



(19)

REPUBLIK
ÖSTERREICH
Patentamt

(10) Nummer:

AT 410 753 B

(12)

PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: A 1997/2000
(22) Anmeldetag: 28.11.2000
(42) Beginn der Patentdauer: 15.12.2002
(45) Ausgabetag: 25.07.2003

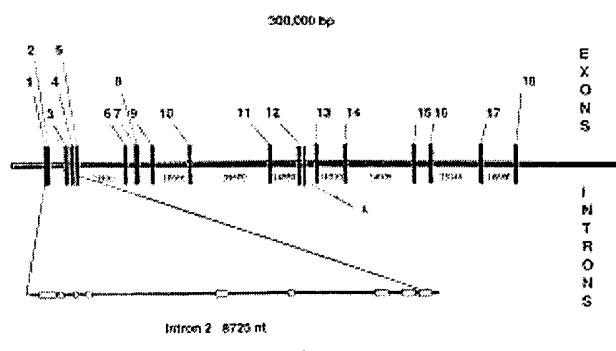
(51) Int. Cl.⁷: A61K 38/17
A61K 39/395, A61P 35/00,
G01N 33/53 C12Q 1/68

(73) Patentinhaber:
BIODEVELOPS VERWERTUNG VON LIZENZEN
GMBH
A-1030 WIEN (AT).

(54) PIBF FÜR DIE DIAGNOSE VON TUMOREN

AT 410 753 B

(57) Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Diagnostizierung eines Tumors bei einem Patienten, welches das Messen der Konzentration von Progesteron-induziertem immunmodulierendem Protein (PIBF) oder eines Derivats davon oder eines Fragments davon in der dem Patienten entnommenen Probe umfasst, und die Verwendung eines anti-PIBF-Antikörpers, eines PIBFs oder eines Derivats davon oder eines Fragments davon bzw. eines für PIBF codierenden Polynukleotids als Anti-Tumor-Medikament.



Die vorliegende Erfindung betrifft ein rekombinantes Protein mit einer Progesteron-induzierten immunmodulierenden Protein-(PIBF)-Aktivität, ein Nukleinsäure-Molekül, das für ein rekombinantes Protein mit einer PIBF-Aktivität codiert, einen Nukleinsäure-Vektor, der diese Nukleinsäuresequenz aufweist, eine Zelle, die diesen Vektor umfasst, und ein Verfahren zur Diagnostizierung eines Tumors bei einem Patienten.

Zur Aufrechterhaltung einer normalen Schwangerschaft ist die Produktion von Progesteron - einem Steroidhormon mit einem breiten immunsuppressiven Wirkungsspektrum - eine absolute Notwendigkeit. Periphere Lymphozyten gesunder schwangerer Frauen exprimieren nukleare Rezeptoren als Sensoren für dieses Hormon (Szekeres-Bartho et al., J. Reprod. Immunol. 16, 239 (1989); Szekeres-Bartho et al., Cell. Immunol. 125, 273 (1990)), und produzieren ein Vermittler-Protein mit der Bezeichnung Progesteron-induzierter Blockierungsfaktor (PIBF) (Szekeres-Bartho et al., Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol. 9, 15 (1985)). Die Sequenz der PIBF-cDNA aus der menschlichen Leber zeigte keine wesentliche Homologie mit der von irgend einem der bekannten Proteine (HSPIBF, Acc. No. Y09631). Das codierte Vorläuferprotein ist sehr hydrophil und hat ein Molekulargewicht von 89 kDa. Natürlich vorkommender PIBF ist, so wie ursprünglich entdeckt, ein 34-36 kDa immunmodulierendes Protein mit einer Sequenzlänge von 757 Aminosäuren.

Es wurde festgestellt, dass die Konzentration des PIBF in Harnproben gesunder Personen etwa 1-10 ng/ml beträgt, wogegen die Konzentration des PIBF bei schwangeren Frauen ab dem 2. Trimester in einem Bereich von etwa 70-150 ng/ml liegt. Diese hohen Mengen kehren nach einem Abortus oder nach Wehen rasch wieder auf das normale Niveau zurück.

Es zeigte sich, dass PIBF, welcher die Auswirkungen von Progesteron vermittelt, eine sehr starke immunmodulierende Funktion sowohl *in vitro* als auch *in vivo* aufweist. Tatsächlich erwies sich PIBF als für die Schwangerschaft im Mäusemodell essentiell, da aus den Kulturüberständen von Mauslymphozyten isolierter PIBF Föten vor der durch Antiprogesteron induzierten Resorption schützt. Außerdem bewirken neutralisierende Antikörper gegen den Maus-PIBF die Resorption von Embryonen und folglich einen Abortus. Die wichtige Rolle des PIBF bei der menschlichen Fortpflanzung wurde auch durch Messen der geringen Mengen in den Körperflüssigkeiten pathologischer Schwangerschaften bestätigt. PIBF spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Schwangerschaft, höchst wahrscheinlich dadurch, dass er natürliche Killer-Lymphozyten hemmt. Bedeutsamerweise kann durch experimentelle Manipulation der Menge des PIBF *in vitro* die Killer-Aktivität der peripheren Blutlymphozyten, die NK (natürliche Killer)-Zellen enthalten, moduliert werden. Es wurde festgestellt, dass es mindestens zwei Wirkmechanismen des PIBF auf NK-Zellen gibt: eine ist eine direkte Hemmung der NK-Zellaktivität. NK-Zellen töten ihre Ziel-Zellen durch Exocytose von Perforin und Serin-Esterase enthaltenden Granula in der Kontaktfläche zwischen Effektor- und Ziel-Zellen. Deziduale Lymphozyten - von welchen 60 % NK-Oberflächenmarker tragen - besitzen einen hohen Perforingehalt, sie üben jedoch nur eine geringe cytotoxische Aktivität aus. Obwohl aktivierte NK-Zellen ihre Ziele finden und in Anwesenheit von PIBF binden, setzen sie jedoch kein Perforin aus den Lagergranula frei, und infolgedessen kommt es zu keiner Lyse der Ziel-Zellen. Es scheint, dass PIBF die NK-Zellen lähmt und den cytotoxischen Mechanismus durch Hemmung der Degranulation und dadurch der Freisetzung der Killer-substanzen unter Kontrolle hält.

Es gibt einen weiteren indirekten Mechanismus, mittels welchem PIBF seine Anti-NK-Wirkung ausübt, nämlich durch eine veränderte Cytokin-Expression. In Anwesenheit von PIBF kommt es zu einer beträchtlichen Abnahme der TNF α -(Tumor-Nekrose-Faktor α)-Produktion durch NK-Zellen, die auch bei der Niederregulierung der NK-Aktivität eine Rolle spielen könnte. Die Menge an sezerniertem TNF α steht im umgekehrten Verhältnis zur PIBF-Produktion, und zwar sowohl *in vitro* als auch *in vivo*.

Der zweite Hauptwirkungsmechanismus von PIBF ist die Induktion der T H_2 -Cytokin-Dominanz. Die T H_2 -Dominanz trägt zur Verringerung der zellvermittelten Reaktionen und zur Verbesserung der B-Zellen bei, wogegen die T H_1 -Dominanz zu verringerten humoralen Reaktionen führt und die zellimmunologischen Mechanismen begünstigt. Sezernierter PIBF erleichtert die Produktion von T H_2 -Cytokinen, wie IL-3, IL-4 und IL-10, wogegen er T H_1 -Cytokine, wie IL-12 und IFN- γ supprimiert, und zwar sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Die Neutralisierung des PIBF durch spezifische Antikörper führt *in vivo* zu einer T H_1 -Verschiebung, die auch ein Charakteristikum von fehlgeschlagenen Schwangerschaften ist. Die Auswirkung des PIBF auf humorale Immunreaktionen ist nicht nur eine

einfache Verbesserung, sondern auch die Induktion der Erzeugung asymmetrischer Antikörper. Dies ist eine Population von Antikörpern (ab), die auf Grund des Vorhandenseins eines Mannose-reichen Oligosaccharid-Restes an einem der Fab-Arme des Moleküls eine asymmetrische Struktur hat, und die keine oder nur geringe Effektorfunktionen hat; diese ab könnten jedoch als blockierende Antikörper wirken. Das Verhältnis von asymmetrischem IgG war in Überständen von Hybridom-Zellen, die in Gegenwart von PIBF gezüchtet worden waren, wesentlich höher als in jenen, die in Abwesenheit von PIBF gezüchtet worden waren. Weitere Untersuchungen zeigten ein positives Verhältnis zwischen asymmetrischem Antikörpergehalt der Seren und der PIBF-Expression auf Lymphozyten. Weiters verringerte die Blockierung der Progesteron-Rezeptoren durch RU 486 oder die Neutralisierung endogener PIBF-Aktivität durch spezifische anti-PIBF-Antikörper, die Produktion asymmetrischer Antikörper bei trächtigen Mäusen ganz wesentlich.

Maligne Tumoren, d.h. Krebsarten, sind in allen entwickelten Ländern nach Herzerkrankungen die zweite Haupttodesursache und treten bei einer von drei Personen auf. Eine von je vier Personen stirbt an Krebs. Krebs ist vor allem durch eine Zunahme der Anzahl der abnormalen oder neoplastischen Zellen gekennzeichnet, die von einem normalen Gewebe stammen, welches sich zur Bildung einer Tumormasse vermehrt, durch die Invasion benachbarter Gewebe durch diese neoplastischen Tumorzellen, und durch die Erzeugung maligner Zellen, welche über das Blut oder das Lymphsystem zu regionalen Lymphknoten und zu entfernten Stellen gelangen. Letzteres Fortschreiten zur Malignität wird als Metastase bezeichnet.

Krebs kann aus dem Zusammenbrechen der Kommunikation zwischen neoplastischen Zellen und ihrer Umgebung, einschließlich ihrer normalen Nachbarzellen, entstehen. Sowohl wachstums-stimulierende als auch als wachstumshemmende Signale werden routinemäßig zwischen Zellen innerhalb eines Gewebes ausgetauscht. Normalerweise teilen sich Zellen bei Fehlen stimulierender Signale nicht, und in gleicher Weise hören sie bei Vorliegen von Hemmsignalen auf, sich zu teilen. Im Krebs- oder neoplastischen Zustand erwirbt eine Zelle die Fähigkeit, sich über diese Signale hinwegzusetzen und sich unter Bedingungen, unter welchen normale Zellen nicht wachsen würden, zu vermehren.

Tumorzellen müssen eine Reihe verschiedener fehlerhafter Merkmale erwerben, um sich zu vermehren. Diese Anforderung wird durch die Tatsache belegt, dass die Genome bestimmter gut untersuchter Tumoren mehrere verschiedene, unabhängig voneinander veränderte Gene aufweisen, einschließlich aktiver Onkogene und inaktiver Tumor-Suppressor-Gene. Jede dieser genetischen Veränderungen scheint dafür verantwortlich zu sein, einige dieser Merkmale, die insgesamt den kompletten neoplastischen Phänotyp repräsentieren, zu verleihen.

Tumorzellen tragen Antigene, die als für den Körper fremd erkannt werden können, und es ist eine der Hauptfunktionen des Immunsystems, solche Zellen zu eliminieren, bevor sie große Tumoren bilden können. Diese Immunüberwachung ist bei Patienten mit fortschreitend malignen Erkrankungen deutlich wirkungslos. Eine Reihe von Schutzmaßnahmen wurde identifiziert, die eine Eigenreaktivität supprimiert, und die eine Hauptbarriere in der Fähigkeit des Immunsystems, Tumorzellen auszulöschen, darstellen kann. Es gibt eine Reihe von Mechanismen, die von Tumorzellen ausgeübt werden, wie 1. die Nichtexpression klassischer und die Expression nicht-klassischer, selbstidentifizierender Klasse HMHC-Moleküle (wie HLA-G), welche die Tötungswirkung der (Tumor) Antigen-spezifischen Klasse HMHC-eingeschränkten CTLs unterminiert; 2. eine Tendenz zu T_H2-Reaktionen, wobei die T_H1-Helferfunktion und folglich wirksame cytotoxische Antitumorreaktionen supprimiert werden; und 3. die Produktion immunsuppressiver Faktoren, die lokale und systemische Immunreaktionen niederregulieren (beispielsweise verringert die Sekretion von TGF-β die T-Zellen-Proliferation und die Cytotoxizität die Expression von fas-Ligand, die eine Apoptose von CTLs induziert.). Als Resultat dieser kumulativen Wirkungen haben die Tumoren einen immunologisch privilegierten Zustand und wachsen ohne oder mit einer eingeschränkten Kontrolle durch das Immunsystem.

Es ist ziemlich genau erwiesen, dass viele pathologische Zustände, wie Infektionen, Krebs, Autoimmunerkrankungen, usw. durch die ungünstige Expression bestimmter Moleküle gekennzeichnet sind. Diese Moleküle dienen somit als "Marker" für einen bestimmten pathologischen oder abnormalen Zustand. Abgesehen von ihrer Verwendung als diagnostische "Ziele", d.h. Materialien, die zur Diagnose dieser abnormalen Zustände identifizierbar sind, dienen die Moleküle als Reagenzien, die verwendet werden können, um diagnostische und/oder therapeutische Mittel zu

erzeugen.

Ein Ziel der vorliegenden Erfindung ist ein neues Verfahren zur Diagnostizierung eines Tumors bei einem Patienten, das leicht und sicher durchführbar ist, welches Verfahren keine Hgh-Tech-Geräte erfordert, dem Patienten keine besonderen Unannehmlichkeiten verursacht, das rasch durchführbar ist und Ergebnisse bringt, die eine Unterscheidung zwischen einem Patienten mit einem Tumor und einem gesunden Patienten erlauben.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung eines Sets zur Durchführung des Verfahrens zur Diagnostizierung eines Tumors bei einem Patienten.

Noch ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung einer wirksamen Antitumormedizin.

Das Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung zur Diagnostizierung eines Tumors bei einem Patienten, mit welchem das obige Ziel erreicht wird, umfasst das Entnehmen einer Probe vom Patienten, das Messen der Konzentration des PIBF (Progesteron-induzierten Blockierungs-Faktors) oder eines Derivats davon oder eines Fragments davon in der Probe und das Bestimmen, ob die Konzentration des PIBF in der Probe über oder unter einem vorbestimmten Schwellenwert liegt, wobei die Konzentration über dem Schwellenwert einen Patienten mit einem Tumor identifiziert.

Während der Charakterisierung von PIBF als wichtiges immunmodulierendes Molekül für die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft zeigte es sich überraschenderweise, dass Tumorzellen PIBF oder PIBF-verwandte Substanzen exprimieren, wogegen bei angrenzenden normalen Geweben keine oder nur eine geringe PIBF-Reaktivität feststellbar ist. Dies deutet darauf hin, dass PIBF bei der Entwicklung oder Aufrechterhaltung der immunologischen Toleranz gegenüber bösartig transformierten Zellen eine Rolle spielt und daher einen nützlichen Marker für Tumorzellen bildet.

Daher macht sich das Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung die Tatsache zu Nutze, dass die Konzentration von PIBF in einer Probe, die vom zu testenden Patienten genommen worden ist, höher ist als die Konzentration von PIBF in einer Probe, die von einer gesunden Person genommen wurde.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung kann die vom Patienten genommene Probe jede Art von Probe, die flüssig oder auch nicht ist, sein und kann von praktisch jedem Teil des Körpers stammen. Die Konzentration des PIBF kann gemäß jedem auf diesem Gebiet bekannten Verfahren, das die Quantifizierung der Konzentration von PIBF in einer Probe ermöglicht, gemessen werden. Diese kann chemische, mikrobiologische, physikalische Techniken, Färbung etc. auf Flüssigkeiten, Gewebsproben usw. umfassen. Zu den möglichen Methoden zählen in vivo-Bildgebung mittels Computer-Tomograph (CT) und Magnetresonanz-Bild (Magnetic Resonance Image, MRI) nach Markierung mit Radionuklein- bzw. paramagnetischen (z.B. Gadolinium-)Markierungen.

Da der PIBF Stoffwechsel- oder anderen Veränderungen im Körper des Patienten unterworfen sein kann, kann der PIBF Modifikationen aufweisen, je nach dem, welche Probe vom Patienten genommen wurde. Der PIBF kann beispielsweise gespalten worden sein, so dass nur ein Fragment des PIBF in der vorhandenen Probe vorliegt. Der PIBF kann weiters so modifiziert worden sein, dass ein Derivat des PIBF in dieser Probe vorliegt oder auch ein Fragment dieses Derivats. Daher kann auch ein PIBF-Derivat oder ein Fragment des PIBF oder des PIBF-Derivats oder PIBF-verwandte Substanzen (wie beispielsweise ein gespaltenes Produkt von 34 kDa oder ein alternativ gespleißtes 14 kDa-Produkt) als Indikation der Konzentration des PIBF im Patienten verwendet werden, und daher kann die jeweilige Konzentration für das Verfahren zur Diagnostizierung eines Tumors bei einem Patienten gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet werden.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung kann das Fragment des PIBF oder des PIBF-Derivats beispielsweise weniger als 715 Aminosäuren, vorzugsweise weniger als 500 Aminosäuren, noch mehr bevorzugt weniger als 200 Aminosäuren, und am meisten bevorzugt weniger als 50 Aminosäuren, umfassen.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung umfasst der Ausdruck "Derivat" beispielsweise alle natürlichen oder selbst nicht natürlich auftretenden Modifikationen, z.B. Spaltung, Glykosylierungen, Methylierungen, Acetylierungen, Amidierungen, Phosphorylierungen, Sulfatierungen, Deletionen, Substitutionen, etc..

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung bezieht sich auch "Schwellenwert" auf einen Konzent-

rationswert, der im Allgemeinen die mittlere Probenkonzentration von PIBF bei gesunden Proben-spendern sein wird. Es ist möglich, eine bekannte allgemeine mittlere PIBF-Konzentration bei gesunden Menschen gemäß der Literatur zu nehmen oder auch die Probenkonzentration von PIBF bei gesunden Spendern bei der Durchführung der vorliegenden Erfindung zu bestimmen. Der 5 Schwellenwert kann auch bei gesunden (normalen) Proben bestimmt werden, die früher (im gesunden Zustand) von derselben Person entnommen wurden. Beispiele für solche Schwellenwerte können beispielsweise zwischen 1 und 10 ng/ml, vorzugsweise zwischen 1 und 5 ng/ml, sein, wobei die Konzentration vom Detektionsverfahren sowie vom Typ des Tumors abhängt.

Bei der Bestimmung des Schwellenwertes ist es jedoch wichtig, dass die Probe von der gesunden Person nicht von einer schwangeren Frau genommen wird, da die PIBF-Konzentration bei Proben von schwangeren Frauen höher ist als die PIBF-Konzentration in Proben nicht-schwangerer Frauen.

