



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.05.22

(21) Номер заявки
201401211

(22) Дата подачи заявки
2013.05.03

(51) Int. Cl. **C12N 9/64** (2006.01)
C12N 15/59 (2006.01)
A23C 19/04 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)

(54) ВАРИАНТЫ ХИМОЗИНА С ПОВЫШЕННОЙ СПЕЦИФИЧНОСТЬЮ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В ПОЛУЧЕНИИ СЫРА

(31) 12166673.9; 61/642,095; 12199178.0;
12199277.0; 61/745,063

(32) 2012.05.03; 2012.05.03; 2012.12.21;
2012.12.21; 2012.12.21

(33) EP; US; EP; EP; US

(43) 2015.05.29

(86) PCT/EP2013/059315

(87) WO 2013/164479 2013.11.07

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ДСМ АйПи АСЕТС Б.В. (NL)

(72) Изобретатель:
Деккер Петрус Якобус Теодорус, Йонг
Де Рене Марсель, Мейлвейк Корнелис
Маринус (NL)

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(56) KAPPELER S.R. ET AL.: "Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 342, no. 2, 7 April 2006 (2006-04-07), pages 647-654, XP024923721, ISSN: 0006-291X, DOI: 10.1016/J.BBRC.2006.02.014, [retrieved on 2006-04-07], the whole document

WO-A2-0236752

WO-A1-2008098973

SUZUKI J. ET AL.: "SITE-DIRECTED MUTAGENESIS REVEALS FUNCTIONAL CONTRIBUTION OF THR-218 LYS220 AND ASP304 IN CHYMO SIN", PROTEIN ENGINEERING, vol. 4, no. 1, 1990, pages 69-72, XP001318411, ISSN: 0269-2139, the whole document

JUNCO SUZUKI ET AL.: "ALTERATION OF CATALYTIC PROPERTIES OF CHYMO SIN BY SITE-DIRECTED MUTAGENESIS", PROTEIN ENGINEERING, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 2, no. 7, 1 May 1989 (1989-05-01), pages 563-569, XP000009488, ISSN: 0269-2139, the whole document

CHITPINITYOL SUPANNEE ET AL.: "Site-specific mutations of calf chymosin B which influence milk-clotting activity", FOOD CHEMISTRY, vol. 62, no. 2, June 1998 (1998-06), pages 133-139, XP002685255, ISSN: 0308-8146, the whole document

PALMER DAVID S. ET AL.: "Bovine Chymosin: A Computational Study of Recognition and Binding of Bovine kappa-Casein", BIOCHEMISTRY, vol. 49, no. 11, March 2010 (2010-03), pages 2563-2573, XP002685251, the whole document

MALA B. RAO ET AL.: "Molecular and Biotechnological aspects of microbial proteases", MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS, vol. 62, no. 3, September 1998 (1998-09), pages 597-635, XP002685252, page 602, left-hand column, page 603, right-hand column, last paragraph - page 604, left-hand column

GILLILAND G.L. ET AL.: "THE THREE-DIMENSIONAL STRUCTURE OF RECOMBINANT BOVINE CHYMO SIN AT 2.3 Å RESOLUTION", PROTEINS STRUCTURE FUNCTION AND GENETICS, vol. 8, no. 1, 1990, pages 82-101, XP002685253, ISSN: 0887-3585, the whole document

CHITPINITYOL SUPANNEE ET AL.: "Chymosin and aspartic proteinases", FOOD CHEMISTRY, vol. 61, no. 4, April 1998 (1998-04), pages 395-418, XP002685254, ISSN: 0308-8146, page 396, right-hand column - page 403

HOUEN G. ET AL.: "The primary structure and enzymic properties of porcine prochymosin and chymosin", INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOCHEMISTRY AND CELL BIOLOGY, PERGAMON, GB, vol. 28, no. 6, 1 January 1996 (1996-01-01), pages 667-675, XP002901712, ISSN: 1357-2725, DOI: 10.1016/1357-2725(96)00002-7, the whole document

(57) Изобретение относится к рекомбинантному полипептиду с активностью химозина, который демонстрирует по сравнению с эталонным полипептидом с активностью химозина повышенную специфичность, пониженную протеолитическую активность в сырной матрице, пониженную протеолитическую активность при низком pH, пониженную протеолитическую активность при низкой температуре, повышенный уровень экспрессии, пониженную термостабильность. Также изобретение относится к способам получения заявленного полипептида; нуклеиновой кислоте, кодирующей заявленный полипептид; нуклеотидной конструкции, содержащей нуклеиновую

кислоту; вектору, содержащему нуклеотидную конструкцию; клетке-хозяину, содержащей вектор, а также к применению полипептида в получении сыра и соответствующему способу.

035275 B1

035275 B1

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к вариантному полипептиду, имеющему активность химозина. Изобретение также относится к нуклеотидной последовательности, кодирующей такой вариант, к рекомбинантному экспрессирующему вектору указанной нуклеотидной конструкции и к рекомбинантной клетке-хозяину, содержащей указанный экспрессирующий вектор. Кроме того, изобретение относится к способу получения химозина посредством применения такой клетки-хозяина. Также изобретение относится к способу получения варианта полипептида химозина. Изобретение также относится к композиции, содержащей вариант химозина, применению такого варианта химозина или композиции, содержащий вариант химозина при приготовлении сыра, к способу получения сыра и к полученному сыру.

Предшествующий уровень техники

Ферментативная коагуляция молока с помощью молокосвертывающих ферментов, таких как химозин или пепсин, является одним из наиболее важных процессов при изготовлении сыров. Ферментативная коагуляция молока является двухфазным процессом: первая фаза, на которой протеолитический фермент, химозин или пепсин атакует каппа-казеин, что приводит метастабильному состоянию структуры казеиновой мицеллы, и вторая фаза, на которой молоко последовательно коагулирует и образует сгусток. Химозин (группа 3.4.23.4 согласно Номенклатуре Ферментов, 1992 Международного Союза Биохимии и Молекулярной Биологии, IUBMB) и пепсин (ЕС 3.4.23.1), свертывающие молоко ферменты желудка млекопитающих, являются аспарагиновыми протеазами, принадлежащими к широкому классу пептидаз. Аспарагиновые протеазы обнаружены у эукариот, ретровирусов и некоторых растительных вирусов.

При выработке в клетках слизистой желудка химозин и пепсин появляются в виде ферментативно неактивных пре-прохимозина и пре-пепсиногена соответственно. При экскреции химозина N-концевой пептидный фрагмент, пре-фрагмент (сигнальный пептид) отщепляется с получением прохимозина, включающего про-фрагмент. Прохимозин фактически является неактивной формой фермента, которая, однако, активируется в кислых условиях в активный химозин путем аутокаталитического удаления про-фрагмента. Эта активация происходит *in vivo* в желудочном просвете в соответствующих условиях pH или *in vitro* в кислых условиях.

Структурные и функциональные характеристики бычьих т.е. из *Bos taurus*, пре-прохимозина, прохимозина и химозина интенсивно изучались. Пре-часть молекулы бычьего пре-прохимозина содержит 16 ак остатков, а про-часть соответствующего прохимозина имеет длину 42 ак остатка. Активный бычий химозин, содержащий 323 ак, является смесью двух форм, А и В, обе из которых являются активными и данные секвенирования указывают на то, что различие между этими двумя формами заключается только в остатке аспартата в положении 290 в химозине А и остатка глицина в этом же положении в химозине В.

Тем не менее, очевидно, что продуктивность по показателю общего выхода генного продукта является важным фактором для экономической эффективности промышленного производства фермента. Улучшение производительности химозина приведет к снижению издержек производства и снижению использования ресурсов. Соответственно, существует постоянная потребность в промышленности в улучшении продуктивности химозина в рекомбинантных экспрессирующих системах.

Кроме того, существует потребность в химозине с модифицированной протеолитической активностью в условиях изготовления сыров. В большинстве сыров химозин ответственен за "первичный" протеолиз, который приводит к высвобождению пептидов, которые позже используются молочнокислыми бактериями для "вторичного" протеолиза и образования аромата в ходе созревания.

Сущность изобретения

Изобретение относится к вариантным полипептидам, обладающим активностью химозина, т.е. вариантам химозина. Вариант химозина изобретения может иметь одно или несколько улучшенных свойств по сравнению с эталонным полипептидом, эталонный полипептид, как правило, обладает активностью химозина. Эталонный полипептид может быть химозином дикого типа, таким как химозин дикого типа, например из крупного рогатого скота, такого как *Bos taurus*. Вариантные полипептиды изобретения могут называться "вариантом химозина", "улучшенным химозином" и т.п.

Улучшенное свойство, как правило, будет свойством имеющим отношение к применению вариантного химозина при приготовлении сыра. Вариант химозина с улучшенным свойством, имеющим отношение к изготовлению сыра, может демонстрировать

повышенную производительность, например, измеренную в IMCU на литр ферментационного бульона;

повышенную специфическую активность, например, измеренную в IMCU на мг белка химозина;

повышенную или сниженную специфичность при pH, соответствующем изготовлению или созреванию сыра, где специфичность может, например, быть измерена путем деления активности свертывания на протеолитическую активность (C/P);

повышенную или пониженную активность при низкой температуре;

повышенную или пониженную нацеленность фермента химозина на сырный сгусток;

пониженную температурную стабильность;

повышенную активность свертывания при низком pH, пониженную протеолитическую активность

при низком рН или пониженную протеолитическую активность при низкой температуре;
пониженную солевую стабильность или пониженную активность при высокой концентрации соли;
и/или

увеличенное или уменьшенное созревание сыра, полученное с вариантным химозином.

Каждое из этих улучшений может быть определено по сравнению с эталонным полипептидом.

В частности, вариантный химозин изобретения может демонстрировать улучшенную продуктивность по сравнению с эталонным полипептидом. В ином случае или в дополнение, вариантный химозин изобретения может демонстрировать модифицированную протеолитическую активность в матрице сыра по сравнению с эталонным полипептидом. Вариант может демонстрировать пониженную или повышенную протеолитическую активность по сравнению с родительским полипептидом. В ином случае или в дополнение, вариантный химозин изобретения может демонстрировать измененную, например пониженную, температурную стабильность или измененную активность при рН, соответствующем процессу изготовления сыра, например при низком рН, по сравнению с эталонным полипептидом.

Согласно изобретению предлагается полипептид с активностью химозина, имеющий аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO: 2, и содержащий замену аминокислотного остатка по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 2, выбранную из A51V, A51T, A51I, A51L и A51N. Данный полипептид демонстрирует повышенную специфичность по сравнению с эталонным полипептидом, обладающим активностью химозина и содержащим последовательность SEQ ID NO: 2. В изобретении также предлагаются

нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид изобретения;

нуклеотидная конструкция, содержащая такую нуклеиновую кислоту, функционально связанную с одной или несколькими регуляторными последовательностями, способными управлять экспрессией нуклеиновой кислоты в подходящем хозяине;

рекомбинантный экспрессирующий вектор, содержащий по меньшей мере одну такую нуклеотидную конструкцию; и

рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая такой экспрессирующий вектор.

Изобретение также относится к способу получения полипептида изобретения, включающего культивирование клетки-хозяина изобретения в условиях, обеспечивающих продуцирование полипептида изобретения и его выделение.

Также изобретение относится к способу получения полипептида изобретения, который включает:

a) выбор полипептида, обладающего активностью химозина и имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2;

b) замену одного или нескольких аминокислотных остатков в последовательности SEQ ID NO: 2, причем одна из замен находится в положении 51 последовательности SEQ ID NO: 2 и выбрана из A51V, A51T, A51I, A51L и A51N;

d) определение свойств полученных вариантов полипептида; и

e) выбор варианта полипептида, демонстрирующего повышенную специфичность по сравнению с эталонным полипептидом, обладающим активностью химозина и содержащим последовательность SEQ ID NO: 2.

Кроме того, изобретение относится к

композиции для получения сыра, содержащей полипептид изобретения или полипептид, получаемый способом изобретения:

применению полипептида по изобретению при приготовлении сыра; способу получения сыра, который включает добавление эффективного молокосвертывающего количества полипептида изобретения или композиции изобретения в молоко и проведение соответствующих последующих стадий изготовления сыра.

Описание чертежей

На фигуре представлено схематическое изображение плазмиды pKLAC1, которую использовали для получения вариантов химозина.

Описание перечня последовательностей

SEQ ID NO: 1 представляет собой нуклеотидную последовательность последовательности гена прохимозина В дикого типа из *Bos taurus*, где кодоны были адаптированы для экспрессии в *K.lactis* и с линкерами для клонирования в pKLAC1.

SEQ ID NO: 2 представляет собой аминокислотную последовательность зрелого химозина В из *Bos taurus*.

Подробное описание изобретения

Во всем настоящем описании и в сопровождающих пунктах формулы изобретения слова "содержит", "включает" и "имеет" и вариации, такие как "содержат", "содержащий", "включают" и "включающий", должны толковаться включительно. Т.е. эти слова призваны передать идею возможного включения специально не перечисленных других элементов или чисел, где позволяет контекст.

В данном документе слова, употребляемые в единственном числе, также включают и множественное число. К примеру, элемент может обозначать один элемент или больше одного элемента.

В данном документе "химозин", как правило, служит для обозначения аспарагиновой протеазы, группы 3.4.23.4, согласно Номенклатуре Ферментов, 1992 г., Международного Союза Биохимии и Молекулярной Биологии, IUBMB. Химозин в природе продуцируется главными клетками слизистой оболочки желудка у ювенильных млекопитающих. Химозин является основным ферментативным компонентом сычужного фермента. Телячий сычужный фермент получают из выстилки сычуга (четвертый и конечный отдел желудка) молодых, не отлученных от матери телят.

Прохимозин в контексте настоящего изобретения следует понимать как предшественник или про-фермент химозина. По-видимому, прохимозин обладает лидерной последовательностью (про-часть) в N-концевой области химозина, и считается, что указанная лидерная последовательность отщепляется во время активации прохимозина. Кроме того, в данном контексте препрохимозин состоит из прохимозина, к N-концу которого добавлена гидрофобная лидерная последовательность. Данная лидерная последовательность, также называемая сигналом секреции или пречасть, отщепляется при секреции белка. Химозин в клетке исходно синтезируется в виде препрохимозина (Harris et al., Nucleic acid Research 1982, April 10, 2177-2187 Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA coding for calf preprochymosin).

Ген или кДНК, кодирующая химозин или про-химозин, например вариант по изобретению, может быть клонирован и сверхэкспрессирован в организме-хозяине. Хорошо известны организмы-хозяева, которые использовались для сверхэкспрессии ранее, включают *Aspergillus*, *Kluyveromyces*, *Trichoderma*, *Escherichia coli*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Yarrowia*, *Neurospora* или *Bacillus*.

В настоящее время бычий химозин производится промышленно с использованием технологии рекомбинантных ДНК, например с использованием в качестве организмов-хозяев мицелиальных грибов, таких как грибы вида *Aspergillus*, дрожжевых штаммов, например видов *Kluyveromyces*, или видов бактерий, например *E.coli*. Такие рекомбинантные микробные продуцирующие штаммы конструируются и непрерывно улучшаются с помощью ДНК-технологии, а также осуществляются меры по улучшению классических штаммов в целях улучшения оптимизации экспрессии и секреции гетерологичного белка.

В изобретении вариант химозина может предлагаться в форме пре-прохимозина, прохимозина или (зрелого) химозина. Также может предлагаться соответствующая последовательность нуклеиновой кислоты, т.е. предлагается полинуклеотид, который кодирует пре-прохимозин, прохимозин или (зрелый) химозин.

