

DOI: 10.13376/j.cblls/2025090

文章编号: 1004-0374(2025)07-0904-15



郭敏, 康码(上海)生物科技有限公司创始人、董事长。2005年中国科学技术大学博士毕业后赴美, 在美国 Scripps 研究所任副教授、独立研究员、博士生导师, 从事蛋白质翻译合成相关基础理论研究。先后获 Sidney Kimmel 学者奖、AAF 学者奖及多国基金奖项; 发表 SCI 论文 70 余篇, 在 *Science*、*Nature*、*Nature Reviews Molecular Cell Biology* 等国际顶尖期刊发表论文 30 余篇, 是蛋白质合成生物学基础理论及新功能应用研究领域的国际知名学者。获批国务院特殊津贴, 全国归侨先进个人、上海市海外高层次人才、上海市领军人才、上海市优秀技术带头人、上海青年科技创业年度十大先锋。现任上海市侨联委员、浦东新区政协委员。

无细胞蛋白质合成技术的发展: 从实验室到工业制造

马菁平, 王海鹏, 董强, 郭敏*
(康码(上海)生物科技有限公司, 上海 200000)

摘要: 无细胞蛋白质合成技术 (cell-free protein synthesis, CFPS) 是一种在体外环境中利用细胞来源的核糖体、酶系、tRNAs 及能量系统, 直接以 DNA 或 mRNA 为模板合成蛋白质的技术。近几十年来, 随着合成生物学、基因编辑技术、自动化装置和人工智能的快速发展, CFPS 在基础研究、生物制药、工业催化等领域的应用价值显著提升。本文从技术进展、研究成果、产业化、现存问题及未来前景等方面进行综述, 结合近年国内外研究案例, 探讨这一极具未来意义的技术的发展脉络与挑战。

关键词: 无细胞蛋白质合成; 实验室; 商业化; 工业制造

中图分类号: Q816 **文献标志码:** A

Advancements in cell-free protein synthesis (CFPS) technology: from laboratory to industrial production

MA Jing-Ping, WANG Hai-Peng, DONG Qiang, GUO Min*
(Kangma-Healthcode (Shanghai) Biotech Co., Ltd., Shanghai 200000, China)

Abstract: Cell-free protein synthesis (CFPS) technology is an *in vitro* method that utilizes ribosomes, enzymatic systems, tRNAs, and energy components isolated from cells to directly synthesize proteins using DNA or mRNA as templates. Over the past decades, driven by rapid advancements in synthetic biology, gene-editing technologies, automation platforms and AI, CFPS has significantly enhanced its application value in basic research, biopharmaceuticals, industrial catalysis, and other fields. This review discusses the historic origin, technological progress, research achievements, industrialization efforts, existing challenges and future prospects of CFPS. By incorporating recent domestic and international research cases, it explores the developmental trajectory and key hurdles of this futuristic technology.

Key words: cell-free protein synthesis; laboratory; commercialization; industrial production

收稿日期: 2025-06-12

基金项目: 上海市科学技术委员会研发项目(1802H1B0300, 220H1218100, 23XD1430300)

*通信作者: E-mail: guomin@healthcodon.com

蛋白质是生命体最重要的生物大分子, 具有极其广泛的功能和作用。传统的生物技术通常是利用细胞等生命活体来合成需要的蛋白质。然而, 由于细胞存在生长、维护、排斥、退化、变异, 乃至污染等诸多限制因素, 使用细胞生命形式作为蛋白质合成体系一直面临着很多限制。随着当今人工智能技术高速发展, 大量设计新型蛋白质分子和大规模制造目标活性蛋白质的需求日盛, 传统的活体细胞合成蛋白质技术更是捉襟见肘, 成为现代生物制造和生物医药快速发展的瓶颈。

无细胞蛋白质合成技术就是突破了自然界的“细胞工厂”模式, 将细胞内进行的蛋白质生产过程搬到了细胞外, 从单个细胞各自为战的小作坊, 变成了集团化生产的体外蛋白质合成大厂。由于该技术的简单性、开放性、便携性、通用性和易放大性, 为蛋白质合成的工程化提供了极大的自由度, 让“合成万物”成为可能。

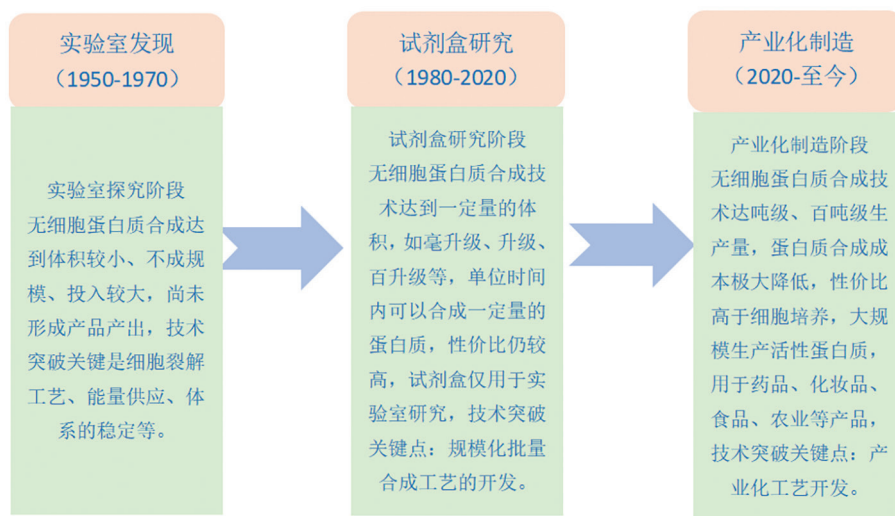
无细胞合成 (cell-free synthesis) 的种类繁多, 其中尤以无细胞蛋白质合成过程最为复杂, 应用也最为广泛。无细胞蛋白质合成研究的起源可以追溯到 70 年前, 自 1954 年起, 经历了 3 个发展阶段: 实验室发现、试剂盒研究、产业化制造 (图 1)。

1 无细胞蛋白质合成技术的出现: 实验室发现

20 世纪 50 年代初, 第二次世界大战结束后, 全球发达国家都致力于科技竞争, 生命科学发展如火如荼。随着 1953 年 Watson 和 Crick 提出 DNA

双螺旋结构模型^[1], DNA 作为生命遗传信息的这一关键属性被揭示, 生物学界开始聚焦于“遗传信息如何指导生命活动”这一核心问题。在这一背景下, 哈佛大学的 Zamecnik 和 Keller 于 1954 年提出了突破性的实验构想——通过无细胞系统, 在体外利用细胞中提取的活性物质, 直接研究氨基酸聚合为蛋白质的反应过程, 开创了体外蛋白质合成研究的先河^[2]。

1961 年, 美国生物学家 Nirenberg 和 Matthaei 在使用大肠杆菌制备的 S30 提取物制作的无细胞体系中, 加入人工合成的多聚尿嘧啶核苷酸 (poly-U), 成功翻译出一条仅含苯丙氨酸的多肽链。该实验验证了 RNA 而非 DNA 指导蛋白质合成的观点, 并首次提及“无细胞蛋白质合成系统” (cell-free protein synthesis, CFPS) 的概念^[3]。CFPS 作为一个通用平台则由 Zubay 等^[4]在 1973 年的方法学综述中得到系统化阐述。1965 年, 来自美国威斯康星大学麦迪逊分校的 Khorana 团队合成了具有特定重复序列的 RNA, 如二聚体、三聚体、四聚体重复序列如 (UCU)_n、(CUC)_n; (UAC)_n、(ACU)_n、(CUA)_n; (... U A G U A G ...)、(... U A A U A A ...)、(... UGAUGA...), 使用大肠杆菌 S30 提取物体系进行实验, 成功破译了所有 64 个三联体密码子, 并发现了 UAA、UAG、UGA 三个终止密码子^[5]。同年, Holley 团队使用酶促裂解加二维纸色谱的方法解析出第一个转运 RNA (tRNA) 的全序列, 进一步证明 tRNA 在氨基酸插入过程中的关键作用^[6]。1968 年,



无细胞蛋白质合成技术出现70年来经历了3个发展阶段: 实验室发现(1950–1970)、试剂盒研究(1980–2020)、产业化制造(2020–至今)。

图1 无细胞蛋白质合成技术的3个发展阶段

美国生物学家 Holley 及其团队通过研究 tRNA 在蛋白质合成中的作用，使用氨基酸分析和多种分离技术(如凝胶电泳、色谱分析等)首次纯化并完整测定了单一 tRNA——丙氨酸 tRNA (tRNA^{Ala}) 的序列，并证明 tRNA 的分子结构是由约 70~80 个核苷酸组成的(77 个核苷酸)，具有独特的“三叶草”结构和三维 L 型折叠。tRNA 的发现及其在蛋白质合成中的作用，标志着分子生物学的一个重大突破，为氨基酸的准确插入提供了分子基础^[7]。1968 年，Nirenberg、Khorana 和 Holley 因为在破译遗传密码方面的杰出贡献，共同获得诺贝尔生理学或医学奖^[6]。无细胞蛋白质体外合成的实验技术，作为人们当时仅有的可控蛋白质合成手段，起到了重要的工具作用。至此，CFPS 完成第一阶段的实验室进化。

