

(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
2024年10月3日 (03.10.2024)



(10) 国际公布号
WO 2024/199526 A1

(51) 国际专利分类号:

C07K 19/00 (2006.01) C12N 1/21 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C12N 15/79 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2024/085334

(22) 国际申请日: 2024年4月1日 (01.04.2024)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202310340138.5 2023年3月31日 (31.03.2023) CN

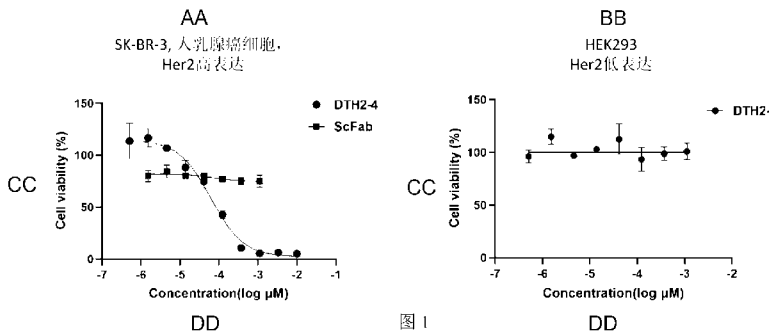
(71) 申请人: 康码(上海)生物科技有限公司 (KANGMA-HEATHCODE (SHANGHAI))

BIOTECH CO., LTD) [CN/CN]; 中国上海市闵行区南雅路2号, Shanghai 201321 (CN)。

(72) 发明人: 郭敏 (GUO, Min); 中国上海市闵行区南雅路2号, Shanghai 201321 (CN)。王海鹏 (WANG, Haipeng); 中国上海市闵行区南雅路2号, Shanghai 201321 (CN)。杨洋 (YANG, Yang); 中国上海市闵行区南雅路2号, Shanghai 201321 (CN)。胡冉 (HU, Ran); 中国上海市闵行区南雅路2号, Shanghai 201321 (CN)。肖嵩 (XIAO, Song); 中国上海市闵行区南雅路2号, Shanghai 201321 (CN)。刘章 (LIU, Zhang); 中国上海市闵行区南雅路2号, Shanghai 201321 (CN)。于雪 (YU, Xue); 中国上海市闵行区南雅路2号, Shanghai 201321 (CN)。

(54) Title: FUSION PROTEIN, CORRESPONDING NUCLEIC ACID, IN-VITRO SYNTHESIS SYSTEM, AND PREPARATION METHOD

(54) 发明名称: 融合蛋白及相应的核酸、体外合成体系和制备方法



AA SK-BR-3, human breast cancer cell, with high expression of Her2
BB HEK293, with low expression of Her2
CC Cell viability (%)
DD Concentration (log μM)

(57) Abstract: Provided is a fusion protein, which can be produced at a low cost, in a short period, and with a high yield. Also provided are a coding nucleic acid of the fusion protein, an in-vitro synthesis system, a preparation method, and the like. The fusion protein has: an effector moiety A for killing a target cell, including a toxin molecule; a targeting vector moiety B that binds to a target site on the target cell, the targeting vector moiety being derived from an antibody or a cytokine; and a first linker L1 for linking the effector moiety A to the targeting vector moiety B, wherein the first linker L1 comprises at least 3 amino acid residues. Preferably, the linking mode of the effector moiety A, the first linker L1, and the targeting vector moiety B from the N-terminus to the C-terminus is A-L1-B or B-L1-A.

(57) 摘要: 一种融合蛋白, 其能够低成本、短周期、高产量生产。所述融合蛋白的编码核酸、体外合成体系和制备方法等。所述融合蛋白具有: 效应部分A, 用于对靶向细胞进行杀伤作用, 包括毒素分子; 导向载体部分B, 与靶向细胞上的目标靶点结合, 导向载体部分来自抗体或细胞因子; 第一连接L1, 将效应部分A和导向载体部分B进行连接, 其中, 第一连接L1包括至少3个氨基酸残基; 优选地, 效应部分A、第一连接L1以及导向载体部分B从N端到C端的连接方式为A-L1-B或B-L1-A。

(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, MU, 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, SC, 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))。
- 在修改权利要求的期限届满之前进行, 在收到该修改后将重新公布(细则48.2(h))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

融合蛋白及相应的核酸、体外合成体系和制备方法

技术领域

本发明属于生物技术领域，具体涉及一种融合蛋白及相应的核酸、体外合成体系和制备方法。

5

背景技术

在全球范围内，癌症发病率逐渐升高，患病人数逐年攀升，每年因癌症死亡人数逐渐增加。在传统的癌症治疗过程中，化疗和放疗等手段由于对于癌症细胞和正常细胞的选择性较差，往往会给病人带来痛苦。具有选择性的免疫疗法近年来得到了快速发展，如靶向药、单克隆抗体、双特异性抗体、ADC和免疫毒素等。

10

免疫毒素一般包括导向载体部分和效应部分，导向载体部分负责将免疫毒素分子结合到带有目标靶点的肿瘤细胞上，效应部分则负责对肿瘤细胞进行杀伤。免疫毒素的导向载体部分往往来自于免疫系统，包括抗体、细胞因子和生长因子等。效应部分则是一些毒素蛋白，将天然存在的毒素蛋白的结合结构域去除，替换为导向载体部分，使毒素蛋白获得靶向肿瘤细胞的能力。这些毒素蛋白可以来自于细菌、真菌、植物、甚至动物的毒素蛋白，常用的细菌毒素蛋白包括霍乱弧菌毒素(Vibrio cholerae toxin, ChxA)、贺志菌毒素(Shiga toxin)、假单胞菌外毒素 A(Pseudomonas exotoxin A, PE)和白喉毒素(Diphtheria toxin, DT)。

15

免疫毒素经历了三代发展：

第一代的免疫毒素用的是完整的单克隆抗体分子，抗体的特异性和稳定性虽不存在问题，但分子太大，不易穿透组织到达靶部位，而且免疫原性高容易引起免疫反应，因此，现在已不采用这种方法；

20

第二代的免疫毒素使用 Fab 代替完整的抗体分子，虽解决了分子太大的问题，但仍然用化学偶联的方法将毒素蛋白与抗体连接：化学偶联法需要加入化学试剂，偶联效率低，生产成本较高，且由于蛋白上可能发生偶联反应的位点众多而导致产品均一性差，而且化学偶联键容易断裂而导致毒性渗漏，较大的毒副作用风险，并且，降解产生的裸抗体则可能封闭抗原，使得治疗效果不佳；

25

而第三代免疫毒素采用基因工程重组表达，将编码导向功能多肽的基因与编码毒素多肽的基因相融合并在适当的表达系统中进行表达，相比化学偶联法制造的免疫毒素而言在产品均一性和稳定性上有了大幅提高，并且使得大量生产免疫毒素成为可能。但目前主要是通过细胞表达，还存在一些局限性：

例如目前多采用大肠杆菌表达系统表达单链抗体免疫毒素，由于免疫毒素的导向部分在大肠杆菌表达系统中不能很好的折叠而往往形成包涵体，而包涵体的复性是一个非常复杂的过程，一般来说，蛋白质的复性效率在 20% 左右，而通过真核系统分泌，能克服大肠杆菌系统表达的一些缺陷，但是，存在较长的发酵周期，成本高，还是难以工业化竞争。

30

并且，第三代中，目前常用抗体的 Fv 片段来构建，这是因为 Fv 片段是含有完整抗原结合位点的最小单位，分子小，容易通过细胞系统表达，但是 Fv 结构由于 VH 和 VL 间不能形成共价键，在体内不稳定，很容易解离。

35

发明内容

本发明提供一种适宜能够低成本、短周期高生产的融合蛋白及相应的核酸、体外合成体系和制备方法等，以能克服现有免疫毒素的上述种种缺陷。

为此，本发明提供了以下的技术方案：

本发明提供一种融合蛋白，其特征在于，具有：效应部分 A，用于对靶向细胞进行杀伤作用，包括毒素分子；导向载体部分 B，与靶向细胞上的目标靶点结合，导向载体部分来自抗体或细胞因子；第一连接 L1，将效应部分 A 和导向载体部分 B 进行连接，其中，第一连接 L1 包括至少 3 个氨基酸残基，优选地为 3-20 个氨基酸残基，更优选为 3-10 个氨基酸残基；再一优选地，效应部分 A、第一连接 L1 以及

40

导向载体部分 B 从 N 端到 C 端以 A-L1-B 取向连接或从 N 端到 C 端以 B-L1-A 的取向连接。

本发明提供的融合蛋白，还具有这样的特征：其中，毒素分子为下组的任意一种毒性多肽：(a)，植物来源的毒素；(b)，细菌来源的毒素；(c)，真菌来源的毒素；(d)，人源性蛋白毒素；(e)，(a)-(d) 中任意一项的功能片段；(f) (a)-(d) 中任意一项来源的功能片段或该功能片段的变体；优选地，毒素分子来自：白喉毒素，假单胞菌外毒素 A，霍乱弧菌毒素。

本发明提供的融合蛋白，还具有这样的特征：效应部分包括的毒素分子的结构为以下中任意一种：

(1) 白喉毒素的转运结构域 DT 和催化结构域 DA，优选地，从 N 端到 C 以 DA-DT 的取向连接；

(2) 白喉毒素的催化结构域 DA；

(3) 假单胞菌外毒素 A 的转运结构域 PT 和催化结构域 PA，优选地，从 N 端到 C 以 PT-PA 的取向连接；

(4) 假单胞菌外毒素 A 的催化结构域 PA；

(5) 霍乱弧菌毒素的转运结构域 CT 和催化结构域 CA，优选地，从 N 端到 C 以 CT-CA 的取向连接

(6) 霍乱弧菌毒素的催化结构域 CA。

本发明提供的融合蛋白，还具有这样的特征：其中，毒素分子具有如 SEQ ID NO: 1-9 中任意一个所示的氨基酸序列，或具有与 SEQ ID NO: 1-9 中任意一个具有至少 80%、85%、90%、95%、99% 的序列同源性百分比的氨基酸序列。

本发明提供的融合蛋白，还具有这样的特征：其中，导向载体部分为抗体，抗体为单克隆抗体、嵌合抗体、改型抗体、小分子抗体、多特异性抗体以多价抗体中的任意一种或多种；

优选地，抗体为小分子抗体或多价抗体中的任意一种或多种，

再优选地：

所述小分子抗体为 Fv、Fab、ScFv、ScFab、ScIgG、dsFv、纳米抗体以及单域抗体中的任意一种或多种

多价抗体为至少两个单链抗体串联形成的串联抗体以及小分子抗体与聚合蛋白形成的抗体多聚融合蛋白，进一步地，抗体多聚融合蛋白为二聚体或四聚体。

本发明提供的融合蛋白，还具有这样的特征：其中，所述抗体为 ScFab、ScFv、ScIgG、纳米抗体、两个 ScFab 串联、两个 ScFv 串联、两个纳米抗体串联、ScFab 与抗体片段 CH3 的融合、ScFv 与抗体片段 CH3 的融合、两个纳米抗体通过 CH3 融合串联（例如 VHH1-L3-CH3-L3-VHH2）、ScFab 与 Tamavidins2 蛋白的融合、或 ScFv 与 Tamavidins2 蛋白的融合。

本发明提供的融合蛋白，还具有这样的特征：其中，ScFab 的结构满足：ScFab 的轻链部分和重链部分按 N 端到 C 端的取向连接，或 ScFab 的重链部分和轻链部分按 N 端到 C 端的取向连接；ScFab 与抗体片段 CH3 之间按 N 端到 C 端或 C 端到 N 端的取向连接；ScFv 的重链部分和轻链部分按 N 端到 C 端的取向连接；ScFab 与 Tamavidins2 蛋白的融合是从 N 端到 C 端按 Tamavidins2 蛋白到 ScFab 的取向连接；

ScFv 与 Tamavidins2 蛋白的融合是从 N 端到 C 端按 Tamavidins2 蛋白到 ScFab 的取向连接。

本发明提供的融合蛋白，还具有这样的特征：其中，通过第二连接 L2 对 ScFab、ScFv、ScFv、ScIgG 各自的轻链部分和重链部分之间进行连接，所述第二连接 L2 包含至少 15 个氨基酸残基，优选包含 15-180、15-120 或 15-90 或 15-65 或 2060 个氨基酸残基。

本发明提供的融合蛋白，还具有这样的特征：其中，第二连接 L2 中，含有 G、S、T 和 A 中的任意一种或多种的主要氨基酸残基，且主要氨基酸残基的数量占比第二连接总氨基酸数量的百分比至少大于 50%、60%、70%、80% 或 90%，更优选地，主要氨基酸残基中，含有 G 和 S 中的任意一种或多种的氨基酸残基，且含有的总量占比第二连接总氨基酸残基数量的百分比至少大于 40% 或大于 45% 或大于 60% 或大于 70% 或大于 80%；

进一步地，所述第二连接 L2 具有如 SEQ ID NO: 10、12、13、14、17、28、45 以及 47 中任意一个所示的氨基酸序列，或具有与 SEQ ID NO: 10、12、13、14、17、28、45 以及 47 中任意一个具有至少 80%、85%、90%、95%、99% 的序列同源性百分比的氨基酸序列。

5 本发明提供的融合蛋白，还具有这样的特征：其中，两个单链抗体之间、小分子抗体与聚合蛋白之间通过第三连接 L3 连接，所述第三连接 L3 为无或包含至少 3 个氨基酸残基，优选地，包括 5-20 个氨基酸残基，优选地，包括 8-20 个氨基酸残基或 8-15 个或 8-12 个氨基酸残基，更优选地，其中，含有 G 和 S 两种主要氨基酸残基，且主要氨基酸残基的数量占比所述第三连接总氨基酸残基数量的百分比在 40% 以上，

10 例如，第三连接 L3 具有如 SEQ ID NO: 10、14、18、20-30、44、以及 48-51 中任意一个所示的氨基酸序列，或具有与 SEQ ID NO: 10、14、18、20-30、44、以及 48-51 中任意一个具有至少 80%、85%、90%、95%、99% 的序列同源性百分比的氨基酸序列。

本发明提供的融合蛋白，还具有这样的特征：所述抗体为特异性结合 Her2、CD22 中任意一种或多种的的抗体。

15 本发明提供的融合蛋白，还具有这样的特征：抗体来源选自 IgM、IgG、IgA、IgD 和 IgE；优选地，抗体来源选自曲妥珠单抗（Trastuzumab）、利妥昔单抗（Rituxima）、贝伐单抗（Bevacizumab）、阿达木单抗（Adalimumab）、帕博利珠单抗（Pembrolizumab）、乌司奴单抗（Ustekinumab）、纳武利尤单抗（Nivolumab）、奥瑞珠单抗（Ocrelizumab）、帕利珠单抗（Palizumab）、英夫利昔单抗（Infliximab）、奥马珠单抗（Omalizumab）、恩沃利单抗（Envafolimab）、托西珠单抗（Atlizumab）、阿替利珠单抗（Atezolizumab）或西妥昔单抗（Cetuximab），或它们的变体。

20 本发明提供的融合蛋白，还具有这样的特征：其中，

对于 Fab 或 ScFab：

组成 Fab 或 ScFab 的轻链部分具有如 SEQ ID NO: 32 所述的氨基酸序列，或具有与 SEQ ID NO: 32 具有至少 80%、85%、90%、95%、99% 的序列同源性百分比的氨基酸序列；或

25 组成 Fab 或 ScFab 的重链部分的可变结构域具有如 SEQ ID NO: 33 或 55 所示的氨基酸序列，或具有与 SEQ ID NO: 33 或 55 具有至少 80%、85%、90%、95%、99% 的序列同源性百分比的氨基酸序列；或

组成 Fab 或 ScFab 的重链部分的第一恒定结构域 CH1 具有如 SEQ ID NO: 34 或 57 所示的氨基酸序列，或具有与 SEQ ID NO: 34 或 57 具有至少 80%、85%、90%、95%、99% 的序列同源性百分比的氨基酸序列；

30 对于 Fv、dsFv 或 ScFv：

组成 Fv、dsFv 或 ScFv 的轻链部分的可变结构域具有如 SEQ ID NO: 35 或 54 所示的氨基酸序列，或具有与 SEQ ID NO: 35 或 54 具有至少 80%、85%、90%、95%、99% 的序列同源性百分比的氨基酸序列；或

35 组成 Fv、dsFv 或 ScFv 的重链部分的可变结构域的具有如为 SEQ ID NO: 33 或 55 所示的氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 33 或 55 具有至少 80%、85%、90%、95%、99% 的序列同源性百分比；

对于 ScIgG：

组成 ScIgG 的轻链部分具有如 SEQ ID NO: 32 或 56 所示的氨基酸序列，或具有与 SEQ ID NO: 32 或 56 具有至少 80%、85%、90%、95%、99% 的序列同源性百分比的氨基酸序列；或

40 组成 ScIgG 的重链部分具有如 SEQ ID NO: 36 或 17 所示的氨基酸序列，或具有与 SEQ ID NO: 36 或 17 具有至少 80%、85%、90%、95%、99% 的序列同源性百分比的氨基酸序列；

对于涉及的抗体片段 CH3，所述抗体片段 CH3 具有如 SEQ ID NO: 37 所示的氨基酸序列，或具有与 SEQ ID NO: 37 具有至少 80%、85%、90%、95%、99% 的序列同源性百分比的氨基酸序列；

对于涉及的 Tamavidins2 蛋白，所述 Tamavidins2 蛋白具有如 SEQ ID NO: 38 所示的氨基酸序列，

或具有与 SEQ ID NO: 38 具有至少 80%、85%、90%、95%、99% 的序列同源性百分比的氨基酸序列；

对于涉及的纳米抗体，具有如 SEQ ID NO: 52 或 53 所示的氨基酸序列，或具有与 SEQ ID NO: 52 或 53 具有至少 80%、85%、90%、95%、99% 的序列同源性百分比的氨基酸序列；

融合蛋白对靶向细胞的活性，特别是 IC50 与市售的 DS-8201a 或 T-DM1 的相当。

5 本发明提供的融合蛋白，还具有这样的特征：其中，融合蛋白适于无细胞体外合成，优选地，无细胞体外合成为：在无细胞体外合成体系中，以融合蛋白的编码核酸为 DNA 模板或 RNA 模板，在一定条件孵育一定时间后得到融合蛋白。

本发明提供的融合蛋白，还具有这样的特征：其中，无细胞体外合成体系含有细胞提取物，细胞提取物来源于酵母菌株，进一步地，酵母菌株为：酿酒酵母、克鲁维酵母属酵母中的一种或多种的组合，
10 在另一优选例中，克鲁维酵母属酵母为：乳酸克鲁维酵母、马克斯克鲁维酵母以及多布克鲁维酵母中的一种或多种的组合。

本发明提供的融合蛋白，还具有这样的特征：其中，酵母菌株经过基因工程改造以具有毒素抗性。

本发明提供的融合蛋白，还具有这样的特征：其中，所述第一连接 L1 具有如 SEQ ID NO: 10、11、15、16、18-20、31 以及 43 中任意一个所示的氨基酸序列，或具有与 SEQ ID NO: 10、11、15、16、
15 18-20、31 以及 43 中任意一个具有至少 80%、85%、90%、95%、99% 的序列同源性百分比的氨基酸序列。

本发明还提供一种分离的核酸，其特征在于：其中，核酸编码前述的融合蛋白。

本发明还提供一种载体，其特征在于，包括：前述的核酸。

本发明还提供一种宿主细胞，其特征在于，包括：前述的核酸或载体，优选地，宿主细胞为酵母细胞，进一步地，酵母细胞为：酿酒酵母、克鲁维酵母属酵母中的一种或多种的组合，在另一优选例中，
20 克鲁维酵母属酵母为：乳酸克鲁维酵母、马克斯克鲁维酵母以及多布克鲁维酵母中的一种或多种的组合。

本发明还提供一种体外无细胞蛋白质合成体系，其特征在于：

以编码前述的融合蛋白的 mRNA 或 DNA 为模板，合成融合蛋白。

本发明提供的体外无细胞蛋白质合成体系，还具有这样的特征，包括以下中的任意一种或多种：

25 (1) mRNA 或 DNA 模板；

(2) 细胞提取物，细胞提取物为酵母细胞提取物，再进一步地，细胞提取物来自下组的菌株：酿酒酵母、毕氏酵母以及克鲁维酵母中的任意一个或多个的组合；更佳地，酵母细胞提取物的来源包括：克鲁维酵母，更佳地为乳酸克鲁维酵母；

(3) 以下组分中的任意一种或多种：

30 氨基酸混合物、dNTP、RNA 聚合酶、DNA 聚合酶、能量供应体系、聚乙二醇以及水性溶剂。

本发明提供的体外无细胞蛋白质合成体系，还具有这样的特征：

其中，菌株经过基因工程改造以具有毒素抗性。

本发明还提供一种前述的融合蛋白的体外无细胞合成方法，其特征在于，包括：在包括前述的无细胞体外蛋白质合成体系的反应体系中，以编码前述的融合蛋白的 mRNA 或 DNA 为模板进行体外合成反应得到融合蛋白，优选地，DNA 模板与参与体外合成反应的其他成分的体积比的范围为 1:10-1:50 或
35 1:20-1:40 或 1:25-1:35 或 1:30。

