

19



Octrooiraad
Nederland

11 195051

12 C OCTROOI

21 Aanvraag om octrooi: 8820679

51 Int.Cl.⁷
A61K39/12

22 Ingediend: 24.08.1988

86 Oorspronkelijke internationale aanvraag:
PCT/US88/02816

87 Publicatienummer en -datum oorspronkelijke
internationale aanvraag: WO 89/03429 20.04.1989

30 Voorrang:
28.08.1987 US 0000090711
20.10.1987 US 0000110335
25.04.1988 US 0000186054
23.08.1988 US 0000234390

43 Ter inzage gelegd:
03.07.1989 I.E. 1989/13

47 Dagtekening:
01.07.2003

45 Uitgegeven:
01.09.2003 I.E. 2003/09

73 Octrooihouder(s):
Health Research, Incorporated te Albany, New
York, Verenigde Staten van Amerika (US).

74 Gemachtigde:
Mr. G.L. Kooy c.s. te 2514 BB Den Haag.

54 Recombinant-pokkenvirussen, immunologische samenstellingen die een recombinant-pokkenvirus
omvatten en werkwijze voor het tot expressie brengen van het DNA in een recombinant-pokkenvirus.

NL C 195051

Dit octrooi is verleend onder toepassing van artikel 102b van de rijkswet van 19 december 2002 tot wijziging van de Rijsoctrooiwet 1995 in verband met de behandeling van octrooiaanvragen die zijn ingediend op grond van de Rijsoctrooiwet (Stb. 2003, 35)

Recombinant-pokkenvirussen, immunologische samenstellingen die een recombinant-pokkenvirus omvatten en werkwijze voor het tot expressie brengen van het DNA in een recombinant-pokkenvirus

De uitvinding heeft betrekking op recombinant-pokkenvirussen, op immunologische samenstellingen die een recombinant-pokkenvirus omvatten en op een werkwijze voor het tot expressie brengen van het DNA in een recombinant-pokkenvirus.

Achtergrond van de uitvinding

Vogelpokken of vogelpokkenvirus is een geslacht van nauw verwante pokkenvirussen die pluimvee infecteren. Tot het geslacht vogelpokken behoren de soorten pluimveepokken, kanariepokken, junco-pokken, duivenpokken, kwartelpokken, mussenpokken, spreuwenpokken en kalkoenenpokken. De soort pluimveepokken infecteert kuikens en moet niet verward worden met de menselijke ziekte die "waterpokken" genoemd wordt. Het geslacht vogelpokken deelt vele kenmerken met andere pokkenvirussen en is een lid van dezelfde onderfamilie als het koepokvirus namelijk pokkenvirussen van gewervelden. Pokkenvirussen, waaronder koepokken en vogelpokken, vermenigvuldigen zich binnen eukaryotische gastheercellen. Deze virussen onderscheiden zich door hun grote afmetingen, ingewikkelde bouw en doordat zij zich in het cytoplasma vermenigvuldigen. Maar Vaccinia en vogelpokken zijn verschillende geslachten en zijn verschillend in hun molecuulgewichten, hun antigene determinanten en in hun gastheersoorten, zoals vermeld is in Intervirology, deel 17, blz. 42-44, het 4e verslag van de Internationale Commissie over Taxonomie van Virussen (1982).

Andere gewervelden dan vogels, zoals zoogdieren (waaronder de mens) worden door vogelpokkenvirussen niet productief geïnfecteerd. Verder vermenigvuldigt vogelpokken zich niet als zoogdier- (waaronder menselijke) celkweken ermee geïnfecteerd worden. In zulke met vogelpokken beënte zoogdier-celkweken zullen de cellen sterven door het cytotoxische effect, maar er is geen blijk van een productieve virusinfectie.

Het beënten van een andere gewervelde dan een vogel, zoals een zoogdier, met levende vogelpokken leidt tot de vorming van schade bij de entplaats die op die van een koepok-ent lijkt. Maar er komt geen productieve virusinfectie uit voort. Desalniettemin is nu gevonden dat een aldus beënte zoogdier immunologisch op het vogelpokkenvirus respondeert. Dit is een onverwachte uitkomst.

Uit gedode pathogenen of gezuiverde antigeen-bestanddelen van zulke pathogenen bestaande vaccins moeten in grotere hoeveelheden geïnjecteerd worden dan levende virusvaccins om tot een effectieve immuunrespons te komen. Dat komt doordat beënting met levend virus een veel efficiëntere wijze van vaccineren is. Een betrekkelijk kleine ent kan een effectieve immuunrespons geven doordat het van belang zijnde antigeen tijdens de vermenigvuldiging van het virus versterkt wordt. Uit medisch oogpunt gezien geven levende virusvaccins een immuniteit die doeltreffender is en langer aanhoudt dan het beënten met een gedode pathogeen of een gezuiverd antigeen-vaccin. Uit gedode pathogenen of gezuiverde antigeen-bestanddelen van zulke pathogenen bestaande vaccins vereisen dus de bereiding van grotere hoeveelheden vaccin-materiaal dan met levend virus nodig is.

Uit de voorafgaande discussie is duidelijk dat er medische en economische voordelen zijn aan het gebruik van levende virusvaccins. Eén zo'n levend virusvaccin bevat het koepokvirus.

Dit virus staat al bekend als nuttig om er met recombinant-DNA-methoden DNA in te voegen dat de genetische reeksen vertegenwoordigt van antigenen voor zoogdier-pathogenen.

Er zijn in de techniek dus al methoden ontwikkeld waarmee recombinant-koepokvirussen geschapen kunnen worden door het inbouwen van DNA van allerlei herkomst (bijv. viraal, prokaryotisch, eukaryotisch of synthetisch) in een niet-essentieel gebied van het uit koepokvirus-genoom, waaronder DNA-reeksen die voor de antigenen determinanten van een pathogeen organisme coderen. Bepaalde met deze methoden geschapen recombinant-koepokvirussen zijn gebruikt om in zoogdieren specifieke immuniteit uit te lokken tegen een verscheidenheid van zoogdier-pathogenen, alles zoals beschreven in het Amerikaanse octrooi-schrift 4.603.112, waarnaar hier verwezen wordt.

Het niet gemodificeerde koepokvirus heeft een lange geschiedenis van betrekkelijk veilig en doeltreffend gebruik voor het inenten tegen pokken. Maar voor het uitroeien van pokken, toen niet gemodificeerde koepokvirus op grote schaal toegediend werd, was er een bescheiden maar reeel risico op complicaties in de vorm van een algemene pokkeninfectie, vooral bij hen die aan eczeem of aan onderdrukte immuunrespons leden. Een andere zeldzame maar mogelijke complicatie die het gevolg kan zijn van pokkeninenting is een vaccinatie-encefalitis. De meeste van deze reacties waren het gevolg van het beënten van individuen met huidziekten zoals eczeem of met beschadigde immuun-systemen, of van individuen in huishoudens met anderen die eczeem of verminderde immunologische responsen hadden. Vaccinia is een levend virus en is normaliter onschadelijk voor een gezond individu. Maar het kan gedurende meerdere weken na de beënting

tussen individuen overgedragen worden. Als een individu met schade aan de normale immuunrespons geïnfecteerd wordt, of door beënting of door besmettelijke overdracht vanuit een recent beënt individu kunnen de gevolgen ernstig zijn.

- Men kan dus inzien dat een werkwijze die de techniek met de voordelen van het beënten met levend virus verrijkt maar de hierboven besproken problemen vermindert of wegneemt een zeer wenselijke voortgang van de huidige stand der techniek zou betekenen. En dit is thans nog belangrijker door de opkomst van de ziekte die als "verworven immuundeficiëntie-syndroom" (AIDS) bekend staat. Slachtoffers van deze ziekte lijden aan een ernstig immunologisch-niet-functioneren en kunnen gemakkelijk schade oplopen aan een anders veilig levend virus-preparaat als ze met zo'n virus in contact komen, hetzij direct hetzij door contact met een persoon die recent geïmmuniseerd is met een vaccin dat zo'n levend virus bevat.

Oogmerken van de uitvinding

- Het is een doel van deze uitvinding een vaccin te verschaffen dat gewervelden tegen een pathogeen organisme kan immuniseren, dat de voordelen van een levend virusvaccin heeft maar geen of weinig van de nadelen van zowel een levend virusvaccin als van een gedood virusvaccin, zoals hierboven aangegeven, vooral bij gebruik voor het immuniseren van andere gewervelden dan vogels. Het is een ander doel van deze uitvinding in zulke vaccins te gebruiken, synthetische recombinant-vogelpokkenvirussen te verschaffen.

- Het is een ander doel van deze uitvinding een werkwijze te verschaffen voor het uitlokken van een immunologische respons in vogels en andere gewervelden tegen een antigeen door de gewervelde met een synthetisch recombinant-vogelpokkenvirus te beënten dat, in het geval van andere gewervelden dan vogels, zich niet productief in het dier kan vermenigvuldigen onder vorming van infectieus virus. In dat geval is het virus zelf beperkend, wat de mogelijkheid van verspreiding op niet gevaccineerde gastheren beperkt.

- Het is nog een ander doel van de uitvinding een werkwijze te verschaffen voor het uitlokken van een immunologische respons in een gewervelde tegen een antigeen, welke werkwijze het beënten van de gewervelde met een vaccin inhoudt, met in dat vaccin synthetisch recombinant-vogelpokkenvirus dat de antigene determinant van een pathogeen voor die gewervelde omvat en tot expressie brengt.

- Het is een ander doel van de uitvinding een werkwijze te verschaffen voor het tot expressie brengen van een genproduct in een gewervelde door die gewervelde te beënten met een recombinant-virus dat DNA bevat dat voor het genproduct codeert en dat tot expressie brengt zonder productieve vermenigvuldiging van het virus in die gewervelde.

- Het is nog een ander doel van de uitvinding een werkwijze te verschaffen voor het uitlokken van een immunologische respons in een gewervelde tegen een antigeen door de gewervelde met een recombinant-virus te beënten dat DNA bevat dat voor het antigeen codeert en dat tot expressie brengt zonder productieve vermenigvuldiging van het virus in de gewervelde.

Omschrijving van de uitvinding

- De uitvinding heeft betrekking op een recombinantvogelpokkenvirus dat in een niet-essentieel gebied van het vogelpokken-genoom DNA van andere herkomst dan vogelpokken bevat dat codeert voor een antigeen van een zoogdierpathogeen.

- De uitvinding heeft ook betrekking op een immunologische samenstelling die bij introductie in een zoogdier een immunologische respons in het zoogdier uitlokt tegen een pathogeen, welke samenstelling een recombinant-vogelpokkenvirus omvat dat DNA bevat dat voor een antigeen van de pathogeen codeert en het tot expressie brengt zodanig dat antilichamen tegen de pathogeen worden gevormd, zonder productieve vermenigvuldiging van het virus in het zoogdier. Bij voorkeur codeert het DNA uit het recombinantvogelpokkenvirus uit voornoemde immunologische samenstelling voor het rabies-G proteïne en is voornoemde samenstelling een vaccin.

- De uitvinding heeft ook betrekking op een recombinant-vogelpokkenvirus dat een immunologische respons uitlokt tegen een zoogdier-pathogeen wanneer het virus in een zoogdier wordt geïntroduceerd, welk recombinant-vogelpokkenvirus DNA bevat dat voor een antigeen van de pathogeen codeert en het tot expressie brengt zonder productieve vermenigvuldiging van het virus in het zoogdier.

- De uitvinding heeft ook betrekking op een recombinant-vogelpokkenvirus dat in een niet-essentieel gebied van het vogelpokken-genoom DNA van andere herkomst dan vogelpokken bevat dat codeert voor een antigeen van een vogel-pathogeen. Bij voorkeur is het DNA uit voornoemd recombinant-vogelpokkenvirus stroomafwaarts gelegen van een promotor, en wel een koepok-promotor of een entomopoxpromotor.

De uitvinding heeft ook betrekking op een recombinant-vogelpokkenvirus dat een immunologische

respons uitlokt tegen een vogel-pathogeen wanneer het virus in een vogel wordt geïntroduceerd, welk recombinant-vogelpokkenvirus DNA bevat dat voor een antigeen van de pathogeen codeert en het tot expressie brengt zodanig dat antilichamen tegen de pathogeen worden gevormd.

- De uitvinding heeft ook betrekking op een immunologische samenstelling die een van voornoemde
5 recombinantvogelpokkenvirussen en een geschikte drager of geschikt verdunningsmiddel omvat.

De uitvinding heeft ook betrekking op een recombinant-vogelpokkenvirus dat synthetisch is gemodificeerd zodat het in een niet-essentieel gebied van het vogelpokken-genoom DNA bevat dat van nature niet in vogelpokkenvirus voorkomt.

- De uitvinding heeft ook betrekking op een werkwijze voor het tot expressie brengen van het DNA in een
10 recombinant-vogelpokkenvirus dat synthetisch is gemodificeerd zodat het in een niet-essentieel gebied van het vogelpokken-genoom DNA bevat dat van nature niet in vogelpokkenvirus voorkomt. Bij voornoemde werkwijze codeert het DNA bij voorkeur voor een antigeen van een zoogdierpathogeen of voor een antigeen van een vogel-pathogeen. Verder vindt bij voornoemde werkwijze het tot expressie brengen bij voorkeur plaats in cellen van een in vitro celkweek.

- 15 De uitvinding heeft ook betrekking op een recombinant-pokkenvirus dat DNA van wat voor herkomst dan ook en een entomopox-promotor voor het tot expressie brengen van het DNA bevat.

De uitvinding heeft ook betrekking op een recombinant-koepokvirus dat DNA van wat voor herkomst dan ook en een vogelpokken-promotor voor het tot expressie brengen van het DNA bevat.

- Synthetische gemodificeerde vogelpokkenvirusrecombinanten die exogene (d.i. niet-vogelpokken)genen
20 dragen welke voor een antigeen coderen en dat tot expressie brengen, welke recombinanten de vorming van immunologische responsen op het antigeen, en daarmee op het exogene pathogeen in een gewervelde gastheer uitlokken, worden volgens de uitvinding gebruikt om nieuwe vaccins te scheppen die de nadelen vermijden van gebruikelijke vaccins die gedode of verzwakte levende organismen gebruiken, vooral bij het beënten van andere gewervelden dan vogels.

- 25 Opnieuw moet opgemerkt worden dat vogelpokkenvirussen zich alleen in vogels of in vogelcellijnen productief kunnen vermenigvuldigen en aangehouden kunnen worden. De uit vogel-gastheercellen geoogste recombinant-vogelpokkenvirussen leiden bij beënten van een niet-vogel-gewervelde zoals een zoogdier, op een wijze analoog aan het beënten van zoogdieren met koepokken, tot beëntingsschade zonder productieve vermenigvuldiging van het vogelpokkenvirus. Ondanks het falen van het vogelpokkenvirus in de productieve
30 vermenigvuldiging in zo'n beënt niet-vogelgewervelde treedt er toch genoeg expressie van het virus op zodat het beënte dier immunologisch op de antigene determinanten van het recombinant-vogelpokken virus respondeert en ook op de antigene determinanten die door de exogene genen daarin gecodeerd worden.

- Als men ze gebruikt om er een vogelsoort mee te beënten geeft zo'n synthetisch recombinant-vogelpokkenvirus niet alleen een immunologische respons op de door het exogene DNA van iedere
35 herkomst gecodeerde antigenen dat daarin aanwezig kan zijn, maar leidt het ook tot een productieve vermenigvuldiging van het virus in de gastheer met het oproepen van de verwachte immunologische respons op de vogelpokken-vector per se.

- Meerdere onderzoekers hebben voorgesteld recombinantvogelpokken te scheppen, en om precies te zijn als veterinaire vaccins voor de bescherming van pluimvee te gebruiken virussen. Boyle en Coupar in J.
40 Gen. Virol. 67 (1986) 1591-1600 en Binns c.s. in Isr. J. Vet. Med. 42 (1986) 124-127. Noch voorstellen noch feitelijke berichten zijn gevonden betreffende het gebruik van recombinant-vogelpokkenvirussen als werkwijze voor het uitlokken van specifieke immuniteit in zoogdieren.

- Stickl en Mayer beschrijven in Fortschr. Med. 97(40) (1979) 1781-1788 de injectie van vogelpokken-, om precies te zijn pluimveepokken-virus in mensen. Maar dit onderzoek betrof alleen het gebruik van gewone
45 pluimveepokken voor het versterken van niet-specifieke immuniteit in patiënten die aan de nawerkingen van kanker-chemotherapie leden. Er werden geen recombinant-DNA-technieken gebruikt. Er werd niets gezegd over vogelpokken waarin DNA ingebouwd was dat voor antigenen van gewervelde-pathogenen codeert of over een werkwijze voor het uitlokken van specifieke immuniteit in gewervelden. In plaats daarvan was die oudere techniek afhankelijk van een algemeen en niet-specifiek oppeffect op de menselijke gastheer.
50 Een vollediger bespreking van de grondslagen van de genetische recombinatie kan bijdragen tot het begrip hoe de gemodificeerde recombinant-virussen volgens deze uitvinding geschapen worden.

- Genetische recombinatie is in het algemeen het uitwisselen van homologe stukken deoxyribonucleïne-zuur (DNA) tussen twee DNA-strengen. (In bepaalde virussen vervangt ribonucleïnezuur (RNA) het DNA.)
55 Homologe stukken nucleïnezuur zijn stukken nucleïnezuur (RNA of DNA) met dezelfde reeksen nucleotide-basen.

Genetische recombinatie kan van nature optreden tijdens de vermenigvuldiging of het maken van nieuwe virus-genomen binnen de geïnfecteerde gastheercel. Zo kan genetische recombinatie tussen virus-genen

gebeuren tijdens de virus-vermenigvuldigingscyclus die in de gastheercel die tegelijkertijd met twee of meer verschillende virussen of andere genetische constructies geïnfecteerd is. Een stuk DNA uit een eerste genoom wordt uitwisselbaar gebruikt bij het opbouwen van het stuk van het genoom van een tweede, mede infecterend virus waarvan het DNA homoloog met dat van het eerste virus-genoom is.

- 5 Maar recombinatie kan ook plaats vinden tussen stukken DNA van verschillende genomen die niet volmaakt homoloog zijn. Als één zo'n stuk uit een eerste genoom homoloog met een stuk van een ander genoom is, uitgezonderd de aanwezigheid in het eerste stuk van bijvoorbeeld een genetisch merk of een gen dat voor een antigene determinant codeert, kan recombinatie toch optreden en de producten daarvan zijn door de aanwezigheid van dat genetische merk of gen aantoonbaar.

- 10 Succesvol tot expressie komen van het ingebouwde DNA door het gemodificeerde infectieuze virus vereist twee omstandigheden:

Ten eerste moet het inbouwsel in een niet-essentieel gebied van het virus zitten opdat het gemodificeerde virus levensvatbaar blijft. Noch pluimveepokken noch de andere vogelpokvirussen hebben tot nog toe niet-essentiële gebieden getoond analoog aan die die voor het koepokvirus beschreven zijn. Voor

- 15 onderhavige uitvinding werden dan ook niet-essentiële gebieden van vogelpokken ontdekt door het vogelpokken-genoom in fragmenten te splitsen, deze fragmenten naar grootte te scheiden en deze fragmenten ter vermenigvuldiging in plasmiden in te bouwen (plasmiden zijn kleine, kringvormige DNA-moleculen die als extra-chromosomale elementen in vele bacteriën, waaronder *E. coli*, gevonden worden). Methoden voor het inbouwen van DNA-reeksen, zoals genen voor antigene determinanten of andere

- 20 genetische merken, in plasmiden zijn in de techniek goed bekend en zijn in detail beschreven door Maniatis c.s. in *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1982). Dit werd gevolgd door het in de gekloonde pluimveepokken-fragmenten inbouwen van genetische merken en/of voor antigenen coderende genen. Die fragmenten die met succesvollere combinaties gepaard gingen, aange- toond door het met succes terugvinden van het genetische merk of het antigeen, waren die waarin het DNA
- 25 in een niet-essentieel gebied van het pluimveepokken-genoom ingebouwd was.