2 无细胞蛋白质合成技术的商业化尝试：试剂盒研究

从 1958 年开始到 2000 年的这 40 多年间，基于不同细胞来源的蛋白质体外合成实验陆续获得实现(表 1)。1958 年，来自洛杉矶希望城(City of Hope)医院的 Schweet 团队首次利用兔网织红细胞提取物完成体外合成兔血红蛋白的实验，获得首个人工无细胞合成的活性蛋白质^[8]。1964 年，Pratt 等^[9]最早报道了小麦胚芽裂解物的蛋白质合成活性。2000 年，Endo 团队通过优化小麦胚芽提取物制备流程——去除抑制蛋白的 ENDEXT 技术，将脱脂小麦胚芽匀浆，经多次超速离心去除大颗粒及抑制因子，得到高活性提取液；补充能量再生体系(creatine phosphate/kinase)，在双层或连续流动反应器中高效翻译，大幅提升了体系产量^[10]。1972 年，Sampson 等^[11]利用大鼠和小鼠肝细胞裂解物，实现了从小鼠和兔网织红细胞中提取的血红蛋白 mRNA 在体外的高效翻译，证明了哺乳动物组织提取物亦可支持完整蛋白质合成。1976 年，Pelham 等^[12]进一步改良了兔网织红细胞体系，并发现 HeLa、Krebs II 腹水瘤、CHO 等多种来源的哺乳动物细胞均可通过制备无细胞系统，在体外高效翻译异源 mRNA，为病毒 RNA 翻译及启动复合物研究提供了强有力工具。1978 年，来自美国的 Young 团队报道了用酿酒酵母 S-30 裂解物体外翻译内源 mRNA 的研究，确立了酿酒酵母 S-30 裂解物具备翻译活性的重要事实，为后续酵母来源无细胞蛋白质合成系统的开发奠定了基础^[13]。2009 年，日本岛津公司的 Suzuki 等^[14]使用基于 *Spodoptera frugiperda*

Sf21/Sf9 细胞与含杆状病毒 polyhedrin 5'-UTR 增强子的表达载体，开发了昆虫 Sf21/Sf9 细胞来源的无细胞系统；2010 年，岛津公司的 Ezure 等^[15]进一步详述了 Sf21/Sf9 提取物体系的组分配置及应用示例，显示可以用于复杂蛋白质和多聚体的合成。

随着无细胞蛋白质合成实验室技术的成熟，制造、销售实验室用无细胞蛋白质合成试剂盒的产品和企业逐步开始出现。最早提供商业化可购买的无细胞蛋白质合成试剂盒的公司，是来自美国威斯康星州麦迪逊市的 Promega。Promega 于 1992 年推出首款商业化无细胞蛋白合成试剂盒——TNT® Coupled Reticulocyte Lysate System。首发试剂盒产品中包括 T7 Quick (Cat.# L1170) 和 SP6 Coupled (Cat.# L4600) 两种体系，分别用 T7 RNA 多聚酶和 SP6 RNA 多聚酶转录 DNA 模板为 mRNA。这款产品首次在商业化试剂盒中将 DNA 模板转录成 mRNA 和后续的蛋白质翻译反应集成于一个反应管中，从加入 DNA 模板开始，在 30 °C、60~90 min 内即可快速产出模板编码的目标蛋白(常规产量可达约 5 µg/mL)，并可方便地添加辅因子、非天然氨基酸或其他如微粒体等以实现蛋白质翻译后修饰(post-translational modifications, PTM)。此款产品的主要优势在于操作简便、可定制化和支持信号肽剪切/糖基化等 PTM。其“开放式”(open)体系还允许研究者对反应体系中的各种组分，如模板 DNA/mRNA、氨基酸、能量系统、辅酶、缓冲液、修饰酶等进行灵活添加、调整或替换。虽然这套产品受限于当时的技术水平，具有体积小(50 µL)、产量有限(≤ 5 µg/mL)、对离子条件敏感、批次间活性可能波动以及单次成本较高等缺点，但作为无细胞蛋白质合成技术商业化的开创者，它无疑是一款成功的突破。自此，从 20 世纪 90 年代起，全球无细胞蛋白质体外合成领域迎来了小型研发试剂盒时代，无细胞蛋白质合成产业开始出现。

2001 年，日本的 Shimizu 团队开发了一种名为 PURE 的系统(protein synthesis using recombinant elements)^[16]。PURE 系统的技术背景源于对传统细胞裂解提取液系统中存在的稳定性差和组分不确定问题的解决，首次通过使用纯化的组分，在体外重构了一个原核来源的蛋白质合成系统。相较于传统路线，PURE 系统实现了更高的可控性和稳定性，适用于基础生化研究、蛋白质工程、合成生物学等多个领域。PURE 系统使用高度纯化的 T7 RNA 聚合酶和 31 种翻译因子(如起始因子、延伸因子、终

表1 历史上典型的非同源的蛋白质体外合成体系的实验室实现

序号	物种/来源	实验室/城市	年代	技术路线	合成示例蛋白	备注
1	金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	Gale Lab, Cambridge, UK	1954	标记的谷氨酸(glutamic acid)在蛋白质组分中的放射性富集, 表明该氨基酸被整合至新合成的细菌蛋白中	多肽	多细菌蛋白混合
2	小鼠腹水细胞 (<i>Cellulae tumoris ascitis Krebsii</i>)	Keller Lab, New York, USA	1957	腹水瘤细胞裂解提取制备	多肽	mRNA依赖合成首次验证
3	大鼠肝细胞 (<i>Rattus norvegicus</i>)	Zamecnik Lab, Boston, USA	1958	肝细胞裂解提取制备, 放射性氨基酸掺入	简单多肽	首次证明体外氨基酸掺入蛋白
4	兔网织红细胞 (<i>Oryctolagus cuniculus</i> reticulocytes)	City of Hope, LA, USA	1958	含Mg ²⁺ 、K ⁺ 、ATP/GTP等能量底物及兔网织红细胞内源mRNA, 从新鲜兔网织红细胞中制备的核糖体等组分中加入放射性标记的氨基酸	兔血红蛋白	首次完成完整蛋白质分子的细胞外合成
5	大肠杆菌(<i>E. coli</i>)	NIH, Bethesda, MD, USA	1961	S30分离提取+合成 poly-U RNA	Poly-phenylalanine	加入poly-U的试管在1 h反应后测得约38 000 cpm
6	小麦胚芽(Wheat germ, <i>Triticum aestivum</i> germ)	Weizmann Institute, Rehovot, Israel	1973	小麦胚芽制备处理, 20种氨基酸、能量(ATP、GTP、磷酸肌酸和肌酸激酶)、金属离子(Mg ²⁺ 、K ⁺)、缓冲液(HEPES或Tris-HCl)等	TMV衣壳蛋白、兔血红蛋白多肽	首个植物细胞来源的细胞外蛋白质合成
7	兔网织红细胞 (<i>Oryctolagus cuniculus</i> reticulocytes)	Pelham & Jackson Lab, Cambridge, UK	1976	CaCl ₂ /微球菌核酸酶处理+EGTA失活	多种mRNA引导蛋白(≤200 kDa)	恢复75%活性, 支持~200 kDa 蛋白
8	人HeLa细胞 (<i>Homo sapiens</i>)	RIKEN, Yokohama, Japan	1983	从人HeLa细胞中获得, 以帽依赖性和IRES介导的方式有效翻译mRNA。使用重组GADD34和2-氨基嘌呤降低eIF2 α 的磷酸化状态, 显著提高了蛋白质产量	荧光素酶	首个人类细胞来源的翻译机器的体外蛋白质合成
9	脉孢菌 (<i>Dictyostelium discoideum</i>)	A.S. Niamere&S. L. Barclay Lab, USA	1987	S-30组分, Mg ²⁺ (5 mmol/L)、K ⁺ (120 mmol/L)	内源多肽(20~100 kDa), 热休克蛋白	35S的Met 掺入线性 >2 h
10	大肠杆菌(<i>E. coli</i>)	RIKEN, Japan	2001	PURE系统, 体外重组组分一次性投入完成反应	荧光素酶	~160 μ g/mL/h
11	利什曼原虫 (<i>Leishmania tarentolae</i>)	Alexandrov Lab, London, UK	2011	PCR合成模板+SITS 引导CFPS	Rab GTPases	50 μ g/mL, 折叠效率高
12	烟草细胞(BY-2, <i>Nicotiana tabacum</i> cellulae)	Fraunhofer IME, Aachen, Germany	2014	Percoll渐变离心制备 BYL, 批量与透析反应	eYFP、荧光素酶	eYFP: 80 μ g/mL、400 μ g/mL (透析); Luciferase: 100 μ g/mL

表1 历史上典型的非同来源的蛋白质体外合成体系的实验室实现(续表)

序号	物种/来源	实验室/城市	年代	技术路线	合成示例蛋白	备注
13	CHO细胞 (<i>Cricetulus griseus</i> ovarii cellulae)	Fraunhofer IBMT, Potsdam-Golm, Germany	2014	CHO裂解提取体外合成	荧光素酶、糖基化IgG	约50 µg/mL, 可以糖基化
14	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	Northwestern University, Evanston, IL, USA	2014	结合体外转录翻译体系; 利用烟草花叶坏死病毒Ω序列(cap无依赖)和50 nt poly(A)尾优化启动; 两步PCR高通量制备线性DNA模板	荧光素酶、GFP、CAT	1.5 h反应后7~12.5 µg/mL 活性蛋白
15	克鲁维酵母 (<i>Kluyveromyces lactis</i>)	康码(上海)生物 科技有限公司, 中国上海	2016	系统化改造, 结合设备和工艺开发的规模化 IVDTT反应	荧光素酶、血红蛋白、GFP、Kansetin、抗体等多种类型功能蛋白	1~2 mg/mL, 3 h反应可延长至20 h

止因子、氨酰 tRNA 合成酶等, 均分别用大肠杆菌表达, 通过亲和层析结合凝胶过滤方法纯化, 获得纯度大于 95% 的原料), 以及从大肠杆菌细胞中提取的 70S 核糖体 (含 54 种蛋白质亚基和核糖核酸), 再按照各个组分一定的浓度比例, 进行体外重构而成。PURE 系统还使用体外预先转录出的 mRNA 模板, 既保证了相关因子、酶、tRNA、底物和能量分子的充足, 又可以减少传统方法中的杂蛋白、核酸, 以及核酸酶和蛋白酶等干扰因素, 从而实现更加稳定、一致的体外蛋白质合成, 成为优良的实验室研发体系。但 PURE 系统的分别制备高纯度原料的技术路线也造成了其量产难度大、反应体积小和制造成本高的缺点^[17]。同时, 其大肠杆菌来源的核糖体和其他酶因子, 也使得其无法用于真核系统蛋白质合成研究。但无论如何, PURE 系统开创了原料高质量制备, 通过增加原料纯度和定制成分比例, 以提高体外蛋白质合成系统稳定性和均一性的方法, 为后来量产级高效体外合成系统的开发提供了重要线索。

