



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 31 754 T2** 2006.06.29

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 037 991 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 31 754.8**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/27048**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 964 802.7**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 99/031241**

(86) PCT-Anmeldetag: **17.12.1998**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **24.06.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **27.09.2000**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **28.09.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **29.06.2006**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C12N 15/12** (2006.01)

**C07K 14/705** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**C12N 15/62** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C12N 15/11** (2006.01)

(30) Unionspriorität:

**69857 P**      **17.12.1997**      **US**

**92946 P**      **15.07.1998**      **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(73) Patentinhaber:

**Immunex Corp., Thousand Oaks, Calif., US**

(72) Erfinder:

**COSMAN, John, David, Bainbridge Island, US;  
MULLBERG, H., Jurgen, D-55118 Maintz, DE;  
FANSLOW, Cristian, William, Federal Way, US;  
KUBIN, Marek, Bainbridge Island, US; ARMITAGE,  
Richard J., Bainbridge Island, US**

(74) Vertreter:

**Grünecker, Kinkeldey, Stockmair &  
Schwanhäusser, 80538 München**

(54) Bezeichnung: **ZELLOBERFLÄCHENGLYCOPROTEINEN ZUSAMMENHANG MIT MENSCHLICHER B ZELL LYMPHOMEN - ULBP, DNS UND POLYPEPTIDEN**

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

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

**Beschreibung**

## VERWEIS AUF VERWANDTE ANMELDUNGEN

**[0001]** Diese Anmeldung beansprucht den Nutzen der provisorischen U.S. Anmeldung Ser. Nr. 60/069,857, die am 17. Dezember 1997 eingereicht wurde und der provisorischen U.S. Anmeldung Ser. Nr. 60/092,946, die am 15. Juli 1998 eingereicht wurde.

## HINTERGRUND DER ERFINDUNG

## Gebiet der Erfindung

**[0002]** Die Erfindung ist auf gereinigte und isolierte Polypeptide, auf die Nukleinsäuren, die diese Polypeptide codieren und auf Verfahren zur Herstellung rekombinanter Formen dieser Polypeptide gerichtet. Diese Erfindung ist außerdem auf Antikörper, die diese Polypeptide spezifisch erkennen, Zusammensetzungen, die diese Polypeptide enthalten und die Verwendung dieser Materialien in verschiedenen Assays gerichtet. Insbesondere sind die Polypeptide, die Nukleinsäuren, die diese Polypeptide codieren und die Antikörper nützlich zur Detektion von humanen B-Zell-Lymphomen, zur Verstärkung der Produktion von Interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), zur Verstärkung des Wachstums von NK-Zellen und zur Verstärkung der Aktivität von zytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs).

## Beschreibung des zugehörigen Stands der Technik

## 1. Lymphome

**[0003]** Die malignen Lymphome repräsentieren mehrere Krankheiten mit verschiedenen morphologischen und klinischen Erscheinungen. Schemata nach morphologischen Kriterien haben sich als nützlich bei der Skizzierung der natürlichen Historie, der Prognose und dem Ansprechen auf die Therapie erwiesen. Jedoch können verschiedene morphologische Entitäten in einigen Fällen klinisch oder biologisch oder sowohl klinisch als auch biologisch sehr eng verwandt sein, während andere Krankheiten, die morphologische Ähnlichkeiten teilen, klinisch oder biologisch recht verschieden sein können. Folglich sind immunologische Verfahren zu wichtigen Mitteln zur Diagnose und Klassifizierung von bestimmten humanen Tumoren geworden, insbesondere für Leukämien und Lymphome.

**[0004]** Insbesondere wurde bei einigen Patienten, die unter Malignomen leiden, festgestellt, dass sie Antikörper gegen Oberflächendeterminanten produzieren, die mit Tumoren oder anderen malignen Zellen assoziiert sind, ebenso wie gegen eine Vielzahl von Differenzierungsantigenen oder andere Antigene, die nicht mit Tumoren assoziiert sind. Mehrere sehr sensitive immunologische Verfahren wurden zur Detektion solcher Antikörper entwickelt.

**[0005]** Eine Auswahl von anderen Markern hämatopoetischer Malignome erlaubt eine klinisch wertvolle Kategorisierung, die durch morphologische oder histochemische Parameter nicht möglich ist. Diese Marker können auch unter Verwendung von immunologischen Verfahren detektiert werden. Einer der Hauptvorteile dieser Methoden gegenüber anderen Verfahren zur Messung von Tumor-assoziierten Markern ist deren hohes Maß an Sensitivität, die häufig mit einer Fähigkeit einhergeht, eine Substanz im Nanogramm- oder sogar Picoogrammbereich zu detektieren. Außerdem verfügen immunologische Tests über die Fähigkeit zur Diskriminierung zwischen Substanzen mit nahverwandten Strukturen und dadurch zur Identifizierung Tumor-assoziiierter Analoga, die in normalen, nicht malignen Zuständen vorkommen.

**[0006]** Viele Tumor-assoziierte Marker wurden in den Seren oder anderen Körperflüssigkeiten von Patienten mit Malignomen nachgewiesen. Einige wenige dieser Marker wurden ausreichend auf Tumor-tragende Individuen eingeschränkt, um bei der Detektion oder Differenzialdiagnose (oder beiden) von malignen Krankheiten zu helfen; jedoch wurde bei den meisten Markern festgestellt, dass ihnen eine ausreichende Spezifität für solche Anwendungen fehlt, mit einer nennenswerten Häufigkeit von erhöhten Markerkonzentrationen in Patienten mit nicht malignen Krankheiten (d. h. von falsch positiven Resultaten).

**[0007]** Außerdem sind maligne Lymphome im Allgemeinen eine Mischung eines neoplastischen Elements und normalen Elementen oder beides. Eine Zellsuspension, die von einem malignen Lymphom hergestellt wurde, besteht aus einer Mischung von benignen und malignen Zellen, und die malignen Zellen müssen nicht notwendigerweise in der Mehrzahl sein. Um den Phänotyp der malignen Zellen zu bestimmen, ist es notwendig,

solche Marker zu identifizieren, die mit neoplastischen Zellen assoziiert sind.

**[0008]** Es sollte klar sein, dass auf dem Gebiet ein Bedarf zur Identifizierung von zusätzlichen Zelloberflächenmarkern, die mit malignen Zuständen assoziiert sind, vorhanden ist. Insbesondere gibt es einen anhaltenden Bedarf an Zelloberflächenmarkern, die mit malignen Lymphomen assoziiert sind. Die Identifizierung spezifischer Zelloberflächenmarker, die mit malignen Lymphomen assoziiert sind, wird bei dem Nachweis von mit diesen Markern assoziierten Malignomen hilfreich sein.

## 2. NK-Zellen

**[0009]** Eine der Hauptarten von zirkulierenden mononukleären Zellen ist die der natürlichen Killerzellen oder NK-Zellen (M. Manoussaka et al., *Journal of Immunology* 158: 112–119, 1997). NK-Zellen sind ein Zelltyp, der von Knochenmarkvorläuferzellen abgeleitet ist (O. Haller et al., *Journal of Experimental Medicine* 145: 1411–1420, 1977). NK-Zellen scheinen eng mit T-Zellen verwandt zu sein, und die zwei Zelltypen teilen viele Zelloberflächenmarker (M. Manoussaka et al., 1997). Obwohl NK-Zellen zytotoxische Zellen sind, ebenso wie einige T-Zellen, exprimieren NK-Zellen anders als T-Zellen nicht den T-Zell-Rezeptor oder CD3-Komponenten (P. Scott und G. Trinichieri, *Current Opinion in Immunology* 7: 34–40, 1995; G. Trinichieri, *Adv. Immunology* 47: 187–376, 1989). NK-Zellen exprimieren häufig CD16- und CD56-Antigene (K. Oshimi, *International Journal of Hematology* 63: 279–290, 1996). Ähnlich wie zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) sind NK-Zellen fähig, eine zytotoxische Wirkung durch Lysieren einer Vielzahl von Zelltypen auszuüben (G. Trinichieri, 1989). NK-Zellen sind fähig, Zytotoxizität in einer nicht MHC-beschränkten Art und Weise auszuüben (E. Ciccione et al., *J. Exp. Med.* 172: 47, 1990; A. Moretta et al., *J. Exp. Med.* 172: 1589, 1990; und E. Ciccione et al., *J. Exp. Med.* 175: 709).

**[0010]** NK-Zellen vermitteln einige ihrer Funktionen über die Sekretion von Cytokinen, wie z. B. Interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierende Faktoren (GM-CSFs), Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor (M-CSF), Interleukin-3 (IL-3) und IL-8 (P. Scott und G. Trinichieri, 1995).

**[0011]** Cytokine einschließlich IL-2, IL-12, TNF- $\alpha$  und IL-1 können NK-Zellen induzieren, Cytokine zu produzieren (P. Scott und G. Trinichieri, 1995). IFN- $\alpha$  und IL-2 sind starke Induktoren für die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen (G. Trinichieri et al., *Journal of Experimental Medicine* 160: 1147–1169, 1984; G. Trinichieri und D. Santoli, *Journal of Experimental Medicine* 147: 1314–1333, 1977). NK-Zellen können in der Anwesenheit von IL-2 stimuliert und expandiert werden (K. Oshini, *International Journal of Hematology* 63: 279–290, 1996). Von IL-12 wurde gezeigt, dass es die Cytokinproduktion von T- und NK-Zellen induziert und die NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität erhöht (M. Kobayashi et al., *Journal of Experimental Medicine* 170: 827–846, 1989).

**[0012]** NK-Zellen können eine Vielzahl von Zelltypen lysieren, einschließlich normaler Stammzellen, infizierter Zellen und transformierter Zellen (D. See et al., *Scand. J. Immunol.* 46: 217–224, 1997). Zellen, denen MHC Klasse I fehlt, sind gegenüber der NK-Zellvermittelten Lyse empfindlich (H. Reyburn et al., *Immunol. Rev.* 155: 119–125, 1997). Die Lyse von Zellen erfolgt über die Wirkung von zytoplasmatischen Granula, die Proteasen, Nukleasen und Perforin enthalten (D. See et al., 1997). Antikörper, die gegen CD2 und CD11a gerichtet sind, inhibieren den zytotoxischen Effekt von NK-Zellen (O. Ramos et al., *J. Immunol* 142: 4100–4104, 1989; C. Scott et al., *J. Immunol.* 142: 4105–4112, 1989). NK-Zellen können Zellen auch durch Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität lysieren (D. See et al., 1997).

**[0013]** Von NK-Zellen wurde gezeigt, dass sie sowohl extrazelluläre Protozoen als auch Zellen, die von Protozoen infiziert wurden, zerstören (T. Schar-ton-Kersten und A. Sher, *Current Opinion in Immunology* 9: 44–51, 1997). In den meisten Fällen scheint die zytotoxische Aktivität abhängig von der Lymphokinaktivierung zu sein (T. Schar-ton-Kersten und A. Sher, 1997).

**[0014]** NK-Zellen wurden ins Gespräch gebracht als Mediatoren der Wirtsabwehr gegen Infektionen bei Menschen mit Varicella Zoster, Herpes simplex, Cytomegalovirus, Epstein-Barr Virus, Hepatitis B- und Hepatitis C-Viren (D. See et al., 1997). Viele Viren induzieren NK-Zell-Zytotoxizität, einschließlich des Herpesvirus und des Cytomegalovirus (C. Biron, *Current Opinion in Immunology* 9: 24–34, 1997). Die Induktion der NK-Zell-Aktivität ist ein Ergebnis der Induktion von IFN- $\alpha/\beta$  durch eine virale Infektion, und NK-Zellen sind wichtig in der frühen Abwehr gegen viele virale Infektionen (C. Biron, 1997). Die NK1+CD3- Population der NK-Zellen ist die durch eine virale Infektion aktivierte Untergruppe (C. Biron, 1997). Die Antwort von NK-Zellen gegen virale Infektion schließt die direkte Zytotoxizität und die Produktion von verschiedenen Cytokinen wie z. B. IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , ein (C. Biron, 1997).

**[0015]** Etliche humane lymphoproliferative Störungen von NK-Zellen sind bekannt. Diese schließen die proliferative Funktionsstörung NK-Zell-Linien granulärer Lymphozyten (NK cell-lineage granular lymphocyte proliferative disorder, NK-GLPD), das NK-Zell-Lymphom und die akute Leukämie der NK-Zell-Linie ein (K. Oshimi, International Journal of Hematology 63: 279–290, 1996). Die meisten Patienten mit dem aggressiven Typ der NK-GLPD sterben an der Krankheit (K. Oshimi, 1996). Das NK-Zell-Lymphom ist resistent gegenüber Kombinationschemotherapie (K. Oshimi, 1996).

**[0016]** Von NK-Zellen, die mit IL-2 aktiviert wurden, wurde gezeigt, dass sie eine Aktivität gegen humane Leukämiezellen aufweisen (L. Silla et al., Journal of Hematotherapy 4: 269–279, 1995). Darüber hinaus scheinen NK-Zellen eine Rolle bei der Behandlung von chronisch myeloischer Leukämie zu spielen (K. Oshimi, 1996).

**[0017]** NK-Zellen sind sowohl an der Resistenz gegenüber Krebsausbreitung als auch an der Kontrolle der Krebsausbreitung beteiligt (T. Whiteside und R. Herberman, Current Opinion in Immunology 7: 704–710, 1995). Darüber hinaus kann die Anwesenheit und die Aktivierung von NK-Zellen für den Ausgang bestimmend sein; eine niedrige oder nicht vorhandene NK-Aktivität ist mit einem häufigen Vorkommen von viralen Krankheiten und Krebs assoziiert (T. Whiteside und R. Herberman, 1995).

**[0018]** Angesichts der wichtigen Rolle, die NK- und T-Zellen in vivo bei der Wirtsabwehr, der Überwachung der Tumorzellen und bei Autoimmunkrankheiten spielen, ist auf dem Gebiet ein Bedarf an Polypeptiden vorhanden, die für die in vivo- und in vitro-Verstärkung der NK- und T-Zell-Aktivität geeignet sind.

### 3. Interferon $\gamma$

**[0019]** Die Produktion von Interferon  $\gamma$  ist eine Funktion von T-Zellen und NK-Zellen, und IFN- $\gamma$  aktiviert antivirale Immunreaktionen (E. De Maeyer und J. De Maeyer-Guignard, in The Cytokine Handbook, A. W. Thompson (ed.), Academic Press, 1994, S. 265–288). IFN- $\gamma$  inhibiert vorzugsweise die Th2-Proliferation, nicht jedoch die Th1-Proliferation (T. F. Gajewski und F. W. Fith, J. Immunology 140: 4245–4252, 1988). IFN- $\gamma$  spielt außerdem eine wichtige Rolle bei der Makrophagenaktivierung und fördert die Proliferation von aktivierten B-Zellen (E. De Maeyer und J. De Maeyer-Guignard). Diese und andere Effekte von IFN- $\gamma$  weisen darauf hin, dass erhöhte in vivo-Level der IFN- $\gamma$ -Produktion als ein allgemeiner Immunmodulator dienen.

**[0020]** IFN- $\gamma$  wurde klinisch bei der Behandlung von chronischen granulomatösen Krankheiten, atopischer Dermatitis, systemischer Achlerosis, lepromatöser Lepra, gewöhnlichen Warzen, Hepatitis B-Infektionen, myeloischer Leukämie und metastasierten Melanomen verwendet (J. Mordenti et al., Therapeutic Proteins, A. H. C. Kung et al., (eds.), W. H. Freeman und Co., 1993, S. 187–199). Angesichts der sehr wichtigen Rolle, die IFN- $\gamma$  in vivo bei der Immunmodulation spielt, gibt es auf dem Gebiet einen Bedarf an Polypeptiden, die zur Verstärkung der in vivo- und in vitro-IFN- $\gamma$ -Konzentrationen geeignet sind.

### 4. Zytotoxische T-Lymphozyten

**[0021]** CTLs sind eine wichtige in vivo-Verteidigung gegen virale und bakterielle und kanzeröse Krankheiten, da sie Zielzellen, die fremde Antigene aufweisen, lysieren (G. Berke, in Fundamental Immunology, W. E. Paul (ed.) Raven Press Ltd., 1989, S. 735–764). Angesichts der wichtigen Rolle, die CTLs in vivo in der Immunantwort gegen Infektionen und der Tumorumwachung spielen, gibt es auf dem Gebiet einen Bedarf an Polypeptiden, die zur Verstärkung der in vivo- und in vitro-CTL-Aktivität geeignet sind.

### 5. Proteinidentifizierung

**[0022]** In einem weiteren Aspekt ist die Identifizierung der Primärstruktur oder Sequenz eines unbekannten Proteins der Höhepunkt eines beschwerlichen Experimentierungsprozesses. Um ein unbekanntes Protein zu identifizieren, kann der Forscher auf einen Vergleich des unbekannten Proteins mit bekannten Proteinen unter Verwendung einer Vielzahl von Methoden, die den Fachleuten auf dem Gebiet bekannt sind, vertrauen. Zum Beispiel werden Proteine routinemäßig unter Verwendung von Methoden wie z. B. Elektrophorese, Sedimentation, Chromatographie, Sequenzierung und Massenspektrometrie analysiert.

**[0023]** Insbesondere erlaubt der Vergleich eines unbekannten Proteins mit Polypeptiden mit bekanntem Molekulargewicht eine Bestimmung des scheinbaren Molekulargewichts des unbekannten Proteins (T. D. Brock und M. T. Madigan, Biology of Microorganisms 76–77 (Prentice Hall. 6d et. 1991)). Protein-Molekulargewichtsstandards sind kommerziell erhältlich und sind bei der Abschätzung von Molekulargewichten unbekannter Proteine behilflich (New England Biolabs Inc. Catalog: 130–131, 1995; J. L. Hartley, US-Patent Nr. 5,449,758). Je-

doch kann es vorkommen, dass der Molekulargewichtsstandards in ihrer Größe nicht nahe genug mit dem unbekannten Protein übereinstimmen, um eine genaue Einschätzung des scheinbaren Molekulargewichts zu erlauben. Die Schwierigkeit bei der Abschätzung des Molekulargewichts ist im Falle von Proteinen, die einer Fragmentierung durch chemische oder enzymatische Mittel unterzogen werden, durch post-translationale Modifikationen oder Prozessierung modifiziert werden und/oder mit anderen Proteinen in nicht kovalenten Komplexen assoziiert sind, noch erhöht.

**[0024]** Außerdem resultiert die einzigartige Beschaffenheit der Zusammensetzung eines Proteins im Hinblick auf dessen spezifische Aminosäurekonstituenten in einer einzigartigen Lage der Spaltungsstellen innerhalb des Proteins. Die spezifische Spaltung eines Proteins durch chemische oder enzymatische Spaltung resultiert in einem einzigartigen "Peptid-Fingerprint" (D. W. Cleveland et al., J. Biol. Chem. 252: 1102–1106, 1977; M. Brown et al., J. Gen. Virol. 50: 309–316, 1980). Folglich resultiert die Spaltung an spezifischen Stellen in einer reproduzierbaren Fragmentierung eines bestimmten Proteins in Peptide mit präzisen Molekulargewichten. Darüber hinaus besitzen diese Peptide einzigartige Ladungseigenschaften, die den isoelektrischen pH des Peptids bestimmen. Diese einzigartigen Eigenschaften können unter Verwendung einer Vielzahl von elektro-phoretischen und anderen Methoden ausgenutzt werden (T. D. Brock und M. T. Madigan, Biology of Microorganisms 76–77 (Prentice Hall, 6d ed. 1991)).

**[0025]** Die Fragmentierung von Proteinen wird weiterhin zur Analyse der Aminosäurezusammensetzung und zur Proteinsequenzierung angewendet (P. Matsudaira, J. Biol. Chem. 262: 10035–10038, 1987; C. Eckerskorn et al., Electrophoresis 1988, 9: 830–838, 1988), insbesondere die Herstellung von Fragmenten von Proteinen mit einem "blockierten" N-Terminus. Außerdem können fragmentierte Proteine zur Immunisierung, zur Affinitätsselektion (R. A. Brown, US-Patent Nr. 5,151,412), zur Bestimmung von Modifikationsstellen (z. B. Phosphorylierung), zur Erzeugung von aktiven biologischen Wirkstoffen (T. D. Brock und M. T. Madigan, Biology of Microorganisms 300–301 (Prentice Hall, 6d ed. 1991)) und zur Differenzierung von homologen Proteinen (M. Brown et al., J. Gen. Virol. 50: 309–316, 1980) verwendet werden.

**[0026]** Außerdem kann ein Peptid-Fingerprint, wenn er von einem unbekannten Protein erhalten wird, mit einer Datenbank von bekannten Proteinen verglichen werden, um bei der Identifizierung des unbekannten Proteins unter Verwendung von Massenspektrometrie behilflich zu sein (W. J. Henzel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5011–5015, 1993; D. Fenyo et al., Electrophoresis 19: 998–1005, 1998). Eine Vielzahl von Computer-Softwareprogrammen zur Erleichterung dieser Vergleiche sind über das Internet zugänglich, wie z. B. der Protein Prospector (Internetseite: [prospector.uscf.edu](http://prospector.uscf.edu)), Multident (Internetseite: [www.expasy.ch/sprot/multiident.html](http://www.expasy.ch/sprot/multiident.html)), PeptideSearch (Internetseite: [www.mann.embl-heidelberg.de/deSearch/FR\\_PeptideSearchForm.html](http://www.mann.embl-heidelberg.de/deSearch/FR_PeptideSearchForm.html)) und Pro-Found (Internetseite: [www.chait-sgi.rockefeller.edu/cgi-bin/prot-id-frag.html](http://www.chait-sgi.rockefeller.edu/cgi-bin/prot-id-frag.html)). Diese Programme erlauben dem Benutzer, die Spaltungsmittel und die Molekulargewichte der fragmentierten Peptide innerhalb einer festgelegten Toleranz zu bestimmen. Die Programme vergleichen diese Molekulargewichte mit Informationen zu Molekulargewichten von Proteinen, die in der Datenbank gespeichert sind, um bei der Bestimmung der Identität des unbekannten Proteins behilflich zu sein. Genaue Informationen betreffend die Anzahl der fragmentierten Peptide und das genaue Molekulargewicht dieser Peptide ist für eine akkurate Identifizierung notwendig. Daher sollte eine Zunahme der Genauigkeit bei der Bestimmung der Anzahl fragmentierter Peptide und deren Molekulargewicht in einer erhöhten Erfolgswahrscheinlichkeit bei der Identifizierung unbekannter Proteine resultieren.

**[0027]** Außerdem können die Peptidverdaue von unbekannten Proteinen unter Verwendung von Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) sequenziert werden, und die resultierenden Sequenzen können mit Datenbanken abgeglichen werden (J. K. Eng, et al., J. Am. Soc. Mass Spec. 5: 976–989 (1994); M. Mann und M. Wilm, Anal. Chem. 66: 4390–4399 (1994); J. A. Taylor und R. S. Johnson, Rapid Comm. Mass Spec. 11: 1067–1075 (1997)). Rechercheprogramme, die bei diesem Verfahren verwendet werden können, sind im Internet verfügbar, wie z. B. Lutefisk 97 (Internetseite: [www.lsbcc.com:70/Lutefisk97.html](http://www.lsbcc.com:70/Lutefisk97.html)) und die Protein Prospector-, Peptide Search- und ProFound-Programme, die oben beschrieben sind. Daher kann das Hinzufügen der Sequenz eines Gens und deren vorhergesagten Proteinsequenz und Peptidfragmente zu einer Sequenzdatenbank bei der Identifizierung von unbekannten Proteinen unter Verwendung von Tandem-Massenspektrometrie behilflich sein.

**[0028]** Folglich besteht auf dem Gebiet auch der Bedarf an Polypeptiden, die zur Verwendung in Peptidfragmentierungsstudien geeignet sind, zur Verwendung bei der Molekulargewichtsmessung und zur Verwendung bei der Proteinsequenzierung unter Verwendung von Tandem-Massenspektrometrie.

## ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

**[0029]** Die Erfindung ist bei der Erfüllung dieser unterschiedlichen Bedürfnisse auf dem Gebiet durch Zurverfügungstellen isolierter ULBP-Nukleinsäuren und Polypeptide, die durch diese Nukleinsäuren codiert werden, behilflich. Speziell stellt eine Ausführungsform dieser Erfindung Zelloberflächenglycoproteine zur Verfügung, die mit humanen B-Zell-Lymphomen assoziiert sind. Im weiten Sinne bezieht sich diese Erfindung auf neue Polypeptide, die hierin als ULBP-Polypeptide bezeichnet werden, die auf der Oberfläche von humanen B-Zell-Lymphomen vorkommen. Die vorliegende Erfindung ist insbesondere auf Säugerformen von ULBP-Polypeptiden in isolierten und gereinigten Formen gerichtet. Besondere Ausführungsformen der Erfindung sind auf ein isoliertes ULBP-Nukleinsäuremolekül gerichtet, das die DNA-Sequenz der SEQ-ID Nr. 1, SEQ-ID Nr. 3 oder SEQ-ID Nr. 9 umfasst, und ein isoliertes ULBP-Nukleinsäuremolekül, das die Aminosäuresequenz der SEQ-ID Nr. 2, SEQ-ID Nr. 4 oder SEQ-ID Nr. 10 codiert, ebenso wie Nukleinsäuremoleküle, die komplementär zu diesen Sequenzen sind. Sowohl einzelsträngige als auch doppelsträngige RNA- und DNA-Nukleinsäuremoleküle sind von der Erfindung umfasst, ebenso wie Nukleinsäuremoleküle, die mit einer denaturierten, doppelsträngigen DNA hybridisieren, die den gesamten Teil oder einen Teil der SEQ-ID Nr. 1, SEQ-ID Nr. 3 und/oder SEQ-ID Nr. 9 umfasst. Außerdem sind Nukleinsäuremoleküle umfasst, die mit einem der beiden Stränge einer denaturierten, doppelsträngigen DNA hybridisieren, welche die oben genannte Nukleinsäuresequenz umfasst, unter Bedingungen moderater Stringenz in 50% Formamid und  $6 \times \text{SSC}$ , bei  $42^\circ\text{C}$ , bei Waschbedingungen von  $60^\circ\text{C}$ ,  $0,5 \times \text{SSC}$ , 0,1% SDS, und wobei das genannte Nukleinsäuremoleküle eine Aminosäuresequenz codiert, die wenigstens 90% Identität mit der SEQ-ID Nr. 2, SEQ-ID Nr. 4 oder SEQ-ID Nr. 10 aufweist, wobei ein Polypeptid, das aus der genannten Aminosäuresequenz besteht, die zytotoxische T-Lymphozyten-Aktivität verstärken kann.

**[0030]** Die Erfindung umfasst außerdem rekombinante Vektoren, welche die Expression dieser Nukleinsäuremoleküle steuern und Wirtszellen, die stabil oder transient mit diesen Vektoren transformiert oder transfiziert sind.

**[0031]** Außerdem umfasst die Erfindung Verfahren zur Verwendung der oben genannten Nukleinsäuren zur Identifizierung von Nukleinsäuren, die Proteine mit ULBP-Aktivität codieren; zur Identifizierung des humanen Chromosoms Nr. 6; zur Kartierung von Genen auf dem humanen Chromosom Nr. 6; zur Identifizierung von Genen, die mit bestimmten Krankheiten, Syndromen oder anderen humanen Krankheitszuständen assoziiert sind, die mit dem humanen Chromosom 6 assoziiert sind, und zum Studium der Zell-Signaltransduktion und des ULBP-Systems.

**[0032]** Die Erfindung umfasst außerdem die Verwendung von Sense- oder Antisense-Oligonukleotiden der Nukleinsäure der SEQ-ID Nr. 1, der SEQ-ID Nr. 3 oder SEQ-ID Nr. 9 zur Inhibierung der Expression des Polynukleotids, das von dem ULBP-Gen codiert wird.

**[0033]** Die Erfindung umfasst außerdem isolierte Polypeptide und Fragmente davon, die durch diese Nukleinsäuremoleküle codiert werden, einschließlich löslicher Polypeptidanteile der SEQ-ID Nr. 1, SEQ-ID Nr. 3, oder SEQ-ID Nr. 9. Die Erfindung umfasst weiterhin Verfahren zur Herstellung dieser Polypeptide, einschließlich der Kultivierung einer Wirtszelle unter Bedingungen, die die Expression erlauben und der Gewinnung des Polypeptids aus dem Kulturmedium. Insbesondere wird die Expression dieser Polypeptide in Bakterien, Hefen, Pflanzen-, Insekten- und Tier-Zellen von der Erfindung umfasst.

**[0034]** Im Allgemeinen können die Polypeptide der Erfindung zum Studium zellulärer Prozesse wie z. B. der Immunregulation, Zellproliferation, Zelltod, Zellmigration, Zell-Zell-Interaktion und entzündlicher Antworten verwendet werden. Außerdem können diese Polypeptide zur Identifizierung von Proteinen, die mit ULBP-Liganden und ULBP-Rezeptoren assoziiert sind, verwendet werden.

**[0035]** In noch einem weiteren Aspekt schließt die Erfindung Assays ein, die diese Polypeptide zum Screenen nach potenziellen Inhibitoren der Aktivität, die mit Polypeptid-Gegenstrukturmolekülen assoziiert sind, verwenden, sowie Verfahren zur Verwendung dieser Polypeptide als therapeutische Mittel zur Behandlung von Krankheiten, die von ULBP-Polypeptid-Gegenstrukturmolekülen vermittelt werden. Darüber hinaus sind Verfahren zur Verwendung dieser Polypeptide bei der Konstruktion von Inhibitoren davon ebenfalls ein Aspekt der Erfindung.

**[0036]** Die Erfindung stellt weiterhin ein Verfahren zur Verwendung dieser Polypeptide als Molekulargewichtsmarker zur Verfügung, das die Abschätzung des Molekulargewichts eines Proteins oder eines fragmentierten Proteins erlaubt, ebenso wie ein Verfahren zur Visualisierung der Molekulargewichtsmarker gemäß der Erfin-

ung unter Verwendung von Elektrophorese. Die Erfindung umfasst weiterhin Verfahren zur Verwendung der Polypeptide gemäß der Erfindung als Marker zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes eines unbekannten Proteins, ebenso wie Kontrollen zur Bestimmung des Ausmaßes der Fragmentierung eines Proteins.

**[0037]** Außerdem werden durch diese Erfindung Kits zur Unterstützung bei diesen Bestimmungen umfasst.

**[0038]** Ein weiterer Aspekt dieser Erfindung ist die Verwendung der ULBP-Nukleinsäuresequenzen, der vorhergesagten Aminosäuresequenzen des Polypeptids oder von Fragmenten davon, oder eine Kombination der vorhergesagten Aminosäuresequenzen des Peptids oder der Fragmente davon zur Verwendung bei der Recherche einer elektronischen Datenbank als Unterstützung bei einer Identifizierung von Probe-Nukleinsäuren und/oder -Proteinen.

**[0039]** Isolierte polyklonale oder monoklonale Antikörper, die an diese Polypeptide binden, sind ebenfalls von der Erfindung umfasst, zusätzlich zu der Verwendung dieser Antikörper als Hilfsmittel bei der Reinigung der ULBP-Proteine. Die Antikörper wiederum sind nützlich zum Nachweis des Vorhandenseins von ULBP-Polypeptiden in humanen Zellproben, das mit der Existenz einer malignen Erkrankung in einem Patienten korreliert werden kann.

**[0040]** Allgemeiner gesagt stellt diese Erfindung Verfahren zur Detektion von B-Zell-Lymphomen unter Verwendung der Polypeptide, DNA und Antikörper gemäß der Erfindung zur Verfügung. Die Verfahren basieren z. B. auf immunologischen und DNA-Hybridisierungs- und Amplifikations-Methoden.

**[0041]** Darüber hinaus stellt diese Erfindung in vitro- und in vivo-Verfahren zur Erhöhung der IFN- $\gamma$ -Produktion, zur Erhöhung der NK-Zellproliferation und zur Erhöhung der CTL-Aktivität zur Verfügung.

#### KURZE BESCHREIBUNG DER FIGUREN

**[0042]** [Fig. 1](#) stellt den Effekt von ULBP-Polypeptiden auf die Produktion von IFN- $\gamma$  durch NK-Zellen dar.

**[0043]** [Fig. 2](#) stellt den Effekt von ULBP-Polypeptiden auf die Proliferation von NK-Zellen dar, wie durch die Aufnahme von Thymidin angezeigt.

**[0044]** [Fig. 3](#) stellt den Effekt des ULBP-1-Polypeptids auf die CTL-Aktivität dar.

**[0045]** [Fig. 4](#) stellt den Effekt des ULBP-2-Polypeptids auf die CTL-Aktivität dar.

#### DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

**[0046]** ULBP-DNAs sind humane DNAs, die neuartige Zelloberflächenglycoproteine codieren. cDNAs, die humane ULBP-Polypeptide codieren, wurden aus humanen Zellen isoliert und kloniert. Die Entdeckung dieser DNAs, die humane ULBP-Polypeptide codieren, ermöglicht die Konstruktion von Expressionsvektoren, die diese Polypeptide codierende Nukleotidsequenzen umfassen; Wirtszellen, die mit den Expressionsvektoren transfiziert oder transformiert sind; biologisch aktive humane ULBP-Proteine als isolierte und gereinigte Proteine und Polypeptide; und Antikörper, die mit den Polypeptiden immunologisch reagieren.

**[0047]** In einer bestimmten Ausführungsform der Erfindung wurde ein ULBP-Gen, das ULBP-1 genannt wurde, aus einer Namalwa(humanem B-Zell-Lymphom)-cDNA-Bibliothek expressionskloniert. Dies wurde durch Bindung an ein UL16-Fc-Fusionsprotein erreicht. UL16 ist ein Typ 1-Membranglycoprotein, das durch das humane Cytomegalovirus codiert wird (Kaye et al., J. Virol. 66: 6609, 1992). UL16-Fc fusioniert die extrazelluläre Domäne von UL16 an das IgG1 Fc (Muteinform) wie zuvor für OX40-Fc beschrieben (Baum et al., EMBO J. 13: 3992–4001, 1994). Die Expressionsklonierung von ULBP-1 wurde unter Verwendung von Standardmethoden, die zuvor für CD27-L und OX40-L beschrieben wurden (Cell 73: 447, 1993, EMBO J. 13: 3992–4001, 1994), ausgeführt.

**[0048]** Die Nukleotidsequenz des ULBP-Gens (nur der codierende Bereich) im Staden-Format lautet wie folgt:

ATGGCAGCGGCCGCCAGCCCCGCTTCCTTCTGTGCCTCCCGCTTCTGCA  
 CCTGCTGTCTGGCTGGTCCCAGGATGGGTGACACACACTGTCTTT  
 GCTATGACTTCATCATCACTCCTAAGTCCAGACCTGAACCACAGTGGTGT  
 GAAGTTCAAGGCCTGGTGGATGAAAGGCCCTTTTCTTCACTATGACTGTGT  
 TAACCACAAGGCCAAAGCCTTTGCTTCTCTGGGGAAGAAAGTCAATGTCA  
 CAAAAACCTGGGAAGAACAACCTGAAACACTAAGAGACGTGGTGGATTTC  
 CTTAAAGGGCAACTGCTTGACATTCAAGTGGAGAATTTAATACCCATTGA  
 GCCCCTCACCCTGCAGGCCAGGATGTCTTGTGAGCATGAAGCCCATGGAC  
 ACGGCAGAGGATCTTGGCAGTTCCTCTTCAATGGACAGAAGTTCCTCCTC  
 TTTGACTCAAACAACAGAAAGTGGACAGCACTTCATCCTGGAGCCAAGAA  
 GATGACAGAGAAGTGGGAGAAGAACAGGGATGTGACCATGTTCTTCCAGA  
 AGATTTCACTGGGGGATTGTAAGATGTGGCTTGAAGAATTTTGTATGTAC  
 TGGGAACAAATGCTGGATCCAACAAAACCCCTCTCTGGCCCCAGGCAC  
 AACCCAACCCAAGGCCATGGCCACCACCCTCAGTCCCTGGAGCCTTCTCA  
 TCATCTTCCTCTGCTTCATTCTAGCTGGCAGATGA (SEQ ID NO:1).

[0049] Die entsprechende Aminosäuresequenz von ULBP-1 ist:

#### ULBP-1-POLYPEPTID

MAAAASPAFL LCLPLLHLLS GWSRAGWVDI HCLCYDFIIT PKSRPEPQWC  
 EVQGLVDERP FLHYDCVNHK AKAFASLGKK VNVTKTWEEQ TETLRDVVDF  
 LKGQLLDIQV ENLIPIEPLT LQARMSCEHE AHGHGRGSWQ FLFNGQKELL  
 FDSNNRKWTA LHPGAKKMT EWEKNRDVTM FFQKISLGDC KMWLEEFMY  
 WEQMLDPTKP PSLAPGTTQP KAMATTLSPW SLLIIFLCFI LAGR (SEQ ID NO:2).

