



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 37 107 T2 2008.09.25**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 155 114 B1**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 5/00 (2006.01)**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 37 107.7**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/KR00/00104**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 904 108.8**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2000/047717**

(86) PCT-Anmeldetag: **11.02.2000**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **17.08.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **21.11.2001**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **14.11.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **25.09.2008**

(30) Unionspriorität:

9904860 11.02.1999 KR

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(73) Patentinhaber:

**Hanmi Pharm. Co., Ltd., Kyungki, KR; Han, Jae
Yong, Yongin, Kyonggi, KR**

(72) Erfinder:

**HAN, Jae Yong, Yongin-city, Kyonggi-do 449-840,
KR; PARK, Tae Sub, Anyang-shi, Kyonggi-do
431-058, KR**

(74) Vertreter:

derzeit kein Vertreter bestellt

(54) Bezeichnung: **PLURIPOTENTE EMBRYONALE KEIMZELLINIE AUS VÖGELN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

BEREICH DER ERFINDUNG

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer etablierten avianen pluripotenten embryonalen Keimzelllinie und eine pluripotente aviane embryonale Keimzelllinie.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Embryonale Stamm-(ES)-Zellenlinien sind undifferenzierte und pluripotente Zellen, die von Blastozysten oder Morula-Embryos isoliert sind. Obwohl davon ausgegangen wird, dass ES-Zellen in hohem Maße nützlich sind, z. B. in dem Studium der Entwicklungsbiologie, der Analyse der Eigenschaften von totipotenten Zellen und dem Gen-Targeting, um genetisch modifiziertes Vieh zu erzeugen, sind lediglich Maus-ES-Zellen mit erwiesener Keimbahn-Übertragung etabliert worden (Evans, M. J. und Kaufman, M. H., *Nature*, 292, 154–156 (1981); Bradley et al., *Nature*, 309, 255–256 (1984)) und die Verwendung von ES-Zellen bei der Herstellung von Vieh ist aufgrund der Begrenzungen bei der Keimbahn-Übertragung in von Mäusen unterschiedlichen Arten noch nicht zur Realität geworden (First, N. L. et al., *Reprod. Fertil. Dev.*, 6, 553–562 (1994); Wheeler, M. B., *Reprod. Fertil. Dev.*, 6, 563–568 (1994); Giles, J. R. et al., *Mol. Reprod. Dev.*, 36, 130–138 (1993); und Deotshmann, T. C. et al., *Dev. Biol.*, 127, 224–227 (1988)).

[0003] In jüngster Zeit sind primordiale Keimzellen (PGCs), welche die Vorläufer von Spermien oder Eizellen sind, welche sich nach der sexuellen Reife entwickeln, als eine alternative Quelle für pluripotente Stammzellen zur Verfügung gestellt worden. Die aus PGCs erhaltenen Stammzellen werden embryonale Keimzellen (EG) genannt (Resnick, J. L. et al., *Nature*, 359, 550–551 (1992); und Matsui, Y. et al., *Cell*, 70, 841–847 (1992)). Maus-PGCs wurden erfolgreich ko-kulturiert, und zwar auf mitotisch inaktivierten STO-Zellen, welche mit drei kritischen Wachstumsfaktoren ergänzt waren: Stammzellenfaktor (SCF), Leukämie-hemmender Faktor (LIF) und basischer Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF) (Godin, J. R. et al., *Mol. Reprod. Dev.*, 36, 130–138 (1991); Dolci, S. et al., *Nature*, 352, 809–811 (1991); Matsui, Y. et al., *Nature*, 353, 750–752 (1991); und Resnick, J. L. et al., *Nature*, 359, 660–661 (1992). Resnick et al. berichteten, dass sich Maus-PGCs nach dem Subkultivieren weiter vermehrten und Kolonien von Zellen bildeten, welche ES-Zellen ähnlich waren (Resnick, J. L. et al., *Nature*, 359, 550–551 (1992). Labosky et al. zeigten, dass Maus-EG-Zelllinien, die zur Keimbahnübertragung in vivo erforderliche Pluripotenz aufwiesen (Labosky, P. A. et al., *Development*, 120, 3197–3204 (1994)).

[0004] Hinsichtlich Rind- und Schweine-EG-Zellen sind Charakterzüge wie zum Beispiel Morphologie, alkalische Phosphatase-Aktivität und Embryoid-Körperbildung charakterisiert worden (Cherny, R. A. et al., *Reprod. Fertil. Dev.*, 6, 569–575 (1994); Shim, H. et al., *Biol. Reprod.*, 57, 1189–1095 (1997); Piedrahita, J. A. et al., *J. Reprod. Fertil.*, 52, 245–254 (1997)). Die Keimbahnübertragung ist in diesen Arten jedoch nicht nachgewiesen worden.

[0005] Pain et al. berichteten, dass Vogel-Stammzellen mit multiplen morphogenetischen Potenzialen durch Langzeitkultur von blastodermalen Zellen in vitro erlangt und aufrecht erhalten wurden. Die Herstellung von pluripotenten EG-Zellen, welche von PBCs erhalten wurden, ist jedoch nicht zuvor in irgendeiner Nicht-Säugetierart berichtet worden.

[0006] In avianen Spezies bzw. Vogel-Spezies ergeben sich PGCs zunächst von den Epiblast und migrieren zu dem Hypoblast der Area Pellucida (der Keimsichel) in Schritt 4, ungefähr 18–19 Stunden nach der Inkubation (Swift, C. H., *Am. J. Anat.*, 15, 483–516 (1914); Hamburger, V. und Hamilton, H. L., *J. Morphol.*, 88, 49–92 (1951); und Eyal-Giladi, H. und Kochau, S., *Dev. Biol.*, 49, 321–337 (1976)). PGCs bewegen sich von der Keimsichel in die Blutbahn in Schritt 10–12 (Ando, Y. und Fujimoto, T., *Dev. Growth Differ.*, 25, 345–32 (1983); und Ukeshima, A. et al., *J. Electron. Microsc.*, 40, 123–128 (1991)) und zirkulieren in dem Gefäßsystem bis Schritt 17 (2,5 Tage nach der Inkubation), wenn sie den Bereich der Keimleisten erreichen, in welchen sie sich schließlich konzentrieren und kolonisieren (Nieuwkoop, P. D. und Sutasurya, L. A., In *Primordial Germ Cells in the Chordates*, 113–127 (1979)). Diese Abwanderungsbahn und die nachfolgenden Entwicklungsprozesse unterscheiden sich dramatisch von den vergleichbaren Prozessen bei Säugetierspezies.

