(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 114787359 A
(43)申请公布日 2022.07.22

(21)申请号 202080085341.7

(22)申请日 2020.12.11

(30)优先权数据
2019-224297 2019.12.12 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.06.08

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2020/046213 2020.12.11

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/117848 JA 2021.06.17

(71)申请人 中外制药株式会社
地址 日本国东京都

(72)发明人 吉井早贵子 下村康一郎 石野聪

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021
专利代理师 高丽娜 张莹

(51)Int.Cl.
C12N 15/31(2006.01)
C07K 7/04(2006.01)
C07K 7/64(2006.01)
C12N 1/15(2006.01)
C12N 1/19(2006.01)
C12N 1/21(2006.01)
C12N 5/10(2006.01)
C12N 15/09(2006.01)
C12N 15/11(2006.01)
C12N 15/63(2006.01)
C12P 21/02(2006.01)
C40B 30/04(2006.01)
C40B 40/10(2006.01)
G01N 33/15(2006.01)
G01N 33/50(2006.01)

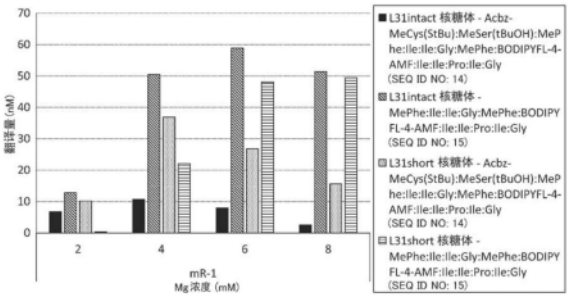
权利要求书2页 说明书84页
序列表14页 附图2页

(54)发明名称

产生含有非天然氨基酸的肽的方法

(57)摘要

本发明揭示了在包含含有改造的L31蛋白质的核糖体的翻译系统中翻译编码含有非天然氨基酸的肽的mRNA可以增加翻译的肽的量。此外，本发明揭示了通过使用这种核糖体，还可以减少副产物的相对量。本发明的改造的L31蛋白质具有从野生型大肠杆菌L31蛋白质的氨基酸序列的C末端开始缺失6个或更多个氨基酸残基的氨基酸序列。



CN 114787359 A

1.用于产生肽的方法,其包括在包含含有改造的L31蛋白质的核糖体的翻译系统中翻译编码包含一种或多种类型非天然氨基酸的肽的mRNA的步骤,其中所述含有改造的L31蛋白质的核糖体与包含含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的野生型大肠杆菌L31的核糖体相比,对于翻译包含非天然氨基酸的肽具有更大的活性。

2.用于产生肽的方法,其包括在包含含有改造的L31蛋白质的核糖体的翻译系统中翻译编码包含一种或多种类型非天然氨基酸的肽的mRNA的步骤,其中所述改造的L31蛋白质选自由以下(1)至(3)的蛋白质组成的组:

(1)包含这样的氨基酸序列的蛋白质,所述氨基酸序列从SEQ ID NO:1所示氨基酸序列中的C末端开始具有6个或更多个氨基酸残基缺失;

(2)包含这样的氨基酸序列的蛋白质,所述氨基酸序列在(1)的蛋白质的氨基酸序列中具有一个或更多个氨基酸插入、取代、缺失和/或添加;和

(3)包含这样的氨基酸序列的蛋白质,所述氨基酸序列与(1)的蛋白质的氨基酸序列具有80%或更高的序列同一性。

3.权利要求2所述的方法,其中与包含含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的野生型大肠杆菌L31的核糖体相比,包含(2)和(3)的蛋白质的核糖体对包含非天然氨基酸的肽的翻译具有更大的活性。

4.权利要求1至3任一项所述的方法,其中含有改造的L31蛋白质的核糖体相对于所述翻译系统中的所有核糖体的比例为50%或更高。

5.权利要求1至4任一项所述的方法,其还包括使所述肽环化的步骤。

6.权利要求1至5任一项所述的方法,其中所述肽在对应于其起始氨基酸的位置包含非天然氨基酸。

7.筛选与靶标物质结合的肽的方法,其包括以下步骤(a)和(b):

(a)使靶标物质与通过权利要求1至6任一项的方法获得的肽或包含通过1至6任一项的方法获得的肽的文库接触;和

(b)选择与所述靶标物质结合的肽。

8.权利要求2至7任一项所述的改造的L31蛋白质。

9.分离的核酸,其编码权利要求8所述的改造的L31蛋白质。

10.载体或细胞,其包含权利要求9所述的核酸。

11.产生含有改造的L31蛋白质的核糖体的方法,其包括以下步骤(a)至(c):

(a)培养权利要求10所述的细胞;

(b)从所述细胞的培养物中产生裂解物;和

(c)从上述裂解物中纯化核糖体。

12.用于产生核糖体的方法,其包括以下步骤(a)和(b):

(a)在镁离子浓度为5mM或更低的条件下,使用弗氏压碎器从野生型大肠杆菌培养物中产生裂解物,和

(b)从所述裂解物中纯化核糖体。

13.核糖体,其包含权利要求8所述的改造的L31蛋白质。

14.组合物,其包含权利要求13所述的核糖体。

15.产生无细胞翻译系统的方法,其包括以下步骤:

(a)通过权利要求11或12所述的方法产生核糖体;和

(b)将所述核糖体和用非天然氨基酸酰化的起始tRNA混合。

产生含有非天然氨基酸的肽的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及产生包含非天然氨基酸的肽和包含该肽的文库的方法。本发明还涉及用于这些方法的改造的L31蛋白质等。

[0002] 发明背景

[0003] 最近已经设计了涉及从含有多个非天然氨基酸的多种肽文库中选择药物候选物的药物发现方法。特别是,利用无细胞翻译系统的含非天然氨基酸肽的mRNA展示文库等因其多样性和易于筛选而越来越被视为有前途。有许多关于使用翻译系统合成含有非天然氨基酸的肽的方法的报道(NPL 1和NPL 2)。然而,在这些文件中描述的方法中,翻译合成的效率很低。

[0004] 在体内,根据mRNA携带的核苷酸序列信息,通过氨基酸聚合合成肽。这种肽合成过程称为翻译。核糖体在翻译过程中起着核心作用。在用于制备mRNA展示文库的无细胞翻译系统中,通常添加纯化的核糖体。

[0005] L31蛋白质被称为构成核糖体的蛋白质。L31蛋白质是形成亚基间桥B1b,并用于稳定30S和50S之间的缔合状态(70S)的蛋白质(NPL 3)。

[0006] 已知L31蛋白质在其纯化过程中被蛋白酶7降解。据报道,从野生型大肠杆菌(Escherichia coli)菌株制备的核糖体,从蛋白酶7缺陷菌株蛋白酶7KO制备的核糖体和从L31蛋白质缺陷菌株L31KO制备的核糖体的活性比较显示,从蛋白酶7缺陷菌株制备的核糖体比从野生型大肠杆菌菌株制备的核糖体和从L31缺陷菌株制备的核糖体具有更高的活性(NPL 3)。同样,已报道,从L31缺陷菌株制备的核糖体显示在体内起始速率38%的降低,和在体外较慢的70S形成速率(NPL 4)。此外,也已报道,L31缺陷菌株显示降低的保真度(NPL 4)。因此,已知在翻译由天然氨基酸组成的肽时,含有未被蛋白酶7降解的L31蛋白质的核糖体比含有切割的L31蛋白质的核糖体和不含L31蛋白质的核糖体具有更高的活性。

[0007] 引文列表

[0008] 非专利文献

[0009] [NPL 1]Maini,R.,Umemoto,S.&Suga,H.Ribosome-mediated synthesis of natural product-like peptides via cell-free translation.Current opinion in chemical biology 34,44-52,doi:10.1016/j.cbpa.2016.06.006(2016).

[0010] [NPL 2]Hartman,M.C.,Josephson,K.,Lin,C.W.&Szostak,J.W.An expanded set of amino acid analogs for the ribosomal translation of unnatural peptides.PloS one 2,e972,doi:10.1371/journal.pone.0000972(2007).

[0011] [NPL 3]Ueta M,Wada C,Bessho Y,Maeda M,Wada A.Genes Cells.2017 May;22(5):452-471.doi:10.1111/gtc.12488.Epub 2017 Apr 10.Genes Cells.2017

[0012] [NPL 4]Lilleorg S,Reier K,Remme J,Liiv A.J Mol Biol.2017 Apr 7;429(7):1067-1080.doi:10.1016/j.jmb.2017.02.015.Epub 2017 Feb 24.J Mol Biol.2017

[0013] [NPL 5]Chadani Y,Niwa T,Izumi T,Sugata N,Nagao A,Suzuki T,Chiba S,Ito K,Taguchi H.Mol Cell.2017 Nov 2;68(3):528-539.e5.doi:10.1016/

j.molcel.2017.10.020.Mol Cell.2017

[0014] 发明概述

[0015] 技术问题

[0016] 一方面，本发明的目标是提供用于产生包含非天然氨基酸的肽的有效方法，并提供改造的L31蛋白质和包含它们的核糖体用于这些方法中。

[0017] [问题的解决]

[0018] 在使用翻译系统产生包含非天然氨基酸的肽时，本发明人检查了在包含未被蛋白酶7降解的L31蛋白质的核糖体和包含被蛋白酶7切割的L31蛋白质的核糖体之间mRNA翻译效率是否不同。结果，本发明人发现，当通过起始抑制(iSP)方法翻译编码包含非天然氨基酸的肽的mRNA时，使用包含被蛋白酶7切割的L31蛋白质的核糖体与使用包含未被蛋白酶7降解的L31蛋白质的核糖体相比导致所翻译的靶标分子的量增加。本发明人还发现，通过使用包含蛋白酶7切割的L31蛋白质的核糖体也可以降低副产物的相对量。这些结果与先前在不包含非天然氨基酸的肽的翻译中已知的事实相反。此外，本发明人在翻译系统中进行了不同镁离子浓度的肽合成，并且揭示当镁离子浓度在一定浓度范围内时，翻译量大，并且副产物比例低。

[0019] 本发明基于这样的发现，具体涉及以下：

[0020] [1]用于产生肽的方法，其包括在包含含有改造的L31蛋白质的核糖体的翻译系统中翻译编码包含一种或多种类型非天然氨基酸的肽的mRNA的步骤，其中所述含有改造的L31蛋白质的核糖体与包含含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的野生型大肠杆菌L31的核糖体相比，对于翻译包含非天然氨基酸的肽具有更大的活性；

[0021] [2]用于产生肽的方法，其包括在包含含有改造的L31蛋白质的核糖体的翻译系统中翻译编码包含一种或多种类型非天然氨基酸的肽的mRNA的步骤，其中所述改造的L31蛋白质选自由以下(1)至(3)的蛋白质组成的组：

[0022] (1)包含这样的氨基酸序列的蛋白质，所述氨基酸序列从SEQ ID NO:1所示氨基酸序列中的C末端开始具有6个或更多个氨基酸残基缺失；

[0023] (2)包含这样的氨基酸序列的蛋白质，所述氨基酸序列在(1)的蛋白质的氨基酸序列中具有一个或更多个氨基酸插入、取代、缺失和/或添加；和

[0024] (3)包含这样的氨基酸序列的蛋白质，所述氨基酸序列与(1)的蛋白质的氨基酸序列具有80％或更高的序列同一性；

[0025] [3]用于产生肽的方法，其包括在包含含有改造的L31蛋白质的核糖体的翻译系统中翻译编码包含一种或多种类型非天然氨基酸的肽的mRNA的步骤，其中所述改造的L31蛋白质选自由以下(1)至(3)的蛋白质组成的组：

[0026] (1)由这样的氨基酸序列组成的蛋白质，所述氨基酸序列从SEQ ID NO:1中所示氨基酸序列中的C末端开始具有6个或更多个氨基酸残基缺失；

[0027] (2)由这样的氨基酸序列组成的蛋白质，所述氨基酸序列在(1)的蛋白质的氨基酸序列中具有一个或更多个氨基酸插入、取代、缺失和/或添加；

[0028] (3)由这样的氨基酸序列组成的蛋白质，所述氨基酸序列与(1)的蛋白质的氨基酸序列具有80％或更高的序列同一性；

[0029] [4][2]或[3]所述的方法，其中所述(1)的从C末端开始具有6个或更多个氨基酸残

基缺失的氨基酸序列是从C末端开始具有8个或更多个氨基酸残基缺失的氨基酸序列；

[0030] [5][4]所述的方法，其中在(1)的SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列中的从C末端开始具有8个或更多个氨基酸残基缺失的氨基酸序列是选自由SEQ ID NO:2和42至48组成的组的氨基酸序列；

[0031] [6][2]至[5]中任一项所述的方法，其中与包含含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的野生型大肠杆菌L31的核糖体相比，包含(2)和(3)的蛋白质的核糖体对包含非天然氨基酸的肽的翻译具有更高的活性；

[0032] [7][2]至[6]中任一项所述的方法，其中与包含含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的野生型大肠杆菌L31的核糖体相比，包含(1)的蛋白质的核糖体对包含非天然氨基酸的肽的翻译具有更高的活性；

[0033] [8][2]至[7]中任一项所述的方法，其中从C末端开始具有6个或更多个氨基酸残基缺失的氨基酸序列是从C末端开始具有6至50个氨基酸残基缺失的氨基酸序列；

[0034] [9][2]至[7]中任一项所述的方法，其中从C末端开始具有6个或更多个氨基酸残基缺失的氨基酸序列是从C末端开始具有8至50个氨基酸残基缺失的氨基酸序列；

[0035] [10][2]至[7]中任一项所述的方法，其中从C末端开始具有6个或更多个氨基酸残基缺失的氨基酸序列是从C末端开始具有6至43个氨基酸残基缺失的氨基酸序列；

[0036] [11][2]至[7]中任一项所述的方法，其中从C末端开始具有6个或更多个氨基酸残基缺失的氨基酸序列是从C末端开始具有8至43个氨基酸残基缺失的氨基酸序列；

[0037] [12][1]至[11]中任一项所述的方法，其中所述改造的L31蛋白质是由从SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的C末端开始具有8个或更多个氨基酸残基缺失的氨基酸序列组成的蛋白质；

[0038] [13][1]至[12]中任一项所述的方法，其中所述改造的L31蛋白质是由选自SEQ ID NO:2和42至48的任一项所示的氨基酸序列组成的蛋白质；

[0039] [14][1]至[13]中任一项所述的方法，其中所述含有改造的L31蛋白质的核糖体相对于翻译系统中的所有核糖体的比例为50％或更高；

[0040] [15][1]至[14]中任一项所述的方法，其中所述翻译系统还包含2至8mM的镁离子；

[0041] [16][1]至[15]中任一项所述的方法，其还包括使所述肽环化的步骤；

[0042] [17][1]至[16]中任一项所述的方法，其中所述肽在对应于其起始氨基酸的位置包含非天然氨基酸；

[0043] [18][1]至[17]中任一项所述的方法，其中通过起始抑制进行翻译；

[0044] [19][1]至[18]中任一项所述的方法，其中所述翻译系统中包含的起始tRNA被非天然氨基酸酰化；

[0045] [20][1]至[19]中任一项所述的方法，其中翻译活性通过其中已经发生氨基酸通读(read-through)的翻译产物相对于所有翻译产物的百分比(iRT百分比)来评价；

[0046] [21][1]至[20]中任一项所述的方法，其中通过使用SEQ ID NO:10的模板mRNA翻译成SEQ ID NO:29的肽来评价翻译活性；

[0047] [22][1]至[21]中任一项所述的方法，其中所述含有改造的L31蛋白质的核糖体的iRT百分比比包含含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的野生型大肠杆菌L31的核糖体的iRT百分比低15％或更多；

[0048] [23]通过[1]至[22]中任一项所述的方法产生的肽或包含通过[1]至[22]中任一项所述的方法产生的肽的文库；

[0049] [24]筛选与靶标物质结合的肽的方法，其包括以下步骤(a)和(b)：

[0050] (a)使靶标物质与通过[1]至[22]中任一项所述的方法获得的肽或包含通过[1]至[22]中任一项所述的方法获得的肽的文库，或[23]所述的肽或文库接触；和

[0051] (b)选择与所述靶标物质结合的肽；

[0052] [25][2]至[24]中任一项所述的改造的L31蛋白质；

[0053] [26][25]所述的改造的L31蛋白质(条件是排除由SEQ ID NO:2所示氨基酸序列组成的L31蛋白质)；

[0054] [27]分离的核酸，其编码[25]或[26]所述的改造的L31蛋白质；

[0055] [28]载体或细胞，其包含[27]所述的核酸；

[0056] [29]产生含有改造的L31蛋白质的核糖体的方法，其包括以下步骤(a)至(c)：

[0057] (a)培养[28]所述的细胞；

[0058] (b)从所述细胞的培养物中产生裂解物；和

[0059] (c)从上述裂解物中纯化核糖体；

[0060] [30]产生改造的L31蛋白质的方法，其包括以下步骤(a)和(b)：

[0061] (a)培养[28]所述的细胞；和

[0062] (b)从所述细胞的培养物中分离表达产物；

[0063] [31]产生核糖体的方法，其包括以下步骤(a)和(b)：

[0064] (a)在镁离子浓度为5mM或更低的条件下，使用弗氏压碎器从野生型大肠杆菌培养物中产生裂解物，和

[0065] (b)从所述裂解物中纯化核糖体；

[0066] [32]包含[25]或[26]所述的改造的L31蛋白质的核糖体；

[0067] [33]包含[32]所述的核糖体的组合物；

[0068] [34][33]所述的组合物，其中含有改造的L31蛋白质的核糖体相对于所有核糖体的比例为50％或更高；

[0069] [35][33]或[34]所述的组合物，其进一步包含以下(a)和/或(b)：

[0070] (a)通过将非天然氨基酸与tRNA键合形成的氨酰-tRNA；和

[0071] (b)编码包含一种或多种类型非天然氨基酸的肽的mRNA；

[0072] [36][33]至[35]中任一项所述的组合物，其还包含被非天然氨基酸酰化的起始tRNA；和

[0073] [37]产生无细胞翻译系统的方法，其包括以下步骤：

[0074] (a)通过[29]或[31]所述的方法产生核糖体；和

[0075] (b)将所述核糖体和用非天然氨基酸酰化的起始tRNA混合。

[0076] [本发明的效果]

[0077] 本发明提供了产生包含非天然氨基酸的肽和包含所述肽的文库的有效方法。此外，本发明提供了用于该方法的改造的L31蛋白质，以及包含它们的核糖体。通过使用本发明的方法，可以有效地产生包含非天然氨基酸的肽及其文库。

[0078] 通常，已经提出包含被蛋白酶7切割的L31蛋白质的核糖体的活性低于包含未切割

的L31蛋白质的核糖体。鉴于这一事实，令人惊讶的是，使用包含本文改造的L31蛋白质的核糖体允许有效翻译成包含非天然氨基酸的肽。

[0079] 附图简述

[0080] 图1是这样的图，其显示了使用L31short核糖体或L31intact核糖体翻译mR-1序列时翻译的靶标分子的量和翻译的iRT肽的量。

[0081] 图2是这样的图，其显示了使用L31short核糖体或L31intact核糖体翻译mR-2序列时翻译的靶标分子的量和翻译的iRT肽的量。

[0082] 图3是这样的图，其显示了使用WT-0MG核糖体、WT-5MG核糖体或WT-10MG核糖体翻译mR-1序列时翻译的靶标分子的量和翻译的iRT肽的量。

[0083] 实施方案说明

[0084] 本发明涉及用于产生肽或肽文库的方法，其包括在包含含有改造的L31蛋白质的核糖体的翻译系统中翻译编码包含一种或多种类型的非天然氨基酸的肽的mRNA的步骤。在本发明中，肽或肽文库可以通过将包含含有改造的L31蛋白质的核糖体的翻译系统与编码包含一种或多种类型的非天然氨基酸的肽的mRNA混合来产生。因此，本发明涉及产生肽或肽文库的方法，其包括将包含含有改造的L31蛋白质的核糖体的翻译系统与编码包含一种或多种类型的非天然氨基的肽的mRNA混合以便翻译mRNA的步骤。与使用包含具有来自野生型大肠杆菌的SEQ ID NO:1的氨基酸序列的野生型L31蛋白质的核糖体相比，本发明的生产方法允许有效地翻译成包含非天然氨基酸的肽。

[0085] L31蛋白质是构成核糖体的蛋白质，并在50S亚基和30S亚基的缔合中起重要作用。本发明人发现，当包含一种或多种类型的非天然氨基酸的肽在包含含有改造的L31蛋白质(其中C末端的氨基酸残基已从来源于野生型大肠杆菌的具有SEQ ID NO:1的氨基酸的野生型L31蛋白质中缺失)的核糖体的翻译系统中合成时，与在包含含有野生型大肠杆菌L31蛋白质的核糖体的翻译系统中合成肽时相比，翻译产物的量增加。此外，本发明人发现，当使用包含含有改造的L31蛋白质的核糖体的翻译系统时，与使用包含含有野生型大肠杆菌L31蛋白质的核糖体的翻译系统时相比，产生的副产物的相对量也可以减少。

[0086] 在本文中，“野生型大肠杆菌L31蛋白质”是指具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的L31，并且其有时也称为“野生型大肠杆菌L31”、“完整L31”、“L31intact”。此外，在本文中，“改造的L31蛋白质”是指“已经从野生型大肠杆菌L31蛋白质的C末端开始缺失6个或更多个氨基酸残基的改造蛋白质”。在本文中，在这些蛋白质中，“其中已经从野生型大肠杆菌L31蛋白质中缺失第63位及其后氨基酸残基的改造的L31蛋白质”，或更具体而言，具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的L31可以称为“shortL31”或“L31short”。此外，“其中已经从野生型大肠杆菌L31蛋白质中缺失第(X+1)个及其后氨基酸残基的改造的L31蛋白质”有时称为“L31(1-X)”。即，上述shortL31也称为“L31(1-62)”。此外，在本文中，包含某种L31蛋白质的核糖体可以用L31蛋白质的名称后跟“核糖体”来命名；例如，包含“intact L31”、“L31intact”、“shortL31”、“L31(1-62)”或“L31short”的核糖体可分别称为“intactL31核糖体”、“L31intact核糖体”、“shortL31核糖体”、“L31(1-62)核糖体”或“L31short核糖体”。此外，从野生型大肠杆菌菌株纯化的核糖体可称为“WT核糖体”。

[0087] 改造的L31蛋白质

[0088] 在本公开的生产方法中，与使用包含野生型大肠杆菌L31的核糖体相比，使用含有

改造的L31蛋白质的核糖体允许有效翻译成包含非天然氨基酸的肽。在本发明的实施方案中，改造的L31蛋白质的实例是：

[0089] (1)包含从SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的C末端开始具有6个或更多个氨基酸残基缺失的氨基酸序列的蛋白质；

[0090] (2)包含在(1)的蛋白质的氨基酸序列中具有一个或更多个氨基酸插入、取代、缺失和/或添加的氨基酸序列的蛋白质；和

[0091] (3)包含与(1)的蛋白质的氨基酸序列具有80％或更高序列同一性的氨基酸序列的蛋白质。

[0092] 上述(1)的蛋白质可以是包含从SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的C末端开始具有8个或更多个氨基酸残基缺失或9个或更多个氨基酸残基缺失的氨基酸序列的蛋白质，并且实例包括包含从C末端开始具有氨基酸残基缺失的氨基酸序列的蛋白质，其中缺失的氨基酸残基的数量范围为选自6个残基、7个残基、8个残基、9个残基、10个残基、11个残基、12个残基和13个残基的下限至选自50个残基、49个残基、48个残基、47个残基、46个残基、45个残基、44个残基、43个残基、42个残基、41个残基、40个残基、39个残基和38个残基的上限。在一个实施方案中，上述(1)的蛋白质的实例包括包含从SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的C末端开始具有氨基酸残基缺失的氨基酸序列的蛋白质，其中缺失氨基酸残基的数量是包括在6至50、6至43、8至50或8至43范围内的任何数量。在进一步的实施方案中，上述(1)的蛋白质的实例包括包含从SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的C末端开始具有6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、27、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50个氨基酸残基缺失的氨基酸序列的蛋白质。更具体地，本公开的改造的L31蛋白质包括包含从SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的C末端开始具有8、43、38、33、28、23、18或13个氨基酸缺失的氨基酸序列的蛋白质，以及由这些蛋白质中氨基酸残基的改变(缺失、取代和/或插入)产生的蛋白质。更具体地，本公开的改造的L31蛋白质还包括，

[0093] (1)蛋白质，其包含选自SEQ ID NO:2和42至48中任一项所示的氨基酸序列；

[0094] (2)蛋白质，其包含在选自SEQ ID NO:2和42至48中任一项所示的氨基酸序列中具有一个或更多个氨基酸缺失、插入、取代和/或添加的氨基酸序列；和

[0095] (3)蛋白质，其包含与选自SEQ ID NO:2和42至48中任一项所示的氨基酸序列具有80％或更高序列同一性的氨基酸序列。

[0096] 本发明的改造的L31蛋白质优选为与包含SEQ ID NO:2和42至48中任一个的氨基酸序列或SEQ ID NO:2的氨基酸序列的蛋白质功能等效的蛋白质。

[0097] 在本文中，术语“包含”意味着“包含”和“由...组成”。

[0098] 在一些实施方案中，本公开的改造的L31蛋白质可以是包含在以下蛋白质的氨基酸序列中具有一个或更多个(例如，不超过10个、不超过9个、不超过8个、不超过7个、不超过6个、不超过5个、不超过4个、或不超过3个、或2、3、4、5、6、7、8、9或10个，或超过10个)氨基酸插入、取代、缺失和/或添加的氨基酸序列的蛋白质：(i)包含从SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的C末端开始具有6或更多个或8或更多个氨基酸残基缺失的氨基酸序列的蛋白质或(ii)包含选自SEQ ID NO:2和42至48中任意所示的氨基酸序列的蛋白质。氨基酸添加、缺失、取代和/或插入可以通过本领域技术人员已知的方法进行。例如，可以在编码氨基酸序列的核

酸上进行位点特异性诱变(Kunkel等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82,488-492(1985))、重叠延伸PCR等。这些可以适当时单独或组合进行。

[0099] 通常,已知蛋白质中一个或更多个(例如,不超过10个、不超过9个、不超过8个、不超过7个、不超过6个、不超过5个、不超过4个、或不超过3个、或2、3、4、5、6、7、8、9、或10、或超过10个)氨基酸的改变(例如,保守的取代、缺失、插入和/或添加)不会影响其肽的功能,并且甚至增强原始蛋白质的功能。根据其侧链的特性,氨基酸分为疏水性氨基酸(A、I、L、M、F、P、W、Y和V)和亲水性氨基酸(R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S和T)。此外,氨基酸侧链可分为脂肪族侧链(G、A、V、L、I和P)、含羟基的侧链(S、T和Y)、含硫原子的侧链(C和M)、含羧酸和酰胺的侧链(D、N、E和Q)、含有碱基的侧链(R、K和H),以及含有芳烃的侧链(H、F、Y和W)。通过将具有SEQ ID NO:1、2和42至48中任意所示氨基酸序列的蛋白质中包括的氨基酸改变为分类为具有相同特征的组的其他氨基酸而产生的蛋白质也包括在本发明的改造的L31蛋白质中。本发明的改造的L31蛋白质还可以包含非保守改变,条件是该蛋白在功能上等同于包含SEQ ID NO:2和42至48中任意的氨基酸序列,或SEQ ID NO:2的氨基酸序列的蛋白质。

[0100] 在本发明的实施方案中,包含与从SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的C末端开始具有6个或更多个或8个或更多个氨基酸残基缺失的氨基酸序列或SEQ ID NO:1、2和42至48任意所示的氨基酸序列具有高序列同一性的氨基酸序列的蛋白质也包括在本公开的改造的L31蛋白质中。本公开中的高同一性是指在完整氨基酸序列或完整核苷酸序列中至少50%或更高、更优选70%或更高、甚至更优选80%或更高、还更优选85%或更高、仍然甚至更优选90%或更高(例如,91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高)的序列同一性。可以使用Karlin和Altschul的算法BLASTBLAST(Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:2264-2268,1990;和Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:5873,1993)确定序列同一性。已经开发了基于BLAST算法的称为BLASTN和BLASTX的程序(Altschul SF,等人:J.Mol.Biol.215:403,1990)。当通过BLASTN分析核苷酸序列时,设置参数,例如,得分=100和字长=12。当通过BLASTX分析氨基酸序列时,设置参数,例如,得分=50和字长=3。使用BLAST和Gapped BLAST程序时,使用各自程序的默认参数。这些分析方法的具体技术是已知的。

[0101] 在本公开中,在编码包含非天然的肽的mRNA的翻译方面,“功能等同”是指含有改造的L31蛋白质的核糖体显示出与包含L31蛋白质的核糖体等同的翻译活性,所述L31蛋白质由从SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的C末端开始具有6个或更多个氨基酸残基缺失的氨基酸序列(例如,SEQ ID NO:2和42至48中任意的氨基酸序列)组成。因此,当相比于包含L31蛋白质的核糖体(其中,所述L31蛋白质由从SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的C末端开始具有6个或更多个氨基酸残基缺失的氨基酸序列(例如,SEQ ID NO:2和42至48中任意的氨基酸序列)组成),包含某种蛋白质的核糖体在翻译编码包含非天然氨基酸的肽的mRNA方面具有相同程度的活性时,则某种蛋白质可称为“与从SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的C末端开始具有6个或更多个氨基酸残基缺失的氨基酸序列(例如,由SEQ ID NO:2和42至48中任意的氨基酸序列组成的蛋白质)功能等同的蛋白质”。本发明人揭示,与包含含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的L31蛋白质的核糖体相比,包含含有从SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的C末端开始具有6个或更多个氨基酸残基缺失的氨基酸序列(例如,SEQ ID NO:2和42至48中任意的氨基酸序列)的L31蛋白质的核糖体具有更大的活性以翻译编码包含非天然氨基酸的肽的mRNA。因此,当与包含含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的L31蛋白质的核糖体相比,包含某种

蛋白质的核糖体具有更大的活性以翻译编码包含非天然氨基酸的肽的mRNA时，则所述某种蛋白质可以称为“与由从SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的C末端开始具有6个或更多个氨基酸残基缺失的氨基酸序列(例如，SEQ ID NO:2和42至48中任意的氨基酸序列)组成的蛋白质功能等同的蛋白质”。或者，在构成核糖体时，如果某种蛋白质与含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的L31蛋白质相比，为核糖体提供更大的活性来翻译编码包含非天然氨基酸的肽的mRNA，则所述某种蛋白质可以称为“与由从SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的C末端开始具有6个或更多个氨基酸残基缺失的氨基酸序列(例如，SEQ ID NO:2和42至48中任意的氨基酸序列)组成的蛋白质功能等同的蛋白质”。

[0102] 在本公开中，“翻译编码包含非天然氨基酸的肽的mRNA的活性”也可以表述为“翻译编码包含非天然氨基酸的肽的mRNA的效率”，并且具体地，其包括掺入携带非天然氨基酸的tRNA的容易程度、编码非天然氨基酸的密码子的通读程度、翻译肽的量和/或产生的副产物的量。

[0103] 在本公开中，“翻译编码包含非天然氨基酸的肽的mRNA的更高活性”也可以表述为“翻译编码包含非天然氨基酸的肽的mRNA的更高效率”，并且具体地，它意味着携带非天然氨基酸的tRNA的掺入更容易、编码非天然氨基酸的密码子的通读频率更低、产生的靶肽量更大、和/或产生的副产物量更少。

[0104] 本公开中的“翻译编码包含非天然氨基酸的肽的mRNA的活性”可以使用其中已经发生氨基酸通读的翻译产物相对于所有翻译产物的百分比作为指标来评估。当编码包含非天然氨基酸的肽的mRNA被翻译时，除了靶标分子(TM)之外，翻译产物还可以包括起始通读(iRT)肽，例如由于起始氨基酸的通读从对应于从开头第二个字母的氨基酸翻译得到的肽(在本公开中称为“1iRT”)，和由于初始氨基酸和对应于从开头第二个字母的氨基酸的通读从对应于从开头第三个字母的氨基酸翻译得到的肽(在本公开中称为“2iRT”)。在本公开中，使用以下等式从起始通读(iRT)和靶标分子(TM)浓度计算的“iRT百分比”可用作“翻译编码包含非天然氨基酸的肽的mRNA的活性”。等式中的“总iRT浓度”可以计算为1iRT(从开头第二个字母开始翻译产生的肽)和2iRT(从开头第三个字母开始翻译产生的肽)的浓度之和。

[0105] (等式1)

[0106] iRT百分比＝(总iRT浓度[nM]/(总iRT浓度[nM]+TM浓度[nM])x 100

[0107] 具体而言，iRT百分比能够通过实施例中描述的方法使用实施例中描述的氨酰-tRNA、翻译系统等进行评估。例如，将SEQ ID NO:10的模板mRNA翻译成SEQ ID NO:29至31或优选地SEQ ID NO:29的肽使得能够评估“翻译编码包含非天然氨基酸的肽的mRNA的活性”。

[0108] 在本公开中，“翻译编码包含非天然氨基酸的肽的mRNA的更大活性”可以意味着iRT比例低。短语“与包含含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的野生型大肠杆菌L31的核糖体相比，翻译包含非天然氨基酸的肽的更高活性”可以表示，例如，包含本公开的改造的L31蛋白质的核糖体的iRT百分比比包含含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的野生型大肠杆菌L31的核糖体的iRT百分比低15％、20％、25％、30％或更多。

[0109] 原核核糖体含有50S大亚基和30S小亚基。此外，50S亚基由23SrRNA和5SrRNA以及多种蛋白质组成。此外，30S亚基由16SrRNA和多种蛋白质组成。另一方面，真核核糖体含有60S大亚基和40S小亚基。此外，60S亚基由28SrRNA、5.8SrRNA和5SrRNA以及多种蛋白质组

成。此外，40S亚基由18SrRNA和多种蛋白质组成。构成核糖体的因子是本领域技术人员已知的。

[0110] 氨基酸

[0111] 在本公开中，构成肽的“氨基酸”包括诸如α-氨基酸等“天然氨基酸”和诸如β-氨基酸和γ-氨基酸等“非天然氨基酸”。氨基酸的三维结构可以是L型氨基酸或D型氨基酸。“氨基酸”、“天然氨基酸”和“非天然氨基酸”可以分别称为“氨基酸残基”、“天然氨基酸残基”和“非天然氨基酸残基”。

[0112] 在具体实施方案中，天然氨基酸为以下20种类型的α-氨基酸：甘氨酸(Gly)、丙氨酸(Ala)、丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr)、缬氨酸(Val)、亮氨酸(Leu)、异亮氨酸(Ile)、苯丙氨酸(Phe)、酪氨酸(Tyr)、色氨酸(Trp)、组氨酸(His)、谷氨酸(Glu)、天冬氨酸(Asp)、谷氨酰胺(Gln)、天冬酰胺(Asn)、半胱氨酸(Cys)、甲硫氨酸(Met)、赖氨酸(Lys)、精氨酸(Arg)和脯氨酸(Pro)。或者，从上述20种氨基酸中排除任何一种或多种类型氨基酸而得到的氨基酸可以用作本公开中的天然氨基酸。在一个实施方案中，天然氨基酸由不包括异亮氨酸的19种氨基酸组成。在一个实施方案中，天然氨基酸由不包括甲硫氨酸的19种不同类型的氨基酸组成。在进一步的实施方案中，天然氨基酸由不包括异亮氨酸和甲硫氨酸的18种类型的氨基酸组成。天然氨基酸通常是L型氨基酸。

[0113] 非天然氨基酸

[0114] 在本公开中，非天然氨基酸是指除由上述20种类型的α-氨基酸组成的天然氨基酸之外的所有氨基酸。非天然氨基酸的实例包括β-氨基酸、γ-氨基酸、D-型氨基酸、具有不同于天然氨基酸侧链的侧链的α-氨基酸、α,α-二取代氨基酸和在其主链氨基上具有取代基的氨基酸(N-取代氨基酸)。非天然氨基酸的侧链没有特别限定，除了氢原子以外，其可以带有烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、芳烷基、环烷基等。此外，在α,α-二取代氨基酸的情况下，两个侧链可以形成环。此外，这些侧链可以带有一个或更多个取代基。在具体的实施方案中，取代基可以选自含有卤素原子、O原子、S原子、N原子、B原子、Si原子或P原子的任何官能团。例如，在本公开中，“具有卤素作为取代基的C1-C6烷基”是指其中烷基中的至少一个氢原子被卤素原子取代的“C1-C6烷基”，具体包括例如，三氟甲基、二氟甲基、氟甲基、五氟乙基、四氟乙基、三氟乙基、二氟乙基、氟乙基、三氯甲基、二氯甲基、氯甲基、五氯乙基、四氯乙基、三氯乙基、二氯乙基和氯乙基。此外，例如，“具有取代基的C5-C10芳基C1-C6烷基”是指其中芳基和/或烷基中的至少一个氢原子被取代基取代的“C5-C10芳基C1-C6烷基”。“具有2个或更多个的取代基”也意味着具有进一步具有其他取代基(诸如氨基或卤素等取代基)的作为取代基的某种官能团(例如，含有S原子的官能团)。非天然氨基酸的具体实例也可以参考WO2013/100132、WO2018/143145等。

[0115] 非天然氨基酸的主链氨基可以是未取代的氨基(NH_2基)或取代的氨基(NHR基)。这里，R表示可以带有取代基的烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、芳烷基或环烷基。此外，与主链氨基的N原子键合的碳链与α位的碳原子可以形成环，如脯氨酸中。氨基的烷基取代的实例包括N-甲基化、N-乙基化、N-丙基化和N-丁基化，芳烷基取代的实例包括N-苄基化。N-甲基氨基酸的具体实例包括N-甲基丙氨酸、N-甲基甘氨酸、N-甲基苯丙氨酸、N-甲基酪氨酸、N-甲基-3-氯苯丙氨酸、N-甲基-4-氯苯丙氨酸、N-甲基-4-甲氧基苯丙氨酸、N-甲基-4-噻唑丙氨酸、N-甲基组氨酸、N-甲基丝氨酸和N-甲基天冬氨酸。

[0116] 含有卤素的取代基的实例包括带有卤素作为取代基的烷基、环烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基和芳烷基，更具体地，实例包括氟烷基、二氟烷基和三氟烷基。

