



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110546256 A

(43)申请公布日 2019.12.06

(21)申请号 201780085712.X

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038

(22)申请日 2017.12.20

代理人 陈晓娜

(30)优先权数据

62/437,034 2016.12.20 US

(51)Int.Cl.

C12N 15/00(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.08.05

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/067537 2017.12.20

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/119042 EN 2018.06.28

(71)申请人 彼得·B·雷因茨

地址 美国北卡罗来纳

(72)发明人 彼得·B·雷因茨

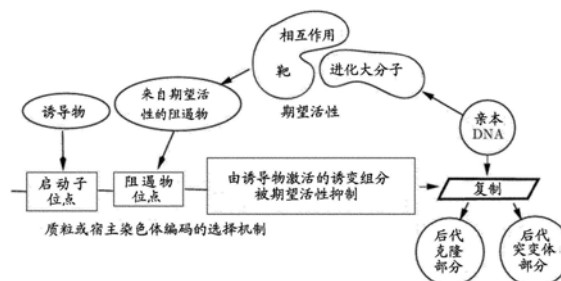
权利要求书2页 说明书8页 附图4页

(54)发明名称

通过调控突变率的定向进化

(57)摘要

本发明涉及用于大分子定向进化的方法和系统。所述方法涉及增加包含编码缺乏期望活性的基因产物的感兴趣基因的进化生物的突变率，由此产生编码包含期望活性并引起诱变抑制的进化基因产物的突变的感兴趣基因。所述系统包括包含编码待进化基因产物的感兴趣基因的进化生物、宿主生物以及任选的进化池、cellstat和/或合适的生长培养基。



1. 一种定向进化大分子的方法,所述方法包括人工增加包含待进化的感兴趣基因的进化生物种群所经历的突变率,其中所述感兴趣基因编码不包含期望活性的基因产物,由此使所述感兴趣基因在一种或多种进化生物中进化,从而编码包含期望活性的进化基因产物,其中所述突变率应答包含期望活性的进化基因产物的产生而成比例地降低,从而有利于包含进化的感兴趣基因的一种或多种进化生物以种群和降低的突变率繁殖。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述进化生物需要宿主生物进行复制。

3. 根据权利要求2所述的方法,其中相对于未被改造成具有增加的突变率的宿主生物的突变率,所述宿主生物被改造成具有增加的突变率。

4. 根据权利要求2或3所述的方法,其中人工增加所述进化生物种群所经历的突变率包括使所述进化生物种群与所述宿主生物种群接触,其中任选地在进化池中发生所述接触。

5. 根据权利要求3或4所述的方法,其中经改造的宿主生物包含质粒或经修饰的宿主染色体,所述质粒或经修饰的宿主染色体含有编码一种或多种诱变组分的一组诱导型基因。

6. 根据权利要求5所述的方法,其中所述一种或多种诱变组分选自能够降低宿主生物中DNA聚合酶对DNA复制的保真度的经修饰的DNA聚合酶蛋白结构域,以及能够与宿主生物中的DNA聚合酶相互作用以降低DNA聚合酶对DNA复制的保真度的蛋白质。

7. 根据权利要求5或6所述的方法,其中增加突变率包括引入含有能够诱导诱变组分产生的噬菌体休克启动子的质粒。

8. 根据权利要求5-7中任一项所述的方法,其中通过与期望活性的产生成比例地产生并下调诱变组分表达的阻遏物分子来降低突变率。

9. 根据权利要求8所述的方法,其中所述阻遏物是四环素阻遏物(TetR)并且所述质粒包含TetR结合位点,所述结合位点包含四环素操纵子序列的一个或多个重复或四环素应答元件。

10. 根据权利要求1-10中任一项所述的方法,其中通过将诱变化合物引入所述进化生物的环境来增加诱变。

11. 根据权利要求1所述的方法,其中所述进化生物是经修饰的M13噬菌体,其中所述进化生物的基因组包含野生型M13噬菌体基因的子集,所述子集包含gIII、gIV以及复制起始点的DNA序列和包装信号的DNA序列,其中噬菌体繁殖所必需的所有其他M13噬菌体基因都是在所述宿主生物所包含的质粒中编码的,并作为对噬菌体感染的应答而组成型表达或者通过外部试剂诱导表达。

12. 根据权利要求11所述的方法,其中所述宿主生物是大肠杆菌(*Escherichia coli*)。

13. 根据权利要求2-11中任一项所述的方法,其中所述进化生物是经修饰的M13噬菌体,其中所述进化生物的基因组包含野生型M13噬菌体基因的子集,所述子集包含gIII、gIV以及复制起始点的DNA序列和包装信号的DNA序列,其中噬菌体繁殖所必需的所有其他M13噬菌体基因都是在所述宿主生物中的质粒中编码的,并作为对噬菌体感染的应答而组成型表达或者通过外部试剂诱导表达。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述宿主生物是大肠杆菌。

15. 一种用于大分子定向进化的系统,所述系统包含:

(a) 包含待进化的感兴趣基因的进化生物种群,其中所述感兴趣基因编码不包含期望活性的基因产物,由此使所述感兴趣基因能够在一种或多种进化生物中进化,从而编码包

含期望活性和直接或间接抑制诱导的诱变的能力的进化基因产物,其中所述进化生物需要宿主生物进行复制;和

(b) 宿主生物种群,其中与未被改造成具有增加的突变率的宿主生物的突变率相比,所述宿主生物被改造成具有增加的突变率。

16. 根据权利要求15所述的系统,还包含至少一种选自下组的成员:容器、cellstat和适用于繁殖所述进化生物和/或宿主生物的生长培养基。

17. 根据权利要求15或16所述的系统,其中所述进化生物是噬菌体且所述宿主生物是细菌。

18. 根据权利要求17所述的系统,其中所述噬菌体是M13且所述宿主生物是大肠杆菌。

19. 根据权利要求18所述的系统,其中所述M13噬菌体是经修饰的M13噬菌体,其包含野生型M13噬菌体基因的子集,所述子集包含gIII、gIV以及复制起始点的DNA序列和包装信号的DNA序列,其中噬菌体繁殖所必需的所有其他M13噬菌体基因都是在所述宿主生物所包含的质粒中编码的,并作为对噬菌体感染的应答而组成型表达或者通过外部试剂诱导表达。