[0007] Allioli et al. berichteten, dass von den Keimdrüsen isolierte Huhn-PGCs sich für einige Tage unter einer in vitro-Kulturbedingungen vermehrten (Allioli, N. et al., *Dev. Biol.*, 165, 30–37 (1994)). Chang et al. züchtete Huhn-PGCs von Keimdrüsen auf Stromazellen der Keimleiste für 5 Tage (Chang, I. et al., *Cell Biol. Int.*, 19, 569–676 (1995)). Diese gezüchteten Keimdrüsen-PGCs hatten die Fähigkeit, zu der Keimleiste zu wandern,

wenn sie wieder in Empfänger-Embryos injiziert wurden. In jüngster Zeit stellten Chang et al. Keimbahnen von chimären Hühnern durch Injektion von Keimdrüsen-PGCs her, welche für 5 Tage in vitro gezüchtet wurden (Chang, I. et al., Cell Biol. Int., 21, 495–499 (1997)).

[0008] Des weiteren beschreibt die PCT-Veröffentlichung Nr. WO 99/06534 ein Verfahren zum Etablieren von EG-Zellen durch Züchten von PGCs, welche aus dem Blut eines Embryos in Schritt 13 bis 14 in einem Medium isoliert wurde, welches mit LIF, bFGF, SCF und IGF-I ohne die Verwendung einer Feeder-Schicht ergänzt wurde. Die Anzahl von Blut-PGCs, die von einem Embryo erhalten werden können, d. h. ungefähr 100 Zellen/Embryo, ist viel geringer als diejenige von gPGCs, d. h. mehr als 1.000 Zellen/Embryo, und es ist schwierig, die Blut-PGCs von dem embryonalen Blut zu isolieren. Des weiteren haften, obwohl die PGCs ohne die Verwendung einer Feeder-Schicht gezüchtet wurden, diese an der Wand des Zuchtgefäßes an und änderten sich morphologisch nach nur 3 oder 4 Durchgängen. Folglich wird angenommen, dass die davon etablierten EG-Zellen bereits differenziert wären. Des weiteren wurden die EG-Zellen ohne eine Prüfung anderer Eigenschaften nur hinsichtlich ihrer alkalischen Phosphatase-Aktivität zur Demonstration der Pluripotenz derselben geprüft und es ist folglich nicht sicher, ob die EG-Zellen tatsächlich etabliert sind. Zusätzlich lehrte oder deutete das Dokument nicht an, ob die EG-Zellen die in vitro und in vivo Unterscheidungsfähigkeit haben, welche Eigenschaften von etablierten EG-Zellen sind und ob sie nach mehreren Durchgängen weiter wuchern.

[0009] Somit besteht auch weiterhin eine Notwendigkeit, eine EG-Zellbahn zu entwickeln, welche fremde Gene durch mehrere Generationen überträgt, wodurch die Herstellung von transgenem Vieh unter Verwendung fremder Gentransfektion und Gen-Targeting ermöglicht wird.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0010] Folglich ist es eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zum Etablieren einer avianischen pluripotenten embryonalen Keimzelllinie (EG) zu schaffen.

[0011] Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, eine aviane pluripotente embryonale Keimzelllinie zu schaffen.

[0012] Gemäß einem Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zur Herstellung einer etablierten avianen embryonalen Keimzelllinie geschaffen, welches die folgenden Schritte aufweist:

- (a) Kultivieren von primordiales Keimzellen (PGCs), die aus einer avianen embryonalen Gonade isoliert wurden, in einem Medium, das mit einem Zellwachstumsfaktor und einem differenzierungshemmenden Faktor angereichert ist, um EG-Zellkolonien zu erhalten;
- (b) Kultivieren der EG-Zellen im gleichen Medium wie in Schritt (a) unter Verwendung einer Feeder-Schicht, bis die EG-Zellen Kolonien gebildet haben; und
- (c) Gewinnung und Subkultivierung der EG-Zellen im gleichen Medium wie in Schritt (a) zur Etablierung der EG-Zelllinie.

[0013] Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung, wird eine embryonale Huhn-Keimzelllinie geschaffen, welche Eigenschaften aufweist, die im wesentlichen identisch zu denjenigen sind, die unter der Zugangsnummer KCLRF-BP-00026 hinterlegt sind.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0014] Die oben genannten und andere Aufgaben und Merkmale der vorliegenden Erfindung werden aus der nachfolgenden Beschreibung der Erfindung deutlicher, wenn sie in Zusammenhang mit den beigefügten Zeichnungen gesehen wird, in welchen:

[0015] [Fig. 1a](#) und [Fig. 1b](#) die morphologischen Eigenschaften der Huhn-EG-Zellkolonien nach 3 Durchgängen auf embryonalem Huhn-Fibroblast zeigen ([Fig. 1a](#): Maßstab, 50 µm; und [Fig. 1b](#): Maßstab, 25 µm);

[0016] [Fig. 2](#) die PAS-Reaktivität in den EG-Zellkolonien darstellt, die sich nach 4 Durchgängen gebildet hatten;

[0017] [Fig. 3](#) die Anti-SSEA-1-Antikörper-Screeningergebnisse in EG-Zellkolonien darstellt, die nach 4 Durchgängen gefärbt waren;

[0018] [Fig. 4](#) die Fruchtbarkeits-Prüfungsergebnisse in den EG-Zellkolonien darstellt, die nach 8 Durchgängen

gen gefärbt waren;

[0019] [Fig. 5a](#) die embryonalen Körper darstellt, die sich aus Huhn-EG-Zellen in Suspensionskultur nach 8 Tagen gebildet hatten; und

[0020] [Fig. 5b](#) bis [Fig. 5d](#) die Ergebnisse der immunohistochemischen Analysen der embryonalen Körper unter Verwendung von Antikörpern gegen Aktin, α -1-Fectoprotein bzw. S100;

[0021] [Fig. 6a](#) typische koreanische Ogot-Hühner mit schwarzen Federn darstellt; und

[0022] [Fig. 6b](#) ein somatisches, chimäres Huhn zeigt, welches weiße Flecken um den Hals und auf der Brust hat; und

[0023] [Fig. 7](#) das Ergebnis der PCR-Analyse für somatischen und Keimbahn-Chimärismus darstellt.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0024] Das Verfahren der vorliegenden Erfindung zur Etablierung einer avianen embryonalen Keimzelllinie (EG) beginnt mit der Isolation von avianen primordialen Keimzellen (PGCs). Der Vogel kann ein Truthahn, ein Huhn, eine Wachtel, ein Fasan oder eine Ente sein. Die PGCs können von der embryonalen Keimdrüse eines avianen Embryos im frühen Zustand isoliert werden, und zwar im Stadium 14 bis 36 (50 Stunden bis 10 Tage nach der Inkubation, vorzugsweise Stadium 24 bis 30 (4 bis 6,5 Tage nach der Inkubation. Zum Beispiel wird die embryonale Keimdrüse eines White Leghorn im Stadium 28 isoliert und dann wird das Keimdrüsengewebe in Trypsin-EDTA dissoziiert, um eine Suspension zu erhalten, welche gonadale primordiale Keimzellen (gPGC) aufweisen.

