



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 118956

(13) C2(51)

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

МПК (2019.01)
C12N 9/64 (2006.01)
C12N 15/59 (2006.01)
A23C 19/06 (2006.01)
C12N 15/00
C12N 15/09 (2006.01)
A23C 9/12 (2006.01)
A23C 19/032 (2006.01)
A23C 20/02 (2006.01)
A23C 11/10 (2006.01)
C12P 21/06 (2006.01)
C12P 21/04 (2006.01)
A23K 20/189 (2016.01)
C07H 21/04 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2014 13887	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
(22) Дата подання заявки:	22.05.2013	WO 200236752 A2, 10.05.2002
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	10.04.2019	WO 2008098973 A1, 21.08.2008
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	12169503.5	Junko Suzuki et al, "Site-directed mutagenesis reveals functional contribution of Thr218, Lys220 and Asp304 in chymosin", Protein engineering, (19900101), vol. 4, no. 1, P. 69 – 71
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	25.05.2012	Pitts J E et al, "Expression and characterisation of chymosin pH optima mutants produced in Trichoderma reesei", Journal of biotechnology, Amsterdam, NL, vol. 28, no. 1, (19930301), P. 69 – 83
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	EP	P. Strop et al, "Engineering enzyme subsite specificity: preparation, kinetic characterization, and x-ray analysis at 2.0-Å resolution of Val111Phe site-mutated calf chymosin", Biochemistry, (19901001), vol. 29, no. 42, P. 9863 – 9871
(41) Публікація відомостей про заявку:	27.04.2015, Бюл.№ 8	Supannee Chitpinyol et al, "Site-specific mutations of calf chymosin B which influence milk-clotting activity", Food chemistry, (19980601), vol. 62, no. 2, P. 133 – 139
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	10.04.2019, Бюл.№ 7	Zhang Y et al, "Functional implications of disulfide bond, Cys45-Cys50, in recombinant prochymosin", Biochimica et Biophysica ACTA, Protein structure and molecular enzymology, Amsterdam; NL, vol. 1343, no. 2, (19971205), P. 278 – 286
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/EP2013/060460, 22.05.2013	Kappeler S R et al, "Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk", Biochemical and biophysical research communications, Academic Press INC, Orlando, FL, US, vol. 342, no. 2, (20060407), P. 647 – 654
(72) Винахідник(и): ван ден Брінк Йоханнес Мартен (DK), Лунд Мартін (DK), Якобсен Йонас (DK), Хансен Сарі Шарлотт (DK), Йсплесен Ібен (DK)		Database UniProt [Online] 5 February 2008 (2008-02-05), "SubName: Full=Preprochymosin b [ECO:0000313] EMBLX55935.1; EC=3.4.23.4 [ECO:0000313] EMBLX55935.1; retrieved from EBI accession no. UNIPROT:A9LY78 Database accession no. A9LY78 Database UniProt [Online] 1 October 2000 (2000-10-01), "SubName: Full=Prochymosin [ECO:0000313] EMBL:AAF27315.1; ", retrieved from EBI accession no. UNIPROT:Q9N1 P5 Database accession no. Q9N1P5 Database UniProt [Online] 1 November 1990 (1990-11-01), "RecName: Full=Chymosin; EC=3.4.23.4; AltName: Full=Preprorennin; Flags: Precursor; ", retrieved from EBI accession no. UNIPROT:P18276 Database accession no. P18276 Database UniProt [Online] 20 March 2007 (2007-03-20), "SubName: Full=Preprochymosin {ECO:0000313}EMBLX55935.1; ", retrieved from EBI accession no. UNIPROT:A3F4M4 Database accession no. A3F4M4
(73) Власник(и): КР. ХАНСЕН А/С, Bøge Alle 10-12, DK-2970 Hørsholm, Denmark (DK)		
(74) Представник: Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115		
(56) Junko Suzuki et al, "Alteration of catalytic properties of chymosin by site-directed mutagenesis", Protein engineering, Oxford university press, Surrey, GB, (19890501), vol. 2, no. 7, P. 563 – 569		
Van Den Brink (J) M. et al, "Increased production of chymosin by glycosylation", Journal of biotechnology, Amsterdam, NL, vol. 125, no. 2, (20060901), P. 304 – 310		
M. G. Williams et al, "Mutagenesis, biochemical characterization and X-ray structural analysis of point mutants of bovine chymosin", Protein engineering design and selection, (19970901), vol. 10, no. 9, P. 991 – 997		

(54) ВАРІАНТ ХІМОЗИНУ З ПОЛІПШЕНИМИ МОЛОКОЗГОРТАЛЬНИМИ ВЛАСТИВОСТЯМИ

(57) Реферат:

Винахід стосується варіантів хімозину з поліпшеними молокозгортальними властивостями.

UA 118956 C2

Галузь техніки, до якої належить винахід

Даний винахід стосується варіантів хімозину із поліпшеними молокозгортальними властивостями.

Рівень техніки

Ферментативна коагуляція молока під дією молокозгортальних ферментів, таких, як хімозин і пепсин, являє собою один з найбільш важливих процесів при приготуванні сирів. Ферментативна коагуляція молока являє собою двофазний процес: першу фазу, де протеолітичний фермент, хімозин або пепсин, атакує к-казеїн, що дає в результаті метастабільний стан структури казеїнових міцел, і другу фазу, де молоко згодом коагулює і утворює коагулум.

Хімозин (ЕС 3.4.23.4) і пепсин (ЕС 3.4.23.1), молокозгортальні ферменти шямка ссавців, являють собою аспарагінпротеази, що належать до широкого класу пептидаз.

Коли вони продукуються в клітинах слизової шямка, хімозин і пепсин існують як ферментативно неактивні пре-прохімозин і пре-пепсиноген відповідно. Коли хімозин екскретується, N-кінцевий пептидний фрагмент, пре-фрагмент (сигнальний пептид) відщеплюється з одержанням прохімозину, що містить про-фрагмент. Прохімозин знаходиться по суті в неактивній формі ферменту, який, однак, стає активним при кислотних умовах, перетворюючись в активний хімозин за допомогою аутокаталітичного видалення про-фрагмента. Ця активація здійснюється *in vivo* в порожнині шямка при відповідних умовах рН або *in vitro* при кислотних умовах.

Структурні і функціональні характеристики бичачого, тобто *Bos taurus*, пре-прохімозину, прохімозину і хімозину широко досліджуються. Пре-частина молекули бичачого пре-прохімозину містить залишків 16 аа і про-частина відповідного прохімозину має довжину залишку 42 аа (амінокислоти). Активний бичачий хімозин містить 323 аа і являє собою суміш двох форм, А і В, обидві вони є активними.

Хімозин продукується в природі у деяких видів ссавців, таких, як жуйні тварини, верблюдові, кози, буйволи, вівці, свині, люди, мавпи і щури.

Бичачий хімозин є комерційно доступним для молочної промисловості протягом ряду років.

WO 02/36752A2 (Chr. Hansen) описує рекомбінантне продукування верблюжого хімозину.

Посилання, перераховані тут нижче, можуть в даному контексті розглядатися як посилання, які описують мутанти хімозину:

- Suzuki et al: Site directed mutagenesis reveals functional contribution of Thr218, Lys220 and Asp304 in chymosin, Protein Engineering, vol.4, January 1990, pages 69-71;

- Suzuki et al: Alteration of catalytic properties of chymosin by site-directed mutagenesis, Protein Engineering, vol. 2, May 1989, pages 563-569;

- van den Brink et al: Increased production of chymosin by glycosylation, Journal of biotechnology, vol. 125, September 2006, pages 304-310;

- Pitts et al: Expression and characterization of chymosin pH optima mutants produced in *Tricoderma reesei*, Journal of biotechnology, vol. 28, March 1993, pages 69-83;

- M. G. Williams et al: Mutagenesis, biochemical characterization and X-ray structural analysis of point mutants of bovine chymosin, Protein engineering design and selection, vol. 10, September 1997, pages 991-997;

- Strop et al: Engineering enzyme subsite specificity: preparation, kinetic characterization, and x-ray analysis at 2.0 Å resolution of Val119Phe site mutated calf chymosin, Biochemistry, vol. 29, October 1990, pages 9863-9871;

- Supannee et al: Site-specific mutations of calf chymosin B which influence milk-clotting activity, Food Chemistry, vol. 62, June 1998, pages 133-139;

- Zhang et al: Functional implications of disulfide bond, Cys45-Cys50, in recombinant prochymosin, Biochimica et biophysica acta, vol. 1343, December 1997, pages 278-286.

Жодне з літературних посилань, розглянутих вище, не описує прямо і однозначно жодного з мутантів/варіантів хімозину, як описано/заявлено нижче в цьому документі.

Суть винаходу

Проблема, яка повинна вирішуватися за допомогою даного винаходу, полягає в одержанні варіантів хімозину із поліпшеними молокозгортальними властивостями.

Як обговорюється в робочих прикладах в цьому документі, автори даного винаходу ідентифікували ряд поліпшених варіантів верблюжого (див. приклад 6 в цьому документі) і бичачого (див. приклад 7 в цьому документі) хімозину.

На основі порівняльного аналізу верблюжого і бичачого варіантів автори даного винаходу ідентифікували ряд додаткових положень амінокислот, які є важливими в цьому документі в

тому значенні, що за допомогою одержання варіанта в одному або декількох з цих положень можна одержати поліпшений варіант хімозину (див. приклад 8 в цьому документі).

Як відомо з літератури, різні послідовності природного поліпептиду хімозину дикого типу, одержаного від різних видів ссавців (таких, наприклад, як жуйні тварини, верблюдові, вівці, свині або щури), мають відносно високу схожість/ідентичність послідовностей. На фігурі 1 в цьому документі це ілюструється за допомогою вирівнювання послідовностей релевантних для цього документа різних послідовностей хімозину.

З урахуванням цього відносно близького співвідношення послідовностей передбачається, що 3D структури різних природних хімозинів дикого типу також є відносно схожими одна на одну.

У даному контексті одержаний природний хімозин дикого типу (такий, як бичачий хімозин або верблюжий хімозин) в цьому документі може являти собою приклад вихідного поліпептиду, тобто вихідного поліпептиду, в який вносять зміни для одержання варіанта поліпептиду хімозину за даним винаходом.

Не обмежуючись теорією, передбачається, що споріднені положення амінокислот, які обговорюються в цьому документі хімозину мають загальне значення для будь-якого релевантного для цього документа ферменту хімозину, що становить інтерес (наприклад, для хімозинів, наприклад, жуйних тварин, верблюдових, овець, свиней, щурів і тому подібне), в тому сенсі, що при одержанні варіанта в одному або декількох з цих положень можна одержати поліпшений загалом варіант хімозину (наприклад, поліпшений варіант хімозину жуйних тварин, верблюдових, овець, свиней або щурів).

Як обговорюється в цьому документі, як еталонна послідовність для визначення положення амінокислоти вихідного поліпептиду хімозину, що становить інтерес (наприклад, верблюдових, овець, жуйних тварин і тому подібне), в цьому документі використовують загальновідому послідовність препрохімозину бичачого хімозину B (Genbank accession number P00794; описано в даному документі як SEQ ID NO:1).

Препрохімозин бичачого хімозину B SEQ ID NO:1 може альтернативно називатися в цьому документі бичачий (*Bos bovis*) хімозин B або просто бичачий хімозин. Послідовність показана також на фігурі 1 в цьому документі.

Інша релевантна для цього документа послідовність хімозину являє собою загальновідому послідовність хімозину *Camelus dromedarius*, в цьому документі SEQ ID NO:2. Вона може альтернативно називатися в цьому документі верблюжим хімозином. Ця послідовність показана також на фігурі 1 в цьому документі.

У даному контексті вважається, що вихідний поліпептид хімозину (наприклад, від овець або щурів), який має щонайменше 65 % ідентичність послідовностей зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO:1 (бичачим хімозином), може розглядатися в цьому документі як достатньо споріднений структурно, наприклад, бичачому або верблюжому хімозину, для поліпшення за допомогою одержання варіанта будь-яких з положень амінокислот, як описано в цьому документі.

Відповідно, перший аспект даного винаходу стосується способу одержання варіанта виділеного поліпептиду хімозину, що включає стадії:

(a): здійснення змін в одному або декількох положеннях вихідного поліпептиду, що має активність хімозину, де зміна включає заміщення, делецію або інсерцію в положенні щонайменше однієї амінокислоти, відповідному будь-якому з положень 117, 134, 141, 143, 156, 241, 279, 280, 281, 298, 300, 307, 309, 311, 325, 350, 352 і 353; і

(b): продукування і виділення зміненого поліпептиду зі стадії (a) з одержанням при цьому виділеного варіанта поліпептиду хімозину, де варіант має активність хімозину;

і де

(i): положення амінокислоти вихідного поліпептиду визначають за допомогою вирівнювання послідовностей вихідного поліпептиду з поліпептидом SEQ ID NO:1 (бичачим хімозином), тобто поліпептид SEQ ID NO:1 використовують для визначення відповідної послідовності амінокислот у вихідному поліпептиді; і

(ii): вихідний поліпептид має щонайменше 65 % ідентичність послідовностей зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO:1 (бичачим хімозином), який містить амінокислоти від положення амінокислоти 59 до положення амінокислоти 381 SEQ ID NO:1.

Як відомо з літератури, фахівець в даній галузі може, основуючись на своїх звичайних загальних знаннях, рутинним способом одержувати і очищувати хімозин і варіанти хімозину.

Кажучи іншими словами, коли фахівець в даній галузі має релевантний для даного документа вихідний поліпептид, що має активність хімозину, який становить інтерес (наприклад, від жуйних тварин, верблюдових, овець, свиней або щурів), рутинною роботою для фахівця в даній галузі є одержання варіанта такого вихідного хімозину, що становить інтерес.

Другий аспект даного винаходу стосується виділеного варіанта поліпептиду хімозину, одержаного за допомогою способу за першим аспектом, або будь-яких релевантних для цього документа його варіантів здійснення.

Термін "одержаний" відносно другого аспекту вище повинен розумітися таким чином, що виділений варіант поліпептиду хімозину одержують за допомогою способу першого аспекту або будь-яких його релевантних для цього документа варіантів здійснення.

Відповідно, термін "одержаний" відносно другого аспекту не може розумітися як той, який може, в принципі, бути одержаний.

Як обговорюється в цьому документі в робочих прикладах в цьому документі, одержують варіанти з використанням поліпептиду SEQ ID NO:1 (бичачий) як вихідного поліпептиду; такий варіант може називатися в цьому документі варіантами бичачого хімозину.