本发明提供的体外无细胞合成方法，还具有这样的特征：其中，无细胞体外蛋白质合成体系包括：酵母细胞提取物、氨基酸混合物、dNTP、RNA 聚合酶、DNA 聚合酶、能量供应体系、聚乙二醇以及水性溶剂；进一步地：酵母细胞提取物来自下组的菌株：酿酒酵母、毕氏酵母以及克鲁维酵母中的任意一个或多个的组合；更佳地，的酵母细胞提取物来自包括：克鲁维酵母，更佳地为乳酸克鲁维酵母，更进
40 一步地，菌株经过基因工程改造以具有毒素抗性。

本发明提供的体外无细胞合成方法，还具有这样的特征：酵母细胞提取物占整个无细胞体外蛋白质合成体系的体积比为 50-80%。

本发明还提供一种如前述核酸或前述的载体或前述的宿主细胞或前述的体外无细胞蛋白质合成体系在制备前述的融合蛋白中的应用。

本发明还提供一种前述的融合蛋白在疾病治疗中的用途，或前述的融合蛋白作为治疗疾病的有效成分的药物，优选地，用于抗肿瘤、抗移植排斥反应和治疗自身免疫性疾病。

5 本发明提供的上述用途，还具有这样的特征：其中，所述疾病治疗为以 HER2 以及 CD22 中的任意一项或多项为目标靶点的治疗。

本发明还提供一种如前述的核酸或前述的载体或前述的宿主细胞或前述的融合蛋白在制备用于前述的的疾病治疗中的用途的药物中的应用。

10 发明作用与效果

本发明提供的一种融合蛋白及相应的核酸、体外合成体系和制备方法，是经过广泛而深入的研究，通过大量筛选和摸索，首次发现了一种适宜体外合成高表达生产的融合蛋白，本发明的融合蛋白由效应部分和导向载体部分通过特定的第一连接形成融合蛋白；具有很高的产量，活性与市售相当，可见，本发明的融合蛋白具有能够替代现有免疫毒素的活性；

15 并且，本发明的融合蛋白能在体外蛋白合成体系中合成，相比现有的合成免疫毒素的细胞表达方式，生产成本、周期短，适合规模化生产和推广。

特别地，相比目前以 Fv 片段为主的免疫毒素结构，本发明的提供的融合蛋白，成功表达达到能以 Fab 片段作为导向载体部分 B 的结构，并且活性达到了市售的活性。

20 附图说明

图 1 为实施例 4 中 4 种融合蛋白的细胞毒性的测试结果；

图 2-4 为实施例 4 中对几个不同分子编号的融合蛋白进行针对高表达 Her2 的乳腺癌细胞 SK-BR-3 细胞系的细胞毒性测试，同时以市面普通的 ADC (RC48) 做对照；

25 图 5-图 7 为实施例 4 中，利用高表达 Her2 的人胃癌细胞 NCI-N87 细胞系测试几个表达的融合蛋白的细胞毒性，分别按照每孔 1000、3000 和 5000 个的数量将细胞加入到 96 孔板中进行测试，结果分别图 5 (3000 个/孔)、图 6 (5000 个/孔) 和图 7 (1000 个/孔)；

图 8 为实施例 5 中，瘤内注射的肿瘤体积变化图；

图 9 为实施例 5 中，瘤内注射的肿瘤重量图；

图 10 为实施例 5 中，尾静脉注射的肿瘤体积变化图；

30 图 119 为实施例 5 中，尾静脉注射的肿瘤重量图；

具体实施方式

35 以下结合附图来说明本发明的具体实施方式。对于实施例中所用到的具体方法或材料，本领域技术人员可以在本发明技术思路的基础上，根据已有的技术进行常规的替换选择，而不仅限于本发明实施例的具体记载。

实施例中所使用的方法如无特殊说明，均为常规方法；所使用的材料、试剂等，如无特殊说明，均可从商业途径获得。

40 本文所用术语的定义意在并入生物技术领域中对于每个术语公认的现有技术的定义。在适当情况下，提供举例说明。除非在特定情况下单独或作为更大组的一部分而受到其他限制，否则这些定义适用于本说明书通篇使用的术语。

本文的“变体”是指不同于参考多肽或多核苷酸序列但保留其基本性质的多肽或多核苷酸序列。通

常，变体与参考多肽或多核苷酸序列在总体上非常相似，并且在许多区域中完全相同。

变体例如包含具有至少一个保守氨基酸取代的亲本多肽序列的氨基酸序列；或者，变体可包含具有至少一个非保守氨基酸取代的亲本多肽序列的氨基酸序列，在这种情况下，非保守氨基酸取代优选不干扰或抑制功能性变体的生物活性，非保守氨基酸取代可增强变体的生物活性，使得变体的生物活性与亲本多肽相比增加。

当参考多肽或多核苷酸序列使用时，术语“序列同源性百分比”是指多核苷酸与多肽之间的比较，并且通过在比较窗口内比较两个最佳比对的序列来确定，其中与用于两个序列的最佳比对的参考序列(不包含添加或缺失)相比，比较窗口内的多核苷酸或多肽序列的部分可包含添加或缺失(即，缺口)。通过以下方式计算百分比：确定两个序列中都存在相同的核酸碱基或氨基酸残基的位置的数目以产生匹配位置的数目，将匹配位置的数目除以比较窗口中较长序列的位置的总数，并将结果乘以 100 以产生序列同源性的百分比。使用本领域已知的多种序列比较算法和程序中的任何一种来评价同源性。此类算法和程序包括但决不限于 TBLASTN、BLASTP、FASTA、TFASTA 和 CLUSTALW。在某些实施方案中，使用本领域众所周知的基本局部

比对搜索工具(“BLAST”)来评价蛋白质和核酸序列同源性(参见例如 Karlin 和 Altschul, 1990, Proc .Natl .Acad .Sci .USA87:2267-2268; Altschul 等, 1990, J .Mol .Biol .215:403-410; Altschul 等, 1993, Nature Genetics 3:266272; Altschul 等, 1997, Nuc .Acids Res .25:3389-3402)。

本文的细胞因子，解释为：由免疫细胞（如单核、巨噬细胞、T 细胞、B 细胞、NK 细胞等）和某些非免疫细胞（内皮细胞、表皮细胞、纤维母细胞等）经刺激而合成、分泌的一类具有广泛生物学活性的小分子蛋白质。细胞因子一般通过结合相应受体调节细胞生长、分化和效应，调控免疫应答。细胞因子 (cytokine, CK) 是免疫原、丝裂原或其他刺激剂诱导多种细胞产生的低分子量可溶性蛋白质，具有调节固有免疫和适应性免疫、血细胞生成、细胞生长、APSC 多能细胞以及损伤组织修复等多种功能。细胞因子可被分为白细胞介素 (IL)、干扰素、肿瘤坏死因子家族 (TNF)、集落刺激因子 (CSF)、趋化因子 (chemokine)、生长因子 (GF) 等。

本文中的术语“抗体”以最宽泛的含义使用，指任何包含两条重链和两条轻链的免疫球蛋白 (Ig) 分子，及其任何抗体片段、突变体、变体或衍生物只要其显示理想的生物活性(例如表位结合活性)。

抗体包括但不限于多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合抗体、全人抗体、结构域抗体、单链、Fab 和 F(ab')₂ 片段、scFv 和 Fab 表达文库等。

全抗体是具有两条全长轻链和两条全长重链的结构，各轻链 (L) 通过二硫键与重链 (H) 连接。全抗体包括 IgA、IgD、IgE、IgM 和 IgG，IgG 是亚类，包括 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4。此外，在人中，轻链可以是 κ 链或 λ 链。

重链和轻链的 V 区分别称为 VH 和 VL。与目标靶点结合的识别结合，是重(“H”)和轻(“L”)链的 N 端可变(“V”)区的主要功能。

重链和轻链的 C 区分别称为 CH 和 CL。CH 的长度不一，IgG、IgA 和 IgD 重链 C 区有 CH1、CH2 和 CH3 三个结构域，IgM 和 IgE 重链 C 区有 CH1、CH2、CH3 和 CH4 四个结构域。

“抗体片段”包含完整抗体的部分，优选地完整抗体的抗原结合或可变区。抗体片段的实例包括 Fab、Fab'、F(ab')₂ 和 Fv 片段；双抗体(Db)；串联双抗体(taDb)、线性抗体(例如美国专利 5,641,870 实施例 2；Zapata 等人, Protein Eng. 8(10):1057-1062(1995))；单臂抗体、单可变结构域抗体、微抗体 (minibody)、单链抗体分子；以及从抗体片段形成的多特异性抗体(例如，包括但不限于 Db-Fc、taDb-Fc、taDb-CH3 和 (scFV)₄-Fc)。

如本文所用的术语“单克隆抗体” (mAb)，指由单一杂交瘤细胞产生，针对单一抗原表位的特异性抗体。

嵌合抗体，人-鼠嵌合抗体(chimeric Ab)，保留了鼠源单抗的特异性、亲和力，又显著减少其对人体的免疫原性，同时还可对抗体进行不同亚类转换，从而产生特异性相同但可介导不同效应的抗体分子。

5 改型抗体 (reshaping Ab)或人源化抗体(hu-manized Ab)，指利用基因工程技术，将人抗体可变区(V)中互补性决定区(CDR)AA序列改换成鼠源单抗CDR序列，重构成既具有鼠源性单抗的特异性又保持抗体亲和力的人源化抗体。

本文的小分子抗体，指例如抗原结合片段(fragment of antigen binding, Fab)，可变区片段(fragment of variable, Fv)，单链可变区片段(single chain fragment of variable, ScFv)，二硫键稳定性可变区(Disulfide-stabilized Fv, dsFv)、单链抗原结合片段(Single chain Fab, ScFab)、ScIgG。

10 “Fab”片段是木瓜蛋白酶消化抗体产生的抗原结合片段，由整个L链和H链的可变结构域(VH)，以及一条重链的第一恒定结构域(CH1)组成。木瓜蛋白酶消化抗体产生两个相同的Fab片段。胃蛋白酶处理抗体产生单个大F(ab')₂片段，其大致对应于具有二价抗原结合活性的两个二硫键连接的Fab片段，并仍能交联抗原。Fab'片段不同于Fab片段之处在于在CH1结构域的羧基端具有额外的数个残基，包括一个或多个来自抗体铰链区的半胱氨酸。Fab'-SH在本文中指其中恒定结构域的半胱氨酸残基携带游离巯基的Fab'。F(ab')₂抗体片段起初是其间有铰链半胱氨酸的Fab'片段对。

15 “Fv”由紧密非共价缔合的一个重链和一个轻链可变区结构域的二聚体组成。此二个结构域的折叠产生6个超可变环(H和L链各3个环)，其提供用于抗原结合的氨基酸残基，并赋予抗体抗原结合特异性。本文的“单链”在本文中以最宽泛的含义使用，指不同的片段连接形成的单个多肽链，例如两个抗体片段连接形成，两个片段之间，可以有连接头，也可以没有。

20 双链Fv(dsFv)通过二硫键连接到重链可变区和轻链可变区，单链Fv(scFv)通常经共价键通过肽连接体连接到重链可变区和轻链可变区。

单链抗原结合片段(Single chain Fab, ScFab)，2007年Stefan Dubel在BMC Biotechnology杂志上公开了single chain Fab (ScFab)的研究工作，相比于ScFv，ScFab的稳定性更好，还保留了原始抗体的亲和力。ScFab是整个L链、和H链的可变结构域(VH)、以及一条重链的第一恒定结构域(CH1)组成连接的成的单个多肽链。

25 “ScIgG”或“单链裂解的IgG”，是指具有包含两个重链和两个轻链的异二聚体结构的任何免疫球蛋白G类分子，其中一个重链已经经受在单条重链上的蛋白水解裂解，而另一个重链保持完整。

单域抗体，仅含重链可变区，结构比Fv的亚单位还小，它是一个具有抗原结合活性的分子。同完整抗体相比，单域抗体仍然具有与抗体结合的同等能力及稳定性。

30 纳米抗体：单独克隆并表达出来的VHH结构具有与原重链抗体相当的结构稳定性以及与抗原的结合活性，是已知的可结合目标抗原的最小单位。VHH晶体为2.5nm，长4nm，分子量只有15KDa，此也被称作纳米抗体(Nanobody, Nb)。

本文的多特异性抗体，指特异性结合相同或不同靶上的2个或更多不同靶点的能力。

本文的多价抗体，指结构具有多个能结合相同靶点的结构域，例如两个相同的ScFv的串联。

35 本文的每种抗体结构中，来自全长抗体的轻链L的，总体称为轻链部分，来自全长抗体的重链H的，总体称为重链部分，例如：

组成Fab或ScFab的部分中：轻链部分为来自全长抗体的轻链L，重链部分包括：来自全长抗体的重链H的可变结构域VH、以及一条重链H的第一恒定结构域(CH1)。需要说明地是，本文的“来自”强调的是源自，而不是仅仅指直接选用来源对象的相应部分的原序列的情况，对于本处，即组成的各个链或结构域部分，可能是这部分与原来源对象上对应链或结构域序列完全相同，也可能是原来源的对应序列的变体，例如，来自重链H的可变结构域VH，则组成Fab或ScFab的部分中的可变结构域的氨基酸序列，可以直接就是来源的抗体的重链H的可变结构域，也可以是来源的抗体的重链H的可变结构域

的变体，其他地方类似解释；

对于 ScIgG，轻链部分为全长的单个轻链 L，重链部分为全长的单个重链；

组成 Fv、dsFv 以及 ScFv 的部分中：轻链部分为来自全长的轻链 L 的可变区 VL；重链部分为来自全长的重链 H 可变区结构域 V；

5 对于全长抗体，则全部的轻链 L 也称为轻链部分，全部的重链 H 也称重链部分。

本文的融合蛋白的“活性”，指例如亲和力 EC50 值和/或 IC50 值。

10 本发明中的“体外无细胞蛋白合成体系”，与“体外表达系统”、“体外蛋白合成体系”、“体外蛋白质合成反应体系”、“无细胞蛋白合成体系”等表述具有相同的含义，可以描述为蛋白质体外合成系统、体外蛋白合成体系、无细胞系统、无细胞蛋白合成体系、无细胞体外蛋白合成体系、体外无细胞蛋白合成体系、体外无细胞合成体系、CFS 体系(cell-free system)、CFPS 体系(cell-free protein synthesis system)等描述方式。包括体外翻译体系、体外转录翻译体系(IVTT 体系)等。

15 体外蛋白合成反应，是指在体外无细胞合成体系中合成蛋白的反应，至少包括翻译过程。包括但不限于 IVTT 反应(体外转录翻译反应)。本发明中，优选 IVTT 反应。IVTT 反应，对应 IVTT 体系，是在体外将 DNA 转录翻译为蛋白质(Protein)的过程，因此，我们还将这类的体外蛋白合成体系称为 D2P 体系、D-to-P 体系、D_to_P 体系、DNAto-Protein 体系；相应的体外蛋白合成方法，还称为 D2P 方法、D-to-P 方法、D_to_P 方法、DNA-to-Protein 方法。

20 本发明的体外无细胞合成方法中，本发明的体外蛋白合成体系、模板、质粒、目标蛋白、体外蛋白合成反应(孵育反应)、各种制备方法、各种检测方法等技术要素，还可以各自独立地从下述文献中选择合适的实施方式或实施方法，包括但不限于 CN111484998A、CN106978349A、CN108535489A、CN108690139A、CN108949801A、CN108642076A、CN109022478A、CN109423496A、CN109423497A、CN109423509A、CN109837293A、CN109971783A、CN109988801A、CN109971775A、CN110093284A、CN110408635A、CN110408636A、CN110551745A、CN110551700A、CN110551785A、CN110819647A、CN110845622A、CN110938649A、CN110964736A 等文献。除非和本发明目的相冲突，否则，这些文献及其引用文献以全部内容、全部目的被引用。

25 融合蛋白

本发明提供的融合蛋白，也是一种免疫毒素，也可以称为融合毒素蛋白(FTP)，具有：效应部分 A、导向载体部分 B 和第一连接 L1，效应部分 A、导向载体部分 B 以及第一连接 L1 的连接顺序无特别限制，在一示例中，效应部分 A、第一连接 L1 以及导向载体部分 B 从 N 端到 C 端以 A-L1-B 取向连接。

效应部分 A 用于对靶向细胞进行杀伤作用，包括毒素分子；

30 导向载体部分 B 与靶向细胞上的目标靶点结合，以将免疫毒素特异性靶向到所需位置，具体指对靶向细胞上的受体或抗原具有特异性结合亲和力的任何氨基酸、肽段、多肽或蛋白质，本文的导向载体部分主要来自抗体或细胞因子。

第一连接 L1 将效应部分 A 和导向载体部分 B 进行连接，在一示例中，第一连接 L1 包括至少 3 个氨基酸残基、3-20 个氨基酸残基或 3-10 个氨基酸残基。

35 在一示例中，第一连接 L1 具有如 SEQ ID NO: 10、11、15、16、18-20、31 以及 43 中任意一个所示的氨基酸序列，或具有与 SEQ ID NO: 10、11、15、16、18-20、31 以及 43 中任意一个具有至少 80%、85%、90%、95%、99% 的序列同源性百分比的氨基酸序列。

40 毒素分子为下组的任意一项的毒性多肽：(a)，植物来源的毒素；(b)，细菌来源的毒素；(c)，真菌来源的毒素；(d)，人源性蛋白毒素；(e)，(f)，(a)-(d) 中任意一项来源的功能片段或该功能片段的变体。也即毒素分子可以是整个毒素，也可以只是毒素的能行使杀伤靶细胞功能的功能片段。

某一来源的毒素的毒性多肽，可能是现有已经存在的毒素，也可能是其变体，例如，植物来源的毒素，包括了以下可能：是已经存在的植物来源的毒素，或是这些已知的植物来源的毒素的变体。

5 优选地，毒素分子来自：白喉毒素，假单胞菌外毒素 A (PE38)，或霍乱弧菌毒素。这里说明了毒素分子具体来源的毒素类型，具体解释，是指毒素分子为：白喉毒素、白喉毒素的功能片段、白喉毒素的变体、白喉毒素的功能片段的变体、假单胞菌外毒素 A、假单胞菌外毒素 A 的功能片段、假单胞菌外毒素 A 的变体、假单胞菌外毒素 A 的功能片段的变体、霍乱弧菌毒素、霍乱弧菌毒素的功能片段、霍乱弧菌毒素的变体、霍乱弧菌毒素的功能片段变体。

10 毒素包括三个结构域，结合结构域(B domain)、转运结构域(T domain)和催化结构域(A domain)，结合结构域与靶向细胞表面的受体或抗原结合，转运结构域通过内化和跨膜转运过程，转运到细胞质中，催化结构域通过胞内催化抑制蛋白合成或诱导凋亡，从而实现对靶向细胞的杀伤作用。

本文的毒素的功能片段，例如只是毒素的催化结构域 A，又例如是毒素的转运结构域 T 和催化结构域 A。

效应部分包括的毒素分子的结构为以下中任意一种：

- 15 (1) 白喉毒素的转运结构域 DT 和催化结构域 DA，优选地，从 N 端到 C 以 DA-DT 的取向连接；
- (2) 白喉毒素的催化结构域 DA；
- (3) 假单胞菌外毒素 A 的转运结构域 PT 和催化结构域 PA，优选地，从 N 端到 C 以 PT-PA 的取向连接；
- (4) 假单胞菌外毒素 A 的催化结构域 PA；
- 20 (5) 霍乱弧菌毒素的转运结构域 CT 和催化结构域 CA，优选地，从 N 端到 C 以 CT-CA 的取向连接；
- (6) 霍乱弧菌毒素的催化结构域 CA。

在一示例中，毒素分子具有如 SEQ ID NO: 1-9 中任意一个所示的氨基酸序列，或具有与 SEQ ID NO: 1-9 中任意一个具有至少 80%、85%、90%、95%、99% 的序列同源性百分比的氨基酸序列。

25 在一示例中，导向载体部分为抗体，抗体为单克隆抗体、嵌合抗体、改型抗体、小分子抗体、多特异性抗体以多价抗体中的任意一种或多种。

在一示例中，抗体为小分子抗体或多价抗体中的任意一种或多种。

优选地，小分子抗体为 Fv、Fab、ScFv、ScFab、ScIgG、dsFv 以及单域抗体中的任意一种或多种。

在一示例中，通过第二连接 L2 对 ScFab、ScFv、ScIgG 各自的轻链部分和重链部分之间进行连接，例如：

30 ScFab 结构式例如为：L-L2-VH-CH1 或 VH-CH1-L2-L；

ScFv 结构式例如为：VH-L2-VL；

ScIgG 结构式例如为：L-L2-H。

第二连接的包含至少 25 个氨基酸残基，优选包含 28~180、30~120 或 30-90 或 30-85 或 30-82 个氨基酸残基。

35 在一示例中，第二连接 L2 中，含有 G、S 和 T 中的任意一种或多种的主要氨基酸，且主要氨基酸的数量占比第二连接总氨基酸数量的百分比至少大于 40%，进一步地，大于 45%，更优选地，大于 60%。

