



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **121380** (13) **C2**
(51) МПК

C12N 9/64 (2006.01)
A23C 19/04 (2006.01)
A23C 9/12 (2006.01)
A23C 11/10 (2006.01)
A23C 19/032 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 15/59 (2006.01)
C12P 21/04 (2006.01)
C12P 21/06 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: а 2016 07691	(72) Винахідник(и): ван ден Брінк Йоганнес Мортен (DK), Єнсен Єспер Ланггольм (DK), Якобсен Йонас (DK), Лунд Мартін (DK), Єппесен Ібен (DK), Єкель Крістіан (DK)
(22) Дата подання заявки: 26.02.2015	(73) Власник(и): КР. ГАНСЕН А/С, Boege Alle 10-12, DK-2970 Hoersholm, Denmark (DK)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 25.05.2020	(74) Представник: Крилова Надія Іванівна, реєстр. №30
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 14156707.3, 14176664.2	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2013174840 A1, 28.11.2013 WO 2013164481 A1, 07.11.2013
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 26.02.2014, 11.07.2014	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: EP, EP	
(41) Публікація відомостей про заявку: 25.11.2016, Бюл.№ 22	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.05.2020, Бюл.№ 10	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/EP2015/054020, 26.02.2015	

(54) ПОЛІПЕПТИД ХІМОЗИНУ З УДОСКОНАЛЕНИМИ ВЛАСТИВОСТЯМИ ЩОДО ЗГОРТАННЯ МОЛОКА**(57) Реферат:**

Винахід стосується способу отримання ізольованого варіанта поліпептиду хімозину, що має удосконалені властивості згортання молока та його застосування.

UA 121380 C2

Винахід стосується варіантів хімозину з удосконаленими властивостями згортання молока.

Ферментна коагуляція молока згортанням молока ферментами, як-то хімозин та пепсин, є одним із найбільш важливих способів виробництва сирів. Ферментна коагуляція молока – двофазовий процес: перша стадія, де протеолітичний фермент, хімозин або пепсин, атакує казеїн, призводить до метастабільного стану структури міцели казеїну, та друга стадія, де молоко згодом коагулює та створює коагулят.

Хімозин (ЕС 3.4.23.4) та пепсин (ЕС 3.4.23.1), ферменти згортанням молока в шлунку ссавця, є аспарагіновими протеазами, які належать до широкого класу пептидаз.

Отримані в клітинах шлункової слизової оболонки хімозин та пепсин виникають відповідно як ферментативно інертні перед-прохімозин та перед-пепсиноген. Коли ізольовано хімозин, фрагмент N-кінцевого пептиду, перед-фрагмент (сигнальний пептид) відщеплено, що дає прохімозин, охоплюючи про-фрагмент. Прохімозин є суттєво неактивною формою ферменту, яка, однак, стає активованою в кислих умовах щодо активного хімозину аутокаталітичним видаленням про-фрагмента. Ця активація відбувається *in vivo* в шлунковій порожнині в придатних умовах pH або *in vitro* в кислих умовах.

Структурні та функціональні характеристики бичачих, тобто "Bos taurus", пре-прохімозину, прохімозину та хімозину докладно досліджено. Препарат молекули бичачого пре-прохімозину містить 16 аа залишків, а про-частка відповідного прохімозину має довжину 42 аа залишків. Активний бичачий хімозин, який містить 323 аа, є сумішшю двох форм, А та В, обидві з яких є активними.

Хімозин виробляється природно у ссавців, як-то бики, верблюди, кози, буйволи, барани, свині, люди, мавпи та щури.

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

В WO02/36752A2 (Chr. Hansen) описано рекомбінантне виробництво верблюжого хімозину.

В WO2013/174840A1 (Chr. Hansen) описано мутанти/варіанти бичачого та верблюжого хімозину.

В WO2013/164479A2 (DSM) описано мутанти бичачого хімозину.

Наведені нижче посилання в наданому контексті можна розглядати як посилання, в яких описано 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 characterisation 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 Val111phe 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.

В жодному з наведених вище посилань не описано безпосередньо та однозначно будь-який з мутантів/варіантів, які описано/заявлено тут нижче.

Проблема, яка вирішена заявленим винаходом – запропонувати варіанти хімозину з удосконаленими властивостями згортання молока.

Як розглянуто на прикладах діючих зразків, винахідники ідентифікували кількість покращених варіантів верблюжого (див. приклад 6) та бичачого/верблюжого (див. приклад 7) хімозину.

На основі порівняльного аналізу верблюжих та бичачих варіантів винахідники ідентифікували кількість положень амінокислоти, які тут є важливими, бо створенням варіантів в одній або більшості цих положень, можна надавати удосконалений варіант хімозину.

Як відомо в рівні техніки, послідовності відмінного природного дикого типу поліпептиду хімозину, отриманого у ссавців (як-то, наприклад, бики, верблюди, вівці, свині або щури) мають відносно високу подібність/ідентичність послідовності.

На фіг. 1 наведено приклад вирівнюванням тут доречних різних послідовностей хімозину.

Через це порівняно близька спорідненість дозволяє вважати, що 3D-структури різних природних диких типів хімозинів також відносно подібні.

У даному контексті отриманий природний дикий тип хімозину (як-то бичачий хімозин або верблюжий хімозин) може бути прикладом вихідного поліпептиду, тобто вихідного поліпептиду, щодо якого зроблено зміни для отримання варіанту поліпептиду хімозину заявленого винаходу.

Без обмеження щодо теорії, припускаємо, що розглянуті тут споріднені з хімозином амінокислотне положення є загально важливими у будь-якому доречному цікавому хімозин-ферменті (як-то, наприклад, хімозини биків, верблюдів, овець, свиней, щурів та т.д.) у том сенсі, що отримання варіантів в одному або більшості положень, взагалі, можуть надавати удосконалений варіант хімозину (наприклад, удосконалений варіант хімозину бика, верблюда, вівці, свині або щура).

Розглянуто, як стандартну послідовність для визначення амінокислотне положення вихідного поліпептиду хімозину (наприклад, верблюда, вівці, бика т.д.) застосовано загальнодоступну відому послідовність бичачого хімозину В-препрохімозину (Genbank інвентарний номер P00794 та розкрито тут як SEQ ID NO: 1).

Бичачий хімозин В-препрохімозин SEQ ID NO: 1, як варіант, називають як "бичачий (Bos bovis) хімозин В" або просто "бичачий хімозин". Послідовність також показано на фіг. 1.

Інша доречна тут послідовність хімозину – добре відома *Camelius dromedarius* послідовність хімозину SEQ ID NO: 2. Як варіант, називають як "верблюжий хімозин". Послідовність також показано на фіг. 1.

У даному контексті, послідовність вихідного поліпептиду хімозину (наприклад, вівці або щура), яка принаймні на 65 % ідентична послідовності зрілого поліпептиду SEQ ID NO: 1 (бичачого хімозину), можна розглядати як структурно адекватну стосовно, наприклад, бичачого або верблюжого хімозину, щоб бути удосконаленим створенням варіанту в будь-якому з положень амінокислоти, як описано.

Відповідно, перший аспект винаходу стосується способу створення варіанту ізольованого поліпептиду хімозину, який полягає в:

(а): здійсненні зміни в одному або більше положеннях у вихідному поліпептиді, який має активність хімозину, причому зміна включає заміщення, видалення або введення принаймні в одному амінокислотному положенні, що відповідає будь-якому з положень 70; 75; 77; 79; 90; 102; 103; 108; 114; 117; 120; 124; 134; 154; 156; 163; 212; 222; 223; 224; 238; 246; 256; 261; K279V; L280; F281; R300D, E,S, T,N, Q,C, U,G, P,A, V,I, L,M, F,Y, W; G309; R312D, E,S, T,N, Q,C, U,G, P,A, V,I, L,M, F,Y, W; 320; 324; D325Q; 326; 331; 336; 346; 361; 367 та 379; та

(b): отриманні та ізолюванні зміненого поліпептиду операції (а), отримуючи, таким чином, варіант ізольованого поліпептиду хімозину, який має активність хімозину; та в якому:

(i): амінокислотне положення вихідного поліпептиду визначають за вирівнюванням вихідного поліпептиду з поліпептидом SEQ ID NO: 1 (бичачого хімозину), тобто, поліпептид SEQ ID NO: 1 застосовують для визначення відповідної послідовності амінокислоти у вихідному поліпептиді; та

(ii): послідовність вихідного поліпептиду принаймні на 65 % ідентична послідовності зрілого поліпептиду SEQ ID NO: 1 (бичачого хімозину), що охоплює амінокислотне положення від 59 до 381 SEQ ID NO: 1;

та із застереженням, що ізольований варіант поліпептиду хімозину не є специфічним варіантом, вибраним з групи, що складається з:

Q246E+G309D+S329P+D337E;
R125Q+G128N+H204R+Q246E+S284T;
Y185F+R213Q+Q246E;
V261A+V263I+G309W+L311I+Y326F;
G128D+L188I+Y326F;
G128N+R312S+S313Y+Y326F;
G128N+R312S+S313Y+Y326F;
D117N+V261A+R312S;
D216S+L224V+V263I+F281V+G309D;
Y79S+L224V+L311I; та
R119S+L224V+T297S.

Вище вказане застереження можна розглядати як таке, що стосується розглянутого вище WO2013/174840A1 (Chr. Hansen), оскільки в цьому документі детально описано ці конкретні варіанти.

Як зрозуміло фахівцю в цій галузі в даному контексті, застереження стосується тільки конкретних згаданих варіантів.

Наприклад, варіант, який включає тільки заміщення Q246E (тобто не G309D, S329P та/або D337E), не є таким специфічним варіантом у застереженні, тобто від цього не відмовляються в даному контексті.

Як відомо в рівні техніки, фахівець у цій галузі може на базі загального рівня техніки легко виробляти та очищувати хімозин та варіанти хімозину.

Іншими словами, інколи у фахівця у цій галузі є доречний тут вихідний поліпептид, який має активність хімозину щодо зацікавленості (наприклад, від биків, верблюдів, овець, свиней або щурів), та повсякденною роботою для фахівця в цій галузі є отримання варіанту такого бажаного вихідного хімозину.

Згідно із другим аспектом винахід стосується варіанту ізолюваного поліпептиду хімозину, який отримано способом згідно з першим аспектом або будь-якими доречними тут його втіленнями.

Термін "отриманий" стосовно згаданого вище другого аспекту слід розуміти так, що варіант ізолюваного поліпептиду хімозину отримано способом згідно з першим аспектом або будь-якими доречними тут його втіленнями.

Відповідно, термін "отриманий" стосовно другого аспекту слід розуміти як досяжний.

Як тут розглянуто, у діючих зразках розроблено варіанти із застосуванням поліпептиду SEQ ID NO: 1 (бичачого) як вихідного поліпептиду, такий варіант тут названо як "варіант бичачого хімозину".

Відповідно, згідно із третім аспектом винахід стосується ізолюваного варіанту поліпептиду хімозину, який має:

(a): зміну в одному або більше положеннях у вихідному поліпептиді, який має активність хімозину, де зміна включає заміщення, видалення або введення принаймні в одному амінокислотному положенні, що відповідає будь-якому з положень 70; 75; 77; 79; 90; 102; 103; 108; 114; 117; 120; 124; 134; 154; 156; 163; 212; 222; 223; 224; 238; 246; 256; 261; K279V; L280; F281; R300D, E, S, T, N, Q, C, U, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, W; G309; R312D, E, S, T, N, Q, C, U, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, W; 320; 324; D325Q; 326; 331; 336; 346; 361; 367 та 379; та

(b): варіант має активність хімозину; та:

(i): амінокислотне положення вихідного поліпептиду визначено за вирівнюванням вихідного поліпептиду з поліпептидом SEQ ID NO: 1 (бичачого хімозину), тобто, поліпептид SEQ ID NO: 1 застосовано для визначення відповідної амінокислотної послідовності у вихідному поліпептиді; та

(ii): послідовність вихідного поліпептиду принаймні на 90 % ідентична послідовності зрілого поліпептиду SEQ ID NO: 1 (бичачого хімозину), який охоплює амінокислотне положення від 59 до 381 SEQ ID NO: 1; та

(iii): послідовність ізолюваного варіанту поліпептиду менше, ніж на 100 % ідентична послідовності зрілого поліпептиду SEQ ID NO: 1 (бичачого хімозину); та із застереженням, що ізолюваний варіант поліпептиду хімозину не є специфічним варіантом, вибраним з групи, що складається з:

Q246E+G309D+S329P+D337E;

R125Q+G128N+H204R+Q246E+S284T;

Y185F+R213Q+Q246E;

V261A+V263I+G309W+L311I+Y326F;

G128D+L188I+Y326F;

G128N+R312S+S313Y+Y326F;

G128N+R312S+S313Y+Y326F; та

D117N+V261A+R312S;

D216S+L224V+V263I+F281V+G309D

Y79S+L224V+L311I та

R119S+L224V+T297S.

Як тут розглянуто, у діючих зразках розроблено варіанти із застосуванням поліпептиду SEQ ID NO: 2 (верблюжого хімозину) як вихідного поліпептиду, так званий "верблюжий варіант хімозину".

Відповідно, згідно із четвертим аспектом винахід стосується ізолюваного варіанту поліпептиду хімозину, який має:

(a): зміну в одному або більше положеннях у вихідному поліпептиді, який має активність хімозину, де зміна включає заміщення, видалення або введення принаймні в одному

амінокислотному положенні, що відповідає будь-якому з положень 70; 75; 77; 79; 90; 102; 103; 108; 114; 117; 120; 124; 134; 154; 156; 163; 212; 222; 223; 224; 238; 246; 256; 261; K279V; L280; F281; R300D, E, S, T, N, Q, C, U, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, W; G309; R312D, E, S, T, N, Q, C, U, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, W; 320; 324; D325Q; 326; 331; 336; 346; 361; 367 та 379; та

5 (b): варіант має активність хімозину;
та:

(i): амінокислотне положення вихідного поліпептиду визначено за вирівнюванням вихідного поліпептиду з поліпептидом SEQ ID NO: 1 (бичачого хімозину), тобто, поліпептид SEQ ID NO: 1 застосовано для визначення відповідної амінокислотної послідовності у вихідному поліпептиді;
10 та

(ii): послідовність вихідного поліпептиду принаймні на 90 % ідентична послідовності зрілого поліпептиду SEQ ID NO: 2 (верблюжого хімозину), який охоплює амінокислотне положення від 59 до 381 SEQ ID NO: 2; та

(iii): послідовність ізольованого варіанту поліпептиду менше, ніж на 100 % ідентична послідовності зрілого поліпептиду SEQ ID NO: 2 (верблюжого хімозину);

та із застереженням, що ізольований варіант поліпептиду хімозину не є специфічним варіантом, вибраним з групи, що складається з:

Q246E+G309D+S329P+D337E;

R125Q+G128N+H204R+Q246E+S284T;

20 Y185F+R213Q+Q246E;

V261A+V263I+G309W+L311I+Y326F;

G128D+L188I+Y326F;

G128N+R312S+S313Y+Y326F;

G128N+R312S+S313Y+Y326F;

25 D117N+V261A+R312S;

D216S+L224V+V263I+F281V+G309D;

Y79S+L224V+L311I; та

R119S+L224V+T297S.

Ізольований варіант поліпептиду хімозину, що описано, можна застосовувати згідно з рівнем техніки, наприклад, отримуючи бажаний харчовий або кормовий продукт (як-то, наприклад, бажаний продукт на основі молока, наприклад, сирним продуктом).

Відповідно, згідно з п'ятим аспектом винахід стосується способу отримання харчового або кормового продукту, який полягає в додаванні ефективної кількості ізольованого варіанту поліпептиду хімозину, що описано, до харчових або кормових інгредієнтів, та здійсненні наступних операцій виготовлення для отримання харчового або кормового продукту.

Утілення заявленого винаходу описано нижче лише прикладами.

Усі визначення доречних термінів є у відповідності щодо розуміння фахівцем у цій галузі стосовно доречного тут технічного контексту.

Термін "хімозин" стосується ферменту класу EC 3.4.23.4. Хімозин має високу специфічність та коагулює молоко розщепленням одного зв'язку 105-Ser-Phe-|-Met-Ala-108 в каппа-ланцюгу казеїну. Альтернативною назвою, застосованою в рівні техніки, є ренін.

Термін "активність хімозину" стосується активності хімозину з ферменту хімозину, як зрозуміло фахівцю у цій галузі в наданому контексті.

Фахівцю у цій галузі відомо як визначити доречну тут активність хімозину.

45 У діючому зразку прикладу 4 запропоновано приклад стандартного способу визначення конкретної активності хімозину, альтернативно названої як "коагулятивна активність" або "коагулятивна активність молока".

У діючому зразку прикладу 5 тут запропоновано зразок стандартного способу визначення протеолітичної активності.

50 Як відомо в рівні техніки, тут доречне так зване "відношення коагуляційної активності до протеолітичної активності" (надалі "К/П") визначено діленням конкретної коагулятивної активності (К) на протеолітичну активність (П).

Як відомо в рівні техніки, більш високе відношення К/П звичайно означає, що зменшено втрату білку протягом, наприклад, виготовлення сиру внаслідок деградації неспецифічного білку, тобто підвищено отримання сиру, та зменшено підвищення гіркої присмаку в сирі під час дозрівання.

Термін "ізольований варіант" означає варіант, модифікований вручну. Згідно з одним аспектом, варіант принаймні є 1 % чистим, наприклад, принаймні 5 % чистим, принаймні 10 % чистим, принаймні 20 % чистим, принаймні 40 % чистим, принаймні 60 % чистим, принаймні 60 % чистим та принаймні 90 % чистим, як визначено за SDS PAGE.

Термін "природний поліпептид" означає пептид у його кінцевій формі внаслідок перетворення та будь-яких модифікацій після перетворення, як-то N-кінцева обробка, C-кінцева обробка, глікозилювання, фосфорилювання, т.д... У даному контексті тут можна бачити доречним зрілий поліпептид хімозину як послідовність активного поліпептиду хімозину, тобто без перед-часткових та/або про-часткових послідовностей. Доречними прикладами зрілого поліпептиду є, наприклад, зрілий поліпептид SEQ ID NO: 1 (бичачого хімозину), що охоплює амінокислотне положення від 59 до 381 SEQ ID NO: 1, або зрілий поліпептид SEQ ID NO: 2 (верблюжого хімозину), що охоплює амінокислотне положення від 59 до 381 SEQ ID NO: 2.

Термін "вихідний" або "вихідний поліпептид, який має активність хімозину" означає поліпептид, у якому зроблено зміну для отримання варіантів ферменту заявленого винаходу. Вихідний поліпептид може бути природним (дикого типу) поліпептидом або його варіантом.

Термін "Ідентичність послідовності" стосується зв'язаності між двома послідовностями амінокислоти або між двома послідовностями нуклеотиду.

Згідно винаходу ступінь Ідентичності послідовності між двома послідовностями амінокислоти визначено, застосовуючи Needleman-Wunsch algorithm (Needleman та Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453), як реалізовано в Needle program of EMBOSS package (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277), переважно – версія 3.0.0 або подальша. Застосовані необов'язкові параметри – погіршення просвіту 10, погіршення довжини просвіту 0,5, та матриця заміщення EBLOSUM62 (EMBOSS версія BLOSUM62). Продукт від Needle, мічений як "найдовша ідентичність", (отриманий, застосовуючи некороткий варіант (–nobrief option)) застосовано як процент ідентичності та розраховано як нижче зазначено:

$$(\text{Ідентичні залишки} \times 100) / (\text{довжина угруповання} - \text{загальне кількість груп в угрупованні})$$

Згідно винаходу ступінь Ідентичності послідовності між двома послідовностями деоксирибонуклеотиду визначено, застосовуючи алгоритм Needleman-Wunsch algorithm (Needleman and Wunsch, 1970, supra) який реалізовано в програмі Needle program of EMBOSS package (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, supra), найкраща версія 3.0.0 або подальша. Застосовані необов'язкові параметри є погіршення відкритої щілини на 10, погіршення подовження щілини на 0,5 та заміщення матриці EDNAFULL (EMBOSS-версія NCBI NUC4.4). Результат обчислення Needle, міченого як "найдовша ідентичність" (отриманого із застосуванням некороткого варіанту (–nobrief option)) застосовано як процент ідентичності та розраховано відповідно наступному:

$$(\text{ідентичні деоксирибонуклеотиди} \times 100) / (\text{довжина угруповання} - \text{загальна кількість груп в угрупованні})$$

Термін "варіант" означає пептид, який має активність хімозину та включає зміну, тобто заміщення, введення та/або видалення в одному або більше (кількох) положеннях. Заміщення означає заміну амінокислоти, яка займає положення з відмінно амінокислотою; видалення означає видалення амінокислоти, яка займає положення; та введення означає додавання 1-3 сусідніх амінокислот до амінокислоти, яка займає положення.

Амінокислота може бути природною або неприродною амінокислотою – наприклад, теоретично можливе заміщення, наприклад, зокрема, D-ізомерами (або D-формами), наприклад, D-аланіну.

Термін "дикий тип" пептиду хімозину означає хімозин, експресований природним організмом, як-то природним організмом ссавця (наприклад, верблюда або бика).

Фігура 1: Угруповання доречних тут різних послідовностей хімозину. Показаний "Bos_bovis_chymosin_B" – бичачий хімозин SEQ ID NO: 1, та показаний "Camelus_dromedarius" – верблюжий хімозин SEQ ID NO: 2. Застосування бичачого хімозину SEQ ID NO: 1 як стандартної послідовності, як тут описано, може, наприклад, означати, що бичачий хімозин має "V" в позиції 10, та верблюжий хімозин має "A" в тому ж положенні 10. Це може, наприклад, також означати, що бичачий/щурячий мають "Q" в позиції 352, та Верблюжий/С._bactrianus (бактріан) мають "E" у тій самій положенні 352.

