



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) PI 0809842-5 B1**



**(22) Data do Depósito: 23/04/2008**

**(45) Data de Concessão: 10/09/2019**

---

**(54) Título:** PROCESSO PARA A OBTENÇÃO DE LINHAGENS DE CÉLULAS AVIÁRIAS DIPLOIDES CONTÍNUAS, PROCESSO DE REPLICAÇÃO DE UM VÍRUS EM UMA LINHAGEM DE CÉLULAS AVIÁRIAS DIPLOIDES CONTÍNUAS E PROCESSO DE PRODUÇÃO DE PEPTÍDEOS E PROTEÍNAS RECOMBINANTES

**(51) Int.Cl.:** A61K 39/145.

**(30) Prioridade Unionista:** 24/04/2007 EP 07300979.7.

**(73) Titular(es):** VALNEVA.

**(72) Inventor(es):** FABIENNE GUEHENNEUX; KARINE MOREAU; MAGALI ESNAULT; MAJID MEHTALI.

**(86) Pedido PCT:** PCT EP2008054912 de 23/04/2008

**(87) Publicação PCT:** WO 2008/129058 de 30/10/2008

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 23/10/2009

**(57) Resumo:** PROCESSO PARA A OBTENÇÃO DE LINHAGENS DE CÉLULAS AVIÁRIAS DIPLOIDES CONTÍNUAS, PROCESSO DE REPLICAÇÃO DE UM VÍRUS EM UMA LINHAGEM DE CÉLULAS AVIÁRIAS DIPLOIDES CONTÍNUAS E PROCESSO DE PRODUÇÃO DE PEPTÍDEOS E PROTEÍNAS RECOMBINANTES A presente invenção refere-se ao desenvolvimento e fabricação de vacinas virais. Em particular, a invenção refere-se ao campo da produção industrial de vacinas e vetores virais, mais particular, ao uso de células-tronco embrionárias aviárias, de preferência, a linhagem de célula EBx® derivada de células-tronco embrionárias de pato, para a produção de vírus e vetores virais. A invenção é particularmente útil para a produção industrial de vacinas virais para a prevenção de infecção viral de humanos e animais.

**“PROCESSO PARA A OBTENÇÃO DE LINHAGENS DE CÉLULAS AVIÁRIAS DIPLOIDES CONTÍNUAS, PROCESSO DE REPLICAÇÃO DE UM VÍRUS EM UMA LINHAGEM DE CÉLULAS AVIÁRIAS DIPLOIDES CONTÍNUAS E PROCESSO DE PRODUÇÃO DE PEPTÍDEOS E PROTEÍNAS RECOMBINANTES”**

**CAMPO DA INVENÇÃO**

[001] A presente invenção refere-se ao desenvolvimento e à fabricação de vacinas virais. Em particular, a invenção se refere ao campo da produção industrial de vacinas e vetores virais, mais especificamente, ao uso de linhagens de células de pato derivadas de células-tronco embrionárias que estão isentas de um retrovírus endógeno aviário, para a produção de vírus e vetores virais. A invenção é particularmente útil para a produção industrial de vacinas virais para evitar a infecção viral em humanos e animais.

**ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

[002] As vacinas evitam e reduzem de modo eficaz a morte e doenças provenientes de muitas infecções virais, tais como, por exemplo, gripe, sarampo, caxumba, varíola e febre amarela.

[003] Muitas vacinas virais são atualmente produzidas em ovos de galinha embrionados ou em fibroblastos de embrião de galinha primário isolado de embriões de galinha. Contudo, a produção de vacina tem sido ocasionalmente complicada, mediante a contaminação inadvertida com os agentes adventícios que possam ter se originado a partir de substratos de células aviárias usados para propagar cepas de vacina. De fato, a atividade de transcriptase reversa (RT), uma indicação da presença de retrovírus, foi detectada nas vacinas atenuadas vivas derivadas de células de filhote de pássaro que incluem as produzidas pelos fabricantes norte-americanos e europeus para a febre amarela, sarampo e caxumba (Hussain et al., 2003, J. Virol 77:1105- 1111; Johnson et Heneine, 2001, J. Virol., 75:3605-3612). As

investigações da origem da atividade de RT naquelas vacinas revelaram a evidência de partículas que contêm RNA a partir de vírus da leucose aviária endógena (ALV-E) e vírus aviário endógeno (EAV) (Johnson et Heneine, 2001, J. Virol 75:3605-3612; Tsang et al., 1999, J. Virol 73:5843-5851; Weissmahr et al., 1997, J. Virol 71:3005-3012).

[004] Tanto ALV-E como EAV são membros de famílias de aves endógenas presentes na linhagem de germe de galinha. Os ALV-E são expressos a partir de *ev loci*, os quais são elementos provirais hereditários. Com base em suas seqüências de envelope, os ALV-E são diferenciados dos subgrupos A a D e J de ALV, os quais são infecções adquiridas de modo exógeno. Enquanto que os ALVs exógenos causam diversas doenças neoplásticas, tais como, miocardite e osteopetrose em galinhas infectadas, os ALV-E não são conhecidos como patogênicos para as galinhas. A falta de potencial oncogênico com infecções por ALV-E pode ser atribuída à ausência tanto de uma oncogene viral como da atividade de otimizador na reptição terminal longa endógena (LTR). Mais do que 20 *ev loci* diferentes têm sido identificados em galinhas Leghorn brancas (*ev-1* a *ev-22*). As designações *ev loci* são determinadas quando reveladas e são categorizadas fenotipicamente em relação aos produtos de gene que eles expressam e suas capacidades de gerar partículas infecciosas. Os fenótipos de ALV-E conferidos pela faixa de *ev loci* a partir das partículas infecciosas estrutural e enzimaticamente completas à estrutural ou enzimaticamente (RT-) defectivas para a expressão de proteína viral não detectável. A maioria de *ev loci* é estruturalmente incompleta e, portanto, não codifica todas as seqüências necessárias para a produção de partículas de vírus infecciosas. A linhagem de galinha, denominada *ev-0*, tem sido obtida por meio da reprodução, para que seja resistente ao ALV-E. As galinhas de linhagem 0 são desprovidas de *ev loci* (isto é, *ev-0*), mas as seqüências provirais EAV estão presentes nas galinhas linhagem 0 de genoma

(Dunwiddie e Faras, 1985, Proc Natl. Acad. Sci USA, 82: 5097-5101).

[005] Pouco se tem conhecimento sobre a família EAV, a qual é distinta, porém relacionada à família ALV. Os elementos EAV estão presentes em pelo menos 50 cópias por genoma de galinha. Contudo, nenhuma das seqüências de EAV conhecidas representa genomas retrovirais intactos e de comprimento inteiro, e nem EAV infecciosos isolados têm sido ainda identificados. Contudo, o EAV mostrou-se altamente expresso em células embrionárias derivadas de gênero de aves, gallus. Weissmahr et al. (1997, J. Virol 71:3005- 3012) têm mostrado que as partículas a partir da família de aves endógena de EAV são provavelmente responsáveis por uma grande parte da atividade de RT de partículas associadas encontrada nos sobrenadantes dos fibroblastos de embriões de galinha cultivados.

[006] O risco de transmissão inadvertida é particularmente alto para a vacina de vírus atenuado vivo, uma vez que eles não podem ser submetidos a um procedimento de inativação e a maioria deles é injetada em humanos, se desviando, assim, dos mecanismos de proteção imunológica não específicos. Deste modo, para garantir a segurança das vacinas para o uso animal e humano, o substrato de células para a produção de vacina tem que ser agora testados em relação à presença de retrovírus de replicação-competente que poderiam ser passados aos hospedeiros humanos e animais durante a imunização (WHO technical reports Series, 1994).

[007] Por outro lado, os sistemas de produção de fibroblastos de embrião de galinha primários e ovos de galinha embrionados são associados a diversas limitações sérias que incluem:

- o processo de fabricação consumidor de recursos, incômodo e prolongado que exige a aquisição e o controle de qualidade de grandes quantidades de ovos ou CEFs para cada campanha de produção individual;
- a necessidade, em muitos casos, do uso dispendioso de

embriões de galinha livres de patógenos específicos (SPF);

- o risco de suprimento insuficiente de ovos nos casos de infecções epidêmicas nos bandos de galinha doadores;

- os custos inflacionários associados ao uso de soro bovino originário de países isentos-BSE;

- a incapacidade de usar os ovos para a propagação de vírus que são altamente virulentos e letais para as galinhas.

[008] Há, portanto, uma necessidade urgente em aperfeiçoar as tecnologias atuais de produção de vacinas virais com base em fibroblastos embrionários de galinha ou ovos. O desenvolvimento de plataformas de cultura celular como uma alternativa para os sistemas de produção de CEF e ovos para a fabricação de vacinas virais é provavelmente a solução promissora e mais rápida para superar as restrições de tempo e obstáculos da produção de vacinas atual. Além disso, o uso de linhagens de células para a fabricação de vacinas virais, em vez de plataformas de CEF ou ovos, teria as seguintes vantagens adicionais em conjunto com a segurança da vacina: aditivos antibióticos não presentes na formulação da vacina; sem a necessidade de conservantes tóxicos (tal como tiomersal); níveis de endotoxina reduzidos, nenhum problema de alergia aos ovos; nenhum risco de BSE/agente adventício mediante a cultura celular em meios livres de soro e proteína; pureza maior da preparação de vacina do vírus.

[009] Os exemplos de linhagens de células para a produção de vacinas virais são MDCK (células derivadas dos rins de cão Madin-Darby), PerC6 (células derivadas de células da retina embrionária humana geneticamente modificada mediante a inserção dos genes E1 a partir do adenovírus humano do tipo 5 desenvolvidas por CRUCCELL (Países Baixos), VERO (células derivadas de células epiteliais dos rins de macaco-verde africano (*Cercopithecus aethiops*) isoladas na universidade de Chiba, em

Chiba, Japão), BHK21 (células imortalizadas a partir de células dos rins de filhote de hamster). Nenhuma das linhagens de células disponíveis cumpre todas as exigências industriais, regulatórias e médicas. Por exemplo, a maioria destas linhagens de células é tumorigênica e existe uma preocupação regulatória importante quanto ao uso de células tumorigênicas para a produção de vacinas humanas; portanto, no momento atual, as autoridades regulatórias estão relutantes quanto à aprovação dos substratos de células tumorigênicas para produzir vacinas em massa. Adicionalmente, algumas destas linhagens de células são dependentes de ancoragem, o que constitui um sério obstáculo para a expansão industrial da produção de vacina.

[010] Portanto, há uma necessidade de desenvolver linhagens de células independentes de ancoragem, livres da replicação-competente de retrovírus, que sejam industrialmente compatíveis e não-tumorigênicas, as quais sejam suscetíveis à infecção por uma ampla faixa de vírus. Isto consiste no propósito da atual invenção.

[011] Deste modo, o inventor tem utilizado a vantagem de sua destreza em biologia de aves e em células-tronco embrionárias aviárias (ES) para encarregar-se do desenvolvimento de novas linhagens de células de pato estáveis que possibilitem a replicação eficiente de um grande grupo de vacinas veterinárias e humanas e candidatos à vacina. Mediante a adaptação de um processo patenteado (vide WO 03/076601 e WO 05/007840), o inventor foi capaz de gerar uma série de linhagens de células de pato bem documentadas e caracterizadas (isto é, as células dEBx®) que são derivadas de células ES de pato, com nenhuma das etapas da imortalização viral, química ou genética e que não produzem retrovírus de replicação-competente em cultura.

#### **DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO**

[012] A atual invenção fornece um processo para obter linhagens de células aviárias diplóides contínuas, denominadas EBx, derivadas de

células-tronco embrionárias aviárias (ES), sendo que as ditas linhagens de células aviárias não produzem partículas de retrovírus endógeno de replicação-competente.

[013] As linhagens de células da invenção são "contínuas" devido ao fato de que têm características para serem cultivadas in vitro durante um período de tempo prolongado. Vantajosamente, as células da invenção são capazes de proliferar por pelo menos 50 gerações, pelo menos 75 gerações, pelo menos 100 gerações, pelo menos 125 gerações, pelo menos 150 gerações, pelo menos 175 gerações, pelo menos 200 gerações, pelo menos 250 gerações. As 250 gerações não constituem um limite de tempo, devido ao fato de que as células obtidas ainda estão vivas e ainda podem ser feitas passagens por meio de passagens adicionais. Sem se ater à teoria, supõe-se que as células da invenção possam ser cultivadas "continuamente", contanto que a telomerase seja expressa pelas células. De fato, presume-se que o alto nível de expressão de telomerase de células aviárias da invenção seja responsável pela estabilidade genética (isto é, as células aviárias da invenção são diplóides) e o crescimento celular contínuo.

[014] O termo "passagem" significa que a transferência da transplantação de células, com ou sem diluição, a partir de um vaso de cultura ao outro. Deve-se compreender que a qualquer tempo as células são transferidas de um vaso ao outro, uma determinada porção das células pode ser perdida e, portanto, a diluição das células, se deliberado ou não, pode ocorrer. Este termo é sinônimo ao termo 'subcultura'. O número de passagem é o número de vezes que as células na cultura, que crescem em suspensão ou em aderência, têm sido subcultivadas ou passadas em um novo vaso. Este termo não é sinônimo de geração ou duplicação de população, o qual é o tempo necessário para uma população celular replicar uma vez, isto é, aproximadamente o tempo para cada uma das células de uma população

replicar. Por exemplo, as células ES de aves da etapa a) da invenção têm um tempo de duplicação de população (PDT) de cerca de > 40 horas. As células EBx de aves da invenção têm um PDT de cerca de < 30 horas; usualmente para as células EBx®, há uma passagem a cada 3 gerações.

[015] O termo "diplóide" significa que as células da invenção têm duas cópias (2n) de cada cromossomo, usualmente um da mãe e um do pai.

[016] O fato em que as linhagens de células EBx® aviárias da invenção são contínuas e diplóides (isto é, geneticamente estável) constitui uma característica única e notável, devido ao fato de que estes termos são usualmente antagonistas. Deste modo, as células de câncer e/ou células imortalizadas obtidas por meio de modificação genética (transformação de vírus, superexpressão de oncogenes, etc.), física (irradiação U.V, raio X ou radiação g, etc.) ou química são células contínuas devido ao fato de que são capazes de replicarem indefinidamente em cultura, mas não são geneticamente estáveis pelo fato de que não exibem cariótipos poliplóides. Por outro lado, as células primárias, tais como fibroblastos embrionários de galinha, MRC5, WI38, os quais são células transformadas, não são contínuas devido ao fato de que têm um tempo de vida finito após poucas gerações, mas são células geneticamente estáveis (isto é, diplóides).

[017] Na presente invenção, os termos "linha de célula" e "células" serão usados indistintamente.

[018] O termo "de aves", "pássaro", "aves" ou "ava", para uso na presente invenção, é destinado a ter o mesmo significado e será usado indistintamente. "Pássaros" se referem a qualquer espécie, subespécie ou raça de organismo da classe taxonômica "ava". Em uma modalidade preferida, "pássaros" se referem a qualquer animal da ordem taxonômica:

- "Anseriformes" (isto é, pato, ganso, cisne e associados). A ordem Anseriformes contém cerca de 150 espécies de pássaros em três

famílias: a Anhimidae (as anhumas), Anseranatidae (o ganso Magpie) e a Anatidae, a qual inclui mais de 140 espécies de pássaros aquáticos, entre eles, os patos, gansos e cisnes. Todas as espécies na ordem são altamente adaptadas para uma existência aquática na superfície de água. Todos são palmípedes para a natação eficiente (embora alguns tenham subseqüentemente se tornado, sobretudo, terrestres).

- "Galliformes" (isto é, galinhas, codornas, peru, faisão e associados). O Galliformes é uma ordem que contém a galinha, perus, codornas e faisões. Cerca de 256 espécies são encontradas mundialmente.

- "Columbiformes" (isto é, pombo e associados). Os Columbiformes da ordem dos pássaros incluem os pombos e pombas muito comuns.

[019] Na atual invenção, o termo "partícula retroviral endógena" ou "partícula de retrovírus endógeno", termos que poderiam ser usados indistintivamente, significa que uma partícula retroviral ou retrovírus codificado por e/ou expresso a partir de seqüências provirais de ALV-E ou EAV presentes em alguns genomas de células aviárias. Nos pássaros, as seqüências provirais de ALV-E são conhecidas por estarem presentes no genoma de galinha doméstica (exceto galinha de linhagem 0), galo selvagem vermelho e faisão de Ringneck. Nos pássaros, as seqüências provirais de EAV são conhecidas por estarem presentes em todos os gêneros gallus, que incluem galinhas domésticas, galinha de linhagem 0, galo selvagem vermelho, galo selvagem verde, galo selvagem cinza, galo do Ceilão e associados (vide Resnick et al., 1990, J. Virol., 64:4640-4653).

[020] De acordo com uma modalidade preferida, os pássaros da invenção são selecionados entre os pássaros que não compreendem seqüências provirais de ALV-E e EAV em seu genoma. Um versado na técnica é capaz de determinar se as seqüências ALV-E e EAV estão presentes em um

genoma de pássaro (Johnson e Heneine, 2001; Weissmahr et al., 1996). Prefere-se que o pássaro seja selecionado do grupo que compreende Anseriformes (isto é, pato, ganso, cisne), perus, codornas, codorna japonesa, galinha d'angola, pavão. Portanto, as células derivadas de tal pássaro não produzem partículas de EAV e/ou ALV-E endógenas de replicação-competente. Em uma modalidade preferida, o pássaro da presente invenção é selecionado do grupo que compreende patos, gansos, cisnes, perus, codornas e codornas japonesas, galinhas de angola e pavões. De acordo com a modalidade mais preferida, o pássaro é um pato, com mais preferência, um pato Muscovy ou Pekin. De acordo com uma modalidade mais preferida, o pássaro é um pato Pekin. Portanto, a atual invenção fornece um processo para obter linhagens de células de pato diplóides contínuas derivadas de células-tronco embrionárias (ES), sendo que as ditas linhagens de células de pato não produzem partículas de retrovírus endógenas de replicação-competente.

[021] De acordo com uma segunda modalidade preferida, os pássaros da invenção são selecionados entre os pássaros que não compreendem as seqüências provirais de ALV-E completas em seu genoma, mas eventualmente seqüências provirais de EAV. Um versado na técnica é capaz de determinar se as seqüências de EAV e ALV-E completas ou parciais estão presentes em um genoma de pássaro (Johnson e Heneine, 2001). Diversas cepas de galinha têm sido selecionadas por reprodução que não contêm as seqüências provirais de ALV-E completas (isto é, cepa ev-0) e, portanto, não produzem retropartículas ALV-E infecciosas, tais como:

- Galinhas domésticas de linhagem 0 de estoque de aves domésticas de USDA de East Lansing (cepa ELL-0). As galinhas de linhagem 0 de East Lansing não cotem qualquer viral endógeno (ev) loci relacionado à ALV (Dunwiddie e Faras, 1985).

- Linhagem de DE e PE11 disponíveis junto à Institut National de

la Recherche Agronomique (Domaine de Magneraud, Surgeres, França).

[022] Portanto, as células derivadas de pássaros ev-0 não produzem não produzem partículas de ALV-E endógenas de replicação-competente. De acordo com uma modalidade preferida, o pássaro é uma galinha doméstica de ev-0 (subespécies de Gallus Gallus domesticus), de preferência, selecionadas entre ELL-O, DE e PE11.

[023] Usualmente, as galinhas ev-0 ainda contêm a seqüência proviral de EAV, mas até agora nenhuns isolados de EAV infeccioso têm sido identificados. Portanto, a atual invenção fornece um processo para a obtenção de linhagens de células de galinhas diplóides contínuas derivadas de células-tronco embrionárias (ES) de cepas de galinhas ev-0, sendo que as ditas linhagens de células de galinhas ev-0 não produzem partículas de retrovírus endógenas de replicação-competente.

[024] De acordo com uma terceira modalidade, os pássaros da invenção são selecionados entre os pássaros que compreendem seqüências provirais de EAV e ALV-E incompletas e/ou completas, em seu genoma, mas que são incapazes de produzir retropartículas de EAV e ALV-E de replicação-competente. Um versado na técnica é capaz de determinar se retropartículas não-infecciosas e/ou infecciosas de EAV e/ou ALV-E são produzidas a partir de células de pássaro (Johnson e Heneine, 2001; Weissmahr et al., 1996). Prefere-se que o pássaro seja selecionado do grupo que compreende galinha livre de patógeno específico (SPF), de preferência, a partir de cepa Valo (Lohman) ou linhagem 22 (SPAFAS).

[025] O termo "replicação-competente" significa que as partículas retrovirais endógenas são infecciosas, isto é, que tais partículas retrovirais são capazes de infectar e replicar em células aviárias da invenção.

[026] O processo de estabelecimento de linhagens de células aviárias diplóides contínuas da invenção, denominadas EBx®, compreende

duas etapas:

a) isolamento, cultura e expansão de células-tronco embrionárias a partir de pássaros que não contêm seqüências provirais endógenas completas, ou um fragmento das mesmas, suscetíveis a produzirem partículas retrovirais endógenas de replicação-competente, mais especificamente, seqüências provirais de EAV e/ou ALV-E ou um fragmento das mesmas, em um meio de cultura completo que contém todos os fatores que permitem seu crescimento e na presença de uma camada alimentadora e suplementada com soro animal, opcionalmente, o dito meio de cultura completo pode compreender aditivos, tais como aminoácidos adicionais (isto é, glutamina, aminoácidos não essenciais, etc.), piruvato de sódio, beta-mercaptoetanol, vitaminas, hidrolisado de proteína de origem não animal (isto é, yeastolate, hidrolisados vegetais (soja, trigo, etc.);

b) passagem por meio da modificação do meio de cultura, a fim de obter uma retirada total dos ditos fatores, da dita camada alimentadora, do dito soro e, opcionalmente, dos ditos aditivos, e obter, ainda, linhagens de células aviárias em suspensão ou aderentes, denominadas EBx®, que não produzem partículas de retrovírus endógenas de replicação-competente, capazes de proliferar durante um longo período de tempo, em um meio basal na ausência de fatores de crescimento exógeno, camada alimentadora e soro animal.

[027] A modificação do meio de cultura da etapa b) do processo de estabelecimento de linhagens de células EBx®, a fim de obter uma retirada total ou progressiva de fatores de crescimento, soro e camada alimentadora, pode ser feita de forma simultânea, sucessiva ou separadamente. A seqüência da desabituação do meio de cultura pode ser escolhida entre:

camada alimentadora / soro / fatores de crescimento;

camada alimentadora / fatores de crescimento / soro;

soro / fatores de crescimento / camada alimentadora;

soro / camada alimentadora / fatores de crescimento;

fatores de crescimento / soro / camada alimentadora;

fatores de crescimento / camada alimentadora / soro.

[028] Em uma modalidade preferida, a seqüência da desabituação consiste em fatores de crescimento / camada alimentadora / soro. Em uma modalidade preferida, a retirada de aditivos, tais como piruvato de sódio, aminoácidos não essenciais (NNEA), vitaminas, yeastolate, é executada após a desabituação de camada alimentadora e antes da desabituação de soro. Prefere-se que a retirada de yeastolate seja executada após a retirada de piruvato de sódio, NNEA e vitaminas.

[029] De acordo com uma modalidade preferida, as células-tronco aviárias embrionárias, de acordo com a etapa a) da invenção, são coletadas a partir de embrião de aves em oviposição, isto é, quando o ovo está posto. De acordo com Sellier et al. (2006, J. Appl. Poult. Res., 15:219-228), a oviposição corresponde aos estágios de desenvolvimento seguintes, de acordo com a classificação de Eyal-Giladi (classificação de EYAL-GILADI: EYAL-GILADI e KOCHAN, 1976, *"From cleavage to primitive streak formation: a complementary normal table and a new look at the first stages of the development in the chick"*. "General Morphology" Dev. Biol. 49:321-337):

pato Muscovy (também chamado de pato Barbari): estágio VII

galinha de angola: estágio VII - VIII

peru: estágio VII-VIII

pato Pekin: estágio VIII

galinha: estágio X

codorna japonesa: estágio XI

ganso: estágio XI.

[030] Prefere-se que as células-troco (ES) embrionárias de pato

da etapa a) sejam obtidas por meio da dissociação de embrião(ões) de pato Pekin em torno do estágio VIII (oviposição) da classificação de Eyal-Giladi. Se o ovo colocado coletado na oviposição não está desenvolvido o suficiente para coletar as células-tronco embrionárias, o ovo colocado pode ser, ainda, incubado entre diversas horas (de um dia para o outro) a um a dois dias para amadurecer o embrião. De acordo com uma segunda modalidade, as células-tronco (ES) embrionárias de pato da etapa a) são de um pato Muscovy. Na oviposição, o pato Muscovy não está maduro o suficiente devido ao fato que está em torno do estágio VII, portanto, o ovo é incubado de um dia para o outro para amadurecer o ovo até o estágio VIII a X da classificação de Eyal-Giladi.

[031] Prefere-se que as células-tronco (ES) embrionárias de galinha, de preferência, a partir de linhagem de galinha ev-0, da etapa a) sejam obtidas por meio da dissociação de embrião(ões) em torno do estágio X (oviposição) da classificação de Eyal-Giladi.

[032] Alternativamente, as células-tronco embrionárias aviárias, de acordo com a etapa a) da invenção, são coletadas do embrião antes da oviposição. As limitações principais encontradas antes da oviposição consistem no fato de que o ovo tem que ser removido de forma cirúrgica da fêmea de ave doméstica e que a quantidade de células ES por embrião é menos importante. Além disso, em estágios muito precoces do desenvolvimento de embriões de aves, as células ES não estão bem individualizadas tornando a cultura in vitro de células ES difícil. Um versado na técnica será capaz de definir o período de tempo antes da colocação do ovo que permite coletar as células ES de aves.

[033] Alternativamente, as células-tronco embrionárias aviárias, de acordo com a etapa a) da invenção, podem ser coletadas a partir do embrião de aves após a oviposição até a incubação. Contudo, as células-tronco embrionárias aviárias irão entrar progressivamente na diferenciação para gerar tecidos diferenciados; portanto, prefere-se coletar ES de aves não

muito depois da colocação. Um versado na técnica será capaz de definir o período de tempo após a colocação do ovo que permite coletar células-tronco embrionárias aviárias.

[034] De acordo com outra modalidade, as células da etapa a) são a população de células-tronco embrionárias enriquecidas em células de germe primordiais (PGC). Com mais preferência, as células ES de aves da etapa a) são PGCs purificadas. Em espécies aviárias, as células de germe primordiais surgem da região central do blastoderme (Ginsburg e Eyal-Giladi, 1987 *Development* 101(2):209-19; Karagenc et al, 1996 *Dev Genet* 19(4):290-301 ; Petite et al, 1997 *Poultry Sci.* 76(8): 1084-92). Então, elas se movem para um de local extra-embrionário anterior, o germinal crescente, até coletadas pela vasculatura entre 2,5 e 5 dias de desenvolvimento embrionário para alcançar a crista germinal. Elas colonizam a crista germinal onde eventualmente em oócitos ou espermatócitos (Nieuwkoop e Sutasurya, 1979. *The Migration of the primordial germ cells*. In: *Primordial germ cell in Chordates*. London: Cambridge University Press p113-127). O método para o isolamento de PGCs a partir de embriões de aves doadoras tem sido relatado na literatura e pode ser facilmente executado por um versado na técnica (vide, por exemplo, JP924997, publicada em 7 de setembro de 1993 Pub. nº 05-227947; Chang et al. 1992. *Cell Biol. Int.* 19(2): 143-149 ; Naito et al. 1994 *Mol. Reprod. Dev.* 39: 153-161 ; Yasuda et al. 1992. *J. Reprod. Fert.* 96: 521-528 ; Chang et al. 1992 *Cell Biol. Int. Reporter* 16(9): 853- 857). De acordo com uma modalidade, as PGCs são coletadas a partir do sangue embrionário coletado da aorta dorsal de um embrião de galinha no estágio 12 a 14 da classificação de Hamburger & Hamilton (Hamburger & Hamilton 1951 *A series of normal stages in the development of chick embryo*. *J. Morphol.* 88: 49-92). Em outra modalidade preferida, as PGCs foram coletadas a partir do crescente germinal por meio de dissecação mecânica do embrião de galinha ou a partir de gônadas. Contudo,

conforme discutido acima, outros métodos para o isolamento de PGCs são conhecidos e pode ser alternativamente usados.

[035] Estas células-tronco embrionárias aviárias são caracterizadas pelo fato de que um tempo de duplicação lento compreende entre 48 a 72 horas em cultura a 39°C.

[036] Sem se ater à teoria, as condições definidas de cultura de células de células ES de aves, seguida pela desabituação progressiva em fatores de crescimento, camada alimentadora, aditivos e soro, permitem adaptar e selecionar células que mantêm a maioria das características desejáveis de células ES (estabilidade de cariótipo, proliferação indefinida, expressão de marcadores de ES), mas exibem adicionalmente características industrialmente amigáveis como crescimento em suspensão até altas densidades celulares no meio livre de soro. A telomerase constitui um dos mais importantes marcadores de ES. Devido à expressão de telomerase mantida e sustentada sobre as passagens de células, a célula EBx® é contínua (isto é, imortais), mas adicionalmente são geneticamente estáveis (isto é, diplóides).

[037] Mais especificamente, a presente invenção fornece um processo para a obtenção de linhagens de células aviárias diplóides contínuas derivadas de células ES, sendo que as ditas linhagens de células aviárias não produzem partículas retrovirais endógenas de replicação-competente, em que o dito processo compreende as seguintes etapas de:

a) isolamento de embrião(ões) de pássaro, de preferência, a partir de pato ou de galinha ev-0, em um estágio desenvolvido compreendendo em torno do estágio VI da classificação de Eyal-Giladi (classificação de Eyal-Giladi: EYAL-GILADI e KOCHAN, 1976, *"From cleavage to primitive streak formation : a complementary normal table and a new look at the first stages of the development in the chick"*. "General Morphology" Dev. Biol., 49:321-337) e antes da incubação, de preferência, em torno da oviposição, sendo que o

genoma do dito pássaro não contém seqüências provirais endógenas suscetíveis a produzir partículas retrovirais endógenas de replicação-competente;

b) suspensão de células-tronco (ES) embrionárias aviárias obtidas por meio da dissociação de embrião(ões) da etapa a) em um meio de cultura basal suplementado com:

- Fator de Crescimento de Insulina 1 (IGF-1) e Fator Neurotrófico Ciliar (CNTF);

- soro animal; e

- opcionalmente, fatores de crescimento selecionados do grupo que compreende interleucina 6 (IL-6), receptor de interleucina 6 (IL-6R), Fator de Célula-tronco (SCF) e Fator de Crescimento de fibroblasto (FGF);

c) semeadura da suspensão de células ES obtidas na etapa b) sobre uma camada de células alimentadoras e, ainda, a cultura das células ES por pelo menos uma passagem;

d) opcionalmente, retirada de todos os fatores de crescimento selecionados do grupo que compreende IL-6, IL-6R, SCF, FGF do meio de cultura sobre uma faixa de diversas passagens a partir de 1 a cerca de 15 passagens, de preferência, de 3 a cerca de 15 passagens e, ainda, a cultura das células ES de aves por pelo menos uma passagem. Prefere-se que a retirada de todos os fatores de crescimento selecionados do grupo que compreende IL-6, IL-6R, SCF, FGF do meio de cultura, seja executada simultaneamente durante uma passagem. Usualmente, a retirada de IL-6, IL-6R, SCF, FGF é executada em torno da passagem 10 a 15;

e) retirada de IGF-1 e CNTF do meio de cultura e, ainda, cultura das células ES de aves por pelo menos uma passagem. Prefere-se que a retirada dos fatores de crescimento selecionados do grupo que compreende IGF-1 e CNTF do meio de cultura, seja executada simultaneamente durante

uma passagem. Usualmente, a retirada de IGF-1 e CNTF é executada em torno da passagem nº 15 a nº 25. Alternativamente, a retirada de IGF-1 e CNTF é executada pela diminuição progressiva sobre diversas passagens (pelo menos 2 passagens e, aproximadamente, até 15 passagens);

f) diminuição progressiva da concentração de células alimentadoras no meio de cultura, a fim de obter uma retirada total da camada alimentadora após diversas passagens e, ainda, a cultura das células;

g) opcionalmente, diminuição progressiva da concentração de aditivos no meio de cultura, a fim de obter uma retirada total de aditivos após pelo menos uma passagem; e

h) opcionalmente, diminuição de forma progressiva da concentração de soro animal no meio de cultura, a fim de obter uma retirada total de soro animal após diversas passagens; e

i) obtenção de linhagens de células aviárias aderentes, denominadas EBx®, derivadas de células ES capazes de proliferar em um meio basal na ausência de fatores de crescimento, camada alimentadora, opcionalmente, sem soro animal e aditivos, sendo que as ditas linhagens de células aviárias diplóides contínuas não produzem partículas de retrovírus endógenas de replicação-competente;

j) opcionalmente, adaptar, ainda, as ditas linhagens de células EBx® aviárias aderentes às condições de cultura em suspensão. Toda a etapa de adaptação de cultura de célula à suspensão pode acontecer ao longo do processo de estabelecimento de células EBx®. Por exemplo, com células EBx® de pato derivadas de células-tronco embrionárias de Muscovy, as células foram adaptadas ao crescimento em suspensão antes da retirada da camada alimentadora. Para as células EBx® de pato (EB24, EB26, EB66) derivadas de pato Pekin, as células foram adaptadas ao crescimento em suspensão antes da retirada de soro animal.

k) opcionalmente, a subclonagem, ainda, das ditas células EBx® aviárias, por exemplo, por diluição limite.

[038] Em uma modalidade preferida, a presente invenção refere-se a um processo para a obtenção de linhagens de células aviárias diplóides contínuas, denominadas EBx®, derivadas de células-tronco embrionárias (ES) de aves, sendo que as ditas linhagens de células aviárias não produzem partículas de retrovírus endógenas de replicação-competente, e o dito processo compreende as etapas de:

a) isolamento de embrião(ões) de pássaro em um estágio de desenvolvimento em torno da oviposição, sendo que o genoma do dito pássaro não contém seqüências provirais endógenas suscetíveis a produzir partículas retrovirais endógenas de replicação-competente;

b) suspensão de células-tronco (ES) embrionárias aviárias obtidas pela dissociação de embrião(ões) da etapa a) em um meio de cultura basal suplementado com pelo menos:

- fator de crescimento de insulina 1 (IGF-1) e fator neurotrófico ciliar (CNTF); e

- soro de mamífero, tal como soro bovino fetal;

c) semeadura da suspensão de células ES obtidas na etapa b) sobre uma camada de células alimentadoras e, ainda, a cultura das células ES por pelo menos uma passagem;

e) retirada de IGF-1 e CNTF a partir do meio de cultura e, ainda, a cultura das células por pelo menos uma passagem;

f) diminuição de forma progressiva da concentração de células alimentadoras no meio de cultura, a fim de obter uma retirada total da camada alimentadora após diversas passagens e, ainda, a cultura das células;

g) diminuição de forma progressiva da concentração do dito soro de mamífero no meio de cultura, a fim de obter uma retirada total do soro de

mamífero após diversas passagens e:

h) obtenção de linhagens de células EBx® aviárias aderentes derivadas de células ES capazes de proliferar em um meio basal na ausência de fatores de crescimento, camada alimentadora e soro de mamífero, sendo que as ditas linhagens de células aviárias diplóides contínuas não produzem partículas de retrovírus endógenas de replicação-competente;

i) opcionalmente, adaptar, ainda, as linhagens de células EBx® aviárias aderentes às condições de cultura em suspensão, de preferência, mediante a promoção do crescimento como suspensão, com mais preferência, o meio da transferência das linhagens de células EBx® aviárias aderentes obtidas na etapa h) em outro suporte que tenha característica de fixação menor do que o suporte inicial (isto é, tal como suporte de fixação ultra baixo).

[039] A etapa j) de adaptação de linhagens de células EBx® aviárias aderentes às condições de cultura em suspensão, quando realizada, pode ser efetuada em outra modalidade preferida antes da etapa g) de diminuição de forma progressiva da concentração de soro de mamífero no meio de cultura.

[040] Em outra modalidade preferida, o meio de cultura basal na etapa b) do processo para a obtenção de linhagens de células aviárias diplóides contínuas, de acordo com a presente invenção, é ainda suplementado com um fator de crescimento selecionado do grupo que compreende interleucina 6 (IL-6), receptor de interleucina 6 (IL-6R), fator de célula-tronco (SCF) e fator de crescimento fibroblasto (FGF), e o dito processo compreende adicionalmente uma etapa d) de:

d) opcionalmente, a retirada de todos os fatores de crescimento selecionados do grupo que compreende IL-6, IL-6R, SCF, FGF a partir do meio de cultura e, ainda, a cultura das células ES por pelo menos uma passagem.

[041] Em uma modalidade mais preferida, quando a etapa d) é

realizada, a etapa e) de retirada de IGF-1 e CNTF a partir do meio de cultura, é efetuada após a etapa d) de retirada de todos os fatores de crescimento selecionados do grupo que compreende IL-6, IL-6R, SCF, FGF a partir do meio de cultura.

