

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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
4. Dezember 2003 (04.12.2003)

PCT

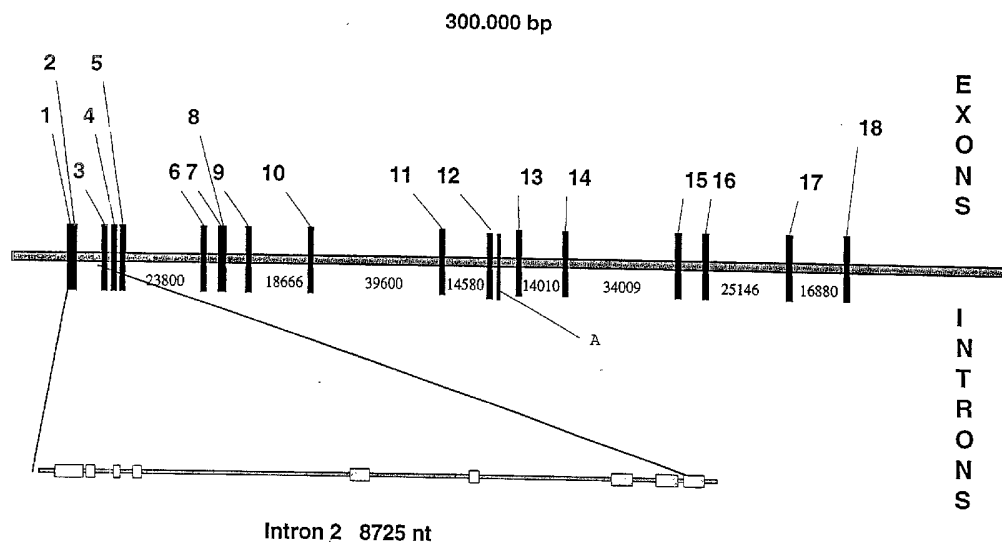
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 03/100428 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: G01N 33/574, A61K 38/17, 39/395, C07K 14/47, 16/18
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT03/00157
- (22) Internationales Anmeldedatum: 28. Mai 2003 (28.05.2003)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: A 809/2002 28. Mai 2002 (28.05.2002) AT
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): INTERCELL AG [AT/AT]; Campus Vienna Biocenter 6, A-1030 Wien (AT).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SZEKERES-BARTHO, Julia [HU/HU]; Lenke u. 4, H-7626 Pecs (HU). NAGY, Eszter [HU/AT]; Taborstrasse 9, A-1020 Wien (AT). POLGAR, Beata [HU/HU]; Napvirag u. 21, H-7624 Pecs (HU). PALKOVICS, Tamas [HU/HU]; Gagarin u. 48, H-8360 Keszthely (HU). LACHMANN, Margit [AT/AT]; Am Hofgartl 7/8/12, A-1110 Wien (AT). KLADE, Christoph [AT/AT]; Gröhrmühlgasse 1B/17, A-2700 Wr. Neustadt (AT). HENICS, Tamas [HU/AT]; Taborstrasse 9, A-1020 Wien (AT).
- (74) Anwalt: SONN & PARTNER; Riemergasse 14, A-1040 Wien (AT).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: PROGESTERONE-INDUCED BLOCKING FACTOR (PIBF)

(54) Bezeichnung: PIBF



(57) Abstract: The invention relates to a method for diagnosing a tumor in a patient that involves measuring the concentration of progesterone-induced immunoregulatory protein (PIBF) or a derivative thereof or a fragment thereof in the sample taken from the patient. The invention also relates to the use of an anti-PIBF antibody, a PIBF or a derivative thereof or a fragment thereof or a polynucleotide, which codes for the PIBF, as an antitumor medicament.

(57) Zusammenfassung: 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.



WO 03/100428 A2



GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

**(84) Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,

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

## PIBF

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 Zielzellen 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 Killersubstanzen 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 $\alpha$ - (Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$ )-Produktion durch NK-Zellen, die auch bei der Niederregulierung der NK-Aktivität eine Rolle spielen könnte. Die Menge an sezerniertem TNF $\alpha$  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<sub>H2</sub>-Cytokin-Dominanz. Die T<sub>H2</sub>-Dominanz trägt zur Verringerung der zellvermittelten Reaktionen und zur Verbesserung der B-

Zellen bei, wogegen die  $T_{H1}$ -Dominanz zu verringerten humoralen Reaktionen führt und die zellimmunologischen Mechanismen begünstigt. Sezernierter PIBF erleichtert die Produktion von  $T_{H2}$ -Cytokinen, wie IL-3, IL-4 und IL-10, wogegen er  $T_{H1}$ -Cytokine, wie IL-12 und IFN- $\gamma$  supprimiert, und zwar sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Die Neutralisierung des PIBF durch spezifische Antikörper führt *in vivo* zu einer  $T_{H1}$ -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 wachstumsstimulierende 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 aktivierter Onkogene und inaktivierter 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 I-MHC-Moleküle (wie HLA-G), welche die Tötungswirkung der (Tumor)Antigen-spezifischen Klasse I-MHC-ingeschränkten 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- $\beta$  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 Reagentien, 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 High-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, Gewebeproben usw. umfassen. Zu den möglichen Methoden zählen in vivo-Bildgebung mittels Computertomograph (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

vorhandenden 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. Es zeigte sich auch, dass alternativ prozessierte PIBF-mRNAs in Tumorzellen in einer im Vergleich zu normalen Zellen unterschiedlichen Konzentration vorhanden sind, weshalb Proteine oder Fragmente, die aus diesen unterschiedlichen Formen von mRNA-Molekülen oder Fragmenten davon translatiert sind, ebenfalls vom Ausdruck "Fragmente" mit umfasst sind. 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 bezieht sich der Ausdruck "PIBF oder Fragmente davon" - ohne darauf eingeschränkt zu sein - auf Sequenzen gemäß SEQ ID Nr: 1, 3, 4, 6, 8, 10, 14, 15, 17, 19, 20, 23, 25, 27, 29, 31, 32, 34 und 36 oder Fragmente oder Derivate davon. Daher sind Beispiele für PIBF oder Fragmente davon, die gemäß der vorliegenden Erfindung detektiert oder quantifiziert werden können, diese oben erwähnten Sequenzen. Da es sich zeigte, dass die Exons 17 und 18 in beinahe allen identifizierten mRNA-Formen inkludiert sind, werden PIBF-Fragmente, die die Exons 17 und 18 aufweisen (vgl. die Figuren) vorzugsweise für die Detektion oder Quantifizierung von PIBF in einer Probe verwendet.

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 Konzentrationswert, 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 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. Weiters kann der Schwellenwert Null sein, wenn alternativ prozessierte PIBF-mRNA-Produkte nur in Tumorzellen und nicht in gesunden Zellen vorhanden sind. Daher hängt der Schwellenwert auch vom PIBF-Molekül ab und muss für jedes spezifische PIBF-Molekül einzeln bestimmt werden.

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 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 Patienten, bei welchen die Möglichkeit besteht, dass sie einen Tumor haben,

sowie gesunde Menschen, die sich einer allgemeinen Routineuntersuchung unterziehen. Natürlich kann der Ausdruck "Patient" auch jedes Tier, insbesondere Maus, Ratte, Meerschweinchen, Affe, umfassen, wobei das Tier vorzugsweise ein für Analysen, z.B. zum Nachweis spezifischer Tumoren, zum Testen von Anti-Tumor-Substanzen oder karzinogenen Substanzen, verwendetes Labortier ist. Weiters kann das Tier ein genetisch modifiziertes Tier sein, welches eine Prädisposition für die Bildung von Tumoren aufweist.

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 als Patienten mit einem Tumor angesehen werden. Es bedeutet auch, dass es sehr schwierig ist, diesen Test zur Detektion von Tumorwachstum zu benützen, 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.

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

Das Epithelkarzinom ist vorzugsweise ein Kolonkarzinom oder ein Brustkarzinom, ein Lymphom, ein Kehlkopfkarcinom, ein Tumor des Harntrakts, insbesondere ein Blasenkarzinom, ein Lungentumor, eine Leukämie, ein Plasmozytom, ein Myelom, insbesondere Myeloma multiplex, ein myeloproliferative Erkrankung oder ein Kopf- und Hals-Tumor. 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, 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 Probennahme vom Patienten, ohne jeglichen chirurgischen Schritt und ohne die Notwendigkeit spezifischer 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 Diagnose bei einem Patienten, der sehr schwach ist, und für regelmäßige Überprüfungen des Fortschreitens des Tumors bei einem Patienten. Die PIBF-Konzentration kann beispielsweise mittels einer 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 Gewebeprobe. 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 Gewebeprobe vom Patienten verwendet wird, die direkte Lokalisierung des Tumors, insbesondere, wenn verschiedene Gewebeproben 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, insbesondere durch einen kompetitiven Test, einen Sandwich-Test, durch Immunfärbung ("immunostaining") oder Kombinationen dieser Methoden. 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.

Beispiele für rekombinante, monoklonale anti-Human-PIBF-Antikörper, die wie oben beschrieben verwendet werden können, sind an der Hybridom-Zellbank an der medizinischen Fakultät der Universität von Pécs, Abteilung für Immunologie und Biotechnologie, Ungarn, unter den Hinterlegungsnummern 11 bis 14/2001, Zelllinien-Codes HYB 255-258, hinterlegt.

"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 Wirtsspezies 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, Polyanionen, Aluminium, Polykationen (z.B. polyArg), Peptide, Ölemulsionen, Schlüssellock-Napfschnecken-Haemocyanin (keyhole limpet hemocyanin) und Dinitrophenol. 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 dem Schlüssellock-Napfschnecken-Haemocyanin fusioniert werden, und Antikörper gegen das chimäre Molekül werden erzeugt.

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.

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.

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.

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')<sub>2</sub>-Fragmente, die durch Pepsin-Verdau des Antikörper-Moleküls erzeugt werden können, und die Fab-Fragmente, die durch Reduktion der Disulfid-Brücken der F(ab')<sub>2</sub>-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.

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.

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.

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 gemessen. Dieses Verfahren wird vorzugsweise dann verwendet, wenn die zu messende Probe eine Gewebeprobe des Patienten ist. Gemäß diesem Verfahren wird der anti-PIBF-Antikörper direkt zur Gewebeprobe des Patienten zugegeben, wo er an den in der Gewebeprobe vorhandenen PIBF bindet. Der gebundene Antikörper wird dort durch direkte Anzeige der Konzentration des PIBF in der Gewebeprobe 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, antisense-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. Hier ist es wiederum weiters bevorzugt, die Konzentration alternativ prozessierter mRNA zu messen. Auch die Anwesenheit oder Abwesenheit eines spezifischen mRNA-Moleküls kann eine Information dahingehend liefern, ob die Zellen Tumorzellen sind oder nicht.

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. Nr.3 (PIBF-cDNA) stammen.

Beispiele für solche zu detektierende und/oder zu quantifizierende PIBF-mRNA-Moleküle sind z.B. jene, die von DNA oder RNA detektiert werden, welche von der Nukleotid-Sequenz der SEQ ID Nr. 5, 7, 9, 11, 12, 13, 16, 18, 21, 22, 24, 26, 28, 30, 33, 35 und 37 stammt. Da es sich zeigte, dass die Exons 17 und 18 in beinahe allen identifizierten mRNA-Formen inkludiert sind, werden vorzugsweise die DNA oder RNA, die von einer für die Exons 17 und 18 codierenden Sequenz stammen (vgl. die Figuren) für die Detektion oder Quantifikation von PIBF-mRNA in einer Probe verwendet.

Hybridisierungssonden können mittels verschiedenster Marker-Gruppen markiert werden, beispielsweise Radionukleotide, wie  $^{32}\text{P}$  oder  $^{35}\text{S}$ , 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-Transcriptase 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, z.B. mit einer Substanz oder durch vollständiges oder teilweises Entfernen des Tumorgewebes, 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, und die oben angeführten Beispiele gelten auch hier.

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. Hier gelten dieselben Definitionen und bevorzugten Ausführungsformen oder Beispiele, wie oben erwähnt.

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.

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 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 verschiedene Strategien zur Bekämpfung eines Tumors bei einem Patienten entwickelt werden.

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

oben erwähnten hinterlegten Antikörper können auch für diesen Aspekt der vorliegenden Erfindung verwendet werden.

Vorzugsweise hat der Antikörper ein an ihm haftendes Molekül. In diesem Fall wird der anti-PIBF-Antikörper als Ziel- oder Abgabemechanismus verwendet, um ein Molekül, z.B. ein pharmazeutisches Mittel, zu Zellen oder Geweben zu bringen, die PIBF exprimieren. 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 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 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 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 Hemmprotein 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 Signalgebende 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 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 Lysolecithin, Pluronic-Polyole, Polyanione, Polykatione (z.B. polyArg), Peptide, Ölemulsionen, Schlüssellock-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.

Ein vorteilhafter Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung eines Polynukleotids, das für PIBF oder ein Derivat davon oder ein Fragment davon codiert, oder eines PIBF-antisense-Moleküls zur Herstellung eines Anti-Tumor-Medikaments. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung bezieht sich der Ausdruck "für PIBF codierendes Polynukleotid" oder "zur PIBF-mRNA komplementäre Nukleotidsequenzen" auf eine Sequenz, die von einer Sequenz stammt, welche vorzugsweise ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr. 3, 5, 7, 9, 11, 12, 13, 16, 18, 21, 22, 24, 26, 28, 30, 33, 35, 37 oder Fragmenten oder Derivaten davon.

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 antisense-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 Sequenz-spezifische 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 Synthetisierung 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 Phosphodiesterase-Bindungen innerhalb des Molekül-Gerüsts. 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. Natürlich gelten auch hier wiederum dieselben Definitionen und bevorzugten Ausführungsformen wie oben erwähnt.

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, intramedullar, intrathekal, intraventrikulär, transdermal, subkutan, intraperitoneal, intranasal, enteral, topisch, sublingual oder rektal.

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, Aufschlammungen, Suspensionen u.dgl..

Gemäß einem anderen Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung auch ein rekombinantes Protein mit einer PIBF-Aktivität gemäß SEQ. ID.Nr.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.Nr.2), weist jedoch nicht die exakten Aminosäuren 595 bis

614 sowie die Aminosäure Nr. 333 gemäß der natürlichen PIBF-Sequenz (SEQ.ID.Nr.2) auf. Die Proteinsequenz des rekombinanten PIBF-Proteins gemäß der vorliegenden Erfindung (SEQ.ID.Nr.1) umfasst 757 Aminosäurereste. Die vorliegende Erfindung sieht daher neue rekombinante PIBF-Proteine mit der SEQ.ID.Nr.1 oder Derivate oder Homologe davon vor. Daher umfasst das rekombinante Protein mit einer PIBF-Aktivität gemäß der vorliegenden Erfindung

- die Aminosäuresequenz gemäß SEQ.ID.Nr.1, oder
- eine Aminosäuresequenz mit einer Aminosäure-Identität von mindestens 98% mit der Sequenz gemäß SEQ.ID.Nr.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.Nr.1, wie mittels FAST/A-Algorithmus bestimmt, und
- 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) paralytisch 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/ $\mu\text{g}$  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- $\gamma$ )-Lymphokinen entweder auf Protein- oder auf 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)/ $\mu\text{g}$  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.

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.Nr.1) zu erzeugen, welches rekombinante Protein besonders große funktionelle Ähnlichkeiten mit dem natürlichen Protein aufweist.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung weist das rekombinante Protein eine Aminosäuresequenz, wie durch die Aminosäurereste 300 bis 350 in SEQ.ID.Nr.1 angegeben, auf. Die Aminosäure Nr. 333 im natürlichen Human-PIBF-Protein (SEQ.ID.Nr.2) ist Cys anstelle von Arg im rekombinanten PIBF-Protein gemäß der vorliegenden Erfindung (SEQ.ID.Nr.1). Daher weist das rekombinante Protein gemäß der vorliegenden Erfindung vorzugsweise ein Arg als Aminosäure Nr. 333 gemäß SEQ.ID.Nr.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.Nr.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 Aminosäurereste 580 bis 630 in SEQ.ID.Nr.1 angegeben, und eine beträchtliche PIBF-Aktivität (>50%) auf. Dieses rekombinante Protein weist daher die Sequenz des erfindungsgemäßen PIBF zwischen den Aminosäureresten 580 bis 630

in SEQ.ID.Nr.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 der vorliegenden Erfindung ist ein Protein mit einer PIBF-Aktivität vorgesehen, umfassend

- die Aminosäuresequenz gemäß SEQ.ID.Nr. 4 oder
- eine Aminosäure mit einer Aminosäure-Identität von mindestens 85%, vorzugsweise mindestens 90%, noch mehr bevorzugt, mindestens 95%, am meisten bevorzugt, 99%, mit der Sequenz gemäß SEQ.ID.Nr.4, wie mittels FAST/A-Algorithmus bestimmt.

Dieses Protein erwies sich als ein 89 kDa-Protein mit einer PIBF-Aktivität, das von einer Maus isoliert worden war. Diese Aminosäuresequenz ist besonders vorteilhaft in Bezug auf die Aspekte der Detektion, Diagnose und Analyse von Tumoren, Anti-Tumor-Substanzen, karzinogenen Substanzen bei Mäusen, aber auch bei anderen Labor-Tieren. Weiters können mit Hilfe dieses erfindungsgemäßen Proteins Tests an Tieren, z.B. Mäusen, Meerschweinchen, Hamstern, Ratten, mit einer Veranlagung für einen Tumor durchgeführt werden. Ein weiterer Aspekt betrifft Tiere, insbesondere Mäuse, bei welchen dieses Protein inhibiert ist oder seine Aktivität blockiert ist. Dies kann z.B. durch das Vorsehen von Analoga der Bindungspartner dieses Proteins durchgeführt werden.