В данном документе положения, которые могут быть замещены для получения варианта по изобретению, определяются по отношению к SEQ ID NO: 2, которая представляет собой зрелый бычий химозин, т.е. это последовательность, которая не включает препро- или про-последовательность.

Изобретение касается вариантных полипептидов, обладающих активностью химозина при сравнении с эталонным полипептидом, обладающим активностью химозина. Эталонный полипептид может быть, как правило, представлен в виде полипептида дикого типа, обладающего активностью химозина, такого как химозин SEQ ID NO: 2 или родственная последовательность. Эталонный полипептид также может быть обозначен как родительский полипептид или сравниваемый полипептид.

Более конкретно, изобретение относится к вариантному полипептиду, обладающему активностью химозина, где вариант имеет аминокислотную последовательность, которая при сравнении с химозином, включающим последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, содержит по меньшей мере одну замену аминокислотного остатка, соответствующего любой из аминокислот 2, 22, 40, 48, 50, 51, 53, 61, 62, 76, 88, 98, 99, 109, 112, 117, 125, 126, 135, 144, 160, 161, 163, 187, 189, 194, 200, 201, 202, 203, 221, 223, 240, 242, 244, 254, 267, 271, 273, 278, 280, 284, 289, 292, 294 или 295, где указанные положения определены относительно SEQ ID NO: 2 и где вариант имеет одно или несколько измененных свойств по сравнению с эталонным полипептидом, имеющим активность химозина.

Эталонный полипептид дикого типа может быть получен из любых подходящих организмов. Как правило, эталонный пептид дикого типа может быть получен из млекопитающего, предпочтительно из такого, в котором пре-прохимозин продуцируется естественным образом в желудочно-кишечном тракте.

Такие млекопитающие включают бычьих, т.е. виды из семейства Bovinae, например *Bos taurus*, виды буйволов, включающих азиатских буйволов, индийских буйволов и африканских буйволов. Эталонный полипептид может представлять собой овечью или козлиную последовательность дикого типа. Эталонный полипептид может представлять собой последовательность дикого типа верблюжьих, например рода *Camelus*, включая два вида *Camelus dromedarius* и *Camelus bactrianus*, рода *Lama*, включая *Lama glama*, *Lama guanicoe* и *Lama paco* или рода *Vicuna*.

Предпочтительно, если эталонный полипептид представляет собой химозин, представленный в последовательности SEQ ID NO: 2.

Вариантный полипептид будет, как правило, иметь улучшенное свойство по сравнению с эталонным полипептидом, конкретно в отношении свойства, касающегося применения вариантного полипептида в получении сыра.

В частности, улучшенное свойство может относиться к протеолитической активности и/или к продуктивности.

Улучшенная продуктивность может демонстрироваться с помощью варианта химозина, который демонстрирует улучшенную экспрессию по сравнению с родительским полипептидом. В ином случае

или дополнительно повышенная продуктивность варианта химозина может демонстрироваться химозином с более высокой специфической активностью по сравнению с родительским полипептидом.

Таким образом, одной из целей настоящего изобретения является предложение способа получения с высоким выходом рекомбинантного необычного пре-прохимозина, прохимозина или химозина. Изобретение относится к вариантам химозина, которые при экспрессии в одной и той же клетке-хозяине и, по существу, в идентичных условиях, экспрессируются с выходом активности, который значительно выше, чем та активность, которую получают с эталонным химозином, таким как SEQ ID NO: 2.

Согласно этому вышеописанный способ предпочтительно является способом, в котором выход молокосвертывающей активности необычных пре-прохимозина, прохимозина или химозина по меньшей мере на 10, 25, 50, 100 или 200% выше, чем выход молокосвертывающей активности бычьих пре-прохимозина, прохимозина или химозина, полученный при использовании в идентичных условиях получения того же экспрессирующего вектора, но кодирующего последовательности бычьих пре-прохимозина, прохимозина или химозина вместо последовательности, кодирующей необычи пре-прохимозин, прохимозин или химозин.

Вариант химозина по изобретению может быть модифицирован, в частности может быть уменьшена протеолитическая активность в сырном матриксе по сравнению с родительским полипептидом. Такой улучшенный химозин может иметь улучшенную специфичность, например, при pH созревания сыра. Специфичность химозинового препарата может быть, в частности, измерена путем определения соотношения С/Р. Более высокое соотношение С/Р предполагает более высокую специфичность, которая может приводить к снижению первичного протеолиза.

В ином случае или дополнительно, вариант химозина по изобретению с пониженной протеолитической активностью в сырной матрице может демонстрировать пониженное направленное воздействие на сырный сгусток по сравнению с родительским полипептидом. Пониженное направленное воздействие на сырный сгусток будет приводить к меньшему включению химозина в сырную матрицу и, следовательно, к пониженному протеолизу.

В ином случае или дополнительно, вариант химозина по изобретению с пониженной протеолитической активностью в сырной матрице может иметь пониженную температурную стабильность по сравнению с родительским полипептидом. Некоторые типы сыров получают с использованием стадии варки или растягивания, когда сырный сгусток нагревают перед получением конечного сырного продукта. Во время такой стадии нагревания химозин с уменьшенной температурной стабильностью будет инактивироваться и, следовательно, в сырной матрице будет наблюдаться пониженный протеолиз.

В ином случае или дополнительно, химозин с пониженной протеолитической активностью в сырной матрице может обладать пониженной активностью при более низких температурах по сравнению с родительским полипептидом. Многие сыры хранятся и созревают (вызревают) при пониженных температурах. Химозин с пониженной протеолитической активностью при более низкой температуре будет приводить к снижению протеолиза в сырной матрице.

Другой путь получения химозина с пониженной протеолитической активностью в сырной матрице состоит в создании вариантов химозина, которые обладают пониженной устойчивостью к соли или пониженной активностью, при повышении концентрации соли. Многие типы сыров солят путем засаливания или смешивания соли с сырным зерном. В среднем концентрация соли в сыре находится в интервале от 0,8% (домашний сыр) до 3% (фета и голубой сыр). Следовательно, химозин с пониженной устойчивостью к соли или с пониженной активностью при таких условиях будет приводить к получению сыра с пониженным протеолизом.

Химозин с пониженной протеолитической активностью в сыре будет приводить в результате к получению меньшей мягкости и вызревания сыра, что может быть предпочтительным для молодых сыров, таких как Моцарелла, пицца-сыр и паста-филата, путем повышения срока хранения и улучшения свойств нарезки и измельчения благодаря более прочной структуре. Пониженный первичный протеолиз также предполагает, что в процессе созревания уменьшается развитие горького вкуса. Это особенно может относиться к сырам с более высоким содержанием воды, где первичный протеолиз повышен и горечь воспринимается как проблема.

Кроме того, химозин с пониженной протеолитической активностью в процессе получения сыра может приводить к пониженной потере казеина в сыворотке и, таким образом, к повышенному выходу сыра. Кроме того, когда используется химозин с пониженной протеолитической активностью, может повышаться качество сыворотки.

Соответственно, вариант химозина по изобретению может особенно подходить в таких применениях.

Напротив, вариант по изобретению может демонстрировать повышенный первичный протеолиз в сырной матрице. Повышенный первичный протеолиз, как правило, предполагает, что развитие вкуса в сыре в процессе созревания будет повышаться. Время созревания полутвердого и твердого сыров может быть уменьшено с использованием таких вариантов химозина, снижая, таким образом, цену производства и ограничивая порчу товара. Кроме того, повышенный первичный протеолиз может приводить к более быстрому сливанию творожных зерен в течение первой недели хранения, уменьшая необходимое время перед тем, как сыр можно будет разрезать или разломать.

Слабый первичный протеолиз, в частности, имеет место в сырах, приготовленных с использованием ультрафильтрованного молока, где концентрация казеина во время сычужного свертывания выше и требуется введение меньшего количества химозина. Таким образом, сыр, приготовленный с использованием ультрафильтрованного молока, часто демонстрирует дефекты при созревании. Химозин с повышенной активностью в сырной матрице может компенсировать пониженную дозировку, требуемую для сычужного свертывания. Кроме того, более высокое pH сыворотки при сушке и более низкие температуры приготовления, как правило, применяемые в производстве сыров пониженной жирности, приводит к меньшей сохранности химозина в сыре. Это отчасти является причиной более низкой степени первичного протеолиза во время созревания и твердой структуры сыра пониженной жирности. Кроме того, в данном документе химозин с повышенной активностью в сырной матрице может применяться при исправлении структурных дефектов в сыре пониженной жирности. Соответственно, в таких применениях может использоваться химозин по изобретению, демонстрирующий повышенный протеолиз.

Существует несколько путей получения химозина с повышенной протеолитической активностью в сырной матрице. Один путь получения такого улучшенного химозина заключается в выборе вариантов химозина, которые имеют пониженную специфичность при pH созревания сыра. Специфичность химозинового препарата может быть измерена путем определения соотношения C/P. Более низкое соотношение C/P предполагает более низкую специфичность, которая может приводить к повышенному первичному протеолизу.

Другой путь получения химозина с повышенной протеолитической активностью в сырной матрице представляет собой выбор вариантов химозина, которые имеют повышенное направленное воздействие на сырный сгусток. Повышенное направленное воздействие на сырный сгусток будет приводить в результате к большему включению химозина в сырную матрицу и, следовательно, к повышенному первичному протеолизу.

Другой путь получения химозина с повышенной протеолитической активностью представляет собой выбор вариантов химозина, которые имеют высокую активность при более низкой температуре, используемой для созревания сыра. Такие варианты химозина могут усиливать первичный протеолиз в сырной матрице.

В данном документе, под термином "IMCU" понимают Международные Молокосвертывающие Единицы. Одна единица IMCU равна около 0,126 нмоль бычьего химозина В (например, Maxigen или CHY-MAX). Силу молокосвертывающего фермента (такого как фермент химозин, присутствующий в композиции по настоящему изобретению) определяют как молокосвертывающая активность (IMCU на 1 мл или на 1 г).

После добавления разведенного коагулянта к стандартному молочному субстрату молоко будет выпадать в осадок хлопьями. Время свертывания молока представляет собой период времени от добавления коагулянта до образования видимых хлопьев или комков в молочном субстрате. Силу образца коагулянта определяют путем сравнения времени свертывания молока для образца с аналогичным значением эталонного стандарта, нормы. Это отражено в стандарте IDF 157A:1997, который дает определение IMCU: суммарная молокосвертывающая активность первой партии порошка с эталонным стандартом телячьего химозина была раз и навсегда установлена на уровне 1000 Международных Молокосвертывающих Единиц на 1 грамм (IMCU/г). Следующие препараты эталонных стандартов будут устанавливаться относительно предыдущего эталона. Принцип IMCU: Определение времени, необходимого для видимой флокуляции сычужного стандарта молочного субстрата с использованием 0,05% хлорида кальция, pH 6,5. IMCU/мл образца определяют путем сравнения времени свертывания для образца с временем свертывания для стандарта, имеющего известную молокосвертывающую активность и содержащего ту же ферментную композицию в образце.

Вариант химозина по изобретению может иметь другую специфичность. Как правило, может иметь высокоспецифичную молокосвертывающую активность (С) и низкую общую, т.е. не специфичную протеолитическую активность (Р) по отношению к молочным белкам. Соответственно, соотношение C/P предпочтительно должно быть настолько высоким, насколько это возможно, поскольку относительно высокое Р-значение в процессе производства сыра и в процессе созревания сыра будет приводить к образованию низкомолекулярных пептидов и свободных аминокислот, которые, в свою очередь, могут придавать конечному сырному продукту нежелательный горький вкус и, кроме того, могут приводить к потере выхода сырного продукта. При использовании в данном документе, термин "соотношение C/P" определяется с помощью методов определения С-значения и Р-значения, соответственно, как описано ниже в разделе примеры.

Вариант химозина по изобретению может иметь более высокое соотношение C/P относительно эталонного полипептида. Такой вариант может иметь соотношение C/P в интервале от около 1,5 до около 20, предпочтительно соотношение C/P составляет по меньшей мере около 3, как, например, по меньшей мере около 5 или даже по меньшей мере около 10.

Согласно изобретению предлагается вариантный полипептид, имеющий активность химозина, в котором вариант имеет аминокислотную последовательность, которая при выравнивании с химозином, имеющим последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, содержит по меньшей мере одну замену

аминокислотного остатка, соответствующего любой из аминокислот 2, 22, 40, 48, 50, 51, 53, 61, 62, 76, 88, 98, 99, 109, 112, 117, 125, 126, 135, 144, 160, 161, 163, 187, 189, 194, 200, 201, 202, 203, 221, 223, 240, 242, 244, 254, 267, 271, 273, 278, 280, 284, 289, 292, 294 или 295, где указанные положения определены относительно SEQ ID NO: 2 и где вариант имеет одно или несколько измененных свойств по сравнению с эталонным полипептидом, имеющим активность химозина (как например полипептид SEQ ID NO: 2).

В табл. 1 представлены положения, которые влияют на конкретные свойства вариантов химозина по изобретению.

Соответственно, вариант по изобретению может демонстрировать ослабленный протеолиз в сырной матрице или повышенную продуктивность по сравнению с эталонным химозином, таким как химозин, включающий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2. Такой вариант может демонстрировать повышенную специфичность или пониженную термостабильность по сравнению с химозином, включающим последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2.

Конкретно, такой вариантный полипептид по изобретению может включать аминокислотную последовательность, которая при сравнении с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 2, содержит по меньшей мере одну замену аминокислотного остатка, соответствующего любой из аминокислот 48, 50, 51, 61, 62, 109, 117, 126, 135, 144, 160, 161, 201, 202, 203, 221, 223, 240, 242, 244, 254, 267, 280, 292 или 295, где указанные положения определены относительно SEQ ID NO: 2 и где вариант демонстрирует повышенную специфичность по сравнению с эталонным полипептидом, имеющим активность химозина.

Вариантный полипептид изобретения может включать аминокислотную последовательность, которая при выравнивании с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 2, содержит по меньшей мере одну замену аминокислотного остатка, соответствующего любой из аминокислот 48, 50, 51, 53, 109, 126, 135, 144, 160, 201, 221, 242, 267 или 280 где указанные положения, определены относительно SEQ ID NO: 2 и где вариант демонстрирует сниженную температурную стабильность по сравнению с эталонным полипептидом, имеющим активность химозина.

Вариантный полипептид по изобретению может демонстрировать повышенную специфичную активность или повышенный уровень экспрессии.

Вариантный полипептид изобретения может включать аминокислотную последовательность, которая при выравнивании с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 2, содержит по меньшей мере одну замену аминокислотного остатка, соответствующего любой из аминокислот 98, 109, 112, 117, 126, 135, 144, 161, 202, 203, 221, 223, 240, 244, 254, 273 или 295 где указанные положения определены относительно SEQ ID NO: 2 и где вариант демонстрирует повышенную специфическую активность по сравнению с эталонным полипептидом, имеющим активность химозина.

Вариантный полипептид изобретения может включать аминокислотную последовательность, которая при выравнивании с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 2, содержит по меньшей мере одну замену аминокислотного остатка, соответствующего любой из аминокислот 50, 53, 109, 135, 144, 160, 201, 242, 267, 280 или 295, где указанные положения определены относительно SEQ ID NO: 2 и где вариант демонстрирует повышенный уровень экспрессии по сравнению с эталонным полипептидом, имеющим активность химозина.