Стосовно послідовностей хімозину, показаних на фігурі 1, вівця має Ідентичність послідовності 94,5 % з бичачим SEQ ID NO: 1; С._bactrianus (бактріан) має Ідентичність послідовності 83,2 % з бичачим SEQ ID NO: 1; Camelus_dromedarius має Ідентичності послідовності 84 % з бичачим SEQ ID NO: 1; свиня має 80,3 % Ідентичності послідовності з бичачим SEQ ID NO: 1, та щур має 71,9 % послідовності з бичачою ідентичністю SEQ ID NO: 1.

Як зрозуміло фахівцю в цій галузі у даному контексті – доречна тут Ідентичність послідовності процентних відношень послідовностей природного поліпептиду, наприклад, хімозину вівці, С._bactrianus, верблюда, свині або щура, з природним поліпептидом SEQ ID NO:

1 (бичачого хімозину, тобто амінокислоти амінокислотному положенні від 59 до 381 SEQ ID NO: 1) є відносно подібними щодо згаданих вище процентних відношень Ідентичності послідовності.

Фігура 2: 3D-структура бичачого хімозину – 3D структура є загальною доступною. Як приклад, показано, що амінокислотні положення 296 та 294 присутні в бичачому хімозині.

5 Фігура 3: Показано графічне представлення величин REMCAT та Протеолу ряду варіантів хімозину.

Фігура 4: Графік PCA дії індивідуальних заміщень. Усі числа положень є в 15 нижчими ніж числа положень, застосовані в тексті.

Визначення амінокислотного положення бажаного хімозину

10 Як розглянуто вище, стандартну послідовність для визначення амінокислотного положення доречного тут бажаного поліпептиду хімозину (наприклад, верблюда, вівці, бичачого т.д...) тут застосовано загально відому бичачу послідовність хімозину, розкритого тут як SEQ ID NO: 1.

15 Згідно з винаходом поліпептид, розкритий у SEQ ID NO: 1 (бичачому хімозині), застосовано для визначення відповідного залишку амінокислоти в іншому поліпептиді хімозину. Амінокислотну послідовність іншого поліпептиду хімозину орієнтовано згідно з поліпептидом, розкритим в SEQ ID NO: 1 та на основі угруповання, число амінокислотних положень відповідно до будь-якого залишку амінокислоти в поліпептиді, розкритому в SEQ ID NO: 1, визначено, застосовуючи алгоритм ClustalW algorithm, який описано тут у робочому прикладі 1.

20 Ідентифікацію відповідного залишку амінокислоти в іншому поліпептиді хімозину можна підтверджувати, застосовуючи алгоритм Needleman-Wunsch algorithm (Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453), який реалізовано в програмі Needle program пакету EMBOSS package (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277), краща версія – 3,0,0 або більш пізня.

25 Базована на вищих добре відомих комп'ютерних програмах ця робота є рутинною для фахівця в цій галузі для визначення амінокислотного положення доречного тут бажаного поліпептиду хімозину (наприклад, верблюда, вівці, бичачого т.д...).

На фігурі 1 показано приклад угруповання.

30 Як приклад на фігурі 1 можна бачити, наприклад, що застосоване тут бичаче посилання SEQ ID NO: 1 має "G" в положенні 50, та "Camelus_dromedarius" (SEQ ID NO: тут 2) має "A" в цьому положенні 50.

Термінологія варіантів

В описі варіантів винаходу описану нижче термінологію адаптовано до зручності посилання. Застосовано єдину букву або три букви абrevіатур амінокислот IUPAC.

35 Конкретні варіанти, розглянуті нижче в цій секції "термінології", можуть не бути доречними варіантами винаходу, тобто ця секція "термінології" є саме для опису доречної тут застосованої термінології як такої.

40 Заміщення. Для амінокислотного заміщення застосовано наступну термінологію: "вихідна амінокислота, положення, заміщена амінокислота". Відповідно, теоретичне заміщення треоніну аланіном в положенні 226 позначено як "Thr226Ala" або "T226A". Чисельні мутації ізольовано додаванням позначок ("+"), наприклад, "Gly205Arg+Ser411Phe" або "G205R+S411F", які позначають заміщення в положеннях 205 та 411 гліцину (G) аргініном (R) та серину (S) фенілаланіном (F), відповідно. Заміщення А, наприклад, позначене "226A", стосується заміщення вихідної амінокислоти (наприклад, Т, Q, S або іншої вихідної амінокислоти) аланіном в положенні 226.

45 Видалення. Для видалення амінокислоти, застосовано наступну термінологію: "вихідна амінокислота, позиція, *". Відповідно, видалення гліцину в положенні 195 позначено як "Gly195*" або "G195*". Чисельні видалення ізольовано додаванням позначок ("+"), наприклад, "Gly195* + Ser411*" або "G195* + S411*".

50 Вставки. Для уведення амінокислоти застосовано наступну термінологію: "вихідна амінокислота, позиція, вихідна амінокислота, вставлена амінокислота". Відповідно уведення лізину позаду гліцину в положенні 195 позначено "Gly195GlyLys" або "G195GK". Уведення чисельних амінокислот позначено [вихідна амінокислота, позиція, вихідна амінокислота, вставна амінокислота #1, вставна амінокислота #2; т.д...]. Для прикладу, уведення лізину та аланіну позаду гліцину в положенні 195 вказано як "Gly195GlyLysAla" або "G195GKA".

55 У таких випадках залишки вставленої амінокислоти нумеровано додаванням малих літер до номера положення залишку амінокислоти, який є попереднім щодо залишків вставленої амінокислоти. У вищому прикладі послідовність була б наступною:

Вихідна:	Варіант:
195	195 195a 195b
G	G-K - A

Чисельні зміни. Варіанти, які охоплюють чисельні зміни ізольовано додаванням позначок ("+"), наприклад, "Arg170Tyr+Gly195Glu" або "R170Y+G195E", які відображають заміщення тирозину та глутамінової кислоти на аргінін та гліцин в положеннях 170 та 195, відповідно.

Різні заміщення. Різні заміщення можна вводити в положення, та різні заміщення ізольовано комою, наприклад, "Arg170Tyr, Glu" або "R170Y, E" відображає заміщення аргініну тирозином або глутаміновою кислотою на положенні 170. Отже, "Tyr167Gly, Ala+Arg170Gly, Ala" або "Y167G, A+R170G, A" позначають наступні варіанти:

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

Спосіб створення варіанту ізольованого поліпептиду хімозину

Як розглянуто вище та як відомо в рівні техніки, фахівець в цій галузі може, базі спираючись на загальні знання, легко отримувати та очищати хімозин та варіанти хімозину.

Іншими словами, якщо інколи фахівець в цій галузі здатен володіти доречним тут вихідним поліпептидом, який має активність бажаного хімозину (наприклад, від биків, верблюдів, овець, свиней або щурів), то рутинною роботою для фахівця є варіант такого вихідного хімозину, який становить інтерес.

Приклад придатного способу отримання та ізолювання хімозину (варіантний або вихідний) може бути добре відомим, наприклад, грибова рекомбінантна експресія/отримання, базоване на технології, яку, наприклад, описано в WO02/36752A2 (Chr. Hansen).

Це рутинна робота для фахівця в цій галузі, якщо здійснювати зміну в одному або більше положеннях у вихідному поліпептиді, який має активність хімозину, де зміна включає заміщення, видалення або введення принаймні в одному амінокислотному положенні.

Як відомо фахівцю в цій галузі, це можна здійснювати, наприклад, так званим спрямованим на сайт мутагенезом та рекомбінантною експресією/отриманням, базованими на технології.

Також рутинною роботою для фахівця в цій галузі є визначення: чи має, чи ні активність хімозину доречний тут вихідний поліпептид (наприклад, верблюжий або бичачий дикий тип хімозину) та/або доречний тут варіант.

Як відомо в рівні техніки, активність хімозину можна визначати за так званим відношення К/П, яке визначено діленням конкретної коагулятивної активності (К) на протеолітичну активність (П).

Як відомо в рівні техніки, більш високе відношення К/П звичайно означає, що втрата білку протягом під час, наприклад, виготовлення сиру внаслідок деградації неспецифічного білку зменшено, тобто підвищено отримання сиру, та зменшено підвищення гіркого присмаку в сирі під час дозрівання.

У робочому зразку прикладу 4 описано придатний спосіб визначення конкретної коагулятивної активності (К), та у зразку прикладу 5 описано придатний спосіб визначення протеолітичної активності (П).

Кращим варіантом ізольованого поліпептиду хімозину, як тут описано, є варіант, який має активність хімозину, що призводить до більш високого відношення К/П, порівняно з відношенням К/П бичачого хімозину, який містить зрілий поліпептид SEQ ID NO: 1.

Переважно, якщо ізольований варіант поліпептиду хімозину, який тут описано, є варіантом, який має активність хімозину, що призводить до більш високого відношення К/П, порівняно з відношенням К/П верблюжого хімозину, який містить зрілий поліпептид SEQ ID NO: 2.

Більш переважно, якщо ізольований варіант поліпептиду хімозину, як тут описано, є варіантом, який має

- активність хімозину, що призводить до більш високого відношення К/П, порівняно з відношенням К/П бичачого хімозину, який містить зрілий поліпептид SEQ ID NO: 1; та

- активність хімозину, що призводить до більш високого відношення К/П, яке порівнянне зі відношенням К/П верблюжого хімозину, який містить зрілий поліпептид SEQ ID NO: тут 2.

Як розглянуто вище, як стандартну послідовність для визначення амінокислотному положенні доречного тут цікавого поліпептиду хімозину (наприклад, верблюжого, овечого, бичачого т.д.) тут застосовано загально відому послідовність бичачого хімозину, розкриту як SEQ ID NO: 1.

Як розглянуто вище, розглянуті тут, базовані, наприклад, на комп'ютерних програмах угруповання послідовності, є рутинною роботою для фахівця в цій галузі для визначення

доречного тут амінокислотного положення доречного бажаного поліпептиду хімозину (наприклад, верблюда, вівці, бика т.д.).

Термін "послідовність вихідного поліпептиду принаймні на 65 % ідентична послідовності зрілого поліпептиду SEQ ID NO: 1 (бичачого хімозину)", наприклад, способу першого аспекту, котрий тут можна розглядати як такий, що стосується обмеження базованої послідовності вихідного поліпептиду хімозину, застосованого для створення доречного тут його варіанту.

Іншими словами – послідовність природного вихідного поліпептиду хімозину (наприклад, вівці або свині) принаймні на 65 % ідентична послідовності природного бичачого хімозину, вважають достатнім щодо структурної ідентичності, наприклад, бичачого або верблюжого хімозину, щоб бути доречним, тобто в даному контексті вважають, що послідовність природного вихідного поліпептиду хімозину (від, наприклад, вівці або щура) принаймні на 65 % ідентична послідовності зрілого поліпептиду SEQ ID NO: 1 (бичачого хімозину), можна розглядати як достатньо структурованою стосовно, наприклад, бичачого або верблюжого хімозину, щоб бути покращенням утворенням варіанту в будь-якому з амінокислотних положень, як описано.

Послідовність верблюжого поліпептиду хімозину SEQ ID NO: 2 на 84 % ідентична послідовності бичачого поліпептиду SEQ ID NO: 1 (тобто повне SEQ ID NO: 1 в положенні від 1 до 381, яке включає перед- та про-послідовність).

Як зрозуміло фахівцю в даному контексті, доречний тут вихідний поліпептид, який має активність хімозину, уже може, наприклад, бути варіантом, наприклад, відповідного дикого типу хімозину.

Наприклад, верблюжому варіанту хімозину, наприклад, з 5-10 змінами (наприклад, заміщеннями), які порівнянні щодо дикого типу верблюжого поліпептиду хімозину SEQ ID NO: 2, ще слід бути вихідним поліпептидом, послідовність якого принаймні на 65 % ідентична послідовності зрілого поліпептиду SEQ ID NO: 1 (бичачого), як потрібний тут, наприклад, згідно з першими аспектом.

Іншими словами, доречний тут ізольований варіант поліпептиду хімозину може містити зміни (наприклад, заміщення) в іншому положенні ніж положення, наприклад, згідно з першими аспектом.

Стосовно послідовностей хімозину, показаних тут на фіг. 1, у вівці послідовність на 94,5 % ідентична послідовності бичачого SEQ ID NO: 1; послідовність *C. bactrianus* (бактріан) на 83,2 % ідентична послідовності з бичачим SEQ ID NO: 1; у свині послідовність на 80,3 % ідентична послідовності з бичачим SEQ ID NO: 1, та у щура послідовність на 71,9 % ідентична з бичачим SEQ ID NO: 1.

Як зрозуміло фахівцю у даному контексті, процентні відношення доречної тут Ідентичності послідовності, наприклад, хімозину зрілої вівці, *C. bactrianus* (бактріану), верблюда, свині або щура щодо зрілого поліпептиду SEQ ID NO: 1 (бичачого хімозину, тобто позицій амінокислотних положень 59 – 381 SEQ ID NO: 1) є відносно подібними щодо вище згаданих процентних відношень Ідентичності послідовності.

Кращі варіанти:

Як розглянуто вище, наприклад, перший аспект стосується ізольованого варіанту поліпептиду хімозину, де зміна включає заміщення, видалення або введення принаймні в одному амінокислотному положенні, що відповідає будь-якому з положень 70; 75; 77; 79; 90; 102; 103; 108; 114; 117; 120; 124; 134; 154; 156; 163; 212; 223; 224; 238; 246; 256; 261; K279V; L280; F281; R300D, E, S, T, N, Q, C, U, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, W; G309; R312D, E, S, T, N, Q, C, U, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, W; 320; 324; D325Q; 326; 331; 336; 346; 361; 367 та 379.

Бажане утілення стосується ізольованого варіанту поліпептиду хімозину, де зміна містить заміщення, видалення або введення принаймні в одному амінокислотному положенні, що відповідає будь-якому з положень, наприклад, згідно з першим аспектом.

Може бути бажаним, якщо принаймні одна зміна є заміщенням, тобто доречне бажане утілення стосується виділеного варіанту поліпептиду хімозину, де зміна включає заміщення принаймні в на одному амінокислотному положенні, що відповідає будь-якому з положень, наприклад, згідно з першим аспектом.

Переважно, якщо ізольований варіант поліпептиду хімозину, де зміна включає заміщення принаймні в одному амінокислотному положенні положення, яке відповідає будь-якому з положень L70M; F75Y; K77T; Y79S; V90L; D102N; I103V; K120Q; F124Y; H134Q; I154L; D156V; L163E; S212A; S222G; M223E; L224V; L238I; Q246E; V256I; V261A; K279V; L280I; F281A; R300D, E, S, T, N, Q; R312D, E, S, T, N, Q; E320T; R324V; D325Q; Y326F; K336D, E, S, T, N, Q, C, U, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, W; S331Y; Q346E; I361L; V367I; або K379P.

Переважно, заміщенням є Q246E; K279V; R300Q; R312S; Y326F або K336D, E, S, T, N, Q, де переважним заміщенням K336 є K336Q.

Як зрозуміло фахівцю в даному контексті, якщо вихідний поліпептид хімозину вже має, наприклад, "V" в положенні 156, тоді немає сенсу говорити про заміщення 156V для цього конкретного вихідного поліпептиду хімозину. Як можна бачити на фіг. 1, тут хімозин дикого типу щура має "V" в положенні 156, заміщення 156V можна розглядати як недоречне тут для послідовності хімозину конкретного поліпептиду щура фіг. 1.

Як зрозуміло спеціалісту в даному контексті, якщо вихідний поліпептид хімозину не має, наприклад, "D" в положенні 156, тоді немає сенсу говорити про заміщення D156V для цього конкретного вихідного поліпептиду хімозину. Як можна бачити на фігурі 1, тут хімозин дикого типу щура має "V" в положенні 156, отже, можна бачити, що заміщення D156V тут недоречне для конкретної послідовності поліпептиду хімозину щура фігури 1.

Згідно із кращим утіленням заміщенням є:

H134Q+Q246E+Y326F;

D117N+L280I+G309D;

H134Q+D156V+G309D;

D156V+Q246E+L280I;

D117N+H134Q+L280I;

D156V+G309D+Y326F;

D117N+D156V+D325M;

L280I+D325M+Y326F;

D117N+Q246E+Y326F;

D117N+H134Q+D325M;

N310Q+N349Q+K279V;

R300Q+N307D;

N307D+G309D;

N307D+R312S;

R300Q+K336Q;

N307D+K336Q;

G309D+R312S;

R300Q+N307D+G309D+R312S+K336Q;

N158Q+N349Q+R300Q+N307D+G309D+R312S+K336Q;

L280I+G309D+S331Y+T342S+D325Q;

L280I+G309D+L224V+E320T+T235S;

L280I+G309W+K77T+R324I;

L280I+G309D+H134Q+V213F+F281A;

L280I+G309D+V213F+E320T+V90L;

L280I+G309D+Q220S+L224V+H134Q;

L280I+G309W+L238I+T342S;

L280I+G309W+F75Y+Y79S;

L280I+G309D+F75Y+S331Y+Q346E;

L280I+G309D+L224V+I103V+L238I;

L280I+G309D+F124Y+Q346E+I154L;

L280I+G309D+I154L+V261A+V367I;

L280I+G309D+Y79S+L224V+S212A;

L280I+G309D+L70M+T342S;

L280I+G309D+H134Q+M223E+L70M;

L280I+G309D+Y79S+T342S+I154L;

L280I+G309D+Y79S+I103V+F281A;

L280I+G309D+V256I+V261A+K379P;

L280I+G309D+Q346E+K77T+T235S;

L280I+G309D+H239N+R324I+D325Q;

L280I+G309D+H134Q+V213F+F281A;

L280I+G309D+Y326F+L70M+D325Q;

L280I+G309D+H134Q+M223E+L70M;

L280I+G309W+S212A+V261A;

L280I+G309D+S331Y+L224V+Y326F;

L280I+G309D+K120Q+M223E+H239N;

L280I+G309D+H239N+R324I+D325Q;

L280I+G309W+L238I+T342S;

L280I+G309D+V213F+E320T+V90L;

L280I+G309D+L70M+T342S;

- L280I+G309D+H134Q+V213F+F281A;
 L280I+G309D+Y79S+L224V+S212A;
 L280I+G309D+S331Y+L224V+Y326F;
 L280I+G309D+H134Q+M223E+L70M;
 5 L280I+G309W+L238I+T342S;
 L280I+G309D+V213F+E320T+V90L; або
 L280I+G309W+S212A+V261A.
 Згідно з більш переважним утіленням заміщення є наступним:
 D117N+L280I+G309D;
 10 L280I+D325M+Y326F;
 D117N+Q246E+Y326F;
 R300Q+N307D+G309D+R312S+K336Q; або
 N158Q+N349Q+R300Q+N307D+G309D+R312S+K336Q.
 Кращий вихідний поліпептид має активність хімозину:
 15 Послідовність переважного вихідного поліпептиду принаймні на 70 % ідентична
 послідовності зрілого поліпептиду SEQ ID NO: 1 (бичачого хімозину), послідовність більш
 переважного вихідного поліпептиду принаймні на 75 % ідентична послідовності зрілого
 поліпептиду SEQ ID NO: 1 (бичачого хімозину).
 Як обґрунтований приклад – тут придатний доречний вихідний поліпептид, наприклад, може
 20 бути бичачим хімозином А, який відомий в рівні техніки, бичачий хімозин може мати тільки одну
 амінокислотну відмінність стосовно бичачого хімозину В SEQ ID NO: 1.
 Як розглянуто вище, тут у діючих зразках розроблено варіанти із застосуванням поліпептиду
 SEQ ID NO: 1 (бичачого) як вихідного поліпептиду, такий варіант тут можна називати як варіанти
 бичачого хімозину.
 25 Відповідно, у переважному утіленні послідовність вихідного поліпептиду принаймні на 90 %
 ідентична послідовності зрілого поліпептиду SEQ ID NO: 1 (бичачого хімозину), та більш
 переважно послідовність вихідного поліпептиду принаймні на 95 % ідентична послідовності
 зрілого поліпептиду SEQ ID NO: 1 (бичачого хімозину), та найбільш переважно, якщо
 30 послідовність вихідного поліпептиду принаймні на 97 % ідентична послідовності зрілого
 поліпептиду SEQ ID NO: 1 (бичачого хімозину). Переважно, коли вихідний поліпептид є зрілим
 поліпептидом SEQ ID NO: 1 (бичачого хімозину).
 Як зрозуміло фахівцю в даному контексті, доречний тут вихідний поліпептид, який має
 активність хімозину, вже, наприклад, може бути варіантом, наприклад, відповідного хімозину
 дикого типу.
 35 Наприклад, бичачому варіанту хімозину, наприклад, з 5-10 змінами (наприклад,
 заміщеннями), який порівняний зі зрілим бичачим поліпептидом хімозину дикого типу SEQ ID
 NO: 1, також послідовність вихідного поліпептиду принаймні на 95 % має бути ідентична
 послідовності зрілого поліпептиду SEQ ID NO: 1 (бичачого хімозину).
 Зрілий поліпептид SEQ ID NO: 1 (бичачий) має довжину з 323 амінокислот, відповідно,
 40 бичачому варіанту хімозину, наприклад, з 25 амінокислотними заміщеннями, який порівняний
 зі зрілим бичачим поліпептидом хімозину дикого типу SEQ ID NO: 1, не слід бути вихідним
 поліпептидом, в якому послідовність принаймні на 95 % ідентична послідовності зрілого
 поліпептиду SEQ ID NO: 1 (бичачого хімозину).
 Іншими словами та загалом, доречний ізольований варіант поліпептиду хімозину може
 45 містити зміни (наприклад, заміщення) в інших положеннях ніж положення, наприклад, згідно з
 першим аспектом.
 Як розглянуто вище, у діючих зразках розроблено варіанти із застосуванням поліпептиду
 SEQ ID NO: 2 (верблюжого) як вихідного поліпептиду, такий варіант названо "верблюжим
 варіантом хімозину".
 50 Відповідно, згідно із переважним утіленням послідовність вихідного поліпептиду принаймні
 на 90 % ідентична послідовності зрілого поліпептиду SEQ ID NO: 2 (верблюжого хімозину),
 краще більш переважно, якщо послідовність вихідного поліпептиду принаймні на 95 %
 ідентична послідовності зрілого поліпептиду SEQ ID NO: 2 (верблюжого хімозину), та краще
 найбільш переважно, якщо послідовність вихідного поліпептиду принаймні на 97 % ідентична
 55 послідовності зрілого поліпептиду SEQ ID NO: 2 (верблюжого хімозину). Може бути
 переважним, коли вихідний поліпептид – зрілий поліпептид SEQ ID NO: 2 (верблюжий хімозин).
 Як зрозуміло фахівцю в даному контексті, вихідний поліпептид, послідовність якого
 принаймні на 90 % ідентична послідовності зрілого поліпептиду SEQ ID NO: 2 (верблюжого), ще
 є в межах потреби базованої Ідентичності послідовності SEQ ID NO: 1 (бичачого) пункту (ii)

першого аспекту, тобто це – вихідний поліпептид, послідовність якого принаймні на 65 % ідентична послідовності зрілого поліпептиду SEQ ID NO: 1 (бичачого хімозину).

