断裂型内含肽 *Npu* DnaE 的 C 端序列赖氨酸突变对其剪接活性的影响

张敬仪，朱建伟，张宝红*

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

摘要：断裂型内含肽 *Nostoc punctiforme*（*Npu*）DnaE 作为一种为构建抗体 - 药物偶联物（ADC）过程中实现定点偶联的工具，其 C 端序列中的赖氨酸对其剪接活性有较大影响。该研究对断裂型内含肽 *Npu* DnaE C 端序列中的赖氨酸进行定点突变，得到了 5 种氨基酸（精氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、谷氨酸和甲硫氨酸）取代的多肽序列，以探究不同氨基酸取代对其剪接活性的影响。结果显示分别由精氨酸、谷氨酰胺和甲硫氨酸 3 种氨基酸取代赖氨酸的内含肽 C 端序列保持了剪接活性，其中精氨酸取代的内含肽 C 端序列剪接效率较高。采用精氨酸取代的内含肽 C 端序列制备了 ADC HER2-Lc-SMCC-DM1，经检测其保有抗原亲和力和抗肿瘤活性。该研究结果为 ADC 的定点偶联和基于内含肽设计、改造蛋白质或多肽连接合成相关研究提供了技术支撑。

关键词：*Npu* DnaE；断裂型内含肽；赖氨酸突变；剪接活性；抗体-药物偶联物

中图分类号：Q816　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1001-8255(2022)12-1719-07

DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.12.007

Effect of Lysine Mutation in the C-Terminal Sequence of *Npu* DnaE Split Intein on the Splicing Activity

ZHANG Jingyi, ZHU Jianwei, ZHANG Baohong*

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

ABSTRACT: The split intein, *Nostoc punctiforme*(*Npu*) DnaE, is a site-specific conjugating tool for antibody-drug conjugates(ADC). Its splicing activity is affected by the lysine residues in the C-terminal sequence. This study focused on the splicing activities of different lysine mutants in the C-terminal sequence of *Npu* DnaE. Five amino acid(arginine, glutamine, glycine, glutamic acid and methionine) mutants were performed to explore the effects of different site-directed mutagenesis on lysine in the C-terminal sequence of the split intein *Npu* DnaE. The results showed that substitutions of lysine in the C-terminus by arginine, glutamine and methionine maintained splicing activity, and the arginine-substituted C-terminus exhibited the higher splicing efficiency. The ADC, HER2-Lc-SMCC-DM1, was further produced by split intein with arginine-substituted C-terminus, and both the antigen affinity and bioactivity were retained. This research provided technical support for site-specific ADC and protein/peptide synthesis based on the application of the intein.

Key Words: *Npu* DnaE; split intein; lysine residue mutation; splicing activity; antibody-drug conjugate

内含肽具有自剪接功能，可从其宿主多肽链中将自身切除，使其两侧氨基酸残基以肽键形式连接。内含肽剪接不需要 ATP 供给能量，而是依赖于内含肽的正确折叠以及一系列氨基酸残基的亲核置换反应[1—2]。在自然界中存在连续型与断裂型 2 种内含肽，前者的结构为 1 条连续肽链[3]，后者的结构则被分成 2 个侧面连接宿主蛋白（外显肽）的 N 或 C 末端的多肽片段[4—5]。内含肽能够形成肽键的特点使其成为蛋白质工程学中的重要工具。断裂型内含肽的结构域含有 2 个分别编码在 2 个不同基因中的片段，N 端和 C 端内含肽，2 个多肽分子可通过亲和力作用

收稿日期：2022-04-27

作者简介：张敬仪(1996—)，女，硕士研究生，专业方向：生物技术药物。

通信作者：张宝红(1975—)，女，副教授，博士生导师，从事生物技术药物研究与开发。

E-mail：bhzhang@sjtu.edu.cn

降低反应浓度，该特性使其具有更广泛的应用，如同位素标记[6]、制备环肽[7]、腺病毒介导的体内基因治疗[8]、各种长度的蛋白质和多肽的连接[9]。其中，断裂型内含肽 *Nostoc punctiforme*（*Npu*）DnaE 因具有较高的剪接活性，已被广泛地应用于蛋白质制备、纯化等试验中。研究证明，*Npu* DnaE 能达到 55%～90%的转化率，并且仅有少量的 N 端和 C 端切割副产物生成[10]。