Ein bevorzugter Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Protein, welches eine Aminosäuresequenz mit einer Identität von mindestens 85%, vorzugsweise mindestens 90%, noch mehr bevorzugt, mindestens 95%, wie mittels FAST/A-Algorithmus bestimmt, mit einer Sequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den SEQ.ID.Nr. 6, 8, 10, 14, 15, 17, 19, 20, 23, 25, 27, 29, 31, 32, 34 und 36 aufweist, wobei dieses Protein ein alternativ prozessiertes PIBF-Protein ist. Es zeigte sich, dass alternativ prozessierte mRNA-Moleküle in verschiedenen Geweben vorhanden sind und daher auch alternativ prozessierte Proteine exprimieren. Überraschenderweise liegen diese alternativ prozessierten Proteine in Tumorgeweben in einer anderen

Konzentration vor, im Vergleich zu den gesunden Geweben. Dies kann vorteilhaft zur Detektion und Analyse von Tumoren in einer Probe verwendet werden, wobei insbesondere die SEQ.ID.Nr. 6 und 8 bevorzugt sind, da diese zwei kleinere PIBF-Formen sind, die man in humanen Primär-Tumoren findet, die SEQ.ID.Nr. 6 im Adenokarzinom des Magens und die SEQ.ID.Nr. 8 im Endometrium-Adenokarzinom. Gegenstücke vom normalen Gewebe derselben Patienten exprimierten keine nachweisbaren Mengen dieser PIBF-mRNA-Spleiß-Varianten. Es zeigte sich jedoch auch, dass die Exons 17 und 18 in beinahe allen identifizierten Formen inkludiert sind. Daher sind Peptide, die diese Exons aufweisen, besonders vorteilhaft. Der Ausdruck "alternativ gespleißte PIBF-Proteine" bezieht sich auf Proteine, die von Proteinen mit PIBF-Aktivität abgeleitet sind.

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.

In Bezug auf das Maus-Nukleinsäure-Molekül, z.B. SEQ.ID.Nr.5 oder ein Fragment davon, wird dies vorzugsweise zur Erzeugung von "knock-out"-Mäusen verwendet, d.h. von Mäusen, bei welchen die Expression des PIBF-Gens oder eines Fragments davon blockiert oder inhibiert ist. Dies wird beispielsweise durchgeführt, indem ein antisense-Maus-PIBF-Nukleinsäure-Molekül oder ein Fragment davon vorgesehen wird, welche Strategie voranstehend beschrieben ist. Ein anderer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft daher "knock-out"-Mäuse, die eine inhibierte oder reduzierte Expression des aktiven PIBF-Proteins aufweisen.

Vorzugsweise wird ein Nukleinsäure-Molekül vorgesehen, das für ein alternativ prozessiertes PIBF-Protein codiert, umfassend

eine Nukleinsäuresequenz mit einer Identität von mindestens 80%, vorzugsweise mindestens 90%, noch mehr bevorzugt, mindestens 95%, mit einer Sequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ. ID. Nr. 7, 9, 11, 12, 13, 16, 18, 21, 22, 24, 26, 28, 30, 33, 35 und 37 oder

- eine Sequenz, die unter stringenten Bedingungen mit einer der obigen Sequenzen hybridisiert, oder
- eine Sequenz, die infolge des genetischen Codes einer der obigen Sequenzen degeneriert ist.

Dies sind Nukleinsäuresequenzen, die alternativ gespleißten mRNA-Molekülen entsprechen, welche man in verschiedenen Geweben findet, wobei insbesondere die SEQ.ID.Nr.7 und die SEQ.ID.Nr.9 sich auf alternativ gespleißte mRNA-Moleküle beziehen, die man nur in Tumorgeweben fand, während normale Gewebe diese mRNA-Sequenzen nicht aufwiesen. Daher sind diese bei der Detektion oder Analyse von Tumoren sowie von gesunden Zellen und Geweben besonders vorteilhaft.

Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung einen Nukleinsäure-Vektor, der eine erfindungsgemäße Nukleinsäure-Sequenz aufweist.

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 oder ein erfindungsgemäßes Protein 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-Aminosäuresequenzen,

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.

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.

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

Fig. 7 zeigt PIBF-Mengen in Harnproben von Patienten mit nicht-Adenokarzinom-Tumoren und nicht-festen Tumoren.

Fig. 8 zeigt die Detektion erhöhter PIBF-Mengen mit Hilfe monoklonaler und polyklonaler Antikörper.

Fig. 9 zeigt die Normalisierung von PIBF-Mengen nach Operation oder Chemotherapie.

Fig. 10 zeigt die verschiedenen PIBF-mRNAs, die in humanen Primär-Tumoren überexprimiert wurden.

Fig. 11 zeigt die PIBF-Bindung an Human-PBMC.

Fig. 12 zeigt alternativ gespleißte PIBF-mRNA.

Fig. 13 zeigt die immunohistochemische Analyse von humanen Primär- und Sekundär-(Metastasen)-Melanomen.

Fig. 14 zeigt die Detektion erhöhter PIBF-Mengen mit Hilfe von Peptid-spezifischen polyklonalen/monoklonalen Antikörpern.

Fig. 15 bis 16 zeigen PIBF-Mengen in Harnproben von Patienten mit hämatologischen Tumoren.

Fig. 17 zeigt die PIBF-Mengen in Harnproben von Patienten mit Kopf- und Hals-Tumoren vor und nach Therapie.

Fig. 18 zeigt die PIBF-Mengen in Harnproben von Patienten mit Harntrakt-Tumoren vor und nach Therapie.

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.

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 genomischen "contigs".

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-Eintragungen, die zur humanen PIBF-Sequenz passen

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 immun-privilegiertes 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

	ACC#	Ursprung der cDNA-Bibliothek		
		Organ	embryonal, normal, Tumor	zusammenpassende Teile (nt)
	1AA099685	Uterus	normal, schwanger	860-1321
	2AI188926	Plazenta, gepoolt (2)	normal, 8.-9. Schwangerschaftswoche	2409-2763(87)
	3AI200713	Plazenta, gepoolt (2)	normal, 8.-9. Schwangerschaftswoche	2418-2763(86)
	4N27300	Plazenta, gepoolt (2)	normal, 8.-9. Schwangerschaftswoche	2367-2763(84)
	5N40036	Plazenta, gepoolt (2)	Normal, 8.-9. Schwangerschaftswoche	1657-2089(20)
	6AA251149	Tonsillen, Keimzentrum	normal - B-Zellen-angereichert	2440-2763(84)
	7AA251594	Tonsillen, Keimzentrum	normal - B-Zellen-angereichert	307-633
	8AA806027	Tonsillen, Keimzentrum	normal - B-Zellen-angereichert	1644-2025
	9AA610068	Hoden	normal	2455-2763(86)
	10AI126269	Hoden	normal	2385-2763(91)
	11AI758409	Niere, Gewebemasse Kid11	normal	2491-2763(83)
	12H64996	Nase (Olfac-Epithel)	normal (weiblich)	(75)1669-1837(98)
13	AW79358 7	Uterus (exp. ORFs) L	erwachsen	(224) 1989- 2346
14	AW81855 3	Magen ORF	erwachsen	2544- 2667 (8)
15	BE16554 9	Kopf-Hals	erwachsen	1881-2264
16	AA91369 3	Lunge-Hoden-B- Zelle	normal + fötal (Lunge)	2501- 2763 (8)
17	AA97101 0	Lunge-Hoden-B- Zelle	normal + fötal (Lunge)	2531- 2763 (102)
18	AI01456 1	Lunge-Hoden-B- Zelle	normal + fötal (Lunge)	(41) 1616- 2116
19	AI22238 5	Lunge-Hoden-B- Zelle	normal + fötal (Lunge)	2361- 2763 (8)
20	AI80906 9	Lunge-Hoden-B- Zelle	normal + fötal (Lunge)	1644-2179
21	AW08518 6	Lunge-Hoden-B- Zelle	normal + fötal (Lunge)	2328- 2763 (86)
22	AW26953 7	Lunge-Hoden-B- Zelle	normal + fötal (Lunge)	2376- 2763 (83)
23	AW572968	Lunge-Hoden-B-Zelle	normal + fötal (Lunge)	2515-2616
24	AI350620	Gesamtkörper	Fötus (8-9 Wochen)	2565-2763(87)
25	D31319	Lunge, Gewebemasse	fötal	1394-1765
26	AA004593	Leber + Milz	fötal (20 Wochen)	(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)
29	AW978222	Colon	Tumor, Metastase	1656-2135
30	AI254231	Colon	Adenokarzinom	(140)2482-2763(101)
31	AA307364	Colon, Zelllinie	Karzinom (HCC)	2017-2391(55)
32	AA603710	Keimzelle	Misch-Tumoren	2404-2763(84)
33	AI350870	Keimzelle	Mischtyp-Tumoren (3)	2511-2763(84)
34	AI990811	Keimzelle (GC_6)	gepoolte Tumoren	2283-2763(96)

	ACC#	Ursprung der cDNA-Bibliothek		
35	AI278790	Lunge, neuroendokrin	karzinoid	2514-2763(92)
36	AI554801	Uterus, gepoolt (2) Ut3	Endometrium-Karzinom	2407-2763(88)
37	AI915158	Uterus, gepoolt (3) (ut2)	seröses Papill. cc. starkes Wachstum.	1714-1837(109)
38	AW273347	Uterus, gepoolt (2)	seröses Papill. cc. starkes Wachstum	1785-2311(50)
39	AW169084	Uterus, gepoolt (3) (ut2)	Endometrium-Karzinom	2200-2763(84)
40	AI769755	Niere, Pool von 2 Kid12	Tumor, hellzellig	2671-2763(403)
		<b>Organ</b>	<b>embryonal, normal, Tumor</b>	<b>zusammenpassende Teile (nt)</b>
41	AW769371	Niere (Pool von 2) Kid13	Wilms'-Tumor (Pr. + Meta.)	2310-2763(102)
42	N59340	Gehirn (männlich)	Multiple Sklerose-Läsion	(102)2506-2763(83)
43	N77149	Gehirn (männlich)	Multiple Sklerose-Läsion	1858-2175(12)

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

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.

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

<b>Kontrolle (a)</b>	<b>Schwanger (b)</b>	<b>Drohende vorzeitige Wehen (c)</b>	<b>Tumor-Patienten (e)</b>	
n=48	n=23	n=19	n=65	
x=5,5+/-1,8	x=110+/-36	x=6+/-4,7	x=27,7+/-5,3	
			Lunge (n=23)	
a-b p<0,001	b-c <0,002		ohne Metastasen (n=12) <b>29,4</b>	mit Metastasen (n=11) <b>43,1</b>
a-c NS				
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 Mamma-Epithelkarzinom)-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-Doublett 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 Immunisierung 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 Harnblasenkarzinom (Übergangszelle), und in Reihe "3" ist Magenkrebs (Adenokarzinom) 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).

TABELLE III

<i>Organ</i>	<i>Gewebs- und Tumor-Typ</i>	<i>Anzahl PIBF-Positiver (Anzahl der Getesteten)</i>
Magen	Adenokarzinom	1(2)
Gallenblase	Adenokarzinom	0(1)
Prostata	Adenokarzinom	0(1)
Colon	Adenokarzinom	
	Primär-Tumor	1(1)
Ovarium	Cystadenokarzinom	2(3)
Schilddrüse	Carcinoma papillare	2(2)
Brust	Invasives duktales Karzinom	1(1)
Brust	Invasives lobuläres Karzinom	1(1)
Uterus	Cc. endometrioides	0(1)
Uterus	stromales karzinom	0(1)
Uterus	Leiomyosarkom	0(1)
Septum nasi	Leiomyosarkom	0(1)
Haut	Melanom	0(2)
Haut	epitheliales Karzinom	1(1)
Lunge	epitheliales Karzinom	2(2)
Speiseröhre	Adenokarzinom	1(1)
Harnblase	Übergangszellen-Karzinom	1(1)
Metastase (Haut)	hellzelliges Nierenkarzinom	0(1)
Metastase (Lymphknoten)	Plattenepithel	1(1)
Metastase (Lymphknoten)	Adenocc. coli	1(2)

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

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 Zugabe 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 Inhibierung der Tötungsaktivität beinahe vollständig aus (Fig. 5D).

#### Beispiel 5: Modulierung des Cytokin-Gleichgewichts

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-Zelldichte gezüchtet worden waren, zugegeben. Die Erzeugung des Prototyps  $T_{H2}$ -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 rPIBF-Konzentration von 0,35 +/- 0,15 auf 3,5 +/- 1,5% zu. Bei der höchsten rPIBF-Konzentration (10 µg/ml) waren 10x mehr IL-10-positive Lymphozyten vorhanden als in Kontroll-Kulturen (Fig. 6A). Die entgegengesetzte Wirkung war auf IL-12 ( $T_{H1}$ -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  $T_{H2}$ -Cytokin-Expression ist. Von noch größerer Wichtigkeit ist, dass neutralisierende Antikörper aktiven PIBF, der durch Zellen *in vivo* erzeugt ist, entfernen und folglich  $T_{H1}$ -Cytokine verstärken können.

#### Beispiel 6: Diagnose-Test

Der diagnostische Wert der Harn-PIBF-Mengen bei Malignitäten wird weiter beispielhaft durch die Verwendung von Harnproben von Patienten mit nicht-Adenokarzinom-Tumoren und nicht-festen Tumoren (Fig. 7) gezeigt; die Punkte repräsentieren Ergebnisse mit einzelnen Serien. Die Durchschnittszahlen sind gezeigt. N bedeutet die Anzahl von Patienten.

#### Beispiele:

Verschiedene hämatologische Malignitäten, insbesondere Lymphome (LY, N:36) und auch Leukämien (Leu, N=18), Plasmozytome (PL, N=11) und myeloproliferative Erkrankungen (MOP, N=7) sind durch eine über der normalen Harn-PIBF-Konzentration (Kontrolle C, N=86) liegende Konzentration (Fig. 7A); (A = alle Tumoren) gekennzeichnet. Andere Beispiele sind Kopf- und Hals-Tumoren (Fig. 7C) und die Malignitäten des Harntrakts (Fig. 7B) + = mit Metastasen, N = 15; - = ohne Metastasen, N = 14. Es ist auch offensichtlich, dass die Masse des Tumorgewebes - das heißt, Erkrankung mit oder ohne Metastasen, Entfernen des Tumors - die PIBF-Konzentration stark beeinflusst (Fig. 7B, C).

Die polyklonalen Antikörper werden in einem ähnlichen Antigen-Einfang-Sandwich-Test mit einem Paar monoklonaler Antikörper (ab) ersetzt, die in Mäusen unter Verwendung des N-terminalen 48 kDa-rPIBF als Antigen erzeugt wurden. Etwa zwanzig verschiedene Hybridom-Klone wurden getestet, danach wurden vier stabil und gut produzierende Klone für den ELISA-Test und auch für andere Diagnose-Methoden (Immunohistochemie) ausgewählt. Diese Hybridom-Klone sind bei der Hybridom-Zellbank an der medizinischen Fakultät der Universität von Pécs hinterlegt. (Die Hinterlegungsnummern sind 11-14/2001, Zelllinien-Codes: HYB255-258). Die erhöhten PIBF-Mengen in Harnproben von Tumorpatienten werden mit den monoklonalen Antikörper-Paaren ähnlich den polyklonalen Antikörpern detektiert (Fig. 8), wobei C = Kontrolle, A = alle hämatologischen Tumoren, L = Lymphom, Leu = Leukämie, P = Plasmazytom, N = nicht definiert; Nr. = Anzahl der Patienten; POLY = polyklonaler ab, MONO = monoklonaler ab.

Die umfangreicheren Daten verstärken nicht nur die

diagnostischen Möglichkeiten, sondern insbesondere auch die Tumor-Überwachungsmöglichkeit des Harn- und Serum-PIBF-ELISA. Mit dem Test ist ein therapeutischer Erfolg und Fehlschlag nachweis- und vorhersagbar, wie sich durch eine Normalisierung der PIBF-Mengen nach einer Operation oder Chemotherapie und einen signifikanten Anstieg bei Patienten, die einen Rückfall erleiden, zeigt (Fig. 9A: hämatologischer Tumor, B: Harntrakt-Tumor), sowohl bei den polyklonalen als auch bei den monoklonalen anti-PIBF-Antikörpern, wobei C = Kontrolle, B = vor Behandlung REL = Rückfall, REM = Remission.

#### Beispiel 7: Verschiedene Formen von PIBF

Zusätzlich zum Human-PIBF der gesamten Länge wurde Maus-PIBF-mRNA der gesamten Länge und die Proteinsequenz identifiziert (SEQ.ID.Nr.4,5). Der Maus-PIBF ist auch in 18 Exons organisiert und weist eine Aminosäuren-Homologie von 89% auf.

