



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 26 404 T2** 2004.09.09

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 871 492 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 26 404.1**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US97/00224**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 902 853.7**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 97/025068**

(86) PCT-Anmeldetag: **03.01.1997**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **17.07.1997**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **21.10.1998**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **26.11.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **09.09.2004**

(51) Int Cl.⁷: **A61K 47/48**
G01N 33/574

(30) Unionspriorität:

10166 P 05.01.1996 US

(73) Patentinhaber:

**The Government of the United States of America
as represented by the Secretary of the Department
of Health and Human Services, Bethesda, Md., US**

(74) Vertreter:

Hofstetter, Schurack & Skora, 81541 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**PASTAN, Ira, Potomac, US; CHANG, Kai, Silver
Spring, US**

(54) Bezeichnung: **MESOTHELINANTIGEN, VERFAHREN UND TESTSATZ ZUR TARGETIERUNG**

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

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

Beschreibung**GEBIET DER ERFINDUNG**

[0001] Diese Erfindung betrifft die Identifikation eines spezifischen Antigens, das an Tumorzellen zu finden ist, insbesondere Mesotheliomen und Eierstock-Tumorzellen, und unter anderem Verfahren und Zusammensetzungen zum Abzielen auf das Antigen tragende Zellen.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Monoklonale Antikörper werden derzeit zum Diagnostizieren und Behandeln von Krebs verwendet (Mach, J., et al., Current Opinion Immunol. 8, 685–693 (1991); Grossbard, M. L., et al., Blood 80 (4): 863–878 (1992)). Damit er zur Therapie nützlich ist, sollte der Antikörper ein Antigen erkennen, das in großen Mengen an den Krebszellen und in vernachlässigbaren Mengen in normalen Zellen vorhanden ist. Alternativ kann das Antigen in beträchtlichen Mengen an normalen Zellen vorhanden sein, wenn normale Zellen nicht Komponenten eines wesentlichen Organs sind. Diese Methode war bei der Entwicklung von neuen Behandlungen für Leukämien und Lymphomen nützlich. Verschiedene Differenzierungsantigene wurden an Lymphomen und Leukämien identifiziert, die gute Ziele für die Immuntherapie sind, da sie an den Stammzellen, die differenzierte Lymphozyten verursachen, nicht vorhanden sind (Grossbard, M. L., et al., Blood 80 (4): 863–878 (1992)). Somit können normale Lymphozyten, die durch die Immuntherapie abgetötet werden, regeneriert werden. Einige Beispiele von Lymphozytenantigenen dieses Typs sind CD19, CD22, CD25 und CD30 (Grossbard, M. L., et al., Blood 80 (4): 863–878 (1992); Engert, A., et al., Cancer Research 50, 84–88 (1990)). Es wäre natürlich sehr nützlich, Antikörper zu haben, die Differenzierungsantigene an festen Tumoren erkennen, aber nur eine kleine Anzahl von diesen stehen zur Verfügung. Ein Grund, der zum Mangel an solchen Antikörpern beiträgt, besteht darin, daß Anstrengungen zur Identifikation von Differenzierungsantigenen an verschiedenen Arten von Epithelialzellen im Vergleich zu den intensiven Anstrengungen, die zur Identifikation von Differenzierungsantigenen an Zellen des blutbildenden Systems gemacht wurden, relativ mäßig waren.

[0003] Eierstockkrebs stellt eine der Krankheiten dar, die durch Immuntherapie behandelt werden könnte, da die Eierstöcke während der Operation für diese Krankheit immer entfernt werden und die Reaktivität mit normalem Eierstockgewebe kein Problem ist. Verschiedene Antikörper, die Differenzierungsantigene an Eierstockkrebszellen erkennen, wurden erzeugt. Einer von diesen ist OC125, der das CA125-Antigen erkennt (Bast, R., et al., N. Eng. J. Med. 309, 883–887 (1983)). CA125 ist ein Glycoprotein mit hohem Molekulargewicht, das durch Eierstockkrebszellen verbreitet wird und bei der Diagnose von Eierstockkrebs nützlich war. Antikörper für CA125 sind jedoch für die Immuntherapie nicht nützlich, da das CA125-Antigen in den Blutstrom verbreitet wird (Bast, R., et al., N. Eng. J. Med. 309, 883–887 (1983)). Ein weiterer ist MOV18, der das Folat-bindungsprotein erkennt. Dieses Protein ist in Eierstockkrebsen sowie in einigen anderen Tumoren reichlich vorhanden. Dieses Protein wird leider auch in der Niere reichlich exprimiert (Campbell, I. G., et al., Cancer Res. 51, 5329–5338 (1991)). Ein Antikörper, den wir vorher isolierten und als MAb K1 bezeichneten, reagiert mit vielen Eierstockkrebsen und vielen Mesotheliomen. Wie OC125 reagiert der Antikörper auch mit normalen Mesothelzellen, aber er reagiert nicht mit anderen Zellentypen, abgesehen von schwacher Reaktivität mit einigen Zellen in der Luftröhre (Chang, K., et al., Int. J. Cancer 50, 373–381 (1992); Chang, K., et al., Cancer Res. 52, 181–186 (1992), siehe auch US-Patent 5 320 956). Das von MAb K1 erkannte Antigen scheint ein Differenzierungsantigen zu sein, das am Mesothel vorliegt und an Krebsen, die vom Mesothel abgeleitet sind, wie z. B. Mesotheliomen vom epithelähnlichen Typ, sowie an den meisten Eierstockkrebsen exprimiert wird. Somit sollte die auf das CAK1-Antigen gerichtete Immuntherapie das potentielle Risiko der Beschädigung von normalen Mesothelzellen und vielleicht von Zellen der Luftröhre berücksichtigen (Chang, K., et al., Int. J. Cancer 50, 373–381 (1992); Chang, K., et al., Cancer Res. 52, 181–186 (1992); Chang, K., et al., Int. J. Cancer 51, 548–554 (1992); Chang, K., et al., Am. J. Surg. Pathol. 16, 259–268 (1992)).

[0004] Unter Verwendung der Eierstock-Krebszelllinie OVCAR-3 sowie von HeLa-Zellen wurde gezeigt, daß das Antigen ein Glycoprotein mit ungefähr 40 kD ist, das an die Zelloberfläche durch Phosphatidylinositol gebunden ist. Das Protein wird freigesetzt, wenn die Zellen mit Phosphotidylinositol-spezifischer Phospholipase C behandelt werden (Chang, K., et al., Cancer Res. 52, 181–186 (1992)). Wir hatten vorher versucht, eine cDNA zu klonen, die zwei verschiedene intrazelluläre Proteine codiert, die auch mit MAb K1 reagieren (Chang, K., und Pastan, I., Int. J. Cancer 57, 90–97 (1994)). Keines von diesen ist das Zelloberflächen-Membranantigen, das von MAb K1 erkannt wird.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0005] Eine Aufgabe der Erfindung ist in den Ansprüchen definiert.

[0006] Die vorliegende Erfindung stellt Verwendungen für isolierte Polypeptide mit mindestens 10 benachbar-

ten Aminosäuren aus der Polypeptidsequenz von SEQ. ID. NR. 2 bereit, wobei das Polypeptid an Antiseren bindet, die gegen das Polypeptid mit voller Länge von SEQ. ID. NR. 2 als Immunogen erhöht ist, welches mit einem Polypeptid von 40 kD vollständig immunadsorbiert wurde, welches an die Zelloberfläche von OV-CAR-3- und HeLa-Zellen (das K1-Antigen) gebunden ist. Polypeptide mit voller Länge der Erfindung weisen typischerweise eine Größe von etwa 69 kD auf, obwohl sie größer sind, wenn sie glycosyliert oder in ein Gebilde wie z. B. einen eukaryotischen Expressionsvektor integriert sind. Die Polypeptide der vorliegenden Erfindung können in verschiedenen Formen vorliegen, einschließlich isolierten, natürlich vorkommenden, endoproteolytischen Polypeptiden, rekombinant erzeugten Polypeptiden und als Teile von rekombinanten Polypeptiden wie z. B. Fusionsproteinen.

[0007] Die vorliegende Erfindung stellt auch Verwendungen für isolierte Nukleinsäuren bereit, die die vorstehend beschriebenen Polypeptide codieren. Beispielhafte Nukleinsäuren umfassen diejenigen, die in SEQ. ID. NR. 1 beschrieben sind. In bevorzugten Ausführungsbeispielen ist die Nukleinsäure ein Teil eines rekombinanten Vektors wie z. B. ein Plasmid oder Virus oder kann als Sonde zum Nachweis für das Antigen verwendet werden. In bevorzugten Ausführungsbeispielen hybridisiert die Nukleinsäure selektiv mit der Nukleinsäure von SEQ. ID. NR. 1. Die Nukleinsäuresequenz kann z. B. ein Mesothelinpolypeptid mit vollständiger Sequenzidentität zu einem natürlich vorkommenden Mesothelinprotein codieren. Die Nukleinsäure kann auch ein Mesothelinpolypeptid codieren, das nicht zu einem natürlich vorkommenden Mesothelinpolypeptid identisch ist, wie z. B. ein Fusionsprotein oder ein genetisch konstruiertes Mutantenmesothelinprotein, das die für die Proteinfunktion oder die Immunogenität kritischen Basen, wie hierin beschrieben, beibehält.

[0008] Rekombinante Zellen, die eine Nukleinsäure der vorliegenden Erfindung umfassen, werden auch bereitgestellt, einschließlich eukaryotischer und prokaryotischer Zellen. Die vorliegende Erfindung stellt auch Antikörper bereit, die spezifisch an die Polypeptide der vorliegenden Erfindung binden.

[0009] Die Erfindung ist ferner zum Abzielen auf und/oder Hemmen des Wachstums von Zellen, die Mesothelin tragen, nützlich; Verfahren zum Nachweis des Antigens und seines Expressionsniveaus als Angabe der Anwesenheit von Tumorzellen; und Kits für einen solchen Nachweis.

DEFINITIONEN

[0010] Wenn nicht anders definiert, haben alle hierin verwendeten technischen und wissenschaftlichen Begriffe dieselbe Bedeutung, wie sie üblicherweise von Fachleuten, zu denen diese Erfindung gehört, verstanden wird. Obwohl beliebige Verfahren und Materialien, die zu den hierin beschriebenen ähnlich oder äquivalent sind, bei der Ausführung oder Prüfung der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, werden die bevorzugten Verfahren und Materialien beschrieben. Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung werden die folgenden Begriffe nachstehend definiert.

[0011] Der Begriff "Antikörper", wie hierin verwendet, umfaßt verschiedene Formen von modifizierten oder veränderten Antikörpern, wie z. B. ein intaktes Immunglobulin, verschiedene Fragmente, wie z. B. ein Fv-Fragment, ein Fv-Fragment, das nur die variablen Bereiche einer leichten und schweren Kette enthält, ein Fv-Fragment, das durch eine Disulfidbindung gebunden ist (Brinkmann et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 547–551 (1993)), ein Fab- oder (Fab)₂-Fragment, das die variablen Bereiche und Teile der konstanten Bereiche enthält, ein Ein-Ketten-Antikörper und dergleichen (Bird et al., Science 242: 424–426 (1988); Huston et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85: 5879–5883 (1988)). Der Antikörper kann von tierischem (insbesondere Maus oder Ratte) oder menschlichem Ursprung sein oder kann chimär sein (Morrison et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 81: 6851–6855 (1984)) oder humanisiert sein (Jones et al., Nature 321: 522–525 (1986)), und veröffentlichte GB-Patentanmeldung #8707252).

[0012] Der Begriff "Immuntest" ist ein Test, der einen Antikörper verwendet, um einen Analyten oder ein Antigen spezifisch zu binden. Der Immuntest ist durch die Verwendung von spezifischen Bindungseigenschaften eines speziellen Antikörpers, um den Analyten zu isolieren, auf diesen abzielen und/oder ihn zu quantifizieren, gekennzeichnet.

[0013] Die Begriffe "isoliert", "gereinigt" oder "biologisch rein" beziehen sich auf Material, das im wesentlichen oder essentiell von Komponenten frei ist, die es normalerweise begleiten, wie es in seinem natürlichen Zustand zu finden ist.

[0014] Der Begriff "Nukleinsäure" bezieht sich auf ein Desoxyribonukleotid- oder Ribonukleotid-Polymer in entweder ein- oder doppelsträngiger Form und umfaßt, wenn nicht anderweitig begrenzt, bekannte Analoge von natürlichen Nukleotiden, die in einer ähnlichen Weise wie natürlich vorkommende Nukleotide funktionieren können.

[0015] Der Begriff "Nukleinsäuresonde" bezieht sich auf ein Molekül, das an eine spezifische Sequenz oder Teilsequenz einer Nukleinsäure bindet. Eine Sonde ist vorzugsweise eine Nukleinsäure, die durch Komplementärbasenpaarung an die volle Sequenz oder an eine Teilsequenz einer Zielnukleinsäure bindet. Es ist für einen Fachmann selbstverständlich, daß Sonden Zielsequenzen binden können, denen die vollständige Komplementarität mit der Sondensequenz fehlt, in Abhängigkeit von der Stringenz der Hybridisierungsbedingungen.

gen. Die Sonden werden vorzugsweise direkt, wie mit Isotopen, Chromophoren, Lumiphoren, Chromogenen, oder indirekt, wie z. B. mit Biotin, an das später ein Streptavidinkomplex binden kann, markiert. Durch Testen auf die Anwesenheit oder Abwesenheit der Sonde kann man die Anwesenheit oder Abwesenheit der Auswahlsequenz oder -teilsequenz nachweisen.

[0016] Die Begriffe "Polypeptid", "Peptid" und "Protein" werden hierin zur Bezugnahme auf ein Polymer von Aminosäureresten austauschbar verwendet. Die Begriffe gelten für Aminosäurepolymere, in denen ein oder mehrere Aminosäurereste ein künstliches chemisches Analog einer entsprechenden natürlich vorkommenden Aminosäure sind, sowie für natürlich vorkommende Aminosäurepolymere.

[0017] Der Begriff "rekombinant", wenn er mit Bezug auf eine Zelle verwendet wird, gibt an, daß die Zelle eine DNA codiert, deren Ursprung für den Zellentyp exogen ist. Eine rekombinante Zelle exprimiert somit beispielsweise Gene, die innerhalb der natürlichen (nicht-rekombinanten) Form der Zelle nicht gefunden werden.

[0018] Der Begriff "identisch" im Zusammenhang mit zwei Nukleinsäure- oder Polypeptidsequenzen bezieht sich auf die Reste in zwei Sequenzen, die gleich sind, wenn sie auf maximale Übereinstimmung angeordnet sind. Eine optimale Anordnung von Sequenzen zum Vergleich kann durchgeführt werden, z. B. durch den lokalen Homologiealgorithmus von Smith und Waterman Adv. Appl Math. 2: 482 (1981), durch den Homologieanordnungsalgorithmus von Needleman und Wunsch J. Mol. Biol. 48: 443 (1970), durch die das Verfahren der Suche nach Ähnlichkeit von Pearson und Lipman Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85: 2444 (1988), durch computergestützte Implementierungen dieser Algorithmen (GAP, BESTFIT, FASTA und TFASTA im Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) oder durch Untersuchung.

[0019] Der Begriff "wesentliche Identität" oder "wesentliche Ähnlichkeit" im Zusammenhang mit einem Polypeptid gibt an, daß ein Polypeptid eine Sequenz mit mindestens 70% Sequenzidentität zu einer Referenzsequenz oder vorzugsweise 80% oder bevorzugter 85% Sequenzidentität zur Referenzsequenz oder am meisten bevorzugt 90% Identität über ein Vergleichsfenster von etwa 10–20 Aminosäureresten umfaßt. Eine Angabe, daß zwei Polypeptidsequenzen im wesentlichen identisch sind, ist, daß ein Peptid immunologisch mit Antikörpern reaktiv ist, die gegen das zweite Peptid erhöht sind. Somit ist ein Polypeptid zu einem zweiten Polypeptid beispielsweise im wesentlichen identisch, wenn sich die zwei Peptide nur um eine konservative Substitution unterscheiden.

[0020] Eine Angabe, daß zwei Nukleinsäuresequenzen im wesentlichen identisch sind, ist, daß das Polypeptid, das die erste Nukleinsäure codiert, mit dem von der zweiten Nukleinsäure codierten Polypeptid immunologisch kreuzreaktiv ist.

[0021] Eine weitere Angabe, daß zwei Nukleinsäuresequenzen im wesentlichen identisch sind, ist, daß die zwei Moleküle unter stringenten Bedingungen miteinander hybridisieren. Stringente Bedingungen sind von der Sequenz abhängig und sind unter verschiedenen Umweltparametern verschieden. Im allgemeinen werden stringente Bedingungen als etwa 5°C bis 20°C niedriger als der thermische Schmelzpunkt (T_m) für die spezifische Sequenz bei einer definierten Ionenstärke und definiertem pH-Wert ausgewählt. T_m ist die Temperatur (unter definierter Ionenstärke und definiertem pH-Wert), bei der 50% der Zielsequenz mit einer perfekt abgestimmten Sonde hybridisiert. Nukleinsäuren, die unter stringenten Bedingungen nicht miteinander hybridisieren, sind jedoch immer noch im wesentlichen identisch, wenn die Polypeptide, die sie codieren, im wesentlichen identisch sind. Dies geschieht z. B., wenn eine Kopie einer Nukleinsäure unter Verwendung der durch den genetischen Code zugelassenen maximalen Codondegeneration erzeugt wird.

[0022] Die Sätze "bindet spezifisch an ein Protein" oder "hybridisiert spezifisch mit" oder "spezifisch immunoreaktiv mit", wenn auf einen Antikörper Bezug genommen wird, beziehen sich auf eine Bindungsreaktion, die die Anwesenheit des Proteins in Gegenwart einer heterogenen Population von Proteinen und anderen biologischen Materialien bestimmt. Unter festgelegten Immuntestbedingungen binden die festgelegten Antikörper somit vorzugsweise an ein spezielles Protein und binden nicht in einer signifikanten Menge an andere Proteine, die in der Probe vorliegen. Die spezifische Bindung an ein Protein unter solchen Bedingungen erfordert einen Antikörper, der wegen seiner Spezifität für ein spezielles Protein ausgewählt wird. Eine Vielfalt von Immuntestformaten kann verwendet werden, um Antikörper auszuwählen, die mit einem speziellen Protein spezifisch immunreaktiv sind. Festphasen-ELISA-Immuntests werden beispielsweise routinemäßig verwendet, um monoklonale Antikörper auszuwählen, die mit einem Protein spezifisch immunreaktiv sind. Siehe Harlow und Lane (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, New York, für eine Beschreibung von Immuntestformaten und Bedingungen, die verwendet werden können, um die spezifische Immunreaktivität zu bestimmen.

KURZBESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0023] **Fig. 1:** Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz der CAK1-9 cDNA. Die Nukleotidsequenz (obere Linie) und die abgeleitete Aminosäuresequenz (untere Linie) der CAK1 cDNA ist mit Nukleotidzahlen links aufgelistet. Die Translation von CAK1 beginnt an den Nukleotiden 100–102 (ATG) und endet bei

1986–88 (TGA). Das mutmaßliche Signalpeptid ist unterstrichen und eine typische hydrophobe Sequenz für die GPI-Verankerung ist doppelt unterstrichen. Eine wahrscheinliche Furinspaltungsstelle RPRFRR ist unterstrichen und die Spaltungsstelle durch einen Pfeil gezeigt. Es sind vier potentielle N-gebundene Glycosylierungsstellen vorhanden (in fetten Buchstaben). Ein Varianten-Polyadenylierungssignal (AGTAAA) liegt 22 Basenpaare stromaufwärts vom Polyadenylierungsschwanz vor. Die ursprüngliche p6-1 cDNA-Sequenz erstreckt sich über die Nukleotide 721 bis 2138.

[0024] **Fig. 2:** Verschiedene Formen des CAK1-Tumorantigens. S.P. = mutmaßliches Signalpeptid; H.P. = von der GPI-Verankerung abhängiges hydrophobes Peptid; CHO = Kohlenhydrate; M = Membran; AA = Aminosäuren.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG

[0025] Diese Erfindung betrifft die Entdeckung eines Antigens, das hierin als Mesothelin bezeichnet wird, welches am Mesothel, an Mesotheliomen, Eierstock-Krebszellen und einigen schuppenförmigen Zellkarzinomen zu finden ist. Vorher wurde ein als monoklonaler Antikörper K1 bezeichneter Antikörper beschrieben, der mit einem an OVCAR-3-Zellen (von einer menschlichen Eierstock-Tumorzelllinie) gefundenen Antigen mit einem Molekulargewicht von 40 kD (Kilodalton) reagiert. Siehe z. B. US-Patent Nr. 5 320 956. Das hier beschriebene und beanspruchte Antigen wurde unerwartet während eines Versuchs erhalten, das K1-Antigen zu klonen und zu sequenzieren. Mesothelin weist in seiner Form mit voller Länge ein scheinbares Molekulargewicht von etwa 69 kD auf und scheint das Vorstufenprotein für das K1-Antigen mit 40 kD zu sein. Das K1-Antigen selbst erwies sich als schwierig zu klonen und unsere ersten Versuche führten zum Klonen von zwei verschiedenen intrazellulären Proteinen, wie vorstehend erwähnt (siehe Chang & Pastan, Int. J. Cancer, oben). Obwohl die Existenz des K1-Antigens bekannt war, war seine cDNA nicht routinemäßig zu klonen. Zuerst waren wir nicht in der Lage, ausreichende Mengen von ihm zum Klonen zu erhalten. Die hier verwendeten Verfahren waren arbeitsaufwendiger, aber erfolgreich, da ohne unser Wissen das K1-Antigen von einem größeren Molekül abgeleitet war, dessen Existenz wir nicht kannten. Die DNA-Sequenz und entsprechende Aminosäuresequenz für Mesothelin mit voller Länge sind in **Fig. 1** und in Sequenz ID. Nrn. 1 bzw. 2 dargelegt.

[0026] Der Verweis auf Mesothelin hierin bezieht sich auf sowohl das isolierte Polypeptid mit voller Länge als auch isolierte Polypeptidfragmente mit mindestens 10 benachbarten Aminosäuren von der Sequenz mit voller Länge, wobei das Fragment an Antiseren bindet, die gegen das Polypeptid mit voller Länge erhöht sind, welches mit dem K1-Antigen mit 40 kD vollständig immunosorbiert wurde.

[0027] Mesothelin, wie hier beschrieben, stellt ein Antigen dar, das am Mesothel, an Mesotheliomen, Eierstockkrebsen und einigen schuppenförmigen Zellkarzinomen zu finden ist. Wir haben dieses Antigen Mesothelin genannt, um seine Anwesenheit an Mesothelzellen widerzuspiegeln. Die cDNA mit voller Länge für Mesothelin ist 2138 Bp in der Länge und enthält einen offenen Leserahmen von 1884 Bp. Das Protein, das es codiert, enthält 628 Aminosäuren mit einem berechneten Molekulargewicht von etwa 69000 Dalton in seiner Form mit voller Länge.

[0028] Das Protein enthält vier potentielle N-gebundene Glycosylierungsstellen N-X-S oder N-X-T, die in **Fig. 1** in fetten Buchstaben gezeigt sind. Eine typische Signalsequenz ist am Aminoende nicht vorhanden. Ein kurzes hydrophobes Segment befindet sich jedoch 15 Aminosäuren vom ersten Methionin (**Fig. 1**). Diese Sequenz könnte als Signalsequenz für die Membraninsertion dienen, da das Protein auf der Zelloberfläche zu finden ist und während der freien Zelltranslation in Mikrosomen eingefügt wird. Es ist auch eine mutmaßliche proteolytische Verarbeitungsstelle vorhanden, RPRFRR, die mit der Aminosäure 293 beginnt (**Fig. 1**). Diese Stelle wird von Furin, einer Protease, die bei der Reifung von verschiedenen Membranproteinen sowie der Aktivierung von Pseudomonas und Diphtherietoxinen wichtig ist, erkannt wird (Chiron, M. F., et al., J.B.C 269 (27): 18169–18176 (1994)).