В ином случае вариантный полипептид по изобретению может включать аминокислотную последовательность, которая при выравнивании с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 2, содержит по меньшей мере одну замену аминокислотного остатка, соответствующего любой из аминокислот 2, 22, 40, 76, 88, 98, 99, 112, 125, 144, 163, 187, 189, 194, 200, 223, 271, 278, 284, 289 или 294, где указанные положения определены относительно SEQ ID NO: 2 и где вариант демонстрирует пониженную специфичность по сравнению с эталонным полипептидом, имеющим активность химозина.

Вариантный полипептид изобретения может включать аминокислотную последовательность, которая при выравнивании с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 2, содержит по меньшей мере одну замену аминокислотного остатка, соответствующего любой из аминокислот 48, 50, 53, 144, 160, 201, 242, 267 или 280, где указанные положения определены относительно SEQ ID NO: 2 и где вариант демонстрирует измененную, такую как повышенную, активность свертывания при pH, подходящем для процесса производства сыра, таком как, например, низкое pH, по сравнению с эталонным полипептидом, имеющим активность химозина.

Активность варианта может быть уменьшена при pH, подходящем для процесса производства сыра, таком как, например, низкое pH, по сравнению с эталонным полипептидом, имеющим активность химозина, или при температуре, подходящей для процесса производства сыра, такой как например низкая температура, по сравнению с эталонным полипептидом, имеющим активность химозина.

Низкое pH в данном контексте может указывать на то, что pH составляет менее чем около 6,7, например около 6,5 или менее, около 6,3 или менее, как, например, около 6,2 или менее или меньшие значения pH.

Низкая температура в данном контексте может указывать на то, что температура составляет около 20°C или менее, например около 15°C или менее, например около 12°C или менее, как, например, около 10°C или менее, как, например, около 6°C или менее.

Вариантный полипептид изобретения может содержать аминокислотную последовательность, которая при выравнивании с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 2, содержит по меньшей мере одну замену аминокислотного остатка, соответствующего любой из аминокислот 51, 126, 135 или 221, где указанные положения определены относительно SEQ ID NO: 2 и где вариант демонстрирует пониженную протеолитическую активность при низком pH по сравнению с эталонным полипептидом, имеющим активность химозина.

Вариантный полипептид изобретения может содержать аминокислотную последовательность, которая при выравнивании с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 2, содержит по меньшей мере одну замену аминокислотного остатка, соответствующего любой из аминокислот 51, 109, 126, 135 или 221, где указанные положения определены относительно SEQ ID NO: 2 и где вариант демонстрирует пониженную протеолитическую активность при низкой температуре по сравнению с эталонным полипептидом, имеющим активность химозина.

Вариантный полипептид по изобретению может содержать аминокислотную последовательность, которая при выравнивании с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 2, содержит замену аминокислоты 221, причем указанное положение определено относительно SEQ ID NO: 2, и где вариант демонстрирует пониженную активность при низком pH и/или при низкой температуре по сравнению с эталонным полипептидом, имеющим активность химозина.

Предпочтительный эталонный полипептид, подходящий для применения в изобретении, представляет собой полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, или имеющую по меньшей мере 80% гомологии с SEQ ID NO: 2, например по меньшей мере 85% гомологии с SEQ ID NO: 2, как, например, по меньшей мере 85% гомологии с SEQ ID NO: 2, как, например, по меньшей мере 90% гомологии с SEQ ID NO: 2, например по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% гомологии с SEQ ID NO: 2.

Аминокислотные остатки в варианте химозина по изобретению, которые могут быть заменены по сравнению с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 2, соответствуют положениям 2, 22, 40, 48, 50, 51, 53, 61, 62, 76, 88, 98, 99, 109, 112, 117, 125, 126, 135, 144, 160, 161, 163, 187, 189, 194, 200, 201, 202, 203, 221, 223, 240, 242, 244, 254, 267, 271, 273, 278, 280, 284, 289, 292, 294 или 295, как определено относительно последовательности SEQ ID NO: 2.

Вариант химозина по изобретению может содержать замену в одном или нескольких из указанных положений, например двух, трех, четырех, по меньшей мере 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 35, по меньшей мере 40, по меньшей мере 45 или по меньшей мере 50 или всех указанных положений.

Вариант химозина по изобретению может включать одну или несколько замен, как определено выше. "Замена" в данном контексте означает, что положение в варианте, которое соответствует одному из положений, представленных выше в SEQ ID NO: 2, содержит аминокислотный остаток, который не находится в этом положении в эталонном полипептиде (эталонным полипептидом может быть SEQ ID NO: 2).

Предпочтительные замены представлены в табл. 1 ниже (причем положения определены относительно последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2).

В табл. 1 представлены предпочтительные замены, более предпочтительные замены, еще более предпочтительные замены и наиболее предпочтительные замены.

Вариант по изобретению может быть получен с использованием любой комбинации замен, представленных в табл. 1 и из любого из предпочтительных столбцов. В общем, замены могут быть выбраны из столбца наиболее предпочтительных замен.

Вариант химозина по изобретению также может включать дополнительные модификации по сравнению с родительской последовательностью в положениях, отличных от тех, которые определены выше, например, одна или несколько дополнительных замен, вставок или делеций. Вариант по изобретению может включать комбинацию различных типов модификации данного вида. Вариант может включать одну, две, три, четыре, по меньшей мере 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30 или более таких модификаций (которые все могут быть одного типа или могут быть модификациями разного типа). Как правило, дополнительные модификации могут быть заменами.

Таблица 1. Предпочтительные замены, определенные относительно SEQ ID NO: 2

Положение	Предпочтительная	Более предпочтительная	Еще более предпочтительная	Наиболее предпочтительная	повышенная экспрессия	повышенная специфическая активность	повышенная специфичность	комбинация специфичность	комбинация температурная стабильность	комбинация активность скрининга при низком pH	комбинация протекторная активность при низком pH	комбинация протекторная активность при высокой температуре
E2	все АК	KQRLVMTSAD	KQRD	K				K				
L22	все АК	IVFM	IV	I				I				
F40	все АК	LIVM	LIV	L				L				
K48	все АК	NTQSIDERH	NTQS	N			N		N	N		
N50	все АК	DEKRH	DE	D	D		D		D	D		
A51	все АК	VTILNSG	VTILNG	VTILNG			VTILNG		VTIL		VTI	VTI
K53	все АК	QTSANERHYFG	QTSANE	Q	Q				Q	Q		
R61	все АК	SQEDKHLAGNT	SQEDKH	S			S					
K62	все АК	QDELNRHT	QDEL	Q			Q					
H76	все АК	QRTAH	QRH	Q				Q				
Y88	все АК	LIVSAT	LIV	L				L				
D98	все АК	VISLTAG	VIS	V		V		V				
I99	все АК	TPVAQSEKRDLMN	TPVAQS	T				T				
E109	все АК	QMFLWYND	QMFLWY	QLM	QL	Q	QML		Q			Q
D112	все АК	ENQKRHSPTA	ENQKRH	EN		E		EN				
A117	все АК	STGPVMVCL	STGPV	STV		TV	STV					
M125	все АК	LVFICT	LVFI	L				L				
A126	все АК	GSPT	GSP	GS		GS	GS		G		G	G
S135	все АК	ATGPVIEC	ATGP	TP	P	T	TP		T		T	T
N144	все АК	DHQKREHASTFGI	DHQKE	DHQEK	D	HKE	KE	D ^H Q	D	DH		
N160	все АК	DEKRHQSGA	DE	D	D		D		D	D		
G161	все АК	DEKRHQNSA	DE	D		D	D					
E163	все АК	GADSTPQN	GAD	G				G				
V187	все АК	LMFISTKQNFYAERH	LMFI	LM				LM				
Q189	все АК	GEKDRALVTSNH	GEKDR	GEK				K				
T194	все АК	SAGKRQN	SAG	S				S				
I200	все АК	VMLWYFC	VMLW	V				V				
S201	все АК	NDEKRHNAGPT	NDE	ND	D		ND		D	D		
G202	все АК	DEKRHNSTPA	DE	D		D	D					
V203	все АК	EDKRHQANGSY	ED	E		E	E					
K221	все АК	LMVITASGNHQK	LMVITASN	LMVITASN		LMVITASN	LMVITASN		L	M	M	V
V223	все АК	FIMLWQTASFY	FIMWQL	FIMWQL		MWQL	FMWQL	I				
Q240	все АК	EDKRHTASLV	ED	E		E	E					
Q242	все АК	EDKRHSATMLY	ED	E	E		E		E	E		
G244	все АК	DEKRHASTP	DE	D		D	D					
S254	все АК	DEKRHQNSGAP	DE	D		D	D					
M267	все АК	EDKRHQASPGNTA	ED	E	E		E		E	E		
T271	все АК	PNQAGP	PNQ	P				P				
S273	все АК	YFTAGPQN	YFT	Y		Y						
Q278	все АК	KRENDLPSTM	KREND	K				K				
Q280	все АК	EDKRHSYNM	ED	E	E		E		E	E		
T284	все АК	SGAPMRIYNLFV	SGAP	S				S				
S289	все АК	GPATQENDV	GPAT	G				G				
H292	все АК	NDEKRSNAGT	NDE	D			D					
Q294	все АК	HDNPSAT	HDN	H				H				
K295	все АК	LQMERYFTHN	LQMER	LQMER	MR	LME	QMER					

В табл. 2 представлены предпочтительные замены и комбинации замен. Т.е. представлено количество предпочтительных вариантов согласно изобретению. Вариант по изобретению может включать комбинации замен, определенных термином комбинации положений, определенных в табл. 2. Например,

вариантный полипептид по изобретению может включать замену в положении 51 и 221 (варианты под номерами 71-79) по отношению к SEQ ID NO: 2. Вариант по изобретению может представлять собой любой вариант, представленный в табл. 2. Табл. 2 представлена здесь, а также она повторяется в разделе примеры.

Таблица 2. Аминокислотные замены, введенные в белковую последовательность химозина В (SEQ ID NO: 2). Аминокислоты изображены однобуквенным кодом

Вариант#	Замены									
1	A51V									
2	E109Q									
3	A117S									
4	S201N									
5	K221L									
6	K221M									
7	K221V									
8	V223F									
9	K295Q									
10	K48N	K53Q	R61S	K62Q						
11	K48N	K53Q	N144D	N160D	S201D					
12	N50D	K53Q	N144D	N160D	S201D	Q242E	M267E	Q280E		
13	L22I									
14	F40L									
15	H76Q									
16	Y88L									
17	D98V									
18	I99T									
19	D112N									
20	D112E									
21	M125L									
22	A126G									
23	S135A									
24	N144D									
25	N144H									
26	N144Q									
27	E163G									
28	V187L									
29	V187M									
30	Q189K									
31	T194S									
32	I200V									
33	V223I									
34	T271P									
35	Q278K									
36	T284S									
37	S289G									
38	Q294H									
39	E2K									
40	S135T									
41	Q240E									
42	Y268F									
43	S273Y									
44	K295L									
45	A51T									
46	A51L									
47	A51N									
48	A51G									
49	K221I									
50	K221T									
51	K221A									
52	K221S									
53	K221N									
54	K221H									
55	E109M									
56	E109L									
57	A117T									
58	A117V									
59	V223M									
60	V223L									
61	V223W									
62	V223Q									

63	K295M									
64	K295E									
65	K295R									
66	K295Y									
67	A126S									
68	S135P									
69	N144K									
70	N144E									
71	A51V	K221V								
72	A51V	E109Q								
73	A51V	A117S								
74	A51V	K221M								
75	A51V	K295Q								
76	K221V	E109Q								
77	K221V	A117S								
78	K221V	K295Q								
79	K221V	V223F								
80	A51V	K221V	E109Q							
81	A51V	K221V	A117S							
82	A51V	K221V	K295Q							
83	A51V	K221V	V223F							
84	A51V	K221M	K295Q							
85	A51V	K221L	K295Q							
86	A51V	K221M	V223F							
87	A51V	K221L	V223F							
88	A51V	E109Q	A117S							
89	A51V	E109Q	K221M							
90	K221V	E109Q	A117S							
91	K221V	E109Q	V223F							
92	K221V	E109Q	K295Q							
93	K221V	A117S	V223F							
94	K221V	A117S	K295Q							
95	A51V	K221V	S135 T	A126G						
96	A51V	K221V	S135 T	A126G	S273Y					
97	A51V	K221V	S135 T	A126G	Q240E					
98	A51V	K221V	S135 T	A126G	S273Y	Q240E				
99	A51V	K221V	S135T	A126G	E109Q					
100	A51V	K221V	S135T	A126G	K295Q					
101	A51T	K221T								
102	A51I	K221I								
103	A51I	K221T								
104	A51T	K221T	S135T	A126G						
105	A51I	K221I	S135T	A126G						
106	A51I	K221T	S135T	A126G						
107	A51V	N50D	K53Q	N144H	N160D	S201D	Q242E	M267E	Q280E	
108	K221V	N50D	K53Q	N144H	N160D	S201D	Q242E	M267E	Q280E	
109	A51V	K221V	N50D	K53Q	N144H	N160D	S201D	Q242E	M267E	Q280E
110	A51V	K221V	N50D	N144H	N160D	S201D	Q242E	M267E	Q280E	
111	N50D	K53Q	N160D	S201D	Q242E	M267E	Q280E			
112	N50D	N160D	S201D	Q242E	M267E	Q280E				
113	H292D	G244D	S254D	G161D	G202D	Q240E				
114	N160D	S201D	Q242E	M267E	Q280E	H292D	G244D	S254D	G161D	V203E
115	K48N	K53Q	N144H	N160D	S201D					

Вариант по изобретению (например, вариант, содержащий одну или несколько замен, представленных в табл. 1 или 2) может иметь по меньшей мере около 80% гомологии с эталонным полипептидом химозина, таким как химозин SEQ ID NO: 2, например по меньшей мере около 85% гомологии с родительским полипептидом, как, например, по меньшей мере около 90% гомологии с родительским полипептидом, по меньшей мере 95% гомологии с родительским полипептидом, по меньшей мере около 98% гомологии с родительским полипептидом или по меньшей мере около 99% гомологии с родительским полипептидом. Такой вариант будет, как правило, содержать одну или несколько замен или ряд замен, представленных в табл. 1 или 2.

Вариант изобретения, как правило, будет сохранять активность химозина. Иначе говоря, вариант изобретения, как правило, будет обладать активностью аспарагиновой протеазы. Вариант по изобретению соответствует такому, который, как правило, способен к свертыванию молока и который может использоваться в приготовлении пищевого продукта, такого как сыр.

Предпочтительно, если вариант по изобретению будет, как правило, демонстрировать улучшенные свойства по сравнению с эталонным пептидом химозина, из которого он получен. Такое улучшенное свойство относится, как правило, к такому свойству, которое имеет отношение, если вариант будет использоваться, как указано ниже, например к способу приготовления сыра.

Вариант, который демонстрирует свойство, которое является улучшенным относительно эталонного химозина, представляет собой вариант, который демонстрирует измеряемое уменьшение или повышение релевантного свойства, как правило так, что вариант становится более подходящим для применения, указанного ниже, например, в способе получения сыра.

Таким образом, свойство может быть уменьшено по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на

60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%. В ином случае, свойство может быть повышено по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 200%, по меньшей мере на 500% или по меньшей мере на 1000%. Процент снижения или повышения в данном контексте представляет собой процент снижения или увеличения в сравнении с полипептидом эталонного химозина. Специалистам хорошо известно, как могут быть измерены такие процентные изменения - это является сравнением активности эталонного химозина и вариантного химозина.

Варианты, описанные в данном документе, в совокупности содержатся в терминах "полипептиды по изобретению" или "вариант по изобретению".