Beim Versuch, die PIBF-mRNA-Mengen in normalen und Tumor-Geweben mit RT-PCR zu vergleichen, entdeckte man eine Anzahl alternativ gespleißter PIBF-mRNA-Formen. Die Struktur der alternativ gespleißten mRNAs und die korrespondierenden Protein-Produkte sind in Tabelle IV zusammengefasst. Alle in einer Spezies identifizierten Formen können in anderen Spezies vorkommen und ähnliche Funktionen haben. Dies ist durch die homologen 35 kDa-PIBF-Protein-Formen beispielhaft angeführt. Mit Ausnahme einer Form von mRNA, die eine alternative Exon 14'-DNA enthält, die in der vorherrschenden pre-mRNA eine Intron-Sequenz ist, wurden sie alle durch ein perfektes Exon-"Skipping" erzeugt, wobei mehrere Exons im Vergleich zur gesamten Länge ausgelassen wurden. Die Exon-17- und -18-Sequenzen sind in beinahe allen identifizierten Formen inkludiert. Das lässt darauf schließen, dass die von diesen Exons codierten Aminosäuresequenzen für die PIBF-Funktion wesentlich sind. Außerdem führen mehrere mRNA-Formen mit verschiedenen Sequenzen zu diesem selben C-terminalen PIBF-Polypeptid mit einem vorausgesagten Molekulargewicht von 10 kDa. Die trunkierten Formen des PIBF, die mittels RT-PCR-Analysen von RNA-Proben identifiziert wurden, wurden aus verschiedenen humanen (SEQ.ID.Nr. 6, Nr. 10-20) und Maus-Geweben und Zelllinien (SEQ.ID.Nr. 8, 9, 23-37) isoliert.

Die verschiedenen PIBF-Formen werden differenziert exprimiert und weisen unterschiedliche funktionelle Attribute auf.

Beispiele:

Die mRNA der gesamten Länge (Exons 1-18) codiert für ein 89 kDa-Kernprotein. Die Bioinformatik sagt eine Kern-Kompartimentalisierung auf Grund der beiden Kern-Lokalisierungs-Signale in den Exons 7 und 13 voraus, und eine Nukleinsäure-Bindungsdomäne in den Exons 14-16. Gemäß Zell-Fraktionierung und Western Blot mit monoklonalen anti-PIBF-Antikörpern ist das 89 kDa-Protein tatsächlich ausschließlich an den Kern-Fractionen lokalisiert. Formen mit geringerem Molekulargewicht sind in den zytosolischen und sezernierten Fractionen verschiedener Human- und Maus-Primär-Tumoren, Embryo und Zelllinien vorhanden.

Auf der Basis der Northern- (Fig. 3) und RT-PCR-Analyse (Fig. 10) kann man die mRNA der gesamten Länge beinahe in allen Geweben finden, jedoch in unterschiedlichen Mengen. Eine semiquantitative RT-PCR wurde an zusammenpassenden Tumor-/Normalgewebe-Paaren durchgeführt. Dieselbe Menge an RNA wurde entweder mit PIBF-spezifischen Exon 1/Exon 18- (Fig. 10A) und Exon 2/Exon 18-Primer-Paaren (Fig. 10B) oder mit für Ribosomen-Protein S9-spezifischen Primern (für eine Beladungs-Kontrolle) derselben Proben amplifiziert. Die Proben sind: 1 = Plazenta-cDNA, 2 = Magentumor, 3 = Magen, normal, 4 = Uterus-tumor, 5 = Uterus, normal, 6 = Neg. Kontr.: ohne Matrize. Rasch wachsende Zellen, z.B. bei Tumoren und Embryo, Zellen immun-privilegierter Gewebe (Hoden, Plazenta) enthalten mehr PIBF-mRNA der gesamten Länge. Die RT-PCR-Analyse von humanen Primär-Tumoren und die nachfolgende Klonierung und DNA-Sequenzierung von PIBF-cDNA zeigen, dass die alternativ prozessierten PIBF-mRNA-Formen anders exprimiert werden. Dies ist durch zwei kleinere PIBF-Formen beispielhaft gezeigt, die man in humanen Primär-Tumoren findet. Die Expression der Exons (1-5)-(17-18)-Form im Magen-Adenokarzinom und die der Exons 1-(13-18)-Form im Endometrium-Adenokarzinom ist auf Tumorgewebe eingeschränkt, da die Gegenstücke aus normalem Gewebe derselben Patienten keine nachweisbaren Mengen dieser PIBF-mRNA-Spleiß-Varianten

exprimieren. Wichtig ist, dass man diese beiden und andere alternativ prozessierte PIBF-mRNAs auch in immunprivilegierten Geweben (Plazenta, Embryo, Hoden) und in Immunzellen findet.

Die Funktion des PIBF hängt auch von der Struktur der reifen Protein-Form ab. Eine der interessantesten Formen wird von Exons 2-3-4-5-17-18-mRNA codiert, die man häufig in Human- und Maus-Geweben findet, wie Human- und Maus-Plazenta, Human-Lymphozyten, Maus-Embryo und im Human-Magentumor. Sie codiert für ein 298 und 297 Aminosäuren langes Polypeptid mit einem vorausgesagten Molekulargewicht von 35 kDa. (SEQ.ID.Nr.6,7 für den Menschen, SEQ.ID.Nr. 8,9 für die Maus). Die beiden Proteine sind zu 86% homolog. Die FACS-Analyse zeigt, dass die humane 35 kDa-Form spezifisch an humane Immunzellen bindet (Fig. 11): FACS-Färbung von humanen PBMCs mit 35 kDa-PIBF und  $\alpha$ -PIBF-Antikörpern (anti-Kaninchen-FITC). Die Zellen sind in der Monozyten-Zellregion (Fig. 11A) und im Lymphozyten-"Gate" (Fig. 11B) gezeigt. M ist die Anzahl der Zellen im "Gate" mit erhöhter Fluoreszenz, in Prozent (%) ausgedrückt, die Zahlen bedeuten: 1 = PBMC + anti-Exon 17 PIBF, 2 = PBMC + PIBF-35kDa (1  $\mu$ g) + anti-Exon 17, 3 = PBMC + PIBF-35kDa (5  $\mu$ g) + anti-Exon 17, 4 = PBMC + PIBF-35kDa (15  $\mu$ g) + anti-Exon 17. Die Bindung an humane Lymphozyten und Monozyten deutet auf einen PIBF-Rezeptor an diesen Immunzellen hin. Eine trunkierte Version von rPIBF mit Exon 1-9 (48 kDa) mit dem N-terminalen Teil dieser funktionellen PIBF-Form und ohne den C-terminalen Teil (Exon 17-18) ist hinsichtlich einer Bindung an Immunzellen nicht funktionell (Daten nicht gezeigt).

Table IV.

SEQ.ID.Nr.	Name/Definition	gefunden in Geweben	Exon-Struktur der mRNA (nt)	Proteingröße
Nr. 1	veröffentlichter Human-Gesamtlängen-PIBF		Exon 1-18	758AS 89-kDa
Nr. 2, 3	Alternativer Human-Gesamtlängen-PIBF	jede Zelle (Kern-)	Exon 1-18	758AS 89-kDa
Nr. 4, 5	Maus-Gesamtlängen-PIBF	jede Zelle (Kern-)	Exon 1-18	757AS 89-kDa
Nr. 6, 7	Alternativ gespleißt, human 35-kDa	Plazenta Lymphozyten Tumor (Magen-Adenoc.)	Exon (1-5) - (17-18)	298AS 35-kDa
Nr. 8, 9	Alternativ gespleißt, Maus 35-kDa (Homolog von Nr. 4)	Embryo Plazenta	Exon (1-5) - (17-18)	297AS 35-kDa
Nr. 10, 11, 12, 13	Alternativ gespleißt, human 10-kDa	Tumor (Endomet.-Adenoc.) Schwangerschaft Lymphozyten MCF-7 Human Mamma-Adenoc. Zelllinie Leukozyten	Exon 1 - (13-18)  Exon 1 - (15-18)  Exon 14' - 15-18	87AS 10-kDa
Nr. 14	Alternativ gespleißt, human 14-kDa	Schwangerschaft Lymphocyten MCF-7 Tumor-Zelllinie	Exon 1 - (9-10) - (12-15) - (17-18)	118AS 14-kDa
Nr. 15, 16	Alternativ gespleißt, human 8-kDa	Schwangerschaft Lymphozyten MCF-7 Tumor-Zelllinie	Exon 1 - (9-10) - (12-15) - (17-18)	70AS 8-kDa
Nr. 17, 18	Alternativ gespleißt, human 20-kDa	MCF-7 Tumor-Zelllinie	Exon 1 - (3-7) - (9-10) - 12 - (17-18)	185AS 20-kDa
Nr. 19, 21, 22	Alternativ gespleißt, human 37-kDa	MCF-7 Tumor-Zelllinie	Exon (1-7) - (9-15) - (17-18) Exon (1-7) - (9-10) - 12 - (17-18)	308AS 37-kDa
Nr. 20	Alternativ gespleißt, human 31-kDa	MCF-7 Tumor-Zelllinie	Exon (1-7) - (9-15) - (17-18)	258AS 31-kDa
Nr. 23, 24	Alternativ gespleißt, Maus 18-kDa	Embryo Plazenta	Exon (1-2) - (17-18)	157AS 18-kDa

SEQ.ID.Nr.	Name/Definition	gefunden in Geweben	Exon-Struktur der mRNA (nt)	Proteingröße
Nr.25, 26	Alternativ gespleißt, Maus 30-kDa	Plazenta	Exon (1-4)-(16-18)	256AS 30-kDa
Nr.27, 28	Alternativ gespleißt, Maus 27-kDa	Erwachsenen- Hoden	Exon (1-2)-(15-18)	229AS 27-kDa
Nr.29, 30	Alternativ gespleißt, Maus 61-kDa	Embryo	Exon (1-11)-(17-18)	512AS 61-kDa
Nr.31, 33	Alternativ gespleißt, Maus 68-kDa	Embryo	Exon (1-11)-18	569AS 68-kDa
Nr.32	Alternativ gespleißt, Maus 10,5-kDa	Embryo	Exon (1-11)-18	86AS 10,5-kDa
Nr.34, 35	Alternativ gespleißt, Maus 37-kDa	Embryo	Exon 1-(8-14)-(17-18)	309AS 37-kDa
Nr.36, 37	Alternativ gespleißt, Maus 76-kDa	Erwachsenen- Hoden	Exon (1-11)-(15-18)	641AS 76-kDa

Die Fig. 12A bis 12Q zeigen die alternativ prozessierten PIBF-Proteine, wobei die Exons schematisch dargestellt sind:

Fig. 12A zeigt Maus-89-kDA PIBF der gesamten Länge (SEQ ID Nr. 4), Fig. 12B zeigt die Exons (1-5)-(17-18), die man bei Magentumor, humaner terminaler Plazenta, männlichen und weiblichen Lymphozyten, weiblichen Schwangerschafts-Lymphozyten (SEQ ID Nr. 6) findet, Fig. 12C zeigt die Exons (1-5)-(17-18), die man in Maus-Plazenta und -Embryo (SEQ.ID Nr. 8) findet, Fig. 12D zeigt die Exons 1-(13-18) (SEQ. ID Nr. 11), Fig. 12E zeigt die Exons 1-(15-18), die man in MCF-7-Zellen und Schwangerschafts-Lymphozyten findet (SEQ.ID No. 12), Fig. 12F zeigt einen Teil von Intron 14 und Exons 15-18, die man in der Leukozyten-cDNA-Bibliothek findet (SEQ. ID Nr. 13), Fig. 12G zeigt die Exons 1+(9-10)+(12-15)+(17-18), die man in MCF-7-Zellen und Schwangerschafts-Lymphozyten findet (SEQ. ID Nr. 14), Fig. 12H zeigt die Exons 1+(3-7)+(9-10)+12+(17-18), die man in MCF-7-Zellen findet - humane Mamma-Tumor-Zelllinie (SEQ. ID Nr. 17), Fig. 12I zeigt Exon (1-7)+(9-15)+(17-18), die man in MCF-7-

Zellen findet - humane Mamma-Tumor-Zelllinie (SEQ. ID Nr. 19), Fig. 12J zeigt Exon (1-7)+(9-10)+12+(17-18), die man in MCF-7-Zellen findet - humane Mamma-Tumor-Zelllinie (SEQ. ID Nr. 22), Fig. 12K zeigt Exon (1-2)-(17-18), die man in Maus-Embryo und -Plazenta findet (SEQ. ID Nr. 23), Fig. 12L zeigt Exon (1-4)-(16-18), die man in Maus-Plazenta findet (SEQ. ID Nr. 25), Fig. 12M zeigt Exons (1-2)-(15-18), die man in Maus-Hoden findet (SEQ. ID Nr. 27), Fig. 12N zeigt die Exons 1-11 18 die man im Maus-Embryo (SEQ. ID Nr. 29) findet, Fig. 12O zeigt die Exons (1-11)-18, die man im Maus-Embryo (SEQ. ID Nr. 31) findet, Fig. 12P zeigt die Exons 1-(8-14)-(17-18), die man im Maus-Embryo (SEQ. ID Nr. 34) findet, und Fig. 12Q zeigt die Exons (1-1)-(15-18), die man in Maus-Hoden (SEQ. ID Nr. 36) findet.

#### Beispiel 8: Detektion von PIBF in humanen Primär-Tumor-Geweben

Methode: Immunhistochemie (vgl. Beispiel 3, außer dass monoklonale Antikörper verwendet wurden, nicht polyklonale Kaninchen-Seren).

Neben den früher vorgesehenen Beispielen: 8 verschiedene Human-Melanome wurden mit monoklonalen anti-PIBF-Antikörpern getestet. Die Antikörper wurden unter Verwendung des N-terminalen 48 kDa-Fragments von PIBF erzeugt (siehe oben). Fig. 13 zeigt zwei repräsentative immunhistochemische Analysen der 8 verschiedenen getesteten Melanome.

#### Beispiel 9: Diagnose-Test

Methode: ELISA mit monoklonalem anti-PIBF-Antikörper (vgl. Beispiel 6)

Der Zwei-Platten-Test mit polyklonalen Antikörpern, der in Beispiel 6 dargelegt ist, wurde vereinfacht, indem ein Peptidspezifischer polyklonaler oder monoklonaler Antikörper in einem Ein-Platten-ELISA-Test verwendet wurde. Der polyklonale Antikörper wurde erzeugt, indem Kaninchen (New Zealand White) dreimal in Intervallen von 3 Wochen mit einem 55 AS langen Peptid (MKQILVKMHSKHSSENSLLLTKEPKHVTEHQKSKTLNVPKEHEDNIFTPKPTL),

entsprechend Exon 17 von PIBF, das beständig in allen bisher nachgewiesenen gespleißten Varianten vorhanden war (vgl. Beispiel 7), immunisiert wurden. Neue monoklonale Antikörper wurden gegen dieses Peptid erzeugt, indem BalbC-Mäuse gemäß Standard-Protokollen immunisiert wurden, um mAbs zu erzeugen. Die Spezifität wurde mittels ELISA getestet, wobei das Immunisierungs-Peptid und rekombinante PIBFs verwendet wurden.

#### Protokoll für KOMPETITIVEN PIBF-ELISA: 1-PLATTEN-SYSTEM

1. Mikrotiter-Platten mit 96 Vertiefungen wurden über Nacht bei 4°C mit 100 µl/Vertiefung eines anti-Exon17-polyklonalen oder monoklonalen IgG beschichtet (4 µg/ml in 50 mM Carbonat-Puffer, pH 9,6).
2. Die Platten wurden dreimal mit 200 µl PBS-Tween (pH: 7,2-7,4) gewaschen, und nicht-spezifische Bindungsstellen wurden mit PBS-Tween +0,5% Gelatine + 0,1% BSA 1 h lang bei 37°C blockiert.
3. Die Platten wurden dreimal mit 200 µl PBS-Tween gewaschen.
4. Standard-Präparation: logarithmische Verdünnung von mit Exon 17 codierten synthetischen Peptid-Verdünnungen (2000 ng/ml, 1000 ng/ml, 100 ng/ml, 10 ng/ml, 1 ng/ml, 0,1 ng/ml) in 0,5 M Phosphat-Puffer, pH 7,4-7,6, wurden mit einem gleichen Volumen eines mit Biotin markierten synthetischen Peptids (1 µg/ml in 0,5 M PBS) gemischt.
5. Proben-Herstellung: biologische Proben wurden 1:2,5 und 1:5 in 0,5 M Phosphat-Puffer, pH 7,4-7,6, verdünnt und mit einem gleichen Volumen eines mit Biotin markierten synthetischen Peptids (1 µg/ml in 0,5 M PBS) gemischt.  
100 µl Aliquots der verdünnten Standard- und Harnproben wurden in die Vertiefungen von ELISA-Platten gegeben und 1 h lang bei 37°C inkubiert.
6. Nach dem Waschen wurden die Platten mit HRPO-konjugiertem Streptavidin, das 1:1000 in 0,1% BSA + PBS-Tween verdünnt worden war, 30 min lang bei 37°C inkubiert. Die gebundenen Enzym-Konjugate wurden mit OPD nachgewiesen. Die Absorption wurde bei 492 nm innerhalb von 30 min bestimmt. Die Konzentrationen des Harn-PIBF wurden aus der Standard-Kurve berechnet, und reichten von 0,005 ng/ml bis 1000 ng/ml.

Die Fig. 14-18 zeigen die Detektion der PIBF-Mengen bei spezifischen Tumor-Patienten.

