

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
29. Juni 2006 (29.06.2006)

PCT

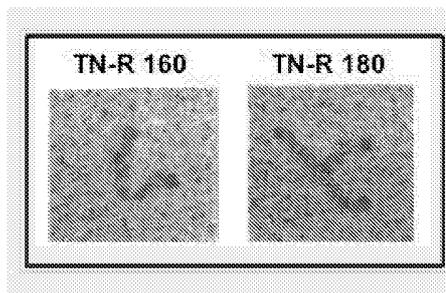
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2006/067094 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation:
C07K 14/47 (2006.01) A61K 51/10 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2005/056860
- (22) Internationales Anmeldedatum:
16. Dezember 2005 (16.12.2005)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
10 2004 062 420.8
20. Dezember 2004 (20.12.2004) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): RHEINISCHE-FRIEDRICH-WILHELMS-UNIVERSITÄT BONN [DE/DE]; Regina-pacis-weg 3, 53113 Bonn (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): PESHEVA, Penka [DE/DE]; Röckesbergstr. 6, 53227 Bonn (DE).
- (74) Anwälte: HELBING, Jörg usw.; Von Kreisler Selting Werner, Postfach 10 22 41, 50462 Köln (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR ISOLATING NEURAL CELLS USING TENASCIN-R COMPOUNDS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR ISOLIERUNG NEURALER ZELLEN MIT TENASCIN-R-VERBINDUNGEN



(57) Abstract: The invention relates to a method for isolating neural cells using tenascin-R compounds, to tenascin-R fragments that are especially useful for said method and to tenascin-R fusion proteins. The invention also relates to the recombinant production of said tenascin-R compounds, to a kit for carrying out said method and to the use of said method for producing highly purified neural cell populations, and to antibodies that are suitable for the detection and isolation of tenascin-R compounds.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Isolierung von neuralen Zellen unter Verwendung von Tenascin-R-Verbindungen, besonders für dieses Verfahren geeignete Tenascin-R-Fragmente und Tenascin-R-Fusionsproteine, die rekombinante Herstellung dieser Tenascin-R-Verbindungen, sowie einen Kit zur Durchführung dieses Verfahrens und die Verwendung des Verfahrens zur Herstellung hochreiner neuraler Zellpopulationen. Die Erfindung betrifft weiterhin Antikörper, die für die Detektion und Isolation von Tenascin-R-Verbindungen geeignet sind.

WO 2006/067094 A1



ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung in elektronischer Form getrennt veröffentlicht; auf Antrag vom Internationalen Büro erhältlich

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht
— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

052731wo/JH/PCH

Verfahren zur Isolierung neuraler Zellen mit Tenascin-R-Verbindungen

5 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Isolierung von neuralen Zellen unter Verwendung von Tenascin-R-Verbindungen, besonders für dieses Verfahren geeignete Tenascin-R-Fragmente und Tenascin-R-Fusionsproteine, die rekombinante Herstellung dieser Tenascin-R-Verbindungen, sowie einen Kit zur Durchführung dieses Verfahrens und die Verwendung des Verfahrens zur Herstellung
10 hochreiner neuraler Zellpopulationen. Die Erfindung betrifft weiterhin Antikörper, die für die Detektion und Isolation von Tenascin-R-Verbindungen geeignet sind.

Hintergrund der Erfindung

Bei der Kontaktaufnahme von Zellen mit dem sie umgebenden extrazellulären
15 Milieu kann es zu vielfältigen Antworten der Zelle kommen, die von Abstoßung und Vermeidung des Milieus auf der einen bis zur stabilen Zelladhäsion auf der anderen Seite reichen können. Das Wechselspiel zwischen Komponenten der extrazellulären Umgebung, der Extrazellulärmatrix, einerseits, und auf der Zelloberfläche vorhandenen Rezeptoren für solche Komponenten andererseits, bildet die
20 Grundlage für viele entwicklungsbiologische Prozesse, die für eine Zelle unter anderem durch Proliferations-, Migrations- oder Differenzierungsverhalten gekennzeichnet sind. Solch zelluläres Verhalten führt auf Organismenebene zur Musterbildung oder auf Gewebe- oder Organebene zur Neubildung als Folge einer Verletzung (Boudreau, N. J., Jones, P. L., *Biochem. J.* 339:481-488 (1999); Sobeih,
25 M. M., Corfas, G., *Int. J. Dev. Neurosci.* 148:971-84 (2002); Schmid, R. S., Anton, E. S., *Cereb. Cortex.* 13:219-24 (2003)). Im Zentralnervensystem (ZNS) korreliert die regulierte Expression von Extrazellulärmatrixkomponenten wie Chondroitin-sulfat-Proteoglykanen oder Proteinen der Tenascin-Familie mit biologischen
30 Prozessen, welche sowohl die Adhäsion und Migration von Neuronen, die Navigation von Axonen, die Synapsenbildung und -plastizität, die Wirkung von Wachstumsfaktoren und Cytokinen als auch das Überleben von Neuronen und die strukturelle Organisation der Extrazellulärmatrix umfassen (Dow, K. E., Wang, W., *Cell Mol. Life Sci.* 54:567-81 (1998); Wright, J. W. et al., *Peptides* 23:221-46 (2002); Grimpe, B., Silver, J., *Prog. Brain Res.* 137:333-49 (2002); Bosman, F. T., Stamenkovic, I.,
35 *J. Pathol.* 200:423-8 (2003)).

Tenascin-R (TN-R) (ehemals als J1-160/180, Janusin oder Restrictin bezeichnet) ist ein Mitglied der Tenascin-Familie von Extrazellulärmatrixproteinen, das exklusiv im ZNS von Vertebraten auftritt und dort von Oligodendrozyten und manchen Gruppen von Neuronen, i.e. Motoneurone und Interneurone, während späterer
5 Entwicklungsstadien und im erwachsenen Zustand exprimiert wird (Pesheva, P., Probstmeier, R., Prog. Neurobiol. 61:465-93 (2000); Scherberich, A. et al., J. Cell Sci. 117:571-81 (2004)). Das Protein tritt in zwei molekularen Formen auf, mit Molekulargewichten von 160 kD (TN-R 160) oder 180 kD (TN-R 180). TN-R findet sich im Gewebe primär in Assoziation mit Oligodendrozyten, myelinisierten Axonen,
10 perineuronalen Netzen von Moto- und Interneuronen, sowie dendriten- und synapsenreichen Regionen.

TN-R ist aus vier unterschiedlichen Domänenstrukturen aufgebaut (Fig. 1). Der N-Terminus, dessen Sequenz nur in Tenascin-Proteinen vorkommt, enthält ein Cystein-reiches Segment (Cys-rich), und wird gefolgt von viereinhalb EGF-
15 ähnlichen Segmenten (EGF-like) sowie 9 Fibronectin Typ III (FN III)-ähnlichen Domänen (von denen die 6. Domäne alternativ gespleisst werden kann). Den C-Terminus des TN-R Proteins bildet eine globuläre, Fibrinogen-ähnliche Domäne (FNG). Einzelne TN-R Polypeptidketten sind an ihren N-Termini über Disulfidbrücken miteinander verbunden und bilden so Homotrimere (TN-R 180) oder -dimere (TN-R
20 160), wobei letztere durch proteolytische Spaltung von TN-R 180 nahe des N-Terminus entstehen (Woodworth, A. et al., J. Biol. Chem. 279:10413-21 (2004)).

Die Funktionsweite von TN-R umfasst die molekulare Kontrolle neuraler Zelladhäsion, Migration und Differenzierung (von der Axonnavigation Fortsätze bildender Neuronen bis zur Reifung myelinbildender Oligodendrozyten) während
25 normaler entwicklungsbiologischer Vorgänge sowie regenerativer Prozesse nach Verletzung im erwachsenen Gehirn (Pesheva, P., Probstmeier, R., Prog. Neurobiol. 61:465-93 (2000); Chiquet-Ehrismann, R., Int. J. Biochem. Cell. Biol. 36:986-90 (2004)). TN-R wirkt u.a. als adhäsives oder antiadhäsives Molekül, als Differenzierungsfaktor für Oligodendrozyten, oder als "Stopmolekül" für wachsende
30 Axone. Diese Eigenschaften sind von den entsprechenden Rahmenbedingungen abhängig: dem jeweiligen Zelltyp, dem Vorhandensein zellulärer Rezeptoren und Signalkaskaden, der räumlichen Verteilung und der posttranslationalen Modifikation des TN-R Glykoproteins. Einige der zellulären Rezeptoren von TN-R, die identifiziert wurden (F3/F11, Disialoganglioside, Sulfatide), induzieren unterschiedliche zelluläre
35 Wirkmechanismen, die einerseits bei der Musterbildung während der Ontogenese,

andererseits bei regenerativen Prozessen von Bedeutung sind (Angelov, D. et al., J. Neurosci. 18:6218-29 (1998); Probstmeier, R. et al., J. Neurosci. Res. 60:21-36 (2000); Montag-Sallaz, M., Montag, D., Genes Brain Behav. 2:20-31 (2003); Saghatelian, A. et al., Nat. Neurosci. 7:347-56 (2004); Brenneke, F. et al., 5 Epilepsy Res. 58:133-43 (2004)). Die beiden wesentlichen Effekte von TN-R auf das Verhalten neuraler Zellen sind die Inhibition der Zelladhäsion und des Neuritenwachstums einerseits und die Förderung der Oligodendrozytenadhäsion und -differenzierung andererseits. Letztere erfolgt vermittelt durch Sulfatide und bewirkt letztendlich Oligodendrozytenmigration und Myelinisierung/Remyelinisierung. 10 Erstere kann entweder substratunabhängig erfolgen (vermittelt durch F3/F11 und andere, noch unbekannte Faktoren), oder Substrat/Integrin-abhängig (vermittelt durch Fibronektin und GD2/GD3). Die inhibitorische Wirkung von TN-R hat letztlich einen Einfluss auf die neurale Zellmigration, das räumlich koordinierte Axonwachstum und die Synaptogenese, oder sie trägt unter Verletzungs- 15 bedingungen zur Verhinderung der Axon-Regeneration und der Adhäsion aktivierter Mikroglia in einer TN-R-reichen Umgebung bei.

Einige neurale Rezeptoren und intrazelluläre Signalwege, die die Wirkung von TN-R in neuronalen und glialen Zellen vermitteln, sind bekannt, ebenso konnten molekulare Komponenten identifiziert werden, die an der Expression von TN-R 20 durch Oligodendrozyten und Motoneurone beteiligt sind (Tab. 1; Pesheva, P. et al., Prog. Brain Res. 132:103-14 (2001)).

Tab.1: Für TN-R identifizierte zelluläre Rezeptoren und Liganden der Extrazellulärmatrix. In der rechten Tabellenhälfte sind die für die jeweilige Interaktion relevanten Domänen von TN-R angegeben; CS GAG: Chondroitinsulfat-Glykosaminoglykane; EGF-L: EGF-ähnliche Segmente und Cystein-reiches Segment. 25

| Zelluläre Rezeptoren | Tenascin-R Bindungsdomäne | Liganden der Extrazellulärmatrix | Tenascin-R Bindungsdomäne |
|--------------------------------|---------------------------|----------------------------------|---|
| F3/F11 | EGF-L, FN2-3 | Fibronektin | CS GAG, unbekannt |
| β2 Untereinheit von Na-Kanälen | FN1-2, FN6-8 | Collagene | unbekannt |
| Neurofascin | FN2-5 | Tenascin-C | CS GAG, Ca ²⁺ -abhängig |
| CALEB | FNG | Tenascin-R | Unbekannt, Kation ²⁺ -abhängig |
| MAG | EGF-L, FNG | Lecticans | FN3-5, Ca ²⁺ -abhängig |
| Sulfatide | unbekannt | Phosphacan | EGF-L, Ca ²⁺ -abhängig |
| Ganglioside | Unbekannt | | |

Als aus mehreren Domänen aufgebautes Extrazellulärmatrixprotein erscheint eine Aufteilung der distinkten biologischen Funktionen auf distinkte Domänenbereiche 30 und/oder distinkte Glykostrukturen von TN-R nahe liegend (Fig. 1). Es ist bekannt,

dass aus adultem Nagergehirn aufgereinigte TN-R Proteine die Adhäsion und Fortsatzbildung von aus früh postnatalem Gehirn isolierten O4/Sulfatid-positiven Oligodendrozyten fördern (Fig. 3; Pesheva, P. et al., *J. Neurosci.* 17:4642-51 (1997)). Diese Vorgänge werden durch Sulfatide vermittelt, einer Gruppe von in der Zellmembran von Oligodendrozyten vorkommenden Glykolipiden. Eine wichtige Konsequenz der Interaktion von TN-R mit Sulfatid-exprimierenden Oligodendrozyten ist eine Stimulierung der Reifung dieser Zellen; i.e. die vermehrte Expression myelinspezifischer Proteine und Glykolipide, was eine Sulfatid-vermittelte Wirkungsweise des Differenzierungspotentials von TN-R auf Oligodendrozyten nahe legt (Fig. 4; Pesheva, P. et al., *J. Neurosci.* 17:4642-51 (1997)).

EP 0759987, US 5,635,360, US 5,681,931 und US 5,591,583 beschreiben humanes TN-R und dessen immunologischen Nachweis unter Verwendung von Antikörpern gegen ein Proteinfragment, welches den Nukleotiden 2686-3165 der cDNA-Sequenz und somit den FN III-Domänen 6 und 7 des humanen TN-R entspricht.

Die frühesten Stadien sich entwickelnder Gliazellen finden sich in Säugern im Rückenmark in ventralen Bereichen des Neuralrohrs, im Gehirn in den ventrikulären Zonen des Vorderhirns. In diesen Regionen proliferieren erste Vorläuferzellen von Oligodendrozyten, die durch eine einfache Morphologie und die Expression des Disialogangliosids GD3 und/oder von O4 Antigenen gekennzeichnet sind, und wandern in der Folgezeit in Bereiche der später entstehenden weißen Substanz ein (Miller, R. H. *Prog. Neurobiol.* 67:451-67 (2002); Noble, M. et al., *Dev. Biol.* 265:33-52 (2004); Liu, Y. Rao, M. S., *Biol. Cell.* 96:279-90 (2004)). Dort werden die Zellen postmitotisch und differenzieren in reife Oligodendrozyten mit einer komplexen Morphologie. Dieser Reifungsprozess korreliert mit der Expression myelinspezifischer Lipide (Sulfatide und Galactocerebroside) und Proteine (MBP, MAG, und PLP). Die Entstehung, das Überleben und die Differenzierung von Oligodendrozyten in myelinbildende Zellen werden über verschiedene Wachstumsfaktoren (bFGF, PDGF, CNTF, IGF-1, NT-3), Hormone und Extrazellulärmatrixmoleküle (Thyroidhormone, Retinolsäure, TN-R) reguliert (Dubois-Dalcq, M., Murray, K., *Pathol. Biol. (Paris)* 48:80-6 (2000); Kagawa, T. et al., *Microsc. Res. Tech.* 52:740-5 (2001); Noble, M. et al., *Dev. Neurosci.* 25:217-33 (2003)).

Da insbesondere für gliale Zellen (wie Oligodendrozyten und neurale Stammzellen) keine adäquaten Modellsysteme in Gestalt von Zelllinien vorhanden sind, muss zu ihrer Gewinnung sowohl in der Grundlagenforschung als auch im Rahmen potentieller diagnostischer/therapeutischer Anwendungsbereiche bisher auf relativ

zeitaufwendige und niedrig effiziente Anreicherungsverfahren von Primärzellen zurückgegriffen werden. Diese Verfahren ermöglichen außerdem oftmals nur die Herstellung angereicherter Mischzellpopulationen. Die bisherigen Verfahren zur Isolierung definierter Zellpopulationen nutzen unterschiedliche Techniken wie

5 Dichtegradientenzentrifugationen oder immunologische Verfahren (Fluorescence-activated cell sorting, biomagnetic cell sorting, Antikörper- und Komplement-vermittelte Zelltötung, Antikörper-Panning) (Luxembourg, A. T. et al., Nat. Biotechnol. 16:281-5 (1998); Uchida, N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 97:14720-5 (2000); Nistri, S. et al., Biol. Proced. Online 4:32-37 (2002); Nunes, M. C. et al.,

10 Nat. Med. 9:439-47 (2003); Vroemen, M., Weidner, N., J. Neurosci. Methods 124:135-43 (2003)). Solche Verfahren sind nicht sehr effizient und ergeben nur eine unvollständige Anreicherung (durch Dichtegradientenzentrifugationen sind z.B. nur Anreicherungen distinkter Zellpopulationen möglich), oder sie sind zeitintensiv und/oder hohen Zellverlusten begleitet (wie bei immunologischen Verfahren). Dies

15 gilt insbesondere für Oligodendrozyten, die bisher durch eine mehrwöchige Kultivierung gemischter glialer Kulturen (McCarthy, K. D., DeVellis, J., J. Cell Biol. 85:890-902 (1980); Kramer, E.M. et al., J. Biol. Chem. 274:29042-9 (1999); Testai, F. D. et al., J. Neurosci. Res. 75:66-74 (2004)) oder über mehrere Selektionsschritte mit Hilfe von Fluorescence-activated/biomagnetic cell sorting

20 oder Antikörper-Panning gewonnen werden (Scarlato, M. et al., J. Neurosci. Res. 59:430-5 (2000); Tang, D. G. et al., J. Cell Biol. 148:971-84 (2000); Diers-Fenger, M. et al., Glia 34:213-28 (2001); Crang, A. J. et al., Eur. J. Neurosci. 20:1445-60 (2004)).

25 **Zusammenfassung der Erfindung**

Die Isolierung definierter Zellpopulationen aus Primärgewebe, insbesondere solchen neuralen Ursprungs, ist nach den bislang bekannten Methoden aufwändig und zeitintensiv, und als Ergebnis werden häufig nur wenig angereicherte Zellmischpopulationen erhalten. Es wurde nun gefunden, dass gereinigte TN-R

30 Proteine die stabile Adhäsion von Oligodendrozyten unterschiedlicher Reifestadien unterstützen und auf neuronale und mikrogliale Zellen antiadhäsiv wirken. Dieses ermöglicht die Isolierung und Reinigung definierter Zellpopulationen aus neuralem Primärgewebe, insbesondere zur direkten selektiven Aufreinigung von Oligodendrozyten aus gemischten neuralen Zellpopulationen.

Es wird ein Verfahren zur Verfügung gestellt, das es ermöglicht, in einem einzigen Reinigungsschritt eine hochreine definierte Zellpopulation, insbesondere eine Oligodendrozytenpopulation, aus Primärgewebe neuralen Ursprungs zu isolieren.

Die Erfindung betrifft im Einzelnen

- 5 (1) ein Verfahren zur Isolierung und Reinigung von neuronalen Zellen aus neuralem Primärgewebe von Vertebraten, umfassend die Selektion der Zellen aus einer Einzelzellsuspension mittels einer Tenascin-R-haltigen Sonde (nachfolgend auch "Tenascin-R-Sonde"), welche Tenascin-R-Verbindungen ausgewählt aus nativem Tenascin-R (nachfolgend kurz "TN-R") sowie Homologen und Fragmenten desselben
10 und Fusionsproteine derartiger Verbindungen umfasst;
- (2) eine bevorzugte Ausführungsform des vorstehend definierten Verfahrens (1), wobei
- (i) das native Tenascin-R humanes Tenascin-R ist und/oder die Aminosäuresequenz SEQ ID NO:1 besitzt oder eine Substitutions-, Deletions- und/oder
15 Additionsmutante derselben ist; und/oder
- (ii) das Tenascin-R-Fragment den C-Terminus von nativem Tenascin-R oder eine Substitutions-, Deletions- und/oder Additionsmutante desselben umfasst, besonders denjenigen Bereich, der durch die Nukleotide 3940-4155 der SEQ ID NO:1 kodiert wird, insbesondere einen derjenigen Bereiche, die durch die
20 Nukleotide 2926-4155, 3439-4155, 3487-4155 oder 3940-4155 von humanem TN-R der SEQ ID NO:1 kodiert werden; und/oder
- (iii) das Tenascin-R-Fragment die Aminosäurereste 1287 bis 1358 der SEQ ID NO:2, bevorzugt eine oder mehrere der Teilsequenzen des humanen TN-R ausgewählt aus den Aminosäuren 1287-1358, 1120-1358, 1136-1358 oder 949-
25 1358 in SEQ ID NO:2 oder eine Substitutions-, Deletions- und/oder Additionsmutante derselben umfasst; und/oder
- (iv) das Tenascin-R-Fusionsprotein eine Tenascin-R-Komponente, umfassend natives Tenascin-R, ein Tenascin-R-Fragment oder eine Tenascin-R-Mutante, insbesondere wie vorstehend unter (i) bis
30 (iii) beschrieben, und eine funktionelle Komponente, umfassend weitere funktionelle Peptide oder Proteine, aufweist oder aus zwei oder mehr, bevorzugt zwei oder drei funktionellen Tenascin-R-Komponenten wie vorstehend definiert zusammengesetzt ist;
- (3) eine bevorzugte Ausführungsform des vorstehend definierten Verfahrens (1)
35 oder (2), wobei