[0029] Die Form mit 40 kD ("K1") scheint durch mehrere Reifungsschritte von einer Vorstufe mit 69 kD abgeleitet zu sein. Diese sind in **Fig. 2** zusammengefaßt. Anfänglich wird Mesothelin als Polypeptid mit 69 kD mit einem hydrophoben Schwanz hergestellt, der wahrscheinlich entfernt und durch Phosphatidylinositol ersetzt wird (Chang, K., et al., Cancer Res. 52, 181–186 (1992)). Nach Glycosylierung an einer oder mehreren seiner vier mutmaßlichen N-gebundenen Glycosylierungsstellen wird es durch eine Protease gespalten unter Gewinnung von Formen mit höherem Molekulargewicht, das Fragment (oder Dublett) mit 40 kD, das auf der Oberfläche von OVCAR-3-Zellen zu finden ist, und ein kleineres (~31 kD) Fragment. Das letztere könnte in das Medium freigesetzt und/oder weiter abgebaut werden. Wir stellten fest, daß das aminoendständige Fragment im Medium von OVCAR-3-Zellen nachgewiesen wurde.

[0030] Mesothelin ist eines von vielen Proteinen und Glycoproteinen, die durch Phosphatidylinositol an die Zelloberfläche gebunden sind. Verschiedene Funktionen wurden diesen Molekülen zugeschrieben. Einige sind Rezeptoren, die an der Zellensignalisierung beteiligt sind; andere sind an der Zellenerkennung und/oder -anhaftung beteiligt (Dustin, M. L., et al., Nature 329, 846–848 (1987); Stiernberg, J., et al., J. Immunol., 38, 3877–3884 (1987)). GPI-gebundene Proteine können mit Tyrosinkinasen in Wechselwirkung treten (Stefano-

va, I., et al., Science 254, 1016–1019 (1991); Pandey, A., et al., Science 268, 567–569 (1995)). Antikörper für Mesothelin wären bei der Inhibierung der Ausbreitung oder Implantation von Eierstock-Krebszellen in die Bauchfellwand, die manchmal auftritt, beispielsweise während der Eierstock-Krebsoperation, nützlich. Ohne zu beabsichtigen, an eine Theorie gebunden zu sein, ist es unsere Überzeugung, daß Mesothelin wahrscheinlich für die Anhaftung und Implantation von Eierstock-Karzinomzellen, die häufig in der gesamten Bauchhöhle auftritt, oder für die Anhaftung von Tumorzellen in der Brusthöhle verantwortlich ist. Mesothelin spielt bei der Anhaftung eine Rolle, da Mesothelintransfektanten langsamer von Kulturschalen entfernt werden als nicht-transfizierte Zellen. Mesothelzellen sind äußerst flach und regulieren den Verkehr von Molekülen und Zellen in die und aus der Bauch- oder Brusthöhle.

[0031] Mesothelin ist in normalen Mesothelzellen sehr reichlich vorhanden, aus denen bösartige Mesotheliomen und Eierstock-Zystadenokarzinome abgeleitet werden. Diese zwei Arten von Tumoren teilen sich eine eindeutige biologische Eigenschaft, die sie von anderen festen Tumoren unterscheidet. In den frühen Stufen breiten sich beide Arten von Tumoren aggressiv über die gesamte Bauch- oder Brust-) Höhle aus und dringen lokal ein, aber metastasieren nicht distal durch Lymphgefäße oder den Blutstrom. Tatsächlich erliegen viele Patienten ihrem Krebs, bevor sich entfernte Metastasen entwickeln. Mesothelin spielt wahrscheinlich eine Rolle bei diesem Prozeß, da Zellen, die Mesothelin überexprimieren, die Anhaftungseigenschaften geändert haben und die Mesothelinexpression in schlecht differenzierten Eierstockkrebsen vermindert ist (Chang, K., et al., Int. J. Cancer 51, 548–554 (1992); Chang, K., et al., Am. J. Surg. Pathol. 16, 259–268 (1992)). Die Implantation von Eierstock-Krebszellen durch einen starken Anhaftungsmechanismus kann der erste Schritt in Richtung von lokalem Eindringen und distaler Metastasenbildung sein. Somit verhindert das Blockieren der Eierstock-Krebsimplantation das Eindringen und die Metastasenbildung sowie die Proliferation der Krebszellen und Leitzellszellen zu Apoptose und dergleichen.

I. Nachweis für Mesothelin

[0032] Der Nachweis von Mesothelin ist als Indikator für die Anwesenheit von Tumorzellen, insbesondere Eierstock-Tumorzellen oder Mesotheliomen, nützlich. Wenn es im Serum gefunden wird, kann es ein Faktor sein, der auf die Anwesenheit von restlichen Krebszellen hindeutet. Tumorgewebe enthalten verschiedene Proteasen, die für die Spaltung von Mesothelin verantwortlich sein können. Die Menge an N-endständigem Fragment von Mesothelin, das in Blut oder aszitischer Flüssigkeit vorhanden ist, kann die Anzahl von vorhandenen restlichen Tumorzellen widerspiegeln. Der serologische Nachweis von Mesothelin kann als neuer Indikator für die Überwachung des Krankheitsprozesses dienen. Das Grundprinzip für den Nachweis der Mesothelinproteine besteht darin, das Protein unter Verwendung von spezifischen Liganden nachzuweisen, die an Mesothelin binden, aber nicht an andere Proteine oder Nukleinsäuren in einer normalen menschlichen Zelle oder ihren Umgebungen. Die Liganden können entweder eine Nukleinsäure oder ein Antikörper sein. Die Liganden können natürlich vorkommen oder genetisch oder physikalisch modifiziert sein, wie z. B. nicht-natürliche oder Antikörper-Derivate, d. h. FAB, oder chimäre Antikörper.

A. Probensammlung und -verarbeitung

[0033] Mesothelin wird vorzugsweise in einer biologischen Probe, wie z. B. einem Serum, einer Zelle oder einer Gewebeprobe, die von einem Patienten stammt, quantifiziert. In einem bevorzugten Ausführungsbeispiel wird Mesothelin in Proben von Serum, Mesothelzellen, Gebärmutterhals- oder Eierstockgewebe mit Bezug auf einen aus rekombinantem Mesothelin hergestellten Standard quantifiziert.

[0034] Die Probe kann nach Bedarf durch Verdünnung in einer geeigneten Pufferlösung vorbehandelt oder konzentriert werden, wenn es in Abhängigkeit von dem verwendeten Test erwünscht ist. Eine beliebige Anzahl von wässrigen Standardpufferlösungen, die einen von einer Vielfalt von Puffern verwenden, wie z. B. Phosphat, Tris oder dergleichen, mit physiologischem pH-Wert kann verwendet werden.

B. Quantifizierung von Mesothelinpeptiden

[0035] Mesothelinpeptide können durch ein beliebiges einer Anzahl von Mitteln, die Fachleuten gut bekannt sind, nachgewiesen und quantifiziert werden. Diese umfassen analytische biochemische Verfahren, wie z. B. Elektrophorese, Kapillarelektrophorese, Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC), Dünnschichtchromatographie (DC), Hyperdiffusionschromatographie und dergleichen, und verschiedene immunologische Verfahren, wie z. B. Flüssigkeits- oder Gelausfällungsreaktionen, Immunodiffusion (einzeln oder doppelt), Immunelektrophorese, Radioimmuntests (RIAs), enzymgekoppelte Immunadsorptionsbestimmungen (ELISAs), Immunfluoreszenztests und dergleichen.

C. Allgemeine Verfahren – Nukleinsäurenachweis

[0036] Anerkannte Mittel zum Durchführen von Hybridisierungstests zum Nachweis sind bekannt und allgemeine Überblicke über die Technologie können aus einer Durchsicht von folgendem erhalten werden: Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach, Hrsg. Hames, B. D. und Higgins, S. J., IRL Press, 1985; Hybridization of Nucleic Acids Immobilized on Solid Supports, Meinkoth, J. und Wahl, G.; Analytical Biochemistry Band 238, 267–284, 1984, und Innis et al., PCR Protocols, oben, die alle durch den Hinweis hierin aufgenommen werden.

[0037] Wenn beispielsweise PCR verwendet wird, sind Primer dazu ausgelegt, auf einen spezifischen Teil der Nukleinsäure des Zielmittels abzielen. Vorzugsweise sind die Primer etwa 14 bis etwa 24 Nukleotide lang. Aus der hierin bereitgestellten Sequenzinformation können Fachleute geeignete spezifische Primer auswählen.

[0038] Zielspezifische Sonden können in den Nukleinsäure-Hybridisierungsdiagnostiktests für Mesothelin verwendet werden. Die Sonden sind für das interessierende Ziel spezifisch oder komplementär zu diesem. Sonden für eine der Nukleinsäuresequenzen im offenen Leserahmen für Mesothelin wären beispielsweise wirksam. Für die genaue Alldifferentiation sollten die Sonden etwa 14 Nukleotide lang und vorzugsweise etwa 20–30 Nukleotide lang sein. Für einen allgemeineren Nachweis sind die Nukleinsäuresonden etwa 50 bis etwa 1000 Nukleotide, am meisten bevorzugt etwa 200 bis etwa 400 Nukleotide.

[0039] Der Nachweis der Mesothelinpolypeptide und andere Aspekte der vorliegenden Erfindung können von Verfahren wie z. B. PCR, TAS, 3SR, QB-Amplifikation und Klonen Gebrauch machen, um eine Nukleinsäure in einer biologischen Probe zu amplifizieren, die ein Mesothelinpolypeptid codiert, für den Nachweis oder unter anderem für die Herstellung von Sonden und Primerwerkzeugen für den Nachweis.

[0040] Die Anwesenheit einer Mesothelinnukleinsäure in einer biologischen Probe wie beispielsweise Serum oder Gewebe, bei dem der Verdacht besteht, daß es Tumorzellen enthält, ist z. B. als Sonde zum Abschätzen der Anwesenheit von Mesothelin und anschließend zum Bereitstellen eines Beweises, der auf Tumorzellen hindeutet, nützlich.

[0041] Die Nukleinsäuren der vorliegenden Erfindung werden durch Verfahren in vitro geklont oder amplifiziert, wie z. B. die Polymerasekettenreaktion (PCR), die Ligasekettenreaktion (LCR), die cDNA-Synthese und RNA-Transkription beinhaltende zyklische Amplifikation (TAS), das selbstgestützte Sequenzreplikationssystem (3SR) und das Q β -Replikaseamplifikationssystem (QB). Eine breite Vielfalt von Klon- und in vitro Amplifikationsmethodologien sind Fachleuten gut bekannt. Beispiele dieser Verfahren und Instruktionen, die ausreichen, um Fachleute durch viele Klonanwendungen zu leiten, sind zu finden in Berger und Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology 152 Academic Press, Inc., San Diego, CA (Berger); Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning – A Laboratory Manual (2. Ausg.) Band 1–3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, NY (Sambrook et al.); Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel et al., Hrsg., Current Protocols, ein Gemeinschaftsprojekt zwischen Greene Publishing Associates, Inc. und John Wiley & Sons, Inc., (1994 Ergänzung) (Ausubel); Cashion et al., US-Patent Nr. 5 017 478; und Carr, Europäisches Patent Nr. 0 246 864. Beispiele von Verfahren, die ausreichen, um Fachleute durch in vitro Amplifikationsverfahren zu leiten, sind zu finden in Berger, Sambrook und Ausubel, sowie Mullis et al., (1987) US-Patent Nr. 4 683 202; PCR Protocols A Guide to Methods and Applications (Innis et al. Hrsg.) Academic Press Inc. San Diego, CA (1990) (Innis); Arnheim & Levinson (1. Oktober 1990) C&EN 36–47; The Journal of NIH Research (1991) 3, 81–94; (Kwoh et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1173; Guatelli et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 1874; Lomell et al. (1989) J. Clin. Chem 35, 1826; Landegren et al., (1988) Science 241, 1077–1080; Van Brunt (1990) Biotechnology 8, 291–294; Wu und Wallace (1989) Gene 4, 560; und Baringer et al. (1990) Gene 89, 117.

[0042] Für Fachleute ist es leicht verständlich und es ist hier beabsichtigt, daß, wenn auf spezielle Sequenzaufstellungen Bezug genommen wird, wie z. B. SEQ. ID. NRN. 1 und 2, eine solche Bezugnahme Sequenzen umfaßt, die im wesentlichen ihrer komplementären Sequenz entsprechen, und die beschriebenen Toleranzen für geringfügige Sequenzfehler, einzelne Basenänderungen, Deletionen, Substitutionen und dergleichen einschließen, so daß eine beliebige solche Sequenzänderung der Nukleinsäuresequenz entspricht, die die relevante Sequenzaufstellung betrifft.

D. Antikörper für Mesothelin und Antikörper-Liganden-Bindungstests

[0043] Antikörper (oder Antiseren) sind gegen die Polypeptide der vorliegenden Erfindung erhöht, einschließlich einzelner Fragmente derselben, sowohl in ihren natürlich vorkommenden Formen (mit voller Länge) als auch in rekombinanten Formen. Außerdem sind Antikörper gegen diese Polypeptide in entweder ihren natürlichen Konfigurationen oder in nicht-natürlichen Konfigurationen erhöht. Antiidiotypische Antikörper können auch erzeugt werden. Viele Verfahren zur Herstellung von Antikörpern sind Fachleuten bekannt. Die folgende Erörterung wird als allgemeiner Überblick über die zur Verfügung stehenden Verfahren dargestellt; ein Fachmann wird jedoch erkennen, daß viele Veränderungen an den folgenden Verfahren bekannt sind.

1. Antikörperherstellung

[0044] Eine Anzahl von Immunogenen werden verwendet, um Antikörper herzustellen, die mit Mesothelinpolypeptiden spezifisch reaktiv sind. Rekombinante oder synthetische Polypeptide mit 10 Aminosäuren in der Länge oder mehr, die aus den Teilsequenzen von SEQ. ID. NR. 1 ausgewählt sind, sind das bevorzugte Polypeptidimmunogen für die Herstellung von monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern. In einer Klasse von bevorzugten Ausführungsbeispielen ist ein Immunogenpeptidkonjugat auch als Immunogen eingeschlossen. Natürlich vorkommende Polypeptide werden auch entweder in reiner oder unreiner Form verwendet. Transfizierte Säugerzellen, die rekombinantes Mesothelin überexprimieren, können auch als Immunogen entweder in ganzen intakten Zellen oder in Membranzubereitungen verwendet werden. Diese Immunogene sind für die Erzeugung von polyklonalen oder monoklonalen Antikörpern nützlich.

[0045] Rekombinante Polypeptide werden in eukaryotischen oder prokaryotischen Zellen exprimiert und unter Verwendung von Standardverfahren gereinigt. Das Polypeptid oder eine synthetische Version desselben wird dann in ein kleines Tier injiziert, das in der Lage ist, Antikörper zu erzeugen. Entweder monoklonale oder polyklonale Antikörper können für die anschließende Verwendung in Immuntests erzeugt werden, um die Anwesenheit und Menge des Polypeptids zu messen. Verfahren zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern sind Fachleuten bekannt. Kurz gesagt, wird ein Polypeptid, das mit einem geeigneten Träger gekoppelt ist (z. B. GST, Schlüssellochhaft-Hemancyanin usw.), oder ein Polypeptid, das in einen Immunisierungsvektor integriert ist, wie z. B. ein rekombinantes Vacciniavirus (siehe US-Patent Nr. 4 722 848), mit einem Hilfsmittel vermischt und Tiere werden mit dem Gemisch immunisiert. Die Immunreaktion des Tiers auf die Immunogenzubereitung wird überwacht, indem Testblutproben genommen werden und der Titer der Reaktivität auf das interessierende Polypeptid bestimmt wird. Wenn geeignet hohe Titer von Antikörper gegen das Immunogen erhalten werden, wird Blut vom Tier gesammelt und Antiseren werden hergestellt. Eine weitere Fraktionierung der Antiseren, um sie für Antikörper anzureichern, die gegen das Polypeptid reaktiv sind, wird durchgeführt, wo es erwünscht ist. Siehe z. B. Coligan (1991) *Current Protocols in Immunology* Wiley/Greene, NY; und Harlow und Lane (1989) *Antibodies: a Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Press, NY, und die nachstehenden Beispiele.

[0046] Antikörper, einschließlich Bindungsfragmente und rekombinante Ein-Ketten-Varianten davon, gegen vorbestimmte Fragmente von Mesothelinpolypeptiden werden durch Immunisieren von Tieren z. B. mit Konjugaten der Fragmente mit Trägerproteinen, wie vorstehend beschrieben, erhöht. Typischerweise ist das interessierende Immunogen ein Peptid mit mindestens etwa 3 Aminosäuren; typischerweise ist das Peptid 5 Aminosäuren lang, vorzugsweise ist das Fragment 10 Aminosäuren lang und bevorzugter ist das Fragment 15 Aminosäuren lang oder mehr. Die Peptide werden typischerweise mit einem Trägerprotein (z. B. wie einem Fusionsprotein) gekoppelt oder werden in einem Immunisierungs- oder Expressionsvektor rekombinant exprimiert. Antigen determinanten an Peptiden, an die Antikörper binden, sind typischerweise 3 bis 10 Aminosäuren lang.

[0047] Monoklonale Antikörper werden aus Zellen hergestellt, die den gewünschten Antikörper absondern. Diese Antikörper werden auf das Binden an normale oder modifizierte Polypeptide selektiert. Spezifische monoklonale und polyklonale Antikörper binden gewöhnlich mit einem K_D von mindestens etwa 0,1 mM, gewöhnlicher mindestens etwa 50 μ M, und am meisten bevorzugt mindestens etwa 1 μ M oder besser.

[0048] In einigen Fällen ist es erwünscht, monoklonale Antikörper aus verschiedenen Säugerwirten wie z. B. Mäusen, Nagern, Primaten, Menschen usw. herzustellen. Die Beschreibung von Verfahren zur Herstellung solcher monoklonalen Antikörper ist Fachleuten gut bekannt und ist zu finden z. B. in Asai, Hrsg. *Antibodies in Cell Biology*, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Stites et al. (Hrsg.) *Basic and Clinical Immunology* (4. Ausg.) Lange Medical Publications, Los Altos, CA, und hierin angeführten Bezugsquellen; Harlow und Lane, oben; Goding (1986) *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2. Ausg.) Academic Press, New York, NY; und Kohler und Milstein (1975) *Nature* 256: 495–497. Die Polypeptide und Antikörper der vorliegenden Erfindung werden mit und ohne Modifikation verwendet und umfassen chimäre Antikörper wie z. B. humanisierte Mäuseantikörper.

[0049] Andere geeignete Verfahren beinhalten die Auswahl von Bibliotheken von rekombinanten Antikörpern in Phagen- oder ähnlichen Vektoren. Siehe Huse et al. (1989) *Science* 246: 1275–1281; und Ward, et al. (1989) *Nature* 341: 544–546.

[0050] Die Polypeptide und Antikörper werden häufig durch entweder kovalentes oder nicht-kovalentes Binden einer Substanz, die für ein nachweisbares Signal sorgt, markiert. Eine breite Vielfalt von Markern und Konjugationsverfahren sind bekannt und sind sowohl in der wissenschaftlichen als auch Patenliteratur umfangreich berichtet. Geeignete Marker umfassen Radionukleotide, Enzyme, Substrate, Cofaktoren, Inhibitoren, Fluoreszenzanteile, Chemilumineszenzanteile, magnetische Teilchen und dergleichen. Patente, die die Verwendung solcher Marker lehren, umfassen US-Patent Nrn. 3 817 837; 3 850 752; 3 939 350; 3 996 345; 4 277 437; 4 275 149; und 4 366 241. Rekombinante Immunglobuline können auch hergestellt werden. Siehe beispielsweise Cabilly, US-Patent Nr. 4 816 567; und Queen et al. (1989) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86: 10029–10033.

[0051] Die Antikörper dieser Erfindung werden auch zur Affinitätschromatographie beim Isolieren von Meso-

thelinpolypeptiden verwendet. Säulen werden hergestellt, wobei z. B. die Antikörper an einen festen Träger gebunden sind, z. B. Teilchen, wie z. B. Agarose, Sephadex oder dergleichen, wobei ein Zellysat durch die Säule geleitet, gewaschen und mit zunehmenden Konzentrationen eines milden Denaturierungsmittels behandelt wird, wodurch gereinigte Mesothelinpolypeptide freigesetzt werden.

[0052] Die Antikörper können zum Selektieren von Expressionsbibliotheken nach speziellen Expressionsprodukten wie z. B. Säugermesothelin verwendet werden. Gewöhnlich werden die Antikörper in einem solchen Verfahren mit einem Anteil markiert, der einen leichten Nachweis der Anwesenheit eines Antigens durch Antikörperbindung ermöglicht.

[0053] Antikörper, die gegen Mesothelinpolypeptide erhöht sind, können auch verwendet werden, um antiidiotypische Antikörper zu erhöhen. Diese sind zum Nachweis oder zur Diagnose von verschiedenen pathologischen Zuständen, die mit der Anwesenheit der jeweiligen Antigene in Zusammenhang stehen, nützlich.

2. Immuntests

[0054] Ein spezielles Protein kann durch eine Vielfalt von Immuntestverfahren quantifiziert werden. Für einen Überblick über immunologische und Immuntestverfahren im allgemeinen siehe Stites und Terr (Hrsg.) 1991 Basic and Clinical Immunology (7. Ausg.). Überdies können die Immuntests der vorliegenden Erfindung in einer beliebigen von verschiedenen Konfigurationen durchgeführt werden, z. B. jene, die in Maggio (Hrsg.) (1980) Enzyme Immunoassay CRC Press, Boca Raton, Florida; Tijan (1985) "Practice and Theory of Enzyme Immunoassays", Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam; Harlow und Lane, oben; Chan (Hrsg.) (1987) Immunoassay: A Practical Guide Academic Press, Orlando, FL; Price und Newman (Hrsg.) (1991) Principles and Practice of Immunoassays Stockton Press, NY; und Ngo (Hrsg.) (1988) Non-isotopic Immunoassays Plenum Press, NY, besprochen sind.

[0055] Immuntests verwenden auch häufig ein Markierungsmittel, um den aus dem Aufnahmemittel und dem Analyten gebildeten Bindungskomplex spezifisch zu binden und zu markieren. Das Markierungsmittel kann selbst eines der Anteile sein, die den Antikörper/Analyten-Komplex umfassen. Somit kann das Markierungsmittel ein markiertes Mesothelinpolypeptid oder ein markierter Anti-Mesothelin-Antikörper sein. Alternativ kann das Markierungsmittel ein dritter Anteil wie z. B. ein weiterer Antikörper sein, der spezifisch an den Antikörper/Mesothelin-Komplex oder an eine modifizierte Aufnahmegruppe (z. B. Biotin) bindet, die an das Mesothelinpeptid oder den Anti-Mesothelin-Antikörper kovalent gebunden ist.