Literaturstellen

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.
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.
5. Szekeres-Bartho, J., Autran, B., Debre, P., Andreu, G., Denver, L., Chaouat, G. Immunoregulatory 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 antiprogestosterone. *Am. J. Ob. Gyn.* 163, 1320, 1990.
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.

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.
11. Szekeres-Bartho, J., G. Par, Gy. Dombay, 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.
13. Szekeres-Bartho, J., Wegmann, T.G., A progesterone-dependent immunomodulatory protein alters the Th1/Th2 balance. *Reprod. Immunol.* 31, 81-95, 1996.
14. Szekeres-Bartho, J., Wegmann, T.G. Kelemen, K., Bogнар, I., Faust, Zs., Varga, P. Interaction of progesterone- and cytokine-mediated immunomodulatory mechanisms in favor of successful gestation. *Regional Immunology*, 6,315, 1995.
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., Bogнар, I., Paal, M., und Szekeres-Bartho, J. A progesterone-induced protein increases the synthesis of asymmetric antibodies. *Cell. Immunol.* 167, 129, 1996.
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 modu-

- lates 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.
  20. Karlhofer FM, Ribaldo RK, und Yokoyama WM. MHC class I alloantigen specificity of Ly-49+ IL-2-activated natural killer cells. *Nahlre.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.
  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. Immunol.* 162, 6658, 1999.
  25. Kollias G. Douni E, Kassiotis G. Kontoyiannis D. On the role of tumor necrosis factor and receptors in models of multiorgan failure, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and inflammatory bowel disease. *Immunol Rev.* 169, 175, 1999
  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.

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.
30. Bonavida B., Bradley TP, Grimm EA. Frequency determination of killer cells by a single-cell cytotoxic assay. *Methods Enzymol* 93, 270, 1983.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Diagnostizierung eines Tumors bei einem Patienten, welches Verfahren das Entnehmen einer Probe vom Patienten, das Messen der Konzentration von PIBF (Progesteron-induzierter 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, umfasst, wobei die Konzentration über dem Schwellenwert einen Patienten mit einem Tumor identifiziert.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Tumor ein Epithel-Karzinom, ein Kolonkarzinom oder ein Brustkarzinom, ein Lymphom, ein Kehlkopfkarzinom, ein Harntrakt-Tumor, insbesondere ein Blasenkarzinom, ein Lungentumor, eine Leukämie, ein Plasmazytom, ein Myelom, insbesondere Myeloma multiplex, eine myeloproliferative Erkrankung, oder ein Kopf- und Halstumor ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Probe eine Körperflüssigkeit, insbesondere Harn oder Serum ist.
4. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Probe eine Gewebeprobe 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, insbesondere durch einen kompetitiven 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 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, umfassend 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.
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.
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.
29. Rekombinantes Protein mit einer Progesteron-induzierten, immunmodulierenden Protein(PIBF-)-Aktivität, welches
  - die Aminosäuresequenz gemäß SEQ.ID.Nr.1 oder
  - eine Aminosäuresequenz mit einer Aminosäure-Identität von mindestens 98% mit der Sequenz gemäß SEQ.ID.Nr.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.Nr.1, wie mittels FAST/A-Algorithmus bestimmt, und
  - eine PIBF-Aktivität von mindestens 50% des natürlichen Human-PIBF-Moleküls aufweist.
30. Rekombinantes Protein nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, dass es eine Aminosäuresequenz, wie durch die Aminosäurereste 300 bis 350 in SEQ.ID.Nr.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.Nr.1 angegeben, aufweist.

32. Protein mit PIBF-Aktivität, umfassend
- die Aminosäuresequenz gemäß SEQ.ID.Nr.4 oder
  - eine Aminosäure mit einer Aminosäure-Identität von mindestens 85%, vorzugsweise mindestens 90%, noch mehr bevorzugt, mindestens 95%, am meisten bevorzugt 99%, mit der Sequenz gemäß SEQ.ID.Nr.4, wie mittels FAST/A-Algorithmus bestimmt.
33. Protein, dadurch gekennzeichnet, dass es eine Aminosäuresequenz mit einer Identität von mindestens 85%, vorzugsweise mindestens 90%, noch mehr bevorzugt, mindestens 95%, wie mittels FAST/A-Algorithmus bestimmt, mit einer Sequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ.ID.Nr. 6, 8, 10, 14, 15, 17, 19, 20, 23, 25, 27, 29, 31, 32, 34 und 36 aufweist, wobei das Protein ein alternativ prozessiertes PIBF-Protein ist.
34. Nukleinsäure-Molekül, das für ein rekombinantes Protein mit einer PIBF-Aktivität nach einem der Ansprüche 29 bis 32 codiert.
35. Nukleinsäure-Molekül, welches für ein alternativ prozessiertes PIBF-Protein codiert, dadurch gekennzeichnet, dass es eine Nukleinsäuresequenz mit einer Identität von mindestens 80%, vorzugsweise mindestens 90%, noch mehr bevorzugt, mindestens 95% mit
- einer Sequenz, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ.ID.Nr. 7, 9, 11, 12, 13, 16, 18, 21, 22, 24, 26, 28, 30, 33, 35 und 37, oder
  - einer Sequenz, die unter stringenten Bedingungen mit einer der obigen Sequenzen hybridisiert, oder
  - einer Sequenz, die infolge des genetischen Codes zu einer der obigen Sequenzen degeneriert ist,
- aufweist.
36. Nukleinsäure-Vektor, umfassend eine Nukleinsäuresequenz

gemäß einem der Ansprüche 34 oder 35 und ein geeignetes Regulierungselement.

37. Nukleinsäure-Vektor nach Anspruch 36, dadurch gekennzeichnet, dass er weiters einen Selektions-Marker aufweist.
38. Zelle, umfassend einen Vektor nach einem der Ansprüche 34 bis 36.





  
100  
1 MSRKISKESKVNISSELESDISLETTPVPTDDISSSEEREKVRITRQLIERKELLHNIQLLKIELSQKTMWIDNLDKVDYLTKEIELEKLNDAIHQKQ  
2 MSRKIAKEPKKVNISSELESDISLETTHDDVSSSEEREKVKITQGLIERKELLHNIQLLKIELSQKTMWIDNLDKVDYLTKEIELEKLNDAIHQKQ  
3 HITHEPRQINISSELESDIDLATTHDDVSSSEEREKFPITSHLFEERELLHYIQLLKIELSQKTMWIDNLDKVDYLTKEIELEKLNDAIHQKQ  
  
101  
4 LLTLRLDNQLAFQOKDASKYQELMKQEMETILLRQKQLEETNIQLREKAGDVRRLDFELTEBQYIKLKAPPEDQLSIPYVSVRFYELVNPRLKEICE  
5 LLTLRLDNQLTIQOKDAKVKYQELMKQEMETILLRQKQLEETNHQLREK  
6 LLTLRLDNQSTIQOKD  
  
201  
7 LQVKNILAEELSTKNQKQLTETYEEDRKNYSEVQIRCOPLALELADTKQLIQOQDYRQENYDKVKSERDALEQEVIELRRKHEILEASHMIQTKERS  
8 LQVKKSELSEELSTKGQLKQLTETYEEDRRNNAELLIRCORLITLADTKQLVQOQDYRQENYDKVKK  
  
301  
9 
  
400  
10 ELSKEVVTLEQVFTLLQKDKKEYLNRQNMELSVCCAHEEDRLERLQALLESKKAREMEYKYVASRDHYKTEYENKLDHLELEQIRLKTNOEIDQLRNASR  
11 KLXTNLEIDQLRSAXR  
  
401  
12 EMYERENLRREARDNAVAKERAVMAEKDALEKHDQLLDRYRELQSTESKVTEFLHQSKLSEFESERVQLLQEEETARNLTQCQLECEKYQKLEVLTK  
13 EMYERENLRREARDNALAEKNRAVAEKDALGKHEQLLDRYRELQXXESKVFELHQSKLK-FESERVQLLQEEETARNLTQCQLECEKYQKLEVLTK  
14 KIPEKIRVLTK  
  
501  
15 EFYSLQASSEKRITELQAQNSEHQARLDIYEKLEKELDEIIMQTAEIENDEEAERVLFVSYGYGANVPTTAKRRLKQSVHLARRVLQLEKONSLLILKDLKH  
16 EFYSLQTSSEKRITELQAQNSEHQARLDIYEKLEKELDEIIMQTAEIENDEEAERILYVSYGYGANVPTTAKRPLKQSVHLARRVLQLEKONSLLILKDLKH  
17 EFYSLQASSEKRITELQAQNSDHRARLDIYEKLEKELDEIIMQTAEIENDEEAERVLFVSYGY - ANVPTTAKRRLKQSVHLARRVLQLEKONSLLILKDLKH  
  
601  
18 
  
700  
19 RKDQVTLQSQEL--DRANSLNQTQPPYRILIESVRQDSKIDSLTESIAQLEKDVSNLNKEKSALLQTKNQWALDLEQLNHREELAAMKQIIVKMHSK  
20 QKNPSKTAFTSLTERANSLNQTQPPYRILIESVRQDAKIDSLMKSTAQLEKDVSNLNKEKSALLQTKNQWALDLEQLNHSRREE-----  
21 QKNQVTLQSQEL--DRAN  
22 LEKDVSNLNKEKSALLQTKNQWALDLEQLNHSRREEFAAMKQIIVKMHSK  
  
701  
23 HSENSLLLTKEPKHVTENQSKTILNPKXEHEDNIFPKPTLFTKKEAPEWSKKQKMKI  
24 -----VTENQ-AKTLNMPREHEENIFPKPTLFTKKEAPEWSKKQKMKI  
25 HSENNLFTKMEKSVTENQ-AKTLNMPREHEENIFPKPTLFTKKEAPEWSKKQKMKI

Fig.1

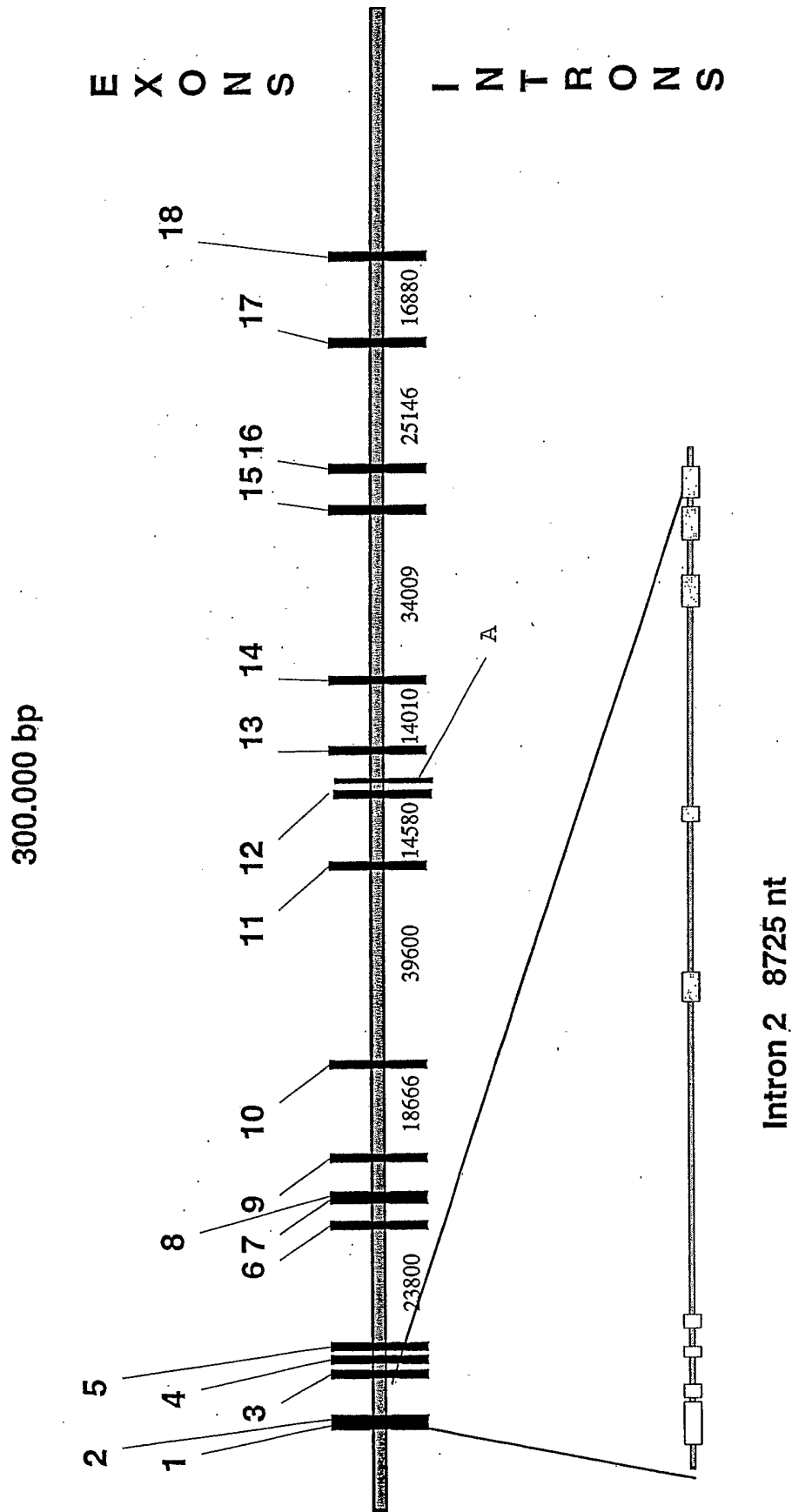


FIG. 2

3/23

A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W

9,5-  
7,5-  
4,4-  
2,4-  
1,3-  
0,2-



Fig.3

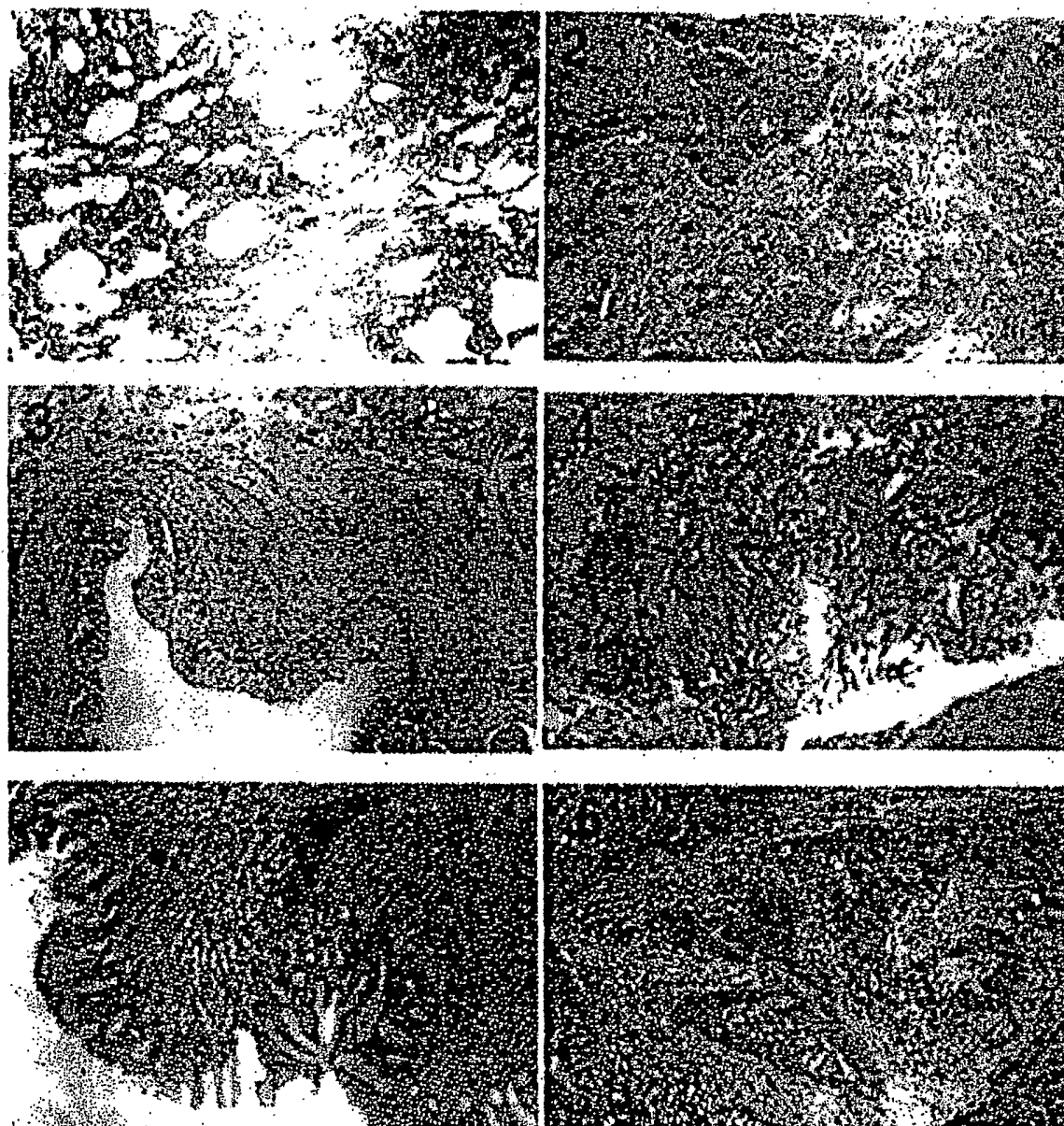


Fig. 4

FIG. 5A

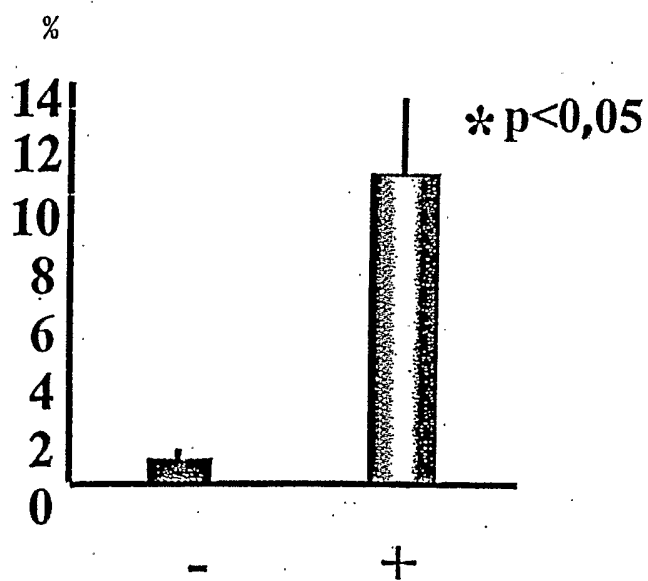
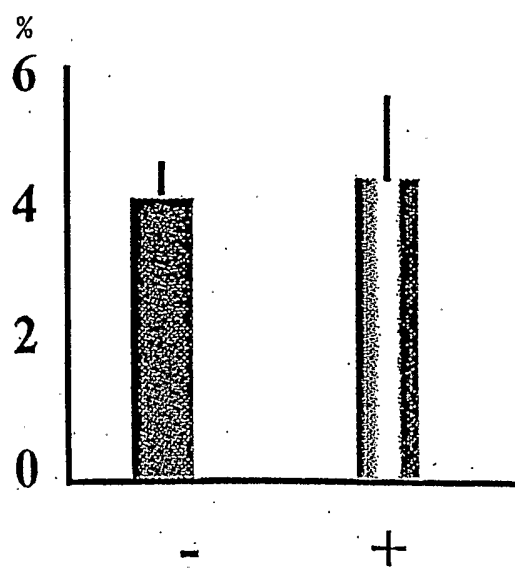