- (i) die Tenascin-R-Sonde durch nichtkovalente Wechselwirkungen (wie Wechselwirkung mit TN-R-spezifischen Antikörpern etc.) oder durch eine andere adäquate Kupplungstechnik, welche die Spezifität der Tenascin-R-Sonde nicht verändert (wie kovalente Vernetzung etc.), an ein Trägermaterial gebunden ist,
5 und/oder
- (ii) die Einzelzellsuspension mit der Tenascin-R-Sonde in Kontakt gebracht wird, so dass in der Einzelzellsuspension vorhandene Tenascin-R-bindende Zellen an die Sonde gebunden werden; und/oder
- (iii) durch spezifische Bindung neuraler Stammzellen aus der Einzelzellsuspension
10 an die Tenascin-R-Sonde eine Isolierung dieser Zellen aus der Zellkultur erfolgt, die nicht gebundenen Zellen entfernt werden und optional anschließend die über die Tenascin-R-Sonde an das Trägermaterial gebundenen Zellen durch Trypsinierung, Inkubation mit Accutase® oder ein anderes adäquates Verfahren vom Trägermaterial abgelöst werden; und/oder
- (iv) die gebundenen Zellen durch immunologische Methoden nachgewiesen werden;
15 und/oder
- (v) das Verfahren *in vitro* erfolgt;
- (4) ein Tenascin-R-Fragment oder Tenascin-R-Fusionsprotein, welches wie vorstehend unter (1) oder (2) definiert ist und bevorzugt eine Aminosäuresequenz
20 ausgewählt aus den Aminosäuren 1287-1358, 1120-1358, 1136-1358 oder 949-1358 in SEQ ID NO:2 besitzt;
- (5) eine DNA, die für ein Tenascin-R-Fragment oder TN-R-Fusionsprotein nach (4) kodiert;
- (6) einen Vektor, der eine DNA nach (5) umfasst;
- (7) einen Wirtsorganismus, der mit einem Vektor nach (6) transformiert/transfiziert
25 ist und/oder eine DNA nach (5) aufweist;
- (8) ein Verfahren zur Herstellung eines Tenascin-R-Fragments oder TN-R-Fusionsproteins nach (4), umfassend das Kultivieren des Wirtsorganismus nach (7);
- (9) einen Antikörper, der durch Immunisierung eines geeigneten Wirtsorganismus
30 mit Tenascin-R von wenigstens zwei unterschiedlichen Spezies, insbesondere mit TN-R von wenigstens zwei unterschiedlichen Vertebraten erhältlich ist, und/oder welcher an TN-R von wenigstens zwei unterschiedlichen Spezies, insbesondere von wenigstens zwei unterschiedlichen Vertebraten bindet, d.h. Kreuzreaktivität mit unterschiedlichen Vertebraten-TN-R zeigt;

- (10) eine bevorzugte Ausführungsform des Antikörpers nach (9), wobei der Antikörper ein monoklonaler Antikörper ist;
- (11) eine Zelllinie, die den Antikörper nach (10) produziert;
- (12) einen Kit zur Isolierung und Reinigung von neuronalen Zellen, insbesondere von Oligodendrozyten, nach einem oder mehreren der Verfahren (1) und (2), insbesondere enthaltend
- 5 (i) eine wie in (1) oder (2) definierte Tenascin-R-Sonde, und/oder
(ii) einen Vektor, der für eine solche Tenascin-R-Sonde kodiert, und/oder
(iii) eine Stammkultur einer Zelllinie, die dazu geeignet ist, die wie in (1) oder (2)
- 10 definierte Tenascin-R-Sonde zu exprimieren, vorzugsweise rekombinant zu exprimieren;
- (13) die Verwendung der Tenascin-R-Sonde nach (1) oder (2) zur Gewinnung von neuronalen Zellen, insbesondere von Oligodendrozyten, für die Anzucht differenzierter Zellen, insbesondere neuronaler Zellen, in neurobiologischen und zellphysiologischen
- 15 Untersuchungen, in der biologischen und klinischen Forschung und für diagnostische und therapeutische Verfahren *in vitro* und *in vivo*, insbesondere für die Herstellung eines Medikaments zur Zelltherapie und zur Therapie von neurodegenerativen Krankheiten, die mit einem Verlust von Oligodendrozyten oder Myelin einhergehen, insbesondere Multipler Sklerose und periventrikulärer
- 20 Leukomalazie (PVL); und
- (14) die Verwendung des Antikörpers nach (9) oder (10)
- (i) zum immunochemischen Nachweis von TN-R;
- (ii) zur Hemmung der Wirkung von TN-R;
- (iii) zur Beeinflussung der Neuralentwicklung und
- 25 (iv) zur Herstellung von Medikamenten zur Therapie und Prophylaxe traumatischer Nervenläsionen und von Medikamenten zur gezielten Beeinflussung der Neuralentwicklung;
- (15) ein Verfahren zur Therapie und Prophylaxe von traumatischen Nervenläsionen oder zur gezielten Beeinflussung der Neuralentwicklung, umfassend die
- 30 Verabreichung einer pharmakologisch ausreichenden Menge des Antikörpers nach (9) oder (10) an einen menschlichen oder tierischen Patienten, der einer solchen Behandlung bedarf;
- (16) ein Verfahren zur Zelltherapie oder zur Therapie von neurodegenerativen Krankheiten, die mit einem Verlust von Oligodendrozyten oder Myelin einhergehen,
- 35 insbesondere von Multipler Sklerose und periventrikulärer Leukomalazie (PVL),

umfassend die Gabe einer Tenascin-R-Sonde wie in (1) oder (2) definiert, bevorzugt eines Tenascin-R-Fragments oder Tenascin-R-Fusionsproteins wie in (4) definiert, an einen menschlichen oder tierischen Patienten; und

5 (17) ein Verfahren zur Herstellung von Oligodendrozyten aus isolierten Stammzellen *in vitro* durch Inkubation der Stammzellen in Anwesenheit einer Tenascin-R-Sonde wie in (1) oder (2) definiert, bevorzugt eines Tenascin-R-Fragments oder Tenascin-R-Fusionsproteins wie in (4) definiert.

Kurzbeschreibung der Figuren

10 Fig. 1: Aufbau von TN-R. Die Position der alternativ gespleißten FN III-ähnlichen Domäne ist als R1 angegeben. Die eingefügte Teilabbildung zeigt elektronenmikroskopische Aufnahmen rotationsbedampfter TN-R Moleküle, die aus Mausgehirn gereinigt wurden. Einzelne Polypeptidketten sind an ihren N-terminalen Enden über Disulfidbrücken miteinander verbunden, was zur Ausbildung von Dimeren (TN-R
15 160) oder Trimeren (TN-R 180) führt.

Fig. 2: CLUSTAL W (1.82)-Alignment der bekannten Aminosäuresequenzen von Tenascin-R aus verschiedenen Vertebraten. "*" kennzeichnet identische Aminosäuren, ":" kennzeichnet konservativen Aminosäureaustausch, "." kennzeichnet semi-konservativen Aminosäureaustausch. Gut zu erkennen ist die hohe phylogenetische Konservierung des die FNG-Domäne enthaltenden C-Terminus.
20

Fig. 3: Einfluss verschiedener polarer Glykolipide und O4-Antikörper auf die Zelladhäsion durch TN-R. TN-R Substrate wurden in der Abwesenheit (- GL) oder Anwesenheit von Sulfatiden (+ Sulf), Galactocerebrosiden (+ GalC), Monosialogangliosiden (+ GM1) und Sphingosin (+ Sph) vorinkubiert. Oligodendrozyten (OL,
25 linke Bildhälfte) oder Erythrozyten (RBC, rechte Bildhälfte) wurden in Ab- oder Anwesenheit von O4 Antikörpern (+ O4 Ab) auf die entsprechend behandelten Substrate ausgesät. Die Zahl adhärenter Zellen nach einstündiger Inkubationszeit auf unbehandelten TN-R-Substraten wurde als 100% gesetzt.

Fig. 4: Beeinflussung der Differenzierung von Oligodendrozyten durch TN-R. Aus
30 frühpostnatalem Mausgehirn aufgereinigte Oligodendrozyten wurden auf PLL (Poly-L-Lysin)-Substraten in der Abwesenheit (- TN-R) oder Anwesenheit (+ TN-R) von substratgebundenen TN-R Proteinen (gereinigt aus humanem oder Rattengehirn) ausgesät. Die Expression myelinspezifischer Proteine (MBP) wurde nach 2 Tagen in Kultur mit Hilfe indirekter Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen.

Fig. 5: Charakterisierung der Spezifität und funktionellen Aktivität der monoklonalen Antikörper R1, R2, R4, R5 und R6.

A) ELISA-Assay zur Analyse der Kreuzreaktivitäten von R4 und R6 mit TN-R Proteinen verschiedener Vertebratenklassen. Mikrotiterplatten wurden mit Gehirnextrakten verschiedener Vertebraten (40 µg/ml) beschichtet und die Bindung der Antikörper R4 und R6 (nach 2 Stunden Inkubation bei 37°C) mit Peroxidasegekoppelten anti-Maus IgG Antikörpern nachgewiesen. Maximale Bindung für den jeweiligen Antikörper wurde als 100% gesetzt.

B) Westernblot-Analyse von Gehirnextrakten verschiedener Vertebraten mit R6 Antikörper. Gehirnextrakte (50 µg Gesamtprotein/Tasche) aus Hai (Squalus), Goldfisch (Carassius), Salamander (Salamandra), Ringelnatter (Natrix), griechischer Landschildkröte (Testudo), Taube (Columba), Igel (Erinaceus), Maus (Mus) und Mensch (Homo) wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrozellulosefilter transferiert und mit R6 Antikörper inkubiert. Immunreaktive Proteinbanden wurden durch Inkubation mit Peroxidasegekoppelten anti-Maus IgG Antikörpern nachgewiesen. Immunaffinitätsgereinigtes TN-R aus Mausgehirn (m. TN-R) mit den charakteristischen Proteinbanden von 160 und 180 kD diente als Referenz.

C) Einfluss von R4 und R6 Antikörpern auf die TN-R-vermittelte Inhibition der neuronalen Zelladhäsion und Neuritenbildung (Bsp. 6). Kleinhirnneurone aus 8 Tage alten Mäusen wurden auf gemischte Substrate (im Verhältnis 1:1) bestehend aus Laminin und Rinderserumalbumin (BSA, Kontrollsubstrat) oder Laminin und humanem TN-R (h. TN-R) ausgesät. Die Substrate wurden vor dem Ausplattieren der Zellen in Ab- (- Ab) oder Anwesenheit von R4 oder R6 Antikörpern (+ R4/R6) inkubiert. Zelladhäsion und Neuritenbildung wurden 2 Tage nach Kulturnahme lichtmikroskopisch ausgewertet.

D) Langzeit-Adhäsion von Maus-Kleinhirnneuronen auf Poly-L-Lysin(PLL)-TN-R-Substrat unter Einfluss der monoklonalen Antikörper. Substrat mit BSA (Kontrolle) oder TN-R aus Mensch wurden in Ab- (-Ab) oder Anwesenheit von TN-R-Antikörpern präinkubiert und anschließend die Neurone ausplattiert. Die Zahl der Neurone, die nach 24 h am Kontroll-Substrat hafteten, wurde als 100 % gesetzt.

E) Westernblot von R4 mit verschiedenen Geweben und Tenascinen. Getestet wurden Hirn, Herz, Leber, Niere und Lunge adulter Mäuse, Haut und Hautfibroblasten-konditioniertes Medium (CM) neonataler Mäuse, TN-R 160 aus adultem Maushirn und TN-C (br. TN-C) aus frühem postnatalen Maushirn. pTN-C

Ab: polyklonaler Antikörper gegen TN-C; R4 MAb: monoklonaler Antikörper gegen TN-R.

Fig. 6: Aus adultem Gehirn verschiedener Vertebratenspezies immunaffinitäts-gereinigte TN-R Proteine. Spur 1 (Hai), Spur 2 (Karpfen), Spur 3 (Huhn), Spur 4 (Maus), Spur 5 (Ratte), Spur 6 (Mensch). TN-R ist nachweisbar als Polypeptid mit den Hauptformen von 220 kD (im Haigehirn), 170 kD (im Karpfengehirn) oder 160 kD und 180 kD (im Gehirn höherer Vertebraten).

Fig. 7: Selektion von Oligodendrozyten aus Einzelzellsuspensionen (aus Gehirngewebe von 2 (P2), 5 (P5) und 8 (P8) Tage alten Mäusen) auf substratgebundene TN-R Proteine isoliert aus dem Gehirn verschiedener Vertebraten (Karpfen, Huhn (ch), Ratte, Mensch) unterschiedlicher Vertebratenklassen (Fisch, Vogel, Säuger). An diese Substrate adhärierende Zellen wurden nach einem Tag in Kultur mit Toluidinblau gefärbt (obere Zeilen). Adhärente Zellen konnten mit Hilfe indirekter Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen myelinspezifische Glykolipide (GalC) nach 2 (P8) bis 5 Tagen (P2) in Kultur als Oligodendrozyten identifiziert werden (untere Zeile; Bildausschnitt korrespondiert nicht mit dem Bildausschnitt der oberen Zeilen). 99±1% der isolierten Zellen waren GalC-positiv.

Fig. 8: Fähigkeit von TN-R verschiedener Arten, die Oligodendrozyten-Differenzierung hervorzurufen.

A) MBP-Expression durch Maus-Oligodendrozyten nach 48 h Kultur auf PLL-TN-R-Substrat.

B) Autokrine Regulation der TN-R-Sekretion durch kultivierte Maus-Oligodendrozyten. Die TN-R-Sekretion durch Oligodendrozyten auf PLL-TN-R wurde mit derjenigen von Oligodendrozyten auf PLL-BSA verglichen und als Vielfaches der Proteinsekretion (Protein increase) ausgedrückt.

Sequenzprotokoll – freier Text

| SEQ ID NO: | Beschreibung |
|------------|--------------|
| 1 & 2 | TN-R |
| 3-14 | primer |

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

Die Erfindung betrifft eine Methode zur Isolierung hochreiner Zellpopulationen aus neuralem Primärgewebe in einem Einstufenverfahren mit Hilfe nativer Tenascin-R-

Proteine oder TN-R-Fragmente von Vertebraten, bevorzugt von Fischen, Amphibien, Reptilien, Vögeln und Säugetieren, besonders bevorzugt von Hai, Karpfen, Huhn, Nagern einschließlich Maus und Ratte, Rind, Schwein und Mensch, ganz besonders bevorzugt aus Nagern und Mensch, durch selektive Substratadhäsion.

- 5 Phylogenetische Studien zur Funktion von Tenascin-R im Nervensystem von Vertebraten zeigen als stammesgeschichtlich hoch konservierte Funktion von Tenascin-R-Proteinen die Unterstützung der Adhäsion und Fortsatzbildung von Oligodendrozyten (Fig. 3 und 7). Die vorliegende Erfindung zeigt, dass diese Eigenschaft des gesamten Tenascin-R-Proteins auch auf distinkten rekombinanten
10 Fragmenten des humanen Tenascin-R Proteins lokalisierbar ist.

"Tenascin-R-Sonde" bedeutet im Kontext der vorliegenden Erfindung ein Protein, das natives Tenascin-R, welches *in vivo* und *in vitro* durch Oligodendrozyten erkannt und gebunden wird, und/oder weitere Tenascin-R-Verbindungen einschließlich Tenascin-R-Homologe und Tenascin-R-Fragmente, die ebenfalls mit
15 hoher Sensitivität und Spezifität *in vivo* und *in vitro* durch Oligodendrozyten und/oder durch andere neurale Zellen aus Primärgewebe gebunden werden, enthalten kann, wobei "Tenascin-R-Verbindungen" die an anderer Stelle definierte Bedeutung hat. Dies schließt auch Fusionsproteine aus mehreren Tenascin-R-Verbindungen ein, bevorzugt aus zwei oder drei Tenascin-R-Verbindungen. Die
20 Bestandteile dieser Fusionsproteine können direkt oder mittels eines (flexiblen) Linkerpeptids miteinander verknüpft sein. Bevorzugt sind Fusionsproteine aus TN-R-Fragmenten. Besonders bevorzugt enthält die Tenascin-R-Sonde humanes Tenascin-R und dessen Homologe und Fragmente, ganz besonders bevorzugt die Teilsequenz der humanen TN-R, welche die Aminosäurereste 1287-1358 der SEQ ID
25 NO:2 umfasst. Die Tenascin-R-Sonde kann neben ihren TN-R-Anteilen auch Nicht-TN-R-Anteile besitzen, welche die Stabilität des TN-R-Anteils gewährleisten und/oder die Immobilisierbarkeit und Kopplungsfähigkeit an andere Moleküle erhalten oder erhöhen. Insbesondere ist eine erfindungsgemäße Tenascin-R-Sonde rekombinant hergestellt.

- 30 "Tenascin-R-Verbindungen" sind erfindungsgemäß Proteine oder Peptide, welche entweder native TN-R, substantiell identisch zu nativen TN-R, Fragmente von nativen TN-R oder deren substantiell identische Homologe sind.

"Primärgewebe" ist ein biologisches Gewebe, das direkt aus einem Organismus entnommen und ohne weitere Veränderung seines genetischen Materials verwendet

wird. "Primärzellen" sind aus Primärgewebe stammende Zellen. Primärzellen sind gegenüber Zelllinien vorteilhaft, weil sie aufgrund ihrer Herkunft den Zellen im intakten Organismus strukturell und funktionell am nächsten stehen.

"Isoliert" bedeutet im Falle eines Proteins, dass es von anderen Proteinen, mit denen es normalerweise in demjenigen Organismus assoziiert ist, in welchem es natürlicherweise vorkommt, getrennt oder gereinigt wurde. Dies umfasst biochemisch gereinigte Proteine, rekombinant hergestellte Proteine und auf chemischem Wege synthetisierte Proteine. Die Definition gilt übertragen auch für Nucleinsäuren, insbesondere DNA, und Peptide.

10 "Nativ" wird gleichbedeutend mit "natürlich" bzw. "natürlich vorkommend" verwendet.

Für die erfindungsgemäße "rekombinante Herstellung" werden in der Fachwelt übliche Methoden zur rekombinanten Herstellung eukaryotischer Proteine verwendet, insbesondere die Expression als Fusionsprotein in eukaryotischen Zellen, ganz
15 besonders bevorzugt die Expression als Fusionsprotein mit Polyhistidinschwanz und/oder Xpress-Tag. Des Weiteren bevorzugt ist die Verwendung von DNA, die für das entsprechende Protein kodiert.

Nucleinsäuresequenzen, insbesondere DNA-Sequenzen, die für erfindungsgemäße Proteine oder Peptide kodieren, sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung
20 entweder identisch oder substantiell identisch zur nativen oder zu der ihr zugrundeliegenden künstlichen erfindungsgemäßen Sequenz. Wenn im Rahmen dieser Erfindung eine spezielle Nucleinsäuresequenz genannt wird, so sind damit diese Sequenz selbst und die zu ihr substantiell identischen Sequenzen erfasst. "Substantiell identisch" bedeutet hierbei, dass nur ein Austausch von Basen in der
25 Sequenz im Rahmen des degenerierten Nucleinsäure-Codes erfolgt ist, dass also dadurch die Codons innerhalb kodierender Sequenzen der substantiell identischen Nucleinsäure lediglich gegenüber dem ursprünglichen Molekül in einer Weise verändert sind, welche nicht zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz des Translationsprodukts führt (in der Regel Austausch des Codons durch ein anderes
30 Codon seiner Codon-Familie). Bevorzugt sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung die Sequenzen, welche im Sequenzprotokoll benannt werden, und deren erfindungsgemäße Fragmente.

Proteinsequenzen und Peptidsequenzen können im Rahmen der vorliegenden Erfindung durch Substitution von Aminosäuren modifiziert werden. Bevorzugt sind

solche Substitutionen, bei denen die Funktion und/oder Konformation des Proteins oder Peptids erhalten bleibt, besonders bevorzugt jene Substitutionen, bei denen eine oder mehrere Aminosäuren durch Aminosäuren ersetzt werden, die ähnliche chemische Eigenschaften besitzen, z.B. Valin durch Alanin ("konservativer Aminosäureaustausch"). Der Anteil der substituierten Aminosäuren im Vergleich zum nativen Protein oder – falls es sich nicht um ein natives Protein handelt – zur Ausgangssequenz beträgt bevorzugt 0-30% (bezogen auf die Zahl der Aminosäuren in der Sequenz), besonders bevorzugt 0-15%, ganz besonders bevorzugt 0-5%.

Nukleinsäuresequenzen und Aminosäuresequenzen können als Volllänge-Sequenzen oder als Additions- oder Deletionsprodukte dieser Volllängesequenzen zur Durchführung der Erfindung eingesetzt werden. Bei den Aminosäuresequenzen umfassen die Additionsprodukte auch Fusionsproteine, außerdem Aminosäuresequenzen, die durch Addition von 1-100, bevorzugt 1-30, ganz besonders bevorzugt 1-10 Aminosäuren entstehen. Die addierten Aminosäuren können dabei einzeln oder in zusammenhängenden Abschnitten von 2 oder mehr miteinander verknüpften Aminosäuren ein- oder angefügt werden. Die Addition kann am N- oder C-Terminus oder innerhalb der ursprünglichen Sequenz stattfinden. Es sind mehrere Additionen in einer Sequenz zulässig, wobei eine einzelne Addition bevorzugt ist, besonders bevorzugt eine Addition am C- oder N-Terminus.

Die Deletionsprodukte der Volllängen-Aminosäuresequenzen entstehen – falls nicht für spezielle Sequenzen anders angegeben - durch Deletion von 1-100, bevorzugt 1-20, ganz besonders bevorzugt 1-10 Aminosäuren. Die deletierten Aminosäuren können dabei einzeln oder in zusammenhängenden Abschnitten von 2 oder mehr miteinander verknüpften Aminosäuren entfernt werden. Die Deletion kann am N- oder C-Terminus oder innerhalb der ursprünglichen Sequenz stattfinden. Es sind mehrere Deletionen in einer Sequenz zulässig, wobei eine einzelne Deletion bevorzugt ist, besonders bevorzugt eine Deletion am C- oder N-Terminus.

Die zulässigen Deletionen und Additionen in den erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen haben den Umfang und die Ausprägung, welche der zulässigen Aminosäuredeletionen bzw.- additionen entsprechen. Über die Deletion und Addition ganzer Codons hinaus ist auch die Addition oder Deletion von einzelnen oder paarweisen Basen möglich.

