



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 118510809 A

(43) 申请公布日 2024.08.16

(21) 申请号 202380015977.8

陈晓锐 何晓文

(22) 申请日 2023.01.06

(74) 专利代理机构 上海巛石知识产权代理事务  
所(普通合伙) 31309

(66) 本国优先权数据

202210011545.7 2022.01.06 CN

202210018557.2 2022.01.07 CN

专利代理师 张琤 蒋舫玮

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.07.02

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CN2023/070928 2023.01.06

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/131276 ZH 2023.07.13

(71) 申请人 原启生物科技(上海)有限责任公司

地址 201203 上海市浦东新区张衡路1227  
号1幢303室

(72) 发明人 王华菁 钟阵威 成超 谢二敏

(54) 发明名称

靶向MSLN的抗原结合蛋白及其应用

(57) 摘要

一种分离的抗原结合蛋白,能够靶向MSLN,所述分离的抗原结合蛋白包含抗体重链可变区VH中的至少一个CDR,所述VH包含SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:69和SEQ ID NO:70中任一项所示的氨基酸序列。还提供了包含所述抗原结合蛋白的嵌合抗原受体,以及其在治疗肿瘤方面的用途。

# (12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局

(43) 国际公布日  
2023年7月13日 (13.07.2023)



(10) 国际公布号  
**WO 2023/131276 A1**

(51) 国际专利分类号:

*C07K 16/28* (2006.01) *C07K 19/00* (2006.01)  
*C07K 16/30* (2006.01) *C12N 15/85* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2023/070928

(22) 国际申请日: 2023年1月6日 (06.01.2023)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

202210011545.7 2022年1月6日 (06.01.2022) CN  
202210018557.2 2022年1月7日 (07.01.2022) CN

(71) 申请人: 原启生物科技(上海)有限责任公司 (ORICELL THERAPEUTICS CO., LTD.) [CN/CN]; 中国上海市浦东新区张衡路1227号1幢303室, Shanghai 201203 (CN)。

(72) 发明人: 王华菁 (WANG, Huajing); 中国上海市浦东新区张衡路1227号1幢303室, Shanghai 201203 (CN)。钟阵威 (ZHONG, Zhenwei); 中国上海市浦东新区张衡路1227号1幢303室, Shanghai 201203 (CN)。成超 (CHENG, Chao); 中国上海市浦东新区张衡路1227号1幢303室, Shanghai 201203 (CN)。谢二敏 (XIE, Ermin); 中国上海市浦东新区张衡路1227号1幢303室, Shanghai 201203 (CN)。陈晓锐 (CHEN, Xiaorui); 中国上海市浦东新区张衡路1227号1幢303室, Shanghai 201203 (CN)。何晓文 (HE, Xiaowen); 中国上海市浦东新区张衡路1227号1幢303室, Shanghai 201203 (CN)。

(74) 代理人: 上海巔石知识产权代理事务所(普通合伙) (SHANGHAI DIANSHI PARTNERS, P.C.); 中国上海市浦东新区盛夏路608号2号103室/张净, 蒋舫玮, Shanghai 201210 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,

BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(54) Title: ANTIGEN BINDING PROTEIN TARGETING MSLN AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 靶向MSLN的抗原结合蛋白及其应用

(57) Abstract: An isolated antigen binding protein, capable of targeting MSLN. The isolated antigen binding protein comprises at least one CDR in an antibody heavy chain variable region VH, and the VH comprises an amino acid sequence shown in any one of SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 69, and SEQ ID NO: 70. Also provided are a chimeric antigen receptor comprising the antigen binding protein, and the use of the antigen binding protein in treating tumors.

(57) 摘要: 一种分离的抗原结合蛋白, 能够靶向 MSLN, 所述分离的抗原结合蛋白包含抗体重链可变区 VH 中的至少一个 CDR, 所述 VH 包含 SEQIDNO:8、SEQIDNO:13、SEQID NO:69 和 SEQID NO: 70 中任一项所示的氨基酸序列。还提供了包含所述抗原结合蛋白的嵌合抗原受体, 以及其在治疗肿瘤方面的用途。



WO 2023/131276 A1

## 靶向 MSLN 的抗原结合蛋白及其应用

### 技术领域

本申请涉及生物医药领域，具体的涉及一种靶向 MSLN 的抗原结合蛋白，包含所述抗原结合蛋白的嵌合抗原受体，及其应用。

### 背景技术

间皮素（Mesothelin, MSLN）是位于细胞表面的糖蛋白，通过糖基磷脂酰肌醇锚定于细胞膜上。间皮素基因编码一种 69kDa 的前体蛋白，被弗林蛋白酶（成对碱性氨基酸蛋白酶，furin）样转化酶水解为两条链，C 端约 40KD 的膜结合蛋白即为成熟的间皮素，N 端约 30KD 称之为巨核细胞促进因子（MPF）的片断脱落并释放出细胞外。MPF 和膜锚 MSLN 均为 N-糖基化，MPF 可在体外促进巨核细胞克隆的形成，膜锚 MSLN 可以与 MUC16 互作，在细胞粘附过程中起重要作用，因此目前靶向治疗中均选择膜锚 MSLN 做为靶点，故目前 MSLN 专指 MSLN 的 C 端 40KD 片段，即膜锚 MSLN。

间皮素是一种在腹膜、胸膜和心包腔的间皮细胞系的细胞表面存在的糖蛋白。间皮素在间皮瘤即癌症/肿瘤细胞、卵巢癌、胰腺癌、胃癌、肺癌和子宫内膜癌中优势表达(过表达)。与此相反，其表达在正常细胞例如间皮细胞中受限。

### 发明内容

本申请提供了一种分离的抗原结合蛋白，其能够特异性结合 MSLN。本申请还提供了包含所述抗原结合蛋白的嵌合抗原受体，以及包含和/或表达该嵌合抗原受体的细胞，所述细胞具有以下一种或多种特点：（1）扩增能力强；（2）能够杀伤表达 MSLN 的靶细胞；（3）在靶细胞刺激下分泌细胞因子；（4）抑制肿瘤细胞的生长。

一方面，本申请提供了一种分离的抗原结合蛋白，其包含抗体重链可变区 VH 中的至少一个 CDR，所述 VH 包含 SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 69 和 SEQ ID NO: 70 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗原结合蛋白包含 HCDR3，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 65 和 SEQ ID NO: 66 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗原结合蛋白包含 HCDR3，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 29 和 SEQ ID NO: 34 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗原结合蛋白包含 HCDR2，且所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 67 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗原结合蛋白包含 HCDR2，且所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 30 和 SEQ ID NO: 35 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗原结合蛋白包含 HCDR1，且所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 68 (X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>MG，其中，X<sub>1</sub> 为 N、R、S、T 或 Y，X<sub>2</sub> 为 N 或 Y，X<sub>3</sub> 为 A、N 或 V) 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗原结合蛋白包含 HCDR1，且所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 31 和 SEQ ID NO: 36 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗原结合蛋白包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，且所述 HCDR1，HCDR2 和 HCDR3 包含选自下组的任意一组氨基酸序列：

(1) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列；

(2) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列；

(3) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列；

(4) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 21 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 20 所示的氨基酸序列，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 19 所示的氨基酸序列；

(5) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 26 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 25 所示的氨基酸序列，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列；

(6) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 31 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 30 所示的氨基酸序列，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 29 所示的氨基酸序列；以及

(7) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 36 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 35 所示的氨基酸序列，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 34 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗原结合蛋白包含 H-FR1，所述 H-FR1 的 C 末端与所述 HCDR1 的 N 末端直接或间接相连，且所述 H-FR1 包含 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 32 和 SEQ ID NO: 37 中任一项所示的氨基

酸序列。

在某些实施方式中，所述抗原结合蛋白包含 H-FR2，所述 H-FR2 位于所述 HCDR1 与所述 HCDR2 之间，且所述 H-FR2 包含 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗原结合蛋白包含 H-FR3，所述 H-FR3 位于所述 HCDR2 与所述 HCDR3 之间，且所述 H-FR3 包含 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗原结合蛋白包含 H-FR4，所述 H-FR4 的 N 末端与所述 HCDR3 的 C 末端直接或间接相连，且所述 H-FR4 包含 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗原结合蛋白包括抗体重链可变区 VH，且所述 VH 包含 SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 69 和 SEQ ID NO: 70 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗原结合蛋白包括抗体重链可变区 VH，且所述 VH 包含 SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 33 和 SEQ ID NO: 38 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗原结合蛋白包括抗体或其抗原结合片段。

在某些实施方式中，所述抗原结合片段包括 Fab、Fab'、F(ab)<sub>2</sub>、Fv 片段、F(ab')<sub>2</sub>、scFv、di-scFv、VHH 和/或 dAb。

在某些实施方式中，所述抗体选自下组：单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体和全人源抗体。

在某些实施方式中，所述抗原结合片段为 VHH，且所述 VHH 包含 SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 69 和 SEQ ID NO: 70 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗原结合片段为 VHH，且所述 VHH 包含 SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 33 和 SEQ ID NO: 38 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗原结合蛋白能够与参比抗体竞争结合 MSLN (Mesothelin, 间皮素) 蛋白，其中所述参比抗体包含抗体重链可变区 VH，所述参比抗体的 VH 包含 HCDR1，HCDR2 和 HCDR3，且所述参比抗体包含选自下述的任意一组氨基酸序列：

(1) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列；

(2) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列；

(3) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID

NO: 15 所示的氨基酸序列，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列；

(4) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 21 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 20 所示的氨基酸序列，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 19 所示的氨基酸序列；

(5) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 26 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 25 所示的氨基酸序列，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列；

(6) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 31 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 30 所示的氨基酸序列，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 29 所示的氨基酸序列；以及

(7) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 36 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 35 所示的氨基酸序列，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 34 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗原结合蛋白包含抗体重链恒定区，所述抗体重链恒定区源自 IgG。

在某些实施方式中，所述抗原结合蛋白包含抗体重链恒定区，所述抗体重链恒定区源自人 IgG。

在某些实施方式中，所述抗原结合蛋白包含抗体重链恒定区，所述抗体重链恒定区源自人 IgG1。

在某些实施方式中，所述抗原结合蛋白的重链恒定区包含 IgG 的 Fc 区。

在某些实施方式中，所述 Fc 区包含 SEQ ID NO: 54 所示的氨基酸序列。

另一方面，本申请还提供了嵌合抗原受体，其包含靶向部分，所述靶向部分包含所述的抗原结合蛋白。

在某些实施方式中，所述嵌合抗原受体包含共刺激域，所述共刺激域包含源自选自下组中的一种或多种蛋白的共刺激域：CD28、4-1BB、CD27、CD2、CD7、CD8、OX40、CD226、DR3、SLAM、CDS、ICAM-1、NKG2D、NKG2C、B7-H3、2B4、FcεRI $\gamma$ 、BTLA、GITR、HVEM、DAP10、DAP12、CD30、CD40、CD40L、TIM1、PD-1、LFA-1、LIGHT、JAML、CD244、CD100、ICOS、CD83 的配体、CD40 和 MyD88。

在某些实施方式中，所述嵌合抗原受体的所述共刺激域为源自 4-1BB 的胞内共刺激信号区域。

在某些实施方式中，所述嵌合抗原受体中的所述共刺激域包含 SEQ ID NO: 39 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述嵌合抗原受体包含胞内信号传导域，所述胞内信号传导域包含源自选自下组中的一种或多种蛋白的胞内信号传导域：CD3 $\zeta$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD79a、

CD79b、FcεRIγ、FcεRIβ、FcγRIIa、牛白血病病毒 gp30、Epstein-Barr 病毒 (EBV) LMP2A、猿免疫缺陷病毒 PBJ14 Nef、卡波西肉瘤疱疹病毒 (HSKV)、DAP10、DAP-12 和至少包含一个 ITAM 的结构域。

在某些实施方式中，所述嵌合抗原受体的所述胞内信号传导域为源自 CD3 ζ 的信号传导域。

在某些实施方式中，所述嵌合抗原受体的所述胞内信号传导域包含 SEQ ID NO: 41 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述嵌合抗原受体包含跨膜区，所述跨膜区包含源自选自下组中的一种或多种蛋白的跨膜域：CD8、CD28、4-1BB、CD4、CD27、CD7、PD-1、TRAC、TRBC、CD3ε、CD3ζ、CTLA-4、LAG-3、CD5、ICOS、OX40、NKG2D、2B4、CD244、FcεRIγ、BTLA、CD30、GITR、HVEM、DAP10、CD2、NKG2C、LIGHT、DAP12、CD40L、TIM1、CD226、DR3、CD45、CD80、CD86、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD134、CD137、CD154 和 SLAM。

在某些实施方式中，所述嵌合抗原受体的所述跨膜区为源自 CD8 的跨膜区。

在某些实施方式中，所述嵌合抗原受体的所述跨膜区包含 SEQ ID NO: 40 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述嵌合抗原受体在靶向部分和跨膜区之间包括铰链区，所述铰链区包含源自选自下组中的一种或多种蛋白的铰链区：CD28、IgG1、IgG4、IgD、4-1BB、CD4、CD27、CD7、CD8、PD-1、ICOS、OX40、NKG2D、NKG2C、FcεRIγ、BTLA、GITR、DAP10、CD40L、TIM1、CD226、SLAM、CD30 和 LIGHT。

在某些实施方式中，所述嵌合抗原受体的所述铰链区为源自 CD8 的铰链区。

在某些实施方式中，所述嵌合抗原受体的所述铰链区包含 SEQ ID NO: 42 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述嵌合抗原受体还包含信号肽。

在某些实施方式中，所述嵌合抗原受体的所述信号肽源自 CD8 蛋白的信号肽。

在某些实施方式中，所述嵌合抗原受体的所述信号肽包含 SEQ ID NO: 43 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述嵌合抗原受体还包含低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段。

在某些实施方式中，所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段包含选自下组的一种或多种：低密度脂蛋白受体相关蛋白 1-12 和其功能性片段。

在某些实施方式中，所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段为低密度脂蛋白受体相关蛋白 5 和/或 6 或其片段。

在某些实施方式中，所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段包含 SEQ ID NO: 44 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述嵌合抗原受体包含 SEQ ID NO: 47、SEQ ID NO: 48、SEQ ID NO: 49、SEQ ID NO: 50、SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 52 和 SEQ ID NO: 53 中任一项所示的氨基酸序列。

另一方面，本申请还提供了一种多肽，其包含所述抗原结合蛋白。

另一方面，本申请还提供了一种或多种分离的核酸分子，其编码所述分离的抗原结合蛋白和/或所述嵌合抗原受体。

在某些实施方式中，所述核酸分子包含启动子。

在某些实施方式中，所述启动子为组成型启动子。

在某些实施方式中，所述启动子为 EF1 $\alpha$  启动子。

另一方面，本申请还提供了一种载体，其包含所述核酸分子。

在某些实施方式中，所述载体包含病毒载体。

在某些实施方式中，所述载体包含慢病毒载体。

另一方面，本申请还提供了一种细胞，其包含所述抗原结合蛋白，所述嵌合抗原受体，所述核酸分子和/或所述载体。

在某些实施方式中，所述细胞为免疫效应细胞。

在某些实施方式中，所述细胞包含 T 细胞、B 细胞、天然杀伤细胞（NK 细胞）、巨噬细胞、NKT 细胞、单核细胞、树突状细胞、粒细胞、淋巴细胞、白细胞、外周血单个核细胞、胚胎干细胞、淋巴祖细胞和/或多能干细胞。

在某些实施方式中，所述细胞为 T 细胞。

在某些实施方式中，所述细胞含包含和/或表达低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段。

在某些实施方式中，所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段包含选自下组的一种或多种：低密度脂蛋白受体相关蛋白 1-12 和其功能性片段。

在某些实施方式中，所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段为低密度脂蛋白受体相关蛋白 5 和/或 6 或其片段。

在某些实施方式中，所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段包含 SEQ ID NO: 44 所示的氨基酸序列。

另一方面，本申请还提供了制备经修饰的免疫效应细胞的方法，所述方法包括在使得所述抗原结合蛋白和/或所述嵌合抗原受体表达的条件下，培养所述细胞。

另一方面，本申请还提供了制备经修饰的免疫效应细胞的方法，其包括像免疫效应细胞中引入所述载体。

另一方面，本申请还提供了药物组合物，其包含所述的分离的抗原结合蛋白，所述嵌合抗原受体，所述多肽，所述核酸分子，所述载体和/或所述细胞，以及任选地药学上可接受地载体。

另一方面，本申请还提供了所述的分离的抗原结合蛋白，所述的嵌合抗原受体，所述的多肽，所述的核酸分子，所述的载体，所述的细胞，和/或所述的药物组合物，在制备药物中的用途，所述药物用于预防、治疗和/或缓解与 MSLN 异常表达相关的疾病或病症。

在某些实施方式中，所述与 MSLN 异常表达相关的疾病或病症包括肿瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤包括实体瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤包括非实体瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤包括表达 MSLN 抗原的肿瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤包括卵巢癌、胰腺癌、胃癌、间皮细胞癌、胆管癌、三阴性乳腺癌和/或子宫内膜癌。

另一方面，本申请还提供了一种预防、治疗和/或缓解与 MSLN 异常表达相关的疾病或病症的方法，所述方法包括向有需要的受试者施用所述的分离的抗原结合蛋白，所述的嵌合抗原受体，所述的多肽，所述的核酸分子，所述的载体，所述的细胞，和/或所述的药物组合物。

在某些实施方式中，所述与 MSLN 异常表达相关的疾病或病症包括肿瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤包括实体瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤包括非实体瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤包括表达 MSLN 抗原的肿瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤包括卵巢癌、胰腺癌、胃癌、间皮细胞癌、胆管癌、三阴性乳腺癌和/或子宫内膜癌。

本领域技术人员能够从下文的详细描述中容易地洞察到本申请的其它方面和优势。下文的详细描述中仅显示和描述了本申请的示例性实施方式。如本领域技术人员将认识到的，本申请的内容使得本领域技术人员能够对所公开的具体实施方式进行改动而不脱离本申请所涉及发明的精神和范围。相应地，本申请的附图和说明书中的描述仅仅是示例性的，而非为限制性的。

