

(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  
2017年9月14日 (14.09.2017)



(10) 国际公布号  
WO 2017/152808 A1

- (51) 国际专利分类号:  
C12N 15/113 (2010.01) A61P 35/00 (2006.01)  
C12N 15/10 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2017/075577
- (22) 国际申请日: 2017年3月3日 (03.03.2017)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:  
201610134657.6 2016年3月10日 (10.03.2016) CN
- (71) 申请人: 北京大学 (PEKING UNIVERSITY)  
[CN/CN]; 中国北京市海淀区学院路 38 号, Beijing  
100191 (CN)。
- (72) 发明人: 夏青 (XIA, Qing); 中国北京市海淀区学院  
路 38 号, Beijing 100191 (CN)。 杨琦 (YANG, Qi);  
中国北京市海淀区学院路 38 号, Beijing 100191  
(CN)。
- (74) 代理人: 中国专利代理 (香港) 有限公司 (CHINA  
PATENT AGENT (H.K.) LTD.); 中国香港特别行政  
区湾仔港湾道 23 号鹰君中心 22 号楼, Hong Kong  
(CN)。
- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保  
护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,

BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,  
GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR,  
IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK,  
LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,  
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH,  
PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK,  
SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,  
UG, US, UZ, VC, VN, 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, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA,  
RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ,  
BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH,  
CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE,  
IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO,  
RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,  
GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

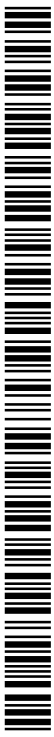
- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
- 包括按细则 13 之二规定在说明书以外提交的关于  
生物材料保藏的说明(细则 13 之二.4(d)(i)和 48.2(a)  
(viii))。
- 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

(54) Title: READ THROUGH TRUNCATED PROTEIN IN PREMATURE TERMINATION CODON DISEASES BY USING OPTIMIZED GENE CODON EXPANSION SYSTEM

(54) 发明名称: 利用优化的基因密码子扩展系统通读提前终止密码子疾病中的截短蛋白

(57) Abstract: Provided is a method for high-efficiently reading through a nonsense mutation site in disease causing genes in monogenic hereditary diseases and recovering a normal structure and a function of a mutant protein, by using a genetic code expansion unnatural amino acid system. By modifying tRNA(tRNAPyl) of ancient methanococcus jannaschii, an all-new unnatural amino acid system that can be high-efficiently read through and that are coded by UAA and UGA, the use range of tRNAPyl and pyrrole lysyl-tRNA synthase (PylRS) orthogonal pairs is expanded. Plasmids simulating endogenous premature termination codon are constructed, so as to evaluate the read-through endogenous premature termination codon. Also provided is a system mainly comprising genes causing monogenichereditary diseases and tumor inhibitory genes in tumor cells.

(57) 摘要: 提供了利用基因密码扩展的非天然氨基酸系统, 高效率通读单基因遗传病中致病基因的无义突变位点, 恢复突变体蛋白的正常结构和功能的方法。通过改造古甲烷球菌的 tRNA(tRNAPyl), 得到全新的高通读效率的 UAA 和 UGA 编码的非天然氨基酸系统, 扩展了 tRNAPyl 和吡咯赖氨酰-tRNA 合成酶(PylRS)正交对的使用范围。构建了模拟内源性提前终止密码子的质粒, 用于评价通读内源性提前终止密码子的效率。还提供了主要包括单基因遗传病的致病基因和肿瘤细胞内的肿瘤抑制基因的系统。



WO 2017/152808 A1

利用优化的基因密码子扩展系统通读提前终止密码子疾病中的截短蛋白

### 技术领域

本发明属于生物制药领域，具体涉及利用基因密码扩展的非天然  
5 氨基酸系统，通读单基因遗传病的无义突变位点。并且通过改造古甲  
烷球菌的 tRNA (tRNAPyl)，得到全新的高通读效率的 UAA 和 UGA  
编码的非天然氨基酸系统，扩展了 tRNAPyl 和吡咯赖氨酰-tRNA 合成  
酶 (PylRS) 正交对的使用范围，可用于通读三种无义突变的终止密码  
子 UAG, UAA 和 UGA。

10

### 背景技术

#### 无义突变导致的遗传性疾病

人类基因组中的存在许多种基因突变类型，无义突变是基因突变  
中的一类。基因突变是基因组DNA分子发生的可遗传的变异现象，其  
15 中包括移码突变和碱基置换。移码突变包括碱基的插入和缺失，碱基  
置换主要为错义突变和无义突变。无义突变是指编码基因的某个碱基  
发生突变，产生终止密码子UAG、UAA和UGA，终止密码子不编码  
任何氨基酸。终止密码子不能与转移 RNA (tRNA) 的反密码子配对，  
但能被终止因子或释放因子识别，终止肽键的合成，使蛋白质合成终  
20 止，因而生成不完整和没有功能的蛋白质。无义突变的发生使基因框  
内产生提前终止密码子 (Premature termination codons, PTC)，导致  
基因编码的两种结果，一种即产生截短型蛋白，另一种则导致含有PTC  
的mRNA的稳定性降低，从而引发无义介导的mRNA降解途径(NMD)。  
据统计，大约有11.2%的遗传性疾病会产生PTC突变，被称作提前终止  
25 密码子病 (Premature termination codons diseases, PTC diseases)，另  
一方面，许多癌症发生也会产生PTC突变 (KEELING K. M., WANG D.,  
CONARD S. E., BEDWELL D. M. Suppression of premature termination  
codons as a therapeutic approach. Critical reviews in biochemistry and  
molecular biology, 2012, 47: 444-463.)。

30 杜氏肌营养不良 (Duchennemuscular dystrophy, DMD) 是PTC  
疾病中的一个典型代表。DMD是一种严重的肌肉萎缩疾病，也是最常  
见的 X连锁隐性遗传性疾病，以进展性、致死性为主要特点。DMD基

因的无义突变则是导致DMD发生的主要原因之一。无义突变产生提前终止密码子UAG、UAA、UGA，生成截短了的多肽产物，使患者缺失或缺少功能性的抗萎缩蛋白（dystrophin），致使肌肉萎缩。据报道，Duchenne型肌营养不良症在活产男婴中的发病率为1/6300 ~ 1/3500

5 [Dooley J, Gordon KE, Dodds L, MacSween J. Duchenne muscular dystrophy: a 30 - year population - based incidence study. Clin Pediatr (Phila), 2010, 49:177-179.]。该病目前尚无有效治愈方法，多于幼年期发病，青少年期丧失行走能力，成年早期死亡，给患者个人、家庭和社会造成沉重心理和经济负担。

10 先前的研究中通读提前终止密码子的方法有：（1）化学小分子诱导的通读：氨基糖苷类药物如 G418 和非氨基糖苷类药物如 PTC124。1996 年，Howard 等在对囊性纤维变性的研究过程中首次观察到氨基糖苷类抗生素可以在哺乳动物细胞内诱导 PTC 通读，从而合成完整的有功能的蛋白质。但氨基糖苷类抗生素在发挥无义抑制作用的同时，可

15 产生严重的不良反应，其中最严重的是耳毒性和肾毒性。并且在 2016 年 2 月，PTC124 刚被美国 FDA 拒绝受理（2）外显子跳跃方法：针对跳过外显子 51 表达 DMD 患者的反义核苷酸药物。但 FDA 已经拒绝了 BioMarin 的 drisapersen。而另一家公司 Sarepta Therapeutics 的 Eteplirsen 在 2016 年 5 月将会得到 FDA 的评审结果；（3）抑制子 tRNA 通读：

20 其反密码子环发生突变而能和终止密码子配对，以致能通读终止密码子。该治疗手段难以进入临床应用的主要原因抑制子 tRNA 可能会识别正常终止密码子从而导致异常蛋白的潜在毒性。

### 遗传密码扩展技术

25 经过数年的研究，人们对原核生物核糖体的翻译机制已有较全面的理解，多种核糖体不同功能状态的晶体和电镜结构已得到解析，大多数氨 tRNA 合成酶的结构也已获得。基于这些研究成果，近年来发展起来了遗传密码扩展的技术—利用琥珀终止密码子（TAG）来编码多种非天然氨基酸并在生物活体内将其定点插入。到目前为止，这一技术已经将数种非天然氨基酸成功地定点表达在活细胞的蛋白质当中，

30 赋予了这些蛋白质新颖的物理、化学和生理性质。使用这一方法，可以将非天然氨基酸（包括亲和标记和光致异构化的氨基酸、羧基氨基酸和糖基化氨基酸）引入蛋白质中（L. Wang 等人，（2001），*SCIENCE*

292:498-500; J.W. Chin 等, 2002, *Journal of the American Chemical Society* 124:9026-9027; J. W. Chin, & P. G. Schultz, 2002, *ChemBioChem* 11:1135-1137)。这些研究表明, 有可能且有选择性且常规地引入化学官能基团到蛋白质中, 例如, 羰基、炔基、和叠氮基团等特殊化学基团, 这些基团一般能够有效且选择性地形成稳定的共价键, 引入致病蛋白后可以用于研究致病蛋白和其他蛋白相互作用的机制。

经观察 tRNAPyl 和 PylRS 合成酶的复合体的晶体结构, PylRS 合成酶不识别 tRNAPyl 的反密码子环, 所以我们认为改变 tRNAPyl 的反密码子环的碱基序列不影响 tRNAPyl 和 PylRS 合成酶的正交性。

非天然氨酰 tRNA 合成酶是来自古菌或大肠杆菌等微生物的氨酰 tRNA 合成酶, 经过正负筛选人工蛋白序列改造, 不与大肠杆菌或真核生物内源的 tRNA 结合的具有特定序列的氨酰 tRNA 合成酶。参考文献: Wang L, Schultz P G. Expanding the genetic code[J]. *Angewandte chemie international edition*, 2005, 44(1): 34-66。

本文所使用的 tRNA 与非天然氨酰 tRNA 合成酶“正交”的含义意味着这种 tRNA 不是任何内源性氨酰 tRNA 合成酶的底物, 这种氨酰 tRNA 合成酶不能够氨酰化任何内源性的 tRNA。这种正交对互相之间存在唯一对应关系。关于正交的含义还可以参考文献: Wang L, Schultz P G. Expanding the genetic code[J]. *Angewandte chemie international edition*, 2005, 44(1): 34-66。

#### 发明内容

发明人经过对现有技术的思考和研究, 通过改造古甲烷球菌的 tRNA (tRNAPyl), 构建了 PCMV-UUA (tRNA<sup>Pyl</sup><sub>UUA</sub>/PylRS) 和 PCMV-UCA (tRNA<sup>Pyl</sup><sub>UCA</sub>/PylRS) 质粒, 得到全新的高通读效率的 UAA 和 UGA 编码的非天然氨基酸系统, 使之能够用于通读三种终止密码子 UAG, UAA 和 UGA; 构建了模拟内源性提前终止密码子的质粒——在由内含子和外显子组成的 Smad 基因上引入提前终止密码子, 可以用于评价通读内源性提前终止密码子的效率; 将基因密码子扩展技术用于通读单基因遗传病的和肿瘤细胞中抑癌基因的无义突变位点, 恢复相应蛋白质的表达。

本发明的优点可体现在如下中的一个或几个:

1、 获得了全新的高通读效率的 UAA 和 UGA 编码的非天然氨基酸系统。

2、 利用基因密码子扩展技术，实现通读遗传性疾病中的无义突变，恢复截短蛋白的正常结构和功能。

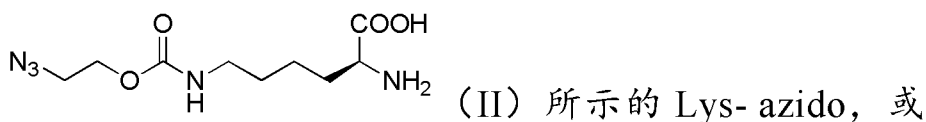
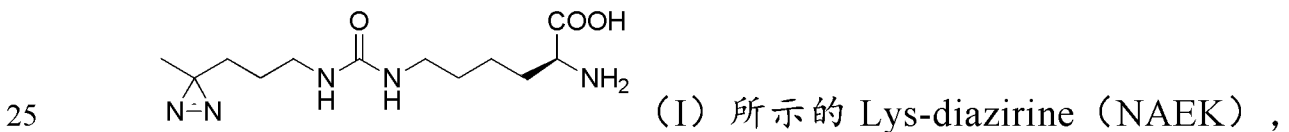
5 在一方面，本发明涉及 tRNA，其中所述 tRNA 反密码子环上的碱基 CUA 突变为 UUA 或 UCA，并且突变后的 tRNA 还能被至少一种与其正交的非天然氨酰 tRNA 合成酶识别。

在一方面，本发明涉及 tRNA，其中所述 tRNA 的反密码子环不与至少一种与其正交的非天然氨酰 tRNA 合成酶结合。

10 在一方面，本发明涉及 tRNA，其中所述 tRNA 为源自古甲烷球菌的 tRNA(tRNAPyl)，或源自大肠杆菌的 tRNA，优选地，所述 tRNA 为 tRNA<sup>Pyl</sup><sub>UUA</sub>，其序列为 SEQ ID NO: 1，或者 tRNA<sup>Pyl</sup><sub>UCA</sub>，其序列为 SEQ ID NO: 2。

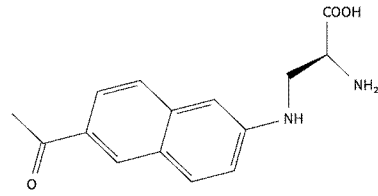
在一方面，本发明涉及非天然氨基酸系统，其中所述系统包括本  
15 发明任一方面的 tRNA 和与其正交的至少一种非天然氨酰 tRNA 合成酶或其编码核酸序列，优选地，所述非天然氨基酸系统选自赖氨酸类非天然氨基酸系统、亮氨酸类非天然氨基酸系统和酪氨酸类非天然氨基酸系统，任选地，其中所述赖氨酸类非天然氨基酸系统包括源自古甲烷球菌的 tRNA(tRNAPyl)和吡咯赖氨酰-tRNA 合成酶 (PylRS)，所  
20 述亮氨酸类非天然氨基酸系统包括源自大肠杆菌的 tRNA(tRNA<sup>Leu</sup>)、亮氨酰-tRNA 合成酶 (LeuRS)，所述酪氨酸类非天然氨基酸系统包括源自大肠杆菌的 tRNA(tRNA<sup>Tyr</sup>)、酪氨酰-tRNA 合成酶 (TyrRS)。

在一方面，本发明涉及非天然氨基酸系统，所述赖氨酸类非天然氨基酸选自：



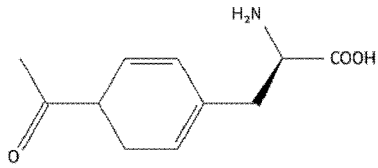
其它含有双吡丙啉、叠氮结构的非天然氨基酸中的至少 1 种，所

述亮氨酸类非天然氨基酸选自：



(III) 所示

的 Anap, 所述酪氨酸类非天然氨基酸选自：



(IV)

所示的 pAcF。

在一方面, 本发明涉及包含本发明任一方面的 tRNA 或本发明任一方面的非天然氨基酸系统的质粒、载体、宿主细胞或试剂盒。

在一方面, 本发明涉及基因密码子扩展的方法, 其中将 tRNA 反密码子环上的碱基 CUA 进行点突变为 UUA 和 UCA, 并且突变后的 tRNA 还能被与其对应的非天然氨基酸 tRNA 合成酶识别。

本发明任一方面的方法, 其中所述 tRNA 是为源自古甲烷球菌的 tRNA(tRNA<sup>Pyl</sup>), 或源自大肠杆菌的 tRNA, 优选地, 所述 tRNA 为 tRNA<sup>Pyl</sup><sub>UUA</sub>, 其序列为 SEQ ID NO: 1, 或者 tRNA<sup>Pyl</sup><sub>UCA</sub>, 其序列为 SEQ ID NO: 2。

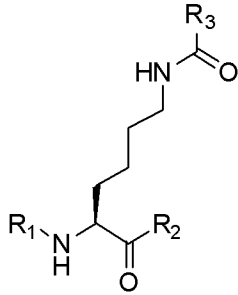
在一方面, 本发明涉及本发明任一方面的 tRNA 或本发明任一方面的非天然氨基酸系统在制备用于治疗遗传病或癌症的药物中的用途, 其中所述遗传病或癌症是由于基因无义突变引起, 优选地, 所述遗传病或癌症是 Dystrophin 蛋白、抑癌基因 STK11 或 EPHB2 蛋白中发生无义突变导致。

本发明任一方面的用途, 其中所述遗传病和癌症选自: 杜氏肌营养不良、囊肿性纤维化、血友病 A、血友病 B、脂质储积症、共济失调毛细血管扩张、赫勒氏综合症、家族黑蒙性白痴、胃癌、肺癌。

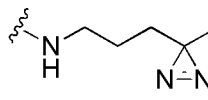
在一方面, 本发明涉及通读恢复无义突变体蛋白的正常表达和功能的方法, 其中将本发明任一方面的 tRNA 或本发明任一方面的非天然氨基酸系统导入含有无义突变体蛋白的细胞或生物体内。

本发明任一方面的方法, 其中所导入的 tRNA 或非天然氨基酸系统识别目标蛋白的无义突变, 并且在无义突变的相应位点引入非天然氨基酸以使得目标蛋白的翻译得以避免提前终止并合成完整的有功能的蛋白质。

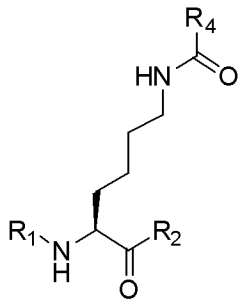
本发明任一方面的方法，其中所引入的非天然氨基酸是位于第 N 位的 Lys-diazirine，其在蛋白中的连接方式如下式所示：



其中，由 R1 到 R2 的方向为氨基酸序列的 N 末端到 C 末端方向，  
5 第 N 位可以是致病蛋白或抑癌基因蛋白上的任意一位氨基酸，相应地，R1 为第 1 至第 N-1 位氨基酸残基，R2 为第 N+1 位至 C 末端的氨基酸

残基，R3 为  或者

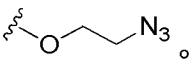
所引入的非天然氨基酸是位于第 N 位的 Lys- azido，其在致病蛋白或抑癌基因蛋白中的连接方式如下式所示：



10

其中，由 R<sub>1</sub> 到 R<sub>2</sub> 的方向为氨基酸序列的 N 末端到 C 末端方向，  
第 N 位可以是如权利要求 1 所述的致病蛋白或抑癌基因蛋白上的任意一位，相应地，R<sub>1</sub> 为第 1 至第 N-1 位氨基酸残基，R<sub>2</sub> 为第 N+1 位至 C 末端的氨基酸残基，

15

R<sub>4</sub> 为 .

在一方面，本发明涉及哺乳动物稳定细胞系，其为 HEK293-PYL，保藏日为 2015 年 11 月 17 日、其保藏号为 CGMCC No: 11592。

评价基因密码子扩展技术的方法，其特征在于其通读效率是用内源性提终止密码子质粒表达 Smad 蛋白的量评价，优选通过以下步骤：

20

(1) 将 Smad 基因克隆到 pcDNA3 上，优选 Smad 基因序列如 SEQ ID NO: 3 所示；

(2) 将 39, 122, 133 位密码子突变为 UAG 琥珀型终止密码子，

得到突变体质粒 pcDNA3-Smad-39TAG, pcDNA3-Smad -122TAG 和 pcDNA3-Smad-133TAG, 优选所述突变体序列如 SEQ ID NO:4-6 所示;

(3) 用突变体质粒转染稳定细胞系 HEK293-PYL, 加入非天然氨基酸培养 1-96 小时, 优选 12-72 小时, 最优选 48 小时后提取蛋白, 经 western blot 检测到全长 Smad 蛋白, 根据全长 Smad 蛋白表达量的多少评价通读效率。

在一方面, 本发明涉及引物对, 其中, 所述引物对序列为

PCMV-UAG-UAA-for :

TGTAGATCGAATGGACTTTAAATCCGTTTCAGCCGG 和

10 PCMV-UAG-UAA-rev :

CCGGCTGAACGGATTTAAAGTCCATTCGATCTACA

或

PCMV-UAG-UGA-for :

CATGTAGATCGAATGGACTTCAAATCCGTTTCAGCCGGGGTT 和

15 PCMV-UAG-UGA-rev :

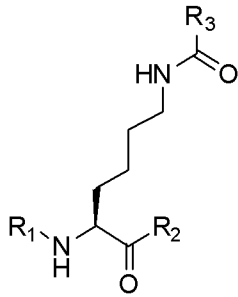
AACCCGGCTGAACGGATTTGAAGTCCATTCGATCTACATG

。

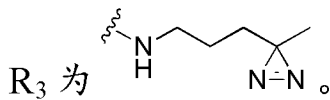
在一方面, 本发明涉及利用优化的基因密码子扩展技术, 在无义突变体蛋白的提前终止密码子处插入非天然氨基酸来, 通读恢复单基因遗传病中的致病蛋白和肿瘤细胞内抑癌基因蛋白的正常表达和功能的方法。

在一方面, 本发明涉及古甲烷球菌的 tRNA(tRNA<sup>Py1</sup>), 由原始 tRNA<sup>Py1</sup><sub>CUA</sub> 的反密码子环定点突变改造成 tRNA<sup>Py1</sup><sub>UUA</sub> 和 tRNA<sup>Py1</sup><sub>UCA</sub>, 序列分别对应 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2, 其特征在于分别与终止密码子 UAA、UGA 完美配对。tRNA<sup>Py1</sup><sub>UUA</sub> 和 tRNA<sup>Py1</sup><sub>UCA</sub> 分别构建在 PCMV-UUA 和 PCMV-UCA 质粒上。

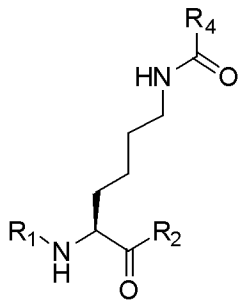
在一方面, 本发明涉及致病蛋白或抑癌基因蛋白, 其中所插入的非天然氨基酸是位于第 N 位的 Lys-diazirine, 其在蛋白中的连接方式如下式所示:



其中，由 R<sub>1</sub> 到 R<sub>2</sub> 的方向为氨基酸序列的 N 末端到 C 末端方向，第 N 位可以是致病蛋白或抑癌基因蛋白上的任意一位氨基酸，相应地，R<sub>1</sub> 为第 1 至第 N-1 位氨基酸残基，R<sub>2</sub> 为第 N+1 位至 C 末端的氨基酸残基，

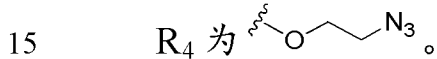


在一方面，本发明涉及致病蛋白或抑癌基因蛋白，其中所引入的非天然氨基酸是位于第 N 位的 Lys- azido，其在致病蛋白或抑癌基因蛋白中的连接方式如下式所示：



10

其中，由 R<sub>1</sub> 到 R<sub>2</sub> 的方向为氨基酸序列的 N 末端到 C 末端方向，第 N 位可以是如权利要求 1 所述的致病蛋白或抑癌基因蛋白上的任意一位，相应地，R<sub>1</sub> 为第 1 至第 N-1 位氨基酸残基，R<sub>2</sub> 为第 N+1 位至 C 末端的氨基酸残基，