Ein Fragment einer Nukleinsäure oder eines Proteins ist ein Teil von dessen Sequenz, das kürzer als Volllänge ist, jedoch noch einen minimal zur Hybridisierung

bzw. spezifischen Bindung erforderlichen Sequenzabschnitt enthält. Im Falle einer Nukleinsäure ist dieser Sequenzabschnitt noch in der Lage, mit der nativen Nukleinsäure unter stringenten Bedingungen zu hybridisieren und umfasst vorzugsweise mindestens 15 Nukleotide, besonders bevorzugt mindestens 25 Nukleotide. Im Falle eines Peptids ist dieser Sequenzabschnitt ausreichend, um eine Bindung eines für einen Abschnitt des nativen Proteins spezifischen Antikörpers oder einer Zelle, welche an TN-R oder ein TN-R-Fragment bindet, zu ermöglichen. Die Peptidlänge beträgt vorzugsweise wenigstens 5 Aminosäuren, besonders bevorzugt wenigstens 10 Aminosäuren, ganz besonders bevorzugt wenigstens 20 Aminosäuren.

Ein "Fusionsprotein" im Kontext der vorliegenden Erfindung umfasst mindestens eine erfindungsgemäße Tenascin-R-Verbindung, die mit mindestens einem zweiten Protein oder Peptid verknüpft ist. Dieses zweite Protein oder Peptid ist bevorzugt ein Selektions- oder Markerprotein, ein Protein, welches der Bindung des Fusionsproteins an eine Oberfläche dient, oder eine Tenascin-R-Verbindung. Bevorzugt sind Fusionsproteine aus nativem Tenascin-R und weiteren funktionellen Proteinen und Peptiden, und Fusionsproteine aus zwei oder mehr, besonders bevorzugt zwei oder drei Tenascin-R-Fragmenten. Die Nukleinsäuresequenzen, die in einem Vektor oder einem transformierten Wirtsorganismus für die einzelnen Teile des Fusionsproteins kodieren, sind in einer Weise miteinander verknüpft, welche die Expression unter der Kontrolle eines einzigen Promoters erlaubt. Die Aminosäuresequenzen der einzelnen funktionalen Teile des Fusionsproteins sind dabei entweder direkt oder mit einem Linker verknüpft. Der Linker ist 1-30 Aminosäuren lang, bevorzugt 10-20 Aminosäuren.

"Neurodegenerative Erkrankungen" sind Erkrankungen des Nervensystems, die mit dem Absterben von neuronalen und/oder makroglialen Zellen aufgrund von Beeinträchtigungen ihrer funktionellen Integrität assoziiert sind. Solche Zellschädigungen und -verluste führen zu Ausfall oder Störung der Funktionen der betroffenen Regionen des Nervensystems und/oder der von diesen Regionen gesteuerten Körperteilen.

Die durch das Verfahren nach Ausführungsform (1) und (2) isolierten Zellen sind bevorzugt gliale Zellen, besonders bevorzugt Oligodendrozyten.

Die Tenascin-R-Sonde zur Verwendung in Ausführungsform (1) umfasst entweder ein natives TN-R Protein oder ein TN-R Proteinfragment. Das native TN-R stammt

dabei bevorzugt aus Hirngewebe von Fisch (Hai, Karpfen, Goldfisch, Forelle etc.), Amphibien (Salamander, Frosch, etc.), Reptilien (griechische Landschildkröte, Ringelnatter, etc.), Vögeln (Huhn, Taube etc.) und Säugern (Igel, Kaninchen, Nager, Schwein, Rind, Mensch), besonders von Säugetieren, insbesondere aus Nager, Schwein, Rind oder Mensch. Das native TN-R Protein wird bevorzugt rekombinant hergestellt. Die TN-R-Proteinfragmente sind bevorzugt rekombinant hergestellt und/oder humane TN-R-Fragmente. Eine bevorzugte Quelle für die entsprechende DNA-Sequenz ist im letztgenannten Fall die humane Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y. Die Expression der Fragmente erfolgt bevorzugt nach Transformation von humanen Flp-In 293-Zellen (Invitrogen) mit den entsprechenden DNA-Sequenzen (Bsp. 2).

Die TN-R-Sonde kann in Ausführungsform (1) zudem weitere funktionelle Protein- oder Peptidsequenzen enthalten und/oder an einen Träger gekoppelt sein.

Ein bevorzugter Aspekt der Ausführungsform (1) und (2) ist die Verwendung des C-Terminus von TN-R in der Tenascin-R-Sonde, insbesondere derjenigen Bereiche, welche die FN III-Domänen 7 und 8 sowie die FNG-Domäne repräsentieren. Diese Bereiche können entweder einzeln oder miteinander verknüpft verwendet werden, wobei die Gegenwart der FNG-Domäne in der Sonde bevorzugt ist. Besonders bevorzugt ist die Verwendung desjenigen Bereichs des humanen TN-R, der die FNG-Domäne umfasst, also durch die Nukleotide 3940-4155 der SEQ ID NO:1 kodiert wird; ganz besonders die Verwendung derjenigen Bereiche des humanen TN-R, welche durch bp 2926-4155 (FN III 7,8 + FNG-Domäne; Bsp. 2: H-TNR-6), und/oder durch bp 3439-4155 (FNG-Domäne; Bsp. 2: H-TNR-3) bp 3940-4155 und/oder bp 3487-4155 in SEQ ID NO:1 kodiert werden.

Demzufolge umfassen DNA-Fragmente der Ausführungsform (5) bevorzugt bp 3940-4155, 2926-4155, bp 3487-4155 und/oder bp 3439-4155 der SEQ ID NO:1.

Bevorzugte Tenascin-R-Fragmente für den Einsatz in einer Tenascin-R-Sonde sind somit Fragmente, die den C-Terminus des TN-R enthalten. Der C-Terminus des TN-R Proteins bildet eine Fibrinogen-ähnlichen Domäne, in dem vier Cysteinreste inklusive der umgebenden vier bis fünf Aminosäuren bei höheren Vertebraten in Position und Zusammensetzung hochgradig konserviert sind. Dieser Bereich, bevorzugt der Bereich, welcher in humanem TN-R die Aminosäuren 1287-1358 umfasst, ganz besonders der Bereich, der den Aminosäuren 1287-1358, 1120-1358, 1136-1358 (Carnemolla, B. et al., J. Biol. Chem. 271:8157-8160 (1996))

oder 949-1358 in SEQ ID NO:2 entspricht, ist für den Einsatz als Tenascin-R-Fragment in der TN-R-Sonde zur Adsorption von Oligodendrozyten bevorzugt. Dieser Bereich stellt darüberhinaus die bevorzugte Sequenz der Tenascin-R-Fragmente nach Ausführungsform (4) dar. Besonders bevorzugt sind als TN-R-Fragment Peptide mit der Sequenz der Aminosäurereste 949-1358 oder 1120-1358 von SEQ ID NO:1.

Die phylogenetisch konservierte Eigenschaft von TN-R Proteinen, als adhäsives Substrat für Oligodendrozyten wirken zu können, wird auf molekularer Ebene durch eine hohe Konservierung der Aminosäuresequenz zwischen verschiedenen Vertebratenspezies reflektiert: die humane TN-R Sequenz weist Homologien von 93% (zu Ratte), 75% (zu Huhn) und 60% (zu Zebrafisch) auf (Fig. 2). Diese Eigenschaft macht sich die vorliegende Anmeldung zunutze.

Ein Aspekt der Ausführungsform (1) ist die Herstellung der Tenascin-R-Sonde durch Isolierung des Tenascin R aus natürlichen Quellen (vgl. Bsp. 1) oder als rekombinantes natives Protein. Die Herstellung durch rekombinante Methoden ist hierbei bevorzugt.

Die Isolierung des TN-R aus natürlichen Quellen erfolgt bevorzugt durch bekannte chromatographische und/oder immunologische Methoden zur Proteinreinigung, insbesondere durch Affinitätschromatographie an TN-R-Antikörper (Bsp. 1). Als Quelle für das TN-R kommen Gewebe und Einzelzellsuspensionen höherer und niederer Vertebraten infrage.

Rekombinante Methoden zur Herstellung der TN-R-Sonde umfassen die bekannten gängigen Methoden zur Transformation von Pro- und Eukaryoten (beschrieben z.B. in G. Schimpf (Hrsg.), Gentechnische Methoden, 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag (2002); Smith, C., The Scientist 12(3):18 (1998); Unger, T., The Scientist 11(17):20 (1997)). Geeignete Methoden zur Herstellung rekombinanter Proteine oder Proteinfragmente umfassen Transfektions- oder Transformationsmethoden, die auf verschiedenen Expressionssystemen/-vektoren für prokaryotische (insbesondere *E. coli*) und eukaryotische Zellen (Hefe, Pilze, Insekten- und Säugerzellen) basieren. Um funktionell aktive rekombinante Proteine zu erzeugen (also solche, die nach ihrer Faltung/Konformation und Glykosylierung dem nativen Protein am ähnlichsten sind), werden Säugerzellen als Produzenten bevorzugt. Die verschiedenen Expressionsvektoren für Säugerzellen unterscheiden sich hauptsächlich in Promotertyp (SV40, CMV, human EF1alpha, MMTV-LTR, MSV-

LTR, RSV-LTR, etc.), Art der Expression (transient, konstitutiv, induzierbar), Induktionsmechanismus, Selektionsmarker (Antibiotikum- oder Drogenresistenz und/oder Koexpression leicht nachweisbarer Proteine) und Elemente für subzelluläres Targeting des Genprodukts (Mitochondrien, Kern, Sekretion). Als
5 Produzenten rekombinanter Proteine/Proteinfragmente werden eukaryotische Expressionssysteme, die das Fremdgen konstitutiv exprimieren, bevorzugt.

In einer bevorzugten Durchführungsform von (2) zur erfindungsgemäßen Expression humaner rekombinanter Proteinfragmente werden definierte PCR-Fragmente des humanen TN-R mit Hilfe des TOPO TA Klonierungssystems
10 (Invitrogen) in den pcsecTag/FRT/V5-His-TOPO-Vektor (Invitrogen) kloniert, welcher die konstitutive Expression und Sekretion des gewünschten, mit einem am C-Terminus mit 6xHis-Peptid versehenen Proteinfragments in humanen Flp-In 293 Zellen (Invitrogen) erlaubt. In Flp-In-Zellen ist das Plasmid pFRT/lacZeo (Invitrogen) stabil integriert, die FRT-Region wird spezifisch von der Flp-
15 Rekombinase erkannt. Bei gleichzeitiger Transfektion der Flp-293-Zellen mit dem pOG44-Plasmid, das die Expression der Flp-Rekombinase ermöglicht, und dem die Basensequenz des gewünschten Proteinfragments tragenden pcsecTag/FRT/V5-His-TOPO-Vektor kommt es an der FRT-Region zu einem Einbau der für die Herstellung eines sekretierten Proteinfragments notwendigen Anteile des pcsecTag/FRT/V5-His-
20 TOPO-Vektors. Dies ermöglicht die Sekretion polyHis-tragender Proteinfragmente in den Zellkulturüberstand und ihre Aufreinigung über Nickel-Chelatchromatographie aus gesammelten Zellkulturüberständen.

Ein weiterer Aspekt der Ausführungsform (1) ist die Herstellung der TN-R-Fragmente durch chemische Synthese, durch Fragmentierung von isoliertem TN-R
25 oder rekombinant, bevorzugt rekombinant gemäß Ausführungsform (8). Geeignete rekombinante Methoden umfassen die bekannten gängigen Methoden zur Transformation von Pro- und Eukaryoten (beschrieben z.B. in G. Schimpf (Hrsg.), Gentechnische Methoden, 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag (2002); Smith, C., The Scientist 12(3):18 (1998); Unger, T., The Scientist 11(17):20
30 (1997)). Hierfür kann ein Wirtsorganismus gemäß Ausführungsform (7) verwendet werden, der mit einem Vektor transformiert oder transfiziert ist, der die vorstehend definierten TN-R oder TN-R-Fusionsprotein kodierenden DNA Sequenzen umfasst. Solch ein Vektor kann, neben den genannten DNA Sequenzen noch an den Wirtsorganismus angepasste funktionelle Sequenzen wie Promotoren,
35 Leadersequenzen usw. enthalten. Zur chemischen Herstellung von TN-R-

Fragmenten sowie zur Fragmentierung von isoliertem TN-R können einschlägig bekannte Methoden verwendet werden, wie z.B. Festphasen-Peptidsynthese bzw. enzymatische oder mechanische Fragmentierungsmethoden.

Ein weiterer bevorzugter Aspekt der Ausführungsform (1) betrifft ein Fusionsprotein umfassend eine Tenascin-R-Komponente, ausgewählt aus nativem Tenascin-R oder Tenascin-R-Fragmenten und Fusionsproteinen aus zwei der mehr Tenascin-R-Fragmente, und eine funktionelle Komponente, die funktionelle Peptid- oder Proteinsequenzen umfasst. Die Komponenten können direkt oder mittels eines (flexiblen) Linkerpeptides miteinander verknüpft sein. Ein weiterer Aspekt betrifft die Kombination von zwei oder mehreren der vorstehend definierten Tenascin-R-Komponenten, insbesondere Tenascin-R-Fragmenten, in einer Art und Weise, die nicht der nativen Aminosäuresequenz entspricht, zu einer erfindungsgemäßen Tenascin-R-Sonde. Die Verknüpfung kann ebenfalls direkt oder mittels eines Linkerpeptides erfolgen. Zur Synthese können die oben genannten Vektorsysteme verwendet werden, wobei diejenigen cDNA-Sequenzen von Teilen der TN-R-Sequenz, welche räumlich nicht benachbart sind, über endständige Restriktionsenzym-Schnittstellen nach gängigen technischen verfahren miteinander verknüpft werden.

Die Tenascin-R-Sonde gemäß Ausführungsform (1) bis (4) umfasst vorzugsweise die Teilsequenz der humanen TN-R, welche die Aminosäurereste 1287-1358 umfasst, ganz besonders den Bereich, der den Aminosäureresten 1287-1358, 1120-1358, 1136-1358 oder 949-1358 in SEQ ID NO:2 entspricht. Ein bevorzugter Aspekt von (1) bis (4) ist, dass die Sonde eine der Aminosäuresequenzen dieser Gruppe besitzt oder sich aus 2 oder mehreren der Aminosäuresequenzen dieser Gruppe in einem Fusionsprotein zusammensetzt, wobei auch die Wiederholung einer oder mehrerer der Sequenzen innerhalb des Fusionsproteins möglich ist. Gegenstand der Erfindung sind auch die Nukleinsäuren, die Nukleinsäurefragmente umfassen, welche für derartige Proteine kodieren, bevorzugt DNA-Sequenzen und cDNA.

In einem bevorzugten Aspekt der Ausführungsform (2) ist die Tenascin-R-Sonde humanes Tenascin-R oder ein Homologes/Fragment desselben und entweder durch Präparation aus Zellen von Menschen oder durch rekombinante Herstellung erhältlich. Insbesondere ist es als natives TN-R aus Zellen neuralen Ursprungs, besonders bevorzugt aus SH-SY5Y Neuroblastomzellen erhältlich. Rekombinante

Herstellung speziell der TN-R-Fragmente findet bevorzugt in entsprechend transformierten humanen Flp-In 293-Zellen statt.

Ein bevorzugter Aspekt der Ausführungsform (1) und (2) ist die Durchführung des Verfahrens als Einstufenverfahren und/oder durch selektive Substratadhäsion an die Tenascin-R-Sonde. Hierbei werden durch enzymatische Behandlung des
5 gewünschten zentralnervösen Gewebes gewonnene Einzelzellsuspensionen auf mit TN-R Proteinen oder Proteinfragmenten beschichteten Plastikoberflächen ausgesät. Nach Inkubation, bevorzugt für 8-20 h und bevorzugt in serumfreiem Medium (was eine Vermehrung astrozytärer und mikroglialer Zellen verhindert), finden sich auf
10 den immobilisierten TN-R Substraten reine Oligodendrozytenpopulationen (Fig. 7). Andere Zelltypen liegen im Zellkulturüberstand vor und können durch Mediumwechsel vollständig entfernt werden. Da nur ein einziger Selektionsschritt erfolgt und die Selektionsphase kurz ist im Vergleich zur Dauer der bislang üblichen mehrwöchigen Kultivierung gemischter glialer Kulturen und weiterer
15 Selektionsverfahren, ist die resultierende Zellausbeute hoch. Grund dafür ist u.a., dass sämtliche Oligodendrozyten (verschiedener Differenzierungsstadien) aus einem Primärgewebe auf TN-R-Substraten selektioniert werden können. Im Gegensatz hierzu ist die Isolierung von Oligodendrozyten aus gemischten glialen Kulturen mit einem hohen Verlust an Zellen verbunden (z.B. beim Abschütteln der
20 auf einer Astrozyten-Monoschicht haftenden Oligodendrozyten und Mikroglia und bei weiterer Selektion mikroglialer Zellen). Ein Vergleichsbeispiel mag dies verdeutlichen: um eine Ausbeute von $2-4 \times 10^6$ Oligodendrozyten aus P0-P2 Nagergehirnen zu erhalten, genügt eine Selektion auf TN-R-Substraten aus dem Gewebe nur eines Gehirns in nur einem Schritt, während dafür bei Kultivierung
25 gemischter glialer Kulturen zehn Gehirne und mindestens 2 Wochen Kultivierungszeit erforderlich sind.

Das erfindungsgemäße Isolierungsverfahren nach (1) und (2) erlaubt die Isolierung vollständiger Oligodendrozytenpopulationen und ist damit auch vorteilhaft gegenüber immunologischen Selektionsverfahren wie z.B. FACS, biomagnetic cell
30 sorting oder Antikörper-Panning. Diese erlauben nur die Anreicherung distinkter Oligodendrozytenpopulationen; oligodendrogliale Zellen, die von den Antikörpern nicht erkannt werden, gehen verloren.

Das erfindungsgemäße Verfahren von (1) und (2) ermöglicht somit die Isolierung von oftmals für weitere Experimente ausreichenden Oligodendrozytenpopulationen
35 aus einem einzigen Vertebraten, insbesondere einem einzigen Nager. Dies ist

insbesondere von Vorteil, wenn bestimmte Effekte an Mäusen untersucht werden, die z.B. in transgenen Mäusen, Knockout-Mäusen oder mit Testsubstanzen behandelten Mäusen auftreten.

Die als Startmaterial der Ausführungsform (1) und (2) verwendeten Primärgewebe
5 können aus unterschiedlichen ZNS-Bereichen sowie aus unterschiedlichen Entwicklungsstadien stammen. Bevorzugte ZNS-Bereiche sind das Gehirn und einzelne Gehirnregionen (insbesondere Vorderhirn, Kleinhirn, Hippocampus, Hirnstamm), der optische Nerv und das Rückenmark. Die geeigneten Entwicklungsstadien umfassen embryonale, fötale, früh-/spätpostnatale und adulte
10 Gewebe, bevorzugt frühpostnatale und adulte Gewebe.

Wird im Verfahren nach (1) bis (3) eine Einzelzellsuspension verwendet, so enthält diese Zellen einer oder mehrerer Differenzierungsstufen, bevorzugt einer einzigen Differenzierungsstufe.

Die neuralen Primärgewebe, die zur Durchführung des Verfahrens nach (1) und (2)
15 verwendet werden, stammen aus niederen und höheren Vertebraten, einschließlich Fischen, Amphibien, Reptilien, Vögeln und Säugetieren, besonders bevorzugt aus Hai, Karpfen, Huhn, Nagern einschließlich Maus und Ratte, Rind, Schwein und Mensch, ganz besonders bevorzugt aus Nagern und Mensch.

Die TN-R-Sonde zur Verwendung in (1) und (2) stammt vorzugsweise aus TN-R
20 höherer und niederer Vertebraten. Bevorzugt ist sie das native TN-R oder ein Fragment des nativen TN-R.

Die Gewinnung von Einzelzellsuspensionen aus Primärgewebe zum Einsatz im Verfahren gemäß Ausführungsform (1) oder (2) erfolgt nach in der Fachwelt üblichen Methoden. So kann das Gewebe in einem oder mehreren Schritten
25 mechanisch und/oder enzymatisch in Gewebefragmente und/oder einzelne Zellen überführt werden. Geeignete Methoden werden in "Zell- und Gewebekultur" (T. Lindl, Spektrum Akademischer Verlag, 2002) und "Current Protocols in Neuroscience" (John Wiley & Sons, Inc., 2004, Hrsg. J Crawley et al.) beschrieben. Die so gewonnenen Zellen werden in serumfreiem Medium resuspendiert und dann
30 mit der TN-R-Sonde in Kontakt gebracht. Nach einer zur vollständigen Adsorption der selektierten Zellen ausreichenden Inkubationszeit (1-48 h, bevorzugt 8-20 h) unter geeigneten Bedingungen werden die nicht adhärenen Zellen entfernt. Die adhärenen Zellen können für eine weitere Verwendung entweder adhären bleiben oder enzymatisch, bevorzugt durch Behandlung mit Trypsin bzw. Trypsin-EDTA,

Collagenase, Dispase, Pronase, Accutase[®] oder anderen geeigneten Proteinasen, insbesondere mit Accutase[®], vom Adsorbens abgelöst werden. Ihre Weiterverwendung umfasst die Kultivierung – auch auf anderen Substraten oder Plastikoberflächen bzw. in anderen definierten Medien - zur Gewinnung von beispielsweise
5 unreifen Vorläufer-Oligodendrozyten oder myelinkompetenten Oligodendrozyten.

Das Verfahren nach (1) und (2) kann unabhängig davon eingesetzt werden, ob die TN-R-Sonde und das neurale Primärgewebe aus Organismen derselben Spezies stammen. So ist eine Isolierung von Oligodendrozyten über Speziesgrenzen hinweg möglich. TN-R aus verschiedenen Vertebraten können zur Selektion von
10 Oligodendrozyten aus Einzelzellkulturen anderer Spezies verwendet werden (Bsp. 3; Fig. 7). Unter anderem umfasst dies die Selektion von Oligodendrozyten aus Mensch, Schwein, Rind, Huhn, Maus, Ratte, Frosch und anderen höheren Vertebraten auf TN-R aus einer anderen Spezies (umfassend Fisch, Huhn, Maus, Ratte, Rind, Schwein, Mensch etc.).