内含肽的结构中含有一些保守基序，但在一般情况下，除了如基序 B 中的组氨酸（His）等个别保守度较高的氨基酸外，只要替代的氨基酸具有相似的基团与性质功能就可保持内含肽原有的活性[11]。*Npu* DnaE 是实现人表皮生长因子受体 -2（HER2）单抗和细胞毒素定点偶联构成抗体 - 药物偶联物（antibody drug conjugate，ADC）T-DM1 的工具，具体工作原理为：细胞毒素通过赖氨酸（K）连接在内含肽 C 端，再经剪接，与融合在 *Npu* DnaE N 端的抗体相偶联。然而，*Npu* DnaE C 端序列中的所有 K 残基都可能与毒素发生连接，进而影响后续内含肽剪接反应的效率与产物的均一性[12]。因此，对 *Npu* DnaE C 端序列中的 K 进行突变以得到最佳定点偶联条件成为本研究目的。本研究通过定点突变 *Npu* DnaE 的 C 端序列中的 K 残基，对 5 种不同性质的氨基酸［精氨酸（R）、谷氨酰胺（Q）、甘氨酸（G）、谷氨酸（E）和甲硫氨酸（M）］取代的内含肽进行剪接活性探究，成功用剪接活性较高的 R 取代的 *Npu* DnaE C 端制备了 HER2 与细胞毒素（SMCC-DM1）的定点偶联产物 HER2-Lc-SMCC-DM1，并采用生物膜干涉技术（bio-layer interferometry，BLI）和流式细胞术检测其亲和力和体外抗肿瘤活性。结果显示内含肽剪切反应所需的还原、氧化步骤未对抗体的亲和力和抗肿瘤活性产生影响，为内含肽 *Npu* DnaE 介导定点制备 ADC 的可行性和实用性提供了研究基础。

1　仪器与试药

Forma Steri-Cult CO_2 细胞培养箱（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；IC 1000 型细胞计数仪（上海睿钰生物科技有限公司）；Infinite® M1000 Pro 型多功能酶标仪（瑞士 Tecan 公司）；RED96 型生物大分子相互作用仪（美国 ForteBio 公司）。

质粒大量抽提试剂盒购自美国 Omega 公司；细胞培养基 Freestyle 293、细胞培养基 RPMI-1640、胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）与磷酸盐缓冲液（PBS，pH 7.4）购自美国 Gibco 公司；细胞培养基 SFM4HEK293 购自美国 Hyclone 公司；CCK-8 试剂盒购自东仁化学科技（上海）有限公司；人免疫球蛋白 G1（human IgG1）、异硫氰酸荧光素（FITC）标记的山羊抗人 IgG1 二抗购自北京义翘神州科技股份有限公司；曲妥珠单抗（trastuzumab，商品名 Herceptin，批号 LC13JA1007）购自翌圣生物科技（上海）股份有限公司；Protein A 预装柱（HiTrap® rProtein A Fast Flow）购自美国 GE Healthcare 集团；Gator™ Flex SA Kit 购自美国 ForteBio 公司。

将 *Npu* DnaE C 端序列中的 K 残基进行定点突变，分别突变为 R、Q、G、E 和 M，得到 5 种替换了 K 的多肽片段，分别命名为 *Npu* $DnaE^C$-R、*Npu* $DnaE^C$-Q、*Npu* $DnaE^C$-G、*Npu* $DnaE^C$-E 和与 *Npu* $DnaE^C$-M，均由吉尔生化（上海）有限公司合成（表 1）。多肽 *Npu* $DnaE^C$-R-SMCC-DM1 由上海楚肽生物科技有限公司合成。SMCC-DM1（批号 MTC-20160806-01）购自博瑞生物医药（苏州）股份有限公司；链霉亲和素（streptavidin，SA，批号 2006021）购自颇尔富迪生物分析仪器（上海）有限公司；二硫苏糖醇（dithiothreitol，DTT）购自上海少辛生物科技有限公司；三（2- 羰基乙基）磷盐酸盐［*tris*（2-carboxyethyl）phosphine hydrochloride，TCEP］购自西格玛奥德里奇（上海）贸易有限公司；质粒 pM09-anti-HER2-Lc、pM09-anti-HER2-Hc、内含肽 *Npu* DnaE 多肽、人胚胎肾细胞 293E（HEK293E 细胞）与人胃癌细胞（NCI-N87 细胞）购均为本实验室保存。

表 1　*Npu* $DnaE^C$ 的 5 种突变序列设计

（下划线为外显肽）

Tab.1　Five Types of Mutated *Npu* $DnaE^C$ Sequences

(The extein is underlined.)