Відповідно, третій аспект даного винаходу стосується виділеного варіанта поліпептиду хімозину, що містить:

(a): зміну в одному або декількох положеннях вихідного поліпептиду, що має активність хімозину, де зміна включає заміщення, делецію або інсерцію в положенні щонайменше однієї амінокислоти, відповідному будь-якому з положень 117, 134, 141, 143, 156, 241, 279, 280, 281, 298, 300, 307, 309, 311, 325, 350, 352 і 353; і

(b): де варіант має активність хімозину;

і де

(i): положення амінокислоти вихідного поліпептиду визначають за допомогою вирівнювання послідовностей вихідного поліпептиду з поліпептидом SEQ ID NO:1 (бичачим хімозином), тобто поліпептид SEQ ID NO:1 використовують для визначення відповідної послідовності амінокислот у вихідному поліпептиді; і

(ii): вихідний поліпептид має щонайменше 90 % ідентичність послідовностей зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO:1 (бичачим хімозином), який містить амінокислоти від положення амінокислоти 59 до положення амінокислоти 381 SEQ ID NO:1; і

(iii): виділений варіант поліпептиду має менше, ніж 100 % ідентичність послідовностей зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO:1 (бичачим хімозином).

Як обговорюється в цьому документі в робочих прикладах в цьому документі, одержують варіанти з використанням поліпептиду SEQ ID NO:2 (верблюжого хімозину) як вихідного поліпептиду; такий варіант може в цьому документі називатися варіантом верблюжого хімозину.

Відповідно, четвертий аспект даного винаходу стосується виділеного варіанта поліпептиду хімозину, що містить:

(a): зміну в одному або декількох положеннях вихідного поліпептиду, що має активність хімозину, де зміна включає заміщення, делецію або інсерцію в положенні щонайменше однієї амінокислоти, відповідному будь-якому з положень 117, 134, 141, 143, 156, 241, 279, 280, 281, 298, 300, 307, 309, 311, 325, 350, 352 і 353; і

(b): де варіант має активність хімозину;

і де

(i): положення амінокислоти вихідного поліпептиду визначають за допомогою вирівнювання послідовностей вихідного поліпептиду з поліпептидом SEQ ID NO:1 (бичачим хімозином), тобто поліпептид SEQ ID NO:1 використовують для визначення відповідної послідовності амінокислот у вихідному поліпептиді; і

(ii): вихідний поліпептид має щонайменше 90 % ідентичність послідовностей зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO:2 (верблюжим хімозином), який містить амінокислоти від положення амінокислоти 59 до положення амінокислоти 381 SEQ ID NO:2; і

(iii): виділений варіант поліпептиду має менше, ніж 100 % ідентичність послідовності зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO:2 (верблюжим хімозином).

Виділений варіант поліпептиду хімозину, як описано в цьому документі, може використовуватися відповідно до літературних даних, наприклад, для приготування харчового або кормового продукту, що становить інтерес (такого, наприклад, як продукт на основі молока, який становить інтерес, який, наприклад, може являти собою сирний продукт).

Відповідно, п'ятий аспект даного винаходу стосується способу приготування харчового або кормового продукту, що включає додавання ефективної кількості виділеного варіанта поліпептиду хімозину, як описано в цьому документі, в харчовий або кормовий інгредієнт (інгредієнти) і здійснення додаткових стадій приготування з одержанням харчового або кормового продукту.

Варіант здійснення даного винаходу описаний нижче тільки як приклади.

Визначення

Всі визначення термінів, релевантних для цього документа, знаходяться відповідно до того, що розумілося б фахівцем у даній галузі відносно релевантного для цього документа технічного контексту.

Термін "хімозин" стосується ферменту класу EC 3.4.23.4. Хімозин має високу специфічність, і він згортає молоко за допомогою розщеплення одинарного зв'язку 105-Ser-Phe-|-Met-Ala-108 в каппа-ланцюгу казеїну. Альтернативна назва, що використовується в даній галузі, являє собою "ренін".

Термін "активність хімозину" стосується активності хімозину для ферменту хімозину, як розуміється фахівцем в даному контексті.

Фахівець у даній галузі знає, як визначити релевантну для цього документа активність хімозину. У робочому прикладі 4 в цьому документі пропонується приклад стандартного способу визначення питомої активності хімозину, яка альтернативно називається активністю згортання або молокозгортальною активністю.

У робочому прикладі 5 в цьому документі пропонується приклад стандартного способу визначення протеолітичної активності.

Як відомо з літератури, релевантне для цього документа так зване відношення C/P визначається за допомогою ділення питомої активності згортання (C) на протеолітичну активність (P).

Як відомо з літератури, вище відношення C/P означає, як правило, що втрати білка під час, наприклад, приготування сиру через неспецифічну деградацію білка зменшуються, тобто вихід сиру поліпшується, і що розвиток гіркої смаку у сири під час його дозрівання зменшується.

Термін "виділений варіант" означає варіант, який модифікується руками людини. В одному з аспектів варіант є чистим щонайменше на 1 %, наприклад, чистим щонайменше на 5 %, чистим щонайменше на 10 %, чистим щонайменше на 20 %, чистим щонайменше на 40 %, чистим щонайменше на 60 %, чистим щонайменше на 80 % і чистим щонайменше на 90 %, як визначено за допомогою SDS PAGE.

Термін "зрілий поліпептид" означає пептид в його кінцевій формі після трансляції і будь-яких посттрансляційних модифікацій, таких, як N-кінцевий процесинг, C-кінцевий процесинг, глікозилювання, фосфорилювання і тому подібне. У даному контексті релевантний для цього документа зрілий поліпептид хімозину можна розглядати як активну послідовність поліпептиду хімозину, тобто без послідовностей пре-частини і/або про-частини. Релевантні для цього документа приклади зрілого поліпептиду являють собою, наприклад, зрілий поліпептид SEQ ID NO:1 (бичачий хімозин), який містить амінокислоти від положення амінокислоти 59 до положення амінокислоти 381 SEQ ID NO:1, або зрілий поліпептид SEQ ID NO:2 (верблюжий хімозин), який містить амінокислоти від положення амінокислоти 59 до положення амінокислоти 381 SEQ ID NO:2.

Термін "вихідний" або "вихідний поліпептид, який має активність хімозину" означає поліпептид, в якому здійснюють зміни для одержання варіантів ферментів за даним винаходом. "Вихідний" може являти собою поліпептид, який зустрічається в природі (дикого типу), або його варіант.

Термін "ідентичність послідовності" стосується співвідношення між двома послідовностями амінокислот або між двома послідовностями нуклеотидів.

Для цілей даного винаходу рівень ідентичності послідовностей між двома послідовностями амінокислот визначають із використанням алгоритму Needleman-Wunsch (Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443-453), як здійснюється в програмі Needle пакету EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16:276-277), переважно версії 3.0.0 або пізнішої. Необов'язкові використовувані параметри являють собою штраф за внесення делеції у вирівнюванні 10, штраф за продовження делеції 0,5 і підстановкову матрицю EBLOSUM62 (EMBOSS version of BLOSUM62). Результат Needle, що відмічається як "найбільш широка ідентичність" (одержана з використанням опції -nobrief) використовують як процент ідентичності і обчислюють таким чином:

$$(\text{Ідентичні залишки} \times 100) / (\text{довжина вирівнювання послідовностей} - \text{загальна кількість розривів при вирівнюванні послідовностей}).$$

Для цілей даного винаходу рівень ідентичності послідовності між двома послідовностями дезоксирибонуклеотидів визначають з використанням алгоритму Needleman-Wunsch (Needleman i Wunsch, 1970, вище), як здійснюється для програми Needle з пакету EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, вище), переважно версії 3.0.0 або пізнішої. Використовувані необов'язкові параметри являють собою штраф за внесення делеції у вирівнювання 10, штраф за продовження делеції 0,5 і підстановкову матрицю EDNAFULL (EMBOSS version of NCBI NUC4.4). Вихідні дані Needle, що

відмічаються як "найбільш широка ідентичність" (одержана з використанням опції -nobrief), використовують як процент ідентичності і обчислюють таким чином:

$$(\text{Ідентичні дезоксирибонуклеотиди} \times 100) / (\text{довжина вирівнювання послідовностей} - \text{загальна кількість розривів при вирівнюванні послідовностей}).$$

5 Термін "варіант" означає пептид, що має активність хімозину, що містить зміну, наприклад, заміщення, інсерцію, і/або делецію, в одному або декількох положеннях. "Заміщення" означає заміну амінокислоти, яка займає деяке положення, іншою амінокислотою; "делеція" означає видалення амінокислоти, що займає деяке положення; і "інсерція" означає додавання 1-3 амінокислот поруч з амінокислотою, що займає деяке положення.

10 Амінокислота може являти собою природні або штучні амінокислоти, наприклад, заміщенні, наприклад, зокрема, D-ізомерами (або D-формами), наприклад, D-аланіну могло би бути можливим теоретично.

Термін "пептид хімозину дикого типу" означає хімозин, який експресується організмом, що зустрічається в природі, наприклад, ссавцем (наприклад, верблюдицею або коровою), що зустрічається в природі.

Креслення

Фігура 1: вирівнювання релевантних для цього документа різних послідовностей хімозину. Показаний "Bos_bovis_chymosin_B" в цьому документі являє собою бичачий хімозин SEQ ID NO:1, і показаний "Camelus_dromedarius" в цьому документі являє собою верблюжий хімозин SEQ ID NO:2. Використовуючи бичачий хімозин SEQ ID NO:1 як еталонну послідовність, як описано в цьому документі, можна, наприклад, побачити, що бичачий хімозин має "V" в положенні 10, а верблюжий хімозин має "A" в цьому ж положенні 10. Можна, наприклад, також побачити, що жуйні тварини/щури мають "Q" в положенні 352, а верблюд/C._bactrianus має "E" в тому ж положенні 352.

25 Відносно послідовностей хімозину, показаних на фігурі 1, вівця має 94,5 % ідентичність послідовностей з бичачою послідовністю SEQ ID NO:1; C._bactrianus має 83,2 % ідентичність послідовностей з бичачою послідовністю SEQ ID NO:1; Camelus_dromedarius (верблюжий хімозин SEQ ID NO:2) має 84 % ідентичність послідовностей з бичачою послідовністю SEQ ID NO:1; свиня має 80,3 % ідентичність послідовностей з бичачою послідовністю SEQ ID NO:1, і щур має 71,9 % ідентичність послідовностей з бичачою послідовністю SEQ ID NO:1.

30 Як зрозуміло фахівцям в даній галузі в даному контексті, релевантні для цього документа проценти ідентичності послідовностей для послідовностей зрілих поліпептидів, наприклад, для хімозину вівці, C._bactrianus, верблюда, свині або щура зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO:1 (бичачим хімозином, тобто положення амінокислот від 59 до 381 SEQ ID NO:1), є відносно схожими з розглянутими вище процентами ідентичності послідовностей.

35 Фігура 2: 3D структура бичачого хімозину. 3D структура є загальнодоступною. Як приклад показано, де саме в бичачому хімозині присутні положення амінокислот 296 і 294.

Докладний опис винаходу

Визначення положення амінокислот хімозину, що становить інтерес

40 Як обговорюється вище як еталонну послідовність для визначення положення амінокислоти релевантного для цього документа поліпептиду хімозину, що становить інтерес (наприклад, верблюда, вівці, жуйних тварин і тому подібного), в цьому документі використовують загальновідому послідовність бичачого хімозину, описану в цьому документі як SEQ ID NO:1.

45 Для цілей даного винаходу поліпептид, описаний як SEQ ID NO:1 (бичачий хімозин), використовують для визначення відповідного залишку амінокислоти в іншому поліпептиді хімозину. Послідовність амінокислот іншого поліпептиду хімозину вирівнюється з поліпептидом, описаним як SEQ ID NO:1, і на основі вирівнювання послідовностей визначають кількість положень амінокислот, відповідних будь-якому залишку амінокислоти в поліпептиді, описаному як SEQ ID NO:1, з використанням алгоритму ClustalW, як описано в робочому прикладі 1 в цьому документі.

50 Ідентифікація відповідного залишку амінокислоти в іншому поліпептиді хімозину може бути підтверджена з використанням алгоритму Needleman-Wunsch (Needleman і Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443-453), як здійснюється в програмі Needle з пакету EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16:276-277), переважно версії 3.0.0 або пізнішої.

55 Основуючись на наведених вище добре відомих комп'ютерних програмах, для фахівця в даній галузі є рутинною роботою визначення положення амінокислоти релевантного для цього документа поліпептиду хімозину, що становить інтерес (наприклад, верблюда, вівці, жуйних тварин і тому подібного).

60 На фігурі 1 в цьому документі показаний приклад вирівнювання послідовностей.

Тільки як приклад на фігурі 1 можна, наприклад, побачити, що еталонна бичача послідовність SEQ ID NO:1, що використовується в цьому документі, має "G" в положенні 50, і послідовність "Camelus_dromedarius" (SEQ ID NO:2 в цьому документі) має "A" в цьому ж положенні 50.

5 Номенклатура варіантів

При описі варіантів даного винаходу номенклатура, описана нижче, адаптується для простоти згадування. Використовують прийняті IUPAC однобуквені або трибуквені скорочені найменування амінокислот.

10 Конкретні варіанти, які обговорюються в даному розділі "номенклатура" нижче, можуть не являти собою релевантні для цього документа варіанти даного винаходу, тобто розділ "номенклатура" призначений просто для опису релевантної для цього документа використовуваної номенклатури як такої.

Заміщення. Для заміщення амінокислот використовують наступну номенклатуру: вихідна амінокислота, положення, заміщена амінокислота. Відповідно, теоретичне заміщення треоніну аланіном у положенні 226 позначається як "Thr226Ala" або "T226A". Множина мутацій розділяються знаками плюс («+»), наприклад, "Gly205Arg+Ser411Phe" або "G205R+S411F", що являє собою заміщення в положеннях 205 і 411 гліцину (G) аргініном (R) і серином (S) з фенілаланіном (F) відповідно. Заміщення, позначене, наприклад, "226A", стосується заміщення вихідної амінокислоти (наприклад, T, Q, S або іншої вихідної амінокислоти) аланіном в положенні 226.

Делеції. Для делецій амінокислоти використовують наступну номенклатуру: вихідна амінокислота, положення, *. Відповідно, делеція гліцину в положенні 195 позначається як "Gly195*" або "G195*». Множина делецій розділяються за допомогою знаків плюс («+»), наприклад, "Gly195* + Ser411*" або "G195* + S411*».

25 Інсерції. Для інсерції амінокислоти використовують наступну номенклатуру: вихідна амінокислота, положення, вихідна амінокислота, вставлена амінокислота. Відповідно, інсерція лізину після гліцину в положенні 195 позначається як "Gly195Glylys" або "G195GK". Інсерція множини амінокислот позначається (вихідна амінокислота, положення, вихідна амінокислота, вставлена амінокислота № 1, вставлена амінокислота № 2; і тому подібне). Наприклад, інсерція лізину і аланіну після гліцину в положенні 195 позначається "Gly195GlylysAla" або "G195GKA".

У таких випадках вставлені залишки амінокислоти нумеруються за допомогою додавання малих букв у номер положення залишку амінокислоти перед вставленим залишком (залишками) амінокислоти. У вказаному вище прикладі, таким чином, послідовність повинна являти собою:

Схожий	Варіант
195	195 195a 195b
G	G-K-A

35

Множинні зміни. Варіанти, що містять множинні зміни, розділяються за допомогою знаків плюс («+»): наприклад, "Arg170Tyr+Gly195Glu" або "R170Y+G195E" являє собою заміщення тирозину і глутамінової кислоти замість аргініну і гліцину в положеннях 170 і 195 відповідно.

