



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 115298308 A

(43) 申请公布日 2022. 11. 04

(21) 申请号 202180022619.0

(22) 申请日 2021.03.18

(30) 优先权数据

62/992,637 2020.03.20 US

63/017,755 2020.04.30 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.09.20

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/023003 2021.03.18

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/188819 EN 2021.09.23

(71) 申请人 同生运营公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 克里斯汀·阿多尔夫森

佩尔·格瑞森 伊索尔德·卡利汉

亚当·劳伦斯

詹姆斯·斯波纳莫尔

杰伊·科尼茨卡

(74) 专利代理机构 北京博辉通达知识产权代理

有限公司 11750

专利代理师 李肖芳 李平

(51) Int. Cl.

C12N 9/88 (2006.01)

C12N 15/60 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

A61K 35/74 (2015.01)

A61P 3/00 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

C12R 1/19 (2006.01)

权利要求书7页 说明书41页 附图7页

(54) 发明名称

经工程化以减轻高苯丙氨酸血症的微生物

(57) 摘要

公开了遗传工程化细菌、其药物组合物以及调节和治疗与高苯丙氨酸血症相关的疾病的方法。

1. 一种突变型苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 多肽, 其包含与野生型PAL相比在选自92、133、167、432、470、433、263、366和396的氨基酸位置处的一个或多个突变。

2. 如权利要求1所述的突变型PAL多肽, 其包含与野生型PAL相比在选自S92、H133、I167、L432、V470、A433、A263、K366和/或L396的氨基酸位置处的一个或多个突变。

3. 如权利要求1或2所述的突变型PAL多肽, 其中所述野生型PAL是发光光杆菌PAL。

4. 如权利要求3所述的突变型PAL多肽, 其中所述发光光杆菌PAL包含SEQ ID NO: #。

5. 如权利要求1-4中任一项所述的突变型PAL多肽, 其中所述突变包括S92G; H133M; I167K; L432I; V470A。

6. 如权利要求1-4中任一项所述的突变型PAL多肽, 其中所述突变包括S92G; H133F; A433S; V470A。

7. 如权利要求1-4中任一项所述的突变型PAL多肽, 其中所述突变包括S92G; H133F; A263T; K366K (例如, 多核苷酸序列中的沉默突变); L396L (例如, 多核苷酸序列中的沉默突变); V470A。

8. 如权利要求1-7中任一项所述的突变型PAL多肽, 其中与所述野生型PAL相比, 所述多肽表现出代谢苯丙氨酸的能力增加。

9. 如权利要求1-8中任一项所述的突变型PAL多肽, 其中与所述野生型PAL相比, 所述多肽表现出至少两倍的代谢苯丙氨酸的能力增加。

10. 如权利要求1-9中任一项所述的突变型PAL多肽, 其中与所述野生型PAL相比, 所述多肽表现出至少三倍的代谢苯丙氨酸的能力增加。

11. 如权利要求1-10中任一项所述的突变型PAL多肽, 其中与所述野生型PAL相比, 所述多肽表现出至少四倍的代谢苯丙氨酸的能力增加。

12. 如权利要求1-11中任一项所述的突变型PAL多肽, 其中与所述野生型PAL相比, 所述多肽表现出至少五倍的代谢苯丙氨酸的能力增加。

13. 如权利要求8-12中任一项所述的突变型PAL多肽, 其中与所述野生型PAL相比代谢苯丙氨酸的能力增加是通过检测苯丙氨酸、马尿酸和/或反式肉桂酸的水平来测量的。

14. 一种多核苷酸, 其编码如权利要求1-13中任一项所述的突变型PAL多肽。

15. 一种基因表达系统, 其包括如权利要求14所述的多核苷酸。

16. 如权利要求15所述的基因表达系统, 其中编码突变型PAL的多核苷酸可操作地连接至不与所述基因天然缔合的启动子。

17. 如权利要求16所述的基因表达系统, 其中所述启动子是诱导型启动子。

18. 如权利要求17所述的基因表达系统, 其中所述诱导型启动子是IPTG诱导型启动子。

19. 如权利要求17所述的基因表达系统, 其中所述诱导型启动子是温度调节型启动子或氧水平依赖型启动子。

20. 如权利要求19所述的基因表达系统, 其中所述氧水平依赖型启动子包括延胡索酸和硝酸还原酶调节剂 (FNR) 启动子、精氨酸脱亚胺酶和硝酸还原 (ANR) 启动子和异化硝酸呼吸调节剂 (DNR) 启动子。

21. 如权利要求15-20中任一项所述的基因表达系统, 其还包括编码野生型PAL的基因。

22. 如权利要求21所述的基因表达系统, 其中所述野生型PAL可操作地连接至不与所述基因天然缔合的启动子。

23. 如权利要求15-22中任一项所述的基因表达系统, 其还包含编码L-氨基酸脱氨酶(LAAD)的基因。

24. 如权利要求23所述的基因表达系统, 其中所述编码LAAD的基因可操作地连接至不与所述基因天然缔合的启动子。

25. 如权利要求15-24中任一项所述的基因表达系统, 其还包含编码苯丙氨酸转运蛋白的基因。

26. 如权利要求25所述的基因表达系统, 其中所述编码苯丙氨酸转运蛋白的基因可操作地连接至不与所述基因天然缔合的启动子。

27. 一种遗传工程化微生物, 其包含编码如权利要求1-13中任一项所述的突变型PAL多肽的一个或多个基因或如权利要求15-26中任一项所述的基因表达系统。

28. 一种遗传工程化微生物, 其包含编码如权利要求1-13中任一项所述的突变型PAL的一个或多个基因, 其中所述突变型PAL可操作地连接至不与所述基因天然缔合的启动子。

29. 如权利要求28所述的遗传工程化微生物, 其中所述启动子是诱导型启动子。

30. 如权利要求29所述的遗传工程化微生物, 其中所述诱导型启动子是IPTG诱导型启动子。

31. 如权利要求29所述的遗传工程化微生物, 其中所述诱导型启动子是温度调节型启动子或氧水平依赖型启动子。

32. 如权利要求31所述的遗传工程化微生物, 其中所述氧水平依赖型启动子包括FNR、ANR和DNR启动子。

33. 如权利要求28-32中任一项所述的遗传工程化微生物, 其还包含编码野生型PAL的基因。

34. 如权利要求33所述的遗传工程化微生物, 其中编码所述野生型PAL的所述基因可操作地连接至不与所述基因天然缔合的启动子。

35. 如权利要求28-34中任一项所述的遗传工程化微生物, 其还包含编码LAAD的基因。

36. 如权利要求35所述的遗传工程化微生物, 其中所述LAAD可操作地连接至不与所述基因天然缔合的诱导型启动子。

37. 如权利要求28-36中任一项所述的遗传工程化微生物, 其还包含编码苯丙氨酸转运蛋白的基因。

38. 如权利要求37所述的遗传工程化微生物, 其中所述苯丙氨酸转运蛋白可操作地连接至不与所述基因天然缔合的启动子。

39. 一种遗传工程化微生物, 其包含:

(a) 编码如权利要求1-13中任一项所述的突变型PAL多肽的一个或多个基因, 其中所述多肽可操作地连接至不与所述一个或多个基因天然缔合的IPTG诱导型启动子、温度调节型启动子或氧水平依赖型启动子;

(b) 编码苯丙氨酸转运蛋白的一个或多个基因, 其中编码所述苯丙氨酸转运蛋白的所述一个或多个基因可操作地连接至不与所述一个或多个基因天然缔合的诱导型启动子; 以及任选地

(c) 编码L-氨基酸脱氨酶(LAAD)的一个或多个基因, 其中编码所述LAAD的所述一个或多个基因可操作地连接至不与所述一个或多个基因天然缔合的诱导型启动子。

40. 如权利要求38或39所述的遗传工程化微生物,其中可操作地连接至编码所述PAL的所述一个或多个基因的所述启动子和可操作地连接至编码所述苯丙氨酸转运蛋白的所述一个或多个基因的所述启动子是同一启动子的独立拷贝。

41. 如权利要求38或39所述的遗传工程化微生物,其中编码所述PAL的所述一个或多个基因和编码所述苯丙氨酸转运蛋白的所述一个或多个基因可操作地连接至同一启动子的同一拷贝。

42. 如权利要求36-41中任一项所述的遗传工程化微生物,其中编码所述LAAD的所述一个或多个基因可操作地连接的启动子不同于可操作地连接至编码所述PAL的所述一个或多个基因的所述启动子和可操作地连接至编码所述苯丙氨酸转运蛋白的所述一个或多个基因的所述启动子。

43. 如权利要求36-42中任一项所述的遗传工程化微生物,其中可操作地连接至编码所述PAL的所述一个或多个基因的所述启动子、可操作地连接至编码所述苯丙氨酸转运蛋白的所述一个或多个基因的所述启动子和可操作地连接至编码所述LAAD的所述一个或多个基因的所述启动子由外源环境条件诱导。

44. 如权利要求38-43中任一项所述的遗传工程化微生物,其中可操作地连接至编码所述PAL的所述一个或多个基因的所述启动子和可操作地连接至编码所述苯丙氨酸转运蛋白的所述一个或多个基因的所述启动子由哺乳动物肠道中发现的外源环境条件诱导。

45. 如权利要求44所述的遗传工程化微生物,其中可操作地连接至编码所述PAL的所述一个或多个基因的所述启动子和可操作地连接至编码所述苯丙氨酸转运蛋白的所述一个或多个基因的所述启动子由哺乳动物小肠中发现的外源环境条件诱导。

46. 如权利要求38-45中任一项所述的遗传工程化微生物,其中可操作地连接至编码所述苯丙氨酸转运蛋白的所述一个或多个基因的所述启动子选自由以下组成的组:在低氧或厌氧条件下诱导的启动子、温度调节型启动子和由阿拉伯糖、IPTG、四环素或鼠李糖诱导的启动子。

47. 如权利要求46所述的遗传工程化微生物,其中可操作连接至编码所述苯丙氨酸转运蛋白的所述一个或多个基因的所述启动子是FNR响应性启动子。

48. 如权利要求36-47中任一项所述的遗传工程化微生物,其中编码所述LAAD的所述基因受到由哺乳动物肠道中天然存在的环境因子诱导的启动子控制。

49. 如权利要求36-47中任一项所述的遗传工程化微生物,其中编码所述LAAD的所述基因受到由哺乳动物肠道中非天然存在的环境因子诱导的启动子控制。

50. 如权利要求49所述的遗传工程化微生物,其中编码所述LAAD的所述基因受到由阿拉伯糖、IPTG、四环素或鼠李糖诱导的启动子控制。

51. 如权利要求37-50中任一项所述的遗传工程化微生物,其中编码所述苯丙氨酸转运蛋白的所述一个或多个基因位于所述微生物中的染色体上。

52. 如权利要求37-50中任一项所述的遗传工程化微生物,其中编码所述苯丙氨酸转运蛋白的所述一个或多个基因位于所述微生物中的质粒上。

53. 如权利要求28-52中任一项所述的遗传工程化微生物,其中编码所述PAL的所述一个或多个基因位于所述微生物中的质粒上。

54. 如权利要求28-52中任一项所述的遗传工程化微生物,其中编码所述PAL的所述一

个或多个基因位于所述微生物中的染色体上。

55. 如权利要求35-54中任一项所述的遗传工程化微生物,其中编码所述LAAD的所述一个或多个基因位于所述微生物中的质粒上。

56. 如权利要求35-54中任一项所述的遗传工程化微生物,其中编码所述LAAD的所述一个或多个基因位于所述微生物中的染色体上。

57. 如权利要求37-56中任一项所述的遗传工程化微生物,其中所述苯丙氨酸转运蛋白是PheP。

58. 如权利要求27-57中任一项所述的遗传工程化微生物,其中所述微生物是当所述微生物存在于哺乳动物肠道中时是互补的基因的营养缺陷型。

59. 如权利要求58所述的遗传工程化微生物,其中所述哺乳动物肠道是人类肠道。

60. 如权利要求59所述的遗传工程化微生物,其中所述微生物是胸苷生物合成途径中的二氨基庚二酸或酶营养缺陷型的。

61. 如权利要求27-60中任一项所述的遗传工程化微生物,其中所述微生物进一步被工程化以含有编码对所述微生物有毒的物质的基因,其中所述基因受到由哺乳动物肠道中非天然存在的环境因子诱导的启动子控制。

62. 如权利要求30和33-61中任一项所述的遗传工程化微生物,其中所述温度调节型启动子在37°C与42°C之间的温度下被诱导。

63. 如权利要求62所述的遗传工程化微生物,其中所述温度调节型启动子是 λ CI诱导型启动子。

64. 如权利要求62或63所述的遗传工程化微生物,其还包含编码温度敏感性CI阻遏物突变体的一个或多个基因。

65. 如权利要求64所述的遗传工程化微生物,其中所述温度敏感性CI阻遏物突变体是CI857。

66. 如权利要求64或65所述的遗传工程化微生物,其中编码所述温度敏感性CI阻遏物突变体的所述一个或多个基因受到FNR响应性启动子或由阿拉伯糖、IPTG、四环素或鼠李糖诱导的启动子控制。

67. 如权利要求36-63中任一项所述的遗传工程化微生物,其还包含温度敏感型CI阻遏物突变体,其中编码所述LAAD的所述一个或多个基因和编码所述温度敏感型CI阻遏物突变体的所述基因受到同一启动子控制。

68. 如权利要求67所述的遗传工程化微生物,其中所述启动子由阿拉伯糖、IPTG、四环素或鼠李糖的存在直接或间接诱导。

69. 如权利要求36-48和51-67中任一项所述的遗传工程化微生物,其中编码所述LAAD的所述一个或多个基因受到FNR响应性启动子控制。

70. 如权利要求64-69中任一项所述的遗传工程化微生物,其中编码所述温度敏感性CI阻遏物突变体的所述一个或多个基因位于所述微生物中的质粒上。

71. 如权利要求64-69中任一项所述的遗传工程化微生物,其中编码所述温度敏感性CI阻遏物突变体的所述一个或多个基因位于所述微生物中的染色体上。

72. 一种包含遗传工程化微生物的药物组合物,所述遗传工程化微生物包含编码如权利要求1-13中任一项所述的突变型PAL的一个或多个基因。

73. 如权利要求72所述的药物组合物,其中所述突变型PAL可操作地连接至不与所述基因天然缔合的启动子。

74. 如权利要求73所述的药物组合物,其中所述启动子是诱导型启动子。

75. 如权利要求74所述的药物组合物,其中所述诱导型启动子是IPTG诱导型启动子。

76. 如权利要求75所述的药物组合物,其中所述启动子是温度调节型启动子或氧水平依赖型启动子。

77. 如权利要求76所述的药物组合物,其中所述氧水平依赖型启动子包括FNR、ANR和DNR启动子。

78. 如权利要求72-77中任一项所述的药物组合物,其还包含编码野生型PAL的基因。

79. 如权利要求78所述的药物组合物,其中编码所述野生型PAL的所述基因可操作地连接至不与所述基因天然缔合的启动子。

80. 如权利要求72-79中任一项所述的药物组合物,其还包含编码LAAD的基因。

81. 如权利要求80所述的药物组合物,其中所述LAAD可操作地连接至不与所述基因天然缔合的诱导型启动子。

82. 如权利要求72-81中任一项所述的药物组合物,其还包含编码苯丙氨酸转运蛋白的基因。

83. 如权利要求82所述的药物组合物,其中所述苯丙氨酸转运蛋白可操作地连接至不与所述基因天然缔合的启动子。

84. 如权利要求72-83中任一项所述的药物组合物,其被配制以用于口服施用。

85. 一种减轻高苯丙氨酸血症或治疗与高苯丙氨酸血症相关的疾病的方法,其包括向有需要的受试者施用包含遗传工程化微生物的药物组合物的步骤,所述遗传工程化微生物包含编码如权利要求1-13中任一项所述的突变型PAL的一个或多个基因。

86. 如权利要求85所述的方法,其中所述突变型PAL可操作地连接至不与所述基因天然缔合的启动子。

87. 如权利要求86所述的方法,其中所述启动子是诱导型启动子。

88. 如权利要求87所述的方法,其中所述诱导型启动子是IPTG诱导型启动子。

89. 如权利要求87所述的方法,其中所述诱导型启动子是温度调节型启动子或氧水平依赖型启动子。

90. 如权利要求89所述的方法,其中所述氧水平依赖型启动子包括FNR、ANR和DNR启动子。

91. 如权利要求85-90中任一项所述的方法,其还包含编码野生型PAL的基因。

92. 如权利要求91所述的方法,其中编码所述野生型PAL的所述基因可操作地连接至不与所述基因天然缔合的启动子。

93. 如权利要求85-92中任一项所述的方法,其还包含编码LAAD的基因。

94. 如权利要求93所述的方法,其中所述LAAD可操作地连接至不与所述基因天然缔合的诱导型启动子。

95. 如权利要求85-94中任一项所述的方法,其还包含编码苯丙氨酸转运蛋白的基因。

96. 如权利要求95所述的方法,其中所述苯丙氨酸转运蛋白可操作地连接至不与所述基因天然缔合的启动子。

97. 如权利要求85-96中任一项所述的方法,其中所述疾病选自由以下组成的组:苯丙酮尿症、经典或典型苯丙酮尿症、非典型苯丙酮尿症、永久性轻度高苯丙氨酸血症、非苯丙酮尿症高苯丙氨酸血症、苯丙氨酸羟化酶缺乏症、辅因子缺乏症、二氢蝶啶还原酶缺乏症、四氢蝶呤合酶缺乏症、塞加瓦氏病和肝病。

98. 如权利要求27-97中任一项所述的遗传工程化微生物,其中所述微生物是细菌。

99. 如权利要求98所述的细菌,其中所述细菌包含一个或多个噬菌体基因组,其中所述噬菌体包含与裂解性生长、水平基因转移、细胞裂解、噬菌体结构、噬菌体装配、噬菌体包装、重组、复制、翻译、噬菌体插入及其组合相关的一个或多个噬菌体基因中的一个或多个突变。

100. 如权利要求99所述的细菌,其中所述一个或多个噬菌体基因选自蛋白酶编码基因、溶素编码基因、毒素编码基因、抗生素抗性基因、噬菌体翻译相关蛋白编码基因、结构蛋白基因、板蛋白基因、噬菌体装配基因、门户蛋白基因、重组基因、整合酶编码基因、转化酶编码基因、转座酶编码基因、复制相关蛋白编码基因、引物酶编码基因、tRNA相关蛋白编码基因、噬菌体插入基因、附着位点基因、包装基因、终止酶编码基因、尾蛋白编码基因及其组合。

101. 如权利要求99或100所述的细菌,其中所述突变在编码以下的基因中:脂质A生物合成(KDO)2-(月桂酰基)-脂质IVA酰基转移酶、肽酶、锌ABC转运蛋白底物结合蛋白、锌ABC转运蛋白ATP酶、高亲和力锌转运蛋白膜组分、ATP依赖性DNA解旋酶RuvB、ATP依赖性DNA解旋酶RuvA、霍利迪连接游离酶、二氢新蝶呤三磷酸焦磷酸酶、天冬氨酰基-tRNA合成酶、水解酶、DNA聚合酶V、MsgA、噬菌体尾蛋白、尾蛋白、宿主特异性蛋白、肽酶P60、尾蛋白、尾纤维蛋白、微小尾蛋白U、DNA破裂-再连接蛋白、肽酶S14、衣壳蛋白、DNA包装蛋白、终止酶、溶菌酶、穿孔素、DNA腺嘌呤甲基化酶、丝氨酸蛋白酶、抗终止蛋白、抗阻遏物、交叉连接内切脱氧核糖核酸酶、腺嘌呤甲基转移酶、DNA甲基转移酶ECOLIN_10240、GntR家族转录调节因子ECOLIN_10245、cI阻遏物、未知功能结构域(DUF4222);DNA重组酶、多重抗生素抗性调节因子(MarR)、P22中未知的ead样蛋白、未知功能蛋白(DUF550);3'-5'核酸外切酶、切除酶、整合酶、tRNA甲基转移酶及其组合。

102. 如权利要求99-101中任一项所述的细菌,其中所述一个或多个突变选自:

- a. 所述噬菌体基因组中一个或多个噬菌体基因的部分或完整序列的一个或多个缺失;
 - b. 一个或多个核苷酸到所述噬菌体基因组中的一个或多个噬菌体基因中的一个或多个插入;
 - c. 所述噬菌体基因组中一个或多个噬菌体基因的部分或完整序列的一个或多个取代;
 - d. 所述噬菌体基因组中一个或多个噬菌体基因的部分或完整序列的一个或多个倒位;
- 和
- e. a、b、c和d中两个或更多的组合。

103. 如权利要求99-102中任一项所述的细菌,其中所述一个或多个噬菌体基因组以益生菌的天然状态存在。

104. 如权利要求99-103中任一项所述的细菌,其中所述一个或多个噬菌体基因组编码一种或多种溶原性噬菌体、缺陷性或隐性噬菌体或卫星噬菌体。

105. 如权利要求99-104中任一项所述的细菌,其中相对于在所述一个或多个噬菌体基

基因组中不具有一个或多个靶向突变的同一细菌,所述一个或多个突变减少或防止噬菌体颗粒从所述细菌中释放。

106.如权利要求99-105中任一项所述的细菌,其中所述细菌是选自由以下组成的组的益生菌:拟杆菌属、双歧杆菌属、梭菌属、埃希氏菌属、大肠埃希氏菌尼斯勒菌株、乳杆菌属和乳球菌属。

107.如权利要求106所述的细菌,其中所述一个或多个噬菌体基因组选自以下中的一种或多种:大肠埃希氏菌尼斯勒噬菌体1基因组、大肠埃希氏菌尼斯勒噬菌体2基因组和大肠埃希氏菌尼斯勒噬菌体3基因组。

108.如权利要求107所述的细菌,其中所述噬菌体基因组是大肠埃希氏菌尼斯勒噬菌体3基因组,并且其中所述突变位于选自以下的一个或多个基因中或包含选自以下的一个或多个基因:ECOLIN_09965、ECOLIN_09970、ECOLIN_09975、ECOLIN_09980、ECOLIN_09985、ECOLIN_09990、ECOLIN_09995、ECOLIN_10000、ECOLIN_10005、ECOLIN_10010、ECOLIN_10015、ECOLIN_10020、ECOLIN_10025、ECOLIN_10030、ECOLIN_10035、ECOLIN_10040、ECOLIN_10045、ECOLIN_10050、ECOLIN_10055、ECOLIN_10065、ECOLIN_10070、ECOLIN_10075、ECOLIN_10080、ECOLIN_10085、ECOLIN_10090、ECOLIN_10095、ECOLIN_10100、ECOLIN_10105、ECOLIN_10110、ECOLIN_10115、ECOLIN_10120、ECOLIN_10125、ECOLIN_10130、ECOLIN_10135、ECOLIN_10140、ECOLIN_10145、ECOLIN_10150、ECOLIN_10160、ECOLIN_10165、ECOLIN_10170、ECOLIN_10175、ECOLIN_10180、ECOLIN_10185、ECOLIN_10190、ECOLIN_10195、ECOLIN_10200、ECOLIN_10205、ECOLIN_10210、ECOLIN_10220、ECOLIN_10225、ECOLIN_10230、ECOLIN_10235、ECOLIN_10240、ECOLIN_10245、ECOLIN_10250、ECOLIN_10255、ECOLIN_10260、ECOLIN_10265、ECOLIN_10270、ECOLIN_10275、ECOLIN_10280、ECOLIN_10290、ECOLIN_10295、ECOLIN_10300、ECOLIN_10305、ECOLIN_10310、ECOLIN_10315、ECOLIN_10320、ECOLIN_10325、ECOLIN_10330、ECOLIN_10335、ECOLIN_10340和ECOLIN_10345。

109.如权利要求108所述的细菌,其中所述突变包括ECOLIN_10110、ECOLIN_10115、ECOLIN_10120、ECOLIN_10125、ECOLIN_10130、ECOLIN_10135、ECOLIN_10140、ECOLIN_10145、ECOLIN_10150、ECOLIN_10160、ECOLIN_10165和ECOLIN_10170以及ECOLIN_10175的完全或部分缺失。

110.如权利要求108或109所述的细菌,其中所述缺失是ECOLIN_10110、ECOLIN_10115、ECOLIN_10120、ECOLIN_10125、ECOLIN_10130、ECOLIN_10135、ECOLIN_10140、ECOLIN_10145、ECOLIN_10150、ECOLIN_10160、ECOLIN_10165和ECOLIN_10170的完全缺失以及ECOLIN_10175的部分缺失。

111.如权利要求99-110中任一项所述的细菌,其包含一个或多个额外遗传修饰。

112.如权利要求111所述的细菌,其中所述一个或多个额外遗传修饰包含一个或多个内源基因中的一个或多个突变。

113.如权利要求111或112所述的细菌,其中所述一个或多个额外遗传修饰包括一种或多种非天然基因的添加。

114.如权利要求99-113中任一项所述的细菌,其中所述细菌还包含抗生素抗性。

经工程化以减轻高苯丙氨酸血症的微生物

[0001] 本申请要求2020年3月20日提交的美国临时申请第62/992,637号和2020年4月30日提交的美国临时申请第63/017,755号的权益,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。

[0002] 本公开涉及用于减轻高苯丙氨酸血症的组合物和治疗方法。在某些方面,本公开涉及能够减轻哺乳动物中的高苯丙氨酸血症的遗传工程化微生物,例如细菌。在某些方面,本文公开的组合物和方法可用于治疗与高苯丙氨酸血症相关的疾病,例如苯丙酮尿症。

