

# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

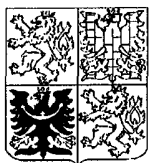
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

**2959-97**

(19)

ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **20. 03. 96**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **21.03.95**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **95/9505663**

(33) Země priority: **GB**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14. 01. 98**  
(Věstník č. 1/98)

(86) PCT číslo: **PCT/GB96/00671**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 96/29395**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>:

**C 12 N 5/10**

(71) Přihlášovatel:

STRINGER Bradley Michael John, Cardiff,  
GB;

(72) Původce:

Stringer Bradley Michael John, Cardiff, GB;

(74) Zástupce:

Jírotková Ivana Ing., Nad Štolou 12, Praha  
7, 17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsob kultivace buněk**

(57) Anotace:

Způsob selektivní kultivace preselektované subpopulace buněk z heterogenní buněčné populace in vitro zahrnuje kroky: (a) zavedení selekčního markeru (například pozitivního a/nebo negativního selekčního markeru) do heterogenní buněčné populace, přičemž marker podléhá v preselektované subpopulaci diferenciální expresi/aktivitě, a (b) selektivní kultivaci preselektované subpopulace na bázi diferenciální exprese/aktivity selekčního markeru v ní.

CZ 2959-97 A3

Způsob kultivace buněk

### Oblast techniky

Předložený vynález se týká způsobů kultivace buněk, zejména způsobů kultivace buněk pro přípravu v podstatě homogenní populace buněk (například neuronových buněk) *in vitro*. Vynález se dále týká neurálních buněk (například lidských neurálních buněk), které mají zabudovány selekční markery (například pozitivní a/nebo negativní selekční markery).

### Dosavadní stav techniky

Centrální nervová soustava je v současné době předmětem intenzivního zkoumání, ale její mimořádná složitost na buněčné úrovni působí proti úplnému pochopení její funkce. Zatímco se stále více rozvíjejí selektivní postupy označování specifických subpopulací neurálních buněk *ex vivo* (jako imunodetekce, histochemie hybridizací *in situ* atd.), separace a purifikace těchto subpopulací jako živých buněk přináší vážné potíže.

S ohledem na tento problém jsou používány různé přístupy. Například se používají techniky, jako je diferenciální odstředování, pro obohacování specifických neurálních buněčných fenotypů. Další metody jsou založeny na použití specifických substrátů specifických pro fluorescenční buňky k označení subpopulací buněk, nebo na použití fluorescenčních stopovacích barviv vstříkovaných do specifické terminační oblasti daného souboru neuronů (Schaffner a kol. (1987), J. Neuroscience 7:3088). V každém případě probíhá oddělování označených buněk od neoznačených buněk tříděním fluorescencí aktivovaných buněk (fluorescence-activated cell sorting, FACS).

Další postup je založen na identifikaci na extracelulární membráně vázaných markerů specifických pro daný buněčný typ (Urakami & Chiu (1990), J. Neuroscience 10:620). V tomto případě je dosaženo oddělení nanesením populace smíšených buněk na adherentní vrstvu protilátky za vzniku komplexů buňka-protilátka,

z nichž mohou být buňky, o které je zájem, později disociovány pro další studium.

Podle dalšího známého postupu jsou originální buňky, z nichž vzniká specifická buněčná populace, imortalizovány transdukci onkogenu nebo subkultivací samovolných buněčných výrůstků.

Pravděpodobně s výjimkou techniky imortalizace prekurzorových buněk, nenabyla většina těchto postupů všeobecného použití. Částečně je to díky mimořádné heterogenitě fenotypů v centrálním nervovém systému, takové, že použité markery a separativní techniky musí být maximálně specifické, aby se zabránilo křížovým reakcím s nežádoucími buněčnými typy.

Za druhé je stupeň purifikace, požadovaný pro získání homogenity, často v rozsahu dvou nebo více řádů; takové obohacení je příliš velké pro FACS nebo nanášení na vrstvu protilátky; výsledkem je určitý stupeň kontaminace.

Za třetí je dostupnost dostatečně hojných, avšak přitom ještě adekvátně specifických extracelulárních markerů, které jsou běžné také pro lépe charakterizované neurální buněčné skupiny (například dopaminergické buňky nebo glutamatergické buňky), omezená.