De tweede voorwaarde voor de expressie van ingebouwd DNA is de aanwezigheid van een promotor in het juiste verband met het ingebouwde DNA. De promotor moet zodanig geplaatst zijn dat het boven- strooms van de tot expressie te brengen DNA-reeks ligt. Omdat vogelpokkenvirussen niet goed gekaracteri- seerd zijn en vogelpokken-promotoren in de techniek nog niet geïdentificeerd waren, worden als onderdeel

30 van deze uitvinding promotoren van andere pokkenvirussen met nut bovenstrooms van het tot expressie te brengen DNA ingebouwd. Pluimveepokken-promotoren kunnen ook met succes gebruikt worden om de werkwijze uit te voeren en de producten volgens de uitvinding te maken. Volgens deze uitvinding blijken pluimveepokken-promotoren, koepok-promotoren en entomopox-promotoren het overschrijven in recombinant-pokkenvirus te bevorderen.

- 35 Boyle en Coupar hebben in *J. Gen. Virol.* 67 (1986) 1591 gespeculeerd dat vaccinia-promotoren "verondersteld mogen worden in (pluimveepokken-) virus te werken". De auteurs vonden en kloonden een pluimveepokken-TK-gen (Boyle c.s. in *Virology* 156 (1987) 355-365 en bouwden het in koepok-virus in. Dit TK-gen kwam tot expressie, vermoedelijk dankzij het herkennen van de pluimveepokken-TK-promotor-reeks door de polymerase-functies van vaccinia. Maar, ondanks dit speculeren bouwden de auteurs geen enkele
- 40 koepok-promotor in een pluimveepokkenvirus en namen ze ook geen expressie van een vreemde DNA-reeks in een pluimveepokken-genoom waar. Voorafgaande aan deze uitvinding was het niet bekend dat promotoren van andere pokken-virussen, zoals vacciniapromotoren, in feite een gen in een vogelpokken- genoom op gang zouden helpen.

45 *Beschrijving van bepaalde bevoorkeurde uitvoeringsvormen*

Pluimveepokken- en kanariepokken-virussen zijn volgens deze uitvinding vooral gebruikt als bevoorkeurde door recombinatie te modificeren soorten vogelpokken bij het daarin inbouwen van exogeen DNA.

- Pluimveepokken is een soort vogelpokken die vooral kuikens infecteert, maar zoogdieren niet. De hier als FP-5 aangeduide pluimveepokken-stam is een uit kuikenembryo afkomstig pluimveepokken-vaccinstam uit
- 50 de handel, verkrijgbaar bij de American Scientific Laboratories (Afdeling van de Schering Corp.) te Madison, WI, veterinaire ontheffing no. 165 van de Verenigde Staten, serie no. 30321.

De hier als FP-1 aangeduide pluimveepokken-stam is een als vaccin voor één dag oude kuikens te gebruiken gemodificeerde Duvette-stam. De stam is een pluimveepokken-vaccinstam met de aanduiding 0 DCEP 25/CEP67/2309 van oktober 1980, en is verkrijgbaar bij het Instituut Mérieux.

- 55 Kanariepokken is een andere soort vogelpokken. Analoog aan pluimveepokken infecteert kanariepokken vooral kanaries, maar niet zoogdieren. De hier als CP aangeduide kanariepokken-stam is een kanariepokken-vaccinstam uit de handel met de aanduiding LF2 CEP 524 24 10 75 en is ook verkrijgbaar

bij het Instituut Mérieux.

- Tot de in deze vogelpok-virussen door genetische recombinatie volgens de uitvinding ingebouwde DNA-reeksen behoort ook het Lac-Z-gen van prokaryotische herkomst, het rabies-glycoproteïnen (het G-gen), een antigeen van een pathogeen voor zoogdieren maar niet voor vogels, het kalkoeneninfluenza-hemagglutinine-gen, het antigeen van een pathogene vogelvirus anders dan het vogelpokkenvirus, het gp51,30-gen voor de omhulling van het runderleukemievirus (een zoogdieren-virus), het gen voor het versmeltingseiwit van het virus van de Newcastle-ziekte (de Texas-stam) (een vogelvirus), het gen voor de FeLV-omhulling van het kattenleukemievirus (een zoogdierenvirus), het RAV-1-gen van de omhulling van het rous-virus dat een vogelvirus is dat pluimvee ziek maakt, het nucleoproteïne-gen van het virus van de Pennsylvanië-kuikeninfluenza van 1/83 (een vogelvirus), het matrix-gen en peplomergen van het infectieuze bronchitisvirus (stam Mass 41) (een vogelvirus) en het glycoproteïne-D-gen (gD) van herpes simplex virus (een zoogdierenvirus).

- Het isoleren van het Lac-Z-gen is beschreven door Casadaban c.s. in *Methods in Enzymology* 100 (1983) 293-308. De structuur van het rabies-G-gen is bijvoorbeeld onthuld door Anilionis c.s. in *Nature* 294 (1981) 275-278.

- Zijn inbouw in koepokvirus en zijn expressie in deze vector zijn ook een door Kieny c.s. in *Nature* 312 (1984) 163-166, beschreven. Het kalkoenen-influenza-hemagglutinine-gen is beschreven door Kawaoka c.s. in *Virology* 158 (1987) 218-227. Het gp51,30gen voor de omhulling van het runderleukemie-virus is beschreven door Rice c.s. in *Virology* 138 (1984) 82-93. Het versmeltingsgen voor de Texas-stam van de Newcastle-ziekte is kalfsplasmide pNDV 108 verkrijgbaar bij het Institute Mérieux. Het gen voor de omhulling van het kattenleukemie-virus is beschreven door Guilnot c.s. in *Virology* 161 (1987) 252-258. Het met rous geassocieerde virus type 1 is verkrijgbaar bij het Institute Mérieux als twee klonen, penVRVIPT en mp19env (190). Het NP-gen van de kuikeninfluenza is als plasmide pNP 33 verkrijgbaar bij Yoshihiro Kawaoka van het St. Jude Children's Research Hospital. Een cDNA-kloon van het matrix-gen van een infectieus bronchitisvirus Mass 41 en het peplomer-gen zijn als plasmide pIBVM63 verkrijgbaar bij het Institute Mérieux. Het gD-gen van het herpes simplex virus is door Watson c.s. beschreven in *Science* 218 (1982) 381-384.

- In de hierna meer in detail beschreven recombinantvogelpokkenvirussen zitten één van de volgende drie vacciniapromotoren. De Pi-promotor uit het Ava I H-gebied van vaccinia is door Wachsmann c.s. beschreven in *J. Inf. Dis.* 155 (1987) 1188-1197. Meer in het bijzonder is deze promotor afkomstig van het Ava I H(Xho I G)-fragment van de L-variant van de WR-vacciniastam, waarin de promotor het afschrijven van rechts naar links regelt. De plaats van de promotor op de kaart is ongeveer 1,3 Kbp (kilo-baseparen) vanaf het linker einde van Ava IH, ongeveer 12,5 Kbp vanaf het linker uiteinde van het vaccinia-genoom en ongeveer 8,5 Kbp links vanaf de Hind III/C/N-samenvoeging. De volgorde van deze promotor is

- (GGATCCC)-ACTGTAAAAATAGAACTATAATCATATAATAGTGTAGGTTGGT-AGTAGGGTACTCGTGATTAATTTATTGTTAACTTG-(AATTC),

waarin de symbolen tussen haakjes aanhechtende reeksen voorstellen.

De Hind III H-promotor (hier ook "HH" of "H6") werd gedefinieerd met standaard karteringstechnieken door overschrijven. Het heeft de volgorde:

- ATTCTTTATTCTATACTTAAAAAATGAAAA
TAAATACAAAGGTTCTTGAGGGTTGTGTTAAATTGAAAGCGAGAAATAATCATA-AATT

ATTCATTATCGCGATATCCGT
TAAGTTTGTATCGTAATG.

- Deze reeks is identiek aan die die door Rosel c.s. in *J. Virol.* 60 (1986) 436-449 beschreven werd als bovenstrooms van het open afleesdeel H6.

De 11K-promotor is als beschreven door Wittek in *J. Virol.* 49 (1984) 371-378 en door C. Betholet c.s. in *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 2096-2100.

- De recombinant-vogelpokkenvirussen volgens deze uitvinding worden opgebouwd in twee stappen die in de techniek bekend zijn en analoog aan wat genoemd is in het eerder geciteerde Amerikaanse octrooischrift 4.603. 112 voor het scheppen van synthetische recombinanten van het virus vaccinia.

- Eerst wordt de in het virus in te bouwen DNA-reeks geplaatst in een plasmide van *E. coli* waarin DNA dat homoloog is voor een stuk niet-essentieel DNA van het vogelpokkenvirus ingebouwd is. Los daarvan wordt de in te voegen DNA-reeks aan een promotor verbonden. De combinatie van promotor en gen wordt dan in het plasmide ingebouwd, zodanig dat de promotor-gen-combinatie aan beide uiteinden geflankeerd wordt door DNA dat homoloog is met een niet-essentieel gebied van het vogelpokken-DNA. Het aldus geconstrueerde plasmide wordt dan versterkt door groei binnen de bacterie *E. coli*. (Plasmide-DNA wordt

gebruikt om het exogene genetische materiaal te dragen en te versterken, en die methode is in de techniek goed bekend. Bijvoorbeeld zijn deze plasmide-technieken door Clewell beschreven in J. Bacteriol. 110 (1972) 667-676. De technieken voor het isoleren van het vermeerderde plasmide uit de gastheer *E. coli* zijn in de techniek ook bekend en zijn bijvoorbeeld door Clewell c.s. beschreven in Proc. Natl. Acad. Sci. USA.

5 62 (1969) 1159-1166).

Het na groei binnen *E. coli* vermeerderde en geïsoleerde plasmide-materiaal wordt dan in de tweede stap gebruikt. Namelijk wordt het plasmide met daarin de in te bouwen DNA-reeks op een celweek overgebracht, bijv. op kuikenembryo-fibroblasten, samen met het vogelpokkenvirus (zoals pluimveepokken stam FP-1 of FP-5). Recombinatie tussen het homologe pluimveepokken-DNA in het plasmide en het
10 virus-genoom geeft een vogelpokkenvirus die gemodificeerd is door aanwezigheid, in een niet-essentieel gebied van zijn genoom, van DNA-reeksen die niet uit pluimveepokken afkomstig zijn.

Een beter begrip van deze uitvinding en de vele voordelen daarvan krijgt men uit de volgende voorbeelden, die slechts ter toelichting dienen.

15 Voorbeeld I

Voorbijgaande expressieproeven die het herkennen van koepokpromotoren door overschrijffactoren voor pluimveepokken-RNA laten zien

Er werd een aantal plasmide geconstrueerd met daarin de reeks die voor het oppervlakte-antigeen van het virus Hepatitis B (HBSAg) codeert verbonden aan promotorreeksen voor het virus Vaccinia. Van beide
20 plasmiden werd 50 µg overgebracht op CEF-cellen die met 10 pfu per cel aan pluimveevirus of vaccinia geïnfecteerd waren. Men liet de infectie 24 uur voortschrijden en de cellen werden toen door drie opeenvolgende cycli van bevriezen en ontdooien gelyseerd.

De hoeveelheid HBSAg in het lysaat werd bepaald met de commercieel verkrijgbare AUSRIA II - ¹²⁵I kit van de Abbott Laboratories, afdeling Diagnostics. De aan- of afwezigheid van HBSAg komt tot uiting in de
25 verhouding van de netto tellingen (monster minus achtergrond) van het onbekende tot een vooraf door de leverancier bepaalde drempelwaarde. Dit geeft een P/N-verhouding (positief/negatief). De uitkomsten staan in tabel I.

Er werden drie verschillende koepokvirus-promotorreeksen gebruikt: de Pi-promotor welke vroeg in de koepok-infectie herkend wordt voordat het DNA zich gaat vermeerderen, de 11K promotor die laat in de
30 koepokinfectie herkend wordt na het begin van de DNA-vermeerdering, en de Hind III promotor H (HH) die in de koepokinfectie zowel vroeg als laat herkend wordt. Deze promotoren zijn hier al eerder beschreven.

De cijfers laten zien dat het in de lysaten van geïnfecteerde cellen gevormde HBSAg het resultaat is van het herkennen van de koepokvirus-promotoren door de vertalingsfactoren van zowel vogelpokken als koepokken.

35

TABEL I

Plasmide	Virus	Beschrijving	P/N
40 pMP 131piR2	pluimvee-koepok	SAg verbonden aan de Pi-promotor	1,8 9,1
pMPK 22.13S	pluimvee-koepok	SAg verbonden aan de 11K-promotor	14 2
pPDK 22.5	pluimvee-koepok	SAg verbonden aan de 11K-promotor	92,6 5,6
45 pRW 668	pluimvee-koepok	SAg verbonden aan de HH-promotor	77 51,4
(geen plasmide)	pluimvee-koepok		1,1
(geen plasmide)	koepok		1,3
50 pMPK 22. 13S	(geen virus)		1,3

Voorbeeld II

Opbouwen van het recombinant-pluimveepokkenvirus vFP-1 dat het Lac-Z-gen bevat

55 Een fragment in een niet-essentieel gedeelte van het pluimveepokkenvirus werd als volgt gelokaliseerd en geïsoleerd.

Het nuclease Bal 31 werd gebruikt om uit het DNA van FP-5 de enkelstrengige eindstandige haarspeld-

lussen te verwijderen Het (grotere) Klenow-fragment van DNA-polymerase I werd gebruikt om de uiteinden stomp te maken. Na verwijderen van de lussen werden er fragmenten gemaakt door vertering met restrictie-endonuclease Bgl II. Deze vertering gaf een serie FP-5-fragmenten die door elektroforese over agarose-gel gescheiden werden.

- 5 Zo'n Bgl II-fragment met stomp uiteinde van 8,8 Kbp werd geïsoleerd en ingevoegd in een commercieel verkrijgbaar plasmide, pUC 9, dat met Bam HI en Sma I opengesplitst was. Het verkregen plasmide werd aangeduid als pRW 698.

- Om de afmetingen van het pluimveepokken-fragment te verminderen werd dit plasmide met Hind III gesplitst, wat twee andere fragmenten gaf. Een fragment van 6,7 Kbp werd weggedaan en het overgehouden fragment van 4,7 Kbp werd aan zichzelf verbonden, wat een nieuw plasmide gaf, aangeduid als pRW 699.

- Om een door 11K gepromoot Lac-Z-gen in dit plasmide in te bouwen werd pRW 699 met EcoRV opengeknipt, dat dit plasmide op slechts één plaats doorsnijdt. Dit segment van met 11K gepromoot Lac-Z-gen werd toen als een PstI-Bam HI-fragment met stomp uiteinde ingebouwd, wat een nieuw plasmide 15 gaf, aangeduid als pRW 702. De Lac-Z-kloon is van pMC 1871, zoals door Casadaban c.s. beschreven, loc. cit. De 11K-promotor werd via een Bam HI-verbinding aan het 8^{ste} codon van het Lac-Z-gen verbonden.

- Met recombinatietechnieken zoals in het Amerikaanse octrooischrift 4.603. 112 voor het koepokvirus beschreven werd het plasmide pRW 702 dan gecombineerd met het pluimveevirus FP-5 dat op kuikenembryo-fibroblasten (CEF) groeide, met behulp van de volgende procedure voor het genereren van 20 vFP-1. Van het DNA van pRW 702 werd 50 µg in een eindvolume van 100 µl gemengd met 0,5 µg DNA van compleet pluimveepokken-genoom. Hieraan werden 10 µl 2,5 M CaCl₂ en 110 µl 2 x HEBS-buffer (pH = 7) toegevoegd, wat aangemaakt was uit:

- 40 mM Hepes
300 mM NaCl
25 1,4 mM Na₂HPO₄
10 mM KCl
12 mM glucose

- Na 30 minuten op kamertemperatuur werd uit een pluimveepokkenvirus-voorraad die tot 5 pfu/cel verdund was 200 µl toegevoegd en met het mengsel werden Petri-schalen van 60 mm met daarin een 30 primaire monolaag CEF beënt. Op dat tijdstip werd ook 0,7 ml medium van Eagles met daarin 2% foetaal runderserum (FBS) toegevoegd. De platen werden 2 uur op 37°C geïncubeerd, waarna nog 3 ml medium van Eagles met 2% FBS toegevoegd werd en de platen 3 dagen geïncubeerd werden. De cellen werden door drie opeenvolgende cycli van bevriezen en ontdooien gelyseerd en onder de virus-nakomelingen werd toen naar de aanwezigheid van recombinanten gezocht.

- 35 Een bewijs van een succesvol inbouwen door recombinatie van het met 11K gepromote Lac-Z-gen in het genoom van pluimveepokken FP-5 werd verkregen door een proef op de expressie van het Lac-Z-gen. Het Lac-Z-gen codeert voor het enzym β-galactosidase, wat het chromogene substraat 5-broom-4-chloorindolyl-3-β-D-galactoside (X-gal) splitst, waarbij een blauw indolyl-derivaat vrijkomt. Blauwe plaques werden opgevat als positieve recombinanten.

- 40 Het succesvolle inbouwen van Lac-Z in het genoom van pluimveepokken FP-5 en zijn expressie werden ook bevestigd door de immuun-precipitatie van het eiwit β-galactosidase met in de handel verkrijgbare antisera onder toepassing van standaardtechnieken met door vFP-1 geïnfecteerde CEF, BSC (apenier-cel lijn – ATCC CCL26), VERO (apenier-cel lijn – ATCC CCL81) en MRC-5 (menselijke diploïde longcellen lijn – ATCC CCL171).

- 45 De expressie in β-galactosidase door het recombinantvirus vFP-1 werd verder in vivo bevestigd door konijnen en muizen met het virus te beënten en daarna een toename in de titer van antilichamen tegen het eiwit β-galactosidase in het serum van de beënte dieren te vinden.

In het bijzonder werd het recombinant-vFP-1 van gastheercel-verontreinigingen gezuiverd en intradermaal op twee plaatsen van beide kanten van twee konijnen geënt. Elk konijn kreeg in totaal 10⁶ pfu.

- 50 Met tussenpozen van een week werd bloed uit de dieren afgetapt en de sera werden in een ELISA-bepaling gebruikt onder toepassing van een in de handel verkrijgbaar preparaat van gezuiverd β-galactosidase als bron van antigeen.

Zowel de konijnen als de muizen die met het recombinant-vFP-1 beënt waren gaven een immuunrespons op het β-galactosidase, zoals de ELISA-proef liet zien. In beide soorten was de respons één week na het

- 55 beënten aantoonbaar.

Voorbeeld III

Vanuit het pluimveepokkenvirus FP-5 opbouwen van het recombinantvirus vFP-2 dat het G-gen van rabies en Lac-Z bevat

- 5 Uit FP-5 werd een pVU II-fragment van 0,9 Kbp verkregen en dat werd met standaardtechnieken tussen de twee Pvu II-plaatsen in pUC 9 ingevoegd. Het verkregen product, aangeduid als pRW 688.2, heeft twee Hinc II-plaatsen, met een onderlinge afstand van ongeveer 30 bp, asymmetrisch binnen het Pvu II-fragment en dus met een lange arm en een korte arm van het fragment.

Met voor het invoeren van Pst I- en Bam HI-plaatsen bekende technieken werden oligonucleotide-aanpassers tussen deze twee Hinc II-plaatsen ingevoegd, wat plasmide pRW 694 gaf.

- 10 Dit plasmide werd nu met Pst I en Bam HI gesplitst en het Lac-Z-gen met daaraan de eerder beschreven vaccinia-promotor 11K werd ingevoegd, wat een nieuw plasmide gaf, pRW 700.

Om een met Pi-gepromoot rabies-gen G te scheppen werd de Bgl II-plaats die nabij het 5'-einde van het rabies-gen ligt (zie Kieny c.s., loc.cit.) stomp gemaakt en aan de ingevulde Eco R plaats van de eerder beschreven Pi-promotor gebonden.