[0050] Das isolierte und gereinigte ULBP-1-Polypeptid gemäß der Erfindung hat ein Molekulargewicht von etwa 31 kD, wie durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) bestimmt. Das Signalpeptid des ULBP-1-Polypeptids (Aminosäuren 1–21) kann abgespalten werden, um ein reifes Protein, das bei aa 22 beginnt, zur Verfügung zu stellen.

[0051] In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wurde ein ULBP-Gen, das ULBP-2 genannt wurde, als ein EST erkannt, der homolog zu dem ULBP-1-Gen ist (GenBank Zugangsnummer R25716). Die Sequenz in der EST-Datenbank war nicht korrekt. Darüber hinaus wurde dieser EST nicht als ein Protein codierend erkannt, das mit einem anderen Protein verwandt ist. Der EST-Klon wurde beschafft und vollständig sequenziert, was zeigte, dass er eine vollständige Proteinsequenz codiert.

[0052] Die Nukleotidsequenz des ULBP-2-Gens (nur die codierende Sequenz) lautet wie folgt:



ATGGCAGCAGCCGCCGCTACCAAGATCCTTCTGTGCCTCCCGCTTCTGCT  
 CCTGCTGTCCGGCTGGTCCCGGGCTGGGCGAGCCGACCCTCACTCTCTTT  
 GCTATGACATCACCGTCATCCCTAAGTTCAGACCTGGACCACGGTGGTGT  
 GCGGTTCAAGGCCAGGTGGATGAAAAGACTTTTCTTCACTATGACTGTGG  
 CAACAAGACAGTCACACCTGTCAGTCCCCTGGGGAAGAACTAAATGTCA  
 CAACGGCCTGGAAAGCACAGAACCCAGTACTGAGAGAGGTGGTGGACATA  
 CTTACAGAGCAACTGCGTGACATTGAGCTGGAGAATTACACACCCAAGGA  
 ACCCCTCACCCCTGCAGGCAAGGATGTCTTGTGAGCAGAAAGCTGAAGGAC

ACAGCAGTGGATCTTGGCAGTTCAGTTTCGATGGGCAGATCTTCCTCCTC  
 TTTGACTCAGAGAAGAGAATGTGGACAACGGTTCATCCTGGAGCCAGAAA  
 GATGAAAGAAAAGTGGGAGAATGACAAGGTGTGGCCATGTCCTTCCATT  
 ACTTCTCAATGGGAGACTGTATAGGATGGCTTGAGGACTTCTTGATGGGC  
 ATGGACAGCACCCCTGGAGCCAAGTGCAGGAGCACCACTCGCCATGTCCTC  
 AGGCACAACCCAACTCAGGGCCACAGCCACCACCCTCATCCTTTGCTGCC  
 TCCTCATCATCCTCCCCTGCTTCATCCTCCCTGGCATCTGA [SEQ ID NO:3].

[0053] Die entsprechende Aminosäuresequenz von ULBP-2 ist:

#### ULBP-2-POLYPEPTID

MAAAATKIL LCLPLLLLLS GWSRAGRADP HSLCYDITVI PKFRPGPRWC  
 AVQGVVDEKT FLHYDCGNKT VTPVSPLGKK LNVTTAWKAQ NPVLREVVDI  
 LTEQLRDIQL ENYTPKEPLT LQARMSCEQK AEGHSSGSWQ FSFDGQIFLL  
 FDSEKRMWTT VHPGARKMKE KWENDKVVAM SFHYFSMGDC IGWLEDFLMG  
 MDSTLEPSAG APLAMSSGTT QLRATATTLI LCLLIILPC FILPGI [SEQ ID  
 NO: 4].

[0054] Das isolierte und gereinigte ULBP-2-Polypeptid gemäß der Erfindung hat ein Molekulargewicht von etwa 31 kD, wie durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) bestimmt. Im Falle dieses Polypeptids erfolgt die Abspaltung des Signalpeptids zwischen den Aminosäuren 21 und 22.

[0055] Die ULBP-1- und ULBP-2-Polypeptide sind auf der Aminosäureebene 60% identisch. Die Ähnlichkeiten und Unterschiede in ihren Sequenzen werden deutlich aus dem folgenden Sequenz-Alignment der Aminosäuren 1–243 der SEQ-ID Nr. 2 mit den Aminosäuren 1–245 der SEQ-ID Nr. 4.:

ULBP-1 1 MAAAASPAFLCLPLLHLLSGWSRAGWVDTHCLCYDFIITPKSRPEPQWC  
 : |||||.. : ||||| ||||| ||||| : . | . | : |||| : . . | | || : | . | |  
 ULBP-2 1 MAAAAATKILLCLPLLLLLSGWSRAGRAPHSLCYDITVIPKFRPGPRWC  
 51 EVQGLVDERPFLHYDCVNHKAKAFASLGKKVNVTKTWEEQTETLRDVVDF  
 . ||| ||| : . ||||| . | . . . . . |||| : ||| . | . | . . | : ||| :  
 51 AVQGVDEKTFHYDCGNKTVTPVSPGLKKLVTTAWKAQNPVLREVVDI  
 101 LKGQLLDIQVENLPIEPLTLQARMSCEHEAHGHGRGSWQFLNGQKFL  
 | . : || ||| : || . | ||||| ||||| : . | . | : . |||| | : || |||  
 101 LTEQLRDIQLENYTPKEPLTLQARMSCEQKAEGHSSGSWQFSFDGQIFLL  
 151 FDSNNRKWTALHPGAKKMTKEKWEKNRDVTMFFQKISLGDCKMWLEEFMY  
 ||| : . | . | . : |||| : || . |||| : . : | . | | : : ||| ||| : |||

151 FDSEKRMWTTVHPGARKMKEKWENDKVVAMSFHYFSMGDCIGWLEDFLMG

201 WEQMLDPTKPPSLA..PGTTQPKAMATTLSPWSLLIIFLCFILAG 243

: | : | . . : . | | ||| : | |||| : |||| : |||| : |

201 MDSTLEPSAGAPLAMSSGTTQLRATATTLILCCLLIILPCFILPG 245

[0056] In einer weiteren bestimmten Ausführungsform der Erfindung wurde ein ULBP-Gen, das ULBP-3 genannt wurde, als ein EST erkannt, der homolog zu dem ULBP-1-Gen ist (GenBank Zugangsnummer A1091180). Der EST-Klon wurde beschafft und vollständig sequenziert, was zeigte, dass er eine Proteinsequenz codiert, der die ersten fünf Aminosäuren der Leader-Sequenz fehlen. Die Nukleotidsequenz des ULBP-3-Gens lautet wie folgt:

AGCCCCGCGA TCCTTCCGCG CCTCGCGATT CTTCGGTACC TGCTATTCTGA  
 CTGGTCCGGG ACGGGGCGGG CCGACGCTCA CTCTCTCTGG TATAACTTCA  
 CCATCATTC A TTTGCCAGCA CATGGGCAAC AGTGGTGTGA GGTCCAGAGC  
 CAGGTGGATC AGAAGAATTT TCTCTCCTAT GACTGTGGCA GTGACAAGGT  
 CTTATCTATG GGTCACCTAG AAGAGCAGCT GTATGCCACA GATGCCTGGG  
 GAAAACAAC T GGAAATGCTG AGAGAGGTGG GGCAGAGGCT CAGACTGGAA  
 CTGGCTGACA CTGAGCTGGA GGATTTTACA CCCAGTGGAC CCCTCACGCT  
 GCAGGTCAGG ATGTCTTGTG AGTGTGAAGC CGATGGATAC ATCCGTGGAT  
 CTTGGCAGTT CAGCTTCGAT GGACGGAAGT TCCTCCTCTT TGACTCAAAC  
 AACAGAAAGT GGACAGTGGT TCACGCTGGA GCCAGGCGGA TGAAAGAGAA  
 GTGGGAGAAG GATAGCGGAC TGACCACCTT CTTCAAGATG GTCTCAATGA  
 GAGACTGCAA GAGCTGGCTT AGGGACTTCC TGATGCACAG GAAGAAGAGG  
 CTGGAACCCA CAGCACCACC CACCATGGCC CCAGGCTTAG CTCAACCCAA  
 AGCCATAGCC ACCACCCTCA GTCCCTGGAG CTTCTCATC ATCCTCTGCT  
 TCATCCTCCC TGGCATCTGA GAAGAGTCAT TTAGAGTGAC AGGTGGAAGG  
 TGATATCAAG AAGCCTCTGT TAGCCTGGTC TGGTTCCTGC TCTCCCTTCA  
 GGGAGGCCGC CTGTCTACTC ACCACTGTGC CTTTCTGGAA AGCAGGAGTT  
 CAAGCCTTAG CAAGCCCAGA GGCCCCCAGC AGATGATGAG GACATTGTCTG  
 GCTCAACGTC TCAGGCCACT CATTACCTTC GCTCATGATC CCAGCAGCCA  
 [SEQ ID NO:9]

[0057] Die entsprechende Aminosäuresequenz von ULBP-3 ist:

SPAILPRLAI LPYLLFDWSG TGRADAHSLW YNFTIIHLPR HGQQWCEVQS  
 QVDQKNFLSY DCGSDKVLSM GHLEEQLYAT DAWGKQLEML REVGQRLRLE  
 LADTELEDFT PSGPLTLQVR MSCECEADGY IRGSWQFSFD GRKFLLFDSN  
 NRKWTVVHAG ARRMKEKWEK DSGLTTFFKM VSMRDCKSWL RDFLMHRKKR  
 LEPTAPPTMA PGLAQPKAIA TTLSPWSFLI ILCFILPGI (SEQ ID NO:10)

[0058] ULBP-3 ist ein Mitglied der ULBP-Familie. ULBP-1 und ULBP-3 sind zu 54% identisch, und ULBP-2 und ULBP-3 sind zu 54% identisch, was aus dem folgenden Sequenz-Alignment der Aminosäuresequenzen von ULBP-1 (SEQ-ID Nr. 2), ULBP-2 (SEQ-ID Nr. 4) und ULBP-3 (SEQ-ID Nr. 10) ersichtlich wird:

	1		50
ULBP1	MAAAASPAFL LCLPLL.HLL SGWSRAGWVD THCLCYDFII TPKSRPEPQW		
ULBP2	MAAAAATKIL LCLPLL.LLL SGWSRAGRAD PHSLCYDITV IPKFRPGPRW		
ULBP3	~~~~~SPAIL PRLAILPYLL FDWSGTGRAD AHSLWYNFTI IHLPRHGQQW		
	51		100
ULBP1	CEVQGLVDER PFLHYDCVNH KAKAFASLGK KVNVTKTWEE QTETLRDVVD		
ULBP2	CAVQGQVDEK TFLHYDCGNK TVTPVSPLGK KLNVTTANKA QNPVLREVVD		
ULBP3	CEVQSQVDQK NFLSYDCGSD KVLSMGHEE QLYATDANGK QLEMLREVGO		
	101		150
ULBP1	FLKGQLLDIQ VENLIPIEPL TLQARMSCEH EAHGHGRGSW QFLFNGQKFL		
ULBP2	ILTEQLRDIQ LENYTPKEPL TLQARMSCEQ KAEGHSSGSW QFSFDGQIFL		
ULBP3	RLRLELADTE LEDFTPSGPL TLQVRMSCEC EADGYIRGSW QFSFDGRKFL		
	151		200
ULBP1	LFDSNNRKWT ALHPGAKKMT EKWEKNRDVT MFFQKISLGD CKMWLEEFM		
ULBP2	LFDSEKRMWT TVHPGARKMK EKWENDKVVA MSFHYFSMGD CIGWLEDFM		
ULBP3	LFDSNNRKWT VVHAGARRMK EKWEKDSGLT TFFKMVSMRD CKSWLRDFM		
	201		248
ULBP1	YWEQMLDPT. .KPPSLAPGT TQPKAMATTI SPWSLLIIFL CFILAGR*		
ULBP2	GMDSTLEPSA GAPLAMSSGT TQLRATATTI ILCCLLIILP CFILPGI*		
ULBP3	HRKKRLEPTA ..PPTMAPGL AQPKAIAATTI SPWSFLIIL. CFILPGI*		

ULBP1	1	MAAAASPAFL	LCLPLL.HLL	SGWSRAGWVD	THCLCYDFII	TPKSRPEPQW	49
		.	.:	.   . :	.:	:	
ULBP3	1	.....	SPAILPRLAILPYLL	FDWSGTGRAD	AHSLWYNFTI	IHLPRHGQQW	45
	50	CEVQGLVDER	PFLHYDCVNH	KAKAFASLGK	KVNVTKTWEE	QTETLRDVVD	99
		.	::	.	. .  .:	.:	
	46	CEVQSQVDQK	NFLSYDCGSD	KVLSMGHEE	QLYATDANGK	QLEMLREVGO	95

```

100 FLKGQLLDIQVENLIPIEPLTLQARMSCEHEAHGHRGSGWQFLFNGQKFL 149
   | : : | | : : : | | | | | | | | | | | | | | | | : | | |
96 RLRLELADTELEDFTPSGPLTLQVRMSCECEADGYIRGSWQFSFDGRKFL 145

150 LFDSNNRKWTALHPCAKMTEKWEKNRDVTMFFQKISLGDCKMWLEEFLLM 199
   | | | | | | | | : | : | : | | | | : : | | . : | : | | | : | |
146 LFDSNNRKWTVVHAGARRMKEKWEKDSGLTTFKVMVSMRDCKSWLRDFLLM 195

200 YWEQMLDPTKPPSLAPGTTQPKAMATTLSPWSLLIIFLCFILAGR* 245
   : . | : | | | : | | | . | | | : | | | | | : | | | | | |
196 HRKKRLEPTAPPTMAPGLAQPKAIATTLSPWSFLIILCFILPGI* 240

```

```

ULBP2 1 MAAAAATKILLCLPLL.LLLSGWSRAGRADPHSLCYDITVIPKFRPGPRW 49
      | | | | | : | | | | | | | | | | : | : | | | |
ULBP3 1 .....SPAILPRLAILPYLLFDWSGTGRADAHSLWYNFTIIHLPRHGQW 45

50 CAVQGOVDEKTFLLHYDCGNKTVTPVSPGLGKKNVTTAWKAQNPVLREVVD 99
   | | | | | | | | : | : | | | | | | | | | : | | | |
46 CEVQSQVDQKNFLSYDCGSDKVLSMGHLEEQLYATDAWGKQLEMLREVVGQ 95

100 ILTEQLRDIQLENYTPKEPLTLQARMSCEQKAEGHSSGSWQFSFDGQIFL 149
   | : | | : | : : | | | | | | | | | | : | | | | | | |
96 RLRLELADTELEDFTPSGPLTLQVRMSCECEADGYIRGSWQFSFDGRKFL 145

150 LFDSEKRMWTTVHPCARKMKEKWENDKVVAMS FHYFSMGDCIGWLEDFLLM 199
   | | | | . | | | | | : | | | | | | | | : . | | | | | |
146 LFDSNNRKWTVVHAGARRMKEKWEKDSGLTTFKVMVSMRDCKSWLRDFLLM 195

200 GMDSTLEPSAGAPLAMSSGTTQLRATATTLILCCLLIILPCFILPGI* 247
   | | | . | | . | . | . | : | | | | : | | | | | | |
196 HRKKRLEPT..APPTMAPGLAQPKAIATTLSPWSFLIILCFILPGI* 240

```

**[0059]** Ein "|" zeigt die Identität von Aminosäuren an, ein "." zeigt eine schwache Konservierung der Aminosäuren an und ein ":" zeigt eine hohe Konservierung der Aminosäuren an, wie durch ein Alignment der Sequenzen unter Verwendung des GCG GAP-Programms mit der Pep Scorig-Matrix, Gap Creation Penalty=30, Gap Extension Penalty=1 bestimmt.

**[0060]** ULBP-1-, ULBP-2- und ULBP-3-Polypeptide sind entfernt verwandt mit einer Anzahl von MHC Klasse 1 Proteinen, insbesondere nicht-klassischen Klasse 1 Molekülen oder Klasse 1 Molekülen von nicht-humanen Spezies. ULBP-1-, ULBP-2- und ULBP-3-Polypeptide enthalten Regionen, die homolog zu den  $\alpha$ 1- und  $\alpha$ 2-Domänen der MHC Klasse 1 Proteine sind. Jedoch weisen sie eine unterschiedliche Struktur zu anderen Klasse 1 Molekülen auf, da ihnen die Alpha-3-Domäne fehlt, die für die Bindung von Beta-2-Mikroglobulin benötigt wird. Die  $\alpha$ 1-Domäne geht etwa von den Aminosäuren 30–117 im Falle von ULBP-1 und ULBP-2 und etwa von den Aminosäuren 26–113 im Falle von ULBP-3. Die  $\alpha$ 2-Domäne geht etwa von den Aminosäuren 118–200 im Falle von ULBP-1 und ULBP-2 und etwa von den Aminosäuren 114–196 im Falle von ULBP-3. Außerdem können die ULBP-1- und ULBP-2-Gene kartografisch dem Chromosom 6q20-23 zugeordnet werden, was anders ist bei allen anderen MHC Klasse 1 Genen und verwandten Genen.

**[0061]** Es versteht sich, dass die ULBP-DNA und die Proteine und Polypeptide, die von der DNA codiert werden, nicht auf ULBP-1, ULBP-2 und ULBP-3 beschränkt sind. Insbesondere bezeichnet der Begriff "ULBP-DNA" eine Gattung von Polynukleotiden, die dieselbe Sequenz wie die SEQ-ID Nr. 1, SEQ-ID Nr. 3 und SEQ-ID Nr. 9 aufweisen, ebenso wie solche Polynukleotide, die einen hohen Grad an Ähnlichkeit (wenigstens 90% Homologie) mit solchen DNA-Sequenzen aufweisen.

**[0062]** In ähnlicher Weise bezieht sich der Begriff "ULBP-Polypeptid" auf eine Gattung von Polypeptiden und Proteinen, die die gleichen Aminosäuresequenzen wie die SEQ-ID Nr. 2, SEQ-ID Nr. 4 oder SEQ-ID Nr. 10 aufweisen, ebenso wie auf Polypeptide und Proteine, die einen hohen Grad an Ähnlichkeit (wenigstens 90% Identität) mit solchen Aminosäuresequenzen aufweisen und wobei die Proteine biologisch aktiv sind. ULBP-Polypeptide schließen außerdem biologisch aktive Genprodukte von Polynukleotiden der SEQ-ID Nr. 1, SEQ-ID Nr. 3 und SEQ-ID Nr. 9 ein. Wenn er hierin verwendet wird, ist der Begriff "ULBP" so vorgesehen, dass

er ULBP-DNA ebenso wie ULBP-Polypeptide umfasst.

**[0063]** Die Entdeckung der Nukleinsäuren gemäß der Erfindung ermöglicht die Konstruktion von Expressionsvektoren, die die Nukleinsäuresequenzen, welche die Polypeptide codieren, umfassen; Wirtszellen, die mit den Expressionsvektoren transfiziert oder transformiert sind; isolierte und gereinigte biologisch aktive Polypeptide und Fragmente davon; die Verwendung der Nukleinsäuren oder von Oligonukleotiden davon als Sonden zur Identifizierung von Nukleinsäuren, die Proteine mit ULBP-Aktivität codieren; die Verwendung der Nukleinsäuren oder von Oligonukleotiden davon zur Identifizierung des humanen Chromosoms Nr. 6; die Verwendung der Nukleinsäuren oder von Oligonukleotiden davon zur Kartierung von Genen auf dem humanen Chromosom Nr. 6; die Verwendung der Nukleinsäuren oder von Oligonukleotiden davon zur Identifizierung von Genen, die mit bestimmten Krankheiten, Syndromen oder anderen humanen Krankheitszuständen, die mit dem humanen Chromosom Nr. 6 assoziiert sind, zu identifizieren (einschließlich Retinitis pigmentosa-25 (6q14-q21); Insulin-abhängiger Diabetes mellitus, 15 (6q21); progressiver pseudorheumatoider Arthropathie während der Kindheit (6q22); Muskeldystrophie, kongenitaler Merosin-Defekt (6q22-q23); und dilatativer Kardiomyopathie 1F (6q23)), und die Verwendung von einzelsträngigen Sense- oder Antisense-Oligonukleotiden von den Nukleinsäuren, um die Expression von Polynukleotiden, die von ULBP-Gen codiert werden, zu inhibieren.

### NUKLEINSÄUREMOLEKÜLE

**[0064]** In einer besonderen Ausführungsform bezieht sich die Erfindung auf bestimmte isolierte Nukleotidsequenzen, die frei sind von kontaminierendem endogenem Material. Eine "Nukleotidsequenz" bezeichnet ein Polynukleotidmolekül in Form eines separaten Fragmentes oder als Komponente eines größeren Nukleinsäurerekonstruktes. Das Nukleinsäuremolekül wurde von DNA oder RNA abgeleitet, die wenigstens einmal in im Wesentlichen reiner Form und in einer Menge oder Konzentration isoliert wurde, die die Identifizierung, Manipulation und Gewinnung seiner Teil-Nukleotidsequenzen durch biochemische Standardverfahren ermöglicht (wie z. B. solche, die in Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd sed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) dargestellt sind). Solche Sequenzen werden vorzugsweise zur Verfügung gestellt und/oder in Form eines offenen Leserahmens konstruiert, der nicht durch nicht-translatierte Sequenzen oder durch Introns, die typischerweise in eukaryontischen Genen vorkommen, unterbrochen wird. Sequenzen von nicht translatisierter DNA können 5' oder 3' von einem offenen Leserahmen vorkommen, wo dieselben mit der Manipulation oder Expression der codierenden Region nicht interferieren.

**[0065]** Nukleinsäuremoleküle gemäß der Erfindung schließen DNA sowohl in einzelsträngiger als auch in doppelsträngiger Form ein, ebenso wie das RNA-Gegenstück dazu. DNA schließt z. B. cDNA, genomische DNA, chemisch synthetisierte DNA, durch PCR amplifizierte DNA und Kombinationen daraus ein. Genomische DNA kann durch konventionelle Methoden z. B. unter Verwendung der cDNA der SEQ-ID Nr. 1, SEQ-ID Nr. 3 oder SEQ-ID Nr. 9 oder eines geeigneten Fragmentes davon als Sonde isoliert werden.

**[0066]** Die DNA-Moleküle gemäß der Erfindung schließen vollständig lange Gene ebenso wie Polynukleotide und Fragmente davon ein. Das vollständig lange Gen kann das N-terminale Signalpeptid einschließen. Weitere Ausführungsformen schließen DNA ein, die eine lösliche Form codiert, z. B. die extrazelluläre Domäne des Proteins codiert, entweder mit oder ohne das Signalpeptid und/oder die GPI-Verknüpfung (GPI linkage).

**[0067]** Die Nukleinsäuren gemäß der Erfindung stammen vorzugsweise von humanen Quellen, die Erfindung schließt jedoch auch solche Nukleinsäuren ein, die von nicht-humanen Spezies stammen.

### Bevorzugte Sequenzen

**[0068]** Eine besonders bevorzugte Nukleotidsequenz gemäß der Erfindung ist die SEQ-ID Nr. 1, SEQ-ID Nr. 3 oder SEQ-ID Nr. 9, wie oben dargestellt. Die Sequenz der Aminosäuren, die durch die DNA der SEQ-ID Nr. 1 codiert wird, ist in SEQ-ID Nr. 2 gezeigt. Die Sequenz der Aminosäuren, die durch die DNA der SEQ-ID Nr. 3 codiert werden, ist in SEQ-ID Nr. 4 gezeigt. Die Sequenz der Aminosäuren, die durch die DNA der SEQ-ID Nr. 9 codiert werden, ist in SEQ-ID Nr. 10 gezeigt. Diese Sequenzen identifizieren die ULBP-1-, ULBP-2- und ULBP-3-Polynukleotide als Mitglieder der ULBP-Familie.

### Zusätzliche Sequenzen

**[0069]** Aufgrund der bekannten Degenerierung des genetischen Codes, worin mehr als ein Codon die gleiche Aminosäure codieren kann, kann eine DNA-Sequenz von der in SEQ-ID Nr. 1, SEQ-ID Nr. 3 oder SEQ-ID Nr. 9 gezeigten abweichen und dennoch ein Polynukleotid codieren, das die Aminosäuresequenz der SEQ-ID Nr.

2, SEQ-ID Nr. 4 oder SEQ-ID Nr. 10 aufweist. Solche abweichenden DNA-Sequenzen können aus stummen Mutationen (z. B. wie sie während der PCR-Amplifikation auftreten) resultieren oder können das Produkt einer bewussten Mutagenese einer nativen Sequenz sein.

**[0070]** Die Erfindung stellt folglich isolierte DNA-Sequenzen zur Verfügung, die die Polypeptide gemäß der Erfindung codieren, und die ausgewählt sind aus: (a) einer DNA, die die Nukleotidsequenz der SEQ-ID Nr. 1, SEQ-ID Nr. 3 oder SEQ-ID Nr. 9 umfasst; (b) einer DNA, die die Polypeptide der SEQ-ID Nr. 2, SEQ-ID Nr. 4 oder SEQ-ID Nr. 10 codiert; (c) einer DNA, die fähig ist, mit einer DNA gemäß (a) oder (b) unter Bedingungen moderater Stringenz zu hybridisieren und die die Polypeptide gemäß der Erfindung codiert; und (d) einer DNA, die fähig ist, mit einer DNA gemäß (a) oder (b) unter Bedingungen hoher Stringenz zu hybridisieren und die die Polypeptide gemäß der Erfindung codiert. Selbstverständlich sind die Polypeptide, die durch solche DNA-Sequenzen codiert werden, von der Erfindung umfasst.

**[0071]** Die Erfindung stellt folglich äquivalente isolierte DNA-Sequenzen zur Verfügung, die biologisch aktive ULBP-Polypeptide codieren, die ausgewählt sind aus: (a) einer DNA, die von dem codierenden Bereich eines nativen Säuger-ULBP-Gens abgeleitet ist; (b) einer DNA, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus den Nukleotidsequenzen 1–735 der SEQ-ID Nr. 1, den Nukleotidsequenzen 1–741 der SEQ-ID Nr. 3 und den Nukleotidsequenzen 1–717 der SEQ-ID Nr. 9 und (c) einer DNA, die fähig ist, mit einer DNA gemäß (a) oder (b) unter Bedingungen moderater Stringenz zu hybridisieren und die biologisch aktive ULBP-Polypeptide codiert. ULBP-Polypeptide, die durch solche DNA äquivalenten Sequenzen codiert werden, sind von der Erfindung umfasst. ULBP-Polypeptide, die durch DNA codiert werden, die von anderen Säugerspezies stammen, wobei die DNA mit der komplementären Sequenz der DNA der SEQ-ID Nr. 1, SEQ-ID Nr. 3 oder SEQ-ID Nr. 9 hybridisiert, sind ebenfalls umfasst.

**[0072]** Wie hierin verwendet können die Bedingungen moderater Stringenz von den durchschnittlichen Fachleuten auf dem Gebiet auf Grundlage z. B. der Länge der DNA einfach bestimmt werden. Die Grundbedingungen werden von Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2 ed. Bd. 1, S. 1.101–104, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) dargestellt und schließen die Verwendung einer Vorwaschlösung für die Nitrocellulosefilter aus  $5 \times \text{SSC}$ , 0,5% SDS, 1,0 mM an EDTA (pH 8), von Hybridisierungsbedingungen von etwa 50% Formamid,  $6 \times \text{SSC}$  und etwa 42°C (oder einer anderen ähnlichen Hybridisierungslösung, wie z. B. Stark's Lösung in etwa 50% Formamid bei etwa 42°C) und von Waschbedingungen von etwa 60°C,  $0,5 \times \text{SSC}$ , 0,1% SDS ein. Bedingungen hoher Stringenz können ebenso von dem Fachmann auf Grundlage z. B. der Länge der DNA einfach bestimmt werden. Im Allgemeinen sind solche Bedingungen wie die oben angegebenen Hybridisierungsbedingungen definiert und mit einem Waschschrift bei etwa 68°C,  $0,2 \times \text{SSC}$ , 0,1% SDS. Der Fachmann wird erkennen, dass die Temperatur und die Salzkonzentration der Waschlösung wie benötigt an die Gegebenheiten wie z. B. der Länge der Probe angepasst werden können.

**[0073]** Ebenfalls als eine Ausführungsform gemäß der Erfindung eingeschlossen ist DNA, die Polypeptidfragmente und Polypeptide codiert, die inaktivierte N-Glycosylierungsstelle(n), inaktivierte Protease-Prozessierungsstelle(n) oder konservierte Aminosäureaustausch(e) umfassen, wie unten beschrieben.

**[0074]** In einer weiteren Ausführungsform umfassen die Nukleinsäuremoleküle gemäß der Erfindung außerdem Nukleotidsequenzen, die wenigstens 80% identisch mit einer nativen Sequenz sind. Ebenfalls vorgesehen sind Ausführungsformen, in denen ein Nukleinsäuremolekül eine Sequenz umfasst, die wenigstens 90% identisch, wenigstens 95% identisch, wenigstens 98% identisch, wenigstens 99% identisch oder wenigstens 99,5% identisch mit einer nativen Sequenz ist.

**[0075]** Die Prozentidentität kann durch visuelle Untersuchung und mathematische Berechnung bestimmt werden. Alternativ kann die Prozentidentität von zwei Nukleinsäuresequenzen durch Vergleich der Sequenzinformationen unter Verwendung des GAP-Computerprogramms, Version 6.0, wie von Devereux et al. beschrieben (*Nucl. Acids Res.* 12: 387, 1984) und von der University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWGGC) erhältlich, bestimmt werden. Die bevorzugten Default-Parameter für das GAP-Programm schließen ein: (1) eine unäre Vergleichsmatrix für Nukleotide (enthaltend einen Wert von 1 für Identitäten und von 0 für Nichtidentitäten) und die gewichtete Vergleichsmatrix von Gribskov und Burgess. *Nucl. Acids Res.* 14: 6745, 1986, wie beschrieben von Schwartz und Dayhoff, eds., *Atlas of Protein Sequence and Structure*, National Biomedical Research Foundation, S. 353–358, 1979; (2) einen Abzug (penalty) von 3,0 für jede Lücke (gap) und zusätzlich 0,10 Abzug für jedes Symbol in jeder Lücke; und (3) keinen Abzug für Lücken am Ende. Andere Programme, die von den Fachleuten auf dem Gebiet der Sequenzvergleiche verwendet werden, können ebenfalls verwendet werden.

**[0076]** Die Erfindung stellt außerdem isolierte Nukleinsäuren zur Verfügung, die bei der Herstellung von Polypeptiden nützlich sind. Solche Polypeptide können durch jegliche der Vielzahl von konventionellen Methoden hergestellt werden. Eine DNA-Sequenz, die ein ULBP-Polypeptid codiert oder ein gewünschtes Fragment davon, kann in einen Expressionsvektor für die Herstellung des Polypeptids oder Fragmentes subkloniert werden. Die DNA-Sequenz wird vorteilhafterweise mit einer Sequenz fusioniert, die ein geeignetes Leader- oder Signal-Peptid codiert. Alternativ kann das gewünschte Fragment unter Verwendung der bekannten Methoden chemisch synthetisiert werden. DNA-Fragmente können außerdem durch den Verdau einer vollständig langen klonierten DNA-Sequenz mit Restriktionsendonukleasen hergestellt werden und durch Elektrophorese auf Agarosegelen isoliert werden. Wenn nötig, können die Oligonukleotide, die den 5'- oder 3'-Terminus bis zu einem gewünschten Punkt rekonstruieren, mit einem durch den Restriktionsenzymverdau erzeugtes DNA-Fragment ligiert werden. Solche Oligonukleotide können zusätzlich eine Restriktionsendonukleasen-Schnittstelle stromaufwärts der gewünschten codierenden Sequenz enthalten und ein Initiationscodon (ATG) am N-Terminus der codierenden Sequenz positionieren.

**[0077]** Das wohlbekannte Polymerasekettenreaktion(PCR)-Verfahren kann ebenfalls angewendet werden, um eine DNA-Sequenz, die ein gewünschtes Proteinfragment codiert, zu isolieren und zu amplifizieren. Oligonukleotide, die die gewünschten Termini des DNA-Fragmentes definieren, werden als 5'- und 3'-Primer verwendet. Die Oligonukleotide können zusätzlich Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen enthalten, um die Insertion des amplifizierten DNA-Fragmentes in einen Expressionsvektor zu erleichtern. PCR-Methoden sind in Saiki et al., Science 239: 487 (1988); Recombinant DNA Methodology, Wu et al., eds., Academic Press, Inc., San Diego (1989), S. 189–196; und PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis et al., eds., Academic Press, Inc. (1990) beschrieben.

#### POLYPEPTIDE UND FRAGMENTE DAVON

**[0078]** Die Erfindung umfasst Polypeptide und Fragmente davon in verschiedenen Formen, einschließlich solcher, die natürlich vorkommen oder mit Hilfe verschiedener Methoden hergestellt werden, wie z. B. Arbeitsverfahren, welche die rekombinante DNA-Technologie einschließen. Zum Beispiel können DNAs, die ULBP-Polypeptide codieren, von der SEQ-ID Nr. 1, SEQ-ID Nr. 3 oder SEQ-ID Nr. 9 durch in vitro-Mutagenese erlangt werden, welche die ortgerichtete Mutagenese, die Zufallsmutagenese und die in vitro-Nukleinsäuresynthese einschließt. Solche Formen schließen Derivate, Varianten und Oligomere ebenso wie Fusionsprotein oder Fragmente davon ein, sind jedoch nicht auf diese beschränkt.

#### Polypeptide und Fragmente davon

**[0079]** Die Polypeptide gemäß der Erfindung schließen vollständig lange Proteine, die von den oben dargestellten Nukleotidsequenzen codiert werden, ein. Besonders bevorzugte Polypeptide schließen die Aminosäuresequenz der SEQ-ID Nr. 2, SEQ-ID Nr. 4 und SEQ-ID Nr. 10 ein, wobei besonders bevorzugte Fragmente die Aminosäuren etwa von der Aminosäure 22 bis etwa zu der Aminosäure 219 der SEQ-ID Nr. 2 und etwa von der Aminosäure 22 bis etwa zu der Aminosäure 223 der SEQ-ID Nr. 4 umfassen.

**[0080]** Die Polypeptide der SEQ-ID Nr. 2, SEQ-ID Nr. 4 und SEQ-ID Nr. 10 schließen eine N-terminale hydrophobe Region ein, die als Signalpeptid fungiert. Die Computeranalyse sagt voraus, dass das Signalpeptid den Resten 1 bis 21 der SEQ-ID Nr. 2 und SEQ-ID Nr. 4 und den Resten 1 bis 17 der SEQ-ID Nr. 10 entspricht. Die Spaltung des Signalpeptids würde somit ein reifes Protein ergeben, das die Aminosäuren 22 bis 244 der SEQ-ID Nr. 2, die Aminosäuren 22 bis 246 der SEQ-ID Nr. 4 und die Aminosäuren 17 bis 239 der SEQ-ID Nr. 10 umfasst. Der Fachmann wird erkennen, dass die oben beschriebenen Begrenzungen der Regionen (die unter Verwendung von zu diesem Zwecke erhältlichen Computerprogrammen vorhergesagt werden können) von den oben beschriebenen abweichen können.

**[0081]** Die Polypeptide der SEQ-ID Nr. 2, SEQ-ID Nr. 4 und SEQ-ID Nr. 10 schließen eine C-terminale hydrophobe Region ein, die als GPI-Verknüpfung (GPI linkage) fungiert. Die vorhergesagte GPI entspricht in etwa den letzten 20 Resten der SEQ-ID Nr. 2, SEQ-ID Nr. 4 und SEQ-ID Nr. 10. Ein Entfernen der GPI-Verknüpfung würde somit ein Protein ergeben, das die Aminosäuren 1 bis etwa 224 der SEQ-ID Nr. 2, 1 bis etwa 226 der SEQ-ID Nr. 4 und 1 bis etwa 219 der SEQ-ID Nr. 10 umfasst. Eine Entfernung von sowohl dem Signalpeptid als auch der GPI-Verknüpfung würde folglich ein Protein ergeben, das die Aminosäuren von etwa 22 bis etwa 224 der SEQ-ID Nr. 2, von etwa 22 bis etwa 226 der SEQ-ID Nr. 4 und von etwa 17 bis etwa 219 der SEQ-ID Nr. 10 umfasst. Der Fachmann wird erkennen, dass die oben beschriebenen Begrenzungen solcher Regionen des Peptids ungefähr sind und von den oben beschriebenen abweichen können.