Dále vyžaduje většina z těchto známých obohacovacích technik relativně nezralé neurální buňky, aby se zabránilo jejich destrukci v průběhu postupu.

Konečně jsou tyto úvahy ještě mnohem více omezeny u lidských neurálních buněk vzhledem k potížím, které jsou při získávání potřebných množství čerstvé lidské mozkové tkáně.

#### Podstata vynálezu

Předložený vynález poskytuje způsob selektivní kultivace preselektované subpopulace buněk z heterogenní populace *in vitro*, obsahující kroky:

(a) vnesení selekčního markeru (například pozitivního a/nebo negativního selekčního markeru) do heterogenní buněčné populace,

příčemž marker podléhá v preselektované subpopulaci diferenciální expresi/aktivitě; a

(b) selektivní kultivace preselektované subpopulace na bázi diferenciální exprese/aktivity selekčního markeru v ní.

Preselektovanou subpopulací buněk může být v podstatě homogenní populace buněk konkrétního buněčného typu nebo buněčné třídy. Například může být preselektovanou subpopulací konkrétní třída neurálních buněk. V případě neurálních buněk může být preselektovaná populace selektována na základě charakteristik transmitteru, například mohou být postupem podle tohoto vynálezu selektivně kultivovány neurony obsahující dopamin nebo acetylcholin.

Selekční markery nemusí být vneseny do každé buňky tvořící heterogenní buněčnou populaci; pro většinu účelů je postačující, když selekční markery přijme výrazná část buněk.

Výhodně se však selekční marker (markery) zabudovávají do většího podílu (například v podstatě do celé) heterogenní buněčné populace.

Jak je zde doloženo, postup podle vynálezu nalezne konkrétní využití při selektivní kultivaci specifických tříd v podstatě normálních neurálních buněk. Postup podle předloženého vynálezu má ale i obecné použití a může být použit pro selektivní kultivaci jiných subpopulací buněk.

Ze stavu techniky je známo, že neurální buňky savců mohou být transdukovány heterologním genetickým materiálem. Pro transdukcii eukaryotických a jiných buněk existuje mnoho metod, ale charakteristiky neurálních buněk jsou takové, že přirozené postupy transfekce jsou v současnosti nejvýhodnější (Miller (1992), Nature 357:455). Například transdukcce virově obaleným genetickým materiálem je nejen účinnější, ale rovněž má za následek nižší úmrtnost neurálních buněk během aktuálního postupu, než ke které dochází například při vysrážení fosforečnanem vápenatým, elektroporaci, ostřelování mikroprojektily nebo při mikroinjekci. Transdukcce savčích neurálních buněk z centrální nervové soustavy *in vivo* (Culver a kol. (1992), Science 256:1550) i *in vitro* (Stringer & Foster (1994,) Brain Res 79:267) byly popsány.

Genetický materiál, který může být zaveden do žijících buněk, může zahrnovat jak pozitivní, tak negativní selekční marker. Pozitivní selekční marker je takový, který umožní transdukované buňce přežít za podmínek, které by usmrtily buňky neexprimující selekční fenotyp. Negativní selekční marker propůjčuje citlivost buňkám, které ho exprimují, takže jsou ničeny za podmínek, které jsou pro jiné buňky relativně neškodné.

Je dostupná široká řada selekčních markerů. Geny, které jsou široce aplikované jako pozitivní selekční markery, zahrnují bakteriální fosfotransferázu neomycinu (neo; Colbere-Garapin a kol. (1981), J. Mol. Biol. 150:1), hygromycinfosfotransferázu (hph; Santerre a kol. (1984), Gene 30:147) a xanthinuaninfosforibosyltransferázu (gpt; Mulligan & Berg (1981), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072).

Také se používají jako pozitivní selekční markery thymidinkináza viru herpes simplex typu 1 (HSV-1 TK ; Wigler a kol. (1977), Cell 11:223), adeninfosforibosyltransferáza (APRT; Wigler a kol. (1979), Proc. Natl. Acad. Sci., USA 76:1373) a hypoxanthinfosforibosyltransferáza (HPRT; Jolly a kol. (1983), Proc. Natl. Acad. Sci., USA 80:477). Tyto posledně uvedené markery musejí být použity v buňkách, které mají zvláštní mutantní genotyp (totiž takový, který vede k deficitu genového produktu, na němž je selekce založena).