- 15 Deze constructie werd op de Pst I-plaats van pRW 700 ingevoegd, wat het plasmide pRW 735. 1 gaf, met daarin de vreemde gen-reeks Pi-rabies G-11K-Lac Z. Dit invoegsel was binnen het plasmide zodanig georiënteerd dat de lange Pvu II-Hinc II-arm van de FP-5-donorreeks 3' ten opzichte van het Lac Z-gen was.

- 20 De aldus verkregen uiteindelijke constructie werd met de eerder beschreven methoden door infectie en transfectie van kuikenembryo-fibroblasten met pluimveepokken-virus FP-5 gerecombineerd wat het recombinant-pluimveepokken-virus vFP-2 gaf. Dit recombinant-virus werd met behulp van X-gal-kleuring gevonden. De juiste invoeging en het tot expressie komen van zowel het merkende Lac Z-gen als het rabies-gen G werden bevestigd met een aantal hierna beschreven methoden.

- 25 Het door immunofluorescentie lokaliseren van het rabies-antigeen met specifieke antilichamen toonde met succes de expressie van het rabies-antigeen aan op het oppervlak van vogel- en niet-vogel-cellen die met virus vFP-2 geïnfecteerd waren. Net als te voren werd de expressie van het rabies-antigeen en het β -galactosidase door met het virus vFP-2 geïnfecteerde vogel- en niet-vogel-cellen bevestigd met de immunoprecipitatie-methode.

- 30 Een ander bewijs dat de vFP-2-belichaming van deze uitvinding een succesvol recombinant-virus dat het rabies-gen G en het gen voor β -galactosidase draagt werd verkregen door twee konijnen met vFP-2 te beënten. Beide konijnen werden intradermaal met 1×10^8 pfu aan vFP-2 beënt. Beide konijnen gaven de typische pokkenverschijnselen. Elke week werd bloed uit de konijnen afgetapt en de sera werden met ELISA onderzocht op de aanwezigheid van voor het rabies-glycoproteïne en het β -galactosidase specifieke antilichaam.

- 35 Zoals tabel II hieronder laat zien vertoonde konijn 205 één week na de beënting met de ELISA-proef aantoonbare gehalten aan antilichaam tegen β -galactosidase. Na 2 weken was dit gestegen tot een titer van 1 op 4000, welke tot 5 weken na de beënting aanhield. Met de antigeen invangende ELISA-proef vertoonde serum van konijn 205 gedurende 3 tot 10 weken na de beënting aantoonbare gehalten aan antilichamen tegen rabies.

40

TABEL II

Productie van antilichaam door konijn 205 tegen rabies-antigeen en tegen β -galactosidase

45	Tijd	Antilichaam-titer (serum-verdunning)
	Voor de bloedaftap tegen β -galactosidase	0
	Week 1	1 : 500
	Weken 2-5 (elk)	1 : 4000
50	Week 6	1 : 500
	Week 9	1 : 250
	Voor de bloedaftap tegen rabies	0
	Week 3	1 : 200
	Week 6	1 : 200
55	Week 10	1 : 100

Voorbeeld IVA

Het uit pluimveevirus FP-1 opbouwen van recombinant-virus vFP-3 dat gepromoot rabiesgen G bevat

Deze belichaming laat zien dat het rabies-gen G door andere pluimveepokken-stammen dan FP-5 volledig tot expressie komt, vooral door een andere stam van het pluimveevirus, aangeduid als FP-1.

- 5 Net als in voorbeeld III werd uit FP-1 een Pvu II-fragment van 0,9 Kbp verkregen, onder de aanname dat, net als in FP-5, dit fragment een niet-essentieel gebied zou bevatten.

Dit fragment werd tussen de twee Pvu II-plaatsen van pUC 9 geplaatst, wat een plasmide gaf, aangeduid als pRW 731. 15R. Dit plasmide heeft twee Hinc II-plaatsen, ongeveer 30 bp uit elkaar, asymmetrisch binnen het Pvu II-fragment, wat het fragment dus een lange arm en een korte arm geeft.

- 10 Tussen de twee Hinc II-plaatsen werd een commercieel verkrijgbare Pst-verbinding (5') - CCTGCAGG - (3') ingevoegd, wat een plasmide pRW 741 gaf.

Een met HH gepromoot rabies-gen G werd op de Pst I-plaats in dit plasmide geplaatst, wat het nieuwe plasmide pRW 742B gaf. Door recombinatie van dit plasmide met FP-1, door infectie en transfectie van CEF-cellen, werd virus vFP-3 verkregen.

- 15 Het begincodon voor het afschrijven van het open af te lezen stel, ATG, werd, aangevuld met de HH-promotor bovenop het begincodon van het rabies-gen G geplaatst met behulp van een synthetisch oligonucleotide dat de EcoRV-plaats in de HH-promotor en de Hind III-plaats in het rabies-gen G overspande. Het 5'-einde van dit door HH gepromoot rabies-gen werd met bekende technieken gemodificeerd zodat het nu een Pst I-plaats bevatte en het bouwsel werd toen op de Pst I-plaats van pRW 741 ingevoegd
20 waardoor pRW 742B geschapen werd. De oriëntatie van deze constructie in het plasmide was dezelfde als in het eerder in voorbeeld III besproken pRW 735.1.

Recombinatie werd uitgevoerd als beschreven in voorbeeld II. De verkregen recombinant werd vFP-3 genoemd.

- 25 De expressie van het rabies-antigeen zowel in vogels als in niet-vogel-cellen die met het virus vFP-3 geïnfecteerd waren werd bevestigd met de eerder beschreven immuunprecipitatie- en immunofluorescentie-technieken.

- Nog een bewijs dat de uitvoeringsvorm vFP-3 volgens deze uitvinding een succesvol recombinant-virus is dat de genen voor rabies G tot expressie brengt werd verkregen door paren konijnen intradermaal met het recombinant-virus te beënten. Er werden twee konijnen intradermaal met vFP-3 beënt, per konijn 1×10^6
30 pfu. Deze beide konijnen gaven de typische pokkenverschijnselen, welke 5-6 dagen na de beënting hun maximum bereikten. Met tussenpozen van een week werd er bloed uit de konijnen afgetap en de sera werden met ELISA onderzocht op de aanwezigheid van voor het rabies-glycoproteïne specifieke antilichamen.

- Ook werden vijf ratten elk intradermaal met 5×10^7 pfu aan vFP-3 beënt. Op alle dieren verschenen er
35 pokken.

Zowel de konijnen als de ratten hadden twee weken na het beënten aantoonbare gehalten aan voor rabies specifieke antilichamen. Twee blanco konijnen die intradermaal met het moedervirus FP-1 beënt waren hadden geen aantoonbare gehalten aan antilichaam tegen rabies.

- Om de mogelijkheid uit te sluiten dat de antilichaamrespons toe te schrijven was aan het invoeren van
40 rabies-antigeen dat toevallig met de virusent mee kwam of een deel uitmaakte van het membraan van het recombinat-pluimveevirus, in plaats van aan de veronderstelde de novo synthese van het rabies-antigeen door het recombinant-virus in het dier, werd het virus vFP-3 chemisch geïnactiveerd en toen in konijnen geënt.

- Het gezuiverde virus werd overnacht bij 4°C met 0,001% β -propiolacton geïnactiveerd en toen door
45 centrifugeren geconcentreerd. Het virus-sediment werd in met 10 mM tris gebufferde zoutoplossing gesuspenderd, ultrasoon stukgetrild en getitreerd om zeker te stellen dat er geen infectieus virus over gebleven was. Er werden twee konijnen intradermaal met geïnactiveerd vFP-3 beënt en twee met een equivalente hoeveelheid onbehandelde recombinant. De afmetingen van de pokkenschade werden opgemeten.

- 50 De beide konijnen die onbehandeld vFP-3 kregen hadden na 5 dagen typische pokken ontwikkeld, geklasseerd als 4-5+. Met geïnactiveerd beënte konijnen ontwikkelden ook huidschade, maar deze werden 5 dagen na het beënten als 2+ geklasseerd.

- Uit konijnen werd met tussenpozen van een week bloed afgetapt en de sera werden met ELISA beproefd
55 op de aanwezigheid van voor rabies specifieke antilichamen en voor pluimveepokken specifieke antilichamen. De uitkomsten staan in tabel III hierna.

TABEL III

		Levend vFP-3		Geïnactiveerd vFP-3			
5 Konijn: Antilichaam waarop beproefd werd:		Nr. 295 Rabies FP	Nr. 318 Rabies FP	Nr. 303 Rabies FP	Nr. 320 Rabies FP		
Week na het enten							
10	0	0	0	0	0	0	0
	2	250	4000	500	4000	0	1000
	3	1000	4000	500	4000	0	2000
	4	1000	4000	2000	4000	0	2000
	5	4000	4000	2000	4000	0	4000
15	6	4000	4000	4000	4000	0	2000

Bij deze proef werd het eindpunt van de bepaling (opgegeven als het omgekeerde van de serumverduunning) arbitrair op 0,2 gesteld nadat de absorptiewaarden van alle sera voor de uitdaging er afgetrokken waren.

- 20 Zowel konijn 295 als nr. 318, die het levende virus kregen, ontwikkelden een immuunrespons tegen het rabies-glycoproteïne en tegen de pluimveepokken-antigenen. Konijnen 303 en 320 ontwikkelden ook een immuunrespons tegen pluimveepokken-antigenen, hoewel de titer lager was. Geen van deze konijnen ontwikkelden een waarneembare respons op het rabies-glycoproteïne.

- 25 Deze uitkomsten betekenen dat de in het konijn opgewekte immuunrespons toe te schrijven is aan een de novo expressie van het rabies-gen voor glycoproteïne dat in het recombinant-virus zat en niet een respons op eventueel toevallig met de ent meegekomen glycoproteïne.

Voorbeeld IVB

- 30 Vanuit pluimveepokkenvirus FP-1 opbouwen van het recombinantvirus vFP-5 dat een niet gepromoot rabies-gen G bevat

- Expressie van een vreemd gen dat door recombinatie in het pluimveepokken-genoom ingevoegd is vereist de aanwezigheid van een promotor. Dit werd aangetoond door het scheppen van nog een recombinant, vFP-5, die identiek aan vFP-3 was behalve dat de HH-promotor nu weggelaten werd. De aanwezigheid van het rabies-gen in deze recombinant werd bevestigd door nucleïnezuur-hybridisering. Maar in met 35 het virus geïnfekteerde CEF-celkweken werd geen rabiesantigeen aangetoond.

Voorbeeld V

Passageproeven in vitro om vast te stellen of pluimveevirus zich in niet-vogel-cellen vermenigvuldigt

- 40 Er werd een proef uitgevoerd waarbij drie celsystemen, één uit vogels en twee niet, beënt werden met de moederstam FP-1 of met de recombinant vFP-3. Er werden steeds twee schalen met CEF, MRC-5 of VERO met FP-1 of met vFP-3 beënt in een dosis van 10 pfu per cel.

- Na drie dagen werd één schaal van elk paar geoogst. Het virus werd er door drie opeenvolgende cycli van bevroren en ontdooien uit vrijgemaakt en op een verse monolaag van dezelfde cellijn overgeënt. Dit werd zesmaal herhaald, en bij het einde van de proef werden monsters van elke generatie op CEF- 45 monolagen getitreerd op infectiviteit.

De uitkomsten staan in tabel IVA en laten zien dat in CEF-cellen een serie generaties van zowel FP-1 als van vFP-3 mogelijk is, maar niet in de twee niet-vogel-cellijnen. Infectieus virus was maar drie of vier passages op VERO- of MRC-5-cellen niet aantoonbaar.

- De tweede schaal werd gebruikt om na te gaan of het niet met directe titratie aantoonbare virus 50 aangetoond kon worden na versterking in toelatende CEF-cellen. Na drie dagen werden de cellen van elke tweede schaal door afschrapen geoogst en een derde van de cellen werd gelyseerd en op een verse CEF-monolaag overgeënt. Toen na 7 dagen het volledige pathologische effect bereikt was werden de cellen gelyseerd en werd de opbrengst van het virus getitreerd. De uitkomsten staan in tabel IVB. Met doorgang in CEF-cellen ter versterking van eventueel aanwezig virus kon het virus toch na vier of vijf 55 passages niet meer aangetoond worden.

Pogingen om tot persistent geïnfekteerde cellen te komen faalden.

Bij nog een poging om aanwijzingen voor een blijvende virus-expressie in niet-vogelcellen te vinden

werden de hierboven voor virus-titratie gebruikte monsters in een standaard immunologische stippenproef gebruikt, waarbij antilichamen tegen pluimveepokken en tegen rabies ingezet werden om de aan- of afwezigheid van de respectievelijke antigenen aan te tonen. De uitkomsten van deze proeven bevestigen de titratie-uitkomsten.

5

TABEL IVA
Passage-proef

10	Beënt met virus van het cel-type	FP-1			vFP-3	
		CEF	VERO	MRC-5	CEF	VERO MRC-5
15	Gen. 1	6,6 ^a	4,8	4,9	6,6	5,4
	2	6,7	2,9	3,7	6,5	4,2
	3	6,4	1,4	1,0	6,4	1,7
	4	6,1	N.A. ^b	N.A.	6,2	N.A.
	5	6,4	N.A.	N.A.	6,3	N.A.
	6	5,7	N.A.	N.A.	5,9	N.A.

20 a – titer van het virus uitgedrukt in de ¹⁰log van het aantal pfu per ml.

b – niet aantoonbaar.

TABEL IVB
Versterkingsproef

25	Beënt met virus van het cel-type	FP-1			vFP-3	
		CEF	VERO	MRC-5	CEF	VERO MRC-5
30	Gen. 1	6,4 ^a	6,2	6,4	6,5	6,3
	2	7,5	6,3	6,0	6,5	6,3
	3	6,2	6,7	5,3	5,9	6,1
	4	5,6	4,6	3,9	5,7	4,8
	5	6,3	4,1	N.A.	6,1	4,7
	6	6,2	N.A. ^b	N.A.	6,2	N.A.

a – titer van het virus uitgedrukt in de ¹⁰log van het aantal pfu per ml.

b – niet aantoonbaar.

Voorbeeld VI

40 Nog meer recombinanten van pluimveepokken FP-1: vFP-6, vFP-7, vFP-8 en vFP-9

Recombinant-virussen vFP-6 en vFP-7 werden met de volgende procedure in elkaar gezet.

Een Pvu II-fragment van FP-1 van 5,5 Kbp werd in tussen de twee Pvu-II-plaatsen in pUC 9 ingevoegd, wat plasmide pRW 731. 13 gaf. Dit plasmide werd toen op één enkele Hinc II-plaats doorgeknipt, en afgestompt, met HH gepromoot rabies-gen G werd ingebouwd, wat plasmiden pRW 748A en -B gaf (met tegengestelde oriënteringen van het invoegsel). Plasmiden pRW 748A en -B werden dan afzonderlijk gebruikt om CEF-cellen samen het virus FP-1 te transfecteren, hetgeen door recombinatie respectievelijk vFP-6 en vFP-7 gaf.

45 Een Pvu-II-fragment van FP-1 van 10 Kbp werd tussen de twee Pvu II-plaatsen van pUC 9 ingevoegd, wat pRW 731. 15 gaf. Dit plasmide werd toen op de ene Bam HI-plaats doorgeknipt en toen werd er een door HK gepromoot Lac Z-gen ingebouwd, wat pRW 749A en -B (met tegengestelde oriëntaties van het invoegsel) gaf. Recombinatie van deze donorplasmiden met FP-1 leidde tot respectievelijk vFP-8 en vFP-9. Deze plaats wordt nu aangeduid als "plaats f8".

vFP-8 en vFP-9 brachten het lac Z-gen tot expressie, zoals met X-gal bleek. vFP-6 en vFP-7 brachten het rabies-gen G tot expressie wat met een voor rabies specifiek antiserum aangetoond werd.

Voorbeeld VII

Immunisering met vFP-3 ter bescherming van dieren tegen uitdaging door levend rabies-virus

- Groepen van 20 vrouwelijke SPF-muizen van 4-6 weken oud werden in hun voetzolen beënt met 50 µl vFP-3 in dosis variërende van 0,7 tot 6,7 WKID₅₀ per muis (de WKID₅₀ of 50% weefsel kweek-infectieuze dosis is die dosis waarbij 50% der cellen van de weefselkweek een cytopathologisch effect vertonen). Na 14 dagen werden 10 muizen van elke groep opgeofferd en werden er serummonsters gewonnen voor de SFFR-proef. De overblijvende 10 muizen werden uitgedaagd door intracerebrale beënting met 10 LD₅₀ aan rabies-virus van de CVS-stam, en weer 14 dagen later werd nagegaan hoeveelheid dat overleefden. De uitkomsten staan hieronder in tabel VA.

10

TABEL VA

Dosis vFP-3 10log WKID ₅₀	Antilichamen tegen rabies 10log van de eindverdunding*	Overlevenden
6,7	1,9	8/10
4,7	1,8	0/10
2,7	0,4	0/10
0,7	0,4	0/10

20

* Gemeten met de SFFR- (snelle Fluorescentie Focus-Remmings)proef, Laboratory Techniques in Rabies, 3^e uitgave van het WHO te Geneve, blz. 354-357.

De proef werd herhaald met een uitdaging door 12,5 LD₅₀ van het rabies-virus. De uitkomsten staan in tabel V hieronder.

25

TABEL VB

Dosis vFP-3 10log WKID ₅₀	Antilichamen tegen rabies 10log van de eindverdunding*	Overlevenden
6,7	2,8	5/10
4,7	2,1	2/10
2,7	0,6	0/8
0,7	0,6	0/8

35

- Twee honden en twee katten werden geïmmuniseerd met één enkele subcutane beënting met 8 x de WKID₅₀ van de recombinant vFP-3. Bovendien hield men twee honden en vier katten van eenzelfde leeftijd en gewicht aan als niet gevaccineerde blanco's. Uit alle dieren werd iedere week bloed afgetapt. Op dag nr. 94 werd elke hond uitgedaagd door beënting in de slaapbeenspier met twee doses 0,5 ml speekselklier-homogenaat van de NY-stam van het rabies-virus, welke bij het Institute Mérieux verkrijgbaar is. De totale dosis kwam overeen met 1000 x de LD₅₀ voor een muis bij intracerebrale toediening. De zes katten werden net zo uitgedaagd door beënting in de nekspier met twee doses van 0,5 ml van het zelfde virus. De totale dosis per dier kwam overeen met 40.000 x de muizen-LD₅₀ bij intracerebrale toediening. Men bekeek de dieren dagelijks. Alle niet gevaccineerde dieren stierven, op de in tabel VI aangegeven dag, met symptomen van rabies. De gevaccineerde dieren overleefden de uitdaging en men bleef ze waarnemen tot drie weken na de dood van het laatste blanco dier. De uitkomsten staan bij elkaar in de volgende tabel VI.

45

TABEL VI

Proefdier	Gevaccineerd met	Titer op dagen na de beënting					Tijd van sterven
		0	14	21	28	94	
55 Kat 7015	vFP-3 ^a	0	2,2 ^b	2,4	2,4	1,5	+
7016	vFP-3	0	1,7	1,9	2,0	1,3	+

TABEL VI (vervolg)

5	Proefdier	Gevaccineerd met	Titer op dagen na de beënting					Tijd van sterven
			0	14	21	28	94	
10	8271	c ^c	0	0	0	0	0	d/13 ^d
	T10	c	0	0	0	0	0	d/12
	T41	c	0	0	0	0	0	d/13
	T42	c	0	0	0	0	0	d/12
	Hond 426	vFP-3	0	0,8	1,0	1,1	1,2	+
	427	vFP-3	0	1,5	2,3	2,2	1,9	+
	55	c	0	0	0	0	0	d/15
	8240	c	0	0	0	0	0	d/16

a - Zowel katten als honden die met vFP-3 gevaccineerd werden kregen subcutaan achtmaal de WKID₅₀

b - De titer uitgedrukt in de ¹⁰log van de hoogste serumverduunning die het aantal fluorescerende putjes bij de SFFR-proef met meer dan 50% verminderde.

c - Niet gevaccineerde blanco dieren.

d - Dood na het aantal gegeven dagen na de uitdaging.

