

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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
9. März 2006 (09.03.2006)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2006/024367 A2

(51) Internationale Patentklassifikation:
A61K 38/17 (2006.01) **A61P 37/00** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(74) Anwälte: **OTTEN, Hajo** usw.; Witte, Weller & Partner,
Postfach 105462, 70047 Stuttgart (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2005/008579

(22) Internationales Anmeldedatum:
8. August 2005 (08.08.2005)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2004 042 894.8 30. August 2004 (30.08.2004) DE

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA,
MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,
OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,
NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **EBERHARD-KARLS- UNIVERSITÄT TÜBINGEN** [DE/DE]; Universitätsklinikum, Geissweg 3, 72076
Tübingen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **STEINLE, Alexan-**
der [DE/DE]; Neue Strasse 10, 72070 Tübingen (DE).
FRIESE, Manuel [DE/GB]; 33B Walton Crescent, Wal-
ton Manor, Oxford OX1 2JQ (GB). **WIENDL, Heinz**
[DE/DE]; Schlossbergstrasse 10, 72070 Tübingen (DE).
WELLER, Michael [DE/DE]; Albstrasse 47, 72810
Gomaringen (DE). **SCHREINER, Bettina** [DE/DE];
Doblerst. 6, 72074 Tübingen (DE). **WEISSERT, Robert**
[DE/DE]; Philosophenweg 63, 72076 Tübingen (DE).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu ver-
öffentlichen nach Erhalt des Berichts

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

(54) Title: USE OF NKG2D RECEPTOR/NKG2D LIGAND INTERACTION BLOCKERS IN THE TREATMENT OF AUTO-
IMMUNE DISEASES

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON BLOCKERN DER NKG2D-REZEPTOR-/NKG2D-LIGANDEN-INTERAKTION
BEI AUTOIMMUNERKRANKUNGEN

(57) Abstract: The invention relates to the use of NKG2D receptor/NKG2D ligand interaction blockers for producing a medica-
ment for treating auto-immune diseases, especially multiple sclerosis, and for blocking the NKG2D receptor, said blockers being
selected from the group containing soluble NKG2D receptors, soluble MICA, soluble MICB, soluble ULBP1, soluble ULBP2, sol-
uble ULBP3, soluble ULBP4, soluble RAET1L, soluble RAET1G, and allelic variants or fragments or derivatives of said blockers.
The invention also relates to synthetically produced NKG2D receptor/NKG2D ligand interaction blockers.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Blockern der NKG2D-Rezeptor-/NKG2D-Li-
ganden-Interaktion zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Autoimmunkrankheiten, insbesondere der Multiplen
Sklerose, sowie zur Blockierung des NKG2D-Rezeptors, wobei die Blocker ausgewählt sind aus der Gruppe umfassend löslicher
NKG2D-Rezeptor, lösliches MICA, lösliches MICE, lösliches ULBP1, lösliches ULBP2, lösliches ULBP3, lösliches ULBP4, lösli-
ches RAET1L, lösliches RAET1G, sowie allelische Varianten oder Fragmente oder Derivate der genannten Blocker, sowie synthe-
tisch hergestellte Blocker der NKG2D-Rezeptor/NKG2D-Liganden-Interaktion.

WO 2006/024367 A2

Verwendung von Blockern der NKG2D-Rezeptor-/NKG2D-Liganden-
Interaktion bei Autoimmunerkrankungen

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Blockern der NKG2D-Rezeptor-/NKG2D-Liganden-Interaktion zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Autoimmunkrankheiten.

Autoimmunität beruht auf einer spezifischen, adaptiven Immunantwort gegen körpereigene Antigene. Normalerweise lässt das Immunsystem körpereigene Substanzen unbehelligt und bekämpft nur Fremdkörper. Autoimmunität lässt sich als Ergebnis eines Zusammenbruchs der Toleranz gegenüber körpereigenen Stoffen und/oder eines defekten Kontroll- und Regulationsmechanismus des Immunsystems auffassen. Die genauen Ursachen für die Entstehung von Autoimmunkrankheiten sind bisher unbekannt. Es wird jedoch vermutet, dass neben umweltbedingten auch erbliche Faktoren eine Rolle spielen. T-Lymphozyten scheinen an der Auslö-

sung der Krankheiten wesentlich beteiligt zu sein, da sie sowohl als cytotoxische T-Lymphozyten als auch durch die Aktivierung von Makrophagen Gewebeschädigungen verursachen können.

Autoimmunkrankheiten lassen sich in gewebe- oder organspezifische sowie systemische, also nicht-organspezifische Autoimmunkrankheiten einteilen. So ist bspw. die Erkrankung Multiple Sklerose ein Beispiel für eine organspezifische, vermutlich T-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankung beim Menschen.

Bei der T-Zell-vermittelten Immunantwort erkennen zytotoxische T-Lymphozyten körpereigene Peptide in Kontext von MHC-Klasse I Molekülen (MHC = major histocompatibility complex / Haupthistokompatibilitätskomplex) und führen zur Zerstörung der erkannten Zelle. Dies ist vermutlich der Fall bspw. bei der rheumatoiden Arthritis und bei dem insulinabhängigen Diabetes mellitus.

Der Nachweis von Autoimmunkrankheiten, die durch autoreaktive T-Lymphozyten verursacht werden, ist schwierig, da die Isolierung und Charakterisierung der entsprechenden autoantigenen Peptide technisch schwierig ist.

In der Praxis ist das therapeutische Vorgehen oft konfrontiert mit chronischen, langsam fortschreitenden Autoimmunkrankheiten. Zu Teilerfolgen führte der Einsatz von Immunsuppressiva und Corticosteroiden.

Andere Therapieansätze machen sich die Idee zunutze, dass bestimmte Peptide die Autoimmunreaktion verhindern können. Die

Peptide, die eine ähnliche Aminosäurestruktur wie das die Krankheit verursachende Selbstpeptid besitzen, binden dann zwar an die MHC-Moleküle, die von den T-Zell-Rezeptoren der autoreaktiven T-Zellen erkannt werden, jedoch werden die T-Zellen dadurch nicht mehr aktiviert.

Mit anderen Therapieansätzen soll erreicht werden, dass lösliche Komplexe aus MHC-Molekülen, Peptid und einem Toxin an diejenige T Zellen binden, die den Schaden im Organismus auslösen.

In anderen Ansätzen werden Cytokine, die bei der Auslösung von Autoimmunkrankheiten beteiligt sind, durch Antagonisten blockiert, wie bspw. Interleukin-1- und Tumor-Nekrosis-Faktor- α -Antagonisten.

Neuere Studien haben nun Anhaltspunkte aufgezeigt, wonach der NKG2D-Rezeptor eine Rolle zumindest bei manchen Autoimmunkrankheiten spielt.

Der aktivierende Immunrezeptor NKG2D wird auf natürlichen Killerzellen (NK Zellen) und mehreren T-Zellsubpopulationen einschließlich CD8+ T Zellen exprimiert.

NK Zellen sind ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems und als solche an der Immunabwehr von Viren und Tumoren beteiligt. Dabei bestimmt das Zusammenspiel von Signalen aktivierender und inhibitorischer Rezeptoren die Aktivierung von NK Zellen. Durch die Vermittlung des aktivierenden Immunrezeptors NKG2D erkennen zytotoxische Lymphozyten, das heißt NK Zellen und CD8+ T Zellen, virusinfizierte bzw. maligne Körperzellen, die infolge dessen eliminiert werden können. Außer auf CD8+ $\alpha\beta$

T Zellen und NK Zellen konnte die NKD2D-Expression auch auf $\gamma\delta$ T Zellen gezeigt werden.

Der Rezeptor NKG2D wird konstitutiv auf der Zelloberfläche exprimiert und ist mit dem Adapterprotein DAP10 assoziiert. Nach Interaktion mit seinen MHC Klasse I-ähnlichen Liganden vermittelt der Rezeptor NKG2D über das Adapterprotein ein Aktivierungssignal in die zytotoxischen Lymphozyten.

Als NKG2D-Liganden sind bisher im Menschen die MHC-Klasse-I-Ketten-ähnlichen Moleküle A (MICA), MICB und die UL16-bindenden Proteine (ULBP) 1, 2, 3 und 4 (= RAET1E) und RAET1L sowie RAET1G identifiziert worden (siehe Steinle et al., „Interactions of human NKG2D with its Ligands MICA , MICB, and homologs of the mouse RAE-1 Protein Family“, Immunogenetics 53:279-287, 2001; Cosman et al., „ULBPs, novel MHC Class I related Molecules, bind to CMV Glycoprotein UL 16 and stimulate NK Cytotoxicity through the NKG2D Receptor“, Immunity 14:123-133, 2001; Bacon et al., „Two human ULBP/RAET1 molecules with transmembrane regions are ligands for NKG2D“, J. Immunol. 173:1078-1084, 2004). In der Maus sind die NKG2D-Liganden RAE-1 α , β , γ , δ und ϵ , sowie H60 und das ULBP-Homolog MULT1 beschrieben worden.

Die verschiedenen NKG2D-Liganden haben unterschiedliche Expressionsmuster. Die Liganden werden nach derzeitigem Kenntnisstand nicht oder nur in geringem Umfang von normalen Körperzellen exprimiert, während unter pathologischen Bedingungen ihre Expression hochreguliert wird, wie beispielsweise bei Transformationen (bspw. epitheliale Tumore, Gliome, Leukämien), Infektionen (bspw. durch das humane Cytomegalovirus (HCMV) oder durch Mycobacterium tuberculosis) oder bei zellulärem Stress.

Trotz der aufgezeigten Möglichkeiten zur Behandlung von Autoimmunkrankheiten besteht immer noch ein großes Interesse, Alternativen zu den bisher eingesetzten Therapieansätzen zu finden, da die aufgezeigten Ansätze oftmals schwerwiegende Nebenwirkungen verursachen oder nur mit großem Aufwand und unter hohen Kosten durchzuführen sind oder nur Teilerfolge erbringen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, Substanzen zur Herstellung eines Arzneimittels bereitzustellen, welches zur Prophylaxe und/oder Therapie von Autoimmunkrankheiten dient.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe durch die Bereitstellung von zumindest einem Blocker der NKG2D-Rezeptor-/NKG2D-Liganden-Interaktion gelöst, der ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend löslicher NKG2D-Rezeptor, lösliches MICA, lösliches MICB, lösliches ULBP1, lösliches ULBP2, lösliches ULBP3, lösliches ULBP4, lösliches RAET1L, lösliches RAET1G, sowie allelische Varianten oder Fragmente oder Derivate der genannten Blocker, sowie synthetisch hergestellte Blocker der NKG2D-Rezeptor/NKG2D-Liganden-Interaktion.

Die Erfinder konnten in eigenen Versuchen zeigen, dass durch die Gabe eines genannten löslichen Blockers der NKG2D-Rezeptor-/Liganden-Interaktion der Ausbruch von Autoimmunkrankheiten verhindert oder zumindest gebremst werden konnte.

Ogasawara et al. („NKG2D Blockade Prevents Autoimmune Diabetes in NOD Mice“, Immunity 20:757-767, 2004) zeigten, dass NKG2D-Liganden-Expression in Pankreas von erkrankten NOD-(„nonobese diabetic“-) Mäusen nachgewiesen werden konnte. Dieselbe Arbeitsgruppe konnte auch zeigen, dass eine Blockade des NKG2D-

Rezeptors durch anti-NKG2D monoklonale Antikörper in NOD-Mäusen den Ausbruch der Krankheit verhindern konnte.

Ferner konnten Groh et al. („Stimulation of T-Cell Autoreactivity by Expression of NKG2D and its MIC Ligands in Arthritis“, Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 100:9452-9457, 2003) in ihren Studien zeigen, dass beim Menschen auf Synoviozyten von Patienten mit rheumatoider Arthritis NKG2D-Liganden vorliegen und dass deren Interaktion mit NKG2D-Rezeptoren, die bei diesen Patienten auch auf CD4⁺ CD28⁻ T-Zellen exprimiert werden, die Zerstörung von Synovialzellen bedeutend beeinflussen kann.

Jedoch ist in keiner der neueren Studien gezeigt, noch ist ein Hinweis darauf zu finden, dass durch lösliche NKG2D-Rezeptoren, MICA/B oder lösliches ULBP die NKG2D-Rezeptor/NKG2D-Liganden-Interaktion derart beeinflusst werden kann, dass der Ausbruch von Autoimmunkrankheiten verhindert oder zumindest verzögert werden kann.

Die Erfinder haben mit ihren Versuchen hingegen erstmalig gezeigt, dass durch die Gabe von löslichem NKG2D-Rezeptor der Ausbruch von Symptomen der Multiplen Sklerose deutlich gehemmt werden konnte. Diese Ergebnisse zeigen somit die Möglichkeit auf, lösliche Liganden oder Fragmente davon im Rahmen einer Therapie bei Autoimmunkrankheiten einzusetzen. Darüber hinaus zeigten transgene Mäuse, die eine hohe Konzentration von löslichem MICA im Serum enthielten, ebenfalls eine ähnliche Verzögerung des Krankheitsausbruchs.