**[0082]** Die Polypeptide gemäß der Erfindung können membrangebunden sein oder sie können sezerniert werden und folglich löslich sein. Lösliche Polypeptide sind fähig, von Zellen, in denen sie exprimiert werden, sezerniert zu werden. Im Allgemeinen können lösliche Polypeptide identifiziert (und damit von nicht löslichen membrangebundenen Gegenständen unterschieden) werden durch Abtrennen intakter Zellen, die das gewünschte Polypeptide exprimieren, von dem Kulturmedium, z. B. durch Zentrifugation und durch Untersuchen des Mediums (Überstand) auf das Vorhandensein des gewünschten Polypeptids. Das Vorhandensein des Polypeptids in dem Medium deutet darauf hin, dass das Polypeptid von den Zellen sezerniert wurde und folglich eine lösliche Form des Proteins ist.

**[0083]** In einer Ausführungsform umfassen die löslichen Polypeptide und Fragmente davon die gesamte extrazelluläre Domäne oder einen Teil davon, es fehlt ihnen jedoch die GPI-Verknüpfung, die die Retention des Polypeptids auf einer Zellmembran verursachen würde. Ein lösliches Polypeptid kann einen Teil der GPI-Verknüpfung enthalten, solange das Polypeptid von der Zelle, in der es produziert wird, sezerniert wird.

**[0084]** Lösliche Polypeptide schließen somit Polypeptide, die die Aminosäuren mit einem N-Terminus bei Aminosäuren 20–30 und einem C-Terminus bei Aminosäuren 200–227 der SEQ-ID Nr. 2, einen N-Terminus bei Aminosäure 20–30 und einen C-Terminus bei Aminosäuren 200–227 der SEQ-ID Nr. 4 und einen N-Terminus bei Aminosäure 16–26 und einen C-Terminus bei Aminosäuren 196–223 der SEQ-ID Nr. 10 umfassen, ein, sind jedoch nicht auf diese beschränkt.

**[0085]** Im Allgemeinen ist die Verwendung löslicher Formen vorteilhaft für bestimmte Anwendungen. Die Reinigung der Polypeptide aus den rekombinanten Wirtszellen wird vereinfacht, da die löslichen Polypeptide von den Zellen sezerniert werden. Weiterhin sind lösliche Polypeptide im Allgemeinen geeigneter für die intravenöse Verabreichung.

**[0086]** Die Erfindung stellt außerdem Polypeptide und Fragmente der extrazellulären Domäne zur Verfügung, welche die gewünschte biologische Aktivität beibehält. Besondere Ausführungsformen sind auf Polypeptidfragmente gerichtet, die die Fähigkeit zur Bindung von ULBP-Gegenstrukturen, wie z. B. ULBP-16, beibehalten. Solch ein Fragment kann ein lösliches Polypeptid wie oben beschrieben sein. In einer weiteren Ausführungsform enthalten die Polypeptide und Fragmente vorteilhafterweise Regionen, die in der ULBP-Familie wie oben beschrieben konserviert sind.

**[0087]** Außerdem werden hierin Polypeptidfragmente zur Verfügung gestellt, die wenigstens 20 oder wenigstens 30 aufeinanderfolgende Aminosäuren der Sequenz der SEQ-ID Nr. 2, SEQ-ID Nr. 4 oder SEQ-ID Nr. 10 umfassen. Polypeptidfragmente können außerdem als Immunogene bei der Erzeugung von Antikörpern eingesetzt werden.

#### Varianten

**[0088]** Natürlich vorkommende Varianten ebenso wie abgeleitete Varianten von den Polypeptiden und Fragmenten werden hierin zur Verfügung gestellt.

**[0089]** Eine "ULBP-Variante" wie hierin verwendet bezeichnet ein Polypeptid, das im Wesentlichen homolog zu dem nativen ULBP-Polypeptid ist, jedoch eine Aminosäuresequenz aufweist, die sich von der des nativen ULBP-Polypeptids (human, murin oder eine andere Säugerspezies) aufgrund einer oder mehrerer Deletionen, Insertionen oder Substitutionen unterscheidet. Die Variante hat eine Aminosäuresequenz, die vorzugsweise wenigstens 80% identisch mit einer nativen ULBP-Polypeptid-Aminosäuresequenz ist, am bevorzugtesten wenigstens 90% identisch ist. Die Prozentidentität kann z. B. durch Vergleichen der Sequenzinformationen unter Verwendung des GAP-Computerprogramms, Version 6.0, beschrieben durch Devereux et al., (Nucl. Acids Res. 12: 387, 1984) und erhältlich von der University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWGCG) bestimmt werden. Das GAP-Programm verwendet das Alignment-Verfahren nach Needleman und Wunsch (J. Mol. Biol. 48: 443, 1970), wie von Smith und Waterman überarbeitet (Adv. Appl. Math. 2: 482, 1981). Die bevorzugten Default-Parameter für das GAP-Programm beinhalten: (1) eine unäre Vergleichsmatrix für Nukleotide (enthaltend einen Wert von 1 für Identitäten und von 0 für Nichtidentitäten) und die gewichtete Vergleichsmatrix von Gribskov und Burgess. Nucl. Acids Res. 14: 6745, 1986, wie beschrieben von Schwartz und Dayhoff, eds., Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, S. 353–358, 1979; (2) einem Abzug (penalty) von 3,0 für jede Lücke (gap) und einen zusätzlichen 0,10 Abzug für jedes Symbol in jeder Lücke; und (3) keinen Abzug für Lücken am Ende.

**[0090]** Varianten schließen außerdem Ausführungsformen ein, in denen ein Polypeptid oder Fragment eine



Aminosäure umfasst, die wenigstens 90% identisch, wenigstens 95% identisch, wenigstens 98% identisch, wenigstens 99% identisch oder wenigstens 99,9% identisch mit dem bevorzugten Polypeptid oder Fragment davon ist. Prozentidentität kann wie oben bestimmt werden. Alternativ kann die Prozentidentität von zwei Proteinsequenzen durch Vergleichen der Sequenzinformation unter Verwendung des GAP-Computerprogramms, basierend auf dem Algorithmus von Needleman und Wunsch (J. Mol. Biol. 48: 443, 1970) und erhältlich von der University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWGCG), bestimmt werden. Die bevorzugten Default-Parameter des GAP-Computerprogramms schließen ein: (1) eine Auswertungsmatrix (scoring matrix), Blosum62, wie von Henikoff und Henikoff beschrieben (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915, 1992); (2) eine Lücken-Gewichtung von 12; (3) eine Lückenlängen-Gewichtung von 4; und (4) keinen Abzug (penalty) für Endlücken. Andere Programme, die von dem Fachmann auf dem Gebiet für Sequenzvergleiche verwendet werden, können ebenfalls verwendet werden.

**[0091]** Die Varianten gemäß der Erfindung schließen z. B. solche ein, die das Ergebnis von alternativen mRNA-Splicing-Ereignissen oder von proteolytischer Spaltung sind. Alternatives Splicing von mRNA kann z. B. ein verkürztes aber biologisch aktives Protein erzeugen, wie z. B. eine natürlich vorkommende lösliche Form des Proteins. Variationen, die der Proteolyse zugeschrieben werden können, schließen z. B. Unterschiede in den N- oder C-Termini bei Expression in verschiedenen Typen von Wirtszellen aufgrund der proteolytischen Entfernung von einer oder mehreren terminalen Aminosäuren von dem Protein (im Allgemeinen zwischen 1–5 terminalen Aminosäuren) ein. Proteine, in denen Unterschiede in der Aminosäuresequenz einem genetischen Polymorphismus (allelische Variation unter Individuen, die das Protein produzieren) zuzuschreiben sind, sind ebenfalls hierin vorgesehen.

**[0092]** Wie oben angegeben stellt die Erfindung isolierte und gereinigte oder homogene ULBP-Polypeptide, sowohl rekombinant als auch nicht rekombinant, zur Verfügung. Varianten und Derivate von nativen ULBP-Proteinen, welche die gewünschte biologische Aktivität beibehalten, können durch Mutationen der Nukleotidsequenzen, die für native ULBP-Polypeptide codieren, erhalten werden. Änderungen der nativen Aminosäuresequenz können durch jede der Vielzahl von konventionellen Verfahren erreicht werden. Mutationen können an bestimmten Loci durch Synthetisieren von Oligonukleotiden, die eine mutierte Sequenz flankiert von Restriktionsstellen, welche die Ligation mit Fragmenten der nativen Sequenz ermöglichen, enthalten, eingeführt werden. Im Anschluss an die Ligation codiert die resultierende rekonstruierte Sequenz ein Analog, das die gewünschte Aminosäureinsertion, -substitution oder -deletion aufweist.

**[0093]** Alternativ können Oligonukleotid-gerichtete ortsspezifische Mutageneseverfahren angewendet werden, um ein geändertes Gen zur Verfügung zu stellen, indem vorher festgelegte Codons durch Substitution, Deletion oder Insertion verändert sein können. Beispielhafte Verfahren zur Herstellung der oben dargestellten Veränderungen werden von Walder et al. (Gene 42: 133, 1986); Bauer et al. (Gene 37: 73, 1985); Craik (Bio-Techniques, Januar 1985, 12–19); Smith et al., (Genetic Engineering: Principles and Methods, Plenum Press, 1981); Kunkel (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488, 1985); Kunkel et al., (Methods in Enzymol. 154: 367, 1987); und die US-Patente Nr. 4,518,584 und 4,737,462 offenbart.

**[0094]** Die ULBP-Polypeptide können, um ULBP-Derivate zu erzeugen, durch Bildung kovalenter oder aggregativer Konjugate mit anderen chemischen Resten, wie z. B. Glycosylgruppen, Polyethylenglycolgruppen, Lipiden, Phosphaten, Acetylgruppen und dergleichen modifiziert werden. Kovalente Derivate von ULBP-Polypeptiden können durch Verbinden der chemischen Reste mit funktionellen Gruppen auf ULBP-Aminosäureseitenketten oder am N-Terminus oder C-Terminus eines ULBP-Polypeptids oder der extrazellulären Domäne davon hergestellt werden. Weitere Derivate von ULBP-Polypeptiden innerhalb des Umfangs dieser Erfindung schließen kovalente oder aggregative Konjugate von ULBP-Polypeptiden oder deren Fragmente mit anderen Proteinen oder Polypeptiden ein, wie z. B. durch Synthese in rekombinanten Kulturen als N-terminale oder C-terminale Fusionen. Zum Beispiel kann das Konjugat eine Signal- oder Leader-Polypeptidsequenz (z. B. die  $\alpha$ -Faktor-Leadersequenz von *Saccharomyces*) am N-Terminus eines ULBP-Polypeptids umfassen. Das Signal- oder Leader-Peptid steuert co-translational oder post-translational den Transfer des Konjugates von dessen Syntheseort an einen Ort innerhalb oder außerhalb der Zellmembran oder Zellwand.

**[0095]** Konjugate, die diagnostische (detektierbare) oder therapeutische Mittel daran angefügt umfassen, sind ebenfalls hierin vorgesehen, wie nachstehend detaillierter diskutiert wird.

**[0096]** Weitere Derivate schließen kovalente oder aggregative Konjugate der Polypeptide mit anderen Proteinen oder Polypeptiden ein, wie z. B. durch Synthese in rekombinanter Kultur als N-terminale oder C-terminale Fusionen. Beispiele für Fusionsproteine werden nachstehend im Zusammenhang mit Oligomeren behandelt. Weiterhin können die Fusionsproteine Peptide umfassen, die zur Erleichterung der Reinigung und Identifikation

on angefügt werden. Solche Peptide schließen z. B. Poly-His oder die antigenischen Identifikationspeptide, die in US-Patent Nr. 5,011,912 und in Hopp et al., Bio/Technology 6: 1204, 1988 beschrieben werden, ein. Ein solches Peptid ist das FLAG<sup>®</sup>-Peptid, Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys, das hoch antigenisch ist und ein Epitop zur Verfügung stellt, das reversibel durch einen spezifischen monoklonalen Antikörper gebunden wird, was eine rasche Untersuchung ermöglicht und eine einfache Reinigung des exprimierten rekombinanten Proteins. Ein murines Hybridom, das 4E11 genannt wird, produziert einen monoklonalen Antikörper, der das FLAG<sup>®</sup>-Peptid in der Anwesenheit von bestimmten bivalenten Metallkationen bindet, wie in US-Patent 5,011,912 beschrieben. Die 4E11 Hybridom-Zelllinie wurde bei der American Type Culture Collection unter der Zugangsnummer HB 9259 hinterlegt. Monoklonale Antikörper, die das FLAG<sup>®</sup>-Peptid binden, sind von Eastman Kodak Co., Scientific Imaging Systems Division, New Haven, Connecticut erhältlich.

**[0097]** Unter den abweichenden Polypeptiden, die hierin zur Verfügung gestellt werden, sind Varianten von nativen Polypeptiden, welche die native biologische Aktivität oder dessen substanzielles Äquivalent beibehalten. Ein Beispiel ist eine Variante, die mit der im Wesentlichen gleichen Bindungsaffinität wie die native Form bindet. Die Bindungsaffinität kann durch konventionelle Methoden gemessen werden, z. B. wie in US-Patent Nr. 5,512,457 beschrieben und wie unten dargelegt.

**[0098]** Varianten schließen Polypeptide ein, die im Wesentlichen homolog zu der nativen Form sind, jedoch eine Aminosäuresequenz aufweisen, die sich von der der nativen Form aufgrund einer oder mehrerer Deletionen, Insertionen oder Substitutionen unterscheidet. Besondere Ausführungsformen schließen Polypeptide ein, die zwischen einer und zehn Deletionen, Insertionen oder Substitutionen von Aminosäureresten im Vergleich zu einer nativen Sequenz umfassen, sind jedoch nicht auf diese beschränkt.

**[0099]** Eine bestimmte Aminosäure kann z. B. durch einen Rest mit ähnlichen physiochemischen Eigenschaften ersetzt werden. Beispiele für solche konservativen Substitutionen schließen Substitutionen eines aliphatischen Restes mit einem anderen ein, wie z. B. Ile, Val, Leu oder Ala füreinander; Substitutionen eines polaren Restes mit einem anderen, wie z. B. zwischen Lys und Arg, Glu und Asp oder Gln und Asn; oder Substitutionen eines aromatischen Restes mit einem anderen, wie z. B. Phe, Trp oder Tyr füreinander. Weitere konservative Substitutionen, die z. B. die Substitution einer gesamten Region mit ähnlichen hydrophoben Eigenschaften einschließt, sind wohl bekannt.

**[0100]** In ähnlicher Weise schließen die DNAs gemäß der Erfindung Varianten ein, die sich von einer nativen DNA-Sequenz aufgrund einer oder mehrerer Deletionen, Insertionen oder Substitutionen unterscheiden, jedoch ein biologisch aktives Polypeptid codieren.

**[0101]** Die Erfindung schließt weiterhin Polypeptide gemäß der Erfindung mit oder ohne assoziiertem nativem Glycosylierungsmuster ein. Polypeptide, die in Hefe- oder Säuger-Expressionssystemen (z. B. COS-1- oder COS-7-Zellen) exprimiert werden, können in ihrem Molekulargewicht oder Glycosylierungsmuster ähnlich oder signifikant unterschiedlich von einem nativen Polypeptid sein, abhängig von der Wahl des Expressionssystems. Die Expression von Polypeptiden gemäß der Erfindung in bakteriellen Expressionssystemen wie z. B. E. coli stellt nicht-glycosylierte Moleküle zur Verfügung. Weiterhin kann eine bestimmte Präparation verschiedene unterschiedlich glycosylierte Spezies des Proteins enthalten. Glycosylgruppen können durch konventionelle Verfahren entfernt werden, insbesondere durch solche, die Glycopeptidase verwenden. Im Allgemeinen können die glycosylierten Polypeptide gemäß der Erfindung mit einem molekularen Überschuss an Glycopeptidase (Boehringer Mannheim) inkubiert werden.

**[0102]** Dementsprechend sind ähnliche DNA-Konstrukte, welche die verschiedenen Additionen oder Substitutionen von Aminosäureresten oder Sequenzen, oder Deletionen von terminalen oder internen Resten oder Sequenzen codieren, von der Erfindung umfasst. Zum Beispiel können N-Glycosylierungsstellen in der extrazellulären Domäne des Polypeptids modifiziert werden, um die Glycosylierung zu verhindern, was die Expression eines reduzierten Kohlenhydratanalogs in Säuger- und Hefe-Expressionssystemen erlaubt. N-Glycosylierungsstellen in eukaryontischen Polypeptiden sind gekennzeichnet durch ein Aminosäuretriplett Asn-X-Y, wobei X jede Aminosäure außer Pro ist und Y Ser oder Thr ist. Geeignete Substitutionen, Additionen oder Deletionen in der Nukleotidsequenz, welche diese Triplets codiert, resultiert in der Vermeidung eines Anfügens von Kohlenhydratresten an die Asn-Seitenkette. Die Veränderung eines einzigen Nukleotids, so gewählt, dass Asn durch eine andere Aminosäure ersetzt wird, ist z. B. ausreichend, um eine N-Glycosylierungsstelle zu inaktivieren. Alternativ können das Ser oder Thr durch eine andere Aminosäure ersetzt werden, wie z. B. Ala. Bekannte Verfahren zur Inaktivierung von N-Glycosylierungsstellen in Proteinen schließen solche wie in US-Patent 5,071,972 und EP 276,846 ein.

**[0103]** In weiteren Beispielen für Varianten können Sequenzen, die Cys-Reste codieren, die nicht essentiell für die biologische Aktivität sind, so geändert werden, dass die Cys-Reste deletiert oder durch andere Aminosäuren ersetzt werden, was die Bildung von inkorrekten intramolekularen Disulfidbrücken bei der Faltung oder Renaturierung verhindert.

**[0104]** Weitere Varianten werden durch Modifikation von benachbarten dibasischen Aminosäureresten hergestellt, um die Expression in Hefesystemen, in denen die KEX2-Proteaseaktivität vorhanden ist, zu verstärken. EP 212,914 offenbart die Verwendung von ortsgerichteter Mutagenese zur Inaktivierung der KEX2-Protease-Prozessierungsstellen in einem Protein. KEX2-Protease-Prozessierungsstellen werden durch Deletieren, Addieren oder Substituieren von Resten zur Veränderung von Arg-Arg-, Arg-Lys- und Lys-Arg-Paaren zur Entfernung des Vorkommens dieser benachbarten basischen Reste inaktiviert. Lys-Lys-Paarungen sind erheblich weniger empfindlich gegen die KEX2-Spaltung, und die Umwandlung von Arg-Lys oder Lys-Arg zu Lys-Lys stellt einen konservativen und bevorzugten Ansatz zur Inaktivierung von KEX2-Stellen dar.

#### Oligomere

**[0105]** Von der Erfindung umfasst sind Oligomere oder Fusionsproteine, die ULBP-Polypeptide enthalten. Solche Oligomere können in Form kovalent verbundener oder nicht kovalent verbundener Multimere vorliegen, einschließlich Dimere, Trimere oder höherer Oligomere. Wie oben erwähnt sind bevorzugte Polypeptide löslich und folglich können diese Oligomere lösliche Polypeptide umfassen. In einem Aspekt der Erfindung behalten die Oligomere die Bindungsfähigkeit der Polypeptidkomponenten und stellen daher bivalente, trivalente usw. Bindungsstellen zur Verfügung.

**[0106]** Eine Ausführungsform der Erfindung ist auf Oligomere gerichtet, die mehrere Polypeptide umfassen, die über kovalente oder nicht kovalente Wechselwirkungen zwischen Peptideinheiten verbunden sind, die an die Polypeptide fusioniert sind. Solche Peptide können Peptidlinker (Spacer) sein oder Peptide, die die Eigenschaft haben, Oligomerisierung zu fördern. Leucin-Zipper und bestimmte Polypeptide, die von Antikörpern stammen, gehören zu den Peptiden, die die Oligomerisierung der daran angefügten Polypeptide fördern können, wie unten detaillierter beschrieben ist.

#### Immunglobulin-basierte Oligomere

**[0107]** Als eine Alternative wird ein Oligomer unter Verwendung von Polypeptiden, die von Immunglobulinen abgeleitet sind, hergestellt. Die Herstellung von Fusionsproteinen, die bestimmte heterologe Polypeptide umfassen, die an verschiedene Teile der von Antikörpern abgeleiteten Polypeptide (einschließlich der Fc-Domäne) fusioniert sind, wurde beschrieben, z. B. durch Ashkenazi et al. (PNAS USA 88: 10535, 1991); Byrn et al. (Nature 344: 677, 1990); und Hollenbaugh und Aruffo ("Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", in Current Protocols in Immunology, Suppl. 4, S. 10.19.1–10.19.11, 1992).

**[0108]** Eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist auf ein Dimer gerichtet, das zwei Fusionsproteine umfasst, die durch Fusion eines Polypeptids gemäß der Erfindung an ein Fc-Polypeptid, das von einem Antikörper stammt, erzeugt wurden. Eine Genfusion, die das Polypeptid/Fc-Fusionsprotein codiert, wird in einen geeigneten Expressionsvektor eingefügt. Polypeptid/Fc-Fusionsproteine werden in Wirtszellen exprimiert, die mit dem rekombinanten Expressionsvektor transformiert wurden und es wird ihnen erlaubt, sich ähnlich Antikörpermolekülen zusammenzusetzen, woraufhin Zwischenketten-Disulfidbindungen zwischen den Ketten der Fc-Einheiten ausgebildet werden, um divalente Moleküle zu ergeben.

**[0109]** Der Begriff "Fc-Polypeptid", wie hierin verwendet, schließt native und muteine Formen von Polypeptiden ein, die aus der Fc-Region eines Antikörpers bestehen, der irgendeine oder alle der CH-Domänen der Fc-Region umfasst. Verkürzte Formen solcher Polypeptide, welche die Hinge-Region enthalten, die die Dimerisierung fördert, sind ebenfalls eingeschlossen. Bevorzugte Polypeptide umfassen ein Fc-Polypeptid, das von einem humanen IgG1-Antikörper abgeleitet ist.

**[0110]** Ein geeignetes Fc-Polypeptid, das in der PCT-Anmeldung WO 93/10151 beschrieben wird, ist ein Einzelkettenpolypeptid, das sich von der N-terminalen Hinge-Region bis zu dem nativen C-Terminus der Fc-Region eines humanen IgG1-Antikörpers erstreckt. Ein weiteres nützliches Fc-Polypeptid ist das Fc-Mutein, das in US-Patent 5,457,035 und in Baum et al., (EMBO J. 13: 3992–4001, 1994) beschrieben wird. Die Aminosäuresequenz dieses Muteins ist identisch mit dem der nativen Fc-Sequenz, die WO 93/10151 gezeigt wird, mit der Ausnahme, dass die Aminosäure 19 von Leu nach Ala getauscht wurde, die Aminosäure 20 von Leu nach Glu getauscht wurde und die Aminosäure 22 von Gly nach Ala getauscht wurde. Das Mutein zeigt eine redu-

zierte Affinität für Fc-Rezeptoren.

**[0111]** Die oben beschriebenen Fusionsproteine, die Fc-Einheiten umfassen (und Oligomere, die daraus gebildet sind), bieten den Vorteil einer einfachen Reinigung durch Affinitätschromatographie über Protein A- oder Protein G-Säulen.

**[0112]** In einer weiteren Ausführungsform können die Polypeptide gemäß der Erfindung an die Stelle des variablen Teils einer schweren oder leichten Kette eines Antikörpers gesetzt werden. Wenn Fusionsproteine mit sowohl den schweren Ketten als auch den leichten Ketten eines Antikörpers hergestellt werden, ist es möglich, ein Oligomer mit nicht weniger als vier extrazellulären Regionen von ULBP zu bilden.

**[0113]** Sowohl ULBP-1- als auch ULBP-2-Polypeptide können als Fc-Fusionsproteine unter Verwendung eines Fc-Muteins exprimiert werden, um fusionierte Polypeptide mit den folgenden Sequenzen zur Verfügung zu stellen:

#### ULBP1-Fc-FUSIONSPOLYPEPTID

MAAAASPAFL LCLPLLHLLS GWSRAGWVD T HCLCYDFIIT PKSRPEPQWC  
 EVQGLVDERP FLHYDCVNHK AKAFASLGKK VNVTKTWEEQ TETLRDVVDF  
 LKGQLLDIQV ENLIPIEPLT LQARMSCEHE AHGHGRGSWQ FLFNGQKFLL  
 FDSNNRKWTA LHPGAKKMT E KWEKNRDVTM FFQKISLGDC KMWLEEFMY  
 WEQMLDPTKP PSLAPGTTQP RSCDKTHTCP PCPAPEAEGA PSVFLFPKP  
 KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN  
 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ  
 VYTLPPSRDE LTKNQVSLT LKVGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV  
 LDSGGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK  
 (SEQ ID NO:5);

#### ULBP2-Fc-FUSIONSPOLYPEPTID

MAAAAATKIL LCLPLLLLLS GWSRAGRADP HSLCYDITVI PKFRPGPRWC  
 AVQGVVDEKT FLHYDCGNKT VTPVSPLGKK LNVTTAWKAQ NPVLREVVDI  
 LTEQLRDIQL ENYTPKEPLT LQARMSCEQK AEGHSSGSWQ FSFDGQIFLL  
 FDSEKRMWTT VHPGARKMKE KWENDKVVM SFHYFSMGDC IGWLEDFLMG  
 MDSTLEPSAG APLAMSSGTT QLRRSCDKTH TCPFPCAPEA EGAPSVFLFP  
 PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE  
 QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR  
 EPQVYTLPPS RDELTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GPENNYKTT  
 PPVLDSGGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS  
 PGK (SEQ ID NO:6).

**[0114]** ULBP-1 und ULBP-2 sind membrangebundene Glycoproteine, die durch eine GPI-Verknüpfung auf der Zelloberfläche gehalten werden. Siehe Yan et al., J. Mol. Biol. 275: 25–33 (1998) und Medof et al., FASEB J. 10: 574–86 (1996). Die etwa 20 Carboxy-terminalen Aminosäuren der ULBP-Polypeptide spezifizieren die GPI-Verknüpfung. Die Deletion dieser Aminosäuren in den ULBP-1- und ULBP-2-Fc-Fusionsproteinen resultiert in Proteinen, denen die GPI-Verknüpfung fehlt.

**[0115]** Die Erfindung umfasst ULBP-Polypeptide und -Fragmente, denen die GPI-Verknüpfung fehlt. Ein bevorzugtes ULBP-Polypeptidfragment umfasst wenigstens 6 aufeinanderfolgende Aminosäuren einer Aminosäuresequenz. In weiteren Ausführungsformen umfasst ein bevorzugtes ULBP-Polypeptidfragment wenigstens 10, wenigstens 20 oder wenigstens 100 aufeinanderfolgende Aminosäuren einer Aminosäuresequenz.

Diese Polypeptide können in löslicher Form hergestellt werden.

**[0116]** Sowohl ULBP-1 als auch ULBP-2 binden UL16-Fc. Außerdem binden sie eine Anzahl von humanen Zellarten, einschließlich Mitogen-stimulierter humaner T-Zellen und natürlicher Killerzellen (NK-Zellen). Es wurde außerdem herausgefunden, dass die ULBP-Fc-Proteine an K299-Zellen binden, einem anaplastischen Lymphom. ULBP1-Fc bindet besser als ULBP2-Fc.

#### Peptidlinker-basierte Oligomere

**[0117]** Alternativ ist das Oligomer ein Fusionsprotein, das mehrere Polypeptide umfasst, mit oder ohne Peptidlinkern (Spacer-Peptiden). Unter den geeigneten Peptidlinkern sind solche, die in den US-Patenten 4,751,180 und 4,935,233 beschrieben werden. Eine DNA-Sequenz, die einen gewünschten Peptidlinker codiert, kann zwischen und in demselben Leserahmen wie die DNA-Sequenzen gemäß der Erfindung unter Verwendung jeder beliebigen geeigneten konventionellen Methode inseriert werden. Zum Beispiel kann ein chemisch synthetisiertes Oligonukleotid, das den Linker codiert, zwischen die Sequenzen ligiert werden. In besonderen Ausführungsformen umfasst ein Fusionsprotein zwischen zwei bis vier löslichen ULBP-Polypeptiden, die durch Peptidlinker voneinander getrennt sind.

#### Leucin-Zipper

**[0118]** Ein weiteres Verfahren zur Herstellung der Oligomere gemäß der Erfindung schließt die Verwendung eines Leucin-Zippers ein. Leucin-Zipper-Domänen sind Peptide, welche die Oligomerisierung der Proteine, in denen sie enthalten sind, fördern. Leucin-Zipper wurden ursprünglich in mehreren DNA-bindenden Proteinen identifiziert (Landschulz et al., Science 240: 1759, 1988) und wurden seitdem in einer Vielzahl von verschiedenen Proteinen entdeckt. Unter den bekannten Leucin-Zippern sind natürlich vorkommende Peptide und Derivate davon, die dimerisieren oder trimerisieren.

**[0119]** Die Zipper-Domäne (hierin auch als oligomerisierende oder oligobildende Domäne bezeichnet) umfasst einen repetitiven Heptad Repeat, häufig mit vier oder fünf Leucinresten mit dazwischengefügten weiteren Aminosäuren. Beispiele für Zipperdomänen sind solche, die in dem Hefe-Transkriptionsfaktor GCN4 zu finden sind und in einem hitzestabilen DNA-bindenden Protein, das in Rattenleber vorkommt (C/EBP; Landschulz et al., Science 243: 1681, 1989). Zwei nukleäre transformierende Proteine (nuclear transforming proteins), fos und jun, weisen ebenfalls Zipperdomänen auf, ebenso wie das Genprodukt des murinen Proto-Onkogens, c-myc (Landschulz et al., Science 240: 1759, 1988). Die Produkte der nukleären Onkogene fos und jun umfassen Zipperdomänen, die präferentiell Heterodimere bilden (O'Shea et al., Science 245: 646, 1989, Turner und Tjian, Science 243: 1689, 1989). Die Zipperdomäne ist notwendig für die biologische Aktivität (DNA-Bindung) in diesen Proteinen.

**[0120]** Die fusogenen Proteine von mehreren verschiedenen Viren, einschließlich des Paramyxovirus, Coronavirus, Masemvirus und vieler Retroviren, besitzen ebenfalls Zipperdomänen (Buckland und Wild, Nature 338: 547, 1989; Britton, Nature 353: 394, 1991; Delwart und Mosialos, AIDS Research and Human Retroviruses 6: 703, 1990). Die Zipperdomänen in diesen fusogenen viralen Proteinen befinden sich nahe der Transmembranregion der Proteine; es wurde vorgeschlagen, dass die Zipperdomänen zu der oligomeren Struktur der fusogenen Proteine beitragen könnten. Die Oligomerisierung von fusogenen viralen Proteinen ist an der Fusionsporenbildung beteiligt (Spruce et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 3523, 1991). Von Zipperdomänen wurde außerdem kürzlich berichtet, dass sie eine Rolle bei der Oligomerisierung von Hitzeschock-Transkriptionsfaktoren spielen (Rabindran et al., Science 259: 230, 1993).

**[0121]** Zipperdomänen falten sich zusammen als kurze, parallele Superhelices (O'Shea et al., Science 259: 230, 1993). Die allgemeine Architektur der parallelen Superhelices wurde gut charakterisiert, mit einer "Knobs-into-holes"-Packung wie von Crick 1953 vorgeschlagen (Acta Crystallogr. 6: 689). Das Dimer, das von einer Zipperdomäne gebildet wird, wird durch den Heptad Repeat stabilisiert, der nach der Bezeichnung von McLachlan und Stewart (J. Mol. Biol. 98: 293; 1975) als (abcdefg)<sub>n</sub> bezeichnet wird, in dem die Reste a und d im Allgemeinen hydrophobe Reste sind, wobei d ein Leucin ist, die auf derselben Seite einer Helix auftreten. Entgegengesetzt geladene Reste treten im Allgemeinen an den Positionen g und e auf. Folglich sind in einer parallelen Superhelix, die von zwei helikalen Zipperdomänen gebildet wird, die "Knobs", die durch die hydrophoben Seitenketten der ersten Helix gebildet werden, in die "Holes", die zwischen den Seitenketten der zweiten Helix gebildet werden, verpackt.

**[0122]** Die Reste an der Position d (häufig Leucin) tragen zu großen hydrophoben Stabilisierungsenergien bei

und sind wichtig für die Oligomerbildung (Krystek et al., Int. J. Peptide Res. 38: 229, 1991). Lovejoy et al. (Science 259: 1288, 1993) haben kürzlich von der Synthese eines dreifachsträngigen  $\alpha$ -helikalen Bündels, in dem die Helices up-up-down laufen, berichtet. Ihre Studien bestätigten, dass die hydrophobe Stabilisierungsenergie die hauptsächlich treibende Kraft für die Bildung von Superhelices aus helikalen Monomeren zur Verfügung stellt. Diese Studien weisen außerdem darauf hin, dass elektrostatische Interaktionen zu der Stöchiometrie und Geometrie von Superhelices beitragen. Eine weiterführende Diskussion der Struktur von Leucin-Zipfern ist in Harbury et al. (Science 262: 1401, 26. November 1993) zu finden.

**[0123]** Beispiele für Leucin-Zipper-Domänen, die für die Herstellung löslicher oligomerer Proteine geeignet sind, sind in der PCT-Anmeldung WO 94/10308 beschrieben, und der Leucin-Zipper, der aus dem Lungen-Superfectant D (surfactant protein D, SPD) stammt, ist in Hoppe et al., (FEBS. Letters 344: 191, 1994) beschrieben. Die Verwendung eines modifizierten Leucin-Zippers, der die stabile Trimerisierung eines heterologen Proteins, welches daran fusioniert ist, erlaubt, ist in Fanslow et al. (Semin. Immunol. 6: 267–278, 1994) beschrieben. Rekombinante Fusionsproteine, die ein lösliches Polypeptid fusioniert an ein Leucin-Zipperpeptid umfassen, werden in geeigneten Wirtszellen exprimiert, und das lösliche Oligomer, das gebildet wird, wird aus dem Kulturüberstand gewonnen.

**[0124]** Bestimmte Leucin-Zipper-Einheiten bilden präferentiell Trimere. Ein Beispiel ist ein Leucin-Zipper, der aus dem Lungen-Superfectant D (surfactant protein D, SPD) stammt, wie in Hoppe et al. (FEBS. Letters 344: 191, 1994) und in dem US-Patent 5,716,805 beschrieben. Dieses von dem Lungen-SPD abgeleitete Leucin-Zipperpeptid umfasst die Aminosäuresequenz Pro Asp Val Ala Ser Leu Arg Gln Gln Val Glu Ala Leu Gln Gly Gln Val Gln His Leu Gln Ala Ala Phe Ser Gln Tyr.

**[0125]** Ein weiteres Beispiel für ein Leucin-Zipper, der die Trimerisierung fördert, ist ein Peptid, das die Aminosäuresequenz Arg Met Lys Gln Ile Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys Ile Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu Arg umfasst, wie in dem US-Patent 5,716,805 beschrieben. In einer weiteren alternativen Ausführungsform wird ein N-terminaler Asp-Rest angefügt; in einer anderen fehlt dem Peptid der N-terminale Arg-Rest.

**[0126]** Fragmente der zuvor genannten Zipperpeptide, welche die Eigenschaft zur Förderung der Oligomerisierung beibehalten, können ebenfalls verwendet werden. Beispiele für solche Fragmente schließen Peptide ein, denen ein oder zwei der N-terminalen oder C-terminalen Reste, die in den zuvor genannten Aminosäuresequenzen vorhanden sind, fehlen, sind jedoch nicht auf diese beschränkt. Leucin-Zipper können von natürlich vorkommenden Leucin-Zipperpeptiden abgeleitet sein, z. B. über konservative Substitution(en) in der nativen Aminosäuresequenz, wobei die Fähigkeit des Peptids zur Förderung der Oligomerisierung beibehalten wird.

**[0127]** Weitere Peptide, die von natürlich vorkommenden trimeren Proteinen abgeleitet sind, können bei der Herstellung trimerer ULBPs verwendet werden. Alternativ können synthetische Peptide, welche die Oligomerisierung fördern, verwendet werden. In besonderen Ausführungsformen werden die Leucinreste in einer Leucin-Zipper-Einheit durch Isoleucinreste ersetzt. Solche Peptide, die Isoleucin umfassen, können als Isoleucin-Zipper bezeichnet werden, sind jedoch von dem Begriff "Leucin-Zipper" wie hierin verwendet umfasst.

