抗人 MSLN 单克隆抗体的构建及体外活性表征

陆　颖，朱建伟*

（上海交通大学药学院，细胞工程与抗体药物教育部工程研究中心，上海 200240）

摘要：由于间皮素（MSLN）在多种实体瘤中广泛表达而在正常间皮细胞上表达较低，可作为实体瘤治疗的重要靶点。研究旨在通过将具有较高亲和力的重组抗人 MSLN IgG1 型单克隆抗体（rhMSLN mAb）序列构建到哺乳动物细胞表达载体 pcDNA3.4 中，采用 Expi293F 细胞系高效表达重组单克隆抗体 rhMSLN mAb，并采用表面等离子体共振和流式细胞术对其结合活性进行初步探究，采用乳酸脱氢酶（LDH）释放法鉴定其介导的抗体依赖的细胞毒作用（ADCC）。研究结果表明，rhMSLN mAb 在 Expi293F 细胞中以特定条件进行瞬时表达的产量可达 70.2 mg/L，与 MSLN 重组蛋白的亲和力为 7.02 nmol/L，对人胃癌细胞（NCI-N87 细胞）ADCC 作用的 EC_{50} 为 2.48×10^{-3} μg/mL，为靶向 MSLN 生物技术药物开发及生产提供了前期探索性支持。

关键词：间皮素；单克隆抗体；Expi293F 细胞；抗体依赖的细胞毒作用

中图分类号：Q816　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2024)06-0804-07

DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2024.06.010

Preparation and *in vitro* Bioactivity Characterization of Recombinant Humanized Anti-MSLN Monoclonal Antibody

LU Ying, ZHU Jianwei*

(*Engineering Research Center of Cell & Therapeutic Antibody (MOE), School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240*)

ABSTRACT: Mesothelin (MSLN) could be served as an important target for immunotherapy for its wide expression in a variety of solid tumors and less expression in normal mesothelial cells. In this study, a recombinant humanized IgG1 monoclonal antibody (rhMSLN mAb) sequence against MSLN with high affinity was constructed into the mammalian cell expression vector pcDNA3.4, and efficiently expressed by the Expi293F cell line. Then, the affinity of the antibody was assessed by surface plasmon resonance and flow cytometry at the molecular and cellular levels respectively. Lactate dehydrogenase (LDH) release assay was used to identify the antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) mediated by the antibody. The results showed that rhMSLN mAb could yield up to 70.2 mg/L under specific conditions by the Expi293F cell line. The affinity to recombinant MSLN was 7.02 nmol/L. The EC_{50} of ADCC against human gastric carcinoma cell line (NCI-N87 cell) was 2.48×10^{-3} μg/mL. This study provided explorative support for the development and production of biopharmaceuticals targeting MSLN.

Key Words: mesothelin; monoclonal antibody; Expi293F cell line; antibody-dependent cellular cytotoxicity

间皮素（mesothelin，MSLN）是通过糖基磷脂酰肌醇锚定在细胞表面的蛋白，由位于人类染色体 16p.13.3 的 *msln* 基因编码。*msln* 基因可编码表达一种相对分子质量为 71 000 的前体蛋白，经水解后生成相对分子质量为 40 000 的 MSLN 和相对分子质量为 31 000 的巨核细胞增强因子（megakaryocyte-potentiating factor，MPF）[1—2]。MSLN 在正常生理条件下的功能尚不完全清楚，但其在间皮瘤、卵巢癌、

收稿日期：2023-11-17

作者简介：陆　颖（1997—），女，硕士，专业方向：微生物与生化药学。

通信作者：朱建伟（1956—），男，博士，讲席教授，从事生物技术药物的研发。

E-mail：jianweiz@sjtu.edu.cn

胰腺癌、胃癌和乳腺癌等多种实体瘤中过表达[1—4]。MSLN 的过表达可激活多种细胞内途径，包括核因子 κB(nuclear factor-κB，NFκB)、促分裂原活化的蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase，MAPK) 和磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphoinositide 3-kinase，PI3K) 途径，并通过诱导基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases，MMPs) 的激活和表达以抗细胞凋亡或促进细胞增殖和转移，导致细胞耐药[5—7]。此外，MSLN 过表达常与预后不良有关[8—10]。因此，近年来 MSLN 已成为热门的肿瘤免疫治疗靶点，应用前景良好。

