



PATENTDIREKTORATET  
TAASTRUP

- (21) Patentansøgning nr.: 3045/90  
(22) Indleveringsdag: 21 dec 1990  
(24) Løbedag: 17 aug 1984  
(41) Alm. tilgængelig: 21 dec 1990  
(44) Fremlagt: 23 sep 1991  
(86) International ansøgning nr.: -  
(62) Stamansøgning nr.: 3971/84  
(30) Prioritet: 19 aug 1983 US 524819

(51) Int.Cl.<sup>5</sup>

C 07 K 15/28  
C 12 N 5/18

- (71) Ansøger: \*American Cyanamid Company; One Cyanamid Plaza; Wayne; New Jersey, US  
(72) Opfinder: Robert Harris \*Schenkel; US, Rosie Bick-Har \*Wong; US, Pallaiah \*Thammana; US

(74) Fuldmægtig: Ingeniørfirmaet Budde, Schou & Co.

**(54) Monoklonale antistoffer, der er reaktive med Eimeriaarters sporozoitters antigener, og fremgangsmåde til deres fremstilling**

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

3045-90

Monoklonale antistoffer mod Eimeriaarters sporozoitter fås ved anvendelse af hybridomateknik ved fusion af celler fra en musemyelomalinie og miltceller fra mus immuniseret med Eimeria tenella-sporozoitter, og hybridomakulturer anvendes til at producere monoklonale antistoffer. Disse specifikke sporozoitantigener anvendes til fremstilling af vacciner til forebyggelse og behandling af coccidiose.

Den foreliggende opfindelse angår monoklonale antistoffer, der reagerer specifikt mod sporozoitte fra parasitiske Eimeriaarter samt en fremgangsmåde til deres fremstilling. Disse antistoffer fås ved hybridomateknologi ved hjælp af hybridomakulturer, der frembringer antistoffer mod Eimeriaarter, specielt E. tenella. Ved den foreliggende opfindelse er der identificeret og karakteriseret sporozoitantigener, der sammen med visse monoklonale antistoffer er effektive til forebyggelse og behandling af coccidiose. Antistofferne ifølge opfindelsen er derfor anvendelige til fremstilling af vacciner mod coccidiose.

Coccidiose er en sygdom hos dyr, der fremkaldes af en række forskellige parasitiske protozoer. Fuglecoccidiose er en ødelæggende fjerkræsygdom, der forårsages af arter af slægten Eimeria. Denne sygdom har en kompliceret cyklus, der omfatter både kønnede og ukønnede stadier. Kyllinger inficeres til at begynde med med lidelsen efter indtagelse af fritlevende oocyster, der i reglen findes i forbindelse med fækalier. Oocyster udvikler sig til invaderende, ukønnede sporozoitte i kyllingens mavetarmkanal. Sporozoitterne inficerer epithelceller og udvikles til flerkernestrukturer, der kaldes schizonte. Hver schizont modnes og frigør efterhånden mange invaderende, ukønnede strukturer, der kaldes merozoitte. Disse merozoitte forlader de inficerede celler og invaderer igen andre epithelceller. De mangfoldige, invaderende, ukønnede stadier, der omfatter sporozoitte og merozoitte, er ansvarlige for meget af coccidiosens patologi. Coccidiosens kønnede cyklus begynder, når merozoitterne differencierer til gametocytter. Der sker befrugtning, og produkterne heraf, der kaldes oocyster, frigøres i fæces. Parasittens livscyklus er således sluttet. Hos kyllinger afsluttes cyklussen for Eimeria tenella, der er en repræsentativ art, i løbet af ca. 7-9 døgn.

På grund af de kolossale økonomiske tab, som fjerkræindustrien påføres af Eimeriaarter, er en vaccine yderst ønskværdig. Imidlertid er det på grund af parasittens kom-