[0056] In einem bevorzugten Ausführungsbeispiel ist das Markierungsmittel ein Antikörper, der spezifisch an das Aufnahmemittel (Anti-Mesothelin) bindet. Solche Mittel sind Fachleuten gut bekannt und umfassen am typischsten markierte Antikörper, die spezifisch Antikörper der speziellen Tierspezies binden, von der das Aufnahmemittel abgeleitet ist (z. B. ein antiidiotypischer Antikörper). Wenn das Aufnahmemittel beispielsweise ein von der Maus abgeleiteter Anti-Mensch-Mesothelinantikörper ist, kann das Markierungsmittel somit beispielsweise ein Ziegen-Anti-Maus-IgG, d. h. ein Antikörper, der für den konstanten Bereich des Mausantikörpers spezifisch ist, sein.

[0057] Andere Proteine, die in der Lage sind, konstante Immunglobulinbereiche spezifisch zu binden, wie z. B. Streptokokkenprotein A oder -protein G, werden auch als Markierungsmittel verwendet. Diese Proteine sind normale Bestandteile der Zellwände von Streptokokkenbakterien. Sie weisen eine starke nicht-immunogene Reaktivität mit konstanten Immunglobulinbereichen von einer Vielfalt von Spezies auf. Siehe im allgemeinen Kronval, et al., (1973) J. Immunol., 111: 1401–1406, und Akerstrom, et al., (1985) J. Immunol., 135: 2589–2542.

[0058] In den gesamten Tests können Inkubations- und/oder Waschschriffe nach jeder Kombination von Reagenzien erforderlich sein. Die Inkubationsschritte können von etwa 5 Sekunden bis mehreren Stunden, vorzugsweise etwa 5 Minuten bis etwa 24 Stunden variieren. Die Inkubationszeit hängt jedoch vom Testformat, vom Analyten, vom Volumen der Lösung, von den Konzentrationen und dergleichen ab. Gewöhnlich werden die Tests bei Umgebungstemperatur ausgeführt, obwohl sie über einen Bereich von Temperaturen, wie z. B. 5°C bis 45°C, durchgeführt werden können.

(a) Nichtkompetitive Testformate

[0059] Immuntests für den Nachweis von Mesothelin können entweder kompetitiv oder nichtkompetitiv sein. Nichtkompetitive Immuntests sind Tests, in denen die Menge an aufgenommenem Analyten (in diesem Fall Mesothelin) direkt gemessen wird. In einem bevorzugten "Sandwich"-Test wird das Aufnahmemittel (z. B. Anti-Mesothelin-Antikörper) beispielsweise direkt an ein festes Substrat gebunden, wo sie immobilisiert werden. Diese immobilisierten Antikörper nehmen dann in der Testprobe vorhandenes Mesothelin auf. Das so immobilisierte Mesothelin wird dann durch ein Markierungsmittel wie z. B. einen zweiten menschlichen Mesothelinantikörper, der einen Marker trägt, gebunden. Alternativ kann dem zweiten Mesothelinantikörper ein Marker fehlen, aber er kann wiederum durch einen markierten dritten Antikörper gebunden werden, der für Antikörper der Spezies spezifisch ist, von welcher der zweite Antikörper abgeleitet ist.

[0060] Sandwichtests für Mesothelin können konstruiert werden. Wie vorstehend beschrieben, bindet das immobilisierte Anti-Mesothelin spezifisch an in der Probe vorhandenes Mesothelin. Das markierte Anti-Mesothelin bindet dann an das bereits gebundene Mesothelin. Freies markiertes Anti-Mesothelin wird gewaschen und das restliche gebundene markierte Anti-Mesothelin wird nachgewiesen (z. B. unter Verwendung eines Gammadetektors, wenn der Marker radioaktiv ist).

(b) Kompetitive Testformate

[0061] In kompetitiven Tests wird die Menge an Analyt (z. B. Mesothelin), die in der Probe vorliegt, indirekt durch Messen der Menge eines zugegebenen (exogenen) Analyten gemessen, der von einem Aufnahmemittel (z. B. Anti-Mesothelin-Antikörper) durch den in der Probe vorhandenen Analyten verdrängt (oder durch Konkurrenz verdrängt) wird. In einem kompetitiven Test wird eine bekannte Menge an Analyt zur Probe zugegeben und die Probe wird mit einem Aufnahmemittel in Kontakt gebracht, in diesem Fall einem Antikörper, der den Analyten spezifisch bindet. Die Menge an Analyt, der an den Antikörper gebunden ist, ist zur Konzentration des in der Probe vorhandenen Analyten umgekehrt proportional.

[0062] In einem besonders bevorzugten Ausführungsbeispiel wird das Aufnahmemittel an einem festen Substrat immobilisiert. Die Menge an Mesothelin, das an das Aufnahmemittel gebunden ist, wird entweder durch Messen des in einem Mesothelin/Antikörper-Komplex vorhandenen Mesothelins oder alternativ durch Messen der Menge an restlichem unkomplexiertem Mesothelin bestimmt. Die Menge an Mesothelin kann durch Bereitstellen eines markierten Mesothelins erfaßt werden.

[0063] Ein Hapteninhibitionstest ist ein weiterer bevorzugter kompetitiver Test. In diesem Test wird ein bekannter Analyt, in diesem Fall Mesothelin, auf einem festen Substrat immobilisiert. Eine bekannte Menge an Anti-Mesothelin-Antikörper wird zur Probe zugegeben und die Probe wird dann mit dem immobilisierten Mesothelin in Kontakt gebracht. In diesem Fall ist die Menge an Anti-Mesothelin-Antikörper, der an das immobilisierte Mesothelin gebunden ist, zur Menge an in der Probe vorhandenem Mesothelin proportional. Wiederum wird die Menge an immobilisiertem Antikörper durch Erfassen entweder der immobilisierten Fraktion des Antikörpers oder der Fraktion des Antikörpers, der in Lösung verbleibt, erfaßt. Die Erfassung kann direkt sein, wenn der Antikörper markiert ist, oder indirekt durch die anschließende Zugabe eines markierten Anteils, der spezifisch an den Antikörper bindet, wie vorstehend beschrieben.

(c) Erzeugung von gesammelten Antiseren zur Verwendung bei Immuntests

[0064] Ein Mesothelinprotein, das spezifisch an einen Antikörper bindet, der gegen ein definiertes Immunogen erzeugt wird, oder das mit diesem spezifisch immunoreaktiv ist, wie z. B. ein Immunogen, das aus der Aminosäure von SEQ. ID. NR. 2 besteht, wird in einem Immuntest bestimmt. Der Immuntest verwendet ein polyklonales Antiserum, das gegen das Protein von SEQ. ID. NR. 2 (das immunogene Polypeptid) erhöht war.

[0065] Um Antiseren für die Verwendung in einem Immuntest zu erzeugen, wird das Polypeptid der SEQ. ID. NR. 2 isoliert, wie hierin beschrieben. Rekombinantes Rezeptorpolypeptid kann beispielsweise in einer Säuger- oder anderen eukaryotischen Zelllinie hergestellt werden. Ein Inzuchtstamm von Mäusen wird mit dem Protein von SEQ. ID. NR. 2 unter Verwendung eines Standardhilfsmittels wie z. B. Freund's Hilfsmittel und eines Standard-Mausimmunisierungsprotokolls (siehe Harlow und Lane, oben) immunisiert. Alternativ wird ein synthetisches Polypeptid, das von den hierin offenbarten Sequenzen abgeleitet ist und an ein Trägerprotein konjugiert ist, als Immunogen verwendet. Polyklonale Seren werden gesammelt und gegen das immunogene Polypeptid in einem Immuntest, beispielsweise einem Festphasen-Immuntest, titriert, wobei das Immunogen an einem festen Träger immobilisiert ist. Polyklonale Antiseren mit einem Titer von 10^4 oder mehr werden ausgewählt und auf ihre Kreuzreaktivität gegen interessierende Proteine unter Verwendung eines kompetitiven Bindungsimmuntests wie z. B. dem in Harlow und Lane, oben, auf Seiten 570–573, beschriebenen getestet.

[0066] Immuntests im kompetitiven Bindungsformat werden für Kreuzreaktivitätsbestimmungen verwendet. Das immunogene Polypeptid wird beispielsweise an einem festen Träger immobilisiert. Zum Test zugegebene Proteine konkurrieren mit der Bindung der Antiseren an das immobilisierte Antigen. Die Fähigkeit der obigen Proteine, mit der Bindung der Antiseren an das immobilisierte Protein zu konkurrieren, wird mit dem immunogenen Polypeptid verglichen. Der Prozentsatz der Kreuzreaktivität für die obigen Proteine wird unter Verwendung von Standardberechnungen berechnet. Diejenigen Antiseren mit weniger als 10% Kreuzreaktivität mit dem interessierenden Protein werden kombiniert und gesammelt. Die kreuzreagierenden Antikörper werden dann aus den gesammelten Antisera durch Immunadsorption entfernt. Die immunadsorbierten und gesammelten Antiseren werden dann in einem kompetitiven Bindungsimmuntest verwendet, wie hierin beschrieben, um ein zweites "Ziel"-Polypeptid mit dem immunogenen Polypeptid zu vergleichen. Um diesen Vergleich durchzuführen, werden die zwei Polypeptide jeweils in einem breiten Bereich von Konzentrationen getestet und die zum Inhibieren von 50% der Bindung der Antiseren an das immobilisierte Protein erforderliche Menge jedes Polypeptids wird unter Verwendung von Standardverfahren bestimmt. Wenn die Menge des Zielpolypeptids,

die erforderlich ist, geringer als zweimal die Menge des immunogenen Polypeptids, die erforderlich ist, ist, dann wird behauptet, daß das Zielpolypeptid spezifisch an einen an dem immunogenen Protein erzeugten Antikörper bindet. Als Endbestimmung der Spezifität werden die gesammelten Antisera vollständig mit dem immunogenen Polypeptid immunadsorbiert, bis keine Bindung an das Polypeptid, das in der Immunadsorption verwendet wird, nachweisbar ist. Die vollständig immunadsorbierten Antisera werden dann auf Reaktivität mit dem Testpolypeptid getestet. Wenn keine Reaktivität beobachtet wird, dann wird das Testpolypeptid spezifisch durch die Antisera gebunden, die durch das immunogene Protein hervorgerufen werden.

D. Andere Testformate

[0067] Westerblotanalyse kann auch verwendet werden, um die Anwesenheit von Mesothelin in der Probe nachzuweisen und zu quantifizieren. Das Verfahren umfaßt im allgemeinen das Trennen von Probenproteinen durch Gelelektrophorese auf der Basis des Molekulargewichts, Überführen der getrennten Proteine auf einen geeigneten festen Träger (wie z. B. einen Nitrocellulosefilter, einen Nylonfilter oder derivatisierten Nylonfilter) und Inkubieren der Probe mit den Antikörpern, die Mesothelin spezifisch binden. Die Anti-Mesothelin-Antikörper binden spezifisch an Mesothelin auf dem festen Träger. Diese Antikörper können direkt markiert werden oder können alternativ anschließend unter Verwendung von markierten Antikörpern (z. B. markierten Schaf-Anti-Maus-Antikörpern, wobei der Antikörper für Mesothelin ein Mäuseantikörper ist) erfaßt werden, welche spezifisch an das Anti-Mesothelin binden.

[0068] Andere Testformate umfassen Liposomen-Immuntests (LIAs), die Liposomen verwenden, die dazu ausgelegt sind, spezifische Moleküle (z. B. Antikörper) zu binden und eingekapselte Reagenzien oder Marker freizusetzen. Die freigesetzten Chemikalien werden dann gemäß Standardverfahren nachgewiesen (siehe Monroe et al. (1986) Amer. Clin. Prod. Rev. 5: 34–41).

E. Marker

[0069] Das Markierungsmittel für die hierin beschriebenen Anwendungen kann z. B. ein monoklonaler Antikörper, ein polyklonaler Antikörper, ein Mesothelinbindungsprotein oder ein Komplex wie z. B. die hierin beschriebenen oder ein Polymer wie z. B. eine Affinitätsmatrix, ein Kohlenhydrat oder ein Lipid sein. Der Nachweis kann durch ein beliebiges bekanntes Verfahren wie z. B. Immunblotting, Westernanalyse, Gelbeweglichkeits-Verschiebungstests, Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierungsanalyse (FISH), Verfolgung von radioaktiven oder biolumineszenten Markern, nuklearmagnetische Resonanz, elektronenparamagnetische Resonanz, Strömungsstoppspektroskopie, Säulenchromatographie, Kapillarelektrophorese oder andere Verfahren, die ein Molekül auf der Basis einer Änderung in Größe und/oder Ladung verfolgen, vor sich gehen. Der spezielle Marker oder die nachweisbare Gruppe, die in dem Test verwendet wird, ist kein entscheidender Aspekt der Erfindung. Die nachweisbare Gruppe kann ein beliebiges Material mit einer nachweisbaren physikalischen oder chemischen Eigenschaft sein. Solche nachweisbaren Marker wurden auf dem Gebiet von Immuntests gut entwickelt und im allgemeinen kann ein beliebiger Marker, der in solchen Verfahren nützlich ist, auf die vorliegende Erfindung angewendet werden. Somit ist ein Marker eine beliebige Zusammensetzung, die durch spektroskopische, photochemische, biochemische, immunochemische, elektrische, optische oder chemische Mittel nachweisbar ist. Nützliche Marker in der vorliegenden Erfindung umfassen Magnetkügelchen (z. B. Dynabeads™), Fluoreszenzfarbstoffe (z. B. Fluoresceinisoithiocyanat, Texasrot, Rhodamin und dergleichen), Radiomarker (z. B. ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C oder ^{32}P), Enzyme (z. B. Meerrettichperoxidase, alkalische Phosphatase und andere, die üblicherweise in einem ELISA verwendet werden) und kolorimetrische Marker wie z. B. Kügelchen aus kolloidalem Gold oder gefärbtem Glas oder Kunststoff (z. B. Polystyrol, Polypropylen, Latex usw.).

[0070] Der Marker kann direkt oder indirekt mit der gewünschten Komponente des Tests gemäß Verfahren, die auf dem Fachgebiet gut bekannt sind, gekoppelt werden. Wie vorstehend angegeben, können eine breite Vielfalt von Markern verwendet werden, wobei die Wahl des Markers von der erforderlichen Empfindlichkeit, der leichten Konjugation der Verbindung, Stabilitätsanforderungen, der zur Verfügung stehenden Instrumentenausrüstung und Verfügbarkeitsbereitstellungen abhängt.

[0071] Nicht-radioaktive Marker werden häufig durch indirekte Mittel gebunden. Im allgemeinen wird ein Ligandenmolekül (z. B. Biotin) an das Molekül kovalent gebunden. Der Ligand bindet dann an ein Antiliganden- (z. B. Streptavidin) Molekül, das entweder von Natur aus nachweisbar ist oder an ein Signalsystem wie z. B. ein nachweisbares Enzym, eine Fluoreszenzverbindung oder eine Chemilumineszenzverbindung kovalent gebunden ist. Eine Anzahl von Liganden und Antiliganden können verwendet werden. Wenn ein Ligand einen natürlichen Antiliganden aufweist, beispielsweise Biotin, Thyroxin und Cortisol, kann er in Verbindung mit den markierten, natürlich vorkommenden Antiliganden verwendet werden. Alternativ kann eine beliebige Hapten- oder Antigenverbindung in Kombination mit dem Antikörper verwendet werden.

[0072] Die Moleküle können auch direkt an Signal erzeugende Verbindungen z. B. durch Konjugation mit einem Enzym oder Fluorophor konjugiert werden. Als Marker interessierende Enzyme sind hauptsächlich Hy-

drolasen, insbesondere Phosphatasen, Esterasen und Glycosidasen oder Oxidoreduktasen, insbesondere Peroxidasen. Fluoreszenzverbindungen umfassen Fluorescein und seine Derivate, Rhodamin und seine Derivate, Dansyl, Umbelliferon usw. Chemilumineszenzverbindungen umfassen Luciferin und 2,3-Dihydrophthalazindione, z. B. Luminol. Für einen Überblick über verschiedene Markierungs- oder Signal erzeugende Systeme, die verwendet werden können, siehe US-Patent Nr. 4 391 904.

[0073] Mittel zum Nachweis von Markern sind Fachleuten gut bekannt. Wenn der Marker beispielsweise ein radioaktiver Marker ist, umfassen Mittel zum Nachweis folglich einen Szintillationszähler oder einen photographischen Film wie bei der Autoradiographie. Wenn der Marker ein Fluoreszenzmarker ist, kann er durch Anregen des Fluorochroms mit der geeigneten Lichtwellenlänge und Erfassen der resultierenden Fluoreszenz z. B. durch Mikroskopie, visuelle Untersuchung, über einen photographischen Film, durch die Verwendung von elektronischen Detektoren wie z. B. ladungsgekoppelten Bauelementen (CCDs) oder Photovervielfachern und dergleichen nachgewiesen werden. Ebenso können enzymatische Marker durch Bereitstellung von geeigneten Substraten für das Enzym und Erfassen des resultierenden Reaktionsprodukts nachgewiesen werden. Schließlich können einfache kolorimetrische Marker einfach durch Beobachten der dem Marker zugeordneten Farbe nachgewiesen werden. In verschiedenen Tauchstifttests erscheint konjugiertes Gold folglich häufig rosa, während verschiedene konjugierte Kügelchen in der Farbe des Kügelchens erscheinen.

[0074] Einige Testformate erfordern nicht die Verwendung von markierten Komponenten. Agglutinationstests können beispielsweise verwendet werden, um die Anwesenheit der Zielantikörper nachzuweisen. In diesem Fall werden mit Antigen beschichtete Teilchen durch Proben, die die Zielantikörper umfassen, agglutiniert. In diesem Format muß keine der Komponenten markiert werden und die Anwesenheit des Zielantikörpers wird durch einfache visuelle Untersuchung nachgewiesen.

F. Substrate

[0075] Wie vorstehend erwähnt, können in Abhängigkeit von dem Test verschiedene Komponenten, einschließlich des Antigens, Zielantikörpers oder Anti-Mensch-Antikörpers, an eine feste Oberfläche gebunden werden. Viele Verfahren zum Immobilisieren von Biomolekülen an einer Vielfalt von festen Oberflächen sind auf dem Fachgebiet bekannt. Die feste Oberfläche kann beispielsweise eine Membran (z. B. Nitrocellulose), eine Mikrotiterschale (z. B. PVC, Polypropylen oder Polystyrol), ein Teströhrchen (Glas oder Kunststoff), einen Tauchstift (z. B. Glas, PVC, Polypropylen, Polystyrol, Latex und dergleichen), ein Mikrozentrifugenröhrchen oder ein Glas-, Siliziumdioxid-, Kunststoff-, Metall- oder Polymerkügelchen sein. Die gewünschte Komponente kann kovalent gebunden oder durch nicht-spezifische Bindung nicht-kovalent gebunden sein.

[0076] Eine breite Vielfalt von organischen und anorganischen Polymeren, sowohl natürlich als auch synthetisch, können als Material für die feste Oberfläche verwendet werden. Erläuternde Polymere umfassen Polyethylen, Polypropylen, Poly(4-methylbuten), Polystyrol, Polymethacrylat, Poly(ethylenterephthalat), Rayon, Nylon, Poly(vinylbutyrat), Polyvinylidendifluorid (PVDF), Silikone, Polyformaldehyd, Cellulose, Celluloseacetat, Nitrocellulose und dergleichen. Andere Materialien, die verwendet werden können, umfassen Papier, Gläser, Keramiken, Metalle, Halbmetalle, Halbleitermaterialien, Zemente oder dergleichen. Außerdem können Substanzen, die Gele bilden, wie z. B. Proteine (z. B. Gelatinen), Lipopolysaccharide, Silikate, Agarose und Polyacrylamide, verwendet werden. Polymere, die verschiedene wässrige Phasen bilden, wie z. B. Dextrane, Polyalkylenglycole oder Tenside, wie z. B. Phospholipide, langkettige (12–24 Kohlenstoffatome) Alkylammoniumsalze und dergleichen sind auch geeignet. Wenn die feste Oberfläche porös ist, können verschiedene Porengrößen in Abhängigkeit von der Art des Systems verwendet werden.

[0077] Bei der Vorbereitung der Oberfläche können eine Vielzahl von verschiedenen Materialien verwendet werden, z. B. als Laminat, um verschiedene Eigenschaften zu erhalten. Proteinbeschichtungen wie z. B. Gelatine können beispielsweise verwendet werden, um nicht-spezifisches Binden zu vermeiden, die kovalente Konjugation zu vereinfachen, die Signalerfassung zu verbessern oder dergleichen.

[0078] Wenn eine kovalente Bindung zwischen einer Verbindung und der Oberfläche erwünscht ist, ist die Oberfläche gewöhnlich polyfunktional oder in der Lage, polyfunktionalisiert zu werden. Funktionale Gruppen, die auf der Oberfläche vorliegen können und zum Binden verwendet werden können, können Carbonsäuren, Aldehyde, Aminogruppen, Cyanogruppen, ethylenische Gruppen, Hydroxylgruppen, Mercaptogruppen und dergleichen umfassen. Die Art und Weise der Bindung einer breiten Vielfalt von Verbindungen an verschiedene Oberflächen ist gut bekannt und ist in der Literatur reichlich erläutert. Siehe beispielsweise Immobilized Enzymes, Ichiro Chibata, Halsted Press, New York, 1978, und Cuatrecasas, J. Biol. Chem. 245 3059 (1970).

[0079] Zusätzlich zur kovalenten Bindung können verschiedene Verfahren zum nicht-kovalenten Binden einer Testverbindung verwendet werden. Nicht-kovalentes Binden ist typischerweise eine nicht-spezifische Absorption einer Verbindung an der Oberfläche. Typischerweise wird die Oberfläche mit einer zweiten Verbindung blockiert, um das nicht-spezifische Binden von markierten Testverbindungen zu verhindern. Alternativ ist die Oberfläche derart ausgelegt, daß sie eine Verbindung nicht-spezifisch bindet, aber eine andere nicht signifikant bindet. Eine Oberfläche, die ein Lectin wie z. B. Concanavalin A trägt, bindet beispielsweise eine Kohlenhydrat

enthaltende Verbindung, aber kein markiertes Protein, dem Glycosylierung fehlt. Verschiedene feste Oberflächen zur Verwendung beim nicht-kovalenten Binden von Testkomponenten sind in US-Patent Nrn. 4 447 576 und 4 254 082 besprochen.

II. Abzielen von Effektormolekülen auf Mesothelin

[0080] Diese Erfindung stellt auch Zusammensetzungen und Verfahren zum Nachweisen der Anwesenheit oder Abwesenheit von Tumorzellen, die Mesothelin tragen, bereit. Diese Verfahren beinhalten die Bereitstellung eines chimären Moleküls, das ein Effektormolekül umfaßt, das heißt einen nachweisbaren Marker, der an ein Zielmolekül gebunden ist, das Mesothelin spezifisch bindet. Der auf Mesothelin abzielende Anteil bindet das chimäre Molekül spezifisch an Tumorzellen, die dann durch ihre Verbindung mit dem nachweisbaren Marker markiert werden. Der anschließende Nachweis des mit der Zelle verbundenen Markers weist auf die Anwesenheit einer Tumorzelle hin.

[0081] In noch einem weiteren Ausführungsbeispiel kann das Effektormolekül ein anderer spezifisch bindender Anteil wie z. B. ein Antikörper, ein Wachstumsfaktor oder ein Ligand sein. Das chimäre Molekül wirkt dann als hochspezifischer bifunktionaler Linker. Dieser Linker kann zum Binden und Verstärken der Wechselwirkung zwischen Zellen oder Zellenkomponenten, an die das Fusionsprotein bindet, wirken. Wenn beispielsweise die "Ziel"-Komponente des chimären Moleküls ein Polypeptid umfaßt, das spezifisch an Mesothelin bindet, und die "Effektor"-Komponente ein Antikörper oder Antikörperfragment (z. B. ein Fv-Fragment eines Antikörpers) ist, bindet die Zielkomponente somit spezifisch Krebszellen, während die Effektorkomponente das Zellenwachstum hemmt oder zum Verstärken und Richten einer Immunreaktion in Richtung von Zielkrebszellen wirken kann.