FIG. 5B



6/23

FIG. 5C

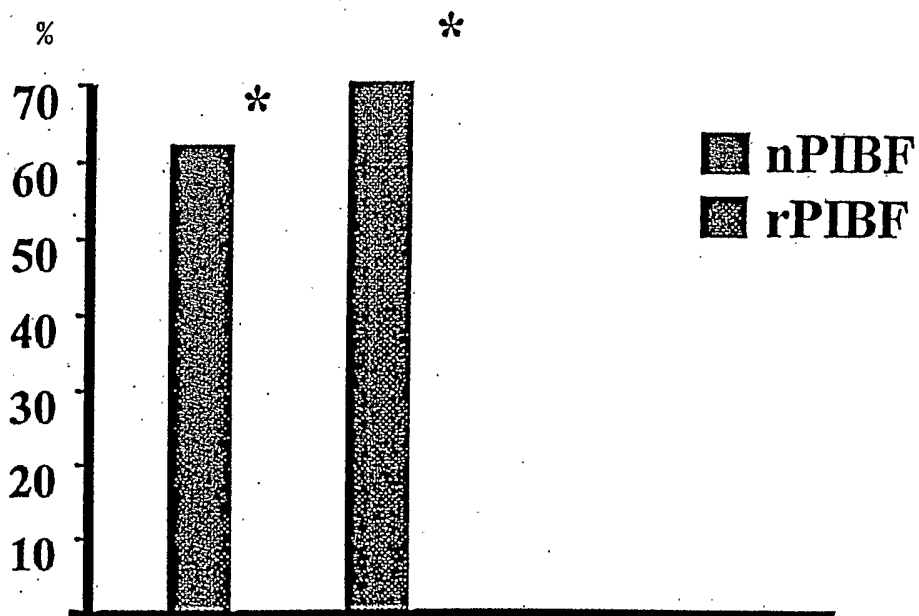
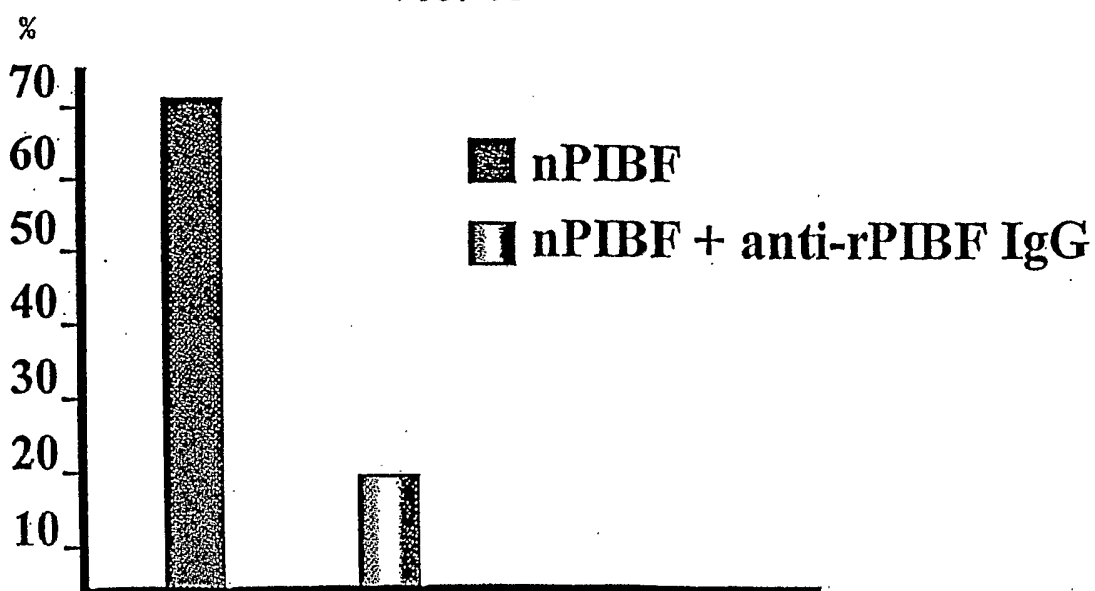


FIG. 5D



7/23

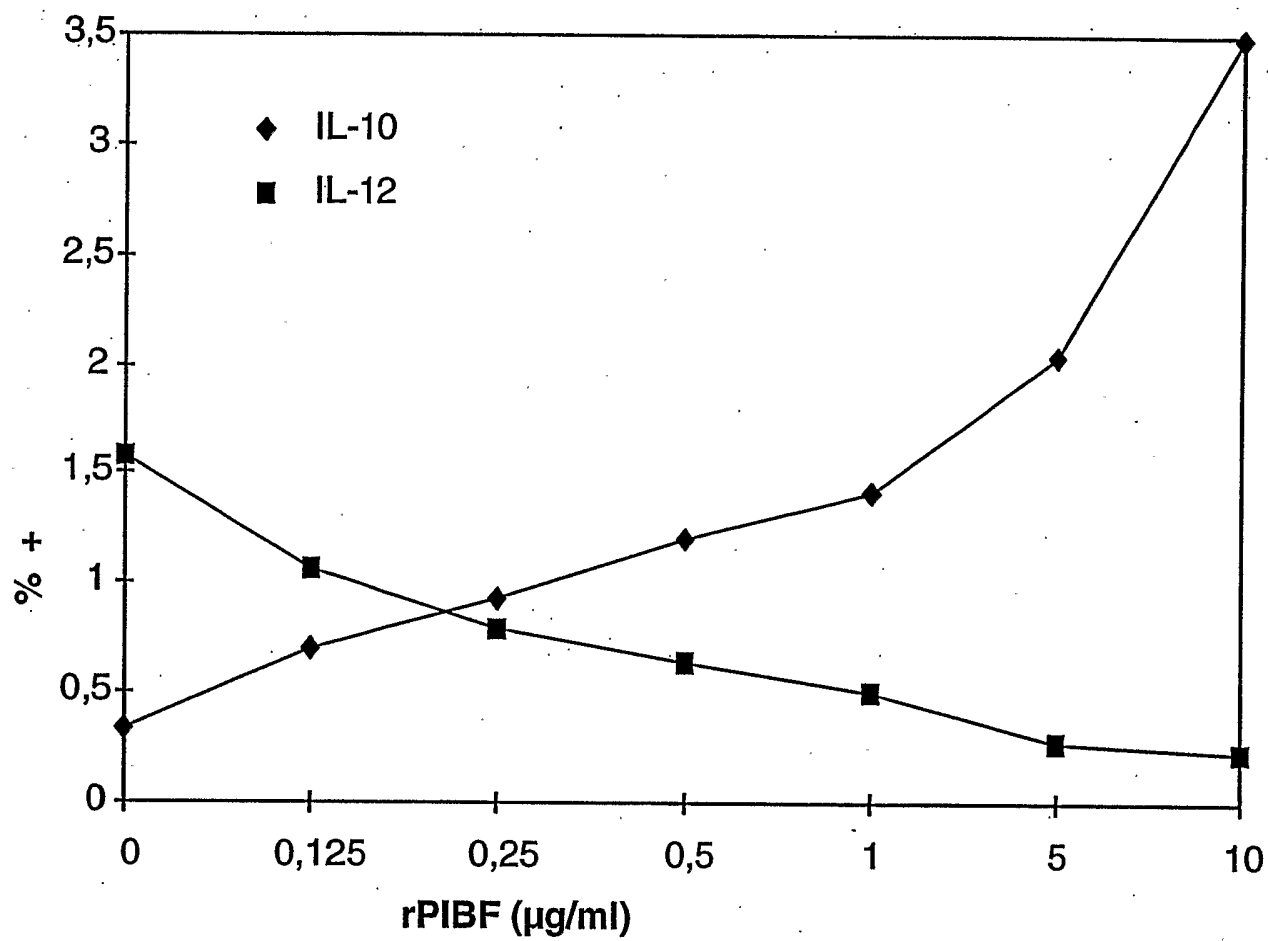


Fig. 6A

8/23

FIG. 6B

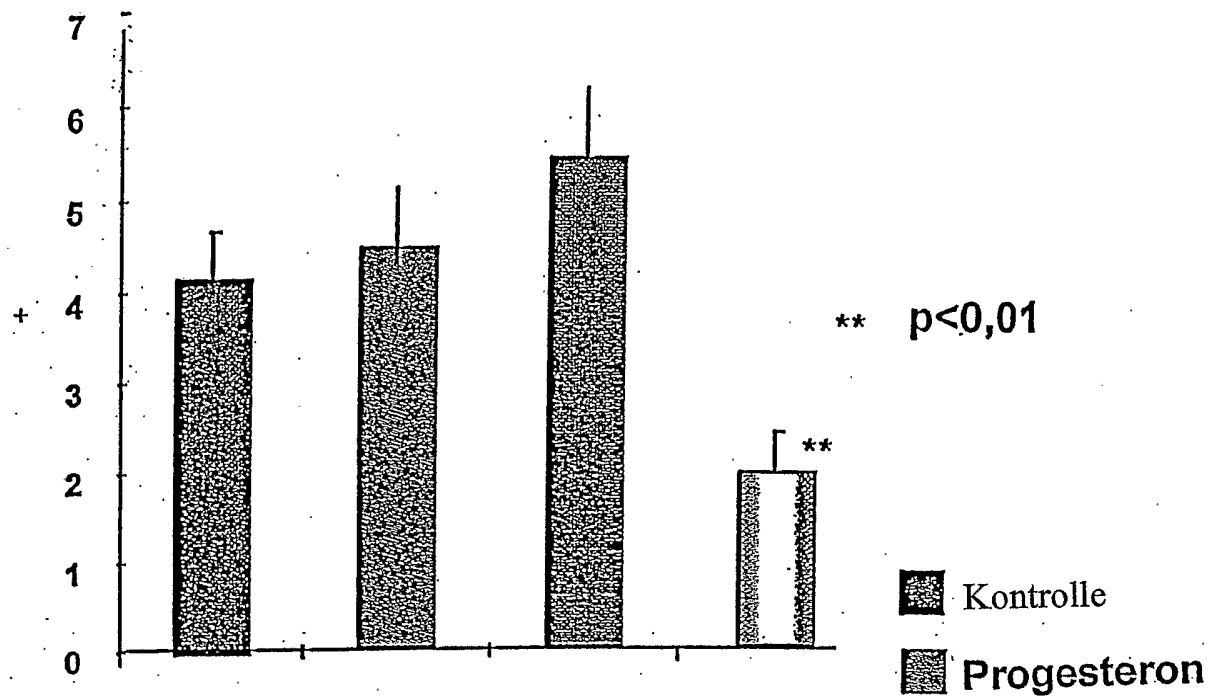
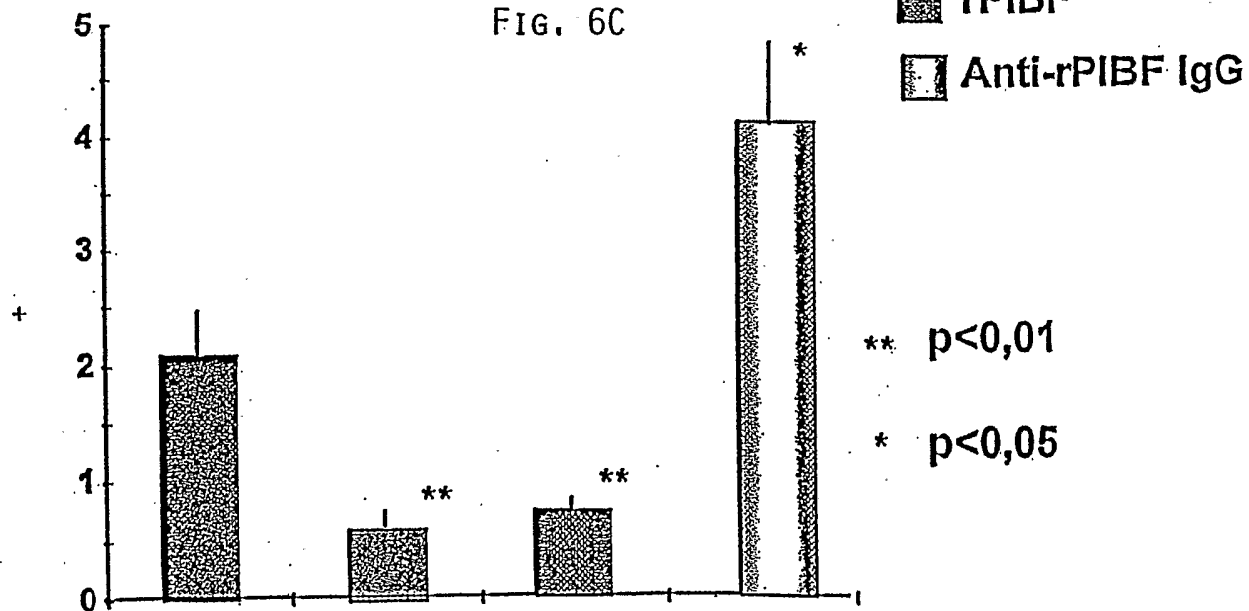