[0117] 含O原子的取代基的实例包括羟基(-OH)、氧基(-OR)、羰基(-C＝O-R)、羧基(-CO_2H)、氧羰基(-C＝O-OR)、羰氧基(-O-C＝O-R)、硫代羰基(-C＝O-SR)、羰基硫基(-S-C＝O-R)、氨基羰基(-C＝O-NHR)、羰基氨基(-NH-C＝O-R)、氧羰基氨基(-NH-C＝O-OR)、磺胺氨基(-NH-SO_2-R)、氨基磺酰基(-SO_2-NHR)、氨磺酰基氨基(-NH-SO_2-NHR)、硫羧基(-C(＝O)-SH)和羧基羰基(-C(＝O)-CO_2H)。

[0118] 氧基(-OR)的实例包括烷氧基、环烷氧基、烯氧基、炔氧基、芳氧基、杂芳氧基和芳烷氧基。

[0119] 羰基(-C＝O-R)的实例包括甲酰基(-C＝O-H)、烷基羰基、环烷基羰基、烯基羰基、炔基羰基、芳基羰基、杂芳基羰基和芳烷基羰基。

[0120] 氧羰基(-C＝O-OR)的实例包括烷氧基羰基、环烷氧基羰基、烯氧基羰基、炔氧基羰基、芳氧基羰基、杂芳氧基羰基和芳烷氧基羰基。

[0121] (-C＝O-OR)

[0122] 羰基氧基(-O-C＝O-R)的实例包括烷基羰基氧基、环烷基羰基氧基、烯基羰基氧基、炔基羰基氧基、芳基羰基氧基、杂芳基羰基氧基和芳烷基羰基氧基。

[0123] 硫代羰基(-C＝O-SR)的实例包括烷基硫代羰基、环烷基硫代羰基、烯基硫代羰基、炔基硫代羰基、芳基硫代羰基、杂芳基硫代羰基和芳烷基硫代羰基。

[0124] 羰基硫基(-S-C＝O-R)的实例包括烷基羰基硫基、环烷基羰基硫基、烯基羰基硫基、炔基羰基硫基、芳基羰基硫基、杂芳基羰基硫基和芳烷基羰基硫基。

[0125] 氨基羰基(-C＝O-NHR)的实例包括烷基氨基羰基、环烷基氨基羰基、烯基氨基羰基、炔基氨基羰基、芳基氨基羰基、杂芳基氨基羰基和芳烷基氨基羰基。其他实例包括通过将烷基、环烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基或芳烷基进一步取代与-C＝O-NHR中的N原子键合的H原子而产生的基团。

[0126] 羰基氨基(-NH-C＝O-R)的实例包括烷基羰基氨基、环烷基羰基氨基、烯基羰基氨基、炔基羰基氨基、芳基羰基氨基、杂芳基羰基氨基和芳烷基羰基氨基。其他实例包括通过将烷基、环烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基或芳烷基进一步取代与-NH-C＝O-R中的N原子键合的H原子而产生的基团。

[0127] 氧羰基氨基(-NH-C＝O-OR)的实例包括烷氧羰基氨基、环烷氧羰基氨基、烯基氧羰基氨基、炔基氧羰基氨基、芳氧羰基氨基、杂芳氧羰基氨基和芳烷氧羰基氨基。其他实例包括通过将烷基、环烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基或芳烷基进一步取代与-NH-C＝O-OR中的N原子键合的H原子而产生的基团。

[0128] 磺酰基氨基(-NH-SO_2-R)的实例包括烷基磺酰基氨基、环烷基磺酰基氨基、烯基磺酰基氨基、炔基磺酰基氨基、芳基磺酰基氨基、杂芳基磺酰基氨基和芳烷基磺酰基氨基。其他实例包括通过将烷基、环烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基或芳烷基进一步取代与-NH-SO_2-R中的N原子键合的H原子而产生的基团。

[0129] 氨基磺酰基(-SO_2-NHR)的实例包括烷基氨基磺酰基、环烷基氨基磺酰基、烯基氨基磺酰基、炔基氨基磺酰基、芳基氨基磺酰基、杂芳基氨基磺酰基和芳烷基氨基磺酰基。其他实例包括通过将烷基、环烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基或芳烷基进一步取代与-SO_2-NHR

中的N原子键合的H原子而产生的基团。

[0130] 氨磺酰氨基(-NH-SO_2-NHR)的实例包括烷基氨磺酰氨基、环烷基氨磺酰氨基、烯基氨磺酰氨基、炔基氨磺酰氨基、芳基氨磺酰氨基、杂芳基氨磺酰氨基和芳烷基氨磺酰氨基。另外,与-NH-SO_2-NHR中的N原子键合的两个H原子可以被独立地选自烷基、环烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基和芳烷基的取代基取代;或者这两个取代基可以形成环。

[0131] 对于含S原子的取代基,实例包括硫醇(-SH)、硫基(-S-R)、亚磺酰基(-S=O-R)、磺酰基(-S(O)$_2$-R)和磺基(-SO_3H)。

[0132] 硫基(-S-R)的实例包括烷硫基、环烷硫基、烯硫基、炔硫基、芳硫基、杂芳硫基、芳烷硫基等。

[0133] 亚磺酰基(-S=O-R)的实例包括烷基亚磺酰基、环烷基亚磺酰基、烯基亚磺酰基、炔基亚磺酰基、芳基亚磺酰基、杂芳基亚磺酰基和芳烷基亚磺酰基。

[0134] 磺酰基(-S(O)$_2$-R)的实例包括烷基磺酰基、环烷基磺酰基、烯基磺酰基、炔基磺酰基、芳基磺酰基、杂芳基磺酰基和芳烷基磺酰基。

[0135] 对于含N原子的取代基,实例包括叠氮化物(-N_3,也称为“叠氮基”)、氰基(-CN)、伯氨基(-NH2)、仲氨基(-NH-R)、叔氨基(-NR(R'))、脒基(-C(=NH)-NH_2)、取代脒基(-C(=NR)-NR'R")、胍基(-NH-C(=NH)-NH2)、取代胍基(-NR-C(=NR"')-NR'R")和氨基羰基氨基(-NR-CO-NR'R")。

[0136] 仲氨基(-NH-R)的实例包括烷基氨基、环烷基氨基、烯基氨基、炔基氨基、芳基氨基、杂芳氨基和芳烷基氨基。

[0137] 叔氨基(-NR(R'))的实例包括氨基,例如烷基(芳烷基)氨基,其具有各自独立地选自烷基、环烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基和芳烷基的任意两个取代基;并且这两个任意取代基可以形成环。

[0138] 取代的脒基(-C(=NR)-NR'R")的实例包括这样的的基团,其中N原子上的三个取代基R、R'和R"中的每一个独立地选自烷基、环烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基和芳烷基;并且这样的实例包括烷基(芳烷基)(芳基)脒基。

[0139] 取代的胍基(-NR-C(=NR"')-NR'R")的实例包括这样的基团,其中R、R'、R"和R"'各自独立地选自烷基、环烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基和芳烷基;或其中它们形成环的基团。

[0140] 氨基羰基氨基(-NR-CO-NR'R")的实例包括这样的基团,其中R、R'和R"各自独立地选自氢原子、烷基、环烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基和芳烷基;或其中它们形成环的基团。

[0141] 含B原子的取代基的实例包括硼基(-BR(R'))和二氧硼基(-B(OR)(OR'))。这两个取代基R和R'各自独立地选自烷基、环烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基和芳烷基;或者它们可以形成环。

[0142] 构成肽的“氨基酸”的至少一个原子可以是相同原子序数(质子数)和不同质量数(质子和中子总数)的原子(同位素)。构成肽的“氨基酸”中所含的同位素的实例包括氢原子、碳原子、氮原子、氧原子、磷原子、硫原子、氟原子和氯原子,包括^{2}H、^{3}H、^{13}C、^{14}C、^{15}N、^{17}O、^{18}O、^{31}P、^{32}P、^{35}S、^{18}F和^{36}Cl。

[0143] 如本文所用,“卤素原子”的实例包括F、Cl、Br和I。

[0144] 本文中,“烷基”是指通过从脂肪烃中去除任何一个氢原子而衍生的一价基团,并

涵盖烃基或烃基结构的子集，其在骨架中含有氢和碳原子，但不含有杂原子(其指碳原子和氢原子以外的原子)或不饱和碳-碳键。烷基不仅包括直链烷基，还包括支链烷基。烷基具体为具有1至20个碳原子数的烷基(C_1-C_{20};以下，“C_p-C_q”是指碳原子数为p至q)，并且优选的实例包括C_1-C_{10}烷基，更优选C_1-C_6烷基。烷基的具体实例包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、叔丁基、异丁基(2-甲基丙基)、正戊基、仲戊基(1-甲基丁基)、叔戊基(1,1-二甲基丙基)、新戊基(2,2-二甲基丙基)、异戊基(3-甲基丁基)、3-戊基(1-乙基丙基)、1,2-二甲基丙基、2-甲基丁基、正己基、1,1,2-三甲基丙基、1,2,2-三甲基丙基、1,1,2,2-四甲基丙基、1,1-二甲基丁基、1,2-二甲基丁基、1,3-二甲基丁基、2,2-二甲基丁基、2,3-二甲基丁基、3,3-二甲基丁基、1-乙基丁基和2-乙基丁基。

[0145] 在本文中，“烯基”是指具有至少一个双键(两个相邻的SP^2碳原子)的一价基团。根据双键和取代基(如果存在)的构型，双键的几何形状可以是entgegen(E)或zusammen(Z)或顺式或反式构型。烯基不仅包括直链烯基，还包括支链烯基。烯基的实例优选为C_2-C_{10}烯基，更优选C_2-C_6烯基，具体为乙烯基、烯丙基、1-丙烯基、2-丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基(包括顺式和反式)、3-丁烯基、戊烯基、3-甲基-2-丁烯基和己烯基。

[0146] 在本文中，“炔基”是指具有至少一个三键(两个相邻的SP碳原子)的一价基团。炔基不仅包括直链炔基，还包括支链炔基。炔基的实例优选为C_2-C_{10}炔基，更优选C_2-C_6炔基，具体为乙炔基、1-丙炔基、炔丙基、3-丁炔基、戊炔基、己炔基、3-苯基-2-丙炔基、3-(2’-氟苯基)-2-丙炔基、2-羟基-2-丙炔基、3-(3-氟苯基)-2-丙炔基和3-甲基-(5-苯基)-4-戊炔基。

[0147] 在本文中，“环烷基”是指饱和或部分饱和的环状一价脂肪烃基，包括单环、双环和螺环。环烷基的实例优选为C_3-C_8环烷基，具体为环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基、环辛基、双环[2.2.1]庚基和螺[3.3]庚基。

[0148] 在本文中，“芳基”是指一价芳香烃环，优选的实例包括C_6-C_{10}芳基。芳基的具体实例包括苯基和萘基(例如，1-萘基和2-萘基)。

[0149] 在本文中，“杂芳基”是指除碳原子之外含有1至5个杂原子的一价芳香环基团。该环可以是单环或与另一个环形成的稠环，其可以是部分饱和的。成环原子数优选为5至10(5至10元杂芳基)，更优选5至7(5至7元杂芳基)。杂芳基的具体实例包括呋喃基、噻吩基、吡咯基、咪唑基、吡唑基、噻唑基、异噻唑基、噁唑基、异噁唑基、噁二唑基、噻二唑基、三唑基、四唑基、吡啶基、嘧啶基、哒嗪基、吡嗪基、三嗪基、苯并呋喃基、苯并噻吩基、benzothiadiazolyl、苯并噻唑基、苯并噁唑基、苯并噁二唑基、苯并咪唑基、吲哚基、异吲哚基、吲唑基、喹啉基、异喹啉基、肉桂基、喹唑啉基、喹喔啉基、苯并二噁唑基、indolizinyl和咪唑并吡啶基。

[0150] 在本文中，“烷氧基”是指与上述定义的“烷基”键合的氧基，并且优选的实例包括C_1-C_6烷氧基。烷氧基的具体实例包括甲氧基、乙氧基、1-丙氧基、2-丙氧基、正丁氧基、异丁氧基、仲丁氧基、叔丁氧基、戊氧基和3-甲基丁氧基。

[0151] 在本文中，“烯氧基”是指与上述定义的“烯基”键合的氧基，并且优选的实例包括C_2-C_6烯氧基。烯氧基的具体实例包括乙烯氧基、芳氧基、1-丙烯氧基、2-丙烯氧基、1-丁烯氧基、2-丁烯氧基(包括顺式和反式)、3-丁烯氧基、戊烯氧基和己烯氧基。

[0152] 在本文中，“环烷氧基”是指与上述定义的“环烷基”键合的氧基，并且优选的实例包括C3-C8环烷氧基。环烷氧基的具体实例包括环丙氧基、环丁氧基和环戊氧基。

[0153] 在本文中，“芳氧基”是指与上述定义的“芳基”键合的氧基，并且优选的实例包括C_6-C_{10}芳氧基。芳氧基的具体实例包括苯氧基、1-萘氧基和2-萘氧基。

[0154] 在本文中，“氨基”狭义是指-NH_2，广义是指-NRR’，其中R和R’独立地选自氢、烷基、烯基、炔基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基，或其中R和R’与它们所连接的氮原子一起形成环。氨基的优选实例包括-NH_2、单C_1-C_6烷基氨基、二C_1-C_6烷基氨基和4-至8-元环状氨基。

[0155] 在本文中，“单烷基氨基”是指对应于上述定义的“氨基”的基团，其中R是氢，R’是上述定义的“烷基”，并且优选的实例包括单C_1-C_6烷基氨基。单烷基氨基的具体实例包括甲氨基、乙氨基、正丙氨基、异丙氨基、正丁氨基、仲丁氨基和叔丁氨基。

[0156] 在本文中，“二烷基氨基”是指对应于上述定义的“氨基”的基团，其中R和R’独立地为上述定义的“烷基”，并且优选的实例包括二C_1-C_6烷基氨基。二烷基氨基的具体实例包括二甲氨基和二乙氨基。

[0157] 在本文中，“氨基烷基”是指其中上述定义的“烷基”的一个或多个氢被上述定义的“氨基”取代的基团，并且优选为C_1-C_6氨基烷基。氨基烷基的具体实例包括1-吡啶基甲基、2-(1-哌啶基)乙基、3-(1-哌啶基)丙基和4-氨基丁基。

[0158] 在本文中，“芳烷基(芳烷基)”是指其中上述定义的“烷基”中的至少1个氢原子被上述定义的“芳基”取代的基团，并且优选为C_7-C_{14}芳烷基，更优选C_7-C_{10}芳烷基。芳烷基的具体实例包括苄基、苯乙基和3-苯丙基。

[0159] 对于非天然氨基酸的具体实例可以参考WO2013/100132、WO2018/143145等。

[0160] 在实施方案中，通过本发明的制备方法获得的包括一种或多种类型氨基酸的肽可以用作药物。在肽用作药物的情况下，优选高代谢稳定性和膜渗透性。如本文所用的这样的特征是指“类药性”或“药物样”。如本文所用的术语“药物样氨基酸”是指α-、β-和γ-氨基酸，其中主链氨基(NH_2基团)的两个氢原子之，或主链亚甲基(-CH_2-基团)的一个或两个氢原子可以被烷基、环烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、芳烷基等取代。这些取代基可以进一步被“有助于类药性的取代基”取代。药物样氨基酸的优选实例是WO2018/225864中公开的具有“长侧链”的氨基酸。药物样氨基酸也可以是L-氨基酸、D-氨基酸、α,α-二取代氨基酸、N-取代氨基酸等。药物样氨基酸不一定必须是可翻译的。药物样氨基酸包括从“翻译氨基酸”获得的肽的侧链部分(例如，当在D-酪氨酸处获得命中化合物时，通过化学修饰D-酪氨酸获得的D-氨基酸，或者当在β-丙氨酸处获得命中化合物时，通过化学修饰β-丙氨酸获得的β-氨基酸)，或可以通过N-甲基氨基酸的化学转化优化N-取代部分的结构而化学合成的氨基酸。此类氨基酸作为药物样肽的成分起作用，因此选自可通过翻译后化学修饰提供药物样肽的一系列氨基酸。例如，如下所述，当氨基不参与翻译后修饰时，具有氨基烷基的赖氨酸不包括在药物样氨基酸中。然而，当赖氨酸的氨基被用作翻译后修饰中的反应性官能团(例如，交叉单元)时，赖氨酸单元作为药物样氨基酸的单元被包括在内。这样，氨基酸是否为“药物样氨基酸”由已经通过翻译后修饰转化的官能团决定。可以作为这种取代基的上述单独定义的取代基的实例包括酯基(-CO-OR)、硫酯基(-CO-SR)、硫醇基(-SH)或受保护的硫醇基、氨基(-NH2)、单取代氨基(-NH-R)或双取代氨基(-NRR’)，或受保护氨基、取代的磺酰基氨基(-NH-SO_2-R)、烷基硼烷基(-BRR)’、烷氧基硼烷基(-B(OR)(OR’))、叠氮基(-N_3)、酮酸基团(-CO-CO_2H)、硫代羧酸基(-CO-SH)、磷酰基酯基(-CO-PO(R)(R’))和酰基羟基氨基(-NH-O-CO-R)。药物样氨基酸侧链中所含的一个或两个不相邻的亚甲基可以被氧原子、羰基(-CO-)或

磺酰基(-SO_2-)取代。

[0161] 如本文所用的“有助于类药性的取代基”的实例包括取代基,例如卤素(例如F、Cl、Br或I)、羟基(-OH)、烷氧基(-OR)、氧基(-OR)、酰胺基(-NR-COR’或-CO-NRR′)、磺酰基(-SO_2-R)、亚磺酰基(-SOR)、氧氨基(-mR--OR′)、氨基氧基(-O-NRR′)、氧羰基(-CO-OR)、硫代羰基(-CO-SR)、硫醇(-SH)、硫基(-SR)、伯氨基(-NH_2)、仲氨基(-NHR)或叔氨基(-NRR’)、磺酰氨基(-NH-SO_2-R)、硼基(-BRR’)、二氧硼基(-B(OR)(OR’))、叠氮基(-N_3)、羧基羰基(-CO-CO_2H)、磷酰基羰基(-CO-PO(R))(R’))、羰氧基氨基(-NH-O-CO-R)、羟基氨基(-NR-OR’)和氨基羟基(-O-NRR’)。

[0162] 构成本公开的包含一种或多种类型的非天然氨基酸的肽的非天然氨基酸的具体实例包括MeSer(tBuOH)、BODIPYFL-4-AMF、MeCys(StBu)、MeG、MeStBuOH、Nle、S3F5MePyr、SPh2Cl、MeF、MeHph、MeA3Pyr、SPh2Cl、Pic(2)、MeHph和dA。这些非天然氨基酸可以被掺入,例如,在对应于肽的第二个字母或第三个字母的位置。

[0163] 肽

[0164] 在本公开中,肽是指通过酰胺键和/或酯键连接的两个或更多个氨基酸。在没有任何限制的情况下,本公开的肽包括线性肽和环状肽。本公开的肽还包括肽、肽和核酸的复合物(肽-核酸复合物),以及肽、核糖体和核酸的复合物。本公开的“核酸”包括DNA、mRNA和tRNA。本公开的“肽”可以包括其药学上可接受的盐。

[0165] 在一个实施方案中,本公开的肽具有通过酰胺键和/或酯键连接的2至100、3至50、4至30或5至30个氨基酸。例如,在一个实施方案中,当将本发明的包含一种或多种非天然氨基酸的肽用作药物时,为了获得高的膜渗透性,构成肽的氨基酸数优选为20或更少,更多优选为18或更少、16或更少、15或更少、14或更少,并特别优选13或更少,具体的实例包括9、10、11、12和13。另外,为了获得高代谢稳定性,构成肽的氨基酸数优选为8或更多,更优选为9或更多,甚至更优选为10或更多,特别优选为11或更多。当考虑获得膜渗透性和代谢稳定性时,构成肽的氨基酸数优选为5至20,或7至20,更优选7至17、8至16、9至16、或10至16,甚至更优选8至13、10至15、11至15、10至14、10至13或11至14,特别优选11至13。

[0166] 构成本公开的环肽的环状部分的氨基酸的数量不受限制,但实例包括4或更多、6或更多、7或更多、8或更多、9或更多、10或更多、11或更多、12或更多、20或更少、18或更少、16或更少、15或更少、14或更少、13或更少、12或更少、11或更少、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个和16个。当考虑获得膜渗透性和代谢稳定性时,构成上述环状部分的氨基酸的数量优选为5至15,更优选为5至14、7至14、或8至14,甚至更优选为8至13、9至13、8至12、8至11,或9至12,并且特别优选9至11。在本文中,肽的“环状部分”是指由两个或更多个连接的氨基酸残基形成的环状部分。

[0167] 在非限制性实施方案中,本公开的环肽可以具有线性部分。在本文中,用于指环状肽的部分结构的“线性部分”是指不包含在环状部分的主链结构中的部分,并且在这部分的链上具有至少一个酰胺键和/或酯键。线性部分中的氨基酸数(单元数)优选为0至8,更优选为0至5,还更优选为0至3。在非限制性实施方案中,本公开中的线性部分可包括天然氨基酸和非天然氨基酸(包括化学修饰或骨架转化的氨基酸)。

[0168] 在非限制性实施方案中,包含在本公开的肽中的非天然氨基酸的数量的实例优选为2或更多,更优选4或更多、5或更多、或6或更多,还更优选7或更多,并且特别优选8或更

多，并且还优选20或更少、15或更少、14或更少、13或更少、12或更少、10或更少、或9或更少。本公开的肽中包含的非天然氨基酸的数量的实例是相对于构成环状部分的氨基酸的数量的30％或更多、40％或更多、50％或更多、60％或更多、70％或更多，或80％或更多。此外，本公开的肽包含例如优选1或更多，更优选2或更多、3或更多、4或更多，甚至更优选7或更多，特别优选8或更多种类型的非天然氨基酸，并且还优选20或更少、15或更少、14或更少、13或更少、12或更少、10或更少、或9或更少种类型的非天然氨基酸。

[0169] 在本公开的包含一种或多种类型的非天然氨基酸的肽中，其包含非天然氨基酸的位点不受限制，但在一个实施方案中，肽可包含在对应于起始氨基酸的位置上的非天然氨基酸，并且可以进一步包含在对应于第二字母和/或第三字母氨基酸的位置上的非天然氨基酸。

[0170] 已知当在起始氨基酸位点引入除fMet之外的氨基酸时，观察到被定义为起始通读(iRT)的现象，其中翻译从对应于从开头的第二个字母或第三个字母的氨基酸开始(在下文中，以这种方式产生的肽被定义为起始通读肽(iRT肽))。通过使用本公开的改造的L31蛋白质或包含该蛋白的核糖体，即使在合成具有在起始氨基酸位点处引入的非天然氨基酸的肽时，也可以避免起始通读的现象。此外，iRT肽没有被环化。因此，在产生包含环肽的文库时，如果编码这些肽的大部分mRNA变成编码iRT肽的那些mRNA，则可以展示的分子数量变得有限，展示的环肽的数量减少，并且文库的多样性减少。使用本公开的改造的L31蛋白质或包含该蛋白的核糖体可以防止文库质量的这种降低。

[0171] 肽编码mRNA

[0172] 在本公开中，肽是通过翻译编码包含一种或多种类型的非天然氨基酸的肽的mRNA而产生的。mRNA是携带可以翻译成蛋白质的遗传信息的RNA。遗传信息作为密码子在mRNA上编码，每个密码子对应于总共20种类型氨基酸中的一种。蛋白质翻译从起始密码子开始，到终止密码子结束。原则上，真核生物中的起始密码子是AUG；然而，在原核生物(真细菌和古细菌)中，除了AUG之外，GUG、UUG等也可以用作起始密码子。AUG是编码甲硫氨酸(Met)的密码子，在真核生物和古细菌中，翻译是从甲硫氨酸开始的。另一方面，在真细菌中，由于起始密码AUG仅对应于N-甲酰甲硫氨酸(fMet)，因此翻译从甲酰甲硫氨酸开始。有三种类型的终止密码子：UAA(ocher)、UAG(琥珀)和UGA(蛋白石)。当终止密码子被称为翻译终止因子(释放因子；RF)的蛋白质识别时，先前已合成的肽链与tRNA解离，翻译过程结束。在一个实施方案中，本公开的编码包含一种或多种类型的非天然氨基酸的肽的mRNA可以示例为包含编码至少在对应于起始氨基酸的位置处包含非天然氨基酸的肽的密码子的mRNA。

[0173] 在本公开的编码包含一种或多种类型的非天然氨基酸的肽的mRNA中，其包含非天然氨基酸的位点不受限制，但在一个实施方案中，mRNA可包含编码对应于起始氨基酸位置处的非天然氨基酸的密码子。

[0174] 肽翻译

[0175] 如上所述，在本公开中，包含一种或多种类型的非天然氨基酸的肽可以通过从编码肽的mRNA翻译产生。在本文中，“翻译”是指通过从编码肽的核酸(例如DNA或RNA)翻译来合成肽。翻译是使用mRNA作为模板，通过核糖体的作用，通过重复的酰胺键合和/或酯键合反应获得线性肽的步骤。

[0176] 一方面，本公开提供了用于产生包含至少1种、2种或多种、3种或多种、4种或多种、

或5种或多种类型非天然氨基酸的肽的方法和包含所述肽的文库。不限于，此类生产方法可包括以下步骤(i)和(ii)：

[0177] (i)制备附着有非天然氨基酸的至少1种、2种或多种、3种或多种、4种或多种、或5种或多种的tRNA；

[0178] (ii)通过在翻译系统中翻译包含对应于上述tRNA的反密码子的密码子中的至少一个的核酸而获得上述肽。

[0179] 在本文中，核酸可以包含与上述tRNA的反密码子对应的密码子中的至少一个。在另一个非限制性实施方案中，本公开的编码包含一种或多种类型的非天然氨基酸的肽的mRNA可以是包含编码在对应于起始氨基酸的位置处包含非天然氨基酸的肽的密码子的mRNA。

[0180] 在天然氨基酸的翻译中，20种类型的蛋白质氨基酸和翻译终止被分配给64种密码子中的每一种。当从翻译系统中去除具体氨基酸时，对应于该氨基酸的密码子变为空密码子。因此，如果将连接具有与该空密码子互补的反密码子的tRNA的所需非天然氨基酸添加到翻译系统中，然后进行翻译，则该氨基酸由该密码子编码，并且通过翻译形成已经引入所需非天然氨基酸而非去除的氨基酸的肽。

[0181] 在本公开的实施方案中，起始抑制(iSP)方法优选用于肽翻译。在典型的翻译中，通常，作为翻译起始氨基酸，甲硫氨酸被翻译为N-末端氨基酸。对于翻译的开始，有一个专门的“起始tRNA”。当起始tRNA与甲硫氨酸(原核生物中的甲酰甲硫氨酸)键合，然后转运至核糖体时，翻译起始于N-末端氨基酸为甲硫氨酸(原核生物中的甲酰甲硫氨酸)。相反，通过在翻译系统中翻译产生在N-末端具有所需氨基酸的肽称为起始抑制法，其中在所述翻译系统中用甲硫氨酸氨酰化的起始tRNA已被去除(或防止产生)，并且相反，已经添加了用事先准备的所需氨基酸氨酰化的起始tRNA。已知在N末端引入非天然氨基酸的耐受性大于在氨基酸延伸过程中引入的耐受性，并且具有与天然氨基酸显著不同结构的非天然氨基酸可以用作N-末端氨基酸(非专利文献：J.Am.Chem.Soc.2009 Apr.15;131(14):5040-1.Translation initiation with initiator tRNA charged with exotic peptides.Goto,Y,Suga,H.)。在本公开的一个实施方案中，翻译系统中含有的起始tRNA可以是被非天然氨基酸酰化的一种起始tRNA。

[0182] 翻译系统

[0183] 在本公开中，“翻译系统”被定义为包括用于肽翻译的方法和用于肽翻译的组合物的概念。在本公开中，“翻译系统”不受限制，只要它含有包括本公开的改造的L31蛋白质的核糖体。本发明的“翻译系统”是指进一步组合参与翻译的一组蛋白质因子、tRNA、氨基酸、诸如ATP等能源及其再生系统的系统，并优选包括可以将mRNA翻译成蛋白质的系统。此外，其中正在进行翻译的系统也可以包括在本文的“翻译系统”中。本文的翻译系统可以含有在肽翻译过程中充当模板的核酸，并且可以另外含有起始因子、延伸因子、释放因子、氨酰基-tRNA合成酶等。这些因子可以通过从多种细胞提取物中纯化获得。从中纯化因子的细胞的实例可以包括原核细胞和真核细胞。原核细胞的实例是大肠杆菌细胞、极端嗜热细胞和枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis)细胞。用作材料的已知真核细胞包括酵母细胞、小麦胚芽、兔网织红细胞、植物细胞、昆虫细胞或动物细胞。除了天然存在的tRNA和氨酰-tRNA合成酶(ARS)，还可以使用识别非天然氨基酸的人工tRNA和人工氨酰-tRNA合成酶。通过使用人

工tRNA和人工氨酰-tRNA合成酶可以合成其中位点特异性引入非天然氨基酸的肽。此外，必要时，可以通过将RNA聚合酶(如T7 RNA聚合酶)添加到翻译系统中，从模板DNA进行转录。

[0184] 在本文中，“翻译系统包含某种物质”包括这样的实施方案，其中即使系统在翻译开始时不包含该物质，但该物质在翻译过程中仍然会在该系统内合成并包括在所述系统中。例如，当在翻译过程中合成用氨基酸酰化的tRNA时，翻译系统被理解为包含该氨酰基-tRNA。

[0185] 翻译系统的主要类型是使用活细胞的翻译系统和使用细胞提取物的翻译系统(无细胞翻译系统)。使用活细胞的已知翻译系统包括，例如，其中通过显微注射法或脂质转染法将所需氨酰基-tRNA和mRNA引入活细胞如非洲爪蟾卵母细胞和哺乳动物细胞中以进行肽翻译的系统(Nowak等人，Science(1995)268:439-442)。无细胞翻译系统的已知实例是使用来自大肠杆菌(Chen等人，Methods Enzymol(1983)101:674-690)、酵母(Gasior等人，J Biol Chem(1979)254:3965-3969)、小麦胚芽(Erickson等人，Methods Enzymol(1983)96:38-50)、兔网织红细胞(Jackson等人，Methods Enzymol(1983)96:50-74)、HeLa细胞(Barton等人，Methods Enzymol(1996)275:35-57)、昆虫细胞(Swerdel等人，Comp Biochem Physiol B(1989)93:803-806)等的那些。这种翻译系统可以通过本领域技术人员已知的方法或与其类似的方法适当地制备。无细胞翻译系统还包括通过分离和纯化肽翻译所需的每种因子并重构它们而构建的翻译系统(重构的无细胞翻译系统)(Shimizu等人，Nat Biotech(2001)19:751-755)。重构的无细胞翻译系统通常可能含有核糖体、氨基酸、tRNA、氨酰-tRNA合成酶(aaRS)、翻译起始因子(例如，IF1、IF2和IF3)、翻译延伸因子(例如，EF-Tu、EF-Ts和EF-G)、翻译释放因子(例如RF1、RF2和RF3)、核糖体再循环因子(RRF)、作为能源的NTP、能量再生系统以及翻译所需的其他因子。当还进行来自DNA的转录反应时，可以进一步包含RNA聚合酶等。无细胞翻译系统中所含的多种因子可以通过本领域技术人员公知的方法分离和纯化，并用于适当地构建重构的无细胞翻译系统。或者，可以使用市售的重构的无细胞翻译系统，例如Genefrontier’s PUREfrex(注册商标)和New England Biolabs’ PURExpress(注册商标)。在重构的无细胞翻译系统的情况下，可以通过从翻译系统的组分中仅重构必要的组分来构建所需的翻译系统。

[0186] PURESYSTEM(注册商标)(BioComber，Japan)是重构的无细胞翻译系统，其中分别提取和纯化大肠杆菌中翻译所需的蛋白质因子、能量再生酶和核糖体，然后与tRNA、氨基酸、ATP、GTP等混合。由于该系统不仅杂质含量低，而且是重构的系统，因此可以容易地制备不含需要待排除的蛋白质因子和氨基酸的系统((i)Nat.Biotechnol.2001;19:751-5.Cell-free translation reconstituted with purified components.Shimizu,Y.,Inoue,A.,Tomari,Y.,Suzuki,T.,Yokogawa,T.,Nishikawa,K.,Ueda,T.;(ii)Methods Mol.Biol.2010;607:11-21.PURE technology.Shimizu,Y.,Ueda,T.)。

[0187] 例如，已经有关于使用终止密码子作为密码子来引入非天然氨基酸的方法的许多报道。通过使用上述PURESYSTEM，可以构建排除天然氨基酸和ARS的合成系统。这允许将编码所排除天然氨基酸的密码子分配给非天然氨基酸(J.Am.Chem.Soc.2005;127:11727-35.Ribosomal synthesis of unnatural peptides.Josephson,K.,Hartman,MC.,Szostak,JW.)。此外，可以通过破坏密码子简并性添加非天然氨基酸而不排除天然氨基酸(Kwon,I.,等人，Breaking the degeneracy of the genetic code.J.Am.Chem.Soc.2003,

125,7512-3.)。包含N-甲基氨基酸的肽可以通过利用无细胞翻译系统如PURESYSTEM以核糖体方式合成。

[0188] 更具体地,核糖体合成例如可以通过将mRNA添加到已知的无细胞翻译系统如PURESYSTEM中来进行,在所述无细胞翻译系统中适当选择并混合在大肠杆菌中翻译所必需的蛋白质因子(甲硫氨酰-tRNA转化酶、EF-G、RF1、RF2、RF3、RRF、IF1、IF2、IF3、EF-Tu、EF-T和ARS(必要的选自AlaRS、ArgRS、AsnRS、AspRS、CysRS、GlnRS、GluRS、GlyRS、HisRS、IleRS、LeuRS、LtsRS、MetRS、PheRS、ProRS、SerRS、ThrRS、TrpRS、TyrRS和ValRS))、核糖体、氨基酸、肌酸激酶、肌激酶、无机焦磷酸酶、二磷酸核苷激酶、大肠杆菌衍生的tRNA、磷酸肌酸、谷氨酸钾、HEPES-KOH(pH 7.6)、醋酸镁、亚精胺、二硫苏糖醇、GTP、ATP、CTP、UTP等。同样,添加T7RNA聚合酶使得能够从含有T7启动子的模板DNA进行偶联转录/翻译。此外,可以将一组所需的氨酰tRNA和一组氨酰tRNA合成酶(ARS)可接受的非天然氨基酸(例如,F-Tyr)添加到系统中,以核糖体方式合成包含非天然氨基酸的肽化合物(Kawakami,T.,等人Ribosomal synthesis of polypeptoids and peptoid-peptide hybrids.J.Am.Chem.Soc.2008,130,16861-3;Kawakami,T.,等人Diverse backbone-cyclized peptides via codon reprogramming.Nat.Chem.Biol.2009,5,888-90)。此外,编码包含非天然氨基酸的肽的mRNA也可以通过添加代替天然ARS或除了天然ARS之外的ARS的变体,还可以通过在系统中添加一组非天然氨基酸来翻译。或者,编码包含非天然氨基酸的肽的mRNA的翻译效率及其伴随的非天然氨基酸掺入可以通过使用核糖体、EF-Tu等的变体来提高(Dedkova LM,等人Construction of modified ribosomes for incorporation of D-amino acids into proteins.Biochemistry.2006,45,15541-51;Doi Y,等人Elongation factor Tu mutants expand amino acid tolerance of protein biosynthesis system.J Am Chem Soc.2007,129,14458-62;Park HS,等人Expanding the genetic code of Escherichia coli with phosphoserine.Science.2011,333,1151-4)。

[0189] 此外,本公开中的翻译系统优选含有包含本公开的改造的L31蛋白质的核糖体,其相对于所述翻译系统中含有的所有核糖体,以分子数量计其百分比为至少50%或更多,优选60%或更多,更优选70%或更多,甚至更优选80%或更多,或特别优选90%或更多(例如,91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%或更多)。术语“所有核糖体”没有特别限制,只要其指翻译系统中含有的核糖体即可,但它们可以示例为包含本公开的改造的L31蛋白质的核糖体和其他核糖体(例如,包含野生型大肠杆菌L31的核糖体和与其功能等效的核糖体)的总和。

[0190] 例如,可以基于改造的L31蛋白质的质谱强度与所有核糖体的质谱强度之比来计算改造的L31蛋白质相对于翻译系统中所有核糖体的百分比。

[0191] 此外,本公开的翻译系统优选含有镁离子。已知镁离子是维持核糖体的小亚基和大亚基缔合状态所必需的。L31蛋白质是形成核糖体大亚基和小亚基之间相互作用的蛋白质之一。缺乏L31蛋白质的核糖体和包含shortL31的核糖体比包含完整L31的核糖体需要更高的镁离子浓度来维持缔合状态。因此,在其中使用含有改造的L31蛋白质的核糖体的本公开的生产方法中,优选使镁离子浓度高于其中使用包含完整L31的核糖体的翻译系统中的镁离子浓度。为了制备这样的翻译系统,本发明的方法可以进一步包括将镁离子添加到本发明的翻译系统中的步骤。或者,在本发明中,也可以使用已预先添加了镁离子的翻译系

统。添加的镁的量没有特别限制，但实例包括例如可以通过选自1mM或更多、2mM或更多、3mM或更多、4mM或更多、5mM或更多、6mM或更多、或7mM或更多的下限和选自9mM或更少、8mM或更少、7mM或更少、6mM或更少、5mM或更少、4mM或更少，或3mM或更少的上限的任何组合具体说明的范围。

[0192] tRNA

[0193] 为了通过翻译编码包含非天然氨基酸的肽的mRNA将非天然氨基酸掺入肽中，正交并有效掺入核糖体的tRNA的氨酰化是必要的((i)Biochemistry.2003;42:9598-608.Adaptation of an orthogonal archaeal leucyl-tRNA and synthetase pair for four-base,amber,and opal suppression.Anderson,JC.,Schultz,PG.;和(ii)Chem.Biol.2003;10:1077-84.Using a solid-phase ribozyme aminoacylation system to reprogram the genetic code.Murakami,H.,Kourouklis,D.,Suga,H.)。以下五种方法可用作氨酰化tRNA的方法。

[0194] 在细胞内，各个氨基酸的氨酰tRNA合成酶(ARS)被提供为用于氨酰化tRNA的酶。因此，第一种方法包括利用某些ARS接受非天然氨基酸如N-Me His的事实的方法，或制备和使用接受非天然氨基酸的突变氨酰tRNA合成酶的方法((i)Proc.Natl.Acad.Sci.U S A.2002;99:9715-20.An engineered Escherichia coli tyrosyl-tRNA synthetase for site-specific incorporation of an unnatural amino acid into proteins in eukaryotic translation and its application in a wheat germ cell-free system.Kiga,D.,Sakamoto,K.,Kodama,K.,Kigawa,T.,Matsuda,T.,Yabuki,T.,Shirouzu,M.,Harada,Y.,Nakayama,H.,Takio,K.,Hasegawa,Y.,Endo,Y.,Hirao,I.,Yokoyama,S.;(ii)Science.2003;301:964-7.An expanded eukaryotic genetic code.Chin,JW.,Cropp,TA.,Anderson,JC.,Mukherji,M.,Zhang,Z.,Schultz,PG.,Chin,JW.;和(iii)Proc.Natl.Acad.Sci.U S A.2006;103:4356-61.Enzymatic aminoacylation of tRNA with unnatural amino acids.Hartman,MC.,Josephson,K.,Szostak,JW.)。其次，也可以使用其中在体外将tRNA氨酰化，然后对氨基酸进行化学修饰的方法(J.Am.Chem.Soc.2008;130:6131-6.Ribosomal synthesis of N-methyl peptides.Subtelny,AO.,Hartman,MC.,Szostak,JW.)。第三，其中CA已经从3′-末端CCA序列中去除的tRNA可以通过使用RNA连接酶与单独制备的氨酰化pdCpA连接以获得氨酰tRNA(Biochemistry.1984;23:1468-73.T4RNA ligase mediated preparation of novel“chemically misacylated”tRNAPheS.Heckler,TG.,Chang,LH.,Zama,Y.,Naka,T.,Chorghade,MS.,Hecht,SM.)。还存在通过柔性酶进行的氨酰化，所述柔性酶是允许tRNA携带多种非天然氨基酸的活性酯的核酶(J.Am.Chem.Soc.2002;124:6834-5.Aminoacyl-tRNA synthesis by a resin-immobilized ribozyme.Murakami,H.,Bonzagni,NJ.,Suga,H.)。第四，也可以使用其中在阳离子胶束内超声搅拌tRNA和氨基酸的活性酯的方法(Chem.Commun.(Camb).2005;(34):4321-3.Simple and quick chemical aminoacylation of tRNA in cationic micellar solution under ultrasonic agitation.Hashimoto,N.,Ninomiya,K.,Endo,T.,Sisido,M.)。第五，通过将氨基酸活性酯连接到与接近tRNA 3′-末端的序列互补的PNA并将其添加到tRNA上，也可以实现氨酰化(J.Am.Chem.Soc.2004;126:15984-9.In situ chemical aminoacylation with amino acid thioesters linked to a peptide nucleic acid.