Die PIBF-Konzentration, die in der vom Patienten entnommenen Probe gemessen wird, welche über dem vorbestimmten Schwellenwert liegt, identifiziert Individuen mit einem Verdacht auf einen 15 Tumor. Ein "Tumor", wie hierin verwendet, bezeichnet jedes neoplastische Zellwachstum und jede Vermehrung, sei sie bösartig oder gutartig, und alle vor-kanzerösen und kanzerösen Zellen und Gewebe.

Unter den Ausdruck "Patient" fallen im Rahmen der vorliegenden Erfindung Patienten mit einem Tumor, jedoch auch ein Patient, bei dem die Möglichkeit besteht, dass er einen Tumor hat, 20 sowie gesunde Menschen, die sich einer allgemeinen Routineuntersuchung unterziehen.

Da die Schwangerschaft auch zu erhöhten PIBF-Mengen führt, müssen sexuell aktive Frauen mittels herkömmlicher Schwangerschaftstests (z.B. auf Grund von hCG) getestet werden, bevor sie 25 als Patienten mit einem Tumor angesehen werden. Es bedeutet auch, dass es sehr schwierig ist, diesen Test zur Detektion von Tumorwachstum zu benutzen, wenn der Patient eine schwangere Frau ist, die über das erste Trimester hinaus ist. Da jedoch ein beträchtlicher Teil der mit einer Schwangerschaft in Beziehung stehenden Malignitäten mit dem unkontrollierten Wachstum von Schwangerschafts-bezogenen Geweben zu tun hat (wie Trophoblastenzellen bei Mola hydatidosa), könnten extrem hohe PIBF-Mengen (> 150-200 ng/ml) ein Tumorwachstum mit oder ohne Vorhandensein eines lebensfähigen Babys anzeigen.

30 Vorzugsweise ist der Tumor, der mit dem Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung diagnostiziert werden soll, ein epitheliales Carcinom. Da die überwiegende Mehrzahl der Human-Tumoren (bezogen auf die weltweiten Sterblichkeitsdaten) epitheliale Carcinome sind (Lunge, Brust, Colon, usw.), ist das Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung für die Diagnose dieser Art von Tumor besonders vorteilhaft.

35 Das epitheliale Carcinom ist vorzugsweise ein Lungen-Carcinom, Colon-Carcinom, bzw. ein Brust-Carcinom. Die PIBF-Konzentration bei Proben, die von Patienten mit den oben erwähnten Tumoren entnommen wurden, ist besonders hoch im Vergleich zu PIBF-Konzentrationen in Proben von gesunden Patienten. Daher identifiziert, wenn das Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung zur Diagnostizierung eines der oben erwähnten Tumoren verwendet wird, eine Konzentration, 40 die über dem Schwellenwert liegt, Individuen mit einem Verdacht auf einen Tumor. Eine Konzentration, die unter dem Schwellenwert liegt, schließt jedoch nicht unbedingt das Vorhandensein eines Tumors in bestimmten Fällen aus.

Gemäß einer vorteilhaften Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die Probe eine Körperflüssigkeit, vorzugsweise Harn bzw. Serum. Dies ermöglicht eine sehr einfache Art der Proben-nahme vom Patienten, ohne jeglichen chirurgischen Schritt und ohne die Notwendigkeit spezifi-scher High-Tech-Instrumente. Die Körperflüssigkeit kann in jedem Labor oder selbst im Heim des Patienten entnommen werden und ist besonders vorteilhaft für eine Routinediagnose, eine Diagno-se bei einem Patienten, der sehr schwach ist, und für regelmäßige Überprüfungen des Fortschrei-tens des Tumors bei einem Patienten. Die PIBF-Konzentration kann beispielsweise mittels einer 50 Trockenchemie-Methode, z.B. mit einem Streifen, der seine Farbe je nach der PIBF-Konzentration in einer Probe, in die er eingetaucht wird, ändert, gemessen werden.

Alternativ ist die Probe eine Gewebsprobe. Obwohl die Entnahme dieser Art von Probe aus dem Patienten nicht so einfach ist wie das Entnehmen einer Körperflüssigkeit, ermöglicht ein Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung, bei welchem eine Gewebsprobe vom Patienten verwendet wird, die direkte Lokalisierung des Tumors, insbesondere, wenn verschiedene Gewebs-

proben entnommen und miteinander verglichen werden. Weiters ist es möglich, die Progression des Tumors direkt zu verfolgen. Außerdem kann das Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung durch Detektion der Gewebe mit einem Tumor weiters zumindest als ein zusätzliches Verfahren zur Entscheidung, ob Gewebe und welche Teile eines Körpers des Patienten chirurgisch entfernt werden müssen, verwendet werden.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist der Schwellenwert die Konzentration des PIBF in einer Probe einer gesunden Person. Natürlich ist der Schwellenwert besonders präzise, wenn er die mittlere Konzentration des PIBF einer Mehrzahl von Proben von gesunden Personen ist.

Vorzugsweise wird der Schwellenwert durch Messen der Konzentration des PIBF in einer Probe mindestens einer gesunden Person parallel zur Bestimmung der Konzentration des PIBF in einer Probe des Patienten bestimmt. Da die gemessene Konzentration vom Verfahren der Messung der PIBF-Konzentration abhängt, ist die Diagnose spezifischer und exakter, wenn das Verfahren zur Messung der PIBF-Konzentration in der Probe des Patienten und in der Probe der gesunden Person identisch ist. Um die Sensitivität des Verfahrens weiters zu erhöhen, werden die Probe des Patienten und die Probe der gesunden Person vorzugsweise parallel gemessen, z.B. zur selben Zeit, um jegliche störende Parameter, z.B. Temperatur, Puffer, etc., die einen Einfluss auf das Ergebnis haben, zu eliminieren. Die Probe der gesunden Person wird vorzugsweise parallel als "Negativprobe" gemessen.

Vorteilhaft wird als positive Kontrolle die Konzentration des PIBF oder eines Derivats davon oder eines Fragments davon in einer Probe, die eine bestimmte Konzentration von PIBF oder eines Derivats davon oder eines Fragments davon aufweist, parallel zur Bestimmung der PIBF-Konzentration in der Probe des Patienten gemessen. Die Parallel-Messung der positiven Kontrolle ermöglicht es, die Ergebnisse zu kontrollieren und jegliche Divergenz im Verfahren festzustellen.

Vorzugsweise wird die PIBF-Konzentration in der Probe immunologisch gemessen. Jedes immunologische Verfahren, das dem Fachmann bekannt ist, kann angewendet werden. Immunologische Verfahren oder sehr sensitive Verfahren zur Detektion von Molekülen sind daher zur Messung der PIBF-Konzentration in der Probe besonders vorteilhaft. Um das immunologische Verfahren durchzuführen, ist es notwendig, mindestens einen anti-PIBF-Antikörper zu haben, der spezifisch an PIBF, Derivate davon oder Fragmente davon, bindet. Der Antikörper kann monoklonal oder polyklonal sein und kann weiters rekombinant sein. Weiters können humanisierte monoklonale oder durch Phagen codierte monoklonale Einzelketten-Antikörper verwendet werden.

"Einzelketten-Antikörper" sind strukturell so definiert, dass sie den Bindungsteil eines ersten Polypeptids aus der variablen Region eines Antikörpers in Verbindung mit dem Bindungsteil eines zweiten Polypeptids aus der variablen Region eines Antikörpers umfassen, wobei die beiden Polypeptide durch einen Peptid-Linker verbunden sind, der das erste und das zweite Polypeptid zu einer einzigen Polypeptidkette verbindet. Die einzige Polypeptidkette umfasst somit ein Paar variabler Regionen, die durch einen Polypeptid-Linker verbunden sind. Die Regionen können sich zur Bildung einer funktionalen Antigen-Bindungsstelle verbinden, wie in jenem Fall, in welchem die Regionen ein variables Regionen-Paar mit einer leichten Kette und einer schweren Kette mit entsprechend paarweisen komplementären Bestimmungsregionen (complementary determining regions, CDRs) umfassen.

Der Ausdruck "humanisierter Antikörper", wie hierin verwendet, bedeutet Antikörper-Moleküle, in welchen Aminosäuren in den bekannten Antigenbindungsreagenzien zwecks größerer Ähnlichkeit mit einem humanen Antikörper ersetzt wurden, wobei jedoch die ursprüngliche Bindungsfähigkeit erhalten bleibt.

Die Antikörper können unter Verwendung von Verfahren, die auf diesem Gebiet wohlbekannt sind, erzeugt werden. Zu solchen Antikörpern zählen, ohne auf diese eingeschränkt zu sein, polyklonale, monoklonale, rekombinante, chimäre, Einzelketten-(single chain)-Antikörper, Fab-Fragmente und Fragmente, die von einer Fab-Expressionsbibliothek erzeugt wurden. Neutralisierende Antikörper (d.h. jene, die die Dimer-Bildung hemmen) sind zur therapeutischen Verwendung besonders bevorzugt.

Für die Herstellung von Antikörpern können verschiedene Wirte, einschließlich Ziegen, Kaninchen, Ratten, Mäuse, Hühner (Yab), Menschen und andere, durch Injektion mit natürlichem oder rekombinantem PIBF-Protein oder jedem Fragment oder Oligopeptid desselben, das immunogene

Eigenschaften aufweist, oder einer PIBF-DNA (Fragment) immunisiert werden. Je nach der Wirts-Spezies können verschiedene Adjuvantien zur Steigerung der immunologischen Reaktion verwendet werden. Zu solchen Adjuvantien zählen, ohne auf diese eingeschränkt zu sein, Freund' sches Adjuvans, Mineralgele, wie Aluminiumhydroxid, und grenzflächenaktive Substanzen, wie Lysolezithin, Pluronic-Polyole, Polyanione, Aluminium, Polykationen (z.B. polyArg), Peptide, Ölemulsionen, Schlüsselloch-Napfschnecken-Haemocyanin (keyhole limpet hemocyanin) und Dinitrophenol.

5 Unter den bei Menschen verwendeten Adjuvantien sind BCG (Bacilli Calmette-Guerin) und Corynebacterium parvum besonders bevorzugt.

Es ist bevorzugt, dass die Peptide, Fragmente oder Oligopeptide, die zur Induktion von Antikörpern gegen PIBF verwendet werden, eine Aminosäuresequenz aufweisen, die aus mindestens fünf Aminosäuren und, mehr bevorzugt, mindestens 10 Aminosäuren besteht. Es ist auch bevorzugt, dass sie identisch mit einem Teil der Aminosäuresequenz des natürlichen Proteins sind. Kurze Abschnitte von PIBF-Aminosäuren können mit jenen eines anderen Proteins, wie dein Schlüsselloch-Napfschnecken-Haemocyanin fusioniert werden, und Antikörper gegen das chimäre Molekül werden erzeugt.

10 Monoklonale Antikörper gegen PIBF können unter Verwendung jeder Technik, die eine Erzeugung von Antikörper-Molekülen durch kontinuierliche Zelllinien in Kultur vorsieht, hergestellt werden. Zu diesen zählen die Hybridom-Technik, die Human-B-Zellen-Hybridom-Technik und die EBV-Hybridom-Technik, ohne jedoch auf diese eingeschränkt zu sein.

15 Außerdem können Techniken, die für die Herstellung "chimärer Antikörper" entwickelt wurden, das Spleißen von Maus-Antikörper-Genen zu humanen Antikörper-Genen zum Erhalt eines Moleküls mit entsprechender Antigen-Spezifität und biologischer Aktivität verwendet werden. Alternativ können Techniken, die für die Erzeugung von Einzelketten-Antikörpern beschrieben wurden, adaptiert werden, wobei Verfahren des Standes der Technik verwendet werden, um PIBF-spezifische Einzelketten-Antikörper zu erzeugen. Antikörper mit verwandter Spezifität, jedoch mit einer unterschiedlichen idiotypischen Zusammensetzung, können durch das Mischen von Ketten ("chain shuffling") aus randomisierten kombinatorischen Immunglobulin-Bibliotheken erzeugt werden.

20 Antikörper können auch durch Induktion einer *in vivo*-Produktion in der Lymphozyten-Population oder durch Screenen rekombinanter Immunglobulin-Bibliotheken oder von Gruppen hoch-spezifischer Bindungs-Reagenzien erzeugt werden.

25 Antikörper-Fragmente, die spezifische Bindungsstellen für PIBF enthalten, können ebenfalls hergestellt werden. Beispielsweise zählen zu diesen Fragmenten, ohne auf diese eingeschränkt zu sein, die F(ab')2-Fragmente, die durch Pepsin-Verdau des Antikörper-Moleküls erzeugt werden können, und die Fab-Fragmente, die durch Reduktion der Disulfid-Brücken der F(ab')2-Fragmente erzeugt werden können. Alternativ können Fab-Expressions-Bibliotheken konstruiert werden, um eine rasche und einfache Identifizierung monoklonaler Fab-Fragmente mit der gewünschten Spezifität zu ermöglichen.

30 Verschiedene Immunoassays können zum Screenen verwendet werden, um Antikörper mit der gewünschten Spezifität zu identifizieren. Zahlreiche Protokolle für kompetitive Bindungs- oder immunradiometrische Tests unter Verwendung entweder polyklonaler oder monoklonaler Antikörper mit etablierten Spezifitäten sind auf dem Gebiet wohlbekannt. Zu solchen Immunoassays gehört typischerweise die Messung der Komplex-Bildung zwischen PIBF und seinem spezifischen Antikörper. Ein Zwei-Stellen-Immunoassay auf monoklonaler Basis unter Verwendung monoklonaler Antikörper, die gegenüber zwei voneinander unabhängigen PIBF-Epitopen reaktiv sind, ist bevorzugt, doch kann ein kompetitiver Bindungs-Test ebenso verwendet werden.

35 Bei einer bevorzugten Ausführungsform wird die Konzentration des PIBF in der Probe durch einen kompetitiven Test gemessen. Gemäß diesem Verfahren wird eine feste Phase mit vorzugsweise rekombinantem Human-PIBF (oder seinen Varianten) mit einer spezifischen Konzentration bedeckt. Markierte anti-PIBF-Antikörper werden zusammen mit den zu messenden Beispielen zugegeben. Je höher die PIBF-Konzentration in der Probe ist, desto niedriger ist der entsprechende detektierte Wert. Auf Grund dieser Ablesungen kann die absolute Konzentration des PIBF bestimmt werden. Dies ist ein besonders präzises Verfahren, insbesondere, wenn die Probe eine Körperflüssigkeit ist, und kann beispielsweise mittels ELISA durchgeführt werden.

40 45 50 55 Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird die Konzentration des

PIBF in einer Probe mittels eines Sandwich-Tests gemessen. Für diesen Test muss man zwei anti-PIBF-Antikörper haben, die jeder an ein anderes Epitop des PIBF-Moleküls binden. Der erste anti-PIBF-Antikörper ist vorzugsweise an einem festen Träger immobilisiert, wonach die zu messende Probe zugegeben wird, so dass der in der Probe vorhandene PIBF an den ersten anti-PIBF-Antikörper bindet. Ein zweiter anti-PIBF-Antikörper, der vorzugsweise markiert ist, wird zugegeben, so dass er an den gebundenen PIBF bindet. Die Menge des gebundenen zweiten anti-PIBF-Antikörpers wird gemessen und als Angabe für die absolute Konzentration des PIBF in der Probe verwendet. Auch dieses Verfahren wird vorzugsweise verwendet, wenn die zu messende Probe eine Körperflüssigkeit des Patienten ist, und kann mittels ELISA durchgeführt werden.

Gemäß einer anderen bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird die Konzentration des PIBF in einer Probe mittels Immunfärbung ("immunostaining") gemessen. Dieses Verfahren wird vorzugsweise dann verwendet, wenn die zu messende Probe eine Gewebsprobe des Patienten ist. Gemäß diesem Verfahren wird der anti-PIBF-Antikörper direkt zur Gewebsprobe des Patienten zugegeben, wo er an den in der Gewebsprobe vorhandenen PIBF bindet. Der gebundene Antikörper wird dort durch direkte Anzeige der Konzentration des PIBF in der Gewebsprobe quantifiziert. Dieses Verfahren ermöglicht die Lokalisierung von PIBF in einer Probe.

Vorzugsweise wird die PIBF-Konzentration indirekt gemessen, durch Messung der Konzentration von PIBF-mRNA in der Probe. Dazu können Polynukleotide, einschließlich Oligonukleotid-Sequenzen, anti-sense-RNA- und -DNA-Moleküle und PNAs verwendet werden. Die Polynukleotide können zur Detektion und Quantifizierung der Gen-Expression in Proben verwendet werden, in welchen die Expression von PIBF mit einem Tumor in Verbindung gebracht wird. Demgemäß kann ein Set bereitgestellt werden, welches ein Reagens umfasst, das die oben erwähnten (markierten) Polynukleotide aufweist, um eine PIBF-mRNA-Messung in der bestimmten Probe durchzuführen.

Gemäß einem Aspekt kann die Hybridisierung mit Nukleotid-Sonden zur Identifizierung von PIBF-mRNA-Sequenzen verwendet werden. Nukleotid-Sequenzen, die zur PIBF-mRNA komplementär sind, können mittels Standardmethoden markiert werden und unter Bedingungen, die für die Bildung von Hybridisierungskomplexen geeignet sind, zu einer Flüssigkeits- oder Gewebsprobe eines Patienten zugegeben werden. Nach einer geeigneten Inkubationsdauer wird die Probe gewaschen, und das Signal wird quantifiziert und mit dem Schwellenwert verglichen.

Die Spezifität der Sonde, ob sie aus einer hochspezifischen Region oder aus einer weniger spezifischen Region hergestellt ist und die Stringenz der Hybridisierung (maximal, hoch, mittel oder niedrig) bestimmen, ob die Sonde nur natürlich vorkommende Sequenzen, die für PIBF codieren, Allele, oder verwandte Sequenzen identifiziert.

Sonden, die für die Hybridisierung von PIBF-mRNA (verwandten) Sequenzen verwendet werden, sollten vorzugsweise eine mindestens 50%, vorzugsweise 70%, noch mehr bevorzugt 90%, Homologie mit der PIBF-codierenden Sequenz oder Fragmenten davon aufweisen. Die Hybridisierungssonden der vorliegenden Erfindung können DNA oder RNA sein und von der Nukleotid-Sequenz der SEQ ID. NO 3 (PIBF-cDNA) stammen.

Hybridisierungssonden können mittels verschiedenster Marker-Gruppen markiert werden, beispielsweise Radionukliden, wie ^{32}P oder ^{35}S , oder enzymatischen Markierungen, wie alkalische Phosphatase, die über Avidin/Biotin-Kopplungssysteme mit der Sonde gekoppelt ist, u.dgl..