人胚肾细胞 (HEK293F 细胞) 是常见的用于重组真核糖蛋白生产的哺乳动物细胞系。相较于上一代 HEK293T 细胞系，HEK293F 细胞克服了贴壁生长的限制，增加了每升培养体积的蛋白质产量。然而，HEK293F 细胞培养时细胞密度较低 (不超过每 1 mL 含 1×10^6 ～ 2×10^6 个细胞)，而高表达 293 细胞 (Expi293F 细胞) 可在更高的密度 (每 1 mL 含 5×10^6 ～ 6×10^6 个细胞) 条件下培养，并且可在较高的密度 (每 1 mL 含 2×10^6 ～ 3×10^6 个细胞) 下瞬时转染，实现更高的蛋白产量[11]。

M912 抗体是首个报道的靶向人 MSLN 的重组单克隆抗体 (recombinant humanized IgG1 monoclonal antibody，rhMSLN mAb)，最初是从人源 Fab DNA 噬菌体库中分离得到的，与 MSLN 的亲和力中等 (50 nmol/L)[12]。前期研究利用噬菌体展示技术对 M912 抗体的序列进行了优化，得到了抗体亲和力更优的 HP4-44/LP2-LC。本研究选择 HP4-44/LP2-LC 和 Expi293F 细胞表达 rhMSLN mAb，经 Protein A 亲和色谱柱纯化后，采用表面等离子体共振 (surface plasmon resonance，SPR) 和流式细胞术 (flow cytometry，FCM) 分析抗体亲和力，并利用乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase，LDH) 法检测 rhMSLN mAb 介导的抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用 (antibody-dependent cellular cytotoxicity，ADCC)。

1 仪器与试药

Tanon EPS100 型核酸电泳仪和 Tanon GIS 型凝胶成像分析系统 (上海天能科技有限公司)；T100 型 PCR 仪、Mini-PROTEAN® Tetra 型电泳槽和 PowerPac™ 型基础电泳仪电源均购自美国 Bio-Rad 公司；Infinite M200 Pro 型多功能酶标仪 (瑞士 Tecan 公司)；AKTA Start 型快速液相系统、Biacore 8K 型分子相互作用仪均购自美国 GE Healthcare 公司；Cytoflex 型流式细胞仪 (美国 Beckman Coulter 公司)。

2×PrimeSTAR Max Premix、内切酶 *Dpn* Ⅰ (日本 TaKaRa 公司)；高保真 Q5 聚合酶 (Q5 High-Fidelity 2×Master Mix，美国 New England Biolabs 公司)；ClonExpress® 同源重组试剂盒 (南京诺唯赞生物科技股份有限公司)；DNA 凝胶回收试剂盒 (美国 Axygen 公司)；Hieff™ PCR master mix[含染色剂，翌圣生物科技 (上海) 股份有限公司]；线性聚乙烯亚胺 (PEI，相对分子质量 25 000，美国 PloyScience 公司)；OPM-293 CD05 型培养基、OPM-293 ProFeed 型补料 (上海奥浦迈生物科技股份有限公司)；细胞补料葡萄糖 [D-(+)-Glucose，美国 Sigma-Aldrich 公司]；MabSelect SuRe LX 型亲和色谱柱 (瑞典 Cytiva 公司)；BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (江苏碧云天高新技术有限公司)；重组人源 MSLN 蛋白 (北京义翘神州科技股份有限公司)；RPMI 1640 培养基、无酚红 RPMI 1640 培养基、胰蛋白酶、胎牛血清 (美国 Gibco 公司)；异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate，FITC) 标记的羊抗人 IgG 二抗 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司)；NK 细胞分选试剂盒 (加拿大 STEMCELL 公司)；CytoTox 96 型非放射性细胞毒性检测试剂盒 (美国 Promega 公司)；HBS-EP 缓冲液 (10×，美国 Cytiva 公司)；引物合成服务及测序服务由铂尚生物技术 (上海) 有限公司提供。

pcDNA3.4-HP4-44 质粒、pIRES-LP2-LC 质粒、插入特定信号肽序列的 pcDNA3.4 质粒由本实验室保存；DH5α 化学感受态细胞购自苏州新赛美生物科技有限公司；人肺癌细胞系 NCI-H292 和人胃癌细胞系 NCI-N87 由本实验室保存；人外周血单核细胞 (peripheral blood mononuclear cell，PBMC) 购自上海合佑生生物科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 rhMSLN mAb 表达载体的构建

重链质粒 pcDNA3.4-HP4-44 由本实验室保存。需构建以 pcDNA3.4 为载体轻链质粒，即将 pIRES-LP2-LC 质粒中的 LP2-LC 序列克隆至插入特定信号肽序列的 pcDNA3.4 载体中。首先采用引物 1 和 2

