

(11) Número de Publicação: **PT 1646715 E**

(51) Classificação Internacional:

**C12N 7/00** (2007.10)    **C12N 5/07** (2007.10)

---

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

---

(22) Data de pedido: **2004.07.22**

(30) Prioridade(s): **2003.07.22 EP 03291813**  
**2003.12.09 FR 0314389**

(43) Data de publicação do pedido: **2006.04.19**

(45) Data e BPI da concessão: **2010.05.12**  
**152/2010**

(73) Titular(es):

**VIVALIS**  
**LIEUDIT LA CORBIÈRE 49450 ROUSSAY**    **FR**

(72) Inventor(es):

**BERTRAND PAIN**    **FR**  
**FABIENNE GUEHENNEUX**    **FR**

(74) Mandatário:

**MANUEL GOMES MONIZ PEREIRA**  
**RUA ARCO DA CONCEIÇÃO, N.º 3, 1º ANDAR 1100-028**  
**LISBOA**    **PT**

(54) Epígrafe: **PRODUÇÃO DE POXVÍRUS COM LINHAGEM DAS CÉLULAS AVIARIAS  
ADERENTES OU NÃO ADERENTES**

(57) Resumo:

## DESCRIÇÃO

### **PRODUÇÃO DE POXVÍRUS COM LINHAGEM DAS CÉLULAS AVIARIAS ADERENTES OU NÃO ADERENTES**

A presente invenção refere-se a um método para produzir vírus vaccinia vivo ou atenuado, nativo ou modificado, com células tronco embrionárias aviarias, compreendendo o acto de infectar as referidas células com partículas de vírus.

Historicamente, o vírus vaccinia é conhecido por ter sido usado com sucesso para imunizar contra varíola permitindo a sua erradicação em 1980 de acordo com WHO (Organização Mundial de Saúde). Desde então, a vacinação foi interrompida. Hoje em dia, o ressurgimento deste vírus é considerado como uma potencial ameaça que pode ser devastadora para a população não protegida. O problema é que apenas 15 milhões de doses de vacina contra a varíola estão disponíveis nos EUA e o FDA emitiu orientações e contratos para produzir grandes quantidades de doses de vacina contra a varíola. Mais informações encontram-se disponíveis em:  
<http://www.bt.cdc.gov/Agent/Smallpox/SmallpoxConsensus.pdf>.

No entanto, o aceleramento de produção requer novos métodos de produção e linhagem de células adequadas. Nesta invenção, são descritas novas linhagens de células (aderentes ou não aderentes) das espécies aviarias que podem ser usadas como substrato para a produção de vaccinia por companhias farmacêuticas. Estas novas células são derivadas de embriões de aves e podem suplantar os ovos ou OS fibroblastos embrionários primários que são utilizados actualmente.

Tradicionalmente, as vacinas induzem imunidade a doenças através do uso de uma versão de enfraquecimento ou de inactivação do agente infeccioso. Hoje em dia as propriedades de poxvirus atenuadas tais como a ausência de replicação nas células humanas e a boa indução de resposta imune permitem o desenvolvimento de novas estratégias de vacinas usando por exemplo MVA (Vírus Ankara Modificado) como vector. A MVA é uma estirpe altamente atenuada do vírus vaccinia (VV) que era inicialmente desenvolvida como uma vacina segura para a varíola antes da erradicação dessa doença. A MVA foi obtida da estirpe Ankara através de cerca de 570 passagens em série através dos fibroblastos embrionários de pintos primários (CEF) e como consequência desta adaptação, contém várias grandes deleções genómicas em comparação com a estirpe parental. A MVA não pode mais ser replicada na maior parte das linhagens de células de mamíferos e é não patogénico em animais. Mais importante é que não foram reportadas quaisquer complicações sérias quando MVA foi administrado como vacina contra a varíola em mais de 100,000 humanos, incluindo indivíduos imuno-deprimidos. Através das técnicas clássicas de biologia molecular, é possível obter MVA recombinante contendo ADN exógeno codificado para péptidos específicos ou proteínas de interesse terapêutico. Estes vírus recombinantes após injecção, *in vivo*, são capazes de estimular o sistema imunitário contra抗igénios específicos tais como抗igénios tumoriais. Actualmente, estas novas gerações de vectores de vacina são desenvolvidos ou podem ser desenvolvidos para lutarem contra doenças infecciosas animais ou humanas e contra uma grande variedade de tipos de tumor (melanoma, cancro da próstata, cancro da mama, cancro do pulmão, cancro dos ovários, cancro do fígado ...).

Drexler I. et al. (1998 J. Gen Virol. 79:347-352) observou que o vírus Ankara Vaccinia Modificado altamente atenuado (MVA) replica em células de rim de hamsters bebés (um potencial hospedeiro para propagação do vírus) mas não em vários humanos transformados e células primárias; assim sendo, a gama de hospedeiros de MVA é restrita. Além disso, esta estirpe de poxvírus altamente atenuada não cria infecções produtivas (Moss B, Dev Biol Stand 1994:55-63). Por exemplo, Blanchard TJ. Et al. (1998 J- Gen. Virol. 79:1159-1167) reportaram que o vírus Ankara Vaccinia Modificado passa por replicação limitada em células humanas e falhas de várias proteínas imuno-modulatorias. Além disso, os rendimentos de produção devem ser compatíveis com a viabilidade económica da produção em massa da vacina contra a varíola.

O registo de segurança de MVA e a potente resposta imune humoral e celular induzida em indivíduos vacinados gerou interesse industrial e científico considerável no uso de MVA como um vector recombinante para imunizar contra doenças infecciosas animais e humanas, em particular contra o HIV e cancro. Estando dada a sua adaptação ao CEF, a MVA pode crescer até elevados títulos em tais células e lotes clínicos actuais de candidatos de vacina MVA recombinante são produzidos no CEF primário. No entanto, o estabelecimento de CEFs requer experiência na preparação da cultura de tecido primário e depende se os ovos de galinha são mantidos sob condições especiais isentos de agentes patogénicos. Além disso, o processo de produção é grandemente laborioso e difícil de padronizar, uma vez que as células primárias sobrevivem apenas umas passagens e tem então de serem preparadas de modo contínuo a partir de ovos embrionários. Enquanto os produtores de vacina lidam com estas limitações

de produção de lotes de material MVA para a fase I e II de ensaios clínicos, ampliação do processo de produção à base de CEF para os ensaios clínicos da fase II e eventualmente para comercialização posterior continua a ser um sério obstáculo.

O problema a ser resolvido pela presente invenção é providenciar linhagem de células para aplicar o vírus vaccinia que evitaria os problemas acima mencionados indo ao encontro dos requisitos da agência reguladora. É este o propósito da presente invenção.

Idealmente, essa linhagem de célula deverá ser totalmente compatível com a regulamentação; a célula deverá ser totalmente caracterizada por um conhecimento histórico. Além disso, a linhagem de célula deverá ser não tumorigénica, geneticamente não modificada e estável sob cultura a longo prazo. A linhagem de célula deverá ser capaz de replicar vírus e adaptar-se a aderência estável e suspensão de crescimento em meio sem soro. Nestes aspectos, os inventores investigaram o uso de células aviarias para replicarem os vírus. Os inventores reportam que o novo embrião aviário estabelecido deriva das linhagens de células tronco detalhadas no nosso pedido co-pendente PCT/FR03/00735 (WO03/076601), são particularmente adequados para replicarem poxivirus, em particular orthopoxvirus tais como o vírus vaccinia.

Uma vez que proliferação e células ilimitadas é necessário para o processo de produção em massa de vacinas, os inventores escolheram examinar as células de tronco derivadas de embriões aviários com capacidade de replicar vírus. No entanto, para manter embriões aviários derivados de células

tronco *in vitro* durante longos períodos de tempo, é necessário observar culturas específicas e condições de manutenção como descrito em Pain e tal. (1996, Development 122:2339–2348); US 6,114,168 e EP 787 180 e estas condições de cultura exigem custos. O problema era ser capaz de manter células tronco derivadas de embriões aviários na cultura num meio económico enquanto evita obstáculos tais como diferenciação e senescênciia celular. No contexto da invenção, foi constatado que a retirada de factores de crescimento, soro e/ou camada de alimentação leva ao isolamento da população de células tronco derivadas de embriões aviários, que podem crescer indefinidamente em meio de cultura básica.

Também à parte das células de tronco hematopoiético que são para a maior parte de células não aderentes, as células obtidas de acordo com as técnicas da arte anterior exibem um fenótipo aderente. No entanto, as células não aderentes são preferidas para a produção industrial de vacinais virais. Este fenótipo é vantajoso quer para a simplificação de manuseamento que evita o uso de uma enzima proteolítica para dissociação quer para as elevadas densidade de célula alcançadas por células não aderentes em cultura *in vitro*. A presente invenção descreve a produção células tronco derivadas de embriões aviários na cultura que podem tornar-se espontaneamente não aderentes ou para que o não aderente seja obtido pela retirada da camada de fornecimento. Por causa do seu crescimento em suspensão, estas linhas são perfeitamente adequadas para a produção industrial de vacinas em bioreactores.

Em adição às suas propriedades de crescimento num meio de cultura básico. Foi descoberto que estas linhagens de célula

permitem a replicação de determinados vírus em produções equivalentes a ou superiores às produções obtidas com os métodos actuais, o que faz destas células particularmente úteis para a produção em massa de vacinas.

### DESCRIÇÃO

Assim, num primeiro aspecto, a presente invenção refere-se a um método para replicar o vírus vaccinia, tal como nativo ou vírus de vaccinia recombinante em células tronco derivadas de embriões aviários, o método da invenção compreende as etapas de inoculação das referidas células tronco derivadas de embriões aviários com partículas virais e fazer cultura das referidas células num meio basal; até que ocorra a lise de células e que as novas partículas virais produzidas seja libertadas no referido meio, em que as células tronco derivadas de embriões aviários sejam obtidas por um processo que consiste em:

- a) Fazer cultura de células embriões aviários, num meio de cultura completo compreendendo os factores tróficos SCF, IGF-1, BFGF e citocinas seleccionadas o grupo de LIF, interleucina 11, interleucina 6, receptor de interleucina 6, CNTF, em oncoestatina e cardiotrofina e uma camada de alimentação, preferivelmente inactivada e complementada em soro;
- b) Passagem modificando o meio da cultura de modo a obter retirada progressiva ou total dos referidos factores, do soro e/ou da camada de alimentação,
- c) Estabelecimento de linhagens de células aviarias aderentes ou não aderentes capazes de proliferarem num

meio basal na ausência de factores de crescimento exógenos.

No caso, o meio basal da etapa c) continua a compreender um baixo nível de soro (i.e. á volta de 2% ou menos), o referido processo poderá opcionalmente compreender uma etapa adicional d) de alteração do meio basal contendo não mais que o factor de crescimento exógeno, não mais que camada alimentação inactivada e um baixo nível de soro num meio de cultura seleccionado entre:

- um meio basal complementado com soro (i) e diluído com um meio ausente de soro, então fazer cultura durante passagens sucessivas das referidas células aviarias no meio basal (i) em que o rácio do meio isento de soro é progressivamente aumentado até ao desaparecimento total do referido meio basal contendo nenhum factor de crescimento exógeno, nenhuma camada de alimentação inactivado e um baixo nível de soro;
- um meio isento de soro (SFM) complementado com soro (ii), fazendo depois a cultura durante as passagens sucessivas das referidas células aviarias no referido meio (ii) em que o rácio de soro é progressivamente decrescente até obter um meio isento de soro;
- meio isento de soro (SFM) (iii), fazendo então a cultura das referidas células aviarias em meio (iii); mantendo então num meio isento de soro as referidas células aviarias adaptadas à alteração do meio.

O termo “aviário” tal como aqui usado destina-se a referir a quaisquer espécies, subespécies ou raça de organismo da classe taxonómica “ava”, tais como, mas não limitados a,

tais organismo tais como galinhas, perus, patos, gansos, codornizes, faisões, papagaios, tentilhões, gaviões, corvos, avestruz, ema e casuar. O termo inclui as estirpes de *Gallus gallus*, ou galinhas (por exemplo Leghorn Branco, Leghorn Castanho, Galo Barred-Rock, Sussex, New Hampshire, Rhode Island, Australorp, Minorca, Amrox, California Gray, Italian Partidge-colored) bem como as estirpes de perus, faisões, codornizes, patos, avestruzes e outras aves comuns de criação. Numa forma de realização preferida, as células aviárias da presente invenção é uma célula de galinha.

O termo "factor que permite o seu crescimento" usado aqui significa factor de crescimento necessário para a sobrevivência e o crescimento das células aviárias SCF, IGF-1 e bFGF. As citocinas são principalmente citocinas cuja acção é através de um receptor que se encontra associado a uma proteína gp130 tal como LIF, interleucina 11, interleucina 6, receptor de interleucina 6, CNTF, em oncoestatina e cardiotrofina.

As células aviárias da etapa a) são células seleccionadas entre as células de tronco e embriões aviários. É descrito que, as células são células tronco de embriões aviários totipotentes ou pluripotentes isolados de uma suspensão da população de células blastodermais de etapa X dissociada obtida de um embrião aviário, mais preferivelmente embrião de galinha (ver classificação EYAL-GILADI's: EYAL-GFLADI 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). Estas células de tronco de embriões

aviários são caracterizadas por um tempo de duplicação lento compreendido entre 48 e 72 horas em cultura a 39°C.

A modificação do meio de cultura da etapa b) do processo da invenção, de modo a obter a retirada progressiva ou total de factores de crescimento, soro e/ou camada de alimentação, pode ser feita em simultâneo, de modo sucessivo ou separado. A sequencia do desmame do meio de cultura pode ser escolhido entre:

- camada do alimentação/ soro / factores de crescimento;
- camada do alimentação/ factores de crescimento / soro;
- soro/ factores de crescimento / camada do alimentação;
- soro/ camada do alimentação / factores de crescimento;
- factores de crescimento/ soro / camada do alimentação;
- factores de crescimento/camada do alimentação/ / soro.

É descrito um método como definido acima, em que as linhagens estabelecidas são células de tronco aderentes que proliferam na ausência de camada de alimentação inactivada. Neste respeito, no método descrito acima, a etapa b) consiste na retirada dos componentes do meio (somente factores de crescimento ou somente soro ou factores de crescimento e depois soro ou alternativamente soro e depois factores de crescimento).

Numa outra forma de realização, a invenção refere-se a um método como definido acima em que as linhagens estabelecidas são células de tronco não aderentes que proliferam em suspensão num meio isento de factores de crescimento exógenos. A este respeito, no método descrito acima, é descrito que a etapa b) consiste numa retirada progressiva ou

total da camada de fornecimento e então opcionalmente numa retirada dos outros componentes do meio (factores de crescimento e soro).

Numa outra forma de realização, a invenção refere-se a um método como definido acima em que as linhagens estabelecidas são células de tronco não aderentes que proliferam em suspensão num meio isento de soro (meio livre de soro).

Numa outra forma de realização, a invenção refere-se a um método como definido acima em que as linhagens estabelecidas são células de tronco não aderentes que proliferam em suspensão num meio isento de factores de crescimento e soro.

Numa outra alternativa, é descrito que a etapa b) consiste numa retirada progressiva ou total dos factores de crescimento, opcionalmente seguidos por uma retirada progressiva do soro.