Bij nog andere proeven werden de recombinant-virussen vFP-2 en vFP-3 langs verschillende wegen op vee overgeënt.

De beënte dieren werden op dagen nr.'s 6, 14, 21, 28 en 35 op antilichamen tegen rabies onderzocht.

25 Zoals in de volgende tabel VIIA te zien vertoonden alle dieren een serologische respons op het rabies-antigeen.

TABEL VII A

30	Dosis rund nr.	Antilichaam-titers in met vFP-3 beënte zoogdieren					
		Rabies neutraliserende antilichamen SFFR-proef ¹⁰ log van de verduunning					
	Dag nr.	0	6	14	21	28	35
35	7,3 x WKID ₅₀ 1420 (intraderm)	neg	0,6	2	1,7	1,8	1,7
	8 x WKID ₅₀ 1419 (subcut)	neg	1,6	2,2	2,1	2,1	1,9
40	8 x WKID ₅₀ 1421 (intramusc)	neg	0,9	2,2	2,2	1,8	1,7
	7,3 x WKID ₅₀ 1423 (intramusc)	neg	0,9	1,1+	1+	1+	1,1+

+ niet significant.

50 Alle runderen werden op dag nr. 55 na de beënting opnieuw gevaccineerd met 8 x WKID₅₀ en vertoonden een anamnese-respons op het rabies-antigeen. Bij de opjagende hervaccinering werden alle runderen subcutaan beënt, behalve nr. 1421 die opnieuw intramusculair beënt werd. SFFR-titers werden bepaald op dagen nr.'s 55, 57, 63, 70, 77 en 86. De uitkomsten staan in tabel VIIB.

TABEL VIIB

Dag nr.	55	57	63	70	77	86
Rund nr.						
5 1419	1,7	1,5	2,9	2,9	2,6	2,9
1420	1,0	0,5	1,9	2,3	2,2	2,0
1421	1,3	1,2	2,9	2,7	2,5	2,5
1423	1,0	0,7	2,4	2,5	2,5	2,2

10 Alle gegevens gelden vFP-3, behalve bij rund nr. 1423, waar het voor vFP-2 geldt.

Runderen, katten en konijnen werden ook intradermaal beënt met bekende hoeveelheden pluimveevirus en na een week werden huidkorsten van de dieren verzameld. Deze werden vernalen, in zout-oplossing gesuspenderd en getitreerd om er het virusgehalte van te vinden.

Slechts resten infectieus virus konden teruggevonden worden. Dit laat zien dat in vivo geen productieve

15 infectie optreedt.

Voorbeeld VIII

Beënting van kuikens met vFP-3

Het recombinant-pluimveepokken-virus vFP-3 werd overgeënt op kuikens om de expressie van vreemd

20 DNA door een recombinant pluimvee-pokkenvirus te laten zien in een systeem dat productieve vermenigvuldiging van de vector toelaat.

Witte leghornkuikens werden intradermaal met $9 \times \text{WKID}_{50}$ aan vFP-3 of onder doorboren van de vleugels met $3 \times \text{WKID}_{50}$ aan vFP-3 beënt. Bloedmonsters werden 21 dagen na de vaccinering genomen voor een SFFR-proef op rabies-antilichamen. Na 21 dagen was de titer in beënte kuikens significant hoger

25 dan in de blanco's. In de niet beënte blanco's was de gemiddelde titer namelijk 0,6, in de intramusculair beënte vogels was dat 1,9, en in de vogels met doorboorde vleugels was dat 1,2.

Voorbeeld IX

Recombinant-pluimveepokken vFP-11 die kalkoenen-antigeen tegen influenza H5 HA tot expressie brengt

30 Vogels kunnen tegen vogelpathogenen geïmmuniseerd worden met de recombinant-vogelpokkenvirussen volgens de uitvinding.

Zo werd het nieuwe plasmide pRW 759 (nog te beschrijven), afgeleid van pluimveepokkenvirus FP-1 en met daarin het door Hind III H gepromote hemagglutinine-gen (H5) van A/kalkoen/ Ierland/1378/83 (TYHA) gebruikt om CEF-cellen te besmetten, welke concurrerend met het moedervirus FP-1 geïnfected werden.

35 Recombinant-pluimveepokken-virus vFP-11 werd met de eerder hierin beschreven technieken verkregen.

De synthese van een hemagglutinine-molecuul door met vFP-11 geïnfectede cellen werd bevestigd door immunoprecipitatie in lysaten van cellen die eerst door metabolisme radioactief gemerkt waren, onder toepassing van voor H5 specifieke antilichamen en standaardtechnieken. De specifieke immunoprecipitatie van voorloperhemagglutinine met een molecuulgewicht van ong. 63.000 en van twee splitsingsproducten

40 met molecuulgewichten van 44.000 en 23.000 werd aangetoond. Zulke eiwitten sloegen niet neer uit een lysaat van niet geïnfectede CEF-cellen of uit cellen die met het moedervirus FP-1 geïnfected waren.

Om vast te stellen dat het in de met recombinantpluimveepokken vFP-11 geïnfectede cellen gemaakte HA-molecuul op het celoppervlak tot expressie kwam werden immunofluorescentieproeven uitgevoerd. Met het recombinant-pluimveepokken-virus vFP-11 geïnfectede CEF-cellen vertoonden aan hun oppervlak een

45 sterke fluorescentiekleuring. Aan met het moedervirus FP-1 geïnfectede cellen werd geen fluorescentie waargenomen.

Plasmide pRW 759 werd als volgt geschapen:

Het pRW 742B (zie voorbeeld IV) werd opengeknijpt door gedeeltelijke vertering met Pst I en het fragment werd nogeens geknijpt met EcoRV om het rabies-gen G te verwijderen, wat de HH-promotor op het

50 overblijvende fragment van ongeveer 3,4 Kbp achterliet. Dat werd met alkalisch fosfatase behandeld en een synthetisch oligonucleotide werd ingevoegd om de HH-promotor bij ATG met TYHA samen te voegen, wat pRW 744 gaf.

Dit plasmide werd opengeknijpt door gedeeltelijke vertering met Dra I, het lineaire fragment werd met Sal I geknijpt, en het grotere fragment werd opnieuw geïsoleerd en met alkalisch fosfatase behandeld.

55 Tenslotte werd pRW 759 gemaakt door het met Sal I en Dra I geïsoleerde stuk dat voor TYHA codeert en door Kawaoka c.s. in Virology 158 (1987) 218-227 beschreven is, in de vector pRW 744 in te bouwen.

Voorbeeld X

Immuniseren met vFP-11 om vogels tegen uitdaging met levend influenzavirus te beschermen

Om de immunogeniteit van recombinant-pluimveepokkenvirus vFP-11 te bepalen werden vaccinerings- en uitdagingstoeven in kippen en kalkoenen uitgevoerd.

- 5 Specifiek-pathogeen-vrije witte leghornkuikens werden 2 dagen en 5 weken oud gevaccineerd door het vleugelvlies te doorboren met een dubbele naald die ook voor de commerciële vaccinatie van pluimvee tegen pluimveepokken gebruikt wordt. Elke vogel kreeg ongeveer 2 µl met daarin 6×10^5 pfu aan vFP-11. Uit de oudere vogels werd voor de vaccinatie bloed afgetapt, en 2 weken later uit alle vogels vlak voor de uitdaging.
- 10 Ter vergelijking werd een tweede groep kuikens gevaccineerd met een gebruikelijk H5-vaccin dat een water-in-olie-emulsie van een geïnactiveerde stam H5N2 is.
- Geïnactiveerd H5N2-vaccin werd bereid uit A/Mallard/NY/189/82-(H5N2-) influenza-virus dat in kippen-eieren met 11 dagen oude embryo's gekweekt was; de geïnfecteerde allantois - vloeistof met een HA-titer van 800/0, 1 ml en een infectiviteit van $10^{8.5}/0$, 1 ml werd met 0,1% propiolacton geïnactiveerd en in een
- 15 water-in-olie-emulsie omgezet zoals beschreven door Stone c.s. in Avian Dis. 22 (1978) 666-674 en door Brugh c.s. in Proc. van het Tweede Intern. Symp. over Vogel Influenza, blz. 283-292 (1986). Het vaccin werd in 0,2 ml toegediend aan witte SPF leghornkuikens van 2 dagen en 5 weken oud, en wel subcutaan, onder de huid aan de binnenkant van de dijspier.
- Een derde en vierde groep kuikens kregen respectievelijk het moedervirus FP-1 en geen vaccin.
- 20 De kuikens werden uitgedaagd met ongeveer 10^3 LD₅₀ van het zeer pathogene influenzavirus A/kalkoen/Ierland/1378/83 (H5N8) of A/kip/Penn/1370/83 (H5N2) door elke kip 0,1 ml in de naren toe te dienen. Vogels van 2 dagen oud werden 6 weken en vogels van 5 weken oud werden 5 weken na het vaccineren uitgedaagd. De vogels werden dagelijks bekeken op tekenen van de ziekte, zijnde opzwellen en blauwworden van het gezicht en de kam en bloedingen aan de poten (dergelijke kippen konden vaak niet blijven
- 25 staan), verlamming en de dood. Het meeste sterven was tussen 4 en 7 dagen na de infectie. Van de levende kuikens werden 3 dagen na de infectie afstrijkjes uit de luchtpijp en de cloaca genomen en hierin werd op virus gezocht door er eieren met embryo's mee te beënten. De met pluimveepokken (zowel van het wilde type als het recombinant virus) beënte kuikens ontwikkelden typerende huidschade op de linkervleugel. Op de derde dag vormde zich op de plek van elke naaldeprik een pok, zelfinfiltratie volgde met de
- 30 vorming van huidkorsten en herstel na 7 dagen. Er was geen secundaire huidschade en er waren geen tekenen van verspreiding op niet gevaccineerde kuikens die er mee in contact kwamen. De uitkomsten van de uitdagingstoeven staan in tabel VIII en de daarbij behorende serologische vondsten in tabel IX.

TABEL VIII

35

Bescherming van kuikens via H5 dat in pluimveepokken tot expressie komt						
Uitdagend virus	Vaccin	Leeftijd van de kuikens	Bescherming ziek/dood/ totaal	Virus in Luchtpijp	Cloaca	
40						
45	Ty/Ierland (H5N8)	Pv-pokken-H5 (vFP-11)	2 dagen	0/0/10	0/10	0/10
			5 weken	0/0/5	0/5	0/5
		Geïnactiveerd	2 dagen	0/0/9	0/9	0/9
		H5N2	5 weken	0/0/5	0/5	0/5
		Pv-pokken	2 dagen	10/9/10	2/6	3/6
50		blanco	5 weken	4/3/5	0/5	4/5
		Niets	2 dagen	10/9/10	2/7	5/7
			2 dagen*	2/1/2	2/2	2/2
			5 weken	2/2/5	0/5	1/5
55	Ck/Penn (H5N2)	Pv-pokken-H5 (vFP-11)	2 dagen	0/0/10	8/10	0/10
			5 weken	0/0/6	5/6	2/6

TABEL VIII (vervolg)

Bescherming van kuikens via H5 dat in pluimveepokken tot expressie komt					
5	Geïnacti- veerd	2 dagen	0/0/8	2/8	0/8
	H5N2	5 weken	0/0/5	3/5	0/5
	Pv-pokken	2 dagen	10/1/10	10/10	10/10
	blanco	5 weken	5/0/5	5/5	5/5
	Niets	2 dagen	9/3/9	9/9	9/9
10		2 dagen*	2/2/2	2/2	2/2
		5 weken	5/2/5	5/5	5/5

* Samen met de pluimveepokken-H5-groep van 10 vogels werden er vier niet gevaccineerde kippen in het zelfde hok opgekweekt om op verspreiding van vogelpokken H5 te testen.

Tabel IX

Serologische respons uitgelokt door beënting met vFP-11 of met een geïnactiveerd influenza-virus-vaccin										
Uitdagend virus	Vaccin	Leeftijd van de kuikens	HI-titers tegen (a)				Neutralisering van de infectiviteit			
			Ty/erland Post 1	Ck/Penn Post 2	Post 1	Post 2	Post 1	Post 2	Ty/erland Post 1	Ck/Penn Post 1
Ty/erland (H5N8)	Pv-pokken-H5	2 dagen	15 ^(e)	156	<	65			70	2.500
		5 weken	100	480	<	20			160	10.000
	Geïnacti-veerd	2 dagen	30	70	30	50	65		1.000	
	H5N2	5 weken	350	600	180	200	240		2.500	
	Pv-pokken	2 dagen	<	160 ^{(1)(b)}	<	20	<		300 ⁽¹⁾	
	blanco	5 weken	<	1280 ⁽²⁾	<	60	<		10.000 ⁽²⁾	
Ck/Penn/	Niets	2 dagen	<	80 ⁽¹⁾	<	20	<		300 ⁽¹⁾	
		5 weken	<	2000 ⁽³⁾	<	60	<		70 ⁽³⁾	
	Pv-pokken-H5	2 dagen	15.600	<	90	300		70	<	2.500
		5 weken	80	2500	<	70		<	400	
	Geïnacti-veerd	2 dagen	60	300	20			10		
	H5N2	5 weken	300	500	100	200		150	1.500	
	Pv-pokken	2 dagen	<	60 ⁽⁸⁾	<	120	<	<	40	
	Blanco	5 weken	<	90	<	140	<	<	40	
	Niets	2 dagen	<	60 ⁽⁸⁾	<	160	<	<	25	
		5 weken	<	160 ⁽³⁾	<	150	<	<	70	

- (a) Uit de vijf weken oude vogels werd voor het vaccineren bloed afgetapt dat in HI- en neutraliseringsproeven getest werd; geen daarvan bevatte aantoonbare gehalten aan antilichaam en de uitkomsten zijn hier niet vermeld. Uit de twee dagen oude kuikens werd 6 weken na het vaccineren bloed afgetapt (post 1) en uit de 5 weken oude vogels 5 weken na het vaccineren (post 1) uit beide groepen werd 2 weken na de uitdaging bloed genomen (post 2). De cijfers zijn de gemiddelde antilichaamtiteren voor dezelfde groepen kuikens als die in tabel I genoemd zijn.
- (b) De aantallen tussen haakjes geven aan hoeveel er de uitdaging overleefden
< = minder dan 10.
- (c) Hemagglutineringsremmingsproeven (HI-proeven) werden in microtiterplaten uitgevoerd met sera die met receptorafbrekend enzym behandeld waren, met 4 HA-eenheden Ty/lre-virus en met 0,5% kippenerythrocyten, zoals beschreven door Palmer c.s. in Immun. Series No. 6, blz. 51-52 (Amerikaans Ministerie van Gezondheid, Opvoeding en Welzijn, 1975). Proeven betreffende de neutralisering van de infectiviteit gebeurden door 10^3 EID₅₀ van het Ty/lre-virus met verdunningen van het serum 30 minuten bij kamertemperatuur te incuberen, waarna eieren met embryo's met porties daarvan beënt werden. Virusgroei werd vastgesteld door hemagglutineringsproeven na 2 dagen incubatie van de eieren bij 33°C.
- Kuikens die met de vogelpokken-recombinant (vFP-11) of met het geïnactiveerde H5N2 influenza-vaccin in adjuvans beënt waren waren beschermd tegen uitdaging met het homologe influenzavirus Ty/lre (H5N8) en tegen het verwante maar te onderscheiden influenzavirus Ck/Penn (H5N2). In tegenstelling daarmee vertoonde de meerderheid der vogels die met het moeder-FPV beënt waren of die geen vaccin kregen klinische tekenen van een zeer pathogene influenza, waaronder zwellen en blauwworden van gezicht en kam, bloedingen aan de poten en verlammingen. De meeste van deze vogels gingen dood. De gevaccineerde vogels scheiden geen aantoonbare hoeveelheden Ty/lre af maar wel Ck/Penn.
- Zowel de geïnactiveerde als de recombinant-vaccins lokten HI en neutraliserende antilichamen tegen Ty/lre uit, maar de gehalten aan door vogelpokken-recombinant vFP-11 uitgelokte gehalten aan antilichaam neutraliseerden voor de uitdaging HA niet en neutraliseerden het heterologe Ck/Penn H5 ook niet. Maar ongeacht dat werden de kuikens beschermd tegen uitdaging met zowel Ty/lreals Ck/Penn-influenzavirussen.
- De door vaccineren met vFP-11 uitgelokte immuniteit tegen H5 influenza hield ten minste 4 tot 6 weken aan en vertoonde kruisreacties. Om de duur en de specificiteit van de respons verder te onderzoeken werd een groep van 4 weken oude kuikens in het vleugelvlies met vFP-11 beënt, zoals eerder beschreven, en met tussenpozen van een maand uitgedaagd met het kruisreagerende Ck/Penn-virus. Opnieuw waren voor de uitdaging geen HI-antilichamen aan te tonen. Desalniettemin waren de vogels langer dan 4 maanden beschermd.
- Het door vFP-11 tot expressie gebrachte H5 lokt ook in kalkoenen een beschermende immuunrespons uit. Uitgeteelde witte kalkoenen werden op een leeftijd van 2 dagen of van 4 weken op de eerder beschreven wijze met prikken in het vleugelvlies gevaccineerd. De uitkomsten hiervan staan in tabel X.

TABEL X

Bescherming van kalkoenen via H5-HA dat in vFP-11 tot expressie kwam									
Vaccin	Leeftijd der kippen	Bescherming ziek/dood/totaal	Virus aangetoond luchtpijp	cloaca	HI-antilichaam		Neutraliserende antilichamen tegen 10^3 log van		
					Ty/lre Post 1	Ty/lre Post 2	Post 1	Post 1	Post 2
vFP-11	2dagen	1/1/5	5/5	3/5	<10	160	<1	4,32	
recombinant	4weken	2/1/6	2/6	0/6	<10	640	1,05	4,16	
Contact-	2 dagen	2/2/2	2/2	2/2	<10	dood	<1	dood	
blanco's	4 weken	2/2/2	2/2	2/2	<10	dood	<1	dood	

Een significant overleven van de uitdaging door het homologe virus Ty/Ire werd bij beide leeftijdsgroepen waargenomen. De niet gevaccineerde blanco vogels zaten samen met de gevaccineerde vogels in dezelfde hokken om op verspreiding van het recombinant-virus te testen. Deze vogels overleefden de uitdaging niet.

5

Voorbeeld XI

Opbouw van pluimveepokkenvirus FP-1 recombinant vFP 12 die het gen voor het nucleoproteïne van kuikeninfluenza tot expressie brengt

- 10 Plasmide pNP 33 bevat een cDNA-kloon van het gen voor het nucleoproteïne (NP) van het influenzavirus kuiken/Pennsylvanië/ 1/83. Alleen van de 5'- en 3'-einden van dit ongeveer 1,5 Kbp grootte gen is de volgorde vastgesteld. Het NP-gen werd als 5'-Cla I-Xho I 3'-fragment met stompe uiteinden van uit pNP 33 in Sma I overgebracht, met de Eco RI-plaats van het pUC 9 aan het 3'-einde, hetgeen pRW 714 gaf. Het begincodon van het NP-gen voor het vertalen (ATG) bevat de volgende (onderstreepte) Aha II-plaats: ATGGCGTC.

- 15 De eerder beschreven promotor voor Vaccinia H6 werd met een dubbelstrengig synthetisch oligonucleotide aan het NP-gen gehecht. Het synthetische oligonucleotide omvatte de H6-reeks van de Eco RV-plaats aan zijn ATG en in de voor het NP coderende reeks op de Aha II-plaats. Het oligonucleotide werd gesynthetiseerd met voor Bam HI en Eco RI aangrijpbare eindigen zodat het in pUC 9 ingebouwd kon worden, hetgeen pRW 755 gaf. Beginnende met het voor Bam HI aangrijpbare einde, met het ATG
- 20 onderstreept, is de volgorde van dit dubbelstrengige oligonucleotide:

GATCCGATATCCGTTAAGTTTGTATCGTAATGGCGTCG
GCTATAGGCAATTCAAACATAGCATTACCGCAGCTTAA

- Het door Aha II opgeknipte, gedeeltelijk verteerde product van pRW 755 werd geïsoleerd en met Eco RI opnieuw bewerkt. Het fragment van pRW 755 dat bij het ATG één enkele Aha II-doorsnijding bevatte en
- 25 met Eco RI opnieuw bewerkt was, werd geïsoleerd, met fosfatase behandeld en als vector voor het hierna te beschrijven verteringsproduct van pRW 714 gebruikt.