在高保真 Q5 聚合酶的作用下经两步 PCR 法反向扩增出已连接信号肽的 pcDNA3.4 载体，然后使用引物 3 和 4 扩增出 LP2-LC 插入片段。PCR 引物序列如表 1 所示。扩增所得的线性 pcDNA3.4 载体片段和 LP2-LC 插入片段，经 1% 琼脂糖电泳分离、纯化。结果显示，经 PCR 获得了与预期相符的目的条带（轻链序列为 737 bp，线性化 pcDNA3.4 载体为 6 014 bp)（图 1A、1B)。采取同源重组方式连接 2 个纯化后的片段。将连接产物转化至 DH5α 大肠埃希菌感受态细胞，挑取单克隆菌落，并采用菌落 PCR 对连接产物进行初步验证。琼脂糖凝胶电泳结果显示，菌落 PCR 显示泳道 5 对应的单克隆菌落有目的条带生成（图 1C)。取该菌液送铂尚生物技术（上海）有限公司测序，结果表明该质粒与目的序列完全一致，即 pcDNA3.4-LP2-LC 表达载体被成功构建。

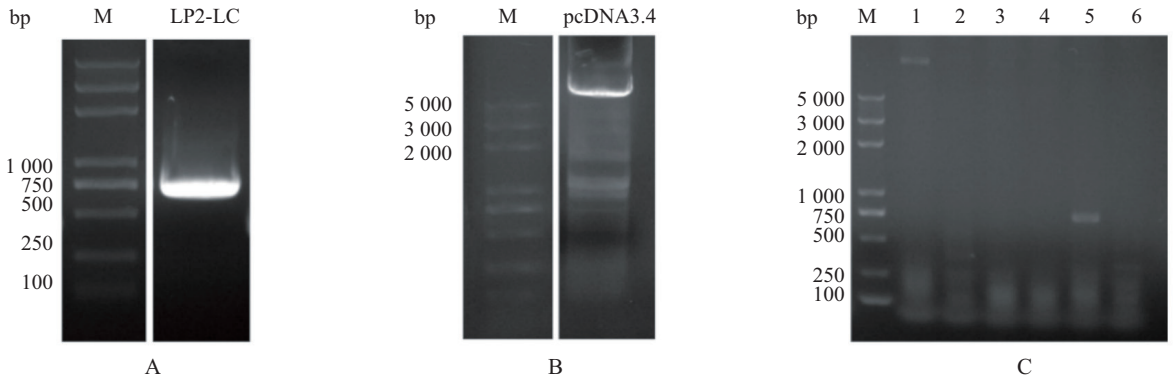
2.2　rhMSLN mAb 瞬时表达

本研究选用 Expi293F 细胞作为表达系统，pcDNA3.4 质粒作为载体，瞬时共转染包含重链序列的 pcDNA3.4-HP4-44 质粒和包含轻链序列的 pcDNA3.4-LP2-LC 质粒以获得 rhMSLN mAb。取冻存的 Expi293F 细胞复苏、接种至 OPM-293 CD05 培养基中，于 37 ℃、5% CO_2、125 r/min 的恒温摇床中培养，维持细胞密度为每 1 mL 含 0.5×10^6 ～ 3×10^6 个细胞，细胞存活率 >95 %。转染前 24 h，取 Expi293F 细胞，离心 (300×*g*)，去除原培养基，加入新鲜 OPM-293 CD05 培养基重悬细胞，并稀释为每 1 mL 含 1.5×10^6 个细胞，培养过夜，此时细胞密度约为每 1 mL 含 3×10^6 个细胞。用 OPM-293 CD05 培养基作为稀释液，按照每 1 mL 细胞培养液含 0.8 μg 质粒（轻链、重链质量比为 1 ： 1）配制质粒混合液，按 PEI 和 DNA 的质量比为 4 ： 1 添加 PEI，混匀，室温下静置 20 min，将 PEI 包裹的质粒混合液全部加至细胞悬液中继续培养。转染后 d1，每 1 L 细胞培养液中添加 OPM-293 ProFeed 型补料 50 mL 和葡萄糖 3 g；d3，每 1 L 细胞培养液添加葡萄糖 4 g。当细胞存活率下降至60%～70%时收取细胞培养上清液。