FIG. 6C



9/23

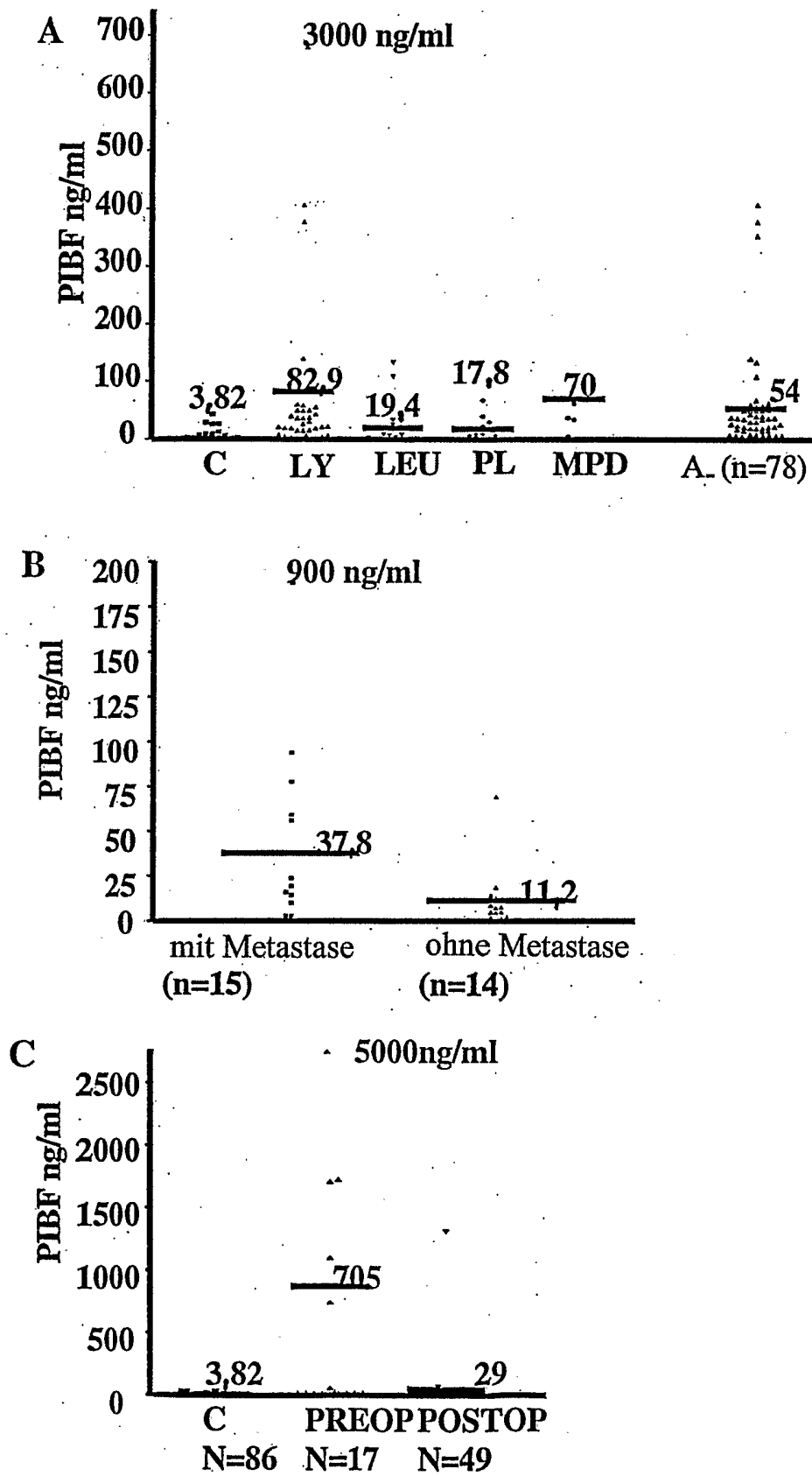


Fig. 7

10/23

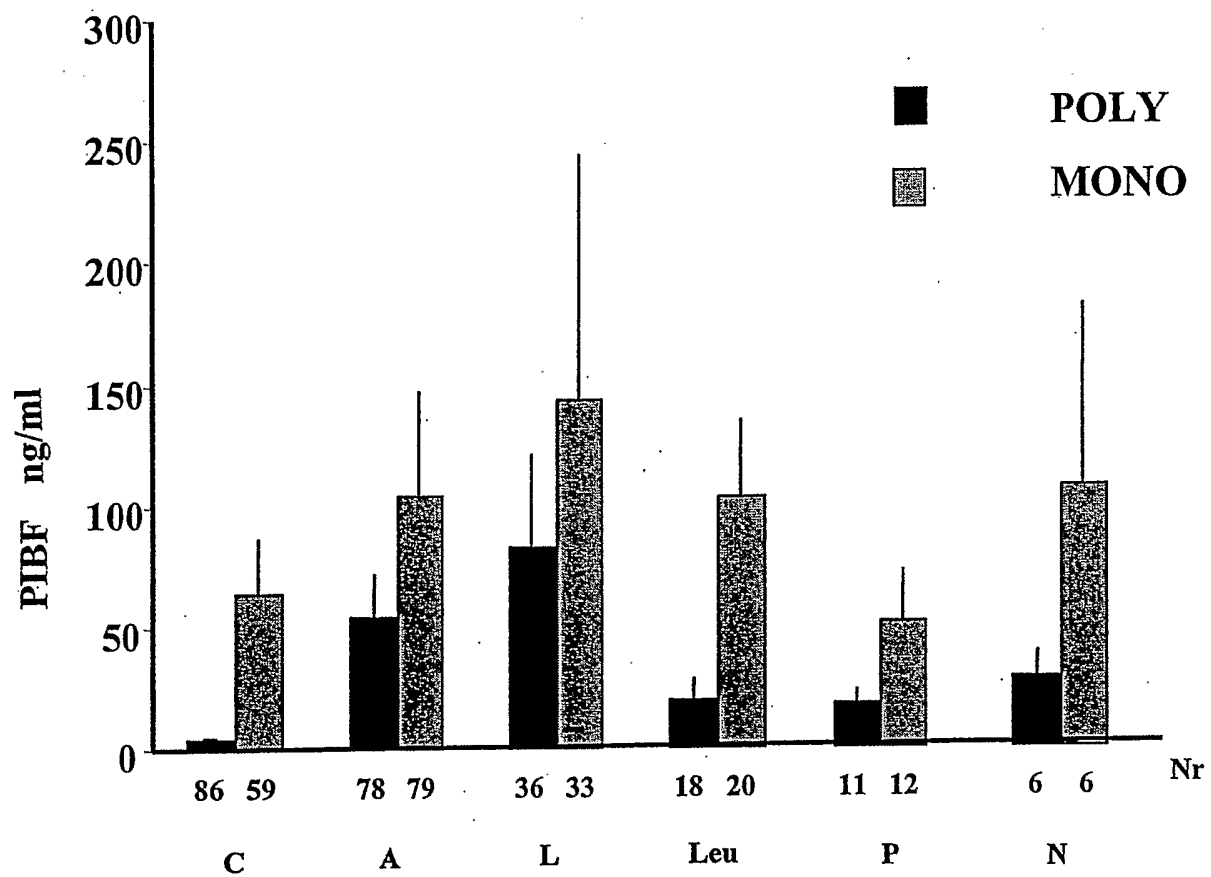


FIG. 8

11/23

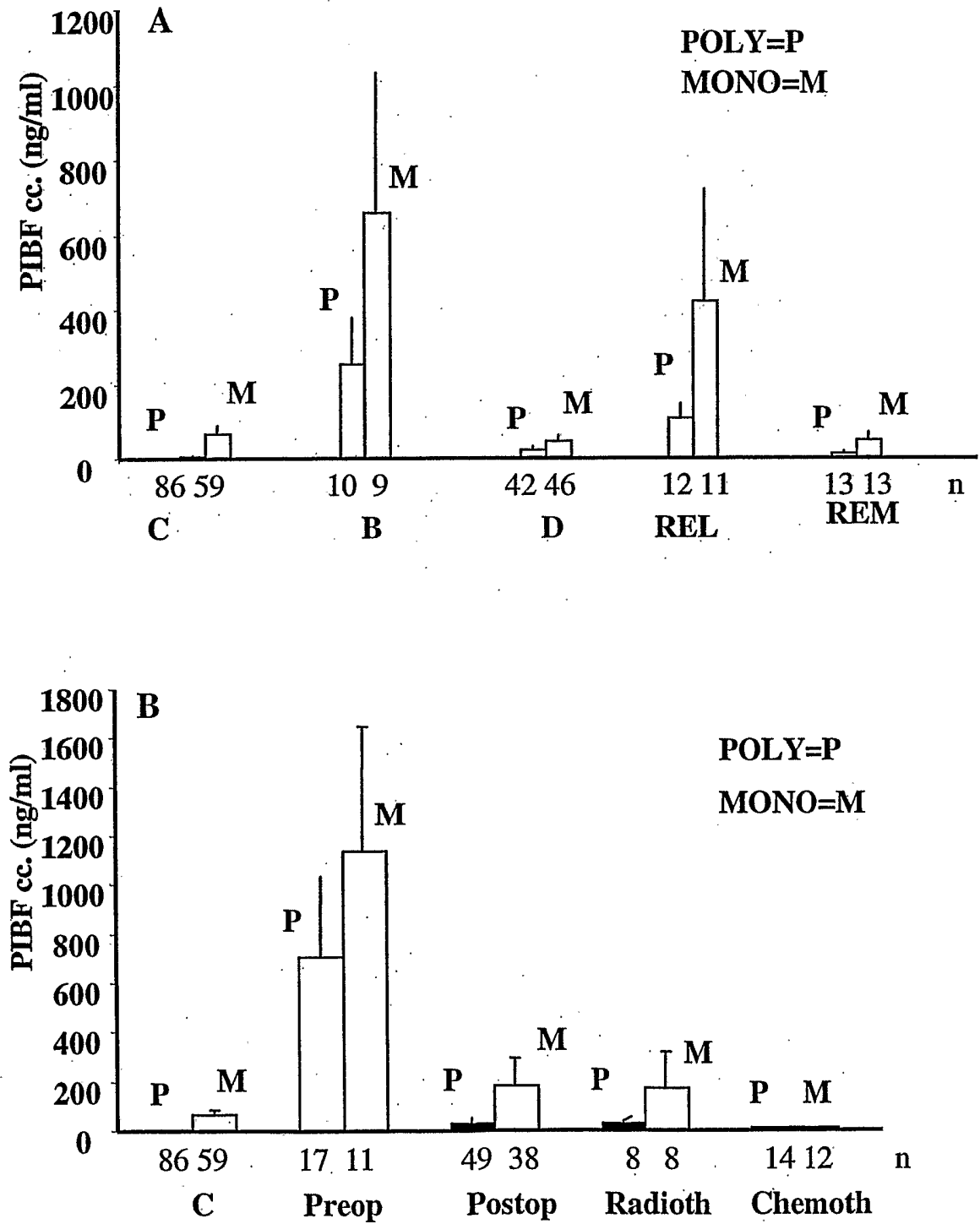


Fig. 9

12/23

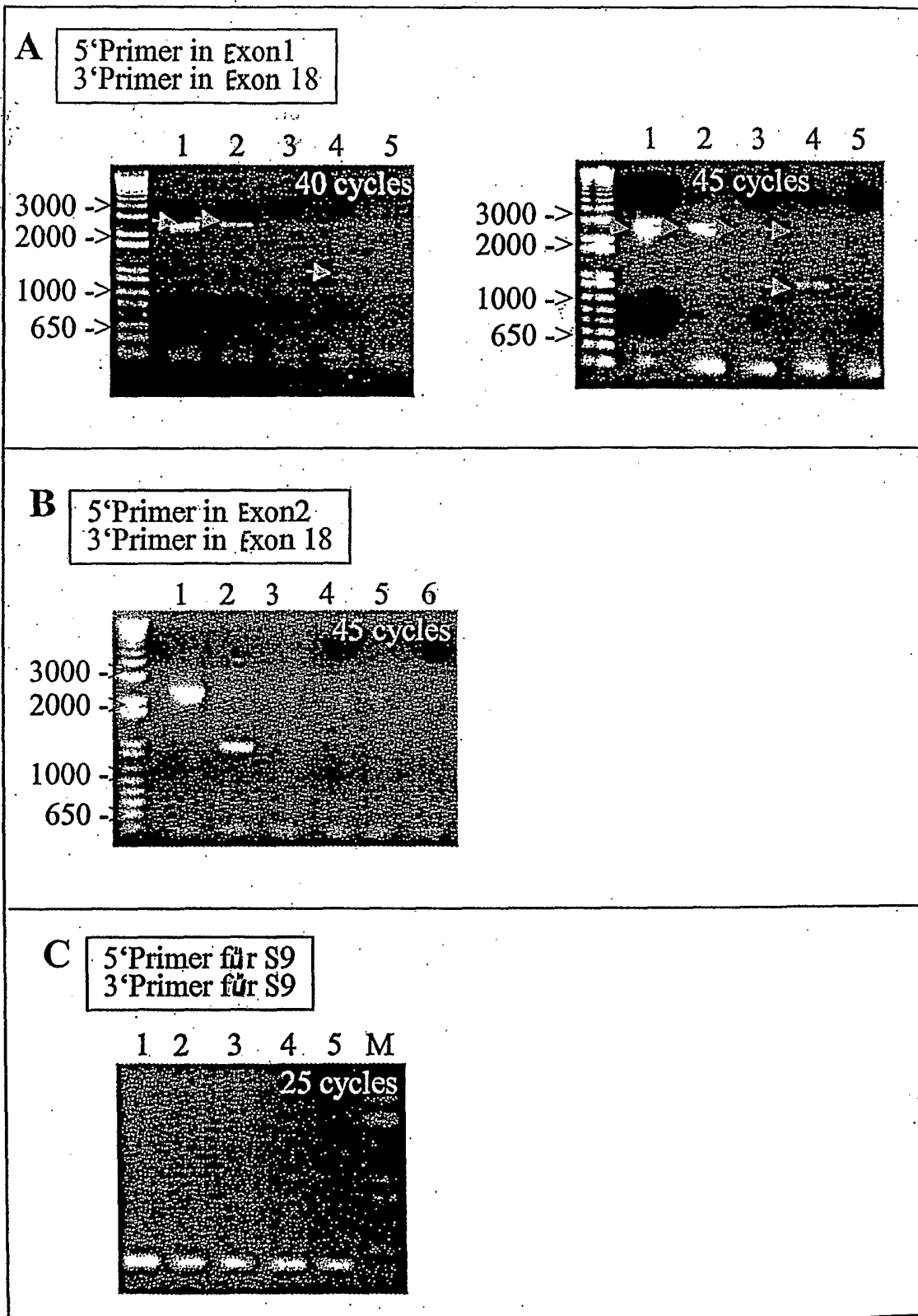


Fig. 10

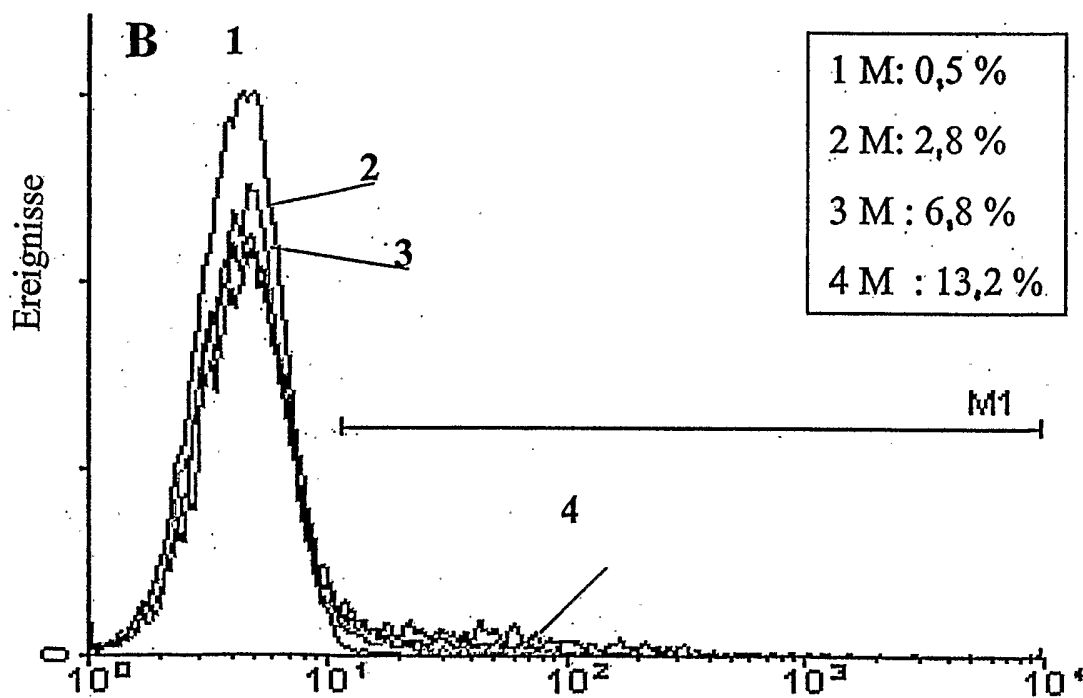
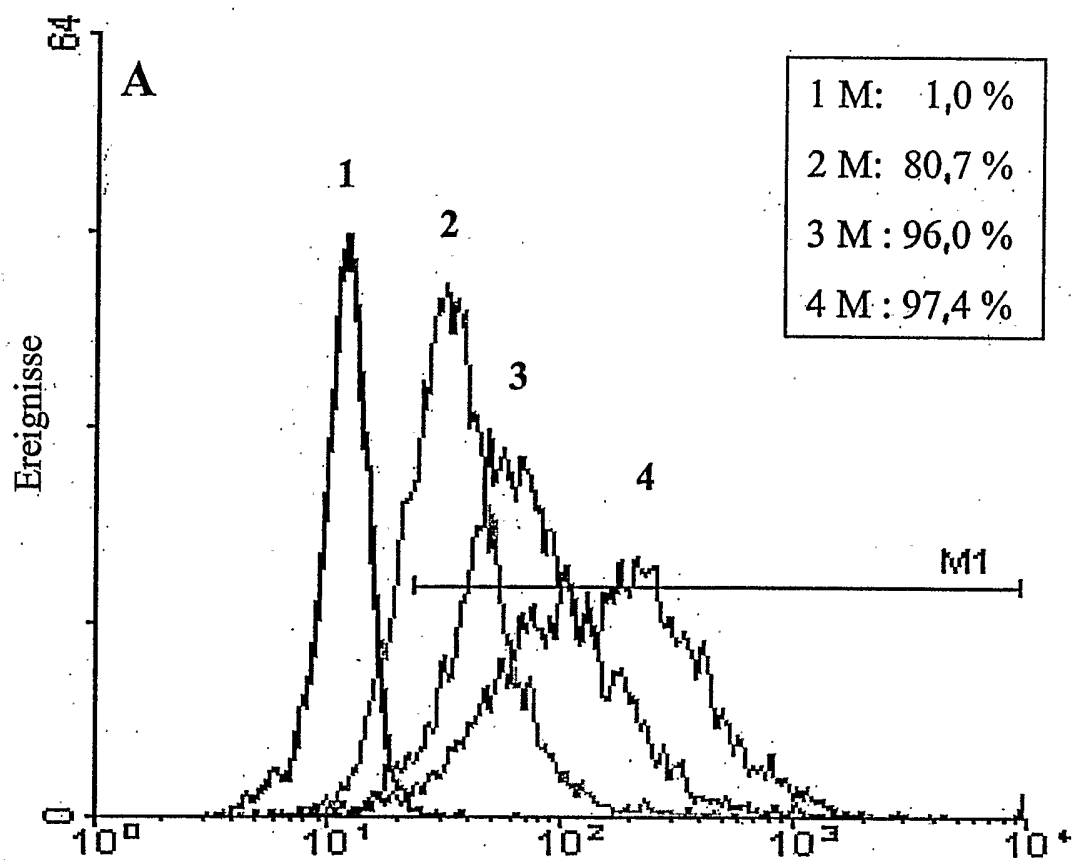