Výhodné negativní selekční markery zahrnují geny kódující produkty týkající se programové buněčné smrti (apoptózy), například gen pro p53. Tyto negativní selekční markery mohou být aktivovány vyvoláním exprese dotyčného genu (například použitím promotoru citlivého na tetracyklin, jak je popsáno dále). Použití genů, kódujících produkty účastníků se apoptózy, má tu výhodu, že dočasná exprese (v mnoha případech 30 minut nebo méně) genu může být postačující k zániku buňky, a umožňuje tak spolehlivou a velice ostrou negativní selekci.

Některé z výše uvedených genů také dodávají negativní stejně jako pozitivní selekční fenotypy. Tyto geny zahrnují HSV-1, APRT, HPRT a gpt. Tyto geny kódují enzymy, které mohou katalyzovat konverzi jistých nukleosidových nebo purinových analogů na

cytotoxické meziprodukty. Například nukleosidový analog ganciclovir (GCV) je dobrým substrátem pro HSV-1 thymidinkinázu, ale špatným substrátem pro přirozenou thymidinkinázu nacházející se v buňkách savců. V důsledku toho může být použit GCV pro účinnou negativní selekci proti buňkám exprimujícím gen HSV-1 TK (St. Clair a kol. (1987), *Antimicrob. Agents Chemotherap.* 31:844).

Xanthinguaninfosforibosyltransferáza může být použita pro pozitivní i negativní selekci v případě exprese ve standardních buňkách (Besnard a kol. (1987), *Mol. Cell Biol.* 7:4139). Cytosindeamináza může být rovněž použita jako negativní selekční marker, převádějící neškodný 5-fluorcytosin na cytotoxický 5-fluorouracil (Polak & Scholer (1976), *Chemotherapy (Basel)* 21:113).

Selekční markery se obvykle používají jak v prokaryotickém, tak v eukaryotickém genetickém inženýrství, aby umožnily ze směsné populace buněk izolaci těch, které prodělaly vyjimečnou genetickou změnu. Například mohou být použity ve fyzikálním spojení s jiným genem, který kóduje produkt zájmu, aby se selektovaly buňky, které přibraly tento další gen spolu se selekčním markerem. Příkladně byl neo gen použit k monitorování geneticky modifikovaných buněk odebraných ze vzorku pacienta, který se podrobil genové terapii.

Rovněž bylo navrženo použít negativní selekční markery jako bezpečnostní prostředky v genové terapii (Lupton a kol. (1991), *Mol. Cell Biol.* 11:3374). Mnoho genových terapií zahrnuje odebrání somatických buněk pacientovi, zavedení terapeutického genu do nich (jehož exprese vede k opravě biochemické léze), s následným opětovným přenesením buněk do pacienta. Jelikož se opětovně zavedené geneticky modifikované buňky mohou v konečném důsledku projevit jako škodlivé pro zdraví pacienta (například pokud se projeví jako imunologicky nekompatibilní nebo se stávají maligními), může být spolu s terapeutickým genem zaveden negativní selekční marker, aby se umožnila (pokud je to nezbytné) následná selektivní eliminace geneticky modifikovaných buněk.

Byla připravena řada vektorů nesoucích pozitivní nebo negativní selekční markery, a pro odborníka v dané oblasti techniky jsou tyto snadno dostupné (viz např. Miller (1992),

Nature 357:455). Ostatní mohou být snadno sestaveny použitím standardních postupů klonování genů.

Postup podle vynálezu může zahrnovat předchozí indukci nebo replikaci ve směsné populaci embryonálních neurálních buněk, použití doplňku do kultivačního media, jako je epidermální růstový faktor nebo fibroblastový růstový faktor, nebo předchozí transfekci imortalizačními onkogeny k vyvolání takové replikace. Alternativně lze použít neexpandující buněčné kultury.