Термин "полипептид" и "олигопептид" рассматриваются как синонимы (как это обычно признается), и каждый термин может быть использован взаимозаменяемо в зависимости от контекста для обозначения цепи по меньшей мере из двух аминокислот связанных пептидной связью. Слово "полипептид" используется здесь для цепей, содержащих больше чем семь аминокислотных остатков. Олигопептидные и полипептидные формулы и последовательности в данном описании пишутся слева направо и в направлении от N-конца к C-концу. Используемый здесь однобуквенный аминокислотный код широко известен в данной области и может быть найден в Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd, ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

Полипептид изобретения может быть в выделенной форме, например частично выделенной форме. Под "выделенным" полипептидом или белком понимается полипептид или белок удаленный из своей естественной среды. Например, рекомбинантно-производимые полипептиды и белки, экспрессируемые в клетках-хозяевах, рассматриваются как выделенные в целях изобретения, если являются рекомбинантными полипептидами, которые, по существу, были очищены любым подходящим методом. Полипептидный вариант согласно изобретению может быть извлечен и очищен из культур рекомбинантных клеток с помощью способов, известных в данной области.

Полипептиды по настоящему изобретению включают продукты процедур химического синтеза и продукты, полученные рекомбинантными методами из прокариотических или эукариотических хозяев, включающих, например, бактерии, дрожжи, клетки высших растений, насекомых и клетки млекопитающих. В зависимости от используемого в процедуре рекомбинантного получения хозяина, полипептиды настоящего изобретения могут быть гликозилированы или негликозилированы. Кроме того, полипептиды изобретения могут также включать в начале модифицированный остаток метионина, в некоторых случаях как результат опосредованных хозяином процессов.

Изобретение также описывает биологически активные фрагменты полипептидных вариантов по изобретению. Такие фрагменты считаются охваченными термином "вариант изобретения".

Биологически активные фрагменты варианта полипептида изобретения включают полипептиды, содержащие аминокислотные последовательности в достаточной степени идентичные или полученные из аминокислотной последовательности вариантного белка изобретения, которые включают меньшее количество аминокислот, чем полноразмерный белок, но которые демонстрируют по меньшей мере одну биологическую активность соответствующего полноразмерного белка. Как правило, биологически активные фрагменты содержат домен или мотив по меньшей мере с одной активностью вариантного белка по изобретению. Биологически активный фрагмент белка по изобретению может быть полипептидом, длина которого составляет, например, 10, 25, 50, 100 или более аминокислот. Более того, другие биологически активные части, в которых удалены другие области белка, могут быть получены путем рекомбинантных технологий и оценены по одному или нескольким биологическим активностям нативной формы полипептида изобретения.

Как правило, фрагмент белка изобретения будет содержать один или несколько замен, определенных в данном документе.

Изобретение также описывает функции фрагментов нуклеиновых кислот, кодирующих вышеупомянутые биологически активные фрагменты (где биологически активные фрагменты сами являются вариантами изобретения).

Как изложено выше, в настоящем изобретении предлагаются полинуклеотиды, кодирующие варианты полипептиды изобретения. Изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему по меньшей мере один функциональный домен полипептидного варианта изобретения. Как правило, такой домен будет содержать один или несколько замен, определенных в данном документе.

В одном воплощении изобретения последовательность нуклеиновой кислоты согласно изобретению кодирует полипептид, который представляет собой вариант, включающий аминокислотную последовательность, которая содержит одно или несколько укорачиваний и/или по меньшей мере одну замену, делецию и/или вставку аминокислоты по сравнению с родительской аспарагиназой. Такой полипептид, однако, будет, как правило, содержать одну или несколько замен, описанных в данном документе.

Использованные в данном документе термины "ген" или "рекомбинантный ген" относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые включают открытую рамку считывания, кодирующую вариант, описанный в данном документе. Ген может включать кодирующие последовательности, некодирующие последовательности, интроны и регуляторные последовательности. Иначе говоря, "ген", при использова-

нии в данном документе, может относиться к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, определенной в данном документе. Соответственно, термин "ген", в контексте настоящей заявки, относится не только к естественным последовательностям.

Молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению может быть получена с использованием стандартных методов молекулярной биологии, хорошо известных специалисту в данной области, в комбинации с информацией о последовательности, представленной в данном документе.

Например, с использованием стандартных синтетических методов требуемая молекула нуклеиновой кислоты может быть синтезирована *de novo*. Такой синтетический процесс как правило может быть автоматизированным процессом.

В ином случае, молекула нуклеиновой кислоты по изобретению может быть получена с использованием сайт-направленного мутагенеза существующей молекулы нуклеиновой кислоты, например молекулы нуклеиновой кислоты дикого типа. Сайт-направленный мутагенез может проводиться с использованием ряда методов, хорошо известных специалистам в данной области.

В одном таком способе, упомянутом в данном документе исключительно для примера, ПЦР проводят на плазмидной матрице с использованием олигонуклеотидных "праймеров", кодирующих искомую замену. Поскольку праймеры являются концами вновь синтезированных цепей, то в течение первого цикла должно произойти неправильное спаривание при связывании матрицы ДНК-цепи, и цепь на основе праймера (содержащая мутацию) должна быть равной концентрации с исходной матрицей. После успешных циклов пойдет экспоненциальный рост, а после 25 циклов превышение по численности цепи с мутацией относительно исходной цепи, не подвергнутой мутации, будет составлять порядка 8 миллионов:1, что в результате приведет к получению почти гомогенного раствора мутированных амплифицированных фрагментов. ДНК-матрица затем может быть удалена с помощью ферментативного гидролиза с использованием, например, фермента рестрикции, который расщепляет только метилированную ДНК, такого как DpnI. Матрица, полученная способом выделения плазмид щелочным лизисом, и, таким образом, являющаяся метилированной, на данной стадии разрушается, а мутированная плаزمида сохраняется, так как она была получена *in vitro* и, таким образом, не является метилированной.

В таком способе за одну реакцию ПЦР в молекулу нуклеиновой кислоты может быть введена более чем одна мутация (кодирующая замену, как описано в данном документе), например, путем использования одного или нескольких олигонуклеотидов, каждый из которых содержит неправильные пары. В ином случае, в молекулу нуклеиновой кислоты может быть введена более чем одна мутация путем проведения более чем одной реакции ПЦР, с введением каждой реакцией одной или нескольких мутаций, так что измененные нуклеиновые кислоты вводятся в нуклеиновую кислоту последовательно, итерационным образом.

Нуклеиновая кислота по изобретению может быть получена с использованием в качестве матрицы кДНК, мРНК или, в ином случае, геномной ДНК и с использованием олигонуклеотидных праймеров с неправильным спариванием в соответствии со способом сайт-направленного мутагенеза, как описано выше. Молекула нуклеиновой кислоты, выделенная таким образом, может быть клонирована в подходящий вектор и охарактеризована с помощью анализа последовательности ДНК.

Последовательность нуклеиновой кислоты по изобретению может включать одну или несколько делеций, т.е. пропусков по сравнению с родительским химозимом. Такие делеции/разрывы также могут быть образованы с помощью сайт-направленного мутагенеза с использованием соответствующих олигонуклеотидов. Методы образования таких делеций хорошо известны специалистам в данной области.

Кроме того, олигонуклеотиды, соответствующие или гибридизуемые с нуклеотидными последовательностями согласно изобретению, могут быть получены с помощью стандартных синтетических способов, например с использованием автоматического ДНК-синтезатора.

Кроме того, в настоящее изобретение включены комплементарные молекулы нуклеиновых кислот. Молекула нуклеиновой кислоты, которая является комплементарной другой нуклеотидной последовательности, является последовательностью, которая в достаточной степени комплементарна другой нуклеотидной последовательности, так, что может гибридизоваться с другой нуклеотидной последовательностью с образованием стабильного дуплекса.

Один аспект изобретения относится к выделенным молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют вариант по изобретению или его биологически активный фрагмент или домен, а также молекулам нуклеиновой кислоты, достаточным для применения в качестве гибридизационных зондов для идентификации молекул нуклеиновых кислот, кодирующих полипептид по изобретению, и фрагментам таких молекул нуклеиновых кислот, подходящим для применения в качестве ПЦР-праймеров для амплификации или мутации молекул нуклеиновых кислот, как, например, для получения молекул нуклеиновых кислот по изобретению.

"Выделенный полинуклеотид" или "выделенная нуклеиновая кислота" представляет собой молекулу ДНК или РНК, которая непосредственно не граничит с обоими кодирующими последовательностями, с которыми она непосредственно граничит (с одной с 5' конца и с одной с 3' конца) в естественном геноме организма, из которого данная молекула получена. Таким образом, в одном воплощении, выделенная нуклеиновая кислота включает некоторые или все 5' концевые некодирующие последовательности

(например, промотор), которые непосредственно граничат с кодирующей последовательностью.

Термин таким образом включает, например, рекомбинантную ДНК, которая вставлена в вектор, в автономно реплицирующуюся плазмиду или вирус, или в геномную ДНК прокариотического или эукариотического организма, или которая существует в виде отдельной молекулы (например, кДНК, или фрагмента геномной ДНК, полученной ПНР или обработкой эндонуклеазами рестрикции). Термин также включает рекомбинантную ДНК, которая является частью гибридного гена, кодирующего дополнительный полипептид, которая фактически не содержит клеточного материала, вирусного материала или культуральной среды (когда производится методами рекомбинантных ДНК), или химических предшественников или других химических веществ (если молекула синтезирована химически). Более того, "выделенный фрагмент нуклеиновой кислоты" представляет собой фрагмент нуклеиновой кислоты, не существующий в природе как фрагмент, и который не может быть обнаружен в естественном состоянии.

Использованный здесь термин "полинуклеотид" или "молекула нуклеиновой кислоты" предназначен для включения молекулы ДНК (например, кДНК или геномной ДНК) и молекулы РНК (например, мРНК) и аналогов ДНК или РНК, полученных с помощью аналогов нуклеотидов. Молекула нуклеиновой кислоты может быть одноцепочечной или двухцепочечной, но предпочтительно является двухцепочечной ДНК. Нуклеиновая кислота может быть синтезирована с использованием олигонуклеотидных аналогов или производных (например, инозина или фосфоротиоатных нуклеотидов). Такие олигонуклеотиды могут быть использованы, например, для подготовки нуклеиновых кислот, которые имеют измененные способности спаривания оснований или повышенную устойчивость к нуклеазам.

В другом воплощении изобретения предлагается выделенная молекула нуклеиновой кислоты, которая является антисмысловой относительно молекулы нуклеиновой кислоты изобретения.

Термины "гомология" или "процент идентичности" в данном документе используются взаимозаменяемо. Для цели данного изобретения термин определяется в данном документе для определения процента идентичности последовательностей двух аминокислотных последовательностей или двух последовательностей нуклеиновых кислот, которые выравниваются для оптимального сравнения (например, в последовательность первой аминокислотной или нуклеотидной последовательности для оптимального выравнивания со второй аминокислотной или нуклеотидной последовательностью могут быть внесены разрывы). Затем сравниваются аминокислотные или нуклеотидные остатки в соответствующих аминокислотных или нуклеотидных позициях. Если положение в первой последовательности занято тем же аминокислотным остатком или нуклеотидным остатком, что и в соответствующем положении второй последовательности, то молекулы являются идентичными по этому положению. Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией числа идентичных положений совместно используемых последовательностями (т.е. $\% \text{ идентичности} = \frac{\text{число идентичных положений}}{\text{общее число положений}} \times 100$). Предпочтительно, две последовательности имеют одинаковую длину.

Сравнение последовательностей может быть проведено по всей длине двух сравниваемых последовательностей, или по фрагменту двух последовательностей. Как правило, сравнение может быть проведено по всей длине двух сравниваемых последовательностей. Однако идентичность последовательности может быть определена для участка, например, длиной двадцать, пятьдесят, сто или больше смежных аминокислотных остатков.

Специалист в данной области будет осведомлен о факте того, что для определения гомологии между двумя последовательностями доступно несколько программ. Например, сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя последовательностями может быть осуществлено с помощью математического алгоритма. В предпочтительном воплощении процент идентичности между двумя аминокислотными или нуклеотидными последовательностями может быть определен с помощью алгоритма Нидлмана и Вунша (*J. Mol. Biol.* (48):444-453 (1970)), который включен в программу "GAP" программного пакета "Accelrys GCG" (доступного по адресу <http://www.accelrys.com/products/gcg/>), с помощью либо матрицы "Blossom 62", либо матрицы "PAM250", и с штрафом за открытие разрыва 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и штрафом за длину 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Специалист поймет, что все эти различные параметры дадут несколько различающиеся результаты, но общий процент идентичности двух последовательностей значительно не изменится при использовании различных алгоритмов.

Белковые последовательности или последовательности нуклеиновых кислот по настоящему изобретению могут дополнительно использоваться в качестве "последовательности запроса" для осуществления поиска в публичных базах данных, например, для выявления других членов семейства или родственных последовательностей. Такие поиски могут быть осуществлены с помощью программ "BLASTN" и "BLASTP" (версия 2.0) Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10. Белковый поиск "Blast" может быть осуществлен с помощью программы "BLAST", сумма баллов=50, размер слова=3, для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных белковым молекулам по изобретению. Для получения выравнивания, содержащего разрывы для целей сравнения, может использоваться "Gapped BLAST", как описано в работе Altschul et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17): 3389-3402. При использовании программ "BLAST" и "Gapped BLAST" могут использоваться параметры по умолчанию соответствующих программ (например, "BLASTP" и "BLASTN"). См. домашнюю страницу Национального Центра Биотехно-

логической Информации по адресу <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Другой аспект изобретения касается векторов, предпочтительно экспрессирующих векторов, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид варианта химозина по изобретению.

Использованный здесь термин "вектор" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной переносить другую нуклеиновую кислоту, с которой они связаны. Один тип вектора является "плазмидой", которая представляет собой кольцевой, замкнутый фрагмент двухцепочечной ДНК с которым могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Другим типом вектора является вирусный вектор, в котором дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. Некоторые вектора проявляют способность к автономной репликации в клетке-хозяине в которую они введены (например, бактериальные вектора, имеющие бактериальную точку начала репликации и эписомальные вектора млекопитающих). Другие вектора (например, неэписомальные вектора млекопитающих) интегрируются в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяин, и таким образом, реплицируются вместе с хозяйским геномом. Более того, некоторые вектора способны управлять экспрессией генов, с которыми они функционально связаны. В данном документе такие вектора называются "экспрессирующими векторами". В общем, экспрессирующие векторы, используемые в методах рекомбинантных ДНК, часто представлены в виде плазмид. Термины "плазида" и "вектор" в данном документе могут быть использованы взаимозаменяемо, поскольку плазида является наиболее часто используемой формой вектора. Однако изобретение имеет целью включить другие формы экспрессирующих векторов, таких как вирусные вектора (например, репликативно-дефектные ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые выполняют аналогичные функции.