[042] De acordo com a invenção, "meio de cultura basal" significa um meio de cultura com uma formulação de meios clássica que permite, por si própria, pelo menos a sobrevivência de células e, até melhor, o crescimento celular. Os exemplos de meios basais são BME (meio basal de Eagle), MEM (meio mínimo de Eagle), meio 199, DMEM (meio de Dulbecco modificado de Eagle), GMEM (meio Glasgow modificado de Eagle), DMEM-HamF12, Ham-F12 e Ham-F10, meio de Dulbecco modificado de Iscove, meio 5A de MacCoy, RPMI 1640, GTM3. O meio basal compreende sais inorgânicos (por exemplo:  $\text{CaCl}_2$ , KCl, NaCl,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ , etc.), aminoácidos, vitaminas (tiamina, riboflavin, ácido fólico, pantotenato D-Ca, etc.) e outros componentes, tais como glicose, beta-mercapto-etanol, piruvato de sódio. Prefere-se que o meio basal seja um meio sintético. A tabela 1 expõe a composição de DMEM / HAM F12:

**TABELA 1: FORMULAÇÃO DE DMEM-HAM F12 (MG/L)**

**Sais inorgânicos**

Cloreto de cálcio anidro	116,60
Nitrato férrico(III) - $9\text{H}_2\text{O}$	0,05
Sulfato férrico(II) - $7\text{H}_2\text{O}$	0,417
Cloreto de potássio	311,80
Sulfato cúprico(II) - $5\text{H}_2\text{O}$	0,0013
Cloreto de magnésio - $6\text{H}_2\text{O}$	61,20
Sulfato de magnésio anidro	48,84
Cloreto de sódio	6996,00
Dihidrogênio fosfato de sódio - $\text{H}_2\text{O}$	62,50

Dihidrogênio fosfato di-sódio anidro	71,02
Sulfato de zinco - 7H <sub>2</sub> O	0,432
Hidrogênio carbonato de sódio	1200,00

**Aminoácidos**

L-Alanina	4,45
L-Arginina - HCl	147,50
L-Asparagina - H <sub>2</sub> O	7,50
L-Ácido aspártico	6,65
L-Cistina - HCl - H <sub>2</sub> O	31,29
L-Cisteína - 2HCl	17,56
L-Ácido glutâmico	7,35
L-Glutamina em E15-813	365,00
Glicina	18,75
L-Histidina - HCl - H <sub>2</sub> O	31,48
L-Isoleucina	54,47
L-Leucina	59,05
L-Lisina - HCl	91,25
L-Metionina	17,24
L-Fenilalanina	35,48
L-Prolina	17,25
L-Serina	26,25
L-Treonina	53,45
L-Triptofano	9,02
L-Tirosina	38,70
L-Valina	52,85

**Vitaminas**

D(+)-Biotina	0,0035
--------------	--------

Pantotenato de D-Cálcio	2,24
Cloreto de Colina	8,98
Ácido fólico	2,65
Mio-Inositol	12,60
Nicotinamida	2,02
Piridoxal - HCl	2,00
Piridoxina - HCl	0,031
Riboflavina	0,219
Tiamina - HCl	2,17
Timidina	0,365
Vitamina B12	0,68

**Outros componentes**

D-Glicose anidro	3151,00
Hipoxantina	2,10
DL-68-ácido lipóico	0,105
Ácido linoléico	0,042
Vermelho de fenol	8,10
Putrescina - 2HCl	0,081
Piruvato de sódio	55,00

[043] Adicionalmente, o meio basal da invenção pode ser complementado com aditivos selecionados do seguinte grupo:

- 0,1 a 5 mM de L-glutamina, de preferência, entre 2 a 3 mM de L-glutamina;

- 0,05 a 2 mM de piruvato de sódio, de preferência, entre 0,1 mM a 1 mM de piruvato de sódio;

- 0,1 a 2,5 % de aminoácidos não essenciais, de preferência, cerca de 1 % de aminoácidos não essenciais;

- 0,1 a 2,5% de vitaminas, de preferência, cerca de 1 % de vitaminas;

- 0,05 a 5 mM de beta-mercapto-etanol, de preferência, cerca de 0,16 mM de beta-mercapto- etanol;

- hidrolisado de proteína de origem não animal.

[044] Para o estabelecimento de células EBx® de pato da invenção, prefere-se que o meio basal seja complementado com hidrolisado de proteína de origem não animal. Os hidrolisados de proteína de origem não animal são selecionados a partir do grupo que consiste em bactéria triptona, levedura triptona, hidrolisados vegetais, tais como hidrolisados de soja, ou uma mistura dos mesmos. Em uma modalidade preferida, os hidrolisados de proteína de origem não animais consistem no hidrolisado de levedura. O termo "hidrolisado" inclui uma digestão enzimática de extrato de levedura ou peptona de soja. O hidrolisado pode ser obtido a partir de uma pluralidade de preparações de extrato de levedura ou peptona de soja, respectivamente, as quais podem ser, ainda, enzimaticamente digeridas (por exemplo, por meio de papaína), e/ou formadas por autólise, termólise e/ou plasmólise. Os hidrolisados podem ser também obtidos comercialmente, tal como Yeastolate, Hy-Soy, Hy-Yeast 412 e Hi-Yeast 444, a partir de fontes, tais como SAFC BioSciences (anteriormente JRH) (Lenaxa, KA), Quest International (Norwich, N.I.), OrganoTechnie S.A. (França) ou Deutsche Hefewerke GmbH (Alemanha). As fontes de extratos de levedura são também apresentadas no documento WO 98/15614. As fontes de hidrolisados de soja e extratos de levedura são também apresentadas no documento W000/03000. Prefere-se que os hidrolisados usados nos meios da invenção sejam purificados a partir de uma fração crua, devido ao fato de que as impurezas que poderiam interferir no cultivo eficiente são, de preferência, eliminadas durante esta purificação, aperfeiçoando, assim, a consistência do hidrolisado. A purificação pode ser o

meio de ultrafiltração ou cromatografia de Sephadex (por exemplo, com Sephadex G25, Sephadex G10 ou materiais equivalentes), cromatografia de troca de íon, cromatografia de afinidade, cromatografia de exclusão de tamanho ou cromatografia de "fase invertida". Prefere-se que a purificação seja executada por meio da ultrafiltração com a utilização de um filtro de cut-off de 10kDa. Estes processos são conhecidos no campo. Com o uso destes métodos, as frações podem ser selecionadas, as quais contêm hidrolisado de levedura ou soja de peso molecular definidos. Prefere-se que os pesos moleculares médios dos hidrolisados de levedura e soja sejam, de preferência, entre cerca de 220 e 375 dáltons. Prefere-se que o hidrolisado de levedura esteja presente no meio de cultura de célula. O hidrolisado de levedura 50X (em torno de 200 g/l) obtido, por exemplo, junto a SAFB-BIOSCIENCES (Ref 58902C), está presente no meio de cultura de célula a uma concentração final que compreende entre cerca de 0,1X a 2X, de preferência, cerca de 0,5X a cerca de 1X no meio de cultura. O hidrolisado de soja pode ser também adicionado ao meio de cultura de célula. O hidrolisado de soja 50X obtido, por exemplo, junto a SAFB-BIOSCIENCES (Ref 58903C), é adicionado a uma concentração final que compreende entre cerca de 0,1X a 2X, de preferência, cerca de 1X no meio de cultura. Alternativamente, uma mistura de hidrolisado de soja e hidrolisado de levedura pode ser adicionada ao meio de cultura de célula, conforme descrito em US2004/0077086.

[045] De acordo com um meio basal preferido da invenção, DMEM-HamF12 que são complementados com 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sódio, 1 % aminoácidos não essenciais, 1 % de vitaminas, 0,16 mM de beta-mercapto-etanol e, opcionalmente, com 1X de hidrolisado de levedura.

[046] O termo "meio de cultura completo" significa um meio de cultura basal complementado ou não, de preferência, um meio basal sintético, suplementado com pelo menos um fator de crescimento e soro animal. O

exemplo de meio de cultura completo é descrito nos documentos WO 03/076601, WO 05/007840, EP 787180, US 6.114.168, US 5.340.740, US 6.656.479, US 5.830.510 e em Pain et al. (1996, Development 122:2339-2348). Alternativamente, o meio de cultura completo pode ser um meio condicionado, de preferência, meio condicionado de BRL. A título de exemplo, os meios condicionados de BRL são preparados de acordo com técnicas reconhecidas na técnica, tais conforme descritas por Smith e Hooper (1987, Dev. Biol. 121 :1-9). As células BRL estão disponíveis junto ao número de acesso ATCC CRL-1442. O meio condicionado pode ser suplementado com soro animal e fatores de crescimento exógenos, conforme descrito abaixo.

[047] O termo "fatores de crescimento", para uso na presente invenção, significa o fator de crescimento necessário para a sobrevivência e o crescimento das células ES de aves indiferenciadas em cultura, em um meio de cultura basal. É possível distinguir esquematicamente duas famílias de fatores de crescimento: as citocinas e os fatores tróficos. As citocinas são principalmente as citocinas cuja ação é através de um receptor que é associado à proteína gp130. Deste modo, o fator inibitório de leucemia (LIF), interleucina 11, interleucina 6, receptor de interleucina 6, fator neurotrófico ciliar (CNTF), oncostatina e cardiotrofina têm um modo similar de ação com o recrutamento no nível do receptor de uma cadeia específica e a combinação da citada por último com a proteína gp130 na forma monomérica ou, às vezes, heterodimérica. Os fatores tróficos são, principalmente, o fator de célula-tronco (SCF), fator de crescimento de insulina 1 (IGF-1) e fator de crescimento fibroblasto (FGF), de preferência, FGF básico (bFGF) ou FGF humano (hFGF).

[048] O meio de cultura completo, de acordo com a invenção, compreende o meio de cultura basal, de preferência, o meio basal sintético, e pelo menos uma citocina cuja ação é através de um receptor que está associado à proteína gp130 e/ou pelo menos um dos fatores tróficos. Prefere-

se que o meio de cultura completo, de acordo com a invenção, compreenda o meio basal e pelo menos um fator de crescimento selecionado do grupo que consiste em fator inibitório de leucemia (LIF), oncostatina, cardiotrofina, fator de crescimento de insulina 1 (IGF-1), fator neurotrófico ciliar (CNTF), interleucina 6 (IL-6), receptor de interleucina 6 (IL-6R), fator de célula-tronco (SCF), fator de crescimento fibroblasto (FGF), interleucina 11 (IL-11). De acordo com uma primeira modalidade preferida, o meio de cultura completo é o meio basal suplementado com soro animal e com pelo menos IGF-1 e CNTF. De acordo com uma segunda modalidade preferida, o meio de cultura completo é o meio basal suplementado com o soro animal e pelo menos IGF-1, CNTF, IL-6 e IL-6R. De acordo com uma terceira modalidade preferida, o meio de cultura completo é o meio basal suplementado com soro animal e pelo menos IGF-1, CNTF, IL-6, IL-6R, SCF, FGF. De acordo com outra modalidade, o meio de cultura completo é um meio de cultura condicionado que compreende os fatores de crescimento (isto é, expressos por células BRL ou STO, por exemplo) e, opcionalmente, suplementado com pelo menos um dos fatores de crescimento exógenos selecionados no grupo que compreende: LIF, IGF-1, CNTF, IL-6, IL-6R, SCF, FGF, IL-11. A concentração dos fatores de crescimento IGF-1, CNTF, IL-6, IL-6R, SCF, FGF, IL-11 no meio basal ou no meio de cultura condicionado é compreendida entre cerca de 0,01 a 10 ng/ml, de preferência, 0,1 a 5 ng/ml e, com mais preferência, cerca de 1 ng/ml.

[049] Além disso, o meio de cultura da invenção pode compreender adicionalmente antibióticos, tais como, por exemplo, gentamicina, penicilina e estreptomicina, para evitar a contaminação bacteriana. Os antibióticos podem ser adicionados ao meio de cultura nas passagens precoces da cultura de células ES. Por exemplo, pode ser adicionada ao meio de cultura a gentamicina a uma concentração final de 10 ng/ml, a penicilina a uma concentração final de 100 U/ml e a estreptomicina a

uma concentração final de 100 µg/ml. Em uma modalidade preferida, os antibióticos não são adicionados ao meio de cultura durante as últimas etapas do processo de estabelecimento de linhagens de células aviárias diplóides contínuas da invenção.

[050] Durante o processo de estabelecimento de células-tronco embrionárias aviárias da invenção, as células são cultivadas sobre uma camada de células alimentadoras. Com mais preferência, as células alimentadoras são células animais ou linhagens de células cultivadas com o propósito da cultura de células ES de aves. Alternativamente, as células alimentadoras podem ser substituídas por fatores de crescimento ligados mais matriz extracelular. A matriz alimentadora irá, posteriormente, se referir às células alimentadoras ou matriz extracelular. Uma matriz alimentadora, para uso na presente invenção, é construída de acordo com os procedimentos conhecidos na técnica. Conforme observado acima, prefere-se que a matriz alimentadora seja pré-condicionada. O termo "pré-condicionada" significa que a matriz alimentadora é cultivada na presença de meios por um período de tempo antes do depósito de células que se originam a partir dos ovos de aves fertilizados de disco blastoderme em contato com a matriz alimentadora, por exemplo, um tempo suficiente para iniciar e estabelecer a produção, por exemplo, de fatores de crescimento ou outros fatores pela matriz alimentadora; usualmente, uma matriz alimentadora é pré-condicionada por meio da cultura da matriz alimentadora, por si própria, por um a dois dias antes do depósito de células que se originam a partir dos ovos de aves fertilizados de disco blastoderme em contato com a matriz alimentadora. Prefere-se que as células alimentadoras compreendam células de fibroblasto de camundongo. Os fibroblastos STO são preferidos, mas os fibroblastos primários são também adequados. Além disso, enquanto que a presente invenção tem sido descrita em relação ao uso de matrizes alimentadoras de células de camundongo,

deve-se observar que podem ser usadas as matrizes alimentadoras que compreendem células de outras espécies de murídeos (por exemplo, rato); outras espécies de mamíferos (por exemplo, espécies unguladas, bovina, suína); ou espécies aviárias (por exemplo, galináceo, galinha, peru, pato, ganso, codorna, faisão). Em outra modalidade, as células alimentadoras da invenção podem ser transfectadas com vetor(es) de expressão que permitem, por exemplo, a expressão constitutiva de fatores de crescimento, tais como células STO em SCF de aves. Deste modo, este "alimentador" produz o fator em uma forma na qual é solúvel e/ou fixado na membrana plasmática das células. Portanto, o processo de cultura da presente invenção pode compreender, opcionalmente, o estabelecimento de uma monocamada de células alimentadoras. As células alimentadoras são mitoticamente inativas com o uso de técnicas padrão. Por exemplo, as células alimentadoras podem ser expostas à radiação gama ou X (por exemplo, 4000 rads de radiação gama) ou podem ser tratadas com mitomicina C (por exemplo, 10 µg/ml por 2 a 3 horas). Os procedimentos para a inativação de células de modo mitótico são também detalhados na informação tipicamente enviada com as células a partir da coleção de culturas do tipo americana (American Type Culture Collection (ATCC)), 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209 (por exemplo, as células alimentadoras STO estão disponíveis sob o número de acesso ATCC 1503). As monocamadas podem, opcionalmente, ser cultivadas a cerca de 80 % de confluência, de preferência, a cerca de 90 % de confluência e, com mais preferência, cerca de 100 % de confluência. Enquanto que a configuração das células alimentadoras, como uma monocamada, é a configuração preferida para a cultura, observa-se que qualquer configuração adequada está dentro do escopo da presente invenção. Deste modo, observa-se, por exemplo, que as camadas, monocamadas, agrupamentos, agregados ou outras associações ou grupos de células alimentadoras incluem-se no

escopo da presente invenção e incorrem no significado do termo “matriz”.

[051] O meio de cultura da invenção é suplementado com soro animal. Prefere-se que o soro animal usado seja soro animal fetal. O soro bovino fetal é preferido. Além disso, enquanto que a presente invenção tem sido descrita em relação ao uso do soro bovino fetal, deve-se observar que pode ser usado o soro animal que compreende soro a partir de outras espécies animais (por exemplo, galinha, cavalo, porco, ungulado, etc.). A concentração final de soro animal no meio de cultura é compreendido entre aproximadamente 1 a 25 %, de preferência, entre 5 % a 20 %, com mais preferência, entre 8% e 12 %. Na modalidade preferida, a concentração final de soro animal no meio de cultura é de aproximadamente 10 %. De acordo com uma modalidade preferida, o meio de cultura compreende aproximadamente 10 % de soro de bezerro fetal.

[052] Em uma primeira modalidade preferida, o pássaro da presente invenção é selecionado da ordem de Anseriformes e é, de preferência, um pato, com mais preferência, um pato Pekin e, com mais preferência, cepa de pato Pekin GL30 ou M14. De acordo com uma segunda modalidade preferida, o pássaro da presente invenção é um pato Muscovy. Portanto, a atual invenção fornece um primeiro processo para a obtenção de linhagens de células de pato diplóides contínuas derivadas de células-tronco embrionárias (ES), sendo que as ditas linhagens de células de pato não produzem partículas de retrovírus endógenas de replicação-competente, e o dito processo compreende as etapas de:

a) isolamento de embrião(ões) de pato em oviposição (isto é, colocação do ovo) um pouco antes ou após a oviposição. Opcionalmente, o ovo pode ser incubado, usualmente de um dia para o outro, para amadurecer (isto é, pato Muscovy);

b) suspensão de células-tronco (ES) embrionárias de pato obtidas

por meio da dissociação de embrião(ões) da etapa a) em um meio de cultura basal suplementado com fator de crescimento de insulina 1 (IGF-1 ), fator neurotrófico ciliar (CNTF), interleucina 6 (IL-6), receptor de interleucina 6 (IL-6R), fator de célula-tronco (SCF) e fator de crescimento fibroblasto (FGF) e soro animal;

c) semeadura da suspensão de células ES obtidas na etapa b) sobre uma camada de células alimentadoras e, ainda, a cultura das células ES de pato por pelo menos 1 passagem;

d) retirada de todos os fatores de crescimento selecionados do grupo que compreende IGF-1, CNTF, IL-6, IL-6R, SCF, FGF, a partir do meio de cultura, sobre uma faixa de 1 a cerca de 15 passagens, de preferência, simultaneamente sobre uma passagem, e, ainda, a cultura das células ES de pato por pelo menos uma passagem;

f) diminuição de forma progressiva da concentração de células alimentadoras no meio de cultura, de uma passagem a outra, a fim de se obter uma retirada total de camada alimentadora após diversas passagens, de preferência, após cerca de 5 a cerca de 25 passagens e, ainda, a cultura das células;

g) opcionalmente, a diminuição de forma progressiva da concentração de soro animal no meio de cultura, a fim de se obter uma retirada total de soro animal após diversas passagens; e

h) obtenção de linhagens de células de pato aderentes derivadas de células ES, denominadas EBx® de pato, capazes de proliferar em um meio basal na ausência de fatores de crescimento, camada alimentadora, opcionalmente, sem soro animal, sendo que as ditas linhagens de células de pato diplóides contínuas não produzem partículas de retrovírus endógenas de replicação-competente;

i) opcionalmente, adaptar, ainda, as linhagens de células de pato

aderentes às condições de cultura em suspensão. Os aditivos ao meio basal são retirados durante o processo e, de preferência, entre as etapas f) e g) ou entre as etapas g) e h).

[053] A concentração de soro animal na etapa b) é, de preferência, de 5 a 10 %. A concentração com fator de crescimento de insulina 1 (IGF-1), fator neurotrófico ciliar (CNTF), interleucina 6 (IL-6), receptor de interleucina 6 (IL-6R), fator de célula-tronco (SCF) e fator de crescimento fibroblasto (FGF) é, de preferência, de cerca de 1 ng/ml.

[054] A atual invenção fornece também um segundo processo para a obtenção de linhagens de células de pato diplóides contínuas derivadas de células-tronco embrionárias (ES), sendo que as ditas linhagens de células de pato não produzem partículas de retrovírus endógenas de replicação-competente, e o dito processo compreende as etapas de:

a) isolamento de embrião(ões) de pato em oviposição (isto é, colocação do ovo) um pouco antes ou após a oviposição. Opcionalmente, o ovo pode ser incubado, usualmente de um dia para o outro, para amadurecer (isto é, pato Muscovy);

b) suspensão de células-tronco (ES) embrionárias de pato obtidas por meio da dissociação de embrião(ões) da etapa a) em um meio de cultura basal suplementado com IGF-1, CNTF, IL-6, IL-6R, SCF e F e soro animal;

c) semeadura da suspensão de células ES obtidas na etapa b) sobre uma camada de células alimentadoras e, ainda, a cultura das células ES de pato por pelo menos 1 passagem;

d) retirada de todos os fatores de crescimento selecionados do grupo que compreende IL-6, IL-6R, SCF, FGF a partir do meio de cultura sobre uma faixa de 1 a cerca de 15 passagens, de preferência, simultaneamente sobre uma passagem, e, ainda, a cultura das células ES de pato por pelo menos uma passagem;

e) retirada dos fatores de crescimento IGF-1 e CNTF a partir do meio de cultura sobre uma faixa de 1 a cerca de 15 passagens, de preferência, simultaneamente sobre uma passagem, e, ainda, a cultura das células ES de pato por pelo menos uma passagem;

f) diminuição de forma progressiva da concentração de células alimentadoras no meio de cultura, a fim de se obter uma retirada total de camada alimentadora após diversas passagens, de preferência, após cerca de 5 a cerca de 25 passagens e, ainda, a cultura das células;

g) opcionalmente, a diminuição de forma progressiva da concentração de soro animal no meio de cultura, a fim de se obter uma retirada total de soro animal após diversas passagens; e

h) obtenção de linhagens de células de pato aderentes derivadas de células ES, denominadas EBx® de pato, capazes de proliferar em um meio basal, na ausência de fatores de crescimento, camada alimentadora, opcionalmente, sem soro animal, sendo que as ditas linhagens de células de pato diplóides contínuas não produzem partículas de retrovírus endógenas de replicação-competente;

i) opcionalmente, adaptar, ainda, as linhagens de células de pato aderentes às condições de cultura em suspensão. Os aditivos ao meio basal são retirados durante o processo e, de preferência, entre as etapas f) e g) ou entre as etapas g) e h).

[055] A concentração de soro animal na etapa b) é, de preferência, de 5 a 10 %. A concentração de IGF-1, CNTF, IL-6, IL-6R, SCF e FGF é, de preferência, de cerca de 1 ng/ml.

[056] A atual invenção fornece também um terceiro processo para a obtenção de linhagens de células de pato diplóides contínuas derivadas de células-tronco embrionárias (ES), sendo que as ditas linhagens de células de pato não produzem partículas de retrovírus endógenas de replicação-

competente, e o dito processo compreende as etapas de:

a) isolamento de embrião(ões) de pato em oviposição (isto é, colocação do ovo) um pouco antes ou após a oviposição. Opcionalmente, o ovo pode ser incubado, usualmente de um dia para o outro, para amadurecer (isto é, pato Muscovy);

b) suspensão de células-tronco (ES) embrionárias de pato obtidas por meio da dissociação de embrião(ões) da etapa a) em um meio de cultura basal suplementado com fator de crescimento de insulina 1 (IGF-1 ), fator neurotrófico ciliar (CNTF) e soro animal;

c) semeadura da suspensão de células ES obtidas na etapa b) sobre uma camada de células alimentadoras e, ainda, a cultura das células ES de pato por pelo menos 1 passagem;

d) retirada dos fatores de crescimento IGF-1 e CNTF, a partir do meio de cultura, sobre uma faixa de 1 a cerca de 15 passagens, de preferência, simultaneamente sobre uma passagem, e, ainda, a cultura das células ES de pato por pelo menos uma passagem;

f) diminuição de forma progressiva da concentração de células alimentadoras no meio de cultura a fim de se obter uma retirada total de camada alimentadora após diversas passagens, de preferência, após cerca de 5 a cerca de 25 passagens e, ainda, a cultura das células;

g) opcionalmente, diminuição de forma progressiva da concentração de soro animal no meio de cultura, a fim de se obter uma retirada total de soro animal após diversas passagens; e

h) obtenção de linhagens de células de pato aderentes derivadas de células ES, denominadas EBx® de pato, capazes de proliferar em um meio basal na ausência de fatores de crescimento, camada alimentadora, opcionalmente, sem soro animal, sendo que as ditas linhagens de células aviárias diplóides contínuas não produzem partículas de retrovírus endógenas

de replicação-competente;

i) opcionalmente, adaptar, ainda, as linhagens de células EBx® de pato aderentes às condições de cultura em suspensão.

[057] Os aditivos ao meio basal são retirados durante o processo e, de preferência, entre etapas f) e g) ou entre as etapas g) e h).

[058] A concentração de soro animal na etapa b) é, de preferência, de 5 a 10 %. Prefere-se que a concentração de IGF-1 e CNTF seja de cerca de 1 ng/ml.

[059] Uma vez que as linhagens de células de pato de suspensão ou aderente tenham sido obtidas, o processo da invenção pode compreender também a etapa adicional de adaptação das células EBx® de pato para o crescimento no meio de cultura de célula, sem o hidrolisado de proteína de origem não animal, tal como hidrolisados de levedura.

[060] Prefere-se que as linhagens de células EBx® de pato da invenção não exibam a atividade de transcriptase reversa por meio da análise Q-PERT. Além disso, nenhuma partícula de retrovírus endógenas de replicação-competente são produzidas pelas células EBx® de pato, conforme demonstrado pelos experimentos de co-cultura de células EBx® de pato da invenção, com células de replicação-competente de ALV, tais como células QT6 de codorna ou células DF1 de galinha. Adicionalmente, a análise de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) demonstra também a ausência de partículas de retrovírus endógenas de replicação-competente em células EBx® de pato. Prefere-se que a linhagem de célula EBx® de pato da invenção seja selecionada entre pato EB24, pato EB26 e pato EB66, conforme descrito daqui por diante.

[061] Em outra modalidade preferida, o pássaro da presente invenção é selecionado da ordem dos Galliformes e, com mais preferência, é uma galinha, de preferência, uma galinha doméstica ev-0 (subespécies Gallus

Gallus domesticus). Portanto, a atual invenção fornece um processo para a obtenção de linhagens de células de galinha doméstica ev-0 diplóides contínuas derivadas de células-tronco embrionárias (ES), sendo que as ditas linhagens de células de galinha doméstica ev-0 não produzem partículas de retrovírus ALV-E endógenas de replicação-competente e o dito processo compreende as etapas de:

a) isolamento de embrião(ões) de galinha doméstica ev-0 em oviposição (isto é, colocação do ovo) um pouco antes ou após a oviposição;

b) suspensão células-tronco (ES) embrionárias de galinha doméstica ev-0 obtidas por meio da dissociação de embrião(ões) da etapa a) em um meio de cultura basal suplementado com IGF-1, CNTF, IL-6, IL-6R, SCF e FGF e soro animal;

c) semeadura da suspensão de células ES obtidas na etapa b) sobre uma camada de células alimentadoras e, ainda, a cultura das células (ES) de galinha doméstica ev-0 por pelo menos 1 passagem;

d) retirada de todos os fatores de crescimento selecionados do grupo que compreende IGF-1, CNTF, IL-6, IL-6R, SCF, FGF, a partir do meio de cultura, sobre uma faixa de 1 a cerca de 15 passagens, de preferência, simultaneamente sobre uma passagem, e, ainda, a cultura das células (ES) de galinha por pelo menos uma passagem;

f) diminuição de forma progressiva da concentração de células alimentadoras no meio de cultura, a fim de se obter uma retirada total de camada alimentadora após diversas passagens, de preferência, após cerca de 5 a cerca de 25 passagens, e, ainda, a cultura das células;

g) opcionalmente, a diminuição de forma progressiva da concentração de soro animal no meio de cultura, a fim de se obter uma retirada total de soro animal após diversas passagens e

h) obtenção de linhagens de células de galinha doméstica ev-0

aderentes derivadas de células ES, denominadas EBx ev-0, capazes de proliferar em um meio basal na ausência de fatores de crescimento, camada alimentadora, opcionalmente, sem soro animal, sendo que as ditas linhagens de células aviárias diplóides contínuas não produzem partículas de retrovírus ALV-E endógenas de replicação-competente;

i) opcionalmente, adaptar, ainda, EBx ev-0 de linhagens de células aviárias aderentes às condições de cultura em suspensão.

[062] Os aditivos ao meio basal são retirados durante o processo e, de preferência, entre as etapas f) e g) ou entre as etapas g) e h)

[063] A concentração de soro animal na etapa b) é, de preferência, de 5 a 10 %. Prefere-se que a concentração de IGF- 1, CNTF, IL-6, IL-6R, SCF e FGF seja de cerca de 1 ng/ml.

[064] A atual invenção fornece também um segundo processo para a obtenção de linhagens de células de galinhas domésticas ev-0 diplóides contínuas derivadas de células-tronco embrionárias (ES), sendo que as linhagens de células de galinhas domésticas ev-0 não produzem partículas de retrovírus ALV-E endógenas de replicação-competente, e o dito processo compreende as etapas de:

a) isolamento de embrião(ões) de galinha doméstica ev-0 em oviposição (isto é, colocação do ovo), um pouco antes ou após a oviposição;

b) suspensão de células-tronco (ES) embrionárias de galinha doméstica ev-0 obtidas por meio da dissociação de embrião(ões) da etapa a) em um meio de cultura basal suplementado com IGF-1, CNTF, IL-6, IL-6R, SCF e FGF e soro animal;

c) semeadura da suspensão de células ES obtidas na etapa b) sobre uma camada de células alimentadoras e, ainda, a culturas das células (ES) de galinha doméstica ev-0 por pelo menos 1 passagem;

d) retirada de todos os fatores de crescimento selecionados do

grupo que compreende IL-6, IL-6R, SCF, FGF, a partir do meio de cultura, sobre uma faixa de 1 a cerca de 15 passagens, de preferência, simultaneamente sobre uma passagem e, ainda, a cultura das células (ES) de galinha por pelo menos uma passagem;

e) retirada dos fatores de crescimento IGF-1 e CNTF, a partir do meio de cultura, sobre uma faixa de 1 a cerca de 15 passagens, de preferência, simultaneamente sobre uma passagem e, ainda a cultura das células (ES) de galinha doméstica ev-0 por pelo menos uma passagem;

f) diminuição de forma progressiva da concentração de células alimentadoras, no meio de cultura, a fim de se obter uma retirada total de camada alimentadora após diversas passagens, de preferência, após cerca de 5 a cerca de 45 passagens, e, ainda, a cultura das células;

g) opcionalmente, a diminuição de forma progressiva da concentração de soro animal no meio de cultura, a fim de se obter uma retirada total de soro animal após diversas passagens e

h) obtenção de linhagens de células de galinha doméstica ev-0 aderentes, derivadas de células ES, capazes de proliferar em um meio basal na ausência de fatores de crescimento, camada alimentadora, opcionalmente, sem soro animal, sendo que as ditas linhagens de células de galinhas domésticas ev-0 diplóides contínuas, denominadas EBx® de galinha, não produzem partículas de retrovírus endógenas de replicação-competente;

i) opcionalmente, adaptar, ainda, as linhagens de células de galinha doméstica ev-0 aderentes às condições de cultura em suspensão.

[065] Os aditivos ao meio basal são retirados durante o processo e, de preferência, entre as etapas f) e g) ou entre as etapas g) e h).

[066] A concentração de soro animal na etapa b) é, de preferência, de 5 a 10 %. Prefere-se que a concentração de IGF-1, CNTF, IL-6, IL-6R, SCF e FGF seja de cerca de 1 ng/ml.

[067] A atual invenção fornece também um terceiro processo para a obtenção de linhagens de células de galinhas domésticas ev-0 diplóides contínuas derivadas de células-tronco embrionárias (ES), sendo que as linhagens de células de galinhas domésticas ev-0 não produzem partículas de retrovírus ALV-E endógenas de replicação-competente e o dito processo compreende as etapas de:

a) isolamento de embrião(ões) de galinha doméstica ev-0 em oviposição (isto é, colocação do ovo), um pouco antes ou após a oviposição;

b) suspensão de células-tronco (ES) embrionárias de galinha doméstica ev-0 obtidas por meio da dissociação de embrião(ões) da etapa a) em um meio de cultura basal suplementado com IGF-1 e CNTF e soro animal;

c) semeadura da suspensão de células ES obtidas na etapa b) sobre uma camada de células alimentadoras e, ainda, a cultura das células (ES) de galinha doméstica ev-0 por pelo menos 1 passagem;

d) retirada dos fatores de crescimento IGF-1 e CNTF, a partir do meio de cultura, sobre uma faixa de 1 a cerca de 15 passagens, de preferência, simultaneamente sobre uma passagem e, ainda, a cultura das células (ES) de galinha doméstica ev-0 por pelo menos uma passagem;

f) diminuição de forma progressiva da concentração de células alimentadoras, no meio de cultura, a fim de se obter uma retirada total de camada alimentadora após diversas passagens, de preferência, após cerca de 5 a cerca de 45 passagens, e, ainda, a cultura das células;

g) opcionalmente, a diminuição de forma progressiva da concentração de soro animal no meio de cultura, a fim de se obter uma retirada total de soro animal após diversas passagens; e

h) obtenção de linhagens de células de galinha doméstica ev-0 aderentes derivadas de células ES, denominadas EBx® ev-0 de galinha, capazes de proliferar em um meio basal na ausência de fatores de

crescimento, camada alimentadora, opcionalmente, sem soro animal, sendo que as ditas linhagens de células de galinhas diplóides contínuas não produzem partículas de retrovírus endógenas de replicação-competente;

i) opcionalmente, adaptar, ainda, as linhagens de células de galinha doméstica ev-0 aderentes às condições de cultura em suspensão.

[068] Os aditivos ao meio basal são retirados durante o processo e, de preferência, entre as etapas f) e g) ou entre as etapas g) e h).

[069] A concentração de soro animal na etapa b) é, de preferência, de 5 a 10 %. Prefere-se que a concentração de IGF-1 e CNTF seja de cerca de 1 ng/ml.

[070] Em outra modalidade preferida, o pássaro da presente invenção is a galinhas doméstica (subespécies Gallus Gallus domesticus) obtida a partir de um bando livre de patógeno específico (SPF). Com mais preferência, a linhagem de galinha consiste em Leghorn branca. Os ovos de galinha SPF têm sido examinados pela ausência de vírus e patógenos bacterianos de galinha conhecidos, que incluem o vírus da reticuloendoteliase (REV) e o vírus da leucose exógeno de aves (ALV-A, ALV-B, ALV-C, ALV-D, ALV-J). O ovo SPF da invenção pode consistir em ovos VALO de LOHMANN (Cuxhaven, Alemanha) ou ovos L22 de CHARLES RIVER (Spafas). Portanto, a atual invenção fornece também processos para a obtenção de linhagens de células de galinhas diplóides contínuas derivadas de células-tronco embrionárias (ES) obtidas a partir de ovos de galinha SPF, conforme descrito com os ovos de galinha ev-0. Prefere-se que a linhagem de célula EBx® de galinha obtida a partir de ovos SPF seja EBv13.

[071] As linhagens de células EBx® de galinha da invenção podem exibir a atividade de transcriptase reversa por meio da análise Q-PERT, mas sem produzir partículas de retrovírus endógenas de replicação-competente. A ausência de partículas de retrovírus endógenas de replicação-

competente pode ser demonstrada por meio de experimentos de co-cultura de células ev-0 EBx® de galinha da invenção com células de replicação-competente de ALV, tais como células QT6 de codorna ou células DF1 de galinha. Adicionalmente, a ausência de partículas de retrovírus endógenas em células em células ev-0 EBx® de galinha pode ser também demonstrada por meio de TEM.

[072] A temperatura do corpo do pássaro é usualmente em torno de 39°C. Portanto, os processos da invenção podem compreender também a etapa adicional de diminuição da temperatura de cultura de célula para 37°C, com a finalidade de adaptar as linhagens de células aviárias da invenção para crescerem a 37°C. Prefere-se que a adaptação de temperatura seja executada após a depleção de alimentador e antes da depleção de soro. Alternativamente, a adaptação de temperatura é executada após a etapa de depleção de soro ou após a etapa de adaptação das linhagens de células à cultura de suspensão.

[073] As EBx® de linhagens estabelecidas da invenção têm a característica de crescer como células aderentes ou células em suspensão em um meio de cultura livre de fatores de crescimento exógenos e soro animal, e sem células alimentadoras. As diferentes técnicas podem ser usadas sozinhas ou em combinação para adaptar as células à cultura de suspensão, entre elas:

- As células aderentes são semeadas a alta densidade celular, levemente acima da confluência celular para forçar as células a entrarem em suspensão;

- As células aderentes são semeadas em um meio de cultura de célula com uma baixa concentração de soro animal;

- As células aderentes são semeadas em vasos de cultura de célula feitos de plástico que não permitem a adesão de célula ou uma adesão de célula fraca, tais como placas e pratos bacterianos, e placas de fixação

ultra-baixa desenvolvidas por companhias como Corning (placas e pratos de cultura de tecido Ref. 3262, 3473, 3471, 3474; frascos Ref. 3814...) ou Sarstedt (frascos ref 831810502...);

- As células aderentes são semeadas em vasos e cultivadas sob agitação (aproximadamente 50 rpm).