40 Різні заміщення. Коли в деякі положення можуть вводиться різні заміщення, ці різні заміщення розділяються комою: наприклад, "Arg170Tyr, Glu" або "R170Y, E" представляє заміщення аргініну тирозином або глутаміновою кислотою в положенні 170. Таким чином, "Tyr167Gly, Ala+Arg170Gly, Ala" або "Y167G, A+R170G, A" означає наступні варіанти:

"Tyr167Gly+Arg170Gly", "Tyr167Gly+Arg170Ala", "Tyr167Ala+Arg170Gly" і "Tyr167Ala+Arg170Ala".

45 Спосіб одержання виділеного варіанта поліпептиду хімоzinу

Як обговорюється вище, як відомо в даній галузі, фахівець на основі своїх звичайних загальних знань може рутинно одержати і очистити хімозин і варіанти хімоzinу.

50 Кажучи іншими словами, після того як фахівець в даній галузі буде мати релевантний для цього документа вихідний поліпептид, що має активність хімоzinу, що становить інтерес (наприклад, жуйних тваринних, верблюдових, овець, свиней або шурів), для фахівця у даній галузі є рутинною роботою одержання варіанта такого вихідного хімоzinу, що становить інтерес.

Приклад способу, придатного для використання при одержанні і виділенні хімоzinу (варіанта або вихідного), може являти собою добре відому технологію, наприклад, технологію на основі грибового рекомбінантного експресування/продукування, як описано, наприклад, в WO 02/36752A2 (Chr. Hansen).

55

Для фахівця в даній галузі також є рутинною роботою здійснення змін в одному або декількох положеннях у вихідному поліпептиді, що має активність хімозину, де зміна включає заміщення, делецію або інсерцію в положенні щонайменше однієї амінокислоти.

5 Як відомо фахівцеві в даній галузі, це можна зробити, наприклад, за допомогою так званого сайт-направленого мутагенезу і технології на основі рекомбінантного експресування/продукування.

Також рутинною роботою для фахівця в даній галузі є визначення того, чи має релевантний для цього документа вихідний поліпептид (наприклад, верблюжий або бичачий хімозин дикого типу) і/або релевантний для цього документа варіант активність хімозину або ні.

10 Як відомо з літератури, активність хімозину може бути визначена за допомогою так званого відношення С/Р, яке визначається за допомогою ділення питомої активності згортання (С) на протеолітичну активність (Р).

15 Як відомо з літератури, вище відношення С/Р означає, як правило, що втрати білка протягом, наприклад, приготування сиру через неспецифічну деградацію білка зменшуються, тобто вихід сиру покращується, і що розвиток гіркого смаку в сирі під час дозрівання зменшується.

У робочому прикладі 4 в цьому документі описується відповідний спосіб для визначення питомої активності згортання (С), а в робочому прикладі 5 в цьому документі описується відповідний спосіб визначення протеолітичної активності (Р).

20 Переважно виділений варіант поліпептиду хімозину, як описано в цьому документі, являє собою варіант, де варіант має активність хімозину, що дає вище відношення С/Р, порівняно з відношенням С/Р бичачого хімозину, що містить зрілий поліпептид з послідовністю SEQ ID NO:1, в цьому документі.

25 Переважно виділений варіант поліпептиду хімозину, як описано в цьому документі, являє собою варіант, де варіант має активність хімозину, що дає вище відношення С/Р порівняно з відношенням С/Р верблюжого хімозину, що містить зрілий поліпептид з послідовністю SEQ ID NO:2, в цьому документі.

Переважніше виділений варіант поліпептиду хімозину, як описано в цьому документі, являє собою варіант, де варіант має:

30 - активність хімозину, що дає вище відношення С/Р порівняно з відношенням С/Р бичачого хімозину, що містить зрілий поліпептид з послідовністю SEQ ID NO:1, в цьому документі; і
- активність хімозину, що дає вище відношення С/Р порівняно з відношенням С/Р верблюжого хімозину, що містить зрілий поліпептид з послідовністю SEQ ID NO:2, в цьому документі.

35 Як обговорюється вище, як еталонну послідовність для визначення положення амінокислоти релевантного для цього документа поліпептиду хімозину, що становить інтерес (наприклад, верблюдових, овець, жуйних тварин і тому подібного), в цьому документі використовують загальновідому послідовність бичачого хімозину, описану в цьому документі як SEQ ID NO:1.

40 Як обговорюється вище, основуючись, наприклад, на комп'ютерних програмах вирівнювання послідовностей для послідовностей, що обговорюються в цьому документі, для фахівця в даній галузі є рутинною роботою визначення положення амінокислоти, релевантної для цього документа поліпептиду хімозину, релевантного для цього документа, що становить інтерес (наприклад, верблюдових, овець, жуйних тварин і тому подібного).

45 Термін "вихідний поліпептид має щонайменше 65 % ідентичність послідовностей зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO:1 (бичачий хімозин)", наприклад, способу першого аспекту, в даному документі може розглядатися як такий, що стосується обмеження на основі послідовності вихідного поліпептиду хімозину, що використовується для одержання його варіанта, релевантного для цього документа.

50 Кажучи іншими словами, зрілий вихідний поліпептид хімозину (наприклад, вівці або свині), який має щонайменше 65 % ідентичність послідовностей зі зрілим бичачим хімозином, як вважається, є достатньо структурно ідентичним, наприклад, бичачому або верблюдаху хімозину, щоб бути релевантним для цього документа, тобто в даному контексті вважається, що зрілий вихідний поліпептид хімозину (наприклад, від вівці або щура), який має щонайменше 65 % ідентичність послідовностей зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO:1 (бичачий хімозин), може розглядатися в цьому документі як достатньо структурно споріднений, наприклад, бичачому або верблюдаху хімозину, щоб його можна було поліпшувати за допомогою одержання варіанта в будь-якому положенні амінокислот, як описано в цьому документі.

60 Поліпептид верблюдаху хімозину SEQ ID NO:2 має 84 % ідентичність послідовностей з бичачим поліпептидом SEQ ID NO:1 (тобто з повною послідовністю SEQ ID NO:1 від положення 1 до 381, яка включає пре і про послідовність).

Як зрозуміло фахівцям в даній галузі, в даному контексті релевантний для цього документа вихідний поліпептид, що має активність хімозину, може вже являти собою, наприклад, варіант, наприклад, відповідного хімозину дикого типу.

Наприклад, варіант верблюжого хімозину, наприклад, із 5-10 змінами (наприклад, заміщеннями), порівняно з поліпептидом верблюжого хімозину дикого типу SEQ ID NO:2 як і раніше буде вихідним поліпептидом, який має щонайменше 65 % ідентичність послідовностей зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO:1 (бичачим), як потрібно, наприклад, в першому аспекті в цьому документі.

Кажучи іншими словами, релевантний для цього документа виділений варіант поліпептиду хімозину може містити зміни (наприклад, заміщення) в положенні іншому, ніж положення, наприклад, першого аспекту в цьому документі.

Відносно послідовностей хімозину, показаних на фігурі 1 в цьому документі, вівця має 94,5 % ідентичність послідовностей з бичачою послідовністю SEQ ID NO:1; *C. bactrianus* має 83,2 % ідентичність послідовностей з бичачою послідовністю SEQ ID NO:1; свиня має 80,3 % ідентичність послідовностей з бичачою послідовністю SEQ ID NO:1, і щур має 71,9 % ідентичність послідовності з бичачою послідовністю SEQ ID NO:1.

Як зрозуміло фахівцям в даній галузі в даному контексті, релевантні для цього документа проценти ідентичності послідовностей, наприклад, зрілого хімозину вівці, *C. bactrianus*, верблюда, свині або щурів зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO:1 (бичачим хімозином; тобто положення 59-381 амінокислот SEQ ID NO:1) є відносно подібними розглянутим вище процентам ідентичності послідовностей.

Переважаючі варіанти

Як обговорюється вище, наприклад, перший аспект стосується виділеного варіанта поліпептиду хімозину, де зміна включає заміщення, делецію або інсерцію в положенні щонайменше однієї амінокислоти, відповідному будь-якому з положень 117, 134, 141, 143, 156, 241, 279, 280, 281, 298, 300, 307, 309, 311, 325, 350, 352 і 353.

Переважаючий варіант здійснення стосується виділеного варіанта поліпептиду хімозину, де зміна включає заміщення, делецію або інсерцію в положенні щонайменше однієї амінокислоти, відповідному будь-якому з положень 134, 141, 143, 280, 281, 298, 300, 307, 309, 311, 352 і 353.

Може бути переважним, щоб щонайменше одна зміна являла собою заміщення, тобто релевантний для цього документа переважний варіант здійснення стосується виділеного варіанта поліпептиду хімозину, де зміна включає заміщення в положенні щонайменше однієї амінокислоти, відповідному будь-якому з положень 117, 134, 141, 143, 156, 241, 279, 280, 281, 298, 300, 307, 309, 311, 325, 350, 352 і 353.

Переважно виділений варіант поліпептиду хімозину являє собою варіант, де зміна включає заміщення в положенні щонайменше однієї амінокислоти, відповідному будь-якому з положень 134, 141, 143, 280, 281, 298, 300, 307, 309, 311, 352 і 353.

Переважно заміщення являє собою таке заміщення, де заміщення являє собою 117N, 134Q, 141E, 143F, 156V, 241I, 279M, 280I, 281V, 298E, 300R, 307D, 309D, 309W, 311I, 325M, 350N, 352L, 352Q, 353L або 353Q.

Як зрозуміло фахівцям в даній галузі в даному контексті, якщо вихідний поліпептид хімозину вже має, наприклад, "V" в положенні 156, тоді немає значення говорити про здійснення заміщення 156V для цього конкретного вихідного поліпептиду хімозину. Як можна побачити на фігурі 1 в цьому документі, хімозин щура дикого типу має "V" в положенні 156; заміщення 156V може розглядатися в цьому документі як ірелевантне для конкретної послідовності поліпептиду хімозину щура на фігурі 1.

Переважно заміщення являє собою таке заміщення, де заміщення являє собою 134Q, 141E, 143F, 280I, 281V, 298E, 300R, 307D, 309D, 309W, 311I, 352L, 352Q, 353L або 353Q.

Переважно заміщення являє собою таке заміщення, де заміщення являє собою D117N, H134Q, Q141E, I143F, D156V, V241I, V279M, L280I, F281V, Q298E, Q300R, N307D, G309D, G309W, L311I, D325M, H350N, Q352L, E352L, E352Q, K353L або K353Q.

Як зрозуміло фахівцям в даній галузі в даному контексті, якщо вихідний поліпептид хімозину не має, наприклад, "D" в положенні 156, тоді немає значення говорити про здійснення заміщення D156V для цього конкретного вихідного поліпептиду хімозину. Як можна побачити на фігурі 1 в цьому документі, хімозин щура дикого типу має "V" в положенні 156; заміщення D156V може, отже, розглядатися в цьому документі як ірелевантне для конкретної послідовності поліпептиду хімозину щура на фігурі 1.

У переважному варіанті здійснення заміщення являє собою таке заміщення, де заміщення являє собою H134Q, Q141E, I143F, L280I, F281V, Q298E, Q300R, N307D, G309D, G309W, L311I, Q352L, E352L, E352Q, K353L або K353Q.

У переважному варіанті здійснення заміщення являє собою таке заміщення, де заміщення являє собою:

- F281V+V306I+I321L;
- H134Q+I154L+D216S;
- 5 V261A+V263I+G309W+L311I+Y326F;
- D156V+G309D+M314L+V317I;
- H134Q+L280I+G309W;
- R119Q+D156V+V375L;
- Y79S+R119S+H204R;
- 10 Y79S+H 134Q+Y365F+V375L;
- Y194I+R213Q+G309D;
- Y79S+D117N+I321L;
- Y185F+D325M+E352Q;
- Y79S+L224V+L311I;
- 15 S132F+H134Q+M200I+M215L+G221E;
- F281V+G309W+S331Y+D337E;
- D156V+G309D+M314L+V317I;
- G128D+L188I+Y326F;
- R119S+V241I+L280I+L311I+D325M;
- 20 R119Q+S284T+T297S+V306I+G309W
- K279V+V281F;
- Q298E+Q300R;
- H350N+Q352E+K353L;
- D307N+D309G або
- 25 Q141 E+I143F.

Переважний вихідний поліпептид, що має активність хімозину

- Переважно вихідний поліпептид має щонайменше 70 % ідентичність послідовностей зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO:1 (бичачим хімозином), більш переважно вихідний поліпептид має щонайменше 75 % ідентичність послідовностей зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO:1 (бичачим хімозином).
- 30

Просто як приклад відповідний, релевантний для цього документа вихідний поліпептид може являти собою, наприклад, бичачий хімозин А, як відомо в даній галузі, бичачий хімозин А може мати тільки єдину відмінність в амінокислотах порівняно з бичачим хімозином В SEQ ID NO:1 в цьому документі.

- 35 Як обговорюється вище в робочих прикладах в цьому документі, одержують варіанти з використанням поліпептиду SEQ ID NO:1 (бичачого) як вихідного поліпептиду; такий варіант може називатися в цьому документі "варіантами бичачого хімозину".

- Відповідно, в переважному варіанті здійснення вихідний поліпептид має щонайменше 90 % ідентичність послідовностей зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO:1 (бичачим хімозином), більш переважно вихідний поліпептид має щонайменше 95 % ідентичність послідовностей зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO:1 (бичачим хімозином), і ще більш переважно вихідний поліпептид має щонайменше 97 % ідентичність послідовностей зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO:1 (бичачим хімозином). Може бути переважним, щоб вихідний поліпептид являв собою зрілий поліпептид SEQ ID NO:1 (бичачий хімозин).
- 40

- 45 Як зрозуміло фахівцям в даній галузі в даному контексті, релевантний для цього документа вихідний поліпептид, що має активність хімозину, може вже являти собою, наприклад, варіант, наприклад, відповідного хімозину дикого типу.

- Наприклад, варіант бичачого хімозину, наприклад, із 5-10 змінами (наприклад, заміщеннями) порівняно зі зрілим поліпептидом бичачого хімозину дикого типу SEQ ID NO:1 як і раніше буде являти собою вихідний поліпептид, який має щонайменше 95 % ідентичність послідовностей зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO:1 (бичачим хімозином).
- 50

- Зрілий поліпептид SEQ ID NO:1 (бичачий) має 323 амінокислоти в довжину відповідно, варіант бичачого хімозину, наприклад, із 25 заміщеннями амінокислот порівняно зі зрілим поліпептидом бичачого хімозину дикого типу SEQ ID NO:1 не буде являти собою вихідний поліпептид, який має щонайменше 95 % ідентичність послідовностей зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO:1 (бичачим хімозином).
- 55

Кажучи іншими словами, і загалом релевантний для цього документа виділений варіант поліпептиду хімозину може містити зміни (наприклад, заміщення) в положеннях інших, ніж положення, наприклад, першого аспекту в цьому документі.