Durch die Gabe von löslichem NKG2D-Rezeptor und dessen Bindung an seine (an Zelloberflächen gebundenen) Liganden wird verhindert, dass diese Liganden den auf Oberflächen von (u.a.) NK Zellen exprimierten NKG2D-Rezeptor binden und diese aktivieren.

Andererseits kann die Gabe von löslichen NKG2D-Liganden bewirken, dass diese an den auf Oberflächen von (u.a.) NK Zellen exprimierten NKG2D-Rezeptor binden, diesen jedoch nicht aktivieren können, da hierzu vermutlich ein Zell-Zell-Kontakt notwendig ist.

Vorliegend bedeutet „Fragment“ jedes Fragment eines der genannten löslichen Peptide, welches wie das lösliche Protein an den NKG2D-Rezeptor binden kann. Mit „Derivaten“ sind jede Protein-Abwandlungen gemeint, die vom löslichen Protein abweichende Modifizierungen aufweisen, bspw. Aminosäuresubstitutionen, und zwar insbesondere an den Stellen der löslichen Proteine, über welche die Bindung der Proteine an den NKG2D-Rezeptor nicht vermittelt wird. Auch solche Proteine oder Peptide, die von den Blockern abgeleitet sind, können für eine erfindungsgemäße Verwendung eingesetzt werden.

Ferner bedeutet vorliegend „allelische Varianten“ alle Varianten von Nucleotidsequenzen der für die genannten Proteine codierenden Gene, die zumindest bisher im Stand der Technik bekannt sind. So sind bspw. für MICA bisher 56 Allele identifiziert worden (siehe bspw. auf der Internetseite des EMBL-EBI (European Bioinformatics Institute) www.ebi.ac.uk/imgt/hla) und für MICB 16 Allele.

Somit werden unter „Fragmenten, Derivaten oder allelische Varianten der genannten Blocker“ alle Substanzen verstanden, die die gleichen Bindungseigenschaften wie die genannten Blocker der NKG2D-Rezeptor-/NKG2D-Liganden-Interaktion aufweisen.

Es können jedoch nicht nur die genannten Proteine als Blocker eingesetzt werden, sondern vielmehr jeder niedermolekulare synthetisch hergestellte Blocker der NKG2D-Rezeptor/NKG2D-Liganden-Interaktion. Solche synthetisch hergestellte Blocker können bspw. dadurch identifiziert werden, dass durch Zugabe synthetischer Substanzen, die z. B. durch kombinatorische Chemie hergestellt wurden, im „high throughput“-Verfahren eine Blockierung der Interaktion zwischen rekombinant hergestelltem löslichem MICA, das z. B. auf Mikrotiterplatten oder sog. „beads“ immobilisiert wird, und mit rekombinant hergestelltem löslichem, biotinyliertem NKG2D analysiert wird. Eine Bindung von NKG2D an MICA kann über Streptavidin-Konjugate detektiert werden (z. B. Streptavidin-Phycoerythrin in der Durchflusszytometrie oder Streptavidin-Meerrettichperoxidase in ELISA-Verfahren). Derart identifizierte synthetische Blocker können dann in funktionellen Versuchen, z. B. in Zytotoxizitätsexperimenten mit NK Zellen, getestet werden.

Als Blocker können aber auch bspw. Antikörper eingesetzt werden, die gegen den NKG2D-Rezeptor gerichtet sind, oder Fragmente davon.

Polyklonale Antikörper können in herkömmlicher Weise durch Immunisierung von Tieren, insbesondere von Kanninchen, mittels

Injektion des Antigens bzw. Fragmenten davon, und anschließender Reinigung des Immunglobulins erhalten werden.

Monoklonale anti-NKG2D-Rezeptor-Antikörper können nach Standardprotokollen gemäß dem von Köhler und Milstein beschriebenen Prinzip („Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity“, Nature 256:495-497, 1975) gewonnen werden. Hierfür werden bspw. Mäuse immunisiert und anschließend antikörperproduzierende Zellen der immunisierten Tiere immortalisiert, bspw. durch Fusion mit Myelomzellen. Anschließend wird der Überstand der erhaltenen Hybridome mittels immunologischen Standardassays auf monoklonale anti-NKG2D-Rezeptor-Antikörper gescreent. Für den therapeutischen oder diagnostischen Einsatz im Menschen können diese tierischen Antikörper ggf. auf herkömmliche Weise chimerisiert (siehe bspw. Neuberger et al., „Recombinant antibodies possessing novel effector functions“ Nature 312:604-608, 1984) oder humanisiert (siehe bspw. Riechmann et al., „Reshaping human antibodies for therapy“, Nature 332:323-327, 1988) werden.

Insbesondere ist bevorzugt, wenn als Blocker ein Protein oder Peptid eingesetzt wird, das eine Aminosäuresequenz enthält, die ausgewählt ist aus den im beiliegenden Sequenzprotokoll aufgeführten Sequenzen mit den SEQ ID Nr. 1 bis SEQ ID NR. 15, und insbesondere ein Protein, das eine Aminosäuresequenz aufweist, die ausgewählt ist aus den Sequenzen mit der SEQ ID Nr. 1 bis SEQ ID Nr. 15.

Das im beigefügten Sequenzprotokoll aufgeführte Peptid mit der SEQ ID-Nr. 1 des beigefügten Sequenzprotokolls stellt die komplette (full-length) Aminosäuresequenz des NKG2D-Rezeptors dar.

Dieser weist eine cytoplasmatische Domäne (AS 1-51), eine Transmembrandomäne (AS 52-72) und eine Ektodomäne (AS 73-216) auf. Mit der Aminosäuresequenz der SEQ ID- Nr. 2 des beigefügten Sequenzprotokolls ist vorliegend die diese Ektodomäne umfassende Sequenz identifiziert. Mit der SEQ ID-Nr. 3 des beigefügten Sequenzprotokolls ist die Sequenz von MICA*01, mit der SEQ ID-Nr. 5 die Sequenz von MICB*02 identifiziert. Die SEQ ID-Nrn. 4 und 6 sind jeweils Sequenzabschnitte von MICA*01 und MICB*02. Unter den SEQ ID-Nrn. 7 bis 15 des beigefügten Sequenzprotokolls sind jeweils die full-length Sequenzen sowie Sequenzabschnitte der Proteine ULBP1, ULBP2, ULBP3, ULBP4, RAET1L und RAET1G aufgeführt. Eine Übersicht über die bereits bekannten Sequenzen sowie deren Datenbank-Identifikationsnummern (Accession Number) findet sich in der beigefügten Tabelle 1.

Es ist bevorzugt, wenn die Blocker, also löslicher NKG2D-Rezeptor, lösliches MICA/B und lösliche ULBP-Moleküle, für die Verwendung rekombinant hergestellt werden.

Hierbei kann es von Vorteil sein, nicht das full-length Protein zu exprimieren, sondern bspw. nur bindungsrelevante Domänen der Proteine. So kann bspw. der lösliche NKG2D-Rezeptor ohne die cytoplasmatische Region und ohne die Transmembran-Domäne expri-miert werden (z. B. von Asn 80 bis Val 216; = SEQ ID Nr. 2); lösliches MICA kann bspw. von Glu 1 bis Lys 276 (= SEQ ID-Nr. 4), lösliches MICB von Glu 1 bis Lys 276 (= SEQ ID-NR. 6), lösliches ULBP1 von Asp 1 bis Lys 181 (= SEQ ID-NR. 8), lösliches ULBP2 von Asp 1 bis Ala 181 (= SEQ ID-NR. 10) und lösliches ULBP3 von Asp 1 bis Ala 181 (= SEQ ID-Nr. 12) expri-miert werden. Geeignet für die Expression sind bspw. Sf9 Insektenzel-

len oder eukaryontische Expressionssysteme, wie z.B. 293T oder COS7 Zellen.

Bei der erfindungsgemäßen Verwendung ist insbesondere bevorzugt, wenn die Autoimmunkrankheiten ausgewählt sind aus der Gruppe umfassend Multiple Sklerose, Diabetes Typ I, rheumatoide Arthritis, Psoriasis, Spondylarthritiden, Zöliakie, Morbus Behcet, Morbus Crohn, Colitis ulcerosa und Systemischer Lupus Erythematoses (SLE).

Insbesondere ist bevorzugt, wenn die Verwendung bei der schubförmigen Multiple Sklerose erfolgt, vorzugsweise in der Anfangsphase der schubförmigen Multiplen Sklerose.

Bei der Multiplen Sklerose sind in den Entzündungsherden (Plaques) u.a. T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Makrophagen zu finden, was als Hinweis auf eine Autoimmunreaktion gewertet wird. Ferner konnten Autoantikörper gegen verschiedenen Komponenten der Myelinschicht nachgewiesen werden, bspw. gegen basische Myelinproteine, Proteolipid-Proteine oder gegen das Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG). Zur Therapie der multiplen Sklerose wird momentan insbesondere rekombinant hergestelltes Interferon β eingesetzt, insbesondere beim schubförmigen Krankheitsverlauf.

Der Autoimmunkrankheit Diabetes Typ I liegt eine zellulär vermittelte chronische und irreversible Zerstörung der insulinproduzierenden β -Zellen des Pankreas zugrunde, wobei vermutlich ein auf den β -Zellen präsentierte Peptid von autoimmunen T-Lymphozyten erkannt wird, die ihrerseits die β -Zellen zerstören.

Bei der rheumatoiden Arthritis handelt es sich um eine Autoimmunkrankheit, bei welcher vermutlich durch eine Veränderung von Synovialzellen eine Immunantwort von T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Makrophagen induziert wird, die zur Antikörperbildung gegen Synovialzellen führt. Als Folge werden Hydrolasen, Kollagenasen und lysosomale Enzyme freigesetzt, die zur Zerstörung von Gelenkknorpel führen. Eine Therapie erfolgt momentan mit Antiphlogistika, Corticosteroiden u.a. Antirheumatika, sowie mit anti-TNF- α -Antagonisten.

Eine mögliche Erklärung der NKG2D-Wirkungsweise bei der Pathogenese von Autoimmunkrankheiten ist eine Induktion von NKG2D-Liganden durch zellulären Stress oder virale oder bakterielle Infektionen auf den Zellen der Organe bzw. Gewebe, die von der Autoimmunität betroffen sind. Diese induzierte Expression von NKG2D-Liganden könnte dann eine Lyse der entsprechenden Zellen durch NK Zellen vermitteln. Hierdurch würde nicht nur das entsprechende Gewebe zerstört, sondern auch sehr viele Autoantigene freigesetzt, die wiederum von Antigen-präsentierenden Zellen aufgenommen und über MHC-Moleküle präsentiert werden könnten, was zur Aktivierung potentiell autoreaktiver T Zellen führen könnte. Alternativ könnten autoreaktive T Zellen auch direkt durch die NKG2D-Liganden-Expression auf dem betroffenen Gewebe aktiviert werden.

Mit der erfindungsgemäßen Verwendung wird ein Ansatz aufgezeigt, mit welchem eine neue Alternative zur Behandlung der oben angegebenen Krankheiten ermöglicht wird. Die Erfinder konnten nämlich in eigenen Versuchen zeigen, dass in Mäusen bei einem Einsatz von löslichem NKG2D-Rezeptor der Ausbruch der schubförmigen Multiplen Sklerose im Vergleich zu unbehandelten

Mäuse deutlich hinausgezögert werden konnte. Gleiches wurde mit MICA-transgenen Mäusen gezeigt, die hohe Serumkonzentrationen an löslichem MICA enthalten.

Die Erfindung betrifft weiterhin eine pharmazeutische Zusammensetzung, die zumindest einen Blocker der NKG2D-Rezeptor-/NKG2D-Liganden-Interaktion enthält.

Dabei ist bevorzugt, wenn die pharmazeutische Zusammensetzung zumindest einen Blocker enthält, der ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend löslicher NKG2D-Rezeptor, lösliches MICA, lösliches MICB, lösliches ULBP1, lösliches ULBP2, lösliches ULBP3, lösliches ULBP4, lösliches RAET1L, lösliches RAET1G, sowie allelische Varianten oder Fragmente oder Derivate der genannten Blocker, sowie synthetisch hergestellte Blocker der NKG2D-Rezeptor/NKG2D-Liganden-Interaktion.

Die Erfindung betrifft ferner eine pharmazeutische Zusammensetzung, die als Blocker ein Protein enthält, das eine Aminosäuresequenz enthält, die ausgewählt ist aus der im beigefügten Sequenzprotokoll aufgeführten Sequenzen SEQ ID-Nr. 1 bis SEQ ID-Nr. 15, und insbesondere ein Protein, das eine solche Aminosäuresequenz aufweist.

Dabei ist nicht ausgeschlossen, dass die Zusammensetzung auch mehrere der genannten Blocker enthält.