20. 根据权利要求15或16所述的系统,其中所述进化生物是权利要求1-14中任一项所述的进化生物。

21. 根据权利要求15、16和20中任一项所述的系统,其中所述宿主生物是权利要求2-14中任一项所述的宿主生物。

22. 由权利要求1-14中任一项所述的方法产生的包含期望活性的基因产物。

23. 根据权利要求22所述的基因产物,其中所述基因产物是蛋白质或RNA。

24. 编码权利要求22或23所述的基因产物的核酸分子。

25. 编码包含期望活性的基因产物的核酸分子,所述核酸分子是由权利要求1-14中任一项所述的方法产生的。

26. 包含权利要求22或23所述的基因产物和/或权利要求24或25所述的核酸分子的细胞或病毒。

27. 根据权利要求26所述的细胞,其中所述细胞选自细菌细胞、动物细胞、哺乳动物细胞、人细胞、真菌细胞、藻类细胞和植物细胞。

28. 根据权利要求26所述的细胞,其中所述细胞是非人细胞或体外培养的人细胞。

通过调控突变率的定向进化

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2016年12月20日提交的美国临时专利申请第62/437,034号的权益,其在此通过引用而全部并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及核酸的定向进化和由此编码的基因产物的领域。

背景技术

[0004] 噬菌体的连续进化有潜力成为有力的蛋白质改造工具。在该过程中,微生物的连续进化迅速产生编码蛋白质的DNA序列,该DNA序列经历了多代突变并对所述蛋白质的特定性质进行选择。这种蛋白质改造方法的通用性受限于我们将可表达的初始基因插入复制微生物并形成对期望活性的选择机制的能力。

[0005] 目前,定向进化的最佳实践利用了细菌病毒M13丝状噬菌体的快速繁殖来进化新蛋白质。经转化的大肠杆菌(E.coli)宿主细胞提供高水平的突变以及适应度选择机制,其奖励表现出期望特性的病毒粒子。与自然进化一样,定向进化需要以下三个过程的重复循环:(1)变异或突变,以允许新的或增强的功能;(2)选择,以给予具有期望新功能或增强功能的个体相对于表现出更低程度所述功能的个体的繁殖优势;(3)繁殖,以将所选功能传递给下一代。

[0006] 目前的连续进化程序用外部试剂诱导升高的突变率,以便快速采样大部分的进化景观(evolutionary landscape)。在宿主细胞培养期间必须避免这些升高的突变率,当已将宿主细胞转移到它们受到进化生物感染的环境时,可通过外部试剂进行诱导。结果,复制的宿主细胞和产生的病毒粒子都可能含有大量突变。

[0007] 通过噬菌体的连续进化来改造新蛋白质目前需要用下述两种额外功能转化宿主细菌:(1)提供病毒突变率升高的诱变载体,和(2)对编码产生期望活性的产物的基因型提供繁殖优势的选择机制。

[0008] 称为噬菌体辅助连续进化(PACE)的技术通过在含有噬菌体的容器中诱导高水平诱变来形成快速进化环境(美国专利第9,394,537号)。因为诱变是外部诱导的,它会影响该容器内的所有实体。特别地,即使未感染的大肠杆菌细胞在生长和分裂时也会经历增强水平的突变。通过精心控制的流速减轻了由大肠杆菌突变体的存在所造成的影响,精心控制的流速实际上确保了给定大肠杆菌细胞在含有进化噬菌体的容器中的时间少于一个生命周期(分裂时间)。每小时一到四个体积的流速足以确保少于百分之一的大肠杆菌在容器中停留足以分裂并产生含有突变的子细胞那么长的时间。

[0009] 具体而言,PACE系统需要:(1)修饰的病毒基因组,用待进化的基因取代关键的噬菌体基因,(2)具有诱导型诱变的经转化的宿主,(3)含有选择机制的宿主质粒,以提供与进化基因的期望活性成比例的关键噬菌体基因,和(4)接近细胞分裂时间的大肠杆菌通过时间(transit time)。

[0010] PACE方法从M13噬菌体中去除关键基因并用待进化的蛋白质取代该基因,从而使进化蛋白质成为噬菌体所需蛋白质的代替物。选择机制要求宿主细胞产生或抑制这种关键的噬菌体蛋白,以奖励或清除编码所考虑蛋白质的噬菌体。

[0011] 该方法至少有两方面产生困难。首先,从噬菌体中去除关键基因会产生残缺的噬菌体,在进行进化实验之前不容易繁殖。繁殖噬菌体需要人工提供关键蛋白质。PACE包括允许外部诱导关键蛋白质产生的额外机制。

[0012] 第二个困难涉及目前实施PACE所采用的关键噬菌体基因选择:融合蛋白(pIII)。这种蛋白质在大肠杆菌中的存在通常是由M13感染的结果,它会诱发应答来阻止随后的噬菌体感染。这种感染应答是M13感染的大肠杆菌成为定向进化有效平台的原因之一。大肠杆菌应答并奖励感染它的第一个M13,只产生作为该噬菌体子代的噬菌体后代。如果超感染可能的话,大肠杆菌就会产生多个噬菌体谱系的后代,其选择机制受到其进化蛋白质的综合影响。

[0013] 宿主产生pIII融合蛋白的机制不仅必须是外部可诱导的,以便繁殖残缺的噬菌体,而且还要牢牢控制直到感染发生。这是因为宿主细胞内无意产生的pIII会引起阻止任何噬菌体感染的感染应答。