进一步地，第二连接 L2 具有如 SEQ ID NO: 10、12、13、14、17、28、45 以及 47 中任意一个所示的氨基酸序列，或具有与 SEQ ID NO: 10、12、13、14、17、28、45 以及 47 中任意一个具有至少 80%、85%、90%、95%、99% 的序列同源性百分比的氨基酸序列。

在一示例中，ScFab 的结构满足：ScFab 的轻链部分和重链部分按 N 端到 C 端的取向连接，或 ScFab 的重链部分和轻链部分按 N 端到 C 端的取向连接。

在一示例中，ScFv 的重链部分和轻链部分按 N 端到 C 端的取向连接。

5 优选地，多价抗体为至少两个单链抗体串联形成的串联抗体：例如两个 ScFv 串联，两个 ScFab 串联。串联的两个单元结构之间，可以有连接头或无连接头。

另一优选地，多价抗体为小分子抗体与聚合蛋白形成的抗体多聚融合蛋白，通过聚合蛋白，将多个小分子抗体聚合为多聚体，优选地，抗体多聚融合蛋白为二聚体或四聚体。

进一步地，抗体多聚融合蛋白的示例为：ScFab 与抗体片段 CH3 的融合、ScFv 与抗体片段 CH3 的融合、ScFab 与 Tamavidins2 蛋白的融合、ScFv 与 Tamavidins2 蛋白的融合。

10 其中，Tamavidins 为抗真菌蛋白，根据美国专利 US12/716182，它是一种从食用蘑菇侧耳（*Pleurotus comucopiae*, Tamogitake）中纯化的新型链亲和素样蛋白。来自纯化蛋白质的基因称为 tam1，具有由其编码的氨基酸序列的蛋白质称为 tamavidin 1，tam1 的同系物称为 tam 2，具有由其编码的氨基酸序列的蛋白质称为 tamavidin 2，tamavidins 1 和 2 在氨基酸序列上分别与链霉亲和素具有 46.7% 和 48.1% 的同源性，在氨基酸序列上与亲和素分别具有 31.2% 和 36.2% 的同源性。

15 优选地，ScFab 与 Tamavidins2 蛋白的融合是从 N 端到 C 端按 Tamavidins2 蛋白到 ScFab 的取向连接；ScFv 与 Tamavidins2 蛋白的融合是从 N 端到 C 端按 Tamavidins2 蛋白到 ScFab 的取向连接。ScFab 与抗体片段 CH3 之间按 N 端到 C 端或 C 端到 N 端的取向连接。

在一示例中，组成 Fab 或 ScFab 的轻链部分具有如 SEQ ID NO: 32 的氨基酸序列，或具有与 SEQ ID NO: 32 具有至少 80%、85%、90%、95%、99% 的序列同源性百分比的氨基酸序列。

20 在一示例中，组成 Fab 或 ScFab 的重链部分的可变结构域具有如 SEQ ID NO: 33 或 55 所示的氨基酸序列，或具有与 SEQ ID NO: 33 或 55 具有至少 80%、85%、90%、95%、99% 的序列同源性百分比的氨基酸序列。

在一示例中，组成 Fab 或 ScFab 的重链部分的第一恒定结构域 CH1 具有如 SEQ ID NO: 34 或 57 所示的氨基酸序列，或具有与 SEQ ID NO: 34 或 57 具有至少 80%、85%、90%、95%、99% 的序列同源性百分比的氨基酸序列。

在一示例中，组成 Fv、dsFv 或 ScFv 的轻链部分的可变结构域具有如 SEQ ID NO: 35 或 54 所示的氨基酸序列，或具有与 SEQ ID NO: 35 或 54 具有至少 80%、85%、90%、95%、99% 的序列同源性百分比的氨基酸序列。

在一示例中，组成 Fv、dsFv 或 ScFv 的重链部分的可变结构域的具有如为 SEQ ID NO: 33 或 55 所示的氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 33 或 55 具有至少 80%、85%、90%、95%、99% 的序列同源性百分比。

在一示例中，组成 ScIgG 的轻链部分具有如 SEQ ID NO: 32 或 56 所示的氨基酸序列，或具有与 SEQ ID NO: 32 或 56 具有至少 80%、85%、90%、95%、99% 的序列同源性百分比的氨基酸序列。

35 在一示例中，组成 ScIgG 的重链部分具有如 SEQ ID NO: 36 或 17 所示的氨基酸序列，或具有与 SEQ ID NO: 36 或 17 具有至少 80%、85%、90%、95%、99% 的序列同源性百分比的氨基酸序列。

在一示例中，本发明提供融合蛋白中，涉及的抗体片段 CH3 具有如 SEQ ID NO: 37 所示的氨基酸序列，或具有与 SEQ ID NO: 37 具有至少 80%、85%、90%、95%、99% 的序列同源性百分比的氨基酸序列；

40 在一示例中，本发明提供的融合蛋白中，涉及的 Tamavidins2 蛋白具有如 SEQ ID NO: 38 所示的氨基酸序列，或具有与 SEQ ID NO: 38 具有至少 80%、85%、90%、95%、99% 的序列同源性百分比的氨基酸序列。

基酸序列。

在一示例中，对于涉及的纳米抗体，具有如 SEQ ID NO: 52 或 53 所示的氨基酸序列，或具有与 SEQ ID NO: 52 或 53 具有至少 80%、85%、90%、95%、99% 的序列同源性百分比的氨基酸序列。

两个单链抗体之间、小分子抗体与聚合蛋白之间通过第三连接 L3 连接，例如：

5 两个 ScFab 串联的结构例如为：

ScFab (L-L2-VH-CH1) -L3-ScFab (L-L2-VH-CH1) ；

两个 ScFv 串联的结构式例如为：

ScFv (VH-L2-VL) -L3-ScFv (VH-L2-VL) ；

ScFab 与抗体片段 CH3 之间连接的结构例如为：

10 CH3-L3-ScFab (L-L2-VH-CH1)；

ScFv 与抗体片段 CH3 之间连接的结构例如为：

CH3-L3-ScFv (VH-L2-VL)；

Tamavidins2 蛋白与 ScFab 的融合的结构例如为：

Tamavidins2-L3-ScFab (L-L2-VH-CH1)。

15 第三连接 L3 为无或包含至少 3 个氨基酸残基，优选地，包括 5-20 个氨基酸残基。

在一示例中，第三连接 L3 含有 G 和 S 两种主要氨基酸残基，且主要氨基酸残基的数量占比第三连接总氨基酸数量的百分比在 40% 以上，优选地，该占比在 50% 以上、60%、65% 以上、70% 或 75% 以上。

在一示例中，第三连接 L3 为 IgG1 的铰链区 或氨基酸序列与铰链区具有至少 80% 或至少 85% 或至少 90% 或至少 95 或至少 99% 以上一致性的片段。

20 例如，第三连接 L3 具有如 SEQ ID NO: 10、14、18、20-30、44、以及 48-51 中任意一个所示的氨基酸序列，或具有与 SEQ ID NO: 10、14、18、20-30、44、以及 48-51 中任意一个具有至少 80%、85%、90%、95%、99% 的序列同源性百分比的氨基酸序列。

在一示例中，抗体为特异性结合 Her2、CD22 中任意一项的抗体。

25 人表皮生长因子受体(HER)家族包括 4 种结构相关的成员——HER1 (ErbB1, 也称为 EGFR)、HER2 (ErbB2, 也称为 HER2/neu)、HER3 (ErbB3) 和 HER4 (ErbB4)。HER2 是一种 185 kDa 蛋白质，具有胞外配体结合域(ECD, 胞外域)和胞内酪氨酸激酶域。N 末端的 ECD 可以分为 4 个亚结构域(subdomain)(I - IV)。HER2 是乳腺癌治疗的一种有希望的靶标，因为发现它在约四分之一的乳腺癌患者中过表达(Bange 等,2001,Nature Medicine 7:548)。体外研究业已表明：抑制 HER2 可诱导乳腺癌细胞显著凋亡(Faltus T 等,Neoplasia.2004; 6(6):786 - 95; Yang G 等,J Biol Chem.2004; 279(6):4339 - 45)。近年来，
30 HER2 已成为大约 30% 乳腺癌患者的重要生物标志物和治疗靶标。

CD22 是一种谱系限制性 B 细胞抗原，在 60-70% 的 B 细胞淋巴瘤和白血病中表达。CD22 在 B 细胞发育的早期阶段不存在于细胞表面，也不在干细胞上表达(Tedder, T. F. et al., 免疫学牧师, 5:481-504(1997))。

进一步地，抗体来源选自 IgM、IgG、IgA、IgD 和 IgE；

35 优选地，的抗体来源选自曲妥珠单抗 (Trastuzumab)、利妥昔单抗 (Rituxima)、贝伐单抗 (Bevacizumab)、阿达木单抗 (Adalimumab)、帕博利珠单抗 (Pembrolizumab)、乌司奴单抗 (Ustekinumab)、纳武利尤单抗 (Nivolumab)、奥瑞珠单抗 (Ocrelizumab)、帕利珠单抗 (Palizumab)、英夫利昔单抗 (Infliximab)、奥马珠单抗 (Omalizumab)、恩沃利单抗 (Envafolimab)、托西珠单抗 (Atlizumab)、阿替利珠单抗 (Atezolizumab) 或西妥昔单抗

(Cetuximab)，或它们的变体。

在一示例中，本发明提供的融合蛋白的 EC50 值小于等于 1nM 或小于等于 0.8nM 或小于等于 0.7nM 或小于等于 0.6nM 或小于等于 0.5nM 或小于等于 0.4nM 或小于等于 0.2nM。

在一示例中，融合蛋白的 IC50 值与市售的 DS-8201a 的 IC50 值或 T-DM1 的 IC50 值相当。（DS-8201a 的 IC50 值参见：Yusuke Ogitani 等，DS-8201a, a novel HER2-targeting ADC with a novel DNA topoisomerase I inhibitor, demonstrates a promising anti-tumor efficacy with differentiation from T-DM1, March 29, 2016; DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2822; T-DM1 的 IC50 值参见：Junttila TT, Li G, Parsons K, Phillips GL, Sliwkowski MX. Trastuzumab-DM1 (T-DM1) retains all the mechanisms of action of trastuzumab and efficiently inhibits growth of lapatinib insensitive breast cancer. Breast cancer research and treatment. 2011;128:347-56.)。

本发明提供的融合蛋白，适于无细胞体外合成，优选地，无细胞体外合成为：在无细胞体外合成体系中，以融合蛋白的编码核酸为 DNA 模板，在一定条件孵育一定时间后得到融合蛋白。

在一示例中，无细胞体外合成体系含有细胞提取物，细胞提取物来源选自酵母菌株，进一步地，酵母细胞为：酿酒酵母、克鲁维酵母属酵母中的一种或多种的组合，在另一优选例中，克鲁维酵母属酵母为：乳酸克鲁维酵母、马克斯克鲁维酵母以及多布克鲁维酵母中的一种或多种的组合。

在一示例中，酵母菌株经过基因工程改造以具有毒素抗性，具有毒素抗性的菌株获取的细胞提取物参与体外蛋白合成时，能克服免疫毒素的毒性问题。

本文的“具有毒素抗性”指对免疫毒素的毒性具有一定的耐受性。

优选地，本文的细胞提取物来源的菌株，其细胞中的 DPH 基因表达或活性被降低和/或 eEF2 的氨基酸序列发生突变；优选地，所述 DPH 基因的表达量 $\leq 10\%$ ，更佳地， $\leq 5\%$ ，更佳地， $\leq 2\%$ ；和/或将 DPH 基因的表达或活性降低满足以下条件：A1/A0 的比值 $\leq 30\%$ ，更佳地 $\leq 10\%$ ，更佳地 $\leq 5\%$ ，更佳地， $\leq 2\%$ ，最佳地为 0-2%，其中，A1 为所述基因工程细胞中 DPH 基因的表达或活性；A0 为野生型 DPH 基因的表达或活性。

进一步优选地，所述细胞中的 DPH 基因的表达或活性被降低通过选自以下组的方式实现：基因编辑、基因突变、基因敲除、基因中断、RNA 干扰技术、或其组合。

进一步优选地，所述 DPH 基因选自 DPH1~7 基因中的一种或多种，具体为 DPH1、DPH2、DPH3、DPH4、DPH5、DPH6 和 DPH7 基因。

进一步优选地，所述 eEF2 氨基酸序列中的第 699 位和/或 701 位发生突变。

进一步优选地，所述 eEF2 氨基酸序列中第 699 位的组氨酸 (H) 突变为甲硫氨酸 (M)。

进一步优选地，所述 eEF2 氨基酸序列中第 701 位的甘氨酸 (G) 突变为精氨酸 (R)。

进一步优选地，所述细胞中至少包含 DPH 基因被敲除。

进一步优选地，所述细胞的 DPH 基因被敲除且 eEF2 的氨基酸序列发生突变。

进一步优选地，所述 DPH 基因所编码蛋白的氨基酸序列为 SEQ ID NO:59~65 或者为具有与 SEQ ID NO:SEQ ID NO:59~65 所示氨基酸序列 $\geq 85\%$ 、 $\geq 90\%$ 、 $\geq 95\%$ 、 $\geq 97\%$ 、 $\geq 98\%$ 或 $\geq 99\%$ 以上同源性，且具有与 SEQ ID NO:SEQ ID NO:59~65 序列相同活性的多肽。

进一步优选地，所述 eEF2 的氨基酸序列为 SEQ ID NO:66 或者为具有与 SEQ ID NO:SEQ ID NO:66 所示氨基酸序列 $\geq 85\%$ 、 $\geq 90\%$ 、 $\geq 95\%$ 、 $\geq 97\%$ 、 $\geq 98\%$ 或 $\geq 99\%$ 以上同源性，且具有与 SEQ ID NO:SEQ ID NO:66 序列相同活性的多肽。

核酸

本发明还提供一种分离的核酸，“核酸分子”包括 DNA(例如基因组 DNA 或互补 DNA)和 mRNA 分子，其可以单链或双链。

“分离的”意指核酸分子不位于或以其他方式不提供给于细胞内。

5 载体

本发明还提供一种包括前述的核酸的载体。

在一示例中，载体是表达载体。

宿主细胞

10 本发明还提供一种包括前述的核酸或前述的的载体的宿主细胞。

优选地，宿主细胞为酵母细胞，

进一步地，酵母细胞为：酿酒酵母、克鲁维酵母属酵母中的一种或多种的组合，在另一优选例中，克鲁维酵母属酵母为：乳酸克鲁维酵母、马克斯克鲁维酵母以及多布克鲁维酵母中的一种或多种的组合。

在一示例中，酵母细胞来源的菌株经过前述的基因工程改造以具有前述的毒素抗性。

15

体外无细胞蛋白质合成体系

本发明还提供一种体外无细胞蛋白质合成体系，以编码权利要求 1-17 任意一项的融合蛋白的 mRNA 或 DNA 为模板，合成融合蛋白。

在一示例中，本发明提供的体外无细胞蛋白质合成体系，包括以下中的任意一种或多种：

20

(1) 编码前述保护的融合蛋白的 mRNA 或 DNA 模板；

(2) 细胞提取物，细胞提取物为酵母细胞提取物，再进一步地，细胞提取物来自下组的菌株：酿酒酵母、毕氏酵母以及克鲁维酵母中的任意一个或多个的组合；更佳地，的酵母细胞提取物来自包括：克鲁维酵母，更佳地为乳酸克鲁维酵母，更优选地，来自克鲁维酵母；

(3) 以下组分中的任意一种或多种：

25

氨基酸混合物、dNTP、RNA 聚合酶、DNA 聚合酶、能量供应体系、聚乙二醇以及水性溶剂。

在一示例中，体外无细胞蛋白质合成体系中，细胞提取物来源的菌株经过前述的基因工程改造以具有前述的毒素抗性。

体外无细胞合成方法

30

本发明还提供一种前述的融合蛋白的体外无细胞合成方法，包括：

在包括前述的无细胞体外蛋白质合成体系的反应体系中，以编码前述的融合蛋白的 mRNA 或 DNA 为模板进行体外合成反应得到融合蛋白，优选地，DNA 模板与参与体外合成反应的其他成分的体积比为 1:10-1:50，优选 1:20-1:40；最优选 1:25-1:35，特别优选为 1:30。

35

在一示例中，本发明提供的体外无细胞合成方法中，无细胞体外蛋白质合成体系包括：酵母细胞提取物、氨基酸混合物、dNTP、RNA 聚合酶、DNA 聚合酶、能量供应体系、聚乙二醇以及水性溶剂；

进一步地：

酵母细胞提取物来自下组的菌株：酿酒酵母、毕氏酵母以及克鲁维酵母中的任意一个或多个的组合；

较佳地，的酵母细胞提取物来自包括：克鲁维酵母，更佳地为乳酸克鲁维酵母，

更进一步地，菌株经过基因工程改造以具有毒素抗性。

在一示例中，本发明提供的体外无细胞合成方法中，酵母细胞提取物占整个无细胞体外蛋白质合成体系的体积比为 50-80%，或者为 50%-55%、50-60%、50-65%。

5

制备融合蛋白中的应用

本发明还提供一种前述的核酸在制备前述的融合蛋白中的应用；

本发明还提供一种前述的载体在制备前述的融合蛋白中的应用；

本发明还提供一种前述的宿主细胞在制备前述的融合蛋白中的应用；

10 本发明还提供一种前述的体外无细胞蛋白质合成体系在制备前述的融合蛋白中的应用。

疾病治疗中的用途

本发明还提供一种前述的融合蛋白在疾病治疗中的用途，优选地，用于抗肿瘤、抗移植排斥反应和治疗自身免疫性疾病。

15 在一示例中，疾病治疗为以 HER2 为目标靶点的治疗。

本发明提供的前述的融合蛋白，对目标靶点，例如对 HER2 的亲合力 EC50 值能达到 0.16nM，对目标细胞的毒性 IC50 值能达到现有产品的相当毒性，能上述的疾病治疗中应用。

20 可优选用于耐性癌为肺癌、尿路上皮癌、大肠癌、前列腺癌、卵巢癌、胰腺癌、乳腺癌、膀胱癌、胃癌、胃肠道间质瘤、宫颈癌、食道癌、鳞状细胞癌、腹膜癌、肝癌、肝细胞癌、结肠癌、直肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、子宫癌、唾液腺癌、肾癌、外阴癌、甲状腺癌、阴茎癌、白血病、恶性淋巴瘤、浆细胞瘤、骨髓瘤、或肉瘤的情况，可更优选用于耐性癌为乳腺癌、胃癌、大肠癌、或非小细胞肺癌的情况，进一步更优选用于耐性癌为乳腺癌、或胃癌的情况。

制备药物中的应用

25 本发明还提供一种前述的核酸在制备用于用于前述的疾病治疗的用途的药物中的应用。

本发明还提供一种前述的载体在制备用于用于前述的疾病治疗的用途的药物中的应用。

本发明还提供一种前述的宿主细胞在制备用于用于前述的疾病治疗的用途的药物中的应用。

本发明还提供一种前述的融合蛋白在制备用于用于前述的疾病治疗的用途的药物中的应用。

30 以下，以具体的实施例，进一步说明本发明的内容。

实施例 1 本发明的融合蛋白的分子设计

分别以具有活性的白喉毒素和 PE38 的活性片为效应部分 A，分别以靶向 Her2 和 CD22 的来源的抗体为导向载体部分 B，进行具体说明。

35 效应部分 A 和导向载体部分 B 之间采用第一连接 L1 进行连接，针对第一连接 L1 的长度和序列组成进行了优化。

使用包含催化结构域 A 和转运结构域 T 的白喉毒素片段，删除了能够识别其天然靶点的结合结构域，具体包括氨基酸的 1-389 位片段；

PE 毒素蛋白包含 3 个结构域，氨基端的结构域 I 负责结合天然靶点，中间的结构域 II 负责跨膜靶向（转运结构域 PT），羧基端的结构域 III 是催化结构域（催化结构域 PA）。我们选取转运结构域 PTI 和催化结构域 PAI 片段，删除结构域 I，具体包含氨基酸的 251-613 位片段。

5 Trastuzumab 是靶向 Her2 的人源 IgG1 单克隆抗体，选择其 Fv 片段、Fab 片段或者全长抗体作为导向载体部分 B。将 trastuzumab 的片段或者全长设计为单链分子：包括单链 Fv (Single chain Fv, ScFv)、单链 Fab (Single chain Fab, ScFab) 和单链 IgG (Single chain IgG, ScIgG)。其中 ScFv 是将 VL 和 VH (VL-VH) 或 VH 和 VL (VH-VL) 连接，ScFab 是将 L 链与 VH-CH1 片段连接，ScIgG 则是将 L 链与 H 链连接，这些连接采用第二连接 L2 进行连接，对连接的长度和氨基酸序列进行优化。

10 使用的 CD22 抗体是来自于 FDA 批准上市的 ADC 药物 Inotuzumab ozogamicin 的抗体部分，是人源化的 IgG4 单克隆抗体，靶向 CD22。单链分子的具体设计参照前述的靶向 Her2 的人源 IgG1 单克隆抗体的设计。

