基因密码子扩展技术在生物医药领域的应用

黄雨佳[†], 王永[†], 胡利明, 秦学文, 刘涛^{*}

北京大学医学部药学院, 天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100191

[†]同等贡献

^{*}通讯作者, E-mail: taoliupku@pku.edu.cn

收稿日期: 2018-03-29; 接受日期: 2018-05-09; 网络版发表日期: 2018-09-13

国家重点基础研究发展规划(编号: 2016YFA0201400)、国家自然科学基金(编号: 21778005)和中组部青年千人计划资助

摘要 自然界中的蛋白质由20种天然氨基酸组成。基因密码子扩展技术利用无义密码子实现蛋白质中非编码蛋白氨基酸(noncanonical amino acids, ncAAs)的定点引入。目前, 该技术已在不同物种的体蛋白中插入了几百种ncAAs, 其应用已经扩展到了生物医药领域。一方面其定点引入生物正交化学官能团的特性, 已在蛋白与抗体制药领域展现出了强大的应用潜力; 另一方面其实现对无义密码子的通读调控, 拓展了由合成生物学引领的新一代生物医药的应用和发展。本文重点总结了近年来基于基因密码子扩展技术所开发的各类蛋白抗体及细胞类药物, 以及基于这一技术引领的新型生物治疗方法。

关键词 基因密码子扩展, 非天然氨基酸, 生物医药, 抗体药物偶联, 活病毒疫苗

1 引言

蛋白质不仅是细胞的组成成分之一, 而且是细胞功能的主要执行者。自然界中, 蛋白质由20种天然氨基酸组成, 这些天然氨基酸不同的理化性质在赋予蛋白质结构和功能多样性的同时也限制了其特性的进一步开发, 尽管翻译后修饰(post-translational modification, PTM)比如磷酸化、糖基化等以及结合辅酶因子能在一定程度上弥补这一缺陷, 但调控类型仍然较为局限。于是科学家在这20种天然氨基酸的基础上创造出能够编码蛋白质的新型非天然氨基酸结构, 极大地丰富了蛋白质的结构与功能。

过去几十年中, 科学家们为了在蛋白质中加入非编码蛋白氨基酸(noncanonical amino acids, ncAAs)做

了各种尝试, 基因密码子扩展技术便是其中之一, 其能实现在生物体内任意目标蛋白的特定位点引入ncAAs。这一技术是利用与宿主细胞生物正交的氨酰-tRNA合成酶(aminoacyl-tRNA synthetase, aaRS)/tRNA对, 利用终止密码子(UAG/UGA/UAA)编码ncAAs (图1(a))。

目前, 人们不仅开发出了不同体系的正交aaRS/tRNA对, 如来源于大肠杆菌的TyrRS体系^[1]、LeuRS体系^[2], 来源于古菌的Mm/MbPylRS体系^[3]、MjTyrRS体系^[4]等, 也通过正负筛选, 针对不同结构的ncAAs筛选出了不同的正交aaRS/tRNA对, 用于在不同细胞、不同物种中的基因密码子扩展。人们针对这一技术也从不同角度进行了优化, 如针对这一体系本身的改良。近期, 研究人员利用噬菌体依赖的连续进化(phage-assisted continuous evolution, PACE)和噬菌体依赖的

引用格式: Huang Y, Wang Y, Hu L, Qin X, Liu T. Therapeutic applications of genetic code expansion. *Sci Sin Chem*, 2018, 48: 1394–1406, doi: 10.1360/N032018-00071

图1 基因密码子扩展技术原理及应用(网络版彩图)

Figure 1 Principles and applications of genetic code expansion technique (color online).

非连续进化(phage-assisted noncontinuous evolution, PANCE)技术对aaRS/tRNA对进行了多突变位点的大规模筛选^[5,6], 得到了比此前传统筛选方法更优的基因密码子扩展系统; 通过对tRNA和aaRS表达体系的优化可实现含ncAAs蛋白的高表达^[7,8], 甚至实现了一个蛋白上30个ncAAs的同时插入^[9]. 也有针对ncAAs本身性质的优化, 如过表达氨基酸转运酶, 提高氨基酸的细胞吸收等^[10], 此外, 人们还针对细胞中其他如延伸因子^[11]、释放因子^[7,12,13]、核糖体^[14]、无义介导的mRNA降解(nonsense-mediated mRNA decay, NMD)^[15]等进行了改造。

利用这些方法, 人们已实现在大肠杆菌^[4]、酵母^[1]、哺乳动物细胞^[16]、干细胞^[17]、线虫^[18]、果蝇^[19]、斑马鱼^[20]、小鼠^[20-22]甚至是植物^[23]等多个物种中的ncAAs插入. 基因密码子扩展技术已成为研究体内外蛋白结构、功能的一大利器(图1(b)). 通过引入具有反应活性的ncAAs实现蛋白间自发、定点的共价交联, 捕捉活细胞内蛋白-蛋白相互作用^[24,25]; 带荧光的ncAAs和与ncAAs反应的荧光素也在细胞标记和细胞成像方面获得了广泛应用^[26-28]. 通过在蛋白中加入特定条件保护的氨基酸, 人们实现了光调控的蛋白功能^[29,30]和小分子的激酶调控^[31]等; 同时, 基因密码子扩展技术还被用于PTM的研究, 如磷酸化丝氨酸^[32,33]、磷酸化苏氨酸^[34]、磷酸化酪氨酸^[10]、乙酰化赖氨酸^[35]等(图1(b)).

由于基因密码子扩展技术具有能在蛋白质几乎任意位点插入ncAAs的特性, 这一技术在生物医药领域中具有巨大优势, 本文将从不同方面讨论目前基因密码子扩展技术在生物医药领域的应用。

2 抗体药物偶联

抗体-药物偶联(antibody-drug conjugates, ADC)结合了单克隆抗体优异的抗原识别能力和化学毒性小分子高效的癌细胞杀伤能力, 实现了对肿瘤等细胞的精准杀伤, 有效地提高了肿瘤药物治疗窗浓度范围^[36], 因而在疾病治疗, 尤其在肿瘤领域方面具有广泛应用. 传统的ADC药物通过亲电反应基团对抗体上的半胱氨酸或赖氨酸残基进行修饰^[37], 然而由于抗体上赖氨酸数量较多, 无法实现均一的化学修饰, 半胱氨酸的生成会破坏二硫键、影响抗体整体性, 因此传统方法

