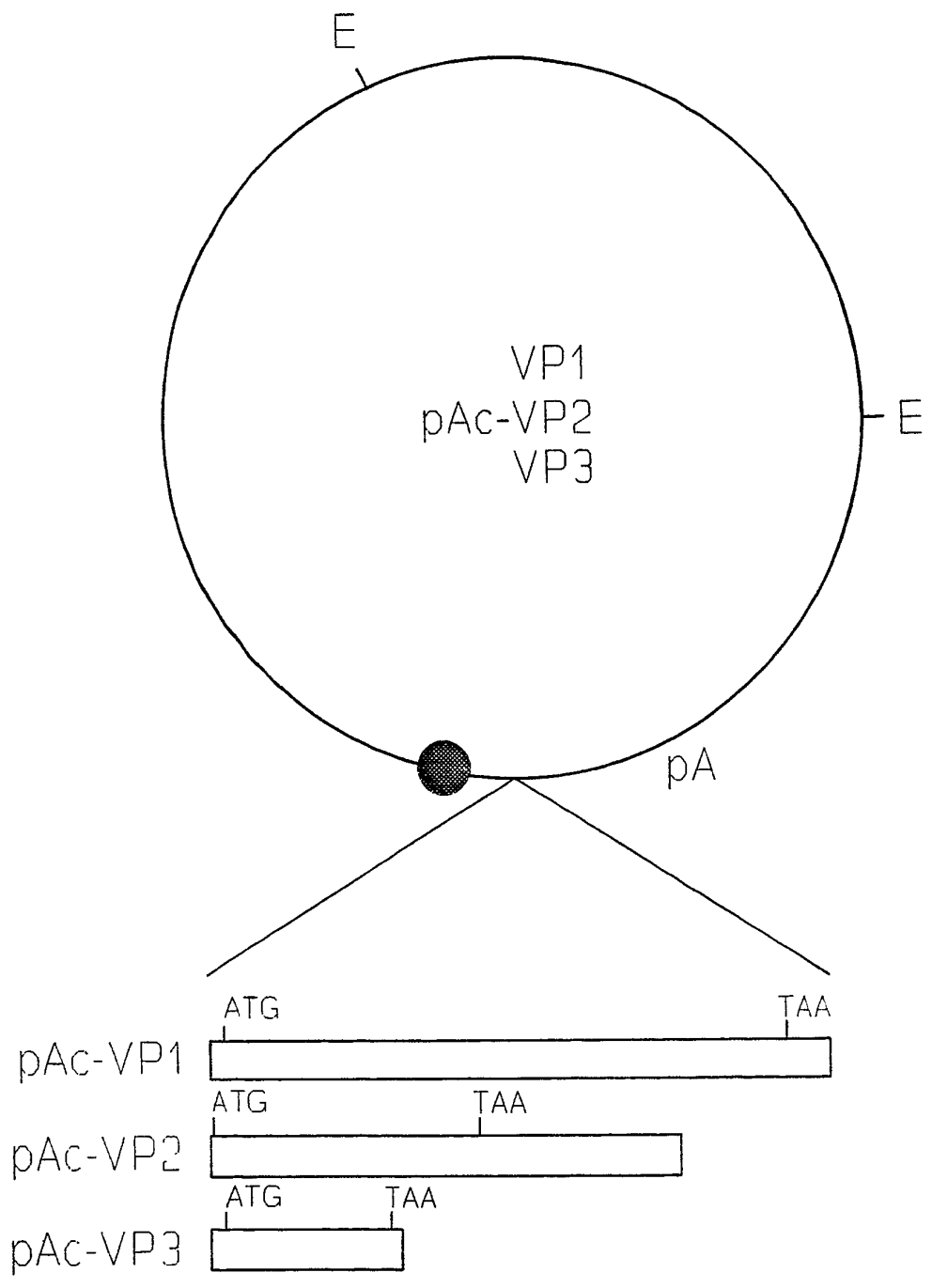
M N A L Q E D T P P G P S T V F R P P T S S R P L E T P H C R E I R I G I A G I
ATGAACGCTCTCCAAGAAGATACTCCACCCGGACCATCAACGGTGTTCAGGCCACCACCAAGTTTACACGGCCGTGGAAACCCCTCACTGCAGAGAGATCCGGATTGGTATCGCTGGAATT 605