15 为了提高导向载体部分 B 与目标靶点的亲和力，将免疫毒素中 ScFv 或 ScFab 进行串联，形成 ScFv-ScFv 或 ScFab-ScFab 的分子构造，串联的 ScFv 和 ScFab 之间采用通过第三连接 L3 连接进行连接。同时，也分别采用介导二聚体和四聚体的 CH3 和 Tam2 蛋白与 ScFv 和 ScFab 进行融合，形成 ScFv-CH3、CH3-ScFv、ScFab-CH3、CH3-ScFab、ScFv-Tam2、Tam2-ScFv、ScFab-Tam2 和 Tam2-ScFab 的分子构造，与 CH3 和 Tam2 的融合都用通过第三连接 L3 连接进行连接。对第三连接 L3 连接的长度和氨基酸序列进行优化。

融合蛋白的具体分子设计信息如表 1 所示：分子中各个部分涉及的序列具体参考表 6。

表 1 表格中的“/”表示无连接 linker					
DT-HER2 抗体					
序号	分子编号	分子构造	L1 (Linker 1)序列	L2 (Linker 2)序列	L3 (Linker 3)序列
1	DTH2-1	DT-L1-ScFv (VH-L2-VL)	SEQ ID NO.:11	SEQ ID NO.:28	
2	DTH2-10	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)-L3-ScFab	SEQ ID NO.:10	SEQ ID NO.:12	SEQ ID NO.:25
3	DTH2-104	DT-L1-(VHH1-L3-CH3-L3-VHH2)	SEQ ID NO.:11		SEQ ID NO.:10
4	DTH2-105	DT-L1-(VHH1-L3-CH3-L3-VHH2)	SEQ ID NO.:10		SEQ ID NO.:10
5	DTH2-106	DT-L1-VHH1	SEQ ID NO.:11		
6	DTH2-108	DT-L1-VHH1-L3-CH3	SEQ ID NO.:11		SEQ ID NO.:10/
7	DTH2-109	DT-L1-VHH2	SEQ ID NO.:11		
8	DTH2-11	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)-L3-ScFab	SEQ ID NO.:10	SEQ ID NO.:12	SEQ ID NO.:26
9	DTH2-110	DT-L1-VHH2	SEQ ID NO.:10		
10	DTH2-111	DT-L1-VHH2-L3-CH3	SEQ ID NO.:11		SEQ ID NO.:10/
11	DTH2-12	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)-L3-ScFab	SEQ ID NO.:11	SEQ ID NO.:12	SEQ ID NO.:24
12	DTH2-13	DT-L1-ScFv (VH-L2-VL)-L3-ScFv	SEQ ID NO.:11	SEQ ID NO.:28	SEQ ID NO.:29
13	DTH2-14	DT-L1-ScFv (VH-L2-VL)-L3-ScFv	SEQ ID NO.:10	SEQ ID NO.:28	SEQ ID NO.:27
14	DTH2-15	DT-L1-ScFv (VL-L2-VH)-L3-ScFv	SEQ ID NO.:11	SEQ ID NO.:14	SEQ ID NO.:30
15	DTH2-16	DT-L1-ScFv (VL-L2-VH)-L3-ScFv	SEQ ID NO.:10	SEQ ID NO.:14	SEQ ID NO.:27
16	DTH2-17	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)-L3-ScFab (L-L2-VH-CH1)	SEQ ID NO.:11	SEQ ID NO.:12	SEQ ID NO.:30

17	DTH2-18	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)-L3-ScFab	SEQ ID NO.:10	SEQ ID NO.:12	SEQ ID NO.:27
18	DTH2-2	DT-L1-ScFv (VH-L2-VL)	SEQ ID NO.:10	SEQ ID NO.:28	
19	DTH2-23	DT-L1-CH3-L3-ScFab (L-L2-VH-CH1)	SEQ ID NO.:11	SEQ ID NO.:12	SEQ ID NO.:22
20	DTH2-25	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)-L3-CH3	SEQ ID NO.:11	SEQ ID NO.:12	SEQ ID NO.:22
21	DTH2-26	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)-L3-CH3	SEQ ID NO.:11	SEQ ID NO.:12	SEQ ID NO.:51
22	DTH2-28	DT-L1-Tam2-L3-ScFab (L-L2-VH-CH1)	SEQ ID NO.:11	SEQ ID NO.:12	SEQ ID NO.:22
23	DTH2-3	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)	SEQ ID NO.:11	SEQ ID NO.:12	
24	DTH2-32	DT-L1-CH3-L3-ScFv (VH-L2-VL)	SEQ ID NO.:11	SEQ ID NO.:28	SEQ ID NO.:22
25	DTH2-34	DT-L1-ScFv (VH-L2-VL)-L3-CH3	SEQ ID NO.:11	SEQ ID NO.:28	SEQ ID NO.:22
26	DTH2-36	DT-L1-Tam2-L3-ScFv (VH-L2-VL)	SEQ ID NO.:11	SEQ ID NO.:28	SEQ ID NO.:22
27	DTH2-38	DT-L1-ScFv (VH-L2-VL)-L3-Tam2	SEQ ID NO.:11	SEQ ID NO.:28	SEQ ID NO.:22
28	DTH2-4	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)	SEQ ID NO.:10	SEQ ID NO.:12	
29	DTH2-42	DT-L1-CH3-L3-ScFv (VL-L2-VH)	SEQ ID NO.:11	SEQ ID NO.:28	SEQ ID NO.:22
30	DTH2-44	DT-L1-ScFv (VL-L2-VH)-L3-CH3	SEQ ID NO.:11	SEQ ID NO.:28	SEQ ID NO.:22
31	DTH2-46	DT-L1-ScFv (VL-L2-VH)-L3-Tam2	SEQ ID NO.:11	SEQ ID NO.:28	SEQ ID NO.:22
32	DTH2-48	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)-L3-CH3	SEQ ID NO.:11	SEQ ID NO.:12	SEQ ID NO.:20
33	DTH2-49	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)-L3-CH3	SEQ ID NO.:11	SEQ ID NO.:12	SEQ ID NO.:21
34	DTH2-5	DT-L1-ScIgG (L-L2-H)	SEQ ID NO.:11	SEQ ID NO.:12	
35	DTH2-50	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)-L3-CH3	SEQ ID NO.:11	SEQ ID NO.:12	/
36	DTH2-51	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)-L3-CH3	SEQ ID NO.:11	SEQ ID NO.:12	/
37	DTH2-6	DT-L1-ScIgG (L-L2-H)	SEQ ID NO.:10	SEQ ID NO.:12	
38	DTH2-62	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)-L3-ScFab	SEQ ID NO.:11	SEQ ID NO.:13	SEQ ID NO.:28
39	DTH2-63	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)-L3-ScFab	SEQ ID NO.:10	SEQ ID NO.:13	SEQ ID NO.:28
40	DTH2-64	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)-L3-CH3	SEQ ID NO.:11	SEQ ID NO.:12	SEQ ID NO.:22
41	DTH2-65	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)-L3-CH3	SEQ ID NO.:11	SEQ ID NO.:12	SEQ ID NO.:22
42	DTH2-66	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)-L3-CH3	SEQ ID NO.:11	SEQ ID NO.:12	SEQ ID NO.:22
43	DTH2-67	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)-L3-CH3	SEQ ID NO.:11	SEQ ID NO.:12	SEQ ID NO.:22
44	DTH2-68	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)-L3-CH3	SEQ ID NO.:11	SEQ ID NO.:12	SEQ ID NO.:22
45	DTH2-69	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)-L3-CH3	SEQ ID NO.:11	SEQ ID NO.:12	SEQ ID NO.:14
46	DTH2-7	DT-L1-ScFv (VL-L2-VH)	SEQ ID NO.:11	SEQ ID NO.:14	
47	DTH2-70	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)-L3-CH3	SEQ ID NO.:11	SEQ ID NO.:12	SEQ ID NO.:28
48	DTH2-71	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)-L3-CH3	SEQ ID NO.:11	SEQ ID NO.:12	SEQ ID NO.:50
49	DTH2-72	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)-L3-CH3	SEQ ID NO.:11	SEQ ID NO.:12	SEQ ID NO.:18
50	DTH2-73	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)-L3-CH3	SEQ ID NO.:11	SEQ ID NO.:12	SEQ ID NO.:48
51	DTH2-74	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)-L3-CH3	SEQ ID NO.:11	SEQ ID NO.:12	SEQ ID NO.:49
52	DTH2-75	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)-L3-CH3	SEQ ID NO.:11	SEQ ID NO.:12	SEQ ID NO.:44
53	DTH2-76	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)	SEQ ID NO.:10	SEQ ID NO.:12	
54	DTH2-77	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)	SEQ ID NO.:20	SEQ ID NO.:12	
55	DTH2-78	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)	SEQ ID NO.:15	SEQ ID NO.:12	
56	DTH2-79	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)	SEQ ID NO.:31	SEQ ID NO.:12	
57	DTH2-8	DT-L1-ScFv (VL-L2-VH)	SEQ ID NO.:10	SEQ ID NO.:14	

58	DTH2-80	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)	SEQ ID NO.:18	SEQ ID NO.:12	
59	DTH2-81	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)	SEQ ID NO.:19	SEQ ID NO.:12	
60	DTH2-82	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)-L3-CH3	SEQ ID NO.:10	SEQ ID NO.:12	SEQ ID NO.:22
61	DTH2-83	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)-L3-CH3	SEQ ID NO.:10	SEQ ID NO.:12	SEQ ID NO.:22
62	DTH2-84	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)-L3-CH3	SEQ ID NO.:20	SEQ ID NO.:12	SEQ ID NO.:22
63	DTH2-85	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)-L3-CH3	SEQ ID NO.:15	SEQ ID NO.:12	SEQ ID NO.:22
64	DTH2-86	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)-L3-CH3	SEQ ID NO.:16	SEQ ID NO.:12	SEQ ID NO.:22
65	DTH2-87	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)-L3-CH3	SEQ ID NO.:18	SEQ ID NO.:12	SEQ ID NO.:22
66	DTH2-88	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)-L3-CH3	SEQ ID NO.:19	SEQ ID NO.:12	SEQ ID NO.:22
67	DTH2-9	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)-L3-ScFab	SEQ ID NO.:11	SEQ ID NO.:12	SEQ ID NO.:23
DT-CD22 抗体					
序号	分子编号	分子构造	L1 (Linker 1)序列	L2 (Linker 2)序列	L3 (Linker 3)序列
68	DT22-12	DT-L1-ScFv (VL-L2-VH)-SS	SEQ ID NO.:10	SEQ ID NO.:28	
69	DT22-14	DT-L1-ScFv (VL-L2-VH)-SS	SEQ ID NO.:10	SEQ ID NO.:47	
70	DT22-2	DT-L1-ScFv (VL-L2-VH)	SEQ ID NO.:10	SEQ ID NO.:47	
71	DT22-22	DT-L1-ScFv (VH-L2-VL)-SS	SEQ ID NO.:10	SEQ ID NO.:47	
72	DT22-24	DT-L1-ScFv (VH-L2-VL)-SS	SEQ ID NO.:10	SEQ ID NO.:28	
73	DT22-28	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)	SEQ ID NO.:10	SEQ ID NO.:46	
74	DT22-34	DT-L1-ScIgG (L-L2-H)	SEQ ID NO.:10	SEQ ID NO.:45	
75	DT22-4	DT-L1-ScFv (VL-L2-VH)	SEQ ID NO.:10	SEQ ID NO.:28	
PE38-Her2 抗体					
序号	分子编号	分子构造	L1 (Linker 1)序列	L2 (Linker 2)序列	L3 (Linker 3)序列
76	PEH2-1	ScFv(VL-L2-VH)-L1-PE38	SEQ ID NO.:43	SEQ ID NO.:14	
77	PEH2-2	ScFv(VL-L2-VH)-L1-PE38	SEQ ID NO.:20	SEQ ID NO.:14	
78	PEH2-3	ScFv(VH-L2-VL)-L1-PE38	SEQ ID NO.:43	SEQ ID NO.:14	
79	PEH2-4	ScFv(VH-L2-VL)-L1-PE38	SEQ ID NO.:20	SEQ ID NO.:14	

表 1 中，涉及串联抗体的，串联抗体的结构相同的省略其中一个的结构描述：例如“DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)-L3-ScFab”中，两个 ScFab 的结构相同，省略其中一个的结构描述。下同。

5 实施例 2 融合蛋白的准备

以下实施例以融合蛋白 DTH2-13 为例进行介绍，其他构造的融合蛋白的实验方式类似。

2.1 融合蛋白表达质粒的构建

首先构建 8His-DTH2-eGFP-8His 的表达质粒，在此基础上利用同源重组的方法将抗体或者抗体片段插入到 DT 片段（效应部分 A）的羧基端。

10 具体方法是：

首先用引物 1 和引物 2 从含有 trastuzumab ScIgG 的 DNA 序列的质粒上将 ScFab 的 DNA 序列扩增出来：

引物 1：

CTGGTGGTGGTGGTTCTGACATCCAAATGACCCAATCTCCATCTTC;

引物 2:

GTGGTGGTGAGAACCACCCCTTGTGACAAGACTTTGGTTCAACCTTC。

然后用引物 3 和引物 4 对 SUMO-DT-8His-eGFP-8His 的表达质粒进行 PCR 扩增:

引物 3:

5 GAACCAAAGTCTTGTGACAAGGGTGGTTCTCACCACCACCAC;

引物 4:

GGAGATTGGGTCATTTGGATGTCAGAACCACCACCACCAGAACC。

10 将两个扩增的 DNA 片段按照 1: 1 的体积比混合, 总体积 10 uL, 加入 1 uL 的 DpnI 内切酶, 37 °C 孵育 4-5 h, 然后转化入大肠杆菌感受态细胞 DH5 α , 涂布到含有氨苄青霉素的固体 LB 培养基上, 置于 37 °C 过夜培养。

第二天从固体培养基上挑取单克隆接种到 200 uL LB 培养基中, 置于 37 °C 摇床培养约 6 h, 然后将菌液送去测序。

将测序正确的菌液接种到 5 mL LB 培养基中, 37 °C 摇床中过夜培养。第二天使用质粒提取试剂盒对质粒进行抽提, 完成表达质粒的构建。

15

2.2 体外蛋白合成表达融合蛋白

以 30 mL 反应体系为例进行方法描述。

20 首先制备表达质粒的 AMPi 扩增体系 (AMPi 扩增体系为康码在售产品: 产品编号 PROTN_AMPiN10V03500)。取 100 uL AMPi 反应液, 加入到 900 uL 超纯水中, 加入约 0.5 uL AMPiase 酶, 加入 DTH2 分子的表达质粒作为模板, 终浓度为 2 ng/uL。置于 37 °C 孵育过夜。

对 AMPi 扩增结果进行 DNA gel 分析, 表达质粒得到扩增后, 按照 1: 30 的体积比例将扩增完成后的 1 mL AMPi 扩增体系加入到 30 mL D2P 体外蛋白合成体系 (IVTT) 中。置于 30 °C 摇床中孵育 3-4 h。

25 所用体外无细胞蛋白质合成体系 (IVTT) 组成为: 终浓度为 22mM pH 为 7.4 的 4-羟乙基哌嗪乙磺酸, 30-150mM 醋酸钾, 1.0-5.0mM 醋酸镁, 1.5-4mM 核苷三磷酸混合物(腺嘌呤核苷三磷酸、鸟嘌呤核苷三磷酸、胞嘧啶核苷三磷酸和尿嘧啶核苷三磷酸), 0.08-0.24mM 的氨基酸混合物(甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、色氨酸、丝氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、蛋氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、苏氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸和组氨酸), 25mM 磷酸肌酸, 1.7mM 二硫苏糖醇, 0.27mg/mL 磷酸肌酸激酶, 0.027-0.054mg/mL T7RNA 聚合酶, 1%-4% 的聚乙二醇, 0.5%-2% 的蔗糖, 最后加入 50-80% 体积的酵母细胞提取物。

30 所用酵母细胞提取物来源乳酸克鲁维酵母细胞提取物, 酵母细胞为进行了敲除 dph2 的菌株 (dph2 Δ 改造菌株)。

2.3 融合蛋白的纯化

按照 IVTT 体积的 0.2% 取出 Ni 磁珠, 用超纯水清洗 2-3 次备用。

35 待体外翻译孵育 3 h 后, 将磁珠加入到反应体系中, 再孵育 1 h。用磁铁将磁珠从反应体系中取出, 然后依次用 1 mL 含有 5 mM 咪唑、20 mM 咪唑和 60 mM 咪唑的 Washing buffer 洗脱 2 次、1 次和 1 次。最后用 2-5 mL 含有 250 mM 咪唑的 Elution buffer 进行洗脱。

将 Washing buffer 和 Elution buffer 洗脱液进行 SDS-PAGE 纯度分析, 并根据融合表达的 eGFP 的荧光读数, 计算出免疫毒素的表达水平。

根据表达结果，本发明经体外无细胞蛋白合成的各个融合蛋白，除去异常结果，linker的合理设计，能使得3h的纯化后融合蛋白表达水平最低的超过10mg/L，有的融合蛋白3h的表达水平接近2000mg/L、5000mg/L。相比目前的细胞表达系统，生产周期更短，成本更低：已知的CHO细胞系统表达的，表达水平被限制在2-5 mg/L，又例如，目前有用毕赤酵母系统分泌表达的，诱导42小时以上，才能达到近30mg/L的表达水平，而且需要配合各种培养条件。

对表1的部分分子进行表达纯化，产量结果如表2所示：

表2								
表2中，“0”表示无linker，或未表达纯化到								
分子编号	分子构造	L1 序列	L1 长度	L2 序列	L2 长度	L3 序列	L3 长度	表达水平 (mg/L)
DTH2-104	DT-L1-(VHH1-L3-CH3-L3-VHH2)	EASGGPE	7			(GGGGS) 2	10	725.187
DTH2-105	DT-L1-(VHH1-L3-CH3-L3-VHH2)	(GGGGS) 2	10			(GGGGS) 2	10	827.192
DTH2-32	DT-L1-CH3-L3-ScFv (VH-L2-VL)	EASGGPE	7	(GGGGS) 4	20	GGSGGGGS	8	288.844
DTH2-42	DT-L1-CH3-L3-ScFv (VL-L2-VH)	EASGGPE	7	(GGGGS) 4	20	GGSGGGGS	8	182.330
DT22-28	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)	(GGGGS) 2	10	GGSSGSGSGSTGTSSS GTGTSAGTTGTSASTS GSGSGGGGGSGGGGSA GGTATAGASSGS	60			407
DTH2-4	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)	(GGGGS) 2	10	GGSSGSGSGSTGTSSS GTGTSAGTTGTSASTS GSGSGGGGGSGGGGSA GGTATAGASSGS	60			1968.685
DTH2-76	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)	GGSGGGGS	8	GGSSGSGSGSTGTSSS GTGTSAGTTGTSASTS GSGSGGGGGSGGGGSA GGTATAGASSGS	60			43.932
DTH2-77	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)	GGGGS	5	GGSSGSGSGSTGTSSS GTGTSAGTTGTSASTS GSGSGGGGGSGGGGSA GGTATAGASSGS	60			21.098
DTH2-78	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)	GS	2	GGSSGSGSGSTGTSSS GTGTSAGTTGTSASTS GSGSGGGGGSGGGGSA	60			41.943

				GGTATAGASSGS				
DTH2-79	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)	KESGSVSS EQLA	12	GGSSGSGSGSTGTSSS GTGTSAGTTGTSASTS GSGSGGGGGSGGGGSA GGTATAGASSGS	60			0
DTH2-80	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)	EGKSSGSG SES	11	GGSSGSGSGSTGTSSS GTGTSAGTTGTSASTS GSGSGGGGGSGGGGSA GGTATAGASSGS	60			39.238
DTH2-81	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)	GSAPAPAG S	9	GGSSGSGSGSTGTSSS GTGTSAGTTGTSASTS GSGSGGGGGSGGGGSA GGTATAGASSGS	60			37.103
DTH2-25	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)-L3-CH3	EASGGPE	7	GGSSGSGSGSTGTSSS GTGTSAGTTGTSASTS GSGSGGGGGSGGGGSA GGTATAGASSGS	60	GGSGGGGS	8	516.288
DTH2-26	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)-L3-CH3	EASGGPE	7	GGSSGSGSGSTGTSSS GTGTSAGTTGTSASTS GSGSGGGGGSGGGGSA GGTATAGASSGS	60	CPPCPAPELL	10	0
DTH2-48	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)-L3-CH3	EASGGPE	7	GGSSGSGSGSTGTSSS GTGTSAGTTGTSASTS GSGSGGGGGSGGGGSA GGTATAGASSGS	60	GGGGS	5	0
DTH2-49	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)-L3-CH3	EASGGPE	7	GGSSGSGSGSTGTSSS GTGTSAGTTGTSASTS GSGSGGGGGSGGGGSA GGTATAGASSGS	60	GGG	3	0
DTH2-50	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)-L3-CH3	EASGGPE	7	GGSSGSGSGSTGTSSS GTGTSAGTTGTSASTS GSGSGGGGGSGGGGSA GGTATAGASSGS	60	No linker	0	0
DTH2-51	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)-L3-CH3	EASGGPE	7	GGSSGSGSGSTGTSSS GTGTSAGTTGTSASTS GSGSGGGGGSGGGGSA GGTATAGASSGS	60	No linker, 删除 CH3 N 端第一个氨基酸	0	0
DTH2-64	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)-L3-CH3	EASGGPE	7	GGSSGSGSGSTGTSSS GTGTSAGTTGTSASTS GSGSGGGGGSGGGGSA GGTATAGASSGS	60	GGSGGGGS, CH3 N 端添 加 SKAK	8	18.678