**[0128]** Sowohl ULBP-1- als auch ULBP-2-Polypeptide können als Leucin-Zipper-Fusionsproteine unter Verwendung eines Leucin-Zipper-Motivs exprimiert werden, welche die folgenden Sequenzen haben:

#### ULBP1-LZ-FUSIONSPOLYPEPTID

```

1    METDTLLLWV LLLWVPGSTG WSRAGWVDTH CLCYDFIITP KSRPEPQWCE
51   VQGLVDERPF LHYDCVNHKA KAFASLGKKV NVTKTWEEQT ETLRDVVDFL
101  KGQLLDIQVE NLIPIEPLTL QARMSCEHEA HGHGRGSWQF LFNGQKFLLF
151  DSNNRKWTAL HPGAKKMTEK WEKNRDVTMF FQKISLGDCK MWLEEFILMYW
201  EQMLDPTKPP SLAPGTTQPR SGSSRMKQIE DKIEEILSKI YHIENEIARI
251  KKLIGERGTS SRGSHHHHHH [SEQ ID NO:7]

```

**[0129]** Die Aminosäuren 1–19 sind das Signalpeptid des humanen Ig-Kappa, welches das ULBP-1-Signalpeptid ersetzt. Dieses verbessert die Expression etwas, jedoch könnte auch das native ULBP-1-Signalpeptid verwendet werden, ebenso wie weitere heterologe Signalpeptide. Die Aminosäuren 20–218 stammen von UL-

BP-1 (SEQ-ID Nr. 2), gefolgt von einem kurzen Spacer, PRSGSS, dem Leucin-Zipper (genau Isoleucin-Zipper) der Aminosäuren 225–247, einem Spacer und sechs Histidinen, die als Markierung (tag) zur Reinigung dienen.

#### ULBP2-LZ-FUSIONSPOLYPEPTID

```

1   MAAAAATKIL LCLPLLLLLS GWSRAGRADP HSLCYDITVI PKFRPGPRWC
51  AVQQQVDEKT FLHYDCGNKT VTPVSPLGKK LNVTTAWKAQ NPVLREVVDI
101 LTEQLRDIQL ENYTPKEPLT LQARMSCEQK AEGHSSGSWQ FSFDGQIFLL
151 FDSEKRMWTT VHPGARKMKE KWENDKVVM SFHYFSMGDC IGWLEDFLMG
201 MDSTLEPSAG APLAMSSGTT QLRGSGSSRM KQIEDKIEEI LSKYHIENE
251 IARIKKLIGE RGTSSRGS HH [SEQ ID NO:8]

```

**[0130]** Die Aminosäuren 1–223 stammen von dem ULBP-2-Polypeptid (SEQ-ID Nr. 4), einschließlich seines nativen Signalpeptids, und die Spacer, der Leucin-Zipper und Poly-His sind dieselben wie oben angegeben.

#### HERSTELLUNG VON POLYPEPTIDEN UND FRAGMENTEN DAVON

**[0131]** Die Expression, Isolation und Reinigung der Polypeptide und Fragmente gemäß der Erfindung können durch jede beliebige geeignete Methode erreicht werden, einschließlich der folgenden, sind jedoch nicht auf diese beschränkt.

#### Expressionssysteme

**[0132]** Die vorliegende Erfindung stellt außerdem rekombinante Klonierungs- und Expressionsvektoren zur Verfügung, die DNA enthalten, ebenso wie Wirtszellen, welche die rekombinanten Vektoren enthalten. Expressionsvektoren, die DNA enthalten, können zur Herstellung der Polypeptide oder Fragmente gemäß der Erfindung, die durch die DNA codiert werden, verwendet werden. Ein Verfahren zur Herstellung von Polypeptiden umfasst die Kultivierung von Wirtszellen, die mit einem das Polypeptid codierenden rekombinanten Vektor transformiert wurden, unter Bedingungen, welche die Expression des Polypeptids fördern, und die anschließende Gewinnung der exprimierten Polypeptide aus der Kultur. Der Fachmann wird erkennen, dass das Verfahren zur Reinigung der exprimierten Polypeptide abhängig von Faktoren wie der Art der Wirtszelle, die verwendet wird, und davon, ob das Polypeptid eine membrangebundene oder lösliche Form ist, die von den Wirtszellen sezerniert wird, variiert.

**[0133]** Jedes geeignete Expressionssystem kann verwendet werden. Die Vektoren schließen eine DNA ein, die ein Polypeptid oder Fragment gemäß der Erfindung codiert, die funktionell mit geeigneten transkriptionellen oder translationellen regulatorischen Nukleotidsequenzen verbunden ist, wie z. B. solchen, die aus einem Säuger-, mikrobiellen, viralen oder Insekten-Gen stammen. Beispiele für regulatorische Sequenzen schließen transkriptionelle Promotoren, Operatoren oder Enhancer ein, eine mRNA-ribosomale Bindungsstelle und geeignete Sequenzen, welche die Initiation und Termination der Transkription und Translation kontrollieren. Nukleotidsequenzen sind funktionell verbunden, wenn die regulatorische Sequenz funktionell mit der DNA-Sequenz in Beziehung steht. Folglich ist eine Promotor-Nukleotidsequenz funktionell mit einer DNA-Sequenz verbunden, wenn die Promotor-Nukleotidsequenz die Transkription der DNA-Sequenz kontrolliert. Ein Replikationsursprung, der die Fähigkeit zur Replikation in der gewünschten Wirtszelle verleiht und ein Selektionsgen, durch welches die Transformanten identifiziert werden, sind im Allgemeinen in dem Expressionsvektor eingeschlossen.

**[0134]** Außerdem kann eine Sequenz, die ein geeignetes Signalpeptid (nativ oder heterolog) codiert, in die Expressionsvektoren eingeschlossen werden. Eine DNA-Sequenz für ein Signalpeptid (sekretorischer Leader) kann im Leserahmen (in frame) mit der Nukleinsäure gemäß der Erfindung fusioniert werden, so dass die DNA zunächst in ein Fusionsprotein transkribiert und die mRNA translatiert in ein Fusionsprotein wird, welches das Signalpeptid umfasst. Ein Signalpeptid, das in den vorgesehenen Wirtszellen funktionsfähig ist, begünstigt die extrazelluläre Sekretion des Polypeptids. Das Signalpeptid wird von dem Polypeptid bei Sekretion des Polypeptids aus der Zelle abgespalten.

**[0135]** Der Fachmann wird auch erkennen, dass die Position(en), an denen das Signalpeptid abgespalten wird, von denen durch das Computerprogramm vorhergesagten abweichen kann und entsprechend solcher Faktoren wie die Art der Wirtszellen, die bei der Expression eines rekombinanten Polypeptids verwendet wer-

den, variieren kann. Eine Proteinpräparation kann eine Mischung von Proteinmolekülen enthalten, die verschiedene N-terminale Aminosäuren haben, die sich aus der Spaltung des Signalpeptids an mehr als einer Stelle ergeben.

**[0136]** Geeignete Wirtszellen für die Expression von Polypeptiden schließen prokaryontische Zellen, Hefezellen oder Zellen höherer Eukaryonten ein. Säuger- oder Insekten-Zellen werden im Allgemeinen bei der Verwendung als Wirtszellen bevorzugt. Geeignete Klonierungs- und Expressionsvektoren für die Verwendung mit bakteriellen, Pilz-, Hefe- und Säuger-Zellwirten sind z. B. in Pouwels et al. Cloning Vectors: A Laboratory Manual. Elsevier, New York, (1985) beschrieben. Zellfreie Translationssysteme können ebenso zur Herstellung der Polypeptide unter Verwendung von RNAs, die von den hierin offenbarten DNA-Konstrukten abgeleitet sind, verwendet werden.

#### Prokaryontische Systeme

**[0137]** Prokaryonten schließen Gramm-negative oder Gramm-positive Organismen ein. Geeignete prokaryontische Wirtszellen für die Transformation schließen z. B. *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* und verschiedene andere Spezies innerhalb der Genera *Pseudomonas*, *Streptomyces* und *Staphylococcus* ein. In einer prokaryontischen Wirtszelle wie z. B. *E. coli* kann ein Polypeptid einen N-terminalen Methioninrest zur Erleichterung der Expression des rekombinanten Polypeptids in der prokaryontischen Wirtszelle enthalten. Das N-terminale Met kann von dem exprimierten rekombinanten Polypeptid abgespalten werden.

**[0138]** Expressionsvektoren für die Verwendung in prokaryontischen Wirtszellen umfassen im Allgemeinen ein oder mehrere phänotypische selektierbare Markergene. Ein phänotypisches selektierbares Markergen ist z. B. ein Gen, das ein Protein codiert, das eine Antibiotikumresistenz verleiht, oder das einen autotrophischen Bedarf deckt. Beispiele für geeignete Expressionsvektoren für prokaryontische Wirtszellen schließen solche ein, die von den kommerziell erhältlichen Plasmiden wie z. B. dem Klonierungsvektor pBR322 (ATCC 37017) abgeleitet sind. pBR322 enthält Gene für die Ampicillin- und Tetracyclinresistenz und stellt folglich ein einfaches Mittel zur Identifizierung der transformierten Zellen zur Verfügung. Ein geeigneter Promotor und eine DNA-Sequenz werden in den pBR322-Vektor inseriert. Andere kommerziell erhältliche Vektoren schließen z. B. pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden) und pGEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, USA) ein.

**[0139]** Promotorsequenzen, die häufig für Expressionsvektoren für rekombinante prokaryontische Wirtszellen verwendet werden, schließen die  $\beta$ -Lactamase (Penicillinase), das Lactose-Promotorsystem (Chang et al., Nature 275: 615, 1978; und Goeddel et al., Nature 281: 544, 1979), das Tryptophan(trp)-Promotorsystem (Goeddel et al., Nucl. Acids Res. 8: 4057, 1980; und EP-A-36776) und den Tac-Promotor (Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, S. 412, 1982) ein. Ein besonders nützliches Expressionssystem für prokaryontische Wirtszellen verwendet einen Phagen- $\lambda P_L$ -Promotor und eine cl857ts thermolabile Repressorsequenz. Plasmidvektoren, die von der American Type Culture Collection erhältlich sind und die Derivate des  $\lambda P_L$ -Promotors enthalten, schließen das Plasmid pHUB2 (vorhanden in dem *E. coli*-Stamm JMB9, ATCC 37092) und pPLc28 (vorhanden in *E. coli* RR1.ATCC 53082) ein.

**[0140]** Die ULBP-DNA kann im Leserahmen in die verschiedenen Klonierungsstellen eines gewöhnlichen bakteriellen Expressionsvektors kloniert werden. Im idealen Fall würde der Vektor einen induzierbaren Promotor stromaufwärts der Klonierungsstelle enthalten, so dass das Hinzufügen eines Induktors zu einer Produktion des rekombinanten Proteins in großen Mengen zu einer von dem Forscher gewählten Zeit führt. Bei einigen Proteinen können die Expressionslevel durch Einfügen von Codons, die einen Fusionspartner (wie z. B. Hexahistidin) codieren, zwischen den Promotor und das Gen von Interesse verstärkt werden. Das resultierende "Expressionsplasmid" kann in einer Vielzahl von *E. coli*-Stämmen propagiert werden.

**[0141]** Für die Expression des rekombinanten Proteins werden die Bakterienzellen in Wachstumsmedium vermehrt, bis eine zuvor bestimmte optische Dichte erreicht ist. Die Expression des rekombinanten Proteins wird anschließend induziert, z. B. durch Zugabe von IPTG (Isopropyl-b-D-thiogalactopyranosid), das die Expression von Proteinen von Plasmiden, die einen Lac-Operator/Promotor enthalten, aktiviert. Nach der Induktion (typischerweise 1 bis 4 Stunden lang) werden die Zellen durch Pelletieren in einer Zentrifuge, z. B. bei  $5000 \times G$  20 Minuten lang bei  $4^\circ C$  geerntet.

**[0142]** Zur Gewinnung des exprimierten Proteins können die pelletierten Zellen in eine zehnfachen Menge von 50 mM Tris-HCl (pH 8)/1 M NaCl resuspendiert und anschließend zwei- oder dreimal durch eine French Press gegeben werden. Die meisten stark exprimierten rekombinanten Proteine bilden unlösliche Aggregate,



die als Einschlusskörper bekannt sind. Einschlusskörper können von den löslichen Proteinen durch Pelletieren in einer Zentrifuge bei  $5000 \times G$  für 20 Minuten,  $4^{\circ}C$ , abgetrennt werden. Das Pellet der Einschlusskörper wird mit 50 mM Tris HCl (pH 8)/1% Triton X-100 gewaschen und anschließend in 50 mM Tris HCl (pH 8)/8 M Harnstoff/0,1 M DTTf gelöst. Sämtliches Material, das nicht gelöst werden kann, wird durch Zentrifugation ( $10000 \times G$  für 20 Minuten,  $20^{\circ}C$ ) entfernt. Das Protein von Interesse wird, in den meisten Fällen, das am reichlichsten vorhandene Protein in dem resultierenden geklärten Überstand sein. Dieses Protein kann in die aktive Form durch Dialyse gegen 50 mM Tris-HCl (pH 8)/5 mM  $CaCl_2$ /5 mM  $Zn(OAc)_2$ /1 mM GSSG/0,1 mM GSH "renaturiert" werden. Nach der Renaturierung kann die Reinigung durch eine Vielzahl von chromatographischen Verfahren ausgeführt werden, wie z. B. dem Ionenaustausch oder der Gelfiltration. In einigen Protokollen kann die initiale Reinigung vor der Renaturierung ausgeführt werden. Als ein Beispiel können Hexahistidin-markierte Fusionsproteine partiell auf immobilisiertem Nickel gereinigt werden.

**[0143]** Während die vorstehenden Reinigungs- und Renaturierungsmethoden davon ausgehen, dass das Protein am besten aus den Einschlusskörpern gewonnen wird, werden sich die Fachleute auf dem Gebiet der Proteinreinigung bewusst sein, dass viele rekombinante Proteine am besten aus der löslichen Fraktion der Zellysate gereinigt werden. In diesen Fällen ist häufig eine Renaturierung nicht erforderlich und die Reinigung durch standardchromatographische Verfahren kann direkt durchgeführt werden.

### Hefesysteme

**[0144]** Alternativ können die Polypeptide in Hefewirtszellen exprimiert werden, vorzugsweise von der Gattung *Saccharomyces* (z. B. *S. cerevisiae*). Weitere Gattungen von Hefe, wie z. B. *Pichia* oder *Kluyveromyces* können ebenfalls verwendet werden. Hefevektoren werden häufig einen Replikationsursprung von einem 2  $\mu$ -Hefep lasmid aufweisen, eine autonome Replikationssequenz (ARS), eine Promotorregion, Sequenzen für die Polyadenylierung, Sequenzen für die Transkriptionstermination und ein Gen für einen selektierbaren Marker. Geeignete Promotorsequenzen für Hefevektoren schließen unter anderem Promotoren für Metallothionein, 3-Phosphoglyceratkinase (Hitzeman et al., J. Biol. Chem. 255: 2073, 1980) oder andere glycolytische Enzyme (Hess et al., J. Adv. Enzyme Reg. 7: 149, 1968; und Holland et al., Biochem. 17: 4900, 1978) wie z. B. Enolase, Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase, Hexokinase, Pyruvatdecarboxylase, Phosphofructokinase, Glucose-6-phosphatisomerase, 3-Phosphoglyceratmutase, Pyruvatkinase, Triosephosphatisomerase, Phosphoglucoseisomerase und Glucokinase ein. Weitere geeignete Vektoren und Promotoren für die Verwendung bei der Hefeexpression werden weiter in Hitzeman, EPA-73,657 beschrieben. Eine weitere Alternative ist der Glucose-reprimierbare ADH2-Promotor, der von Russell et al. beschrieben wird ((J. Biol. Chem. 258: 2674, 1982) und von Beier et al. (Nature 300: 724, 1982). Shuttle-Vektoren, die sowohl in Hefe als auch in *E. coli* replizierbar sind, können durch Insertieren von DNA-Sequenzen aus pBR322 für die Selektion und Replikation in *E. coli* (Amp<sup>r</sup>-Gen und Replikationsursprung) in die oben beschriebenen Hefevektoren konstruiert werden.

**[0145]** Die Hefe- $\alpha$ -Faktor-Leadersequenz kann für die direkte Sekretion des Polypeptids verwendet werden. Die  $\alpha$ -Faktor-Leadersequenz wird häufig zwischen die Promotorsequenz und die Sequenz des strukturellen Gens insertiert. Siehe, z. B., Kurjan et al., Cell 30: 933, 1982 und Bitter et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 81: 5330, 1984. Weitere Leadersequenzen, die für die Erleichterung der Sekretion von rekombinanten Polypeptiden aus Hefezellen geeignet sind, sind den Fachleuten auf dem Gebiet bekannt. Eine Leadersequenz kann nahe seinem 3'-Ende modifiziert werden, so dass sie ein oder mehrere Restriktionsstellen enthält. Dies wird die Fusion der Leadersequenz mit dem strukturellen Gen erleichtern.

**[0146]** Protokolle zur Transformation von Hefe sind den Fachleuten auf dem Gebiet bekannt. Eines dieser Protokolle wird von Hinnen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1929, 1978 beschrieben. Das Hinnen et al. Protokoll selektiert für Trp<sup>-</sup>-Transformanten in einem selektiven Medium, wobei das selektive Medium aus 0,67% Hefestickstoffbase, 0,5% Casamino säuren, 2% Glucose, 10 mg/ml Adenin und 20 mg/ml Uracil besteht.

**[0147]** Hefewirtszellen, die mit Vektoren enthaltend eine ADH2-Promotorsequenz transformiert wurden, können zum Induzieren der Expression in einem "reichen" Medium wachsen gelassen werden. Ein Beispiel für ein reiches Medium ist eines, das aus 1% Hefeextrakt, 2% Pepton und 1% Glucose ergänzt mit 80 mg/ml Adenin und 80 mg/ml Uracil, besteht. Die De-Reprimierung des ADH2-Promotors erfolgt, wenn die Glucose aus dem Medium verbraucht ist.

### Säuger- oder Insekten-Systeme

**[0148]** Säuger- oder Insekten-Wirtszellsystems te können ebenfalls verwendet werden, um rekombinante Polypeptide zu exprimieren. Baculovirussysteme für die Herstellung von heterologen Proteinen in Insekten-

zellen werden von Luckow und Summers, *Bio/Technology* 6: 47 (1988) besprochen. Etablierte Zelllinien mit Säugerherkunft können ebenfalls verwendet werden. Beispiele für geeignete Säuger-Wirtszelllinien schließen die COS-7-Linie aus Nierenzellen des Affen (ATCC CRL 1651) (Gluzman et al., *Cell* 23: 175, 1981), L-Zellen, C127-Zellen, 3T3-Zellen (ATCC CCL 163), Ovarienzellen des chinesischen Hamsters (CHO-Zellen), He-La-Zellen und BHK-Zelllinien (ATCC CRL 10) und die CV1/EBNA-Zelllinie ein, die aus der Nierenzelllinie CV1 der afrikanischen grünen Meerkatze stammt, wie von McMahan et al. (*EMBO J.* 10: 2821, 1991) beschrieben.

**[0149]** Etablierte Verfahren zum Einführen von DNA in Säugerzellen wurden beschrieben (Kaufman, R. J., *Large Scale Mammalian Cell Culture*, 1990, S. 15–69). Zusätzliche Protokolle, die kommerziell erhältliche Reagenzien verwenden, wie z. B. Lipofectamin Lipidreagents (Gibco/BRL) oder Lipofectamin-Plus Lipidreagents können zur Transfektion von Zellen verwendet werden (Felgner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7413–7417, 1987). Außerdem kann die Elektroporation verwendet werden, um Säugerzellen unter Verwendung von herkömmlichen Methoden zu transfizieren, wie z. B. den in Sambrook et al. beschriebenen (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2 ed. Bd. 1–3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Die Selektion von stabilen Transformanten kann unter Verwendung von auf dem Gebiet bekannten Verfahren, wie z. B. der Resistenz gegenüber zytotoxischen Arzneimitteln durchgeführt werden. Kaufman et al., *Meth. In Enzymology* 185: 487–511, 1990, beschreibt mehrere Selektionsschemata, wie z. B. die Dihydrofolatreduktase(DHFR)-Resistenz. Ein geeigneter Wirtstamm für die DHFR-Selektion kann der CHO-Stamm DX-B11 sein, der eine Defizienz in DHFR aufweist (Urlaub und Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216–4220, 1980). Ein Plasmid, das die DHFR cDNA exprimiert, kann in den Stamm DX-B11 eingeführt werden, und nur Zellen, die das Plasmid enthalten, können in dem entsprechenden selektiven Medium wachsen. Weitere Beispiele für selektierbare Marker, die in einen Expressionsvektor eingeschlossen werden können, schließen cDNAs ein, die Resistenz gegen Antibiotika wie z. B. G418 und Hygromycin B verleihen. Zellen, die den Vektor enthalten, können auf Basis der Resistenz gegen diese Verbindungen selektiert werden.

**[0150]** Transkriptionelle und translationelle Kontrollsequenzen für Säuger-Wirtszell-Expressionsvektoren können aus viralen Genomen ausgeschnitten werden. Allgemein verwendete Promotorsequenzen und Enhancer-Sequenzen stammen vom Polyomavirus, Adenovirus 2, Simianvirus 40 (SV 40) und dem menschlichen Cytomegalovirus. DNA-Sequenzen, die aus dem SV40 viralen Genom stammen, z. B. der SV40 Origin, der frühe und späte Promotor, Enhancer, Splice-Stellen und Polyadenylierungsstellen, können verwendet werden, um weitere genetische Elemente für die Expression einer strukturellen Gensequenz in einer Säugerwirtszelle zur Verfügung zu stellen. Virale frühe und späte Promotoren sind besonders nützlich, da beide leicht aus dem Virusgenom als Fragment erhalten werden können, das außerdem einen viralen Replikationsursprung enthalten kann (Fiers et al., *Nature* 273: 113, 1978; Kaufman, *Meth. in Enzymology*, 1990). Kleinere oder größere SV40-Fragmente können ebenfalls verwendet werden, vorausgesetzt, dass die etwa 250 Basenpaar lange Sequenz, die sich von der Hind III-Stelle bis zur Bgl I-Stelle erstreckt, die in dem SV40 viralen Replikationsursprung lokalisiert ist, umfasst ist.

**[0151]** Zusätzliche Kontrollsequenzen, von denen gezeigt wurde, dass sie die Expression heterologer Gene von Säuger-Expressionsvektoren verbessern, schließen Elemente wie das Expressions-verstärkende Sequenzelement (expression augmenting sequence element, EASE) aus CHO-Zellen (Morris et al., *Animal Cell Technology*, 1997, S. 529–534 und PCT Anmeldung WO 97/25420) und die Tripartit Leader(TPL)- und VA-Gen-RNAs aus dem Adenovirus 2 (Gingeras et al., *J. Biol. Chem.* 257: 13475–13491, 1982) ein. Die interne Ribosomeneintrittsstelle(IRES)-Sequenzen viralen Ursprungs erlauben die effiziente Translation von dizistronischen mRNAs (Oh und Samow, *Current Opinion in Genetics and Development* 3: 295–300, 1993; Ramesh et al., *Nucleic Acids Research* 24: 2697–2700, 1996). Von der Expression einer heterologen cDNA als Teil einer dizistronischen mRNA, gefolgt von dem Gen für einen selektierbaren Marker (z. B. DHFR), wurde gezeigt, dass sie die Transfizierbarkeit des Wirtes und die Expression der heterologen cDNA verbessert (Kaufman, *Meth. in Enzymology*, 1990). Beispielhafte Expressionsvektoren, die dizistronische mRNAs verwenden, sind der pTR-DC/GFP, der von Mosser et al., *Biotechniques* 22: 150–161, 1997 beschrieben wurde und der p2A51, der von Morris et al. *Animal Cell Technology*, 1997, S. 529–534, beschrieben wurde.

**[0152]** Ein nützlicher Vektor für starke Expression, pCAVNOT, wurde von Mosley et al., *Cell* 59: 335–348, 1989 beschrieben. Weitere Expressionsvektoren für die Verwendung in Säugerwirtszellen können wie von Okayama und Berg (*Mol. Cell. Biol.* 3: 280, 1983) beschrieben konstruiert werden. Ein nützliches System für die starke Expression von Säuger-cDNAs in C127 murinen Säuger-Epithelzellen kann wie im Wesentlichen von Cosman et al. (*Mol. Immunol.* 23: 935, 1986) beschrieben konstruiert werden. Ein geeigneter Vektor zur starken Expression, PMLSV N1/N4, beschrieben von Cosman et al., *Nature* 312: 768, 1984, wurde als ATCC 39890 hinterlegt. Zusätzliche nützliche Säugerexpressionsvektoren sind in EP-A-0367566 und in WO 91/18982 beschrieben. Als eine noch weitere Alternative können die Vektoren von Retroviren stammen.

**[0153]** Zusätzliche nützliche Expressionsvektoren, pFLAG® und pDC311, können ebenfalls verwendet werden. Die FLAG®-Technologie ist basiert auf der Fusion eines hydrophilen FLAG®-Markerpeptids mit niedrigem Molekulargewicht (1 kD) mit dem N-Terminus eines rekombinanten Proteins, das durch pFLAG®-Expressionsvektoren exprimiert wird. pDC311 ist ein weiterer spezialisierter Vektor, der für die Expression von Proteinen in CHO-Zellen verwendet wird. pDC311 ist gekennzeichnet durch eine bizistronische Sequenz, die das Gen von Interesse und ein Dihydrofolatreduktase(DHFR)-Gen enthält, mit einer internen Ribosomeneintrittsstelle für die DHFR-Translation, einem Expressions-verstärkende Sequenzelement (expression augmenting sequence element, EASE), dem humanen CMV-Promotor, einer Tripartit Leader-Sequenz und einer Polyadenylierungsstelle.

**[0154]** Bezugnehmend auf die Signalpeptide, die verwendet werden können, kann das native Signalpeptid durch ein heterologes Signalpeptid oder eine heterologe Leader-Sequenz ersetzt werden, wenn dies gewünscht ist. Die Auswahl des Signalpeptids oder des Leaders kann von Faktoren wie z. B. der Art der Wirtszellen, in dem das rekombinante Polypeptid hergestellt werden soll, abhängig sein. Zur Veranschaulichung schließen Beispiele für heterologe Signalpeptide, die in Säugerwirtszellen funktionsfähig sind, die Signalsequenz für Interleukin-7 (IL-7), die in dem Patent der Vereinigten Staaten 4,965,195 beschrieben ist, ein; die Signalsequenz für Interleukin-2 Rezeptor, der in Cosman et al, Nature 312: 768 (1984) beschrieben ist; das Interleukin-4 Rezeptor Signalpeptid, das in EP 367,566 beschrieben ist; das Typ I Interleukin-1 Rezeptor Signalpeptid, das in dem US-Patent 4,986,607 beschrieben ist; und das Typ II Interleukin-1 Rezeptor Signalpeptid, das in EP 460,846 beschrieben ist.

#### Reinigung

**[0155]** Die Erfindung schließt außerdem Verfahren zur Isolierung und Reinigung der Polypeptide und Fragmente davon ein. Ein isoliertes und gereinigtes ULBP-Polypeptid gemäß der Erfindung kann durch rekombinante Expressionssysteme wie oben beschrieben hergestellt werden oder aus natürlich vorkommenden Zellen gereinigt werden. Das ULBP-Polypeptid kann substantiell gereinigt werden, wie durch eine einzige Proteinbande bei Analyse durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) angezeigt. Ein Verfahren zur Herstellung von ULBP umfasst die Kultivierung einer Wirtszelle, die mit einem Expressionsvektor umfassend eine DNA-Sequenz, die ein ULBP-Polypeptid codiert, transformiert wurde, unter Bedingungen, die ausreichen, um die Expression ULBP zu fördern. Das ULBP-Polypeptid wird anschließend aus dem Kulturmedium oder aus Zellextrakten gewonnen, abhängig davon, welches Expressionssystem verwendet wird.

#### Isolation und Reinigung

**[0156]** Der Ausdruck "isoliert und gereinigt" wie hierin verwendet bedeutet, dass ULBP im Wesentlichen frei ist von Assoziationen mit anderer DNA, Proteinen oder Polypeptiden, z. B. als ein Reinigungsprodukt aus einer rekombinanten Wirtszellkultur oder als gereinigtes Produkt aus einer nicht rekombinanten Quelle. Der Begriff "im Wesentlichen gereinigt" wie hierin verwendet bezeichnet eine Mischung, die ULBP enthält, und im Wesentlichen frei ist von der Assoziation mit anderer DNA, Proteinen oder Polypeptiden, außer der Anwesenheit von bekannter DNA oder Proteinen, die unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers entfernt werden können, und wobei die im Wesentlichen gereinigten ULBP-Proteine die biologische Aktivität beibehalten. Der Begriff "gereinigtes ULBP" bezieht sich entweder auf die "isolierte und gereinigte" Form von ULBP oder die "im Wesentlichen gereinigte" Form von ULBP, wie beide hierin beschrieben sind.

**[0157]** Der Begriff "biologisch aktiv", soweit er sich auf ULBP-Protein bezieht, bedeutet, dass das ULBP-Protein fähig ist, mit UL16 zu assoziieren oder mit UL16 unter Verwendung eines Antikörpers gegen UL16 ko-immunopräzipitiert zu werden. In ähnlicher Weise zeigt die Assoziation eines ULBP-2-Proteins mit UL16, dass das ULBP-2-Protein biologisch aktiv ist.

**[0158]** In einer bevorzugten Ausführungsform kann die Reinigung der rekombinanten Polypeptide oder Fragmente unter Verwendung von Fusionen der Polypeptide oder Fragmente gemäß der Erfindung mit anderen Polypeptiden, um bei der Reinigung der Polypeptide oder Fragmente gemäß der Erfindung behilflich zu sein, erreicht werden. Solche Fusionspartner können das Poly-His oder andere antigene Identifikationspeptide, die oben beschrieben sind, sein, ebenso wie die zuvor beschriebenen Fc-Einheiten.

**[0159]** Im Hinblick auf jede beliebige Wirtszelle werden die Methoden zur Reinigung eines Polypeptids oder Fragmentes, wie dem Fachmann bekannt ist, abhängig von Faktoren wie der Art der Wirtszelle, die verwendet wird und ob das rekombinante Polypeptid oder Fragment in das Kulturmedium sezerniert wird oder nicht, variieren.

**[0160]** Im Allgemeinen kann das rekombinante Polypeptid oder Fragment aus den Wirtszellen isoliert werden, wenn es nicht sezerniert wird, oder aus dem Medium oder Überstand, wenn es löslich ist und sezerniert wird, gefolgt von einem oder mehreren Konzentrations-, Aussalzungs-, Ionenaustausch-, hydrophobe Interaktions-, Affinitätsreinigungs- oder Größenausschlusschromatographie-Schritten. Was die spezifischen Arten zur Ausführung dieser Schritte angeht, kann das Kulturmedium erst konzentriert werden unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Proteinkonzentrationsfilters, z. B. einer Amicon- oder Millipore Pellicon-Ultrafiltrationseinheit. Im Anschluss an den Konzentrierungsschritt kann das Konzentrat auf eine Reinigungsmatrix wie z. B. ein Gelfiltrationsmedium aufgetragen werden. Alternativ kann ein Anionenaustauschharz verwendet werden, z. B. eine Matrix oder ein Substrat, das funktionelle (pendant) Diethylaminoethyl(DEAE)-Gruppen aufweist. Die Matrices können Acrylamid, Agarose, Dextran, Cellulose oder andere Arten sein, die im Allgemeinen bei der Proteinreinigung verwendet werden. Alternativ kann ein Kationenaustauschschritt angewendet werden. Geeignete Kationenaustauscher schließen verschiedene unlösliche Matrices ein, die Sulfopropyl- oder Carboxymethyl-Gruppen umfassen. Zusätzlich kann ein Chromatofokussierungsschritt (chromatofocusing) verwendet werden. Alternativ kann ein hydrophobe Interaktions-Chromatographieschritt verwendet werden. Geeignete Matrices können Phenyl- oder Octyl-Reste sein, die an Harz gebunden sind. Zusätzlich kann eine Affinitätschromatographie mit einer Matrix, die das rekombinante Protein selektiv bindet, verwendet werden. Beispiele für solche verwendeten Harze sind Lectinsäulen, Farbsäulen und Metallchelate-bildende Säulen. Schließlich können ein oder mehrere Reverse Phase-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie(reversed phase high performance liquid chromatography, RP-HPLC)-Schritte, die hydrophobe RP-HPLC-Medien verwenden (z. B. Silicagel oder Polymerharze, die funktionelle Methyl-, Octyl-, Octyldecyl- oder andere aliphatische Gruppen aufweisen) verwendet werden, um die Polypeptide weiter zu reinigen. Einige oder alle der voranstehenden Reinigungsschritte, in verschiedenen Kombinationen, sind bekannt und können verwendet werden, um ein isoliertes und gereinigtes rekombinantes Protein zur Verfügung zu stellen.

**[0161]** Rekombinantes Protein, das in Bakterienkultur hergestellt wird, wird im Allgemeinen durch ein anfängliches Aufschließen der Wirtszellen, Zentrifugation, Extraktion aus den Zellpellets, wenn es ein unlösliches Polypeptid ist oder aus der Überstandsflüssigkeit, wenn es ein lösliches Polypeptid ist, gefolgt von einer oder mehreren Konzentrierungs-, Aussalzungs-, Ionenaustausch-, Affinitätsreinigungs- oder Größenausschlusschromatographie-Schritten, isoliert. Schließlich kann RP-HPLC für die finalen Reinigungsschritte verwendet werden. Mikrobielle Zellen können durch jedes beliebige geeignete Verfahren aufgeschlossen werden, einschließlich dem Wechsel zwischen Einfrieren und Auftauen (freeze-thaw cycling), Ultraschallbehandlung, mechanischem Aufschluss oder der Verwendung von Zelllysierungsmitteln.

**[0162]** Transformierte Hefewirtszellen werden vorzugsweise verwendet, um ULBP als ein sezerniertes Polypeptid zu exprimieren, um die Reinigung zu vereinfachen. Sezerniertes rekombinantes Polypeptid aus einer Wirtshefzellenfermentation kann durch Verfahren analog zu denen von Urdal et al. (J. Chromatog. 296: 171, 1984) offenbart gereinigt werden. Urdal et al. beschreiben zwei sequenzielle, reverse Phase HPLC-Schritte zur Reinigung von rekombinantem humanem IL-2 auf einer präparativen HPLC-Säule.

**[0163]** Zusätzlich zur rekombinanten Herstellung von ULBP kann ULBP aus Zelllinien isoliert und gereinigt werden und insbesondere aus Namalwa humanen B-Zell-Lymphomzellen.

**[0164]** Es ist außerdem möglich, eine Affinitätssäule, die ein Polypeptid-bindendes Protein gemäß der Erfindung, wie z. B. einen monoklonalen Antikörper, der gegen Polypeptide gemäß der Erfindung erzeugt wurde, zu verwenden, um die exprimierten Polypeptide affinitätszureinigen. Diese Polypeptide können von der Affinitätssäule unter Verwendung konventioneller Verfahren entfernt werden, z. B. in einem hochsalzigen Elutionspuffer und anschließend für die Verwendung in einen Niedrigsalzpuffer dialysiert werden oder durch Veränderung des pH oder anderen Komponenten, abhängig von der verwendeten Affinitätsmatrix, oder vollständig entfernt werden unter Verwendung des natürlich vorkommenden Substrates der Affinitätseinheit, wie z. B. einem Polypeptid, das von der Erfindung abgeleitet wurde.

**[0165]** Gemäß diesem Aspekt der Erfindung können Polypeptid-bindende Proteine, wie z. B. die anti-Polypeptid Antikörper gemäß der Erfindung oder andere Proteine, die mit dem Polypeptid gemäß der Erfindung interagieren können, an einen Feste Phase-Träger wie z. B. eine Säulenchromatographiematrix oder ein ähnliches Substrat, das zur Identifizierung, Auftrennung oder Reinigung von Zellen, die Polypeptide gemäß der Erfindung auf ihrer Oberfläche exprimieren, geeignet ist, gebunden werden. Die Adhärenz von Polypeptid-bindenden Proteinen gemäß der Erfindung auf einer Feste Phase-Kontaktfläche kann durch jedes beliebige Mittel erreicht werden, z. B. können magnetische Mikrosphären mit diesen Polypeptid-bindenden Proteinen beschichtet werden und in einem Inkubationsgefäß über ein magnetisches Feld festgehalten werden. Suspensionen von Zellmischungen werden mit der festen Phase, die solche Polypeptid-bindende Proteine darauf auf-

weist, in Kontakt gebracht. Zellen, die Polypeptide gemäß der Erfindung auf ihrer Oberfläche aufweisen, binden an die fixierten Polypeptid-bindenden Proteine, und ungebundene Zellen werden gewaschen. Dieses Affinitätsbindungsverfahren ist nützlich zur Reinigung, zum Screenen oder zur Trennung solcher Polypeptid-exprimierenden Zellen aus einer Lösung. Verfahren zur Freisetzung der positiv selektierten Zellen von der festen Phase sind auf dem Gebiet bekannt und umfassen z. B. die Verwendung von Enzymen. Solche Enzyme sind vorzugsweise nicht toxisch und nicht schädlich für die Zellen und sind vorzugsweise auf die Spaltung der Zelloberflächen-Bindungspartner gerichtet.