[0025] Das Entwicklungsstadium des Embryos ist jedoch nicht begrenzend, so lange es den Zweck der Erfindung beeinflusst und kann abhängig von der avianen Spezies oder der Art des Organs, des Gewebes und Membran variieren, von welchen die PGCs separiert werden.

[0026] Die isolierten PGCs werden bei einer Temperatur, welche in einem Bereich von 37°C bis 42°C liegt, unter einer Atmosphäre, welche 5% CO₂ enthält, in einem Medium, welches Zellwachstumsfaktoren und einen differenzierungshemmenden Faktor enthält, bis zu der Kolonialisierung der EG-Zellen gezüchtet. Das Medium ist vorzugsweise DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Gibco BRL cat#, 10313-021) oder ein funktionelles Äquivalent davon.

[0027] Beispielhafte Zellwachstumsfaktoren, die bei der vorliegenden Erfindung nützlich sind, beinhalten Stammzellenfaktor (SCF), basischen fibroblasten Wachstumsfaktor (bFGF), Interleukin-11 (IL-11), Insulin-artiger Wachstumsfaktor-I (IGF-I) und eine Mischung davon. Ein repräsentativer differenzierungshemmender Faktor ist ein Leukämie-hemmender Faktor (LIF). Das Kulturmedium kann des weiteren ein Säugetierserum, ein avianes Serum oder einen zusätzlichen Bestandteil umfassen, der aus der Gruppe ausgewählt ist, die Natriumpyruvat, Glutamin, β -Mercaptoethanol und eine Mischung davon umfasst.

[0028] Das Kulturmedium ist vorzugsweise DMEM, dem 0,1 bis 30% fötales Rinderserum (FBS), 0,02 bis 20% Hühnerserum, 0,01 bis 100 mM Natriumpyruvat, 0,02 bis 200 mM Glutamin, 0,55 bis 5500 μ M β -Mercaptoethanol, 0,05 bis 500 ng/ml SCF, 0,1 bis 1000 Einheiten/ml LIF, 0,1 bis 1000 ng/ml bFGF, 0,0004 bis 4 ng/ml IL-11 und 0,1 bis 1000 ng/ml IGF-1 hinzugefügt wurden.

[0029] Die auf dem Medium gebildeten EG-Zellkolonien werden in einzelne EG-Zellen getrennt, z. B. durch wiederholtes Pipettieren, und die EG-Zellen werden zurückerlangt, in einem Medium suspendiert, z. B. dem oben beschriebenen Medium, und dann bei 37 bis 42°C für 7 bis 10 Tage auf einer Feeder-Schicht bis zu der Kolonisierung von Zellen, die die morphologischen Eigenschaften einer EG-Zelllinie zeigen. Als die Feeder-Schicht können aviane, embryonale Fibroblasten oder ein Äquivalent davon verwendet werden, während mitotisch aktive, aviane, embryonale Fibroblasten (CEF) oder aviane Fibroblasten am bevorzugtesten sind.

[0030] Die sich ergebenden EG-Zellen werden mit einem Intervall von 7 bis 10 Tagen in demselben Medium wie oben beschrieben durchgeführt, um eine embryonale Keimzelllinie zu etablieren. Die auf diese Weise etablierte Keimzelllinie kann für einen Zeitraum von mehr als 4 Monaten durch wiederholte Subkultur aufrecht erhalten werden.

[0031] Die vorliegende Erfindung stellt auch eine Huhn-EG-Zelllinie zur Verfügung, welche unter Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens hergestellt wurde.

[0032] Die Morphologie der Huhn-EG-Zelllinienkolonien weist mehrere Schichten auf und die Kolonien sind gut abgegrenzt. Jede Huhn-EG-Zelle ist aus einem großen Kernkörperchen und einer relativ geringen Menge an Zytoplasma zusammengesetzt, ähnlich zu den getrennten Morphologien von Maus- und Schwein-ES-Zellen und -EG-Zellen (Wobus, A. M. et al., *Exp. Cell. Res.* 152, 212–2199 (1984); Matsui, Y. et al., *Cell*, 70, 841–847 (1992); Resnick, J. L. et al., *Nature*, 359, 550–551 (1992); Shim, H. et al., *Biol. Reprod.*, 57, 1089–1095 (1997); und Piedrahita, J. A. et al., *Biol. Reprod.*, 58, 1321–1329 (1998)). Die Morphologie der Huhn-EG-Zellen ist von derjenigen der Maus-ES oder -EG-Zellen jedoch dadurch geringfügig unterschiedlich, dass annähernd alle der Kolonien gleichförmig rund sind und dass die markanten dunklen Kernkörperchen, die bei den anderen Spezies beobachtet werden, nicht klar unterscheidbar sind. Aviane Spezies sind von den Säugetierspezies hinsichtlich der Physiologie, Entwicklung und Abgrenzung der Keimzellen unterschiedlich und somit sind die Huhn-EG-Zellen in ihrer Form, ihren Anhaftungseigenschaften und anderen Eigenschaften unterschiedlich von Maus-EG-Zellen.

[0033] Die Huhn-EG-Zellen behalten die Eigenschaften der Keimdrüsen-PGCs und undifferenzierten Stammzellen bei. Die Huhn-EG-Zellen drücken SSEA-1-Antigen aus und in einer in vitro Suspensionskultur entwickeln sie sich erfolgreich in „embryoid bodies“ bzw. embryonale Körper, welche sich in einer Vielzahl von Zelltypen unterscheiden. Des weiteren wird bestätigt, dass die Huhn-EG-Zellen wuchern und sich in verschiedene Gewebe einschließlich den Keimdrüsen unterscheiden, und zwar während der Entwicklung des Embryos in einem Experiment, in welchem Hühner verwendet werden, und sie sind daher in vivo pluripotent.

[0034] Eine der bei der vorliegenden Erfindung verwendeten embryonalen Keimzellbahnen, die bei der vorliegenden Erfindung eingesetzt wurde, wurde am 22. September 1999 bei der Korean Cell Line Research Foundation (KCLRF) (Adresse: Cancer Research Institute, Seoul National University College of Medicine, #28, Yongdong, Chongno-gu, Seoul, 110–744, Republic of Korea) unter den Bedingungen des Budapester Vertrags über die internationale Anerkennung der Hinterlegung von Mikroorganismen für die Zwecke von Patentverfahren unter der Zugangsnummer KCLRF-BP-00026 hinterlegt.

[0035] Eine somatische oder Keimbahn-Chimäre kann durch Mikroinjektion von EG-Zellen in ein Ei, vorzugsweise in die Keimhöhle oder das Blutgefäß desselben, hergestellt werden. Noch bevorzugter kann die EG-Zelle in die Keimhöhle eines Eis im Stadium X oder in das Blutgefäß eines Eis in einem Stadium im Bereich von 13 bis 17 mikroinjiziert werden.