[0014] 目前的定向进化方法通过将诱变化合物引入含有进化噬菌体种群的容器的培养基中来诱导诱变,从而赋予噬菌体种群整体上不变的突变率。该诱变化合物可能是直接引起突变的小分子,或者触发产生易错聚合酶组分的诱导物。使用该第二种方法,产生不同量的修饰聚合酶亚基的细胞将具有相应的DNA复制错误率。在宿主细胞内激活这些诱变组分表达的能力使得本方法成为可能。

发明内容

[0015] 本发明的方法实现了采用诱变抑制作为选择机制的连续进化系统。进化大分子的期望活性导致了更高数量的与亲本相同的后代,通过增加携带该基因型的噬菌体的数量来奖励该基因型。

[0016] 本发明的方法涉及宿主细胞培养系统,其将未感染的大肠杆菌细胞提供给含有进化噬菌体种群的容器。所述噬菌体包含完整的野生型基因组加上待进化蛋白质的基因。与在其他连续进化方法中一样,在宿主细胞中诱导诱变,整体诱导或作为对感染的应答而诱导诱变。然而,选择机制由下述组成:应答进化蛋白质的期望活性而降低突变率。含有编码具有期望活性的蛋白质的DNA序列的个体在复制时将获得更低的突变率,产生更多具有与亲本噬菌体相同的基因型的后代。我们将这种选择方法称为诱变选择或M选择。

[0017] 编码未显示出期望活性的进化蛋白质的噬菌体将继续接受最大诱导突变率。尽管这种选择机制并未立即清除表现不良的个体,但由于几代内的差错灾难(error catastrophe),它们的世系将会经历灭绝。当然,除非其中一个突变体表达了对进化蛋白质的改善,在这种情况下,其后代将开始经历降低的突变率并因此经历更忠实的繁殖。

[0018] 本发明的方法具有以下特性:具有增加水平的期望活性的世系将不那么积极地探索进化景观,而表现不良的个体担着其世系经历差错灾难的风险会继续积极地探索突变空间。

[0019] 在本发明的一个实施方案中,本文所述的方法还采用了大肠杆菌感染应答噬菌体

休克启动子来作为诱导诱变升高的一种方法。因此,未感染的宿主细胞不会经受增强的突变,能够无限期地停留在进化池(lagoon)中等待感染。受感染的细胞比未感染的细胞生长得更慢,因为能量都投入噬菌体产生了,这就减慢了细胞生命周期,降低了对高流速的需求。此外,受感染的细胞仅产生预感染的(pre-infected)子细胞,其消除了突变的大肠杆菌与后代噬菌体之间的任何相互作用。

[0020] 本诱变选择方法降低了繁殖残缺噬菌体的难度。如在经典噬菌体展示中一样,将待进化的蛋白质添加到功能完全的噬菌体中。诱变选择还通过消除对编码pIII基因的宿主质粒的需求而避免了与宿主细胞中不需要的pIII产生相关联的问题。

[0021] PACE与本公开内容之间的重要区别在于该诱变不是外部诱导的,因此,未感染的细胞不被突变,使得在感染的宿主表达诱变产物之前能够产生最低数量的忠实拷贝。这可能证实了保留PACE的阿拉伯糖诱导的诱变作为在进化池中达到中等基线突变率的方式来说是有用的。

[0022] 这就缺少外部诱导的诱变,因此未感染细胞中的诱变减轻了对一个宿主细胞生命周期的进化池通过时间的限制。此外,M13感染减慢了大肠杆菌的倍增时间,进一步缓解了这种限制。如果未感染的细胞在进化池中繁殖,它们将不突变,如果被感染的细胞繁殖,则子细胞将被预感染且仅仅继续以原始感染所确定的突变水平来去除感染亲本的病毒。因此,在诱变选择中可使用更广范围的流速。

[0023] 本发明的方法和PACE之间的另一重要区别是当期望活性改善时就不那么积极地搜索突变空间。经历活性升高的基因型不那么积极地搜索突变空间,而具有很低活性或无活性的突变体继续积极地搜索突变空间。这种混合种群和弱选择的使用就延迟了基因型的固定,允许延长进化景观的使用,并有助于确保系统不会陷入局部适应峰(local fitness peak)。

[0024] 因为没有从噬菌体中去除关键基因,它在开始定向进化过程之前能够容易地繁殖。由于没有噬菌体基因掺入宿主质粒中,因此避免了与宿主中存在的pIII和相关联的过早感染应答相关的问题。通过阻断阻遏物分子或单独表达另外的诱变组分,可添加另外的负选择机制。

附图说明

[0025] 图1显示诱变选择(M选择)的一般示意图。

[0026] 图2显示了使用噬菌体休克启动子和Tet阻遏物的M选择的范例,其中双杂交蛋白质-蛋白质结合引起四环素阻遏物基因(tetR)的表达从而产生四环素阻遏蛋白(TetR),所述四环素阻遏蛋白能够结合质粒或经修饰的宿主染色体中的四环素应答元件或其他四环素操纵子序列,从而阻断噬菌体休克启动子的转录。

[0027] 图3显示了对表现出低水平期望活性的噬菌体进行应答的范例。弱结合允许更高的突变率。

[0028] 图4显示了对表现出高水平期望活性的噬菌体进行应答的范例。强结合产生更多克隆。

[0029] 图5显示了进化T7聚合酶以识别或结合T3聚合酶启动子的M选择的范例。

具体实施方式

[0030] 现在将在下文中参考附图更全面地描述本发明,附图中示出了本发明的一些但非全部实施方案。实际上,这些发明可按许多不同形式进行实施,不应理解为限于本文所阐述的实施方案;相反,提供这些实施方案是为了使本公开内容满足适用的法律要求。相同数字始终指代相同元件。

[0031] 受益于前述描述和相关附图中提供的教导,这些发明所属领域的技术人员将会想到本文所阐述的本发明的许多改进和其他实施方案。因此,应理解的是,本发明不限于所公开的具体实施方案,并旨在将改进和其他实施方案包括在所附权利要求的范围内。尽管本文采用了特定术语,但仅以一般性和描述性意义使用它们,而不是出于限制目的。