Рекомбинантные экспрессирующие векторы по изобретению включают нуклеиновую кислоту по изобретению в форме подходящей для экспрессии нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине, что означает, что рекомбинантный экспрессирующий вектор содержит одну или несколько регуляторных последовательностей, выбранных на основе используемых для экспрессии клеток-хозяев, которые функционально связаны с экспрессируемой последовательности нуклеиновой кислоты. В рекомбинантном экспрессионном векторе "функционально связанный" предназначено для обозначения того, что представляющая интерес нуклеотидная последовательность связана с регуляторной(ыми) последовательность(ями) таким образом, который позволяет экспрессию нуклеотидной последовательности (например, *in vitro* системе транскрипции/трансляции или в клетке-хозяине, когда вектор вводится в клетку-хозяин). Термин "регуляторная последовательность" включает промоторы, энхансеры и другие элементы контроля экспрессии (например, сигнал полиаденилирования). Такие регуляторные последовательности описаны, например, в Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Регуляторные последовательности включают те последовательности, которые управляют конститутивной экспрессией нуклеотидной последовательности во множестве типов клеток-хозяев и те, которые управляют экспрессией нуклеотидной последовательности только в некоторых клетках-хозяевах (например, тканеспецифичные регуляторные последовательности). Специалистам в данной области понятно, что конструирование экспрессирующего вектора может зависеть от таких факторов, как выбор трансформируемой клетки-хозяина, желаемый уровень экспрессии белка и т.п. Экспрессирующие векторы по изобретению могут быть введены в клетки-хозяева чтобы тем самым продуцировать белки или пептиды, кодируемые описанными здесь нуклеиновыми кислотами (например, вариант химозина SEQ ID NO: 2, например, функциональный эквивалент или фрагмент или слитый белок, включающий один или несколько из таких вариантов).

Рекомбинантные экспрессирующие векторы по изобретению могут быть сконструированы для экспрессии вариантов белков по изобретению в прокариотических или эукариотических клетках. Например, вариант белка по изобретению может экспрессироваться в бактериальных клетках, таких как *E.coli*, клетках насекомых (с помощью бакуловирных экспрессирующих векторов), дрожжевых клетках и клетках млекопитающих. Подходящие клетки-хозяева дополнительно обсуждаются в книге Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). В ином случае, рекомбинантный экспрессирующий вектор может транскрибироваться и транслироваться *in vitro*, например, с помощью регуляторных последовательностей T7 промотора и T7 полимеразы.

Экспрессирующие векторы, применяемые в настоящем изобретении, включают векторы, полученные на основе хромосом, эписом и вирусов, например векторы, полученные из бактериальных плазмид, бактериофагов, дрожжевой эписомы, дрожжевых хромосомных элементов, вирусов, таких как бакуловирусы, паповавирусы, вирусы коровьей оспы, аденовирусы, вирусы оспы-дефтерита птиц, вирусы псевдобешенства и ретровирусы, и векторы, полученные на основе их комбинаций, таких как те, что получены из генетических элементов плазмид и бактериофагов, такие как космиды и фагмиды.

ДНК-вставка должна быть функционально связана с подходящим промотором, например, таким как PL-промотор фага лямбда, промоторы *E.coli lac*, *trp* и *tac*, ранний и поздний промоторы SV40 и промоторы ретровирусных LTR. Другие подходящие промоторы будут известны специалисту в данной области. В конкретном воплощении, предпочтительными являются те промоторы, которые способны задавать высокий уровень экспрессии химозина в мицелиальных грибах. Такие промоторы известны в данной области. Экспрессирующие конструкции могут содержать сайты для инициации транскрипции, терминации, и, в

транскрибируемой области, сайт связывания с рибосомой для трансляции. Кодирующая часть зрелых транскриптов, экспрессируемых конструкциями, будет включать инициирующий трансляцию триплет AUG в начале и кодон терминации в соответствующей позиции в конце транслируемого полипептида.

Векторная ДНК может быть внедрена в прокариотические или эукариотические клетки с помощью обычных способов трансфекции и трансформации. Используемые в данном документе термины "трансформация" и "трансфекция" предназначены для обозначения множества признанных в данной области способов внедрения чужеродной нуклеиновой кислоты (например, ДНК) в клетку-хозяина, включая копреципитацию с фосфатом кальция и хлоридом кальция, DEAE-декстран опосредованную трансфекцию, трансдукцию, инфекцию, липофекцию, катионную опосредованную липидами трансфекцию или электропорацию. Подходящие способы для трансформации или трансфекции клеток-хозяев могут быть найдены в Sambrook et al. (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd, ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989), Davis et al., *Basic Methods in Molecular Biology* (1986) и в других лабораторных руководствах.

Для стабильной трансфекции клеток млекопитающих известно, что в зависимости от экспрессирующего вектора и используемого способа трансфекции только малая часть клеток может интегрировать чужеродную ДНК в свой геном. В целях идентификации и отбора этих интегрантов, как правило, в клетки-хозяева вместе с представляющим интерес геном вводится ген, который кодирует селективный маркер (например, ген устойчивости к антибиотику). Предпочтительные селективные маркеры, включают те, которые придают устойчивость к лекарственным соединениям, таким как G418, гидромицин и метатрексат. Нуклеиновая кислота, кодирующая селективный маркер, может быть введена в клетку-хозяина в том же векторе, который кодирует вариант белка по изобретению, или может быть введена в отдельном векторе. Клетки, стабильно трансфецированные вводимой нуклеиновой кислотой, могут быть идентифицированы отбором по лекарственному средству (например, клетки, которые имеют внедренный селективный маркерный ген, будут выживать, в то время как другие клетки будут умирать).

Экспрессия белков в прокариотах часто проводится в *E.coli* с векторами, содержащими конститутивный или индуцируемый промоторы, управляющие экспрессией либо химерных, либо нехимерных белков. Химерные вектора добавляют ряд аминокислот к кодируемому в них белку, например, к N-концу рекомбинантного белка. Такие химерные вектора, как правило, служат трем целям: 1) повышение экспрессии рекомбинантного белка; 2) повышение растворимости рекомбинантного белка; и 3) помощь в очистке рекомбинантного белка в качестве лиганда для аффинной очистки. Часто в химерных экспрессирующих векторах, на стыке химерного функционального компонента и рекомбинантного белка вводится сайт протеолитического гидролиза, для того чтобы можно было отделить рекомбинантный белок от химерного функционального компонента с последующей очисткой химерного белка.

Как уже отмечалось, экспрессирующие вектора предпочтительно будут содержать селективные маркеры. Такие маркеры включают дигидрофолатредуктазу или устойчивость к неомицину для культуры эукариотических клеток и устойчивость к тетрациклину или ампициллину для культивируемых *E.coli* и других бактерий. Типичные примеры соответствующих хозяев включают бактериальные клетки, такие как *E.coli*, *Streptomyces*, *Salmonella typhimurium* и некоторые виды *Bacillus*; грибные клетки, такие как виды рода *Aspergillus*, например *A.niger*, *A.oryzae* and *A.nidulans*, такие как дрожжи, такие как *Kluyveromyces*, например *K.lactis* и/или *Pichia*, например *P.pastoris*; клетки насекомых такие как *Drosophila S2* и *Spodoptera Sf9*; клетки животных, такие как CHO, COS и меланомы Боуэса; и растительные клетки. Соответствующие культуральные среды и условия для вышеописанных клеток-хозяев известны в данной области.

Предпочтительные вектора для использования в бактериях раскрыты, например, в WO A1 2004/074468, который прилагается к данному документу ссылкой. Другие подходящие вектора будут очевидны для специалистов.

Известные бактериальные промоторы, подходящие для применения в настоящем изобретении, включают промоторы, раскрыты в WO A1 2004/074468, который включен в данный документ ссылкой.

Транскрипция высшими эукариотами ДНК, кодирующей вариант по настоящему изобретению, может быть повышена путем включения в вектор энхансерной последовательности. Энхансеры являются *cis*-действующими элементами ДНК, обычно около от 10 до 300 п.н., которые действуют, повышая транскрипционную активность промотора в данном типе клеток-хозяев. Примеры энхансеров включают энхансер SV40, который находится на поздней стороне от точки начала репликации (п.н. 100-270), энхансер цитомегаловирусного промотора, энхансер полиомы на поздней стороне от точки начала репликации, и энхансеры аденовируса.

Для секреции транслированного белка в просвет эндоплазматического ретикулума, в периплазматическое пространство или во внеклеточную среду, в экспрессирующийся ген может быть внедрен соответствующий сигнал. Сигналы могут быть эндогенными по отношению к полипептиду или могут быть гетерологичными сигналами.

Вариант по изобретению может экспрессироваться в форме, так что он может включать дополнительные гетерологичные функциональные участки, например сигналы секреции. Вариант по изобретению также может включать, например, участок дополнительных аминокислот, конкретно, заряженных

аминокислот, добавленных к N-концу полипептида, например для улучшения стабильности и устойчивости в клетке-хозяине в процессе очистки или в последующих процессах обработки и хранения. Кроме того, пептидные компоненты могут быть добавлены к варианту по изобретению для облегчения очистки, например, путем добавления гистидиновых остатков T7-тага.

Варианты по изобретению, такие как белки по настоящему изобретению, или их функциональные эквиваленты, например их биологически активные части, могут быть функционально связаны с невариантным полипептидом (например, с гетерологичными аминокислотными последовательностями) с образованием химерных белков. "Не вариантный полипептид" в данном контексте относится к полипептиду, имеющему аминокислотную последовательность, соответствующую белку, который фактически не гомологичен варианту химозина по изобретению.

В рамках химерного белка вариант по изобретению может соответствовать полноразмерной последовательности или только биологически активному фрагменту полипептида по изобретению. В предпочтительном воплощении химерный белок по изобретению включает по меньшей мере две биологически активные части. В рамках химерного белка термин "функционально связанный" должен показать, что вариантный полипептид и невариантный полипептид сшиваются друг с другом с сохранением рамки считывания. Невариантный полипептид может быть пришит к N-концу или к C-концу вариантного полипептида.

Экспрессия и секреция варианта химозина может усиливаться с помощью экспрессии варианта в форме химерного белка. В данном контексте последовательность нуклеиновой кислоты может кодировать химерный белок, включающий пре-прохимозин, прохимозин или химозин. Более конкретно, партнером по химере может быть глюкоамилаза или ее фрагмент. В одном воплощении пре-прохимозин, прохимозин или химозин или их химерный белок секретируется на мембране клетки-хозяина.

Например, в одном воплощении, химерный белок представляет собой химерный белок, в котором последовательность(и) варианта пришиты к C-концу GST-последовательностей. Такие химерные белки могут облегчить очистку рекомбинантного варианта по изобретению. В другом воплощении химерный белок является вариантом по изобретению, содержащим гетерологичную сигнальную последовательность на его N-конце. В некоторых клетках-хозяевах (например, в клетках-хозяевах млекопитающих и дрожжей) экспрессия и/или секреция варианта по изобретению может быть увеличена посредством использования гетерологичной сигнальной последовательности.

В другом примере, в качестве гетерологичной сигнальной последовательности может быть использована секреторная последовательность бакуловирусного белка оболочки gp67 (*Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, 1992). Другие примеры эукариотических гетерологичных сигнальных последовательностей включают секреторные последовательности мелиттина и человеческой плацентарной щелочной фосфатазы (Stratagene; Ла-Хойя, Калифорния). В еще одном примере полезные прокариотические гетерологичные сигнальные последовательности включают секреторный сигнал rhoA (Sambrook et al., выше) и секреторный сигнал белка A (Pharmacia Biotech; Пискаатавэй, Нью-Джерси).

Сигнальная последовательность может быть использована для облегчения секреции и выделения варианта по изобретению. Сигнальные последовательности, как правило, характеризуются ядром гидрофобных аминокислот, которые, как правило, отрезаются от зрелого белка в процессе секреции за один или два шага расщепления. Такие сигнальные пептиды содержат сайт процессинга, который позволяет отрезать сигнальную последовательность от зрелых белков, как только они проходят через секреторный путь. Сигнальная последовательность направляет секрецию варианта, например, из эукариотического хозяина, в который трансформирован экспрессирующий вектор, и сигнальная последовательность последовательно или параллельно отрезается. Затем вариант по изобретению может быть легко очищен от внеклеточной среды известными способами. В ином случае, сигнальная последовательность может быть связана с вариантом, представляющим интерес, с помощью последовательности, которая облегчает очистку, например, с помощью домена GST. Так, например, последовательность, кодирующая вариант по изобретению, может быть объединена с последовательностью маркера, например, с последовательностью, кодирующую пептид, который способствует очистке химерного полипептида. В некоторых предпочтительных воплощениях этого аспекта изобретения маркерная последовательность представляет собой пептид гексагистидина, такой как метка предоставляемая в числе прочих вектором pQE (Qiagen, Inc.), многие из которых коммерчески доступны. Как описано в работе Gentz et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:821-824 (1989), гексагистидин, например, обеспечивает удобную очистку химерного белка. НА-метка является другим полезным для очистки пептидом, который соответствует эпитопу, полученному из белка-гемагглютинаина гриппа, который был описан в работе Wilson et al., *Cell* 37:767 (1984).

Химерный белок по изобретению получают стандартными способами рекомбинантных ДНК. Так, например, фрагменты ДНК, кодирующие различные полипептидные последовательности, лигированы вместе с сохранением рамки считывания, в соответствии с обычными способами, например, путем приенения для лигирования тупых или липких концов, гидролиза рестрикционными ферментами для обеспечения необходимых концов, заполнения липких концов в случае необходимости, обработки щелочной фосфатазой для предотвращения нежелательного объединения, и энзиматического лигирования. В другом

воплощении химерный ген может быть синтезирован традиционными способами, включая автоматические синтезаторы ДНК. В ином случае, может быть проведена амплификация ПНР генных фрагментов с помощью якорных праймеров, которые дают начало комплементарному перекрытию между двумя последовательными генными фрагментами, которые могут быть последовательно отождествлены и реамплифицированы для образования химерной генной последовательности (см., например, *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel et al. John Wiley & Sons: 1992). Более того, множество коммерчески доступных экспрессирующих векторов уже кодируют химерный функциональный компонент (например, полипептид GST). Вариант-кодирующая нуклеиновая кислота может быть клонирована в такой экспрессирующий вектор так, чтобы химерная функциональная составляющая была связана с указанным вариантом в рамке считывания.

Термины "функциональные эквиваленты" и "функциональные варианты" в данном описании применяются взаимозаменяемо. Функциональные эквиваленты по изобретению являются выделенными фрагментами ДНК, которые кодируют полипептид, который демонстрирует конкретную функцию вариант, определенного в данном документе). Функциональные эквиваленты, следовательно, также охватывают биологические фрагменты и сами охватываются термином "вариант" изобретения.

Предпочтительно, функциональный эквивалент изобретения включает один или несколько замен, описанных в данном документе. Однако функциональный эквивалент может содержать одну или несколько модификаций в дополнение к заменам, описанным выше.

Функциональные эквиваленты нуклеиновых кислот могут, как правило, содержать молчащие мутации или мутации, которые не влияют на биологическую функцию кодируемого полипептида. Соответственно, в изобретении предлагаются молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие вариантный химозинный белок, который содержит аминокислотные остатки, которые не являются существенными для конкретной биологической активности. Такие варианты белки отличаются по аминокислотной последовательности от последовательности родительского химозина, от которой они произошли, сохраняя при этом по меньшей мере одну его биологическую активность, предпочтительно они сохраняют, по меньшей мере, активность химозина. В одном воплощении выделенная молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, где белок содержит фактически гомологичную аминокислотную последовательность, по меньшей мере, около 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% или больше гомологичную эталонной аминокислотной последовательности (например, которая показана в SEQ ID NO: 2).

Определенный в данном документе термин "фактически гомологичный" относится к первой аминокислотной или нуклеотидной последовательности, которая содержит достаточное или минимальное число идентичных или эквивалентных (например, с похожей боковой цепью) аминокислот или нуклеотидов относительно второй аминокислотной или нуклеотидной последовательности, так чтобы первая и вторая аминокислотная или нуклеотидная последовательности имели общий домен. Например, аминокислотные или нуклеотидные последовательности, которые содержат общий домен, обладающие идентичностью около 60%, предпочтительно 65%, более предпочтительно 70%, еще более предпочтительно 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% или больше, определены здесь как в достаточной степени идентичные.