在一方面，本发明涉及基因密码子扩展技术，其通读效率是用内源性提终止密码子质粒 pcDNA3-Smad 表达 Smad 蛋白的量评价。通过以下步骤：

(1) 将原序列如 SEQ ID NO: 3 所示的 Smad 基因克隆到 pcDNA3 上。

(2) 将 39, 122, 133 位密码子突变为 UAG 琥珀型终止密码子，突变体质粒 pcDNA3-Smad-39TAG, pcDNA3-Smad -122TAG 和

pcDNA3-Smad-133TAG。序列如 SEQ ID NO: 4~6 所示。

(3) 突变体质粒转染稳定细胞系 HEK293-PYL, 加入非天然氨基酸培养 48 小时后提取蛋白, 经 western blot 检测到全长 Smad 蛋白。

在一方面, 本发明涉及可稳定表达 tRNA (tRNA<sup>Pyl</sup><sub>CUA</sub>) 和吡咯赖  
5 氨酰-tRNA 合成酶(PyIRS)的哺乳动物稳定细胞系, 其为 HEK293-PYL, 保藏日为 2015 年 11 月 17 日、其保藏号为 CGMCC No: 11592。以及稳定整合表达 tRNA<sup>Pyl</sup><sub>UUA</sub>/PyIRS 的 HEK293-PYL-TAA 稳定细胞系, 和稳定表达 tRNA<sup>Pyl</sup><sub>UCA</sub>/PyIRS 的 HEK293-PYL-TGA 稳定细胞系。

## 10 具体实施方案

具体地, 在本发明的一个具体的实施方案中, 构建了识别三种终止密码子 (琥珀型(amber)、赭石型(ocher)、乳白型(opal)) 的三种 tRNA<sup>Pyl</sup>/PyIRS 质粒, 并在稳定细胞系 HEK293-PYL (已保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心, 保藏日为 2015 年 11 月 17 日、保藏号为  
15 CGMCC No: 11592。其分类命名为人 HEK293T 细胞) 中恢复 DMD 疾病蛋白 Dystrophin 的表达、通读了内源性提前终止密码子和在 A549 和 DU145 肿瘤细胞系中恢复了抑癌基因 STK11 和 EPHB2 蛋白的表达。主要通过以下 6 个步骤: (1) 构建 PCMV-UUA (tRNA<sup>Pyl</sup><sub>UUA</sub>/PyIRS) 和 PCMV-UCA (tRNA<sup>Pyl</sup><sub>UCA</sub>/PyIRS) 质粒; (2) 构建含有提前终止密码子的 GFP 报告基因 pcDNA3.1-GFP-39TAG; pcDNA3.1-GFP-39TAA; pcDNA3.1-GFP-39TGA; (3) 根据 DMD 病人的无义突变位点, 利用点突变技术在 dystrophin 蛋白的同源异构体蛋白 Dp71b 蛋白相应位点引入提前终止密码子, 构建含有提前终止密码子 UAG 的 Dp71b 蛋白质粒 Dp71b<sup>3116TAG</sup>, Dp71b<sup>3317TAG</sup>, Dp71b<sup>3601TAG</sup>; (4) 在 Smad 基因 (由  
25 内含子和外显子组成) 上引入提前终止密码子 TAG, 构建了模拟内源性提前终止密码子的质粒 pcDNA3-Smad-39TAG, pcDNA3-Smad-122TAG 和 pcDNA3-Smad-133TAG; (5) 将步骤 (1) 和 (2) 的质粒交叉对应转染至 293T 细胞, 加入非天然氨基酸培养 48 小时后观察绿色荧光, 比较三种终止密码子的通读效率; (6) 将步骤 (3) 中的质粒转染稳定细胞系 HEK293-PYL, 加入非天然氨基酸培养 48 小时后  
30 提蛋白, western blot 方法检测到 Dp71b 全长蛋白, 疾病蛋白表达恢复; (7) 将步骤 (4) 中的质粒转染稳定细胞系 HEK293-PYL, 加入非天

然氨基酸培养 48 小时后提蛋白, western blot 方法检测 Smad 全长蛋白, 证明基因密码子扩展技术能够有效抑制无义介导的 mRNA 降解途径, 通读不同位置内源性的提前终止密码子; (8) 将 PCMV-CUA(tRNA<sup>Py1</sup><sub>CUA</sub>/PyIRS) 转染肿瘤细胞系 A549 和 DU145, 加入  
5 非天然氨基酸培养 48 小时后提取蛋白, 经 western blot 证明在肿瘤细胞系 A549 和 DU145 中 STK11 蛋白和全长 EPHB2 蛋白恢复表达。

在本发明的一个具体的实施方案中, 以 PCMV-CUA (tRNA<sup>Py1</sup><sub>CUA</sub>/PyIRS) 作为模板质粒, 设计点突变引物, 利用定点突变试剂盒, 将 tRNA<sup>Py1</sup><sub>CUA</sub> 反密码子环上的碱基 CUA 通过上述引物进行点突  
10 变为 UUA 和 UCA, 获得 PCMV-UUA (tRNA<sup>Py1</sup><sub>UUA</sub>/PyIRS) 和 PCMV-UCA (tRNA<sup>Py1</sup><sub>UCA</sub>/PyIRS) 质粒。

在本发明的一个具体的实施方案中, 利用含有提前终止密码子的 GFP 绿色荧光蛋白检测三种 tRNA<sup>Py1</sup><sub>CUA/UUA/UCA</sub>/PyIRS 的通读效率。第一步利用点突变技术将 GFP 荧光基因第 39 位氨基酸密码子分别点突  
15 变为 UAG、UAA、UGA 三种提前终止密码子得到 pcDNA3.1-GFP-39TAG、pcDNA3.1-GFP-39TAA 和 pcDNA3.1-GFP-39TGA 三个质粒。第二步用 PCMV-CUA/UUA/CAU 和 pcDNA3.1-GFP-39TAG/TAAA/TGA 交叉对应共转染 293T 细胞。第三步加入非天然氨基酸培养 48 小时后用荧光显微镜观察绿色荧光。最终确认 tRNA<sup>Py1</sup>/PyIRS 对与之完美配对的终止  
20 密码子有高效的通读作用, 其中通读效率 UAG 最高, UGA 次之, UAA 最低。

在本发明的一个具体的实施方案中, 将基因密码子扩展技术应用于恢复人类遗传性疾病相关无义突变蛋白表达。根据人类 DMD 疾病中无义突变位置, 在野生型 Dp71b 序列对应位置进行点突变, 构建含有  
25 提前终止密码子 UAG 的 Dp71b 蛋白质粒 Dp71b<sup>3116TAG</sup> (c.9346C>T), Dp71b<sup>3317TAG</sup> (c.9952C>T), Dp71b<sup>3601TAG</sup> (c.10801C>T)。将质粒转染稳定细胞系 HEK293-PYL, 加入非天然氨基酸培养 48 小时后提蛋白, western blot 方法检测到 Dp71b 全长蛋白, 疾病蛋白表达恢复。

在本发明的一个具体的实施方案中, 用稳定细胞系 HEK293-PYL 验证 tRNA<sup>Py1</sup><sub>CUA</sub>/PyIRS 通读不同位置的内源性提前终止密码子。第一步将由内含子和外显子组成的 Smad 基因克隆到 pcDNA3 质粒上, 然后  
30 利用点突变方法将 Smad 第 39 位, 122 位和 133 位氨基酸密码子突变

为 UAG 提前终止密码子，得到质粒 pcDNA3-Smad-39TAG，pcDNA3-Smad-122TAG 和 pcDNA3-Smad-133TAG。将内源性提前终止密码子质粒（pcDNA3-Smad-39TAG，pcDNA3-Smad-122TAG 或 pcDNA3-Smad-133TAG）顺时转染含有古甲烷球菌的 tRNA(tRNA<sup>Pyl</sup>) 和吡咯赖氨酰-tRNA 合成酶 (PylRS) 的稳定细胞系。加入非天然氨基酸后培养 48 小时后提取蛋白，经 western blot 三组都检测到全长 Smad 的蛋白。证明基因密码子扩展技术能够有效抑制无义介导的 mRNA 降解途径，通读不同位置内源性的提前终止密码子，恢复全长蛋白的表达。

10 在本发明的一个具体的实施方案中，将基因密码子扩展技术用完通读肿瘤细胞中抑癌基因的无义突变位点。将 PCMV-CUA(tRNA<sup>Pyl</sup><sub>CUA</sub>/PylRS) 转染肿瘤细胞系 A549 和 DU145（人肺癌细胞 A 549 基因组上 STK11 发生无义突变 c.109C>T, p.Q37X, 为终止密码子 UAG；人前列腺癌细胞 DU 145 基因组上 EPHB2 基因发生无义突变 c.2167C>T, p.Q723X, 为终止密码子 UAG）。

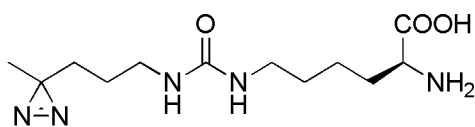
15 加入非天然氨基酸培养 48 小时后提取蛋白，经 western blot 证明基因密码子扩展技术在肿瘤细胞系 A549 和 DU145 中恢复了全长 STK11 蛋白和全长 EPHB2 蛋白的表达。

更为具体地，本发明提供了

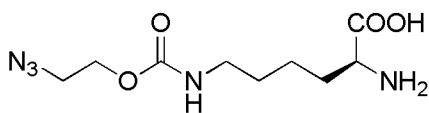
20 1. 利用基因密码子扩展技术，在无义突变体蛋白的提前终止密码子处插入非天然氨基酸来，通读恢复单基因遗传病中的致病蛋白和肿瘤细胞内抑癌基因蛋白的正常表达和功能的方法。

2. 如项目 1 所述的基因密码子扩展技术，由源自古甲烷球菌的 tRNA(tRNA<sup>Pyl</sup>)、吡咯赖氨酰-tRNA 合成酶 (PylRS) 和非天然氨基酸组成。所述非天然氨基酸选自：

25



(I) 所示的 Lys-diazirine (NAEK)，

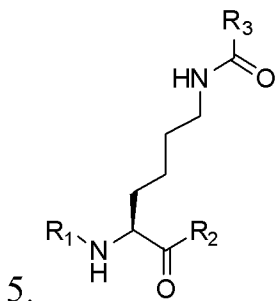


(II) 所示的 Lys-azido，或

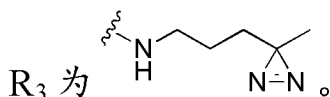
其它含有双吡丙啉、叠氮结构的非天然氨基酸中的至少 1 种。

3.如项目 2 所述的古甲烷球菌的 tRNA(tRNAPyl), 由原始 tRNA<sup>Pyl</sup><sub>CUA</sub> 的反密码子环定点突变改造成 tRNA<sup>Pyl</sup><sub>UUA</sub> 和 tRNA<sup>Pyl</sup><sub>UCA</sub>, 序列分别对应 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 2, 其中分别与终止密码子 UAA、UGA 完美配对。 tRNA<sup>Pyl</sup><sub>UUA</sub> 和 tRNA<sup>Pyl</sup><sub>UCA</sub> 分别构建在  
5 PCMV-UUA 和 PCMV-UCA 质粒上。

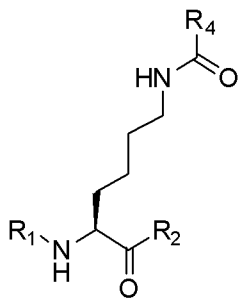
4.如项目 1 所述的致病蛋白或抑癌基因蛋白, 其中所插入的非天然氨基酸是位于第 N 位的 Lys-diazirine, 其在蛋白中的连接方式如下式所示:



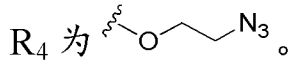
10 其中, 由 R<sub>1</sub> 到 R<sub>2</sub> 的方向为氨基酸序列的 N 末端到 C 末端方向, 第 N 位可以是致病蛋白或抑癌基因蛋白上的任意一位氨基酸, 相应地, R<sub>1</sub> 为第 1 至第 N-1 位氨基酸残基, R<sub>2</sub> 为第 N+1 位至 C 末端的氨基酸残基,



15 6.如项目 1 所述的致病蛋白或抑癌基因蛋白, 其中所引入的非天然氨基酸是位于第 N 位的 Lys- azido, 其在流感病毒蛋白中的连接方式如下式所示:



20 其中, 由 R<sub>1</sub> 到 R<sub>2</sub> 的方向为氨基酸序列的 N 末端到 C 末端方向, 第 N 位可以是如权利要求 1 所述的致病蛋白或抑癌基因蛋白上的任意一位, 相应地, R<sub>1</sub> 为第 1 至第 N-1 位氨基酸残基, R<sub>2</sub> 为第 N+1 位至 C 末端的氨基酸残基,



7.如项目 1-5 所述的基因密码子扩展技术,其通读效率是用内源性提终止密码子质粒 pcDNA3-Smad 表达 Smad 蛋白的量评价。通过以下步骤:

5 (1) 将原序列如 SEQ ID NO: 3 所示的 Smad 基因克隆到 pcDNA3 上。

(2) 将 39, 122, 133 位密码子突变为 UAG 琥珀型终止密码子, 突变体质粒 pcDNA3-Smad-39TAG, pcDNA3-Smad -122TAG 和 pcDNA3-Smad-133TAG。序列如 SEQ ID NO: 4~6 所示。

10 (3) 突变体质粒转染稳定细胞系 HEK293-PYL, 加入非天然氨基酸培养 48 小时后提取蛋白, 经 western blot 检测到全长 Smad 蛋白。

8. 可稳定表达 tRNA (tRNAPyl) 和吡咯赖氨酰-tRNA 合成酶 (tRNAPyl) 的哺乳动物稳定细胞系, 其为 HEK293-PYL, 保藏日为 2015 年 11 月 17 日、其保藏号为 CGMCC No: 11592。

15

附图说明:

图 1. tRNAPyl<sub>CUA</sub>/PylRS, tRNAPyl<sub>UUA</sub>/PylRS 和 tRNAPyl<sub>UCA</sub>/PylRS 分别通读 GFP 绿色荧光蛋白 TAG, TAA 和 TGA 终止密码子。

20 图 2A. 正交 tRNA/氨酰 tRNA 合成酶的稳定细胞系 HEK293-PYL 筛选方法的建立。

图 2B. 双病毒过表达体系的构建。

图 2C. pXH-12t-zeo 载体的构建。

25 图 3. Western blot 验证在稳定细胞系 HEK293-PYL 中, 通读疾病蛋白 dystrophin 上的提前终止密码子从而恢复蛋白表达。

图 4. 稳定细胞系 HEK293-PYL 中通读内源性提前终止密码子

图 5. 基因密码子扩展技术通读 A549 和 DU145 肿瘤细胞系中提前终止密码子, 恢复 STK11 和 EPHB2 蛋白表达

30 以上所述的仅是本发明的一些实施方式。对于本领域的普通技术人员来说, 在不脱离本发明创造构思的前提下, 还可以做出若干变形

和改进，这些都属于本发明的保护范围。

为了更好地理解本发明，发明人用实施例对具体试验进行阐述和说明，其中所述实施例仅用于说明，并不限定本发明的保护范围。任何与本发明等价的变体或者实施方案都包括在本发明中。

5 实施例 1：PCMV-UUA (tRNA<sup>Pyl</sup><sub>UUA</sub>/PylRS) 和 PCMV-UCA (tRNA<sup>Pyl</sup><sub>UCA</sub>/PylRS) 质粒的构建

(1) 古甲烷球菌 PCMV-CUA 质粒 (tRNA<sup>Pyl</sup><sub>CUA</sub>/PylRS) 的获得

从保藏地：中国普通微生物菌种保藏管理中心 菌种保藏地址：地址：北京市朝阳区北辰西路 1 号院，中国科学院微生物研究所，保藏  
10 日为 2011 年 6 月 14 日、保藏号为 CGMCC No: 4951 的分类命名为大肠埃希氏菌 (Escherichia coli) 的含有质粒 pACYC-tRNA / PylRS 的大肠埃希氏菌 pACYC-tRNA / PylRS 中获取质粒 pACYC-tRNA / PylRS (以下简称该质粒为 PCMV-CUA)，该质粒可以表达特异识别非天然氨基酸 Lys-diazirine 和 Lys-azido 的 tRNA 合成酶(PylRS)和特异性识别  
15 琥珀终止密码子 UAG 的 tRNA (tRNA<sup>Pyl</sup><sub>CUA</sub>)。

(2) 点突变 tRNA<sup>Pyl</sup><sub>CUA</sub> 构建 PCMV-UUA (tRNA<sup>Pyl</sup><sub>UUA</sub>/PylRS) 和 PCMV-UCA (tRNA<sup>Pyl</sup><sub>UCA</sub>/PylRS) 质粒

发明人针对突变 tRNA<sup>Pyl</sup><sub>CUA</sub> 的反密码子环，分别设计突变引物，具体的引物如下所示。

20 表 1 tRNA<sup>Pyl</sup><sub>CUA</sub> 的反密码子环点突变引物

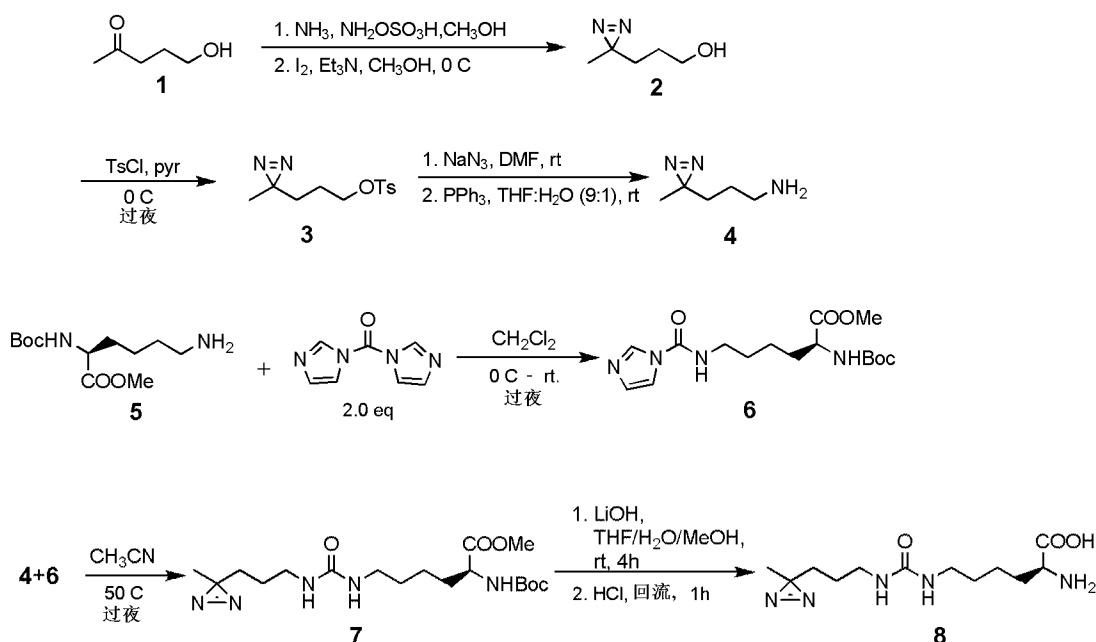
PCMV-UAG-UAA-for	TGTAGATCGAATGGACTTTAAATCCGTTTCAGCC GG
PCMV-UAG-UAA-rev	CCGGCTGAACGGATTAAAGTCCATTCGATCTA CA
PCMV-UAG-UGA-for	CATGTAGATCGAATGGACTTCAAATCCGTTCA GCCGGGTT
PCMV-UAG-UGA-rev	AACCCGGCTGAACGGATTTGAAGTCCATTCGA TCTACATG

以 PCMV-CUA 作为模板质粒, 利用定点突变试剂盒(QuikChange® Lightning Site-Directed Mutagenesis Kits, Catalog #210518), 按说明书操作将 tRNA<sup>Pyl</sup><sub>CUA</sub> 反密码子环上的碱基 CUA 通过上述引物进行点突变为 UUA 和 UCA, 获得 PCMV-UUA (tRNA<sup>Pyl</sup><sub>UUA</sub>/PylRS) 和 PCMV-UCA

(tRNA<sup>Py1</sup><sub>UCA</sub>/PyIRS)质粒, 经测序验证突变成功。tRNA<sup>Py1</sup><sub>UUA</sub> 的序列为 SEQ ID NO: 1 所示; tRNA<sup>Py1</sup><sub>UCA</sub> 的序列为 SEQ ID NO: 2 所示。

实施例 2: 利用含有提前终止密码子的 GFP 绿色荧光蛋白检测三种 tRNA<sup>Py1</sup><sub>CUA/UUA/UCA</sub>/PyIRS 正交系统的通读效率

- 5 (1) 非天然氨基酸 Lys-diazirine 的合成和鉴定  
非天然氨基酸 Lys-diazirine 的化学合成反应式如下。



如上述所示, 将原料 1 (5-羟基-2-戊酮) 15 mL 与液氨 40mL 在 -40  
10 °C 下搅拌反应 5h, 之后降温至 -60°C, 缓慢滴加 NH<sub>2</sub>OSO<sub>3</sub>H 的甲醇溶液, 加毕升至室温, 反应过夜。滤除沉淀, 向上清液中加入三乙胺, 冰浴条件下缓慢加入 I<sub>2</sub>, 至反应液颜色变深, 不再产生气泡为止。反应完全后蒸除溶剂, 经乙醚萃取后干燥。蒸除乙醚, 剩余液体减压蒸馏获得 25.4g 无色粘稠液体产物 2。

15 将上述产物 2 用吡啶溶解, 0°C 搅拌下加入 11 g TsCl, 反应过夜。待反应完全后将反应液倒入浓盐酸与冰水的混合液中, 乙醚萃取, 醚层分别用 1N 盐酸和 1N NaOH 洗涤。有机相干燥柱分得到 11.8g 无色粘稠液体产物 3。

将上述产物 3 用 DMF 溶解, 加入 NaN<sub>3</sub> 室温反应隔夜至反应完全,  
20 加入大量水, 乙醚萃取。蒸除乙醚, 剩余产物用 THF:水(9:1)混溶, 加入三苯基磷, 室温反应。反应完后加 1N HCl 混匀, 旋干 THF, 二氯甲

烷把未反应的原料，PPh<sub>3</sub>和O=PPh<sub>3</sub>洗掉，液相加1N NaOH调pH到12，二氯甲烷萃取出4.0 g产物4。

将5.2 g原料5 (Boc-Lys-OMe)与羰基二咪唑反应，制备出5.9 g化合物6。之后化合物6与上述产物4 (4.0 g)偶联得到化合物7，最后经过两步脱保护，将Boc和甲酯脱除，得到目标4.5 g产物8，即Lys-diazirine。经谱学验证，结果为：

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 3.10 (1H, t, J = 6.3 Hz), 2.96 (4H, m), 1.25 (10H, m), 0.90 (3H, s); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O): 183.63, 160.66, 56.00, 39.80, 39.30, 34.49, 30.84, 29.20, 26.75, 23.92, 22.43, 18.80; HREIMS m/z 308.16937 [M+1]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>N<sub>5</sub>NaO<sub>3</sub>, 308.16931), 证明所得到的Lys-diazirine结构正确。