[074] As células EBx®, de preferência, EBx® de pato e EBx® ev-0 de galinha, podem ser cultivadas in vitro durante um período de tempo considerável. Vantajosamente, as células EBx® independentes de ancoragem ou aderentes (isto é, "suspensas"), obtidas por meio do processo da invenção, são capazes de proliferar por pelo menos 50 gerações, pelo menos 75 gerações, pelo menos 100 gerações, pelo menos 125 gerações, pelo menos 150 gerações, pelo menos 175 gerações, pelo menos 200 gerações, pelo menos 250 gerações. Compreende-se que a expressão " linhagem" significa qualquer população de células capazes de proliferar indefinidamente em cultura in vitro, enquanto que se mantém um grau inferior ou maior das mesmas características fenotípicas e morfológicas. Os clones podem ser obtidos, por exemplo, por meio de diluição limite, a partir de células EBx® da invenção. Estes clones são células que são geneticamente idênticas à célula a partir da qual são derivadas por divisão.

[075] A presente invenção também se refere às linhagens de células aviárias diplóides contínuas, denominadas EBx®, obteníveis por meio do processo da invenção, sendo que as ditas EBx® são células individualizadas redondas (isto é, diâmetro em torno de 10 µm), pequenas, com um tempo de duplicação de cerca de 30 horas ou menos, a 37°C ou 39°C. As células EBx® aviárias, de preferência, a EBx® de pato ou EBx® ev-0 de galinha, expressam um fenótipo de célula-tronco embrionária com as seguintes características:

- alta razão núcleo-citoplasmático,

- atividade de telomerase endógena,
- opcionalmente, expressa um ou mais marcadores de ES adicionais, tais como marcadores fosfatase alcalina, SSEA-1 , EMA-1 , ENS1.
- tempo de duplicação mais curto do que o tempo de duplicação das células ES de aves da etapa a) do processo da invenção (48h às 72h, a 39°C), de cerca de 30 horas ou menos (de preferência, 24 horas) a 37°C.

[076] As ditas células não produzem partículas de retrovírus endógenas de replicação-competente.

[077] As linhagens de células EBx® aviárias da invenção são capazes de proliferar indefinidamente em um meio basal, em particular em um meio, tal como meios SAFC Excell, DMEM, GMEM, DMEM- HamF12 e McCoy, livre de fatores de crescimento exógenos, soro e/ou camada alimentadora inativa, opcionalmente, complementado com diversos aditivos comumente usados por versados na técnica. Os exemplos de aditivos são aminoácidos não essenciais, vitaminas, piruvato de sódio e antibióticos. As células EBx® de pato da invenção têm a característica notável que consiste em crescer em um meio de cultura basal que não é complementado com glutamina.

[078] A presente invenção também se refere a um meio de cultura de célula para manter as células-tronco embrionárias aviárias pluri- ou multipotentes, de preferência células-tronco (ES) embrionárias de pato pluri- ou multipotentes, na cultura em um estado indiferenciado. De acordo com uma modalidade preferida, a presente invenção refere-se ao meio de cultura de célula para células-tronco embrionárias de pato que compreende um meio de cultura basal, suplementado com soro animal e suplementado com pelo menos IGF-1 e CNTF. De acordo com uma segunda modalidade preferida, a presente invenção refere-se ao meio de cultura de célula para células-tronco embrionárias de pato que compreende um meio de cultura basal suplementado com soro animal e suplementado com pelo menos IGF-1, CNTF, II-6, II-6R. De

acordo com uma terceira modalidade preferida, a presente invenção refere-se a um meio de cultura de célula para células-tronco embrionárias de pato que compreende um meio de cultura basal suplementado com soro animal e suplementado com pelo menos IGF-1, CNTF, II-6, II-6R, SCF e FGF. Os ditos meios são suficientes para a manutenção das ditas células ES de pato na cultura por pelo menos 7 dias, de preferência, por pelo menos 20 dias, de preferência, por pelo menos 100 dias em um estado indiferenciado. Os ditos meios de cultura da invenção ainda podem compreender, opcionalmente, pelo menos um composto selecionado do grupo que compreende interleucina-11, cardiotrofina, oncostatina e fator inibitório de leucemia (LIF). Prefere-se que os ditos meios de cultura compreendam, ainda, hidrolisado de proteína de origem não animal, conforme descrito anteriormente; com mais preferência, que seja o hidrolisado de levedura a 1X de concentração. O meio de cultura de células ES de aves (de preferência, pato) da invenção pode compreender, ainda, uma camada de células alimentadoras.

[079] A atual invenção fornece também uma cultura de célula ES de pato prolongada que consiste essencialmente de células ES de pato indiferenciadas que expressam o fenótipo de célula-tronco com as seguintes características:

- uma alta razão núcleo-citoplasmático,
- uma atividade de telomerase endógena,
- opcionalmente, as células ES de pato podem expressar um ou mais marcadores de ES adicionais, tais como marcadores fosfatase alcalina, SSEA-1, EMA-1, ENS1.
- um tempo de duplicação em torno de 40 horas a 37°C ou 39°C.

[080] As ditas células de pato indiferenciadas, de acordo com a invenção, são capazes de manter o dito fenótipo de célula-tronco quando crescem sobre células alimentadoras em um meio de cultura de célula para

células-tronco embrionárias de pato, conforme descrito anteriormente. As ditas células de pato indiferenciadas são úteis para produzir patos transgênicos ou quiméricos.

[081] Portanto, a presente invenção também se refere a um método de obtenção de pato quimérico, sendo que o dito método compreende as etapas de:

a) introdução de uma cultura de célula ES de pato prolongada, conforme descrito acima, na cavidade subgerminal de um embrião de pato recipiente; e

b) incubação do embrião obtido na etapa a) para chocar como um pato novo;

c) seleção do dito pato novo quimérico que compreende células heterólogas tendo colonizado o dito pato novo.

A presente invenção se refere também a um método de obtenção de pato quimérico geneticamente modificado, que compreende as etapas de:

a) introdução de umas células ES de pato geneticamente modificadas, conforme descrito acima, na cavidade subgerminal de um embrião de pato recipiente; e

b) incubação do embrião obtido na etapa a) para chocar como um pato novo;

c) seleção do dito pato novo quimérico que compreende células heterólogas geneticamente modificadas que tenham colonizado o dito pato novo.

[082] A presente invenção se refere também a um método de obtenção de uma progênie do dito pato novo quimérico, sendo que o dito método compreende as seguintes etapas:

a) permitir que o pato novo quimérico selecionado obtido nas etapas c) amadureça como um pássaro adulto;

b) reprodução do dito pássaro adulto que tem células heterólogas neste, produzindo com isso uma progênie de pássaro;

c) seleção dos pássaros de interesse na progênie.

[083] A invenção pode compreender a etapa adicional da expressão de um polipeptídeo heterólogo codificado por um vetor de expressão compreendido nas ditas células ES de pato geneticamente modificadas. Prefere-se que o polipeptídeo heterólogo seja liberado no fluido biológico de pato, tal como sangue, esperma, urina ou o branco de um ovo de ave em desenvolvimento produzido por uma fêmea do pato geneticamente modificado.

[084] Todas as células EBx® da invenção têm as características mencionadas acima e são úteis para a produção de biológicas, tais como vacinas virais, peptídeos recombinantes e proteínas.

[085] A atual invenção fornece também um processo de replicação de um vírus nas linhagens de células EBx® aviárias diplóides contínuas da invenção. Com mais preferência, a invenção fornece um processo de replicação de um vírus nas linhagens de células EBx® aviárias diplóides contínuas da invenção, de preferência, linhagens de células EBx® de galinha ou pato, que compreende as etapas de:

infecção de uma cultura de célula EBx® aviária com um vírus de interesse; sendo que as ditas células EBx® aviárias são de preferência cultivadas no meio livre de soro animal;

cultura das células EBx® aviárias infectadas, a fim de replicar os dito vírus;

coleta do vírus no sobrenadante da cultura de célula e/ou dentro das ditas células.

[086] De acordo com uma modalidade preferida, o dito processo compreende as etapas de:

a) proliferação da EBx® aviárias em um vaso de cultivo, em

suspensão, em um meio livre de soro nº 1;

b) infecção das ditas células com o vírus selecionado, quando a densidade celular for de pelo menos 1,5 milhões de células/ml;

c) opcionalmente, um pouco antes da infecção, simultaneamente à infecção ou imediatamente após a infecção, adicionar ao meio livre de soro de cultura de célula nº 2; e

d) a cultura adicional das ditas células infectadas a fim de permitir a replicação do vírus; e

e) opcionalmente, a coleta do dito vírus.

[087] O dito processo da invenção pode compreender a etapa adicional de adição de enzima proteolítica no meio de cultura, em condições que permitem a propagação do vírus. A enzima proteolítica é selecionada a partir do grupo que consiste em tripsina, quimotripsina, termolisina, pepsina, pancreatina, papaína, pronase, subtilisina A, elastase, furina e carboxipeptidase. De acordo com uma modalidade preferida, a enzima é tripsina. Prefere-se que a enzima proteolítica seja uma proteína recombinante produzida em um hospedeiro procaríoto ou em vegetais (isto é, tripzina). A enzima proteolítica pode ser adicionada antes, durante e/ou depois da infecção do vírus. Prefere-se que a adição de enzima proteolítica seja executada após a infecção do vírus. A adição de enzima proteolítica no meio de cultura pode ser executada uma vez por dia, mais do que uma vez por dia ou menos que uma vez por dia até a coleta do vírus.

[088] O termo "vírus", para uso na presente invenção, inclui não somente os vírus que ocorrem naturalmente, mas também os vírus atenuados, vírus recombinados, cepas de vacina, assim como os vírus recombinantes e vetores virais derivados dos mesmos. Prefere-se que os vírus da invenção sejam selecionados do grupo que compreende poxvírus, ortomixovírus, paramixovírus, vírus de herpes, hepadnavírus, adenovírus, parvovírus,

reovírus, circovírus, coronavírus, flavivírus, togavírus, birnavírus e retrovírus.

[089] Em uma modalidade preferida, os vírus, os vetores virais relacionados, partículas virais e vacinas virais pertencem à família de poxviridae e, com mais preferência, ao cordopoxviridae. Em uma modalidade, os vírus ou vetores virais relacionados, partículas virais e vacinas virais são um poxvírus, de preferência, um avipoxvírus selecionado entre poxvírus de galinha (isto é, TROVAC), poxvírus de canário (isto é, ALVAC), poxvírus de junco, poxvírus de mainata, poxvírus de pombo, poxvírus de psittacine, poxvírus de codorna, poxvírus de pardal, poxvírus de estorninho, poxvírus de peru. De acordo com outra modalidade preferida, o vírus é um vírus de varíola selecionado entre cepa de vírus de varíola Lister-Elstree, vírus de varíola modificado, tal como vírus de varíola modificado de Ankara (MVA), o qual pode ser obtido junto a ATCC (ATCC número VR-1508), NYVAC (Tartaglia et al., 1992, *Virology*, 188:217-232), LC16m8 (Sugimoto et Yamanouchi, 1994, *Vaccine*, 12:675-681 ), CVI78 (Kempe et al., 1968, *Pediatrics* 42:980-985) e outros vírus de varíola recombinantes ou não-recombinantes.

[090] Em outra modalidade preferida, os vírus, os vetores virais relacionados, as partículas virais e vacinas pertencem à família de ortomixoviridae, em particular, o vírus influenza. O vírus influenza é selecionado a partir do grupo que consiste em vírus influenza humano, vírus influenza de aves, vírus influenza eqüino, vírus influenza suíno, vírus influenza felino. Prefere-se que o vírus influenza seja selecionado em cepas A, B e C. Entre as cepas A, uma pode se referir aos vírus com diferentes subtipos de hemaglutinina e neuraminidase, tal como, sem limitação, H1N1, H2N2, H3N2, H4N2, H4N6, H5N1, H5N2, H7N7 et H9N2. Entre as cepas H1N1, uma pode se referir a A/Porto Rico/8/34, A/Nova Caledônia/20/99, A/Beijing/262/95, A/Joanesburgo/282/96, A/Texas/36/91, A/Cingapura, A/Ilhas salomão/03/2006. Entre as cepas H3N2, uma pode se referir a A/Panamá/2007/99,

A/Moscú/10/99, A/Joanesburgo/33/94, A/Wisconsin/10/04. Entre as cepas B, uma pode se referir, sem limitação, a B/Porto Rico/8/34, B/Joanesburgo/5/99, B/Viena/1/99, B/Ann Arbor/1/86, B/Memphis/1/93, B/Harbin/7/94, N/Shandong/7/97, B/Hong Kong/330/01, B/Yamanashi/166/98, B/Jiangsu/10/03, B/Malásia. O vírus influenza da invenção é selecionado entre os vírus de ocorrência natural, isolado viral primário obtido a partir do indivíduo infectado, vírus recombinante, vírus atenuado, vírus sensível á temperatura, vírus adaptado á baixa temperatura, vírus recombinado, vírus criado por engenharia genética reversa. Quando o vírus da invenção é o vírus influenza, o processo da invenção compreende a etapa adicional de adição de enzima proteolítica no meio de cultura, sob condições que permitem a propagação do vírus. De acordo com uma modalidade preferida, a enzima é tripsina. A concentração final de tripsina no meio de cultura de célula é compreendida entre cerca de 0,01 µg/ml até 10 µg/ml. Com mais preferência, a concentração final de tripsina no meio de cultura de célula é compreendida entre 0,01 a 10 usp/ml (usp: unidade farmacopéia dos Estados Unidos - US pharmacopea unit) de preferência, entre cerca de 0,05 a 2 usp/ml, com mais preferência, entre cerca de 0,3 a 1 usp/ml e, com mais preferência, cerca de 0,75 usp/ml.

[091] Em outra modalidade preferida, os vírus, os vetores virais relacionados, as partículas virais e vacinas pertencem à família de paramixoviridae. Prefere-se que o vírus seja um paramixovírus de ocorrência natural ou um paramixovírus recombinante selecionado do grupo que compreende vírus de sarampo, vírus de caxumba, vírus de rubéola, vírus Sendai, vírus sincicial respiratório (RSV), parainfluenza humana dos tipos I e III, vírus Rinderpest, vírus de destempero canino, vírus de doença de Newcastle, vírus parainfluenza de pato. De acordo com a modalidade preferida, o vírus é o vírus de sarampo ou um vírus de sarampo recombinante. De acordo com outra modalidade preferida, o vírus é o vírus de doença de Newcastle (NDV) ou um

NDV recombinante. O exemplo de cepa de NDV é a cepa LaSota. Quando o vírus da invenção é NDV, o processo da invenção compreende, de preferência, a etapa adicional de adição de enzima proteolítica no meio de cultura, sob condições que permitem a propagação do vírus. De acordo com uma modalidade preferida, a enzima é tripsina. A concentração final de tripsina no meio de cultura de célula é compreendida entre cerca de 0,01 µg/ml até 10 µg/ml. Com mais preferência, a concentração final de tripsina no meio de cultura de célula é compreendida entre 0,01 a 10 usp/ml (usp: unidade farmacopéia dos Estados Unidos - US pharmacopea unit), de preferência, entre cerca de 0,3 a 1 usp/ml, com mais preferência, entre cerca de 0,4 a 0,75 usp/ml. De forma interessante, as linhagens de células EBx® da invenção que podem crescer em aderência são úteis para executar a titulação de vírus e, de preferência, a Titulação de NDV, em um ensaio de placa. De fato, ao contrário dos fibroblastos DF1 de galinha e CEFs para os quais não foi possível observar qualquer um dos efeitos citopáticos, o crescimento de vírus em células EBx® conduz a formação de células gigantes características. Adicionalmente, as partículas virais de NDV podem ser determinadas por meio do ensaio de hemaglutinação. Portanto, a invenção também diz respeito ao uso de células EBx® da invenção para a titulação de vírus, tais como vírus de NDV.

[092] Em outra modalidade preferida, os vírus, os vetores virais relacionados, as partículas virais e vacinas pertencem à família de togaviridae. Prefere-se que o vírus seja um alfavírus de ocorrência natural ou um alfavírus recombinante selecionado do grupo que compreende vírus Sinbis, vírus da floresta Semliki, vírus O'nyong'nyong, vírus Chikungunya, vírus de Mayaro, vírus do rio Ross, vírus de encefalite eqüina oriental, vírus de encefalite eqüina ocidental, vírus de encefalite eqüina venezuelana.

[093] Em outra modalidade preferida, os vírus, os vetores virais relacionados, as partículas virais e vacinas pertencem à família de

herpesviridae. Prefere-se que o vírus seja um vírus de doença de Marek de ocorrência natural ou um vírus de doença de Marek recombinante. O vírus de doença de Marek (MDV) é selecionado, de preferência, entre as cepas de vacina de licenciadas de MDV, tais como: FC126 (HTV), SB-1, 301 B/1, CVI988 Clone C, CV1988/C/R6, CVI988/Rispens, R2/23 (Md 11/75).

[094] Em outra modalidade preferida, os vírus, os vetores virais relacionados, as partículas virais e vacinas pertencem à família de hepadnaviridae. Prefere-se que o vírus seja hepadnavírus de ocorrência natural ou um hepadnavírus recombinante selecionado, de preferência, entre hepadnavírus humano e de aves. Prefere-se que o hepadnavírus de aves seja selecionado entre o grupo que consiste em vírus de hepatite B de pato (DHBV), vírus de hepatite B de garça (HHBV) e de ganso de neve (SGHBV).

[095] Em outra modalidade preferida, os vírus, os vetores virais relacionados, as partículas virais e vacinas pertencem à família de birnaviridae, em particular, vírus de doença bursal infecciosa.

[096] Em outra modalidade preferida, os vírus, os vetores virais relacionados, as partículas virais e vacinas pertencem à família de flaviviridae, em particular, vírus da Dengue, vírus de encefalite japonesa e vírus do Nilo ocidental.

[097] Em outra modalidade preferida, os vírus, os vetores virais relacionados, as partículas virais e vacinas pertencem à família de coronaviridae, em particular, vírus de bronquite infecciosa.

[098] Em outra modalidade preferida, os vírus, os vetores virais relacionados, as partículas virais e vacinas pertencem à família de circoviridae, em particular, vírus de anemia de galinha.

[099] Em outra modalidade preferida, os vírus, os vetores virais relacionados, as partículas virais e vacinas pertencem à família de retroviridae. Prefere-se que o vírus seja um retrovírus de ocorrência natural selecionado

entre vírus de reticuloendoteliose, vírus de anemia infecciosa de pato, vírus da necrose do baço ou um retrovírus recombinante dos mesmos.

[0100] Em outra modalidade preferida, os vírus, os vetores virais relacionados, as partículas virais e vacinas pertencem à família de parvoviridae. Prefere-se que o vírus seja um parvovírus de ocorrência natural, tal como parvovírus de pato ou um parvovírus recombinante do mesmo.

[0101] Em outra modalidade preferida, os vírus, os vetores virais relacionados, as partículas virais e vacinas pertencem à família de adenoviridae. Prefere-se que o vírus seja um adenovírus de ocorrência natural selecionado, de preferência, entre adenovírus de galinha, adenovírus de ganso, adenovírus de pato e adenovírus de pombo, ou um adenovírus recombinante dos mesmos. Os exemplos de Adenovírus de galinha consistem em adenovírus de galinha 1 (CELO), adenovírus de galinha 5 (340), adenovírus de galinha 4 (KR95), adenovírus de galinha 10 (CFA20), adenovírus de galinha 2 (P7-A), adenovírus de galinha 3 (75), adenovírus de galinha 9 (A2-A), adenovírus de galinha 11 (380), adenovírus de galinha 6 (CR1 19), adenovírus de galinha 7 (YR36), adenovírus de galinha 8a (TR59), adenovírus de galinha 8b (764) e vírus da síndrome da queda de postura. Os exemplos de adenovírus de ganso consistem em adenovírus de ganso 1, adenovírus de ganso 2, adenovírus de ganso 3. O exemplo de adenovírus de pato consiste em adenovírus de pato 2. O exemplo de adenovírus de pombo consiste em adenovírus de pombo 1.

[0102] Os vírus recombinantes incluem, mas não se limitam a, vetores virais que compreendem um gene heterólogo. Em algumas modalidades, uma função(ões) auxiliar(ES) para a replicação dos vírus é fornecida pela EBx® de célula hospedeira, um vírus auxiliar ou plasmídeo auxiliar. Os vetores representativos incluem, mas não se limitam a, aqueles que não infeccionam células aviárias ou de mamíferos.

[0103] A atual invenção se refere também ao uso de células

EBx® da invenção para replicar bactéria intracelular, tal como clamídia, rickettsia ou coxiella.

[0104] As células EBx® da invenção podem ser usadas também para produzir peptídeos e proteínas recombinantes. A invenção se refere também a um método de produção de peptídeos e proteínas recombinantes, que inclui as etapas de: (i) modificar geneticamente as células EBx® da invenção por meio da transfecção estável ou transiente de um vetor de expressão; (ii) opcionalmente, selecionar as células EBx® que expressão os ditos peptídeos ou proteínas recombinantes; (iii) purificar ditos peptídeos ou proteínas. Os peptídeos e proteínas produzidos em células EBx® são também incluídos na presente invenção.

[0105] O vaso de cultura da invenção é selecionado, com mais preferência, entre biorreator tanque agitado contínuo, biorreator Wave™, biorreator Bello™, frasco spinner, frasco e uma fábrica de células. Tipicamente, as células são escaladas a partir de um frasco de banco primário de células ou de células de trabalho através de diversos tamanhos de frascos T, garrafas roller ou biorreator Wave™ e, de preferência, finalmente aos biorreatores. A suspensão de célula resultante é, então, tipicamente alimentada em um biorreator de produção por semeadura (tipicamente, volume de 20 a 30l) para a cultura adicional, e em algumas modalidades, a um biorreator de produção maior (tipicamente, volume de 150 a 180l e acima). A razão de volume do segundo (maior) biorreator para o biorreator por semeadura depende do grau para o qual a linhagem de célula é propagada no primeiro biorreator, mas é tipicamente de 3:1 a 10:1, por exemplo, na faixa de (6 a 8):1. De acordo com uma modalidade preferida, o vaso de cultura é um biorreator tanque agitado contínuo que permite o controle de temperatura, aeração, pH e outras condições controladas, e o qual é equipado com entradas adequadas para a introdução das células, oxigênio estéril, diversos meios de cultura e saídas para

a remoção das células e meios, e meio para a agitação do meio de cultura no biorreactor.

[0106] De acordo com a presente invenção, o termo "meio livre de soro" (SFM) significa um meio de cultura de célula pronto para o uso, isto é, que não exige a adição de soro animal, permitindo a sobrevivência das células e o crescimento celular. Este meio não é necessariamente definido de forma química e pode conter hidrolisados de diversas origens, a partir de vegetais ou levedura, por exemplo. Prefere-se que o dito SFM seja de "origem não animal" qualificada, isto é, que não contém componentes de origem humana ou animal (estado FAO: "livre de origem animal"). Em SFM, as proteínas de soro nativo são substituídas por proteínas recombinantes. Alternativamente, o meio SFM, de acordo com a invenção, não contém proteína (meio PF: "livre de proteína") e/ou é quimicamente definido (meio CDM: "meio quimicamente definido"). Os meios SFM apresentam diversas vantagens: (i) a primeira de todas consiste no fato que é a conformidade regulatória de tais meios (na realidade não há risco de contaminação por agentes adventícios, tais como BSE, vírus); (ii) a otimização do processo de purificação; (iii) a melhor reprodutibilidade no processo devido ao fato de que o meio é mais bem definido. Os exemplos de meios SFM disponíveis comercialmente consistem em: VP SFM (InVitrogen Ref 11681-020, catálogo 2003), Opti Pro (InVitrogen Ref 12309-019, catálogo 2003), Episerf (InVitrogen Ref 10732-022, catálogo 2003), Pro 293 S-CDM (Cambrex ref 12765Q, catálogo 2003), LC17 (Cambrex Ref BESP302Q), Pro CHO 5-CDM (Cambrex ref12-766Q, catálogo 2003), HyQ SFM4CHO (Hyclone Ref SH30515-02), HyQ SFM4CHO-Utility (Hyclone Ref SH30516.02), HyQ PF293 (Hyclone ref SH30356.02), HyQ PF Vera (Hyclone Ref SH30352.02), meio Excell 293 (SAFC Biosciences ref 14570-1000M), meio livre de proteína Excell 325 PF CHO (SAFC Biosciences ref 14335-1000M), meio Excell VPRO (SAFC Biosciences ref 14560-1000M), meio livre de soro Excell 302 (SAFC

Biosciences ref 14312-1000M), Excell 65319, Excell 65421, Excell 65625, Excell 65626, Excell 65627, Excell 65628, Excell 65629 (JRH Biosciences), Excell MDCK SFM (SAFC-Biosciences Ref. 14581 C), Excell MDCK Prod (Ref. M3678), meio de terapia de gene 3 (livre de componente animal) (SIGMA-Aldrich, ref. G-9916 ou Excell GTM-3) (chamado daqui por diante de meio G9916), HYQ CDM4 HEK-293 (Hyclone Ref. SH30859), HYQ SFM4 HEK-293 (HYCLONE Ref. SH30521 ), AEM (InVitrogen). De acordo com a primeira modalidade preferida, o meio livre de soro nº 1 e o meio livre de soro nº 2 são o mesmo meio. De acordo com uma segunda modalidade preferida, o meio livre de soro nº 1 e o meio livre de soro nº 2 têm uma composição diferente.

[0107] O processo da invenção abrange a remoção de todo ou uma parte do meio livre de soro 1, seguida por sua substituição pelo meio livre de soro nº 2. Contudo, é mais conveniente remover uma fração substancial (por exemplo, até cerca de 50 %) do meio livre de soro 1 e, então, repor com o meio livre de soro nº 2, durante a remoção do meio 1, por exemplo, através do filtro spin. De acordo com uma modalidade preferida, o meio livre de soro nº 2 é diretamente adicionado ao meio livre de soro nº 1, sem a remoção de uma parte do meio livre de soro nº 1. Entre 0,25 a 10 volumes de meio livre de soro nº 2 são adicionados a 1 volume do meio livre de soro nº 1. Em uma modalidade preferida, entre cerca de 0,5 a 8 volumes de meio livre de soro nº 2 são adicionados a 1 volume do meio livre de soro nº 1. Em uma modalidade mais preferida, entre cerca de 3 a 6 volumes do meio livre de soro nº 2 são adicionados a 1 volume do meio livre de soro nº 1.

[0108] O meio livre de soro nº 1 e/ou o meio livre de soro nº 2 pode ser suplementado com pelo menos um ingrediente selecionado a partir do grupo que consiste em aminoácidos, lipídios, ácidos graxos, colesterol, vitaminas, carboidratos, hidrolisado de proteínas de origem não animal, e uma mistura dos mesmos.

[0109] Alternativamente, o processo de replicação de um vírus da invenção consiste em um processo de batelada alimentada que compreende a etapa adicional de alimentação das células com pelo menos um ingrediente selecionado a partir do grupo que consiste em aminoácidos, lipídios, vitaminas, carboidrato, hidrolisado de proteínas de origem não animal, tensoativo e uma mistura dos mesmos. De acordo com uma primeira modalidade preferida, a alimentação ocorre durante as etapas a) a d) do processo da invenção de replicação de um vírus, alternativamente, somente durante as etapas b) a d) ou, alternativamente, somente durante as etapas d). A alimentação pode ocorrer em uma base diária ou em uma base contínua. Quando a alimentação é descontínua, a alimentação pode ocorrer uma vez por dia, mais do que uma vez por dia ou menos que uma vez por dia.

[0110] Os meios SFM da invenção compreendem uma série de ingredientes, que incluem aminoácidos, vitaminas, sais inorgânicos e orgânicos, fontes de carboidrato, sendo que cada ingrediente está presente em uma quantidade que suporta a cultura de uma célula in vitro. Contudo, com a finalidade de aperfeiçoar o crescimento celular ou a produtividade viral, ingredientes adicionais são adicionados aos meios SFM.

[0111] A escolha de aminoácido(s) para adicionar à cultura de célula pode ser determinada em uma análise de consumo de aminoácidos pelas células na cultura; tal consumo varia de acordo com as espécies de células. De acordo com uma modalidade preferida, os aminoácidos adicionados ao meio podem ser selecionados a partir do grupo que consiste em asparagina e glutamina, ou uma mistura dos mesmos. Em uma modalidade mais preferida, a glutamina é adicionada para a cultura de célula EBx de galinha e a alimentação de glutamina é executada durante a etapa a) a d) para manter a concentração de glutamina no meio entre cerca de 0,5 mM a cerca de 5 mM, de preferência, entre cerca de 1 mM a cerca de 3 mM e, com a máxima

preferência, cerca de 2 mM. Em uma modalidade preferida, a alimentação de glutamina ocorre em uma base contínua. De forma interessante, as células EBx® de pato não consomem muita glutamina, devido ao fato de que as células de pato têm a capacidade de sintetizar a glutamina. Portanto, a glutamina pode ser adicionada ou não para a cultura de célula EBx de pato.

[0112] De acordo com uma modalidade preferida, os carboidratos adicionados ao meio são selecionados a partir do grupo que consiste em D-glicose, D-sucrose e D-galactose, ou uma mistura dos mesmos. De acordo com uma modalidade mais preferida, o carboidrato adicionado é D-glicose. A alimentação de D-glicose é executada durante a etapa a) a d), com mais preferência, entre b) a d), para manter a concentração de D-glicose no meio entre cerca de 0,5g/l a 25g/l de D-glicose, de preferência, entre cerca de 1 g/l a 10 g/l de D-glicose, de preferência, cerca de 2 a 3 g/l de D-glicose. Em uma modalidade preferida, a alimentação de D-glicose ocorre em uma base contínua.

[0113] De acordo com uma modalidade preferida, os lipídios são selecionados a partir do grupo que consiste em colesterol, esteróides e ácidos graxos, tais como ácido palmítico, ácido palmitoléico, ácido esteárico, ácido oléico, ácido linoléico, ácido linolênico e seus derivados, ou uma mistura dos mesmos. Com mais preferência, os ácidos graxos são provenientes de SIGMA-ALDRICH (Ref. F7050) e cerca de 0,35 µl/ml de solução de ácidos graxos é adicionado ao meio de cultura.

[0114] O meio pode conter substâncias auxiliares, tais como substâncias tampão como bicarbonato de sódio, estabilizantes de oxidação, estabilizantes para neutralizar o estresse mecânico, ou inibidores de protease. Se exigido, um tensoativo não-iônico, tal como polipropileno glicol (PLURONIC F-61, PLURONIC F-68, SYNPERONIC F-68, PLURONIC F-71 ou PLURONIC F-108) pode ser adicionado ao meio como um agente anti-espumante. Estes

agentes são geralmente usados para proteger as células dos efeitos negativos de aeração, uma vez que, sem uma adição de um tensoativo, as bolhas de ar rompidas e ascendentes podem conduzir ao dano das células que estão localizadas sobre a superfície destas bolhas de ar ("espargir"). Prefere-se que a quantidade de tensoativo não-iônico seja entre cerca de 0,05 e cerca de 10 g/L, tipicamente, entre cerca de 0,1 e cerca de 5 g/L. De acordo com outra modalidade da invenção, a concentração de tensoativo no meio de cultura de célula pode ser modificada para adaptar (isto é, aumentar ou diminuir) o tamanho dos conglomerados de célula.

[0115] De acordo com uma modalidade do processo de replicação de um vírus da invenção, a adição de meio livre de soro nº 2, à cultura de célula, é executada após a etapa de infecção b), de preferência, entre cerca de 0,5 a 4 horas após a etapa b) e, com mais preferência, cerca de 1 hora após a etapa b). De acordo com outra modalidade da invenção, a adição de meio livre de soro nº 2, à cultura de célula, é executada depois da etapa de infecção b), de preferência, entre cerca de 0,5 a 4 horas após a etapa b) e, com mais preferência, cerca de 1 hora antes da etapa b). De acordo com outra modalidade da invenção, a adição do meio livre de soro nº 2, à cultura de célula, é executada simultaneamente à etapa de infecção b). A infecção viral da etapa b) é realizada a uma m.o.i (multiplicidade de infecção) de cerca de 10 a  $10^{-8}$ , de preferência,  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ , com mais preferência, cerca de  $10^{-2}$  a  $10^{-5}$  e, com mais preferência, cerca de  $10^{-4}$ . O indivíduo versado na técnica irá determinar a m.o.i ótima de acordo com o tipo de vírus. Na etapa c), as células infectadas são cultivadas, de preferência, durante pelo menos 24 h, pelo menos 48 h, pelo menos 72 h, pelo menos 96 h, pelo menos 120 h, pelo menos 144 h. Quando o vírus é um poxvírus, as células infectadas são cultivadas pelo menos 144 h.

[0116] No processo da invenção, a cultura de célula da etapa a) é

realizada por meio de cultura em batelada, cultura em batelada repetida, cultura em batelada alimentada ou cultura de perfusão. Com mais preferência, a cultura de célula da etapa a) é executada por meio de cultura em batelada alimentada. A infecção na etapa b) é executada quando a densidade celular é de pelo menos cerca de 4 milhões, de preferência, 6 milhões de células/ml, com mais preferência, 8 milhões de células/ml, no processo em batelada ou batelada alimentada. Quando um processo de perfusão é usado, a infecção na etapa b) é executada quando a densidade celular é de pelo menos 8 milhões de células/ml, de preferência, cerca de 9 a 10 milhões de células/ml, ou até maiores.

[0117] Prefere-se que o pH do meio de cultura livre de soro nas etapas a), b), c) e d) seja monitorado pelo biorreator. O pH deverá se situar em uma faixa de 6,5 a 7,8, de preferência, cerca de 6,8 a 7,5 e, com mais preferência, cerca de 7,2.

[0118] No processo da invenção, a etapa d) permanece por 1 a 10 dias antes da coleta. De acordo com uma modalidade preferida, a etapa d) permanece por 2 a 5 dias antes da coleta. O tempo de coleta (etapa e) é definido de acordo com a densidade celular no vaso de cultura. O inventor revelou agora que o tempo ótimo para a coleta dos vírus consiste em dois dias depois que se tenha alcançado o nível ótimo da densidade de células viáveis e tenha começado a diminuir devido a infecção viral.

[0119] A cultura de célula é executada a uma temperatura compreendida entre 32°C a 39°C, dependendo do tipo do vírus. Para a produção de poxvírus e vírus influenza, a infecção da cultura de célula é executada, de preferência, a 33°C.

[0120] As células EBx® têm a capacidade de crescer em cultura de suspensão com conglomerados de células em agregados soltos de poucas células, até mais que cem células. Sem se ater à teoria, o tamanho dos

conglomerados podem variar de acordo com a composição do meio de cultura de célula. Por exemplo, a presença de tensoativo, tal como polipropileno glicol (PLURONIC F-61, PLURONIC F-68, SYNPERONIC F-68, PLURONIC F-71 ou PLURONIC F-108), a agitação, a concentração de íons divalentes, tais como  $Mg^{2+}$  e  $Ca^{2+}$ , pode ter um efeito sobre o tamanho dos conglomerados. O inventor revelou agora que o rendimento viral pode ser aumentado por permitir que as células EBx® da invenção se agreguem umas às outras para formar conglomerados durante pelo menos a etapa a) do processo. Durante o aumento em escala do frasco do banco primário de células e de células de trabalho através de diversos tamanhos de frascos T ou garrafas roller a biorreatores, as células em suspensão são geralmente passadas para um vaso maior, por meio de diluição no meio fresco ou por meio de centrifugação seguida por um re-suspensão de pelota de célula em um meio fresco. O inventor revelou que durante as passagens das células é recomendado manter os conglomerados de célula grandes na cultura. Então, é melhor não romper os conglomerados de células a fim de aperfeiçoar a replicação de vírus em células EBx®. Por exemplo, durante as fases iniciais de cultura da etapa a) em frascos T ou garrafas roller, recomenda-se diluir a cultura de célula para dar passagem às células em vaso(s) maior(es) e recomenda-se não centrifugar, não romper, os conglomerados de células por meio de pipetagem ou agitação. Contudo, conglomerados grandes demais podem ser sub-ótimos para uma alta produção viral. Conseqüentemente, o versado na técnica irá definir se um rompimento parcial dos conglomerados, por meio de pipetagem ou agitação, durante as passagens de células iniciais da etapa a) pode aperfeiçoar o rendimento viral. De acordo com uma modalidade preferida, os poxvírus e, de preferência, vírus MVA, ALVAC e poxvírus de galinha são obtidos por meio de um processo da invenção que inclui a etapa a) de proliferação de EBx® conglomerada em agregados soltos de poucas células, até mais que pelo menos cem células,

pelo menos duzentas células, pelo menos quinhentas células, pelo menos mil células.

[0121] Os inventores revelaram que o tamanho dos conglomerados de células EBx®, de preferência, conglomerados de células EBx® de pato, pode depender da concentração de íons de Mg<sup>2+</sup> e/ou Ca<sup>2+</sup> em meio de cultura de célula independente de ancoragem. Desde que os conglomerados grandes em demasia possam ser sub-ótimos para uma alta viral produção viral, o tamanho dos conglomerados pode ser monitorado por meio do ajuste da concentração de Mg<sup>2+</sup> e Ca<sup>2+</sup> no meio de cultura de célula. Para as células EBx® de pato, o meio de cultura de célula contém, de preferência, a concentração de Mg<sup>2+</sup> compreendida entre 0,5 mM e 2,5 mM, de preferência, cerca de 1,6 mM, e a concentração de Ca<sup>2+</sup> compreendida entre 0,01 mM e 0,5 mM, de preferência, cerca de 0,1 mM.