Специалисту будет понятно, что изменения могут быть введены мутациями в нуклеотидные последовательности по изобретению, что тем самым приведет к изменениям в аминокислотной последовательности полученного белка без существенного изменения функции такого белка.

Соответственно, вариант химозина по изобретению предпочтительно является белком, который содержит аминокислотную последовательность гомологичную по меньшей мере на 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% или более гомологичной эталонной аминокислотной последовательности, например, которая показана в SEQ ID NO: 2, и который сохраняет по меньшей мере одну функциональную активность эталонного полипептида. Варианты изобретения, например функциональные эквиваленты белка по изобретению могут быть также идентифицированы, например, скринингом комбинаторных библиотек мутантов, например укороченных мутантов, белка изобретения на предмет активности химозина. В одном воплощении неоднородная библиотека вариантов образуется путем комбинаторного мутагенеза на уровне нуклеиновых кислот. Неоднородная библиотека вариантов может быть получена, например, ферментативным лигированием смеси синтетических олигонуклеотидов в последовательности генов так, чтобы образовать вырожденный набор возможных белковых последовательностей экспрессирующихся в виде отдельных полипептидов, или, наоборот, в виде набора больших химерных белков (например, для фагового дисплея). Существуют различные способы, которые могут быть использованы для создания библиотеки возможных вариантов полипептидов изобретения из вырожденных олигонуклеотидных последовательностей. Методы синтеза вырожденных олигонуклеотидов известны в данной области (см., например, Narang (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura et al. (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakura et al. (1984) *Science* 198:1056; Ike et al. (1983) *Nucleic Acid Res.* 11:477).

Кроме того, библиотеки фрагментов последовательности, кодирующей полипептид изобретения, могут быть использованы для создания неоднородной популяции полипептидов для скрининга с последующим отбором вариантов. Например, библиотека фрагментов кодирующей последовательности может быть получена путем обработки двухцепочечного ПНР-фрагмента, кодирующего представляющие инте-

рес последовательности, нуклеазами в условиях, в которых внесение одонитевого разрыва происходит только один раз на молекулу; денатурации двухцепочечной ДНК; ренатурации ДНК для образования двухцепочечной ДНК, в которую могут включаться смысловые/антисмысловые пары из разных продуктов с одноцепочечным разрывом; удаления одноцепочечной части из преобразованных дуплексов с помощью обработки S1 нуклеазой; и лигирования полученной в результате библиотеки фрагментов в экспрессирующий вектор. С помощью этого способа может быть получена экспрессирующая библиотека, которая кодирует N-концевые и внутренние фрагменты представляющего интерес белка с различными размерами.

В данной области известно несколько способов скрининга генных продуктов комбинаторных библиотек, полученных точечными мутациями или укорачиванием, и для скрининга библиотек кДНК для поиска генных продуктов, обладающий особыми свойствами. Наиболее широко используются способы, которые поддаются масштабированию до уровня анализа с высокой пропускной способностью, для скрининга больших генных библиотек, как правило, включают клонирование генной библиотеки в реплицирующиеся экспрессирующие вектора, трансформацию подходящих клеток полученной в результате библиотеки векторов, и экспрессию комбинаторных генов в условиях, в которых обнаружение требуемой активности облегчает выделение вектора кодирующего ген, продукт которого был обнаружен. Сайт-направленный множественный рекурсивный мутагенез (Recursive ensemble mutagenesis (REM)), способ, который повышает частоту встречаемости функциональных мутантов в библиотеках, может быть использован в сочетании с тестами скрининга для выявления вариантов белка изобретения (Arkin and Yourvan (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7811-7815; Delgrave et al. (1993) Protein Engineering 6(3): 327-331).

Фрагменты полинуклеотида по изобретению могут включать также полинуклеотиды, не кодирующие функциональные полипептиды. Такие полинуклеотиды можно использовать в качестве зондов или праймеров для реакции ПЦР.

Нуклеиновые кислоты по изобретению независимо от того, кодируют ли они функциональные или нефункциональные полипептиды, могут быть использованы в качестве зондов гибридизации или в качестве праймеров полимеразной цепной реакции (ПЦР). Применения молекул нуклеиновых кислот настоящего изобретения, которые не кодируют полипептид с активностью химозина, включают, помимо прочего, (1) гибридизацию *in situ* (например, FISH) в хромосомной метафазной пластинке для определения точной хромосомной локализации химозин-кодирующего гена, как описано в работе Verma et al., Human Chromosomes: a Manual of Basic Techniques, Pergamon Press, New York (1988); (2) нозерн-блот анализ для выявления экспрессии мРНК химозина в определенных тканях и/или клетках и (3) зонды и праймеры, которые можно использовать в качестве диагностического инструмента для анализа наличия нуклеиновых кислот, способных гибридизоваться с зондом или праймером в конкретном биологическом образце (например, в ткани).

Варианты данного эталонного фермента химозина могут быть получены следующей стандартной процедурой.

Мутагенез (сниженной точности, с использованием неэквиволярных количеств олигонуклеотидов, с использованием методики в которой в процессе синтеза олигонуклеотидной последовательности соответствующей последовательности дикого типа, помимо соответствующих нуклеотидов в последовательность включаются определенные количества случайных олигонуклеотидов) или синтез вариантов.

Трансформация, например в *K.lactis*.

Культивирование трансформантов, селекция трансформантов.

Экспрессия.

Необязательная очистка и концентрирование.

Первичный Скрининг.

Идентификация улучшенного варианта (например, по специфической активности).

В одном воплощении изобретение относится к способу получения варианта полипептида химозина по изобретению, который включает:

- a) выбор эталонного химозинового полипептида;
- b) замену по меньшей мере одного аминокислотного остатка, соответствующего любому из 2, 22, 40, 48, 50, 51, 53, 61, 62, 76, 88, 98, 99, 109, 112, 117, 125, 126, 135, 144, 160, 161, 163, 187, 189, 194, 200, 201, 202, 203, 221, 223, 240, 242, 244, 254, 267, 271, 273, 278, 280, 284, 289, 292, 294 или 295, где указанные положения, определены относительно SEQ ID NO: 2;
- c) необязательная замена одной или нескольких дополнительных аминокислот, определенных в b);
- d) получение варианта, на основании стадий a)-c);
- e) определение свойства варианта, например, изложенного в примерах; и
- f) отбор варианта со свойством, измененным при сравнении с полипептидом эталонного химозина.

В предпочтительном воплощении в способе получения варианта полипептида химозина по изобретению, полипептид эталонного химозина имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2.

Более предпочтительно, если в стадии b) способа по изобретению заменен по меньшей мере один аминокислотный остаток, соответствующий любому из числа 2, 22, 40, 48, 50, 51, 53, 61, 62, 76, 88, 98, 99, 109, 112, 117, 125, 126, 135, 144, 160, 161, 163, 187, 189, 194, 200, 201, 202, 203, 221, 223, 240, 242, 244,

254, 267, 271, 273, 278, 280, 284, 289, 292, 294 или 295, где указанные положения определены относительно SEQ ID NO: 2. Эталонный полипептид может иметь по меньшей мере 80% гомологию с SEQ ID NO: 2.

В другом воплощении изобретение описывает клетки, например трансформированные клетки-хозяева или рекомбинантные клетки-хозяева, которые содержат нуклеиновую кислоту, охватываемую изобретением. "Трансформированная клетка" или "рекомбинантная клетка" является клеткой, в которую (или в предшественник которой) вводится нуклеиновая кислота по изобретению посредством методов рекомбинантных ДНК. К ним относятся как прокариотические, так и эукариотические клетки, например бактерии, грибы, дрожжи и т.п., особенно предпочтительными являются клетки дрожжей, например *K.lactis*. Клетки-хозяева также включают, в частности, клеточные линии млекопитающих, такие как CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, WI38 и клеточные линии хордидного сплетения.

Примерами подходящих бактериальных организмов-хозяев являются грамположительные виды, такие как Bacillaceae, включая *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus megaterium* и *Bacillus thuringiensis*, виды *Streptomyces species* такие как *Streptomyces murinus*, виды молочнокислых бактерий, включая *Lactococcus spp.* такие как *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus spp.* включая *Lactobacillus reuteri*, *Leuconostoc spp.* и *Streptococcus spp.* В ином случае в качестве организма-хозяина могут быть выбраны штаммы грамотрицательных бактериальных штаммов, такие как виды, принадлежащие к Enterobacteriaceae, включая *E.coli*, или Pseudomonadaceae.

Подходящий дрожжевой организм-хозяин предпочтительно может быть выбран из видов *Saccharomyces*, включая *Saccharomyces cerevisiae* или виды, принадлежащие *Schizosaccharomyces*. Другие полезные дрожжевые организмы-хозяева включают *Pichia spp.* такие как их метилотрофные виды, включая *Pichia pastoris*, и *Kluveromyces spp.* включая *Kluveromyces lactis*.

Подходящие организмы-хозяева среди мицелиальных грибов включают виды *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Thielavia*, *Tolyopcladium* или *Trichoderma*, такие как, например, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus nidulans* или *Aspergillus niger*, включая *Aspergillus nigervar. awamori*, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cereals*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sporotrichiodes*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Humicola insolens*, *Humicola langinosa*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium camembertii*, *Penicillium purpurogenum*, *Rhizomucor miehei*, *Thielavia terrestris*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesii* или *Trichoderma viride*.

Клетка-хозяин может быть выбрана так, чтобы модулировать экспрессию вставленных последовательностей, или модифицировать и процессировать продукт, кодируемый включенной нуклеотидной последовательностью в особым, желательным образом. Такие модификации (например, гликозилирование) и процессирование (например, гидролиз) белковых продуктов может облегчать оптимальное функционирование кодируемого белка.

Различные хозяйские клетки обладают характерными и специфичными механизмами для посттрансляционного процессинга и модификации белка и генных продуктов. Для обеспечения требуемой и корректной модификации и обработки продуцируемого чужеродного белка могут быть выбраны соответствующие клеточные линии или хозяйские системы, хорошо знакомые специалистам в области молекулярной биологии и/или микробиологии. С этой целью могут использоваться эукариотические клетки-хозяева, которые обладают клеточной машинерией для правильного процессинга первичного транскрипта, гликозилирования и фосфорилирования генного продукта. Такие хозяйские клетки хорошо известны в данной области.

При необходимости стабильно трансформированная клеточная линия может продуцировать вариант по изобретению. Множество векторов, подходящих для стабильной трансфекции клеток млекопитающих, доступно широкому кругу лиц, способы конструирования таких клеточных линий также публично известны, например, из Ausubel et al. (выше).

Настоящее изобретение также раскрывает композицию, содержащую варианты химозина по изобретению. Композиция необязательно может содержать другие ингредиенты, такие как, например, другие ферменты, такие как пепсин. Такая композиция может включать вариантный полипептид изобретения или полипептид, полученный способом изобретения для идентификации вариантного химозина.

Кроме вариантного химозина и одного или нескольких дополнительных ферментов композиция по изобретению может содержать добавки, которые обычно используются в сычужных ферментах животного происхождения, например NaCl.

Изобретение также относится к применению вариантного полипептида по изобретению или композиции изобретения при приготовлении сыра. Соответственно, изобретение относится к способу получения сыра, который включает добавление эффективного молокосвертывающего количества вариантного химозина по изобретению или композиции изобретения в молоко и проведение соответствующих допол-

нительных стадий изготовления сыра.

Иначе говоря, в изобретении предлагается способ приготовления сыра, включающий: (i) добавление в молоко варианта химозина или композиции по изобретению для осуществления свертывания молока, в результате чего получается свернувшееся молоко; и (ii) переработка свернувшегося молока в сыр.

В таком способе изготовления сыра из молока молоко может быть коровьим молоком, верблюжьим молоком, буйволиным молоком, козьим молоком, овечьим молоком и смесью любых таких типов молока.

Изобретение относится к сыру, получаемому таким способом.

Ссылку данного документа на патентный документ или другой материал, которая приведена в качестве предшествующего уровня техники, не следует понимать как признание того, что документ или материал был известен или что информация, которую он содержит, была частью общедоступных знаний, в момент, который соответствует дате приоритета любого из пунктов формулы изобретения.

Описание каждой ссылки, представленной в данном документе, включено сюда ссылкой в полном объеме.

Изобретение дополнительно иллюстрируется следующими примерами.

Примеры

Материалы и методы, составы сред.

Среда YEP2D: 10 г/л дрожжевого экстракта, 20 г/л бактопептона, 40 г/л глюкозы. pH довели до pH 6,7 с помощью 4N NaOH. Среду автоклавировали в течение 30 мин при 110°C.

Среда YEP2D/MES: 10 г/л дрожжевого экстракта, 20 г/л бактопептона, 40 г/л глюкозы, 20 г/л MES. pH доводили до pH 6,7 с помощью 4N NaOH. Среду автоклавировали в течение 30 мин при 110°C.

Чашки с YEP2D содержат среду YEP2D с 1,8-2% агара. Среду автоклавировали в течение 30 мин при 110°C и разливали в чашки Петри.

Состав буфера.

Буфер NaOH-MES: готовили MES-буфер при pH 6,05, содержащий 50 г/кг MES и разводили 1 объемом 4N NaOH 7 объемами MES-буфера.

Штаммы.

GG799. Этот штамм *Kluuveromyces lactis* использовали в качестве штамма дикого типа. Этот штамм получали из New England Biolabs, Ипсвич, Массачусетс, США.

Методы молекулярной биологии.

Использовали молекулярно-биологические методы, известные специалистам (см. Sambrook & Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Ed., CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001). Примеры общей конструкции экспрессирующих векторов для сверхэкспрессии гена, трансформации, применения маркеров и селективных сред можно обнаружить в WO 2007060247, WO 2010102982 и US 4943529 и представленных в них ссылках.

Количественная оценка химозина.

Внутренний стандарт (ISTD) WIL*GDVFIREYYSV*FDR был заказан в CPC Scientific (Саннивейл, Калифорния, США) и содержал L* 6x¹³C 1x¹⁵N и V* 5x¹³C 1x¹⁵N. ISTD, содержит внутренний сайт расщепления трипсина, для отслеживания полноты гидролиза трипсином.

Белки осаждали из образца (100 мкл) путем 1:1 разведения в 20% ТХУ в ацетоне -20°C и инкубации в течение 60 мин при -20°C. Белки осаждали центрифугированием в течение 20 мин при 5251xg, 4°C. Надосадочную жидкость осторожно отбрасывали и осадок отмывали 300 мкл ацетона -20°C. Белки осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 5251xg, 4°C. Надосадочную жидкость осторожно отбрасывали и осадок растворяли в 50 мкл 50 mM NaOH. К образцам добавляли ISTD (10 мкл, 7,96 пмоль) в 100 mM NH₄HCO₃ и 100 mM NH₄HCO₃ (390 мкл). Добавляли 500 mM DTT (5 мкл) в 100 mM NH₄HCO₃ и образцы инкубировали в течение 30 мин при 25°C. Добавляли 550 mM IAA (10 мкл) в 100 mM NH₄HCO₃ и инкубировали образцы в течение 30 мин при 21°C в темноте. Добавляли 15 мкл 1 мг/мл Трипсина (Worthington) в 0,01N HCl pH 3 и образцы расщепляли инкубацией при 37°C в течение ночи. Добавляли другие 3 мкл 1 мг/мл трипсина в 0,01N HCl pH 3 до полного расщепления инкубацией при 37°C в течение более чем трех часов. Гидролизаты подкисляли муравьиной кислотой (МК, 5 мкл). Образцы инъецировали с полным заполнением петли (5 мкл) в Accela-LTQ-Velos (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США).