DTH2-65	DT-L1-ScFab (L-L2-VH- CH1)-L3-CH3	EASGGPE	7	GGSSGSGSGSTGTSSS GTGTSAGTTGTSASTS GSGSGGGGGSGGGGSA GGTATAGASSGS	60	GGSGGGGS, CH3 N端删 除 GPQ	8	26.548
DTH2-66	DT-L1-ScFab (L-L2-VH- CH1)-L3-CH3	EASGGPE	7	GGSSGSGSGSTGTSSS GTGTSAGTTGTSASTS GSGSGGGGGSGGGGSA GGTATAGASSGS	60	GGSGGGGS, CH1 C端删 除 KTHT	8	46.527
DTH2-67	DT-L1-ScFab (L-L2-VH- CH1)-L3-CH3	EASGGPE	7	GGSSGSGSGSTGTSSS GTGTSAGTTGTSASTS GSGSGGGGGSGGGGSA GGTATAGASSGS	60	GGSGGGGS, CH1 C端删 除 HT	8	36.172
DTH2-68	DT-L1-ScFab (L-L2-VH- CH1)-L3-CH3	EASGGPE	7	GGSSGSGSGSTGTSSS GTGTSAGTTGTSASTS GSGSGGGGGSGGGGSA GGTATAGASSGS	60	GGSGGGGS, CH3 N端删 除 G	8	36.225
DTH2-69	DT-L1-ScFab (L-L2-VH- CH1)-L3-CH3	EASGGPE	7	GGSSGSGSGSTGTSSS GTGTSAGTTGTSASTS GSGSGGGGGSGGGGSA GGTATAGASSGS	60	(GGGGS) 3	15	37.178
DTH2-70	DT-L1-ScFab (L-L2-VH- CH1)-L3-CH3	EASGGPE	7	GGSSGSGSGSTGTSSS GTGTSAGTTGTSASTS GSGSGGGGGSGGGGSA GGTATAGASSGS	60	(GGGGS) 4	20	40.140
DTH2-71	DT-L1-ScFab (L-L2-VH- CH1)-L3-CH3	EASGGPE	7	GGSSGSGSGSTGTSSS GTGTSAGTTGTSASTS GSGSGGGGGSGGGGSA GGTATAGASSGS	60	KESGSVSSEQLA	12	46.077
DTH2-72	DT-L1-ScFab (L-L2-VH- CH1)-L3-CH3	EASGGPE	7	GGSSGSGSGSTGTSSS GTGTSAGTTGTSASTS GSGSGGGGGSGGGGSA GGTATAGASSGS	60	EGKSSGSGSES	11	12.735
DTH2-73	DT-L1-ScFab (L-L2-VH- CH1)-L3-CH3	EASGGPE	7	GGSSGSGSGSTGTSSS GTGTSAGTTGTSASTS GSGSGGGGGSGGGGSA GGTATAGASSGS	60	GSAGSAAGSGEF	12	0
DTH2-74	DT-L1-ScFab (L-L2-VH- CH1)-L3-CH3	EASGGPE	7	GGSSGSGSGSTGTSSS GTGTSAGTTGTSASTS GSGSGGGGGSGGGGSA GGTATAGASSGS	60	GSAPAPAGGGGS	12	60.139
DTH2-75	DT-L1-ScFab (L-L2-VH- CH1)-L3-CH3	EASGGPE	7	GGSSGSGSGSTGTSSS GTGTSAGTTGTSASTS GSGSGGGGGSGGGGSA	60	GSAEAAAKEAAAAGGGGS	19	29.479

				GGTATAGASSGS				
DTH2-82	DT-L1-ScFab (L-L2-VH- CH1)-L3-CH3	(GGGGS) 2	10	GGSSGSGSGSTGTSSS GTGTSAGTTGTSASTS GSGSGGGGGSGGGGSA GGTATAGASSGS	60	GGSGGGGS	8	0
DTH2-83	DT-L1-ScFab (L-L2-VH- CH1)-L3-CH3	GGSGGGGS	8	GGSSGSGSGSTGTSSS GTGTSAGTTGTSASTS GSGSGGGGGSGGGGSA GGTATAGASSGS	60	GGSGGGGS	8	29.654
DTH2-84	DT-L1-ScFab (L-L2-VH- CH1)-L3-CH3	GGGGS	5	GGSSGSGSGSTGTSSS GTGTSAGTTGTSASTS GSGSGGGGGSGGGGSA GGTATAGASSGS	60	GGSGGGGS	8	109.868
DTH2-85	DT-L1-ScFab (L-L2-VH- CH1)-L3-CH3	GS	2	GGSSGSGSGSTGTSSS GTGTSAGTTGTSASTS GSGSGGGGGSGGGGSA GGTATAGASSGS	60	GGSGGGGS	8	38.133
DTH2-86	DT-L1-ScFab (L-L2-VH- CH1)-L3-CH3	KESGSVSS EQLA	12	GGSSGSGSGSTGTSSS GTGTSAGTTGTSASTS GSGSGGGGGSGGGGSA GGTATAGASSGS	60	GGSGGGGS	8	13.361
DTH2-87	DT-L1-ScFab (L-L2-VH- CH1)-L3-CH3	EGKSSGSG SES	11	GGSSGSGSGSTGTSSS GTGTSAGTTGTSASTS GSGSGGGGGSGGGGSA GGTATAGASSGS	60	GGSGGGGS	8	18.678
DTH2-88	DT-L1-ScFab (L-L2-VH- CH1)-L3-CH3	GSAPAPAG S	9	GGSSGSGSGSTGTSSS GTGTSAGTTGTSASTS GSGSGGGGGSGGGGSA GGTATAGASSGS	60	GGSGGGGS	8	16.589
DTH2-10	DT-L1-ScFab (L-L2-VH- CH1)-L3-ScFab	(GGGGS) 2	10	GGSSGSGSGSTGTSSS GTGTSAGTTGTSASTS GSGSGGGGGSGGGGSA GGTATAGASSGS	60	GGSHHQPFASGGPE	15	0
DTH2-11	DT-L1-ScFab (L-L2-VH- CH1)-L3-ScFab	(GGGGS) 2	10	GGSSGSGSGSTGTSSS GTGTSAGTTGTSASTS GSGSGGGGGSGGGGSA GGTATAGASSGS	60	GGSHHEASGGPE	12	0
DTH2-12	DT-L1-ScFab (L-L2-VH- CH1)-L3-ScFab	EASGGPE	7	GGSSGSGSGSTGTSSS GTGTSAGTTGTSASTS GSGSGGGGGSGGGGSA GGTATAGASSGS	60	GGSHHTQPFGGGGGGGS	19	0

DTH2-62	DT-L1-ScFab (L-L2-VH- CH1)-L3-ScFab	EASGGPE	7	GAGAGSGAGAGSGAGA GSGAGAGSGAGAGSGA GAGS	34	(GGGGS) 4	20	0
DTH2-63	DT-L1-ScFab (L-L2-VH- CH1)-L3-ScFab	(GGGGS) 2	10	GAGAGSGAGAGSGAGA GSGAGAGSGAGAGSGA GAGS	34	(GGGGS) 4	20	0
DTH2-9	DT-L1-ScFab (L-L2-VH- CH1)-L3-ScFab	EASGGPE	7	GGSSGSGSGSTGTSSS GTGTSAGTTGTSASTS GSGSGGGGGSGGGGSA GGTATAGASSGS	60	GGSHHGHTQPFGGGGSGG GGS	22	0
DTH2-18	DT-L1-ScFab (L-L2-VH- CH1)-L3-ScFab	(GGGGS) 2	10	GGSSGSGSGSTGTSSS GTGTSAGTTGTSASTS GSGSGGGGGSGGGGSA GGTATAGASSGS	60	GGSHHGPE	9	0
DTH2-1	DT-L1-ScFv (VH-L2-VL)	EASGGPE	7	(GGGGS) 4	20			1049. 773
DTH2-2	DT-L1-ScFv (VH-L2-VL)	(GGGGS) 2	10	(GGGGS) 4	20			1028. 027
DTH2-13	DT-L1-ScFv (VH-L2-VL)- L3-ScFv	EASGGPE	7	(GGGGS) 4	20	SHGGSLGGS	9	188. 444
DTH2-14	DT-L1-ScFv (VH-L2-VL)- L3-ScFv	(GGGGS) 2	10	(GGGGS) 4	20	GGSHHGPE	9	0
DT22-22	DT-L1-ScFv (VH-L2-VL)-SS	(GGGGS) 2	10	GSTSGSGKPGSGEGST KG	18			2868
DT22-24	DT-L1-ScFv (VH-L2-VL)-SS	(GGGGS) 2	10	(GGGGS) 4	20			2933
DT22-2	DT-L1-ScFv (VL-L2-VH)	(GGGGS) 2	10	GSTSGSGKPGSGEGST KG	18			570
DT22-4	DT-L1-ScFv (VL-L2-VH)	(GGGGS) 2	10	(GGGGS) 4	20			1674
DTH2-7	DT-L1-ScFv (VL-L2-VH)	EASGGPE	7	(GGGGS) 3	15			1187. 860
DTH2-8	DT-L1-ScFv (VL-L2-VH)	(GGGGS) 2	10	(GGGGS) 3	15			450. 062
DTH2-44	DT-L1-ScFv (VL-L2-VH)- L3-CH3	EASGGPE	7	(GGGGS) 4	20	GGSGGGGS	8	371. 578
DTH2-15	DT-L1-ScFv (VL-L2-VH)- L3-ScFv	EASGGPE	7	(GGGGS) 3	15	GGSHHGGS	8	251. 416

DTH2-16	DT-L1-ScFv (VL-L2-VH)- L3-ScFv	(GGGGS) 2	10	(GGGGS) 3	15	GGSHHGPE	9	288. 522
DTH2-46	DT-L1-ScFv (VL-L2-VH)- L3-Tam2	EASGGPE	7	(GGGGS) 4	20	GGSGGGGS	8	212. 005
DT22-12	DT-L1-ScFv (VL-L2-VH)-SS	(GGGGS) 2	10	(GGGGS) 4	20			1257
DT22-14	DT-L1-ScFv (VL-L2-VH)-SS	(GGGGS) 2	10	GSTSGSGKPGSGEGST KG	18			3693
PEH2-3	ScFv (VH-L2- VL)-L1-PE38	GG		(GGGGS) 3	15			1432
PEH2-4	ScFv (VH-L2- VL)-L1-PE38	GGGGS		(GGGGS) 3	15			1404
PEH2-1	ScFv (VL-L2- VH)-L1-PE38	GG		(GGGGS) 3	15			2049
PEH2-2	ScFv (VL-L2- VH)-L1-PE38	GGGGS		(GGGGS) 3	15			1593
DT22-34	DT-L1-ScIgG (L-L2-H)	(GGGGS) 2	10	GGSSGSGSGTGTSSS GTGTSAGTTGTSASTS GSGSGGGGGSGGGGSA GGTATAGASSGS	60			1514
DTH2-106	DT-L1-VHH1	EASGGPE	7					3791. 236
DTH2-108	DT-L1-VHH1- L3-CH3	EASGGPE	7			(GGGGS) 2	10	818. 966
DTH2-109	DT-L1-VHH2	EASGGPE	7					4417. 456
DTH2-110	DT-L1-VHH2	(GGGGS) 2	10					3688. 224
DTH2-111	DT-L1-VHH2- L3-CH3	EASGGPE	7			(GGGGS) 2	10	5058. 481

实施例 3 融合蛋白体外亲和力测试

在 24 孔板中孵育 DTH2 分子的 IVTT 体系，每个分子孵育 150 uL，37 °C 孵育 3 h。

用包被液将 1mg/ml 重组人 Her2 稀释至 0.25 ug/mL，加入酶标板，100 uL/孔，4 °C 孵育过夜。

- 5 洗板 3 次，每次 300 uL PBST，然后加入 200 uL 封闭液，37 °C 封闭 1 h，洗板 3 次，每次 300 uL PBST。样品用稀释液（PBST，含 1% BSA）稀释至 20 ug/mL，再 3 倍梯度稀释，共 11 个稀释度，加入酶标板，100 uL/孔，并加入稀释液作为空白对照，37°C 温育 1 h。

洗板 3 次，每次 300 uL PBST，然后加入 HRP 标记的兔抗人 IgG (Fab specific) (1 :5000 稀释)，100 uL/孔，37°C 温育 1 h。

- 10 洗板 3 次，加入 TMB 显色液，100 uL/孔，37 °C 显色 10 min。加入终止液（2M 硫酸），50 uL/孔，于酶标仪波长 450nm 处测定吸光度值。

在 prism 软件中选择 4-Parameter 绘制曲线，以样品浓度为横坐标，A450 为纵坐标，并计算亲和力

EC50 值。

从前述一次纯化出的蛋白中挑选部分参照同样方法进行 EC50 检测，结果如表 3 所示：

分子编号	分子构造	亲和力 EC50 (nM)
DTH2-25	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)-L3-CH3	0.171
DTH2-26	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)-L3-CH3	0.357
DTH2-17	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)-L3-ScFab (L-L2-VH-CH1)	0.481
DTH2-28	DT-L1-Tam2-L3-ScFab (L-L2-VH-CH1)	0.496
DTH2-4	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)	0.669
DTH2-23	DT-L1-CH3-L3-ScFab (L-L2-VH-CH1)	0.756
DTH2-3	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)	0.930
DTH2-50	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)-L3-CH3	0.630
DTH2-51	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)-L3-CH3	0.590
DTH2-49	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)-L3-CH3	0.740
DTH2-13	DT-L1-ScFv (VH-L2-VL)-L3-ScFv (VH-L2-VL)	1.044
DTH2-36	DT-L1-Tam2-L3-ScFv (VH-L2-VL)	1.076
DTH2-1	DT-L1-ScFv (VH-L2-VL)	1.283
DTH2-111	DT-L1-VHH2-L3-CH3	1.547
DTH2-5	DT-L1-ScIgG (L-L2-H)	1.719
DTH2-38	DT-L1-ScFv (VH-L2-VL)-L3-Tam2	1.757
DTH2-16	DT-L1-ScFv (VL-L2-VH)-L3-ScFv (VL-L2-VH)	1.988
DTH2-6	DT-L1-ScIgG (L-L2-H)	2.331
DTH2-76	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)	2.632
DTH2-77	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)	2.901
DTH2-81	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)	3.023
DTH2-82	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)-L3-CH3	3.163
DTH2-88	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)-L3-CH3	3.414
DTH2-2	DT-L1-ScFv (VH-L2-VL)	3.476
DTH2-79	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)	3.547

DTH2-15	DT-L1-ScFv (VL-L2-VH)-L3-ScFv (VL-L2-VH)	3.567
DTH2-85	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)-L3-CH3	3.932
DTH2-83	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)-L3-CH3	3.976
DTH2-78	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)	4.153
DTH2-87	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)-L3-CH3	4.229
DTH2-80	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)	4.250
DTH2-7	DT-L1-ScFv (VL-L2-VH)	4.567
DTH2-8	DT-L1-ScFv (VL-L2-VH)	4.681
DTH2-84	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)-L3-CH3	5.440
DTH2-86	DT-L1-ScFab (L-L2-VH-CH1)-L3-CH3	5.454
DTH2-44	DT-L1-ScFv (VL-L2-VH)-L3-CH3	5.789
DTH2-42	DT-L1-CH3-L3-ScFv (VL-L2-VH)	6.590

实施例 4 融合蛋白细胞毒性的测试

(一) 利用高表达 Her2 的乳腺癌细胞 SK-BR-3 细胞系测试表达的融合蛋白的细胞毒性。此细胞系为贴壁细胞系，重悬后对细胞进行计数，然后按照每孔 3000 个的数量将细胞加入到 96 孔板中，每孔细胞培养液体积为 100 uL，置于 37 °C 培养箱过夜培养。

将纯化好的融合蛋白，利用 eGFP 荧光读数的方法测定目标蛋白浓度，稀释到 30 nM。然后按照 3 倍稀释进行梯度稀释，最终产生 10 个蛋白样品。取 50 uL 蛋白样品加入到 100 uL 细胞培养液中，最终的蛋白浓度从 10 nM 到约 0.5 pM。在一个孔中加入 50 uL PBS 作为阴性对照。将细胞培养液置于 37 °C 培养箱培养 72 h。

使用 MTT 试剂盒测定每孔中残留的活细胞的数量，用每个样品孔中的细胞数量除以加入 PBS 的阴性对照孔中的细胞数量得到 Viability，对每个样品 10 个样品浓度对应的 viability 数据利用 Prism 进行数据拟合，获得蛋白样品的 IC50 值。

(1) 细胞安全性测试：以 DTH2-4 的细胞毒性结果为例进行结果分析，同时使用不包含毒素活性片段 (DT 分子，毒素分子) 的 ScFab 分别测试对 SK-BR-3 的细胞毒性是否是由 DT 分子的融合引起的，然后将 DTH2-4 作用于 Her2 低表达的 HEK-293 细胞来测试蛋白的安全性和选择性。

图 1 为实施例中一种融合蛋白的细胞毒性的测试结果。

如图 1 左侧所示，DTH2-4 目前的细胞毒性的 IC50 值达到 62.29 pM，在同样的浓度范围内，ScFab 对 SK-BR-3 细胞不具有杀伤性，证明 DTH2-4 的细胞毒性是由于毒素分子的存在引起的。如图 1 右侧所示，在同样的蛋白浓度范围内，DTH2-4 对于 HEK-293 细胞不具有明显的杀伤效果，证明其安全性，可以使用。

(2) 继续对几个不同分子编号的融合蛋白进行针对高表达 Her2 的乳腺癌细胞 SK-BR-3 细胞系的细胞毒性测试，同时以市面普通的 ADC (RC48) 做对照，结果如表 4、图 2、图 3 和图 4 所示：

表 4

分子编号	DTH2-1	DTH2-2	DTH2-7	DTH2-8	RC48
对应图 2 中的编号	144	145	150	151	RC48
IC50 (nM)	0.1079	0.0626	0.1647	0.09556	0.154
分子编号	DTH2-109	DTH2-109	DTH2-104	DTH2-110	RC48
对应图 3 中的编号	653 (0906)	653 (0907)	648	654	RC48
IC50 (nM)	0.6084	0.7776	0.1982	0.5203	0.3176
分子编号	DTH2-1		DTH2-2		RC48
对应图 4 中的编号	PDT-144-1215		PDT-145-1222-3		RC48
IC50 (nM)	0.03566		0.03379		0.1266

(二) 采用同样的方式, 利用高表达 Her2 的人胃癌细胞 NCI-N87 细胞系测试几个表达的融合蛋白的细胞毒性, 采用前述的方法, 分别按照每孔 1000、3000 和 5000 个的数量将细胞加入到 96 孔板中进行测试, 结果分别如表 5、图 5、图 6 和图 7。

分子编号	DTH2-1	RC48
对应图 5 中的编号	PDT-144-1215 (3000 个/孔)	RC48
IC50 (nM)	0.05105	0.4812
分子编号	DTH2-1	RC48
对应图 6 中的编号	PDT-144-1215 (5000 个/孔)	RC48
IC50 (nM)	0.07093	0.2275
分子编号	DTH2-2 (1000 个/孔)	RC48
对应图 7 中的编号	PDT-145-1222-3	RC48
Bottom	5.899	17.41
Top	96.7	93.17
LogIC50	-1.651	-0.5972
HillSlope	-0.9748	-2.124
IC50 (nM)	0.02234	0.2528

Span	90.8	75.77
R squared	0.9943	0.9924

通过上述可以看出，虽然表 4 或表 5 中的几个 EC50 都大于 1nM，但是细胞毒性实验相比市面上的，都达到了更好的活性效果，可以替代市面的现有进行应用。具体可以根据需要，选择相应的靶向结构和 IC50，得到需要的毒性大小的分子。

5

实施例 4 动物实验

以 DTH2-1，针对在小鼠肿瘤模型中抑制肿瘤生长（裸鼠异位瘤（BT474））：

10 将冻存的 BT474 细胞进行复苏，置于培养皿中进行培养，5% CO2 培养箱 37°C 培养。待培养一段时间后进行细胞传代，传代后细胞转移至新的细胞培养皿中进行培养，细胞至少进行体外传代 2~3 次，确保进行接种时细胞生长状况处于最佳时期。待细胞数目与生长状态达到试验要求时，收集细胞，用 PBS 重悬，根据试验动物数量，制备足量的细胞悬液待接种时使用。

15 用 1 mL 一次性注射器吸取混匀的细胞悬液，缓慢注射到裸鼠右前肢腋窝皮下，接种量约为 5×10⁶ cells/只。瘤细胞接种后，待裸鼠荷瘤形成后每天用游标卡尺测量肿瘤的长径（A）和短径（B），计算肿瘤体积。