Die Zusammensetzung kann darüber hinaus auch weitere Zusatzstoffe und/oder Träger enthalten, die üblicherweise bei der Zubereitung einer zu verabreichenden pharmazeutischen Zusammensetzung verwendet werden. Solche Inhaltsstoffe sind zum Bei-

spiel Verdünnungsmittel, Bindemittel, Suspensionsmittel, Schmiermittel, Stabilisatoren usw. Dazu zählen, sind aber nicht hierauf beschränkt, z.B. Wasser, Salzlösungen, Alkohole, pflanzliche Öle, Polyethylenglycole, Monoglyceride, etc. Eine Übersicht über derartige Inhaltsstoffe findet sich beispielsweise in A. Tippe, „Handbook of Pharmaceutical Excipients“, 3. Edition 2000, American Pharmaceutical Association and Pharmaceutical Press.

Je nach Verabreichung der pharmazeutischen Zusammensetzung, also oral oder parenteral, wird die Zusammensetzung formuliert sein, also beispielsweise in Form von Kapseln, Tabletten oder aber flüssigen Zubereitungen, die bspw. auch injiziert oder intravenös verabreicht werden können. Die Verabreichung kann ferner in Abhängigkeit vom Patienten und der Erkrankung, systemisch oder lokal und subtil gerichtet vorgenommen werden.

Ferner kann die Zusammensetzung weitere aktive Inhaltsstoffe oder Arzneimittel ausweisen, wie beispielsweise Interferone und ähnliche.

Die pharmazeutische Zusammensetzung kann dann bei Autoimmunkrankheiten eingesetzt werden, wie bspw. Multiple Sklerose, Diabetes Typ I, rheumatoide Arthritis, Psoriasis, Spondylarthritiden, Zöliakie, Morbus Behcet, Morbus Crohn, Colitis ulcerosa und Systemischer Lupus Erythematoses (SLE).

Weitere Vorteile ergeben sich aus den Figuren und dem nachfolgenden Beispiel.

Es versteht sich, dass die vorstehend genannten und die nachstehend noch zu erläuternden Merkmale nicht nur in der jeweils angegebenen Kombination, sondern auch in anderen Kombinationen oder in Alleinstellung verwendbar sind, ohne den Rahmen der vorliegenden Erfindung zu verlassen.

Ausführungsbeispiele der Erfindung werden in den nachfolgenden Figuren näher erläutert. Es zeigen:

Fig. 1 NKG2D-Liganden-Expression im ZNS bei Patienten mit Multipler Sklerose sowie in humaner Mikroglia:

Fig. 1A: Immunhistochemische Anfärbung von demyelinisierten ZNS-Läsionen („plaque“ bzw. „shadow plaque“) von MS-Patienten. Gezeigt sind Anfärbungen von MHC-Klasse II Molekülen (MHC-II), MIC-Molekülen (BAM01) und „Major Basic Protein“ (MBP), sowie mit einer Isotypkontrolle.

Fig. 1B: Quantifizierung von MICA Transkripten mittels Echtzeit-PCR im ZNS von gesunden („Normal“) versus MS-Patienten („MS“) mit Normierung auf die T98G Gliomazelllinie, sowie von unreifen Dendritischen Zellen (DC „imm“) versus reifen DC („DC mature“) versus isolierter Mikroglia.

Fig. 2 NKG2D-Liganden-Expression im ZNS und in Mikrogliazellen bei der experimentellen autoimmunen Encephalomyelitis von Mäusen:

Fig. 2A: Nachweis von RAE-1 und NKG2D im ZNS von C57BL/6 Mäusen am Tag der EAE-Induktion (day 0) sowie am Tag 10 bzw. 20 nach EAE-Induktion mittels Immunblot. Die Zahlen geben die Einheiten der relativen Densitometrie wieder (Tag 0 normiert auf 1.0). Zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmenge wurde β -Aktin detektiert.

Fig. 2B: Quantifizierung von RAE-1 δ Transkripten mittels Echtzeit-PCR im ZNS von C57BL/6 Mäusen („Normal“) und C57BL/6 Mäusen nach EAE-Induktion („EAE“) mit Normierung auf die Maus-Gliomazelllinie GL261, sowie in isolierten Astrozyten und Mikrogliazellen von C57BL/6 Mäusen.

Fig. 3 Effekt der NKG2D-Blockade bei der experimentellen autoimmunen Encephalomyelitis (EAE).

Fig. 3A: Durchschnittlicher „clinical score“ von je sechs H2-K^b-MICA transgenen Mäusen (offene Kreise) sowie sechs nicht-transgenen Geschwistern (geschlossene Kreise) an Tagen 0 bis 30 nach EAE-Induktion.

Fig. 3B: Durchschnittlicher „clinical score“ an Tagen 0 bis 25 nach EAE-Induktion von fünf C57BL/6 Mäusen bei Gabe von löslichem NKG2D (offene Kreise; die sechste Maus zeigte keinerlei Symptome) sowie von sechs Mäusen bei Gabe von PBS (geschlossene Kreise). PBS bzw. sNKG2D wurde an Tagen 0, 2, 4, 6, 8, und 10 intraperitoneal appliziert.

Fig. 3C: MOG-Peptid spezifische T Zellproliferation bei Mäusen, bei denen EAE induziert wurde, und die entweder mit PBS oder mit löslichem NKG2D, wie in Fig. 3B beschrieben, behandelt wurden. Milzzellen wurden mit $1\mu\text{g/ml}$ oder $10\mu\text{g/ml}$ MOG-Peptid stimuliert.

Fig. 3D: Durchschnittlicher „clinical score“ an Tagen 0 bis 30 nach EAE-Induktion von je sechs C57BL/6 Mäusen bei Gabe von löslichem NKG2D (offene Kreise) sowie bei Gabe von PBS (geschlossene Kreise). PBS bzw. sNKG2D wurde an Tagen 10, 12, 14, 16, 18, und 20 intraperitoneal appliziert.

Fig. 3E: MOG-Peptid spezifische T Zellproliferation bei Mäusen, bei denen EAE induziert wurde, und die entweder mit PBS oder mit löslichem NKG2D, wie unter Fig. 3D beschrieben, behandelt wurden. Milzzellen wurden mit $1\mu\text{g/ml}$ oder $10\mu\text{g/ml}$ MOG-Peptid stimuliert.

Beispiel

1. Material und Methoden

1.1 Patienten

Hirne von MS-Patienten wurden immunohistochemisch untersucht. Die Studie wurde gemäß dem durch das Ethikkomitee des Universitätsklinikums Tübingen zugelassenen Protokoll durchgeführt.

1.2 Antikörper

Folgende monoklonale Antikörper wurden verwendet: BAM01 (Maus IgG₁), anti-MICA/B; anti-Maus RAE-1 γ (R & D Systems, Wiesbaden, Deutschland), anti-Maus NKG2D (R & D Systems) und anti- β -Aktin (Santa Cruz Biotechnologies).

1.3 Zelllinien

Die humane maligne Gliomazelllinie T98G wurde von Dr. Tribolet (Lausanne, Schweiz) erhalten. Die Maus-Gliomazelllinie GL261 war ein Geschenk von XO Brakefield (Harvard Medical School Boston, USA). Die Zellen wurden in DMIM-Medium kultiviert, welches mit 2mM L-Glutamin (Gibco Life Technologies, Paisley, Großbritannien), 10 % FCS (Biochrom KG, Berlin, Deutschland) und Penicillin (100 IU/ml)/Streptomycin (100 μ g/ml; Gibco) ergänzt war.

1.4 Immunoblot

Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Induzierung der experimentellen autoimmunen Encephalomyelitis wurde das Gehirngewebe der Mäuse isoliert. Das Gewebe wurde in Lysispuffer (50 mM Tris-HCl (pH 8) mit 120 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,5 % NP-40, 2 μ g/ml Aprotinin, 10 μ g/ml Leupeptin und 100 μ g/ml PMSF) mittels Ultraschall aufgeschlossen. Aliquots der Gewebelysate wurden auf 12 % SDS-PAGE Gelen unter nicht-reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulose überführt. Die Gesamtmenge an Protein der Lysate betrug 40 μ g je Spur. Nach Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen mit 5 % (w/v) Milchkpulver in PBS für 30 Minuten wurden die Filter mit den spezifischen monoklonalen Antikörpern über Nacht bei 4°C inkubiert,

gewaschen und mit Peroxidase-konjugierten Ziegen-Anti-Kaninchen oder Ziegen-Anti-Ratte IgG (1:3000 verdünnt; Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, USA) drei Stunden lang bei 22°C inkubiert. Die Primärantikörper wurden in einer Konzentration von 1 µg/ml in PBS mit 0,05 % Tween20 und 1,3 % fettarme Milch eingesetzt.

1.5 Isolierung der humanen Mikrogliazellen

Primäre gliale Zellen wurden aus adulten Patienten während einer chirurgischen Resektion gewonnen, welche zur Behandlung einer nicht Tumor-bezogenen unheilbaren Epilepsie durchgeführt wurde. Die Gewebeproben wurden in Regionen entnommen, die abseits der aktiven Stelle lagen. Die methodische Isolierung und Kultivierung adulter menschlicher Mikroglia wurde bereits beschrieben, bspw. von Yong et al. („Culture of Cells from Human Brains Biopsies“, Protocol for Neural Cell Culture, Seite 35-42, 1992). Hierzu wurden ein bis drei mm³ Gewebe mit 0,025 % Collagenase A und DNase (50 mg/ml) (Böhringer, Mannheim) für 45 Minuten behandelt, und anschließend mittels Passage durch ein 130 µm Nylonnetz mechanisch auftrennt. Die Zellen wurden über einen 30 %igen Percoll-Gradienten (Pharmacia) bei 15.000 rpm für 30 Minuten weiter aufgetrennt. Die Zellen, die aus der Zwischenschicht gewonnen wurden, enthielten eine gemischte gliale Zellpopulation, die aus ungefähr 65 % Oligodendroglia, 30 % Mikroglia und 5 % Astroglia bestand. Zur Anreicherung der Mikroglia wurde die gemischte Zellpopulation in Eagles MEM suspendiert, das mit 5 % FCS, 2,5 U/ml Penicillin, 2,5 mg/ml Streptomycin, 2 mM Glutamin und 0,1 % Glukose (alles von Gibco) ergänzt war, und wurde über Nacht in 25 cm² Gewebekulturflaschen oder 48-Well-Platten (Falcon, Fisher Scientific) in

feuchter Atmosphäre bei 37°C mit 5 % CO₂ inkubiert. Die weniger adhärrierenden Oligodendroglia wurden durch vorsichtiges Schütteln entfernt. Die übrigen adhärrierenden Zellen, also Astroglia und Mikroglia, ließ man morphologisch über drei Tage entwickeln. Danach wurden die weniger adhärrierenden Astroglia durch rotierendes Schütteln für fünf Stunden bei 150 rpm abgespült. Die zurückbleibenden Mikroglia (1,2 x 10⁵ Zellen/cm²) waren zu 95 % rein, was durch Immunzytochemie bestätigt werden konnte.

1.6 Isolierung von Maus-Mikrogliazellen

Maus-Mikrogliazellen wurden von primären gemischten Hirngliazellkulturen durch Anwendung eines modifizierten, bereits beschriebenen Verfahrens isoliert (siehe Magnus et al., J. Neuropatol. ex. Neurol. 2002, 61(9):760-766).

1.7 Real-time PCR

RNA-Extraktion und cDNA-Synthese wurden mittels Standardverfahren durchgeführt. Die quantitative Analyse der Gen-expression wurde mit QRT-PCR unter Verwendung des ABI Prism 7000 Sequenzdetektionssystems (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) wie zuvor beschrieben durchgeführt (siehe Wiendl et al. Brain, 2003, 126:1026-1035). Dabei wurde die cDNA-Amplifikation unter Verwendung der SYBRGreen-Chemie nachgewiesen. Die Zyklusparameter betragen zwei Minuten bei 50°C, zehn Minuten bei 95°C, sowie vierzig Zyklen mit jeweils fünfzehn Sekunden Denaturierung bei 95°C und eine Minute Annealing bei 60°C. Die Daten wurden mit dem ABI PRISM® Detektionssystem analysiert und unter Verwendung des ΔC_T -Verfahrens zur relativen Quantifizierung quantifiziert. Die Grenzwertzyklen (C_T) für die 18S rRNA

(Referenz) und MICA oder RAE-1 (Probe) wurden je zweimal bestimmt. Ein Kalibrierungswert (100 %) wurde abgeschätzt und die relative Veränderung der Kopienzahl gemäß der Formel $rl = 2 - [(C_T \text{ Probe} - C_T \text{ Referenz}) - (C_T \text{ Kalibrierungsprobe} - C_T \text{ Kalibrierungsreferenz})]$ berechnet. Die folgenden spezifischen Primer wurden verwendet: 18S:5'-CGG CTA CCA CAT CCA AGG AA-3' (SEQ ID-Nr. 16), 5'-GCT GGA ATT ACC GCG GCT-3' (SEQ ID-Nr. 17), MICA:5'-CCT TGG CCA TGA ACG TCA GG-3' (SEQ ID-Nr. 18), 5'-CCT CTG AGG CCT CRC TGC G-3' (SEQ ID-Nr. 19), RAE-1δ:5'-TCC TAC CCC AGC AGA TGA AG-3' (SEQ ID-Nr. 20), 5'-CCA CTT CAG TGG CAT TTG CTG-3' (SEQ ID-Nr. 21).