表 1　PCR 引物

Tab.1　Primers for PCR

引物	方向	序列
1	正向	5'-AAGGGTTCGATCCCTACCGG-3'
2	反向	5'-GGTAAGGGTTCGATCCTCTAGAGTC-3'
3	正向	5'-ACCTCCAGCAGGGCTGATATCCAGATGACCCAGACCACC-3'
4	反向	5'-TGGGGGCGGCCACCGTACGCTTGATCTCCAGCTTGGTGCC-3'



A—LP2-LC 插入片段；B—带有特定信号肽序列的 pcDNA3.4 线性化载体；C—LP2-LC 菌落 PCR 鉴定载体的构建结果，泳道 1 ～ 6 为所挑取的不同单克隆菌落经菌落 PCR 得到的产物。

图 1　pcDNA3.4-LP2-LC 表达载体的构建

Fig.1　Construction of pcDNA3.4-LP2-LC Expression Vectors

2.3 rhMSLN mAb 的纯化及鉴定

取“**2.2**”项下的细胞培养上清液，先后通过 0.45 和 0.22 μm 滤膜过滤，备用。

平衡缓冲液：取 NaH_2PO_4 2.4 g、NaCl 8.7 g（终浓度 150 mmol/L），加入超纯水 800 mL 溶解，用 1 mol/L 氢氧化钠溶液调至 pH 7.2，用超纯水定容至 1 000 mL。

清洗缓冲液：取枸橼酸 19.2 g，加入超纯水 800 mL 溶解，用 1 mol/L 氢氧化钠溶液调至 pH 5.0，用超纯水定容至 1 000 mL。

洗脱缓冲液：取枸橼酸 19.2 g，加入超纯水 800 mL 溶解，用 1 mol/L 氢氧化钠溶液调至 pH 3.0，用超纯水定容至 1 000 mL。

中和缓冲液：取氢氧化钠 4 g，加入超纯水 800 mL 溶解，用超纯水定容至 1 000 mL。

20%乙醇：取无水乙醇 200 mL，用超纯水定容至 1 000 mL。

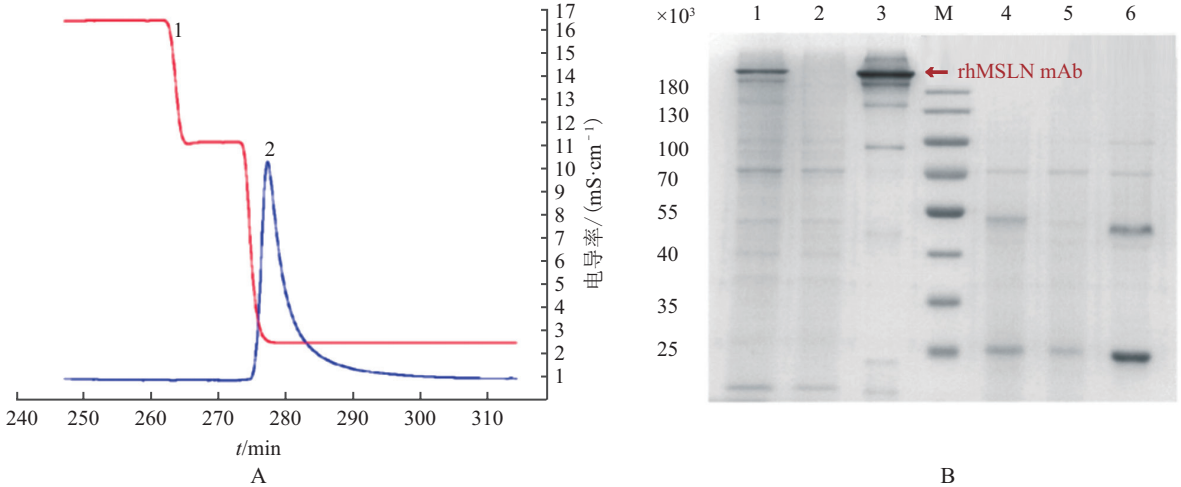
上述溶液均经 0.22 μm 滤膜过滤后使用。

亲和色谱纯化：将 Protein A（MabSelect SuRe LX）亲和色谱柱接入 AKTA Start 蛋白纯化系统，使用平衡缓冲液进行柱平衡；随后取过滤后的细胞培养上清液进样，进样结束后再次平衡；使用清洗缓冲液除去非特异性结合杂质，再使用洗脱缓冲液洗脱目的蛋白，根据 280 nm 处的吸光度（$OD_{280\ nm}$）值对洗脱峰进行收集；收集结束后尽快用中和缓冲液将样品调至 pH 7 左右。采用 10% SDS-PAGE 分析纯化的样品，并将抗体透析至 PBS 中，超滤浓缩，经 0.22 μm 滤膜过滤除菌后冻存于 －80 ℃超低温冰箱中。