Numa outra alternativa, é descrito que a etapa b) consiste numa retirada progressiva ou total dos factores de crescimento e/ou soro opcionalmente seguidos por uma retirada progressiva da camada do alimentação.

Numa forma de realização preferida, as linhagens estabelecidas obtidas na etapa C) são células de tronco não aderentes que proliferam em suspensão num meio isento de factores de crescimento de células de alimentação e soro. Este método permite uma selecção de clones que se adaptam a estas novas condições cada vez mais drásticas até as linhagens estáveis serem obtidas capazes de crescer num meio esgotado de soro ou num meio completamente isento de soro.

De modo mais preciso, a etapa a) do processo poderá compreender a inoculação de frascos de cultura compreendidos entre cerca de  $7 \times 10^4/\text{cm}^2$  a  $8 \times 10^4/\text{cm}^2$  de células aviárias num meio de cultura completo. Preferivelmente, a inoculação é feita em cerca de  $7.3 \times 10^4/\text{cm}^2$  ( $4 \times 10^6$  células/ $55\text{cm}^2$  ou  $4 \times 10^6$  células/ $100\text{ mm}$  cápsula).

"Meio de cultura completo" quer dizer um meio basal complementado com factores de crescimento e soro animal. Exemplo de meio de cultura completo é descrito em in Pain et al. (1996, Development 122:2339-2348), EP 787,180 e US 6,114,168, US 5,340,740, US 6,656,479 e US 5,830,510. De acordo com a invenção, "meio basal" significa um meio com uma formulação clássica que permite, por si só, pelo menos sobrevivência de células e ainda melhor crescimento de células. Exemplos de um meio basal são BME (Meio basal Eagle), MEM (Meio mínimo Eagle), meio 199, DMEM (Dulbecco's Meio modificado Eagle), GMEM (meio Glasgow modificado Eagle), DMEM-HamF12, Harn-F12 e Ham-F10, Iscove's Modified Dulbecco's meio, MacCoy's 5A meio, RPMI 1640. Meio basal comprehende sais inorgânicos (por exemplo:  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ , ...), aminoácidos, vitaminas (tiamina, riboflavina, ácido fólico, DCa pantotenato,...) e outro componentes tais como glucose, beta-mercaptopropano, sódio piruvato.

É possível de modo esquemático distinguir duas famílias de factores de crescimento: as citocinas e os factores tróficos. As citocinas são principalmente citocinas cuja acção é através de um receptor que é associado a uma proteína gp130. Assim, LIF, interleucina 11, interleucina 6, receptor de interleucina 6, CNTF, oncoestatina e cardiotrofina têm um modo similar de acção com o recrutamento ao nível do receptor

de uma cadeia específica e a combinação deste último com a proteína gp130 na forma monomérica ou por vezes heterodimérica. Os factores tróficos são principalmente SCF, IGF-1 e bFGF. É descrito que; o meio completo compreende meio basal, Factor de Crescimento Insulina 1 (IGF-1), factor Neutrófico Ciliar (CNTF), interleucina 6 (IL-6), receptor de interleucina 6 (IL-6R) Factor de células Tronco (SCF) factor de Crescimento Fibroblasto básico (bFGF), opcionalmente interleucina 11 (IL-11) e soro animal. As células de embriões aviários da etapa a) podem ser feitas culturas durante diversas passagens no meio completo. O meio pode ser complementado por pelo menos um dos factores de crescimento seleccionado no grupo de: LIF, IGF-1, CNTF, IL-6, IL-6R, SCF, bFGF, IL-11, oncoestatina e cardiotrofina.

É também descrito que, o meio de cultura completo é o meio basal complementado com IGF-1, CNTF, IL-6, IL-6R, SCF, bFGF, opcionalmente IL-11. A concentração de factores de crescimento IGF-1, CNTF, IL-6, IL-6R, SCF, bFGF, opcionalmente IL-11 no meio basal é compreendido entre cerca de 0.01 e 10 ng/ML, preferivelmente, 0.1 a 5ng/ml e mais preferivelmente cerca de 1 ng/ml.

Após passagens de cerca de 3 a 10, o meio completo é esvaziado de factores de crescimento (etapa b). Preferivelmente, para cada factor de crescimento o esvaziamento é feito directamente numa etapa, de uma passagem para outra. De modo alternativo, o esvaziamento do factor de crescimento é desempenhado de modo gradual, por uma progressão decrescente da concentração do factor de crescimento no meio completo. O esvaziamento dos factores de crescimento pode sem levados a cano em simultâneo para pelo

menos dois factores de crescimento. O esvaziamento nos factores de crescimento pode ser feito em duas rondas de depleção: primeira, os SCF, IL6, IL6R, e opcionalmente IL11, são directamente esvaziados do meio completo; as células aviárias são então mantidas em cultura durante pelo menos passagem num meio completo contendo IGF1 e CNTF, opcionalmente IL-11 e suplementado com soro animal. Segunda, IGF1 e CNTF, opcionalmente IL-11 são directamente removidos do meio de cultura, que ultimamente compreende apenas o meio basal suplementado com soro. Normalmente, o meio é totalmente esvaziado de factores de crescimento entre 20 a 30 passagens.

A privação de células de fornecedor pode ser desempenhada após a privação dos factores de crescimento. A privação de células de fornecedor é progressiva e desempenhada sobre diversas passagens. As células viárias são agora inoculadas em frasco numa concentração mais baixa do que na etapa a) à volta e entre  $4 \times 10^6$  células/cm<sup>2</sup> e  $5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>. As células de fornecimento são inoculadas em frasco à vota de  $4.2 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>. Progressivamente, a concentração das células de fornecedor no frasco é reduzida. Praticamente, a mesma concentração das células de fornecedor é usada durante entre 2 a 4 passagens, em seguida uma baixa concentração das células de fornecedor é usada para umas passagens adicionais entre 2 a 4. O frasco é então inoculado com cerca de  $4.2 \times 10^4$  células de fornecedor/cm<sup>2</sup>, seguido de  $2.2 \times 10^4$  células de fornecedor/cm<sup>2</sup>, depois em cerca de  $1.8 \times 10^4$  células de fornecedor/cm<sup>2</sup>, e depois em cerca de  $1.4 \times 10^4$  células de fornecedor/cm<sup>2</sup>, depois em cerca de  $1.1 \times 10^4$  células de fornecedor/cm<sup>2</sup>, e depois em cerca de  $0.9 \times 10^4$  células de fornecedor/cm<sup>2</sup>, depois em cerca de  $0.5 \times 10^4$  células de fornecedor/cm<sup>2</sup>. Depois o frasco é inoculado com entre  $6.5 \times$

$10^4$  células aviárias/cm e  $7.5 \times 10^4$  células aviárias/cm<sup>2</sup> e sem células de fornecimento. Na hipótese das células aviárias não se encontrarem em bom estado após uma diminuição da concentração de células no frasco, então as células aviárias são colocadas em cultura para passagens adicionais com a mesma concentração de células de fornecedor antes de avançar com a privação das células de fornecedor.

A privação de soro pode ser levada a cabo após o factor de crescimento a privação das células de fornecedor. O meio basal é alterado por um meio seleccionado de entre:

- um meio basal (i) complementado com soro e diluído com um novo meio isento de soro (ii). Então fazer cultura das células aviárias durante passagens sucessivas no meio (i) em que a proporção do meio isento de soro é progressivamente aumentada até ao desaparecimento total do referido meio basal complementado com soro.
- um novo meio isento de soro (ii) complementado com soro. Fazendo depois a cultura das células aviárias através das passagens sucessivas no referido meio (ii) em que proporção de soro é progressivamente diminuída até obter um meio isento de soro (desmame gradual).
- novo meio isento de soro (ii), não complementado com soro. Então as células aviárias são directamente colocadas directamente no meio isento de soro (ii) (desmame gradual).

A privação de soro pode ser levada a cabo pelo desmame progressivo.

De acordo com a presente invenção, "meio isento de soro" (SFM) significa um meio de cultura de clula pronto a usar, isto quer dize que não carece de adição de soro que permite a sobrevivências das células e crescimento de células. Este meio não é necessariamente quimicamente definido e poderá conter hidrolizatos de várias origens, desde plantas por exemplo. De modo preferido, o referido SFM são qualificados de "origem não animal" isto é para dizer que não contem componentes de origem anima ou humana (estado FAO; "isento de origem animal"). No SFM, as proteínas de soro nativo são substituídas por proteínas recombinantes. De modo alternativo o meio SFM de acordo com a invenção não contem proteína (meio PF: "meio isento de proteína") e/ou são quimicamente definidos (meio CDM: "meio quimicamente definido"). Meio SFM apresenta diversas vantagens: (i) a primeira de todas é o comprimento da regulação de tal meio (de facto não existe risco de contaminação por agentes adventícios tais como vírus BSE); (ii) a optimização do processo d purificação; (iii) a melhor reprodutibilidade no processo por causa do melhor meio definido. Exemplos de meios SFM disponíveis comercialmente: VP SFM (InVitrogen Ref 11681-020, catalogue 2003), Opti Pro (InVitrogen Ref 12309-019, catalogue 2003), Episerf (InVitrogen Ref 10732-022, catalogue 2003), Pro 293 S-CDM (Cambrex ref 12765Q, catalogue 2003), LC17 (Cambrex Ref BESP302Q), Pro CHO 5-CDM (Cambrex ref 12-766Q, catalogue 2003), HyQ SFM4CHO (Hyclone Ref SH30515-02), HyQ SFM4CHO-Utility (Hyclone Ref SH30516.02), HyQ PF293 (Hyclone ref SH30356.02), HyQ PF Vero (Hyclone Ref SH30352.02), Ex cell 293 medium (JRH Biosciences ref 14570-1000M), Ex cell 325 PF CHO Protein free medium (JRH Biosciences ref 14335-1000M), Ex cell VPRO medium (JRH

Biosciences ref 14560-1000M), Ex cell 302 serum free medium (JRH Biosciences ref 14312-1000M).

É também descrito um processo de obtenção de linhagens de células aviárias, preferivelmente linhagens de células não transformadas, capazes de crescer em meios isentos de soro; são feitas culturas dessas linhagens de células num meio de cultura completo opcionalmente com células de fornecedor. O referido processo compreende as células aviárias, preferivelmente não transformadas, num meio de cultura completo e opcionalmente com camada de fornecedor. O referido processo compreende as etapas de:

- As células aviárias podem ser as células aviárias da etapa a) acima, as linhagens aviárias estabelecidas do processo da invenção, tais como EB1, EB14 ou S86N45 (também nomeado EB45), ou outra linhagem de célula derivada de embriões aviários tais como DF1 (US 5,672,485 e US 6,207,415);
- pelo menos uma passagem na cultura modificando ou alterando o meio de cultura de modo a obter um desmame total de soro, também por retirada progressiva ou directa de soro;
- linhagens de células aviárias aderentes ou não aderentes capazes de crescerem em meio isento de soro.

A invenção baseia-se na constatação da passagem do meio de cultura de células basal complementada com soro animal para um meio isento de soro não deve ser realizado pela simples remoção do soro do meio de cultura basal mas que precisa de uma mudança no tipo de meio de cultura, que deve ser um meio isento de soro (SFM). Além disso, quando as linhagens de

células aviárias necessitam de crescerem com factores de crescimento ou células de fornecimento, o desmame de soro é preferivelmente desempenhado após os desmame em factores de crescimento e/ou células de fornecedor.

As células de fornecedor são células de origem animal que foram preferivelmente inactivadas por irradiação ou quimicamente tratadas com mitomicina. O fornecedor poderá ser geneticamente modificado para expressar os factores de crescimento tais como SCF. Preferencialmente, as células de fornecedor são as linhagens de células fibroblásticas de rato tais como STO (Cultura do Tipo Americana ATCC M°CRL-1503).

O método descrito acima poderá compreender de modo adicional uma etapa em que as células obtidas na etapa c) se encontrem sujeitas a uma selecção ou uma adaptação no meio de cultura usado para a produção em larga escala de modo a obter clones adequado para a produção de vacinas destinadas à terapia de humanos ou animais.

Este processo leva à criação de novas linhagens de células embrionárias aviárias derivados que são mantidas em cultura *in vitro* durante um período de tempo considerável. Vantajosamente, as células provenientes de linhagens de células obtidas na etapa c) são capazes de proliferem, pelo menos durante 600 dias. Os 600 dias de não constituem um limite de tempo, pois as linhagens de células obtidas continuam ainda vivos após períodos de tempo muito mais longos. Assim, estas linhas são consideradas como sendo capaz de crescer indefinidamente em meio de cultura básica livre de factores de crescimento exógenos, soro e / ou camada de fornecedor inactivada. A expressão "linhagem" é entendida por

significar qualquer população de células capazes de proliferar indefinidamente em cultura *in vitro*, mantendo num maior ou menor grau as mesmas características morfológicas e fenotípicas. Naturalmente, o método mencionado acima torna possível a obtenção de clones celulares derivados de células obtidas a partir de linhagens estabelecidas. Esses clones são células que são geneticamente idênticas à célula a partir da qual são obtidas por divisão.

É também descrito que as linhagens de células estabelecidas, e as células derivadas do mesmo (etapa c ou d) são células tronco derivadas de embriões aviários, mais precisamente as células são pluripotentes aviária células estaminais embrionárias derivadas. As células tronco derivadas de embriões aviários são obtidas pelo processo da invenção são pequenas, redondas, células individualizadas com um tempo de duplicação de cerca de 24 horas ou menos a 39°C. As células obtidas pelo processo da invenção é pelo menos à passagem p60, p70, pelo menos, p80, p90, pelo menos, p100, p110, pelo menos, ou pelo menos p120 p130 ou mais tarde. As células tronco derivadas de embriões aviários obtidas pelo processo da invenção têm pelo menos uma das seguintes características:

- uma alta relação núcleo-citoplasmática,
- uma actividade de fosfatase alcalina endógena,
- uma actividade telomerase endógena,
- uma reactividade com anticorpos específicos seleccionados do grupo de anticorpos SSEA-1 (TEC01), SSEA-3, e EMA-1. Estas linhas de células e as células dela derivadas são capazes de proliferarem, por pelo menos, 600 dias em meio basal, em particular num meio como o DMEM, GMEM, HamF12 ou McCoy ou suplementados com

diferentes aditivos comumente utilizados por pessoas técnicos na arte. Entre os aditivos, podem ser mencionados aminoácidos não essenciais, vitaminas e piruvato de sódio. É descrito que no entanto, as células são capazes de proliferar em meio basal sem glutamina - é também descrito que essas células e as linhas de células derivadas de lá terem a característica de crescer, quer como células aderentes ou como células em suspensão.

É descrito que as linhagens de células estabelecidas aviárias aqui descritas e as células derivadas são úteis para a produção de produtos biológicos, tais como peptídeos e proteínas recombinantes (ou seja, anticorpos, hormonas, citocinas ...), vírus, vectores virais, partículas virais e vacinas virais.