- Het gedeeltelijk door Aha II verteerde, opgeknipte en geïsoleerde verteringsproduct van pRW 714 werd met Eco RI opnieuw bewerkt. Een met Aha II en Eco RI verkregen en geïsoleerd fragment van ongeveer 1,5 Kbp, met daarin de voor NP coderende reeks, werd in de bovengenoemde vector pRW 757
- 30 ingebouwd, hetgeen pRW 757 gaf. De complete H6-promotor werd gevormd door de reeksen bovenstrooms (5') van de Eco RV-plaats toe te voegen. Uit het (in voorbeeld IV beschreven) plasmide pRW 742B was de H6-reeks benedenstrooms (3') van de Eco RV-plaats samen met reeksen tot aan de Nde I-plaats van pUC 9 verwijderd. Het met fosfatase behandelde Eco RV-Nde I-fragment van pRW 742B werd als vector voor het hierna te noemen fragment van pRW 757 gebruikt. Het geïsoleerde lineaire product van de gedeeltelijke
- 35 vertering van pRW 757 door Eco RV werd na vertering door Nde I opnieuw geïsoleerd; dit fragment bevat de H6-promotor vanaf de Eco RV-plaats via het NP-gen tot aan de Nde I-plaats van pUC 9. Het fragment van pRW 757 werd in de vector pRW 742B geplaatst, hetgeen pRW 758 gaf. Het Eco RI-fragment van pRW 758, dat nu het complete door H6 gepromote NP-gen bevatte, werd, nadat zijn uiteinden met het Klenow-fragment van DNA-polymerase I stomp gemaakt worden, in de Hinc II-plaats van pRW 731. 13 ingebouwd,
- 40 wat pRW 760 gaf. De Hinc II-plaats in pRW 731. 13 is de plaats in FP-1 die in voorbeeld VI voor het opbouwen van vFP-6 en vFP-7 gebruikt was.

- Met pluimveepokkenvirus FP-1 als reddend virus werd plasmide pRW 760 in een recombinatieproef in vitro gebruikt. De nakomeling-plaques werden gemeten en in situ door plaque-hybridisering gezuiverd. Expressie van het gen werd bevestigd door immunoprecipitatie onderzoek met behulp van een polykonaal
- 45 geitenantiserum tegen NP. De grootte van het eiwit dat specifiek uit een lysaat van met vFP-12 geïnfecteerde CEF-cellen neersloeg was ongeveer 55 KD; hetgeen binnen het in de literatuur voor influenzavirus-nucleoproteïnen genoemde traject ligt.

Voorbeeld XII

- 50 Constructie van een dubbele recombinant van het pluimveepokkenvirus vFP-15 dat de genen voor het nucleoproteïne van vogelinfluenza (NP) en voor hemagglutinine (HA) tot expressie brengt

- Het hemagglutinine-gen (HA-gen) uit A/Tyr/Ire/1378/83 werd eerder beschreven in verband met het opbouwen van vFP-11 (voorbeeld IX). Bij het maken van een dubbele recombinant werd het HA-gen eerst overgebracht naar plaats f8 die eerder gedefinieerd werd bij de opbouw van vFP-8 met behulp van plasmide
- 55 pRW 731. 15.

Het bij het opbouwen van vFP-11 gebruikte plasmide was pRW 759. Het aan de H6-promotor verbonden hemagglutinine-gen werd door een gedeeltelijke vertering met Pst I uit dit plasmide verwijderd. Dit fragment

kreeg toen met het Klenow-fragment van DNA-polymerase I stompe uiteinden en werd in de Bam HI-plaats van pRW 731. 15 met stompe uiteinden ingebouwd, wat pRW 771 gaf.

- 5 Het plasmide pRW 771 werd toen gebruikt in een in vitro recombinatieproef met vFP-12 als reddend virus. Het recombinantvirus vFP-12 bevat dit aan de H6-promotor gebonden gen voor nucleoproteïne op de in plasmide pRW 731. 13 gedefinieerde plaats f7. Recombinant-plaques die nu beide invoegingen bevatten werden geselecteerd en in de plaque gezuiverd door hybridisering in situ en de expressie werd aan het oppervlak bevestigd met een aan eiwit A en β -galactosidase gekoppeld immunoessaai. De expressie van beide genen werd bevestigd door immunoprecipitatie uit lysaten van cellen die met het dubbele recombinant-virus vFP-15 geïnfecteerd waren.

10

Voorbeeld XIII

Opbouw van recombinant-kanariepokkenvirussen

- Het volgende voorbeeld toont de identificatie van vier niet-essentiële inbouwplaatsen in het kanariepokken-genoom en het opbouwen van vier recombinant-kanariepokkenvirussen vCP-16, vCP-17, 15 vCP-19 en vCP-20.

Het recombinant-kanariepokkenvirus vCP-16 werd als volgt opgebouwd.

- Een Pvu II-fragment van 3,4 Kbp uit het DNA van kanariepokken werd in pUC 9 gekloond, wat pRW 764.2 gaf. Binnen dit fragment werd één enkele Eco RI-plaats gevonden, asymmetrisch geplaatst, met een korte arm van 700 bp en een lange arm van 2700 bp. Het plasmide werd met Eco RI verteerd en kreeg met 20 het Klenowfragment van DNA-polymerase I stompe uiteinden. Het H6/rabies-gen G met stompe uiteinden werd toen in deze plaats ingevoegd en gebruikt om E. coli te transformeren. Het plasmide pRW 775 dat daarvan het resultaat was werd in een recombinatieproef in vitro gebruikt. Nakomeling-plaques die op een immunoscherm positief waren werden eruit gezocht en in de plaque gezuiverd. De aldus verkregen recombinant kreeg de aanduiding vCP-16 en de invoegplaats C3.

- 25 Het voor de opbouw hierboven gebruikte plasmide pRW 764.2 had ook één enkele Bgl II-plaats, ongeveer 2,4 Kbp vanaf de Eco RI-plaats. Met dezelfde kloonstrategie werd het H6/rabiesgen G ook op dezelfde plaats in plasmide pRW 764.2 ingebouwd, wat pRW 774 gaf. Dit plasmide werd gebruikt bij het opbouwen van de recombinant vCP-17 met de als C4 aangeduide invoegplaats.

- Plasmide pRW 764.5 heeft een Pvu II-fragment van het kanariepokken-DNA van 850 bp met in dit 30 fragment één enkele Bgl II-plaats 400 bp vanaf het uiteinde. Met de eerder beschreven kloonstrategie werd werd aan de H6-promotor verbonden rabiesgen G op deze plaats ingevoegd, wat pRW 777 gaf. Het verkregen stabiele recombinant-virus kreeg de aanduiding vCP-19 en de invoeg plaats C5.

- Plasmide pRW 764.7 bevat een Pvu II-fragment van 1,2 Kbp met één enkele Bgl II-plaats 300 basen vanaf het einde. Het plasmide werd met Bgl II verteerd en kreeg met het Klenowfragment van DNA- 35 polymerase I stompe uiteinden. Het met 11K gepromote Lac Z-gen met stompe uiteinden werd ingevoegd, wat plasmide pRW 778 gaf. Het met dit plasmide opgebouwde stabiele recombinant-virus kreeg de aanduiding vCP-20 en de invoegplaats C6.

Voorbeeld XIV

- 40 Opbouw van een pluimveepokkenvirus-recombinant vFP-29 dat bij expressie het versmeltingseiwit van het virus van de Newcastleziekte geeft

- Plasmide pNDV 10⁸, de cDNA-kloon van het gen voor het versmeltingseiwit van de Texas-stam van het Newcastleziektevirus, bestond uit een met Hpa I gemaakt cDNA-fragment van ongeveer 3,3 Kbp dat zowel de reeks bevat die voor het versmeltingseiwit codeert als aanvullende voor de Newcastleziekte coderende 45 reeksen, samen op de Sca I-plaats van pBR 322 gekloond. De stappen bij de productie van het invoeg-plasmide worden hierna beschreven.

(1) Het scheppen van plasmide pCE 11

- Een FPV-inbouwvector, pCE 11, werd opgebouwd door meervoudige verbindingstukken op de Hinc II-plaats van pRW 731. 13 (aangeduid als "plaats f7") in te voegen. Het pRW 731. 13 heeft een Pvu 50 II-fragment uit het DNA van FP-1 van 5,5 Kbp. Een niet-essentiële plaats werd eerder gedefinieerd op de Hinc II-plaats door opbouw van de eerder in voorbeeld VI beschreven stabiele recombinant vFP-6. De op de Hinc II-plaats ingevoegde meervoudige verbindingstukken bevatten de volgende aangrijpingspunten voor Nru I, Eco RI, Sac I, Kpn I, Sma I, Bam HI, Xba I, Hinc II, Sal I, Acc I, Pst I, Sph I, Hind III en Hpa I.

(2) Het scheppen van plasmide pCE 19

- 55 Dit plasmide is een andere modificatie van pCE 11, waarin tussen de Sac I en Eco RI-plaatsen het uit koepokvirus afkomstige stopsignaal ATTTTNT (L. Yuen en B. Moss in J. Virology 60 (1986) 320-323) (waar N in dit geval een A is) tussengevoegd was, met dienovereenkomstig verlies van de Eco RI-plaats.

(3) Invoegen van de voor Newcastleziekte coderende reeksen

Een over een gel gezuiverd Bam HI-fragment van 1,8 Kbp, met daarin alle nucleotiden van het gen voor het versmeltingseiwit op de 22 laatste van het 5'-einde na, werd op de Bam HI-plaats van pUC 18 ingevoegd, wat pCE 13 gaf. Dit plasmide werd met Sal I verteerd, dat 12 basen bovenstrooms van het 5'-einde van de coderende reeks in de vector knipt. De uiteinden werden met het Klenow-fragment van DNA-polymerase I opgevuld en het plasmide werd verder verteerd met Hind III dat 18 basen bovenstrooms van de Sal I-plaats doorknipt. Een over een gel gezuiverd Sma I / Hind III-fragment van 146 bp, met daarin de eerder voor bevoorkeurde uitvoeringsvormen beschreven koepokvirus-promotor H6 en ook meervoudige verbindingstukken werd aan de vector verbonden en in *E. coli*-cellen overgebracht. Het verkregen plasmide werd aangeduid als pCE 16.

Om het initiërende codon ATG van het gen voor het versmeltingseiwit van de Newcastleziekte met het 3'-einde van de promotor H6 op lijn te brengen en de 22 nucleotiden die nabij het 5'-einde (van het Newcastleziekte-virus) in pCE 16 ontbreken te vervangen werden aanvullende synthetische oligonucleotiden ontworpen die op aangrijpingsplaatsen voor Eco RV en Kpn I eindigden. De oligonucleotide-reeks was 5'-ATC-CGT-TAA-GTT-TGT-ATC-GTA-ATG-GGC-TCC-AGA-TCT-TCT-A CC-AGG-ATC-CCG-GTA-C 3'.

De constructie pCE 16 werd toen met Eco RV en Kpn I verteerd. De Eco RV-plaats staat in de promotor H6 24 basen bovenstrooms van het initiërende ATG. De Kpn I-plaats staat in de voor een Newcastleziekte coderende reeks 29 basen benedenstrooms van het ATG.

De oligonucleotiden werden glad gemaakt, gefosforyleerd en met het opgeknijpte plasmide verbonden, en het aldus gemaakte DNA werd gebruikt om cellen van *E. coli* te transformeren. Dit plasmide werd aangeduid als pCE 18.

Om de voor Newcastleziekte coderende reeks in een FPV-inbouwvector te voegen werd een over een gel gezuiverd Sma I / Hind III-fragment van pCE 18 (opgeknijpt in het gebied van de meervoudige verbindingen) van 1,9 Kbp aan het hierboven beschreven Sma I / Hind III-fragment van pCE 19 van 7,8 Kbp verbonden. Het stopsignaal voor het overschrijven stond 16 basen benedenstrooms van de Sma I-plaats. Het verkregen plasmide kreeg de aanduiding pCE 20.

Het plasmide pCE 20 werd gebruikt in een in vitro recombinatieproef met pluimveepokkenvirus FP-1 als reddend virus. De verkregen nakomelingen werden op CEF-monolagen uitgeplaat en de plaques ondergingen met behulp van een polykonaal kuikenserum tegen Newcastleziekte een immunoschermproef met aan β -galactosidase geknoopt eiwit A. Positief kleurende plaques werden eruit gekozen en ondergingen vier cycli van plaque-zuivering om een homogene populatie te krijgen. De recombinant kreeg de aanduiding vFP-29.

35 Voorbeeld XV

Opbouw van pluimveepokken-recombinanten die het omhullende glycoproteïne van kattenleukemievirus (FeLV) maken

Het gen voor de FeLV-omhulling bevat de reeks die voor het polyeiwit p70 = p15E codeert. Dit gen werd aanvankelijk in het plasmide pSD467vC ingebouwd met de koepokpromotor H6 in 5'-stand ten opzichte van het FeLV-omhullingsgen. Het plasmide pSD467vC was verkregen door eerst een Sal I / Hind III-fragment van 1802 bp met daarin het gen voor het koepok-hemagglutinine in de vector pUC18 in te bouwen. De plaats van het hemagglutininegen was eerder bepaald (Shida, in *Virology* 150 (1988) 451-462). Het grootste deel van dit open af te lezen geval dat voor het hemagglutinine codeerde werd weggelaten (nucleotiden 443 tot en met 1311) en een meervoudige kloningsplaats werd ingevoegd die aangrijpingsplaatsen voor de restrictie-enzymen Bgl II, Sma I, Pst I en Eag I bevatte. In het verkregen plasmide pSD467vC was het koepok-gedeelte bovenstrooms van de meervoudige kloningsplaats geflankeerd door een arm van 442 bp en benedenstrooms door een arm van 491 bp. Deze flankerende armen maken het mogelijk het in dit meervoudige kloningsgebied ingevoegde genetische materiaal in het hemagglutinine-gebied van de Kopenhagen-stam van het koepokvirus te recombineren. De verkregen recombinant-nakomelingen zijn hemagglutinine-negatief.

De H6-promotor werd gesynthetiseerd door vier elkaar overlappende oligonucleotiden, die tezamen de complete hierboven in bevoorkeurde uitvoeringsvormen beschreven reeks omvatten, te ontlaten. Het verkregen fragment van 132 bp bevatte aan het 5'-einde een aangrijpingsplaats voor Bgl II en aan het 3'-einde een plaats voor Sma I. Dit werd op de Bgl II / Sma I-restrictieplaats in pSD467vC ingevoegd. Het aldus verkregen plasmide kreeg de aanduiding pPT15. Het gen voor de FeLV-omhulling zat op die ene Pst I-plaats van pPT15 welke net benedenstrooms van de promotor H6 staat. Het aldus opgebouwde plasmide kreeg de aanduiding pFeLV1A.

Voor de constructie van de recombinant FP-1 werden reeksen van 2,4 Kbp voor de H6/FeLV-omhulling door vertering met Bgl II en gedeeltelijke vertering met Pst I uit pFeLV1A geknipt. De Bgl II-plaats zit op de 5'-grens van de H6-promotorreeks. De plaats voor Pst I ligt 420 bp benedenstrooms van het stopsignaal voor het omhullings-glycoproteïne in het open af te lezen geval.

- 5 De reeks van 2,4 Kbp voor H6 en de FeLV-omhulling werd in met Bam HI en Pst I verteerd pCE 11 ingevoegd. Deze inbouwvector pCE 11 voor FP-1 was afgeleid van pRW 731. 13 door inbouw van een meervoudige kloningsplaats op de niet-essentiële Hinc II-plaats. Deze inbouwvector maakt het ontstaan van FP-1 recombinanten mogelijk die vreemde genen op plaats f7 van het FP-1-genoom herbergen. Het inbouwplasmide voor de recombinant FP-1/FeLV kreeg toen de aanduiding pFeLVF1. Met deze constructie
- 10 is men echter niet zeker van een perfecte vervanging van ATG door ATG.

- Om de perfecte ATG:ATG-constructie te bereiken werd een Nru I / Sst II-fragment van ongeveer 1,4 Kbp, afgeleid van de koepokvirus-inbouwvector pFeLV1C. De plaats voor Nru I ligt binnen de promotor H6 op een plaats 24 bp bovenstrooms van het ATG. De plaats voor Sst II ligt 1,4 Kbp benedenstrooms van het ATG en 1 Kbp bovenstrooms van het eindsignaal voor de vertaling. Dit Nru I/Sst II fragment werd verbonden met een fragment van 9,9 Kbp dat door vertering met Sst II en gedeeltelijke vertering met Nru I
- 15 gevormd was. Dit fragment van 9,9 Kbp bevat de FP-1 flankerende armen van 5,5 Kbp, de reeksen van de vector pUC, 1,4 Kbp van de FeLV-reeks die met de benedenstroomse gedeelten van het omhullingsgen overeenkomen, en de het verst naar het 5'-einde gelegen 100 bp van de promotor H6. Het verkregen plasmide kreeg de aanduiding pFeLVF2. De ATG:ATG-constructie werd bevestigd door analyse van de
- 20 nucleotiden-volgorde.

- Een andere inbouwvector voor het FP-1, het pFeLVF3, werd uit pFeLVF2 afgeleid door de reeksen voor de FeLV-omhulling, overeenkomende met het beweerde immuniteit onderdrukkende gebied (Cianciolo c.s. in *Science* **230** (1985) 453-455) (nucleotiden 1548 t/m 1628 van de coderende reeks). Dit werd bereikt door een Sst II / Pst I-fragment (met de hierboven genoemde aangrijpingsplaatsen) van ongeveer 1 Kbp uit de
- 25 koepokvirus-inbouwvector pFeLV1D te isoleren. Het plasmide pFeLV1d komt overeen met pFeLVIC behalve dat de omhullingsreeksen overeenkomende met het immuniteit onderdrukkende gebied (nucleotiden 1548 t/m 1628) door op de oligonucleotiden gerichte mutagenese weggelaten werden (zie Mandecki in *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83** (1987) 7177-7181.) Het Sst II / Pst I-fragment van 1 Kbp dat de nucleotiden 1548 t/m 1628 mistte werd ingebouwd in een Sst II/Pst I-fragment van 10,4 Kbp dat de rest van het uit pFeLVF2
- 30 afkomstige gen voor de H6:FeLV-omhulling bevatte.

- De inbouwplasmiden pFeLVF2 en pFeLVF3 werden in recombinatieproeven in vitro gebruikt met FP-1 als reddend virus. Nakomelingen van de recombinatie werden uitgeplaat op CEF-monolagen en recombinant-virussen werden geselecteerd door plaque-hybridisering op CEF-monolagen. Door hybridiseringsanalyse geïdentificeerde recombinant-nakomelingen werden er uit gehaald en ondergingen vier cycli plaque-
- 35 zuivering om tot homogene populaties te komen. Een FP-1 recombinant die het hele gen voor de FeLV-omhulling herbergde kreeg de aanduiding vFP-25 en een FP-1 recombinant die het hele gen had maar het de immuniteit onderdrukkende gebied miste werd vFP-32 genoemd. Van beide recombinanten is door immunoprecipitatie met polykonaal runderserum tegen FeLV (van de Antibodies, Inc. te Davis, Ca.) aangetoond dat ze het geëigende genproduct bevatten. Van belang is dat deze FP-1 recombinanten het
- 40 vreemde gen voor de FeLV-omhulling tot expressie brengen in de CRFK-celijn (ATCC #CCL94), welke uit de kat afkomstig is.