Protein A 亲和色谱图（图 2A）显示，经 pH 5.0 的清洗缓冲液清洗时无杂质被洗脱，经 pH 3.0 的洗脱缓冲液洗脱时，rhMSLN mAb 被大量洗脱且洗脱峰独立。10% SDS-PAGE 凝胶电泳结果显示，rhMSLN mAb 由 2 条轻链和 3 条重链组装而成，重链的相对分子质量约为 55 000，轻链的相对分子质量约为 25 000，与理论值相符（图 2B）。采用 BCA 法按试剂盒说明书检测浓度，结果显示 rhMSLN mAb 的质量浓度为 1.17 mg/mL，产量约为 70.2 mg/L。

2.4 rhMSLN mAb 亲和力的检测

通过 SPR 法测定 rhMSLN mAb 的亲和力及动力学参数。将配体蛋白 MSLN 用 pH 4.5、5.0、5.5 的乙酸溶液稀释至质量浓度为 1 μg/mL，采用分子相



A—Protein A 亲和色谱图（1—电导率；2—OD280 nm）；B—10% SDS-PAGE 凝胶电泳图（1、4—样品；2、5—流穿液；3、6—pH 3.0 的洗脱液）。

图 2 rhMSLN mAb 的 Protein A 亲和色谱纯化结果和凝胶电泳图

Fig.2 Purification Results of Protein A Affinity Chromatography and SDS-PAGE Electrophoresis Diagram of rhMSLN mAb

互作用仪进行预富集测试，筛选得配体蛋白固定在CM5芯片上适用的pH值为4.5。用pH 4.5的乙酸溶液稀释配体蛋白MSLN至2 μg/mL，芯片活化7～10 min，配体蛋白偶联600～1 200 s，芯片封闭7 min后进行测试。采用1×HBS-EP缓冲液稀释纯化的rhMSLN mAb至浓度为1.56、3.125、6.25、12.5、25、50 nmol/L，分别进样测试。运行使用1×HBS-EP缓冲液，运行模式为多循环动力学运行，结合120 s，解离240 s。使用Biacore™ Insight Evaluation Software 4.0软件，用1∶1结合拟合模型进行动力学曲线拟合，计算rhMSLN mAb的结合速率常数（K_a）、解离速率常数（K_d）以及平衡解离常数（K_D）。所得动力学曲线如图3所示。结果表明，rhMSLN mAb的K_a为1.97×10^6 L·mol^{-1}·s^{-1}），K_d为1.39×10^{-2} s^{-1}，K_D（即抗体亲和力）为7.02×10^{-9} mol/L。

2.5 rhMSLN mAb的生物学活性检测

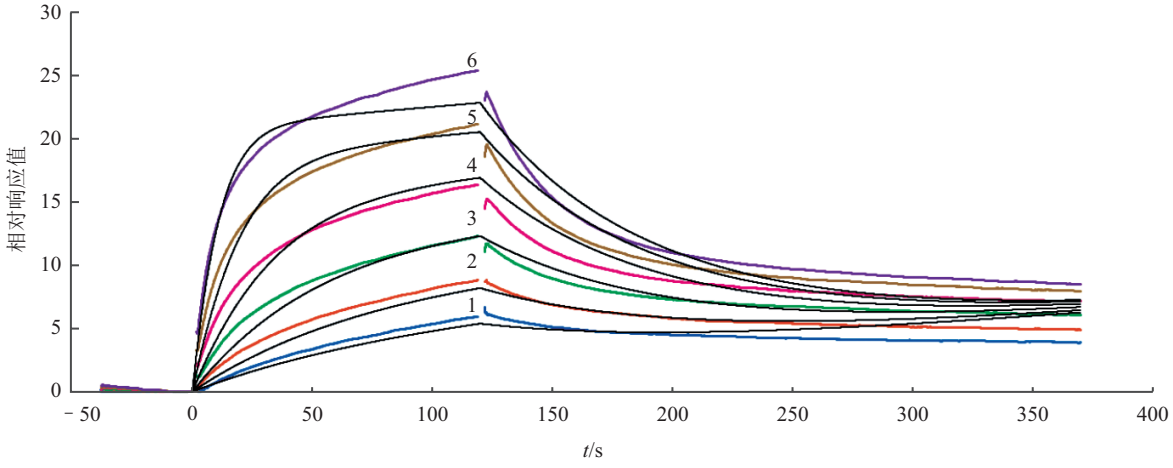
MSLN在NCI-H292细胞和NCI-N87细胞中皆有表达。本研究选取这2种细胞系作为靶细胞，探究rhMSLN mAb的生物学活性。