Výhodně jsou buňky v časném stupni po očkování transdukovány pozitivním selekčním markerem a negativním selekčním markerem, oběma operabilně vázanými s prvkem exprese. Prvek exprese může být specifický pro danou oblast centrální nervové soustavy, daný typ neurálních buněk nebo specifickou subpopulaci neuronů. Po dosažení požadované úrovně expanze kultivace mohou být buňky ponechány, alespoň částečně, aby se diferencovaly. Potom se aplikuje příslušné léčivo, takže se odstraní netransdukovávané buňky a buňky transdukovávané bez aktivního specifického prvku exprese, zatímco transdukovávané buňky s aktivním prvkem (který vede k expresi následujících selekčních markerů) budou rezistentní.

Prvky exprese pro použití podle vynálezu mohou být příkladně vybrány z: promotorů a/nebo zesilovačů transkripce, které jsou specificky účinné v:

(i) dopaminergických, serotoninergických, GABAergických, cholinergních nebo peptidergických neuronech nebo jejich subpopulacích; (ii) Schwannových buňkách, oligodendrocytech, astrocytech, mikroglíích a jejich subpopulacích; (iii) konkrétních stádiích embryogeneze a (iv) jiných specifických tkáních, jiných než neurálních. Zvláště výhodné pro použití podle předloženého vynálezu jsou na tetracyklin citlivé promotory popsané například Furthem a kol., (1994), PNAS USA (sv. 91, str. 9302-9306). Tyto promotory mohou být použity jako prvek v regulačním systému citlivém na tetracyklin, k ovlivnění časové a/nebo prostorové regulace genové exprese *in vivo*.

Alternativně mohou být vybrány z promotorů a/nebo zesilovačů transkripce, které řídí transkripci genů pro: (i) receptory specifické pro neurotransmitery; (ii) iontové kanály; (iii) receptory účastnící se hradlování ("gating") iontových kanálů;

15.10.97

(iv) cytokiny, růstové faktory a hormony a (v) jakoukoliv substanci, která je specificky produkována a vylučována parakrinním, autokrinním nebo endokrinním způsobem. Příklady jsou v tabulce 1.

Vynález poskytuje způsob kultivace lidských a jiných savčích buněk (například neurálních buněk) a produkce homogenních kultur jednotlivého buněčného typu selekcí na subpopulaci buněk na bázi genetického materiálu v nich obsaženého.

Tyto kultury mohou mít různá použití včetně základních elektrofyziologických, neurochemických a vývojových experimentů. Dále mohou být populace purifikovaných neurálních buněk užitečné v mnoha klinicky použitelných studiích, jako je stanovení uskutečnitelnosti transplantace ke zmírnění symptomů degenerativních onemocnění centrální nervové soustavy, a mohou nacházet použití při různých formách léčení, prevence a diagnostiky.

Uvedená onemocnění zahrnují: (i) Parkinsonovu nemoc nebo parkinsonismus, přičemž preselektovanou subpopulací buněk jsou dopaminergické neurony substantia nigra; (ii) Huntingtonovu nemoc, přičemž preselektovanou subpopulací buněk jsou neurální buňky z corpus striatum; (iii) Alzheimerovu nemoc, přičemž preselektovanými subpopulacemi buněk jsou neurony obsahující acetylcholin, serotonin a/nebo noradrenalin, spojené s neo- a paleokortexem; nebo (iv) sklerózu multiplex, přičemž preselektovanou subpopulací buněk jsou oligodendrocyty mozku.