Mais precisamente, as linhagens de células estabelecidas aviárias aqui descritas e as células derivados são úteis para a produção de vacinas vivas ou atenuadas, recombinantes ou não, contra a varíola, cancros e doenças infecciosas. É descrito que os vírus, os vectores virais relacionados, as partículas virais e as vacinas virais são preferencialmente escolhidos entre o grupo de adenovírus, hepadnavírus, vírus herpes, orthomyxovírus, papovavírus, paramixovírus, picomavírus, poxvírus, reovírus e retrovírus. Os vírus, os vectores virais relacionados, partículas virais e vacinas virais podem pertencer à família dos poxvírus, e mais preferencialmente à chordopoxviridae. O vírus ou os vectores virais relacionados, partículas virais e vacinas virais podem ser um avipoxvírus seleccionado entre vírus da buba aviária, o vírus da varíola do canário (i.e. ALVAC), vírus juncopox, o

vírus mynahpox, vírus pigeonpox, o vírus psittacinepox, sparrowpoxvirus quailpoxvirus, starling poxvirus, poxvirus do perú. De acordo com a presente invenção, o vírus é o vírus vaccinia.

É descrito que o vírus, os vectores virais relacionados, as partículas virais e vacinas pertencem à família de orthomyxovirus, em particular vírus influenza e à família dos paramixovírus, em particular contra os vírus do sarampo, papeira e rubéola.

É também descrito o uso das linhagens de células estabelecidas aviárias aderente ou não aderentes descritas neste documento são geneticamente, biologicamente ou quimicamente modificado, capazes de proliferar indefinidamente em cultura, e com as características acima para replicar vírus vivos ou atenuados da família orthopoxvirus, de modo mais particular vivo ou atenuado vírus vaccinia e vírus vaccinia recombinante.

Aqui descrito está o uso das células aderentes ou não aderentes, tal como definido anteriormente para produzir vacinas vivas ou atenuadas compreendendo a cultura das linhagens de células aderente ou não aderente linhas celulares estabelecidas na etapa c) de acordo com o processo acima descrito, inoculando as referidas células com partículas virais e cultura das referidas células num meio basal como mencionado acima até que ocorra a lise das células e, recuperando as partículas virais produzidas recentemente no referido meio. A invenção é particularmente útil para a produção de vírus vaccinia atenuado, Lister-Elstree estirpe do vírus vaccinia, vírus de vaccinia modificado como o vírus

Vaccinia Modificado Ankara (MVA), que pode ser obtido a partir de 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 vaccinia recombinante. Vantajosamente, as células derivados de linhagens estabelecidas podem ser infectadas de modo a produzir um vírus vaccinia vivo ou um vírus atenuado, que é um vírus de vaccinia modificado e/ou vaccinia recombinante. As referidas células podem ser infectadas por qualquer técnica acessível a pessoas qualificados na técnica.

Alternativamente, as células derivadas de linhagens estabelecidas podem ser transfectadas ou modificadas de modo a produzir um vírus vaccinia vivo ou um vírus atenuado, que é um vírus vaccinia modificado e/ou vaccinia recombinante. As referidas células podem ser modificadas por qualquer técnica acessível a pessoas técnicas na arte, em particular por não homólogos ou homólogos, dirigido e/ou de recombinação condicional (Cre-Lox ou sistema FLP-FRT), através da transformação de qualquer vector, vírus plasmídio ou vírus recombinante, em especial com a ajuda de retrovírus ou vírus recombinante.

Numa forma de realização particular, a invenção é dirigida a um método para produzir vacinas vivas ou atenuadas contra a varíola compreendendo a cultura das linhagens de células aderente ou não aderente estabelecidas na etapa c), segundo a processo acima descrito, inoculando as referidas células com partículas virais e pondo em cultura as referidas células, num meio basal como mencionado acima, até a lise celular ocorrer e, recuperando as partículas virais

recentemente produzidas lançadas no referido meio. A invenção é particularmente útil para a produção de vírus vaccinia atenuada, estirpe do vírus vaccinia Lister-Elstree, vírus vaccinia modificado como o vírus Vaccinia Ankara Modificada (MVA), que pode ser obtido a partir de 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 vaccinia recombinante. Por exemplo, pode-se usar MVA como uma vacina contra a varíola.

Numa segunda forma de realização particular, a invenção é dirigida a um método para produzir vacinas vivas ou atenuadas como uma vacina contra o cancro e doenças infecciosas; o referido método é composto de cultura das linhagens de células aderente ou não aderente estabelecidas na etapa c) ou d) de acordo com o processo acima descrito, inoculando as referidas células com partículas recombinantes virais e de cultura das referidas num meio basal como mencionado acima, até a lise celular ocorrer e, recuperando as recentemente produzidas partículas recombinantes virais lançados no referido meio. Por exemplo, pode-se usar MVA recombinante para expressar o antigénio contra:

- doenças adquiridas, tais como, por exemplo e sem limitação, o cancro de próstata, cancro pancreático, cancro colorretal, cancro do pulmão, cancro da mama, melanoma;
- doenças infecciosas, tais como, por exemplo e sem limitação, SIDA (vírus HIV), hepatite A, hepatite B, hepatite C, malária, raiva, febre amarela, encefalite japonesa, papeira, sarampo, rubéola.

Para o restante da descrição, será feita referência à legenda das figuras abaixo.

#### LEGENDA DAS FIGURAS

**Figura 1:** Curva de crescimento para uma linhagem de célula da invenção que mostra a replicação de longa duração de células.

**Figura 2:** os tempos de duplicação de população de S86N45 (EB45) (aderente) e EB14 (suspensão) células.

**Figura 3:** influência da temperatura em células de crescimento cinéticas S86N45 (EB45)

**Figura 4:** Curva de crescimento para uma linhagem de célula da invenção que mostra a replicação de longo termo de células com retirada do soro (até 2% de soro).

**Figura 5:** Adaptação de S86N45 (EB45) e células EB14 para crescer em meio isento de soro (SFM).

**Figura 6:** Cultura de células de suspensão EB14 num bioreactor 2L num meio isento de soro.

**Figura 7:** Curva de crescimento para uma linha de célula da invenção (S86N16) que mostra a replicação de longo termo de células com retirada de camada de fornecedor.

**Figura 8:** Fotografia que mostra a característica morfológica de células tronco aviárias N: núcleo, n: núcleolo e C: citoplasma (isolado S86N99, aumentado X40, fotografia tirada com uma câmera digital Cyber-shot)

**Figura 9: Fotografias que mostram a actividade fosfatase alcalina de linhagens tronco aviárias que são aderentes ou que estão em suspensão**

Após fixação (0,1% formaldeído/ /0.5% glutaraldeído, 30 minutos a 4°C), as células são lavadas duas vezes em 1X PBS e incubadas entre 10 e 30 minutos a 37°C em NBT/BCIP (Cloreto nitro azul de tetrazólio 0,375 mg/ml, 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato 0,188 mg/ml, 0.1 M Tris pH 9,5, 0,05 M MgCl<sub>2</sub>, 0,1 M NaCl). A reacção é interrompida por duas lavagens de 1X PBS e as fotografias são tiradas.

A-ilustra a coloração violeta característica da actividade endógena de fosfatase alcalina obtida com a linhagem aderente S86N45 P87, uma linhagem de cultura, sem alimentação ou factor (aumento de 40X, câmera Sony Cyber-shot digital).

B-ilustra a característica coloração violeta da actividade endógena de fosfatase alcalina obtida com a linhagem 14 EB mantida a partir de 8 passagens em suspensão, a linhagem de derivados de células S86N45, cultivadas em suspensão, sem alimentação ou factor (ampliação X20, Sony Cyber-shot digital câmera).

C-S86N45 (EB45) marcadores de células específicas.

**Figura 10: Susceptibilidade viral de CEF e células aderentes S86N45 (EB45) (72 horas pós-infecção - MOI 0.1)**

**Figura 11: susceptibilidade viral do CEF e células aderentes S86N45 (EB45) em várias multiplicidades de infecção (MOI) (48 horas após a infecção)**

Figura 12: Cinética de MVA-GFP propagação em células aderentes S86N45 (EB45).

Figura 13: cinética de propagação MVA-GFP em células de suspensão EB14.

Figura 14: replicação de MVA-GFP em células de crescimento S86N45 (EB45), em meio DMEM-F12.

Figura 15: Replicação de um tipo de vírus selvagem MVA em células de crescimento S86N45 (EB45), em meio DMEM-F12 (MOI: 0,1)

Figura 16: replicação MVA de suspensão de células EB14 num meio contendo soro (MOI: 0,2)

Figura 17: replicação MVA em suspensão de crescimento de células EB14 em meio isento de soro (MOI: 0,01)

Figura 18: Rendimento MVA de suspensão em células de crescimento EB14 em meio isento de soro (MOI: 0,01)

#### EXEMPLOS

#### EXEMPLO 1: Produção e estabelecimento das células aderentes

Os ovos são abertos, a gema é separada da clara durante a abertura. Os embriões são retirados da gema directamente ou com o auxílio de uma pipeta Pasteur, ou com a ajuda de um pequeno filtro de papel absorvente (Whatmann 3M papel), corte de antemão, sob a forma de um anel perfurado com o auxílio de um punção. O diâmetro da perfuração é de cerca de 5 mm. Estes

pequenos anéis são esterilizados com calor seco por aproximadamente 30 minutos num forno. Este pequeno anel de papel é depositado na superfície da gema e centrado sobre o embrião, que é, portanto, rodeada por um anel de papel. Este último é então cortado com o auxílio de pequenos pares de tesouras e a totalidade removida é colocado numa placa de Petri, com PBS ou com soro fisiológico. Portanto o embrião, transportado pelo anel é limpo do excesso de gema no meio e o disco embrionário, portanto, livre da vitelina em excesso, são recolhidas com uma pipeta Pasteur.

Em ambos os casos, os embriões são colocados num tubo contendo meio fisiológico (1X PBS, Tris Glucose, médio e afins). Os embriões são então dissociadas mecanicamente e inoculados num "alimentação" no meio de cultura definida. Entre as condições preferenciais utilizadas para a cultura, a preferência é dada ao meio de cultura composto por MacCoy ou meio DF12 como meio basal suplementado com soro fetal bovino numa concentração inicial de 12 para 8%, com aminoácidos não essenciais a 1%, com uma mistura de vitaminas de origem comercial em 1%, com piruvato de sódio numa concentração final de 1 mM, com beta-mercaptoetanol na concentração final de 0,2 mM, glutamina, na concentração final de 2,9 mM, com uma mistura inicial de antibióticos contendo gentamicina numa concentração final de 10 ng/ml, penicilina na concentração final de 100 U/ml e estreptomicina na concentração final de 100 µg/ml. Rapidamente após a primeira passagem das células, a mistura de antibióticos não é mais adicionado ao meio. A expressão rapidamente significa após as primeiras 3 a 5 passagens em geral. Uma mistura de nucleosídeos pode também ser adicionada, sendo esta mistura preparada como acima descrito (Pain et al., 1996). Entre o meio basal testado sob

estas mesmas condições e que dá resultados semelhantes são HamF12, Glasgow MEM e meio DMEM, este último complementado com biotina numa concentração final de 8mg/l. A título de comparação, a concentração de biotina é de 0,2 mg/l no meio MacCoy, 0,0073 mg/l no HamF12 e 0 no meio comercial DMEM e GMEM.

Os factores de crescimento e as citocinas adicionadas ao meio de cultura são factores preferenciais e as citocinas, que são recombinantes, incluindo rato SCF numa concentração final de 1 ng/ml, IGF-1 numa concentração final de 1 para 5 ng/ml, CNTF na concentração final de 1 ng/ml, IL-6 numa concentração final de 1 ng/ml, e o receptor solúvel IL-6 uma concentração final de 0,5 ng/ml e 1 ng/ml. Nalguns testes, outros factores podem ser adicionados durante as primeiras passagens. Por exemplo, até a passagem 3 ou 10, é possível adicionar bFGF ao meio numa concentração final de 1 ng/ml e de IL-11 na concentração final de 1 ng/ml.

A inoculação é realizada neste meio do "alimentação" inactivado, composto de fibroblastos de rato estabeleceu como linhagens, as células STO. Em alguns casos, essas células foram transfectadas com simples vectores de expressão que permite a expressão de factores de crescimento, tais como SCF aviários, constitutivamente nas células STO. Assim, este "alimentação" produz o factor de forma solúvel e/ou agarrados à membrana plasmática das células.

Após a inoculação inicial das células directamente neste meio, um meio fresco pode ser adicionado ou o meio pode ser parcialmente alterado no dia seguinte, e em seguida, parcial ou totalmente durante os dias subsequentes, dependendo da

taxa de adesão observada para as células primárias. Após cerca de 4-7 dias, dependendo dos casos, a cultura inicial é dissociado e transferida para novos pratos no mesmo meio inicial do alimentação inactivado. Depois de três a cinco passagens, as células são cultivadas num alimentação de células inactivadas de STO que são não transfectadas ou transfectadas com um vector de expressão de codificação de resistência a um antibiótico, tal como o gene para resistência à neomicina, à higromicina, à puromicina e similares. Após cerca de vinte passagens, as células são progressivamente privados de factores de crescimento e citocinas. A expressão "retirada gradual" é entendida como um factor de crescimento de remoção pelo factor de crescimento, ou grupo de factores de crescimento, por grupo de factores de crescimento, a partir do meio de cultura. Na primeira forma de realização, numa passagem, o SCF é em primeiro lugar removido e, em seguida, duas ou três passagens mais tarde, outro factor de crescimento, como IGF-1, por exemplo. Se as células não apresentarem alterações morfológicas ou uma variação na taxa média de proliferação, os outros factores, tais como CNTF e IL-6, são removidos. Numa segunda forma de realização preferida, a retirada dos factores de crescimento é realizado grupo de factores de crescimento por grupo de factores de crescimento. Um primeiro grupo de factores de crescimento composto por SCF, IL6, IL6R e IL11 é removido em seguida, o segundo grupo composto por IGF1 e CNTF. Numa terceira forma de realização, esta retirada também podem ser drástica. Todos os factores são, neste caso removidos de uma só vez. As células são então observadas e são apenas passadas alguns dias mais tarde, se a sua taxa de proliferação se alterar. A segunda solução é geralmente aquela que é praticada.

Vários isolados são assim obtidos e mantidos por longos períodos de tempo. A expressão muito longos períodos de tempo, entende-se por períodos de várias semanas, com um mínimo de 50 dias, de preferência períodos superiores a 200-400 dias, sem limitação de tempo. Períodos superiores a 600 dias são observados.

Independentemente do suporte utilizado, todas as células que são aderentes estão dissociadas com uma enzima proteolítica de dissociação, como pronase, collagenase, dispase, tripsina, e assim por diante. De preferência, uma enzima proteolítica de origem bacteriana é usado para evitar qualquer potencial contaminação de origem animal. Estas células têm as características das células tronco embrionárias com uma morfologia específica ilustrada, a título de exemplo, pela fotografia da figura 8 ou seja, um tamanho pequeno, uma relação núcleo-citoplasmática de grande porte, um núcleo com pelo menos um nucléolo, que é claramente visível e citoplasma muito pequeno. Essas células são caracterizadas por um crescimento na forma de massas mais ou menos compactas sólidas. As células aderentes e não aderentes apresentam reactividade cruzada com um número de anticorpos, como descrito acima em Pain et al. (1996) e nas patentes US 6,114,168 e EP 787 180. O componente de actividade endógena telomerase está também presente e é um factor importante na natureza do "tronco" dessas células.

Células de isolados diferentes são obtidas e mantidas durante longos períodos de tempo. A Tabela 1 ilustra algumas das características desses isolados.