[0032] 定义

[0033] “期望活性”是我们希望增强的进化基因产物(例如蛋白质或RNA)的特性。例如,期望活性可以是与另一蛋白质或指定为靶的核酸分子(例如dsDNA、ssDNA、ssRNA、dsRNA等)中的特定核苷酸序列结合的能力。期望活性也可以是酶活性。已认识到使用本发明的方法可进一步增强期望活性的初始最低水平或量。例如,期望活性可以是进化基因产物与特定蛋白质的结合。最初,期望活性可以是基因产物与特定蛋白质结合足以引起最低的诱变抑制的最低结合水平。然而,使用本发明的方法,可以进一步增加或增强基因产物与特定蛋白质的结合水平,从而进一步增强诱变的抑制。

[0034] “靶”是我们试图影响的蛋白质或核酸底物。靶是由宿主生物产生的,不受进化压力的影响。例如,这可能是蛋白质或核酸底物,特别是我们希望我们的进化蛋白与之结合的其中的特定核苷酸序列。

[0035] “宿主生物”是用一种或多种核酸分子转化的微生物,其中转化的微生物能够基于进化或已进化基因产物所表现出的期望活性来影响进化生物的繁殖。优选地,微生物不应受到进化压力的影响。

[0036] “选择机制”是特定期望活性导致编码与该活性相关基因的实体繁殖增加的过程。例如,基于结合未经受进化压力的第二蛋白质的程度,选择经受突变率升高的噬菌体所携带的蛋白质。

[0037] “cellstat”是宿主细胞在被进化生物(例如噬菌体)感染之前进行繁殖的容器。设计cellstat环境来维持低水平的诱变并避免对宿主细胞(例如细菌细胞、大肠杆菌细胞)的选择压力。

[0038] “进化池(lagoon)”是宿主生物(例如细菌)种群在其中与进化生物(例如噬菌体)种群接触并可被其感染以及在其中维持进化生物后代的容器。设计进化池环境来增强诱变,以便加速感兴趣基因和由其编码的基因产物的进化。

[0039] “差错灾难(error catastrophe)”是由过度突变的积累所引起的灭绝。

[0040] “弱选择”是指生物无法在进化种群中固定下来,原因在于,它的适应度仅略高于其竞争者的适应度。

[0041] “种群”旨在表示两个或更多个体,但通常来说,本发明的种群将包含 10^4 、 10^5 、 10^6 个或更多个体(例如噬菌体,细菌),要理解的是,本发明的种群中个体的数量可根据任何数量的因素(包括例如进化池或其他容器的体积、进化生物的物种、宿主生物的物种以及环境条件)而变化。

[0042] “进化生物 (evolving organism)” 是包含编码感兴趣基因产物的感兴趣基因的待进化的生物。本发明优选的进化生物是病毒,特别是噬菌体,更特别是M13。

[0043] “超感染 (super-infection)” 是指一种以上的病毒对单个宿主细胞的感染。

[0044] 描述

[0045] 现在,极高但仍可控的体内突变率是可能的。这种广谱诱变具有高达 10^5 倍的基础突变率,可在单个宿主细胞内进行控制。如果这种诱变是由感染引发的,比如用噬菌体休克启动子引发,但随后通过期望活性而降低,则将满足两个进化主要组分。由表现出期望活性的个体所产生的相同噬菌体后代数量的增加将对期望活性进行选择。这就是诱变选择。尽管先前的方法在进化池中诱导均匀的诱变,但诱变选择在每个感染的宿主细胞内诱导独特的诱变水平。

[0046] 尽管《克隆与突变体》可能听起来像是一部糟糕的科幻电影的标题,但它恰恰说明了诱变选择是如何运作的。如果基因型不编码具有期望特性的蛋白质,则该过程就产生更多突变体,如果基因型导致具有期望特性的蛋白质的表达,则产生更多克隆。在未显示出期望活性的蛋白质存在下的最大诱变与产生显示出期望活性的蛋白质时的极低水平诱变之间调节诱变水平。

[0047] 有必要每代产生两种克隆来感染宿主以产生足够的噬菌体,以防止基因型消失 (washout)。假设噬菌体产量为100个/小时,进化池通过时间为1小时,则每个基因组四 (4) 个突变的最大突变率将避免消失。噬菌体后代为亲本精确拷贝的百分比是由泊松分布所得到的,其中 $\mu=0$ 是预期的突变数, λ 是每个病毒粒子的突变率 (突变率/碱基*6.4kbp/基因组)。 $\lambda=4$ 的突变率得到1.8%的零突变概率。

$$[0048] \quad P(\mu, \lambda) = \frac{e^{-\lambda} \lambda^\mu}{\mu!} \rightarrow P(0, 4) = \frac{e^{-4}}{1} = .018$$

[0049] 因此基因组能够耐受并在进化池中具有任何克隆留下的每碱基最大突变率是 $4/6400 = 6.25 \times 10^{-4}$ 。产生M13噬菌体的大肠杆菌的基础率为 7.2×10^{-7} 。正常M13感染的噬菌体平均产量取100个/小时,并假设宿主细胞的通过时间为1小时,则需要2%的最低克隆率:每次感染两个忠实拷贝以避免消失。先前的高突变率考虑似乎允许更慢的流速,这将降低该最小分数。

[0050] 图1显示了诱变选择过程的概况。诱导物通过使诱变组分表达来激活诱变。当产生期望活性时,表达阻遏蛋白并抑制所述诱变组分的表达。诱变抑制量与期望活性的量成比例。诱变的减少增加了无突变噬菌体后代的数量。

