



INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) Número de Publicação: **PT 901522 E**

(51) Classificação Internacional:
C12N 5/10 (2006.01)

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

(22) Data de pedido: **1997.05.22**

(30) Prioridade(s): **1996.05.23 FR 9606630**

(43) Data de publicação do pedido: **1999.03.17**

(45) Data e BPI da concessão: **2006.10.25**
001/2007

(73) Titular(es):

MERIAL
29, AVENUE TONY GARNIER 69007 LYON FR

(72) Inventor(es):

JACQUES SAMARUT FR
JEAN-FRANÇOIS BOUQUET FR
CATHERINE CLEUZIAT FR
PHILIPPE DESMETTRE FR

(74) Mandatário:

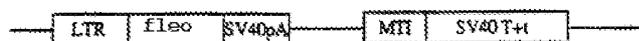
ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS
RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **CÉLULAS AVIÁRIAS IMORTAIS**

(57) Resumo:

RESUMO**"CÉLULAS AVIÁRIAS IMORTAIS"**

O presente invento tem por objectivo células aviárias immortalizadas não transformadas, resistentes à apoptose, em particular provenientes de tecidos aviários, ou seja células que não sejam do sangue ou hematopoiéticas, particularmente fibroblastos e células epiteliais, por exemplo embriões.



DESCRIÇÃO**"CÉLULAS AVIÁRIAS IMORTAIS"**

O presente invento está relacionado com linhas de células aviárias e seus derivados.

O estabelecimento de linhas celulares a partir de órgãos retirados de espécies aviárias não pode ser conseguido espontaneamente, como acontece com determinados órgãos provenientes de espécies de mamíferos.

As únicas linhas celulares disponíveis até agora foram obtidas usando as propriedades transformantes de determinados vírus aviários tendo propriedades oncogénicas, tais como os retrovírus do grupo das leucoses aviárias ou o vírus da doença de Marek ou determinadas moléculas químicas como sejam metilcolantreno e dietilnitrosamina.

Estas linhas celulares apresentam, na sua maior parte, características de transformação importantes que as tornam incapazes de replicarem vírus vacinais.

Os autores iniciaram uma nova via consistindo em introduzir nas células um vector sem carácter oncogénico mas capaz de integrar nas células um gene escolhido pela sua capacidade para induzir imortalização.

Os primeiros ensaios foram realizados com a ajuda de vectores que integram genes de retrovírus aviários como sejam erbA e erbB.

O pedido de patente francês FR-A-2596770 propõe um processo de imortalização no qual se infecta uma cultura de células aviárias ou de mamífero com um vector ou um sistema sem carácter oncogénico para as referidas células, mas capaz de integrar nestas células um gene escolhido entre v-myb, v-ets e v-erbA. Vectores adequados podem ser os vírus AMV, E26 e XJ12, este último sendo um vírus derivado do vírus AEV no qual o gene v-erB, onocogene, foi eliminado.

Na prática, estes ensaios permitiram obter linhas celulares estabelecidas a partir de células da linha hematopoiética, mas não deram os resultados esperados para células de embrião de galinha em cultura aderente, como sejam os fibroblastos ou células epiteliais.

Linhas celulares aviárias do tipo mieloblastóide (células sanguíneas) não transformadas foram obtidas com a ajuda do oncogéne myb (pedido de patente internacional WO91/18971).

Paralelamente, os autores propuseram os genes precoces t e T do vírus símio SV40 para imortalizar células provenientes de diferentes tecidos de mamífero (D.S.

Neufeld *et al.*, *Molecular and Cellular Biology*, August, 2794-2802, O. Kellermann and F. Kelly, *Differentiation*, 1986, 32: 74-81 e pedido de patente francesa FR-A-2649721).