Tabela 1

<b>Nome</b>	<b>Espécies</b>	<b>Inicio</b>	<b>Paragem</b>	<b>Dias</b>	<b>Passagem</b>	<b>Geração</b>
S86N16	Galinha S86N	26-01-2000	05-08-2001	559	207	692
WL3	Galinha WL	28-01-2000	09-08-2001	403	153	333
Valo4	Galinha Valo	26-09-2000	07-02-2002	401	135	317
S86N45	Galinha S86N	29-01-2001	12-11-2001	287	118	329

Note-se que o termo “paragem” não corresponde ao fim da proliferação das células, mas a uma paragem deliberada das culturas de células pelo pesquisador. O número de geração n é obtido pela fórmula:  $X = 2^n$  ou X é o número cumulativo teórico de células. Este número está disponível desde que as células são contadas a cada passagem e a cada inoculação. A história completa da cultura encontra-se, portanto, disponível. Células S86N45 também chamadas EB45.

#### **EXEMPLO 2: Passagem das células**

Uma das características das células tronco, em especial células tronco somáticas e células tronco embrionárias é a sua capacidade de proliferação *in vitro* por períodos de tempo considerável. De modo a propagar e a passar as células, o meio de cultura é alterado e substituído por um novo meio poucas horas antes da sua passagem. A curva apresentada na figura 1 ilustra um perfil de crescimento celular e de estabelecimento.

### **EXEMPLO 3: Duplicação de tempo e tempo de divisão médio**

3.1 Começa com as células estabelecidas na cultura e nas células apresentadas nos exemplos anteriores, a divisão de tempo médio pode ser calculada. Para todos os isolados independentes, a taxa de proliferação aumenta ligeiramente durante sucessivas passagens, causando a divisão de tempo médio durante o estabelecimento das células para variar. Na fase de aderentes, as células são inicialmente inoculadas numa camada de alimentação inactivada e passada regularmente com uma densidade de inoculação inicial constante de 1 para  $2 \times 10^6$  células por prato de 100 milímetros (prato 55 cm<sup>2</sup>). A Tabela 2 ilustra o tempo de duplicação (d) e a divisão de tempo médio (MDT por hora) por 3 tipos de células estabelecidas como uma função do tempo de cultura. Observa-se que o tempo de duplicação médio diminuiu durante o estabelecimento.

Tabela 2:

Células/dias	50	100	150	200	250	300	350	400	450	500	550
S86N16 (d)	0.30	0.63	1.00	0.86	1.13	1.15	1.47	1.70	1.94	1.50	1.9
S86N16 (MDT)	80	38	24	27.9	21.2	20.9	163	14.1	12.4	16	12.6
S86N45 (d)	0.49	0.89	0.89	1.45	2.15	x	x	x	x	x	x
S86N45 (MDT)	49	26.8	27	16.5	11.1	x	x	x	x	x	x
Valo4 (d)	0.03	0.61	1.00	1.17	1.26	1.03*	1.08*	1.25*	x	x	x

\* As células Valo passam durante este estabelecimento num suporte de plástico, sem a presença de uma alimentação. A duplicação do tempo diminui e depois aumenta novamente, quando as células se habituam novamente a este novo ambiente.

O tempo médio de duplicação d é estabelecido para o período de tempo indicado em dias com a seguinte fórmula:  $d = (1/\text{Log}_2(\text{LogX}_2/\text{X}_1)) / (\text{T}_2 - \text{T}_1)$  em que X<sub>2</sub> e X<sub>1</sub> são os números totais de células nos tempos T<sub>1</sub> e T<sub>2</sub>. Esta fórmula é uma consequência directa do cálculo do número de gerações N pela fórmula  $N = 2^d$ , apresentado no exemplo 1. A divisão de tempo médio (MDT) é obtida em horas dividindo 24 horas por d.

3.2-As galinhas têm uma temperatura corporal de 39°C. Análises de S86N45 (EB45) e células cinéticas de crescimento celular EB 14 foram assim realizadas inicialmente a 39°C. Sob estas condições as células foram caracterizadas por um tempo de geração muito curto geralmente compreendida entre 15 a 20 horas (**Figura 2**).

#### **EXEMPLO 4: temperatura da cultura da célula**

O ciclo muito rápido das células S86N45 (EB45) e EB14 a 39°C pode ser sub-óptimo para produção eficiente de vírus MVA. O crescimento celular, a 37°C e 35°C foi, portanto, também analisado (Figura 3). Como esperado, o ciclo celular é reduzido a 37°C. Tais condições devem em princípio, ser mais adequadas para a propagação de vírus e por isso serão seleccionadas nos testes MVA descritos abaixo. É importante notar que as células S86N45 (EB45) e EB14 podem também ser cultivadas a 35°C, embora com uma cinética muito reduzida. Adaptação das células S86N45 e EB14 à baixa temperatura (35°C e mesmo 33°C) é particularmente útil para a produção de vacinas virais termo-sensíveis atenuadas.

#### **EXEMPLO 5: Controle do nível de soro para a proliferação de linhagens**

## **5,1 – meio com concentração de soro baixa**

Durante a obtenção destas linhagens, os meios de cultura utilizados são meios de cultura convencionais constituído por uma base (DMEM, GMEM, HamF12, McCoy, e assim por diante), suplementado com diferentes aditivos tais como aminoácidos não essenciais, vitaminas e piruvato de sódio. Este meio complexo dispõe de soro fetal bovino, que continua a ser um componente central da cultura, embora os componentes de diferentes origens, incluindo os componentes da planta, possam ser gradualmente utilizados. Um processo para controlar e habituar as células às proporções relativamente baixas de soro fetal bovino é apresentado. Assim, é possível manter as células em proliferação elevada (Time Division > 1), com baixas percentagens de soro (2%, por exemplo, no caso de células S86N16).

As curvas apresentadas na **Figura 4** ilustra a redução relativa de soro para um determinado tipo de célula: células S86N16, o tempo de duplicação e divisão dos tempos médios foram calculados e apresentados na tabela 3. Note-se que os tempos de divisão meios aumentaram em função da redução relativa no soro. A fase de recuperação, é no entanto, observada depois de algum tempo na cultura, nas condições mencionadas. Desta vez, no entanto, continua a ser inferior a 24 h ( $d > 1$ ), o que já representa uma proliferação muito vantajosa em termos industriais, mesmo em concentrações séricas de 2%, o que já é relativamente baixa. Melhorias no que diz respeito aos metabólitos diferentes para serem utilizados podem ser previstas, a fim de aumentar esse tempo e ainda optimizar ainda mais as condições de cultura.

**Tabela 3: Duplicação de tempo e tempo de divisão médio para células S86N16**

Condição	10%	7.5%	3.75%	2%
d	2.02	1.51	1.47	1.08
MDT	11.9	15.8	16.3	22.2

Os exemplos são tomados entre as passagens P204 e p 179 para a condição de 10%, entre p198 Pe 176 para o 7,5%, entre o p224 e P201 para 3,75% e entre p216 p199 e para os 2%.

## **5,2 Adaptação ao meio de isenção de soro e crescimento em biorreatores**

A mais importante melhoria foi conseguida através da adaptação de células S86N45 (EB45) e EB 14 do meio isento de soro. Várias formulações foram testadas e um par de formulações de meio isento de soro foram identificados que permitam o crescimento eficiente das S86N45 células (EB45) e EB14 (Figura 5).

Além disso, a cultura das células EB 14 em meios contendo soro e meios isentos de soro poderia estar mais acima desde o crescimento eficiente ter sido reproduzido e demonstrado em biorreatores 2L (**Figura 6**). Além disso, as células EB 14 também podem ser eficientemente cultivadas em biorreatores tanque agitado 3L e atingir densidades de mais de 2 milhões de células/ml.

#### **EXEMPLO 6: privação das células da camada de alimentação**

De acordo com as condições de cultura iniciais, a presença de uma camada de células inactivadas parece ser necessária para a obtenção de células tronco embrionárias como foi descrito acima. Esta camada de alimentação já não parece ser necessária após um número de passagens. Só o plástico de "cultura tratada" parece ser importante. Com efeito, uma das características de algumas células eucarióticas é proliferar de forma aderente. De modo a facilitar a adesão das células, os vários materiais plásticos utilizados são a "cultura" tratada. Eles passam durante a sua fabricação por um tratamento que adiciona cargas à superfície do plástico, tais cargas promovem a aderência da matriz extra celular das células. Em contrapartida, o plástico não tratado da cultura de célula, muitas vezes chamado de plástico de qualidade bacteriológica, não é tratado à superfície pela adição de alimentações específicos. A adesão das células da mesma é geralmente muito difícil ou mesmo impossível, ou então induz alterações na morfologia e no comportamento que muitas vezes são drásticas. Esta distinção entre as duas qualidades de plásticos torna possível a obtenção, dependendo das inoculações que são levada a cabo, células com comportamentos diferentes. Privação gradual das culturas de "alimentação" inactivado torna possível a obtenção, após algumas passagens, de culturas homogéneas de células tronco directamente inoculadas no plástico de "cultura tratada".

As curvas de crescimento comparativas para as células mantidas na presença e na ausência de "alimentação" inactivado são apresentados com o caso das células S86N16 na **figura 7**. Esta adaptação das células é progressiva, para não

perder o carácter de células tronco das células inicialmente mantidas num “alimentação”. Derivados progressivos são assim feitos. A obtenção de células que se proliferam em plástico é a realização do processo de retirada. Na tabela 4, os tempos de divisão mostram a sensibilidade das células ao seu ambiente. Como no caso da retirada progressiva do soro, uma adaptação é obtida com um efeito de recuperação nas células após algumas passagens, nas condições definidas.

**Tabela 4:**

Condição	1.2	0.5	0.3	plástico
d	1.95	1.84	1.39	1.42
MDT	12.3	13	17.3	16.9

Os exemplos são tomados entre as passagens p154 e p131 para as 3 condições  $1.2 \times 10^6$ ,  $0.5 \times 10^6$  e  $0.3 \times 10^6$  de células de alimentação e entre p161 e p139 para a condição de plástico apenas.

#### **EXEMPLO 7: A privação de células em factores de crescimento**

De acordo com as condições de cultura iniciais, a presença de factores de crescimento é necessária. É possível esquematicamente distinguir duas famílias de factores: as citocinas e factores tróficos.

As citocinas são principalmente citocinas cuja acção é através de um receptor que está associado à proteína gp130. Assim, LIF, interleucina 11, interleucina 6, CNTF, oncostatina e cardiotrofina têm um modo de acção semelhante com o recrutamento ao nível do receptor de uma cadeia

específica e a combinação destes com a proteína gp130 em formas monoméricas ou às vezes heterodimérica. Em alguns casos, a combinação de uma forma solúvel dos receptores, uma forma descrita *inter alia* para os receptores para interleucina 6 e CNTF, torna possível aumentar o efeito proliferativo observado. Já foi demonstrado que a adição de pelo menos uma dessas citocinas parece ser necessário para a obtenção de células tronco embrionárias.

Os factores tróficos são principalmente SCF, IGF-1 e bFGF, que também são utilizados no início da cultura, conforme descrito acima. Sua presença é também necessária para a obtenção e ampliação das células.

Reduzindo progressivamente esses factores de crescimento, é possível obter, depois de algumas passagens, as condições de cultura que permitem a proliferação das células tronco embrionárias ou somáticas sem a adição de um factor de crescimento exógeno. Os diferentes marcadores utilizados para caracterizar estas células são sempre positivos para as células mantidas sem factores.

#### **EXEMPLO 8: Comparação do meio utilizado**

Inoculadas em diferentes meios, as células não são obtidos com as mesmas frequências. Comparação das composições dos meios faz a identificação de um dos componentes em particular difícil. Parece mais provável que do conjunto permite uma melhoria na fisiologia das células. Entre os meios preferidos, o meio Ham F12, o meio MacCoy, o meio DMEM, o meio DMEM-F12 e um meio DMEM enriquecido com biotina vai ser

notado. Começando com um tal isolamento, ensaios de adaptação são realizados nestes diferentes meios.

#### **Exemplo 9: Estabelecimento de células não aderentes**

Durante as passagens sucessivas das células tronco, a inoculação de alta densidade directamente no prato bacteriológico torna possível a obtenção, após algumas passagens, as células embrionárias que se desliguem do seu substrato e que proliferam em suspensão na forma de pequenos agregados regulares. Esta proliferação é incentivada por várias passagens por mais diluição, dissociação mecânica e não utilização de enzimas proteolíticas. A agitação das culturas é geralmente realizada, mas não representam um factor de distinção para a obtenção de células não aderentes. Tal como as células aderentes, estas células têm uma morfologia característica de células tronco, ou seja, um tamanho pequeno, uma grande relação de nucleo-citoplasmática, um núcleo com pelo menos um nucléolo, que é claramente visível e um citoplasma reduzido. Essas células são caracterizadas por um crescimento em pequenos agregados que são mais ou menos compactos (**figura 8**). Estas células não aderentes apresentam reactividade cruzada com um número de anticorpos, como descrito acima no Pain et al. (1996). Estas células são também positivas para a actividade telomerase endógena (tal como apresentado no exemplo, 10 para a EB1, EB4 e células EB5). Numa fase não aderente, as células exibem uma elevada proliferação em diferentes meios. A densidade de inoculação inicial e o elevado fornecimento regular de novo meio fornece alta densidade que pode variar em cerca de  $1 \times 10^6$  células por ml. A **Tabela 5** resume as principais características de algumas isoladas (células parentais

passagem inicial do processo numa suspensão, o número de dias mantidos em cultura em suspensão, o número de passagens e das gerações obtidas antes da interrupção voluntária da manutenção). Pode portanto, notar-se que a passagem para a o fazer numa suspensão pode variar de um isolado para outro (ver isolado EB1 e EB14) e a taxa de proliferação (ver isolado EB3 e EB14).

**Tabela 5:**

Nome	Células parentais	Passagem inicial	Inicio	Dias	Passagens	Gerações
EB1	S86N16	p111	20-01-2001	184	41	120
EB3	S86N16	p118	23-01-2001	381	17	40
EB4	S86N45	p100	25-09-2001	44	17	40
EB5	S86N45	p100	25-09-2001	44	17	40
EB14	S86N45	p81	05-09-2002	70	24	65

Note-se que o termo “início” corresponde às células a serem colocadas sob não adesão.

Descobrimos também que a obtenção de células não aderentes é possível após várias passagens, a qualquer momento, a partir de células tronco não aderentes, que proliferaram com ou sem camada de alimentação.

#### **Exemplo 10: Caracterização das células estabelecidas**

As células tronco mantidas por longos períodos de tempo em cultura são caracterizadas com base nos mesmos critérios acima descritos (Pain et al., 1996). Assim, é possível detectar com regularidade a actividade de fosfatase alcalina endógena, ilustrada pela fotografia das **figuras 9a-9b**, a

actividade de telomerase endógena (**figura 9c**) e reactividade com anticorpos específicos, tais como os anticorpos SSEA-1 (TEC-01) e EMA-1.