[0122] A invenção refere-se também ao vírus obtível por meio de um processo da invenção. A atual invenção se refere também à vacina que contém o vírus da invenção. O processo de fabricação de uma vacina viral compreende o processo de replicação de um vírus, de acordo com a invenção, sendo que a etapa e) da coleta de vírus compreende pelo menos uma etapa selecionada entre filtração, concentração, congelamento e estabilização por meio da adição de agente estabilizante. A coleta de vírus é executada de acordo com tecnologias bem conhecidas pelo versado na técnica. De acordo com uma modalidade preferida, a etapa de coleta do dito vírus compreende coletar o sobrenadante da cultura de célula obtido a partir da centrifugação de cultura de célula, então, a filtração, concentração, congelamento e preparação do vírus estabilizado por meio da adição do agente estabilizante. Por exemplo, para o vírus influenza vide Furminger, In Nicholson, Webster e Hay (Eds) Textbook of influenza, capítulo 24 pp324- 332.

[0123] O processo de fabricação de uma vacina viral, de acordo

com a invenção, pode compreender também a etapa adicional de inativação do vírus coletado. Prefere-se que a inativação seja executada por meio do tratamento com formaldeído, beta-propiolactona, éter, éter e detergente (isto é, tais como Tween 80™), brometo de cetil-trimetil amônio (CTAB) e Triton N102, deoxicolato de sódio e tri(N-butil)fosfato.

[0124] De acordo com outra modalidade, a invenção se refere também a um processo de preparação de proteínas antigênicas virais a partir do vírus obtível por meio de um processo da invenção, o dito processo compreende as etapas adicionais de:

a) opcionalmente, a incubação de sobrenadante de cultura de célula que compreende vírus inteiro com uma enzima de restrição de ácido desoxiribonucléico, de preferência, DNases (vide classificação EC3.1.21 e EC3.1.22) e nucleases (vide classificação EC3.1.30 e EC3.1.31). Prefere-se que a enzima de digestão de DNA seja benzonase (Benzon nuclease) ou DNase I;

b) junção de detergente catiônico. Os exemplos de detergente catiônico são, sem limitação, sal cetil-trimetil amônio, tal como CTAB, sal miristil-trimetil amônio, lipofectina, DOTMA e Tween™;

c) isolamento de proteínas antigênicas. Esta última etapa pode ser realizada por meio de centrifugação ou ultrafiltração.

[0125] O vírus na vacina pode estar presente como partículas de vírus intactos ou como partículas de vírus desintegrados. De acordo com uma modalidade, a vacina é uma vacina inativa ou morta. De acordo com outra modalidade, a vacina é uma vacina atenuada viva, sendo que as ditas vacinas compreendem principalmente o sobrenadante de cultura de célula EBx passível de ser obtido por meio do processo da invenção, de preferência, sem soro, opcionalmente, filtrado e/ou concentrado e que compreende o dito vírus. De acordo com uma terceira modalidade, a vacina compreende as proteínas

antigênicas virais passíveis de serem obtidas a partir de um vírus preparado de acordo com o processo da invenção.

[0126] A invenção também consiste em fornecer uma vacina que compreende uma EBx® de linhagem de célula infectada, de preferência, EBx® de pato ou galinha ev-0, passível de ser obtida por meio do processo da invenção, sendo que a EBx® de linhagem de célula infectada, de preferência, EBx® de pato ou galinha ev-0, é coletada na etapa d).

[0127] A vacina da invenção pode compreender o vírus da invenção em combinação com substâncias farmacologicamente aceitáveis, as quais aumentam a resposta imune. Os exemplos não-limitadores de substâncias que aumentam a resposta imune compreendem adjuvante de Freund incompleto, saponina, sais de hidróxido de alumínio, lisolecitina, poli-óleos plútônicos, poliânions, peptídeos, bacilo de Calmette-Guerin (BCG) e corynebacterium parvum. O exemplo de adjuvante sintético consiste em QS-21. Adicionalmente, as proteínas de imunoestimulação (interleucinas II1, II2, IL3, IL4, IL12, IL13, fator estimulante de colônia macrófaga granulócita, etc.) podem ser usadas para intensificar a resposta imune.

[0128] Prefere-se que a vacina da invenção seja uma formulação líquida, uma preparação congelada, uma preparação congelada e desidratada, opcionalmente, adaptada para a via de administração intranasal.

[0129] A vacina da invenção é usada para o tratamento terapêutico e/ou profilático de um humano ou um animal infectado por um vírus anteriormente relacionado. Prefere-se que a vacina viral da invenção seja usada para o tratamento terapêutico e/ou profilático de um humano infectado por um vírus selecionado entre varíola, influenza, sarampo, caxumba, vírus de rubéola, RSV. Alternativamente, a vacina da invenção é usada, de preferência, para o tratamento terapêutico e/ou profilático de um animal infectado por um vírus selecionado entre influenza, vírus de doença de Newcastle, vírus da

síndrome da queda de postura, doença bursal infecciosa, vírus de bronquite infecciosa, vírus de destempero canino, vírus de anemia de galinha. A vacina viral recombinante da invenção pode ser usada também para o tratamento terapêutico e/ou profilático de doenças crônicas, tais como câncer e doenças infecciosas, tais como AIDS.

[0130] As linhagens de células EBx® da invenção são úteis para gerar e produzir vírus recombinado. Os vírus com um genoma segmentado, tal como vírus influenza, pode ser recombinado. Ao infectar simultaneamente as células EBx® da invenção com pelo menos duas cepas diferentes de vírus influenza, uma mistura de genoma segmentado a partir de duas cepas diferentes está presente na mesma célula hospedeira. Durante a montagem do vírus, toda combinação de segmentos de genoma pode teoricamente ser gerada. O vírus recombinado específico pode, então, ser isolado por meio da seleção ou eliminação, com um anticorpo, por exemplo, de vírus com um traço desejado (vide Kilnourne E. D em Plotkin SA e Mortimer E.A. Eds, *Vacines* 1994). As linhagens de células EBx® da invenção também são úteis para gerar e produzir vírus influenza por meio de genética reversa (vide Enami, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:3802-3805 (1990); Enami et Palese, *J. Virol.* 65:2511-2513 (1991); Luytjes, *Cell* 59:1107-1113 (1989)).

[0131] A presente invenção se refere também ao uso de linhagens de células EBx® da invenção como um substrato de célula para executar a titulação de vírus. As células EBx® serão eficazes no sistema de célula atual de substituição, tais como ovos embrionados, CEFs, células DF1 e outros, usados para determinar o título de uma solução viral. Prefere-se que a titulação viral é executada por meio do método TCID<sub>50</sub> (Reed L, Muench H, 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.* 27, 493-97).

[0132] A presente invenção se refere também ao use de linhagens de células EBx® da invenção como um substrato de célula para executar o teste

sanitário.

[0133] A invenção se refere também à composição diagnóstica que contém o vírus da invenção ou constituintes da mesma.

[0134] Os exemplos abaixo descrevem a invenção em mais detalhes. As seguintes preparações e exemplos são dados para possibilitar que o versado na técnica compreenda mais claramente e pratique a presente invenção. A presente invenção, contudo, não se limita no escopo pelas modalidades exemplificadoras, as quais se destinam somente ilustrar os únicos aspectos da invenção, e os métodos que são funcionalmente equivalentes estão dentro do escopo da invenção. De fato, diversas modificações da invenção, em adição às descritas no presente documento, se tornarão evidentes aos versados na técnica a partir da descrição anterior e dos desenhos em anexo. Tais modificações são destinadas a serem incluídas no escopo das reivindicações em anexo. Para o restante da descrição, a referência será feita à legenda para as figuras abaixo.

### **BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

#### **FIGURA 1**

#### **CÉLULAS EBX DE GALINHA INDEPENDENTE DE ANCORAGEM**

#### **FIGURA 1A: CÉLULAS EBV13 VAIO DE GALINHA INDEPENDENTE DE ANCORAGEM NO**

#### **MEIO LIVRE DE SORO**

[0135] As células EBv13 foram cultivadas a 37°C no meio livre de soro em suspensão Excell 65319 (SAFC). As células EBv13 têm um tamanho homogêneo e crescem em conglomerados soltos em cultura. O tempo de duplicação de população é cerca de 16 a 18 horas e a densidade celular alcançada em vasos de frascos agitados foi de cerca de 4 a 5 milhões de células/ml.

#### **FIGURA 1B: CÉLULAS EB DE LINHAGEM 0 DE GALINHA INDEPENDENTE DE ANCORAGEM**

#### **EM MEIO LIVRE DE SORO**

[0136] As células EB linhagem 0 foram cultivadas a 39°C em meio livre de soro em suspensão Excell 66444 (SAFC).

[0137] As células EB de linhagem 0 têm um tamanho homogêneo e crescem em conglomerados soltos.

## **FIGURA 2**

### **CÉLULAS EBV13 VAIO DE GALINHA EXPRESSAM ALTO NÍVEL DE TELOMERASE**

[0138] As células EBv 13 na passagem p193 expressam alto nível de telomerase na mesma ordem de magnitude que as células EB14-O74 de galinha (vide WO03/076601) na passagem p164 (banco primário de células - Master cell Bank: MCB) ou na passagem p184 (banco de célula de trabalho - Workin Cell bank: WCB). As células-tronco embrionárias (mES) de murídeo foram usadas como um controle positivo e fibroblasto (FED) de camundongo foi usado como um controle negativo.

## **FIGURAS 3A E 3B:**

### **SUSCETIBILIDADE DE EBV13 VAIO DE GALINHA AO POXVÍRUS**

[0139] EBv 13 (passagem 188) foram semeadas a  $0,4 \times 10^6$  células/ml em frascos F175 de 100ml, em 40ml de meio SFM Excell 65319 ou meio G9916 SFM (SAFC) suplementado com 4mM de glutamina. O crescimento celular e a infecção com MVA-GFP (MOI  $10^{-2}$  TCID<sub>50</sub>/célula) foram executadas a 37°C. Uma hora após a infecção, 60 ml de meio fresco foram adicionados.

[0140] Figura 3A: cinética da densidade celular no meio SFM Excell 65319 ou meio G9916 SFM (SAFC).

[0141] Figura 3B: produtividade de MVA expressa em TCID<sub>50</sub>/ml, no meio SFM Excell 65319 ou meio G9916 SFM (SAFC).

## **FIGURA 4**

### **ANÁLISE DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DE CÉLULAS EBX DE PATO**

[0142] A análise de microscopia eletrônica de transmissão de células dEBx foi executada por Dr. A Rivoire (Lyon, França). As células EBx de pato exibem uma morfologia de células-tronco embrionárias típicas (isto é, alta razão núcleo-citoplasmático) que se assemelha ao fenótipo das células-tronco embrionárias de

murídeo e células VIVALIS EB14 descritas no documento WO2006/108846. As células EBx de pato são células redondas pequenas com um nucléolo ou núcleo grande, com pseudopodia curta que se estende a partir da membrana plasmática. Elas são altamente metabólicas ativas com um citoplasma rico em ribossomo e mitocôndria.

### **FIGURAS 5A E 5B**

#### **EXPRESSÃO DE TELOMERASE EM LINHAGENS DE CÉLULAS EBX DE PATO**

[0143] A expressão de telomerase durante diferentes estágios do estabelecimento de células EBx de pato foi investigada com o uso do kit de detecção de telomerase Roche (telomerase OCR ELISA).

[0144] Figura 5A: a telomerase é encontrada por ser altamente expressa em diferentes linhagens de células EBx de pato aderentes assim como nas células EBv13 de galinha. As células epiteliais de pato usadas como um controle negativo não expressam telomerase.

[0145] Figura 5B: Durante o processo de estabelecimento de células EBx de pato em suspensão, é mantido um alto nível de expressão de telomerase. O alto nível de telomerase foi investigado em células EBx de pato durante a privação de alimentador (com ou sem células alimentadoras), durante o processo de adaptação de células EB26 de pato à suspensão e após a privação de soro privação de dEB24 e dEB26. As células EBx de pato, tais como EB24 e EB26, expressam alto nível de telomerase, assim como as células EB14 de galinha. A EB66 de pato também expressa alto nível de telomerase (dados não mostrados).

### **FIGURAS 6A E 6B:**

#### **CÉLULAS EBX® DE PATO EXIBEM NENHUMA ATIVIDADE DE TRANSCRIPTASE REVERSA**

##### **ENDÓGENA**

[0146] Figura 6A: expressão de transcriptase reversa endógena foi investigada por meio da análise F-PERT direta (Lovatt et al., 1999, J. Virol. Methods, 82:185-200) em células puras (FRANÇA). As linhagens de células de

pato EBx®, EB26 e EB5-1, exibem nenhuma atividade de transcriptase reversa(RT) endógena. O alto nível de atividade de RT foi detectado na cultura de células EB14 e EBv13 de galinha (em diferentes passagens) assim como, a uma extensão inferior, em fibroblasto embrionário de galinha (CEF) derivado de cepa de galinha livre de patógeno específico (SPF). As células CEM, as quais são negativas em RTase, foram usadas como um controle negativo para ajustar o limite de detecção do ensaio.

[0147] Figura 6B: A presença de partículas retrovirais endógenas, replicativas (isto é, replicação-competente) ou não-replicativas, no sobrenadante de cultura de células EBx de pato e galinha foi investigada por meio de um ensaio ELISA que detecta o antígeno capsideo principal de leucose de aves P27. As linhagens de células de pato EBx, EB26 e EB5-1, assim como as EBv13 de galinha, não segregam o antígeno p27 ALV. Ao contrário, as células EB 14 de galinha expressam o antígeno P27 ALV.

#### **FIGURAS 7A E 7B:**

#### **CÉLULAS EBX DE PATO SEGREGAM VÍRUS REPLICATIVO DA LEUCOSE AVIÁRIA**

#### **(ALV)**

[0148] O ensaio de co-cultura de células EBx de pato com linhagem de célula QT6 de codorna, conhecido por ser sensível às ALVs exógena e endógena, foi executado em Bioreliance (UK) para detectar a presença de vírus de pato replicativo endógeno.

[0149] Figura 7A: descreve o princípio da co-cultura QT6.

[0150] Figura 7B: a presença de vírus replicativo é detectada por meio do ensaio ELISA que detecta o antígeno capsideo principal de leucose de aves P27.

[0151] O ensaio demonstra que nenhuma das células EBx® de pato testadas (dEB26 e dEB51) segregam o ALV replicativo. O vírus RAV-1, o qual é conhecido por replicar em QT6, foi usado como um controle positivo.

**FIGURA 8:****EXPRESSÃO DE SUPERFÍCIE CELULAR DE RECEPTORES SAA2-3 E SAA2-6 EM LINHAGENS DE CÉLULAS EB14 DE GALINHA E EBX DE PATO**

[0152] As células são incubadas com lectinas marcadas com digoxigenina: lectina aglutinina de Sambuca nigra liga-se, especificamente, à Sia2-6Gal, enquanto que a lectina aglutinina de Maackia amurensis liga-se, especificamente, à Sia2-3Gal. As lectinas que se ligam às células são reveladas com anticorpo anti-digoxigenina FITC-marcado de acordo com as técnicas bem conhecidas pelo versado na técnica. As células FITC-marcada são numeradas com um classificador de célula fluorescente (FACS). As moléculas SA $\alpha$ 2-3 e SA $\alpha$ 2-6 são descritas por serem os receptores para os vírus influenza humanos e de aves, respectivamente. Quase todas as células EBx de pato expressam altamente os receptores de superfície celular SA $\alpha$ 2-3 e SA $\alpha$ 2-6.

**FIGURAS 9A E 9B****PROPAGAÇÃO DO VÍRUS MVA-GFP EM CÉLULAS EBX DE PATO INFECTADAS**

[0153] Figura 9A: EBx<sup>®</sup> de pato foi deixada formar conglomerados pequenos, em frascos de tanque agitado T175, durante a proliferação celular em um meio SFM de crescimento celular. Os conglomerados foram, então, infectados com 10<sup>-2</sup> TCID<sub>50</sub>/célula de vírus MVA-GFP e a mistura foi diluída no meio SFM de produção. Durante um período de propagação do vírus por 6 dias, a 37°C, foram tiradas, diariamente, fotos de células infectadas expostas em UV. O pico de infecção MVA foi alcançado no dia 4 de pós-infecção (pi). No dia 6 de pi, as células infectadas começaram a morrer.

[0154] Figura 9B: titulação de vírus MVA-GFP propagado em células EBx<sup>®</sup> de pato, em um biorreator de batelada alimentada de 3l. (painel esquerdo) A biomassa derivada de EBx de pato foi deixada acumular durante a fase de proliferação celular no meio de crescimento Excell (SAFC). No dia 4, a densidade celular alcançou 4 milhões de células/ml. As células foram, então, infectadas com

$10^{-1}$  TCID<sub>50</sub>/célula de vírus MVA-GFP e a mistura foi diluída em 1,5l de meio Excell. Durante um período de propagação do vírus por 6 dias, a 37°C, as amostras foram diariamente coletadas e a titulação de TCID<sub>50</sub> (painel direito) foi executada no final da cinética. Um rendimento de 8,5 log de TCID<sub>50</sub>/ml foi alcançado a 4 p.i. que corresponde a um rendimento de 205 de TCID<sub>50</sub>/célula.

### **FIGURA 10**

#### **INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO E MAGNÉSIO NO MEIO SFM SOBRE O TAMANHOS DOS CONGLOMERADOS DE CÉLULAS EBX®**

[0155] Figura 10A: células EBv13 de galinha forma primeiro cultivadas no meio SFM, de SAFC Biosciences, que compreende uma alta concentração de íons de cálcio (Ca<sup>2+</sup>) (aproximadamente 0,79 mM) e magnésio (Mg<sup>2+</sup>); neste meio, as células produzem grandes agregados em cultura.

[0156] Três dias após ter alterado o meio de cultura de célula com o mesmo meio SFM que compreende uma concentração mais baixa de Ca<sup>2+</sup> (0,03 mM final) e Mg<sup>2+</sup> (1,6 mM final), as células formam agregados menores.

[0157] Figura 10B: as células de pato EB24, EB26 e EB66 foram primeiro cultivadas no meio SFM, de SAFC Biosciences, que compreende uma alta concentração de íons de cálcio (Ca<sup>2+</sup>) (aproximadamente 0,79 mM) e magnésio (Mg<sup>2+</sup>); neste meio, as células produzem agregados grandes em cultura.

[0158] Três dias após ter alterado o meio de cultura de célula com o mesmo meio SFM que compreende uma concentração mais baixa de Ca<sup>2+</sup> (0,03 mM final) e Mg<sup>2+</sup> (1,6 mM final), as células formam agregados menores.

#### **FIGURAS 11A E 11B: PRODUÇÃO DE CEPAS A DE VÍRUS INFLUENZA, EM CÉLULAS EBX DE PATO, EM BIORREATORES DE 3L**

[0159] A biomassa de EBx® de pato foi deixada acumular a 37°C, durante a fase de proliferação celular, em um meio de crescimento celular. As células foram, então, infectadas com  $10^{-4}$  TCID<sub>50</sub>/célula de vírus influenza A/H1N1/Beijing/262/95 ou A/H3N2/Nova Iorque/55/2004, a mistura foi diluída em

1,5l de meio de produção Excell suplementado com 0,75 USP/mL de tripsina e a temperatura foi diminuída para 33°C.

[0160] Durante um período de propagação do vírus de 14 dias, as amostras foram diariamente coletadas e armazenadas a -80°C.

[0161] Figura 11A: cinética do crescimento de células EBx de pato infectadas com cepa de vírus influenza A/H1N1/Beijing/262/95

[0162] Painel esquerdo: densidade celular (losangos,  $\times 10^{-6}$  células.  $\text{ml}^{-1}$ ) e título viral em  $\log\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ .

[0163] Painel direito: número total de células (quadrado), viabilidade (círculos pretos, %) e concentração de hemaglutinina em  $\text{ug}/\text{ml}$  (círculos vermelhos, %).

[0164] O rendimento viral alcançou 20  $\text{ug}$  de hemaglutinina por  $\text{ml}$  de sobrenadante de cultura.

[0165] Figura 11B: cinética do crescimento de células EBx de pato infectadas com cepa de vírus influenza A/H3N2/Nova Iorque/55/2004

[0166] Painel esquerdo: densidade celular (losangos,  $\times 10^{-6}$  células.  $\text{ml}^{-1}$ )

[0167] Painel direito: número total de células (quadrado), viabilidade (círculos pretos, %) e concentração de hemaglutinina em  $\text{ug}/\text{ml}$  (círculos vermelhos, %).

[0168] O rendimento viral alcançou 30  $\text{ug}$  de hemaglutinina por  $\text{ml}$  de sobrenadante de cultura.

## **FIGURA 12**

### **PRODUÇÃO DE CEPA B DE VÍRUS INFLUENZA EM CÉLULAS EBX® DE PATO**

[0169] A biomassa de EBx® de pato foi deixada acumular a 37°C, durante a fase de proliferação celular, em um meio de crescimento celular. As células foram, então, infectadas com  $10^{-3}$   $\text{TCID}_{50}/\text{célula}$  de vírus influenza B/Jiangsu/10/2003, a mistura foi diluída em 1,5l de meio de produção Excell

suplementado com 0,75 USP/mL de tripsina e a temperatura foi diminuída para 33°C. Durante um período de propagação do vírus de 14 dias, as amostras foram diariamente coletadas e armazenadas a -80°C.

[0170] Painel esquerdo: densidade celular (losangos,  $\times 10^{-6}$  células.  $\text{ml}^{-1}$ ).

[0171] Painel direito: número total de células (quadrado), viabilidade (círculos pretos, %) e concentração de hemaglutinina em  $\mu\text{g/ml}$  (círculos vermelhos, %).

[0172] O rendimento viral alcançou 25  $\mu\text{g}$  de hemaglutinina por  $\text{ml}$  de sobrenadante de cultura.

### **FIGURA 13**

#### **ANÁLISE DE PRODUTIVIDADE DE NDV E EXPRESSÃO DE PROTEÍNA VIRAL EM CÉLULAS EB66 DE PATO EM SUSPENSÃO (MOI $10^{-3}$ , 0,75 USP/ML DE TRIPSINA)**

[0173] As células EBx de galinha e pato são sensíveis a e replicam a cepa La Sota de NDV. Os títulos (em  $\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ ) de NDV produzidos em células EB66 de pato aumentam a partir do dia 0 ao dia 2 pi para alcançar uma média de  $10^{6.83}$   $\text{TCID}_{50}/\text{ml}$  (painel esquerdo da Figura 13).

[0174] A análise de Western blot (painel direito da Figura 13) mostrou a expressão de proteínas virais NDV (HN, Fo/F, NP & M). A composição de proteínas virais do vírus NDV produzido em células EB66 de pato é similar a uma obtida com o vírus NDV produzido em células EB14 de galinha. Adicionalmente, a cinética de liberação para os vírus produzidos em células EBx de pato e galinha é similar.

### **FIGURA 14**

#### **ANÁLISE DA REPLICAÇÃO DE VÍRUS DE SARAMPO RECOMBINANTE EM CÉLULAS EB66 DE PATO EM SUSPENSÃO (MOI $10^{-1}$ OU $10^{-2}$ ), EM FRASCOS DE CULTURA DE TECIDO, NO MEIO LIVRE DE SORO**

[0175] As células EB66 de pato são pelo menos tão sensíveis

quanto às células VERO à infecção pelo vírus de sarampo. Os títulos (em TCID<sub>50</sub>/ml) de proteína verde fluorescente que expressa o vírus recombinante de sarampo (GFP) produzidos em células EB66 de pato alcançam 10<sup>-7</sup> TCID<sub>50</sub>/ml no dia 6 de pós-infecção.

### **FIGURAS 15A E 15B**

#### **SSEA-1, EMA-1 E EXPRESSÃO DE TELOMERASE EM CÉLULAS EB66 DE PATO**

[0176] A expressão de telomerase em diferentes passagens de EB66 de pato, cultivada em garrafas roller, foi investigada com o uso do kit de detecção de telomerase Roche (telomerase OCR ELISA). SSEA-1 e EMA-1 em diferentes passagens de EB66 de pato, cultivada em garrafas roller, foi investigada por meio da análise FACS.

[0177] Figura 15A: telomerase é encontrada por ser altamente expressa na linhagem de célula EB66 de pato em suspensão, em diferentes passagens (138, 144, 147, 150, 154).

[0178] Figura 15B: marcadores de superfície celular SSEA-1 e EMA-1 foram encontrados por serem altamente expressa na linhagem de célula EB66 de pato em suspensão, em diferentes passagens (138, 144, 147, 150, 154).

#### **FIGURA 16: ANÁLISE DE CARIÓTIPO DE CÉLULAS EB66 DE PATO**

[0179] O cariótipo de células EB66 de pato foi executado por Pr. Franck, ENVL, Lyon. As células EB66 são células diplóides.

### **EXEMPLOS**

#### **EXEMPLO 1: LINHAGEM DE CÉLULA EBV13 DE GALINHA A PARTIR DA CEPA VALO DE**

#### **GALINHA SPF**

#### **1.1- MATÉRIA PRIMA**

#### **OVOS**

[0180] Cepa livre de patógeno específico (SPF) denominada Valo. A cepa valo é uma cepa de Leghorn branca produzida e distribuída por

Lohmann da Alemanha. Aqueles ovos de galinha SPF, fornecidos com certificado de análise, são testados por: CAV, adenovírus de aves (grupo 1, serotipos 1 a 12 e grupo 3), EDS, vírus encefalomielite de aves, RSV/vírus de leucose de aves (que inclui serotipo ALV-J), vírus de nefrite de aves, reovírus de aves, poxvírus de galinha, vírus de bronquite infecciosa, vírus de bursite infecciosa (IBDV), vírus de laringo traqueíte infecciosa, vírus influenza tipo A, vírus de doença de Marek, micoplasmoses (Mg + Ms), Mycobacterium avium, Vírus de doença de Newcastle, Vírus da reticuloendoteliose, Salmonella pullorum, outras infecções de salmonela, vírus de rinotraqueíte de aves (ART), Hemophilus paragallinarum. Os ovos de galinha Valo foram somente submetidos a uma desinfecção com descontaminante para evitar a contaminação ligada à manipulação de ovos durante o transporte.

#### **CÉLULAS ALIMENTADORAS**

[0181] Na primeira etapa do processo de estabelecimento de EBv13, as células a partir de origem murina (células STO) foram usadas como camada alimentadora para manter a pluripotência de células-tronco de galinha. Estas células alimentadoras são mitoticamente inativas por meio de radiação gama (45 a 55 Grays) antes da semeadura sobre plástico. Esta dose de radiação é uma dose subletal que induz uma parada definitiva do ciclo celular, mas ainda permite a produção de fatores de crescimento e matriz extracelular, necessária para a promoção do crescimento celular de células não-diferenciadas.

[0182] A linhagem de célula STO foi derivada por A. Bernstein, Ontario Cancer Institute, Toronto, Canadá, a partir de uma linhagem contínua de fibroblastos embrionários de camundongo SIM (Sandos Inbred Mice), e foi fornecida por American Type Culture Collection (ATCC) (número do produto STO: CRL-1503, número de lote 1198713). As camadas alimentadoras frescas foram preparadas duas vezes por semana, em geral, na segunda e quinta-feira. De modo exponencial, as células foram dissociadas e contadas. Uma parte das células foi semeada para a manutenção de culturas viáveis e outra parte foi irradiada. Para a

irradiação, preparou-se uma suspensão de célula a  $10 \times 10^6$  de células/ml em tubos. As células foram expostas uma dose de 45 a 55 grey e foram semeadas sobre plástico. Após a semeadura, os pratos ou placas cobertos com células alimentadoras inativas foram usados durante um máximo de 5 dias.

#### **MEIO**

DMEM-HamF12 (Cambrex, Cat nº BE04-687)

Meio Optipro (Invitrogen, Cat nº 12309)

EX-CELL™ 65195, 60947 e 65319 (SAFC, meio personalizado)

#### **ADITIVOS**

Glutamina (Cambrex, Cat nº BE17-605E)

Penicilina/estreptomicina (Cambrex, Cat nº BE17-602E)

Aminoácidos não essenciais (Cambrex, Cat nº BE13-114E)

Piruvato de sódio (Cambrex, Cat nº BE13-115)

Vitaminas (Cambrex, Cat nº 13-607C)

Beta Mercapto Etanol (Sigma, Cat nº M7522)

#### **TAMPÕES E FIXADORES**

PBS 1X (Cambrex, Cat nº BE17-516F)

Para formaldeído 4% (Sigma, Cat nº P6148)

KCl 5,6% (Sigma, Cat nº P9333)

Metanol/ácido acético (3/1): Metanol (Merk, Cat nº K34497209; Ácido acético Sigma Cat nº A6283)

Colcemida, Karyomax (Gibco, Cat nº 15212-046)

#### **AGENTE CRIOPROTETOR**

Dimetil sulfoxido (DMSO) (Sigma, Cat nº D2650)

#### **FATORES**

[0183] Dois fatores recombinantes diferentes foram usados:

- Fator neurotrófico ciliar humano recombinante (CNTF) (Peprotech Inc, Cat nº 450-13)

- Fator como insulina humana recombinante I (IGF1 ) (Peptotech Inc, Cat nº 100-11)

[0184] Os dois fatores foram produzidos em E. Coli bacteria.

#### **SORO BOVINO FETAL**

##### **SORO BOVINO FETAL NÃO IRRADIADO (FBS) (SAFC, CAT Nº 12103)**

[0185] O soro não irradiado usado no programa foi coletado e produzido nos Estados Unidos. Os animais usados para a coleta foram inspecionados por USDA e aceitáveis para o abate. Foram adicionados no meio durante cultura de células-tronco de aves. Este lote não foi submetido à irradiação para evitar a destruição de componentes ou proteínas críticas identificadas como essenciais para a manutenção de células-tronco em cultura.

##### **SORO IRRADIADO (JRH, CAT Nº 12107)**

[0186] O lote irradiado usado no programa foi coletado e produzido nos Estados Unidos. Este lote irradiado foi adicionado como suplemento no meio DMEM usado para a cultura de Células FED ou STO (células alimentadoras). Estas células não exigem células-tronco como uma qualidade específica de soro para o crescimento e manutenção em cultura. Para minimizar a alta concentração de soro no meio, adaptaram-se as células STO para crescerem na presença de 4 % de FBS somente.

#### **AGENTES DE DISSOCIAÇÃO:**

##### **- PRONASE (ROCHE, CAT Nº 165 921)**

[0187] Pronase é uma protease recombinante fabricada pela Roche Diagnostics, Alemanha, usada para a dissociação de células-tronco de aves aderentes.

##### **- TRIPSINA EDTA (CAMBREX, CAT Nº BE17-161E)**

[0188] Tripsina é usada para a dissociação de células FED ou STO e nas últimas passagens para a dissociação de células aviárias adaptadas ao meio livre de soro. Esta enzima de origem suína é fabricada de forma

asséptica de acordo com as condições referenciais de cGMP por meio de um método de filtração estéril validado e testada de acordo com E.P. atual. A matéria prima, irradiada antes da formulação, é testada acerca de parvovírus suíno em conformidade estrita com 9/CFR 113.53.

**- SOLUÇÃO DE DISSOCIAÇÃO DE CÉLULA NÃO ENZIMÁTICA (SIGMA, CAT Nº C5914)**

[0189] Este agente de dissociação está pronto para a formulação de uso usado para separar de forma branda as células a partir da superfície de crescimento do vaso de cultura. A fórmula não contém proteína e permite o desalojamento de células sem o uso de enzimas. As proteínas celulares são preservadas tornando possíveis os estudos de imun química que dependem do reconhecimento de proteínas da superfície celular. Esta enzima foi usada para separar a célula antes da análise FACS de marcadores biológicos como EMA-1 (antígeno de membrana epitelial 1) e SSEA1 (antígeno embrionário de estágio específico-1).

**1.2 - PROCESSO DE ESTABELECIMENTO DE LINHAGEM DE CÉLULA EBV13**

[0190] Os ovos foram abertos, a gema foi separada do albúmen durante a abertura. Os embriões foram removidos da gema, diretamente com o auxílio de uma pipeta de Pasteur ou com o auxílio de um papel de filtro absorvente pequeno (papel Whatmann 3M), recortado antecipadamente na forma de um anel perfurado com o auxílio de um perfurador. O diâmetro da perfuração foi cerca de 5 mm. Estes anéis pequenos foram esterilizados com o uso de calor a seco por cerca de 30 minutos em um forno. Este pequeno anel de papel é depositado sobre a superfície da gema e centralizado sobre o embrião, o qual é, então, circundado pelo anel de papel. O último é, então, recortado com o auxílio de pequenos pares de tesouras e o total removido é colocado em um prato Petri, preenchido com PBS ou com uma solução salina fisiológica. O embrião, deste modo, levado pelo anel foi limpo do excesso de gema no meio e o disco embrionário, por conseguinte, livre da vitelina em

excesso, é coletado com uma Pipeta de Pasteur.

[0191] Os embriões Valo de galinha foram colocados em um tubo que contém meio fisiológico (1X PBS, Tris glicose, meio, e similares). Os embriões Valo foram, então, mecanicamente dissociados e inoculados sobre uma camada de células STO alimentadoras no meio de cultura completo a 39°C. As células alimentadoras foram semeadas em frasco a cerca de  $2.7 \times 10^4$  de célula/cm<sup>2</sup>. O meio de cultura completo é composto de DMEM-Ham F12 meio comercial basal suplementado com 10 % de soro de bezerro fetal, com IGF1 e CNTF a uma concentração final de 1 ng/ml, e com 1 % de aminoácidos não essenciais, com 1 % de mistura de vitaminas de origem comercial, com piruvato de sódio a uma concentração final de 1 mM, com beta-mercapto-etanol a uma concentração final de 0,2 mM, glutamina a uma concentração final de 2,9 mM, com uma mistura inicial de antibióticos que contém penicilina a uma concentração final de 100 U/ml e estreptomicina a uma concentração final de 100 µg/ml. Rapidamente após as primeiras passagens das células, a mistura de antibióticos não é mais adicionada ao meio. Compreende-se que a expressão de forma rápida se refere em geral após as 3 a 5 primeiras passagens.

[0192] Quando é feita a passagem das células ES de aves, a partir de embriões Valo de galinha, de um disco de cultura ao outro, a semeadura de pratos de cultura foi executadas com cerca de  $7 \times 10^4$ /cm<sup>2</sup> a  $8 \times 10^4$ /cm<sup>2</sup> de células ES de aves no meio de cultura completo. Prefere-se que a semeadura seja feita com cerca de  $7,3 \times 10^4$ /cm<sup>2</sup> (prato de  $4 \times 10^6$  de células/55cm<sup>2</sup> ou  $4 \times 10^6$  de células/100 mm). As células aviárias, de preferência, as células embrionárias de aves, da etapa a) são cultivadas durante diversas passagens no meio completo. Na passagem 15, o meio completo foi submetido à depleção em fatores de crescimento IGF1 e CNTF. A depleção é feita diretamente em uma etapa, a partir de uma passagem à outra. As células-tronco embrionárias, de

preferência, as células embrionárias aviárias, são cultivadas durante diversas passagens no meio completo sem os fatores de crescimento IGF1 e CNTF.

[0193] Então, a depleção de células alimentadoras foi executada após a depleção de fatores de crescimento IGF1 e CNTF por meio de uma diminuição progressiva da concentração de células alimentadoras durante diversas passagens. Praticamente, a mesma concentração das células alimentadoras foi usada para 2 a 4 passagens, então, uma concentração mais baixa das células alimentadoras foi usada para 2 a 4 passagens adicionais, e assim por diante. O frasco foi semeado originalmente com cerca de  $2,7 \times 10^4$  de células alimentadoras/cm<sup>2</sup>, então, cerca de  $2,2 \times 10^4$  de células alimentadoras/cm<sup>2</sup>, então, cerca de  $1,8 \times 10^4$  de células alimentadoras/cm<sup>2</sup>, então, cerca de  $1,4 \times 10^4$  de células alimentadoras/cm<sup>2</sup>, e depois, cerca de  $1,1 \times 10^4$  de células alimentadoras/cm<sup>2</sup>, então, cerca de  $0,9 \times 10^4$  de células alimentadoras/cm<sup>2</sup>, e depois, cerca de  $0,5 \times 10^4$  de células alimentadoras/cm<sup>2</sup>. Então, o frasco foi semeado com  $6,5 \times 10^4$  de células aviárias/cm<sup>2</sup> a  $7,5 \times 10^4$  de células aviárias/cm<sup>2</sup>, e sem células alimentadoras. A depleção de células alimentadoras começou em torno da passagem 21 e terminou em torno da passagem 65. Durante a depleção de células alimentadoras, as células ES Valo de galinha foram semeadas em frasco de cultura a uma concentração mais baixa do que na etapa a), cerca de  $4 \times 10^4$  célula/cm<sup>2</sup> a  $5 \times 10^4$  célula/cm<sup>2</sup>. Na hipótese em que as células ES Valo não estão em um bom formato seguida por uma diminuição da concentração de células alimentadoras no frasco, então, as células aviárias são cultivadas por passagens adicionais com a mesma concentração de células alimentadoras antes de prosseguir a depleção de células alimentadoras.