15 Das Verfahren nach (1) und (2) kann des weiteren unabhängig davon eingesetzt werden, in welcher Differenzierungsstufe (z.B. Vorläufer – unreife – reife Oligodendrozyten) die selektierten Zellen vorliegen. Es werden allen Zellen einer Zellart selektiert, unabhängig von ihrem Entwicklungsstadium.

Die Selektion von definierten Zellpopulationen aus Einzelzellsuspensionen gemäß
20 (1) und (2) erfolgt in einem Aspekt dadurch, dass die an die TN-R-Sonde gebundenen Zellen isoliert werden und zur weiteren Verwendung vorgesehen sind. In einem anderen Aspekt dagegen ist es der Überstand, der durch die spezifische Adsorption von Zellen an die TN-R-Sonde von diesen Zellen befreit wird und zur weiteren Verwendung als definierte Zellpopulation vorgesehen ist. In wieder einem
25 anderen Aspekt wird als TN-R-Sonde ein modifiziertes TN-R oder ein TN-R-Fragment eingesetzt, dass für andere Zellen als das Ausgangsprotein (natives TN-R) selektiv ist. Die TN-R-Sonde im letztgenannten Aspekt umfaßt bevorzugt die FN III-Domänen 1 bis 8 oder 4 bis 6, besonders bevorzugt die durch bp 1051-3483 in SEQ ID NO:1 (H-TNR-S2; humane FN III-Domäne 1-8) und bp 1573-2945 in SEQ
30 ID NO:1 (H-TNR-S5; humane FN III-Domäne 4-6) kodierten Proteine.

In einem Aspekt der Ausführungsform (3) ist die Tenascin-R-Sonde durch geeignete Methoden zur Immobilisierung an ein Trägermaterial gekoppelt. Die Immobilisierung kann kovalent oder nichtkovalent erfolgen. Derartige geeignete Immobilisierungsmethoden umfassen adäquate Kupplungstechniken, welche die

Spezifität der Tenascin-R-Sonde nicht verändern, wie z.B. die kovalente Vernetzung des Proteins mit dem Trägermaterial oder die Immobilisierung durch Wechselwirkung mit einem geeigneten Antikörper. Bevorzugt erfolgt die Kupplung nichtkovalent (Bsp. 3), über einen Antikörper oder durch kovalente Vernetzung.

- 5 In einer bevorzugten Ausprägung dieses Aspekts der Ausführungsform (3) werden zur Isolierung von Zellen aus Primärgewebe neuralen Ursprungs Trägermaterialien wie z.B. Zellkulturplatten mit TN-R bzw. mit rekombinant hergestellten TN-R-Fragmenten beschichtet, indem das Trägermaterial, bevorzugt eine Plastikoberfläche, mit einer Lösung der TN-R-Sonde inkubiert und anschließend
10 gewaschen wird. Durch selektive Substratadhäsion erfolgt dann die Isolierung reiner Zellpopulationen aus Zellsuspensionen. Unter Verwendung von TN-R konnten aus frühpostnatalen Nagerhirnen 100% reine Oligodendrozytenpräparationen gewonnen werden (Bsp.3): 2×10^6 Oligodendrozyten aus einem P0-P2 Nagervorderhirn, $4-6 \times 10^6$ Oligodendrozyten aus einem P5 Nagervorderhirn, 2×10^6
15 Oligodendrozyten aus einem P7-P8 Nagerkleinhirn. Ähnliche Ergebnisse sind mit rekombinant hergestellten Tenascin-R-Fragmenten möglich.

In einer weiteren Ausprägung dieses Aspekts wird die TN-R-Sonde auf einer Plastikoberfläche immobilisiert. Dies ermöglicht ebenfalls die selektive Adhäsion und Isolation von definierten Zellpopulationen, insbesondere von Oligodendrozyten,
20 jedoch nicht von anderen neuralen Zellen (wie Astrozyten, Mikroglia oder Neuronen), aus den als Startmaterial verwendeten gemischten Zellpopulationen.

Die Immobilisierung erfolgt bevorzugt durch direkten Kontakt der TN-R-Sonde mit der Trägeroberfläche. Nach ausreichender Inkubationszeit (1-4 h) wird das nicht gebundene Protein abgewaschen. Die nicht besetzten Bindungsstellen auf der
25 Oberfläche werden anschließend blockiert, z.B. durch Inkubation mit einem BSA-haltigen Blockierungspuffer. Die so beschichteten Oberflächen können bis zu ihrer Verwendung feucht gehalten oder nach Eintrocknen verwendet werden, wobei der Einsatz nicht eingetrockneter Oberflächen bevorzugt ist.

Als bevorzugte TN-R-Sonde werden in Ausführungsform (3) natives TN-R oder ein
30 Fragment des nativen TN-R verwendet. Auch die Verwendung einer Mischung aus mehr als einer TN-R-Sonde zur Beschichtung des Trägermaterials ist möglich.

Das Verfahren nach Ausführungsform (1) bis (3) ist zur Gewinnung von neuralen Zellen, insbesondere von Oligodendrozyten, für die Anzucht differenzierter Zellen, insbesondere neuraler Zellen, in neurobiologischen und zellphysiologischen

Untersuchungen, in der biologischen und klinischen Forschung und für diagnostische und therapeutische Verfahren *in vitro* und *in vivo*, insbesondere für die Herstellung eines Medikaments zur Zelltherapie und zur Therapie von neurodegenerativen Krankheiten geeignet. Des Weiteren ist es zum Nachweis von neurodegenerativen Krankheiten nutzbar.

Ausführungsform (9) betrifft Antikörper, vorzugsweise monoklonale Antikörper gemäß Ausführungsform (10), welche an TN-R in wenigstens zwei Spezies, vorzugsweise zwei Vertebraten binden, bevorzugt die monoklonalen Antikörper R4 und R6 (Bsp. 5). Diese zeigen im Gegensatz zu den in Pesheva, P. et al. (J. Cell. Biol. 109:1765-1778 (1989)) beschriebenen Antikörpern R1 und R2 Kreuzreaktivität mit verschiedenen Spezies/Vertebraten. Besonders R6 kann zum Nachweis von TN-R in allen Vertebratenklassen (Fische, Amphibien, Reptilien, Vögel und Säuger; Fig. 5A und 5B) verwendet werden; R4 erkennt das Protein nur in höheren Vertebratenklassen (Fig. 5A und Tab. 2). R4 und R6 erkennen Proteinepitope auf dem TN-R Molekül, d.h. sie sind auch nach Glykosidase-Verdau, der zur Abspaltung der Zuckerreste des Proteins führt, noch aktiv.

Die Kreuzaktivität mit verschiedenen Spezies ist bedingt durch das Herstellungsverfahren, nämlich dass ein geeigneter Wirtsorganismus mit Tenascin-R von wenigstens zwei unterschiedlichen Spezies, vorzugsweise von zwei unterschiedlichen Vertebraten durch übliche Verfahren immunisiert wird und nachfolgenden Screening- und Reinigungsschritten isoliert wird. Geeignete Wirtsorganismen für die Immunisierung sind insbesondere nicht-humane Säuger wie Nager (Mäuse, Ratten u.s.w.), Kaninchen, Meerschweinchen, Ziege u.s.w.

Die Antikörper nach Ausführungsform (9) sind in verschiedenen auf Nachweis und/oder Bindung von TN-R basierenden immunochemischen Verfahren anwendbar (Tab. 2, Anwendungsbereiche), insbesondere in ELISAs, Westernblots, histologischen und zytologischen Untersuchungen und Immunpräzipitationen. Auch in *in vitro*-Assays sind sie von Bedeutung, da ihre Anwesenheit die inhibitorische Wirkung des TN-R Proteins auf die neuronale Zelladhäsion und das Axonwachstum neutralisieren kann (Fig. 5C). Die Antikörper reagieren spezifisch mit TN-R in Hirn-Extrakten oder gereinigtem TN-R und zeigen keine Kreuzreaktivität mit anderen TN-Proteinen. Letzteres läßt sich daraus schließen, dass keine Reaktion mit Herz oder Niere (in Maus enthaltend TN-W, Scherbich, A. et al., J. Cell. Sci. 117:571-581 (2004)), neonataler Haut oder Hautfibroblasten-konditionertem Medium (enthaltend TN-X, Zweers, M.C. et al., Cell Tissue Res. 319:279-287 (2005)) und

TN-C-Präparationen aus Maushirn stattfindet. Exemplarisch ist in Fig. 5 die Reaktivität von R4 und R6 dargestellt.

Kreuzreaktivität der Antikörper nach Ausführungsform (9) besteht jedoch insofern, dass R1, R2, R4, R5 und R6 mit TN-R aller getesteten höheren Vertebraten reagieren, und R1, R5 und R6 sogar mit allen getesteten Arten (Tab.2, Fig. 5B).
5 Letztere sind in einem Aspekt der Ausführungsform (9) daher bevorzugt.

R1, R2, R4, R5 und R6 erkennen unterschiedliche Protein-Epitope auf TN-R, was sich durch enzymatische Entfernung der N- und O-verknüpften Glykokonjugate und Feststellung der topographischen Nähe molekularer Epitope durch kompetitiven
10 ELISA zeigte. Dies erklärt auch, warum die Antikörper unterschiedlichen Einfluss auf die Adhäsion und das Neuritenwachstum von Maus-Neuronen auf TN-R-haltigem Substrat haben (Fig. 5C und D, Bsp. 6). Diese *in vitro*-Tests weisen darauf hin, dass Epitope, welche durch R4, R5, und R6 (und teilweise R2) erkannt werden, in derartige Prozesse involviert sind.

15 Daher sind bevorzugte Antikörper der Ausführungsform (9) Antikörper, welche gegen derartige Epitope gerichtet sind.

Die Antikörper gemäß Ausführungsform (10) können dabei durch Kultivieren der Zelllinie gemäß Ausführungsform (11) hergestellt werden. Die Zelllinien
20 Ausführungsform (11) sind insbesondere sogenannte Hybridomzelllinien. Diese sind z.B. durch Immunisierung eines geeigneten Wirtsorganismus mit TN-R von wenigstens zwei verschiedenen Spezies, wie vorstehend beschrieben, Isolation von Milzzellen des Wirtsorganismus und nachfolgendes Verschmelzen mit geeigneten primären Zellen, z. B. Myelomzellen, erhältlich. In Abhängigkeit vom Wirtsorganismus und vom Ursprung der primären Zellen handelt es sich um Homo-
25 oder Heterohybridomzellen, wobei das Erstere bevorzugt ist.

Weiterhin bevorzugt sind die monoklonalen Antikörper gemäß Ausführungsform (10) der Erfindung, unter denen R4, R5 und R6, insbesondere R4 und R6, wie sie durch die Hybridomzelllinien DSM ACC2754 (tn-R4) und DSM ACC2753 (tn-R6) produziert werden, besonders bevorzugt sind.

30 Die Antikörper der Ausführungsformen (9) und (10) der Erfindung sind nicht nur zum immunochemischen Nachweis von TN-R geeignet, sondern auch zur Hemmung der Wirkung von TN-R *in vivo* und *in vitro*.

Aufgrund ihrer Wechselwirkung mit TN-R in Bezug auf die neuronale Zelladhäsion und das Axonwachstum sind die Antikörper nach Ausführungsformen (9) und (10) des weiteren gemäß Ausführungsform (14) zur gezielten Beeinflussung der Neuralentwicklung *in vivo* und *in vitro*, zur Therapie und Prophylaxe von traumatischen Nervenläsionen und zur Herstellung von Medikamenten zur gezielten Beeinflussung der Neuralentwicklung und zur Therapie und Prophylaxe von traumatischen Nervenläsionen einsetzbar. Traumatische Nervenläsionen entstehen z.B. nach mechanischer Nervenschädigung. Die Regeneration der Nervenfasern nach solchen Läsionen wird durch TN-R negativ beeinflusst (Probstmeier, R. et al., J. Neurosci. Res. 60:21-36 (2000); Zhang, Y. et al., Mol. Cell. Neurosci. 17:444-459 (2001); Becker, C.C. et al., Mol. Cell. Neurosci. 26:376-389 (2004); Xu, G. et al., J. Neurochem. 91 :1018-1023 (2004)).

Die Erfindung betrifft daher in Ausführungsform (15) ebenfalls ein Verfahren zur Therapie und Prophylaxe von traumatischen Nervenläsionen und zur gezielten Beeinflussung der Neuralentwicklung umfassend das Verabreichen einer geeigneten Menge an Antikörper nach Ausführungsform (9) oder (10) an einen Patienten, der einer solchen Behandlung bedarf. Die verabreichte Antikörpermenge und die notwendige Dosierung wird vom behandelnden Arzt von Fall zu Fall festzulegen sein. Sie hängt dabei unter anderem einerseits vom Alter, Körpergewicht und der Konstitution des Patienten, andererseits von der Art und Schwere der zu behandelnden Krankheit ab.

Der Kit gemäß Ausführungsform (12) enthält bevorzugt das in Ausführungsform (4) definierten Protein oder eine Stammkultur der Zelllinie zur Produktion dieses Proteins. Besonders bevorzugt enthält dieser Kit humanes Tenascin-R oder dessen erfindungsgemäße Fragmente und/oder eine Stammkultur von Zellen, die zur rekombinanten Produktion dieser Proteine geeignet sind.

Ein bevorzugter Aspekt der Ausführungsform (12) ist ein Kit, in dem die Tenascin-R-Sonde durch eine adäquate Kupplungstechnik wie in den Aspekten der Ausführungsform (3) beschrieben an ein Trägermaterial gebunden ist, und/oder in dem weiterhin TN-R-Antikörper (z.B. zur Überprüfung der Immobilisierungseffizienz der TN-R-Sonde), eine oder mehrere enzymatische Lösung(en) zur Zelldissoziation, ggf. Mittel zur Detektion der Bindung von Zellen an die Tenascin-R-Sonde, Puffer und/oder Kulturmedien enthalten sind. Zu den Puffern und Medien zählen insbesondere Blockierungspuffer und definierte serumfreie Kulturmedien. Im

Kit enthaltene Antikörper sind bevorzugt Antikörper der Ausführungsform (9) oder (10).

In Ausführungsform (13) ist die Verwendung eines TN-R-Fragments oder eines TN-R-Fusionsproteins wie in Ausführungsform (4) definiert, bevorzugt.

- 5 Eine bevorzugte Verwendung der erfindungsgemäßen TN-R-Sonde ist der Einsatz der Tenascin-R-Sonde zur Gewinnung von Oligodendrozyten gemäß Ausführungsform (13). Ein damit verknüpfter Aspekt der Ausführungsform (13) ist die Anzucht differenzierter Zellen aus den so gewonnenen Zellpopulationen. Die differenzierungsfördernde Wirkung des nativen TN-R wurde bereits beschrieben
10 (Pesheva, P. et al., J. Neurosci. 17:4642-51 (1997)). Auch die erfindungsgemäßen Fragmente des TN-R können differenzierungsfördernd auf Oligodendrozyten unterschiedlicher Reifestadien wirken, insbesondere H-TNR-S3 und H-TNR-S6 (vgl. Bsp. 2).

- Die Diagnoseverfahren gemäß der Ausführungsform (13) können *in vivo* und *in*
15 *vitro* durchgeführt werden, bevorzugt jedoch *in vitro*. Bevorzugt verwendet wird für die Verwendung gemäß Ausführungsform (13) eine Tenascin-R-Sonde gemäß Ausführungsform (4), insbesondere humanes Tenascin-R oder dessen erfindungsgemäße Fragmente. Die Tenascin-R-Sonde kann dabei aus Quellen gereinigt worden sein, in denen sie natürlich vorkommt, oder rekombinant hergestellt
20 worden sein. Bevorzugt wird eine rekombinante Tenascin-R-Sonde verwendet.

- Neurodegenerative Erkrankungen, die mit einem Verlust von Oligodendrozyten (durch Zelltod) oder Myelin assoziiert sind, wie z.B. Multiple Sklerose (MS), zeichnen sich dadurch aus, dass in den betroffenen Regionen Remyelinisierung nicht oder nur im geringen Umfang stattfinden kann. Das liegt zum Großteil daran,
25 dass die vorhandenen "traumatischen" (also als Folge der Wirkung pathologischer Stimuli veränderten) Vorläufer- und unreifen Oligodendrozyten nicht in der Lage sind zu differenzieren/remyelinisieren. Die Erfindung bietet hier Ansätze für neue diagnostische und/oder therapeutische Verfahren:

- Zur Diagnose von MS ist besonders die schnelle (innerhalb von 1-2 Tagen)
30 Selektion "traumatischer" Zellen auf TN-R-Sonden geeignet, bevorzugt aus einem Tiermodell oder aus Biopsie-Proben von Patienten. Dies ermöglicht die Durchführung von direkten Untersuchungen ihres molekularen Profils und/oder die Entwicklung diagnostischer Marker. Für die Entwicklung eines Medikaments zur Zelltherapie können "traumatische" Oligodendrozyten mit verschiedenen

Wirkstoffkandidaten behandelt werden, um den Einfluss der letzteren auf die "Genesung traumatischer Zellen", bzw. die Remyelinisierungspotenz solcher Zellen zu bestimmen.

Die erfindungsgemäße Methode ist auch geeignet zur Selektion "normaler" adulter Oligodendrozyten, welche vor der Kultivierung unter traumatischen Bedingungen *in vitro* (durch Zugabe relevanter Cytokine oder Liquorproben von Patienten/erkrankten Tieren) selektioniert und anschließend mit Wirkstoffkandidaten behandelt werden. Solch ein *in vitro*-System erlaubt Untersuchungen zu den stattfindenden traumatischen Veränderungen in Oligodendrozyten, die Rückschlüsse auf solche Veränderungen *in vivo* ermöglichen.

Des weiteren können derartig kultivierte Oligodendrozyten zur Entwicklung diagnostischer Marker dienen, wobei auch verschiedene Stadien der traumatischen Veränderungen festgestellt werden können. Die so gewonnenen Oligodendrozyten sind auch geeignet zum Screening auf Wirkstoffkandidaten, die den Zelltod und/oder eine fehlende Myelinisierungskompetenz von Oligodendrozyten unter traumatischen Bedingungen aufheben, bzw. als Medikament zur Zelltherapie *in vivo* eingesetzt werden können.

Schließlich ist auch der Einsatz eines rekombinanten TN-R-Fragments, insbesondere des C-Terminus oder eines C-terminalen Fragments, v.a. der Fragmente H-TNR-S3 und/oder H-TNR-S6 (vgl. Bsp. 2), als Medikament oder zur Herstellung eines Medikaments zur direkten Zelltherapie bei neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere Multipler Sklerose, möglich.

Ein bevorzugter Aspekt der Ausführungsform (13) ist somit die Verwendung der Tenascin-R-Sonde zur Diagnose von Multipler Sklerose (MS) und zur Herstellung eines Medikaments gegen MS.

Ein weiterer bevorzugter Aspekt der Ausführungsform (13) ist somit die Verwendung der Tenascin-R-Sonde zur Herstellung eines Medikaments zur Zelltherapie und zur Therapie von neurodegenerativen Krankheiten, die mit einem Verlust von Oligodendrozyten oder Myelin einhergehen, insbesondere Multipler Sklerose und periventrikulärer Leukomalazie (PVL).

Ausführungsform (16) betrifft ein Verfahren zur Zelltherapie und zur Therapie von neurodegenerativen Krankheiten, die mit einem Verlust von Oligodendrozyten oder Myelin einhergehen, insbesondere Multipler Sklerose und periventrikulärer Leukomalazie (PVL), umfassend das Verabreichen einer pharmakologisch geeigneten

Menge der TN-R-Sonde an einen Patienten, der einer solchen Behandlung bedarf. Die verabreichte Menge und die notwendige Dosierung wird vom behandelnden Arzt von Fall zu Fall festzulegen sein. Sie hängt dabei unter anderem einerseits vom Alter, Körpergewicht und der Konstitution des Patienten, andererseits von der Art und Schwere der zu behandelnden Krankheit ab.

Das Verfahren (17) zur Herstellung von Oligodendrozyten aus isolierten Stammzellen wird bevorzugt mit neuronalen oder nicht-neuronalen Stammzellen durchgeführt, welche ein Potential zur Sulfatid-Expression besitzen. Besonders bevorzugte isolierte Stammzellen sind Vorläuferzellen neuronalen oder hämatopoetischen Ursprungs. So können humane neurale Stammzellen in Gegenwart von TN-R selektiv zu reifen Oligodendrozyten differenziert werden (Bsp. 7).

Ganz besonders bevorzugt dient das Verfahren (17) der Differenzierung unreifer Oligodendrozyten *in vitro*. Wie Fig. 8 zeigt, differenzieren sich unreife Oligodendrozyten unter dem Einfluss von exogenem, substratgebundenen TN-R aller getesteten Vertebraten morphologisch. Gleichzeitig wird die Myelinge-Expression hochreguliert, wie sich durch die rasche Induktion von MBP-Expression belegen lässt. Diese Effekte sind besonders stark bei Einsatz von TN-R aus höheren Vertebraten. Die Zellantwort der Oligodendrozyten wird vermutlich durch TN-R-Wechselwirkung mit Sulfatiden vermittelt und beinhaltet wahrscheinlich eine autokrine TN-R-Regulation (Pesheva, P. et al., J. Neurosci. 17:4642-4651 (1997)). Letzteres wird dadurch unterstützt, dass die TN-R-Sekretion durch Oligodendrozyten, welche auf TN-R-haltigem Substrat kultiviert wurden, durch TN-R aus höheren Vertebraten stark und durch Fisch-TN-R etwas weniger erhöht wurde (Fig. 8B).

Bevorzugt wird für die Differenzierung unreifer Oligodendrozyten *in vitro* auf TN-R-beschichteten Oberflächen eine TN-R-Konzentration von mindestens 10 µg/ml eingesetzt. Besonders bevorzugt ist eine TN-R-Konzentration von mindestens 20 µg/ml, ganz besonders eine TN-R-Konzentration von 20 µg/ml.