1.8 Produktion von löslichem Maus NKG2D-Rezeptor in Insektenzellen

Der rekombinante lösliche Maus NKG2D-Rezeptor ohne die aminoterminalen cytoplasmatische Region und die Transmembrandomäne wurde in Sf9 Insektenzellen (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) unter Verwendung des BAC-to-BAC-Systems (Gibco Life Technologies, Großbritannien) hergestellt. Das Expressionskonstrukt (SEQ ID-Nr. 24) besitzt eine amino-terminale FLAG/Hexahistidin-Markierungssequenz (siehe Steinle et al., „Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB and homologs of the mouse RAE-1 Protein family“, *Immunogenetics* 53:279-287, 2001). Die Sequenz des Maus NKG2D-Rezeptors (full-length) ist in dem beiliegenden Sequenzprotokoll mit der SEQ ID-Nr. 23 wiedergegeben.

1.9 Mäuse

Weibliche C57BL/6-Mäuse wurden von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) käuflich erworben. MICA-transgene C57BL/6-Mäuse (freundlicherweise überlassen von Dr. Spies, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle) exprimieren MICA*07 cDNA unter Kontrolle eines MHC-Klasse I Promotors, nämlich des MHC-Klasse I Gens K^b. Für die Experimente wurden Mäuse im Alter von sechs bis acht Wochen eingesetzt.

1.10 EAE Induktion und Behandlung

EAE (experimentelle autoimmune Encephalomyelitis) wurde bei C57BL/6-Mäusen durch subkutane Immunisierung mit 200 µg MOG₃₅₋₅₅Peptid in CFA (Sigma-Aldrich) induziert. Ferner wurden intraperitoneal oder intravenös 200 ng Pertussistoxin (Calbiochem) am Tag der Immunisierung und zwei Tage danach verabreicht. Körpergewicht und klinische Einordnung („Clinical Scores“) (0 = gesund; 1 = schlaffer Schwanz; 2 = Ataxie und/oder Lähmung der Hintergliedmaßen; 3 = Lähmung der Hintergliedmaßen und/oder Lähmung der Vordergliedmaßen; 4 = Tetraparalyse; 5 = sterbend oder tot) wurden aufgezeichnet. Die Versuche wurden gemäß den NIH (National Institute of Health) Richtlinien „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“ durchgeführt. Bei denjenigen Versuchen, bei welchen lösliche NKG2D-Rezeptoren (= sNKG2D) eingesetzt wurden, um die NKG2D-Liganden-/NKG2D-Rezeptoren-Interaktion zu blockieren, wurden die Tiere entweder mit löslichem Maus-NKG2D-Rezeptor (intraperitoneal) oder mit PBS behandelt (i.p.). Am Tag der Immunisierung oder am Tag zehn wurden jeweils 100 µg verabreicht und 50 µg jeweils jeden zweiten Tag bis zehn Tage nach der Immunisierung oder am Tag zwanzig.

1.11 Splenozyten-Proliferations-Assay

Aus Milz gewonnene Zellsuspensionen (5×10^5 -Zellen/Well) wurden in 100 μ l RPMI 1640-Medium mit 10 % FCS (Biochrom KG), 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin-Streptomycin (Gibco) und 50 μ M 2-Mercaptoethanol (Gibco) mit MOG₃₅₋₅₅ in unterschiedlichen Konzentrationen ausplattiert. Kontroll-Wells enthielten lediglich Respondersplenozyten plus Medium. Alle Versuchsansätze werden jeweils dreifach ausgemessen. Während des viertägigen Kulturzeitraums wurden die Kulturen mit 1 μ Ci/Well pulsiert [Methyl-³H]-Thymidin (Amersham). Die Zellen wurden geerntet und die eingebaute Radioaktivität wurde anschließend in einem „Wallac 1450 Microbeta plus“ Flüssigszintillationszähler ausgezählt.

1.12 Statistik

Die Signifikanzanalyse wurde unter Verwendung des zweiseitigen Students t-Test durchgeführt, wobei $P < 0,05$ als signifikant und $P < 0,001$ als hochsignifikant betrachtet wurde (Excel, Microsoft, USA). P -Werte wurden mittels des Mantel log-rank Tests evaluiert (siehe Mantel: "Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration", Cancer Chemother. Rep. 50:163-170, 1966).

2. Ergebnisse

2.1 Expression von MICA in MS-Läsionen

Die Expression von NKG2D-Liganden wurde in Gehirnproben von MS-Patienten und in Kontroll-ZNS-Gewebe untersucht. Im ZNS-Gewebe der normalen grauen oder weißen Substanz von MS-Gewebeproben konnte keine Immunreaktivität für MICA/B nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte eine starke MICA/B-Expression in MS-Patientenproben detektiert werden, die im Bereich von demyelinisierten ZNS-Läsionen mit aktivierten, MHC Klasse II positiven Mikrogliazellen kolokalisiert (Fig. 1A). Diese Beobachtung konnte auf mRNA-Ebene bestätigt werden: Hier zeigte sich eine starke Hochregulierung der MICA mRNA in Gewebeproben entzündlicher MS-Läsionen im Vergleich zu Kontrollgewebe. Entsprechend zu den Beobachtungen *in vivo* zeigten isolierte menschliche Mikrogliazellen, wie Dendritische Zellen, ebenfalls eine Expression von MICA mRNA *in vitro* (Fig. 1B).

2.2 Expression von NKG2D-Liganden und NKG2D-Rezeptoren im Maus EAE-Modell

Nach dem Nachweis einer starken NKG2D-Ligandenexpression in MS-Gehirnproben wurde die pathogene Bedeutung der Expression dieser Proteine bei einer entzündlichen ZNS-Demyelinisierung im Tiermodell anhand der MOG-induzierten EAE untersucht. Hierzu wurde die Expression des Maus-NKG2D-Liganden RAE-1 und des NKG2D-Rezeptors im Verlauf der EAE im ZNS untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Figur 2 gezeigt. Ein Immunblot von Proteinen aus Gehirnen von Mäusen mit EAE zeigt, dass die Expression von RAE-1 und NKG2D im Verlauf der EAE deutlich ansteigt, während die Expression des Kontrollproteins (β -Aktin) unverändert bleibt (Fig. 2A). Dies deutet darauf hin, dass im Verlauf der EAE Mikrogliazellen aktiviert wurden und NKG2D-positive Lymphozyten in das Gehirn eingewandert sind.

Diese Ergebnisse konnten auch auf der mRNA-Ebene bestätigt werden. Auch die relative Expression der RAE-1 δ mRNA ist in Gehirngewebe von Mäusen mit EAE (an Tag 20 nach der Induktion) um ein Vielfaches höher als in normalen Kontroll-Gehirngewebe (Fig. 2B). In isolierten Maus-Mikrogliazellen, nicht jedoch auf Astrozyten, konnten ebenfalls erhöhte RAE-1 δ Transkriptmengen nachgewiesen werden (Fig. 2B).

2.3 MICA-transgene Tiere sind weniger empfänglich für MOG-induzierte EAE.

Für die Untersuchung der Bedeutung der NKG2D-Rezeptor/NKG2DL-Liganden-Interaktion bei der entzündlichen ZNS Demyelinisierung wurde der Krankheitsverlauf von MOG-induzierter EAE in MICA-transgenen C57BL/6-Mäusen untersucht. Diese Mäuse exprimieren eine MICA*07 cDNA konstitutiv unter Kontrolle eines MHC Klasse I Promotors (H-2K^b) und weisen hohe Konzentrationen an löslichem MICA im Serum auf (45-90 ng/ml). Aufgrund dessen ist bei diesen transgenen Mäusen die NKG2D Expression deutlich vermindert, vermutlich durch eine Liganden-induzierte Herabregulation, und NKG2D-vermittelte NKG2D-Effektorfunktionen sind stark beeinträchtigt. Im Vergleich zu nicht-transgenen Mäusen wurde bei den MICA-transgenen Mäusen eine bedeutende Verzögerung des Ausbruchs der Krankheitssymptome beobachtet (Fig. 3A).

2.4 Blockierung von NKG2D-Liganden mit löslichem NKG2D-Rezeptor schützt Tiere vor MOG-induzierter EAE.

Um zu untersuchen, ob eine Blockierung der NKG2D-Rezeptor-/NKG2D-Liganden-Interaktion den Verlauf der EAE beeinflussen kann, wurde den Mäusen lösliches NKG2D (sNKG2D) (wie unter 1.8 sowie 1.10 beschrieben) verabreicht, um die Interaktion der Liganden mit dem Rezeptor in unterschiedlichen Phasen der EAE zu unterbrechen. Hierzu wurde sNKG2D an den Tagen null bis zehn (Frühphase) verabreicht. Es konnte beobachtet werden, dass bei einer sNKG2D-Behandlung während der Frühphase EAE deutlich später ausbrach (Fig. 3B). Es erkrankten auch nur fünf der sechs Mäuse in der sNKG2D-behandelten Gruppe. Darüber hinaus war die MOG-Peptid-spezifische T-Zellproliferation von Milzzellen aus Mäusen mit sNKG2D-Behandlung im Vergleich zu Milzzellen von Kontroll-behandelten Mäusen signifikant reduziert (Fig. 3C).

Als nächstes wurde der EAE-Verlauf bei einer Verabreichung von sNKG2D in der Spätphase (Tag 10 bis 20) untersucht. Hierbei ergab sich keine Verbesserung im Krankheitsverlauf im Vergleich zu Kontroll-behandelten Tieren (Fig. 3D). Entsprechend war die MOG-Peptid-spezifische T-Zell-Proliferation auch nicht durch die Verabreichung von löslichem NKG2D-Rezeptor beeinflusst (Fig. 3E).

Insgesamt entwickelten alle Tiere, die mit dem Peptid MOG₃₅₋₅₅ immunisiert wurden, starke EAE-Symptome, jedoch hatte eine frühe Behandlung mit löslichem NKG2D-Rezeptor einen stark positiven Effekt, da hierdurch der Krankheitsausbruch deutlich verzögert werden konnte.

Tabelle 1

SEQ ID-Nr.	Name, Länge	Definition/Besonderheiten	Acc. Nr.
SEQ ID-Nr. 1	NKG2D (Homo sapiens) Full-length, 216 AS	NKG2D-Typ II integrales Membranprotein 1-51 Cytoplasm. Domäne 52-72 Transmembranregion 73-216 Ektodomäne	Acc_P26718
SEQ ID-Nr. 2	NKG2D (Homo sapiens)	Ektodomäne	-
SEQ ID-Nr. 3	MICA*01 (Homo sapiens) Full-length, 383 AS	MHC-Klasse-I Ketten- verwandtes Protein	AAA21718
SEQ ID-Nr. 4	MICA*01 (Homo sapiens) Glu 1 bis Lys 276		
SEQ ID-Nr. 5	MICB*02 (Homo sapiens) Full-length, 383 AS	MHC-Klasse-I Ketten- verwandtes Protein	AAC39847
SEQ ID-Nr. 6	MICB*02 (Homo sapiens) Glu 1 bis Lys 276		
SEQ ID-Nr. 7	ULBP1 (Homo sapiens) Full-length, 244 AS	ULBP1 Protein	AAK13081
SEQ ID-Nr. 8	ULBP1 (Homo sapiens) Asp 1 bis Lys 181		
SEQ ID-Nr. 9	ULBP2 (Homo sapiens) Full-length, 246 AS	ULBP2 Protein	AAK13082
SEQ ID-Nr. 10	ULBP2 (Homo sapiens) Asp 1 bis Ala 181		
SEQ ID-Nr. 11	ULBP3 (Homo sapiens) Full-length, 244 AS	ULBP3 Protein	AAK13083
SEQ ID-Nr. 12	ULBP3 (Homo sapiens) Asp 1 bis Ala 181		
SEQ ID-Nr. 13	ULBP4 (Homo sapiens) Full-length, 263 AS	ULBP4 Protein	AAP15166

SEQ ID-Nr.	Name, Länge	Definition/Besonderheiten	Acc. Nr.
SEQ ID-Nr. 14	RAET1G1 (Homo sapiens) Full-length, 334 AS	RAET1G1	AAO22238
SEQ ID-Nr. 15	RAET1L (Homo sapiens) Full-length, 246 AS	Retinoic Acid Early Transcript 1	AAK91503
SEQ ID-Nr. 22	NKG2D-L (Mus musculus) Full-length, 232 AS	NKG2D-L	AAC24356
SEQ ID-Nr. 23	NKG2D-S (Mus musculus) Full-length, 219 AS	NKG2D Homolog	AAC28245
SEQ ID-Nr. 24	NKG2D löslich (Mus musculus) 168 AS	NKG2D Ektodomäne AS 4-11: Flag-tag, AS 15-20: Hexahistidin-tag AS 21-26: Linker AS 27-169: Ektodomäne	-

Patentansprüche

1. Verwendung von zumindest einem Blocker der NKG2D-Rezeptor-/NKG2D-Liganden-Interaktion zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Autoimmunkrankheiten, dadurch gekennzeichnet, dass der Blocker ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend löslicher NKG2D-Rezeptor, lösliches MICA, lösliches MICB, lösliches ULBP1, lösliches ULBP2, lösliches ULBP3, lösliches ULBP4, lösliches RAET1L, lösliches RAET1G, sowie allelische Varianten oder Fragmente oder Derivate der genannten Blocker, sowie synthetisch hergestellte Blocker der NKG2D-Rezeptor/NKG2D-Liganden-Interaktion.
2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als Blocker ein Protein eingesetzt wird, das eine Aminosäuresequenz enthält, die ausgewählt ist aus den Sequenzen mit den SEQ ID-Nr. 1 bis SEQ ID-Nr. 15.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Blocker ein Protein eingesetzt wird, das eine Aminosäuresequenz besitzt, die ausgewählt ist aus den Sequenzen mit den SEQ ID-Nr. 1 bis SEQ ID-Nr. 15.
4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass ein Blocker eingesetzt wird, der rekombinant hergestellt wurde.
5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Verwendung bei Krankheiten erfolgt,

die ausgewählt sind aus der Gruppe umfassend Multiple Sklerose, Diabetes Typ I, rheumatoide Arthritis, Psoriasis, Spondylarthritiden, Zöliakie, Morbus Behcet, Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, Systemischer Lupus Erythematoses (SLE).