[0036] Ein gewünschtes fremdes Gen kann transfektiert und durch Elektroporation oder Liposome in die erfindungsgemäßen Huhn-EG-Zellen eingeführt werden und stabil transfektierte Huhn-EG-Zellen können durch Hindurchführen derselben in einem Medium, welches ein Antibiotikum enthält, ausgewählt werden.

[0037] Somit sind die erfindungsgemäßen Huhn-EG-Zelllinien nützlich für die Produktion von transgenen Hühnern und für Studien der Keimzelldifferentiation und der genetischen Prägung.

[0038] Die folgenden Beispiele sind dafür vorgesehen, die vorliegende Erfindung weiter darzustellen, ohne ihren Schutzbereich einzuschränken.

[0039] Des weiteren sind die nachfolgend angegebenen Prozentsätze für Feststoff-in-Feststoff-Mischungen, flüssig-in-flüssig und Feststoff-in-Flüssigkeiten jeweils auf einer Gewichts/Gewicht, Volumen/Volumen und Gewicht/Volumen-Basis, wenn nicht anders angegeben.

Beispiel 1: Isolation von PGCs und Einrichtung von Kulturbedingungen zum Erzeugen einer Huhn-EG-Zellbahn

(Schritt 1) Isolation von PGCs

[0040] Ein befruchtetes Ei eines White Leghorn, erhalten von dem College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, wurde für 5,5 Tage (bis zum Stadium 28) bei 37,5°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60–70% ausgebrütet. Der Embryo wurde von dem befruchteten Ei in Stadium 28 extrahiert und in einer 100 mm Petrischale mit magnesiumfreier, phosphatgepufferter Saline (PBS) gewaschen, um den Dotter und Blut zu entfernen. Der Embryo wurde in eine mit einem schwarzen Wachs beschichtete Petrischale gegeben und die embryonalen Keimdrüsen wurden mittels Zangen von demselben entfernt. Das Keimdrüsengewe-

be wurde durch Behandeln mit 0,25% Trypsin-0,05% EDTA in einzelne gonadale, primordiale Keimzellen (gPGCs) getrennt. Hierzu wurde DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco BRL, USA) hinzugefügt, welches 10% FBS (fetales Bovinserum, Gibco, USA) enthielt, um Trypsin-EDTA zu inaktivieren, und gPGCs wurden durch Zentrifugation geerntet.

(Schritt 2) Einrichten der Zellbedingung

[0041] Das EG(embryonales Keim)-Zellkulturmedium (d. h. DMEM) wurde mit einem oder mehreren Wachstumsfaktoren ergänzt, welche von Stammzellenfaktor (SCF), Leukämiehemmendem Faktor (LIF) und basischem Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF) ausgewählt wurde. Es wurde berichtet, dass SCF, LIF und bFGF wichtige Wachstumsfaktoren für das Überleben und das Wachstum der PBCs in der Maus sind (Resnick, J. L. et al., *Nature*, 259, 550–551 (1992); und Donovan, P. J., *Curr. Top. Dev. Biol.*, 29, 189–225 (1994)). Zusätzlich zu diesen drei Faktoren wurden wachstumsbezogene Faktoren, wie zum Beispiel Interleukin-11 (IL-11) und insulinartiger Wachstumsfaktor-I (IGF-I) zu dem Medium hinzugefügt. Die in Schritt 1 erhaltenen gPGCs wurden in dem Kulturmedium suspendiert, es wurden verschiedene Kombinationen der oben genannten Faktoren hinzugefügt und sie wurden dann bei 37°C unter einer Atmosphäre, welche 5% CO₂ enthielt, bis zu der Kolonisierung der EG-Zellen ausgebrütet.

[0042] Tests zeigten, dass die Kolonisierung der EG-Zellen in der Abwesenheit von IL-11 und IGF-I nicht auftritt. Aus diesem Grund sind IL-11 und IGF-I essentiell für das Überleben und die Wucherung von Huhn-EG-Zellen.

Beispiel 2: Kultur von Huhn-EG-Zellen

[0043] Die in Beispiel 1 erhaltene EG-Zellen wurden in eine 24-Well-Kulturplatte platziert, welche EG-Zell-Kulturmedium enthielt, das aus DMEM (Gibco, USA) bestand, zu dem 10% FBS, 2% Huhnerum (Gibco, USA), 1 mM Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin, $5,5 \times 10^{-5}$ M β -Mercaptoethanol, 100 μ g/ml Streptomycin, 100 Einheiten/ml Penizillin, 5 ng/ml menschlicher Stammzellenfaktor (hSCF; Sigma, USA), 10 Einheiten/ml Mausleukämiehemmender Faktor (mLIF; Sigma, USA), 10 ng/ml basischer Bovin-Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF; Sigma, USA), 0,04 ng/ml menschliches Interleukin-11 (h-IL-11; Sigma, USA) und 10 ng/ml menschlicher insulinartiger Wachstumsfaktor-I (IGF-I; Sigma, USA) hinzugefügt waren, und in einem Brutkasten für 7–10 Tage bei 37°C unter einer Atmosphäre von 5% CO₂ ausgebrütet, um EG-Zellkolonien zu produzieren, die auf einer Schicht aus Keimleisten Stromazellen (GRSC) lagen. Die Kolonien von Huhn-EG-Zellen wurden durch behutsames Pipettieren von der GRSC-Schicht getrennt und durch eine Zentrifuge bei 200 X g für 5 Minuten geerntet. Die geernteten EG-Zellen wurden in DMEM suspendiert und in eine frische 24-Well-Platte zusammen mit embryonischen Huhn-Fibroblasten (CEFs) geteilt, welche nicht mitotisch inaktiviert waren. Die EG-Zellkolonien wurden mit einem Intervall von 7 bis 10 Tagen unter den Bedingungen wie oben beschrieben ein- bzw. hindurchgeführt. Diese Kolonien wurden für bis zu 10 Durchgänge beibehalten und über eine Zeitdauer von 4 Monaten in wiederholter Subkultur vermehrt.

[0044] Die [Fig. 1a](#) und [Fig. 1b](#) zeigen Huhn-EG-Zellkolonien nach 3 Durchgängen auf embryonischem Huhn-Fibroblast(CEF)-Zellen ([Fig. 1a](#): Maßstab, 50 μ m; und [Fig. 1b](#): Maßstab, 25 μ m). Die Morphologie der Huhn-EG-Zellen war leicht unterschiedlich von derjenigen von Maus-ES- oder -EG-Zellen. Annähernd alle der Huhn-EG-Zellkolonien waren gleichmäßig rund und waren nicht fest an der CEF-Zuführungsschicht festgebunden. Im Gegensatz zu Maus-ES- oder -EG-Zellen waren Huhn-EG-Zellen nicht fest zusammengepackt und es war nicht schwierig, die einzelnen Komponenten-Zellen zu unterscheiden. Die Morphologie der Kolonien war vielschichtig und die Grenzen derselben waren gut abgegrenzt. Die Huhn-EG-Zellen waren aus einem großen Nukleus und einer relativ geringen Menge Zytoplasma zusammengesetzt, während seine Kernkörperchen nicht markant waren.