O pedido de patente francesa FR-A-2649721 propõe por seu lado um método de imortalização condicionada que será utilizável para todos os tipos celulares e em todas as espécies, o objectivo sendo aqui ultrapassar o inconveniente da grande especificidade das vias clássicas (limitação a espécies e/ou tipos celulares particulares): transformação de células por um vírus transformante (adenovírus, vírus de Epstein-Barr, determinados papovavírus, como seja o vírus SV40 ou o vírus polioma; por exemplo, o vírus SV40 é indicado como só transformando células de roedores e células humanas); a transfecção com construções contendo um gene transformante ligado a um promotor viral; transfecção com um gene transformante ligado a um promotor celular. A escolha deste pedido de patente baseia-se numa construção que associa um fragmento de DNA da sequência reguladora da vimentina e um fragmento de DNA codificador de um gene imortalizador, que pode ser o antigénio T do vírus SV40 sob o controlo do promotor, induzível, da vimentina. As espécies aviárias nunca são referidas neste documento.

Na espécie aviária, a utilização real de tais oncogénos virais nunca foi descrita, exceptuando a utilização da forma 12S da proteína E1A do Adenovírus 5 humano que permitiu imortalizar células epitelióides de codorniz (Guilhot *et al.* (1993), *Oncogene* 8: 619-624).

Contra o que seria de esperar, os inventores conseguiram produzir linhas celulares aviárias, imortais e não transformadas.

De forma mais geral, os inventores encontraram ser possível preparar linhas celulares aviárias imortais, não transformadas e resistentes à apoptose, mesmo a partir de células de tecidos aviários, ou seja outras células que não as células circulantes do sangue ou hematopoiéticas.

O presente invento tem, portanto, como objectivo células aviárias imortalizadas não transformadas, resistentes à apoptose, em particular provenientes de tecidos aviários desde que não sejam células do sangue ou hematopoiéticas, principalmente fibroblastos e células epiteliais, por exemplo embriões.

O presente invento tem, mais particularmente, como objectivo uma linha celular aviária imortal, não transformada, escolhida entre o grupo constituído por:

- linha TDF-2A bcl-2 depositada na CNCM (Colecção Nacional de Culturas de Microrganismos do Instituto Pasteur) com a referência I-1709
- linha TCF-4.10 depositada na CNCM com a referência I-1710

- linha TCF-4.10 bcl-2 depositada na CNCM com a referência I-1711

bcl-2 significa que as células da linha integram de forma funcional o gene bcl-2, que lhes confere resistência à apoptose (WO-A-93/20200 aqui incluída como referência).

Obviamente, o invento engloba as células derivadas destas linhas. Por isso, deve-se entender que estão abrangidas não apenas as células conforme depositadas na CNCM com as referências indicadas, mas também as células constituindo a descendência daquelas, por um lado células obtidas por simples multiplicação e podendo sofrer mutações quando das multiplicações e por outro lado células obtidas após modificação intencional, o que se designa por células derivadas, e ainda células tendo sofrido os dois tipos de modificações.

Assim, o invento engloba também células derivadas obtidas por modificações das referidas células. Estas modificações podem compreender:

- Inserção de uma ou mais cassetes de expressão compreendendo uma ou mais sequências nucleotídicas codificadoras de uma molécula com interesse industrial, estas cassetes de expressão estando aptas a produzir esta molécula após inserção nas células do invento. A técnica é perfeitamente conhecida dos familiarizados

com a matéria. Como moléculas de interesse industrial, pode-se citar principalmente subunidades virais do tipo peptídeo, proteína, glicoproteína, principalmente para utilização em vacina ou como reagente de diagnóstico, moléculas proteicas tais como hormonas, etc.