Bevorzugt wird das Verfahren (17) mit TN-R höherer Vertebraten, besonders bevorzugt mit einer erfindungsgemäßen TN-R-Sonde, ganz besonders bevorzugt mit nativem TN-R oder einem TN-R-Fragment oder -Fusionsprotein der Ausführungsform (4) durchgeführt.

Die Hybridomzelllinien tn-R4 (Produzent des Antikörpers R4) und tn-R6 (Produzent des Antikörpers R6) wurden am 02. Dezember 2005 unter den Hinterlegungsnummern DSM ACC2754 bzw. DSM ACC2753 bei der DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, 5 38124 Braunschweig, Deutschland, hinterlegt.

Die Erfindung wird anhand der nachfolgenden Beispiele näher erläutert. Diese schränken den Schutzbereich der Erfindung jedoch nicht ein.

Beispiele

10 Verwendete Lösungen/Medien:

1. HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) (Sigma)

2. Enzymatische Lösungen für Zelldissoziation:

1% (w/v) Trypsinlösung: 1% (w/v) Trypsin (Zellkultur getestet), 0,1% (w/v) DNase I, 1 mM EDTA, 0,8 mM MgSO₄, 10 mM HEPES in HBSS (Ca/Mg-frei).

15 DNaselösung: 0,05% (w/v) DNase I, 10 mM HEPES in BME (Basal Medium Eagle).

3. Definiertes serumfreies Medium: DMEM (Sigma) supplementiert mit Insulin (10 µg/ml), Progesteron (0,06 µg/ml), Trijodthyronin (0,34 µg/ml), L-Thyroxin (0,52 µM), Putrescin (16 µg/ml), Natriumselenit (0,22 µM), Transferrin (0,1 mg/ml), HEPES (25 mM), Gentamycin (25 µg/ml), Penicillin (100 units/ml) sowie 20 Streptomycin (0,1 mg/ml).

4. Blockierungspuffer: 2% (w/v) BSA (Rinderserumalbumin, fettsäurefrei) in PBS (150 mM NaCl, 8 mM Na₂HPO₄, 17,4 mM NaH₂PO₄), pH 7,2, hitzeinaktiviert (für 20 Minuten bei 70°C).

Gewebeextrakte und Westernblots: Gewebeproben wurden in PBS oder TES (s. Bsp.

25 1) mit oder ohne 1 % Triton® X-100 für 2 h bei 4 °C homogenisiert. Alle Puffer enthielten Spermidin und Proteaseinhibitoren (vgl. Bsp. 1). Unlösliches Material wurde durch Sedimentation abgetrennt. Gewebeextrakte aus Fischen (50 µg Protein/Spur) und anderen Vertebraten (20 µg Protein/Spur) wurden durch SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen über 7 %-Polyacrylamid-Gele aufgetrennt 30 und entweder Silbergefärbt oder durch Westernblot mit TN-R spezifischen Antikörpern analysiert. Bei den Westernblots dienten alkalische-Phosphatase- oder horseradish-Peroxidase (HRP)-konjugierte sekundäre Antikörper (Promega; Roche Dagnostics) zur Detektion (Pesheva, P. et al., J. Neurosci. Res. 51:49-57 (1998)).

Enzymatische Behandlung von TN-R: Zur enzymatischen Entfernung von N- 35 verknüpften Oligosacchariden wurden gereinigte TN-R Proteine mit N-Glycosidase F

oder H (Roche Diagnostics) behandelt wie beschrieben (Pesheva, P. et al., J. Cell. Biol. 109:1765-1778 (1989)). Zur enzymatischen Entfernung von O-verknüpften GAGs wurden die NT-R Proteine mit Chondroitinase ABC oder Heparinase (Sigma) behandelt wie beschrieben (Probstmeier, R. et al., Brain Res. 863:42-51 (2000)).

- 5 Zellkulturen: Primäre Kulturen von Kleinhirnneuronen (in serumfreiem Fischer-Medium; Pesheva, P. et al., Neuron 10:69-82 (1993)), Oligodendrozyten (in serumfreiem Sato-Medium; Pesheva, P. et al., J. Neurosci. 17:4642-4651 (1997)) und Hautfibroblasten (in DMEM 10 % FCS) wurden wie beschrieben hergestellt. Zur Untersuchung des Neuritenwachstums wurden Kleinhirnneurone (1×10^6 Zellen/ml)
10 auf den Testsubstraten in einem serumfreien Fischer-Medium kultiviert.

Beispiel 1: Immunaффinitätschromatographische Aufreinigung von TN-R Proteinen

Die Aufreinigung von TN-R Proteinen aus adultem Gehirn (Hai, Karpfen, Huhn, Maus, Ratte, Rind, Schwein, Mensch) erfolgte über immunaффinitätschromatographische Verfahren (Fig. 6). Hierzu wurde das Ausgangsgewebe mit
15 einem Harnstoff-haltigen Puffer (20 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 10 mM EGTA, 1M Harnstoff, pH 7,9; inklusive 1 mM Spermidin und folgenden Proteaseinhibitoren: 1µM Aprotinin, 5 µM SBTI (Trypsininhibitor aus Sojabohne), 1 mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid), Iodoacetamid (19 µg/ml), Typ III Trypsininhibitor
20 aus Eiweiß (10 µg/ml)) für 2 h bei 4°C aufgeschlossen und anschließend unlösliche Anteile für 30 Minuten bei 30.000 g pelletiert. Der Überstand wurde mit 40% (w/v) Ammoniumsulfat gefällt und präzipitierte Anteile durch einen Zentrifugationsschritt bei 30.000 g gesammelt. Das Präzipitāt wurde nachfolgend in 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 150 mM NaCl, pH 7,2, gelöst und gegen denselben Puffer
25 dialysiert. Nicht gelöste Anteile wurden durch eine einstündige Zentrifugation bei 100.000 g und 4°C entfernt.

Alternativ wurde folgendes Aufschlussverfahren verwendet: Homogenisation des Gewebes in TES Puffer (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, pH 7,4; inklusive 1 mM Spermidin und den oben angegebenen Proteaseinhibitoren) und
30 Übernachtinkubation bei 4°C. Nicht gelöste Anteile wurden danach durch eine einstündige Zentrifugation bei 100.000 g und 4°C entfernt. Der Überstand des jeweils letzten Zentrifugationsschritts wurde anschließend für die weitere immunaффinitätschromatographische Reinigung von TN-R Proteinen verwendet. Hierzu wurden die Überstände über Säulenmatrizes geleitet, an die monoklonale
35 TN-R Antikörper gebunden waren. Es handelte sich dabei um monoklonale

Antikörper, die als R1, R2 (Pesheva, P. et al., J. Cell. Biol. 109:1765-1778 (1989)), R4 oder R6 (siehe Bsp. 5) bezeichnet wurden. Diese Antikörper wurden an CNBr-aktivierte Sepharose[®]4B gekoppelt. Nach Passage der Zentrifugationsüberstände wurden die Antikörpersäulen zuerst mit 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,5 M NaCl, 0,5% (v/v) Triton[®]X-100, pH 7,2, anschließend mit PBS (Phosphat-gepufferte Saline, pH 7,2) gewaschen. Die an die Antikörper gebundenen TN-R Proteine wurden mit einem basischen Elutionspuffer (0,1 M Diethylamin, 0,1 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, pH 11,2) von der Säule gelöst. Das Eluat wurde sofort neutralisiert und gegen PBS dialysiert.

10

Beispiel 2: Herstellung humaner TN-R Fragmente

Ähnlich wie die anderen bekannten TN-R Proteine, setzt sich das humane TN-R Protein aus verschiedenen distinkten Domänen zusammen (Carnemolla, B. et al., J. Biol. Chem. 271:8157-60 (1996)). Beginnend mit einer Cystein-reichen Region am N-Terminus, gefolgt von 4,5 EGF-ähnlichen Domänen und 8 FN III-ähnlichen Domänen (wobei zwischen der 5. und 6. Domäne eine weitere bei entsprechendem alternativem Spleißen vorhanden sein kann, was dann 9 FN III-ähnlich Domänen ergibt), endet das Molekül am C-Terminus mit einer Fibrinogen-ähnlichen Domäne. Die publizierte humane TN-R-Sequenz umfasst mit 9 FN III-ähnlichen Domänen 4716 Basen (SEQ ID NO:1; NCBI nucleotide NM_003285). Hiervon entfällt auf den kodierenden Bereich der Abschnitt zwischen den Basen 82 bis 4158, auf das Signalpeptid (zur Sekretion des TN-R Proteins) der Basenbereich 82 bis 150. Für die Herstellung rekombinanter eukaryotisch exprimierter TN-R Proteinfragmente wurden nachfolgende DNA-Sequenzen entsprechend einzelner Domänenbereiche ausgewählt:

25

"H-TNR-S1": bp 151-1065

(Bereich: „Cys-Region“ bis „EGF-ähnliche Domänen“ (inkl.))

"H-TNR-S2": bp 1051-3483

(Bereich: „FN-III-ähnliche Domäne 1“ bis „ FN-III-ähnliche Domäne 8“ (inkl.))

30

H-TNR-S3": bp 3439-4155

(Bereich: „Fibrinogen-ähnliche Domäne “ (inkl.))

"H-TNR-S4": bp 151-1599

(Bereich: „Cys“-Region bis „ FN-III-ähnliche Domäne 3 (inkl.))

"H-TNR-S5": bp 1573-2945

35

(Bereich: „ FN-III-ähnliche Domäne 4 “ bis „ FN-III-ähnliche Domäne 6 “ (inkl.))

"H-TNR-S6": bp 2926-4155

(Bereich: „ FN-III-ähnliche Domäne 7“ bis „Fibrinogen- ähnliche Domäne “ (inkl.))

In ihrer Gesamtheit decken die Fragmente H-TNR-S1 bis H-TNR-S6 das ganze TN-R Protein ab.

- 5 Zur Gewinnung humaner TN-R-spezifischer mRNA wurde die menschliche Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y verwendet (Woodworth, A. et al., J. Biol. Chem. 279:10413-21 (2004)). Gesamt-RNA wurde aus diesen Zellen unter Verwendung von Trizol-Reagenz (Invitrogen) nach Herstellervorschrift gereinigt. Die cDNA-Synthese aus diesen RNA-Präparationen erfolgte unter Verwendung von "Random
10 hexamer"-Primern oder oligo(dT)-Primern mit Hilfe des SuperScript II Systems (Invitrogen) nach Herstellervorschrift. Zur Herstellung von H-TNR-S1- bis H-TNR-S6-spezifischer cDNA-Fragmente wurden folgende Primer verwendet:

H-TNR-S1

SEQ ID NO:3: upstream: TCC ATG ATC AAG CCT TCA GAG TG (bp 151-173)

- 15 SEQ ID NO:4: downstream: AGG GGC AAC TGC TGA GCA GT (bp 1046-1065)
(Produktlänge: 915 bp)

H-TNR-S2

SEQ ID NO:5: upstream: TCA GCA GTT GCC CCT CCA GAG G (bp 1051-1072)

- 20 SEQ ID NO:6: downstream: ATG AGG GAA CAC CCG GCC TCC (bp 3463-3483)
(Produktlänge: 2433 bp)

H-TNR-S3

SEQ ID NO:7: upstream: ATC ACC TCC ACC GCT TTC ACC (bp 3439-3459)

- 25 SEQ ID NO:8: downstream: GAA CTG TAA GGA CTG CCG TTT TCT (bp 4132-4155)
(Produktlänge: 717 bp)

H-TNR-S4

SEQ ID NO:9: upstream: TCC ATG ATC AAG CCT TCA GAG TG (bp 151-173)

- 30 SEQ ID NO:10: downstream: GCC GTC AAT GAC TGT GGA GAC (bp 1579-1599)
(Produktlänge: 1449 bp)

H-TNR-S5

SEQ ID NO:11: upstream: GCC AGC GTC TCC ACA GTC ATT G (bp 1573-1594)

- 35 SEQ ID NO:12: downstream: GTT GTC CAT GGC TGT GTG CAC A (bp 2925-2946)
(Produktlänge: 1374 bp)

H-TNR-S6

SEQ ID NO:13: upstream: GTG CAC ACA GCC ATG GAC AA (bp 2926-2945)

- 40 SEQ ID NO:14: downstream: GAA CTG TAA GGA CTG CCG TTT TC (bp 4133-4155)
(Produktlänge: 1230 bp)

Die gewonnenen PCR-Fragmente wurden mit Hilfe des TOPO TA Klonierungssystems (Invitrogen), das sich die überstehenden A-Reste der PCR-Produkte bei Verwendung von Taq-Polymerase zunutze macht, nach
40 Herstellervorschrift in den pcsecTag/FRT/V5-His-TOPO-Vektor (Invitrogen) kloniert. Dieser Vektor erlaubt nach stabiler Integration in eukaryotische Flp-In-Zelllinien (siehe unten) die Sekretion des gewünschten, am C-Terminus mit einem 6xHis-Peptid versehenen Proteinfragments in den Zellkulturüberstand. PolyHis-tragende

Proteinfragmente wurden über Nickel-Chelatchromatographie aus gesammelten Zellkulturüberständen aufgereinigt.

Als Produzenten der Proteinfragmente wurden Flp-In 293 Zellen (Invitrogen) verwendet, die sich von der menschlichen Nierenzelllinie HEK 293 ableiten. In Flp-In-Zellen ist das Plasmid pFRT/lacZeo (Invitrogen) stabil integriert. Dieser Vektor enthält eine von der Flp-Rekombinase spezifisch erkannte FRT-Region. Bei gleichzeitiger Transfektion der Flp-293-Zellen mit dem pOG44-Plasmid, das die Expression der Flp-Rekombinase ermöglicht, und dem die Basensequenz des gewünschten Proteinfragments tragenden pcsecTag/FRT/V5-His-TOPO-Vektor kommt es an der FRT-Region zu einem Einbau der für die Herstellung des sekretierten Proteinfragments notwendigen Anteile des pcsecTag/FRT/V5-His-TOPO-Vektors.

Beispiel 3: Selektive Aufreinigung von Oligodendrozyten aus ZNS-Gewebe von Säugern mit Hilfe von nativem Tenascin-R

Als Ausgangsmaterial wurden postnatale Mausgehirne (entweder das Gesamtgehirn oder isolierte Vorderhirn- und Kleinhirnbereiche bzw. Präparationen des optischen Nervs) der Altersstufen Postnataltag 0 (P0) bis adult verwendet. Isolierte Gehirnbereiche wurden nach mechanischer Zerkleinerung entsprechend der Herkunft bzw. des Alters mit 0,5 bis 1%iger (w/v) Trypsinlösung behandelt (P0 bis P2 Gehirne mit 0,5% (w/v) Trypsinlösung für 12 min bei Raumtemperatur (RT), P5 Gehirne mit 1% (w/v) Trypsinlösung für 15 min bei RT, P8 Gehirne mit 1% (w/v) Trypsinlösung für 20 min bei RT und adulte Gehirne mit 1% (w/v) Trypsinlösung für 30 min bei RT). Die Gewebesteile wurden nach Zugabe eines größeren Volumens HBSS bei 600 g für 10 Minuten bei 4°C pelletiert.

Zur Gewinnung von Einzelzellen wurden die pelletierten Gewebestücke in DNase-Lösung aufgenommen und in einer Pasteurpipette mit verengtem Spitzendurchmesser mehrmals auf- und abpipettiert. Die erhaltene grobe Zellsuspension wurde in einem 5-10fachen Volumen an serumfreiem Medium (supplementiert mit 0,2% (w/v) hitzeinaktiviertem Rinderserumalbumin) verdünnt und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Der die Einzelzellsuspension enthaltende Überstand wurde bei 600 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert und die pelletierten Einzelzellen in serumfreiem Medium resuspendiert. Die so gewonnenen Einzelzellsuspensionen enthielten alle in den entsprechenden Gehirnen/Gehirnbereichen vorhandenen Zelltypen (Neurone, Astrozyten, Oligodendrozyten, Mikroglia, meningiale und endotheliale Zellen).

Zur Gewinnung reiner Oligodendrozytenpopulationen wurden die im letzten Abschnitt vorgestellten Einzelzellsuspensionen (2×10^6 Zellen/ml in serumfreiem Medium) auf mit Tenascin-R Protein beschichteten Zellkulturschalen (siehe unten) ausplattiert und für 8-20 Stunden in einem CO₂-Inkubator (5% CO₂) kultiviert.

5 Nicht adhärente Zellen wurden mit HBSS weggespült und adhärente Zellen in serumfreiem Medium weiter kultiviert. Anschließend wurden die auf TN-R-Substraten adhärenen Zellen mit einem GalC-spezifischen monoklonalen Maus-Antikörper (O1; Bansai, R. et al., J. Neurosci. Res. 24:548-557 (1989)) inkubiert (30 min bei RT). Nach Fixierung der Zellen mit 4 % (v/v) Paraformaldehyd in PBS
10 für 10 min bei RT wurde die Bindung des O1-Antikörpers auf die Zellen durch Inkubation mit Cyanin3- oder FITC-gekoppelten anti-Maus-Ig-Antikörpern (20 min bei RT) fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen. Auf dem Substrat verblieben 99+/-1% GalC-färbbare Zellen, also nur Oligodendrozyten (Fig. 7, untere Zeile).

Die durch dieses Einstufenverfahren gewonnenen Zellen konnten für weitere
15 Verwendungszwecke durch Behandlung mit Accutase[®] (Sigma) vom Substrat abgelöst und auf anderen Substraten/Plastikoberflächen bzw. in anderen definierten Medien zur Gewinnung von beispielsweise unreifen Vorläufer-Oligodendrozyten oder myelinkompetenten Oligodendrozyten weiter kultiviert werden.

Für die Herstellung von Substraten aus Tenascin-R Proteinen/Proteinfragmenten
20 wurden Plastikoberflächen (Zellkulturschalen, -flaschen, etc.) mit den entsprechenden Proteinen/Proteinfragmenten (20-40 µg/ml in PBS) für 1-2 h bei 37°C inkubiert, mit PBS gewaschen, anschließend mit Blockierungspuffer inkubiert (1 h bei 37°C) und abschließend erneut mit PBS (2-3 mal) gewaschen. Für die Herstellung von TN-R-Substraten zur Gewinnung reiner Oligodendrozyten-
25 populationen konnten TN-R Proteine aus Hai, Karpfen, Huhn, Maus, Ratte, Rind, Schwein, oder Mensch verwendet werden. Zumindest die aus Nager-TN-R hergestellten Substrate können nach Beschichtung auch eingetrocknet werden, ohne dass die spezifisch adhäsiven Eigenschaften der TN-R Proteine für Oligodendrozyten hierdurch verloren gingen.

30

Beispiel 4: Selektive Aufreinigung von Oligodendrozyten aus ZNS-Gewebe von Säugern mit Hilfe von Tenascin-R-Fragmenten

Für die Selektion reiner Oligodendrozytenpopulationen aus ZNS-Gewebe mit Hilfe von rekombinant hergestellten TN-R-Fragmenten werden im Wesentlichen die in
35 Bsp. 3 beschriebenen Schritte zur Gewinnung von Einzelzellsuspensionen aus

postnatalem Gehirngewebe und zur Selektion von Oligodendrozyten auf mit TN-R-Fragmenten beschichteten Zellkulturschalen aus der Zellsuspension unter serumfreien Kulturbedingungen angewandt. Die durch dieses Einstufenverfahren gewonnenen oligodendroglialen Zellen können für weitere Verwendungszwecke vom

5 Substrat abgelöst und auf anderen Substraten bzw. unter anderen Kulturbedingungen weiter vermehrt oder untersucht werden.

Für die Herstellung von Substraten aus rekombinant hergestellten TN-R-Fragmenten werden Plastikoberflächen mit den entsprechenden, aus dem C-Terminus des humanen TN-R stammenden Proteinfragmenten, die

10 Aminosäuresequenzen der FNG-Domäne und/oder Teile davon enthalten, beschichtet (10-20 µg/ml in PBS für 2 h bei 37°C). Alternativ werden die entsprechenden TN-R-Fragmente kovalent an Träger gekoppelt, z.B. durch eine N-Alkylcarbamat-Bindung von Aminogruppen des Proteinfragments an 1,1'-Carbonyldiimidazol-aktivierte Matrizes (i.e. Plastikoberflächen oder Biopolymere).

15 Die Substratträger werden anschließend mit PBS gewaschen, mit Blockierungspuffer inkubiert (1 h bei 37°C) und abschließend erneut mit PBS gewaschen.

Beispiel 5: Herstellung monoklonaler TN-R Antikörper

Die monoklonalen TN-R Antikörper R1 und R2 wurden bereits charakterisiert (R1 =

20 Antikörper aus Klon 597, R2 = Antikörper aus Klon 596 in Pesheva, P. et al., J. Cell. Biol. 109:1765-1778 (1989)). Sie wurden gegen Hühnerhirn-Glycoproteine erzeugt und erkennen diverse Vertebraten-TN-R, u.a. von Huhn und Mensch (Tab. 2). Die monoklonalen TN-R-Antikörper R4, R5 und R6 wurden durch Immunisierung mit einer äquimolaren Mischung aus Huhn-TN-R und humanem TN-R als Antigen in

25 BALB/c-Mäusen hergestellt (3 subkutane Injektionen in 2-Wochen-Abständen mit 5 µg Protein/Maus). Die genannten TN-R Proteine waren zuvor durch immunaffinitätschromatographische Reinigung über Säulenmatrices, an die R2 Antikörper gekoppelt waren, aus erwachsenem Hirngewebe gewonnen worden. Hybridomklone, gewonnen durch die Fusion von aus mit diesen TN-R Proteinen

30 immunisierten Mäusen stammenden Milzzellen mit Maus-Myelomzellen (Myelomzelllinie P3X63/Ag8), wurden in ELISA-Assays gegen Huhn-, Maus- und humanes TN-R gescreent. Hierfür wurden Mikrotiterplatten mit Maus- oder einer äquimolaren Mischung aus Huhn- und humanen TN-R beschichtet (0,5 µg/ml in 0,1 M NaHCO₃ über Nacht bei 4°C) und mit Hybridomzellüberständen inkubiert (2h bei

35 37°C). Die Bindungen der in diesen Überständen vorhandenen kreuzreaktiven

Antikörper wurde durch Inkubation mit Peroxidase-gekoppelten anti-Maus-Ig-Antikörpern nachgewiesen. Die Spezifität positiver Hybridomklone für TN-R war unabhängig von der Herkunft des TN-R Proteins, wie durch weitere ELISA- und Westernblotanalysen von immunaffinitätsgereinigten TN-R Proteinen und

5 Gehirnextrakten gezeigt werden konnte.

Die Reinigung der Antikörper erfolgte durch Auftrennung der Überstände der Hybridomkulturen über Protein G-Sepharose-Säulen (Amersham).