Um dos critérios importantes durante o estabelecimento das células é a presença de telomerase. Vários testes foram realizados durante a manutenção das células em cultura usando um kit de detecção TRAP (Telomerase PCR Elisa, Roche). As células são detectadas positivas após várias passagens em cultura. Assim, a actividade telomerase é detectável para células S86N16, as células S86N45 (EB45), para EB1, EB4 EB5 que são derivados de forma não aderente (ver **tabela 6**). Os CEFs (Fibroblastos de Embriões de Galinha) mantidos em cultura primária são considerados como negativo. O limiar de uma OD <0,2 é o limite recomendado pelo kit como o limite negativo. Todas as análises foram realizadas num equivalente de 2000 células.

**Tabela 6: Teste da actividade de telomerase em várias linhagens em várias passagens**

Células	Passagem	Telomerase OD
S86N16	p12	1.7
	p29	2.8
	p185	0.97
	p204	0.95
S86N16 EB1	p134	1.1
S86N45 (EB45)	p50	0.87
	p58	1.1
	p66	0.96
	p94	1.2
EB4	p112	1.4
EB5	p112	0.94

CEF*	p4	0.07
* CEF: Fibroblasto de Embriões de Galinha		

De particular importância, as células da invenção têm conservado algumas características essenciais de “células tronco”. Elas expressam uma serie de marcadores específicos de células tronco que se encontram presente nas células tronco embrionárias em ratos, galinhas e humanos (Por exemplo, fosfatase alcalina, SSEA-1, EMA-1, telomerase) (**Figura 9**). Como esperado, a expressão destes marcadores é perdida na indução de diferenciação celular através da adição de ácido retinóico (RA) ou DMSO (Tabela 7 e **Figura 9c**). Eles replicam indefinidamente *in vitro* (**Figura 1**); várias linhagens de candidatos estiveram em cultura mais de um ano sem obstáculos específicos, tais como a diferenciação.

**Tabela 7: marcadores específicos de células ES: “a expressão marcadores é diminuída na diferenciação com ácido retiônico”**

MARCADORES	SEM ÁCIDO RETIÔNICO	COM ÁCIDO RETIÔNICO
Fosfato Alcalino	++++	-
SSEA-1	90	<10
EMA-1	90	10
Actividade Telomerase	>1.5	<0.2

Os marcadores SSEA1 e EMA1 são expressos em percentagem de células marcadas.

#### **EXEMPLO 11: Transfecção e indução das células**

As células tronco mantidas num crescimento a longo prazo são transfectadas com plasmídeos de expressão diferentes. Tem

sido demonstrado que as células estaminais aviárias poderão ser transfectadas (Pain et al., 1996). Em particular, as células não aderentes são transfectadas e vários sistemas de selecção permitem identificar as células transfectadas estavelmente (selecção de células, limitando a diluição, e semelhantes). Essas modificações genéticas podem ser feitas na fase indiferenciada das células tronco. Uma vez esta modificação tenha sido obtida, a célula é então induzida para diferenciar espontaneamente ou por adição de um indutor de diferenciação. Neste caso, é possível utilizar o ácido retinóico em concentrações de  $10^{-8}$  M a  $10^{-6}$  M, ou sulfóxido dimetil em concentrações finais de 1 a 2% ou butirato de sódio nas concentrações de  $10^{-4}$  a  $10^{-8}$  M, ou éster de forbol (TPA, PMA, e de modo semelhante) ou lipopolissacarídeos (LPS) em concentrações finais de 1 a 5 µg/ml. Noutro exemplo, as células podem formar corpos embrióides em suspensão, tais corpos embrióides podem ser levados a aderir ao plástico depois de dissociação ou não dissociação das células que os constituem. Estas células diferenciadas proliferam, mas têm uma capacidade mais limitada de proliferação, a longo prazo. Ao visarem à modificação genética de um gene que influencia a proliferação das células, é possível fazer essas células diferenciadas, capazes de proliferar a longo prazo.

**EXEMPLO 12: Protocolo para infectar linhagem aviária não aderente (EB1) com um vírus**

*Amplificação das células:*

As células EB1 e EB14 são inoculadas num meio, de preferência MacCoy, 5A HAMF12 ou meio DMEM, ou qualquer outro meio de interesse, contendo 5% de soro numa concentração de  $0,2 \times 10^6$

células/ml para um volume inicial de 50 ml em geral. Elas são mantidas em cultura a 39°C e a 7,5% no CO<sub>2</sub>, com agitação. Um novo meio é adicionado todos os dias para os 3-4 dias que dura a ampliação, de modo a alcançar uma concentração celular de 1-3 X 10<sup>6</sup> células/ml para um volume de cultura final de 100 a 250 ml.

As células em suspensão são colectadas e centrifugadas durante 10 minutos a 1 000 rpm, aproximadamente. O pellet é ressuspenso em 20 a 50 ml de 1X PBS (tampão fosfato de sal). As células são então contadas, centrifugadas e as células peletizadas são retomadas num meio isento de soro com uma concentração final de 3-5 X 10<sup>6</sup> células/ml. Vários tubos são, então, elaborados sob essas condições com 3-5 X 10<sup>6</sup> células por tubo.

*Preparação do vírus e da infecção:*

A família viral tem um **título** conhecido sendo descongeladas rapidamente a 37°C e diluído em meio isento de soro num título de 10 X para 1000 X a concentração necessária para a infecção final. As células são infectadas com o vírus de interesse numa m.o.i. (multiplicidade de infecção), de entre 0.01 e 0,5 de acordo com os tipos de vírus, que envolve a adição de entre 0,1 e 10% volume/volume da suspensão viral para o pellet celular. Após incubação durante uma hora a uma temperatura ideal para o vírus, em geral entre 33 e 37°C, as células são novamente centrifugadas e o meio removido com cuidado. Esta etapa é considerada, muitas vezes necessária para limitar o efeito do vírus inicial no processo subsequente. Uma das possibilidades é a de diluir as células directamente sem centrifugá-las novamente com meio contendo

soro (5% de soro) numa concentração final de entre 0.2 e 1 X  $10^6$  células/ml e incubadas novamente.

*Colheita do sobrenadante e das células:*

Após e entre de 2 a 4 dias de incubação, dependendo da cinética viral e o potencial efeito citopático de determinados vírus, o meio contendo as células ou fragmentos celulares é colhido. Dependendo do vírus, apenas o pellet ou o sobrenadante pode ser de interesse e conter as partículas virais. As células são colhidas e centrifugadas. O sobrenadante recolhido é centrifugado novamente durante 5 a 10 minutos a 2500 rpm, e armazenadas a -80°C antes de purificação das partículas. Um alíquota é colectado, de modo a realizar a titulação. O pellet celular foi retomada em 5 ml de meio isento de soro, sonicado e centrifugados durante 5 a 10 minutos a 2 500 rpm. O sobrenadante obtido é armazenado a -80° C até a purificação e titulação de uma alíquota.

A infecção viral e eficiência de produção são comparadas entre as várias condições realizadas. Para o vírus, com efeitos citopáticos, as titulações são em geral realizados pela técnica de placa de lise.

**Exemplo 13: Protocolo para infectar uma linhagem de células aviárias aderentes (S86N45) com um vírus**

*Preparação das células:*

As células são inoculadas 48 horas antes da infecção em frascos T150 numa concentração entre 0,03 e 0,06 X  $10^6$  células/cm<sup>2</sup> num meio, de preferência MacCoy 5A, a HAMF12 ou

meio DMEM, ou qualquer outro meio de interesse, contendo 5% de soro. Eles são mantidos a 39°C e 7,5% de CO<sub>2</sub>.

*Infecção:*

A família viral com um título conhecido é descongelada rapidamente a 37°C e diluído num meio isento de soro num título de 10 X 1000 X a concentração necessária para a infecção final. As células são infectadas com o vírus de interesse numa m.o.i. (multiplicidade de infecção), de 0.01 e 0,5 acordo com os tipos de vírus, que envolve a adição de entre 0,1 e 10% de volume/volume da suspensão viral para a monocamada de células. A infecção é geralmente levada a cabo num mínimo de meio (5 e 10 ml para um frasco de 75 cm<sup>2</sup>) num meio contendo 0% soro. Após incubação durante 1 hora na temperatura ideal para o vírus, em geral 33 a 37°C, 20 ml de 5% meio são adicionados aos frascos. Num caso particular, as células podem ser lavadas com PBS, a fim de remover as partículas que podem ser anexadas às células. No caso de um vírus citopático, as células são observados diariamente após a infecção, a fim de acompanhar o aparecimento de lise celular, o que indica um bom progresso da infecção.

*Colheita do sobrenadante e das células:*

Após 2 a 4 dias de incubação, dependendo da cinética viral e o potencial efeito citopático de determinados vírus, o meio contendo o sobrenadante, as células e os resíduos celulares são colhidas. Dependendo do vírus, apenas o sedimento ou o sobrenadante pode ser de interesse e conter as partículas virais. As células são colhidas e centrifugadas. O sobrenadante é centrifugado novamente durante 5 a 10 minutos

a 2 500 rpm, e armazenado a -80°C antes de purificação das partículas. Um alíquota é recolhido, de modo a realizar a titulação. O sedimento celular foi retomado em 5ml de meio isento de soro, sonicado e centrifugado durante 5 a 10 minutos a 2 500 rpm. O sobrenadante obtido é armazenado a -80°C até à purificação e à titulação de uma alíquota.

A infecção viral e eficiência de produção são comparadas entre as várias condições realizadas. Para o efeito citopático com vírus, as titulações são em geral realizados pela técnica de placa de lise.

**EXEMPLO 14: A replicação do vírus Vaccinia Ankara Modificado (MVA) sobre as células tronco aviárias, aderente e não aderente da linhagem EB45 e linhagem EB14.**

Uma série de testes foram realizados nas células EB45 (S86N45) e EB14 para determinar a respectiva susceptibilidade à infecção MVA, a cinética de propagação MVA, e os rendimentos de produção virais. O vírus MVA usado nesses estudos foi um vector MVA recombinante expressando a proteína repórter GFP (MVA-GFP) ou um vírus MVA não recombinante. Recentemente a preparação de fibroblastos embrionários de galinha (CEF) foram incluídos em todos os testes das células de controlo.

**14.1-Considerações de segurança**

O vírus MVA (título  $2,5 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>/ml em frascos de 0,5 ml) foi recebido em condições de congelado. Por razões de segurança, o vírus MVA e as células infectadas foram mantidas sob condições controladas (congelado a -80°C) e o material

plástico contaminado foi colocado em solução de hipoclorito durante mais de uma hora e depois colocado num saco para total e completa desactivação através de autoclave.

## **14.2-Produção de vírus**

### **14.2.1-Celulas aderentes S86N45 (EB45)**

$1 \times 10^6$  de células aderentes são semeados num prato de 100 mm no dia antes da infecção, em 20 mL do meio. 24 horas depois, o meio é descartado, as células são incubadas a 37°C com o inóculo (2 mL do meio isento de soro, com uma multiplicidade de infecção de 0.01 ou 0.1 TCID/célula). 1 hora depois, o inóculo é descartado, e 20 mL de meio pré-aquecido é adicionado às células, e a incubação é mantida a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub>. Para a preparação do vírus, as células infectadas são colhidos através de um arrancador, transferidos num tubo de 50 mL Falcon™ e girado a 1200 rpm em temperatura ambiente. Os vírus sobrenadantes (vírus extra-celulares, EV) são colectados, e a célula pellet (vírus intracelulares, IV) é diluída em 1 ou 2 mL de meio. EV e IV são amostras submetidas aos três ciclos de congelamento-descongelamento e, em seguida são sonicadas. Após centrifugação a 2500rpm durante 10 m à temperatura ambiente, as amostras EV e IV são aliquotadas e mantidas a -80°C até a titulação.

### **14.2.2-Células em suspensão EB14**

0,4 de células EB14  $\times 10^6$ /mL são semeadas em 40 mL do meio ( $16 \times 10^6$  células) em frascos de centrifugação de 125 mL o dia antes da adição do inóculo viral, numa moi de 0,01 ou 0,1 TCID/célula no meio. Após 1 hora de incubação do vírus, 80 mL

de meio pré-aquecido é adicionado. A incubação é mantida a 37°C em condições de rotação desejadas e 5% de CO<sub>2</sub>. As células infectadas são, então, colhidas em diferentes tempos pós-infecção, transferidas em tubos Falcon™ de 50 mL e girou a 1200 rpm em temperatura ambiente. O sobrenadante (vírus extracelulares, EV) é recolhido, e a célula pellet (vírus intracelulares, IV) é diluída em 5 ou 10 mL de meio. As amostras EV e IV submetidas ambas os três ciclos de congelação-descongelamento e, em seguida são sonicadas. Após centrifugação a 2500rpm durante 10 m à temperatura ambiente, as amostras EV e IV são aliquotadas e mantidas a -80°C até a titulação.

#### **14.3-Titulação de vírus**

##### ***14.3.1- Titulação de MVA através do método de diluição ponto final TCID<sub>50</sub>***

A titulação do vírus MVA é feita pelo método de diluição ponto final TCID<sub>50</sub> nas células CEF ou DF-1. O ensaio determina que a amostra contém uma dose suficiente de vírus infeccioso para produzir infecção. O TCID<sub>50</sub> é determinado como a diluição que produziu efeito citopático (CPE) numa metade do número total de culturas de células. Um fundo plano P96 é necessário para um título de amostra viral. Resumidamente, 15000 CEF células/100 µL são semeados por cavidade. Oito fileiras de onze cavidades são semeadas. As oito linhas de suporte para a altura em série das diluições 10 da amostra viral (ou seja, entre 10<sup>-2</sup> a 10<sup>-9</sup>). Para cada diluição em série, uma mistura de 1 mL é feito em meio isento de soro, 100 µL da mistura é distribuído em 10 cavidades correspondente de diluição, e a décima primeira fileira é a

cavidade de controlo não infectada. A placa P96 é incubada a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub>. Entre 5 a 10 dias mais tarde, o título viral é calculado pelo método de Reed-Muench, gravando as cavidades CPE positivas.

#### **14.4- Resultados da susceptibilidade à infecção e titulação MVA**

14.4.1-A susceptibilidade intrínseca das células EB45 (S86N45) e EB 14 à infecção MVA foi investigada usando o vector MVA-GFP recombinante. Esse vector específico foi seleccionado para os estudos de simplificar o monitoramento e quantificação de células infectadas. EBx e células CEF foram assim tratados com diferentes multiplicidades de infecções (moi) e as células foram analisadas por microscopia de fluorescência e fluorocitometria vários dias pós-infecção.

Como mostrado nas figuras 10 e 11, todas as células aderentes EB45 que ainda estão viáveis até 48 horas pós-infecção expressaram fortemente a proteína repórter GFP, mesmo quando se utiliza um moi tão baixos quanto 0,1 TCID<sub>50</sub>/célula. De ressaltar, a Figura 10 também ilustra o tamanho muito menor das células EB45 e EB 14 quando comparadas com as células CEF.

No seu conjunto, estes resultados demonstram claramente a elevada susceptibilidade das células aderentes EB45 EB14 à infecção MVA.

14.4.2- A seguinte tabela 8 lista resultados obtidos nos vários testes de infecção MVA-GFP executados. Todas as amostras foram tituladas duas vezes.