Fig. 11  
ERSATZBLATT (REGEL 26)

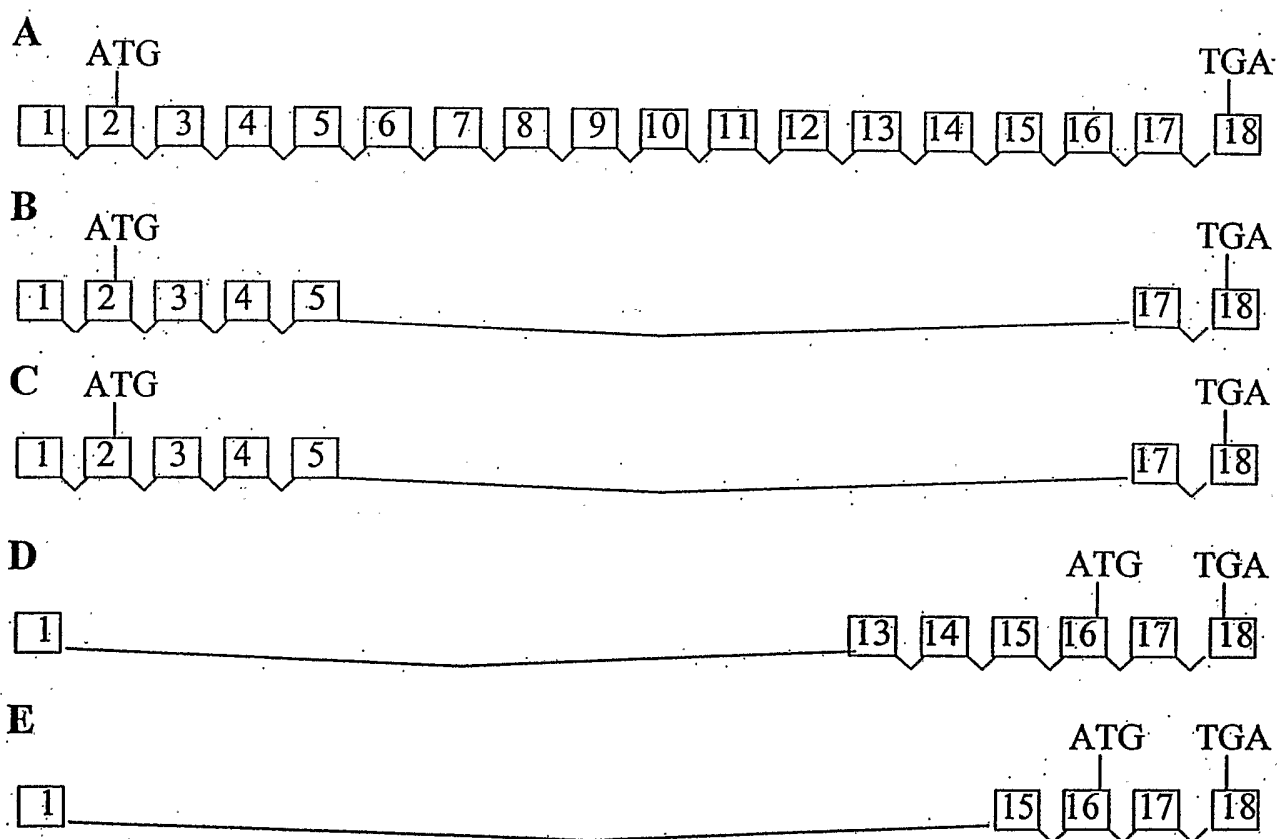


Fig. 12 A-E

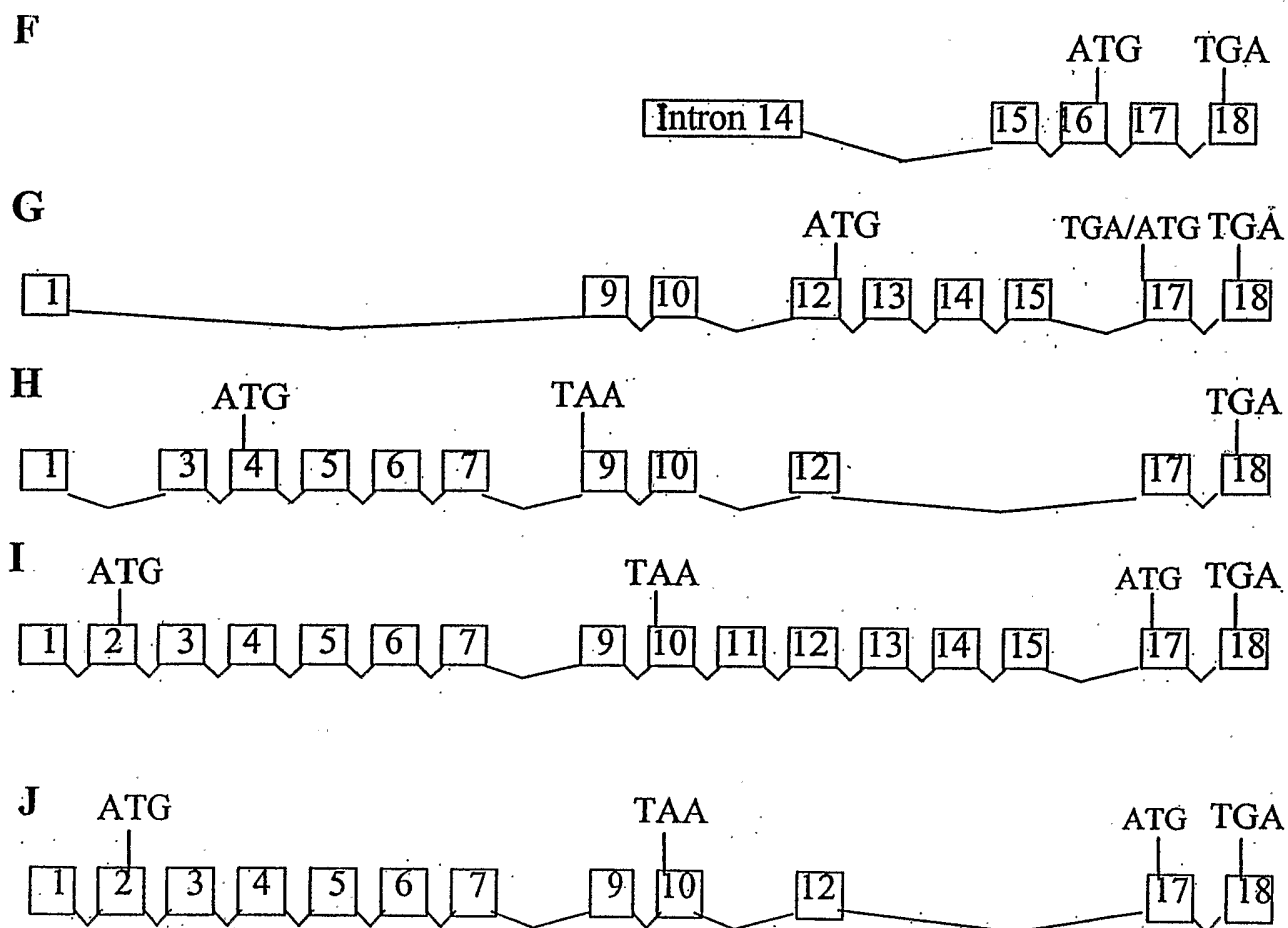


Fig. 12 F-J

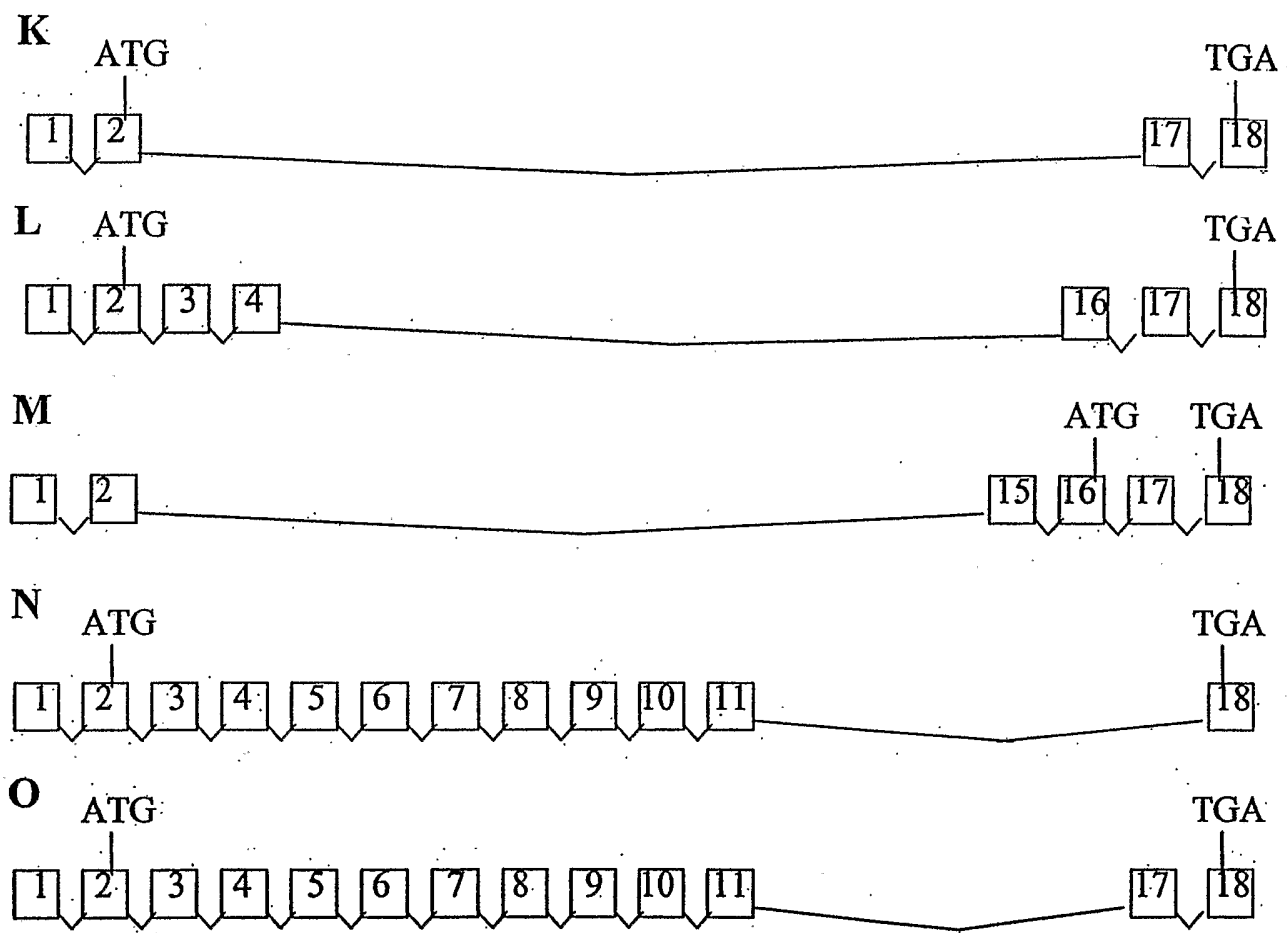


Fig. 12 K-O

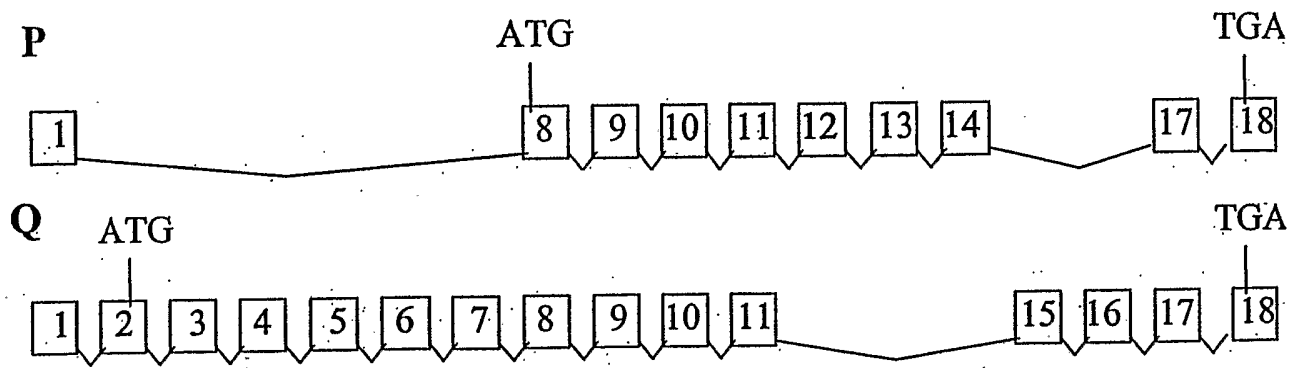


Fig. 12 P-Q

Immunhistochemische Färbung von Melanoma malignum-Proben

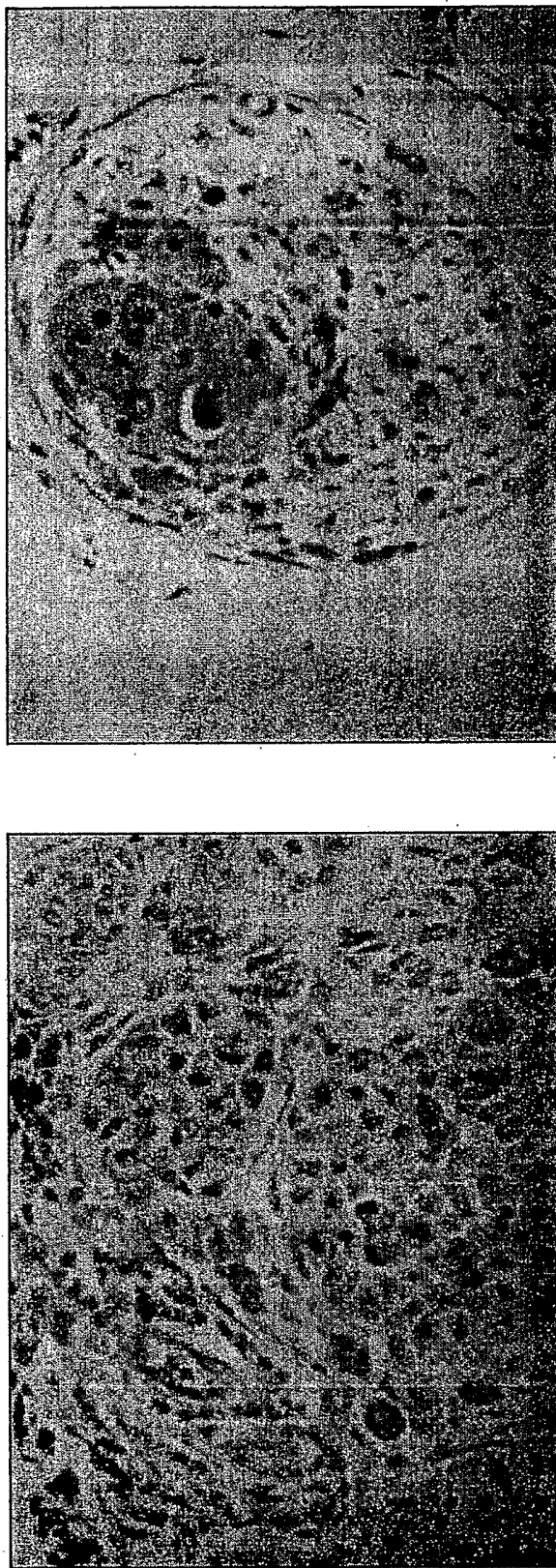


Fig.13

Ein-Platten-ELISA-Test zur Messung von PIBF aus Körperflüssigkeiten

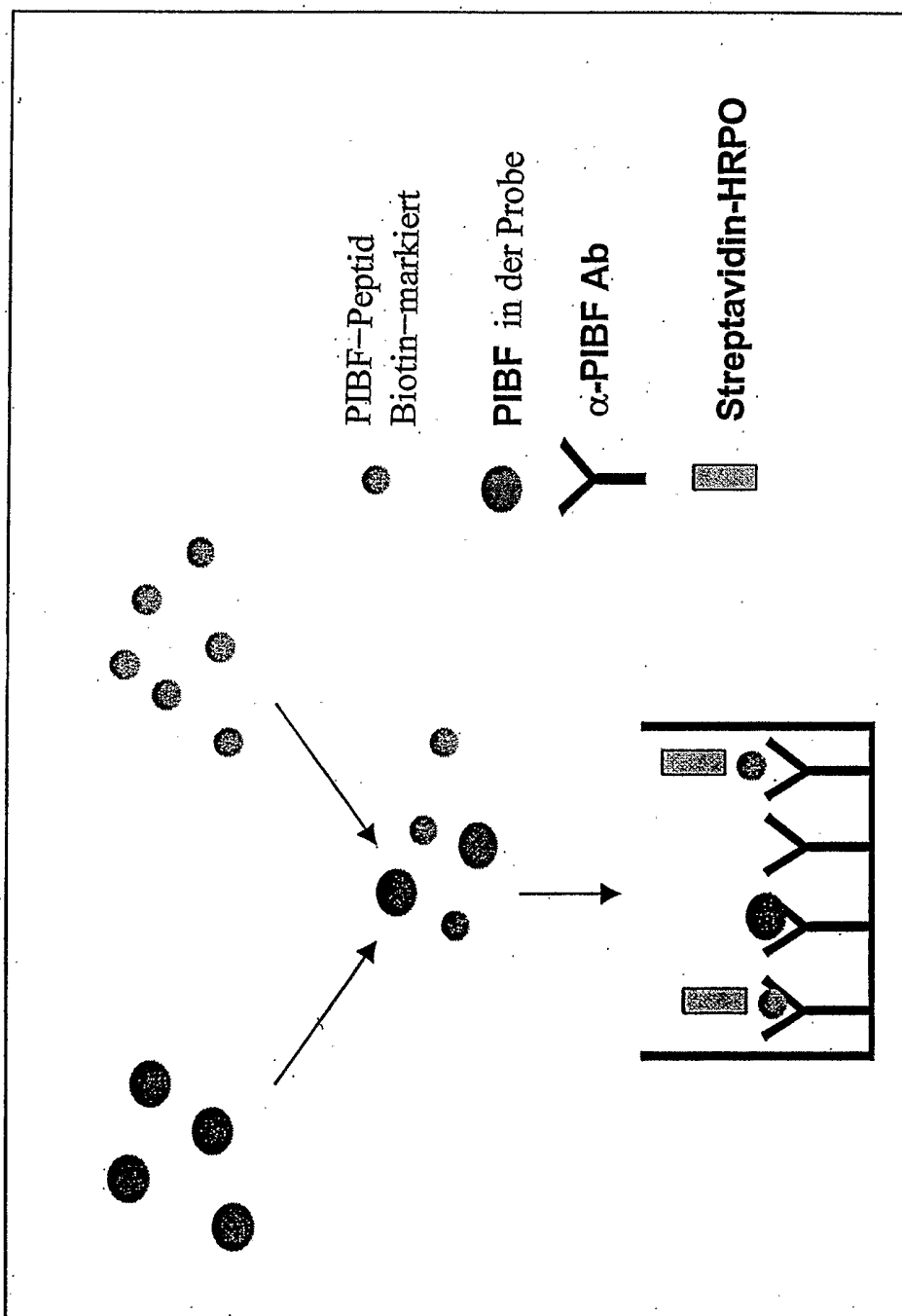


Fig. 14

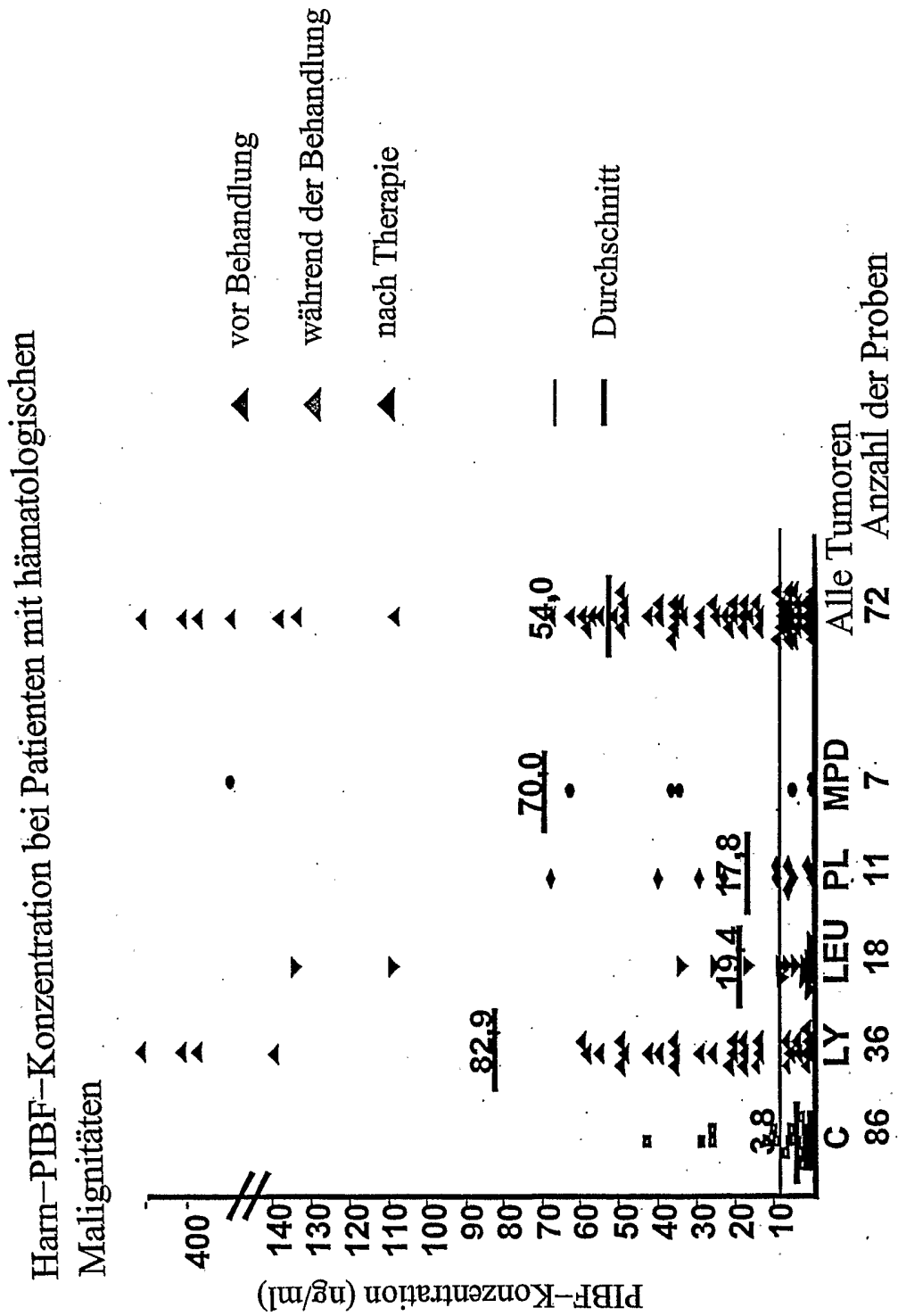


Fig. 15

Auswirkung der Therapie auf Ham-PIBF-Mengen von Patienten mit hämatologischen Malignitäten