2.5.1 rhMSLN mAb的结合活性检测

取NCI-H292细胞和NCI-N87细胞，分别采用含10% FBS的RPMI 1640培养基（完全培养基），在37 ℃、5% CO_2的条件下进行培养。取对数生长期的细胞消化、重悬、计数，以每管5×10^5个细胞分装到离心管中，4 ℃离心（300×*g*）3 min，弃去上清，剩余物用染色缓冲液（即含2% FBS的PBS）50 μL重悬。另取rhMSLN mAb，用染色缓冲液稀释为0.015、0.412、11.111 μg/mL（A组）和0.025、0.667、18.000 μg/mL（B组），A组加入重悬的NCI-H292细胞，B组加入重悬的NCI-N87细胞。另取等体积的染色缓冲液加入2种重悬细胞作为对照组。各组细胞于4 ℃孵育30 min后，用染色缓冲液500 μL清洗细胞，共3次，加入识别人Fc段的FITC标记荧光抗体1 μL，4 ℃避光孵育30 min。再次用染色缓冲液清洗3次后，重悬于染色缓冲液200 μL中。通过流式细胞仪检测FITC通道的荧光强度，并使用Flowjo 10.8.1软件分析数据。结果表明，rhMSLN mAb能与NCI-H292和NCI-N87细胞呈浓度依赖性结合（图4A、4B）。

2.5.2 rhMSLN mAb介导的杀伤活性检测

本研究采用LDH法评估rhMSLN mAb对NCI-N87细胞的ADCC作用，并选取本实验室保存的沉默Fc结构域的rhMSLN mAb作为对照。试验按照CytoTox 96型非放射性细胞毒性检测试剂盒说明书，设置相应的试验组与对照组，每组2个复孔。提前12 h用胰酶消化处理对数生长期的NCI-N87细胞，按照每孔100 μL（1×10^4个细胞）均匀铺板于96孔细胞培养板中。采用NK细胞阴性选择试剂盒从



1—1.56 nmol/L；2—3.125 nmol/L；3—6.25 nmol/L；4—12.5 nmol/L；5—25 nmol/L；6—50 nmol/L。

图3　SPR分析rhMSLN mAb与MSLN抗原的动态结合

Fig.3　Analysis of the Dynamic Binding Process of rhMSLN mAb to MSLN Antigen by SPR