Як обговорюється вище в робочих прикладах в цьому документі, одержують варіанти з використанням поліпептиду SEQ ID NO:2 (верблюжого) як вихідного поліпептиду; такий варіант може називатися в цьому документі варіантом верблюжого хімозину.

Відповідно, в переважному варіанті здійснення вихідний поліпептид має щонайменше 90 % ідентичність послідовностей зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO:2 (верблюжим хімозином), більш переважно вихідний поліпептид має щонайменше 95 % ідентичність послідовностей зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO:2 (верблюжим хімозином), і ще більш переважно вихідний поліпептид має щонайменше 97 % ідентичність послідовностей зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO:2 (верблюжим хімозином). Може бути переважним, щоб вихідний поліпептид являв собою зрілий поліпептид SEQ ID NO:2 (верблюжий хімозин).

Як зрозуміло фахівцеві в даній галузі в даному контексті, вихідний поліпептид, який має щонайменше 90 % ідентичність послідовностей зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO:2 (верблюжим), як і раніше знаходиться в межах вимог ідентичності послідовностей відносно SEQ ID NO:1 (бичачому) пункту (ii) першого аспекту в цьому документі; тобто він буде являти собою вихідний поліпептид, який має щонайменше 65 % ідентичність послідовностей зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO:1 (бичачим хімозином).

Виділений варіант бичачого хімозину

Як обговорюється вище в робочих прикладах в цьому документі, одержують варіанти з використанням поліпептиду SEQ ID NO:1 (бичачого) як вихідного поліпептиду; такий варіант може називатися в цьому документі "варіантом бичачого хімозину".

Як обговорюється вище, третій аспект, відповідно, стосується виділеного варіанта поліпептиду хімозину, що містить:

(a): зміну в одному або декількох положеннях вихідного поліпептиду, що має активність хімозину, де зміна включає заміщення, делецію або інсерцію в положенні щонайменше однієї амінокислоти, відповідному будь-якому з положень 117, 134, 141, 143, 156, 241, 279, 280, 281, 298, 300, 307, 309, 311, 325, 350, 352 і 353; і

(b): де варіант має активність хімозину;

і де

(i): положення амінокислоти вихідного поліпептиду визначають за допомогою вирівнювання послідовностей вихідного поліпептиду з поліпептидом SEQ ID NO:1 (бичачим хімозином), тобто поліпептид SEQ ID NO:1 використовують для визначення відповідної послідовності амінокислот в вихідному поліпептиді; і

(ii): вихідний поліпептид має щонайменше 90 % ідентичність послідовностей зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO:1 (бичачим хімозином), який містить амінокислоти від положення амінокислоти 59 до положення амінокислоти 381 SEQ ID NO:1; і

(iii): виділений варіант поліпептиду має менше, ніж 100 % ідентичність послідовностей зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO:1 (бичачим хімозином).

Описані вище визначення і переважні варіанти здійснення є також релевантними для цього аспекту.

Переважно виділений варіант поліпептиду бичачого хімозину, як описано в цьому документі, являє собою варіант, де варіант має активність хімозину, що дає вище відношення C/P порівняно з відношенням C/P бичачого хімозину, що містить зрілий поліпептид SEQ ID NO:1.

У переважному варіанті здійснення вихідний поліпептид має щонайменше 92 % ідентичність послідовностей зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO:1 (бичачим хімозином), більш переважно вихідний поліпептид має щонайменше 95 % ідентичність послідовностей зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO:1 (бичачим хімозином), і ще більш переважно вихідний поліпептид має щонайменше 97 % ідентичність послідовностей зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO:1 (бичачим хімозином).

Як зрозуміло фахівцеві в даній галузі в даному контексті, виділений варіант хімозину може містити зміни (наприклад, заміщення) в положеннях амінокислот інших, ніж наведено вище.

Наприклад, варіант бичачого хімозину, наприклад, із 5-10 змінами (наприклад, заміщеннями) порівняно з поліпептидом бичачого хімозину дикого типу SEQ ID NO:1 буде, як і раніше, являти собою вихідний поліпептид, який має щонайменше 95 % ідентичність послідовностей зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO:1 (бичачим хімозином).

Може бути переважним, щоб виділений варіант бичачого хімозину містив менше 30 змін амінокислот (наприклад, заміщень) порівняно зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO:1 (бичачим хімозином), або може бути переважним, щоб виділений варіант бичачого хімозину містив менше 20 змін амінокислот (наприклад, заміщень) порівняно зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO:1 (бичачим хімозином), або може бути переважним, щоб виділений варіант бичачого хімозину містив менше 10 змін амінокислот (наприклад, заміщень) порівняно зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO:1 (бичачим хімозином), або може бути переважним, щоб виділений варіант бичачого

хімозину містив менше 5 змін амінокислот (наприклад, заміщень) порівняно зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO:1 (бичачим хімозином).

5 Як зрозуміло фахівцеві в даній галузі в даному контексті, термін "виділений варіант поліпептиду має менше, ніж 100 % ідентичність послідовностей зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO:1 (бичачим хімозином)» пункту (iii) вище стосується того, що описаний в цьому документі виділений варіант бичачого хімозину, зрозуміло, не повинен містити послідовності поліпептидів, яка є на 100 % ідентичною загальновідомій послідовності бичачого хімозину дикого типу SEQ ID NO:1.

10 Переважний варіант здійснення стосується виділеного варіанта поліпептиду бичачого хімозину, де зміна включає заміщення, делецію або інсерцію в положенні щонайменше однієї амінокислоти, відповідному будь-якому з положень 134, 141, 143, 280, 281, 298, 300, 307, 309, 311, 352 і 353.

15 Може бути переважним, щоб щонайменше одна зміна являла собою заміщення, тобто релевантний для цього документа переважний варіант здійснення стосується виділеного варіанта поліпептиду хімозину, де зміна включає заміщення в положенні щонайменше однієї амінокислоти, відповідному будь-якому з положень 117, 134, 141, 143, 156, 241, 279, 280, 281, 298, 300, 307, 309, 311, 325, 350, 352 і 353.

20 Переважно виділений варіант поліпептиду хімозину являє собою варіант, де зміна включає заміщення в положенні щонайменше однієї амінокислоти, відповідному будь-якому з положень 134, 141, 143, 280, 281, 298, 300, 307, 309, 311, 352 і 353.

Переважно заміщення являє собою таке заміщення, де заміщення являє собою 117N, 134Q, 141E, 143F, 156V, 241I, 279M, 280I, 281V, 298E, 300R, 307D, 309D, 309W, 311I, 325M, 350N, 352L, 352Q, 353L або 353Q.

25 Переважно заміщення являє собою таке заміщення, де заміщення являє собою 134Q, 141E, 143F, 280I, 281V, 298E, 300R, 307D, 309D, 309W, 311I, 352L, 352Q, 353L або 353Q.

Переважно заміщення являє собою таке заміщення, де заміщення являє собою D117N, H134Q, Q141E, I143F, D156V, V241I, V279M, L280I, F281V, Q298E, Q300R, N307D, G309D, G309W, L311I, D325M, H350N, Q352L, E352L, E352Q, K353L або K353Q.

30 У переважному варіанті здійснення заміщення являє собою таке заміщення, де заміщення являє собою:

F281V+V306I+I321L;
H134Q+I154L+D216S;
V261A+V263I+G309W+L311I+Y326F;
D156V+G309D+M314L+V317I;
35 H134Q+L280I+G309W;
R119Q+D156V+V375L;
Y79S+R119S+H204R;
Y79S+H134Q+Y365F+V375L;
Y194I+R213Q+G309D;
40 Y79S+D117N+I321L;
Y185F+D325M+E352Q;
Y79S+L224V+L311I;
S132F+H134Q+M200I+M215L+G221E;
F281V+G309W+S331Y+D337E;
45 D156V+G309D+M314L+V317I;
G128D+L188I+Y326F;
R119S+V241I+L280I+L311I+D325M;
R119Q+S284T+T297S+V306I+G309W
K279V+V281F;
50 Q298E+Q300R;
H350N+Q352E+K353L;
D307N+D309G; або
Q141E+I143F.

Виділений варіант верблюжого хімозину

55 Як обговорюється вище в робочих прикладах в цьому документі, одержують варіанти з використанням поліпептиду SEQ ID NO:2 (верблюжим хімозином) як вихідного поліпептиду; такий варіант може називатися в цьому документі "варіантом верблюжого хімозину".

Як обговорюється вище, четвертий аспект, відповідно, стосується виділеного варіанта поліпептиду хімозину, що містить:

(a): зміну в одному або декількох положеннях вихідного поліпептиду, що має активність хімозину, де зміна включає заміщення, делецію або інсерцію в положенні щонайменше однієї амінокислоти, відповідному будь-якому з положень 117, 134, 141, 143, 156, 241, 279, 280, 281, 298, 300, 307, 309, 311, 325, 350, 352 і 353; і

5 (b): де варіант має активність хімозину;
і де

(i): положення амінокислоти вихідного поліпептиду визначають за допомогою вирівнювання послідовностей вихідного поліпептиду з поліпептидом SEQ ID NO:1 (бичачим хімозином), тобто поліпептид SEQ ID NO:1 використовують для визначення відповідної послідовності амінокислот у вихідному поліпептиді; і

10 (ii): вихідний поліпептид має щонайменше 90 % ідентичність послідовностей зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO:2 (верблюжим хімозином); і

(iii): виділений варіант поліпептиду має менше, ніж 100 % ідентичність послідовностей зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO:2 (верблюжим хімозином).

15 Описані вище визначення і переважні варіанти здійснення є також релевантними для цього аспекту.

Переважно виділений варіант поліпептиду верблюжого хімозину, як описано в цьому документі, являє собою варіант, де варіант має активність хімозину, що дає вище відношення C/P порівняно з відношенням C/P верблюжого хімозину, що містить зрілий поліпептид SEQ ID NO:2.

20 У переважному варіанті здійснення вихідний поліпептид має щонайменше 92 % ідентичність послідовностей зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO:2 (верблюжим хімозином), більш переважно вихідний поліпептид має щонайменше 95 % ідентичність послідовностей зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO:2 (верблюжим хімозином), і ще більш переважно вихідний поліпептид має щонайменше 97 % ідентичність послідовностей зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO:2 (верблюжим хімозином).

Як зрозуміло фахівцеві в даній галузі в даному контексті, виділений варіант "хімозин" може містити зміни (наприклад, заміщення) в положеннях амінокислот інших, ніж наведено вище.

Наприклад, варіант верблюжого хімозину, наприклад, із 5-10 змінами (наприклад, заміщеннями) порівняно з поліпептидом верблюжого хімозину дикого типу SEQ ID NO:2 буде, як і раніше, являти собою вихідний поліпептид, який має щонайменше 95 % ідентичність послідовностей зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO:2 (верблюжим хімозином).

Може бути переважним, щоб виділений варіант верблюжого хімозину містив менше 30 змін амінокислот (наприклад, заміщень) порівняно зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO:2 (верблюжим хімозином), або може бути переважним, щоб виділений варіант верблюжого хімозину містив менше 20 змін амінокислот (наприклад, заміщень) порівняно зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO:2 (верблюжим хімозином), або може бути переважним, щоб виділений верблюжий варіант хімозину містив менше 10 змін амінокислот (наприклад, заміщень) порівняно зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO:2 (верблюжим хімозином), або може бути переважним, щоб виділений варіант верблюжого хімозину містив менше 5 змін амінокислот (наприклад, заміщень) порівняно зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO:2 (верблюжим хімозином).

Як зрозуміло фахівцеві в даній галузі в даному контексті, термін "виділений варіант поліпептиду має менше, ніж 100 % ідентичність послідовностей зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO:2 (верблюжим хімозином)" пункту (iii) вище стосується того, що описаний в цьому документі виділений варіант верблюжого хімозину, зрозуміло, не повинен містити послідовність поліпептидів, яка є на 100 % ідентичною загальновідомій послідовності верблюжого хімозину дикого типу SEQ ID NO:2.

Переважний варіант здійснення стосується виділеного варіанта поліпептиду верблюжого хімозину, де зміна включає заміщення, делецію або інсерцію в положенні щонайменше однієї амінокислоти, відповідному будь-якому з положень 134, 141, 143, 280, 281, 298, 300, 307, 309, 311, 352 і 353.

Може бути переважним, щоб щонайменше одна зміна являла собою заміщення, тобто релевантний для цього документа переважний варіант здійснення стосується виділеного варіанта поліпептиду хімозину, де зміна включає заміщення в положенні щонайменше однієї амінокислоти, відповідному будь-якому з положень 117, 134, 141, 143, 156, 241, 279, 280, 281, 298, 300, 307, 309, 311, 325, 350, 352 і 353.

Переважно виділений варіант поліпептиду хімозину, де зміна включає заміщення в положенні щонайменше однієї амінокислоти, відповідному будь-якому з положень 134, 141, 143, 280, 281, 298, 300, 307, 309, 311, 352 і 353.

Переважно заміщення являє собою таке заміщення, де заміщення являє собою 117N, 134Q, 141E, 143F, 156V, 241I, 279M, 280I, 281V, 298E, 300R, 307D, 309D, 309W, 311I, 325M, 350N, 352L, 352Q, 353L або 353Q.

5 Переважно заміщення являє собою таке заміщення, де заміщення являє собою 134Q, 141E, 143F, 280I, 281V, 298E, 300R, 307D, 309D, 309W, 311I, 352L, 352Q, 353L або 353Q.

Переважно заміщення являє собою таке заміщення, де заміщення являє собою D117N, H134Q, Q141E, I143F, D156V, V241I, V279M, L280I, F281V, Q298E, Q300R, N307D, G309D, G309W, L311I, D325M, H350N, Q352L, E352L, E352Q, K353L або K353Q.

10 У переважному варіанті здійснення заміщення являє собою таке заміщення, де заміщення являє собою:

F281V+V306I+I321L;

H134Q+I154L+D216S;

V261A+V263I+G309W+L311I+Y326F;

D156V+G309D+M314L+V317I;

15 H134Q+L280I+G309W;

R119Q+D156V+V375L;

Y79S+R119S+H204R;

Y79S+H134Q+Y365F+V375L;

Y194I+R213Q+G309D;

20 Y79S+D117N+I321L;

Y185F+D325M+E352Q;

Y79S+L224V+L311I;

S 132F+H134Q+M200I+M215L+G221E;

F281V+G309W+S331Y+D337E;

25 D156V+G309D+M314L+V317I;

G128D+L188I+Y326F;

R119S+V241I+L280I+L311I+D325M;

R119Q+S284T+T297S+V306I+G309W

K279V+V281F;

30 Q298E+Q300R;

H350N+Q352E+K353L;

D307N+D309G; або

Q141E+I143F.

Спосіб приготування продукту на основі молока

35 Як обговорюється вище, виділений варіант поліпептиду хімозину, як описано в цьому документі, може використовуватися відповідно до літератури, наприклад, для приготування продукту на основі молока, що становить інтерес (такого, наприклад, як сирний продукт).