- Voor de constructie van kanariepokken-recombinanten werd een fragment van 2,2 Kbp met daarin de reeksen voor de H6:FeLV-I-omhulling door vertering met Sma I en Hpa I uit pFeLVF2 geknipt. De plaats voor Sma I is bij de 5'-grens van de H6-promotorreeks. De plaats voor Hpa I ligt 180 bp benedenstrooms
- 45 van het beëindigingssignaal op het open af te lezen geval voor de omhulling.

- De reeks van 2,2 Kbp voor de H6/FeLV-omhulling werd op de niet-essentiële Eco RI-plaats van het inbouwplasmide pRW764.2 ingevoegd nadat die uiteinden van de Eco RI-plaats afgestompt waren. Deze inbouwvector maakt het ontstaan van CP-recombinanten mogelijk die vreemde genen op plaats C4 van het CP-genoom te herbergen. Het recombinant-plasmide voor het inbouwen van CP kreeg de aanduiding
- 50 pFeLVCP2. Deze constructie vertoont een perfecte vervanging van ATG door ATG.

- Het inbouwplasmide pFeLVCP2 werd in recombinatieproeven in vitro gebruikt met kanariepokken als reddend virus. Nakomelingen van deze recombinatie werden op CEF-monolagen uitgeplaat en de recombinant-virussen werden er in een immunoschermproef met aan β -galactosidase geknoopt eiwit A met behulp van een polykonaal runderserum tegen FeLV uit de handel (Antibodies Inc. te Davis, Ca.) uitge-
- 55 zocht. Positief kleurende plaques werden eruit genomen en ondergingen vier cycli van plaque-zuivering om een homogene populatie te verkrijgen. Een recombinant dat het gehele gen voor de FeLV-omhulling tot uitdrukking bracht kreeg de aanduiding vCP-36.

Voorbeeld XVI

Opbouw van pluimveepokkenvirus-recombinant vFP-22 die het gen voor de omhulling van het met rous geassocieerde virus type 1 tot expressie brengt

- De kloon penvRVIPT van het omhullingsgen RAV-1 bevat 1,1 Kbp aan voor RAV-1 coderend DNA, als
 5 een Kpn I/Sac I-fragment in M13mp18 gekloond. Dit fragment is aan het 5'-einde intact maar mist een deel van het 3'-einde en werd in de volgende manipulaties gebruikt. Een over een gel gezuiverd Eco RI/Pst I-fragment uit penvRVIPT van 1,1 Kbp werd op de Eco RI- en Pst I-plaatsen van pUC 9 ingebouwd, hetgeen pRW 756 gaf. Dit plasmide werd toen met Kpn I en Hind III verteerd waardoor 59 basen bovenstrooms van het ATG in de vector geknipt werd. Er werd een Kpn I/Hind III-fragment van 146 baseparen,
 10 met daarin de eerder beschreven koepokvirus-promotor H6, ingebouwd, hetgeen het plasmide pCE 6 gaf.

Om er zeker van te zijn dat het initiërende ATG van het gen voor de RAV-omhulling nabij het 3'-einde van de promotor H6 lag, onder weglating van van buitenkomende reeksen, werden nog twee aanvullende synthetische oligonucleotiden opgebouwd met Eco RV en Ban II-plaatsen aan de uiteinden. Dit oligonucleotide was 5'-ATC-CGT-TAA-GTT-TGT-ATC-GTA-ATG-AGG-CGA-GCC-3'.

- 15 Het plasmide pCE 6 werd verteerd met Eco RV, dat 24 basen bovenstrooms van het ATG in de promotor H6 knipt, en met Ban II dat 7 basen benedenstrooms van het ATG in de voor de RAV-omhulling coderende reeks knipt. De DNA-segmenten werden met elkaar verbonden en gebruikt om *E. coli*-cellen te transformeren. Het plasmide dat daarvan het resultaat was, pCE 7, verschafte promotor H6 en een correcte 5'-reeks voor de uiteindelijke constructie.

- 20 Uit een restrictiekaart bleek de kloon mp19env (190) het gehele gen voor de RAV-1 omhulling te bevatten. Een Kpn I/Sac I-fragment van mp19env (190) dat het gehele gen bevatte werd op de Kpn I- en Sac I-plaatsen pUC 18 ingevoegd, wat pCE 3 gaf. Dit plasmide werd met Hpa I verteerd, dat de voor RAV-1 coderende reeks 132 basen benedenstrooms van het initiërende ATG doorknipt, en met Sac I, dat het gen nabij het 3'-einde doorknipt. De eerder beschreven FPV-inbouwvector pCE 11 werd met Sma I en Sac I
 25 verteerd, waardoor het plasmide in het gebied van de meervoudige verbindingen doorgeknipt werd. Het Hpa I/Sac I-fragment van pCE 3 werd met pCE 11 verbonden, wat pCE 14 gaf.

- Het plasmide pCE 7 werd toen met Xho I en Hind III verteerd, wat een fragment van 332 baseparen gaf dat de promotor H6 en de correcte 5'-reeks bevatte. Plasmide pCE 14 werd met Hind III verteerd, dat in het gebied van de meervoudige verbindingen van de vector knipte en met Xho I dat in de coderingsreeks
 30 knipte. Dit DNA werd met het uit pCE 7 verkregen Hind III/Xho I-fragment verbonden, wat pCE 15 gaf, de uiteindelijke genconstructie voor de RAV-1 omhulling.

- Dit plasmide werd in een recombinatieproef *in vitro* gebruikt met pluimveepokken FP-1 als reddend virus. Nakomelingen van de recombinatie werden op CEF-monolagen uitgeplaat en de plaques werden met behulp van een polykonaal serum tegen RAV-1 in een immunoschermproef met aan β -galactosidase
 35 geknoopt eiwit A uitgezocht. Positief kleurende plaques werden eruit genomen en ondergingen vier cycli van plaque-zuivering om een homogene populatie te verkrijgen. De gemaakte recombinant kreeg de aanduiding vFP-22. Immunoprecipitatieproeven met door vFP-22 geïnfecteerde CEF-lysaten toonden het specifiek neerslaag van twee eiwitten met schijnbare molecuulgewichten van 76.500 en 30.000, overeenkomende met de twee genproducten van het omhullingsgen. Er bleek niets van een voorloper.

- 40 In voorafgaande proeven vertoonden met vFP-22 beënte kuikens een immuunrespons tegen de RAV-1-omhulling, product van dat gen.

Voorbeeld XVII

- Opbouw van vogelpokkenvirus-recombinanten die het gen voor de GP51,30-omhulling van runderleukemievirus tot expressie brengen

(1) Opbouw van pBLVF 1 en pBLVF 2

- De plasmiden pBLVF 1 en pBLVF 2 bevatten het gen van runderleukemievirus (BLV) voor de GP51,30-omhulling. In beide plasmiden staat het omhullingsgen onder overschrijfcontrole van koepokvirus-promotor H6 en zit het tussen twee flankerende pluimveepokken-armen gekloond (plaats f7). De nucleotide-reeksen
 50 van beide plasmiden is identiek, behalve op de codon-plaatsen 268 en 269. (Het pBLVF 1 codeert voor een eiwit dat op die twee plaatsen de aminozuren Arg en Ser bevat, terwijl pBLVF 2 voor een eiwit codeert dat de aminozuren Gln en Thr bevat.)

- pBLVF 1 en pBLVF 2 werden met de volgende procedure in elkaar gezet. Plasmide pNS97-1, een plasmide dat het gehele gen voor de BLV-omhulling bevat, werd met *Ham H1* en gedeeltelijk met *Mst II* bewerkt. Het
 55 fragment van 2,3 Kbp dat het gehele gp51,30gen bevatte werd over een agarose-gel geïsoleerd en de kleverige uiteinden daarvan werden opgevuld met het Klenow-fragment van DNA-polymerase I uit *E. coli*. De Pst I-verbindingsstukken werden toen met de uiteinden van het fragment verbonden, dat na vertering

met Pst I met de Pst I-plaats van pTP 15 (voorbeeld XV) verbonden werd. Dat zet het BLV-gen naast de koepok-promotor H6. (pTP15 bevat de koepokpromotor H6 op een niet-essentiële plaats in het koepok-genoom gekloond.) Dit plasmide werd toen met Eco RV en gedeeltelijk met Ava II verteerd. Het fragment van 5,2 Kbp werd geïsoleerd en de nucleotiden

- 5 5'-ATCCGTTAAGTTTGTATCGTAATGCCCAAAGAACGACG-3' en
5'-GACCGTCGTTCTTTGGGCATTACGATACAACTTAACGGAT-3'

werden gebruikt om het plasmide weer kringvormig te maken. Dat verwijdert onnodige basen tussen het BLV-gen en de promotor H6.

- 10 Het verkregen plasmide werd met Pst I en gedeeltelijk met Bgl II bewerkt en het fragment van 1,7 Kbp dat het met H6 gepromote BLV-gen bevatte werd in pCE 11, de eerder beschreven pluimveepokkenvirus-inbouwvector, op de Bam H1/Pst I-plaats gekloond, onder toepassing van f7. Dit plaatst het met H6 gepromote BLV-gen tussen flankerende pluimveepokken-armen. Dit plasmide kreeg de aanduiding pBLVF 1.

- 15 Een identieke procedure werd gebruikt om pBLVF 2 op te bouwen, behalve dat aanvullend een mutagenese in vitro uitgevoerd werd voordat het met H6 gepromote BLV-gen in pCE 11 ingevoegd werd. Deze mutagenese werd met de volgende procedure uitgevoerd: plasmide pNS97-1 werd met Xma I en gedeeltelijk met Stu I verteerd. Het fragment van 5,2 Kbp werd geïsoleerd en de oligonucleotiden
5'-CCGGGTCAGACAACTCCCGTCGCAGCCCTGACCTTAGG-3' en
5'-CCTAAGGTCAGGGCTGCGACGGGAGTTTGTCTGAC-3'

- 20 werden gebruikt om het plasmide weer kringvormig te maken. Dit verandert de nucleotiden van codonen 268 en 269 van CGC-AGT in CAA-ACT.

(2) Constructie van de recombinant-virussen

- De plasmiden pBLVF 1 en pBLVF 2 werden in een recombinatieproef in vitro gebruikt met FP-1 als reddend virus. De recombinant-nakomelingen werden door een plaque-hybridisering in situ uitgezocht en
25 toen de populatie op dit criterium zuiver geacht werd werden de plaques in een β -galactosidase-eiwit A-immunoessaai er met een monokonaal, voor BLV-gp specifiek antilichaampreparaat uitgezocht. Beide uit plasmiden pBLVF 1 en pBLVF 2 gemaakte recombinanten vFP 23 en vFP 24 vertoonden bij de immunoschermproef een positieve kleuring, wat aangeeft dat op het geïnfecteerde celoppervlak een immunologisch herkenbaar glycoproteïne gevormd werd.

- 30 De plasmiden pBLVK 4 en pBLVK 6 bevatten het gp51,30gen voor de BLV-omhulling, respectievelijk met en zonder het splitsingsgen. Beide genen werden op de enige Eco RI-plaats van pRW 764.2 (plaats C3) gekloond (pRW 764.2 is in voorbeeld XIII beschreven), en staan onder overschrijftcontrole van de koepok-viruspromotor H6.

- De plasmiden werden op de volgende wijze gemaakt: pBLVF 1 en pBLVF 2 werden uitgeknipt met het
35 restrictie-enzym Hind III. Het oligonucleotide BKL 1 (AGCTTGAATTCA) werd op die plaats gekloond, wat een Eco RI-plaats 3' ten opzichte van het BLV-gen schiep. Daar er ook een Eco RI-plaats 5' ten opzichte van het BLV-gen is werden deze plasmiden (pBLVK 1 en pBLVK 2) met Eco RI uitgeknipt en het fragment met het door H6 gepromote BLV-gen werd op de Eco RI-plaats van pRW 764.2 gekloond. De verkregen plasmiden kregen de aanduidingen pBLVK 4, resp. pBLVK 6. De plasmiden werden in een recombinatie-
40 proef in vitro gebruikt met kanariepokken als ontvangend virus. De recombinanten werden geselecteerd en gezuiverd op basis van de met een immunoessaai vast-gestelde oppervlakte-expressie van het glycoproteïne. De recombinanten kregen de aanduidingen vCP 27 en vCP 28, respectievelijk uit plasmiden pBLVK 4 en pBLVK 6.

- Schapen en runderen kregen langs verschillende wegen de pluimveepokken-recombinanten vFP23 en
45 vFP24. De dieren kregen twee inentingingen, de tweede 45 dagen na de eerste. Serum-monsters werden 5 weken na de eerste beënting en 2 weken na de tweede beënting genomen. Antilichamen tegen gp51 werden in een competitieve ELISA-proef gemeten en de titer werd uitgedrukt in het omgekeerde van de serum-verdunning die de competitie met 50% verminderde. De uitkomsten staan in tabel XI.

- Na de eerste beënting vertoonde geen der beproefde soorten een aantoonbare immuunrespons. Maar na
50 de tweede beënting vertoonden zowel schapen als runderen een belangrijke verhoging van de antilichamen.

TABEL XI

Beënting van schapen en runderen met vFP23 en vFP24								
5	Dier		Virus	Dosis en route		ELISA	Titer	
				1°	2°	1°	2°	
10	Rund	B56	FP-1	10 ⁸ +10 ^{8a}	108+10 ⁸	0	0	
		B59	FP-1	ID	subcut. 0	0		
	Schaap	M89	FP-1			0	0	
		M9	FP-1			0	0	
	Rund	B62	vFP-23	10 ⁸ +10 ⁸	108+10 ⁸	0	200 ^b	
		B63	vFP-23	ID	subcut. 0	80		
	Schaap	M83	vFP-23			0	80	
		M84	vFP-23			0	500	
	15	Rund	M85	vFP-23			0	100
			B52	vFP-24	10 ⁸ +10 ⁸	108+10 ⁸	0	200
20	Schaap	B53	vFP-24	ID	subcut. 0	60		
		M87	vFP-24			0	200	
		M92	vFP-24			0	20	
		M93	vFP-24			0	20	

^a Intradermale injecties op twee punten

^b Titer uitgedrukt als het omgekeerde van de verdunning die 50% competitie geeft.

Voorbeeld XVIII

- 25 Opbouwen van een pluimveepokken-recombinant vFP-26 uit virus FP-1 die het gen voor de matrix van het infectieuze bronchitisvirus Mass 41 tot expressie brengt

Plasmide pIBVM63 bevat een cDNA-kloon van het matrixgen van het infectieuze bronchitis-virus (IBV) van de stam Mass 41. Een Eco RI-fragment van pIBVM63 dat 8 Kbp groot is bevat bovenstreams van het matrix-gen het peplomer-gen en nog verder bovenstreams is er een aangrijpingsplaats voor Eco RV.

- 30 Plasmide pRW 715 heeft een Eco RI-verbinder die de twee Pvu II-plaatsen van pUC 9 met elkaar verbindt. Het Eco RI-fragment van 8 Kbp uit pIBVM63 werd op de Eco RI-plaats in pRW 715 gebouwd, wat pRW 763 gaf. Door uit pRW 763 de Eco RI-plaats aan het 5'-einde te verwijderen werd het plasmide pRW 776 geschapen, met slechts één enkele Eco RI-plaats benedenstreams (3' ten opzichte van) het matrix-gen. Het gedeeltelijk door Eco RI verteerde, opgeknijpte product van pRW 763 werd na isoleren nog eens met Eco RV bewerkt. Het grootste fragment werd geïsoleerd, met het Klenow-fragment van DNA-polymerase I afgestompt en met zichzelf verbonden, wat pRW 776 gaf. De constructie pRW 776 had het complete IBV-peplomeer en de matrix-genen, gevolgd door één enkele aangrijpingsplaats voor Eco RI.

- Alleen van de 5'- en 3'-einden van het ongeveer 900 bp grote matrix-gen werden de nucleotiden-volgorden bepaald. Het 5'-stuk van het matrix-gen, bevat, beginnende bij het begincodon voor de vertaling (ATG) de volgende nucleotiden (met de plaats voor Rsa I onderstreept): ATGTCCAACGAGACAAATTGTAC. De eerder beschreven promotor H6 werd met een synthetisch oligonucleotide aan het matrix gen gekoppeld. Het synthetische oligonucleotide bevatte de H6reeks vanaf zijn Eco RV-plaats over het ATG tot in de voor het matrix coderende reeks tot en met de eerste Rsa I-plaats. Het oligonucleotide werd met voor Bam HI en Eco RI aangrijpbare uiteinden opgebouwd zodat het in pUC 9 ingevoegd kon worden, wat pRW 772 gaf. Het Eco RI-einde is 3' ten opzichte van de Rsa I-plaats. Beginnende bij het voor Bam HI aangrijpbare einde is de structuur van het dubbelstrengige synthetische oligonucleotide (met ATG onderstreept):

GATCGCGATATCCGTTAAGTTTGTATCGTAATGTCCAACGAGACAAATTGTACG

CGCTATAGGCAATTCAAACATAGCATTACAGGTTGCTCTGTTAACATGCTTAA

- Het product van de gedeeltelijke vertering van pRW 772 met Rsa I werd geïsoleerd en met Eco RI nogeens bewerkt. Het fragment van pRW 772 dat alleen op de genoemde Rsa I-plaats doorgeknipt en met Eco RI nogeens geknipt was werd geïsoleerd, met fosfatase behandeld en als vector voor het hierna te beschrijven verteringsproduct van pRW 776 gebruikt.

- Het lineaire product van de gedeeltelijke vertering van pRW 776 door Rsa I werd na isoleren nogeens bewerkt met Eco RI. Eco RI grijpt juist voorbij het 3'-einde van het matrix-gen aan. Een Rsa I / Eco RI-fragment dat de voor het matrix coderende reeks vanaf de genoemde Rsa I-plaats bevatte, werd geïsoleerd en in de genoemde vector pRW 772 ingebouwd, wat pRW 783 gaf. De complete promotor H6 werd gevormd door 5'-reeksen aan de Eco RV-plaats toe te voegen. Het 5'-einde van promotor H6 was een

Hinf I-plaats die met een stomp uiteinde in de Sal I-plaats van het pUC 9 gewerkt was, wat een Eco RI-plaats gaf; 5' ten opzichte van promotor H6 lag de Hind III-plaats van het pUC 9. Het Hind III /Eco RV-fragment met de 5'-promotor H6 werd tussen de Hind III- en Eco RV-plaatsen van pRW 783 gestoken, wat pRW 786 gaf. Het Eco RI-fragment van pRW 786, met daarin het complete door H6 gepromote matrix-gen werd met het Klenow-fragment van DNA-polymerase I stomp gemaakt en in de afgestompte Bam HI-plaats van pRW 731. 15 (plek f8) ingebouwd, wat pRW 789 gaf. De Bam HI-plaats van pRW 731. 15 is de in voorbeeld VI voor het opbouwen van vFP-8 gebruikte FP-1-plaats.

Plasmide pRW 789 werd gebruikt bij het opbouwen van vFP-26 Recombinant-plaques werden in situ door plaque-hybridisering geselecteerd en verder verwerkt.

- 10 Bij primaire proeven werd in met vFP-26 ingeënte kuikens een immuunrespons tegen het IBV-matrix-eiwit opgewekt.