- A infecção crónica por um vírus capaz de se multiplicar nestas células, para produção de vírus ou de vacina, com ou sem modificação prévia da susceptibilidade face a estes vírus. A infecção pode também não ser crónica, mas realizada numa série de células escolhidas para a multiplicação viral. (As modificações que se seguem pensa-se que sejam vantajosamente combinadas com os dois tipos anteriores).
- Introdução de genes de sobrevivência ou anti-apoptose para além de bcl-2, tais como os genes codificadores de proteínas das proteínas p19E1B do adenovírus humano (Rao *et al.* (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7742-7746), LMP-1 (gregory *et al.* (1991), *Nature* 349:612-614) e BHRF1 (Pearson *et al.* (1987), *Virology* 160:151-161) do vírus Epstein Barr, IC34.5 do vírus herpes simples (Chou e Roizamn (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3266-3270) e p35 de baculovírus (Clem *et al.* (1991), *Science* 254: 1388-1390), com o fim de tornar estas linhas mais resistentes às condições de cultura, principalmente manutenção em confluência.
- Sobre-expressão de genes implicados no controlo do

ciclo celular por vectores adequados para aumentar a velocidade de proliferação. Com efeito, foi demonstrado que, nalguns casos, a sobre-expressão de genes codificadores das ciclinas induzem um encurtamento do ciclo celular e portanto um aumento da velocidade de proliferação (Rosenberg *et al.*, (1995), *Oncogene* 10:1501-1509; Quelle *et al.* (1993), *Genes and Dev.* 7:1559-1571).

- Modificação do espectro de susceptibilidade viral das linhas através da integração de genes codificadores dos receptores do vírus com interesse, tendo em vista a sua replicação. Pode-se referir uma espécie de mamífero em que a expressão do receptor do vírus da rubéola (CD46) pelas células murinas, normalmente não permissivas ao vírus, confere susceptibilidade às células para este vírus e capacidade de o replicar (Naniche *et al.* (1993), *J. Virol.* 67:6025-6032). O interesse é principalmente tornar as células susceptíveis a um vírus com o objectivo de o replicar nestas.
- Integração de oncogenes capazes de acelerar o crescimento celular.

É evidente que as células derivadas de acordo com o invento podem compreender uma ou mais destas modificações apresentadas atrás.

O invento tem ainda como objectivo um processo de

produção de moléculas com interesse industrial ou de vírus, compreendendo a cultura das células atrás descritas.

No âmbito do presente invento, tem-se em vista principalmente a produção de moléculas ou vírus para a obtenção de reagentes de diagnóstico ou vacinas, ou ainda moléculas com interesse terapêutico.

O invento será agora descrito mais detalhadamente com a ajuda de métodos de realização a título exemplificativo, não limitativo, e referem-se às figuras anexas na quais:

- a figura 1 mostra a estrutura do vector pDAMT servindo para preparar a linha TDF-2A, com:

LTR: sequência repetida directa (Repetição Terminal Longa)

δLTR: LTR eliminada

MTI: promotor da metalotioneína I murina

SV40 T+t: região precoce de SV40

SV40: promotor de SV40

- a figura 2 mostra a estrutura do vector pphMT que serviu para preparar a linha FC F-4.10, com:

LTR: sequência repetida directa (Repetição Terminal Longa)

fleo: gene de resistência à fleomicina
SV40pA: poliA de SV40
MTI: promotor da metalotioneína I murina
SV40 T+t: região precoce de SV40

EXEMPLO 1: Produção da linha celular TDF-2A

I. Descrição da sua origem e das suas características

1.1 Descrição do vector utilizado: vector pDAMT

Possui a região precoce do vírus SV40 (codificadora dos antigénios T e t) (fragmento HindIII/BamHI) (Fiers *et al.* (1978), *Nature* 273:113-120) sob o controlo do promotor da metalotioneína de ratinho (fragmento EcoRI/BglIII transformado em local HindIII) (Durnam *et al.* (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:6511-6515; Brinster *et al.* (1982), *Nature* 296:39-42).