T I T L S L C G C A N A R A P T L R S A T A D N S E S T G F K N V P D L R T D Q
ACAATCACTCTATCGCTGTGGCTGCCGAATGCTCCCGCTCCACCGCTAAGATCTGCAACTGGGACAAATTCAGAAAGCACTGGTTCAGAAATGTGCCGGACTTGAGGACCGATCAA 725

P K P P S K K R S C D P S E Y R V S E L K E S L I T T P S R P R T A K R R I R
CCCAAGCCTCCCTCGAAGAAGCGATCCTGGACCCCTCCGAGTACAGGGTAAGCGGCTAAMAGAAAGCTTGATTACCACCTACTCCAGCCGACCCCGAACCCGCAAAAAGGCCGTATAAGA 845

L *
CTGTAA 850

FIG.3



● = polyhedrine promotor
 ATG = initiatiecodon
 TAA = stopcodon
 pA = polyadenyleringssignaal
 E = EcoRI

9301272

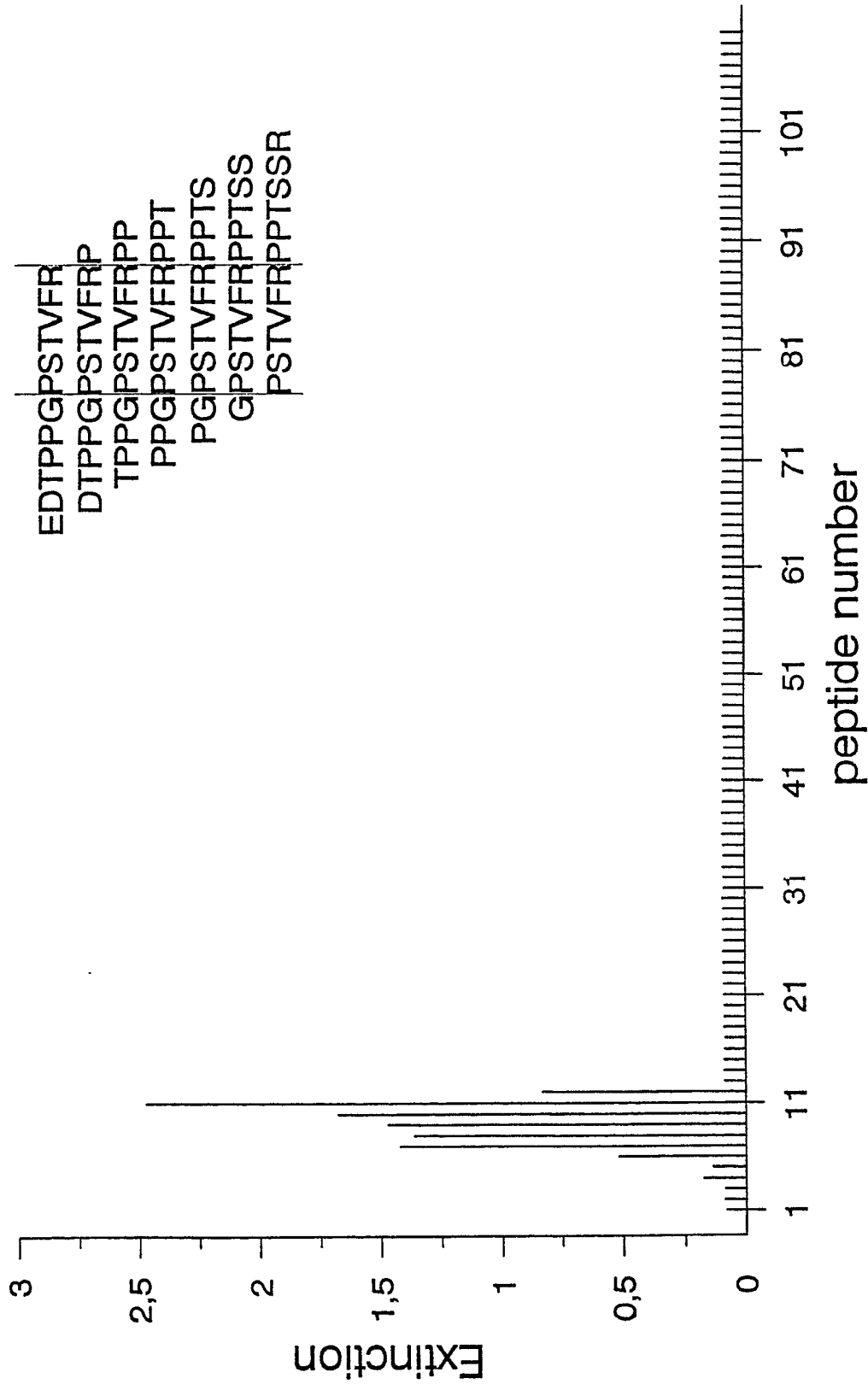


FIG. 5

9301272

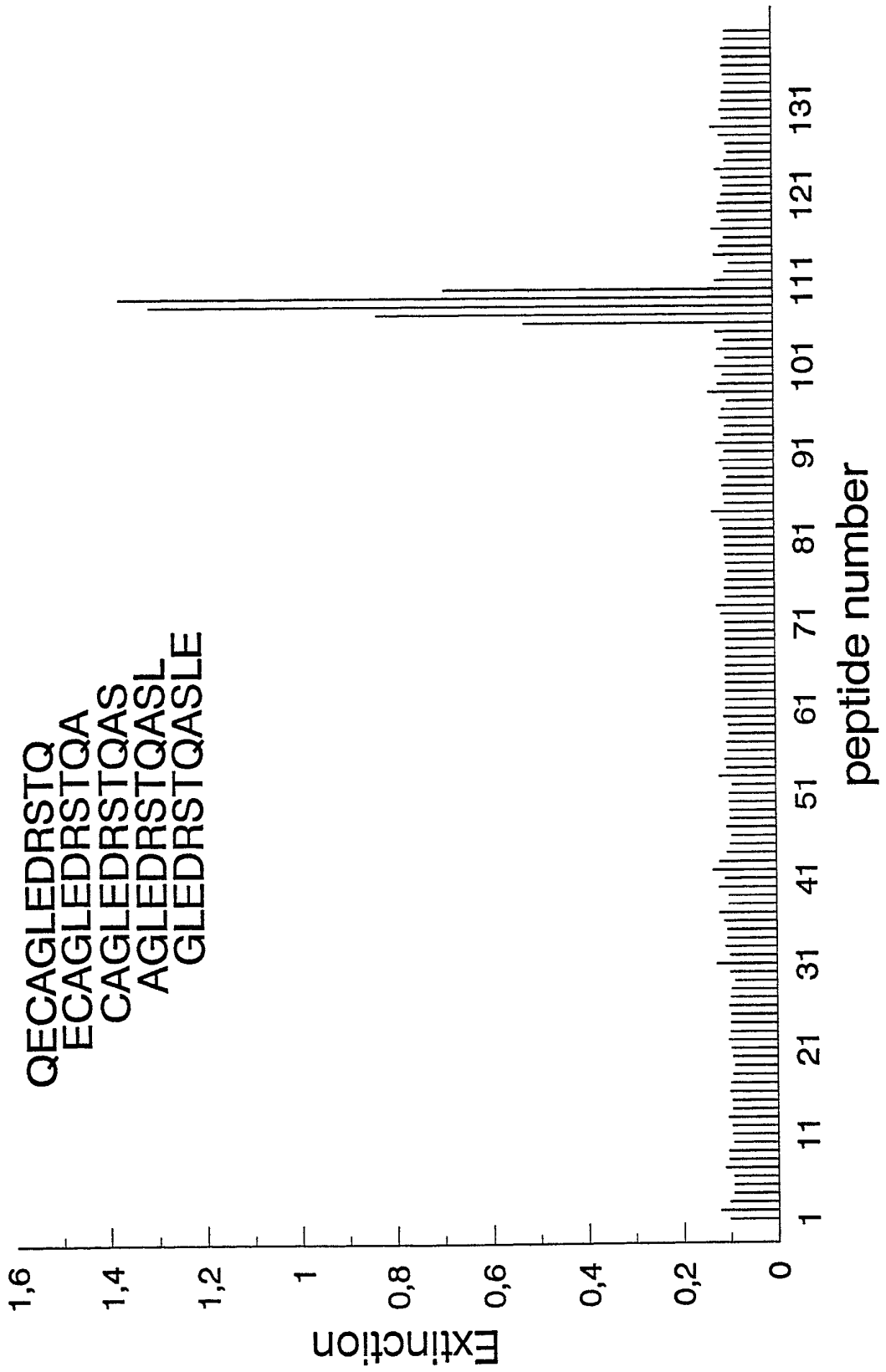


FIG. 6

9 3 0 1 2 7 2

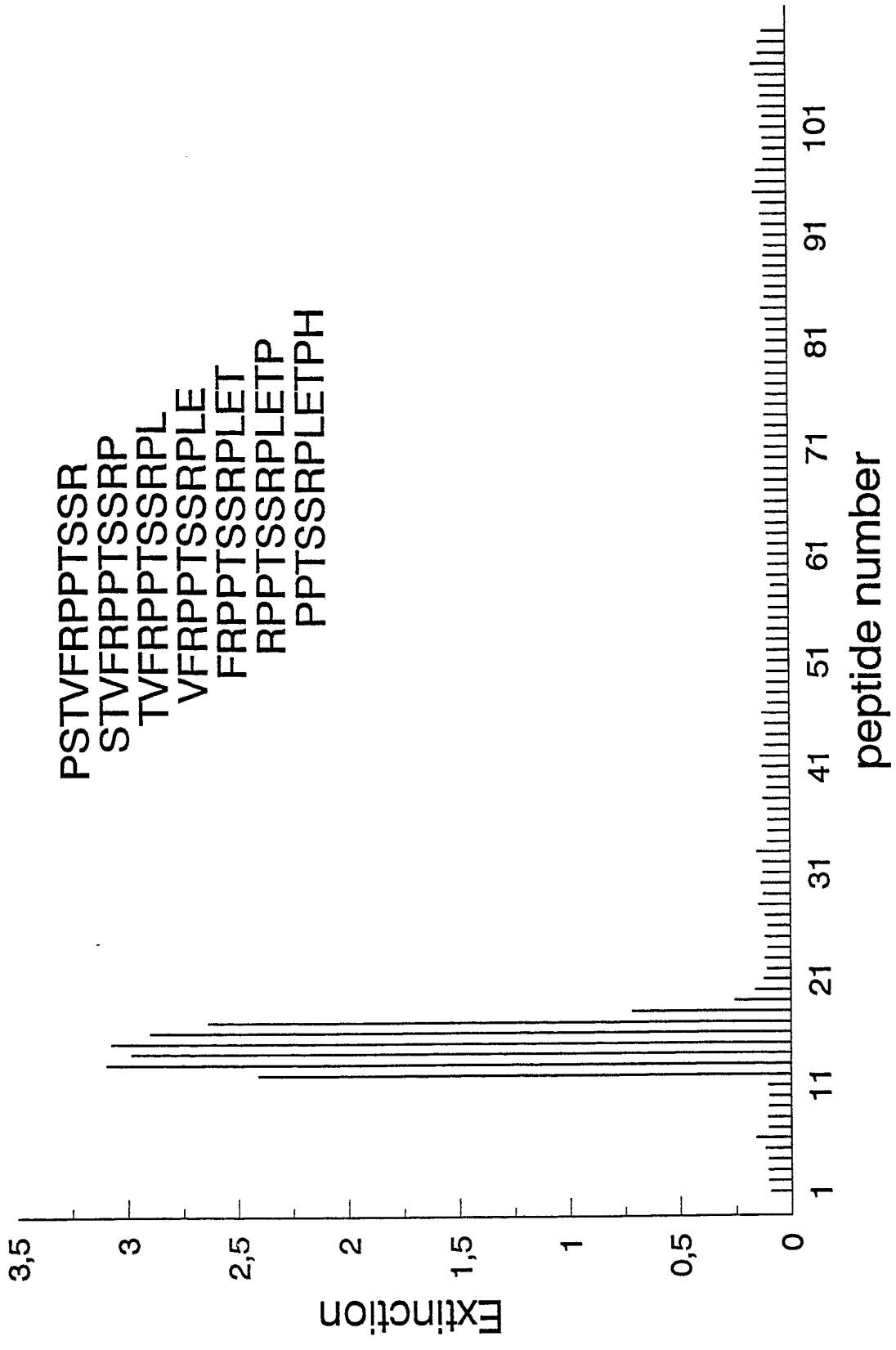
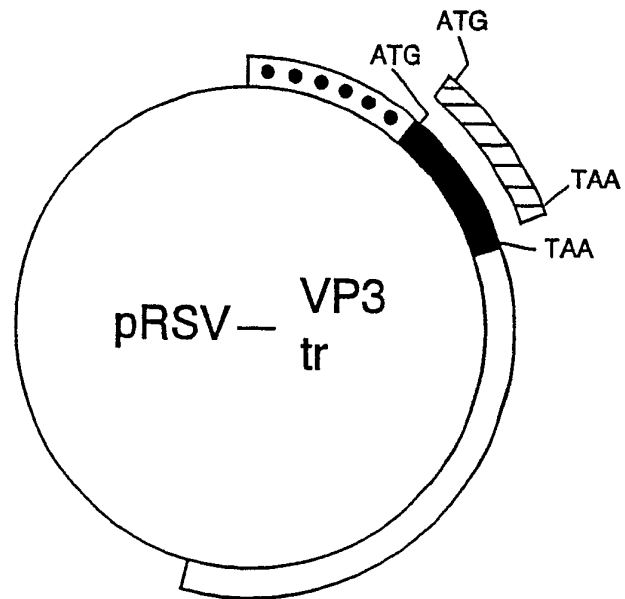