[0051] 图2显示了这可能如何运作的一个例子。靶蛋白 (由宿主生物组成型表达且不经受进化压力) 与噬菌体所编码的并在感染后的宿主中表达的进化蛋白质之间的相互作用引起阻遏物表达,这会减少诱变组分的表达。靶与进化蛋白质之间结合亲和力的增加导致了更高水平的阻遏物表达,并因此导致宿主细胞内更低的突变率。噬菌体休克启动子是激活名义突变水平的特别好的诱导物,确保只有受感染的细胞才会有更水平的突变。因为噬菌体-休克启动子被感染后表达的p4蛋白 (pIV) 所激活,阻遏物被进化蛋白的表达所激活,所以激活物和阻遏物组分将同时竞争以调控突变率。

[0052] 图3显示了对编码具有低水平期望行为的进化蛋白的噬菌体进行应答的范例,在这个例子中,所述期望行为是与靶蛋白结合。因为阻遏物表达很少或不表达,突变率就保持

在由对噬菌体休克启动子的反应所确定的高水平。由宿主生物所产生的后代将含有大量突变体,因此积极地搜索进化景观,很少会产生这种不良表现噬菌体基因型的克隆或精确拷贝。

[0053] 图4显示了对编码具有高水平期望活性的蛋白质的噬菌体进行应答的范例。进化蛋白质和靶之间的强结合导致了增强的阻遏物表达,导致诱变组分的更低产量,并因此导致更低突变率。更少的所得后代会包含突变,导致不那么积极地搜索变异,更多的后代将携带编码具有高水平期望活性的蛋白质的该基因型的精确拷贝。

[0054] 本发明的非限制性实施方案包括例如以下实施方案。

[0055] 1. 一种定向进化大分子的方法,所述方法包括人工增加包含待进化的感兴趣基因的进化生物种群所经历的突变率,其中感兴趣基因编码不包含期望活性的基因产物,由此使感兴趣基因在一种或多种进化生物中进化,从而编码包含期望活性的进化基因产物,其中突变率应答包含期望活性的进化基因产物的产生而成比例地降低,从而有利于包含进化的感兴趣基因的一种或多种进化生物以种群和降低的突变率繁殖。

[0056] 2. 实施方案1的方法,其中进化生物需要宿主生物进行复制。

[0057] 3. 实施方案2的方法,其中相对于未被改造成具有增加的突变率的宿主生物的突变率,所述宿主生物被改造成具有增加的突变率。

[0058] 4. 实施方案2或3的方法,其中人工增加进化生物种群所经历的突变率包括使进化生物种群与宿主生物种群接触,其中任选地在进化池中发生接触。

[0059] 5. 实施方案3或4的方法,其中经改造的宿主生物包含质粒或经修饰的宿主染色体,所述质粒或经修饰的宿主染色体含有编码一种或多种诱变组分的一组诱导型基因。

[0060] 6. 实施方案5的方法,其中所述一种或多种诱变组分选自能够降低宿主生物中DNA聚合酶对DNA复制的保真度的经修饰的DNA聚合酶蛋白结构域,以及能够与宿主生物中的DNA聚合酶相互作用以降低DNA聚合酶对DNA复制的保真度的蛋白质。

[0061] 7. 实施方案5或6的方法,其中增加突变率包括引入含有能够诱导诱变组分产生的噬菌体休克启动子的质粒。

[0062] 8. 实施方案5-7中任一项的方法,其中通过与期望活性的产生成比例地产生并下调诱变组分表达的阻遏物分子来降低突变率。

[0063] 9. 实施方案8的方法,其中所述阻遏物是四环素阻遏物(TetR)并且所述质粒包含TetR结合位点,所述结合位点包含四环素操纵子序列的一个或多个重复或四环素应答元件。

[0064] 10. 实施方案1-10中任一项的方法,其中通过将诱变化合物引入进化生物的环境来增加诱变。

[0065] 11. 实施方案1的方法,其中进化生物是经修饰的M13噬菌体,其中所述进化生物的基因组包含野生型M13噬菌体基因的子集,该子集包含gIII、gIV以及复制起始点的DNA序列和包装信号的DNA序列,其中噬菌体繁殖所必需的所有其他M13噬菌体基因都是在宿主生物所包含的质粒中编码的,并且是作为对噬菌体感染的应答而组成型表达或者通过外部试剂诱导表达。

[0066] 12. 实施方案11的方法,其中所述宿主生物是大肠杆菌(*Escherichia coli*)。

[0067] 13. 实施方案2-11中任一项的方法,其中进化生物是经修饰的M13噬菌体,其中所

述进化生物的基因组包含野生型M13噬菌体基因的子集,该子集包含gIII、gIV以及复制起始点的DNA序列和包装信号的DNA序列,其中噬菌体繁殖所必需的所有其他M13噬菌体基因都是在宿主生物中的质粒中编码的,并作为对噬菌体感染的应答而组成型表达或者通过外部试剂诱导表达。

[0068] 14. 实施方案13的方法,其中所述宿主生物是大肠杆菌。

[0069] 15. 一种用于大分子定向进化的系统,所述系统包含:

[0070] (a) 包含待进化的感兴趣基因的进化生物种群,其中所述感兴趣基因编码不包含期望活性的基因产物,由此使所述感兴趣基因能够在一种或多种进化生物中进化,从而编码包含期望活性和直接或间接抑制诱导的诱变的能力的进化基因产物,其中进化生物需要宿主生物进行复制;和(b) 宿主生物种群,其中与未被改造成具有增加的突变率的宿主生物的突变率相比,所述宿主生物被改造成具有增加的突变率。

[0071] 16. 实施方案15的系统,还包含至少一种选自下组的成员:容器、cellstat和适用于繁殖进化生物和/或宿主生物的生长培养基。

[0072] 17. 实施方案15或16的系统,其中所述进化生物是噬菌体且所述宿主生物是细菌。

[0073] 18. 实施方案17的系统,其中所述噬菌体是M13且所述宿主生物是大肠杆菌。

[0074] 19. 实施方案18的系统,其中M13噬菌体是经修饰的M13噬菌体,其包含野生型M13噬菌体基因的子集,该子集包含gIII、gIV以及复制起始点的DNA序列和包装信号的DNA序列,其中噬菌体繁殖所必需的所有其他M13噬菌体基因都是在宿主生物所包含的质粒中编码的,并作为对噬菌体感染的应答而组成型表达或者通过外部试剂诱导表达。