plekse livscyklus og på grund af den varierende mængde antigener, der er til stede i hvert stadium, tidligere blevet iagttaget, at inaktiverede eller dræbte parasitter ikke har frembragt konsekvent immunitet. En løsning på dette problem er at isolere og karakterisere særlige antigener fra parasitten og indgive dem i tilstrækkelig mængde til, at de kan fungere som immuniseringsmiddel. Sådanne antigener vil fortrinsvis yde beskyttelse mod infektion med alle vigtige arter. Man ved, at forskellige Eimeria-arter samt forskellige stadier i denne arts livscyklus har både fælles og specifikke antigener [Z. Cerna, *Folia Parasitologica* (Prag), 17, 135-140 (1970), Davis m.fl., *Immunol.* 34, 879-888 (1978), M.E. Rose, *Immunol.* 2, 112-122 (1959), Rose m.fl. *Immunol.*, 5, 79-92 (1962), og Tanielian m.fl., *Acta Parasitol. Yugosl.* 7, 79-84 (1976)]. Man ved også, at udvikling af immunitet over for Eimeria er artsspecifik, og hos nogle arter tamfjerkræ er der klar stammespecifik immunitet [T.K. Jeffers, P.L. Long m.fl. udg., i *Avian Coccidiosis*, side 57-125, *Proc. 13. Poultry Sci. Symp.* (1978), L.P. Joyner, *Parasitol.* 59, 725-732 (1969), P.L. Long, *Parasitol.* 69, 337-347 (1974), og Long m.fl., *Parasitol.* 79, 451-457 (1979)]. Indtil nu er immunogener af Eimeriaarter, der kan stimulere beskyttende immunitet hos fugle- og pattedyrværter, ikke blevet isoleret eller identificeret. Sådanne Eimeriaimmunogener vil sandsynligvis give en vellykket immunisering mod coccidiose.

Udviklingen af lymphocyt-hybridomateknologi udgør et værktøj til frembringelse af forholdsvis store mængder specifikke antistoffer mod en række forskellige Eimeriaantigener. Ved at fusionere celler, som producerer et specifikt antistof (miltceller), med celler fra en myelomatumor, er det muligt at fremstille hybridomaceller, der udskiller monoklonale antistoffer rettet specifikt mod det oprindelige sensibiliseringsantigen (Köhler & Milstein, *Nature* (London) 256, 495-497 (1975)]. Hvis der kunne fås monoklonale antistoffer mod parasitten, ville det måske være muligt at overføre sådanne antistoffer til inficeret eller modtageligt

fjerkræ og således bibringe værtsorganismen et vist omfang af passiv immunitet. Når først sådanne hybridomakulturer, der producerer monoklonale antistoffer, er opnået, er det muligt ved hjælp af forskellige metoder at benytte sådanne  
5 antistoffer til at isolere og identificere specifikke antigener, der igen kan benyttes som vaccine, således at værtsorganismer får et system af aktiv immunitet. Der kendes en række patentskrifter vedrørende hybridomakulturer og monoklonale antistoffer, nemlig US patentskrifterne nr.  
10 4.172.124, 4.196.265, 4.271.145, 4.361.549, 4.631.550, 4.364.932, 4.364.933, 4.364.934, 4.364.935, 4.364.936, 4.381.292 og 4.381.295.

På baggrund af den ovennævnte omtale af coccidiosens økonomiske virkninger inden for dyrehold og især fjerkræindustrien, er en bekæmpelse af protozoparasitten yderst påkrævet. Det er således opfindelsens formål at tilvejebringe nye og værdifulde monoklonale antistoffer mod sporozitter af slægten *Eimeria*. Endvidere er det opfindelsens formål at  
15 isolere og identificere specifikke *E. tenella*-antigener, der kan anvendes til fremstilling af en vaccine til bekæmpelse af fjerkræcoccidiose.  
20

I overensstemmelse hermed angår den foreliggende opfindelse monoklonale antistoffer, som er ejendommelige ved det i den kendetegnende del af krav 1 angivne.

25 Ved en udførelsesform for opfindelsen er de her omhandlede, monoklonale antistoffer ejendommelige ved det i den kendetegnende del af krav 2 angivne, specielt ved det i den kendetegnende del af krav 3 angivne.

De her omhandlede, monoklonale antistoffer fremstilles  
30 ved en fremgangsmåde, som er ejendommelig ved det i den kendetegnende del af krav 4 eller 5 angivne.