[0003] 苯丙氨酸是一种必需氨基酸,主要存在于膳食蛋白质中。通常,少量用于蛋白质合成,并且剩余部分在需要苯丙氨酸羟化酶(PAH)和辅因子四氢生物蝶呤的酶促途径中羟基化为酪氨酸。高苯丙氨酸血症是一组与会有毒性并导致脑损伤的苯丙氨酸水平过量相关的疾病。原发性高苯丙氨酸血症是由PAH基因突变和/或辅因子代谢阻滞导致的PAH活性缺乏引起的。

[0004] 苯丙酮尿症(PKU)是一种由PAH基因突变引起的严重形式的高苯丙氨酸血症。PKU是一种常染色体隐性遗传病,是世界范围内最常见的先天性代谢缺陷(每3000名新生儿中有1例),并且在美国影响着大约13000名患者。已经确定了400多种不同的PAH基因突变(Hoeks等人,2009)。血液中苯丙氨酸(phe)的积累会对儿童和成人的中枢神经系统造成严重损害。如果新生儿未经治疗,PKU会导致不可逆的脑损伤。目前对PKU的治疗包括从饮食中完全排除苯丙氨酸。大多数天然蛋白质来源都含有苯丙氨酸,这是一种必需氨基酸并且也是生长所必需的。在PKU患者中,这意味着他们依赖医疗食品和不含phe的蛋白质补充剂以及氨基酸补充剂来提供足够的苯丙氨酸用于生长。这种饮食对患者来说很困难并对生活质量有影响。

[0005] 如所讨论,目前的PKU疗法需要由蛋白质限制组成的实质上改造的饮食。从出生开始治疗通常会减少脑损伤和精神发育迟滞(Hoeks等人,2009年;Sarkissian等人,1999年)。然而,必须仔细监控蛋白质限制性饮食,并且必须在饮食中补充必需氨基酸以及维生素。此外,获取低蛋白食品是一个挑战,因为它们比高蛋白、未改造对应物更昂贵(Vockley等人,2014)。

[0006] 在患有PKU的儿童中,低苯丙氨酸饮食导致的生长迟滞很常见(Dobbelaere等人,2003)。成年后,可能会出现新的问题,诸如骨质疏松症、母体PKU和维生素缺乏症(Hoeks等人,2009)。血液中可自由穿透血脑屏障的苯丙氨酸水平过量也可导致神经损伤、行为问题(如易怒、疲劳)和/或身体症状(如惊厥、皮疹、身体霉味)。国际指南建议终身饮食苯丙氨酸限制,这被广泛认为是困难和不现实的(Sarkissian等人,1999),并且“需要继续努力克服带着PKU生活的最大挑战-终身坚持低苯丙氨酸饮食”(MacLeod等人,2010)。

[0007] 在具有残余PAH活性的患者亚组中,口服施用辅因子四氢生物蝶呤(也称为THB、BH4、Kuvan或沙丙蝶呤)可以与饮食限制一起使用,以降低血液苯丙氨酸水平。然而,辅因子疗法是昂贵的,并且仅适用于轻度形式的苯丙酮尿症。例如,Kuvan的年度费用可能高达每位患者57,000美元。此外,Kuvan的副作用可包括胃炎和严重过敏反应(例如,喘息、头晕、恶心、皮肤潮红)。

[0008] 苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 能够将苯丙氨酸代谢成无毒水平的氨和反式肉桂酸。与PAH不同, PAL不需要THB辅因子活性来代谢苯丙氨酸。已经对使用PAL的口服酶疗法进行了研究, 但是“没有继续进行人类和甚至动物研究, 因为PAL不能以合理的成本获得足够的量”(Sarkissian等人, 1999)。聚乙二醇化形式的重组PAL (PEG-PAL) 作为一种可注射治疗形式, 也在开发中。然而, 大多数服用PEG-PAL的受试者遭受了注射部位反应和/或产生了针对这种治疗酶的抗体 (Longo等人, 2014年)。因此, 对用于与包括PKU在内的高苯丙氨酸血症相关的疾病的有效、可靠和/或长期治疗的需求仍未得到满足。对在允许消耗更多天然蛋白质的同时控制患者血液Phe水平的治疗的需求仍未得到满足。

[0009] 在一些实施方案中, 本公开提供了突变型PAL多肽和多核苷酸。在一些实施方案中, 与野生型PAL (例如发光光杆菌 (*P. luminescens*) PAL) 相比, 突变型PAL表现出稳定性增加和/或代谢苯丙氨酸和/或减轻高苯丙氨酸血症的能力增加。在一些实施方案中, 与野生型PAL (例如发光光杆菌PAL) 相比, 突变型PAL多肽包含在氨基酸位置92、133、167、432、470、433、263、366和/或396处的一个或多个突变。在一些实施方案中, 与野生型PAL (例如发光光杆菌PAL) 相比, 突变型PAL多肽包含在氨基酸位置S92、H133、I167、L432、V470、A433、A263、K366和/或L396处的一个或多个突变。

[0010] 在一些实施方案中, 本公开提供了产生突变型PAL的遗传工程化微生物, 例如细菌。在一些实施方案中, 工程化微生物还包含编码苯丙氨酸转运蛋白例如PheP的基因。在一些实施方案中, 工程化微生物还可包含编码L-氨基酸脱氨酶 (LAAD) 的基因。工程化微生物还可含有一个或多个与生物安全和/或生物防护相关的基因序列。任何这些基因序列在基因表达系统中的表达可以用合适的启动子或启动子系统来调节。

[0011] 在某些实施方案中, 遗传工程化微生物是非致病性的, 并且可以被引入到肠道中以降低苯丙氨酸的毒性水平。本公开还提供了包含遗传工程化微生物的药物组合物, 以及调节和治疗与高苯丙氨酸血症相关的疾病的方法。在一些实施方案中, 包含突变型PAL的遗传工程化细菌包含一个或多个噬菌体基因组, 其中噬菌体基因组中的一种或多种是有缺陷的, 例如, 使得不产生裂解性噬菌体。

[0012] 附图简述

[0013] 图1描绘了通过TCA测量的mPAL1、mPAL2和mPAL3的苯丙氨酸代谢。

[0014] 图2描绘了与野生型PAL3相比, mPAL1、mPAL2和mPAL3的苯丙氨酸代谢。

[0015] 图3A-3B描绘了野生型PAL3、mPAL1、mPAL2和mPAL3的米氏图 (Michaelis-Menten graph)。

[0016] 图4A-4C描绘了在食蟹猴模型中突变型PAL功效的体外研究。通过测定血浆TCA和尿中马尿酸的水平来测量PAL变体的活性。

[0017] 图5A-5C描绘了通过全细胞和细胞裂解物测定确定的野生型PAL3活性的TCA反馈抑制。

具体实施方式

[0018] 本公开尤其包括突变型PAL多肽和多核苷酸。在一些实施方案中, 与野生型PAL (例如发光光杆菌PAL) 相比, 突变型PAL表现出稳定性增加和/或代谢苯丙氨酸和/或减轻高苯丙氨酸血症的能力增加。本公开还包括包含突变型PAL的遗传工程化微生物、其药物组合物

以及调节和治疗与高苯丙氨酸血症相关的病症(例如PKU)的方法。

[0019] 为了能够更容易地理解本公开,首先定义某些术语。应当根据本公开的其余部分并如本领域普通技术人员所理解的来解读这些定义。除非另有定义,否则本文所使用的所有技术和科学术语具有与本领域普通技术人员通常所理解的相同的含义。附加定义如整个具体实施方式中所阐述。

[0020] “高苯丙氨酸血症(Hyperphenylalaninemia)”、“高苯丙氨酸血症的(hyperphenylalaninemic)”和“过量苯丙氨酸(excess phenylalanine)”在本文中可互换使用,是指体内苯丙氨酸浓度增加或异常高。在一些实施方案中,高苯丙氨酸血症的诊断信号是至少2mg/dL、至少4mg/dL、至少6mg/dL、至少8mg/dL、至少10mg/dL、至少12mg/dL、至少14mg/dL、至少16mg/dL、至少18mg/dL、至少20mg/dL或至少25mg/dL的血液苯丙氨酸水平。如本文所用,与高苯丙氨酸血症相关的疾病包括但不限于苯丙酮尿症、经典或典型苯丙酮尿症、非典型苯丙酮尿症、永久性轻度高苯丙氨酸血症、非苯丙酮尿症高苯丙氨酸血症、苯丙氨酸羟化酶缺乏症、辅因子缺乏症、二氢蝶啶还原酶缺乏症、四氢蝶呤合酶缺乏症和塞加瓦氏病(Segawa's disease)。受影响的个体可能会出现渐进性和不可逆的神经功能缺损、智力迟钝、脑病、癫痫、湿疹、生长迟缓、小头畸形、震颤、肢体痉挛和/或色素减退(Leonard2006)。高苯丙氨酸血症也可继发于其他疾病,例如肝病。

[0021] “苯丙氨酸解氨酶”和“PAL”用于指将苯丙氨酸转化或加工成反式肉桂酸和氨的PME。反式肉桂酸毒性低,在哺乳动物中被肝酶转化为马尿酸,马尿酸分泌在尿液中。PAL可以代替PAH酶来代谢过量的苯丙氨酸。PAL酶活性不需要THB辅因子活性。在一些实施方案中,PAL由来自或衍生自原核物种的PAL基因编码。在替代性实施方案中,PAL由衍生自真核物种的PAL基因编码。在一些实施方案中,PAL由来自或衍生自细菌物种的PAL基因编码,所述细菌物种包括但不限于木糖氧化无色杆菌(*Achromobacter xylosoxidans*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、发光光杆菌(*Photobacterium luminescens*)、变异鱼腥藻(*Anabaena variabilis*)和根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)。在一些实施方案中,PAL由衍生自多变鱼腥藻的PAL基因编码,并且在本文中称为“PAL1”(Moffitt等人,2007)。在一些实施方案中,PAL由衍生自发光光杆菌的PAL基因编码,并且在本文中称为“PAL3”(Williams等人,2005)。在一些实施方案中,PAL由衍生自酵母物种,例如圆红冬孢酵母(*Rhodospiridium toruloides*)的PAL基因编码(Gilbert等人,1985)。在一些实施方案中,PAL由衍生自植物物种,例如拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的PAL基因编码(Wanner等人,1995)。可以使用PAL或其功能片段的任何合适的核苷酸和氨基酸序列。

[0022] 如本文所用,PAL包括野生型、天然存在的PAL以及突变型、非天然存在的PAL。如本文所用,“突变型PAL”或“PAL突变体”是指与野生型、天然存在的PAL多核苷酸或多肽序列相比,已被修饰(例如诱变)的非天然存在的和/或合成的PAL。在一些实施方案中,修饰是沉默突变,例如在相应多肽序列没有改变的情况下多核苷酸序列的改变。在一些实施方案中,与野生型PAL相比,突变型PAL表现出稳定性增加和/或代谢苯丙氨酸且/或减轻高苯丙氨酸血症的能力增加。在一些实施方案中,突变型PAL衍生自发光光杆菌PAL。在一些实施方案中,与野生型PAL(例如发光光杆菌PAL)相比,突变型PAL多肽包含在氨基酸位置92、133、167、432、470、433、263、366和/或396处的一个或多个突变。在一些实施方案中,与野生型PAL(例如发光光杆菌PAL)相比,突变型PAL多肽包含在氨基酸位置S92、H133、I167、L432、V470、

A433、A263、K366和/或L396处的一个或多个突变。在一些实施方案中，与野生型PAL（例如发光光杆菌PAL）中的位置相比，突变型PAL多肽包含在氨基酸位置S92G、H133F、I167K、L432I、V470A、A433S、A263T、K366K（例如，多核苷酸序列中的沉默突变）和/或L396L（例如，多核苷酸序列中的沉默突变）的一个或多个突变。在一些实施方案中，与野生型PAL（例如发光光杆菌PAL）中的位置相比，突变型PAL多肽包含S92G；H133M；I167K；L432I；V470A。在一些实施方案中，与野生型PAL（例如发光光杆菌PAL）中的位置相比，突变型PAL多肽包含S92G；H133F；A433S；V470A。在一些实施方案中，与野生型PAL（例如发光光杆菌PAL）中的位置相比，突变型PAL多肽包含S92G；H133F；A263T；K366K（例如，多核苷酸序列中的沉默突变）；L396L（例如，多核苷酸序列中的沉默突变）；V470A。

[0023] “苯丙氨酸羟化酶”和“PAH”用于指在人体内与辅因子四氢生物蝶呤一起催化苯丙氨酸芳族侧链的羟基化以产生酪氨酸的酶。编码PAH的人类基因位于12号染色体的长臂(q)上的位置22和24.2之间。PAH的氨基酸序列在哺乳动物中高度保守。人和哺乳动物PAH的核酸序列是熟知的，并可广泛获得。1985年报道了PAH的全长人类cDNA序列(Kwok等人, 1985)。PAH的活性片段也是熟知的(例如, Kobe等人, 1997)。

[0024] “L-氨基酸脱氨酶”和“LAAD”用于指催化L-氨基酸的立体特异性氧化脱氨作用以产生它们各自的酮酸、氨和过氧化氢的酶。例如，LAAD催化苯丙氨酸转化为苯丙酮酸。多种LAAD酶是本领域已知的，其中许多酶来源于细菌，诸如变形杆菌属(*Proteus*)、普罗维登西亚菌属(*Providencia*)和摩根氏菌属(*Morganella*)，或来源于毒液。LAAD的特征在于苯丙氨酸降解反应速度快(Hou等人, Appl Microbiol Technol. 2015 Oct; 99(20): 8391-402; “Production of phenylpyruvic acid from L-phenylalanine using an L-amino acid deaminase from *Proteus mirabilis*: comparison of enzymatic and whole-cell biotransformation approaches”)。大多数真核和原核L-氨基酸脱氨酶是胞外的；然而，变形杆菌种LAAD局限于质膜(内膜)，向外面向周质间隙，其中酶活性驻留。由于这种定位的结果，变形杆菌LAAD介导的苯丙氨酸降解不需要苯丙氨酸通过内膜转运到细胞质中。苯丙氨酸很容易通过外膜被吸收到周质中，而不需要转运蛋白，因此消除了对提高底物的利用率的转运蛋白的需要。在一些实施方案中，遗传工程化微生物包含衍生自细菌物种的LAAD基因，所述细菌物种包括但不限于变形杆菌属、普罗维登西亚菌属和摩根氏菌属细菌。在一些实施方案中，细菌物种是奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)。在一些实施方案中，细菌物种是普通变形杆菌(*Proteus vulgaris*)。在一些实施方案中，由遗传工程化微生物编码的LAAD定位于质膜，面向周质间隙，并且其中催化活性出现在周质间隙中。

[0025] “苯丙氨酸代谢酶”或“PME”用于指能够将苯丙氨酸降解成例如无毒代谢物的酶。本领域已知的任何苯丙氨酸代谢酶都可以由本公开的遗传工程化微生物，例如细菌编码。PME包括但不限于苯丙氨酸羟化酶(PAH)、苯丙氨酸解氨酶(PAL)、氨基转移酶、L-氨基酸脱氨酶(LAAD)和苯丙氨酸脱氢酶。

[0026] 与苯丙氨酸羟化酶、苯丙氨酸脱氢酶或氨基转移酶的反应需要辅因子，而LAAD和PAL不需要任何额外的辅因子。在一些实施方案中，由遗传工程化微生物编码的PME需要辅因子。在一些实施方案中，该辅因子与遗传工程化微生物的施用同时或相继提供。在其他实施方案中，遗传工程化微生物可以产生辅因子。在一些实施方案中，遗传工程化微生物编码苯丙氨酸羟化酶。在一些实施方案中，遗传工程化微生物编码苯丙氨酸脱氢酶。在一些实施

方案中,遗传工程化微生物编码氨基转移酶。不希望受到理论束缚,不需要辅因子意味着酶降解苯丙氨酸的速率取决于底物的可用性,而不受辅因子可用性的限制。在一些实施方案中,由遗传工程化微生物产生的PME是PAL。在一些实施方案中,由遗传工程化微生物产生的PME是LAAD。在一些实施方案中,遗传工程化微生物编码PME的组合。

[0027] 在一些实施方案中,PME的催化活性取决于氧水平。在一些实施方案中,PME在微需氧条件下具有催化活性。作为非限制性实例,LAAD催化活性取决于氧。在一些实施方案中,LAAD在低氧条件下,例如微需氧条件下具有活性。在一些实施方案中,PME在非常低的氧水平下或在氧不存在的情况下(例如在结肠中发现的情况)发挥作用。

[0028] “苯丙氨酸代谢物”是指由于苯丙氨酸降解产生的代谢物。代谢物可以由苯丙氨酸直接产生,由使用苯丙氨酸作为底物的酶产生,或者由代谢途径下游的作用于苯丙氨酸代谢物底物的不同酶间接产生。在一些实施方案中,苯丙氨酸代谢物由编码PME的遗传工程化细菌产生。在一些实施方案中,苯丙氨酸代谢物由PAL作用直接或间接产生,例如由通过遗传工程化微生物产生的PAL。此类PAL代谢物的非限制性实例是反式肉桂酸和马尿酸。在一些实施方案中,苯丙氨酸代谢物由LAAD作用直接或间接产生,例如由通过遗传工程化微生物产生的LAAD。此类LAAD代谢物的实例是苯丙酮酸和苯基乳酸。

[0029] “苯丙氨酸转运蛋白”用于指能够将苯丙氨酸转运到细菌细胞中的膜转运蛋白(参见例如Pi等人,1991)。在大肠埃希氏菌中,pheP基因编码负责苯丙氨酸转运的高亲和力和苯丙氨酸特异性通透酶(Pi等人,1998)。在一些实施方案中,苯丙氨酸转运蛋白由衍生自细菌物种的pheP基因编码,所述细菌物种包括但不限于乙酸钙不动杆菌(*Acinetobacter calcoaceticus*)、肠道沙门氏菌(*Salmonella enterica*)和大肠埃希氏菌。其他苯丙氨酸转运蛋白包括由aroP基因编码的通用(Ageneral)氨基酸通透酶,以高亲和力转运包括苯丙氨酸在内的三种芳香族氨基酸,并被认为是与PheP一起负责最大份额的苯丙氨酸输入。此外,低水平的苯丙氨酸转运活性已被追踪到LIV-I/LS系统的活性,所述LIV-I/LS系统是由两种周质结合蛋白LIV-I结合蛋白(LIV-I系统)和LS结合蛋白(LS系统)以及膜组分LivHMGF组成的支链氨基酸转运蛋白。在一些实施方案中,苯丙氨酸转运蛋白由衍生自细菌物种的aroP基因编码。在一些实施方案中,苯丙氨酸转运蛋白由衍生自细菌物种的LIV-I结合蛋白和LS-结合蛋白以及LivHMGF基因编码。在一些实施方案中,遗传工程化微生物包含多于一种类型的苯丙氨酸转运蛋白,选自pheP、aroP和LIV-I/LS系统。示例性苯丙氨酸转运蛋白是本领域已知的,参见例如PCT/US2016/032562和PCT/US2016/062369,其内容以引用的方式并入本文。

[0030] “苯丙氨酸”和“Phe”用于指具有式 $C_6H_5CH_2CH(NH_2)COOH$ 的氨基酸。苯丙氨酸是酪氨酸、多巴胺、去甲肾上腺素和肾上腺素的前体。L-苯丙氨酸是一种必需氨基酸,并且是主要存在于膳食蛋白质中的苯丙氨酸形式;发现立体异构体D-苯丙氨酸在膳食蛋白质中的量较低;DL-苯丙氨酸是两种形式的组合。苯丙氨酸可以是指L-苯丙氨酸、D-苯丙氨酸和DL-苯丙氨酸中的一种或多种。

[0031] 如本文所用,“基因表达系统”是指基因和能够或调节基因表达的调节元件的组合。基因表达系统可包含基因,例如编码突变型PAL多肽的基因,以及一个或多个启动子、终止子、增强子、绝缘子、沉默子和其他促进基因表达的调节序列。在一些实施方案中,基因表达系统可以包含编码突变型PAL的基因和与其可操作连接以促进基因表达的启动子。在一

些实施方案中,基因表达系统可以包含可操作地连接至一个或多个启动子以促进基因表达的多个基因。在一些实施方案中,多个基因可以位于相同的质粒或染色体上,例如呈顺式并且可操作地连接至相同的启动子。在一些实施方案中,多个基因可以位于不同的质粒或染色体上,并且可操作地连接至不同的启动子。

[0032] “可操作地连接”是指核酸序列,例如编码PAL的基因,以允许核酸序列表达的方式连接到调节区序列,例如顺式作用。调节区是能够指导所关注基因的转录的核酸,并且可以包含启动子序列、增强子序列、应答元件、蛋白质识别位点、诱导型元件、启动子控制元件、蛋白质结合序列、5'和3'非翻译区、转录起始位点、终止序列、聚腺苷酸化序列和内含子。

[0033] 如本文所用,“非天然”核酸序列是指通常不存在于微生物中的核酸序列,例如内源序列的额外拷贝或异源序列(诸如来自微生物的不同物种、品系或亚系的序列、或与来自相同亚型的微生物的未修饰序列相比被修饰和/或突变的序列)。在一些实施方案中,非天然核酸序列是合成的、非天然存在的序列(参见例如,Purcell等人,2013)。非天然核酸序列可以是调节区、启动子、基因和/或基因盒中的一个或多个基因。在一些实施方案中,“非天然的”是指在自然界中彼此不存在于相同关系中的两个或更多个核酸序列。非天然核酸序列可以存在于质粒或染色体上。此外,任何调节区、启动子、基因和/或基因盒的多个拷贝可存在于微生物中,其中调节区、启动子、基因和/或基因盒的一个或多个拷贝可如本文所述被突变或以其他方式改变。在一些实施方案中,遗传工程化微生物被工程化以包含相同调节区、启动子、基因和/或基因盒的多个拷贝,以便增加拷贝数或包含执行多种不同功能的基因盒的多个不同组件。在一些实施方案中,本发明的遗传工程化微生物包含编码苯丙氨酸代谢酶的基因,所述基因可操作地连接至不与所述基因天然缔合的诱导型启动子,例如可操作地连接至编码PAL的基因的FNR启动子或可操作地连接至LAAD的ParaBAD启动子。

[0034] “诱导型启动子”是指与一个或多个基因可操作地连接的调节区,其中在所述调节区的诱导物的存在下基因的表达增加。

[0035] “外源环境条件”或“环境条件”是指诱导本文所述的启动子的环境或情况。所述短语意指对于工程化微生物是外部的但是对于宿主受试者环境是内源的或天然的环境条件。因此,“外源”和“内源”可以互换使用,是指环境条件,其中所述环境条件对于哺乳动物体是内源的但是对于完整的微生物细胞是外部的或外源的。在一些实施方案中,外源环境条件对于哺乳动物的肠道是特异的。在一些实施方案中,外源环境条件对于哺乳动物的上胃肠道是特异的。在一些实施方案中,外源环境条件对于哺乳动物的下胃肠道是特异的。在一些实施方案中,外源环境条件对于哺乳动物的小肠是特异的。在一些实施方案中,外源环境条件是低氧、微需氧或厌氧条件,诸如哺乳动物肠道的环境。在一些实施方案中,外源性环境条件是指存在对健康或疾病状态的哺乳动物肠道特异的分子或代谢物,例如丙酸盐。在一些实施方案中,外源环境条件是组织特异性或疾病特异性代谢物或分子。在一些实施方案中,外源环境条件是低pH环境。在一些实施方案中,本公开的遗传工程化微生物包含pH依赖性启动子。在一些实施方案中,本公开的遗传工程化微生物包含氧水平依赖性启动子。在一些方面,细菌已经进化出能够感知氧水平的转录因子。不同的信号传导途径可能由不同的氧水平触发,并且以不同的动力学发生。

[0036] 如本文所用,“外源环境条件”或“环境条件”也是指工程化微生物外部的设置或环境或环境条件,其涉及微生物的体外培养条件。“外源环境条件”也可以是指生物体生长、生

产和制造过程中的条件。此类条件包括需氧培养条件、厌氧培养条件、低氧培养条件和其它设定氧浓度下的条件。这些条件还包括培养基中存在化学和/或营养诱导剂,诸如四环素、阿拉伯糖、IPTG、鼠李糖等。此类条件还包括在体内施用前微生物生长的温度。例如,使用某些启动子系统,某些温度允许有效载荷的表达,而其他温度不允许。氧水平、温度和培养基组成影响此类外源环境条件。此类条件影响增殖速率、PME (例如, PAL或LAAD) 的诱导速率、转运蛋白 (例如, PheP) 和/或其他调节因子 (例如, FNRS24Y) 的诱导速率,以及在菌株生产过程中菌株的总体生存力和代谢活性。

[0037] “氧水平依赖性启动子”或“氧水平依赖性调节区”是指一种或多种氧水平感知转录因子能够结合的核酸序列,其中相应转录因子的结合和/或激活会激活下游基因表达。氧水平依赖性转录因子的实例包括但不限于FNR、ANR和DNR。相应FNR响应性启动子、ANR响应性启动子和DNR响应性启动子是本领域已知的 (参见例如, Castiglione等人, 2009; Eiglmeier等人, 1989; Galimand等人, 1991; Hasegawa等人, 1998; Hoeren等人, 1993; Salmon等人, 2003)。表1中示出了非限制性的实例。在非限制性实例中,启动子 (PfnrS) 衍生自己知在低或无环境氧的条件下高度表达的大肠埃希氏菌尼斯勒延胡索酸和硝酸还原酶基因S (fnrS) (Durand和Storz, 2010; Boysen等人, 2010)。PfnrS启动子在厌氧和/或低氧条件下被在尼斯勒中天然发现的全局转录调节因子FNR激活。在厌氧和/或低氧条件下, FNR形成二聚体,并且在其控制下与特定基因启动子中的特定序列结合,从而激活它们的表达。然而,在有氧条件下,氧与FNR二聚体中的铁-硫簇发生反应,并且将它们转化为非活性形式。以这种方式,采用PfnrS诱导型启动子来调节蛋白质或RNA的表达。PfnrS在本申请中与FNRS、fnrS、FNR、P-FNRS启动子和其他表示启动子PfnrS的此类相关名称可互换使用。