Die Antikörper R4, R5 und R6 gehörten wie R1 und R2 der IgG1-Subklasse von Immunglobulinen an und erkannten TN-R Proteine in verschiedenen

10 Vertebratenklassen (Fig. 5 und Tab.2): Fische (R5, R6), Amphibien (R5, R6), Reptilien (R4, R5, R6), Vögel (R4, R5, R6) und Säuger (R4, R5, R6). R4 erkannte also nur das TN-R in höheren Vertebratenklassen. Die Ergebnisse für R1 , R2, R4, R5 und R6 sind in Tab. 2 zusammengefasst. In höheren Vertebraten erkannte R1 nur die 180 kD-Form des TN-R Proteins.

15 Keiner der Antikörper reagierte mit anderen ECM-Proteinen neben TN-R (wie z.B. TN-C, Fibronectin, Laminin, Vitronectin oder Kollagenen; vgl. Fig. 5E).

R4 und R6 waren auch nach Abspaltung der Zuckerreste von den TN-R Proteinen durch Glykosidase-Verdau noch aktiv, sie erkannten also Proteinepitope auf dem TN-R-Molekül.

20 Tab. 2 fasst die Ergebnisse mehrerer ELISA- und Western Blot-Analysen zusammen: während R2 und R4 hauptsächlich mit TN-R höherer Vertebraten reagieren, erkennen R1, R5 und R6 alle getesteten Vertebratenarten. In höheren Vertebraten, die sowohl die 160 kD- als auch die 180 kD-Form von TN-R aufweisen, erkennt R1 hauptsächlich die 180 kD-Form. Die Antikörper sind in verschiedenen

25 immunochemischen Verfahren einsetzbar (Tab.2). Des weiteren interferieren R2, R4, R5 und R6 *in vitro* mit der inhibitorischen Wirkung des TN-R auf die neuronale Zelladhäsion und das Axonwachstum, indem sie diese Wirkung neutralisieren (Fig. 5C und 5D).

30 Tab. 2: Kreuzreaktivitäten der monoklonalen TN-R Antikörper (R1, R2, R4, R5, R6) mit verschiedenen Vertebraten; Anwendungsbereiche.

| Vertebratenklasse/Familie | TN-R Proteine | R1 | R2 | R4 | R5 | R6 |
|---------------------------|---------------|----|----|----|----|----|
| <u>Chondrichthyes</u> | | | | | | |
| Squalidae (Hai) | 220 kD | x | | | x | x |
| <u>Ostheichthyes</u> | | | | | | |
| Cyprinidae (Karpfen) | 170 kD | x | | | x | x |
| Salmonidae (Forelle) | 170 kD | x | | | x | x |

| | | | | | | |
|---|-----------------|---|---|---|---|---|
| <u>Amphibia</u> | | | | | | |
| Salamandridae (Salamander) | 180 kD | x | x | | x | x |
| Ranidae (Frosch) | 160-180 kD | x | x | | x | x |
| <u>Reptilia</u> | | | | | | |
| Colubridae (Grasschlange) | 160-180 kD | x | x | x | x | x |
| Testudinidae (Schildkröte) | 160-180 kD | x | x | | x | x |
| <u>Aves</u> | | | | | | |
| Phasianidae (Huhn) | 160-180 kD | x | x | x | x | x |
| Columbidae (Taube) | 160-180 kD | x | x | x | x | x |
| <u>Mammalia</u> | | | | | | |
| Erinaceidae (Igel) | 160-180 kD | x | x | x | x | x |
| Muridae (Maus, Ratte) | 160-180 kD | x | x | x | x | x |
| Sciuridae (Maulwurf) | 160-180 kD | x | x | x | x | x |
| Leporidae (Kaninchen) | 160-180 kD | x | x | x | x | x |
| Bovidae (Rind) | 160-180 kD | x | x | x | x | x |
| Suidae (Schwein) | 160-180 kD | x | x | x | x | x |
| Homo sapiens | 160-180 kD | x | x | x | x | x |
| <u>Anwendungsbereiche</u> | | | | | | |
| ELISA | nativ | x | x | x | x | x |
| Immunzytochemie | nativ / fixiert | x | x | x | x | x |
| Immunhistochemie | nativ / fixiert | x | x | x | x | x |
| Westernblot | denaturiert | ± | x | x | x | x |
| Immunpräzipitation | nativ | x | x | x | x | x |
| <u>Interferenz</u> mit TN-R-vermittelter Inhibition der neuronalen Adhäsion | | - | x | x | x | x |

Beispiel 6: Zelladhäsions- und Neuritenwachstumstests

Für Kurz- und Langzeitadhäsionstests wurden entweder TN-R alleine, TN-R in einer Mischung mit anderen ECM-Proteinen oder Proteinfragmenten, oder eine TN-R-Schicht auf PLL-Substrat hergestellt wie beschrieben (Pesheva, P. et al., Neuron 10:69-82 (1993); Pesheva, P. et al., J. Cell. Sci. 107:2323-2333 (1994)). Für Neuritenwachstumstests wurde Laminin in Mischung mit BSA (Kontrollprotein) oder TN-R (Verhältnis 20:20µg/ml für jedes Protein) in Zellkulturschalen als Beschichtung aufgebracht und 60 min bei 37 °C inkubiert. Für Zelladhäsionstests wurden entweder TN-R alleine (20 µg/ml in PBS) oder BSA bzw. TN-R vermischt mit Laminin, Fibronectin oder Fibronectin-Fragmenten (Verhältnis 20:20 µg/ml für jedes Protein) als Schicht auf Plastik-Zellkulturschalen ausgebracht und 60 min bei 37°C inkubiert. Für die Zelladhäsionstests wurden kultivierte Zellen (s. oben, Zellkulturen) durch milde Behandlung mit Accutase® (PAA Laboratories; 10 min bei 15 RT) oder 0,01 % Trypsin (Sigma; 5 min bei RT) aus der Zellkulturschale gelöst. Dann wurden Einzelzellkulturen (1x10⁶ Zellen/ml) im jeweils geeigneten Medium auf die Testsubstrate ausplattiert. Für quantitative Analysen wurden Zellen, welche an die verschiedenen getesteten Substrate anhafteten in mikroskopischen Feldern von 800 µm² mit der Bildanalysesoftware AxioVision (Zeiss) ausgezählt. Mittelwerte

± Standardabweichung wurden aus den Ergebnissen von fünf verschiedenen mikroskopischen Feldern gebildet.

Beispiel 7: Differenzierung von Oligodendrozyten aus humanen neuronalen

5 Stammzellen

Humane neurale Stammzellen (Cambrex, human neural progenitors: PT-2599; 3×10^6 Zellen/ml) wurden als Neurospheroiden in NPMM (Neural Progenitor Maintenance Medium, Cambrex, CC-3209) für 7 Tage (bei 37 °C und 5% CO₂) in Zellkulturflaschen (T-75) vermehrt. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt.

10 Anschließend wurden die Stammzellen enthaltenden Neurospheroiden auf mit Laminin (20 µg/ml) beschichteten Zellkulturschalen ausplattiert (1-2 Neurospheroiden/Schale) und durch Kultivierung in einem definierten serumfreien Medium (DMEM/Ham's F12, N2 Supplement (Invitrogen), 50 ng/ml bFGF, 10 ng/ml PDGF) für minimal 7 Tage vermehrt. Das Medium wurde alle 2 Tage zur Hälfte erneuert.

15 Diese Kulturbedingungen führten zur Vorprogrammierung der neuronalen Stammzellen zu einem dominant glialen Phänotyp (nachweisbar durch die Expression von Sulfatiden). Die Zellen wurden anschließend durch Behandlung mit Accutase® (PAA, 10 min bei RT) von den Zellkulturschalen abgelöst, in einem definierten Medium (1×10^6 Zellen/ml in DMEM, N2 Supplement, 10 ng/ml T3
20 (Trijodothyronin, Sigma)) aufgenommen und auf nur mit Poly-D-Lysin (PDL, Sigma) oder auf mit PDL und TN-R (20 µg/ml) beschichteten Zellkulturplatten ausplattiert. Die anschließende Inkubation bei 37 °C und 5% CO₂ führte dazu, dass sich nach 5 Tagen in Gegenwart von TN-R, nicht aber in Gegenwart von nur PDL dominant reife Oligodendrozyten gebildet hatten, wie durch die Expression von MBP (myelin basic
25 protein) nachgewiesen wurde.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Isolierung und Reinigung von neuronalen Zellen aus neuronalem Primärgewebe von Vertebraten, umfassend die Selektion der Zellen aus einer Einzelzellsuspension mittels einer Tenascin-R-haltigen Sonde ("Tenascin-R-Sonde"),
5 welche Tenascin-R-Verbindungen ausgewählt aus nativem Tenascin-R (TN-R) sowie Homologen und Fragmenten desselben und Fusionsproteine derartiger Verbindungen umfasst.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei
 - (i) die Tenascin-R-Verbindung der Tenascin-R-Sonde eine rekombinante Tenascin-
10 R-Verbindung ist; und/oder
 - (ii) das TN-R aus Vertebraten, bevorzugt aus Fischen, Reptilien, Amphibien, Vögeln und Säugetieren, besonders bevorzugt aus Hai, Karpfen, Huhn, Nagern einschließlich Maus und Ratte, Rind, Schwein und Mensch, ganz besonders bevorzugt aus Nagern und Mensch stammt; und/oder
 - 15 (iii) die Tenascin-R-Sonde weitere funktionelle Peptid- oder Proteinsequenzen enthält und/oder an einen Träger gekoppelt ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei
 - (i) das native Tenascin-R humanes Tenascin-R ist und/oder die Aminosäuresequenz
20 SEQ ID NO:1 besitzt oder eine Substitutions-, Deletions- und/oder Additionsmutante derselben ist; und/oder
 - (ii) das Tenascin-R-Fragment den C-Terminus von nativem Tenascin-R oder eine Substitutions-, Deletions- und/oder Additionsmutante desselben umfasst, bevorzugt denjenigen Bereich umfasst, der durch die Nukleotide 3940-4155 der SEQ ID NO:1 kodiert wird, besonders bevorzugt einen derjenigen Bereiche umfasst, die durch die
25 Nukleotide 2926-4155, 3439-4155, 3487-4155 oder 3940-4155 von humanem TN-R der SEQ ID NO:1 kodiert werden; und/oder
 - (iii) das Tenascin-R-Fragment die Aminosäurereste 1287 bis 1358 der SEQ ID NO:2, bevorzugt eine oder mehrere der Teilsequenzen des humanen TN-R ausgewählt aus den Aminosäuren 1287-1358, 1120-1358, 1136-1358 oder 949-
30 1358 in SEQ ID NO:2 oder eine Substitutions-, Deletions- und/oder Additionsmutante derselben umfasst; und/oder
 - (iv) das Tenascin-R-Fusionsprotein
eine Tenascin-R-Komponente, umfassend natives Tenascin-R, ein Tenascin-R-Fragment oder eine Tenascin-R-Mutante, insbesondere wie vorstehend unter (i) bis
35 (iii) beschrieben, und eine funktionelle Komponente, umfassend weitere

funktionelle Peptide oder Proteine, aufweist oder aus zwei oder mehr, bevorzugt zwei oder drei funktionellen Tenascin-R-Komponenten wie vorstehend definiert zusammengesetzt ist.

4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei das Tenascin-R-Fragment ein Peptid mit der
5 Sequenz der Aminosäurereste 1287-1358, 1120-1358, 1136-1358 oder 949-1358, vorzugsweise der Aminosäurereste 949-1358 oder 1120-1358 von SEQ ID NO:1 ist.

5. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, wobei

(i) das Verfahren zur Isolierung und Reinigung von glialen Zellen, bevorzugt von Oligodendrozyten, geeignet ist; und/oder

10 (ii) das Vertebraten-Primärgewebe aus niederen oder höheren Vertebraten einschließlich Fischen, Amphibien, Vögeln und Säugetieren, besonders bevorzugt aus Hai, Karpfen, Huhn, Nagern einschließlich Maus und Ratte, Rind, Schwein und Mensch, ganz besonders bevorzugt aus Nagern und Mensch stammt; und/oder

(iii) die Isolierung der Zellen durch selektive Substratadhäsion an die Tenascin-R-
15 Sonde und/oder in einem einzigen Reinigungsschritt erfolgt.

6. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Einzelzellsuspension

(i) aus embryonalem, fötalem, früh- oder spätpostnatalem und/oder adultem Gewebe hergestellt wird; und/oder

20 (ii) aus Gewebe aus verschiedenen Bereichen des Nervensystems, bevorzugt aus Nervengewebe oder Gehirn, besonders bevorzugt aus Gehirn, Rückenmark oder optischem Nerv hergestellt wird; und/oder

(iii) Zellen einer oder mehrerer Differenzierungsstufen, bevorzugt einer einzigen Differenzierungsstufe, enthält.

25 7. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6, wobei

(i) die Tenascin-R-Sonde durch nichtkovalente Wechselwirkungen, einschließlich Wechselwirkung mit TN-R-spezifischen Antikörpern usw., oder durch eine andere adäquate Kupplungstechnik, welche die Spezifität der Tenascin-R-Sonde nicht verändert, einschließlich kovalente Vernetzung usw., an ein Trägermaterial
30 gebunden ist; und/oder

(ii) die Einzelzellsuspension mit der Tenascin-R-Sonde in Kontakt gebracht wird, so dass in der Einzelzellsuspension vorhandene Tenascin-R-bindende Zellen an die Sonde gebunden werden; und/oder

- (iii) durch spezifische Bindung neuraler Stammzellen aus der Einzelzellsuspension an die Tenascin-R-Sonde eine Isolierung dieser Zellen aus der Zellkultur erfolgt, die nicht gebundenen Zellen entfernt werden und optional anschließend die über die Tenascin-R-Sonde an das Trägermaterial gebundenen Zellen durch Trypsinierung,
- 5 Inkubation mit Accutase® oder ein anderes adäquates Verfahren vom Trägermaterial abgelöst werden; und/oder
- (iv) die gebundenen Zellen durch immunologische Methoden nachgewiesen werden; und/oder
- (v) das Verfahren *in vitro* erfolgt.
- 10 8. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7, das
- (i) zur Gewinnung von neuralen Zellen, insbesondere von Oligodendrozyten, für die Anzucht differenzierter Zellen, insbesondere neuraler Zellen, in neurobiologischen und zellphysiologischen Untersuchungen, in der biologischen und klinischen Forschung und für diagnostische und therapeutische Verfahren *in vitro* und *in vivo*,
- 15 insbesondere für die Herstellung eines Medikaments zur Zelltherapie und zur Therapie von neurodegenerativen Krankheiten; und/oder
- (ii) zum Nachweis von neurodegenerativen Krankheiten geeignet ist.
9. Tenascin-R-Fragment oder Tenascin-R-Fusionsprotein wie in Anspruch 3 oder 4
- 20 definiert.
10. Tenascin-R-Fragment oder Tenascin-R-Fusionsprotein nach Anspruch 9, welches eine Aminosäuresequenz ausgewählt aus den Aminosäuren 1287-1358, 1120-1358, 1136-1358 oder 949-1358 in SEQ ID NO:2 aufweist.
11. DNA, die für ein Tenascin-R-Fragment oder Tenascin-R-Fusionsprotein nach
- 25 Anspruch 9 oder 10 kodiert.
12. Vektor, der eine DNA nach Anspruch 11 umfasst.
13. Wirtsorganismus, der mit einem Vektor nach Anspruch 12 transformiert/transfiziert ist und/oder eine DNA nach Anspruch 11 aufweist.
14. Verfahren zur Herstellung eines Tenascin-R-Fragments oder Tenascin-R-
- 30 Fusionsproteins nach Anspruch 10, umfassend das Kultivieren des Wirtsorganismus nach Anspruch 13.
15. Antikörper, der durch Immunisierung eines geeigneten Wirtsorganismus mit Tenascin-R von wenigstens zwei unterschiedlichen Spezies, insbesondere mit

Tenascin-R von wenigstens zwei unterschiedlichen Vertebraten erhältlich ist, und/oder welcher an Tenascin-R von wenigstens zwei unterschiedlichen Spezies, insbesondere von wenigstens zwei unterschiedlichen Vertebraten bindet.

5 16. Antikörper nach Anspruch 15, der monoklonal ist und bevorzugt durch die Hybridomzelllinie DSM ACC2754 oder DSM ACC2753 produziert wird.

17. Zelllinie oder Hybridomzelllinie, die einen monoklonalen Antikörper nach Anspruch 16 produziert.

18. Verwendung des Antikörpers nach Anspruch 15 oder 16

(i) zum immunochemischen Nachweis von TN-R;

10 (ii) zur Hemmung der Wirkung von TN-R;

(iii) zur Beeinflussung der Neuralentwicklung und

(iv) zur Herstellung von Medikamenten zur Therapie und Prophylaxe traumatischer Nervenläsionen und von Medikamenten zur gezielten Beeinflussung der Neuralentwicklung.

15 19. Verfahren zur Therapie und Prophylaxe traumatischer Nervenläsionen oder zur gezielten Beeinflussung der Neuralentwicklung, umfassend die Verabreichung einer pharmakologisch ausreichenden Menge des Antikörpers gemäß Anspruch 15 oder 16 an einen menschlichen oder tierischen Patienten, der einer solchen Behandlung bedarf.

20 20. Kit zur Isolierung und Reinigung von neuronalen Zellen, insbesondere von Oligodendrozyten, nach einem oder mehreren der Verfahren der Ansprüche 1 bis 8, insbesondere enthaltend

(i) eine wie in Ansprüchen 1 bis 4 definierte Tenascin-R-Sonde, und/oder

(ii) einen Vektor, der für die in (i) definierte Tenascin-R-Sonde kodiert, und/oder

25 (iii) eine Stammkultur einer Zelllinie, die dazu geeignet ist, die wie in Ansprüchen 1 bis 4 definierte Tenascin-R-Sonde zu exprimieren.

21. Kit nach Anspruch 20, wobei

(i) die Sonde an ein Trägermaterial gebunden ist; und/oder

30 (ii) der Kit weiterhin Tenascin-R-Antikörper, insbesondere die in Anspruch 15 definierten Antikörper umfasst; und/oder

(iii) der Kit weiterhin enzymatische Lösungen zur Zelldissoziation, Puffer und/oder Kulturmedien umfasst.

22. Verwendung einer Tenascin-R-Sonde wie in Ansprüchen 1 bis 4 definiert, bevorzugt eines Tenascin-R-Fragments oder Tenascin-R-Fusionsproteins wie in Anspruch 9 oder 10 definiert, zur Gewinnung von neuronalen Zellen, insbesondere von Oligodendrozyten, für die Anzucht differenzierter Zellen, insbesondere neuraler Zellen, in neurobiologischen und zellphysiologischen Untersuchungen, in der biologischen und klinischen Forschung und für diagnostische und therapeutische Verfahren *in vitro* und *in vivo*, insbesondere für die Herstellung eines Medikaments zur Zelltherapie und zur Therapie von neurodegenerativen Krankheiten, die mit einem Verlust von Oligodendrozyten oder Myelin einhergehen, insbesondere Multipler Sklerose und periventrikulärer Leukomalazie (PVL).
23. Verfahren zur Zelltherapie oder zur Therapie von neurodegenerativen Krankheiten, die mit einem Verlust von Oligodendrozyten oder Myelin einhergehen, insbesondere von Multipler Sklerose und periventrikulärer Leukomalazie (PVL), umfassend die Gabe einer Tenascin-R-Sonde wie in einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4 definiert, bevorzugt eines Tenascin-R-Fragments oder Tenascin-R-Fusionsproteins wie in Anspruch 9 oder 10 definiert, an einen menschlichen oder tierischen Patienten.
24. Verfahren zur Herstellung von Oligodendrozyten aus isolierten Stammzellen *in vitro* durch Inkubation der Stammzellen in Anwesenheit einer Tenascin-R-Sonde wie in einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4 definiert, bevorzugt eines Tenascin-R-Fragments oder Tenascin-R-Fusionsproteins wie in Anspruch 9 oder 10 definiert.
25. Verfahren nach Anspruch 24, wobei die isolierten Stammzellen neurale oder nicht-neurale Stammzellen sind, welche das Potential zur Sulfatid-Expression besitzen.