6. Verwendung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Verwendung bei der schubförmigen Multiplen Sklerose erfolgt.
7. Verwendung nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass Verwendung in der Anfangsphase der schubförmigen Multiplen Sklerose erfolgt.
8. Verwendung von gegen den NKG2D-Rezeptor gerichteten Antikörpern zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Autoimmunkrankheiten, die ausgewählt sind aus der Gruppe umfassend Multiple Sklerose, rheumatoide Arthritis, Psoriasis, Spondylarthritiden, Zöliakie, Morbus Behcet, Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, Systemischer Lupus Erythematoses (SLE).
9. Pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend zumindest einen Blocker der NKG2D-Rezeptor-/NKG2D-Liganden-Interaktion.
10. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass der Blocker ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend, löslicher NKG2D-Rezeptor, anti-NKG2D-Rezeptor-Antikörper, lösliches MICA, lösliches MICB, lösliches ULBP1, lösliches ULBP2, lösliches ULBP3, lösliches

ULBP4, lösliches RAET1L, lösliches RAET1G, sowie allelische Varianten oder Fragmente oder Derivate der genannten Blocker, sowie synthetisch hergestellte Blocker der NKG2D-Rezeptor/NKG2D-Liganden-Interaktion.

11. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass als Blocker ein Protein eingesetzt wird, das eine Aminosäuresequenz enthält, die ausgewählt ist aus den Sequenzen mit den SEQ ID-Nr. 1 bis SEQ ID-Nr. 15.
12. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass als Blocker ein Protein eingesetzt wird, das eine Aminosäuresequenz besitzt, die ausgewählt ist aus den Sequenzen mit den SEQ ID-Nr. 1 bis SEQ ID-Nr. 15.
13. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 9 bis 12 zur Behandlung von Autoimmunkrankheiten, insbesondere zur Behandlung von Multipler Sklerose, rheumatoider Arthritis, Psoriasis, Spondylarthritiden, Zöliakie, Morbus Behcet, Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, Systemischer Lupus Erythematoses (SLE).

1 / 6

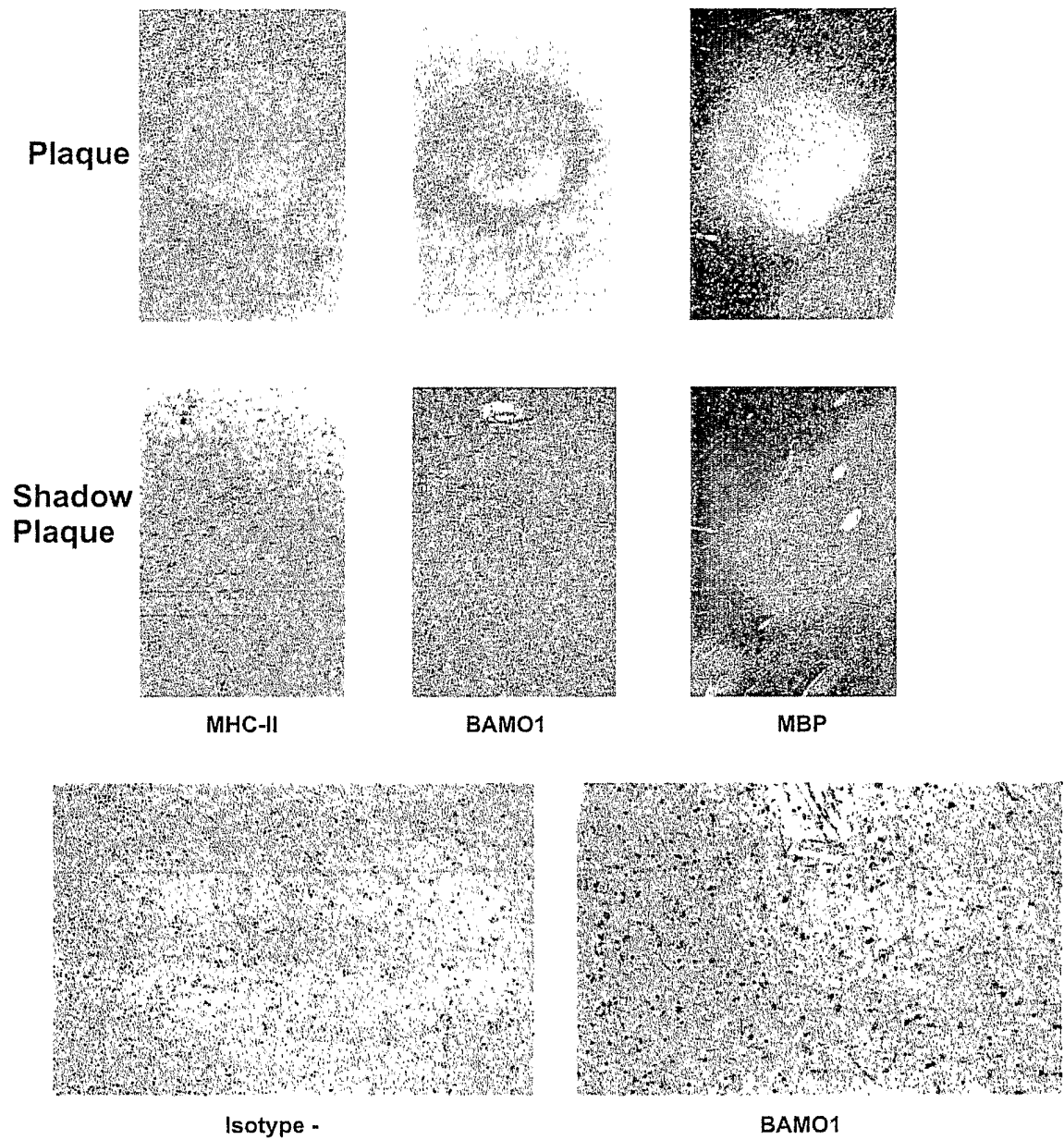


Fig. 1A

2 / 6

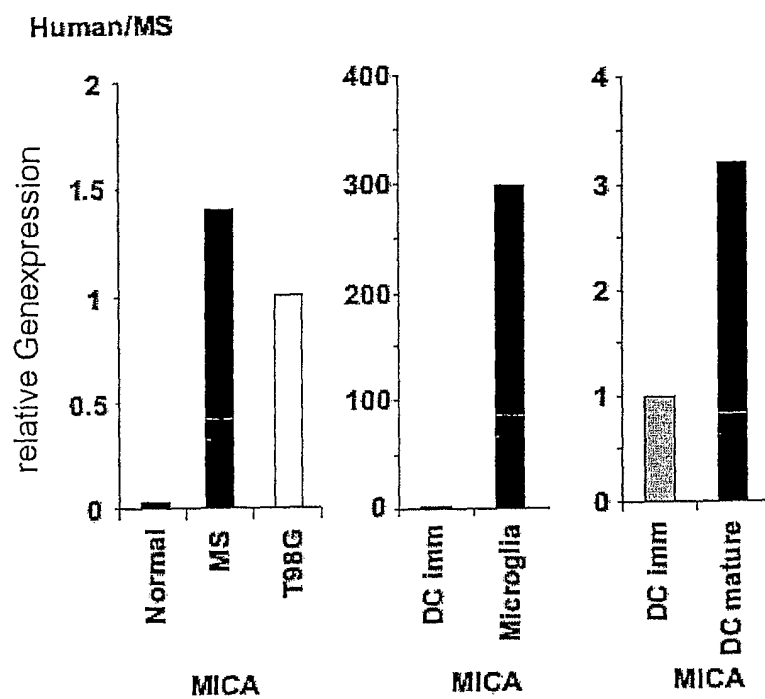


Fig. 1B

3 / 6

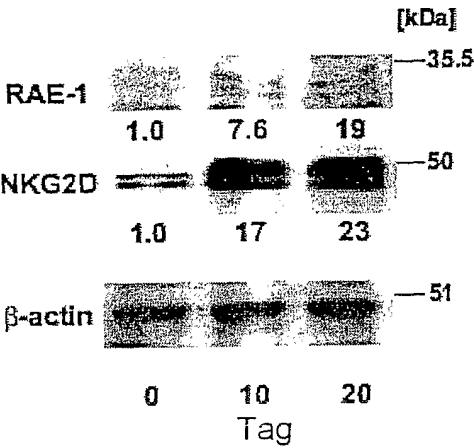


Fig. 2A

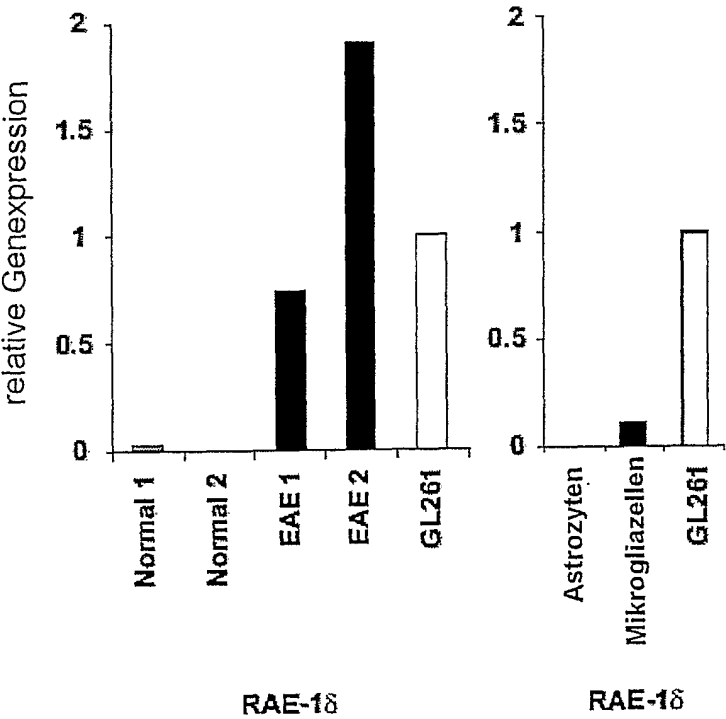
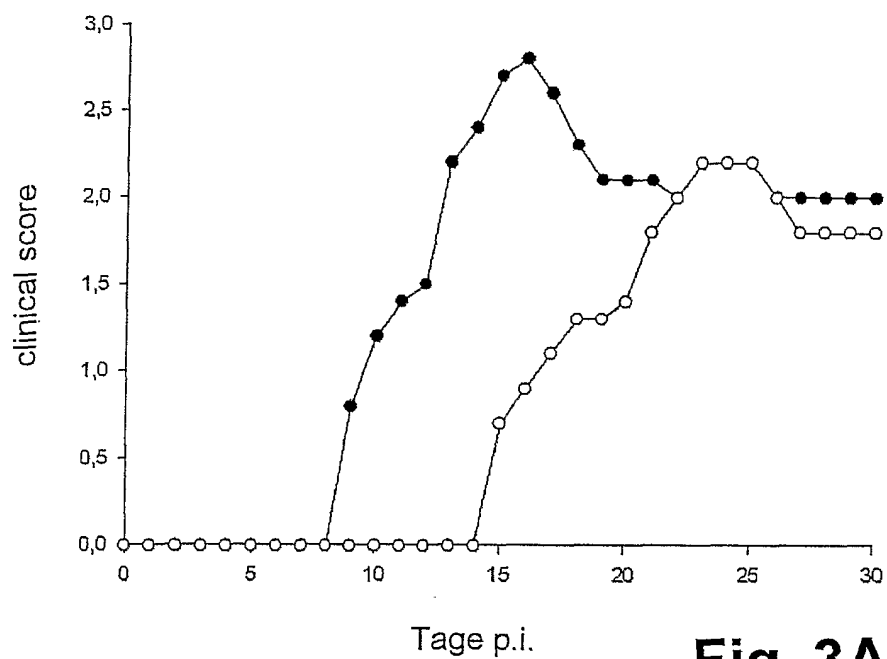
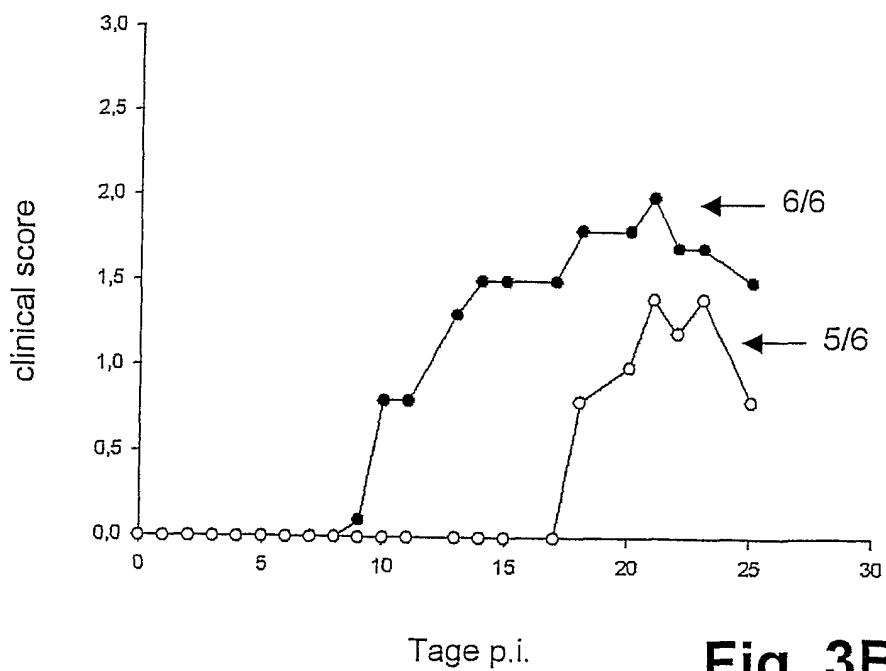