[0075] 20. 实施方案15或16的系统,其中进化生物是实施方案1-14任一项的进化生物。

[0076] 21. 实施方案15、16和20中任一项的系统,其中所述宿主生物是实施方案2-14中任一项的宿主生物。

[0077] 22. 由实施方案1-14中任一项的方法产生的包含期望活性的基因产物。

[0078] 23. 实施方案22的基因产物,其中所述基因产物是蛋白质或RNA。

[0079] 24. 编码实施方案22或23的基因产物的核酸分子。

[0080] 25. 编码包含期望活性的基因产物的核酸分子,所述核酸分子是由权利要求1-14中任一项的方法产生的。

[0081] 26. 包含实施方案22或23的基因产物和/或实施方案24或25的核酸分子的细胞或病毒。

[0082] 27. 实施方案26的细胞,其中所述细胞选自细菌细胞、动物细胞、哺乳动物细胞、人细胞、真菌细胞、藻类细胞和植物细胞。

[0083] 28. 实施方案26的细胞,其中所述细胞是非人细胞或体外培养的人细胞。

[0084] 替代实施方案

[0085] 可以采用其他机制来应答期望活性降低突变率,包括但不限于用编码诱变聚合酶组分的mRNA进行的RNA干扰、刺激高准确度聚合酶组分的产生或者抗突变体基因的活化。

[0086] 随着诱导高突变率的新方法的发展,无疑将提出新方法来调控所产生的突变率。因此,该方法的明显延展就是将该调控用作连续进化中的选择机制。

[0087] 本文所使用的冠词“一种”和“一个”意指该冠词的一种/一个语法对象或多于一种/一个(即至少一种/一个)的语法对象。举例来说,“一个元件”就表示一个或多个元件。

[0088] 在整个说明书中,单词“包含(comprising)”或变体(例如“包括(comprises)”或“含有(comprising)”)应理解为暗示包含所述元件、整数或步骤,或者元件、整数或步骤的组,但不排除任何其他元件、整数或步骤或者元件、整数或步骤的组。

[0089] 在本文中提及包括两个或更多个已定义步骤的方法时,所定义的步骤可以以任何顺序或同时进行(除非上下文排除了该可能性),该方法可包括在任何已定义步骤之前、在两个已定义步骤之间或者在所有已定义步骤之后进行的一个或多个其他步骤(除非上下文排除了该可能性)。

[0090] 本文使用术语“至少”后跟数字来表示范围的起始包括该数字(它可以是具有上限或没有上限的范围,取决于所定义的变量)。例如,“至少1”表示1或大于1。本文使用术语“至多”后跟数字来表示范围的终止包括该数字(它可以是具有1或0作为其下限的范围,或者不具有下限的范围,取决于所定义的变量)。例如,“至多4”表示4或小于4,“至多40%”表示“40%或小于40%”。在本说明书中,当范围是以“(第一个数字)至(第二个数字)”或“(第一个数字)-(第二个数字)”给出时,这就表示了包括两个数字为界的范围。例如,“25至100”表示下限为25且上限为100的范围,且包括25和100两者。

[0091] 说明书中提及的所有出版物和专利申请表示了本发明所属领域的技术人员的水平。所有出版物和专利申请均通过引用而并入本文,其程度如同每篇单独的出版物或专利申请是具体且单独地表明通过引用而并入的。