名称	氨基酸序列（C'—N'）
野生型	IKIATRKYLGKQNVYDIGVERDHNFALKNGFIASNCFN
Npu $DnaE^C$-R	IRIATRRYLGRQNVYDIGVERDHNFALRNGFIASNCFNK
Npu $DnaE^C$-Q	IQIATRQYLGQQNVYDIGVERDHNFALQNGFIASNCFNK
Npu $DnaE^C$-G	IGIATRGYLGGQNVYDIGVERDHNFALGNGFIASNCFNK
Npu $DnaE^C$-E	IEIATREYLGEQNVYDIGVERDHNFALENGFIASNCFNK
Npu $DnaE^C$-M	IMIATRMYLGMQNVYDIGVERDHNFALMNGFIASNCFNK

2 方法与结果

2.1 HER2-Lc-SMCC-DM1 的制备

2.1.1 融合 *Npu* DnaE^{N} 的抗 HER2 抗体制备

通过重叠 PCR 技术将 *Npu* DnaE^{N} 序列和抗 HER2 抗体轻链 C 端序列连接成新的轻链，并构建轻链表达质粒 pM09-anti-HER2-Lc-*Npu* DnaE^{N}；将轻链表达质粒和重链表达质粒（pM09-anti-HER2-Hc）通过聚乙烯亚胺（PEI）共转染至 HEK293E 细胞中，在 37℃、5% CO_2、125 r/min 的条件下进行培养，表达具有 *Npu* DnaE^{N} 内含肽结构域的抗 HER2 抗体（HER2-Lc-*Npu* DnaE^{N}）。培养物低温低速离心（4 300×*g*，4 ℃，5 min）后收集上清，用 Protein A 柱进行纯化（结果如图 1A 所示），纯化后的抗体透析在反式剪接缓冲液（500 mmol/L NaCl，50 mmol/L Tris-HCl，pH 7.4）中。

2.1.2 *Npu* DnaE C 端 K 突变序列的体外反式剪接反应

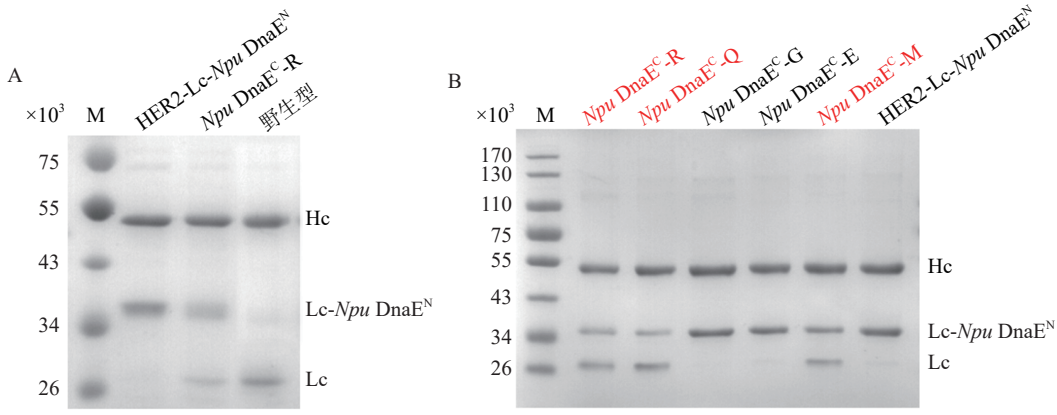
向纯化后的 HER2-Lc-*Npu* DnaE^{N} 和 5 种 C 端突变后的 *Npu* DnaE 中分别预先加入还原剂（2 mmol/L DTT 或 5 mmol/L TCEP），以物质的量浓度比 =1 ∶ 2 混合。混合物在 37 ℃水浴孵育 4 h 后，加入终浓度 0.3%的 H_2O_2 终止反应，使抗体中的巯基重新氧化形成二硫键。剪接产物通过 10% SDS-PAGE 检测（图 1B）。

Npu DnaE 以较高的剪接效率（30 ℃，$t_{1/2}$=50 s）在蛋白质工程中被广泛应用[13]，而 C 端序列中的 K 经 R 取代后尽管反应效率降低，但仍保有剪接活性（图 1A）。融合 N 端内含肽的轻链（底物 Lc-*Npu* DnaE^{N}）相对分子质量约 37 000，而剪接反应的发生使轻链上的内含肽 N 端掉落，生成约 26 000 的轻链（产物 Lc）。结果显示，R、Q 和 M 取代 K 的内含肽 C 端具有剪接活性，根据 Lc-*Npu* DnaE^{N} 条带灰度值结果判断 R 与 Q 取代在反应中比 M 取代消耗更多的底物（Lc-*Npu* DnaE^{N}）（表 2），证明 R 取代与 Q 取代的产物剪接效率更高；G 取代和 E 取代的内含肽 C 端则无条带（Lc）生成，说明没有发生剪接反应。对 *Npu* DnaE^{C}-R 的进行反应动力学分析结果如图 2 所示，*Npu* DnaE^{C}-R 的剪接反应需要 3 ～ 4 h 到达平台期。