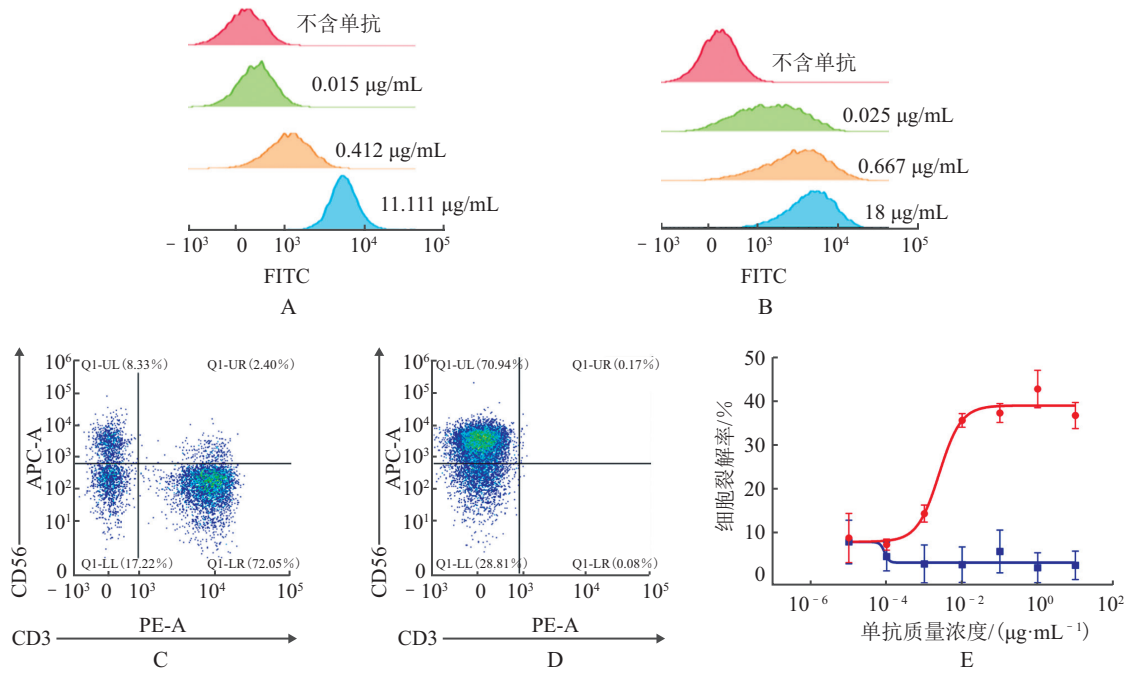
健康人 PBMC 中分选得到纯度较高的 NK 细胞（图 4C、4D），于 37 ℃、5% CO_2 条件下静息过夜。试验前，使用含灭活 FBS 的完全培养基稀释单抗至特定质量浓度（最高质量浓度 30 μg/mL，10 倍梯度稀释，共设置 7 个质量浓度梯度），同时调整 NK 细胞密度，吸弃培养基，取 NK 细胞悬液 100 μL 加入相应的孔中，使得效应细胞和靶细胞数量比为 5 ∶ 1，随后分别加入不同质量浓度的单抗 50 μL 作为试验组。另分别取 NCI-N87 细胞和 NK 细胞，加入等体积的完全培养基，分别作为靶细胞空白组和效应细胞组，混匀后置 37 ℃、5% CO_2 培养箱中孵育 16 h。检测前 45 min，另取未加入 NK 细胞的 NCI-N87 细胞，加入 10× 细胞裂解液 15 μL，作为靶细胞 LDH 最大释放对照及体积校正对照，并继续孵育至检测时间点。各组细胞孵育结束后室温离心 (250×*g*) 3 min，每孔取细胞培养上清液 50 μL 于新的 96 孔板中，加入 LDH 检测液 50 μL，于室温条件下避光孵育 30 min，每孔加入终止液 50 μL，振荡混匀后用酶标仪检测 490 nm 处的吸光度。根据下式计算细胞裂解率，采用 GraphPad Prism8.0.2 软件对数据进行四参数非线性拟合，用 $\bar{x}\pm s$ 展示数据。

结果显示，rhMSLN mAb 能有效介导 ADCC 作用，实现约 40%的最大杀伤，且杀伤作用呈现剂量依赖性，EC_{50} 为 2.48×10^{-3} μg/mL，R^2=0.951 0。而 rhMSLN mAb（Fc 结构域沉默）对 NK 细胞杀伤靶细胞无促进作用（图 4E）。

$$细胞裂解率=\frac{试验组释放-效应细胞自释放-靶细胞自释放}{靶细胞最大释放-靶细胞自释放}\times100\%$$

3 讨论

随着对肿瘤细胞和免疫系统之间动态关系的深入研究，恶性肿瘤免疫疗法也在不断发展。相对于血液瘤而言，针对实体瘤的免疫疗法开发更具挑战性。MSLN 在多种恶性肿瘤中的表达水平显著升高[4,13]，而在正常组织中的表达较低，具有高度的特异性。这使得 MSLN 成为理想的抗肿瘤靶



A—流式细胞术检测 rhMSLN mAb 与 NCI-H292 细胞的结合；B—流式细胞术检测 rhMSLN mAb 与 NCI-N87 细胞的结合；C—NK 细胞分选前的流式鉴定；D—NK 细胞分选后的流式鉴定；E—LDH 法检测 rhMSLN mAb 介导的对 NCI-N87 细胞的 ADCC 作用（● —rhMSLN mAb；■—Fc 结构域沉默的 rhMSLN mAb）。