TABULKA 1

| Promotor                            | Tkáň/typ buňky                                        | Aplikace                                    | Odkaz                                               |
|-------------------------------------|-------------------------------------------------------|---------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Tyrosin hydroxyláza                 | Katecholaminergické neurony                           | Alzheimer.nemoc<br>Parkinson. nemoc         | Stachowick a kol. (1994)<br>Mol Brain Res 22,309-19 |
| TSH receptor                        | Buňky štítné žlázy                                    | Hypotyreóza                                 | Ikuama & Nakata (1994)<br>Jap J Clin Med 52,962-8   |
| BSF1                                | GABAergické neurony                                   | Epilepsie                                   | Motejlek a kol. (1994)<br>Biol Chem 269,15265-73    |
| Lidská dopamin $\beta$ -hydroxyláza | Neurony noradrenalinu                                 | Alzheimerova nemoc                          | Hoyle a kol. (1994)<br>Nerosci 14,2455-63           |
| Tyreoglobulin                       | Buňky štítné žlázy                                    | Hypotyreóza                                 | Pichon a kol. (1994)<br>Biochem J 298,537-41        |
| Serotonin 2-receptor                | Gliové buňky v serotoninergních projekčních oblastech | Neurodegenerativní choroby                  | Ding a kol. (1994) Mol Brain Res 20,181-91          |
| CD4 receptor                        | CD4 exprimující lymfocyty                             | AIDS                                        | Nakayama a kol. (1963)<br>Int Immunol 5,817-24      |
| Lidská cholin acetyl-transferáza    | Acetylcholinové neurony                               | Alzheimer.nemoc<br>Motoneuronová onemocnění | Li a kol. (1963)<br>Neurochem Res<br>18,271-5       |

Příklady provedení vynálezu

## Příklad 1

## Příprava homogenní kultury lidských dopaminergických neuronů

Gen thymidinkinázy (tk) viru Herpes simplex (HSV) a gen neo jsou operabilně vázány na promotor, který je aktivní pouze v neuronech obsahujících dopamin, například kontrolujících expresi tyrosinhydroxylázy (viz, např. Harrington a kol. (1987), Nucl. Acids Res. 15:2363). Konstrukt se potom klonuje do vhodného klonovacího místa retrovirálního vektoru a použije se k transfekci amfotropní retrovirové obalující buněčné linie (např.  $\psi$ -forma ("crip") (přehled viz Molecular Virology: A Practical Approach (ed. AJ Davison & RM Elliott), IRL Press, 1993).

Tkáň se oddělí z ventrálního středního mozku lidského embrya (přibližně 5-8týdenního těhotenství) a pěstuje v disociované kultuře. Dopaminergické prekurzorové buňky se navodí k replikaci použitím fibroblastového růstového faktoru (Mayer a kol. (1993), Neuroscience 56:389), epidermálního růstového faktoru (Reynolds & Weiss (1992), Science 255:1707) nebo onkogenní transdukci (Stringer a kol. (1994), Brain Res. 79:267). Krátce po očkování se kultivované buňky transdukují retrovirálně obalenými selekčními markery a kultury se ponechají expandovat. Když je vyprodukován dostatečný počet buněk, inkubují se kultury za podmínek vedoucích k zastavení dělení neuronů. Potom se kultury ošetří geneticinem, aby se eliminovaly netransdukované buňky a transdukované buňky neexprimující tyrosinhydroxylázu, ale ponechají se transdukované neurony obsahující tyrosinhydroxylázu.

## Příklad 2

## Příprava homogenní kultury lidských oligodendrocytů

Gen thymidinkinázy (tk) viru Herpes simplex (HSV) a gen neo jsou operabilně vázány na promotor, který je aktivní pouze v oligodendrocytech, řídící expresi oligodendrocytický specifického enzymu galaktocerebrosidázy. Konstrukt je virově obalen jako v příkladu 1. Alternativně lze použít virus, jako je adenovirus. Tkáň z embryonálního nebo dospělého mozku se oddělí a kultivuje v disociované kultuře. Pokud je nezbytné, indukuje se buněčná replikace (například použitím buněk z myši HS2ts6 (Noble a

kol. (1991), WO 91/13150), a krátce po očkování se buňky transdukují geny kódujícími pozitivní selekční marker vázaný například na promotor galaktocerebrosidázy, a negativní selekční marker vázaný na přirozeně aktivní promotor, jako je cytomegalovirus. Buněčná selekce se provede jako v příkladu 1 a poskytne čisté populace oligodendrocytů.