Voorbeeld XIX

- 15 Opbouwen van een pluimveepokken-recombinant vFP-31 uit virus FP-1 die het peplomeer van het infectieuze bronchitisvirus tot expressie brengt

In voorbeeld XVIII zijn de cDNA-kloon pIBVM 63 van het infectieuze bronchitisvirus (IBV) Mass 41 en zijn subkloon pRW 776 voor het opbouwen van vFP-26 beschreven. Subkloon pRW 776 bevat het IBV-peplomeer-gen van 4 Kbp gevolgd door het matrix-gen met aan het 3'-einde één enkele plaats voor Eco RI. Alleen van de 5'- en 3'-einden van het ongeveer 4 Kbp grote IBV-peplomeer-gen werden de nucleotiden-20 volgorden bepaald. Eén enkele Xba I-plaats scheidt de twee genen. Het 5'-einde van het peplomeer-gen bevat, beginnende bij het begincodon (ATC) van de vertaling de volgende nucleotiden (met de Rsa I-plaats onderstreept):

ATGTTGGTAACACCTCTTTACTAGTGACTCTTTTGTGTGTAC

- 25 De eerder beschreven promotor H6 werd met een synthetisch oligonucleotide aan het peplomeer-gen gekoppeld. Het synthetische oligonucleotide bevatte de promotorreeks H6 vanaf zijn Nru I-plaats via het ATG tot in de voor het peplomeer coderende reeks tot aan zijn eerste Rsa I-plaats. Het oligonucleotide werd met voor Bam HI en Eco RI aangrijpbare einden gesynthetiseerd zodat het in pUC 9 ingebouwd kon worden, wat pRW 768 gaf. Het uiteinde voor Eco RI was 3' ten opzichte van de plaats voor Rsa I. Beginnende met het voor Bam HI aangrijpbare einde was de structuur van het dubbelstrengige synthetische oligonucleotide 30 (met het ATG onderstreept):

GATCTCGCGATATCCGTTAAGTTTGTATCGTAATGTTGGTAACACCTCTT

AGCGCTATAGGCAATTCAAACATAGCATTACAACCATTGTGGAGAA

TTACTAGTGACTCTTTTGTGTGTACG

AATGATCACTGAGAAAACACACATGCTTAA

- 35 Het door gedeeltelijke vertering van pRW 768 met Rsa I verkregen product werd na isoleren met Eco RI opnieuw bewerkt. Het fragment van pRW 768 dat op de bovengenoemde Rsa I-plaats één enkele doorsnijding had en met Eco RI opnieuw geknipt was werd geïsoleerd, met fosfatase behandeld en als vector voor het hierna te beschrijven verteringsproduct van pRW 776 gebruikt.

- 40 Het door gedeeltelijke vertering met Rsa I opengeknippte product van pRW 776 werd opnieuw bewerkt met Eco RI. Het 5 Kbp grote fragment van pRW 776 dat vanaf de bovengenoemde Rsa I-plaats tot aan de Eco RI-plaats liep werd geïsoleerd; dit fragment bevat IBV-reeksen vanaf de genoemde peplomeer-Rsa I-plaats tot aan de Eco RI-plaats aan het 3'-einde van het matrix-gen. Inbouw van dit fragment van pRW 776 in de genoemde vector pRW 768 deed pRW 788 ontstaan. Het matrix-gen werd vanaf de eerder genoemde Xba I-plaats verwijderd. De 5'-promotor H6 werd bij de Nru I-plaats toegevoegd door het 45 afgestompte, 4 Kbp grote Nrs I/Bxa I-fragment van pRW 788 in de vector pRW 760 met stompe Nru U- en Bam HI-einden gevoegd, wat pRW 790 gaf. De vector pRW 760 is in voorbeeld XI beschreven; kort gezegd is het door koepok-H6 gepromoot influenza-nucleoproteïne dat door de niet-essentiële plaats f7 van FP-1 geflankeerd is. De vector pRW 760 werd gemaakt door aan het 3'-einde de H6 reeksen vanaf de Nru I-plaats tot en met het einde van het nucleoproteïne bij Bam HI te verwijderen. pRW 790 is door H6 50 gepromoot IBV-peplomeer in de Hinc II-plaats van pRW 731. 13. Recombinatie van het donorphasmide pRW 790 met FP-1 gaf vFP-31.

Immunoprecipitatieproeven met CEF-lysaten die uit met vFP-31 geïnfecteerde cellen gemaakt waren lieten een specifiek neerslaan van een klein beetje voorlopereiwit met een molecuulgewicht van ongeveer 180.000 en van splitsingsproducten met een MG van 90.000 zien.

Voorbeeld XX

Opbouwen van een pluimveepokken-recombinant vFP-30 uit virus FP-1 die het D-gen van herpes simplex-virus tot expressie brengt

Het D-gen voor het glycoproteïne van herpes simplexvirus (HSV) type 1 stam KOS werd op de Bam

- 5 HI-plaats van pUC 9 als een 5'Bam HI gekoppeld Hpa II aan 3'-Bam HI gekoppeld Nru I-fragment gekloond; het 5'-einde ligt naast de Pst I-plaats van het pUC 9. De 5'-reeks van het HSV-gD is, beginnende bij het begincodon voor de vertaling (ATG) (met onderstreept de aangrijpingsplaats voor Nco I):

ATGGGGGGGGCTGCCGCCAGGTTGGGGGCCGTGATTTTGTTCGTCATAGTG-G
GCCTCCATGG.

- 10 De eerder beschreven koepok-promotor H6 werd met een synthetisch oligonucleotide aan het gD gen van HSV gekoppeld. Het synthetische oligonucleotide omvat het 3'-gedeelte van de promotor H6 vanaf Nru I via het ATG tot in de voor gD coderende reeks tot en met de aangrijpingsplaats voor Nco I. Het oligonucleotide werd met een aangrijpingspunt voor Pst I aan het 5'-einde gesynthetiseerd. De gD-kloon in pUC 9 werd met Pst I en Nco I geknipt en de 5'-HSV-reeks werd verwijderd zodat het door het synthetische oligonucleotide vervangen kon worden, wat tot pRW 787 leidde. De structuur van dit dubbelstrengige synthetische oligonucleotide is:

- GTCCGCGATATCCGTTAAGTTTGTATCGTAATGGGAGGTGCCG-
ACGTCAGCGCTAT AGGCAATTCAAACATAGCATTACCTCCACGGC-
CAGCTAGATTAGGTGCTGTTATTTTATT TGTAGTTATAGTAGGACTC
20 GTCGATCTAATCCACGACAATAAAATAAACATCAATATCATCCTGAGGTAC

Vertering van pRW 787 met Nru I en Bam HI leidt tot een fragment van ongeveer 1,3 Kbp dat de 3'-promotor H6 bevat vanaf de Nru I-plaats via de voor gD coderende reeks tot aan de Bam HI-plaats. De vector pRW 760, met Nru I en Bam HI bewerkt, is reeds in voorbeeld XI beschreven. Invoegen van het fragment van 1,3 Kbp in de vector pRW 760 gaf pRW 791. De vector pRW 791 bevat het complete door

- 25 koepok-H6 gepromote gen voor HSV-gD in de niet-essentiële Hinc II-plaats van FP-1 in pRW 731. 13 (plek f7).

Recombinatie van het donorplasmide pRW 791 met FP-1 leidde tot vFP-30. Oppervlakte-expressie van het glycoproteïne werd in recombinant-plaques vastgesteld in een immunoessaai op basis van aan β -galactosidase gekoppeld eiwit A en voor HSV-1 specifieke sera.

30

Voorbeeld XXI

Gebruik van entomopox-promotoren voor het regelen van de expressie van vreemde genen in pokkenvirus-vectoren

(a) Achtergrond.

- 35 Pokkenvirussen van insecten (entomopox) worden tegenwoordig tot de onderfamilie Entomopoxvirinae gerekend, welke verder onderverdeeld wordt in drie geslachten A, B en C overeenkomende met entomopox-virussen die respectievelijk uit de insectenordes Coleoptera, Lepidoptera en Orthoptera geïsoleerd zijn. Entomopox-virussen hebben in de natuur een beperkte keuze aan gastheren en hun vermenigvuldiging in gewervelden is niet bekend.

- 40 Het bij dit onderzoek gebruikte entomopox-virus was aanvankelijk geïsoleerd uit geïnfecteerde larven van *Amsacta moorei* (Lepidoptera: arctiidae) uit India. (Roberts en Granados in J. Invertebr. Pathol. 12 (1968) 141-143). Het virus, aangeduid als AmEPV, is de type-soort van het geslacht B.

- AmEPV van het wilde type werd verkregen van Dr. R. Granados (Boyce Thompson Institute van de Cornell University) als infectieuze hemolymfe van geïnfecteerde larven van *Estigmene acrea*. Het virus
45 bleek zich voort te planten in een ongewervelden-cel lijn IPLB-LD652Y, afgeleid van ovariumweefsel van *Lymantria dispar* (de zigeunermot) (beschreven door Goodwin c.s. in In Vitro 14 (1978) 485-494. De cellen werden bij 28°C gekweekt in medium IPL-528 aangevuld met 4% foetaal kalver- en 4% kuiken-serum.

Het wilde virus werd door plaquevorming uitgetest op LD652Y-cellen en één plaque, aangeduid als V1, werd er voor de volgende proeven uit genomen. Dit isolaat geeft laat in de infectiecyclus talrijke insluitings-

- 50 lichamen (IIn) in het cytoplasma van de geïnfecteerde cellen.

(b) Identificatie van de promotor.

De identificatie en het karteren van een AmEPV-promotor gebeurde als volgt. Het totale RNA van laat geïnfecteerde LD652Y-cellen (48 uur na de infectie) werd geïsoleerd en gebruikt om er een eerste streng met 32P gemerkt cDNA uit te maken. Het cDNA werd toen gebruikt om stippen met restrictieverteringen van
55 het AmEPV-genoom af te tasten. Dit Southern-patroon liet een sterk signaal bij een Cla I-fragment van 2,6 kb zien, hetgeen aangeeft dat het fragment voor een sterk tot expressie komend gen codeert. Dit fragment werd in een plasmide gekloond en zijn DNA-volgorde werd vastgesteld.

Onderzoek van deze reeks liet een open af te lezen geval zien dat voor een polypeptide van 42 Kd codeert. In vitro vertaling van het totale RNA van 48 uur na de infectie en uiteenrafelen van de producten met SDS-PAGE gaf een polypeptide van ongeveer 42 Kd te zien.

- (c) Opbouw van een recombinant-koepokvirus met expressie van een vreemd gen onder controle van de entomopoxpromotor

Om na te gaan of een entomopox-promotor in een pokkenvirus systeem van een gewervelde zou functioneren werd het volgende plasmide opgebouwd. Chemisch werd een oligonucleotide gesynthetiseerd dat de 10^7 basen 5' ten opzichte van het startsignaal voor vertalen van het 42K-gen af lag (hierna aangeduid als de AmEPV-42K-promotor) aan het 5'-einde geflankeerd door een aangrijpingsplaats voor Bgl II en met de eerste 14 basen van het hepatitis B-virus voorafgaande aan het voor S2 coderende gebied dat op een Eco RI-plaats eindigt aan het 3'-einde. De AmEPV-42K promotor heeft de volgende structuur:

TCAAAAAAATATAATGATTCACCATC
TGATAGAAAAAAATTTATTGGGAAGA
ATATGATAATTTTTGGGATTTCAA
ATTGAAAATATATAATTACAATATAAAATG

De AmEPV-42K-promotor werd als volgt aan het oppervlakteantigeen van het hepatitis B-virus (HBVsAg) gekoppeld. Er werd een plasmide pUC opgebouwd dat het oppervlakte-antigeen van hepatitis B-virus en een stuk voorafgaande aan het voor S2 coderende gebied bevat (het door Galibert c.s. in Nature 281 (1979) 646-650 beschreven type ayw), geflankeerd door koepokvirus-armen in het niet-essentiële gebied van het koepok-virus-genoom dat voor hemagglutinine (HA) codeert. (De HA-armen zijn in voorbeeld XV beschreven; het HA-gebied door Shida in Virology 150 (1986) 451-462.) Het hierboven beschreven oligonucleotide werd met behulp van de ene plaats voor Eco RI in het voor HBVsAg coderende gebied en met die ene plaats voor Bgl II in de HA-koepokarm in dit plasmide ingebouwd. Het verkregen recombinant-koepokvirus kreeg de aanduiding vP547.

Dat de expressie van de voor HBVsAg coderende reeks onder onder controle van de entomopox 42K-promotor stond werd bevestigd met een immunoessaai. Gelijkwaardige kweken van de zoogdiercellijn BSC-40 werden met het moeder-koepokvirus of met recombinant vP 547 geïnfecteerd; 24 uur na de infectie werden de cellen gelyseerd en werd het lysaat in serie verdunning op een nitrocellulosemembraan gebracht. Het membraan werd eerst met een geitenserum tegen HBV geïncubeerd en daarna met 125 I-eiwit A. Na uitwassen werd het membraan op een röntgen-film gelegd. Positieve signalen vond men bij de met vP 547 geïnfecteerde kweken maar niet bij de met het moedervirus geïnfecteerde kweken, wat herkenning van de AmEPV-42K-promotor door het koepokvirus in de zoogdiercellen aangeeft.

De bovengenoemde uitkomsten werden bevestigd met een Ausria-proef (zie voorbeeld I voor details) waarmee men HBVsAg in geïnfecteerde zoogdiercellen kan vinden. Koepokviro recombinanten die het aan AmEPV-42K of aan de koepokvirus-promotor H6 gekoppelde gen voor HBsAg bevatten werden gebruikt om BSC-40-cellen te infecteren en de mate van expressie in het oppervlakte-antigeen werd met de Ausria-proef vastgesteld. Zoals aangegeven in tabel XII laten de uitkomsten zien dat bij gebruik van de 42K-promotor de expressie van HBsAg belangrijk was.

TABEL XII
Expressie van HBVsAg in recombinant-koepokvirus

Recombinant-virus	Promotor	Ausria P/N-verh.
vP410	Blanco	1,0
vP481	H6	24,3
vP547	42K	44,9

Er werden nog meer proeven uitgevoerd om de tijdelijke aard van de regeling van de AmEPV-42K-promotor op de achtergrond van een pokkenvirus voor gewervelden zeker te stellen. Gelijkwaardige kweken van BSC-40-cellen werden met vP 547 geïnfecteerd in aanwezigheid van 40 µg/ml cytosinearabioside, een remmer van de DNA-vermeerdering dat de late vertaling van het virus dus blokkeert. De mate van expressie 24 uur na de infectie werd met een Ausria-proef gemeten. De uitkomsten laten zien dat de 42K-promotor in het vermeerderingssysteem van een koepokvirus als vroege promotor herkend werd.

Merk op dat het gebruik van de AmEPV-42K-promotor voor de expressie van vreemde genen in een zoogdiersysteem duidelijk verschillend is van het gebruik van de NPV-polyhedrine-promotor uit *Autographa californica* voor de expressie van genen in ongewervelden-systemen (Luckow en Summers in Biotechnology

6 (1988) 47-55). De polyhedrine-promotor wordt niet herkend door het vertalingsapparaat in zoogdiercellen (Tjla c.s. in Virology 125 (1983) 107-117). Het gebruik van de AmEPV-42K-promotor in zoogdiercellen betekent dat voor de eerste keer een promotor van een insectenvirus gebruikt werd voor de expressie van vreemde genen in een niet uit insecten afkomstige virusvector in cellen die niet van ongewervelden zijn.

- 5 Om vast te stellen of vogelpokkenvirussen de 42K-entomopox-promotor ook herkennen werd de volgende proef uitgevoerd. Identieke kweken van CEF-cellen werden beënt met 10 pfu per cel aan pluimveepokkenvirus, kanariepokkenvirus of koepokvirus, en tegelijkertijd getransfecteerd met 25 µg van één der volgende plasmiden: 1) plasmide 42K. 17 dat de reeks voor het oppervlakte-antigeen van het HBV en het stuk voorafgaande aan het voor S2 coderende gebied bevat, of 2) het plasmide pMP15.spsP dat 10 dezelfde voor HBVsAg coderende reeks bevat gekoppeld aan de eerder beschreven koepokvirus-promotor H6. Na 42 uur werden de kweken bevroren, de cellen gelyseerd en het lysaat met een Ausria proef (zie 15 voorbeeld I) op de aanwezigheid van HBVsAg onderzocht.

De in tabel XIII getoonde resultaten moet men kwalitatief interpreteren. Ze geven aan dat zowel het vertalingsapparaat van pluimveepokken als dat van kanariepokken in staat is de 42K-promotor te herkennen 15 en de daaraan gekoppelde reeks die voor HBVsAg codeert mee vertaalt. Hoewel de maten van expressie lager zijn dan wat men met de koepok-promotor H6 verkrijgt liggen ze duidelijk boven de achtergrondwaarden die men met de negatieve blanco's verkrijgt.

TABEL XIII

20 Herkenning van de 42K-entomopox-promotor door pluimveepokkenvirus

	Virus	Promotor	P/N-verh.
	Pluimveepokken	42K	39,1
		H6	356,8
25	Kanariepokken	42K	90,2
		H6	222,2
	Koepokken	42K	369,4
		H6	366,9
	Niets	42K	7,8
30	Niets	H6	7,2
	Koepokken	-	7,2

Voorbeeld XXII

- 35 Immunisering met VCP-16 om muizen tegen levend rabies-virus te beschermen

Groepen van 20 muizen van 4 tot 6 weken oud werden in hun voedsel beënt met 50 tot 100 µl van een reeks verdunningen van één der twee recombinanten: (a) de in voorbeeld VI beschreven pluimveepokken-rabies-recombinant vFP-6, en (b) de in voorbeeld XIII beschreven kanariepokken-rabies-recombinant vCP-16. Na 14 dagen werden 10 muizen van elke groep opgeofferd en werd hun serum opgevangen. De 40 titer van het serum tegen rabies werd berekend met de eerder in voorbeeld VII beschreven SFFR-proef. De overige 10 muizen van elke groep werden uitgedaagd met een intracerebrale beënting met de in voorbeeld VII gebruikte rabiesstam CVS. Elke muis kreeg 30 µl, wat overeenkwam met 16 maal de LD₅₀ voor de muis. Na 28 dagen keek men hoeveel muizen er nog in leven waren en werd de beschermende dosis voor 50% (BD50) berekend. De uitkomsten staan in tabel XIV.

- 45 De mate van bescherming der muizen bij beënting met vFP-6 bevestigen de in voorbeeld VII besproken uitkomst van het beënten met de pluimveepokken-recombinant vFP-3. De mate van bescherming bij beënting met vCP-16 is aanzienlijk hoger. Op basis van de berekende BD50 is de kanariepokken-rabies-recombinant 100 maal zo sterk in de bescherming tegen rabies als de pluimveepokken-rabies-recombinant.

TABEL XIV

Beschermdende immuniteit tegen rabies-virus uitgelokt door twee pluimveepokken-rabies-recombinanten

Pluimveepokken vFP-6			Kanariepokken vCP-16		
5 Beëntings-dosis	SFFR-titer	Mate van overleven	Beëntings-dosis	SFFR-titer	Mate van overleven
7,5 ^a	2,3 ^b	7/10	6,5	2,5	10/10
5,5	1,8	5/10	4,5	1,9	8/10
10 3,5	0,7	0/10	2,5	1,1	1/10
1,5	0,6	0/10	0,5	0,4	0/10
1	PD ₅₀ = 6,17			1 PD ₅₀ = 4,18	

^a Virus-titers opgegeven als ¹⁰log van de TCID₅₀.15 ^b Opgegeven is de ¹⁰log van de verste serumverdunding die bij een SFFR-proef het aantal fluorescerende putjes nog met meer dan 50% vermindert.*Voorbeeld XXIII*

Gebruik van pluimveepokken-promotorelementen bij de expressie van vreemde genen

20 I. Identificatie van het pluimveepokken-gen dat voor een product van 25,8 kilodalton codeert.

Zichtbaarmaken van eiwitten in lysaten van met pluimveepokken FP-1 geïnfecteerde CEF-cellen door aankleuren van SDS-polyacrylamide-gelen met Koomassie-brilliant-blauw liet een royaal voorkomende soort met een schijnbaar molecuulgewicht van 25,8 KD zien. Dit eiwit was niet aanwezig in lysaten van niet geïnfecteerde cellen. Pulsproeven met ³⁵S-methionine voor het radioactief merken van op bepaalde tijden na de infectie gesynthetiseerde cellen lieten weer het royale voorkomen van het door FP-1 uitgelokte eiwit zien en toonden aan dat het tussen 6 uur en 54 uur na de infectie gesynthetiseerd wordt. In zijn piek uur is dit FP-1 eiwit van 25,8 KD goed voor ongeveer 5 tot 10% van het totale eiwit van het cellysaat.