基于 Shimizu 等 2001 年开发的 PURE 体系, 日本的 GeneFrontier (现由 Cosmo Bio USA 代理) 于 2011 年进一步推出 PUREflex 1.0, 可实现最高约 160 µg/mL 的蛋白产量, 并在 2015 年升级为 PUREflex 2.0, 将产量提升至约 600 µg/mL^[18]; 美国的 Daicel Arbor Biosciences 于 2018 年在 SynBioBeta 大会上发布首款 myTXTL Linear DNA Expression System^[19], 并于 2024 年 6 月推出 myTXTL Pro 和 Antibody/DS 试剂盒, 以“即加 DNA, 数小时内获得分析级产量”的简便流程助力抗体发现与蛋白质工程^[20]; Thermo Fisher Scientific 则于约 2011 年推出 1-Step Human Coupled IVT Kit, 利用 HeLa 细胞裂解物在 90 min 内生成高达 750 µg/mL 的功能性蛋白, 为真核蛋白研究提供了高产、高保真度的方案^[21]。

无细胞蛋白质合成技术发展也经历了从简单到复杂的技术路线。早期的大部分无细胞蛋白质合成系统, 其合成机器如核糖体、氨酰 tRNA 合成酶、翻译因子、折叠伴侣等主要来自原核细胞, 如 *E. coli* 等。目前常见的无细胞体外蛋白质合成体系来自原核细胞, 如 *Bacillus megaterium*^[22]、*Vibrio natriegens*^[23]、*Pseudomonas putida*^[24]、*Streptomyces venezuelae*^[25]。

与此相对, 真核细胞来源的蛋白质翻译体系具有能够合成复杂蛋白质和复合物、更好的分子保真性、序列同源度更高、不含内毒素等多种优点。但是与原核细胞相比, 真核细胞中的蛋白质合成体系

构成更为复杂。首先,细胞中基本的、进化上保守的、负责完成蛋白质合成的酶、80S核糖体亚基、翻译起始因子、翻译延伸因子以及翻译终止因子等统称为翻译机器(translation machinery),而在真核细胞中,翻译机器的种类多达288种(以酵母细胞为例,哺乳动物的种类更多)^[26],远远超过原核细胞中的翻译机器的种类数量(129种,以*E. coli*为例)(图2)。其次,真核细胞中还存在大量的翻译调控因子(如GCN2、GCN4、mTOR等)和调控通路(如内质网应激引发的PERK通路、病毒感染引起的PKR通路、低铁离子引起的HRI通路、mRNA修饰通路等)^[27,28],以及更加复杂的分子伴侣和蛋白质质量控制系统(Hsp70、Hsp100、Zuo1、Ssb、Ssz1、Rqc1、Tae2、Ltn1、Cdc48、Npl4、Ufd1等)^[29-31]。此外,真核细胞中天然的mRNA转录与蛋白质合成的物理空间和时间分割的特征,使得虽然真核细胞来源的体外蛋白质合成具有高质量、高纯度的优点,但同时也伴随着高难度、低效率、高成本的挑战,成为实现大规模体外蛋白质合成产业化的巨大壁垒。目前常见的无细胞体外蛋白质合成体系来自如酵母细胞^[32]、小麦胚芽细胞^[33]、兔网织红细胞^[34]、中国仓鼠卵巢细胞^[35]、昆虫细胞^[36]、烟草细胞^[37]等真核细胞。

基于原核和真核细胞中蛋白质合成机器的不同特性,利用不同的制备技术路线,过去20年中,全球生物公司陆续推出了数十种有代表性的商业化实验室级的CFPS试剂盒系统。目前上市的无细胞蛋白表达系统来源的系统包括大肠杆菌系统(*E. coli* extract, ECE)、酵母细胞(D2P)、兔网织红细胞(rabbit reticulocyte lysate, RRL)、麦胚(wheat germ extract, WGE)、昆虫(insect cell extract, ICE)和来源细胞系统(如HeLa cell)。参与制作和销售的代表公司包括Promega、Takara、Thermo、NEB以及康码-Healthcode等(表2),他们将无细胞蛋白质合成反应带入了广大科研实验室,成为研究蛋白质合成机理、AI分子设计、高通量蛋白质合成、抗体药物开发等多方面的科研利器,大大促进了相关研究的进展。但 these 产品,仍都具有反应体积小、单位价格高、性价比低、常温不稳定,以及缺乏专用合成设备和上下游配套的分离、纯化、定量系统等问题,导致无细胞蛋白质合成技术长期停留在实验室阶段。同时,这些试剂盒产品尚不足以支撑大规模、成体量的产业化下游产品制造和规模化市场应用。

3 无细胞蛋白质合成技术的商业化: 上市公司

无细胞蛋白质合成系统(CFPS),具有多种应用场景,具有巨大的商业价值,如药物筛选、体外诊断、基础研究、药物制造及战场或现场应急等场景^[38-40]。CFPS系统正在成为工业和高通量生产蛋白质疗法的强大平台,为解决生物制药工程中的问题提供了替代解决方案。此外,CFPS系统已成功应用于高通量药物筛选、非天然氨基酸导入、大规模蛋白质疗法生产、定制抗癌疫苗。这些成就突显了CFPS系统在未来的生物制药工程中具有巨大的应用潜力^[41]。

目前,基于无细胞蛋白质体外合成技术,已经出现不少商业化应用公司,分布在全球多个国家,但鉴于大多数公司均处于产品研发、临床或提供对外服务阶段,尚未有成熟商业化的终端产品获批销售,这里选取了几家上市公司重点介绍。

3.1 Sutro Biopharma公司

2003年,美国加州南旧金山的Sutro Biopharma是目前全球第一家上市的专注于无细胞蛋白生产商业化药物开发的公司(NASDAQ: STRO)。公司围绕专有的XpressCF/XpressCF+平台,使用大肠杆菌来源的无细胞蛋白质合成技术,专注于生物药物的研发。管线涵盖CD74和叶酸受体 α 靶向ADC(如STRO-001、STRO-002)、细胞因子、双特异性抗体等;生产工艺已从1000L(可产出 ≥ 500 L无细胞合成反应),计划放大至可实现5000~10000L商业化批次^[42],并与VGXI、Boehringer Ingelheim等CMO公司合作生产临床用质粒和蛋白质^[43];Sutro通过“技术许可+里程碑/销售分成”与“大规模定制生产”并行的合作模式与包括Merck、Ipsen等,持续推动产能和管线扩张。Sutro目前已有2款产品获得临床审批,处于临床试验阶段^[44]。自Sutro之后,陆续出现了多家以无细胞蛋白质合成技术合成蛋白质分子为目的进行商业化的上市公司(表3)。

3.2 Vaxcyte公司

通过技术分拆,2015年,Sutro衍生出子公司Vaxcyte,专注于疫苗创新。通过使用现代合成技术,包括先进的化学技术和其无细胞蛋白质合成平台XpressCF(由Sutro Biopharma独家授权),该公司正在开发广谱结合疫苗和新型蛋白疫苗,以预防或治疗细菌性传染病。其主要候选疫苗为2款肺炎球菌结合疫苗(pneumococcal conjugate vaccine, PCV)。VAX-24是一种III期就绪的24价广谱无载体PCV,

原核细胞 (以E.coli为例)

核糖体蛋白		核糖体蛋白	
50S ribosomal protein L1	50S ribosomal protein L23		
50S ribosomal protein L2	50S ribosomal protein L24		
50S ribosomal protein L3	50S ribosomal protein L25		
50S ribosomal protein L4	50S ribosomal protein L27		
50S ribosomal protein L5	50S ribosomal protein L28		
50S ribosomal protein L6	50S ribosomal protein L29		
50S ribosomal protein L7/L12	50S ribosomal protein L30		
50S ribosomal protein L9	50S ribosomal protein L31		
50S ribosomal protein L10	50S ribosomal protein L32		
50S ribosomal protein L11	50S ribosomal protein L33		
50S ribosomal protein L13	50S ribosomal protein L34		
50S ribosomal protein L14	50S ribosomal protein L35		
50S ribosomal protein L15	50S ribosomal protein L36		
50S ribosomal protein L16	30S ribosomal protein S1		
50S ribosomal protein L17	30S ribosomal protein S2		
50S ribosomal protein L18	30S ribosomal protein S3		
50S ribosomal protein L19	30S ribosomal protein S4		
50S ribosomal protein L20	30S ribosomal protein S5		
50S ribosomal protein L21	30S ribosomal protein S6		
50S ribosomal protein L22	30S ribosomal protein S7		

核糖体蛋白		核糖体蛋白	
30S ribosomal protein S8	30S ribosomal protein S18		
30S ribosomal protein S9	30S ribosomal protein S19		
30S ribosomal protein S10	30S ribosomal protein S20		
30S ribosomal protein S11	30S ribosomal protein S21		

核糖体RNA (rRNA)	
16S rRNA	
23S rRNA	
5S rRNA	

质量控制系统	
ArfA	
YaeJ	
SspB	

翻译起始因子	tRNA	氨酰-tRNA合成酶	
MTF	49种	LeuRS	
IF1	氨酰-tRNA合成酶	LysRS	
IF2		AlaRS	
IF3		ArgRS	
翻译延伸因子	AsnRS	PheRS	
	EF-G	ProRS	
	EF-Tu	AspRS	
EF-Ts	CysRS	SerRS	
翻译终止因子	GlnRS	ThrRS	
	RF1	GluRS	TrpRS
	RF2	GlyRS	TyrRS
RF3	HisRS		
翻译回收因子	IleRS	ValRS	
RRF			