[0194] A depleção do soro foi executada após a depleção de fator de crescimento e das células alimentadoras. No início da depleção do soro, o meio de cultura foi composto de DMEM-HamF12 meio comercial basal

suplementado com 10 % de soro de bezerro fetal e com 1 % de aminoácidos não essenciais, com 1 % de mistura de vitaminas de origem comercial, com piruvato de sódio a uma concentração final de 1 mM, com beta-mercaptoetanol a uma concentração final de 0,2 mM, glutamina a uma concentração final de 2,9 mM. As células Valo de galinha foram adaptadas ao crescimento, em uma cultura de meio livre de soro, em duas etapas do processo: primeiro, as células Valo de galinha foram rapidamente adaptadas a um meio de cultura composto de meio livre de soro (SFM) comercial, de preferência, ExCell 60947 (SAFC Biosciences), suplementado com 10 % de soro de bezerro fetal e com 1 % de aminoácidos não essenciais, com 1 % de mistura de vitaminas de origem comercial, com piruvato de sódio a uma concentração final de 1 mM, com beta-mercaptoetanol a uma concentração final de 0,2 mM, glutamina a uma concentração final de 2,9 mM. Uma vez que esta rápida adaptação a um novo meio (DMEM-HamF12 ao Excell 60947) foi executada, foi iniciada uma segunda etapa que é executada consistindo em uma adaptação lenta para a diminuição da concentração de soro animal no meio SFM. A depleção do soro é executada por uma diminuição progressiva que começou a partir de 10 % de soro, então, 7,5 %, e depois, 5 %, 2,5 %, 1,25 %, 0,75 % de concentração de soro no meio de cultura de célula SFM para finalmente alcançar 0 % de soro no meio de cultura de célula SFM. A depleção do soro começou na passagem 103 e terminou na passagem 135.

[0195] No final do processo de privação de soro, quando a concentração restante de soro no meio SFM foi de 0,75 % ou 0 %, começou a adaptação de células EBv 13 dependente de ancoragem à cultura em suspensão. Entre as diversas tentativas executadas para isolar os isolados EBv13 independentes de ancoragem, 62,5 % das tentativas obtiveram sucesso e permitiram adquirir diferentes isolados de células EBv 13 em suspensão. Um isolado de células EBv13 foi selecionado de acordo com o tempo de duplicação de

população (cerca de 18h), a concentração celular ótima na cultura de frasco (cerca de 4 milhões de células/ml), a viabilidade de célula, a homogeneidade da cultura de célula (presença e tamanho de conglomerados de células) e a facilidade de manipular as células (Figura 1).

[0196] No final da depleção do soro, as células Valo de galinha dependente de ancoragem, denominadas EBv13, foram capazes de crescer na ausência de fatores de crescimento, na ausência de células alimentadoras, no meio livre de soro. As células EBv13 foram, então, adaptadas ao crescimento a 37°C, por meio da diminuição de forma progressiva da temperatura de cultura de célula de 0,5°C/dia.

## **EXEMPLO 2: LINHAGEM CELULAR DE LINHAGEM 0 EB DE GALINHA A PARTIR DE CEPA**

### **ELL-O DE GALINHA SPF**

#### **2.1 - MATÉRIA PRIMA**

##### **Ovos**

[0197] A cepa livre de patógeno específico (SPF) de galinha denominada ELL-O (linhagem 0 de Lansing oriental - *East Lansing Line 0*) foi fornecida pelo laboratório de oncologia e doença de aves (USDA-ARS-MWA, USA). Os ovos de galinha SPF são produzidos a partir de um bando testado intensivamente por vários patógenos de aves domésticas. A doença testada inclui: *Salmonella pullorum*, *Salmonella gallinarum*, *mycoplasma gallisepticum*, *mycoplasma synoviae*, vírus de elucose de aves A a D e J, vírus de doença de Marek, vírus da reticuloendoteliose, adenovírus de aves, bronquite infecciosa, doença bursal infecciosa, Influenza de aves, doença de Newcastle, encefalomielite de aves e reovírus de aves. Os ovos de galinha de linhagem 0 foram somente submetidos a uma desinfecção com o descontaminante para evitar qualquer risco de contaminação ligada à manipulação de ovos durante o transporte.

##### **CÉLULAS ALIMENTADORAS**

[0198] Na primeira etapa do processo de estabelecimento de EB

de linhagem 0, as células de origem murina (células STO) foram usadas como camada alimentadora para manter a pluripotência de células-tronco de galinha. Estas células alimentadoras são mitoticamente inativas por meio de irradiação gama (45 a 55 Grays) antes da semeadura sobre plástico. Esta dose de irradiação é uma dose subletal que induz uma interrupção definitiva do ciclo celular, mas ainda permite a produção de fatores de crescimento e matriz extracelular, necessários para a promoção do crescimento celular das células não diferenciadas.

[0199] A linhagem de célula STO foi derivada por A. Bernstein, Ontario Cancer Institute, Toronto, Canadá, a partir de uma linhagem contínua a partir de uma linhagem contínua de fibroblastos embrionários de camundongo SIM (Sandos Inbred Mice) e fornecida pela American Type Cultura Collection (ATCC) (número de produto STO: CRL-1503, número de lote 1198713). As camadas alimentadoras frescas foram preparadas duas vezes por semana. De modo exponencial, as células foram dissociadas e contadas. Uma parte das células foi semeada para a manutenção de culturas viáveis e outra parte foi irradiada. Para a irradiação, preparou-se uma suspensão de célula a  $10 \times 10^6$  de células/ml em tubos. As células foram expostas a 45 a 55 grey de dose e foram semeadas sobre plástico. Após a semeadura, os pratos ou placas cobertos com células alimentadoras inativas foram usados durante um máximo de 5 dias.

#### **MEIO**

DMEM-HamF12 (Cambrex, Cat nº BE04-687)

Meio GTM-3 (Sigma, Cat nº G9916)

Meio EX-CELL™ 66522, 65788 e66444 (SAFC, meio personalizado)

#### **ADITIVOS**

Glutamina (Cambrex, Cat nº BE17-605E)

Penicilina/estreptomicina (Cambrex, Cat nº BE17-602E)

Aminoácidos não essenciais (Cambrex, Cat nº BE13-114E)

Piruvato de sódio (Cambrex, Cat nº BE13-115)

Vitaminas (Cambrex, Cat nº 13-607C)

Beta Mercapto Etanol (Sigma, Cat nº M7522)

Yeastolato (SAFC, Cat nº 58902C)

#### **TAMPÕES E FIXADORES**

PBS 1X (Cambrex, Cat nº BE17-516F)

#### **AGENTE CRIOPROTETOR**

Dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma, Cat nº D2650)

#### **FATORES**

[0200] Seis fatores recombinantes diferentes foram usados:

- Fator neurotrófico ciliar humano recombinante (CNTF) (Peprtech Inc, Cat nº 450-13)

- Fator como insulina humana recombinante I (IGF1 ) (Peprtech Inc, Cat nº 100-11)

- Interleucina humana recombinante 6 (IL6) (Peprtech Inc, Cat nº 200-06)

- Receptor de 6 interleucina solúvel humana recombinante (sIL6r) (Peprtech Inc, Cat nº 200-06 R)

- Fator de célula-tronco humana recombinante (SCF) (Peprtech Inc, Cat nº 300-07)

- Fator de crescimento de fibroblasto básico humano recombinante (bFGF) (Peprtech Inc, Cat nº 100- 18B)

[0201] Todos os fatores, exceto IL6r, são produzidos em E. Coli bacteria. O IL6r solúvel é expresso em células HEK293 transfectadas.

#### **SORO BOVINO FETAL**

#### **SORO BOVINO FETAL NÃO IRRADIADO (FBS) (SAFC, CAT Nº 12003)**

[0202] O soro não irradiado usado no programa foi coletado e produzido na Austrália. Os animais usados para a coleta foram inspecionados por USDA e aceitáveis para o abate. Foram adicionados no meio durante

cultura de células-tronco de aves. Este lote não foi submetido à irradiação para evitar a destruição de componentes ou proteínas críticas identificadas como essenciais para a manutenção de células-tronco em cultura.

**SORO IRRADIADO (JRH, CAT Nº 12007)**

[0203] O lote irradiado usado neste programa foi coletado na Austrália. Este lote irradiado foi adicionado como suplemento no meio DMEM usado para a cultura de células FED ou STO (células alimentadoras). Estas células não exigem células-tronco como uma qualidade específica de soro para o crescimento e manutenção em cultura. Para minimizar a alta concentração de soro no meio adaptaram-se as células STO para crescer na presença de 4 % de FBS somente.

**AGENTES DE DISSOCIAÇÃO: - TRIPCINA ((SIGMA, CAT Nº T3449)**

**2.2 - PROCESSO DE ESTABELECIMENTO DA LINHAGEM DE CÉLULA DE LINHAGEM 0**

[0204] Os embriões, a partir de 13 ovos de galinha de linhagem 0, foram coletados de acordo com o processo descrito no Exemplo 1.2. Então, os embriões de linhagem 0 foram colocados em um tubo que contém PBS 1X. Os embriões foram, então, mecanicamente dissociados e inoculados sobre uma camada de células STO alimentadoras no meio de cultura completo a 39°C. As células alimentadoras foram semeadas em pratos a cerca de  $2,7 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>. O meio de cultura completo é composto de DMEM-Ham F12 meio comercial basal suplementado com 10 % de soro de bezerro fetal, com IGF1, CNTF, bFGF, IL6, IL6r e SCF a uma concentração final de 1 ng/ml, e com 1 % de aminoácidos não essenciais, com 1 % de mistura de vitaminas de origem comercial, com piruvato de sódio a uma concentração final de 1 mM, com beta-mercapto-etanol a uma concentração final de 0,2 mM, glutamina a uma concentração final de 2,9 mM, com yeastolate 1X e com uma mistura inicial de antibióticos contendo penicilina a uma concentração final de 100 U/ml e estreptomicina a uma concentração final de 100 µg/ml. Após 7 passagens, a mistura de antibióticos não é mais adicionada ao meio.

[0205] Quando as células ES de aves, a partir de embriões de

linhagem 0 de galinha, são transferidas a partir de um prato de cultura a outro, a semeadura de pratos de cultura foi executada com cerca de  $7 \times 10^4/\text{cm}^2$  a  $8 \times 10^4/\text{cm}^2$  de células ES de aves no meio de cultura completo. Prefere-se que a semeadura seja feita com cerca de  $7,3 \times 10^4/\text{cm}^2$  (prato de  $4 \times 10^6$  células/ $55\text{cm}^2$  ou  $4 \times 10^6$  células/100 mm). As células aviárias, de preferência, as células embrionárias aviárias, da etapa a) são cultivadas durante diversas passagens no meio completo suplementado com 10 ou 15% de FBS. Na passagem 7, o meio completo foi submetido à depleção em fatores de crescimento bFGF, IL6, IL6r e SCF. A depleção foi feita diretamente em uma etapa, a partir de uma passagem à outra. As células-tronco embrionárias, de preferência, as células embrionárias aviárias, foram cultivadas durante diversas passagens no meio completo, sem aqueles 4 fatores de crescimento. Na passagem 12, os 2 últimos fatores IGF1 e CNTF foram removidos do meio e as células ampliadas sem o fator.

[0206] Para promover o meio de base 3 de crescimento celular foram usados sucessivamente: DMEM Ham F12 a partir da passagem 1 à passagem 18, Excell GTM-3 a partir da passagem 18 à passagem 26 e uma mistura de Excell 66788 e Excell 66522, após a passagem 26.

[0207] Após a passagem 30, a depleção de células alimentadoras foi executada por meio de uma diminuição progressiva da concentração de células alimentadoras durante diversas passagens, seguindo etapa por etapa do processo descrito anteriormente. Durante esta fase de privação de alimentadora, algumas células capazes de crescer em suspensão foram isoladas com o uso de Excell 66444, como meio de crescimento, e foi iniciada a privação do soro (Figura B).

### **EXEMPLO 3**

#### **EB66 LINHAGEM DE CÉLULA EBX DE PATO**

##### **3.1 - MATÉRIA PRIMA**

##### **OVOS DE PATO**

[0208] Os ovos de pato, a partir de cepas GL30 de Pekin, foram

obtidos junto a GRIMAUD FRERES SELECTION (La Corbiere, Roussay França). Os patos pai foram vacinados contra Escherichia Coli (vacina autógena Coli 01 & 02), Pasteurella multocida (Landavax), hepatite viral de pato (Hepatovax), Erysipelothrix rhusiopathiae (Ruvax), Avian metapneumovirus (Nemovac), Salmonella typhimurium & Enteridis (Autogenous vacina), Riemerella antipestifer (autovacina de Riemerella), metapneumovirus de aves (Nobilis RTV inativo) e Erysipelothrix rhusiopathiae (Ruvax). Após o recebimento, os ovos de pato Pekin foram submetidos a uma desinfecção em um banho de hipocloreto seguido por uma descontaminação com Fermacidal (Thermo) para evitar qualquer risco de contaminação ligada às poeiras fixadas sobre o envoltório.

#### **CÉLULAS ALIMENTADORAS**

[0209] Na primeira etapa do processo, as células de origem murina (células STO) foram usadas como camada alimentadora para manter a pluripotência de pato células-tronco. Aquelas células alimentadoras são mitoticamente inativas por meio de irradiação gama (45 a 55 Grays), antes da semeadura sobre plástico. Esta dose de irradiação é uma dose subletal que induz uma interrupção definitiva do ciclo celular, mas ainda permite a produção de fatores de crescimento e matriz extracelular, necessários para a promoção do crescimento celular de células não diferenciadas. A linhagem de célula STO foi derivada por A. Bernstein, Ontario Cancer Institute, Toronto, Canadá, a partir de uma linhagem contínua de fibroblastos embrionários de camundongos SIM (Sandos Inbred Mice) e foi fornecida pela American Type Culture Collection (ATCC) (número de produto STO: CRL-1503, número de lote 1198713). As camadas alimentadoras frescas foram preparadas duas vezes por semana. De modo exponencial, as células foram dissociadas e contadas. Uma parte das células foi semeada para a manutenção de culturas viáveis e outra parte foi irradiada. Para a irradiação, preparou-se uma suspensão de célula a  $10 \times 10^6$  células/ml em tubos. As células foram expostas a uma dose de 45 a 55 grey e

foram semeadas sobre plástico. Após a semeadura, os pratos ou placas cobertos com células alimentadoras inativas foram usados durante um máximo de 5 dias.

#### **MEIO**

Meio EX-CELL™ 65788, 65319, 63066 e 66444 (SAFC, meio personalizado)

Meio GTM-3 (Sigma, Cat nº G9916)

DMEM- HamF12 (Cambrex, Cat nº BE04-687)

DMEM (Cambrex, Cat nº BE 12-614F)

#### **ADITIVOS**

Glutamina (Cambrex, Cat nº BE17-605E)

Penicilina/estreptomicina (Cambrex, Cat nº BE17-602E)

Aminoácidos não essenciais (Cambrex, Cat nº BE13-114E)

Piruvato de sódio (Cambrex, Cat nº BE13-115)

Vitaminas (Cambrex, Cat nº 13-607C)

Beta Mercapto Etanol (Sigma, Cat nº M7522)

Yeastolate (SAFC, Cat nº 58902C)

#### **TAMPÕES E FIXADORES**

PBS 1X (Cambrex, Cat nº BE17-516F)

#### **AGENTE CRIOPROTETOR**

Dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma, Cat nº D2650)

#### **FATORES**

[0210] Dois fatores recombinantes diferentes foram usados:

- Fator neurotrófico ciliar humano recombinante (CNTF) (Peprtech Inc, Cat nº 450-13)

- Fator como insulina humana recombinante I (IGF1 ) (Peprtech Inc, Cat nº 100-11)

Os 2 fatores são produzidos em E. Coli bacteria.

**SORO BOVINO FETAL****SORO BOVINO FETAL NÃO IRRADIADO (FBS) (JRH, CAT Nº 12003)**

[0211] O soro não irradiado usado no programa foi coletado e produzido na Austrália. Os animais usados para a coleta foram inspecionados por USDA e aceitáveis para o abate. Foram adicionados no meio durante cultura de células-tronco de aves. Este lote não foi submetido à irradiação para evitar a destruição de componentes ou proteínas críticas identificadas como essenciais para a manutenção de células-tronco em cultura.

**SORO IRRADIADO (JRH, CAT Nº 12107)**

[0212] O lote irradiado usado neste programa foi coletado nos Estados Unidos. Este lote irradiado foi adicionado como suplemento no meio DMEM usado para a cultura de STO células (células alimentadoras). Estas células não exigem células-tronco como uma qualidade específica de soro para o crescimento e manutenção em cultura. Para minimizar a alta concentração de soro no meio adaptaram-se as células STO para crescerem na presença de 4 % de FBS somente.

**AGENTES DE DISSOCIAÇÃO****- PRONASE (ROCHE, CAT Nº 165 921)**

[0213] Pronase é uma protease recombinante fabricada por Roche Diagnostics, Alemanha, usada para a dissociação de células-tronco de aves aderentes.

**- TRIPSINA EDTA (CAMBREX, CAT Nº BE17-161E)**

[0214] Tripsina é usada para a dissociação de células STO e nas últimas passagens para a dissociação de células aviárias adaptadas ao Meio livre de soro. Esta enzima de origem suína é fabricada de forma asséptica, de acordo com as condições referenciais de cGMP, por meio de um método de filtração estéril validado e testado de acordo com EP atual. A matéria prima, irradiada antes da formulação, é testada acerca de parvovírus suíno em

conformidade estrita com 9/CFR 113.53.

**- TRYPZEAN (SIGMA, CAT Nº T3449)**

[0215] A solução de Trypzean é formulada com uma tripsina bovina recombinante, expressa em milho e fabricada por Sigma Aldrich com a utilização do sistema de expressão de proteína vegetal transgênica patenteada de ProdiGene. Este produto é otimizado tanto para a dissociação celular em cultura de células aderentes suplementada com soro como livre de soro.

**- SOLUÇÃO DE DISSOCIAÇÃO DE CÉLULA NÃO ENZIMÁTICA (SIGMA, CAT Nº C5914)**

[0216] Este agente de dissociação está pronto para a formulação de uso usado para separar de forma branda as células a partir da superfície de crescimento do vaso de cultura. A fórmula não contém proteína, e permite o desalojamento de células sem o uso de enzimas. As proteínas celulares são preservadas tornando possível os estudos de imunquímica que dependem do reconhecimento de proteínas da superfície celular. Esta enzima foi usada para separar a célula antes da análise FACS de marcadores biológicos como EMA-1 (antígeno de membrana epitelial 1) e SSEA1 (antígeno embrionário de estágio específico-1).

**3.2 - PROCESSO DE ESTABELECIMENTO DE LINHAGEM DE CÉLULA EBX DE PATO**

**EB66**

[0217] Cerca de 360 ovos de pato fertilizados foram abertos, a gema foi separada do albúmen durante a abertura. Os embriões foram removidos da gema com o auxílio de um papel de filtro absorvente pequeno (papel Whatmann 3M), recortados antecipadamente na forma de um anel perfurado com o auxílio de um perfurador. O diâmetro da perfuração é cerca de 5 mm. Estes anéis pequenos foram esterilizados com o uso de aquecimento a seco por cerca de 30 minutos em um forno. Na prática, durante a etapa de coleta de embrião, um pequeno anel de papel é depositado sobre a superfície da gema e centralizado sobre o embrião, o qual é, então, circundado pelo anel

de papel. O último é, então, recortado com o auxílio de pequenos pares de tesouras e o total removido é colocado em um prato Petri, preenchido com PBS ou com uma solução salina fisiológica. O embrião, deste modo, levado pelo anel foi limpo do excesso de gema no meio e o disco embrionário, por conseguinte, livre da vitelina em excesso, é coletado com uma Pipeta de Pasteur.

[0218] Os embriões de pato foram colocados em tubos de 50 ml contendo PBS 1X. Os embriões de pato foram, então, mecanicamente dissociados, lavados com PBS, e semeados sobre uma camada inativa de células STO alimentadoras no meio de cultura completo a 39°C, 7,5 % de CO<sub>2</sub>. As células alimentadoras foram semeadas em placas ou pratos de 6 cavidades a cerca de 2,7 x10<sup>4</sup> célula/cm<sup>2</sup>. O meio de cultura completo é composto de meio livre de soro DMEM-Ham F12 suplementado com 10 % de soro bovino fetal, com IGF1, CNTF, a uma concentração final de 1 ng/ml e com 1 % de aminoácidos não essenciais, com 1 % de mistura de vitaminas de origem comercial, com piruvato de sódio a uma concentração final de 0,1 mM, com beta-mercapto-etanol a uma concentração final de 0,5 mM, glutamina a uma concentração final de 2,1 mM, penicilina a uma concentração final de 100 U/ml, estreptomicina a uma concentração final de 100 µg/ml e yeastolate 1X. Rapidamente, na passagem 4, a mistura de antibióticos não é mais adicionada ao meio.

[0219] As células ES de pato foram cultivadas no meio DMEM-Ham F12 até a passagem 4. Após a passagem 4, o meio base é modificado e o meio completo DMEM-Ham F12 é substituído pelo Meio SFM GTM-3 suplementado com 10 % de soro bovino fetal, com IGF1, CNTF, a uma concentração final de 1 ng/ml, com 1 % de aminoácidos não essenciais, com 1 % de mistura de vitaminas de origem comercial, com piruvato de sódio a uma concentração final de 0,1 mM, com beta-mercapto-etanol a uma concentração final de 0,5 mM, glutamina a uma concentração final de 2,1 mM e yeastolate

1X. As células ES de pato foram, ainda, cultivadas durante 14 passagens neste novo meio de cultura, então, a privação de fatores de crescimento foi executada na passagem 18. IGF1 e CNTF foram simultaneamente removidos do meio, deste modo, a partir da passagem 19 à passagem 24, o meio de cultura era o meio GTM-3 suplementado com 10 % de FBS, com 1 % de aminoácidos não essenciais, com 1 % de mistura de vitaminas de origem comercial, com piruvato de sódio a uma concentração final de 0,1 mM, com beta-mercapto-etanol a uma concentração final de 0,5 mM, glutamina a uma concentração final de 2,1 mM e yeastolate 1X.

[0220] Quando é feita a passagem das células ES de pato, a partir de embriões de pato Pekin, a partir de um prato de cultura ao outro, a semeadura de prato de cultura foi executada com cerca de  $7 \times 10^4/\text{cm}^2$  a  $12 \times 10^4/\text{cm}^2$  de células ES de pato no meio de cultura completo.

[0221] Então, após a passagem 24, a depleção de células alimentadoras foi executada por meio de uma diminuição progressiva da concentração de células alimentadoras durante diversas passagens. Os pratos foram originalmente semeados com cerca de  $2,7 \times 10^4$  de células alimentadoras/ $\text{cm}^2$ , e depois, cerca de  $1,8 \times 10^4$  de células alimentadoras/ $\text{cm}^2$  entre a passagem 25 e 31, então, cerca de  $1,4 \times 10^4$  de células/ $\text{cm}^2$  entre a passagem 32 e 35, cerca de  $1 \times 10^4$  de células alimentadoras/ $\text{cm}^2$  entre a passagem 36 e 41, e depois, cerca de  $0,7 \times 10^4$  de células alimentadoras/ $\text{cm}^2$  entre a passagem 42 e 44 e finalmente a partir da passagem 45 os pratos foram semeados somente com células aviárias e sem células alimentadoras. No final da depleção de alimentadoras, os pratos são semeados com  $9 \times 10^4$  de células aviárias/ $\text{cm}^2$  a  $12,7 \times 10^4$  de células aviárias/ $\text{cm}^2$ . A depleção de células alimentadoras começou na passagem 25 e terminou na passagem 45. Durante a depleção de células alimentadoras, as células ES de pato são semeadas em pratos de cultura a uma concentração maior do que na etapa a),

cerca de  $9 \times 10^4$  célula/cm<sup>2</sup> a  $12,7 \times 10^4$  célula/cm<sup>2</sup>.

[0222] Após diversas passagens sem células alimentadoras, os parâmetros de crescimento (tempo de duplicação de população (PDT) e densidade) são estudados para confirmar robustez e estabilidade da célula e para iniciar a privação de aminoácidos, vitaminas, beta mercaptoetanol, piruvato de sódio e yeastolate. As células são consideradas robustas o suficiente para ser submetidas a tal privação se o PDT for inferior a cerca de 40 horas e a densidade celular maior do que cerca de  $26 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>.

[0223] No caso do desenvolvimento de células EBx® de pato presente, chamado de EB66, a privação de vitaminas, piruvato de sódio, aminoácidos não essenciais e beta mercaptoetanol foi iniciada na passagem 52. Todos aqueles aditivos foram removidos simultaneamente a partir do meio. Deste modo, entre a passagem 52 e a passagem 59, o meio de cultura é SFM GTM-3 suplementado com glutamina, yeastolate e FBS. Após um curto período de adaptação às novas condições de cultura, foi iniciada a diminuição de temperatura. Esta diminuição foi executada de forma progressiva entre a passagem 60 e a passagem 67. Após a passagem 67, as células foram capazes de crescer a 37°C. Após a passagem 67, o meio base GTM-3 foi substituído por um novo meio base SFM, chamado de Excell 65788. Então, após a passagem 67, o meio de cultura era Excell 65788 suplementado com 10 % de FBS, 2,5 mM de glutamina e 1X yeastolate. Na passagem 80,  $4 \times 10^6$  de células foram transferidas em um prato de fixação ultrabaixa (ULA), mantido sob agitação constante, para iniciar o crescimento de células independentes de ancoragem. Para promover o crescimento como suspensão, o meio base foi modificado e a porcentagem de soro foi diminuída a partir de 10 % a 5 % para a semeadura no prato ULA. Deste modo, a partir da passagem 80 à passagem 85, o meio de cultura era SFM GTM-3 suplementado com 5 % de FBS, 2,5mM de glutamina e 1X yeastolate. A diminuição lenta de FBS foi iniciada sobre a

suspensão de célula EB66 após a passagem 85. A depleção do soro foi executada por uma diminuição progressiva começando a partir de 2,5 % de soro, e depois, 1,5 % de concentração de soro no Meio de cultura de célula SFM para finalmente alcançar 0 % de soro no meio de cultura de célula SFM. A depleção do soro começou na passagem 86 e terminou na passagem 94. No final da depleção do soro, células dEB66 independentes de ancoragem foram capazes de crescer a 37°C na ausência de fatores de crescimento, na ausência de células alimentadoras, no meio livre de soro.

[0224] Após a obtenção de células de pato EB66, que são capazes de crescer a 37°C no SFM GTM-3 suplementado por 2,5 mM de glutamina, alguma adaptação adicional aos meios SFM foi feita por meio de diluição ou adaptação progressiva nas novas formulações SFM como Excell 63066, Excell 66444, Excell CHO ACF, por exemplo.

[0225] A subclonagem of célula EB66 de pato em suspensão também poderiam ser realizadas na presença ou ausência de yeastolate.

#### **EXEMPLO 4: LINHAGEM DE CÉLULA EBX DE PATO EB26**

##### **4.1 - MATÉRIA PRIMA**

[0226] Ovos de pato, células alimentadoras, aditivos, tampões e fixadores, Agentes criopreservativos, soro de bezerro fetal e agentes de dissociação (idem ao Exemplo 3).

[0227] Os ovos de pato a partir de cepas GL30 Pekin foram usados.

##### **MEIO**

Meio EX-CELL 65319, 63066 e 66444 (SAFC, meio personalizado)

Meio GTM-3 (Sigma, Cat nº G9916)

DMEM (Cambrex, Cat nº BE 12-614F)

##### **FATORES**

[0228] Seis fatores recombinantes diferentes foram usados:

- Fator neurotrófico ciliar humano recombinante (CNTF) (Peprtech Inc, Cat nº 450-13)
- Fator como insulina humana recombinante I (IGF1 ) (Peprtech Inc, Cat nº 100-11)
- Interleucina humana recombinante 6 (IL6) (Peprtech Inc, Cat nº 200-06)
- Receptor de 6 interleucina solúvel humana recombinante (sIL6r) (Peprtech Inc, Cat nº 200-06 R)
- Fator de célula-tronco humana recombinante (SCF) (Peprtech Inc, Cat nº 300-07)
- Fator de crescimento de fibroblasto básico humano recombinante (bFGF) (Peprtech Inc, Cat nº.100- 18B)

[0229] Todos os fatores, exceto IL6r, são produzidos em E. Coli bacteria. O IL6r solúvel é expresso em células HEK293 transfectadas.

#### **4.2 - PROCESSO DE ESTABELECIMENTO DE LINHAGEM DE CÉLULA EBX DE PATO**

##### **EB26**

[0230] Os embriões de pato foram coletados conforme descrito anteriormente com EB66. Os embriões de pato foram colocados em tubos de 50 ml contendo PBS 1X. Os embriões de pato foram, então, mecanicamente dissociados, lavados em PBS e semeados sobre uma camada inativa de células STO alimentadoras no meio de cultura completo a 39°C, 7,5 % de CO<sub>2</sub>. As células alimentadoras foram semeadas em placas ou pratos de 6 cavidades a cerca de 2,7 x10<sup>4</sup> célula/cm<sup>2</sup>. O meio de cultura completo é composto de meio livre de soro GTM-3 suplementado com 5 % de soro bovino fetal, com IGF1, CNTF, II-6, II-6R, SCF e FGF a uma concentração final de 1 ng/ml, e com 1 % de aminoácidos não essenciais, com 1 % de mistura de vitaminas de origem comercial, com piruvato de sódio a uma concentração final de 0,1 mM,

com beta-mercapto-etanol a uma concentração final de 0,5 mM, glutamina a uma concentração final de 2,1 mM, penicilina a uma concentração final de 100 U/ml, estreptomicina a uma concentração final de 100 µg/ml e yeastolate 1X. Rapidamente, após as primeiras passagens das células, a mistura de antibióticos não é mais adicionada ao meio. Compreende-se que a expressão de forma rápida refere-se em geral após as 3 a 9 primeiras passagens. As células ES de pato foram cultivadas no meio completo até a passagem 9. Após a passagem 9, o meio completo é parcialmente submetido à depleção em fatores. Deste modo, entre a passagem 10 e 13, SCF, IL6, IL6r e bFGF foram removidos para o meio e somente IGF1 e CNTF recombinante são mantidos a uma concentração de 1 ng/mL. Uma diminuição simultânea da concentração de IGF1 e CNTF é executada em segundo lugar entre a passagem 13 e 16, para finalmente se obter as células capazes de crescer sem fatores recombinantes na passagem 17. A depleção de fator foi feita por meio de uma adaptação progressiva às concentrações mais baixas de fatores. Quando foi feita a passagem das células ES de pato, a partir de embriões de pato Pekin, de um prato de cultura ao outro, a semeadura do prato de cultura foi executada com cerca de  $7 \times 10^4/\text{cm}^2$  a  $12 \times 10^4/\text{cm}^2$  de células ES de pato no meio de cultura completo. Prefere-se que a semeadura seja feita com cerca de  $7,3 \times 10^4/\text{cm}^2$  (prato de  $4 \times 10^6$  de células/ $55\text{cm}^2$  ou  $4 \times 10^6$  de células/100 mm). Após a depleção de fatores recombinantes, uma diminuição de yeastolate foi executada na passagem 23, alcançando a concentração final a 0,5X. Então, após a passagem 31, a depleção de células alimentadoras foi executada por meio de uma diminuição progressiva da concentração de células alimentadoras durante diversas passagens. Os pratos foram originalmente semeados com cerca de  $2,7 \times 10^4$  de células alimentadoras/ $\text{cm}^2$ , então, cerca de  $1,8 \times 10^4$  de células alimentadoras/ $\text{cm}^2$  entre a passagem 32 e 38, então, cerca de  $1,4 \times 10^4$  células/ $\text{cm}^2$  entre a passagem 39 e 44, e depois, cerca de  $1 \times 10^4$  de células

alimentadoras/cm<sup>2</sup> entre a passagem 45 e 47, cerca de  $0,7 \times 10^4$  de células alimentadoras/cm<sup>2</sup> entre a passagem 48 e 50, e finalmente, a partir da passagem 51, os pratos foram semeados somente com células aviárias e sem células alimentadoras. No final da depleção de alimentadoras, os pratos são semeadas com  $9 \times 10^4$  de células aviárias/cm<sup>2</sup> a  $12,7 \times 10^4$  de células aviárias/cm<sup>2</sup>. A depleção de células alimentadoras começou na passagem 32 e terminou na passagem 51. Durante a depleção de células alimentadoras, as células ES de pato são semeadas em pratos de cultura a uma concentração maior do que na etapa a), cerca de  $9 \times 10^4$  célula/cm<sup>2</sup> a  $12,7 \times 10^4$  célula/cm<sup>2</sup>. Após diversas passagens sem células alimentadoras, os parâmetros de crescimento (tempo de duplicação de população (PDT) e densidade) foram estudados para confirmar a robustez e estabilidade da célula e para iniciar o crescimento celular como suspensão. As células são consideradas como robustas o suficiente para serem submetidas a uma cultura em suspensão, se o PDT for inferior a cerca de 40 horas e a densidade celular maior que cerca de  $26 \times 10^4$  de células/cm<sup>2</sup>. Além disso, a morfologia das células deveria ser: redonda, refratária, muito pequena e as células não devem ser fixadas demais ao prato de plástico.

[0231] No caso do desenvolvimento de célula EB26, a cultura em suspensão foi iniciada na passagem 53.  $7 \times 10^6$  de células foram transferidas em um prato de fixação ultrabaixa e mantido sob agitação constante a cerca de 50 a 70 rpm. Para as próximas passagens, as células foram semeadas em frascos T175 (Sarsted, ref 831812502) a uma concentração compreendida entre  $0,4$  a  $0,5 \times 10^6$  de células/ml. Após um curto período de adaptação às novas condições de cultura, o PDT das células diminuiu a partir de cerca de 160 H há 40 horas. Com relação a esta boa evolução, na passagem 59, um novo conjunto de privação foi executado. Deste modo, as vitaminas, piruvato de sódio, beta-mercaptoetanol e aminoácidos não essenciais foram removidos.

Por conseguinte, após a passagem 59, o meio de cultura foi suplementado com 5 % de FBS, 0,5 X yeastolate e 2,5 mM de glutamina somente. A depleção do soro é executada sobre suspensões de célula já submetidas à depleção em fator de crescimento, células alimentadoras, vitaminas, aminoácidos não essenciais, piruvato de sódio e beta-mercaptoetanol. A depleção do soro foi executada por meio de uma diminuição progressiva começando a partir de 5 % de soro, e depois, 2,5 %, então, 1,5 % de concentração de soro no meio de cultura de célula SFM, para finalmente alcançar 0 % de soro no meio de cultura de célula SFM. A depleção do soro começou na passagem 61 e terminou na passagem 79. No final da depleção do soro, as células EB26 de pato independentes de ancoragem foram capazes de crescer a 39°C na ausência de fatores de crescimento, na ausência de células alimentadoras, no meio livre de soro. As células EB26 foram, então, adaptadas ao crescimento na ausência de 0,5X yeastolate a 37°C, por meio da diminuição da temperatura de cultura de célula na passagem 80.

[0232] Após a obtenção de células EB26, que são capazes de crescer a 37°C no SFM GTM-3 suplementado por 2,5 mM de glutamina, alguma adaptação adicional foi feita por meio da diluição ou adaptação progressiva sobre as novas formulações de SFM como Excell 63066, Excell 66444, Excell CHO ACF. A subclonagem de célula EB26 de pato em suspensão também poderia ser realizada na presença ou ausência de yeastolate.

#### **EXEMPLO 5: LINHAGEM DE CÉLULA EBX DE PATO EB24**

##### **5.1 - MATÉRIA PRIMA**

[0233] Ovos de pato, células alimentadoras, aditivos, tampões e fixadores, agentes criopreservativos, soro de bezerro fetal e agentes de dissociação (idem ao Exemplo 3).

[0234] Os ovos de pato, a partir de cepas GL30 Pekin, foram

usados.

### MEIO

Meio EX-CELL™ 65319, 63066 e 66444 (SAFC, meio personalizado)

Meio GTM-3 (Sigma, Cat nº G9916)

DMEM F12 (Cambrex, Cat nº BE04-687)

DMEM (Cambrex, Cat nº BE 12-614F)

### FATORES

[0235] Seis fatores recombinantes diferentes foram usados:

- Fator neurotrófico ciliar humano recombinante (CNTF) (Peptidech Inc, Cat nº 450-13)

- Fator como insulina humana recombinante I (IGF1 ) (Peptidech Inc, Cat nº 100-11)

- Interleucina humana recombinante 6 (IL6) (Peptidech Inc, Cat nº 200-06)

- Receptor de 6 interleucina solúvel humana recombinante (sIL6r) (Peptidech Inc, Cat nº 200-06 R)

- Fator de célula-tronco humana recombinante (SCF) (Peptidech Inc, Cat nº 300-07)

- Fator de crescimento de fibroblasto básico humano recombinante (bFGF) (Peptidech Inc, Cat nº 100-18B)

[0236] Todos os fatores, exceto IL6r, são produzidos em E. Coli bacteria. O IL6r solúvel é expresso em células HEK293 transfectadas.