Die für PIBF codierenden Polynukleotid-Sequenzen können weiters bei der Northern Blot-Analyse, Dot-Blot oder anderen Techniken auf Membran-Basis verwendet werden; bei Dip-Stick-, Pin, ELISA oder (Mikro)-Chip-Tests unter Verwendung von Flüssigkeiten oder Geweben aus Patienten-Biopsien zur Detektion von PIBF-mRNAs. Solche Methoden sind auf dem Gebiet wohl bekannt.

Zusätzlich kann PIBF-mRNA mittels RT-PCR detektiert und gemessen werden: In einem ersten Schritt wird die mRNA durch Revers-Transkriptase in cDNA transkribiert, wonach die cDNA detektiert und mittels PCR quantifiziert wird. Die Oligomeren für die PCR können chemisch synthetisiert, enzymatisch erzeugt, oder aus einer rekombinanten Quelle produziert sein. Oligomere bestehen vorzugsweise aus zwei Nukleotid-Sequenzen, einer mit sense- und einer anderen mit antisense-Orientierung, die unter optimierten Bedingungen zur Identifizierung der spezifischen Sequenz verwendet werden. Dieselben beiden Oligomeren, "nested" Sets von Oligomeren oder selbst ein degenerierter Pool von Oligomeren können unter weniger stringenten Bedingungen zur Detektion und/oder Quantifizierung nah verwandter Sequenzen verwendet werden.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der positiven oder negativen Progression eines Tumors in einem Patienten, umfassend das Diagnostizieren eines Tumors bei einem Patienten gemäß einer der oben erwähnten Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung, und das Bestimmen, ob die gemessene Konzentration des PIBF oder eines Derivats davon oder Fragments davon in der Probe über oder unter mindestens einer zuvor gemessenen Konzentration des PIBF oder eines Derivats davon oder Fragments davon in mindestens einer zuvor vom selben Patienten entnommenen Probe ist, wobei eine Konzentration über der zuvor gemessenen Konzentration eine positive Progression identifiziert. Da die Konzentration des PIBF in einer Probe direkt proportional zur Progression des Tumors, z.B. Größe, Entwicklung etc. ist, ermöglicht das Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung eine direkte Analyse des Krankheitsverlaufs. Für eine vollständige Charakterisierung der Progression des Tumors ist es natürlich vorteilhaft, über einen Zeitraum viele Proben zu nehmen, insbesondere vor und nach einer spezifischen Behandlung, in welchem Fall die Wirksamkeit der spezifischen Behandlung analysiert werden kann. Der hierin verwendete Ausdruck "positive Progression" bedeutet, dass sich der Tumor weiterentwickelt.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung eines anti-PIBF-Antikörpers oder eines Fragments desselben bei einem oben beschriebenen Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung. Wie voranstehend erwähnt, kann der anti-PIBF-Antikörper monoklonal, polyklonal, er kann weiters rekombinant, humanisiert oder ein durch Phagen codierter Einzelketten-Antikörper sein. Wenn nur ein Fragment des Antikörpers verwendet wird, umfasst dieses Fragment das Epitop des anti-PIBF-Antikörpers, welches den PIBF erkennt.

Es ist bevorzugt, einen monoklonalen Antikörper zu verwenden, um ein höchst spezifisches und präzises Ergebnis zu erreichen. Der monoklonale Antikörper kann, wie oben erwähnt, hergestellt werden.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung von PIBF oder eines Derivats davon oder eines Fragments davon bei einem der oben erwähnten Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung. Wie bereits voranstehend erwähnt, kann das Fragment ein Fragment des PIBF oder ein Fragment des PIBF-Derivats sein.

Vorzugsweise ist der PIBF rekombinant, was bedeutet, dass auch das Derivat oder das Fragment rekombinant sein kann.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Set, welches ein erstes Reagens, das mindestens einen anti-PIBF-Antikörper oder ein Fragment davon aufweist, und ein zweites Reagens, das PIBF oder ein Derivat davon oder ein Fragment davon in einer bestimmten Konzentration aufweist, umfasst. Natürlich sind der anti-PIBF-Antikörper und der PIBF in einer Form vorhanden, die deren Lagerung ermöglicht, z.B. in trockener, lyophilisierter, gefrorener oder gelöster Form. Weiters kann das Set jedwede weitere Puffer, Enzyme, Salze etc. enthalten, die für die Durchführung des oben erwähnten Verfahrens notwendig sind.

Vorzugsweise umfasst das Set eine feste Phase, an welche der mindestens eine anti-PIBF-Antikörper oder das Fragment davon oder der PIBF oder das Derivat davon oder das Fragment davon gebunden, ist. Die feste Phase kann jede dem Fachmann auf diesem Gebiet bekannte feste Phase sein, z.B. jedes unlösliche Material, das ein Substrat darstellen kann, auf welchem man die Proteine oder Peptide immobilisieren kann, beispielsweise in Form eines trockenen Streifens. Zu solchen Substraten können Nylon, Aminosäuren, Glas, Cellulose u.dgl. zählen. Das Set kann vorzugsweise für einen kompetitiven oder für einen Sandwich-Test verwendet werden, wobei das weitere Reagens, das entweder den Antikörper oder den PIBF aufweist, je nachdem, welcher an der festen Phase immobilisiert ist, und die Probe zur festen Phase zugegeben werden.

Vorzugsweise ist der im oben erwähnten Set vorhandene PIBF rekombinant, was natürlich bedeutet, dass auch das Derivat davon bzw. das Fragment davon rekombinant sind.

Ein bevorzugtes Set umfasst ein weiteres Reagens mit einem zweiten anti-PIBF-Antikörper oder einem Fragment davon, welches an ein Epitop des PIBF bindet, das von dem vom ersten anti-PIBF-Antikörper oder dessen Fragment erkannte Epitop verschieden ist. Dieses Set ist besonders vorteilhaft, um einen Sandwich-Test durchzuführen.

Das oben erwähnte Set gemäß der vorliegenden Erfindung dient vorzugsweise zur Diagnostizierung eines Tumors bei einem Patienten bzw. zur Feststellung der Progression eines Tumors bei einem Patienten. Die Verfahren sind dieselben, wie oben beschrieben, wobei das Reagens, das

den PIBF oder ein Derivat davon oder ein Fragment davon in der bestimmten Konzentration aufweist, entweder als positive Kontrolle, wie oben beschrieben, oder zur Durchführung eines kompetitiven Tests, wie oben beschrieben, (wobei es in Konkurrenz zum in der Probe des Patienten vorhandenen PIBF verwendet wird,) oder für beides verwendet wird.

5 Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung eines anti-PIBF-Antikörpers oder eines Fragments davon zur Herstellung eines anti-Tumor-Medikaments. Der anti-PIBF-Antikörper oder das Fragment davon bewirkt eine spezifische Blockierung oder Neutralisierung von PIBF, wodurch die PIBF-Aktivität in Tumoren spezifisch eliminiert wird und die Tumoren somit für NK (und potentiell für CD8+ und andere T-Zellen-vermittelte Lyse) empfänglich gemacht
10 werden. Weiters können mono- und bi-spezifische Antikörper PIBF an der Oberfläche von Tumorzellen spezifisch erkennen und können verwendet werden, um toxische Substanzen an das tumoröse Kompartiment des Körpers des Patienten abzugeben. Die Hauptstrategie des anti-Tumor-Medikaments ist die Verwendung des Wissens, dass Tumorzellen höhere PIBF-Konzentrationen erzeugen. Mit dieser Information, die die Grundlage der vorliegenden Erfindung bildet, können
15 verschiedene Strategien zur Bekämpfung eines Tumors bei einem Patienten entwickelt werden.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform ist der Antikörper ein monoklonaler, humanisierter, bzw. Einzelketten-Antikörper.

Vorzugsweise hat der Antikörper ein an ihm haftendes Molekül. In diesem Fall wird der anti-PIBF-Antikörper als Ziel- oder Abgabe-Mechanismus verwendet, um ein Molekül, z.B. ein pharmazeutisches Mittel, zu Zellen oder Geweben zu bringen, die PIBF exprimieren.
20

Der Antikörper, der dem Patienten verabreicht wird, bindet an den PIBF exprimierenden Tumor und bringt dadurch das Molekül, das für den Tumor toxisch ist, in direkten Kontakt mit dem Tumor. Es gibt verschiedene Verfahren und Moleküle, die verwendet werden, die dem Fachmann auf diesem Gebiet bekannt sind. Beispielsweise kann ein toxisches Molekül verwendet werden, das in
25 die Tumorzellen eindringt und beispielsweise in essentielle Stoffwechselschritte eingreift, wodurch es die Zellen tötet. Das toxische Molekül kann auch eine Zell-Lyse induzieren oder als Rezeptor für andere toxische Substanzen oder Enzyme dienen, die die tumorösen Zellen töten. Das Wichtigste ist jedoch, unabhängig von der Art, in welcher das toxische Molekül wirkt, dass das Molekül durch
30 den anti-PIBF-Antikörper spezifisch zu den tumorösen Zellen geleitet wird und in gesunde Zellen nicht eingreift.

Das Molekül kann vorzugsweise eine toxische Substanz bzw. ein Prodrug sein, insbesondere ein Radionuklid, ein Toxin bzw. ein chemotherapeutisches Medikament. Durch Abgabe der Substanz an das tumoröse Ziel wird ein wirksames Anti-Tumor-Medikament erhalten.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung des PIBF oder eines
35 Derivats davon oder Fragments davon für die Herstellung eines Anti-Tumor-Medikaments. Gemäß der vorliegenden Erfindung gibt es zwei Strategien für diese Anti-Tumor-Medikamente:

- Ein PIBF-Derivat oder ein Fragment desselben wird als Hemm-Protein oder -Peptid verwendet, welches in die PIBF-Wirkung eingreift, indem es putative Rezeptoren für PIBF, die an Zellen, z.B. NK-Zellen, vorhanden sind, bindet und dadurch blockiert oder inaktiviert, oder Signal-gebende
40 Komponenten stromabwärts der Rezeptor-Bindung inhibiert.

- Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist das Medikament ein Vakzin. Das PIBF-Derivat oder Fragment davon weist das immunogene Peptid von PIBF auf und kann zur Impfung verwendet werden, entweder um Antigen-spezifische cytotoxische Anti-Tumor-T-Zellen-Reaktionen zu induzieren und/oder um die Produktion neutralisierender Antikörper
45 durch das Immunsystem des Krebspatienten selbst zu stimulieren, was die NK-Zellen von der Suppression durch PIBF befreien würde.

Vorzugsweise weist das Vakzin ein Adjuvans auf. Ein solches Adjuvans können beispielsweise, doch nicht ausschließlich, Freund'sche Mineral-Gele, wie Aluminiumhydroxid und grenzflächenaktive Substanzen, wie Lyssolecithin, Pluronic-Polyole, Polyanione, Polykatione (z.B. polyArg), Peptide, Ölemulsionen, Schlüsselloch-Napfschnecken-Haemocyanin und Dinitrophenol sein. Zu den bei Menschen vorzugsweise verwendeten Adjuvantien gehören BCG (Bacilli Calmette-Guerin) und Corynebacterium parvum.

Vorzugsweise ist der PIBF oder das Derivat davon oder das Fragment davon rekombinant bzw. ein chemisch synthetisiertes Molekül.

55 Ein vorteilhafter Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung eines Polynukleo-

tids, das für PIBF oder ein Derivat davon oder ein Fragment davon codiert, oder eines PIBF-antisense-Moleküls zur Herstellung eines Anti-Tumor-Medikaments.

Gene, die für PIBF codieren, können durch Transformation einer Zelle oder eines Gewebes mit Expressionsvektoren, die große Mengen eines Polynukleotids oder eines Derivats davon oder eines Fragments davon, das für PIBF codiert, ausgeschaltet werden. Solche Konstrukte können verwendet werden, um untranslatierbare sense oder antisense-Sequenzen in eine Zelle einzuführen. Selbst wenn keine Integration in die DNA vorliegt, können solche Vektoren weiterhin RNA-Moleküle transkribieren, bis sie durch endogene Nukleasen abgeschaltet werden. Eine vorübergehende Expression kann bei einem nicht-replizierenden Vektor einen Monat oder länger dauern und noch länger, wenn geeignete Replikationselemente Teil des Vektor-Systems sind.

Modifikationen der Gen-Expression sind durch Entwerfen von anti-sense-Molekülen, DNA, RNA oder PNA, zu den Steuerregionen des für PIBF codierenden Gens, d.h. der Promotoren, Enhancer und Introne, erhältlich. Oligonukleotide, die aus der Transkriptionsinitiierungsstelle stammen, z.B. zwischen den Positionen -10 und +10 ab der Start-Stelle, sind bevorzugt. In ähnlicher Weise kann eine Hemmung unter Verwendung der "Dreifach-Helix"-Basenpaarungs-Methodik erreicht werden. Dreifach-Helix-Paarung ist nützlich, weil es die Hemmung der Fähigkeit der Doppelhelix, sich für die Bindung von Polymerasen, Transkriptionsfaktoren oder regulierenden Molekülen genügend zu öffnen, bewirkt. Die antisense-Moleküle können auch so gestaltet werden, dass sie die Translation der mRNA blockieren, indem sie das Transkript hindern, an Ribosome zu binden.

Der Ausdruck "antisense", wie hierin verwendet, bezieht sich auf Nukleotid-Sequenzen, die zu einer spezifischen DNA- oder RNA-Sequenz komplementär sind. Antisense-Moleküle können mit jedem Verfahren hergestellt werden, einschließlich einer Synthese durch Ligieren des (der) Gens (Gene), an welchem (welchen) ein Interesse besteht, in umgekehrter Orientierung zu einem Virus-Promotor, der die Synthese eines komplementären Stranges ermöglicht. Sobald er in eine Zelle eingeführt ist, vereinigt sich dieser transkribierte Strang mit den natürlichen, von der Zelle produzierten Sequenzen, um Duplexe zu bilden. Diese Duplexe blockieren dann entweder die weitere Transkription oder die Translation.

Gemäß einem Aspekt können antisense-Moleküle zu dem für PIBF codierenden Polynukleotid in Situationen verwendet werden, in welchen es wünschenswert wäre, die Transkription der mRNA zu blockieren. Insbesondere können Zellen mit Sequenzen transformiert werden, die zu für PIBF codierenden Polynukleotiden komplementär sind. So können antisense-Moleküle verwendet werden, um die PIBF-Aktivität zu modulieren, oder um eine Regulierung der Gen-Funktion zu erreichen. Eine derartige Technik ist auf dem Gebiet wohlbekannt, und sense- oder antisense-Oligomere oder größere Fragmente können von verschiedenen Orten entlang der Codier- oder Steuerregionen von Sequenzen, die für PIBF codieren, entworfen werden.

Expressionsvektoren, die von Retroviren, Adenovirus, Herpes- oder Vaccinia-Viren oder von verschiedenen Bakterien-Plasmiden stammen, können zur Abgabe von Nukleotid-Sequenzen an das angepeilte tumoröse Organ, Gewebe, oder die Zellpopulation verwendet werden. Verfahren, die dem Fachmann auf diesem Gebiet gut bekannt sind, können zur Konstruktion rekombinanter Vektoren verwendet werden, die antisense-Moleküle exprimieren, welche zu den Polynukleotiden des für den PIBF codierenden Gens komplementär sind.

Ribozyme, enzymatische RNA-Moleküle, können ebenfalls zur Katalyse der spezifischen Spaltung von RNA verwendet werden. Zum Mechanismus der Ribozym-Wirkung gehört die Sequenzspezifische Hybridisierung des Ribozym-Moleküls an eine komplementäre Ziel-RNA, gefolgt von endonukleolytischer Spaltung. Beispiele, die verwendet werden können, umfassen hergestellte Hammerkopf-Motiv-Ribozym-Moleküle die die endonukleolytische Spaltung von Sequenzen, die für PIBF codieren, spezifisch und effizient katalysieren können.

Spezifische Ribozym-Spaltungsstellen innerhalb jedes potentiellen RNA-Zieles werden anfangs durch Scannen des Ziel-Moleküls auf Ribozym-Spaltungsstellen, die die folgenden Sequenzen inkludieren, identifiziert: GUA, GUU und GUC. Sobald sie identifiziert sind, können kurze RNA-Sequenzen von zwischen 15 und 20 Ribonukleotiden, entsprechend der Region des Ziel-Gens, das die Spaltstelle enthält, im Hinblick auf sekundäre Strukturmerkmale, die das Oligonukleotid inoperabel machen könnten, bewertet werden. Die Eignung der Anwärter-Ziele kann auch durch Testen der Zugänglichkeit zu einer Hybridisierung mit komplementären Oligonukleotiden unter

Verwendung von Ribonuklease-Schutz-Tests evaluiert werden.

Antisense-Moleküle und -Ribozyme der Erfindung können mit jedem Verfahren, das auf dem Gebiet für die Synthese von Nukleinsäuremolekülen bekannt ist, hergestellt werden. Zu diesen zählen Techniken zur chemischen Synthesierung von Oligonukleotiden, wie die chemische Festphasen-Phosphoramidit-Synthese. Alternativ können RNA-Moleküle durch *in vitro*- und *in vivo*-Transkription von DNA-Sequenzen, die für PIBF codieren, erzeugt werden. Solche DNA-Sequenzen können in vielerlei Vektoren mit geeigneten RNA-Polymerase-Promotoren, wie T7 oder SP6, inkorporiert werden. Alternativ können diese cDNA-Konstrukte, die antisense-RNA konstitutiv oder induzierbar synthetisieren, in Zelllinien, Zellen oder Gewebe eingebracht werden.

RNA-Moleküle können modifiziert werden, um die intrazelluläre Stabilität und die Halbwertszeit zu erhöhen. Zu den möglichen Modifikationen zählen, ohne jedoch auf diese beschränkt zu sein, die Addition von flankierenden Sequenzen am 5'- und/oder 3'-Ende des Moleküls oder die Verwendung von Phosphorthioat oder 2'-O-Methyl anstelle von Phosphodiester-Bindungen innerhalb des Molekül-Gerüstes. Dieses Konzept wohnt der Produktion von PNAs inne und kann in allen diesen Molekülen erweitert werden durch den Einschluss nicht-traditioneller Basen, wie Inosin, Queosin und Wybutosin sowie Acetyl-, Methyl-, Thio- und ähnlich modifizierter Formen von Adenin, Cytidin, Guanin, Thymin und Uridin, die von endogenen Endonukleasen nicht so leicht erkannt werden.

Viele Methoden zur Einführung von Vektoren in Zellen oder Gewebe sind verfügbar und gleichermaßen zur Verwendung *in vivo*, *in vitro* und *ex vivo* geeignet. Für die *ex vivo*-Therapie können Vektoren in Stammzellen eingefügt werden, die dem Patienten entnommen wurden und klonal vermehrt wurden zwecks autologer Re-Transplantation in denselben Patienten (allogene Stammzellen-Transplantation). Ein Einbringen durch Transfektion und durch Liposom-Injektionen kann unter Verwendung von Verfahren, die auf diesem Gebiet wohl bekannt sind, erreicht werden.