Ізольований варіант бичачого хімозину:

5 Як розглянуто вище, у діючих зразках розроблено варіанти із застосуванням поліпептиду SEQ ID NO: 1 (бичачого) як вихідного поліпептиду, такий варіант тут названо як "варіанти бичачого хімозину".

Як розглянуто вище, третій аспект відповідно стосується ізольованого варіанту поліпептиду хімозину, наступне що має:

10 (a): зміну одному або більше положенням у вихідному поліпептиді, який має активність хімозину, де зміна включає заміщення, видалення або введення принаймні в одному амінокислотному положенні, що відповідає будь-якому з положень 70; 75; 77; 79; 90; 102; 103; 108; 114; 117; 120; 124; 134; 154; 156; 163; 212; 222; 223; 224; 238; 246; 256; 261; K279V; L280; F281; R300D, E, S, T, N, Q, C, U, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, W; G309; R312D, E, S, T, N, Q, C, U, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, W; 320; 324; D325Q; 326; 331; 336; 346; 361; 367 та 379; та

15 (b): варіант має активність хімозину;

та:

20 (i): амінокислотне положення вихідного поліпептиду визначено за вирівнюванням вихідного поліпептиду з поліпептидом SEQ ID NO: 1 (бичачого хімозину), тобто, поліпептид SEQ ID NO: 1 застосовано для визначення відповідної амінокислотної послідовності у вихідному поліпептиді; та

(ii): послідовність вихідного поліпептиду принаймні на 90 % ідентична послідовності зрілого поліпептиду SEQ ID NO: 1 (бичачого хімозину), який охоплює амінокислотне положення від 59 до 381 SEQ ID NO: 1; та

25 (iii): послідовність ізольованого варіанту поліпептиду менше, ніж на 100 % ідентична послідовності зрілого поліпептиду SEQ ID NO: 1 (бичачого хімозину);

та із застереженням, що ізольований варіант поліпептиду хімозину не є специфічним варіантом, вибраним з групи, що складається з:

Q246E+G309D+S329P+D337E;

R125Q+G128N+H204R+Q246E+S284T;

30 Y185F+R213Q+Q246E;

V261A+V263I+G309W+L311I+Y326F;

G128D+L188I+Y326F;

G128N+R312S+S313Y+Y326F;

G128N+R312S+S313Y+Y326F; та

35 D117N+V261A+R312S;

D216S+L224V+V263I+F281V+G309D

Y79S+L224V+L311I та

R119S+L224V+T297S.

Описані вище визначення та переважні утілення також є доречними щодо цього аспекту.

40 Переважно, якщо ізольований бичачий варіант поліпептиду хімозину, як тут описано, є варіантом, який має активність хімозину, що призводить до більш високого відношення К/П, порівняно з відношенням К/П бичачого хімозину, що має зрілий поліпептид SEQ ID NO: 1.

45 Згідно із переважним утіленням послідовність вихідного поліпептиду принаймні на 92 % ідентична послідовності зрілого поліпептиду SEQ ID NO: 1 (бичачого хімозину), краще більш переважно, якщо послідовність вихідного поліпептиду принаймні на 95 % ідентична послідовності зрілого поліпептиду SEQ ID NO: 1 (бичачого хімозину), та найбільш переважно, якщо послідовність вихідного поліпептиду принаймні на 97 % ідентична послідовності зрілого поліпептиду SEQ ID NO: 1 (бичачого хімозину). Переважним може бути, якщо вихідний поліпептид є зрілим поліпептидом SEQ ID NO: 1 (бичачого хімозину).

50 Як зрозуміло фахівцю в даному контексті, ізольований варіант хімозину може містити зміни (наприклад, заміщення) в інших амінокислотних положеннях, ніж надані вище.

Наприклад, бичачому варіанту хімозину, наприклад, з 5-10 змінами (наприклад, заміщеннями), який порівняний із диким типом бичачого поліпептиду хімозину SEQ ID NO: 1, ще слід бути вихідним поліпептидом, має послідовність якого принаймні на 95 % ідентична 55 послідовності зрілого поліпептиду SEQ ID NO: 1 (бичачого хімозину).

60 Це може бути переважним, коли ізольований варіант бичачого хімозину містить менше 30 амінокислотних змін (наприклад, заміщень), порівняно зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO: 1 (бичачим хімозином), або це може бути переважним, коли ізольований варіант бичачого хімозину містить менше 20 амінокислотних змін (наприклад, заміщень), порівняно зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO: 1 (бичачим хімозином), це може бути переважним, коли ізольований

варіант бичачого хімозину містить менше 10 амінокислотних змін (наприклад, заміщень), порівняно зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO: 1 (бичачий хімозин), це може бути переважним, коли ізольований варіант бичачого хімозину містить менше 5 амінокислотних змін (наприклад, заміщень), порівняно зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO: 1 (бичачим хімозином).

5 Як зрозуміло фахівцю в даному контексті, термін "послідовність ізольованого варіанту поліпептиду менше, ніж на 100 % ідентична послідовності зрілого поліпептиду SEQ ID NO: 1 (бичачого хімозину)" позначеного вище пункту (iii) стосується того, що описаний тут ізольований варіант бичачого хімозину звичайно не буде мати послідовності поліпептиду, яка є ідентичною на 100 % послідовності загально відомого дикого типу бичачого хімозину SEQ ID NO: 1.

10 Переважне утілення стосується ізольованого бичачого варіанту поліпептиду хімозину, де зміна містить заміщення, видалення або введення принаймні в одному амінокислотному положенні, що відповідає будь-якому положенню третього аспекту.

Може бути переважним, якщо принаймні одна зміна є заміщенням, тобто тут доречне переважне утілення стосується ізольованого варіанту поліпептиду хімозину, де зміна включає заміщення принаймні в одному амінокислотному положенні, що відповідає будь-якому з положень третього аспекту.

15 Переважно, якщо заміщенням є L70M; F75Y; K77T; Y79S; V90L; D102N; I103V; N108D; D117N; F114Y; K120Q; F124Y; H134Q; I154L; D156V; L163E; S212A; M223E; L224V; L238I; Q246E; V256I; V261A; K279V; L280I; F281A; R300D, E, S, T, N, Q; R312D, E, S, T, N, Q; E320T; 20 R324V; D325Q; Y326F; K336D, E, S, T, N, Q, C, U, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, W; S331Y; Q346E; I361L; V367I; або K379P.

Переважно, якщо заміщенням є Q246E; K279V; R300Q; R312S; Y326F або K336D, E, S, T, N, Q, де переважно заміщення K336 є K336Q.

Згідно із переважним утіленням заміщенням є:

25 H134Q+Q246E+Y326F;
D117N+L280I+G309D;
H134Q+D156V+G309D;
D156V+Q246E+L280I;
D117N+H134Q+L280I;
30 D156V+G309D+Y326F;
D117N+D156V+D325M;
L280I+D325M+Y326F;
D117N+Q246E+Y326F;
D117N+H134Q+D325M;
35 N310Q+N349Q+K279V;
R300Q+N307D;
N307D+G309D;
N307D+R312S;
R300Q+K336Q;
40 N307D+K336Q;
G309D+R312S;
R300Q+N307D+G309D+R312S+K336Q;
N158Q+N349Q+R300Q+N307D+G309D+R312S+K336Q;
L280I+G309D+S331Y+T342S+D325Q;
45 L280I+G309D+L224V+E320T+T235S;
L280I+G309W+K77T+R324I;
L280I+G309D+H134Q+V213F+F281A;
L280I+G309D+V213F+E320T+V90L;
L280I+G309D+Q220S+L224V+H134Q;
50 L280I+G309W+L238I+T342S;
L280I+G309W+F75Y+Y79S;
L280I+G309D+F75Y+S331Y+Q346E;
L280I+G309D+L224V+I103V+L238I;
L280I+G309D+F124Y+Q346E+I154L;
55 L280I+G309D+I154L+V261A+V367I;
L280I+G309D+Y79S+L224V+S212A;
L280I+G309D+L70M+T342S;
L280I+G309D+H134Q+M223E+L70M;
L280I+G309D+Y79S+T342S+I154L;
60 L280I+G309D+Y79S+I103V+F281A;

- 5 L280I+G309D+V256I+V261A+K379P;
L280I+G309D+Q346E+K77T+T235S;
L280I+G309D+H239N+R324I+D325Q;
L280I+G309D+H134Q+V213F+F281A;
L280I+G309D+Y326F+L70M+D325Q;
L280I+G309D+H134Q+M223E+L70M;
L280I+G309W+S212A+V261A;
L280I+G309D+S331Y+L224V+Y326F;
10 L280I+G309D+K120Q+M223E+H239N;
L280I+G309D+H239N+R324I+D325Q;
L280I+G309W+L238I+T342S;
L280I+G309D+V213F+E320T+V90L;
L280I+G309D+L70M+T342S;
L280I+G309D+H134Q+V213F+F281A;
15 L280I+G309D+Y79S+L224V+S212A;
L280I+G309D+S331Y+L224V+Y326F;
L280I+G309D+H134Q+M223E+L70M;
L280I+G309W+L238I+T342S;
L280I+G309D+V213F+E320T+V90L; або
20 L280I+G309W+S212A+V261A.
Згідно з більш переважним утіленням заміщенням є таким, де заміщенням є:
D117N+L280I+G309D;
L280I+D325M+Y326F;
D117N+Q246E+Y326F;
25 R300Q+N307D+G309D+R312S+K336Q; або
N158Q+N349Q+R300Q+N307D+G309D+R312S+K336Q.

Ізольований варіант верблюжого хімозину:

- Як розглянуто вище, у діючих зразках розроблено варіанти із застосуванням поліпептиду
30 SEQ ID NO: 2 (верблюжого хімозину) як вихідного поліпептиду, такий варіант тут названо
"верблюжий варіант хімозину".

Як розглянуто вище, четвертий аспект відповідно стосується ізольованого варіанту
поліпептиду хімозину, наступне що має:

- (а): зміну в одному або більше положеннях у вихідному поліпептиді, який має активність
хімозину, де зміна включає заміщення, видалення або введення принаймні в одному
35 амінокислотному положенні, що відповідає будь-якому з положень 70; 75; 77; 79; 90; 102; 103;
108; 114; 117; 120; 124; 134; 154; 156; 163; 212; 223; 224; 238; 246; 256; 261; K279V; L280; F281;
R300D, E, S, T, N, Q, C, U, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, W; G309; R312D, E, S, T, N, Q, C, U, G, P, A, V, I, L,
M, F, Y, W; 320; 324; D325Q; 326; 331; 336; 346; 361; 367 та 379; та

- (b): варіант має активність хімозину;
40 та:

- (i): амінокислотне положення вихідного поліпептиду визначено за вирівнюванням вихідного
поліпептиду з поліпептидом SEQ ID NO: 1 (бичачого хімозину), тобто, поліпептид SEQ ID NO: 1
застосовано для визначення відповідної амінокислотної послідовності у вихідному поліпептиді;
та

- 45 (ii): послідовність вихідного поліпептиду принаймні на 90 % ідентична послідовності зрілого
поліпептиду SEQ ID NO: 2 (верблюжого хімозину), який охоплює амінокислотне положення від
59 до 381 SEQ ID NO: 2; та

- (iii): послідовність ізольованого варіанту поліпептиду менше, ніж на 100 % ідентична
послідовності зрілого поліпептиду SEQ ID NO: 2 (верблюжого хімозину);

- 50 та із застереженням, що ізольований варіант поліпептиду хімозину не є специфічним
варіантом, вибраним з групи, що складається з:

- Q246E+G309D+S329P+D337E;
R125Q+G128N+H204R+Q246E+S284T;
Y185F+R213Q+Q246E;
55 V261A+V263I+G309W+L311I+Y326F;
G128D+L188I+Y326F;
G128N+R312S+S313Y+Y326F;
G128N+R312S+S313Y+Y326F;
D117N+V261A+R312S;
60 D216S+L224V+V263I+F281V+G309D;

Y79S+L224V+L311I; та
R119S+L224V+T297S.

Описані вище визначення та переважні утілення також є доречними щодо цього аспекту.

5 Переважно, якщо ізольований верблюжий варіант поліпептиду хімозину, який тут описано, є варіантом, де варіант має активність хімозину, що призводить до більш високого відношення К/П, порівняно з відношенням К/П верблюжого хімозину, що має зрілий поліпептид SEQ ID NO: 2.

10 Згідно із переважним утіленням послідовність вихідного поліпептиду принаймні на 92 % ідентична послідовності зрілого поліпептиду SEQ ID NO: 2 (верблюжого хімозину), краще більш переважно, якщо послідовність вихідного поліпептиду принаймні на 95 % ідентична послідовності зрілого поліпептиду SEQ ID NO: 2 (верблюжого хімозину), та найбільш переважно, якщо послідовність вихідного поліпептиду принаймні на 97 % ідентична послідовності зрілого поліпептиду SEQ ID NO: 2 (верблюжого хімозину). Переважним може бути, коли вихідний поліпептид – зрілий поліпептид SEQ ID NO: 2 (верблюжий хімозин).

15 Як зрозуміло фахівцю в даному контексті, ізольований варіант хімозину може містити зміни (наприклад, заміщення) в інших позиціях амінокислотних положеннях, ніж наведено вище.

Наприклад, верблюжому варіанту хімозину, наприклад, з 5-10 змінами (наприклад, заміщеннями), у порівнянні з диким типом верблюжого поліпептиду хімозину SEQ ID NO: 2, ще слід бути вихідним поліпептидом, має послідовність якого принаймні на 95 % ідентична 20 послідовності зрілого поліпептиду SEQ ID NO: 2 (верблюжого хімозину).

Може бути переважним, якщо ізольований верблюжий варіант хімозину містить менше 30 амінокислотних змін (наприклад, заміщень), порівняно зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO: 2 (верблюжим хімозином), може бути переважним, якщо ізольований верблюжий варіант хімозину містить менше 20 амінокислотних змін (наприклад, заміщень), порівняно зі зрілим поліпептидом 25 SEQ ID NO: 2 (верблюжим хімозином), може бути переважним, якщо ізольований верблюжий варіант хімозину містить менше 10 амінокислотних змін (наприклад, заміщень), порівняно зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO: 2 (верблюжим хімозином), може бути переважним, якщо ізольований верблюжий варіант хімозину містить менше 5 амінокислотних змін (наприклад, заміщень), порівняно зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO: 2 (верблюжим хімозином).

30 Як зрозуміло фахівцю в даному контексті, термін “ послідовність ізольованого варіанту поліпептиду менше, ніж на 100 % ідентична послідовності зрілого поліпептиду SEQ ID NO: 2 (верблюжого хімозину)” вказаного вище пункту (iii) стосується того, що описаний ізольований верблюжий варіант хімозину звичайно не буде мати послідовності поліпептиду, яка на 100 % ідентична послідовності загально відомого дикого тип верблюжого хімозину SEQ ID NO: 2.

35 Переважне утілення стосується ізольованого верблюжого варіанту поліпептиду хімозину, де зміна містить заміщення, видалення або введення принаймні в одному амінокислотному положенні, що відповідає будь-якому з положень четвертого аспекту.

Переважно, якщо принаймні одна зміна є заміщенням, тобто доречне переважне утілення стосується ізольованого варіанту поліпептиду хімозину, де зміна включає заміщення принаймні 40 в на одному амінокислотному положенні, що відповідає будь-якому з положень четвертого аспекту.

Переважно, якщо заміщенням є L70M; F75Y; K77T; Y79S; V90L; D102N; I103V; K120Q; F124Y; I154L; L163E; S212A; M223E; L224V; L238I; Q246E; V256I; V261A; K279V; R300D, E,S, 45 T,N, Q; R312D, E,S, T,N, Q; E320T; R324V; Y326F; K336D, E,S, T,N, Q,C, U,G, P,A, V,I, L,M, F,Y, W; S331Y; Q346E; I361L; V367I; або K379P.

Переважно, якщо заміщенням є Q246E; K279V; R300Q; R312S; Y326F або K336D, E,S, T,N, Q, де переважним заміщенням K336 є K336Q.

Згідно із переважним утіленням заміщенням є:

50 H134Q+Q246E+Y326F;
D117N+L280I+G309D;
H134Q+D156V+G309D;
D156V+Q246E+L280I;
D117N+H134Q+L280I;
D156V+G309D+Y326F;
55 D117N+D156V+D325M;
L280I+D325M+Y326F;
D117N+Q246E+Y326F;
D117N+H134Q+D325M;
N310Q+N349Q+K279V;
60 R300Q+N307D;

- N307D+G309D;
 N307D+R312S;
 R300Q+K336Q;
 N307D+K336Q;
 5 G309D+R312S;
 R300Q+N307D+G309D+R312S+K336Q;
 N158Q+N349Q+R300Q+N307D+G309D+R312S+K336Q;
 L280I+G309D+S331Y+T342S+D325Q;
 L280I+G309D+L224V+E320T+T235S;
 10 L280I+G309W+K77T+R324I;
 L280I+G309D+H134Q+V213F+F281A;
 L280I+G309D+V213F+E320T+V90L;
 L280I+G309D+Q220S+L224V+H134Q;
 L280I+G309W+L238I+T342S;
 15 L280I+G309W+F75Y+Y79S;
 L280I+G309D+F75Y+S331Y+Q346E;
 L280I+G309D+L224V+I103V+L238I;
 L280I+G309D+F124Y+Q346E+I154L;
 L280I+G309D+I154L+V261A+V367I;
 20 L280I+G309D+Y79S+L224V+S212A;
 L280I+G309D+L70M+T342S;
 L280I+G309D+H134Q+M223E+L70M;
 L280I+G309D+Y79S+T342S+I154L;
 L280I+G309D+Y79S+I103V+F281A;
 25 L280I+G309D+V256I+V261A+K379P;
 L280I+G309D+Q346E+K77T+T235S;
 L280I+G309D+H239N+R324I+D325Q;
 L280I+G309D+H134Q+V213F+F281A;
 L280I+G309D+Y326F+L70M+D325Q;
 30 L280I+G309D+H134Q+M223E+L70M;
 L280I+G309W+S212A+V261A;
 L280I+G309D+S331Y+L224V+Y326F;
 L280I+G309D+K120Q+M223E+H239N;
 L280I+G309D+H239N+R324I+D325Q;
 35 L280I+G309W+L238I+T342S;
 L280I+G309D+V213F+E320T+V90L;
 L280I+G309D+L70M+T342S;
 L280I+G309D+H134Q+V213F+F281A;
 L280I+G309D+Y79S+L224V+S212A;
 40 L280I+G309D+S331Y+L224V+Y326F;
 L280I+G309D+H134Q+M223E+L70M;
 L280I+G309W+L238I+T342S;
 L280I+G309D+V213F+E320T+V90L; або
 L280I+G309W+S212A+V261A.
 45 Згідно з більш переважним утіленням заміщенням є:
 D117N+L280I+G309D;
 L280I+D325M+Y326F;
 D117N+Q246E+Y326F;
 R300Q+N307D+G309D+R312S+K336Q; або
 50 N158Q+N349Q+R300Q+N307D+G309D+R312S+K336Q.
 Спосіб отримання продукту на основі молока

Як розглянуто вище, ізольований варіант поліпептиду хімозину, як описано, можна застосовувати згідно з рівнем техніки, наприклад, отримувати бажаний продукт на основі молока (як-то, наприклад, сирний продукт).

- 55 Як розглянуто вище, згідно з аспектом винахід стосується способу отримання харчового або кормового продукту, який полягає в додаванні ефективної кількості ізольованого варіанту поліпептиду хімозину, як тут описано, до харчових або кормових інгредієнтів та здійсненні наступних операцій виготовлення для отримання харчового або кормового продукту.

- 60 Переважно, якщо харчовий або кормовий продукт є продуктом на основі молока, та де спосіб полягає в додаванні ефективної кількості ізольованого варіанту поліпептиду хімозину, як

описано, до молока та здійсненні наступних операцій виготовлення для отримання продукту на основі молока.