[0092] 尽管为了清楚理解的目的已经通过说明和例子详细地描述了前述发明,但将显而易见的是,可以在所附权利要求的范围内实施某些改变和修改。

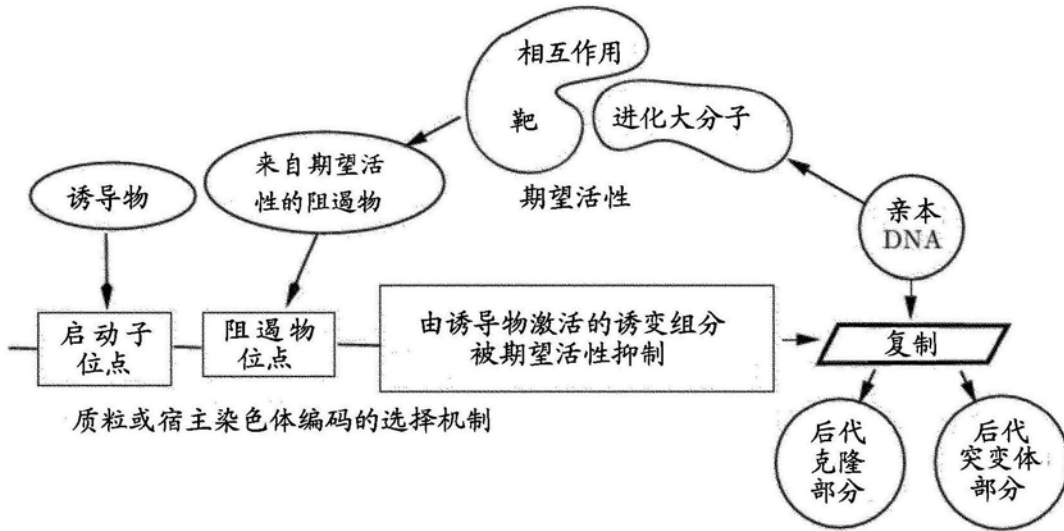


图1

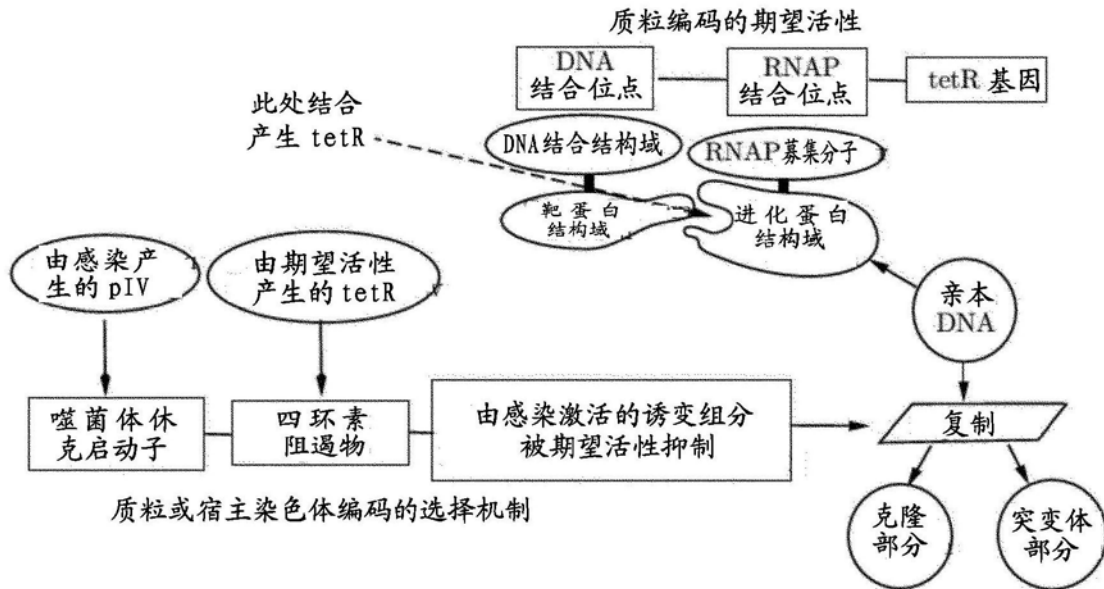