O fragmento EcoRI/EcoRI contendo esta unidade de transcrição proveniente do vector pMTSVneo (Peden *et al.* (1989), *Exp. Cell. Res.* 185:60-72) foi inserido no local XbaI do vector pDA1 (Aubert *et al.* (1991), *J. Cell. Biol.* 113:497-506). Este último deriva essencialmente do genoma do vírus associado ao sarcoma de Rous-2 (RAV-2) após modificação da LTR situada em 3'. Com efeito, a região U3 da LTR 3' de RAV-2 foi eliminada e ligada às regiões R e U5 isoladas da LTR do vírus associado ao sarcoma de Rous-1 (RAV-1). É igualmente portadora de uma unidade de

transcrição contendo o gene de resistência à neomicina sob o controlo do promotor SV40 derivado do vector pSV2neo (Southern e Berg (1982), J. Mol. Appl. Genet. 1:327-341). Ver figura 1.

1.2. Estabelecimento da linha e demonstração da imortalização.

Células provenientes de embriões de pato de Barbarie com 14 dias foram transfectadas com o vector pDAMT pelo método que utiliza dimetilsulfóxido (DMSO) e descrito por Kawai e Nishizawa (1984), Mol. Cell. Biol. 4:1172-1174. As células transfectadas foram em seguida seleccionadas usando geneticina G418 (150 µg/ml) durante 15 dias. Os clones resistentes foram então subcultivados regularmente, 1 a 2 passagens em média por semana. Após este período de proliferação activa de 3 meses, as células entraram num período de crise durante a qual a maior parte das células morreram. Após este período que durou 2 meses, vários clones retomaram uma proliferação activa sugerindo a sua imortalização.

A linha celular TDF-2A derivou assim de duas culturas. Foi estudada depois de forma mais aprofundada.

As células TDF-2A atingiram 200 passagens, ou seja cerca de 460 gerações, e foram mantidas em cultura durante mais de 600 dias continuamente. Comparativamente, células testemunhas, sem expressarem a região precoce do

vírus SV40, não podem ser mantidas em cultura mais de 20 passagens.

1.3. Características de proliferação.

As células imortalizadas foram cultivadas a 38°C, em frasco rolante, num meio contendo HAM F-10 10X a 6%, 199 Hanks 10X a 4%, Tryptose Broth Phosphate 2,95% a 4%, Bicarbonato de Sódio 5,6% a 2,5%, vitamina BME 100X a 0,1%, soro fetal bovino a 3%, canamicina 5% a 1%, vancomicina 0,5% a 1%.

Nestas condições, as suas taxas de duplicação são de 1 em cada 24 horas.

1.4. Expressão do antígeno T.

Por imunofluorescência ou imunofosfatase indireta usando um anticorpo específico do antígeno T (Pab 101: Santa Cruz Biotechnology ref. sc147), foi demonstrado que todas as células expressam o antígeno T no núcleo, indicando que todas integraram o vector.

Esta integração foi ainda mostrada por transferência Southern. O DNA genómico dos fibroblastos imortalizados foi digerido com as enzimas de restrição XbaI, BstXI. A hibridação com uma sonda específica do antígeno T (fragmento NdeI/NdeI de 1018 pb) permitiu verificar que a unidade de transcrição permite a expressão do gene

imortalizador, inserido nas células TDF-2A, não sofrendo de rearranjos substanciais. Com efeito, o tamanho dos fragmentos de hibridação obtidos está de acordo com o esperado.

1.5. Ausência de poder tumorigénico.

As células imortalizadas não apresentam poder tumorigénico. Elas são incapazes de formar colónias em meio semi-sólido ou de formar tumores sob a membrana corioalantoideica de ovo de galinha ou de pata. São igualmente incapazes de formar tumores em ratinho atímico (ratinho "nu"), em pintos e patinhos SPF (isentos de organismos patogénicos) com 1 dia.

1.6. Cariótipo.

O cariótipo das células TDF-2A foi estudado às 114^a e 135^a passagens. Permitiu verificar que as células eram de origem aviária com a presença de microcromossomas característicos desta espécie. Ainda, os cromossomas observados são representativos dos cromossomas encontrados nas células primárias de embriões de pato confirmando assim a origem da linha.