## 附图说明

本申请所涉及的发明的具体特征如所附权利要求书所显示。通过参考下文中详细描述的实施方式和附图能够更好地理解本申请所涉及发明的特点和优势。对附图简要说明如下：

图 1 显示的是噬菌体 Pool ELISA 结果。

图 2 显示的是阳性克隆的选取。

图 3A-图 3D 显示的是本申请的抗原结合蛋白与 MSLN 的亲合力检测。

图 4 显示的是流式验证本申请所述的抗原结合蛋白与过表达人 MSLN 的 293T 的结合活性。

图 5 显示的是流式验证本申请所述的抗原结合蛋白与 293T, KERA, LO2, A549 和 HACAT 细胞的非特异性结合。

图 6 显示的是 CAR-T 细胞的体外反复刺激增殖实验结果。

图 7 显示的是 CAR-T 细胞的体外杀伤结果。

图 8-图 10 显示的是检测 CAR-T 细胞体外细胞因子释放的结果。

图 11 显示的是 SK-OV3 肿瘤模型小鼠体内药效实验结果。

## 具体实施方式

以下由特定的具体实施例说明本申请发明的实施方式，本领域技术人员可由本说明书所公开的内容容易地了解本申请发明的其他优点及效果。

### 术语定义

在本申请中，术语“MSLN”也称间皮素，或 CAK1 抗原或前幼巨核细胞增强因子，是存在于正常间皮细胞上的蛋白质，并且在一些肿瘤细胞中过表达。在本申请中，该术语可以包含 MSLN 蛋白或其功能活性片段。在本申请中，该术语还可以包含 MSLN 蛋白的同源物、类似物或变体。例如，所述 MSLN 可以包括人 MSLN。

在本申请中，术语“分离的抗原结合蛋白”通常是指脱离了其天然存在状态的具有抗原结合能力的蛋白。所述“分离的抗原结合蛋白”可以包含结合抗原的部分和任选的，允许抗原结合部分采用促进其结合抗原的构象的框架或构架部分。抗原结合蛋白可以包含例如抗体来源的蛋白框架区（FR）或具有移植的可变区（CDR）或 CDR 衍生物的备选蛋白框架区或人工框架区。例如，所述抗原结合蛋白可以包括抗体或其抗原结合片段。例如，所述抗原结合蛋白可以结合 MSLN 蛋白。例如，所述抗原结合蛋白可以与参比抗体竞争结合 MSLN 蛋白。

例如，所述抗原结合蛋白可以包括抗体重链可变区 VH。例如，所述抗原结合蛋白可以包括源自抗体重链可变区 VH 中的至少一个 CDR。例如，所述 VH 可以包含 HCDR3、HCDR2 和/或 HCDR1。例如，所述 VH 可以包括框架区 H-FR1，所述 H-FR1 的 C 末端与所述 HCDR1 的 N 末端直接或间接相连。例如，所述 VH 可以包括框架区 H-FR2，所述 H-FR2 位于所述 HCDR1 与所述 HCDR2 之间。例如，所述 VH 可以包括框架区 H-FR3，所述 H-FR3 位于所述 HCDR2 与所述 HCDR3 之间。例如，所述 VH 可以包括框架区 H-FR4，所述 H-FR4 的 N 末端与所述 HCDR3 的 C 末端相连。例如，所述抗原结合蛋白可以为 VHH。例如，所述的抗原结合蛋白可以包括抗体重链恒定区，所述抗体重链恒定区可以源自 IgG。例如，所述抗体重链恒定区可以源自人 IgG。例如，所述抗体重链恒定区可以源自人 IgG1。

使用的术语“抗体”包括完整抗体和其结合片段。通常，片段与其来源的完整抗体竞争性地与抗原特异性结合。任选，抗体或其结合片段可以与其它蛋白质化学结合，或者与其它蛋白质以融合蛋白质的形式表达。例如，所述抗体可以是单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体和全人源抗体。例如，所述抗体或其结合片段的结合蛋白质可以包括 MSLN。例如，所述抗体或其结合片段对 MSLN 可以有特异性。

术语“抗原结合片段”是指完整抗体的一部分并且是指完整抗体的抗原决定可变区。例如，所述抗原结合片段的可以包括 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv 片段和单链 Fv 片段、串联 Fv 片段、VHH、双特异性抗体。例如，所述抗原结合片段可以是 VHH。例如，所述抗原结合片段可以结合 MSLN。例如，所述抗原结合片段对 MSLN 可以有特异性。

在本申请中，术语“VHH”通常是指包含重链抗体的可变抗原结合结构域的抗体。VHH 也可称为纳米抗体 (Nanobody) (Nb) 和/或单域抗体。例如，所述 VHH 可以结合 MSLN。例如，所述 VHH 对 MSLN 可以有特异性。

在本申请中，所述抗体可包含通过二硫键相互连接的至少两条重(H)链和两条轻(L)链。每条重链由重链可变区(VH)和重链恒定区组成。术语“重链恒定区”由三个结构域 CH1，CH2 和 CH3 组成。每条轻链由轻链可变区(VL)和轻链恒定区组成。术语“轻链恒定区”由一个结构域 CL 组成。VH 和 VL 区可以进一步细分为高变区，称为互补决定区(CDR)，散布有更保守的区域，称为构架区(FR)。每个 VH 和 VL 由以下列顺序从氨基末端到羧基末端排列的三个 CDR 和四个 FR 组成:FR1，CDR1，FR2，CDR2，FR3，CDR3，FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合。

在本申请中，术语“参比抗体”是指可与所述分离的抗原结合蛋白竞争性结合于 MSLN 相同表位的抗体。所述参比抗体可以包括重链可变区 VH。例如，所述参比抗体可以具有 3 个

CDR 序列。例如，所述参比抗体的 VH 可以包括 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。例如，所述的 CDR 序列可以与所述分离的抗原结合蛋白的 CDR 序列一致。

在本申请中，术语“IgG”是指属于基本上由公认的免疫球蛋白  $\gamma$  基因编码的抗体类别的多肽。在人类中，此类别包括 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4。在小鼠中，此类别包括 IgG1、IgG2a、IgG2b 和 IgG3。

在本申请中，术语“嵌合抗原受体”（CAR）通常是指至少包含特异性地结合抗原或靶标的胞外结构域、跨膜区以及胞内结构域的重组多肽。例如，所述胞外结构域与所述跨膜区之间包括铰链区。例如，所述嵌合抗原受体还可以包括低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段。例如，所述嵌合抗原受体可以包括信号肽。CAR 的胞外结构域与靶细胞表面上的靶抗原结合导致 CAR 聚簇并将激活刺激传送给含 CAR 细胞。CAR 重定向免疫效应细胞的特异性，并且触发了增殖、细胞因子产生、能够以不依赖主要组织相容性（MHC）的方式介导表达靶抗原的细胞死亡的分子的吞噬作用和/或产生。例如，所述胞外结构可以包括上述的抗原结合蛋白。例如，所述胞外结构可以特异性结合 MSLN。

在本申请中，术语“胞内结构域”指意思是包括足以转导活化信号的任何截短部分的胞内结构域。所述胞内结构域可以包括胞内信号区域和/或共刺激信号区域。术语“胞内信号区域”指可以产生促进含 CAR 细胞(例如 CART 细胞或表达 CAR 的 NK 细胞)的免疫效应子功能的信号的胞内区域。例如，所述胞内信号区域可以包括选自下组中的一种或多种蛋白的胞内信号区域：CD3 $\zeta$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD79a、CD79b、Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ 、Fc $\epsilon$ RI $\beta$ 、Fc $\gamma$ RIIa、牛白血病病毒 gp30、Epstein-Barr 病毒（EBV）LMP2A、猿免疫缺陷病毒 Pbj14 Nef、卡波西肉瘤疱疹病毒（HSKV）、DAP10、DAP-12 和至少包含一个 ITAM 的结构域。例如，所述胞内信号区域可以是源自 CD3 $\zeta$  的信号传导结构域。术语“共刺激信号区域”是指所述胞内信号区域中能够转导效应信号的 CAR 的一部分。例如，所述共刺激信号区域可以包括源自选自下组中的一种或多种蛋白的胞内共刺激信号区域：CD28、4-1BB、CD27、CD2、CD7、CD8、OX40、CD226、DR3、SLAM、CDS、ICAM-1、NKG2D、NKG2C、B7-H3、2B4、Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ 、BTLA、GITR、HVEM、DAP10、DAP12、CD30、CD40、CD40L、TIM1、PD-1、LFA-1、LIGHT、JAML、CD244、CD100、ICOS、CD83 的配体、CD40 和 MyD88。例如，所述共刺激信号区域可以是源自 4-1BB 的胞内共刺激信号区域。

在本申请中，术语“跨膜区”指能够跨越细胞质膜的肽、多肽或蛋白质的结构域。可采用这些结构域将胞外结构域锚定在细胞膜上。例如，所述跨膜区可以包含选自下组中的一种或多种蛋白的跨膜域：CD8、CD28、4-1BB、CD4、CD27、CD7、PD-1、TRAC、TRBC、CD3 $\epsilon$ 、

CD3 $\zeta$ 、CTLA-4、LAG-3、CD5、ICOS、OX40、NKG2D、2B4、CD244、Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ 、BTLA、CD30、GITR、HVEM、DAP10、CD2、NKG2C、LIGHT、DAP12、CD40L、TIM1、CD226、DR3、CD45、CD80、CD86、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD134、CD137、CD154 和 SLAM。例如，所述跨膜区可以源自 CD8 的跨膜区。

在本申请中，术语“铰链区”表示抗体重链多肽中连接 CH1 结构域和 CH2 结构域的一部分，例如，从根据 Kabat 的 EU 编号系统的约第 216 位至约第 230 位。铰链区通常是由两条具有相同氨基酸序列的多肽组成的二聚体分子。铰链区一般包括约 25 个氨基酸残基，是柔性的，允许抗原结合区独立的移动。铰链区可以细分为 3 个结构域：上、中、下铰链结构域。例如，所述铰链区可以包含源自选自下组中的一种或多种蛋白的铰链区：CD28、IgG1、IgG4、IgD、4-1BB、CD4、CD27、CD7、CD8、PD-1、ICOS、OX40、NKG2D、NKG2C、Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ 、BTLA、GITR、DAP10、CD40L、TIM1、CD226、SLAM、CD30 和 LIGHT。例如，所述铰链区可以源自 CD8 的铰链区。

在本申请中，术语“低密度脂蛋白受体相关蛋白 (Low-density lipoprotein receptor-related protein)”指一种属于内吞性受体的细胞表面蛋白，在生物体内广泛分布并有很大的组织间差异性，主要功能是摄取胆固醇进入细胞内用以细胞增殖和固醇类激素及胆汁酸盐的合成。例如，所述低密度脂蛋白受体相关蛋白可以来自于任何脊椎动物。例如，所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段可以位于所述胞内信号区域的 C 端。例如，所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段可以包含选自下组的一种或多种：低密度脂蛋白受体相关蛋白 1-12 和其功能性片段。例如，所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段可以为低密度脂蛋白受体相关蛋白 6 或其片段。

在本申请中，术语“信号肽”是指处于新生 CAR 蛋白的氨基末端(N-末端)的前导序列，其在翻译时或在翻译后将新生蛋白引导到内质网并后续表面表达。例如，所述信号肽源自 CD8 蛋白的信号肽。

在本申请中，术语“多肽”、“肽”和“蛋白”在本文中可以互换，是指氨基酸残基的聚合物。这个术语可用于指一个或多个氨基酸残基是其相应的天然氨基酸的人工合成化学模拟物的氨基酸聚合物，也可用于指天然的氨基酸聚合物，那些含修饰残基的氨基酸聚合物以及非天然的氨基酸聚合物。例如，所述多肽可以包括所述的抗原结合蛋白。

在本申请中，术语“核酸分子”包括 DNA 分子和 RNA 分子。一个核酸分子可以是单链或双链的，但优选为双链 DNA。术语“启动子”通常是指一个 DNA 序列，可以调节与启动子操作性连接的所选 DNA 序列的表达，从而影响细胞中所选 DNA 序列的表达。例如，所述

核酸分子可以编码包括所属抗原结合蛋白和/或所述嵌合抗原受体。例如，所述核酸分子可以包括启动子。例如，所述启动子可以是组成型启动子。例如，所述启动子可以是 EF1 $\alpha$  启动子。

在本申请中，术语“载体”通常是指可以附着本申请的一种或多种核酸分子的分子。例如，所述载体可以是病毒载体。例如，所述载体可以是慢病毒载体。

在本申请中，术语“细胞”指可以向其转染核酸的细胞，术语“细胞”包括用于质粒繁殖的原核细胞，和用于核酸表达和编码多肽产生的真核细胞。例如，细胞可以包括所述的抗原结合蛋白，所述的核酸分子和/或所述的载体。例如，所述细胞可以是免疫效应细胞。术语“免疫效应细胞”通常是指参与免疫应答，行使效应功能的免疫细胞。例如，所述行使效应功能可以包括清除异物抗原或促进免疫效应子应答等。例如，免疫效应细胞可以包括 T 细胞、B 细胞、天然杀伤细胞（NK 细胞）、巨噬细胞、NKT 细胞、单核细胞、树突状细胞、粒细胞、淋巴细胞、白细胞、外周血单个核细胞、胚胎干细胞、淋巴祖细胞和/或多能干细胞。例如，免疫效应细胞可以是 T 细胞。

在本申请中，术语“药物组合物”通常指适合施用于哺乳动物个体的化学或生物组合物。例如，所述药物组合物可以包括所述抗原结合蛋白，所述嵌合抗原受体，所述多肽，所述核酸分子，所述载体和/或所述细胞，以及可选的药学上可接受的载体。所述药物组合物可以用于预防、治疗和/或缓解与 MSLN 异常表达相关的疾病或病症。例如，所述与 MSLN 异常表达相关的疾病或病症可以包括肿瘤。例如，所述肿瘤包括实体瘤和/或非实体瘤。

在本申请中，术语“特异性结合”或“特异性的”通常指可测量的和可再现的相互作用，例如靶标和抗体之间的结合，可在分子(包括生物分子)的异质群体存在的情况决定靶标的存在。例如，特异性结合靶标(其可以为表位)的抗体可以是以比它结合其它靶标更大的亲和性、亲合力、更容易、和/或以更长的持续时间结合该靶标的抗体。在某些实施方案中，抗体特异性结合蛋白质上的表位，所述表位在不同种属的蛋白质中是保守的。在某些实施方案中，特异性结合可以包括但不要求排他性地结合。

在本申请中，术语“受试者”通常指人类或非人类动物，包括但不限于猫、狗、马、猪、奶牛、羊、兔、小鼠、大鼠或猴。

在本申请中，涉及的蛋白质、多肽和/或氨基酸序列，还应理解为至少包含以下的范围：与该所述蛋白质或多肽具备相同或类似功能的变体或同源物。

在本申请中，所述变体可以为，例如在所述蛋白质和/或所述多肽（例如，特异性结合 MSLN）的氨基酸序列中经过取代、缺失或添加一个或多个氨基酸的蛋白质或多肽。例如，

所述功能性变体可包含已经通过至少 1 个，例如 1-30 个、1-20 个或 1-10 个，又例如 1 个、2 个、3 个、4 个或 5 个氨基酸取代、缺失和/或插入而具有氨基酸改变的蛋白质或多肽。所述功能性变体可基本上保持改变（例如取代、缺失或添加）之前的所述蛋白质或所述多肽的生物学特性。例如，所述功能性变体可保持改变之前的所述蛋白质或所述多肽的至少 60%，70%，80%，90%，或 100% 的生物学活性（例如抗原结合能力）。例如，所述取代可以为保守取代。

在本申请中，所述同源物可以为与所述蛋白质和/或所述多肽（例如，特异性结合 MSLN）的氨基酸序列具有至少约 85%（例如，具有至少约 85%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99% 或更高的）序列同源性的蛋白质或多肽。

在本申请中，所述同源性通常是指两个或多个序列之间的相似性、类似或关联。可以通过以下方式计算“序列同源性百分比”：将两条待比对的序列在比较窗中进行比较，确定两条序列中存在相同核酸碱基（例如，A、T、C、G、I）或相同氨基酸残基（例如，Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、Cys 和 Met）的位置的数目以得到匹配位置的数目，将匹配位置的数目除以比较窗中的总位置数（即，窗大小），并且将结果乘以 100，以产生序列同源性百分比。为了确定序列同源性百分数而进行的比对，可以按本领域已知的多种方式实现，例如，使用可公开获得的计算机软件如 BLAST、BLAST-2、ALIGN 或 Megalign（DNASTAR）软件。本领域技术人员可以确定用于比对序列的适宜参数，包括为实现正在比较的全长序列范围内或目标序列区域内最大比对所需要的任何算法。所述同源性也可以通过以下的方法测定：FASTA 和 BLAST。对 FASTA 算法的描述可以参见 W. R. Pearson 和 D. J. Lipman 的“用于生物学序列比较的改进的工具”，美国国家科学院院刊(Proc. Natl. Acad. Sci.), 85: 2444-2448, 1988; 和 D. J. Lipman 和 W. R. Pearson 的“快速灵敏的蛋白质相似性搜索”，Science, 227: 1435-1441, 1989。对 BLAST 算法的描述可参见 S. Altschul、W. Gish、W. Miller、E. W. Myers 和 D. Lipman 的“一种基本的局部对比（alignment）搜索工具”，分子生物学杂志，215: 403-410, 1990。

在本申请中，术语“包含”通常是指包括、总括、含有或包涵的含义。在某些情况下，也表示“为”、“由……组成”的含义。

在本申请中，术语“约”通常是指在指定数值以上或以下 0.5%-10% 的范围内变动，例如在指定数值以上或以下 0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、或 10% 的范围内变动。

## 发明详述

### 分离的抗原结合蛋白

在本申请中，所述抗原结合蛋白可以包括抗体或其抗原结合片段。在本申请中，所述抗原结合片段可以包括 Fab、Fab'、F(ab)<sub>2</sub>、Fv 片段、F(ab')<sub>2</sub>、scFv、di-scFv、VHH 和/或 dAb。在本申请中，所述抗体可以包括单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体和全人源抗体。