[0038] 表1. 转录因子和响应性基因和调节区的实例

转录因子	响应性基因、启动子和/或调节区的实例:
FNR	<i>nirB</i> , <i>ydfZ</i> , <i>pdhR</i> , <i>focA</i> , <i>ndH</i> , <i>hlyE</i> , <i>narK</i> , <i>narX</i> , <i>narG</i> , <i>yfiD</i> , <i>tdcD</i>
ANR	<i>arcDABC</i>
DNR	<i>norb</i> , <i>norC</i>

[0040] 示例性氧水平依赖型启动子,例如FNR启动子,是本领域熟知的,并且示例性FNR启动子提供在表2中。参见例如PCT/US2016/032562和PCT/US2016/062369,其内容以引用的方式并入本文。

[0041] 表2. FNR响应性调节区序列的实例

[0042]

SEQ ID NO	FNR 响应性调节区序列
SEQ ID NO: 9	ATCCCCATCACTCTTGATGGAGATCAATTCCCCAAGC TGCTAGAGCGTTACCTTGCCCTTAAACATTAGCAATG TCGATTTATCAGAGGGCCGACAGGCTCCACAGGAG AAAACCG
SEQ ID NO: 10	CTCTTGATCGTTATCAATTCCCACGCTGTTTCAGAGC GTTACCTTGCCCTTAAACATTAGCAATGTCGATTTAT CAGAGGGCCGACAGGCTCCACAGGAGAAAACCG
<i>nirB1</i> SEQ ID NO: 11	GTCAGCATAACACCCTGACCTCTCATTAAATTGTTTCAT GCCGGGCGGCACTATCGTCGTCCGGCCTTTTCCTCT CTTACTCTGCTACGTACATCTATTTCTATAAATCCGTT CAATTTGTCTGTTTTTTGCACAAACATGAAATATCAG ACAATTCCGTGACTTAAGAAAATTTATACAAATCAG CAATATACCCCTTAAGGAGTATATAAAGGTGAATTTG ATTTACATCAATAAGCGGGGTTGCTGAATCGTTAAG GTAGGCGGTAATAGAAAAGAAATCGAGGCAAAA
<i>nirB2</i> SEQ ID NO: 12	CGGCCCCGATCGTTGAACATAGCGGTCCGCAGGCGGC ACTGCTTACAGCAAACGGTCTGTACGCTGTCGTCTT TGTGATGTGCTTCCTGTTAGGTTTCGTACGCCGTCAC CGTCAGCATAACACCCTGACCTCTCATTAAATTGCTCA TGCCGGACGGCACTATCGTCGTCCGGCCTTTTCCTC TCTTCCCCCGCTACGTGCATCTATTTCTATAAACCCG CTCATTTTGTCTATTTTTTTGCACAAACATGAAATATC AGACAATTCCGTGACTTAAGAAAATTTATACAAATC AGCAATATACCCATTAAGGAGTATATAAAGGTGAATT TGATTTACATCAATAAGCGGGGTTGCTGAATCGTTAA GGTAGGCGGTAATAGAAAAGAAATCGAGGCAAAAat gtttgtttaactttaagaaggagatatatacat

[0043]

<i>nirB3</i> SEQ ID NO: 13	GTCAGCATAACACCCTGACCTCTCATTAATTGCTCAT GCCGGACGGCACTATCGTCGTCCGGCCTTTTCCTCT CTTCCCCCGCTACGTGCATCTATTTCTATAAACCCGC TCATTTTGTCTATTTTTTGCACAAACATGAAATATCA GACAATTCGTGACTTAAGAAAATTTATACAAATCA GCAATATACCCATTAAGGAGTATATAAAGGTGAATTT GATTTACATCAATAAGCGGGGTTGCTGAATCGTTAA GGTAGGCGGTAATAGAAAAGAAATCGAGGCCAAAA
<i>ydfZ</i> SEQ ID NO: 14	ATTTCCTCTCATCCCATCCGGGGTGAGAGTCTTTTCC CCCGACTTATGGCTCATGCATGCATCAAAAAAGATG TGAGCTTGATCAAAAACAAAAAATATTTCACTCGAC AGGAGTATTTATATTGCGCCCGTTACGTGGGCTTCGA CTGTAAATCAGAAAGGAGAAAAACACCT
<i>nirB+RBS</i> SEQ ID NO: 15	GTCAGCATAACACCCTGACCTCTCATTAATTGTTTCAT GCCGGGCGGCACCTATCGTCGTCCGGCCTTTTCCTCT CTTACTCTGCTACGTACATCTATTTCTATAAATCCGTT CAATTTGTCTGTTTTTTGCACAAACATGAAATATCAG ACAATTCCGTGACTTAAGAAAATTTATACAAATCAG CAATATACCCCTTAAGGAGTATATAAAGGTGAATTTG ATTTACATCAATAAGCGGGGTTGCTGAATCGTTAAG GATCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAG GAGATATACAT
<i>ydfZ+RBS</i> SEQ ID NO: 16	CATTTCTCTCATCCCATCCGGGGTGAGAGTCTTTTC CCCCGACTTATGGCTCATGCATGCATCAAAAAAGAT GTGAGCTTGATCAAAAACAAAAAATATTTCACTCGA CAGGAGTATTTATATTGCGCCCG GATCCCTCTAGAA ATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACAT
<i>fnrS1</i> SEQ ID NO: 17	AGTTGTTCTTATTGGTGGTGTTGCTTTATGGTTGCAT CGTAGTAAATGGTTGTAACAAAAGCAATTTTCCGG CTGTCTGTATACAAAACGCCGTAAAGTTTGAGCGA AGTCAATAAACTCTCTACCCATTCAGGGCAATATCTC TCTT GATCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTA AGAAGGAGATATACAT
<i>fnrS2</i> SEQ ID NO: 18	AGTTGTTCTTATTGGTGGTGTTGCTTTATGGTTGCAT CGTAGTAAATGGTTGTAACAAAAGCAATTTTCCGG CTGTCTGTATACAAAACGCCGCAAAGTTTGAGCGA AGTCAATAAACTCTCTACCCATTCAGGGCAATATCTC TCTT GATCCAAAGTGA ACTCTAGAAATAATTTTGT TAACTTTAAGAAGGAGATATACAT

[0044]	<i>nirB+crp</i> SEQ ID NO: 19	TCGTCTTTGTGATGTGCTTCCTGTTAGGTTTCGTCAG CCGTCACCGTCAGCATAACACCCTGACCTCTCATT ATTGCTCATGCCGGACGGCACTATCGTCGTCGCGGCC TTTTCCTCTCTTCCCCCGCTACGTGCATCTATTTCTAT AAACCCGCTCATTTTGTCTATTTTTTGCACAAACATG AAATATCAGACAATTCCGTGACTTAAGAAAATTTATA CAAATCAGCAATATACCCATTAAAGGAGTATATAAAGG TGAATTTGATTTACATCAATAAGCGGGGTTGCTGAAT CGTTAAGGTAGaaatgtgatctagttcacattGCGGTAATAGAA AAGAAATCGAGGCCAAAAtgtttgtttaactttaagaaggagatat <i>cat</i>
	<i>fnrS+crp</i> SEQ ID NO: 20	AGTTGTTCTTATTGGTGGTGTGCTTTATGGTTGCAT CGTAGTAAATGGTTGTAACAAAAGCAATTTTCCGG CTGTCTGTATACAAAACGCCGCAAAGTTTGAGCGA AGTCAATAAACTCTCTACCCATTTCAGGGCAATATCTC TCaaatgtgatctagttcacattttgtttaactttaagaaggagatat <i>cat</i>

[0045] 如本文所用,术语“低氧”是指氧 (O_2) 的水平、量或浓度低于存在于大气中的氧的水平、量或浓度 (例如 $<21\%O_2$; <160 托 O_2)。因此,术语“一种或多种低氧条件”或“低氧环境”是指含有的氧水平低于存在于大气中的水平的条件或环境。在一些实施方案中,术语“低氧”意指在哺乳动物肠道中发现的氧 (O_2) 的水平、量或浓度,所述肠道例如内腔、胃、小肠、十二指肠、空肠、回肠、大肠、盲肠、结肠、远端乙状结肠、直肠和肛管。在一些实施方案中,术语“低氧”意指 O_2 的水平、量或浓度为 0-60mmHg O_2 (0-60 托 O_2) (例如,0、1、2、3、4、5、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、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59 和 60mmHg O_2), 包括其任何和所有增量分数 (例如 0.2mmHg O_2 、0.5mmHg O_2 、0.75mmHg O_2 、1.25mmHg O_2 、2.175mmHg O_2 、3.45mmHg O_2 、3.75mmHg O_2 、4.5mmHg O_2 、6.8mmHg O_2 、11.35mmHg O_2 、46.3mmHg O_2 、58.75mmHg 等,这里列出的示例性分数是为了说明的目的,并不意味着以任何方式进行限制)。在一些实施方案中,“低氧”指约 60mm Hg O_2 或更少 (例如,0 至约 60mmHg O_2)。术语“低氧”也可以是指 0-60mmHg O_2 (包括端值) 之间的 O_2 水平、量或浓度范围,例如 0-5mmHg O_2 、 <1.5 mmHg O_2 、6-10mmHg、 <8 mmHg、47-60mmHg 等。这里列出的示例性范围是为了说明的目的,并不意味着以任何方式进行限制。参见例如 Albenberg 等人, *Gastroenterology*, 147 (5): 1055-1063 (2014); Bergofsky 等人, *J Clin. Invest.*, 41 (11): 1971-1980 (1962); Crompton 等人, *J Exp. Biol.*, 43: 473-478 (1965); He 等人, *PNAS (USA)*, 96: 4586-4591 (1999); McKeown, *Br. J. Radiol.*, 87: 20130676 (2014) (doi:10.1259/brj.20130676), 所述文献各自讨论了在各种物种的哺乳动物肠道中发现的氧水平,并且所述文献各自以引用的方式整体并入本文。在一些实施方案中,术语“低氧”是指在除了肠道之外的哺乳动物器官或组织 (例如泌尿生殖道、肿瘤组织等) 中发现的氧 (O_2) 的水平、量或浓度,其中氧以降低的水平存在,例如以低氧或缺氧水平存在。在一些实施方案中,“低氧”是指在部分需氧、半需氧、微需氧、毫微需氧 (nanoaerobic)、微缺氧 (microoxic)、低氧、缺氧和/或厌氧条件下存在的氧 (O_2) 的水平、量或浓度。PCT/US2016/062369 中提供了各种器

官和组织中存在的氧量的汇总,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。在一些实施方案中,氧(O_2)的水平、量或浓度被表示为溶解氧(“DO”)的量,所述溶解氧是指液体中存在的游离的非化合物氧(O_2)的水平,并且通常以毫克每升(mg/L)、百万分率(ppm;1mg/L=1ppm)或者以微摩尔(umol)(1umol O_2 =0.022391mg/L O_2)为单位报告。Fondriest Environmental, Inc., “Dissolved Oxygen”, Fundamentals of Environmental Measurements, 2013年11月19日, www.fondriest.com/environmental-measurements/parameters/water-quality/dissolved-oxygen/。在一些实施方案中,术语“低氧”意指约6.0mg/L DO或更低的氧(O_2)水平、量或浓度,例如6.0mg/L、5.0mg/L、4.0mg/L、3.0mg/L、2.0mg/L、1.0mg/L或0mg/L、以及其中的任何分数,例如3.25mg/L、2.5mg/L、1.75mg/L、1.5mg/L、1.25mg/L、0.9mg/L、0.8mg/L、0.7mg/L、0.6mg/L、0.5mg/L、0.4mg/L、0.3mg/L、0.2mg/L和0.1mg/L DO,这里列出的示例性分数是为了说明的目的并且不意味着以任何方式进行限制。液体或溶液中的氧含量也可以报告为空气饱和度的百分比或氧饱和度的百分比(溶液中溶解氧(O_2)的浓度与在稳定平衡下在一定温度、压力和盐度下溶解在溶液中的最大氧量的比率)。没有氧气产生者或消耗者的充分充气的溶液(例如,经受混合和/或搅拌的溶液)是100%空气饱和的。在一些实施方案中,术语“低氧”意在是指40%或更低的空气饱和度,例如40%、39%、38%、37%、36%、35%、34%、33%、32%、31%、30%、29%、28%、27%、26%、25%、24%、23%、22%、21%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%和0%空气饱和度,包括其任何和所有增量分数(例如,30.25%、22.70%、15.5%、7.7%、5.0%、2.8%、2.0%、1.65%、1.0%、0.9%、0.8%、0.75%、0.68%、0.5%、0.44%、0.3%、0.25%、0.2%、0.1%、0.08%、0.075%、0.058%、0.04%、0.032%、0.025%、0.01%等),以及0-40%之间(包括端点)的任何空气饱和度水平的范围(例如,0-5%、0.05-0.1%、0.1-0.2%、0.1-0.5%、0.5-2.0%、0-10%、5-10%、10-15%、15-20%、20-25%、25-30%等)。这里列出的示例性分数和范围是为了说明的目的,并不意味着以任何方式进行限制。在一些实施方案中,术语“低氧”意在是指9%或更低的 O_2 饱和度,例如9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0%的 O_2 饱和度,包括其任何和所有增量分数(例如,6.5%、5.0%、2.2%、1.7%、1.4%、0.9%、0.8%、0.75%、0.68%、0.5%、0.44%、0.3%、0.25%、0.2%、0.1%、0.08%、0.075%、0.058%、0.04%、0.032%、0.025%、0.01%等),以及0-9%之间(包括端点)的任何范围的 O_2 饱和度水平(例如,0-5%、0.05-0.1%、0.1-0.2%、0.1-0.5%、0.5-2.0%、0-8%、5-7%、0.3-4.2% O_2 等)。这里列出的示例性分数和范围是为了说明的目的,并不意味着以任何方式进行限制。

[0046] “组成型启动子”是指能够促进在其控制下和/或与其可操作地连接的编码序列或基因连续转录的启动子。

[0047] 组成型启动子、诱导型启动子及其变体是本领域熟知的,并描述于PCT/US2016/032562和PCT/US2016/062369中,其内容以引用的方式并入本文。

[0048] “肠道”是指负责食物转移和消化、营养吸收和废物排泄的器官、腺体、肠道和系统。在人类中,肠道包括胃肠(GI)道,其开始于嘴并终止于肛门,并且另外还包括食道、胃、小肠和大肠。肠道还包括附属器官和腺体,诸如脾、肝、胆囊和胰腺。上胃肠道包括食道、胃和小肠的十二指肠。下胃肠道包括小肠的剩余部分(即空肠和回肠)以及大肠的全部(即盲肠、结肠、直肠和肛管)。可以在整个肠道(例如在胃肠道中,以及特别是在小肠中)中发现细

菌。在一些实施方案中,遗传工程化微生物在肠道中具有活性(例如,表达一种或多种PME)。在一些实施方案中,遗传工程化微生物在大肠中具有活性(例如,表达一种或多种PME)。在一些实施方案中,遗传工程化微生物在小肠中具有活性(例如,表达一种或多种PME)。在一些实施方案中,遗传工程化微生物在小肠和大肠中具有活性。不希望受到理论束缚,苯丙氨酸降解在小肠中可能非常有效,因为氨基酸吸收(例如苯丙氨酸吸收)发生在小肠中。通过防止或减少血液中苯丙氨酸的摄入,可以避免水平增加和所得Phe毒性。此外,氨基酸在肠与身体之间的广泛肠再循环可以去除PKU中的全身性苯丙氨酸(例如,Chang等人描述的,在PKU的大鼠模型中(Chang等人,A new theory of enterorecirculation of amino acids and its use for depleting unwanted amino acids using oral enzyme-artificial cells,as in removing phenylalanine in phenylketonuria;Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.1995;23(1):1-21))。血液中的苯丙氨酸循环进入小肠,并且可以被在该部位具有活性的微生物清除。在一些实施方案中,遗传工程化微生物穿过小肠。在一些实施方案中,遗传工程化微生物在小肠中的停留时间增加。在一些实施方案中,遗传工程化微生物定居在小肠中。在一些实施方案中,遗传工程化微生物不定居在小肠中。在一些实施方案中,遗传工程化微生物在肠道中的停留时间增加。在一些实施方案中,遗传工程化微生物定居在肠道中。在一些实施方案中,遗传工程化微生物不定居在肠道中。

[0049] “微生物”是指通常由单细胞组成的微观、亚微观或超微观大小的生物体或微生物。微生物的实例包括细菌、酵母、病毒、寄生虫、真菌、某些藻类和原生动物。在一些方面,微生物被工程化(“工程化微生物”)以产生一种或多种感兴趣的分子或蛋白质。在某些方面,微生物被工程化为从其环境(例如,肠道)中吸收和分解代谢某些代谢物或其他化合物。在某些方面,微生物被工程化以合成某些有益代谢物或其他化合物(合成的或天然存在的)并将它们释放到其环境中。在某些实施方案中,工程化微生物是工程化细菌。在某些实施方案中,工程化微生物是工程化病毒。

[0050] “非致病性细菌”是指不能在宿主体内引起疾病或有害反应的细菌。在一些实施方案中,非致病性细菌是革兰氏阴性菌。在一些实施方案中,非致病性细菌是革兰氏阳性菌。在一些实施方案中,非致病性细菌是共生细菌,其存在于肠道的固有微生物群中。非致病性细菌的实例包括但不限于芽孢杆菌属(*Bacillus*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)、双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)、短杆菌属(*Brevibacteria*)、梭菌属(*Clostridium*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、埃希氏菌属(*Escherichia*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、乳球菌属(*Lactococcus*)、酵母属和葡萄球菌属,例如凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、脆弱拟杆菌(*Bacteroides fragilis*)、枯草拟杆菌(*Bacteroides subtilis*)、多形拟杆菌(*Bacteroides thetaiotaomicron*)、两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*)、婴儿双歧杆菌(*Bifidobacterium infantis*)、乳双歧杆菌(*Bifidobacterium lactis*)、长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)、丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)、屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)、大肠埃希氏菌、嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)、保加利亚乳杆菌(*Lactobacillus bulgaricus*)、干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)、约氏乳杆菌(*Lactobacillus johnsonii*)、副干酪乳杆菌(*Lactobacillus paracasei*)、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、罗伊氏乳杆菌(*Lactobacillus reuteri*)、鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*)、乳酸乳球菌

(*Lactococcus lactis*) 和鲍氏酵母菌 (*Saccharomyces boulardii*) (Sonnenborn等人, 2009; Dinleyici等人, 2014; 美国专利号6,835,376; 美国专利号6,203,797; 美国专利号5,589,168; 美国专利号7,731,976)。天然致病性细菌可以进行遗传工程化来降低或消除致病性。

[0051] “益生菌”用于指可以赋予含有适当量微生物的宿主生物体健康益处的活的非致病性微生物,例如细菌。在一些实施方案中,宿主生物体是哺乳动物。在一些实施方案中,宿主生物体是人。非致病性细菌的一些物种、菌株和/或亚型目前被认为是益生菌。益生菌细菌的实例包括但不限于双歧杆菌属、埃希氏菌属、乳杆菌属和酵母属,例如两歧双歧杆菌、屎肠球菌、大肠埃希氏菌、大肠埃希氏菌尼斯勒菌株、嗜酸乳杆菌、保加利亚乳杆菌、副干酪乳杆菌、植物乳杆菌和鲍氏酵母菌 (Dinleyici等人, 2014; 美国专利号5,589,168; 美国专利号6,203,797; 美国专利6,835,376)。益生菌可以是细菌的变体或突变菌株 (Arthur等人, 2012; Cuevas-Ramos等人, 2010; Olier等人, 2012; Nougayrede等人, 2006)。可以对非致病性细菌进行遗传工程化以增强或改善所需的生物特性,例如生存能力。可以对非致病性细菌进行遗传工程化以提供益生菌特性。可以对益生菌进行遗传工程化以增强或改善益生菌特性。

[0052] 如本文所用,“稳定的”微生物用于指携带非天然遗传物质(例如PAL基因)的微生物宿主细胞,所述非天然遗传物质被整合到宿主基因组中或在自我复制的染色体外质粒上传播,使得非天然遗传物质得以保留、表达和/或传播,例如在特定条件下。稳定的微生物能够在体外(例如在培养基中)和/或在体内(例如在肠道中)存活和/或生长。例如,稳定微生物可以是包含PAL基因例如突变型PAL的遗传修饰细菌,其中携带PAL基因的质粒或染色体稳定地保持在宿主细胞中,使得PAL可以在宿主细胞中表达,并且宿主细胞能够在体外和/或体内存活和/或生长。在一些实施方案中,拷贝数影响非天然遗传物质(例如PAL基因或PAH基因)表达的稳定性。在一些实施方案中,拷贝数影响非天然遗传物质(例如PAL基因或PAH基因)的表达水平。

[0053] 如本文所用,术语“调节”和“治疗”及其同源词是指疾病、病症和/或病状或其至少一种可辨别症状的改善。在另一个实施方案中,“调节”和“治疗”是指至少一个可测量的物理参数(不一定可由患者辨别)的改善。在另一个实施方案中,“调节”和“治疗”是指在身体上(例如,可辨别症状的稳定)、在生理上(例如,物理参数的稳定)或两者抑制疾病、病症和/或病状的进展。在另一个实施方案中,“调节”和“治疗”是指减缓疾病、病症和/或病状的进展或逆转其进展。如本文所用,“预防”及其同源词是指延迟给定疾病、病症和/或病状或与此类疾病、病症和/或病状相关的症状的发病或降低获得给定疾病、病症和/或病状或与此类疾病、病症和/或病状相关的症状的风险。需要治疗者可能包括已经患有某种特定医学疾病的个体,以及有患上疾病的风险或最终可能患上疾病的个体。例如,通过与发展疾病相关的一种或多种风险因素的存在、疾病的存在或进展、或患有疾病的受试者对治疗的可能接受性来评估治疗的需要。原发性高苯丙氨酸血症(例如PKU)是由先天性基因突变引起的,目前尚无治愈方法。高苯丙氨酸血症也可继发于其他疾病,例如肝病。治疗高苯丙氨酸血症可包括减少或消除过量苯丙氨酸和/或相关症状,但不一定包括消除基础疾病。

[0054] 如本文所用,“药物组合物”是指本发明的遗传工程化细菌与其它组分诸如生理上合适的载体和/或赋形剂的制剂。

[0055] 可以互换使用的短语“生理学上可接受的载体”和“药学上可接受的载体”是指不会对生物体造成显著刺激并且不会消除所施用的细菌化合物的生物活性和特性的载体或稀释剂。佐剂包括在这些短语中。

[0056] 术语“赋形剂”是指添加到药物组合物中以进一步促进活性成分施用的惰性物质。实例包括但不限于碳酸氢钙、磷酸钙、各种糖和各种类型的淀粉、纤维素衍生物、明胶、植物油、聚乙二醇和表面活性剂(包括例如聚山梨醇酯20)。

[0057] 术语“治疗有效剂量”和“治疗有效量”用于指引起疾病(例如高苯丙氨酸血症)的预防、症状发作延迟或症状改善的化合物的量。治疗有效量可以例如足以治疗、预防与过量苯丙氨酸水平相关的疾病或病症、减轻其严重性、延迟其发作和/或降低发生其一种或多种症状的风险。治疗有效量以及治疗有效的施用频率可以通过本领域已知的方法来确定,并且在下面进行论述。

[0058] 如本文所用,术语“多肽”包括“一种多肽”以及“多种多肽”,并且是指由通过酰胺键(即肽键)线性连接的氨基酸单体构成的分子。术语“多肽”是指两个或更多个氨基酸的任何一条或多条链,而不是指产物的特定长度。因此,“肽”、“二肽”、“三肽”、“寡肽”、“蛋白质”、“氨基酸链”或用于指两个或更多个氨基酸的一条链或多条链的任何其他术语都包括在“多肽”的定义中,并且术语“多肽”可以代替这些术语中的任何一个使用,或者与这些术语中的任何一个互换使用。术语“二肽”是指两个连接的氨基酸的肽。术语“三肽”是指三个连接的氨基酸的肽。术语“多肽”也旨在指多肽的表达后修饰的产物,所述表达后修饰包括但不限于糖基化、乙酰化、磷酸化、酰胺化、衍生化、蛋白水解切割或通过非天然存在氨基酸的修饰。多肽可以来源于天然生物来源或通过重组技术产生。在其他实施方案中,多肽由本发明的遗传工程化微生物产生。

[0059] 术语“噬菌体(phage)”和“噬菌体(bacteriophage)”在本文中可互换使用。这两个术语都是指在细菌内感染和复制的病毒。如本文所用,“噬菌体(phage)”或“噬菌体(bacteriophage)”总体是指原噬菌体、溶原性噬菌体、休眠噬菌体、温和噬菌体、完整噬菌体、缺陷性噬菌体、隐性噬菌体和卫星噬菌体、噬菌体尾细菌素、尾蛋白(tailiocin)和基因转移剂。

[0060] 如本文所用,术语“原噬菌体”指噬菌体的基因组物质,其被整合到宿主细胞的复制子中,并与宿主一起复制。如果被特异性激活,原噬菌体可能产生噬菌体。在某些情况下,原噬菌体不能产生噬菌体或从未产生过噬菌体(即缺陷性或隐性原噬菌体)。在某些情况下,原噬菌体也是指卫星噬菌体。术语“原噬菌体”和“内源性噬菌体”在本文中可互换使用。