照上述方法向纯化后的 HER2-Lc-*Npu* DnaE^{N} 和 *Npu* DnaE^{C}-R-SMCC-DM1 分别预先加入 2 mmol/L DTT 进行还原、氧化反应，反应产物使用 Protein A 柱进行纯化，除去剪接掉落的内含肽。再将纯化后的 HER2-Lc-SMCC-DM1 透析至 PBS 中，－80 ℃保存备用。

2.2 HER2-Lc-SMCC-DM1 的亲和力检测

以分子间相互作用仪通过 BLI 检测亲和力。HER2 生物素化抗原（HER2-biotin）浓度为 25 nmol/L，



A—HER2-Lc-*Npu* DnaE^{N}、*Npu* DnaE^{C}-R 与野生型 C 端的剪接结果比较；
B—HER2-Lc-*Npu* DnaE^{N}、5 种突变 *Npu* DnaE 内含肽 C 端的剪接反应。
M—蛋白标准品；Hc—重链；Lc-*Npu* DnaE^{N}—融合内含肽 N 端的轻链；Lc—内含肽 N 端剪接掉落后的轻链。

图 1 SDS-PAGE 检测 *Npu* DnaE^{C} 突变序列的剪接反应

Fig.1 Splicing Results of Each Mutated *Npu* DnaE^{C} Sequences by SDS-PAGE

表 2　5 种突变 *Npu* DnaE 内含肽 C 端的剪接效率
（以 Lc-*Npu* DnaE^{N} 条带灰度值为参考）

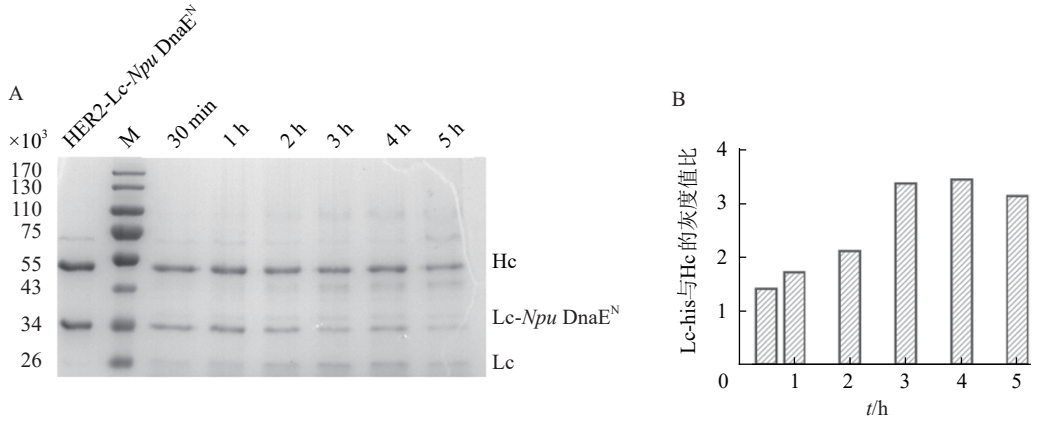
Tab.2　Splicing Efficiencies of the 5 Types of Site-specific Mutation in C-terminus of *Npu* DnaE (Gray-scale value of Lc-*Npu* DnaE^{N} bands are used as reference.)

序列	灰度值	相对含量/%
Npu DnaE^{C}-R	5 959.418	37.44
Npu DnaE^{C}-Q	5 522.882	34.70
Npu DnaE^{C}-G	15 797.267	99.25
Npu DnaE^{C}-E	15 423.388	96.90
Npu DnaE^{C}-M	9 999.782	62.83
HER2-Lc-*Npu* DnaE^{N}	15 916.217	100.00