Der anvendes et præparat af *E. tenella*-sporozitter til at immunisere mus, for at de efterhånden kan fremstille monoklonale antistoffer ifølge Köhlers og Milsteins metode,  
35 som beskrevet nedenfor. De monoklonale antistoffer anvendes til at identificere parasittens antigener. Antigenerne, der

frembringer monoklonale antistoffer, der reagerer med sporozoitte og udviser neutralisering af parasitvækst, betragtes som beskyttende antigener. De beskyttende antigener, der forekommer hos forskellige arter af Eimeria, anses som mulige kandidater til udvikling af en vaccine mod fuglecoccidiose.

Der fås opløselige antigener fra E. tenellas sporozoitte. Disse opløselige antigener adskilles elektrophoretisk efter deres molekylvægt, og de, der reagerer specifikt med monoklonale antistoffer ifølge opfindelsen, identificeres. Ved hjælp af passende standarder karakteriseres de reaktive antigener derpå på basis af molekylvægt.

For at kunne bedømme de monoklonale antistoffers evne til effektivt at neutralisere coccidiale sporozoitte infektionsformåen udsættes kyllinger, der tidligere er blevet behandlet med forskellige monoklonale antistoffer ifølge opfindelsen, for sporozoitte af E. tenella. Dette in vivo forsøgssystem viser de udvalgte, monoklonale antistoffers beskyttelsesevne.

Kyllinger, der får injektion med opløseliggjorte sporozoitantigener, herunder dem, der er identificeret ved hjælp af de tilsvarende, monoklonale antistoffer, viser sig at være beskyttet mod oral infektion. Denne immuniseringsproces viser vaccins evne til at udvikle sporozoitantigener, der kan erkendes af monoklonale antistoffer.

Opfindelsen vil i det følgende blive nærmere belyst ved hjælp af eksempler.

#### Eksempel 1

#### 30 Konstruktion af hybridomaliner

Sporozoitte af organismen Eimeria tenella fås ved at excystere oocyster med sporer ved anvendelse af kendte metoder [Doran m.fl., Proc. Helminthol. Soc. Wash., 34, 59-65 (1967)]. Et således opnået præparat af E. tenella-sporozoitte anvendes til at immunisere 18 uger gamle BALB/c-hunmus ved intraperitoneal injektion. Når det ved hjælp af

indirekte immunfluorescensanalyse (IFA), der er kendt på området, er konstateret, at en immuniseret mus producerer anti-sporozoit-antistoffer, udvindes miltceller fra musen, og disse fusioneres med musemyelomacelle-linie P3X63,Ag8,653. 5 Fusionsprocessen udføres i nærvær af 30-35% polyethylenglycol (950-1050). Fremgangsmåden til opnåelse af hybridomaer er tidligere blevet beskrevet (jfr. Kennett m.fl., Monoclonal Antibodies, Plenum Press, 365-371 (1980)). Hybridomafusionsprodukter dyrkes i HAT-medium [J.W. Littlefield, Science, 10 145, 709-710 (1964)] indeholdende Iscove's modificerede Dulbecco's medium (IMDM) med 20% kalvefosterserumsupplement. Dyrkningsmedier overvåges for produktion af anti-sporozoit-antistof ved indirekte immunfluorescensanalyse (IFA) ved hjælp af glutaraldehydfikserede sporozoit-af E. tenella 15 som antigenkilde. Af alle de afprøvede kulturer viser 33 fordybninger sig at være positive ved IFA.

For at sikre hybridomakulturernes monoklonalitet anvendes en begrænsende fortyndingsmetode. Efter E. tenella-sporozoiters udsættelse for forskellige, monoklonale, antistoffer ifølge opfindelsen iagttages tre hoved-IFA-reaktivitetsmønstre på behandlede sporozoit-af E. tenella 20 tistoffer ifølge opfindelsen iagttages tre hoved-IFA-reaktivitetsmønstre på behandlede sporozoit-af E. tenella: (1) reaktion på hele overfladen af sporozoit-af E. tenella, (2) overfladereaktion som pletter på sporozoit-af E. tenella og (3) indvendig reaktion omkring kernemembranerne i sporozoit-af E. tenella. Disse reaktionsmønstre 25 bekræftes af ferritinmærkning og transmissionselektronmikroskopi (Speer m. fl., J. of Protozoology, i trykken). Bedømt ved IFA danner hybridomakulturer ifølge opfindelsen identiske antistoffer efter kloning. Kloner dyrkes enten in vitro eller i BALB/c-mus som peritoneale tumorer, og ascitesvæsken 30 indeholder antistoffer i en koncentration på op til ca. 10 mg/ml.