(2) 构建含有提前终止密码子的GFP报告基因

绿色荧光蛋白GFP是最常用的报告基因，也是指示非天然氨基酸插入的有力工具，其由238个氨基酸组成，其基因序列如SEQ ID NO: 7。

将GFP序列插入pcDNA3.1商业质粒上，将GFP荧光基因第39位氨基酸密码子分别点突变为UAG、UAA、UGA三种提前终止密码子。设计能够使编码所述氨基酸的密码子分别突变为三种终止密码子的引物，具体引物如下表所示。

表2 GFP突变引物列表

GFP-39-UAG-for	GGCGAGGGCGATGCCACCTAGGGCAAGCTGACCCTG AAGTTC
GFP-39-UAG-for	GAACTTCAGGGTCAGCTTGCCCTAGGTGGCATCGCC CTCGCC
GFP-39-UAA-for	GGCGAGGGCGATGCCACCTAAGGCAAGCTGACCCTG AAGTTC
GFP-39-UAA-for	GAACTTCAGGGTCAGCTTGCCTTAGGTGGCATCGCC CTCGCC
GFP-39-UAG-for	GGCGAGGGCGATGCCACCTGAGGCAAGCTGACCCT GAAGTTC
GFP-39-UAG-for	GAACTTCAGGGTCAGCTTGCCTCAGGTGGCATCGCC CTCGCC

利用定点突变试剂盒 (QuikChange® Lightning Site-Directed Mutagenesis Kits, Catalog #210518), 按说明书操作, 以野生型 GFP 表达载体 pcDNA3.1-GFP-WT 为模板将第 39 位的氨基酸密码子分别突变为三种终止密码子, 构建得到表达质粒 (pcDNA3.1-GFP-39TAG、  
5 pcDNA3.1-GFP-39TAA 和 pcDNA3.1-GFP-39TGA), 经测序验证突变成功。

(3) 293T 细胞中顺转 PCMV 和 pcDNA3.1-GFP 质粒验证突变后的正交系统的通读效率

将实施例 2 的步骤 2 获得的 pcDNA3.1-GFP, 以及实施例 1 的步骤 2 的 PCMV 质粒按表 3 的分组以 1:2 比例混合, 再与转染试剂 megatrans1.0 按 1:3 比例混合, 共同加入 293T 细胞, 6 小时后换液加入浓度为 1mM 的 NAEK, 至细胞于 37°C, 5%CO<sub>2</sub> 的孵箱中继续培养 48 小时后用荧光显微镜观察绿色荧光, 结果如图 1 所示。最终确认 tRNA<sup>Pyl</sup> /PylRS 对与之完美配对的终止密码子有高效的通读作用, 其中通读效率 UAG 最高, UGA 次之, UAA 最低。  
15

表 3 PCMV 质粒和 GFP 质粒分组混合

组别	质粒
1	PCMV-TAG 和 pcDNA3.1-GFP-39TAG
2	PCMV-TAA 和 pcDNA3.1-GFP-39TAG
3	PCMV-TGA 和 pcDNA3.1-GFP-39TAG
4	PCMV-TAG 和 pcDNA3.1-GFP-39TAA
5	PCMV-TAA 和 pcDNA3.1-GFP-39TAA
6	PCMV-TGA 和 pcDNA3.1-GFP-39TAA
7	PCMV-TAG 和 pcDNA3.1-GFP-39TGA
8	PCMV-TAA 和 pcDNA3.1-GFP-39TGA
9	PCMV-TGA 和 pcDNA3.1-GFP-39TGA

### 实例 3: 三种稳定细胞系 HEK293-PYL 中通读疾病蛋白 Dystrophin

#### (1) 稳定细胞系 HEK293-PYL 的构建

20 构建了分别带有 puromycin 和 hygromycin 抗性的 2 个慢病毒过表达载体, 两者分别携带氨酰 tRNA 合成酶和带有 39 位 TAG 突变的报告基因 GFP, 通过两轮病毒转导 HEK-293T 细胞和 puromycin/hygromycin

筛选，得到稳定细胞株 pyIRS/GFP<sup>39TAG</sup>。之后，构建了三种携带 12 个拷贝数 tRNA (CUA\UUA\UCA) 和 zeomycin 抗性的 pXH-zeo-12tRNA 载体，质粒线性化转染细胞株 pyIRS/GFP<sup>39TAG</sup>，后经 UAA 存在下 zeomycin 筛选，最后分离出 GFP 阳性细胞 (UAA 存在下细胞呈绿色，  
5 去除 UAA 细胞呈无色)，从而得到了分别表达 tRNA<sup>Pyl</sup><sub>CUA</sub>/PyIRS、tRNA<sup>Pyl</sup><sub>UUA</sub>/PyIRS 和 tRNA<sup>Pyl</sup><sub>UCA</sub>/PyIRS 的三株稳定细胞系 HEK293-PYL (图 2A)。

#### a. 载体的构建

我们首先构建了分别带有 puromycin 和 hygromycin 抗性的 2 个慢病毒过表达载体，两者分别携带氨酰 tRNA 合成酶和带有 39 位 TAG 突变的报告基因 GFP，见图 2B。我们从 psd31 载体出发，我们先通过 BamHI/xbaI 酶切位点将 sv40-puro<sup>R</sup> 基因分别替换成 IRES-puro<sup>R</sup> 和 IRES-hygro<sup>R</sup> 基因，这样就得到了 2 个不同抗性的病毒载体 psd31-IRES-puro<sup>R</sup> 和 psd31-IRES-hygro<sup>R</sup>。其中，IRES 为内部核糖体进入序列 (internal ribosome entry site)，IRES 序列常用于多顺反子基因  
15 表达。例如，在目的基因之后插入 IRES 序列，后面是选择标记基因，这样转录出来的 mRNA 就可以同时表达两种蛋白。利用 IRES 系统过表达目的基因有 2 个优势：1. 目的基因与标记基因共用一个启动子，避免了假阳性的出现；2. IRES 翻译效率低于传统翻译起始位点，使得目的基因表达量高于标记基因。所以，我们在 IRES 位点的前面通过  
20 BamHI 酶切位点分别引入 CMV-pyIRS 序列和 CMV-GFP<sup>39TAG</sup> 序列，就得到了能同时过表达两个目的蛋白的双病毒体系 psd31-CMV-pyIRS-IRES-puro<sup>R</sup>/psd31-CMV-GFP<sup>39TAG</sup>-IRES-hygro<sup>R</sup>。所用主要引物见表  
4。

25

表 4. 双病毒构建引物

SOE	IRES-hygro-for(BamHI)	CGGGATCCAATTCCGCCCTCTC
PCR 引物	IRES-hygro-middle-for:	CCCACAAGGAGACGACCTTCCATGAAAA AGCCTGAACTCACC
	IRES-hygro-middle-rev:	GGTGAGTTCAGGCTTTTTCATGGAAGGTC GTCTCCTTGTGGG
	IRES-hygro-rev(xbaI):	GCTCTAGA TCATTCCTTTGCCCTCGGAC
SOE	3.1-CMV-for(BamHI)	CGGGATCCGTTGACATTGATTATTGAC
PCR 引物	CMV-GFP-middle-for:	CCCAAGCTGGCTAGTTAAGCTTGCCACCA TGGATTACAAGGATGACGACG
	CMV-GFP-middle-rev:	CGTCGTCATCCTTGTAAATCCATGGTGGCA AGCTTAACTAGCCAGCTTGGG
	GFP-his-rev(BamHI):	CGGGATCCTCAATGGTGATGGTGATGAT G
PCR 引物	Pro-P1-for(BamHI):	TGGATCCCCAATATTGGCCATTAGCC
	MbpylRS-rev(bamHI):	TGGATCCAAAAATTATAGATTGGTTG
测序 引物	PSD31-BamHI-测序-for:	CAGGGACAGCAGAGATCCAG
	31-IRES-BamHI-rev:	GGCTTCGGCCAGTAACGTTAG

发明人用质粒稳定转染的方法过表达 tRNA。为了保证 tRNA 的表  
达量，发明人构建得到了载体 pXH-12t-zeo，其序列如 SEQ ID NO: 8  
5 所示。（图 2C）

#### b. 慢病毒的包装和转导

先包装 psd31-CMV-pylRS-IRES-puro<sup>R</sup> 病毒，转导 HEK293T 细胞，  
puromycin 筛选浓度为 0.6ug/ml，得到稳定细胞系 1 号后，再加入  
psd31-CMV-GFP39TAG-IRES-hygro<sup>R</sup> 病毒，hygromycin 筛选浓度为  
10 200ug/ml，得到稳定细胞系 2 号。

#### c. 质粒的稳定转染

发明人通过质粒稳定转染，进行了第三轮筛选，最后得到了稳定  
表达正交 tRNA/氨酰 tRNA 合成酶的特殊细胞系，步骤如下：

A. 将 pXH-12t-zeo 载体酶切线性化后，转染表达 pylRS 和 GFP<sup>39TAG</sup>

蛋白的稳定细胞系 2 号 (10cm 培养皿, 每皿 10ug 质粒, 转染时不能有抗生素的存在)。

B. 转染 6 小时后换液, 加入非天然氨基酸。

5 C. 转染 48 小时后, 观察绿色荧光, 换液, 加入 400ug/ml 的 zeomycin。

D. 每 3 天换液, 直到 blank 组全部死亡, 转染组形成克隆。

E. 分离纯化 GFP 阳性克隆, 继续用剂量减半的 zeomycin 扩大培养, 得到 12t-zeo 稳定细胞系 HEK293-PYL。

质粒稳定转染筛选单克隆的要点如下:

10 A. 质粒稳定转染细胞密度很重要, 筛选时细胞密度偏稀, 易死亡难形成克隆。

B. 从单克隆化时开始, 就要加大营养, 血清和生长因子。

15 C. 单克隆接种到孔中细胞数目很少时, 细胞之间的信号会变得很弱, 也会导致阳性细胞的状态不佳甚至死亡。可以使用一种特殊的培养液: 即细胞汇合度达到 80% 的时候的旧培养液通过过滤器消毒, 和新鲜的培养液按 1: 1 混合备用。或者适当增加血清浓度。

D. 单克隆消化后, 不要加 zeomycin 和 UAA, 等细胞贴壁后再加, 避免细胞死亡。

(2) 构建含有提前终止密码子 UAG 的 Dp71b 突变质粒

20 Dystrophin 蛋白的同源异构体 Dp71b 序列如 SEQ ID NO: 9 所示, 发明人根据杜氏肌营养不良病人无义突变的位点, 对野生型 Dp71b 序列进行点突变, 在不同位置引入提前终止密码子, 构建含有提前终止密码子 UAG 的 Dp71b 质粒 Dp71b<sup>3116TAG</sup> (c.9346C>T), Dp71b<sup>3317TAG</sup> (c.9952C>T), Dp71b<sup>3601TAG</sup> (c.10801C>T), 如序列 SEQ ID NO:10~12  
25 所示, 经测序验证突变成功。

表 5: Dp71b 点突变引物

Dp71b-9346-for	TGAAACTCCGAAGACTGTAGAAGGCCCTTTGCTTG
Dp71b-9346-for	CAAGCAAAGGGCCTTCTACAGTCTTCGGAGTTTCA
Dp71b-9952-for	CATCAGGCCAAATGTAACATCTGCAAATAGTGTCCAA TCATT
Dp71b-9952-for	AATGATTGGACACTATTTGCAGATGTTACATTTGGCC TGATG
Dp71b-10801-for	GCTGGAGCAACCCTAGGCAGAGGCCAA
Dp71b-10801-for	TTGGCCTCTGCCTAGGGTTGCTCCAGC