[0082] In noch einem weiteren bevorzugten Ausführungsbeispiel kann das Effektormolekül ein pharmakologisches Mittel (z. B. ein Arzneimittel) oder ein Träger, der ein pharmakologisches Mittel enthält, sein. Somit kann der Anteil, der spezifisch an Mesothelin bindet, an ein Arzneimittel wie z. B. Vinblastin, Doxorubicin, Genistein (ein Tyrosinkinase-Inhibitor), ein Gegensinn-Molekül und andere pharmakologische Mittel, die Fachleuten bekannt sind, konjugiert werden, wodurch das pharmakologische Mittel spezifisch auf Tumorzellen abgezielt wird.

[0083] Alternativ kann das Zielmolekül an einen Träger gebunden werden, der die therapeutische Zusammensetzung enthält. Solche Träger umfassen, sind jedoch nicht begrenzt auf Liposomen, Mizellen, verschiedene synthetische Kügelchen und dergleichen.

[0084] Ein Fachmann wird erkennen, daß die chimären Moleküle der vorliegenden Erfindung mehrere Zielanteile umfassen können, die an einen einzelnen Effektor gebunden sind, oder im Gegenteil mehrere Effektormoleküle, die an einen einzelnen Zielanteil gebunden sind. In noch anderen Ausführungsbeispielen können die chimären Moleküle sowohl mehrere Zielanteile als auch mehrere Effektormoleküle umfassen. Diese Erfindung stellt somit beispielsweise "doppelt abgezielte" zytotoxische chimäre Moleküle bereit, bei denen das Zielmolekül, das spezifisch an Mesothelin bindet, an ein zytotoxisches Molekül gebunden ist, und ein anderes Molekül (z. B. ein Antikörper oder ein anderer Ligand) an das andere Ende des Toxins gebunden ist. Ein solches doppelt abgezieltes Zytotoxin könnte einen Wachstumsfaktor umfassen, der beispielsweise am Aminoende eines PE und Anti-Tac (Fv), das in die Domäne III zwischen der Aminosäure 604 und 609 eingefügt ist, gegen die Domäne Ia ausgetauscht ist. Andere Antikörper können auch geeignet sein.

A. Das Zielmolekül

[0085] In einem bevorzugten Ausführungsbeispiel ist das Zielmolekül ein Molekül, das spezifisch an Mesothelin bindet. Eine Vielfalt von Immuntestformaten können verwendet werden, um geeignete Antikörper auszuwählen, und sind vorstehend erörtert.

B. Das Effektormolekül

[0086] Wie vorstehend beschrieben, kann die Effektormolekülkomponente der chimären Moleküle dieser Erfindung ein beliebiges Molekül sein, dessen Aktivität erwünscht ist, um es an Zellen abzugeben, die Mesothelin exprimieren. Besonders bevorzugte Effektormoleküle umfassen Zytotoxine wie z. B. PE oder DT, Radionuklide, Liganden wie z. B. Wachstumsfaktoren, Antikörper, nachweisbare Marker wie z. B. Fluoreszenz- oder radioaktive Marker und therapeutische Zusammensetzungen wie z. B. Liposomen und verschiedene Arzneimittel.

I. Zytotoxine

[0087] Besonders bevorzugte Zytotoxine umfassen Pseudomonasexotoxine, Diphtherietoxine, Ricin und Ab-

rin. Pseudomonasexotoxin und Diphtherietoxin sind am meisten bevorzugt.

(a) Pseudomonasexotoxin (PE)

[0088] Pseudomonasexotoxin A (PE) ist ein äußerst aktives Monomerprotein (Molekulargewicht 66 kD), das von *Pseudomonas aeruginosa* abgesondert wird, welches die Proteinsynthese in eukaryotischen Zellen durch die Inaktivierung des Elongationsfaktors 2 (EF-2) durch Katalysieren seiner ADP-Ribosylierung (Katalysieren der Übertragung des ADP-Ribosylanteils von oxidiertem NAD auf EF-2) hemmt.

[0089] Das Toxin enthält drei Strukturdomänen, die gemeinsam wirken, um Zytotoxizität zu verursachen. Die Domäne Ia (Aminosäuren 1–252) vermittelt die Zellenbindung. Die Domäne II (Aminosäuren 253–364) ist für die Translokation in das Cytosol verantwortlich und die Domäne III (Aminosäuren 400–613) vermittelt die ADP-Ribosylierung des Elongationsfaktors 2, welcher das Protein inaktiviert und Zelltod verursacht. Die Funktion der Domäne Ib (Aminosäuren 365–399) bleibt undefiniert, obwohl ein großer Teil von ihr, die Aminosäuren 365–380, ohne Verlust der Zytotoxizität deletiert werden können. Siehe Siegall et al., J. Biol. Chem. 264: 14256–14261 (1989), welches durch den Hinweis hierin aufgenommen wird.

[0090] Wenn das Zielmolekül mit PE fusioniert ist, ist ein bevorzugtes PE-Molekül eines, in dem die Domäne Ia (Aminosäuren 1 bis 252) deletiert ist und die Aminosäuren 365 bis 380 aus der Domäne Ib deletiert wurden. Die gesamte Domäne Ib und ein Teil von Domäne II (Aminosäuren 350 bis 394) können jedoch deletiert sein, insbesondere wenn die deletierten Sequenzen gegen ein Verbindungspeptid wie z. B. GGGGS [SEQ. ID. NR. 3] ausgetauscht sind.

[0091] Außerdem können die PE-Moleküle unter Verwendung von ortsspezifischer Mutagenese oder anderen auf dem Fachgebiet bekannten Verfahren weiter modifiziert werden, um das Molekül für eine spezielle gewünschte Anwendung zu verändern. Mittel zum Verändern des PE-Moleküls in einer Weise, die sich auf die funktionalen Vorteile, die von den hier beschriebenen PE-Molekülen bereitgestellt werden, nicht wesentlich auswirkt, können auch verwendet werden und solche resultierenden Moleküle sollen hierin erfaßt werden.

[0092] Für maximale zytotoxische Eigenschaften eines bevorzugten PE-Moleküls sind verschiedene Modifikationen an dem Molekül empfohlen. Eine geeignete Carboxyl-endständige Sequenz für das rekombinante Molekül ist bevorzugt, um das Molekül in das Cytosol von Zielzellen zu verlagern. Aminosäuresequenzen, die als wirksam festgelegt wurden, umfassen REDLK [SEQ. ID. NR. 4] (wie in natürlichem PE), REDL [SEQ. ID. NR. 5], RDEL [SEQ. ID. NR. 6] oder KDEL [SEQ. ID. NR. 7], Wiederholungen von diesen oder andere Sequenzen, die funktionieren, um Proteine im endoplasmatischen Retikulum, das hier als "endoplasmatische Retentionssequenzen" bezeichnet wird, aufrechtzuerhalten oder zurückzuführen. Siehe beispielsweise Chaudhary et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 308–312, und Seetharam et al., J. Biol. Chem. 266: 17376–17381 (1991), und das allgemein erteilte USSN 07/459 635, eingereicht am 2. Januar 1990.

[0093] Deletionen der Aminosäuren 365–380 von Domäne Ib können ohne Verlust der Aktivität durchgeführt werden. Ferner können die Aminosäuren 1–279 deletiert werden, so daß das Toxin mit einem Methionin, gefolgt von Glycin in der Position 280, beginnt. Ein Serin kann in der Position 289 angeordnet werden, um die Bildung von unzuverlässigen Disulfidbindungen zu verhindern, was vorteilhaft ist. Das Zielmolekül kann als Austausch gegen die Domäne Ia eingefügt werden.

[0094] Bevorzugte Formen von PE enthalten die Aminosäuren 253–364 und 381–608 und ihnen folgen die natürlichen Sequenzen REDLK [SEQ. ID. NR. 4] oder die Mutantensequenzen KDEL [SEQ. ID. NR. 7] oder KDEL [SEQ. ID. NR. 6]. Lysine in den Positionen 590 und 606 können an Glutamin mutiert oder nicht mutiert sein.

[0095] Das Zielmolekül kann auch an einem Punkt innerhalb der Domäne III des PE-Moleküls eingefügt werden. Am meisten bevorzugt wird das Zielmolekül zwischen etwa den Aminosäurepositionen 607 und 609 des PE-Moleküls fusioniert. Dies bedeutet, daß das Zielmolekül nach etwa der Aminosäure 607 des Moleküls eingefügt wird und ein geeignetes Carboxylende von PE durch Anordnen der Aminosäuren etwa 604–613 von PE nach dem Zielmolekül erneut erzeugt wird. Somit wird das Zielmolekül innerhalb des rekombinanten PE-Moleküls nach etwa Aminosäure 607 eingefügt und ihm folgen die Aminosäuren 604–613 von Domäne III. Das Zielmolekül kann auch in die Domäne Ib eingefügt werden, um Sequenzen zu ersetzen, die für die Toxizität nicht erforderlich sind. Debinski, et al., Mol. Cell. Biol., 11: 1751–1753 (1991).

[0096] Verfahren zum Klonen von Genen, die PE codieren, das mit verschiedenen Liganden fusioniert ist, sind Fachleuten gut bekannt. Siehe beispielsweise Siegall et al., FASEB J., 3: 2647–2652 (1989); Chaudhary et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 4538–4542 (1987).

[0097] Fachleute werden erkennen, daß zusätzliche Modifikationen, Deletionen, Insertionen und dergleichen an den chimären Molekülen der vorliegenden Erfindung oder an den Nukleinsäuresequenzen, die auf Mesothelin gerichtete chimäre Moleküle codieren, vorgenommen werden können. Alle solchen Konstruktionen können durch Verfahren der Gentechnik, die Fachleuten gut bekannt sind, durchgeführt werden (siehe im allgemeinen Sambrook et al., oben) und können Proteine erzeugen, die unterschiedliche Eigenschaften der Affinität, Spezifität, Stabilität und Toxizität aufweisen, die sie für verschiedene klinische und biologische Anwendun-

gen besonders geeignet machen.

(b) Diphtherietoxin (DT)

[0098] Wie PE tötet das Diphtherietoxin (DT) Zellen durch den ADP-Ribosylierungs-Elongationsfaktor 2 ab, wodurch die Proteinsynthese gehemmt wird. Diphtherietoxin ist jedoch in zwei Ketten A und B unterteilt, die durch eine Disulfidbrücke verbunden sind. Im Gegensatz zu PE ist die Kette B von DT, die sich am Carboxylende befindet, für die Rezeptorbindung verantwortlich und die Kette A, die sich am Aminoende befindet, enthält die enzymatische Aktivität (Uchida et al., Science, 175: 901–903 (1972); Uchida et al. J. Biol. Chem., 248: 3838–3844 (1973)).

[0099] In einem bevorzugten Ausführungsbeispiel weisen die Zielmolekül-Diphtherietoxin-Fusionsproteine dieser Erfindung die natürliche Rezeptorbindungsdomäne auf, die durch Abschneiden der Diphtherietoxinkette B entfernt wird. Besonders bevorzugt ist DT388, ein DT, in dem die Carboxylendständige Sequenz, die am Rest 389 beginnt, entfernt ist. Chaudhary, et al., Bioch. Biophys. Res. Comm., 180: 545–551 (1991).

[0100] Wie die chimären PE-Zytotoxine können die DT-Moleküle chemisch an ein Mesothelin-Zielmolekül konjugiert sein, aber in einem bevorzugten Ausführungsbeispiel wird das Zielmolekül mit dem Diphtherietoxin durch ein rekombinantes Mittel fusioniert. Die Proteinketten codierenden Gene können in cDNA oder in genomischer Form durch ein beliebiges Fachleuten bekanntes Klonverfahren geklont werden. Verfahren zum Klonen von Genen, die DT codieren, das mit verschiedenen Liganden fusioniert ist, sind auch Fachleuten gut bekannt. Siehe beispielsweise Williams et al., J. Biol. Chem. 265: 11885–11889 (1990), und die gleichzeitig angehängte Patentanmeldung (USSN 07/620 939), die die Expression einer Anzahl von Wachstumsfaktor-DT-Fusionsproteinen beschreiben.

[0101] Der Begriff "Diphtherietoxin" (DT), wie hierin verwendet, bezieht sich auf natürliches DT mit voller Länge oder ein DT, das modifiziert wurde. Modifikationen umfassen typischerweise die Entfernung der Zieldomäne in der B-Kette und beinhalten insbesondere Beschneidungen des Carboxylbereichs der B-Kette.

[0102] Nachweisbare Marker, die für die Verwendung als Effektormolekülkomponente der chimären Moleküle dieser Erfindung geeignet sind, umfassen eine beliebige Zusammensetzung, die durch spektroskopische, photochemische, biochemische, immunochemische, elektrische, optische oder chemische Mittel, alle wie vorstehend beschrieben, nachweisbar ist.

C. Bindung des Zielmoleküls an das Effektormolekül

[0103] Ein Fachmann wird erkennen, daß das Zielmolekül und die Effektormoleküle in einer beliebigen Reihenfolge miteinander verbunden werden können. Wenn das Zielmolekül ein Polypeptid ist, kann das Effektormolekül folglich entweder mit den Amino- oder Carboxyenden des Zielmoleküls verbunden werden. Das Zielmolekül kann auch mit einem internen Bereich des Effektormoleküls verbunden werden, oder im Gegenteil kann das Effektormolekül mit einer internen Stelle des Zielmoleküls verbunden werden, solange die Bindung die jeweiligen Aktivitäten der Moleküle nicht stört.

[0104] Das Zielmolekül und das Effektormolekül können durch ein beliebiges einer Anzahl von Fachleuten bekannten Mitteln gebunden werden. Typischerweise wird das Effektormolekül entweder direkt oder durch einen Linker (Spacer) an das Zielmolekül konjugiert. Wenn jedoch sowohl das Effektormolekül als auch das Zielmolekül Polypeptide sind, ist es bevorzugt, das chimäre Molekül als Ein-Ketten-Fusionsprotein rekombinant zu exprimieren.

D. Konjugation des Effektormoleküls an das Zielmolekül

[0105] In einem Ausführungsbeispiel wird das Zielmolekül chemisch an das Effektormolekül (z. B. ein Zytotoxin, ein Marker, ein Ligand oder ein Arzneimittel oder Liposom) konjugiert. Mittel zum chemischen Konjugieren von Molekülen sind Fachleuten gut bekannt.

[0106] Das Verfahren zum Binden eines Mittels an einen Antikörper oder anderes Polypeptid-Zielmolekül variieren gemäß der chemischen Struktur des Mittels. Polypeptide enthalten typischerweise eine Vielfalt von funktionalen Gruppen; z. B. Carbonsäure- (COOH) oder freie Amin- ($-NH_2$) Gruppen, die zur Reaktion mit einer geeigneten funktionalen Gruppe an einem Effektormolekül zur Verfügung stehen, um den Effektor daran zu binden.

[0107] Alternativ kann das Zielmolekül und/oder das Effektormolekül derivatisiert werden, um zusätzliche reaktive funktionale Gruppen freizulegen oder zu binden. Die Derivatisierung kann das Binden von irgendeinem einer Anzahl von Linkermolekülen wie z. B. diejenigen, die von Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois, erhältlich sind, beinhalten.

[0108] Ein "Linker", wie hierin verwendet, ist ein Molekül, das verwendet wird, um das Zielmolekül an das Effektormolekül zu binden. Der Linker ist in der Lage, kovalente Bindungen mit sowohl dem Zielmolekül als auch

dem Effektormolekül zu bilden. Geeignete Linker sind Fachleuten gut bekannt und umfassen, sind jedoch nicht begrenzt auf, gerad- oder verzweigt-kettige Kohlenstofflinker, heterocyclische Kohlenstofflinker oder Peptidlinker. Wenn das Zielmolekül und das Effektormolekül Polypeptide sind, können die Linker an die Bestandteilsamino-säuren durch ihre Seitengruppen (z. B. durch eine Disulfidbindung mit Cystein) gebunden werden. In einem bevorzugten Ausführungsbeispiel werden jedoch die Linker an die Alpha-Kohlenstoffamino- und Carboxylgruppen der endständigen Aminosäuren gebunden.

[0109] Ein bifunktionaler Linker mit einer funktionalen Gruppe, die mit einer Gruppe an einem speziellen Mittel reaktiv ist, und einer anderen Gruppe, die mit einem Antikörper reaktiv ist, kann verwendet werden, um das gewünschte Immunkonjugat zu bilden. Alternativ kann die Derivatisierung eine chemische Behandlung des Zielmoleküls beinhalten, z. B. eine Spaltung des Zuckeranteils eines Glycoprotein-Antikörpers mit Perjodat, um freie Aldehydgruppen zu erzeugen. Die freien Aldehydgruppen am Antikörper können mit freien Amin- oder Hydrazingruppen an einem Mittel zur Reaktion gebracht werden, um das Mittel daran zu binden. (Siehe US-Patent Nr. 4 671 958). Verfahren zur Erzeugung von freien Sulfhydrylgruppen an Polypeptid, wie z. B. Antikörper oder Antikörperfragmente, sind auch bekannt (siehe US-Pat. Nr. 4 659 839).

[0110] Viele Verfahren und Linkermoleküle zum Binden von verschiedenen Verbindungen, einschließlich Radionuklid-Metallchelate, Toxine und Arzneimittel, an Proteine wie z. B. Antikörper sind bekannt. Siehe beispielsweise Europäische Patentanmeldung Nr. 188 256; US-Patent Nrn. 4 671 958, 4 659 839, 4 414 148, 4 699 784; 4 680 338; 4 569 789; und 4 589 071; und Borlinghaus et al., Cancer Res. 47: 4071–4075 (1987). Insbesondere ist die Herstellung von verschiedenen Immunotoxinen innerhalb des Fachgebiets gut bekannt und ist beispielsweise in "Monoclonal Antibody-Toxin Conjugates: Aiming the Magic Bullet", Thorpe et al., Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine, Academic Press, S. 168–190 (1982), Waldmann, Science, 252: 1657 (1991), US-Patent Nrn. 4 545 985 und 4 894 443, zu finden.

[0111] Unter einigen Umständen ist es erwünscht, das Effektormolekül vom Zielmolekül zu befreien, wenn das chimäre Molekül seine Zielstelle erreicht hat. Daher können chimäre Konjugate mit Bindungen, die in der Nähe der Zielstelle spaltbar sind, verwendet werden, wenn der Effektor an der Zielstelle freigesetzt werden soll. Das Spalten der Bindung, um das Mittel vom Antikörper freizusetzen, kann durch enzymatische Aktivität oder Bedingungen, denen das Immunkonjugat entweder innerhalb der Zielzelle oder in der Nähe der Zielstelle ausgesetzt wird, ausgelöst werden. Wenn die Zielstelle ein Tumor ist, kann ein Linker, der unter Bedingungen, die an der Tumorstelle vorhanden sind (z. B. wenn er tumorzugehörigen Enzymen oder einem sauren pH-Wert ausgesetzt ist), spaltbar ist, verwendet werden.

[0112] Eine Anzahl von verschiedenen spaltbaren Linkern sind Fachleuten bekannt. Siehe US-Pat. Nrn. 4 618 492; 4 542 225 und 4 625 014. Der Mechanismus zur Freisetzung eines Mittels aus diesen Linkergruppen umfaßt beispielsweise Bestrahlung einer photolabilen Bindung und säurekatalysierte Hydrolyse. Das US-Pat. Nr. 4 671 958 umfaßt beispielsweise eine Beschreibung von Immunokonjugaten mit Linkern, die an der Zielstelle in vivo durch die proteolytischen Enzyme des Komplementsystems des Patienten gespalten werden. Angesichts der großen Anzahl von Verfahren, die zum Binden einer Vielzahl von radiodiagnostischen Verbindungen, radiotherapeutischen Verbindungen, Arzneimitteln, Toxinen und anderen Mitteln an Antikörper berichtet wurden, kann ein Fachmann ein geeignetes Verfahren zum Binden eines gegebenen Mittels an einen Antikörper oder ein anderes Polypeptid bestimmen.

E. Herstellung von Fusionsproteinen

[0113] Wenn das Zielmolekül und/oder das Effektormolekül relativ kurz ist (d. h. weniger als etwa 50 Aminosäuren), können sie unter Verwendung von chemischen Standard-Peptidsyntheseverfahren synthetisiert werden. Wenn beide Moleküle relativ kurz sind, kann das chimäre Molekül als einzelnes benachbartes Polypeptid synthetisiert werden. Alternativ können das Zielmolekül und das Effektormolekül separat synthetisiert und dann durch Kondensation des Aminoendes von einem Molekül mit dem Carboxylende des anderen Moleküls fusioniert werden, wodurch eine Peptidbindung gebildet wird. Alternativ können das Ziel- und das Effektormolekül jeweils mit einem Ende eines Peptid-Spacermoleküls kondensiert werden, wodurch ein benachbartes Fusionsprotein gebildet wird.

[0114] Eine Festphasen-Synthese, bei der die C-endständige Aminosäure der Sequenz an einen unlöslichen Träger gebunden wird, gefolgt von sequentieller Zugabe der restlichen Aminosäuren in der Sequenz, ist das bevorzugte Verfahren für die chemische Synthese der Polypeptide dieser Erfindung. Verfahren für die Festphasen-Synthese sind von Barany und Merrifield, Solid-Phase Peptide Synthesis; S. 3–284 in The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology. Band 2: Special Methods in Peptide Synthesis, Teil A., Merrifield, et al. J. Am. Chem. Soc., 85: 2149–2156 (1963), und Stewart et al., Solid Phase Peptide Synthesis, 2. Ausg., Pierce Chem. Co., Rockford, Ill. (1984), beschrieben.

[0115] In einem bevorzugten Ausführungsbeispiel werden die chimären Fusionsproteine der vorliegenden Erfindung unter Verwendung von rekombinanter DNA-Methodologie synthetisiert. Im allgemeinen beinhaltet dies die Erzeugung einer DNA-Sequenz, die das Fusionsprotein codiert, das Anordnen der DNA in einer Expressi-

onskassette unter der Steuerung eines speziellen Promotors, Exprimieren des Proteins in einem Wirt, Isolieren des exprimierten Proteins und, falls erforderlich, Renaturieren des Proteins.

[0116] DNA, die die Fusionsproteine dieser Erfindung codiert, kann durch ein beliebiges geeignetes Verfahren hergestellt werden, einschließlich beispielsweise Klonen und Einschränken von entsprechenden Sequenzen oder direkte chemische Synthese durch Verfahren wie z. B. das Phosphotriester-Verfahren von Narang et al. Meth. Enzymol. 68: 90–99 (1979); das Phosphodiester-Verfahren von Brown et al., Meth. Enzymol. 68: 109–151 (1979); das Diethylphosphoramidit-Verfahren von Beaucage et al., Tetra. Lett., 22: 1859–1862 (1981); und das Verfahren mit festem Träger von US-Patent Nr. 4 458 066.

[0117] Die chemische Synthese erzeugt ein einzelsträngiges Oligonukleotid. Dieses kann durch Hybridisierung mit einer komplementären Sequenz oder durch Polymerisation mit einer DNA-Polymerase unter Verwendung des einzelnen Strangs als Schablone in doppelsträngige DNA umgewandelt werden. Ein Fachmann würde erkennen, daß, obwohl die chemische Synthese von DNA auf Sequenzen mit etwa 100 Basen begrenzt ist, längere Sequenzen durch die Ligation von kürzeren Sequenzen erhalten werden können.