### Eksempel 2

Fremstilling af antigener associeret med E. tenella-sporozoit-af E. tenella 35 zoitter

Til antigenfremstillingen anvendes frist ekscyterede

sporozoitter af *E. tenella*. Sporozoitternes ydermembrankomponenter ekstraheres ved hjælp af detergenter (dvs. 0,5% "Nonidet® P40", 0,5-2% "CHAPS" eller 0,5-1% "Triton® X-100") i 5 mM natriumphosphatpuffer med pH 7,8. Pufferen indeholder

5 følgende proteaseinhibitorer: aprotinin (2 trypsinenheder/ml), antipain (25 µg/ml), leupeptin (25 µg/ml), phenylmethylsulfonylfluorid (4 mM) [Yoshida m.fl., J. Exp. Med., 154, 1225-1236 (1981)]. Det med detergent opløseliggjorte

10 materiale centrifugeres ved 100.000 x G i 10 minutter for at fjerne partikelformet materiale. Det klare, ovenstående lag indeholder opløselige antigener associeret med *E. tenella*-sporozoitter.

### Eksempel 3

#### 15 Antigenkarakterisering

Opløselige antigener af *E. tenella*-sporozoitter adskilles efter molekylvægt ved anvendelse af SDS-polyacrylamid-gelelektrophorese (PAGE) [U.K. Laemmli, Nature 227, 680-685 (1970)]. SDS-PAGE-adskilte proteiner overføres elektrophoretisk på nitrocellulosemembraner ved hjælp af Western-pletningsteknik [Towbin m.fl., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 76, 4350-4354 (1979)]. Nitrocellulosefilterne omsættes derpå med enten fortyndet ascitesvæske eller brugt hybridomayrkningsvæske, der indeholder antistoffer. Bundne, monoklonale

20 antistoffer påvises derpå ved hjælp af radioimmunpåvisning, der omfatter <sup>125</sup>I-mærket anti-muse-IgG-antistof (New England Nuclear). Det ubundne, andet antistof fjernes ved vask, og nitrocellulosefiltrene eksponeres derpå med "Kodak® XAR-5" røntgenfilm.

30 Alternativt identificeres specifikke antigen-monoklonalt antistof-komplekser ved hjælp af en ELISA-teknik ved brug af peberrodsperoxidasekoblet kanin-IgG-antistof (Cappel Lab) mod museimmunoglobulin (Burnett m.fl., Anal. Biochem. 112, 195-203 (1981)]. Der anvendes "Bio-Rad Immuno

35 Blot" analysesættet.

De reaktive sporozoitantigeners tilsyneladende mole-

kylvægt bestemmes ved at sammenligne de elektrophoretiske Rf-værdier for antigenerne med Rf-værdier for forbindelser med kendte molekylvægte, der køres som standarder sammen med antigenerne i samme system. Forskellige antigeners forsøgs-  
5 søgsmolekylvægtsdata findes i tabel I.

Tabel I

Molekylvægtbestemmelse for forskellige E. tenella-sporozoit-  
antigener

10

Hybridoma- kultur	Monoklonalt antistof	Antigens omtr. molekylvægt
s5E5	s1	110 ± 16, 130 ± 20 kD
15 s4E2	s2	110 ± 16, 130 ± 20 kD
s1C4	s3	66 ± 9 kD, 55 ± 8 kD, 20-30 kD, 18 ± 3 kD, 15 ± 2 kD
s2G8	s4	55 ± 8 kD
20 s5B9	s5	55 ± 8 kD
s1A	s6	54 ± 8 kD
s3C11	s7	50 ± 7 kD
s3D3	s8	29 ± 4 kD
s1E4	s9	58 ± 9 kD, 130 ± 20 kD

25

Eksempel 4

Neutralisering af E. tenella-sporozoit-  
antistoffer ved brug af in vivo kyllingeprøve