分子伴侣和转运蛋白	分子伴侣和转运蛋白	分子伴侣和转运蛋白
SRP	CbpA	BamA
Tat	DjlA	BamB
YidC	GrpE	BamC
SecA	NapD	BamD
SecE	DmsD	BamE
SecYEG	DnaJ	LoIA
SR	GroES	LoIB
TF	GroEL	LoICDE
DnaK	Hsp90	Hsp90
SurA	HdeA	DsbA
Skp	Spy	DsbB
DegP	PpiA	DsbC
FkpA	PpiD	

真核细胞 (以酵母为例)

核糖体蛋白		核糖体蛋白		核糖体蛋白		核糖体蛋白	
60S ribosomal protein L12	60S ribosomal protein L29	60S ribosomal protein L15	40S ribosomal protein S30				
60S ribosomal protein L17	60S ribosomal protein L8	60S ribosomal protein P1	40S ribosomal protein S24				
60S ribosomal protein L18	60S ribosomal protein L27	60S ribosomal protein P2	40S ribosomal protein S7				
60S ribosomal protein L1	60S ribosomal protein L43	60S ribosomal protein P0	40S ribosomal protein S26				
60S ribosomal protein L31	60S ribosomal protein L32	60S ribosomal protein P9	40S ribosomal protein S3				
60S ribosomal protein L6	60S ribosomal protein L23	60S ribosomal protein L40	40S ribosomal protein S5				
60S ribosomal protein L26	60S ribosomal protein L25	60S ribosomal protein L41	40S ribosomal protein S29				
60S ribosomal protein L4	60S ribosomal protein L9	40S ribosomal protein S21	40S ribosomal protein S27				
60S ribosomal protein L14	60S ribosomal protein L30	40S ribosomal protein S19	40S ribosomal protein S0				
60S ribosomal protein L37	60S ribosomal protein L24	40S ribosomal protein S11	40S ribosomal protein S8				
60S ribosomal protein L34	60S ribosomal protein L19	40S ribosomal protein S17	40S ribosomal protein S16				
60S ribosomal protein L38	60S ribosomal protein L13	40S ribosomal protein S18	40S ribosomal protein S9				
60S ribosomal protein L7	60S ribosomal protein L21	40S ribosomal protein S4	40S ribosomal protein S6				
60S ribosomal protein L22	60S ribosomal protein L9	40S ribosomal protein S1	40S ribosomal protein S12				
60S ribosomal protein L10	60S ribosomal protein L16	40S ribosomal protein S25	40S ribosomal protein S15				
60S ribosomal protein L5	60S ribosomal protein L35	40S ribosomal protein S22	40S ribosomal protein S2				
60S ribosomal protein L33	60S ribosomal protein L28	40S ribosomal protein S14	40S ribosomal protein S13				
60S ribosomal protein L42	60S ribosomal protein L11	40S ribosomal protein S20	40S ribosomal protein S28				
60S ribosomal protein L36	60S ribosomal protein L20	40S ribosomal protein S10	40S ribosomal protein S20				
60S ribosomal protein L2	60S ribosomal protein L3	40S ribosomal protein S23					

核糖体RNA (rRNA)	翻译延伸因子	tRNA	质量控制系统	
18S rRNA	PABP	53种	Rqc1	
25S rRNA	eIF2 α	氨酰-tRNA合成酶	Rqc2	
5.8S rRNA	eIF2 β		Ltn1	
5S rRNA	eIF2 γ		Cdc48	
翻译起始因子	翻译延伸因子	AlaRS	Vms1	
		ArgRS	翻译调控因子	
		AsnRS		Gen2
		AspRS		PKR
		CysRS		PERK
		GlnRS		HRI
		GluRS		Sch9
		GlyRS		Sfp1
		HisRS		TOR1
		IleRS		LST8
LeuRS	Kog1			
LysRS	Tco89			
MetRS	Gtr1			
PheRS	Gtr2			
ProRS	Ego1			
SerRS	Ego2			
ThrRS	Ego3			
TrpRS	EAP1			
TyrRS	Caf20			
ValRS				

分子伴侣和转运蛋白	分子伴侣和转运蛋白	分子伴侣和转运蛋白	分子伴侣和转运蛋白	分子伴侣和转运蛋白	分子伴侣和转运蛋白
Ssa1	Scj1	Hsp82	NatC	Hsf1	SND2
Ssa2	Mdj1	AHA1	NatE	SRP54	SND3
Ssa3	Sis1	Hch1	NatF	SRP21	EGD2
Ssa4	Djpl	CDC37	NMT1	SRP14	EGD1
Ssb1	Ca1	Sba1	TCP1	SRP72	BTT1
Ssb2	Erj5	Sti1	CCT2	SEC65	Get3
Kar2	Jjj1	Cpr6	CCT3	SRP68	Get4
Ssc1	Jjj3	Cpr7	CCT4	SR α	Get5
SSq1	Jac1	Ppt1	CCT5	SR β	Get1
Emc10	Cwc23	Cns1	CCT6	SEC61	Get2
Ssz1	Swa2	She4	CCT7	SEC62	EMC1
Sse1	Jem1	Tah1	CCT8	SEC71	EMC2
Sse2	Jid1	Pih1	GIM1	SEC72	EMC3
Lhs1	Jj2	SGT2	GIM2	Ssh1	EMC4
Fes1	Sec63	SGT1	GIM3	SSS1	EMC5
Sil1	Zuo1	IDS2	GIM4	SBH1	EMC6
Sn11	Mdj2	MetAp1	GIM5	WBP1	EMC7
Ydj1	Pam18	MetAp2	GIM6	SWP1	
Xdj1	Hlj1	NatA	Ufd1	STT3	
Apj1	Hsc82	NatB	Np14	SND1	

细胞中的蛋白质翻译过程可能是所有合成路径中最复杂的。从mRNA模板开始，蛋白质翻译过程中的分子机器主要包括核糖体、氨酰-tRNA合成酶、tRNA、翻译起始因子、翻译延伸因子、翻译终止因子、核糖体释放因子、质量控制系统、翻译调控因子，以及分子伴侣等。真核细胞还有更加复杂的调控，更多的tRNA种类。统一计算，原核细胞(如大肠杆菌)和真核细胞(酿酒酵母)中参与蛋白质合成和调控的这些关键翻译机器(蛋白质、酶、分子伴侣、rRNAs、tRNAs等)的总数分别达288种和129种。

图2 真核与原核细胞中蛋白质翻译过程中的关键分子机器

正在开发用于预防侵袭性肺炎球菌病。VAX-31 是公司的下一代 31 价 PCV，是目前临床上最广泛

的 PCV 候选药物。Vaxcyte 的其他在研管线还有新型 A 组链球菌疫苗、新型治疗性牙周炎疫苗以及新

表2 商业化的实验室级无细胞蛋白质合成体系产品及代表企业

序号	产品名称	系统来源/技术类型	公司	表达得率 [*] (标准蛋白或上限)	反应体积/产品规格
1	PURExpress In Vitro Protein Synthesis Kit	<i>E. coli</i> recombinant/reconstitution	New England Biolabs, USA	0.25 mg/mL	10× 25 μL
2	TnT Quick Coupled Transcription/Translation System	RRL	Promega, USA	5 μg/mL	40 × 50 μL
3	Flexi Rabbit Reticulocyte Lysate System	RRL	Promega, USA	0.1~0.2 mg/mL	30× 50 μL
4	TnT Coupled Wheat Germ Extract System	Wheat germ	Promega, USA	10~100 μg/mL	40 × 50 μL
5	TnT SP6 High-Yield wheat Germ Protein Expression System	Wheat germ	Promega, USA	10~100 μg/mL	10× 50 μL
6	TnT T7 Insect Cell Extract Protein Expression System	<i>Sy21</i> system	Promega, USA	25~50 μg/mL	40× 50 μL
7	<i>E. coli</i> S30 Extract System	<i>E. coli</i>	Promega, USA	0.5~1 mg/mL	30× 50 μL
8	myTXTL®Pro Cell-Free Expression Ki	<i>E. coli</i>	Arbor Biosciences, USA	1 mg/mL	300 μL
9	Retic Lysate IVT™ Kit	RRL	Thermo Fisher Scientific, USA	0.1~0.2 mg/mL	ND*
10	MembraneMax™	<i>E. Coli slyD</i> -Extract	Thermo Fisher Scientific, USA	0.05~0.1 mg/mL	ND*
11	Expressway™ Mini/Maxi	<i>E. coli</i>	Thermo Fisher Scientific, USA	0.5 mg/mL	1 mL
12	1-Step CHO High-Yield IVT Kit	CHO	Thermo Fisher Scientific, USA	0.2~0.3 mg/mL	4 mL
13	1-Step Human High-Yield IVT Kit	HeLa	Thermo Fisher Scientific, USA	0.2~0.3 mg/mL	200 μL
14	In Vitro (cell-free) LEXSY	<i>Leishmania tarentolae</i>	Jena Bioscience, Germany	10~50 μg/mL	2× 500 μL
15	AccuRapid™	<i>E. coli</i>	BIONEER, South Korea	0.1 mg/mL	24× 45 μL
16	RTS 500 wheat germ	Wheat germ	Biotechrabbit, Germany	0.1 mg/mL	5× 1 mL
17	RTS 9000 <i>E. coli</i> HY	<i>E. coli</i>	Biotechrabbit, Germany	0.4~0.5 mg/mL	10 mL
18	RTS 100 <i>Sf21</i>	<i>Sf21</i>	Biotechrabbit, Germany	0.05 mg/mL	5× 50 μL
19	PUREfrex™1.0	Developed based on PURE system technology	Eurogentec, Belgium	0.16 mg/mL	250 μL
20	Next Generation Cell Free Protein Expression Kit	Wheat germ	Sigma-Aldrich, USA	0.5~1 mg/mL	ND*
21	iPack/iPE-Quick™ Kit	<i>E. coli</i>	Sigma-Aldrich, USA	0.2 mg/mL	ND*
22	WEPRO® TT Premium ONE/PLUS Expression Kit	Wheat germ	CellFre Sciences Co. Ltd., Japan	0.1~0.2 mg/mL	24× 55 μL
23	ALiCE™ Cell-Free Protein Expression	Tobacco BY-2	Leniobio, Germany	2 mg/mL	5 mL
24	Human Cell-Free Protein Expression Maxi System	Human HeLa cells	Takara Bio, Japan	50 μg/mL	10× 20 μL
25	ProteinFactory Standard	D2P	Kangma-Healthcode, China	1 mg/mL	1× 10 mL
26	ProteinFactory HighYield	D2P	Kangma-Healthcode, China	2 mg/mL	1× 10 mL