## 5.2 – PROCESSO DE ESTABELECIMENTO DE LINHAGEM DE CÉLULA EBX® DE PATO

### EB24

[0237] Os embriões de pato foram coletados conforme anteriormente descrito com EB66. Os embriões de pato foram colocados em tubos de 50 ml contendo PBS 1X. Os embriões de pato são, então,

mecanicamente dissociados e semeados sobre uma camada inativa de células STO alimentadoras no meio de cultura completo a 39°C, 7,5 % de CO<sub>2</sub>. As células alimentadoras foram semeadas em placas ou pratos de 6 cavidades a cerca de 2,7 x10<sup>4</sup> célula/cm<sup>2</sup>. O meio de cultura completo é composto de meio livre de soro DMEM-Ham F12 suplementado com 10% de soro bovino fetal, com IGF1, CNTF, II-6, II-6R, SCF e FGF a uma concentração final de 1 ng/ml, e com 1 % de aminoácidos não essenciais, com 1 % de mistura de vitaminas de origem comercial, com piruvato de sódio a uma concentração final de 0,1 mM, com beta-mercapto-etanol a uma concentração final de 0,5 mM, glutamina a uma concentração final de 2,1 mM, penicilina a uma concentração final de 100 U/ml, estreptomicina a uma concentração final de 100 µg/ml e 1X yeastolate. Rapidamente, após as primeiras passagens das células, a mistura de antibióticos não é mais adicionada ao meio. Compreende-se que a expressão de forma rápida se refira em geral a após 3 a 9 primeiras passagens.

[0238] As células ES de pato são cultivadas no meio completo DMEM-Ham F12 até a passagem 7. Após a passagem 7, o meio base é modificado e o meio completo DMEM-Ham F12 é substituído pelo meio completo GTM-3 suplementado com 10 % de soro bovino fetal, com IGF1, CNTF, II-6, II-6R, SCF e FGF a uma concentração final de 1 ng/ml, com 1 % de aminoácidos não essenciais, com 1 % de mistura de vitaminas de origem comercial, com piruvato de sódio a uma concentração final de 0,1 mM, com beta-mercapto-etanol a uma concentração final de 0,5 mM, glutamina a uma concentração final de 2,1 mM, penicilina a uma concentração final de 100 U/ml, estreptomicina a uma concentração final de 100 µg/ml e yeastolate 1X. Deste modo, na passagem 11, a concentração de soro é diminuída a 5 % e SCF, IL6, IL6r e bFGF são removidos para o meio. Então, a partir da passagem 11, o meio é composto de 5 % de FBS, com IGF1 e CNTF a uma concentração final

de 1 ng/ml, com 1 % de aminoácidos não essenciais, com 1 % de mistura de vitaminas de origem comercial, com piruvato de sódio a uma concentração final de 0,1 mM, com beta-mercapto-etanol a uma concentração final de 0,5 mM, glutamina a uma concentração final de 2,1 mM, penicilina a uma concentração final de 100 U/ml, estreptomicina a uma concentração final de 100 µg/ml e yeastolate 1X. Uma retirada simultânea de IGF1 e CNTF é executada na passagem 22. Os fatores recombinantes não estão presentes no meio de cultura GTM-3 após a passagem 22. As células de pato foram mantidas em tal meio entre a passagem 23 e a passagem 28. Quando é feita a passagem das células ES de pato, a partir de embriões de pato Pekin, de um prato de cultura ao outro, a semeadura do prato de cultura foi executada com cerca de  $7 \times 10^4/\text{cm}^2$  a  $12 \times 10^4/\text{cm}^2$  de células ES de pato no meio de cultura completo. Prefere-se que a semeadura seja feita com cerca de  $7,3 \times 10^4/\text{cm}^2$  (prato de  $4 \times 10^6$  de células/ $55\text{cm}^2$  ou  $4 \times 10^6$  de células/ $100 \text{ mm}$ ). Então, após a passagem 28, a depleção de células alimentadoras é executada por meio de uma diminuição progressiva da concentração de células alimentadoras durante diversas passagens. Os pratos foram originalmente semeados com cerca de  $2,7 \times 10^4$  de células alimentadoras/ $\text{cm}^2$ , então, cerca de  $1,8 \times 10^4$  de células alimentadoras/ $\text{cm}^2$  entre a passagem 29 e 33, e depois, cerca de  $1,4 \times 10^4$  células/ $\text{cm}^2$  entre a passagem 34 e 37, cerca de  $1 \times 10^4$  de células alimentadoras/ $\text{cm}^2$  entre a passagem 38 e 42, então, cerca de  $0,7 \times 10^4$  de células alimentadoras/ $\text{cm}^2$  entre a passagem 43 e 46, e finalmente, a partir da passagem 47, os pratos foram semeados somente com células aviárias e sem células alimentadoras,. No final da depleção de alimentadoras, os pratos são semeados com  $9 \times 10^4$  de células aviárias/ $\text{cm}^2$  a  $12,7 \times 10^4$  de células aviárias/ $\text{cm}^2$ . A depleção de células alimentadoras começou na passagem 29 e terminou na passagem 47. Durante a depleção de células alimentadoras, as células ES de pato são semeadas em pratos de cultura a uma concentração

maior do que na etapa a), cerca de  $9 \times 10^4$  célula/cm<sup>2</sup> a  $12,7 \times 10^4$  célula/cm<sup>2</sup>. Após diversas passagens sem células alimentadoras, os parâmetros de crescimento (tempo de duplicação de população (PDT) e densidade) foram estudados para confirmar a robustez e estabilidade da célula e para iniciar o crescimento celular como suspensão. As células são consideradas como robustas o suficiente para serem submetidas a uma cultura em suspensão, se o PDT for inferior a cerca de 40 horas e a densidade celular maior do que cerca de  $26 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>. Além disso, a morfologia das células deveria ser: redonda, refratária, muito pequena e as células não devem ser fixadas demais ao prato de plástico. No caso do desenvolvimento de célula EB24, a cultura em suspensão é iniciada na passagem 48.  $8 \times 10^6$  de células foram transferidas em um prato de fixação ultrabaixo e mantidas sob agitação constante a cerca de 50 a 70 rpm. Para as próximas passagens, as células foram semeadas em frascos T175 (Sarsted, ref 831812502) a uma concentração compreendida entre  $0,4$  a  $0,5 \times 10^6$  de células/ml. Após um curto período de adaptação às novas condições de cultura, o PDT das células diminuiu a partir de cerca de 248 H há 128 horas e a próxima etapa de privação é, então, executada. Deste modo, na passagem 52, as vitaminas, aminoácidos não essenciais, piruvato de sódio e beta-mercaptoetanol são removidos. Com relação a esta boa evolução do PDT alcançando 44 horas, na passagem 56, a partir da passagem 57, a privação de soro foi iniciada. Deste modo, a partir da passagem 57, o meio de cultura GTM-3 foi suplementado somente com 5 % de FBS, 1X yeastolate e 2,5 mM glutamina. A depleção do soro é executada sobre suspensões de célula já submetidas à depleção em fatores de crescimento, células alimentadoras, vitaminas, aminoácidos não essenciais, piruvato de sódio e beta-mercaptoetanol. A depleção do soro foi executada por meio de uma diminuição progressiva começando a partir de 5 % de soro, e depois, 2,5 %, 2 %, então, 1,5 % de concentração de soro no meio de cultura de célula SFM, para

finalmente alcançar 0 % de soro no meio de cultura de célula SFM. A depleção do soro começou na passagem 57 e terminou na passagem 77. Durante esta depleção do soro, a adaptação ao crescimento a 37°C foi também executada. Deste modo, na passagem 65, as células crescendo no meio de cultura suplementado com 2,5 % de FBS foram transferidas a 37°C, evitando uma mudança de temperatura progressiva. No final da depleção do soro, as células EB24 de pato independentes de ancoragem foram capazes de crescer a 37°C na ausência de fatores de crescimento, na ausência de células alimentadoras, no meio livre de soro.

[0239]Após a obtenção de células EB24 de pato capazes de crescer a 37°C no SFM GTM-3 suplementado por 2,5 mM de glutamina, alguma adaptação adicional foi feita por meio da diluição ou adaptação progressiva nas novas formulações de SFM como Excell 63066, Excell 66444, Excell CHO ACF. A subclonagem de EB24 de pato em suspensão foi executada, um subclone EB24-12 de pato foi selecionado devido ao seu bom desempenho para replicar de maneira eficaz os vírus.

#### **EXEMPLO 6: LINHAGEM DE CÉLULA EBX DE PATO MUSCOVY**

##### **6.1 - MATÉRIA PRIMA**

##### **OVOS DE PATO:**

[0240]Os ovos SPF de pato, a partir de cepas Muscovy, foram obtidos junto a Le Couvoir de Cerveloup (França). Aqueles ovos de pato SPF são produzidos a partir de um bando intensamente testado em relação a vários patógenos de aves domésticas. A doença testada inclui: Salmonella gallinarum-pullorum, Mycoplasma synoviae, Mycoplasma meleagridis, Mycoplasma galliepticum, vírus de doença de Marek, Influenza de aves, Paramixovírus tipo 2, Paramixovírus Tipo 3, doença de Newcastle, Adenovírus tipo 3 (EDS), doença de Gumboro, reovírus de aves, vírus da reticuloendoteliose, encefalomielite de aves, vírus de rinotraqueite

infecioso e Clamidiose. Os ovos de pato Muscovy foram somente submetidos a uma desinfecção com o descontaminante para evitar qualquer risco de contaminação ligada à manipulação de ovos durante o transporte.

**CÉLULAS ALIMENTADORAS (VIDE EXEMPLOS ANTERIORES)**

**MEIOS**

Meio EX-CELL™ 66444 (SAFC, meio personalizado)

Meio GTM-3 (Sigma, Cat nº G9916)

DMEM- HamF12 (Cambrex, Cat nº BE04-687)

**ADITIVOS**

Glutamina (Cambrex, Cat nº BE17-605E)

Penicilina/estreptomicina (Cambrex, Cat nº BE17-602E)

Aminoácidos não essenciais (Cambrex, Cat nº BE13-114E)

Piruvato de sódio (Cambrex, Cat nº BE13-115)

Vitaminas (Cambrex, Cat nº 13-607C)

Beta Mercapto Etanol (Sigma, Cat nº M7522)

Yeastolate (SAFC, Cat nº 58902C)

**TAMPÕES E FIXADORES:**

PBS 1X (Cambrex, Cat nº BE17-516F)

**AGENTE CRIOPROTETOR**

Dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma, Cat nº D2650)

**FATORES**

[0241]Dois fatores recombinantes diferentes foram usados:

- Fator neurotrófico ciliar humano recombinante (CNTF)  
(Peprtech Inc, Cat nº 450-13)

- Fator como insulina humana recombinante I (IGF1 )  
(Peprtech Inc, Cat nº 100-11)

[0242]Os 2 fatores são produzidos em E. Coli bacteria.

**SORO BOVINO FETAL****SORO BOVINO FETAL NÃO IRRADIADO (FBS) (JRH, CAT Nº 12003)**

[0243] O soro não irradiado usado no programa foi coletado e produzido na Austrália. Os animais usados para a coleta foram inspecionados por USDA e aceitáveis para o abate. Foi adicionado no meio durante cultura de células-tronco de aves. Este lote não foi submetido à irradiação para evitar a destruição de componentes ou proteínas críticas identificadas como essenciais para a manutenção de células-tronco em cultura.

**SORO IRRADIADO (JRH, CAT Nº 12007)**

[0244] O lote irradiado usado neste programa foi coletado na Austrália. Este lote irradiado foi adicionado como suplemento no meio DMEM usado para a cultura de STO células (células alimentadoras). Estas células não exigem células-tronco como uma qualidade específica de soro para o crescimento e manutenção em cultura. Para minimizar a alta concentração de soro no meio adaptaram-se as células STO para crescerem na presença somente de 4 % de FBS.

**AGENTES DE DISSOCIAÇÃO:**

- Pronase (Roche, Cat nº 165 921)
- Trypzean (Sigma, cat nº T3449)

**6.2 - PROCESSO DO ESTABELECIMENTO DE LINHAGEM DE CÉLULA EBX DE PATO****MUSCOVY**

[0245] Os embriões a partir de 20 ovos SPF fertilizados, de patos Muscovy, foram coletados de acordo com o processo descrito no Exemplo 3. Os embriões de pato foram colocados em tubos de 50 ml contendo PBS 1X. Os embriões de pato foram, então, mecanicamente dissociados, lavados com PBS, e semeados em uma cavidade de uma placa de 12 cavidades, cobertos com uma camada inativa de células STO alimentadoras. As células embrionárias de pato foram semeadas no meio de cultura completo e

transferidas a 39°C, 7,5% 5% de CO<sub>2</sub>. As células alimentadoras foram semeadas a cerca de 2,7 x10<sup>4</sup> célula/cm<sup>2</sup>. O meio de cultura completo usado é composto de DMEM-Ham F12 suplementado com 10 % de soro bovino fetal, com IGF1, CNTF, a uma concentração final de 1 ng/ml, e com 1 % de aminoácidos não essenciais, com 1 % de mistura de vitaminas de origem comercial, com piruvato de sódio a uma concentração final de 0,1 mM, com beta-mercapto-etanol a uma concentração final de 0,5 mM, glutamina a uma concentração final de 2,1 mM, penicilina a uma concentração final de 100 U/ml, estreptomicina a uma concentração final de 100 µg/ml e yeastolate 1X. Na passagem 2, o meio base DMEM-HamF12 é substituído pelo meio base GTM-3. A mistura de antibióticos não é mais adicionada ao meio após a passagem 4.

[0246] As células ES de pato foram cultivadas no meio GTM-3 completo até a passagem 8. Após a passagem 8, a concentração de IGF1 e CNTF é reduzida a 0,5 ng/ml. As células ES de pato foram, ainda, cultivadas durante 2 passagens neste novo meio de cultura, então, a privação do fator de crescimento foi executada na passagem 10. IGF1 e CNTF foram simultaneamente removidos do meio.

[0247] Deste modo, a partir da passagem 10 à passagem 37, o meio de cultura era o meio GTM-3 suplementado com 10 % de FBS, com 1 % de aminoácidos não essenciais, com 1 % de mistura de vitaminas de origem comercial, com piruvato de sódio a uma concentração final de 0,1 mM, com beta-mercapto-etanol a uma concentração final de 0,5 mM, glutamina a uma concentração final de 2,1 mM e yeastolate 1X.

[0248] Quando é feita a passagem das células ES de pato, isoladas a partir dos embriões de pato Muscovy, de um prato de cultura ao outro, a semeadura foi executada com cerca de 12 x 10<sup>4</sup>/cm<sup>2</sup> de células ES de pato no meio de cultura. Algum meio condicionado pode ser ocasionalmente usado para a semeadura de célula, a fim de aperfeiçoar a recuperação celular

pós dissociação.

[0249] Então, após a passagem 37, a depleção de células alimentadoras foi executada por meio de uma diminuição progressiva de concentração de células alimentadoras durante diversas passagens, seguindo etapa por etapa do processo anteriormente descrito.

[0250] Durante esta fase de privação de alimentadoras, algumas células capazes de crescer em suspensão foram isoladas e adaptadas a crescer sem aditivos e soro (Figura 4C). As células EBx de pato Muscovy independentes de ancoragem expressam marcadores de células ES, tais como telomerase, SSEA-1 e EMEA-1 (dados não mostrados).

### **EXEMPLO 7: CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS DE CÉLULAS EBX**

#### **7.1 – CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS EBV13 VALO DE GALINHA**

##### **7.1.1 – ATIVIDADE DE TELOMERASE**

[0251] A detecção de telomerase é alcançada com o uso de Telo TAGGG telomerase PCR ELISA desenvolvido por Roche Applied Science (Telomeric Repeat Amplification Protocol (TRAP) - Cat. nº 11 854 666 910 ), de acordo com o protocolo do fornecedor. O Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA permite a amplificação de produtos de prolongamento mediado por telomerase combinados com a detecção não radioativa seguindo um protocolo de ELISA. O ensaio é válido se o valor de absorbância do controle negativo for menor ou igual a  $0,25 A_{450\text{nm}} - A_{690\text{nm}}$  e se o valor de absorbância do controle positivo for maior ou igual a  $1,5 A_{450\text{nm}} - A_{690\text{nm}}$ , ao usar  $1 \times 10^3$  de equivalente de célula no ensaio. As amostras são referidas à positiva telomerase se a diferença na absorbância for maior que  $0,2 A_{450\text{nm}} - A_{690\text{nm}}$  unidades. Dois controles foram usados: o controle negativo é fibroblastos murinos (células FED) e os controles positivos são células FGB8 (Células-tronco embrionárias estabelecidas por Vivalis a partir de embriões de camundongos 129 SV) e células EB14-O74 de galinha anteriormente estabelecidas em WO 03/076601.

[0252] Os resultados obtidos são resumidos na figura nº 2. As células EBv13 expressam alto nível de telomerase. Na passagem p193 e 195, a atividade de telomerase é equivalente a uma das células EB14-074 de galinha.

### **7.1.2 – MARCADORES BIOLÓGICOS DE CÉLULAS ES**

[0253] As células-tronco embrionárias são caracterizadas pela expressão de marcadores biológicos expressos na membrana celular. A expressão de EMA-1 (antígeno de membrana epitelial-1) e SSEA-1 (antígeno embrionário de estágio específico-1) em células EBv13 são associados por meio da análise FACS. Após 10 minutos de fixação com PFA 4 % (Paraformaldeído), os controles e as amostras de células são enxaguadas e pré-incubadas com anticorpos monoclonais específicos de EMA-1 ou SSEA-1. Um segundo anticorpo conjugado à FITC é usado para a detecção de células que expressam os 2 marcadores biológicos selecionados. As amostras foram analisadas por meio de citometria de fluxo com o uso de um FACS (separador celular ativado por fluxo - Flow Activated Cell Sorter) de Coulter.

[0254] A análise FACS foi feita em células de fibroblastos de camundongo (células FED) como um controle negativo, células ES FGB8 de murídeo como um controle positivo, células EB14-074 de galinha como um controle positivo, células EBx e células EBv13. Conforme esperado, as células FED não expressam marcadores biológicos, considerando que células FGB8 e EB14-074 apresentam uma coloração importante, respectivamente de 60,13 % e 78,7 para EMA-1 e 94,45 % e 95 % para SSEA-1 (dados não mostrados). A população de células EBv 13 de galinha não apresentam qualquer coloração para EMA1 (2 %) e uma muito leve para SSEA-1 (22 %).

### **7.1.3 – CARIÓTIPO**

[0255] A análise de cariótipo foi executada para verificar o diploidismo de célula e a origem de aves das células EBv13. As células na

fase exponencial de crescimento foram coletadas e tratadas 2 horas por colcemida (0,02µg/ml). Após a lavagem e centrifugação, um choque hipotônico é executado sobre as células com KCl (0,56 %) durante 20 minutos. Subseqüentemente, as células EBv13 foram fixadas em metanol/ácido acético (3/1) e armazenadas de um dia para o outro a -20°C. O dia seguinte, a metáfase foi marcada no vidro, colorida por uma solução de wright/giemsa e observada sob o microscópio. Diversas séries de metafases foram observadas confirmando a origem da galinha das células EBv13. Nenhuma evidência de poliploidismo é observada.

#### **7.1.4 – A INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA DE CÉLULA SOBRE OS TAMANHOS DE CONGLOMERADOS DAS CÉLULAS EBV13**

[0256] Os inventores revelaram que a concentração de cálcio e magnésio no meio livre de soro usado para a infecção e cultura de células EBx causam um impacto sobre o tamanho dos conglomerados. A Figura 10 mostra a diminuição no tamanho de conglomerados quando é feita a passagem das células EBv13 a partir de um meio com um alta concentração de Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> para uma baixa concentração.

### **7.2 – CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS DE CÉLULAS EBX DE PATO**

#### **7.2.1 – MORFOLOGIA DAS CÉLULAS EBX DE PATO**

[0257] A análise de microscopia eletrônica de transmissão das células EBx® foi executada por Dr. A Rivoire (Lyon, França). As células EBx® de pato exibem uma morfologia de células-tronco embrionárias típica (isto é, alta razão núcleo-citoplasmático) que se assemelha ao fenótipo das células-tronco embrionárias de murideo e as células VIVALIS EB14 descritas em WO2006/108846. As células EBx® de pato são células pequenas redondas (diâmetro ~ 10 µm) com um nucléolo e núcleo grandes, com curta pseudopodia que se estende a partir da membrana plasmática (Figura 4). Elas são altamente ativas metabólicas com um citoplasma rico em ribossomo e mitocôndria.

Contêm numerosos vacúolos intracelulares, um sistema de Golgi muito desenvolvido e um retículo endoplasmático granuloso.

### **7.2.2 - EXPRESSÃO DE TELOMERASE DE CÉLULAS EBx® DE PATO**

[0258] A expressão de telomerase durante os diferentes estágios do estabelecimento de células EBx® de pato foi investigada mediante o uso do kit de detecção de telomerase Roche (Telomerase OCR ELISA). A telomerase é encontrada por ser altamente expressa em células aderentes EBx® de pato, assim como durante a privação de alimentadores, durante o processo de adaptação das células EBx® de pato à suspensão e durante privação de alimentadores.

[0259] A Figura 5 mostra que a EB24 e EB26 de pato expressam alto nível de telomerase, assim como as células EB14 de galinha. A EB66 de pato também expressa alto nível de telomerase, todos ao longo das passagens de células. Esta alta atividade de telomerase é estável em células EB66 após a adaptação em SFM diferente (Figura 15).

### **7.2.3 – As CÉLULAS EBx® DE PATO EXIBEM NENHUMA ATIVIDADE DE TRANSCRIPTASE**

#### **REVERSA ENDÓGENA**

[0260] A expressão de transcriptase reversa endógena foi investigada por meio da análise F-PERT direta (Lovatt et al., 1999, J. Virol. Methods, 82:185-200) em células puras (FRANÇA). As linhagens de células EBx® de pato, EB24 (dados não mostrados), EB66 (dados não mostrados), EB26 e EB51, não exibem atividade de transcriptase reversa (RT) endógena (Figura 6A). A atividade de RT foi detectada na cultura de células EB14 de galinha, assim como, a uma extensão menor, em fibroblasto embrionário de galinha derivado de cepa de galinha livre de patógeno específico (SPF).

[0261] A presença de partículas retrovirais endógenas, replicativas ou não-replicativas, no sobrenadante da cultura de célula de células EBx® de galinha e pato foi investigada por meio de um ensaio ELISA que detecta o

antígeno capsideo principal de leucose de aves P27 (Figura 6B). Todas as linhagens de células EBx® de pato (EB26, EB51, EB24, EB66...), assim como EBv13 de galinha, não segregam o antígeno de ALV p27. Ao contrário, as células EB14 de galinha expressam o antígeno de ALV P27.

#### **7.2.4 – AS CÉLULAS EBX DE PATO NÃO SEGREGAM O VÍRUS REPLICATIVO DA LEUCOSE AVIÁRIA (ALV)**

[0262] O ensaio de co-cultura de células EBx de pato com linhagem de célula QT6 de codorna, conhecida por ser sensível aos ALVs exógenos e endógenos, foi executado para detectar a presença de vírus de pato replicativo endógeno. A Figura 7A descreveu o princípio da co-cultura de QT6. A presença de vírus replicativo é detectada por meio de um ensaio ELISA que detecta o antígeno capsideo principal de leucose de aves P27. O ensaio demonstra que nenhuma das células EBx de pato testadas segregam o ALV replicativo (isto é, replicação-competente) (Figura 7B).

#### **7.2.5 – AS CÉLULAS EBX DE PATO EXPRESSAM OS RECEPTORES DO VÍRUS INFLUENZA HUMANO E DE AVES**

[0263] A detecção de receptores aos vírus influenza humano (Sia $\alpha$ 2-6Gal) e de aves (Sia $\alpha$ 2-3Gal), em células EBx de pato, foi executada por meio da análise de separador de célula fluorescente com o uso de lectinas marcadas com digoxigenina (Boehringer):

- Lectina aglutinina Sambuca nigra (SNA) liga-se, especificamente, à Sia $\alpha$ 2-6Gal;
- Lectina aglutinina Maackia amurensis (MAA) liga-se, especificamente, à Sia $\alpha$ 2-3Gal.

[0264] As células EBx de pato e EB14 de galinha foram lavadas em 10mM HEPES, 150mM NaCl pH7,5 e re-suspensas no mesmo tampão a uma concentração final de  $5 \cdot 10^6$ . As células foram incubadas 30 min sobre gelo, então, por um adicional de 15 a 30 minutos na presença de SNA ou MAA.

As células tratadas com lectina foram lavadas em 10mM HEPES, 150mM NaCl pH7,5, antes da incubação sobre gelo, durante 15 a 30 minutos com anticorpos anti-dioxigenina marcados com FITC. Então, as células foram lavadas em NaCl 0,9 % e analisadas por FACS.

[0265] As células EBx de pato e EB14 de galinha expressam receptores de superfície de célula que compreendem oligossacarídeos com resíduos de Sia $\alpha$ 2-6Gal e Sia $\alpha$ 2-3Gal (Figura 8).

### **7.2.6 – CARIÓTIPO**

[0266] A análise de cariótipo foi executada para verificar o diploidismo de célula e a origem de aves das células EB66 e EB24 de pato. As células na fase exponencial do crescimento foram coletadas e tratadas 3 a 6 horas por colcemida (0,6 mg/ml). Após a lavagem e centrifugação, um choque hipotônico é executado em células com KCl (0,56 %) durante 20 minutos. Subseqüentemente, as células EB66 e EB24 de pato foram fixadas em metanol/ácido acético (3/1) e armazenadas de um dia para o outro a -20°C. O dia seguinte, a metáfase foi esperada no vidro, colorida por uma solução de wright/giemsa e observada sob o microscópio.

[0267] Diversas séries de metafases foram observadas confirmando a origem do pato das células EBx. Nenhuma evidência de poliploidismo é observada. A Figura 16 mostra o cariótipo diplóide das células EBx66 de pato (Figura 16).

### **EXEMPLO 6: REPLICAÇÃO DE POXVÍRUS EM LINHAGEM DE CÉLULA EBV13 DE GALINHA**

[0268] A suscetibilidade das células EBv13 à infecção com poxvírus foi investigada com o uso de uma varíola modificada Ankara recombinante - Modified Vaccinia Ankara (MVA) codificando um gene GFP (proteína verde fluorescente).

[0269] Os seguintes protocolos foram usados: três dias antes da infecção, 0,4 X 10<sup>6</sup> de células EBv13 (passagem 188)/ml são semeadas

em frascos T175 sob 40 ml de SFM Excell 65319 (SAFC) suplementado com 4 mM de glutamina. A infecção é executada a uma multiplicidade de infecção de  $10^{-2}$  TCID<sub>50</sub>/célula (estoque MVA-GFP está em  $10^9,7$  TCID/ml). Uma hora após a infecção, 60 ml de meio fresco é adicionado ao frasco. A cultura e a infecção foram executadas a 37°C, 7,5 % de CO<sub>2</sub>, e agitadas a 60 rpm. Cada dia após a infecção, uma alíquota da suspensão de célula é coletada e congelada. No final da cinética, uma avaliação da produtividade é executada seguindo o método TCID<sub>50</sub>. Resumidamente, a titulação de vírus de MVA-GFP infeccioso foi executada em células DF-1. As células foram semeadas em placas de 96 cavidades de fundo plano a uma densidade de  $15 \times 10^3$  células/cavidade no meio DMEM (Biowhittaker) suplementado com 5 % de soro de bezerro fetal (FCS) (SAFC) e 2 mM de L-glutamina (Biowhittaker). Vinte quatro horas depois, as células foram infectadas com dez vezes as amostras seriamente diluídas em DMEM e incubadas por uma semana a 37°C, 5 % de CO<sub>2</sub>, em uma atmosfera umedecida. A infectividade do vírus foi medida através da observação microscópica de efeito citopático global (CPE) e as células infectadas exposta a UV. Então, os títulos TCID<sub>50</sub> foram calculados de acordo com o método Reed e Muench (1938, A simple method of estimating fifty percent endpoints. Am. J. Hyg. 27, 493-97). A viabilidade e a proliferação celular são monitoradas desde o princípio do experimento. As células Valo de galinha EBv13 mostram-se altamente sensíveis à infecção MVA-GFP (Figuras 3A e 3B).

#### **EXEMPLO 8: REPLICAÇÃO DE POXVÍRUS EM LINHAGENS DE CÉLULAS EBX DE**

#### **PATO**

[0270]A suscetibilidade das células EBx de pato à infecção com poxvírus foi investigada com o uso de uma vacínia modificada Ankara recombinante - Modified Vaccinia Ankara (MVA) codificando um GFP. A

titulação de vírus foi executada conforme anteriormente descrito para as células EBv13 de galinha.

### **8.1 – MÉTODO DE CULTURA DE CÉLULA**

[0271] As células EBx de pato foram armazenadas em frascos tipo cryovials em nitrogênio líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$  ( $20 \times 10^6$  de células/frascos). O crio-frasco (cryovial) é diretamente descongelado em um banho de água pré-aquecida a  $+37^{\circ}\text{C}$ . A suspensão de célula é colocada em um tubo estéril de 50 ml com 30 ml de meio de cultura pré-aquecido. Após a centrifugação (5 min a  $300 \pm 20$  g, a temperatura ambiente), 15 ml de meio de cultura fresco é adicionado sobre o pelota e brandamente homogeneizado. A amostra é numerada com o uso de Trypan azul. A numeração deve ser  $> 20 \times 10^6$  de células e a viabilidade deve ser  $> 70\%$  para garantir uma boa cultura.

[0272] A suspensão de célula é plaqueada em um frasco T75  $\text{cm}^2$  e incubada a  $+37^{\circ}\text{C}$  sob uma atmosfera de  $7,5\%$  de  $\text{CO}_2$ , em um agitador orbital a 50 rpm. O meio fresco é, então, adicionado diariamente. É feita, então, a passagem das células para aumentar a biomassa das células a semear em biorreator de 3l.  $320 \cdot 10^6$  de células são necessárias para inocular um biorreator de 3l. Uma amostra é tomada a pós a leve mistura para executar uma numeração, com o uso de trypan azul, para determinar a densidade celular. Uma mistura de célula de 150 ml é preparada a fim de se obter uma concentração celular de  $0,4 \times 10^6$  de células. $\text{ml}^{-1}$  no volume de cultura final de 800 ml no biorreator. Antes da semeadura das células, o pH é ajustado no vaso para 7,2 (devido ao fato de que o pH será diminuído mediante a injeção de superfície de  $\text{CO}_2$ ). O  $\text{pO}_2$  é ajustado a  $50\%$  de saturação de  $\text{O}_2$  (o controlador de fluxo de massa é ajustado a  $100\%$ , o qual corresponde a uma taxa fluxo de borrifador máxima a  $50 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ). No início do processo, o pH é mantido por meio da injeção de superfície de  $\text{CO}_2$ , depois, é controlado pela adição de  $7,5\%$   $\text{NaHCO}_3$ . A aeração da superfície é começada com ar a uma taxa de fluxo

de 0,3 ml.min<sup>-1</sup>. A numeração de células é executada em uma base de rotina.

[0273] Após 3 dias de cultura, a densidade celular deveria ser maior que 4 a 5 x 10<sup>6</sup> de células.ml<sup>-1</sup>. Se a densidade celular esperada é alcançada, a infecção de vírus é executada a um MOI de 10<sup>-4</sup>. A temperatura do vaso é ajustada a 33 °C. A cepa do vírus é descongelada sobre o gelo. A mistura de infecção é preparada em 10 ml de meio de produção. Após a inoculação da mistura de infecção no biorreator, a absorção viral é executada durante 1 hora. O meio de produção final é preparado em 1,5l de meio de produção, a tripsina é adicionada a fim de se obter uma concentração final no vaso de 0,3 U. ml<sup>-1</sup> (2,3 l sobre o todo). O meio de produção final pré-aquecido é, então, adicionado. Todo dia uma amostra de aproximadamente 15 ml é coletada a partir do biorreator para executar a numeração de células, a análise de morfologia das células e para observar CPE. Os metabólitos, tais como glutamato, glutamina, lactato e glicose, são analisados ao longo de toda cultura com o software básico BioProfile. A concentração dos metabólitos é ajustada se necessário. Por exemplo, a concentração de glutamina é ajustada a 2 mM, se necessário. A concentração de glicose é ajustada a 2 g.l<sup>-1</sup>, se necessário.

[0274] A titulação de vírus é realizada no final do experimento com o uso de todas as amostras coletadas.

## **8.2 – RESULTADOS**

### **8.2.1 – A CINÉTICA DO CRESCIMENTO CELULAR DAS CÉLULAS EBx® DE PATO EM UM BIORREATOR DE BATELADA ALIMENTADA (FEDBATCH) DE 3L**

[0275] As células EBx® de pato são cultivadas rotineiramente no biorreator tanque agitado. A biomassa derivada de EBx® de pato é deixada acumular a 37°C em um meio de crescimento celular até que uma densidade celular de 5 a 6.10<sup>6</sup> de células/ml foi alcançada. Então, a mistura é diluída de cerca de 3 a 10 vezes, e a cinética de crescimento celular é acompanhada durante um período de 10 dias. Sob tais condições, a densidade celular de 12 a

20 milhões de células/ml é rotineiramente alcançada em torno do dia 5 a 8. Deste modo, as células EBx® de pato exibem uma faixa de razão de divisão que chega pelo menos até 10 a 15 vezes.

### **8.2.2 – A INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA DE CÉLULA SOBRE O TAMANHO DE CONGLOMERADOS DURANTE A INFECÇÃO DE VÍRUS MVA-GFP DAS CÉLULAS EBX DE PATO**

[0276] Os inventores revelaram que a concentração de cálcio e magnésio no meio livre de soro usado para a infecção e cultura de células EBx causam um impacto sobre o tamanho dos conglomerados. A presença de conglomerados pequenos das células EBx de pato aperfeiçoa a propagação e infecção do vírus, conduzindo a altos títulos de vírus MVA (Figura 9A).

### **8.2.3 – A PRODUÇÃO DE VÍRUS MVA NO BIORREATOR DE 3L**

[0277] A biomassa derivada de EBx® de pato é deixada acumular durante a fase de propagação celular no meio de crescimento Excell 66444 a 37°C. As células foram, então, infectadas com  $10^{-2}$  TCID<sub>50</sub>/célula de vírus MVA-GFP e a mistura foi diluída no meio de produção Excell 66444. Após adição de meio Excell fresco, a densidade celular baixou no dia 2, e no dia 4, a densidade celular das células infectadas aumentou e alcançou 12 milhões de células/ml. Sob tais condições, a produtividade de MVA-GFP é alta. Desde o dia 4 após infecção, o título de MVA-GFP é de cerca de  $10^8$  TCID<sub>50</sub>/ml (Figura 9B). Um rendimento de MVA-GFP de 205 TCID<sub>50</sub>/célula foi obtido nas células EBx® de pato.

## **EXEMPLO 9: PRODUÇÃO DE VÍRUS INFLUENZA NAS LINHAGENS DE CÉLULAS EBX DE PATO**

### **9.1 - MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **9.1.1 – ENSAIO DE INFECTIVIDADE DE VÍRUS INFLUENZA (TCID<sub>50</sub>)**

[0278] A titulação do vírus influenza infeccioso foi executada em células MDCK. Em suma, as células foram semeadas em placas de in 96

cavidades de fundo plano a uma densidade de  $3 \times 10^3$  de células/cavidade no meio UltraMDCK suplementado com 2,5 mM de L-glutamina. Vinte quatro horas depois, as células foram infectadas com dez vezes as amostras seriamente diluídas em UltraMDCK contendo  $6 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  de tripsina-EDTA e incubadas por uma semana a  $33^\circ\text{C}$ , 5 % de  $\text{CO}_2$ , em uma atmosfera umedecida. A replicação do vírus foi, então, testada em um ensaio HA com o uso de células de eritrócitos de galinha e os títulos de  $\text{TCID}_{50}$  foram calculados de acordo com o método Reed e Muench (1938)\*. \*Reed L, Muench H, 1938. *A simple method of estimating fifty percent endpoints*. Am. J. Hyg. 27, 493-97.

### **9.1.2 – ENSAIO DE IMUNODIFUSÃO RADIAL ÚNICO (SRID)**

[0279] A concentração de hemaglutinina em amostras derivadas de das células EB14 infectadas com o vírus influenza, foi determinada conforme descrito por Wood e associados\*. Resumidamente, a placas de vidro foram cobertas com um agarose gel contendo o soro de anti-Influenza (concentração recomendada fornecida por NIBSC). Após o ajuste do gel, 10  $\mu\text{l}$  de diluições adequadas da referência e das amostras foram carregadas em cavidades perfuradas  $\varnothing$  de 3mm. Após uma incubação de 18 às 24h em uma câmara úmida a temperatura ambiente, as placas foram enxaguadas em 0,9 % NaCl e lavadas em água destilada. O gel foi, então, pressionado e seco. As placas foram coloridas sobre a solução de azul brilhante de Coomassie por 15 min e descolorida duas vezes em uma mistura de metanol e ácido acético até as zonas coloridas claramente definidas se tornaram visíveis. Após secar as placas, o diâmetro das cavidades de antígeno circundando as zonas coloridas foi medido em duas direções em ângulos retos. As curvas de resposta por dose de diluições de antígeno contra a superfície foram construídas e os resultados foram calculados de acordo com os métodos de ensaio de slope-ratio padrão. \*Wood JM. Et al. *"An improved single-radial- immunodiffusion technique for the assay of influenza hemaglutinina antigen: application for potency*

*determinations of inactivated whole virus and subunit vaccines"* (J. Biol. Stand., 1977, 5(3):237-47).