产生的ADC药物往往是不稳定的混合物。药物分子连接的不均一性还会影响其免疫原性、稳定性及活体半衰期^[38]。为解决这一问题, 研究人员通过基因工程技术实现抗体-药物的定点偶联。如引入反应性的半胱氨酸、将抗体分子的某位点突变为半胱氨酸等^[39]。但这些人引入的半胱氨酸会与培养基中含巯基的物质形成二硫键进而影响偶联, 同时二硫键某些加成产物的不稳定性也限制了其在临床上的使用^[40]。另外, 通过酶法也能实现定点偶联, 如使用甲酰甘氨酸生成酶(formylglycine-generating enzyme, FGE)识别包含引入半胱氨酸的五肽序列并将半胱氨酸氧化成甲酰甘氨酸^[41,42]或利用谷氨酰胺转移酶使谷氨酰胺的 γ -酰胺基团与伯胺生成异肽链^[43]。但是该方法对抗体上可修饰位点的选择较为有限, 可能会影响进一步的优化。目前已有4种ADC药物经美国FDA批准上市^[44]。虽然处于临床实验阶段的ADC药物较多, 但疗效、安全性尚未达到上市标准, 急需寻找新的设计思路。

随着基因密码子扩展技术日趋成熟, 通过引入含特殊官能团如酮基、叠氮基、炔基、双键等的ncAAs与药物分子发生高效、高特异性的定点偶联成为了一种生产ADC药物的新方法(图2)^[37,45]。如Schultz课题

组^[46]将两个4-乙酰基-L-苯丙氨酸(pAcF)通过aaRS/tRNA_{UAG}^{pAcF}定点引入曲妥珠单抗(trastuzumab), 与药物分子上的含氧基团形成肟键, 偶联效率高、血浆清除率低且抗肿瘤效果佳。为提高插入pAcF的抗体产量, 美国Ambrx公司的Tian等^[47]将aaRS/tRNA整合到中国仓鼠卵巢癌细胞(Chinese hamster ovary, CHO)基因组中, 含ncAAs的抗体产量提升至超过1 g/L, 可用于治疗转移性癌症、前列腺癌和肾癌。北京大学Zhou课题组^[48]在利妥昔单抗(rituximab)上定点插入含叠氮基的ncAA, 通过与双功能连接臂 DIBO-DOTA发生高效的click 反应, 进而标记放射性核素⁶⁴Cu或¹⁷⁷Lu, 具有广泛临床应用前景。近日, Chin课题组^[49]又开发了一套插入新型环丙烯赖氨酸类似物(CypK)的基因密码子扩展体系并将其运用于曲妥珠单抗与药物的偶联之中, 该方法生产的抗体与四嗪连接的微管抑制剂MMAE发生快速的D-A反应, 在血清中稳定存在, 高效杀灭乳腺癌细胞。除抗肿瘤外, 这一技术也被用于抑制性免疫治疗, 例如, Schultz课题组^[50]利用基因密码子扩展技术将达沙替尼这一免疫抑制剂定点偶联到表达有CXCR4单克隆抗体上, 避免了达沙替尼选择性不足所产生的副反应, 用于治疗T细胞介导的免疫紊乱。

Antibody-drug conjugate

图2 基因密码子扩展技术中常用的偶联反应类型(网络版彩图)

Figure 2 Coupling reactions used in genetic code expansion technique (color online).

3 双特异性抗体

双特异性抗体(bispecific antibody, BsAb)具有两种特异性抗原结合位点,可同时与靶细胞、功能细胞(通常为T细胞)相互作用,增强其对靶细胞的杀伤作用,尤其是休眠及免疫原性较低的肿瘤细胞,产生1+1>2的治疗效果. 目前已有两个双特异性抗体被批准上市. Trion公司在2009年开发的卡妥索单抗注射剂(Catumaxomab, Removab)由欧盟批准用于治疗EpCAM阳性肿瘤所引起的恶性腹水,但鼠源抗体的高免疫原性限制了其临床应用. 2014年由安进公司研发的双特异性靶向抗体博纳吐单抗(Blinatumomab, Blincyto)获得FDA批准上市,同时结合T细胞的CD3受体和淋巴瘤细胞的CD19受体,用于治疗费城染色体阴性(Ph-)的复发性或难治性B细胞急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)^[51]. 生产双特异性抗体的传统方法很大程度上依赖于基因融合,因而限制了两个配体结合域的空间排列^[52,53]. 基因工程改造的片段分子,尤其是基于单链可变片段(single-chain variable fragment, scFv)也常常表达量较低、容易聚集、半衰期较短^[54]. 人们通过半合成方法生产的双特异性抗体中也会掺杂结构复杂且不稳定的异构产品,导致非特

异性T细胞活化、细胞因子释放等^[55].

通过定点引入ncAAs、用聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)连接臂的正交反应偶联两配体结构域的方法生产双特异性抗体(图3),可实现抗体间距离和空间位置的调控,解决了以上问题. Schultz课题组^[54]将pAcF这一ncAA定点引入抗HER2和抗CD3抗体的Fab区,通过两步反应连接这两者形成双特异性抗体,在体外实验中,只需皮摩尔级浓度的抗体即可实现效应细胞介导的细胞杀伤. 也可利用pAcF通过形成抗HER2抗体-寡核苷酸复合物进而形成一定构象的同型多聚物,甚至是异源多聚抗体,募集T细胞,杀伤高表达HER2的乳腺癌细胞或高表达CD20的淋巴瘤细胞,具有较高的生物活性和稳定性^[56].

通过合适的连接臂,抗体也可直接与癌细胞受体小分子抑制剂进行偶联,该方法首次应用于激素难治性前列腺癌,并显著提高了病人1~2年生存期^[57,58]. Schultz课题组^[59]通过基因密码子扩展技术将pAcF定点引入CD3抗体的fab区,这种靶向前列腺特异性膜抗原(prostate-specific membrane antigen, PSMA)的双特异性抗体展现出了对高表达PSMA肾癌细胞的体外杀伤活性,对正常肾细胞则没有杀伤;在啮齿异种移植动物模型中,该ADC具有优良的抗癌活性,对移植人类

图3 基因密码子扩展技术在抗体相关领域的应用(网络版彩图)

Figure 3 Applications of genetic code expansion related to antibodies (color online).