## (3) 稳定细胞系 HEK293-PYL 中通读疾病蛋白 Dystrophin

将实施例 3 的步骤 2 获得的 Dp71b<sup>3116TAG</sup>, Dp71b<sup>3317TAG</sup>,  
 5 Dp71b<sup>3601TAG</sup> 质粒与转染试剂 megatrans1.0 按 1:3 比例混合, 共同加入稳定细胞系 HEK293-PYL 中, 6 小时后换液加入浓度为 1mM 的 NAEK, 至细胞于 37°C, 5%CO<sub>2</sub> 的孵箱中继续培养 48 小时后提取蛋白, western blot 检测 (一抗为 anti-dystrophin, 为抗 dystrophin 蛋白 C 末端抗体, 货号 12715-1-AP) 到全长 dystrophin 蛋白的产生, 如图 3。  
 10 证明 tRNA<sup>Py1</sup> /PyIRS 能够通读不同位置的提前终止密码子, 恢复疾病蛋白的表达。

实施例 4: 稳定细胞系 HEK293-PYL 中通读内源性提前终止密码子效果考察

(1) 内源性提前终止密码子质粒 pcDNA3.1-Smad-39TAG;  
 15 pcDNA3.1-Smad-39TAA; pcDNA3.1-Smad-39TGA 构建

将有内含子和外显子组成的 Smad 基因序列 (如 SEQ ID:3 所示) 插入 pcDNA3.1 商业质粒上, 然后将 Smad 第 39 位, 122 位和 133 位氨基酸密码子突变为 UAG 提前终止密码子, 得到质粒 pcDNA3-Smad-39TAG, pcDNA3-Smad-122TAG 和  
 20 pcDNA3-Smad-133TAG (如 SEQ ID:4~6 所示)。

## (2) 稳定细胞系中验证内源性提前终止密码子的通读

将实施例 4 的步骤 1 获得的 pcDNA3-Smad-39TAG, pcDNA3-Smad-122TAG 或 pcDNA3-Smad-133TAG 质粒与转染试剂

megatrans1.0 按 1:3 比例混合, 加入 稳定细胞系 HEK293-PYL 中, 6 小时后换液加入浓度为 1mM 的 NAEK, 至细胞于 37°C, 5%CO<sub>2</sub> 的孵箱中继续培养 48 小时后提取蛋白, western blot 检测 (一抗为 anti-myc, 标签抗体) 到全长 Smad 蛋白的产生, 如图 4。验证基因密码子扩展技术能够抑制无义介导的 mRNA 降解过程, 并通读提前终止密码子, 恢复蛋白的表达。

#### 实施例 5: 基因密码子扩展通读肿瘤细胞系基因组上的提前终止密码子

经查阅文献, 人肺癌细胞 A 549 基因组上 STK11 发生无义突变 c.109C>T, p.Q37X, 为琥珀型终止密码子 UAG; 人前列腺癌细胞 DU 145 基因组上 EPHB2 基因发生无义突变 c.2167C>T, p.Q723X, 为琥珀型终止密码子 UAG。

将 PCMV-CUA (tRNA<sup>Pyl</sup><sub>CUA</sub> /PylIRS) 质粒与转染试剂 megatrans1.0 按 1: 3 比例混合, 分别转染 A 549 和 DU 145 细胞, 6 小时后换液加入浓度为 1mM 的 NAEK, 至细胞于 37°C, 5%CO<sub>2</sub> 的孵箱中继续培养 48 小时后提取蛋白, western blot 检测 (一抗分别为 anti-STK11 和 anti-EPHB2) 到全长蛋白的 STK11 和 EPHB2 产生, 如图 5。验证基因密码子扩展技术能够通读内源性基因组上的提前终止密码子, 恢复抑癌基因蛋白表达。

打印件(原件为电子形式)

0-1	PCT/RO/134表 有关保藏的微生物或其他生物材料的说明 (PCT细则第13条之二)	
0-1-1	软件版本	PCT-SAFE 版本 3.51.074.250 MT/FOP 20160701/0.20.5.24
0-2	国际申请号	PCT/CN2017/075577
0-3	申请人或代理人的档案号	FPCH17160036

1	下面的说明与本申请说明书中此处提到的 保藏的微生物或其他生物材料相关:	
1-1	页码	9
1-2	行号:	13-15
1-3	保藏事项	
1-3-1	保藏单位名称	CGMCC 中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心
1-3-2	保藏单位地址	Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, No. 1, West Beichen Road, Chaoyang District, Beijing 100101, China
1-3-3	保藏日期	2015年 11月 17日 (17.11.2015)
1-3-4	保藏号	CGMCC 11592
1-5	本说明是对下列指定国	所有指定国

由受理局填写

0-4	本表格与国际申请一起收到: (是或否)	
0-4-1	受权官员	

由国际局填写

0-5	国际局收到本表格日期:	
0-5-1	受权官员	

## 权 利 要 求

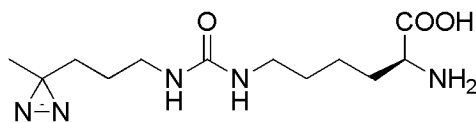
1. tRNA, 其特征在于所述 tRNA 反密码子环上的碱基 CUA 突变为 UUA 或 UCA, 并且突变后的 tRNA 还能被至少一种与其正交的非天然  
5 氨酰 tRNA 合成酶识别。

2. 权利要求 1 的 tRNA, 其中所述 tRNA 的反密码子环不与至少一种与其正交的非天然氨酰 tRNA 合成酶结合。

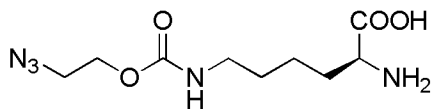
3. 权利要求 1 或 2 的 tRNA, 其特征在于所述 tRNA 为源自古甲烷  
10 球菌的 tRNA(tRNAPyl), 或源自大肠杆菌的 tRNA, 优选地, 所述 tRNA 为 tRNA<sup>Pyl</sup><sub>UUA</sub>, 其序列为 SEQ ID NO: 1, 或者 tRNA<sup>Pyl</sup><sub>UCA</sub>, 其序列为 SEQ ID NO: 2。

4. 非天然氨基酸系统, 其特征在于所述系统包括权利要求 1-3 任  
15 一项的 tRNA 和与其正交的至少一种非天然氨酰 tRNA 合成酶或其编码核酸序列, 优选地, 所述非天然氨基酸系统选自赖氨酸类非天然氨基酸系统、亮氨酸类非天然氨基酸系统和酪氨酸类非天然氨基酸系统, 任选地, 其中所述赖氨酸类非天然氨基酸系统包括源自古甲烷球菌的 tRNA(tRNAPyl) 和吡咯赖氨酰-tRNA 合成酶 (PylRS), 所述亮氨酸类非天然氨基酸系统包括源自大肠杆菌的 tRNA(tRNA<sup>Leu</sup>)、亮氨酰-tRNA 合成酶 (LeuRS), 所述酪氨酸类非天然氨基酸系统包括源自大肠杆菌  
20 的 tRNA(tRNA<sup>Tyr</sup>)、酪氨酰-tRNA 合成酶 (TyrRS)。

5. 根据权利要求 4 的非天然氨基酸系统, 所述赖氨酸类非天然氨基酸选自:

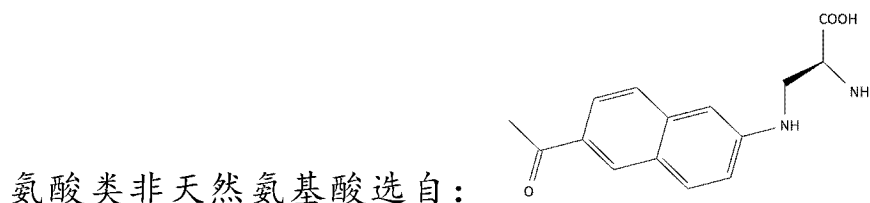


(I) 所示的 Lys-diazirine (NAEK),



(II) 所示的 Lys-azido, 或

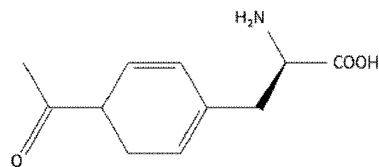
25 其它含有双吡丙啉、叠氮结构的非天然氨基酸中的至少 1 种, 所述亮



氨酸类非天然氨基酸选自:

(III) 所示的 Anap,

所述酪氨酸类非天然氨基酸选自：  
的 pAcF。



(IV) 所示

6. 包含权利要求 1-3 任一项的 tRNA 或权利要求 4-5 任一项的非天然氨基酸系统的质粒、载体、宿主细胞或试剂盒。

5 7. 基因密码子扩展的方法，其特征在于将 tRNA 反密码子环上的碱基 CUA 进行点突变为 UUA 和 UCA，并且突变后的 tRNA 还能被与其对应的非天然氨基酸 tRNA 合成酶识别。

8. 根据权利要求 7 的方法，其中所述 tRNA 是为源自古甲烷球菌的 tRNA(tRNAPyl)，或源自大肠杆菌的 tRNA，优选地，所述 tRNA  
10 为 tRNA<sup>Pyl</sup><sub>UUA</sub>，其序列为 SEQ ID NO: 1，或者 tRNA<sup>Pyl</sup><sub>UCA</sub>，其序列为 SEQ ID NO: 2。

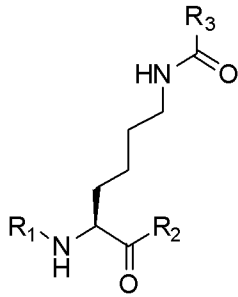
9. 权利要求 1-3 任一项的 tRNA 或权利要求 4-6 任一项的非天然氨基酸系统在制备用于治疗遗传病或癌症的药物中的用途，其中所述遗传病或癌症是由于基因无义突变引起，优选地，所述遗传病或癌症是  
15 Dystrophin 蛋白、抑癌基因 STK11 或 EPHB2 蛋白中发生无义突变导致。

10. 根据权利要求 9 的用途，其中所述遗传病和癌症选自：杜氏肌营养不良、囊肿性纤维化、血友病 A、血友病 B、脂质储积症、共济失调毛细血管扩张、赫勒氏综合症、家族黑蒙性白痴、胃癌、肺癌。

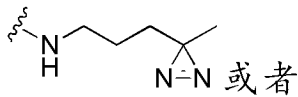
11. 通读恢复无义突变体蛋白的正常表达和功能的方法，其特征在于将权利要求 1-3 任一项的 tRNA 或权利要求 3-6 任一项的非天然氨基酸系统导入含有无义突变体蛋白的细胞或生物体内。  
20

12. 根据权利要求 11 的方法，其中所导入的 tRNA 或非天然氨基酸系统识别目标蛋白的无义突变，并且在无义突变的相应位点引入非天然氨基酸以使得目标蛋白的翻译得以避免提前终止并合成完整的有  
25 功能的蛋白质。

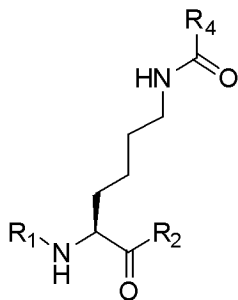
13. 根据权利要求 12 的方法，其中所引入的非天然氨基酸是位于第 N 位的 Lys-diazirine，其在蛋白中的连接方式如下式所示：



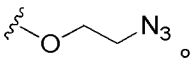
其中，由 R1 到 R2 的方向为氨基酸序列的 N 末端到 C 末端方向，第 N 位可以是致病蛋白或抑癌基因蛋白上的任意一位氨基酸，相应地，R1 为第 1 至第 N-1 位氨基酸残基，R2 为第 N+1 位至 C 末端的氨基酸

5 残基，R3 为  或者

所引入的非天然氨基酸是位于第 N 位的 Lys- azido，其在致病蛋白或抑癌基因蛋白中的连接方式如下式所示：



10 其中，由 R<sub>1</sub> 到 R<sub>2</sub> 的方向为氨基酸序列的 N 末端到 C 末端方向，第 N 位可以是如权利要求 1 所述的致病蛋白或抑癌基因蛋白上的任意一位，相应地，R<sub>1</sub> 为第 1 至第 N-1 位氨基酸残基，R<sub>2</sub> 为第 N+1 位至 C 末端的氨基酸残基，

R<sub>4</sub> 为 .