### CDR

抗体的 CDR 又称互补决定区，是可变区的一部分。该区域的氨基酸残基可以与抗原或抗原表位接触。抗体 CDR 可以通过多种编码系统来确定，如 CCG、Kabat、Chothia、IMGT、AbM、综合考虑 Kabat/Chothia 等。这些编码系统为本领域内已知，具体可参见，例如，<http://www.bioinf.org.uk/abs/index.html#kabatnum>。本领域技术人员可以根据抗体的序列和结构，用不同的编码系统确定出 CDR 区。使用不同的编码系统，CDR 区可能存在差别。在本申请中，所述 CDR 涵盖根据任何 CDR 划分方式划分得到的 CDR 序列；也涵盖其变体，所述变体包括所述 CDR 的氨基酸序列经过取代、缺失和/或添加一个或多个氨基酸。例如 1-30 个、1-20 个或 1-10 个，又例如 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个或 9 个氨基酸取代、缺失和/或插入；也涵盖其同源物，所述同源物可以为与所述 CDR 的氨基酸序列具有至少约 85%（例如，具有至少约 85%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99% 或更高的）序列同源性的氨基酸序列。在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白通过 Kabat 编码系统定义。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白可以包含抗体重链可变区 VH 中的至少一个 CDR，例如，所述 VH 可以包含 SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 69 和 SEQ ID NO: 70 中任一项所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述抗原结合蛋白可以包含 HCDR3，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 65 和 SEQ ID NO: 66 中任一项所示的氨基酸序列。

例如，所述 HCDR3 可以包含 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 29 和 SEQ ID NO: 34 中任一项所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白可以包含 HCDR2，且所述 HCDR2 可以包含如 SEQ ID NO: 67 所示的氨基酸序列。例如，所述 HCDR2 可以包含 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 30 和 SEQ ID NO: 35 中任一项所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白可以包含 HCDR1，且所述 HCDR1 可以包含如

SEQ ID NO: 68 (X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>MG, 其中, X<sub>1</sub>为 N、R、S、T 或 Y, X<sub>2</sub>为 N 或 Y, X<sub>3</sub>为 A、N 或 V) 所示的氨基酸序列。例如, 所述 HCDR1 可以包含 SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 31 和 SEQ ID NO: 36 中任一项所示的氨基酸序列。

在本申请中, 所述分离的抗原结合蛋白可以包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 所述 HCDR1 可以包含 SEQ ID NO: 68 (X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>MG, 其中, X<sub>1</sub>为 N、R、S、T 或 Y, X<sub>2</sub>为 N 或 Y, X<sub>3</sub>为 A、N 或 V) 所示的氨基酸序列, 所述 HCDR2 可以包含 SEQ ID NO: 67 所示的氨基酸序列, 且所述 HCDR3 可以包含 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 65 和 SEQ ID NO: 66 中任一项所示的氨基酸序列。

在本申请中, 所述分离的抗原结合蛋白可以包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 且所述 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 可以包括下组的任意一组氨基酸序列:

(1) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列, 所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列, 且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列;

(2) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列, 所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列, 且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列;

(3) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列, 所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列, 且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列;

(4) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 21 所示的氨基酸序列, 所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 20 所示的氨基酸序列, 且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 19 所示的氨基酸序列;

(5) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 26 所示的氨基酸序列, 所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 25 所示的氨基酸序列, 且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列;

(6) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 31 所示的氨基酸序列, 所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 30 所示的氨基酸序列, 且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 29 所示的氨基酸序列; 以及

(7) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 36 所示的氨基酸序列, 所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 35 所示的氨基酸序列, 且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 34 所示的氨基酸序列。

## FR

本申请中, 抗体框架区 FR 指抗体可变区中存在于分歧性更高的 (即高变) CDR 之间的部分。此类框架区典型地称为框架 1 至 4 (FR1、FR2、FR3 和 FR4) 且提供用于在三维空间中呈现六个 CDR (三个来自重链且三个来自轻链) 的骨架, 以形成抗原结合表面。

在本申请中, 所述分离的抗原结合蛋白可以包含 H-FR1, 所述 H-FR1 可包含 SEQ ID NO:

4、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 32 和 SEQ ID NO: 37 中任一项所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白可以包含 H-FR2，所述 H-FR2 可包含 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白可以包含 H-FR3，所述 H-FR3 可包含 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白可以包含 H-FR4，所述 H-FR4 可包含 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白可以包含 H-FR1、H-FR2、H-FR3 和 H-FR4，所述 H-FR1 可以包含 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 32 和 SEQ ID NO: 37 中任一项所示的氨基酸序列，所述 H-FR2 可以包含 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列，所述 H-FR3 可以包含 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列，且所述 H-FR4 可以包含 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列。

#### VH/VHH

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白可以包括抗体重链可变区 VH，且所述 VH 可以包含 SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 69 和 SEQ ID NO: 70 中任一项所示的氨基酸序列。例如，所述 VH 可包含 SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 33 和 SEQ ID NO: 38 中任一项所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述抗原结合片段可以是 VHH，且所述 VHH 可以包含 SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 69 和 SEQ ID NO: 70 中任一项所示的氨基酸序列。例如，所述 VHH 可以包含 SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 33 和 SEQ ID NO: 38 中任一项所示的氨基酸序列。

#### 重链恒定区

在本申请中，所述的分离的抗原结合蛋白可以包括重链恒定区。所述重链恒定区是指包含至少三个重链恒定结构域 CH1、CH2、和 CH3 的区域。非限制性示例性重链恒定区包括  $\gamma$ 、 $\delta$ 、和  $\alpha$ 。非限制性示例性重链恒定区还包括  $\epsilon$  和  $\mu$ 。每个重链恒定区对应于一种抗体同种型。例如，包含  $\gamma$  恒定区的抗体为 IgG 抗体，包含  $\delta$  恒定区的抗体为 IgD 抗体，包含  $\alpha$  恒定区的抗体为 IgA 抗体。此外，包含  $\mu$  恒定区的抗体为 IgM 抗体，包含  $\epsilon$  恒定区的抗体为 IgE 抗体。某些同种型可以进一步细分为亚类。例如，IgG 抗体包括但不限于，IgG1（包含  $\gamma_1$  恒定区）、IgG2（包含  $\gamma_2$  恒定区）、IgG3（包含  $\gamma_3$  恒定区）、和 IgG4（包含  $\gamma_4$  恒定区）抗体；IgA 抗体包括但

不限于, IgA1 (包含  $\alpha_1$  恒定区) 和 IgA2 (包含  $\alpha_2$  恒定区) 抗体; IgM 包括但不限于, IgM1 和 IgM2。

在本申请中, 所述分离的抗原结合蛋白可以包括抗体重链恒定区, 所述抗体重链恒定区可以源自 IgG。在本申请中, 所述分离的抗原结合蛋白可以包括抗体重链恒定区, 所述抗体重链恒定区可以源自人 IgG。在本申请中, 所述分离的抗原结合蛋白可以包含抗体重链恒定区, 所述抗体重链恒定区可以源自人 IgG1。在本申请中, 所述抗原结合蛋白的重链恒定区可以包含 IgG 的 Fc 区。例如, 所述 Fc 区可以包含 SEQ ID NO: 54 所示的氨基酸序列。

#### 嵌合抗原受体

另一方面, 本申请还提供了一种嵌合抗原受体 (CAR), 所述嵌合抗原受体 (CAR) 可以包含结合 MSLN 蛋白的靶向部分, 例如, 结合 MSLN 蛋白的靶向部分可以是本申请所述的抗原结合蛋白。

例如, 本申请的 CAR 可包含 VHH, 所述 VHH 可包含 SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 33 和 SEQ ID NO: 38 中任一项所示的氨基酸序列。

在本申请中, 所述 CAR 包含胞外的结合 MSLN 蛋白的靶向部分外, 还可包含胞内结构域。

在本申请中, 所述 CAR 可以包括胞内的共刺激信号区域, 其可提供刺激信号。例如, 所述共刺激信号区域可以包括选自下组中的一种或多种蛋白的胞内共刺激信号区域: CD28、4-1BB、CD27、CD2、CD7、CD8、OX40、CD226、DR3、SLAM、CDS、ICAM-1、NKG2D、NKG2C、B7-H3、2B4、Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ 、BTLA、GITR、HVEM、DAP10、DAP12、CD30、CD40、CD40L、TIM1、PD-1、LFA-1、LIGHT、JAML、CD244、CD100、ICOS、CD83 的配体、CD40 和 MyD88。

例如, 所述共刺激信号区域可以为源自 4-1BB 的胞内共刺激信号区域。例如, 所述共刺激信号区域可以包含 SEQ ID NO: 39 所示的氨基酸序列。

在某些情形中, 所述 CAR 可包含胞内信号区域, 其可以包含至少有一个 ITAM 基序的结构域。所述胞内信号传导结构域可以将激活信号传输到细胞内部。例如, 所述胞内信号区域可以包含源自选自下组中的一种或多种蛋白的胞内信号区域: CD3 $\zeta$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD79a、CD79b、Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ 、Fc $\epsilon$ RI $\beta$ 、Fc $\gamma$ RIIa、牛白血病病毒 gp30、Epstein-Barr 病毒 (EBV) LMP2A、猿免疫缺陷病毒 PBj14 Nef、卡波西肉瘤疱疹病毒 (HSKV)、DAP10、DAP-12 和其他至少包含一个 ITAM 的结构域。

例如，所述胞内信号区域可以为源自 CD3  $\zeta$  的信号传导结构域。例如，所述胞内信号区域可以包含 SEQ ID NO: 41 所示的氨基酸序列。

在某些情形中，所述 CAR 可包含跨膜域，所述跨膜域是细胞表面蛋白中一段跨越细胞膜的序列，其可以包含疏水性  $\alpha$  螺旋。所述跨膜域可以源自任意的 I 型跨膜蛋白。跨膜域可以是预测为形成疏水螺旋的合成序列。例如，所述跨膜区可以包含源自选自下组中的一种或多种蛋白的跨膜域：CD8、CD28、4-1BB、CD4、CD27、CD7、PD-1、TRAC、TRBC、CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\zeta$ 、CTLA-4、LAG-3、CD5、ICOS、OX40、NKG2D、2B4、CD244、Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ 、BTLA、CD30、GITR、HVEM、DAP10、CD2、NKG2C、LIGHT、DAP12、CD40L、TIM1、CD226、DR3、CD45、CD80、CD86、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD134、CD137、CD154 和 SLAM。

例如，所述跨膜区可以为源自 CD8 的跨膜区。例如，所述跨膜区可以包含 SEQ ID NO: 40 所示的氨基酸序列。

在某些情形中，所述 CAR 可包含铰链区，所述铰链区可以位于所述胞外的靶向部分和所述跨膜域之间。例如，所述铰链区可以包含选自下组中的一种或多种蛋白的铰链区：CD28、IgG1、IgG4、IgD、4-1BB、CD4、CD27、CD7、CD8、PD-1、ICOS、OX40、NKG2D、NKG2C、Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ 、BTLA、GITR、DAP10、CD40L、TIM1、CD226、SLAM、CD30 和 LIGHT。

例如，所述铰链区可以为源自 CD8 的铰链区。例如，所述铰链区可以包含 SEQ ID NO: 42 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述 CAR 在所述结合 MSLN 蛋白的靶向部分的 N 端还可包含信号肽。例如，所述信号肽可以为源自 CD8 蛋白的信号肽。例如，所述信号肽可以包含 SEQ ID NO: 43 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述 CAR 还可包含低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段。例如，所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段可以位于所述 CAR 的 C 端。例如，所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段可以包括低密度脂蛋白受体相关蛋白 1-12 和其功能性片段。例如，所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段可以是低密度脂蛋白受体相关蛋白 5 和/或 6 或其片段。例如，所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段可以包括 SEQ ID NO: 44 所示的氨基酸序列。例如，编码所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段的核酸分子可以包含 SEQ ID NO: 45 所示的核苷酸序列。

在本申请中，所述 CAR 中的所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段的序列可通过自剪切肽（例如，T2A、P2A、E2A 等 2A 肽）连接至 CAR 的 C 端序列。例如，所述低密度脂蛋

白受体相关蛋白或其片段可以通过 T2A 与胞内信号区域的 C 端连接。例如，所述剪切肽可以包含 SEQ ID NO: 46 所示的氨基酸序列。

在本申请中，自 N 端至 C 端，所述 CAR 可依次包含结合 MSLN 蛋白的靶向部分（例如，所述抗原结合蛋白，又例如，本申请所述 VHH）、所述铰链区、所述跨膜域、所述共刺激信号区域和所述胞内信号区域。例如，自 N 端至 C 端，所述 CAR 可依次包含所述 VHH，源自 CD8 的铰链区，源自 CD8 的跨膜区，源自 4-1BB 的共刺激信号区域，和源自 CD3  $\zeta$  的胞内信号区域，且所述 VHH 可包含 SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 33 和 SEQ ID NO: 38 中任一项所示的氨基酸序列。

在本申请中，自 N 端至 C 端，所述 CAR 可依次包含结合 MSLN 蛋白的靶向部分（例如，所述抗原结合蛋白，又例如，本申请所述 VHH）、所述铰链区、所述跨膜域、所述共刺激信号区域、所述胞内信号区域和所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段。例如，自 N 端至 C 端，所述 CAR 可依次包含所述 VHH，源自 CD8 的铰链区，源自 CD8 的跨膜区，源自 4-1BB 的共刺激信号区域，源自 CD3  $\zeta$  的胞内信号区域，和包含 SEQ ID NO: 44 所示的氨基酸序列的低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段，且所述 VHH 可包含 SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 33 和 SEQ ID NO: 38 中任一项所示的氨基酸序列。

在本申请中，自 N 端至 C 端，所述 CAR 可依次包含信号肽、结合 MSLN 蛋白的靶向部分（例如，所述抗原结合蛋白，又例如，本申请所述 VHH）、所述铰链区、所述跨膜域、所述共刺激信号区域和所述胞内信号区域。

在本申请中，自 N 端至 C 端，所述 CAR 可依次包含信号肽、结合 MSLN 蛋白的靶向部分（例如，所述抗原结合蛋白，又例如，本申请所述 VHH）、所述铰链区、所述跨膜域、所述共刺激信号区域、所述胞内信号区域和所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段。

例如，所述的嵌合抗原受体包可以含 SEQ ID NO: 47 所示的氨基酸序列。例如，所述的嵌合抗原受体可以包含 SEQ ID NO: 48 所示的氨基酸序列。例如，所述的嵌合抗原受体可以包含 SEQ ID NO: 49 所示的氨基酸序列。例如，所述的嵌合抗原受体可以包含 SEQ ID NO: 50 所示的氨基酸序列。例如，所述的嵌合抗原受体可以包含 SEQ ID NO: 51 所示的氨基酸序列。例如，所述的嵌合抗原受体可以包含 SEQ ID NO: 52 所示的氨基酸序列。例如，所述的嵌合抗原受体可以包含 SEQ ID NO: 53 所示的氨基酸序列。

#### 核酸分子

另一方面，本申请还提供了一种或多种核酸分子，所述核酸分子可以是任意长度的分离

形式的核苷酸、脱氧核苷酸和/核糖核苷酸，可以编码所述分离的抗原结合蛋白和/或所述的嵌合抗原受体。

例如，所述核酸分子可以包括启动子。例如，所述启动子可以是组成型启动子。例如，所述启动子可以是 EF1 $\alpha$  启动子。

另一方面，本申请还提供了一种或多种核酸分子，所述核酸分子包含能够在细胞中表达所述嵌合抗原受体和所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段的序列。在本申请中，编码所述嵌合抗原蛋白的核酸序列可以与编码所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段的核酸序列通过剪切肽连接。

### 载体

另一方面，本申请还提供了一种载体，所述载体可以包括所述的核酸分子。所述载体可以转化、转导或转染宿主细胞，使其携带的遗传物质元件在宿主细胞内表达。例如，载体可以包括启动子、转录子、增强子、复制子、选择元件和报告基因。例如，载体可以包括协助进入细胞的成分。为了使所述核酸分子在载体中复制，所述核酸分子的 5'端和 3'端还可以包含长末端重复序列。

例如，所述载体可以是病毒载体。例如，所述载体可以是慢病毒载体。

### 细胞

另一方面，本申请还提供了细胞，所述细胞可以包括所述的分离的抗原结合蛋白、所述的嵌合抗原受体、所述的核酸分子和/或所述的载体。所述细胞可以包括单个细胞的后代。由于天然、偶然或有意的突变，后代可以不一定与原始母细胞完全相同(在总 DNA 互补体的形态上或在基因组上)。

在某些实施方案中，所述的细胞可以是免疫效应细胞。在某些实施方案中，所述的细胞可以包括 T 细胞、B 细胞、天然杀伤细胞 (NK 细胞)、巨噬细胞、NKT 细胞、单核细胞、树突状细胞、粒细胞、淋巴细胞、白细胞、外周血单个核细胞、胚胎干细胞、淋巴祖细胞和/或多能干细胞。例如，

在某些实施方案中，所述的细胞可以是 T 细胞。

在本申请中，所述细胞可以包含和/或表达所述 CAR。在本申请中，所述细胞可以包含和/或表达所述 CAR 和所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段。

### 药物组合物

另一方面，本申请还提供了一种药物组合物，可以包括所述分离的抗原结合蛋白、所述嵌合抗原受体、所述核酸分子、所述载体和/或所述细胞，以及任选地药学上可接受的佐剂。

在某些实施方案中，所述药物组合物还可以包含一种或多种(药学上有效的)载剂、稳定剂、赋形剂、稀释剂、增溶剂、表面活性剂、乳化剂和/或防腐剂的合适的制剂。组合物的可接受成分在所用剂量和浓度下优选地对接受者无毒。本发明的药物组合物可以包括液体、冷冻和冻干组合物。

在某些实施方案中，所述药学上可接受的佐剂可以包括与药物给药相容的任何和所有的溶剂、分散介质、包衣、等渗剂和吸收延迟剂，通常安全、无毒，且既不是生物学上也非其它方面不合需要的。

在某些实施方案中，所述药物组合物可以包含肠胃外、经皮、腔内、动脉内、鞘内和/或鼻内施用或直接注射到组织中。例如，所述药物组合物可以通过输注或注射施用于患者或者受试者。在某些实施方案中，所述药物组合物的施用可以通过不同的方式进行，例如静脉内、腹膜内、皮下、肌肉内、局部或真皮内施用。

#### 制备方法

另一方面，本申请还提供了制备所述分离的抗原结合蛋白和/或所述嵌合抗原受体的方法。所述方法可以包括在使得所述抗原受体和/或所述嵌合抗原受体表达的条件下，培养所述细胞。

本申请还提供了制备经修饰的免疫效应细胞的方法，所述方法可以包括向免疫细胞中引入所述载体。

#### 用途

另一方面，本申请还提供了所述分离的抗原结合蛋白、所述的嵌合抗原受体、所述的核酸分子、所述的载体、所述的细胞和/或所述的药物组合物在制备药物中的用途，所述药物可以用于预防、缓解和/或治疗疾病和/或病症。