[0118] Alternativ können Teilsequenzen geklont werden und die entsprechenden Teilsequenzen unter Verwendung von geeigneten Restriktionsenzymen gespalten werden. Die Fragmente können dann ligiert werden, um die gewünschte DNA-Sequenz zu erzeugen.

[0119] Obwohl die zwei Moleküle vorzugsweise im wesentlichen direkt aneinander gebunden sind, wird ein Fachmann erkennen, daß die Moleküle durch einen Peptid-Spacer, der aus einer oder mehreren Aminosäuren besteht, getrennt werden können. Im allgemeinen weist der Spacer keine andere spezifische biologische Aktivität als das Binden der Proteine oder das Bewahren eines gewissen minimalen Abstands oder einer anderen räumlichen Beziehung zwischen ihnen auf. Die Bestandteilsaminosäuren des Spacers können jedoch ausgewählt werden, um eine gewisse Eigenschaft des Moleküls zu beeinflussen, wie z. B. die Faltung, Nettoladung oder Hydrophobizität.

[0120] Die Nukleinsäuresequenzen, die die Fusionsproteine codieren, können in einer Vielfalt von Wirtszellen exprimiert werden, einschließlich E. coli, anderen bakteriellen Wirten, Hefe und verschiedenen höheren eukaryotischen Zellen, wie z. B. den COS-, CHO- und HeLa-Zelllinien und Myelomzelllinien. Das rekombinante Proteingemisch wird wirksam an geeignete Expressionssteuersequenzen für jeden Wirt gebunden. Für E. coli umfaßt dies eine Promotorstelle wie z. B. die T7-, trp- oder Lambda-Promotoren, eine Ribosombindungsstelle und vorzugsweise ein Transkriptionsterminationssignal. Für eukaryotische Zellen umfassen die Steuersequenzen einen Promotor und vorzugsweise einen Verstärker, der von Immunglobulinen, SV40, Cytomegalovirus usw. abgeleitet ist, und eine Polyadenylierungssequenz und kann Spleißdonor- und -akzeptorsequenzen umfassen.

[0121] Die Plasmide und Vektoren der Erfindung können in die gewählte Wirtszelle durch gut bekannte Verfahren wie z. B. Kalziumchloridtransformation für E. coli und Kalziumphosphatbehandlung oder Elektroporation für Säugerzellen überführt werden. Durch die Plasmide transformierte Zellen können durch Resistenz gegen Antibiotika, die durch Gene verliehen wird, die an den Plasmiden enthalten sind, wie z. B. die amp-, gpt-, neo- und hyg-Gene, ausgewählt werden.

[0122] Sobald sie exprimiert sind, können die rekombinanten Fusionsproteine gemäß Standardverfahren des Fachgebiets gereinigt werden, einschließlich Ammoniumsulfatausfällung, Affinitätsäulen, Säulenchromatographie, Gelelektrophorese und dergleichen (siehe im allgemeinen R. Scopes, Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y. (1982), Deutscher, Methods in Enzymology Band 182: Guide to Protein Purification., Academic Press, Inc. N.Y. (1990)). Im wesentlichen reine Zusammensetzungen mit mindestens etwa 90 bis 95% Homogenität sind bevorzugt, und 98 bis 99% oder mehr Homogenität sind für pharmazeutische Verwendungen am meisten bevorzugt. Sobald sie teilweise oder bis zu Homogenität gereinigt sind, wie erwünscht, können die Polypeptide dann therapeutisch verwendet werden.

III. Verabreichung von Zielmitteln für Mesothelin an Patienten

[0123] Therapeutische Mittel der vorliegenden Erfindung wie z. B. Antikörper für Mesothelin oder wie z. B. Antikörper oder andere Zielmoleküle, die an ein Effektormolekül gebunden sind, sollen in einer beliebigen geeigneten Weise, vorzugsweise mit pharmazeutisch verträglichen Trägern, verabreicht werden. Ein Fachmann wird erkennen, daß geeignete Verfahren zur Verabreichung solcher Verbindungen im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung an einen Patienten zur Verfügung stehen, und, obwohl mehr als ein Weg verwendet werden kann, um eine spezielle Verbindung zu verabreichen, ein spezieller Weg häufig eine unmittelbare und wirksamere Reaktion als ein anderer Weg bereitstellen kann. Es sollte erkannt werden, daß die Verabreichung von Peptiden für eine Vielfalt von Krankheiten gut bekannt ist und ein Fachmann die Information, die zur Verwendung von Peptiden zur Behandlung dieser anderen Krankheiten zur Verfügung steht, auf Mesothelinpeptide extrapolieren kann.

[0124] Pharmazeutisch verträgliche Träger sind Fachleuten auch gut bekannt. Die optimale Wahl des Trägers wird teilweise durch die spezielle Verbindung sowie durch das spezielle Verfahren, das zum Verabreichen der Verbindung verwendet wird, bestimmt. Folglich besteht eine breite Vielfalt von geeigneten Formulierungen der

pharmazeutischen Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung.

[0125] Antikörper können zu einer injizierbaren Zubereitung formuliert werden. Parenterale Formulierungen sind bekannt und sind zur Verwendung in der Erfindung, vorzugsweise zur i. m. oder i. v. Verabreichung, geeignet. Die Formulierungen, die therapeutisch wirksame Mengen von Antikörpern oder Immunotoxinen enthalten, sind entweder sterile wässrige Lösungen, flüssige Suspensionen oder lyophilisierte Versionen und enthalten wahlweise Stabilisatoren oder Exzipienten. Lyophilisierte Zusammensetzungen werden mit geeigneten Verdünnungsmitteln, z. B. Wasser zur Injektion, Salzlösung, 0,3% Glycin und, in einem Anteil von etwa 0,01 mg/kg des Wirtskörpergewichts bis 10 mg/kg, wenn geeignet, zur ursprünglichen Konzentration verdünnt. Typischerweise werden die pharmazeutischen Zusammensetzungen, die die Antikörper oder Immunotoxine enthalten, in einer therapeutisch wirksamen Dosis in einem Bereich von etwa 0,01 mg/kg bis etwa 5 mg/kg des behandelten Säugers verabreicht. Eine bevorzugte therapeutisch wirksame Dosis der pharmazeutischen Zusammensetzung, die den Antikörper oder das Immunotoxin enthält, liegt in einem Bereich von etwa 0,01 mg/kg bis etwa 0,5 mg/kg Körpergewicht des behandelten Säugers, welche über mehrere Tage bis zwei Wochen durch tägliche intravenöse Infusion, die jeweils über einen Zeitraum von einer Stunde gegeben wird, in einem sequentiellen Patienten-Dosiseskalationsschema verabreicht wird.

[0126] Der Antikörper kann systemisch durch Injektion i. m., subcutan, intrathekal oder intraperitoneal oder in Gefäßräume, insbesondere in die Bauchhöhle oder Brusthöhle, z. B. Injektion in einer Dosierung von mehr als etwa 1 µg/cm³ Fluid/Tag, verabreicht werden. Ein permanenter intrathekaler Katheter wäre ein zweckmäßiges Mittel zum Verabreichen von therapeutischen Antikörpern. Diese Dosis hängt von den Eigenschaften des verwendeten Antikörpers oder Immunotoxins, z. B. seiner biologischen Aktivität und biologischen Halbwertszeit, von der Konzentration des Antikörpers in der Formulierung, der Stelle und Dosierungsrate, der klinischen Toleranz des beteiligten Patienten, der Krankheit, an der der Patient leidet, und dergleichen, ab, wie es durchaus innerhalb der Fähigkeit des Arztes liegt.

[0127] Der Antikörper der vorliegenden Erfindung kann in Lösung verabreicht werden. Der pH-Wert der Lösung sollte im Bereich von pH 5 bis 9,5, vorzugsweise pH 6,5 bis 7,5 liegen. Der Antikörper oder Derivate davon sollten sich in einer Lösung mit einem geeigneten pharmazeutisch verträglichen Puffer wie z. B. Phosphat, Tris(hydroxymethyl)aminomethan-HCl oder Citrat oder dergleichen befinden. Die Pufferkonzentrationen sollten im Bereich von 1 bis 100 mM liegen. Die Lösung des Antikörpers kann auch ein Salz wie z. B. Natriumchlorid oder Kaliumchlorid in einer Konzentration von 50 bis 150 mM enthalten. Eine wirksame Menge eines Stabilisationsmittels wie z. B. ein Albumin, ein Globulin, eine Gelatine, ein Protamin oder ein Salz von Protamin kann auch enthalten sein und kann zu einer Antikörper oder Immunotoxin enthaltenden Lösung oder zu der Zusammensetzung, aus der die Lösung hergestellt wird, zugegeben werden. Der Antikörper oder das Immunotoxin kann auch über Mikrokügelchen, Liposomen oder andere Mikroteilchen-Abgabesysteme, die in bestimmten Geweben, einschließlich Blut, angeordnet sind, verabreicht werden.

Dosierungen

[0128] In therapeutischen Anwendungen variieren die Dosierungen von gemäß der Erfindung verwendeten Verbindungen in Abhängigkeit von der Klasse der Verbindung und dem behandelten Zustand. Das Alter, das Gewicht und der klinische Zustand des Empfängerpatienten; und die Erfahrung und Beurteilung des Klinikers oder praktischen Arztes, der die Therapie verordnet, liegen unter den Faktoren, die die ausgewählte Dosierung beeinflussen. Die Dosierung eines Immunglobulins kann beispielsweise im Bereich von etwa 0,1 Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht pro Tag bis etwa 10 mg/kg pro Tag für polyklonale Antikörper und etwa 5% bis e 20% dieser Menge für monoklonale Antikörper liegen. In einem solchen Fall kann das Immunglobulin einmal täglich als intravenöse Infusion verabreicht werden. Vorzugsweise wird die Dosierung täglich wiederholt, bis entweder ein therapeutisches Ergebnis erzielt wird oder bis Nebenwirkungen ein Absetzen der Therapie rechtfertigen. Im allgemeinen sollte die Dosis ausreichen, um Symptome oder Zeichen der Krankheit zu behandeln oder zu verbessern, ohne unannehmbare Toxizität für den Patienten zu erzeugen.

[0129] Eine therapeutisch wirksame Menge der Verbindung ist jene, die entweder eine subjektive Erleichterung von (einem) Symptomen) oder eine objektiv identifizierbare Verbesserung bereitstellt, wie z. B. die Hemmung des Tumorzellenwachstums, wie vom Kliniker oder von einem anderen qualifizierten Beobachter festgestellt. Der Dosierungsbereich variiert mit der verwendeten Verbindung, dem Verabreichungsweg und der Leistungsfähigkeit der speziellen Verbindung.

IV. Gentherapie und inhibitorische Nukleinsäuretherapeutika

[0130] Unter Verwendung der Nukleotidsequenzinformation dieser Erfindung kann ein Fachmann Strategien und Verfahren formulieren, um das Mesotheligen zu isolieren, die Genstruktur für die Funktion zu beschreiben, und kann auch spezifische Promotoren für bekannte oder unbekannte Transkriptionsfaktoren entdecken, die beim genetischen Eingriff von Mesotheliom- und Eierstockkrebsen von weiterem Wert sind. Analytische

- DNA-Sequenzanalyse von normalem Mesothelin in Mesothelzellen kann zu einer Entdeckung von Mutationen) des Gens in Mesotheliom- und Eierstockkrebsen führen.
- [0131] Mesothelin zeigt eine Haptogenität, die der Implantation der Mesotheliom- und Eierstockkrebsen zugeschrieben werden kann. Durch Einführen von Gegensinn-DNA oder Blockieren der Transkription des Mesothelins können neue Gentherapieschemen gemäß aktuellen Strategien der Gentherapie aufgestellt werden.
- [0132] Inhibitorische Nukleinsäuretherapeutika, die die Expression oder Aktivität des Mesothelins blockieren können, sind bei der Verlangsamung oder Hemmung von Mesotheliomen oder Eierstocktumoren oder anderen anomalen Zellen, die mit Mesothelin verbunden sind, nützlich. Inhibitorische Nukleinsäuren können einsträngige Nukleinsäuren sein, die spezifisch an eine komplementäre Nukleinsäuresequenz binden können. Durch Binden an die geeignete Zielsequenz wird ein RNA-RNA-, ein DNA-DNA- oder RNA-DNA-Duplex oder -Triplex gebildet. Die Nukleinsäuren werden häufig als "Gegensinn" bezeichnet, da sie gewöhnlich zur Richtung oder zum Codierstrang des Gens komplementär sind, obwohl in letzter Zeit Methoden zur Verwendung von "Sinn"-Nukleinsäuren auch entwickelt wurden. Der Begriff "inhibitorische Nukleinsäuren", wie hierin verwendet, bezieht sich auf sowohl "Sinn"- als auch "Gegensinn"-Nukleinsäuren.
- [0133] Durch Binden an die Zielnukleinsäure kann die inhibitorische Nukleinsäure die Funktion der Zielnukleinsäure hemmen. Dies könnte beispielsweise ein Ergebnis der Blockierung der DNA-Transkription, der Verabreichung oder Poly(A)-Addition zu mRNA, DNA-Replikation, Translation oder der Förderung von inhibitorischen Mechanismen der Zellen, wie z. B. Förderung des RNA-Abbaus, sein.
- [0134] Inhibitorische Nukleinsäureverfahren umfassen daher eine Anzahl von verschiedenen Methoden für das Ändern der Expression von beispielsweise einem Mesothelin. Diese verschiedenen Arten der Technologie der inhibitorischen Nukleinsäuren sind in Helene, C. und Toulme, J., 1990, *Biochim. Biophys. Acta.* 1049: 99–125, beschrieben, das nachstehend als "Helene und Toulme" bezeichnet wird.
- [0135] Kurz gesagt, können Therapiemethoden mit inhibitorischen Nukleinsäuren in jene, die auf DNA-Sequenzen abzielen, jene, die auf RNA-Sequenzen abzielen (einschließlich Vor-mRNA und mRNA), jene, die auf Proteine abzielen (Sinnstrangmethoden), und jene, die die Spaltung oder chemische Modifikation der Zielnukleinsäuren verursachen, klassifiziert werden.
- [0136] Methoden, die auf DNA abzielen, fallen in verschiedene Kategorien. Nukleinsäuren können dazu ausgelegt werden, an die Duplex-DNA zu binden, um eine Tripelhelix- oder "Triplex"-Struktur zu bilden. Alternativ werden inhibitorische Nukleinsäuren dazu ausgelegt, an Bereiche von einsträngiger DNA zu binden, die sich aus dem Öffnen der Duplex-DNA während der Replikation oder Transkription ergibt. Siehe Helene und Toulme.
- [0137] Üblicher werden inhibitorische Nukleinsäuren dazu ausgelegt, an mRNA oder mRNA-Vorstufen zu binden. Inhibitorische Nukleinsäuren werden verwendet, um die Reifung von Vor-mRNA zu verhindern. Inhibitorische Nukleinsäuren können dazu ausgelegt werden, die RNA-Reifung, -Spleißung oder -Translation zu stören.
- [0138] Die inhibitorischen Nukleinsäuren können auf mRNA abgezielt werden. In dieser Methode werden die inhibitorischen Nukleinsäuren dazu ausgelegt, die Translation des codierten Proteins spezifisch zu blockieren. Unter Verwendung dieser Methode kann die inhibitorische Nukleinsäure verwendet werden, um bestimmte Zellenfunktionen durch Hemmung der Translation von mRNA, die kritische Proteine codiert, selektiv zu unterdrücken. Eine inhibitorische Nukleinsäure, die zu Bereichen von c-myc-mRNA komplementär ist, hemmt beispielsweise die c-myc-Proteinexpression in einer menschlichen promyelozytischen Leukämiezelllinie HL60, die das c-myc-Protoonkogen überexprimiert. Siehe Wickstrom E. L., et al., 1988, *PNAS (USA)* 85: 1028–1032, und Harel-Bellan, A., et al., 1988, *Exp. Med.* 168: 2309–2318. Wie in Helene und Toulme beschrieben, wurde gezeigt, daß das Abzielen von inhibitorischen Nukleinsäuren auf mRNA durch mehrere verschiedene Mechanismen funktioniert, um die Translation des (der) codierten Proteins (Proteine) zu hemmen.
- [0139] Die in die Zelle eingeführten inhibitorischen Nukleinsäuren können auch den "Sinn"-Strang des Gens oder der mRNA umfassen, um die Enzyme oder Bindungsproteine, die an der mRNA-Translation beteiligt sind, aufzunehmen oder um diese zu konkurrieren. Siehe Helene und Toulme.
- [0140] Schließlich können die inhibitorischen Nukleinsäuren verwendet werden, um eine chemische Inaktivierung oder Spaltung der Zielgene oder -mRNA zu induzieren. Die chemische Inaktivierung kann durch die Einführung von Vernetzungen zwischen der inhibitorischen Nukleinsäure und der Zielnukleinsäure innerhalb der Zelle auftreten. Andere chemischen Modifikationen der Zielnukleinsäuren, die durch geeignet derivatisierte inhibitorische Nukleinsäuren induziert werden, können auch verwendet werden.
- [0141] Spaltung und daher Inaktivierung der Zielnukleinsäuren kann durch Binden eines Substituenten an die inhibitorische Nukleinsäure, die aktiviert werden kann, um Spaltungsreaktionen zu induzieren, durchgeführt werden. Der Substituent kann einer sein, der entweder chemische oder enzymatische Spaltung bewirkt. Alternativ kann die Spaltung durch die Verwendung von Ribozymen oder katalytischer RNA induziert werden. In dieser Methode würden die inhibitorischen Nukleinsäuren entweder natürlich vorkommende RNA (Ribozymen) oder synthetische Nukleinsäuren mit katalytischer Aktivität umfassen.
- [0142] Das Abzielen von inhibitorischen Nukleinsäuren auf spezifische Zellen des Immunsystems durch Konjugation mit Zielanteilen, die Rezeptoren auf der Oberfläche dieser Zellen binden, kann für alle der obigen For-

men der Therapie mit inhibitorischen Nukleinsäuren verwendet werden. Diese Erfindung umfaßt alle Formen der Therapie mit inhibitorischen Nukleinsäuren, wie vorstehend beschrieben und wie in Helene und Toulme beschrieben.

[0143] Diese Erfindung betrifft das Abzielen von inhibitorischen Nukleinsäuren auf Sequenzen von Mesothelin zur Verwendung beim Hemmen oder Verlangsamen des Wachstums von Tumoren, die mit Mesothelin verbunden sind. Ein mit der Therapie mit inhibitorischen Nukleinsäuren verbundenes Problem ist die wirksame Abgabe der inhibitorischen Nukleinsäure an die Zielzelle in vivo und die anschließende Internalisierung der inhibitorischen Nukleinsäure durch diese Zelle. Die Abgabe kann jedoch durch Binden der inhibitorischen Nukleinsäure an einen Zielanteil, um ein Konjugat zu bilden, das an einen spezifischen Rezeptor auf der Oberfläche der infizierten Zielzelle bindet und das nach dem Binden internalisiert wird, durchgeführt werden. Vorzugsweise wird die inhibitorische Nukleinsäure an die Bauchhöhle, die Brusthöhle sowie irgendeinen anderen Ort abgegeben, an dem Zellen, die Mesothelin tragen, von Interesse sind.

[0144] Die Gentherapie kann auch genetische Defekte durch Einfügen von exogenen zellulären Genen, die eine gewünschte Funktion codieren, in Zellen, denen diese Funktion fehlt, korrigieren, so daß die Expression des exogenen Gens a) einen genetischen Effekt korrigiert oder b) die Zerstörung von Zellen, die genetisch defekt sind, verursacht. Verfahren zur Gentherapie sind auf dem Fachgebiet gut bekannt, siehe beispielsweise Lu, M., et al. (1994), Human Gene Therapy 5: 203; Smith, C. (1992), J. Hematotherapy 1: 155; Cassel, A. et al. (1993), Exp. Hematol. 21: 585 (1993); Larrick, J. W. und Burck, K. L., GENE THERAPY: APPLICATION OF MOLECULAR BIOLOGY, Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, New York (1991), und Kreigler, M. GENE TRANSFER AND EXPRESSION: A LABORATORY MANUAL, W. H. Freeman and Company, New York (1990). Eine Modalität der Gentherapie beinhaltet (a) das Erhalten einer lebensfähigen Probe von primären Zellen eines speziellen Zelltyps von einem Patienten; (b) Einführen eines Nukleinsäuresegments, das ein gewünschtes Genprodukt codiert, in diese primären Zellen; (c) Identifizieren und Isolieren von Zellen und Zelllinien, die das Genprodukt exprimieren; (d) erneutes Einführen von Zellen, die das Genprodukt exprimieren; (e) Entfernen einer aliquoten Menge von Gewebe mit Zellen, die sich aus Schritt c ergeben, und ihrer Nachkommenschaft aus dem Patienten; und (f) Bestimmen der Menge der Zellen, die sich aus Schritt c ergeben, und ihrer Nachkommenschaft in der aliquoten Menge. Die Einführung eines Vektors, der eine Sequenz (für ein "gewünschtes Genprodukt") codiert, welche die Mesothelinexpression oder -aktivität blockiert, in Zellen in Schritt (b) kann beim Hemmen oder Verlangsamen des Wachstums von Tumorzellen, die mit Mesothelin verbunden sind, nützlich sein.

V. Impfstoffentwicklung

Impfstoffentwicklung unter Verwendung einer Mesothelinamino-säuresequenz

[0145] Substanzen, die für die Verwendung als Impfstoffe für die Verhinderung und das Hemmung des Wachstums von Tumoren, die Mesothelin tragen, geeignet sind und Verfahren zur Verabreichung derselben können verwendet werden. Die Impfstoffe sind gegen Mesothelin gerichtet. Vorzugsweise umfassen die Impfstoffe von Mesothelin abgeleitetes Antigen.

[0146] Impfstoffe können rekombinant hergestellt werden. Typischerweise umfaßt ein Impfstoff etwa 1 bis etwa 50 Mikrogramm Antigen oder Antigenprotein oder -peptid. Bevorzugter beträgt die Menge an Protein etwa 15 bis etwa 45 Mikrogramm. Typischerweise wird der Impfstoff so formuliert, daß die Dosis etwa 0,5 Milliliter umfaßt. Der Impfstoff kann durch einen beliebigen auf dem Fachgebiet bekannten Weg verabreicht werden. Vorzugsweise ist der Weg intraperitoneal oder parenteral.

[0147] Es gibt eine Anzahl von Strategien zum Verstärken der Wirksamkeit eines Antigens, insbesondere in Zusammenhang mit dem Fachgebiet von Impfstoffen. Die Zyklisierung oder Zirkularisierung eines Peptids kann beispielsweise das Antigen- und immunogene Leistungsvermögen des Peptids steigern. Siehe US-Patent Nr. 5 001 049. Üblicher kann ein Antigen an einen geeigneten Träger, gewöhnlich ein Proteinmolekül, konjugiert werden. Dieses Verfahren hat mehrere Facetten. Es kann ermöglichen, daß mehrere Kopien eines Antigens wie z. B. eines Peptids an ein einzelnes größeres Trägermolekül konjugiert werden. Außerdem kann der Träger Eigenschaften besitzen, die den Transport, die Bindung, die Absorption oder die Übertragung des Antigens erleichtern.

[0148] Zur parenteralen Verabreichung sind Beispiele von geeigneten Trägern das Tetanustoxoid, das Diphtherietoxoid, Serumalbumin und Lamprey- oder Schlüssellochhaft-Hemocyanin, da sie das resultierende Konjugat mit minimaler genetischer Restriktion bereitstellen. Konjugate mit diesen universellen Trägern können als T-Zellen-Klonaktivatoren in Individuen mit sehr unterschiedlichen Gensätzen funktionieren.