Beispiel 3: Charakterisierung der EG-Zelle

[0045] Um zu ermitteln, ob die Pluripotenz der EG-Zelle charakteristische Merkmale einer pluripotenten Zelle aufwies, wurde das Vorhandensein von Glykogenen und SSEA-1-Epitop sowie ihre alkalische Phosphatase-Aktivität und ihre Fähigkeiten, sich in vitro zu vermehren und zu differenzieren, untersucht.

(1) Periodische Acid-Shiff's (PAS) Verfärbung

[0046] Die nach vier Durchgängen in Beispiel 2 erhaltenen EG-Zellkolonien wurden an einer Platte in einer 1%-igen Glutaraldehyd-Lösung für 5 Minuten fixiert und zwei Mal mit einem gleichen Volumen einer phosphat-

gepufferten Saline (PBS) gewaschen. Die EG-Zellkolonien wurden in periodischer Säurelösung (Sigma, USA) bei Raumtemperatur für 5 Minuten eingetaucht und dann mit einem gleichen Volumen PBS gewaschen. Die EG-Zellkolonien wurden dann in Schiff's-Lösung (Sigma, USA) bei Raumtemperatur für 5 Minuten eingetaucht und dann zwei Mal mit einem gleichen Volumen PBS gewaschen. Die sich ergebenden EG-Zellkolonien wurden unter einem invertierten Mikroskop beobachtet. Huhn-PGCs können leicht durch die PAS-Reaktion identifiziert werden, welche Glykogene in dem Zytoplasma (Meyer, D. B., Dev. Biol., 10, 154–190 (1964)) färbt. Wie aus [Fig. 2](#) ersichtlich ist, können die EG-Zellen nach vier Durchgängen durch PAS gefärbt werden, obwohl die Verfärbung relativ schwach ist.

(2) Anti-SSEA-1-Antikörper-Untersuchung

[0047] Das SSEA-1-Epitop ist charakteristisch für undifferenzierte Murin-ES-Zellen und war ein Kriterium zum Unterscheiden von pluripotenten Stammzellen (Solter, D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 75, 5565–5596 (1978)).

[0048] Um zu ermitteln, ob die Pluripotenz der EG-Zellen charakteristische Merkmale einer pluripotenten Zelle aufwies, wurde das Vorhandensein von SSEA-1-Epitop ermittelt.

[0049] Die nach vier Durchgängen in Beispiel 2 erhaltenen EG-Zellkolonien wurden an einer Platte in einer 1%-igen Glutaraldehyd-Lösung für 5 Minuten fixiert und zwei Mal mit einem gleichen Volumen einer PBS gewaschen. Eine ascite Flüssigkeit von Anti-SSEA-1-Monoclonalem Antikörper (MC-480; Solter, D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 75, 5565–5596 (1978)) wurde von der Development Studies Hybridoma Bank, Iowa University USA gekauft, 1000-fach mit PBS verdünnt und zu den EG-Zellkolonien hinzugefügt. Die sich ergebenden EG-Zellkolonien wurden mit Avidin/Biotin-konjugierter alkalischer Phosphatase (Vector Lab., USA) zur Reaktion gebracht und dann mit BCIP/NBT alkalischem Phosphatasesubstrat (BCIP/NBT alkalischer Phosphatasesubstratkit IV, Vector Lab., USA). Die Reaktion wurde durch Hinzufügen von 10 mM EDTA (pH-Wert 8,0) hierzu gestoppt.

[0050] Wie aus [Fig. 3](#) ersichtlich ist, sind nach 4 Durchgängen alle EG-Zellen positiv bezüglich SSEA-1-Färbung, was zeigt, dass das SSEA-1-Epitop durch Huhn-EG-Zellen ausgedrückt wird.

(3) Vermehrungsprüfung

[0051] Die nach 8 Durchgängen in Beispiel 2 erhaltenen EG-Zellkolonien wurden in einer Bromodeoxyuridin (BrdU, ein Thymidinanalog) enthaltenden Lösung bei 37°C für 1 Stunde gehalten und zwei Mal mit einem gleichen Volumen PBS gewaschen. Die sich ergebenden EG-Zellkolonien wurden durch ein Zellwuchersassaykit (Amersham, UK) gefärbt und dann durch Wiederholen des Vorgangs von (1) mit PAS gegengefärbt. EG-Zellkolonien, welche inkorporiertes BrdU enthielten, wurden unter Verwendung jeglicher Anti-BrdU-Monoklonalantikörper und eines Peroxidase/DAB-Systems (Amersham, UK) detektiert.

[0052] [Fig. 4](#) stellt das Wuchersassayergebnis von nach 8 Durchgängen gefärbten EG-Zellkolonien dar. Wie aus [Fig. 4](#) ersichtlich ist, befinden sich die EG-Zellen nach 8 Durchgängen in einer kontinuierlichen Wucherung.

(4) Alkalisches Phosphatase-Aktivitätsassay

[0053] Die alkalische Phosphatase-Aktivität der EG-Zellkolonien, die nach 4 Durchgängen in Beispiel 2 erhalten wurden, wurde unter Verwendung eines alkalischen Phosphatasesubstratkits IV (Vektor Lab., USA) gemessen.

[0054] Das Ergebnis zeigt, dass die EG-Zellen kaum eine alkalische Phosphataseaktivität aufweisen und die Aktivität während der Subkultur nicht wiedergewannen.

[0055] Gemäß Swartz, W. J., Anat. Rec., 202, 379–385 (1982) ist die alkalische Phosphataseaktivität von avianischen PGCs bereits zwei Tage nach der Inkubation, jedoch nicht nach dem Eintritt von PGCs in die Keimleiste zu beobachten, was bedeuten würde, dass die alkalische Phosphataseaktivität von gonadalen PGCs sowie darin eingeführten EG-Zellen tatsächlich sehr schwach wäre.

(5) In-Vitro-Differentiation und immunohistochemische Analyse

[0056] Um zu prüfen, ob aus den Huhn-EG-Zellen embryonale Körper gebildet werden können, wurden die

nach 4 Durchgängen in Beispiel 2 erhaltenen EG-Zellkolonien leicht ungerührt und zentrifugiert, um individuell getrennte EG-Zellen zu erhalten. Die EG-Zellen wurden in EG-Zellkulturmedium, welches frei von mLIF war, suspendiert und dann in einer nicht klebenden bakteriologischen Petrischale angeordnet. Das Medium wurde jeden zweiten Tag für 8 Tage gewechselt und die Morphologie der Zellen wurde täglich überwacht.

[0057] [Fig. 5a](#) zeigt die aus den Huhn-EG-Zellen in einer Suspension nach 8 Tagen gebildeten embryonalen Körper.