表2 商业化的实验室级无细胞蛋白质合成体系产品及代表企业(续表)

序号	产品名称	系统来源/技术类型	公司	表达得率 ^{&} (标准蛋白或上限)	反应体积/产品规格
27	ProteinFactory Fast	D2P	Kangma-Healthcode, China	0.5~1 g/mL	5× 10 mL
28	ProteinFactory NMR	D2P	Kangma-Healthcode, China	0.5~1 mg/mL	5× 10 mL
29	ProteinFactory Membrane	D2P	Kangma-Healthcode, China	0.5~1 mg/mL	1× 10 mL
30	ProteinFactory UNAA	D2P	Kangma-Healthcode, China	0.5~1 mg/mL	1× 10 mL
31	ProteinFactory FastLiter	D2P	Kangma-Healthcode, China	0.5~1 g/L	10× 100 mL
32	ProteinFactory FastLiter100	D2P	Kangma-Healthcode, China	0.5~1 g/L	100× 100 mL

CHO: Chinese hamster ovary; *E. coli*: *Escherichia coli*; IVT: *in vitro* translation; PURE: Protein Synthesis Using Recombinant Elements; RRL: rabbit reticulocyte lysate; RTS: rapid translation systems; Sf21: *Spodoptera frugiperda* 21; D2P: DNA-to-Protein. &: 表达得率为网页上检索到的对应产品中标准蛋白(如Luciferase、eGFP等)的体外合成量或其标称上限, 具体信息以厂家提供数据为准; *: 信息未公开, 或需单独询问。

型志贺氏菌疫苗, 但均处于临床前阶段^[45]。

3.3 PeptiDream公司

PeptiDream 成立于 2006 年, 总部位于日本神奈川县川崎市。公司利用其创始人 Hiroaki Suga 开发出的 PDPS (peptide discovery platform system) 技术, 在体外实现含有天然和非天然氨基酸的大序列容量的多肽合成和筛选^[46, 47]。PDPS 技术通过构建包含数万亿种非标准肽的高多样性库, 筛选出高亲和力和高选择性的大环肽候选物, 开发用于治疗 and 诊断的肽类药物、小分子药物、肽-药物偶联物(PDC) 和多功能肽偶联物(MPC)。此外, PeptiDream 通过其子公司 PDRadiopharma, 在日本市场销售多种放射性药物和放射性诊断产品^[48]。

4 中国无细胞蛋白质合成技术的研发

近年来, 全球无细胞领域研究进入快速发展期, 2024 年全球无细胞蛋白质合成相关论文发表数量是 1970 年的近 20 倍, 几乎以每 10 年一倍的速度增加(图 3)。至 2025 年撰文时间为止, 全球累计发表无细胞蛋白质合成相关论文 21 5887 篇。其中最早进行无细胞蛋白质合成研究的国家主要有美国、中国、英国、德国、日本、意大利、法国、加拿大等。

中国最早的无细胞蛋白质合成研究发表于 1991 年, 此后快速发展, 到目前为止已有相关学术论文 17 839 篇, 占世界上无细胞蛋白质合成相关论文总数的 8.26%, 位居第 2, 论文占比最高的前六名国家分别为美国、中国、英国、德国、日本、意大利。

随着中国无细胞合成技术研究近 20 年的快速发展, 涌现出了许多具有典型代表性的研发团队,

例如中国科学院天津工业生物技术研究所、北京大学合成与功能生物分子中心、清华大学工业生物团队、厦门大学化学化工学院、上海交通大学、中国科学院深圳先进研究院等^[49-52]。

不久前, 清华大学工业生物催化教育部重点实验室卢元团队开发了一种通过动态阻遏器实现温度控制的无细胞表达系统并利用重组元素合成蛋白质^[53, 54]。而华南理工大学生物科学与工程学院林影、郑穗平团队也搭建了基于无细胞蛋白合成技术的途径酶快速筛选体系^[55]。中国科学院天津工业生物技术研究所张以恒研究员, 首次提出体外生物转化(*in vitro* BioTransformation, ivBT) 的概念, 它是介于微生物发酵和酶催化之间的新质生物制造平台, 实现了超限生物制造, 可以从纤维素中体外无辅酶酶促合成淀粉, 在保障粮食安全、推动新能源革命中具有战略价值^[56]。ivBT 是一个基于体外合成生物学的生物制造平台。多酶分子机器是 ivBT 的特有超高效生物催化剂。不会自我复制的多酶分子机器摆脱生物体繁殖的局限, 超越细胞工厂合成极限, 实现重要生物化学合成与超限生物能量转化, 使得无细胞工厂成为未来生物制造的重要途径^[57, 58]。作为体外生物转化合成中最复杂的技术分支, 无细胞蛋白质合成技术通过 70 年的科技与产业积累, 为未来体外生物转化平台的规模化发展提供了重要引领和参考。

中国无细胞蛋白质合成产业化的代表性企业是成立于 2015 年的康码(上海)生物科技有限公司(以下简称康码公司)。该公司是一家具备蛋白质合成底层核心技术, 拥有自主独创的专利生物合成路线的中国生物技术企业^[59]。康码公司自主开发出了

表3 全球代表性商业化无细胞蛋白质合成系统

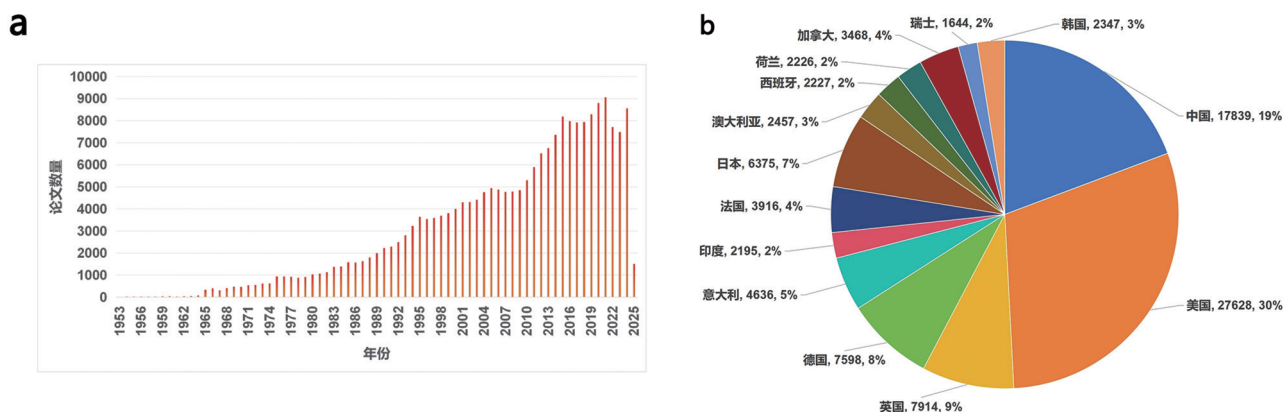
产品示例	翻译机器主要来源物种/ 技术名称类型	是否可用 RNA模板	是否可用 DNA模板	反应温度	反应时间 [#]	特点
PUREfrefx (GeneFrontier)	大肠杆菌/重组的体外耦 合转录/翻译系统	可选	是	37 °C	2~6 h	原核系统, 重组重构, 成本很高, 产量有限
TNT WG (Promega)	小麦胚芽/ TNT (Transcription/ Translation Systems)	可选	是	25~30 °C	2~4 h	真核系统, 翻译忠实性高, 蛋白质溶解性好, 成本高, 效率不稳定
TnT Reticulocyte (Promega)	兔网织红细胞/ a single-tube, coupled transcription/translation system	可选	是	30 °C	1.5~3 h	真核系统, 折叠效率高, 降解快, 背景蛋白多
NEBExpress (NEB)	<i>E. coli</i> , a coupled transcription/translation system	否	是	37 °C	2~4 h	原核系统, 易制备, 折叠与修饰能力差
1-Step CHO (ThermoFisher)	CHO <i>in vitro</i> translation (IVT) system	可选	是	30 °C	1.5~4 h	真核系统, 支持复杂蛋白表达, 成本高, 获取困难
XpressCF (Sutro Biopharma)	<i>E. coli</i> XtractCF	ND*	是	25~30 °C	单次表达1 天内完成	原核系统、反应时间一般为14 h, 以保证蛋白质正确折叠与组装
授权自 Sutro XpressCF (Vaxcyte)	<i>E. coli</i> XtractCF	ND*	是	25~30 °C	单次表达1 天内完成	原核系统, 专用于疫苗蛋白合成与位点特异性化学修饰, 高产量及拓展性
PDPS (PeptideDream)	基于一种利用柔性酶与 定制体外翻译装置(称 为柔性体外翻译(FIT)系 统)集成来实现遗传密 码重编程的方案	可选	是	25~37°C	1~2 h	生成高度多样化的大环肽文库, 快速高成功率发现有效化合物
ProteinFactory (Kangma-Healthcode)	D2P-IVDTT	是	是	20~30 °C	1~3 h	真核系统, 折叠效率高, 设计灵活, 自动化高通量, 大规模至百吨级, 反应可延长至20 h, 成本低于细胞表达