Jedes der oben beschriebenen Anti-Tumor-Medikamente kann an jedem geeigneten Subjekt, einschließlich beispielsweise Säugern, wie Hunden, Katzen, Kühen, Pferden, Kaninchen, Affen und, am meisten bevorzugt, Menschen, angewendet werden.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Behandlung eines Patienten mit einem Tumor, wobei das Verfahren die Verabreichung einer wirksamen Menge eines anti-PIBF-Antikörpers oder eines Fragments davon an den Patienten umfasst.

In zwei Veröffentlichungen (Szekeres-Bartho et al., Am.J.Reprod. Immuno. 24, 105, 1990; Szekeres-Bartho et al., Cell.Immunol.177, 194, 1997) wurde nachgewiesen, dass die Zugabe von neutralisierendem anti-PIBF-Antikörper bei Mäusen ein erfolgreiches Schwangerschaftsergebnis stört. Außerdem verhinderte PIBF, isoliert aus Kulturüberständen von mit Progesteron behandelten Maus-Lymphozyten bei Injektion *in vivo* die abortive Wirkung von Anti-Progesteron-Medikamenten. Diese Daten lassen darauf schließen, dass diese Reagenzien auf ähnliche Weise bei Patienten mit Krebs oder mit Autoimmunerkrankungen wirken könnten.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Behandlung eines Tumors bei einem Patienten, wobei dieses Verfahren die Verabreichung einer wirksamen Menge von PIBF oder eines Derivats davon oder eines Fragments davon umfasst.

Ein anderer bevorzugter Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Behandlung eines Tumors bei einem Patienten, wobei das Verfahren die Verabreichung einer wirksamen Menge eines Polynukleotids, das für PIBF oder für ein Derivat davon oder ein Fragment davon oder für PIBF-antisense-Molekül codiert, umfasst.

Ein anderer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft eine pharmazeutische Präparation zur Behandlung eines Tumors bei einem Patienten, wobei die Präparation einen anti-PIBF-Antikörper oder ein Fragment davon, PIBF oder ein Derivat davon oder ein Fragment davon, und von Polynukleotid codierten PIBF oder ein Derivat davon oder ein Fragment davon bzw. ein PIBF-antisense-Molekül umfasst.

Die pharmazeutische Zusammensetzung kann alleine oder in Kombination mit mindestens einem anderen Mittel, wie einer stabilisierenden Verbindung, verabreicht werden, welche in jedem sterilen, biokompatiblen pharmazeutischen Träger verabreicht werden kann, einschließlich - doch nicht ausschließlich - Kochsalzlösung, gepufferte Kochsalzlösung, Dextrose und Wasser. Die pharmazeutischen Präparationen können alleine oder in Kombination mit anderen Mitteln, Arzneistoffen oder Hormonen einem Patienten verabreicht werden. Die für das Verfahren zur Behandlung

eines Tumors bei einem Patienten verwendeten pharmazeutischen Präparationen können auf zahlreichen Wegen verabreicht werden, einschließlich - jedoch nicht ausschließlich - oral, intravenös, intramuskulär, intraarteriell, intramedullär, intrathekal, intraventrikulär, transdermal, subkutan, intraperitoneal, intranasal, enteral, topisch, sublingual oder rektal.

5 Zusätzlich zu den aktiven Ingredienzien können diese pharmazeutischen Zusammensetzungen geeignete pharmazeutisch akzeptable Träger, einschließlich Exzipienten und Hilfsstoffe, aufweisen, die die Verarbeitung der aktiven Verbindungen zu Präparationen, die pharmazeutisch verwendet werden können, erleichtern. Die Träger ermöglichen die Formulierung der pharmazeutischen Präparationen als Tabletten, Pillen, Dragees, Kapseln, Flüssigkeiten, Gele, Sirups, Aufschlämmungen, Suspensionen u.dgl..

10 Gemäß einem anderen Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung auch ein rekombinantes Protein mit einer PIBF-Aktivität gemäß SEQ.ID.NO 1 und Derivate davon. Dieses PIBF-Protein gemäß der vorliegenden Erfindung besitzt die volle PIBF-Aktivität, vergleichbar natürlichem PIBF (umfassend die Sequenz gemäß SEQ.ID.NO 2), weist jedoch nicht die exakten Aminosäuren 595 bis 614 sowie die Aminosäure Nr. 333 gemäß der natürlichen PIBF-Sequenz (SEQ.ID.NO 2) auf. Die Proteinsequenz des rekombinanten PIBF-Proteins gemäß der vorliegenden Erfindung (SEQ.ID.NO 1) umfasst 757 Aminosäurereste. Die vorliegende Erfindung sieht daher neue rekombinante PIBF-Proteine mit der SEQ.ID.NO 1 oder Derivate oder Homologe davon vor. Daher umfasst das rekombinante Protein mit einer PIBF-Aktivität gemäß der vorliegenden Erfindung

15 20 - die Aminosäure-Sequenz gemäß SEQ.ID.NO 1, oder
- eine Aminosäure-Sequenz mit einer Aminosäure-Identität von mindestens 98% mit der Sequenz gemäß SEQ.ID.NO 1, wie mittels FAST/A-Algorithmus bestimmt, oder
- eine Aminosequenz mit einer Aminosäure-Identität von mindestens 95% mit der Sequenz von Aminosäurerest 580 bis 630 von SEQ.ID.NO 1, wie mittels FAST/A-Algorithmus bestimmt, und

25 25 - eine PIBF-Aktivität von mindestens 50% des natürlichen humanen PIBF-Moleküls.

Die PIBF-Aktivität kann als NK- oder CTL-Hemmung definiert und quantifiziert werden. Eine NK-Hemmung wird angenommen, wenn in Gegenwart von PIBF die ansonsten effizienten Effektor-Zellen (in Abwesenheit von PIBF getestet) paralysiert sind, d.h. entweder die Erkennung und Bindung (Konjugation) oder die Tötung der Ziel-Zellen als Folge der PIBF-Konzentration verringert ist. Die Aktivität kann als Prozent Inhibierung/ μ g PIBF oder ähnlicher Substanzen im Vergleich zu keinem PIBF ausgedrückt werden. Dies gilt in ähnlicher Weise für CTL-Hemmaktivität (Szekeres-Bartho et al., Cell.Immunol.177 (1997), 194-199), Szekeres-Bartho et al., Am.J.Reprod.Immunol. 24, 105, (1990)). Weiters kann die PIBF-Aktivität als Th2-Verstärkung, die durch Quantifizierung von Th2 (IL-3, IL-4, IL-6, IL-10)- zu Th1 (IL-12, IFN- γ)-Lymphokinen entweder auf Protein- oder auf 30 mRNA-Ebene gemessen wird, und nachfolgende Feststellung des Verhältnisses der Th2-Signale zu den Th1-Signalen bestimmt wird, definiert und quantifiziert werden. Eine Zunahme der Th2- und eine gleichzeitige Abnahme der Th1-Cytokine zeigen eine Th2-Verstärkung an. Sie kann als Steigerung der Prozentsatzes von Th2-Cytokin-positiven oder eine Abnahme im Prozentsatz von Th1-Cytokin-positiven peripheren mononuklearen Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells, PMBCs)/ μ g PIBF ausgedrückt werden. Man kann auch die absoluten Mengen dieser Cytokine (gemäß Standardmethoden aus der Literatur), die in den Kulturüberstand oder in Körperflüssigkeiten sezerniert werden, als eine Funktion der PIBF-Konzentration zu messen. Die Cytokin-mRNAs können mittels Standard-Quantifizierungstests auf RT-PCR-Basis, Szekeres-Bartho et al., AJRI 35 (1996), 348-351, Szekeres-Bartho et al., Am.J.Reprod.Immunol. 23, 26, (1990), Szekeres-Bartho et al., Am.J.Ob.Gyn. 163, 1320 (1990) gemessen werden.

35 40 45 Trotz der wesentlichen Unterschiede in der Aminosäuresequenz des PIBF-Proteins gemäß der vorliegenden Erfindung im Vergleich zur natürlichen humanen PIBF-Sequenz ist es möglich, ein rekombinantes Protein mit einer Sequenz, wie oben definiert (SEQ.ID.NO 1) zu erzeugen, welches rekombinante Protein besonders große funktionelle Ähnlichkeiten mit dem natürlichen Protein aufweist.

50 Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung weist das rekombinante Protein eine Aminosäure-Sequenz, wie durch die Aminosäurereste 300 bis 350 in SEQ.ID.NO 1 angegeben, auf. Die Aminosäure Nr. 333 im natürlichen Human-PIBF-Protein (SEQ.ID.NO 2) ist Cys anstelle von Arg im rekombinanten PIBF-Protein gemäß der vorliegenden Erfindung (SEQ.ID.NO 1). Daher weist das rekombinante Protein gemäß der vorliegenden Erfindung

vorzugsweise ein Arg als Aminosäure Nr. 333 gemäß SEQ.ID.NO 1 und eine beträchtliche PIBF-Aktivität (>50%) auf. Es kann jedoch entweder an einem oder an beiden Enden weitere Aminosäurereste aufweisen, die mit den Aminosäureresten in SEQ.ID.NO 1 identisch, homolog zu diesen oder von diesen verschieden sind, solange das rekombinante Protein eine PIBF-Aktivität von mindestens 50% des natürlichen Human-PIBF-Moleküls hat.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung weist das rekombinante Protein eine Aminosäuresequenz, wie durch die Aminosäurerreste 580 bis 630 in SEQ.ID.NO 1 angegeben, und eine beträchtliche PIBF-Aktivität (>50%) auf. Dieses rekombinante Protein weist daher die richtige Sequenz des PIBF zwischen den Aminosäureresten 580 bis 630 in SEQ.ID.NO 1 auf. Es kann weiters entweder an einem oder an beiden Enden weitere Aminosäurereste aufweisen, die mit den Aminosäureresten in SEQ.ID.NO.1 identisch, homolog zu diesen oder von diesen verschieden sind, solange das rekombinante Protein eine PIBF-Aktivität von mindestens 50% eines natürlichen Human-PIBF-Moleküls hat.

Gemäß einem weiteren Aspekt sieht die vorliegende Erfindung ein Nukleinsäure-Molekül vor, das für das oben beschriebene rekombinante Protein mit einer PIBF-Aktivität gemäß der vorliegenden Erfindung codiert. Es ist natürlich weiters möglich, dass das Nukleinsäure-Molekül eine zusätzliche Sequenz aufweist, die für mindestens ein zweites Protein, das ein anderes als das PIBF-Protein ist, codiert, wodurch eine Nukleinsäure-Sequenz vorgesehen wird, die für ein Fusionsprotein codiert, das mindestens in einem Teil ein Peptid mit PIBF-Aktivität aufweist.

Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung einen Nukleinsäure-Vektor, der eine Nukleinsäure-Sequenz aufweist, die für das oben erwähnte rekombinante Protein mit einer PIBF-Aktivität gemäß der vorliegenden Erfindung codiert, und ein geeignetes Regulierungselement aufweist, das die Transkription eines komplementären Nukleinsäure-Moleküls von mindestens der für die PIBF-Aktivität codierenden Nukleinsäure-Sequenz der vorliegenden Erfindung ermöglicht.

Wenn der oben erwähnte Vektor gemäß der vorliegenden Erfindung in einen geeigneten Wirt eingeführt wird, wird mRNA produziert, die einen RNA-Strang für die Translation eines rekombinanten Proteins mit PIBF-Aktivität gemäß der vorliegenden Erfindung vorsieht.

Das Regulierungselement kann jedes geeignete Element sein, das dem Fachmann auf diesem Gebiet bekannt ist, insbesondere ein spezifischer Promotor, der gemäß dem spezifischen Wirt, in welchen der Vektor eingeführt werden soll, ausgewählt wird, um eine maximale Produktion an rekombinantem Protein zu erreichen. Das Regulierungselement kann weiters Enhancer aufweisen, die die Transkription verstärken.

Vorzugsweise weist der Nukleinsäure-Vektor einen Selektionsmarker auf. Der Selektionsmarker kann jeder geeignete Marker sein, der dem Fachmann auf diesem Gebiet bekannt ist, um Zellen oder Wirtsorganismen zu selektieren, in welche der Vektor eingeführt worden ist. Ein solcher Selektionsmarker kann beispielsweise jedes Gen sein, das für ein Antibiotika-Resistenz vermittelndes Protein codiert, oder ein Gen, das für ein für den Zellstoffwechsel notwendiges Protein codiert, wobei die Zellen oder Wirtsorganismen, in die der oben erwähnte Vektor eingeführt werden soll, einen Mangel an diesem Protein aufweisen. Der Selektionsmarker kann weiters jedes Gen sein, das den Phänotyp der Zelle oder des Wirtsorganismus, die (der) den oben erwähnten Vektor aufgenommen hat, verändert, z.B. die Farbe.

Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung eine Zelle, welche den oben erwähnten Vektor gemäß der vorliegenden Anmeldung aufweist. Der Vektor kann in das Genom der Zelle integriert sein oder auch als exogene DNA im Cytoplasma vorhanden sein, solange die Transkription des komplementären Nukleinsäure-Moleküls vorgesehen ist. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung umfasst der Ausdruck "Zelle" jede prokaryontische oder eukaryontische Zelle. Diese Zellen werden vorzugsweise zur Herstellung rekombinanter Proteine mit PIBF-Aktivität gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet. Diese hergestellten rekombinanten Proteine können gemäß auf diesem Gebiet gut bekannter Verfahren isoliert und gereinigt und weiter verwendet werden, z.B. zur Herstellung pharmazeutischer Präparationen, die rekombinante Proteine mit PIBF-Aktivität gemäß der vorliegenden Erfindung aufweisen.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele und Figuren genauer beschrieben, ist jedoch nicht auf diese beschränkt.

Fig. 1 zeigt die Ausrichtung rekombinanter und (natürlicher) Maus-PIBF-Aminosäure-

Sequenzen,

Fig. 2 zeigt eine schematische Darstellung der Exons und Introns in der PIBF-Gen-Region auf Chromosom 13,

Fig. 3 zeigt einen Northern Blot zur Detektion von PIBF-mRNA in verschiedenen Geweben.

5 Fig. 4 zeigt die immunhistochemische Analyse eines humanen Primär-Tumors.

Fig. 5A - 5D zeigen den Einfluss der anti-PIBF-Behandlung auf NK-Zell-Ziel-Tötung von Tumorzellen.

Die Fig. 6A - 6 C zeigen die Wirkung des rekombinanten PIBF auf IL-10- und IL-12-Expression von Nicht-Schwangerschafts-Lymphozyten.

10 Fig. 1 zeigt die Ausrichtung von rekombinantem (humanem) und Maus-(natürlichem) PIBF, wobei A die rekombinante Sequenz ist, B die IC-Maus-Sequenz (aus einer Maus-Hodenbibliothek kloniert) ist, C die EST-Maus, zusammengesetzt aus dEST-Bibliotheken auf Basis der Human-Sequenzen, ist und D die bovine Sequenz ist. X repräsentiert die Signal-Sequenz gemäß der PSG-Voraussagemethode, y die Signal-Sequenz gemäß der GvH-Voraussage, z das ER-Membran-Retentionssignal, w das Leucin-Zipp-Muster -DNA-Bindungsmotiv, v das peroxisomale Targeting-Signal und u das nukleare Lokalisations-Signal.

15 Das PIBF-Gen befindet sich auf Chromosom 13. Eine Anzahl von Introns sind im PIBF-Gen vorhanden (vgl. Fig. 2), wobei in Intron 2 mehrfache Kopien des Alu-repeat-Elements vorhanden sind, das als Stelle für alternatives Spleißen dient. A zeigt eine Lücke zwischen genomicischen "contigs".

20 Fig. 3 zeigt einen Northern Blot zur Detektion von PIBF-mRNA in verschiedenen normalen Geweben: Magen (A), Schilddrüse (B), Rückenmark (C), Lymphknoten (D), Luftröhre (E), Nebenniere (F), Knochenmark (G), Milz (H), Thymus (I), Prostata (J), Hoden (K), Uterus (L), Dünndarm (M), Kolon (N), PBL (O), Herz (P), Gehirn (Q), Plazenta (R), Lunge (S), Leber (T), Skelettmuskel (U), Niere (V), Pankreas (W). Die Pfeile in Fig. 4 zeigen 3 verschiedene mRNA-Formen an.

Beispiel 1: ESTs expressed sequence tags-Eintragungen, die zur humanen PIBF-Sequenz passen

30 EST-Eintragungen in Human-cDNA-Bibliotheken wurden gesucht, die zur humanen PIBF-Sequenz passen. 43 Eintragungen mit PIBF-Sequenzen wurden aus 2,2 Millionen dESTs, die in 3776 Human-cDNA-Bibliotheken abgelegt waren, gefunden. Diese 43 Eintragungen gehören zu 27 verschiedenen Bibliotheken. 7 der 27 (25%) Bibliotheken stammen von normalen Geweben (von nicht-schwangeren Erwachsenen, ohne Tumor). Wichtig ist, dass Hoden, welcher ein immunprivilegiertes Gewebe ist, häufig die Anwesenheit von PIBF-mRNA anzeigt. 13 der 27 Bibliotheken enthalten mRNAs, die in tumorösen Geweben exprimiert wurden (~50%). Der Rest stammt von fötalem oder Schwangeren-Geweben. Dies zeigt, dass PIBF vorzugsweise während der Entwicklung, Schwangerschaft und Malignität exprimiert wird. Die Anzahl der passenden ESTs kann jedoch mit dem mRNA-Überfluss in Wechselbeziehung stehen, hängt jedoch sehr von der Qualität der Bibliothek ab. Aus diesem Grund kann man sie nicht direkt als Maß für die Expressionsmenge ansehen (vgl. Tabelle I).