**[0166]** Alternativ können Mischungen von Zellen, von denen vermutet wird, dass sie Polypeptid-exprimierende Zellen gemäß der Erfindung enthalten, zunächst mit einem biotinylierten Polypeptid-bindenden Protein gemäß der Erfindung inkubiert werden. Die Inkubationszeiten sind typischerweise wenigstens von einer Dauer von einer Stunde, um die ausreichende Bindung an die Polypeptide gemäß der Erfindung sicherzustellen. Die resultierende Mischung wird anschließend über eine Säule gegeben, die aus Avidinbeschichteten Kügelchen besteht, wobei die hohe Affinität von Biotin für Avidin für die Bindung der Polypeptid-bindenden Zellen an die Kügelchen sorgt. Die Verwendung von Avidin-beschichteten Kügelchen ist auf dem Gebiet bekannt. Siehe Berenson, et al., J. Cell. Biochem., 10D: 239 (1986). Das Wegwaschen von ungebundenem Material und das Freisetzen der gebundenen Zellen wird unter Verwendung von herkömmlichen Verfahren durchgeführt.

**[0167]** In den oben beschriebenen Verfahren sind geeignete ULBP-bindende Polypeptide anti-ULBP Antikörper und andere Proteine, die fähig sind, ULBP mit hoher Affinität zu binden. Ein bevorzugtes ULBP-bindendes Protein ist ein anti-ULBP monoklonaler Antikörper.

**[0168]** Der gewünschte Reinheitsgrad ist abhängig von der vorgesehenen Verwendung des Proteins. Ein relativ hoher Reinheitsgrad ist z. B. gewünscht, wenn das Polypeptide in vivo verabreicht werden soll. In solch einem Fall werden die Polypeptide derart gereinigt, dass keine Proteinbanden, die anderen Proteinen entsprechen, bei der Analyse durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nachweisbar sind. Der einschlägige Fachmann auf dem Gebiet wird erkennen, dass aufgrund unterschiedlicher Glycosylierung, unterschiedlicher post-translationeller Prozessierung und dergleichen mehrere Banden, die dem Polypeptid entsprechen, durch SDS-PAGE sichtbar gemacht werden können. Am wünschenswertesten wird das Polypeptid gemäß der Erfindung bis zu einer beträchtlichen Homogenität gereinigt, was angezeigt wird durch eine einzige Proteinbande bei der Analyse durch SDS-PAGE. Die Proteinbande kann durch Silberfärbung, Coomassie Blau-Färbung oder (wenn das Protein radioaktiv markiert ist) durch Autoradiographie visualisiert werden.

#### Assays

**[0169]** Die gereinigten Polypeptide gemäß der Erfindung (einschließlich Proteinen, Polypeptiden, Fragmenten, Varianten, Oligomeren und anderen Formen) können auf ihre Fähigkeit zur Bindung von UL16 oder eines ULBP-Gegenstrukturmoleküls in jedem beliebigen geeigneten Assay getestet werden, wie z. B. in einem konventionellen Bindungs-Assay. Zur Veranschaulichung kann das Polypeptid mit einem detektierbaren Reagens (z. B. einem Radionuklid, Chromophor, Enzym, das eine colorimetrische oder fluorometrische Reaktion katalysiert, und dergleichen) markiert werden. Das markierte Polypeptid wird mit Zellen, die ein ULBP-Gegenstrukturmolekül exprimieren, in Kontakt gebracht. Die Zellen werden anschließend gewaschen, um ungebundenes markiertes Polypeptid zu entfernen, und die Anwesenheit der zellgebundenen Markierung wird durch eine geeignete Methode bestimmt, die entsprechend dem Wesen der Markierung ausgewählt wird.

**[0170]** Ein Beispiel für ein Bindungsassay-Verfahren ist das Folgende. Ein rekombinanter Expressionsvektor, der UL16 cDNA enthält, wird konstruiert. Die Information zur DNA- und Aminosäuresequenz für UL16 wird in Kaye et al., J. Virol. 66: 6609, 1992) dargestellt. Zum Beispiel fusioniert UL16-Fc die extrazelluläre Domäne von UL16 an das IgG-I Fc (Muteinform), wie zuvor für OX40-Fc beschrieben (Baum et al., EMBO J. 13: 3992–4001, 1994). CV1-EBNA-1-Zellen werden in 10 cm<sup>2</sup>-Schalen mit dem rekombinanten Expressionsvektor transfiziert. CV1/EBNA-1-Zellen (ATCC CRL 10478) exprimieren konstitutiv das EBV nukleäre Antigen-1, gesteuert von dem CMV immediate-early Enhancer/Promotor. CV1-EBNA-1 stammt aus der Nierenzelllinie CV1 der afrikanischen grünen Meerkatze (ATCC CCL 70), wie von McMahan et al. (EMBO J. 10: 2810, 1991) beschrieben.

**[0171]** Die transfizierten Zellen werden 24 Stunden lang kultiviert, und die Zellen in jeder Schale werden anschließend in eine 24 Well-Platte aufgeteilt. Nach der Kultivierung für zusätzliche 48 Stunden werden die transfizierten Zellen (etwa  $4 \times 10^4$  Zellen/Well) mit BMNFDM gewaschen, das ein Bindungsmedium ist (RPMI 1640, enthaltend 25 mg/ml bovines Serumalbumin, 2 mg/ml Natriumazid, 20 mM Hepes pH 7,2), dem 50 mg/ml fettfreie Trockenmilch zugesetzt wurde. Die Zellen werden anschließend eine Stunde lang bei 37°C mit verschie-

denen Konzentrationen von, z. B., einem löslichen Polypeptid/Fc-Fusionsprotein, das wie oben dargestellt hergestellt wurde, inkubiert. Die Zellen werden anschließend gewaschen und mit einer konstant sättigenden Konzentration eines  $^{125}\text{I}$ -Maus anti-humanem IgG in Bindungsmedium inkubiert, bei leichtem Schütteln eine Stunde lang bei 37°C. Nach ausgiebigem Waschen werden die Zellen über Trypsinierung freigesetzt.

**[0172]** Das oben verwendete Maus-antihumane IgG ist gegen die Fc-Region von humanem IgG gerichtet und kann von den Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, erhalten werden. Der Antikörper wird unter Verwendung des Standard-Chloramin-T-Verfahrens radioiodiert. Der Antikörper wird an den Fc-Teil eines jedes Polypeptid/Fc-Proteins binden, das an die Zellen gebunden hat. In sämtlichen Assays wird die nichtspezifische Bindung des  $^{125}\text{I}$ -Antikörpers in der Abwesenheit des Fc-Fusionsproteins/Fc ebenso wie in der Anwesenheit des Fc-Fusionsproteins und einem 200-fachen molaren Überschuss an unmarkiertem Maus anti-humanem IgG-Antikörper untersucht.

**[0173]** Zellgebundener  $^{125}\text{I}$ -Antikörper wird auf einem Packard Autogamma-Zähler quantifiziert. Affinitätsberechnungen (Scatchard, Ann. N. Y. Acad. Sci. 51: 660, 1949) werden auf RS/1 (BBN Software, Boston, MA) auf einem Microvax Computer erzeugt.

**[0174]** Eine weitere Art eines geeigneten Bindungs-Assays ist ein kompetitiver Bindungs-Assay. Zur Veranschaulichung kann die biologische Aktivität einer Variante durch Untersuchen der Fähigkeit der Variante, mit dem nativen Protein um die Bindung an UL16 oder an Zellen, die eine ULBP-Gegenstruktur exprimieren, zu konkurrieren, bestimmt werden.

**[0175]** Kompetitive Bindungs-Assays können mit herkömmliche Methoden durchgeführt werden. Reagenzien, die in kompetitiven Bindungs-Assays verwendet werden können, schließen radioaktiv markiertes UL16 und intakte Zellen, die ULBP (endogen oder rekombinant) auf der Zelloberfläche exprimieren, ein. Zum Beispiel kann ein radioaktiv markiertes lösliches ULBP-Fragment verwendet werden, um mit einer löslichen ULBP-Variante um die Bindung an die Zelloberfläche (Bindungspartner) zu konkurrieren. Anstelle von intakten Zellen könnte man ein lösliches UL16/Fc-Fusionsprotein, das an eine feste Phase über die Interaktion von Protein A oder Protein G (auf der festen Phase) mit der Fc-Einheit gebunden ist, verwenden. Chromatographiesäulen, die Protein A und Protein G enthalten, schließen solche ein, die von Pharmacia Biotech., Inc., Piscataway, NJ, erhältlich sind.

**[0176]** Weitere Arten von kompetitiven Bindungs-Assays verwenden radioaktiv markiertes lösliches UL16, wie z. B. ein lösliches UL16/Fc-Fusionsprotein und intakte Zellen, die ULBP exprimieren. Qualitative Ergebnisse können durch kompetitive autoradiografische Plattenbindungs-Assays erhalten werden, während Scatchard Plots (Scatchard, Am. N. Y. Acad. Sci. 51: 660, 1949) verwendet werden können, um quantitative Ergebnisse zu erzeugen.

#### VERWENDUNG VON ULBP-NUKLEINSÄUREN ODER OLIGONUKLEOTIDEN

**[0177]** Zusätzlich zu ihrer Verwendung zur Expression von oben beschriebenen Polypeptiden können die Nukleinsäuren gemäß der Erfindung, einschließlich der DNA und Oligonukleotiden davon verwendet werden:

- als Sonden zur Identifizierung von Nukleinsäuren, die Proteine mit ULBP-Aktivität codieren;
- zur Identifizierung des humanen Chromosoms Nummer 6;
- zur Kartierung von Genen auf dem humanem Chromosom Nummer 6;
- zur Identifizierung von Genen, die mit bestimmten Krankheiten, Syndromen oder anderen Krankheitszuständen, die mit dem humanen Chromosom Nummer 6 assoziiert sind, zu identifizieren;
- als Einzelstrang-Sense- oder Antisense-Oligonukleotide, um die Expression von Polypeptiden, die durch das ULBP-Gen codiert werden, zu inhibieren;
- um behilflich zu sein bei der Detektion von defekten Genen in einem Individuum; und
- zur Gentherapie.

#### Sonden

**[0178]** Unter den Verwendungen der Nukleinsäuren gemäß der Erfindung ist die Verwendung von Fragmenten als Sonden oder Primern. Solche Fragmente umfassen im Allgemeinen wenigstens etwa 17 aufeinanderfolgende Nukleotide einer DNA-Sequenz. In weiteren Ausführungsformen umfasst ein DNA-Fragment wenigstens 30 oder wenigstens 60 aufeinanderfolgende Nukleotide einer DNA-Sequenz.

**[0179]** Da die Homologen von SEQ-ID Nr. 1, SEQ-ID Nr. 3 und SEQ-ID Nr. 9 von anderen Säugerspezies hier-

in vorgesehen sind, können Sonden basierend auf den Sequenzen der SEQ-ID Nr. 1, SEQ-ID Nr. 3 und SEQ-ID Nr. 9 verwendet werden, um cDNA-Bibliotheken, die von anderen Säugerspezies stammen, unter Verwendung von herkömmlichen Cross-Species Hybridisierungsmethoden zu screenen.

**[0180]** Unter Verwendung der Kenntnis des genetischen Codes in Kombination mit den Aminosäuresequenzen, die oben dargestellt sind, können Sets von degenerierten Oligonukleotiden hergestellt werden. Solche Oligonukleotide sind nützlich als Primer, z. B. bei Polymerasekettenreaktionen (PCR), wodurch DNA-Fragmente isoliert und amplifiziert werden.

#### Chromosomkartierung

**[0181]** ULBP-1- und ULBP-2-Polypeptide sind entfernt verwandt mit einer Anzahl von MHC Klasse 1-Proteinen, insbesondere nicht-klassischen Klasse 1 Molekülen, oder Klasse 1 Molekülen von nicht-humanen Spezies. ULBP-1- und ULBP-2-Polypeptide enthalten Regionen, die homolog zu den  $\alpha$ 1- und  $\alpha$ 2-Domänen der MHC Klasse 1-Proteine sind. Jedoch weisen sie eine Struktur auf, die sich von anderen Klasse 1-Molekülen dadurch unterscheidet, dass ihnen die  $\alpha$ 3-Domäne fehlt, die nötig ist für die Bindung von Beta-2-Mikroglobulin. Außerdem sind die ULBP-1- und ULBP-2-Gene auf Chromosom 6q20-23 kartiert, was anders ist als bei anderen MHC Klasse 1-Genen und verwandten Genen.

**[0182]** Der gesamte Teil oder Teile der Nukleinsäuren der SEQ-ID Nr. 1 oder SEQ-ID Nr. 3, einschließlich Oligonukleotiden, können von den Fachleuten auf dem Gebiet unter Verwendung wohlbekannter Methoden zur Identifizierung des humanen Chromosoms 6 und dem spezifischen Locus davon, der die DNA der ULBP-Familienmitglieder enthält, verwendet werden. Geeignete Methoden schließen die Verwendung der Sequenz oder Teilen davon, einschließlich Oligonukleotiden, als Sonden in verschiedenen wohlbekannten Methoden wie z. B. Strahlungshybridisierungskartierung (radiation hybrid mapping) (hohe Auflösung) in situ-Hybridisierung mit Chromosomen-Abschnitten (mittlere Auflösung) und Southern Blot-Hybridisierung mit hybriden Zelllinien, die individuelle humane Chromosomen enthalten (geringe Auflösung) ein, sind jedoch nicht auf diese beschränkt.

**[0183]** Zum Beispiel können Chromosomen durch Strahlungshybridisierung (radiation hybridization) kartiert werden. PCR wird unter Verwendung des Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research Genebridge4 Panel of 93 Radiation Hybrids ([http://www-genome.wi.mit.edu/ftp/distribution/human\\_STS\\_releases/july97/rhmap/genebridge4.html](http://www-genome.wi.mit.edu/ftp/distribution/human_STS_releases/july97/rhmap/genebridge4.html)) durchgeführt. Es werden Primer verwendet, die innerhalb eines putativen Exons des Gens von Interesse liegen und die ein Produkt von der humangenomischen DNA amplifizieren, jedoch keine genomische DNA vom Hamster amplifizieren. Die Ergebnisse der PCR werden in einen Datenvektor konvertiert, der bei der Whitehead/MIT Radiation Mapping Site im Internet (<http://www-seq.wi.mit.edu>) eingereicht wird. Die Daten werden ausgewertet und die Zuordnung und Platzierung relativ zu bekannten Sequence Tag Site(STS)-Markern auf der Radiation Hybrid-Karte wird zur Verfügung gestellt. Die folgende Webseite stellt zusätzlich Informationen über die Strahlungshybridisierungskartierung (radiation hybrid mapping) zur Verfügung: [http://www-genome.wi.mit.edu/ftp/distribution/human\\_STS\\_releases/july97/07-97.INTRO.html](http://www-genome.wi.mit.edu/ftp/distribution/human_STS_releases/july97/07-97.INTRO.html).

#### Identifizierung assoziierter Krankheiten

**[0184]** Wie oben dargelegt wurden die SEQ-ID Nr. 1 und SEQ-ID Nr. 3 auf die 6q20-23-Region des Chromosoms 6 kartiert. Diese Region ist mit spezifischen Krankheiten assoziiert, die Retinitis pigmentosa-25 (6q14-q21); Insulin-abhängiger Diabetes mellitus, 15 (6q21); progressive pseudorheumatoide Arthropathie während der Kindheit (6q22); Muskeldystrophie, kongenitaler Merosin-Defekt (6q22-q23); und dilatative Kardiomyopathie 1F (6q23) einschließen, ist jedoch nicht auf diese beschränkt. Folglich können die Nukleinsäure der SEQ-ID Nr. 1 oder SEQ-ID Nr. 3 oder ein Fragment davon von den Fachleuten auf dem Gebiet unter Verwendung wohlbekannter Methoden verwendet werden, um Anomalitäten zu analysieren, die mit auf dem Chromosom 6 liegenden Genen assoziiert sind. Dieses ermöglicht einem, Krankheitszustände, in denen dieser Marker rearrangiert oder deletiert ist, zu unterscheiden. Außerdem können Nukleotide der SEQ-ID Nr. 1 oder SEQ-ID Nr. 3 oder Fragmente davon als Positionsmarker verwendet werden, um weitere Gene mit unbekannter Lokalisierung zu kartieren.

**[0185]** Die DNA kann bei der Entwicklung von Behandlungen für jede beliebige Funktionsstörung verwendet werden, die (direkt oder indirekt) durch defekte Gene oder nicht ausreichende Mengen von Genen, die den Nukleinsäuren gemäß der Erfindung entsprechen, vermittelt werden. Die Offenbarung von nativen Nukleotidsequenzen hierin erlaubt den Nachweis von defekten Genen und deren Austausch durch normale Gene. De-

defekte Gene können in in vitro-diagnostischen Assays und durch Vergleich einer nativen Nukleotidsequenz, die hierin offenbart ist, mit der eines Gens, das von einer Person stammt, von der vermutet wird, dass sie einen Defekt in diesem Gen aufweist, detektiert werden.

#### Sense-Antisense

**[0186]** Weitere nützliche Fragmente der Nukleinsäuren schließen Antisense- oder Sense-Oligonukleotide ein, die eine einzelsträngige Nukleinsäuresequenz (entweder RNA oder DNA) umfassen, die fähig ist, an Ziel-mRNA(Sense)- oder DNA(Antisense)-Sequenzen zu binden. Antisense- oder Sense-Oligonukleotide gemäß der Erfindung umfassen ein Fragment einer DNA (SEQ-ID Nr. 1, SEQ-ID Nr. 3 oder SEQ-ID Nr. 9). Solch ein Fragment umfasst im Allgemeinen wenigstens etwa 14 Nukleotide, vorzugsweise zwischen etwa 14 und etwa 40 Nukleotiden. Die Fähigkeit, ein Antisense- oder Sense-Oligonukleotid basierend auf einer cDNA, die ein bestimmtes Protein codiert, abzuleiten, ist z. B. in Stein und Cohen (Cancer Res. 48: 2659, 1988) und in van der Krol et al. (Bio-Techniques 6: 958, 1988) beschrieben.

**[0187]** Die Bindung von Antisense- oder Sense-Oligonukleotiden an Ziel-Nukleinsäuresequenzen resultiert in der Bildung von Dupliziden, die die Proteinexpression auf eine oder mehrere Arten, einschließlich der verstärkten Degradation der mRNA durch RNaseH, der Inhibition des Splicings, der vorzeitigen Termination der Transkription oder Translation oder auf andere Arten blockiert oder inhibiert. Die Antisense-Oligonukleotide können folglich verwendet werden, um die Expression von Proteinen zu verhindern. Antisense- oder Sense-Oligonukleotide umfassen weiterhin Oligonukleotide, die modifizierte Zucker-Phosphodiester-Rückgrade aufweisen (oder andere Zuckerbindungen, wie z. B. die in WO 91/06629 beschriebenen), und worin solche Zuckerbindungen resistent gegenüber endogenen Nukleasen sind. Solche Oligonukleotide mit resistenten Zuckerbindungen sind stabil in vivo (d. h. fähig, der Degradation durch Enzyme zu widerstehen), behalten jedoch die Sequenzspezifität zur Fähigkeit zur Bindung an Ziel-Nukleotidsequenzen bei.

**[0188]** Weitere Beispiele für Sense- oder Antisense-Oligonukleotide schließen solche Oligonukleotide ein, die kovalent mit organischen Resten verbunden sind, z. B. solche wie in WO 90/10448 beschrieben, sowie weiteren Resten, die die Affinität des Oligonukleotids für eine Ziel-Nukleinsäuresequenz erhöhen, wie z. B. Poly-(L-Lysin). Noch darüber hinaus können interkalierende Agenzien, wie z. B. Ellipticin und alkylierende Agenzien oder Metallkomplexe an die Sense- oder Antisense-Oligonukleotide angefügt werden, um die Bindungsspezifitäten der Antisense- oder Sense-Oligonukleotide für die Ziel-Nukleotidsequenz zu modifizieren.

**[0189]** Antisense- oder Sense-Oligonukleotide können in eine Zelle, welche die Ziel-Nukleinsäuresequenz enthält, durch jedes beliebige Gen-Transferv Verfahren, einschließlich z. B., Lipofektion, CaPO<sub>4</sub>-vermittelter DNA-Transfektion, Elektroporation oder durch Verwendung von Gen-Transfervektoren, wie z. B. dem Epstein-Barr-Virus, eingeführt werden.

**[0190]** Sense- oder Antisense-Oligonukleotide werden vorzugsweise in eine Zelle, die eine Ziel-Nukleinsäuresequenz enthält, durch Insertion des Sense- oder Antisense-Oligonukleotids in einen geeigneten retroviralen Vektor, anschließendes Inkontaktbringen der Zelle mit dem retroviralen Vektor enthaltend die insertierte Sequenz, entweder in vivo oder ex vivo, eingeführt. Geeignete retrovirale Vektoren schließen das murine Retrovirus M-MuLV, N2 (ein Retrovirus, der von M-MuLV abgeleitet ist) oder die Double Copy-Vektoren, die DCT5A, DCT5B und DCT5C genannt werden (siehe PCT-Anmeldung US 90/02656) ein, sind jedoch nicht auf diese beschränkt.

**[0191]** Sense- oder Antisense-Oligonukleotide können außerdem in eine Zelle, die die Ziel-Nukleotidsequenz enthält, durch Bildung eines Konjugates mit einem Liganden-bindenden Molekül, wie in WO 91/04753 beschrieben, eingeführt werden. Geeignete Liganden-bindende Moleküle schließen Zelloberflächenrezeptoren, Wachstumsfaktoren, weitere Cytokine oder andere Liganden, die an Zelloberflächenrezeptoren binden, ein, sind jedoch nicht auf diese beschränkt. Vorzugsweise beeinträchtigt die Konjugation des Liganden-bindenden Moleküls die Fähigkeit des Liganden-bindenden Moleküls, an dessen entsprechendes Molekül oder Rezeptor zu binden, nicht wesentlich, oder blockiert den Eintritt des Sense- oder Antisense-Oligonukleotids oder dessen konjugierter Version in die Zelle nicht.

**[0192]** Alternativ kann ein Sense- oder ein Antisense-Oligonukleotid in eine Zelle, welche die Ziel-Nukleinsäuresequenz enthält, durch Bildung eines Oligonukleotid-Lipidkomplexes, wie in WO 90/10448 beschrieben, eingeführt werden. Der Sense- oder Antisense-Oligonukleotid-Lipidkomplex wird vorzugsweise innerhalb der Zelle durch eine endogene Lipase dissoziiert ... an einen monoklonalen Antikörper, der auf einen spezifischen Zelltyp gerichtet ist.



## VERWENDUNG VON ULBP-POLYPEPTIDEN UND FRAGMENTIERTEN POLYPEPTIDEN

**[0193]** Verwendungen hierin schließen die folgenden ein, sind jedoch nicht auf diese beschränkt:

- als Marker zur Detektierung von Krebs
- zur Verstärkung der IFN- $\gamma$ -Produktion und der NK-Zellproliferation
- zur Verstärkung der CTL-Aktivität
- zur Reinigung von Proteinen und der Aktivitätsmessung davon
- als Trägersubstanz
- als therapeutische Mittel
- zur rationalen Wirkstoffentwicklung (rational drug design)
- als Forschungsreagenzien
- als Molekulargewichtsmarker und Marker zur isoelektrischen Fokussierung
- als Kontrollen für die Peptidfragmentation
- zur Identifizierung von unbekannten Proteinen
- zur Herstellung von Antikörpern

Als Marker zur Detektion von Krebs

**[0194]** Die ULBP-DNA und -Polypeptide können als Marker zur Detektierung von Krebs [im Folgenden "ULBP-Marker"], insbesondere von B-Zell-Lymphomen verwendet werden. Im Allgemeinen stellen Krebsmarker Veränderungen in dem Phänotyp einer Zelle dar, die maligne Zellen von normalen Zellen unterscheiden. Marker können entweder an der Entstehung von Krebs beteiligt sein (wie z. B. Mutationen in Onkogenen oder Tumore-Suppressor-Genen) oder es kann sich um sekundäre Modifikationen handeln, die während des Fortschreitens des Tumors erworben werden. Siehe, z. B., Vincent T. DeVita, Jr., Samuel Hellman und Steven A. Rosenberg, *Cancer Principles & Practice of Oncology*, 159–284 (5th ed. 1997) (welche die Verwendung von Krebsmarkern beschreiben).

**[0195]** In jedem Fall erleichtert ein ULBP-Marker die Detektion, Identifizierung, Diagnose oder Prognose von Krebs, insbesondere von B-Zell-Lymphomen. Der ULBP-Marker kann verwendet werden, um maligne von benignen Neoplasien zu unterscheiden, ebenso wie zur Unterscheidung von infiltrativen reaktiven Prozessen von neoplastischen Zellen. Darüber hinaus kann der ULBP-Marker die Diagnose eines Tumors durch Identifizieren der normalen Vorläuferzellen, aus denen ein Tumor hervorgeht, durch Untersuchen der Merkmale der Gewebedifferenzierung, die von dem Tumor gezeigt werden, erleichtern. Darüber hinaus ist das Überprüfen von Zellen und Geweben auf den ULBP-Marker nützlich bei der Subtypisierung und dem Staging von Tumoren, was wichtige Informationen bezüglich der Prognose zur Verfügung stellt. Der ULBP-Marker kann außerdem zur Überwachung von Resterkrankungen oder rezidivierenden Erkrankungen nach der Behandlung verwendet werden. Schließlich kann der ULBP-Marker durch Identifizierung eines genomischen Rearrangements in normalen Geweben Patienten diagnostizieren, die eine geerbte Prädisposition zur Entwicklung von spezifischen Krebsarten aufweisen. Dagegen werden nicht ererbte oder sporadische Tumore genomische Rearrangements des ULBP-Gens nur in der Tumorable zeigen.

**[0196]** Verfahren zur Verwendung von Markern zur Krebsdetektion sind den Fachleuten auf dem Gebiet bekannt. Zum Beispiel kann ein genomisches Rearrangement, ein Kennzeichen von Krebs, unter Verwendung der ULBP-DNA nachgewiesen werden. Ein genomisches Rearrangement wird in der vorliegenden Anmeldung definiert als eine Deletion, eine Insertion, eine Translokation, eine Inversion, eine Amplifikation, eine Duplikation oder eine Punktmutation in oder nahe dem ULBP-Gen, einschließlich dem Promotor, den intronischen Sequenzen und dem 3'-untranslatierten Bereich (UTR). Verfahren zum Nachweis eines genomischen Rearrangements in neoplastischen Zellen unter Verwendung der ULBP-DNA sind dem Fachmann auf dem Gebiet bekannt und schließen Southern Hybridisierung, PCR-basierte Assays, Fluoreszenz in situ-Hybridisierung (FISH), DNA-Sequenzierungsreaktionen, Allel-spezifische Oligonukleotidhybridisierung (allelic specific oligonucleotide hybridization), RNase Protection und Assays, die auf konformationellen Unterschieden basieren, ein, wie z. B. den Einzelstrang konformationellen Polymorphismus (single-strand conformational polymorphism, SSCP), die denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE) und Enzyme, die spezifisch Mismatches zwischen Sequenzen detektieren, z. B. MutS und Resolvase, sind jedoch nicht auf diese beschränkt (siehe DeVita, S. 263–269, der die oben genannten Verfahren, die bei der Detektion von Krebs durch Marker verwendet werden, zusammenfasst). Genomische Rearrangements können außerdem durch Verwendung der ULBP-DNA, die an Glaschips befestigt sind, durch Hybridisieren einer Probe mit dem Chip nachgewiesen werden.

**[0197]** Die ULBP-DNA kann verwendet werden, um die Expression des ULBP-Gens nachzuweisen. Viele Ge-

ne, die an der Entstehung und dem Fortschreiten von Krebs beteiligt sein können oder nicht, sind entweder überexprimiert, unterexprimiert oder abwesend im Vergleich zu Expressionsmustern, die in der Zellart beobachtet werden, aus welcher der Krebs vermutlich hervorgegangen ist. Dagegen können die Expressionslevel vergleichbar mit den normalen Expressionsmustern sein; jedoch enthält die Messenger-RNA (mRNA) Mutationen wie z. B. Stopp-, Punkt- oder alternatives Splicing-Mutationen, die in dem Wildtyp-Gen nicht vorhanden sind. Der Nachweis dieser veränderten Expressionsmuster und mRNA-Spezies in einer Krebszelle kann als Marker für diese bestimmte Krebsart verwendet werden.

**[0198]** Die ULBP-Nukleotidsequenz kann verwendet werden, um Expressionsmuster und mRNA-Spezies in einer Krebszelle zu detektieren, insbesondere in B-Zell-Lymphomen. Wiederum würde der Fachmann auf dem Gebiet wissen, wie die bekannten Verfahren zu modifizieren sind, um Expressionsmuster und mRNA-Spezies des ULBP-Gens zu detektieren. Eines der Verfahren umfasst die Durchführung einer Northern Hybridisierung durch Isolieren entweder der mRNA oder der Gesamt-RNA aus einer Krebszelle und dem Sondieren (probing) mit dem ULBP-Nukleotid. Die Detektion kann außerdem durch ein auf einer Reverse Transcriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) basiertes Assay, oder durch eine Kombination aus RT-PCR und Southern Hybridisierung durchgeführt werden. Darüber hinaus können Mutationen in den mRNA-Spezies durch die oben genannten Verfahren für den Nachweis von genomischem Rearrangement detektiert werden.

**[0199]** Die in situ-Hybridisierung (ISH) ist noch ein weiteres wohlbekanntes Verfahren, das in der vorliegenden Erfindung verwendet werden kann, um ULBP-Expression und mRNA-Spezies zu detektieren (siehe DeVita, S. 267). Zum Beispiel kann in Paraffin eingebettetes Gewebe, das von einem Patienten gewonnen wurde, unter Verwendung markierter ULBP-Nukleotide, die komplementär zur mRNA sind, gescreent werden, was den Vergleich der Expressionsmuster in neoplastischen Zellen, die zu normalem Gewebe benachbart auftreten, erlaubt. Folglich kann der durchschnittliche Fachmann auf dem Gebiet durch die Offenbarung der Sequenzen der ULBPs gemäß der vorliegenden Erfindung bekannte Verfahren zur Nutzung von Markern zum Detektieren von mRNA-Spezies in normalen und Krebszellen leicht modifizieren.

**[0200]** Die ULBP-Nukleotide können nicht nur als Marker zum Nachweis von Krebs verwendet werden, sondern es können auch Assays, die ULBP-Polypeptide verwenden, entworfen werden, um Krebs zu detektieren. In einer Ausführungsform kann isoliertes und gereinigtes ULBP mit Lymphomzellen unter Bedingungen, die das Binden von ULBP-1 an Lymphomzellen erlaubt, inkubiert werden. Ungebundenes ULBP-1 kann unter Verwendung eines Waschschrittes entfernt werden und gebundenes ULBP-1 kann unter Verwendung eines anti-ULBP-1 monoklonalen Antikörpers detektiert werden (siehe Meyers et al., Leuk. and Lymph. 18: 119–122).

**[0201]** In einer weiteren Ausführungsform können Assays zur Detektion von Krebs, die Antikörper verwenden, die mit ULBP-Polypeptiden hergestellt wurden, entwickelt werden (siehe DeVita, S. 260–262). Zum Beispiel können Antikörper, die gegen ULBP-Polypeptide erzeugt wurden, in immunhistologischen Untersuchungen verwendet werden, um benigne von malignen Proliferationen zu unterscheiden. Diese immunhistologischen Untersuchungen können die Überproduktion, Unterproduktion oder Fehlkompartimentierung des ULBP-Proteins in Krebszellen im Vergleich zu den normalen Ursprungszellen nachweisen. Der Hinweis auf eine Veränderung in der Produktion des Wildtyp ULBP-Proteins kann ein Marker sein, der mit einem maligneren oder fortgeschrittenen Stadium von Krebs assoziiert ist.

**[0202]** In ähnlicher Weise können in anormaler Weise produzierte ULBP-Proteine in Proben, die aus Körperflüssigkeiten gewonnen wurden, durch Antikörper detektiert werden, die gegen das ULBP-Protein gerichtet sind. Zum Beispiel kann es sein, dass anormal produziertes ULBP-Protein nicht in der Zellmembran verbleibt und stattdessen von der Zelle in den Blutstrom des Patienten sezerniert wird. Blutproben, die von einem Patienten stammen, werden dann unter Verwendung von ULBP-Antikörpern analysiert, um die Anwesenheit von anormalem ULBP-Protein in dem Blut mit Hilfe eines Durchflusszytometers zu bestimmen. Das Vorhandensein von anormalem ULBP-Protein in dem Blutstrom kann helfen, die Therapie zu überwachen und ein Fortschreiten oder ein Rezidiv in Patienten mit Krebs, insbesondere mit B-Zell-Lymphom, zu detektieren.

#### Verstärkung der IFN- $\gamma$ -Produktion und NK-Zellproliferation

**[0203]** ULBP-Polypeptide wurden verwendet, um die IFN- $\gamma$ -Produktion und die NK-Zellproliferation in dosisabhängiger Weise zu verstärken ([Fig. 1](#) und [Fig. 2](#)). ULBP-Polypeptide können daher in Verfahren zur Verstärkung der IFN- $\gamma$ -Produktion und NK-Zellproliferation durch Inkubieren der ULBP-Polypeptide mit NK-Zellen, z. B. wie in Beispiel 5 beschrieben, verwendet werden. Der Fachmann erkennt, dass ULBP-Proteine verwendet werden können, um die IFN- $\gamma$ -Produktion und NK-Zellproliferation sowohl in vitro als auch in vivo zu verstärken. Der Fachmann wird weiterhin verstehen, dass die Verstärkung der IFN- $\gamma$ -Produktion und NK-Zellproliferation

ration durch ULBP-Polypeptide eine Immunantwort, z. B. gegen Viren, Bakterien, Parasiten und Tumore, modulieren kann.

#### Verstärkung der CTL-Aktivität

**[0204]** ULBP-Polypeptide wurden verwendet, um die CTL-Aktivität in einer dosisabhängigen Weise zu verstärken ([Fig. 3](#) und [Fig. 4](#)). Daher können die ULBP-Polypeptide in Verfahren zur Verstärkung der CTL-Aktivität durch Inkubation der ULBP-Polypeptide mit CTLs verwendet werden, z. B. wie in Beispiel 6 beschrieben. Der Fachmann erkennt, dass ULBP-Polypeptide verwendet werden können, um die CTL-Aktivität sowohl in vitro als auch in vivo zu verstärken. Der Fachmann erkennt ferner, dass die Verstärkung der CTL-Aktivität durch ULBP-Polypeptide eine Immunantwort, z. B. gegen Viren, Bakterien und Tumore, modulieren kann.

#### Reinigungsreagenzien

**[0205]** Jedes der Polypeptide gemäß der Erfindung findet Verwendung als ein Proteinreinigungsreagens. Die Polypeptide können an ein festes Trägermaterial angebracht werden und verwendet werden, um ULBP-Gegenstrukturmoleküle durch Affinitätschromatographie zu reinigen. In besonderen Ausführungsformen wird ein Polypeptid (in jeder beliebigen hierin beschriebenen Form, in der es fähig ist, ULBP-Gegenstrukturmoleküle zu binden) durch herkömmliche Verfahren an einen festen Träger angefügt. Zum Beispiel sind Chromatographiesäulen erhältlich, die funktionelle Gruppen enthalten, die mit funktionellen Gruppen auf Aminosäureseitenketten von Proteinen reagieren (Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ). Als Alternative wird ein Polypeptid/Fc-Protein (wie oben beschrieben) einer Protein A oder Protein G enthaltenden Chromatographiesäule über die Interaktion mit der Fc-Einheit beigelegt.