### **9.1.3 – ANÁLISE WESTERN BLOT DA PROTEÍNA HEMAGLUTININA INFLUENZA**

[0280] SDS-PAGE foi executada conforme descrito por Laemmli UK (1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 259:680-685) em 10 % de gel poliacrilamida. As proteínas desnaturadas (1 % SDS, 70mM  $\beta$ -mercaptoetanol) foram transferidas para a membrana difluoreto de polivinilideno (hybond P, Amersham) por meio de um procedimento blotting semi-seco (Kyhse-Andersen J (1984) Electroblotting de múltiplos géis : um simples aparelho sem tanque de atmpão para a transferência rápida de proteínas a partir de poliacrilamida para nitrocelulose (J Biochem Biophys Methods 10:203-209). As membranas de blot foram bloqueadas por 1 h, a temperatura ambiente, com a mistura composta de 5 % de leite em pó gordo em TBST suplementado com 1 % de FCS (SAFC). Então, as membranas de blot foram incubadas de um dia para o outro em solução de bloqueio suplementada com soro de ovelha anti-HA policlonal específico (1:500 (NIBSC). As membranas de blot foram lavadas 6 vezes com TBST e incubada por 1 h, a temperatura ambiente, com um anticorpo policlocan IgG anti-ovelha de coelho hrp-conjugado (1:5000 (Rockland) em solução de bloqueio. Após 6 lavagens com TBST, o complexo conjugado de proteína foi finalmente revelado com o uso de quimioluminescência (kit ECL, Amersham) e películas (Hyperfilm, Amersham).

## **9.2 - INFECÇÃO DE VÍRUS INFLUENZA DAS CÉLULAS EBx® DE PATO NO BIORREATOR**

### **DE 3L**

#### **9.2.1 - MATERIAIS E EQUIPAMENTOS**

##### **Material de descongelamento de células**

Frascos T75 cm<sup>2</sup> (Sarstedt, Cat nº 831813502)

Meio de cultura (meio livre de soro)

L-Glutamina 200mM (Biowhittaker, Cat nº BE17-605E)

Agitador orbital IKA KS260 (Fisher Bioblock, Cat nº F35044)

Material de amplificação de células

Frascos T175 cm<sup>2</sup> (Sarstedt, Cat nº 831812502)

Meio de cultura (meio livre de soro): Excell 65319 (JRH, Cat nº 65319- 1000M1687) adicionado com 2,5mM de glutamina

L-Glutamina 200mM (Biowhittaker, Cat nº BE17-605E)

D (+) Glicose (45 %) (Sigma, Cat nº G8769)

Material de produção

Meio de produção (meio livre de soro) : Excell 65629 (JRH, Cat nº 65629) suplementado com 2,5mM de glutamina

L-Glutamina 200mM (Biowhittaker, Cat nº BE17-605E)

D (+) Glicose (45 %) (Sigma, Cat nº G8769)

Trypzean 1X (Sigma, Cat nº T3449)

7,5 % de solução de bicarbonato de sódio (Sigma, Cat nº 205-633-8)

Cepa do vírus influenza (congelado a -80°C)

**9.2.2- MÉTODO DE CULTURA DE CÉLULA (IDEM AO PARA A REPLICAÇÃO DE MVA -**

**EXEMPLO 7.1)**

[0281] Titulação de vírus, ensaios de hemaglutinina (HAU) e quantificações de antígeno HA (western blot, SRID) são realizados no final do experimento com o uso de todas as amostras coletadas.

**9.3- RESULTADOS**

[0282] Os inventores demonstram que as células EBx de pato são substratos de células eficientes e seguras para a replicação de diversas cepas A e B do vírus influenza. A produção do vírus influenza pode ser executada em diversos vasos, tais como frascos, spinner (dados não mostrados) e biorreatores. O processo de batelada alimentada eficiente e reproduzível da

produção de vírus influenza, em biorreatores tanque agitados de 3l e 30L, foi obtido pelos inventores. O rendimento viral acima de 15 mg/l e até 50 mg/l de hemaglutinina é obtido de modo rotineiro em frascos e em biorreatores com cepas A e B do vírus influenza (Figuras 11 e 12).

**EXEMPLO 10: REPLICAÇÃO DO VÍRUS DE DOENÇA DE NEWCASTLE EM LINHAGENS DE CÉLULAS EBX DE PATO**

[0283] A suscetibilidade das células EBx de pato à infecção com vírus de doença de Newcastle foi investigada com o uso de uma cepa La Sota NDV.

**10.1 – MÉTODOS**

[0284] As células EBx® de pato foram crescidas no meio Excell (SFAC) em frascos T175 a 37°C, sob a atmosfera de 7,5 % de CO<sub>2</sub>, sobre um agitador orbital a 60 rpm. No dia 0, as células são semeadas a 0,4x10<sup>6</sup> de células/ml em 40 ml de meio fresco. A cultura de célula foi incubada a 37°C, 7,5 % de CO<sub>2</sub>, sob agitação (60 rpm). A cinética do crescimento celular foi seguida até a densidade celular alcançar uma concentração entre 4x10<sup>6</sup> a 6x10<sup>6</sup> de células/ml (usualmente, no dia 3 após a semeadura). Neste ponto, as células são inoculadas com a cepa La Sota NDV em dois MOI diferentes (10<sup>-3</sup> e 10<sup>-4</sup> TCID<sub>50</sub>/células) e incubadas por uma hora adicional a 37°C, 7,5 % de CO<sub>2</sub>, sob agitação (60 RPM). Então, a cultura de célula foi diluída com a adição de 60 ml de meio de produção viral fresco e a incubação prosseguiu a 37°C e 7,5 % de CO<sub>2</sub>, sob agitação (60 rpm). A cinética de produção de vírus e crescimento celular foi executada durante 7 dias. Como uma fonte de protease, a tripsina recombinante (SAFC) foi adicionada todo dia no meio de cultura; duas concentrações de tripsina (0,4 e 0,75 USP/ml) foram testadas. Alíquotas diárias foram removidas para a numeração celular, titulação de vírus e análise Western blotting.

[0285] As amostras foram separadas com o uso de 10 % de SDS-

PAGE e submetidas ao blotting na membrana PDVF (Amersham) por meio da técnica semi-seca. A imunodeteção foi executada com o uso de antisoro policlonal de galinha contra NDV (1:2000, CHARLES RIVER laboratories), seguido por anti-galinha coelho conjugado com fosfatase alcalina (1 :5000, SIGMA). O anticorpo secundário ligado foi detectado com o uso do kit de sistema de detecção de quimioluminescência ECL (ROCHE).

### **10.2 – RESULTADOS**

[0286] As células EBx de galinha e pato são sensíveis a e replicam a cepa La Sota NDV. Os títulos (em TCID<sub>50</sub>/ml) de NDV produzido nas células EBx® de pato aumentam a partir do dia 0 ao dia 2 pi para alcançar uma média de 10<sup>6,83</sup> TCID<sub>50</sub>/ml (painel esquerdo da Figura 13).

[0287] A análise Western blot (painel direito da Figura 13) mostrou a expressão das proteínas virais de NDV (HN, Fo/F, NP e M). A composição de proteínas virais de vírus NDV produzidos nas células EBx® de pato é similar a uma obtida com o vírus NDV produzido nas células EBx® de galinha. Adicionalmente, a cinética da liberação para os vírus produzidos em células EBx de pato e galinha é similar.

### **EXEMPLO 11: REPLICAÇÃO DO VÍRUS DE SARAMPO EM CÉLULAS EB66 DE PATO**

[0288] A suscetibilidade das células EB66 de pato à infecção com o vírus de sarampo foi investigada com o uso de um vírus recombinante de sarampo que expressa a proteína verde fluorescente.

### **11.1 – MÉTODOS**

[0289] As células EB66 foram crescidas no meio Excell em frascos T175 a 37°C, sob a atmosfera de 7,5 % de CO<sub>2</sub>, em um agitador orbital a 60 rpm. No dia 0, as células são semeadas a 0,4x10<sup>6</sup> de células/ml em 40 ml de meio fresco. A cultura de célula foi incubada a 37°C, 7,5 % de CO<sub>2</sub>, sob agitação (60 rpm). A cinética do crescimento celular foi seguida até a densidade celular alcançar uma concentração entre 4x10<sup>6</sup> a 6x10<sup>6</sup> de

células/ml (usualmente, no dia 3 após a semeadura). Neste ponto, as células são inoculadas com vírus recombinante de sarampo em dois MOI diferentes ( $10^{-1}$  e  $10^{-2}$  TCID<sub>50</sub>/células) e incubadas por uma hora adicional a 37°C, 7,5 % de CO<sub>2</sub>, sob agitação (60 RPM). Então, a cultura de célula foi diluída com a adição de 60 ml de meio de produção viral fresco e a incubação prosseguiu a 37°C e 7,5 % de CO<sub>2</sub>, sob agitação (60 rpm). A cinética de produção de vírus e crescimento celular foi executada durante 7 dias. Alíquotas diárias foram removidas para a numeração celular e a titulação de vírus.

### **11.2 – RESULTADOS**

[0290] As células EB66 são sensíveis a e replicam o vírus de sarampo. Sob condições não otimizadas, os títulos (em TCID<sub>50</sub>/ml) de sarampo produzido em células EB66 alcançam uma média de  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/ml (Figura 14).

### REIVINDICAÇÕES

1. PROCESSO PARA A OBTENÇÃO DE LINHAGENS DE CÉLULAS AVIÁRIAS DIPLOIDES CONTÍNUAS, derivadas de células-tronco embrionárias aviárias (ES), sendo que as ditas linhagens de células aviárias são capazes de proliferar em um meio basal na ausência de fatores de crescimento, e camada alimentadora e não produzem partículas de retrovírus endógenas de replicação-competente, caracterizado compreender as etapas de:

a) isolamento de embrião(ões) de pássaro a um estágio de desenvolvimento em torno da oviposição, sendo que o dito pássaro é selecionado da Ordem de Anseriformes e o genoma do dito pássaro não contém sequências provirais endógenas suscetíveis a produzirem partículas retrovirais endógenas de replicação-competente;

b) suspensão de células-tronco (ES) embrionárias aviárias obtidas por meio da dissociação de embrião(ões) da etapa a) em um meio de cultura basal suplementado com:

- Fator de Crescimento de Insulina 1 (IGF-1) e Fator Neurotrófico Ciliar (CNTF); e

- soro animal;

c) semeadura da suspensão de células ES obtidas na etapa b) sobre uma camada de células alimentadoras e, ainda, a cultura das células ES por pelo menos uma passagem;

e) retirada de IGF-1 e CNTF do meio de cultura, e, ainda, a cultura das células por pelo menos uma passagem;

f) diminuição progressiva da concentração das células alimentadoras no meio de cultura, a fim de obter uma retirada total de camada alimentadora após diversas passagens, e, ainda, a cultura das células;

h) obtenção de linhagens de células aviárias aderentes, derivadas de células ES, capazes de proliferar em um meio basal na ausência de fatores

de crescimento, camada alimentadora, opcionalmente, sem soro animal, sendo que as ditas linhagens de células aviárias geneticamente estáveis contínuas não produzem partículas de retrovírus endógenas de replicação-competente.

2. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por, após a etapa f), a concentração de soro animal no meio de cultura ser progressivamente diminuída a fim de obter uma retirada total de soro animal após diversas passagens.

3. PROCESSO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 2, caracterizado pelas ditas linhagens de células aviárias aderentes serem adaptadas a condições de cultura em suspensão.

4. PROCESSO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pela retirada dos fatores de crescimento IGF-1 e CNTF do meio de cultura na etapa e) ser feita simultaneamente.

5. PROCESSO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo dito pássaro ser um pato.

6. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo dito pato ser um pato Pekin.

7. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo dito pato ser um pato Muscovy.

8. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado por, na etapa a), o ovo de dito pato Muscovy ser incubado para amadurecer antes do isolamento do embrião do pato.

9. PROCESSO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado por ditas linhagens de células aviárias geneticamente estáveis contínuas terem pelo menos uma das seguintes características:

- uma alta razão núcleo-citoplasmático,
- uma atividade de telomerase endógena,

- um diâmetro de cerca de 10 µm;
- um tempo de duplicação de população de cerca de 30 horas ou menos a 37°C; e

- ditas células expressam um ou mais marcadores adicionais selecionados do grupo que compreende fosfatase alcalina, SSEA-1, EMA-1, ENS-1, e

sendo que as ditas células não produzem partículas de retrovírus endógenas de replicação-competente.

10. PROCESSO DE REPLICAÇÃO DE UM VÍRUS EM UMA LINHAGEM DE CÉLULAS AVIÁRIAS DIPLOIDES CONTÍNUAS, que pode ser obtida por meio do processo conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado por compreender as etapas de:

- a) infecção das ditas células aviárias com um vírus de interesse;
- b) cultura das ditas células aviárias infectadas, a fim de replicar o dito vírus;
- c) coleta do vírus em sobrenadante de cultura de célula e/ou dentro das ditas células.

11. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo dito vírus ser selecionado a partir do grupo que compreende poxvírus, ortomixovírus, paramixovírus, vírus de herpes, hepadnavírus, adenovírus, parvovírus, reovírus, circovírus, coronavírus, flavivírus, togavírus, birnavírus e retrovírus.

12. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo vírus ser selecionado a partir do grupo que consiste em:

- um poxvírus ou um poxvírus recombinante selecionado entre o grupo que compreende vírus de varíola modificada Ankara ("*MVA - Modified Vaccinia Ankara*"), vírus de varíola de Lister-Elstree, vírus de varíola LC16m8, vírus de varíola CVI78, poxvírus de galinha, poxvírus de canário (isto é,

ALVAC), NYVAC, poxvírus de junco, poxvírus de mainata, poxvírus de pombo, poxvírus de psittacine, poxvírus de codorna, poxvírus de pardal, poxvírus de estorninho, poxvírus de peru;

- um paramixovírus ou um paramixovírus recombinante selecionado entre o grupo que compreende vírus de sarampo, vírus de caxumba, vírus de rubéola, vírus Sendai, Vírus sincitial respiratório (RSV), vírus parainfluenza humano dos tipos I e III, vírus Rinderpest, vírus do destempero canino, Vírus de doença de Newcastle, vírus parainfluenza de pato;

- um ortomixovírus, um ortomixovírus recombinante ou um ortomixovírus recombinado selecionado entre vírus influenza humano, vírus influenza aviário, vírus influenza suíno, vírus influenza equino, vírus influenza felino;

- um togavírus selecionado entre vírus Sinbis, vírus da floresta Semliki, vírus O'nyong'nyong, vírus Chikungunya, vírus de Mayaro, vírus do rio Ross, vírus de encefalite equina oriental, vírus de encefalite equina ocidental, vírus de encefalite equina venezuelana ou um togavírus recombinante dos mesmos;

- um retrovírus selecionado entre vírus de reticuloendoteliose, vírus de anemia infecciosa de pato, vírus da necrose do baço ou um retrovírus recombinante dos mesmos;

- um parvovírus de pato ou um parvovírus recombinante do mesmo;

- um adenovírus selecionado entre adenovírus de galinha, adenovírus de ganso, adenovírus de pato e adenovírus de pombo ou um adenovírus recombinante dos mesmos;

- um birnavírus, de preferência vírus de doença bursal infecciosa;

e

- um flavivírus, de preferência, selecionado entre vírus da dengue,

vírus de encefalite japonesa e vírus do Nilo ocidental.

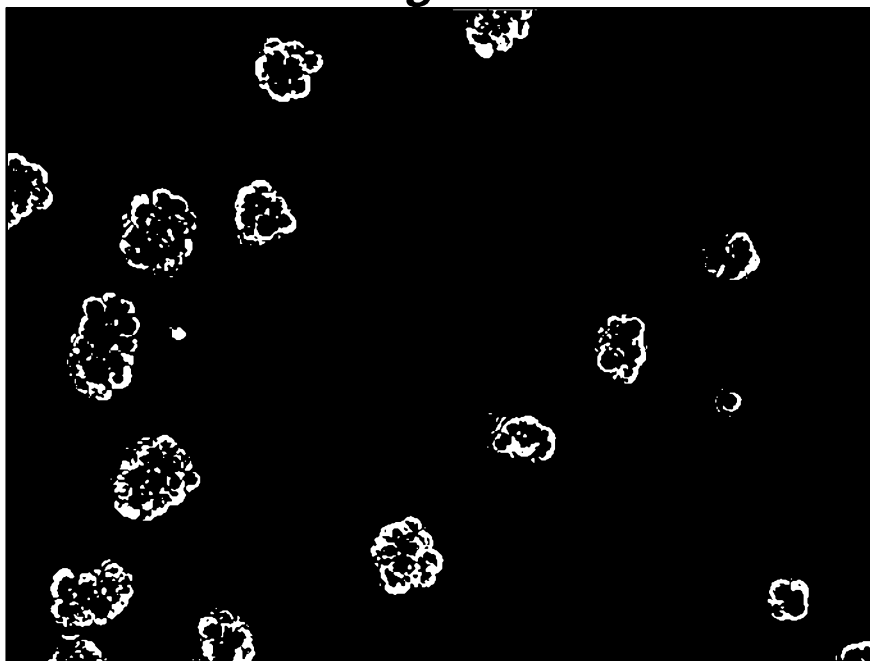
13. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE PEPTÍDEOS E PROTEÍNAS RECOMBINANTES, caracterizado por compreender as etapas de:

a) modificar geneticamente as linhagens de células aviárias diploides contínuas obtidas por meio do processo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 9, por meio da transfecção estável ou transiente de um vetor de expressão;

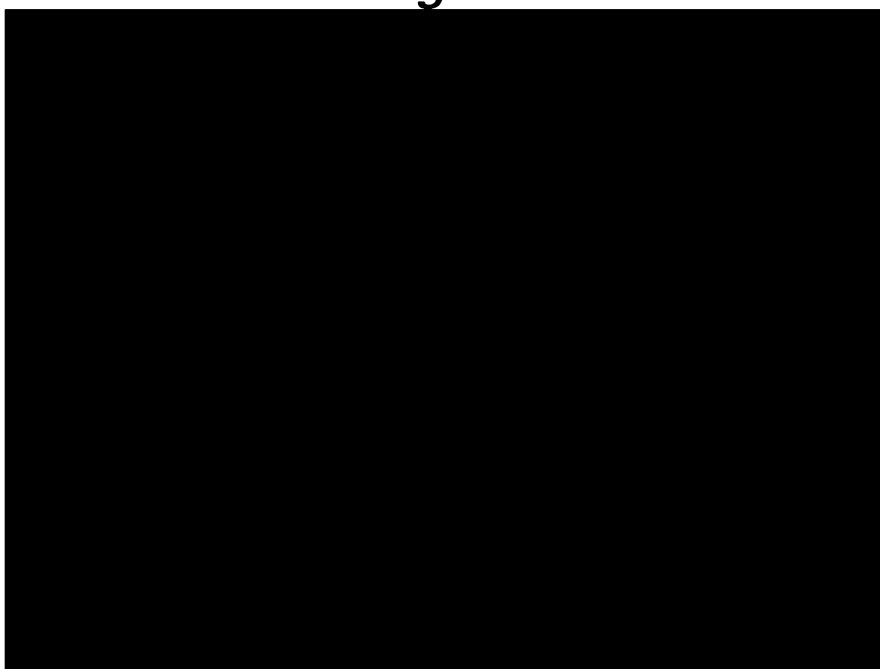
b) selecionar ditas linhagens de células aviárias modificadas que expressam os ditos peptídeos ou proteínas recombinantes; e

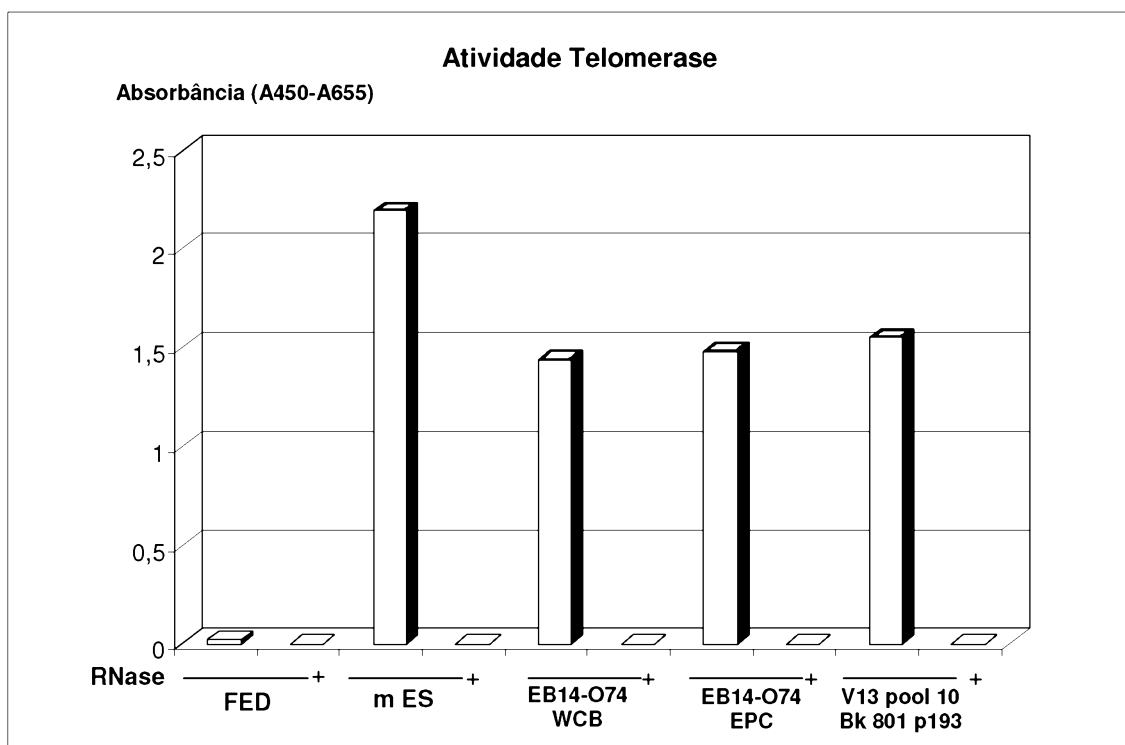
c) purificar as proteínas ou peptídeos recombinantes.

**Fig. 1A**

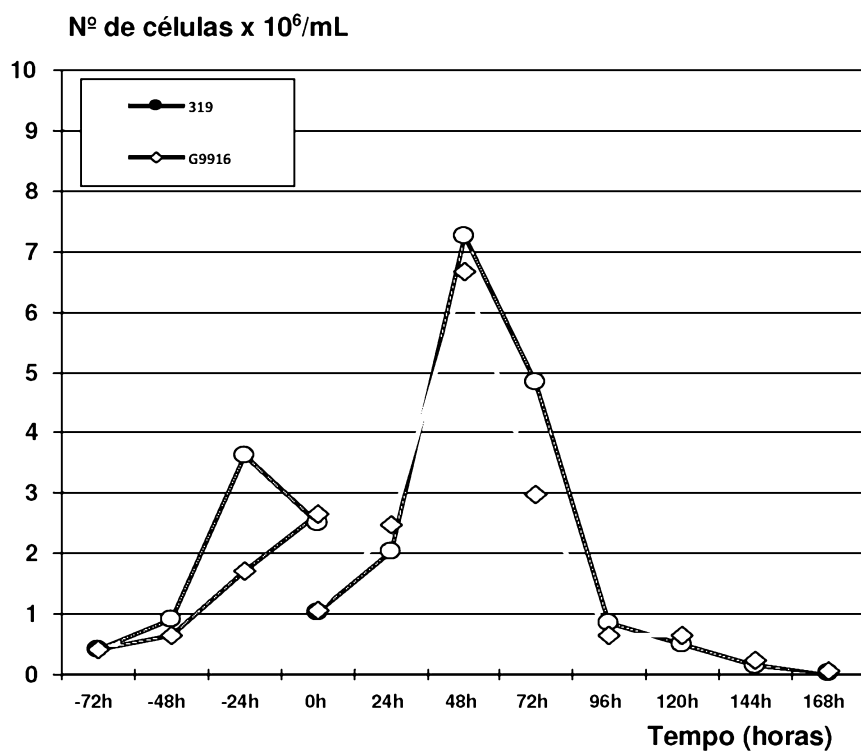
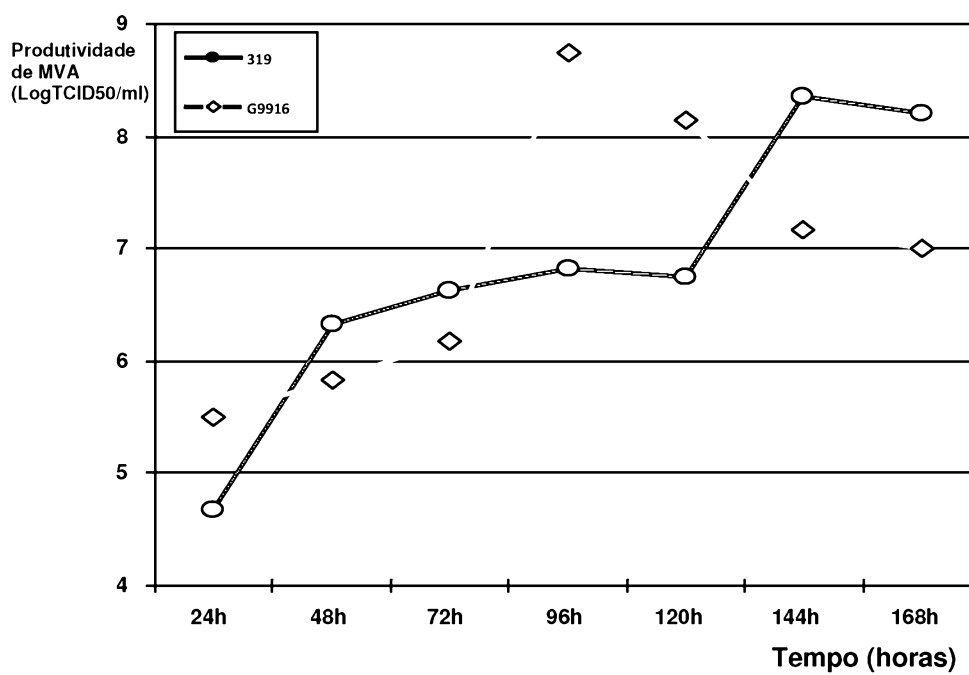


**Fig.1B**

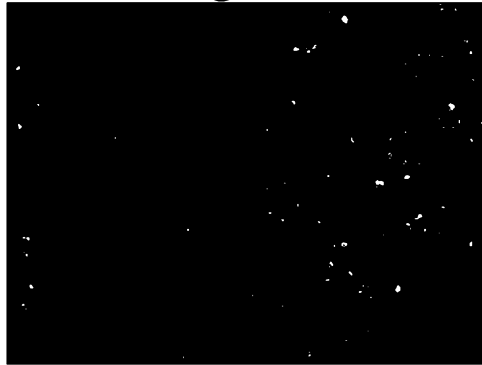




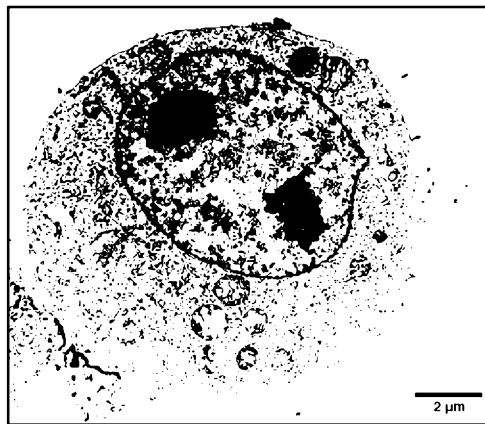
**Fig. 2**

**Fig. 3A****Fig. 3B**

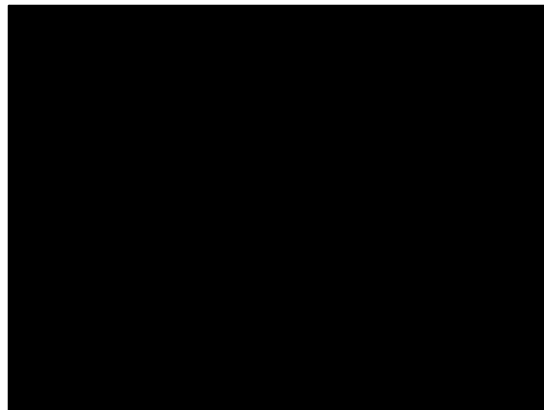
**Fig. 4A**



**Fig. 4B**



**Fig. 4C**



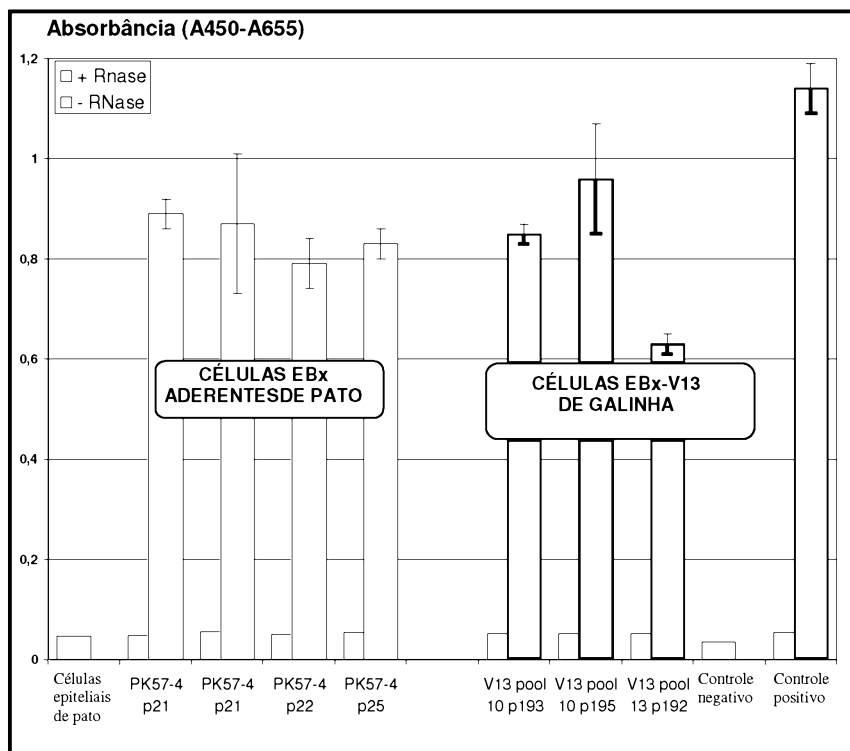


Fig. 5A

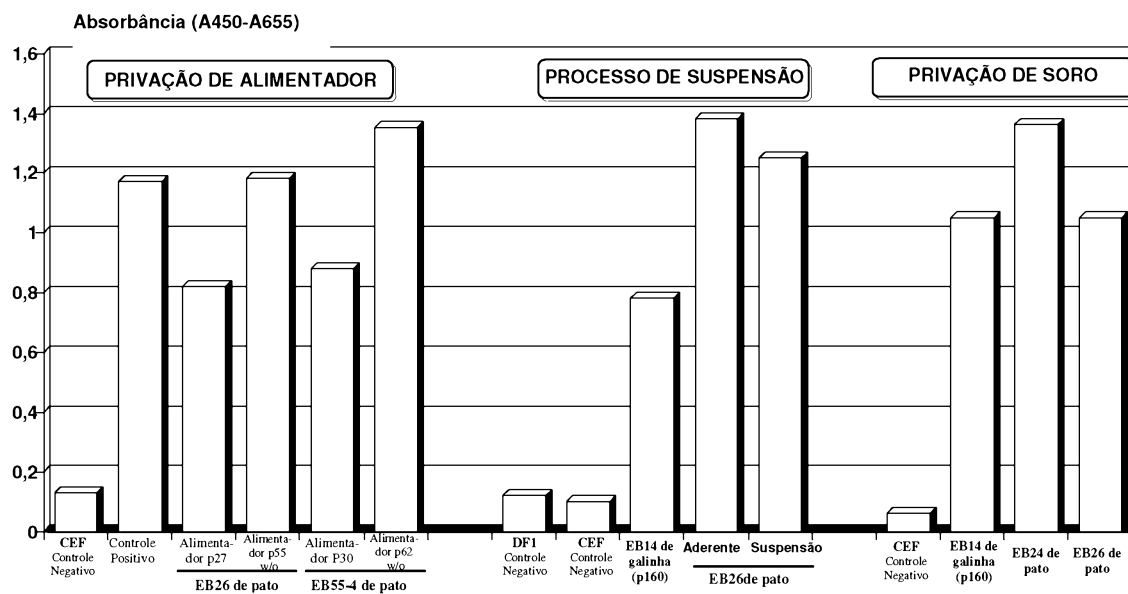
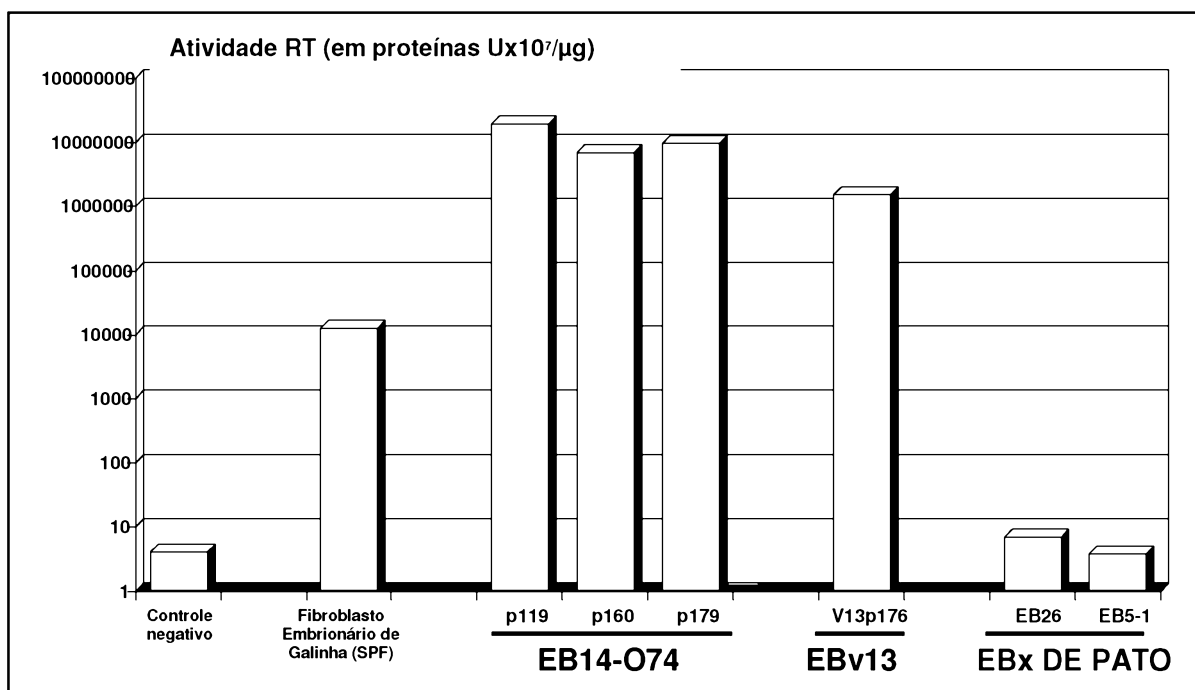
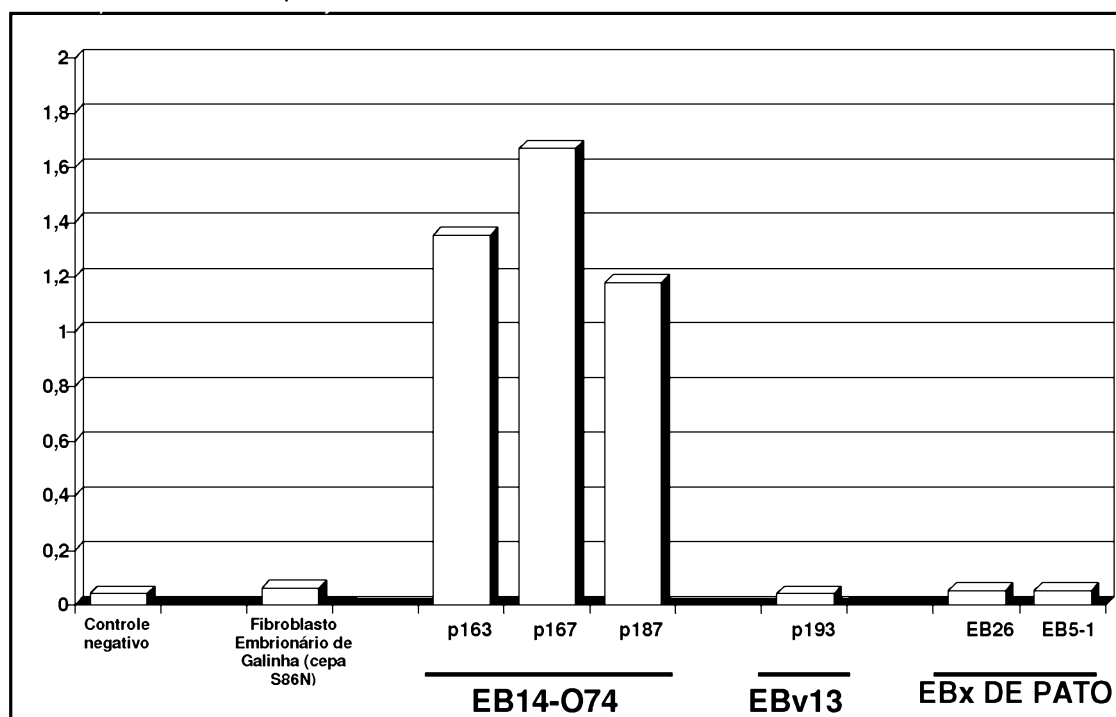