[0061] “内源性噬菌体”或“内源性原噬菌体”也是指在自然状态下存在于细菌(及其亲本菌株)的噬菌体。

[0062] 如本文所用,术语“噬菌体敲除”或“灭活噬菌体”是指已被修饰,使得它不再能产生和/或包装噬菌体颗粒或者它产生的噬菌体颗粒少于野生型噬菌体序列的噬菌体。在一些实施方案中,灭活噬菌体或噬菌体敲除是指温和噬菌体在其溶原状态下的灭活,即灭活成原噬菌体。这种修饰是指噬菌体中的突变;此类突变包括在噬菌体基因组内的一个或多个位置,例如在噬菌体基因组内的一个或多个基因内的插入、缺失(噬菌体基因组的部分或完全缺失)、置换、倒位。

[0063] 如本文所用, 形容词“无噬菌体 (phage-free)”、“无噬菌体 (phagefree)”和“无噬菌体 (phageless)”可互换使用, 以表征含有一种或多种原噬菌体的细菌或菌株, 其中一种或多种原噬菌体已被修饰。修饰可导致原噬菌体被诱导或释放噬菌体颗粒的能力丧失。或者, 与没有修饰的等基因菌株相比, 修饰可导致效率更低或频率更低的诱导或效率更低或频率更低的噬菌体释放。诱导和释放噬菌体的能力可以使用本文所述的噬斑试验来测量。

[0064] 如本文所用, 噬菌体诱导是指溶原性原噬菌体生命周期的一部分, 其中裂解性噬菌体基因被激活, 产生噬菌体颗粒并发生裂解。

[0065] PAL突变体

[0066] 本公开提供了突变型PAL多肽和编码所述多肽的多核苷酸。在一些实施方案中, 突变型PAL由衍生自原核物种的基因编码。在一些实施方案中, 突变型PAL由衍生自真核物种的基因编码。在一些实施方案中, 突变型PAL由衍生自细菌物种的PAL基因编码, 所述细菌物种包括但不限于木糖氧化无色杆菌 (*Achromobacter xylosoxidans*)、铜绿假单胞菌、发光光杆菌、变异鱼腥藻和根癌农杆菌。在一些实施方案中, 突变型PAL由衍生自多变鱼腥藻的PAL基因编码。在一些实施方案中, 突变型PAL由衍生自发光光杆菌的PAL基因编码。在一些实施方案中, 突变型PAL由衍生自酵母物种, 例如圆红冬孢酵母的PAL基因编码。在一些实施方案中, 突变型PAL由衍生自植物物种, 例如拟南芥的PAL基因编码。PAL的任何合适的核苷酸和氨基酸序列或其功能片段都可以用于衍生突变型PAL。在一些实施方案中, 与野生型PAL相比, 突变型PAL表现出稳定性和/或活性增加。PAL基因的非限制性实例如表3所示。

[0067] 表3. 示例性苯丙氨酸代谢酶的序列

[0068]

描述	序列
苯丙氨酸解氨酶 (变异鱼腥藻) 登录号: Q3M5Z3.1	MKTLSPAQSKTSSQQFSFTGNSSANVIIGNQKL TINDVARVARNGTLVSLTNNTDILQGIQASCDYI NNAVESGEPIYGVTSFGGGMANVAISREQASEL QTNLVWFLKTGAGNKLPLADVRAAMLLRANS HMRGASGIRLELIKRMIFLNAGVTPYVYEFGS IGASGDLVPLSYITGSLIGLDPSFKVDFNGKEMD APTALRQLNLSPLTLLPKEGLAMMNGTSMVTG IAANCVYDTQILTAIAMGVHALDIQALNGTNQS FHPFIHNSKPHPGQLWAADQMISLLANSQLVDR ELDGKHDYRDHELIQDRYSLRCLPQYLGPIVDG ISQIAKQIEIEINSVTDNPLIDVDNQASYHGGNF LGQYVGMGMDHLRYYIGLLAKHLDVQIALLA SPEFSNGLPPSLLGNRERKVNMGKGLQICGNS IMPLLTIFYGNSIADRFPTHAEQFNQINNSQGYTS ATLARRSVDIFQNYVAIALMFGVQAVDLRTYK KTGHYDARACLS PATERLYSAVRHVVGQKPTS DRPYIWNQNEQGLDEHIARISADIAAGGVIVQA VQDILPCLH
组氨酸氨解酶[变异鱼腥藻 ATCC 29413](登录号: ABA23593.1)	MKTLSPAQSKTSSQQFSFTGNSSANVIIGNQKL TINDVARVARNGTLVSLTNNTDILQGIQASCDYI NNAVESGEPIYGVTSFGGGMANVAISREQASEL QTNLVWFLKTGAGNKLPLADVRAAMLLRANS HMRGASGIRLELIKRMIFLNAGVTPYVYEFGS IGASGDLVPLSYITGSLIGLDPSFKVDFNGKEMD APTALRQLNLSPLTLLPKEGLAMMNGTSMVTG IAANCVYDTQILTAIAMGVHALDIQALNGTNQS FHPFIHNSKPHPGQLWAADQMISLLANSQLVDR ELDGKHDYRDHELIQDRYSLRCLPQYLGPIVDG ISQIAKQIEIEINSVTDNPLIDVDNQASYHGGNF LGQYVGMGMDHLRYYIGLLAKHLDVQIALLA SPEFSNGLPPSLLGNRERKVNMGKGLQICGNS IMPLLTIFYGNSIADRFPTHAEQFNQINNSQGYTS

[0069]

	ATLARRSVDIFQNYVAIALMFGVQAVDLRTRYK KTGHYDARACLSPATERLYSAVRHVVGQKPTS DRPYIWNDNEQGLDEHIARISADIAAGGVIVQA VQDILPCLH
组氨酸氨解酶[发 光光杆菌](WP_01 1146484)	MKAKDVQPTIINKNGLISLEDIYDIAIKQKKVEI STEITELLTHGREKLEEKLNSEGEVIYGINTGFGG NANLVVPFEKIAEHQQNLLTFLSAGTGDYMSKP CIKASQFTMLLSVCKGWSATRPIVAQAIVDHIN HDIVPLVPYRGSVGASGDLIPLSYIARALCGIGK VYYMGAEIDAAEAIAKRAGLTPLSLKAKEGLALI NGTRVMSGISAITVIKLEKLFKASISAIALAVEAL LASHEHYDARIQQVKNHPGQNAVASALRNLLA GSTQVNLLSGVKEQANKACRHQEITQLNDTLQ EVYSIRCAPQVLGIVPESLATARKILEREVISAN DNPLIDPENGDVLHGGNFMGQYVARTMDALK LDIALIANHLHAIVALMMDNRFSGRLPNSLSPTP GMYQGFKGVLQSQTALVAAIRHDCASGIHTL ATEQYNQDIVSLGLHAAQDVLEMEQKLRNIVS MTILVVCQAIHLRGNISEIAPETAKFYHAVREISS PLITDRALDEDIIRIADAIINDQLPLPEIMLEE
组氨酸氨解酶(发 光光杆菌)登录号: CAE15566	MKQLTIYPGKLTDELQVYVLPVKITLDSQIFP AIERSVECVNAILAENRTAYGINTGFGLLASTRI EEDNLEKLQRSVLVSHAAGVGKALDDNMTRLI MVLKINSLSRGYSGIRLAVIQALIALVNAEIYPHI PCKGSVGASGDLAPLAHMSLLLLGEGQARYQG EWLPAKEALAKANLQPITLAAKEGLALLNGTQ VSTAFALRGLFEAEDLLAAAIVCGLSVEAALG SRKPF DARVHVVRGQQGQIDVAALYRHVLEES SELSDSHINCPKVQDPYSLRCQPQVMGACLTQL RHAADVILTEANAVSDNPLVFAEQGEVISGGNF HAEPVAMASDNLALVLAIEIGALSERRIALLMDS HMSQLPPFLVENGGVNSGFMAIQVTAAALASE NKALAHPASVDSLPTSANQEDHVSMAAPAAGR LWEMAENTRGILAEWLSACQGIDFRNGLKSSP ILEEARVILRAKVDYYDQDRFFAPDIDAAVKLL AEQHLSSLLPSGQILQRKNNR
氨基酸脱氨酶(奇 异变形杆菌)登录 号: ACD36582	MAISRRKFILGGTVVAVAAGAGVLTPLMTREGR FVPGTPRHGFVEGTGGPLPKQDDVVVIGAGILG IMTAINLAERGLSVTIVEKGNIAEQSSRFYQGA ISKMPDETFLHHLGKHRWREMNAKVGIDTT YRTQGRVEVPLDEEDLENVRKWIDAKSKDVGS DIPFRTKMIEGAELKQRLRGATTDWKIAGFEED SGSFDPEVATFVMAEYAKKMGIKIFTNCAARGL ETQAGVISDVVTEKGPIKTSRVVAVAGGVGSRLF MQNLNVDVPTLPAYQSQQLISAAPNAPGGNVA LPGGIFFRDQADGTYSATSPRVIVAPVVKESFTYG YKYLPLLALPDFPVHISLNEQLINSFMQSTHWD LNEESPFEKYRDMTALPDLPELNASLEKLKKEF PAFKESTLIDQWSGAMAIAPDENPIISDVKEYPG LVINTATGWGMTESPVSAEITADLLL GK KPVLD

[0070]

氨基酸脱氨酶[奇异变形杆菌 HI4320]) 登录号: AAA86752.1	AKPFSLYRF MNISRRKLLLGVAAGVLAGGAALVPMVRRD GKFVEAKSRASFVEGTQGALPKEADVVIIGAGI QGIMTAINLAERGMSVTILEKGGIAGEQSGRAY SQIISYQTSPEIFPLHHYGKILWRGMNEKIGADT SYRTQGRVEALADEKALDKAQAWIKTAKEAA GFDTPLNTRIIKGEELSNRLVGAQTPWTVAAFE EDSGSVDPETGTPALARYAKQIGVKIYTNC AVR GIETAGGKISDVVSEKGAIKTSQVVL AGGIWSR LFMGMNGIDIPTLNVYLSQQRVSGVPGAPRGN VHLPNGIHFREQADGT YAVAPRIFTSSIVKDSFL LGPKFMHLLGGGELPLEFSIGEDLFNSFKMPTS WNLDEKTPFEQFRVATATQNTQHLD AVFQRMK TEFPVFEKSEVVERWGAVVSPTFDELPIISEVKE YPGLVINTATVWGMTEGPAAGEVTADIVMGKK PVIDPTPFSLDRFKK
来自普通变形杆菌的 L-AAD;(登录号: BAA90864)	MAISRRKFIIGGTVVAVAAGAGILTPMLTREGR FVPGTPRHGFVEGTEGALPKQADV VVVGAGIL GIMTAINLVERGLSVVIVEKGN IAGEQSSRFYG QAISYKMPDETFLHHLGKHRWREMNAKVGI DTTYRTQGRVEVPLDEEDLVNVRK WIDERSKN VGS DIPFKTRIIEGAELNQRLRGATT DWK IAGFE EDSGSFDPEVATFVMAEYAKKMGVRIYTQCA ARGLETQAGVISDVVTEKGAIKTSQVVVAGGV WSRLFMQNLNVDVPTLPAYQSQQLISGSPTAP GGNVALPGGIFFREQADGT YATSPRVIVAPVVK ESFTYGYKYLPLLALPDFPVHISLNEQLINSFMQ STHWNLDEVSPFEQFRNMTALPDLPELNASLE KLKAEFPAFKESKLIDQWSGAMA IAPDENPIISE VKEYPGLVINTATGWGMTESPVSAELTADLLL GKKPVLDPKPFSLYRF
苯丙氨酸羟化酶 [智人] (登录号 AAH26251)	MSTAVLENPGLGRKLSDFGQETSYIEDNCNQN GAISLIFSLKEEVGALAKVLRLFEENDVNLTHIE SRPSRLKKDEYEFFTHLDKRSLPALTNIIKILRHD IGATVHELSDRDKK KDTVPWFPRTIQELDRFANQ ILSYGAELDADHPGFKDPVYRARRKQFADIAY NYRHGQPIPRVEYMEEGKKTWGT VFKTLKSLY KTHACYEYNHIFP LLEKYCGFHEDNIPQLEDVS QFLQTCTGFRLRPVAGLLSSRD FLGGLAFRVFH CTQYIRHGSKPMYTPEPDICHELLGHVPLFSDR SFAQFSQEIGLASLGAPDEYIEKLAT IYWFTVEF GLCKQGDSIKAYGAGLLSSFGE LQYCLSEKPKL LPLELEKTAIQNYTVTEFQPLY YVAESFNDAKE KVRNFAATIPRPF SVRYDPYTQR IEVLDNTQQ KILADSINSEIGILCSALQKIK

[0071] 在一些实施方案中,突变型PAL由衍生自野生型发光光杆菌PAL的PAL基因例如SEQ ID NO:1编码。在一些实施方案中,与野生型PAL(例如发光光杆菌PAL,例如SEQ ID NO:1)中的位置相比,突变型PAL包含选自92、133、167、432、470、433、263、366和396的一个或多个氨基酸位置中的突变。在一些实施方案中,与野生型PAL(例如发光光杆菌PAL,例如SEQ ID NO:1)中的位置相比,突变型PAL包含选自S92、H133、I167、L432、V470、A433、A263、K366和/

或L396的一个或多个氨基酸位置中的突变。在一些实施方案中,氨基酸突变是沉默突变,例如在氨基酸编码序列中没有相应变化的情况下多核苷酸序列中的变化。在一些实施方案中,与野生型PAL(例如发光光杆菌PAL,例如SEQ ID NO:1)中的位置相比,突变型PAL包含选自S92G、H133M、H133F、I167K、L432I、V470A、A433S、A263T、K366K(例如多核苷酸序列中的沉默突变)和/或L396L(例如多核苷酸序列中的沉默突变)的一个或多个氨基酸位置中的突变。

[0072] 在一些实施方案中,与野生型PAL(例如发光光杆菌PAL,例如SEQ ID NO:1)中的位置相比,突变型PAL包含选自S92G、H133M、I167K、L432I和V470A的一个或多个氨基酸位置中的突变。该突变体在本文中被称为“mPAL1”(SEQ ID NO:2;表4)。

[0073] 在一些实施方案中,与野生型PAL(例如发光光杆菌PAL,例如SEQ ID NO:1)中的位置相比,突变型PAL包含选自S92G、H133F、A433S和V470A的一个或多个氨基酸位置中的突变。该突变体在本文中被称为“mPAL2”(SEQ ID NO:3;表4)。

[0074] 在一些实施方案中,与野生型PAL(例如发光光杆菌PAL,例如SEQ ID NO:1)中的位置相比,突变型PAL包含选自S92G、H133F、A263T、K366K(例如多核苷酸序列中的沉默突变)、L396L(例如多核苷酸序列中的沉默突变)和V470A的一个或多个氨基酸位置中的突变。该突变体在本文中被称为“mPAL3”(SEQ ID NO:4;表4)。

[0075] 表4. 示例性PAL突变体的序列

[0076]

名称	氨基酸序列
野生型发光光 杆菌 PAL3(SE Q ID NO: 1)	MKAKDVQPTIIINKNGLISLEDIYDIAIKQKKVEISTEITE LLTHGREKLEEKLNSEGEVIYGINTGFGGNANLVVPFEKI AEHQQNLLTFLSAGTGDYMSKPCIKASQFTMLLSVCKG WSATRPIVAQAIVDHNHNDIVPLVPRYGSVGASGDLPLS YIARALCGIGKVYYMGAEIDAAEAIKRAGLTPLSLKAK EGLALINGTRVMSGISAITVIKLEKLFKASISAIALAVEA LLASHEHYDARIQQVKNHPGQNAVASALRNLLAGSTQ VNLLSGVKEQANKACRHQEITQLNDTLQEVYSIRCAPQ VLGIVPESLATARKILEREVISANDNPLIDPENGDLVHGG NFMGQYVARTMDALKLDIALIANHLHAIVALMMDNRF SRGLPNSLSPTPGMYQGFGKVQLSQTALVAAIRHDCAA SGIHTLATEQYNQDIVSLGLHAAQDVLEMEQKLRNIVS MTILVVCQAIHLRGNISEIAPETAKFYHAVREISSPLITDR ALDEDIIRIADAIINDQLPLPEIMLEE
mPAL1 (SEQ ID NO: 2)	MKAKDVQPTIIINKNGLISLEDIYDIAIKQKKVEISTEITE LLTHGREKLEEKLNSEGEVIYGINTGFGGNANLVVPFEKI AEHQQNLLTFLGAGTGDYMSKPCIKASQFTMLLSVCK GWSATRPIVAQAIVDMINHNDIVPLVPRYGSVGASGDLIP LSYIARALCGIGKVYYMGAEIDAAEAIKRAGLTPLSLK AKEGLALINGTRVMSGISAITVIKLEKLFKASISAIALAV EALLASHEHYDARIQQVKNHPGQNAVASALRNLLAGS TQVNLLSGVKEQANKACRHQEITQLNDTLQEVYSIRCA PQVLGIVPESLATARKILEREVISANDNPLIDPENGDLVH GGNFMGQYVARTMDALKLDIALIANHLHAIVALMMDN RFSRGLPNSLSPTPGMYQGFGKVQLSQTALVAAIRHDC AASGIHTIATEQYNQDIVSLGLHAAQDVLEMEQKLRNI VSMTILVACQAIHLRGNISEIAPETAKFYHAVREISSPLIT DRALDEDIIRIADAIINDQLPLPEIMLEE
mPAL2 (SEQ ID NO: 3)	MKAKDVQPTIIINKNGLISLEDIYDIAIKQKKVEISTEITE LLTHGREKLEEKLNSEGEVIYGINTGFGGNANLVVPFEKI AEHQQNLLTFLGAGTGDYMSKPCIKASQFTMLLSVCK GWSATRPIVAQAIVDFINHNDIVPLVPRYGSVGASGDLIPL SYIARALCGIGKVYYMGAEIDAAEAIKRAGLTPLSLKA KEGLALINGTRVMSGISAITVIKLEKLFKASISAIALAVE ALLASHEHYDARIQQVKNHPGQNAVASALRNLLAGST QVNLLSGVKEQANKACRHQEITQLNDTLQEVYSIRCAP QVLGIVPESLATARKILEREVISANDNPLIDPENGDLVH GNFMGQYVARTMDALKLDIALIANHLHAIVALMMDNR FSRGLPNSLSPTPGMYQGFGKVQLSQTALVAAIRHDCA ASGIHTLSTEQYNQDIVSLGLHAAQDVLEMEQKLRNIV SMTILVACQAIHLRGNISEIAPETAKFYHAVREISSPLITD RALDEDIIRIADAIINDQLPLPEIMLEE
mPAL3 (SEQ ID NO: 4)	MKAKDVQPTIIINKNGLISLEDIYDIAIKQKKVEISTEITE LLTHGREKLEEKLNSEGEVIYGINTGFGGNANLVVPFEKI AEHQQNLLTFLGAGTGDYMSKPCIKASQFTMLLSVCK GWSATRPIVAQAIVDFINHNDIVPLVPRYGSVGASGDLIPL

[0077]

SYIARALCGIGKVYYMGAEIDAAEAIKRALGLTPLSLKA KEGLALINGTRVMSGISAITVIKLEKLFKASISAIALAVE ALLASHEHYDARIQQVKNHPGQNAVASTLRNLLAGST QVNLLSGVKEQANKACRHQEITQLNDTLQEVYSIRCAP QVLGIVPESLATARKILEREVISANDNPLIDPENGDLVH GNFMGQYVARTMDALKLDIALIANHLHAIVALMMDNR FSRGLPNSLSPTPGMYQGFGVQLSQTALVAAIRHDCA ASGIHTLATEQYNQDIVSLGLHAAQDVLEMEQKLRNIV SMTILVACQAIHLRGNISEIAPETAKFYHAVREISSPLITD RALDEDIIRIADAIINDQLPLPEIMLEE
--

[0078] 在一些实施方案中,与野生型PAL(例如发光光杆菌PAL)相比,突变型PAL表现出稳定性增加。在一些实施方案中,与野生型PAL(例如发光光杆菌PAL)相比,突变型PAL表现出约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%或超过100%的稳定性增加。在一些实施方案中,与野生型PAL(例如发光光杆菌PAL)相比,突变型PAL表现出约两倍、三倍、四倍或五倍的稳定性增加。在一些实施方案中,与野生型PAL(例如发光光杆菌PAL)相比,突变型PAL表现出代谢苯丙氨酸和/或减轻高苯丙氨酸血症的活性或能力增加。在一些实施方案中,与野生型PAL(例如发光光杆菌PAL)相比,突变型PAL表现出约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%或超过100%的代谢苯丙氨酸和/或减轻高苯丙氨酸血症的活性或能力增加。在一些实施方案中,与野生型PAL(例如发光光杆菌PAL)相比,突变型PAL表现出约两倍、三倍、四倍或五倍的代谢苯丙氨酸和/或减轻高苯丙氨酸血症的活性或能力增加。在一些实施方案中,与野生型PAL(例如发光光杆菌PAL)相比,突变型PAL表现出至少两倍的活性增加。在一些实施方案中,与野生型PAL(例如发光光杆菌PAL)相比,突变体表现出至少三倍的活性增加。在一些实施方案中,与野生型PAL(例如发光光杆菌PAL)相比,突变体表现出至少四倍的活性增加。在一些实施方案中,与野生型PAL(例如发光光杆菌PAL)相比,突变体表现出至少五倍的活性增加。在一些实施方案中,通过在体外或体内检测苯丙氨酸、马尿酸和/或反式肉桂酸的水平来测量PAL代谢苯丙氨酸的能力的增加。

[0079] 基因表达系统

[0080] 在一些实施方案中,基因表达系统包含基因,例如编码突变型PAL多肽的基因,以及一种或多种启动子、终止子、增强子、绝缘子、沉默子和其他促进基因表达的调节序列。

[0081] 在一些实施方案中,本公开提供了基因表达系统,其包含编码PAL(例如突变型PAL)的基因的一个或多个拷贝。

[0082] 在一些实施方案中,基因表达系统包含衍生自野生型发光光杆菌PAL例如SEQ ID NO:1的突变型PAL。在一些实施方案中,基因表达系统包含与野生型PAL(例如发光光杆菌PAL,例如SEQ ID NO:1)中的位置相比具有在选自92、133、167、432、470、433、263、366和396的一个或多个氨基酸位置中的突变的突变型PAL。在一些实施方案中,基因表达系统包含与野生型PAL(例如发光光杆菌PAL,例如SEQ ID NO:1)中的位置相比具有在选自S92、H133、I167、L432、V470、A433、A263、K366和/或L396的一个或多个氨基酸位置中的突变的突变型PAL。在一些实施方案中,基因表达系统包含与野生型PAL(例如发光光杆菌PAL,例如SEQ ID NO:1)中的位置相比具有在选自S92G、H133F、H133M、I167K、L432I、V470A、A433S、A263T、

K366K (例如多核苷酸序列中的沉默突变) 和/或L396L (例如多核苷酸序列中的沉默突变) 的一个或多个氨基酸位置中的突变的突变型PAL。

[0083] 在一些实施方案中, 基因表达系统包含与野生型PAL (例如发光光杆菌PAL, 例如SEQ ID NO:1) 中的位置相比具有在选自S92G、H133M、I167K、L432I和V470A的一个或多个氨基酸位置中的突变的突变型PAL。在一些实施方案中, 基因表达系统包含与野生型PAL (例如发光光杆菌PAL, 例如SEQ ID NO:1) 中的位置相比具有在选自S92G、H133F、A433S和V470A的一个或多个氨基酸位置中的突变的突变型PAL。在一些实施方案中, 基因表达系统包含与野生型PAL (例如发光光杆菌PAL, 例如SEQ ID NO:1) 中的位置相比具有在选自S92G、H133F、A263T、K366K (例如多核苷酸序列中的沉默突变)、L396L (例如多核苷酸序列中的沉默突变) 和V470A的一个或多个氨基酸位置中的突变的突变型PAL。在一些实施方案中, 基因表达系统包含mPAL1。在一些实施方案中, 基因表达系统包含mPAL2。在一些实施方案中, 基因表达系统包含mPAL3。

[0084] 在一些实施方案中, 基因表达系统包含突变型PAL, 并且与包含野生型PAL (例如发光光杆菌PAL) 的合适对照 (例如基因表达系统) 相比, 表现出稳定性增加。在一些实施方案中, 与包含野生型PAL (例如发光光杆菌PAL) 的合适对照 (例如基因表达系统) 相比, 包含突变型PAL的基因表达系统表现出约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%或超过100%的稳定性增加。在一些实施方案中, 与包含野生型PAL (例如发光光杆菌PAL) 的合适对照 (例如基因表达系统) 相比, 包含突变型PAL的基因表达系统表现出约两倍、三倍、四倍或五倍的稳定性增加。在一些实施方案中, 基因表达系统包含突变型PAL, 并且与包含野生型PAL (例如发光光杆菌PAL) 的合适对照 (例如基因表达系统) 相比, 表现出代谢苯丙氨酸和/或减轻高苯丙氨酸血症的活性或能力增加。在一些实施方案中, 与合适的对照 (例如包含野生型PAL的基因表达系统, 例如发光光杆菌PAL) 相比, 包含突变型PAL的基因表达系统表现出约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%或超过100%的代谢苯丙氨酸和/或减轻高苯丙氨酸血症的活性或能力增加。在一些实施方案中, 与合适的对照 (例如包含野生型PAL的基因表达系统, 例如发光光杆菌PAL) 相比, 包含突变型PAL的基因表达系统表现出约两倍、三倍、四倍或五倍的代谢苯丙氨酸和/或减轻高苯丙氨酸血症的活性或能力增加。在一些实施方案中, 基因表达系统包含突变型PAL, 并且与合适的对照 (例如包含野生型PAL的基因表达系统, 例如发光光杆菌PAL) 相比, 表现出至少两倍的活性增加。在一些实施方案中, 基因表达系统包含突变型PAL, 并且与合适的对照 (例如包含野生型PAL的基因表达系统, 例如发光光杆菌PAL) 相比, 表现出至少三倍的活性增加。在一些实施方案中, 基因表达系统包含突变型PAL, 并且与合适的对照 (例如包含野生型PAL的基因表达系统, 例如发光光杆菌PAL) 相比, 表现出至少四倍的活性增加。在一些实施方案中, 基因表达系统包含突变型PAL, 并且与合适的对照 (例如包含野生型PAL的基因表达系统, 例如发光光杆菌PAL) 相比, 表现出至少五倍的活性增加。