II. Propriedades.

As células TDF-2A apresentam principalmente susceptibilidade a vírus específicos de pato, tais como o adenovírus, o parvovírus e o reovírus que são habitualmente

replicados em células primárias de embriões de pato. Pode-se assim produzir vírus nesta linha.

EXEMPLO 2: Caracterização da linha TDF-2A através da identificação de locais de integração

O DNA genómico das células TDF-2A, preparado a partir de células provenientes da 114^a e da 135^a passagens, foi digerido com as enzimas de restrição BglIII e KpnI. O DNA assim tratado foi então sujeito a electroforese em gel, seguido de uma transferência para membrana de nylon, depois hibridado com uma sonda específica do antigénio T (fragmento NdeI/NdeI de 1018 pb). Assim, a digestão com BglIII permite obter duas bandas de hibridação de tamanho elevado (cerca de 15 e 23 Kb) sugerindo a existência de dois locais de integração. A digestão com KpnI permite a obtenção de uma banda principal de tamanho elevado (cerca de 20 Kb) e pelo menos uma banda minoritária confirmando a existência de pelo menos dois locais de integração.

EXEMPLO 3: Produção da linha celular TCF-4.10

1. Descrição da sua origem e das suas características

1.1. Descrição do vector utilizado: vector pphMT

O vector possui a região precoce do vírus SV40 (codifica os antigénios T e t) (fragmento HindIII/BamHI) (Fiers *et al.* (1978), Nature 273:113-120) sob o controlo do

promotor da metalotioneína I de ratinho (fragmento EcoRI/BglIII transformado em local HindIII) (Durnam *et al.* (1980), *proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:6511-6515; Brinster *et al.* (1982), *Nature* 296:39-42).

O fragmento EcoRI/EcoRI contendo esta unidade de transcrição proveniente do vector pMTSVneo (Peden *et al.* (1989), *Exp. Cell. Res.* 185:60-72) foi inserido no local EcoRI do vector pUT507 (comercializado por CAYLA-FRANCE) situado 3' relativamente à região que permite a expressão do gene de resistência à fleomicina (figura 2). A estrutura do vector pUT507 foi descrita em Mulsan *et al.* (1988), *Somatic Cell and Molecular Genetics* 14:243-252.

1.2. Estabelecimento da linha e demonstração do imortalização.

Fibroblastos provenientes de embriões de galinha foram transfectados pelo vector pphMT pelo método que utiliza o dimelsulfóxido (DMSO) e descrito por Kawai e Nishizawa (1984), *Mol. Cell. Biol.* 4: 1172-1174. As células transfectadas foram em seguida seleccionadas pela aplicação progressiva (de 10 µg/ml a 50 µg/ml) de fleomicina durante 15 dias. Os clones resistentes foram então subcultivados regularmente, 1 a 2 passagens por semana. Após um período de proliferação activa de cerca de 2 meses, as células entram num período de crise em que o crescimento celular é muito fraco e durante o qual a mortalidade é muito elevada. Após um período que durou 3 a 4 meses, algumas células do

clone TCF-4.10 retomaram uma proliferação activa sugerindo a sua imortalização.

As células TCF-4.10 atingiram assim 200 passagens em cultura, ou seja cerca de 400 gerações e foram mantidas em cultura durante 3 anos. Comparativamente, os fibroblastos testemunha, não exprimindo a região precoce do vírus SV40, não podem ser mantidos em cultura mais de 20 a 30 passagens.

1.3. Característica de proliferação.

Os fibroblastos imortalizados foram cultivados a 38°C num meio HAM F-10 10X a 6%, 199 HANKS 10X a 4%, Tryptose Broth Phosphate 2,95% a 4%. Bicarbonato de sódio 5,6% a 2,5%, vitamina BME 100X a 0,1%, soro fetal bovino a 3%, canamicina 5% a 1%, vancomicina 0,5% a 1%. Nestas condições, a sua velocidade de duplicação é de 0,7 em 24 horas.