PUREfrefx: Reconstituted Cell-Free Protein Synthesis Kit; TNT WG: TnT® Coupled Wheat Germ Extract System; TnT Reticulocyte: TnT® Coupled Reticulocyte Lysate Systems; NEBExpress: The NEBExpress® Cell-free *E. coli* Protein Synthesis System; Step CHO: 1-Step CHO High-Yield IVT Trial Kit; XpressCF™Sutro: Sutro's Cell-Free System; PDPS: Proprietary Drug Discovery Platform - System; ProteinFactory: ProteinFactory. *: 信息未公开, 或需单独询问; #: 反应时间为蛋白得率稳定时的时间, 或可以持续反应得到蛋白质的时间。

DNA-to-Protein (D2P) 体外蛋白质一步法合成技术, 其蛋白质合成材料来源于真核细胞, 且通用性强、产业化潜力大、技术工艺成熟。与传统的蛋白质合成技术相比, D2P 无细胞蛋白质合成系统能够高效地制造复杂蛋白质、细胞因子, 快速筛选抗体, 同时有非天然氨基酸的特异性位点耦合技术, 增加了药物的均质性和安全性, 并能合成活体细胞难以合成的细胞毒素、癌症药物, 以及 AI 设计的、自然

界不存在的全新蛋白质分子。通过 10 年的技术研发和产业化积累, 康码公司成功打破了传统细胞培养与细胞内表达蛋白质的体系, 突破了全球无细胞蛋白质合成的产业化瓶颈, 率先实现了百吨级批次产能和万吨级年产能, 是目前世界上已知的拥有最大规模的无细胞蛋白质合成生产线的生物技术企业。

在抗击新冠疫情期间, 康码公司联合湖北省疾控中心、中国科学院武汉病毒研究所、武汉大学、



(a)过去70年中全球无细胞蛋白质合成科研文章数量曲线；(b)过去70年全球无细胞蛋白质合成科研文章数量的国家地区分布图
图3 1953年来全球无细胞蛋白质科研文章

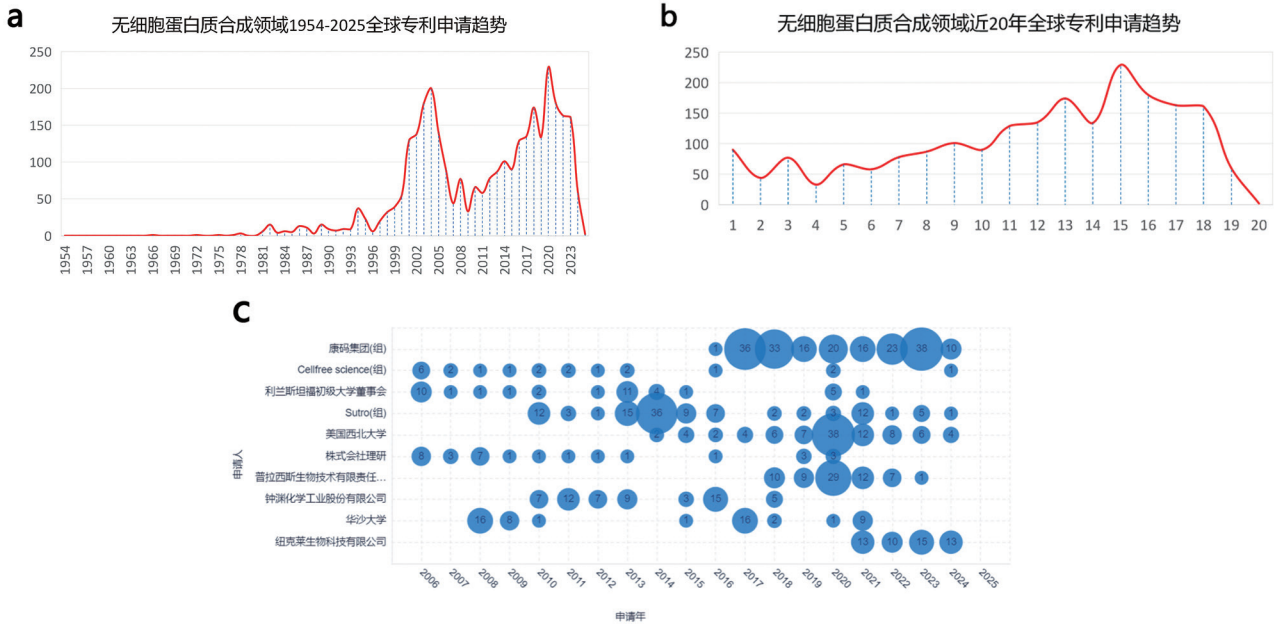
华中理工大学研发出了新冠病毒阻断剂康斯汀蛋白(Kansetin)，该蛋白对新冠病毒 SARS-CoV-2 等呼吸道病毒具有极强亲和力。通过模拟人体 ACE2 结构，康斯汀蛋白高效结合新冠病毒，实现对病毒的物理黏连，达到高效阻断病毒侵染人体细胞的效果，且具有广谱抗病毒变种的能力^[60]。康斯汀蛋白可有效阻断原始株、阿尔法、贝塔、德尔塔、奥密克戎等多种突变株^[61]。与世界上其他已知的广谱抗新冠病毒变种的分子相比，康斯汀具有最强的体外抑制活性，对奥密克戎 BA.1 体外抑制常数 IC_{50} 为 121.9 pM，对奥密克戎 BA.2 为 134.0 pM^[62]。通过 AI 设计和 D2P 无细胞人工合成技术制造的康斯汀分子还具有极高的热稳定性， $T_m > 82\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，常温可以保持活性 2 年以上，远远超过人体天然的 ACE2 蛋白分子^[61]。2023 年，“Lencoron® 栏冠”鼻腔抗病毒喷雾医疗器械获得欧盟 CE 认证，出口土耳其、阿联酋、印尼、菲律宾和新加坡等国。2023 年，康斯汀蛋白新冠阻断剂项目获上海市优秀科技成果转化项目奖。康斯汀蛋白新冠阻断剂是世界上第一款基于无细胞蛋白质合成技术大规模生产并销售的终端产品，是无细胞蛋白质合成产业化的先行者^[63]。

2022 年 9 月，康码公司基于 5 吨级无细胞蛋白质合成的产业化基础，启动第三代 160 吨级无细胞蛋白质合成产业化工厂的建设，并于 2023 年 4 月 30 日达产，成为世界上第一个百吨级无细胞蛋白质合成企业，真正实现了无细胞蛋白质合成技术的产业化突破。2023 年 10 月，康码公司正式发布 GMP 级无细胞蛋白质合成专用的生物反应器，实现 3 小时高效蛋白质体外合成、满足 GMP 标准、单批次单体 1 000 L 反应、实时在线监控、定量合成、单

位时间合成效率高达 0.5 g/L/h，比传统细胞（如 CHO 细胞合成抗体）单位合成效率提高 100 倍以上。康码公司拥有目前世界上最大的吨级以上的无细胞蛋白质生产线：批次产能 160 吨级、年满载产能达 3 万吨。

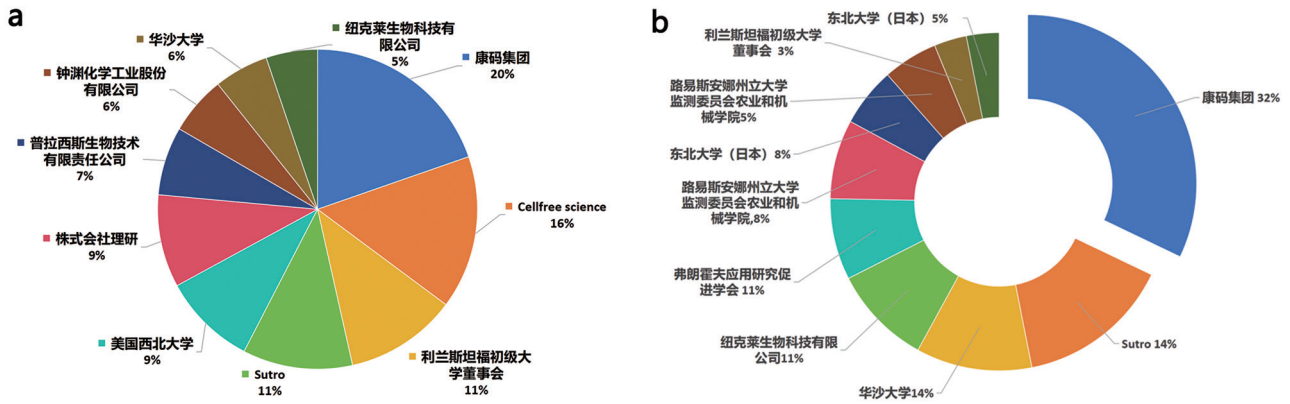
利用康码公司合成的蛋白质产品和无细胞蛋白质合成生物反应设备，广大用户已成功开展各种药物开发、分子筛选、活性和结构实验等多种研究及应用^[64-68]。康码公司基于量产级无细胞蛋白质合成技术和产能，陆续推出多款基于无细胞蛋白质合成的产品，获批上市的已达 33 款。其中包括 19 款国家和省级药监局备案审批的无细胞合成人源化蛋白原料和化妆品产品。这些产品都是全球市场上率先基于无细胞蛋白质合成技术批量化生产的终端产品（非研发试剂盒或开发服务），显示了无细胞蛋白质合成技术产业化后的强大产品能力和巨大市场潜力。