将 HER2-Lc-SMCC-DM1 与同型单克隆抗体（曲妥珠单抗）稀释为 50、60、80、100、200 nmol/L；SA 探针使用前自干燥柜中取出，提前约 30 min 用 PBS 浸泡备用；抗原包被 300 s 后设置多循环动力学测试程序：磷酸盐吐温缓冲液（PBST，pH 7.4）封闭 300 s，结合 300 s，解离 600 s；10 mmol/L G（pH 1.5）再生 15 s，随后检测并用 ForteBio Octet Data Acquisition 7.0 软件进行数据拟合，动力学模型采用 1 ∶ 1 的结合形式。将 0.2 μg/ml 抗原固定于芯片进行 5 个浓度梯度检测，结果显示 HER2-Lc-SMCC-DM1 和对照组曲妥珠单抗与 HER2 抗原的亲和力（k_{Da}）均达到“nmol/L”级（分别为 2.84 和 2.28 nmol/L，图 3，表 3），表明在剪接反应中，经过还原反应和氧化反应后成功连接上细胞毒素的抗体分子仍具有亲和力。

2.3　HER2-Lc-SMCC-DM1 的抗肿瘤活性

使用荧光激活细胞分选缓冲液（含 2% FBS 的 PBS）1 ml 将 NCI-N87 细胞洗涤 3 次，然后分别加入终质量浓度为 1.5 g/ml 的 HER2-Lc-SMCC-DM1、曲妥珠单抗和空白对照抗体（human IgG1）孵育 1 h 后，使用荧光激活细胞分选缓冲液洗涤细胞 3 次，然后加入 FITC 标记的山羊抗人 IgG1 二抗，冰上孵育 1 h。通过流式细胞仪检测细胞表面 FITC 信号。流式荧光分析结果显示，HER2-Lc-SMCC-DM1 组



A—10% SDS-PAGE 检测反应效率；B—生成产物与底物条带的灰度值比。

M—蛋白标准品；Hc—重链；Lc-*Npu* DnaE^{N}—融合内含肽 N 端的轻链；Lc—内含肽 N 端剪接掉落后的轻链。

图 2　*Npu* DnaE^{C}-R 的反应动力学

Fig.2　Kinetics of *Npu* DnaE^{C}-R

表 3　BLI 检测抗原抗体的亲和力

Tab.3　Affinity Detection of Antigen-antibody by BLI

分析物溶液	动力学模型	固定相	k_{on}[1)]/(mol·L^{-1}·s^{-1})	k_{Dis}[2)]/s^{-1}	k_{Da}/mol·L^{-1}
HER2-Lc-SMCC-DM1	1∶1 结合	HER2	5.27×10^{4}	1.50×10^{-4}	2.84×10^{-9}
曲妥珠单抗			5.45×10^{4}	1.24×10^{-4}	2.28×10^{-9}

注：[1)]k_{on} 为结合速率常数（association rate constant），为图 3 中曲线陡峭部分的拟合值；[2)]k_{Dis} 为解离速率常数（dissociation rate constant），为图 3 中平滑部分曲线的拟合值。

和曲妥珠单抗组能特异性结合细胞表面的 HER2 受体，说明 HER2-Lc-SMCC-DM1 具有良好的靶细胞结合能力（图 4A）。

NCI-N87 细胞在 R10 培养基［RPMI-1640，含体积分数 10% FBS］中培养，每 2 ～ 3 d 照 1 ∶ 3 进行细胞传代至对数生长期。加药前一天以 R10 培养基将细胞重新悬浮，调整细胞密度并铺板，每孔约 5 000 个细胞，37 ℃、5 % CO_2 培养。24 h 后，分别将 HER2-Lc-SMCC-DM1 与曲妥珠单抗以 1.5×10^2 nmol/L 为起始浓度，按 10 倍梯度稀释 8 个浓度（1.5×10^{-5} ～ 1.5×10^2 nmol/L）分别加入孔板中继续培养。4 ～ 5 d 后通过 CCK-8 试剂盒检测细胞增殖情况。试验设置空白组与零给药组，每个条件下皆设有 3 个复孔。用酶标仪测定 450 nm 处吸光值，照下式计算细胞活性。

$$细胞活性=(A_{样品}-A_{空白})/(A_{零给药}-A_{空白})\times100\%$$

CCK-8 法检测结果显示，HER2-Lc-SMCC-DM1 对 NCI-N87 细胞的增殖有抑制作用，且给药剂量较高时，细胞的存活率明显降低，表明抑制增殖作用在一定范围内具有浓度依赖性，其半数抑制浓度（IC_{50}）为 0.865 nmol/L，而曲妥珠单抗则显示无明显抑制作用（图 4B）。结果说明 HER2-Lc-SMCC-DM1 具有一定的抗肿瘤活性。