Молоком, наприклад, може бути: соєве молоко, молоко вівці, молоко кози, молоко буйвола, молоко яка, молоко лами, молоко верблюда або молоко корови.

5 Продуктом на основі молока, наприклад, може бути кисломолочним продуктом, сиром або твердим сиром.

Аспекти/Втілення надано у форматі формули винаходу

Описані тут аспекти та переважні утілення винаходу можна надавати/описувати в так званому форматі формули винаходу, що наведено нижче.

10 1. Спосіб отримання ізолюваного варіанту поліпептиду хімозину, який полягає в:

(а): здійсненні зміни в одному або більше положеннях у вихідному поліпептиді, який має активність хімозину, причому зміна включає заміщення, видалення або введення принаймні в одному амінокислотному положенні, що відповідає будь-якому з положень 70; 75; 77; 79; 90; 102; 103; 108; 114; 117; 120; 124; 134; 154; 156; 163; 212; 222; 223; 224; 238; 246; 256; 261; 15 K279V; L280; F281; R300D, E, S, T, N, Q, C, U, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, W; G309; R312D, E, S, T, N, Q, C, U, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, W; 320; 324; D325Q; 326; 331; 336; 346; 361; 367 та 379; та

(b): отриманні та ізолюванні зміненого поліпептиду операції (а) та отриманні таким чином ізолюваного варіанту поліпептиду хімозину, який має активність хімозину;

та в якому:

20 (i): амінокислотне положення вихідного поліпептиду визначають за вирівнюванням вихідного поліпептиду з поліпептидом SEQ ID NO: 1 (бичачого хімозину), тобто, поліпептид SEQ ID NO: 1 застосовують для визначення відповідної амінокислотної послідовності у вихідному поліпептиді; та

25 (ii): послідовність вихідного поліпептиду принаймні на 65 % ідентична послідовності зрілого поліпептиду SEQ ID NO: 1 (бичачого хімозину), що охоплює амінокислотне положення від 59 до 381 SEQ ID NO: 1;

та із застереженням, що ізолюваний варіант поліпептиду хімозину не є специфічним варіантом, вибраним з групи, що складається з:

Q246E+G309D+S329P+D337E;

30 R125Q+G128N+H204R+Q246E+S284T;

Y185F+R213Q+Q246E;

V261A+V263I+G309W+L311I+Y326F;

G128D+L188I+Y326F;

G128N+R312S+S313Y+Y326F;

35 G128N+R312S+S313Y+Y326F;

D117N+V261A+R312S;

D216S+L224V+V263I+F281V+G309D;

Y79S+L224V+L311I; та

R119S+L224V+T297S.

40 2. Спосіб отримання ізолюваного варіанту поліпептиду хімозину за п. 1, в якому ізолюваний варіант поліпептиду хімозину має:

- активність хімозину, що призводить до більш високого відношення К/П, порівняно з відношенням К/П бичачого хімозину, який містить зрілий поліпептид SEQ ID NO: 1; та

45 - активність хімозину, що призводить до більш високого відношення К/П, порівняно з відношенням К/П верблюжого хімозину, який містить зрілий поліпептид SEQ ID NO: 2.

3. Спосіб отримання ізолюваного варіанту поліпептиду хімозину за будь-яким з попередніх пунктів, в якому зміна включає заміщення, видалення або введення принаймні в одному амінокислотному положенні, що відповідає будь-якому з положень за п. 1.

50 4. Спосіб отримання ізолюваного варіанту поліпептиду хімозину за будь-яким з попередніх пунктів, в якому зміна включає заміщення принаймні в одному амінокислотному положенні, що відповідає будь-якому з положень за п. 1.

5. Спосіб отримання ізолюваного варіанту поліпептиду хімозину за п. 4, в якому заміщенням є L70M; F75Y; K77T; Y79S; V90L; D102N; I103V; N108D; D117N; F114Y; K120Q; F124Y; H134Q; I154L; D156V; L163E; S212A; S222G; M223E; L224V; L238I; Q246E; V256I; V261A; K279V; L280I; 55 F281A; R300D, E, S, T, N, Q; R312D, E, S, T, N, Q; E320T; R324V; D325Q; Y326F; K336D, E, S, T, N, Q, C, U, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, W; S331Y; Q346E; I361L; V367I; або K379P.

6. Спосіб отримання ізолюваного варіанту поліпептиду хімозину за п. 5, в якому заміщенням є Q246E; K279V; R300Q; R312S; Y326F або K336D, E, S, T, N, Q.

60 7. Спосіб отримання ізолюваного варіанту поліпептиду хімозину за п. 6, в якому заміщенням є K336Q.

8. Спосіб отримання ізольованого варіанту поліпептиду хімозину за п. 4, в якому заміщенням є:

- 5 H134Q+Q246E+Y326F;
D117N+L280I+G309D;
H134Q+D156V+G309D;
D156V+Q246E+L280I;
D117N+H134Q+L280I;
D156V+G309D+Y326F;
D117N+D156V+D325M;
- 10 L280I+D325M+Y326F;
D117N+Q246E+Y326F;
D117N+H134Q+D325M;
N310Q+N349Q+K279V;
R300Q+N307D;
N307D+G309D;
N307D+R312S;
R300Q+K336Q;
N307D+K336Q;
G309D+R312S;
- 20 R300Q+N307D+G309D+R312S+K336Q;
N158Q+N349Q+R300Q+N307D+G309D+R312S+K336Q;
L280I+G309D+S331Y+T342S+D325Q;
L280I+G309D+L224V+E320T+T235S;
L280I+G309W+K77T+R324I;
- 25 L280I+G309D+H134Q+V213F+F281A;
L280I+G309D+V213F+E320T+V90L;
L280I+G309D+Q220S+L224V+H134Q;
L280I+G309W+L238I+T342S;
L280I+G309W+F75Y+Y79S;
- 30 L280I+G309D+F75Y+S331Y+Q346E;
L280I+G309D+L224V+I103V+L238I;
L280I+G309D+F124Y+Q346E+I154L;
L280I+G309D+I154L+V261A+V367I;
L280I+G309D+Y79S+L224V+S212A;
- 35 L280I+G309D+L70M+T342S;
L280I+G309D+H134Q+M223E+L70M;
L280I+G309D+Y79S+T342S+I154L;
L280I+G309D+Y79S+I103V+F281A;
L280I+G309D+V256I+V261A+K379P;
- 40 L280I+G309D+Q346E+K77T+T235S;
L280I+G309D+H239N+R324I+D325Q;
L280I+G309D+H134Q+V213F+F281A;
L280I+G309D+Y326F+L70M+D325Q;
L280I+G309D+H134Q+M223E+L70M;
- 45 L280I+G309W+S212A+V261A;
L280I+G309D+S331Y+L224V+Y326F;
L280I+G309D+K120Q+M223E+H239N;
L280I+G309D+H239N+R324I+D325Q;
L280I+G309W+L238I+T342S;
- 50 L280I+G309D+V213F+E320T+V90L;
L280I+G309D+L70M+T342S;
L280I+G309D+H134Q+V213F+F281A;
L280I+G309D+Y79S+L224V+S212A;
L280I+G309D+S331Y+L224V+Y326F;
- 55 L280I+G309D+H134Q+M223E+L70M;
L280I+G309W+L238I+T342S;
L280I+G309D+V213F+E320T+V90L; або
L280I+G309W+S212A+V261A.

9. Спосіб отримання ізольованого варіанту поліпептиду хімозину за п. 4, в якому заміщенням є:

60

D117N+L280I+G309D;
L280I+D325M+Y326F;
D117N+Q246E+Y326F;

R300Q+N307D+G309D+R312S+K336Q; або
5 N158Q+N349Q+R300Q+N307D+G309D+R312S+K336Q.

10. Спосіб отримання ізолюваного варіанту поліпептиду хімозину за будь-яким з попередніх пунктів, в якому послідовність вихідного поліпептиду принаймні на 75 % ідентична послідовності зрілого поліпептиду SEQ ID NO: 1 (бичачого хімозину).

11. Спосіб отримання ізолюваного варіанту поліпептиду хімозину за п. 10, в якому послідовність вихідного поліпептиду принаймні на 95 % ідентична послідовності зрілого поліпептиду SEQ ID NO: 1 (бичачого хімозину).

12. Спосіб отримання ізолюваного варіанту поліпептиду хімозину за будь-яким з пп. 1–9, в якому послідовність вихідного поліпептиду принаймні на 95 % ідентична послідовності зрілого поліпептиду SEQ ID NO: 2 (верблюжого хімозину), який охоплює амінокислотне положення від 59 до 381 SEQ ID NO: 2.

13. Ізолюваний варіант поліпептиду хімозину, отриманий способом за будь-яким з пп. 1–12.

14. Ізолюваний варіант поліпептиду хімозину, наступне що має:

(а): зміну в одному або більше положеннях у вихідному поліпептиді, який має активність хімозину, де зміна включає заміщення, видалення або введення принаймні в одному амінокислотному положенні, що відповідає будь-якому з положень 70; 75; 77; 79; 90; 102; 103; 108; 114; 117; 120; 124; 134; 154; 156; 163; 212; 222; 223; 224; 238; 246; 256; 261; K279V; L280; F281; R300D, E, S, T, N, Q, C, U, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, W; G309; R312D, E, S, T, N, Q, C, U, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, W; 320; 324; D325Q; 326; 331; 336; 346; 361; 367 та 379; та

(b): варіант має активність хімозину;
25 та:

(i): амінокислотне положення вихідного поліпептиду визначено за вирівнюванням вихідного поліпептиду з поліпептидом SEQ ID NO: 1 (бичачого хімозину), тобто, поліпептид SEQ ID NO: 1 застосовано для визначення відповідної амінокислотної послідовності у вихідному поліпептиді; та

(ii): послідовність вихідного поліпептиду принаймні на 90 % ідентична послідовності зрілого поліпептиду SEQ ID NO: 1 (бичачого хімозину), який охоплює амінокислотне положення від 59 до 381 SEQ ID NO: 1; та

(iii): послідовність ізолюваного варіанту поліпептиду менше, ніж на 100 % ідентична послідовності зрілого поліпептиду SEQ ID NO: 1 (бичачого хімозину);

35 та із застереженням, що ізолюваний варіант поліпептиду хімозину не є специфічним варіантом, вибраним з групи, що складається з:

Q246E+G309D+S329P+D337E;
R125Q+G128N+H204R+Q246E+S284T;
Y185F+R213Q+Q246E;
40 V261A+V263I+G309W+L311I+Y326F;
G128D+L188I+Y326F;
G128N+R312S+S313Y+Y326F;
G128N+R312S+S313Y+Y326F;
D117N+V261A+R312S;
45 D216S+L224V+V263I+F281V+G309D
Y79S+L224V+L311I та
R119S+L224V+T297S.

15. Ізолюваний варіант поліпептиду хімозину за п. 14, який має активність хімозину, що призводить до більш високого відношення К/П, порівняно з відношенням К/П бичачого хімозину, який має зрілий поліпептид SEQ ID NO: 1.

16. Ізолюваний варіант поліпептиду хімозину за будь-яким з пп. 14–15, в якому послідовність вихідного поліпептиду принаймні на 97 % ідентична послідовності зрілого поліпептиду SEQ ID NO: 1 (бичачого хімозину).

17. Ізолюваний варіант поліпептиду хімозину за будь-яким з пп. 14–16, в якому ізолюваний варіант бичачого хімозину містить менше 10 амінокислотних змін (наприклад, заміщень), порівняно зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO: 1 (бичачого хімозину).

18. Ізолюваний варіант поліпептиду хімозину за будь-яким з пп. 14–17, в якому зміна включає заміщення, видалення або введення принаймні в одному амінокислотному положенні, що відповідає будь-якому з положень за п. 14.

19. Ізольований варіант поліпептиду хімозину за будь-яким з пп. 16–18, в якому зміна включає заміщення принаймні в одному амінокислотному положенні, що відповідає будь-якому з положень за п. 14.

20. Ізольований варіант поліпептиду хімозину за п. 19, в якому заміщенням є L70M; F75Y; K77T; Y79S; V90L; D102N; I103V; N108D; D117N; F114Y; K120Q; F124Y; H134Q; I154L; D156V; L163E; S212A; S222G; M223E; L224V; L238I; Q246E; V256I; V261A; K279V; L280I; F281A; R300D; E,S, T,N, Q; G309D, W; R312D, E,S, T,N, Q; E320T; R324V; D325Q; Y326F; K336D, E,S, T,N, Q,C, U,G, P,A, V,I, L,M, F,Y, W; S331Y; Q346E; I361L; V367I; або K379P.

21. Ізольований варіант поліпептиду хімозину за п. 20, в якому заміщенням є Q246E; K279V; R300Q; R312S; Y326F або K336D, E,S, T,N, Q.

22. Ізольований варіант поліпептиду хімозину за п. 21, в якому заміщенням є K336Q.

23. Ізольований варіант поліпептиду хімозину за п. 19, в якому заміщенням є:

H134Q+Q246E+Y326F;
D117N+L280I+G309D;
H134Q+D156V+G309D;
D156V+Q246E+L280I;
D117N+H134Q+L280I;
D156V+G309D+Y326F;
D117N+D156V+D325M;
L280I+D325M+Y326F;
D117N+Q246E+Y326F;
D117N+H134Q+D325M;
N310Q+N349Q+K279V;
R300Q+N307D;
N307D+G309D;
N307D+R312S;
R300Q+K336Q;
N307D+K336Q;
G309D+R312S;
R300Q+N307D+G309D+R312S+K336Q;
N158Q+N349Q+R300Q+N307D+G309D+R312S+K336Q;
L280I+G309D+S331Y+T342S+D325Q;
L280I+G309D+L224V+E320T+T235S;
L280I+G309W+K77T+R324I;
L280I+G309D+H134Q+V213F+F281A;
L280I+G309D+V213F+E320T+V90L;
L280I+G309D+Q220S+L224V+H134Q;
L280I+G309W+L238I+T342S; L280I+G309W+F75Y+Y79S;
L280I+G309D+F75Y+S331Y+Q346E;
L280I+G309D+L224V+I103V+L238I;
L280I+G309D+F124Y+Q346E+I154L;
L280I+G309D+I154L+V261A+V367I;
L280I+G309D+Y79S+L224V+S212A;
L280I+G309D+L70M+T342S;
L280I+G309D+H134Q+M223E+L70M;
L280I+G309D+Y79S+T342S+I154L;
L280I+G309D+Y79S+I103V+F281A;
L280I+G309D+V256I+V261A+K379P;
L280I+G309D+Q346E+K77T+T235S;
L280I+G309D+H239N+R324I+D325Q;
L280I+G309D+H134Q+V213F+F281A;
L280I+G309D+Y326F+L70M+D325Q;
L280I+G309D+H134Q+M223E+L70M;
L280I+G309W+S212A+V261A;
L280I+G309D+S331Y+L224V+Y326F;
L280I+G309D+K120Q+M223E+H239N;
L280I+G309D+H239N+R324I+D325Q;
L280I+G309W+L238I+T342S;
L280I+G309D+V213F+E320T+V90L;
L280I+G309D+L70M+T342S;

- L280I+G309D+H134Q+V213F+F281A;
 L280I+G309D+Y79S+L224V+S212A;
 L280I+G309D+S331Y+L224V+Y326F;
 L280I+G309D+H134Q+M223E+L70M;
 5 L280I+G309W+L238I+T342S;
 L280I+G309D+V213F+E320T+V90L; або
 L280I+G309W+S212A+V261A.
24. Ізольований варіант поліпептиду хімозину за п. 19, в якому заміщенням є:
 D117N+L280I+G309D;
 10 L280I+D325M+Y326F;
 D117N+Q246E+Y326F;
 R300Q+N307D+G309D+R312S+K336Q; або
 N158Q+N349Q+R300Q+N307D+G309D+R312S+K336Q.
25. Ізольований варіант поліпептиду хімозину, що має:
 15 (a): зміну в одному або більше положеннях у вихідному поліпептиді, який має активність хімозину, де зміна включає заміщення, видалення або введення принаймні в одному амінокислотному положенні, що відповідає будь-якому з положень 70; 75; 77; 79; 90; 102; 103; 108; 114; 117; 120; 124; 134; 154; 156; 163; 212; 222; 223; 224; 238; 246; 256; 261; K279V; L280; F281; R300D, E, S, T, N, Q, C, U, G, P, A, V, I, L, M, F, Y, W; G309; R312D, E, S, T, N, Q, C, U, G, P, A, V, I,
 20 L, M, F, Y, W; 320; 324; D325Q; 326; 331; 336; 346; 361; 367 та 379; та
 (b): варіант має активність хімозину;
 та:
 (i): амінокислотне положення вихідного поліпептиду визначено за вирівнюванням вихідного поліпептиду з поліпептидом SEQ ID NO: 1 (бичачого хімозину), тобто, поліпептид SEQ ID NO: 1 застосовано для визначення відповідної амінокислотної послідовності у вихідному поліпептиді;
 25 та
 (ii): послідовність вихідного поліпептиду принаймні на 90 % ідентична послідовності зрілого поліпептиду SEQ ID NO: 2 (верблюжого хімозину), що охоплює амінокислотне положення від 59 до 381 SEQ ID NO: 2; та
 30 (iii): послідовність ізольованого варіанту поліпептиду менше, ніж на 100 % ідентична послідовності зрілого поліпептиду SEQ ID NO: 2 (верблюжого хімозину);
 та із застереженням, що ізольований варіант поліпептиду хімозину не є специфічним варіантом, вибраним з групи, що складається з:
 Q246E+G309D+S329P+D337E;
 35 R125Q+G128N+H204R+Q246E+S284T;
 Y185F+R213Q+Q246E;
 V261A+V263I+G309W+L311I+Y326F;
 G128D+L188I+Y326F;
 G128N+R312S+S313Y+Y326F;
 40 G128N+R312S+S313Y+Y326F;
 D117N+V261A+R312S;
 D216S+L224V+V263I+F281V+G309D;
 Y79S+L224V+L311I; та
 R119S+L224V+T297S.
- 45 26. Ізольований варіант поліпептиду хімозину за п. 25, який має активність хімозину, що призводить до більш високого відношення К/П, порівняно з відношенням К/П верблюжого хімозину, який має зрілий поліпептид SEQ ID NO: 2.
27. Ізольований варіант поліпептиду хімозину за будь-яким з пп. 25–26, в якому послідовність вихідного поліпептиду принаймні на 97 % ідентична послідовності зрілого поліпептиду SEQ ID NO: 2 (верблюжого хімозину).
 50
28. Ізольований варіант поліпептиду хімозину за будь-яким з пп. 25–26, який містить менше 10 амінокислотних змін (наприклад, заміщень), порівняно зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO: 2 (верблюжий хімозин).
29. Ізольований варіант поліпептиду хімозину за будь-яким з пп. 25–28, в якому зміна включає заміщення, видалення або введення принаймні в одному амінокислотному положенні, що відповідає будь-якому з положень за п. 23.
 55
30. Ізольований варіант поліпептиду хімозину за будь-яким з пп. 25–29, в якому зміна включає заміщення принаймні в одному амінокислотному положенні, що відповідає будь-якому з положень за п. 23.

31. Ізольований варіант поліпептиду хімозину за п. 30, в якому заміщенням є L70M; F75Y; K77T; Y79S; V90L; D102N; I103V; N108D; D117N; F114Y; K120Q; F124Y; H134Q; I154L; D156V; L163E; S212A; S222G; M223E; L224V; D325Q; L238I; Q246E; V256I; V261A; K279V; L280I; F281A; R300D, E,S, T,N, Q; G309D, W; R312D, E,S, T,N, Q; E320T; R324V; Y326F; K336D, E,S, T,N, Q,C, U,G, P,A, V,I, L,M, F,Y, W; S331Y; Q346E; I361L; V367I; або K379P.

32. Ізольований варіант поліпептиду хімозину за п. 31, в якому заміщенням є Q246E; K279V; R300Q; R312S; Y326F або K336D, E,S, T,N, Q.

33. Ізольований варіант поліпептиду хімозину за п. 32, в якому заміщенням є K336Q.