2.2. Expressão do antigénio T.

Através de imunofluorescência ou imunofosfatase indirectas, usando anticorpos específicos do antigénio T (Pab 101: Santa Cruz Biotechnology ref. sc147), foi demonstrado que todas as células expressam o antigénio T no seu núcleo, indicando que todas integraram o vector.

2.3. Ausência do poder tumorigénico.

Os fibroblastos imortalizados não apresentam poder tumorigénico. São incapazes de formar tumores na membrana corialantoideica de ovos de galinha ou de pata.

3. Propriedades.

As células TCF-4.10 apresentam principalmente susceptibilidade aos vírus aviários. Pode-se mencionar principalmente os Poxvírus aviários, tais como o Canarypox, o Fowlpox ou ainda os vírus da doença de Marek (serotipos 1, 2 e 3 (HVT)), o vírus da doença de Gumboro. Pode-se produzir estes vírus nesta linha.

EXEMPLO 4: Multiplicação de Canarypox nas células TCF-4.10.

As células TCF-4.10 foram semeadas em frascos rolantes. O Canarypox foi inoculado nas monocamadas estabelecidas. Quando o efeito citopático provocado pelo vírus era generalizado, fez-se a colheita por agitação da monocamada de células. Esta é portanto composta por uma camada de células e sobrenadante de cultura. O conjunto foi homogeneizado por tratamento com o homogeneizador Ultraturrax durante 1 min a 13500 rotações/min (aparelho IKA type 25).

A determinação do título de vírus infeccioso foi realizado através de micrométodo em placas de 96 alvéolos.

As diluições de vírus foram inoculadas na monocamada estabelecida de células secundárias de embriões de galinha. Cada uma das diluições virais foi inoculada em 6 alvéolos. As placas foram colocadas em incubação numa estufa de CO₂ durante 8 dias. A presença de vírus nos alvéolos foi controlada ao microscópio observando o efeito citopático (ECP) característico. O título infeccioso foi calculado de acordo com o método de KARBBER e foi expresso pelo logaritmo do inverso da diluição viral que dá 50% de ECP [Título = $d+r/Nx(n+N/2)$] com d igual à diluição expressa em log onde há 100% de alvéolos positivos, r é igual ao inverso da diluição, N é igual ao número de alvéolos por diluição e n é igual ao número de alvéolos positivos entre 0 e 100%).

Resultados: os títulos virais obtidos são equivalentes aos obtidos nas células primárias de embriões de pato.

EXEMPLO 5: Integração do gene bcl-2

Um vector que permite a expressão do gene bcl-2 sob o controlo do promotor CMV (citomegalovírus humano) foi usado para transfectar células TDF-2A e TCF-4.10 usando os métodos clássicos de transfecção (método com DMSO descrito por Kawai e Nishizawa (1984), Mol. Cell. Biol. 4:1172-1174 ou lipofectamina seguindo as recomendações do fornecedor Gibco-BRL).

Após selecção das células transfectadas, a ex-

pressão da proteína Bcl-2 foi detectada por transferência Western.

As células expressando a proteína Bcl-2 foram então testadas quanto à sua capacidade para sobreviver nas condições de cultura em que um processo de apoptose foi observado (manutenção das células na confluência).

Assim, no caso das células TDF-2A bcl-2 o processo de apoptose induzido quando as células chegam à confluência é atrasado 3 a 4 dias relativamente às células TDF-2A. No caso das células TCF-4.10 bcl-2 um aumento da densidade celular na confluência foi observado relativamente às células TCF-4.10.