全球公开专利检索分析显示，从 2015 年康码公司进入无细胞蛋白质合成技术领域后，无细胞蛋白质合成专利申请迎来了第二次快速增长期，带来了产业的二次革新（图 4a、4b、4c）。康码公司目前拥有全球无细胞蛋白质合成技术路线最多的公开专利，其过去 30 年在该领域的专利贡献位居世界第一^[69]。在全球有效专利申请排名前十的申请人中，康码公司的专利总数量位列第一（图 5a）。此外，康码公司维持有效专利（指在申请中的以及授权维持中的）的数量是第二名的 2.3 倍（图 5b）。按照技术的专利分类统计显示，康码公司在无细胞蛋白质合成领域的工程改造、制造工艺、生产设备、分子设计开发等四个技术维度的专利数量都远超其他申请人（图 5b、6a、6b）。



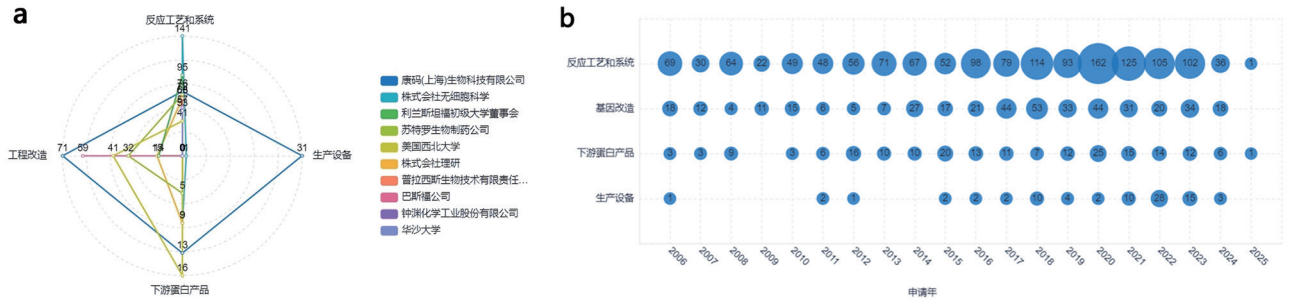
(a)近70年, 全球无细胞蛋白质领域专利申请趋势图(1954-2025); (b)近20年, 全球无细胞蛋白质领域专利申请趋势图(2006-2025); (c) 近20年, 全球专利申请排名前十申请人的专利的申请趋势

图4 无细胞蛋白质领域全球专利申请趋势和分布情况



(a)截至2025年5月, 全球所有专利排名前十的申请人分布图; (b)截至2025年5月, 全球有效专利申请排名前十的申请人分布图

图5 无细胞蛋白质领域全球专利申请人分布情况



(a)截至2025年5月, 无细胞蛋白质合成领域全球专利主要技术分类申请分布图; (b)过去20年, 无细胞蛋白质合成领域全球专利主要技术分类申请数量年份分布图。图中数据仅统计截至统计日(2025年5月)的公开可检索专利数量, 对于新提交的未公开专利申请(最长18个月)未予统计。

图6 无细胞蛋白质合成领域全球专利主要技术分类申请分布情况

康码公司最近又与位于上海张江高科技园区的中国科学院上海高等研究院国家蛋白质科学研究(上海)设施开启合作,成立蛋白质智造联合实验室,计划在该实验室搭建康码公司最新开发的 D2Pi-2.0 (DNA-to-Protein Intelligence 2.0) 系统,形成全自动、高通量的蛋白质合成能力;其合成通量是同等体量细胞合成的 100 倍以上,预计每天能够合成数千种毫克级蛋白质分子。该系统建成后将对广大科研人员 and 产业界开放,为我国在生物医药研发、合成生物学等领域的基础研究和商业化开发的需求提供有力的技术支撑。

5 无细胞蛋白质合成技术面临的挑战与发展前景

无细胞蛋白质合成技术仍然具有其特有的缺点和弱势。首先,无细胞系统的源头开发需要大量长期的人工构建,技术难度高;高效低成本合成体系成分复杂,开发周期长,技术壁垒高;对软硬件基础要求高,需要全产业链的整合。其次,基于无细胞蛋白质合成技术的单体蛋白质分子得率上限基本停留在 1~5 g/L 区间,其单位产能突破需要无细胞蛋白质生产系统持续优化,包括底盘细胞的进化更新、开发蛋白质合成的新型能源再生系统、稳定底物的供应、减少合成副产物、旁路循环控制和开发更加高效的体外正交翻译系统等^[70]。再次,现阶段全球无细胞蛋白质合成的产业标准和质量标准不成熟,行业标准、国家标准和国际标准不完善,制约了行业发展。虽然无细胞蛋白质合成技术在速度、灵活性与可控性上的独特优势使其在生物医药、可持续制造及诊断技术中展现出不可替代的价值,正在重塑生物制造与合成生物学的研究范式,但是技术标准化、成本控制与复杂系统重构仍是未来突破的关键。随着人工智能、自动化与合成生物学的深度融合,无细胞蛋白质合成有望成为下一代生物经济的核心驱动力,推动从“实验室创新”到“产业化落地”的全面跨越^[50, 71]。

随着 AI 技术的发展,研究者能够突破生物体基于基因编码蛋白质序列的限制,人类终于到了可以自主设计、创造全新非天然蛋白质的时代。人工无细胞体外合成蛋白质的产业化发展,对全球生物医药和生物制造产业具有重大意义^[38, 72, 73]。大力发展新兴的无细胞蛋白质合成技术,建立无细胞工厂,一方面可以解决细胞合成蛋白质技术长期存在的菌株构建时间长、单位时间合成效率低、无法通用、

合成成本高、制造设备复杂要求高、细胞排放环境污染多等诸多限制;另一方面可以利用其独有的开放性、通用性和先进性,进一步加大生物合成的效率和广度,像新能源汽车、光伏产业那样^[73, 74],推进整体生物制造生产力发展。

[参 考 文 献]

- [1] Watson JD, Crick FHC. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 1953, 171: 737-8
- [2] Zamecnik PC, Keller EB. Relation between phosphate energy donors and incorporation of labeled amino acids into proteins. *J Biol Chem*, 1954, 209: 337-54
- [3] Nirenberg MW, Matthaei JH. The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1961, 47: 1588-602
- [4] Zubay G. *In-vitro* synthesis of protein in microbial systems. *Annu Rev Genet*, 1973, 7: 267-87
- [5] Khorana HG. Polynucleotide synthesis and the genetic code. *Fed Proc*, 1965, 24: 1473-87
- [6] Holley RW, Apgar J, Everett GA, et al. Structure of a ribonucleic acid. *Science*, 1965, 14: 1462-5
- [7] Holley RW, Apgar J, Everett GA, et al. Structure of a transfer RNA. *Science*, 1968, 160: 21-9
- [8] Schweet R, Lamfrom H, Allen E. The synthesis of hemoglobin in a cell-free system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1958, 44: 1029-35
- [9] Pratt WB, Loomis CR. Protein synthesis by wheat germ ribosomes. *Science*, 1964, 146: 1003-4
- [10] Endo Y, Sawasaki T. ENDEXT: enhanced wheat germ cell-free protein expression system. *J Biotechnol*, 2000, 80: 1-7
- [11] Sampson J, Mathews MB, Osborn M, et al. Hemoglobin messenger ribonucleic acid translation in cell-free systems from rat and mouse liver and *Landschutz ascites* cells. *Biochemistry*, 1972, 11: 3636-40
- [12] Pelham HRB, Jackson RJ. An efficient rabbit reticulocyte system for mammalian mRNA translation. *Eur J Biochem*, 1976, 67: 247-56
- [13] Gallis BM, McDonnell JP, Hopper JE, et al. Endogenous messenger ribonucleic acid-directed polypeptide chain elongation in a cell-free system from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 1975, 122: 719-26
- [14] Suzuki T, Ezure T, Ito M, et al. An insect cell-free system for recombinant protein expression using cDNA resources. *Methods Mol Biol*, 2009, 577: 97-108
- [15] Ezure T, Suzuki T, Shikata M, et al. A cell-free protein synthesis system from insect cells. *Methods Mol Biol*, 2010, 607: 31-42
- [16] Shimizu Y, Inoue A, Tomari Y, et al. Cell-free translation reconstituted with purified components. *Sci Adv*, 2001, 19: 751-5
- [17] GeneFrontier Corporation. PUREfrex® [EB/OL]. [2025-06-10]. <https://purefrex.genefrontier.com/>
- [18] GeneFrontier Corporation. PUREfrex®1.0 [EB/OL].