[0085] 在一些实施方案中, 基因表达系统还包含额外PME, 例如PAH、LAAD。示例性PME及其组合是本领域已知的, 参见例如PCT/US2016/032562和PCT/US2016/062369, 其内容以引用的方式并入本文。在一些实施方案中, 基因表达系统包含突变型PAL和野生型PAL。

[0086] 在一些实施方案中, 除了一种或多种PME之外, 基因表达系统还包含一种或多种编

码苯丙氨酸转运蛋白的基因。在一些实施方案中,苯丙氨酸转运蛋白由衍生自细菌物种的pheP基因编码,所述细菌物种包括但不限于乙酸钙不动杆菌(*Acinetobacter calcoaceticus*)、肠道沙门氏菌(*Salmonella enterica*)和大肠埃希氏菌。苯丙氨酸转运蛋白的实例包括由aroP基因编码的通用氨基酸通透酶,以高亲和力转运包括苯丙氨酸在内的三种芳香族氨基酸,并被认为是与PheP一起负责最大份额的苯丙氨酸输入。此外,低水平的苯丙氨酸转运活性已被追踪到LIV-I/LS系统的活性,所述LIV-I/LS系统是由两种周质结合蛋白LIV-I结合蛋白(LIV-I系统)和LS结合蛋白(LS系统)以及膜组分LivHMGF组成的支链氨基酸转运蛋白。在一些实施方案中,苯丙氨酸转运蛋白由衍生自细菌物种的aroP基因编码。在一些实施方案中,苯丙氨酸转运蛋白由衍生自细菌物种的LIV-结合蛋白和LS-结合蛋白以及LivHMGF基因编码。在一些实施方案中,遗传工程化细菌包含选自pheP、aroP和LIV-I/LS系统的超过一种类型的苯丙氨酸转运蛋白。

[0087] 在一些实施方案中,基因表达系统包含一个或多个编码转录调节因子(例如转录因子)的基因。

[0088] 在一些实施方案中,一种或多种PME和/或苯丙氨酸转运蛋白和/或转录调节因子可操作地连接至启动子。在一些实施方案中,启动子是组成型启动子。在一些实施方案中,一种或多种PME和/或苯丙氨酸转运蛋白和/或转录调节因子可操作地连接至诱导型启动子。在一些实施方案中,一种或多种PME和/或苯丙氨酸转运蛋白和/或转录调节因子受到由外源环境条件诱导的启动子控制,如本文所述。在一些实施方案中,一种或多种PME和/或苯丙氨酸转运蛋白和/或转录调节因子受到由外源环境条件诱导的启动子控制,例如在哺乳动物肠道特异性分子或代谢物的存在下。在一个实施方案中,一种或多种PME和/或苯丙氨酸转运蛋白和/或转录调节因子在由低氧、微需氧或厌氧条件诱导的启动子的控制下表达,其中基因的表达在低氧或厌氧环境例如哺乳动物肠道环境下被激活。在一些实施方案中,启动子是FNR、ANR或DNR启动子。表2提供了FNR启动子序列的非限制性实例。在其他实施方案中,一种或多种PME和/或苯丙氨酸转运蛋白和/或转录调节因子在氧水平依赖性启动子的控制下表达,所述启动子融合到转录激活因子例如CRP的结合位点。CRP(环AMP受体蛋白或分解代谢激活蛋白或CAP)在细菌中,当存在可快速代谢的碳水化合物(诸如葡萄糖)时,通过抑制负责摄取、代谢和同化不太有利的碳源的基因来发挥主要调节作用(Wu等人, 2015)。

[0089] 在替代性实施方案中,一种或多种PME和/或苯丙氨酸转运蛋白和/或转录调节因子受到在阿拉伯糖存在下被激活的 P_{araBAD} 启动子控制。在一个实施方案中,LAAD的表达受到 P_{araBAD} 启动子控制。在一个实施方案中,LAAD的表达发生在有氧或微有氧条件下。在一个实施方案中,PAL表达受到 P_{araBAD} 启动子控制。在一个实施方案中,PAL表达发生在需氧或微需氧条件下。在一个实施方案中,PAL表达发生在厌氧或低氧条件下,而LAAD表达发生在需氧或微需氧条件下。在一个实施方案中,PAL表达发生在厌氧或低氧条件下,而LADD表达受到 P_{araBAD} 启动子控制。在一些实施方案中,一种或多种PME和/或苯丙氨酸转运蛋白基因在通过暴露于化学和/或营养诱导剂而被诱导的启动子的控制下表达。在一些实施方案中,一种或多种PME和/或苯丙氨酸转运蛋白和/或转录调节基因在通过暴露于四环素而被诱导的启动子的控制下表达。在一些实施方案中,一种或多种PME和/或苯丙氨酸转运蛋白和/或转录调节基因在通过暴露于阿拉伯糖而被诱导的启动子的控制下表达。在一些实施方案中,一种

或多种PME和/或苯丙氨酸转运蛋白和/或转录调节基因在通过暴露于IPTG或其他LacI诱导剂而被诱导的启动子的控制下表达。在一些实施方案中,一种或多种PME和/或苯丙氨酸转运蛋白和/或转录调节基因在通过暴露于鼠李糖被诱导的启动子的控制下表达。在一些实施方案中,一种或多种PME和/或苯丙氨酸转运蛋白和/或转录调节基因在通过暴露于四环素而被诱导的启动子的控制下表达。在一些实施方案中,表达超过一种PME基因,例如PAL和LAAD基因,并且每种基因在不同启动子,例如本文讨论的任何启动子的控制下表达。

[0090] 在一些实施方案中,基因表达系统包含一个或多个基因序列,其表达受温度敏感机制控制。温度调节剂是有利的,因为无需使用外部化学物质或专门的培养基就能进行强转录控制(参见例如Nemani等人,Magnetic nanoparticle hyperthermia induced cytosine deaminase expression in microencapsulated E.coli for enzyme-prodrug therapy;JBiotecnol.2015年6月10日;203:32-40,以及其中的参考文献)。使用突变体cI857阻遏物和pL和/或pR噬菌体 λ 启动子进行的温度调节蛋白表达已被用于使重组细菌菌株工程化。克隆在 λ 启动子下游的感兴趣基因然后可以通过噬菌体 λ 的突变不耐热cI857阻遏物有效地调节。在低于37°C的温度下,cI857与pR启动子的oL或oR区域结合,并通过RNA聚合酶阻断转录。在更高的温度(例如37-42°C)下,功能性cI857二聚体不稳定,消除与oL或oR DNA序列的结合,并且启动mRNA转录。如本文所述,可以通过优化核糖体结合位点(RBS)来控制或进一步微调ParaBad的诱导型表达。

[0091] 在一个实施方案中,一种或多种PME和/或Phe转运蛋白(例如,PheP)和/或转录调节因子的表达由一种或多种温度调节型启动子驱动。在一个实施方案中,PAL的表达由温度调节型启动子驱动。在一个实施方案中,PheP的表达由温度调节型启动子驱动。在一个实施方案中,LAAD的表达由温度调节型启动子驱动。

[0092] 在一些实施方案中,表达超过一种PME基因,例如PAL和LAAD基因,并且每个基因在相同启动子,例如本文讨论的任何启动子的控制下表达。在一些实施方案中,PME基因和/或苯丙氨酸转运蛋白基因和/或转录调节因子在不同启动子,例如本文讨论的任何启动子的控制下表达。在一些实施方案中,PME基因和/或苯丙氨酸转运蛋白基因和/或转录调节因子在相同启动子,例如本文讨论的任何启动子的控制下表达。

[0093] 在另一个实施方案中,一种或多种诱导型启动子,例如温度调节型启动子、阿拉伯糖诱导型启动子、tet诱导型启动子和IPTG诱导型启动子,驱动一种或多种双顺反子信息的表达。双顺反子信息可以包括一种或多种PME,例如PAL或LAAD,和/或一种或多种Phe转运蛋白,例如PheP,和/或一种或多种转录调节因子。在一个实施方案中,一种或多种诱导型启动子驱动三顺反子信息的表达。三顺反子信息可以包括一种或多种PME,例如PAL或LAAD,和/或一种或多种Phe转运蛋白,例如PheP,和/或一种或多种转录调节因子。在一个实施方案中,一种或多种诱导型启动子驱动多顺反子信息的表达。诱导的多顺反子信息可以包括一种或多种PME,例如PAL或LAAD,和/或一种或多种Phe转运蛋白,例如PheP,和/或一种或多种转录调节因子。

[0094] 在一些实施方案中,基因表达系统还可以包含一个或多个与生物安全和/或生物防护相关的基因序列,例如删除开关(kill-switch)、基因保护系统和/或营养缺陷型。这些基因序列的表达可以用本文所述的启动子或启动子系统来调节。启动子可以是调节一种或多种不同基因的同一起动子,可以是调节不同基因的相同启动子的不同拷贝,或者可以包

括使用组合用于调节不同基因的表达的不同启动子。使用不同的调节或启动子系统来控制基因表达,提供了灵活性(例如,在不同环境条件下差异控制基因表达的能力和/或在时间上差异控制基因表达的能力),并且还提供了“微调”基因表达的能力,任何或所有这些调节都可以用来优化基因表达和/或微生物生长。实例和组合是本领域已知的,参见例如PCT/US2016/032562和PCT/US2016/062369,其内容以引用的方式并入本文。

[0095] 经工程化以减轻高苯丙氨酸血症的微生物

[0096] 本文提供了能够减少过量苯丙氨酸的遗传工程化微生物。在一些实施方案中,遗传工程化微生物是细菌。在一些实施方案中,细菌是非致病菌。在一些实施方案中,细菌是共生细菌。在一些实施方案中,细菌是益生菌。在一些实施方案中,遗传工程化细菌是被修饰或突变以降低或消除致病性的天然致病性细菌。在一些实施方案中,非致病性细菌是革兰氏阴性菌。在一些实施方案中,非致病性细菌是革兰氏阳性菌。示例性细菌实例包括但不限于芽孢杆菌属、拟杆菌属、双歧杆菌属、短杆菌属、梭菌属、肠球菌属、大肠埃希氏菌、乳杆菌属、乳球菌属、酵母属和葡萄球菌属,例如凝结芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、脆弱拟杆菌、枯草拟杆菌、多形拟杆菌、两歧双歧杆菌、婴儿双歧杆菌、乳双歧杆菌、长双歧杆菌、丁酸梭菌、屎肠球菌、嗜酸乳杆菌、保加利亚乳杆菌、干酪乳杆菌、约氏乳杆菌、副干酪乳杆菌、植物乳杆菌、罗伊氏乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、乳酸乳球菌和鲍氏酵母菌。在某些实施方案中,基因工程化细菌选自自由以下组成的组:脆弱拟杆菌、多形拟杆菌、枯草拟杆菌、两歧双歧杆菌、婴儿双歧杆菌、乳双歧杆菌、丁酸梭菌、大肠埃希氏菌、嗜酸乳杆菌、植物乳杆菌、罗伊氏乳杆菌和乳酸乳球菌。

[0097] 在一些实施方案中,遗传工程化细菌是大肠埃希氏菌菌株尼斯勒1917(大肠埃希氏菌尼斯勒),其是已进化成最佳表征的益生菌之一的肠杆菌科革兰氏阴性菌(Ukena等人,2007)。该菌株的特征在于完全无害(Schultz,2008),并具有GRAS(通常被认为是安全的)状态(Reister等人,2014,着重强调)。

[0098] 本领域普通技术人员将会理解,本文所公开的遗传修饰可以适用于细菌的其他物种、菌株和亚型。此外,来自一种或多种不同物种的基因可以彼此引入,例如来自圆红冬孢酵母的PAL基因可在大肠埃希氏菌中表达(Sarkissian等人,1999),并且已知原核和真核苯丙氨酸解氨酶共享序列同源性(Xiang和Moore,2005)。

[0099] 本发明的未修饰的大肠埃希氏菌尼斯勒和遗传工程化细菌可以例如通过肠道或血清中的防御因子(Sonnenborn等人,2009)或通过施用后数小时或数天激活删除开关来破坏。因此,遗传工程化细菌可能需要持续施用。在一些实施方案中,为人类受试者计算停留时间。可以计算遗传工程化细菌在体内的停留时间。

[0100] 在一些实施方案中,遗传工程化微生物(例如细菌)包含一种或多种编码PAL,例如突变型PAL的基因。在一些实施方案中,遗传工程化微生物(例如细菌)包含衍生自原核物种的PAL。在一些实施方案中,遗传工程化微生物(例如细菌)包含衍生自真核物种的PAL。在一些实施方案中,遗传工程化微生物,例如细菌,包含源自细菌物种的PAL,所述细菌物种包括但不限于木糖氧化无色杆菌、铜绿假单胞菌、发光光杆菌、变异鱼腥藻和根癌农杆菌。

[0101] 在一些实施方案中,遗传工程化微生物(例如细菌)包含衍生自野生型发光光杆菌PAL,例如SEQ ID NO:1的突变型PAL。在一些实施方案中,遗传工程化微生物(例如细菌)包含与野生型PAL(例如发光光杆菌PAL,例如SEQ ID NO:1)中的位置相比具有在选自92、133、

167、432、470、433、263、366和396的一个或多个氨基酸位置中的突变的突变型PAL。在一些实施方案中,遗传工程化微生物(例如细菌)包含与野生型PAL(例如发光光杆菌PAL,例如SEQ ID NO:1)中的位置相比具有在选自S92、H133、I167、L432、V470、A433、A263、K366和/或L396的一个或多个氨基酸位置中的突变的突变型PAL。在一些实施方案中,遗传工程化微生物(例如细菌)包含与野生型PAL(例如发光光杆菌PAL,例如SEQ ID NO:1)中的位置相比具有在选自S92G、H133M、H133F、I167K、L432I、V470A、A433S、A263T、K366K(例如多核苷酸序列中的沉默突变)和/或L396L(例如多核苷酸序列中的沉默突变)的一个或多个氨基酸位置中的突变的突变型PAL。

[0102] 在一些实施方案中,遗传工程化微生物(例如细菌)包含与野生型PAL(例如发光光杆菌PAL,例如SEQ ID NO:1)中的位置相比具有在选自S92G、H133M、I167K、L432I和V470A的一个或多个氨基酸位置中的突变的突变型PAL。在一些实施方案中,遗传工程化微生物(例如细菌)包含与野生型PAL(例如发光光杆菌PAL,例如SEQ ID NO:1)中的位置相比具有在选自S92G、H133F、A433S和V470A的一个或多个氨基酸位置中的突变的突变型PAL。在一些实施方案中,遗传工程化微生物(例如细菌)包含与野生型PAL(例如发光光杆菌PAL,例如SEQ ID NO:1)中的位置相比具有在选自S92G、H133F、A263T、K366K(例如多核苷酸序列中的沉默突变)、L396L(例如多核苷酸序列中的沉默突变)和V470A的一个或多个氨基酸位置中的突变的突变型PAL。在一些实施方案中,遗传工程化微生物(例如细菌)包含mPAL1。在一些实施方案中,遗传工程化微生物(例如细菌)包含mPAL2。在一些实施方案中,遗传工程化微生物(例如细菌)包含mPAL3。

[0103] 在一些实施方案中,遗传工程化微生物(例如细菌)包含突变型PAL,并且与包含野生型PAL(例如发光光杆菌PAL)的合适对照(例如,遗传工程化微生物,例如细菌)相比表现出稳定性增加。在一些实施方案中,与包含野生型PAL(例如发光光杆菌PAL)的合适对照(例如遗传工程化微生物,例如细菌)相比,包含突变型PAL的遗传工程化微生物(例如细菌)表现出约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%或超过100%的稳定性增加。在一些实施方案中,与包含野生型PAL(例如发光光杆菌PAL)的合适对照(例如遗传工程化微生物,例如细菌)相比,包含突变型PAL的遗传工程化微生物(例如细菌)表现出约两倍、三倍、四倍或五倍的稳定性增加。在一些实施方案中,遗传工程化微生物(例如细菌)包含突变型PAL,并且与包含野生型PAL(例如发光光杆菌PAL)的合适对照(例如遗传工程化微生物,例如细菌)相比,表现出代谢苯丙氨酸和/或减轻高苯丙氨酸血症的活性或能力增加。在一些实施方案中,与包含野生型PAL(例如发光光杆菌PAL)的合适对照(例如遗传工程化微生物,例如细菌)相比,包含突变型PAL的遗传工程化微生物(例如细菌)表现出约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%或超过100%的代谢苯丙氨酸和/或减轻高苯丙氨酸血症的活性或能力增加。在一些实施方案中,与包含野生型PAL(例如发光光杆菌PAL)的合适对照(例如遗传工程化微生物,例如细菌)相比,包含突变型PAL的遗传工程化微生物(例如细菌)表现出约两倍、三倍、四倍或五倍的代谢苯丙氨酸和/或减轻高苯丙氨酸血症的活性或能力增加。在一些实施方案中,遗传工程化微生物(例如细菌)包含突变型PAL,并且与包含野生型PAL(例如发光光杆菌PAL)的合适对照(例如遗传工程化微生物,例如细菌)相比,表现出至少两倍的活性增加。在一些实施方案中,遗传工程化微生物(例如细菌)包含突变型PAL,并且与包含野生型PAL(例如发

光光杆菌PAL)的合适对照(例如遗传工程化微生物,例如细菌)相比,表现出至少三倍的活性增加。在一些实施方案中,遗传工程化微生物(例如细菌)包含突变型PAL,并且与包含野生型PAL(例如发光光杆菌PAL)的合适对照(例如遗传工程化微生物,例如细菌)相比,表现出至少四倍的活性增加。在一些实施方案中,遗传工程化微生物(例如细菌)包含突变型PAL,并且与包含野生型PAL(例如发光光杆菌PAL)的合适对照(例如遗传工程化微生物,例如细菌)相比,表现出至少五倍的活性增加。

[0104] 在一些实施方案中,遗传工程化微生物(例如细菌)包含额外PME,例如PAH、LAAD。示例性PME及其组合是本领域已知的,参见例如PCT/US2016/032562和PCT/US2016/062369,其内容以引用的方式并入本文。在一些实施方案中,遗传工程化微生物(例如细菌)包含突变型PAL和野生型PAL。

[0105] 在一些实施方案中,遗传工程化微生物(例如细菌)包含本文所述的突变型PAL和本文所述的苯丙氨酸转运蛋白(例如PheP)。在一些实施方案中,遗传工程化微生物(例如细菌)包含本文所述的突变型PAL、本文所述的LAAD和本文所述的苯丙氨酸转运蛋白(例如PheP)。

[0106] 在一些实施方案中,遗传工程化微生物(例如细菌)包含转录调节因子,例如本文所述的非天然转录调节因子。

[0107] 在这些实施方案中,遗传工程化微生物(例如细菌)中存在的PME(例如突变型PAL)、苯丙氨酸转运蛋白和/或转录调节因子可以可操作地连接至一个或多个启动子。对于每个基因或每个基因的每个拷贝,启动子可以相同或不同。在一些实施方案中,启动子是组成型启动子或诱导型启动子。在一些实施方案中,启动子由外源环境条件诱导。在一些实施方案中,启动子由外源环境条件诱导,例如在哺乳动物肠道特异性分子或代谢物存在的情况下诱导。在一些实施方案中,启动子由低氧、微需氧或厌氧条件诱导,其中基因的表达在低氧或厌氧环境下被激活,例如在哺乳动物肠道环境下被激活。在一些实施方案中,启动子是FNR、ANR或DNR启动子。在一些实施方案中,氧水平依赖型启动子融合到转录激活因子(例如CRP)的结合位点。在一些实施方案中,启动子是 P_{araBAD} 启动子,其在阿拉伯糖存在下被激活。在一个实施方案中,LAAD的表达受到 P_{araBAD} 启动子控制。在一个实施方案中,LAAD的表达发生在有氧或微有氧条件下。在一个实施方案中,PAL表达受到 P_{araBAD} 启动子控制。在一个实施方案中,PAL表达发生在需氧或微需氧条件下。在一个实施方案中,PAL表达发生在厌氧或低氧条件下,而LAAD表达发生在需氧或微需氧条件下。在一个实施方案中,PAL表达发生在厌氧或低氧条件下,而LAAD表达受到 P_{araBAD} 启动子控制。在一些实施方案中,一种或多种PME和/或苯丙氨酸转运蛋白和/或转录调节基因在通过暴露于化学和/或营养诱导剂而被诱导的启动子的控制下表达。在一些实施方案中,一种或多种PME和/或苯丙氨酸转运蛋白和/或转录调节基因在通过暴露于四环素而被诱导的启动子的控制下表达。在一些实施方案中,一种或多种PME和/或苯丙氨酸转运蛋白基因和/或转录调节因子在通过暴露于阿拉伯糖而被诱导的启动子的控制下表达。在一些实施方案中,一种或多种PME和/或苯丙氨酸转运蛋白基因和/或转录调节因子在通过暴露于IPTG或其他LacI诱导剂而被诱导的启动子的控制下表达。在一些实施方案中,一种或多种PME和/或苯丙氨酸转运蛋白和/或转录调节基因在通过暴露于鼠李糖而被诱导的启动子的控制下表达。在一些实施方案中,一种或多种PME和/或苯丙氨酸转运蛋白和/或转录调节基因在通过暴露于四环素而被诱导的启动子的控

制下表达。在一些实施方案中,表达超过一种PME基因,例如PAL和LAAD基因,并且每种基因在不同启动子,例如本文讨论的任何启动子的控制下表达。

[0108] 在一些实施方案中,PME(例如突变型PAL)、苯丙氨酸转运蛋白和/或转录调节因子的表达受温度敏感机制,例如突变型cI857阻遏物、pL和/或pR噬菌体 λ 启动子控制。在一些实施方案中,在低于37℃的温度下,cI857结合pR启动子的oL或oR区域,并阻断RNA聚合酶的转录。在更高的温度(例如37-42℃)下,功能性cI857二聚体不稳定,消除与oL或oR DNA序列的结合,并且启动mRNA转录。如本文所述,可以通过优化核糖体结合位点(RBS)来控制或进一步微调ParaBad的诱导型表达。

[0109] 在一个实施方案中,一种或多种PME和/或Phe转运蛋白(例如PheP)和/或转录调节因子在遗传工程化微生物(例如细菌)中的表达由一种或多种温度调节型启动子驱动。在一个实施方案中,PAL的表达由温度调节型启动子驱动。在一个实施方案中,PheP的表达由温度调节型启动子驱动。在一个实施方案中,LAAD的表达由温度调节型启动子驱动。

[0110] 在一些实施方案中,超过一种PME基因在遗传工程化微生物(例如细菌)中表达,并且每个基因在相同启动子,例如本文讨论的任何启动子的控制下表达。在一些实施方案中,超过一种PME基因在遗传工程化微生物(例如细菌)中表达,并且每个基因在相同启动子,例如本文讨论的任何启动子的控制下表达。在一些实施方案中,遗传工程化微生物(例如细菌)中的PME基因和/或苯丙氨酸转运蛋白和/或转录调节基因在不同启动子,例如本文讨论的任何启动子的控制下表达。在一些实施方案中,遗传工程化微生物(例如细菌)中的PME基因和/或苯丙氨酸转运蛋白和/或转录调节基因在相同启动子,例如本文讨论的任何启动子的控制下表达。

[0111] 在另一个实施方案中,遗传工程化微生物(例如细菌)中的一种或多种诱导型启动子,例如温度调节型、阿拉伯糖诱导型、tet诱导型和IPTG诱导型启动子,驱动一种或多种双顺反子信息的表达。双顺反子信息可以包括一种或多种PME,例如PAL或LAAD,和/或一种或多种Phe转运蛋白,例如PheP,和/或一种或多种转录调节因子。在一个实施方案中,一种或多种诱导型启动子驱动三顺反子信息的表达。三顺反子信息可以包括一种或多种PME,例如PAL或LAAD,和/或一种或多种Phe转运蛋白,例如PheP,和/或一种或多种转录调节因子。在一个实施方案中,一种或多种诱导型启动子驱动多顺反子信息的表达。诱导的多顺反子信息可以包括一种或多种PME,例如PAL或LAAD,和/或一种或多种Phe转运蛋白,例如PheP,和/或一种或多种转录调节因子。

[0112] 一种或多种PME、苯丙氨酸转运蛋白和转录调节基因可以存在于遗传工程化微生物(例如细菌)的质粒或染色体上。在一些实施方案中,来自染色体的表达可用于增加PME和/或苯丙氨酸转运蛋白和/或转录调节因子的表达稳定性。在一些实施方案中,一种或多种PME和/或苯丙氨酸转运蛋白和/或转录调节基因整合到微生物的染色体中的遗传工程化微生物的一个或多个整合位点中。在一些实施方案中,一种或多种PME和/或苯丙氨酸转运蛋白和/或转录调节基因在质粒上表达。在一些实施方案中,质粒是低拷贝质粒。在其他实施方案中,质粒是高拷贝质粒。

[0113] 在一些实施方案中,遗传工程化微生物(例如细菌)也可以包含一个或多个与生物安全和/或生物防护相关的基因序列,例如删除开关、基因保护系统、细胞生长和/或存活必需基因、thyA、dapA和/或营养缺陷型基因。这些基因序列的表达可以用本文所述的启动子