### Příklad 3

#### Příprava homogenní kultury v podstatě normálních lidských buněk ganglia dorzálního kořene exprimujících peptid příbuzný genu kalcitoninu

Neurony z ganglií dorzálního kořene (DRG) se mohou kultivovat *in vivo* při použití jako zdroje materiálu embryonální, neonatální nebo dospělé tkáně. Směsná buněčná populace se kultivuje například na podkladové vrstvě například předem připravených jiných než neuronálních buněk odolných proti neomycinu za vzniku trofického nosiče (Brenneman a kol. (1987), J. Cell Biol. 104:1603). DRG buňky se transfikují adenovirovou technologií genem neo vázaným operabilně na promotor exprese peptidu příbuzného genu kalcitoninu (CGRP). Po několika dnech pro umožnění aktivace promotoru a tím indukování exprese neo se DRG buňky, které aktivně neexprimují neo, zničí použitím neomycinu. Výsledkem je čistá populace diferenciovaných CGRP-pozitivních neuronů z lidských DRG pro použití *in vitro*.

### Příklad 4

#### Transdukce neurálních buněk

Primární buňky z fetální (z 8. týdnu těhotenství) lidské kůry, corpus striatum, hypothalamu, mezencefalonu, komplexního švu, prodloužené míchy a ventrálního rohu míchy byly odděleně očkovány do baněk potažených želatinou/poly-L-lyzinem. Prostředím byla směs DMEM/Ham's F12 (1:1) obsahující penicilin/streptomycin, L-glutamin (2mM) a modifikovaný zásobní roztok (Bottenstein a Sato, PNAS 76(1979)514-517; Romijn a kol., J. Neurophysiol. 40(1981)1132-1150), který obsahuje bazický fibroblastový růstový faktor (5 ng/ml).

Jakmile buňky přilnuly, byly do prostředí společně s 0,8 µg/ml polybrenu přidány retrovirální částice obsahující konstrukt

15.10.97

(tsA58) zahrnující marker odolnosti proti geneticinu (GR18<sup>r</sup>) vázaný na promotor SV40T. Po 1 hodině bylo kultivační medium nahrazeno čerstvým médiem. Po 5 dnech byl do kultivačního prostředí přidáván po dalších 10 dní geneticin (0,4 mg/ml), aby se vymýtily buňky, které nemají zabudovaný retrovirový vektor.

Po 15 až 20 dnech bylo možno zjistit ve všech oblastech uvedených výše shluky lidských prekurzorových neurálních buněk, které byly schopné replikace v prostředí obsahujícím FGF a které byly rovněž odolné vůči geneticinu. Všechny vykazovaly neuronální fenotyp (byly například pozitivní na neuronově specifickou enolázu).

Takto je možné transdukovat stabilní lidské neurální buňky z různých oblastí centrální nervové soustavy retrovirově obalenými genovými konstrukty. Za druhé může konstrukt zahrnovat selekční znak, jako je odolnost vůči geneticinu.

## P A T E N T O V É      N Á R O K Y

1. Štěp nebo tkáňový implantát obsahující buňky, které mají v sobě zabudovaný pozitivní selekční marker operabilně vázaný na tkáňově nebo buněčně specifický prvek exprese.

2. Způsob přípravy v podstatě čisté subpopulace buněk v y z n a -  
č u j í c í s e t í m, že zahrnuje kroky:

- (a) poskytnutí heterogenní buněčné populace *in vitro*;
- (b) transfekce, infekce, například retrovirovým vektorem, nebo transdukce heterogenní buněčné populace pozitivním selekčním markerem operabilně vázaným na tkáňově nebo buněčně specifický prvek exprese za vzniku transfikované nebo transformované heterogenní buněčné populace;
- (c) selektivní kultivace subpopulace buněk z heterogenní buněčné populace z kroku (b) na základě tkáňově nebo buněčně specifické exprese pozitivního selekčního markeru za vzniku v podstatě čisté subpopulace buněk.

3. Štěp nebo tkáňový implantát podle nároku 1 nebo způsob podle nároku 2, kde buňky dále obsahují negativní selekční marker, například produkt/produkty kódující gen účastnící se programované smrti buňky nebo apoptózy, například gen p53.

4. Vynález podle nároku 3, kde negativní selekční marker nepodléhá diferenciální expresi/aktivitě, například je exprimován přirozeně.