Fig. 2B

4 / 6

**Fig. 3A****Fig. 3B**

5 / 6

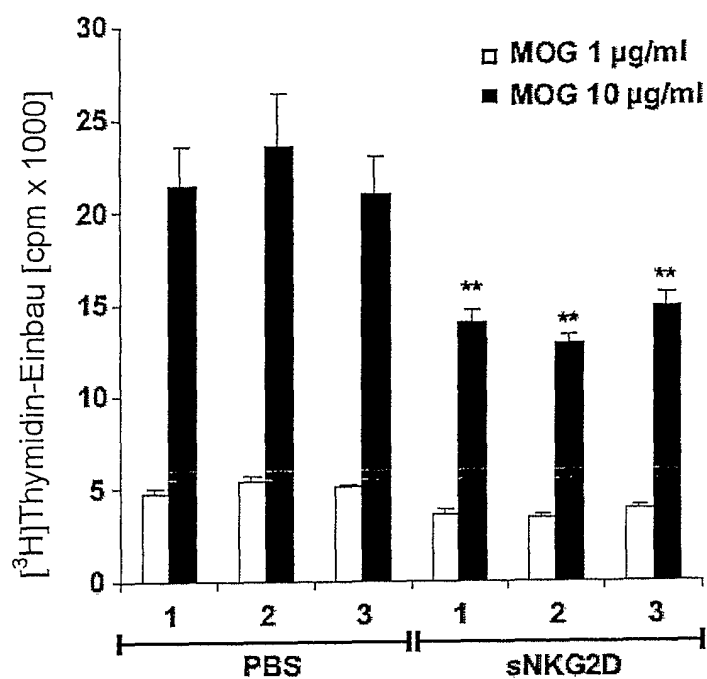


Fig. 3 C

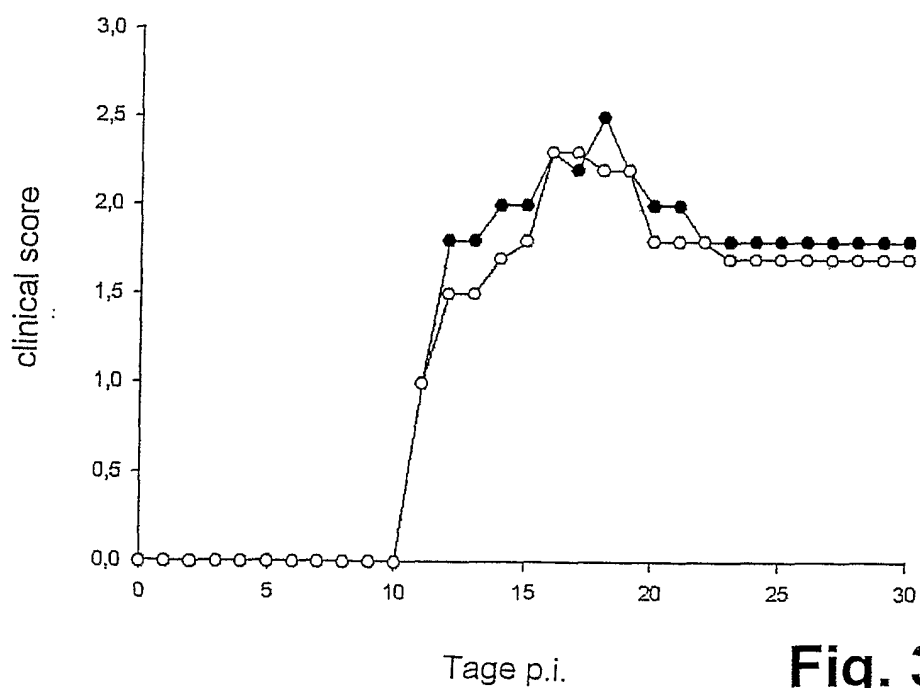


Fig. 3 D

6 / 6

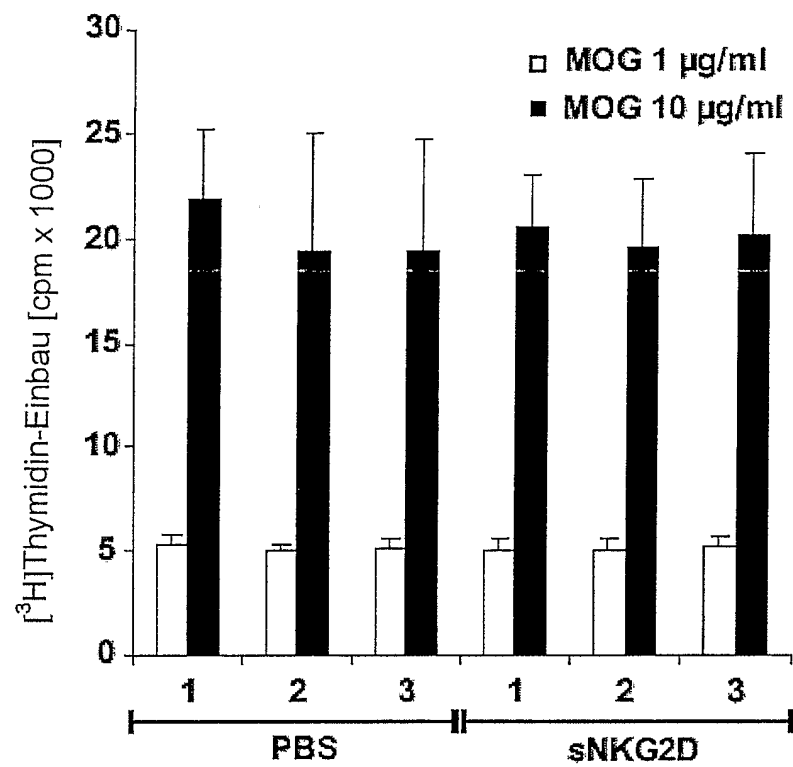


Fig. 3E

SEQUENCE LISTING

<110> Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Universitätsklinikum

<120> Verwendung von Blockern der NKG2D-Rezeptor/NKG2D-Liganden-Interaktion bei Autoimmunkrankheiten

<130> 5402P327

<160> 24

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 216

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> DOMAIN

<222> (1)..(51)

<223> Cytoplasmatische Domäne

<220>

<221> TRANSMEM

<222> (52)..(72)

<223>

<220>

<221> DOMAIN

<222> (73)..(216)

<223> Extrazelluläre Domäne

<400> 1

30

Met Gly Trp Ile Arg Gly Arg Arg Ser Arg His Ser Trp Glu Met Ser
 1 5 10 15

Glu Phe His Asn Tyr Asn Leu Asp Leu Lys Lys Ser Asp Phe Ser Thr
 20 25 30

Arg Trp Gln Lys Gln Arg Cys Pro Val Val Lys Ser Lys Cys Arg Glu
 35 40 45

Asn Ala Ser Pro Phe Phe Phe Cys Cys Phe Ile Ala Val Ala Met Gly
 50 55 60

Ile Arg Phe Ile Ile Met Val Ala Ile Trp Ser Ala Val Phe Leu Asn
 65 70 75 80

Ser Leu Phe Asn Gln Glu Val Gln Ile Pro Leu Thr Glu Ser Tyr Cys
 85 90 95

Gly Pro Cys Pro Lys Asn Trp Ile Cys Tyr Lys Asn Asn Cys Tyr Gln
 100 105 110

Phe Phe Asp Glu Ser Lys Asn Trp Tyr Glu Ser Gln Ala Ser Cys Met
 115 120 125

Ser Gln Asn Ala Ser Leu Leu Lys Val Tyr Ser Lys Glu Asp Gln Asp
 130 135 140

Leu Leu Lys Leu Val Lys Ser Tyr His Trp Met Gly Leu Val His Ile
 145 150 155 160

Pro Thr Asn Gly Ser Trp Gln Trp Glu Asp Gly Ser Ile Leu Ser Pro
 165 170 175

Asn Leu Leu Thr Ile Ile Glu Met Gln Lys Gly Asp Cys Ala Leu Tyr
 180 185 190

31

Ala Ser Ser Phe Lys Gly Tyr Ile Glu Asn Cys Ser Thr Pro Asn Thr
 195 200 205

Tyr Ile Cys Met Gln Arg Thr Val
 210 215

<210> 2

<211> 137

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Asn Ser Leu Phe Asn Gln Glu Val Gln Ile Pro Leu Thr Glu Ser Tyr
 1 5 10 15

Cys Gly Pro Cys Pro Lys Asn Trp Ile Cys Tyr Lys Asn Asn Cys Tyr
 20 25 30

Gln Phe Phe Asp Glu Ser Lys Asn Trp Tyr Glu Ser Gln Ala Ser Cys
 35 40 45

Met Ser Gln Asn Ala Ser Leu Leu Lys Val Tyr Ser Lys Glu Asp Gln
 50 55 60

Asp Leu Leu Lys Leu Val Lys Ser Tyr His Trp Met Gly Leu Val His
 65 70 75 80

Ile Pro Thr Asn Gly Ser Trp Gln Trp Glu Asp Gly Ser Ile Leu Ser
 85 90 95

Pro Asn Leu Leu Thr Ile Ile Glu Met Gln Lys Gly Asp Cys Ala Leu
 100 105 110

Tyr Ala Ser Ser Phe Lys Gly Tyr Ile Glu Asn Cys Ser Thr Pro Asn
 115 120 125

32

Thr Tyr Ile Cys Met Gln Arg Thr Val
 130 135

<210> 3
 <211> 383
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3

Met Gly Leu Gly Pro Val Phe Leu Leu Leu Ala Gly Ile Phe Pro Phe
 1 5 10 15

Ala Pro Pro Gly Ala Ala Ala Glu Pro His Ser Leu Arg Tyr Asn Leu
 20 25 30

Thr Val Leu Ser Trp Asp Gly Ser Val Gln Ser Gly Phe Leu Thr Glu
 35 40 45

Val His Leu Asp Gly Gln Pro Phe Leu Arg Cys Asp Arg Gln Lys Cys
 50 55 60

Arg Ala Lys Pro Gln Gly Gln Trp Ala Glu Asp Val Leu Gly Asn Lys
 65 70 75 80

Thr Trp Asp Arg Glu Thr Arg Asp Leu Thr Gly Asn Gly Lys Asp Leu
 85 90 95

Arg Met Thr Leu Ala His Ile Lys Asp Gln Lys Glu Gly Leu His Ser
 100 105 110

Leu Gln Glu Ile Arg Val Cys Glu Ile His Glu Asp Asn Ser Thr Arg
 115 120 125

Ser Ser Gln His Phe Tyr Tyr Asp Gly Glu Leu Phe Leu Ser Gln Asn

33

130	135	140
Leu Glu Thr Lys Glu Trp Thr Met Pro Gln Ser Ser Arg Ala Gln Thr		
145	150	155 160
Leu Ala Met Asn Val Arg Asn Phe Leu Lys Glu Asp Ala Met Lys Thr		
	165	170 175
Lys Thr His Tyr His Ala Met His Ala Asp Cys Leu Gln Glu Leu Arg		
	180	185 190
Arg Tyr Leu Lys Ser Gly Val Val Leu Arg Arg Thr Val Pro Pro Met		
	195	200 205
Val Asn Val Thr Arg Ser Glu Ala Ser Glu Gly Asn Ile Thr Val Thr		
	210	215 220
Cys Arg Ala Ser Gly Phe Tyr Pro Trp Asn Ile Thr Leu Ser Trp Arg		
	225	230 235 240
Gln Asp Gly Val Ser Leu Ser His Asp Thr Gln Gln Trp Gly Asp Val		
	245	250 255
Leu Pro Asp Gly Asn Gly Thr Tyr Gln Thr Trp Val Ala Thr Arg Ile		
	260	265 270
Cys Gln Gly Glu Glu Gln Arg Phe Thr Cys Tyr Met Glu His Ser Gly		
	275	280 285
Asn His Ser Thr His Pro Val Pro Ser Gly Lys Val Leu Val Leu Gln		
	290	295 300
Ser His Trp Gln Thr Phe His Val Ser Ala Val Ala Ala Ala Ala Ile		
	305	310 315 320
Phe Val Ile Ile Ile Phe Tyr Val Arg Cys Cys Lys Lys Lys Thr Ser		