另一方面，本申请还提供了预防、缓解和/或治疗疾病和/或病症的方法，所述方法可以包括向受试者施用所述分离的抗原结合蛋白、所述嵌合抗原受体、所述核酸分子、所述载体、所述的细胞和/或所述的药物组合物。

另一方面，本申请还提供了所述分离的抗原结合蛋白、所述嵌合抗原受体、所述核酸分子、所述载体、所述的细胞和/或所述的药物组合物，其用于预防、缓解和/或治疗疾病和/或病症。

在本申请中，所述疾病和/或病症可以包括与 MSLN 表达异常相关的疾病和/或病症。

在本申请中，所述疾病和/或病症可以包括肿瘤。

在本申请中，所述肿瘤可以包括实体瘤和/或非实体瘤。

在本申请中，所述肿瘤可以包括血液瘤和/或淋巴瘤。

在本申请中，所述肿瘤可以包括表达 MSLN 抗原的肿瘤。

在本申请中，所述肿瘤可以包括卵巢癌、胰腺癌、胃癌、间皮细胞癌、胆管癌、三阴性乳腺癌和/或子宫内膜癌。

在本申请中，所述受试者可以包括人类或非人类动物。

另一方面，本申请提供了多肽，其包含所述分离的抗原结合蛋白。

另一方面，本申请提供了试剂盒或给药装置，其包括所述分离的抗原结合蛋白、所述嵌合抗原受体、所述核酸分子、所述载体、所述的细胞和/或所述的药物组合物。

不欲被任何理论所限，下文中的实施例仅仅是为了阐释本申请发明的各个技术方案，而不用于限制本申请发明的范围。

## 实施例

### 实施例 1 筛选靶向 MSLN-His 的纳米抗体

#### 1.1 靶向 MSLN-His 的淘选

构建和表达全长的 MSLN 及其 3 个 domain，分别为 MSLN-D1 (AA 296-390)，MSLN-D2 (AA 391-486) 和 MSLN-D3 (487-598)，用 IgG-Fc 和 MSLN-His 蛋白 10 $\mu$ g/ml 包被平板，4 $^{\circ}$ C 放置过夜。隔天用 1 $\times$ PBST (PBS 中含有 0.05% Tween20) 清洗 3 次后，0.5% BSA 室温封闭 2 小时，1 $\times$ PBST 清洗 3 次，在 IgG1-Fc 孔加入 100 $\mu$ l 噬菌体库 (公司内部的人工合成纳米抗体库 NanoOri\_1.0) 进行负筛，1 小时后将 IgG1-Fc 中的噬菌体转移至 MSLN-His 的孔中进行正筛，1.5 小时后用 1 $\times$ PBST 清洗 10 次，以洗掉不结合抗原的噬菌体，最后用 pH=2.2 的 Glycine-HCl 进行洗脱，100 $\mu$ l/well，然后用 pH=8.0 的 Tris-HCl 中和，取一半洗脱出来的噬菌体感染处于对数生长期的 TG1，半小时后超感染 M13KO7，过夜培养。隔天沉淀噬菌体用于下一轮的筛选。相似的筛选过程重复 4 轮，第二轮正筛后，用 1 $\times$ PBST 清洗 20 次，第三轮清洗 30 次，第四轮清洗 40 次。

#### 1.2 Pool ELISA

提前一天用 2 $\mu$ g/ml 的 MSLN-His，IgG1-Fc 和 0.5% BSA 包被 96 孔板，静置过夜。隔天用 1 $\times$ PBST 清洗三次，然后用 0.5% BSA 封闭 2 小时。封闭结束后用 1 $\times$ PBST 清洗三次，加入 30 $\mu$ l 每一轮的噬菌体库，室温震荡孵育 1 小时，用 1 $\times$ PBST 清洗三次后加入二抗 Anti-M13-HRP (Sino Biological, 货号: 11973-MM05T-H) 和 Anti-Flag-HRP (abcam, 货号: ab1162)，室温孵育 30-60 分钟，用 1 $\times$ PBST 清洗 7 次后加入 TMB 显色液，3-5 分钟后加入 2M 磷酸终止反应，读取 450nm 波长的吸收值。

结果如图 1 所示，结果显示从第二轮开始，靶向 MSLN-His 的特异性抗体就开始出现富集，但是 anti-Flag-HRP 二抗的曲线表明第三轮和第四轮的富集更加明显。因此从第三轮和第四轮的菌液中各挑取 96 个单克隆。

### 1.3 噬菌体酶联免疫方法（ELISA）鉴定特异性阳性单克隆

4 轮淘选后，将第四轮预留的 output 涂板 2YT/carb，隔天随机挑取 192 个单菌落于 800 $\mu$ l 的 2YT/carb/M13KO7 中，过夜震荡培养，产生噬菌体。提前一天用 2 $\mu$ g/ml 的 MSLN-His 和 IgG1-Fc 包被 384 孔板，静置过夜。隔天用 1 $\times$ PBST 清洗三次，然后用 0.5%BSA 封闭 2 小时，同时离心收集噬菌体上清。封闭结束后用 1 $\times$ PBST 清洗三次，加入 30 $\mu$ l 噬菌体上清，室温震荡孵育 1 小时，用 1 $\times$ PBST 清洗三次后加入二抗 Anti-M13-HRP，室温孵育 30-60 分钟，用 1 $\times$ PBST 清洗 7 次后加入 TMB 显色液，3-5 分钟后加入 2M 磷酸终止反应，读取 450nm 波长的吸收值。当样品孔的 OD 值大于对照孔（0.5%BSA 或者 IgG1-Fc）2 倍以上时，判定为阳性。最后将阳性噬菌体重新感染 TG1，并进行测序。根据序列比对软件 BioEdit 分析各个克隆的氨基酸序列。把 CDR1、CDR2、CDR3 序列相同的克隆视为同一抗体株。

结果如图 2 所示，一共挑取了 192 个单克隆，将 MSLN/Fc>5 的孔视为阳性，之后将所有 130 多个阳性克隆进行测序。

测序结果如图 3A-3D 所示，测序结果显示有 42 条特异性的纳米抗体序列，经噬菌体 ELISA 验证后，保留 21 条序列，全部以 VHH-Fc 融合蛋白的形式表达纯化后进行 ELISA，以 5% Milk 作为非特异性结合的对照，P4 为阳性克隆（P4 的 VH 如 SEQ ID NO: 58 所示，P4 的 VL 如 SEQ ID NO: 62 所示），Caplacizumab 为阴性对照。结果显示 MSLN1，MSLN 2，MSLN 3，MSLN 10，MSLN 11，MSLN 16，MSLN 18，MSLN 27，MSLN 36，MSLN 39，MSLN 41，MSLN 42 共 12 个高特异性、高亲和力结合 MSLN，EC50 与阳性抗体 P4 相似；MSLN 5，MSLN 6，MSLN 7，MSLN 14，MSLN 29，MSLN 35 共 6 个抗体的特异性较差，4，15 的特异性很差，而 30 号则完全不结合。

## 实施例 2 鉴定靶向 3 个 MSLN 结构域的纳米抗体的结合活性

### 2.1 VHH-Fc 融合蛋白在真核细胞中的表达和纯化

从测序结果中挑选特异性的抗体序列，将其克隆至载体 pcDNA3.4 中，将重组质粒转化到大肠杆菌 DH5 $\alpha$ （天根生化科技有限公司，货号：CB101-02）中，然后将菌液均匀地涂在含有 100 $\mu$ g/ml 氨苄青霉素的 2YT 固体培养基上，37 $^{\circ}$ C 静置过夜。隔天挑取单克隆，37 $^{\circ}$ C 摇床培养 6 个小时左右，取一半的菌液送测序，另一半保存在 4 $^{\circ}$ C。将测序正确的克隆放大培养，质粒中抽。采用 PEI 转染的方法将表达质粒转染至 EXP1293 中，在 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱中表达 5

天，之后收集细胞上清，用 ProteinA 亲和层析柱纯化抗体。最终获得纯度达 90%以上的抗体蛋白。

## 2.2 酶联免疫吸附实验检测 VHH-Fc 对人 MSLN 蛋白及其三个结构域的特异性结合

用 2 $\mu$ g/ml 的 MSLN-His 和三个 MSLN-Domain 蛋白包被高吸附 96 孔板，4 $^{\circ}$ C 静置过夜，1 $\times$ PBST 清洗 3 次，0.5%BSA 室温封闭 2 小时，1 $\times$ PBST 清洗 3 次，加入 100nM 的 VHH-Fc，室温震荡孵育 1 小时，用 1 $\times$ PBST 清洗三次后加入二抗 Anti-human IgG Fc Antibody HRP( abcam, 货号: ab99759)，室温孵育 30-60 分钟，用 1 $\times$ PBST 清洗 7 次后加入 TMB 显色液，3-5 分钟后加入 2M 磷酸终止反应，读取 450nm 波长的吸收值。

## 2.3 通过流式细胞术鉴定二价 VHH-Fc 与人 MSLN 转染的 293T 和 OVCAR3 的结合活性

复苏 OVCAR3 和 293T-MSLN 细胞并传代，实验当天收获细胞，计数后调整细胞密度为 1 $\times$ 10<sup>6</sup>/ml，每孔 30ul (3 $\times$ 10<sup>4</sup>/well)。将具有代表性的 MSLN 纳米抗体和阳性抗体 P4，阴性抗体 Caplacizumab，以 100nM 为最高浓度，3 倍比，7 个梯度，设 PBS 对照，每孔 30ul，混匀后 4 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。用含 0.1%BSA 的 PBS 洗涤二次，500g，5min，4 $^{\circ}$ C，甩干。1:200 稀释荧光二抗 Goat pAb to Hu IgG [DyLight 650] (abcam, 货号: ab98593)，每孔 30ul，混匀后 4 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟；含 0.1%BSA 的 PBS 洗涤二次，500g，5min，4 $^{\circ}$ C，甩干，30ul/well 重悬，上高通量流式检测仪 (IQue) 读值，将收集到的数据用 Graphpad 做三参数拟合曲线。结果如图 4 所示，在图中，图注中的数字代表 MSLN VHH 所对应的序列编号。结果显示，MSLN 1，MSLN 2，MSLN 3，MSLN 4，MSLN 5，MSLN 6，MSLN 10，MSLN 11，MSLN 16，MSLN 18，MSLN 27，MSLN 36，MSLN 39，MSLN 41，MSLN 42 与高表达 MSLN 的卵巢癌细胞株 OVCAR3 和过表达细胞株 293-MSLN 的流式结合活性较好。

## 2.4 通过流式细胞术鉴定二价 VHH-Fc 与组织细胞的非特异性结合

复苏 293T，LO2，KERA，A549，HACAT 和 K562-MSLN 细胞并传代，实验当天收获细胞，计数后调整细胞密度为 1 $\times$ 10<sup>6</sup>/ml，每孔 30ul (3 $\times$ 10<sup>4</sup>/well)。将具有代表性的 MSLN 纳米抗体和阳性抗体 P4，浓度为 20ug/ml，每孔 30ul，混匀后 4 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。用含 0.1%BSA 的 PBS 洗涤二次，500g，5min，4 $^{\circ}$ C，甩干。1:200 稀释荧光二抗 Goat pAb to Hu IgG [DyLight 650] (abcam, 货号: ab98593)，每孔 30ul，混匀后 4 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟；含 0.1%BSA 的 PBS 洗涤二次，500g，5min，4 $^{\circ}$ C，甩干，30ul/well 重悬，上高通量流式检测仪 (IQue) 读值。结果如图 5 所示，结果显示，MSLN 1，MSLN 4，MSLN 5，MSLN 6，MSLN 11，MSLN 36，MSLN 42 号序列均与 293T，LO2，KERA，A549，HACAT 细胞有非特异结合活性。

### 实施例 3 CAR-T 慢病毒包装盒检测

#### 3.1 慢病毒包装

用于构建本发明的慢病毒质粒载体的载体系统属于第三代慢病毒载体系统，该系统共有三个质粒：编码 Gag-Pol 蛋白和 Rev 蛋白的包装质粒 psPAX2；编码包膜蛋白 VSV-G 的 PMD2.G 质粒，含有编码目的基因 CAR 核心质粒。基于 BBz/L6 平台核心质粒中编码 CAR 基因由延长因子-1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ) 启动子调控表达。病毒的包装过程如下：1 $\times 10^6$  的 293FT 细胞悬于 2ml DMEM (10% FBS) 培养基中，铺于 6 孔板，细胞充分分散均匀，5%CO<sub>2</sub>、37°C 培养，约 24h；质粒、试剂平衡室温；100 $\mu$ l Opti-MEM 培养基含 4.5ug (psPAX2: PMD2.G: 核心质粒=3:2:4) 和 13.5 $\mu$ l (质粒: FuGENEHD=1:3) 转染试剂 (Promega, 货号: E2311)，包装质粒充分混匀，后缓慢逐滴加入转染试剂，全部加后，逐一轻轻充分混匀，室温静置 15min；吸去原 400ul 培养基 DMEM (10% FBS)，逐滴分区滴加脂质体阳离子复合物 (100 $\mu$ l Opti-MEM+PSH1+PMH2+核心质粒+FuGENEHD)，5%CO<sub>2</sub>、37°C 培养约 17 小时；去除含质粒培养基 (约剩 200ul, One by one)，更换 2.5ml 含 5%FBS DMEM 培养基 (37°C 预热 30min)，5%CO<sub>2</sub>、37°C 培养约 24-26 小时；收集病毒上清，3000 rpm、10 min，分装约 720 $\mu$ l 于冻存管冻存 -80°C，另取适量用于慢病毒滴度测定。

#### 3.2 慢病毒滴度测定

取状态良好 293T 细胞，1 $\times$ PBS 洗涤，1.5ml 0.25% 胰酶 37°C 消化，11ml 培养基终止。调整细胞体系为 2 $\times 10^5$  cells/well/2.5mL；细胞系培养基以 1: 1000 加入 10ug/ml polybrene，充分混匀；12 孔板，每孔加 1ml 细胞悬液；逐滴分区加入所得病毒原液 5 $\mu$ l，补齐每孔 2.5ml，充分混匀；设置不含病毒细胞悬液，为流式检测空白对照；5%CO<sub>2</sub>、37°C 培养约 42-48h；去上清，PBS 洗涤，400ul 0.25% 胰酶 (gibco, 货号: 25200072)，37°C 消化，约 1min，2.5mL 完全培养基终止消化；1ml 移液枪轻吹至细胞完全分散，移至 1.5ml EP 管，细胞计数；取 5 $\times 10^5$  细胞量，用于流式检测。

### 实施例 4 T 细胞的感染和扩增

PBMC 细胞复苏，加 11ml X-VIVO，离心 500g，5min；加 12ml X-VIVO，离心 400g，5min；加 12ml X-VIVO，离心 300g，5min；1ml X-VIVO 悬计数；调整细胞密度 1 $\times 10^6$  cells/ml，按 1:3 比例 (细胞:磁珠) 加入 CD3/CD28(4 $\times 10^8$ /ml) 磁珠 (赛默飞，货号: 11131D) 对 T 细胞进行激活，充分混匀，12 孔板，每孔 700ul 细胞悬液 (7 $\times 10^5$  cells/well/700ul)；激活的 PBMC 37°C、CO<sub>2</sub> 培养箱、18h；按 MOI 为 4-5 比例加入病毒上清，polybrene 至终浓度为 5ug/ml (1:

2000, 按终体积), 添加补齐相应培养基, 混匀细胞, 设置空白对照, 水平离心机, 1200rpm、1h; 37°C、5%CO<sub>2</sub> 培养箱 24h; 轻混匀, 收集细胞于 1.5ml EP 管, 300g、5min, 去上清 (约剩 50-100ul 培养基), 1ml X-VIVO 培养基重悬, 至 12-well-plate 中, 补加 500ul 培养基, 37°C、5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养 48h; 观察培养基颜色, 添加适量 X-VIVO 培养基 (800ul-1mL), 37°C、5%CO<sub>2</sub>; 每 2 天对细胞进行计数, 调整细胞密度为 7×10<sup>5</sup>/ml, 6-Well-plate /3ml; 总细胞数为 2.1×10<sup>6</sup>, 37°C、5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养 24h; 观察添加适量培养基 (1mL), 24h; 轻混匀, 计数; 根据所计数得出细胞总数除前总细胞数 2.1E+6, 即为扩增倍数 T<sub>2</sub>; 调整细胞密度为 7×10<sup>5</sup>/ml, 6-Well-plate /3ml, 总细胞数为 2.1×10<sup>6</sup> 传代; 取 6×10<sup>5</sup> 细胞数用于 CAR-T 阳性率、CD25/CD69 CAR 检测 (去磁珠 1min); 37°C、5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养 24h; 观察添加适量培养基 (1mL), 24h; 轻混匀, 计数; 根据所计数得出细胞总数除前总细胞数 2.1×10<sup>6</sup>, 即为扩增倍数 T<sub>3</sub>; 调整细胞密度为 7×10<sup>5</sup>/ml, 6-Well-plate /3ml, 总细胞数为 2.1×10<sup>6</sup> 传代; 取 9E5 细胞数用于 CAR-T 阳性率、PD-L1/TIM3/LAG3 CAR 检测 (去磁珠 1min); 取适量细胞数用于体外肿瘤杀伤活性实验; 37°C、5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养 24h; 观察添加适量培养基 (1mL—2.5mL), 48h; 轻混匀, 计数; 根据所计数得出细胞总数除前总细胞数 2.1×10<sup>6</sup>, 即为扩增倍数 T<sub>4</sub>; 取相应细胞用于 CAR-T 反复刺激实验; 取适量细胞数用于 CAR-T 阳性率、CD25/CD69、PD-1/TIM3/LAG3 CAR 检测 (去磁珠 1min); 扩增倍数: T<sub>1</sub>\*T<sub>2</sub>\*T<sub>3</sub>\*T<sub>4</sub>。