[0058] Die auf diese Weise gebildeten embryonalen Körper wurden gesammelt und dann in einer 96-Wellplatte verteilt, um an derselben anzuhaften und zu differenzieren. Die sich ergebenden Zellen wurden unter Verwendung von Antikörpern für muskelspezifisches Aktin (Dako, USA), Endoderm-spezifisches α -1-Fectoprotein (Dako, USA) und Ektoderm-spezifisches S100 (Dako, USA) zusammen mit einem DAKO LSAB-Kit und Avidin/Biotin-konjugiertem Peroxidasystem (Dako, USA) einer immunohistochemischen Analyse ausgesetzt.

[0059] Die [Fig. 5b](#) bis [Fig. 5d](#) stellen jeweils die Ergebnisse der immunohistochemischen Analysen der embryonalen Körper unter Verwendung von Antikörpern gegen Aktin, α -1-Fectoprotein und S100 dar. Wie aus den [Fig. 5b](#) bis [Fig. 5d](#) ersichtlich ist, sind die EG-Zellen in der Lage, in vitro in eine Vielzahl von Zelltypen, z. B. Entoderm, Mesoderm und Ektoderm-Abstammung zu differenzieren.

Beispiel 4: Produktion von chimären Hühnern

[0060] Koreanische Ogol-Huhnembryos im Zustand X oder 13 bis 17 (Egal-Giladi, H. et al., Dev. Biol., 49, 321–337 (1976)) wurden als Empfänger verwendet. Der seitliche Teil oder das spitze Ende von jedem koreanischen Ogol-Huhn wurde durchstoßen, um ein kleines Fenster zu schaffen, und dann wurde die Schalenmembran entfernt.

[0061] Die nach 3 oder 4 Durchgängen in Beispiel 2 erhaltenen EG-Zellen wurden in einem EG-Zellkultur-Medium mit einer Konzentration von 10^3 Zellen/ μ l suspendiert und dann wurde unter Verwendung einer Mikropipette 2 μ l der Suspension in die Keimhöhle oder das Blutgefäß des Eis injiziert. Mit CEF injizierte Eier wurden als ein Vergleich verwendet. Die Öffnung von jedem Ei wurde zwei Mal mit einer Paraffinfolie versiegelt und dann wurden die Eier mit dem spitzen Ende nach unten abgelegt bis zum Ausbrüten. Den ausgebrüteten Hühnern wurde es ermöglicht, für 3 Monate zu wachsen, um somatische chimäre Hühner zu werden.

[0062] Von 45 Eiern mit manipulierten Embryos wurden 8 Eier ausgebrütet und unter den acht waren 3 Hühner (37,5%) äußerlich chimär. Unter den chimären Hühnern wurden zwei weißgefleckte Hühner von den mit den EG-Zellen von 3 Durchgängen injizierten Embryos ausgebrütet und eines war von den mit den EG-Zellen von 4 Durchgängen injizierten Embryos. Das Ausmaß der weißen Flecken änderte sich unter den 3 Hühnern signifikant. Bei dem Vergleichshühner wurde keine weiße Feder entdeckt.

[0063] [Fig. 6a](#) stellt ein paar typische koreanische Ogol-Hühner dar, welche schwarze Federn aufweisen; und [Fig. 6b](#) die somatischen chimären Hühner, welche weiße Flecken um den Hals und auf der Brust haben. Die Federfarbe eines White Leghorn ist aufgrund des dominanten die Pigmentierung hemmenden Gens (I/I) weiß und eines koreanischen Ogol-Huhns aufgrund des rezessiven Pigmentgens (i/i) schwarz. Folglich deutet das oben genannte Ergebnis darauf hin, dass die EG-Zellen des White Leghorn in der Lage sind, in vivo in dem empfangenden koreanischen Ogol-Huhnembryo zu differenzieren, und aus diesem Grund sind die EG-Zellen in vivo pluripotent. Um den somatischen Chimerismus des Huhns zu verifizieren, wurden genomische DNA-Proben durch Phenolextraktion aus dem Muskel, dem Herz, der Leber und der Keimdrüse von 5 Hühnern entnommen, welche während dem Ausbrüten starben, und dann einer PCR-Analyse unter Verwendung von White Leghorn-spezifischer SCAR (sequenzcharakterisierter verstärkter Region) Primern ausgesetzt, welche nukleotide Sequenzen von SEQ ID NR: 1 Vorwärtsprimer und SEQ ID NR: 2 Rückwärtsprimer aufwies.

[0064] PCR-Reaktionen wurden auf einer 25 μ l Skala unter Verwendung von 50 bis 100 ng genomischer DNA, 0,2 mM von jedem dNTP, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,4 pmol Vorwärtsprimer, 0,4 pmol Rückwärtsprimer und einer Einheit Taq-Polymerase durchgeführt. Das PCR-Programm bestand aus 1 Minute Denaturierung bei 94°C, 1 Minute Temperieren bei 60°C und 2 Minuten Ausdehnung bei 72°C für 45 Zyklen in einem DNA-Thermostyler (Perkin Elmer Cetus). Das erzeugte White Leghorn-spezifische DNA-Fragment war ungefähr 3 kb. [Fig. 7](#) stellt die Ergebnisse der PCR-Analyse für somatischen Chimerismus dar: Spalten 1, 5, 9, 13 und 17, PCR-Produkte, welche die Leber-DNA verwenden; Spalten 2, 6, 10, 14 und 18, die Muskel-DNA; Spalten 3, 7, 11, 15 und 19, die Herz-DNA; Spalten 4, 8, 12, 16 und 20, die Keimdrüsen-DNA; Spalte 21, ko-

reanisches Ogor-Huhn genomisches DNA; Spalte 22, White Leghorn genomische DNA; und Spalte 23, keine Vorlage. Wie aus [Fig. 7](#) ersichtlich ist, waren die somatischen Chimerismen zwischen Individuen unterschiedlich. Eines der 5 Hühnchen zeigte somatischen Chimerismus in allen Gewebeprobe(n) (Leber, Herz, Muskel und Keimdrüsen). Die injizierten EG-Zellen trugen zu den Keimdrüsen von zwei ausgebrüteten Hühnchen und dem Herz in allen Hühnchen bei; zwei Hühnchen zeigten den somatischen Chimerismus nur in dem Herz. Diese Ergebnisse zeigen an, dass Huhn-EG-Zellen differenzieren können und in vivo zu verschiedenen Geweben einschließlich den Keimdrüsen beitragen können.

Beispiel 5: Transfektion von fremden Genen in PGCs oder EG-Zellen und Selektion derselben

[0065] Ein Reporter-Gen (GFP oder Lac Z) wurde in PGCs oder EG-Zellen unter Verwendung von Elektroporation bzw. Liposom transfektiert. Die Effizienz der Transfektion des Gens war ungefähr 80% im Falle der Verwendung von Elektroporation und 30% im Fall der Verwendung von Liposom. Transfektierte PGCs oder EG-Zellen wurden in ein DMEM-Medium geleitet, welches 350 µg/ml Neomycin enthielt, um die stabil transfektierten PGCs oder EG-Zellen auszuwählen.