**[0206]** Das Polypeptid findet außerdem Verwendung bei der Reinigung oder Identifizierung von Zellen, die ULBP-Gegenstrukturmoleküle auf der Zelloberfläche exprimieren. Die Polypeptide werden an eine feste Phase wie z. B. eine Säulenchromatographiematrix oder ein ähnlich geeignetes Substrat gebunden. Zum Beispiel können magnetische Mikrosphären mit den Polypeptiden beschichtet werden und über ein magnetisches Feld in einem Inkubationsgefäß gehalten werden. Suspensionen von Zellmischungen, die ULBP-Gegenstrukturmolekül-exprimierende Zellen enthalten, werden mit der festen Phase, die das Polypeptid darauf aufweisen, in Kontakt gebracht. Zellen, die ULBP-Gegenstrukturmoleküle auf der Zelloberfläche exprimieren, binden an die fixierten Polypeptide, und ungebundene Zellen werden anschließend gewaschen.

**[0207]** Alternativ können die Polypeptide mit einer detektierbaren Komponente konjugiert werden und anschließend mit Zellen, die auf ULBP-Gegenstrukturmolekül-Expression getestet werden sollen, inkubiert werden. Nach der Inkubation wird ungebundenes markiertes Material entfernt und die Anwesenheit oder Abwesenheit der detektierbaren Komponente auf den Zellen wird bestimmt.

**[0208]** In einer weiteren Alternative werden Zellmischungen, von denen angenommen wird, dass sie Zellen enthalten, die ULBP-Gegenstrukturmoleküle exprimieren, mit biotinylierten Polypeptiden inkubiert. Die Inkubationszeiten liegen typischerweise bei wenigstens einer Dauer von einer Stunde, um ausreichende Bindung zu gewährleisten. Die resultierende Mischung wird anschließend über eine mit Avidin beschichteten Kügelchen gepackte Säule gegeben, wodurch die hohe Affinität von Biotin zu Avidin für die Bindung der gewünschten Zellen an die Kügelchen sorgt. Methoden für die Verwendung von Avidin-beschichteten Kügelchen sind bekannt (siehe Berenson et al., J. Cell. Biochem., 10D: 239, 1986). Das Waschen zur Entfernung ungebundenen Materials und die Freisetzung der gebundenen Zellen werden unter Verwendung herkömmlicher Verfahren durchgeführt.

#### Messung der Aktivität

**[0209]** Polypeptide finden außerdem Verwendung bei der Messung der biologischen Aktivität von ULBP-Gegenstrukturmolekülen im Hinblick auf ihre Bindungsaffinität. Die Polypeptide können folglich verwendet werden, wenn "Qualitätssicherungsstudien" durchgeführt werden, z. B. zur Überwachung der Lagerfähigkeit und Stabilität des Proteins unter verschiedenen Bedingungen. Zum Beispiel können die Polypeptide in einer Bindungsaffinitätsstudie verwendet werden, um die biologische Aktivität eines ULBP-Gegenstrukturmoleküls zu messen, das bei verschiedenen Temperaturen gelagert worden ist oder in verschiedenen Zelltypen hergestellt wurde. Die Proteine können außerdem verwendet werden, um zu bestimmen, ob die biologische Aktivität nach der Modifikation eines ULBP-Gegenstrukturmoleküls (z. B. durch chemische Modifikation, Trunkierung, Mutation, etc.) erhalten geblieben ist. Die Bindungsaffinität des modifizierten ULBP-Gegenstrukturmoleküls wird mit der eines nicht modifizierten ULBP-Gegenstrukturmoleküls verglichen, um irgendwelche nachteiligen Einflüsse

se der Modifikationen auf die biologische Aktivität der ULBP-Gegenstrukturmoleküle nachzuweisen. Die biologische Aktivität eines ULBP-Gegenstrukturmoleküls kann folglich ermittelt werden, bevor es z. B. in einer Forschungsstudie verwendet wird.

#### Trägersubstanz

**[02110]** Die Polypeptide können in in vitro- oder in vivo-Verfahren verwendet werden, um diagnostische oder therapeutische Mittel zu solchen Zellen oder Zellarten zu transportieren, von denen festgestellt wird, dass sie ULBP-Gegenstrukturmoleküle auf der Zelloberfläche exprimieren. Zum Beispiel bindet ULBP-1-Fc an anaplastische Lymphome. Daher kann das ULBP-1-Polypeptid an ein Toxin angefügt werden, um an Lymphomzellen zu binden und diese Zellen spezifisch zu töten. Die Methodik kann ähnlich sein wie für die erfolgreiche Verwendung eines anti-CD72 Immuntoxins, um therapieresistente B-Zelllinien-akute lymphoblastische Leukämie in SCID-Mäusen zu behandeln (Meyers et al., Leuk. and Lymph. 18: 119–122).

**[02111]** Darüber hinaus binden ULBP1-Fc und ULBP2-Fc an aktivierte T-Zellen stärker als an ruhende T-Zellen. Daher können sie, wenn sie an Toxine gebunden werden oder radioaktiv gemacht werden, verwendet werden, um aktivierte T-Zellen bei Krankheiten zu töten, in denen T-Zellen überaktiv sind (Autoimmunität), wie z. B. Lupus, multiple Sklerose, rheumatoide Arthritis, Psoriasis, Transplantatabstoßung, Graft versus Host-Krankheit. Da sie außerdem an NK-Zellen binden, können sie verwendet werden, um NK-Zellen zu töten, was bei der Behandlung von Transplantatabstoßung hilfreich wäre.

**[02112]** Detektierbare (diagnostische) und therapeutische Mittel, die an ein Polypeptid angefügt werden können, schließen Toxine, andere zytotoxische Mittel, Arzneimittel, Radionuklide, Chromophore, Enzyme, die eine colorimetrische oder fluorometrische Reaktion katalysieren und dergleichen ein, wobei das entsprechende Mittel abhängig von der vorgesehenen Anwendung ausgewählt wird, sind jedoch nicht auf diese beschränkt. Unter den Toxinen sind Ricin, Abrin, Diphtherietoxin, Exotoxin A von *Pseudomonas aeruginosa*, ribosomale inaktivierende Proteine, Mycotoxine wie z. B. Trichothecene und Derivate und Fragmente (z. B. Einzelketten) davon. Radionuklide, die für die Diagnose geeignet sind, schließen  $^{123}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$  und  $^{76}\text{Br}$  ein, sind jedoch nicht auf diese beschränkt. Beispiele für Radionuklide, die für die therapeutische Verwendung geeignet sind, sind  $^{131}\text{I}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{77}\text{Br}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{109}\text{Pd}$ ,  $^{64}\text{Cu}$  und  $^{67}\text{Cu}$ .

**[02113]** Solche Agenzien können an das Polypeptid durch jedes beliebige geeignete konventionelle Verfahren angefügt werden. Das Polypeptid umfasst funktionelle Gruppen auf Aminosäureseitenketten, die mit funktionellen Gruppen auf einem gewünschten Agens zur Reaktion gebracht werden können, um z. B. kovalente Bindungen zu bilden. Alternativ kann das Protein oder Agens derivatisiert werden, um eine reaktive funktionelle Gruppe zu erzeugen oder anzufügen. Die Derivatisierung kann das Anfügen eines der bifunktionellen Koppelungsreagenzien, die zum Anfügen von verschiedenen Molekülen an Proteine zur Verfügung stehen (Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois), umfassen. Etliche Methoden zur radioaktiven Markierung von Proteinen sind bekannt. Radionuklidmetalle können z. B. unter Verwendung eines geeigneten bifunktionellen Chelat-bildenden Mittels an Polypeptide angefügt werden.

**[02114]** Konjugate, die Polypeptide und ein geeignetes diagnostisches oder therapeutisches Mittel (vorzugsweise kovalent verbunden) umfassen, werden somit hergestellt. Die Konjugate werden in einer Menge, die für die jeweilige Anwendung geeignet ist, verabreicht oder anderswie verwendet.

#### Therapeutische Mittel

**[02115]** Die Polypeptide gemäß der Erfindung können bei der Herstellung eines Medikamentes zur Behandlung von jeglichen Funktionsstörungen, die (direkt oder indirekt) durch defekte oder nicht ausreichende Mengen der Polypeptide vermittelt werden, verwendet werden. Diese Polypeptide können einem Säuger, der von einer solchen Funktionsstörung betroffen ist, verabreicht werden.

**[02116]** Die Polypeptide können weiterhin bei der Herstellung eines Medikamentes zur Inhibierung einer biologischen Aktivität von ULBP-Gegenstrukturmolekülen in in vitro- oder in vivo-Verfahren verwendet werden. Zum Beispiel kann ein gereinigtes Polypeptid verwendet werden, um die Bindung von ULBP-Gegenstrukturmolekülen an endogene Zelloberflächenmoleküle zu inhibieren. Biologische Effekte, die aus der Bindung von ULBP-Gegenstrukturmolekülen an endogene Rezeptoren resultieren, werden dadurch inhibiert.

**[02117]** ULBP-Polypeptide können bei der Herstellung eines Medikamentes zur Behandlung einer durch ein ULBP-Gegenstrukturmolekül vermittelten Funktionsstörung verwendet werden. Solche durch ULBP-Gegen-

strukturmoleküle vermittelte Funktionsstörungen schließen Krankheitszustände ein, die (direkt oder indirekt) durch ULBP-Gegenstrukturmoleküle verursacht oder verschlimmert werden.

**[0218]** Zusammensetzungen gemäß der vorliegenden Erfindung können ein Polypeptid in jeder beliebigen hierin beschriebenen Form enthalten, wie z. B. als native Proteine, Varianten, Derivate, Oligomere und biologisch aktive Fragmente. In besonderen Ausführungsformen umfasst die Zusammensetzung ein lösliches Polypeptid oder ein Oligomer, welches lösliche ULBP-Polypeptide umfasst.

**[0219]** Zusammensetzungen, die eine wirksame Menge eines Polypeptids gemäß der Erfindung in Kombination mit weiteren Bestandteilen wie z. B. einem physiologisch annehmbaren Verdünnungsmittel, Träger oder Hilfsstoff umfassen, werden hierin zur Verfügung gestellt. Die Polypeptide können im Einklang mit bekannten Verfahren, die zur Herstellung pharmazeutisch nützlicher Zusammensetzungen verwendet werden, formuliert werden. Sie können entweder als einziger aktiver Stoff oder mit anderen bekannten aktiven Stoffen, die für eine bestimmte Indikation geeignet sind, in einer Mischung mit pharmazeutisch annehmbaren Verdünnungsmitteln (z. B. Salzlösung, Tris-HCl, Acetat und Phosphat-gepufferten Lösungen), Konservierungsmitteln (z. B. Thimerosal, Benzylalkohol, Parabene), Emulgatoren, Löslichmacher, Adjuvantien und/oder Trägerstoffen kombiniert werden. Geeignete Formulierungen für pharmazeutische Zusammensetzungen schließen solche wie in Remington's Pharmaceutical Sciences, 16. Ausgabe, 1980, Mack Publishing Company, Easton, PA, ein.

**[0220]** Darüber hinaus können solche Zusammensetzungen mit Polyethylenglycol (PEG) oder Metallionen komplexiert werden, oder in polymere Verbindungen wie z. B. Polyacetansäure, Polyglycolsäure, Hydrogele, Dextran usw. eingefügt werden, oder in Liposome, Mikroemulsionen, Mycellen, unilamellere oder multilamellere Vesikel, Erythrozyten Ghosts oder Spheroblasten aufgenommen werden. Solche Zusammensetzungen werden den physikalischen Zustand, die Löslichkeit, die Stabilität, die in vivo-Freisetzungsrates und die in vivo-Clearancerates beeinflussen und werden daher entsprechend der vorgesehenen Anwendung ausgewählt.

**[0221]** Die Zusammensetzungen gemäß der Erfindung können in jeder beliebigen geeigneten Weise verabreicht werden, z. B. topisch, parenteral oder durch Inhalation. Der Begriff "parenteral" schließt die Injektion z. B. über subkutane, intravenöse oder intramuskuläre Wege ein und schließt auch die lokalisierte Verabreichung, z. B. am Ort der Krankheit oder der Verletzung, ein. Die retardierte Freisetzung aus Implantaten ist ebenfalls vorgesehen. Der Fachmann auf dem entsprechenden Gebiet wird erkennen, dass die geeignete Dosis variieren wird, abhängig von Faktoren wie der Art der zu behandelnden Funktionsstörung, dem Körpergewicht, Alter und Allgemeinzustand des Patienten und dem Weg der Verabreichung. Vorläufige Dosen können in Übereinstimmung mit Tierversuchen bestimmt werden, und die Skalierung von Dosierungen für die Verabreichung beim Menschen wird gemäß den auf dem Gebiet akzeptierten Verfahren durchgeführt.

**[0222]** Zusammensetzungen, die Nukleinsäuren in physiologisch annehmbaren Formulierungen umfassen, sind ebenfalls vorgesehen. Die DNA kann z. B. für Injektionen formuliert werden.

#### Rationale Wirkstoffentwicklung

**[0223]** Darüber hinaus können ULBP-Polypeptide außerdem für die strukturbasierte Entwicklung von ULBP-Inhibitoren verwendet werden. Eine solche strukturbasierte Entwicklung ist auch als "rationale Wirkstoffentwicklung" (rational drug design) bekannt. Die ULBP-Polypeptide können dreidimensional z. B. durch Röntgenstrahlenkristallographie, Kernspinresonanz oder Homologie-Modeling (homology modeling), alles wohlbekannte Verfahren, analysiert werden. Die Verwendung der strukturellen Information von ULBP in Softwaresystemen zur molekularen Modellierung zur Unterstützung bei der Inhibitorentwicklung und Inhibitor-ULBP-Interaktion ist ebenfalls von der Erfindung vorgesehen. Solche ein computerunterstützte Modeling und Arzneientwicklung kann Informationen wie die Analyse der chemischen Konformation, das elektrostatische Potenzial der Moleküle, Proteinfaltung usw. verwenden. Zum Beispiel hat sich die Entwicklung von klassenspezifischen Inhibitoren von Metalloproteasen im Wesentlichen auf Versuche konzentriert, das katalytische Zinkatom zu chelatieren oder zu binden. Synthetische Inhibitoren werden im Allgemeinen so konstruiert, dass sie eine negativ geladene Komponente enthalten, an die eine Reihe von anderen Gruppen angefügt werden können, die entwickelt wurde, um in die Spezifitätstaschen der jeweiligen Protease zu passen. Ein besonderes Verfahren gemäß der Erfindung umfasst das Untersuchen der dreidimensionalen Struktur von ULBP auf mögliche Bindungsstellen für Substrate, das Synthetisieren eines neuen Moleküls, das eine vorausgesagte Reaktionsstelle beinhaltet und das Untersuchen des neuen Moleküls wie oben beschrieben.

**[0224]** Eine weitere Verwendung des Polypeptids gemäß der vorliegenden Erfindung ist ein Forschungshilfsmittel zum Untersuchen der biologischen Effekte, die aus dem Inhibieren der ULBP/ULBP-Gegenstrukturinteraktionen auf verschiedenen Zelltypen resultieren. Polypeptide können außerdem in in vitro-Assays zur Detektion von ULBP-Gegenstrukturmolekülen oder ULBP-Polypeptiden oder deren Interaktionen verwendet werden.

**[0225]** ULBP kann außerdem als Reagens verwendet werden, um (a) die Proteine zu identifizieren, an welche es bindet und welche an dem ULBP-Signaling beteiligt sind und um (b) weitere Proteine zu identifizieren, mit denen es interagieren könnte und die in die Signaltransduktionswege involviert sein würden. Diese anderen Proteine würden dann nützliche Mittel sein, um nach weiteren Inhibitoren des Signalings zu suchen. ULBP könnte durch Koppeln von rekombinantem Protein an eine Affinitätsmatrix verwendet werden oder durch Verwendung als Beute (bait) in dem 2-Hybrid-System.

**[0226]** Die Interaktion zwischen ULBP-Polypeptid und dessen Gegenstruktur ermöglicht das Screening nach kleinen Molekülen, die die ULBP-Polypeptid/ULBP-Gegenstrukturassoziation störend beeinflussen und die Aktivität von ULBP oder dessen Gegenstruktur inhibieren. Zum Beispiel kann das an der SUNY entwickelte Yeast two-Hybrid-System (beschrieben im US-Patent Nr. 5,283,173 von Fields et al.) verwendet werden, um nach Inhibitoren von ULBP wie folgt zu screenen. Das ULBP-Polypeptid und dessen Gegenstruktur oder Teile davon, die für deren Interaktion verantwortlich sind, können mit der Gal 4-DNA-Bindungsdomäne bzw. der Gal 4-Transkriptionsaktivierungsdomäne fusioniert werden und in einen Stamm eingeführt werden, der für das Wachstum auf Platten, denen Histidin fehlt, von der Gal 4-Aktivität abhängig ist. Verbindungen, die Wachstum verhindern, können zur Identifikation von ULBP-Inhibitoren gescreent werden. Alternativ kann das Screening so modifiziert werden, dass die ULBP-Polypeptid/ULBP-Polypeptidgegenstrukturinteraktion das Wachstum inhibiert, so dass die Inhibition der Interaktion das Auftreten von Wachstum erlaubt.

**[0227]** Ein weiterer, in vitro-, Ansatz zum Screenen von ULBP-Inhibition wäre, eine der Komponenten (entweder das ULBP-Polypeptid oder dessen Gegenstruktur) in Vertiefungen einer Mikrotiterplatte zu immobilisieren und einen leicht zu detektierenden Indikator an die andere Verbindung zu koppeln. Ein Inhibitor der Interaktion wird durch die Abwesenheit des detektierbaren Indikators in der Vertiefung identifiziert.

**[0228]** Darüber hinaus sind die ULBP-Polypeptide gemäß der Erfindung nützlich für die strukturbasierte Entwicklung/Konstruktion eines ULBP-Inhibitors. Solch eine Konstruktion würde die folgenden Schritte umfassen: Bestimmen der dreidimensionalen Struktur des ULBP-Polypeptids, Analysieren der dreidimensionalen Struktur der wahrscheinlichen Bindungsstellen des Substrats, Synthetisieren eines Moleküls, das eine vorhergesagte Reaktionsstelle enthält und Bestimmen der inhibierenden Aktivität des Moleküls.

**[0229]** ULBP-DNA, ULBP-Polypeptide und Antikörper gegen ULBP-Polypeptide können als Reagenzien in einer Vielzahl von Forschungsprotokollen verwendet werden. Beispiele für solche Forschungsprotokolle sind in Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Ausgabe, Bd. 1–3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989), angegeben. Zum Beispiel können diese Reagenzien als Marker für zellspezifische oder gewebsspezifische Expression von RNA oder Proteinen dienen. In ähnlicher Weise können diese Reagenzien verwendet werden, um die konstitutive und transiente Expression von ULBP-RNA oder -Polypeptiden zu untersuchen. ULBP-DNA kann verwendet werden, um die chromosomale Lokalisierung der ULBP-DNA zu bestimmen und um Gene in Bezug auf diese chromosomale Lage zu kartieren. ULBP-DNA kann außerdem verwendet werden, um die genetische Heterogenität und Herkunft durch die Verwendung von Methoden wie z. B. dem genetischen Fingerabdruck zu bestimmen, ebenso wie zur Identifizierung von Risiken, die mit genetischen Störungen assoziiert sind. ULBP-DNA kann weiterhin verwendet werden, um zusätzliche mit der ULBP-DNA verwandte Gene zu identifizieren und um evolutionäre Stammbäume basierend auf dem Vergleich von Sequenzen aufzustellen. Die ULBP-DNA und ULBP-Polypeptide können verwendet werden, um durch positive Screeningverfahren wie z. B. Southern Blotting und Immunblotting und durch negative Screeningverfahren wie z. B. Subtraktion Gene oder Proteine zu selektionieren, die homolog zu der ULBP-DNA oder ULBP-Polypeptiden sind.

Molekulargewicht, Marker für den isoelektrischen Punkt

**[0230]** Die Polypeptide der vorliegenden Erfindung können einer Fragmentierung in kleinere Peptide durch chemische und enzymatische Mittel unterzogen werden, und die so hergestellten Peptidfragmente können bei der Analyse von anderen Proteinen und Polypeptiden verwendet werden. Zum Beispiel können solche Peptidfragmente als Peptid-Molekulargewichtsmarker, als Marker für den isoelektrischen Punkt von Peptiden oder

bei der Analyse des Grades der Peptidfragmentierung verwendet werden. Folglich umfasst die Erfindung auch diese Polypeptide und Peptidfragmente, ebenso wie Kits, die bei der Bestimmung des scheinbaren Molekulargewichts und des isoelektrischen Punktes eines unbekannten Proteins nützlich sind und Kits zur Bestimmung des Grades der Fragmentierung eines unbekannten Proteins.

**[0231]** Obwohl sämtliche Verfahren der Fragmentierung von der Erfindung umfasst sind, ist die chemische Fragmentierung eine bevorzugte Ausführungsform und umfasst die Verwendung von Cyanbromid zur Spaltung unter neutralen oder sauren Bedingungen, so dass die spezifische Spaltung an Methioninresten auftritt (E. Gross, *Methods in Enz.* 11: 238–255, 1967). Dies kann weiterhin zusätzliche Schritte enthalten, wie z. B. einen Carboxymethylierungsschritt zur Umwandlung der Cysteinreste in nicht-reagierende Spezies.

**[0232]** Enzymatische Fragmentierung ist eine weitere bevorzugte Ausführungsform und umfasst die Verwendung einer Protease, wie z. B. der Asparaginylendopeptidase, Arginylendopeptidase, *Achromobacter*-Protease I, Trypsin, *Staphylococcus aureus* V8-Protease, Endoproteinase Asp-N oder Endoproteinase Lys-C unter herkömmlichen Bedingungen, um eine Spaltung an spezifischen Aminosäureresten zu erzeugen. Asparaginylendopeptidase kann spezifisch auf Carboxylseiten der Asparaginreste, die in den Polypeptiden gemäß der Erfindung vorhanden sind, spalten. Arginylendopeptidase kann spezifisch auf Carboxylseiten von Argininresten, die innerhalb dieser Polypeptide vorhanden sind, spalten. *Achromobacter*-Protease I kann spezifisch auf Carboxylseiten der Lysinreste, die in den Polypeptiden vorhanden sind, spalten (Sakiyama und Nakat, US-Patent Nr. 5,248,599; T. Masaki et al., *Biochim. Biophys. Acta* 660: 44–50, 1981; T. Masaki et al., *Biochim. Biophys. Acta* 660: 51–55, 1981). Trypsin kann spezifisch auf der Carboxylseite der Arginin- und Lysinreste spalten, die in den Polypeptiden gemäß der Erfindung vorhanden sind. Die enzymatische Fragmentierung kann außerdem mit einer Protease erfolgen, die an verschiedenen Aminosäureresten spaltet. Zum Beispiel kann die *Staphylococcus aureus* V8-Protease spezifisch auf der Carboxylseite der Asparaginsäure- und Glutaminsäurereste, die in den Polypeptiden vorhanden sind, spalten (D. W. Cleveland, *J. Biol. Chem.* 3: 1102–1106, 1977). Die Endoproteinase Asp-N kann spezifisch auf der Amino- oder Carboxylseite der Asparaginreste, die in den Polypeptiden vorhanden sind, spalten. Die Endoproteinase Lys-C kann spezifisch auf der Carboxylseite der Lysinreste spalten, die in den Polypeptiden gemäß der Erfindung vorhanden sind. Weitere enzymatische und chemische Behandlungen können in ähnlicher Weise verwendet werden, um diese Polypeptide spezifisch in ein einzigartiges Set an spezifischen Peptiden zu fragmentieren.

**[0233]** Natürlich können die Peptide und Fragmente der Polypeptide gemäß der Erfindung auch durch konventionelle rekombinante Verfahren und durch synthetische Verfahren, die auf dem Gebiet wohlbekannt sind, hergestellt werden. Im Hinblick auf rekombinante Verfahren können die Polypeptide und Peptidfragmente, die von der Erfindung umfasst sind, variable Molekulargewichte aufweisen, abhängig von der Wirtszelle, in denen sie exprimiert werden. Die Glycosylierung von Polypeptiden und Peptidfragmenten gemäß der Erfindung in verschiedenen Zellarten kann zu Abweichungen in dem Molekulargewicht dieser Teile führen, abhängig von dem Ausmaß der Modifikation. Die Größe dieser Teile kann am heterogensten bei Fragmenten von Polypeptiden, die aus dem extrazellulären Teil des Polypeptids stammen, sein. Einheitliche Polypeptide und Peptidfragmente können durch Verwendung von Polypeptiden, die gänzlich von den transmembranen Regionen und cytoplasmatischen Regionen abgeleitet sind, durch Vorbehandlung mit N-Glycanase, um Glycosylierung zu entfernen oder durch Exprimieren der Polypeptide in bakteriellen Wirten erhalten werden.

**[0234]** Das Molekulargewicht dieser Polypeptide kann außerdem durch Fusionieren zusätzlicher Peptidsequenzen sowohl an die Amino- als auch an die Carboxyl-terminalen Enden von Polypeptiden gemäß der Erfindung variiert werden. Fusionen von zusätzlichen Peptidsequenzen an die Amino- und Carboxyl-terminalen Enden von Polypeptiden gemäß der Erfindung können verwendet werden, um die Expression dieser Polypeptide zu verstärken oder bei der Reinigung der Proteine behilflich zu sein. Darüber hinaus werden Fusionen von zusätzlichen Peptidsequenzen an die Amino- und Carboxyl-terminalen Enden von Polypeptiden gemäß der Erfindung einige, im Allgemeinen jedoch nicht alle, der fragmentierten Peptide der Polypeptide, die durch enzymatische oder chemische Behandlung erzeugt wurden, verändern. Natürlich können in die Polypeptide gemäß der Erfindung unter Verwendung von molekularbiologischen Routineverfahren und molekularbiologischen bekannten Verfahren Mutationen eingeführt werden. Zum Beispiel kann eine Mutation so gestaltet sein, dass sie eine proteolytische Spaltstelle für ein spezifisches Enzym oder eine Spaltungsstelle für ein spezifisches chemisch induziertes Fragmentierungsverfahren eliminiert. Die Eliminierung der Spaltungsstelle wird den Peptidfingerabdruck des Polypeptids gemäß der Erfindung nach Fragmentierung mit spezifischen Enzymen oder chemischen Verfahren verändern.

**[0235]** Die Polypeptide und die resultierenden fragmentierten Peptide können durch Verfahren, einschließlich der Sedimentation, Elektrophorese, Chromatographie und Massenspektrometrie, analysiert werden, um deren



Molekulargewicht zu bestimmen. Da die einzigartige Aminosäuresequenz eines jeden Stückes ein Molekulargewicht spezifiziert, können diese Stücke anschließend als Molekulargewichtsmarker dienen, unter Verwendung solcher Analysemethoden, die bei der Bestimmung des Molekulargewichts eines unbekannten Proteins, Polypeptids oder Fragments davon nützlich sind. Die Molekulargewichtsmarker gemäß der Erfindung sind insbesondere als Molekulargewichtsmarker für die Abschätzung des scheinbaren Molekulargewichts von Proteinen, die ähnliche scheinbare Molekulargewichte aufweisen, geeignet und erlauben infolgedessen eine größere Genauigkeit bei der Bestimmung des scheinbaren Molekulargewichts von Proteinen.

**[0236]** Wenn sich die Erfindung auf die Verwendung von ULBP-Polypeptidfragmenten und fragmentierten Peptid-Molekulargewichtsmarker bezieht, haben diese Marker vorzugsweise wenigstens eine Größe von 10 Aminosäuren. Bevorzugter liegt die Größe dieser fragmentierten Peptid-Molekulargewichtsmarker zwischen 10 und 100 Aminosäuren. Noch bevorzugter sind fragmentierte Peptid-Molekulargewichtsmarker mit einer Größe zwischen 10 und 50 Aminosäuren und insbesondere zwischen 10 und 35 Aminosäuren. Am bevorzugtesten sind fragmentierte Peptid-Molekulargewichtsmarker mit einer Größe zwischen 10 und 20 Aminosäuren.

**[0237]** Unter den Verfahren zur Bestimmung des Molekulargewichts sind Sedimentation, Gelelektrophorese, Chromatographie und Massenspektrometrie. Eine besonders bevorzugte Ausführungsform ist die denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (U. K. Laemmli, *Nature* 227: 680–685, 1970). Herkömmlich verwendet das Verfahren zwei separate Spuren eines Gels, das Natriumdodecylsulfat und eine Konzentration von Acrylamid zwischen 6 und 20% enthält. Die Fähigkeit, gleichzeitig den Marker und die Probe unter identischen Bedingungen aufzutrennen, erlaubt eine erhöhte Genauigkeit. Es versteht sich natürlich, dass viele verschiedene Methoden für die Bestimmung des Molekulargewichts eines unbekannten Proteins unter Verwendung der Polypeptide gemäß der Erfindung verwendet werden können und dass diese Ausführungsform den Umfang der Erfindung in keiner Weise beschränkt.

**[0238]** Jedes nichtglycosylierte Polypeptid oder Fragment davon hat einen *pI*, der inhärent durch dessen einzigartige Aminosäuresequenz bestimmt wird (wobei der *pI* durch den Fachmann unter Verwendung jeglicher Computerprogramme, die für die Vorhersage der *pI*-Werte entwickelt wurden und zur Zeit erhältlich sind, berechnet werden kann, unter Verwendung jeder beliebigen wohlbekannten Aminosäure-*pKa*-Tabelle berechnet werden kann, oder empirisch gemessen werden kann). Daher können diese Polypeptide und Fragmente davon als spezifische Marker dienen, um bei der Bestimmung des isoelektrischen Punktes eines unbekannten Proteins, Polypeptids oder fragmentierten Polypeptids unter Verwendung von Methoden wie z. B. der isoelektrischen Fokussierung behilflich zu sein. Diese Polypeptid- oder fragmentierte Peptid-Marker sind insbesondere nützlich bei der Berechnung scheinbarer isoelektrischer Punkte von unbekannten Proteinen, die scheinbare isoelektrische Punkte aufweisen, die in der Nähe derer der Polypeptid- oder fragmentierten Peptid-Marker gemäß der Erfindung liegen.

**[0239]** Die Methode der isoelektrischen Fokussierung kann weiterhin mit anderen Methoden wie z. B. der Gelelektrophorese kombiniert werden, um ein Protein gleichzeitig auf Grundlage des Molekulargewichts und der Ladung aufzutrennen. Die Fähigkeit, gleichzeitig diese Polypeptid- oder fragmentierte Peptid-Marker und die unbekannten Proteine unter identischen Bedingungen aufzutrennen, erlaubt eine erhöhte Genauigkeit bei der Bestimmung des scheinbaren isoelektrischen Punktes des unbekannten Proteins. Dies ist von besonderem Interesse bei Methoden wie z. B. der zweidimensionalen Elektrophorese (T. D. Brock und M. T. Madigan, *Biology of Microorganisms* 76–77 (Prentice Hall, 6d ed. 1991)), bei denen das Wesen des Verfahrens vorschreibt, dass sämtliche Marker simultan mit dem unbekannten Protein aufgetrennt werden sollen. Außerdem können bei solchen Verfahren diese Polypeptide und fragmentierten Peptide davon bei der Bestimmung sowohl des isoelektrischen Punktes als auch des Molekulargewichts eines unbekannten Proteins oder fragmentierten Peptids behilflich sein.

**[0240]** Polypeptide und fragmentierte Peptide können unter Verwendung von zwei verschiedenen Verfahren visualisiert werden, die eine Diskriminierung zwischen dem unbekannten Protein und den Molekulargewichtsmarkern erlauben. In einer Ausführungsform können die Polypeptid- und fragmentierte Peptid-Molekulargewichtsmarker gemäß der Erfindung unter Verwendung von Antikörpern, die gegen diese Marker erzeugt wurden und von konventionellen Immunoblotting-Methoden visualisiert werden. Dieser Nachweis wird unter herkömmlichen Bedingungen durchgeführt, die nicht in dem Nachweis des unbekannten Proteins resultieren. Es versteht sich, dass es nicht möglich sein könnte, Antikörper gegen sämtliche Polypeptidfragmente gemäß der Erfindung zu erzeugen, da kleine Peptide keine immunogenen Epitope enthalten könnten. Es versteht sich weiterhin, dass nicht alle Antikörper in diesem Assay funktionieren werden; jedoch können solche Antikörper, die fähig sind, Polypeptide und Fragmente gemäß der Erfindung zu binden, unter Verwendung konventioneller Verfahren einfach ermittelt werden.



**[0241]** Das unbekannte Protein wird auch durch Verwendung eines herkömmlichen Färbeverfahrens visualisiert. Der molare Überschuss eines unbekannten Proteins gegenüber den Polypeptid- oder fragmentierten Peptid-Molekulargewichtsmarkern gemäß der Erfindung ist derart, dass das herkömmliche Färbeverfahren in erster Linie das unbekannte Protein detektiert. Die Konzentration dieser Polypeptid- oder fragmentierten Peptid-Molekulargewichtsmarker ist derart, dass eine geringe oder keine Detektion dieser Marker durch herkömmliche Färbeverfahren ermöglicht wird. Der bevorzugte molare Überschuss eines unbekannten Proteins gegenüber den Polypeptid-Molekulargewichtsmarkern gemäß der Erfindung liegt zwischen 2- und 100000-fach. Bevorzugter ist der bevorzugte molare Überschuss des unbekannten Proteins gegenüber diesen Polypeptid-Molekulargewichtsmarkern zwischen 10- und 10000-fach und insbesondere zwischen 100- und 1000-fach.

**[0242]** Es versteht sich natürlich, dass viele Verfahren zur Bestimmung und Detektion des Molekulargewichts und isoelektrischen Punktes eines unbekannten Proteins, Polypeptids und fragmentierter Peptide davon unter Verwendung dieser Polypeptid-Molekulargewichtsmarker und Peptidfragmente davon angewendet werden können, und dass diese Ausführungsformen in keinsten Weise den Umfang der Erfindung beschränken.

**[0243]** In einer weiteren Ausführungsform kann die Analyse der fortschreitenden Fragmentierung der Polypeptide gemäß der Erfindung in spezifische Peptide (D. W. Cleveland et al., J. Biol. Chem. 252: 1102–1106, 1977), z. B. durch Veränderung der Zeit oder Temperatur der Fragmentierungsreaktion, als Kontrolle für das Ausmaß der Spaltung eines unbekannten Proteins verwendet werden. Zum Beispiel erlaubt die Spaltung der gleichen Menge eines Polypeptids und eines unbekannten Proteins unter gleichen Bedingungen einen direkten Vergleich des Ausmaßes der Fragmentierung. Bedingungen, die zu der vollständigen Fragmentierung des Polypeptids führen, können auch zu der vollständigen Fragmentierung des unbekannten Proteins führen.

**[0244]** Was die spezifische Verwendung der Polypeptide und fragmentierten Peptide gemäß der Erfindung als Molekulargewichtsmarker angeht, erzeugt die Fragmentierung des Polypeptids der SEQ-ID Nr. 2, SEQ-ID Nr. 4 oder SEQ-ID Nr. 10 mit Cyanbromid ein einzigartiges Set an fragmentierten Peptid-Molekulargewichtsmarkern mit einzigartigen Molekulargewichten. Die Verteilung von Methioninresten bestimmt die Anzahl der Aminosäuren in jedem Peptid, und die einzigartige Aminosäurezusammensetzung eines jeden Peptids bestimmt dessen Molekulargewicht.

**[0245]** Außerdem hat das bevorzugte gereinigte Polypeptid gemäß der Erfindung ein berechnetes Molekulargewicht von etwa 31000 Dalton in Abwesenheit von Glycosylierung.

**[0246]** Wenn ein intaktes Protein verwendet wird, erlaubt die Verwendung dieser Polypeptid-Molekulargewichtsmarker eine erhöhte Genauigkeit bei der Bestimmung des scheinbaren Molekulargewichts von Proteinen, die ein scheinbares Molekulargewicht haben, das nahe 31000 Dalton liegt. Wenn Fragmente verwendet werden, gibt es eine erhöhte Genauigkeit bei der Bestimmung von Molekulargewichten innerhalb des Bereichs der Molekulargewichte des Fragments.

**[0247]** Schließlich können, was die Kits angeht, die von der Erfindung umfasst sind, die Bestandteile solcher Kits variiert werden, enthalten jedoch typischerweise die Polypeptid- und fragmentierten Peptid-Molekulargewichtsmarker. Außerdem können solche Kits die Polypeptide enthalten, in denen eine für die Fragmentierung notwendige Stelle entfernt wurde. Darüber hinaus können die Kits Reagenzien für die spezifische Spaltung des Polypeptids und des unbekannten Proteins durch chemische oder enzymatische Spaltung enthalten. Kits können darüber hinaus Antikörper enthalten, die gegen Polypeptide oder Fragmente davon gemäß der Erfindung gerichtet sind.