**Tabela 8 : Resultados da titulação**

Condições experimentais	Multiplicidade de infecções (MOI)	Tempo após infecção (PI) (em horas)	Titulação (em TCID <sub>50</sub> /ml)
Células (EB45) em meio DMEM-F12 (prato de 100 mm diâmetro)	0.01	96	9.57
		96	8.57
	0.1	72	7.5
		72	7.63
Células EB 14 em meio DMEM-F12 (frascos centrifugadores 120 ml)	0.2	48	7.5
		72	7.63
	0.01	96	7.5
		96	7.71
Células CEF em meio HAM-F12 (prato de 100 mm diâmetro)	0.01	72	7.39
	0.1	72	7.91

#### **14.3- Propagação de MVA nas células EB14 e EB45**

A propagação da MVA na suspensão EB14 e nas células aderentes EB45 foi determinada por uma análise quantitativa da cinética de replicação MVA-GFP. As células EB45 foram cultivadas em pratos em meio DMEM-F12 e foram infectados com um moi de 0,1, enquanto as células EB14 foram cultivadas em frascos de 120ml de rotação em meio DMEM-F12 durante 24 horas antes da infecção com um moi de 0,2. A percentagem de células infectadas foi então quantificada pela análise FACS em vários tempos pós-infecção. Como ilustrado nas **Figuras 12 e 13**, todas as células que ainda continuam viáveis não expressam GFP às 48 horas (EB45) ou 72 horas (EB14), pós-infecção.

#### **14.4- Rendimento viral nas células de crescimento EB45 aderentes em meio contendo soro**

**14.4.1-** A produtividade viral das células aderentes EB45 foi analisada por meio de células cultivadas em DMEM-F12. MVA foi encontrado por ser replicado muito eficientemente na EB45 em DMEM-F12 e obter rendimentos mais elevados do que com as células controle CEF (**Figura 14**).

**14.4.2-** Numa nova série de testes, um vírus MVA não recombinante (da ATCC) foi utilizado para um estudo de replicação comparativo sobre as células EF e as células EB45: confirmando resultados anteriores com o vector MVA-GFP, maiores rendimentos de produção foram novamente obtidos com este vírus MVA (**Figura 15**).

Em conjunto, esses resultados demonstram a elevada susceptibilidade à infecção de MVA e a eficiente produção de vírus das células aderentes EB45, que são superiores em fibroblastos embrionários de galinha. Além disso, todos estes testes foram realizados em condições normais. Por conseguinte, é razoável argumentar que os rendimentos do vírus ainda maior pode ser alcançada mediante a optimização das condições experimentais e, em particular, usando meios de cultura celular óptimos.

#### **14.5- Rendimento viral em suspensão de células de crescimento EB14 em meio contendo soro**

A produtividade viral das células EB14 foi determinada em frascos de rotação usando células de crescimento em meio DMEM-F12. Os resultados de uma primeira série de testes, usando uma multiplicidade de infecção de 0,1 são mostradas na **figura 16**. Esses dados confirmam os resultados anteriores obtidos com as células aderentes e confirma a capacidade das

células de suspensão EB14 para produzir de forma eficiente vírus recombinantes MVA, com rendimentos próximo de 100 TCID<sub>50</sub>/célula, duas vezes maior que a obtida com os fibroblastos embrionários de galinha.

#### **14.6- Rendimentos virais em suspensão das células de crescimento EB14 em meio isento de soro**

Idealmente, a produção de vacinas virais deve ser realizado em células cultivadas em meio de suspensão isento de soro em biorreatores. De modo a investigar a produção de MVA num meio isento de soro, uma série de testes foi iniciada em que células em suspensão EB14 foram infectadas com o vetor MVA-GFP em frascos tipo de rotação em meio livre de soro em duas diferentes multiplicidades de infecção (0,01 e 0.1). As análises FACS das células confirmam a infecção eficiente das células EB 14, nas duas condições experimentais (**Figura 17**). Além disso, e como esperado, os testes mostram que a infecção é mais rápida quando se usa um moi de 0,1, enquanto em um moi de 0,01 as células são mais viáveis e capazes de produzir descendência do vírus por um longo período de tempo (dados não mostrados).

Análise de rendimentos de vírus MVA confirmam que a produção eficiente é alcançada pela suspensão de células de crescimento EB14 em suspensão em meio isento de soro e meio isento de proteínas (**Figura 18**). A produção de vírus superior à anormalmente obtida com as células CEF é rotineiramente obtida. Além disso, a análise da distribuição das partículas infecciosas indicam que a maioria dos virions são mantidos no interior das células e somente uma fracção é segregada no sobrenadante (**Figura 18**).

As células EB14 e S86N45 são bem caracterizadas são células tronco embrionárias aviárias não geneticamente modificadas que podem ser eficientemente cultivados em meio isento de soro, quer em suspensão quer como células aderentes. Os inventores demonstraram que as células são altamente susceptíveis à infecção e propagação de um do vírus vacina Ankara recombinante e não recombinante, e os resultados indicam que a produção viral é pelo menos 2 a 3 vezes maior do que no controle das células CEF. Em conjunto, essas características fazem das células da invenção, principalmente a EB14 e EB45, um substrato de células altamente promissora para substituir o actual sistema de produção à base de ovo ou de CEF para a produção de vectores baseados em MVA.

### **REFERÊNCIAS**

- Baba TW, Humphries EIL (1985). Formation of a transformed follicle is necessary but not sufficient for development of an avian leukosis virus-induced lymphoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 213-216.
- Beug H, von Kirchbach A, Doderlein G, Conscience JF, Graf T. (1979). Chicken hematopoietic cells transformed by seven strains of defective avian leukemia viruses display three distinct phenotypes of differentiation. Cell 18: 375-390.
- Guilhot C, Benchaibi M, Flechon JE, Samarut J. (1993). The 12S adenoviral E1A protein immortalizes avian cells and interacts with the avian RB product. Oncogene 8: 619-624
- Kawaguchi T, Nomura K, Hirayama Y, Kitagawa T. (1987). Establishment and characterization of a chicken hepatocellular carcinoma cell line, LMH. Cancer Res 1987 47: 4460-4464.

- Kim H, You S, Farris J, Foster LK, Foster DN. (2001). Post-transcriptional inactivation of p53 in immortalized chicken embryo fibroblast cells. *Oncogene* 20: 3306-3310.
- Kim H, You S, Kim IJ, Foster LK, Farris J, Ambady S, Ponce de Leon FA, Foster DN. (2001). Alterations in p53 and E2F-1 function common to immortalized chicken embryo fibroblasts. *Oncogene* 20: 2671-2682.
- Liu JL, Klein PA, Moscovici MG, Moscovici C. (1992). Monoclonal antibodies recognizing normal and retrovirus transformed chicken hematopoietic cells. *Virology* 189: 583-591.
- Moscovici C, Moscovici MG, Jimenez H, Lai MM, Hayman MJ, Vogt PK. (1977). Continuous tissue culture cell lines derived from chemically induced tumors of Japanese quail. *Cell* 11: 95-103.
- Moss B. (1994) Replicating and host-restricted non-replicating vaccinia virus vectors for vaccine development. *Dev Biol Stand.* 82: 55-63.
- Pain B., Clark M.E., Shen M., Nakazawa H., Sakurai M., Samarat J., Etches RJ. (1996). Long-term in vitro culture and characterisation of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities. *Development* 122: 2339-2348.
- Pain B., Chenevier P., Samarat J. (1999). Chicken embryonic stem cells and transgenic strategies. *Cells Tissues Organs* 165: 212-219.
- Samarut J, Gazzolo L. (1982). Target cells infected by avian erythroblastosis virus differentiate and become transformed. *Cell* 28: 921-929.
- Smith JR and Pereira-Smith OM (1996). Replicative senescence: implications for in vivo aging and tumor suppression. *Science* 273, 63-67.

30-07-2010

## **REIVINDICAÇÕES**

1. Método de replicação do vírus vaccinia nativo ou recombinante compreendendo as etapas de inoculação das células tronco derivadas de embriões aviários com partículas virais dos referidos vírus vaccinia e cultura das referidas células, num meio basal até a lise celular ocorra e que as partículas virais produzam os referidos vírus vaccinia que são libertados no referido meio, em que as referidas células tronco derivadas de embriões aviários são obtidas por um processo que consiste em:

a) cultivo de células embrionárias aviárias num meio de cultura completo suplementado com soro contendo:

- os factores de crescimento compreendendo os factores tróficos SCF, IGF-1, BFGF e citocinas seleccionadas do grupo das citocinas constituído por LIF, interleucina 11, interleucina 6, receptor de interleucina 6, CNTF, em oncoestatina e cardiotrofina; e

- uma camada de alimentação,

b) passagem modificando o meio da cultura de modo a obter retirada progressiva ou total dos referidos factores, do soro e/ou da camada de alimentação,

c) estabelecimento de linhagens de células aviarias aderentes ou não aderentes capazes de proliferarem num meio basal na ausência de factores de crescimento exógenos, de soro e/ou camada de alimentação inactivado.

2. Método de acordo com a reivindicação 1 em que a etapa a), as referidas células embrionárias aviárias cultivadas são células embrionárias de galinha ou de pato.
3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que a camada de alimentação é inactivada.
4. Método de acordo com uma das reivindicações da 1 a 3, em que o referido vírus vaccinia é o vírus Vaccinia Ankara Modificado (MVA), o vírus vaccinia Lister-Elstree, o vírus NYVAC, o vírus LC16m8ou ou o vírus CV178.
5. Método de acordo com as reivindicações 1 à 4, em que as referidas linhagens de células aviária obtidas na etapa c) são capazes de proliferar, durante pelo menos, 600 dias.
6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, em que as referidas linhagens de células aviárias obtidas na etapa c) são células tronco não aderentes, que proliferam em suspensão num meio isento de factores de crescimento exógenos.
7. Método de acordo com uma das reivindicações da 1 a 5, onde as referidas linhagens de células aviárias são células tronco não aderentes, que proliferam em suspensão num meio isento de soro (meio isento de soro).
8. Método de acordo com uma das reivindicações da 1 à 5, onde as referidas linhagens de células aviárias são células tronco não aderentes, que proliferam em suspensão num meio isento de factores de crescimento exógenos e soro.

9. Método de acordo com uma das reivindicações da 1 à 5, em que as referidas linhagens de células aviárias obtidas na etapa c) são células tronco não aderentes, que proliferam em suspensão num meio livre de factores de crescimento exógenos, soro e células de alimentação.

10. Método de acordo com uma das reivindicações da 1 à 9, em que as referidas linhagens de células aviárias obtidas na etapa c) têm pelo menos uma das seguintes características:

- uma alta relação núcleo-citoplasmática,
- uma actividade de fosfatase alcalina endógena,
- uma actividade telomerase endógena,
- uma reactividade com anticorpos específicos seleccionados do grupo de anticorpos SSEA-1 (TEC01), SSEA-3, e EMA-1

11. Método de acordo com uma das reivindicações da 1 à 10, em que as referidas linhagens de células aviárias obtidas na etapa c) são cultivados em meio basal.

12. Método de acordo com a reivindicação 11, em que as linhagens de células aviárias obtidas na etapa c) são cultivados em meio basal seleccionado do grupo constituído por DMEM, GMEM, HamF12 McCoy ou suplementadas com aditivos seleccionados do grupo consistindo em aminoácidos não essenciais, vitaminas e piruvato de sódio.

13. Método para produzir vacina viva ou atenuada compreendendo a cultura de linhagens celulares aderentes ou não aderentes estabelecidas na etapa c) de acordo com o método das reivindicações da 1 à 12.

14. Método de acordo com a reivindicação 13 para produzir vacina viva ou atenuada contra a varíola.

15. Método de acordo com a reivindicação 13 para produzir vacina viva ou atenuada contra o cancro.

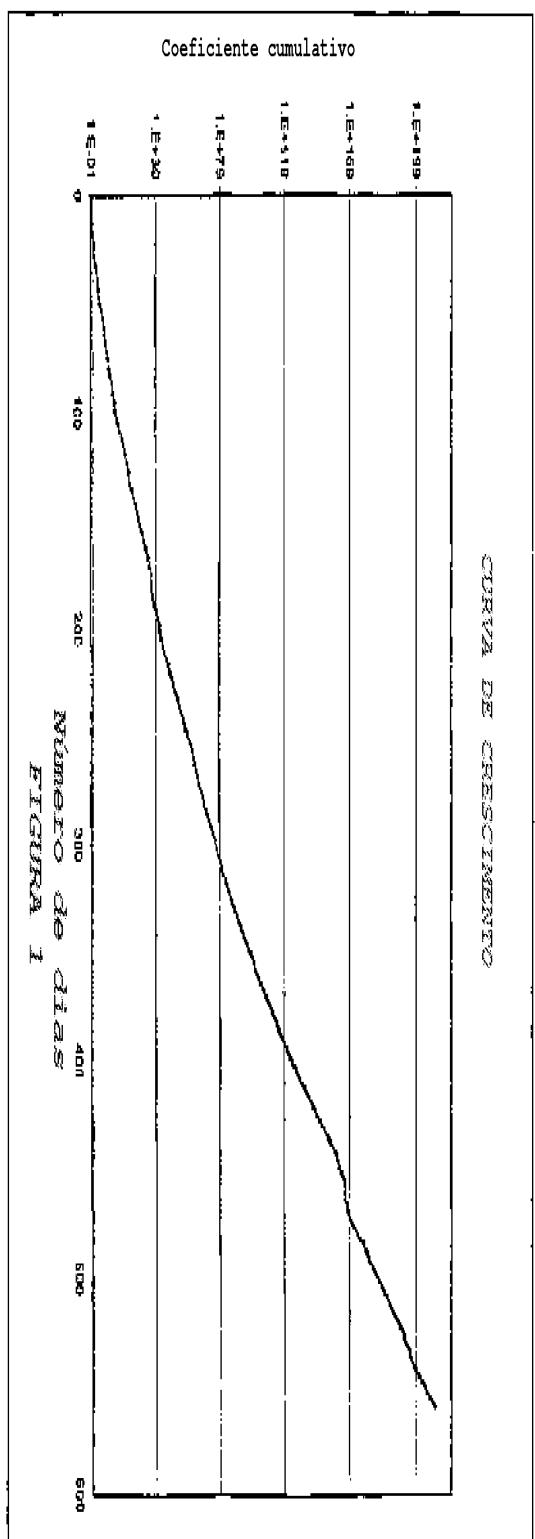
16. Método de acordo com a reivindicação 13 para produzir vacina viva ou atenuada contra doenças ou infecções.

30-07-2010

RESUMO

**PRODUÇÃO DE POXVÍRUS COM LINHAGEM DAS CÉLULAS AVIARIAS  
ADERENTES OU NÃO ADERENTES**

A presente invenção refere-se a um método para replicar poxvirus tais como vírus vaccinia compreendendo as etapas de inoculação de células tronco embrionárias aviárias com partículas virais e fazer culturas das referidas células num meio basal até que a lise das células ocorra sendo as novas partículas virais produzidas libertadas no referido meio.