或启动子系统来调节。启动子可以是调节一种或多种不同基因的同一启动子,可以是调节不同基因的相同启动子的不同拷贝,或者可以包括使用组合用于调节不同基因的表达式不同启动子。使用不同的调节或启动子系统来控制基因表达,提供了灵活性(例如,在不同环境条件下差异控制基因表达的能力和/或在时间上差异控制基因表达的能力),并且还提供了“微调”基因表达的能力,任何或所有这些调节都可以用来优化基因表达和/或微生物生长。实例和组合是本领域已知的,参见例如PCT/US2016/032562和PCT/US2016/062369、美国临时申请号62/184,811、PCT/US2016/062369,其内容以引用的方式并入本文。

[0114] 在一些实施方案中,遗传工程化微生物还包含天然分泌机制或非天然分泌机制,其能够在细胞外环境中从细胞质中分泌分子。许多微生物进化出复杂的分泌系统来运输底物穿过细胞膜。底物(诸如小分子、蛋白质和DNA)可以释放到细胞外空间或周质(诸如肠腔或其他空间),注射到靶细胞中,或与微生物膜结合。PCT/US2016/062369中公开了分泌系统的实例。

[0115] 在一些实施方案中,其中遗传工程化微生物是细菌,本公开提供了包含一个或多个噬菌体基因组的细菌,其中一个或多个噬菌体基因组是缺陷性的。在一些实施方案中,本公开提供了包含一个或多个噬菌体基因组的细菌,其中一个或多个噬菌体基因组是缺陷性的,使得不产生裂解性噬菌体。在一些实施方案中,本公开提供了包含一个或多个噬菌体基因组的细菌,其中一个或多个噬菌体基因组是缺陷性的,因为不表达一个或多个噬菌体基因。在一些实施方案中,本公开提供了包含一个或多个噬菌体基因组的细菌,其中一个或多个噬菌体基因组中的一个或多个噬菌体基因包含一个或多个突变。在一些实施方案中,一个或多个噬菌体基因组以益生菌的天然状态存在。在一些实施方案中,细菌编码一种或多种溶原性噬菌体。在一些实施方案中,细菌编码一种或多种缺陷性或隐性噬菌体或卫星噬菌体。在一些实施方案中,细菌编码一种或多种尾蛋白或基因转移剂。在一些实施方案中,一个或多个突变影响噬菌体经历裂解周期的能力,例如减少给定群体中细菌可经历裂解阶段的频率或数量。在一些实施方案中,一个或多个突变防止噬菌体感染其他细菌。在一些实施方案中,一个或多个突变改变,例如增加或减少细菌适合度。

[0116] 在一些实施方案中,遗传工程化细菌的一个或多个噬菌体基因组被突变。此类突变可以包括一个或多个噬菌体基因的部分或完整序列的一个或多个缺失。或者,突变可以包括一个或多个核苷酸在一个或多个噬菌体基因中的一个或多个插入。在另一个实例中,突变可以包括一个或多个噬菌体基因的部分或完整序列的一个或多个取代。在另一个实例中,突变包括噬菌体基因组中一个或多个噬菌体基因的部分或完整序列的一个或多个倒位。此外,突变可以包括一个或多个缺失、插入、取代或倒位的任何组合。在某些实施方案中,相对于在一个或多个噬菌体基因组中不具有一种或多种定向突变的同一细菌,一个或多个突变减少或防止噬菌体颗粒从细菌中产生和释放。在一些实施方案中,细菌是大肠埃希氏菌尼斯勒菌株。在一些实施方案中,突变的噬菌体基因组是大肠埃希氏菌尼斯勒噬菌体1基因组、大肠埃希氏菌尼斯勒噬菌体2基因组和/或大肠埃希氏菌尼斯勒噬菌体3基因组。在一个实施方案中,突变的噬菌体基因组是大肠埃希氏菌尼斯勒噬菌体3基因组。在一个实施方案中,突变位于或包含选自以下的一个或多个基因:ECOLIN_09965、ECOLIN_09970、ECOLIN_09975、ECOLIN_09980、ECOLIN_09985、ECOLIN_09990、ECOLIN_09995、ECOLIN_10000、ECOLIN_10005、ECOLIN_10010、ECOLIN_10015、ECOLIN_10020、ECOLIN_

10025、ECOLIN_10030、ECOLIN_10035、ECOLIN_10040、ECOLIN_10045、ECOLIN_10050、ECOLIN_10055、ECOLIN_10065、ECOLIN_10070、ECOLIN_10075、ECOLIN_10080、ECOLIN_10085、ECOLIN_10090、ECOLIN_10095、ECOLIN_10100、ECOLIN_10105、ECOLIN_10110、ECOLIN_10115、ECOLIN_10120、ECOLIN_10125、ECOLIN_10130、ECOLIN_10135、ECOLIN_10140、ECOLIN_10145、ECOLIN_10150、ECOLIN_10160、ECOLIN_10165、ECOLIN_10170、ECOLIN_10175、ECOLIN_10180、ECOLIN_10185、ECOLIN_10190、ECOLIN_10195、ECOLIN_10200、ECOLIN_10205、ECOLIN_10210、ECOLIN_10220、ECOLIN_10225、ECOLIN_10230、ECOLIN_10235、ECOLIN_10240、ECOLIN_10245、ECOLIN_10250、ECOLIN_10255、ECOLIN_10260、ECOLIN_10265、ECOLIN_10270、ECOLIN_10275、ECOLIN_10280、ECOLIN_10290、ECOLIN_10295、ECOLIN_10300、ECOLIN_10305、ECOLIN_10310、ECOLIN_10315、ECOLIN_10320、ECOLIN_10325、ECOLIN_10330、ECOLIN_10335、ECOLIN_10340和ECOLIN_10345。在一个实施方案中,突变,例如一个或多个缺失,位于或包含选自ECOLIN_10110、ECOLIN_10115、ECOLIN_10120、ECOLIN_10125、ECOLIN_10130、ECOLIN_10135、ECOLIN_10140、ECOLIN_10145、ECOLIN_10150、ECOLIN_10160、ECOLIN_10165、ECOLIN_10170和ECOLIN_10175的一个或多个基因。包含本文公开的细菌和药学上可接受的载体的药学上可接受的组合物。

[0117] 噬菌体基因组的修饰是本领域已知的,参见例如PCT/US18/38840,其内容以引用的方式并入本文。

[0118] 在一些实施方案中,突变位于或包含一个或多个编码裂解基因的基因。在一些实施方案中,突变位于或包含编码一种或多种蛋白酶或溶素的一种或多种基因。在一些实施方案中,突变位于或包含编码一种或多种毒素的一种或多种基因。在一些实施方案中,突变位于或包含编码一种或多种抗生素抗性相关蛋白的一种或多种基因。在一些实施方案中,突变位于或包含编码一种或多种噬菌体翻译相关蛋白的一个或多个基因。在一些实施方案中,一个或多个突变位于或包含一个或多个编码结构蛋白的基因。此类结构基因包括编码头、尾、领或被毛的多肽的基因。在一些实施方案中,一个或多个突变位于或包含编码头部结构多肽的一个或多个基因。在一些实施方案中,一个或多个突变位于或包含编码尾部结构多肽的一个或多个基因。在一些实施方案中,一个或多个突变位于或包含编码领部结构多肽的一个或多个基因。在一些实施方案中,一个或多个突变位于或包含编码尾部蛋白的一个或多个基因。在一些实施方案中,一个或多个突变位于或包含编码被毛结构多肽的一个或多个基因。在一些实施方案中,突变位于或包含编码一种或多种板蛋白的一种或多种基因。在一些实施方案中,突变位于或包含编码装配噬菌体所需的一种或多种蛋白质的一种或多种基因。在一些实施方案中,突变位于或包含编码一种或多种门户蛋白的一种或多种基因。在一些实施方案中,突变位于或包含编码参与重组的一种或多种多肽的一种或多种基因。在一些实施方案中,突变位于或包含编码一种或多种整合酶的一种或多种基因。在一些实施方案中,突变位于或包含编码一种或多种转化酶的一种或多种基因。在一些实施方案中,突变位于或包含编码一种或多种转座酶的一种或多种基因。在一些实施方案中,突变位于或包含编码参与复制或翻译的一种或多种多肽的一种或多种基因。在一些实施方案中,突变位于或包含编码一种或多种引物酶的一种或多种基因。在一些实施方案中,突变位于或包含编码一种或多种tRNA相关蛋白的一种或多种基因。在一些实施方案中,突变位于或包含编码参与噬菌体插入的一种或多种多肽的一种或多种基因。在一些实施方案中,突

变位于或包含编码附着位点的一个或多个基因。在一些实施方案中,突变位于或包含编码参与包装的一种或多种多肽的一种或多种基因。在一些实施方案中,突变位于或包含编码一种或多种终止酶的一种或多种基因。在一些实施方案中,突变位于或包含编码一种或多种尾蛋白的一种或多种基因。在一些实施方案中,突变位于与裂解性生长、水平基因转移、细胞裂解、噬菌体结构、噬菌体装配、噬菌体包装、重组、复制、翻译、噬菌体插入或其组合相关的一个或多个基因内。在一些实施方案中,突变位于或包含编码一种或多种宿主基因的一种或多种基因。在一些实施方案中,突变发生在编码以下的基因中:脂质A生物合成(KDO) 2-(月桂酰基)-脂质IVA酰基转移酶、肽酶、锌ABC转运蛋白底物结合蛋白、锌ABC转运蛋白ATP酶、高亲和力锌转运蛋白膜组分、ATP依赖性DNA解旋酶RuvB、ATP依赖性DNA解旋酶RuvA、霍利迪连接游离酶(Holliday junction resolvase)、二氢新蝶呤三磷酸焦磷酸酶、天冬氨酰基-tRNA合成酶、水解酶、DNA聚合酶V、MsgA、噬菌体尾蛋白、尾蛋白、宿主特异性蛋白、肽酶P60、尾蛋白、尾纤维蛋白、微小尾蛋白U、DNA破裂-再连接蛋白、肽酶S14、衣壳蛋白、DNA包装蛋白、终止酶、溶菌酶、穿孔素、DNA腺嘌呤甲基化酶、丝氨酸蛋白酶、抗终止蛋白、抗阻遏物、交叉连接内切脱氧核糖核酸酶、腺嘌呤甲基转移酶、DNA甲基转移酶ECOLIN_10240、GntR家族转录调节因子ECOLIN_10245、cI阻遏物、未知功能结构域(DUF4222);DNA重组酶、多重抗生素抗性调节因子(MarR)、P22中未知的ead样蛋白、未知功能蛋白(DUF550);3'-5'核酸外切酶、切除酶、整合酶、tRNA甲基转移酶及其组合。

[0119] 在一些实施方案中,突变位于或包含编码参与细胞裂解、噬菌体结构、噬菌体装配、噬菌体包装重组、复制或翻译、噬菌体插入、宿主蛋白及其组合中一种或多种的一种或多种多肽的基因。

[0120] 在一些实施方案中,本文所述的遗传工程化细菌是工程化大肠埃希氏菌尼斯勒菌株1917。PCT/US2018/038840(其以引用的方式整体并入本文)中描述的生物信息学评估揭示了大肠埃希氏菌尼斯勒基因组中的三个高可信度、预测的原噬菌体序列,在本文中称为噬菌体1、噬菌体2和噬菌体3。大肠埃希氏菌尼斯勒中最长的预测噬菌体(噬菌体3)含有总共68种蛋白质,并且包括噬菌体尾、头、门户、终止酶、溶素、衣壳和整合酶,所有这些看起来都是完整的。噬菌体2总共包含69种蛋白质,并且包括噬菌体转座酶、裂解酶、终止酶、头蛋白、门户蛋白、衣壳蛋白和尾蛋白。对噬菌体2的进一步检查揭示了int/xis基因对已被可移动遗传元件破坏,并且cI阻遏物已被碎片化成单独的DNA结合和感测肽,预期这防止了该噬菌体的诱导。在大肠埃希氏菌尼斯勒中预测的最短的完整噬菌体噬菌体1含有总共32个蛋白质,并且包括裂解和转座酶功能。然而,在称为噬菌体1的假定原噬菌体元件中缺乏许多结构基因,这就对其释放活噬菌体颗粒的潜力提出了质疑。在一些实施方案中,遗传工程化细菌包含一种或多种大肠埃希氏菌尼斯勒噬菌体,例如噬菌体1、噬菌体2和噬菌体3。在一些实施方案中,遗传工程化细菌包含大肠埃希氏菌尼斯勒噬菌体的噬菌体3。PCT/US18/38840提供了示例性噬菌体的基因,所述专利的内容以引用的方式并入本文。

[0121] 药物组合物

[0122] 本文公开的包含遗传工程化微生物(例如包含突变型PAL的遗传工程化细菌)的药物组合物可用于治疗、管理、改善和/或预防与高苯丙氨酸血症相关的疾病,例如PKU。提供了本发明的药物组合物,其包含单独的或与预防剂、治疗剂和/或药学上可接受的载体组合的一种或多种遗传工程化微生物。在某些实施方案中,药物组合物包含一种微生物物种、菌

株或亚型,其被工程化以包含本文所述的遗传修饰。在替代性实施方案中,药物组合物包含两种或更多种微生物物种、菌株和/或亚型,它们各自被工程化以包含本文所述的遗传修饰。

[0123] 本文所述的药物组合物可以使用一种或多种生理学上可接受的载体以常规方式配制,所述生理学上可接受的载体包括赋形剂和助剂,它们有助于将活性成分加工成用于药物用途的组合物。配制药物组合物的方法是本领域已知的(参见例如,"Remington's Pharmaceutical Sciences,"Mack Publishing Co.,Easton,PA)。在一些实施方案中,对药物组合物进行压片、冻干、直接压缩、常规混合、溶解、造粒、磨细、乳化、包封、包埋或喷雾干燥,以形成片剂、颗粒剂、纳米颗粒、纳米胶囊、微胶囊、微型片剂、丹剂或粉剂,它们可以是肠溶包衣的或未包衣的。合适的制剂取决于施用途径。

[0124] 本文所述的基因工程化微生物可以被配制为呈任何合适剂型(例如,用于口服施用的液体、胶囊、小药囊、硬胶囊、软胶囊、片剂、肠溶衣片剂、悬浮粉剂、颗粒剂或基质缓释制剂)和用于任何合适施用类型(例如,口服、局部、注射、立即释放、脉冲释放、延迟释放或持续释放)的药物组合物。在一些实施方案中,遗传工程化微生物是细菌。遗传工程化细菌的合适剂量范围可为约 10^5 至 10^{12} 个细菌,例如大约 10^5 个细菌、大约 10^6 个细菌、大约 10^7 个细菌、大约 10^8 个细菌、大约 10^9 个细菌、大约 10^{10} 个细菌、大约 10^{11} 个细菌或大约 10^{11} 个细菌。所述组合物可以每天、每周或每月施用一次或多次。可以在膳食之前、期间或之后施用组合物。在一个实施方案中,在受试者进食膳食之前施用药物组合物。在一个实施方案中,药物组合物通常与膳食一起施用。在一个实施方案中,在受试者进食膳食之后施用药物组合物。

[0125] 遗传工程化微生物可以被配制成药物组合物,所述药物组合物包含一种或多种药学上可接受的载体、增稠剂、稀释剂、缓冲液、缓冲剂、表面活性剂、中性或阳离子脂质、脂质复合物、脂质体、渗透促进剂、载体化合物和其他药学上可接受的载体或药剂。例如,药物组合物可以包括但不限于添加碳酸氢钙、碳酸氢钠、磷酸钙、各种糖和各种类型的淀粉、纤维素衍生物、明胶、植物油、聚乙二醇和表面活性剂(包括例如聚山梨醇酯20)。在一些实施方案中,本发明的基因工程化微生物可以配制在碳酸氢钠溶液(例如1摩尔碳酸氢钠溶液)中(例如,以缓冲酸性细胞环境,诸如胃)。可以将基因工程化微生物以中性或盐的形式施用和配制。药学上可接受的盐包括与阴离子形成的盐,例如衍生自盐酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等的盐,以及与阳离子形成的盐,例如衍生自钠、钾、铵、钙、氢氧化铁、异丙胺、三乙胺、2-乙氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等的盐。

[0126] 可以将本文公开的基因工程化微生物局部施用并且配制成软膏、乳膏、透皮贴剂、洗剂、凝胶、香波、喷雾剂、气雾剂、溶液、乳剂或本领域技术人员熟知的其他形式。参见例如"Remington's Pharmaceutical Sciences,"Mack Publishing Co.,Easton,PA。在一个实施方案中,对于不可喷雾的局部剂型,使用包含载体或一种或多种与局部应用相容的赋形剂并且具有大于水的动态粘度的粘性至半固体或固体形式。合适的制剂包括但不限于溶液、悬浮液、乳液、乳膏、软膏、粉剂、搽剂、油膏等,它们可以被灭菌或与辅助剂(例如防腐剂、稳定剂、湿润剂、缓冲剂或盐)混合用于影响各种性质(例如渗透压)。其他合适的局部剂型包括可喷雾的气溶胶制剂,其中与固体或液体惰性载体组合的活性成分被包装在与加压挥发物(例如,气体推进剂,诸如氟利昂)的混合物中或在挤压瓶中。也可以将保湿剂或湿润剂添加到药物组合物和剂型中。此类附加成分的实例是本领域熟知的。在一个实施方案中,

包含本发明重组微生物的药物组合物可以被配制成卫生产品。例如,卫生产品可以是抗微生物制剂或发酵产品(诸如发酵液)。卫生产品可以是例如洗发水、护发素、面霜、软膏、洗液和润唇膏。

[0127] 可以将本文公开的遗传工程化微生物口服施用并且配制成片剂、丸剂、糖衣丸、胶囊、液体、凝胶、糖浆、浆液、悬浮液等。可以使用固体赋形剂制备用于口服使用的药物组合物,任选地研磨所得混合物并加工颗粒混合物,之后如果需要添加合适的助剂以获得片剂或糖衣丸芯。合适的赋形剂包括但不限于填充剂,诸如糖,包括乳糖、蔗糖、甘露醇或山梨醇;纤维素组合物,诸如玉米淀粉、小麦淀粉、大米淀粉、马铃薯淀粉、明胶、黄蓍胶、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠;和/或生理上可接受的聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮(PVP)或聚乙二醇(PEG)。也可以添加崩解剂,诸如交联聚乙烯吡咯烷酮、琼脂、海藻酸或其盐诸如海藻酸钠。

[0128] 片剂或胶囊可以通过常规手段与以下物质一起制备:药学上可接受的赋形剂,诸如粘合剂(例如,预凝胶化玉米淀粉、聚乙烯吡咯烷酮、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素、聚乙二醇、蔗糖、葡萄糖、山梨醇、淀粉、树胶、高岭土和黄蓍胶);填充剂(例如,乳糖、微晶纤维素或磷酸氢钙);润滑剂(例如,钙、铝、锌、硬脂酸、聚乙二醇、十二烷基硫酸钠、淀粉、苯甲酸钠、L-亮氨酸、硬脂酸镁、滑石或二氧化硅);崩解剂(例如,淀粉、马铃薯淀粉、淀粉羟乙酸钠、糖、纤维素衍生物、二氧化硅粉末);或湿润剂(例如,十二烷基硫酸钠)。可以通过本领域熟知的方法对片剂进行包衣。可以存在包衣壳,并且常见的膜包括但不限于聚交酯、聚乙醇酸、聚酸酐、其他可生物降解的聚合物、海藻酸盐-聚赖氨酸-海藻酸盐(APA)、海藻酸盐-聚甲烯-共-胍-海藻酸盐(A-PMCG-A)、羟甲基丙烯酸酯-甲基丙烯酸甲酯(HEMA-MMA)、多层HEMA-MMA-MAA、聚丙烯腈-氯乙烯(PAN-PVC)、丙烯腈/甲代烯丙基磺酸钠(AN-69)、聚乙二醇/聚五甲基环五硅氧烷/聚二甲基硅氧烷(PEG/PD5/PDMS)、聚N,N-二甲基丙烯酰胺(PDMAAm)、含硅胶囊、硫酸纤维素/海藻酸钠/聚甲烯-共-胍(CS/A/PMCG)、醋酸邻苯二甲酸纤维素、海藻酸钙、k-角叉菜胶-刺槐豆胶凝胶珠、胶凝糖-黄原胶珠、聚(丙交酯-共-乙交酯)、角叉菜胶、淀粉聚酸酐、淀粉聚甲基丙烯酸酯、聚氨基酸和肠溶包衣聚合物。

[0129] 在一些实施方案中,将遗传工程化微生物进行肠溶包衣以释放到肠道或肠道的特定区域(例如大肠)中。从胃到结肠的典型pH范围为约1-4(胃)、5.5-6(十二指肠)、7.3-8.0(回肠)和5.5-6.5(结肠)。在一些疾病中,pH范围可能会改变。在一些实施方案中,包衣在特定的pH环境中降解,以便指定释放的部位。在一些实施方案中,使用至少两层包衣。在一些实施方案中,外部包衣和内部包衣在不同的pH水平下降解。

[0130] 用于口服施用的液体制剂可以采取溶液、糖浆、悬浮液或干燥产品的形式,用于在使用前用水或其他合适的媒介物复原。此类液体制剂可通过常规方式用药学上可接受的药剂制备,所述药学上可接受的药剂诸如悬浮剂(例如,山梨醇糖浆、纤维素衍生物或氢化食用脂肪);乳化剂(例如,卵磷脂或阿拉伯胶);非水媒介物(例如,扁桃仁油、油脂、乙醇或分馏植物油);以及防腐剂(例如,对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯或山梨酸)。所述制剂还可以包含适当的缓冲盐、调味剂、着色剂和甜味剂。用于口服施用的制剂可以适当地配制用于缓慢释放、受控释放或持续释放本文所述的遗传工程化微生物。

[0131] 在某些实施方案中,遗传工程化微生物可以例如与惰性稀释剂或可同化的可食用载体一起口服施用。所述化合物也可以被包封在硬或软壳明胶胶囊中,压制成片剂,或直接

掺入受试者的饮食中。对于口服治疗性施用,可以将化合物与赋形剂混合,并以可摄取片剂、口含片、锭剂、胶囊、酏剂、悬浮液、糖浆、晶片等形式使用。为了通过除肠胃外施用以外的方式施用化合物,可能需要用防止其失活的材料对化合物进行包衣,或者将化合物与防止其失活的材料共同施用。

[0132] 在另一个实施方案中,包含本发明重组微生物的药物组合物可以是可食用产品,例如食品。在一个实施方案中,食品是奶、浓缩奶、发酵奶(酸奶、酸乳、冷冻酸奶、乳酸菌发酵饮料)、奶粉、冰淇淋、奶油干酪、干干酪、豆浆、发酵豆浆、蔬果汁、果汁、运动饮料、糕饼、糖果、婴儿食品(诸如婴儿蛋糕)、营养食品、动物饲料或膳食补充剂。在一个实施方案中,食品是发酵食品,诸如发酵乳制品。在一个实施方案中,发酵乳制品是酸奶。在另一个实施方案中,发酵乳制品是奶酪、奶、奶油、冰淇淋、奶昔或酸乳酒。在另一个实施方案中,将本发明的重组微生物组合在含有旨在用作益生菌的其他活细菌细胞的制剂中。在另一个实施方案中,食品是饮料。在一个实施方案中,饮料是基于果汁的饮料或含有植物或草药提取物的饮料。在另一个实施方案中,食品是果冻或布丁。适用于施用本发明重组微生物的其它食品是本领域熟知的。参见例如US 2015/0359894和US 2015/0238545,其各自的全部内容以引用的方式明确并入本文。在又一个实施方案中,将本发明的药物组合物注射到食品中、喷雾到或喷洒到食品上,所述食品诸如面包、酸奶或奶酪。

[0133] 在一些实施方案中,所述组合物被配制用于肠内施用、空肠内施用、十二指肠内施用、回肠内施用、胃分流施用或结肠内施用,通过肠溶包衣或未包衣的纳米颗粒、纳米胶囊、微胶囊或微型片剂施用。也可以将药物组合物配制为直肠组合物,诸如栓剂或保留灌肠剂,使用例如常规栓剂基质,诸如可可脂或其他甘油酯。组合物可以是在油性或水性媒介物中的悬浮液、溶液或乳液,并且可以含有悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。

[0134] 本文所述的遗传工程化微生物可以鼻内施用,配制成气溶胶形式、喷雾、薄雾或滴剂形式,并且使用合适的推进剂(例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其他合适的气体)从加压包装或喷雾器中以气溶胶喷雾的形式方便地递送。可以通过提供阀门输送计量的量来确定加压气溶胶剂量单位。可以将用于吸入器或吹入器的胶囊和药筒(例如,明胶的)配制成含有化合物和合适的粉末基质(诸如乳糖或淀粉)的粉末混合物。

[0135] 遗传工程化微生物可以作为迟效制剂施用和配制。此类长效制剂可以通过植入或通过注射施用,包括静脉内注射、皮下注射、局部注射、直接注射或输注。例如,可以用合适的聚合物或疏水材料(例如,作为可接受的油中的乳液)或离子交换树脂或作为微溶衍生物(例如,作为微溶盐)来配制组合物。

[0136] 在一些实施方案中,本文公开了单一剂型的药学上可接受的组合物。单一剂型可以是液体或固体形式。单一剂型可以不经修饰直接施用于患者,或者可以在施用之前稀释或重构。在某些实施方案中,可以将单一剂型以推注形式施用,例如,单次注射、单次口服剂量,包括含有多个片剂、胶囊、丸剂等的口服剂量。在替代性实施方案中,单一剂型可以在一段时间内施用,例如通过输注。

[0137] 在其他实施方案中,组合物可以在受控释放或持续释放系统中递送。在一个实施方案中,可以使用泵来实现受控释放或持续释放。在另一个实施方案中,聚合材料可以用于实现本公开的疗法的受控或持续释放(参见例如美国专利号5,989,463)。用于持续释放制剂的聚合物的实例包括但不限于聚(2-羟乙基甲基丙烯酸酯)、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(丙