#### Identifizierung von unbekannten Proteinen

**[0248]** Wie oben dargelegt, kann ein Polypeptid- oder Peptid-Fingerabdruck in eine Datenbank eingeführt oder mit einer Datenbank von unbekannten Proteinen verglichen werden, um bei der Identifizierung des unbekannten Proteins unter Verwendung von Massenspektrometrie behilflich zu sein (W. J. Henzel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5011–5015, 1993; D. Fenyo et al., Electrophoresis 19: 998–1005, 1998). Eine Vielzahl von Computersoftwareprogrammen zur Erleichterung dieser Vergleiche ist über das Internet zugänglich, wie z. B. der Protein Prospector (Internetseite: [prospector.uscf.edu](http://prospector.uscf.edu)), Multident (Internetseite: [www.expasy.ch/sprot/multiident.html](http://www.expasy.ch/sprot/multiident.html)), PeptideSearch (Internetseite: [www.mann.embl-heidelberg.de...de-Search/FR\\_PeptideSearchForm.html](http://www.mann.embl-heidelberg.de...de-Search/FR_PeptideSearchForm.html)) und ProFound (Internetseite: [www.chait-sgi-rockefeller.edu/cgi-bin/prot-id-frag.html](http://www.chait-sgi-rockefeller.edu/cgi-bin/prot-id-frag.html)). Diese Programme erlauben dem Nutzer, die Spaltungsmittel und die Molekulargewichte der fragmentierten Peptide innerhalb einer festgelegten Toleranz zu bestimmen. Die Programme vergleichen beobachtete Molekulargewichte mit vorhergesagten Peptid-Molekulargewichten, die aus Se-

quenzdatenbanken stammen, um bei der Bestimmung der Identität des unbekannten Proteins behilflich zu sein.

**[0249]** Außerdem kann der Verdau eines Polypeptids oder Peptids unter Verwendung der Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) sequenziert werden, und die resultierende Sequenz kann mit einer Datenbank abgeglichen werden (J. K. Eng et al., J. Am. Soc. Mass Spec. 5: 976–989 (1994); M. Mann und M. Wilm, Anal. Chem. 66: 4390–4399 (1994); J. A. Taylor und R. S. Johnson, Rapid Comm. Mass Spec. 11: 1067–1075 (1997)). Rechercheprogramme, die in diesen Verfahren verwendet werden können, existieren im Internet, wie z. B. Lutfisk 97 (Internetseite: [www.lsbcc.com:70/Lutfisk97.html](http://www.lsbcc.com:70/Lutfisk97.html)) und die Protein Prospector-, Peptide Search- und ProFound-Programme, die oben beschrieben sind.

**[0250]** Das Einfügen der Sequenz eines Genes und dessen vorhergesagter Proteinsequenz und Peptidfragmente in eine Sequenzdatenbank kann daher bei der Identifizierung unbekannter Proteine unter Verwendung von Massenspektrometrie hilfreich sein.

### Antikörper

**[0251]** Antikörper, die mit den Polypeptiden gemäß der Erfindung immunologisch reagieren, werden hierin zur Verfügung gestellt. Solche Antikörper binden über die Antigenbindungsstellen des Antikörpers spezifisch an die Polypeptide (im Gegensatz zur nichtspezifischen Bindung). Folglich können die Polypeptide, Fragmente, Varianten, Fusionsproteine usw., wie oben dargelegt, als Immunogene bei der Herstellung von damit immunreaktiven Antikörpern verwendet werden.

**[0252]** In einem weiteren Aspekt gemäß der Erfindung können ULBP und Peptide, die auf der Aminosäuresequenz von ULBP basieren, verwendet werden, um Antikörper herzustellen, die spezifisch an ULBP binden. Spezifische Beispiele für solche Antikörperpräparationen sind in den Beispielen 3 und 4 hierin beschrieben. Der Begriff "Antikörper" soll polyklonale Antikörper, monoklonale Antikörper, Fragmente davon wie z. B. F(ab')<sub>2</sub>- und Fab-Fragmente, ebenso wie jegliche rekombinant hergestellte Bindungspartner einschließen. Antikörper sind als spezifisch bindend definiert, wenn sie ULBP-Polypeptid mit einer  $K_a$  größer als oder gleich etwa  $10^7 \text{ M}^{-1}$  binden. Affinitäten von Bindungspartnern oder Antikörpern können leicht unter Verwendung herkömmlicher Methoden bestimmt werden, z. B. solcher wie von Scatchard et al., Ann. N. Y. Acad. Sci. 51: 660 (1949) beschrieben.

**[0253]** Polyklonale Antikörper können leicht aus einer Vielzahl von Quellen erzeugt werden, z. B. aus Pferden, Kühen, Ziegen, Schafen, Hunden, Hühnern, Kaninchen, Mäusen oder Ratten, unter Verwendung von Verfahren, die auf dem Gebiet wohlbekannt sind. Im Allgemeinen wird gereinigtes ULBP oder ein Peptid, das auf der Aminosäuresequenz des ULBP-Polypeptids basiert und das in geeigneter Weise konjugiert ist, dem Wirtstier typischerweise über parenterale Injektion verabreicht. Die Immunogenizität des ULBP-Polypeptids kann durch die Verwendung eines Adjuvans, z. B. des Freund's kompletten oder inkompletten Adjuvans, verstärkt werden. Im Anschluss an Booster-Immunisierungen werden kleine Serumproben gewonnen und auf Reaktivität mit ULBP-Polypeptid getestet. Beispiele für verschiedene Assays, die für solche Bestimmungen nützlich sind, schließen die in Antibodies: A Laboratory Manual Harlow and Lane (Editoren), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988, beschriebenen ein; ebenso wie Verfahren, wie z. B. die Gegenstrom Immunelektrophorese (countercurrent immunoelectrophoresis, CIEP), Radioimmunassay, Radioimmunpräzipitation, Festphasen-Immunassays (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), Dot Blot-Assays und Sandwich-Assays. Siehe US-Patent-Nrn. 4,376,110 und 4,486,530.

**[0254]** Monoklonale Antikörper können leicht unter Verwendung wohlbekannter Verfahren hergestellt werden. Siehe, z. B., die Verfahren, die in den US-Patenten Nr. RE 32011, 4,902,614, 4,543,439 und 4,411,993 beschrieben werden; Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Plenum Press, Kennett, McKearn und Bechtol (eds.), 1980. Kurz beschrieben, wird den Wirtstieren, wie z. B. Mäusen, intraperitoneal wenigstens einmal und vorzugsweise wenigstens zweimal in etwa 3 Wochen-Intervallen isoliertes und gereinigtes ULBP oder konjugierte ULBP-Peptide injiziert, wahlweise in Anwesenheit eines Adjuvans. Mäusen werden anschließend durch die herkömmliche Dot Blot-Methode oder Antibody Capture (ABC) untersucht, um zu bestimmen, welches Tier am besten zur Fusion geeignet ist. Etwa zwei bis drei Wochen später wird den Mäusen ein intravenöser Boost an ULBP-Peptid oder konjugiertem ULBP-Peptid verabreicht. Die Mäuse werden später geopfert und die Milzzellen mit kommerziell erhältlichen Myelomzellen, wie z. B. Ag8.653 (ATCC), gemäß etablierten Protokollen fusioniert. Kurz beschrieben, werden die Myelomzellen mehrere Male in Medium gewaschen und mit Mauszellen in einem Verhältnis von etwa drei Milzzellen zu einer Myelomzelle fusioniert. Das Fusionsmittel kann jedes beliebige geeignete Agens, das auf dem Gebiet verwendet wird, sein,

z. B. Polyethylenglycol (PEG). Die Fusion wird auf Platten ausplattiert, die Medium enthalten, welches das selektive Wachstum der fusionierten Zellen erlaubt. Die fusionierten Zellen können etwa acht Tage wachsen gelassen werden. Überstände aus resultierenden Hybridomen werden gesammelt und auf eine Platte gegeben, die zunächst mit einem Ziegen anti-Maus Ig beschichtet ist. Im Anschluss an das Waschen wird ein Marker, wie z. B.  $^{125}\text{I}$ -ULBP, zu jeder der Vertiefungen gegeben und anschließend folgt eine Inkubation. Positive Vertiefungen können anschließend durch Autoradiographie detektiert werden. Positive Klone können in Großkultur wachsen gelassen werden, und die Überstände werden anschließend über eine Protein A-Säule (Pharmacia) gereinigt.

**[0255]** Die monoklonalen Antikörper gemäß der Erfindung können unter Verwendung alternativer Methoden, wie z. B. den von Altling-Mees et al., "Monoclonal Antibody Expression Libraries: A Rapid Alternative to Hybridomas", *Strategies in Molecular Biology* 3: 1–9 (1990) beschriebenen, hergestellt werden. In ähnlicher Weise können Bindungspartner unter Verwendung rekombinanter DNA-Methoden konstruiert werden, um die variablen Regionen eines Gens, das einen spezifischen Antikörper codiert, einzufügen. Solch ein Verfahren ist in Larrick et al., *Biotechnology*, 7: 394 (1989) beschrieben.

**[0256]** Antigen-bindende Fragmente solcher Antikörper, die mit Hilfe von herkömmlichen Verfahren hergestellt werden können, sind ebenfalls von der vorliegenden Erfindung umfasst. Beispiele für solche Fragmente schließen Fab- und  $\text{F(ab')}_2$ -Fragmente ein, sind jedoch nicht auf diese beschränkt. Antikörperfragmente und Derivate, die mit Hilfe von gentechnologischen Verfahren hergestellt werden, werden ebenfalls zur Verfügung gestellt.

**[0257]** Die monoklonalen Antikörper gemäß der vorliegenden Erfindung schließen chimäre Antikörper, z. B. humanisierte Versionen von murinen monoklonalen Antikörpern, ein. Solche humanisierten Antikörper können durch bekannte Verfahren hergestellt werden und bieten den Vorteil einer verringerten Immunogenizität, wenn die Antikörper Menschen verabreicht werden. In einer Ausführungsform umfasst ein humanisierter monoklonaler Antikörper die variable Region eines murinen Antikörpers (oder nur die Antigenbindungsstelle davon) und eine konstante Region, die von einem humanen Antikörper stammt. Alternativ kann ein humanisiertes Antikörperfragment die Antigenbindungsstelle eines murinen monoklonalen Antikörpers und ein Fragment der variablen Region (dem die Antigenbindungsstelle fehlt), das von einem humanen Antikörper stammt, umfassen. Verfahren für die Herstellung chimärer und weiter veränderter monoklonaler Antikörper schließen die in Riechmann et al. (*Nature* 332: 323, 1988), Liu et al. (*PNAS* 84: 3439, 1987), Larrick et al. (*Bio/Technology* 7: 934, 1989) und Winter und Harris (*TIPS* 14: 139, Mai 1993) beschriebenen ein. Verfahren zur transgenen Erzeugung von Antikörpern sind in GB 2,272,440, US-Patent Nm. 5,569,825 und 5,545,806 und damit verwandten Patenten, die deren Priorität beanspruchen, zu finden.

**[0258]** In einer Ausführungsform sind die Antikörper spezifisch für die Peptide gemäß der Erfindung und sind nicht mit anderen Proteinen kreuzreaktiv. Screeningverfahren, durch die solche Antikörper identifiziert werden können, sind wohlbekannt und können z. B. die Immunaффinitätschromatographie einschließen.

**[0259]** Hybridomzelllinien, die monoklonale Antikörper produzieren, die für die Polypeptide gemäß der Erfindung spezifisch sind, sind ebenfalls hierin vorgesehen. Solche Hybridome können durch herkömmliche Methoden hergestellt und identifiziert werden. Ein Verfahren zur Herstellung solch einer Hybridomzelllinie umfasst das Immunisieren eines Tieres mit einem Polypeptid; das Ernten von Milzzellen aus diesem immunisierten Tier; das Fusionieren der genannten Milzzellen mit einer Myelomzelllinie, wodurch Hybridomzellen erzeugt werden; und das Identifizieren einer Hybridomzelllinie, die einen monoklonalen Antikörper produziert, der das Polypeptid bindet. Die monoklonalen Antikörper können durch konventionelle Verfahren gewonnen werden.

**[0260]** Antikörper, die mit den Polypeptiden gemäß der Erfindung immunologisch reagieren, werden hierin zur Verfügung gestellt. Solche Antikörper binden spezifisch über die Antigenbindungsstellen des Antikörpers an die Polypeptide (im Gegensatz zur nichtspezifischen Bindung). Folglich können die Polypeptide, Fragmente, Varianten, Fusionsproteine usw., wie oben dargestellt, als "Immunogene" bei der Herstellung von damit immunologisch reagierenden Antikörpern verwendet werden. Genauer enthalten die Polypeptide, Fragmente, Varianten, Fusionsproteine usw. antigene Determinanten oder Epitope, die die Bildung von Antikörpern hervorruufen.

**[0261]** Diese antigenen Determinanten oder Epitope können entweder linear oder konformationell (diskontinuierlich) sein. Lineare Epitope sind aus einem einzigen Abschnitt von Aminosäuren des Polypeptids zusammengesetzt, während konformationelle oder diskontinuierliche Epitope aus Aminosäureabschnitten aus verschiedenen Regionen der Polypeptidkette zusammengesetzt sind, die bei der Proteinfaltung in unmittelbare

Nachbarschaft gebracht werden (C. A. Janeway, Jr. Und P. Travers, *Immuno Biology* 3: 9 (Garland Publishing Inc., 2. Ausgabe 1996)). Da gefaltete Proteine komplexe Oberflächen aufweisen, ist die Zahl vorhandener Epitope recht zahlreich; jedoch ist aufgrund der Konformation des Proteins und sterischer Hindernisse die Zahl der Antikörper, welche die Epitope tatsächlich binden, geringer als die Zahl vorhandener Epitope (C. A. Janeway, Jr. Und P. Travers, *Immuno Biology* 2: 14 (Garland Publishing Inc., 2. Ausgabe 1996)). Epitope können durch jedes beliebige auf dem Gebiet bekannte Verfahren identifiziert werden.

**[0262]** Folglich bezieht sich ein Aspekt der vorliegenden Erfindung auf die antigenen Epitope der Polypeptide gemäß der Erfindung. Solche Epitope sind nützlich zur Erzeugung von Antikörpern, insbesondere monoklonaler Antikörper, wie unten detaillierter beschrieben wird. Außerdem können die Epitope der Polypeptide gemäß der Erfindung als Forschungsreagenzien, in Assays und zur Reinigung spezifischer bindender Antikörper aus Substanzen wie z. B. polyklonalen Seren oder Überständen von kultivierten Hybridomen verwendet werden. Solche Epitope oder Varianten davon können unter Verwendung von auf dem Gebiet wohlbekannten Methoden hergestellt werden, wie z. B. der Festphasensynthese, der chemischen oder enzymatischen Spaltung eines Polypeptids oder unter Verwendung rekombinanter DNA-Technologie.

**[0263]** Was die Antikörper angeht, die durch die Epitope der Polypeptide gemäß der Erfindung erzeugt werden können, egal ob die Epitope isoliert worden sind oder Teil des Polypeptids bleiben, so können sowohl polyklonale als auch monoklonale Antikörper durch herkömmliche Verfahren hergestellt werden. Siehe, z. B., *Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Kennet et al., (eds.), Plenum Press, New York (1980); und *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow und Land (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (1988).

#### Verwendungen davon

**[0264]** Die Antikörper gemäß der Erfindung können in Assays zum Nachweis des Vorhandenseins der Polypeptide oder Fragmente gemäß der Erfindung, entweder *in vitro* oder *in vivo*, verwendet werden. Die Antikörper können außerdem bei der Reinigung von Polypeptiden oder Fragmenten gemäß der Erfindung durch Immunoaffinitätschromatographie verwendet werden.

**[0265]** Jene Antikörper, die zusätzlich die Bindung der Polypeptide gemäß der Erfindung an ULBP-Gegenstrukturmoleküle blockieren, können verwendet werden, um eine biologische Aktivität, die aus einer solchen Bindung resultiert, zu inhibieren. Solche blockierenden Antikörper können unter Verwendung jedes geeigneten Assay-Verfahrens identifiziert werden, wie z. B. durch Testen der Antikörper auf ihre Fähigkeit, die Bindung von ULBP-Polypeptiden an bestimmte Zellen, die ULBP-Gegenstrukturmoleküle exprimieren, zu inhibieren. Beispiele für solche Zellen sind NK-Zellen und zytotoxische T-Lymphocyten. Alternativ können blockierende Antikörper durch Assays zur Fähigkeit, einen biologischen Effekt zu inhibieren, der aus der Bindung eines ULBP-Gegenstrukturmoleküls an Zielzellen resultiert, identifiziert werden. Antikörper können auf ihre Fähigkeit untersucht werden, die ULBP-Gegenstrukturmolekül-vermittelte Lyse von Zellen z. B. zu inhibieren.

**[0266]** Solch ein Antikörper kann in einem *in vitro*-Verfahren verwendet oder *in vivo* verabreicht werden, um eine biologische Aktivität zu inhibieren, die durch die Entität, die den Antikörper erzeugt hat, vermittelt wird. Funktionsstörungen, die durch die Interaktion von ULBP-Gegenstrukturmolekülen mit Zelloberflächen(Bindungspartner)-Rezeptor verursacht oder (direkt oder indirekt) verschlimmert werden, können folglich behandelt werden. Ein therapeutisches Verfahren umfasst die *in vivo*-Verabreichung eines blockierenden Antikörpers an ein Säugetier in einer Menge, die wirksam ist, eine ULBP-Gegenstrukturmolekül-vermittelte biologische Aktivität zu inhibieren. Monoklonale Antikörper werden im Allgemeinen bei der Verwendung in solchen therapeutischen Verfahren bevorzugt. In einer Ausführungsform wird ein Antigen-bindendes Antikörperfragment verwendet.

**[0267]** Antikörper können auf agonistische (d. h. Liganden-nachahmende) Eigenschaften überprüft werden. Solche Antikörper induzieren bei Bindung an Zelloberflächen-ULBP-Polypeptide biologische Effekte (z. B. die Transduktion biologischer Signale), die den biologischen Effekten ähnlich sind, die induziert werden, wenn ULBP-Gegenstrukturmoleküle an Zelloberflächen-ULBP-Polypeptide binden.

**[0268]** Zusammensetzungen, die einen Antikörper umfassen, der gegen ULBP-Polypeptide gerichtet ist, sowie ein physiologisch annehmbares Verdünnungsmittel, Hilfsstoff oder Träger, werden hierin zur Verfügung gestellt. Geeignete Bestandteile solcher Zusammensetzungen sind die gleichen wie oben für Zusammensetzungen beschrieben, die ULBP-Polypeptide enthalten.

**[0269]** Ebenfalls hierin zur Verfügung gestellt werden Konjugate, die ein detektierbares (diagnostisches) oder therapeutisches Mittel enthalten, das an den Antikörper angefügt ist. Beispiele für solche Mittel sind oben dargestellt. Die Konjugate finden Anwendung in in vitro- oder in vivo-Methoden.

**[0270]** Die Ausführungsformen in der Beschreibung und den folgenden Beispielen stellen eine Veranschaulichung der Ausführungsformen gemäß der Erfindung dar und sollten nicht als den Umfang der Erfindung beschränkend ausgelegt werden. Der Fachmann erkennt, dass viele andere Ausführungsformen von der beanspruchten Erfindung umfasst sind. In den folgenden Beispielen handelt es sich bei allen Verfahren um konventionelle Verfahren, es sei denn, es ist anders angegeben.

#### BEISPIEL 1

##### Rekombinante Expression von humanem ULBP-1

**[0271]** Ein humanes ULBP-1-Fc-Konstrukt wurde auf die folgende Weise erzeugt. ULBP-1-DNA, die die extrazelluläre Domäne von humanem ULBP-1-Polypeptid (Reste 1–218) codiert, wurde durch PCR unter Verwendung eines Upstream-Primers, der eine XhoI-Stelle enthält (5'-GCAACTCGAGAGCTCCAGGTCTCAATGGCAG-3') und eines Downstream-Primers, der eine BglII-Stelle enthält (5'-GATGAGATCTGGGTTGGGTTGTGCCTGGGGCCAG-3') erzeugt. Das humane ULBP-1 DNA-Fragment wurde im Leserahmen in den pDC409-Vektor kloniert, der eine 5'-SaI-Stelle und das humane Immunglobulin Fc-Region-Mutein (beschrieben in EMBO J. 13: 3992, 1994), gefolgt von einer BglII-Stelle, enthält.

**[0272]** Das humane ULBP1-Fc Fusionspolypeptid wurde und wie in Fanslow et al., J. Immunol. 149: 655, 1992, beschrieben hergestellt und gereinigt.

**[0273]** Das humane ULBP1-LZ Fusionspolypeptid wurde unter Verwendung der Expressionsvektoren, der Transfektion und den Zellkulturmethoden, wie für das ULBP1-Fc Polypeptid verwendet, hergestellt. Für die Reinigung wird der Poly His-Tag verwendet, um das rekombinante Protein an Nickel-NTA-Harz zu binden (hergestellt von Qiagen, <http://www.qiagen.com>), gemäß den Herstellerangaben. Das Harz wird mit 30 Säulenvolumina 20 mM NaPO<sub>4</sub> pH 7,4 + 300 mM NaCl + 5 mM Imidazol gewaschen. Das rekombinante Protein wird anschließend unter Verwendung zunehmender Konzentrationen an Imidazol eluiert. Zunächst wird ein Gradient von 5–20 mM Imidazol 20 mM NaPO<sub>4</sub> pH 7,4 + 300 mM NaCl verwendet, gefolgt von 20 mM Imidazol 20 mM NaPO<sub>4</sub> pH 7,4 + 300 mM NaCl, gefolgt von einem Gradienten von 20–100 mM Imidazol 20 mM NaPO<sub>4</sub> pH 7,4 + 300 mM NaCl, gefolgt von 100 mM Imidazol 20 mM NaPO<sub>4</sub> pH 7,4 + 300 mM NaCl, gefolgt von 500 mM Imidazol 20 mM NaPO<sub>4</sub> pH 7,4 + 300 mM NaCl. Die Fraktionen werden gesammelt und durch SDS-PAGE analysiert, um solche Fraktionen zu identifizieren, die das rekombinante Protein enthalten.

#### BEISPIEL 2

##### Rekombinante Expression von humanem ULBP-2

**[0274]** Ein humanes ULBP2-Fc-Konstrukt wurde auf die folgende Weise erzeugt. ULBP-2-DNA, die die extrazelluläre Domäne von humanem ULBP-2-Polypeptid (Reste 1–223) codiert, wurde durch PCR unter Verwendung eines Upstream-Primers, der eine XhoI-Stelle enthält (5'-GATTCTCGAGTCCTTAATGGCAGCAGCC-3') und eines Downstream-Primers, der eine BamHI-Stelle enthält (5'-ACAAGGATCCCCTGAGTTGGGTTGTGCC-3'), erzeugt. Das humane ULBP-1-DNA-Fragment wurde im Leserahmen in den pDC409-Vektor kloniert, der eine 5' SaI-Stelle und das humane Immunglobulin Fc Region-Mutein (beschrieben in EMBO J. 13: 3992, 1994), gefolgt von einer BglII-Stelle, enthält, kloniert.

**[0275]** Das humane ULBP2-Fc Fusionspolypeptid wurde wie in Fanslow et al., Immunol. 149: 655, 1992, beschrieben produziert und gereinigt.

**[0276]** Das humane ULBP2-LZ Fusionspolypeptid wurde wie oben für das ULBP1-LZ Fusionspolypeptid beschrieben hergestellt und gereinigt.

#### BEISPIEL 3

##### Herstellung von Antikörpern gegen ULBP-1

**[0277]** Es wurden monoklonale Antikörper gegen ULBP-1 erzeugt. Balb/c-Mäuse wurden mit 10 µg

ULBP1-Fc (1 mg/ml Stammlösung, Charge #1) in Titermax Adjuvans (CytRx Corp., Norcross, GA) immunisiert. Die Tiere wurden zwei Wochen später mit 10 µg desselben Proteins in komplettem Freund'schen Adjuvans (Sigma) geboostet. 12 Wochen nach der zweiten Immunisierung wurde eine Maus intravenös mit 10 µg ULBP1-Fc (Charge #3) in Salzlösung geboostet. Vier Tage später wurde die Maus geopfert und die Milz und die Lymphknoten wurden mit NS1-Myelomen mit 50% PEG/DMSO-Lösung fusioniert. Die fusionierten Zellen wurden in 96-Wellplatten (Costar) mit HAT (Sigma) selektivem Medium gegeben. Hybridomüberstände wurden mit Hilfe des Antibody Capture Assays (ABC) auf Antikörperproduktion gescreent. Kurz beschrieben, wurden 96 Wellplatten (Nunc) über Nacht mit Ziege anti-Maus, IgG Fc-spezifisch (Pierce) beschichtet, anschließend viermal mit PBS gewaschen. Die Überstände wurden eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend fünfmal mit PBS gewaschen. ULBP1-Fc wurde zu jeder Vertiefung dazugegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, gefolgt von fünf Waschschritten mit PBS. Ziege anti-humanes Ig, Fc-Fragment-spezifisch (Jackson) wurde dazugegeben und eine Stunde lang inkubiert, gefolgt von fünf Waschschritten mit PBS. Die Platten wurden mit TMB-Substrat (KPL) entwickelt und auf einem Plattenlesegerät bei 650 nm ausgewertet. Positive Vertiefungen wurden anschließend gegen irrelevantes Fc-Protein gescreent, um Antikörper, die gegen humanes Fc reaktiv sind, zu entfernen. Sie wurden weiterhin mit Hilfe von Durchfluss-Zytometrie auf die Bindung an mit ULBP-1 transfizierte CV-1-Zellen gescreent. Positive Hybridome wurden mit Hilfe von Verfahren zur Titration und limitierenden Verdünnung kloniert und in Großkulturen wachsen gelassen. Überstände wurden über eine Protein A-Säule (Bio-Rad) gereinigt und bei -20°C gelagert.

#### BEISPIEL 4

##### Herstellung von Antikörpern gegen ULBP-2

**[0278]** Es wurden monoklonale Antikörper gegen ULBP-2 erzeugt. Balb/c-Mäuse wurden mit 10 µg ULBP2-Fc in Titermax Adjuvans (CytRX Corp., Norcross, GA) immunisiert. Die Tiere wurden zwei Wochen später mit 10 µg des gleichen Proteins in komplettem Freund'schen Adjuvans (Sigma) geboostet. Acht Wochen nach der zweiten Immunisierung wurde eine Maus intravenös mit 6 µg ULBP-Fc in Salzlösung geboostet. Vier Tage später wurde die Maus geopfert und die Milz und die Lymphknoten wurden mit NS1-Myelomen mit 50% PEG/DMSO-Lösung fusioniert. Die fusionierten Zellen wurden in 96 Wellplatten (Costar) mit HAT (Sigma) selektivem Medium ausplattiert. Hybridom überstände wurden auf Antikörperproduktion durch Antibody Capture Assay (ABC) gescreent. Kurz beschrieben, wurden 96 Wellplatten (Nunc) über Nacht mit Ziege anti-Maus IgG, Fc-spezifisch, (Pierce) beschichtet, anschließend viermal mit PBS gewaschen. Die Überstände wurden eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend fünfmal mit PBS gewaschen. ULBP2-Fc wurde zu jeder Vertiefung dazugegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, gefolgt von fünf Waschschritten mit PBS. Ziege anti-humanes Ig, Fc-Fragment-spezifisch, (Jackson) wurde dazugegeben und eine Stunde lang inkubiert, gefolgt von fünf Waschschritten mit PBS. Die Platten wurden mit TMB-Substrat (KPL) entwickelt und auf einem Plattenlesegerät bei 650 nm ausgewertet. Positive Vertiefungen wurden anschließend gegen irrelevantes Fc-Protein gescreent, um Antikörper, die gegen humanes Fc reaktiv sind, zu entfernen. Sie wurden außerdem mit Hilfe von Durchfluss-Zytometrie auf Bindung an CON-Astimulierte T-Zellen und durch Immunpräzipitation von ULBP-2 transfizierten CV-1-Zellen gescreent. Positive Hybridome wurden mit Hilfe von Verfahren der Titration und limitierenden Verdünnung kloniert und in Großkulturen wachsen gelassen. Überstände wurden über eine Protein A-Säule (Bio-Rad) gereinigt und bei -20°C gelagert. Gereinigter Antikörper wurde mit Hilfe des ELISA-Capture Assays (Maus MonoAb-ID-Kit, Zymed) isotypisiert.

#### BEISPIEL 5

##### ULBP-vermittelte Verstärkung der IFN-γ-Produktion und der NK-Zellproliferation

**[0279]** NK-Zellen wurden nach Kurzzeitkultivierung von Lymphozyten aus peripherem Blut wie zuvor beschrieben (B. Perussia et al., Nat. Immun. Cell Growth Regulat. 6: 171–188, 1987) erzeugt. Weitere Anreicherung wurde mit Hilfe von negativer Selektion durch Verwendung des magnetischen Zellseparierers und magnetischen Kügelchen (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) gemäß dem Herstellerprotokoll erhalten. Dieses Verfahren resultiert in einer Population von > 95% CD3-, CD16+, CD56+ NK-Zellen, wie durch FACS-Analyse, die nach Färben der Zellen mit dem entsprechenden PE-konjugierten monoklonalen Antikörpern (Pharmingen) durchgeführt wurde, festgestellt wurde.

**[0280]** Gereinigte NK-Zellen wurden mit 50 ng/ml IL-15 (Immunex Corp.) 20 Stunden lang in RPMI1640-Medium enthaltend 10% FCS, ergänzt mit Antibiotika und Glutamin, in einen 37°C befeuchteten Inkubator mit 5% CO<sub>2</sub>, bei einer Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml stimuliert. Nach drei Waschschritten mit PBS wurden die Zellen in RPMI1640-Medium, enthaltend 10% FCS, ergänzt mit Antibiotika und Glutamin, dreifach in einer 96

Well-Platte mit einer Konzentration von 100000 Zellen/Vertiefung in 250 µl Volumen, in der Anwesenheit von rIL-12 (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN) mit einer Konzentration von 1 ng/ml, allein oder mit den Konzentrationen von ULBP1-LZ oder ULBP2-LZ wie in den [Fig. 1](#) und [Fig. 2](#) angegeben, kultiviert.

**[0281]** Nach 48 Stunden Kultivierung wurden die zellfreien Überstände unter Verwendung eines IFN-γ-spezifischen ELISAs unter Verwendung von B133.1 monoklonalen und P3 polyklonalen anti-humanen IFN-γ-Antikörpern auf IFN-γ-Konzentration überprüft. Die Ergebnisse sind in [Fig. 1](#) gezeigt. Um die Zellproliferation zu evaluieren, wurden die NK-Zellen nach 48 Stunden Kultivierung für die letzten 16 Stunden mit 30 µl Medium enthaltend 40 µCi/ml [Methyl-<sup>3</sup>H]Thymidin gepulst, geerntet und in einem Beta-Zähler (Packard) gezählt. Die Ergebnisse sind in [Fig. 2](#) gezeigt.

#### BEISPIEL 6

##### ULBP-vermittelte Verstärkung der CTL-Aktivität

**[0282]** Mononukleäre Zellen aus peripherem Blut (PBMC) wurden aus heparinisiertem Blut durch Zentrifugation über Ficoll-Hypaque isoliert und dreimal in Kulturmedium (RPMI 1640, angereichert mit 10% hitzeinaktiviertem fötalem bovinem Serum, 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin und 2 mM Glutamin) gewaschen. Eine Million bestrahlter (3500 rad) Effektorzellen wurden mit einer Million Responderzellen und ULBP1-LZ- oder ULBP2-LZ-Proteinen mit einer Konzentration wie in den [Fig. 3](#) und [Fig. 4](#) angegeben kokultiviert. Die Kulturen wurden in einem Gesamtvolumen von 2 ml Kulturmedium bei 37°C in einer feuchten Atmosphäre von 5% CO<sub>2</sub> 7 Tage lang ausgeführt. Zu diesem Zeitpunkt wurden die kultivierten Zellen gewaschen und in einem 4 stündigen Chrom-Freisetzungssassay (chromium release assay) eingesetzt, um die cytolytische Aktivität gegen <sup>51</sup>Cr-markierte PHA-Blasten von Tag 3 wie zuvor beschrieben zu untersuchen (M. R. Alderson, H. M. Sassenfeld und M. B. Widmer, J. Exp. Med. 172: 577–587, 1990). Die Ergebnisse sind in den [Fig. 3](#) und [Fig. 4](#) gezeigt und als prozentspezifische <sup>51</sup>Cr-Freisetzung von Vertiefungen, die Serien verdünnter Responderzellen und eine festgelegte Anzahl von Targetzellen enthalten, dargestellt.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> COSMAN, David J.

MULLBERG, Jurgen H.

FANSLow III, William C.