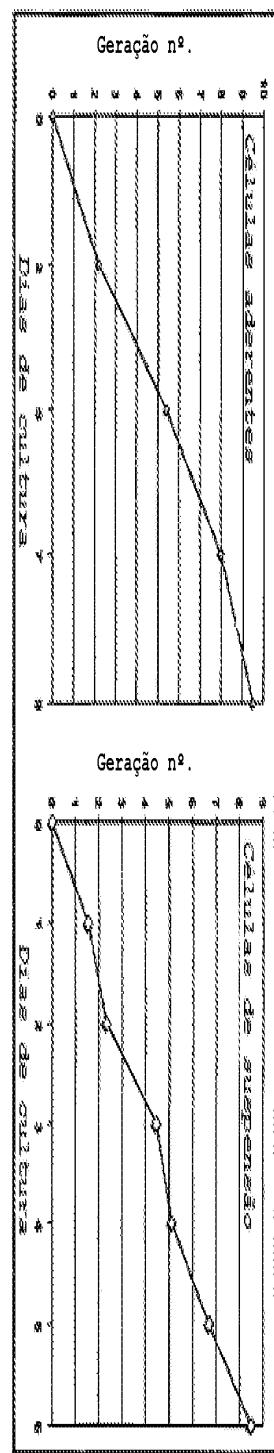


FIGURA 2

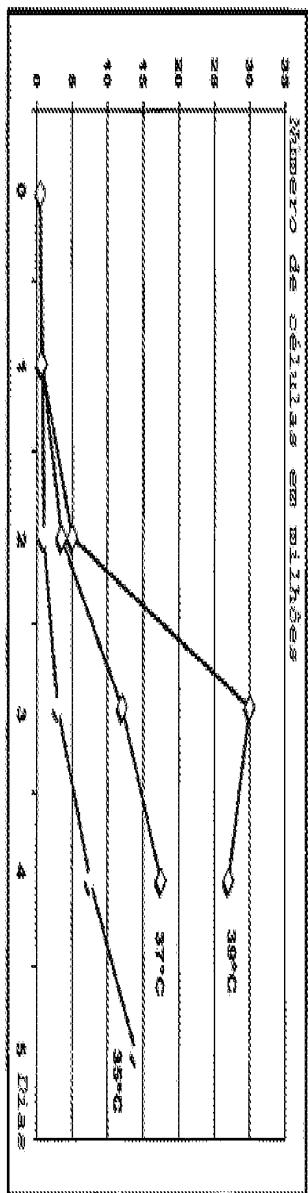
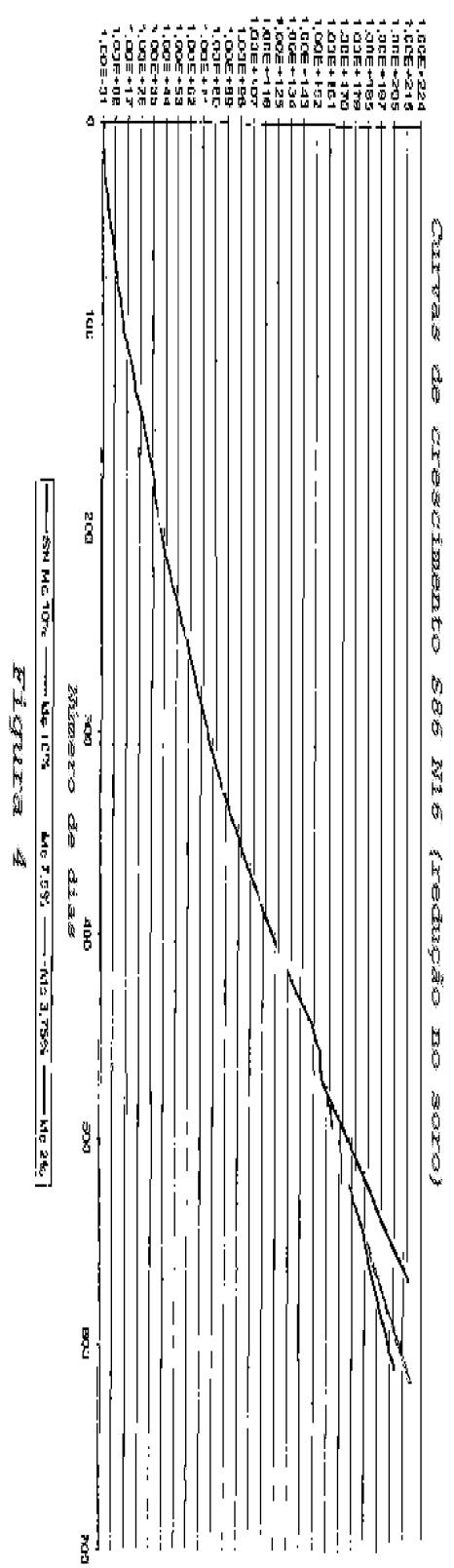


FIGURA 3

## Coeficiente cumulativo



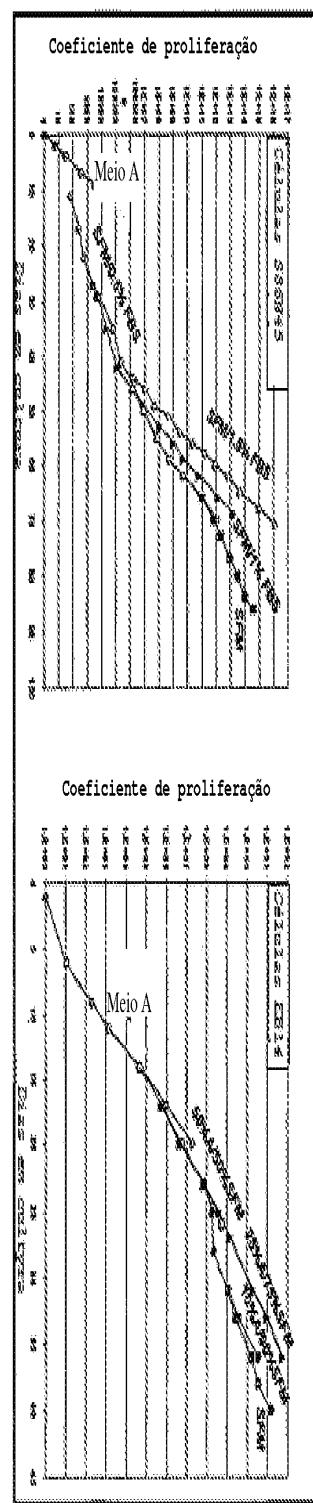


FIGURA 5

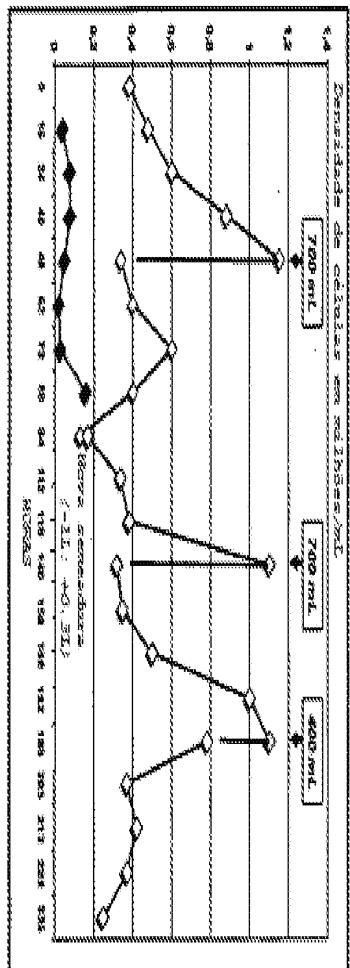


FIGURA 6

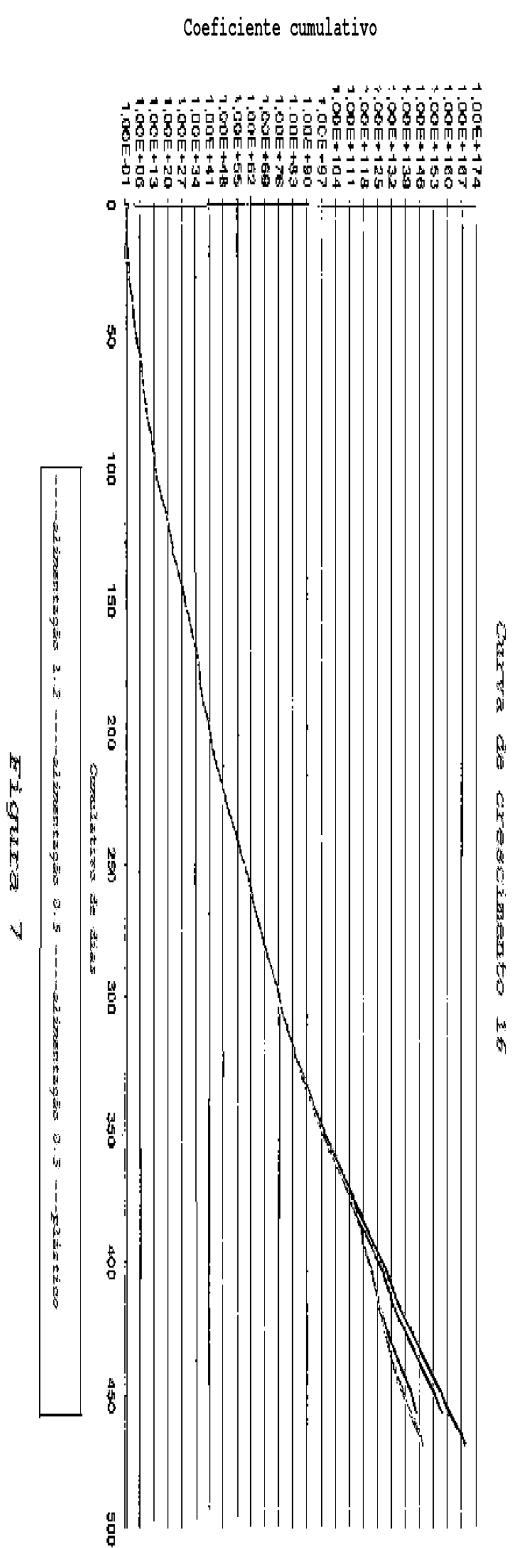
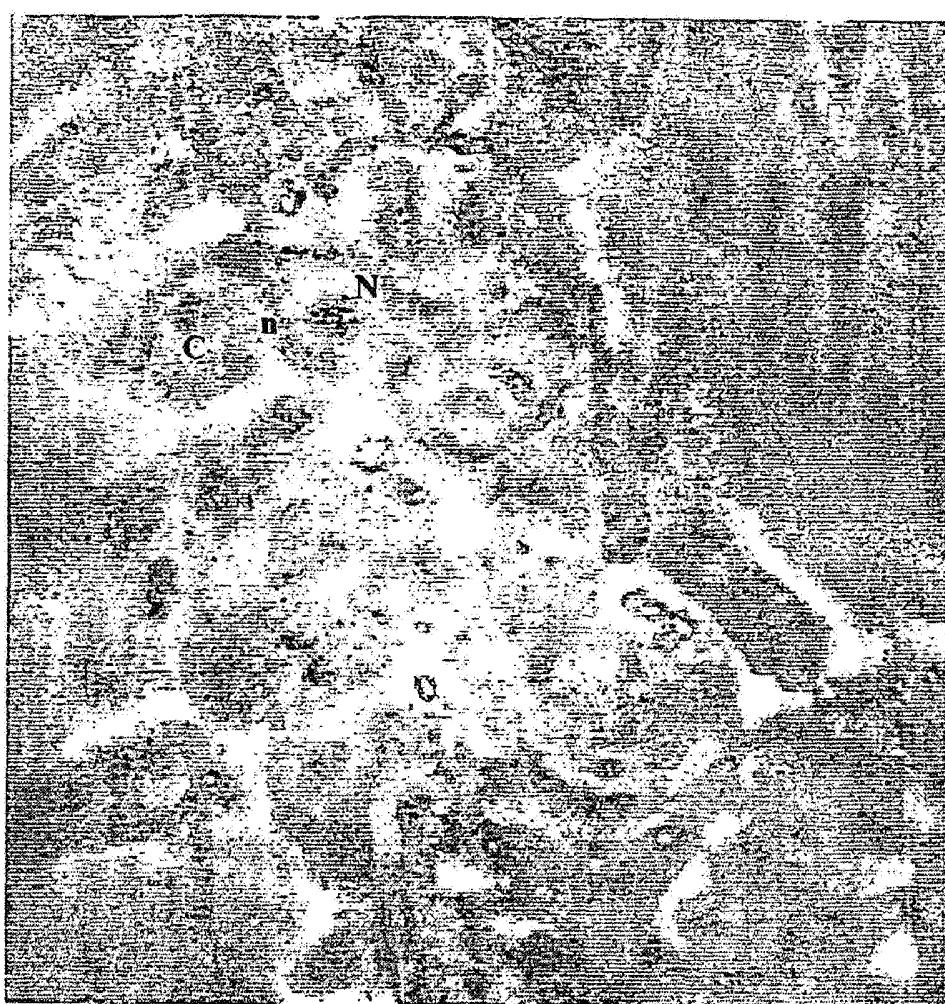