单核细胞免疫缺陷的小鼠没有毒性; 另外, 其半衰期也明显延长。同样是通过该方法实现的抗体-叶酸偶联, 在靶向癌细胞上高表达的叶酸受体时也具有不错的活性^[60]。Young课题组^[61]利用含四嗪的ncAA与含环辛炔的ncAA发生的快速D-A反应, 开发出了一种识别成熟B细胞抗原的双特异性抗体(BiFab-BCMA), 能高效且特异性地募集T细胞, 杀伤恶性多发性骨髓瘤细胞, 解决了多发性骨髓瘤对传统药物的耐药性问题。Cao等^[62]在通过基因密码子扩展技术研究不同形式、不同价的双特异性抗体的Fc段是否会影响抗肿瘤作用时, 发现不同价的结构并不会严重影响抗肿瘤的活性, 而含有Fc结构的抗体会显著增加抗肿瘤的活性, 这一发现也增加了对不同结构对双特异性抗体活性影响的理解。

4 免疫治疗

目前, 免疫治疗已成为替代传统放化疗用于治疗肿瘤的新型治疗方式, 其中一种是利用嵌合抗原受体T细胞疗法(chimeric antigen receptor T-cell immunotherapy, CAR-T)治疗肿瘤, 这种方法通过让T细胞表达含有胞外结合结构域和胞内信号传导结构域的嵌合受体, 在CAR-T细胞回输病人体内后, 实现对肿瘤细胞的高效识别和杀伤。尽管CAR-T技术有诸多优势, 但在实际应用过程中, 其不可控性也导致了一系列问题, 如T细胞的快速增殖导致的细胞因子释放综合症(cytokine release syndrome, CRS), 对某些B细胞表面抗原的识别导致长效B细胞发育不全等^[63]。因此, Young和Cao课题组^[64,65]利用基因密码子扩展技术实现了对CAR-T活化过程的调控(switchable CAR-T, sCAR-T)(图2)。这一方法中的sCAR-T细胞识别的是异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC), 以及定点标记有FITC的肿瘤靶向抗体。通过控制FITC标记的“开关”分子有无, 实现CAR-T细胞对肿瘤识别活性的调节。此外, 针对同一个sCAR-T细胞, 其开关分子也可以进行替换, 不仅能对靶向CD19调控, 也可以对靶向CD22等其他B细胞表面抗原进行调控, 且这种促CAR-T细胞增殖的效果及其治疗相关毒性都与“开关”分子的剂量严格相关, 只需停止给予“开关”分子, 即可停止CAR-T细胞的杀伤。因此通过此种方法控制的CAR-T细胞在保证其强效杀伤肿瘤作用的同时也提高了安全性, 是

一种具有普适性的免疫治疗调控方法^[65]。

5 病毒载体

腺相关病毒(Adeno-Associated Viruses, AAV)是细小病毒科的一种单链线状DNA病毒, 其衣壳为二十面体结构, 由3种蛋白vp1, vp2, vp3构成。这种病毒可以感染人类和灵长类动物, 但需借助腺病毒、疱疹病毒等辅助病毒才能完成增殖周期^[66]。随着相关研究的深入, 人们尝试将AAV用于基因治疗领域, 这得益于其作为基因递送载体的诸多优点: (i) 无明显致病性; (ii) 宿主范围广, 可感染分裂和非分裂细胞; (iii) 转导效率高, 表达稳定持久。尽管AAV已成为当前基因治疗中最常用的递送载体, 但其有限的基因包装容量, 靶向性不足和免疫原性等问题仍限制着它在治疗领域发挥更大的作用。

因此, 针对AAV的这些缺陷, 研究者们设法对其进行了各种改造, 其中运用基因密码子扩展技术对衣壳蛋白进行修饰的策略显得卓有成效(图4), 为提高AAV的稳定性并降低其免疫原性, Zhou课题组^[67]在其衣壳蛋白vp1上定点插入含有叠氮基团的非天然氨基酸NAEK, 然后利用正交反应将含有炔基修饰的PEG分子特异性地连接至该位点, 在PEG分子的保护下, AAV在血清中的稳定性提高了约两倍^[67]。另一方面, 为增强AAV的靶向性, Zhou^[68]和Chatterjee课题组^[69]分别成功利用基因密码子扩展技术和正交化策略将靶向整合素的环肽cRGD位点特异性地连接到AAV的衣壳蛋白上, 使该病毒选择性地靶向高表达整合素的细胞, 显著提高了疗效。最近, Chatterjee课题组^[70]还成功改造出一种光调控的AAV, 实现了对其感染性的精确控制^[70]。他们对AAV2用于识别宿主细胞表面特定分子HSPG的vp1蛋白上关键的精氨酸残基(R585, R588)进行改造, 利用基因密码子扩展技术将其替换为具有光活性的赖氨酸衍生物NBK, 这种ncAA由于对赖氨酸正电荷的屏蔽作用及其空间位阻效应干扰了AAV2与宿主细胞表面分子HSPG的相互作用, 从而抑制了AAV2的感染性。当人为地用紫外光对病毒进行短暂照射后, NBK就会脱去光保护基团, 转变为正常的赖氨酸, 使病毒恢复感染性。研究者相信利用该方法将会使得AAV这一基因治疗载体具有更强的时空可调控性。

图4 基因密码子扩展技术在病毒载体中的应用(网络版彩图)

Figure 4 Applications of genetic code expansion related to viral vectors (color online).

6 延长治疗性蛋白半衰期

PEG常被用于延长治疗性蛋白的稳定性和血浆半衰期以提高药物的效率、降低给药频率^[71]。然而,由于通过传统方法随机修饰的PEG常常会影响治疗性蛋白的结合位点,并且这种混杂的随机修饰也影响药物的有效性和安全性,因而利用基因密码子扩展技术定点修饰治疗性蛋白具有相当的优势。人生长激素(human growth hormone, hGH)是一种用来治疗病理性矮小及其他生长相关异常疾病的药用蛋白,但是,由于hGH的极短的活体半衰期,病人需要每天大剂量注射。Ambrx公司Cho等^[72]通过基因密码子扩展技术在hGH上定点修饰PEG,极大增强了hGH的体内半衰期,不仅增强了其效力,而且降低了注射频率。同时,和传统非定点PEG连接方法相比,该方法也具有更好的生产可控性和批次间重复性^[72]。后来,Zhou课题组^[73]在这一工

作基础上进行了优化,实现了hGH上多个位点的PEG标记,得到的生长激素在不影响生物功能的同时,比单PEG标记的更为稳定,具有更佳的药代动力学性质和免疫原性。这一技术不仅被用于hGH,还被用于干扰素- $\alpha 2b$ (IFN- $\alpha 2b$)^[74]、成纤维细胞生长因子21 (fibroblast growth factor 21, FGF21)^[75]、白介素-4 (interleukin-4, IL-4)^[76]以及AAV^[67]等。

除了在治疗性蛋白上进行定点修饰外,一些ncAAs本身也能提高蛋白的稳定性,例如,通过引入芳基异硫氰酸酯,在肌球蛋白中形成分子内交联,可显著提升其热稳定性^[77]。长链硫醇^[78]及氟苯丙氨酸^[79]等的引入也能提高蛋白稳定性。