- 1/9-

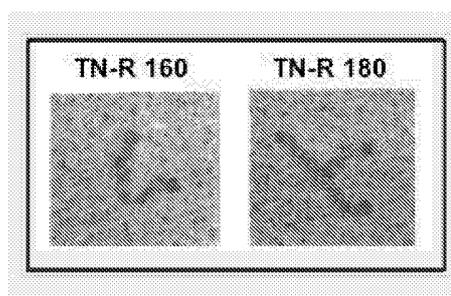


Fig. 1

TN-R multiple sequence alignment

```

gi|29789028|ref|NP_071707.1|      Mus musculus
gi|6981668|ref|NP_037177.1|      Rattus norvegicus
gi|5730098|ref|NP_003276.2|      Homo sapiens
gi|45384054|ref|NP_990607.1|     Gallus gallus
gi|35902868|ref|NP_919364.1|     Danio rerio

gi|29789028|ref|NP_071707.1|      MGIDGETVVLKNMLIGVNLILLGSMKLPSECRLEVTTERAQRQTVEEEGG 50
gi|6981668|ref|NP_037177.1|      MGIEGETVVLKNMLIGVNLILLGSMKLPSECRLEVTTERVQRQTVEEEGG 50
gi|5730098|ref|NP_003276.2|      MGADGETVVLKNMLIGVNLILLGSMIKPSECQLEVTTERVQRQSVVEEEGG 50
gi|45384054|ref|NP_990607.1|      MGTDSENPVLRNVLISFNLLLLGAVLKPFECRLEVTTEPAERPAVDEEKG 50
gi|35902868|ref|NP_919364.1|      --MWGCTMAIQGSVVSLALLFFGIQAVPSPTSKLVRTTRVRR-QVPEGGD 47
      . . .::: .::: *::: * * * * . * * * .

gi|29789028|ref|NP_071707.1|      ASSHNTSSKEQPMVFNHVYININVPLESLCSSGLEASAEQDMSAE----DD 96
gi|6981668|ref|NP_037177.1|      ASSYNTSSKEQPMVFNHVYININVPLESLCSSGLEASAEQDVSAB----DD 96
gi|5730098|ref|NP_003276.2|      IANYNTSSKEQPMVFNHVYININVPIDNLCSGLEASAEQEVSAE----DE 96
gi|45384054|ref|NP_990607.1|      LANCSPPVKEQPMVFHHIYNINVPVDSCCSSMLRSSAE-EVSSE----DD 95
gi|35902868|ref|NP_919364.1|      PADN----QQQPMVFNHVYININVPVESLCSVDLDAVTPETNKTAGSDK 93
      :.      : **:*:*:*:*:*:*:*:* * * * : : : . *

gi|29789028|ref|NP_071707.1|      TLAEYIGQTSDHESQVTFTHKINLPKACPCASSQVLQELLSRIEMLER 146
gi|6981668|ref|NP_037177.1|      TLAEYTGQTSDHESQVTFTHKINLPKACPCASSAQLQELLSRIEMLER 146
gi|5730098|ref|NP_003276.2|      TLAEYMGQTSDHESQVTFTHRINLPKACPCASSAQLQELLSRIEMLER 146
gi|45384054|ref|NP_990607.1|      RLAEYTEQTSDESQVTFTHRINLPKQACKCSTSLPSLQELLSRIEMLER 145
gi|35902868|ref|NP_919364.1|      MPTEYTEETVDSQVTFTHRINIPKQACACP-SATTIEQLASRIEMLER 142
      :** : * * :*****:*:*:* * * * * : : * *****

gi|29789028|ref|NP_071707.1|      EVSLLRDQCNTNCCQESAATGQLDYVPHCSGHGNFSEFCGICNEGWFG 196
gi|6981668|ref|NP_037177.1|      EVSVLRDQCNTNCCQESAATGQLDYVPHCSGHGNFSEFCGICNEGWFG 196
gi|5730098|ref|NP_003276.2|      EVSVLRDQCNTNCCQESAATGQLDYVPHCSGHGNFSEFCGICNEGWFG 196
gi|45384054|ref|NP_990607.1|      EVSMLRDQCNTNCCQENAAATGRLDYTLPCSGHGNFSEFCGICNEGWAG 195
gi|35902868|ref|NP_919364.1|      EVSLLRDQCSSCCGESSVMGRDLFVPPQCG-HGTFMEVCGVCEEGWIG 191
      ***:* * * . : * * * . : * : * : * * * * * * * * * * *

gi|29789028|ref|NP_071707.1|      KNCSEPYCPLGCSRGVVGVGQCICDSEYSGDDCSELRCPTDCSSRGLCV 246
gi|6981668|ref|NP_037177.1|      KNCSEPYCPLGCSRGVVGVGQCICDSEYSGDDCSELRCPTDCSSRGLCV 246
gi|5730098|ref|NP_003276.2|      KNCSEPYCPLGCSRGVVGVGQCICDSEYSGDDCSELRCPTDCSSRGLCV 246
gi|45384054|ref|NP_990607.1|      SNCSEPRCPRGCSRGVVGVGQCICDSEYSGDDCSELRCPTDCSSRGLCV 245
gi|35902868|ref|NP_919364.1|      KNCTEPRCPDDCSGGQICIEGDCVCDRNFPGGENCSEPRCPDSCSDRGLCI 241
      .**:* * * * . * . : * : * : * * * * * : : . : * : * : * * * * * * * * * *

gi|29789028|ref|NP_071707.1|      DGECVCEEPYTGEDCRELRCPGDCSGKGCANGTCLCQEGYAGEDCSQRR 296
gi|6981668|ref|NP_037177.1|      DGECVCEEPYTGEDCRELRCPGDCSGKGCANGTCLCQEGYAGEDCSQRR 296
gi|5730098|ref|NP_003276.2|      DGECVCEEPYTGEDCRELRCPGDCSGKGCANGTCLCQEGYAGEDCSQRR 296
gi|45384054|ref|NP_990607.1|      DGECICEEGPGGEDCSQPRCPDRCSGRGHCDNGTCVCAEGYAGEDCSQRR 295
gi|35902868|ref|NP_919364.1|      DGECVCEEFAGEDCSLGRCLNDCSDQGACVNGSCQCRSGFLGEDCSLIF 291
      ***:* * * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

gi|29789028|ref|NP_071707.1|      CLNACSGRGHCQEGLCICEEGYQGPDCSAVAPPEDLRVAGISDRSIELEW 346
gi|6981668|ref|NP_037177.1|      CLNACSGRGHCQEGLCICEEGYQGPDCSAVAPPEDLRVAGISDRSIELEW 346
gi|5730098|ref|NP_003276.2|      CLNACSGRGHCQEGLCICEEGYQGPDCSAVAPPEDLRVAGISDRSIELEW 346
gi|45384054|ref|NP_990607.1|      CPNACSGRGVCQDGLCICEEGYQGPDCSAVAPPENLRVTGISDGSIELEW 345
gi|35902868|ref|NP_919364.1|      CANNCSQRGVCKEGFCVCEGYTGDGCTSVLPPMNLRVRGVSENTIDLQW 341
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

gi|29789028|ref|NP_071707.1|      DGPMAVTEYVISYQPTALGGLQLQQRVPGDWSGVTIMELEPGLTYNISVY 396
gi|6981668|ref|NP_037177.1|      DGPMAVTEYVISYQP-SLGGGLQLQQRVPGDWSGVTITILEPGLTYNISVY 395
gi|5730098|ref|NP_003276.2|      DGPMAVTEYVISYQPTALGGLQLQQRVPGDWSGVTITILEPGLTYNISVY 396
gi|45384054|ref|NP_990607.1|      DSLGAATEYVVSYPAGPGGSQQLQQRVPGDWSTITITILEPGLTYNISVY 395
gi|35902868|ref|NP_919364.1|      EGPALTLDTLLTYEPTTPGGVQLEMRVPGNVNTITIKGLNPGLEYNVVNY 391
      :.      * : * : * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

gi|29789028|ref|NP_071707.1|      AVISNLSLPIITAKVATHLSTPQGLQFKTITETTVEVQWEPFSSFDGWE 446
gi|6981668|ref|NP_037177.1|      AVISNLSLPIITAKVATHLSTPQGLQFKTITETTVEVQWEPFSSFDGWE 445
gi|5730098|ref|NP_003276.2|      AVISNLSLPIITAKVATHLSTPQGLQFKTITETTVEVQWEPFSSFDGWE 446
gi|45384054|ref|NP_990607.1|      AVISDVLSSPVTTKVTNLTATPQGLKFKTITETTVEVQWEPFSSFDGWE 445
gi|35902868|ref|NP_919364.1|      AVIDNISSPMNTLVSTYLSNPDGLLFSKIMETSVEVQWQPLDYLFDGWE 441
      *** : : * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

- 3/9 -

gi|29789028|ref|NP_071707.1| ISFIPKNNEGGVIAQLPSDVTSTFNQTGLKPGEEYIVNVVALKEQARSPT 496
gi|6981668|ref|NP_037177.1| ISFTPKNNEGIVIAQLPSDVTSTFNQTGLKPGEEYIVNVVALKEQARGPPT 495
gi|5730098|ref|NP_003276.2| ISFIPKNNEGGVIAQVPSDVTSTFNQTGLKPGEEYIVNVVALKEQARSPT 496
gi|45384054|ref|NP_990607.1| ISFIPKNNEGGVIAQLPSTVTFNQTGLKPGEEYIVNVVALKQDQARSPPA 495
gi|35902868|ref|NP_919364.1| ISFIPKNDNDGGMTAQLPSTITSTFHQTGLKPGEEYIVNLVALKQDGRSLPV 491
*** **:*:*:*: **:*:* :*:***** *.:****:*.. *

gi|29789028|ref|NP_071707.1| SASVSTVIDGPTQIILVRDVSSTVAFVVEWTPPRAKVDFILLKYGLVGGEGG 546
gi|6981668|ref|NP_037177.1| SASVSTVIDGPTQIILVRDVSSTVAFVVEWTPPRAKVDFILLKYGLVGGEGG 546
gi|5730098|ref|NP_003276.2| SASVSTVIDGPTQIILVRDVSSTVAFVVEWTPPRAKVDFILLKYGLVGGEGG 545
gi|45384054|ref|NP_990607.1| SDSISLTLIDGPTQIILVRDVSSTVAFVVEWTPPRARVDAILLKYGLADGEGG 545
gi|35902868|ref|NP_919364.1| TATVTTLIDGPIQLIVRDISSTVAFVVEWSPPKAKVDQIILLKYGLVGGEGP 541
: .:.*:**** *:.*:*:***** **:*:* *:.*:***.. **

gi|29789028|ref|NP_071707.1| KTTFRLOPPLSQYSVQALRPGSRYEVSISAVRGNTSEASSTQFTTEIDA 596
gi|6981668|ref|NP_037177.1| KTTFRLOPPLSQYSVQALRPGSRYEVSISAVRGNTSEASSTQFTTEIDA 595
gi|5730098|ref|NP_003276.2| RTTFRLOPPLSQYSVQALRPGSRYEVSISAVRGNTSEASSTQFTTEIDA 596
gi|45384054|ref|NP_990607.1| RTTFRLOPPLSQYSVQALRPGARVHLAVSALRGANESQPALAQFTTEIDA 595
gi|35902868|ref|NP_919364.1| KTTFRLOPPLSQYSVQALRPGSTYEVSISAVRGNTSEASSTQFTTEIDA 591
:*****.*****.*.*****: *.:.*:*. ** :*****

gi|29789028|ref|NP_071707.1| PKNLRVGSRTATSLDLEWDNSEAEAEQYKVVVYSTLAGEQYHEVLVPGKIG 646
gi|6981668|ref|NP_037177.1| PKNLRVGSRTATSLDLEWDNSEAEAEQYKVVVYSTLAGEQYHEVLVPGKIG 645
gi|5730098|ref|NP_003276.2| PKNLRVGSRTATSLDLEWDNSEAEAEQYKVVVYSTLAGEQYHEVLVPRGIG 646
gi|45384054|ref|NP_990607.1| PKNLRVGSRTATSLDLEWDNSEAEAEHSAHRYRVVYSTLAGEHYHEVLVPRDTG 645
gi|35902868|ref|NP_919364.1| PKNLRVLSKTSISLLEWDNSEADVEGYSVVYSTLAGDQYDKVIVPRNDG 641
***** *:.*. **:* *****:.. * *****:.*:.*:***.. *

gi|29789028|ref|NP_071707.1| PTTKTTLDLVPVGTVEYGVGIVSVMNSKQSI PATMNARTELDSPRDLMVTA 696
gi|6981668|ref|NP_037177.1| PTTKTTLDLVPVGTVEYGVGIVSVMNSKQSI PATMNARTELDSPRDLMVTA 695
gi|5730098|ref|NP_003276.2| PTTKTTLDLVPVGTVEYGVGIVSVMNSKQSI PATMNARTELDSPRDLMVTA 696
gi|45384054|ref|NP_990607.1| PTTKTTLDLVPVGTVEYGVGIVSVMNSKQSI PATMNARTELDSPRDLMVTA 695
gi|35902868|ref|NP_919364.1| PTTKTTLDLVPVGTVEYGVGIVSVMNSKQSI PATMNARTELDSPRDLMVTA 691
.:.:* *:.*:*****:*****:..:.* ***** ** * ** **

gi|29789028|ref|NP_071707.1| SSETSISLIWTKASGPIDHYRITFTPSSGISSEVTVPRDRSTYTLTDLEP 746
gi|6981668|ref|NP_037177.1| SSETSISLIWTKASGPIDHYRITFTPSSGISSEVTVPRDRSTYTLTDLEP 745
gi|5730098|ref|NP_003276.2| SSETSISLIWTKASGPIDHYRITFTPSSGIASEVTVPRDRSTYTLTDLEP 746
gi|45384054|ref|NP_990607.1| STETSISLSLWTKAMGPIDHYRITFTPASGMASEVTVSRNESQLTSLSELP 745
gi|35902868|ref|NP_919364.1| STDNTITLLWGTVQGPIDHYRITFTPSSGVTTTELTVPKDVTTLTSLIQP 741
.:.:* * .. *****:.*:.*:***:..:.*:***:..: * **:*:

gi|29789028|ref|NP_071707.1| GAEYIISITAERGRQQSLESTVDAFTGFRPISHLHFSHVTSSSVNITWSD 796
gi|6981668|ref|NP_037177.1| GAEYIISITAERGRQQSLESTVDAFTGFRPISHLHFSHVTSSSVNITWSD 795
gi|5730098|ref|NP_003276.2| GAEYIISITAERGRQQSLESTVDAFTGFRPISHLHFSHVTSSSVNITWSD 796
gi|45384054|ref|NP_990607.1| GTEYITISITAERGRQQSLEATVDAFTGVRPITQLHFSQTLTSSVNITWSD 795
gi|35902868|ref|NP_919364.1| GTEYITITVAQRGRQQSTAATIDAFRTGFRPITQLFFSEVSSDSLTVAWSS 791
::* *:.*:***** :*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:

gi|29789028|ref|NP_071707.1| PSPPADRLIILNYSRPRDKEEDMLEVLLDATKRHAVLMGLQPATEYIVNLVA 846
gi|6981668|ref|NP_037177.1| PSPPADRLIILNYSRPRDEEEEMMEVLLDATKRHAVLMGLQPATEYIVNLVA 845
gi|5730098|ref|NP_003276.2| PSPPADRLIILNYSRPRDEEEEMMEVSLDATKRHAVLMGLQPATEYIVNLVA 846
gi|45384054|ref|NP_990607.1| PSPPADRLVLTYSRPR-EEAPQQLALDGTTRRHASLTGLRSTEYLVSLVA 844
gi|35902868|ref|NP_919364.1| PAPPADAFIILNYSAQDSSSEDS-EIALDGSKTRITLTGLMPSRRYTATLV 840
::*:* :*:*:*:* * .: * * * : * * * : * * * : * * * :

gi|29789028|ref|NP_071707.1| VHGTVTSEPIVGSITTGIDPPKNITISNVTKDSLTVSWSSPPVAFDYYRV 896
gi|6981668|ref|NP_037177.1| VHGTVTSEPIVGSITTGIDPPKNITISNVTKDSLTVSWSSPPVAFDYYEY 895
gi|5730098|ref|NP_003276.2| VHGTVTSEPIVGSITTGIDPPKIDITISNVTKDSVMVSWSSPPVAFDYYRV 896
gi|45384054|ref|NP_990607.1| VHGVSSSEPVVTSITTGMDAPKDLRVGNITQDSMVIYWSPPVAFDHYRI 894
gi|35902868|ref|NP_919364.1| MHGNVTSKPVVGSVNTGMDPPRDITVLYVTEESVTITWIQPLALLDYYRM 890
:*:

gi|29789028|ref|NP_071707.1| SYRPTQVGRDLSSVVPNTVTEFAITRILYPAEYIEISLNSVGRGEESEERIC 946
gi|6981668|ref|NP_037177.1| PID-HPSGRDLSSVVPNTVTEFTITRILYPASQYIEISLNSVGRGEESEERIC 944
gi|5730098|ref|NP_003276.2| SYRPTQVGRDLSSVVPNTVTEFTITRILNYPATEYIEISLNSVGRGEESEERIC 946
gi|45384054|ref|NP_990607.1| SYR-AAEGRTDSTAIGNDATEYIMRLLQPATKYEIGVKSVRGEESEVAS 943
gi|35902868|ref|NP_919364.1| SYQ-SSKGRMDSVVDSDINNYTSLHLPATEYIEIKLNAVGRSQESKIVIT 939
. ** ** .: . :.: * **:*:*:* :*:*:*:*:

gi|29789028|ref|NP_071707.1| TLVHTAMDSPMDLIATNITPTEALLQWKAPMGEVENYVIVLTHFAIAGET 996
gi|6981668|ref|NP_037177.1| TLVHTAMDSPMDLIATNITPTEALLQWKAPMGEVENYVIVLTHFAMAGET 994
gi|5730098|ref|NP_003276.2| TLVHTAMDNVPDLIATNITPTEALLQWKAPVGEVENYVIVLTHFAVAGET 996
gi|45384054|ref|NP_990607.1| ITTYTAMDAPLGVATNITPTEALLQWNPPLMDVESYVIVLTHFAIAGET 991

- 5/9 -

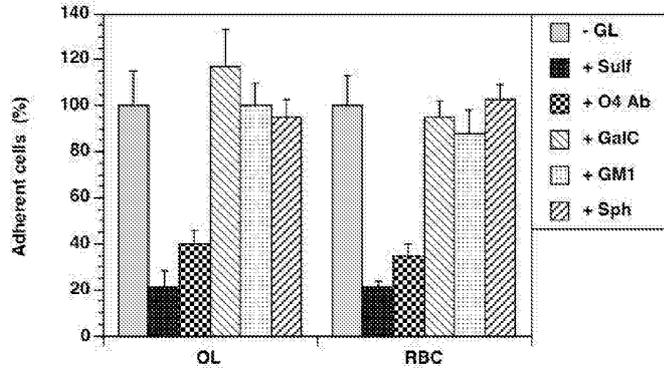


Fig.3

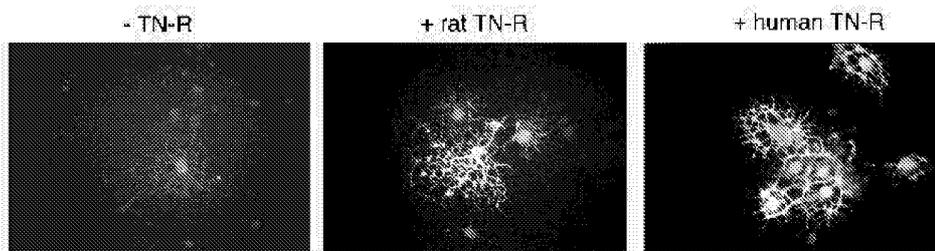


Fig.4

Fig.5A

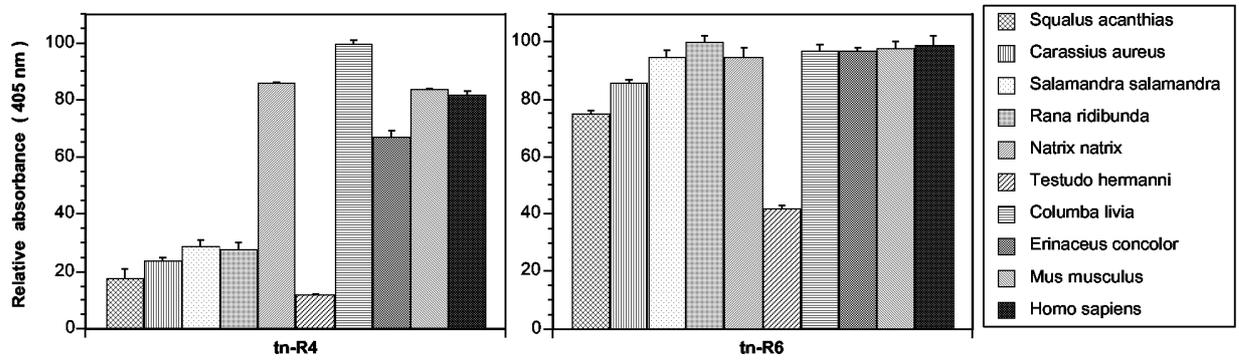


Fig.5B

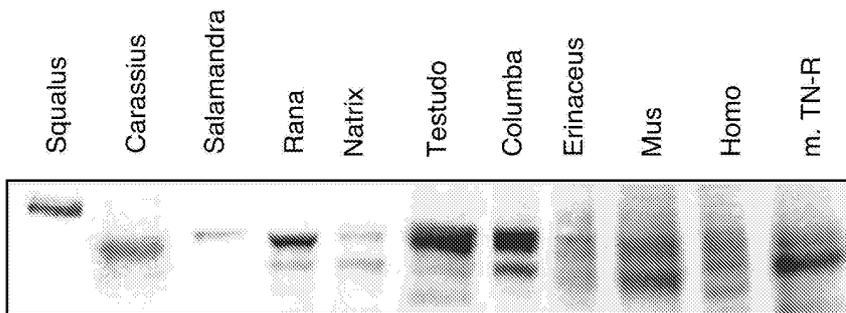
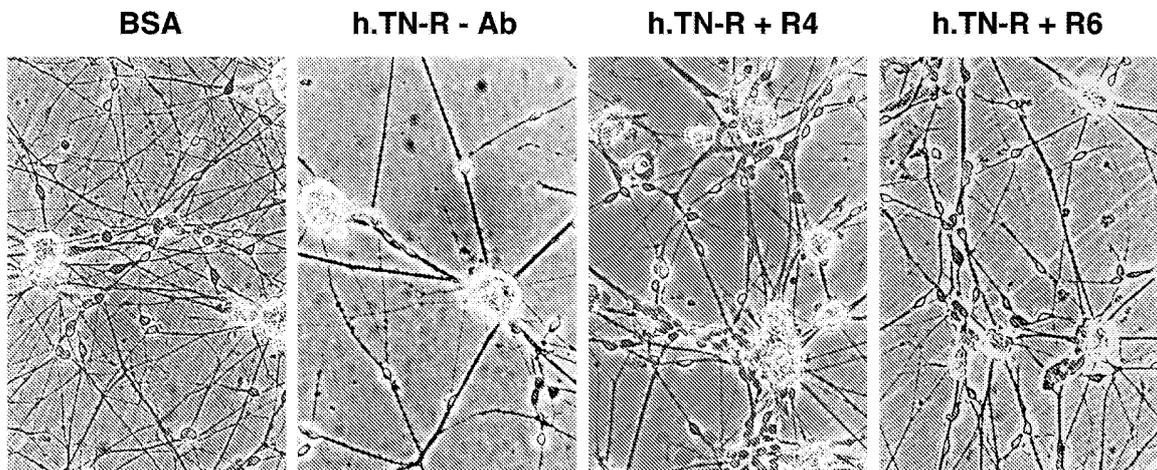


Fig.5C



- 7/9 -

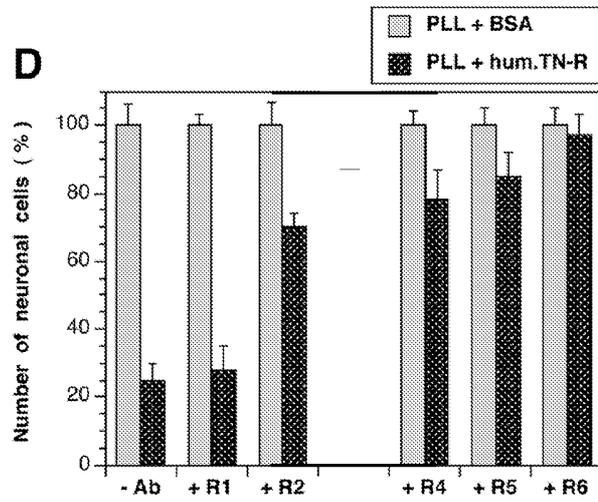


Fig.5D

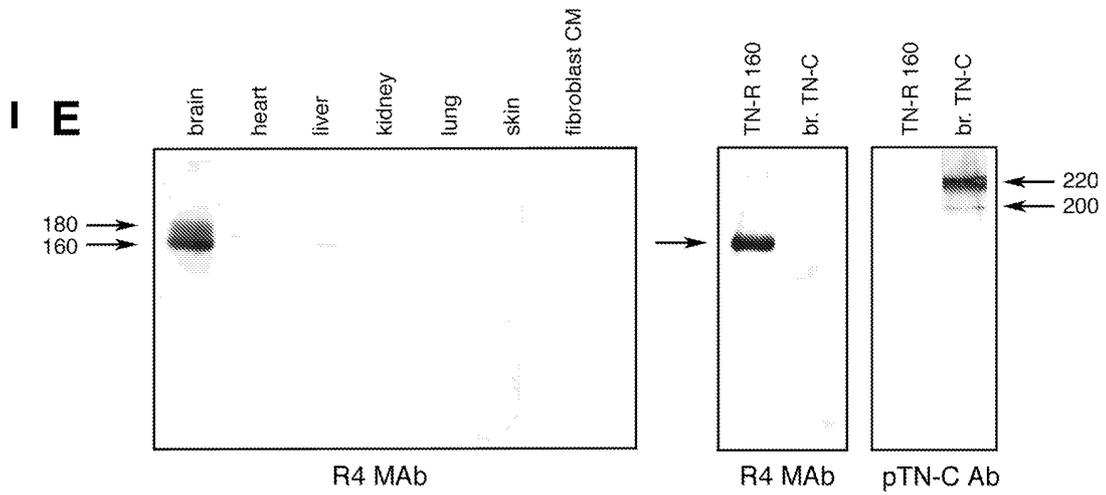


Fig.5E

-8/9-

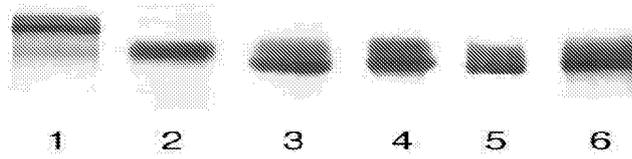


Fig. 6

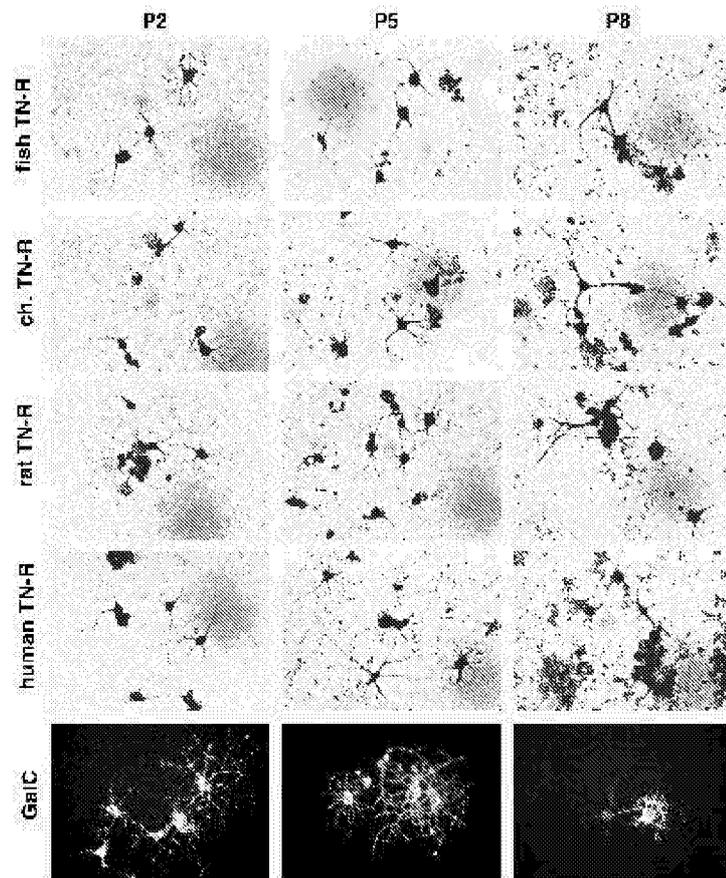


Fig. 7

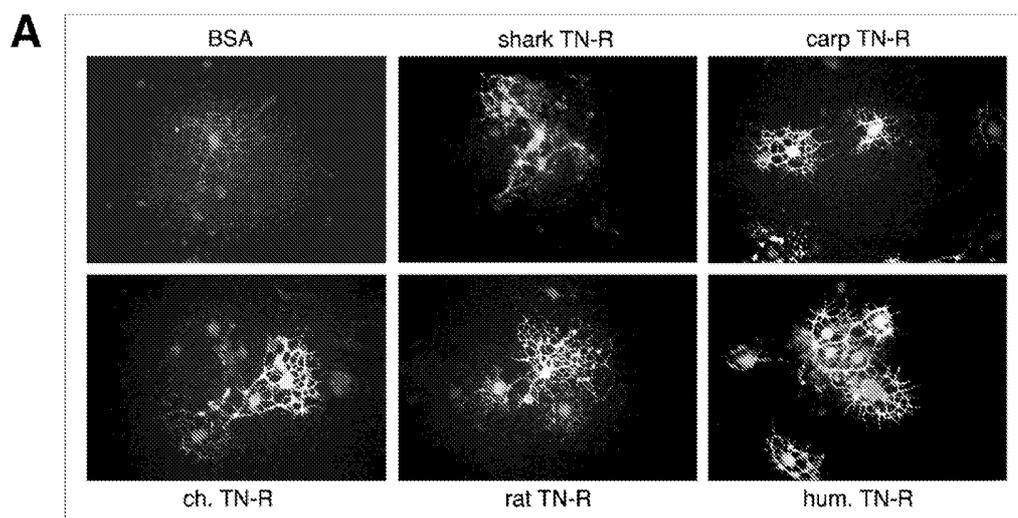


Fig.8A

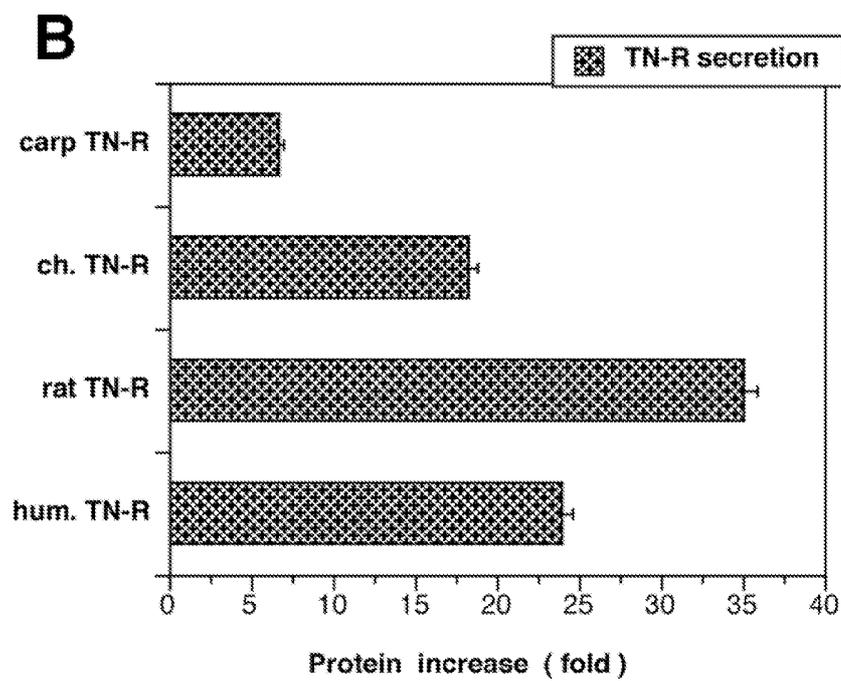


Fig.8B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2005/056860A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K14/47 C07K16/30 A61K51/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, Sequence Search, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------------|