[0066] Während die Erfindung unter Bezugnahme auf die oben genannten spezifischen Ausführungsformen beschrieben worden ist, sollte verstanden werden, dass verschiedene Modifikationen und Änderungen an der Erfindung von den Fachleuten gemacht werden können, welche ebenfalls in den Schutzbereich der Erfindung fallen, wie er durch die beigefügten Ansprüche definiert ist.

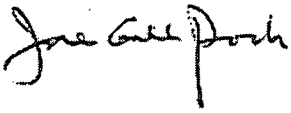
BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSE OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

RECEPTION IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1

To: Jae Yong Han

Dongbo APT 101-513, Yongin 3 cha, Suji, Yongin-City,
Kyonggi-do 449-840, KOREA

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR : CEG (chicken embryonic germ cell line)	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCLRF-BP-00026
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by:	
<input checked="" type="checkbox"/> A scientific description	
<input checked="" type="checkbox"/> A proposed taxonomic designation	
(Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on September, 22, 1999	
IV. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name : Director Korean Cell Line Research Foundation	Signature(s) : 
Address : Cancer Research Institute Seoul National University College of Medicine 28 Yongon-dong, Chongno-Gu Seoul, 110-744, Korea	Date : 1999. 10. 25

SEQUENZPROTOKOLL

<110> HAN, JAE YONG
HAM MI PHARM. CO., LTD.
PARK, TAE SUB

<120> AVIAN PLURIPOTENT EMBRYONIC GERM CELL LINE

<130> PC91143/HMY

<150> KR 1999-4860
<151> 1999-02-11

<160> 2

<170> KOPATIN 1.5

<210> 1
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> White Leghorn-specific SCAR primer (forward primer)

<400> 1
aacgcgtaga gttgcagggg tcag 24

<210> 2
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> White Leghorn-specific SCAR primer (reverse primer)

<400> 2
aacgcgtaga tattcgagta cctt 24

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung einer etablierten avianen embryonalen Keimzelllinie (EG), wobei das Verfahren folgende Schritte umfasst:

- (a) Kultivieren von primordiales Keimzellen (PGCs), die aus einer avianen embryonalen Gonade isoliert wurden, in einem Medium, das mit einem Zellwachstumsfaktor und einem differenzierungshemmenden Faktor angereichert ist, um EG-Zellkolonien zu erhalten;
- (b) Kultivieren der EG-Zellen im gleichen Medium wie in Schritt (a) unter Verwendung einer Feeder-Schicht, bis die EG-Zellen Kolonien gebildet haben; und
- (c) Gewinnung und Subkultivierung der EG-Zellen im gleichen Medium wie in Schritt (a) zur Etablierung der EG-Zelllinie.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei sich die aviane embryonale Gonade in einem Stadium im Bereich von 14 bis 36 befindet.

3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei sich die aviane embryonale Gonade in einem Stadium im Bereich von 24 bis 30 befindet.
4. Verfahren nach Anspruch 1, wobei es sich bei der avianen Spezies um Truthahn, Huhn, Wachtel, Fasan oder Ente handelt.
5. Verfahren nach Anspruch 1, wobei eine Schicht aus Keimleisten-Stromazellen (GRSCs) als Feeder-Schicht verwendet wird, wenn primordiale Keimzellen in Schritt (a) kultiviert werden.
6. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Wachstumsfaktor von der aus Stammzellenfaktor (SCF), basischem Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF), Interleukin-11 (IL-11), insulinartigem Wachstumsfaktor I (IGF-I) und einem Gemisch davon bestehenden Gruppe ausgewählt wird.
7. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Medium mit einem Wachstumsfaktor angereichert wird, der von der aus 0,05 bis 500 ng/ml SCF, 0,1 bis 1000 ng/ml bFGF, 0,0004 bis 4 ng/ml IL-11, 0,1 bis 1000 ng/ml IGF-I und einem Gemisch davon bestehenden Gruppe ausgewählt wird.
8. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Differenzierungshemmende Faktor ein Leukämie-hemmender Faktor (LIF) ist.
9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei die Menge an LIF 0,1 bis 1000 Einheiten/ml beträgt.
10. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Medium weiterhin Säugetier- oder avianes Serum umfasst.
11. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Medium weiterhin einen zusätzlichen Bestandteil umfasst, der von der aus Natriumpyruvat, Glutamin, β -Mercaptoethanol und einem Gemisch davon bestehenden Gruppe ausgewählt wird.
12. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Feeder-Schicht mitotisch aktiv ist.
13. Verfahren nach Anspruch 1 oder 12, wobei es sich bei der Feeder-Schicht um Fibroblasten oder ein Äquivalent dazu handelt.
14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei es sich bei den Fibroblasten um aviane Fibroblasten oder aviane embryonale Fibroblasten handelt.
15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei die aviane Spezies Huhn ist.
16. Aviane embryonale Keimzelllinie (EG), hergestellt gemäß dem Verfahren nach Anspruch 1.
17. Aviane EG-Zelllinie nach Anspruch 16, die durch wiederholtes Subkultivieren aufrechterhalten werden kann.
18. Aviane EG-Zelllinie nach Anspruch 16, die das Antigen SSEA-1 exprimiert, einen Embryoidkörper bildet und zu verschiedenen Geweben differenziert und beiträgt.
19. Aviane EG-Zelllinie nach Anspruch 16, bei der es sich um eine embryonale Keimzelllinie vom Huhn handelt und die Eigenschaften aufweist, die im Wesentlichen identisch zu der unter der Zugangsnummer KCL-RF-BP-00026 hinterlegten Zelllinie sind.
20. Verfahren zur Herstellung einer somatischen oder Keimbahn-Chimäre, das das Injizieren der avianen EG-Zelllinie nach Anspruch 16 in ein nichtmenschliches Ei umfasst.
21. Verfahren nach Anspruch 20, wobei die EG-Zelle in eine Keimhöhle oder in ein Blutgefäß des nichtmenschlichen Eis injiziert wird.
22. Verfahren nach Anspruch 21, wobei die EG-Zelle in die Keimhöhle des nichtmenschlichen Eis in einem Stadium X injiziert wird.
23. Verfahren nach Anspruch 21, wobei die EG-Zelle in das Blutgefäß des nichtmenschlichen Eis in einem

Stadium im Bereich von 13 bis 17 injiziert wird.

24. Verfahren zur Transfektion eines fremden Gens in aviane EG-Zellen, gekennzeichnet dadurch, dass Elektroporation oder Liposom verwendet wird.

25. Verfahren zur Selektion stabil transfizierter avianer EG-Zellen, das das Passagieren von EG-Zellen umfasst, die mit einem fremden Gen transfiziert sind, in einem Medium, das ein Antibiotikum enthält.