14. 哺乳动物稳定细胞系，其为 HEK293-PYL，保藏日为 2015 年 15 11 月 17 日、其保藏号为 CGMCC No: 11592。

15. 评价基因密码子扩展技术的方法，其特征在于其通读效率是用内源性提终止密码子质粒表达 Smad 蛋白的量评价，优选通过以下步骤：

(1) 将 Smad 基因克隆到 pcDNA3 上，优选 Smad 基因序列如 20 SEQ ID NO: 3 所示；

(2) 将 39, 122, 133 位密码子突变为 UAG 琥珀型终止密码子，得到突变体质粒 pcDNA3-Smad-39TAG, pcDNA3-Smad -122TAG 和

pcDNA3-Smad-133TAG, 优选所述突变体序列如 SEQ ID NO:4-6 所示;

(3) 用突变体质粒转染稳定细胞系 HEK293-PYL, 加入非天然氨基酸培养 1-96 小时, 优选 12-72 小时, 最优选 48 小时后提取蛋白, 经 western blot 检测到全长 Smad 蛋白, 根据全长 Smad 蛋白表达量的多少评价通读效率。

16. 引物对, 其特征在于, 所述序列为 PCMV-UAG-UAA-for:

TGTAGATCGAATGGACTTTAAATCCGTTCAGCCGG

和

PCMV-UAG-UAA-rev

:

CCGGCTGAACGGATTTAAAGTCCATTCGATCTACA

10 或

PCMV-UAG-UGA-for

:

CATGTAGATCGAATGGACTTCAAATCCGTTCAGCCGGGTT

和

PCMV-UAG-UGA-rev

:

AACCCGGCTGAACGGATTTGAAGTCCATTCGATCTACATG

15 。

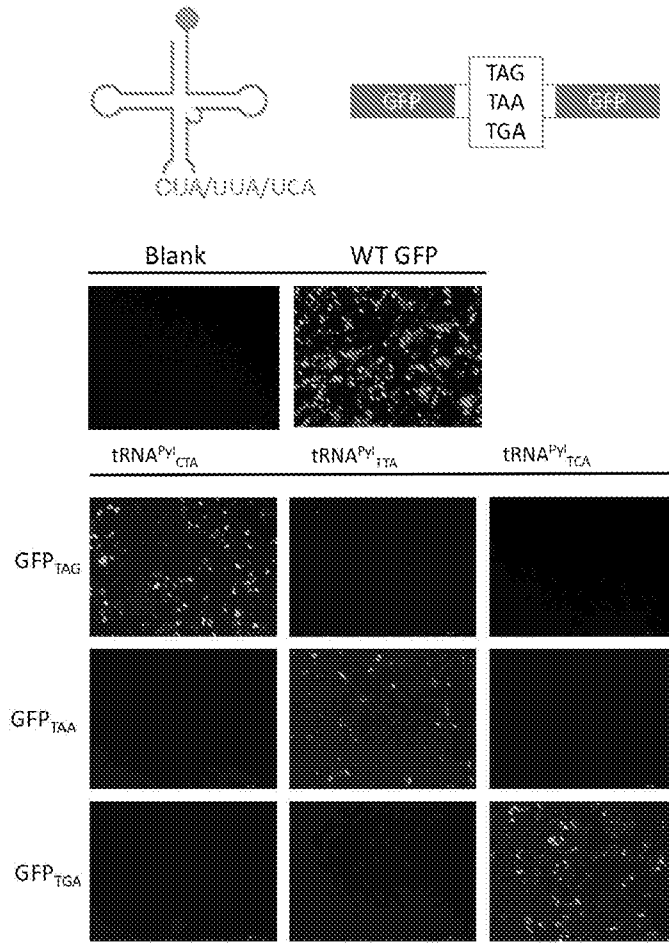


图 1

筛选稳定细胞系的流程

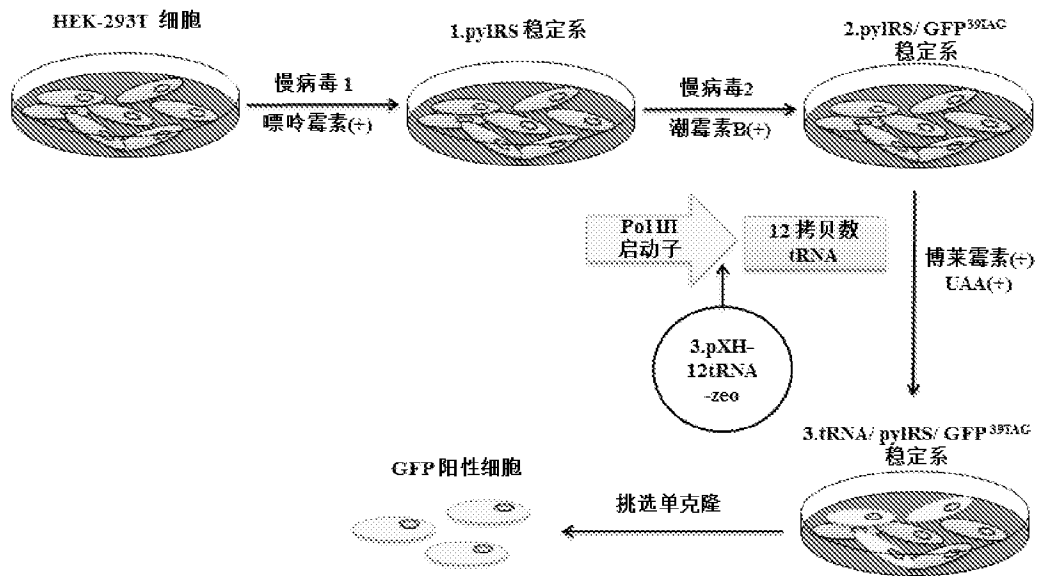


图 2A

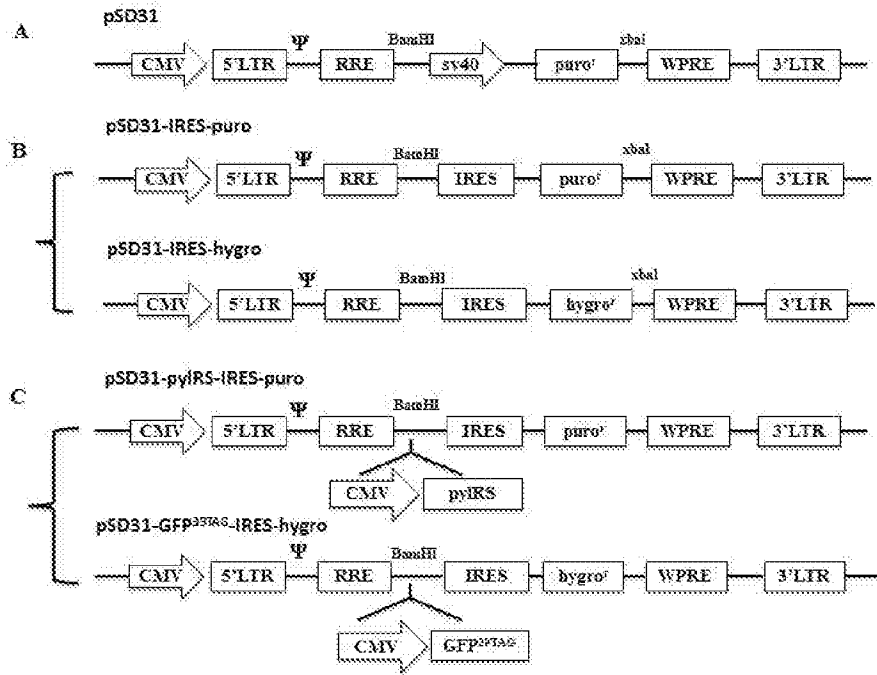


图 2B

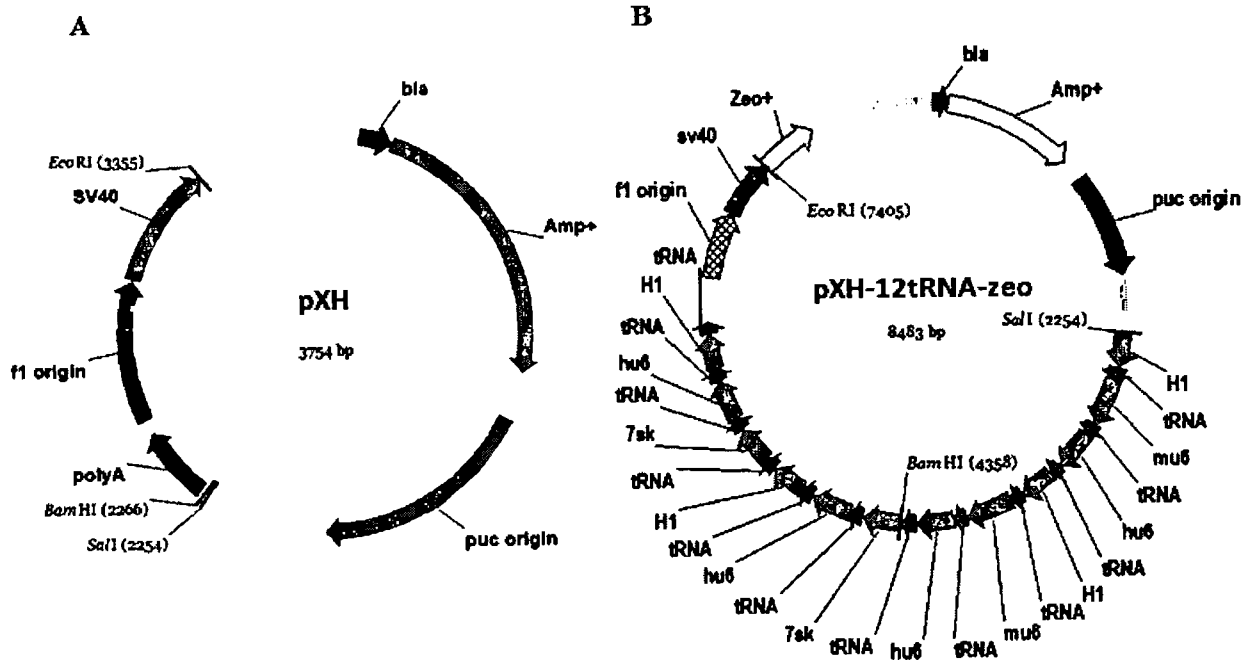


图 2C

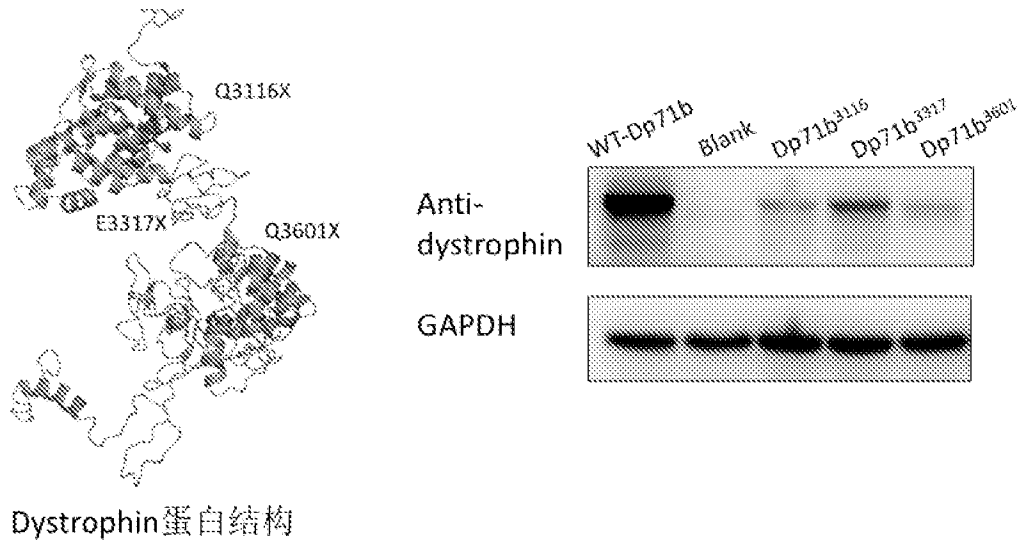


图 3

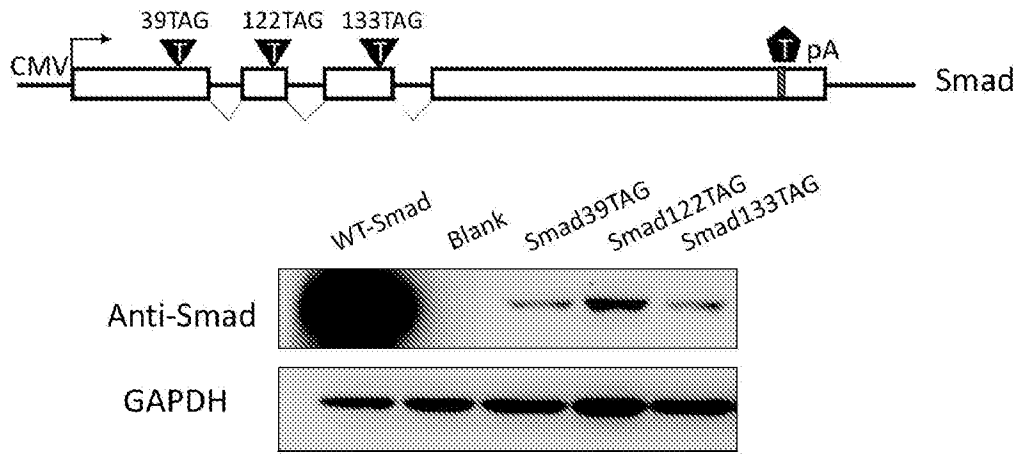


图 4

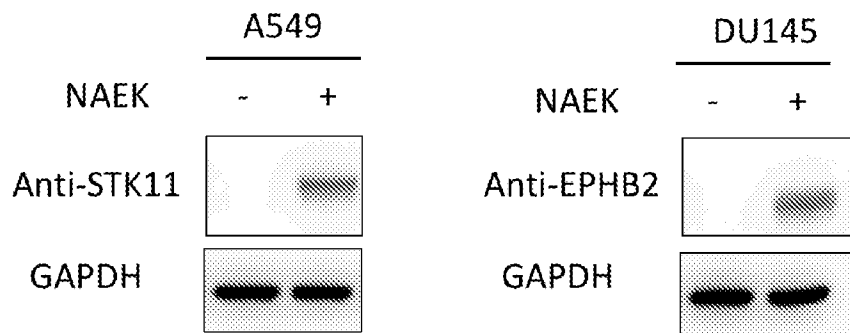


图 5

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/CN2017/075577**

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/113 (2010.01) i; C12N 15/10 (2006.01) i; A61P 35/00 (2006.01) i; C12N 5/10 (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)

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)

CPRSABS; CNABS; DWPI; SIPOABS; CNTXT; WOTXT; USTXT; EPTXT; JPTXT; CNKI; WEB OF SCIENCE; PUBMED; STN; GENBANK+EMBL+DDBJ: tRNA, single gene inheritance disease, aminoacyl-tRNA synthetase, AARS, non-canonical amino acid, stop codon, nonsense mutation, nonsense suppression, readthrough, duchenne muscular dystrophy, DMD, monogenic disease, nongenetic disorder, single gene disorder, mutat+, CGMCC No: 11592, sequence research on sequences 1-4

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2015100277 A2 (UYRP UNIV ROCHESTER et al.), 02 July 2015 (02.07.2015), see abstract, and description, paragraphs [00143], [00149] and [00222], SEQ ID NOs: 106 and 107	1-12, 14-16
X	CN 102504022 A (SUZHOU YUANJI BIOLOGICAL TECHNOLOGY CO., LTD.), 20 June 2012 (20.06.2012), see abstract, and embodiments 2 and 3, SEQ ID NOs: 11 and 12	1-8
Y	WO 2015100277 A2 (UYRP UNIV ROCHESTER et al.), 02 July 2015 (02.07.2015), see abstract, and description, paragraphs [00143], [00149] and [00222], SEQ ID NOs: 106 and 107	13
Y	CN 102838663 A (PEKING UNIVERSITY), 26 December 2012 (26.12.2012), see abstract, and claims 2 and 3	13
A	GUO, Nini et al., "tRNA-directed Transcription Antitermination", PROGRESS IN BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, vol. 24, no. 5, 31 December 1997 (31.12.1997), ISSN: 1000-3282, pages 392-396, see the whole document	1-16

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&amp;” document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search  
22 May 2017 (22.05.2017)

Date of mailing of the international search report  
**14 June 2017 (14.06.2017)**

Name and mailing address of the ISA/CN:  
State Intellectual Property Office of the P. R. China  
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao  
Haidian District, Beijing 100088, China  
Facsimile No.: (86-10) 62019451

Authorized officer  
**LI, Xiaogu**  
Telephone No.: (86-10) **62411615**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/CN2017/075577**

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Roy, B. et al., "Nonsense suppression by near-cognate tRNAs employs alternative base pairing at codon positions 1 and 3", PNAS, vol. 112, no. 10, 10 March 2015 (10.03.2015), ISSN: 0027-8424, pages 3038-3043, see the whole document	1-16

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

International application No.  
**PCT/CN2017/075577**

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2015100277 A9	01 October 2015	EP 3087088 A2	02 November 2016
		US 2016355552 A1	08 December 2016
		WO 2015100277 A2	02 July 2015
		WO 2015100277 A3	30 July 2015
CN 102504022 A	20 June 2012	None	
CN 102838663 A	26 December 2012	CN 102838663 B	11 June 2014

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/075577

<p>A. 主题的分类</p> <p>C12N 15/113(2010.01)i; C12N 15/10(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; C12N 5/10(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>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>CPRSABS;CNABS;DWPI;SIPOABS;CNTXT;WOTXT;USTXT;EPTXT;JPTXT;CNKI;WEB OF SCIENCE;PUBMED;STN;GENBANK+EMBL+DDBJ;tRNA, 氨酰tRNA合成酶, 非天然氨基酸, 终止密码子, 无义突变, 通读, 单基因病, 单基因遗传病, 杜氏肌营养不良, 突变, aminoacyl-tRNA synthetase,AARS, non-canonical amino acid, stop codon, nonsense mutation, nonsense suppression, readthrough, duchenne muscular dystrophy, DMD, monogenic disease, nongenetic disorder, single gene disorder, mutat+,CGMCC No: 11592, 对序列1-4的序列检索。</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>X</td> <td>WO 2015100277 A2 (UYRP UNIV ROCHESTER等) 2015年 7月 2日 (2015 - 07 - 02) 参见摘要, 说明书[00143], [00149], [00222]段, SEQ ID NOs:106-107</td> <td>1-12, 14-16</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 102504022 A (苏州元基生物技术有限公司) 2012年 6月 20日 (2012 - 06 - 20) 参见摘要, 实施例2和3, SEQ ID NOs: 11-12</td> <td>1-8</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2015100277 A2 (UYRP UNIV ROCHESTER等) 2015年 7月 2日 (2015 - 07 - 02) 参见摘要, 说明书[00143], [00149], [00222]段, SEQ ID NOs:106-107</td> <td>13</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 102838663 A (北京大学) 2012年 12月 26日 (2012 - 12 - 26) 参见摘要, 权利要求2-3</td> <td>13</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>郭妮妮等. "由tRNA引导的转录抗终止机制" 生物化学与生物物理进展, 第24卷, 第5期, 1997年 12月 31日 (1997 - 12 - 31), ISSN: 1000-3282, 第392-396页, 参见全文</td> <td>1-16</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	WO 2015100277 A2 (UYRP UNIV ROCHESTER等) 2015年 7月 2日 (2015 - 07 - 02) 参见摘要, 说明书[00143], [00149], [00222]段, SEQ ID NOs:106-107	1-12, 14-16	X	CN 102504022 A (苏州元基生物技术有限公司) 2012年 6月 20日 (2012 - 06 - 20) 参见摘要, 实施例2和3, SEQ ID NOs: 11-12	1-8	Y	WO 2015100277 A2 (UYRP UNIV ROCHESTER等) 2015年 7月 2日 (2015 - 07 - 02) 参见摘要, 说明书[00143], [00149], [00222]段, SEQ ID NOs:106-107	13	Y	CN 102838663 A (北京大学) 2012年 12月 26日 (2012 - 12 - 26) 参见摘要, 权利要求2-3	13	A	郭妮妮等. "由tRNA引导的转录抗终止机制" 生物化学与生物物理进展, 第24卷, 第5期, 1997年 12月 31日 (1997 - 12 - 31), ISSN: 1000-3282, 第392-396页, 参见全文	1-16
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
X	WO 2015100277 A2 (UYRP UNIV ROCHESTER等) 2015年 7月 2日 (2015 - 07 - 02) 参见摘要, 说明书[00143], [00149], [00222]段, SEQ ID NOs:106-107	1-12, 14-16																		
X	CN 102504022 A (苏州元基生物技术有限公司) 2012年 6月 20日 (2012 - 06 - 20) 参见摘要, 实施例2和3, SEQ ID NOs: 11-12	1-8																		
Y	WO 2015100277 A2 (UYRP UNIV ROCHESTER等) 2015年 7月 2日 (2015 - 07 - 02) 参见摘要, 说明书[00143], [00149], [00222]段, SEQ ID NOs:106-107	13																		
Y	CN 102838663 A (北京大学) 2012年 12月 26日 (2012 - 12 - 26) 参见摘要, 权利要求2-3	13																		
A	郭妮妮等. "由tRNA引导的转录抗终止机制" 生物化学与生物物理进展, 第24卷, 第5期, 1997年 12月 31日 (1997 - 12 - 31), ISSN: 1000-3282, 第392-396页, 参见全文	1-16																		
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																				
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>"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)</p> <p>"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&amp;" 同族专利的文件</p>																				
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2017年 5月 22日</p>	<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2017年 6月 14日</p>																			
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中华人民共和国国家知识产权局 (ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>	<p>受权官员</p> <p>李肖葵</p> <p>电话号码 (86-10)62411615</p>																			

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	Bijoyita Roy等. "Nonsense suppression by near-cognate tRNAs employs alternative base pairing at codon positions 1 and 3" PNAS, 第112卷, 第10期, 2015年 3月 10日 (2015 - 03 - 10), ISSN: 0027-8424, 第3038-3043页, 参见全文	1-16

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/075577

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)
WO	2015100277	A9	2015年 10月 1日	EP	3087088	A2	2016年 11月 2日
				US	2016355552	A1	2016年 12月 8日
				WO	2015100277	A2	2015年 7月 2日
				WO	2015100277	A3	2015年 7月 30日
.....				无			
CN	102504022	A	2012年 6月 20日				
.....							
CN	102838663	A	2012年 12月 26日	CN	102838663	B	2014年 6月 11日
.....							

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)