| X | XIAO ZHI-CHENG ET AL: "Distinct effects of recombinant tenascin-R domains in neuronal cell functions and identification of the domain interacting with the neuronal recognition molecule F3/11" EUROPEAN JOURNAL OF NEUROSCIENCE, vol. 8, no. 4, 1996, pages 766-782, XP002378375 ISSN: 0953-816X abstract page 767, column 2, paragraph 3 - page 771, column 1, paragraph 1 page 771, column 2, paragraph 1 page 773, column 1, paragraph 2 page 779, column 1, paragraph 2 - page 780, column 2, paragraph 2; figures 1,2,4; tables 1-4 ----- -/-- | 1-3,5-9, 11-15, 18,22 |

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 April 2006

Date of mailing of the international search report

17/05/2006

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mossier, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2005/056860

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|--------------------------------|
| P,X | LIAO HONG ET AL: "Tenascin-R plays a role in neuroprotection via its distinct domains that coordinate to modulate the microglia function" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 280, no. 9, March 2005 (2005-03), pages 8316-8323, XP002378376 ISSN: 0021-9258 abstract page 8316, column 2, paragraph 3 - page 8318, column 1, paragraph 1; figures 1,2,6 | 1-3,5-9, 11-15, 18,22 |
| X | PESHEVA P ET AL: "THE F3/11 CELL ADHESION MOLECULE MEDIATES THE REPULSION OF NEURONS BY THE EXTRACELLULAR MATRIX GLYCOPROTEIN J1-160/180" NEURON, CAMBRIDGE, MA, US, vol. 10, no. 1, January 1993 (1993-01), pages 69-82, XP001051443 cited in the application abstract page 71, column 2, paragraph 3 - page 73, column 2, paragraph 1 page 79, column 1, paragraph 4 - page 80; figures 3,4 | 1-3,5-8, 15,18,22 |
| X | PESHEVA PENKA ET AL: "Tenascin-R is an intrinsic autocrine factor for oligodendrocyte differentiation and promotes cell adhesion by a sulfatide-mediated mechanism" JOURNAL OF NEUROSCIENCE, vol. 17, no. 12, 1997, pages 4642-4651, XP002378377 ISSN: 0270-6474 cited in the application abstract page 4643, column 1, paragraph 2 - page 4644, column 2, paragraph 1 figures 1-3,8; table 1 | 1-3,5-8, 15,18, 22,24,25 |
| X | WO 96/28550 A (BECTON, DICKINSON AND COMPANY) 19 September 1996 (1996-09-19) cited in the application abstract page 4, line 14 - page 5, line 30 page 6, line 8 - line 30 page 7, line 27 - line 36; sequence 4 | 9,11-15, 18,20,21 |

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2005/056860

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | <p>WO 2004/052922 A (SINGAPORE GENERAL HOSPITAL PTE LTD; XIAO, ZHI-CHENG; DENISON, CHRISTOP) 24 June 2004 (2004-06-24) abstract page 2, line 20 - page 5, line 7 page 16, line 8 - page 19, line 10 page 23, line 4 - page 24, line 15; claims 0-30, 47, 49</p> | 9, 11-15, 18, 19, 23 |
| X | <p>PESHEVA P ET AL: "J1-160 AND J1-180 ARE OLIGODENDROCYTE-SECRETED NONPERMISSIVE SUBSTRATES FOR CELL ADHESION" JOURNAL OF CELL BIOLOGY, vol. 109, no. 4 PART 1, 1989, pages 1765-1778, XP002378378 ISSN: 0021-9525 cited in the application abstract page 1766, column 1, paragraph 3 - column 2, paragraph 1; figures 1-5</p> | 15, 18 |
| A | <p>PESHEVA PENKA ET AL: "The yin and yang of tenascin-R in CNS development and pathology" PROGRESS IN NEUROBIOLOGY (OXFORD), vol. 61, no. 5, August 2000 (2000-08), pages 465-493, XP002378379 ISSN: 0301-0082 the whole document im besonderen page 480, column 2, paragraph 3 - page 483, column 2, paragraph 1</p> | 1-24 |
| A | <p>CARNEMOLLA B ET AL: "HUMAN TENASCIN-R" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOCHEMICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM, , US, vol. 271, no. 14, 5 April 1996 (1996-04-05), pages 8157-8160, XP000606961 ISSN: 0021-9258 abstract; figures 1,2; table 1</p> | 1-24 |
| A | <p>JONES F S ET AL: "The tenascin family of ECM glycoproteins: Structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling" DEVELOPMENTAL DYNAMICS, WILEY-LISS, INC., NEW YORK, NY, US, vol. 218, no. 2, June 2000 (2000-06), pages 235-259, XP002250835 ISSN: 1058-8388</p> | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2005/056860**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 19 and 23 relate to a method for treatment of the human or animal body the search was carried out and was based on the stated effects of the compound or composition.

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2005/056860

| Patent document cited in search report | | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 9628550 | A | 19-09-1996 | AT 260339 T | 15-03-2004 |
| | | | AU 704606 B2 | 29-04-1999 |
| | | | AU 5311696 A | 02-10-1996 |
| | | | CA 2189252 A1 | 16-09-1996 |
| | | | DE 69631624 D1 | 01-04-2004 |
| | | | DE 69631624 T2 | 29-07-2004 |
| | | | EP 0759987 A1 | 05-03-1997 |
| | | | JP 3055947 B2 | 26-06-2000 |
| | | | JP 9506267 T | 24-06-1997 |
| | | | US 5591583 A | 07-01-1997 |
| WO 2004052922 | A | 24-06-2004 | AU 2003288434 A1 | 30-06-2004 |
| | | | CA 2508847 A1 | 24-06-2004 |
| | | | CN 1745094 A | 08-03-2006 |
| | | | EP 1567545 A2 | 31-08-2005 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2005/056860

| A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES INV. C07K14/47 C07K16/30 A61K51/10 | | |
|---|--|---|
| Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC | | |
| B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) C07K A61K | | |
| Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen | | |
| Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, Sequence Search, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE | | |
| C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN | | |
| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
| X | XIAO ZHI-CHENG ET AL: "Distinct effects of recombinant tenascin-R domains in neuronal cell functions and identification of the domain interacting with the neuronal recognition molecule F3/11" EUROPEAN JOURNAL OF NEUROSCIENCE, Bd. 8, Nr. 4, 1996, Seiten 766-782, XP002378375 ISSN: 0953-816X Zusammenfassung Seite 767, Spalte 2, Absatz 3 - Seite 771, Spalte 1, Absatz 1 Seite 771, Spalte 2, Absatz 1 Seite 773, Spalte 1, Absatz 2 Seite 779, Spalte 1, Absatz 2 - Seite 780, Spalte 2, Absatz 2; Abbildungen 1,2,4; Tabellen 1-4 ----- -/-- | 1-3,5-9, 11-15, 18,22 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie | | |
| <ul style="list-style-type: none"> * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist | | |
| Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 26. April 2006 | | Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 17/05/2006 |
| Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 | | Bevollmächtigter Bediensteter Mossier, B |

| C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN | | |
|---|--|--------------------------------|
| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
| P,X | <p>LIAO HONG ET AL: "Tenascin-R plays a role in neuroprotection via its distinct domains that coordinate to modulate the microglia function" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 280, Nr. 9, März 2005 (2005-03), Seiten 8316-8323, XP002378376 ISSN: 0021-9258 Zusammenfassung Seite 8316, Spalte 2, Absatz 3 - Seite 8318, Spalte 1, Absatz 1; Abbildungen 1,2,6</p> | 1-3,5-9, 11-15, 18,22 |
| X | <p>-----</p> <p>PESHEVA P ET AL: "THE F3/11 CELL ADHESION MOLECULE MEDIATES THE REPULSION OF NEURONS BY THE EXTRACELLULAR MATRIX GLYCOPROTEIN J1-160/180" NEURON, CAMBRIDGE, MA, US, Bd. 10, Nr. 1, Januar 1993 (1993-01), Seiten 69-82, XP001051443 in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Seite 71, Spalte 2, Absatz 3 - Seite 73, Spalte 2, Absatz 1 Seite 79, Spalte 1, Absatz 4 - Seite 80; Abbildungen 3,4</p> | 1-3,5-8, 15,18,22 |
| X | <p>-----</p> <p>PESHEVA PENKA ET AL: "Tenascin-R is an intrinsic autocrine factor for oligodendrocyte differentiation and promotes cell adhesion by a sulfatide-mediated mechanism" JOURNAL OF NEUROSCIENCE, Bd. 17, Nr. 12, 1997, Seiten 4642-4651, XP002378377 ISSN: 0270-6474 in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Seite 4643, Spalte 1, Absatz 2 - Seite 4644, Spalte 2, Absatz 1 Abbildungen 1-3,8; Tabelle 1</p> | 1-3,5-8, 15,18, 22,24,25 |
| X | <p>-----</p> <p>WO 96/28550 A (BECTON, DICKINSON AND COMPANY) 19. September 1996 (1996-09-19) in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Seite 4, Zeile 14 - Seite 5, Zeile 30 Seite 6, Zeile 8 - Zeile 30 Seite 7, Zeile 27 - Zeile 36; Sequenz 4</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p> | 9,11-15, 18,20,21 |

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|----------------------|
| X | WO 2004/052922 A (SINGAPORE GENERAL HOSPITAL PTE LTD; XIAO, ZHI-CHENG; DENISON, CHRISTOP) 24. Juni 2004 (2004-06-24) Zusammenfassung Seite 2, Zeile 20 - Seite 5, Zeile 7 Seite 16, Zeile 8 - Seite 19, Zeile 10 Seite 23, Zeile 4 - Seite 24, Zeile 15; Ansprüche 0-30,47,49 | 9,11-15, 18,19,23 |
| X | ----- PESHEVA P ET AL: "J1-160 AND J1-180 ARE OLIGODENDROCYTE-SECRETED NONPERMISSIVE SUBSTRATES FOR CELL ADHESION" JOURNAL OF CELL BIOLOGY, Bd. 109, Nr. 4 PART 1, 1989, Seiten 1765-1778, XP002378378 ISSN: 0021-9525 in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Seite 1766, Spalte 1, Absatz 3 - Spalte 2, Absatz 1; Abbildungen 1-5 | 15,18 |
| A | ----- PESHEVA PENKA ET AL: "The yin and yang of tenascin-R in CNS development and pathology" PROGRESS IN NEUROBIOLOGY (OXFORD), Bd. 61, Nr. 5, August 2000 (2000-08), Seiten 465-493, XP002378379 ISSN: 0301-0082 das ganze Dokument im besonderen Seite 480, Spalte 2, Absatz 3 - Seite 483, Spalte 2, Absatz 1 | 1-24 |
| A | ----- CARNEMOLLA B ET AL: "HUMAN TENASCIN-R" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOCHEMICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM,, US, Bd. 271, Nr. 14, 5. April 1996 (1996-04-05), Seiten 8157-8160, XP000606961 ISSN: 0021-9258 Zusammenfassung; Abbildungen 1,2; Tabelle 1 | 1-24 |
| A | ----- JONES F S ET AL: "The tenascin family of ECM glycoproteins: Structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling" DEVELOPMENTAL DYNAMICS, WILEY-LISS, INC., NEW YORK, NY, US, Bd. 218, Nr. 2, Juni 2000 (2000-06), Seiten 235-259, XP002250835 ISSN: 1058-8388 | |

Feld II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

Obwohl die Ansprüche 19 and 23 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/056860

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | | Datum der Veröffentlichung |
|--|---|-------------------------------|-----------------------------------|---------------|-------------------------------|
| WO 9628550 | A | 19-09-1996 | AT | 260339 T | 15-03-2004 |
| | | | AU | 704606 B2 | 29-04-1999 |
| | | | AU | 5311696 A | 02-10-1996 |
| | | | CA | 2189252 A1 | 16-09-1996 |
| | | | DE | 69631624 D1 | 01-04-2004 |
| | | | DE | 69631624 T2 | 29-07-2004 |
| | | | EP | 0759987 A1 | 05-03-1997 |
| | | | JP | 3055947 B2 | 26-06-2000 |
| | | | JP | 9506267 T | 24-06-1997 |
| | | | US | 5591583 A | 07-01-1997 |
| WO 2004052922 | A | 24-06-2004 | AU | 2003288434 A1 | 30-06-2004 |
| | | | CA | 2508847 A1 | 24-06-2004 |
| | | | CN | 1745094 A | 08-03-2006 |
| | | | EP | 1567545 A2 | 31-08-2005 |