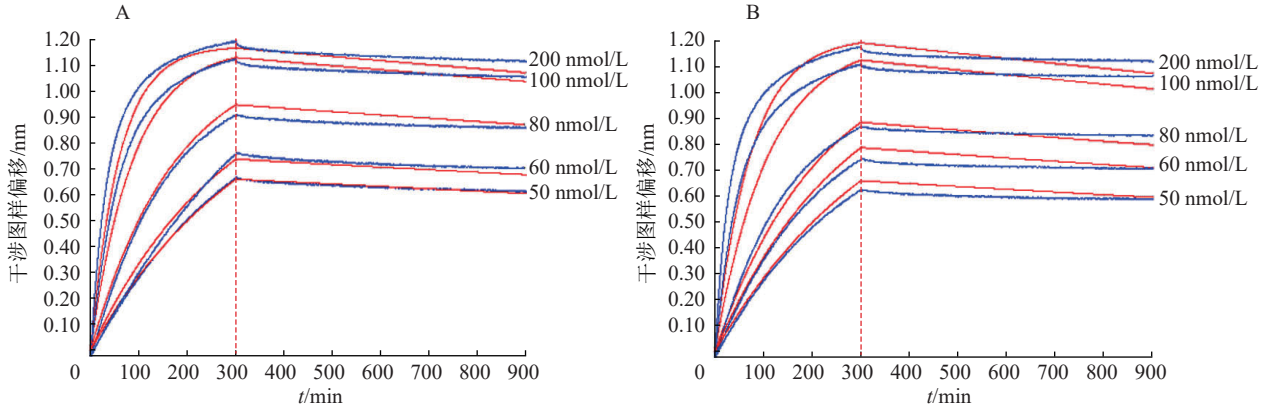
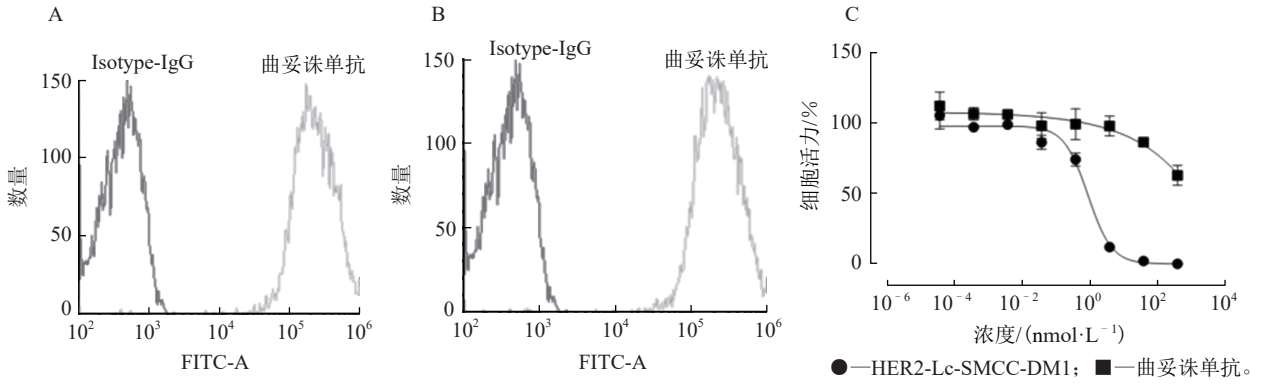


图 3 HER2-Lc-SMCC-DM1（A）及曲妥珠单抗（B）与 HER2 抗原的亲和力分析

Fig.3 Affinity Analysis of HER2-Lc-SMCC-DM1 (A) and Trastuzumab (B) Binding to HER2 Antigen



A—NCI-N87 细胞与 HER2-Lc-SMCC-DM1 的结合能力；B—NCI-N87 细胞与曲妥珠单抗（下）的结合能力；C—HER2-Lc-SMCC-DM1 和曲妥珠单抗对 NCI-N87 细胞的增殖抑制作用（n=3）。

图 4 HER2-Lc-SMCC-DM1 与曲妥珠单抗对 NCI-N87 细胞的作用

Fig.4 Inhibitory Activity of HER2-Lc-SMCC-DM1 and Trastuzumab on Cell Proliferation of NCI-N87 Cells