7 生物疫苗

基因密码子扩展技术另一治疗应用是生产治疗性

疫苗, 硝基基团一直以来作为半抗原被使用, 临床实验也表明以双硝基苯基团修饰的癌症细胞蛋白可用作黑色素瘤的治疗性疫苗^[80]. 将含对硝基苯丙氨酸的ncAAs定点插入啮齿类动物的肿瘤坏死因子 α (murine tumor necrosis factor- α , mTNF- α)中, 得到了全新的CD4⁺ T细胞识别抗原决定簇, 打破自身免疫耐受, 产生同源抗体应答^[80], 在没有佐剂的情况下即可对突变及原始的mTNF- α 产生较强且长时间的抗体反应^[81]. 这一实验结果仅在将mTNF- α 第11, 42或86位氨基酸突变为对硝基苯丙氨酸时产生, 对第19或第104位氨基酸突变则没有出现类似结果, 表明打破免疫耐受所需突变氨基酸环境的重要性^[82]. 对其他蛋白如对视黄醇结合蛋白、Kexin样前转化酶枯草杆菌蛋白酶(proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, PCSK9)引入硝基酪氨酸、磺胺基酪氨酸等吸电子ncAAs也可以打破免疫耐受, 因而可以推测, 体内蛋白若发生异常PTM, 可能会打破自身免疫耐受, 进而引发自身免疫病^[82].

流感、埃博拉、AIDS等流行病严重危害着人类的健康. 随着免疫学的进步和发展, 人们逐渐尝试用免疫学的手段和方法来解决这些问题. 目前最常用的是失活或减毒的疫苗, 但是完全失活或减毒的疫苗往往会存在产率或是效力降低的问题^[83]. 最近基因密码子扩展技术也被用来制造ncAAs依赖的基因改造生物(genetically modified organism, GMO). 这一技术的要点在于, GMO中的关键蛋白仅能在ncAAs存在时正常表达, 此时生物正常生长; 而在不人为给予特定ncAAs的条件下, 这些活病原体无法合成全长的关键蛋白, 在宿主细胞中逐渐死亡(图5). 该技术如今被用于复制缺陷型活病毒疫苗, 如在流感病毒-A、HIV-1及肝炎D型病毒基因组中引入终止密码子, 这种病毒只有在人工改造过的含正交aaRS/tRNA对的细胞中及在人为提供特定ncAAs的情况下才能复制存活, 在正常细胞中无法复制^[84,85]. 由于NP蛋白在流感病毒感染过程中发挥着重要作用^[86,87], 因此Zhou课题组^[84]选择在病毒NP蛋白上插入终止密码子, 得到含提前终止密码子(pre-mature termination codon, PTC)的病毒, 通过引入多个终止密码子的方法降低其逃逸率, 即突变位点重新突变回有义密码子的概率, 这一PTC病毒比现有商业化生产的疫苗具有更强的免疫原性, 可引起更强、更广泛的免疫反应. 同样, 利用基因密码子技术在HIV病毒

的编码关键蛋白Gag上插入终止密码子, 通过ncAAs插入与否控制病毒是否复制, 可得到活HIV病毒疫苗^[88].

此外, 基因密码子扩展技术也被用于人造营养缺陷型菌株的生产^[89], 在细菌关键蛋白的功能部位引入终止密码子, 使该细菌严格依赖特定ncAA的插入进行复制. 利用在与细菌存活密切相关的TEM-1 β -内酰胺酶上引入终止密码子可降低其逃逸率, 提高其生物相容性^[90]. 但与病毒相比, 细菌是一个完整生命体, 拥有完整的转录、复制、翻译体系, 不需依赖即可自主编码蛋白, 可利用各种突变机制来逃逸无义密码子突变, 因此在细菌的关键蛋白中选择特定的突变位点来插入ncAAs通常会有较高逃逸率^[91], 要求其不影响原野生型蛋白的功能也是一件极为困难的事, 这些是该技术中的应用中的限制, 也是目前亟待解决的问题之一. Isaacs课题组^[89]利用释放因子1和TAG密码子敲除的大肠杆菌菌株, 通过在22个必需基因上引入多个TAG密码子, 降低了逃逸率; Church课题组^[92]则结合计算设计和非天然氨基酸的筛选技术, 获得了代谢依赖于非天然氨基酸的大肠杆菌, 这一菌株不能利用天然氨基酸存活, 并且能避免由突变和水平基因转移造成的逃逸. Schultz课题组^[93]利用关键蛋白上的赖氨酸的乙酰化、去乙酰化等PTM过程, 在这些赖氨酸位点引入终止密码子, 当没有乙酰化赖氨酸(AcK)存在时, 该蛋白无法合成, 只有当在蛋白上引入AcK, 该蛋白在去乙酰化酶的作用下从非活性状态转化为活性状态, 同时基于芽孢杆菌RNA聚合酶的自杀开关也进一步降低了逃逸率, 这一技术为发展活细菌疫苗提供了可能^[93]. 近期, Schultz课题组^[94]通过将多种病原菌必需的甘露糖-6-磷酸异构酶(metalloenzyme mannose-6-phosphate isomerase, ManA)锌离子配位残基上的264位组氨酸替换为3-甲基-L组氨酸(MeH)实现了在对生物体基因改造最小情况下的ncAA依赖型菌株. 由于将无义密码子UAG/UAA逃逸突变回组氨酸密码子(CAU/CAC)需要两个间隔单点突变, 而将这一位点的组氨酸突变为其他氨基酸时, 突变菌株依旧无法生长, 因而这一方法获得的MeH严格依赖型菌株具有极低的逃逸率. 此外, 他们课题组还利用某些单体无活性而二聚体具有活性的蛋白制造依赖于ncAA形成蛋白-蛋白连接的复制缺陷型细菌^[95]. 这些工作都为活细菌疫苗提供了发展方向.

图5 基因密码子扩展技术制作活病毒/细菌疫苗的原理及应用(网络版彩图)

Figure 5 Principles and applications of genetically modified organisms (GMO) (color online).

8 其他应用

CRISPR/Cas9是当下最热门的基因编辑工具之一,它源自细菌和古菌中的适应性免疫系统,通过聚集规则间隔短回文重复(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)靶向异源的核酸,进而利用Cas蛋白进行特异性剪切.通过对Cas9蛋白活性的调控,可以实现在不同时间、空间条件下的精准基因编辑. Deiters课题组^[96]在Cas9蛋白上插入光保护的赖氨酸(PCK),阻挡Cas9蛋白与gRNA的相互作用,当保护基在紫外光照射下脱除时, Cas9-gRNA恢复相互作用,实现了光调控的基因编辑,通过限制有活性的Cas9蛋白存在的时间和空间,可降低CRISPR/Cas9技术的脱靶效应.