LC-MS/MS осуществляли со следующими параметрами.

Буфер А: 0,1% FA, буфер В: 0,1% FA в AcN (оба категории U-HPLC, Biosolve, Валкенсвард, Нидерланды).

Колонка: Zorbax XDB-C18 1,8 мкм 2,1x50 мм с защитной колонкой (Agilent, Санта-Клара, Калифорния, США).

Температура колонки 50°C.

Градиент: 0-5 мин 10-50% В, 5-6,5 мин 80% В, 6,5-8 мин 10% В.

Скорость потока: 0-5 мин 400 мкл/мин, 5-7,5 мин 600 мкл/мин, 7,5-8 мин 400 мкл/мин.

Способ MS состоит из 3 скан-сегментов:

скан-сегмент 1: 0-2,8 мин. ITMS+c norm (539,84)→(145,0-2000,0), ITMS+c norm (542,95)→(145,0-

2000,0), MS/MS: AT CID CE 35,0%, Q 0.250, время 10.000, IsoW 2,0, CV=0,0V;

скан-сегмент 2: 2,8-4,1 мин. ITMS+c norm (559,90)→(150,0-2000,0), ITMS+c norm (563,52)→(155,0-2000,0), MS/MS: AT CID CE 35,0%, Q 0,250, время 10,000, IsoW 2,0, CV=0,0V;

скан-сегмент 3: 4,1-8 мин. ITMS+c norm (727,04)→(200,0-2000,0), ITMS+c norm (731,37)→(200,0-2000,0), MS/MS: AT CID CE 35,0%, Q 0,250, время 10,000, IsoW 2.0, CV=0,0V.

Количественную оценку осуществляли путем определения соотношения площади LC-MS/MS нативного полипептида химозина и площади LC-MS/MS расщепленного ISTD (EYYSV*FDR). Определение площади пика осуществляли с помощью "QuanBrowser" (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США).

Активность сворачивания (C).

Раствор молока получали путем добавления 11 г молочного порошка "Nilac" (NIZO Food Science, Эде, Нидерланды) к 100 мл 4,5 мМ CaCl₂ (с получением pH 6,6). Раствор перемешивали в течение 30 мин и поддерживали в темноте в течение следующих 30 мин. После этого молоко было готовым и его использовали в течение получаса. Далее 5 мл молочного раствора добавляли в тестовую пробирку и предварительно инкубировали в течение 5 мин в водяной бане при 32°C. Реакцию начинали добавлением 100 мкл фермента к раствору молока. Свертывание молока отслеживали визуально с течением времени. Момент начала коагуляции является точкой времени свертывания. Для получения эталонной кривой для определения активности использовали различные количества разведенного и очищенного препарата "Maxiren 1800" (DSM Food-Specialties, Делфт, Нидерланды). 100 мг "Maxiren 1800" растворяли в 15 мл H₂O, концентрировали и отмывали с помощью H₂O и 40 мМ MES-NaOH, pH 5,7 с использованием центрифужного фильтра "Amicon Ultra", 10 кДа. Конечный объем доводили до 5 мл. Осуществляли серии измерений свертывания при различных концентрациях (установленных на 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15 и 20 IMCU/мл в стоковом растворе "Maxiren") и определяли время свертывания для каждого разведения и связь между временем свертывания и количеством единиц в анализе. Время свертывания, обнаруженное для протестированных образцов, рассчитывали обратно к активности IMCU оригинального стокового раствора "Maxiren", определенной в данном анализе, и выражали в Ед./мл. Эту молокосвертывающую активность протестированных образцов использовали при расчете C/P (см. пример 3).

Общая протеолитическая активность (P).

Протеолитическую активность оценивали с помощью натриевой соли казеина из коровьего молока (Sigma, C8654) в качестве субстрата. Реакционная смесь (750 мкл) содержала: 730 мкл субстрата (0,5% натриевой соли казеина в 33 мМ MES, pH 5,8) и 20 мкл тестируемого образца. Реакционную смесь инкубировали в течение 120 мин при 32°C и реакцию останавливали добавлением 250 мкл 12% (мас./мас.) ТХУ при интенсивном перемешивании на вибрационном смесителе. Для определения OD280 (t=0 мин) реакцию останавливали сразу же после старта. OD280 надосадочных жидкостей измеряли после центрифугирования при 12 000 об/мин в течение 10 мин. В тестируемых образцах рассчитывали различие (deltaOD) между OD280 (t=120 мин) и OD280 (t=0 мин) и измеряли протеолитическую активность при pH 5,8. Протеолитическую активность (P) рассчитывали обратно к концентрации оригинального образца путем умножения на коэффициент 50 и использовали для расчета C/P (см. пример 3).

Для примеров 8 и 9 использовали различные способы детекции протеолитической активности. Протеолитическую активность оценивали с помощью набора "QuantiCleave Protease assay kit" (Thermo Scientific-Pierce) согласно инструкциям изготовителя с небольшими изменениями. Тестируемые образцы химозина разводили в 40 мМ MES, pH 5,7 вплоть до 20 IMCU/мл. Реакционная смесь содержала: 125 мкл раствора сукцинированного казеина (0,2% (мас./об.) в 40 мМ MES-буфера при предпочтительном pH и 25 мкл разведенного образца химозина. Реакционную смесь инкубировали в течение 60 мин при предпочтительной температуре и добавляли 50 мкл рабочего раствора TNBSA в 0,5 М боратном буфере, pH 8,5, для реакции с экспонированными первичными аминами. Через 120 мин инкубации при комнатной температуре плотность оранжево-желтого продукта измеряли при 405 нм. Холостые пробы, содержащие такие же компоненты, что и реакция, но без субстрата, обрабатывали схожим образом. Конечные результаты корректировали по значению, измеренному в холостой пробе.

Пример 1. ДНК-конструкции и трансформация.

Синтетические ДНК-конструкции сконструировали так, чтобы они начинались с рестрикционного сайта XhoI, кодирующего аминокислоты L и E, за которым в рамке считывания следует ДНК, кодирующая сайт расщепления kex-протеазы, с аминокислотами K и R, за которым в рамке считывания следуют гены, кодирующие варианты бычьего про-химозина В, начиная с аминокислот А, Е, I и Т, и заканчивались рестрикционным сайтом PacI, сразу после стоп кодона. В качестве примера, ДНК-фрагмент, кодирующий последовательность про-химозина В дикого типа приведен в SEQ ID NO: 1. Использование кодонов адаптировали согласно способу, описанному в патентной заявке US 090286280. Все варианты были разработаны схожим образом и клонированы в виде XhoI PacI - фрагментов в вектор pKLAC1 (New England Biolabs, Ипсвич, Массачусетс, США).

Полученные открытые рамки считывания начинались с лидерной последовательности K.lactis фактора спаривания альфа и продолжались через сайт процессирования kex в варианты бычьего про-

химозина В. Аминокислотные изменения, которые были введены в 135 вариантов, изображены в табл. 2. Положение изменения указано в сравнении с последовательностью зрелого химозина В (SEQ ID NO: 2). Некоторые аминокислотные положения заменяли на различные другие аминокислоты, такие как в положении 221 (вариант #5, 6 и 7) и положении 295 (вариант # 9 и 44), для тестирования имеют ли различные изменения в этих положениях схожий или различный эффект. Некоторые другие варианты имеют множественные изменения, внесенные в аминокислотную последовательность химозина, такие как варианты #10, 11 и 12. Ген дикого типа, кодирующий неизмененный белок прохимозина, также использовали в клонировании и трансформации гена и позднее использовали для сравнения с ферментами вариантных генов.

Таблица 2. Аминокислотные замены, введенные в белковую последовательность химозина В. Аминокислоты изображены согласно однобуквенной аннотации

Вариант#	Мутации
1	A51V
2	E109Q
3	A117S
4	S201N
5	K221L
6	K221M
7	K221V
8	V223F
9	K295Q
10	K48N K53Q R61S K62Q
11	K48N K53Q N144D N160D S201D
12	N50D K53Q N144D N160D S201D Q242E M267E Q280E
13	L22I
14	F40L
15	H76Q
16	Y88L
17	D98V
18	I99T
19	D112N
20	D112E
21	M125L
22	A126G
23	S135A
24	N144D
25	N144H
26	N144Q
27	E163G
28	V187L
29	V187M
30	Q189K
31	T194S
32	I200V
33	V223I
34	T271P
35	Q278K
36	T284S
37	S289G
38	Q294H
39	E2K
40	S135T
41	Q240E
42	Y268F
43	S273Y
44	K295L
45	A51T
46	A51L
47	A51N
48	A51G
49	K221I
50	K221T
51	K221A
52	K221S
53	K221N
54	K221H
55	E109M
56	E109L
57	A117T
58	A117V
59	V223M
60	V223L
61	V223W
62	V223Q

63	K295M									
64	K295E									
65	K295R									
66	K295Y									
67	A126S									
68	S135P									
69	N144K									
70	N144E									
71	A51V	K221V								
72	A51V	E109Q								
73	A51V	A117S								
74	A51V	K221M								
75	A51V	K295Q								
76	K221V	E109Q								
77	K221V	A117S								
78	K221V	K295Q								
79	K221V	V223F								
80	A51V	K221V	E109Q							
81	A51V	K221V	A117S							
82	A51V	K221V	K295Q							
83	A51V	K221V	V223F							
84	A51V	K221M	K295Q							
85	A51V	K221L	K295Q							
86	A51V	K221M	V223F							
87	A51V	K221L	V223F							
88	A51V	E109Q	A117S							
89	A51V	E109Q	K221M							
90	K221V	E109Q	A117S							
91	K221V	E109Q	V223F							
92	K221V	E109Q	K295Q							
93	K221V	A117S	V223F							
94	K221V	A117S	K295Q							
95	A51V	K221V	S135 T	A126G						
96	A51V	K221V	S135 T	A126G	S273Y					
97	A51V	K221V	S135 T	A126G	Q240E					
98	A51V	K221V	S135 T	A126G	S273Y	Q240E				
99	A51V	K221V	S135T	A126G	E109Q					
100	A51V	K221V	S135T	A126G	K295Q					
101	A51T	K221T								
102	A51I	K221I								
103	A51I	K221T								
104	A51T	K221T	S135T	A126G						
105	A51I	K221I	S135T	A126G						
106	A51I	K221T	S135T	A126G						
107	A51V	N50D	K53Q	N144H	N160D	S201D	Q242E	M267E	Q280E	
108	K221V	N50D	K53Q	N144H	N160D	S201D	Q242E	M267E	Q280E	
109	A51V	K221V	N50D	K53Q	N144H	N160D	S201D	Q242E	M267E	Q280E
110	A51V	K221V	N50D	N144H	N160D	S201D	Q242E	M267E	Q280E	
111	N50D	K53Q	N160D	S201D	Q242E	M267E	Q280E			
112	N50D	N160D	S201D	Q242E	M267E	Q280E				
113	H292D	G244D	S254D	G161D	G202D	Q240E				
114	N160D	S201D	Q242E	M267E	Q280E	H292D	G244D	S254D	G161D	V203E
115	K48N	K53Q	N144H	N160D	S201D					

Трансформацию и отбор штаммов осуществляли электропорацией и селекцией на ацетамид-содержащих чашках, в частности, как описано в WO 2007060247. Плазмиды лианеризовали расщеплением с помощью SacII и трансформировали электропорацией штамм *Kluyveromyces lactis* GG799. По шесть трансформантов каждой конструкции тестировали на выработку химозина с помощью ферментации в перемешиваемых колбах, и наилучший продуцирующий трансформант был выбран для дальнейшего анализа.

Пример 2. Культивирование, активация и концентрирование.

Штаммы *Kluyveromyces lactis*, несущие мутантный ген бычьего про-химозина, помещали в чашки с YEP2D-агром и выращивали в течение 48 ч при 30°C. Прекультуру в 20 мл среды YEP2D в 100 мл колбах Эрленмейера инокулировали дрожжевыми клетками, взятыми из чашек. Культуры выращивали в течение 24 ч в инкубируемом шейкере при 30°C и 250 об/мин. Количество прекультуры для инокуляции новых 500 мл колб Эрленмейера со 100 мл среды YEP2D/MES рассчитывали для получения конечного OD600=0,01. Эти основные культуры выращивали в течение 65 ч в инкубируемом шейкере при 30°C и 250 об/мин. Для сохранения штамма 2 мл пре-культуры центрифугировали (400 об/мин в течение 10 мин), клеточный осадок суспендировали в 0,7 мл 70% глицерина и хранили при -60°C.

Про-химозин был преобразован (активирован) в зрелый химозин с помощью стадии с pH, описанной ниже. 35 г бульона основной культуры после 65 ч культивирования центрифугировали при 8000 об/мин в течение 15 мин (10°C) и 17 мл надосадочной жидкости использовали для активации про-химозина. Активацию завершали добавлением разведенной соляной кислоты (1N) в малых aliquотах (как правило, добавлением 1N HCl в объеме 50-200 мкл) к образцу, обеспечивая хорошее перемешивание для того, чтобы избежать локальных эффектов pH. pH образца корректировали до 2,35-2,40. Через 30-90 мин инкубации при 30°C pH корректировали до 6,05±0,05 с помощью буфера MES-NaOH.

Активированные образцы химозина концентрировали в 20 раз, а компоненты среды отмывали 40 мМ MES-NaOH, pH 5,7 с использованием диафильтрации. Для этого использовали центрифужный фильтр "Amicon Ultra", 10 кДа. Начальный объем активированного образца составлял 20 мл, а объем конечного концентрированного образца составлял 1 мл. Образцы были составлены путем добавления 1 мл глицерина. Степень конечной концентрации, следовательно, являлась 10-кратной по сравнению с исходной концентрацией химозина. Эти образцы использовали для измерения активности и концентрации белка химозина (примеры 3 и 4). Для анализа уровня экспрессии химозина и для проверки степени активации образцы загружали на 4-12% градиентный ДСН-ПААГ (NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel, Invitrogen). Использовали следующий маркер молекулярных масс: "SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard", Invitrogen (188, 98, 62, 49, 38, 28, 17, 14, 7, 3 кДа). Активация про-химозина выглядела полной во всех вариантах химозина.

Пример 3. Определение активности.

Специфичность химозина (C/P) является важным параметром для функциональных свойств фермента в процессе изготовления сыра. Специфичность индивидуального образца химозина может быть рассчитана путем деления молокосвертывающей активности (С) на общую протеолитическую активность (Р). Это значение затем делится на C/P, которое измеряется для контрольного образца "Maxigen", для получения относительного C/P. Способ для измерения С и Р активности описан в разделе материалов и методов. Как видно из табл. 3, различные варианты имеют относительное соотношение C/P выше, чем 1,0, что указывает на то, что у них более высокое C/P по сравнению с контрольным химозином "Maxigen". Также несколько мутантов имеет более низкое относительное C/P соотношение, чем "Maxigen" (табл. 4).