Lisboa, 27 de Dezembro de 2006

REIVINDICAÇÕES

1. Uma célula aviária imortalizada, não transformada, que integra no seu genoma a região precoce do vírus SV40 codificador dos antígenos T e t e contendo um gene codificador de uma proteína anti-apoptose, a região precoce do vírus SV40 codificadora dos antígenos T e t e o gene codificador da proteína anti-apoptose tendo sido introduzidos na célula por transfecção.

2. A célula de acordo com a reivindicação 1, em que a proteína anti-apoptose é Bcl-2.

3. A célula da reivindicação 1, em que a proteína anti-apoptose é p19E1B de adenovírus humano, LMP-1 do vírus Epstein Barr, BHRF-1 do vírus Epstein Barr, ICP34.5 do vírus herpes simples ou p35 de baculovírus.

4. A célula de qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que a região precoce do vírus SV40 codificador dos antígenos T e t está sob o controlo do promotor MTI.

5. A célula de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4 obtida a partir de tecidos aviários.

6. A célula da reivindicação 5 obtida a partir de fibroblastos ou de células epiteliais.

7. Uma linha celular compreendendo células de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6.

8. Uma linha de células aviárias imortalizadas, não transformadas, que foi escolhida no grupo constituído por:

- linha TDF-2A bcl-2 depositada na CNCM (Colecção Nacional de Culturas de Microrganismos do Instituto Pasteur) com a referência I-1709,
- linha TCF-4.10 depositada na CNCM com a referência I-1710,
- linha TCF-4.10 bcl-2 depositada na CNCM com a referência I-1711.

9. Uma célula aviária imortalizada, não transformada, derivada de uma linha celular de acordo com a reivindicação 8.

10. A célula de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6 e 9, compreendendo a integração de um gene codificador de um receptor viral.

11. A célula de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6 e 9, compreendendo a integração do oncogene capaz de acelerar o crescimento celular.

12. A célula de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6 e 9 a 11, contendo ainda uma sequência nucleotídica heteróloga

13. A célula de acordo com a reivindicação 12, em que a célula expressa um produto codificado pela sequência nucleotídica heteróloga.

14. A célula da reivindicação 13, em que a sequência nucleotídica codifica um peptídeo, uma proteína ou uma glicoproteína viral.

15. A célula da reivindicação 14 de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6 e 9 a 11, infectada por um vírus.

16. A célula de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6 e 9 a 11, infectada por um vírus.

17. Célula da reivindicação 16 estabelecida a partir de uma célula proveniente de embrião de pato.

18. A célula da reivindicação 17 na qual o vírus é um vírus de pato, seleccionado principalmente entre o adenovírus de pato, o parvovírus de pato e um reovírus.

19. Célula da reivindicação 16 estabelecida a partir de um fibroblasto proveniente de embrião de galinha.

20. Célula da reivindicação 19, em que o vírus é um vírus aviário seleccionado principalmente entre os poxvírus, tais como o Canarypox, o Fowlpox, os vírus da

doença de Marek (serotipo 1,2), o vírus herpes de perua (HVT) e um vírus da doença de Gumboro.

21. Um método para produzir um vírus, compreendendo a infecção da célula de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6 e 9 a 11 com o vírus, em condições que permitem a produção de vírus.

22. Um método para produzir um peptídeo, proteína ou uma glicoproteína viral, compreendendo a infecção da célula de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6 e 9 a 11 com o vírus, em condições que permitem a produção do peptídeo, da proteína ou da glicoproteína viral.

23. O método da reivindicação 22, em que a célula é uma célula de acordo com uma das reivindicações 18 ou 20.

Lisboa, 27 de Dezembro de 2006

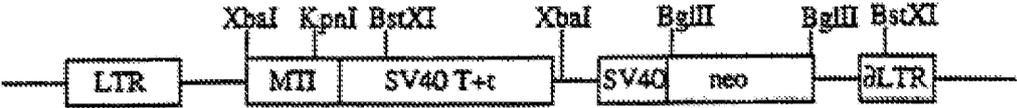


Fig. 1



Fig. 2