34. Ізольований варіант поліпептиду хімозину за п. 30, в якому заміщенням є:

- 10 H134Q+Q246E+Y326F;
D117N+L280I+G309D;
H134Q+D156V+G309D;
D156V+Q246E+L280I;
D117N+H134Q+L280I;
15 D156V+G309D+Y326F;
D117N+D156V+D325M;
L280I+D325M+Y326F;
D117N+Q246E+Y326F;
D117N+H134Q+D325M;
20 N310Q+N349Q+K279V;
R300Q+N307D;
N307D+G309D;
N307D+R312S;
R300Q+K336Q;
25 N307D+K336Q;
G309D+R312S;
R300Q+N307D+G309D+R312S+K336Q;
N158Q+N349Q+R300Q+N307D+G309D+R312S+K336Q;
L280I+G309D+S331Y+T342S+D325Q;
30 L280I+G309D+L224V+E320T+T235S;
L280I+G309W+K77T+R324I;
L280I+G309D+H134Q+V213F+F281A;
L280I+G309D+V213F+E320T+V90L;
L280I+G309D+Q220S+L224V+H134Q;
35 L280I+G309W+L238I+T342S;
L280I+G309W+F75Y+Y79S;
L280I+G309D+F75Y+S331Y+Q346E;
L280I+G309D+L224V+I103V+L238I;
L280I+G309D+F124Y+Q346E+I154L;
40 L280I+G309D+I154L+V261A+V367I;
L280I+G309D+Y79S+L224V+S212A;
L280I+G309D+L70M+T342S;
L280I+G309D+H134Q+M223E+L70M;
L280I+G309D+Y79S+T342S+I154L;
45 L280I+G309D+Y79S+I103V+F281A;
L280I+G309D+V256I+V261A+K379P;
L280I+G309D+Q346E+K77T+T235S;
L280I+G309D+H239N+R324I+D325Q;
L280I+G309D+H134Q+V213F+F281A;
50 L280I+G309D+Y326F+L70M+D325Q;
L280I+G309D+H134Q+M223E+L70M;
L280I+G309W+S212A+V261A;
L280I+G309D+S331Y+L224V+Y326F;
L280I+G309D+K120Q+M223E+H239N;
55 L280I+G309D+H239N+R324I+D325Q;
L280I+G309W+L238I+T342S;
L280I+G309D+V213F+E320T+V90L;
L280I+G309D+L70M+T342S;
L280I+G309D+H134Q+V213F+F281A;
60 L280I+G309D+Y79S+L224V+S212A;

L280I+G309D+S331Y+L224V+Y326F;
L280I+G309D+H134Q+M223E+L70M;
L280I+G309W+L238I+T342S;
L280I+G309D+V213F+E320T+V90L; або

5 L280I+G309W+S212A+V261A.

35. Ізольований варіант поліпептиду хімозину за п. 30, в якому заміщенням є:

D117N+L280I+G309D;
L280I+D325M+Y326F;
D117N+Q246E+Y326F;

10 R300Q+N307D+G309D+R312S+K336Q; або
N158Q+N349Q+R300Q+N307D+G309D+R312S+K336Q.

36: Спосіб отримання харчового або кормового продукту, який полягає в додаванні ефективною кількості ізольованого варіанту поліпептиду хімозину за будь-яким з пп. 14–35 до харчових або кормових інгредієнтів та здійсненні наступних операцій виготовлення для отримання харчового або кормового продукту.

15 37: Спосіб отримання харчового або кормового продукту за п. 35, в якому продукт є продуктом на основі молока, та спосіб полягає в додаванні до молока ефективною кількості ізольованого варіанту поліпептиду хімозину за будь-яким з пп. 14–36 та здійсненні наступних операцій виготовлення для отримання продукту на основі молока.

20 38: Спосіб отримання продукту на основі молока за п. 37, в якому молоком є соєве молоко, молоко вівці, молоко кози, молоко буйвола, молоко яка, молоко лами, молоко верблюда або молоко корови.

39: Спосіб отримання продукту на основі молока за будь-яким з пп. 36–38, в якому продуктом на основі молока є кисломолочний продукт, сир або твердий сир.

25 Приклади

Приклад 1: угруповання та нумерація послідовності білку хімозину та послідовності варіанту Послідовності білку хімозину вирівнювали, застосовуючи алгоритм ClustalW algorithm відповідно до EBI (EBI, інструментальні засоби, регулювання кратної послідовності, CLUSTALW", <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) та як описано в Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007). Bioinformatics 23(21), 2947-2948.

Настановні параметри ClustalW2 settings для регулювань кратної послідовності були (Вагова матриця білку) Protein weight Matrix=BLOSUM, GAP open=10, GAP EXTENSION=0,05, GAP DISTANCES=8, No End Gaps, ITERATION=none, NUMITER=1, CLUSTERING=NJ

35 Як стандартну послідовність бичачий хімозин препрохімозин В застосовано (інвентарний номер Genbank P00794 тут розкрито як SEQ ID NO: 1), де N-кінцевий метіонін має число 1 (MRCL.....), та C-кінцевий ізолейцин (в білковій послідовності ...LAKAI) має число 381. Варіанти вирівнювали стосовно бичачого пре-про-хімозину В, та залишки нумерували згідно з відповідним залишком бичачого хімозину.

40 Приклад 2: Варіанти конструкції хімозину

Варіанти хімозину розробляли, застосовуючи різні стратегії.

Коли це стосувалося верблюжого хімозину, це стосувалося верблюжого хімозину, який охоплював поліпептид SEQ ID NO: тут 2.

45 Верблюжий хімозин SEQ ID NO: 2 можна розглядати тут як доречний вихідний поліпептид, який мав, активність хімозину, застосованого для створення варіантів цього верблюжого хімозину.

Коли стосувалося бичачого хімозину, то це – бичачий хімозин, який охоплював поліпептид SEQ ID NO: тут 1.

50 Бичачий хімозин SEQ ID NO: 1 можна розглядати як доречний тут вихідний поліпептид, який мав, активність хімозину, застосованого для створення варіантів цього бичачого хімозину.

Розробляли варіанти верблюжого хімозину, базовані на угрупованні великого набору загально відомих послідовностей аспарагінової протеази, які мають ідентичність 25 % або більше в порівнянні з бичачим хімозином В.

55 Варіанти звичайно вводили в гіперваріабельні ділянки, тоді, якщо збережені ділянки не змінювали. чисельні варіанти, вводили в кожний варіант конструкції, забезпечуючи кожну одиничну мутацію, присутню в чисельних варіантах конструкцій (для обговорення результатів дивись приклад 6 нижче).

60 Варіанти бичачого хімозину розробляли на базі співставлення бичачого та верблюжого хімозину. Бичачі залишки, наприклад, обмінювали на верблюжий прототип (для обговорення результатів дивись приклад 7 нижче).

Приклад 3: Отримання матеріалу варіантного хімозинового ферменту

Усі варіанти хімозину синтезували як синтетичні гени та клонували в грибовий вектор експресії відповідно суттєво, до pGAMpR-C (описано в WO02/36752A2)

Вектори перетворювали до *E. coli*, та плазмідну ДНК очищали, застосовуючи стандартні протоколи молекулярної біології, відомі фахівцю в рівні техніки.

Варіантні плазмиди окремо перетворювали до роду *Aspergillus niger* або *Aspergillus nidulans*, та білок отримували суттєво, як описано в WO02/36752A2, та очищали, застосовуючи стандартні способи хроматографії.

Як відомо в рівні техніки, спеціаліст може, на базі загального рівня техніки, отримувати та очищати хімозин та варіанти хімозину, як-то описані тут варіанти бичачого та верблюжого хімозину.

Приклад 4: Визначення конкретної активності хімозину

4,1 Визначення активності згортання

Активність згортання молока визначали, застосовуючи спосіб REMCAT, який є стандартним способом, розвинутим International Dairy Federation (спосіб IDF)

Активність згортання молока визначено згідно часу, потрібного для візуальної флокуляції стандартного молочного субстрату, отриманого із сухого молока низького тепла та низької жирності, з розчином кальцій хлориду 0,5 г на літр (pH \approx 6,5). Час згортання сичужного зразку є порівнянням зі стандартним зразком, який має відому активність згортання молока, та який має ту саму ферментну композицію за зразком IDF Standard 110B. Зразки та стандартні зразки визначали в ідентичних хімічних та фізичних умовах. Зразки варіантів регулювали приблизно до 3 IMCU/мл, застосовуючи 84 mM буфер оцтової кислоти pH 5,5. Потім додавали 200 мкл ферменту до 10 мл попередньо нагрітого молока (32 °C) у скляній пробірці, розміщеній у водяній бані, здатній підтримувати постійну температуру 32 °C \pm 1 °C під постійному перемішуванні.

Активність сичужного ферменту до повного згортання молока (інтенсивність) розраховували в Міжнародних одиницях згортання молока (IMCU) на мл стосовно стандарту, який має ту саму ферментну композицію як зразок згідно з формулою:

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

S_{standard} : Активність згортання молока міжнародного стандартного зразку для сичужного ферменту.

T_{standard} : Час згортання в секундах, отриманий для стандартного розбавлення.

D_{sample} : Фактор розбавлення для зразка

D_{standard} : Фактор розбавлення для стандарту

T_{sample} : Час згортання в секундах, отриманий для зразка розбавленого сичужного ферменту з додаванням ферменту до часу флокуляції.

Для визначення коагулятивної активності верблюжого варіанту в прикладі 9 застосовано спосіб μ IMCU замість способу REMCAT. Порівняно з REMCAT аналіз варіантів часу флокуляції хімозину в μ IMCU визначали за вимірюваннями OD в 96-коміркових титраційних мікропланшетах при 800 нм у планшеті-ридері УФ/ВІЗ. Стандартну криву різних розбавлень стандартного зразка з відомою інтенсивністю згортання реєстрували на кожному планшеті. Зразки отримували розбавленням ферменту в 84 mM ацетатному буфері, 0,1 % тритоні X-100, pH 5,5. Реакцію починали при 32 °C додаванням 250 мкл стандартного молочного субстрату, який містить 4 % (масова частка) слабко теплого сухого молока низької жирності та 7,5 % (масова частка) кальцій хлориду (pH \approx 6,5), до 25 мкл зразку ферменту. Визначали активність згортання варіантів молока хімозину в Міжнародних одиницях згортання молока (IMCU) на мл, базовану на часі флокуляції зразку стосовно стандартної кривої.

4,2 Визначення загального вмісту білку

Загальний уміст білку визначали, застосовуючи аналіз Pierce BCA Assay Kit від Thermo Scientific, супроводжені інструкціями постачальника.

4,3 Обчислення конкретної активності згортання

Конкретну коагулятивну активність (IMCU/мг загального білку) визначали за діленням коагулятивної активності (IMCU/мл) на загальний уміст білку (мг загального білку на мл).

Приклад 5: Визначення протеолітичної активності

Загальну протеолітичну активність вимірювали, застосовуючи флуоресцентно маркований казеїн Bodipy-FL як субстрат (EnzChek; Molecular Bioprobes, E6638). Похідні казеїну, інтенсивно марковані pH-нечутливим зеленою флуоресценцією Bodipy-FL, мають наслідком майже повне гасіння кон'югованої флуоресценції. Каталізований протеазою гідроліз вивільнює флуоресцентний Bodipy-FL. Цей спосіб є дуже чутливим, який був дуже важливим для цього

експерименту, тоді як CHYMAX M має найменшу загальну протеолітичну активність щодо всіх відомих у цей час коагулянтів.

- 5 Аналіз робили в 0,2 М фосфатному буфері, відрегульованому до бажаного рН при кінцевій концентрації субстрату 0,04 мг/мл. Перед змішуванням 1 частини субстрату з 1 частиною ферменту, які обидва отримано у фосфатному буфері, усі варіанти ферменту нормалізовано до 50 IMCU/мл (згідно із прикладом 4). Субстрат та фермент змішували в 96-коміркових титраційних мікропланшетах Nunc Fluoro microtiter plates, герметизованих та інкубованих при 32 °С протягом 60 хвил. Після інкубування герметизацію видаляли, та флуоресценцію реєстрували у флюориметрі. Для варіантів, оцінених у прикладах 9 та 10, 1 частину субстрату 10 змішували з 1 частиною ненормалізованих зразків ферменту в 386-коміркових титраційних мікропланшетах Nunc Fluoro microtiter plates, та флуоресценцію постійно реєстрували у флюориметрі при 32С протягом 10 годин. Нахили лінійної частини зростання флуоресценції застосовували для визначення загальної протеолітичної активності.

Приклад 6: Визначення варіантів верблюжого хімозину

- 15 Для всіх варіантів конкретну коагулятивну активність (IMCU/мг загального білку) визначали при рН 6,5 згідно із прикладом 4, та протеолітичну активність визначали згідно із прикладом 5 при рН 6,5. Відношення К/П визначали для всіх варіантів при рН 6,5 діленням конкретної коагулятивної активності (IMCU/мг) на протеолітичну активність.

Як еталон охоплювали верблужий дикий тип гену.

- 20 Варіанти із чисельними заміщеннями

Можна зробити висновок, що є ясні комбінаторні ефекти, де різні заміщення мають дію на відповідні ефекти.

		IMCU/мг	Протеол	К/П
1	H134Q, Q246E, Y326F	104 %	211 %	49 %
2	D117N, L280I, G309D	122 %	66 %	185 %
3	H134Q, D156V, G309D	117 %	179 %	66 %
4	D156V, Q246E, L280I	105 %	199 %	53 %
5	D117N, H134Q, L280I	67 %	683 %	10 %
6	D156V, G309D, Y326F	100 %	115 %	87 %
8	D117N, D156V, D325M	127 %	457 %	28 %
9	L280I, D325M, Y326F	113 %	94 %	121 %
10	D117N, Q246E, Y326F	127 %	121 %	105 %
11	D117N, H134Q, D325M	134 %	192 %	69 %
Еталон	верблюд	100 %	100 %	100 %

- 25 Можна зробити висновок, що варіанти 1, 2, 3, 4, 8,9, 10 та 11 мають більш високу конкретну коагулятивну активність молока з варіантами 2, 8, 10 та 11, які мають, найсильніше поліпшення.

Можна зробити висновок, що варіанти 2 та 9 мають зменшену протеолітичну активність.

Можна зробити висновок, що варіанти 2, 9 та 10 мають збільшене відношення К/П.

- 30 Базований на цьому варіант 2 є найкращим варіантом, тоді як варіанти 9 та 10 також показують кращі характеристики.

Індивідуальні мутації

Якщо всіма варіантами охоплено чисельні мутації, дані впорядкованих варіантів досліджували більш детально, застосовуючи статистичні способи та аналіз структури 3D для визначення змін індивідуальних амінокислот, які мають позитивну або негативну дію.

- 35 Дії змін індивідуальної амінокислоти можна підсумовувати як викладено нижче, але багато залежить від інших змін амінокислоти в різних варіантах. Базовані на цьому кращі мутації є D117N, Q246E, G 309D, Y326F та L280I.

	<u>К</u>	<u>П</u>	<u>К/П</u>	
H134Q+	--	--		Піддана впливу частка
Q246E+	--	-		Головний ланцюг
Y326F+	-	+/-		Головний ланцюг
D117N++	--	-		Частка головного ланцюга
L280I+	+/-	+/-		В щілину структури
G309D+	--	+/-		Зовні малої частки
D156V+	--	--		Головний ланцюг
D325M++	--	--		Головний ланцюг

Термін "+" стосується позитивної зміни амінокислоти, тобто "++" – більш позитивна ніж "+".

Термін "-" стосується негативної зміни амінокислоти, тобто "--" – більш негативна ніж "-".

5 Термін "позитивний" стосується позитивної дії на властивості варіантів отриманого сиру, тобто покращена коагулятивна активність ("С"), та відношення К/П вважають позитивними ("+" або "++"), тоді як збільшену загальну протеолітичну активність ("Р") вважають негативною властивістю ("-" або "--"). Позначення "+/-" вказує на відносно нейтральну дію

10 Позначення правої колонки таблиці стосується того, де індивідуальні мутації розміщені в структурі 3D верблюда хімозину. Структура 3D верблюда хімозину є загальнодоступною.

Висновки:

Наведені вище результати демонструють, що наступні індивідуальні мутації в верблюдом хімозині були кращими (тобто з покращеним відношенням К/П порівняно з верблюдом хімозином дикого типу): D117N, Q246E, G 309D, Y326F, L280I.

15 Наведені вище результати демонструють, що наступні чисельні заміщення/мутації в верблюдом хімозині були переважними (тобто з удосконаленням відношення К/П порівняно з верблюдом хімозином дикого типу):

D117N+L280I+G309D;

L280I+D325M+Y326F;

20 D117N+Q246E+Y326F.

ПРИКЛАД 7: Визначення варіантів верблюда та бичачого хімозину

Для всіх варіантів конкретну коагулятивну активність (IMCU/мг загального білку) визначали при рН 6,5 згідно із прикладом 4, тоді як загальну або аспецифічну протеолітичну активність визначали як описано в прикладі 5.

25 Відношення К/П визначали для всіх варіантів при рН 6,5 діленням конкретної коагулятивної активності (IMCU/мг) на протеолітичну активність.

Верблюжий ген дикого типу застосовували як посилання.

30 Для удосконаленого зіставлення, зіставлення всіх варіантів робили за умови, що вони не мають активних сайтів N-глікозилювання, так званих варіантів "повторних" (надалі "Ugly"). Це робили зміною N у двох потенційних сайтах N-глікозилювання на Q.

Для подальших результатів дивись фігуру 3.

Опис варіантів

У варіанті J2 заміщували K279 на V у бичачому неглікозилованому хімозині

35 У варіанті J32 ділянку клапана з бичачого неглікозилизованого хімозину заміщували ділянкою клапана з пепсину.

У варіанті J72 негативний фрагмент із бичачого хімозину застосовували для заміщення відповідних ділянок в верблюдом хімозині. У варіанті J44 R300 заміщували в верблюдом хімозині на Q, відповідну амінокислоту в бичачому хімозині. Цю мутацію також утворювали у варіанті J72.

40

			Стосовно верблюжого		
			RemCat	Прот	К/П
J2	БичUgly	N310Q, N349Q, K279V	54 %	227 %	24 %
J22	БичUgly	Пепсиновий позитивний петч	15 %	115 %	13 %
J32	БичUgly	K279V, L80I, K129E, P130T, H134T, Q141T, V171F, E191S, Y192G, N130Q, N349Q	6 %	63 %	10 %
J44	ВербUgly	R300Q	123 %	114 %	108 %
J72	ВербUgly	N158Q, N349Q, R300Q, N307D, G309D, R312S, K336Q	125 %	58 %	215 %
ВербUgly	Верблюжий	N158Q, N349Q	100 %	98 %	102 %
БичUgly	Бичачий	N310Q, N349Q	40 %	208 %	19 %
Верблюжий		Немає даних	100 %	100 %	100 %

Висновки:

Мутація лізину в положенні 279 бичачого хімозину призводить до варіанту, який показав порівнянню протеолітичну активність та збільшену конкретну коагулятивну активність порівняно з бичачим хімозином (варіант J2). Відповідно, можна зробити висновок, що валін в положенні 279 є кращою амінокислотою.

Дія глікозилювання верблюжого хімозину на властивості отриманого сиру є незначною. Порівняння варіанту неглікозилюваного верблюжого з верблюжим хімозином дикого типу вказує на відсутність значних змін. Однак, уведення підстави щодо негативної ділянки із бичачого хімозину у верблюжий хімозин (варіант J72) виявляє позитивну дію на конкретну активність згортання, тоді як загальна протеолітична активність зменшена, приблизно, у 2 рази, що призводить до подвоєння відношення К/П. Уведення одиночної мутації R300Q із цієї ділянки (варіант J44) демонструє подібну позитивну дію на коагулятивну активність, як видно для варіанту J72. У висновку, Q – краща амінокислота в положенні 300.

Вважають, що ділянка негативної ділянки в бичачому хімозині має важливу дію для позиціонування сайту коректного розщеплення зовнішнього ферменту, отже, покращуючи специфічність ферментів. Вважають, що дія головним чином пов'язана із зарядом, тобто будь-яка зміна, яка збільшує негативний заряд, з цієї причини призведе до збільшення специфічності.

Нижче показано угруповання ділянки негативного заряду бичачого та верблюжого хімозину. Вказано тільки заряджені залишки.

RxxxxxxxxNxGxxRxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxK Верблюжий

QxxxxxxxxDxDxxSxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxQ Бичачий

Стосовно нумерацій положенні, при застосування верблюжого як посилання, нумерація праворуч є початковою:

R300

N307

G309

R312

30 K336

Приклад 8: Визначення верблюжих варіантів

Аналізували число різних варіантів, кожний з яких має чисельні заміщення порівняно з диким типом верблюжого хімозину, .

Визначали для всіх варіантів конкретну коагулятивну активність (IMCU/мг загального білку) при рН 6,5 згідно із прикладом 4, тоді як аспецифічну протеолітичну активність визначали як описано в прикладі 5 вимірюванням протеолітичної активності по 100 IMCU.

Верблюжий ген дикого типу охоплювали як посилання.

Аналіз варіантів

Вказані в таблиці варіанти мають амінокислотну послідовність, ідентичну гену верблюжого хімозину (вказаний як верблюжий wt), за винятком варіантів, згаданих для кожного варіанту.

Коагулятивну активність вказано як IMCU на мг загального білку. Покращену активність згортання вказано одним або більше символів "+". Протеолітичну активність зображено в штучних одиницях на 100 IMCU. Покращені варіанти, тобто варіанти зі зменшеними протеолітичними активностями, вказано одним або більше символами "+". Більше символів "+" вказують на сильніше покращення. В колоні "Загальний" символами "+" позначено варіанти, які звичайно мають покращені властивості, тобто слабку протеолітичну активність із високою активністю згортання.