给药时，选择瘤内注射或者尾静脉注射。分 2-3 个注射位点注射，每只裸鼠鼠各注射医用生理盐水、PC（RC48）5mg/kg 蛋白标准品、（DTH2-1）5mg/kg 蛋白供试品，每组注射 3 只裸鼠。

20 给药后，每天用游标卡尺测量肿瘤的长径（A）和短径（B），计算肿瘤体积（见图 8 和图 10）。分两次给药，一周给一次，第一次给药两周后试验结束，解剖剥离瘤块，称瘤重（见图 9 和图 11）。

阴性对照：注射医用生理盐水；

阳性对照：RC48。

瘤内注射结果如图 8 和 9 所示，尾静脉注射结果如同 10 和 11 所示。

25

本文涉及的所有序列汇总如表 6。

表 6		
序列号	名称	序列
SEQ ID NO. :1	白喉毒素	GADDVVDSKSFVMENFSSYHGTRKPGYVDSIQKGIQKPKSGTQGNYYDDWKGFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVTYPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTTEEFIKRFGDGASRVVLSLPAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRGRKRGQDAMYEQACAGNRVRRSVGSSLSCLNLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGPIKNKMS ESPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHPSELKTVTGTNPVFAGANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSILP GIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIALLSSLMVAQAIPLVDELVDIGFAAYNFVESTINLQVQVHNSYNRPAYSPGHK

NO. :12		
SEQ ID NO. :13	连接 linker	GAGAGSGAGAGSGAGAGSGAGAGSGAGAGSGAGAGS
SEQ ID NO. :14	连接 linker	(GGGGS) 3
SEQ ID NO. :15	连接 linker	GS
SEQ ID NO. :16	连接 linker	KESGSVSSEQLA
SEQ ID NO. :17	重链 H (CD22)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYRFTNYWIHWVRQAPGQGLEWIGGINPGNNYATYRRKFQGRVTMTADTSTS TVYMESSLRSEDTAVYYCTREGYGNYGAWFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVKDRVESKYGPPCPP APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKLSLSLGK
SEQ ID NO. :18	连接 linker	EGKSSGSGSES
SEQ ID NO. :19	连接 linker	GSAPAPAGS
SEQ ID NO. :20	连接 linker	GGGGS
SEQ ID NO. :21	连接 linker	GGG
SEQ ID NO. :22	连接 linker	GGSGGGGS
SEQ ID NO. :23	连接 linker	GGSHHGHTQPFGGGSGGGGS
SEQ ID NO. :24	连接 linker	GGSHHTQPFGGGSGGGGS
SEQ ID NO. :25	连接 linker	GGSHHQPFEGSGGPE
SEQ ID NO. :26	连接 linker	GGSHHEASGGPE
SEQ ID NO. :27	连接 linker	GGSHHGPE
SEQ ID NO. :28	连接 linker	(GGGGS) 4
SEQ ID NO. :29	连接 linker	SHGGSLGGS
SEQ ID NO. :30	连接 linker	GGSHHGGS
SEQ ID NO. :31	连接 linker	KESGSVSSEQLA

SEQ ID NO. :32	轻链 L (Her2)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFLTISS LQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO. :33	可变结构域 VH (Her2)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO. :34	第一恒定结构域 CH1 (Her2)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHITFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDK
SEQ ID NO. :35	可变结构域 VL (Her2)	EVQLVESGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSR SGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO. :36	重链 H (Her2)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHITFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDK
SEQ ID NO. :37	第三恒定结构域 CH3 (Her2)	GQPREPQVYVTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSPGK
SEQ ID NO. :38	Tamavidins2	SDVQSSLTGTWYNELNSKMETANKDGLTGKYLKVGDVVYVYPLSGRYNLQPPAGQGVALGWAVSWENSKIHSAT TWSGQFFSESSPVILTQWLLSSSTARGDVWESTLVGNDSTFTKAPTEQQIAHAQLHCRAPRLK
SEQ ID NO. :39	引物 1	CTGGTGGTGGTGGTTCTGACATCCAAATGACCAATCTCCATCTTC
SEQ ID NO. :40	引物 2	GTGGTGGTGAGAACCACCTTGTCACAAGACTTGGTTCAACCTTC
SEQ ID NO. :41	引物 3	GAACCAAAGTCTTGTGACAAGGGTGGTTCTCACCACCACCAC
SEQ ID NO. :42	引物 4	GGAGATTGGGTCATTTGGATGTCAGAACCACCACCACCAGAACC
SEQ ID NO. :43	连接 linker	GG
SEQ ID NO. :44	连接 linker	GSAAAAKEAAAKAGGGGS
SEQ ID NO. :45	连接 linker	GGSSGSGSGSTGTSSSGTGTSAGTTGTSASTSGSGSGGGGGSGGGGSAGGTATAGASSGS
SEQ ID NO. :46	eGFP	VSKGEELFTGVVPIILVELDGDVNGHKFSVRGEGEGDATNGKLT LKFICTTGKLPVPWPTLVTTLYGVQCFSRYPDH MKQHDFFKSAMPEGYVQERTISFKDDGYKTRAEVKFEGD TLVNR IELKGIDFKEDGNILGHKLEYNFNHNVYITA DKQKNGIKANFKIRHNVEDGSQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHVLS TQSKLSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITL GMDELYK
SEQ ID NO. :47	连接 linker	GSTSGSGKPGSGEGSTKG
SEQ ID NO. :48	连接 linker	GSAGSAAGSGEF
SEQ ID	连接 linker	GSAPAPAGGGGS

NO. :49		
SEQ ID NO. :50	连接 linker	KESGSVSSEQLA
SEQ ID NO. :51	连接 linker	CPPCPAPELL
SEQ ID NO. :52	VHH1 (Her2)	EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFI FSNDA MTWVRQAPGKGLEWVSSINWSGHTNYADSVKGRFTISRDN AKR TLYLQMNSLKDED TALYYCVTGYGVTKTPTGQGTQVTVSS
SEQ ID NO. :53	VHH2 (Her2)	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGITFSINTMGWYRQAPGKQRELVALISSIGDYYADSVKGRFTISRDN AKNT VYLQMNSLKPEDTAVYYCKRFRTAAQGTDYWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO. :54	可变结构域 VL (CD22)	DVQVTQSPSSLSASVGD RVTITCRSSQSLANSYGNTFLSWYLHKPGKAPQLLIYGISNRFSGVPDRFSGSGSGTDF T LTISLQPEDFATYYCLQGT HQPYTFGQGTKVEIKR
SEQ ID NO. :55	可变结构域 VH (CD22)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYRFTNYIHWVRQAPGQGLEWIGGINPGNNYATYRRKFQGRVTMTADTSTS TVYMESSLRSEDTAVYYCTREGYGNYGAWFAYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO. :56	轻链 L (CD22)	DVQVTQSPSSLSASVGD RVTITCRSSQSLANSYGNTFLSWYLHKPGKAPQLLIYGISNRFSGVPDRFSGSGSGTDF T LTISLQPEDFATYYCLQGT HQPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNFPYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO. :57	CH1 (CD22)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG TKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVES
SEQ ID NO. :58	8His	HHHHHHHH
SEQ ID NO. :59	Dph1p (DPH1 蛋 白)	MTMGEVEKKPRRRFVGIKKA AEESDPSGSTTELVKKIKPKTNIRHAINQIPPELLNDEEL NAAIKLLPSNYNFEIHKTVWNIRKHKAKRVAIQMPEGLLIYSLVISDILEQFCQCEIVVM GDVSYGACCIDDY TARSLDCDFIVHYAH SCLVPIDITTIKVL YIFVTINIDETHLIKTLQKN FPRGSRIA AFGTIQFNPTIHS MKDKLLQSEHMLYIIPPQIKPLSKGEVLGCTSERLNKEQI DAMVYVGDGRFHLESAMIHNPEIPAFRYDPYNNRRFRERYDQKQLVEVRASAIKARS SKKVGLILGALGRQGNLATVENLET KKLKASGRTVVKIILSEIFPQKLAMFDDIDAFVQVA CPRLSIDWGYAFNKPLLTPYETNVMLENDRMFNEKYYPMDYYHINGYGRGKVPNHDD VTI
SEQ ID NO. :60	Dph2p (DPH2 蛋 白)	MNDSVLVAPSLSTAQTEDTFEFQSYGETEHSR SYLGS DVTKDNLVELVSAYYSVPELIQ YFEEHPQYKKITLQFPDEL VLDSSIVVQLMQQELVKA EDETSQSFNTIDTDEV LHNEKSC GNCSGDCSSKIDKTETKRKVILADTSYSSCCVDEVA SEHVKGDIVVHFGDACMNAV QKLPVVYSLGRPVLDL DLVVSQFKLYAAKDQKICLMADAPHSMHMKSIIYDILHDKEG YKNVVYSDINQDMLQSDTHIVGYNNAVEHDERLRKCVTCGNRNRIYAEVDVSELNEYD LFHVTIPKDPHLLYL TTKFQSVTL YDPSSGMLNEGPFPSMMKRYKFMHMARTAGTIGIL VNTLSLRNTKETMNLKTLKLLKENGK KHYLFVVGKPNVAKLANFEPIDIWCILGCGQGGI VLDQYNEFYKPIITPYELLMALSDEVTWTGQWITDFKSIINQIENEVNDSDMEQDILSS GTECRSDEDEAPEFNAV TGKYVSTSRPLRQIARLEIETPVEEVRASDSTELVKQFSQTVAI RNTVSTSA AFLQTRHWTGLGSDYKDDDEDGEEDGATVEEGTAGVARSYQFDELNKKT
SEQ ID NO. :61	Dph3p (DPH3 蛋 白)	MAEELLNKHD PKLAYVVKYNHDSNPRELASPLEMKRVARPLRHHIHYVPVKSLIFYSK NHPPQFSYETKIKTPISKDVISVQVEYVGLNPVDLKIFNSYTRHMNYEVGIGREYYGKISE VGSNLADTWSVGDEVCGTFWHPNLGKGTCESTILVDPKVDVVLPKPVNISTQQAASF YCLGA AFNILDKLDQEGKLNQSSNILINGASTMTGIFALQLLKFHYRILNRIVLISSTSGM NFIKSNLPELVDELLFIDY AATNGKIYKPLSDLV ASNELVEYNNETGNFITQPFQGSFNL

		VLDFIGGYDIIGHSSSILSKDATYITTVGDNKSNYKKDTFNSWGTASSNIRKLFQGVLWS FDYQMFYFDPNAKLATNEWPKKCHELIESEVVKFIPVDRVYDWKEHQKAFSYLQTGRA HGKVVLKVEKF
SEQ ID NO. :62	Dph4p (DPH4 蛋 白)	MQRSFYEILGIESDASNIEIKRAYRAMLLETHPKSGLNYNSNGNNTSSHSVTDIQEAYQ TLIDQDLRKKYDEELAESFKKLGPHNAGDGLDLFSLDLFDYSGDEQSFMSMNCPRCQITD GFQLTEDALEEHAIIDYEGGGYFVLVQCSACSLWLKVLFDVMEE
SEQ ID NO. :63	Dph5p (DPH5 蛋 白)	MLYFIGLGLSYETDITVRGLNAIKQCSRVYLEHYTSILMTASLEELEEFYGKKVTLADRE LVESGAEELLRDADKEDVAFLVVGDFVGFATHTDLVLRKQRNIPVEVIHNASVMNAV GSCGLQLYNFGQTISMVFFTDSWRPDSWYDKIWENRKIGLHTLVLLDIKVKEQSIENMA RGRLIYEPPRYMSIAQCCEQLLEIEETRGTEAYTPDTPCV AISRLGSASQTFKAGTIKELA EYDSGEPLHSLVILGRQTHELEIEYLLEFCDDREKFKQDVASDQEYFKPPAWVPPPEDED
SEQ ID NO. :64	Dph6p (DPH6 蛋 白)	MKFVALISGGKDSNYNILHCLKQDHELIAFANLHPENEDEQELDSFMFQTVGHDLIRWY PECSGVPLYRQALHKNKSNIALNYTETKDDIEDLYKLLRKIQLDSPLEAVSVGAILS SYQRTRVEDVCSRLGLTTL SYLWQRDQRELMQEMCSMSKDTIVTTDDCDNVGKLDARI IKVAAIGLNQNHGKSLPEILPTMLKLNLSLYDVHICGEGGEFETMVLDTPFKHHGLQLN SINDVTDTSNDGVFAATFNVEYVPEALSPTKLEKELEKLPVPAVLNEK WYEMYLRMTI DLKKNCPNHHNVSPVPSINEVGKLLYISNIAPSKGESLKEKCLDVFSQLTSILSSRSI FACQILSSLLSDMNNFQEVNSYNEYFNVTKIGPLPPARACVESSFLKHPVQLSVVVD LSADCVPDNGHILNRSKDGHLVQGRSYWCPCNIGPYSQATWNQSDRNKVITYISGQIGL EPSSMKLWGDTTLLENPDIAEVVLSLRNYFTLSETVNSSIPLTMVCYISQSYVLPVAVRSA WSLFAKELAESEELWFDQEPVGVDSL VIVKVS NLPKNALCEWTGMNCQNLAIEDDYDE DDLAAQIHMNLTLSQTDIELPNYAHDVHISENGFKRHFITLFLDSHEQLITLSECKNAQ ITLFFSKDYAVPEYTHVEYIPVEQVYDKSSPRAYGLVIKY
SEQ ID NO. :65	Dph7p (DPH7 蛋 白)	MAQQSLQKHPHDEDAEYDSNIGIAYHLRGATKLEVKSFRCRMEETAADKRVTTTRLPPCC LCILREKFIIVGTYLLHKDSGNRTGSIEVYDKELNLLSSIKTYGAILDLKLNPFDDTLLAT AHSTGNMILWTISVDDDNSSIDIKLLNQLVFDPTCLITSLQFSPLLDNLVLLTTTNGDFA TVDIIHGEICFIEEVEPSYFDSSTINYIEVPNADIKVINVQNDHEQIFHKHSLECWTGFEFG CLAPLKDVVFTGGDDSAIAAHDLNSGKKIWSNSKIHQAGVTAIKAARETFRGNKPTSLIT GSYDDHIRSFDLRMLSETTIYPGTDVPPVVKWEDNLQGGVWRFSEAPTNDGLSNNRLM VCCMYNGAKVVNVQNDHFVTEQFIKEGHESMCYGGDWSKETVATCSFYDKSLQLWK SPN
SEQ ID NO. :66	eEF2	MVAFTVDQIRSLMDKVTNVRNMSVIAHVDHGKSTLTDSLVRAGIISAAGEARFTD TRKDEQERGITIKSTAISLFSEMSDDDVKDIKQKTDGNAFLINLIDSPGHVDFSSVTAAL RVTDGALVVVDVTEGVCVQTETVLRQSLAERIKPVVINKVDRALLELQVSKEDLYQS FSRTVESVNVIIISTYADEVLGDVQVYPQRGTVAFGSGLHGWAFTVRQFANRYSKKGFGV DREKMMDRWLWGD SYFNPKTKKWTNKERDADGKPLERAFNMFVLDPIFRLFAAIMNFK KEEIPVLEKLEINLKGDEKELEGKNLLKVMRKFLPAADALLEMIILHLPSPVTAQNYR AEQLYEGPSDDPACIAIKNCDPKSDLMLYVSKMVPTSDKGRFYAFGRVFAAGTVKSGQK VRIQGNFIPGKKEDLFIKAIQRAVLMGRFVEPIDDCPAGNIIGLVGIDQFLKGTGLTT FEGAHNMKVMKFSVSPVQVAVEVKNANDLPKLVEGLKRLSKSDPCVLVSMSESGEHI VAGTGELHLEICLDLENDHAGIPLKISPPVAYRETVEGESSQTALSKSPNKHNRILK AQPIDEVSLAIEGGKINPRDDFKARARIMADEFGWDVTDARKIWCFGPDGNGPNLVV DQTKAVQYLNEIKDSVVAAFQWATKEGPIFGEQMRSVRVNILDVTLHADAIHRGGGQII

		PTMRRATYAGFLLAEPKIQEPVFLVEIQCEQAIGGIYSVLNKKRGQVVSEEQRPGTPLF TVKAYLPINESFGFTGELRQATGGQAFPQMVFHDHWATLGTDPSTKAGEIVLAARKR QGMKEEVPGWQEYYDKL
--	--	---

权利要求书

1. 一种融合蛋白，其特征在于，具有：

效应部分 A，用于对靶向细胞进行杀伤作用，包括毒素分子；

导向载体部分 B，与所述靶向细胞上的目标靶点结合，所述导向载体部分来自抗体或细胞因子；

5 第一连接 L1，将所述效应部分 A 和所述导向载体部分 B 进行连接，

其中，所述第一连接 L1 包括至少 3 个氨基酸残基，优选地为 3-20 个氨基酸残基，更优选地为 3-10 个氨基酸残基；

所述效应部分 A、第一连接 L1 以及导向载体部分 B 从 N 端到 C 端以 A-L1-B 取向连接或从 N 端到 C 端以 B-L1-A 的取向连接。。

10

2. 根据权利要求 1 所述的融合蛋白，其特征在于：

其中，所述毒素分子为下组的任意一种毒性多肽：（a），植物来源的毒素；（b），细菌来源的毒素；（c），真菌来源的毒素；（d），人源性蛋白毒素；（e），（a-）-（d）中任意一项的功能片段；（f）（a-）-（d）中任意一项来源的功能片段或该功能片段的变体；

15

优选地，所述毒素分子来自：白喉毒素，假单胞菌外毒素 A 或霍乱弧菌毒素。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的融合蛋白，其特征在于：

所述效应部分包括的所述毒素分子的结构为以下中任何一种：

20 （1）所述白喉毒素的转运结构域 DT 和催化结构域 DA，优选地，从 N 端到 C 以 DA-DT 的取向连接；

（2）所述白喉毒素的催化结构域 DA；

（3）所述假单胞菌外毒素 A 的转运结构域 PT 和催化结构域 PA，优选地，从 N 端到 C 以 PT-PA 的取向连接；

25 （4）所述假单胞菌外毒素 A 的催化结构域 PA；

（5）霍乱弧菌毒素的转运结构域 CT 和催化结构域 CA，优选地，从 N 端到 C 以 CT-CA 的取向连接

（6）霍乱弧菌毒素的催化结构域 CA。

30 4. 根据权利要求 3 所述的融合蛋白，其特征在于：

其中，毒素分子具有如 SEQ ID NO：1-9 中任意一个所示的氨基酸序列，或具有与 SEQ ID NO：1-9 中任意一个具有至少 80%、85%、90%、95%、99% 的序列同源性百分比的氨基酸序列。

35 5. 根据权利要求 1 或 2 所述的融合蛋白，其特征在于：

其中，所述导向载体部分为抗体，所述抗体为单克隆抗体、嵌合抗体、改型抗体、小分子抗体、多特异性抗体或多价抗体中的任意一种或多种，

优选地，所述抗体为小分子抗体或多价抗体中的任意一种或多种，

40 再优选地，所述小分子抗体为 Fv、Fab、ScFv、ScFab、ScIgG、dsFv、纳米抗体以及单域抗体中的任意一种或多种，

所述多价抗体为至少两个单链抗体串联形成的串联抗体以及小分子抗体与聚合蛋白形成的抗体多聚融合蛋白，再进一步地，所述抗体多聚融合蛋白为二聚体或四聚体。

6. 根据权利要求 5 所述的融合蛋白，其特征在于：

其中，所述抗体为 ScFab、ScFv、ScIgG、纳米抗体、两个 ScFab 串联、两个 ScFv 串联、两个纳米抗体串联、ScFab 与抗体片段 CH3 的融合、ScFv 与抗体片段 CH3 的融合、两个纳米抗体通过 CH3 融合串联、ScFab 与 Tamavidins2 蛋白的融合、或 ScFv 与 Tamavidins2 蛋白的融合。

7. 根据权利要求 6 所述的融合蛋白，其特征在于：

其中，ScFab 的结构满足：ScFab 的轻链部分和重链部分按 N 端到 C 端的取向连接，或 ScFab 的重链部分和轻链部分按 N 端到 C 端的取向连接；

ScFab 与抗体片段 CH3 之间按 N 端到 C 端或 C 端到 N 端的取向连接；

ScFv 的重链部分和轻链部分按 N 端到 C 端的取向连接；

ScFab 与 Tamavidins2 蛋白的融合是从 N 端到 C 端按 Tamavidins2 蛋白到 ScFab 的取向连接；

ScFv 与 Tamavidins2 蛋白的融合是从 N 端到 C 端按 Tamavidins2 蛋白到 ScFab 的取向连接。

8. 根据权利要求 6 或 7 所述的融合蛋白，其特征在于：

其中，通过第二连接 L2 对 ScFab、ScFv、ScFv、ScIgG 各自的轻链部分和重链部分之间进行连接，

所述第二连接 L2 的包含至少 15 个氨基酸残基，优选包含 15-180、15-120 或 15-90 或 15-65 或 2060 个氨基酸残基。

9. 根据权利要求 7 所述的融合蛋白，其特征在于：

其中，所述第二连接 L2 中，含有 G、S、T 和 A 中的任意一种或多种的主要氨基酸残基，且所述主要氨基酸残基的数量占比所述第二连接总氨基酸残基数量的百分比至少大于 50%、60%、70%、80% 或 90%，更优选地，主要氨基酸残基中，含有 G 和 S 中的任意一种或多种的氨基酸，且含有的总量占比所述第二连接总氨基酸数量的百分比至少大于 40% 或大于 45% 或大于 60% 或大于 70% 或大于 80%；