图 4 rhMSLN mAb 介导的体外抗肿瘤活性

Fig.4 rhMSLN mAb Mediated Antitumor Activity *in vitro*

点，给肿瘤免疫疗法开发带来更多选择。

抗体亲和力是抗体开发的重要参数之一，亲和力较高的抗体可更有效地结合在肿瘤细胞表面的抗原上，从而能更有效地识别和清除病原体或肿瘤细胞。本研究基于实验室此前的研究工作，构建并表达了具有较高亲和力的抗人 MSLN 单克隆抗体，通过瞬时共转染 Expi293F 哺乳动物细胞表达体系，实现了更高的抗体产量；并通过 SPR 试验，对分子层面的抗原 - 抗体相互作用进行了评估。结果表明，相较于原 M912 抗体 50 nmol/L 的亲和力，经亲和力成熟得到的抗体序列 HP4-44/LP2-LC 可将亲和力提高至 7.02 nmol/L。抗体在细胞层面的结合能力是最终抗体发挥治疗效果的基础，因此也评估了抗体与多种细胞的结合能力。流式细胞术结果显示，rhMSLN mAb 能呈浓度依赖性地结合于 MSLN 阳性细胞系 NCI-H292 和 NCI-N87 表面上的 MSLN 抗原。杀伤试验结果表明，rhMSLN mAb 能有效介导 NK 细胞对 NCI-N87 肿瘤细胞系的杀伤。MSLN mAb（Fc 结构域沉默）和 rhMSLN mAb 对照试验显示，rhMSLN mAb 与靶细胞上的抗原结合后，抗体 Fc 片段与效应细胞上的 Fc 受体结合，发挥抗体依赖的细胞毒作用。

综上所述，本研究成功构建了靶向 MSLN、高亲和力的 rhMSLN mAb，可通过 Expi293F 细胞系高效生产。rhMSLN mAb 表现出良好的抗体依赖性细胞毒作用，证明该抗体序列具备开发潜力，为未来进一步开发不同类型的靶向 MSLN 的免疫治疗药物提供了支持。

参考文献：

[1] CHANG K, PASTAN I. Molecular cloning of mesothelin, a differentiation antigen present on mesothelium, mesotheliomas, and ovarian cancers [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1996, **93**(1): 136-140.

[2] CHANG K, PASTAN I, WILLINGHAM M C. Isolation and characterization of a monoclonal antibody, K1, reactive with ovarian cancers and normal mesothelium [J]. *Int J Cancer*, 1992, **50**(3): 373-381.

[3] YEO D, CASTELLETTI L, VAN ZANDWIJK N, *et al*. Hitting the bull's-eye: mesothelin's role as a biomarker and therapeutic target for malignant pleural mesothelioma [J]. *Cancers* (Basel), 2021, **13**(16): 3932.

[4] LV J, LI P. Mesothelin as a biomarker for targeted therapy [J]. *Biomark Res*, 2019, **7**(1): 18.

[5] AVULA L R, RUDLOFF M, EL-BEHAEDI S, *et al*. Mesothelin enhances tumor vascularity in newly forming pancreatic peritoneal metastases [J]. *Mol Cancer Res*, 2020, **18**(2): 229-239.

[6] BHARADWAJ U, MARIN-MULLER C, LI M *et al*. Mesothelin confers pancreatic cancer cell resistance to TNF-α-induced apoptosis through Akt/PI3K/NF-κB activation and IL-6/Mcl-1 overexpression [J]. *Mol Cancer*, 2011, **10**(1): 106.

[7] SERVAIS E L, COLOVOS C, RODRIGUEZ L, *et al*. Mesothelin overexpression promotes mesothelioma cell invasion and MMP-9 secretion in an orthotopic mouse model and in epithelioid pleural mesothelioma patients [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, **18**(9): 2478-2489.

[8] SHIN S J, PARK S, KIM M H, *et al*. Mesothelin expression is a predictive factor for peritoneal recurrence in curatively resected stage Ⅲ gastric cancer [J]. *Oncologist*, 2019, **24**(11): e1108-e1114.

[9] RIZK N P, SERVAIS E L, TANG L H, *et al*. Tissue and serum mesothelin are potential markers of neoplastic progression in Barrett's associated esophageal adenocarcinoma [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2012, **21**(3): 482-486.

[10] KACHALA S S, BOGRAD A J, VILLENA-VARGAS J, *et al*. Mesothelin overexpression is a marker of tumor aggressiveness and is associated with reduced recurrence-free and overall survival in early-stage lung adenocarcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2014, **20**(4): 1020-1028.

[11] GREVEN J A, BRETT T J. Production of eukaryotic glycoproteins for structural and functional studies using Expi293F cells [J]. *Curr Protoc*, 2022, **2**(8): e512.

[12] FENG Y, XIAO X D, ZHU Z Y, *et al*. A novel human monoclonal antibody that binds with high affinity to mesothelin-expressing cells and kills them by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity [J]. *Mol Cancer Ther*, 2009, **8**(5): 1113-1118.

[13] FAUST J R, HAMILL D, KOLB E A, *et al*. Mesothelin: an immunotherapeutic target beyond solid tumors [J]. *Cancers* (Basel), 2022, **14**(6): 1550.