Таблиця 1

Аналіз варіантів верблюжого хімозину

						Згорання IMCU/мг	Протеолітичний AU/100 IMCU	Загальний
1	L280I	G309D	E141S	Q220S	R324I	196	161852	
2	L280I	G309W	F75Y	Y79S		419 ++	43355	
3	L280I	G309D	H134Q	S222G	S331Y	299	36409	
4	L280I	G309D	K120Q	M223E	H239N	250	13642 +++	
5	L280I	G309D	Q220S	V213F	T342S	231	139775	
6	L280I	G309D	H134Q	V213F	F281A	376 +	23575 +	
7	L280I	G309D	S331Y	L224V	Y326F	318	12257 +++++	+
8	L280I	G309D	Y326F	V241I	E305T	353 +	33477	
9	L280I	G309D	S331Y	F124Y	I346L	338	37156	
10	L280I	G309D	M223E	L224V	L273V	324	36425	
11	L280I	G309D	H134Q	M223E	L70M	386 +	10664 +++++	++
12	L280I	G309D	F75Y	S331Y	Q346E	418 ++	40393	
13	L280I	G309D	L224V	I103V	L238I	412 ++	50010	
14	L280I	G309W	L238I	T342S		420 +++	21087 +	++
15	L280I	G309D		L70M	T342S	395 ++	22743 +	
16	L280I	G309D	Y79S	L224V	S212A	403 ++	23684 +	
17	L280I	G309D	V213F	E320T	V90L	426 +++	21956 +	++
18	L280I	G309D	L163E	S222G	V261A	246	97468	
19	L280I	G309W	S212A	V261A		344	10865 +++++	+
20	L280I	G309D	Q220S	L224V	H134Q	425 +++	35156	
21	L280I	G309W	K77T	R324I		434 +++	45616	
22	L280I	G309W	I361L	I103V		324	32966	
23	L280I	G309D	E141S	R324V	V367I	360 +	77215	
24	L280I	G309D	Y79S	L273V	L163E	317	62132	
25	L280I	G309D	I154L	T235S	K379P	333	93587	
26	L280I	G309D	F75Y	T342S	V261A	361 +	108877	
27	L280I	G309D	V90L	K379P	V318T	317	52280	
28	L280I	G309D	V256I	V90L	E141S	289	81720	
29	L280I	G309D	I154L	V261A	V367I	405 ++	59055	
30	L280I	G309D	Y326F	L273V	V90L	312	54833	
31	L280I	G309D	H134Q	L163E	V318T	344	43594	
32	L280I	G309D	Y79S	H134Q	Y326F	337	30815	
33	L280I	G309D	Y79S	I103V	F281A	379 +	104307	
34	L280I	G309D	V256I	V261A	K379P	378 +	39517	
35	L280I	G309D	S331Y	L238I	I154L	293	60312	
36	L280I	G309D	S222G	R324V	I154L	223	62784	
37	L280I	G309D	H239N	F124Y	V90L	312	55432	
38	L280I	G309D	H239N	R324I	D325Q	377 +	17261 ++	
39	L280I	G309W	K120Q	V367I		354	75440	
40	L280I	G309D	Y326F	L70M	D325Q	373 +	72792	
41	L280I	G309D	L224V	E320T	T235S	446 +++	32453	
42	L280I	G309D	S331Y	T342S	D325Q	475 +++++	70103	
43	L280I	G309D	F124Y	Q346E	I154L	410 ++	33586	
44	L280I	G309D	V261A	R324V	F281A	198	34974	
45	L280I	G309D	I361L	S212A	V318T	343	64876	
46	L280I	G309D	Y79S	T342S	I154L	382 +	122413	
47	L280I	G309D	Q346E	K77T	T235S	377 +	34716	
48	L280I	G309D	K120Q	Y326F	K77T	264	46463	
Верблюжий wt						366 +	15,664 +++	
Бичачий wt						208	62,662	

Висока конкретна коагулятивна активність є дуже важливою для придатних ферментів згортання молока. У підсумку, 21 варіанти зі збільшеною конкретною активністю згортання, стосовно верблюжого хімозину, ідентифікували та розміщували в таблиці 2, нижче.

Таблиця 2

Варіанти верблюжого хімозину зі збільшеною активністю згортання

						Згортання		Протеолітичний		Загальний
42	L280	G309D	S331	T342	D325	47	+++			
	I	D	Y	S	Q	5	+			
41	L280	G309D	L224	E320	T235	44		70,103		
	I	D	V	T	S	6	+++			
21	L280	G309		R324		43		30,953		
	I	W	K77T	I		4	+++			
17	L280	G309	V213	E320		42		45,616		
	I	D	F	T	V90L	6	+++	21,956	+	++
20	L280	G309		L224		42				
	I	D	Q220S	V	H134Q	5	+++	35,156		
14	L280	G309	L238	T342		42				
	I	W	I	S		0	+++	21,087	+	++
2	L280					41				
	I	G309W	F75Y	Y79S		9	++	43,355		
12	L280	G309				41				
	I	D	F75Y	S331Y	Q346E	8	++	40,393		
13	L280	G309	L224	I103	L238	41				
	I	D	V	V	I	2	++	50,010		
43	L280	G309	F124		I154	41				
	I	D	Y	Q346E	L	0	+++	33,586		
29	L280	G309	I154		V367	40				
	I	D	L	V261A	I	5	+++	59,055		
16	L280	G309		L224	S212	40				
	I	D	Y79S	V	A	3	+++	23,684	+	
15	L280	G309		T342		39				
	I	D		L70M	S	5	+++	22,743	+	
11	L280	G309				38				
	I	D	H134Q	M223E	L70M	6	+	10,664	++++	++
46	L280	G309		T342	I154	38				
	I	D	Y79S	S	L	2	+	122,413		
33	L280	G309		I103	F281	37				
	I	D	Y79S	V	A	9	+	104,307		
34	L280	G309	V256		K379	37				
	I	D	I	V261A	P	8	+	39,517		
47	L280	G309		T235		37				
	I	D	Q346E	K77T	S	7	+	34,716		
38	L280	G309		R324		37				
	I	D	H239N	I	D325Q	7	+	17,261	++	
6	L280	G309		V213	F281	37				
	I	D	H134Q	F	A	6	+	23,575	+	
40	L280	G309	Y326		D325	37				
	I	D	F	L70M	Q	3	+	72,792		
Верблюжий wt						36				
						6	+	15,664	+++	

5

Зменшена протеолітична активність – прерогатива для придатних ферментів згортання молока. У підсумку, ідентифікували 10 варіантів зі зменшеною протеолітичною активністю стосовно верблюжого хімозину (дивись таблицю 3, нижче).

Таблиця 3

Варіанти верблюжого хімозину зі зменшеною протеолітичною активністю

						Згортання		Протеолітичний		Загальний
11	L280 I	G309 D	H134 Q	M223 E	L70M	38 6	+	10,664	++++	++
19	L280 I	G309 W	S212 A	V261 A		34 4		10,865	++++	+
7	L280 I	G309 D	S331 Y	L224 V	Y326 F	31 8		7	++++	+
4	L280 I	G309 D	K120 Q	M223E	H239 N	25 0		2	+++	
38	L280 I	G309 D	H239 N	R324 I	D325Q	37 7	+	1	++	
14	L280 I	G309 W	L238 I	T342 S		42 0	+++	7	+	++
17	L280 I	G309 D	V213 F	E320 T	V90L	42 6	+++	6	+	++
15	L280 I	G309 D		L70M	T342 S	39 5	++	3	+	
6	L280 I	G309 D	H134 Q	V213 F	F281 A	37 6	+	5	+	
16	L280 I	G309 D	Y79S	L224 V	S212 A	40 3	++	4	+	
Верблюжий wt						36 6	+	4	+++	

Базовані на загальному аналізі п'ять варіантів ідентифікували як такі, котрі мають покращені властивості для згортання молока та протеолітичних активностей. Ці п'ять варіантів указано
5 нижче в таблиці 4.

Таблиця 4

Варіанти верблюжого хімозину зі збільшеною коагулятивною активністю та зменшеною протеолітичною активністю

						Згортання		Протеолітичний		Загальний
7	L280 I	G309 D	S331 Y	L224 V	Y326 F	318		12,257	++++	+
11	L280 I	G309 D	H134 Q	M223 E	L70M	386	+	10,664	++++	++
14	L280 I	G309 W	L238 I	T342 S		420	+++	21,087	+	++
17	L280 I	G309 D	V213 F	E320 T	V90L	426	+++	21,956	+	++
19	L280 I	G309 W	S212 A	V261 A		344		10,865	++++	+
Верблюжий wt						366	+	15,664	++++	

Статистичний аналіз дій індивідуальних мутацій

Статистичний аналіз, базований на PCA, застосовано для ідентифікації одиничних мутацій із
10 позитивними діями на протеолітичну активність, коагулятивну активність молока або на обох. У таблиці нижче підсумовано мутації, які призводять до збільшеної активності згортання, зменшеної протеолітичної активності або до обох – збільшеної активності згортання, зменшеної протеолітичної активності. Графік PCA показано на фігурі 4.

Таблиця 5

Одиничні заміщення, яка мають позитивні дії на згортання, протеолітичну активність або на обох

Згортання + протеолітична	Згортання	Протеолітична
H134Q	I103V	R324V
L224V	F75Y	K120Q
Q346E	D325Q	M223E
L70M	I154L	S331Y
G309W	I361L	K379P
E320T	Y79S	L163E
L238I	D117N	
V90L	L280I	
V367I	V261A	
V256I		
K77T		
S212A		
F124Y		

Позиційні дії

5 Уважають, що найбільша кількість мутацій, яким слід мати дію на коагулятивну активність або на загальну протеолітичну активність (тобто специфічність), слід бути локалізованими в або близько до каталітичної щілини. Коли субстрат уведено до каталітичної щілини, тут також має сайт розщеплення.

10 Несподівано, що тільки незначна кількість заміщень, які показали позитивну дію на коагулятивну активність та/або специфічність, були локалізовані в цій ділянці (наприклад, L280I L70M та F75Y). Багато мутацій, які мали позитивну дію, знаходили на інших частках молекули

Заміщення, які призводять до покращеної активності згортання

15 Найбільша кількість заміщень, які призводять до покращеної коагулятивної активності, було локалізовано в тілі ферменту та, вірогідно, мають спричиняти конформаційні зміни в молекулі. Заміщення F75Y локалізовано при доступі до щілини, та переважно є тонким, що призводить до збільшеної полярності.

Таблиця 6

Заміщення, яке надає покращене згортання

I103V	Долька, задня частина
F75Y	Доступ до щілини
D325Q	Головний ланцюг
I154L	Головний ланцюг
I361L	Тіло
Y79S	Головний ланцюг
D117N	Бік
L280I	Близько до щілини
V261A	Бік

Заміщення, які призводять до зменшеної протеолітичної активності

20 Найбільша кількість заміщень локалізовано в тілі молекули. Отримані конформаційні зміни призводять до збільшення доступності для субстрату. Дві мутації знайшли при дольках, які позначають доступ до каталітичної щілини. Заміщення L163E збільшує негативний заряд. Це підсилює результати із прикладу 7, які демонструють важливість завантаження на цих положеннях.

Таблиця 6

Мутації, які призводить до зменшеної протеолітичної активності

R324V	Головний ланцюг
K120Q	Бік
M223E	Тіло
S331Y	Долька
K379P	Головний ланцюг
L163E	Долька

Заміщення, які призводять до покращеного згортання та зменшеної протеолітичної активності

- 5 Деякі заміщення, які призводять до загального поліпшення згортання молока здатні призводити до змін заряду, які вірогідно залучено в розпізнавання субстрату. Вони охоплюють H134Q, що призводить до більш високої позитивної величини, а також заміщення Q346E, що призводить до більш негативного заряду. Інші заміщення з позитивними діями на згортання та специфічність є найбільш правдоподібними, які призводять до більш загальних конформаційних змін молекули хімозину.
- 10

Таблиця 7

Мутації, які надають покращене згортання та зменшену протеолітичну активність

H134Q	Зовнішня частина
L224V	Головний ланцюг
Q346E	Доступ до щілини
L70M	Щілина
G309W	Бокова долька
E320T	Головний ланцюг
L238I	Головний ланцюг
V90L	Близько до щілини
V367I	Головний ланцюг
V256I	Головний ланцюг
K77T	Боковий виступ
S212A	Головний ланцюг
F124Y	Головний ланцюг

Приклад 9: Визначення верблюжих варіантів

Характеристика варіанту

- 15 Варіанти верблюжого хімозину, визначені в прикладі 7 щодо згортання молока (С) та загальних протеолітичних (Р) активностей, виготовляли знову та визначали щодо специфічності розщеплення казеїну К/П (таблиця 1, нижче). Відношення К/П є мірилом коагуляційної ефективності у отриманні сиру, тобто, виходу сиру, отриманого з певного об'єму молока. Згортання молока та загальні протеолітичні активності визначали як описано в прикладах 4 та
- 20 5, відповідно. У цьому випадку, однак, протеолітичну активність вимірювали без нормалізації активності згортання.

- Верблюжий хімозин аналізували як еталонний. Величини К/П всіх варіантів показано як відносні величини щодо верблюжого хімозину дикого типу. Визначали вплив загальної концентрації білку в зразках ферменту на К/П, та величини К/П корегували відповідно для цього відношення.
- 25

Таблица 1

Аналіз варіантів верблюжого хімозину

Варіант	мутації					Згортання (К)	Протеолітична (П)	К/П
1	L280I	G309D	E141S	Q220S	R324I	92%	125%	25%
2	L280I	G309W	F75Y	Y79S		108%	129%	78%
3	L280I	G309D	H134Q	S222G	S331Y	103%	34%	271%
4	L280I	G309D	K120Q	M223E	H239N	96%	81%	85%
5	L280I	G309D	Q220S	V213F	T342S	75%	113%	42%
6	L280I	G309D	H134Q	V213F	F281A	62%	31%	339%
7	L280I	G309D	S331Y	L224V	Y326F	91%	110%	143%
8	L280I	G309D	Y326F	V241I	E305T	135%	114%	94%
9	L280I	G309D	S331Y	F124Y	I346L	98%	123%	81%
10	L280I	G309D	M223E	L224V	L273V	93%	78%	105%
11	L280I	G309D	H134Q	M223E	L70M	116%	68%	246%
12	L280I	G309D	F75Y	S331Y	Q346E	155%	83%	172%
13	L280I	G309D	L224V	I103V	L238I	136%	89%	128%
14	L280I	G309W	L238I	T342S		124%	159%	89%
15	L280I	G309D		L70M	T342S	93%	152%	35%
16	L280I	G309D	Y79S	L224V	S212A	137%	91%	100%
17	L280I	G309D	V213F	E320T	V90L	133%	163%	46%
18	L280I	G309D	L163E	S222G	V261A	72%	49%	182%
19	L280I	G309W	S212A	V261A		104%	122%	138%
20	L280I	G309D	Q220S	L224V	H134Q	201%	52%	315%
21	L280I	G309W	K77T	R324I		160%	102%	139%
22	L280I	G309W	I361L	I103V		108%	132%	79%
24	L280I	G309D	Y79S	L273V	L163E	91%	76%	112%
25	L280I	G309D	I154L	T235S	K379P	112%	118%	112%
26	L280I	G309D	F75Y	T342S	V261A	108%	90%	141%
27	L280I	G309D	V90L	K379P	V318T	95%	135%	55%
28	L280I	G309D	V256I	V90L	E141S	109%	146%	139%
29	L280I	G309D	I154L	V261A	V367I	157%	95%	156%
30	L280I	G309D	Y326F	L273V	V90L	99%	119%	58%
31	L280I	G309D	H134Q	L163E	V318T	95%	59%	247%
32	L280I	G309D	Y79S	H134Q	Y326F	105%	66%	219%
33	L280I	G309D	Y79S	I103V	F281A	124%	66%	342%
34	L280I	G309D	V256I	V261A	K379P	146%	102%	134%
36	L280I	G309D	S222G	R324V	I154L	76%	68%	161%
37	L280I	G309D	H239N	F124Y	V90L	102%	125%	67%
38	L280I	G309D	H239N	R324I	D325Q	90%	143%	127%
39	L280I	G309W	K120Q	V367I		103%	94%	139%
40	L280I	G309D	Y326F	L70M	D325Q	96%	207%	10%
41	L280I	G309D	L224V	E320T	T235S	116%	102%	134%
42	L280I	G309D	S331Y	T342S	D325Q	145%	102%	158%
43	L280I	G309D	F124Y	Q346E	I154L	135%	94%	176%
44	L280I	G309D	V261A	R324V	F281A	71%	63%	137%
45	L280I	G309D	I361L	S212A	V318T	116%	122%	100%
46	L280I	G309D	Y79S	T342S	I154L	137%	102%	115%
47	L280I	G309D	Q346E	K77T	T235S	124%	107%	123%
48	L280I	G309D	K120Q	Y326F	K77T	90%	86%	113%
Верблюжий wt						100%	100%	100%

Усі 30 з 46 описаних варіантів демонструють покращене К/П у порівнянні з верблюжим хімозином дикого типу (таблиця 2, нижче). Для трьох указаних вище варіантів 33, 6 та 20 спостерігали більше ніж 3-разове поліпшення

Таблиця 2

Варіанти верблюжого хімозину з покращеним К/П

Варіант	мутації					Згортання (К)	Протеолітична (П)	К/П
33	L280I	G309D	Y79S	I103V	F281A	124%	66%	342%
6	L280I	G309D	H134Q	V213F	F281A	62%	31%	339%
20	L280I	G309D	Q220S	L224V	H134Q	201%	52%	315%
3	L280I	G309D	H134Q	S222G	S331Y	103%	34%	271%
31	L280I	G309D	H134Q	L163E	V318T	95%	59%	247%
11	L280I	G309D	H134Q	M223E	L70M	116%	68%	246%
32	L280I	G309D	Y79S	H134Q	Y326F	105%	66%	219%
18	L280I	G309D	L163E	S222G	V261A	72%	49%	182%
43	L280I	G309D	F124Y	Q346E	I154L	135%	94%	176%
12	L280I	G309D	F75Y	S331Y	Q346E	155%	83%	172%
36	L280I	G309D	S222G	R324V	I154L	76%	68%	161%
42	L280I	G309D	S331Y	T342S	D325Q	145%	102%	158%
29	L280I	G309D	I154L	V261A	V367I	157%	95%	156%
7	L280I	G309D	S331Y	L224V	Y326F	91%	110%	143%
26	L280I	G309D	F75Y	T342S	V261A	108%	90%	141%
21	L280I	G309W	K77T	R324I		160%	102%	139%
28	L280I	G309D	V256I	V90L	E141S	109%	146%	139%
39	L280I	G309W	K120Q	V367I		103%	94%	139%
19	L280I	G309W	S212A	V261A		104%	122%	138%
44	L280I	G309D	V261A	R324V	F281A	71%	63%	137%
34	L280I	G309D	V256I	V261A	K379P	146%	102%	134%
41	L280I	G309D	L224V	E320T	T235S	116%	102%	134%
13	L280I	G309D	L224V	I103V	L238I	136%	89%	128%
38	L280I	G309D	H239N	R324I	D325Q	90%	143%	127%
47	L280I	G309D	Q346E	K77T	T235S	124%	107%	123%
46	L280I	G309D	Y79S	T342S	I154L	137%	102%	115%
48	L280I	G309D	K120Q	Y326F	K77T	90%	86%	113%
24	L280I	G309D	Y79S	L273V	L163E	91%	76%	112%
25	L280I	G309D	I154L	T235S	K379P	112%	118%	112%
10	L280I	G309D	M223E	L224V	L273V	93%	78%	105%
Верблюжий wt						100%	100%	100%

5

Статистичний аналіз позиційних та мутаційних дій на К/П

Статистичний аналіз, базований на PCA, застосовано для ідентифікації одиничних мутацій із позитивними діями на специфічність згортання молока через протеоліз загального казеїну (К/П) верблюжого хімозину. Знайшли наступні мутації, корисні для високих співвідношень К/П:

10 H134Q, F281A, I103V, V256I, I154L, S222G, L224V, Q346E, S331Y, K77T, V367I, G309D, V261A, D325Q, L280I, D117N, L163E, S212A

Приклад 10: Аналіз верблюжих варіантів

Характеристика варіанту

15 Базований на позиційних та мутаційних діях, визначених у прикладі 7, інший набір варіантів верблюжого хімозину генерували із чисельними заміщеннями порівняно з верблюжим

хімозином дикого типу та визначали стосовно специфічності субстрату казеїну (К/П), як описано в прикладі 9 (таблиця 1, нижче).

Таблиця 1

Аналіз варіантів верблюжого хімозину

Варіант	мутації									Згортання (К)	Протеоліт (П)	К/П	
1	L70M	Y79S	D117N	H134Q	M223E	V256I	L280I	G309D	Q346E	132%	116%	117%	
2	L70M	Y79S	D117N	H134Q	M223E	L280I	G309W	S331Y		131%	56%	194%	
3	L70M	D117N	H134Q	M223E	V256I	L280I	G309D	S331Y	K379P	109%	75%	135%	
4	L70M	D117N	H134Q	S212A	M223E	V261A	L280I	G309D	V367I	83%	115%	108%	
5	L70M	D117N	H134Q	D156V	L280I					135%	108%	137%	
6	L70M	K77T	V90L	D117N	H134Q	D202Q	M223E	L280I	G309D	135%	113%	124%	
7	L70M	Y79S	D117N	H134Q	M223E	V261A	L280I	G309D	E320T	141%	124%	143%	
8	L70M	V109L	H134Q	M223E	G309D					82%	86%	87%	
9	L70M	D117N	F124Y	H134Q	M223E	L238I	L280I	G309D	V367I	105%	97%	115%	
10	L70M	D117N	H134Q	S212A	M223E	L280I	G309W	Q346E		101%	79%	133%	
11	L70M	D117N	H134Q	D156V	M223E	L280I	G309D	E320T	Q346E	153%	101%	119%	
12	L70M	V109L	D117N	H134Q	L224V	L280I	G309D			98%	71%	128%	
13	L70M	D117N	H134Q	D202Q	M223E	V261A	L280I			116%	144%	126%	
14	L70M	D117N	D202Q	M223E	L224V	L280I	G309D			85%	126%	111%	
15	L70M	K77T	D117N	H134Q	S212A	M223E	V256I	L280I	G309D	154%	130%	129%	
16	L70M	H134Q	D156V	M223E	L280I	G309W				136%	131%	137%	
17	L70M	V90L	D117N	H134Q	M223E	L238I	V256I	L280I	G309D	121%	101%	97%	
18	L70M	D117N	H134Q	S212A	M223E	S331Y				124%	76%	151%	
19	L70M	V109L	D117N	F124Y	H134Q	M223E	V261A	L280I	G309W	96%	98%	128%	
20	L70M	V90L	H134Q	M223E	L280I	E320T				138%	110%	98%	
21	L70M	N108D	D117N	H134Q	M223E	G309W	E320T			187%	151%	138%	
22	V109L	D117N	H134Q	M223E	L238I	L280I	G309D	E320T		110%	93%	106%	
23	L70M	D117N	H134Q	M223E	G309D	Q346E	V367I	K379P		67%	102%	118%	
24	L70M	N108D	D117N	V261A	L280I	G309D				95%	117%	102%	
25	L70M	D117N	H134Q	L238I	L280I	G309W	K379P			97%	92%	113%	
26	L70M	Y79S	D117N	M223E	L280I	K379P				137%	123%	129%	
27	D117N	H134Q	M223E	L224V	V256I	L280I				132%	102%	127%	
28	L70M	K77T	N108D	D117N	H134Q	M223E	L280I	Q346E		167%	106%	166%	
29	L70M	Y79S	N108D	D117N	F124Y	H134Q	D202Q	M223E	L280I	G309D	183%	57%	151%
Bovine wt										100%	100%	100%	

- 5 Усі 26 з 29 описаних варіантів демонструють покращені відношення К/П у порівнянні з верблужим хімозином дикого типу. Для найкращого варіанту спостерігали 2-разове поліпшення (таблиця 2, нижче).