烯酸)、聚(乙烯-共-醋酸乙烯酯)、聚(甲基丙烯酸)、聚乙交酯(PLG)、聚酸酐、聚(N-乙烯基吡咯烷酮)、聚(乙烯醇)、聚丙烯酰胺、聚(乙二醇)、聚丙交酯(PLA)、聚(丙交酯-共-乙交酯)(PLGA)和聚原酸酯。用于持续释放制剂的聚合物可以是惰性的、不含可浸出杂质、储存稳定、无菌和可生物降解的。在一些实施方案中,可将受控或持续释放系统置于预防或治疗靶标附近,因此仅需要全身剂量的一部分。可以使用本领域技术人员已知的任何合适的技术。

[0138] 可以调整剂量方案以提供治疗反应。剂量可能取决于几个因素,包括疾病的严重程度和响应性、施用途径、疗程(几天到几个月到几年)和疾病缓解的时间。例如,可以一次施用单次推注,可以在预定的时间段内施用几个分开的剂量,或者可以根据治疗情况所指示减少或增加剂量。剂量规格由活性化合物的独特特征和要实现的特定治疗效果决定。剂量值可以随着待缓解的病状的类型和严重程度而变化。对于任何特定受试者,可以根据个人需要和治疗临床医生的专业判断随时间调整具体的剂量方案。本文提供的化合物的毒性和治疗功效可以通过细胞培养或动物模型中的标准药理学程序来确定。例如,可以确定 LD_{50} 、 ED_{50} 、 EC_{50} 和 IC_{50} ,并且可以将毒性和治疗效果之间的剂量比(LD_{50}/ED_{50})计算为治疗指数。可以使用表现出毒副作用的组合物,并仔细修改以使潜在的损害最小化,从而减少副作用。最初可以从细胞培养测定和动物模型来估计剂量。从体外和体内测定以及动物研究中获得的数据可以用于配制用于人类的剂量范围。

[0139] 可以将药物组合物包装在密封容器中,诸如指示药剂的量的安瓿或小药囊。在一个实施方案中,一种或多种药物组合物作为密封容器中的干燥无菌冻干粉末或无水浓缩物提供,并且可以被重构(例如,用水或生理盐水)至合适的浓度,用于向受试者施用。在一个实施方案中,一种或多种预防剂或治疗剂或药物组合物作为在密封容器中的干燥无菌冻干粉末提供,储存在2℃与8℃之间并在重构后1小时内、3小时内、5小时内、6小时内、12小时内、24小时内、48小时内、72小时内或一周内施用。冻干剂型中可以包含冷冻保护剂,主要是0-10%蔗糖(最佳为0.5%-1.0%)。其他合适的冷冻保护剂包括海藻糖和乳糖。其他合适的增积剂包括甘氨酸和精氨酸(其任一者的浓度可以为0-0.05%),以及聚山梨醇酯80(最佳浓度为0.005%-0.01%)。附加表面活性剂包括但不限于聚山梨醇酯20和BRIJ表面活性剂。可以将药物组合物制备成可注射溶液,并且还可以包含可用作佐剂的药剂,诸如用于增加吸收或分散的那些药剂,例如透明质酸酶。

[0140] 治疗方法

[0141] 本公开的另一方面提供了治疗与高苯丙氨酸血症相关的疾病或与高苯丙氨酸血症相关的症状的方法。在一些实施方案中,本公开提供了一种用于治疗与高苯丙氨酸血症相关的疾病或与高苯丙氨酸血症相关的症状的方法,其包括向有需要的受试者施用包含本文公开的工程化微生物(例如细菌)的组合物。在一些实施方案中,本公开提供了一种用于治疗与高苯丙氨酸血症相关的疾病或与高苯丙氨酸血症相关的症状的方法,其包括向有需要的受试者施用包含工程化微生物的组合物,所述工程化微生物包含编码一种或多种PME(例如PAL,包括突变型PAL、PAH和/或LAAD)的基因序列。

[0142] 在一些实施方案中,治疗方法包括施用包含衍生自野生型发光光杆菌PAL,例如SEQ ID NO:1的突变型PAL的微生物(例如细菌)。在一些实施方案中,治疗方法包括施用微生物(例如细菌),其包含与野生型PAL(例如发光光杆菌PAL,例如SEQ ID NO:1)中的位置相比具有在选自92、133、167、432、470、433、263、366和396的一个或多个氨基酸位置中的突变

的突变型PAL。在一些实施方案中,治疗方法包括施用微生物(例如细菌),其包含与野生型PAL(例如发光光杆菌PAL,例如SEQ ID NO:1)中的位置相比具有在选自S92、H133、I167、L432、V470、A433、A263、K366和/或L396的一个或多个氨基酸位置中的突变的突变型PAL。在一些实施方案中,治疗方法包括施用微生物(例如细菌),其包含与野生型PAL(例如发光光杆菌PAL,例如SEQ ID NO:1)中的位置相比具有在选自S92G、H133M、H133F、I167K、L432I、V470A、A433S、A263T、K366K(例如多核苷酸序列中的沉默突变)和/或L396L(例如多核苷酸序列中的沉默突变)的一个或多个氨基酸位置中的突变的突变型PAL。

[0143] 在一些实施方案中,治疗方法包括施用微生物(例如细菌),其包含与野生型PAL(例如发光光杆菌PAL,例如SEQ ID NO:1)中的位置相比具有在选自S92G、H133M、I167K、L432I和V470A的一个或多个氨基酸位置中的突变的突变型PAL。在一些实施方案中,治疗方法包括施用微生物(例如细菌),其包含与野生型PAL(例如发光光杆菌PAL,例如SEQ ID NO:1)中的位置相比具有在选自S92G、H133F、A433S和/或V470A的一个或多个氨基酸位置中的突变的突变型PAL。在一些实施方案中,治疗方法包括施用微生物(例如细菌),其包含与野生型PAL(例如发光光杆菌PAL,例如SEQ ID NO:1)中的位置相比具有在选自S92G、H133F、A263T、K366K(例如,多核苷酸序列中的沉默突变)、L396L(例如,多核苷酸序列中的沉默突变)和V470A的一个或多个氨基酸位置中的突变的突变型PAL。

[0144] 在一些实施方案中,治疗方法包括施用包含mPAL1的微生物,例如细菌。在一些实施方案中,治疗方法包括施用包含mPAL2的微生物,例如细菌。在一些实施方案中,治疗方法包括施用包含mPAL3的微生物,例如细菌。

[0145] 在一些实施方案中,治疗方法包括施用微生物(例如细菌),其包含与野生型PAL(例如发光光杆菌PAL)相比表现出稳定性增加的突变型PAL。在一些实施方案中,治疗方法包括施用微生物(例如细菌),其包含与野生型PAL(例如发光光杆菌PAL)相比表现出代谢苯丙氨酸和/或减轻高苯丙氨酸血症的活性或能力增加的突变型PAL。在一些实施方案中,治疗方法包括施用微生物(例如细菌),其包含与野生型PAL(例如发光光杆菌PAL)相比表现出至少两倍活性增加的突变型PAL。在一些实施方案中,治疗方法包括施用微生物(例如细菌),其包含与野生型PAL(例如发光光杆菌PAL)相比表现出至少三倍活性增加的突变型PAL。在一些实施方案中,治疗方法包括施用微生物(例如细菌)其包含与野生型PAL(例如发光光杆菌PAL)相比表现出至少四倍活性增加的突变型PAL。在一些实施方案中,治疗方法包括施用微生物(例如细菌)其包含与野生型PAL(例如发光光杆菌PAL)相比表现出至少五倍活性增加的突变型PAL。

[0146] 在一些实施方案中,治疗方法包括施用微生物(例如细菌),其还包含额外PME,例如PAH、LAAD和/或苯丙氨酸转运蛋白。示例性PME及其组合是本领域已知的,参见例如PCT/US2016/032562和PCT/US2016/062369,其内容以引用的方式并入本文。在一些实施方案中,治疗方法包括施用包含突变型PAL和野生型PAL的微生物,例如细菌。

[0147] 在一些实施方案中,治疗方法包括施用微生物(例如细菌),其还包含转录调节因子,例如本文所述的非天然转录调节因子。在这些实施方案中,PME(例如突变型PAL、苯丙氨酸转运蛋白和/或转录调节因子)可以可操作地连接至一个或多个如本文所公开的启动子,例如组成型启动子、诱导型启动子、温度调节型启动子、氧水平依赖型启动子等。

[0148] 在一些实施方案中,遗传工程化微生物(例如细菌)也可以包含一个或多个如本文

所述的与生物安全和/或生物防护相关的基因序列,例如删除开关、基因保护系统、细胞生长和/或存活必需基因、thyA、dapA、营养缺陷型基因等。

[0149] 在一些实施方案中,疾病选自由以下组成的组:苯丙酮尿症、经典或典型苯丙酮尿症、非典型苯丙酮尿症、永久性轻度高苯丙氨酸血症、非苯丙酮尿症高苯丙氨酸血症、苯丙氨酸羟化酶缺乏症、辅因子缺乏症、二氢蝶啶还原酶缺乏症、四氢蝶呤合酶缺乏症和塞加瓦氏病。在一些实施方案中,高苯丙氨酸血症继发于其他病状,例如肝病。在一些实施方案中,本发明提供了用于减轻、改善或消除与这些疾病相关的一种或多种症状的方法,所述症状包括但不限于神经缺损、精神发育迟滞、脑病、癫痫、湿疹、生长迟缓、小头畸形、震颤、肢体痉挛和/或色素减退。在一些实施方案中,待治疗的受试者是人类患者。

[0150] 在某些实施方案中,遗传工程化微生物能够代谢饮食中的苯丙氨酸,以便治疗与高苯丙氨酸血症相关的疾病或病症,例如PKU。在一些实施方案中,遗传工程化微生物与膳食蛋白质同时递送。在其他实施方案中,遗传工程化细菌不与膳食蛋白质同时递送。研究表明,进入肠道的胰腺和其他腺体分泌物含有高水平的蛋白质、酶和多肽,并且其分解代谢产生的氨基酸在被称为“肠再循环”的过程中被重吸收回血液中(Chang, 2007; Sarkissian等人, 1999年)。因此,高水平的肠道苯丙氨酸可部分独立于食物摄入,并可用于被PAL分解。在一些实施方案中,遗传工程化微生物和膳食蛋白质在禁食或苯丙氨酸限制饮食一段时间后递送。在这些实施方案中,患有高苯丙氨酸血症的患者能够恢复基本正常的饮食,或者比不含苯丙氨酸的饮食限制更少的饮食。在一些实施方案中,遗传工程化微生物能够代谢来自额外来源(例如血液)的苯丙氨酸,以便治疗与高苯丙氨酸血症相关的疾病,例如PKU。在这些实施方案中,遗传工程化微生物不需要与膳食蛋白质同时递送,并且产生苯丙氨酸梯度,例如从血液到肠道,并且遗传工程化微生物代谢苯丙氨酸并减轻高苯丙氨酸血症。

[0151] 所述方法可以包括制备含有至少一种本文所述的基因工程化微生物(例如细菌)物种、菌株或亚型的药物组合物,并且将所述药物组合物以治疗有效量施用于受试者。在一些实施方案中,本发明的遗传工程化微生物是口服施用的,例如在液体悬浮液中。在一些实施方案中,本发明的遗传工程化微生物在凝胶帽中冻干并口服施用。在一些实施方案中,本发明的遗传工程化微生物通过饲管或胃分流管施用。在一些实施方案中,本发明的遗传工程化微生物经直肠施用,例如通过灌肠。在一些实施方案中,本发明的遗传工程化微生物被局部、肠内、空肠内、十二指肠内、回肠内和/或结肠内施用。

[0152] 在某些实施方案中,施用本文所述的药物组合物是为了降低受试者的苯丙氨酸水平。在一些实施方案中,与未治疗的或对照受试者中的水平相比,本公开的方法将受试者的苯丙氨酸水平降低至少约10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多。在一些实施方案中,通过比较施用药物组合物之前和之后受试者的苯丙氨酸水平来测量减少。在一些实施方案中,治疗或改善高苯丙氨酸血症的方法允许病状或病症的一种或多种症状改善至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多。

[0153] 在施用药物组合物之前、期间和之后,可以在生物样品中测量受试者的苯丙氨酸水平,所述生物样品诸如血液、血清、血浆、尿、腹膜液、脑脊液、粪便、肠粘膜碎屑、从组织收集的样品和/或从以下中的一种或多种的内容物收集的样品:胃、十二指肠、空肠、回肠、盲肠、结肠、直肠和肛管。在一些实施方案中,所述方法可以包括施用本发明的组合物以降低

苯丙氨酸。在一些实施方案中,所述方法可以包括施用本发明的组合物,以将受试者中的苯丙氨酸降低至检测不到的水平。在一些实施方案中,所述方法可包括施用本发明的组合物以将苯丙氨酸浓度降低至检测不到的水平,或降低至小于治疗前受试者苯丙氨酸水平的约1%、2%、5%、10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%或80%。

[0154] 可以在生物样品中测量受试者的马尿酸盐水平,所述生物样品例如血液、血清、血浆、尿、腹膜液、脑脊液、粪便、肠粘膜碎屑、从组织收集的样品和/或从以下中的一种或多种的内容物收集的样品:胃、十二指肠、空肠、回肠、盲肠、结肠、直肠和肛管。在一些实施方案中,本文所述的方法可以包括施用本发明的组合物以降低苯丙氨酸,导致马尿酸产生水平增加。在一些实施方案中,所述方法可以包括施用本发明的组合物,以将受试者的苯丙氨酸水平降低至检测不到的水平,同时并成比例地增加例如尿中的马尿酸水平。在一些实施方案中,所述方法可包括施用本发明的组合物,导致马尿酸盐浓度增加至超过治疗前受试者尿液马尿酸盐水平的约1%、2%、5%、10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、95%或高达99%或高达100%。

[0155] 在一些实施方案中,可以通过测量产生的马尿酸的量及其积累速率来检测在哺乳动物受试者(例如动物模型或人)的尿液中表达PAL(例如突变型PAL)的遗传工程化微生物的活性(例如苯丙氨酸降解活性)。马尿酸盐是PAL特异性分解产物,通常以低浓度存在于人的尿液中。它是苯丙氨酸通过PAL途径代谢的终产物。苯丙氨酸解氨酶介导苯丙氨酸转化为肉桂酸。当肉桂酸在肠道中产生时,在肝脏中被吸收并迅速转化为马尿酸,并在肝脏中排泄(Hoskins JA和Gray Phenylalanine ammonia lyase in the management of phenylketonuria:the relationship between ingested cinnamate and urinary hippurate in humans.J Res Commun Chem Pathol Pharmacol.1982Feb;35(2):275-82)。苯丙氨酸以1:1比率转化为马尿酸盐,即1摩尔Phe转化为1摩尔马尿酸盐。因此,尿中马尿酸水平的变化可以用作利用这种机制的治疗效果的非侵入性量度。

[0156] 因此,马尿酸具有作为生物标志物的潜力,从而允许监测接受基于PAL的方案的患者饮食依从性和治疗效果。马尿酸可以在患者管理中用作测量血液Phe水平的辅助手段,并且因为它是尿生物标志物,所以它可以特别是在儿童中具有调整蛋白质摄入的优势,这可能是具有挑战性的,因为需要基于生长而变化。

[0157] 在本章节中,术语“基于PAL的药物”是指具有PAL活性的任何药物、多肽、生物制剂或治疗方案,例如PEG-PAL、Kuvan、包含本公开的微生物(例如编码PAL和任选的PheP转运蛋白的微生物)的组合物。在一些实施方案中,本公开提供了一种体内测量PAL活性的方法,所述方法通过向受试者(例如哺乳动物受试者)施用基于PAL的药物并测量受试者体内产生的作为PAL活性量度的马尿酸的量来进行。在一些实施方案中,本公开提供了一种用于监测基于PAL的药物的治疗活性的方法,所述方法通过向受试者(例如哺乳动物受试者)施用基于PAL的药物并测量受试者中产生的作为PAL治疗活性量度的马尿酸盐的量来进行。在一些实施方案中,本公开提供了一种用于调节基于PAL的药物的剂量的方法,所述方法通过向受试者(例如哺乳动物受试者)施用基于PAL的药物,测量受试者体内产生的马尿酸盐的量以确定PAL活性,并调节(例如,增加或减少)药物剂量以增加或减少受试者体内的PAL活性来进行。在一些实施方案中,本公开提供了一种用于调节患有高苯丙氨酸血症的受试者的蛋白质摄入和/或饮食的方法,其包括向受试者施用基于PAL的药物,测量受试者体内产生的马

尿酸的量,以及调节(例如,增加或减少)受试者的蛋白质摄入或以其他方式调节受试者的饮食以增加或减少受试者的PAL活性。在一些实施方案中,本公开提供了一种用于确认患有高苯丙氨酸血症的受试者对蛋白质摄入和/或饮食方案的依从性的方法,其包括向受试者施用基于PAL的药物,测量受试者体内产生的马尿酸的量,以及测量受试者体内的PAL活性。

[0158] 在本文公开的方法的一些实施方案中,监测受试者的血苯丙氨酸水平和尿马尿酸水平。在一些实施方案中,在多个时间点测量血液苯丙氨酸和尿液中的马尿酸,以确定苯丙氨酸分解的速率。在一些实施方案中,尿液中的马尿酸水平用于评估动物模型中的PAL活性或菌株活性。

[0159] 在一些实施方案中,尿液中的马尿酸测量值,单独或与血液苯丙氨酸测量值组合,用于证明菌株的作用机制。在一些实施方案中,尿中的马尿酸测量值,单独或与血液苯丙氨酸测量值组合,用作区分菌株中PAL和LAAD活性的工具,并允许确定每种酶对总体菌株活性的贡献。

[0160] 在一些实施方案中,尿液中的马尿酸测量值,单独或与血液苯丙氨酸测量值组合,用于评估动物模型和人类受试者的安全性。在一些实施方案中,尿液中的马尿酸测量值,单独或与血液苯丙氨酸测量值组合,用于评估剂量反应和所需药理作用和安全性的最佳方案。在一些实施方案中,尿液中的马尿酸测量值,单独或与血液苯丙氨酸测量值组合,用作功效和/或毒性的替代终点。在一些实施方案中,尿液中的马尿酸测量值,单独或与血液苯丙氨酸测量值组合,用于预测患者对包含治疗菌株的方案的反应。在一些实施方案中,尿液中的马尿酸测量值,单独或与血液苯丙氨酸测量值组合,用于鉴定更可能对药物治疗有反应的某些患者群体。在一些实施方案中,尿液中的马尿酸测量值,单独或与血液苯丙氨酸测量值组合,用于避免特定的不良事件。在一些实施方案中,尿液中的马尿酸测量值,单独或与血液苯丙氨酸测量值组合,可用于患者选择。

[0161] 在一些实施方案中,尿液中的马尿酸测量值,单独或与血液苯丙氨酸测量值组合,用作一种用于在包括施用表达PAL的治疗性PKU菌株的方案中调节PKU患者的蛋白质摄入/饮食的方法。

[0162] 在一些实施方案中,尿马尿酸水平的测量值,单独或与血液苯丙氨酸测量值组合,用于测量和/或监测重组PAL的活性。在一些实施方案中,尿中马尿酸水平的测量值用于测量和/或监测重组聚乙二醇化PAL (Peg-PAL) 的活性。在一些实施方案中,马尿酸的尿水平的测量值,单独或与血液苯丙氨酸测量值组合,用于测量和/或监测与本文所述的治疗菌株组合施用的重组PAL的活性。

[0163] 在一些实施方案中,尿液中的马尿酸测量值,单独或与血液苯丙氨酸测量值组合,与其他生物标记物(例如,临床安全性生物标记物)组合使用。此类安全性标记物的非限制性实例包括身体检查、生命体征和心电图(ECG)。其他非限制性实例包括本领域已知的肝脏安全性测试,例如血清天冬氨酸转氨酶(AST)、丙氨酸转氨酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP)、 γ -谷氨酰转移酶(GGT)和胆红素。此类生物安全性标记物还包括肾安全性测试,例如本领域已知的那些,例如血尿素氮(BUN)、血清肌酐、肾小球滤过率(GFR)、肌酐清除率、血清电解质(钠、钾、氯化物和碳酸氢盐)和完全尿液分析(颜色、pH、比重、葡萄糖、蛋白质、酮体和血液、白细胞、管型的显微镜检查),以及胱抑素-c、 β 2-微球蛋白、尿酸、聚集蛋白、N-乙酰基- β -d-氨基葡萄糖苷酶、嗜中性粒细胞明胶酶相关性脂质运载蛋白(NGAL)、N-乙酰基- β -d-氨基葡

糖苷酶 (NAG) 和肾损伤分子-1 (KIM-1)。其他非限制性实例包括本领域已知的血液学安全生物标志物,例如全血细胞计数、总血红蛋白、血细胞比容、红细胞计数、平均红细胞体积、平均细胞血红蛋白、红细胞分布宽度%、平均细胞血红蛋白浓度、总白细胞计数、白细胞分类计数(嗜中性粒细胞、淋巴细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞和单核细胞)和血小板。其他非限制性实例包括本领域已知的骨安全性标记物,例如血清钙和无机磷酸盐。其他非限制性实例包括本领域已知的基本代谢安全生物标志物,例如血糖、甘油三酯(TG)、总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇(LDLc)和高密度脂蛋白胆固醇(HDL-c)。本领域已知的其他特异性安全性生物标记包括例如血清免疫球蛋白水平、C-反应蛋白(CRP)、纤维蛋白原、甲状腺刺激激素(TSH)、甲状腺素、睾酮、胰岛素、乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)及其同工酶、心肌钙蛋白(cTn)和高铁血红蛋白。

[0164] 本发明的方法可包括将药物组合物单独施用或与一种或多种额外治疗剂组合施用。在一些实施方案中,药物组合物与辅因子四氢生物蝶呤(例如,Kuvan/沙丙蝶呤)、大的中性氨基酸(例如,酪氨酸、色氨酸)、糖巨肽、益生菌(例如,VSL3)、酶(例如,聚乙二醇化-PAL)和/或用于治疗苯丙酮尿症的其它药剂联合施用(Al Hafid和Christodoulou,2015)。

[0165] 在一些实施方案中,遗传工程化微生物与一种或多种重组产生的PME酶,例如重组PAL、LAAD或PAH组合施用。在一些实施方案中,重组PAL是突变型PAL。在一些实施方案中,重组酶被进一步配制以改善稳定性和/或递送。在一些实施方案中,与遗传工程化细菌组合施用的一种或多种PME酶被聚乙二醇化。在一些实施方案中,与遗传工程化细菌组合施用的一种或多种PME酶以融合蛋白的形式递送。这种融合蛋白的非限制性实例是PME和用于摄取到细胞的转导结构域之间的融合。这种转导结构域或细胞穿透肽的非限制性实例是TAT肽。在一些实施方案中,与遗传工程化细菌组合施用的一种或多种PME酶被配制在纳米颗粒中。这种纳米颗粒的非限制性实例是硫酸葡聚糖/壳聚糖PME纳米颗粒。在一些实施方案中,与遗传工程化细菌组合施用的一种或多种PME酶以PME微球的形式递送。这种微球的非限制性实例是海藻酸钡PME微球。在一些实施方案中,与遗传工程化微生物组合施用的一种或多种PME酶以无定形二氧化硅PME颗粒的形式递送。

[0166] 实施例

[0167] 实施例1.PAL质粒的构建和转化细菌

[0168] 为了促进大肠埃希氏菌尼斯勒中PAL的诱导型生产,合成了变异鱼腥藻或发光光杆菌的PAL基因以及转录和翻译元件(Gen9,Cambridge,MA)并将其克隆到载体pBR322中。将PAL基因置于诱导型启动子的控制之下。在诱导型FNR启动子或Tet启动子的控制下,为PAL1和PAL3分别产生低拷贝和高拷贝质粒。本文提供了示例性启动子。

[0169] 根据以下步骤,将本文所述的每个质粒转化到大肠埃希氏菌尼斯勒中,用于本文所述的研究。将所有管、溶液和比色皿都预冷至4℃。将大肠埃希氏菌尼斯勒的过夜培养物在5mL含氨苄青霉素的溶源性肉汤(LB)中以1:100稀释并使其生长,直至其达到0.4-0.6的OD₆₀₀。然后将大肠埃希氏菌细胞在4℃下以2,000rpm离心5分钟,去除上清液,并将细胞重悬于1mL 4℃水中。再次将大肠埃希氏菌在4℃下以2,000rpm离心5分钟,去除上清液,并将细胞重悬于0.5mL 4℃水中。再次将大肠埃希氏菌在4℃下以2,000rpm离心5分钟,去除上清液,并最终将细胞重悬于0.1mL 4℃水中。将电穿孔仪设定为2.5kV。将质粒(0.5μg)添加到细胞中,通过移液混合,并移液至无菌冷冻比色皿中。将干燥的比色皿放入样品室中,并施

加电脉冲。立即添加1mL室温SOC培养基,并将混合物转移到培养管中,并在37℃下孵育1小时。将细胞铺展在含有氨苄青霉素的LB平板上,并孵育过夜。

[0170] 为了促进突变体的诱导型生产,将mPAL1、mPAL2和mPAL3克隆到受无水四环素(aTc)响应性启动子控制的低拷贝质粒(pSC101复制起点)中,并转移到尼斯勒细菌中。

[0171] 实施例2. 筛选过程,包括鉴定mPAL1、mPAL2和mPAL3

[0172] 为了在菌株中产生PAL活性,首先使含有表达野生型PAL3、mPAL1、mPAL2和mPAL3的质粒的培养物生长过夜。第二天早上,将过夜培养物用于反稀释到OD600=0.1的新鲜培养基中,并且培养物生长到早期对数期。在进入早期对数期后,以200ng/mL浓度添加aTc以诱导PAL,并且诱导进行5小时。在诱导期结束时,将培养物离心,丢弃上清液,并将沉淀重悬于15%甘油中。将细胞材料储存在-80℃下,直到测试体外PAL活性当日(TCA产生)。