TABELLE I

45	ACC#	Ursprung der cDNA-Bibliothek		
50		Organ	embryonal, normal , Tumor	zusammenpassende Teile (nt)
55	1 AA099685	Uterus	normal, schwanger	860-1321
	2 AI188926	Plazenta, gepoolt (2)	normal, 8.-9. Schwangerschaftswoche	2409-2763(87)

	ACC#	<i>Ursprung der cDNA-Bibliothek</i>			
5		Organ	embryonal, normal , Tumor	zusammenpas-sende Teile (nt)	
10	3	Plazenta, gepoolt (2)	normal, 8.-9. Schwanger-schaftswoche	2418-2763(86)	
15	4	Plazenta, gepoolt (2)	normal, 8.-9. Schwanger-schaftswoche	2367-2763(84)	
20	5	Plazenta, gepoolt (2)	Normal, 8.-9. Schwanger-schaftswoche	1657-2089(20)	
25	6	Tonsillen, Keimzentrum	normal - B-Zellen-angerei-chert	2440-2763(84)	
30	7	Tonsillen, Keimzentrum	normal - B-Zellen-angerei-chert	307-633	
35	8	Tonsillen, Keimzentrum	normal - B-Zellen-angerei-chert	1644-2025	
40	9	Hoden	normal	2455-2763(86)	
45	10	Hoden	normal	2385-2763(91)	
50	11	Niere, Gewebemasse Kid11	normal	2491-2763(83)	
	12	Nase (Olfac-Epithel)	normal (weiblich)	(75)1669-837(98)	
	13	Uterus (exp. ORFs) L	erwachsen	(224)1989-2346	
	14	Magen ORF	erwachsen	2544-2667(8)	
	15	Kopf -Nacken	erwachsen	1881-2264	
	16	Lunge-Hoden-B -Zelle	normal + fötal (Lunge)	2501-2763(8)	
	17	Lunge-Hoden-B -Zelle	normal + fötal (Lunge)	2531-2763(102)	
	18	Lunge-Hoden-B -Zelle	normal + fötal (Lunge)	(41)1616-2116	
	19	Lunge-Hoden-B -Zelle	normal + fötal (Lunge)	2361-2763(8)	
	20	Lunge-Hoden-B -Zelle	normal + fötal (Lunge)	1644-2179	
	21	Lunge-Hoden-B -Zelle	normal + fötal (Lunge)	2328-2763(86)	
	22	Lunge-Hoden-B -Zelle	normal + fötal (Lunge)	2376-2763(83)	
	23	Lunge-Hoden-B -Zelle	normal + fötal (Lunge)	2515-2616	
	24	Gesamtkörper	Fötus (8-9 Wochen)	2565-2763(87)	
	25	D31319	fötal	1394-1765	
	26	AA004593	Leber + Milz	(175)900-1019(54)	
	27	AI741044	5 gepoolte Bibliotheken *	fötal, Plazenta, Tumor	2349-2763(95)
	28	AI808795	5 gepoolte Bibliotheken *	fötal, Plazenta, Tumor	2406-2725(146)

	ACC#	<i>Ursprung der cDNA-Bibliothek</i>			
5		Organ	embryonal, normal , Tumor	zusammenpassende Teile (nt)	
29	AW978222	Colon	Tumor, Metastase	1656-2135	
10	AI254231	Colon	Adenocarcinom	(140)2482-763(101)	
30	AA307364	Colon, Zelllinie	Carcinom (HCC)	2017-2391(55)	
31	AA603710	Keimzelle	Misch-Tumoren	2404-2763(84)	
32	AI350870	Keimzelle	Mischtyp-Tumoren (3)	2511-2763(84)	
15	33	AI990811	Keimzelle (GC_6)	gepoolte Tumoren	2283-2763(96)
34	AI278790	Lunge , neuroendokrin	karzinoid	2514-2763(92)	
20	35	AI554801	Uterus, gepoolt (2) Ut3	Endometrium-Carcinom	2407-2763(88)
36	AI915158	Uterus, gepoolt (3) (ut2)	seröses Papill. cc. starkes Wachstum.	1714-1837(109)	
25	37	AW273347	Uterus, gepoolt (2)	seröses Papill. cc. starkes Wachstum	1785-2311(50)
38	AW169084	Uterus, gepoolt (3) (ut2)	Endometrium-Carcinom	2200-2763(84)	
39	AI769755	Niere, Pool von 2 Kid12	Tumor, hellzellig	2671-2763(403)	
40	41	AW769371	Niere (Pool von 2) Kid13	Wilms'-Tumor (Pr. + Meta.)	2310-2763(102)
45	42	N59340	Gehirn (männlich)	Multiple Sklerose-Läsion	(102)2506-2763(83)
30	43	N77149	Gehirn (männlich)	Multiple Sklerose-Läsion	1858-2175(12)

40 *Gewebemasse, Pool von 5 Geweben: alternde Fibroblasten, Plazenta, gesamter Fötus, Parathyreoid-Tumor, Eierstock-Tumor, Erhebungen abgezogen

Beispiel 2: Bestimmung der PIBF-Konzentration in Harnproben von Krebspatienten

45 Ein kompetitiver Test auf ELISA-Basis wurde zur Messung von PIBF im Harn von Krebspatienten erstellt. ELISA-Platten wurden mit rekombinantem Human-PIBF mit einer Konzentration von 2 µg/ml beschichtet. Mit Biotin markiertes polyklonales anti-PIBF-IgG wurde zusammen mit den Proben, deren PIBF-Gehalt bestimmt werden sollte, zugegeben. Je höher die PIBF-Konzentration in der Probe, desto niedriger ist der entsprechende ELISA-Wert. Auf Grund dieser ELISA-Ablesungen kann die absolute PIBF-Konzentration bestimmt werden.

50 Harnproben von Krebspatienten wurden genommen und frisch verwendet oder kurz nach der Probennahme gefroren und bei -20°C bis zur Analyse gelagert. Es wurde zuvor bestimmt, dass die PIBF-Mengen im Serum bei gesunden schwangeren Frauen bedeutend höher sind als die Mengen bei nicht-schwangeren Frauen oder bei pathologischen Schwangerschaften. Um den Test an Harn-PIBF von Krebspatienten auszuwerten, dienten Harnproben von gesunden schwangeren Frauen

und von normal gesunden, nicht-schwangeren Individuen als positive bzw. negative Kontrollen. Die Ergebnisse sind in Tabelle II zusammengefasst. Normale (gesunde, nicht-schwangere) Individuen haben niedrige Harn-PIBF-Konzentrationen (5 ng/ml). Der Harn schwangerer Frauen war durch eine durchschnittliche PIBF-Konzentration von 110 ng/ml gekennzeichnet. Es ist wichtig, dass hohe PIBF-Mengen nach einem Abortus oder Wehen rasch auf das normale Maß zurückkehrten. Eine Analyse der Harnproben von 65 Tumor-Patienten zeigte deutlich, dass Patienten mit einem Tumor eine wesentlich höhere Menge an PIBF in ihrem Harn aufwiesen als gesunde, nicht-schwangere Individuen, und zwar im Bereich von 5 bis 180 ng/ml. Patienten mit fortgeschrittenem Krebs (großer Primär-Tumor und/oder Metastasen) schienen höhere Werte zu haben, wofür als Beispiel die Daten von Harnproben von Patienten mit Lungentumor mit einer durchschnittlichen Konzentration von 28 gegenüber 43 ng/ml mit bzw. ohne Metastasen dienen.

Diese Daten zeigen, dass die PIBF-Konzentration in Beziehung zur Tumormasse steht, und der Nachweis von PIBF im Harn kann zur Überwachung der Krankheitsprogression und von Rückfällen verwendet werden. Der Anstieg der Harn-PIBF-Konzentration als Folge der Anwesenheit eines PIBF-produzierenden Tumors ist noch stärker, da nicht alle Tumor-Typen PIBF-positiv sind (~70-80% der bisher getesteten Tumoren).

Der am meisten vorherrschende Tumor-Typ unter den Patienten war Lungenkrebs mit 23 Fällen. Die meisten der Lungenkrebs-Patienten wiesen eine hohe PIBF-Konzentration auf. Das Fehlen von hohem PIBF im Harn konnte mit dem klinischen Krankheitsstatus in Korrelation gesetzt werden, es waren nämlich die PIBF-Konzentrationen nach Entfernen des Primär-Tumors und im Remissionsstadium wesentlich niedriger oder sogar normal.

TABELLE II

	Kontrolle (a)	Schwanger (b)	Drohende vorzei- tige Wehen (c)	Tumor-Patienten (e)	
25	n=48	n=23	n=19	n=65	
30	x=5,5+/-1,8	x=110+/-36	x=6+/-4,7	x=27,7+/-5,3	
35	a-b p<0,001	b-c <0,002		Lunge (n=23)	
40	a-c NS			ohne Met- astasen (n=12) 29,4	mit Me- tastasen (n=11) 43,1
	a-d p<0,001				
	a-e p<0,001				

Beispiel 3: Detektion von PIBF in Tumorgeweben

Nach dem Nachweis der PIBF-Expression mittels der MCF-7 (humanes Mammapi-Epithelcarcinom)-Zelllinie wurde eine Reihe von humanen Primär-Tumoren auf die Expression von PIBF untersucht. Es zeigte sich, dass PIBF im Kulturüberstand von MCF-7-Zellen auftritt, was nahe legt, dass dieses Protein auf ähnliche Weise exprimiert und sezerniert wird, was man bei Kulturen von Lymphozyten von Schwangeren oder aktivierten Lymphozyten feststellte. Gemäß einer proteomischen Analyse erkennen anti-PIBF-Antikörper Proteine mit zwei verschiedenen Größen im Zelllysat durch 2D-Western-Analyse. Ein 34-kDa-Spot entspricht vermutlich der sezernierten Form. Ein weiteres großes, 60-62 kDa-Doppellett wird nachgewiesen, welches die Zell-assoziierte Haupt-PIBF-Form sein könnte.

Eine Vielfalt von mit Formalin fixierten humanen Primär-Tumoren wurde ex vivo immunhistologisch untersucht unter Verwendung von polyklonalem Kaninchen-Antiserum, das durch Immunisie-

rung mit humanem, natürlichem PIBF (34-kDa) oder rekombinantem PIBF (89-kDa) erzeugt worden war. Die Ergebnisse zeigen, dass viele der getesteten Tumor-Typen PIBF oder PIBF-verwandte Substanzen, z.B. PIBF-Moleküle verschiedener Länge, PIBF-Moleküle aus unterschiedlich gespleißter mRNA, trunkierte Moleküle, Fusionsproteine usw. exprimieren (Tabelle III). 15 der 27 Tumoren (55%) zeigten eine stark positive Färbung. Das Fehlen einer spezifischen Immunfärbung der Normalgewebe-Gegenstücke beweist, dass transformierte Tumor-Zellen PIBF differentiell exprimieren (vgl. Fig. 4). In der in Fig. 4 linken, mit "A" bezeichneten Spalte ist das Normalgewebe gezeigt, in der rechten, mit "B" bezeichneten Spalte sind Tumorgewebe gezeigt. In der ersten (mit "1" bezeichneten) Reihe ist Lungenkrebs (kleine Zellen), in der zweiten (mit "2") bezeichneten Reihe ist Harnblasencarcinom (Übergangszelle), und in Reihe "3" ist Magenkreb (Adenocarcinom) gezeigt. Diese Daten belegen auch, dass die PIBF-Positivität ein Ergebnis der Expression durch die Tumorzellen selbst ist, und nicht der Bindung von PIBF aus dem extrazellulären Fluid (von infiltrierenden Lymphozyten sezerniert).

15 TABELLE III

<i>Organ</i>	<i>Gewebs- und Tumor- Typ</i>	<i>Anzahl PIBF-Positi ver (Anzahl der Geze teten)</i>
Magen	Adenocarcinom	1(2)
Gallenblase	Adenocarcinom	0(1)
Prostata	Adenocarcinom	0(1)
Colon	Adenocarcinom Primär-Tumor	1(1)
Ovarium	Cystadenocarcinom	2(3)
Schilddrüse	Carcinoma papillare	2(2)
Brust	Invasives duktales Carcinom	1(1)
Brust	Invasives lobuläres Carcinom	1(1)
Uterus	Cc. endometrioides	0(1)
Uterus	stromales Carcinom	0(1)
Uterus	Leiomyosarkom	0(1)
Septum nasi	Leiomyosarkom	0(1)
Haut	Melanom	0(2)
Haut	epitheliales Carci nom	1(1)
Lunge	epitheliales Carci nom	2(2)
Speiseröhre	Adenocarcinom	1(1)
Harnblase	Übergangszellen- Carcinom	1(1)
Metastase (Haut)	hellzelliges Nie- renkarzinom	0(1)
Metastase (Lymphkno- ten)	Plattenepithel	1(1)

	Organ	Gewebs- und Tumor-Typ	Anzahl PIBF-Positiver (Anzahl der Getesteten)
5	Metastase (Lymphknoten)	Adenocc. coli	1(2)

10 Auf Grund der oben erwähnten Ergebnisse ist die PIBF-Produktion ein ganz allgemeines Phänomen des malignen oder undifferenzierten Zustands, und folglich kann PIBF als Tumor-Marker dienen.

Beispiel 4: Modulation der NK-Aktivität durch die Anwesenheit von PIBF

15 Wenn man alle Daten hinsichtlich der potentiellen Bedeutung von PIBF bei der Suppression von anti-Tumor-Reaktionen zusammennimmt, ist es plausibel, dass durch Tumorzellen erzeugter PIBF - sezerniert oder an der Zelloberfläche exprimiert - die Killerzellen-Aktivität systemisch oder lokal inhibieren wird. Es ist seit langem bekannt, dass es Zelllinien gibt, die bei NK-Tests gute Ziele sind, wogegen andere dies nicht sind. Die Human-Tumor-Zelllinie MCF-7 gehört zur Kategorie der schlechten Ziele. Es ist daher eine Möglichkeit, dass die niedrige Tötungsaktivität gegen diese Zellen das Ergebnis einer PIBF-Produktion ist, die die NK-Aktivität inhibiert, da die MCF-7-Zelllinie erwiesenermaßen PIBF produziert. Um diese Möglichkeit zu testen, wurden PIBF-exprimierende MCF-7-Zellen als Ziele in einem 4-stündigen Einzelzellen-Cytotoxizitäts-Test gemäß Grimm und Bonavida "Frequency determination of killer cells by a single-cell cytotoxic assay"; Methods Enzymol. 93, 270 (1983) verwendet. In Fig. 5 ist gezeigt, dass die anti-PIBF-Behandlung die gezielte Tötung von Tumorzellen durch NK-Zellen verstärkt: Das Minus und das Plus bedeuten die Behandlung mit oder ohne anti-PIBF-IgG, die Zahlen sind die Prozent der NK-Aktivität für Fig. 5A und 5B und die Prozent der Hemmung der NK-Aktivität für Fig. 5C und 5D. Die Quelle der NK-Zellen waren frisch isolierte PBMCs von gesunden Individuen. Tatsächlich steigerte die Behandlung dieser Tumor-Zellen mit anti-PIBF-IgGs ihre Empfindlichkeit gegenüber einer durch NK vermittelten Lyse drastisch, etwa 8-10fach (Fig. 5A). Die grundlegende Tötungsaktivität gegen MCF-7-Zellen ist sehr niedrig (1-2%), wogegen hohe Werte (50-80%) messbar sind, wenn K562-Zellen als Zielzellen in Paralleltests verwendet werden. Dieselbe anti-PIBF-Behandlung, die zur Steigerung der Zielaktivität von Tumorzellen wirksam zu sein scheint, hatte jedoch keine Wirkung auf eine Nicht-Tumor-Zelllinie (McCoy, Human-Embryo-Fibroblasten) (Fig. 5B). Durch Charakterisierung repräsentativer Mitglieder (gute im Vergleich zu schlechten Zielen) beider Gruppen kann man eine Wechselbeziehung zwischen der Expression von PIBF- und NK-Zellaktivität aufstellen. Außerdem ermöglicht dieser Test die Untersuchung der Wirksamkeit von exogenem PIBF zur Verringerung der PIBF-Zielzellen-Tötung, und, was noch wichtiger ist, zur Beurteilung der Stärke neutralisierender anti-PIBF-Antikörper zur Stimulierung der Lyse von PIBF+ Tumorzellen. Neutralisierende Kaninchen-anti-Human- und auch -anti-Maus-Antiseren werden hergestellt, wobei diese polyklonalen Antikörper natürlichen PIBF *in vitro* (Human-Leukozyten-Kulturen im NK-Test) oder *in vivo* (trächtige Mäuse, als Tiermodell) inaktivieren können. Durch Zugeben von rekombinantem PIBF zu K562-Zellen (als Ziele) und PBMCs (als Quelle für NK-Zellen) war es möglich, die grundlegende Tötungsaktivität um 60-70% zu verringern (Fig. 5C). Antikörper, die gegen den rekombinanten PIBF erzeugt wurden, schalteten diese Inhibition der Tötungsaktivität beinahe vollständig aus (Fig. 5D)

Beispiel 5: Modulierung des Cytokin-Gleichgewichts

50 Einer der Hauptmechanismen der die Schwangerschaft fördernden Wirkung von PIBF ist die Induktion der T_{H2} -Cytokine. Es gibt nun Beweise dafür, dass die rekombinante Form von PIBF auch wirksam ist, die Cytokin-Expression durch periphere Blutlymphozyten *in vitro* zu modulieren. Um die Funktionalität des rekombinanten Human-PIBF, der in *E. coli* exprimiert und mittels GST-Markierung gereinigt worden war, zu testen, wurde rPIBF zu von Nicht-Schwangeren stammenden peripheren Lymphozyten, die mittels Ficoll-Paque-Gradient isoliert und mit einer 10^6 /ml-Zeldichte

gezüchtet worden waren, zugegeben. Die Erzeugung des Prototyps T_{H_2} -Lymphokin, IL-10, wurde durch Detektion und Zählen der Anzahl IL-10-positiver Lymphozyten (mittels Immunhistochemie auf Cytospins) nach 24 h Behandlung gemessen. Die Prozent IL-10-positiver Lymphozyten nahm in Abhängigkeit von der PIBF-Konzentration von 0,35 +/- 0,15 auf 3,5 +/- 1,5% zu. Bei der höchsten rPIBF-Konzentration (10 μ g/ml) waren 10x mehr IL-10-positive Lymphozyten vorhanden als in Kontroll-Kulturen (Fig. 6A). Die entgegengesetzte Wirkung war auf IL-12(T_{H_1} -Lymphokin)-produzierenden Lymphozyten durch dieselbe Behandlung zu sehen. Die Anzahl IL-12-positiver Lymphozyten nahm in Abhängigkeit der PIBF-Konzentration ab, was zu einer etwa 8-fachen Verringerung bei der höchsten Menge an PIBF führte. Die Neutralisierung der Wirkung natürlichen PIBFs auf die Cytokin-Produktion war ebenso erfolgreich. Die 3-stündige Behandlung der Lymphozyten einer Schwangerschaft (PIBF produzierend) mit anti-PIBF-IgGs führte zu einer signifikanten Verringerung der Anzahl IL-10-positiver und einer signifikanten Zunahme der Anzahl IL-12-positiver Zellen (Fig. 6B und C). Diese Ergebnisse beweisen, dass die rekombinante PIBF-Form aktiv zur Induktion von T_{H_2} -Cytokin-Expression ist. Von noch größerer Wichtigkeit ist, dass neutralisierende Antikörper aktiven PIBF, der durch Zellen in vivo erzeugt ist, entfernen und folglich T_{H_1} -Cytokine verstärken können.