<120> ULBP DNA UND POLYPEPTIDE

<130> 03260.0040-00304

<140>

<141>

<150> 60/069.857

<151> 1997-12-17

<150> 60/092.946

<151> 1998-07-15

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 735

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

atggcagcgg cgcgcagccc cgccttcctt ctgtgcctcc cgcttctgca cctgctgtct 60  
ggctgggtccc gggcaggatg ggtcgacaca cactgtcttt gctatgactt catcatcact 120  
cctaagtcca gacctgaacc acagtgggtg gaagttcaag gcctgggtgga tgaaaggcct 180  
tttcttcact atgactgtgt taaccacaag gccaaagcct ttgcttctct ggggaagaaa 240  
gtcaatgtca caaaaacctg ggaagaacaa actgaaacac taagagacgt ggtggatttc 300  
cttaaagggc aactgcttga cattcaagtg gagaatttaa taccattga gccctcacc 360  
ctgcaggcca ggatgtcttg tgagcatgaa gcccatggac acggcagagg atcttggcag 420  
ttcctcttca atggacagaa gtctctcttc ttgactcaa acaacagaaa gtggacagca 480



cttcacctcg gagccaagaa gatgacagag aagtgggaga agaacagggg tgtgaccatg 540  
 ttcttcacga agatttcact gggggattgt aagatgtggc ttgaagaatt tttgatgtac 600  
 tgggaacaaa tgcctgatcc aacaaaacca cctctctctg cccacaggac aacccaaccc 660  
 aaggccatgg ccaccacccct cagtcctctg agccttctca tcatcttctt ctgcttcatt 720  
 ctagctggca gatga 735

<210> 2

<211> 244

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Ala Ala Ala Ser Pro Ala Phe Leu Leu Cys Leu Pro Leu Leu  
 1 5 10 15

His Leu Leu Ser Gly Trp Ser Arg Ala Gly Trp Val Asp Thr His Cys  
 20 25 30

Leu Cys Tyr Asp Phe Ile Ile Thr Pro Lys Ser Arg Pro Glu Pro Gln  
 35 40 45

Trp Cys Glu Val Gln Gly Leu Val Asp Glu Arg Pro Phe Leu His Tyr  
 50 55 60

Asp Cys Val Asn His Lys Ala Lys Ala Phe Ala Ser Leu Gly Lys Lys  
 65 70 75 80

Val Asn Val Thr Lys Thr Trp Glu Glu Gln Thr Glu Thr Leu Arg Asp  
 85 90 95

Val Val Asp Phe Leu Lys Gly Gln Leu Leu Asp Ile Gln Val Glu Asn  
 100 105 110

Leu Ile Pro Ile Glu Pro Leu Thr Leu Gln Ala Arg Met Ser Cys Glu  
 115 120 125

His Glu Ala His Gly His Gly Arg Gly Ser Trp Gln Phe Leu Phe Asn

130

135

140

Gly Gln Lys Phe Leu Leu Phe Asp Ser Asn Asn Arg Lys Trp Thr Ala

145

150

155

160

Leu His Pro Gly Ala Lys Lys Met Thr Glu Lys Trp Glu Lys Asn Arg

165

170

175

Asp Val Thr Met Phe Phe Gln Lys Ile Ser Leu Gly Asp Cys Lys Met

180

185

190

Trp Leu Glu Glu Phe Leu Met Tyr Trp Glu Gln Met Leu Asp Pro Thr

195

200

205

Lys Pro Pro Ser Leu Ala Pro Gly Thr Thr Gln Pro Lys Ala Met Ala

210

215

220

Thr Thr Leu Ser Pro Trp Ser Leu Leu Ile Ile Phe Leu Cys Phe Ile

225

230

235

240

Leu Ala Gly Arg

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 741

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 3

atggcagcag ccgccgetac caagatcctt ctgtgcctcc cgcttctgct cctgctgtcc 60  
 ggctggtccc gggctgggag agccgaccct cactctcttt gctatgacat caccgtcatc 120  
 cctaagtcca gacctggacc acggtggtgt gcggttcaag gccaggtgga tgaaaagact 180  
 ttcttctact atgactgtgg caacaagaca gtcacacctg tcagtccctt ggggaagaaa 240  
 ctaaattgca caacggcctg gaaagcacag aaccagtagc tgagagaggt ggtggacata 300  
 cttacagagc aactgcgtga cattcagctg gagaattaca caccgaagga acccctcacc 360  
 ctgcaggcaa ggatgtcttg tgagcagaaa gctgaaggac acagcagtag atcttggcag 420

ttcagtttcg atgggcagat ctctctctc ttgactcag agaagagaat gtggacaacg 480  
 gttcatcctg gagccagaaa gatgaaagaa aagtgggaga atgacaaggt tgtggccatg 540  
 tccttccatt acttctcaat gggagactgt ataggatggc ttgaggactt cttgatgggc 600  
 atggacagca ccctggagcc aagtgcagga gcaccactcg ccatgtctc aggcacaacc 660  
 caactcaggg ccacagccac caccctcacc ctttctgcc tctcatcat cctccccctgc 720  
 ttcacctcc ctggcatctg a 741

<210> 4

<211> 246

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Ala Ala Ala Ala Thr Lys Ile Leu Leu Cys Leu Pro Leu Leu

1 5 10 15

Leu Leu Leu Ser Gly Trp Ser Arg Ala Gly Arg Ala Asp Pro His Ser

20 25 30

Leu Cys Tyr Asp Ile Thr Val Ile Pro Lys Phe Arg Pro Gly Pro Arg

35 40 45

Trp Cys Ala Val Gln Gly Gln Val Asp Glu Lys Thr Phe Leu His Tyr

50 55 60

Asp Cys Gly Asn Lys Thr Val Thr Pro Val Ser Pro Leu Gly Lys Lys

65 70 75 80

Leu Asn Val Thr Thr Ala Trp Lys Ala Gln Asn Pro Val Leu Arg Glu

85 90 95

Val Val Asp Ile Leu Thr Glu Gln Leu Arg Asp Ile Gln Leu Glu Asn

100 105 110

Tyr Thr Pro Lys Glu Pro Leu Thr Leu Gln Ala Arg Met Ser Cys Glu

115 120 125

Gln Lys Ala Glu Gly His Ser Ser Gly Ser Trp Gln Phe Ser Phe Asp  
 130 135 140

Gly Gln Ile Phe Leu Leu Phe Asp Ser Glu Lys Arg Met Trp Thr Thr  
 145 150 155 160

Val His Pro Gly Ala Arg Lys Met Lys Glu Lys Trp Glu Asn Asp Lys  
 165 170 175

Val Val Ala Met Ser Phe His Tyr Phe Ser Met Gly Asp Cys Ile Gly  
 180 185 190

Trp Leu Glu Asp Phe Leu Met Gly Met Asp Ser Thr Leu Glu Pro Ser  
 195 200 205

Ala Gly Ala Pro Leu Ala Met Ser Ser Gly Thr Thr Gln Leu Arg Ala  
 210 215 220

Thr Ala Thr Thr Leu Ile Leu Cys Cys Leu Leu Ile Ile Leu Pro Cys  
 225 230 235 240

Phe Ile Leu Pro Gly Ile  
 245

<210> 5

<211> 450

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> PEPTID

<222> (1) .. (219)

<223> ULBP-1 Sequenzen

<220>

<221> PEPTID

&lt;222&gt; (220) . (450)

&lt;223&gt; Humane Ig Fc-Sequenzen

&lt;400&gt; 5

Met Ala Ala Ala Ala Ser Pro Ala Phe Leu Leu Cys Leu Pro Leu Leu

1 5 10 15

His Leu Leu Ser Gly Trp Ser Arg Ala Gly Trp Val Asp Thr His Cys

20 25 30

Leu Cys Tyr Asp Phe Ile Ile Thr Pro Lys Ser Arg Pro Glu Pro Gln

35 40 45

Trp Cys Glu Val Gln Gly Leu Val Asp Glu Arg Pro Phe Leu His Tyr

50 55 60

Asp Cys Val Asn His Lys Ala Lys Ala Phe Ala Ser Leu Gly Lys Lys

65 70 75 80

Val Asn Val Thr Lys Thr Trp Glu Glu Gln Thr Glu Thr Leu Arg Asp

85 90 95

Val Val Asp Phe Leu Lys Gly Gln Leu Leu Asp Ile Gln Val Glu Asn

100 105 110

Leu Ile Pro Ile Glu Pro Leu Thr Leu Gln Ala Arg Met Ser Cys Glu

115 120 125

His Glu Ala His Gly His Gly Arg Gly Ser Trp Gln Phe Leu Phe Asn

130 135 140

Gly Gln Lys Phe Leu Leu Phe Asp Ser Asn Asn Arg Lys Trp Thr Ala

145 150 155 160

Leu His Pro Gly Ala Lys Lys Met Thr Glu Lys Trp Glu Lys Asn Arg

165 170 175

Asp Val Thr Met Phe Phe Gln Lys Ile Ser Leu Gly Asp Cys Lys Met  
 180 185 190  
 Trp Leu Glu Glu Phe Leu Met Tyr Trp Glu Gln Met Leu Asp Pro Thr  
 195 200 205  
 Lys Pro Pro Ser Leu Ala Pro Gly Thr Thr Gln Pro Arg Ser Cys Asp  
 210 215 220  
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala  
 225 230 235 240  
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
 245 250 255  
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
 260 265 270  
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
 275 280 285  
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg  
 290 295 300  
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
 305 310 315 320  
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu  
 325 330 335  
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
 340 345 350  
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
 355 360 365  
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

370

375

380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
 385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp  
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 435 440 445

Gly Lys  
 450

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 453

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; PEPTID

&lt;222&gt; (1)..(223)

&lt;223&gt; ULBP-2 Sequenzen

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; PEPTID

&lt;222&gt; (224)..(453)

&lt;223&gt; Humane Ig Fc-Sequenzen

&lt;400&gt; 6

Met Ala Ala Ala Ala Ala Thr Lys Ile Leu Leu Cys Leu Pro Leu Leu  
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Ser Gly Trp Ser Arg Ala Gly Arg Ala Asp Pro His Ser  
 20 25 30

Leu Cys Tyr Asp Ile Thr Val Ile Pro Lys Phe Arg Pro Gly Pro Arg  
 35 40 45

Trp Cys Ala Val Gln Gly Gln Val Asp Glu Lys Thr Phe Leu His Tyr  
 50 55 60

Asp Cys Gly Asn Lys Thr Val Thr Pro Val Ser Pro Leu Gly Lys Lys  
 65 70 75 80

Leu Asn Val Thr Thr Ala Trp Lys Ala Gln Asn Pro Val Leu Arg Glu  
 85 90 95

Val Val Asp Ile Leu Thr Glu Gln Leu Arg Asp Ile Gln Leu Glu Asn  
 100 105 110

Tyr Thr Pro Lys Glu Pro Leu Thr Leu Gln Ala Arg Met Ser Cys Glu  
 115 120 125

Gln Lys Ala Glu Gly His Ser Ser Gly Ser Trp Gln Phe Ser Phe Asp  
 130 135 140

Gly Gln Ile Phe Leu Leu Phe Asp Ser Glu Lys Arg Met Trp Thr Thr  
 145 150 155 160

Val His Pro Gly Ala Arg Lys Met Lys Glu Lys Trp Glu Asn Asp Lys  
 165 170 175

Val Val Ala Met Ser Phe His Tyr Phe Ser Met Gly Asp Cys Ile Gly  
 180 185 190

Trp Leu Glu Asp Phe Leu Met Gly Met Asp Ser Thr Leu Glu Pro Ser  
 195 200 205

Ala Gly Ala Pro Leu Ala Met Ser Ser Gly Thr Thr Gln Leu Arg Arg



210

215

220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala

225

230

235

240

Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr

245

250

255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val

260

265

270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val

275

280

285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser

290

295

300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu

305

310

315

320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala

325

330

335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro

340

345

350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln

355

360

365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala

370

375

380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr

385

390

395

400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu

405

410

415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
 420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
 435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys  
 450

<210> 7

<211> 270

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> PEPTID

<222> (225) .. (257)

<223> Leucin Zipper-Motiv

<220>

<221> PEPTID

<222> (1) .. (19)

<223> Humanes Ig Kappa-Signalpeptid

<220>

<221> PEPTID

<222> (265) .. (270)

<223> Polyhistidin

<220>

<221> PEPTID

<222> (258) .. (264)

<223> Spacer

<220>

&lt;221&gt; PEPTID

&lt;222&gt; (20)..(218)

&lt;223&gt; ULBP-1 Sequenzen

.

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; PEPTID

&lt;222&gt; (219)..(224)

&lt;223&gt; Spacer

&lt;400&gt; 7

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Trp Ser Arg Ala Gly Trp Val Asp Thr His Cys Leu

20 25 30

Cys Tyr Asp Phe Ile Ile Thr Pro Lys Ser Arg Pro Glu Pro Gln Trp

35 40 45

Cys Glu Val Gln Gly Leu Val Asp Glu Arg Pro Phe Leu His Tyr Asp

50 55 60

Cys Val Asn His Lys Ala Lys Ala Phe Ala Ser Leu Gly Lys Lys Val

65 70 75 80

Asn Val Thr Lys Thr Trp Glu Glu Gln Thr Glu Thr Leu Arg Asp Val

85 90 95

Val Asp Phe Leu Lys Gly Gln Leu Leu Asp Ile Gln Val Glu Asn Leu

100 105 110

Ile Pro Ile Glu Pro Leu Thr Leu Gln Ala Arg Met Ser Cys Glu His

115 120 125

Glu Ala His Gly His Gly Arg Gly Ser Trp Gln Phe Leu Phe Asn Gly

130 135 140

Gln Lys Phe Leu Leu Phe Asp Ser Asn Asn Arg Lys Trp Thr Ala Leu  
 145 150 155 160

His Pro Gly Ala Lys Lys Met Thr Glu Lys Trp Glu Lys Asn Arg Asp  
 165 170 175

Val Thr Met Phe Phe Gln Lys Ile Ser Leu Gly Asp Cys Lys Met Trp  
 180 185 190

Leu Glu Glu Phe Leu Met Tyr Trp Glu Gln Met Leu Asp Pro Thr Lys  
 195 200 205

Pro Pro Ser Leu Ala Pro Gly Thr Thr Gln Pro Arg Ser Gly Ser Ser  
 210 215 220

Arg Met Lys Gln Ile Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys Ile  
 225 230 235 240

Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu  
 245 250 255

Arg Gly Thr Ser Ser Arg Gly Ser His His His His His His  
 260 265 270

<210> 8

<211> 274

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> PEPTID

<222> (1) .. (223)

<223> ULBP-2 Sequenzen

<220>

<221> PEPTID

&lt;222&gt; (224)..(229)

&lt;223&gt; Spacer

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; PEPTID

&lt;222&gt; (230)..(261)

&lt;223&gt; Leucin Zipper-Motiv

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; PEPTID

&lt;222&gt; (262)..(268)

&lt;223&gt; Spacer

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; PEPTID

&lt;222&gt; (269)..(274)

&lt;223&gt; Polyhistidin

&lt;400&gt; 8

Met Ala Ala Ala Ala Thr Lys Ile Leu Leu Cys Leu Pro Leu Leu

1

5

10

15

Leu Leu Leu Ser Gly Trp Ser Arg Ala Gly Arg Ala Asp Pro His Ser

20

25

30

Leu Cys Tyr Asp Ile Thr Val Ile Pro Lys Phe Arg Pro Gly Pro Arg

35

40

45

Trp Cys Ala Val Gln Gly Gln Val Asp Glu Lys Thr Phe Leu His Tyr

50

55

60

Asp Cys Gly Asn Lys Thr Val Thr Pro Val Ser Pro Leu Gly Lys Lys

65

70

75

80

Leu Asn Val Thr Thr Ala Trp Lys Ala Gln Asn Pro Val Leu Arg Glu

85

90

95

Val Val Asp Ile Leu Thr Glu Gln Leu Arg Asp Ile Gln Leu Glu Asn  
 100 105 110

Tyr Thr Pro Lys Glu Pro Leu Thr Leu Gln Ala Arg Met Ser Cys Glu  
 115 120 125

Gln Lys Ala Glu Gly His Ser Ser Gly Ser Trp Gln Phe Ser Phe Asp  
 130 135 140

Gly Gln Ile Phe Leu Leu Phe Asp Ser Glu Lys Arg Met Trp Thr Thr  
 145 150 155 160

Val His Pro Gly Ala Arg Lys Met Lys Glu Lys Trp Glu Asn Asp Lys  
 165 170 175

Val Val Ala Met Ser Phe His Tyr Phe Ser Met Gly Asp Cys Ile Gly  
 180 185 190

Trp Leu Glu Asp Phe Leu Met Gly Met Asp Ser Thr Leu Glu Pro Ser  
 195 200 205

Ala Gly Ala Pro Leu Ala Met Ser Ser Gly Thr Thr Gln Leu Arg Gly  
 210 215 220

Ser Gly Ser Ser Arg Met Lys Gln Ile Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile  
 225 230 235 240

Leu Ser Lys Ile Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys  
 245 250 255

Leu Ile Gly Glu Arg Gly Thr Ser Ser Arg Gly Ser His His His His  
 260 265 270

His His

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 950

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 9

```

agccccgcga tccttcgcgc cctcgcgatt cttccgtacc tgctattcga ctggtccggg 60
acggggcggg ccgacgtca ctctctctgg tataacttca ccatcattca ttgcccaga 120
catgggcaac agtgggtgtga ggtccagagc cagggtggatc agaagaattt tctctcctat 180
gactgtggca gtgacaaggt cttatcraag ggtcacctag aagagcagct gtatgccaca 240
gatgcctggg gaaaacaact ggaaatgctg agagaggtgg ggcagaggct cagactggaa 300
ctggctgaca ctgagctgga ggatitcaca ccagtggaac ccctcacgct gcaggtcagg 360
atgtcttgtg agtgtgaagc cgatggatac atccgtggat cttggcagtt cagcttcgat 420
ggacggaagt tcctcctctt tgactcaaac aacagaaagt ggacagtggg tcacgctgga 480
gccaggcgga tgaaagagaa gtgggagaag gatagcggac tgaccacctt cttcaagatg 540
gtctcaatga gagactgcaa gagctggctt agggacttcc tgatgcacag gaagaagagg 600
ctggaacca cagcaccacc caccatggcc ccaggcttag ctcaacccaa agccatagcc 660
accaccctca gtccctggag cttcctcacc atcctctgct tcacctctcc tggcatctga 720
gaagagtcac ttagagtga aggtggaagg tgatatcaag aagcctctgt tagcctgggc 780
tggttcctgc tctcccttca gggaggccgc ctgtctactc accactgtgc ctttctggaa 840
agcaggagtt caagccttag caagcccaga ggcggccagc agatgatgag gacattgtcg 900
gctcaacgct tcaggccact cattaccttc gctcatgac ccagcagcca 950

```

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 239

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 10

Ser Pro Ala Ile Leu Pro Arg Leu Ala Ile Leu Pro Tyr Leu Leu Phe

1	5	10	15
---	---	----	----

Asp Trp Ser Gly Thr Gly Arg Ala Asp Ala His Ser Leu Trp Tyr Asn

20	25	30
----	----	----

Phe Thr Ile Ile His Leu Pro Arg His Gly Gln Gln Trp Cys Glu Val

35	40	45
----	----	----

Gln Ser Gln Val Asp Gln Lys Asn Phe Leu Ser Tyr Asp Cys Gly Ser

50

55

60

Asp Lys Val Leu Ser Met Gly His Leu Glu Glu Gln Leu Tyr Ala Thr

65

70

75

80

Asp Ala Trp Gly Lys Gln Leu Glu Met Leu Arg Glu Val Gly Gln Arg

85

90

95

Leu Arg Leu Glu Leu Ala Asp Thr Glu Leu Glu Asp Phe Thr Pro Ser

100

105

110

Gly Pro Leu Thr Leu Gln Val Arg Met Ser Cys Glu Cys Glu Ala Asp

115

120

125

Gly Tyr Ile Arg Gly Ser Trp Gln Phe Ser Phe Asp Gly Arg Lys Phe

130

135

140

Leu Leu Phe Asp Ser Asn Asn Arg Lys Trp Thr Val Val His Ala Gly

145

150

155

160

Ala Arg Arg Met Lys Glu Lys Trp Glu Lys Asp Ser Gly Leu Thr Thr

165

170

175

Phe Phe Lys Met Val Ser Met Arg Asp Cys Lys Ser Trp Leu Arg Asp

180

185

190

Phe Leu Met His Arg Lys Lys Arg Leu Glu Pro Thr Ala Pro Pro Thr

195

200

205

Met Ala Pro Gly Leu Ala Gln Pro Lys Ala Ile Ala Thr Thr Leu Ser

210

215

220

Pro Trp Ser Phe Leu Ile Ile Leu Cys Phe Ile Leu Pro Gly Ile

225

230

235

### Patentansprüche

1. Isoliertes Nukleinsäuremolekül, das die DNA-Sequenz der SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 oder SEQ ID NO:9 umfasst.

2. Isoliertes Nukleinsäuremolekül, das eine Aminosäuresequenz kodiert, welche die Sequenz der SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 oder SEQ ID NO:10 umfasst.



3. Isoliertes Nukleinsäuremolekül, das mit einem der beiden Stränge einer denaturierten, doppelsträngigen DNA hybridisiert, die die Nukleinsäuresequenz gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2 umfasst, unter Bedingungen moderater Stringenz in 50% Formamid und  $6 \times \text{SSC}$ , bei  $42^\circ\text{C}$ , bei Waschbedingungen von  $60^\circ\text{C}$ ,  $0,5 \times \text{SSC}$ ,  $0,1\%$  SDS und wobei das genannte Nukleinsäuremolekül eine Aminosäuresequenz kodiert, die wenigstens 90% Identität mit der SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 oder SEQ ID NO:10 aufweist, wobei ein Polypeptid, das aus der genannten Aminosäuresequenz besteht, die zytotoxische T-Lymphozytenaktivität verstärken kann.

4. Das Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 3, wobei das genannte Nukleinsäuremolekül eine Aminosäuresequenz kodiert, die an UL-16 bindet.

5. Isoliertes Nukleinsäuremolekül, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus  
(a) einer Nukleinsäure, die ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuren 30 bis 200 der SEQ ID NO:2, die Aminosäuren 30 bis 200 der SEQ ID NO:4 oder die Aminosäuren 26 bis 196 der SEQ ID NO:10 umfasst,  
(b) einer allelischen Variante der Nukleinsäure gemäß (a) und  
(c) einer Nukleinsäure, die ein Polypeptid kodiert, das wenigstens 90% identisch mit dem Polypeptid gemäß (a) ist,  
wobei die Polypeptide, die durch die Nukleinsäuremoleküle gemäß (a), (b) und (c) kodiert werden, jeweils die zytotoxische T-Lymphozytenaktivität verstärken können.

6. Rekombinanter Vektor, der die Expression eines Nukleinsäuremoleküls steuert, das aus der Gruppe bestehend aus den Nukleinsäuremolekülen gemäß den Ansprüchen 1, 2, 3, 4 und 5 ausgewählt ist.

7. Isoliertes Polypeptid, das durch ein Nukleinsäuremolekül kodiert wird, das aus der Gruppe bestehend aus den Nukleinsäuremolekülen gemäß den Ansprüchen 1, 2, 3, 4 und 5 ausgewählt ist.

8. Das isolierte Polypeptid gemäß Anspruch 7, das ein Molekulargewicht von ungefähr 31 kD, bestimmt durch SDS-PAGE, hat.

9. Das isolierte Polypeptid gemäß Anspruch 7 in nicht-glykosylierter Form.

10. Isolierter Antikörper, der spezifisch an ein Polypeptid bindet, das aus den Aminosäuren 1–244 der SEQ ID NO:2, den Aminosäuren 1–246 der SEQ ID NO:4 oder den Aminosäuren 1–239 der SEQ ID NO:10 besteht.

11. Der isolierte Antikörper gemäß Anspruch 10, wobei der Antikörper ein monoklonaler Antikörper ist.

12. Wirtszelle, die mit dem Vektor gemäß Anspruch 6 transfiziert oder transduziert ist.

13. Genetisch manipulierte Wirtszelle, die die Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1–5 in funktionaler Verbindung mit einem heterologen regulatorischen Element enthält.

14. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids gemäß Anspruch 7, das die Kultivierung einer Wirtszelle gemäß den Ansprüchen 12 oder 13 unter Bedingungen umfasst, die die Expression der Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1–5 erlauben.

15. Das Verfahren gemäß Anspruch 14, das weiterhin die Gewinnung des Polypeptids umfasst.

16. ULBP-Polypeptid, das ein Fragment der SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 oder SEQ ID NO:10 umfasst, wobei das genannte Fragment die zytotoxische T-Lymphozytenaktivität verstärken kann.

17. ULBP-Polypeptid, das ein Fragment von wenigstens 20 aufeinanderfolgenden Aminosäuren der SEQ ID NO:2 umfasst, wobei das ULBP-Protein die zytotoxische T-Lymphozytenaktivität verstärken kann.

18. Isoliertes Polypeptid, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus  
(a) Polypeptiden, die die Aminosäuren 30–117 der SEQ ID NO:2 oder SEQ ID NO:4 umfassen;  
(b) Polypeptiden, die die Aminosäuren 26–113 der SEQ ID NO:10 umfassen;  
(c) Polypeptiden, die die Aminosäuren 118–200 der SEQ ID NO:2 oder SEQ ID NO:4 umfassen;  
(d) Polypeptiden, die die Aminosäuren 114–196 der SEQ ID NO:10 umfassen;  
(e) Polypeptiden, die die Aminosäuren x–y der SEQ ID NO:2 umfassen, wobei x eine ganze Zahl ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus 20 bis 30, einschließlich, ist, und y eine ganze Zahl ausgewählt aus der Gruppe

bestehend aus 200 bis 227, einschließlich, ist;

(f) Polypeptiden, die die Aminosäuren x'-y' der SEQ ID NO:4 umfassen, wobei x' eine ganze Zahl ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus 20 bis 30, einschließlich, ist, und y' eine ganze Zahl ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus 200 bis 227, einschließlich, ist;

(g) Polypeptiden, die die Aminosäuren x"-y" der SEQ ID NO:10 umfassen, wobei x" eine ganze Zahl ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus 16 bis 26, einschließlich, ist, und y" eine ganze Zahl ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus 196 bis 223, einschließlich, ist; und

(h) einem Polypeptid, umfassend eine Aminosäuresequenz, die wenigstens 90 identisch mit den Aminosäuren von wenigstens einem der Polypeptide gemäß (a)-(g) ist, wobei die genannten Polypeptide gemäß (a)-(h) jeweils die zytotoxische T-Lymphozytenaktivität verstärken können.

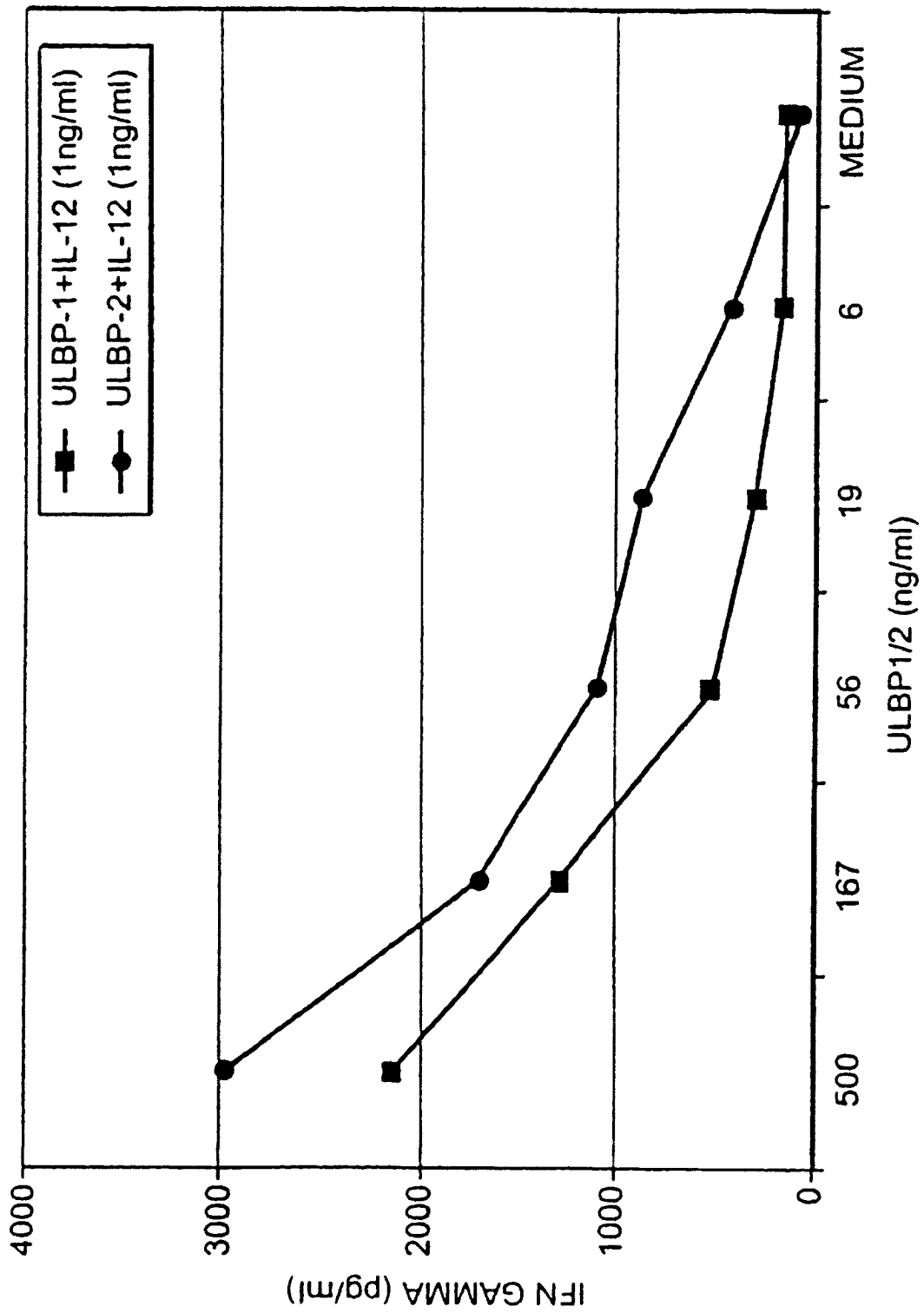
19. Verfahren zum Nachweis von Lymphomzellen, das die Inkubation einer biologischen Probe mit Antikörpern, die spezifisch an ULBP-1 (SEQ ID NO:2), ULBP-2 (SEQ ID NO:4) oder ULBP-3 (SEQ ID NO:10) binden sowie die Detektion der gebildeten Komplexe umfasst.

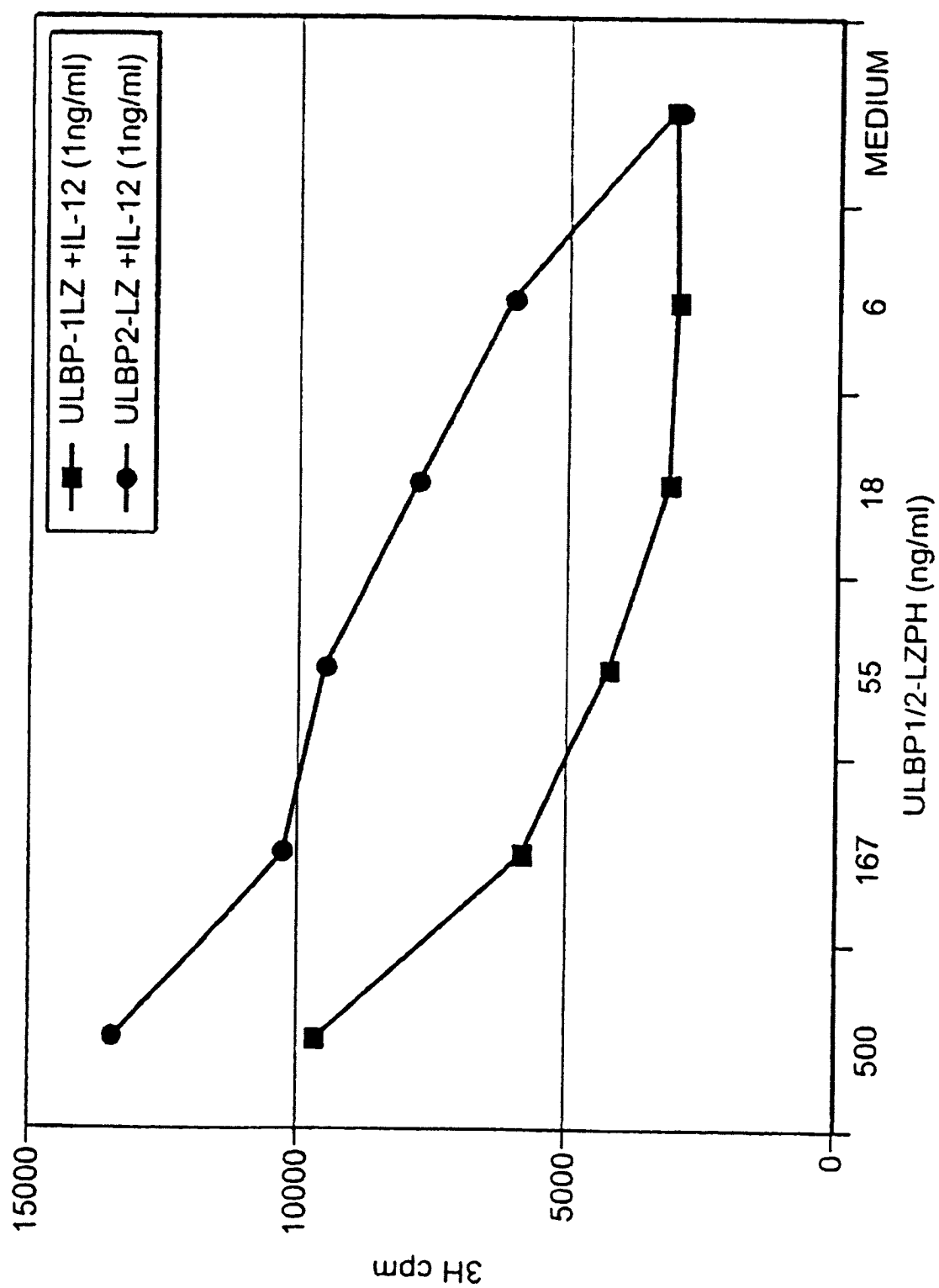
20. Verwendung der Antikörper gemäß Anspruch 11 zur Herstellung eines Medikaments zur Inhibierung einer ULBP-Gegenstrukturmolekül-vermittelten biologischen Aktivität.

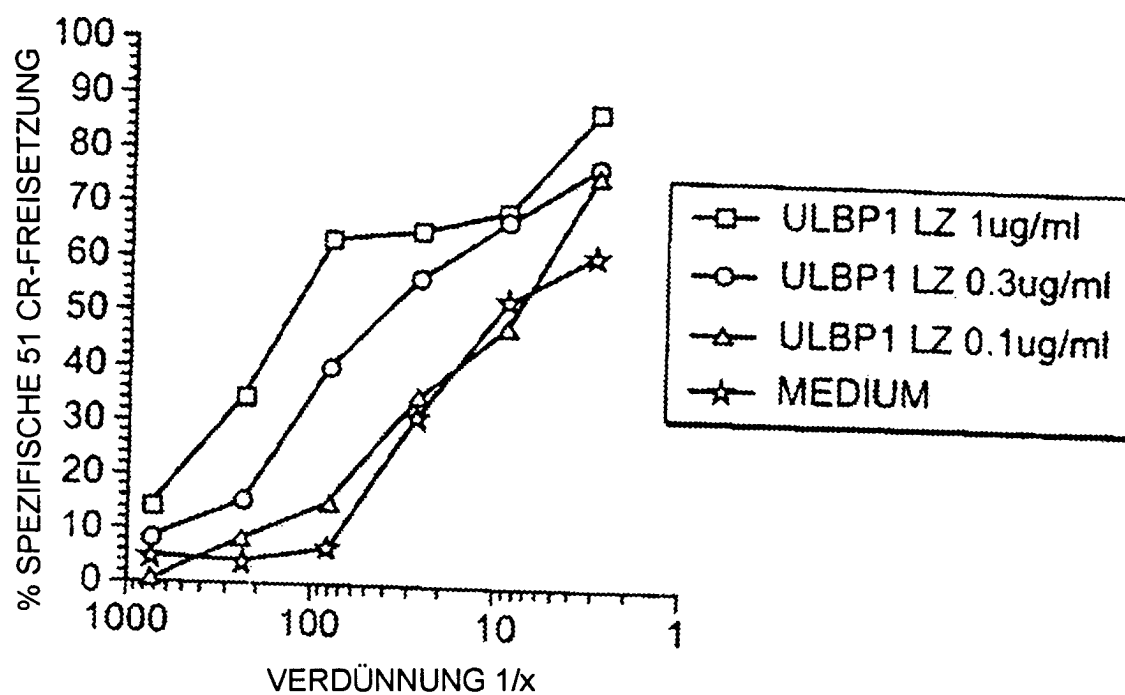
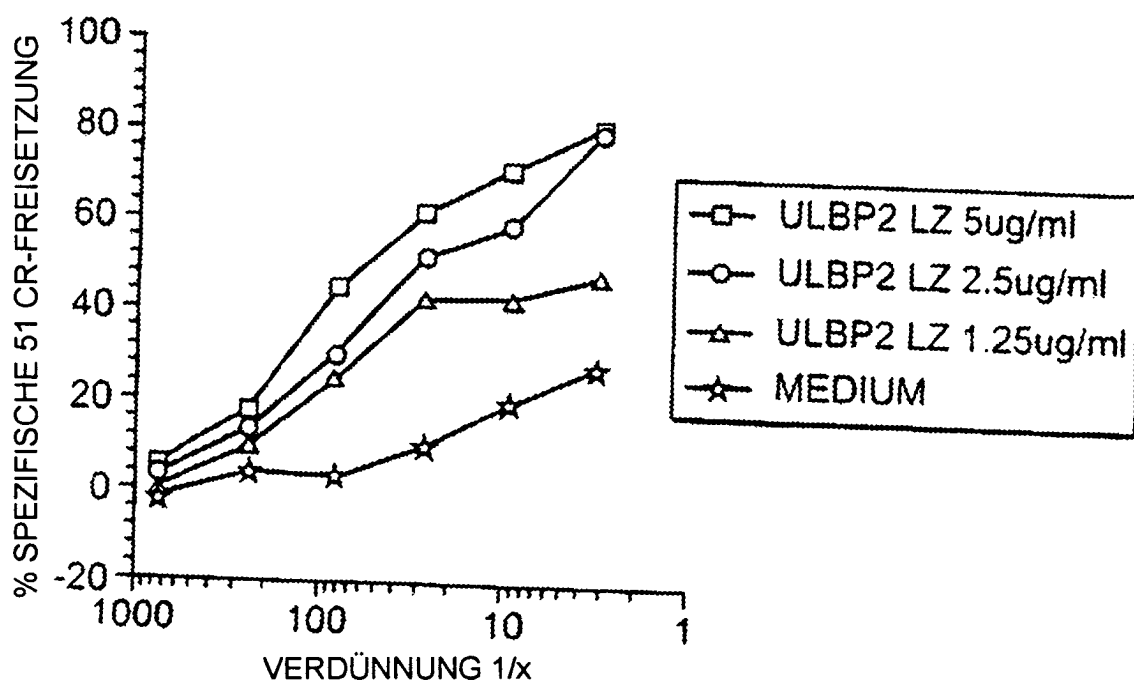
21. In-vitro-Verfahren zur Reinigung eines ULBP-Gegenstrukturmoleküls oder einer Zelle, die ein ULBP-Gegenstrukturmolekül exprimiert, umfassend das in Kontaktbringen des ULBP-Polypeptids gemäß Anspruch 7 mit einer Mischung von Zellen oder Proteinen sowie das Isolieren von Zellen oder Proteinen, die an das ULBP-Protein binden, aus der Mischung.

22. Verwendung des ULBP-Polypeptids gemäß Anspruch 7 zur Herstellung eines Medikaments zur Erhöhung der IFN- $\gamma$  Produktion in vivo, zur Erhöhung der Proliferation von natürlichen Killerzellen in vivo oder zur Erhöhung der zytotoxischen T-Lymphozytenaktivität in vivo.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

**FIG. 1**

**FIG. 2**

**FIG. 3****FIG. 4**