Як обговорюється вище, один з аспектів даного винаходу стосується способу одержання харчового або кормового продукту, що включає додавання ефективної кількості виділеного варіанта поліпептиду хімозину, як описано в цьому документі, в харчові або кормові інгредієнти і здійснення додаткових стадій приготування з одержанням харчового або кормового продукту.

40 Переважно харчовий або кормовий продукт являє собою продукт на основі молока, і спосіб включає додавання ефективної кількості виділеного варіанта поліпептиду хімозину, як описано в цьому документі, в молоко і здійснення додаткових стадій приготування з одержанням продукту на основі молока.

Молоко може, наприклад, являти собою соєве молоко, овече молоко, козяче молоко, буйволине молоко, молоко яка, молоко лами, верблюже молоко або коров'яче молоко.

Продукт на основі молока може являти собою, наприклад, ферментований молочний продукт, столовий сир або сир.

50 Аспекти/варіанти здійснення в цьому документі представлені в форматі формули винаходу

Описані в цьому документі аспекти і переважні варіанти здійснення даного винаходу можуть бути представлені/описані в так званому форматі формули винаходу; це продемонстровано нижче.

1. Спосіб одержання варіанта виділеного поліпептиду хімозину, що включає стадії:

55 (а): здійснення зміни в одному або декількох положеннях вихідного поліпептиду, що має активність хімозину, де зміна включає заміщення, делецію або інсерцію в положенні щонайменше однієї амінокислоти, відповідному будь-якому з положень 117, 134, 141, 143, 156, 241, 279, 280, 281, 298, 300, 307, 309, 311, 325, 350, 352 і 353; і

60 (b): продукування і виділення зміненого поліпептиду зі стадії (а) і з одержанням при цьому виділеного варіанта поліпептиду хімозину, де варіант має активність хімозину;

і де

(i): положення амінокислоти вихідного поліпептиду визначають за допомогою вирівнювання послідовностей вихідного поліпептиду з поліпептидом SEQ ID NO:1 (бичачим хімозином), тобто поліпептид SEQ ID NO:1 використовують для визначення відповідної послідовності амінокислот у вихідному поліпептиді; і

(ii): вихідний поліпептид має щонайменше 65 % ідентичність послідовностей зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO:1 (бичачим хімозином), який містить амінокислоти від положення амінокислоти 59 до положення амінокислоти 381 SEQ ID NO:1.

2. Спосіб одержання варіанта виділеного поліпептиду хімозину за п. 1, де виділений варіант поліпептиду хімозину має:

- активність хімозину, що дає вище відношення C/P порівняно з відношенням C/P бичачого хімозину, що містить зрілий поліпептид SEQ ID NO:1; і

- активність хімозину, що дає вище відношення C/P порівняно з відношенням C/P верблюжого хімозину, що містить зрілий поліпептид SEQ ID NO:2.

3. Спосіб одержання варіанта виділеного поліпептиду хімозину за будь-яким з попередніх пунктів, де зміна включає заміщення, делецію або інсерцію в положенні щонайменше однієї амінокислоти, відповідному будь-якому з положень 134, 141, 143, 280, 281, 298, 300, 307, 309, 311, 352 і 353.

4. Спосіб одержання варіанта виділеного поліпептиду хімозину за будь-яким з попередніх пунктів, де зміна включає заміщення в положенні щонайменше однієї амінокислоти, відповідному будь-якому з положень 117, 134, 141, 143, 156, 241, 279, 280, 281, 298, 300, 307, 309, 311, 325, 350, 352 і 353.

5. Спосіб одержання варіанта виділеного поліпептиду хімозину за будь-яким з попередніх пунктів, де зміна включає заміщення в положенні щонайменше однієї амінокислоти, відповідному будь-якому з положень 134, 141, 143, 280, 281, 298, 300, 307, 309, 311, 352 і 353.

6. Спосіб одержання варіанта виділеного поліпептиду хімозину за п. 4, де заміщення являє собою 117N, 134Q, 141E, 143F, 156V, 241I, 279M, 280I, 281V, 298E, 300R, 307D, 309D, 309W, 311I, 325M, 350N, 352L, 352Q, 353L або 353Q.

7. Спосіб одержання варіанта виділеного поліпептиду хімозину за п. 6, де заміщення являє собою 134Q, 141E, 143F, 280I, 281V, 298E, 300R, 307D, 309D, 309W, 311I, 352L, 352Q, 353L або 353Q.

8. Спосіб одержання варіанта виділеного поліпептиду хімозину за п. 4, де заміщення являє собою D117N, H134Q, Q141E, I143F, D156V, V241I, V279M, L280I, F281V, Q298E, Q300R, N307D, G309D, G309W, L311I, D325M, H350N, Q352L, E352L, E352Q, K353L або K353Q.

9. Спосіб одержання варіанта виділеного поліпептиду хімозину за п. 8, де заміщення являє собою H134Q, Q141E, I143F, L280I, F281V, Q298E, Q300R, N307D, G309D, G309W, L311I, Q352L, E352L, E352Q, K353L або K353Q.

10. Спосіб одержання варіанта виділеного поліпептиду хімозину за п. 4, де заміщення являє собою:

F281V+V306I+I321L;
 H134Q+I154L+D216S;
 V261A+V263I+G309W+L311I+Y326F;
 D156V+G309D+M314L+V317I;
 H134Q+L280I+G309W;
 R119Q+D156V+V375L;
 Y79S+R119S+H204R;
 Y79S+H134Q+Y365F+V375L;
 Y194I+R213Q+G309D;
 Y79S+D117N+I321L;
 Y185F+D325M+E352Q;
 Y79S+L224V+L311I;
 S132F+H134Q+M200I+M215L+G221E;
 F281V+G309W+S331Y+D337E;
 D156V+G309D+M314L+V317I;
 G128D+L188I+Y326F;
 R119S+V241I+L280I+L311I+D325M;
 R119Q+S284T+T297S+V306I+G309W;
 K279V+V281F;
 Q298E+Q300R;
 H350N+Q352E+K353L;

D307N+D309G; або
Q141E+I143F.

11. Спосіб одержання варіанта виділеного поліпептиду хімозину за будь-яким з попередніх пунктів, де вихідний поліпептид має щонайменше 75 % ідентичність послідовностей зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO:1 (бичачим хімозином).

12. Спосіб одержання варіанта виділеного поліпептиду хімозину за п. 11, де вихідний поліпептид має щонайменше 95 % ідентичність послідовностей зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO:1 (бичачим хімозином).

13. Спосіб одержання варіанта виділеного поліпептиду хімозину за будь-яким з пп. 1-10, де вихідний поліпептид має щонайменше 95 % ідентичність послідовностей зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO:2 (верблужим хімозином), який містить амінокислоти від положення амінокислоти 59 до положення амінокислоти 381 SEQ ID NO:2.

14. Виділений варіант поліпептиду хімозину, одержаний способом за будь-яким з пп. 1-13.

15. Виділений варіант поліпептиду хімозину, що містить:

(a): зміну в одному або декількох положеннях вихідного поліпептиду, що має активність хімозину, де зміна включає заміщення, делецію або інсерцію в положенні щонайменше однієї амінокислоти, відповідному будь-якому з положень 117, 134, 141, 143, 156, 241, 279, 280, 281, 298, 300, 307, 309, 311, 325, 350, 352 і 353; і

(b): де варіант має активність хімозину;

і де

(i): положення амінокислоти вихідного поліпептиду визначають за допомогою вирівнювання послідовностей вихідного поліпептиду з поліпептидом SEQ ID NO:1 (бичачим хімозином), тобто поліпептид SEQ ID NO:1 використовують для визначення відповідної послідовності амінокислот у вихідному поліпептиді; і

(ii): вихідний поліпептид має щонайменше 90 % ідентичність послідовностей зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO:1 (бичачим хімозином), який містить амінокислоти від положення амінокислоти 59 до положення амінокислоти 381 SEQ ID NO:1; і

(iii): виділений варіант поліпептиду має менше, ніж 100 % ідентичність послідовностей зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO:1 (бичачим хімозином).

16. Виділений варіант поліпептиду хімозину за п. 15, де виділений варіант має активність хімозину, що дає вище відношення C/P порівняно з відношенням C/P бичачого хімозину, що містить зрілий поліпептид SEQ ID NO:1.

17. Виділений варіант поліпептиду хімозину за будь-яким з пп. 15-16, де вихідний поліпептид має щонайменше 97 % ідентичність послідовностей зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO:1 (бичачим хімозином).

18. Виділений варіант поліпептиду хімозину за будь-яким з пп. 15-17, де виділений варіант бичачого хімозину містить менше 10 змін амінокислот (наприклад, заміщення) порівняно зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO:1 (бичачим хімозином).

19. Виділений варіант поліпептиду хімозину за будь-яким з пп. 15-18, де зміна включає заміщення, делецію або інсерцію в положенні щонайменше однієї амінокислоти, відповідному будь-якому з положень 134, 141, 143, 280, 281, 298, 300, 307, 309, 311, 352 і 353.

20. Виділений варіант поліпептиду хімозину за будь-яким з пп. 15-19, де зміна включає заміщення в положенні щонайменше однієї амінокислоти, відповідному будь-якому з положень 117, 134, 141, 143, 156, 241, 279, 280, 281, 298, 300, 307, 309, 311, 325, 350, 352 і 353.

21. Виділений варіант поліпептиду хімозину за п. 20, де зміна включає заміщення в положенні щонайменше однієї амінокислоти, відповідному будь-якому з положень 134, 141, 143, 280, 281, 298, 300, 307, 309, 311, 352 і 353.

22. Виділений варіант поліпептиду хімозину за п. 20, де заміщення являє собою 117N, 134Q, 141 E, 143F, 156V, 241I, 279M, 280I, 281V, 298E, 300R, 307D, 309D, 309W, 311I, 325M, 350N, 352L, 352Q, 353L або 353Q.

23. Виділений варіант поліпептиду хімозину за п. 22, де заміщення являє собою 134Q, 141 E, 143F, 280I, 281V, 298E, 300R, 307D, 309D, 309W, 311I, 352L, 352Q, 353L або 353Q.

24. Виділений варіант поліпептиду хімозину за п. 22, де заміщення являє собою D117N, H134Q, Q141E, I143F, D156V, V241I, V279M, L280I, F281V, Q298E, Q300R, N307D, G309D, G309W, L311I, D325M, H350N, Q352L, E352L, E352Q, K353L або K353Q.

25. Виділений варіант поліпептиду хімозину за п. 20, де заміщення являє собою:

F281V+V306I+I321L;

H134Q+I154L+D216S;

V261A+V263I+G309W+L311I+Y326F;

D156V+G309D+M314L+V317I;

- H134Q+L280I+G309W;
 R119Q+D156V+V375L;
 Y79S+R119S+H204R;
 Y79S+H134Q+Y365F+V375L;
 5 Y194I+R213Q+G309D;
 Y79S+D117N+I321L;
 Y185F+D325M+E352Q;
 Y79S+L224V+L311I;
 S132F+H134Q+M200I+M215L+G221E;
 10 F281V+G309W+S331Y+D337E;
 D156V+G309D+M314L+V317I;
 G128D+L188I+Y326F;
 R119S+V241I+L280I+L311I+D325M;
 R119Q+S284T+T297S+V306I+G309W
 15 K279V+V281F;
 Q298E+Q300R;
 H350N+Q352E+K353L;
 D307N+D309G; або
 Q141E+I143F.
 20 26. Виділений варіант поліпептиду хімозину, що містить:
 (а): зміну в одному або декількох положеннях вихідного поліпептиду, що має активність хімозину, де зміна включає заміщення, делецію або інсерцію в положенні щонайменше однієї амінокислоти, відповідному будь-якому з положень 117, 134, 141, 143, 156, 241, 279, 280, 281, 298, 300, 307, 309, 311, 325, 350, 352 і 353; і
 25 (b): де варіант має активність хімозину;
 і де
 (i): положення амінокислоти вихідного поліпептиду визначають за допомогою вирівнювання послідовностей вихідного поліпептиду з поліпептидом SEQ ID NO:1 (бичачим хімозином), тобто поліпептид SEQ ID NO:1 використовують для визначення відповідної послідовності амінокислот у вихідному поліпептиді; і
 30 (ii): вихідний поліпептид має щонайменше 90 % ідентичність послідовностей зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO:2 (верблюжим хімозином), який містить амінокислоти від положення амінокислоти 59 до положення амінокислоти 381 SEQ ID NO:2; і
 (iii): виділений варіант поліпептиду має менше, ніж 100 % ідентичність послідовностей зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO:2 (верблюжим хімозином).
 35 27. Виділений варіант поліпептиду хімозину за п. 26, де виділений варіант має активність хімозину, що дає вище відношення C/P порівняно з відношенням C/P верблюжого хімозину, що містить зрілий поліпептид SEQ ID NO:2.
 28. Виділений варіант поліпептиду хімозину за будь-яким з пп. 26-27, де вихідний поліпептид
 40 має щонайменше 97 % ідентичність послідовностей зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO:2 (верблюжим хімозином).
 29. Виділений варіант поліпептиду хімозину за будь-яким з пп. 26-28, де виділений варіант верблюжого хімозину містить менше 10 змін амінокислот (наприклад, заміщення) порівняно зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO:2 (верблюжим хімозином).
 45 30. Виділений варіант поліпептиду хімозину за будь-яким з пп. 26-29, де зміна включає заміщення, делецію або інсерцію в положенні щонайменше однієї амінокислоти, відповідному будь-якому з положень 134, 141, 143, 280, 281, 298, 300, 307, 309, 311, 352 і 353.
 31. Виділений варіант поліпептиду хімозину за будь-яким з пп. 26-30, де зміна включає заміщення в положенні щонайменше однієї амінокислоти, відповідному будь-якому з положень
 50 117, 134, 141, 143, 156, 241, 279, 280, 281, 298, 300, 307, 309, 311, 325, 350, 352 і 353.
 32. Виділений варіант поліпептиду хімозину за п. 31, де зміна містить заміщення в положенні щонайменше однієї амінокислоти, відповідному будь-якому з положень 134, 141, 143, 280, 281, 298, 300, 307, 309, 311, 352 і 353.
 33. Виділений варіант поліпептиду хімозину за п. 31, де заміщення являє собою 117N, 134Q,
 55 141E, 143F, 156V, 241I, 279M, 280I, 281V, 298E, 300R, 307D, 309D, 309W, 311I, 325M, 350N, 352L, 352Q, 353L або 353Q.
 34. Виділений варіант поліпептиду хімозину за п. 33, де заміщення являє собою 134Q, 141E, 143F, 280I, 281V, 298E, 300R, 307D, 309D, 309W, 311I, 352L, 352Q, 353L або 353Q.

35. Виділений варіант поліпептиду хімозину за п. 33, де заміщення являє собою D117N, H134Q, Q141E, I143F, D156V, V241I, V279M, L280I, F281V, Q298E, Q300R, N307D, G309D, G309W, L311I, D325M, H350N, Q352L, E352L, E352Q, K353L або K353Q.