Ninomiya,K.,Minohata,T.,Nishimura,M.,Sisido,M.)。

[0195] 更具体而言,氨酰基tRNA可以使用如下方法来制备。制备编码所需tRNA序列的模板DNA,其中T7、T3或SP6启动子位于其上游。RNA可以通过使用与启动子相容的RNA聚合酶,例如T7RNA聚合酶,或T3或SP6RNA聚合酶转录DNA而合成。tRNA也可以从细胞中提取并纯化,并且可以通过使用具有与tRNA序列互补的序列的探针从中提取所产生的目标tRNA。在这样的提取中,用目的tRNA的表达载体转化的细胞可以用作来源。也可以化学合成具有所需序列的RNA。例如,可以通过RNA连接酶将其中CA已经从3'-末端CCA序列去除的由此获得的tRNA与单独制备的氨酰化pdCpA或pCpA连接以获得氨酰tRNA(pdCpA法,pCpA法)。此类tRNA可用于制备肽。或者,氨酰tRNA也可以通过制备全长tRNA并使用柔性酶将它们氨酰化来制备,所述柔性酶是使tRNA能够携带多种非天然氨基酸的活性酯的核酶。不希望受任何限制,也可以使用天然ARS或其变体制备氨酰tRNA。当使用天然ARS或其变体时,曾经在翻译系统中消耗的氨酰tRNA可以被天然ARS或其变体再生;因此,无需预先制备的氨酰tRNA大量存在于翻译系统中。此类ARS变体描述于WO2016/148044。制备氨酰tRNA的这些方法也可以适当组合。

[0196] 肽环化

[0197] 在非限制性实施方案中,用于产生肽或包含本公开中的肽的文库的方法可以进一步包括使翻译的肽环化的步骤。环化的实施方案包括例如使用酰胺键、碳-碳键、硫醚键、二硫键、酯键、硫酯键、内酰胺键、由三唑结构介导的键,或由荧光团结构介导的键的环化。其中,酰胺键由于其代谢稳定性高而优选。肽翻译步骤和环化反应步骤可以单独或相继进行。环化可以通过WO2013/100132、WO2008/117833、WO2012/074129等中描述的本领域技术人员已知的方法进行。

[0198] 环形成中的键合的实施方案不受限制,但可以是肽的N末端与C末端之间的键合、肽的N末端与另一氨基酸残基的侧链之间的键合、肽的C末端和另一氨基酸残基的侧链之间的键合,或氨基酸残基的侧链之间的键合,或这些中的两种或多种可以组合使用。

[0199] 在非限制性实施方案中,本发明涉及例如用于产生肽或包含所述肽的文库的方法,其包括以下步骤:

[0200] (1)通过本文所述的方法产生包含一种或多种类型非天然氨基酸的无环肽,其中所述无环肽包含在C末端侧的一个侧链具有反应点的氨基酸残基和在N末端侧具有另一个反应点的氨基酸残基;和

[0201] (2)将N末端侧的氨基酸残基的反应点与C末端侧的氨基酸残基侧链的反应点键合,以形成酰胺键、碳-碳键,或硫醚键。

[0202] 这些步骤(1)和(2)可以单独或相继进行。

[0203] 具体地,通过酰胺键合的肽环化方法的非限制性实施方案包括其中使用戊二酸二琥珀酰亚胺酯(DSG)交联N-末端甲硫氨酸的氨基和位于下游(C-末端侧)的赖氨酸的氨基的环化方法;其中将具有氯乙酰基的氨基酸衍生物引入作为N末端翻译起始氨基酸,并且Cys位于下游,并且它们由此允许通过分子内环化反应形成硫醚的环化方法;和通过翻译产生在N末端具有半胱氨酸或半胱氨酸类似物并且在C末端侧的氨基酸的侧链中具有活性酯的肽并使用天然化学连接进行环化的方法。

[0204] 在非限制性实施方案中,本公开中的肽的C末端位点可以不保持为羧酸而是进行

化学修饰。例如,羧酸位点可以与哌啶等反应,并由此转化为哌啶酰胺等。

[0205] 文库

[0206] 本发明涉及通过本文所述的肽生产方法产生的肽,以及包含这种肽的文库。此外,本发明涉及含肽文库,包括通过本文所述的肽生产方法产生肽的步骤。本公开的文库包括包含本公开的肽的文库,以及包含编码本公开的肽的核酸的文库。本公开中的文库包括本公开中的肽文库和肽-核酸复合物文库。该库优选地是展示库。展示文库的实例包括展示利用文库,其中优选mRNA展示文库、DNA展示文库和核糖体展示文库,更优选mRNA展示文库。

[0207] 展示文库

[0208] 展示文库是指其中作为表型的肽与其作为基因型的编码肽的RNA或DNA相关联的文库。通过利用这样的文库,可以鉴定可以特异性结合靶标分子的肽。例如,文库与所需的固定靶标接触,与靶标结合的肽可以通过洗去未与靶标结合的分子来富集(淘选)。可以分析与通过这种过程选择的肽相关的基因信息以确定与靶标结合的肽的序列。例如,使用抗生素嘌呤霉素(氨酰基-tRNA类似物)在其mRNA通过核糖体进行翻译延伸期间与蛋白质的非特异性缀合的方法已被报道为mRNA展示(Proc.Natl.Acad.Sci.USA.1997;94:12297-302.RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins.Roberts,R.W.,Szostak,J.W.)或体外病毒(FEBS Lett.1997;414:405-8.In vitro virus:bonding of mRNA bearing puromycin at the 3'-terminal end to the C-terminal end of its encoded protein on the ribosome in vitro.Nemoto,N.,Miyamoto-Sato,E.,Husimi,Y.,Yanagawa,H.)。

[0209] 通过将诸如嘌呤霉素等间隔子与从含有诸如T7启动子等启动子的DNA文库转录获得的mRNA文库的3′端缀合,当这些mRNA在无细胞翻译系统中翻译成蛋白质时,嘌呤霉素被核糖体误认为是氨基酸,并掺入到蛋白质中。mRNA与由其编码的蛋白质连接,因此获得了其中mRNA与其产物相关联的文库。不涉及大肠杆菌等的转化的该过程实现了高的效率,可构建大规模展示文库。从充当含有与通过淘选富集和选择的分子结合的遗传信息的标签的mRNA合成cDNA,然后通过PCR扩增。可以对扩增产物进行测序以确定所连接的肽的序列。

[0210] 除了mRNA展示之外,已知以下文库为使用无细胞翻译系统的展示文库:

[0211] cDNA展示是包含与肽-嘌呤霉素复合物连接的肽编码cDNA的文库(Nucleic Acids Res.2009;37(16):e108.cDNA display:a novel screening method for functional disulfide-rich peptides by solid-phase synthesis and stabilization of mRNA-protein fusions.Yamaguchi,J.,Naimuddin,M.,Biyani,M.,Sasaki,T.,Machida,M.,Kubo,T.,Funatsu,T.,Husimi,Y.,Nemoto,N.);

[0212] 核糖体展示,其利用核糖体和翻译产物在mRNA翻译过程中处于相对稳定的复合物中的特性(Proc.Natl.Acad.Sci.USA.1994;91:9022-6.An in vitro polysome display system for identifying ligands from very large peptide libraries.Mattheakis,LC.,Bhatt,RR.,Dower,WJ.);

[0213] 共价展示,其利用噬菌体核酸内切酶P2A与DNA形成共价键的特性(Nucleic AcidsRes.2005;33:e10.Covalent antibody display-an in vitro antibody-DNA library selection system,Reiersen,H.,Lobersli,I.,Loset,GA.,Hvattum,E.,Simonsen,B.,Stacy,JE.,McGregor,D.,Fitzgerald,K.,Welschof,M.,Brekke,OH.,

Marvik,OJ.);和

[0214] CIS展示,其利用微生物质粒复制起始蛋白RepA与复制起点ori结合的特性(Proc.Natl.Acad.Sci.USA.2004;101:2806-10.CIS display:In vitro selection of peptides from libraries of protein-DNA complexes.Odegrip,R.,Coomber,D.,Eldridge,B.,Hederer,R.,Kuhlman,PA.,Ullman,C.,FitzGerald,K.,McGregor,D.)。同样,体外区室化是已知的,其中转录-翻译系统被封装到构成DNA文库的每个DNA分子的油包水乳液或脂质体中,并进行翻译反应(Nat.Biotechnol.1998;16:652-6.Man-made cell-like compartments for molecular evolution.Tawfik,S,Griffiths,D.)。可以使用已知方法适当地采用上述方法。

[0215] 核酸文库

[0216] 本公开中的“核酸”可以包括脱氧核糖核酸(DNA)、核糖核酸(RNA)或具有人工碱基的核苷酸衍生物。也可以包括肽核酸(PNA)。本公开的核酸可以是任何这些核酸或其杂合体,只要它们保留目的遗传信息即可。更具体地,本公开的核酸还包括DNA-RNA杂合核苷酸,以及其中不同的核酸(例如DNA和RNA)连接在一起形成单链的嵌合核酸。

[0217] 充当包括在肽化合物文库中的肽化合物的模板的核酸文库的实例包括mRNA文库和DNA文库。可以通过与肽序列上可变氨基酸残基位点的碱基混合物合成来获得核酸文库。例如,它可以合成为四种碱基(N)的混合物的三重重复序列-A、T、G和C用于DNA文库,A、U、G和C用于RNA文库-或者合成为其中每个密码子的第一个和第二个字母是N,第三个字母是诸如W、M、K或S等两个碱基的混合物的那些。此外,如果旨在减少待引入的氨基酸种类的数量到16或更少,那么第三个字母可以是一个碱基。或者,可以制备对应于三字母密码子的密码子单元,并以任意比例混合以用于合成,以自由调节氨基酸残基的出现频率。

[0218] 这些核酸文库可以通过使用无细胞翻译系统进行翻译。当使用无细胞翻译系统时,间隔子编码序列优选包含在目的核酸下游。间隔子序列包括但不限于含有甘氨酸或丝氨酸的序列。此外,优选在核酸文库和在核糖体翻译过程中掺入到肽中的化合物(例如嘌呤霉素或其衍生物)之间包含由RNA、DNA、六甘醇(spc18)聚合物(例如,5个聚合物)等形成的接头。

[0219] 本公开中文库的产生可以根据本公开中产生肽的方法进行,可以适当地与已知方法组合。在一个实施方案中,本公开中的肽文库可以使用本公开中的上述无细胞翻译系统产生。更具体地,本公开中的文库产生方法可以包括使用本公开中的无细胞翻译系统合成肽的步骤。在一个实施方案中,针对本公开中的无细胞翻译系统描述的实施例、优选范围和实施方案也可以照原样应用于本公开中的文库产生方法。

[0220] 筛选方法

[0221] 在非限制性实施方案中,可以通过使用本公开中的文库的筛选来选择可以特异性结合靶标分子的肽。

[0222] 在非限制性实施方案中,本公开中的筛选方法可以通过使包括本公开中的一种或多种非天然氨基酸的肽的文库与靶标分子接触并洗去未与靶标分子结合的肽来富集与靶标分子结合的肽(淘选)。在一个实施方案中,可以通过从包括在因此选择的肽中的mRNA标签(其含有它们的核苷酸序列信息)合成cDNA,然后通过PCR扩增cDNA,并对其核苷酸序列进行测序来鉴定结合肽的氨基酸序列。在一个实施方案中,可以通过转录上述扩增的cDNA获

得mRNA文库，并且这些可以用作模板再次产生肽文库。由于该文库富含可与靶标分子结合的肽，因此该文库可用于再次淘选以进一步浓缩可与靶标分子特异性结合的肽。通过多次重复这些步骤，可以进一步浓缩目标肽。在一个实施方案中，以这种方式浓缩的肽的氨基酸序列可以根据肽中所含的核苷酸序列信息确定，然后可以产生与靶标分子特异性结合的肽。在一个实施方案中，本公开中的筛选方法可以在体外进行。

[0223] 在非限制性实施方案中，通过本公开中的筛选方法获得的肽可以通过已知方法进行化学修饰等以优化肽。在本文中，“优化(optimization)”是指通过转化肽内每个氨基酸的结构以使化合物变成更像药物的肽、对药效靶标具有更强活性的肽和/或在更高程度上避免其毒性的肽。

[0224] 在非限制性实施方案中，本公开的筛选方法包括以下步骤：

[0225] (a)使包含在本公开文库中的肽与靶标分子接触；和

[0226] (b)选择可以与靶标分子结合的肽。

[0227] 本公开中的筛选方法可以在上述步骤(a)之前包括根据本文所述方法获得文库的步骤。所述文库可以根据本公开中肽的产生方法获得。

[0228] 在一个实施方案中，在本公开的筛选方法中，上述步骤(a)和(b)可以重复两次或多次以浓缩能够特异性结合靶标分子的肽。

[0229] 靶标分子

[0230] 本公开的筛选方法中使用的靶标分子没有特别限制，包括例如蛋白质、肽、核酸、糖类和脂质，但尤其优选使用蛋白质作为靶标。

[0231] 靶标分子在体内存在的位置也没有特别限制。在一个实施方案中，细胞内蛋白质也可以成为靶标。

[0232] 在非限制性实施方案中，在本公开的筛选方法中使用的靶标分子在被固定在载体上之后使用。载体没有特别限制，只要它们可以固定靶标分子即可，实例包括珠子和树脂。靶标分子可以通过已知方法固定在载体上。

[0233] 如上所述，本公开中文库的靶标分子和筛选方法没有特别限制，但实例包括GTPase KRas(KRAS)、双特异性丝裂原活化蛋白激酶激酶1(MEK1)、丝裂原活化蛋白激酶3(ERK1)和白细胞介素6受体(IL-6R)。如实施例中所述，本公开中的文库包括可以特异性结合多种靶标分子的肽。因此，在一个实施方案中，它们可以为“棘手的靶标”开发药物，而对于这些目标，药物发现被认为是困难的。

[0234] 在非限制性实施方案中，用于产生本公开的肽的方法可以包括以下步骤：

[0235] (i)使包含在本公开文库中的肽与靶标分子接触；

[0236] (ii)选择可以与靶标分子结合的肽；和

[0237] (iii)基于(ii)中选择的肽的氨基酸序列产生肽。

[0238] 上述方法可以包括通过本文描述的方法获得文库的步骤。

[0239] 在非限制性实施方案中，本公开的文库生产方法、肽产生方法和/或筛选方法可以在体外进行。

[0240] 一方面，本公开的肽可以是环化肽。

[0241] 编码改造的L31蛋白质的核酸等

[0242] 本发明还涉及本公开的改造的L31蛋白质、包含该蛋白的核糖体和编码该蛋白的

分离的核酸。本发明还涉及含有所述核酸的载体或细胞。

[0243] 本公开的改造的L31蛋白质的实例包括以下(1)至(6)：

[0244] (1)包含从SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的C末端开始具有6个或更多个氨基酸残基、8个或更多个氨基酸残基、或9个或更多个氨基酸残基缺失的氨基酸序列的蛋白质；

[0245] (2)包含在(1)的蛋白质的氨基酸序列中具有一个或更多个氨基酸插入、取代、缺失和/或添加的氨基酸序列的蛋白质；

[0246] (3)包含与(1)的蛋白质的氨基酸序列具有80％或更高序列同一性的氨基酸序列的蛋白质；

[0247] (4)包含选自SEQ ID NO:2和42至48中任一项所示的氨基酸序列的蛋白质；

[0248] (5)包含在选自SEQ ID NO:2和42至48中任一项所示的氨基酸序列中具有一个或更多个氨基酸缺失、插入、取代和/或添加的氨基酸序列的蛋白质，其中所述蛋白质是与包含SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的蛋白质功能等效的蛋白质；和

[0249] (6)包含与选自SEQ ID NO:2和42至48中任一项所示的氨基酸序列具有80％或更高序列同一性的氨基酸序列的蛋白质，其中所述蛋白质是与包含SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的蛋白质功能等效的蛋白质。

[0250] 本公开的改造的L31蛋白质、包含该蛋白的核糖体、编码蛋白质的分离的核酸等可以用于例如产生本公开的包含非天然氨基酸的肽和包含该肽的文库。

[0251] 在本公开中，“分离的”核酸是指已经从其自然环境的组分中分离出来的核酸分子。分离的核酸包括在通常含有该核酸分子的细胞中含有的核酸分子，但该核酸分子存在于染色体外或存在于与其天然染色体位置不同的染色体位置。如果核酸不存在于天然染色体上，则分离的核酸可以存在于细胞内的任何位置。本公开的“核酸”包括DNA(基因组DNA和cDNA)和RNA。

[0252] 如本文可互换使用的“多核苷酸”或“核酸”是指任何长度的核苷酸的聚合物，包括DNA和RNA。核苷酸可以是脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、修饰的核苷酸或碱基，和/或它们的类似物，或可以通过DNA或RNA聚合酶或通过合成反应掺入到聚合物中的任何底物。多核苷酸可以包含修饰的核苷酸，例如甲基化核苷酸及其类似物。核苷酸的序列可以被非核苷酸成分打断。多核苷酸可以包含在合成之后的修饰，例如与标记物的缀合。其他类型的修饰包括例如“帽”，用类似物取代一种或多种天然存在的核苷酸，核苷酸间修饰，例如具有不带电荷的连接的修饰(例如膦酸甲酯、磷酸三酯、氨基磷酸酯、氨基甲酸酯等)和带电荷的连接(例如，硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等)的那些，含有侧基部分的那些，例如蛋白质(例如，核酸酶、毒素、抗体、信号肽、聚-L-赖氨酸等)，具有嵌入剂(例如，吖啶、补骨脂素等)的那些，含有螯合剂(例如，金属、放射性金属、硼、氧化金属等)的那些，含有烷基化剂的那些，具有修饰连接(例如，α异头异构体核酸等)的那些，以及未修饰形式的多核苷酸。此外，通常存在于糖中的任何羟基可以被例如，膦酸酯基团、磷酸酯基团取代，被标准保护基团保护，或被活化以制备与额外核苷酸的额外连接，或者可以缀合至固体或半-固体支撑物上。5’和3’末端OH可以被磷酸化或被胺或1至20个碳原子的有机加帽基团部分取代。其他羟基也可衍生为标准保护基团。多核苷酸还可以含有本领域通常已知的核糖或脱氧核糖的类似形式，包括例如2’-O-甲基-、2’-O-烯丙基-、2’-氟代-或2’-叠氮基-核糖、碳环糖类似物、α-异头糖、差向异构糖如阿拉伯糖、木糖或来苏糖、吡喃糖、呋喃糖、景庚酮糖、无环类似物和碱性核苷

类似物如甲基核苷。一个或多个磷酸二酯连接可以被备选连接基团取代。这些备选连接基团包括但不限于这样的实施方案，其中磷酸盐被P(O)S(“硫代酸盐”)、P(S)S(“二硫代酸盐”)、(O)NR_2(“酰胺酸盐”)、P(O)R、P(O)OR′、CO或CH2(“甲缩醛”)代替，其中每个R或R′独立地为H或取代或未取代的烷基(1-20C)，任选含有醚(-O-)连接、芳基、烯基、环烷基、环烯基或芳烷基。并非多核苷酸中的所有连接都需要相同。前面的描述适用于本文提及的所有多核苷酸，包括RNA和DNA。

[0253] 用于制备编码本公开的改造的L31蛋白质的核酸的方法是例如定点诱变方法(Kramer,W.和Fritz,H.-J.(1987)Oligonucleotide-directed construction of mutagenesis via gapped duplex DNA.Methods in Enzymology,154:350-367)。或者，杂交技术(Southern,E.M.(1975)Journal of Molecular Biology,98,503)也可用于获得编码与选自SEQ ID NO:2和42至48中任一项所示的改造的L31蛋白质功能等效的蛋白质的核酸。更具体地，编码本公开的改造的L31蛋白质的核酸可以在严格条件下与编码选自SEQ ID NO:2和42至48中任一项所示的氨基酸序列的核酸杂交。严格的杂交条件可以由本领域技术人员适当选择。例如，在含有25％甲酰胺或在更严格条件下为50％甲酰胺、4xSSC、pH 7.0的50mM Hepes、10x Denhardt溶液和20μg/mL变性鲑精DNA的杂交溶液中，在42℃下进行预杂交过夜，然后通过添加标记的探针并在42℃下过夜温育混合物来进行杂交。用于进行后续洗涤的洗涤溶液和温度条件可以是例如大约“2xSSC,0.1％SDS,50℃”，“2x SSC,0.1％SDS,42℃”，和“1x SSC,0.1％SDS,37℃”；对于更严格的条件，大约“2x SSC,0.1％SDS,65℃”和“0.5x SSC,0.1％SDS,42℃”；并且对于甚至更严格的条件，大约“0.2x SSC,0.1％SDS,65℃”。随着杂交条件如上所述变得更加严格，可以预期分离出与编码选自SEQ ID NO:2和42至48中任一项所示氨基酸序列的核酸序列具有更高同源性的核酸。然而，上述SSC、SDS和温度条件的组合是示例性的，本领域技术人员可以通过适当组合将决定杂交严格性的上述或其他因素(例如、探针浓度、探针长度和杂交反应时间)实现与上相同的严格性。

[0254] 据信，因此分离的核酸在氨基酸水平上与选自SEQ ID NO:2和42至48中任一项所示的改造的L31蛋白质具有高度同源性。此外，在核苷酸序列水平上，认为与编码选自SEQ ID NO:2和42至48中任一项所示的氨基酸序列的核酸的核苷酸序列具有高度同源性。如上所述，高度同源性是指在整个氨基酸序列或整个核苷酸序列中至少50％或更多，更优选70％或更多，甚至更优选80％或更多，还更优选85％或更多，仍然甚至更优选90％或更多(例如，91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更多)的序列同一性。

[0255] 本发明的核酸可用于例如制备改造的L31蛋白质或包含它们的核糖体。在制备改造重组L31蛋白质或包含它的核糖体时，通常将编码改造的L31蛋白质的核酸插入合适的表达载体，并将该载体引入合适的细胞，培养转化的细胞，并分离、纯化和培养表达的改造的L31蛋白质或包含它的核糖体。为了便于纯化的目的，改造的L31蛋白质也可以与其他蛋白质表达为融合蛋白。例如，使用大肠杆菌作为宿主将其制备为与麦芽糖结合蛋白的融合蛋白的方法(可从New England BioLabs,USA商购的载体pMAL系列)、将其制备为与谷胱甘肽-S-转移酶(GST)的融合蛋白的方法(可从Amersham Pharmacia Biotech商购的载体pGEX系列)、利用添加到其中的组氨酸标签制备它的方法(来自Novagen的pET系列)等均可使用。

[0256] 在非限制性实施方案中，载体可以是已经通过同源重组敲入本发明的核酸的敲入载体。即，本发明的改造的L31蛋白质或包含它的核糖体也可以通过同源重组将本发明的核

酸敲入到载体中来制备。可以构建这样的载体，使得用于制备改造的L31蛋白质或包含它的核糖体的本发明的核酸插入到与宿主例如大肠杆菌中的靶基因相同的阅读框中。在一个实施方案中，在敲入载体中，优选将本发明的核酸插入含有靶基因的翻译起始位点的外显子中，使得核酸的翻译起始位点与靶基因的翻译起始位点一致。在这种情况下，在敲入载体中，靶基因的翻译起始位点上游的核苷酸序列优选位于外源基因的翻译起始位点的5'侧。在另一个实施方案中，当外显子-内含子结构序列已经被添加到敲入载体中的外源基因的5'侧时，优选将本发明的核酸插入到含有靶标基因的翻译起始位点的外显子中，使得外显子-内含子结构的5'末端与靶标基因的翻译起始位点一致。在这种情况下，在敲入载体中，靶基因的翻译起始位点上游的核苷酸序列优选位于外显子-内含子结构的5'末端的5'上游。

[0257] 此外，敲入载体优选具有在宿主细胞中复制的能力。敲入载体并不特别受限，只要它们是遗传改造中使用的载体即可，并且已知载体的实例包括质粒载体、粘粒载体、细菌人工染色体(BAC)载体、酵母人工染色体(YAC)载体、逆转录病毒载体、慢病毒载体和其他病毒载体。

[0258] 宿主细胞并不特别受限，只要其是适合表达重组蛋白质的细胞，并且除了上述大肠杆菌以外，还可以使用例如酵母、多种动物和植物细胞、昆虫细胞等。本领域技术人员已知的多种方法可用于将载体引入宿主细胞。例如，为了引入到大肠杆菌中，使用钙离子的引入方法(Mandel，M.，Higa，A.(1970)Journal of Molecular Biology，53，158-162；和Hanahan，D.(1983)Journal of Molecular Biology，166，557-580)是可以使用的。在宿主细胞中表达的改造的L31蛋白质可以通过本领域技术人员已知的方法从宿主细胞或其细胞培养物或培养上清液中纯化和回收。当改造的L31蛋白质与上述麦芽糖结合蛋白等作为融合蛋白表达时，可以容易地进行亲和纯化。

[0259] 在本公开的一个实施方案中，本发明的核酸可以是已经插入到载体中的核酸。例如，当使用大肠杆菌作为宿主细胞时，载体包括但不限于这样的载体，其具有用于在大肠杆菌(例如，JM109、DH5α、HB101或XL1Blue)中扩增的“ori”以实现在大肠杆菌等中扩增和制备大量载体，并且还具有用于选择转化的大肠杆菌的基因(例如，允许使用药物进行鉴别的耐药基因(氨苄青霉素、四环素、卡那霉素、氯霉素等))。这种载体的实例包括M13载体、pUC载体、pBR322、pBluescript和pCR-Script。当将载体用于cDNA的亚克隆和切除时，这样的载体的实例，除了上述载体以外，还包括例如pGEM-T、pDIRECT、pT7等。当使用载体产生改造的L31蛋白质时，表达载体特别有用。当用于在大肠杆菌中表达时，表达载体必须具有上述特性以允许在大肠杆菌中进行载体扩增，并且当宿主大肠杆菌为JM109、DH5α、HB101、XL1-Blue等时，还携带允许在大肠杆菌中有效表达的启动子，例如lacZ启动子(Ward等人，Nature(1989)341:544-546;FASEB J.(1992)6:2422-2427)，araB启动子(Better等人，Science(1988)240，1041-1043)，或T7启动子。这样的载体除上述载体外，还包括pGEX-5X-1(Pharmacia公司制造)、“QIAexpress system”(Qiagen公司制造)、pEGFP、pET等。

[0260] 载体还可以含有多肽分泌的信号序列。作为多肽分泌的信号序列，当多肽被生产到大肠杆菌周质中时，可以使用pelB信号序列(Lei，S.P.等人J.Bacteriol.(1987)169：4379)。例如，可以通过氯化钙法或电穿孔法将载体引入宿主细胞。此外，用于在植物中表达的载体的实例包括pMH1、pMH2和pCAMBIA。

[0261] 除了用于大肠杆菌的载体，用于产生改造的L31蛋白质的载体的实例包括哺乳动物表达载体(例如pcDNA3(Invitrogen制造)、pEGF-BOS(NucleicAcids.Res.1990,18(17),p5322)、pEF和pCDM8)、昆虫细胞来源的表达载体(例如，“Bac-to-BAC杆状病毒表达系统”(Gibco-BRL制造)和pBacPAK8)、植物来源的表达载体(例如，pMH1和pMH2)、动物病毒来源的表达载体(例如，pHSV、pMV和pAdexLcw)、逆转录病毒表达载体(例如，pZIPneo)、酵母来源的表达载体(例如，“Pichia Expression Kit”(Invitrogen制造)、pNV11和SP-Q01)，以及枯草芽孢杆菌来源的表达载体(例如pPL608和pKTH50)。

[0262] 当用于在动物细胞如CHO、COS和NIH3T3细胞中表达时，载体必须具有在细胞中表达所必需的启动子，如SV40启动子(Mulligan等人，Nature(1979)277:108)、MMLV-LTR启动子、EF1α启动子(Mizushima等人，Nucleic Acids Res.(1990)18:5322)和CMV启动子，并且更优选它具有用于选择转化细胞的基因(例如，允许使用药物(新霉素、G418等)鉴别的药物抗性基因)。具有这种特征的载体的实例包括pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV和pOP13。

[0263] 本发明的转化细胞可以用作例如产生或表达改造的L31蛋白质或包含它的核糖体的生成系统。用于蛋白质产生的生成系统包括体外和体内系统。

[0264] 当使用真核细胞时，例如，动物细胞、植物细胞或真菌细胞可以用作宿主细胞。已知的动物细胞包括哺乳动物细胞(例如，除了上述CHO细胞、COS细胞和NIH3T3细胞之外，细胞如3T3、骨髓瘤细胞、小仓鼠肾(BHK)、HeLa和Vero)、两栖动物细胞(例如，非洲爪蟾(Xenopus laevis)卵母细胞(Valle，等人，Nature(1981)291,358-340))，和昆虫细胞(例如，sf9、sf21和Tn5细胞)。对于CHO细胞，特别是DHFR基因缺陷的dhfr-CHO(Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1980)77,4216-4220)和CHO K-1(Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1968)60,1275)可以优选使用。当旨在大规模表达时，特别优选CHO细胞。

[0265] 对于植物细胞，除了下述植物来源的细胞以外，例如已知烟草(Nicotiana tabacum)来源的细胞作为蛋白质生成系统，并且这可以进行愈伤组织培养。

[0266] 同时，已知的真菌细胞包括但不限于酵母细胞，例如酵母属的细胞，例如酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)，和丝状真菌的细胞，例如曲霉属，例如黑曲霉(Aspergillus niger)。

[0267] 在本公开中，改造的L31蛋白质或包含它的核糖体也可以通过从野生型大肠杆菌培养物中纯化获得。更具体地，通过将培养的野生型大肠杆菌细胞悬浮在含有低浓度镁离子的缓冲液中，然后将细胞破碎，可以获得含有改造的L31蛋白质的裂解物。具体而言，通过在含有例如，5mM或更低(更具体地，例如，4mM或更低、3mM或更低、2mM或更低、1mM或更低，或0mM)镁离子的缓冲液中破碎野生型大肠杆菌细胞，可以获得含有本文所述的SEQ ID NO:1的野生型大肠杆菌L31蛋白质和本公开的改造的L31蛋白质的裂解物。大肠杆菌细胞的破碎可以使用本领域技术人员已知的方法进行，例如通过弗氏压碎器、超声处理、均质器、玻璃珠或研钵破碎，但在本公开中优选通过弗氏压碎器破碎。以这种方式制备的裂解物可以通过本领域技术人员已知的方法进行纯化，以分离并获得改造的L31蛋白质或包含它的核糖体。

[0268] 本发明的另一方面提供包含核糖体的组合物，所述核糖体包含本公开的改造的L31蛋白质。本公开的组合物可以用作例如用于产生包含非天然氨基酸的肽等的翻译系统，

或这种系统的一部分。因此，本公开的组合物优选包含含有本公开的改造的L31蛋白质的核糖体，以及例如通过将非天然氨基酸与tRNA附接形成的氨酰-tRNA和编码包含一种或多种类型非天然氨基酸的肽的mRNA等。本公开的组合物包含含有本发明的改造的L31蛋白质的核糖体；相对于组合物中包含的所有核糖体，以分子数量计，其百分比优选至少为50％或更高，优选为60％或更高，更优选为70％或更高，甚至更优选为80％或更高，或特别优选为90％或更高(例如91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、或99％，或更多)。

[0269] 本文引用的所有现有技术文献均通过引用并入本说明书中。

实施例

[0270] 在下文中，将参考实施例更详细地描述本发明，但本发明的内容不必限于以下实施例。实施例中使用了以下缩写。

[0271] AA:醋酸铵

[0272] CH_2CN:氰基甲基

[0273] CH_3CN:乙腈

[0274] CTACl:N,N,N-三甲基十六烷-1-氯化铵

[0275] DBU:1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一碳烯

[0276] DCM:二氯甲烷

[0277] DIPEA:N,N-二异丙基乙胺

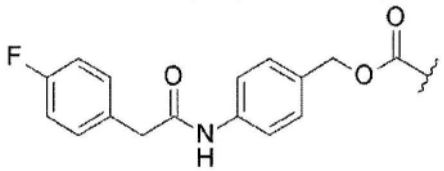
[0278] DMF:二甲基甲酰胺

[0279] DMSO:二甲基亚砜

[0280] FA:甲酸

[0281] Fmoc:9-芴基甲氧基羰基

[0282] F-Pnaz:4-(2-(4-氟苯基)乙酰胺)苄氧基羰基：

[0283] 

[0284] MeCN:乙腈

[0285] NMP:N-甲基-2-吡咯烷酮

[0286] TEA:三乙胺

[0287] TFA:三氟乙酸

[0288] THF:四氢呋喃

[0289] TM:靶标分子

[0290] 可以使用以下缩写:MePhe为MeF,Pic(2)为Pic2,Gly为G,Ile为I,Pro为P,Thr为T,MeSer(tBuOH)为MeStBuOH,D-Ala为dA,Leu为L,BODIPYFL-4-AMF为Bdp4AMF,Acbz-D-MeCys(StBu)为AcbzdMeCStBu,Acbz-MeCys(StBu)为AcbzMeCStBu,Acbz-Cys(StBu)为AcbzCStBu。

[0291] 实施例1.大肠杆菌菌株的构建

[0292] 构建了缺乏ompT(蛋白酶7)的菌株(定义为L31intact菌株)和表达L31蛋白质的N-末端的第1至第62个氨基酸的L31short菌株。在核糖体纯化过程中，已知蛋白酶7在L31蛋白

质的第62和第63个氨基酸之间降解。

[0293] 根据Quick and Easy Conditional Knockout Kit(loxP/Cre)(Gene Bridges)的程序构建大肠杆菌菌株。

[0294] 制备具有添加同源臂的功能盒

[0295] 使用功能盒loxP-PGK-gb2-neo-loxP(Gene Bridges,A003)作为模板,使用Prime STAR HS DNA聚合酶(Takara Bio Inc.,R010A)进行PCR反应。使用QIAquick PCR Purification Kit(QIAGEN,28104)纯化获得的PCR产物。功能盒的浓度约为200ng/μL。使用Oligo1(SEQ ID NO:3)和Oligo2(SEQ ID NO:4)作为引物对用于制备ompT(蛋白酶7)缺陷菌株的功能盒Cassette-1进行PCR。使用Oligo3(SEQ ID NO:5)和Oligo4(SEQ ID NO:6)的引物组对用于制备L31short菌株的功能盒Casette-2进行PCR。

[0296] 大肠杆菌菌株的制备

[0297] 根据Quick and Easy Conditional Knockout Kit(loxP/Cre)(Gene Bridges)中描述的方案制备大肠杆菌菌株。用pRed/ET转化大肠杆菌W3110菌株(大肠杆菌K-12W3110),以制备表达Red/ET的感受态细胞。将功能盒Casette-1或Casette-2电穿孔到制备的感受态细胞中以诱导同源重组。使用得到的菌落进行菌落PCR,从扩增的DNA的长度确认卡那霉素盒的引入和目的基因的缺失或部分缺失。按照试剂盒中描述的方案,从获得的目标大肠杆菌菌株中删除夹在Loxp序列之间的卡那霉素抗性基因盒。从获得的大肠杆菌中制备单菌落,并通过对重组位点的基因组DNA进行测序来确认靶标菌株的产生。