另外,基因密码子扩展技术也被用于多肽类的天然产物的生物合成,这些天然产物往往具有很强的生物活性,如抗细菌^[97]、抗真菌^[98,99]、抗病毒^[100,101]等,基因密码子扩展技术将新的化学结构引入这些天然产

物之中. 2011年, Schultz课题组^[102]将基因密码子扩展技术运用于环肽,通过多轮进化筛选,得到了HIV蛋白酶的高效环肽抑制剂;通过在尼生素不同位点中引入ncAAs,改变尼生素原来的大环结构^[103].人们在装订肽^[104,105]、套索肽^[106-108]及其他翻译后修饰的肽^[105]中也实现了ncAAs的插入.近期, Schultz, Young和Luzhetskyy课题组将ncAAs成功运用于高硫青蒿素^[109]和肉桂霉素^[110].

9 展望

基因密码子扩展技术发展得非常迅速,本文只总结了其在生物医药领域中部分最新、最有影响力的工作.相对于其他在蛋白中引入新的化学基团的方法而言,基因密码子扩展具有诸多方面的优势:(i)这一方法理论上可以实现蛋白上任意位点的ncAAs的插入修饰,而且利用不同密码子及不同aaRS/tRNA对,可实现同一蛋白上多个指定位点不同ncAAs的插入,并且

随着合成生物学领域密码子改造以及基因组合成的发展, 未来可能实现由更多种不同氨基酸组成的蛋白和生物; (ii) 该方法实现了在活细胞、活生物体内 ncAAs 的引入, 有望拓展基于合成生物学的生物医药发展; (iii) 该技术与其他蛋白定点修饰的技术是相互兼容的, 可以实现多种蛋白修饰的组合. 然而尽管这一技术在一些菌株和细胞系中的运用已相对成熟, 但要将这一技术运用到更多物种中, 如致病菌, 活体多细胞生物等依旧具有挑战性. 研究人员已在这方面做了一系列努力, 如Chin课题组^[11]实现了在小鼠胚胎干细胞中ncAAs的引入, Chatterjee课题组^[8]利用杆状病毒载体, 极大地提高了ncAAs在小鼠脑组织中的插入效率, Wang和Li课题组^[20]已实现正交aaRS/tRNA对基因在斑马鱼和小鼠基因组中的引入, 是目前实现基因密码子扩展最复杂的活体生物. 另外, 虽然已有前文中

所提及的优化方法, 想要更大程度地提高ncAAs的插入效率, 尤其是在真核体系中的插入效率也是一大难点. 目前已有近两百种ncAAs被成功运用于基因密码子扩展技术, 但这些氨基酸大多基于某些特定的母核结构开发, 如何在生物体中引入更多样化学结构的ncAAs, 如何开发出更多正交aaRS/tRNA对, 如何让生物自身合成多种结构的ncAAs也将是未来该技术发展的一大方向, 因为只有更多化学结构的出现, 才能开发出该技术在不同领域中更多样的应用.

不可否认的是, 自从2001年第一个ncAA通过基因密码子扩展技术引入大肠杆菌以来^[4], 这一方法已经在生物医药领域中实现了诸多应用, 具有巨大的开发应用前景. 相信未来通过基因密码子扩展技术改造生物大分子、改造生物, 将为人类开发出更多同时具备高效性和安全性的生物疗法.

参考文献

- 1 Chin JW, Ashton Cropp T, Anderson JC, Mukherji M, Zhang Z, Schultz PG. *Science*, 2003, 301: 964–967
- 2 Soma A, Himeno H. *Nucleic Acids Res*, 1998, 26: 4374–4381
- 3 Srinivasan G, James CM, Krzycki JA. *Science*, 2002, 296: 1459–1462
- 4 Wang L, Brock A, Herberich B, Schultz PG. *Science*, 2001, 292: 498–500
- 5 Bryson DI, Fan C, Guo LT, Miller C, Söll D, Liu DR. *Nat Chem Biol*, 2017, 13: 1253–1260
- 6 Suzuki T, Miller C, Guo LT, Ho JML, Bryson DI, Wang YS, Liu DR, Soll D. *Nat Chem Biol*, 2017, 13: 1261–1266
- 7 Schmied WH, Elsässer SJ, Uttamapinant C, Chin JW. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 15577–15583
- 8 Zheng Y, Lewis Jr. TL, Igo P, Polleux F, Chatterjee A. *ACS Synth Biol*, 2017, 6: 13–18
- 9 Amiram M, Haimovich AD, Fan C, Wang YS, Aerni HR, Ntai I, Moonan DW, Ma NJ, Rovner AJ, Hong SH, Kelleher NL, Goodman AL, Jewett MC, Söll D, Rinehart J, Isaacs FJ. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 1272–1279
- 10 Luo X, Fu G, Wang RE, Zhu X, Zambaldo C, Liu R, Liu T, Lyu X, Du J, Xuan W, Yao A, Reed SA, Kang M, Zhang Y, Guo H, Huang C, Yang PY, Wilson IA, Schultz PG, Wang F. *Nat Chem Biol*, 2017, 13: 845–849
- 11 Schrader JM, Chapman SJ, Uhlenbeck OC. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 5215–5220
- 12 Johnson DBF, Xu J, Shen Z, Takimoto JK, Schultz MD, Schmitz RJ, Xiang Z, Ecker JR, Briggs SP, Wang L. *Nat Chem Biol*, 2011, 7: 779–786
- 13 Johnson DBF, Wang C, Xu J, Schultz MD, Schmitz RJ, Ecker JR, Wang L. *ACS Chem Biol*, 2012, 7: 1337–1344
- 14 Wang K, Neumann H, Peak-Chew SY, Chin JW. *Nat Biotechnol*, 2007, 25: 770–777
- 15 Wang Q, Wang L. *J Am Chem Soc*, 2008, 130: 6066–6067
- 16 Wang W, Takimoto JK, Louie GV, Baiga TJ, Noel JP, Lee KF, Slesinger PA, Wang L. *Nat Neurosci*, 2007, 10: 1063–1072
- 17 Shen B, Xiang Z, Miller B, Louie G, Wang W, Noel JP, Gage FH, Wang L. *Stem Cells*, 2011, 29: 1231–1240
- 18 Parrish AR, She X, Xiang Z, Coin I, Shen Z, Briggs SP, Dillin A, Wang L. *ACS Chem Biol*, 2012, 7: 1292–1302
- 19 Bianco A, Townsley FM, Greiss S, Lang K, Chin JW. *Nat Chem Biol*, 2012, 8: 748–750
- 20 Chen Y, Ma J, Lu W, Tian M, Thauvin M, Yuan C, Volovitch M, Wang Q, Holst J, Liu M, Vriz S, Ye S, Wang L, Li D. *Cell Res*, 2017, 27: 294–297
- 21 Kang JY, Kawaguchi D, Coin I, Xiang Z, O’Leary DDM, Slesinger PA, Wang L. *Neuron*, 2013, 80: 358–370
- 22 Han S, Yang A, Lee S, Lee HW, Park CB, Park HS. *Nat Commun*, 2017, 8: 14568
- 23 Li F, Zhang H, Sun Y, Pan Y, Zhou J, Wang J. *Angew Chem Int Ed*, 2013, 52: 9700–9704