36. Виділений варіант поліпептиду хімозину за п. 31, де заміщення являє собою:

5 F281V+V306I+I321L;
H134Q+I154L+D216S;
V261A+V263I+G309W+L311I+Y326F;
D156V+G309D+M314L+V317I;
H134Q+L280I+G309W;
10 R119Q+D156V+V375L;
Y79S+R119S+H204R;
Y79S+H134Q+Y365F+V375L;
Y194I+R213Q+G309D;
Y79S+D117N+I321L;
15 Y185F+D325M+E352Q;
Y79S+L224V+L311I;
S132F+H134Q+M200I+M215L+G221E;
F281V+G309W+S331Y+D337E;
D156V+G309D+M314L+V317I;
20 G128D+L188I+Y326F;
R119S+V241I+L280I+L311I+D325M;
R119Q+S284T+T297S+V306I+G309W
K279V+V281F;
Q298E+Q300R;
25 H350N+Q352E+K353L;
D307N+D309G або
Q141E+I143F.

37. Спосіб приготування харчового або кормового продукту, що включає додавання ефективною кількості виділеного варіанта поліпептиду хімозину за будь-яким з пп. 14-36 в харчовий або кормовий інгредієнт (інгредієнти) і здійснення додаткових стадій приготування з одержанням харчового або кормового продукту.

38. Спосіб приготування харчового або кормового продукту за п. 37, де продукт являє собою продукт на основі молока і де спосіб включає додавання ефективною кількості виділеного варіанта поліпептиду хімозину за будь-яким з пп. 14-36 в молоко і здійснення додаткових стадій приготування з одержанням продукту на основі молока.

39. Спосіб приготування продукту на основі молока за п. 38, де молоко являє собою соєве молоко, овече молоко, козяче молоко, буйволине молоко, молоко яка, молоко лами, верблюже молоко або коров'яче молоко.

40. Спосіб приготування продукту на основі молока за будь-яким з пп. 38-39, де продукт на основі молока являє собою ферментований молочний продукт, столовий сир або сир.

Приклади

Приклад 1

Вирівнювання і нумерація послідовностей білків хімозину і послідовностей варіантів

45 Послідовності білків хімозину поєднуються з використанням алгоритму ClustalW, як передбачається EBI (EBI, інструменти, множинне вирівнювання послідовностей, CLUSTALW", <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) і як описано в Larkin M.A, Blackshields G, Brown N.P, Chenna R, McGettigan P.A, McWilliam H, Valentin F, Wallace I.M, Wilm A, Lopez R, Thompson J.D, Gibson T.J, Higgins D.G (2007). Bio-informatics 23(21), 2947-2948.

50 Налаштування ClustalW2 для множинного вирівнювання послідовностей, для послідовностей, являють собою Protein weight Matrix=BLOSUM, GAP open=10, GAP EXTENSION=0,05, GAP DISTANCES=8, No End Gaps, ITERATION=none, NUMITER=1, CLUSTERING=NJ

Як еталонну послідовність для бичачого хімозину В використовують препрохімозин (Genbank accession number P00794 описується в цьому документі як SEQ ID NO:1), де N-кінцевий метіонін має номер 1 (MRCL...) і де C-кінцевий ізолейцин (в послідовності білка ...LAKAI) має номер 381. Варіанти поєднуються порівняно з бичачим препрохімозином В, і залишки нумеруються відповідно до відповідного залишку бичачого хімозину.

Приклад 2

Конструювання варіантів хімозину

60 Варіанти хімозину конструюють із використанням різних стратегій.

Коли тут згадується верблюжий хімозин, тут згадується верблюжий хімозин, що містить поліпептиди SEQ ID NO:2 в цьому документі.

Верблюжий хімозин SEQ ID NO:2 можна розглядати як релевантний для цього документа вихідний поліпептид, що має активність хімозину, що використовується для одержання його

Коли тут згадується бичачий хімозин, тут згадується бичачий хімозин, що містить поліпептид SEQ ID NO:1 в цьому документі.

Бичачий хімозин SEQ ID NO:1 можна розглядати як релевантний для цього документа вихідний поліпептид, що має активність хімозину, що використовується для одержання його

Варіанти верблюжого хімозину конструюють на основі вирівнювання послідовностей великої множини загальновідомих послідовностей аспарагінпротеази, що мають ідентичність 25 % або більше, порівняно з бичачим хімозином В.

Зміни, як правило, вводяться у гіперваріабельних областях, в той час як консервативні області не змінюються. Множину змін вводять в кожний конструкт варіанта, забезпечуючи те, що кожна окрема мутація присутня у множині конструктів варіантів (відносно обговорення результатів - див. приклад 6 нижче).

Варіанти бичачого хімозину конструюють на основі порівняння бичачого і верблюжого хімозину. Бичачі залишки, наприклад, змінюють на відповідні їм верблюжі залишки (відносно обговорення результатів - див. приклад 7 нижче).

Приклад 3

Приготування ферментативного матеріалу для варіантів хімозину

Всі варіанти хімозину синтезують як синтетичні гени і клонують в грибовий вектор експресії, відповідний в основному рGAM pR-C (описаний в WO 02/36752A2).

Вектори трансформують в *E. Coli*, і плазмиду ДНК очищують з використанням стандартних протоколів молекулярної біології, відомих фахівцям в даній галузі.

Плазмиди варіантів індивідуально трансформують у штам *Aspergillus niger*, і білок продукують в основному, як описано в WO 02/36752A2, і очищують з використанням стандартних хроматографічних методик.

Як відомо з літератури, фахівець в даній галузі може ґрунтуватися на цих загальнодоступних загальних знаннях; продукують і очищують хімозин і варіанти хімозину, такі, як описані в цьому документі варіанти бичачого і верблюжого хімозину.

Приклад 4

Визначення питомої активності хімозину

4.1 Визначення активності згортання

Молокозгортальну активність визначають із використанням методу REMCAT, який являє собою стандартний метод, розроблений International Dairy Federation (метод IDF). Молокозгортальну активність визначають за часом, необхідним для видимої флокуляції стандартного субстрату молока, одержаного з порошку знежиреного молока низькотемпературного сушіння за допомогою розчину хлориду кальцію, 0,5 г на літр (pH≈6,5). Час згортання для зразка сичужного ферменту порівнюють згодом для еталонного стандарту, що має відому молокозгортальну активність і що має таку ж композицію ферментів згідно з IDF Standard 110B, як зразок. Зразки і еталонні стандарти вимірюють при ідентичних хімічних і фізичних умовах. Зразки варіантів доводять приблизно до 3 IMCU/мл з використанням 84 мМ буфера на основі оцтової кислоти, pH 5,5. Потім 200 мкл ферменту додають до 10 мл попередньо нагрітого молока (32 °C) в скляній пробірці, вміщеній на водяну баню, здатну підтримувати постійну температуру 32 °C±1 °C, при постійному перемішуванні.

Загальну молокозгортальну активність (міцність) сичужного ферменту обчислюють в International Milk-Clotting Units (IMCU) на мл відносно стандарту, що має таку ж композицію ферментів, як зразок, відповідно до формули:

$$\text{Міцність в IMCU/мл} = \frac{S_{\text{standard}} \times T_{\text{standard}}}{D_{\text{sample}} \times T_{\text{sample}}}$$

Sstandard:	Молокозгортальна активність міжнародного еталонного стандарту для сичужного ферменту
Tstandard:	Час згортання в секундах, одержаний для стандартного розбавлення
Dsample:	Коефіцієнт розбавлення для зразка
Dstandard:	Коефіцієнт розбавлення для стандарту
Tsample:	Час згортання в секундах, одержаний для розбавленого зразка сичужного ферменту від додавання ферменту до часу флокуляції

4.2 Визначення загального вмісту білка

Загальний вміст білка визначають із використанням Pierce BCA Protein Assay Kit від Thermo Scientific, слідуючи інструкціям виробника.

4.3 Обчислення питомої активності згортання

Питому активність згортання (IMCU/мг білка загалом) визначають за допомогою розподілу активності згортання (IMCU/мл) на загальний вміст білка (мг білка загалом на мл).

Приклад 5

Визначення протеолітичної активності

Загальну протеолітичну активність вимірюють із використанням флуоресцентно міченого казеїну Bodipy-FL як субстрата (EnzChek; Molecular Bioprobes, E6638). Похідні казеїну, сильно мічені рН-нечутливим зеленим-флуоресцентним Bodipy-FL, дають в результаті майже повне гасіння флуоресценції кон'югату. Гідроліз, який каталізується протеазою, вивільняє флуоресцентний Bodipy-FL. Цей спосіб є дуже чутливим, що є головним для цього експерименту, оскільки CHYMAX M має найнижчу загальну протеолітичну активність з усіх коагулянтів, відомих до теперішнього часу.

Аналіз здійснюють в 0,2 М фосфатному буфері, доведеному до бажаного значення рН, при кінцевій концентрації субстрат 0,04 мг/мл. Перед змішуванням 1 частини субстрату з 1 частиною ферменту обидві готують у фосфатному буфері, всі варіанти ферментів нормують на 50 IMCU/мл (відповідно до прикладу 4). Субстрат і фермент змішують в 96-яткових планшетах для мікротитрування Nunc Fluoro, герметизують і інкубують при 32 °C протягом 60 хв. Після інкубування герметизацію знімають і флуоресценцію реєструють на флуориметрі.

Приклад 6

Оцінка варіантів верблюжого хімозину

Для всіх варіантів питому активність згортання (IMCU/мг білка загалом) визначають при рН 6,5 відповідно до прикладу 4. Варіанти ранкірують з використанням наступної стратегії. Варіант з найнижчою питомою активністю дає один пункт, другий знизу дає два пункти, і так далі.

Таку ж стратегію ранкірування здійснюють для відношення С/Р. Відношення С/Р визначають для всіх варіантів при рН 6,5 за допомогою ділення питомої активності згортання (IMCU/мг) на протеолітичну активність.

Визначають загальну кількість пунктів для кожного варіанта з використанням обох стратегій ранкірування, і кінцеве ранкірування здійснюють на основі суми пунктів.

Як еталон включені верблюжий ген дикого типу і бичачий ген дикого типу.

H05-3	42453	F281V	V306I	I321L	x	x	213
G01-1	42419	H134Q	I154L	D216S	x	x	210
G10-2	42492	V261A	V263I	G309W	L311I	Y326F	204
A09-2	42478	D156V	G309D	M314L	V317I	x	203
E01-1	42416	H134Q	L280I	G309W	x	x	200
G03-2	42436	R119Q	D156V	V375L	x	x	197
B06-2	42455	Y79S	R119S	H204R	x	x	195

B09-2	42479	Y79S	H134Q	Y365F	V375L	x	194
G02-1	42427	Y194I	R213Q	G309D	x	x	194
G04-1	42444	Y79S	D117N	I321L	x	x	193
H02-1	42428	Y185F	D325M	E352Q	x	x	189
A04-2	42438	Y79S	L224V	L311I	x	x	186
H10-2	42493	S132F	H134Q	M200I	M215L	G221E	186
H08-1	42477	F281V	G309W	S331Y	D337E	x	185
A09-2	42478	D156V	G309D	M314L	V317I	x	184
H01-1	42420	G128D	L188I	Y326F	x	x	182
G11-1	42500	R119S	V241I	L280I	L311I	D325M	181
H11-2	42501	R119Q	S284T	T297S	V306I	G309W	178
Верблюды	42404	x	x	x	x	x	174
G08-2	42476	Q246E	G309D	S329P	D337E	x	174
G06-1	42460	D156V	M215L	V241I	x	x	170
H09-1	42485	R125Q	G128N	H204R	Q246E	S284T	168
H07-2	42469	D117N	V263I	L280I	V306I	x	167
E06-2	42458	G128D	T244S	L311I	x	x	151
C03-2	42431	V90L	I154L	S335N	x	x	148
B07-1	42463	V194I	V279M	L280I	S284T	x	147
A03-2	42429	Y185F	R213Q	Q246E	x	x	146
E05-2	42450	D117N	S329P	T342S	x	x	145
H06-2	42461	G128N	R312S	S313Y	Y326F	x	145
B03-2	42430	R125Q	V279M	M314L	x	x	143
B10-1	42487	D216S	L224V	V263I	F281V	G309D	143
F01-1	42417	V90L	R119Q	H204R	x	x	143
E03-3	42433	H134Q	K289N	G302D	x	x	142
A02-2	42421	I154L	G221E	V279M	x	x	136
F07-2	42467	T297S	I321L	D325M	T342S	x	135
C11-2	42496	G128D	I154L	I258V	D325M	D337E	132
D02-1	42424	V261A	S331Y	L353K	x	x	132
A04-2	42438	Y79S	L224V	L311I	x	x	131
B01-1	42413	N108K	L280I	S313Y	x	x	131
D12-1	42506	S190A	V279M	S313Y	S331Y	V375L	130
A09-2	42478	D156V	G309D	M314L	V317I	x	129
F09-1	42483	V90L	E352Q	R374L	V375L	x	129
B12-1	42504	N108K	D117N	M215L	M314L	G347S	128
D11-1	42497	D156V	H204R	V261A	I321L	S329P	128
F06-2	42459	D117N	V261A	R312S	x	x	125
H12-1	42502	V90L	L188I	R203Q	L280I	D337E	124
D04-2	42441	L188I	G221E	Y365F	x	x	123

E07-2	42466	R119Q	V279K	K289N	D325M	x	123
C02-2	42423	R119S	R125Q	K289N	x	x	122
D05-1	42449	R119S	L224V	T297S	x	x	122
C08-1	42472	F281V	K289N	L311I	S313Y	x	117
B02-1	42422	S132F	S180A	R203Q	x	x	115

Термін "X" означає відсутність змін, тобто відсутність мутації.

- 5 Оскільки всі варіанти включають множину мутацій, дані за ранжированими варіантами досліджують детальніше з використанням статистичних методів і 3D структурного аналізу для визначення індивідуальних змін амінокислот, які мають позитивний або негативний вплив. У цьому дослідженні також оцінюються/включаються бичачі варіанти, що обговорюються в прикладі 7, нижче.

Ідентифікуються наступні мутації:

10

D117N	++ Основний сегмент
H134Q	++ Відкритий сегмент
L280I	++ У заглибленні
D156V	+ Основний
V241I	+ Основний
D325M	+ Основний
R374L	-- Основний
K289N	-- Загнутий край з іншого боку
V279K	-- В заглибленні
G302D	-- Загнутий край
L353K	- Вхід у заглиблення
L311I	++ Нижня частина заглиблення
G309W	+ Зовнішній малий сегмент
G309D	+
V279M	+

Термін «+» стосується позитивної зміни амінокислоти, тобто «++» є більш позитивним, ніж «+».

Термін «-» стосується негативної зміни амінокислоти, тобто «--» є більш негативним, ніж «-».

- 15 Описи в правому стовпчику таблиці стосуються того, де саме знаходяться індивідуальні мутації в 3D структурі бичачого хімозину. 3D структура бичачого хімозину є загальнодоступною. Як приклад на фігурі 2 показано, де саме положення 296 і 294 амінокислот присутні в бичачому хімозині.