[0298] 实施例2.制备核糖体的方法

[0299] 大肠杆菌的培养

[0300] 培养W3110菌株(WT)。

[0301] 将W3110菌株的细菌细胞接种到预培养基(甘油5g/L、酵母提取物6g/L、KH_2PO_4 4g/L、K_2HPO_4 9.3g/L)中并进行预培养。将预培养的细菌细胞加入30L主培养基(甘油10g/L、酵母提取物10g/L、聚蛋白胨N15g/L、KH_2PO_4 4g/L、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2.4g/L、$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.04g/L、$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.04g/L、癸醇LG-1090.24g/L)中,使OD_{600}为0.1。在50-L培养容器中进行培养。细胞在37℃培养5.4小时,当OD_{600}达到33.5时回收。将培养液等分到500mL中,在室温下放置1小时,在4℃再放置1小时。此后,将混合物以6000x g离心10分钟,将沉淀物悬浮在D-PBS(-)(Takara Bio Inc.,T9181)中,然后再次以6000x g离心10分钟。使用液氮冷冻回收的细菌细胞并储存在-80℃。

[0302] L31short菌株或L31intact菌株的培养

[0303] LB培养基,Miller(Nacalai Tesque,20068-75)用于培养。对细菌细胞进行预培养。将预培养的细菌细胞添加到主培养基中,使得OD_{600}为0.05。通过将1L LB培养基添加到3L带挡板烧瓶(Corning,431253)中进行培养。使用Climo-shaker ISF-1-X,细胞在37℃和100rpm下培养约2小时40分钟。在确认OD_{600}达到约1.0后,将烧瓶从培养箱中取出并在室温下静置1小时。随后,将烧瓶在4℃静置一小时。通过以5000xg离心10分钟收集细菌细胞。使用相当于培养基体积的PBS(Takara Bio Inc.,T9181)悬浮细菌细胞,然后再次以5000xg离心10分钟。使用液氮冷冻细菌细胞并储存在-80℃。

[0304] 破碎大肠杆菌

[0305] 使用FP破碎L31intact菌株和L31short菌株

[0306] 将回收的细菌细胞悬浮在每10D细胞0.004mL的裂解缓冲液(10mM HEPES-KOH,pH 7.6,5mM至10mM $MgCl_2$,50mM KCl,1mM DTT,10μg/mL DNaseI)中。使用弗氏压碎器(Emulsi Flex B15,AVESTIN)破碎细胞。压力设置为40Bar。破碎速度控制在大约1mL/min。在4℃下以20000x g离心30分钟,收集上清液。

[0307] 使用FP破碎WT菌株

[0308] 制备了具有以下组成的三种类型的裂解缓冲液:

[0309] Mg10裂解缓冲液(10mM HEPES-KOH,pH 7.6,50mM KCl,10mM $MgCl_2$,1mM DTT,10μg/mL DNaseI);

[0310] Mg5裂解缓冲液(10mM HEPES-KOH,pH 7.6,50mM KCl,5mM $MgCl_2$,1mM DTT,10μg/mL DNaseI);和

[0311] Mg0裂解缓冲液(10mM HEPES-KOH,pH 7.6,50mM KCl,1mM DTT,10μg/mL DNaseI)。

[0312] 使用每种裂解缓冲液,将细菌细胞悬浮在每10D回收的细菌细胞0.004mL的裂解缓冲液中。使用弗氏压碎器(Emulsi Flex B15,AVESTIN)破碎细胞。压力设置为40Bar。破碎速度控制在大约1mL/min。在4℃下以20000x g离心30分钟,收集上清液。

[0313] 大肠杆菌的纯化

[0314] L31short菌株或L31intact菌株的硫酸铵沉淀

[0315] 向破碎的大肠杆菌溶液的上清液中加入用于硫酸铵沉淀的2x缓冲液(10mM HEPES-KOH,pH 7.6,5mM至10mM $MgCl_2$,50mM KCl,3.24M硫酸铵,1mM DTT),并将混合物在4℃下搅拌30分钟。将其在4℃下以20000x g离心40分钟,并收集上清液。通过0.22μm(Millipore)过滤器过滤上清液。

[0316] WT菌株的硫酸铵沉淀

[0317] 在用搅拌器搅拌的同时,向1mL破碎的大肠杆菌溶液的上清液中加入0.222g在研钵中细碎的硫酸铵。将混合物在4℃搅拌30分钟。将其在4℃下以20380xg离心40分钟,并收集上清液。通过0.22μm(Millipore)过滤器过滤上清液。

[0318] 丁基琼脂糖纯化

[0319] 使用装有丁基琼脂糖4FastFlow(GE Healthcare,17098002)的XK50柱(GE Healthcare,28988952)。用缓冲液A(20mM HEPES-KOH,pH 7.6,10mM $Mg(OAc)_2$,1.5M$(NH4)_2SO_4$,1mM DTT)代替柱中的溶剂。将经过硫酸铵沉淀的样品以2mL/min的速度添加到柱中。用缓冲液A洗涤柱子,并用30%缓冲液A和70%缓冲液B(20mM HEPES-KOH,pH 7.6,10mM $Mg(OAc)_2$,1mM DTT)进一步洗涤。随后,用50%缓冲液A和50%缓冲液B对柱子进行洗脱。

[0320] 超速离心纯化

[0321] 将30%蔗糖缓冲液(20mM HEPES-KOH,pH 7.6,10mM $Mg(OAc)_2$,30mM NH_4Cl,30%蔗糖,1mM DTT)加入超速离心管的一半体积,向其中加入已经通过丁基琼脂糖纯化的洗脱液以不破损界面。在4℃下以99700x g进行离心20小时。将沉淀悬浮在储存缓冲液(20mM HEPES-KOH,pH 7.6,6mM $Mg(OAc)_2$,30mM KCl,1mM DTT)中。

[0322] 最终浓度调整为20μM至30μM。

[0323] 最后,制备了五种核糖体:L31short核糖体、L31intact核糖体、WT-10MG核糖体(使用Mg10裂解缓冲液)、WT-5MG核糖体(使用Mg5裂解缓冲液)和WT-0MG核糖体(使用Mg0裂解缓冲液)。

[0324] 实施例3.L31降解百分比的分析

[0325] 分析了WT-10MG核糖体、WT-5MG核糖体和WT-0MG核糖体中L31的降解百分比。

[0326] 样品制备方法

[0327] 用38μL水稀释核糖体(40pmol)。加入1%的三氟乙酸以沉淀核糖体RNA。进行离心并将上清液与基质(50%乙腈、5mg/mL芥子酸)以1:1的比例混合,并通过在板上点样1μL来结晶用于MALDI/MS。

[0328] 通过MALDI/MS的分析

[0329] 使用线性正模式在质谱仪(ABS CIEX·TOF/TOF 5800)上进行测量。使用核糖体蛋白作为内标进行校准。使用正确校准的测量结果。通过将完整L31的MS强度除以完整L31的MS强度和短L31(short L31)的MS强度之和来计算完整L31的百分比。在N=3时进行测量,取平均值作为完整L31的百分比。

[0330] L31降解速率的分析结果

[0331] 在WT-10MG核糖体中,71%是完整L31。同样,在WT-5MG核糖体中,20%是完整L31,并且在WT-0MG核糖体中,7%是完整L31。

[0332] 实施例4.用于无细胞翻译系统的pCpA-氨基酸(也称为氨酰基-pCpA)的合成

[0333] LCMS的分析条件如下。

[0334] [表1]

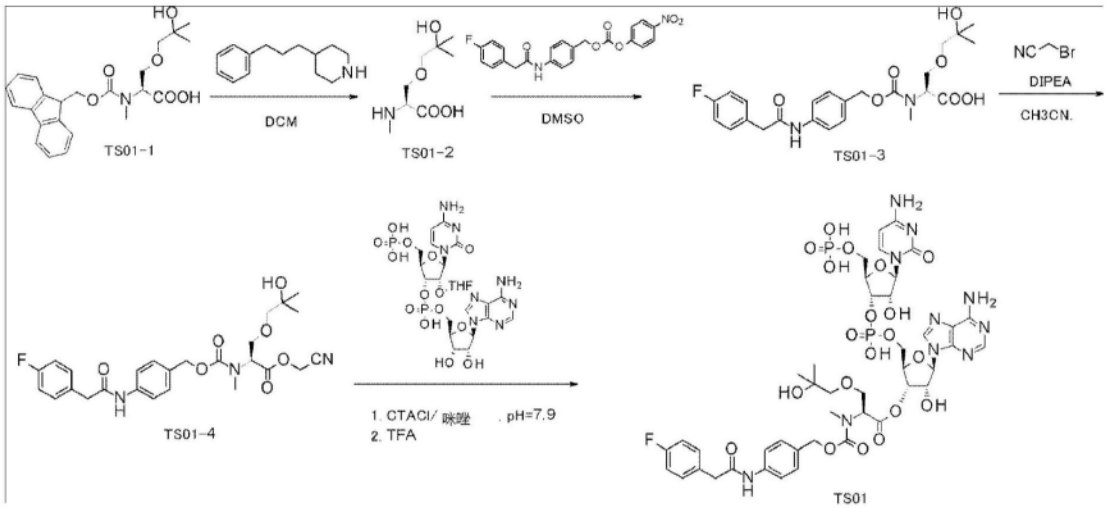
[0335]

制备性条件	仪器	柱(I.D. x长度) (mm)	流动相	梯度 (A/B)	流速 (mL/min)	柱温 (°C)	波长
SQD FA05	Acquity UPLC/SQD	Aldrich Ascentis Express C18 (2.1 x 50)	A) 0.1% FA, H2O B) 0.1% FA CH3CN	95/5 => 0/100 (1.0 min) => 0/100(0.4 min)	1.0	35	210-400nm PDA 总计

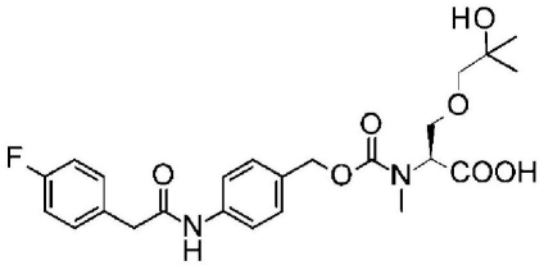
[0336] Pnaz-MeSer(tBuOH)-pCpA(TS01)的合成

[0337] 根据以下方案合成化合物TS01。

[0338]



[0339] N-(((4-(2-(4-氟苯基)乙酰胺)苄基)氧基)羰基)-O-(2-羟基-2-甲基丙基)-N-甲基-L-丝氨酸(TS01-3)的合成

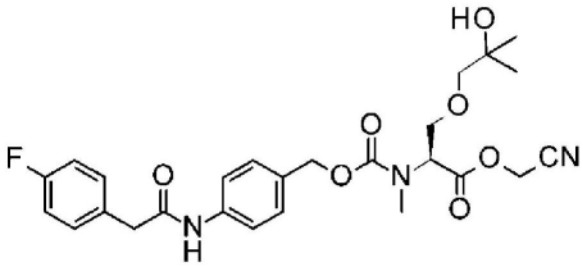
[0340] 

[0341] 将根据WO 2018225864合成的(2S)-2-限9H-芴基-9-基甲氧基)羰基](甲基)氨基]-3-(2-羟基-2-甲基丙氧基)丙酸(TS01-1,41.0mg,0.10mmol)溶解在DCM(0.10mL)中,向其中加入4-(3-苯丙基)哌啶(32.0μL,0.15mmol),并将其在室温下搅拌15小时。通过减压浓缩除去DCM,以得到(2S)-3-(2-羟基-2-甲基-丙氧基)-2-(甲基氨基)丙酸(TS01-2)粗产物。得到的(2S)-3-(2-羟基-2-甲基-丙氧基)-2-(甲基氨基)丙酸(TS01-2,粗产物)和根据WO 2018225864合成的(4-硝基苯基)-4-(2-(4-氟苯基)乙酰胺碳酸苄酯(110.0mg,0.26mmol)溶解在DMSO(0.50mL)中,加入三乙胺(41.8μL,0.30mmol),然后将其在50℃搅拌1小时。将反应溶液通过反相柱色谱法(H_2O中的0.1%FA/CH_3CN中的0.1%FA/)纯化,以得到标题化合物(TS01-3,40mg,84%)。

[0342] LCMS(ESI)m/z=475.4(M-H)-

[0343] 保留时间:0.64min(分析条件SQDFA05)

[0344] 氰基甲基N-(((4-(2-(4-氟苯基)乙酰胺)苄基)氧基)羰基)-O-(2-羟基-2-甲基丙基)-N-甲基-L-丝氨酸酯(serinate)(TS01-4)的合成)

[0345] 

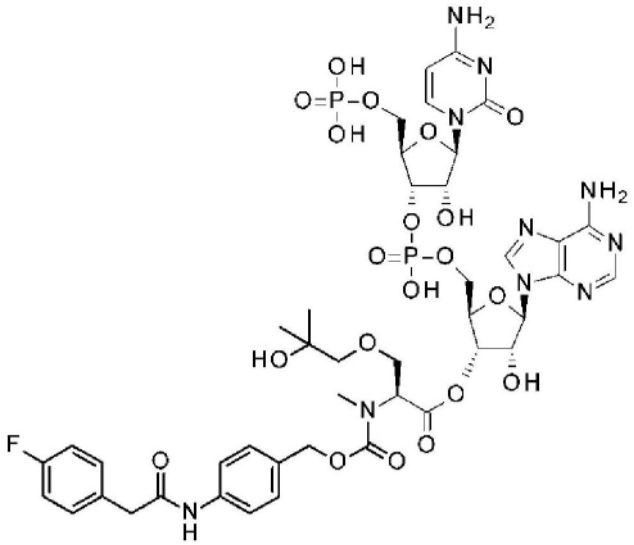
[0346] 将N-(((4-(2-(4-氟苯基)乙酰胺)苄基)氧基)羰基)-O-(2-羟基-2-甲基丙基)-N-甲基-L-丝氨酸(TS01-3,19.0mg,0.04mmol)溶解在CH_3CN(0.20mL)中,然后向其中加入DIPEA(10.48μL,0.06mmol)和2-溴乙腈(3.22μL,0.048mmol),并将其在室温下搅拌12小时。在减压下浓缩反应溶液,以得到标题化合物(TS01-4)作为粗产物。

[0347] LCMS(ESI)514(MH)-

[0348] 保留时间:0.73min(分析条件SQDFA05)

[0349] (2R,3S,4R,5R)-2-(((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧嘧啶-1(2H)-基)-4-羟基-2-((膦酰基氧基)甲基)四氢呋喃-3-基)氧基)(羟基)磷酰基)氧基)甲基)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-4-羟基四氢呋喃-3-基N-(((4-(2-(4-氟苯基)乙酰胺)苄基)氧基)羰基)-O-(2-羟基-2-甲基丙基)-N-甲基-L-丝氨酸酯(serinate)(TS01)的合成

[0350]



[0351] 将通过文献(Helv.Chim.Acta,90,297-310)中描述的方法合成的((2R,3R,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧嘧啶-1(2H)-基)-3-(((((2R,3S,4R,5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(羟基)磷酰基)氧基)-4-((四氢呋喃-2-基)氧基)四氢呋喃-2-基)磷酸二氢甲酯(28.9mg,0.04mmol)溶于缓冲液A(10mL)中,向其中逐滴加入在乙腈中的氰基甲基N-(((4-(2-(4-氟苯基)乙酰胺)苄基)氧基)羰基)-O-(2-羟基-2-甲基丙基)-N-甲基-L-丝氨酸酯(serinate)(TS01-4,粗产物)(0.021mg,0.04mmol,0.50mL)的溶液,并将其在室温下搅拌60分钟。将反应溶液冷却至0℃,然后加入三氟乙酸(0.50mL)。将反应溶液在0℃搅拌60分钟,然后通过反相硅胶柱色谱(0.05%三氟乙酸水溶液/0.05%三氟乙酸-乙腈)纯化,以得到标题化合物(TS01,8.0mg,18.0%)。

[0352] LCMS(ESI)m/z=1109.7(M-H)-

[0353] 保留时间:0.50min(分析条件SQDFA05)

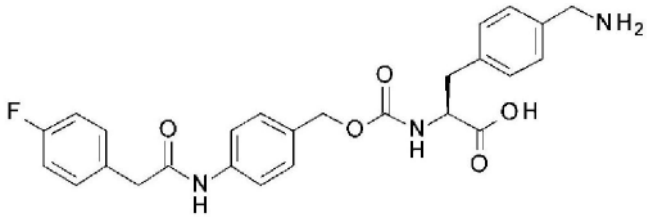
[0354] 如下制备缓冲液A。

[0355] 将乙酸加入到N,N,N-三甲基十六烷-1-氯化铵(6.40g,20mmol)和咪唑(6.81g,100mmol)的水溶液中,以得到缓冲液A(1L),其为20mM N,N,N-三甲基十六烷-1-铵和100mM咪唑,pH 7.9。

[0356] BdpFL-(4-AMF)-pCpA(MT01)的合成

[0357] (2S)-3-[4-(氨基甲基)苯基]-2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基氨基]丙酸(化合物MT02)的合成

[0358]



[0359] 在氮气气氛下,室温下,将4N HCl在1,4-二噁烷中的溶液添加到(2S)-3-[4-(氨基甲基)苯基]-2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基氨基]丙酸(500mg,0.968mmol)在二氯甲烷(4.5mL)中的悬浮液中。在室温下搅拌混合物1小时后,在减压下蒸馏除去溶剂。在室温下将DIPEA(413mg,3.19mmol)添加到获得的残余物和在DMSO(5mL)中的

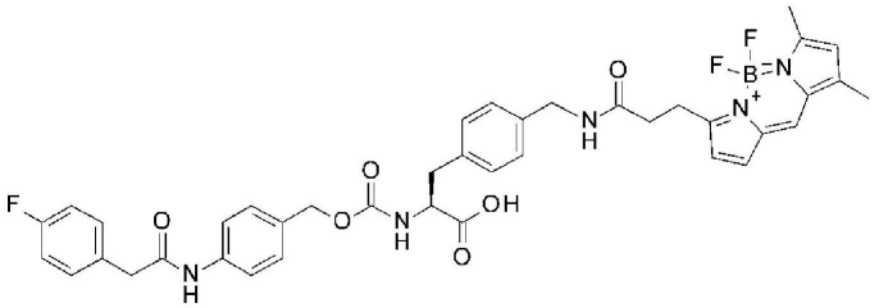
[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲基(4-硝基苯基)碳酸酯(411mg,0.968mmol)的悬浮液中。在室温下搅拌混合物2小时后,在室温下向其中加入哌啶(400mg,4.7mmol),并将其搅拌15分钟。将反应溶液通过反相柱色谱法(0.1%CH_3CN/H_2O)纯化,以得到(2S)-3-[4-(氨基甲基)苯基]-2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基氨基]丙酸(化合物MT02)(83.3mg,18%产率,3步)。

[0360] LCMS(ESI)m/z=480.3(M+H)+

[0361] 保留时间:0.46min(分析条件SQDFA05)

[0362] (S)-3-(4-((3-(5,5-二氟-7,9-二甲基-5H-4λ^4,5λ^4-二吡咯并[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-3-基)丙酰胺)甲基)苯基)-2-((((4-(2-(4-氟苯基)乙酰胺)苄基)氧基)羰基)氨基)丙酸(化合物MT03)的合成

[0363]



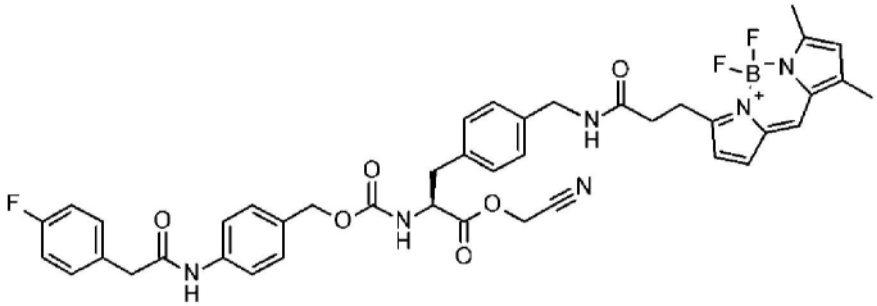
[0364] 在氮气气氛下,在室温下,将3-(3-((2,5-二氧吡咯烷-1-基)氧基)-3-氧丙基)-5,5-二氟-7,9-二甲基-5H-5λ^4-二吡咯并[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborini-4-ium在NMP(500mL)中的溶液加入(2S)-3-[4-(氨基甲基)苯基]-2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基氨基]丙酸(化合物MT02)(11.8mg,0.030mmol)在NMP(500mL)中的溶液中。将混合物在40℃搅拌10分钟后,将反应溶液通过反相柱色谱(0.1%$FACH_3CN/H_2O$)纯化,以得到(S)-3-(4-((3-(5,5-二氟-7,9-二甲基-5H-4λ^4,5λ^4-二吡咯并[1,2-c:2′,1′-f][1,3,2]diazaborinin-3-基)丙酰胺)甲基)苯基)-2-((((4-(2-(4-氟苯基)乙酰胺)苄基)氧基)羰基)氨基)丙酸(化合物MT03)(14.6mg,64%产率)。

[0365] LCMS(ESI)m/z=752.2(M-H)-

[0366] 保留时间:0.79min(分析条件SQDFA05)

[0367] (S)-3-(4-((3-(5,5-二氟-7,9-二甲基-5H-4λ^4,5λ^4-二吡咯并[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-3-基)丙酰胺)甲基)苯基)-2-((((4-(2-(4-氟苯基)乙酰胺)苄基)氧基)羰基)氨基)丙酸氰甲基酯(化合物MT04)的合成

[0368]



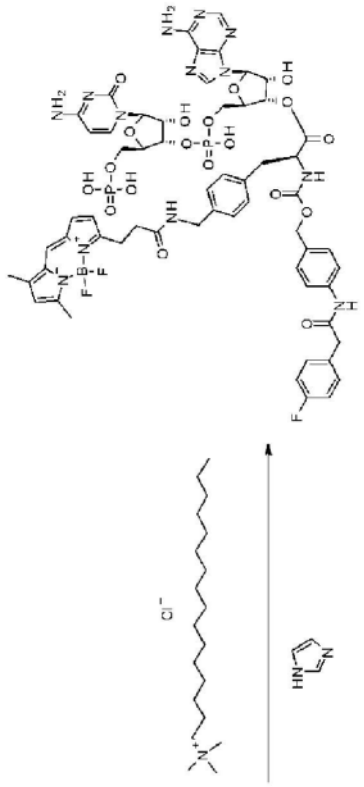
[0369] 在氮气气氛下,将(S)-3-(4-((3-(5,5-二氟-7,9-二甲基-5H-4λ^4,5λ^4-二吡咯并[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-3-基)丙酰胺)甲基)苯基)-2-((((4-(2-(4-氟苯

基)乙酰胺)苄基)氧基)羰基)氨基)丙酸(50mg,0.066mmol)和N-乙基-异丙基丙-2-胺(DIPEA)(23.2μL,0.133mmol)溶解在乙腈(200μL)中,在0℃向其中加入2-溴乙腈(9.0μL,0.133mmol),并将其在40℃搅拌3.5小时。将反应溶液浓缩以得到(S)-3-(4-((3-(5,5-二氟-7,9-二甲基-5H-4λ^4,5λ^4-二吡咯并[1,2-c:2′,1′-f][1,3,2]diazaborinin-3-基)丙酰胺)甲基)苯基)-2-((((4-(2-(4-氟苯基)乙酰胺)苄基)氧基)羰基)氨基)丙酸氰甲基酯(化合物MT04)作为粗产物。所得粗产物直接用于下一步骤。

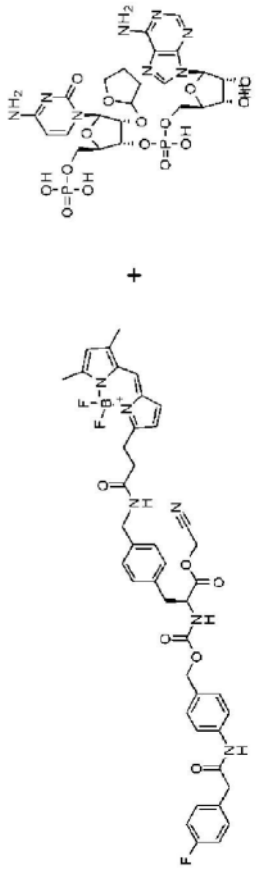
[0370] LCMS(ESI)791.4(MH)-

[0371] 保留时间:0.90min(分析条件SQDFA05)

[0372] [(2R,3S,4R,5R)-2-((((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧嘧啶-1(2H)-基)-4)-羟基-2-((膦酰基氧基)甲基)四氢呋喃-3-基)氧基)(羟基)磷酰基)氧基)甲基)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基-4-羟基四氢呋喃-3-基](2S)-3-(4-((3-(5,5-二氟-7,9-二甲基-5H-4λ^4,5λ^4-二吡咯并[1,2-c:2′,1′-f][1,3,2]diazaborinin-3-基)丙酰胺)甲基)苯基)-2-((((4-(2-(4-氟苯基)乙酰胺)苄基)氧基)羰基)氨基)丙酸酯(化合物MT01,BdpFL-(4-AMF)-pCpA)的合成



[0373]



[0374] 将((2R,3R,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧嘧啶-1(2H)-基)-3-(((((2R,3S,4R,5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(羟基)磷酰基)氧基)-4-((四氢呋喃-2-基)氧基)四氢呋喃-2-基)磷酸二氢甲酯(47.7mg,0.066mmol)溶解在缓冲液

A(55mL)并向其中分三份加入(S)-3-(4-((3-(5,5-二氟-7,9-二甲基-5H)-4λ^4,5λ^4-二吡咯并[1,2-c:2′,1′-f][1,3,2]diazaborinin-3-基)丙酰胺)甲基)苯基)-2-((((4-(2-(4-氟苯基)乙酰胺)苄基)氧基)羰基)氨基)丙酸氰基甲酯(化合物MT03)(52.3mg,0.066mmol)在乙腈(5mL)中的溶液,然后将混合物在室温下搅拌90分钟。在0℃向反应溶液中加入TFA(3mL),将其搅拌5分钟,然后在室温搅拌40分钟。通过反相硅胶柱色谱法(0.05%TFA CH_3CN/H_2O)纯化反应溶液,以得到标题化合物(化合物MT01,BdpFL-(4-AMF)-pCpA)(8.3mg,9.1%产率)。

[0375] LCMS(ESI)m/z=1386.7(M-H)-

[0376] 保留时间:0.65min(分析条件SQDFA05)

[0377] 实施例5.氨酰-tRNA的合成

[0378] tRNAGlu(-CA)的序列

[0379] 以下tRNAGluCUU(-CA)通过常规方法制备。

[0380] 序列TR-1(SEQ ID NO:7)

[0381] tRNAGluCUU(-CA)RNA序列:

[0382] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUCUUACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC

[0383] 以下tRNAGluCUG(-CA)通过常规方法制备。

[0384] 序列TR-2(SEQ ID NO:8)

[0385] tRNAGluCUG(-CA)RNA序列:

[0386] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUCUGACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC

[0387] 以下tRNAfMet(CAU)(-CA)通过常规方法制备。

[0388] 序列TR-3(SEQ ID NO:9)

[0389] GGCGGGGUGGAGCAGCCUGGUAGCUCGUCGGGCUCAUAACCCGAAGAUCGUCGGUUCAAAUCCGGCCCCCGCAAC

[0390] 使用氨酰-pCpA合成氨酰-tRNA:第1部分

[0391] 将10x连接缓冲液(500mM HEPES-KOH pH 7.5、200mM $MgCl_2$)(4μL)、10mM ATP(4μL)和无核酸酶水(5.6μL)添加到50μM转录的tRNAGluCUG(-CA)(SEQ)ID NO:8)(20μL)中,将混合物在95℃加热2分钟,然后在室温下静置5分钟以进行tRNA重折叠。向其中加入10单位/μL T4 RNA连接酶(New England Biolabs)(2.4μL)和氨酰-pCpA(TS01)在DMSO(4μL)中的2.5mM溶液,并在16℃下进行连接反应45分钟。向连接反应液中加入终浓度为0.3M的乙酸钠,进行苯酚-氯仿萃取,通过乙醇沉淀回收氨酰-tRNA(化合物AAtR-1)。在加入混合物用于翻译之前立即将回收的氨酰-tRNA(化合物AAtR-1)溶解在1mM醋酸钠中。

[0392] 化合物AAtR-1

[0393] MeSer(tBuOH)-tRNAGluCUG

[0394] 使用氨酰-pCpA合成氨酰-tRNA:第2部分

[0395] 将10x连接缓冲液(500mM HEPES-KOH pH 7.5、200mM $MgCl_2$)(4μL)、10mM ATP(4μL)和无核酸酶水(5.6μL)添加到50μM转录的tRNAGluCUU(-CA)(SEQ)ID NO:7)(20μL)中,将

混合物在95℃加热2分钟，然后在室温下静置5分钟以进行tRNA重折叠。向其中加入10单位/μL T4 RNA连接酶(New England Biolabs)(2.4μL)和氨酰-pCpA(TS01)在DMSO(4μL)中的2.5mM溶液，并在16℃下进行连接反应45分钟。向连接反应液中加入终浓度为0.3M的乙酸钠，进行苯酚-氯仿萃取，通过乙醇沉淀回收氨酰-tRNA(化合物AAtR-2)。在加入混合物用于翻译之前立即将回收的氨酰-tRNA(化合物AAtR-2)溶解在1mM醋酸钠中。

[0396] 化合物AAtR-2

[0397] BODIPYFL-4-AMF-tRNAGluCUU

[0398] 使用氨酰-pCpA合成氨酰-tRNA:第3部分

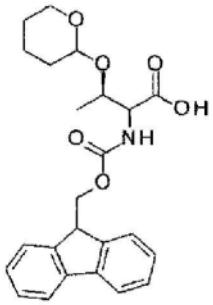
[0399] 将10x连接缓冲液(500mM HEPES-KOH pH 7.5、200mM $MgCl_2$)(4μL)、10mM ATP(4μL)和无核酸酶水(5.6μL)添加到50μM转录的tRNAfMetCAU(-CA)(SEQ)ID NO:9)(20μL)中，将混合物在95℃加热2分钟，然后在室温下静置5分钟以进行tRNA重折叠。向其中添加10单位/μL T4RNA连接酶(New England Biolabs)(2.4μL)和(Acbz-MeCys(StBu)-pCpA(专利文献WO 2017150732中描述的化合物nk14)在DMSO(4μL)中的2.5mM溶液，在16℃下进行连接反应45分钟。在连接反应液中加入0.3M乙酸钠，进行苯酚-氯仿萃取，通过乙醇沉淀回收氨酰基-tRNA(Compound AAtR-3)。在加入混合物用于翻译之前立即将回收的氨酰-tRNA(化合物AAtR-3)溶解在1mM醋酸钠中。

[0400] 化合物AAtR-3

[0401] Acbz-MeCys(StBu)-tRNAfMetCAU

[0402] 实施例6.LCT12的合成

[0403] 合成(2S,3R)-2-((((9H-芴基-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-((四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)丁酸(Fmoc-Thr(THP)-OH)用于通过肽合成仪的LCT-12肽合成

[0404] 

[0405] 将甲苯(50mL)添加到(2S,3R)-2-((((9H-芴基-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-羟基丁酸一水合物(Fmoc-Thr-OH一水合物，购自Tokyo Chemical Industry，5.0g，13.9mmol)和吡啶对甲苯磺酸盐(PPTS，0.175g，0.70mmol)的混合物中，并通过减压蒸馏除去甲苯而共沸除去所包含的水分。向所得残留中加入超脱水四氢呋喃(THF，28mL)和3,4-二氢-2H-吡喃(8.8mL，97mmol)，并且在氮气气氛下，将该混合物在50℃搅拌4小时。通过LCMS(SQDFA05)确认原料消失后，将混合物冷却至25℃，加入乙酸乙酯(30mL)。然后通过加入饱和氯化钠水溶液(30mL)洗涤有机层，并用乙酸乙酯(30mL)萃取水层。合并所有得到的有机层并进一步用饱和氯化钠水溶液(30mL)洗涤两次。有机层用硫酸钠干燥，并在减压下蒸馏除去溶剂，以得到粗产物(9.3g)。

[0406] 将4.65g所得粗产物溶解在四氢呋喃(THF，30mL)中，然后加入调节至pH 8.0的1.0M磷酸盐缓冲液(30mL)。将该混合物在50℃搅拌4小时。将混合物冷却至25℃后，向其中

加入乙酸乙酯(30mL),并分离有机层和水层。通过加入乙酸乙酯(30mL)萃取水层,然后合并所有得到的有机层并用饱和氯化钠水溶液(30mL)洗涤两次。有机层用硫酸钠干燥,在减压下蒸馏除去溶剂,并在25℃减压下用泵将残余物进一步干燥30分钟。

[0407] 将所得残余物溶解在乙醚(50mL)中,然后加入庚烷(50mL)。在受控减压(约100hPa)下,仅蒸馏除去乙醚并将所得混合物过滤以得到固体。将用庚烷的这种洗涤操作重复两次。使用泵在25℃在减压下将所得固体干燥2小时,以得到Fmoc-Thr(THP)-OH的钠盐(2.80g,6.26mmol)。

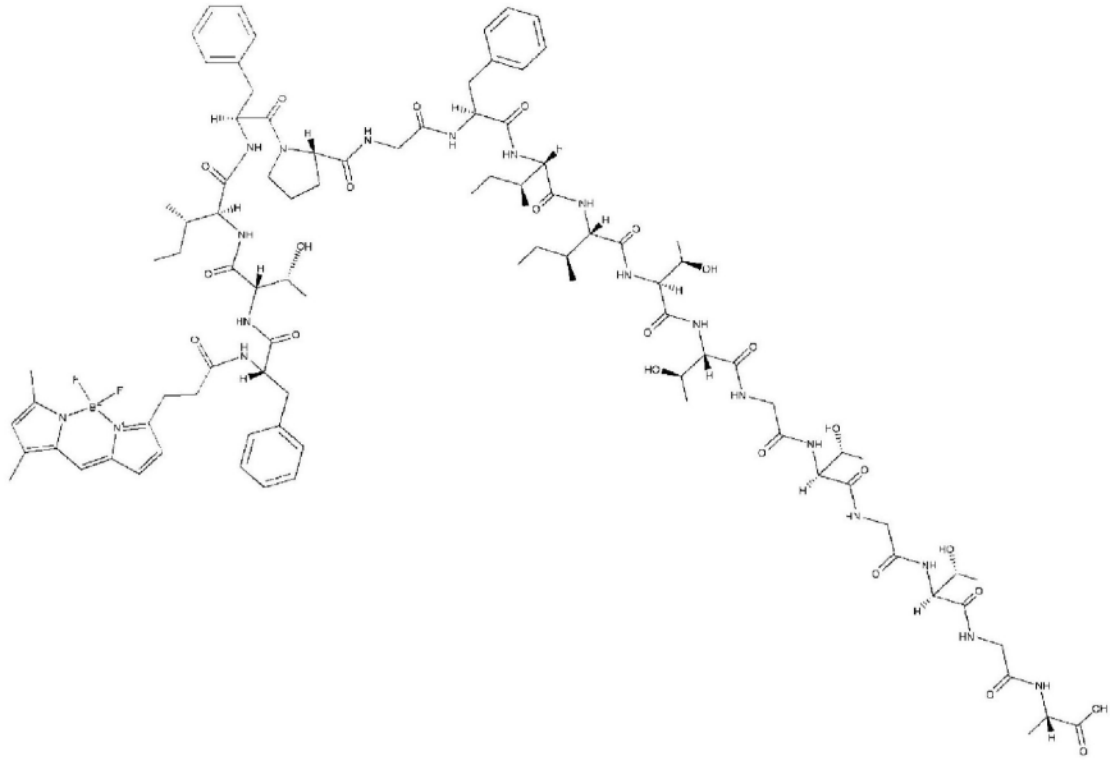
[0408] 将乙酸乙酯(50mL)和pH 2.1的0.05M磷酸水溶液(140mL)加入到所得Fmoc-Thr(THP)-OH的钠盐的总量中,将其在25℃搅拌5min,然后分离有机层和水层。通过加入乙酸乙酯(50mL)萃取水层,然后将所有得到的有机层合并并用饱和氯化钠水溶液(50mL)洗涤两次。有机层用硫酸钠干燥,在减压下蒸馏除去溶剂。在减压下使用泵在25℃下将残余物干燥2小时,然后将所得固体溶解在叔丁基甲基醚(TBME,50mL)中,并在减压下蒸馏除去溶剂。在减压下使用泵在25℃下进一步干燥1小时得到(2S,3R)-2-((((9H-芴基-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-((四氢-2H)-吡喃-2-基)氧基)丁酸(Fmoc-Thr(THP)-OH,2.70g,其中残留30mol%的叔丁基甲基醚(TBME))作为衍生自THP保护基的不对称碳的非对映异构体。将得到的Fmoc-Thr(THP)-OH保存在-25℃的冰箱中。

[0409] LCMS(ESI)m/z=424.2(M-H)-

[0410] 保留时间:0.84min、0.85min(分析条件SQDFA0501)

[0411] 用作LC/MS中的标准样品的在其N末端携带BdpFL的肽(LCT-12)的合成

[0412]



[0413] 使用负载有Fmoc-Ala-OH的2-氯三苯甲基(chlorotrityl)树脂(100mg),使用Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Thr(THP)-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Phe-OH和Fmoc-Pro-OH作为Fmoc氨基酸在肽合成仪上进行肽延伸。肽延伸按照Fmoc法(WO 2013100132B2)的肽合成法进行。进行肽延伸后,在肽合成仪上去除N末端的Fmoc基团,然后用DCM洗涤树脂。