Таблиця 2

Варіанти верблюжого хімозину з покращеним К/П

Варіант	мутації									Згортання (К)	Протеоліз (П)	К/П	
2	L70M	Y79S	D117N	H134Q	M223E	L280I	G309W	S331Y		131%	56%	194%	
28	L70M	K77T	N108D	D117N	H134Q	M223E	L280I	Q346E		167%	106%	166%	
18	L70M	D117N	H134Q	S212A	M223E	S331Y				124%	76%	151%	
29	L70M	Y79S	N108D	D117N	F124Y	H134Q	D202Q	M223E	L280I	G309D	183%	57%	151%
7	L70M	Y79S	D117N	H134Q	M223E	V261A	L280I	G309D	E320T		141%	124%	143%
21	L70M	N108D	D117N	H134Q	M223E	G309W	E320T				187%	151%	138%
5	L70M	D117N	H134Q	D156V	L280I						135%	108%	137%
16	L70M	H134Q	D156V	M223E	L280I	G309W					136%	131%	137%
3	L70M	D117N	H134Q	M223E	V256I	L280I	G309D	S331Y	K379P		109%	75%	135%
10	L70M	D117N	H134Q	S212A	M223E	L280I	G309W	Q346E			101%	79%	133%
15	L70M	K77T	D117N	H134Q	S212A	M223E	V256I	L280I	G309D		154%	130%	129%
26	L70M	Y79S	D117N	M223E	L280I	K379P					137%	123%	129%
12	L70M	V109L	D117N	H134Q	L224V	L280I	G309D				98%	71%	128%
19	L70M	V109L	D117N	F124Y	H134Q	M223E	V261A	L280I	G309W		96%	98%	128%
27	D117N	H134Q	M223E	L224V	V256I	L280I					132%	102%	127%
13	L70M	D117N	H134Q	D202Q	M223E	V261A	L280I				116%	144%	126%
6	L70M	K77T	V90L	D117N	H134Q	D202Q	M223E	L280I	G309D		135%	113%	124%
11	L70M	D117N	H134Q	D156V	M223E	L280I	G309D	E320T	Q346E		153%	101%	119%
23	L70M	D117N	H134Q	M223E	G309D	Q346E	V367I	K379P			67%	102%	118%
1	L70M	Y79S	D117N	H134Q	M223E	V256I	L280I	G309D	Q346E		132%	116%	117%
9	L70M	D117N	F124Y	H134Q	M223E	L238I	L280I	G309D	V367I		105%	97%	115%
25	L70M	D117N	H134Q	L238I	L280I	G309W	K379P				97%	92%	113%
14	L70M	D117N	D202Q	M223E	L224V	L280I	G309D				85%	126%	111%
4	L70M	D117N	H134Q	S212A	M223E	V261A	L280I	G309D	V367I		83%	115%	108%
22	V109L	D117N	H134Q	M223E	L238I	L280I	G309D	E320T			110%	93%	106%
24	L70M	N108D	D117N	V261A	L280I	G309D					95%	117%	102%
Верблюжий wt											100%	100%	100%

Статистичний аналіз позиційних та мутаційних дій на К/П

Статистичний аналіз позиційних та мутаційних дій на К/П

- 5 Статистичний аналіз, базований на PCA, застосовано для ідентифікації одиничних мутацій із позитивними діями на специфічність згортання молока через протеоліз загального казеїну (К/П) верблюжого хімозину. Знайшли наступні мутації, корисні для високих співвідношень К/П:

S331Y, Y79S, K77T, D117N, H134Q, N108D, G309W, L224V, D156V, L280I, M223E, V367I, F114Y

- 10 Приклад 11: Аналіз верблюжих варіантів

Статистичний аналіз, базований на PCA, застосовували на комбінованому комплекті варіантів із прикладів 9 та 10, та одиничні мутації ідентифікували позитивними діями на специфічність згортання молока через протеоліз загального казеїну (К/П) верблюжого хімозину. Знайшли наступні мутації, корисні для високих співвідношень К/П:

- 15 F281A, H134Q, I103V, S331Y, S222G, I154L, L280I, G309D, D117N, L224V, N108D, L163E, G309W, K77T, Y79S

Ці мутації добре погоджуються з корисними мутаціями, визначеними в прикладах 9 та 10.

Структурний аналіз позиційних та мутаційних дій на К/П

- 20 Як видно із прикладу 8, більшість корисних мутацій знову локалізовано далеко від щілини зв'язування субстрату. Тільки L280I та F281A локалізовано безпосередньо в щілині (Gilliland et al. 1990). Точки I280 – у серцевині гідрофобного ядра С-кінцевої дольки. Отже, ця мутація може призводити до тонких конформаційних змін зв'язувальної щілини та, отже, впливати на специфічність субстрату. Позиція 281 є частиною сайту зв'язування S2 та взаємодіє з позицією

P2 в субстраті казеїну. Мутації в цьому положенні дуже вірогідно мають вплив на зв'язування казеїну та, отже, на протеоліз. Мутації G309W та S331Y розташовано на поверхні С-кінцевої дольки в ділянки, яку описано як таку, яка взаємодіє з κ-казеїном для сприяння зв'язування субстрату в каталітичній щілині (Gilliland et al. 1990). Отже, ці мутації можуть мати позитивний вплив на зв'язування субстрату. I154L та D156V, та L163E представляють зміни щодо ядра N-кінцевої дольки, що можливо веде до тонких структурних перегруповань ферменту із впливом на каталітичну активність. Мутації S222G та L224V вводять зміни в бета-схему, яка може взаємодіяти з N-кінцевим білку в його активованій формі (Langholm Jensen et al.). Потенційні дії на стан активації ферменту може призводити до зміщеної специфічності субстрату казеїну. Отримані цільові мутації K77T, Y79S, I103V, N108D, D117N, та H134Q локалізовано на поверхні N-кінцевої дольки та, за винятком I103V, представляють обміни полярних амінокислот. Ці зміни на поверхні ферменту найімовірніше впливають на взаємодії з молекулами казеїну, що призводить до покращеної специфічності на користь κ-казеїну.

Джерела інформації

- 1: WO02/36752A2 (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
- 3: Suzuki et al: Alteration of catalytic properties chymosin by site-directed mutagenesis, *Protein Engineering*, vol. 2, Мож 1989, pages 563-569
- 4: van den Brink et al: Increased production chymosin by glycosylation, *Journal of biotechnology*, vol. 125, September 2006, pages 304-310.
- 5: Pitts et al: Expression and characterisation chymosin pH optima mutants produced in *Tricoderma reesei*, *Journal of biotechnology*, vol. 28, March 1993, pages 69-83
- 6: M.G. Williams et al: Mutagenesis, biochemical characterization and X-ray structural analysis of point mutants bovine chymosin, *Protein engineering design and selection*, vol. 10, September 1997, pages 991-997
- 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: Supannee et al: Site-specific mutations of calf chymosin B as 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.
- 10: WO2013/174840A1 (Chr. Hansen).
- 11: WO2013/164479A2 (DSM).
- 12: Langholm Jensen et al: Camel and bovine chymosin: relationship between their structures and cheese-making properties, *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, vol. 69, 2013, pages 901-913.
- 13: Gilliland et al: The three-dimensional structure bovine chymosin at 2,3Å resolution, *Proteins*, vol. 8, 1990, pages 82-101.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> КР. ГАНСЕН А/С

<120> Варіанти хімозину з удосконаленими властивостями, щодо згортання молока

<130> P5130EP01

<160> 2

<170> BiSSAP 1.0

<210> 1

<211> 381

<212> PRT

<213> Bos taurus

<220>

<221> ДЖЕРЕЛО

<222> 1..381

<223> /мол. тип="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
 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> PRT

<213> Camelus dromedarius

<220>

<221> ДЖЕРЕЛО

<222> 1..381

<223> /мол. тип="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

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Спосіб отримання ізолюваного варіанта поліпептиду хімозину, що має удосконалені властивості згортання молока, який полягає в:
 - (а) здійсненні зміни в положенні вихідного поліпептиду, який має активність хімозину, де зміна включає заміну, делецію або інсерцію у положенні 77, та
 - (b) отриманні та ізолюванні зміненого поліпептиду етапу (а) та отриманні таким чином
- 10 ізолюваного варіанта поліпептиду хімозину, який має активність хімозину; в якому:
 - (i) амінокислотне положення вихідного поліпептиду визначають за вирівнюванням вихідного поліпептиду з поліпептидом SEQ ID NO: 1 (бичачого хімозину), тобто поліпептид SEQ ID NO: 1 застосовують для визначення відповідної амінокислотної послідовності у вихідному поліпептиді; та
 - (ii) вихідний поліпептид має принаймні 75 % ідентичності послідовності зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO: 1 (бичачого хімозину), що знаходиться від амінокислотного положення 59 до амінокислотного положення 381 SEQ ID NO: 1;
- 15 за умови, що ізолюваний варіант поліпептиду хімозину не є специфічним варіантом, вибраним з групи, що складається з:

Q246E+G309D+S329P+D337E;
 R125Q+G128N+H204R+Q246E+S284T;
 Y185F+R213Q+Q246E;
 V261A+V263I+G309W+L311I+Y326F;
 G128D+L188I+Y326F;
 G128N+R312S+S313Y+Y326F;
 G128N+R312S+S313Y+Y326F;
 D117N+V261A+R312S;
 D216S+L224V+V263I+F281V+G309D;
 Y79S+L224V+L311I та
 R119S+L224V+T297S.
- 20 2. Спосіб отримання ізолюваного варіанта поліпептиду хімозину за п. 1, в якому ізолюваний варіант поліпептиду хімозину має:

- активність хімозину, що приводить до більш високого відношення К/П, порівняно з відношенням К/П бичачого хімозину, який містить зрілий поліпептид SEQ ID NO: 1; та
- 35

- активність хімозину, що приводить до більш високого відношення К/П, порівняно з відношенням К/П верблюжого хімозину, який містить зрілий поліпептид SEQ ID NO: 2.

3. Спосіб отримання ізольованого варіанта поліпептиду хімозину за будь-яким з попередніх пунктів, в якому зміна включає заміну принаймні в одному амінокислотному положенні, та в якому заміна являє собою L70M; F75Y; K77T; Y79S; V90L; D102N; I103V; K120Q; F124Y; H134Q; I154L; L163E; S212A; M223E; L224V; L238I; Q246E; V256I; V261A; K279V; F281A; R300D,E,S,T,N,Q; R312D,E,S,T,N,Q; E320T; R324V; Y326F; K336D,E,S,T,N,Q,C,U,G,P,A,V,I,L,M,F,Y,W; S331Y; Q346E; I361L; V367I або K379P.

4. Спосіб отримання ізольованого варіанта поліпептиду хімозину за п. 3, в якому заміна являє собою Q246E; K279V; R300Q; R312S; Y326F; K336D,E,S,T,N,Q або K336Q.

5. Спосіб отримання ізольованого варіанта поліпептиду хімозину за будь-яким з попередніх пунктів, та в якому зміна включає заміну принаймні в одному амінокислотному положенні, та в якому заміна являє собою:

H134Q+Q246E+Y326F;

D117N+L280I+G309D;

H134Q+D156V+G309D;

D156V+Q246E+L280I;

D117N+H134Q+L280I;

D156V+G309D+Y326F;

D117N+D156V+D325M;

L280I+D325M+Y326F;

D117N+Q246E+Y326F;

D117N+H134Q+D325M;

N310Q+N349Q+K279V;

R300Q+N307D;

N307D+G309D;

N307D+R312S;

R300Q+K336Q;

N307D+K336Q;

G309D+R312S;

R300Q+N307D+G309D+R312S+K336Q;

N158Q+N349Q+R300Q+N307D+G309D+R312S+K336Q;

L280I+G309D+S331Y+T342S+D325Q;

L280I+G309D+L224V+E320T+T235S;

L280I+G309W+K77T+R324I;

L280I+G309D+H134Q+V213F+F281A;

L280I+G309D+V213F+E320T+V90L;

L280I+G309D+Q220S+L224V+H134Q;

L280I+G309W+L238I+T342S;

L280I+G309W+F75Y+Y79S;

L280I+G309D+F75Y+S331Y+Q346E;

L280I+G309D+L224V+I103V+L238I;

L280I+G309D+F124Y+Q346E+I154L;

L280I+G309D+I154L+V261A+V367I;

L280I+G309D+Y79S+L224V+S212A;

L280I+G309D+L70M+T342S;

L280I+G309D+H134Q+M223E+L70M;

L280I+G309D+Y79S+T342S+I154L;

L280I+G309D+Y79S+I103V+F281A;

L280I+G309D+V256I+V261A+K379P;

L280I+G309D+Q346E+K77T+T235S;

L280I+G309D+H239N+R324I+D325Q;

L280I+G309D+H134Q+V213F+F281A;

L280I+G309D+Y326F+L70M+D325Q;

L280I+G309D+H134Q+M223E+L70M;

L280I+G309W+S212A+V261A;

L280I+G309D+S331Y+L224V+Y326F;

L280I+G309D+K120Q+M223E+H239N;

L280I+G309D+H239N+R324I+D325Q;

L280I+G309W+L238I+T342S;

- L280I+G309D+ V213F+E320T+V90L;
 L280I+G309D+L70M+T342S;
 L280I+G309D+H134Q+V213F+F281A;
 L280I+G309D+Y79S+L224V+S212A;
 5 L280I+G309D+S331Y+L224V+Y326F;
 L280I+G309D+H134Q+M223E+L70M;
 L280I+G309W+L238I+T342S;
 L280I+G309D+V213F+E320T+V90L або
 L280I+G309W+S212A+V261A.
- 10 6. Спосіб отримання ізолюваного варіанта поліпептиду хімозину за будь-яким з попередніх пунктів, в якому послідовність вихідного поліпептиду принаймні на 95 % ідентична послідовності зрілого поліпептиду SEQ ID NO: 1 (бичачого хімозину).
7. Спосіб отримання ізолюваного варіанта поліпептиду хімозину за будь-яким з пп. 1-5, в якому послідовність вихідного поліпептиду принаймні на 95 % ідентична послідовності зрілого поліпептиду SEQ ID NO: 2 (верблюжого хімозину), який охоплює амінокислотні положення від 59 до 381 SEQ ID NO: 2.
- 15 8. Ізолюваний варіант поліпептиду хімозину, що має удосконалені властивості згортання молока, отриманий способом за будь-яким з пп. 1-7.
9. Ізолюваний варіант поліпептиду хімозину, що має удосконалені властивості згортання молока, що має:
- 20 (а) зміну в одному або більше положеннях у вихідному поліпептиді, який має активність хімозину, де зміна включає заміну, делецію або інсерцію принаймні в одному амінокислотному положенні, що відповідає будь-якому з положень 70; 75; 77; 79; 90; 102; 103; 108; 114; 117; 120; 124; 134; 154; 156; 163; 212; 223; 224; 238; 246; 256; 261; K279V; L280; F281;
 25 R300D,E,S,T,N,Q,C,U,G,P,A,V,I,L,M,F,Y,W; G309; R312D,E,S,T,N,Q,C,U,G,P,A,V,I,L,M,F,Y,W; 320; 324; D325Q; 326; 331; 336; 346; 361; 367 та 379; та
 (b) варіант має активність хімозину;
 та:
 (i) амінокислотне положення вихідного поліпептиду визначено за вирівнюванням вихідного поліпептиду з поліпептидом SEQ ID NO: 1 (бичачого хімозину), тобто поліпептид SEQ ID NO: 1 застосовують для визначення відповідної амінокислотної послідовності у вихідному поліпептиді;
 30 та
 (ii) послідовність вихідного поліпептиду принаймні на 90 % ідентична послідовності зрілого поліпептиду SEQ ID NO: 1 (бичачого хімозину), який охоплює амінокислотні положення від 59 до 381 SEQ ID NO: 1; та
 35 (iii) послідовність ізолюваного варіанта поліпептиду менше ніж на 100 % ідентична послідовності зрілого поліпептиду SEQ ID NO: 1 (бичачого хімозину);
 та за умови, що ізолюваний варіант поліпептиду хімозину не є специфічним варіантом, вибраним з групи, що складається з:
 40 Q246E+G309D+S329P+D337E;
 R125Q+G128N+H204R+Q246E+S284T;
 Y185F+R213Q+Q246E;
 V261A+V263I+G309W+L311I+Y326F;
 G128D+L188I+Y326F;
 45 G128N+R312S+S313Y+Y326F;
 G128N+R312S+S313Y+Y326F та
 D117N+V261A+R312S;
 D216S+L224V+V263I+F281V+G309D;
 Y79S+L224V+L311I та
 50 R119S+L224V+T297S;
 де ізолюваний варіант має активність хімозину, що приводить до більш високого відношення К/П, порівняно з відношенням К/П бичачого хімозину, який містить зрілий поліпептид SEQ ID NO: 1.
10. Ізолюваний варіант поліпептиду хімозину за п. 9, в якому послідовність вихідного поліпептиду принаймні на 97 % ідентична послідовності зрілого поліпептиду SEQ ID NO: 1 (бичачого хімозину);
 55 в якому ізолюваний варіант бичачого хімозину містить менше 10 амінокислотних змін (наприклад, заміни) порівняно зі зрілим поліпептидом SEQ ID NO: 1 (бичачого хімозину).
11. Ізолюваний варіант поліпептиду хімозину за будь-яким з пп. 9-10, в якому зміна включає заміну принаймні в одному амінокислотному положенні, та в якому заміна являє собою L70M;
- 60

F75Y; K77T; Y79S; V90L; D102N; I103V; N108D; D117N; F114Y; K120Q; F124Y; H134Q; I154L; D156V; L163E; S212A; S222G; M223E; L224V; D325Q; L238I; Q246E; V256I; V261A; K279V; L280I; F281A; R300D,E,S,T,N,Q; G309D,W; R312D,E,S,T,N,Q; E320T; R324V; Y326F; K336D,E,S,T,N,Q,C,U,G,P,A,V,I,L,M,F,Y,W; S331Y; Q346E; I361L; V367I або K379P.

- 5 12. Ізольований варіант поліпептиду хімоцину за будь-яким з пп. 9-10, в якому зміна включає заміну принаймні в одному амінокислотному положенні, в якому заміна є:
H134Q+Q246E+Y326F;
D117N+L280I+G309D;
H134Q+D156V+G309D;
- 10 D156V+Q246E+L280I;
D117N+H134Q+L280I;
D156V+G309D+Y326F;
D117N+D156V+D325M;
L280I+D325M+Y326F;
- 15 D117N+Q246E+Y326F;
D117N+H134Q+D325M;
N310Q+N349Q+K279V;
R300Q+N307D;
N307D+G309D;
- 20 N307D+R312S;
R300Q+K336Q;
N307D+K336Q;
G309D+R312S;
R300Q+N307D+G309D+R312S+K336Q;
- 25 N158Q+N349Q+R300Q+N307D+G309D+R312S+K336Q;
L280I+G309D+S331Y+T342S+D325Q;
L280I+G309D+L224V+E320T+T235S;
L280I+G309W+K77T+R324I;
L280I+G309D+H134Q+V213F+F281A;
- 30 L280I+G309D+V213F+E320T+V90L;
L280I+G309D+Q220S+L224V+H134Q;
L280I+G309W+L238I+T342S;
L280I+G309W+F75Y+Y79S;
L280I+G309D+F75Y+S331Y+Q346E;
- 35 L280I+G309D+L224V+I103V+L238I;
L280I+G309D+F124Y+Q346E+I154L;
L280I+G309D+I154L+V261A+V367I;
L280I+G309D+Y79S+L224V+S212A;
L280I+G309D+L70M+T342S;
- 40 L280I+G309D+H134Q+M223E+L70M;
L280I+G309D+Y79S+T342S+I154L;
L280I+G309D+Y79S+I103V+F281A;
L280I+G309D+V256I+V261A+K379P;
L280I+G309D+Q346E+K77T+T235S;
- 45 L280I+G309D+H239N+R324I+D325Q;
L280I+G309D+H134Q+V213F+F281A;
L280I+G309D+Y326F+L70M+D325Q;
L280I+G309D+H134Q+M223E+L70M;
L280I+G309W+S212A+V261A;
- 50 L280I+G309D+S331Y+L224V+Y326F;
L280I+G309D+K120Q+M223E+H239N;
L280I+G309D+H239N+R324I+D325Q;
L280I+G309W+L238I+T342S;
L280I+G309D+V213F+E320T+V90L;
- 55 L280I+G309D+L70M+T342S;
L280I+G309D+H134Q+V213F+F281A;
L280I+G309D+Y79S+L224V+S212A;
L280I+G309D+S331Y+L224V+Y326F;
L280I+G309D+H134Q+M223E+L70M;
- 60 L280I+G309W+L238I+T342S;

L280I+G309D+V213F+E320T+V90L або

L280I+G309W+S212A+V261A.