30

Der anvendes et in-vivo-system til bedømmelse af monoklonale antistoffer ifølge opfindelsen produceret ud fra hybridomaliner til at neutralisere sporozoit-  
fra E. tenella. Fuglens coecum er stedet, hvor infektion med E. tenella finder sted, og den er tilgængelig ved hjælp af  
35 kirurgi [Burns m.fl., Exp. Parasitol. 8, 515-526 (1959), Lawn m.fl., J. Parasitol. 68, 1117-1123 (1982)]. Kyllingers coecum blotlægges kirurgisk og infunderes med præparater af

E. tenella-sporozoitte, der forud er blevet behandlet med monoklonale antistoffer ifølge opfindelsen.

Frisk ekskysterede sporozoitte inkuberes under sterile betingelser med varmeinaktiveret ascitesvæske, der  
5 indeholder monoklonale antistoffer ifølge opfindelsen stam-  
mende fra hybridomalinier. Inkubationstiden er 30-60 minutter  
ved 25-37°C. En inkubationstid ved 37°C på 60 minutter fore-  
trækkes. Derpå indføres behandlede sporozoitte i coecum på  
3 uger gamle kyllinger ved hjælp af kirurgi. Ved slutningen  
10 af inkubationstiden på 5 dage observeres de inficerede kyl-  
lingers coecum for læsioner. Inkubationstiden på 5 døgn  
repræsenterer det mest ødelæggende stadium af coccidiose.  
Resultaterne af dette forsøg er vist i tabel II. Det skal  
bemærkes, at de monoklonale antistoffer s3 og s8 begge giver  
15 60% samlet beskyttelse mod infektion med sporozoitte af E.  
tenella.

20

25

30

35

Tabel II

In-vivo bedømmelse af forskellige monoklonale antistoffer til bekæmpelse af E. tenella-sporozoit

10	5 Behandling, hybridomalnie (kilde til monoklonalt antistof)	Monoklonalt antistof nr.	Antal sporo- zoitter	% beskyttelse		
				Ingen	Delvis	Fuld
	---	---	2000	70	21	9
	s3D3	s8	2000	30	10	60
	s2G8	s4	2000	100	0	0
15	s1C4	s3	2000	20	20	60
	s1E4	s9	2000	60	0	40
	s3D3 & s2G8	s8+s4	2000	25	19	56
	s3D3 & s1C4	s8+s3	2000	75	0	25
20	---	---	3000	89	11	0
	s3D3	s8	3000	60	40	0
	s2G8	s4	3000	67	16	16
	s1C4	s3	3000	50	0	50
	s1E4	s9	3000	100	0	0
25	s3D3 & s2G8	s8+s4	4000	50	50	0
	s3D3 & s1C4	s8+s3	3000	50	0	50
	s3D3 & s1A	s8+s6	3000	80	0	20

30

Eksempel 5Immunisering med E. tenella-sporozoit-antigener

Kyllinger, 1 uge gamle, immuniseres intraperitonealt med opløseliggjorte E. tenella-sporozoit-antigener. Til den indledende injektion anvendes proteinmateriale, der stammer fra  $1,5 \times 10^7$  sporozoit i Freund's komplette adjuvans. To boosterinjektioner følger med 10 dages mellemrum, hvor der til hver anvendes halvdelen af den indledende immuniseringsdosis i Freund's ukomplette adjuvans. 10 døgn efter den sidste booster inficeres kyllingerne oralt med 50.000

oocyster. Fem døgn efter infektion iagttages coecumlæsioner. Resultaterne af dette forsøg er vist i tabel III. Det bemærkes, at opløselige antigener giver signifikant beskyttelse mod oral infektion med oocyster, hvorimod normale kyllinger 5 ikke beskyttes.

Tabel III

10 <u>Behandling</u>	<u>% beskyttelse*)</u>		
	<u>Ingen</u>	<u>Delvis</u>	<u>Fuld</u>
Kontrol	100	0	0
Immuniseret	0	33	66

15 \*% af de afprøvede fugle.

De nye, monoklonale antistoffer nr. s1C4, s3D3, s1E4, s5B9, s5E5, s1A og s2G8, der er isoleret som beskrevet ovenfor, er blevet deponeret hos American Type Culture Collection 20 (ATCC) i Rockville, Maryland, og er blevet optaget i den permanente samling. s1C4 har fået tildelt nr. HB8333, s3D3 nr. HB8331, s1E4 nr. HB8332, s5B9 nr. HB8402, s5E5 nr. HB8403, s1A nr. HB8404 og s2G8 nr. HB8405. Disse antistoffer er tilgængelige for offentligheden ved udstedelse af patent 25 på grundlag af den prioritetsbegrundende ansøgning.