Висновки

- 20 Наведені вище результати демонструють, що наступні мутації у верблюжому хімозині є позитивними (тобто поліпшують відношення C/P порівняно з верблюжим хімозином дикого типу):

D117N

H134Q

25

L280I

D156V

V241I

D325M

L311I

30

G309W

G309D

V279M

Приклад 7

Оцінка варіантів бичачого хімозину

35

Варіанти бичачого хімозину оцінюють на основі їх відношення C/P тільки при pH 6,5.

	Мутації, бичачий → верблюжий	Протеолітична активність	Активність згортання/мг	С/Р
3	K279V, V281F	127,237	37	0,3
4	Q298E, Q300R	59,942	241	4,0
6	H350N, Q352E, K353L	106,417	191	1,8
7	D307N, D309G	56,349	47	0,8
8	Q141E, I143F	91,011	176	1,9
Бичачий (3327)	Немає	124,237	157	1,3
Верблюжий (A01)	Немає	53,354	197	3,7

Оскільки всі варіанти включають множину мутацій, то і дані ранжированих варіантів досліджують детальніше з використанням статистичних методів і 3D структурного аналізу, для визначення індивідуальних змін амінокислот, які мають позитивний або негативний вплив. У цьому дослідженні також оцінюються/включаються верблюжі варіанти, що обговорюються в прикладі 6.

Ідентифікують наступні позитивні мутації бичачого хімозину:

Q298E	++
Q300R	++
H350N	+
K353L	+
Q141E	+
I143F	+

Термін «+» стосується позитивної зміни амінокислоти, тобто «++» є більш позитивним, ніж «+».

Термін «-» стосується негативної зміни амінокислоти, тобто «--» є більш негативним, ніж «-».

Висновки

Наведені вище результати демонструють, що наступні мутації в бичачому хімозині є позитивними (тобто поліпшують відношення С/Р порівняно з бичачим хімозином дикого типу):

Q300R

H350N

K353L

Q141E

I143F

Приклад 8

Положення для одержання позитивної мутації в хімозині

Порівняльна оцінка результатів, описаних в прикладах 6 і 7, дає в результаті наступні дані.

Ділянка каталітичного заглиблення 279-281

Як показано в прикладі 7, подвійна мутація K279V і V281F в бичачому хімозині дає в результаті негативний вплив на відношення С/Р. У верблюжому хімозині мутація V279K також дає в результаті негативний результат (приклад 6). Отже, можна зробити висновок, що оптимальна амінокислота в положенні 281 являє собою V. Спостерігається також, що мутація L280I у верблюда має позитивний вплив.

Ділянка малого сегмента 298-300

Як показано в прикладі 7, подвійна мутація Q298E і Q300R в бичачому хімозині має позитивний вплив на відношення С/Р.

Ділянка каталітичного заглиблення 350-353

Як показано в прикладі 7, потрібна мутація H350N, Q352E і K353L в бичачому хімозині має позитивний вплив на відношення С/Р.

У верблюжому хімозині спостерігають (приклад 6), що L353Q має позитивний вплив, в той час як L353K має негативний вплив.

Ділянка малого сегмента 307-311

Як показано в прикладі 7, подвійна мутація D307N і D309G в бичачому хімозині має негативний вплив на відношення С/Р.

У верблюжому хімозині G309D і G309W мають позитивний вплив. Це означає, що мутація D307N в бичачому хімозині є відповідальною за негативний вплив. У верблюжому хімозині мутація L311I, як показано, має позитивні впливи.

Ділянка основного сегмента 134-143

- 5 Як показано в прикладі 7, подвійна мутація Q141E і I143F в бичачому хімозині має позитивний вплив на відношення C/P.

Зміна H134 в Q у верблюжому хімозині, як показано, має корисний вплив

Положення	Переважаючі амінокислоти
280	I
281	V
298	E
300	R
352	Q (менш переважна L)
309	D або W
307	D
141	E
143	F
353	Q
352	Q
311	I
134	Q

- 10 Посилання

1: WO 02/36752A2 (Chr. Hansen)

2: Suzuki et al: Site directed mutagenesis reveals functional contribution of Thr218, Lys220 and Asp304 in chymosin, Protein Engineering, vol. 4, January 1990, pages 69-71.

- 15 3: Suzuki et al: Alteration of catalytic properties of chymosin by site-directed mutagenesis, Protein Engineering, vol. 2, May 1989, pages 563-569.

4: van den Brink et al: Increased production of chymosin by glycosylation, Journal of biotechnology, vol. 125, September 2006, pages 304-310.

5: Pitts et al: Expression and characterization of chymosin pH optima mutants produced in Tricoderma reesei, Journal of biotechnology, vol. 28, March 1993, pages 69-83.

- 20 6: M. G. Williams et al: Mutagenesis, biochemical characterization and X-ray structural analysis of point mutants of bovine chymosin, Protein engineering design and selection, vol. 10, September 1997, pages 991-997.

- 25 7: Strop et al: Engineering enzyme subsite specificity: preparation, kinetic characterization, and x-ray analysis at 2.0 Å resolution of Val111Phe site mutated calf chymosin, Biochemistry, vol. 29, October 1990, pages 9863-9871.

8: Supanee et al: Site-specific mutations of calf chymosin B which influence milk-clotting activity, Food Chemistry, vol. 62, June 1998, pages 133-139.

9: Zhang et al: Functional implications of disulfide bond, Cys45-Cys50, in recombinant prochymosin, Biochimica et biophysica acta, vol. 1343, December 1997, pages 278-286.

- 30

MI_11174_pos1

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Chr. Hansen A/S

<120> ВАРІАНТИ ХІМОЗИНУ З ПОЛІПШЕНИМИ МОЛОКОЗГОРТАЛЬНИМИ ВЛАСТИВОСТЯМИ

<130> P4629PC00

<160> 2

<170> BISSAP 1.0

<210> 1

<211> 381

<212> Білок

<213> Bos taurus

<220>

<221> ДЖЕРЕЛО

<222> 1..381

<223> /тип_молекули="білок"

/організм="Bos taurus"

<400> 1

```

Met Arg Cys Leu Val Val Leu Leu Ala Val Phe Ala Leu Ser Gln Gly
1      5      10      15
Ala Glu Ile Thr Arg Ile Pro Leu Tyr Lys Gly Lys Ser Leu Arg Lys
20      25      30
Ala Leu Lys Glu His Gly Leu Leu Glu Asp Phe Leu Gln Lys Gln Gln
35      40      45
Tyr Gly Ile Ser Ser Lys Tyr Ser Gly Phe Gly Glu Val Ala Ser Val
50      55      60
Pro Leu Thr Asn Tyr Leu Asp Ser Gln Tyr Phe Gly Lys Ile Tyr Leu
65      70      75      80
Gly Thr Pro Pro Gln Glu Phe Thr Val Leu Phe Asp Thr Gly Ser Ser
85      90      95
Asp Phe Trp Val Pro Ser Ile Tyr Cys Lys Ser Asn Ala Cys Lys Asn
100     105     110
His Gln Arg Phe Asp Pro Arg Lys Ser Ser Thr Phe Gln Asn Leu Gly
115     120     125
Lys Pro Leu Ser Ile His Tyr Gly Thr Gly Ser Met Gln Gly Ile Leu
130     135     140
Gly Tyr Asp Thr Val Thr Val Ser Asn Ile Val Asp Ile Gln Gln Thr
145     150     155     160
Val Gly Leu Ser Thr Gln Glu Pro Gly Asp Val Phe Thr Tyr Ala Glu
165     170     175
Phe Asp Gly Ile Leu Gly Met Ala Tyr Pro Ser Leu Ala Ser Glu Tyr
180     185     190
Ser Ile Pro Val Phe Asp Asn Met Met Asn Arg His Leu Val Ala Gln
195     200     205
Asp Leu Phe Ser Val Tyr Met Asp Arg Asn Gly Gln Glu Ser Met Leu
210     215     220
Thr Leu Gly Ala Ile Asp Pro Ser Tyr Tyr Thr Gly Ser Leu His Trp
225     230     235     240
Val Pro Val Thr Val Gln Gln Tyr Trp Gln Phe Thr Val Asp Ser Val
245     250     255
Thr Ile Ser Gly Val Val Val Ala Cys Glu Gly Gly Cys Gln Ala Ile
260     265     270
Leu Asp Thr Gly Thr Ser Lys Leu Val Gly Pro Ser Ser Asp Ile Leu
275     280     285
Asn Ile Gln Gln Ala Ile Gly Ala Thr Gln Asn Gln Tyr Gly Glu Phe
290     295     300
Asp Ile Asp Cys Asp Asn Leu Ser Tyr Met Pro Thr Val Val Phe Glu
305     310     315     320
Ile Asn Gly Lys Met Tyr Pro Leu Thr Pro Ser Ala Tyr Thr Ser Gln
325     330     335
Asp Gln Gly Phe Cys Thr Ser Gly Phe Gln Ser Glu Asn His Ser Gln
340     345     350

```

```

                                MI_11174_pos1
Lys Trp Ile Leu Gly Asp Val Phe Ile Arg Glu Tyr Tyr Ser Val Phe
      355      360      365
Asp Arg Ala Asn Asn Leu Val Gly Leu Ala Lys Ala Ile
      370      375      380

<210> 2
<211> 381
<212> Білок
<213> Camelus dromedarius

<220>
<221> ДЖЕРЕЛО
<222> 1..381
<223> //тип_молекули="білок"
      /організм="Camelus dromedarius"

<400> 2
Met Arg Cys Leu Val Val Leu Leu Ala Ala Leu Ala Leu Ser Gln Ala
1      5      10      15
Ser Gly Ile Thr Arg Ile Pro Leu His Lys Gly Lys Thr Leu Arg Lys
      20      25      30
Ala Leu Lys Glu Arg Gly Leu Leu Glu Asp Phe Leu Gln Arg Gln Gln
      35      40      45
Tyr Ala Val Ser Ser Lys Tyr Ser Ser Leu Gly Lys Val Ala Arg Glu
      50      55      60
Pro Leu Thr Ser Tyr Leu Asp Ser Gln Tyr Phe Gly Lys Ile Tyr Ile
      65      70      75      80
Gly Thr Pro Pro Gln Glu Phe Thr Val Val Phe Asp Thr Gly Ser Ser
      85      90      95
Asp Leu Trp Val Pro Ser Ile Tyr Cys Lys Ser Asn Val Cys Lys Asn
      100      105      110
His His Arg Phe Asp Pro Arg Lys Ser Ser Thr Phe Arg Asn Leu Gly
      115      120      125
Lys Pro Leu Ser Ile His Tyr Gly Thr Gly Ser Met Glu Gly Phe Leu
      130      135      140
Gly Tyr Asp Thr Val Thr Val Ser Asn Ile Val Asp Pro Asn Gln Thr
      145      150      155      160
Val Gly Leu Ser Thr Glu Gln Pro Gly Glu Val Phe Thr Tyr Ser Glu
      165      170      175
Phe Asp Gly Ile Leu Gly Leu Ala Tyr Pro Ser Leu Ala Ser Glu Tyr
      180      185      190
Ser Val Pro Val Phe Asp Asn Met Met Asp Arg His Leu Val Ala Arg
      195      200      205
Asp Leu Phe Ser Val Tyr Met Asp Arg Asn Gly Gln Gly Ser Met Leu
      210      215      220
Thr Leu Gly Ala Ile Asp Pro Ser Tyr Tyr Thr Gly Ser Leu His Trp
      225      230      235      240
Val Pro Val Thr Leu Gln Gln Tyr Trp Gln Phe Thr Val Asp Ser Val
      245      250      255
Thr Ile Asn Gly Val Ala Val Ala Cys Val Gly Gly Cys Gln Ala Ile
      260      265      270
Leu Asp Thr Gly Thr Ser Val Leu Phe Gly Pro Ser Ser Asp Ile Leu
      275      280      285
Lys Ile Gln Met Ala Ile Gly Ala Thr Glu Asn Arg Tyr Gly Glu Phe
      290      295      300
Asp Val Asn Cys Gly Asn Leu Arg Ser Met Pro Thr Val Val Phe Glu
      305      310      315      320
Ile Asn Gly Arg Asp Tyr Pro Leu Ser Pro Ser Ala Tyr Thr Ser Lys
      325      330      335
Asp Gln Gly Phe Cys Thr Ser Gly Phe Gln Gly Asp Asn Asn Ser Glu
      340      345      350
Leu Trp Ile Leu Gly Asp Val Phe Ile Arg Glu Tyr Tyr Ser Val Phe
      355      360      365
Asp Arg Ala Asn Asn Arg Val Gly Leu Ala Lys Ala Ile
      370      375      380

```

3

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Спосіб отримання виділеного варіанта поліпептиду хімоzinу, що включає:
- (а) продукування варіанта поліпептиду хімоzinу, що має зміну в одному або декількох положеннях його амінокислотної послідовності, в порівнянні з вихідним поліпептидом, що має активність хімоzinу, де вихідний поліпептид має щонайменше 65 % ідентичність послідовності зі зрілим поліпептидом від положення амінокислоти 59 до положення амінокислоти 381 SEQ ID NO: 1 (бичачий хімоzin), де зміна включає заміщення в положенні амінокислоти, відповідному
- 10 положенню 117, визначеному за допомогою вирівнювання амінокислотної послідовності

вихідного поліпептиду з амінокислотною послідовністю поліпептиду SEQ ID NO: 1 (бичачий хімозин), і

(b) виділення варіанта поліпептиду зі стадії (a) з отриманням виділеного варіанта поліпептиду хімозину, де варіант має менше ніж 30 змін амінокислот в області від положення амінокислоти 59 до положення амінокислоти 381 в порівнянні зі зрілим поліпептидом від положення амінокислоти 59 до положення амінокислоти 381 SEQ ID NO: 1 (бичачий хімозин) або в порівнянні зі зрілим поліпептидом від положення амінокислоти 59 до положення амінокислоти 381 SEQ ID NO: 2 (верблюжий хімозин), як визначено вирівнюванням амінокислотної послідовності варіанта з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 1 або SEQ ID NO: 2, відповідно, і має активність хімозину.

2. Спосіб за п. 1, в якому виділений варіант поліпептиду хімозину має: активність хімозину, що дає вище відношення активності згортання до протеолітичної активності (C/P) в порівнянні з відношенням C/P бичачого хімозину, що містить зрілий поліпептид SEQ ID NO: 1; і

активність хімозину, що дає вище відношення C/P в порівнянні з відношенням C/P верблюжого хімозину, що містить зрілий поліпептид SEQ ID NO: 2.

3. Спосіб отримання за п. 1, в якому зміна включає амінокислотне заміщення D117N.

4. Спосіб за п. 1, в якому зміна включає амінокислотні заміщення Y79S, D117N і I321L.

5. Спосіб за п. 1, в якому вихідний поліпептид має щонайменше 95 % ідентичність послідовності зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO: 1 (бичачий хімозин).

6. Спосіб за п. 1, в якому вихідний поліпептид має щонайменше 95 % ідентичність послідовності зі зрілим поліпептидом від положення амінокислоти 59 до положення амінокислоти 381 SEQ ID NO: 2 (верблюжий хімозин).