Fig. 5B

**Fig. 6A**

Ensaio ELISA de ALV-p27

**Fig. 6B**

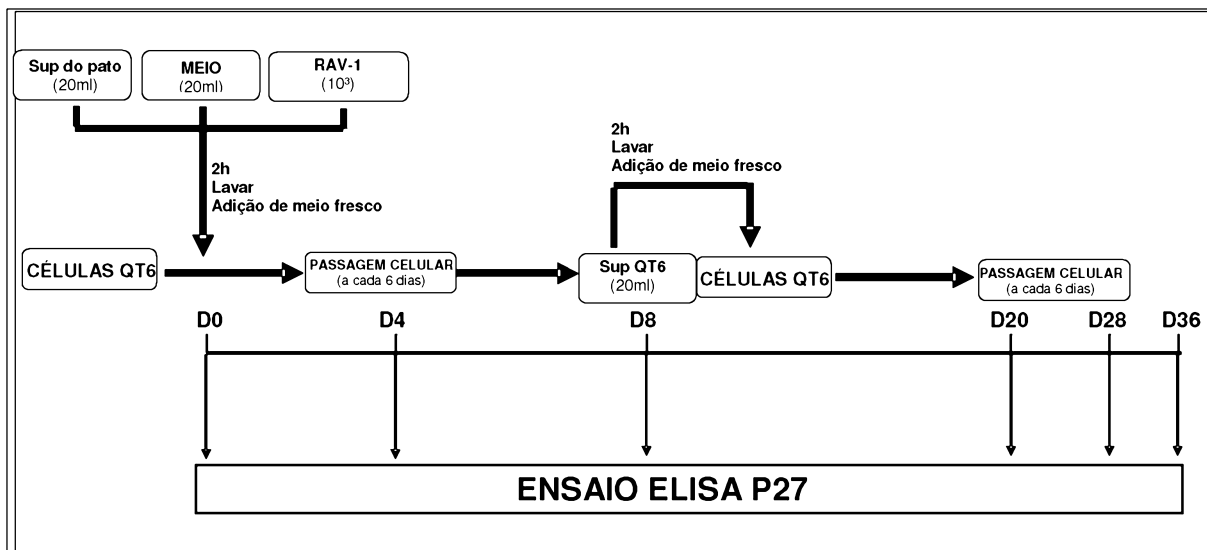


Fig. 7A

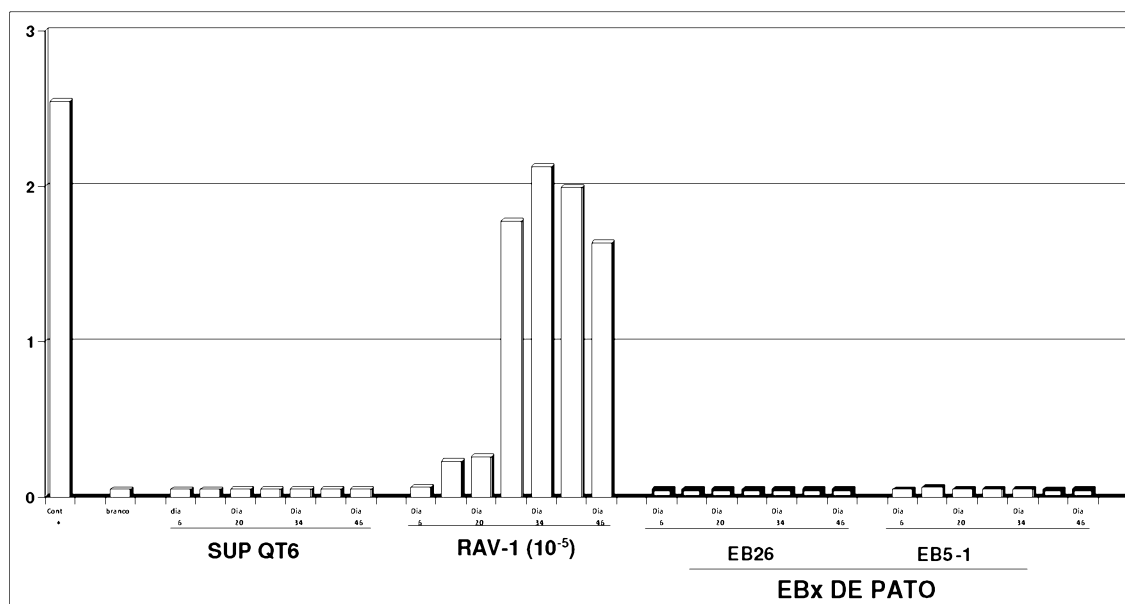
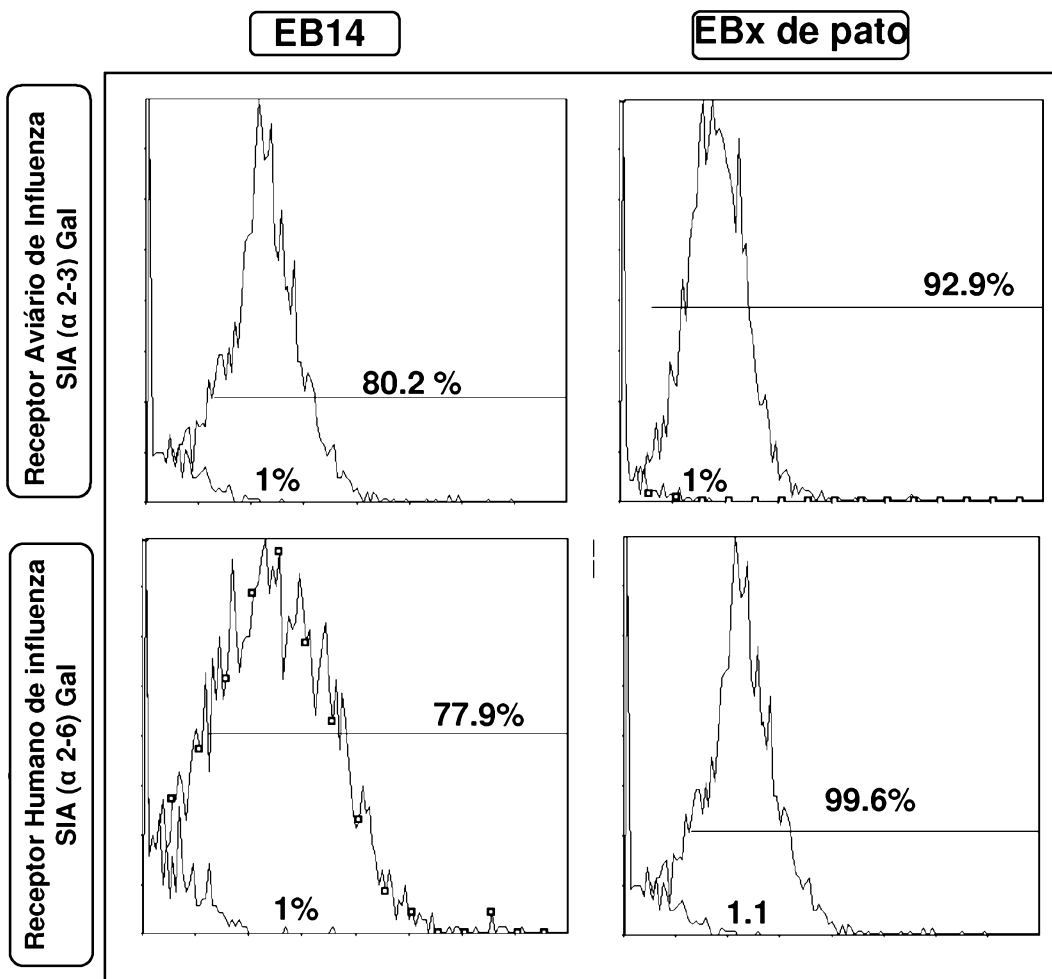
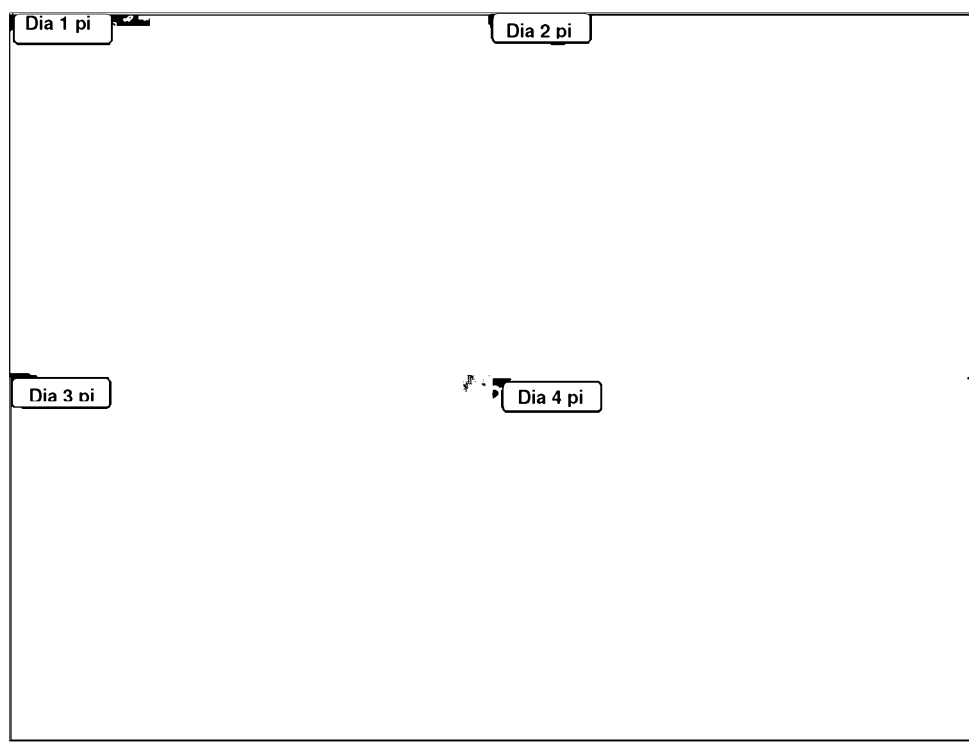


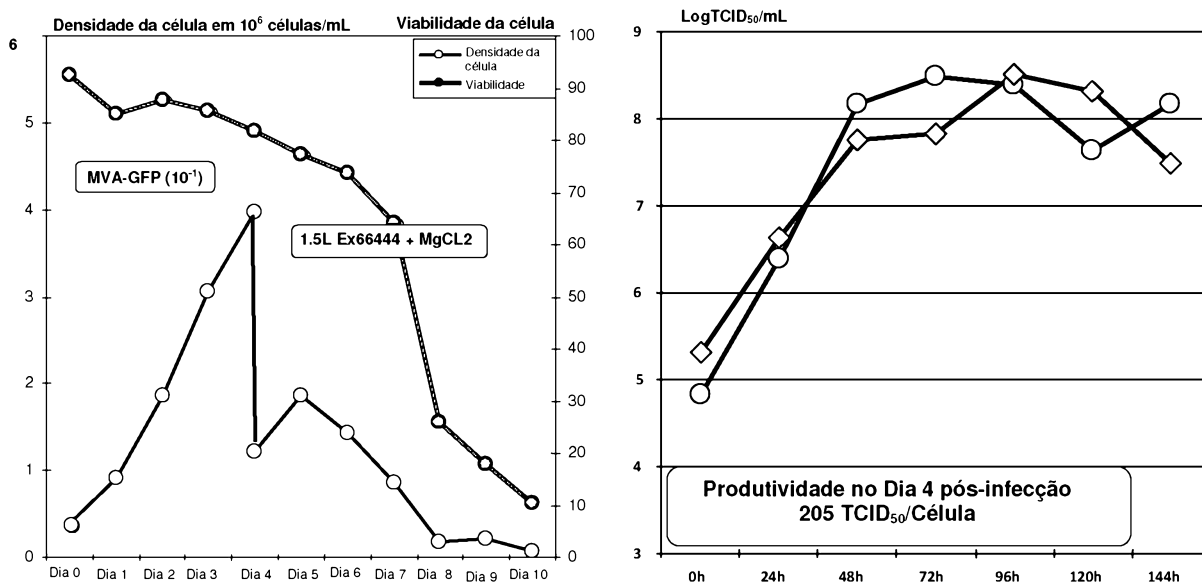
Fig. 7B



**Fig. 8**

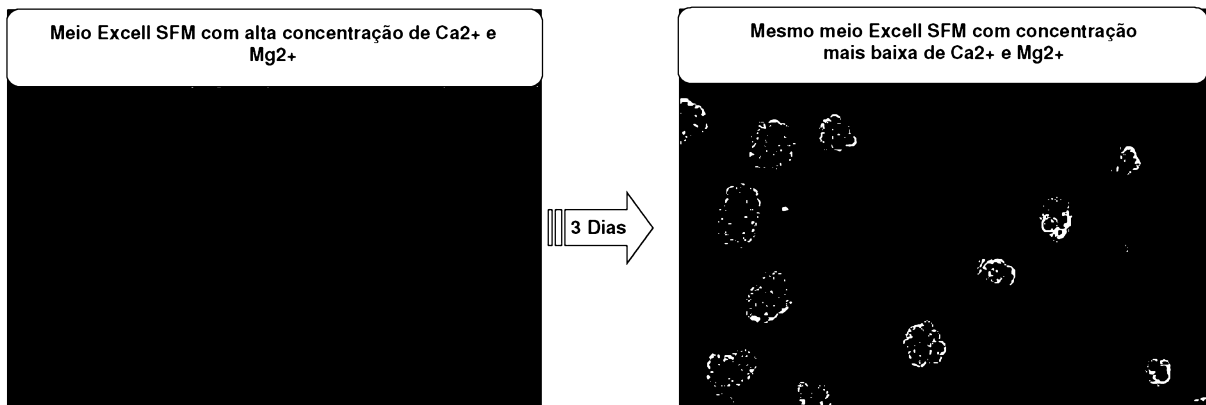


**Fig. 9A**

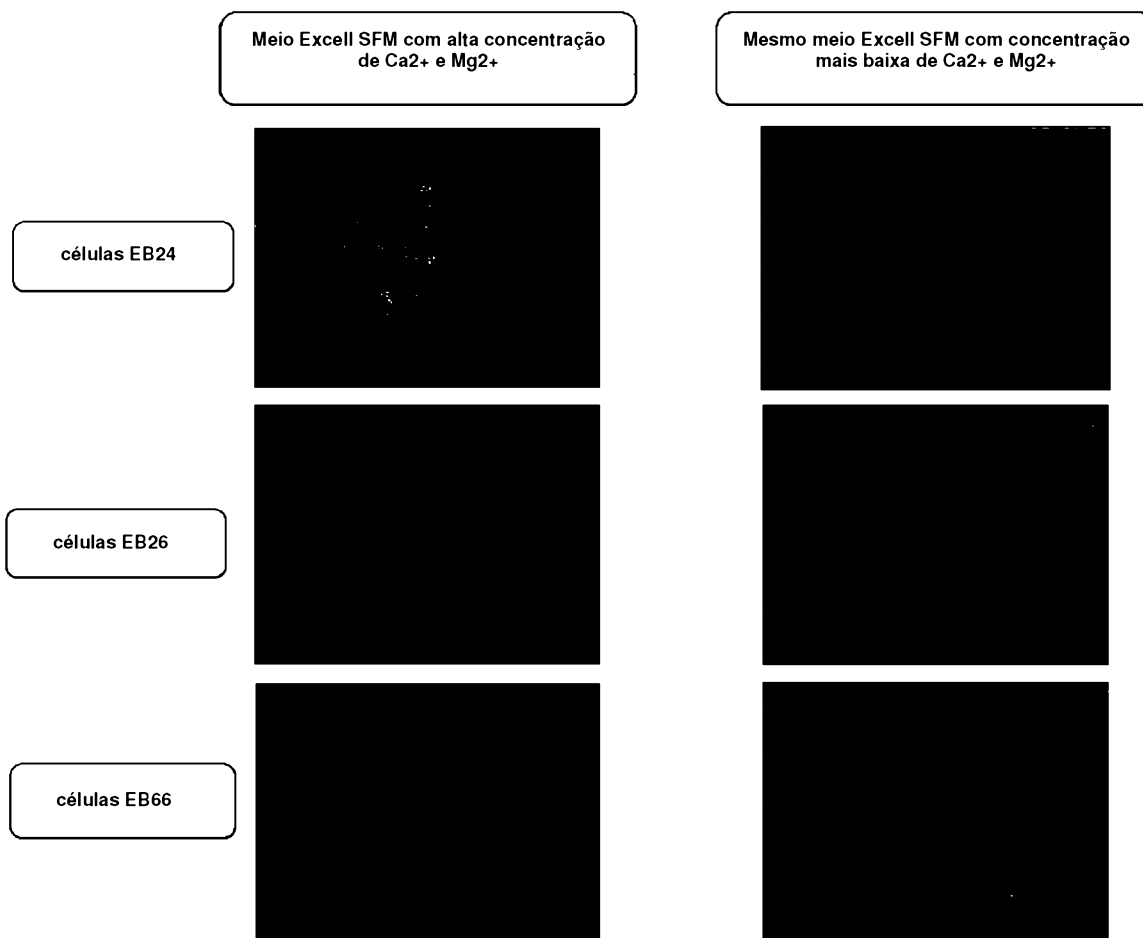


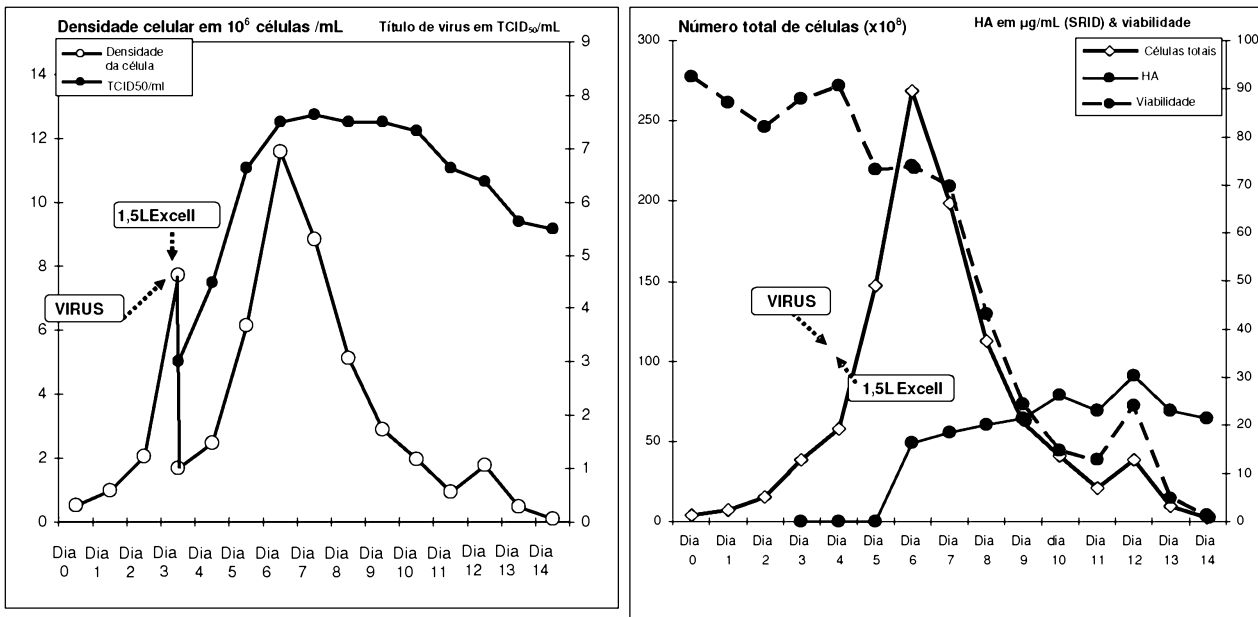
**Fig. 9B**

**Fig. 10A**

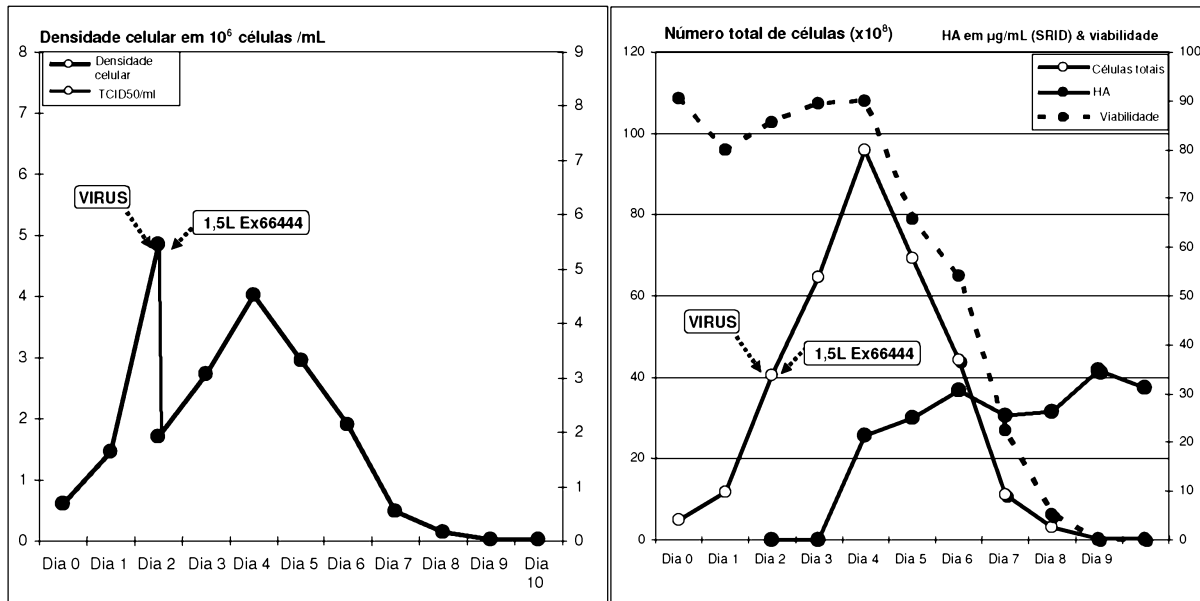


**Fig. 10B**

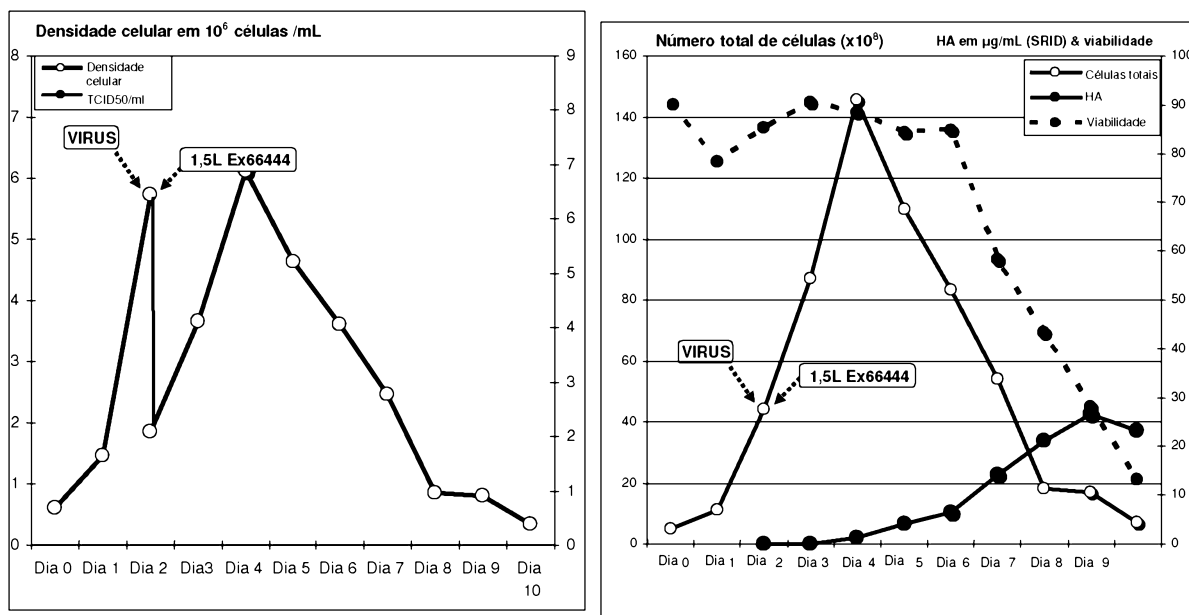




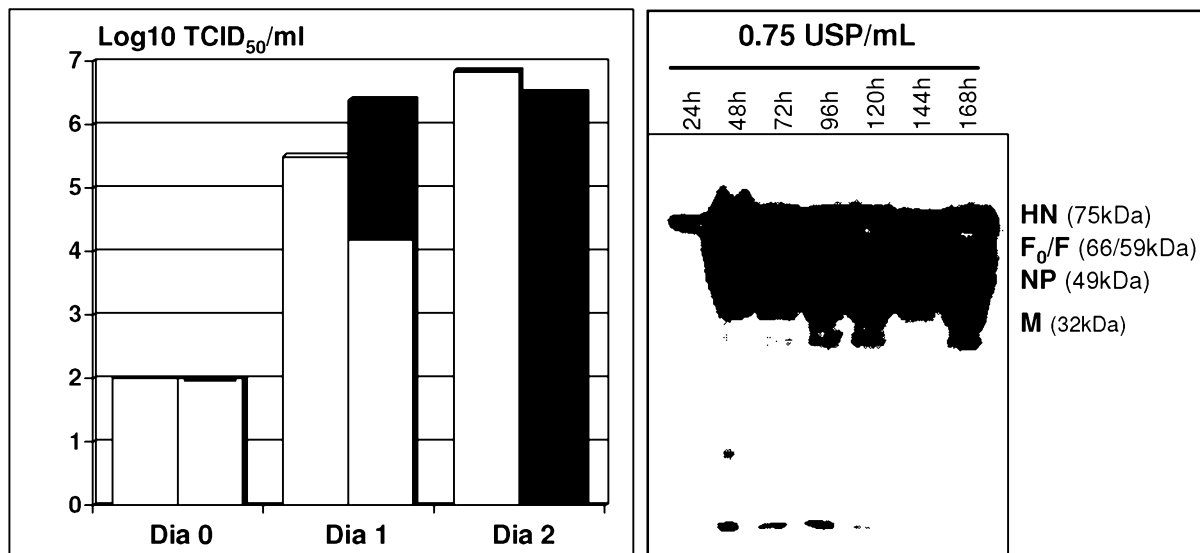
**Fig. 11A**



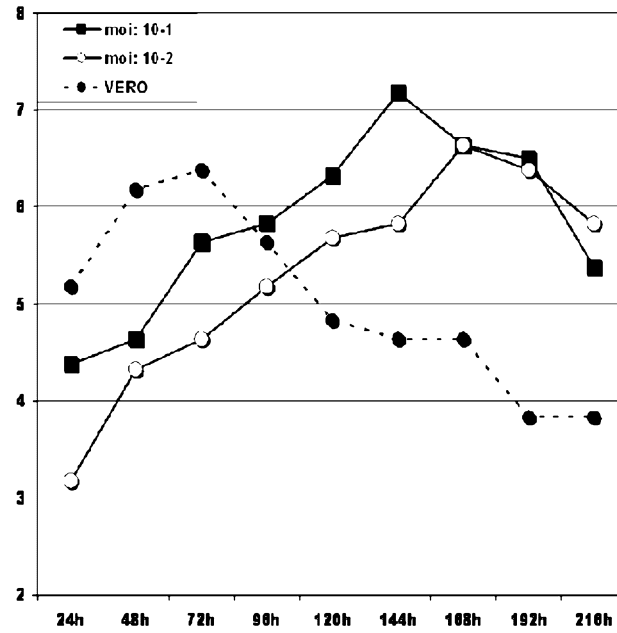
**Fig. 11B**



**Fig. 12**

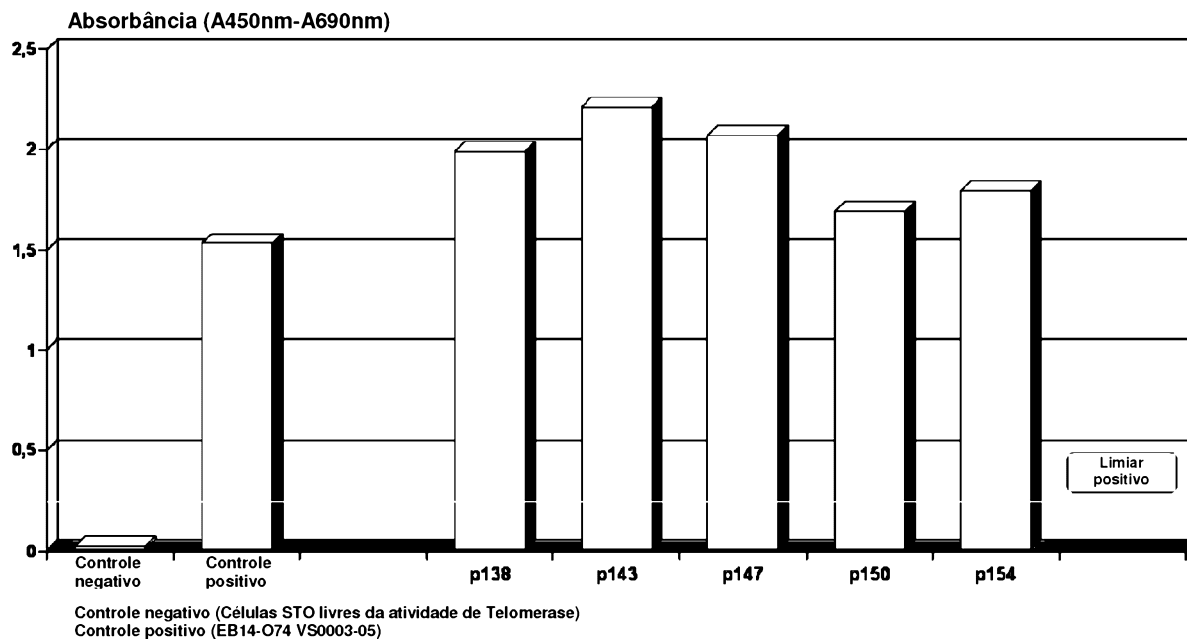


**Fig. 13**

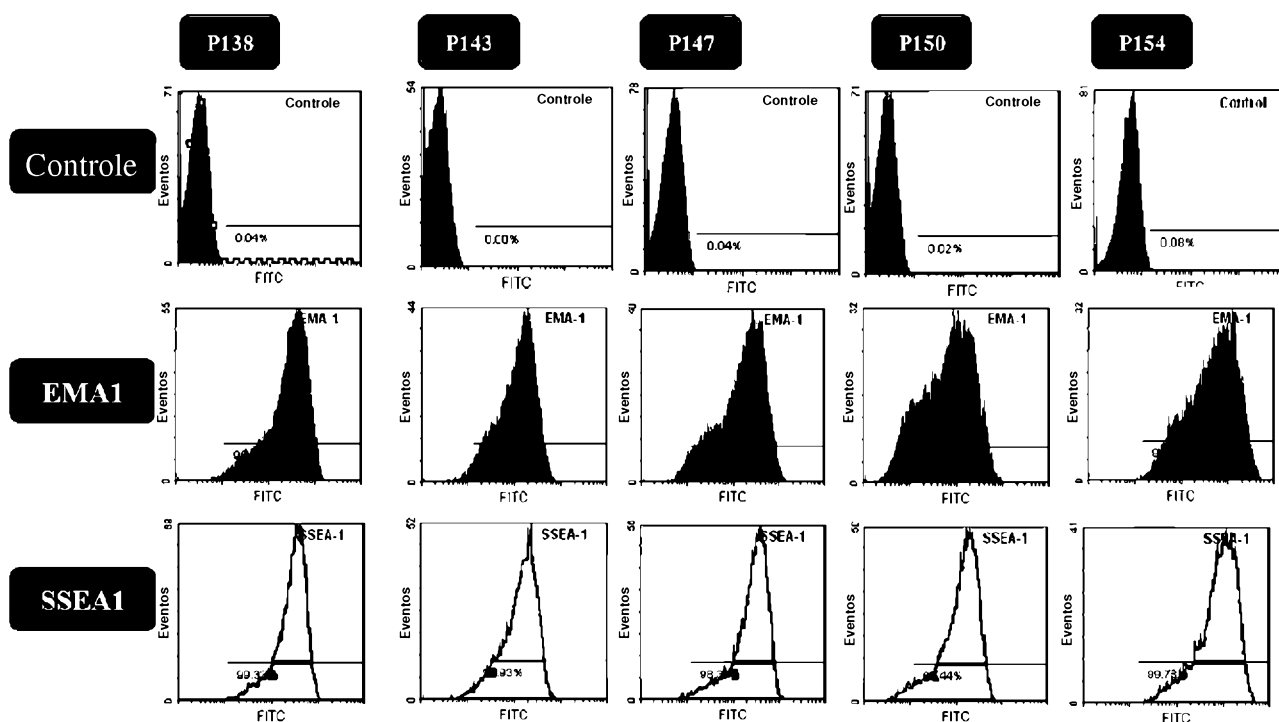


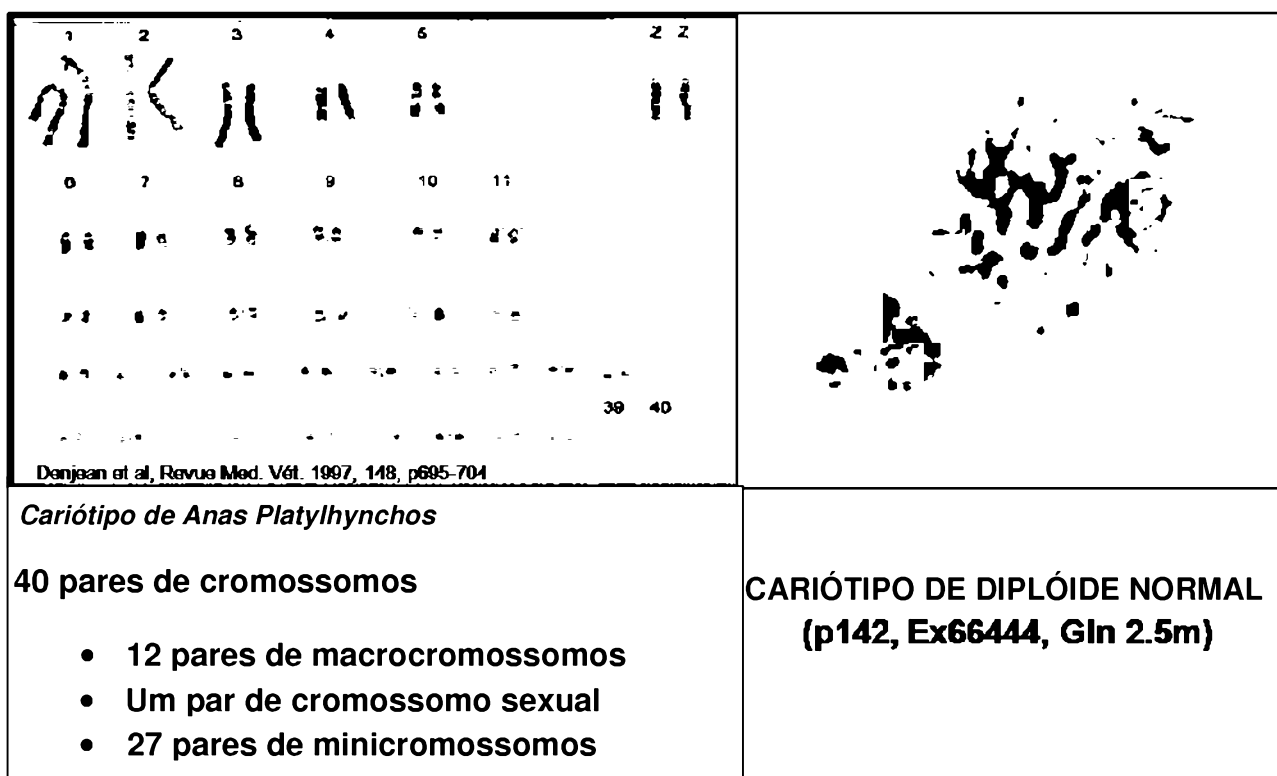
**Fig. 14**

**Fig. 15A**



**Fig. 15B**





**Fig. 16**