[0414] 将TFE/DCM(1∶1,v/v,2mL)添加到树脂中,并将其摇动一小时以从树脂上切割肽。反应完成后,将管内溶液通过合成柱过滤以去除树脂,并将树脂用TFE/DCM(1∶1,v/v,1mL)洗涤两次。合并所有萃取溶液,加入DMF(2mL),然后在减压下将其浓缩。将得到的残余物溶解在NMP(0.5mL)中,将该溶液的1/4(125μL)用于下一步反应。在室温下将调节至76.5mM的BdpFL琥珀酰亚胺酯(140μL)加入到NMP中的肽溶液中,并在40℃搅拌过夜后,在减压下将其浓缩。将所得残余物溶解在HFIP中的0.05M硫酸氢四甲铵(1.2mL,0.060mmol)中,并将其在室温下搅拌2小时。通过反相硅胶柱色谱法(0.1%FA MeCN/H_2O)纯化反应溶液,以得到标题化合物(LCT-12)(0.3mg)。LCT-12的氨基酸序列如SEQ ID NO:17所示。

[0415] LCMS(ESI)m/z=1972.9(M-H)-

[0416] 保留时间:0.74min(分析条件SQDFA05_01)

[0417] 实施例7.肽的核糖体合成

[0418] 实验1的概述

[0419] 进行实验来比较两种核糖体的翻译特性-由L31intact菌株制备的核糖体(L31intact核糖体)和由L31short菌株制备的核糖体(L31short核糖体)。

[0420] 具体而言,通过使用化合物AAtR-1、AAtR-2和起始-tRNA(AAtR-3)允许翻译模板mRNA(其为序列mR-1(SEQ ID NO:10)或序列mR-2(SEQ ID NO:11))经核糖体合成肽化合物。设计使得Acbz-MeCys(StBu):MeSer(tBuOH):MePhe:Ile:Ile:Gly:MePhe:BODIPYFL-4-AMF:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly(SEQ ID NO:14)将翻译自mR-1并且Acbz-MeCys(StBu):T:MePhe:Ile:Ile:Gly:MePhe:BODIPYFL-4-AMF:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly(SEQ ID NO:16)将翻译自mR-2来作为翻译产物。在下文中,氨基酸将用冒号隔开。

[0421] 使用LC-MS对靶标分子(TM)和副产物进行量化。观察到的主要副产物是起始通读(iRT)肽,其翻译起始于由起始氨基酸的第三个字母表示的氨基酸。

[0422] 翻译条件

[0423] 使用的翻译系统是PURE系统,源自原核生物的重组无细胞蛋白质合成系统。具体而言,翻译溶液含有以下:1mM GTP、1mM ATP、20mM磷酸肌酸、50mM HEPES-KOH pH 7.6、100mM乙酸钾、2mM亚精胺、1mM二硫苏糖醇、1.0mg/mL大肠杆菌MRE600(RNase阴性)衍生的tRNA(Roche)(一些tRNA已通过非专利文献的方法去除(Yokogawa T,Kitamura Y,Nakamura D,Ohno S,Nishikawa K.2010.Nucleic Acids research 38:e89))、3μM体外转录的大肠杆菌tRNA Ala1B、0.26μM EF-G、4μg/mL肌酸激酶、3μg/mL肌激酶、2单位/mL无机焦磷酸酶、1.1μg/mL二磷酸核苷激酶、2.7μM IF1、0.4μM IF2、1.5μM IF3、40μM EF-Tu、35μM EF-Ts、1μM EF-P-Lys、0.4单位/μL RNasin Ribonuclease抑制剂(Promega,N2111)、0.4μM至0.5μM青霉素GAmidase(PGA)、2.7μMAlaRS、1μM GlyRS、0.4μM IleRS、0.5μM突变PheRS(WO 2016/148044)、0.16μM ProRS、0.09μM ThrRS、1μM突变ValRS(WO 2016/148044)、1μM突变SerRS(WO 2016/148044)、250μM Gly、250μM Lys、100μM Ile、250μM Pro、250μM Thr、5mM N-甲基丙氨酸、5mM N-甲基苯丙氨酸、5mM N-甲基丝氨酸和5mM N-甲基缬氨酸。以2mM、4mM、6mM和8mM四种浓度制备乙酸镁,以25μM添加起始氨酰-tRNA(化合物AAtR-3),并且将包括化合物AAtR-1和AAtR-2的每种氨酰-tRNA以10μM添加到翻译反应混合物中。此外,将mRNA(mR-1或mR-2)以1μM添加到翻译反应混合物中。该混合物含有不用于翻译的185μM氨酰-tRNA。通过添加1.2μM的L31short核糖体或L31intact核糖体进行翻译,并将混合物保留在37℃静置1

小时。此后，将混合物在95℃加热3分钟，然后静置直至达到室温。以8.58μM添加肽基-tRNA水解酶(Pth)，并将混合物在37℃下静置1小时。

[0424] mRNA的制备

[0425] 使用RiboMAX大规模RNA生产系统T7(Promega，P1280)通过体外转录反应从模板DNA(SEQ ID NO:12或13)合成模板mRNA序列mR-1或序列mR-2，并用RNeasy Mini试剂盒(Qiagen)进行纯化。

[0426] 分析概要

[0427] 将含有包含非天然氨基酸的肽翻译产物的溶液稀释十倍并使用LC-FLR-MS仪器进行分析。对于分析数据，目标翻译肽的保留时间由MS数据确定，并且翻译肽的量通过定量相应保留时间的荧光峰来评估。对于定量评估，使用实施例6中合成的LCT12作为标准品制备标准曲线，并通过相对定量计算含量。在以下分析条件下进行LC-MS。

[0428] 分析条件

[0429] [表2]

[0430]

仪器	Aquity UPLC-FLR-Xevo G2-XS Tof 或 UPLC-LCT
柱	水 BEHC18(2.1x50mm, φ1.7μm)
流动相	A=0.1% FA 具有 H2O B=0.1% FA 具有 CH3CN
梯度 (%B)	0-0.2min=10% 0.2-3.6min=98% 3.6-4.0min=10%
流速 (mL/min)	0.5
柱温	40
荧光测量波长(Ex/Em)	491nm/515nm
Ms 模式	ESI-

[0431] 结果

[0432] 在mRNA序列(mR-1和mR-2)的两个翻译实验中，在每个核糖体的最佳Mg浓度下，靶标分子的翻译量在用L31short核糖体翻译时比用L31intact核糖体翻译时更大。

[0433] 在mRNA序列mR-1和mR-2的两种翻译中，在每个核糖体的最佳Mg浓度下，翻译的iRT肽(作为副产物)与靶标分子的量的比例在使用L31short核糖体时比使用L31intact核糖体时更低。

[0434] 与其起始氨基酸第二个字母为Thr的mR-2的序列相比，在相同位置具有MeSer(tBuOH)的mR-1的序列显示出在最佳Mg^{2+}浓度下提高通过L31short核糖体翻译的靶标分子的量的更大效果。

[0435] 这显示在使用起始抑制(iSup)方法进行翻译时，使用由L31short菌株制备的L31short核糖体是有用的。

[0436] 使用L31short核糖体或L31intact核糖体从mR-1序列和mR-2序列进行翻译时的翻译的靶标分子的量和翻译的iRT肽的量如下所示。

[0437] [表3-1]

[0438]

[0439] [表3-2]

核糖体	mRNA序列	Mg浓度	翻译产物	翻译量(nM)
L31short核糖体	mR-1	2	Acbz-MeCys(StBu):MeSer(tBuOH):MePhe:Ile:Ile:Gly:MePhe:BODIPYFL-4-AMF:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (SEQ ID NO: 14)	10.2
		4	Acbz-MeCys(StBu):MeSer(tBuOH):MePhe:Ile:Ile:Gly:MePhe:BODIPYFL-4-AMF:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (SEQ ID NO: 14)	36.9
		6	Acbz-MeCys(StBu):MeSer(tBuOH):MePhe:Ile:Ile:Gly:MePhe:BODIPYFL-4-AMF:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (SEQ ID NO: 14)	26.8
		8	Acbz-MeCys(StBu):MeSer(tBuOH):MePhe:Ile:Ile:Gly:MePhe:BODIPYFL-4-AMF:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (SEQ ID NO: 14)	15.7
L31intact核糖体		2	Acbz-MeCys(StBu):MeSer(tBuOH):MePhe:Ile:Ile:Gly:MePhe:BODIPYFL-4-AMF:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (SEQ ID NO: 14)	6.8
		4	Acbz-MeCys(StBu):MeSer(tBuOH):MePhe:Ile:Ile:Gly:MePhe:BODIPYFL-4-AMF:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (SEQ ID NO: 14)	10.7
		6	Acbz-MeCys(StBu):MeSer(tBuOH):MePhe:Ile:Ile:Gly:MePhe:BODIPYFL-4-AMF:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (SEQ ID NO: 14)	8.0
		8	Acbz-MeCys(StBu):MeSer(tBuOH):MePhe:Ile:Ile:Gly:MePhe:BODIPYFL-4-AMF:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (SEQ ID NO: 14)	2.6

[0440]

[0441] [表3-3]

核糖体	mRNA序列	Mg浓度	翻译产物	翻译量(nM)
L31short核糖体	mR-1	2	MePhe:Ile:Ile:Gly:MePhe:BODIPYFL-4-AMF:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (SEQ ID NO: 15)	0.3
		4	MePhe:Ile:Ile:Gly:MePhe:BODIPYFL-4-AMF:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (SEQ ID NO: 15)	22.1
		6	MePhe:Ile:Ile:Gly:MePhe:BODIPYFL-4-AMF:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (SEQ ID NO: 15)	48.1
		8	MePhe:Ile:Ile:Gly:MePhe:BODIPYFL-4-AMF:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (SEQ ID NO: 15)	49.5
L31intact核糖体		2	MePhe:Ile:Ile:Gly:MePhe:BODIPYFL-4-AMF:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (SEQ ID NO: 15)	12.8
		4	MePhe:Ile:Ile:Gly:MePhe:BODIPYFL-4-AMF:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (SEQ ID NO: 15)	50.5
		6	MePhe:Ile:Ile:Gly:MePhe:BODIPYFL-4-AMF:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (SEQ ID NO: 15)	58.9
		8	MePhe:Ile:Ile:Gly:MePhe:BODIPYFL-4-AMF:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (SEQ ID NO: 15)	51.4

[0442]

[0443] [表3-4]

核糖体	mRNA序列	Mg浓度	翻译产物	翻译量(nM)
L31short核糖体	mR-2	2	Acbz-MeCys(StBu):T:MePhe:Ile:Ile:Gly:MePhe:BODIPYFL-4-AMF:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (SEQ ID NO: 16)	30.7
		4	Acbz-MeCys(StBu):T:MePhe:Ile:Ile:Gly:MePhe:BODIPYFL-4-AMF:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (SEQ ID NO: 16)	42.7
		6	Acbz-MeCys(StBu):T:MePhe:Ile:Ile:Gly:MePhe:BODIPYFL-4-AMF:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (SEQ ID NO: 16)	30.8
		8	Acbz-MeCys(StBu):T:MePhe:Ile:Ile:Gly:MePhe:BODIPYFL-4-AMF:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (SEQ ID NO: 16)	19.9
L31intact核糖体		2	Acbz-MeCys(StBu):T:MePhe:Ile:Ile:Gly:MePhe:BODIPYFL-4-AMF:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (SEQ ID NO: 16)	24.5
		4	Acbz-MeCys(StBu):T:MePhe:Ile:Ile:Gly:MePhe:BODIPYFL-4-AMF:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (SEQ ID NO: 16)	20.5
		6	Acbz-MeCys(StBu):T:MePhe:Ile:Ile:Gly:MePhe:BODIPYFL-4-AMF:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (SEQ ID NO: 16)	13.2
		8	Acbz-MeCys(StBu):T:MePhe:Ile:Ile:Gly:MePhe:BODIPYFL-4-AMF:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (SEQ ID NO: 16)	4.7

[0444]

核糖体	mRNA序列	Mg浓度	翻译产物	翻译量(nM)
L31short核糖体	mR-2	2	MePhe:Ile:Ile:Gly:MePhe:BODIPYFL-4-AMF:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (SEQ ID NO: 15)	3.5
		4	MePhe:Ile:Ile:Gly:MePhe:BODIPYFL-4-AMF:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (SEQ ID NO: 15)	15.8
		6	MePhe:Ile:Ile:Gly:MePhe:BODIPYFL-4-AMF:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (SEQ ID NO: 15)	28.3
		8	MePhe:Ile:Ile:Gly:MePhe:BODIPYFL-4-AMF:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (SEQ ID NO: 15)	32.4
L31intact核糖体		2	MePhe:Ile:Ile:Gly:MePhe:BODIPYFL-4-AMF:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (SEQ ID NO: 15)	25.0
		4	MePhe:Ile:Ile:Gly:MePhe:BODIPYFL-4-AMF:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (SEQ ID NO: 15)	37.3
		6	MePhe:Ile:Ile:Gly:MePhe:BODIPYFL-4-AMF:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (SEQ ID NO: 15)	49.1
		8	MePhe:Ile:Ile:Gly:MePhe:BODIPYFL-4-AMF:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (SEQ ID NO: 15)	48.8

[0445] 实验2的概述

[0446] 在实施例2中，使用源自W3110菌株的野生型大肠杆菌，并使用以三种Mg^{2+}浓度(10mM、5mM和0mM)制备的破碎缓冲液制备核糖体。通过其各自的制备方法制备的核糖体称为WT-10MG核糖体、WT-5MG核糖体和WT-0MG核糖体。在实施例3中，在纯化过程中降解的L31

蛋白质的百分比是通过MALDI-MS对每个核糖体确定的。结果显示破碎溶液中Mg^{2+}浓度越低，L31降解越多。

[0447] 使用这些核糖体，使用mR-2序列进行翻译实验，如实验1中所示。

[0448] 结果表明，当使用具有最多降解L31的WT-0MG核糖体时，靶标分子的量最大。

[0449] 翻译条件

[0450] 使用的翻译系统是PURE系统，其是源自原核生物的重组无细胞蛋白质合成系统。具体而言，翻译溶液含有以下：1mM GTP、1mMATP、20mM磷酸肌酸、50mM HEPES-KOH pH 7.6、100mM乙酸钾、4mM乙酸镁、2mM亚精胺、1mM二硫苏糖醇、1.0mg/mL大肠杆菌MRE600(RNase阴性)衍生的tRNA(Roche)(一些tRNA已通过非专利文献的方法去除(Yokogawa T,Kitamura Y,Nakamura D,Ohno S,Nishikawa K.2010.Nucleic Acids research 38:e89))、3μM体外转录的大肠杆菌tRNA Ala1B、0.26μM EF-G、4μg/mL肌酸激酶、3μg/mL肌激酶、2单位/mL无机焦磷酸酶、1.1μg/mL二磷酸核苷激酶、2.7μM IF1、0.4μM IF2、1.5μM IF3、40μM EF-Tu、35μM EF-Ts、1μM EF-P-Lys、0.4单位/μL RNasin Ribonuclease抑制剂(Promega,N2111)、0.5μM青霉素G Amidase(PGA)、2.7μM AlaRS、1μM GlyRS、0.4μM IleRS、0.5μM突变PheRS(WO 2016/148044)、0.16μM ProRS、0.09μM ThrRS、1μM突变ValRS(WO 2016/148044)、1μM突变SerRS(WO 2016/148044)、250μM Gly、250μM Lys、100μM Ile、250μM Pro、250μM Thr、5mM N-甲基丙氨酸、5mM N-甲基苯丙氨酸、5mM N-甲基丝氨酸和5mM N-甲基缬氨酸。以25μM添加起始氨酰-tRNA(化合物AAtR-3)，并且将包括化合物AAtR-1和AAtR-2的每种氨酰-tRNA以10μM添加到翻译反应混合物中。该混合物含有不用于翻译的185μM氨酰-tRNA。通过添加1.2μM的WT-0MG核糖体、WT-5MG核糖体或WT-10MG核糖体进行翻译，并将混合物保留在37℃静置1小时。此后，将混合物在95℃加热3分钟，然后静置直至达到室温。以8.58μM添加肽基-tRNA水解酶(Pth)，并将混合物在37℃下静置1小时。

[0451] 分析概述

[0452] 将含有包含非天然氨基酸的肽翻译产物的溶液稀释十倍并使用LC-FLR-MS仪器进行分析。对于分析数据，目标翻译肽的保留时间由MS数据确定，并且翻译肽的量通过量化相应保留时间的荧光峰来评估。对于定量评价，以实施例6中合成的LCT12为标准品制作标准曲线，并通过相对定量计算含量。在以下分析条件下进行LC-MS。

[0453] 分析条件

[0454] [表4]

[0455]

仪器	Aquity UPLC-FLR-Xevo G2-XS Tof
柱	水 BEHC18(2.1x50mm, φ1.7μm)
流动相	A=0.1% FA 具有H2O B=0.1% FA 具有CH3CN
梯度 (%B)	0-0.2min=10% 0.2-3.6min=98% 3.6-4.0min=10%
流速 (mL/min)	0.5
柱温	40
荧光测量波长(Ex/Em)	491nm/515nm
Ms模式	ESI-

[0456] 结果

[0457] 翻译的靶标分子的量降序排列的核糖体是WT-0MG核糖体、WT-5MG核糖体和WT-10MG核糖体。

[0458] 此外,iRT肽与靶标分子的百分比升序排列的核糖体是WT-0MG核糖体、WT-5MG核糖体和WT-10MG核糖体。

[0459] 实验1和实施例3的结果显示,在破碎溶液中低Mg^{2+}浓度的条件下,其中L31被降解的核糖体的百分比增加,并且可以增加iSup方法中的翻译量。

[0460] [表5]

[0461]

核糖体	mRNA序列	Mg浓度 (mM)	翻译产物	翻译量 (nM)
WT-0MG核糖体	mR-2	4	Acbz-MeCys(StBu):T:MePhe:Ile:Ile:Gly:MePhe:BODIPYFL-4-AMF:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (SEQ ID NO: 16)	27.9
WT-5MG核糖体			Acbz-MeCys(StBu):T:MePhe:Ile:Ile:Gly:MePhe:BODIPYFL-4-AMF:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (SEQ ID NO: 16)	25.2
WT-10MG核糖体			Acbz-MeCys(StBu):T:MePhe:Ile:Ile:Gly:MePhe:BODIPYFL-4-AMF:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (SEQ ID NO: 16)	18.2
WT-0MG核糖体			MePhe:Ile:Ile:Gly:MePhe:BODIPYFL-4-AMF:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (SEQ ID NO: 15)	23.2
WT-5MG核糖体			MePhe:Ile:Ile:Gly:MePhe:BODIPYFL-4-AMF:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (SEQ ID NO: 15)	28.7
WT-10MG核糖体			MePhe:Ile:Ile:Gly:MePhe:BODIPYFL-4-AMF:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (SEQ ID NO: 15)	34.7

[0462] 实施例8.使用L31short核糖体的淘选

[0463] 酰化tRNA的合成

[0464] 通过专利文献(WO 2013/100132)中描述的方法制备用于淘选的酰化tRNA。包括专利文献(WO 2018/225864)中描述的Pic(2)、MeAla(3-pyr)、Ser(Ph-2-Cl)和MeGly的15种氨

基酸用于制备Elongator氨酰-tRNA的混合物。翻译溶液中每种酰化tRNA的最终浓度为10μM至20μM。苯酚提取后的操作是在Pnaz保护的pCpA氨基酸上进行的，而无需对其进行脱保护。起始氨酰-tRNA是与实施例5的化合物AAtR-3相同的化合物，并通过以25μM的终浓度添加到翻译溶液中使用。

[0465] 编码肽化合物文库的随机双链DNA文库

[0466] 通过专利文献(WO 2013/100132)中描述的方法构建DNA文库。制备了其中24种三联体(包括TTT、TTG、CTT、ATT、ATG、GTT、CCG、ACT、GCT、CAT、CAG、AAC、GAA、TGG、CGG、AGT、AGG和GGT)随机或重复出现8或9次的DNA。

[0467] 生物素化靶标蛋白的制备

[0468] 谷胱甘肽S-转移酶(GST)用作淘选的靶标蛋白。制备并使用在大肠杆菌中表达的GST。根据非专利文献BMC biotechnology，2008，8，41和Protein Science，1990；108(4)：673-6进行生物素化。

[0469] 用于淘选的翻译溶液

[0470] 翻译溶液含有以下物质：1mM GTP、1mM ATP、20mM磷酸肌酸、50mM HEPES-KOH pH 7.6、100mM乙酸钾、6mM乙酸镁、2mM亚精胺、1mM二硫苏糖醇、1mg/mL大肠杆菌MRE600(RNase阴性)衍生的tRNA(Roche)(一些tRNA已通过非专利文献的方法去除(Yokogawa T，Kitamura Y，Nakamura D，Ohno S，Nishikawa K.2010.Nucleic acids research 38:e89))、4μg/mL肌酸激酶、3μg/mL肌激酶、2单位/mL无机焦磷酸酶、1.1μg/mL核苷二磷酸激酶、0.26μM EF-G、2.7μM IF1、0.4μM IF2、1.5μM IF3、40μM EF-Tu、49μM EF-Ts、1μM EF-P-Lys、1.2μM核糖体(L31short或L31intact)、2.73μMAlaRS、1μM GlyRS、0.4μM IleRS、0.5μM突变PheRS (WO 2016/148044)，0.16μM ProRS，1μM突变SerRS(WO 2016/148044)、0.09μM ThrRS、1μM突变ValRS(WO 2016/148044)、0.11μM LysRS、3μM体外转录的大肠杆菌tRNAAla1B、250μM甘氨酸、100μM异亮氨酸、250μM脯氨酸、250μM苏氨酸、250μM赖氨酸、5mM N-甲基缬氨酸、5mM N-甲基丝氨酸、5mM N-甲基丙氨酸、5mM N-甲基苯丙氨酸、Elongator氨酰-tRNA的混合物、25μM起始氨酰-tRNA和10μM青霉素GAmidase(PGA)。

[0471] 淘选

[0472] 根据专利文献(WO 2013/100132)，使用上述双链DNA文库和含有L31short的翻译溶液或含有L31intact的翻译溶液进行淘选。在GST和生物素之间插入TEV蛋白酶识别序列，并用TEV蛋白酶进行洗脱。在允许肽文库与生物素化蛋白质相互作用后，使用链霉抗生物素蛋白固定的磁珠将其回收，然后洗涤，随后向珠子中加入用于TEV洗脱的溶液(50mM Tris-HCl pH 8.0、0.5mM EDTA、1mM DTT，0.1U/μL AcTEV蛋白酶(Thermo Fisher Scientific，产品编号12575015))以允许反应。反应后，收集上清液并进行PCR。

[0473] 富集序列的分析

[0474] 提取的序列如下：至少一轮或多轮淘选的出现频率为Rank A：0.5％或更多；Rank B：0.05％或更多；或Rank C：NGS的读取数为50或更多，与不添加靶标进行淘选时相比，通过划分最新轮的池并添加靶标进行淘选时，出现频率增加了10倍或更多。结果，当使用使用L31short核糖体的翻译系统时，33个序列为Rank A，253个序列为Rank B，396个序列为Rank C。另一方面，当使用使用L31intact核糖体的翻译系统时，32个序列为Rank A，175个序列为Rank B，247个序列为Rank C。当使用L31short核糖体进行淘选时，比使用L31intact核糖体

进行淘选时可以富集更多的序列。

[0475] 实施例9.使用L31突变核糖体的翻译实验

[0476] 实施例9的概述

[0477] 如后面实施例14所述，构建了8个L31突变株，每个株具有不同长度的L31。如实施例15所述，从这些菌株以及L31short菌株、L31intact菌株和W3110菌株制备核糖体。通过使用所获得的11个核糖体进行肽的核糖体合成，研究了分别包含L31突变体的核糖体的翻译特性。

[0478] 具体而言，使用表6所示的11个核糖体R1至R11，通过核糖体合成具有对应于第二个字母的不同氨基酸的以下三种肽。在本文中，氨基酸序列可以如下用冒号隔开氨基酸来表示。

[0479] AcbzMeCStBu:MeG:MeF:I:I:G:MeF:Bdp4AMF:I:I:P:I:G(SEQ ID NO:29)

[0480] AcbzMeCStBu:MeStBuOH:MeF:I:I:G:MeF:Bdp4AMF:I:I:P:I:G(SEQ ID NO:30)

[0481] AcbzMeCStBu:L:MeF:I:I:G:MeF:Bdp4AMF:I:I:P:I:G(SEQ ID NO:31)

[0482] 模板mRNA序列mR-1(SEQ ID NO:10)与MeG-tRNAGlu(CUG)、MeSer(tBuOH)-tRNAGlu(CUG)和Leu-tRNAGlu(CUG)中的每一种(其是处理第二个字母的氨酰-tRNA)一起使用。使用实施例13中制备的氨酰-tRNA。

[0483] [表6]

[0484]

核糖体缩写	核糖体名称
R1	L31(1-27)核糖体
R2	L31(1-32)核糖体
R3	L31(1-37)核糖体
R4	L31(1-42)核糖体
R5	L31(1-47)核糖体
R6	L31(1-52)核糖体
R7	L31(1-57)核糖体
R8	L31(1-67)核糖体
R9	WT核糖体
R10	L31intact核糖体
R11	L31short核糖体

[0485] 使用LC-MS对靶标分子(TM)和副产物进行定量。观察到的主要副产物是起始通读(iRT)肽，其翻译起始于对应于起始氨基酸的第三个字母的氨基酸。在本文中，其翻译开始于从起始的第二个字母的肽可以称为1iRT，其翻译开始于从起始的第三个字母的肽可以称为2iRT。表7至9显示了TM(SEQ ID NO:29至31)以及相应的1iRT和2iRT中的每一个。

[0486] [表7]

[0487]

	氨基酸序列	SEQ ID NO
TM	AcbzMeCStBu:MeG:MeF:I:I:G:MeF:Bdp4AMF:I:I:P:I:G	29
1iRT	MeG:MeF:I:I:G:MeF:Bdp4AMF:I:I:P:I:G	32
2iRT	MeF:I:I:G:MeF:Bdp4AMF:I:I:P:I:G	35

[0488] [表8]

[0489]

	氨基酸序列	SEQ ID NO
TM	AcbzMeCStBu:MeStBuOH:MeF:I:I:G:MeF:Bdp4AMF:I:I:P:I:G	30
1iRT	MeStBuOH:MeF:I:I:G:MeF:Bdp4AMF:I:I:P:I:G	33
2iRT	MeF:I:I:G:MeF:Bdp4AMF:I:I:P:I:G	35

[0490] [表9]

[0491]

	氨基酸序列	SEQ ID NO
TM	AcbzMeCStBu:L:MeF:I:I:G:MeF:Bdp4AMF:I:I:P:I:G	31
1iRT	L:MeF:I:I:G:MeF:Bdp4AMF:I:I:P:I:G	34
2iRT	MeF:I:I:G:MeF:Bdp4AMF:I:I:P:I:G	35

[0492] 翻译条件

[0493] 从实施例7中实验1的翻译液组合物中排除体外转录的大肠杆菌tRNAAla1B、Lys和氨酰-tRNA后，按照实施例7中实验1的翻译条件，除了加入0.5μM HisRS，并且所述组合物为6.72单位/mL肌激酶、59μM EF-T、4mM乙酸镁、20μM起始氨酰-tRNA(化合物AAtR-3)、10μM编码第二个字母的氨酰-tRNA的每一种、1.2μM核糖体的每一种和1μM mRNA。

[0494] 分析概述

[0495] 根据实施例7的实验2的方法进行分析，不同之处在于使用实施例11中合成的LCT67作为标准品制作校准曲线进行定量评估。

[0496] 结果

[0497] 如表10所示，所有三个序列都显示了这样的翻译特性，即在使用核糖体R1至R7和R11的翻译中所翻译的TM量高且起始通读(iRT)肽的百分比低。包含具有来自N末端的62个或更少氨基酸残基的L31突变体的核糖体显示出具有高翻译活性和低百分比的起始通读(iRT)肽的特性。iRT百分比通过以下等式计算。

[0498] (等式1)

[0499] iRT百分比＝(iRT总浓度[nM]/(iRT总浓度[nM]+TM浓度[nM])x 100

[0500] [表10]

[0501]

No.	核糖体缩写	代表第二个字母的氨基酸	TM 浓度 [nM]	1iRT 浓度 [nM]	2iRT 浓度 [nM]	总 iRT 浓度 [nM]	iRT 百分比
1	R1	MeG	88	0	71	71	45%
2	R2	MeG	83	0	83	83	50%
3	R3	MeG	89	0	67	67	43%
4	R4	MeG	97	0	72	72	42%
5	R5	MeG	86	0	78	78	48%
6	R6	MeG	95	0	73	73	44%
7	R7	MeG	97	0	60	60	39%
8	R8	MeG	49	0	115	115	70%
9	R9	MeG	37	0	137	137	79%
10	R10	MeG	35	0	151	151	81%
11	R11	MeG	80	0	73	73	48%
12	R1	MeStBuOH	108	0	83	83	44%
13	R2	MeStBuOH	111	0	100	100	47%
14	R3	MeStBuOH	119	0	96	96	45%
15	R4	MeStBuOH	116	0	101	101	46%
16	R5	MeStBuOH	119	0	102	102	46%
17	R6	MeStBuOH	109	0	101	101	48%
18	R7	MeStBuOH	121	0	103	103	46%
19	R8	MeStBuOH	58	0	117	117	67%
20	R9	MeStBuOH	51	0	141	141	74%
21	R10	MeStBuOH	43	0	134	134	76%
22	R11	MeStBuOH	86	0	88	88	51%
23	R1	L	117	0	15	15	11%
24	R2	L	107	0	19	19	15%
25	R3	L	124	0	19	19	14%
26	R4	L	119	0	24	24	17%
27	R5	L	113	0	22	22	16%
28	R6	L	120	0	19	19	14%
29	R7	L	110	0	21	21	16%
30	R8	L	66	0	39	39	37%
31	R9	L	65	0	37	37	36%
32	R10	L	59	0	46	46	44%
33	R11	L	95	0	15	15	14%

[0502] 实施例10.L31short核糖体对多种肽的核糖体合成的影响

[0503] 实验1.AcbzdMeCStBu作为起始氨基酸放置,多种氨基酸作为第二个字母放置

[0504] 实验1的概述

[0505] 使用实施例2中纯化的L31short核糖体和L31intact核糖体,核糖体合成了具有代表第二个字母的不同氨基酸的六种肽,以证实在许多肽的核糖体合成中显示L31short核糖体的有利翻译特性。

[0506] 具体而言,核糖体合成了具有代表以下氨基酸序列(SEQ ID NO:36)的第二个字母(X)的不同氨基酸的六种肽。在本文中,X是Nle、S3F5MePyr、SPh2Cl、I、T或L。

[0507] AcbzdMeCStBu:X:MeF:I:I:G:MeF:Bdp4AMF:I:I:P:I:G(SEQ ID NO:36)

[0508] 模板mRNA序列mR-1(SEQ ID NO:10)与Nle-tRNAGlu(CUG)、S3F5MePyr-tRNAGlu(CUG)、SPh2Cl-tRNAGlu(CUG)、Ile-tRNAGlu(CUG)、Thr-tRNAGlu(CUG)和Leu-tRNAGlu(CUG)中的每一种(其是处理第二个字母的氨酰-tRNA)一起使用。使用实施例13中制备的氨酰-tRNA。

[0509] 使用LC-MS对靶标分子(TM)和副产物进行定量。观察到的主要副产物是1iRT和2iRT。iRT百分比通过以下等式计算。

[0510] (等式1)

[0511] iRT百分比＝(iRT总浓度[nM]/(iRT总浓度[nM]+TM浓度[nM])x 100

[0512] 翻译条件

[0513] 在将HisRS从实施例9的翻译条件中排除后,按照实施例9的翻译条件,不同之处在于组合物为8mM乙酸镁、3μg/mL肌激酶、49μM EF-T和20μM起始氨酰-tRNA(Acbz-D-MeCys(StBu)-tRNAfMetCAU)(专利文献WO 2017150732)。

[0514] 分析概述

[0515] 根据实施例9的方法进行分析。

[0516] 结果

[0517] 如表11所示,与使用L31intact核糖体时相比,使用L31short核糖体时,六个序列中的四个序列中翻译的TM量增加了2.8倍至3.9倍,并且在所有六个序列中,与使用L31intact核糖体时相比,使用L31short核糖体时iRT的百分比降低。

[0518] [表11]

[0519]

序号	核糖体	代表第二个字母的氨基酸	TM 浓度 [nM]	1iRT 浓度 [nM]	2iRT 浓度 [nM]	总iRT 浓度 [nM]	iRT 百分比
1	L31short 核糖体	Nle	106	19	65	84	44%
2		S3F5MePyr	112	74	45	119	52%
3		SPh2Cl	26	44	14	58	69%
4		I	86	23	96	119	58%
5		T	15	44	111	155	91%
6		L	118	33	88	121	51%
7	L31intact 核糖体	Nle	27	26	56	82	75%
8		S3F5MePyr	40	144	60	204	84%
9		SPh2Cl	39	130	39	169	81%
10		I	28	13	189	202	88%
11		T	16	66	171	237	94%
12		L	37	67	115	182	83%

[0520] 实验2.AcbzMeCStBu作为起始氨基酸放置,多种氨基酸作为第二个字母放置

[0521] 实验2的概述

[0522] 使用实施例2中纯化的L31short核糖体和L31intact核糖体,核糖体合成了具有代表第二个字母的不同氨基酸的十二个肽,以证实在许多肽的核糖体合成中显示L31short核糖体的有利翻译特性。

[0523] 具体而言,核糖体合成了以下氨基酸序列(SEQ ID NO:37)的具有代表第二个字母(X)的不同氨基酸的十二个肽。在本文种,X是Nle、MeG、MeF、S3F5MePyr、MeHph、MeA3Pyr、SPh2Cl、G、I、T、MeStBuOH或L。

[0524] AcbzMeCStBu:X:MeF:I:I:G:MeF:Bdp4AMF:I:I:P:I:G(SEQ ID NO:37)

[0525] 除了额外使用MeG-tRNAGlu(CUG)、MePhe-tRNAGlu(CUG)、MeHph-tRNAGlu(CUG)、MeA3Pyr-tRNAGlu(CUG)、Gly-tRNAGlu(CUG)或MeSer(tBuOH)-tRNAGlu(CUG)作为处理第二个字母的氨酰-tRNA,按照实施例10的实验1的方法进行实验。观察到的主要副产物是1iRT和2iRT。

[0526] 翻译条件

[0527] 按照实施例10中实验1的翻译条件,不同之处在于使用4mM乙酸镁和20μM起始氨酰-tRNA(化合物AAtR-3)。

[0528] 分析概述

[0529] 根据实施例9的方法进行分析。

[0530] 结果

[0531] 如表12所示,与使用L31intact核糖体时相比,使用L31short核糖体时,12条序列中的11条序列中的翻译的TM量增加了1.6倍至3.7倍,并且在所有12条序列中,与使用L31intact核糖体时相比,使用L31short核糖体时iRT的百分比降低。

[0532] [表12]

[0533]

序号	核糖体	代表第二个字母的氨基酸	TM 浓度 [nM]	1iRT 浓度 [nM]	2iRT 浓度 [nM]	总iRT 浓度 [nM]	iRT百分比
1	L31short 核糖体	Nle	155	0	22	22	12%
2		MeG	94	0	54	54	36%
3		MeF	257	0	23	23	8%
4		S3F5MePyr	174	0	14	14	7%
5		MeHph	151	0	29	29	16%
6		MeA3Pyr	153	0	31	31	17%
7		SPh2Cl	195	13	11	24	11%
8		G	111	0	22	22	17%
9		I	166	0	23	23	12%
10		T	112	0	30	30	21%
11		MeStBuOH	25	0	12	12	32%
12		L	46	0	12	12	21%
13	L31intact 核糖体	Nle	76	0	82	82	52%
14		MeG	38	0	131	131	78%
15		MeF	69	0	58	58	46%
16		S3F5MePyr	77	52	66	118	61%
17		MeHph	93	0	89	89	49%
18		MeA3Pyr	75	0	113	113	60%
19		SPh2Cl	85	48	42	90	51%
20		G	41	0	105	105	72%
21		I	77	0	71	71	48%
22		T	57	0	85	85	60%
23		MeStBuOH	16	0	67	67	81%
24		L	50	18	72	90	64%

[0534] 实验3.AcbzCStBu作为起始氨基酸放置,多种氨基酸作为第二个字母放置

[0535] 实验3的概述

[0536] 使用在实施例2中纯化的L31short核糖体和L31intact核糖体,核糖体合成了具有代表第二个字母的不同氨基酸的十二个肽,以证实在许多肽的核糖体合成中显示L31short

核糖体的有利翻译特性。

[0537] 具体而言，核糖体合成了以下氨基酸序列(SEQ ID NO:38)的具有代表第二个字母(X)的不同氨基酸的十二个肽。在本文中，X为Nle、MeG、MeF、S3F5MePyr、MeHph、MeA3Pyr、SPh2Cl、G、I、T、MeStBuOH或L。按照实施例10的实验2的方法进行实验。

[0538] AcbzCStBu:X:MeF:I:I:G:MeF:Bdp4AMF:I:I:P:I:G(SEQ ID NO:38)

[0539] 使用LC-MS对靶标分子(TM)和副产物进行定量。观察到的主要副产物是1iRT和2iRT。

[0540] 翻译条件

[0541] 按照实施例9的翻译条件，不同之处在于使用0.23μM EF-G、5.92单位/mL肌激酶2、1.0μg/mL核苷二磷酸激酶、2.4μM IF1、1.3μM IF3、35μM EF-Tu、52μM EF-Ts和20μM起始氨酰-tRNA Acbz-Cys(StBu)-tRNAfMetCAU(WO 2017/150732)。

[0542] 分析概述

[0543] 根据实施例9的方法进行分析。

[0544] 结果

[0545] 如表13所示，与使用L31intact核糖体时相比，使用L31short核糖体时，所有12个序列中翻译的TM的量增加了1.7倍至3.8倍，并且在所有12个序列中，与使用L31intact核糖体时相比，使用L31short核糖体时iRT的百分比降低。

[0546] [表13]

[0547]