Prozentsatz der Patienten mit >2xSA über Normalwert vor und nach Behandlung

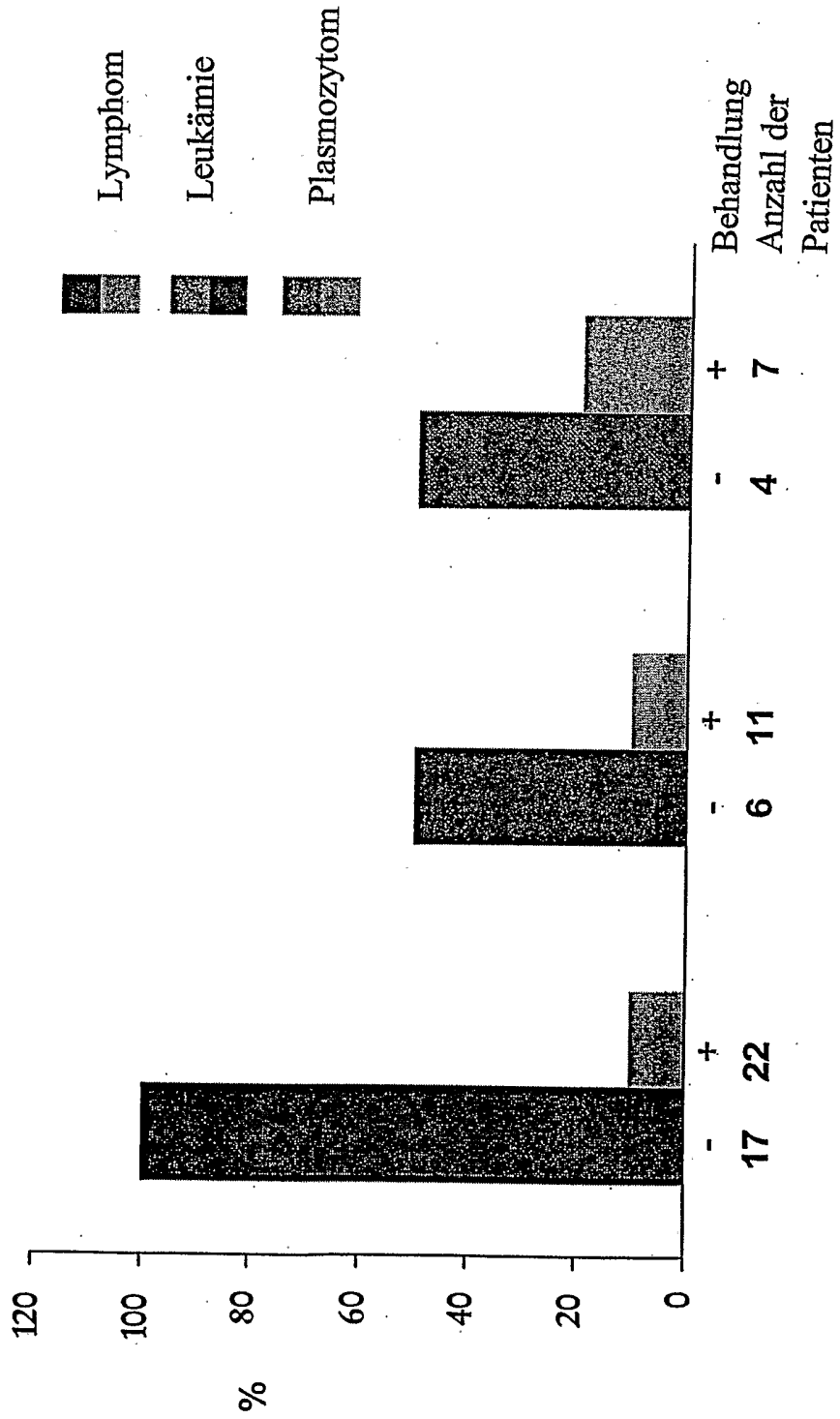
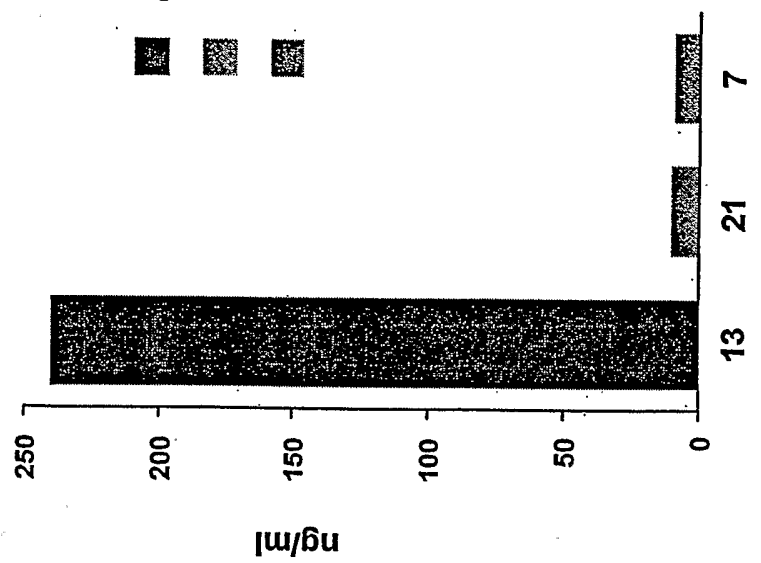


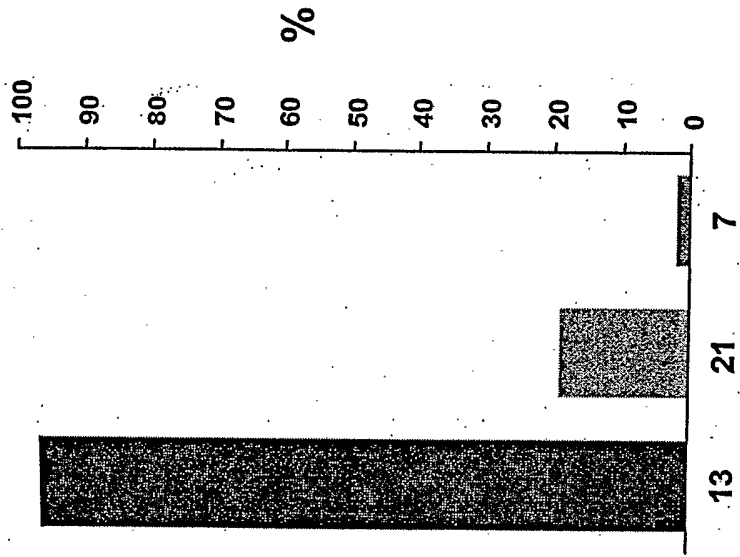
Fig. 16

Harn-PIBF-Konzentration bei Patienten mit Kopf- und Hals-Tumoren\*

A. PIBF -Konzentration



B. Prozentsatz der Patienten mit >2xSA über Normalwert



\*Mehrzahl der Patienten haben Carcinoma laryngis cc. planocellulare

Fig. 17

Auswirkung der Therapie auf PIBF-Konzentrationen bei Patienten mit Harntrakt-Tumoren

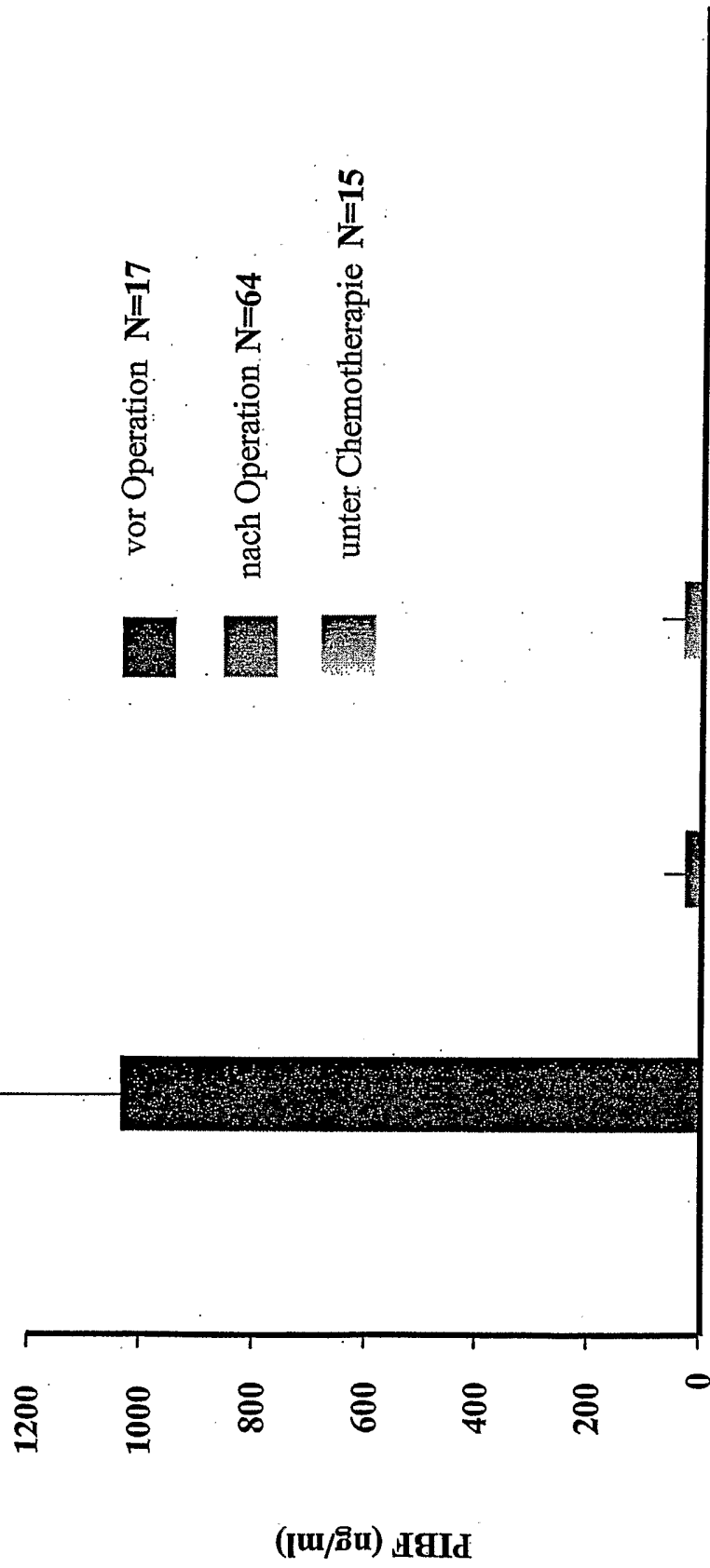


Fig. 18