FIG. 7



■ : VP3 □ : RSV LTR
 ▨ : VP3-tr □ : SV40

FIG. 8a

AMINO-ACID SEQUENCE OF VP3.

```

1-M N A L Q E D T P P G P S T V
  F R P P T S S R P L E T P H C
  R E I R I G I A G I T I T L S
  L C G C A N A R A P T L R S A
  T A D N S E S T G F K N V P D
  L R T D Q P K P P S K K R S C
  D P S E Y R V S E L K E S L I
  T T T P S R P R T A K R R I R
L-121
  
```

FIG. 8b

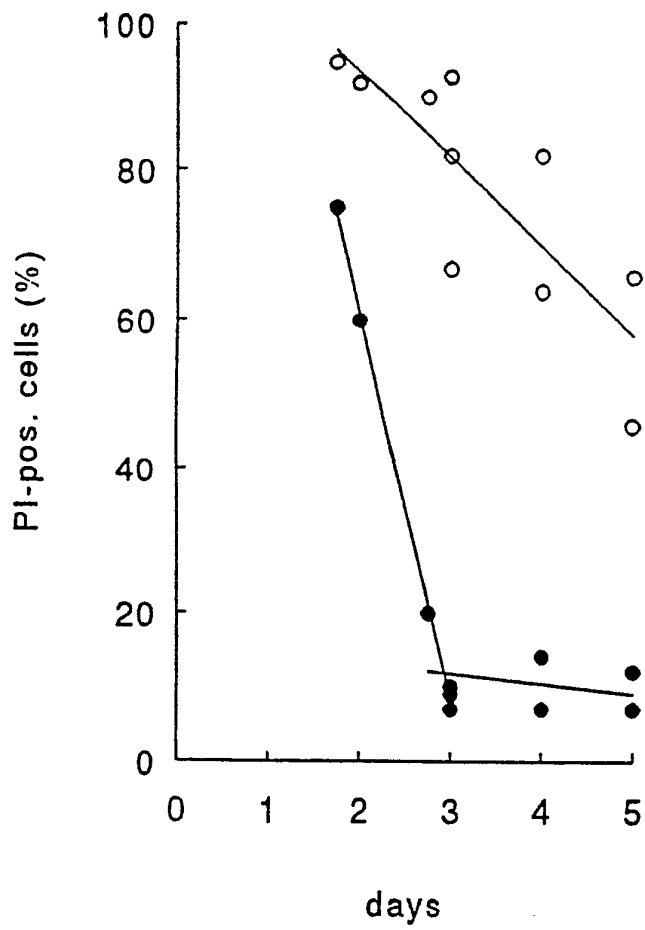


FIG.9

9301272