34

325 330 335
Ala Ala Glu Gly Pro Glu Leu Val Ser Leu Gln Val Leu Asp Gln His
340 345 350
Pro Val Gly Thr Ser Asp His Arg Asp Ala Thr Gln Leu Gly Phe Gln
355 360 365
Pro Leu Met Ser Asp Leu Gly Ser Thr Gly Ser Thr Glu Gly Ala
370 375 380

<210> 4
<211> 276
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Glu Pro His Ser Leu Arg Tyr Asn Leu Thr Val Leu Ser Trp Asp Gly
1 5 10 15
Ser Val Gln Ser Gly Phe Leu Thr Glu Val His Leu Asp Gly Gln Pro
20 25 30
Phe Leu Arg Cys Asp Arg Gln Lys Cys Arg Ala Lys Pro Gln Gly Gln
35 40 45
Trp Ala Glu Asp Val Leu Gly Asn Lys Thr Trp Asp Arg Glu Thr Arg
50 55 60
Asp Leu Thr Gly Asn Gly Lys Asp Leu Arg Met Thr Leu Ala His Ile
65 70 75 80
Lys Asp Gln Lys Glu Gly Leu His Ser Leu Gln Glu Ile Arg Val Cys
85 90 95

35

Glu Ile His Glu Asp Asn Ser Thr Arg Ser Ser Gln His Phe Tyr Tyr
100 105 110

Asp Gly Glu Leu Phe Leu Ser Gln Asn Leu Glu Thr Lys Glu Trp Thr
115 120 125

Met Pro Gln Ser Ser Arg Ala Gln Thr Leu Ala Met Asn Val Arg Asn
130 135 140

Phe Leu Lys Glu Asp Ala Met Lys Thr Lys Thr His Tyr His Ala Met
145 150 155 160

His Ala Asp Cys Leu Gln Glu Leu Arg Arg Tyr Leu Lys Ser Gly Val
165 170 175

Val Leu Arg Arg Thr Val Pro Pro Met Val Asn Val Thr Arg Ser Glu
180 185 190

Ala Ser Glu Gly Asn Ile Thr Val Thr Cys Arg Ala Ser Gly Phe Tyr
195 200 205

Pro Trp Asn Ile Thr Leu Ser Trp Arg Gln Asp Gly Val Ser Leu Ser
210 215 220

His Asp Thr Gln Gln Trp Gly Asp Val Leu Pro Asp Gly Asn Gly Thr
225 230 235 240

Tyr Gln Thr Trp Val Ala Thr Arg Ile Cys Gln Gly Glu Glu Gln Arg
245 250 255

Phe Thr Cys Tyr Met Glu His Ser Gly Asn His Ser Thr His Pro Val
260 265 270

Pro Ser Gly Lys
275

36

<210> 5
<211> 383
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Gly Leu Gly Arg Val Leu Leu Phe Leu Ala Val Ala Phe Pro Phe
1 5 10 15

Ala Pro Pro Ala Ala Ala Glu Pro His Ser Leu Arg Tyr Asn Leu
20 25 30

Met Val Leu Ser Gln Asp Glu Ser Val Gln Ser Gly Phe Leu Ala Glu
35 40 45

Gly His Leu Asp Gly Gln Pro Phe Leu Arg Tyr Asp Arg Gln Lys Arg
50 55 60

Arg Ala Lys Pro Gln Gly Gln Trp Ala Glu Asp Val Leu Gly Ala Lys
65 70 75 80

Thr Trp Asp Thr Glu Thr Glu Asp Leu Thr Glu Asn Gly Gln Asp Leu
85 90 95

Arg Arg Thr Leu Thr His Ile Lys Asp Gln Lys Gly Gly Leu His Ser
100 105 110

Leu Gln Glu Ile Arg Val Cys Glu Ile His Glu Asp Ser Ser Thr Arg
115 120 125

Gly Ser Arg His Phe Tyr Tyr Asp Gly Glu Leu Phe Leu Ser Gln Asn
130 135 140

Leu Glu Thr Gln Glu Ser Thr Val Pro Gln Ser Ser Arg Ala Gln Thr
145 150 155 160

Leu Ala Met Asn Val Thr Asn Phe Trp Lys Glu Asp Ala Met Lys Thr
165 170 175

Lys Thr His Tyr Arg Ala Met Gln Ala Asp Cys Leu Gln Lys Leu Gln
180 185 190

Arg Tyr Leu Lys Ser Gly Val Ala Ile Arg Arg Thr Val Pro Pro Met
195 200 205

Val Asn Val Thr Cys Ser Glu Val Ser Glu Gly Asn Ile Thr Val Thr
210 215 220

Cys Arg Ala Ser Ser Phe Tyr Pro Arg Asn Ile Thr Leu Thr Trp Arg
225 230 235 240

Gln Asp Gly Val Ser Leu Ser His Asn Thr Gln Gln Trp Gly Asp Val
245 250 255

Leu Pro Asp Gly Asn Gly Thr Tyr Gln Thr Trp Val Ala Thr Arg Ile
260 265 270

Arg Gln Gly Glu Glu Gln Arg Phe Thr Cys Tyr Met Glu His Ser Gly
275 280 285

Asn His Gly Thr His Pro Val Pro Ser Gly Lys Val Leu Val Leu Gln
290 295 300

Ser Gln Arg Thr Asp Phe Pro Tyr Val Ser Ala Ala Met Pro Cys Phe
305 310 315 320

Val Ile Ile Ile Ile Leu Cys Val Pro Cys Cys Lys Lys Lys Thr Ser
325 330 335

Ala Ala Glu Gly Pro Glu Leu Val Ser Leu Gln Val Leu Asp Gln His
340 345 350

38

Pro Val Gly Thr Gly Asp His Arg Asp Ala Ala Gln Leu Gly Phe Gln
355 360 365

Pro Leu Met Ser Ala Thr Gly Ser Thr Gly Ser Thr Glu Gly Ala
370 375 380

<210> 6

<211> 276

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Glu Pro His Ser Leu Arg Tyr Asn Leu Met Val Leu Ser Gln Asp Glu
1 5 10 15

Ser Val Gln Ser Gly Phe Leu Ala Glu Gly His Leu Asp Gly Gln Pro
20 25 30

Phe Leu Arg Tyr Asp Arg Gln Lys Arg Arg Ala Lys Pro Gln Gly Gln
35 40 45

Trp Ala Glu Asp Val Leu Gly Ala Lys Thr Trp Asp Thr Glu Thr Glu
50 55 60

Asp Leu Thr Glu Asn Gly Gln Asp Leu Arg Arg Thr Leu Thr His Ile
65 70 75 80

Lys Asp Gln Lys Gly Gly Leu His Ser Leu Gln Glu Ile Arg Val Cys
85 90 95

Glu Ile His Glu Asp Ser Ser Thr Arg Gly Ser Arg His Phe Tyr Tyr
100 105 110

Asp Gly Glu Leu Phe Leu Ser Gln Asn Leu Glu Thr Gln Glu Ser Thr

39

115 120 125

Val Pro Gln Ser Ser Arg Ala Gln Thr Leu Ala Met Asn Val Thr Asn
130 135 140

Phe Trp Lys Glu Asp Ala Met Lys Thr Lys Thr His Tyr Arg Ala Met
145 150 155 160

Gln Ala Asp Cys Leu Gln Lys Leu Gln Arg Tyr Leu Lys Ser Gly Val
165 170 175

Ala Ile Arg Arg Thr Val Pro Pro Met Val Asn Val Thr Cys Ser Glu
180 185 190

Val Ser Glu Gly Asn Ile Thr Val Thr Cys Arg Ala Ser Ser Phe Tyr
195 200 205

Pro Arg Asn Ile Thr Leu Thr Trp Arg Gln Asp Gly Val Ser Leu Ser
210 215 220

His Asn Thr Gln Gln Trp Gly Asp Val Leu Pro Asp Gly Asn Gly Thr
225 230 235 240

Tyr Gln Thr Trp Val Ala Thr Arg Ile Arg Gln Gly Glu Glu Gln Arg
245 250 255

Phe Thr Cys Tyr Met Glu His Ser Gly Asn His Gly Thr His Pro Val
260 265 270

Pro Ser Gly Lys
275

<210> 7

<211> 244

<212> PRT

40

<213> Homo sapiens

<400> 7

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

41

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

<210> 8

<211> 181

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Asp Thr His Cys Leu Cys Tyr Asp Phe Ile Ile Thr Pro Lys Ser Arg
1 5 10 15