- 24 Yang B, Tang S, Ma C, Li ST, Shao GC, Dang B, DeGrado WF, Dong MQ, Wang PG, Ding S, Wang L. *Nat Commun*, 2017, 8: 2240
- 25 Yang Y, Song H, He D, Zhang S, Dai S, Lin S, Meng R, Wang C, Chen PR. *Nat Commun*, 2016, 7: 12299
- 26 Chatterjee A, Guo J, Lee HS, Schultz PG. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 12540–12543
- 27 Uttamapinant C, Howe JD, Lang K, Beránek V, Davis L, Mahesh M, Barry NP, Chin JW. *J Am Chem Soc*, 2015, 137: 4602–4605
- 28 Peng T, Hang HC. *J Am Chem Soc*, 2016, 138: 14423–14433
- 29 Tsai YH, Essig S, James JR, Lang K, Chin JW. *Nat Chem*, 2015, 7: 554–561
- 30 Walker OS, Elsässer SJ, Mahesh M, Bachman M, Balasubramanian S, Chin JW. *J Am Chem Soc*, 2016, 138: 718–721
- 31 Zhang G, Li J, Xie R, Fan X, Liu Y, Zheng S, Ge Y, Chen PR. *ACS Cent Sci*, 2016, 2: 325–331
- 32 Ambrogelly A, Palioura S, Söll D. *Nat Chem Biol*, 2007, 3: 29–35
- 33 Rogerson DT, Sachdeva A, Wang K, Haq T, Kazlauskaitė A, Hancock SM, Huguenin-Dezot N, Muqit MMK, Fry AM, Bayliss R, Chin JW. *Nat Chem Biol*, 2015, 11: 496–503
- 34 Zhang MS, Brunner SF, Huguenin-Dezot N, Liang AD, Schmied WH, Rogerson DT, Chin JW. *Nat Meth*, 2017, 14: 729–736
- 35 Neumann H, Peak-Chew SY, Chin JW. *Nat Chem Biol*, 2008, 4: 232–234
- 36 Hallam TJ, Wold E, Wahl A, Smider VV. *Mol Pharm*, 2015, 12: 1848–1862
- 37 Kim CH, Axup JY, Schultz PG. *Curr Opin Chem Biol*, 2013, 17: 412–419
- 38 Sievers EL, Senter PD. *Annu Rev Med*, 2013, 64: 15–29
- 39 Junutula JR, Bhakta S, Raab H, Ervin KE, Eigenbrot C, Vandlen R, Scheller RH, Lowman HB. *J Immunological Methods*, 2008, 332: 41–52
- 40 Gomez N, Vinson AR, Ouyang J, Nguyen MDH, Chen XN, Sharma VK, Yuk IH. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 105: 748–760
- 41 Zhou Q, Stefano JE, Manning C, Kyazike J, Chen B, Gianolio DA, Park A, Busch M, Bird J, Zheng X, Simonds-Mannes H, Kim J, Gregory RC, Miller RJ, Brondyk WH, Dhal PK, Pan CQ. *Bioconjugate Chem*, 2014, 25: 510–520
- 42 Appel MJ, Bertozzi CR. *ACS Chem Biol*, 2015, 10: 72–84
- 43 Farias SE, Strop P, Delaria K, Galindo Casas M, Dorywalska M, Shelton DL, Pons J, Rajpal A. *Bioconjugate Chem*, 2014, 25: 240–250
- 44 Hoffmann RM, Coumbe BGT, Josephs DH, Mele S, Ilieva KM, Cheung A, Tutt AN, Spicer JF, Thurston DE, Crescioli S, Karagiannis SN. *Oncoimmunology*, 2018, 7: e1395127
- 45 Wang L, Zhang Z, Brock A, Schultz PG. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 56–61
- 46 Axup JY, Bajjuri KM, Ritland M, Hutchins BM, Kim CH, Kazane SA, Halder R, Forsyth JS, Santidrian AF, Stafin K, Lu Y, Tran H, Seller AJ, Biroc SL, Szydluk A, Pinkstaff JK, Tian F, Sinha SC, Felding-Habermann B, Smider VV, Schultz PG. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 16101–16106
- 47 Tian F, Lu Y, Manibusan A, Sellers A, Tran H, Sun Y, Phuong T, Barnett R, Hehli B, Song F, DeGuzman MJ, Ensari S, Pinkstaff JK, Sullivan LM, Biroc SL, Cho H, Schultz PG, DiJoseph J, Dougher M, Ma D, Dushin R, Leal M, Tchistiakova L, Feyfant E, Gerber HP, Sapra P. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 1766–1771
- 48 Wu Y, Zhu H, Zhang B, Liu F, Chen J, Wang Y, Wang Y, Zhang Z, Wu L, Si L, Xu H, Yao T, Xiao S, Xia Q, Zhang L, Yang Z, Zhou D. *Bioconjugate Chem*, 2016, 27: 2460–2468
- 49 Oller-Salvia B, Kym G, Chin JW. *Angew Chem Int Ed*, 2018, 57: 2831–2834
- 50 Wang RE, Liu T, Wang Y, Cao Y, Du J, Luo X, Deshmukh V, Kim CH, Lawson BR, Tremblay MS, Young TS, Kazane SA, Wang F, Schultz PG. *J Am Chem Soc*, 2015, 137: 3229–3232
- 51 Byrne H, Conroy PJ, Whisstock JC, O’Kennedy RJ. *Trends Biotech*, 2013, 31: 621–632
- 52 Muyldermans S. *Annu Rev Biochem*, 2013, 82: 775–797
- 53 Wu C, Ying H, Grinnell C, Bryant S, Miller R, Clabbers A, Bose S, McCarthy D, Zhu RR, Santora L, Davis-Taber R, Kunes Y, Fung E, Schwartz A, Sakorafas P, Gu J, Tarsa E, Murtaza A, Ghayur T. *Nat Biotechnol*, 2007, 25: 1290–1297
- 54 Kim CH, Axup JY, Dubrovskaya A, Kazane SA, Hutchins BA, Wold ED, Smider VV, Schultz PG. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 9918–9921
- 55 Chames P, Baty D. *MAbs*, 2009, 1: 539–547
- 56 Kazane SA, Axup JY, Kim CH, Ciobanu M, Wold ED, Barluenga S, Hutchins BA, Schultz PG, Winssinger N, Smider VV. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 340–346
- 57 Kularatne SA, Venkatesh C, Santhapuram HKR, Wang K, Vaitilingam B, Henne WA, Low PS. *J Med Chem*, 2010, 53: 7767–7777
- 58 Murelli RP, Zhang AX, Michel J, Jorgensen WL, Spiegel DA. *J Am Chem Soc*, 2009, 131: 17090–17092