13. Ізольований варіант поліпептиду хімозину, що має удосконалені властивості згортання молока, який має:

- 5 (a) зміну в одному або більше положеннях у вихідному поліпептиді, який має активність хімозину, де зміна включає заміну, делецію або інсерцію принаймні в одному амінокислотному положенні, що відповідає будь-якому з положень 70; 75; 77; 79; 90; 102; 103; 108; 114; 117; 120; 124; 134; 154; 156; 163; 212; 222; 223; 224; 238; 246; 256; 261; K279V; L280; F281; R300D,E,S,T,N,Q,C,U,G,P,A,V,I,L,M,F,Y,W; G309; R312D,E,S,T,N,Q,C,U,G,P,A,V,I,L,M,F,Y,W; 320; 324; D325Q; 326; 331; 336; 346; 361; 367 та 379; та

(b) варіант має активність хімозину;

та

- 15 (i) амінокислотне положення вихідного поліпептиду визначають за вирівнюванням вихідного поліпептиду з поліпептидом SEQ ID NO: 1 (бичачого хімозину), тобто поліпептид SEQ ID NO: 1 застосовують для визначення відповідної амінокислотної послідовності у вихідному поліпептиді; та

(ii) послідовність вихідного поліпептиду принаймні на 90 % ідентична послідовності зрілого поліпептиду SEQ ID NO: 2 (верблюжого хімозину), який охоплює амінокислотні положення від 59 до 381 SEQ ID NO: 2; та

- 20 (iii) послідовність ізольованого варіанта поліпептиду менше ніж на 100 % ідентична послідовності зрілого поліпептиду SEQ ID NO: 2 (верблюжого хімозину); та за умови, що ізольований варіант поліпептиду хімозину не є специфічним варіантом, вибраним з групи, що складається з:

Q246E+G309D+S329P+D337E;

- 25 R125Q+G128N+H204R+Q246E+S284T;

Y185F+R213Q+Q246E;

V261A+V263I+G309W+L311I+Y326F;

G128D+L188I+Y326F;

G128N+R312S+S313Y+Y326F;

- 30 G128N+R312S+S313Y+Y326F;

D117N+V261A+R312S;

D216S+L224V+V263I+F281V+G309D;

Y79S+L224V+L311I та

R119S+L224V+T297S;

- 35 де ізольований варіант має активність хімозину, що приводить до більш високого відношення К/П, порівняно з відношенням К/П верблюжого хімозину, який містить зрілий поліпептид SEQ ID NO: 2.

14. Ізольований варіант поліпептиду хімозину за п. 13, в якому зміна включає заміну принаймні в одному амінокислотному положенні, в якому заміна являє собою:

- 40 H134Q+Q246E+Y326F;

D117N+L280I+G309D;

H134Q+D156V+G309D;

D156V+Q246E+L280I;

D117N+H134Q+L280I;

- 45 D156V+G309D+Y326F;

D117N+D156V+D325M;

L280I+D325M+Y326F;

D117N+Q246E+Y326F;

D117N+H134Q+D325M;

- 50 N310Q+N349Q+K279V;

R300Q+N307D;

N307D+G309D;

N307D+R312S;

R300Q+K336Q;

- 55 N307D+K336Q;

G309D+R312S;

R300Q+N307D+G309D+R312S+K336Q або

N158Q+N349Q+R300Q+N307D+G309D+R312S+K336Q;

L280I+G309D+S331Y+T342S+D325Q;

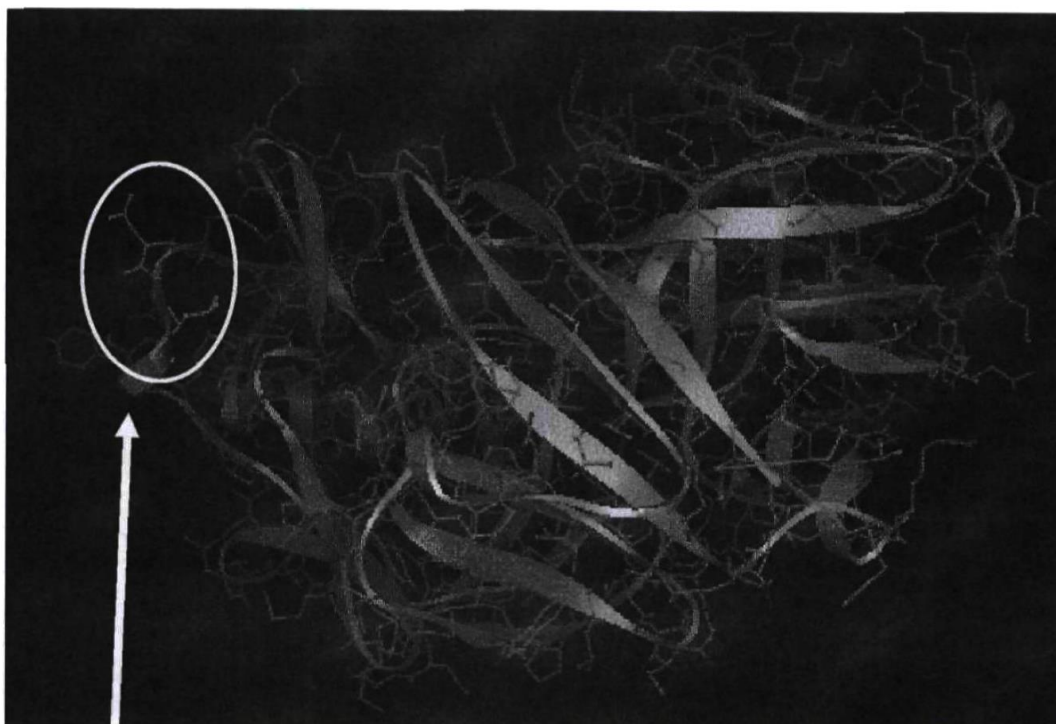
- 60 L280I+G309D+L224V+E320T+T235S;

- L280I+G309W+K77T+R324I;
 L280I+G309D+H134Q+V213F+F281A;
 L280I+G309D+V213F+E320T+V90L;
 L280I+G309D+Q220S+L224V+H134Q;
 5 L280I+G309W+L238I+T342S;
 L280I+G309W+F75Y+Y79S;
 L280I+G309D+F75Y+S331Y+Q346E;
 L280I+G309D+L224V+I103V+L238I;
 L280I+G309D+F124Y+Q346E+I154L;
 10 L280I+G309D+I154L+V261A+V367I;
 L280I+G309D+Y79S+L224V+S212A;
 L280I+G309D+L70M+T342S;
 L280I+G309D+H134Q+M223E+L70M;
 L280I+G309D+Y79S+T342S+I154L;
 15 L280I+G309D+Y79S+I103V+F281A;
 L280I+G309D+V256I+V261A+K379P;
 L280I+G309D+Q346E+K77T+T235S;
 L280I+G309D+H239N+R324I+D325Q;
 L280I+G309D+H134Q+V213F+F281A;
 20 L280I+G309D+Y326F+L70M+D325Q;
 L280I+G309D+H134Q+M223E+L70M;
 L280I+G309W+S212A+V261A;
 L280I+G309D+S331Y+L224V+Y326F;
 L280I+G309D+K120Q+M223E+H239N;
 25 L280I+G309D+H239N+R324I+D325Q;
 L280I+G309W+L238I+T342S;
 L280I+G309D+V213F+E320T+V90L;
 L280I+G309D+L70M+T342S;
 L280I+G309D+H134Q+V213F+F281A;
 30 L280I+G309D+Y79S+L224V+S212A;
 L280I+G309D+S331Y+L224V+Y326F;
 L280I+G309D+H134Q+M223E+L70M;
 L280I+G309W+L238I+T342S;
 L280I+G309D+V213F+E320T+V90L або
 35 L280I+G309W+S212A+V261A.

15. Спосіб отримання харчового продукту, який полягає в додаванні ефективної кількості ізольованого варіанта поліпептиду хімозину за будь-яким з пп. 8-14 до харчових інгредієнтів та здійсненні наступних операцій виготовлення для отримання харчового продукту; та
 в якому отримують продукт на основі молока, та спосіб полягає в додаванні до молока ефективної кількості ізольованого варіанта поліпептиду хімозину за будь-яким з пп. 8-14 та здійсненні наступних операцій виготовлення для отримання продукту на основі молока; та
 40 в якому молоком є соєве молоко, молоко вівці, молоко кози, молоко буйвола, молоко яка, молоко лами, молоко верблюда або молоко корови; та
 в якому продукт на основі молока являє собою кисломолочний продукт, сир або твердий сир.

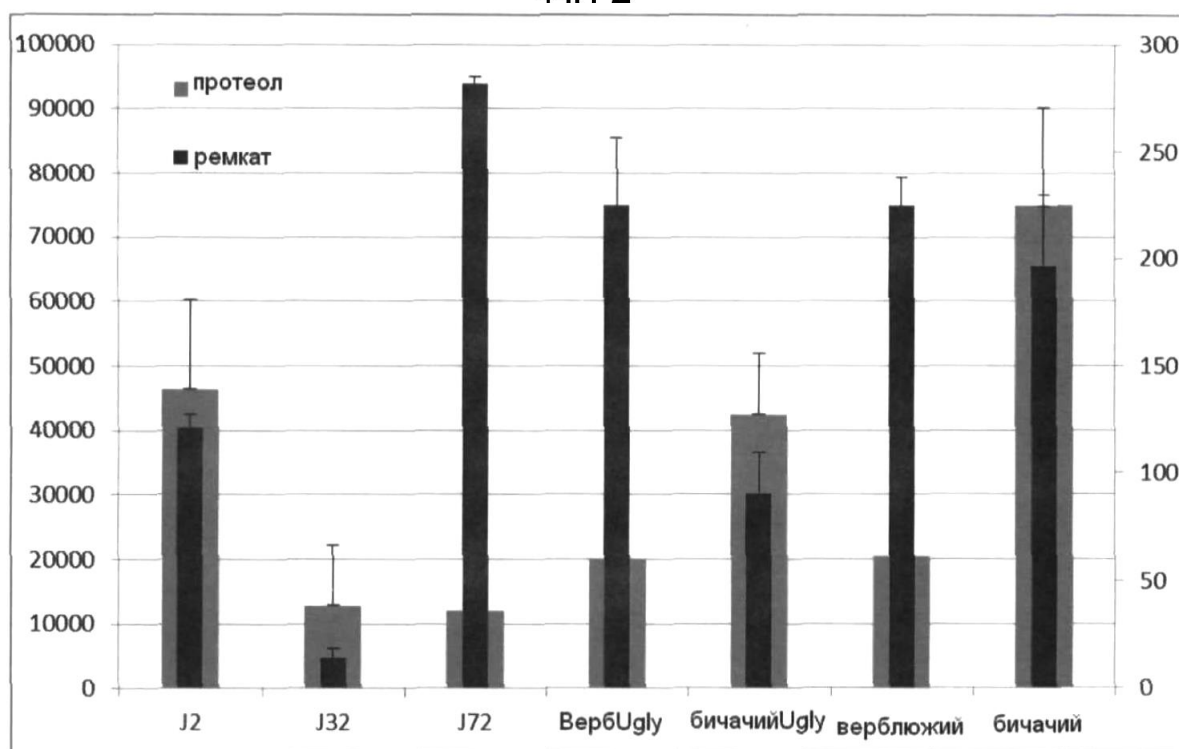
		1		50		
	Бичачий хімозин B	MRCLVLLAV	FALSQGAET	RIPLYKGKSL	RKALKEHGLL	EDFLQKQQYG
	вівця	MRCLVLLAV	FALSQGAET	RIPLYKGKPL	RKALKERGLL	EDFLQKQQYG
	бактріан	MRCLVLLAA	LALSQASGIT	RIPLHKGKTL	RKALKERGLL	EDFLQRQQYA
верблюжий хімозин SEQ	ID NO: 2	MRCLVLLAA	LALSQASGIT	RIPLHKGKTL	RKALKERGLL	EDFLQRQQYA
	свиня	.IRGRVLLAV	LALSQSGGIT	RVPLRKGKSL	RKELKERGLL	EDFLQKQPYA
	щур	MRCFVLLAV	LATAQSHVVT	RIPLHKGKSL	RNTLKEQGGL	EDFLRRHQYE
		51				100
	Бичачий хімозин B	ISSKYSGFGE	VASVPLTNYL	DSQYFGKIYL	GTPPQEFTVL	FDTGSSDFWV
	вівця	VSSEYSGFGE	VASVPLTNYL	DSQYFGKIYL	GTPPQEFTVL	FDTGSSDFWV
	бактріан	VSSKYSSLGK	VAREPLTSYL	DSQYFGKIYI	GTPPQEFTVV	FDTGSSDLWV
верблюжий хімозин SEQ	ID NO: 2	VSSKYSSLGK	VAREPLTSYL	DSQYFGKIYI	GTPPQEFTVV	FDTGSSDLWV
	свиня	LSSKYSFGE	VASEPLTNYL	DTQYFGKIYI	GTPPQEFTVV	FDTGSSELWV
	щур	FSEKNSNIGM	VASEPLTNYL	DSEYFGLIYV	GTPPQEFKVV	FDTGSSELWV
		101				150
	Бичачий хімозин B	PSIYCKSNAC	KNHQRFDPK	SSTFQNLGKP	LSIHYGTGSM	QGILGYDTVT
	вівця	PSIYCKSNAC	KNHQRFDPK	SSTFQNLGKP	LSIRYGTGSM	QGILGYDTVT
	бактріан	PSIYCKSNAC	KNHHRFDPK	SSTFRNLGKP	LSIHYGTGSI	EGFLGYDTVT
верблюжий хімозин SEQ	ID NO: 2	PSIYCKSNVC	KNHHRFDPK	SSTFRNLGKP	LSIHYGTGSM	EGFLGYDTVT
	свиня	PSVYCKSDAC	QNHHRFNPSK	SSTFQNLDKP	LSIQYGTGSI	QGFLGYDTVM
	щур	PSVYCSSKVC	RNHNRFDPSK	SFTFQNLSPK	LFVQYGTGSV	EGFLAYDTVT
		151				200
	Бичачий хімозин B	VSNIVDIQQT	VGLSTQEPGD	VFTYAEFDGI	LGMAYPSLAS	EYSIPVFDNM
	вівця	VSNIVDIQQT	VGLSTQEPGD	VFTYAEFDGI	LGMAYPSLAS	EYSVPVFDNM
	бактріан	VSNIVDPNQT	VGLSTEQPGE	VFTYSEFDGI	LGLAYPSLAS	EYSVPVFDNM
верблюжий хімозин SEQ	ID NO: 2	VSNIVDPNQT	VGLSTEQPGE	VFTYSEFDGI	LGLAYPSLAS	EYSVPVFDNM
	свиня	VAGIVDAHQT	VGLSTQEPSD	IFTYSEFDGI	LGLGYPELAS	EYTVPVFDNM
	щур	VSDIVVPHQT	VGLSTEEPGE	IFTYSPFDGI	LGLAYPTFAS	KYSVPIFDNM
		201				250
	Бичачий хімозин B	MNRHLVAQDL	FSVYMDRNGQ	ESMLTLGAID	PSYITGSLHW	VPVTVQQYWQ
	вівця	MDRRLVAQDL	FSVYMDRSGQ	GSMLTLGAID	PSYITGSLHW	VPVTLQKYWQ
	бактріан	MDRHLVARDL	FSVYMDRNGQ	GSMLTLGATD	PSYITGSLHW	VPVTVQQYWQ
верблюжий хімозин SEQ	ID NO: 2	MDRHLVARDL	FSVYMDRNGQ	GSMLTLGAID	PSYITGSLHW	VPVTLQKYWQ
	свиня	MHRHLVAQDL	FAVYMSRND	GSMLTLGAID	PSYITGSLHW	VPVTMLQYWQ
	щур	MNRHLVAQDL	FSVYMSRNDQ	GSMLTLGAID	QSYFIGSLHW	VPVTVQQYWQ
		251				300
	Бичачий хімозин B	FTVDSVTISG	VVVACEGGCQ	AILDTGTSKL	VGPSSDILNI	QQAIGATQNG
	вівця	FTVDSVTISG	AVVACEGGCQ	AILDTGTSKL	VGPSSDILNI	QQAIGATQNG
	бактріан	FTVDSVTING	VAVACVGGCQ	AILDTGTSVL	FGPSSDILKI	QMAIGATENR
верблюжий хімозин SEQ	ID NO: 2	FTVDSVTING	VAVACVGGCQ	AILDTGTSVL	FGPSSDILKI	QMAIGATENR
	свиня	FTVDSVTING	VVVACNGGCQ	AILDTGTSML	AGPSSDILNI	QMAIGATESQ
	щур	FTVDRIITND	EVVACQGGCP	AVLDTGTALL	TGPRDILNI	QHAIGAVQGG
		301				350
	Бичачий хімозин B	YGEFDIDCDN	LSYMPTVVFE	INGKMYPLTP	SAYTSQDQGF	CTSGFQGENH
	вівця	YGEFDIDCDS	LSSMPTVVFE	INGKMYPLTP	YAYTSQEEGF	CTSGFQGENH
	бактріан	YGEFDVNCGS	LRSMPVVVFE	INGRDFPLAP	SAYTSKDQGF	CTSGFQGDNN
верблюжий хімозин SEQ	ID NO: 2	YGEFDVNCGN	LRSMPVVVFE	INGRDYPLSP	SAYTSKDQGF	CTSGFQGDNN
	свиня	YGEFDIDCGS	LSSMPTVVFE	ISGRMYPLPP	SAYTNQDQGF	CTSGFQGDNSK
	щур	HDQFDIDCWR	LNFMPTVVFE	INGREFPLPP	SAYTNQFQGS	CSSGFR..HG
		351			381	
	Бичачий хімозин B	SQKWILGDVF	IREYYSVFDR	ANNLVGLAKA	I	
	вівця	SHQWILGDVF	IREYYSVFDR	ANNLVGLAKA	I	
	бактріан	SELWILGDVF	IREYYSVFDR	ANNRVGLAKA	I	
верблюжий хімозин SEQ	ID NO: 2	SELWILGDVF	IREYYSVFDR	ANNRVGLAKA	I	
	свиня	SQHWILGVVF	IQEYYSVFDR	ANNRVGLAKA	I	
	щур	SQMWILGDVF	IREFYSVFDR	ANNRVGLAKA	I	

Фіг. 1

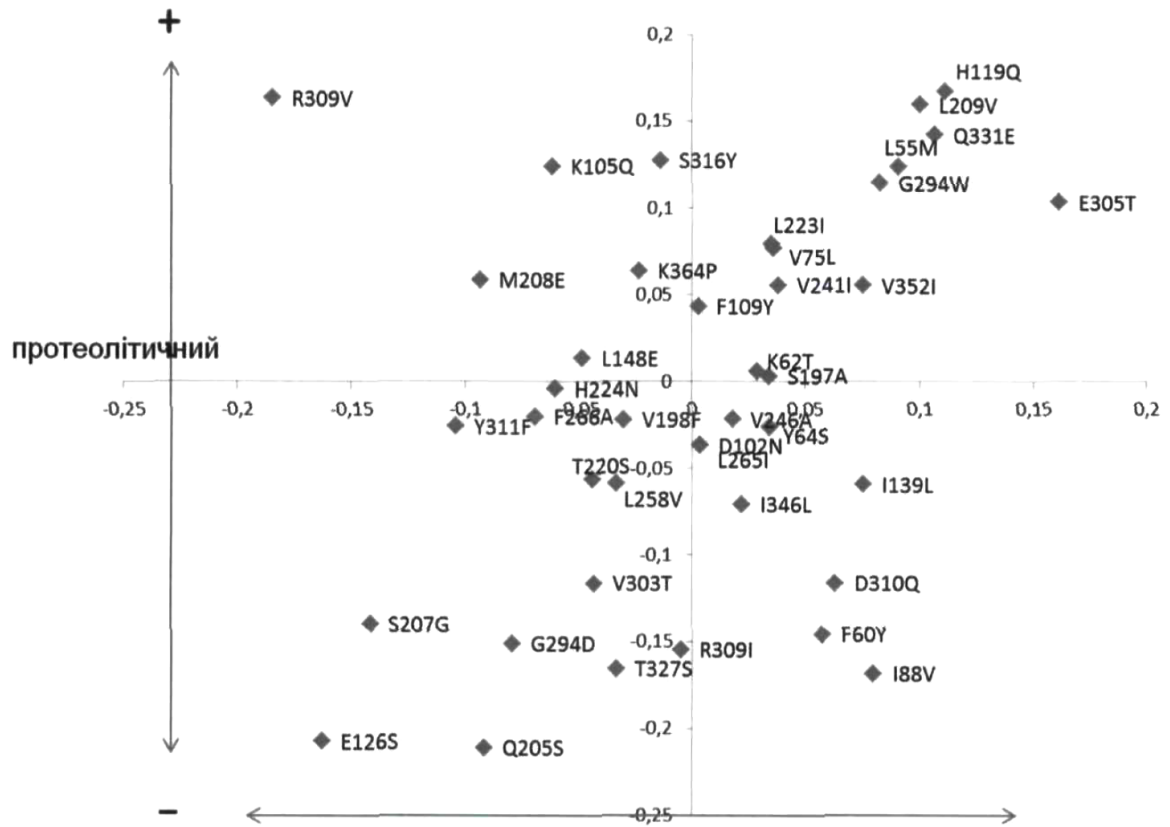


позиції 296 та 294 у бичачому хімоzinі

Фіг. 2



Фіг. 3



Фіг. 4

Комп'ютерна верстка В. Юкін

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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