FIGURA 7

6/12



**FIGURE 8**

7/12



FIGURE 9A

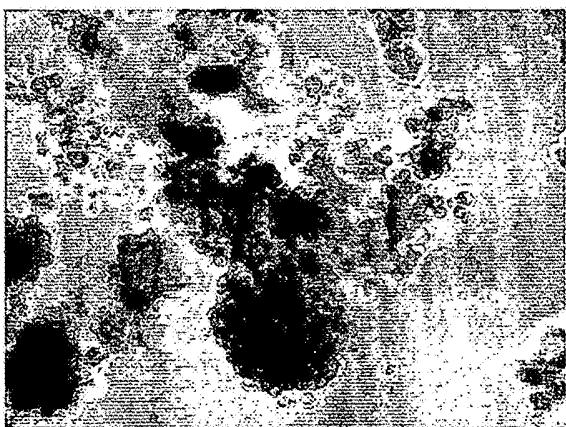


FIGURE 9B

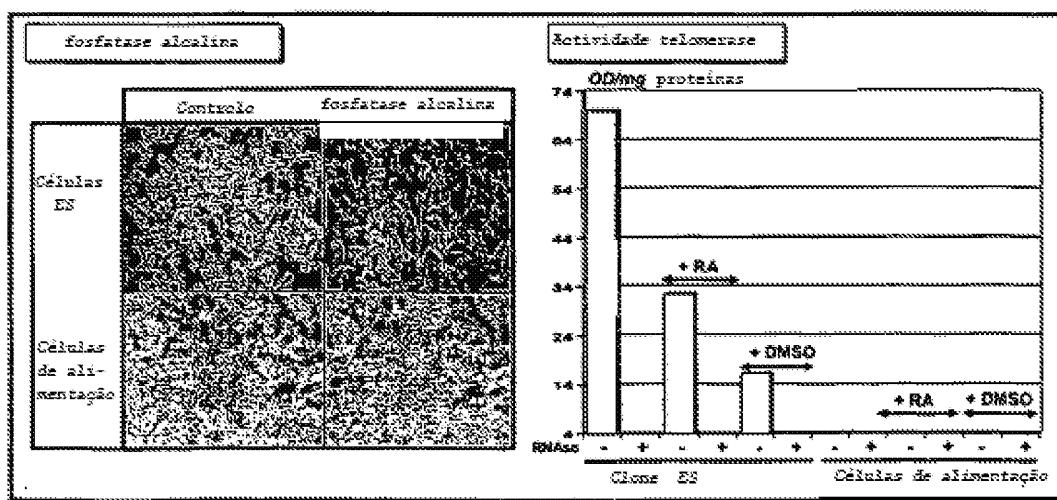


Figura 9C

8/12

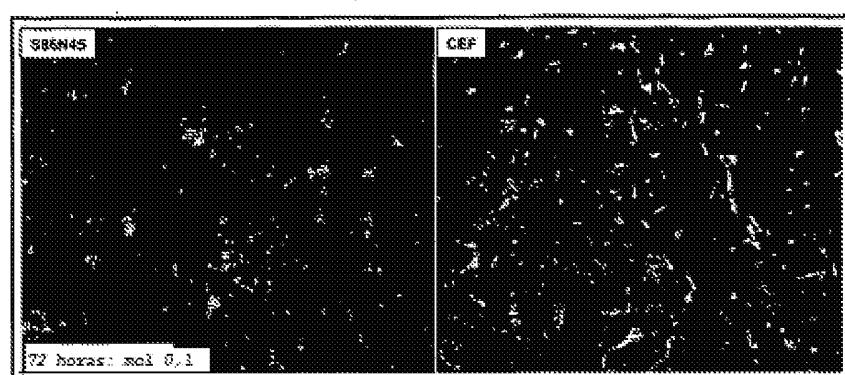


FIGURA 10

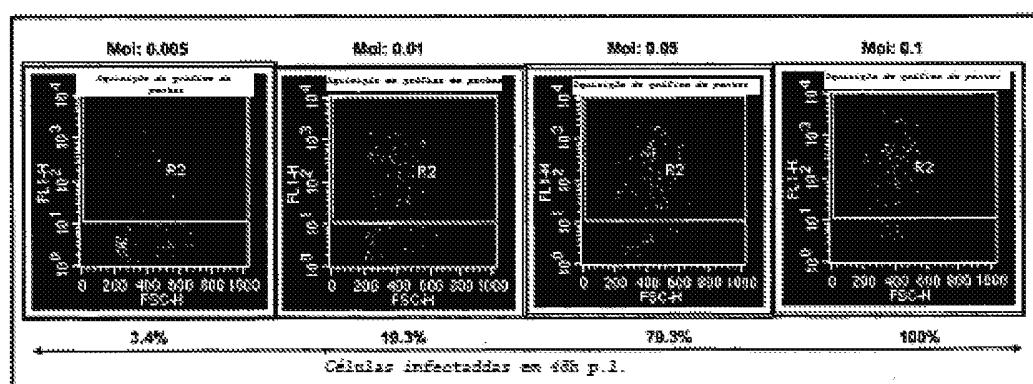


FIGURA 11

9/12

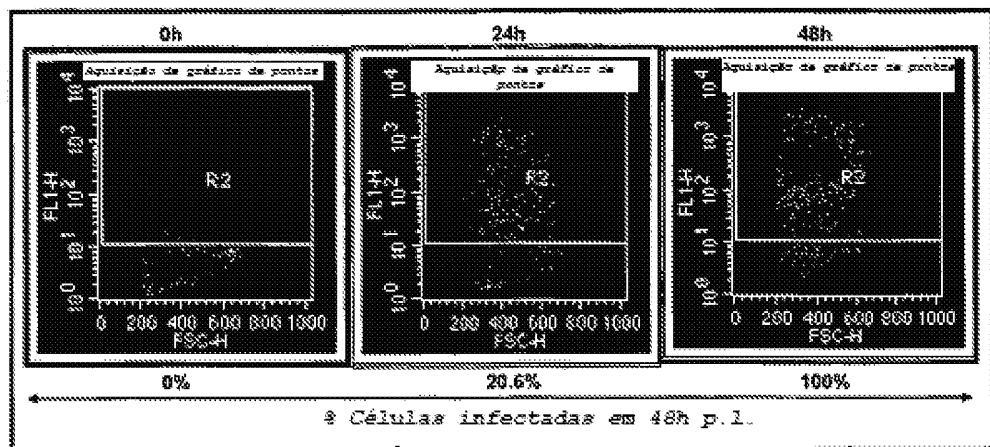


FIGURA 12

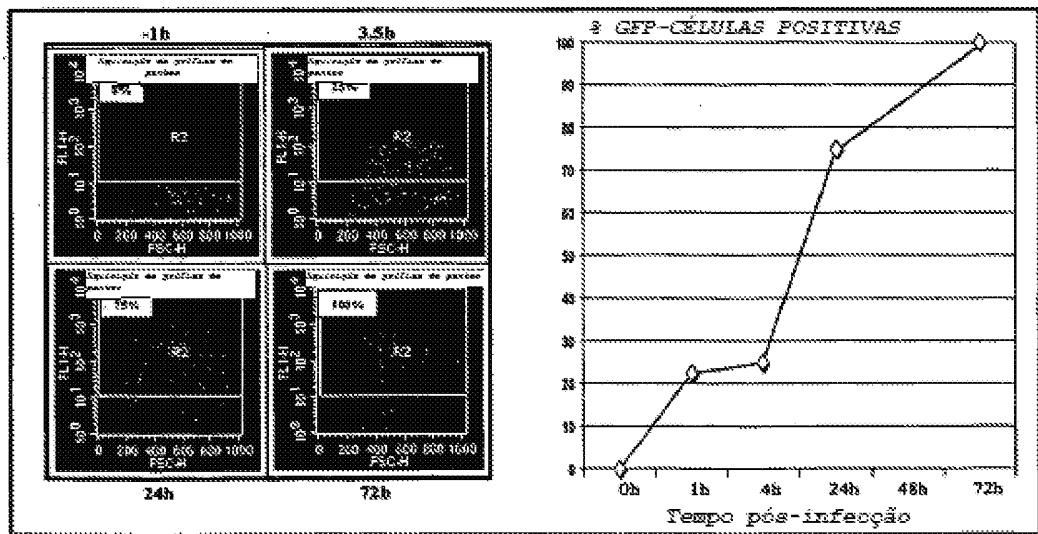


FIGURA 13

10/12

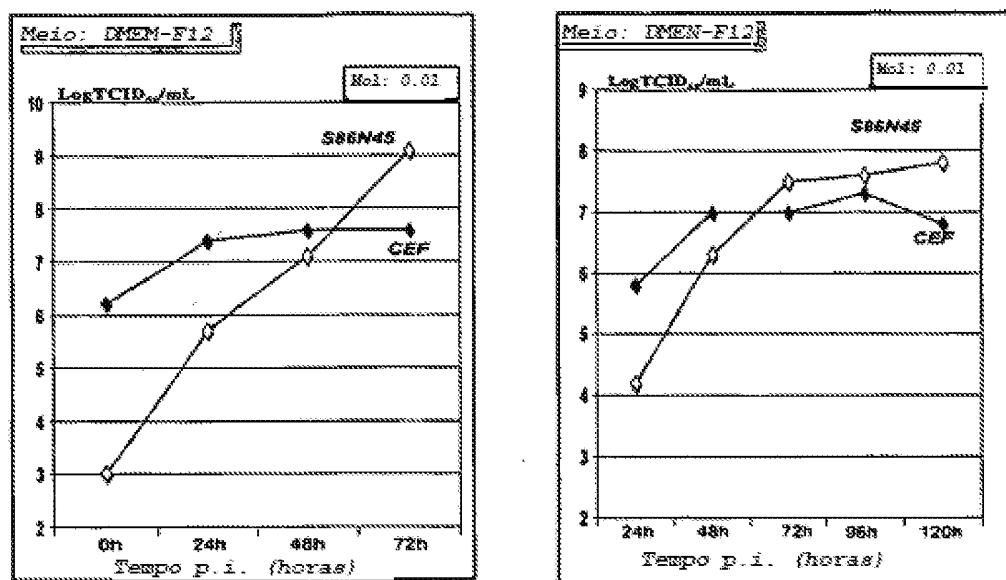


FIGURA 14

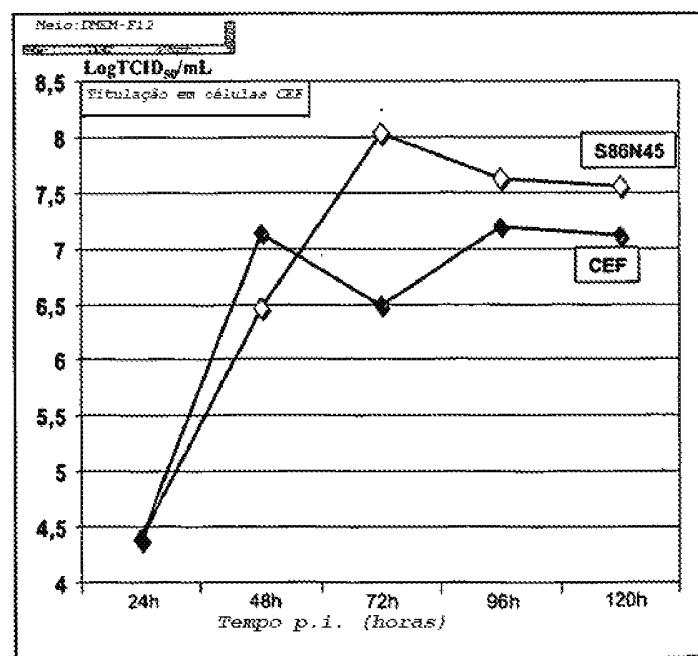


FIGURA 15

11/12

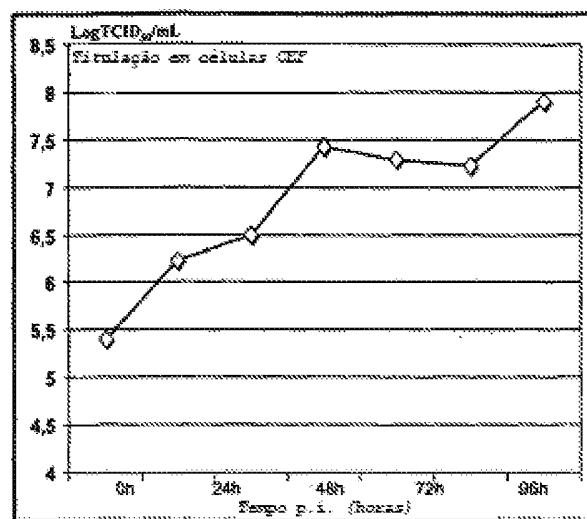


FIGURA 16

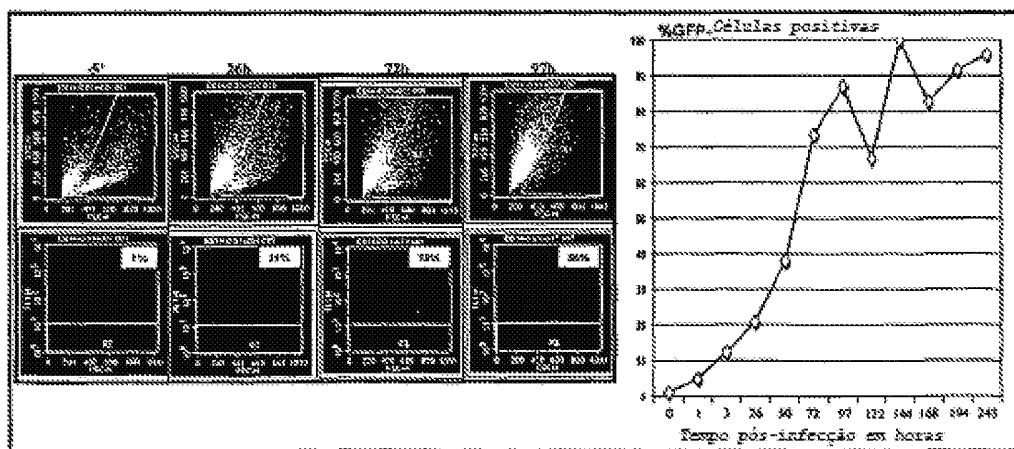


FIGURA 17

# 12/12

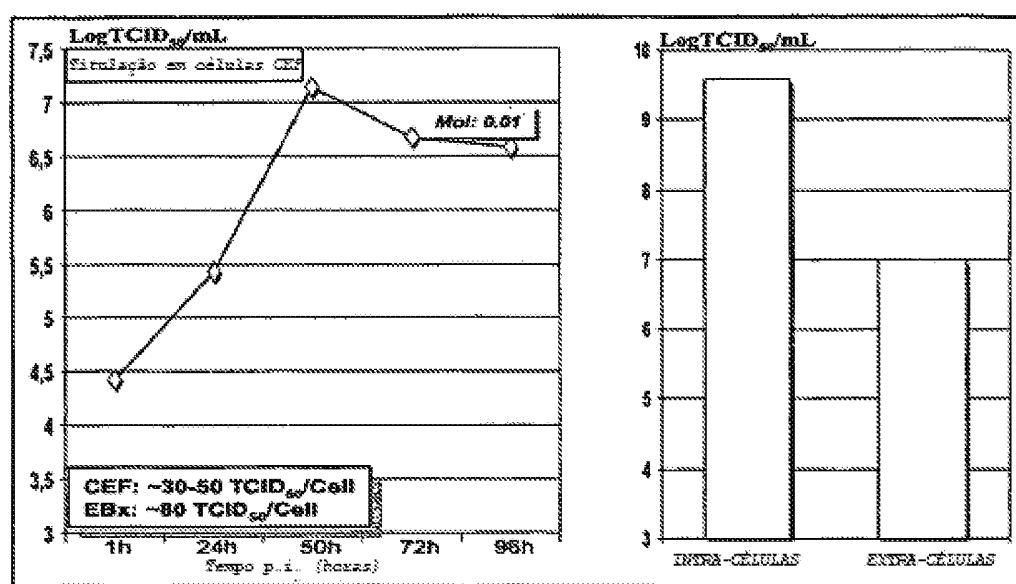


FIGURA 18



183 233

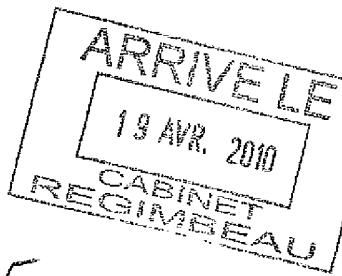
European Patent Office  
80298 MUNICH  
GERMANY  
Tel. +49 (0)89 2399 - 0  
Fax +49 (0)89 2399 - 4465



Warcoin, Jacques  
Cabinet Régimbeau  
20, rue de Chazelles  
75847 Paris Cedex 17  
FRANCE

AIP/AIA

Bpi INBEA  
+See ANN



For any questions about  
this communication:  
Tel.: +31 (0)70 340 45 00

Date

15.04.10

Reference 66284/D21416	Application No./Patent No. 04744255.3 - 2405 / 1646715
Applicant/Proprietor Vivalis	

#### Decision to grant a European patent pursuant to Article 97(1) EPC

Following examination of European patent application No. 04744255.3 a European patent with the title and the supporting documents indicated in the communication pursuant to Rule 71(3) EPC dated 17.09.09 is hereby granted in respect of the designated Contracting States.

Patent No. : 1646715  
Date of filing : 22.07.04  
Priority claimed : 22.07.03/EPA 03291813  
                  09.12.03/FRA 0314389

Designated Contracting States and Proprietor(s) : AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IT LI LU MC NL PL PT RO SE SI SK TR  
Vivalis  
Lieudit la Corbière  
49450 Roussay/FR

This decision will take effect on the date on which the European Patent Bulletin mentions the grant (Art. 97(3) EPC).

The mention of the grant will be published in European Patent Bulletin 10/19 of 12.05.10.

#### Examining Division

Sommer B

Roscoe R

Herrmann K