进一步地，所述第二连接 L2 具有如 SEQ ID NO: 10、12、13、14、17、28、45 以及 47 中任意一个所示的氨基酸序列，或具有与 SEQ ID NO: 10、12、13、14、17、28、45、46 以及 47 中任意一个具有至少 80%、85%、90%、95%、99% 的序列同源性百分比的氨基酸序列。

10. 根据权利要求 5-9 任意一项所述的融合蛋白，其特征在于：

其中，两个单链抗体之间、小分子抗体与聚合蛋白之间通过第三连接 L3 连接，

所述第三连接 L3 为无或包含至少 3 个氨基酸残基，优选地，包括 5-20 个氨基酸残基，优选地，包括 8-20 个氨基酸残基或 8-15 个或 8-12 个氨基酸残基，更优选地，其中，含有 G 和 S 两种主要氨基酸残基，且主要氨基酸残基的数量占比所述第三连接总氨基酸残基数量的百分比在 40% 以上，

例如，第三连接 L3 具有如 SEQ ID NO: 10、14、18、20-30、44、以及 48-51 中任意一个所示的氨基酸序列，或具有与 SEQ ID NO: 10、14、18、20-30、44、以及 48-51 中任意

一个具有至少 80%、85%、90%、95%、99% 的序列同源性百分比的氨基酸序列。

11. 根据权利要求 1-7 任意一项所述的融合蛋白，其特征在于：
其中，所述抗体为特异性结合 Her2、CD22 中任意一种或多种的的抗体。

5

12. 根据权利要求 11 所述的融合蛋白，其特征在于：
所述抗体来源选自 IgM、IgG、IgA、IgD 和 IgE；

10 优选地，所述的抗体来源选自曲妥珠单抗（Trastuzumab）、利妥昔单抗（Rituxima）、
贝伐单抗（Bevacizumab）、阿达木单抗（Adalimumab）、帕博利珠单抗
（Pembrolizumab）、乌司奴单抗（Ustekinumab）、纳武利尤单抗（Nivolumab）、奥瑞珠
单抗（Ocrelizumab）、帕利珠单抗（Palizumab）、英夫利昔单抗（Infliximab）、奥马珠
单抗（Omalizumab）、恩沃利单抗（Envafolimab）、托西珠单抗（Atlizumab）、阿替利珠
单抗（Atezolizumab）或西妥昔单抗（Cetuximab），或它们的变体。

15

13. 根据权利要求 5-12 任意一项所述的融合蛋白，其特征在于：
其中，对于 Fab 或 ScFab：

20 组成 Fab 或 ScFab 的轻链部分具有如 SEQ ID NO：32 所
述的氨基酸序列，或具有与 SEQ ID NO：32 具有至少 80%、85%、90%、95%、99% 的序
列同源性百分比的氨基酸序列；或

组成 Fab 或 ScFab 的重链部分的可变结构域具有如 SEQ ID NO：33 或 55 所示的氨
基
酸序列，或具有与 SEQ ID NO：33 或 55 具有至少 80%、85%、90%、95%、99% 的序列同
源性百分比的氨基酸序列；或

25 组成 Fab 或 ScFab 的重链部分的第一恒定结构域 CH1 具有如 SEQ ID NO：34 或 57
所示的氨基酸序列，或具有与 SEQ ID NO：34 或 57 具有至少 80%、85%、90%、95%、
99% 的序列同源性百分比的氨基酸序列；

对于 Fv、dsFv 或 ScFv：

30 组成 Fv、dsFv 或 ScFv 的轻链部分的可变结构域具有如 SEQ ID NO：35 或 54 所示
的氨基酸序列，或具有与 SEQ ID NO：35 或 54 具有至少 80%、85%、90%、95%、99% 的
序列同源性百分比的氨基酸序列；或

组成 Fv、dsFv 或 ScFv 的重链链部分的可变结构域的具有如为 SEQ ID NO：33 或
55 所示的氨基酸序列，或与 SEQ ID NO：33 或 55 具有至少 80%、85%、90%、95%、
99% 的序列同源性百分比；

35

对于 ScIgG：

组成 ScIgG 的轻链部分具有如 SEQ ID NO：32 或 56 所示的氨基酸序列，或具有与
SEQ ID NO：32 或 56 具有至少 80%、85%、90%、95%、99% 的序列同源性百分比的氨基
酸序列；或

40 组成 ScIgG 的重链链部分具有如 SEQ ID NO：36 或 17 所示的氨基酸序列，或具有
与 SEQ ID NO：36 或 17 具有至少 80%、85%、90%、95%、99% 的序列同源性百分比的氨
基酸序列；

对于涉及的抗体片段 CH3，所述抗体片段 CH3 具有如 SEQ ID NO：37 所示的氨基
酸序列，或具有与 SEQ ID NO：37 具有至少 80%、85%、90%、95%、99% 的序列同源性

百分比的氨基酸序列；

对于涉及的 Tamavidins2 蛋白，所述 Tamavidins2 蛋白具有如 SEQ ID NO: 38 所示的氨基酸序列，或具有与 SEQ ID NO: 38 具有至少 80%、85%、90%、95%、99% 的序列同源性百分比的氨基酸序列；

5 对于涉及的纳米抗体，具有如 SEQ ID NO: 52 或 53 所示的氨基酸序列，或具有与 SEQ ID NO: 52 或 53 具有至少 80%、85%、90%、95%、99% 的序列同源性百分比的氨基酸序列。

10 14. 根据权利要求 1-13 任意一项所述的融合蛋白，其特征在于：

其中，所述融合蛋白适于无细胞体外合成，优选地，所述无细胞体外合成为：在无细胞体外合成体系中，以所述融合蛋白的编码核酸为 DNA 模板或 RNA 模板，在一定条件孵育一定时间后得到所述融合蛋白。

15 15. 根据权利要求 14 所述的融合蛋白，其特征在于：

其中，所述无细胞体外合成体系含有细胞提取物，所述细胞提取物来源于选自酵母菌株，

进一步地，所述酵母菌株为：酿酒酵母、克鲁维酵母属酵母中的一种或多种的组合，在另一优选例中，所述克鲁维酵母属酵母为：乳酸克鲁维酵母、马克斯克鲁维酵母以及多布克鲁维酵母中的一种或多种的组合

20

16. 根据权利要求 15 所述的融合蛋白，其特征在于：

其中，所述酵母菌株经过基因工程改造以具有毒素抗性。

25 17. 根据权利要求 1-16 任意一项所述的融合蛋白，其特征在于：

其中，所述第一连接 L1 具有如 SEQ ID NO: 10、11、15、16、18-20、31 以及 43 中任意一个所示的氨基酸序列，或具有与 SEQ ID NO: 10、11、15、16、18-20、31 以及 43 中任意一个具有至少 80%、85%、90%、95%、99% 的序列同源性百分比的氨基酸序列

30 18. 一种分离的核酸，其特征在于：

所述核酸编码权利要求 1-17 任意一项所述的融合蛋白。

19. 一种载体，其特征在于，包括：权利要求 18 所述的核酸。

35 20. 一种宿主细胞，其特征在于，包括：

权利要求 18 所述的核酸或权利要求 19 所述的载体，

优选地，所述宿主细胞为酵母细胞，

进一步地，所述酵母细胞为：酿酒酵母、克鲁维酵母属酵母中的一种或多种的组合，在另一优选例中，所述克鲁维酵母属酵母为

40 : 乳酸克鲁维酵母、马克斯克鲁维酵母以及多布克鲁维酵母中的一种或多种的组合。

21. 一种体外无细胞蛋白质合成体系，其特征在于：

以编码权利要求 1-17 任意一项所述的融合蛋白的 mRNA 或 DNA 为模板，合成所述

融合蛋白。

22. 根据权利要求 21 所述的体外无细胞蛋白质合成体系，其特征在于，包括以下中的任意一种或多种：

5 (1) 所述 mRNA 或 DNA 模板；

(2) 细胞提取物，所述细胞提取物为酵母细胞提取物，再进一步地，所述细胞提取物来自下组的菌株：酿酒酵母、毕氏酵母以及克鲁维酵母中的任意一个或多个的组合；较佳地，所述的酵母细胞提取物来源的菌株为：克鲁维酵母，更佳地为乳酸克鲁维酵母；

(3) 以下组分中的任意一种或多种：

10 氨基酸混合物、dNTP、RNA 聚合酶、DNA 聚合酶、能量供应体系、聚乙二醇以及水性溶剂。

23. 根据权利要求 22 所述的体外无细胞蛋白质合成体系，其特征在于：

15 其中，所述菌株经过基因工程改造以具有毒素抗性，优选地，菌株细胞中的 DPH 基因表达或活性被降低和/或 eEF2 的氨基酸序列发生突变；优选地，所述 DPH 基因的表达量 $\leq 10\%$ ，较佳地， $\leq 5\%$ ，更佳地， $\leq 2\%$ ；和/或将 DPH 基因的表达或活性降低满足以下条件：A1/A0 的比值 $\leq 30\%$ ，较佳地 $\leq 10\%$ ，更佳地 $\leq 5\%$ ，更佳地， $\leq 2\%$ ，最佳地为 0-2%，其中，A1 为所述基因工程细胞中 DPH 基因的表达或活性；A0 为野生型 DPH 基因的表达或活性。

20

24. 权利要求 1-17 任意一项所述的融合蛋白的体外无细胞合成方法，其特征在于，包括：

25 在包括权利要求 21-23 任意一项所述的无细胞体外蛋白质合成体系的反应体系中，以编码权利要求 1-17 任意一项所述的融合蛋白的 mRNA 或 DNA 为模板进行体外合成反应得到所述融合蛋白，优选地，所述的 DNA 模板与参与所述体外合成反应的其他成分的体积比的范围为 1:10-1:50 或 1:20-1:40 或 1:25-1:35 或 1:30。

25. 根据权利要求 24 所述的体外无细胞合成方法，其特征在于：

30 其中，所述无细胞体外蛋白质合成体系包括：酵母细胞提取物、氨基酸混合物、dNTP、RNA 聚合酶、DNA 聚合酶、能量供应体系、聚乙二醇以及水性溶剂；

进一步地：

所述酵母细胞提取物来自下组的菌株：酿酒酵母、毕氏酵母以及克鲁维酵母中的任意一个或多个的组合；较佳地，所述的酵母细胞提取物来自包括：克鲁维酵母，更佳地为乳酸克鲁维酵母；

35 更进一步地，所述菌株经过基因工程改造以具有毒素抗性。

26. 根据权利要求 25 所述的体外无细胞合成方法

所述酵母细胞提取物占整个所述无细胞体外蛋白质合成体系的体积比为 50-80%。

40

27. 一种如权利要求 18 所述的核酸或权利要求 19 所述的载体或权利要求 20 所述的宿主细胞或权利要求 21-23 任意一项所述的体外无细胞蛋白质合成体系在制备权利要求 1-18 中任意一项所述的融合蛋白中的应用。

28. 权利要求 1-17 任意一项所述的融合蛋白在疾病治疗中的用途，或以权利要求 1-17 任意一项所述的融合蛋白作为治疗疾病的有效成分的药物，优选地，用于抗肿瘤、抗移植排斥反应和治疗自身免疫性疾病，更优选地，所述疾病治疗为以 HER2 以及 CD22 中的任意一项或多项为目标靶点的治疗。

5

29. 一种如权利要求 18 所述的核酸或权利要求 19 所述的载体或权利要求 20 所述的宿主细胞或权利要求 1-17 中任意一项所述的融合蛋白在制备用于权利要求 28 所述的用途的药物中的应用。

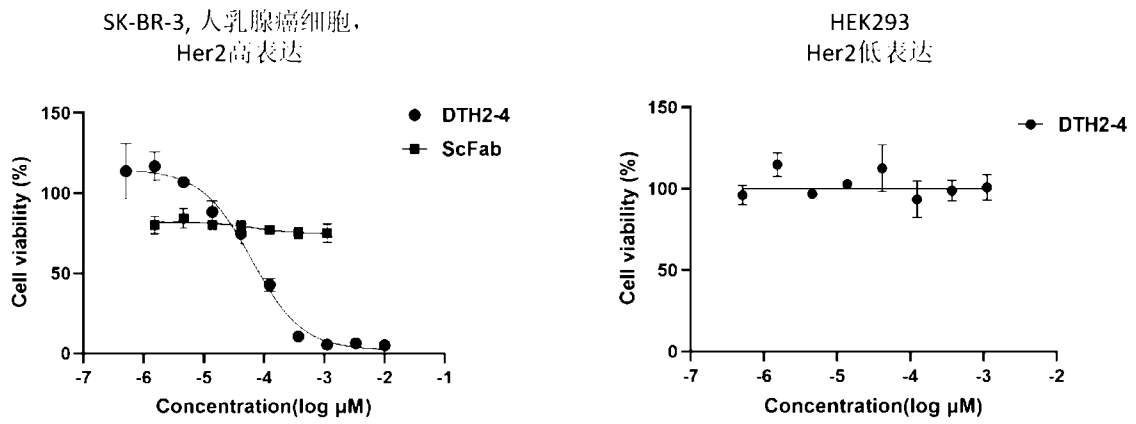
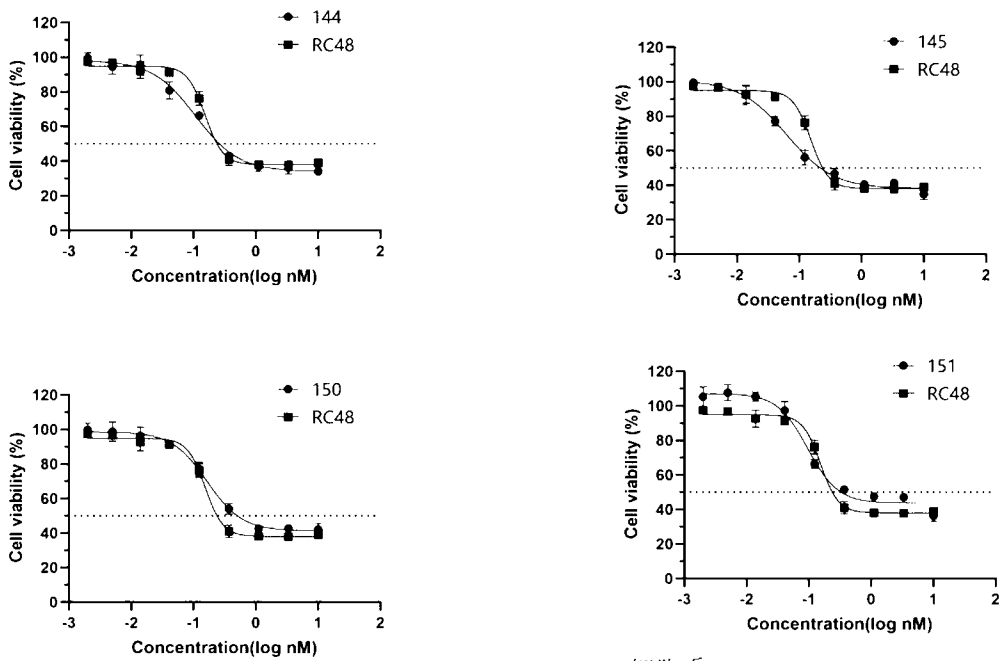


图 1



SK-BR-3细胞系

图 2

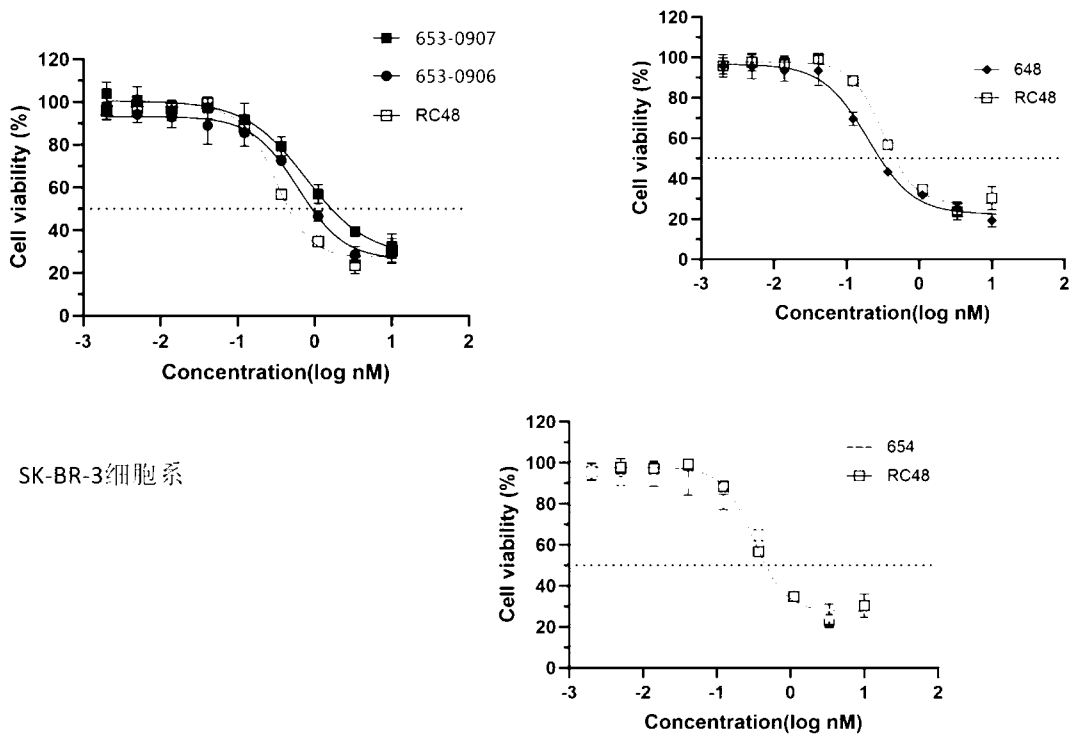


图 3

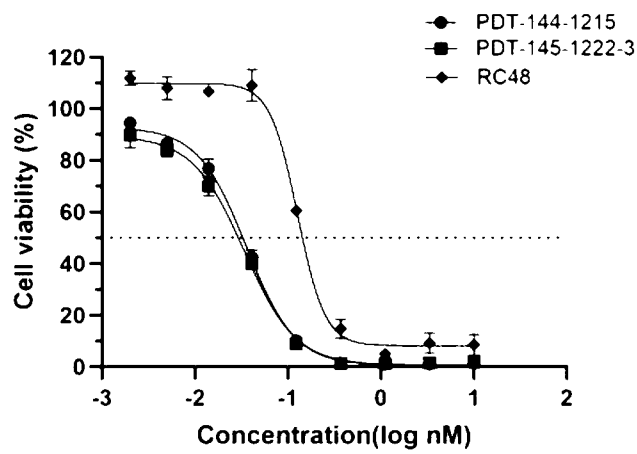
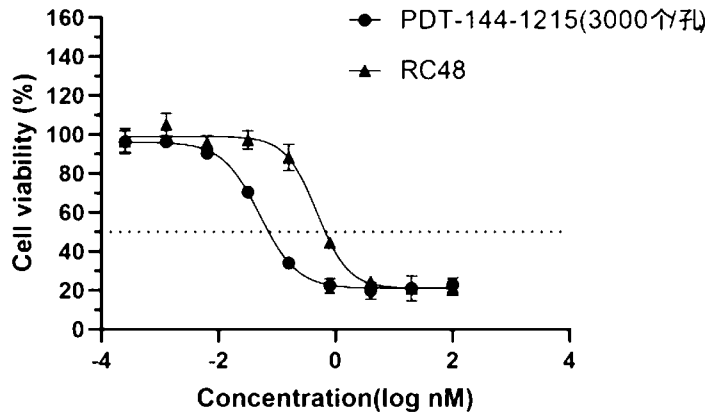
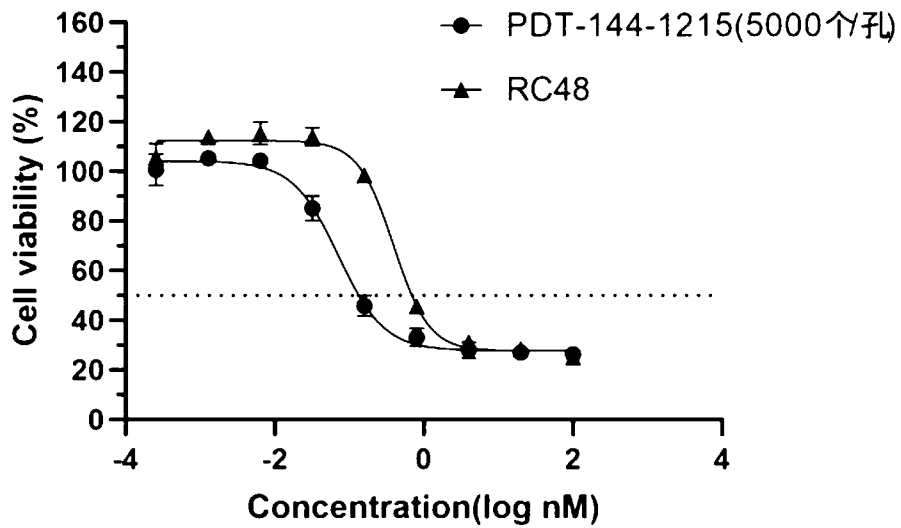