序号	核糖体	代表第二个字母的氨基酸	TM 浓度 [nM]	1iRT 浓度 [nM]	2iRT 浓度 [nM]	总iRT 浓度 [nM]	iRT 百分比
1	L31short 核糖体	Nle	26	0	28	28	52%
2		MeG	14	0	43	43	76%
3		MeF	52	0	15	15	22%
4		S3F5MePyr	33	0	15	15	31%
5		MeHph	39	0	14	14	27%
6		MeA3Pyr	39	0	27	27	41%
7		SPh2Cl	32	0	8	8	19%
8		G	22	0	22	22	50%
9		I	44	0	8	8	16%
10		T	27	0	22	22	45%
11		MeStBuOH	29	0	16	16	35%
12		L	28	0	8	8	21%
13	L31intact 核糖体	Nle	16	0	22	22	59%
14		MeG	6	0	42	42	88%
15		MeF	19	0	24	24	55%
16		S3F5MePyr	16	0	22	22	58%
17		MeHph	17	0	29	29	62%
18		MeA3Pyr	14	0	37	37	73%
19		SPh2Cl	14	0	11	11	44%
20		G	6	0	33	33	85%
21		I	19	0	24	24	56%
22		T	11	0	31	31	73%
23		MeStBuOH	11	0	23	23	68%
24		L	12	0	22	22	65%

[0548] 实验4.fMet作为起始氨基酸放置，多种氨基酸作为第二个字母放置

[0549] 实验4的概述

[0550] 使用实施例2中纯化的L31short核糖体和L31intact核糖体，核糖体合成了具有代

表第二个字母的不同氨基酸的13个肽，以证实在许多肽的核糖体合成中显示L31short核糖体的有利翻译特性。

[0551] 具体而言，核糖体合成了以下氨基酸序列(SEQ ID NO:39)的具有代表第二个字母(X)的不同氨基酸的13个肽。在本文中，X是Nle、MeG、MeF、S3F5MePyr、Pic(2)、MeHph、MeA3Pyr、SPh2Cl、G、I、T、MeStBuOH或L。

[0552] fMet:X:MeF:I:I:G:MeF:Bdp4AMF:I:I:P:I:G(SEQ ID NO:39)

[0553] 除了额外使用Pic(2)-tRNAGlu(CUG)作为处理第二个字母的氨酰基-tRNA外，按照实施例10的实验2的方法进行实验。使用LC-MS对靶标分子(TM)和副产物进行定量。观察到的主要副产物是1iRT和2iRT。

[0554] 翻译条件

[0555] 按照实施例10中实验2的翻译条件，不同之处在于去掉起始氨酰-tRNA(化合物AAtR-3)，并且加入0.03μM MetRS、0.6μM甲硫氨酰tRNA甲酰基转移酶、0.25mM甲硫氨酸和0.1mM叶酸。

[0556] 分析概述

[0557] 根据实施例9的方法进行分析。

[0558] 结果

[0559] 如表14所示，与使用L31intact核糖体时相比，使用L31short核糖体时，13个序列中的12个中翻译的TM量增加了1.2倍至2倍，并且在所有13个序列中，与使用L31intact核糖体时相比，使用L31short核糖体时iRT的百分比降低。

[0560] [表14]

[0561]

序号	核糖体	代表第二个字母的氨基酸	TM 浓度 [nM]	1iRT 浓度 [nM]	2iRT 浓度 [nM]	总 iRT 浓度 [nM]	iRT 百分比
1	L31short 核糖体	Nle	298	0	0	0	0%
2		MeG	153	0	0	0	0%
3		MeF	302	0	0	0	0%
4		S3F5MePyr	374	0	0	0	0%
5		Pic2	115	0	0	0	0%
6		MeHph	260	0	0	0	0%
7		MeA3Pyr	318	0	0	0	0%
8		SPh2Cl	298	0	0	0	0%
9		G	265	0	0	0	0%
10		I	290	0	0	0	0%
11		T	287	0	0	0	0%
12		MeStBuOH	278	0	0	0	0%
13		L	243	0	0	0	0%
14	L31intact 核糖体	Nle	148	0	0	0	0%
15		MeG	96	0	61	61	39%
16		MeF	219	0	35	35	14%
17		S3F5MePyr	222	0	32	32	12%
18		Pic2	115	0	91	91	44%
19		MeHph	216	0	49	49	19%
20		MeA3Pyr	274	0	51	51	16%
21		SPh2Cl	183	0	27	27	13%
22		G	155	0	43	43	22%
23		I	192	0	33	33	15%
24		T	189	0	31	31	14%
25		MeStBuOH	187	0	64	64	25%
26		L	194	0	26	26	12%

[0562] 实验5.AcbzMeCStBu作为起始氨基酸放置,Thr作为代表第二个字母的氨基酸放置,多种氨基酸作为第三个字母放置

[0563] 实验5的概述

[0564] 使用实施例15中纯化的L31short核糖体和L31intact核糖体,核糖体合成了具有代表第三个字母的不同氨基酸的14个肽,以证实在许多肽的核糖体合成中显示L31short核糖体的有利翻译特性。

[0565] 具体而言,核糖体合成了以下氨基酸序列(SEQ ID NO:40)的具有代表第三个字母(X)的不同氨基酸的14个肽。在本文中,X是Nle、MeF、S3F5MePyr、Pic(2)、MeHph、MeA3Pyr、SPh2Cl、G、I、P、T、MeStBuOH、dA或L。

[0566] AcbzMeCStBu:T:X:I:I:G:MeF:Bdp4AMF:I:I:P:I:G(SEQ ID NO:40)

[0567] 模板mRNA序列mR-3(SEQ ID NO:28)与氨酰-tRNA、Nle-tRNAGlu(CUG)、MePhe-tRNAGlu(CUG)、S3F5MePyr-tRNAGlu(CUG)、Pic(2)-tRNAGlu(CUG)、MeHph-tRNAGlu(CUG)、MeA3Pyr-tRNAGlu(CUG)、SPh2Cl-tRNAGlu(CUG)、Gly-tRNAGlu(CUG)、Ile-tRNAGlu(CUG)、Pro-tRNAGlu(CUG)、Thr-tRNAGlu(CUG)、MeSer(tBuOH)-tRNAGlu(CUG)、D-Ala-tRNAGlu(CUG)和Leu-tRNAGlu(CUG)中的每一种(其处理第三个字母)一起使用。使用实施例13中制备的氨酰-tRNA。

[0568] 使用LC-MS对靶标分子(TM)和副产物进行定量。观察到的主要副产物是1iRT和2iRT。

[0569] mRNA的制备

[0570] 使用RiboMAX大规模RNA生产系统T7(Promega,P1280)通过体外转录反应从模板DNA(SEQ ID NO:27)制备模板mRNA序列mR-3(SEQ ID NO:28)并使用RNeasy Mini试剂盒(Qiagen)进行纯化。

[0571] 翻译条件

[0572] 按照实施例9的翻译条件,不同之处在于添加10μM编码第三个字母的各氨酰-tRNA。

[0573] 分析概述

[0574] 根据实施例9的方法进行分析。

[0575] 结果

[0576] 如表15所示,与使用L31intact核糖体时相比,使用L31short核糖体时,所有14个序列中翻译TM的量增加了1.1倍至20.9倍,并且在所有14个序列中,与使用L31intact核糖体时相比,使用L31short核糖体时iRT的百分比降低。在表中,“1iRT+2iRT浓度”表示在色谱图中分别对应于1iRT和2iRT的峰不能分离时,从每个峰的总和定量的1iRT和2iRT的浓度总和。

[0577] [表15]

[0578]

序号	核糖体	代表第三个字母的氨基酸	TM 浓度 [nM]	1iRT 浓度 [nM]	2iRT 浓度 [nM]	1iRT+2iRT 浓度 [nM]	总 iRT 浓度 [nM]	iRT 百分比
1	L31short 核糖体	Nle	83	24	0	0	24	23%
2		MeF	131	0	41	0	41	24%
3		S3F5MePyr	90	0	0	39	39	30%
4		Pic2	104	0	40	0	40	28%
5		MeHph	108	0	50	0	50	32%
6		MeA3Pyr	78	0	52	0	52	40%
7		SPh2Cl	123	0	43	0	43	26%
8		G	96	0	0	27	27	22%
9		I	97	24	0	0	24	20%
10		P	123	25	0	0	25	17%
11		T	106	0	0	26	26	20%
12		MeStBuOH	32	0	46	0	46	59%
13		dA	136	0	37	0	37	22%
14		L	87	20	0	0	20	18%
15	L31intact 核糖体	Nle	59	67	0	0	67	53%
16		MeF	88	0	130	0	130	60%
17		S3F5MePyr	56	0	0	140	140	71%
18		Pic2	69	0	0	96	96	58%
19		MeHph	76	0	101	0	101	57%
20		MeA3Pyr	53	0	76	0	76	59%
21		SPh2Cl	59	0	0	80	80	58%
22		G	58	0	0	90	90	61%
23		I	57	60	0	0	60	51%
24		P	66	92	0	0	92	58%
25		T	65	75	0	0	75	54%
26		MeStBuOH	29	0	73	0	73	72%
27		dA	43	0	41	0	41	48%
28		L	4	66	0	0	66	94%

[0579] 实验6.fMet作为起始氨基酸放置,Thr作为代表第二个字母的氨基酸放置,多种氨基酸作为第三个字母放置

[0580] 实验6的概述

[0581] 使用实施例15中纯化的L31short核糖体和L31intact核糖体，核糖体合成了具有代表第三个字母的不同氨基酸的15个肽，以证实在许多肽的核糖体合成中显示L31short核糖体的有利翻译特性。

[0582] 具体而言，核糖体合成了以下氨基酸序列(SEQ ID NO:41)的具有代表第三个字母(X)的不同氨基酸的15个肽。在本文中，X是Nle、MeG、MeF、S3F5MePyr、Pic(2)、MeHph、MeA3Pyr、SPh2Cl、G、I、P、T、MeStBuOH、dA或L。

[0583] fMet:T:X:I:I:G:MeF:Bdp4AMF:I:I:P:I:G(SEQ ID NO:41)

[0584] 除了额外使用MeG-tRNAGlu(CUG)作为处理第三个字母的氨酰-tRNA外，按照实施例10的实验5的方法进行实验。使用LC-MS对靶标分子(TM)和副产物进行定量。观察到的主要副产物是1iRT和2iRT。

[0585] 翻译条件

[0586] 按照实施例10中实验4的条件，不同之处在于使用6.72单位/mL肌激酶、59μM EF-Ts和0.09μM GlyRS。

[0587] 分析概述

[0588] 根据实施例9的方法进行分析。

[0589] 结果

[0590] 如表16所示，与使用L31intact核糖体时相比，使用L31short核糖体时所有15个序列中翻译的TM量增加，并且使用L31intact时翻译的TM量处于检测极限或以下。在所有15个序列中，与使用L31intact核糖体时相比，使用L31short核糖体时iRT的百分比降低。在表中，“1iRT+2iRT浓度”表示在色谱图中分别对应于1iRT和2iRT的峰不能分离时，从每个峰的总和定量的1iRT和2iRT的浓度总和。

[0591] [表16]

[0592]

序号	核糖体	代表第三个字母的氨基酸	TM 浓度 [nM]	1iRT 浓度 [nM]	2iRT 浓度 [nM]	总 iRT 浓度 [nM]	iRT 百分比
1	L31short 核糖体	Nle	27	57	0	57	68%
2		MeG	42	0	89	89	68%
3		MeF	52	0	62	62	54%
4		S3F5MePyr	48	31	52	83	64%
5		Pic2	50	32	54	86	63%
6		MeHph	41	0	67	67	62%
7		MeA3Pyr	50	0	52	52	51%
8		SPh2Cl	10	27	24	51	84%
9		G	43	29	52	82	66%
10		I	18	46	0	46	72%
11		P	47	73	0	73	61%
12		T	44	43	0	43	49%
13		MeStBuOH	29	0	85	85	74%
14		dA	36	0	73	73	67%
15		L	29	56	0	56	66%
16	L31intact 核糖体	Nle	0	34	0	34	100%
17		MeG	0	0	31	31	100%
18		MeF	0	21	39	59	100%
19		S3F5MePyr	0	29	35	65	100%
20		Pic2	0	0	46	46	100%
21		MeHph	0	0	36	36	100%
22		MeA3Pyr	0	22	0	22	100%
23		SPh2Cl	0	32	41	73	100%
24		G	0	44	0	44	100%
25		I	0	58	0	58	100%
26		P	0	45	0	45	100%
27		T	0	0	65	65	100%
28		MeStBuOH	0	0	58	58	100%
29		dA	0	33	0	33	100%
30		L	0	38	20	58	100%

[0593] 实施例11.LCT-67的合成

[0594] 通过以下程序合成在其N-末端具有BdpFL的肽(LCT-67),其用作LC/MS中的标准品。

[0595] 使用负载有Fmoc-Gly-OH的2-氯三苯甲基树脂(100mg),使用Fmoc-Gly-OH,专利文献(WO 2018225864)(aa01)中描述的方法合成的Fmoc-Thr(THP)-OH,Fmoc-Ile-OH,Fmoc-Leu-OH,Fmoc-Phe-OH,Fmoc-MePhe-OH和Fmoc-Pro-OH作为Fmoc氨基酸在肽合成仪上进行肽延伸(氨基酸缩写描述于本说明书的其他部分中)。通过Fmoc方法按照肽合成方法进行肽延伸(参见例如WO 2013100132)。肽延伸后,在肽合成仪上去除N末端的Fmoc基团,然后用DCM洗涤树脂。

[0596] 将TFE/DCM(1∶1,v/v,2mL)添加到树脂中,并将其摇动一小时以从树脂上切割肽。反应完成后,通过合成柱过滤管内的溶液以除去树脂,并将树脂用TFE/DCM(1∶1,v/v,1mL)洗涤两次。合并所有萃取溶液,添加DMF(2mL),然后将其在减压下浓缩。将所得残余物溶解在NMP(1mL)中,在室温下向其中加入4,4-二氟-5,7-二甲基-4-硼酸-3a,4a-二氮杂-s-茚满(indacene)-3-丙酸N-琥珀酰亚胺酯(5mg,0.013mmol),并将其搅拌19小时。然后对反应溶液进行反相硅胶柱色谱(0.1%FA MeCN/H_2O),并在减压下浓缩含有中间体的级分。将所得残余物溶解在DCM(2mL)中的5%TFA中,并将其在室温下搅拌2小时。在减压下浓缩反应溶

液，然后将所得残余物通过反相硅胶柱色谱(0.1%FA MeCN/H_2O)纯化，以得到标题化合物(LCT-67)(13mg)。LCT-67的氨基酸序列如SEQ ID NO:223所示。

[0597] LCMS(ESI)m/z＝1751.2(M-H)-

[0598] 保留时间:0.97min(分析条件SQDFA05_02)

[0599] 实施例12.pCpA氨基酸的合成

[0600] 在本实施例中使用了以下缩写:Gly或G(甘氨酸)、Ile或I(异亮氨酸)、Leu或L(亮氨酸)、Phe或F(苯丙氨酸)、Pro或P(脯氨酸)和Thr或T(苏氨酸)。

[0601] LCMS分析条件如下表17所示。

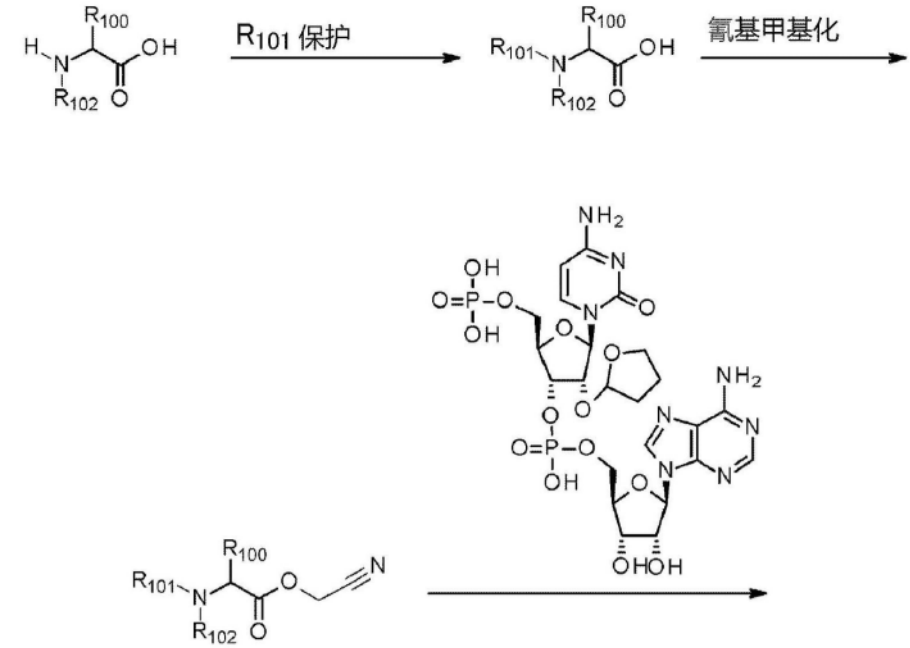
[0602] [表17]

[0603]

制备条件	仪器	柱 (I.D. x 长度)(mm)	流动相	梯度 (A/B)	流速 (mL/min)	柱温度 (°C)	波长
SQD FA05_01	Acquity UPLC/SQD	Aldrich Ascentis Express C18 1.7μm (2.1 x 50)	A) 0.1% FA, H2O B) 0.1% FA CH3CN	95/5 => 0/100 (1.0 min) => 0/100 (0.4 min)	1.0	35	210-400nm PDA 总计
SQD FA05_02	Acquity UPLC/SQD2	Aldrich Ascentis Express C18 2.7μm (2.1 x 50)	A) 0.1% FA, H2O B) 0.1% FA CH3CN	95/5 => 0/100 (1.0 min) => 0/100 (0.4 min)	0.9	35	210-400nm PDA 总计
SMD 方法 1	Shimadzu LCMS-2020 LC-20ADXR	kinetex 2.6u XB-C18 100A 2.6μm (3.0 x 50)	A) 0.1% FA, H2O B) 0.1% FA CH3CN	90/10 => 0/100 (1.2 min) => 0/100 (0.5 min)	1.5	40	190-400nm PDA 总计
SMD 方法 2	Shimadzu LCMS-2020 LC-30AD	kinetex 2.6u XB-C18 100A 2.6μm (2.1 x 50)	A) 0.05% TFA, H2O B) 0.05% TFA CH3CN	95/5 => 0/100 (1.1 min) => 0/100 (0.5 min)	1.0	40	190-400nm PDA 总计
SMD 方法 3	Shimadzu LCMS-2020 LC-20AD	Shim-Pack XR-ODS 2.2μm (3.0 x 50)	A) 0.05% TFA, H2O B) 0.05% TFA CH3CN	95/5 => 0/100 (1.1 min) => 0/100 (0.6 min)	1.2	40	190-400nm PDA 总计
SMD 方法 4	Shimadzu LCMS-2020 LC-20ADXR	CORTECS C18 2.7μm (2.1 x 50)	A) 0.1% FA, H2O B) 0.1% FA CH3CN	90/10 => 0/100 (1.2 min) => 0/100 (0.5 min)	1.0	40	190-400nm PDA 总计
SMD 方法 5	Shimadzu LCMS-2020 LC-30AD	Ascentis Express C18 2.7μm (2.1 x 50)	A) 0.05% TFA, H2O B) 0.05% TFA CH3CN	95/5 => 0/100 (1.1 min) => 0/100 (0.5 min)	1.0	40	190-400nm PDA 总计
SMD 方法 6	Shimadzu LCMS-2020 LC-20AD	Shim-Pack XR-ODS 1.7μm (2.1 x 50)	A) 0.1% FA, H2O B) 0.1% FA CH3CN	90/10 => 0/100 (1.1 min) => 0/100 (0.6 min)	1.2	40	190-400nm PDA 总计

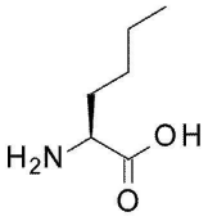
[0604] 根据以下方案合成氨酰基-pCpAs(ST04、ST08、ST11、ST14、ST17、ST20、ST23、ST28、ST31、ST32、ST33和ST34)。

[0605]



[0606] (2S)-2-氨基己酸(化合物ST01,Nle-OH)的合成

[0607]



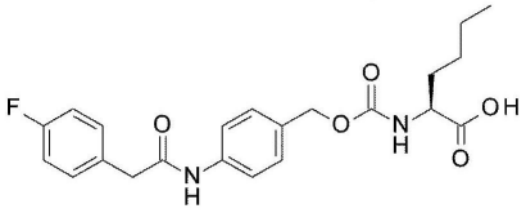
[0608] 在氮气气氛下,在室温下向通过专利文献(WO 2018225851 A1)中描述的方法合成的(2S)-2-(9H-芴基-9-基甲氧基羰基氨基)己酸(35.3mg,0.10mmol)中加入DCM(0.2mL)和H_2O(0.8mL),然后在室温下加入4-(3-苯基丙基)哌啶(0.212mL,1.00mmol),并将该混合物搅拌30分钟。将反应混合物保持静置,然后通过反相硅胶柱色谱(0.1%甲酸水溶液/0.1%甲酸-乙腈溶液)纯化水层,以得到(2S)-2-氨基己酸(化合物ST01,Nle-OH)(10mg,76%)。

[0609] LCMS(ESI)m/z=130.0(M-H)-

[0610] 保留时间:0.14min(分析条件SQDFA05_02)

[0611] (2S)-2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基氨基]己酸(化合物

ST02,F-Pnaz-Nle-OH)的合成

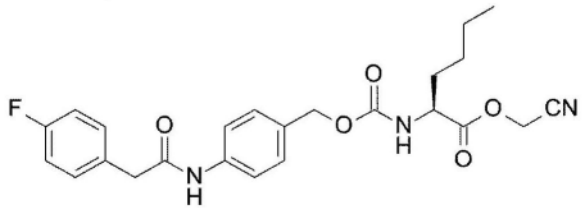
[0612] 

[0613] 在氮气气氛下,在室温下向(2S)-2-氨基己酸(化合物ST01,Nle-OH)(3.94mg,0.03mmol)和通过专利文献(WO 2018143145 A1)中描述的方法合成的(4-硝基苯基)-4-(2-(4-氟苯基)乙酰胺)碳酸苄酯(12.7mg,0.03mmol)的混合物加入DMSO(150μL)和三乙胺(9.62μL,0.07mmol)。将反应混合物置于室温下并搅拌1小时,然后通过反相硅胶柱色谱(0.1%甲酸水溶液/0.1%甲酸-乙腈溶液)纯化以得到(2S)-2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基氨基]己酸(化合物ST02,F-Pnaz-Nle-OH)(9mg,72%)。

[0614] LCMS(ESI)m/z=415.3(M-H)-

[0615] 保留时间:0.74min(分析条件SQDFA05_02)

[0616] 氰基甲基(2S)-2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基氨基]己酸酯(化合物ST03,F-Pnaz-Nle-OCH_2CN)的合成

[0617] 

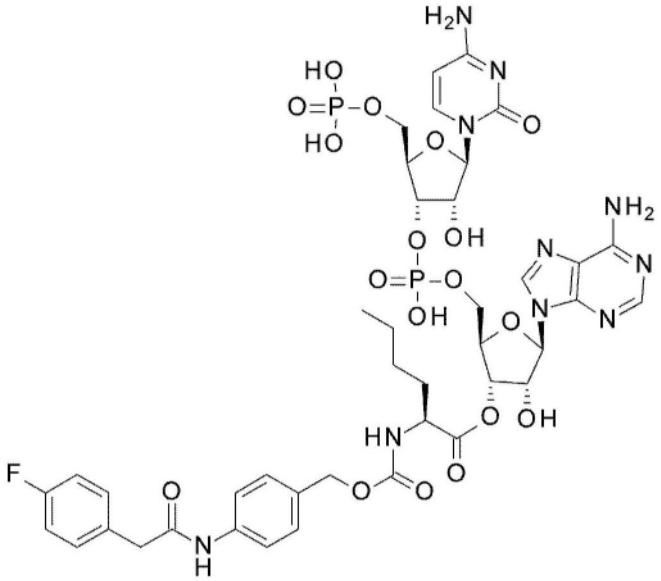
[0618] 在氮气气氛下,在室温下向(2S)-2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基氨基]己酸(化合物ST02,F-Pnaz-Nle-OH)(8.3mg,0.02mmol)的乙腈(0.1mL)溶液中依次加入2-溴乙腈(2.0μL,0.03mmol)和N-乙基-异丙基丙-2-胺(DIPEA)(7.0μL,0.04mmol)。将反应混合物在室温下搅拌16小时,然后将反应溶液浓缩,以得到氰基甲基(2S)-2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基氨基]己酸酯(化合物ST03,F-Pnaz-Nle-OCH2CN)作为粗产物。将得到的粗产物溶于乙腈(0.45mL)中,并直接用于下一步。

[0619] LCMS(ESI)m/z=454.4(M-H)-

[0620] 保留时间:0.83min(分析条件SQDFA05_02)

[0621] [(2R,3S,4R,5R)-2-[[[(2R,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧嘧啶-1-基)-4-羟基-2-(膦酰氧甲基)(phosphonooxymethyl)oxolan-3-基]氧基-羟基磷酰基]氧甲基]-5-(6-氨基嘌呤-9-基)-4-羟基oxolan-3-基](2S)-2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基氨基]己酸酯(化合物ST04,F-Pnaz-Nle-pCpA)的合成

[0622]



[0623] 将通过文献(Helv.Chim.Acta,90,297-310)中描述的方法合成的((2R,3R,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧嘧啶-1(2H)-基)-3-(((((2R,3S,4R,5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(羟基)磷酰基)氧基)-4-((四氢呋喃-2-基)氧基)四氢呋喃-2-基)磷酸二氢甲酯(22mg,0.03mmol)溶解在缓冲液A(9mL)中,向其中加入氰基甲基(2S)-2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基氨基]己酸酯(化合物ST03,F-Pnaz-Nle-OCH_2CN)在乙腈(0.45mL,0.02mmol)中的溶液,并将其在室温下搅拌90分钟。将反应溶液冷却至0℃,然后加入三氟乙酸(0.45mL)。反应液室温下搅拌30min,然后通过反相硅胶柱色谱(0.05%三氟乙酸水溶液/0.05%三氟乙酸-乙腈)纯化,以得到标题化合物(化合物ST04,F-Pnaz-Nle-pCpA)(5.7mg,27%)。

[0624] LCMS(ESI)m/z=1049.7(M-H)-

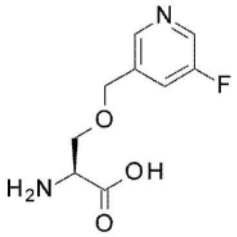
[0625] 保留时间:0.54min(分析条件SQDFA05_02)

[0626] 如下制备缓冲液A。

[0627] 将乙酸加入到N,N,N-三甲基十六烷-1-氯化铵(6.40g,20mmol)和咪唑(6.81g,100mmol)的水溶液中,以得到缓冲液A(1L),其是20mM N,N,N-三甲基十六烷-1-铵和100mM咪唑,pH 8。

[0628] <u>(2S)-2-氨基-3-[(5-氟吡啶-3-基)甲氧基]丙酸(化合物ST05,S3F5MePvr-OH)的合成</u>

[0629]



[0630] 在氮气气氛下,在室温下向通过专利文献(WO2018225864A1)中描述的方法合成的(2S)-2-(9H-芴基-9-基甲氧基羰基氨基)-3-[(5-氟吡啶-3-基)甲氧基]丙酸(43.6mg,0.10mmol)中加入DCM(0.2mL)和H_2O(0.2mL),然后在室温下加入4-(3-苯丙基)哌啶(63.5μL,0.3mmol),并将该混合物搅拌一小时。将反应混合物保持静置,并通过反相硅胶柱色谱

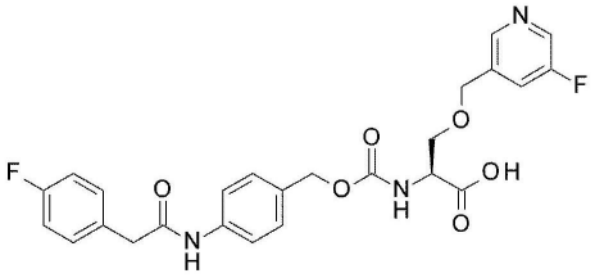
(0.1%甲酸水溶液/0.1%甲酸-乙腈溶液)纯化水层,以得到(2S)-2-氨基-3-[(5-氟吡啶-3-基)甲氧基]丙酸(化合物ST05,S3F5MePyr-OH)(14mg,66%)。

[0631] LCMS(ESI)m/z=213.0(M-H)-

[0632] 保留时间:0.19min(分析条件SQDFA0502)

[0633] (2S)-2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基氨基]-3-[(5-氟吡啶-3-基)甲氧基]丙酸(化合物ST06,F-Pnaz-S3F5MePyr-OH)的合成

[0634]



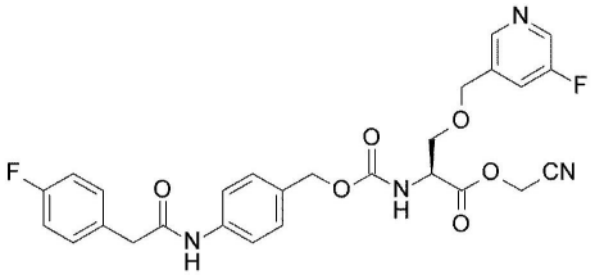
[0635] 在氮气气氛下,在室温下向(2S)-2-氨基-3-[(5-氟吡啶-3-基)甲氧基]丙酸(化合物ST05,S3F5MePyr-OH)(10.7mg,0.05mmol)和通过专利文献(WO 2018143145 A1)中所述方法合成的(4-硝基苯基)-4-(2-(4-氟苯基)乙酰胺)碳酸苄酯(21.2mg,0.05mmol)的混合物中加入DMSO(250μL)和三乙胺(16.0μL,0.12mmol)。将反应混合物置于室温下并搅拌1小时,然后通过反相硅胶柱色谱(0.1%甲酸水溶液/0.1%甲酸-乙腈溶液)纯化以得到(2S)-2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基氨基]己酸(化合物ST06,F-Pnaz-S3F5MePyr-OH)(23mg,92%)。

[0636] LCMS(ESI)m/z=498.4(M-H)-

[0637] 保留时间:0.66min(分析条件SQDFA05_02)

[0638] 氰基甲基(2S)-2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基氨基]-3-[(5-氟吡啶-3-基)甲氧基]丙酸酯(化合物ST07,F-Pnaz-S3F5MePyr-OCH_2CN)的合成

[0639]



[0640] 在氮气气氛下,在室温下向(2S-2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基氨基]-3-[(5-氟吡啶-3-基)甲氧基]丙酸(化合物ST06,F-Pnaz-S3F5MePyr-OH)(9.99mg,0.02mmol)在乙腈(0.1mL)中的溶液中依次加入2-溴乙腈(2.0μL,0.03mmol)和N-乙基-异丙基丙-2-胺(DIPEA)(7.0μL,0.04mmol)。将反应混合物在室温下搅拌16小时,然后将反应溶液浓缩,以得到氰基甲基(2S)-2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基氨基]-3-[(5-氟吡啶-3-基)甲氧基]丙酸酯(化合物ST07,F-Pnaz-S3F5MePyr-OCH_2CN)作为粗产物。将得到的粗产物溶于乙腈(0.45mL)中,并直接用于下一步骤。

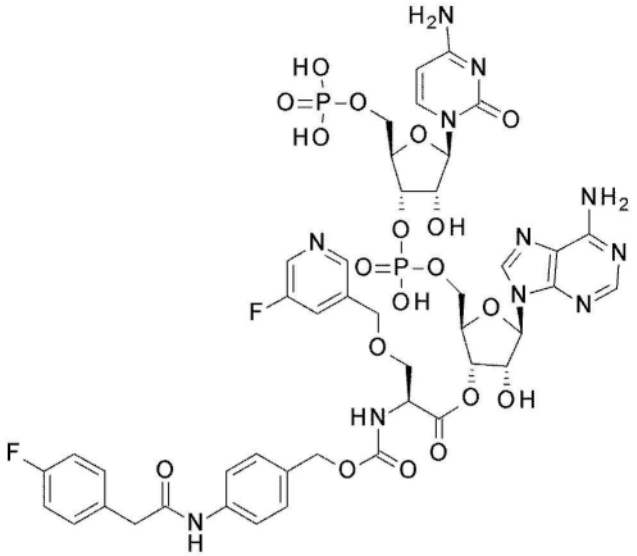
[0641] LCMS(ESI)m/z=537.3(M-H)-

[0642] 保留时间:0.74min(分析条件SQDFA05_02)

[0643] [(2R,3S,4R,5R)-2-[[[(2R,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧嘧啶-1-基)-4-羟基-2-

(膦酰氧甲基)oxolan-3-基]氧-羟基磷酰基]氧甲基]-5-(6-氨基嘌呤-9-基)-4-羟基oxolan-3-基l(2S)-2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基氨基]-3-[(5-氟吡啶-3-基)甲氧基]丙酸酯(化合物ST08,F-Pnaz-S3F5MePyr-pCpA)的合成

[0644]



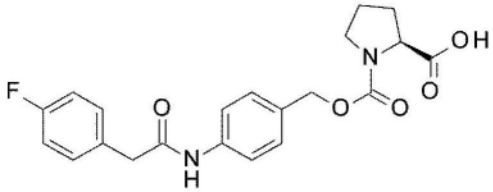
[0645] 将通过文献(Helv.Chim.Acta,90,297-310)中所述方法合成的((2R,3R,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧嘧啶-1(2H)-基)-3-(((((2R,3S,4R,5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(羟基)磷酰基)氧基)-4-((四氢呋喃-2-基)氧基)四氢呋喃-2-基)磷酸二氢甲酯(22mg,0.03mmol)溶解在缓冲液A(9mL)中,并向其中加入氰基甲基(2S)-2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基氨基]-3-[(5-氟吡啶-3-基)甲氧基]丙酸酯(化合物ST07,F-Pnaz-S3F5MePyr-OCH2CN)在乙腈(0.45mL,0.02mmol)中的溶液,并将其在室温下搅拌40分钟。将反应溶液冷却至0℃,然后加入三氟乙酸(0.45mL)。将反应溶液在0℃搅拌1小时,然后通过反相硅胶柱色谱(0.05%三氟乙酸水溶液/0.05%三氟乙酸-乙腈)纯化,以得到标题化合物(化合物ST08,F-Pnaz-S3F5MePyr-pCpA)(6.5mg,29%)。

[0646] LCMS(ESI)m/z=1132.7(M-H)-

[0647] 保留时间:0.51min(分析条件SQDFA05_02)

[0648] (2S)-1-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基]吡咯烷-2-羧酸(化合物ST09,F-Pnaz-Pro-OH)的合成

[0649]



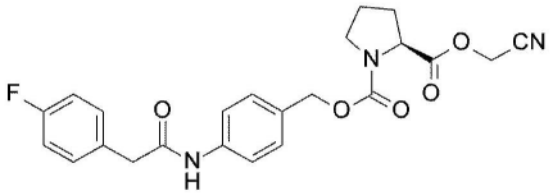
[0650] 在氮气气氛下,在室温下向L-脯氨酸(46.1mg,0.40mmol)和通过专利文献(WO 2018143145 A1)所述的方法合成的(4-硝基苯基)-4-(2-(4-氟苯基)乙酰胺碳酸苄酯(178mg,0.42mmol)的混合物中加入DMSO(2.00mL)和三乙胺(128μL,0.92mmol)。将反应混合物在室温放置并搅拌2天,然后通过反相硅胶柱色谱(0.1%甲酸水溶液/0.1%甲酸-乙腈溶液)纯化,以得到(2S)-1-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基]吡咯烷-2-

羧酸(化合物ST09,F-Pnaz-Pro-OH)(157mg,98%)。

[0651] LCMS(ESI)m/z＝399.2(M-H)-

[0652] 保留时间:0.66min(分析条件SQDFA05_02)

[0653] 2-O-(氰基甲基)1-O-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲基](2S)-吡咯烷-1,2-二羧酸酯(化合物ST10,F-Pnaz-Pro-OCH_2CN)的合成

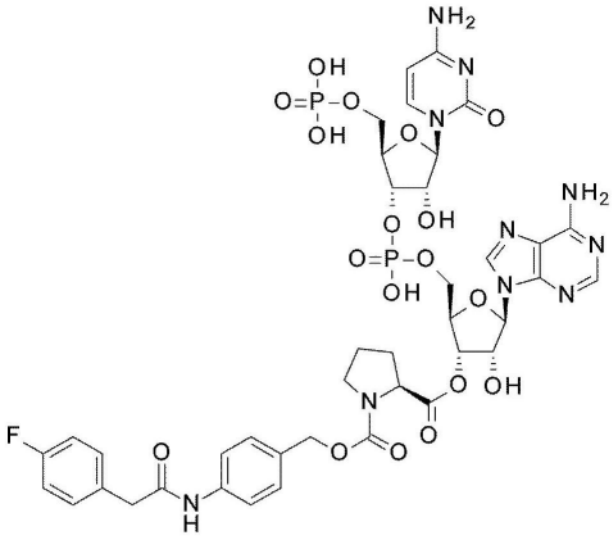
[0654] 

[0655] 在氮气气氛下,在室温下向(2S)-1-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基]吡咯烷-2-羧酸(化合物ST09,F-Pnaz-Pro-OH)(40.0mg,0.10mmol)在乙腈(0.5mL)中的溶液中依次加入2-溴乙腈(13.0μL,0.20mmol)和N-乙基-异丙基丙-2-胺(DIPEA)(35.0μL,0.20mmol)。将反应混合物在室温下搅拌16小时,然后将反应溶液浓缩,以得到2-O-(氰基甲基)1-O-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲基](2S)-吡咯烷-1,2-二羧酸酯(化合物ST10,F-Pnaz-Pro-OCH_2CN)作为粗产物。将得到的粗产物溶于乙腈(3.00mL)中,并直接用于下一步。

[0656] LCMS(ESI)m/z＝438.3(M-H)-

[0657] 保留时间:0.76min(分析条件SQDFA05_02)

[0658] 2-O-[(2R,3S,4R,5R)-2-[[[(2R,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧嘧啶-1-基)-4-羟基-2-(膦酰基氧甲基)oxolan-3-基]氧-羟基磷酰基]氧甲基]-5-(6-氨基嘌呤-9-基)-4-羟基oxolan-3-基]1-O-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲基](2S)-吡咯烷-1,2-二羧酸酯(化合物ST11,F-Pnaz-Pro-pCpA)的合成

[0659] 