Nr. s1C4 HB8333, nr. s3D3 HB8331 og nr. s1E4 HB8332 blev deponeret hos ATCC den 11. august 1983. De nye, monoklonale antistoffer nr. s5B9 HB8402, nr. s5E5 HB8403, nr. s1A HB8404 og nr. s3G8 HB8405 blev deponeret hos ATCC den 30 1. november 1983.

P A T E N T K R A V

1. Monoklonale antistoffer, k e n d e t e g n e t ved, at de er produceret af hybridomaer dannet ved fusion af celler fra en musemyelomalinie og miltceller fra en mus, 5 der i forvejen er immuniseret med Eimeria tenella-sporozoit-ter, og som

(a) reagerer specifikt med Eimeriaarters sporozoiters antigener,

10 (b) reagerer specifikt med antigener af Eimeria tenella med en molekylvægt på 13-150 kD.

2. Monoklonale antistoffer ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at de er fremstillet ud fra hybridomaer dannet ved fusion af P3x63,Ag8,653-myelomaceller og miltcel-ler fra BALB/c-mus, der forud er immuniseret med E. tenella-15 sporozoit-ter.

3. Monoklonalt antistof ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved, at det er produceret af hybridomaet beteg-  
net klon nr. s5E5 og deponeret som ATCC HB8403, eller af  
hybridomaet betegnet klon nr. s4E2, eller af hybridomaet  
20 betegnet klon nr. s1C4 og deponeret som ATCC HB8333, eller  
af hybridomaet betegnet klon nr. s2G8 og deponeret som ATCC  
HB8405, eller af hybridomaet betegnet klon nr. s5B9 deponeret  
som ATCC HB8402, eller af hybridomaet betegnet klon nr. s1A  
deponeret som ATCC HB8404, eller af hybridomaet betegnet  
25 klon nr. s3C11, eller af hybridomaet betegnet klon nr. s3D3  
deponeret som ATCC HB8331, eller af hybridomaet betegnet  
klon nr. s1E4 deponeret som ATCC HB8332.

4. Monoklonalt antistof ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at det er fremstillet ved en fremgangsmåde  
30 ifølge hvilken

(a) mus immuniseres med E. tenella-sporozoit-ter,

(b) milten hos disse mus fjernes, og der fremstilles en suspension heraf,

35 (c) miltcellerne fusioneres med musemyelomceller i nærvær af en fusionspromotor,

(d) de fusionerede celler fortyndes og dyrkes i sepa-

rate fordybninger i et medium, der ikke fremmer vækst af ikke-sammensmeltede myelomceller,

(e) det ovenstående lag i hver fordybning indeholdende et hybridoma bedømmes for tilstedeværelse af antistof, der er reaktivt med E. tenella-sporozoitte,

(f) et hybridoma, der producerer antistof, der er reaktivt med E. tenella-sporozoitte, udvælges og klones, og

(g) antistoffet udvindes fra det ovenstående lag eller ascitesproduktet af klonerne.

5  
10  
15  
20

5. Fremgangsmåde til fremstilling af monoklonale antistoffer ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at klon nr. s5E5 (ATCC HB8403), s4E2, s1C4 (ATCC HB8333), s2G8 (ATCC HB8405), s5B9 (ATCC HB8403), s1A (ATCC HB8404), s3C11, s3D3 (ATCC HB8331) eller s1E4 (ATCC HB8332) dyrkes i et passende medium, og at antistoffet udvindes fra det ovenstående lag i en sådan hybridomakultur, eller at der i en mus injiceres en hybridomakultur betegnet klon nr. s5E5 (ATCC HB8403), s4E2, s1C4 (ATCC HB8333), s2G8 (ATCC HB8405), s5B9 (ATCC HB8402), s1A (ATCC HB8404), s3C11, s3D3 (ATCC HB8331) eller s1E4 (ATCC HB8332), og at antistoffet udvindes fra musens ascites eller serum.

6. Monoklont antistof, k e n d e t e g n e t ved, at det er fremstillet ved fremgangsmåden ifølge krav 5.