De overvloed aan door FP-1 uitgelokt eiwit van 25,8 KD suggereerde dat het gen dat voor dit eiwit codeert door een sterk promotorelement uit FP-1 geregeld wordt. Om dit promotorelement voor later gebruik bij de expressie van vreemde genen in pokkenvirus-recombinanten te lokaliseren werd een polysoom-preparaat uit met FP-1 geïnfecteerde CEF-cellen 54 uur na de infectie verkregen. Uit dit polysoom-preparaat werd het RNA geïsoleerd en bij in vitro gebruik voor het programmeren van een vertalingssysteem voor konijnen-reticulocyten deed het overwegend het FP-1-eiwit van 25,8 KD ontstaan.

Het polysoom-RNA werd ook als matrix gebruikt voor de synthese van een eerste streng cDNA met 35 oligo-dT-12-18 als eerste aangrijpingspunt. Deze eerste cDNA-streng werd als hybridiseringssonde in een stippenanalyse volgens Southern met verteringen van FP-1 gebruikt. De uitkomsten van dit hybridiserings-onderzoek geven de suggestie dat het gen dat voor het eiwit van 25,8 KD codeert in een Hind III-fragment van 10,5 Kbp zat. Dit Hind III-fragment van het genoom werd vervolgens geïsoleerd en aan pBS (een vector uit de handel, van Stratagene te La Jolla, Ca.) gekoppeld en deze kloon kreeg de aanduiding pFP23k-1.

40 Verder hybridiseringsonderzoek met de eerste streng cDNA bij het aftasten van verteringen van pFP23k-1 lokaliseerde het gen voor de 25,8 KD op een Eco RV-subfragment van 3,2 Kbp. Het fragment werd verder in pBS gekloond en kreeg de aanduiding pFP23k-2.

In ongeveer 2,4 Kbp van dit Eco RV-fragment van FP-1 werd de volgorde bepaald met de dideoxy-ketenbeëindigingsmethode van Sanger (Sanger c.s. in Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977) 5463-5467).

45 Analyse van de volgorde liet een open af te lezen gebied zien dat voor een product met een molecuulgewicht van 25,8 KD codeert. Een beslissende vertaling in vitro van dit open afleesbare gebied door het polymerase van bacteriophage T7 (van Stratagene te La Jolla, Ca.) in een vector pBS deed een soort RNA ontstaan dat bij gebruik voor het in vitro programmeren van een vertalingssysteem uit konijnenreticulocyten (van Promega Biotec te Madison, Wi.) een polypeptide met een schijnbaar molecuulgewicht van 25,8 KD gaf. Dit polypeptide liep over een SDS-polyacrylamide-gel gelijk op met het zo overvloedig in lysaten van met FP-1 geïnfecteerde CEF-cellen voorkomende eiwit van 25,8 KD. Dit resultaat suggereert dat dat het gen was dat voor het overvloedig door FP-1 uitgelokte product van 25,8 KD codeert.

II. Gebruik van promotor-elementen bovenstrooms van het FP-1-gen voor het 25,8 KD-eiwit om het gen voor de omhulling van kattenleukemievirus (FeLV) in FP-1- en koepokvirus-recombinanten tot expressie te 55 brengen

Uit pFP23k-2 werd een Eco RV/Eco RI-fragment van 270 bp geïsoleerd dat het gebied van FP-1 omvat dat het gen voor het eiwit van 25,8 KD reguleert (de FP-25,8 KD-promotor) en nog 21 bp van de reeks die

voor de 25,8 KD zelf codeert. Hieronder staat de nucleotidenvolgorde van het FP-25,8 KD-promotorgebied gebruikt om tot pFeLV25.8F1 en pFeLV25.81A te komen. Deze reeks van 270 nucleotiden verschaft 249 nucleotiden van het gebied bovenstrooms van het begincodon (ATG) voor de 25,8 KD en de 21 eerste bp van de coderende reeks zelf.

5 5'-GATATCCCCATCTCTCCAGAACAGCAGCATAGTGTTAGGACAATCATCTAA-
T GCAATATCATATATGAATCTCACTCCGATAGGATACTTACCACAGCTATTATA-
CCTTAATG TATGTTCTATATATTTAAAAACAGAAACAAACGGCTATAAGTTTAT-
ATGATGTCTATATTA TAGTGAGTATATTATAAGTATGCGGGAATATCTTTGATT-
TAACAGCGTACGATTTCGTGATA AGTAAATATAGGCAATGGATAGCATAAATGAA-
10 TTC-3'

Van dit fragment werden de uiteinden stomp gemaakt en toen werd het ingebouwd in een met Sma I verteerde FP-1inbouwvector (pFeLVF1, zie voorbeeld XV) die de reeksen voor de omhulling van FeLV bevatte. Deze inbouwvector maakte de recombinatie op de f7-plaats van het FP-1-genoom mogelijk. Inbouwen van de FP25,8 KD-promotor bovenstrooms (5' ten opzichte van) het gen voor de FeLV-omhulling en de juiste oriëntatie werden door een bepaling van de volgorde bevestigd. Dit inbouwen geeft geen perfecte vervanging van ATG door ATG, door het gen voor de 25,8 KD verschaft ATG staat niet in lijn met het ATG voor de FeLV-omhulling, zodat er geen versmeltingseiwit ontstaat. Het FP-1-inbouwplasmide met daarin de FP-25,8 KD-promotor bovenstrooms van het gen voor de FeLV-omhulling kreeg de aanduiding pFeLV25,8F1. Net zo'n constructie werd gemaakt uit de koepokvirus-inbouwvector pFeLV1A, die het FeLV-gen herbergt (zie voorbeeld XV). De promotor H6 werd door verteren met Bgl II en Sma I uit het pFeLV1A geknipt. Na afstompen van de Bgl II-restrictieplaats werd het afgestompte Eco RV/Eco RI-fragment van 270 bp, met daarin de FP-25,8 KD promotor zodanig ingevoegd dat het 5' ten opzichte van het gen voor de FeLV-omhulling stond. De constructie werd door bepalen van de volgorde bevestigd. Er is ook in deze recombinant geen perfecte vervanging van ATG door ATG, het ATG uit het gen voor 25,8 KD staat niet in lijn met het ATG uit het FeLV-gen. De inbouwvector van het koepokvirus (Kopenhagen-stam) die het bovenstroomse deel van het gen voor de 25,8 KD 5' ten opzichte van het FeLV-gen bevatte kreeg de aanduiding pFeLV25,81A.

De inbouwplasmiden pFeLV25,8F1 en pFeLV25,81A werden gebruikt voor in vitro recombinatie met FP-1 (pFeLV25,8F1) en met de Kopenhagen-stam van het koepokvirus (pFeLV25,81A) als opvangende virussen. De nakomelingen van de recombinatie werden op de geëigende monolagen uitgeplaat en recombinant-virussen werden er met een immunoschermproef met aan β -galactosidase gekoppeld eiwit A en met een runderserum tegen FeLV (van Antibodies, Inc. te Davis, Ca.) uitgehaald. De eerste resultaten wekken de suggestie dat de promotor voor 25,8 KD de expressie van vreemde genen in pokkenvirus-recombinanten kan regelen.

35

Voorbeeld XXIV

Veiligheid en doeltreffendheid van VFP-6 en VCP-16 in pluimvee

Kuikenembryo's van 18 dagen oud, kuikens van 1 dag en kuikens van 28 dagen oud werden met de twee vogelpokkenrecombinanten vFP-6 en vCP-16 (beschreven in voorbeelden VI en XIII) beënt en de respons van de vogels werd op drie criteria beoordeeld: 1) invloed van de vaccinering op het uitkomen der eieren, op directe reacties en op mortaliteit, 2) de tegen rabiesglycoproteïne uitgelokte immuunrespons, en 3) de tegen pluimveepokken-antigenen uitgelokte immuunrespons. De uitgevoerde proeven worden hieronder beschreven.

A. Veiligheidsproeven.

45 Groepen van 20 embryo's van 18 dagen oud werden in de allantois-holte beënt met 3,0 of 4,0 x de 10^5 log aan WKID₅₀ van vFP-6 of vCP-16. Na het uitkomen lette men 14 dagen op de kuikens, waarna men er het bloed uittapte en men de sera verkreeg. De twee in de kuikenembryo's geënte recombinanten hadden geen effect op het uitkomen der eieren en de kuikens bleven tijdens de 14 dagen waarneming gezond.

50 Groepen van 10 SPF kuikens van 1 dag oud werden intramusculair beënt met 3,0 x de WKID₅₀ van elk der recombinanten. Men bleef de kuikens 28 dagen bekijken en serum-monsters werden 14 en 28 dagen na het beënten genomen. Met geen der twee recombinanten werd op de beëntingsplaats enige reactie waargenomen en de kuikens bleven tijdens de volle 28 dagen waarneming gezond.

55 Groepen van 10 kuikens van 28 dagen oud werden met elk der recombinant-virussen beënt en kregen daarbij of intramusculair 3,0 x de WKID₅₀ of cutaan (in het vleugelvlies) 3,0 x de WKID₅₀. Men bleef de kuikens 28 dagen waarnemen en op 14 en 28 dagen na de beënting werden monsters genomen. Men geen der twee recombinanten werd na intramusculaire beënting enige reactie gezien. Beënting via de huid leidde tot een heel kleine vaccinale reactie op pluimveepokken met pokken die heel verschillend van grootte

waren. Beënting met kanariepokken leidde tot een normale huidschade op de inentingsplaats. Alle pokken waren tegen het einde van de proef teruggelopen.

B. Immuunrespons

De eerder in voorbeeld VII beschreven SFFR-proef werd gebruikt om de gehalten aan antilichamen tegen rabies-glucoproteïne te bepalen. Bij iedere groep werden de uitkomsten uitgedrukt in het meetkundige gemiddelde van de titer van de afzonderlijke sera, met een standaardserum dat 23,4 Internationale Eenheden bevatte tot Internationale Eenheden herleid. Het minimum voor een positieve uitslag werd op één eenheid gesteld en dat werd gebruikt om het percentage positief reagerende vogels vast te stellen.

- Antilichamen tegen het vogelpokkenvirus werden met de ELISA-methode beproefd, met de pluimveepokkenvirus-stam als antigeen. Ieder serum-monster werd 1:20 en 1:80 verdund. Met de positieve en negatieve sera werd een ijklijn opgesteld. Het minimum gehalte voor een positieve uitslag werd berekend en ook het gemiddelde van de verschillende waarden der negatieve sera, met daarbij twee standaarddeviaties.

De uitkomsten van dit serologische overzicht staat voor vFP-6 in tabel XV en voor vCP-16 in tabel XVI.

- Met embryo's die met vFP-6 of met vCP-16 tegen zowel rabies- als pluimveepokken-antigenen ingeënt waren werd maar een beperkte serologische respons waargenomen. De pluimveepokkenvector lokte in een groter aantal vogels een serologische respons tegen beide antigenen uit dan de kanariepokken, maar de respons was ook nog heterogeen.

- Kuikens die één dag oud met vFP-6 beënt waren hadden een goede serologische respons, alle vogels waren 28 dagen na de beënting seropositief tegen zowel rabies- als tegen pluimveepokkenantigenen. De respons op beënting met vCP-16 was veel lager, 40% der vogels was na 28 dagen seropositief voor rabies-glycoproteïne en 10% voor vogelpokken-antigenen.

- Kuikens die 28 dagen oud intramusculair met vFP-6 beënt waren vertoonden 14 dagen later een reactie van 100%. Hoewel de meerderheid der vogels ook na huidbeënting seropositief was waren de bereikte titers veel lager, zowel met rabies als met vogelpokken. Net als te voren vertoonden kuikens die zowel intramusculair als in de huid met vCP-16 beënt waren een variabele respons, met een maximum van 70% seropositief voor rabies na intramusculaire beënting. Het lage gehalte aan vogelpokken-antigenen na beënting met kanariepokken kan verband houden met de serologische verwantschap tussen de virussen.

- De uitkomsten laten zien dat zowel vFP-6 als vCP-16 veilig zijn om er kuikens met heel uiteenlopende leeftijden mee te beënten. De pluimveepokken-vector vFP-6 schijnt de meer efficiënte te zijn voor het uitlokken van een immuunrespons in kuikens. Van belang is echter dat beide recombinant-vogelpokkenvirussen, pluimveepokken en kanariepokken, nuttig bleken te zijn bij immuniseren in ovum.

TABEL XV
Immunologische respons tegen pluimveepokken/rabies-glycoproteïne (vFP-6) in kuikens van uiteenlopende leeftijd

Groepen positief	Dosis (WKID ₅₀)	Tijd na inenting (dagen)	Antilichamen tegen Rabies-glycoproteïne gemiddelde titer, IE	Pluimveepokken % der vogels met > 1 IE	Aantal kuikens in % met een gemidd. ELISA van
Embryo's	10 ³	3 + 14	0,28	15%	54%
18 dagen oud	10 ⁴	3 + 14	0,87	30%	46%
Kuikens	10 ³	14	1,8	90%	70%
1 dag oud		28	4,2	100%	100%
intramusculair					
28 dagen oud		28	2,7	100%	100%
intramusculair					
Kuikens	10 ³	14	1,6	100%	100%
28 dagen oud		28	0,54	90%	80%
in het vleugelvlies					

•
•
•

TABEL XVI
Immunologische respons tegen kanariepokken/rabies-glycoproteïne (vCP-16) in kuikens van uiteenlopende leeftijd

Groepen positief	Dosis (WKID ₅₀)	Tijd na inenting (dagen)	Antilichamen tegen		Kanariepokken % der vogels met > 1 IE	Aantal kuikens in % met een gemidd. ELISA van
			Rabies-glycoproteïne gemiddelde titer, IE			
Embryo's	10 ³	3 + 14	0,14		0%	25%
18 dagen oud	10 ⁴	3 + 14	0,19		8%	25%
Kuikens	10 ³	14	0,18		10%	0%
1 dag oud		28	0,21		40%	10%
Intramusculair						
Kuikens	10 ³	14	0,61		70%	60%
28 dagen oud		28	0,24		30%	30%
Intramusculair						
Kuikens	10 ³	14	0,34		40%	30%
28 dagen oud		28	0,11		10%	10%
in het vleugelvlies						

Voorbeeld XXV

Veiligheid en immunogeniteit van het beënten van biggetjes met vFP-6

Twee groepen van drie biggetjes werden met de recombinant vFP-6 beënt met één van de twee volgende routes:

- 5 a) drie dieren kregen intramusculair 8,1 x de WKID₅₀ en
- b) drie dieren kregen dezelfde dosis oraal.

Uit alle dieren werd om de week bloed afgetapt en ze kregen op dag 35 langs dezelfde weg een opjaagbeënting van dezelfde dosis. Dagelijks werd er bij de biggetjes naar klinische signalen gekeken. De sera werden met een ELISA-proef en in een neutraliseringsproef op antilichamen tegen pluimveepokken

10 getest. Antilichamen tegen rabies werden met een SFFR-proef bepaald.

Alle biggetjes bleven in goede gezondheid en er werd na de beënting geen schade waargenomen. Het verloop van de temperatuur was bij alle normaal zonder verschil tussen wel en niet beënte dieren.

Biggetjes die zowel intramusculair als oraal beënt waren ontwikkelden blijkens de ELISA-proef en de serum-neutralisering een serologische respons tegen pluimveepokken. Na de opjaagbeënting was een

15 secundaire respons duidelijk (vijfers niet gegeven). Alle biggetjes ontwikkelden ook een immunologische respons tegen rabies-glycoproteïne zoals bij de SFFR-proef bleek en met beide routes was een opjaageffect duidelijk. Deze uitkomsten staan in tabel XVII.

De uitkomsten laten zien dat beënten met een pluimveepokken-rabies-recombinant voor biggetjes onschadelijk is en dat de recombinant een significante immuunrespons tegen rabies-glycoproteïne kan

20 opwekken, zowel bij orale als bij intramusculaire beënting.

TABEL VII

Antilichamen tegen rabies-glycoproteïne die in met vFP-6 beënte biggetjes gevormd werden

25 Vaccinerings- route	Dier nr.	Rabies-antilichamen op dagen			(titer volgens SFFR)		
		14	21	28	35 ^b	42	49
30 I.M. 985	984	2,4 ^a	2,2	2,1	2,2	3	3
	2,5	2,7	2,6	2,4	3	3	
	986	2,2	2,0	2,1	2,3	3	3
	987	3	2	2,1	2	3	3
	988	2,9	2,4	2,2	2,4	2,7	2,5
Oraal	989	2,8	2	1,7	1,8	2,4	2,5

35

0. ^a Opgegeven is de ¹⁰log van de verste serumverduunning die in de SFFR-proef nog tot meer dan 50% vermindering van het aantal fluorescerende putjes leidde.

^b De dieren kregen op dag nr. 35 een tweede beënting.

40

Conclusies

1. Recombinant-vogelpokkenvirus dat in een niet-essentieel gebied van het vogelpokken-genoom DNA van andere herkomst dan vogelpokken bevat dat codeert voor een antigeen van een zoogdierpathogeen.
- 45 2. Immunologische samenstelling die bij introductie in een zoogdier een immunologische respons in het zoogdier uitlokt tegen een pathogeen, welke samenstelling een recombinant-vogelpokkenvirus omvat dat DNA bevat dat voor een antigeen van de pathogeen codeert en het tot expressie brengt zodanig dat antilichamen tegen de pathogeen worden gevormd, zonder productieve vermenigvuldiging van het virus in het zoogdier.
- 50 3. Immunologische samenstelling volgens conclusie 2, met het kenmerk, dat het DNA codeert voor het rabies-G proteïne en de samenstelling een vaccin is.
4. Recombinant-vogelpokkenvirus dat een immunologische respons uitlokt tegen een zoogdier-pathogeen wanneer het virus in een zoogdier wordt geïntroduceerd, welk recombinant-vogelpokkenvirus DNA bevat dat voor een anti-geen van de pathogeen codeert en het tot expressie brengt zonder productieve vermenigvuldiging van het virus in het zoogdier.
- 55 5. Recombinant-vogelpokkenvirus dat in een niet-essentieel gebied van het vogelpokken-genoom DNA van andere herkomst dan vogelpokken bevat dat codeert voor een antigeen van een vogel-pathogeen.

6. Recombinant-vogelpokkenvirus volgens conclusie 5, met het kenmerk, dat het DNA stroomafwaarts is gelegen van een promotor, en wel een koepok-promotor of een entomopoxpromotor.
7. Recombinant-vogelpokkenvirus dat een immunologische respons uitlokt tegen een vogel-pathogeen wanneer het virus in een vogel wordt geïntroduceerd, welk recombinant-vogelpokkenvirus DNA bevat dat
- 5 voor een antigeen van de pathogeen codeert en het tot expressie brengt zodanig dat antilichamen tegen de pathogeen worden gevormd.
8. Immunologische samenstelling die een recombinantvogelpokkenvirus volgens een van de conclusies 5-7 en een geschikte drager of geschikt verdunningsmiddel omvat.
9. Recombinant-vogelpokkenvirus dat synthetisch is gemodificeerd zodat het in een niet-essentieel gebied
- 10 van het vogelpokken-genoom DNA bevat dat van nature niet in vogelpokken-virus voorkomt.
10. Werkwijze voor het tot expressie brengen van het DNA in een recombinant-vogelpokkenvirus dat synthetisch is gemodificeerd zodat het in een niet-essentieel gebied van het vogelpokken-genoom DNA bevat dat van nature niet in vogelpokken-virus voorkomt.
11. Werkwijze volgens conclusie 10, waarbij het DNA codeert voor een antigeen van een zoogdier-
- 15 pathogeen.
12. Werkwijze volgens conclusie 10, waarbij het DNA codeert voor een antigeen van een vogel-pathogeen.
13. Werkwijze volgens conclusie 10, 11 of 12, waarbij het tot expressie brengen plaatsvindt in cellen van een in vitro celkweek.
14. Recombinant-pokkenvirus dat DNA van wat voor herkomst dan ook en een entomopox-promotor voor
- 20 het tot expressie brengen van het DNA bevat.
15. Recombinant-koepokvirus dat DNA van wat voor herkomst dan ook en een vogelpokken-promotor voor het tot expressie brengen van het DNA bevat.