Таблица 3. Высшее относительное C/P, рассчитанное для различных вариантов химозина

Вариант	
#	Отн. C/P
1	5,3
2	1,2
3	1,2
4	1,2
5	1,2
6	1,4
7	4,1
8	1,0
9	1,1
10	1,2
11	1,2
12	2,0
45	2,0
46	18,3
47	2,7
48	1,2
49	3,8
50	3,0
51	1,8
52	2,8
53	1,8
54	1,9
55	5,6
56	2,2
57	2,1
58	3,2

035275

59	1,1
61	2,8
62	1,6
63	1,2
64	1,9
65	1,1
66	1,4
67	1,2
68	1,6
69	1,1
70	1,5
71	16,8
72	7,1
73	4,9
74	12,2
75	5,3
76	5,1
77	3,7
78	3,8
79	3,1
80	19,9
81	43,8
82	10,4
83	6,6
84	8,3
85	9,1
86	6,6
87	7,7
88	4,3
89	23,1
90	9,1
91	8,1
92	5,9
93	5,5
94	6,2
95	25,8
96	16,8
97	7,2
98	15,1
99	43,8
100	9,5
101	8,8
103	23,1
104	27,4
105	31,3
106	43,8
107	13,7
108	5,8
109	10,4
110	23,1
111	2,4
112	1,6
113	2,9
114	2,5
115	1,5

Таблица 4. Низшее относительное С/Р, рассчитанное для различных вариантов химозина

Вариант	
#	Отн. С/Р
13	0,6
14	0,7
15	0,8
16	0,6
17	0,5
18	0,6
19	0,5
20	0,8
21	0,7
22	0,6
23	0,6
24	0,6
25	0,7
26	0,6
27	0,6
28	0,6
29	0,6
30	0,4
31	0,6
32	0,6
33	0,6
34	0,7
35	0,7
36	0,6
37	0,7
38	0,5
39	0,7

Пример 4. Специфическая активность.

Химозин количественно оценивали с помощью LC-MS, с использованием экспериментальной процедуры, адаптированной из способа Абсолютного Количественного анализа (Absolute Quantification, AQUA) (Gerber et al. 2003).

Синтетический внутренний стандарт, содержащий стабильные тяжелые изотопы, использовали для количественной оценки и разработки способа. Количественная оценка химозина была основана на пептиде EYYSVFDR (меченный изотопом внутренний стандарт; ISTD). Стандарт был приведен к масштабу количественной оценки ЯМР перед экспериментами для гарантии того, что было добавлено корректное абсолютное количество внутреннего стандарта.

Образцы, как описано в примере 2, обрабатывали преципитацией ТХУ, как описано в разделе материалов и методов. Осадки белка солибилизировали в 8М мочеvine, содержащей внутренний стандарт. Образцы разводили до <2М мочеvine с помощью NH_4HCO_3 и добавляли трипсин для протеолитического расщепления. Образцы анализировали с помощью "Accela-LTQ-Orbitrap". Количественную оценку осуществляли путем расчета площадей сигналов ISTD и пептидов химозина, на основании ионов уникального фрагмента для каждого пептида. Соотношение этих областей дает концентрацию химозина, поскольку внутренний стандарт вносился в известном количестве, а пептид химозина был эквимоларен интактному химозину из-за полного расщепления трипсином.

Специфическую активность различных вариантов химозина оценивали путем измерения монокосвертывающей активности и деления этого значения на содержание белка химозина в препарате. Монокосвертывающую активность индивидуальных образцов определяли, как описано в разделе материалов и методов. Относительную специфическую активность вариантов рассчитывали делением специфической активности вариантов химозина на специфическую активность, которая была измерена для контрольного химозина "Maxigen". Как видно из табл. 5, несколько вариантов химозина демонстрируют явный рост в относительной специфической активности фермента.

Таблица 5. Определение относительной специфической активности вариантов химозина

Вариант #	Отн. Спец. Акт.
2	1,2
5	1,8
6	2,0
7	1,5
17	1,1
20	1,1
22	1,6
25	1,4
40	2,0
41	1,2
43	1,5
44	1,1
49	1,6
50	1,7
51	1,6
52	2,0
53	2,5
54	2,1
57	2,8
58	1,9
59	4,2
60	1,8
61	1,2
62	1,1
63	1,7
64	1,7
65	1,2
66	1,2
67	1,1
69	1,4
70	1,4
71	3,5
74	2,3
75	1,5
76	2,9
77	1,8
78	2,5
79	2,6
80	1,9
81	1,9
82	1,3
83	1,5
84	2,0
85	2,1
86	1,9
87	1,4
90	2,7
91	2,4
92	6,9
93	2,3
94	1,4
98	3,5
101	2,3
102	1,5
103	1,8
104	1,9
105	1,5
106	1,1
107	1,3
108	1,5
109	2,7
110	3,4
111	1,3
112	1,5
113	1,4
114	2,3

Пример 5. Продуктивность.

Измеренное содержание белка во всех образцах, определенное как описано в примере 4, сравнивали

с содержанием белка в образце, полученном с помощью гена химозина дикого типа. Содержание белка в этих образцах может быть использовано как указание продуктивности различных вариантов в перемешиваемой колбе, поскольку каждый образец обрабатывали сходным образом. Относительную продуктивность, сравненную с химозином дикого типа, рассчитывали делением двух чисел. Из этого стало ясно, что варианты, которые содержали дополнительный отрицательный поверхностный заряд, такие как варианты #12 и 107, 111, 112, имели более высокую продуктивность, чем химозин дикого типа (табл. 6). Эти варианты имеют множественные изменения в аминокислотной последовательности химозина, которые приводят к введению экстраотрицательных зарядов (аспартат и глутамат) в аминокислотную последовательность телячьего химозина (табл. 2).

Таблица 6. Определение относительной продуктивности вариантов химозина

Вариант #	Отн. продуктивность
12	3,5
56	1,1
63	1,3
65	1,1
68	1,1
72	2,3
89	2,3
107	2,9
111	2,4
112	2,1

Пример 6. Температурная стабильность.

Для измерения термостабильности различных вариантов химозина образцы, полученные в примере 2, были разведены до свертывающей активности 10 Ед./мл в 40 мМ MES pH 5,7. Разведенные образцы затем инкубировали при 45, 50, 55, 60, 65 и 70°C в течение 10 мин. После этой инкубации образцы охлаждали и измеряли остаточную активность с использованием молокосвертывающего анализа, описанного в материалах и методах. Молокосвертывающую активность сравнивали с образцом "Maxigen", который обрабатывали схожим образом. Кроме того, в этих экспериментах использовали образец "Chymax M" (Chr. Hansen). Табл. 7 демонстрирует остаточную молокосвертывающую активность нескольких вариантов химозина после инкубации. Все из наиболее термоллабильных вариантов (95, 98 и 104) содержат мутации S135T и A126G. Эти мутации, следовательно, могут быть вовлечены в термоллабильность. Было обнаружено, что "Chymax M" является более термостабильным, чем "Maxigen" и варианты, полученные из телячьего химозина В. Низкая термостабильность является предпочтительным для полной инактивации фермента, в ходе пастеризации и/или при приготовлении или стадии вытягивания/формования при производстве конкретных сыров.

Таблица 7. Температурная стабильность вариантов химозина

Температура	45	50	55	60	65	70
Maxigen	100	103	91	81	15	0
Chymax M	100	94	97	94	85	0
5	100	97	97	46	0	0
6	100	97	97	50	3	0
7	100	100	91	43	0	0
11	100	102	103	50	0	0
12	100	97	95	41	0	0
46	100	100	95	44	0	0
71	100	100	87	42	0	0
74	100	100	97	56	3	0
80	100	98	85	35	0	0
89	100	100	92	41	0	0
95	100	97	77	11	0	0
98	100	100	81	12	0	0
103	100	97	95	44	0	0
104	100	100	88	23	0	0
106	100	100	90	37	0	0

Пример 7. Активность сворачивания молока при более низком pH.

Активность различных вариантов химозина была определена с помощью адаптации способа свертывания молока, описанного в материалах и методах, путем корректировки pH молочного раствора до других значений pH добавлением молочной кислоты или NaOH соответственно. Перед тестированием свертывающей активности в молочных растворах, скорректированных до различных pH, все тестируемые образцы химозина разводили до 10 Ед./мл в 40 мМ MES pH 5,7. Результаты сравнили с молокосвертывающей активностью "Maxigen" и представили в табл. 8. Молокосвертывающая активность pH 6,6 была принята за 1,0 и все другие результаты связывали с этим числом. Варианты #11, 12 и 107, все с повышенным отрицательным поверхностным зарядом, демонстрировали повышенную свертывающую активность при низком pH по сравнению с молокосвертывающей активностью контрольных коммерческих

химозинов "Maxiren" и "Chymax M". Кроме того, несколько вариантов демонстрировали пониженную сворачивающую активность по сравнению с "Maxiren" при более низком pH. Все эти варианты имеют заряд в аминокислотном положении 221 последовательности зрелого химозина.

Таблица 8. Зависимость активности сворачивания молока от pH

pH	5,8	6	6,2	6,4	6,6	6,8
Maxiren	3,7	3,1	2,5	1,7	1,0	0,5
Chymax M	3,5	2,8	2,1	1,5	1,0	0,5
11	5,8	4,2	2,6	1,8	1,0	0,6
12	6,6	5,0	3,5	2,1	1,0	0,6
107	5,3	4,2	3,2	2,0	1,0	0,5

Пример 8. Протеолитическая активность при пониженной температуре.

Созревание сыров часто проходит при пониженных температурах и, следовательно, уместно оценить протеолитическую активность различных вариантов химозина при пониженных температурах. Поскольку множество вариантов демонстрирует очень низкую протеолитическую активность, мы решили использовать другой, более чувствительный способ измерения протеолиза казеина. Этот способ осуществляли при pH 5,0, более схожем с pH, который соответствует созреванию сыров. Протеолитическую активность при различных температурах оценивали с помощью набора "QuantiCleave Protease assay kit", как описано в разделе материалов и методов, с инкубацией в течение 60 мин при 4, 12 или 30°C.

Результаты данного эксперимента изображены в табл. 9. Некоторые варианты имеют очень низкую активность при пониженной температуре, что подтверждает, что любая протеолитическая активность в ходе созревания сыра будет очень низкой. В частности, выделяется вариант 95, поскольку его протеолитическая активность фактически отсутствует при 4 и 12°C.

Таблица 9. Протеолитическая активность вариантов химозина, измеренная при pH 5 и различных температурах

Температура	4	12	32
Maxiren	0,70	0,81	1,03
Chymax M	0,33	0,39	0,54
46	0,20	0,22	0,34
71	0,40	0,53	0,66
74	0,17	0,21	0,31
80	0,10	0,17	0,49
89	0,14	0,22	0,42
95	0,03	0,05	0,24
98	0,36	0,38	0,65
103	0,23	0,24	0,37
104	0,17	0,20	0,35
106	0,09	0,10	0,16
110	0,36	0,42	0,70

Пример 9. Протеолитическая активность при низком pH.

С помощью альтернативного протеолитического анализа, описанного в примере 8, мы также проверили протеолитическую активность при различных pH. Все инкубации были проведены при 30°C в течение 60 мин, а pH субстратного раствора было скорректировано перед инкубацией до 5,0, 5,5, 6,0, 6,5 и 7,0. Результаты были нормализованы для активностей, которые были измерены при pH 7,0 и отмечены в табл. 10. Из данной таблицы становится очевидно, что несколько вариантов демонстрируют сильную стимуляцию протеолитической активности при пониженном pH. В частности, варианты 71, 74, 95, 98, 103, 104 и 106 демонстрируют пониженную стимуляцию протеолитической активности при низком pH по сравнению с "Maxiren" и "Chymax M". Вариант 95 является особым, потому что фактически нет стимуляции протеолитической активности, когда pH снижается до 5,0. Поскольку pH большинства сыров ниже, чем молочной pH, такой коагулянт с пониженным ответом на снижение pH может оказывать глубокое влияние на созревание сыра и является благоприятным для производства сыров, при котором протеолиз приводит к дефектам процессирования.

Таблица 10. Относительная протеолитическая активность различных вариантов химозина, измеренная при различных pH

pH	5	5,5	6	6,5	7
Maxiren	2,6	2,4	2,2	1,6	1,0
Chymax M	3,7	3,4	3,2	1,7	1,0
71	1,7	1,5	1,2	1,1	1,0
74	2,0	1,8	1,6	1,2	1,0
95	1,2	1,3	1,1	1,0	1,0
98	2,2	2,0	1,7	1,3	1,0
103	2,1	2,0	1,7	1,1	1,0
104	2,4	2,1	1,8	1,3	1,0
106	1,8	2,0	1,4	1,4	1,0

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептид с активностью химозина, имеющий аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO: 2, и содержащий замену аминокислотного остатка по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 2, выбранную из A51V, A51T, A51I, A51L и A51N, причем указанный полипептид демонстрирует повышенную специфичность по сравнению с эталонным полипептидом, обладающим активностью химозина и содержащим последовательность SEQ ID NO: 2.
2. Полипептид по п.1, который является неприродным полипептидом.
3. Полипептид по любому из предшествующих пунктов, который демонстрирует пониженную протеолитическую активность в сырной матрице по сравнению с эталонным полипептидом, обладающим активностью химозина.
4. Полипептид по п.3, который демонстрирует пониженную термостабильность по сравнению с эталонным полипептидом, обладающим активностью химозина.
5. Полипептид по любому из пп.2-4, который демонстрирует повышенную специфическую молоко-свертывающую активность по сравнению с эталонным полипептидом, обладающим активностью химозина.
6. Полипептид по любому из пп.2-4, который демонстрирует повышенный уровень экспрессии по сравнению с эталонным полипептидом, обладающим активностью химозина.
7. Полипептид по п.1, который демонстрирует пониженную протеолитическую активность при низком pH по сравнению с эталонным полипептидом, обладающим активностью химозина.
8. Полипептид по п.1, который демонстрирует пониженную протеолитическую активность при низкой температуре по сравнению с эталонным полипептидом, обладающим активностью химозина.
9. Полипептид по любому из предшествующих пунктов, который содержит дополнительные замены, отличные от указанных в п.1.
10. Нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид по любому из предшествующих пунктов.
11. Нуклеотидная конструкция, содержащая нуклеиновую кислоту по п.10, функционально связанную с одной или несколькими регуляторными последовательностями, способными управлять экспрессией нуклеиновой кислоты в подходящем хозяине.
12. Рекombinantный экспрессирующий вектор, содержащий по меньшей мере одну нуклеотидную конструкцию по п.11.
13. Рекombinantная клетка-хозяин, содержащая экспрессирующий вектор по п.12.
14. Способ получения полипептида по любому из пп.1-9, включающий культивирование клетки-хозяина по п.13 в условиях, обеспечивающих продуцирование указанного полипептида, и его выделение.
15. Способ получения полипептида по любому из пп.1-9, включающий:
 - a) выбор полипептида, обладающего активностью химозина и имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2;
 - b) замену одного или нескольких аминокислотных остатков в последовательности SEQ ID NO: 2, причем одна из замен находится в положении 51 последовательности SEQ ID NO: 2 и выбрана из A51V, A51T, A51I, A51L и A51N;
 - d) определение свойств полученных вариантов полипептида; и
 - e) выбор варианта полипептида, демонстрирующего повышенную специфичность по сравнению с эталонным полипептидом, обладающим активностью химозина и содержащим последовательность SEQ ID NO: 2.
16. Способ по п.15, включающий замену более чем одного аминокислотного остатка.
17. Композиция для получения сыра, содержащая полипептид по любому из пп.1-9 или полипептид, полученный способом по любому из пп.15 или 16.
18. Применение полипептида по любому из пп.1-9 для приготовления сыра.
19. Способ получения сыра, который включает добавление эффективного молоко-свертывающего количества полипептида по любому из пп.1-9 или композиции по п.17 в молоко и проведение соответствующих последующих стадий изготовления сыра.