结果如图 6 所示, 在图中, 图注中的数字代表 MSLN VHH 所对应的序列编号, 选取 MSLN3 (VHH 序列如 SEQ ID NO: 13 所示), MSLN10 (VHH 序列如 SEQ ID NO: 18 所示), MSLN16 (VHH 序列如 SEQ ID NO: 8 所示), MSLN27 (VHH 序列如 SEQ ID NO: 23 所示), MSLN36 (VHH 序列如 SEQ ID NO: 28 所示), MSLN41 (VHH 序列如 SEQ ID NO: 33 所示), MSLN42 (VHH 序列如 SEQ ID NO: 38 所示), 其中 MSLN0 为阴性对照 Caplacizumab, P4 为阳性对照 (VH 序列如 SEQ ID NO: 58 所示, VL 序列如 SEQ ID NO: 62 所示), T 为不加靶细胞的空白对照。结果显示所有的抗体有着与阳性抗体相似的增殖速度。

### 实施例 5 CAR-T 细胞体外肿瘤杀伤活性检测

#### CytoTox 96®非放射性细胞毒性检测

LDH 是一种稳定胞质酶, 细胞裂解时释放, 释放方式与 51Cr 在放射性分析中的释放方式基本相同, 释放的 LDH 在培养基上清中, 通过偶联酶反应检测, 在酶反应中 LDH 可使一种四唑盐 (INT) 转化为红色的甲臞, 生成的红色产物量与裂解细胞数成正比 (Promega, 货号: G1780)。检测 CAR-T 阳性率, 以未感染空白 T 细胞调整感染 CAR 组间比例一致, 各组总细胞数一致; 靶细胞数量为 2×10<sup>4</sup>/96-well-plate/well, 效应细胞: 靶细胞 (E:T) = 3:1、1:1、

1:3、1: 9; 设置只含与实验组等量效应细胞孔作为效应细胞自释放 LDH 背景组; 设置只含与实验组等量空白 T 细胞孔作为 T 细胞自释放 LDH 空白对照组; 设置只含与实验组相同效靶比空白 T 细胞孔作为 T+靶细胞阴性对照组; 设置只含与实验组等量靶细胞孔作为靶细胞自释放 LDH 背景组; 设置只含与实验组等量靶细胞孔作为靶细胞最大释放 LDH 背景组; 设置只含 200uL 细胞培养基单独孔为培养基背景 LDH 对照孔; 设置只含 200uL 细胞培养基单独孔为体积校正对照孔; 相应效应细胞和靶细胞共孵育于 200 $\mu$ l X-VIVO(无 FBS)培养基中, 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养 20-24h; 消化计数取相应量靶细胞, 100 $\mu$ l X-VIVO 重悬铺于 96 孔板中; 按效靶比取相应量效应细胞, 相应空白 T 细胞补齐, 500g, 5min; 100 $\mu$ l X-VIVO 重悬与靶细胞于 96 孔板中混匀; 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>、20-24h; 提前约 45min, 于体积校正对照孔及靶细胞最大释放 LDH 背景孔加入 20uL 裂解液 (10X), 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 培养箱, 45min; 250 x g, 4min; 取 50 $\mu$ l 上清液于酶分析板中, 50 $\mu$ l/孔加入已配制底物 (检测缓冲液配置), 避光, 室温孵育 20-30min; 50 $\mu$ l/孔加入终止液; 观察颜色 (避免气泡); OD490 测量值。

将  $1 \times 10^4$  的肿瘤细胞 SK-OV3-Luciferase-GFP 与示例 MSLN-CAR-T 细胞按照不同的效靶比共培养 18h 和 72h 后, 检测 CAR-T 细胞对肿瘤细胞的杀伤作用, 结果如图 7 所示, 结果显示 MSLN-CAR-101 (其中, 嵌合抗原受体的靶向部分的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 13 所示, 跨膜区的氨基酸序如 SEQ ID NO: 40 所示, 共刺激域的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 39 所示, 胞内信号传导域的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 41 所示, 铰链区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 42 所示, 所述 MSLN-CAR-101 细胞还表达如 SEQ ID NO: 44 所示的外源蛋白片段) 的杀伤作用与阳性序列 P4 有着相似的杀伤作用。

### 实施例 6 细胞因子检测

根据实施例 4 中 T 细胞感染和扩增方式制备 CAR-T; 适量 E:T=1:1 共孵育上清, 用于 IL-2、IFN- $\gamma$  等细胞因子检测。检测 CART 阳性率, 以未感染空白 T 细胞调整感染 CAR 组间比例一致, 各组总细胞数一致 (所需 CAR-T 细胞数, 最低 CAR 阳性比例为基数); T 细胞总数一致; VT(T+CELL 组) = CART+T; 设置与实验组等量的空白 T 细胞孔作为 T 细胞单独组; 设置与实验组等量的效应细胞孔作为效应细胞单独组; 靶细胞数量为  $1 \times 10^4$ /96-well/well, 效应细胞: 靶细胞 (E:T) = 1:1; 依照对应效靶比 1: 1 共孵育, 效应细胞 (含 CAR-T 阳性细胞  $1E4$ ) 与靶细胞( $1E4$ )混合, 补无血清 1 X-VIVO 培养基至终体积 200uL; 轻混匀, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱, 24h; 400 x g, 5min, 取 50 $\mu$ l 细胞上清用于细胞因子检测。

结果如图 8-10 所示, 其中 KERA 为 MSLN 阴性细胞, SK-OV3 为 MSLN 阳性细胞。当 CAR-T 细胞与 SK-OV3 共培养时, CAR-T 细胞被活化, 产生大量的细胞因子 IL-2, TNF- $\alpha$  和

IFN- $\gamma$ 。其中 MSLN-CAR-101 与阳性序列 P4 拥有等量的细胞因子释放。另外，当 CAR-T 细胞与 KERA 共培养时，CAR-T 细胞均不能被激活，无细胞因子释放。

#### 实施例 7 NSG 小鼠动物药效试验

小鼠皮下注射  $3 \times 10^6$  的 SKOV3 肿瘤细胞系，两周后待肿瘤体积大小为  $100-200\text{mm}^3$  时进行随机分组，隔天进行 CAR-T 静脉回输，细胞量为  $5 \times 10^6$ ，每周测量肿瘤 3 次，试验观察到 47 天。最后用 Graphpad 绘制肿瘤生长曲线。其中，5E6 表示接种了  $5 \times 10^6$  的 SK-OV3 的卵巢癌细胞。

结果如图 11 所示，显示 MSLN-CAR-101 显著地抑制了肿瘤的生长。

前述详细说明是以解释和举例的方式提供的，并非要限制所附权利要求的范围。目前本申请所列举的实施方式的多种变化对本领域普通技术人员来说是显而易见的，且保留在所附的权利要求和其等同方式的范围内。

## 权 利 要 求 书

1. 分离的抗原结合蛋白，其能够特异性结合间皮素（Mesothelin, MSLN），所述分离的抗原结合蛋白包含抗体重链可变区 VH 中的至少一个 CDR，所述 VH 包含 SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 69 和 SEQ ID NO: 70 中任一项所示的氨基酸序列。
2. 根据权利要求 1 所述的抗原结合蛋白，其包含 HCDR3，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 65 和 SEQ ID NO: 66 中任一项所示的氨基酸序列。
3. 根据权利要求 2 所述的抗原结合蛋白，其中所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 29 和 SEQ ID NO: 34 中任一项所示的氨基酸序列。
4. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的抗原结合蛋白，其包含 HCDR2，且所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 67 所示的氨基酸序列。
5. 根据权利要求 4 所述的抗原结合蛋白，其中所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 30 和 SEQ ID NO: 35 中任一项所示的氨基酸序列。
6. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的抗原结合蛋白，其包含 HCDR1，且所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 68 (X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>MG，其中，X<sub>1</sub> 为 N、R、S、T 或 Y，X<sub>2</sub> 为 N 或 Y，X<sub>3</sub> 为 A、N 或 V) 所示的氨基酸序列。
7. 根据权利要求 6 所述的抗原结合蛋白，其中所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 31 和 SEQ ID NO: 36 中任一项所示的氨基酸序列。
8. 根据权利要求 1-7 中任一项所述的抗原结合蛋白，其包含 HCDR1，HCDR2 和 HCDR3，且所述 HCDR1，HCDR2 和 HCDR3 包含选自下组的任意一组氨基酸序列：
  - (1) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列；
  - (2) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列；
  - (3) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列；
  - (4) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 21 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 20 所示的氨基酸序列，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 19 所示的氨基酸序列；
  - (5) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 26 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 25 所示的氨基酸序列，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列；

- (6) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 31 所示的氨基酸序列, 所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 30 所示的氨基酸序列, 且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 29 所示的氨基酸序列; 以及
- (7) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 36 所示的氨基酸序列, 所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 35 所示的氨基酸序列, 且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 34 所示的氨基酸序列。
9. 根据权利要求 1-8 中任一项所述的抗原结合蛋白, 其包含 H-FR1, 所述 H-FR1 的 C 末端与所述 HCDR1 的 N 末端直接或间接相连, 且所述 H-FR1 包含 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 32 和 SEQ ID NO: 37 中任一项所示的氨基酸序列。
  10. 根据权利要求 1-9 中任一项所述的抗原结合蛋白, 其包含 H-FR2, 所述 H-FR2 位于所述 HCDR1 与所述 HCDR2 之间, 且所述 H-FR2 包含 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列。
  11. 根据权利要求 1-10 中任一项所述的抗原结合蛋白, 其包含 H-FR3, 所述 H-FR3 位于所述 HCDR2 与所述 HCDR3 之间, 且所述 H-FR3 包含 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列。
  12. 根据权利要求 1-11 中任一项所述的抗原结合蛋白, 其包含 H-FR4, 所述 H-FR4 的 N 末端与所述 HCDR3 的 C 末端直接或间接相连, 且所述 H-FR4 包含 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列。
  13. 根据权利要求 1-12 中任一项所述的抗原结合蛋白, 其包括抗体重链可变区 VH, 且所述 VH 包含 SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 69 和 SEQ ID NO: 70 中任一项所示的氨基酸序列。
  14. 根据权利要求 1-13 中任一项所述的抗原结合蛋白, 其包括抗体重链可变区 VH, 且所述 VH 包含 SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 33 和 SEQ ID NO: 38 中任一项所示的氨基酸序列。
  15. 根据权利要求 1-14 中任一项所述的抗原结合蛋白, 其包括抗体或其抗原结合片段。
  16. 根据权利要求 15 所示的抗原结合蛋白, 其中所述抗原结合片段包括 Fab、Fab'、F(ab)<sub>2</sub>、Fv 片段、F(ab')<sub>2</sub>、scFv、di-scFv、VHH 和/或 dAb。
  17. 根据权利要求 15-16 中任一项所述的抗原结合蛋白, 其中所述抗体选自下组: 单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体和全人源抗体。
  18. 根据权利要求 15-17 中任一项所述的抗原结合蛋白, 其中所述抗原结合片段为 VHH, 且所述 VHH 包含 SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 69 和 SEQ ID NO: 70 中任一项所示的氨基酸序列。
  19. 根据权利要求 18 所述的抗原结合蛋白, 其中所述 VHH 包含 SEQ ID NO: 8、SEQ ID

- NO: 13、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 33 和 SEQ ID NO: 38 中任一项所示的氨基酸序列。
20. 根据权利要求 1-19 中任一项所述的抗原结合蛋白，其能够与参比抗体竞争结合 MSLN (Mesothelin, 间皮素) 蛋白，其中所述参比抗体包含抗体重链可变区 VH，所述参比抗体的 VH 包含 HCDR1，HCDR2 和 HCDR3，且所述参比抗体包含选自下述的任意一组氨基酸序列：
- (1) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列；
  - (2) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列；
  - (3) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列；
  - (4) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 21 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 20 所示的氨基酸序列，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 19 所示的氨基酸序列；
  - (5) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 26 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 25 所示的氨基酸序列，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列；
  - (6) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 31 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 30 所示的氨基酸序列，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 29 所示的氨基酸序列；以及
  - (7) 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 36 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 35 所示的氨基酸序列，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 34 所示的氨基酸序列。
21. 根据权利要求 1-20 中任一项所述的抗原结合蛋白，其包含抗体重链恒定区，所述抗体重链恒定区源自 IgG。
22. 根据权利要求 1-21 中任一项所述的抗原结合蛋白，其包含抗体重链恒定区，所述抗体重链恒定区源自人 IgG。
23. 根据权利要求 1-22 中任一项所述的抗原结合蛋白，其包含抗体重链恒定区，所述抗体重链恒定区源自人 IgG1。
24. 根据权利要求 21-23 中任一项所述的抗原结合蛋白，其中所述抗体重链恒定区包含 IgG 的 Fc 区。
25. 根据权利要求 24 所述的抗原结合蛋白，其中所述 Fc 区包含 SEQ ID NO: 54 所示的氨基酸序列。

26. 嵌合抗原受体，其包含靶向部分，所述靶向部分包含权利要求 1-25 中任一项所述的抗原结合蛋白。
27. 根据权利要求 26 所述的嵌合抗原受体，其包含共刺激域，所述共刺激域包含源自选自下组中的一种或多种蛋白的共刺激域：CD28、4-1BB、CD27、CD2、CD7、CD8、OX40、CD226、DR3、SLAM、CDS、ICAM-1、NKG2D、NKG2C、B7-H3、2B4、FcεRIγ、BTLA、GITR、HVEM、DAP10、DAP12、CD30、CD40、CD40L、TIM1、PD-1、LFA-1、LIGHT、JAML、CD244、CD100、ICOS、CD83 的配体、CD40 和 MyD88。
28. 根据权利要求 27 所述的嵌合抗原受体，其中所述共刺激域为源自 4-1BB 的胞内共刺激信号区域。
29. 根据权利要求 27-28 中任一项所述的嵌合抗原受体，其中所述共刺激域包含 SEQ ID NO: 39 所示的氨基酸序列。
30. 根据权利要求 26-29 中任一项所述的嵌合抗原受体，其包含胞内信号传导域，所述胞内信号传导域包含源自选自下组中的一种或多种蛋白的胞内信号传导域：CD3ζ、CD3δ、CD3γ、CD3ε、CD79a、CD79b、FcεRIγ、FcεRIβ、FcγRIIa、牛白血病病毒 gp30、Epstein-Barr 病毒 (EBV) LMP2A、猿免疫缺陷病毒 PBj14 Nef、卡波西肉瘤疱疹病毒 (HSKV)、DAP10、DAP-12 和至少包含一个 ITAM 的结构域。
31. 根据权利要求 30 所述的嵌合抗原受体，其中所述胞内信号传导域为源自 CD3 ζ 的信号传导域。
32. 根据权利要求 31 所述的嵌合抗原受体，其中所述胞内信号传导域包含 SEQ ID NO: 41 所示的氨基酸序列。
33. 根据权利要求 26-32 中任一项所述的嵌合抗原受体，其包含跨膜区，所述跨膜区包含源自选自下组中的一种或多种蛋白的跨膜域：CD8、CD28、4-1BB、CD4、CD27、CD7、PD-1、TRAC、TRBC、CD3ε、CD3ζ、CTLA-4、LAG-3、CD5、ICOS、OX40、NKG2D、2B4、CD244、FcεRIγ、BTLA、CD30、GITR、HVEM、DAP10、CD2、NKG2C、LIGHT、DAP12、CD40L、TIM1、CD226、DR3、CD45、CD80、CD86、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD134、CD137、CD154 和 SLAM。
34. 根据权利要求 33 所述的嵌合抗原受体，其中所述跨膜区为源自 CD8 的跨膜区。
35. 根据权利要求 34 所述的嵌合抗原受体，其中所述跨膜区包含 SEQ ID NO: 40 所示的氨基酸序列。
36. 根据权利要求 26-35 中任一项所述的嵌合抗原受体，其在靶向部分和跨膜区之间包括铰

- 链区，所述铰链区包含源自选自下组中的一种或多种蛋白的铰链区：CD28、IgG1、IgG4、IgD、4-1BB、CD4、CD27、CD7、CD8、PD-1、ICOS、OX40、NKG2D、NKG2C、FcεRI $\gamma$ 、BTLA、GITR、DAP10、CD40L、TIM1、CD226、SLAM、CD30 和 LIGHT。
37. 根据权利要求 36 所述的嵌合抗原受体，其中所述铰链区为源自 CD8 的铰链区。
  38. 根据权利要求 37 所述的嵌合抗原受体，其中所述铰链区包含 SEQ ID NO: 42 所示的氨基酸序列。
  39. 根据权利要求 26-38 中任一项所述的嵌合抗原受体，其还包含信号肽。
  40. 根据权利要求 39 所述的嵌合抗原受体，其中所述信号肽源自 CD8 蛋白的信号肽。
  41. 根据权利要求 40 所述的嵌合抗原受体，其中所述信号肽包含 SEQ ID NO: 43 所示的氨基酸序列。
  42. 根据权利要求 26-41 中任一项所述的嵌合抗原受体，其还包含低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段。
  43. 根据权利要求 42 所述的嵌合抗原受体，其中所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段包含选自下组的一种或多种：低密度脂蛋白受体相关蛋白 1-12 和其功能性片段。
  44. 根据权利要求 42-43 中任一项所述的嵌合抗原受体，其中所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段为低密度脂蛋白受体相关蛋白 5 和/或 6 或其片段。
  45. 根据权利要求 42-44 中任一项所述的嵌合抗原受体，其中所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段包含 SEQ ID NO: 44 所示的氨基酸序列。
  46. 根据权利要求 26-45 中任一项所述的嵌合抗原受体，其包含 SEQ ID NO: 47、SEQ ID NO: 48、SEQ ID NO: 49、SEQ ID NO: 50、SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 52 和 SEQ ID NO: 53 中任一项所示的氨基酸序列。
  47. 多肽，其包含权利要求 1-25 中任一项所述的抗原结合蛋白。
  48. 一种或多种分离的核酸分子，其编码权利要求 1-25 中任一项所述的抗原结合蛋白和/或权利要求 26-46 中任一项所述的嵌合抗原受体。
  49. 根据权利要求 48 所述的核酸分子，其还包含启动子。
  50. 根据权利要求 49 所述的核酸分子，其中所述启动子为组成型启动子。
  51. 根据权利要求 49-50 中任一项所述的核酸分子，其中所述启动子为 EF1 $\alpha$  启动子。
  52. 载体，其包含权利要求 48-51 中任一项所述的核酸分子。
  53. 根据权利要求 52 所述的载体，其包含病毒载体。
  54. 根据权利要求 52-53 中任一项所述的载体，其包含慢病毒载体。