5. Vynález podle některého z předchozích nároků, kde buňky jsou neurální buňky, například neurony.

6. Vynález podle nároku 5, kde buňky jsou lidské neurální buňky, buňky štítné žlázy, CD4 exprimující T-lymfocyty nebo buňky ze specifické neneurální tkáně.

7. Vynález podle nároku 5 nebo 6, kde buňky jsou neurální buňky vybrané z dopaminergických, glutaminergických, katecholaminergických nebo GABAergických neuronů, neuronů noradrenalinu, gliových buněk ze serotoninergických projekčních

oblastí, acetylcholinových neuronů nebo gangliových buněk lidského dorzálního kmene exprimujících peptid příbuzný genu kalcitoninu.

8. Vynález podle některého z předchozích nároků, kde tkáňově nebo buněčně specifický prvek exprese je vybrán z:

(A) promotorů a/nebo zesilovačů transkripce, které jsou specificky účinné v:

- (i) dopaminergických, serotoninergických, GABAergických, cholinergních nebo peptidergických neuronech a jejich subpopulacích;
- (ii) Schwannových buňkách, oligodendrocytech, astrocytech, mikroglíích a jejich subpopulacích;
- (iii) konkrétních stadiích embryogeneze;
- (iv) specifické neneurální tkáni;
- (v) endokrinních žlázách, plicích, svalech, pohlavních žlázách, vnitřnostech, kosterní tkáni nebo jejich části nebo částech;
- (vi) epiteliálních, fibroblastových, tukových, žírných, mezenchymálních nebo parenchymálních buňkách,
- (vii) složkách krevního systému, například T-lymfocytech, B-lymfocytech a makrofágách; nebo

(B) promotorů/zesilovačů transkripce, které řídí transkripci genů pro:

- (i) neurotransmitterově specifické receptory;
- (ii) iontové kanály;
- (iii) receptory účastnící se hradlování iontových kanálů a
- (iv) cytokiny, růstové faktory a hormony;
- (v) jakoukoliv látku, která je specificky produkována a vylučována parakrinním, autokrinním nebo endokrinním způsobem.

9. Vynález podle nároku 8 (B), kde je promotor vybrán z promotorů pro tyrosinhydroxylázu, TSH receptor, BSF1,  $\beta$ -hydroxylázu lidského dopaminu, thyreoglobulin, serotonin-2-receptor, CD4 receptor a acetyltransferázu lidského cholinu.

10. Vynález podle některého z předchozích nároků, kde je pozitivní selekční marker vybrán z neomycinfosfotransferázy, hygromycinfosfotransferázy, xanthinguanidininfosforibosyl-transferázy, thymidinkinázy viru Herpes simplex typu I,

adeninfosforibosyltransferázy a hypoxanthinfosforibosyltransferázy.

11. Způsob podle některého z nároků 2 až 10, kde heterogenní buněčnou populací je primární buněčná kultura, například lidská - jako je fetální - primární neurální buněčná kultura, například obsahující neurální kmenové/prekurzorové buňky.

12. Buňky získatelné postupem podle některého z nároků 2 až 11.

13. Štěp nebo tkáňový implantát podle některého z nároků 1 a 3 až 10 nebo buňky podle nároku 12 pro použití při léčení, prevenci nebo diagnostice.

14. Štěp nebo tkáňový implantát podle některého z nároků 1 a 3 až 10 nebo buňky podle nároku 12 pro výrobu léčiva pro použití při léčení, prevenci nebo diagnostice.

15. Vynález podle nároku 13 nebo nároku 14, kde léčením je transplantační terapie.

16. Vynález podle nároku 15, kde transplantační terapie je pro léčení:

(i) Parkinsonovy nemoci a/nebo parkinsonismu, přičemž buňkami jsou dopaminergické neurony substantia nigra;

(ii) Huntingtonovy chorey, přičemž buňkami jsou neurální buňky z corpus striatum;

(iii) Alzheimerovy nemoci, přičemž buňkami jsou neurony obsahující acetylcholin, serotonin a/nebo noradrenalin, spojené s paleo- a neokortexem;

(iv) amyotropní laterální sklerózy, přičemž buňkami jsou motoneurony z míchy;

(v) sklerózy multiplex, přičemž buňkami jsou oligodendrocyty mozku.