Pro Glu Pro Gln Trp Cys Glu Val Gln Gly Leu Val Asp Glu Arg Pro
20 25 30

Phe Leu His Tyr Asp Cys Val Asn His Lys Ala Lys Ala Phe Ala Ser
35 40 45

Leu Gly Lys Lys Val Asn Val Thr Lys Thr Trp Glu Glu Gln Thr Glu
50 55 60

Thr Leu Arg Asp Val Val Asp Phe Leu Lys Gly Gln Leu Leu Asp Ile

42

65						70						75						80
Gln	Val	Glu	Asn	Leu	Ile	Pro	Ile	Glu	Pro	Leu	Thr	Leu	Gln	Ala	Arg			
				85							90			95				
Met	Ser	Cys	Glu	His	Glu	Ala	His	Gly	His	Gly	Arg	Gly	Ser	Trp	Gln			
				100							105			110				
Phe	Leu	Phe	Asn	Gly	Gln	Lys	Phe	Leu	Leu	Phe	Asp	Ser	Asn	Asn	Arg			
				115							120			125				
Lys	Trp	Thr	Ala	Leu	His	Pro	Gly	Ala	Lys	Lys	Met	Thr	Glu	Lys	Trp			
				130							135			140				
Glu	Lys	Asn	Arg	Asp	Val	Thr	Met	Phe	Phe	Gln	Lys	Ile	Ser	Leu	Gly			
145								150							155			
				160							165			170				
Asp	Cys	Lys	Met	Trp	Leu	Glu	Glu	Phe	Leu	Met	Tyr	Trp	Glu	Gln	Met			
				165							170			175				
Leu	Asp	Pro	Thr	Lys														
				180														

```
210> 9
<211> 246
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

<400> 9

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

43

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

44

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> 10

<211> 181

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Asp Pro His Ser Leu Cys Tyr Asp Ile Thr Val Ile Pro Lys Phe Arg
 1 5 10 15

Pro Gly Pro Arg Trp Cys Ala Val Gln Gly Gln Val Asp Glu Lys Thr
 20 25 30

Phe Leu His Tyr Asp Cys Gly Asn Lys Thr Val Thr Pro Val Ser Pro
 35 40 45

Leu Gly Lys Lys Leu Asn Val Thr Thr Ala Trp Lys Ala Gln Asn Pro
 50 55 60

Val Leu Arg Glu Val Val Asp Ile Leu Thr Glu Gln Leu Arg Asp Ile
 65 70 75 80

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

Met Ser Cys Glu Gln Lys Ala Glu Gly His Ser Ser Gly Ser Trp Gln
 100 105 110

Phe Ser Phe Asp Gly Gln Ile Phe Leu Leu Phe Asp Ser Glu Lys Arg
 115 120 125

45

Met Trp Thr Thr Val His Pro Gly Ala Arg Lys Met Lys Glu Lys Trp
130 135 140

Glu Asn Asp Lys Val Val Ala Met Ser Phe His Tyr Phe Ser Met Gly
145 150 155 160

Asp Cys Ile Gly Trp Leu Glu Asp Phe Leu Met Gly Met Asp Ser Thr
165 170 175

Leu Glu Pro Ser Ala
180

<210> 11

<211> 244

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Met Ala Ala Ala Ala Ser Pro Ala Ile Leu Pro Arg Leu Ala Ile Leu
1 5 10 15

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

Ser Leu Trp Tyr Asn Phe Thr Ile Ile His Leu Pro Arg His Gly Gln
35 40 45

Gln Trp Cys Glu Val Gln Ser Gln Val Asp Gln Lys Asn Phe Leu Ser
50 55 60

Tyr Asp Cys Gly Ser Asp Lys Val Leu Ser Met Gly His Leu Glu Glu
65 70 75 80

Gln Leu Tyr Ala Thr Asp Ala Trp Gly Lys Gln Leu Glu Met Leu Arg

46

85

90

95

Glu Val Gly Gln Arg Leu Arg Leu Glu Leu Ala Asp Thr Glu Leu Glu
100 105 110

Asp Phe Thr Pro Ser Gly Pro Leu Thr Leu Gln Val Arg Met Ser Cys
115 120 125

Glu Cys Glu Ala Asp Gly Tyr Ile Arg Gly Ser Trp Gln Phe Ser Phe
130 135 140

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

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

Ser Gly Leu Thr Thr Phe Phe Lys Met Val Ser Met Arg Asp Cys Lys
180 185 190

Ser Trp Leu Arg Asp Phe Leu Met His Arg Lys Lys Arg Leu Glu Pro
195 200 205

Thr Ala Pro Pro Thr Met Ala Pro Gly Leu Ala Gln Pro Lys Ala Ile
210 215 220

Ala Thr Thr Leu Ser Pro Trp Ser Phe Leu Ile Ile Leu Cys Phe Ile
225 230 235 240

Leu Pro Gly Ile

<210> 12

<211> 181

<212> PRT

47

<213> Homo sapiens

<400> 12

Asp Ala His Ser Leu Trp Tyr Asn Phe Thr Ile Ile His Leu Pro Arg
1 5 10 15

His Gly Gln Gln Trp Cys Glu Val Gln Ser Gln Val Asp Gln Lys Asn
20 25 30

Phe Leu Ser Tyr Asp Cys Gly Ser Asp Lys Val Leu Ser Met Gly His
35 40 45

Leu Glu Glu Gln Leu Tyr Ala Thr Asp Ala Trp Gly Lys Gln Leu Glu
50 55 60

Met Leu Arg Glu Val Gly Gln Arg Leu Arg Leu Glu Leu Ala Asp Thr
65 70 75 80

Glu Leu Glu Asp Phe Thr Pro Ser Gly Pro Leu Thr Leu Gln Val Arg
85 90 95

Met Ser Cys Glu Cys Glu Ala Asp Gly Tyr Ile Arg Gly Ser Trp Gln
100 105 110

Phe Ser Phe Asp Gly Arg Lys Phe Leu Leu Phe Asp Ser Asn Asn Arg
115 120 125

Lys Trp Thr Val Val His Ala Gly Ala Arg Arg Met Lys Glu Lys Trp
130 135 140

Glu Lys Asp Ser Gly Leu Thr Thr Phe Phe Lys Met Val Ser Met Arg
145 150 155 160

Asp Cys Lys Ser Trp Leu Arg Asp Phe Leu Met His Arg Lys Lys Arg
165 170 175

48

Leu Glu Pro Thr Ala

180

<210> 13

<211> 263

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Met Arg Arg Ile Ser Leu Thr Ser Ser Pro Val Arg Leu Leu Leu Phe
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Ile Ala Leu Glu Ile Met Val Gly Gly His Ser
20 25 30

Leu Cys Phe Asn Phe Thr Ile Lys Ser Leu Ser Arg Pro Gly Gln Pro
35 40 45

Trp Cys Glu Ala Gln Val Phe Leu Asn Lys Asn Leu Phe Leu Gln Tyr
50 55 60

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

Val Tyr Ala Thr Ser Thr Trp Gly Glu Leu Thr Gln Thr Leu Gly Glu
85 90 95

Val Gly Arg Asp Leu Arg Met Leu Leu Cys Asp Ile Lys Pro Gln Ile
100 105 110

Lys Thr Ser Asp Pro Ser Thr Leu Gln Val Glu Met Phe Cys Gln Arg
115 120 125

Glu Ala Glu Arg Cys Thr Gly Ala Ser Trp Gln Phe Ala Thr Asn Gly

49

130	135	140
Glu Lys Ser Leu Leu Phe Asp Ala Met Asn Met Thr Trp Thr Val Ile		
145	150	155 160
Asn His Glu Ala Ser Lys Ile Lys Glu Thr Trp Lys Lys Asp Arg Gly		
	165	170 175
Leu Glu Lys Tyr Phe Arg Lys Leu Ser Lys Gly Asp Cys Asp His Trp		
	180	185 190
Leu Arg Glu Phe Leu Gly His Trp Glu Ala Met Pro Glu Pro Thr Val		
	195	200 205
Ser Pro Val Asn Ala Ser Asp Ile His Trp Ser Ser Ser Ser Leu Pro		
	210	215 220
Asp Arg Trp Ile Ile Leu Gly Ala Phe Ile Leu Leu Val Leu Met Gly		
	225	230 235 240
Ile Val Leu Ile Cys Val Trp Trp Gln Asn Gly Glu Trp Gln Ala Gly		
	245	250 255
Leu Trp Pro Leu Arg Thr Ser		
	260	

<210> 14

<211> 334

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

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

50

Leu Leu Leu Ser Ser Trp Cys Arg Thr Gly Leu 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 Ser 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 Leu Asp Ile Gln Leu Glu Asn
100 105 110

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

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

Gly Gln Ile Phe Leu Leu Phe Asp Ser Glu Asn 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

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

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

51

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

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

Ile Cys Ser Arg His Ser Leu Thr Gln Ser His Gly His His Pro Gln
 245 250 255

Ser Leu Gln Pro Pro Pro His Pro Pro Leu Leu His Pro Thr Trp Leu
 260 265 270

Leu Arg Arg Val Leu Trp Ser Asp Ser Tyr Gln Ile Ala Lys Arg Pro
 275 280 285

Leu Ser Gly Gly His Val Thr Arg Val Thr Leu Pro Ile Ile Gly Asp
 290 295 300

Asp Ser His Ser Leu Pro Cys Pro Leu Ala Leu Tyr Thr Ile Asn Asn
 305 310 315 320

Gly Ala Ala Arg Tyr Ser Glu Pro Leu Gln Val Ser Ile Ser
 325 330

<210> 15

<211> 246

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

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

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

52

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 Leu 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 Ile Asp
130 135 140

Gly Gln Thr 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

Asp Val Ala Met Ser Phe His Tyr Ile 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

53

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> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer für Real-Time PCR (18S)

<400> 16

cggctaccac atccaaggaa

20

<210> 17

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer für Real-Time PCR (18S)

<400> 17

gctggaatta ccgctggct

18

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer für Real-Time PCR (MICA)

<400> 18

ccttgcccat gaacgtcagg

20

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer für Real-Time PCR (MICA)

<400> 19

cctctgaggc ctcrcctgcg

19

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer für Real-Time PCR (RAE-1d)

<400> 20

tcctacccca gcagatgaag

20

<210> 21

<211> 21

<212> DNA

55

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer für Real-Time PCR (RAE-1d)

<400> 21

ccacttcagt ggcatttgct g

21

<210> 22

<211> 232

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 22

Met	Ala	Leu	Ile	Arg	Asp	Arg	Lys	Ser	His	His	Ser	Glu	Met	Ser	Lys
1				5					10					15	

Cys	His	Asn	Tyr	Asp	Leu	Lys	Pro	Ala	Lys	Trp	Asp	Thr	Ser	Gln	Glu
				20				25					30		

Gln	Gln	Lys	Gln	Arg	Leu	Ala	Leu	Thr	Thr	Ser	Gln	Pro	Gly	Glu	Asn
		35					40					45			

Gly	Ile	Ile	Arg	Gly	Arg	Tyr	Pro	Ile	Glu	Lys	Leu	Lys	Ile	Ser	Pro
		50				55					60				

Met	Phe	Val	Val	Arg	Val	Leu	Ala	Ile	Ala	Leu	Ala	Ile	Arg	Phe	Thr
65					70					75				80	

Leu	Asn	Thr	Leu	Met	Trp	Leu	Ala	Ile	Phe	Lys	Glu	Thr	Phe	Gln	Pro
				85					90					95	

Val	Leu	Cys	Asn	Lys	Glu	Val	Pro	Val	Ser	Ser	Arg	Glu	Gly	Tyr	Cys
			100						105				110		

56

Gly Pro Cys Pro Asn Asn Trp Ile Cys His Arg Asn Asn Cys Tyr Gln
 115 120 125

Phe Phe Asn Glu Glu Lys Thr Trp Asn Gln Ser Gln Ala Ser Cys Leu
 130 135 140

Ser Gln Asn Ser Ser Leu Leu Lys Ile Tyr Ser Lys Glu Glu Gln Asp
 145 150 155 160

Phe Leu Lys Leu Val Lys Ser Tyr His Trp Met Gly Leu Val Gln Ile
 165 170 175

Pro Ala Asn Gly Ser Trp Gln Trp Glu Asp Gly Ser Ser Leu Ser Tyr
 180 185 190

Asn Gln Leu Thr Leu Val Glu Ile Pro Lys Gly Ser Cys Ala Val Tyr
 195 200 205

Gly Ser Ser Phe Lys Ala Tyr Thr Glu Asp Cys Ala Asn Leu Asn Thr
 210 215 220

Tyr Ile Cys Met Lys Arg Ala Val
 225 230

<210> 23

<211> 219

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 23

Met Ser Lys Cys His Asn Tyr Asp Leu Lys Pro Ala Lys Trp Asp Thr
 1 5 10 15

Ser Gln Glu Gln Gln Lys Gln Arg Leu Ala Leu Thr Thr Ser Gln Pro
 20 25 30

57

Gly Glu Asn Gly Ile Ile Arg Gly Arg Tyr Pro Ile Glu Lys Leu Lys
35 40 45

Ile Ser Pro Met Phe Val Val Arg Val Leu Ala Ile Ala Leu Ala Ile
50 55 60

Arg Phe Thr Leu Asn Thr Leu Met Trp Leu Ala Ile Phe Lys Glu Thr
65 70 75 80

Phe Gln Pro Val Leu Cys Asn Lys Glu Val Pro Val Ser Ser Arg Glu
85 90 95

Gly Tyr Cys Gly Pro Cys Pro Asn Asn Trp Ile Cys His Arg Asn Asn
100 105 110

Cys Tyr Gln Phe Phe Asn Glu Glu Lys Thr Trp Asn Gln Ser Gln Ala
115 120 125

Ser Cys Leu Ser Gln Asn Ser Ser Leu Leu Lys Ile Tyr Ser Lys Glu
130 135 140

Glu Gln Asp Phe Leu Lys Leu Val Lys Ser Tyr His Trp Met Gly Leu
145 150 155 160

Val Gln Ile Pro Ala Asn Gly Ser Trp Gln Trp Glu Asp Gly Ser Ser
165 170 175

Leu Ser Tyr Asn Gln Leu Thr Leu Val Glu Ile Pro Lys Gly Ser Cys
180 185 190

Ala Val Tyr Gly Ser Ser Phe Lys Ala Tyr Thr Glu Asp Cys Ala Asn
195 200 205

Leu Asn Thr Tyr Ile Cys Met Lys Arg Ala Val
210 215

58

<210> 24

<211> 168

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> AS 4-11: Flag-tag; AS 15-20: Hexahistifin-tag; AS 21-26: Linker;
AS 27-168: Ektodomäne NKG2D

<400> 24

Ala Met Val Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Gly Met Val His His
1 5 10 15

His His His His Ser Ala Glu Gly Ser Gly Lys Glu Thr Phe Gln Pro
20 25 30

Val Leu Cys Asn Lys Glu Val Pro Val Ser Ser Arg Glu Gly Tyr Cys
35 40 45

Gly Pro Cys Pro Asn Asn Trp Ile Cys His Arg Asn Asn Cys Tyr Gln
50 55 60

Phe Phe Asn Glu Glu Lys Thr Trp Asn Gln Ser Gln Ala Ser Cys Leu
65 70 75 80

Ser Gln Asn Ser Ser Leu Leu Lys Ile Tyr Ser Lys Glu Glu Gln Asp
85 90 95

Phe Leu Lys Leu Val Lys Ser Tyr His Trp Met Gly Leu Val Gln Ile
100 105 110

Pro Ala Asn Gly Ser Trp Gln Trp Glu Asp Gly Ser Ser Leu Ser Tyr
115 120 125

Asn Gln Leu Thr Leu Val Glu Ile Pro Lys Gly Ser Cys Ala Val Tyr
130 . 135 140

Gly Ser Ser Phe Lys Ala Tyr Thr Glu Asp Cys Ala Asn Leu Asn Thr
145 150 155 160

Tyr Ile Cys Met Lys Arg Ala Val
165