图 4



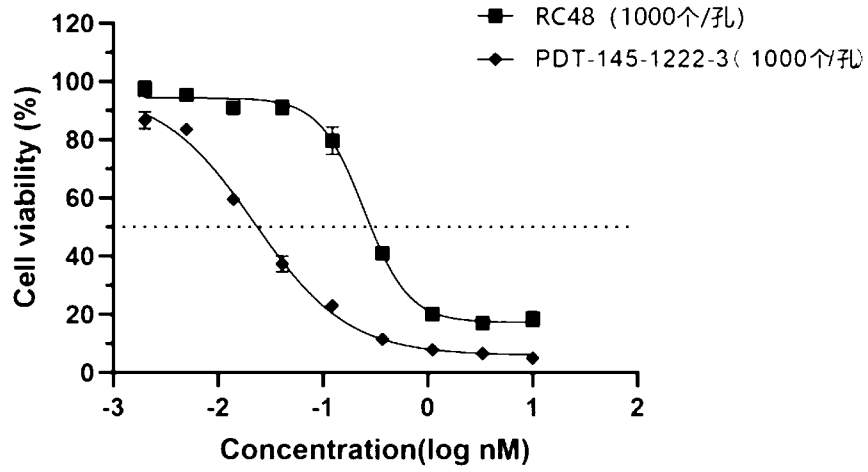
NCI-N87细胞系

图 5



NCI-N87细胞系

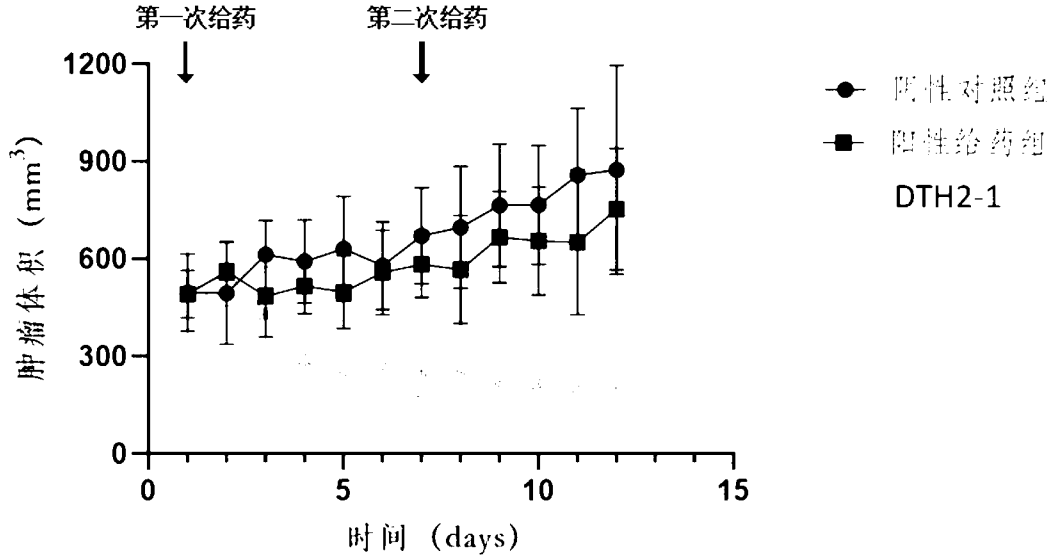
图 6



NCI-N87细胞系

图 7

裸鼠异位瘤 (BT474) 瘤内注射药效



- BALB/c Nude小鼠
- 剂量: 5 mg/kg

图 8

肿瘤重量对比

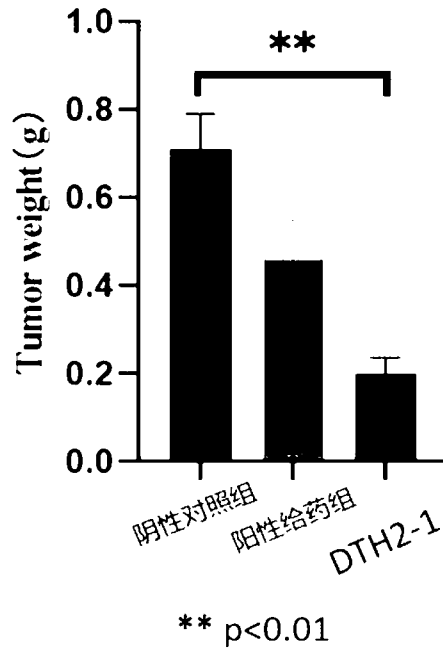
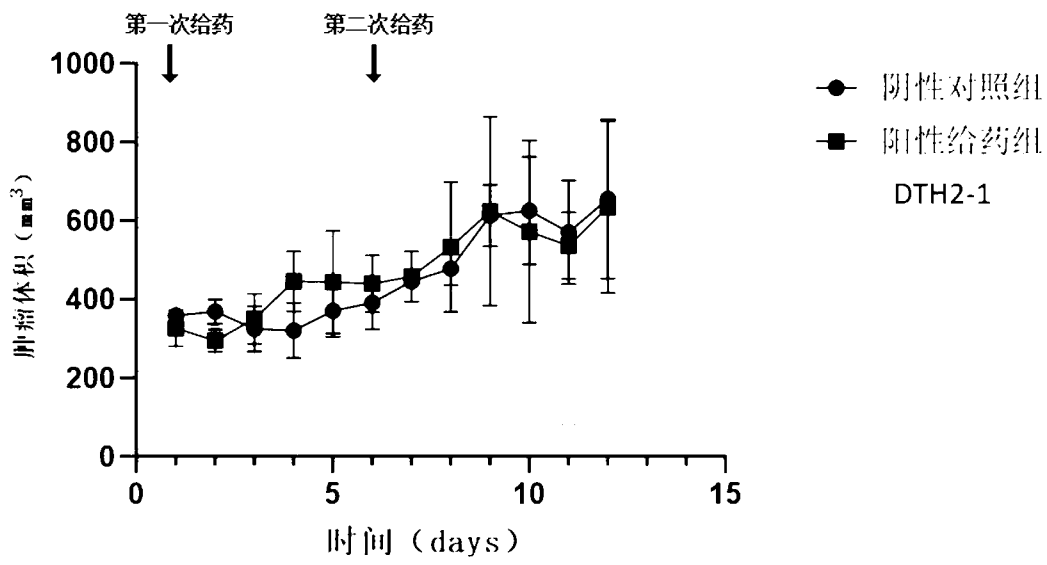


图 9

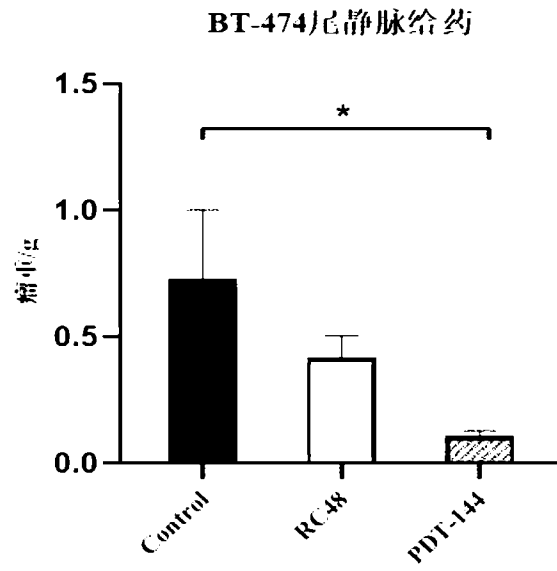
裸鼠异位瘤 (BT474) 静脉注射药效



- BALB/c Nude小鼠
- 剂量: 5 mg/kg

图 10

肿瘤重量对比



* $p < 0.05$

图 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/085334

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 19/00(2006.01)i; C12N15/62(2006.01)i; C12N15/79(2006.01)i; C12N1/21(2006.01)i; A61P35/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC:C07K C12N A61P

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)

CNABS; CNTXT; CJFD; ENTXTC; VEN; ENTXT; CNKI; 万方, WANFANG; 百度学术, Baidu Scholar; 必应, Bing; ISI Web of Science; PubMed; NCBI; 中国专利生物序列检索系统, China Patent Biological Sequence Search System; STN: 康码(上海)生物科技, 白喉毒素, 免疫毒素, 曲妥珠, 抗体, 单抗, 单克隆抗体, 融合蛋白, 肿瘤, 癌, KANGMA-HEATHCODE (SHANGHAI) BIOTECH, diphtheria toxin, DT, immunotoxin, HER2, Trastuzumab, antibody, mAb, monoclonal antibody, fusion protein, tumor, cancer, 序列1-66, sequences 1-66

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 106103489 A (MOLECULAR TEMPLATES, INC.) 09 November 2016 (2016-11-09) description, paragraphs [0726]-[0728]	1-27, 28 (in part), 29
A	CN 101249262 A (SECOND MILITARY MEDICAL UNIVERSITY OF PLA) 27 August 2008 (2008-08-27) claims 1-10	1-27, 28 (in part), 29
A	US 2004127682 A1 (US HEALTH; NOVARTIS AG) 01 July 2004 (2004-07-01) claims 1-119	1-27, 28 (in part), 29

 Further documents are listed in the continuation of Box C. 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

16 July 2024

Date of mailing of the international search report

22 July 2024

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District,
Beijing 100088

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/085334

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.: **28 (in part)**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 28 (in part) relates to the use of the fusion protein of any one of claims 1-17 in the treatment of diseases. The solution is a treatment method implemented on a human or animal body, and falls within subject matter for which no search is required by the Searching Authority as defined in PCT Rule 39.1(iv).
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/CN2024/085334

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN 106103489 A	09 November 2016	JP 2017509318 A	06 April 2017
		JP 6646584 B2	14 February 2020
		AU 2019210656 A1	22 August 2019
		AU 2019210656 B2	22 October 2020
		AU 2019210656 C1	22 June 2023
		US 2022275030 A1	01 September 2022
		US 2022306701 A1	29 September 2022
		WO 2015113005 A1	30 July 2015
		JP 2017509317 A	06 April 2017
		JP 6655017 B2	26 February 2020
		IL 246632 A0	31 August 2016
		IL 246632 B	31 March 2020
		IL 273035 A	30 April 2020
		IL 273035 B	01 December 2021
		KR 20160111951 A	27 September 2016
		ES 2877356 T3	16 November 2021
		CA 2937395 A1	30 July 2015
		WO 2015113007 A1	30 July 2015
		JP 2020079267 A	28 May 2020
		AU 2020294212 A1	28 January 2021
		AU 2020294212 B2	18 August 2022
		IL 278586 B	31 August 2021
		KR 20220011790 A	28 January 2022
		KR 102514910 B1	29 March 2023
		HK 1226083 A1	22 September 2017
		EP 3099705 A1	07 December 2016
		EP 3099705 B1	19 June 2019
		IL 302552 A	01 July 2023
		IL 302552 B1	01 May 2024
		IL 285403 A	30 September 2021
		IL 285403 B1	01 June 2023
		IL 285403 B2	01 October 2023
		US 2016340394 A1	24 November 2016
		MX 2021005131 A	15 June 2021
		JP 2022166140 A	01 November 2022
		JP 7402556 B2	21 December 2023
		IL 246701 A0	31 August 2016
		IL 246701 B	30 November 2020
		CA 2937407 A1	30 July 2015
		HK 1226082 A1	22 September 2017
		KR 20230048153 A	10 April 2023
		IL 287490 A	01 December 2021
		IL 287490 B	01 August 2022
		US 2016347798 A1	01 December 2016
		US 2021253648 A1	19 August 2021
		US 11312751 B2	26 April 2022
		ES 2749862 T3	24 March 2020
		KR 20230028808 A	02 March 2023
		KR 20220011792 A	28 January 2022
		KR 102500408 B1	16 February 2023

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2024/085334

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		EP 3575312 A1	04 December 2019
		AU 2015209063 A1	08 September 2016
		AU 2015209063 B2	02 May 2019
		AU 2015209063 B9	15 August 2019
		AU 2015209063 C1	25 June 2020
		KR 20160113158 A	28 September 2016
		EP 3868776 A1	25 August 2021
		IL 294746 A	01 September 2022
		IL 294746 B1	01 December 2023
		IL 294746 B2	01 April 2024
		JP 2021129598 A	09 September 2021
		JP 7229570 B2	28 February 2023
		MX 2016009807 A	28 February 2017
		AU 2022287636 A1	02 February 2023
		AU 2022287636 B2	04 January 2024
		US 2019153044 A1	23 May 2019
		AU 2015209065 A1	08 September 2016
		AU 2015209065 B2	18 April 2019
		AU 2015209065 C1	26 September 2019
		MX 2016009809 A	02 December 2016
		AU 2021200390 A1	18 March 2021
		AU 2021200390 B2	15 September 2022
		AU 2021200390 C1	22 June 2023
		EP 3099704 A1	07 December 2016
		EP 3099704 B1	17 March 2021
		JP 2021151261 A	30 September 2021
		JP 7126729 B2	29 August 2022
		AU 2019204364 A1	11 July 2019
		AU 2019204364 B2	22 October 2020
		AU 2019204364 C1	15 April 2021
		MX 2022010376 A	21 September 2022
		JP 2020073569 A	14 May 2020
		JP 2023062014 A	02 May 2023
		JP 7442879 B2	05 March 2024
		AU 2022256081 A1	17 November 2022
		AU 2022256081 B2	21 December 2023

CN	101249262	A	27 August 2008

US	2004127682	A1	01 July 2004
		US 7696338 B2	13 April 2010
		US 2011086416 A1	14 April 2011
		US 8217158 B2	10 July 2012
		US 2013211049 A1	15 August 2013
		US 8987426 B2	24 March 2015

<p>A. 主题的分类</p> <p>C07K 19/00(2006.01)i; C12N15/62(2006.01)i; C12N15/79(2006.01)i; C12N1/21(2006.01)i; A61P35/00(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. 检索领域</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 A61P</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>CNABS;CNTXT;CJFD;ENTXTC;VEN;ENTXT;CNKI;万方;百度学术;必应;ISI Web of Science;PubMed;NCBI;中国专利生物序列检索系统;STN: 康码(上海)生物科技, 白喉毒素, 免疫毒素, 曲妥珠, 抗体, 单抗, 单克隆抗体, 融合蛋白, 肿瘤, 癌, KANGMA-HEATHCODE (SHANGHAI) BIOTECH, diphtheria toxin, DT, immunotoxin, HER2, Trastuzumab, antibody, mAb, monoclonal antibody, fusion protein, tumor, cancer, 序列1-66</p>														
<p>C. 相关文件</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>CN 106103489 A (分子模板公司) 2016年11月9日 (2016 - 11 - 09) 说明书第[0726]- [0728]段</td> <td>1-27、28 (部分)、29</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 101249262 A (中国人民解放军第二军医大学) 2008年8月27日 (2008 - 08 - 27) 权利要求1-10</td> <td>1-27、28 (部分)、29</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2004127682 A1 (US HEALTH;NOVARTIS AG;) 2004年7月1日 (2004 - 07 - 01) 权利要求1-119</td> <td>1-27、28 (部分)、29</td> </tr> </tbody> </table> <p><input 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 “&” 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	CN 106103489 A (分子模板公司) 2016年11月9日 (2016 - 11 - 09) 说明书第[0726]- [0728]段	1-27、28 (部分)、29	A	CN 101249262 A (中国人民解放军第二军医大学) 2008年8月27日 (2008 - 08 - 27) 权利要求1-10	1-27、28 (部分)、29	A	US 2004127682 A1 (US HEALTH;NOVARTIS AG;) 2004年7月1日 (2004 - 07 - 01) 权利要求1-119	1-27、28 (部分)、29
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求												
A	CN 106103489 A (分子模板公司) 2016年11月9日 (2016 - 11 - 09) 说明书第[0726]- [0728]段	1-27、28 (部分)、29												
A	CN 101249262 A (中国人民解放军第二军医大学) 2008年8月27日 (2008 - 08 - 27) 权利要求1-10	1-27、28 (部分)、29												
A	US 2004127682 A1 (US HEALTH;NOVARTIS AG;) 2004年7月1日 (2004 - 07 - 01) 权利要求1-119	1-27、28 (部分)、29												
国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期													
2024年7月16日	2024年7月22日													
ISA/CN的名称和邮寄地址	授权官员													
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	夏文静													
	电话号码 (+86) 0512-88996514													

第I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：28(部分)
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
权利要求28（部分）涉及权利要求1-17任意一项所述的融合蛋白在疾病治疗中的用途，该方案为在人体或动物体上实施的治疗方法，属于PCT细则39.1（iv）定义的不要求检索单位检索的主题。
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/CN2024/085334

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)
CN 106103489 A	2016年11月9日	JP 2017509318 A	2017年4月6日
		JP 6646584 B2	2020年2月14日
		AU 2019210656 A1	2019年8月22日
		AU 2019210656 B2	2020年10月22日
		AU 2019210656 C1	2023年6月22日
		US 2022275030 A1	2022年9月1日
		US 2022306701 A1	2022年9月29日
		WO 2015113005 A1	2015年7月30日
		JP 2017509317 A	2017年4月6日
		JP 6655017 B2	2020年2月26日
		IL 246632 A0	2016年8月31日
		IL 246632 B	2020年3月31日
		IL 273035 A	2020年4月30日
		IL 273035 B	2021年12月1日
		KR 20160111951 A	2016年9月27日
		ES 2877356 T3	2021年11月16日
		CA 2937395 A1	2015年7月30日
		WO 2015113007 A1	2015年7月30日
		JP 2020079267 A	2020年5月28日
		AU 2020294212 A1	2021年1月28日
		AU 2020294212 B2	2022年8月18日
		IL 278586 B	2021年8月31日
		KR 20220011790 A	2022年1月28日
		KR 102514910 B1	2023年3月29日
		HK 1226083 A1	2017年9月22日
		EP 3099705 A1	2016年12月7日
		EP 3099705 B1	2019年6月19日
		IL 302552 A	2023年7月1日
		IL 302552 B1	2024年5月1日
		IL 285403 A	2021年9月30日
		IL 285403 B1	2023年6月1日
		IL 285403 B2	2023年10月1日
		US 2016340394 A1	2016年11月24日
		MX 2021005131 A	2021年6月15日
		JP 2022166140 A	2022年11月1日
		JP 7402556 B2	2023年12月21日
		IL 246701 A0	2016年8月31日
		IL 246701 B	2020年11月30日
		CA 2937407 A1	2015年7月30日
		HK 1226082 A1	2017年9月22日
		KR 20230048153 A	2023年4月10日
		IL 287490 A	2021年12月1日
		IL 287490 B	2022年8月1日
		US 2016347798 A1	2016年12月1日
		US 2021253648 A1	2021年8月19日
		US 11312751 B2	2022年4月26日
		ES 2749862 T3	2020年3月24日
		KR 20230028808 A	2023年3月2日
		KR 20220011792 A	2022年1月28日
		KR 102500408 B1	2023年2月16日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2024/085334

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)
		EP 3575312 A1	2019年12月4日
		AU 2015209063 A1	2016年9月8日
		AU 2015209063 B2	2019年5月2日
		AU 2015209063 B9	2019年8月15日
		AU 2015209063 C1	2020年6月25日
		KR 20160113158 A	2016年9月28日
		EP 3868776 A1	2021年8月25日
		IL 294746 A	2022年9月1日
		IL 294746 B1	2023年12月1日
		IL 294746 B2	2024年4月1日
		JP 2021129598 A	2021年9月9日
		JP 7229570 B2	2023年2月28日
		MX 2016009807 A	2017年2月28日
		AU 2022287636 A1	2023年2月2日
		AU 2022287636 B2	2024年1月4日
		US 2019153044 A1	2019年5月23日
		AU 2015209065 A1	2016年9月8日
		AU 2015209065 B2	2019年4月18日
		AU 2015209065 C1	2019年9月26日
		MX 2016009809 A	2016年12月2日
		AU 2021200390 A1	2021年3月18日
		AU 2021200390 B2	2022年9月15日
		AU 2021200390 C1	2023年6月22日
		EP 3099704 A1	2016年12月7日
		EP 3099704 B1	2021年3月17日
		JP 2021151261 A	2021年9月30日
		JP 7126729 B2	2022年8月29日
		AU 2019204364 A1	2019年7月11日
		AU 2019204364 B2	2020年10月22日
		AU 2019204364 C1	2021年4月15日
		MX 2022010376 A	2022年9月21日
		JP 2020073569 A	2020年5月14日
		JP 2023062014 A	2023年5月2日
		JP 7442879 B2	2024年3月5日
		AU 2022256081 A1	2022年11月17日
		AU 2022256081 B2	2023年12月21日

CN	101249262	A	2008年8月27日

US	2004127682	A1	2004年7月1日
		US 7696338 B2	2010年4月13日
		US 2011086416 A1	2011年4月14日
		US 8217158 B2	2012年7月10日
		US 2013211049 A1	2013年8月15日
		US 8987426 B2	2015年3月24日