3 讨论

蛋白质剪接是翻译后的自发加工重排过程[14]，具有高剪接效率的断裂型内含肽 *Npu* DnaE 在蛋白质分子和结构生物学领域得到了广泛应用，不同应用条件下如何合理设计内含肽是研究热点之一[15]。例如，*Npu* DnaE 的序列为非严格保守序列，其基团性质、多肽二级结构与剪接反应密切相关，C 端的外显肽序列突变后可保持剪接活性，并可避免产物中引入外源氨基酸，从而解决了双特异性抗体装配时发生错配等关键性问题[16]。

为了实现 ADC 的均一性，本研究将 *Npu* DnaE 内含肽作为连接工具，其 N 端和 C 端分别与抗体和偶联小分子药物连接，其中 SMCC-DM1 由活化羧酸酯与 K 发生酰胺偶联反应，从而与 *Npu* DnaE C 端偶联[17]。为避免细胞毒素不必要的偶联，对 C 端序列中的其他 K 进行修饰，既减低空间位阻可能对剪接效率产生的影响，也避免 *Npu* DnaE^{C} 复杂混合物造成的无效连接。KADZIOCH 等指出电中性的 M 和带有正电荷的 R 取代能够保持原来的蛋白功能，相反的，带有负电荷的 E 则表现出缺乏相互作用而丧失了活性[18]。本研究根据氨基酸基团性质选择具有代表性的氨基酸对 *Npu* DnaE 内含肽 C 端序列中的 K 进行了不同的突变，并对突变后内含肽段进行了剪接活性的研究。以基团中碳链结构相近为原则，选择带负电的 E 与极性不带电的 Q，非极性且为最小基团的 G，和文献报道过的 M 和 R[18]。结果表明，M 与 R 取代的内含肽序列有剪接活性；含有酸性基团的 E 因为电离作用而无法发生剪接反应，但 Q 取代有剪接活性；而非极性的 G 取代则显示未发生剪接反应。本研究结果显示，极性不带电与极性正电荷（碱性）氨基酸取代的内含肽序列才具有剪接活性。

目前市面上的 ADC 的偶联主要是 K 或半胱氨酸偶联技术，因 K 或半胱氨酸位置的随机性，可在不同位置缀合不同数量的药物，从而导致了 ADC 异质性[19]。如 2020 年 3 月在中国上市的 T-DM1，其细胞毒素、Linker 复合物（SMCC-DM1）与抗体表面的 K 随机偶联，在一定程度上影响了药物的治疗窗口与药动学性质[12]。将 R 取代的内含肽 *Npu* DnaE^{C}-R 应用于抗体偶联药物定点连接的制备中，其突变后的内含肽 C 端不含 K 残基，能更有效地与 SMCC-DM1 定点偶联，成功制得具有均一性的 HER2-Lc-SMCC-DM1。其活性经过生物膜干涉技术和流式细胞术检测，结果显示内含肽剪切反应所需的还原、氧化步骤未对抗体的亲和力和活性产生影响，抗体分子在抗原结合能力及与靶细胞的结合上与曲妥珠单抗不具有显著性差异。针对 HER2 高表达的 NCI-N87 细胞株增殖抑制试验中，HER2-Lc-SMCC-DM1 表现出比曲妥珠单抗更好的体外抗肿瘤活性，且具有明显的浓度依赖性，说明细胞毒素成功连接，并具有良好的细胞增殖抑制作用。

本研究成功得到具有剪接活性的 3 种氨基酸取代的内含肽序列，并用 *Npu* DnaE^{C}-R 成功制备了具有偶联位点特异性的 ADC，为该领域的研究提供了技术支撑，并为临床制备均一有效的 ADC 提供了新思路。内含肽在 ADC 制备领域的研究工作仍有待进一步优化，如进一步优化、完善反应条件以提高突变后的内含肽剪接效率、引入其他远离活性位点的突变，在提升产率的同时减少单抗对 ADC 的竞争性结合[20—21]。此外，临床上效果良好的 T-DM1 平均偶联 3.5 个小分子化合物[22]，如何通过内含肽达到有效荷载，以符合其临床疗效中的药动学需求，也是未来研究的方向[23]。

参考文献：

[1] LIU Z H, FRUTOS S, BICK M J, *et al*. Structure of the branched intermediate in protein splicing [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, **111**(23): 8422-8427.

[2] SHAH N H, MUIR T W. Inteins: nature's gift to protein chemists [J]. *Chemical Sci*, 2014, **5**(1): 446-461.

[3] KANE P M, YAMASHIRO C T, WOLCZYK D F, *et al*. Protein splicing converts the yeast TFP1 gene product to the 69-kDa subunit of the vacuolar H^{+}-adenosine triphosphatase [J]. *Science*, 1990, **250**(4981): 651-657.