55. 细胞，其包含权利要求 1-25 中任一项所述的抗原结合蛋白，权利要求 26-46 中任一项所述的嵌合抗原受体，权利要求 47 所述的多肽，权利要求 48-51 中任一项所述的核酸分子，和/或权利要求 52-54 中任一项所述的载体。
56. 根据权利要求 55 所述的细胞，其为免疫效应细胞。
57. 根据权利要求 55-56 中任一项所述的细胞，其包括 T 细胞、B 细胞、天然杀伤细胞（NK 细胞）、巨噬细胞、NKT 细胞、单核细胞、树突状细胞、粒细胞、淋巴细胞、白细胞、外周血单个核细胞、胚胎干细胞、淋巴祖细胞和/或多能干细胞。
58. 根据权利要求 55-57 中任一项所述的细胞，其为 T 细胞。
59. 根据权利要求 55-58 中任一项所述的细胞，其还包含和/或表达低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段。
60. 根据权利要求 59 所述的细胞，其中所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段包含选自下组的一种或多种：低密度脂蛋白受体相关蛋白 1-12 和其功能性片段。
61. 根据权利要求 59-60 中任一项所述的细胞，其中所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段为低密度脂蛋白受体相关蛋白 5 和/或 6 或其片段。
62. 根据权利要求 59-61 中任一项所述的细胞，其中所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段包含 SEQ ID NO: 44 所示的氨基酸序列。
63. 制备权利要求 1-25 中任一项所述的抗原结合蛋白和/或权利要求 26-46 中任一项所述的嵌合抗原受体的方法，所述方法包括在使得权利要求 1-25 中任一项所述的抗原结合蛋白和/或权利要求 26-46 中任一项所述的嵌合抗原受体表达的条件下，培养权利要求 51-58 中任一项所述的细胞。
64. 制备经修饰的免疫效应细胞的方法，其包括向免疫效应细胞中引入权利要求 52-54 中任一项所述的载体。
65. 药物组合物，其包含权利要求 1-25 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，权利要求 26-46 中任一项所述的嵌合抗原受体，权利要求 47 所述的多肽，权利要求 48-51 中任一项所述的核酸分子，权利要求 52-54 中任一项所述的载体，和/或权利要求 55-62 中任一项所述的细胞，以及任选地药学上可接受的载体。
66. 权利要求 1-25 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，权利要求 26-46 中任一项所述的嵌合抗原受体，权利要求 47 所述的多肽，权利要求 48-51 中任一项所述的核酸分子，权利要求 52-54 中任一项所述的载体，权利要求 55-62 中任一项所述的细胞，和/或权利要求 65 所述的药物组合物，在制备药物中的用途，所述药物用于预防、治疗和/或缓解与 MSLN 异常表达相关的疾病或病症。

67. 根据权利要求 66 所述的用途，其中所述与 MSLN 异常表达相关的疾病或病症包括肿瘤。
68. 根据权利要求 67 所述的用途，其中所述肿瘤包括实体瘤。
69. 根据权利要求 67 所述的用途，其中所述肿瘤包括非实体瘤。
70. 根据权利要求 67-69 中任一项所述的用途，其中所述肿瘤包括表达 MSLN 抗原的肿瘤。
71. 根据权利要求 67-70 中任一项所述的用途，其中所述肿瘤包括卵巢癌、胰腺癌、胃癌、间皮细胞癌、胆管癌、三阴性乳腺癌和/或子宫内膜癌。
72. 一种预防、治疗和/或缓解与 MSLN 异常表达相关的疾病或病症的方法，所述方法包括向有需要的受试者施用权利要求 1-25 中任一项所述的抗原结合蛋白，权利要求 26-46 中任一项所述的嵌合抗原受体，权利要求 47 所述的多肽，权利要求 48-51 中任一项所述的核酸分子，权利要求 52-54 中任一项所述的载体，权利要求 55-62 中任一项所述的细胞，和/或权利要求 65 所述的药物组合物。
73. 根据权利要求 72 所述的方法，其中所述与 MSLN 异常表达相关的疾病或病症包括肿瘤。
74. 根据权利要求 73 所述的方法，其中所述肿瘤包括实体瘤。
75. 根据权利要求 73 所述的方法，其中所述肿瘤包括非实体瘤。
76. 根据权利要求 73-75 中任一项所述的方法，其中所述肿瘤包括表达 MSLN 抗原的肿瘤。
77. 根据权利要求 73-76 中任一项所述的方法，其中所述肿瘤包括卵巢癌、胰腺癌、胃癌、间皮细胞癌、胆管癌、三阴性乳腺癌和/或子宫内膜癌。

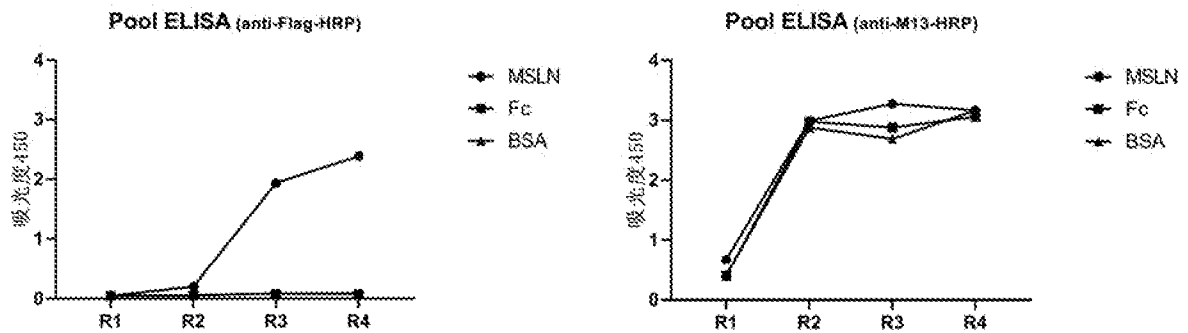


图 1

MSLN/Fc	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	37.9375	34.86306	27.27083	23.28302	1	36.5	1.390476	1.898058	9.125	5.877551	1.897959	2.491071
B	31.75	25.10204	4.18	35.05832	0.886792	32.78431	27.6	2.311688	1.584906	25.42657	42.18961	7.54
C	18.125	1.39726	23.77356	1.208333	1.028986	38.71154	0.980769	1	1	1.620968	2.387755	20.8057
D	2.346939	9.839706	1.196078	26.13725	42.44	0.587302	37.68	1.322034	25.78592	2.303738	1.16	1.295082
E	2.363636	35.5625	1.02	2.169811	35.34815	37.31373	40.34694	27.86667	1.573034	30.02	7.259258	23.5
F	2.632653	1.602837	2.113636	9.072464	1.305085	1.991379	23.04	2.037383	4.546584	12.73077	1.414286	26.1
G	11.34894	1.984375	11.63158	29.18	56.33333	21.22353	41.22222	9.192368	24.04	1.777778	1.134615	20.27451
H	26.38735	30.78	33.3125	41.17388	1.375	1.339623	1.3	1.074074	9.555556	31.82157	32.08772	31.34818

MSLN/Fc	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	27.77193	14.82243	25.71154	12.04673	26	27.73333	1.516129	2.356383	35.35195	3.875	2.641509	28.83768
B	38.09615	25.23302	21.92857	31.32682	8.24	29.17847	34.72727	34.41618	6.435165	18.85788	1.417391	5.230768
C	28.89482	1.275862	24.92857	12.55128	21.02247	27.28825	0.32	30.2983	14.82759	16.5825	12.04902	23.01667
D	18.57882	6.75	27.33962	13.82143	22.61818	6.783536	32.48333	38.69811	33.86071	23.23302	10.24074	8.753428
E	29.33333	28.50888	21.22368	33.34815	25.03784	31.05769	20.88375	21.7377	1.735294	9.142657	16.67797	7.415094
F	33.50843	2.59799	13.48193	30.83829	6.616182	37	28.9	36.92857	8.097353	16.03774	30.94444	26.38588
G	14.05455	30.12281	18.61818	27.31818	26.48057	28.0283	2.285714	27.11111	34.48214	12.93211	28.28786	1.5
H	25.40365	34.90385	32.53571	1.375	37.58364	8.953571	32.31481	18.4875	29.65574	22.59258	1.176923	39.80714