- [2025-06-10]. <https://purefex.genefrontier.com/products/cellfreeproteinsynthesiskits/purefex1.0.html>
- [19] Arbor Biosciences. Microsoft Word – 1801001_ArborBio_myTXTLLD_Press_Release.docx | Arbor Biosciences [EB/OL]. [2025-06-10]. https://arborbiosci.com/wp-content/uploads/2018/10/1801001_ArborBio_myTXTLLD_Press_Release.pdf
- [20] Arbor Biosciences. MyTXTL Pro Kit | Arbor Biosciences [EB/OL]. [2025-06-10]. Arbor Biosciences. <https://arborbiosci.com/products/cell-free-protein-expression/mytxtl-pro-kit/>
- [21] Thermo Scientific. Mammalian 1-Step IVT Systems | Thermo Scientific [EB/OL]. [2025-06-10]. <https://www.thermofisher.cn/cn/zh/home/life-science/protein-biology/protein-expression/cell-free-protein-expression/mammalian-cell-free-protein-expression/overview-thermo-scientific-1-step-ivt-systems.html>
- [22] Moore SJ, MacDonald JT, Wienecke S, et al. Rapid acquisition and model-guided engineering of product-tolerant microbial hosts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115: E4340-9
- [23] Failmezger J, Scholz S, Blombach B, et al. Cell-free protein synthesis from fast-growing *Vibrio natriegens*. *Front Microbiol*, 2018, 9: 1146
- [24] Wang H, Li J, Jewett MC. Development of a *Pseudomonas putida* cell-free protein synthesis platform for rapid screening of gene regulatory elements. *Synth Biol*, 2018, 3: ysy003
- [25] Simon JM, Lai HN, Needham H, et al. *Streptomyces venezuelae* TX-TL - a next generation cell-free synthetic biology tool. *Biotechnol J*, 2017, 12: 1600678
- [26] Guo M, Schimmel P. Essential nontranslational functions of tRNA synthetases. *Nat Chem Biol*, 2013, 9: 145-53
- [27] Nahum S, Hinnebusch AG. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell*, 2009, 136: 731-45
- [28] Shut XE, Swanda RV, Qian S. Nutrient control of mRNA translation. *Annu Rev Nutr*, 2020, 40: 51-75
- [29] Brandman O, Stewart-Ornstein J, Wong DA, et al. A ribosome-bound quality control complex triggers degradation of nascent peptides and signals translation stress. *Cell*, 2012, 151: 1042-54
- [30] Kimpinga HH, Craig EA. The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11: 579-92
- [31] Kramer G, Shiber A, Bukau B. Mechanisms of cotranslational maturation of newly synthesized proteins. *Annu Rev Biochem*, 2019, 88: 337-64
- [32] Hall CE, Johnson MC. Optimized extract preparation methods and reaction conditions for improved yeast cell-free protein synthesis. *Biotechnol Bioeng*, 2013, 110: 2643-54
- [33] Sawasaki T, Morishita R, Gouda MD, et al. Methods for high-throughput materialization of genetic information based on wheat germ cell-free expression system. *Methods Mol Biol*, 2007, 375: 95-106
- [34] Anastasina M, Terenin I, Butcher SA. A technique to increase protein yield in a rabbit reticulocyte lysate translation system. *Biotechniques*, 2014, 56: 36-9
- [35] Thoring L, Dondapati SK, Stech M, et al. High-yield production of “difficult-to-express” proteins in a continuous exchange cell-free system based on CHO cell lysates. *Sci Rep*, 2017, 7: 11710
- [36] Ezure T, Suzuki T, Higashide S, et al. Cell-free protein synthesis system prepared from insect cells by freeze-thawing. *Biotechnol Prog*, 2006, 22: 1570-7
- [37] Buntru M, Vogel S, Stoff K, et al. A versatile coupled cell-free transcription-translation system based on tobacco BY-2 cell lysates. *Biotechnol Bioeng*, 2015, 112: 867-78
- [38] Carlson ED, Gan R, Hodgman CE, et al. Cell-free protein synthesis: applications come of age. *Biotechnol Adv*, 2012, 30: 1185-94
- [39] Silverman AD, Karim AS, Jewett MC. Cell-free gene expression: an expanded repertoire of applications. *Nat Rev Genet*, 2020, 21: 151-70
- [40] Brookwell A, Oza JP, Caschera F. Biotechnology applications of cell-free expression systems. *Life*, 2021, 11: 1367
- [41] Jia X, Deng Z, Liu T. Progress of cell-free protein synthesis system and its applications in pharmaceutical engineering – a review. *Wei Sheng Wu Xue Bao*, 2016, 56: 530-42
- [42] Sutro Biopharma, Boehringer Ingelheim BioXcellence. Sutro Biopharma and Boehringer Ingelheim BioXcellence collaboration established first-in-class cell-free capabilities at commercial scale [EB/OL]. (2025-01-07) [2025-06-10]. <https://www.sutro.bio.com/sutro-biopharma-and-boehringer-ingelheim-bioxcellence-collaboration-established-first-in-class-cell-free-capabilities-at-commercial-scale>
- [43] VGXI Inc. announces a strategic partnership with Sutro Biopharma Inc. to support growing clinical pipeline [EB/OL]. [2025-06-10]. <https://vgxi.com/vgxi-inc-announces-a-strategic-partnership-with-sutro-biopharma-inc-to-support-growing-clinical-pipeline/>
- [44] Sutro Biopharma, Inc. Annual Report 2024 [EB/OL]. (2025-03-13) [2025-06-10]. <https://ir.sutro.bio.com/sec-filings/all-sec-filings/content/0000950170-25-038884/stro-20241231.htm>
- [45] Vaxcyte. Vaxcyte Reports Second Quarter 2024 Financial Results and Provides Business Update [EB/OL]. (2024-08-06) [2025-06-10]. <https://investors.vaxcyte.com/news-releases/news-release-details/vaxcyte-reports-second-quarter-2024-financial-results-and>
- [46] Proprietary Drug Discovery Platform - System(PDPS)[EB/OL]. [2025-06-10]. <https://www.peptidream.com/en/science/pdps/>
- [47] PDR Radiopharma. PDR Radiopharma History [EB/OL]. (2022-03-28) [2025-06-10]. <https://www.pdradiopharma.com/en/about/history>
- [48] Curium Pharma, PeptiDream. Curium Announces Strategic Partnership with PeptiDream for Prostate Cancer Theranostics in Japan [EB/OL]. (2024-10-01) [2025-06-10]. <https://www.curiumpharma.com/2024/10/01/>

- s-strategic-partnership-for-prostate-cancer-theranostics
- [49] Li Z, Li Y, Lin X, et al. Supramolecular protein assembly in cell-free protein synthesis system. *Bioresour Bioprocess*, 2022, 9: 28
- [50] Chen Y, Xia W, Lu F, et al. Cell-free synthesis system: an accessible platform from biosensing to biomanufacturing. *Microbiol Res*, 2025, 293: 128079
- [51] Ji B, Qian Z, Xia X. Application of cell-free synthesis strategy in biomaterial research. *Synth Biol J*, 2021, 3: 658-7
- [52] Meyer C, Zhou C, Fang Z, et al. High-throughput experimentation using cell-free protein synthesis systems. *Methods Mol Biol*, 2022, 2433: 121-34
- [53] Cui Y, Chen X, Wang Z, et al. Cell-free PURE system: evolution and achievements. *BioDesign Res*, 2022: 9847014
- [54] Yang J, Wang C, Lu Y. A temperature-controlled cell-free expression system by dynamic repressor. *ACS Synth Biol*, 2022, 11: 1408-16
- [55] Wu L, Chang Y, Deng Z, et al. Efficient synthesis of gentamicin and its related products in industrial chassis cells. *Synth Biol J*, 2022, 3: 1277-91
- [56] Xu X, Zhang W, You Y, et al. Biosynthesis of artificial starch and microbial protein from agricultural residue. *Sci Bull (Beijing)*, 2023, 68: 214-23
- [57] Shi T, Song Z, Song S, et al. *In vitro* BioTransformation (ivBT): a new frontier of industrial biomanufacturing. *Synth Biol J*, 2024, 5: 1437-60
- [58] Zhang YPJ, Zhu Z, You C, et al. *In vitro* BioTransformation (ivBT): definitions, opportunities, and challenges. *Synth Biol Eng*, 2023, 1: 10013
- [59] 康码(上海)生物科技有限公司. 一种用于体外蛋白质合成的蛋白合成体系、试剂盒及其制备方法: 中国, CN108535489B [P]. 2019-04-19
- [60] Zhang H, Hu B, Lv P, et al. An ACE2-based decoy inhibitor effectively neutralizes SARS-CoV-2 Omicron BA.5 variant. *Viruses*, 2022, 14: 2387
- [61] Lv P, Hu B, Hua R, et al. A novel designed protein antagonist confers potent neutralization against SARS-CoV-2 variants of concern. *J Infect*, 2022, 85: e72-6
- [62] Zhang H, Lv P, Jiang J, et al. Advances in developing ACE2 derivatives against SARS-CoV-2. *Lancet Microbe*, 2023, 4: e369-78
- [63] 连线创始人. 康码生物创始人郭敏: 造出生物“光刻机”实现蛋白质合成产业化[EB/OL]. (2023-02-03) [2025-06-10]. <https://www.cls.cn/detail/1256283>
- [64] Pulitzer JF, Colombo M, Ciaramella M, et al. New control elements of bacteriophage T4 pre-replicative transcription. *J Mol Biol*, 1985, 182: 249-63
- [65] Zhou Y, Wang M, Liu Y, et al. An HD-Zip III transcription factor, BjPHVa, negatively regulates non-glandular trichome formation in *Brassica juncea*. *Physiol Plant*, 2024, 176: e14553
- [66] Zhang Y, Zhou J, Zhang Y, et al. The ABI3 transcription factor interaction and antagonism with ubiquitin E3 ligase ScPRT1 in *Syntrichia caninervis*. *Genes*, 2022, 13: 718
- [67] Tian Z, Shao D, Tang L, et al. Circular single-stranded DNA as a programmable vector for gene regulation in cell-free protein expression systems. *Nat Commun*, 2024, 15: 4635
- [68] Zhang K, Zhang K, Li X, et al. Systemic expression, purification, and initial structural characterization of bacteriophage T4 proteins without known structure homologs. *Front Microbiol*, 2021, 12: 674415
- [69] Meyer C, Nakamura Y, Raso BJ, et al. Analysis of the innovation trend in cell-free synthetic biology. *Life*, 2021, 11: 551
- [70] Liao C, Li H, Zheng H, et al. Optimization and application of cell-free system for protein expression. *Chem Life*, 2022, 42: 1493-501
- [71] Gao W, Cho E, Liu Y, et al. Advances and challenges in cell-free incorporation of unnatural amino acids into proteins. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 611
- [72] Hodgman CE, Jewett MC. Cell-free synthetic biology: thinking outside the cell. *Metab Eng*, 2012, 14: 261-9
- [73] 钱学森. 中国新能源汽车技术发展规划. 中国科学院院刊, 1986, 5: 23-31
- [74] Green M, Dunlop E, Hohl-Ebinger J, et al. Solar cell efficiency tables (Version 57). *Prog Photovolt Res Appl*, 2021, 29: 3-15