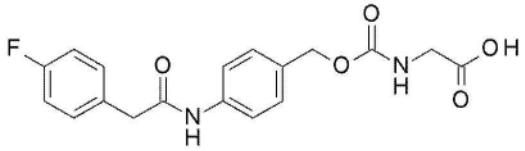
[0660] 将通过文献(Helv.Chim.Acta,90,297-310)中描述的方法合成的((2R,3R,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧嘧啶-1(2H)-基)-3-(((((2R,3S,4R,5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(羟基)磷酰基)氧基)-4-((四氢呋喃-2-基)氧基)四氢呋喃-2-基)磷酸二氢甲酯(72.2mg,0.10mmol)溶解在缓冲液A(60mL)中,向其中加入2-O-(氰基甲基)1-O-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲基](2S)-吡咯烷-1,2-二羧酸

酯(化合物ST10,F-Pnaz-Pro-OCH2CN)在乙腈(3.00mL,0.10mmol)中的溶液,并将其在室温下搅拌20小时。将反应溶液冷却至0℃,然后加入三氟乙酸(3.00mL)。将反应溶液在室温下搅拌30分钟,然后通过反相硅胶柱色谱(0.05%三氟乙酸水溶液/0.05%三氟乙酸-乙腈)纯化,以得到标题化合物(化合物ST11,F-Pnaz-Pro-pCpA)(11mg,11%)。

[0661] LCMS(ESI)m/z=1033.4(M-H)-

[0662] 保留时间:0.49min(分析条件SQDFA05_02)

[0663] 2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基氨基]乙酸(化合物ST12,F-Pnaz-Gly-OH)的合成

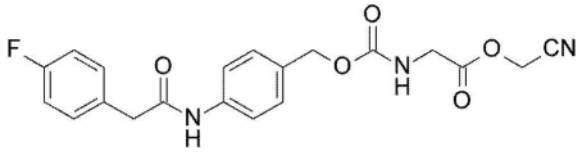
[0664] 

[0665] 在氮气气氛下,在室温下向甘氨酸(30.0mg,0.40mmol)和通过专利文献(WO 2018143145 A1)中描述的方法合成的(4-硝基苯基)-4-(2-(4-氟苯基)乙酰胺)碳酸苄酯(178mg,0.42mmol)的混合物中加入DMSO(2.00mL)和三乙胺(128μL,0.92mmol)。将反应混合物置于室温下并搅拌两天,然后通过反相硅胶柱色谱(0.1%甲酸水溶液/0.1%甲酸-乙腈溶液)纯化,以得到2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基氨基]乙酸(化合物ST12,F-Pnaz-Gly-OH)(57mg,40%)。

[0666] LCMS(ESI)m/z=359.2(M-H)-

[0667] 保留时间:0.60分钟(分析条件SQDFA05_02)

[0668] 氰基甲基2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基氨基]乙酸酯(化合物ST13,F-Pnaz-Gly-OCH_2CN)的合成

[0669] 

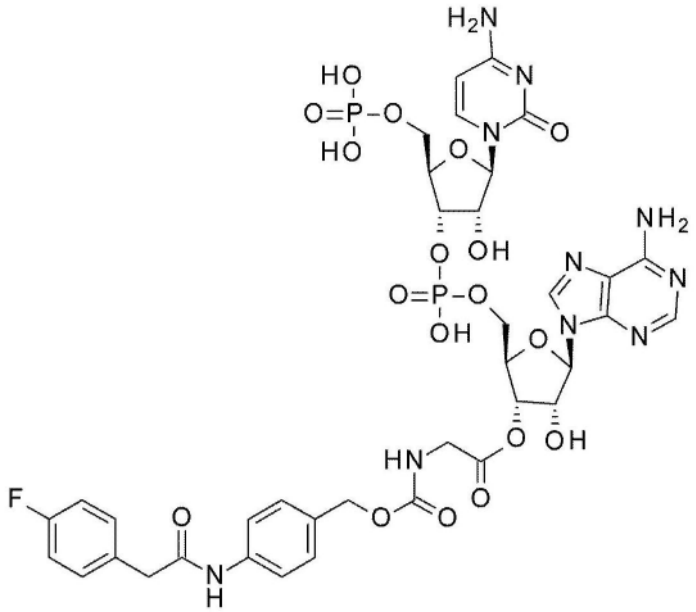
[0670] 在氮气气氛下,在室温下向2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基氨基]乙酸(化合物ST12,F-Pnaz-Gly-OH)(36.0mg,0.10mmol)在乙腈(0.5mL)中的溶液中依次加入2-溴乙腈(13.0μL,0.20mmol)和N-乙基-异丙基丙-2-胺(DIPEA)(35.0μL,0.20mmol)。将反应混合物在室温下搅拌16小时,然后将反应溶液浓缩,以得到氰基甲基2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基氨基]乙酸酯(化合物ST13,F-Pnaz-Gly-OCH2CN)作为粗产物。将得到的粗产物溶于乙腈(3.00mL)中,并直接用于下一步。

[0671] LCMS(ESI)m/z=398.3(M-H)-

[0672] 保留时间:0.69min(分析条件SQDFA05_02)

[0673] [(2R,3S,4R,5R)-2-[[[(2R,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧嘧啶-1-基)-4-羟基-2-(膦酰氧甲基)oxolan-3-基]氧基-羟基磷酰基]氧甲基]-5-(6-氨基嘌呤-9-基)-4-羟基oxolan-3-基]2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基氨基]乙酸酯(化合物ST14,F-Pnaz-Gly-pCpA)的合成

[0674]



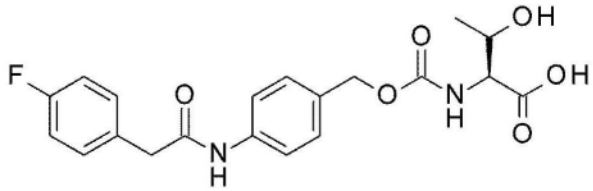
[0675] 将通过文献(Helv.Chim.Acta,90,297-310)中描述的方法合成的((2R,3R,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧嘧啶-1(2H)-基)-3-(((((2R,3S,4R,5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(羟基)磷酰基)氧基)-4-((四氢呋喃-2-基)氧基)四氢呋喃-2-基)磷酸二氢甲酯(72.2mg,0.10mmol)溶解在缓冲液A(60mL)中,向其中加入氰基甲基2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基氨基]乙酸酯(化合物ST13,F-Pnaz-Gly-OCH_2CN)在乙腈中的溶液(3.00mL,0.10mmol),并将其在室温下搅拌90分钟。将反应溶液冷却至0℃,然后加入三氟乙酸(3.00mL)。将反应溶液在室温下搅拌30分钟,然后通过反相硅胶柱色谱(0.05%三氟乙酸水溶液/0.05%三氟乙酸-乙腈)纯化,以得到标题化合物(化合物ST14,F-Pnaz-Gly-pCpA)(16mg,16%)。

[0676] LCMS(ESI)m/z=993.6(M-H)-

[0677] 保留时间:0.47min(分析条件SQDFA05_02)

[0678] (2S)-2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基氨基]-3-羟基丁酸(化合物ST15,F-Pnaz-Thr-OH)的合成

[0679]

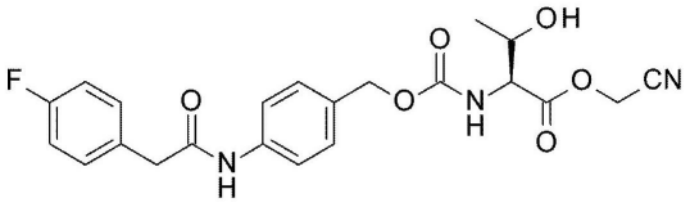


[0680] 在氮气气氛下,在室温下向L-苏氨酸(47.6mg,0.40mmol)和通过专利文献(WO 2018143145 A1)中描述的方法合成的(4-硝基苯基)-4-(2-(4-氟苯基)乙酰胺)碳酸苄酯(178mg,0.42mmol)的混合物中加入DMSO(2.00mL)和三乙胺(128μL,0.92mmol)。将反应混合物置于室温下并搅拌两天,然后通过反相硅胶柱色谱(0.1%甲酸水溶液/0.1%甲酸-乙腈溶液)纯化,以得到(2S)-2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基氨基]-3-羟基丁酸(化合物ST15,F-Pnaz-Thr-OH)(141mg,87%)。

[0681] LCMS(ESI)m/z=403.3(M-H)-

[0682] 保留时间:0.59min(分析条件SQDFA05_02)

[0683] 氰基甲基(2S)-2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基氨基]-3-羟基丁酸酯_(化合物ST16,F-Pnaz-Thr-OCH_2CN)的合成

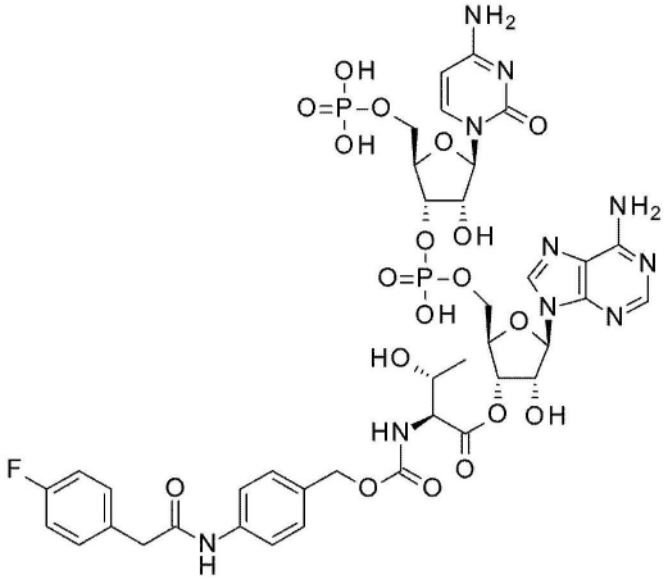
[0684] 

[0685] 在氮气气氛下,在室温下向(2S)-2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基氨基]-3-羟基丁酸(化合物ST15,F-Pnaz-Thr-OH)(81.0mg,0.20mmol)在乙腈(1.0mL)中的溶液中依次加入2-溴乙腈(268μL,4.00mmol)和N-乙基-异丙基丙-2-胺(DIPEA)(69.9μL,0.40mmol)。将反应混合物在室温下搅拌3小时,然后通过反相硅胶柱色谱(0.1%甲酸水溶液/0.1%甲酸-乙腈溶液)纯化,以得到氰基甲基(2S)-2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基氨基]-3-羟基丁酸酯(化合物ST16,F-Pnaz-Thr-OCH2CN)(72.0mg,81%)。

[0686] LCMS(ESI)m/z=442.3(M-H)-

[0687] 保留时间:0.68min(分析条件SQDFA05_02)

[0688] [(2R,3S,4R,5R)-2-[[[(2R,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧嘧啶-1-基)-4-羟基-2-(膦酰氧甲基)oxolan-3-基]氧基-羟基磷酰基]氧甲基]-5-(6-氨基嘌呤-9-基)-4-羟基oxolan-3-基](2S-3R)-2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基氨基]-3-羟基丁酸酯(化合物ST17,F-Pnaz-Thr-pCpA)的合成



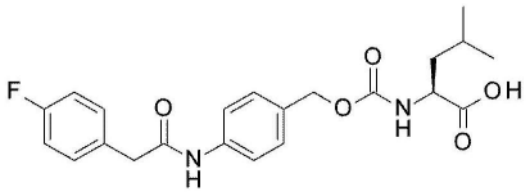
[0689] 将通过文献(Helv.Chim.Acta,90,297-310)中描述的方法合成的((2R,3R,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧嘧啶-1(2H)-基)-3-(((((2R,3S,4R,5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(羟基)磷酰基)氧基)-4-((四氢呋喃-2-基)氧基)四氢呋喃-2-基)磷酸二氢甲酯(72.2mg,0.10mmol)溶解在缓冲液A(60mL)中,向其中加入氰基甲基(2S)-2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基氨基]-3-羟基丁酸酯(化合物ST16,F-Pnaz-Thr-OCH_2CN)在乙腈(3.00mL,0.10mmol)中的溶液,并将其在室温下搅拌90分钟。将反应溶液冷却至0℃,然后加入三氟乙酸(3.00mL)。将反应溶液在室温下搅拌30分

钟，然后通过反相硅胶柱色谱(0.05％三氟乙酸水溶液/0.05％三氟乙酸-乙腈)纯化，以得到标题化合物(化合物ST17，F-Pnaz-Thr-pCpA)(7mg，7％)。

[0690] LCMS(ESI)m/z＝1037.4(M-H)-

[0691] 保留时间：0.48min(分析条件SQDFA05_02)

[0692] (2S)-2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基氨基]-4-甲基戊酸(化合物ST18，F-Pnaz-Leu-OH)的合成

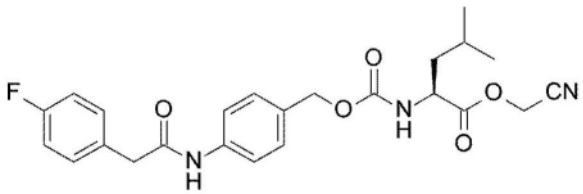
[0693] 

[0694] 在氮气气氛下，在室温下向L-亮氨酸(13.1mg，0.10mmol)和通过专利文献(WO 2018143145 A1)中描述的方法合成的(4-硝基苯基)-4-(2-(4-氟苯基)乙酰胺)碳酸苄酯(42.4mg，0.10mmol)的混合物中加入DMSO(0.50mL)和三乙胺(32.1μL，0.23mmol)。将反应混合物置于室温下并搅拌1小时，然后通过反相硅胶柱色谱(0.1％甲酸水溶液/0.1％甲酸-乙腈溶液)纯化，以得到(2S)-2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基氨基]-4-甲基戊酸(化合物ST18，F-Pnaz-Leu-OH)(28mg，67％)。

[0695] LCMS(ESI)m/z＝415.3(M-H)-

[0696] 保留时间：0.73min(分析条件SQDFA05_02)

[0697] 氰基甲基(2S)-2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基氨基]-4-甲基戊酸酯(化合物ST19，F-Pnaz-Leu-OCH_2CN)的合成

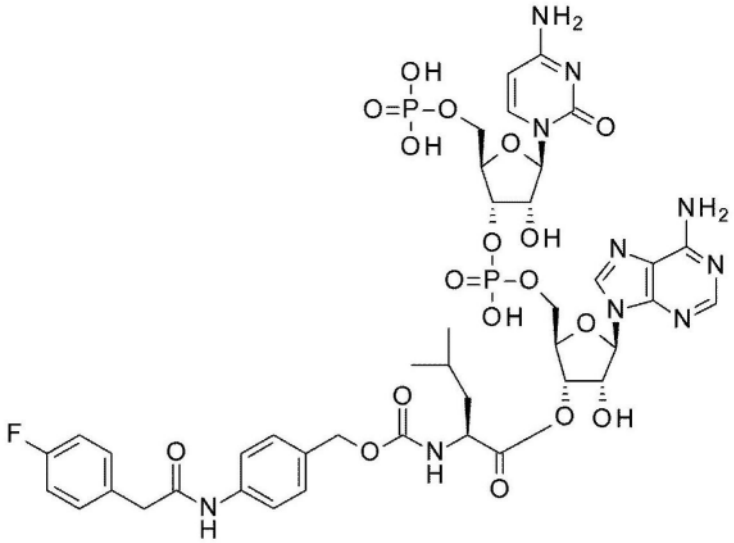
[0698] 

[0699] 在氮气气氛下，在室温下向(2S)-2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基氨基]-4-甲基戊酸(化合物ST18，F-Pnaz-Leu-OH)(12.0mg，0.03mmol)在乙腈(75.0μL)中的溶液中依次加入2-溴乙腈(20.0μL，0.30mmol)和N-乙基-异丙基丙-2-胺(DIPEA)(7.86μL，0.05mmol)。将反应混合物在室温下搅拌1小时，然后将反应溶液浓缩，以得到氰基甲基(2S)-2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基氨基]-4-甲基戊酸酯(化合物ST19，F-Pnaz-Leu-OCH_2CN)作为粗产物。将得到的粗产物溶于乙腈(0.75mL)中，并直接用于下一步。

[0700] LCMS(ESI)m/z＝454.3(M-H)-

[0701] 保留时间：0.82min(分析条件SQDFA05_02)

[0702] [(2R,3S,4R,5R)-2-[[[(2R,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧嘧啶-1-基)-4一羟基-2-(膦酰氧甲基)oxolan-3-基]氧基-羟基磷酰基]氧甲基]-5-(6-氨基嘌呤-9-基)-4-羟基oxolan-3-基](2S)-2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基氨基]-4-甲基戊酸酯(化合物ST20，F-Pnaz-Leu-pCpA)的合成

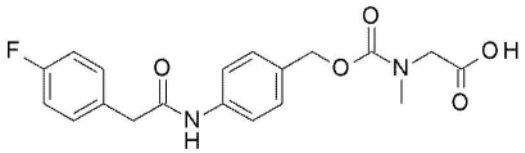


[0703] 将通过文献(Helv.Chim.Acta,90,297-310)中描述的方法合成的((2R,3R,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧嘧啶-1(2H)-基)-3-(((((2R,3S,4R,5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(羟基)磷酰基)氧基)-4-((四氢呋喃-2-基)氧基)四氢呋喃-2-基)磷酸二氢甲酯(72.2mg,0.10mmol)溶解在缓冲液A(15mL)中,向其中加入氰基甲基(2S)-2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基氨基]-4-甲基戊酸酯(化合物ST19,F-Pnaz-Leu-OCH_2CN)在乙腈(0.75mL,0.10mmol)中的溶液,并将其在室温下搅拌60分钟。将反应溶液冷却至0℃,然后加入三氟乙酸(0.75mL)。将反应溶液在室温下搅拌30分钟,然后通过反相硅胶柱色谱(0.05%三氟乙酸水溶液/0.05%三氟乙酸-乙腈)纯化,以得到标题化合物(化合物ST20,F-Pnaz-Leu-pCpA)(9.6mg,31%)。

[0704] LCMS(ESI)m/z=1049.6(M-H)-

[0705] 保留时间:0.54min(分析条件SQDFA05_02)

[0706] 2-[[4-[[244-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基-甲基氨基]乙酸(化合物ST21,F-Pnaz-MeG-OH)的合成

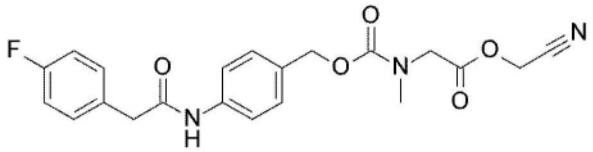
[0707] 

[0708] 在氮气气氛下,在室温下向肌氨酸(483mg,5.42mmol)和通过专利文献(WO 2018143145 A1)中描述的方法合成的(4-硝基苯基)-4-(2-(4-氟苯基)乙酰胺)苄基)碳酸酯(2.0g,4.71mmol)的混合物中加入DMSO(15mL)和三乙胺(953.4mg,9.42mmol)。将反应混合物置于室温下并搅拌16小时,然后通过反相硅胶柱色谱(0.1%甲酸水溶液/0.1%甲酸-乙腈溶液)纯化,以得到2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基-甲基氨基]乙酸(化合物ST21,F-Pnaz-MeG-OH)(1.4g,79%)。

[0709] LCMS(ESI)m/z=397(M+Na)+

[0710] 保留时间:0.88min(分析条件SMD方法3)

[0711] 氰基甲基2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基-甲基氨基]乙酸酯(化合物ST22,F-Pnaz-MeG-OCH_2CN)的合成

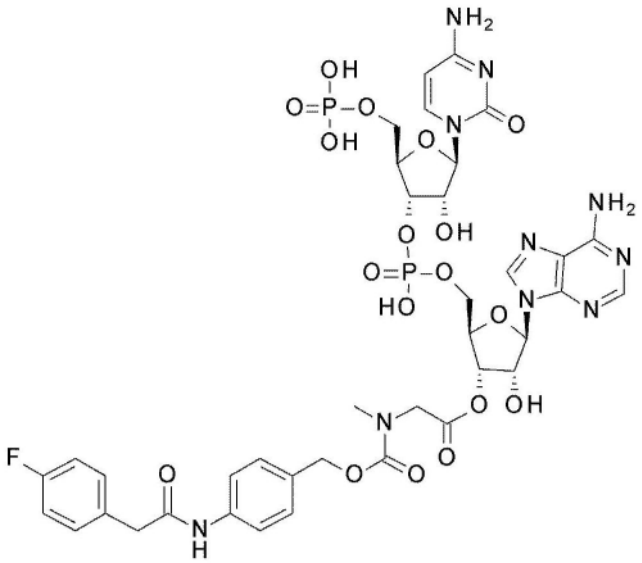
[0712] 

[0713] 在氮气气氛下,将2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基-甲基氨基]乙酸(化合物ST21,F-Pnaz-MeG-OH)(1.38g,3.69mmol)和N-乙基-异丙基丙-2-胺(DIPEA)(0.95g,7.38mmol)溶解在DMF(28mL)中,在室温下向其中加入2-溴乙腈(1.74g,14.75mmol),并将混合物在室温下搅拌16小时。将反应溶液浓缩并通过正相硅胶柱色谱(乙酸乙酯/石油醚)纯化,以得到氰基甲基2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基-甲基氨基]乙酸酯(化合物ST22,F-Pnaz-MeG-OCH2CN)(1.2g,79%)。

[0714] LCMS(ESI)m/z=436(M+Na)+

[0715] 保留时间:0.70min(分析条件SMD方法4)

[0716] [(2R,3S,4R,5R)-2-[[[(2R,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧嘧啶-1-基)-4-羟基-2-(膦酰氧甲基)oxolan-3-基]氧基-羟基磷酰基]氧甲基]-5-(6-氨基嘌呤-9-基)-4-羟基oxolan-3-基]2-[[4-[[2-(4-氟苯基))乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基-甲基氨基]乙酸酯(化合物ST23,F-Pnaz-MeG-pCpA)的合成

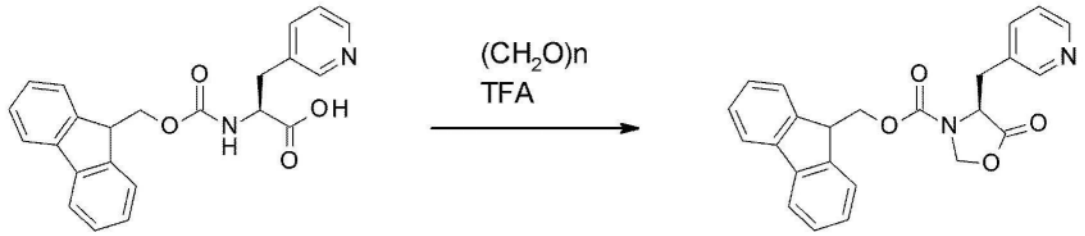


[0717] 将通过文献(Helv.Chim.Acta,90,297-310)中描述的方法合成的((2R,3R,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧基嘧啶-1(2H)-基)-3-(((((2R,3S,4R,5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(羟基)磷酰基)氧基)-4-((四氢呋喃-2-基)氧基)四氢呋喃-2-基)磷酸二氢甲酯(422mg,0.58mmol)溶解在缓冲液A(100mL)中,使用注射泵在15分钟内向其中逐滴加入氰基甲基2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基-甲氨基]乙酸酯(化合物ST22,F-Pnaz-MeG-OCH$_2$CN)(120.7mg,0.29mmol)在乙腈(5mL)中的溶液,并将其在室温下搅拌5小时。将三氟乙酸(2.3mL)加入反应溶液中,然后将反应溶液冷冻干燥,然后将其通过反相硅胶柱色谱(0.05%三氟乙酸水溶液/0.05%三氟乙酸-乙腈)纯化,以得到标题化合物(化合物ST23,F-Pnaz-MeG-pCpA)(76.7mg,26%)。

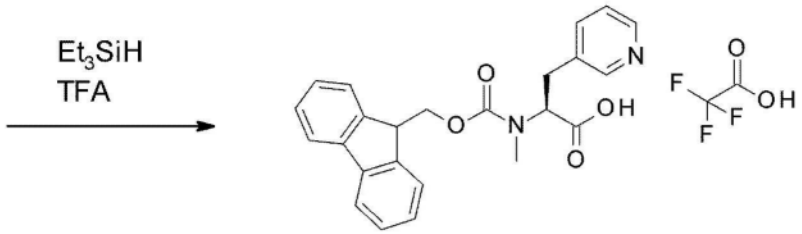
[0718] LCMS(ESI)m/z=1007.5(M-H)-

[0719] 保留时间:0.48min(分析条件SQDFA05_02)

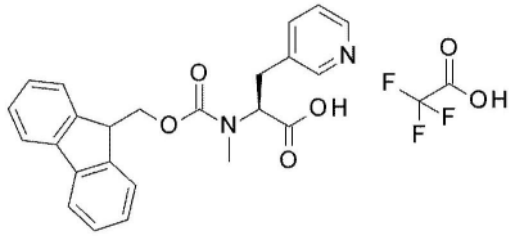
[0720] 根据以下方案合成化合物ST28的合成中间体。



[0721]



[0722] (2S)-2-[9H-芴基-9-基甲氧基羰基(甲基)氨基]-3-吡啶-3-基丙酸2,2,2-三氟乙酸(化合物ST24,Fmoc-MeA3Pyr-OH•TFA)的合成

[0723] 

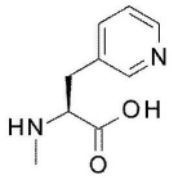
[0724] 将(2S)-2-(9H-芴基-9-基甲氧基羰基氨基)-3-吡啶-3-基丙酸(15g,38.62mmol)、三氟乙酸(27mL,348mmol)和多聚甲醛($(CH_2O)_n$)(3.48g,116mmol)悬浮在甲苯(50mL)中,并将其在氮气气氛下在40℃搅拌16小时。冷却至室温后,将反应溶液在减压下浓缩。将残余物溶解在DCM中,并用饱和碳酸氢钠水溶液洗涤。有机层用无水硫酸钠干燥,然后其进行过滤,并通过减压浓缩除去溶剂,以得到(9H-芴基-9-基)甲基(S)-5-氧-4-(吡啶-3-基甲基)噁唑烷-3-羧酸酯作为粗产物。

[0725] 将得到的粗产物(9H-芴基-9-基)(S)-5-氧-4-(吡啶-3-基甲基)噁唑烷-3-羧酸酯(18g,44.95mmol)溶解在二氯乙烷(100mL)中,并在室温下向其中加入三乙基硅烷(Et_3SiH)(47g,404.20mmol)和三氟乙酸(100mL)。将反应溶液在氮气气氛下于70℃搅拌16小时,然后在减压下浓缩。将所得残余物溶解在乙酸异丙酯中,并向其中加入叔丁基甲基醚和己烷(9:1)的混合溶液。将该溶液在室温下搅拌20分钟,然后在4℃保持静置1小时。通过过滤收集形成的沉淀物,并将其用叔丁基甲基醚和己烷(9:1)的冷却混合溶液洗涤,以得到(2S)-2-[9H-芴基-9-基甲氧基羰基(甲基)氨基]-3-吡啶-3-基丙酸2,2,2-三氟乙酸(化合物ST24,Fmoc-MeA3Pyr-OH•TFA)(19g,95%)。

[0726] LCMS(ESI)m/z=403(M+H)+

[0727] 保留时间:0.77min(分析条件SMD方法1)

[0728] (2S)-2-(甲基氨基)-3-吡啶-3-基丙酸(化合物ST25,MeA3Pyr-OH)的合成

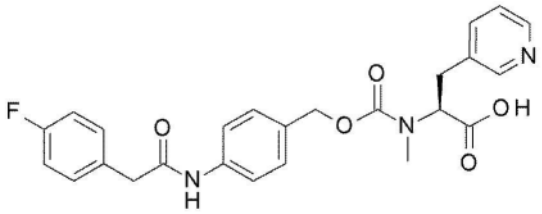
[0729] 

[0730] 在室温下将DMF(72mL)和哌啶(28.5mL)添加到(2S)-2-[9H-芴基-9-基甲氧基羰基(甲基)氨基]-3-吡啶-3-基丙酸;2,2,2-三氟乙酸(化合物ST24,Fmoc-MeA3Pyr-OH•TFA)(19g,47.21mmol)中,并将反应混合物在室温下搅拌3小时。向其中加入乙醚(140mL)和己烷(280mL),并将其在室温下再搅拌3小时。通过过滤收集形成的沉淀物以定量地得到(2S)-2-(甲基氨基)-3-吡啶-3-基丙酸(化合物ST25,MeA3Pyr-OH)(7g)。

[0731] LCMS(ESI)m/z=181(M+H)+

[0732] 保留时间:0.15min(分析条件SMD方法2)

[0733] (2S)-2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基-甲基氨基]-3-吡啶-3-基丙酸(化合物ST26,F-Pnaz-MeA3Pyr-OH)的合成

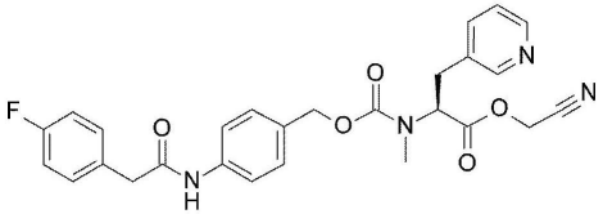
[0734] 

[0735] 在氮气气氛下,在室温下向(2S)-2-(甲基氨基)-3-吡啶-3-基丙酸(化合物ST25,MeA3Pyr-OH)(970mg,5.38mmol)和通过专利文献(WO 2018143145 A1)中描述的方法合成的(4-硝基苯基)-4-(2-(4-氟苯基)乙酰胺)碳酸苄酯(2g,4.71mmol)的混合物中加入DMSO(15mL)和三乙胺(950mg,9.43mmol)。将反应混合物在40℃搅拌16小时,然后通过反相硅胶柱色谱(0.1%甲酸水溶液/0.1%甲酸-乙腈溶液)纯化,以得到(2S)-2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基-甲基氨基]-3-吡啶-3-基丙酸(化合物ST26,F-Pnaz-MeA3Pyr-OH)(1.0g,46%)。

[0736] LCMS(ESI)m/z=466(M+H)+

[0737] 保留时间:0.98min(分析条件SMD方法3)

[0738] 氰基甲基(2S)-2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基-甲基氨基]-3-吡啶-3-基丙酸酯(化合物ST27,F-Pnaz-MeA3Pyr-OCH_2CN)的合成

[0739] 

[0740] 在氮气气氛下,将(2S)-2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基-甲基氨基]-3-吡啶-3-基丙酸(化合物ST26,F-Pnaz-MeA3Pyr-OH)(800mg,1.72mmol)和N-乙基-异丙基丙-2-胺(DIPEA)(444mg,3.44mmol)的混合物溶解在DCM(20mL)中,在室温下向其中加入2-溴乙腈(818mg,6.82mmol)中,并将混合物在室温下搅拌6小时。将反应溶液通过正相硅胶柱色谱(乙酸乙酯/石油醚)浓缩和纯化,以得到氰基甲基(2S)-2-[[4-[[2-(4-氟苯

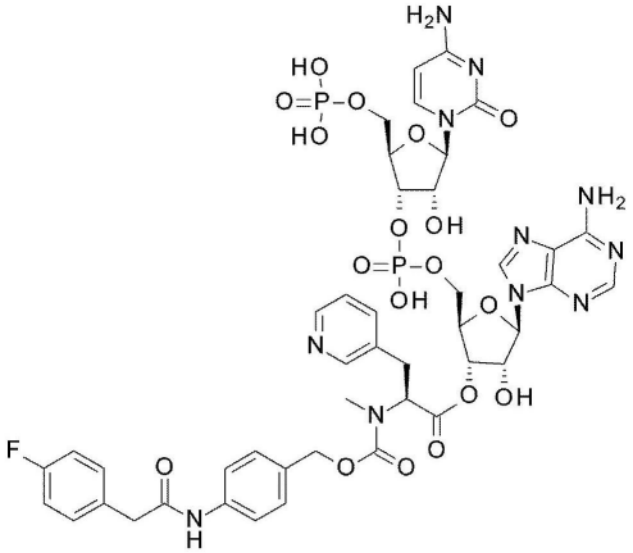
基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基-甲基氨基]-3-吡啶-3-基丙酸酯(化合物ST27,F-Pnaz-MeA3Pyr-OCH_2CN)(221mg,25%)。

[0741] LCMS(ESI)m/z=505(M+H)+

[0742] 保留时间:0.83min(分析条件SMD方法4)

[0743] [(2R,3S,4R,5R)-2-[[[(2R,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧嘧啶-1-基)-4-羟基-2-(膦酰氧甲基)oxolan-3-基]氧基-羟基磷酰基]氧甲基]-5-(6-氨基嘌呤-9-基)-4-羟基oxolan-3-基](2S)-2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基-甲基氨基]-3-吡啶-3-基丙酸酯(化合物ST28,F-Pnaz-MeA3Pyr-pCpA)的合成

[0744]



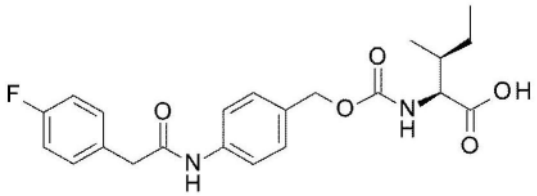
[0745] 将通过文献(Helv.Chim.Acta,90,297-310)中描述的方法合成的((2R,3R,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧嘧啶-1(2H)-基)-3-(((((2R,3S,4R,5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(羟基)磷酰基)氧)-4-((四氢呋喃-2-基)氧)四氢呋喃-2-基)磷酸二氢甲酯(400mg,0.55mmol)溶解在缓冲液A(100mL)中,使用注射泵在15分钟内向其中逐滴加入氰基甲基(2S)-2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基-甲基氨基]-3-吡啶-3-基丙酸酯(化合物ST27,F-Pnaz-MeA3Pyr-OCH_2CN)(146mg,0.29mmol)在乙腈(5mL)中的溶液,并将其在室温下搅拌1小时。向反应溶液中加入三氟乙酸(2.3mL),然后将反应溶液冷冻干燥并通过反相硅胶柱色谱(0.05%三氟乙酸水溶液/0.05%三氟乙酸-乙腈)纯化,以得到标题化合物(化合物ST28,F-Pnaz-MeA3Pyr-pCpA)(64.4mg,5%)。

[0746] LCMS(ESI)m/z=1098.5(M-H)-

[0747] 保留时间:0.39min(分析条件SQDFA05_01)

[0748] (2S,3S)-2-[[4-[[244-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基氨基]-3-甲基戊酸(化合物ST29,F-Pnaz-Ile-OH)的合成

[0749]



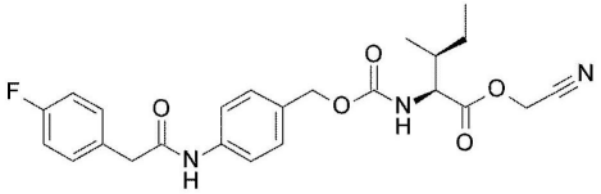
[0750] 在氮气气氛下,在室温下向L-异亮氨酸(52.5mg,0.40mmol)和通过专利文献(WO

2018143145 A1)中描述的方法合成的(4-硝基苯基)-4-(2-(4-氟苯基)乙酰胺)碳酸苄酯(178mg,0.42mmol)的混合物中加入DMSO(2mL)和三乙胺(128μL,0.92mmol)。将反应混合物在室温下搅拌2.5天,然后通过反相硅胶柱色谱(0.1%甲酸水溶液/0.1%甲酸-乙腈溶液)纯化,以得到(2S,3S)-2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基氨基]-3-甲基戊酸(化合物ST29,F-Pnaz-Ile-OH)(125mg,75%)。

[0751] LCMS(ESI)m/z=415.4(M-H)-

[0752] 保留时间:0.74min(分析条件SQDFA05_02)

[0753] 氰基甲基(2S,3S)-2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基氨基]-3-甲基戊酸酯(化合物ST30,F-Pnaz-Ile-OCH_2CN)的合成

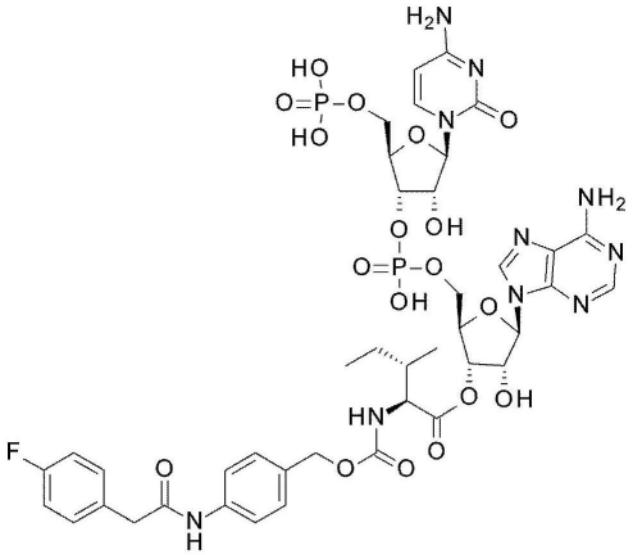
[0754] 

[0755] 在氮气气氛下,将(2S,3S)-2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基氨基]-3-甲基戊酸(化合物ST29,F-Pnaz-Ile-OH)(42mg,0.1mmol)和2-溴乙腈(13μL,0.200mmol)溶解在乙腈(500μL)中,在室温下向其中加入N-乙基-异丙基丙-2-胺(DIPEA)(35μL,0.200mmol),并将混合物在室温下搅拌16小时。浓缩反应溶液,以得到氰基甲基(2S,3S)-2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基氨基]-3-甲基戊酸酯(化合物ST30,F-Pnaz-Ile-OCH_2CN)作为粗产物。将得到的粗产物溶于乙腈(3.00mL)中,并直接用于下一步。

[0756] LCMS(ESI)m/z=454(M-H)-

[0757] 保留时间:0.83min(分析条件SQDFA05_02)

[0758] [(2R,3S,4R,5R)-2-[[[(2R,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧嘧啶-1-基)-4-羟基-2-(膦酰氧甲基)oxolan-3-基]氧-羟基磷酰基]氧甲基]-5-(6-氨基嘌呤-9-基)-4-羟基oxolan-3-基](2S,3S)-2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基氨基]-3-甲基戊酸酯(化合物ST31,F-Pnaz-Ile-pCpA)的合成