[0149] Die Konjugation zwischen einem Peptid und einem Träger kann unter Verwendung von einem der auf dem Fachgebiet bekannten Verfahren durchgeführt werden. Insbesondere kann die Konjugation bifunktionale Quervernetzer als Bindemittel verwenden, wie beispielsweise von Means und Feeney, "A recent review of protein modification techniques", Bioconjugate Chem. 1: 2-12 (1990), detailliert dargestellt.

[0150] Das Antigen kann mit verschiedenen Lösungen und anderen Verbindungen, wie es auf dem Fachgebiet bekannt ist, kombiniert oder vermischt werden. Es kann beispielsweise in Wasser, Salzlösung oder gepufferten Trägern mit oder ohne verschiedene Hilfsmittel oder immunverdünnende Mittel verabreicht werden. Beispiele solcher Hilfsmittel oder Mittel umfassen Aluminiumhydroxid, Aluminiumphosphat, Aluminiumkaliumsulfat (Alum), Berylliumsulfat, Siliziumdioxid, Kaolin, Kohlenstoff, Wasser-in-Öl-Emulsionen, Öl-in-Wasser-Emulsionen, Muramyl-dipeptid, bakterielles Endotoxin, Lipid X, *Corynebacterium parvum* (*Propionibacterium acnes*), *Bordetella pertussis*, Polyribonukleotide, Natriumalginat, Lanolin, Lysolecithin, Vitamin A, Saponin, Liposomen, Levamisol, DEAE-Dextran, blockierte Copolymere oder andere synthetische Hilfsmittel.

[0151] Solche Hilfsmittel sind von verschiedenen Quellen kommerziell erhältlich, beispielsweise Merck Adjuvant 65 (Merck and Company, Inc., Rahway, N.J.) oder Freund's Incomplete Adjuvant und Complete Adjuvant (Difco Laboratories, Detroit, Michigan). Andere geeignete Hilfsmittel sind Amphigen (Öl-in-Wasser), Alhydrogel (Aluminiumhydroxid) oder ein Gemisch von Amphigen und Alhydrogel. Nur Aluminium ist für die menschliche Verwendung anerkannt.

[0152] Der Anteil des Antigens und Hilfsmittels kann über einen breiten Bereich verändert werden, solange beide in wirksamen Mengen vorliegen. Aluminiumhydroxid kann beispielsweise in einer Menge von etwa 0,5% des Impfstoffgemisches (Al_2O_3 -Basis) vorliegen. Auf einer Basis pro Dosis kann die Menge des Antigens im Bereich von etwa 0,1 µg bis etwa 100 µg Protein pro Patient liegen. Ein bevorzugter Bereich ist etwa 1 µg bis etwa 50 µg pro Dosis. Ein bevorzugter Bereich ist etwa 15 µg bis etwa 45 µg. Eine geeignete Dosisgröße ist etwa 0,5 ml. Nach der Formulierung kann der Impfstoff in einen sterilen Behälter integriert werden, der dann abgedichtet und bei einer niedrigen Temperatur, beispielsweise 4°C, gelagert wird, oder er kann gefriergetrocknet werden. Lyophilisierung ermöglicht eine Langzeitlagerung in einer stabilisierten Form.

[0153] Die Behandlung kann aus einer einzelnen Dosis Impfstoff oder einer Vielzahl von Dosen über einen Zeitraum bestehen. Es ist bevorzugt, daß die Dosen an einen Patienten gegeben werden, bei dem der Verdacht besteht, daß er Mesothelin tragende Tumorzellen aufweist. Das Antigen der Erfindung kann mit geeigneten Dosen von Verbindungen, einschließlich Grippeantigenen, wie z. B. Antigenen der Grippe Typ A, kombiniert werden. Das Antigen könnte auch eine Komponente eines rekombinanten Impfstoffs sein, der zur oralen Verabreichung anpaßbar sein könnte.

[0154] Die Impfstoffe der Erfindung können mit anderen Impfstoffen für andere Krankheiten kombiniert werden, um mehrwertige Impfstoffe herzustellen. Eine pharmazeutisch wirksame Menge des Antigens kann mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger wie z. B. einem Protein oder Verdünnungsmittel, das für die Impfung von Säugern, insbesondere Menschen, nützlich ist, verwendet werden. Andere Impfstoffe können gemäß Verfahren hergestellt werden, die Fachleuten gut bekannt sind.

[0155] Fachleute werden leicht erkennen, daß es nur erforderlich ist, einen Säuger geeigneten Epitopen auszusetzen, um einen effektiven Immunschutz hervorzurufen. Die Epitope sind typischerweise Segmente von Aminosäuren, die ein kleiner Teil des ganzen Proteins sind. Unter Verwendung von rekombinanter Genetik ist es Routine, die primäre Struktur eines natürlichen Proteins zu verändern, um Derivate zu erzeugen, die Epitope umfassen, die zu den natürlich vorkommenden Epitopen identisch oder im wesentlichen dieselben sind (immunologisch äquivalent zu diesen). Solche Derivate können Peptidfragmente, Aminosäuresubstitutionen, Aminosäuredeletionen und Aminosäureadditionen innerhalb der Aminosäuresequenz für Mesothelin umfassen. Es ist auf dem Proteinfachgebiet beispielsweise bekannt, daß bestimmte Aminosäurereste gegen Aminosäuren mit ähnlicher Größe und Polarität ohne eine unzulässige Wirkung auf die biologische Aktivität des Proteins ausgetauscht werden können.

[0156] Unter Verwendung der Mesothelinamino-säuresequenz-Information kann ein Fachmann eine Epitopkartierung gegen Seren durchführen, die aus Patienten mit Eierstockkrebsen oder Mesotheliomen isoliert werden. Relativ starke Epitope können identifiziert werden und (ein) übliches Epitope kann (können) auch erkannt werden. Die Epitopkartierung gegen menschliche Seren kann auch auf eine Selektion von Epitop-Peptiden gegen aktivierte menschliche Lymphozyten erweitert werden, um potentielle T-Zellen-Epitope zu identifizieren. Theoretisch ist es nicht wahrscheinlich, daß T-Zellen-Epitope von Mesothelin in menschlichen T-Zellen gefunden werden, sondern Mutationen, die in Mesothelin induziert werden, können neue Epitope erzeugen, die von T-Zellen erkannt werden können. Mutantes Mesothelin kann leicht willkürlich unter Verwendung eines Phagendisplayverfahrens erzeugt werden. Die resultierende Bibliothek wird durch menschliche Seren von Patienten, die unter einem bösartigen Mesotheliom oder Eierstockkrebs leiden, selektiert. Somit können geeignete Antigenpeptide für von Mesothelin abgeleitete Impfstoffe identifiziert werden.

VI. Kits

[0157] Diese Erfindung umfaßt ferner Diagnosekits für den Nachweis der Anwesenheit von Mesothelin in Gewebeproben oder in Serum mit einem Behälter mit einer Nukleinsäure oder einem Antikörper oder einem anderen Zielmittel, das für Mesothelin spezifisch ist, und mit Instruktionsmaterial für den Nachweis von Mesothelin.

[0158] Obwohl die vorangehende Erfindung anhand von Erläuterung und Beispiel für Zwecke der Deutlichkeit des Verständnisses in gewissem Detail beschrieben wurde, ist es für übliche Fachleute angesichts der Lehren dieser Erfindung leicht ersichtlich, daß gewisse Änderungen und Modifikationen an dieser vorgenommen werden können, ohne vom Schutzbereich der beigefügten Ansprüche abzuweichen.

VI. Modelle für die Auswertung von Therapien, die auf Mesothelin gerichtet sind

[0159] Die Mesothelin-cDNA kann in etablierte Tumorzelllinien transfiziert werden, wo sie das Protein exprimiert. Die transfizierten Zelllinien können verwendet werden, um Tumore in Mäusen oder anderen Säugern zu züchten, um ein Modell zum Testen von Therapien, die auf die Kontrolle, das Unterdrücken oder Regulieren der Mesothelinexpression gerichtet sind, bereitzustellen. Transfizierte Tumorzelllinien können in den Testsäuger transplantiert werden. Der Säuger kann dann einem interessierenden Arzneimittel ausgesetzt werden und die anschließende Tumorzellenaktivität kann überwacht werden, um festzustellen, ob das interessierende Arzneimittel Anti-Tumor-Effekte aufweist. Tumorzelllinien, die als besonders gute Kandidaten für dieses Verfahren festgestellt wurden, umfassen Maus-NIH-3T3-Zellen (tumorerzeugende Zelllinien), menschliche A431-Eierstocktumorzellen und MCF-7-Brusttumorzellen, menschliche A2780-Eierstocktumorzellen und menschliche OVCAR-3-Epidermoidkarzinomzellen.

Beispiele

A. Materialien und Verfahren

1. Zellen und Antikörper. Die menschliche Eierstock-Tumorzelllinie OVCAR-3 und die Zelllinien A431, KB, MCF-7, COS-1, WI-38 und NIH 3T3 wurden aus den American Type Culture Collections (ATCC, Rockville, Maryland) erhalten. Die Zellen wurden entweder in RPMI 1640 oder DMEM-Medien (GIBCO Laboratories, Grand Island, NY) kultiviert, mit L-Glutamin (2 mM), Penicillin (50 µg/ml), Streptomycin (50 Einheiten/ml) und 5–10% fötalem Rinderserum (GIBCO) ergänzt. NIH-3T3-Transfektanten wurden in DMEM mit 0,8 mg/ml von G418 (GIBCO) gezüchtet. Die Zellen wurden verwendet, als sie nach dreimaligem Waschen mit eiskaltem PBS (GIBCO) 80–90% Konfluenz erreichten. MAb K1 und Antikörper MOPC-21 wurden beschrieben (Chang, K., et al., *Int. J. Cancer* 50, 373–381 (1992)) und wurden in einer Konzentration von 5–10 µg/ml verwendet.

2. Isolation der cDNA-Klone. Die HeLa S3 cDNA-Bibliothek (ClonTech, Palo Alto, CA) wurde mit ungefähr 50000 pfu/150 mm Filter unter Verwendung von Protein A-gereinigtem MAb K1 (5 µg/ml) und Peroxidase-konjugiertem Ziegen-Anti-Maus-IgG (H + L) (10 µg/ml, Jackson ImmunoResearch Lab, Inc., West Grove, PA) gefiltert, wie vorher beschrieben (Chang, K. und Pastan, I., *Int. J. Cancer* 57, 90–97 (1994)). Zwei positive Platten (λ6-1, λ6-2) wurden isoliert und die Phagen wurden bis zu Homogenität durch drei oder mehr Filterrunden gereinigt. Nach Überprüfung ihrer Spezifität mit MAb K1 durch Zeigen, daß sie nicht mit einem MOPC-21-Kontrollantikörper reagierten, wurden Ein-Platten-Isolate von λ6-1 und λ6-2 verwendet, um 5 bis 10 Phagenplatten herzustellen, gefolgt von Extraktion und Reinigung von Phagen-DNA mit einem Lambdaphagen-DNA-Kit (Qiagen, Inc., Chatsworth, CA). Die Phagen-DNA wurde dann mit EcoRI abgebaut und der Einschub in die EcoRI-Stelle eines pcDNA1/Amp (Invitrogen Corporation, San Diego, CA) Vektors unter Verwendung eines schnellen Ligationsprotokolls (Chang, K., und Pastan, I., *Int. J. Cancer* 57, 90–97 (1994)) subkloniert. Plasmid-DNAs wurden unter Verwendung von Qiagene's Plasmid-DNA-Isolationskit isoliert (Chang, K., und Pastan, I., *Int. J. Cancer* 57, 90–97 (1994)). Eine Restriktionskartierung unter Verwendung von XhoI, EcoRI, Sall, BamHI, NcoI und DNA-Sequenzanalyse deckte auf, daß die zwei Plasmidklone (p6-1 und p6-2) identische 1500 Basenpaareinschübe aufwiesen.

Um einen längeren Klon zu isolieren, wurde der Einschub von p6-1 gereinigt, um eine cDNA-Sonde durch zufällige Primeranlagerung herzustellen (spezifische Aktivität = $8,5 \times 10^5$ cpm/ml). Die HeLa S3 cDNA-Bibliothek wurde unter Verwendung des vorher beschriebenen Filterhybridisierungsverfahrens (Chang, K., und Pastan, I., *Int. J. Cancer* 57, 90–97 (1994)) erneut gefiltert. 14 Lambdaklone wurden isoliert und gereinigt und ihre Einschubgrößen wurden durch Abbau mit EcoRI abgeschätzt. Vier große Einschübe wurden in einen pcDNA1/Amp-Plasmidvektor subkloniert (p9, p13-1, p16 und p18-1). p9 enthielt den größten Einschub mit einem langen offenen Leserahmen.

3. DNA-Sequenzanalyse. Unter Verwendung von T3- und T7-Promotorprimern und zwanzig synthetischen Primern mit 17 Bp wurde der gesamte cDNA-Einschub von p9 unter Verwendung des von Sanger beschriebenen Verfahrens (Sanger, F., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463–5467 (1977)) und eines automatischen Zyklussequenzierungsverfahrens sequenziert.

4. Northern-Blot-Analyse. Gesamte RNAs (20 µg) aus OVCAR-3, KB, MCF-7, A431 und WI38 wurden an einem 1% Agarosegel in MOPS-Puffer mit 16,6% Formaldehyd Elektrophorese unterzogen und dann auf ein Nylon-Papier überführt. Northern-Hybridisierung wurde mit einem vorher beschriebenen Verfahren

(Chang, K., und Pastan, I., *Int. J. Cancer* 57, 90–97 (1994)) durchgeführt. Der Blot wurde mit einer mit 32 -P markierten menschlichen β -Actin-cDNA als interne Kontrolle gewaschen und erneut geprüft, um die Integrität und Menge der beladenen RNA-Proben abzuschätzen.

5. In Vitro Transkription und Translation. Ein TNT-gekoppeltes Retikulozytlysatsystem, eine Hundebauchspeicheldrüsen-Mikrosommembran, 2 μ g Plasmid-DNAs von p9 (pcDCAK1-9), pAPK1 (Chang, K., und Pastan, I., *Int. J. Cancer* 57, 90–97 (1994)) zur Beseitigung und 3 H-Leucin wurden in einem in vitro Transkriptions/Translations- und Translokations/Reifungs-Versuch gemäß dem Protokoll des Herstellers (Promega, Madison, WI, USA) verwendet. Translationsprodukte wurden auf einem 10% SDS-PAGE-Reduktionsgel gelöst. Die Proteine wurden fixiert und der nicht-integrierte Marker wurde durch Aufsaugen des Gels dreimal in 200 ml Puffer, 40% Methanol und 10% Essigsäure in desionisiertem Wasser für 30 min. entfernt. Die Gele wurden dann für 30 min. in 200 ml INTENSIFY Teil A und Teil B (NEN Research Product, Boston, MA) aufgesogen. Nach Trocknen wurden die translatierten Produkte durch Autoradiographie visualisiert.

6. Expression der geklonten cDNAs in Säugerzellen.

Vorübergehende Transfektionen von COS-Zellen wurden unter Verwendung von pcDCAK1-9 (p9) und LipofectAMINE (GIBCO) gemäß dem Protokoll des Herstellers (GIBCO) durchgeführt. COS1-Zellen wurden einen Tag vor dem Versuch mit $2,5 \times 10^5$ Zellen/600 mm Schale ausgestrichen. 24 μ l LipofectAMINE und 76 μ l OptiMEMI-Medium wurden mit 10 μ g pcDNA1/Amp-Vektor oder pcDCAK1-9 in 100 μ l OptiMEMI-Medium bei Raumtemperatur für 30 min. vermischt. Nach Waschen der COS-1-Zellen mit OptiMEMI zweimal wurden 2,4 ml OptiMEMI zu den Transfektionsgemischen zugegeben und auf COS1-Zellen überschichtet, gefolgt von Inkubation bei 37°C für 5 Stunden. 2,6 ml DMEM mit 20% FBS wurden dann in jede Schale zugegeben. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Schalen einer Immunfluoreszenzmarkierung, wie beschrieben (Chang, K., et al., *Int. J. Cancer* 50 373–381 (1992); Chang, K., et al., *Cancer Res.* 52, 181–186 (1992)), oder anderen Behandlungen unterzogen. Der Einschub vom Plasmid p9 (in pcDNA1/Amp) wurde auch in einen pcDNA3-(Invitrogen) Vektor für stabile Transfektion subkloniert. Plasmidminipräparationen wurden unter Verwendung von Qiagen's Miniprep Plasmid DNA Kit hergestellt und die Orientierung des Einschubs in einem individuellen Klon wurde durch Restriktionskartierung bestimmt. Das resultierende Plasmid, pcD3CAK1-9, wurde dann verwendet, um NIH 3T3, MCF-7, A431 und OVCAR-3-Zellen durch DNA-Kalziumphosphatausfällung zu transfizieren, wie beschrieben (Chen, C. und Okayama, N., *Mol. Cell. Biol.* 7, 2745–2752 (1987)). Nach Aussetzen dem Niederschlag über Nacht wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit frischem DMEM/10% FBS-Medium für 2–3 Tage gespeist. Geneticin-G418-Sulfat (0,8 mg/ml) wurde zugegeben und die Kulturen wurden aufrechterhalten, bis Kolonien von 2–3 mm im Durchmesser gebildet wurden. Die Kolonien wurden dann in Mulden einer Platte mit 96 Mulden und dann in eine Schale von 35 mm überführt, als sie 80% konfluent waren. Transfizierte Zellen wurden durch Immunfluoreszenz selektiert (Chang, K., et al., *Int. J. Cancer* 50, 373–381 (1992); Chang, K., et al., *Cancer Res.* 52, 181–186 (1992)) und positive Zellen wurden durch begrenzte Verdünnung weiter subkloniert, wie beschrieben (Chang, K., et al., *Int. J. Cancer* 50, 373–381 (1992)). Einer der NIH-3T3-Transfektantenklone, NIH 3T3 K20, wurde für die weitere Untersuchung gewählt. Um die Expression von CAK1 zu lokalisieren, wurde sowohl Zellenoberflächen- als auch intrazelluläre Immunfluoreszenzmarkierung gemäß vorher beschriebenen Verfahren (Chang, K., et al., *Cancer Res.* 52, 181–186 (1992)) auch durchgeführt.

7. Behandlung der transfizierten Zellen mit PI-PLC.

Mit CAK1 cDNA transfizierte NIH-3T3-Zellen (NIH 3T3 K20) wurden in Kolben von 175 mm² gezüchtet, und wenn sie 90% Konfluenz erreichten, wurden die Zellen dreimal in PBS gewaschen. Die Zellen wurden entweder mit 5 ml 1,25 U/ml PI-PLC (von Bacillus cereus; Boehringer Mannheim Biochemicals) oder 0,05% Trypsin/0,052 mM EDTA für 30 min. bei 37°C und 30 min. bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Die Überstände wurden gesammelt und nach Zentrifugation bei 1000 \times g etwa 10-fach unter Verwendung von Centricon 30 (Amicon, Inc., Beverly, MA) konzentriert. Die konzentrierten Überstände wurden in SDS-PAGE- und Immunblotanalyse verwendet. Die mit Enzym behandelten Zellen können rekultiviert werden und die Wiedergewinnung der CAK1-Expression ist nach Kultivierung über Nacht zu sehen. Die Behandlung mit PI-PLC wurde in einer ähnlichen Weise unter Verwendung von Schalen mit einem Durchmesser von 35 mm, gefolgt von Immunfluoreszenzmarkierung der behandelten Zellen durchgeführt (Chang, K., et al., *Cancer Res.* 52, 181–186 (1992)).

8. Immunblotting-Analyse der transfizierten NIH-3T3-Zellen.

Membran- und cytosolische Fraktionen von transfizierten NIH-3T3-K20-Zellen (Chang, K., und Pastan, I., *Int. J. Cancer* 57, 90–97 (1994)) wurden 12,5% SDS-PAGE ausgesetzt und die gelösten Proteine wurden auf Nitrocellulose überführt. Immunblotting wurde durchgeführt, wie vorher beschrieben (Chang, K., et al., *Int. J. Cancer* 51, 548–554 (1992); Chang, K., und Pastan, I., *Int. J. Cancer* 57, 90–97 (1994)).

B. Ergebnisse

[0160] Expressionsklonen wurde verwendet, um die CAK1 cDNA zu isolieren. Wir beobachteten vorher, daß

MAb K1 mit OVCAR-3- und HeLa-Zellen reagiert. Da wir außerstande waren, die cDNA von einer OVCAR-3-Bibliothek zu isolieren (Chang, K., und Pastan, I., *Int. J. Cancer* 57, 90–97 (1994)), selektierten wir eine HeLa-cDNA-Bibliothek, die in λ gt11 exprimiert ist, wie vorstehend beschrieben. Insgesamt 1×10^6 Phagen wurden selektiert und zwei Phagenklone (λ 6-1 und λ 6-2) wurden identifiziert. DNA-Sequenzierung zeigte beide Phagen im gleichen Einschub von 1,5 kb enthalten. Der Einschub hybridisierte mit mRNA von OVCAR-3- und KB-Zellen (ein HeLa-Subklon, der auch mit MAb K1 reagiert), aber nicht mit RNA von vielen anderen Zelllinien, was darauf hindeutet, daß die cDNA für Zellen spezifisch ist, die mit MAb K1 reagieren. 20 μ g von gesamter RNA von OVCAR-3-Zellen (Bahn 1), MCF-7-Zellen (Bahn 2), KB-Zellen (ein HeLa-Subklon, Bahn 3), A431-Zellen (Bahn 4) und W138-Zellen (Bahn 5) wurden durch Elektrophorese gelöst, auf Nylonpapier überführt und mit einer mit 32 P markierten CAK1-Sonde geblottet. Die Hybridisierung mit einer Actinsonde zeigte, daß die Bahnen gleich beladen waren. Die nachgewiesene mRNA ist 2,2 kb groß, was darauf hindeutet, daß der isolierte Einschub nicht die volle Länge hatte. Der Einschub enthielt einen offenen Leserahmen, ein Stoppcodon und einen Poly-A-Schwanz, aber das 5'-Ende schien zu fehlen. Daher wurde die Phagenbibliothek erneut mit einem der Einschübe selektiert und 14 neue Phagen mit cDNA-Einschüben verschiedener Größen wurden isoliert. Der größte Einschub (#9) war 2138 Bp lang und, wenn er sequenziert wurde, enthielt er einen offenen Leserahmen von 1884 Bp (**Fig. 1**). Er enthält eine typische Kozak-Sequenz (Kozak, M., *Nucleic Acids Res.* 5, 8125–8148 (1987)) (AXXATGG), gefolgt von einem offenen Leserahmen, der ein Protein mit 69 kD codiert. Die Sequenz war in verschiedenen untersuchten Datenbanken (EMBL-GenBank) nicht vorhanden. Da das CAK1-Antigen ursprünglich als mit einer Größe von etwa 40 kD gefunden wurde, wurden verschiedene Versuche ausgeführt, um festzustellen, ob der Klon 9 CAK1 codierte.