SEQUENZPROTOKOLL

20 <110> Cistem Biotechnologies/InterCell

<120> PIBF

<130> R 36444

25 <140>
<141>

<160> 3

30 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 757

35 <212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:rekombinantes Protein

40 <400> 1

Met	Ser	Arg	Lys	Ile	Ser	Lys	Glu	Ser	Lys	Lys	Val	Asn	Ile	Ser	Ser
1			5		5				10				15		
Ser	Leu	Glu	Ser	Glu	Asp	Ile	Ser	Leu	Glu	Thr	Thr	Val	Pro	Thr	Asp
						20			25				30		
Asp	Ile	Ser	Ser	Ser	Glu	Glu	Arg	Glu	Gly	Lys	Val	Arg	Ile	Thr	Arg
							35		40			45			
Gln	Leu	Ile	Glu	Arg	Lys	Glu	Leu	Leu	His	Asn	Ile	Gln	Leu	Leu	Lys
							50		55		60				
Ile	Glu	Leu	Ser	Gln	Lys	Thr	Met	Met	Ile	Asp	Asn	Leu	Lys	Val	Asp
65						70				75					80
Tyr	Leu	Thr	Lys	Ile	Glu	Glu	Leu	Glu	Glu	Lys	Leu	Asn	Asp	Ala	Leu
							85		90				95		
His	Gln	Lys	Gln	Leu	Leu	Thr	Leu	Arg	Leu	Asp	Asn	Gln	Leu	Ala	Phe
					100				105				110		

A T 4 1 0 7 5 3 B

	Gln	Gln	Lys	Asp	Ala	Ser	Lys	Tyr	Gln	Glu	Leu	Met	Lys	Gln	Glu	Met
				115			120						125			
	Glu	Thr	Ile	Leu	Leu	Arg	Gln	Lys	Gln	Leu	Glu	Glu	Thr	Asn	Leu	Gln
5			130				135					140				
	Leu	Arg	Glu	Lys	Ala	Gly	Asp	Val	Arg	Arg	Ser	Leu	Arg	Asp	Phe	Glu
			145			150					155					160
	Leu	Thr	Glu	Glu	Gln	Tyr	Ile	Lys	Leu	Lys	Ala	Phe	Pro	Glu	Asp	Gln
10					165					170					175	
	Leu	Ser	Ile	Pro	Glu	Tyr	Val	Ser	Val	Arg	Phe	Tyr	Glu	Leu	Val	Asn
				180						185						
	Pro	Leu	Arg	Lys	Glu	Ile	Cys	Glu	Leu	Gln	Val	Lys	Lys	Asn	Ile	Leu
			195					200					205			
	Ala	Glu	Glu	Leu	Ser	Thr	Asn	Lys	Asn	Gln	Leu	Lys	Gln	Leu	Thr	Glu
			210				215					220				
15	Thr	Tyr	Glu	Glu	Asp	Arg	Lys	Asn	Tyr	Ser	Glu	Val	Gln	Ile	Arg	Cys
	225				230						235					240
	Gln	Arg	Leu	Ala	Leu	Glu	Leu	Ala	Asp	Thr	Lys	Gln	Leu	Ile	Gln	Gln
					245						250					255
20	Gly	Asp	Tyr	Arg	Gln	Glu	Asn	Tyr	Asp	Lys	Val	Lys	Ser	Glu	Arg	Asp
			260					265						270		
	Ala	Leu	Glu	Gln	Glu	Val	Ile	Glu	Leu	Arg	Arg	Lys	His	Glu	Ile	Leu
			275					280					285			
	Glu	Ala	Ser	His	Met	Ile	Gln	Thr	Lys	Glu	Arg	Ser	Glu	Leu	Ser	Lys
25			290				295					300				
	Glu	Val	Val	Thr	Leu	Glu	Gln	Thr	Val	Thr	Leu	Gln	Lys	Asp		Lys
			305				310					315				320
	Glu	Tyr	Leu	Asn	Arg	Gln	Asn	Met	Glu	Leu	Ser	Val	Arg	Cys	Ala	His
			325								330					
30	Glu	Glu	Asp	Arg	Leu	Glu	Arg	Leu	Gln	Ala	Gln	Leu	Glu	Glu	Ser	Lys
			340					345					350			
	Lys	Ala	Arg	Glu	Glu	Met	Tyr	Glu	Lys	Tyr	Val	Ala	Ser	Arg	Asp	His
			355					360					365			
	Tyr	Lys	Thr	Glu	Tyr	Glu	Asn	Lys	Leu	His	Asp	Glu	Leu	Glu	Gln	Ile
35			370				375					380				
	Arg	Leu	Lys	Thr	Asn	Gln	Glu	Ile	Asp	Gln	Leu	Arg	Asn	Ala	Ser	Arg
			385				390					395				400
	Glu	Met	Tyr	Glu	Arg	Glu	Asn	Arg	Asn	Leu	Arg	Glu	Ala	Arg	Asp	Asn
			405								410					
40	Ala	Val	Ala	Glu	Lys	Glu	Arg	Ala	Val	Met	Ala	Glu	Lys	Asp	Ala	Leu
			420					425					430			
	Glu	Lys	His	Asp	Gln	Leu	Leu	Asp	Arg	Tyr	Arg	Glu	Leu	Gln	Leu	Ser
			435					440					445			
	Thr	Glu	Ser	Lys	Val	Thr	Glu	Phe	Leu	His	Gln	Ser	Lys	Leu	Lys	Ser
			450				455					460				
45	Phe	Glu	Ser	Glu	Arg	Val	Gln	Leu	Leu	Gln	Glu	Glu	Thr	Ala	Arg	Asn
			465				470					475				480
	Leu	Thr	Gln	Cys	Gln	Leu	Glu	Cys	Glu	Lys	Tyr	Gln	Lys	Lys	Leu	Glu
				485						490					495	
50	Val	Leu	Thr	Lys	Glu	Phe	Tyr	Ser	Leu	Gln	Ala	Ser	Ser	Glu	510	Lys
			500					505								
	Ile	Thr	Glu	Leu	Gln	Ala	Gln	Asn	Ser	Glu	His	Gln	Ala	Arg	Leu	Asp
			515					520					525			
	Ile	Tyr	Glu	Lys	Leu	Glu	Lys	Glu	Leu	Asp	Glu	Ile	Met	Gln	Thr	
			530					535					540			
55	Ala	Glu	Ile	Glu	Asn	Glu	Asp	Glu	Ala	Glu	Arg	Val	Leu	Phe	Ser	Tyr

A T 4 1 0 7 5 3 B

	545	Gly	Tyr	Gly	Ala	Asn	550	Val	Pro	Thr	Thr	Ala	555	Lys	Arg	Arg	Leu	560	Lys	Gln	
						565						570						575			
5	Ser	Val	His	Leu	Leu	580	Ala	Arg	Arg	Val	Leu	585	Gln	Leu	Glu	Lys	Gln	590	Asn	Ser	
	Leu	Ile	Leu	Leu	595	Lys	Asp	Leu	Glu	His	600	Arg	Lys	Asp	Gln	Val	605	Thr	Gln	Leu	
10	Ser	Gln	Glu	Leu	Asp	Arg	610	Ala	Asn	Ser	Leu	615	Leu	Asn	Gln	Thr	Gln	Gln			
	Pro	Tyr	Arg	Tyr	Leu	Ile	625	Glu	Ser	Val	Arg	630	Gln	Arg	Asp	Ser	Lys	Ile	640		
	Asp	Ser	Leu	Thr	Glu	Ser	645	Ile	Ala	Gln	650	Glu	Lys	Asp	Val	Ser	655	Asn			
15	Leu	Asn	Lys	Glu	Lys	Ser	660	Ala	Leu	Leu	665	Gln	Thr	Lys	Asn	Gln	Met	Ala			
	Leu	Asp	Leu	Glu	Gln	Leu	675	Leu	Asn	His	680	Arg	Glu	Glu	Leu	Ala	Ala	Met			
	Lys	Gln	Ile	Leu	Val	Lys	690	Met	His	Ser	700	Ser	Glu	Asn	Ser	Leu					
20	Leu	Leu	Thr	Lys	Thr	Glu	705	Pro	Lys	His	710	Val	Thr	715	Glu	Asn	Gln	Lys	Ser	720	
	Lys	Thr	Leu	Asn	Val	725	Pro	Lys	Glu	His	730	Glu	Asp	Asn	Ile	Phe	Thr	735	Pro		
25	Lys	Pro	Thr	Leu	Phe	740	Thr	Lys	Lys	Glu	745	Ala	Pro	Glu	Trp	Ser	750	Lys	Lys		
	Gln	Lys	Met	Lys	Thr	755															

<210> 2

30 <211> 758

<212> PRT

<213> Homo sapiens

	<400> 2																			
35	Met	Ser	Arg	Lys	Ile	5	Ser	Lys	Glu	Ser	Lys	10	Lys	Val	Asn	Ile	Ser	15	Ser	
	1	Leu	Glu	Ser	20	Glu	Asp	Ile	Ser	Leu	25	Glu	Thr	Thr	Val	Pro	30	Thr	Asp	
40	Asp	Ile	Ser	Ser	Ser	Glu	Glu	Glu	Arg	40	Glu	Gly	Lys	Val	Arg	Ile	Thr	Arg		
	Gln	Leu	Ile	Glu	Arg	Lys	Glu	Leu	Leu	His	Asn	Ile	Gln	Leu	Leu	Lys				
	Ile	Glu	Leu	Ser	Gln	Lys	50	70	Thr	Met	Met	Ile	Asp	Asn	Leu	Lys	Val	Asp	80	
45	Tyr	Leu	Thr	Lys	Ile	85	Glu	Glu	Leu	Glu	Glu	90	Lys	Leu	Asn	Asp	Ala	Leu	95	
	His	Gln	Lys	Gln	Leu	Leu	100	Leu	Thr	Leu	Arg	Leu	Asp	Asn	Gln	Leu	Ala	Phe	110	
50	Gln	Gln	Lys	Asp	Ala	Ser	115	Lys	Tyr	120	Gln	Glu	Leu	Met	Lys	Gln	Glu	Met		
	Glu	Thr	Ile	Leu	Leu	Arg	130	Gln	Lys	Gln	Leu	Glu	Glu	Thr	Asn	Leu	Gln			
	Leu	Arg	Glu	Lys	Ala	Gly	145	Asp	Val	Arg	Arg	Ser	Leu	Arg	Asp	Phe	Glu	160		
55	Leu	Thr	Glu	Glu	Gln	Tyr	150	Ile	Lys	Leu	Lys	Ala	Phe	Pro	Glu	Asp	Gln			

AT 410 753 B

					165						170				175		
					Glu	Tyr	Val	Ser	Val	Arg	Phe	Tyr	Glu	Leu	Val	Asn	
		Leu	Ser	Ile	Pro 180												
5		Pro	Leu	Arg 195	Lys	Glu	Ile	Gys	Glu	Leu 200	Gln	Val	Lys 205	Asn	Ile	Leu	
		Ala	Glu	Glu 210	Leu	Ser	Thr	Asn	Lys 215	Asn	Gln	Leu	Lys 220	Gln	Leu	Thr	
		Thr	Tyr	Glu 225	Glu	Asp	Arg	Lys	Asn 230	Tyr	Ser	Glu 235	Val	Gln	Ile	Arg	
10		Gln	Arg	Leu	Ala	Leu	Glu 245	Leu	Ala	Asp	Thr 250	Lys	Gln	Leu	Ile	Gln 255	
		Gly	Asp	Tyr	Arg	Gln 260	Glu	Asn	Tyr	Asp 265	Lys	Val	Lys	Ser	Glu 270	Arg	
15		Ala	Leu	Glu	Gln 275	Glu	Val	Ile	Glu 280	Leu	Arg	Arg	Lys	His 285	Glu	Ile	
		Glu	Ala	Ser 290	His	Met	Ile	Gln 295	Thr	Lys	Glu	Arg	Ser 300	Glu	Leu	Ser	
		Glu	Val 305	Val	Thr	Leu	Glu 310	Gln	Thr	Val	Thr	Leu 315	Leu	Gln	Lys	Asp	
20		Glu	Tyr	Leu	Asn	Arg 325	Gln	Asn	Met	Glu	Leu 330	Ser	Val	Cys	Cys	Ala 335	
		Glu	Glu	Asp	Arg 340	Leu	Glu	Arg	Leu	Gln 345	Ala	Gln	Leu	Glu	Glu 350	Ser	
25		Lys	Ala	Arg 355	Glu	Glu	Met	Tyr	Glu 360	Lys	Tyr	Val	Ala	Ser 365	Arg	Asp	
		Tyr	Lys 370	Thr	Glu	Tyr	Glu	Asn 375	Lys	Leu	His	Asp 380	Glu	Glu	Gln	Ile	
		Arg	Leu	Lys	Thr	Asn	Gln 390	Glu	Ile	Asp	Gln 395	Leu	Arg	Asn	Ala	Ser	
30		Glu	Met	Tyr	Glu	Arg 405	Glu	Asn	Arg	Asn	Leu 410	Arg	Glu	Ala	Arg	Asp 415	
		Ala	Val	Ala	Glu 420	Lys	Glu	Arg	Ala	Val 425	Met	Ala	Glu	Lys	Asp	Ala	
35		Glu	Lys 435	His	Asp	Gln	Leu	Leu	Asp 440	Arg	Tyr	Arg	Glu	Leu 445	Gln	Leu	
		Thr	Glu 450	Ser	Lys	Val	Thr	Glu 455	Phe	Leu	His	Gln 460	Ser	Lys	Leu	Ser	
		Phe	Glu 465	Ser	Glu	Arg	Val 470	Gln	Leu	Leu	Gln 475	Glu	Thr	Ala	Arg	Asn 480	
40		Leu	Thr	Gln	Cys	Gln 485	Leu	Glu	Cys	Glu	Lys 490	Tyr	Gln	Lys	Lys	Leu 495	
		Val	Leu	Thr	Lys 500	Glu	Phe	Tyr	Ser	Leu 505	Gln	Ala	Ser	Ser	Glu	Lys 510	
45		Ile	Thr	Glu 515	Leu	Gln	Ala	Gln	Asn 520	Ser	Glu	His	Gln 525	Ala	Arg	Leu	
		Ile	Tyr 530	Glu	Lys	Leu	Glu	Lys 535	Glu	Leu	Asp	Glu	Ile 540	Ile	Met	Gln	
		Ala	Glu 545	Ile	Glu	Asn	Glu 550	Asp	Glu	Ala	Glu	Arg 555	Val	Leu	Phe	Ser	
50		Gly	Tyr	Gly	Ala	Asn	Val 565	Pro	Thr	Thr	Ala 570	Lys	Arg	Arg	Leu	Lys 575	
		Ser	Val	His	Leu 580	Ala	Arg	Arg	Val	Leu 585	Gln	Leu	Glu	Lys	Gln 590	Asn	
55		Leu	Ile	Xaa 595	Lys	Arg	Ser	Gly	Thr 600	Ser	Lys	Gly	Pro	Ser	Asn	Thr	
																Ala	

A T 4 1 0 7 5 3 B

	Phe	Thr	Arg	Ser	Leu	Thr	Glu	Ala	Asn	Ser	Leu	Leu	Asn	Gln	Thr	Gln
	610						615					620				
5	Gln	Pro	Tyr	Arg	Tyr	Leu	Ile	Glu	Ser	Val	Arg	Gln	Arg	Asp	Ser	Lys
	625					630					635					640
	Ile	Asp	Ser	Leu	Thr	Glu	Ser	Ile	Ala	Gln	Leu	Glu	Lys	Asp	Val	Ser
					645					650					655	
	Asn	Leu	Asn	Lys	Glu	Lys	Ser	Ala	Leu	Leu	Gln	Thr	Lys	Asn	Gln	Met
				660					665				670			
10	Ala	Leu	Asp	Leu	Glu	Gln	Leu	Leu	Asn	His	Arg	Glu	Glu	Leu	Ala	Ala
			675					680				685				
	Met	Lys	Gln	Ile	Leu	Val	Lys	Met	His	Ser	Lys	His	Ser	Glu	Asn	Ser
		690					695					700				
	Leu	Leu	Leu	Thr	Lys	Thr	Glu	Pro	Lys	His	Val	Thr	Glu	Asn	Gln	Lys
		705			710					715						720
15	Ser	Lys	Thr	Leu	Asn	Val	Pro	Lys	Glu	His	Glu	Asp	Asn	Ile	Phe	Thr
				725					730						735	
	Pro	Lys	Pro	Thr	Leu	Phe	Thr	Lys	Lys	Glu	Ala	Pro	Glu	Trp	Ser	Lys
			740					745						750		
20	Lys	Gln	Lys	Met	Lys	Thr										
			755													
25	<210> 3 <211> 2715 <212> DNA <213> Künstliche Sequenz															
	<220> <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:rekombinante DNA															
30	<400> 3															
	cgtgtttgc	tttccgctcc	tccggacatc	cgggagagg	gacttccggc	ggcttgaaa	60									
	agtgcgttgtt	ctgtccctcct	tgcgggtgcgc	gagatggtttgc	tcttggttac	gggtccataac	120									
	ggtccccctgc	cttgaaatcc	cttgggtgggg	gcctgcaacc	ttgtgcctcc	gactggagac	180									
	gccttgggtc	cctcggtgtc	tgcactggct	gctggtaag	gcttcagttgt	ggacgaattg	240									
35	acactttcga	gaatattaaaa	atcaaatttag	agaagaaaaac	tgatccataat	taataaaaaat	300									
	gtctcgaaaa	atttcaaaagg	agtcaaaaaaa	agtgaacatc	tctatgttctc	tggaaatcgt	360									
	agatattatgt	tttagaaacaa	cagttctac	ggatgtatatt	tcctcatcg	aagagcgaga	420									
	ggccaaagtc	agaatccacca	ggcagctaat	tgaacaaaaaa	gaactacttc	ataatattca	480									
	gttactaaaa	atttgagctat	cccagaaaaac	tatgtatgtc	gacaatttga	aagtggatta	540									
40	tcttacaaag	atttgaagaaat	tggaggagaaa	acttaatgtat	gcacttcacc	agaagcagct	600									
	actaacatgt	agatttagaca	accaatttggc	tttcaacag	aaagatgcca	gcaaatatca	660									
	agaatattatgt	aaacaagaa	tggaaaccat	tttgttggaa	cagaaacaaac	tagaagagac	720									
	aaatcttcag	ctaagagaaaa	aagctggaga	tgttcgtcg	agccctgcgt	acttttgatgt	780									
	gacagaagag	caatatatta	aaataaaaagc	ttttctgtaa	gatcagctt	ctattctgt	840									
45	atatgtatct	gttcgttct	atgagctgt	gaatccattaa	agaaaggaaaa	tctgtgaact	900									
	acaagtgtaaa	aagaatatcc	tagcagaaga	attaagtaca	aacaaaaaaacc	aactgaagca	960									
	gctgacagag	acatatgagg	aagatcgaaa	aaactactct	gaagttcaaa	tttagatgtca	1020									
	acgtttggcc	tttagaattag	cagacacaaa	acagtttaatt	cagcaagggt	actaccgtca	1080									
	agagaactat	gataaaagtca	agagtgaacg	tgatgcactt	gaacagggaa	taatttgatgt	1140									
50	taggagaaaa	catgaaatac	ttgaaggccct	tcacatgatt	caaacaaaaag	aacgaagtga	1200									
	attatcaaaa	gaggtgtca	ccttagagca	aactgttact	ttactgc当地	aggataaaaga	1260									
	atatcttaat	cgcctaaaaca	tggagcttag	tgttcgtgt	gctcatgaa	aggatcgcc	1320									
	tgaaagactt	caagctcaac	tggagaagaa	caaaaaaggct	agagaagaga	tgtatgaaaa	1380									
	atatgttagca	tccagagacc	attataaaaac	agaatatgaa	aataaaaactac	atgatgaact	1440									
55	agaacaaatc	agattgaaaa	ccaaaccaaga	aattgtatcaa	cttcgaaatg	cctcttaggaa	1500									