[0759] 

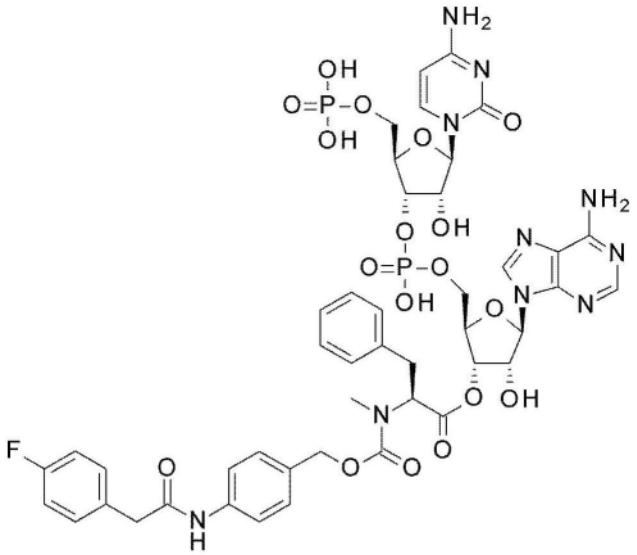
[0760] 将通过文献(Helv.Chim.Acta,90,297-310)中描述的方法合成的((2R,3R,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧嘧啶-1(2H)-yl)-3-(((((2R,3S,4R,5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(羟基)磷酰基)氧基)-4-((四氢呋喃-2-基)氧)四氢呋喃-2-基)磷酸二氢甲酯(72.2mg,0.100mmol)溶解在缓冲液A(60mL)中,向其中加入氰基甲基(2S,3S)-2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基氨基]-3-甲基戊酸酯(化合物ST30,F-Pnaz-Ile-OCH_2CN)(45.5mg,0.100mmol)在乙腈(3.00mL)中的溶液,并将其在室温下搅拌20小时。将反应溶液冷却至0℃,然后加入三氟乙酸(3.00mL)。将反应溶液在室温下搅拌30分钟,然后通过反相硅胶柱色谱(0.05%三氟乙酸水溶液/0.05%三氟乙酸-乙腈)纯化,以得到标题化合物(化合物ST31,F-Pnaz-Ile-pCpA)(12mg,11.4%)。

[0761] LCMS(ESI)m/z=1049.4(M-H)-

[0762] 保留时间:0.54min(分析条件SQDFA05_02)

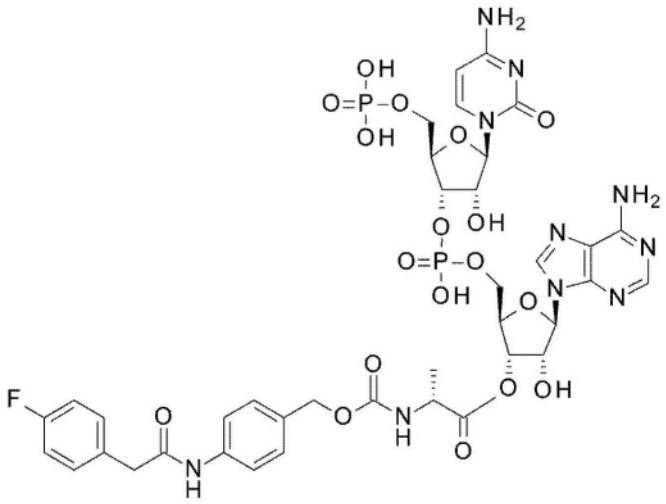
[0763] [(2R,3S,4R,5R)-2-[[[(2R,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧嘧啶-1-基)-4-羟基-2-(膦酰氧甲基)oxolan-3-基]氧-羟基磷酰基]氧甲基]-5-(6-氨基嘌呤-9-基)-4-羟基oxolan-3-基](2S)-2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基-甲基氨基]-3-苯基丙酸酯(化合物ST32,F-Pnaz-MePhe-pCpA)的合成

[0764]



[0765] 这是通过WO 2018/225864中描述的方法合成的。

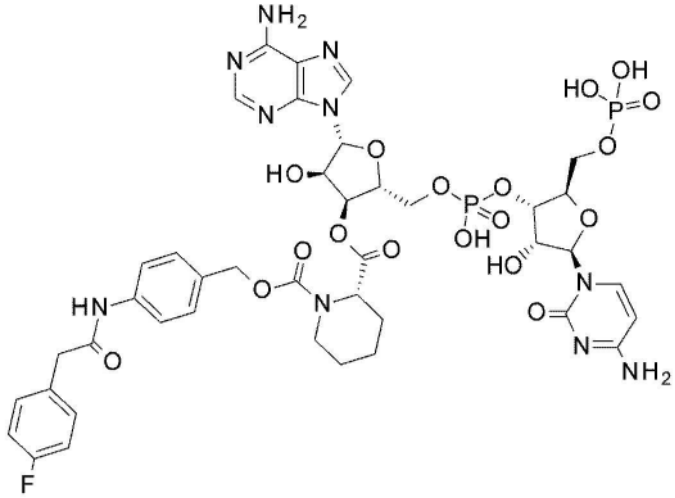
[0766] [(2R,3S,4R,5R)-2-[[[(2R,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧嘧啶-1-基)-4-羟基-2-(膦酰氧甲基)oxolan-3-基]氧基-羟基磷酰基]氧甲基]-5-(6-氨基嘌呤-9-基)-4-羟基oxolan-3-基](2R)-2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基氨基]丙酸酯(化合物ST33,F-Pnaz-D-Ala-pCpA)的合成



[0767] 这是通过WO 2018/143145中描述的方法合成的。

[0768] 2-O-[(2R,3S,4R,5R)-2-[[[(2R,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧嘧啶-1-基)-4-羟基-2-(膦酰氧甲基)oxolan-3-基]氧-羟基磷酰基]氧甲基]-5-(6-氨基嘌呤-9-基)-4-羟基oxolan-3-基]1-O-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲基](2S)-哌啶-1,2-二羧酸酯(化合物ST34,F-Pnaz-Pic(2)-pCpA)的合成

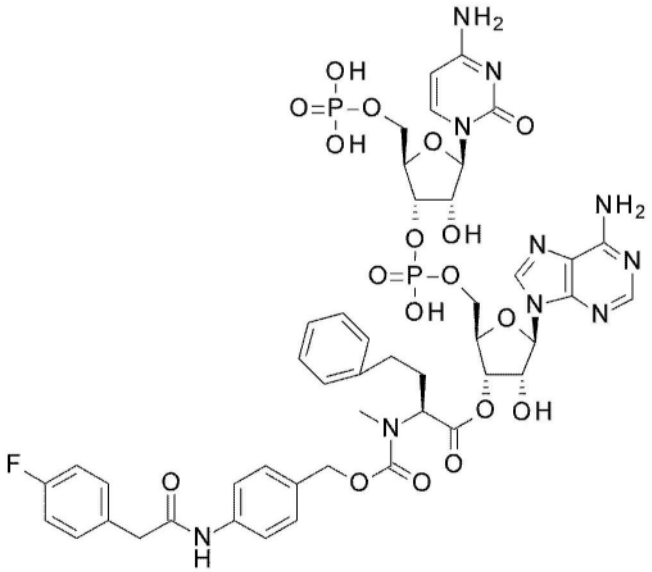
[0769]



[0770] 这是通过WO 2020/138336中描述的方法合成的。

[0771] [(2R,3S,4R,5R)-2-[[[(2R,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧嘧啶-1-基)-4-羟基-2-(膦酰氧甲基)oxolan-3-基]氧-羟基磷酰基]氧甲基]-5-(6-氨基嘌呤-9-基)-4-羟基oxolan-3-基](2S)-2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基-甲基氨基]-4-苯基丁酸酯(化合物ST35,F-Pnaz-MeHph-pCpA)的合成

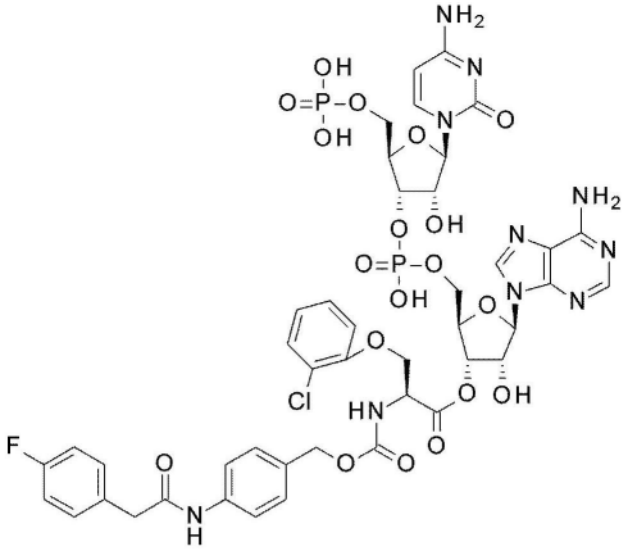
[0772]



[0773] 这是通过专利文献(WO 2020138336 A1)中描述的方法合成的。

[0774] [(2R,3S,4R,5R)-2-[[[(2R,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧嘧啶-1-基)-4-羟基-2-(膦酰氧甲基)oxolan-3-基]氧-羟基磷酰基]氧甲基]-5-(6-氨基嘌呤-9-基)-4-羟基oxolan-3-基](2S)-2-[[4-[[2-(4-氟苯基)乙酰基]氨基]苯基]甲氧基羰基-甲基氨基]-4-苯基丁酸酯(化合物ST36,F-Pnaz-SPh2Cl-pCpA)的合成

[0775]



[0776] 这是通过专利文献(WO 2020138336 A1)中描述的方法合成的。

[0777] 实施例13.氨酰-tRNA的合成

[0778] 根据实施例5的“使用氨酰-pCpA合成氨酰-tRNA:第1部分”中描述的方法合成和回收多种氨酰-tRNA。将回收的多种氨酰-tRNA分别溶解在1mM乙酸钠中。表18显示了制备的氨酰-tRNA的名称和要使用的氨酰-pCpA氨基酸之间的对应关系。

[0779] [表18]

[0780]

氨酰-tRNA的缩写	pCpA氨基酸的名称	化合物号	氨基酸缩写
Nle-tRNAGlu(CUG)	F-Pnaz-Nle-pCpA	ST04	Nle
MeGly-tRNAGlu(CUG)	F-Pnaz-MeG-pCpA	ST23	MeG
MePhe-tRNAGlu(CUG)	F-Pnaz-MePhe-pCpA	ST32	MePhe

S3F5MePyr-tRNA6lu(CUG)	F-Pnaz-S3F5MePyr-pCpA	ST08	S3F5MePyr
Pic(2)-tRNAGlu(CUG)	F-Pnaz-Pic(2)-pCpA	ST34	Pic(2)
MeHph-tRNAGlu(CUG)	F-Pnaz-MeHph-pCpA	ST35	MeHph
MeA3Pyr-tRNAGlu(CUG)	F-Pnaz-MeA3Pyr-pCpA	ST26	MeA3Pyr
SPh2Cl-tRNAGlu(CUG)	F-Pnaz-SPh2Cl-pCpA	ST36	SPh2Cl
Gly-tRNAGlu(CUG)	F-Pnaz-Gly-pCpA	ST14	Gly
Ile-tRNAGlu(CUG)	F-Pnaz-Ile-pCpA	ST31	Ile
Pro-tRNAGlu(CUG)	F-Pnaz-Pro-pCpA	ST11	Pro
Thr-tRNAGlu(CUG)	F-Pnaz-Thr-pCpA	ST15	Thr
MeSer(tBuOH)-tRNAGlu(CUG)	Pnaz-MeSer(tBuOH)-pCpA	TS01	MeSer(tBuOH)
D-Ala-tRNAGlu(CUG)	F-Pnaz-D-Ala-pCpA	ST33	D-Ala
Leu-tRNAGlu(CUG)	F-Pnaz-Leu-pCpA	ST20	Leu

[0781] 实施例14.表达变体的大肠杆菌菌株的产生

[0782] 构建了八个L31变体菌株(L31(1-27)、L31(1-32)、L31(1-37)、L31(1-42)、L31(1-47)、L31(1-52)、L31(-57)和L31(1-67)),其从N末端侧以多种长度表达L31蛋白质。根据Quick and Easy Conditional Knockout Kit(loxP/Cre)(Gene Bridges)附带的方案构建大肠杆菌菌株。

[0783] 产生具有添加的同源臂的功能盒

[0784] 根据实施例1中描述的方法构建功能盒。表19显示了每个菌株的L31表达区的长度及其用于在功能盒(用于产生菌株)上进行PCR的相应引物。

[0785] [表19]

[0786]

	L31 表达区域							
	1-27	1-32	1-37	1-42	1-47	1-52	1-57	1-67
正向引物的 SEQ IN NO	18	19	20	21	22	23	24	25
反向引物的 SEQ IN NO	26	26	26	26	26	26	26	26

[0787] L31变体菌株的产生

[0788] 根据实施例1中描述的方法产生L31变体菌株。

[0789] 实施例15.核糖体的纯化

[0790] 使用L31变体菌株、L31short菌株、L31intact菌株和W3110菌株制备核糖体

[0791] 按照实施例2中所述的方法进行菌株的培养、大肠杆菌的破碎、大肠杆菌的纯化、丁基琼脂糖纯化和超速离心纯化。对于所有菌株,遵循实施例2中L31intact菌株和L31short的相关描述。对于破碎大肠杆菌,使用实施例2中描述的Mg10裂解缓冲液。总共制备了11个核糖体-L31short核糖体、L31intact核糖体、WT核糖体和8个L31变体核糖体-使其最终浓度为10μM至20μM。

[0792] 【工业适用性】

[0793] 本发明提供了用于产生包含非天然氨基酸的肽和肽文库的方法,以及用于这些方法的改造的L31蛋白质等。使用本发明的生产方法使得能够有效翻译编码包含非天然氨基酸的肽的mRNA,以及有效产生这些肽和包含它们的文库。

<110> 中外制药株式会社
<120> 用于产生肽的方法
<130> C1-A1920P
<150> JP 2019-224297
<151> 2019-12-12
<160> 49
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 70
<212> PRT
<213> 大肠杆菌 (Escherichia coli)
<400> 1
Met Lys Lys Asp Ile His Pro Lys Tyr Glu Glu Ile Thr Ala Ser Cys
1 5 10 15
Ser Cys Gly Asn Val Met Lys Ile Arg Ser Thr Val Gly His Asp Leu
20 25 30
Asn Leu Asp Val Cys Ser Lys Cys His Pro Phe Phe Thr Gly Lys Gln
35 40 45
Arg Asp Val Ala Thr Gly Gly Arg Val Asp Arg Phe Asn Lys Arg Phe
50 55 60
Asn Ile Pro Gly Ser Lys
65 70
<210> 2
<211> 62
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
[0001] <223> L31 short
<400> 2
Met Lys Lys Asp Ile His Pro Lys Tyr Glu Glu Ile Thr Ala Ser Cys
1 5 10 15
Ser Cys Gly Asn Val Met Lys Ile Arg Ser Thr Val Gly His Asp Leu
20 25 30
Asn Leu Asp Val Cys Ser Lys Cys His Pro Phe Phe Thr Gly Lys Gln
35 40 45
Arg Asp Val Ala Thr Gly Gly Arg Val Asp Arg Phe Asn Lys
50 55 60
<210> 3
<211> 72
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工合成的核苷酸序列
<400> 3
atataaaaaa tacatattca atcattaaaa cgattgaatg gagaactttt aattaaccct 60
cactaaaggg cg 72
<210> 4
<211> 73
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工合成的核苷酸序列
<400> 4
agttattccc cggggcgatt ttcacctcgg ggaaatttta gttggcgttc taatacgact 60
cactataggg ctc 73

<210> 5
<211> 68
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）
<220>
<223> 人工合成的核苷酸序列
<400> 5
tggcaaacag cgtgatgttg ctaccggtgg ccgtgttgac cgcttcaaca agtaaccctc 60
actaaagg 68
<210> 6
<211> 68
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）
<220>
<223> 人工合成的核苷酸序列
<400> 6
caggcacaaa aaaagcgccg tgcggcgctt ttttcggaaa tccggtctta taatacgact 60
cactatag 68
<210> 7
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）
<220>
<223> 人工合成的核苷酸序列
<400> 7
guccccuucg ucuagaggcc caggacaccg cccucuuacg gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
[0002] <210> 8
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）
<220>
<223> 人工合成的核苷酸序列
<400> 8
guccccuucg ucuagaggcc caggacaccg cccucugacg gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
<210> 9
<211> 75
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）
<220>
<223> 人工合成的核苷酸序列
<400> 9
ggcggggugg agcagccugg uagcucgucg ggcucauaac ccgaagaucg ucgguucaaa 60
uccggccccc gcaac 75
<210> 10
<211> 67
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）
<220>
<223> 人工合成的核苷酸序列
<400> 10
gggguuaacuu uaauaaggag auauaaaauau gcaguuuauu auugguuuua agauuauucc 60
gauuggu 67
<210> 11
<211> 67

<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）
<220>
<223> 人工合成的核苷酸序列
<400> 11
ggguuaacuu uaauaaggag auauaaauau gacuuuuauu auugguuuua agauuauucc 60
gauuggu 67
<210> 12
<211> 85
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）
<220>
<223> 人工合成的核苷酸序列
<400> 12
gtaatacgac tcactatagg gttaacttta ataaggagat ataaatatgc agtttattat 60
tggttttaag attattccga ttggt 85
<210> 13
<211> 85
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）
<220>
<223> 人工合成的核苷酸序列
<400> 13
gtaatacgac tcactatagg gttaacttta ataaggagat ataaatatga cttttattat 60
tggttttaag attattccga ttggt 85
<210> 14
<211> 13
<212> PRT
[0003] <213> 人工序列（Artificial Sequence）
<220>
<223> iRT肽
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa = Acbz-MeCys(StBu)
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa = MeSer(tBuOH)
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> Xaa = MePhe
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Xaa = MePhe
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa = BODIPYFL-4-AMF
<400> 14
Xaa Xaa Xaa Ile Ile Gly Xaa Xaa Ile Ile Pro Ile Gly
1 5 10
<210> 15
<211> 11

<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> iRT 肽
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa = MePhe
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> Xaa = MePhe
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa = BODIPYFL-4-AMF
<400> 15
Xaa Ile Ile Gly Xaa Xaa Ile Ile Pro Ile Gly
1 5 10
<210> 16
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> iRT肽
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
[0004] <223> Xaa = Acbz-MeCys(StBu)
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> Xaa = MePhe
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Xaa = MePhe
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa = BODIPYFL-4-AMF
<400> 16
Xaa Thr Xaa Ile Ile Gly Xaa Xaa Ile Ile Pro Ile Gly
1 5 10
<210> 17
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> LCT12
<400> 17
Phe Thr Ile Phe Pro Gly Phe Ile Ile Thr Thr Gly Thr Gly Thr Gly
1 5 10 15
Ala

<210> 18

<211> 69
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）
<220>
<223> L31(1-27)的正向引物
<400> 18
gaaattactg ctagctgctc ttgcggtaac gtaatgaaaa tccgctccac ctaaccctca 60
ctaaagggc 69
<210> 19
<211> 69
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）
<220>
<223> L31(1-32) 的正向引物
<400> 19
tgctcttgcg gtaacgtaat gaaaatccgc tccaccgttg gtcatgacct gtaaccctca 60
ctaaagggc 69
<210> 20
<211> 69
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）
<220>
<223> L31(1-37) 的正向引物
<400> 20
gtaatgaaaa tccgctccac cgttggtcat gacctgaacc tcgacgtgtg ctaaccctca 60
ctaaagggc 69
<210> 21
[0005] <211> 69
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）
<220>
<223> L31(1-42) 的正向引物
<400> 21
tccaccgttg gtcatgacct gaacctcgac gtgtgcagca agtgccaccc gtaaccctca 60
ctaaagggc 69
<210> 22
<211> 69
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）
<220>
<223> L31(1-47) 的正向引物
<400> 22
gacctgaacc tcgacgtgtg cagcaagtgc cacccgttct tcactggcaa ataaccctca 60
ctaaagggc 69
<210> 23
<211> 69
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）
<220>
<223> L31(1-52) 的正向引物
<400> 23
gtgtgcagca agtgccaccc gttcttcact ggcaaacagc gtgatgttgc ttaaccctca 60
ctaaagggc 69
<210> 24
<211> 69
<212> DNA

<213> 人工序列（Artificial Sequence）
<220>
<223> L31(1-57) 的正向引物
<400> 24
cacccgttct tcactggcaa acagcgtgat gttgctaccg gtggccgtgt ttaaccctca 60
ctaaagggc 69
<210> 25
<211> 69
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）
<220>
<223> L31(1-67) 的正向引物
<400> 25
gttgctaccg gtggccgtgt tgaccgcttc aacaagcgtt tcaacatccc gtaaccctca 60
ctaaagggc 69
<210> 26
<211> 68
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）
<220>
<223> 突变L31的反向引物
<400> 26
caggcacaaa aaaagcgccg tgcggcgctt ttttcggaaa tccggtctta taatacgact 60
cactatag 68
<210> 27
<211> 85
<212> DNA
[0006] <213> 人工序列（Artificial Sequence）
<220>
<223> 人工合成的核苷酸序列
<400> 27
gtaatacgac tcactatagg gttaacttta agaaggagat atacatatga ctcagattat 60
tggttttaag attattccga ttggt 85
<210> 28
<211> 67
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）
<220>
<223> mR-1
<400> 28
gggguuaacuu uaagaaggag auauacauau gacucagauu auugguuuua agauuauucc 60
gauuggu 67
<210> 29
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列（Artificial Sequence）
<220>
<223> 人工合成的肽序列
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa = AcbzMeCStBu
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa = MeG

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> Xaa = MeF
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Xaa = MeF
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa = Bdp4AMF
<400> 29
Xaa Xaa Xaa Ile Ile Gly Xaa Xaa Ile Ile Pro Ile Gly
1 5 10
<210> 30
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列（Artificial Sequence）
<220>
<223> 人工合成的肽序列
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa = AcbzMeCStBu
<220>
<221> MISC_FEATURE
[0007] <222> (2)..(2)
<223> Xaa = MeStBuOH
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> Xaa = MeF
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Xaa = MeF
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa = Bdp4AMF
<400> 30
Xaa Xaa Xaa Ile Ile Gly Xaa Xaa Ile Ile Pro Ile Gly
1 5 10
<210> 31
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列（Artificial Sequence）
<220>
<223> 人工合成的肽序列
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa = AcbzMeCStBu
<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)
<223> Xaa = MeF
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Xaa = MeF
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa = Bdp4AMF
<400> 31
Xaa Leu Xaa Ile Ile Gly Xaa Xaa Ile Ile Pro Ile Gly
1 5 10
<210> 32
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> seq id no. 29的1iRT
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa = MeG
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa = MeF
<220>
[0008]
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa = MeF
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Xaa = Bdp4AMF
<400> 32
Xaa Xaa Ile Ile Gly Xaa Xaa Ile Ile Pro Ile Gly
1 5 10
<210> 33
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> seq id no. 30的1iRT
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa = MeStBuOH
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa = MeF
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa = MeF

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Xaa = Bdp4AMF
<400> 33
Xaa Xaa Ile Ile Gly Xaa Xaa Ile Ile Pro Ile Gly
1 5 10
<210> 34
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列（Artificial Sequence）
<220>
<223> seq id no. 31的1iRT
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa = MeF
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa = MeF
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Xaa = Bdp4AMF
<400> 34
Leu Xaa Ile Ile Gly Xaa Xaa Ile Ile Pro Ile Gly
1 5 10

[0009]

<210> 35
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列（Artificial Sequence）
<220>
<223> seq id nos. 29-31的2iRT
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa = MeF
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> Xaa = MeF
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa = Bdp4AMF
<400> 35
Xaa Ile Ile Gly Xaa Xaa Ile Ile Pro Ile Gly
1 5 10
<210> 36
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列（Artificial Sequence）
<220>
<223> 人工合成的肽序列
<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa = AcbzdMeCStBu
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa = Nle, S3F5MePyr, SPh2Cl, I, T, or L
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> Xaa = MeF
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Xaa = MeF
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa = Bdp4AMF
<400> 36
Xaa Xaa Xaa Ile Ile Gly Xaa Xaa Ile Ile Pro Ile Gly
1 5 10
<210> 37
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列（Artificial Sequence）
<220>
[0010] <223> 人工合成的肽序列
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa = AcbzMeCStBu
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa = Nle, MeG, MeF, S3F5MePyr, MeHph, MeA3Pyr, SPh2Cl, G, I, T, MeStBuOH, 或 L
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> Xaa = MeF
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Xaa = MeF
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa = Bdp4AMF
<400> 37
Xaa Xaa Xaa Ile Ile Gly Xaa Xaa Ile Ile Pro Ile Gly
1 5 10
<210> 38
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> 人工合成的肽序列
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa = AcbzCStBu
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa = Nle, MeG, MeF, S3F5MePyr, MeHph, MeA3Pyr, SPh2Cl, G, I, T, MeStBuOH, 或 L
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> Xaa = MeF
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Xaa = MeF
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa = Bdp4AMF
<400> 38
Xaa Xaa Xaa Ile Ile Gly Xaa Xaa Ile Ile Pro Ile Gly
1 5 10

[0011]

<210> 39
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列（Artificial Sequence）
<220>
<223> 人工合成的肽序列
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa = fMet
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa = Nle, MeG, MeF, S3F5MePyr, Pic(2), MeHph, MeA3Pyr, SPh2Cl, G, I, T, MeStBuOH, 或L
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> Xaa = MeF
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Xaa = MeF
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa = Bdp4AMF
<400> 39
Xaa Xaa Xaa Ile Ile Gly Xaa Xaa Ile Ile Pro Ile Gly
1 5 10

<210> 40
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列（Artificial Sequence）
<220>
<223> 人工合成的肽序列
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa = AcbzMeCStBu
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> Xaa = Nle, MeF, S3F5MePyr, Pic(2), MeHph, MeA3Pyr, SPh2Cl, G, I, P, T, MeStBuOH, dA, 或L
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Xaa = MeF
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa = Bdp4AMF
<400> 40
Xaa Thr Xaa Ile Ile Gly Xaa Xaa Ile Ile Pro Ile Gly
1 5 10

[0012]

<210> 41
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列（Artificial Sequence）
<220>
<223> 人工合成的肽序列
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa = fMet
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> Xaa = Nle, MeG, MeF, S3F5MePyr, Pic(2), MeHph, MeA3Pyr, SPh2Cl, G, I, P, T, MeStBuOH, dA, 或L
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Xaa = MeF
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa = Bdp4AMF
<400> 41
Xaa Thr Xaa Ile Ile Gly Xaa Xaa Ile Ile Pro Ile Gly
1 5 10
<210> 42
<211> 27
<212> PRT
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> L31(1-27)
<400> 42
Met Lys Lys Asp Ile His Pro Lys Tyr Glu Glu Ile Thr Ala Ser Cys
1 5 10 15
Ser Cys Gly Asn Val Met Lys Ile Arg Ser Thr
20 25
<210> 43
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> L31(1-32)
<400> 43
Met Lys Lys Asp Ile His Pro Lys Tyr Glu Glu Ile Thr Ala Ser Cys
1 5 10 15
Ser Cys Gly Asn Val Met Lys Ile Arg Ser Thr Val Gly His Asp Leu
20 25 30
<210> 44
<211> 37
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> L31(1-37)
<400> 44
Met Lys Lys Asp Ile His Pro Lys Tyr Glu Glu Ile Thr Ala Ser Cys
1 5 10 15
[0013] Ser Cys Gly Asn Val Met Lys Ile Arg Ser Thr Val Gly His Asp Leu
20 25 30
Asn Leu Asp Val Cys
35
<210> 45
<211> 42
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> L31(1-42)
<400> 45
Met Lys Lys Asp Ile His Pro Lys Tyr Glu Glu Ile Thr Ala Ser Cys
1 5 10 15
Ser Cys Gly Asn Val Met Lys Ile Arg Ser Thr Val Gly His Asp Leu
20 25 30
Asn Leu Asp Val Cys Ser Lys Cys His Pro
35 40
<210> 46
<211> 47
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> L31(1-47)
<400> 46
Met Lys Lys Asp Ile His Pro Lys Tyr Glu Glu Ile Thr Ala Ser Cys
1 5 10 15
Ser Cys Gly Asn Val Met Lys Ile Arg Ser Thr Val Gly His Asp Leu
20 25 30
Asn Leu Asp Val Cys Ser Lys Cys His Pro Phe Phe Thr Gly Lys

35 40 45
<210> 47
<211> 52
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> L31(1-52)
<400> 47
Met Lys Lys Asp Ile His Pro Lys Tyr Glu Glu Ile Thr Ala Ser Cys
1 5 10 15
Ser Cys Gly Asn Val Met Lys Ile Arg Ser Thr Val Gly His Asp Leu
20 25 30
Asn Leu Asp Val Cys Ser Lys Cys His Pro Phe Phe Thr Gly Lys Gln
35 40 45
Arg Asp Val Ala
50
<210> 48
<211> 57
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> L31(1-57)
<400> 48
[0014] Met Lys Lys Asp Ile His Pro Lys Tyr Glu Glu Ile Thr Ala Ser Cys
1 5 10 15
Ser Cys Gly Asn Val Met Lys Ile Arg Ser Thr Val Gly His Asp Leu
20 25 30
Asn Leu Asp Val Cys Ser Lys Cys His Pro Phe Phe Thr Gly Lys Gln
35 40 45
Arg Asp Val Ala Thr Gly Gly Arg Val
50 55
<210> 49
<211> 67
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> L31(1-67)
<400> 49
Met Lys Lys Asp Ile His Pro Lys Tyr Glu Glu Ile Thr Ala Ser Cys
1 5 10 15
Ser Cys Gly Asn Val Met Lys Ile Arg Ser Thr Val Gly His Asp Leu
20 25 30
Asn Leu Asp Val Cys Ser Lys Cys His Pro Phe Phe Thr Gly Lys Gln
35 40 45
Arg Asp Val Ala Thr Gly Gly Arg Val Asp Arg Phe Asn Lys Arg Phe
50 55 60
Asn Ile Pro
65

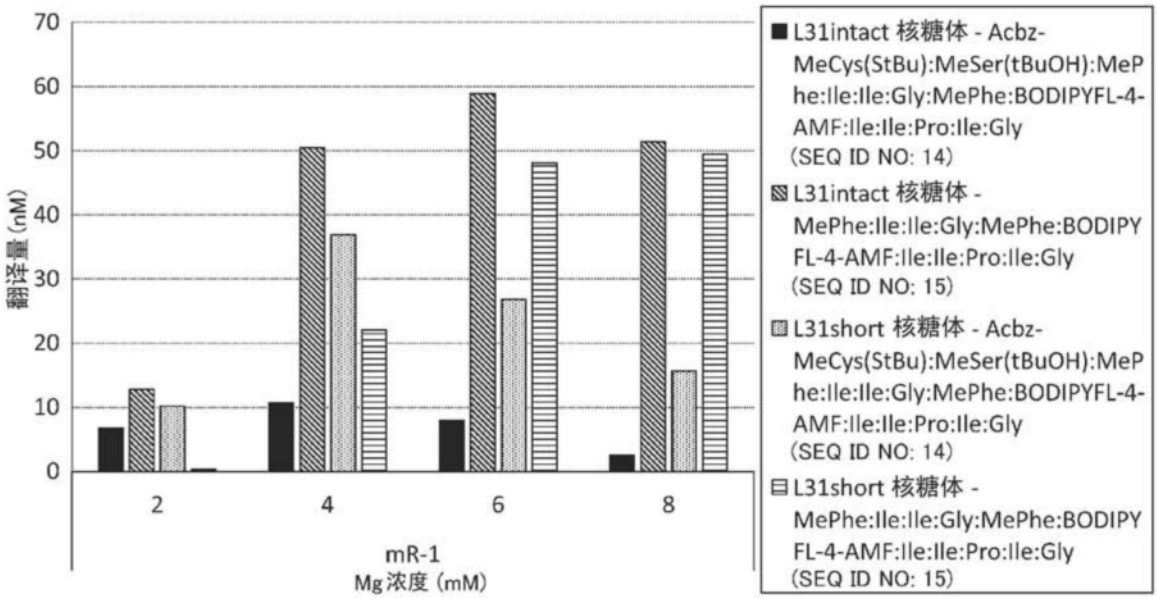

70
60
50
40
30
20
10
0
翻译量 (nM)
2
4
6
8
mR-1
Mg浓度 (mM)
L31intact 核糖体 - Acbz-MeCys(StBu):MeSer(tBuOH):MePhe:Ile:Ile:Gly:MePhe:BODIPYFL-4-AMF:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (SEQ ID NO: 14)
L31intact 核糖体 - MePhe:Ile:Ile:Gly:MePhe:BODIPYFL-4-AMF:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (SEQ ID NO: 15)
L31short 核糖体 - Acbz-MeCys(StBu):MeSer(tBuOH):MePhe:Ile:Ile:Gly:MePhe:BODIPYFL-4-AMF:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (SEQ ID NO: 14)
L31short 核糖体 - MePhe:Ile:Ile:Gly:MePhe:BODIPYFL-4-AMF:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (SEQ ID NO: 15)

图1

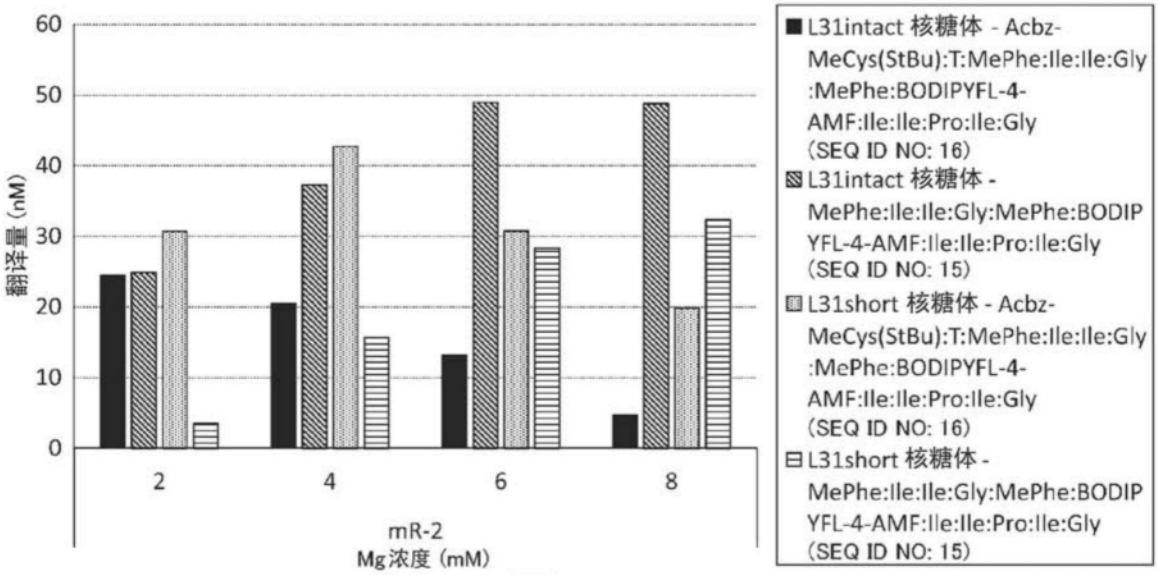

60
50
40
30
20
10
0
翻译量 (nM)
2
4
6
8
mR-2
Mg浓度 (mM)
L31intact 核糖体 - Acbz-MeCys(StBu):T:MePhe:Ile:Ile:Gly:MePhe:BODIPYFL-4-AMF:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (SEQ ID NO: 16)
L31intact 核糖体 - MePhe:Ile:Ile:Gly:MePhe:BODIPYFL-4-AMF:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (SEQ ID NO: 15)
L31short 核糖体 - Acbz-MeCys(StBu):T:MePhe:Ile:Ile:Gly:MePhe:BODIPYFL-4-AMF:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (SEQ ID NO: 16)
L31short 核糖体 - MePhe:Ile:Ile:Gly:MePhe:BODIPYFL-4-AMF:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (SEQ ID NO: 15)

图2

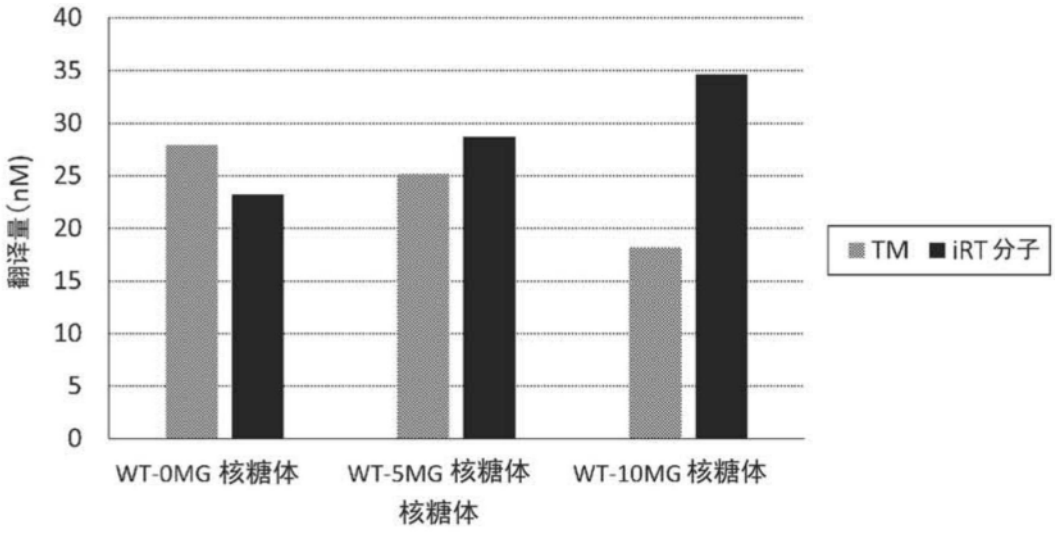

40
35
30
25
20
15
10
5
0
翻译量(nM)
TM
iRT分子
WT-0MG 核糖体
WT-5MG 核糖体
WT-10MG 核糖体
核糖体

图3