图2

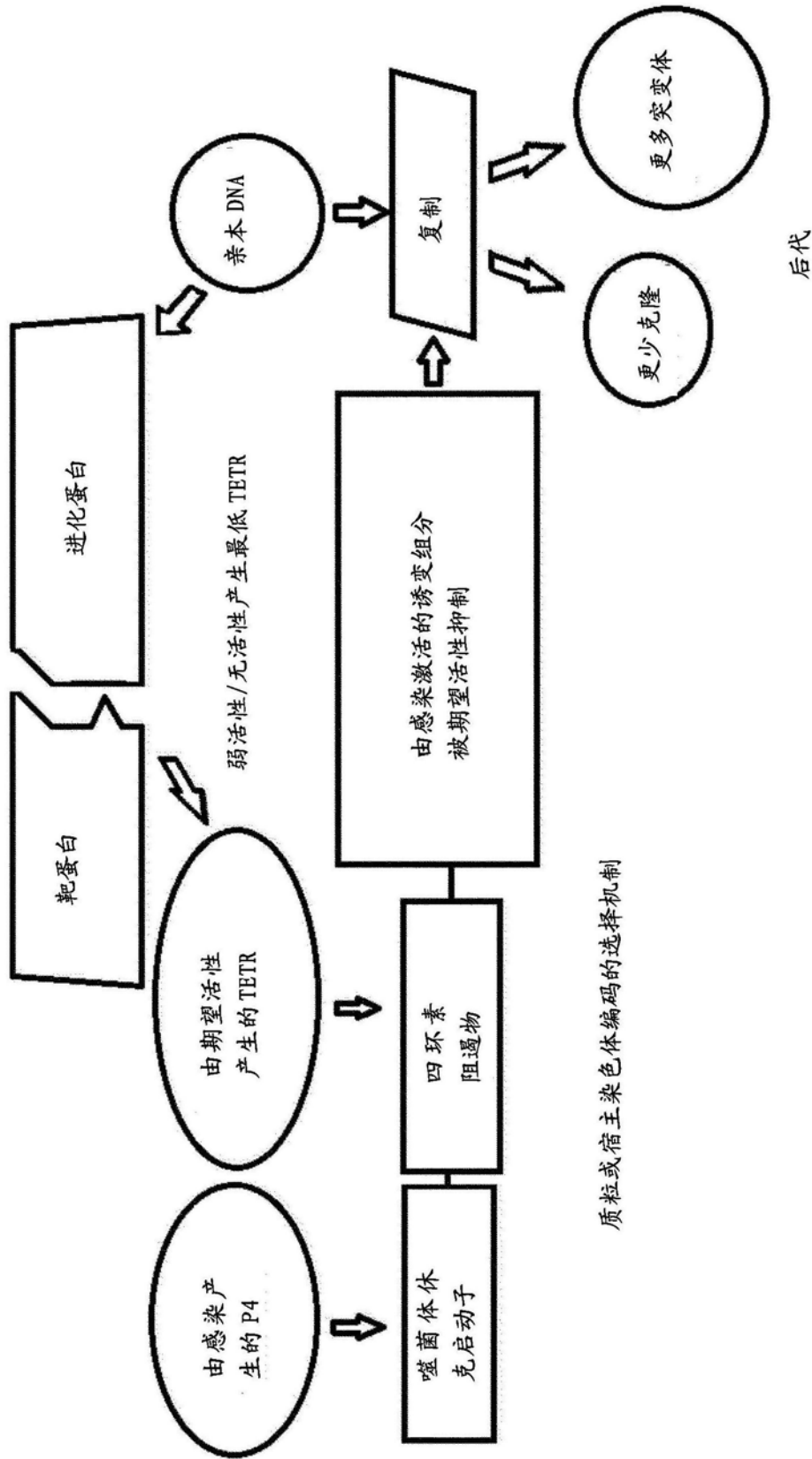


图3

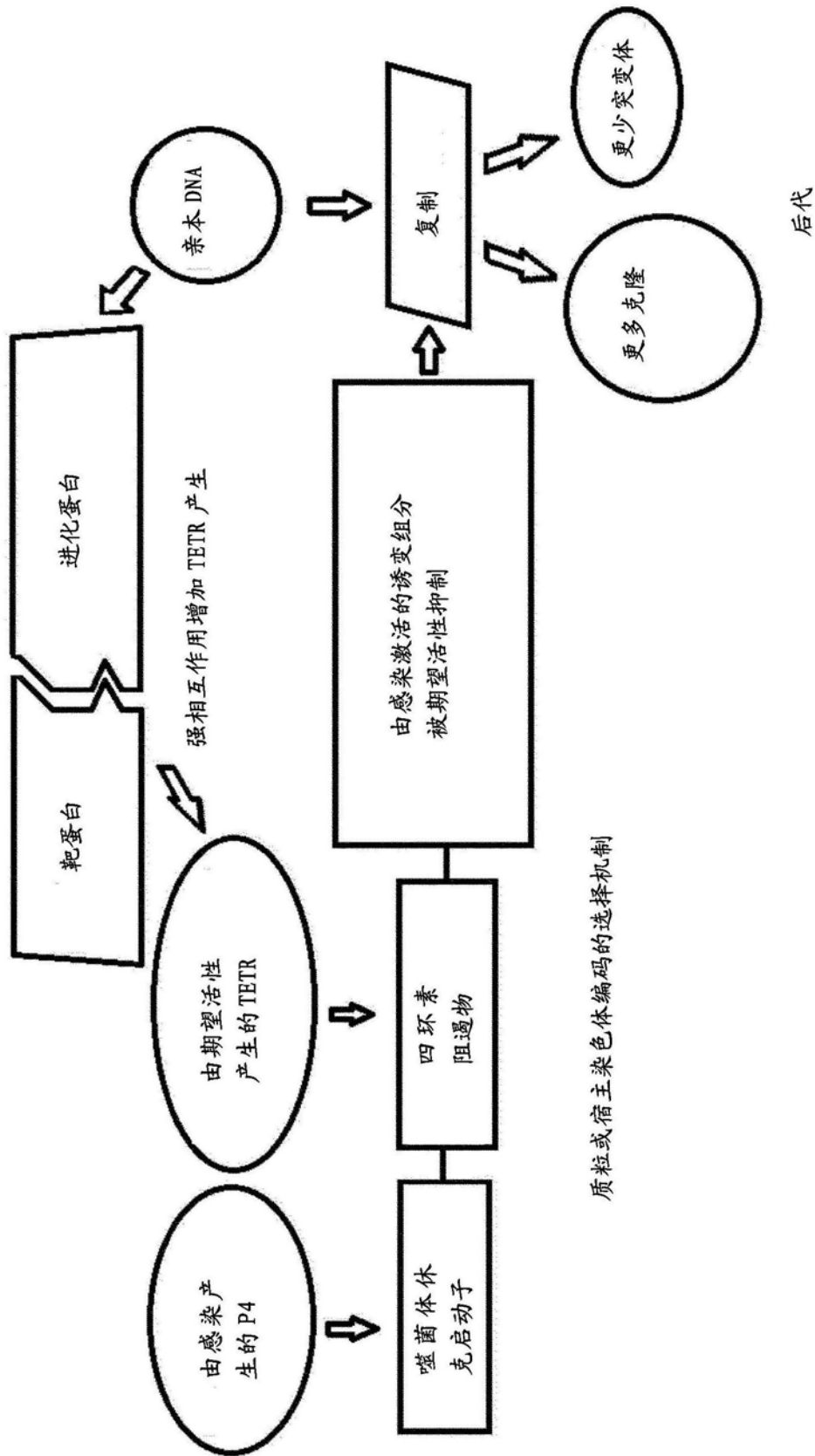


图4

T7 → T3 M 选择

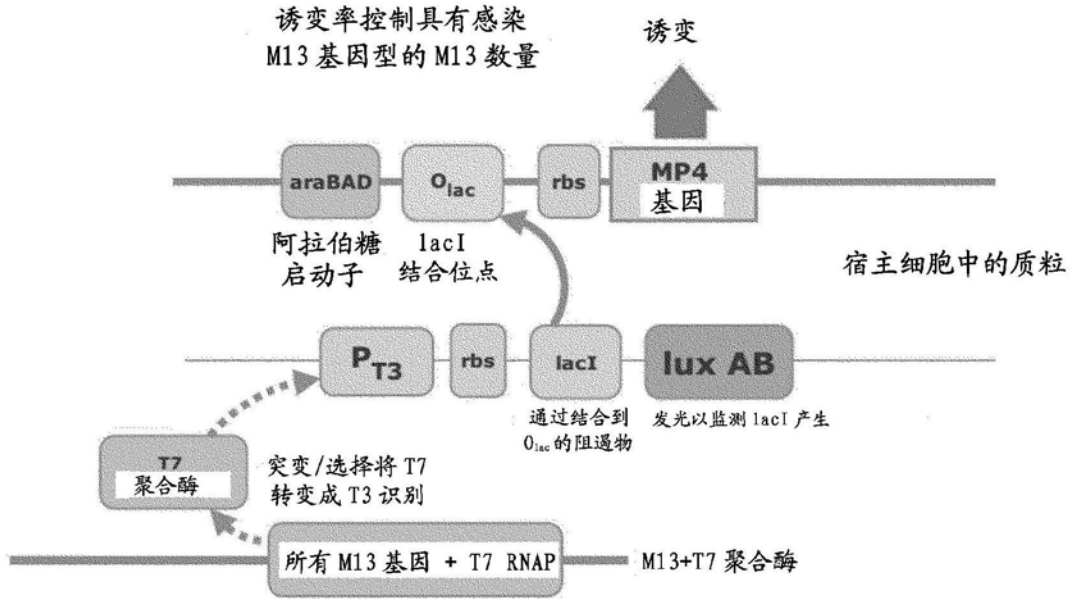


图5