	aatgtatgaa	cgagaaaaca	gaaatctccg	agaagcaagg	gataatgctg	tggctaaaaa	1560
	ggaacgagca	gtatggctg	aaaaggatgc	tttagaaaaaa	cacgatcgc	tcttagacag	1620
	gtacagagaa	ctacaactta	gtacagaaaag	caaagtaaca	gaatttctcc	atcaaagtaa	1680
5	attaaaatct	tttggaaatg	agcgtgtca	acttctgcaa	gaggaaacag	caagaaatct	1740
	cacacagtgt	caattgaaat	gtgaaaaata	tcagaaaaaa	ttggagggtt	taaccaaaga	1800
	attttatagt	ctccaagcct	cttctgaaaaa	acgcattact	gaactcaag	cacagaactc	1860
	agagcatcaa	gcaaggctag	acattttaga	gaaactggaa	aaagagcttg	atgaaataat	1920
	aatgcaaact	gcagaaaattg	aaaatgaaga	tgaggctgaa	agggtctt	tttcctacgg	1980
10	ctatggtgc	aatgttccc	caacagccaa	aagacgacta	aagcaaagtg	ttcacttgc	2040
	aagaagagtg	cttcaattag	aaaaacaaaaa	ctcgctgatt	ttaaaagatc	tggAACatcg	2100
	aaaggaccaa	gtaacacagc	tttcacaaga	gcttgacaga	gccaattcgc	tattaaacca	2160
	gactcaacag	ccttacaggt	atctcattga	atcagtgcgt	cagagagatt	ctaagattga	2220
	ttcactgacg	gaatctattg	cacaacttga	gaaagatgtc	agcaacttaa	ataaagaaaaa	2280
	gtcagctta	ctacagacga	agaatcaaat	ggcattagat	ttagaacaac	ttctaaatca	2340
15	tcgtgaggaa	ttggcagcaa	tgaaacagat	tctcgtaag	atgcatgta	aacattctga	2400
	gaacagctta	cttctacta	aaacagaacc	aaaacatgtg	acagaaaaatc	agaaatcaaa	2460
	gactttgaat	gtgcctaaag	agcataaaga	caatataattt	acacctaaac	caacactctt	2520
	tactaaaaaa	gaagcacctg	agtggctaa	gaaacaaaag	atgaagacct	agtgtttgg	2580
20	atgggaagca	cctgtagacc	attatatact	cctgaagttc	ttttctgtat	ggaaaacaaaa	2640
	attcagctta	atcggtact	cagcattttt	taaataacaa	tgtttatgtt	aactaatatt	2700
	aaattaacaa	attcg					2715

Literaturstellen

- 25 1. Szekeres-Bartho, J., Kinsky, R., Kapovic, M., Vargan P., Chaouat, G. Immuno-endocrine networks in pregnancy. In: Gergely et. al Ed. Progress in Immunology X. Springer Verlag 1993 S.861
2. Szekeres-Bartho, J., Reznikoff-Etievant, M.F., Varga, P., Varga, Z., Chaouat, G. Lymphocytic progesterone receptors in human pregnancy. *J. Reprod Immunol.* 16, 239, 1989.
- 30 3. Szekeres-Bartho, J., Szekeres, Gy., Debre, P., Autran, B., Chaouat, G. Reactivity of lymphocytes to a progesterone receptor-specific monoclonal antibody. *Cell. Immunol.* 125, 273, 1990.
4. Szekeres-Bartho, J., F. Kilar, G. Falkay, V. Csernus, A. Torok, und A. S. Pacsa. The mechanism of the inhibitory effect of progesterone on lymphocyte cytotoxicity: I. Progesterone-treated lymphocytes release a substance inhibiting cytotoxicity and prostaglandin synthesis. *Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.* 9, 15, 1985.
- 35 5. Szekeres-Bartho, J., Autran, B., Debre, P., Andreu, G., Denver, L., Chaouat, G. Immuno-regulatory effects of a suppressor factor from healthy pregnant women's lymphocytes after progesterone induction. *Cell. Immunol.* 122, 281, 1989.
6. Szekeres-Bartho, J., Kinsky, R., Chaouat, G. A progesterone-induced immunologic blocking factor corrects high resorption rate in mice treated with antiprogesterone. *Am. J. Ob. Gyn.* 163, 1320, 1990.
- 40 7. Szekeres-Bartho, J., Chaouat, G. Lymphocyte-derived progesterone induced blocking factor corrects resorption in a murine abortion system. *Am. J. Reprod. Immunol.* 23, 26, 1990.
8. Szekeres-Bartho, J., Faust, Zs., Varga, P. Progesterone-induced blocking factor (PIBF) in normal and pathological pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 34, 342, 1995.
- 45 9. Check, J., Arwitz, M., Gross, J., Szekeres-Bartho, J., Chung, H. Wu. Evidence that the expression of a progesterone-induced blocking factor by maternal T-lymphocytes is positively correlated with conception. *Am. J. Reprod. Immunol.* 38, 6, 1997.
10. Szekeres-Bartho, J., Kinsky, R., Chaouat, G. The effect of a progesterone induced immunologic blocking factor on NK-mediated resorption. *Am. J. Reprod. Immunol.* 24, 105. 1990.
- 50 11. Szekeres-Bartho, J., G. Par, Gy. Dorabay, Smart, Y. C. Z. Volgyi. The anti-abortive effect of PIBF in mice is manifested by modulating NK activity. *Cell. Immunol.* 177, 194, 1997.
12. Faust, Zs., G. Laskarin, D. Rukavina, J. Szekeres-Bartho Progesterone Induced Blocking Factor Inhibits Degranulation of NK Cells *Am. J. Reprod. Immunol.* 42, 71, 1999.
- 55 13. Szekeres-Bartho, J., Wegmann, T.G., A progesterone-dependent immunomodulatory protein

- alters the Th1/Th2 balanced. *Reprod. Immunol.* 31, 81-95, 1996.
14. Szekeres-Bartho, J., Wegmann, T.G. Kelemen, K., Bognar, I., Faust, Zs., Varga, P. Interaction of progesterone- and cytokine-mediated immunomodulatory mechanisms in favor of successful gestation. *Regional Immunology*, 6,315, 1995.
- 5 15. Szekeres-Bartho, J., Faust, Zs., Varga, P., Szereday, L., Kelemen, K. The immunological pregnancy protective effect of progesterone is manifested via controlling cytokine production. *Am. J. Reprod. Immunol.* 35, 348, 1996.
16. Kelemen, K., Bognar, I., Paal, M., und Szekeres-Bartho, J. A progesterone-induced protein increases the synthesis of asymmetric antibodies. *Cell. Immunol.* 167, 129, 1996.
- 10 17. Algarra I, Collado A, Garrido F. Altered MHC class I antigens in tumors. *Int. J. Clin. Lab. Res.* 27, 95, 1997.
18. Rees RC, Mian S. Selective MHC expression in tumors modulates adaptive and innate antitumor responses. *Cancer Immunol. Immunother.* 48, 374, 1999.
19. Whiteside, T. L., und Herberman, R. B. The role of natural killer cells in immune surveillance of cancer. *C717'r. Opin. Immunol.* 7. 704. 1995.
- 15 20. Karlhofer FM, Ribaudo RK, und Yokoyama WM. MHC class I alloantigen specificity of Ly-49+ IL-2-activated natural killer cells. *Nahre.*358. S.66-70. 1992.
21. Phillips JH, Gumperz JE, Parham P. und Lanier LL. Superantigen-dependent, cell-mediated cytotoxicity inhibited by MHC class I receptors on T lymphocytes. *Science* 268. S.403-405. 1995.
- 20 22. Cabestre FA, Lefebvre S. Moreau P. Rouas-Friess N. Dausset J. Carosella ED, Paul P. HLA-G expression: immune privilege for tumour cells? *Semin. Cancer Biol.* 9(1) S.27-36. 1999.
23. Kagi D, Lederman B. Burki K et al. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* 369. S.31-37. 1994.
24. Smyth, M. J. et al. Perforin is a major contributor to NK cell control of tumor metastasis. *J. 25 Immunol.* 162, 6658, 1999.
- 25 26. Manilay JO, Sykes M. Natural killer cells and their role in graft rejection. *Cu7r Op7n Immunol.* 10, 532, 1998.
27. Young NT. Kir genes, killer cells and clinical transplantation. *Transplantation* 68, 1626, 1999
28. Beaman K, Angkachatchai V, Gilman-Sachs A. TJ6: the pregnancy-associated cytokine. *Am J Reprod Immunol.* 35, 338, 1996.
- 30 29. Aslakson CJ, Lee G. Boomer JS, Gilman-Sachs A, Kucuk O., Beaman KD. Expression of regeneration and tolerance factor on B cell chronic lymphocytic leukemias: a possible mechanism for escaping immune surveillance. *Am J Hematol* 61, 46, 199.
- 35 30. Bonavida B., Bradley TP, Grimm EA. Frequency determination of killer cells by a single-cell cytotoxic assay. *Methods Enzymol* 93, 270, 1983.
- 40

PATENTANSPRÜCHE:

- 45 1. Verfahren zur Diagnostizierung eines Tumors bei einem Patienten, welches Verfahren gekennzeichnet ist durch das Bereitstellen einer Probe vom Patienten, das Messen der Konzentration von PIBF (Progesteroninduzierter Blockierungs-Faktor) oder eines Derivats davon oder Fragments davon in der Probe und die Bestimmung, ob die PIBF-Konzentration in der Probe über oder unter einem vorbestimmten Schwellenwert liegt, wobei die Konzentration über dem Schwellenwert einen Patienten mit einem Tumor identifiziert.
- 50 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Tumor ein Epithel-Carcinom, insbesondere ein Lungen-Carcinom, ein Colon-Carcinom oder ein Brust-Carcinom ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Probe eine Körperflüssigkeit, insbesondere Harn oder Serum ist.
- 55 4. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Probe eine

- Gewebsprobe ist.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Schwellenwert die Konzentration des PIBF in einer Probe einer gesunden Person ist.
 6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass der Schwellenwert durch Messen der PIBF-Konzentration in mindestens einer gesunden Person parallel zur Bestimmung der PIBF-Konzentration in einer Probe des Patienten bestimmt wird.
 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass als positive Kontrolle die Konzentration von PIBF oder eines Derivats davon oder eines Fragments davon in der Probe, die eine festgelegte Konzentration von PIBF oder eines Derivats davon oder eines Fragments davon aufweist, gemessen wird, parallel zur Bestimmung der Konzentration des PIBF in der Probe des Patienten.
 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die PIBF-Konzentration in der Probe immunologisch, durch einen konkurrierenden Test, durch einen Sandwich-Test, durch Immunfärbung oder durch Kombinationen dieser Methoden gemessen wird.
 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die PIBF-Konzentration in der Probe indirekt, durch Messung der Konzentration der PIBF-mRNA in der Probe, gemessen wird.
 10. Verfahren zur Bestimmung der positiven oder negativen Progression eines Tumors bei einem Patienten, welches gekennzeichnet ist durch die Diagnostizierung eines Tumors bei einem Patienten gemäß einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9 und die Feststellung, ob die gemessene Konzentration des PIBF oder eines Derivats davon oder eines Fragments davon in der Probe über oder unter mindestens einer zuvor gemessenen Konzentration von PIBF oder einem Derivat davon oder einem Fragment davon in mindestens einer zuvor vom selben Patienten genommenen Probe liegt, wobei eine über der zuvor gemessenen Konzentration liegende Konzentration eine positive Progression identifiziert.
 11. Verwendung eines anti-PIBF-Antikörpers, vorzugsweise eines monoklonalen Antikörpers oder eines Fragments davon bei einem Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 10.
 12. Verwendung von PIBF oder einem Derivat davon oder einem Fragment davon bei einem Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 10.
 13. Verwendung nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass der PIBF ein rekombinanter PIBF ist.
 14. Set, gekennzeichnet durch ein erstes Reagens, das mindestens einen anti-PIBF-Antikörper oder ein Fragment desselben aufweist, und ein zweites Reagens, das PIBF oder ein Derivat davon oder ein Fragment davon mit einer bestimmten Konzentration aufweist.
 15. Set nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass es eine feste Phase aufweist, an die der mindestens eine anti-PIBF-Antikörper oder das Fragment davon oder das PIBF oder das Derivat davon oder das Fragment davon gebunden ist.
 16. Set nach Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, dass der PIBF rekombinant ist.
 17. Set nach einem der Ansprüche 14 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass es mindestens ein weiteres Reagens umfasst, welches einen zweiten anti-PIBF-Antikörper oder ein Fragment davon aufweist, der (das) an ein Epitop des PIBF bindet, welches von dem vom ersten anti-PIBF-Antikörper oder seinem Fragment erkannten Epitop verschieden ist.
 18. Set nach einem der Ansprüche 14 bis 17 zur Diagnostizierung eines Tumors bei einem Patienten bzw. zur Feststellung der Progression eines Tumors bei einem Patienten.
 19. Verwendung eines anti-PIBF-Antikörpers, vorzugsweise eines monoklonalen anti-PIBF-Antikörpers, insbesondere eines humanisierten anti-PIBF-Antikörpers oder eines Fragments davon zur Herstellung eines anti-Tumor-Medikaments.
 20. Verwendung nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass der Antikörper ein Einzelketten-Antikörper ist.
 21. Verwendung nach Anspruch 19 oder 20, dadurch gekennzeichnet, dass der Antikörper ein an ihm haftendes Molekül aufweist.
 22. Verwendung nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass das Molekül eine toxische Substanz ist, insbesondere ein Radionuklid, ein chemotherapeutischer Arzneistoff oder ein

- Toxin, bzw. ein Prodrug.
23. Verwendung von PIBF oder eines Derivats davon oder eines Fragments davon zur Herstellung eines Anti-Tumor-Medikaments.
24. Verwendung nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass das Medikament ein Vakzin ist.
- 5 25. Verwendung nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, dass das Vakzin weiters ein Adjuvans aufweist.
26. Verwendung nach Anspruch 23 oder 24, dadurch gekennzeichnet, dass der PIBF oder das Derivat davon oder das Fragment davon rekombinant ist.
- 10 27. Verwendung nach Anspruch 23 bis 24, dadurch gekennzeichnet, dass der PIBF oder das Derivat davon oder das Fragment davon ein chemisch synthetisiertes Molekül ist.
28. Verwendung eines Polynukleotids, das für PIBF oder ein Derivat davon oder Fragment davon oder für ein PIBF-antisense-Molekül codiert, zur Herstellung eines Anti-Tumor-Medikaments.
- 15 29. Rekombinantes Protein mit einer Progesteron-induzierten, immunmodulierenden Protein(PIBF)-Aktivität, welches
- die Aminosäuresequenz gemäß SEQ.ID.NO 1 oder
 - eine Aminosäuresequenz mit einer Aminosäure-Identität von mindestens 98% mit der Sequenz gemäß SEQ.ID.NO 1, wie mittels FAST/A-Algorithmus bestimmt, oder
 - eine Aminosäuresequenz mit einer Aminosäure-Identität von mindestens 95% mit der Sequenz von Aminosäurerest 580 bis 630 von SEQ.ID.NO 1, wie mittels FAST/A-Algorithmus bestimmt, und
 - eine PIBF-Aktivität von mindestens 50% des natürlichen Human-PIBF-Moleküls aufweist.
- 25 30. Rekombinantes Protein nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, dass es eine Aminosäuresequenz, wie durch die Aminosäurereste 300 bis 350 in SEQ.ID.NO 1 angegeben, aufweist.
31. Rekombinantes Protein nach Anspruch 29 oder 30, dadurch gekennzeichnet, dass es eine Aminosäuresequenz, wie durch die Aminosäurereste 580 bis 630 in SEQ.ID.NO 1 angegeben, aufweist.
- 30 32. Nukleinsäure-Molekül, das für ein rekombinantes Protein mit einer PIBF-Aktivität nach einem der Ansprüche 29 bis 31 codiert.
33. Nukleinsäure-Vektor, umfassend eine Nukleinsäuresequenz, die für ein rekombinantes Protein mit einer PIBF-Aktivität gemäß einem der Ansprüche 29 bis 31 codiert, und ein geeignetes Regulierungselement, das eine Transkription eines komplementären Nukleinsäure-Moleküls mindestens dieser für PIBF-Aktivität codierenden Nukleinsäuresequenz ermöglicht, aufweist.
- 35 34. Nukleinsäure-Vektor nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, dass er weiters einen Selektions-Marker aufweist.
- 35 40 35. Zelle, umfassend einen Vektor nach einem der Ansprüche 32 bis 34.