- 59 Kim CH, Axup JY, Lawson BR, Yun H, Tardif V, Choi SH, Zhou Q, Dubrovskaya A, Biroc SL, Marsden R, Pinstaff J, Smider VV, Schultz PG. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 17796–17801
- 60 Kularatne SA, Deshmukh V, Gymnopoulos M, Biroc SL, Xia J, Srinagesh S, Sun Y, Zou N, Shimazu M, Pinkstaff J, Ensari S, Knudsen N, Manibusan A, Axup JY, Kim CH, Smider VV, Javahishvili T, Schultz PG. *Angew Chem Int Ed*, 2013, 52: 12101–12104
- 61 Ramadoss NS, Schulman AD, Choi S, Rodgers DT, Kazane SA, Kim CH, Lawson BR, Young TS. *J Am Chem Soc*, 2015, 137: 5288–5291
- 62 Cao Y, Axup JY, Ma JSY, Wang RE, Choi S, Tardif V, Lim RKV, Pugh HM, Lawson BR, Welzel G, Kazane SA, Sun Y, Tian F, Srinagesh S, Javahishvili T, Schultz PG, Kim CH. *Angew Chem Int Ed*, 2015, 54: 7022–7027
- 63 Maude SL, Frey N, Shaw PA, Aplenc R, Barrett DM, Bunin NJ, Chew A, Gonzalez VE, Zheng Z, Lacey SF, Mahnke YD, Melenhorst JJ, Rheingold SR, Shen A, Teachey DT, Levine BL, June CH, Porter DL, Grupp SA. *N Engl J Med*, 2014, 371: 1507–1517
- 64 Cao Y, Rodgers DT, Du J, Ahmad I, Hampton EN, Ma JSY, Mazagova M, Choi SH, Yun HY, Xiao H, Yang P, Luo X, Lim RKV, Pugh HM, Wang F, Kazane SA, Wright TM, Kim CH, Schultz PG, Young TS. *Angew Chem Int Ed*, 2016, 55: 7520–7524
- 65 Ma JSY, Kim JY, Kazane SA, Choi SH, Yun HY, Kim MS, Rodgers DT, Pugh HM, Singer O, Sun SB, Fonslow BR, Kochenderfer JN, Wright TM, Schultz PG, Young TS, Kim CH, Cao Y. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: E450–E458
- 66 Daya S, Berns KI. *Clin Microbiol Rev*, 2008, 21: 583–593
- 67 Yao T, Zhou X, Zhang C, Yu X, Tian Z, Zhang L, Zhou D. *Molecules*, 2017, 22: 1155
- 68 Zhang C, Yao T, Zheng Y, Li Z, Zhang Q, Zhang L, Zhou D. *Biomaterials*, 2016, 80: 134–145
- 69 Kelemen RE, Mukherjee R, Cao X, Erickson SB, Zheng Y, Chatterjee A. *Angew Chem Int Ed*, 2016, 55: 10645–10649
- 70 Erickson SB, Mukherjee R, Kelemen RE, Wrobel CJJ, Cao X, Chatterjee A. *Angew Chem Int Ed*, 2017, 56: 4234–4237
- 71 Rasmussen MH, Bysted BV, Anderson TW, Klitgaard T, Madsen J. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010, 95: 3411–3417
- 72 Cho H, Daniel T, Buechler YJ, Litzinger DC, Maio Z, Putnam AMH, Kraynov VS, Sim BC, Bussell S, Javahishvili T, Kaphle S, Viramontes G, Ong M, Chu S, Becky GC, Lieu R, Knudsen N, Castiglioni P, Norman TC, Axelrod DW, Hoffman AR, Schultz PG, DiMarchi RD, Kimmel BE. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 9060–9065
- 73 Wu L, Chen J, Wu Y, Zhang B, Cai X, Zhang Z, Wang Y, Si LL, Xu H, Zheng YX, Zhang CL, Liang C, Li J, Zhang L, Zhang Q, Zhou D. *J Control Release*, 2017, 249: 84–93
- 74 Zhang B, Xu H, Chen J, Zheng Y, Wu Y, Si L, Wu L, Zhang C, Xia G, Zhang L, Zhou D. *Acta Biomater*, 2015, 19: 100–111
- 75 Mu J, Pinkstaff J, Li Z, Skidmore L, Li N, Myler H, Dallas-Yang Q, Putnam AM, Yao J, Bussell S, Wu M, Norman TC, Rodriguez CG, Kimmel B, Metzger JM, Manibusan A, Lee D, Zaller DM, Zhang BB, DiMarchi RD, Berger JP, Axelrod DW. *Diabetes*, 2012, 61: 505–512
- 76 Lühmann T, Schmidt M, Leiske MN, Spieler V, Majdanski TC, Grube M, Hartlieb M, Nischang I, Schubert S, Schubert US, Meinel L. *ACS Biomater Sci Eng*, 2017, 3: 304–312
- 77 Xuan W, Li J, Luo X, Schultz PG. *Angew Chem Int Ed*, 2016, 55: 10065–10068
- 78 Liu T, Wang Y, Luo X, Li J, Reed SA, Xiao H, Young TS, Schultz PG. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: 5910–5915
- 79 Yang CY, Renfrew PD, Olsen AJ, Zhang M, Yuvenco C, Bonneau R, Montclare JK. *ChemBioChem*, 2014, 15: 1761–1764
- 80 Berd D. *Expert Rev Vaccines*, 2004, 3: 521–527
- 81 Gauba V, Grünwald J, Gorney V, Deaton LM, Kang M, Bursulaya B, Ou W, Lerner RA, Schmedt C, Geierstanger BH, Schultz PG, Ramirez-Montagut T. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 12821–12826
- 82 Grünwald J, Hunt GS, Dong L, Niessen F, Wen BG, Tsao ML, Perera R, Kang M, Laffitte BA, Azarian S, Ruf W, Nasoff M, Lerner RA, Schultz PG, Smider VV. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 4337–4342
- 83 Jang YH, Seong BL. *Clin Exp Vaccine Res*, 2012, 1: 35–49
- 84 Si L, Xu H, Zhou X, Zhang Z, Tian Z, Wang Y, Wu Y, Zhang B, Niu Z, Zhang C, Fu G, Xiao S, Xia Q, Zhang L, Zhou D. *Science*, 2016, 354: 1170–1173
- 85 Wang N, Yuan Z, Niu W, Li Q, Guo J. *J Chem Technol Biotechnol*, 2017, 92: 455–462
- 86 Biswas SK, Boutz PL, Nayak DP. *J Virol*, 1998, 72: 5493–5501
- 87 Portela A, Digard P. *J General Virol*, 2002, 69: 723–734
- 88 Wang N, Li Y, Niu W, Sun M, Cerny R, Li Q, Guo J. *Angew Chem Int Ed*, 2014, 53: 4867–4871
- 89 Rovner AJ, Haimovich AD, Katz SR, Li Z, Grome MW, Gassaway BM, Amiram M, Patel JR, Gallagher RR, Rinehart J, Isaacs FJ. *Nature*, 2015, 518: 89–93