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

FIG. 1a

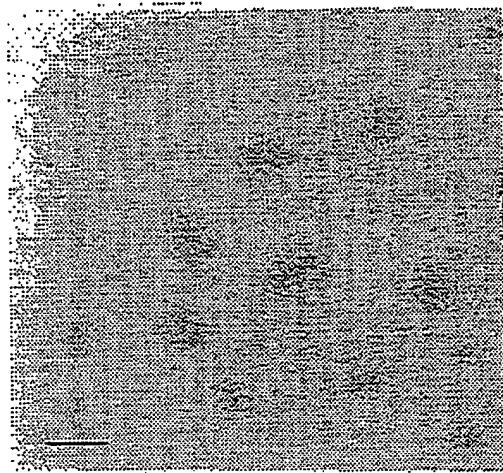


FIG. 1b

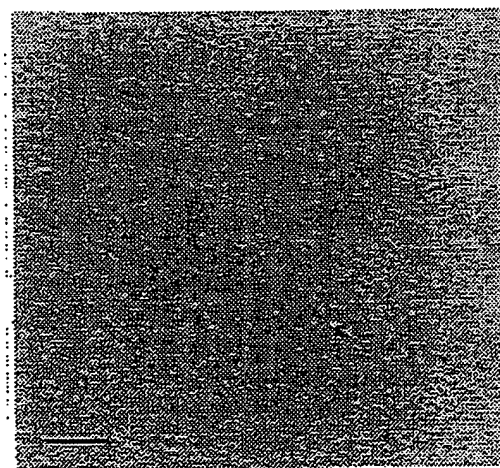


FIG. 2

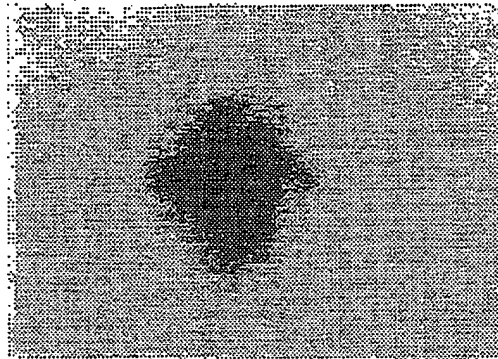


FIG. 3

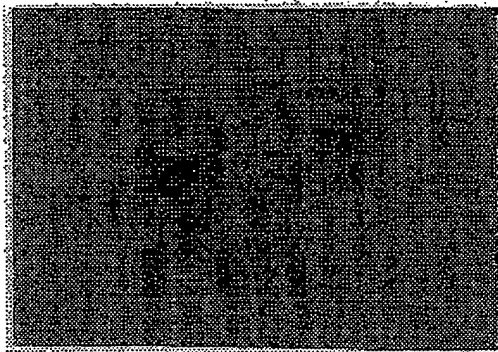


FIG. 4

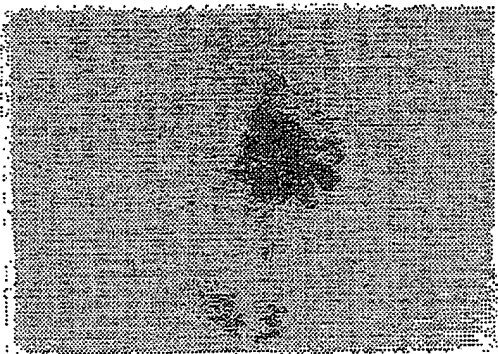


FIG. 5a

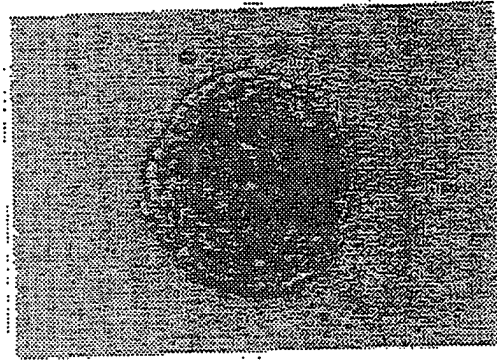


FIG. 5b

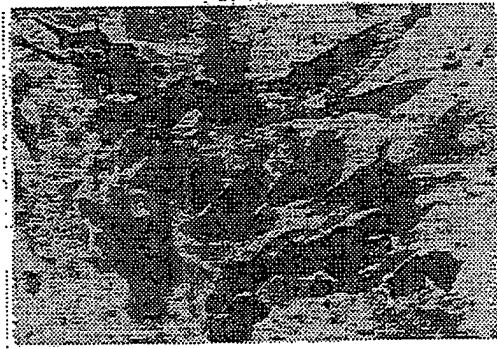


FIG. 5c

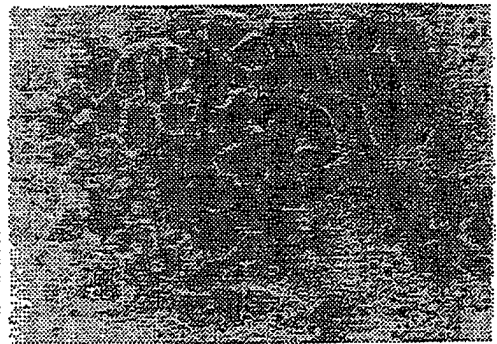


FIG. 5d



FIG. 6a

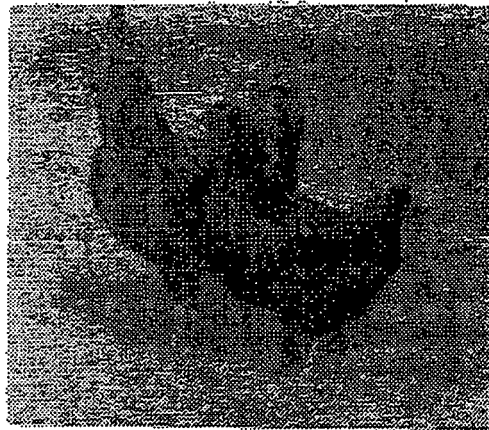


FIG. 6b

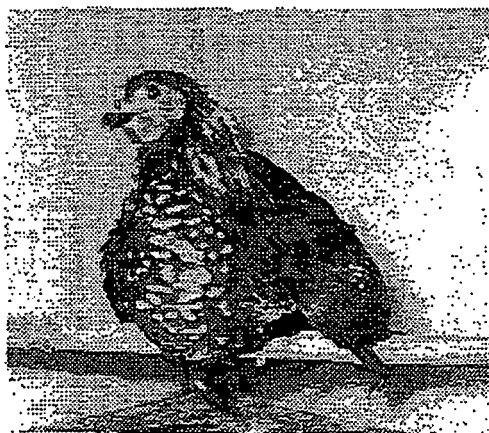


FIG. 7