图 2

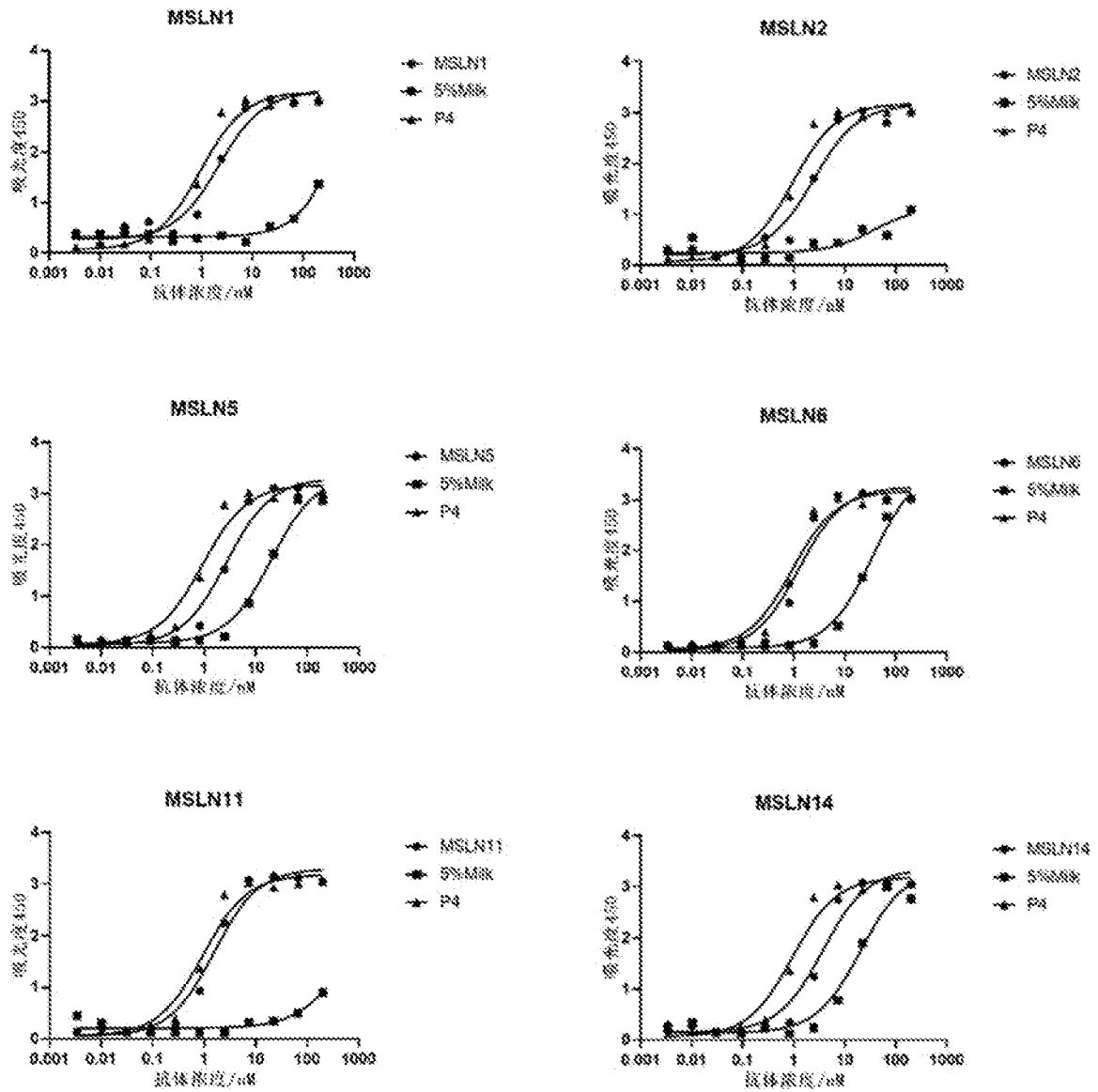


图 3A

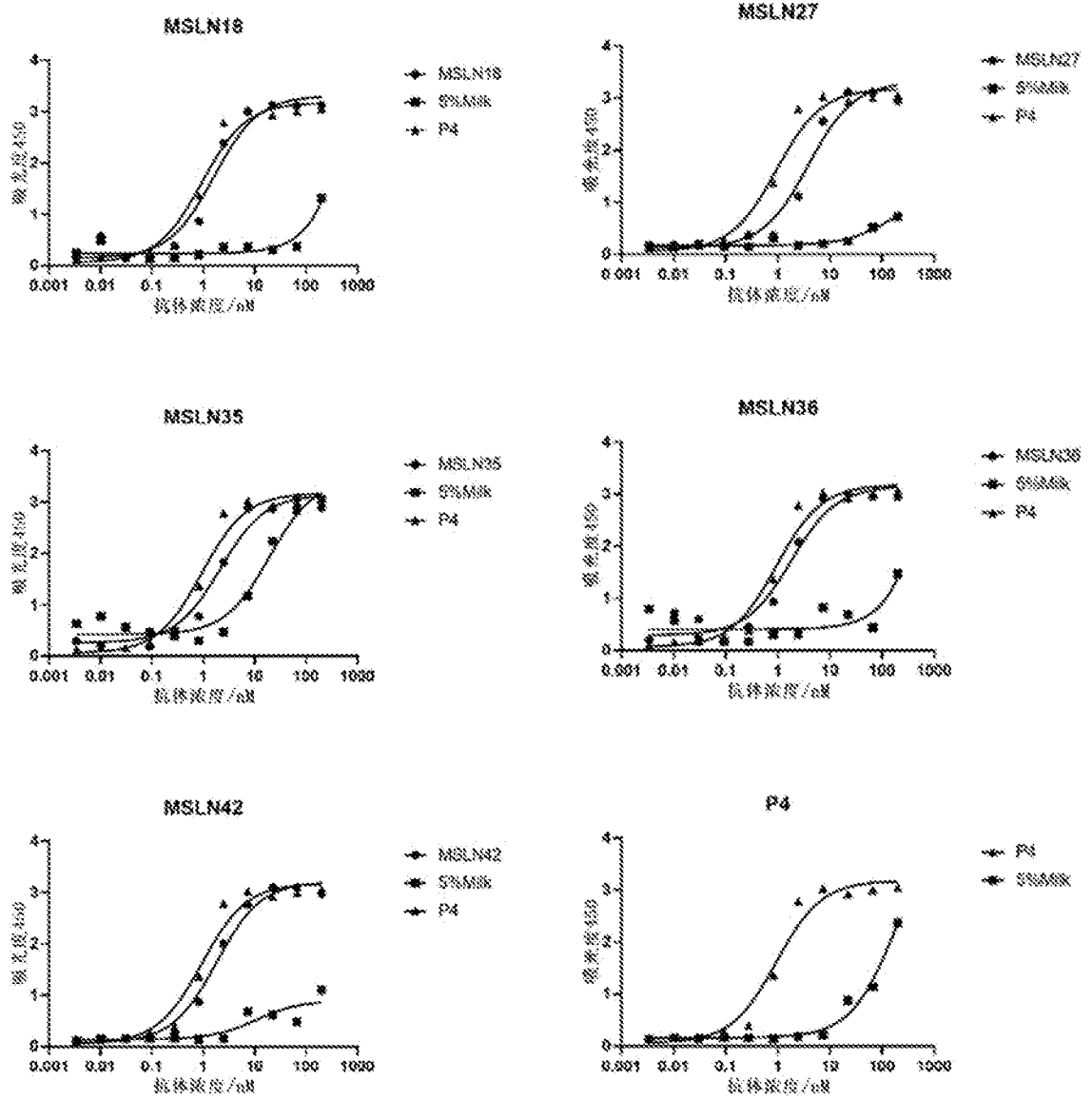


图 3B

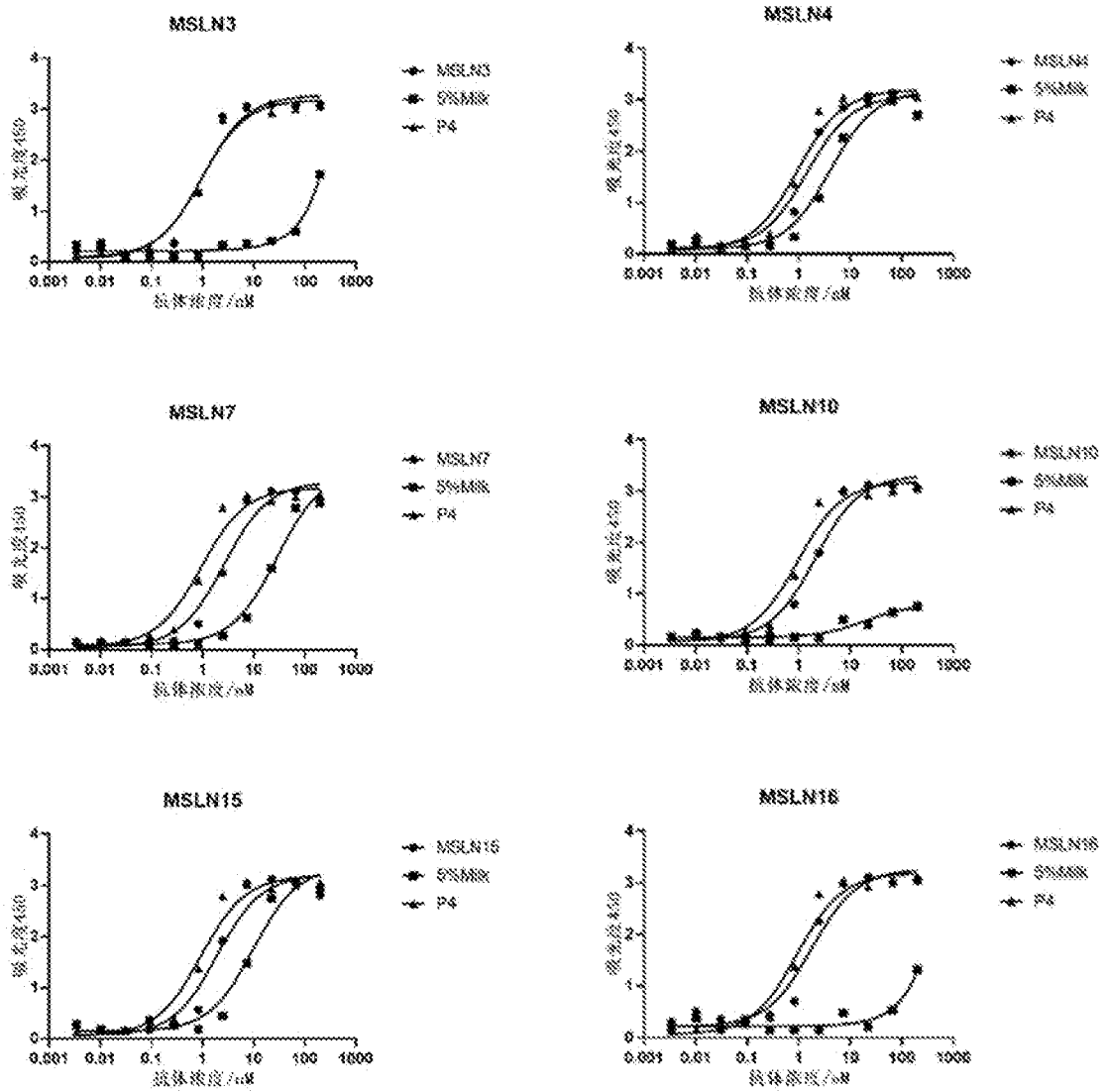


图 3C

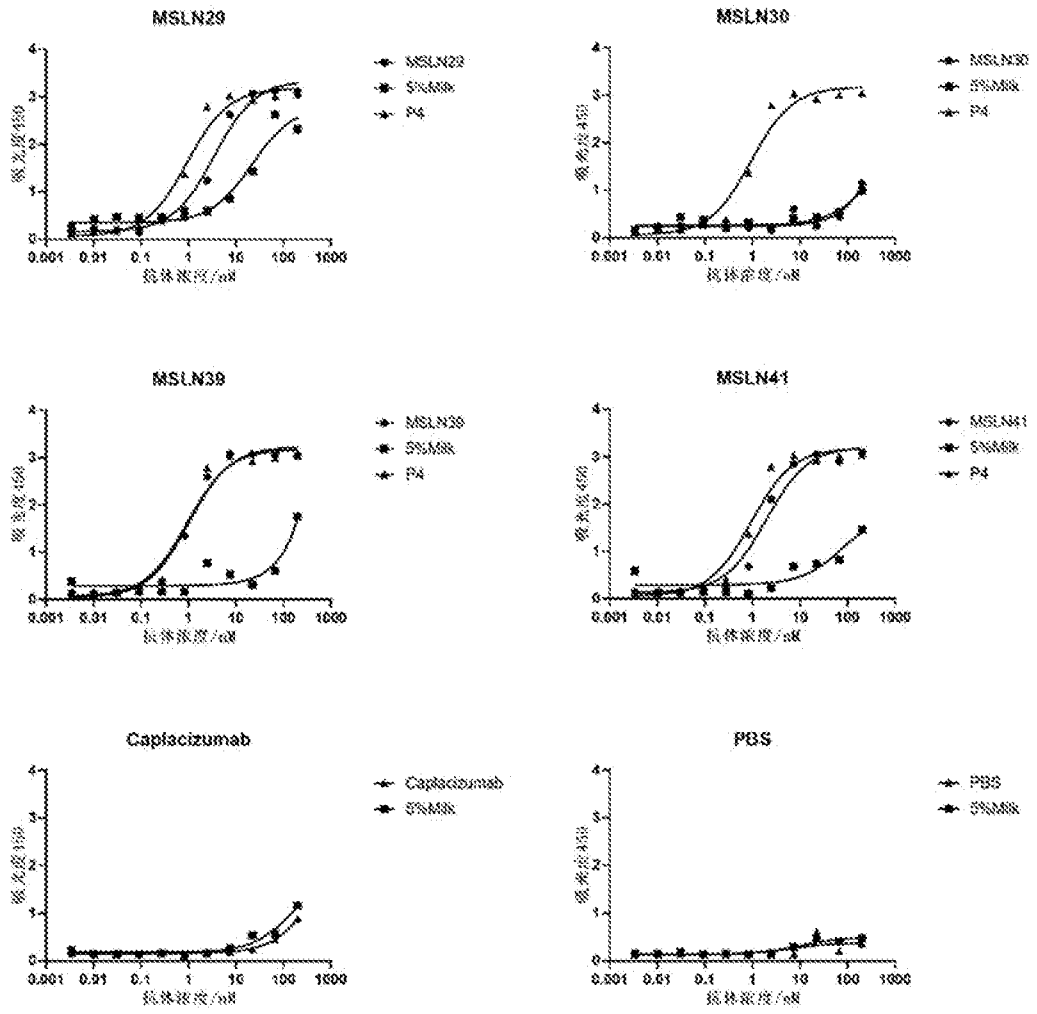


图 3D

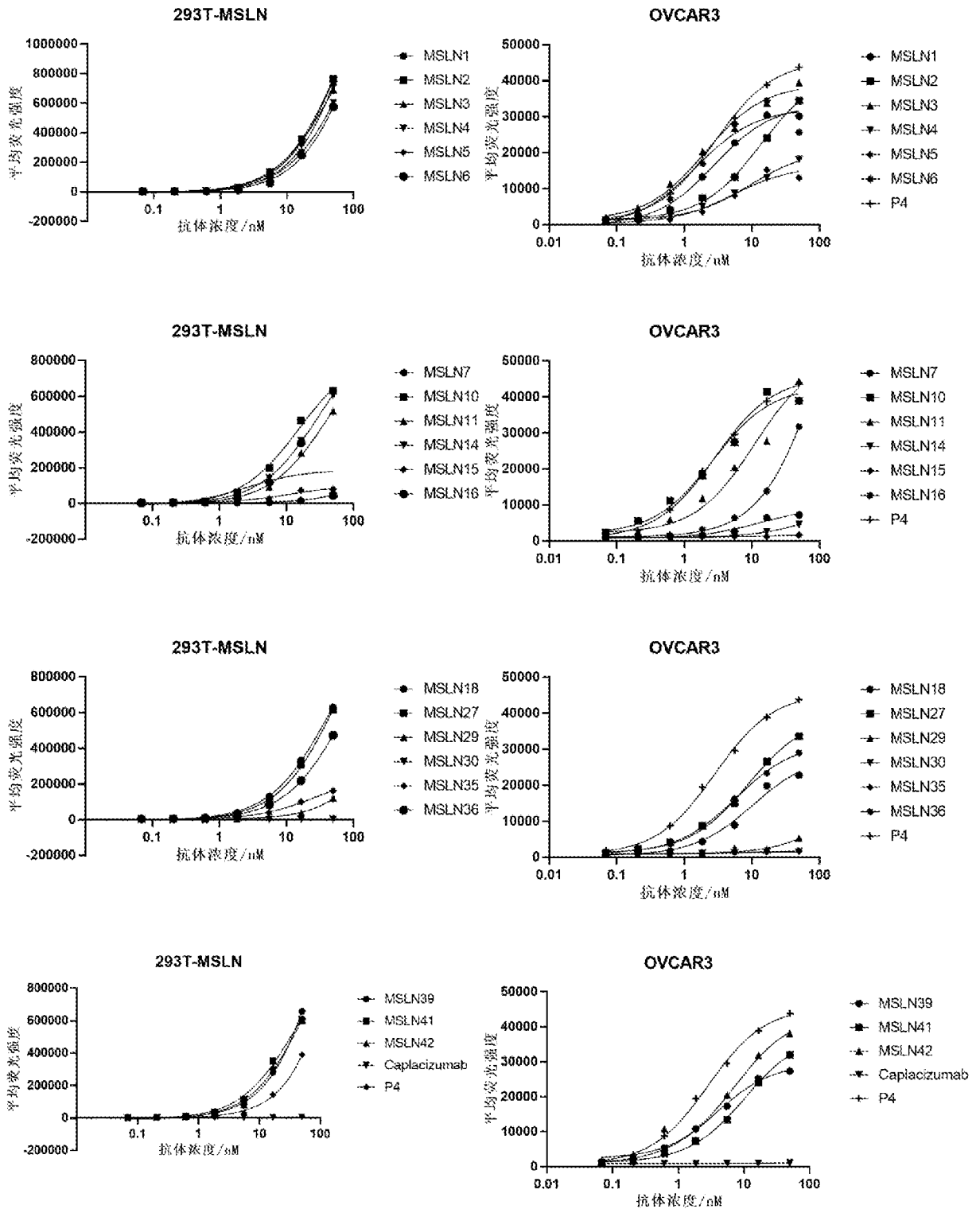


图 4

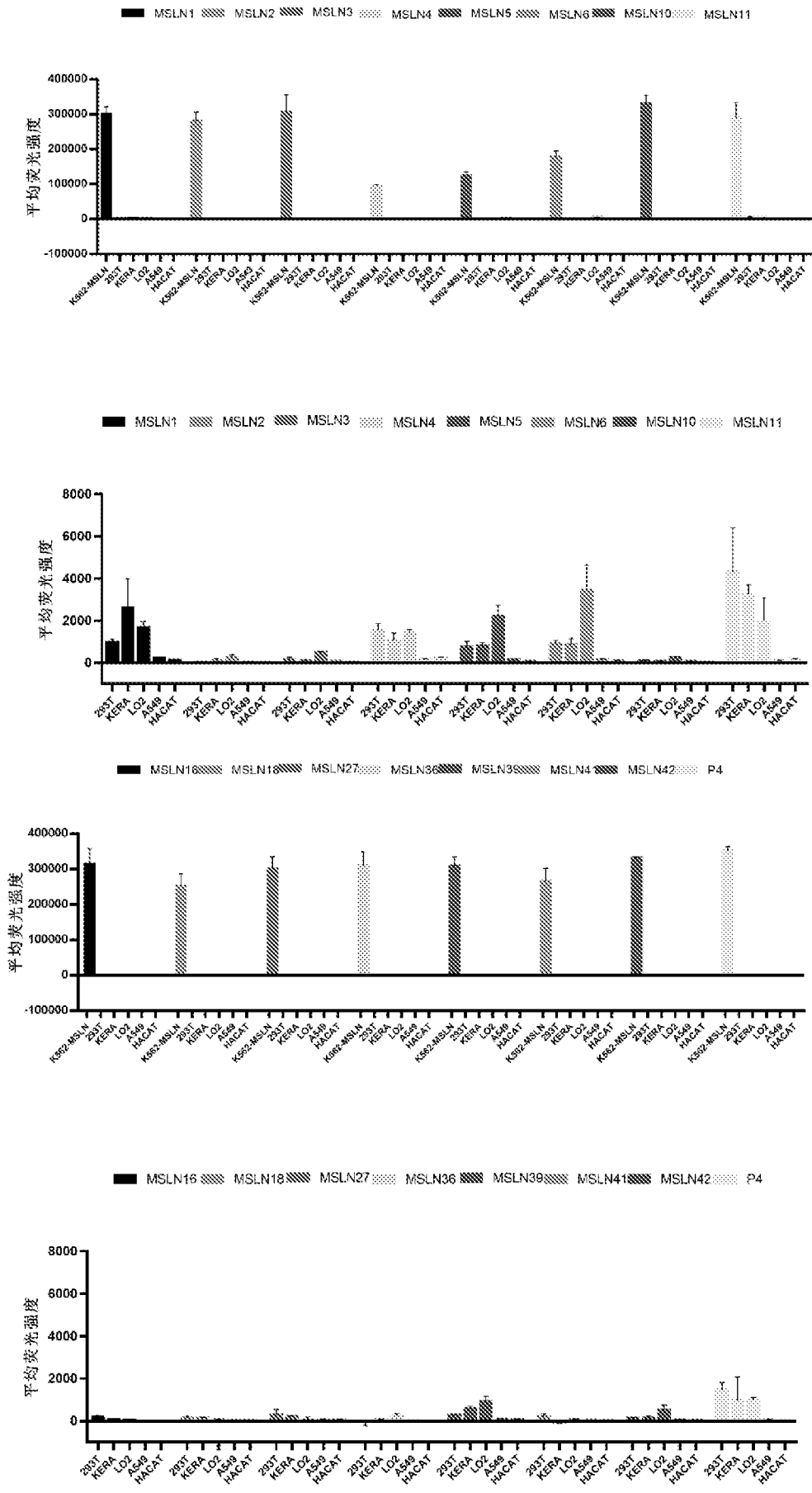


图 5

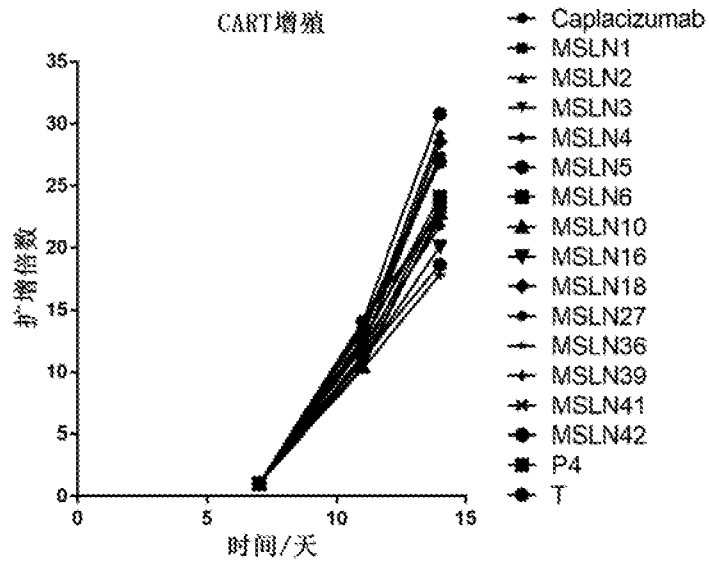


图 6

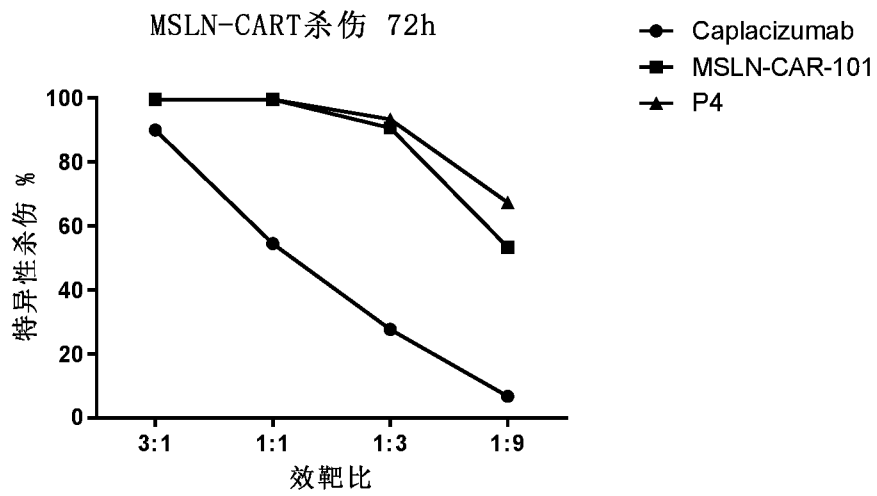
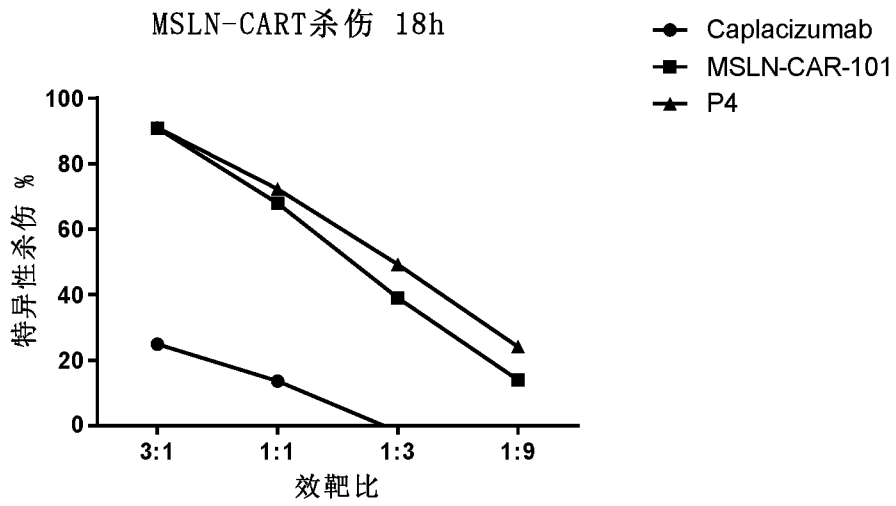