7. Виділений варіант поліпептиду хімозину, отриманий способом, який включає:

(a) продукування варіанта поліпептиду хімозину, що має зміну в одному або декількох положеннях його амінокислотної послідовності в порівнянні з вихідним поліпептидом, що має активність хімозину, де вихідний поліпептид має щонайменше 65 % ідентичність послідовності зі зрілим поліпептидом від положення амінокислоти 59 до положення амінокислоти 381 SEQ ID NO: 1 (бичачий хімозин), де зміна включає заміщення в положенні амінокислоти, відповідному положенню 117, як визначено вирівнюванням амінокислотної послідовності вихідного поліпептиду з амінокислотною послідовністю поліпептиду SEQ ID NO: 1 (бичачий хімозин); і

(b) виділення варіанта поліпептиду зі стадії (a) з отриманням виділеного варіанта поліпептиду хімозину,

де варіант має менше ніж 30 змін амінокислот в області від положення амінокислоти 59 до положення амінокислоти 381 в порівнянні зі зрілим поліпептидом від положення амінокислоти 59 до положення амінокислоти 381 SEQ ID NO: 1 (бичачий хімозин) або в порівнянні зі зрілим поліпептидом від положення амінокислоти 59 до положення амінокислоти 381 SEQ ID NO: 2 (верблюжий хімозин), як визначено вирівнюванням амінокислотної послідовності варіанта з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 1 або SEQ ID NO: 2, відповідно, і має активність хімозину.

8. Виділений варіант поліпептиду хімозину, що має зміну в одному або декількох положеннях його амінокислотної послідовності в порівнянні з вихідним поліпептидом, що має активність хімозину, де вихідний поліпептид має щонайменше 90 % ідентичність послідовності зі зрілим поліпептидом від положення амінокислоти 59 до положення амінокислоти 381 SEQ ID NO: 1 (бичачий хімозин), де зміна включає заміщення в положенні амінокислоти, відповідному положенню 117, як визначено вирівнюванням амінокислотної послідовності вихідного поліпептиду з амінокислотною послідовністю поліпептиду SEQ ID NO: 1 (бичачий хімозин), де:

варіант має активність хімозину;

варіант має менше ніж 100 % ідентичність послідовності зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO: 1 (бичачий хімозин); і

варіант має менше ніж 30 змін амінокислот в області від положення амінокислоти 59 до положення амінокислоти 381 в порівнянні зі зрілим поліпептидом від положення амінокислоти 59 до положення амінокислоти 381 SEQ ID NO: 1 (бичачий хімозин), як визначено вирівнюванням амінокислотної послідовності варіанта з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 1.

9. Виділений варіант поліпептиду хімозину за п. 8, де

вихідний поліпептид має щонайменше 97 % ідентичність послідовності зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO: 1 (бичачий хімозин); і

виділений варіант поліпептиду хімозину містить менше ніж 10 змін амінокислот в області від положення амінокислоти 59 до положення амінокислоти 381 в порівнянні зі зрілим поліпептидом

від положення амінокислоти 59 до положення амінокислоти 381 SEQ ID NO: 1 (бичачий хімозин), як визначено вирівнюванням амінокислотної послідовності варіанта з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 1.

10. Виділений варіант поліпептиду хімозину за п. 8, де зміна включає амінокислотне заміщення D117N.

11. Виділений варіант поліпептиду хімозину за п. 8, де зміна включає амінокислотні заміщення Y79S, D117N і I321L.

12. Виділений варіант поліпептиду хімозину, що має зміну в одному або декількох положеннях його амінокислотної послідовності в порівнянні з вихідним поліпептидом, що має активність хімозину, де вихідний поліпептид має щонайменше 90 % ідентичність послідовності зі зрілим поліпептидом від положення амінокислоти 59 до положення амінокислоти 381 SEQ ID NO: 2 (верблюжий хімозин), де зміна включає заміщення в положенні амінокислоти, відповідному положенню 117, як визначено вирівнюванням амінокислотної послідовності вихідного поліпептиду з амінокислотною послідовністю поліпептиду SEQ ID NO: 1 (бичачий хімозин), де

варіант має активність хімозину; і варіант має менше ніж 100% ідентичність послідовності зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO: 2 (верблюжий хімозин); і

варіант має менше ніж 30 змін амінокислот в області від положення амінокислоти 59 до положення амінокислоти 381 в порівнянні зі зрілим поліпептидом від положення амінокислоти 59 до положення амінокислоти 381 SEQ ID NO: 2 (верблюжий хімозин), як визначено вирівнюванням амінокислотної послідовності варіанта з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 2.

13. Виділений варіант поліпептиду хімозину за п. 12, де зміна включає амінокислотні заміщення Y79S, D117N і I321L.

14. Спосіб приготування харчового або кормового продукту на основі молока, що включає додавання ефективної кількості виділеного варіанта поліпептиду хімозину за п. 8 в харчовий або кормовий інгредієнт (інгредієнти), що містить молоко.

15. Спосіб приготування харчового або кормового продукту на основі молока за п. 14, де молоко вибране з групи, що складається з соєвого молока, овечого молока, козячого молока, буйволового молока, молока яка, молока лами, верблюжого молока і коров'ячого молока.

16. Спосіб приготування харчового або кормового продукту на основі молока за п. 14, де продукт на основі молока являє собою ферментований молочний продукт, столовий сир або сир.

17. Спосіб приготування харчового або кормового продукту на основі молока, що включає додавання ефективної кількості виділеного варіанта поліпептиду хімозину за п. 12 в харчовий або кормовий інгредієнт (інгредієнти), що містять молоко.

18. Спосіб приготування харчового або кормового продукту на основі молока за п. 17, де молоко вибране з групи, що складається з соєвого молока, овечого молока, козячого молока, буйволового молока, молока яка, молока лами, верблюжого молока і коров'ячого молока.

19. Спосіб приготування харчового або кормового продукту на основі молока за п. 17, де продукт на основі молока являє собою ферментований молочний продукт, столовий сир або сир.

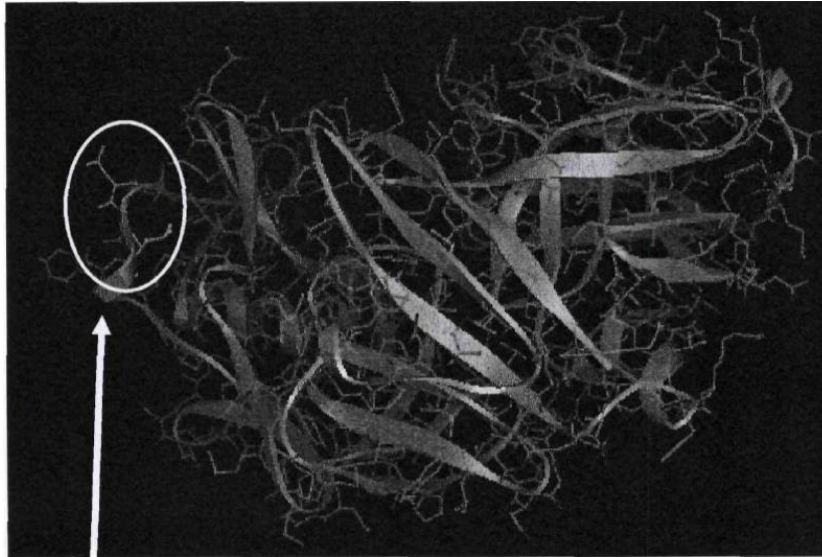
20. Виділений варіант поліпептиду хімозину за п. 8, який **відрізняється** тим, що варіант має активність хімозину, що дає вище відношення активності згортання до протеолітичної активності (C/P) в порівнянні з відношенням C/P бичачого хімозину, що містить зрілий поліпептид SEQ ID NO: 1.

21. Виділений варіант поліпептиду хімозину за п. 12, який **відрізняється** тим, що варіант має активність хімозину, що дає вище відношення активності згортання до протеолітичної активності (C/P) в порівнянні з відношенням C/P верблюжого хімозину, що містить зрілий поліпептид SEQ ID NO: 2.

22. Виділений варіант поліпептиду хімозину за п. 12, в якому зміна включає амінокислотне заміщення D117N.

	1				50
Bos_bovis_хімозин_В	MRCLVLLAV	FALSQGAET	RIPLYKGKSL	RKALKEHGLL	EDFLQKQQYG
Вівця	MRCLVLLAV	FALSQGAET	RIPLYKGKPL	RKALKERGLL	EDFLQKQQYG
C_bactrianus	MRCLVLLAA	LALSQASGIT	RIPLHKGKTL	RKALKERGLL	-----
Camelus_dromedarius	MRCLVLLAA	LALSQASGIT	RIPLHKGKTL	RKALKERGLL	
Свиня	.IRGRVLI		KGKSL	RKELKERGLL	~ ~
Щур	MRCFVLLI		KGKSL	RNTLKEQGLL	EDFLRRHQYE
	51				100
Bos_bovis_хімозин_В	ISSKYSGE		GKIYL	GTPPQEFTVL	FDTGSSDFWV
Вівця	VSSEYSGE		GKIYL	GTPPQEFTVL	FDTGSSDFWV
C_bactrianus	VSSKYSSLGK	VAREPLTSYL	DSQYFGKIYI	GTPPQEFTVV	FDTGSSDLWV
Camelus_dromedarius	VSSKYSSLGK	VAREPLTSYL	DSQYFGKIYI	GTPPQEFTVV	FDTGSSDLWV
Свиня	LSSKYSSFGE	VASEPLTNYL	DTQYFGKIYI	GTPPQEFTVV	FDTGSSSELWV
Щур	FSEKNSNIGM	VASEPLTNYL	DSEYFGLIYV	GTPPQEFTVV	FDTGSSSELWV
	101				150
Bos_bovis_хімозин_В	PSIYCKSNAC	KNHQRFDPRK	SSTFQNLGKP	LSIHVGTGSM	QGILGYDTVT
Вівця	PSIYCKSNAC	KNHQRFDPRK	SSTFQNLGKP	LSIRVGTGSM	QGILGYDTVT
C_bactrianus	PSIYCKSNAC	KNHHRFDPRK	SSTFRNLGKP	LSIHVGTGSI	EGFLGYDTVT
Camelus_dromedarius	PSIYCKSNVC	KNHHRFDPRK	SSTFRNLGKP	LSIHVGTGSM	EGFLGYDTVT
Свиня	PSVYCKSDAC	QNHHRFNPSK	SSTFQNLGKP	LSIQVGTGSI	QGFLGYDTVM
Щур	PSVYCSSKVC	RNHNRFDPSK	SSTFQNLGKP	LFVQVGTGSI	EGFLGYDTVT
	151				200
Bos_bovis_хімозин_В	VSNIVDIQQT	VGLSTQEPGD	VFTYAEFDGI	LGMAYPSLAS	EYSIPVFDNM
Вівця	VSNIVDIQQT	VGLSTQEPGD	VFTYAEFDGI	LGMAYPSLAS	EYSVPVFDNM
C_bactrianus	VSNIVDPNQT	VGLSTEQPGE	VFTYSEFDGI	LGLAYPSLAS	EYSVPVFDNM
Camelus_dromedarius	VSNIVDPNQT	VGLSTEQPGE	VFTYSEFDGI	LGLAYPSLAS	EYSVPVFDNM
Свиня	VAGIVDAHQT	VGLSTQEPGD	IFTYSEFDGI	LGLGYPELAS	EYTVFVFDNM
Щур	VSDIVVPHQT	VGLSTEQPGD	IFTYSEFDGI	LGLAYPTFAS	KYSVPVFDNM
	201				250
Bos_bovis_хімозин_В	MNRHLVAQDL	FSVYMDRNGQ	ESMLTLGAID	PSYYTGSLHW	VPVTVQQYWQ
Вівця	MNRHLVAQDL	FSVYMDRNGQ	GSMLTLGAID	PSYYTGSLHW	VPVTVLQKYWQ
C_bactrianus	MDRHLVARDL	FSVYMDRNGQ	GSMLTLGATD	PSYYTGSLHW	VPVTVQQYWQ
Camelus_dromedarius	MDRHLVARDL	FSVYMDRNGQ	GSMLTLGAID	PSYYTGSLHW	VPVTVLQKYWQ
Свиня	MNRHLVAQDL	FAVYMSRNDQ	GSMLTLGAID	PSYYTGSLHW	VPVTVMLQYWQ
Щур	MNRHLVAQDL	FSVYMSRNDQ	GSMLTLGAID	QSYFIGSLHW	VPVTVQGYWQ
	251				300
Bos_bovis_хімозин_В	FTVDSVTISG	VVVACEGGCQ	AILDGTGSKL	VGPSSDILNI	QQAIGATQNG
Вівця	FTVDSVTISG	AVVACEGGCQ	AILDGTGSKL	VGPSSDILNI	QQAIGATQNG
C_bactrianus	FTVDSVTING	VAVACVGGCQ	AILDGTGSKL	VGPSSDILNI	QQAIGATQNG
Camelus_dromedarius	FTVDSVTING	VAVACVGGCQ	AILDGTGSKL	VGPSSDILNI	QQAIGATQNG
Свиня	FTVDSVTING	VVVACNGGCQ	AILDGTGSKL	AGPSSDILNI	QQAIGATESQ
Щур	FTVDRITIND	EVVACQGGCP	AVLDGTGSKL	TGPGRDILNI	QQAIGAVQGG
	301				350
Bos_bovis_хімозин_В	YGEFDIDCDN	LSMPTVVFE	INGKMYPLTP	SAYTSQDQGF	CTSGFQSENH
Вівця	YGEFDIDCDN	LSSMPTVVFE	INGKMYPLTP	YAYTSQEEGF	CTSGFQGENH
C_bactrianus	YGEFDVNCGS	LRSMPVVFE	INGRDFPLAP	SAYTSKDQGF	CTSGFQGDNN
Camelus_dromedarius	YGEFDVNCGN	LRSMPVVFE	INGRDFPLSP	SAYTSKDQGF	CTSGFQGDNN
Свиня	YGEFDIDCGS	LSSMPTVVFE	ISGRMYPLPP	SAYTNQDQGF	CTSGFQGDNS
Щур	HDQFDIDCWR	LNFMPTVVFE	INGREFPLPP	SAYTNQFQGS	CSSGFR..HG
	351			381	
Bos_bovis_хімозин_В	SQKWILGDVF	IREYYSVFDR	ANNLVGLAKA	I	
Вівця	SHQWILGDVF	IREYYSVFDR	ANNLVGLAKA	I	
C_bactrianus	SELWILGDVF	IREYYSVFDR	ANNRVGLAKA	I	
Camelus_dromedarius	SELWILGDVF	IREYYSVFDR	ANNRVGLAKA	I	
Свиня	SQHWILGVVF	IQEYYSVFDR	ANNRVGLAKA	I	
Щур	SQMWILGDVF	IREYYSVFDR	ANNRVGLAKA	I	

Фір. 1



Положення 296 і 294 в бичачому хімозині

Фіг. 2

Комп'ютерна верстка С. Чулій

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601