1. In vitro Translation. Der Einschub 9 wurde in einen pcDNAI/Amp-Vektor geklont, um pcDICA1-9 herzustellen, und im TNT-Retikulozytensystem verwendet. pcDICA1-9-Plasmid-DNA (Bahnen 1 und 2) und pcDIAPK1 (Bahnen 3 und 4) wurden in einem TNT-gekoppelten Retikulozytenlysatsystem in Gegenwart (+) oder Abwesenheit (–) von Bauchspeicheldrüsen-Mikrosomenmembran (m) verwendet. Die Produkte wurden in 10% reduzierendem SDS-PAGE gelöst und autoradiographiert. Ein Protein mit 69 kD wurde erzeugt. In Gegenwart von Bauchspeicheldrüsenmikrosomen (Bahn 2) wurde ein geringfügig größeres Protein beobachtet, das darauf hindeutete, daß das Protein in Mikrosomen eingefügt und glycosyliert wurde. Als Kontrolle wurde eine cDNA, die ein cytosolisches Protein mit 30 kD codiert, das auch mit MAb K1 reagiert (Chang, K., und Pastan, I. *Int. J. Cancer* 57, 90–97 (1994)) der gleichen Analyse unterzogen. Die Größe des Proteins war durch die Anwesenheit von Mikrosomen unbeeinflusst.

2. Expression in kultivierten Zellen. pcDICA1-9 wurde in COS-Zellen zur vorübergehenden Expression transfiziert. pcDNAI/Amp-Vektoren mit dem Einschub 9 oder ohne Einschub wurden in COS-Zellen transfiziert. Zwei Tage später wurden die Zellen immunzytochemisch mit MAb K1 bei 4°C (zur Oberflächenmarkierung) oder bei 23°C (zur intrazellulären Markierung) markiert und photographiert (Vergrößerung X 250). Das spezifische Markierungsmuster von COS-Zellen, die mit dem Einschub 9 transfiziert waren, unter Verwendung von MAb K1 wurde beobachtet. In nicht-permeabilisierten Zellen wird ein typisches Zellenoberflächen-Fluoreszenzmuster erfaßt. In permeabilisierten Zellen ist eine starke Färbung des Golgi-Bereichs ersichtlich. Keine cytosolische Färbung wurde erfaßt. Keine Immunreaktivität wurde in Zellen beobachtet, die mit dem Vektor ohne Einschub oder Kontrolleinschüben transfiziert wurden. Somit codiert der Einschub 9 ein Zellenoberflächenprotein, das auch im Golgi vorhanden ist.

3. Größe und Verarbeitung des CAK1-Antigens. Um die Größe des Antigens zu bestimmen, das durch Zellen erzeugt wird, die mit dem Einschub 9 transfiziert sind, wurden NIH-3T3-Zellen mit pcD3CAK1-9 transfiziert, um stabile Zelllinien herzustellen. Stabil transfizierte Klone wurden wie vorstehend beschrieben erzeugt und die Anwesenheit des Antigens auf der Oberfläche wurde durch Immunfluoreszenz bestätigt. Dann wurden Membran- und cytosolische Fraktionen aus NIH-3T3-K20-Zellen und aus OVCAR-3-Zellen hergestellt, SDS-PAGE ausgesetzt und durch Immunblotting mit MAb K1 analysiert. Ungefähr 100 μ g Membranfraktion (Bahnen 1 und 3) oder cytosolische Fraktion (Bahnen 2 und 4) der transfizierten NIH-3T3 (pcD3CAK1) und Mock-Kontrolle (pcD3) und Membran (Bahn 5) oder cytosolische Fraktion (Bahn 6) von OVCAR-3-Zellen wurden Elektrophorese unterzogen und mit MAb K1 Immunblotting unterzogen. Wie vorher berichtet, ist die Hauptreaktivität in OVCAR-3-Zellen mit einem Dublett von etwa 40 und 43 kD, das in Membranen, aber nicht im Cytosol vorliegt. In den Transfektanten wurden zwei Bänder mit gleicher Intensität in der Membranfraktion erfaßt; eines mit etwa 40 kD und ein zweites mit etwa 71 kD. Kein Signal wurde im Cytosol erfaßt. Diese Daten lassen darauf schließen, daß CAK1 als Vorstufe mit großem Molekulargewicht hergestellt wird, die durch Proteolyse in eine Form mit ungefähr 40 kD verarbeitet wird.

4. Art der Zellenoberflächenbindung. Um festzustellen, ob CAK1 an die Transfektanten über eine PI-Bindung gebunden wurde, wie es in OVCAR-3-Zellen der Fall ist (Chang, K., et al., *Cancer Res.* 52, 181–186 (1992)), wurde die NIH-3T3-Transfektantenzelllinie k20 mit PI-PLC für 60 min. behandelt. Die transfizierten NIH-3T3-k20-Zellen wurden mit PI-PLC behandelt und mit MAb K1 markiert, wie vorstehend beschrieben. Das CAK1-Signal wurde nach der PI-PLC-Behandlung vollständig aufgehoben. Ein starkes Zellenoberflächen-Markierungsmuster wurde in unbehandelten Zellen beobachtet. Fluoreszenz fehlte nach der Behand-

lung mit PI-PLC. In Phasenkontrastbildern vor (B) und nach (D) Behandlung sind die behandelten Zellen noch an die Schale gebunden, sind jedoch in der Form geringfügig verändert. Das Medium von PI-PLC-behandelten Zellen wurde konzentriert, SDS-PAGE ausgesetzt und mit MAb K1 analysiert. Ein Band mit etwa 70 kD wurde nachgewiesen, aber keine Bänder mit niedrigerem Molekulargewicht wurden nachgewiesen.

C. Zusammenfassung der Ergebnisse

[0161] Somit beschreibt das obige das molekulare Klonen des CAK1-Antigens, das am Mesothel, an Mesotheliomen, Eierstockkrebsen und einigen schuppenartigen Zellkarzinomen gefunden wird. Wir haben dieses Antigen als Mesothelin bezeichnet, um seine Anwesenheit an Mesothelzellen widerzuspiegeln. Ein unerwartetes Merkmal von Mesothelin besteht darin, daß seine cDNA ein Protein mit 69 kD codiert, wohingegen das an OVCAR-3-Zellen vorliegende Antigen, das zum Isolieren von MAb K1 verwendet wird, ein Molekulargewicht von ~40000 Dalton aufweist. Die DNA-Sequenz und die abgeleitete Aminosäuresequenz von CAK1 ist in **Fig. 1** gezeigt. Die cDNA ist 2138 Bp lang und enthält einen offenen Leserahmen von 1884 Bp. Das Protein, das sie codiert, enthält 628 Aminosäuren mit einem berechneten Molekulargewicht von 69001 Dalton. Eine Homologieanalyse wurde mit Nukleotid- oder Aminosäuresequenzen durchgeführt und keine wurde unter Verwendung der EMBL-GenBank nachgewiesen, auf die durch das GCG-Programm zugegriffen wurde. Das Protein enthält vier potentielle N-gebundene Glycosylierungsstellen N-X-S oder N-X-T, die in fetten Buchstaben gezeigt sind. Eine typische Signalsequenz ist am Aminoende nicht vorhanden. Ein kurzes hydrophobes Segment befindet sich jedoch 15 Aminosäuren vom ersten Methionin (**Fig. 1**). Diese Sequenz könnte als Signalsequenz für die Membraninsertion funktionieren, da das Protein an der Zelloberfläche gefunden wird und in Mikrosomen während der freien Zelltranslation eingefügt wird. Auch vorhanden ist eine mutmaßliche proteolytische Reifungsstelle RPRFRR, die an der Aminosäure 293 beginnt (**Fig. 1**). Diese Stelle wird von Furin erkannt, einer Protease, die bei der Reifung von verschiedenen Membranproteinen sowie bei der Aktivierung von Pseudomonas- und Diphtherietoxinen wichtig ist (Chiron, M. F., et al., J.B.C. 269 (27): 18169–18176 (1994)). Die Form mit 40 kD scheint von einer Vorstufe mit 69 kD durch verschiedene Reifungsschritte abgeleitet zu sein. Diese sind in **Fig. 2** zusammengefaßt. Anfänglich wird Mesothelin als Polypeptid mit 69 kD mit einem hydrophoben Schwanz hergestellt, der wahrscheinlich entfernt und gegen Phosphatidylinositol ausgetauscht wird (Chang, K., et al., Cancer Res. 52, 181–186 (1992)). Nach Glycosylierung an einer oder mehreren seiner vier mutmaßlichen N-gebundenen Glycosylierungsstellen wird es durch eine Protease gespalten unter Gewinnung des Fragments mit 40 kD (oder Dublett), das an der Oberfläche von OVCAR-3-Zellen zu finden ist, und eines kleineren (~31 kD) Fragments. Das letztere könnte in das Medium freigesetzt und/oder weiter abgebaut werden. Das Amino-endständige Fragment wurde in letzter Zeit im Medium von OVCAR-3-Zellen nachgewiesen (unsere Daten). In transfizierten NIH-3T3- und MCF-7-Zellen finden wir ungefähr gleiche Mengen von Proteinen mit 70 kD und 40 kD. Wir wiesen ursprünglich die Form mit 40 kD in OVCAR-3- und HeLa-Zellen nach und bemerkten keine größere Form. Erneute Untersuchung der OVCAR-3- und HeLa-Zellengele zeigt eine Spurenmenge der Vorstufe mit 70 kD.

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER: Pastan, Ira
Chang, Kai

(ii) TITEL DER ERFINDUNG: Mesothelin, ein Differenzierungsantigen, das am Mesothel, an Mesotheliomen und Eierstockkrebsen vorliegt, und Verfahren und Kits zum Abzielen auf das Antigen

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 7

(iv) POSTADRESSE:

(A) ADRESSAT: Townsend and Townsend and Crew

(B) STRASSE: One Market Plaza, Steuart Street Tower

(C) STADT: San Francisco

(D) BUNDESSTAAT: Kalifornien

(E) LAND: USA

(F) ZIP: 94105-1492

(v) COMPUTERLESBARE FORM:

(A) MEDIUMTYP: Diskette

(B) COMPUTER: IBM PC-kompatibel

(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Ausgabe #1.0, Version # 1.30

(vi) AKTUELLE ANMELDEDATEN:

(A) ANMELDENUMMER: Noch nicht erteilt

(B) EINREICHUNGSDATUM: Noch nicht erteilt

(C) KLASSIFIZIERUNG:

(viii) BEVOLLMÄCHTIGTER/VERTRETER-INFORMATION:

(A) NAME: Weber, Ellen Lauver

(B) REGISTRIERUNGSNUMMER: 32762

(C) AKTENZEICHEN/REGISTERNUMMER: 015280-25900US

(ix) TELEKOMMUNIKATIONSINFORMATION:

(A) TELEFON: (415) 543-9600

(B) TELEFAX: (415) 543-5043

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 1:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 2138 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) ORT: 100..1986

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 1:

AGGAATTCCG GTGGCCGGCC ACTCCCGTCT GCTGTGACGC GCGGACAGAG AGCTACCGGT	60
GGACCCACGG TGCCTCCCTC CCTGGGATCT ACACAGACC ATG GCC TTG CAA CGG	114
Met Ala Leu Gln Arg	5
1	
CTC GAC CCC TGT TGG TCC TGT GGG GAC CGC CCT GGC AGC CTC CTG TTC	162
Leu Asp Pro Cys Trp Ser Cys Gly Asp Arg Pro Gly Ser Leu Leu Phe	20
10	
CTG CTC TTC AGC CTC GGA TGG GTG CAT CCC GCG AGG ACC CTG GCT GGA	210
Leu Leu Phe Ser Leu Gly Trp Val His Pro Ala Arg Thr Leu Ala Gly	35
25	
30	
GAG ACA GGG ACG GAG TCT GCC CCC CTG GGG GGA GTC CTG ACA ACC CCC	258
Glu Thr Gly Thr Glu Ser Ala Pro Leu Gly Gly Val Leu Thr Thr Pro	50
40	
45	
CAT AAC ATT TCC AGC CTC TCC CCT CGC CAA CTC CTT GGC TTC CCG TGT	306
His Asn Ile Ser Ser Leu Ser Pro Arg Gln Leu Leu Gly Phe Pro Cys	65
55	
60	
GCG GAG GTG TCC GGC CTG AGC ACG GAG CGT GTC CGG GAG CTG GCT GTG	354
Ala Glu Val Ser Gly Leu Ser Thr Glu Arg Val Arg Glu Leu Ala Val	85
70	
75	
80	
GCC TTG GCA CAG AAG AAT GTC AAG CTC TCA ACA GAG CAG CTG CGC TGT	402
Ala Leu Ala Gln Lys Asn Val Lys Leu Ser Thr Glu Gln Leu Arg Cys	100
90	
95	
CTG GCT CAC CGG CTC TCT GAG CCC CCC GAG GAC CTG GAC GCC CTC CCA	450
Leu Ala His Arg Leu Ser Glu Pro Pro Glu Asp Leu Asp Ala Leu Pro	115
105	
110	
TTG GAC CTG CTG CTA TTC CTC AAC CCA GAT GCG TTC TCG GGG CCC CAG	498
Leu Asp Leu Leu Phe Leu Asn Pro Asp Ala Phe Ser Gly Pro Gln	130
120	
125	
GCC TGC ACC CGT TTC TTC TCC CGC ATC ACG AAG GCC AAT GTG GAC CTG	546
Ala Cys Thr Arg Phe Phe Ser Arg Ile Thr Lys Ala Asn Val Asp Leu	145
135	
140	
145	
CTC CCG AGG GGG GCT CCC GAG CGA CAG CGG CTG CTG CCT GCG GCT CTG	594
Leu Pro Arg Gly Ala Pro Glu Arg Gln Arg Leu Leu Pro Ala Ala Leu	165
150	
155	
160	
GCC TGC TGG GGT GTG CGG GGG TCT CTG CTG AGC GAG GCT GAT GTG CGG	642
Ala Cys Trp Gly Val Arg Gly Ser Leu Leu Ser Glu Ala Asp Val Arg	180
170	
175	
180	
GCT CTG GGA GGC CTG GCT TGC GAC CTG CCT GGG CGC TTT GTG GCC GAG	690
Ala Leu Gly Gly Leu Ala Cys Asp Leu Pro Gly Arg Phe Val Ala Glu	195
185	
190	
195	
TCG GCC GAA GTG CTG CTA CCC CGG CTG GTG AGC TGC CCG GGA CCC CTG	738
Ser Ala Glu Val Leu Leu Pro Arg Leu Val Ser Cys Pro Gly Pro Leu	210
200	
205	
210	
GAC CAG GAC CAG CAG GAG GCA GCC AGG GCG GCT CTG CAG GGC GGG GGA	786
Asp Gln Asp Gln Gln Glu Ala Ala Arg Ala Ala Leu Gln Gly Gly Gly	225
215	
220	
225	
CCC CCC TAC GGC CCC CCG TCG ACA TGG TCT GTC TCC ACG ATG GAC GCT	834
Pro Pro Tyr Gly Pro Pro Ser Thr Trp Ser Val Ser Thr Met Asp Ala	245
230	
235	
240	
245	

CTG CGG GGC CTG CTG CCC GTG CTG GGC CAG CCC ATC ATC CGC AGC ATC Leu Arg Gly Leu Leu Pro Val Leu Gly Gln Pro Ile Ile Arg Ser Ile 250 255 260	882
CCG CAG GGC ATC GTG GCC GCG TGG CGG CAA CGC TCC TCT CGG GAC CCA Pro Gln Gly Ile Val Ala Ala Trp Arg Gln Arg Ser Ser Arg Asp Pro 265 270 275	930
TCC TGG CGG CAG CCT GAA CGG ACC ATC CTC CGG CCG CGG TTC CGG CGG Ser Trp Arg Gln Pro Glu Arg Thr Ile Leu Arg Pro Arg Phe Arg Arg 280 285 290	978
GAA GTG GAG AAG ACA GCC TGT CCT TCA GGC AAG AAG GCC CGC GAG ATA Glu Val Glu Lys Thr Ala Cys Pro Ser Gly Lys Lys Ala Arg Glu Ile 295 300 305	1026
GAC GAG AGC CTC ATC TTC TAC AAG AAG TGG GAG CTG GAA GCC TGC GTG Asp Glu Ser Leu Ile Phe Tyr Lys Lys Trp Glu Leu Glu Ala Cys Val 310 315 320 325	1074
GAT GCG GCC CTG CTG GCC ACC CAG ATG GAC CGC GTG AAC GCC ATC CCC Asp Ala Ala Leu Leu Ala Thr Gln Met Asp Arg Val Asn Ala Ile Pro 330 335 340	1122
TTC ACC TAC GAG CAG CTG GAC GTC CTA AAG CAT AAA CTG GAT GAG CTC Phe Thr Tyr Glu Gln Leu Asp Val Leu Lys His Lys Leu Asp Glu Leu 345 350 355	1170
TAC CCA CAA GGT TAC CCC GAG TCT GTG ATC CAG CAC CTG GGC TAC CTC Tyr Pro Gln Gly Tyr Pro Glu Ser Val Ile Gln His Leu Gly Tyr Leu 360 365 370	1218
TTC CTC AAG ATG AGC CCT GAG GAC ATT CGC AAG TGG AAT GTG ACG TCC Phe Leu Lys Met Ser Pro Glu Asp Ile Arg Lys Trp Asn Val Thr Ser 375 380 385	1266
CTG GAG : TC CTG AAG, GCT TTG CTT GAA GTC GAC AAA GGG CAC GAA ATG Leu Glu : Arg Leu Lys Ala Leu Leu Glu Val Asp Lys Gly His Glu Met 390 395 400 405	1314
AGT CCT CAG GCT CCT CGG CGG CCC CTC CCA CAG GTG GCC ACC CTG ATC Ser Pro Gln Ala Pro Arg Arg Pro Leu Pro Gln Val Ala Thr Leu Ile 410 415 420	1362
GAC CGC TTT GTG AAG GGA AGG GGC CAG CTA GAC AAA GAC ACC CTA GAC Asp Arg Phe Val Lys Gly Arg Gly Gln Leu Asp Lys Asp Thr Leu Asp 425 430 435	1410
ACC CTG ACC GCC TTC TAC CCT GGG TAC CTG TGC TCC CTC AGC CCC GAG Thr Leu Thr Ala Phe Tyr Pro Gly Tyr Leu Cys Ser Leu Ser Pro Glu 440 445 450	1458
GAG CTG AGC TCC GTG CCC CCC AGC AGC ATC TGG GCG GTC AGG CCC CAG Glu Leu Ser Ser Val Pro Pro Ser Ser Ile Trp Ala Val Arg Pro Gln 455 460 465	1506
GAC CTG GAC ACG TGT GAC CCA AGG CAG CTG GAC GTC CTC TAT CCC AAG Asp Leu Asp Thr Cys Asp Pro Arg Gln Leu Asp Val Leu Tyr Pro Lys 470 475 480 485	1554
GCC CGC CTT GCT TTC CAG AAC ATG AAC GGG TCC GAA TAC TTC GTG AAG Ala Arg Leu Ala Phe Gln Asn Met Asn Gly Ser Glu Tyr Phe Val Lys 490 495 500	1602
ATC CAG TCC TTC CTG GGT GGG GCC CCC ACG GAG GAT TTG AAG GCG CTC Ile Gln Ser Phe Leu Gly Gly Ala Pro Thr Glu Asp Leu Lys Ala Leu 505 510 515	1650

AGT CAG CAG AAT GTG AGC ATG GAC TTG GCC ACG TTC ATG AAG CTG CGG Ser Gln Gln Asn Val Ser Met Asp Leu Ala Thr Phe Met Lys Leu Arg 520 525 530	1698
ACG GAT GCG GTG CTG CCG TTG ACT GTG GCT GAG GTG CAG AAA CTT CTG Thr Asp Ala Val Leu Pro Leu Thr Val Ala Glu Val Gln Lys Leu Leu 535 540 545	1746
GGA CCC CAC GTG GAG GGC CTG AAG GCG GAG GAG CCG CAC CGC CCG GTG Gly Pro His Val Glu Gly Leu Lys Ala Glu Glu Arg His Arg Pro Val 550 555 560 565	1794
CGG GAC TGG ATC CTA CGG CAG CGG CAG GAC GAC CTG GAC ACG CTG GGG Arg Asp Trp Ile Leu Arg Gln Arg Gln Asp Asp Leu Asp Thr Leu Gly 570 575 580	1842
CTG GGG CTA CAG GGC GGC ATC CCC AAC GGC TAC CTG GTC CTA GAC CTC Leu Gly Leu Gln Gly Gly Ile Pro Asn Gly Tyr Leu Val Leu Asp Leu 585 590 595	1890
AGC GTG CAA GAG ACC CTC TCG GGG ACG CCC TGC CTC CTA GGA CCT GGA Ser Val Gln Glu Thr Leu Ser Gly Thr Pro Cys Leu Leu Gly Pro Gly 600 605 610	1938
CCT GTT CTC ACC GTC CTG GCA CTG CTC CTA GCC TCC ACC CTG GCC Pro Val Leu Thr Val Leu Ala Leu Leu Leu Ala Ser Thr Leu Ala 615 620 625	1983
TGAGGGCCCC ACTCCCTTGC TGGCCCCAGC CCTGCTGGGG ATCCCCGCCT GGCCAGGAGC	2043
AGGCACGGGT GATCCCCGTT CCACCCCAAG AGAACTCGCG CTCAGTAAAC GGGAAACATGC	2103
CCCCTGCAGA CAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAA	2138

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 2:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 628 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG. SEQ ID NR.: 2:

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

Leu Asp Ala Leu Pro Leu Asp Leu Leu Phe Leu Asn Pro Asp Ala
 115 120 125
 Phe Ser Gly Pro Gln Ala Cys Thr Arg Phe Phe Ser Arg Ile Thr Lys
 130 135 140
 Ala Asn Val Asp Leu Leu Pro Arg Gly Ala Pro Glu Arg Gln Arg Leu
 145 150 155 160
 Leu Pro Ala Ala Leu Ala Cys Trp Gly Val Arg Gly Ser Leu Leu Ser
 165 170 175
 Glu Ala Asp Val Arg Ala Leu Gly Gly Leu Ala Cys Asp Leu Pro Gly
 180 185 190
 Arg Phe Val Ala Glu Ser Ala Glu Val Leu Leu Pro Arg Leu Val Ser
 195 200 205
 Cys Pro Gly Pro Leu Asp Gln Asp Gln Gln Glu Ala Ala Arg Ala Ala
 210 215 220
 Leu Gln Gly Gly Gly Pro Pro Tyr Gly Pro Pro Ser Thr Trp Ser Val
 225 230 235 240
 Ser Thr Met Asp Ala Leu Arg Gly Leu Leu Pro Val Leu Gly Gln Pro
 245 250 255
 Ile Ile Arg Ser Ile Pro Gln Gly Ile Val Ala Ala Trp Arg Gln Arg
 260 265 270
 Ser Ser Arg Asp Pro Ser Trp Arg Gln Pro Glu Arg Thr Ile Leu Arg
 275 280 285
 Pro Arg Phe Arg Arg Glu Val Glu Lys Thr Ala Cys Pro Ser Gly Lys
 290 295 300
 Lys Ala Arg Glu Ile Asp Glu Ser Leu Ile Phe Tyr Lys Lys Trp Glu
 305 310 315 320
 Leu Glu Ala Cys Val Asp Ala Ala Leu Leu Ala Thr Gln Met Asp Arg
 325 330 335
 Val Asn Ala Ile Pro Phe Thr Tyr Glu Gln Leu Asp Val Leu Lys His
 340 345 350
 Lys Leu Asp Glu Leu Tyr Pro Gln Gly Tyr Pro Glu Ser Val Ile Gln
 355 360 365
 His Leu Gly Tyr Leu Phe Leu Lys Met Ser Pro Glu Asp Ile Arg Lys
 370 375 380
 Trp Asn Val Thr Ser Leu Glu Thr Leu Lys Ala Leu Leu Glu Val Asp
 385 390 395 400
 Lys Gly His Glu Met Ser Pro Gln Ala Pro Arg Arg Pro Leu Pro Gln
 405 410 415
 Val Ala Thr Leu Ile Asp Arg Phe Val Lys Gly Arg Gly Gln Leu Asp
 420 425 430
 Lys Asp Thr Leu Asp Thr Leu Thr Ala Phe Tyr Pro Gly Tyr Leu Cys
 435 440 445
 Ser Leu Ser Pro Glu Glu Leu Ser Ser Val Pro Pro Ser Ser Ile Trp
 450 455 460

Ala Val Arg Pro Gln Asp Leu Asp Thr Cys Asp Pro Arg Gln Leu Asp
 465 470 475 480
 Val Leu Tyr Pro Lys Ala Arg Leu Ala Phe Gln Asn Met Asn Gly Ser
 485 490 495
 Glu Tyr Phe Val Lys Ile Gln Ser Phe Leu Gly Gly Ala Pro Thr Glu
 500 505 510
 Asp Leu Lys Ala Leu Ser Gln Gln Asn Val Ser Met Asp Leu Ala Thr
 515 520 525
 Phe Met Lys Leu Arg Thr Asp Ala Val Leu Pro Leu Thr Val Ala Glu
 530 535 540
 Val Gln Lys Leu Leu Gly Pro His Val Glu Gly Leu Lys Ala Glu Glu
 545 550 555 560
 Arg His Arg Pro Val Arg Asp Trp Ile Leu Arg Gln Arg Gln Asp Asp
 565 570 575
 Leu Asp Thr Leu Gly Leu Gly Leu Gln Gly Gly Ile Pro Asn Gly Tyr
 580 585 590
 Leu Val Leu Asp Leu Ser Val Gln Glu Thr Leu Ser Gly Thr Pro Cys
 595 600 605
 Leu Leu Gly Pro Gly Pro Val Leu Thr Val Leu Ala Leu Leu Leu Ala
 610 615 620
 Ser Thr Leu Ala
 625

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 3:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 5 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) STRANGART:

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 3:

Gly Gly Gly Gly Ser

1

5

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 4:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 5 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) STRANGART:

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 4:

Arg Glu Asp Leu Lys

1

5

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 5:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 4 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) STRANGART:

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 5:

Arg Glu Asp Leu

1

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 6:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 4 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) STRANGART:

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 6:

Arg Asp Glu Leu

1

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.: 7:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 4 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) STRANGART:

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 7:

Lys Asp Glu Leu

1

Patentansprüche

1. Chimäres Molekül mit einem Zielmolekül und einem Effektormolekül, wobei das Zielmolekül spezifisch an einen Teil von Mesothelin (SEQ ID NR.: 2) bindet, der vom monoklonalen Antikörper K1, einem monoklonalen Antikörper, der von einem Hybridom abgesondert wird, das als ATCC Zugangsnr. 10570 hinterlegt ist, nicht erkannt wird.