图 7

### IL2 分泌

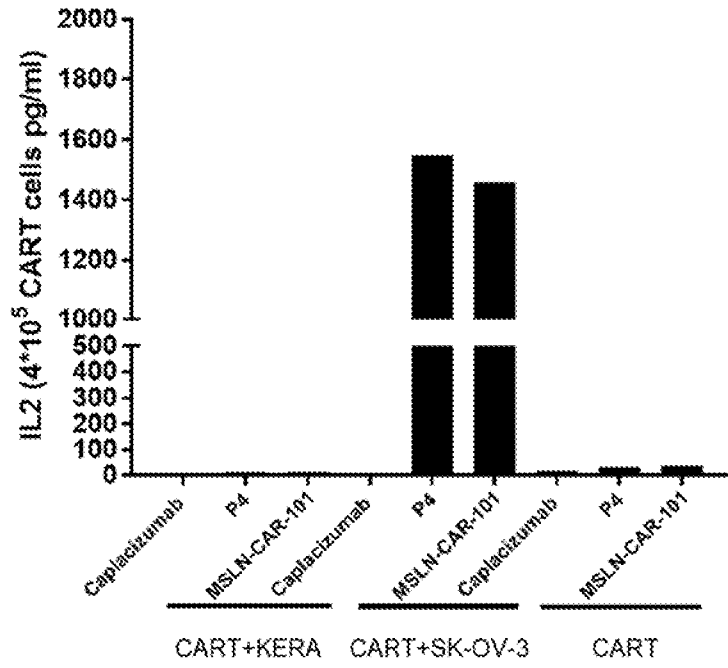


图 8

### TNF $\alpha$ 分泌

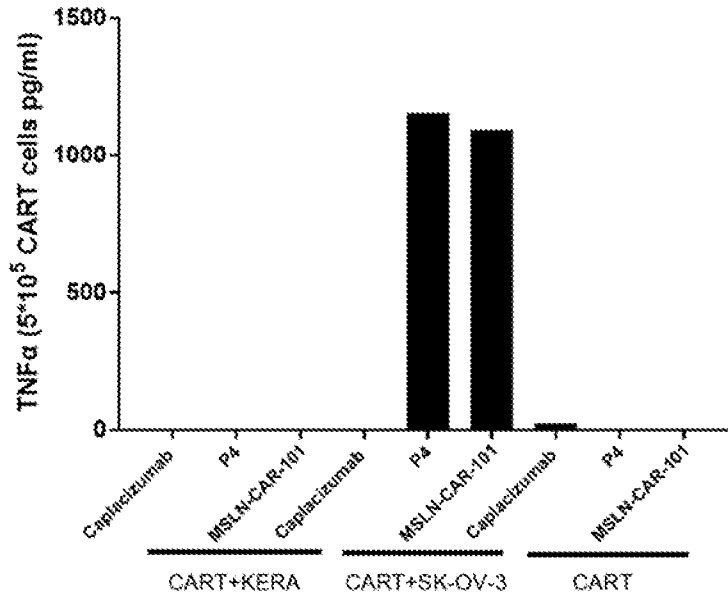


图 9

### IFN- $\gamma$ 分泌

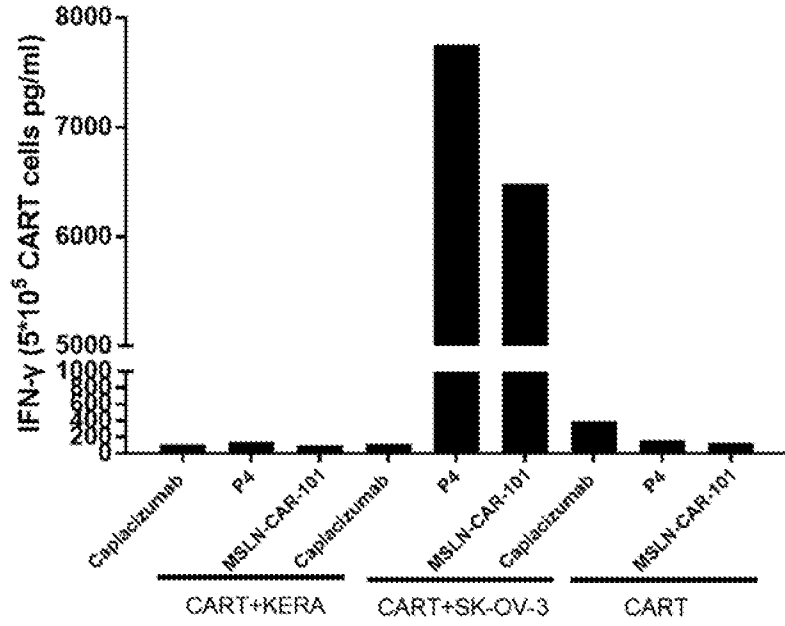


图 10

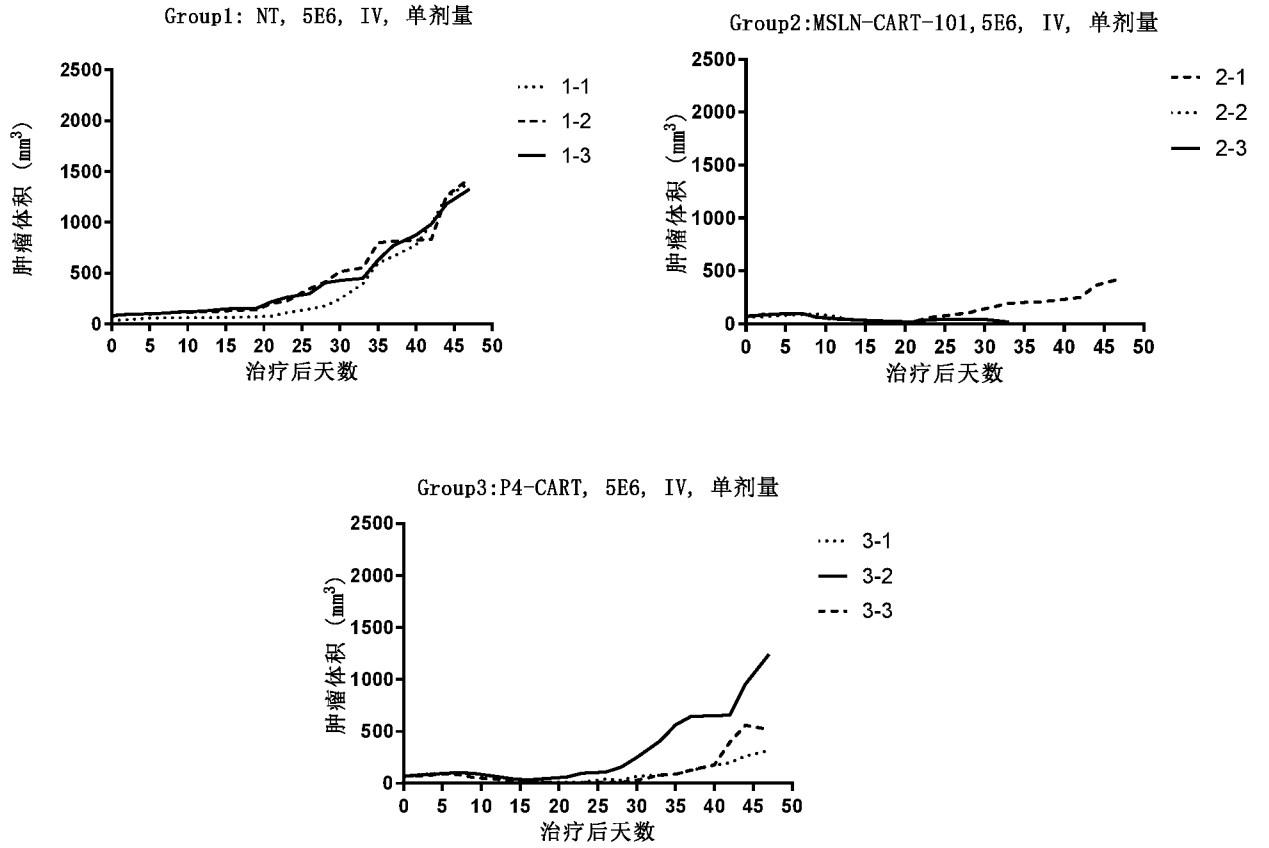


图 11

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/070928

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
C07K16/28(2006.01)i;C07K16/30(2006.01)i;C07K19/00(2006.01)i;C12N15/85(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC:C07K; C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNKI, CNTXT, DWPI, ENTXT, ELSEVIER, ISI Web of Knowledge, PubMed, 中国专利生物序列检索系统, China Patent Biological Sequence Search System, Genbank, EMBL, STN, 抗体, 抗原, 抗原结合蛋白, 单克隆抗体, 单抗, 纳米抗体, 单域抗体, 间皮素, 嵌合抗原受体, CAR, antibody, McAb, monoclonal antibody, humanized antibody, nanobody, VHH, CDR, MSLN, mesothelin		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2017267755 A1 (SRI INTERNATIONAL) 21 September 2017 (2017-09-21) claims 1-2, specific embodiments, sequence listing	1-77
A	CN 109111528 A (HANGZHOU POOLINGMED BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 01 January 2019 (2019-01-01) specific embodiments, sequence table	1-77
A	CN 103819559 A (WUHAN INSTITUTE OF VIROLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 28 May 2014 (2014-05-28) entire document	1-77
A	CN 111560072 A (SHANGHAI HRAIN BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 21 August 2020 (2020-08-21) entire document	1-77
A	CN 111349165 A (NANJING LANDUN BIOLOGICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 30 June 2020 (2020-06-30) entire document	1-77
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search <b>13 March 2023</b>		Date of mailing of the international search report <b>17 March 2023</b>
Name and mailing address of the ISA/CN <b>China National Intellectual Property Administration (ISA/ CN) China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088</b>		Authorized officer
Facsimile No. (86-10)62019451		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/070928

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 110698562 A (ZHEJIANG BLUE SHIELD PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 17 January 2020 (2020-01-17) entire document	1-77
A	CN 112225811 A (SHANGHAI HRAIN BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 15 January 2021 (2021-01-15) entire document	1-77
A	CN 107840891 A (SHANGHAI GENBASE BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 27 March 2018 (2018-03-27) entire document	1-77
A	US 2018002439 A1 (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECH MEDICALE (INSERM) et al.) 04 January 2018 (2018-01-04) entire document	1-77
A	CN 111848819 A (GUANGDONG ZHAOTAI TINEI BIOMEDICAL TECH CO., LTD.) 30 October 2020 (2020-10-30) entire document	1-77
A	CN 112210008 A (SHANGHAI HENGRUN DASHENG BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 12 January 2021 (2021-01-12) entire document	1-77
A	CN 108129566 A (WUHAN INSTITUTE OF VIROLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 08 June 2018 (2018-06-08) entire document	1-77
A	US 2020262928 A1 (GREEN CROSS CO. et al.) 20 August 2020 (2020-08-20) entire document	1-77

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
  - a.  forming part of the international application as filed.
  - b.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),  
 accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2.  With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: **72-77**  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  
Claims 72-77 relate to a method for treating diseases, which falls within the subject matter for which no search is required as defined in PCT Rule 39.1(iv). In the present report, a search is carried out on the basis of "the use of the antigen-binding protein of any one of claims 1-25, the chimeric antigen receptor of any one of claims 26-46, the polypeptide of claim 47, the nucleic acid molecule of any one of claims 48-51, the vector of any one of claims 52-54, the cell of any one of claims 55-62, and/or the pharmaceutical composition of claim 65 in the preparation of a drug for preventing, treating and/or alleviating diseases or conditions related to abnormal expression of MSLN".
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2023/070928**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)	
US	2017267755	A1	21 September 2017	None		
CN	109111528	A	01 January 2019	None		
CN	103819559	A	28 May 2014	None		
CN	111560072	A	21 August 2020	None		
CN	111349165	A	30 June 2020	None		
CN	110698562	A	17 January 2020	None		
CN	112225811	A	15 January 2021	None		
CN	107840891	A	27 March 2018	None		
US	2018002439	A1	04 January 2018	None		
CN	111848819	A	30 October 2020	None		
CN	112210008	A	12 January 2021	None		
CN	108129566	A	08 June 2018	None		
US	2020262928	A1	20 August 2020	EP	3699199 A2	26 August 2020
				EP	3699199 A4	30 June 2021
				EA	202090945 A1	14 July 2020
				CA	3077009 A1	25 April 2019
				WO	2019078698 A2	25 April 2019
				WO	2019078698 A3	04 July 2019
				KR	101966362 B1	05 April 2019
				US	11401343 B2	02 August 2022
				IL	274008 A	31 May 2020
				BR	112020007739 A2	20 October 2020
				MX	2020003943 A	13 August 2020
				AU	2018351417 A1	28 May 2020
				AU	2018351417 B2	23 December 2021
				JP	2021507678 A	25 February 2021
				JP	6978598 B2	08 December 2021
				SG	11202003278 RA	28 May 2020

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2023/070928

<p><b>A. 主题的分类</b></p> <p>C07K16/28(2006.01)i;C07K16/30(2006.01)i;C07K19/00(2006.01)i;C12N15/85(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																										
<p><b>B. 检索领域</b></p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>IPC:C07K; C12N</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNKI, CNTXT, DWPI, ENTXT, ELSEVIER, ISI Web of Knowledge, PubMed, 中国专利生物序列检索系统, Genbank, EMBL, STN, 抗体, 抗原, 抗原结合蛋白, 单克隆抗体, 单抗, 纳米抗体, 单域抗体, 间皮素, 嵌合抗原受体, CAR, antibody, McAb, monoclonal antibody, humanized antibody, nanobody, VHH, CDR, MSLN, mesothelin</p>																										
<p><b>C. 相关文件</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>US 2017267755 A1 (SRI INTERNATIONAL) 2017年9月21日 (2017 - 09 - 21) 权利要求1-2, 具体实施方式, 序列表</td> <td>1-77</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 109111528 A (杭州普略生物科技有限公司) 2019年1月1日 (2019 - 01 - 01) 具体实施方式, 序列表</td> <td>1-77</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 103819559 A (中国科学院武汉病毒研究所) 2014年5月28日 (2014 - 05 - 28) 全文</td> <td>1-77</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 111560072 A (上海恒润达生物科技有限公司) 2020年8月21日 (2020 - 08 - 21) 全文</td> <td>1-77</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 111349165 A (南京蓝盾生物科技有限公司) 2020年6月30日 (2020 - 06 - 30) 全文</td> <td>1-77</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 110698562 A (浙江蓝盾药业有限公司) 2020年1月17日 (2020 - 01 - 17) 全文</td> <td>1-77</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 112225811 A (上海恒润达生物科技有限公司) 2021年1月15日 (2021 - 01 - 15) 全文</td> <td>1-77</td> </tr> </tbody> </table> <p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。      <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p> <p>* 引用文件的具体类型:          “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件          “D” 申请人在国际申请中引证的文件          “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利          “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)          “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件          “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件          “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件          “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性          “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性          “&amp;” 同族专利的文件</p>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	A	US 2017267755 A1 (SRI INTERNATIONAL) 2017年9月21日 (2017 - 09 - 21) 权利要求1-2, 具体实施方式, 序列表	1-77	A	CN 109111528 A (杭州普略生物科技有限公司) 2019年1月1日 (2019 - 01 - 01) 具体实施方式, 序列表	1-77	A	CN 103819559 A (中国科学院武汉病毒研究所) 2014年5月28日 (2014 - 05 - 28) 全文	1-77	A	CN 111560072 A (上海恒润达生物科技有限公司) 2020年8月21日 (2020 - 08 - 21) 全文	1-77	A	CN 111349165 A (南京蓝盾生物科技有限公司) 2020年6月30日 (2020 - 06 - 30) 全文	1-77	A	CN 110698562 A (浙江蓝盾药业有限公司) 2020年1月17日 (2020 - 01 - 17) 全文	1-77	A	CN 112225811 A (上海恒润达生物科技有限公司) 2021年1月15日 (2021 - 01 - 15) 全文	1-77
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																								
A	US 2017267755 A1 (SRI INTERNATIONAL) 2017年9月21日 (2017 - 09 - 21) 权利要求1-2, 具体实施方式, 序列表	1-77																								
A	CN 109111528 A (杭州普略生物科技有限公司) 2019年1月1日 (2019 - 01 - 01) 具体实施方式, 序列表	1-77																								
A	CN 103819559 A (中国科学院武汉病毒研究所) 2014年5月28日 (2014 - 05 - 28) 全文	1-77																								
A	CN 111560072 A (上海恒润达生物科技有限公司) 2020年8月21日 (2020 - 08 - 21) 全文	1-77																								
A	CN 111349165 A (南京蓝盾生物科技有限公司) 2020年6月30日 (2020 - 06 - 30) 全文	1-77																								
A	CN 110698562 A (浙江蓝盾药业有限公司) 2020年1月17日 (2020 - 01 - 17) 全文	1-77																								
A	CN 112225811 A (上海恒润达生物科技有限公司) 2021年1月15日 (2021 - 01 - 15) 全文	1-77																								
国际检索实际完成的日期	2023年3月13日	国际检索报告邮寄日期	2023年3月17日																							
ISA/CN的名称和邮寄地址	中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	授权官员	刘宝																							
传真号 (86-10)62019451		电话号码 (+86) 010-53962038																								

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 107840891 A (上海吉倍生物技术有限公司) 2018年3月27日 (2018 - 03 - 27) 全文	1-77
A	US 2018002439 A1 (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECH MEDICALE (INSERM) 等) 2018年1月4日 (2018 - 01 - 04) 全文	1-77
A	CN 111848819 A (广东昭泰体内生物医药科技有限公司) 2020年10月30日 (2020 - 10 - 30) 全文	1-77
A	CN 112210008 A (上海恒润达生物科技有限公司) 2021年1月12日 (2021 - 01 - 12) 全文	1-77
A	CN 108129566 A (中国科学院武汉病毒研究所) 2018年6月8日 (2018 - 06 - 08) 全文	1-77
A	US 2020262928 A1 (GREEN CROSS CO. 等) 2020年8月20日 (2020 - 08 - 20) 全文	1-77

第1栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列列表进行的:

- a.  作为国际申请的一部分提交的:
- b.  为国际检索的目的在国际申请日之后提交(细则13之三. 1(a)),  
 附有说明序列列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。

2.  本报告是在没有收到符合WIPO ST. 26标准的序列列表的情况下, 考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 在可进行有意义检索的范围内做出的。

3. 补充意见:

## 第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1.  权利要求： 72-77  
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：  
权利要求72-77涉及疾病的治疗方法，属于细则第39.1(iv)规定的不进行检索主题。本报告基于“权利要求1-25 中任一项所述的抗原结合蛋白，权利要求26-46中任一项所述的嵌合抗原受体，权利要求47所述的多肽，权利要求48-51中任一项所述的核酸分子，权利要求52-54 中任一项所述的载体，权利要求55-62 中任一项所述的细胞，和/或权利要求65所述的药物组合物在制备预防、治疗和/或缓解与MSLN异常表达相关的疾病或病症的药物中的用途”进行了检索。
2.  权利要求：  
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：
3.  权利要求：  
因为它们是从属权利要求， 并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/070928

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
US	2017267755	A1	2017年9月21日	无	
CN	109111528	A	2019年1月1日	无	
CN	103819559	A	2014年5月28日	无	
CN	111560072	A	2020年8月21日	无	
CN	111349165	A	2020年6月30日	无	
CN	110698562	A	2020年1月17日	无	
CN	112225811	A	2021年1月15日	无	
CN	107840891	A	2018年3月27日	无	
US	2018002439	A1	2018年1月4日	无	
CN	111848819	A	2020年10月30日	无	
CN	112210008	A	2021年1月12日	无	
CN	108129566	A	2018年6月8日	无	
US	2020262928	A1	2020年8月20日	EP	3699199 A2 2020年8月26日
				EP	3699199 A4 2021年6月30日
				EA	202090945 A1 2020年7月14日
				CA	3077009 A1 2019年4月25日
				WO	2019078698 A2 2019年4月25日
				WO	2019078698 A3 2019年7月4日
				KR	101966362 B1 2019年4月5日
				US	11401343 B2 2022年8月2日
				IL	274008 A 2020年5月31日
				BR	112020007739 A2 2020年10月20日
				MX	2020003943 A 2020年8月13日
				AU	2018351417 A1 2020年5月28日
				AU	2018351417 B2 2021年12月23日
				JP	2021507678 A 2021年2月25日
				JP	6978598 B2 2021年12月8日
				SG	11202003278 RA 2020年5月28日