[0173] 为了测试来自激活细胞的PAL活性,将冷冻细胞等分试样解冻,并以 5.0×10^9 CFU/mL重悬于碳酸氢钠缓冲液中。然后将该溶液与等份的模拟胃液(SGF)混合,并在37℃下振荡孵育2小时。2小时后,取出样品,并通过离心沉淀出细胞。回收上清液并分析反式肉桂酸酯(TCA) (参见图1和2)。

[0174] 使用Shimadzu HPLC-PDA系统进行反式肉桂酸(TCA)的定量。在测定介质中以以下浓度制备TCA标准品:0.005、0.03、0.1、0.7、3.4、6.7、16.9、33.7、50.6mM。将细菌上清液样品解冻,并以4000rpm离心5分钟。在96孔板中,转移5μL标准品和样品,然后添加195μL水。用ClearSeal盖热封所述板并混合。

[0175] 所用的注射体积为20μL,并且运行时间为10分钟,流速为0.35mL/min。流动相A是0.1%三氟乙酸的水溶液,并且流动相B是0.1%三氟乙酸的乙腈溶液。使用Thermo Scientific Hypersil Gold, 100x21mm, 1.9μ, 零件号25002-102130使用以下梯度进行色谱分离:0至2分钟5%→35%B, 2至4分钟35%B, 4.01至4.50分钟90%B, 4.51至6分钟5%B, 10分钟时停止。TCA的保留时间为6.05分钟,在315nm处吸收。(图1和图2)。

[0176] 实施例3. 突变型PAL在小鼠PKU模型中的功效

[0177] 对于体内研究,BTBR-Pah^{enu2}小鼠从Jackson Laboratory获得,并繁殖至纯合体,以用作PKU模型。培养含有本文所述的PAL突变体的细菌。将细菌重悬于磷酸盐缓冲盐水(PBS)中,并通过口服管饲法向小鼠施用。在施用前,细菌可以被ATC诱导2小时。

[0178] 在研究开始时,向小鼠给予补充有100微克/mL ATC和5%蔗糖的水。将小鼠通过去除食物来禁食过夜(10小时),并且第二天早上通过下颌放血收集血液样品,以确定基线苯丙氨酸水平。将血液样品收集在肝素化管中,并在2G下离心20分钟以产生血浆,然后将其取出并储存在-80℃下。再次向小鼠给予食物,并在1小时后用100μL (5×10^9 CFU) 细菌管饲,所述细菌先前已用ATC诱导2小时。使小鼠重新开始进食2小时。如上所述制备血浆样品。测量喂食之前和之后的苯丙氨酸水平,并与对照组进行比较。

[0179] 对于皮下苯丙氨酸激发,在研究前至少3天(即第-6天至第-3天)开始,将纯合BTBR-Pah^{enu2}小鼠(大约6-12周龄)维持不含苯丙氨酸的食物和补充有0.5克/升苯丙氨酸的水。在第1天,将小鼠随机分成治疗组,并通过下颌下皮肤穿刺收集血液样品,以确定基线苯丙氨酸水平。还对小鼠称重以确定每组的平均重量。然后根据平均组体重,通过以每克体重0.1mg皮下注射向小鼠施用单剂量的苯丙氨酸。在注射后30和90分钟,通过口服管饲法向小鼠施用200μL H₂O (n=30)、对照细菌或包含突变型PAL的细菌。在苯丙氨酸激发后2小时和4

小时收集血液样品,并使用质谱法测量血液中的苯丙氨酸水平。

[0180] PAL活性(例如突变型PAL活性)的其他测定是本领域已知的。参见例如PCT/US2016/032562和PCT/US2016/062369,其内容以引用的方式并入本文。

[0181] 实施例4.PAL变体的动力学测量

[0182] 针对野生型PAL3、mPAL1、mPAL2和mPAL3生成了米氏图,其中速率 V (μM TCA/min)是Phe浓度[Phe] (mM)的函数。从饱和的过夜预培养物中以1:100接种细菌,接着在两小时后用200ng/mL ATC诱导。诱导四小时后,使细胞沉淀,在PBS中洗涤,在PBS中归一化至 $\text{OD}_{600}=50$,并在50%甘油中稀释2倍,储存在 -80°C 下。使用具有微尖端的Branson数字超声波仪超声处理制备每个菌株的裂解物。将裂解样品的可溶级分用于动力学测定。通过Bradford测定法测量裂解物样品中的总蛋白质,并且对于动力学测定,将所有样品归一化为每孔10 μg 总蛋白质加载量。将裂解物样品在1X M9 0.5%葡萄糖中孵育,其中Phe浓度范围为40mM Phe低至39 μM ,稀释2倍。动力学测定在UV-star 96孔微孔板(Greiner)中进行,其中TCA通过使用设置为 37°C 静态孵育的BioTek Synergy H1微板读取仪每分钟进行A290测量来定量。每张图上的数据点是由每个测试的Phe浓度的第一小时的活性计算的速率(V ,以 μM TCA/min计),其中活性保持线性。(图3)。

[0183] 实施例5.突变型PAL在食蟹猴模型中的功效

[0184] 为了评价本文所述的突变型PAL的体内功效,如美国专利号10,610,546中所述,通过鼻胃管饲法施用包含mPAL2(SYN7262)的遗传工程大肠埃希氏菌尼斯勒,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。简言之,使SYNB1618和SYN7262菌株在生物反应器中生长,并分别通过添加厌氧生活/IPTG或ATC/IPTG诱导PAL表达。发酵结束时,将细胞离心沉淀并储存在 -80°C 的15%甘油中。在给药当天,向每只动物施用5.5g蛋白胨形式的蛋白质和250mg D5-Phe,然后施用 1×10^{11} 个活细胞剂量的SYNB1618或SYN7262。在六个小时时段内收集血液和尿液。使用Thermo TSQ Quantum Max三重四极杆质谱仪,通过液相色谱联用串联质谱(LC-MS/MS)分析曲线下的血浆TCA曲线下面积以及尿马尿酸盐的排泄。(图4)。

[0185] 实施例6.PKU菌株的全细胞活性

[0186] 如本文所述制备包含不同拷贝数的野生型PAL3的细菌菌株。然后裂解来自每个菌株的一部分细胞。将裂解物样品的可溶级分用于活性测定。如先前所述测量完整细菌和裂解物的PAL3活性。PAL3拷贝数(表达)的增加对TCA产生的全细胞速率几乎没有影响。相反,当相同的细胞物质被裂解时,增加的拷贝数(表达)对应于增加的活性。通过将 d_5 -Phe转化为 d_5 -TCA测量的裂解物PAL活性在存在外源性未标记TCA增加的情况下降低,这表明所述酶被其产物反馈抑制。在PAL诱导期间添加水杨酸盐(大肠埃希氏菌中外排泵的诱导剂)导致体外全细胞PAL活性速率增加(图5)。

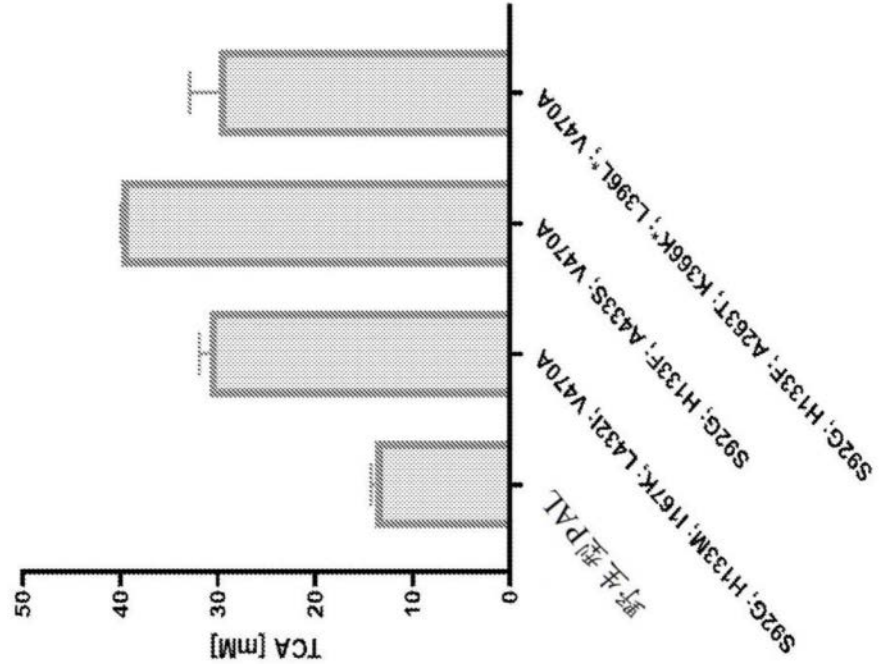


图1

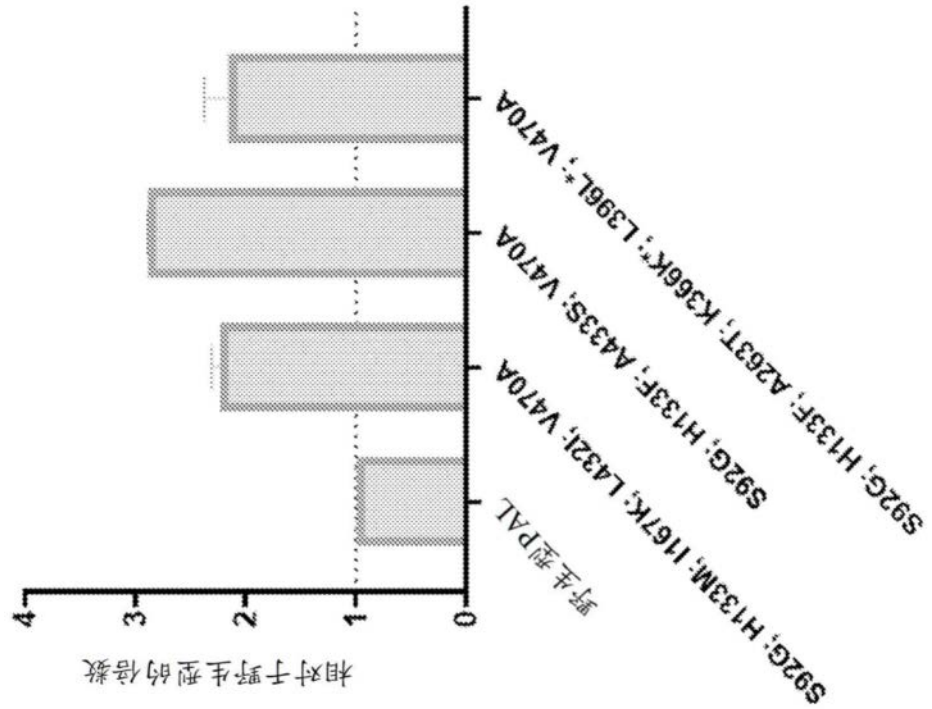


图2

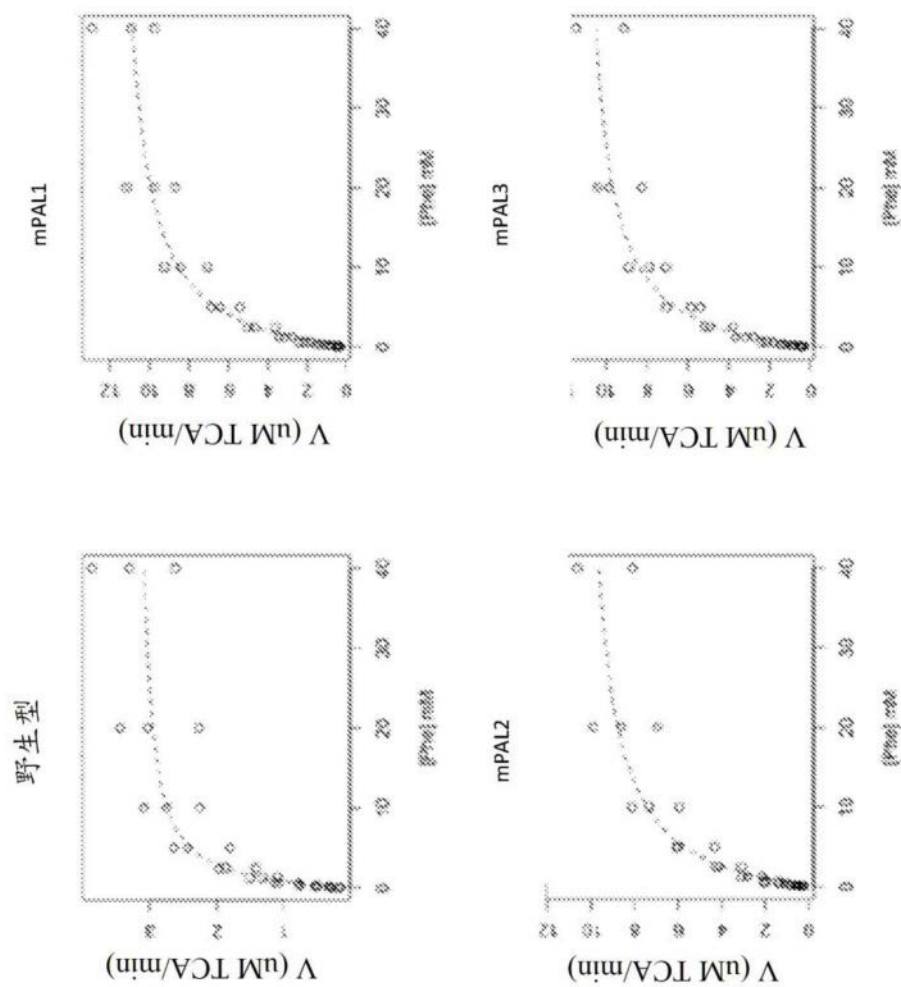


图3A

PAL变体	$V_{\max}$ ($\mu\text{mol TCA}/\text{min}$)	K_m (mM phe)	相关性
野生型	3.19	1.67	0.96
mPAL1	11.95	4.03	0.983
mPAL2	10.7	4.39	0.974
mPAL3	11.46	3.72	0.981

图3B

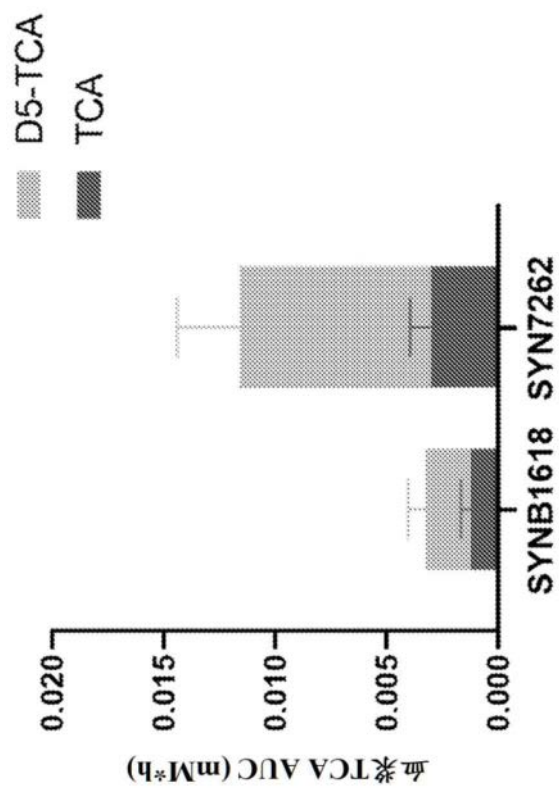


图4A

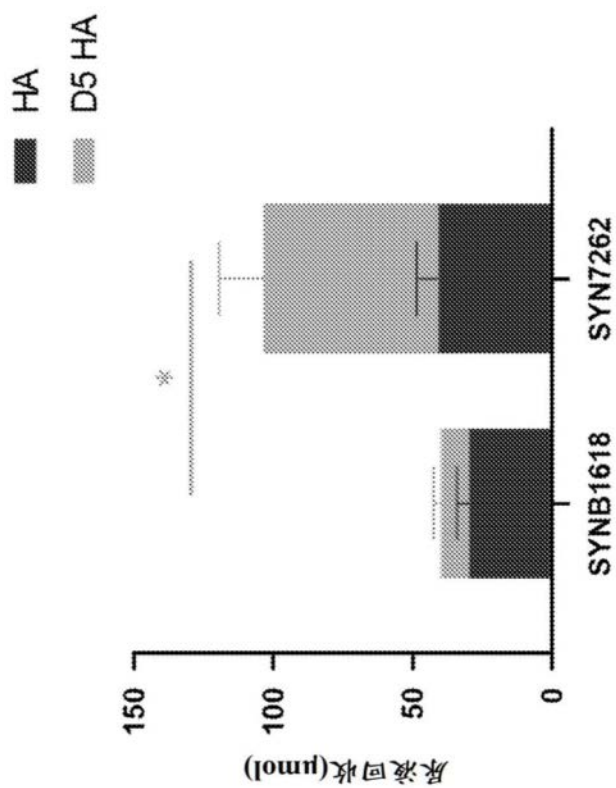


图4B

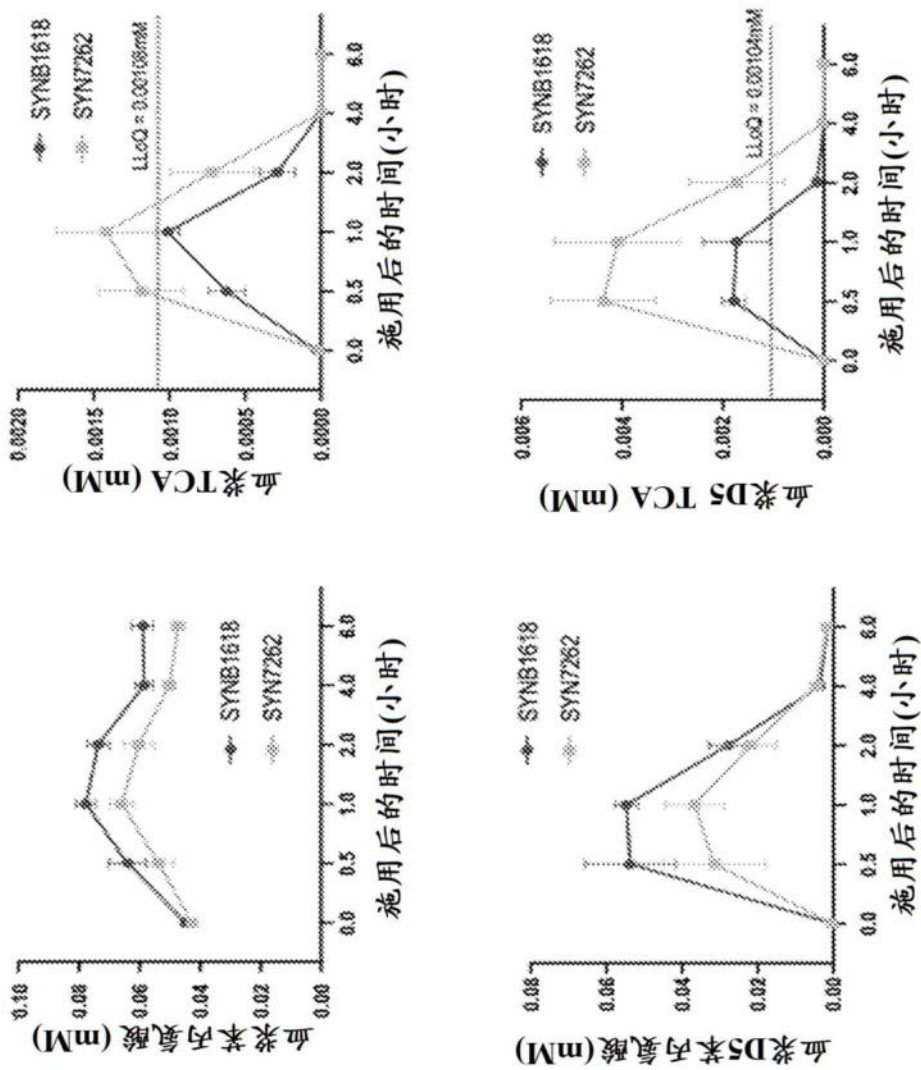


图4C

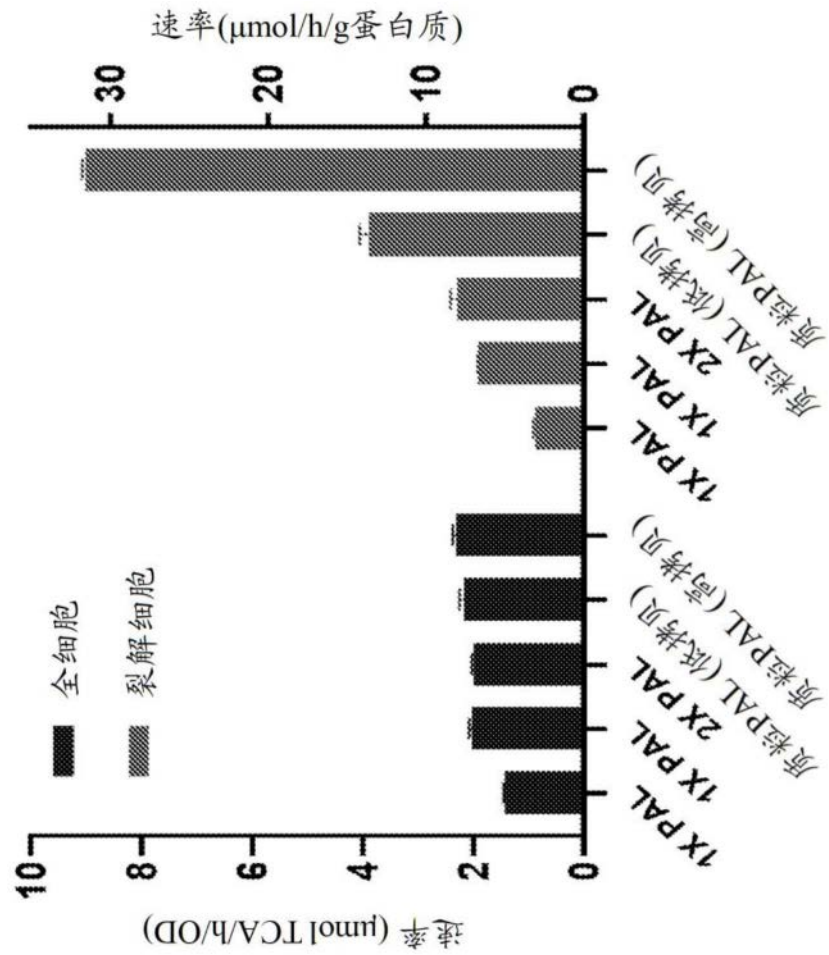


图5A

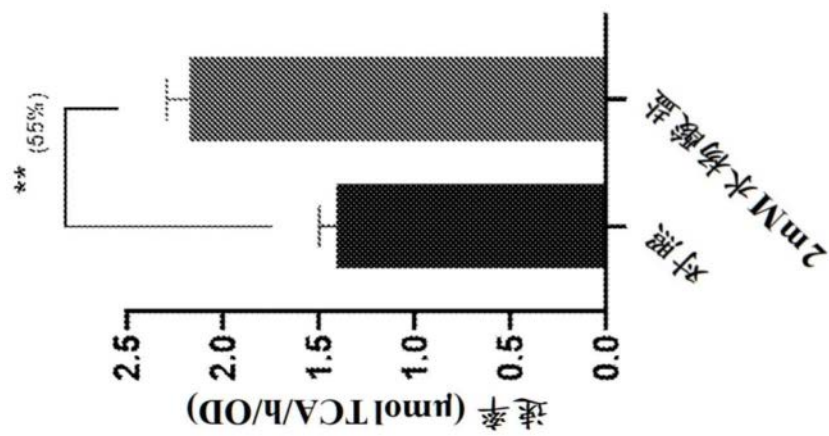


图5B

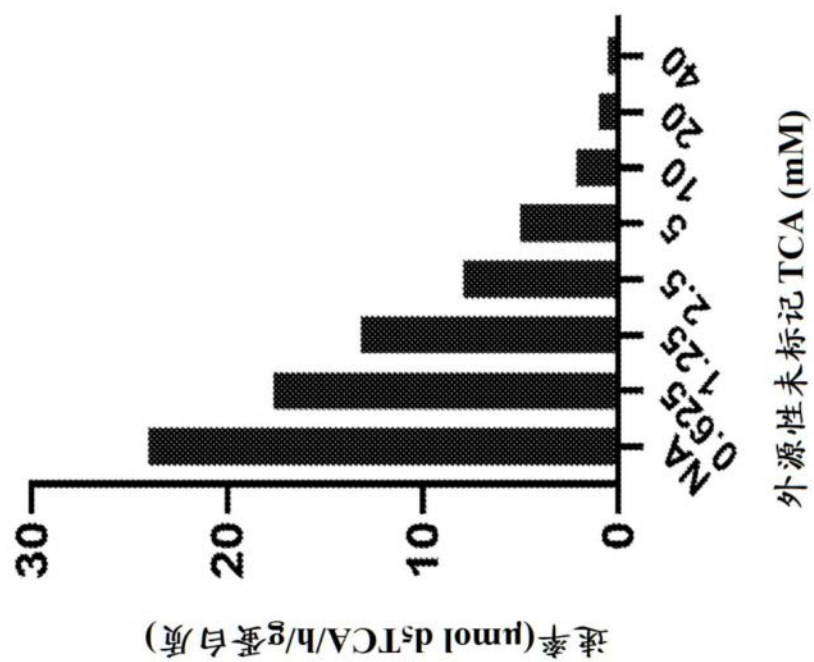


图5C