2. Chimäres Molekül mit einem Zielmolekül und einem Effektormolekül, wobei das Zielmolekül spezifisch an einen Teil von Mesothelin (SEQ ID NR.: 2) bindet, der von einem Antiserum erkannt wird, das (1) gegen Mesothelin erhöht ist und das (2) gegen ein Antigen mit 40 kD immunosorbiert wird, wobei das Antigen mit 40 kD an der Oberfläche von OVCAR-3-Zellen vorliegt und vom monoklonalen Antikörper K1, einem monoklonalen Antikörper, der von einem Hybridom abgesondert wird, das als ATCC Zugangsnr. HB 10570 hinterlegt ist, erkannt wird.

3. Kit für den Nachweis von Tumorzellen, die Mesothelin (SEQ ID NR.: 2) exprimieren, mit einem Behälter mit einem Zielmolekül, das spezifisch an einen Teil von Mesothelin bindet, der vom monoklonalen Antikörper K1, einem monoklonalen Antikörper, der von einem Hybridom abgesondert wird, das als ATCC Zugangsnr. 10570 hinterlegt ist, nicht erkannt wird, und einem Instruktionsmaterial für den Nachweis von Tumorzellen, die Mesothelin exprimieren.

4. Kit für den Nachweis von Tumorzellen, die Mesothelin (SEQ ID NR.: 2) exprimieren, mit einem Behälter mit einem Zielmolekül, das spezifisch an einen Teil von Mesothelin bindet, der von einem Antiserum erkannt wird, das (1) gegen Mesothelin erhöht ist und das (2) gegen ein Antigen mit 40 kD immunosorbiert wird, wobei das Antigen mit 40 kD an der Oberfläche von OVCAR-3-Zellen vorliegt und vom monoklonalen Antikörper K1,

einem monoklonalen Antikörper, der von einem Hybridom abgesondert wird, das als ATCC Zugangsnr. HB 10570 hinterlegt ist, erkannt wird, und Instruktionsmaterial für den Nachweis von Tumorzellen, die Mesothelin exprimieren.

5. Pharmazeutische Zusammensetzung mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger und einem Zielmolekül, das spezifisch an einen Teil von Mesothelin (SEQ ID NR.: 2) bindet, der vom monoklonalen Antikörper K1, einem monoklonalen Antikörper, der von einem Hybridom abgesondert wird, das als ATCC Zugangsnr. 10570 hinterlegt ist, nicht erkannt wird.

6. Pharmazeutische Zusammensetzung mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger und einem Zielmolekül, das spezifisch an einen Teil von Mesothelin (SEQ ID NR.: 2) bindet, der von einem Antiserum erkannt wird, das (1) gegen Mesothelin erhöht ist und das (2) das gegen ein Antigen mit 40 kD immunosorbiert wird, wobei das Antigen mit 40 kD an der Oberfläche von OVCAR-3-Zellen vorliegt und vom monoklonalen Antikörper K1, einem monoklonalen Antikörper, der von einem Hybridom abgesondert wird, das als ATCC Zugangsnr. HB 10570 hinterlegt ist, erkannt wird.

7. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 5 oder 6, wobei das Zielmolekül ferner an ein Effektormolekül gebunden ist, um ein chimäres Molekül zu bilden.

8. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 7, wobei das Effektormolekül aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus einem Cytotoxin, einem Marker, einem Radionuklid, einem Arzneimittel, einem Liposom, einem Liganden und einem Antikörper besteht.

9. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 7, wobei das chimäre Molekül ein einzelnes Kettenfusionsprotein ist.

10. Pharmazeutische Zusammensetzung mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger und einem chimären Molekül nach Anspruch 1.

11. Pharmazeutische Zusammensetzung mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger und einem chimären Molekül nach Anspruch 2.

12. Monoklonaler Antikörper, der spezifisch an einen Teil von Mesothelin (SEQ ID NR.: 2) bindet, der vom monoklonalen Antikörper K1, einem monoklonalen Antikörper, der von einem Hybridom abgesondert wird, das als ATCC Zugangsnr. 10570 hinterlegt ist, nicht erkannt wird.

13. Monoklonaler Antikörper, der spezifisch an einen Teil von Mesothelin (SEQ ID NR.: 2) bindet, der von einem Antiserum erkannt wird, das (1) gegen Mesothelin erhöht ist und das (2) gegen ein Antigen mit 40 kD immunosorbiert wird, wobei das Antigen mit 40 kD an der Oberfläche von OVCAR-3-Zellen vorliegt und vom monoklonalen Antikörper K1, einem monoklonalen Antikörper, der von einem Hybridom abgesondert wird, das als ATCC Zugangsnr. HB 10570 hinterlegt ist, erkannt wird.

14. Hybridom, das den Antikörper von Anspruch 12 absondert.

15. Hybridom, das den Antikörper von Anspruch 13 absondert.

16. Chimäres Molekül nach Anspruch 1, wobei das Effektormolekül ein Cytotoxin ist.

17. Chimäres Molekül nach Anspruch 1, wobei das Cytotoxin ein Pseudomonasexotoxin ist.

18. Verwendung eines chimären Moleküls mit einem Effektormolekül, das an ein Zielmolekül gebunden ist, wobei das Zielmolekül spezifisch an einen Teil von Mesothelin bindet, der vom monoklonalen Antikörper K1, einem monoklonalen Antikörper, der von einem Hybridom abgesondert wird, das als ATCC Zugangsnr. HB 10570 hinterlegt ist, nicht erkannt wird, bei der Herstellung eines Medikaments für die spezifische Abgabe eines Effektormoleküls an eine Tumorzelle, die Mesothelin (SEQ ID NR.: 2) oder einen Teil davon exprimiert.

19. Verwendung nach Anspruch 18, wobei das Zielmolekül ein Antikörper für Mesothelin ist.

20. Verwendung nach Anspruch 18, wobei das Zielmolekül ein monoklonaler Antikörper ist.

21. Verwendung nach Anspruch 18, wobei das Zielmolekül ein scFv ist.

22. Verwendung nach Anspruch 18, wobei der Tumor eine Eierstock-Tumorzelle ist.

23. Verwendung nach Anspruch 18, wobei das Effektormolekül aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus einem Cytotoxin, einem Marker, einem Radionuklid, einem Arzneimittel, einem Liposom, einem Liganden und einem Antikörper besteht.

24. Verwendung nach Anspruch 18, wobei das Effektormolekül ein Pseudomonasexotoxin ist.

25. Verwendung eines chimären Moleküls mit einem Effektormolekül, das an ein Zielmolekül gebunden ist, wobei das Zielmolekül spezifisch an einen Teil von Mesothelin bindet, der von einem Antiserum erkannt wird, das (1) gegen Mesothelin erhöht ist und das (2) gegen ein Antigen mit 40 kD immunosorbiert wird, wobei das Antigen mit 40 kD an der Oberfläche von OVCAR-3-Zellen vorliegt und vom monoklonalen Antikörper K1, einem monoklonalen Antikörper, der von einem Hybridom abgesondert wird, das als ATCC Zugangsnr. HB 10570 hinterlegt ist, erkannt wird, bei der Herstellung eines Medikaments für die spezifische Abgabe eines Effektormoleküls an eine Tumorzelle, die Mesothelin (SEQ ID NR.: 2) oder einen Teil davon exprimiert.

26. Verwendung eines chimären Moleküls mit einem Zielmolekül und einem Effektormolekül, wobei das Zielmolekül spezifisch an einen Teil von Mesothelin bindet, der vom monoklonalen Antikörper K1, einem monoklonalen Antikörper, der von einem Hybridom abgesondert wird, das als ATCC Zugangsnr. HB 10570 hinterlegt ist, nicht erkannt wird, und das Effektormolekül aus der Gruppe ausgewählt wird, die aus einem Cytotoxin, einem Radionuklid, einem Liganden und einem Antikörper besteht, bei der Herstellung eines Medikaments zum Beeinträchtigen des Wachstums einer Tumorzelle, die Mesothelin (SEQ ID NR.: 2) oder einen Teil davon exprimiert.

27. Verwendung nach Anspruch 26, wobei das Cytotoxin aus der Gruppe ausgewählt wird, die aus Pseudomonasexotoxin, Ricin, Abrin und Diphtherietoxin besteht.

28. Verwendung nach Anspruch 26, wobei das Tumorzellenwachstum Tumorzellenwachstum in einem Menschen ist.

29. Verwendung nach Anspruch 26, wobei das Kontaktieren das Verabreichen des chimären Moleküls an einen Menschen intravenös, in eine Körperhöhle oder in einen Hohlraum oder ein Organ umfaßt.

30. Verwendung nach Anspruch 26, wobei das Zielmolekül ein monoklonaler Antikörper ist.

31. Verwendung nach Anspruch 26, wobei das Zielmolekül ein scFv ist.

32. Verwendung eines chimären Moleküls mit einem Zielmolekül und einem Effektormolekül, wobei das Zielmolekül spezifisch an einen Teil von Mesothelin bindet, der von einem Antiserum erkannt wird, das (1) gegen Mesothelin erhöht ist und das (2) gegen ein Antigen mit 40 kD immunosorbiert wird, wobei das Antigen mit 40 kD an der Oberfläche von OVCAR-3-Zellen vorliegt und vom monoklonalen Antikörper K1, einem monoklonalen Antikörper, der von einem Hybridom abgesondert wird, das als ATCC Zugangsnr. HB 10570 hinterlegt ist, erkannt wird, und das Effektormolekül aus der Gruppe ausgewählt wird, die aus einem Cytotoxin, einem Radionuklid, einem Liganden und einem Antikörper besteht, bei der Herstellung eines Medikaments zum Beeinträchtigen des Wachstums einer Tumorzelle, die Mesothelin (SEQ ID NR.: 2) oder einen Teil davon exprimiert.

33. Verwendung eines Zielmoleküls, das spezifisch an einen Teil von Mesothelin bindet, der vom monoklonalen Antikörper K1, einem monoklonalen Antikörper, der von einem Hybridom abgesondert wird, das als ATCC Zugangsnr. HB 10570 hinterlegt ist, nicht erkannt wird, bei der Herstellung eines Medikaments zum Nachweis der Anwesenheit oder Abwesenheit einer Tumorzelle, die Mesothelin (SEQ ID NR.: 2) oder einen Teil davon exprimiert.

34. Verwendung eines Zielmoleküls, das spezifisch an einen Teil von Mesothelin bindet, der von einem Antiserum erkannt wird, das (1) gegen Mesothelin erhöht ist und das (2) gegen ein Antigen mit 40 kD immunosorbiert wird, wobei das Antigen mit 40 kD an der Oberfläche von OVCAR-3-Zellen vorliegt und vom monoklonalen Antikörper K1, einem monoklonalen Antikörper, der von einem Hybridom abgesondert wird, das als ATCC Zugangsnr. HB 10570 hinterlegt ist, erkannt wird, bei der Herstellung eines Medikaments für den Nach-

weis der Anwesenheit oder Abwesenheit einer Tumorzelle, die Mesothelin (SEQ ID NR.: 2) exprimiert.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

1 AGGAATCCGGTGGCCGCCACCTCCGCTGTGTGACCCGCGCACAGAGAGCTACCGGTGGACCCACCGTGCCTCCCTC
 81 CCTGGGATCTACACAGACCATCGCCTTCAACCGCTCGACCCCTGTGGTCTGTGGCGACCGCCCTCCAGCCCTCCTGT
 1 M A L Q R L D P C W R C G D R P G S L L P
 161 TCCTGCTCTTCAGCCTCCGATGCGTGCATCCCGCCAGCACCCCTGGCTGGAGAGACACCGACCGACTCTGCCCCCTCGGG
 22 L L F S L G W V M P A R T L A G E T G T E S A P L G
 241 CGACTCCTGACAAACCCCATTAACATTTCAGCCTCTCCCTCGCCAACTCCTTGGCTTCCCGTGTGCGGAGGTGTCCGG
 48 G V L T T P H N I G S L S P R Q L L G F F C A R V S G
 321 CCTGAGCAGGAGCGTGTCCGGCAGCTGGCTGTGCCCTTGGCACAGAAGATGTCAACCTCTCAACAGAGCAGCTGCGCT
 73 L S T E R V R E L A V A L A Q K K V K L S T E Q L R C
 401 GTCTGGCTCACCGGCTCTCTGACCCCCCAGGACCTGGACGCCCTCCCATTTGGACCTGCTCCTATTCTCAACCCAGAT
 102 L A N R L S E P P E D L D A L P L D L L L F L N P D
 481 GCGTCTCGGGGCCAGGCTCCACCCGTTTCTTCTCCCCCATCACGAAGGCCAATGTGACCTGCTCCCGAGGGCCCC
 128 A F S C P Q A C T R F F S R I T K A N V D L L P R G A
 561 TCCGAGCGACAGCGGTGCTGCCCTCCGCTCTGGCTGTGGGGGTCTCTCCTGAGCGAGCCTGATCTGC
 155 P E R Q R L L P A A L A C W G V R G S L L S E A D V R
 641 GGGCTCTGGAGGCTTCCGACCTGCCTGGCGCTTTGTGGCCGAGTCGGCCGAAGTGTGCTACCCCGCTGGTG
 182 A L G G L A C D L P G R P V A E S A E V L L P R L V
 721 AGTGGCCCGACCCCTGGACACGAGCAGGAGGCGCGGCTCTGCACCGGGGGGACCCCTACGGGCC
 208 S C P G P L D Q D Q Q E A A R A A L Q C G G P F Y G P
 801 CCGTCGACATGGTCTCTCCAGATGGACCCCTCTGCCGGCCCTGTGCCCGTGTCCCGCAGCCCATCATCCCCAGCA
 235 P S T W S V S T M D A L R G L L P V L G Q P I I R S I
 881 TCCCGCAGGCCATCGTGGCCCGGTGGCGCAACGCTCCTCTCGGACCCCATCCTGGCGGACGCTGAACGACCATCCTC
 262 P Q G I V A A W R Q R S S R D P S W R Q P E R T I L
 961 CGGCCGGGTTCCTCCCGCAAGTGGAGAAGADAGCCTGTCTTCAGGCAAGAGGCCCGCGAGATAGACGAGCCCTCAT
 288 R F R F R E V E K T A C P S G K K A R E I D E S L I
 1041 CTTCTACAAGAACTGGGACCTGGAAGCCTGCGTGGATGCGGCCCTGTGGCCACCCAGATGGACCGCTGAACGCCATCC
 315 F Y K K W E L E A C V D A A L L A T Q M D R V N A I P

FIG. 1-1.

1121 CCTTACCTACGAGCACCTGGACGTCCTAAAGCATAAACTGGATGAGCTCTACCCACAAAGGTTACCCCCAGTCTGTGATC
 342 F T Y E Q L D V L K H K L D E L T P Q G Y P E S V I
 1201 CAGCACCTGGGCTACCTCTTCTCAAGATCAGCCCTGAGGACATTCGCAAGTGAATGTGACCTCCCTCGAGACCCCTGAA
 368 Q M L G T L F L K M S P E D I E K W N V T E L R T L K
 1281 GGCTTTGCTTGAAGTCGACAAAGCCACGAATCACTCCTCAGCCTCCTCGGCGCCCCCTCCACACAGGTCGCCACCCCTGA
 395 A L L E V D K G M E M S P Q A P R R P L P Q V A T L I
 1361 TCGACCGCTTGTGAAGGAGGGCCAGCTAGACAAAGACACCCCTGACCCCCCTTCTACCCCTGGGTACCTG
 422 D R F V K G R G Q L D K D T L D T L T K P Y P G Y L
 1441 TGCTCCCTCAGCCCCGAGGAGCTGACCTCCGTGCCCCCAGCACCATCTGGGCGGTGAGGCCCCAGGACCTGGACACGTG
 448 C S L S P E E L S S V P P S S I W A V R P Q D L D T C
 1521 TGACCCCAAGGCAGCTGGACCTCCTCTATCCCAAGGCCCCCTTGCTTCCAGAACATGAACCCGTCCTCGAATACCTTCGTGA
 475 D F Q L D V L Y P K A R L A F Q N M K G S E Y P V K
 1601 AGATCCAGTCTCCTGGGTGGGCCCCCAGGAGGATTTGAAGCCGCTCAGTCAGCAGAAATGTGAGCATGGACTTCGCC
 502 I Q S P L G G A P T E D L K A L S Q Q N V S M D L A
 1681 ACGTTTCATGAAGCTGCGGACGGATCCGGTCCCTGCGTTGACTGTGGCTGAGGTGCAGAAACTTCTGGGACCCACGTTGGA
 528 T F M K L R T D A V L P L T V A E V Q K L L C D M V E
 1761 GGGCCTGAAGCGGAGGCGGCACCGCCCGGTGCGGACTCGATCCTACGGCAGCGGACGACGACCTGGACACGCTGG
 555 G L K A E E R H R P V R D W I L R Q R Q D D L D T L G
 1841 GGCTGGGCTACAGGGCGGCATCCCCAACGGCTACCTGGTCCCTAGACCTCAGCGTGCAGACACACCCCTCTCGGGGACGCC
 582 L G L Q G G I F N C Y L V L D L S V O E T L S C T P
 1921 TGCCTCCTAGGACCTGGACCTGTCTCACCGTCCTGGCACTGCTCCTTAGCCTCCACCCCTGGCCTGAGGGCCCCCCTCCCT
 610 C L L C P G P V L T V L A L L A S T L A
 2001 TCCTCCCCCAGCCCTCCTCGGGATCCCCGGCTGCCACCCAGCCAGCGGTGATCCCCGTTCCACCCCAAGAGAACTC
 2081 GCCCTCAGTAAACGGGAACATGCCCCCTGCAGACAAAAAAGAAAAA 2138

FIG. 1-2.

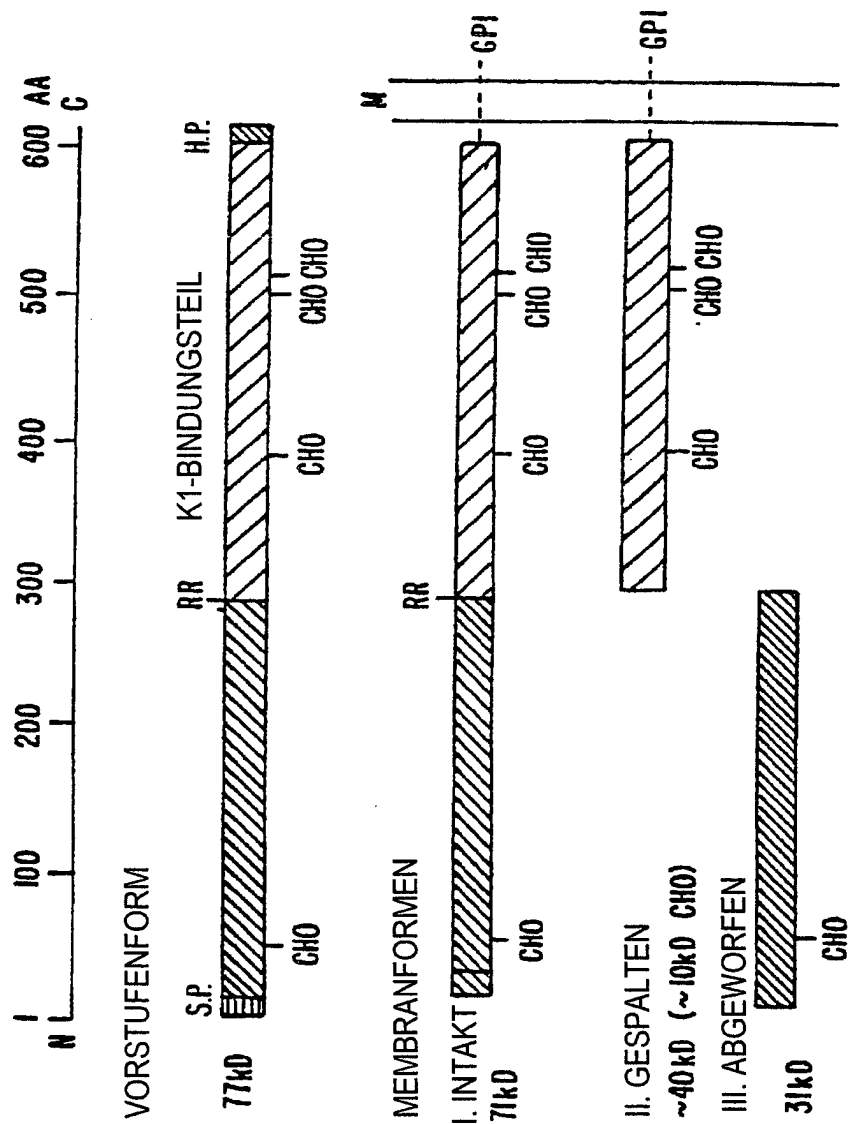


FIG. 2.