[4] CARVAJAL-VALLEJOS P, PALLISSÉ R, MOOTZ H D, *et al*. Unprecedented rates and efficiencies revealed for new natural split inteins from metagenomic sources [J]. *J Biol Chem*, 2012, **287**(34): 28686-28696.

[5] SHAH N H, DANN G P, VILA-PERELLÓ M, *et al*. Ultrafast protein splicing is common among cyanobacterial split inteins: implications for protein engineering [J]. *J Am Chem Soc*, 2012, **134**(28): 11338-11341.

[6] VOLKMANN G, IWAŸ H. Protein trans-splicing and its use in structural biology: opportunities and limitations [J]. *Mol Biosyst*, 2010, **6**(11): 2110-2121.

[7] VILA-PERELLÓ M. Expressed protein ligation: methods and protocols [M]. New York: Humana New York. 2020: 15-29.

[8] LI J, SUN W C, WANG B, *et al*. Protein trans-splicing as a means for viral vector-mediated *in vivo* gene therapy [J]. *Hum Gene Ther*, 2008, **19**(9): 958-964.

[9] BUSKIRK A R, ONG Y C, GARTNER Z J, *et al*. Directed evolution of ligand dependence: small-molecule-activated protein splicing [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, **101**(29): 10505-10510.

[10] ZETTLER J, SCHÜTZ V, MOOTZ H D. The naturally split *Npu* DnaE intein exhibits an extraordinarily high rate in the protein trans-splicing reaction [J]. *FEBS Lett*, 2009, **583**(5): 909-914.

[11] 黄晨燕, 郑茹萍, 李美娜, 等. 内含肽的功能与研究进展[J]. 农业开发与装备, 2017, (7): 36.

[12] GARCÍA-ALONSO S, OCAÑA A, PANDIELLA A. Trastuzumab emtansine: mechanisms of action and resistance, clinical progress, and beyond [J]. *Trends Cancer*, 2020, **6**(2): 130-146.

[13] SHAH N H, ERYILMAZ E, COWBURN D, *et al*. Extein residues play an intimate role in the rate-limiting step of protein trans-splicing [J]. *J Am Chem Soc*, 2013, **135**(15): 5839-5847.

[14] CHERIYAN M, PEDAMALLU C S, TORI K, *et al*. Faster protein splicing with the *nostoc punctiforme* DnaE intein using non-native extein residues [J]. *J Biol Chem*, 2013, **288**(9): 6202-6211.

[15] ROMERO-CASA, GORDO V, CASTRO J, *et al*. Protein splicing: from the foundations to the development of biotechnological applications [J]. *Methods Mol Biol*, 2020, **2133**: 15-29.

[16] 窦同璐, 陈 浩, 曹 津, 等. 断裂内含肽在含有抗体铰链区氨基酸序列的非天然外显肽中的剪接[J]. 中国药科大学学报, 2019, **50**(5): 606-613.

[17] DIESSNER J, BRUTTEL V, STEIN R G, *et al*. Targeting of preexisting and induced breast cancer stem cells with trastuzumab and trastuzumab emtansine(T-DM1) [J]. *Cell Death Dis*, 2014, **5**(3): e1149.

[18] KADZIOCH N P, GAST M, ORIGGI F, *et al*. Clustered lysine residues of the canine distemper virus matrix protein regulate membrane association and budding activity [J]. *J Virol*, 2020, **95**(1): e01269-20.

[19] JUNUTULA J R, RAAB H, CLARK S, *et al*. Site-specific conjugation of a cytotoxic drug to an antibody improves the therapeutic index [J]. *Nat Biotechnol*, 2008, **26**(8): 925-932.

[20] CHARI R V J, MILLER M L, WIDDISON W C. Antibody-drug conjugates: an emerging concept in cancer therapy [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2014, **53**(15): 3796-3827.

[21] SARMIENTO C, CAMARERO J A. Biotechnological applications of protein splicing [J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2019, **20**(5): 408-424.

[22] XU Z Y, GUO D D, JIANG Z L, *et al*. Novel HER2-targeting antibody-drug conjugates of trastuzumab beyond T-DM1 in breast cancer: trastuzumab deruxtecan(DS-8201a) and(Vic-) trastuzumab duocarmazine(SYD985) [J]. *Eur J Med Chem*, 2019, **183**: 111682.

[23] LIN K D, TIBBITTS J. Pharmacokinetic considerations for antibody drug conjugates [J]. *Pharm Res*, 2012, **29**(9): 2354-2366.