HIEZU 8 BLATT ZEICHNUNGEN

45

50

55

X Z Y

1 50 100

A MSR KIS KES KKVN ISSS LESED IS LETT VPTDD SSSEEREGKV RITR OLER KELHN IO LLKIEL SOKT MMID NLK DYL TKIE EEL KLN DAL HQK Q
B MSR KIA KEPK KV NI SS SLESED IS LETT HTDD SSSEEREGKV ITC OLER KELHN IO LLKIEL SOX NMID NLK DYL TKIE EEL KLN DAL HQK Q
C HITHE PRQ INI SS SLESED ID LATTE HTDD SSSEEREGKF PITS HLFERE EL HYIQ QL KIEL SOT NMID NLK DYL TKIE EEL EV KLN DPL HQK Q

150 200

A LLTL RDN QLA FQQKD ASKY QELM KOEMET ILLR OKE ETN LOR REKA GDV RRS LRDF ELL TEE QYIKL KAF PED QLS SIPEY VSVRF YEL VNPL RKE GE
B LLTL RDN QLT IQQD AAKY QELM KOEMET ILLR OKE ETN HQK R
C LLTL RDN QST IQQD VNP ERK E GE

250 300

A LQVK KNI LSEEL STN KNL QLT ETY EEDR KNY SE VQRC ORLA EADT KOL HQGDY ROEN YDKV SERDA LEQE VIEL RRK HEILE ASHMI QT KERS
C LQVK KSE LSEEL STSK GQL QLT ETY EEDR NNPEL IRG QPME EADT KOL HQGDY ROEN YDKV KR

301 W 350 400

A ELSKE VVT LEQ TVT LLQKD KEY LN RQNMEL SVR CAHE EDRL RERL QAO LEE SKKARE E MYEK YVA RDHY KTE YEN K LHDE LEQ I RLK T NQE IDOL RNS R
C ELSXTN LBID QRS X R

450 500

A EMYER EN RL REARDN AAEK DALEK HQLLD RYREL QL STES KV IEL HQS KLK SF E SERVOL QL OET ARN L TO COLE CKY QKK L E VLT K
C EMYER EN RL REARDN AAEKN RAV AAEK DALG K HQLLD RYREL QL XXES KV IEL HQS KLK -F E SERVOL QL OET ARN L TO COLE CKY QKK L E VLT K
D KIPEK IRV LTK

501 550 U 600

A EFYSL QASSEKR IT ELQA QN SEHQ AR LD TYE KLE KEL DE II MOTA ET ENE DE AER V L E SYGY GAN VPTTAK RRL K QSVH LARR V L QLE KON SLIL K DLEH
C EFYSL QASSEKR IT ELQA QN SEHQ AR LD TYE KLE KEL DE II MOTA ET ENE DE AER V L E SYGY GAN VPTTAK RPL K QSVH LARR V L QLE KON SLIL K DLEH
D EFYSL QASSEKR IT ELQA QN SDHRA RLD TYE KLE KEL DE II MOTA ET DDE EAER V L E SYGY -AN VPTTAK RRL K QSVH LARR V L QLE KON SLIL K DLEH

601 650 W 700

A RKD QVT QLS QEL -- DRAN SLL NOT QO PYR YLIES VRD SKIDS LESTAOLE KDV S NLN K EKS ALL OLT K NOM ALD LEQ L NHREE LAAM QI LV KMHS K
C QKN PSK TAFT RS LTER ANS L IN NOT QO PYR YLIES VRD AKL USIM K STA QLB K DV S NLN K EKS ALL OLT K NOM ALD LEQ L SHRE E-----
D QKN QVT QLS QEL -- DRAN

701 759

A HSEN SLL LT KTE PKH V TEN QK CT IN VPKE HEED NIET PK PTI EFT KKA PEWS K KQ KMK T
C ----- VEN Q EKT EN MPREHE EN IPI PPKT K E QEW PPK SQ KMK T
D HSEN NL FLTK MESK SVT EN Q AKT LN MPREHE EN IPI PK PTI EFT KKA QEW PPK SQ KMK T

Fig. 1

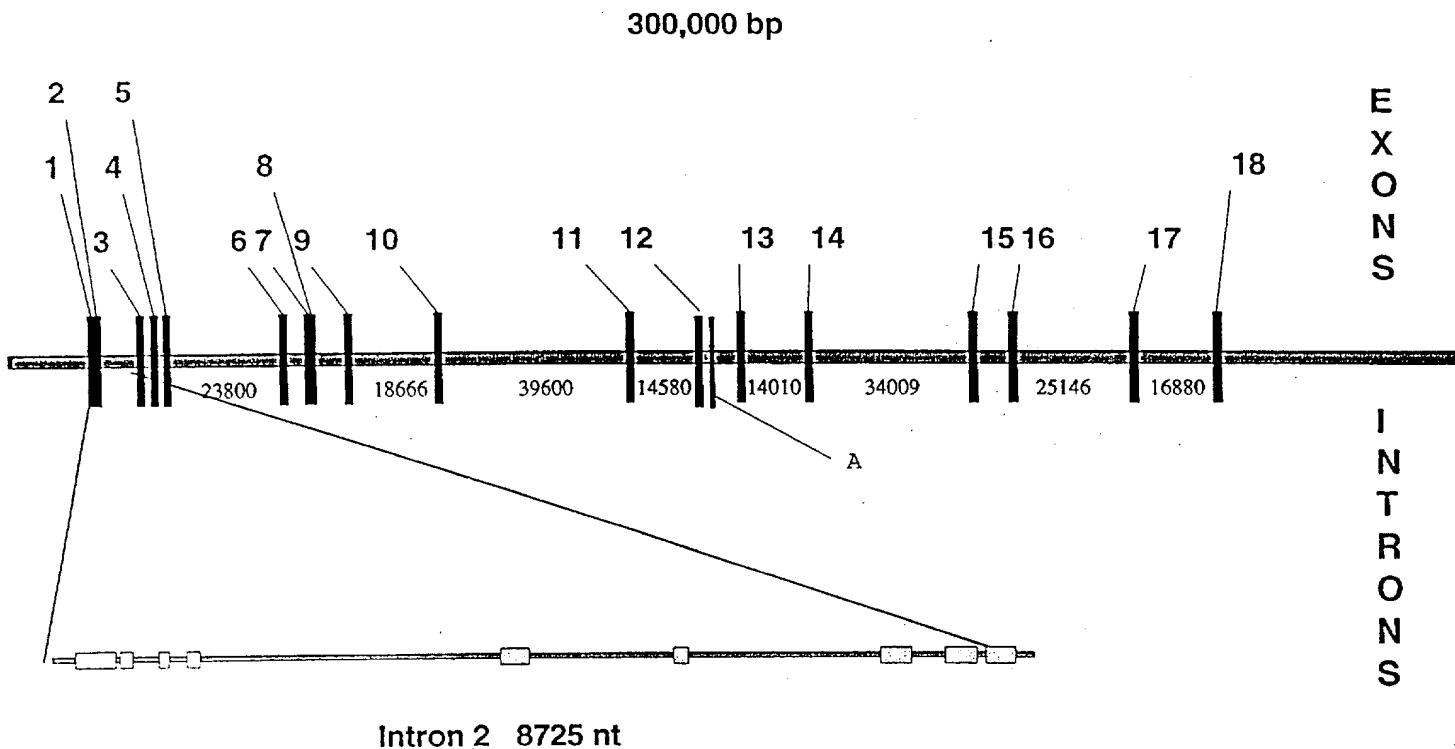


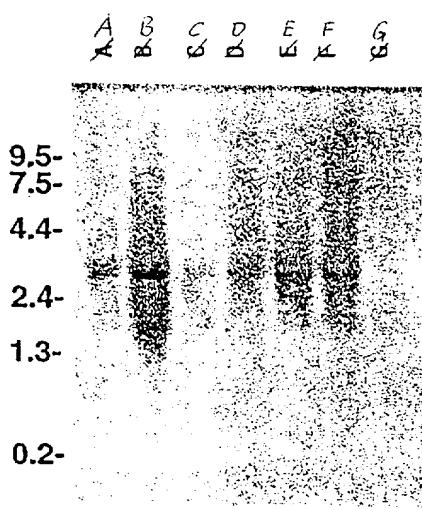
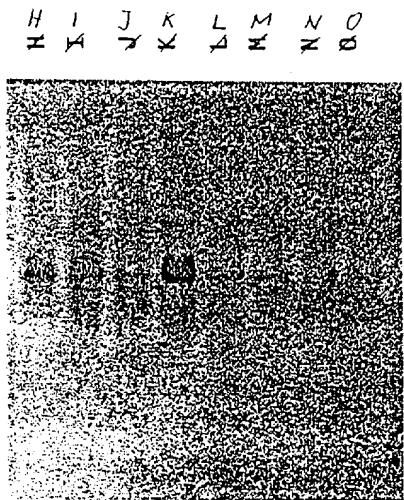
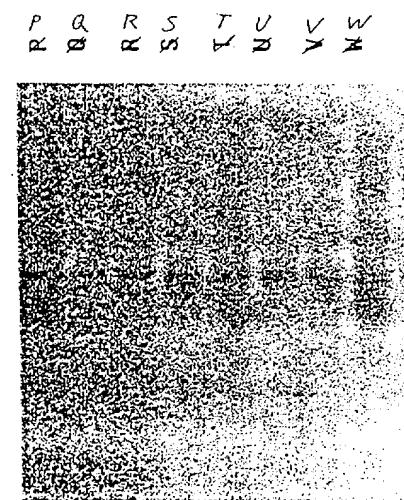
Fig. 2

ÖSTERREICHISCHES PATENTAMT

Ausgegeben am: 25.07.2003
Blatt: 3

८५८

Patentschrift Nr.: AT 410 753 B
Int. Cl. 7 : A61K 38/17, A61K 39/395,
A61P 35/00,
G01N 33/53 C12Q 1/68



۷۱

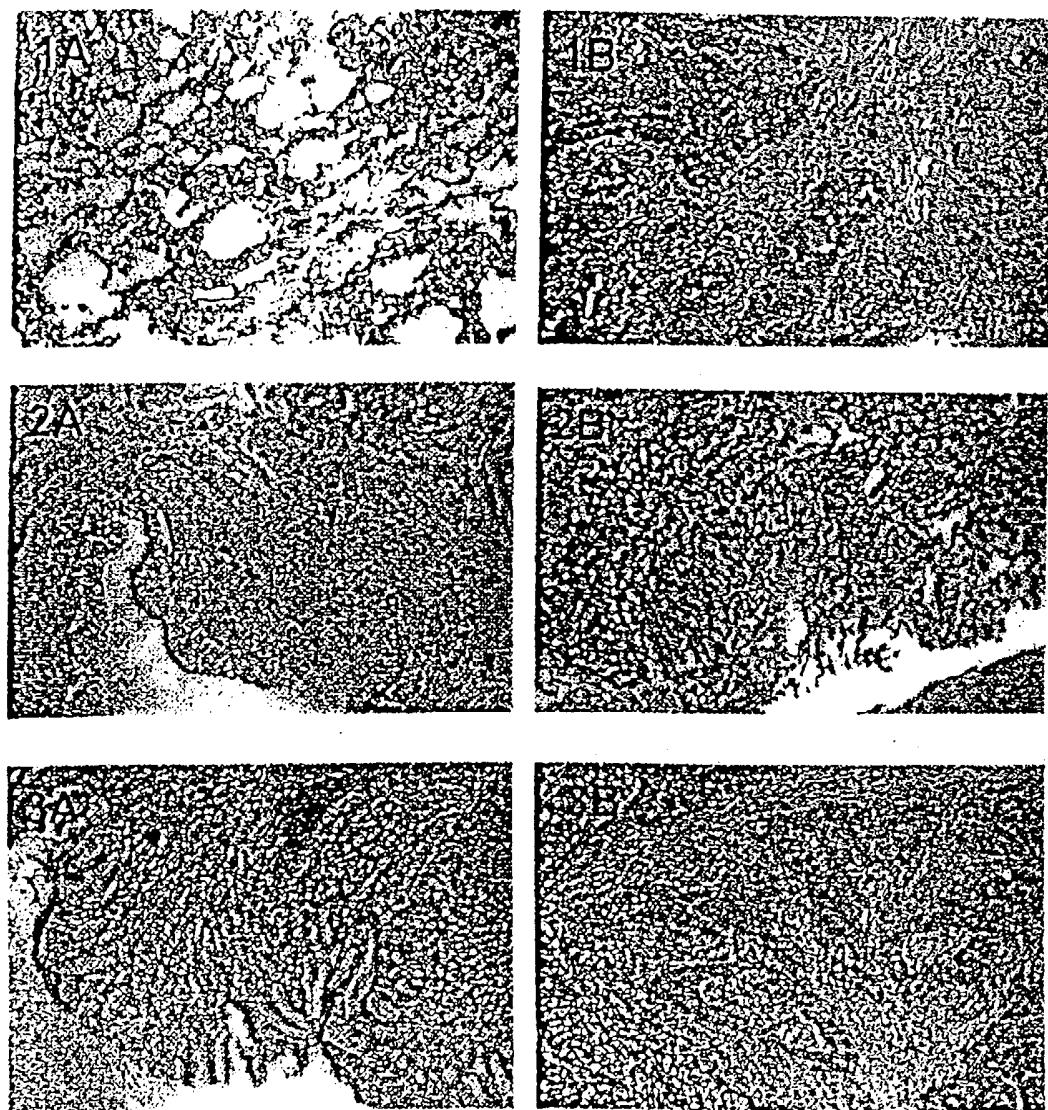


Fig. 4

Fig. 5A

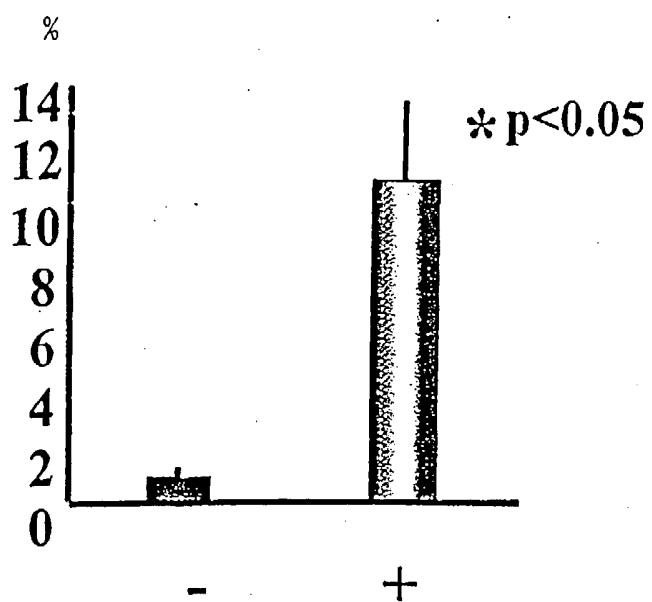


Fig. 5B

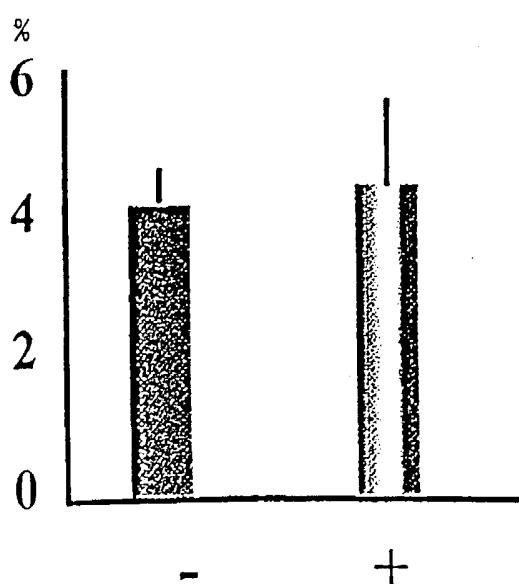


Fig. 5C

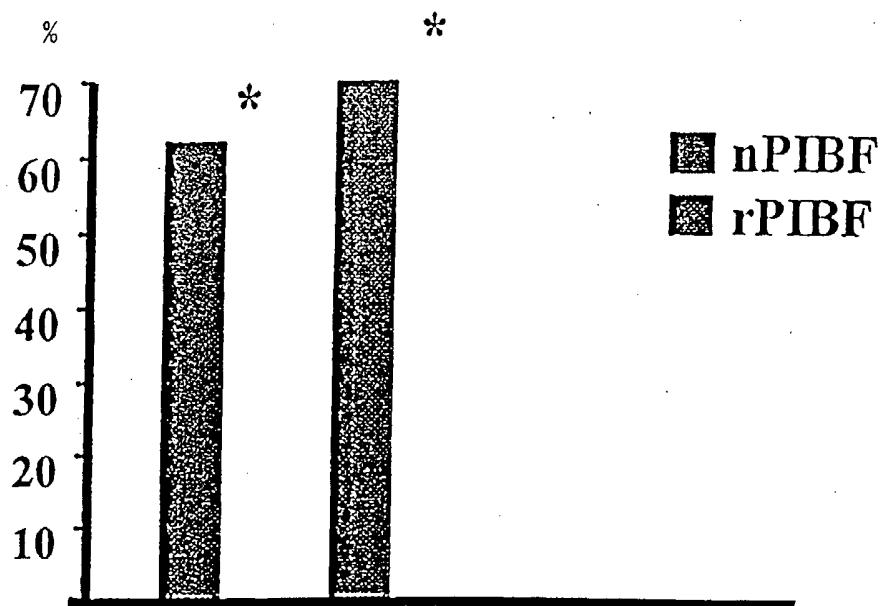


Fig. 5D

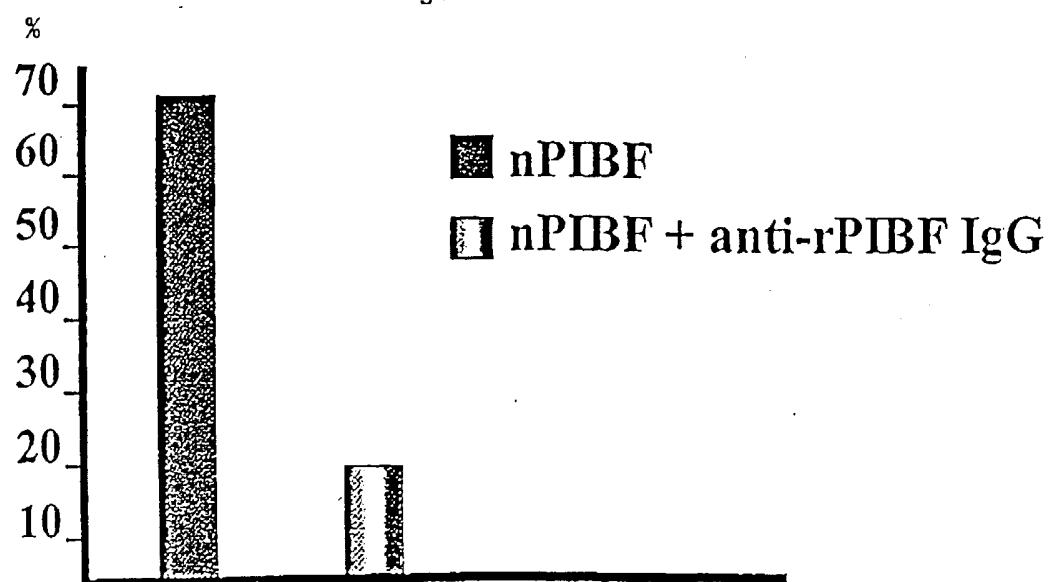


Fig. 6A