- 90 Tack DS, Ellefson JW, Thyer R, Wang B, Gollihar J, Forster MT, Ellington AD. *Nat Chem Biol*, 2016, 12: 138–140
- 91 Ko J, Wang YS, Nakamura A, Guo LT, Söll D, Umehara T. *FEBS Lett*, 2013, 587: 3243–3248
- 92 Mandell DJ, Lajoie MJ, Mee MT, Takeuchi R, Kuznetsov G, Norville JE, Gregg CJ, Stoddard BL, Church GM. *Nature*, 2015, 518: 55–60
- 93 Xuan W, Schultz PG. *Angew Chem Int Ed*, 2017, 56: 9170–9173
- 94 Gan F, Liu R, Wang F, Schultz PG. *J Am Chem Soc*, 2018, 140: 3829–3832
- 95 Koh M, Nasertorabi F, Han GW, Stevens RC, Schultz PG. *J Am Chem Soc*, 2017, 139: 5728–5731
- 96 Hemphill J, Borchardt EK, Brown K, Asokan A, Deiters A. *J Am Chem Soc*, 2015, 137: 5642–5645
- 97 Zheng Q, Wang Q, Wang S, Wu J, Gao Q, Liu W. *Chem Biol*, 2015, 22: 1002–1007
- 98 Mohr KI, Volz C, Jansen R, Wray V, Hoffmann J, Bernecker S, Wink J, Gerth K, Stadler M, Müller R. *Angew Chem Int Ed*, 2015, 54: 11254–11258
- 99 Essig A, Hofmann D, Münch D, Gayathri S, Künzler M, Kallio PT, Sahl HG, Wider G, Schneider T, Aebi M. *J Biol Chem*, 2014, 289: 34953–34964
- 100 Férrir G, Petrova MI, Andrei G, Huskens D, Hoorelbeke B, Snoeck R, Vanderleyden J, Balzarini J, Bartoschek S, Brönstrup M, Süßmuth RD, Schols D. *PLoS ONE*, 2013, 8: e64010
- 101 Richard AS, Zhang A, Park SJ, Farzan M, Zong M, Choe H. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 14682–14687
- 102 Young TS, Young DD, Ahmad I, Louis JM, Benkovic SJ, Schultz PG. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 11052–11056
- 103 Zambaldo C, Luo X, Mehta AP, Schultz PG. *J Am Chem Soc*, 2017, 139: 11646–11649
- 104 Shi Y, Yang X, Garg N, van der Donk WA. *J Am Chem Soc*, 2011, 133: 2338–2341
- 105 Bindman NA, Bobeica SC, Liu WR, van der Donk WA. *J Am Chem Soc*, 2015, 137: 6975–6978
- 106 Al Toma RS, Kuthning A, Exner MP, Denisiuk A, Ziegler J, Budisa N, Süßmuth RD. *ChemBioChem*, 2015, 16: 503–509
- 107 Piscotta FJ, Tharp JM, Liu WR, Link AJ. *Chem Commun*, 2015, 51: 409–412
- 108 Frost JR, Jacob NT, Papa LJ, Owens AE, Fasan R. *ACS Chem Biol*, 2015, 10: 1805–1816
- 109 Luo X, Zambaldo C, Liu T, Zhang Y, Xuan W, Wang C, Reed SA, Yang PY, Wang RE, Javahishvili T, Schultz PG, Young TS. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: 3615–3620
- 110 Lopatniuk M, Myronovskyi M, Luzhetskyy A. *ACS Chem Biol*, 2017, 12: 2362–2370
- 111 Elsässer SJ, Ernst RJ, Walker OS, Chin JW. *Nat Methods*, 2016, 13: 158–164

Therapeutic applications of genetic code expansion

Yujia Huang[†], Yong Wang[†], Liming Hu, Xuewen Qin, Tao Liu^{*}

State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University Health Science Center, Beijing 100191, China

[†]Contributed equally to this work

^{*}Corresponding author (email: taoliu@bjmu.edu.cn)

Abstract: In nature, 64 different codons encode 20 canonical amino acids into proteins with few exemptions. Genetic code expansion technique allows site-specific incorporation of diverse noncanonical amino acids (ncAAs) through nonsense codons suppression into recombinant proteins or the proteomes of living cells. To date, hundreds of ncAAs have been successfully incorporated into a variety of proteins in different species, and their applications have recently expanded from fundamental research to biotherapeutics. Here, we reviewed and discussed the recent progress in the therapeutic applications of an expanded genetic code. On one hand, genetic incorporations of ncAAs with bio-orthogonal reactive groups allow site-specific modifications of protein therapeutics and cell therapeutics with unprecedented quality control, safety and efficacy. On the other hand, the nonsense codon readthrough ability makes it possible for synthetic biologists to exploit new generation biotherapeutics.

Keywords: genetic code expansion, noncanonical amino acids, biotherapeutics, antibody-drug conjugates, live vaccines

doi: [10.1360/N032018-00071](https://doi.org/10.1360/N032018-00071)