

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

- Дата публикации заявки (43)2023.10.02
- Дата подачи заявки (22) 2021.12.30

(51) Int. Cl. **A23J 3/06** (2006.01) A23J 3/22 (2006.01) A23L 13/40 (2016.01) **C07K 14/805** (2006.01)

ЗАМЕНИТЕЛЬ МЯСА, СОДЕРЖАЩИЙ МИОГЛОБИН ЖИВОТНОГО (54) ПРОИСХОЖДЕНИЯ

- (31) 20218000.6; 21174597.1
- (32) 2020.12.31; 2021.05.19
- (33) EP
- (86)PCT/EP2021/087884
- (87)WO 2022/144434 2022.07.07
- (71) Заявитель: ПАЛЕО Б.В. (ВЕ)

(72) Изобретатель: Санкторум Гермес, Де Йонг Энди (ВЕ)

202391560

(74) Представитель: Нилова М.И. (RU)

В изобретении описаны заменитель мяса или пищевой ингредиент, содержащий белок миоглобин (57) животного происхождения, генная конструкция, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую указанный белок, клетка-хозяин, содержащая указанную генную конструкцию, и способ получения указанного миоглобина или указанного заменителя мяса.

ЗАМЕНИТЕЛЬ МЯСА, СОДЕРЖАЩИЙ МИОГЛОБИН ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Область техники, к которой относится изобретение

5

10

15

Аспекты и варианты осуществления, описанные в данном документе, относятся к области заменителя мяса, содержащего белок миоглобин, генной конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую указанный белок, клетки-хозяина, содержащей указанную генную конструкцию, и способа получения указанного миоглобина или указанного заменителя мяса.

Предпосылки изобретения

Несколько заменителей мяса уже разработаны и введены в коммерческое обращение. Вкус, цвет, текстура и пищевые качества таких продуктов не всегда оптимальны в том смысле, что они не имитируют должным образом "мясо". Более того, они также могут не обладать такими же пищевыми качествами, как мясо.

Следовательно, по-прежнему существует потребность в новых изобретениях, которые не имеют всех недостатков существующих пищевых продуктов, направленных на замену мяса.

20

25

30

Описание

Соответственно, аспекты и варианты осуществления настоящего изобретения, описанные в данном документе, обеспечивают решение по меньшей мере некоторых из проблем и потребностей, обсуждаемых в данном документе.

Заменитель мяса

В первом аспекте предусмотрен заменитель мяса или пищевой ингредиент, содержащий миоглобин животного происхождения, предпочтительно миоглобин млекопитающего, более предпочтительно из мамонта, свиньи, овцы или коровы, где более предпочтительно указанный мамонт является шерстистым мамонтом (*Mammuthus primigenius*) или степным мамонтом (*Mammuthus trogontherii*), где наиболее предпочтительно указанный мамонт является степным мамонтом, или миоглобин птицы, предпочтительно из курицы, или

миоглобин рыбы, предпочтительно из тунца, или миоглобин, являющийся его производным.

В одном варианте осуществления заменитель мяса или пищевой ингредиент содержит миоглобин животного происхождения из мамонта, свиньи, овцы, коровы, курицы или тунца или его производное, где предпочтительно указанный мамонт является шерстистым мамонтом (*Mammuthus primigenius*) или степным мамонтом (*Mammuthus trogontherii*), где более предпочтительно указанный мамонт является степным мамонтом.

5

10

15

20

25

30

Можно сказать, что миоглобин животного происхождения получен из мамонта, который предпочтительно является шерстистым мамонтом или степным мамонтом, более предпочтительно из миоглобина степного мамонта, свиньи, овцы, коровы, курицы или тунца, если его аминокислотная последовательность получена из одного из мамонта, предпочтительно из шерстистого мамонта или степного мамонта, свиньи, овцы, коровы, курицы или тунца соответственно, путем добавления, делеции и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты. Добавление, делеция и/или замена двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти аминокислот также рассматриваются в настоящем изобретении. Примеры аминокислотной последовательности миоглобина из шерстистого мамонта, степного мамонта, свиньи, овцы, коровы, курицы или тунца раскрыты в дальнейшем с помощью заданного SEQ ID NO. Такой миоглобин животного происхождения, полученный из миоглобина мамонта, шерстистого мамонта, степного мамонта, свиньи, овцы, коровы, курицы или тунца, также может проявлять по меньшей поддающийся обнаружению уровень активности миоглобина животного происхождения, как поясняется в дальнейшем в данном документе. Мамонт может относиться к любому виду рода Mammuthus, такому как шерстистый мамонт (Mammuthus primigenius) или степной мамонт (Mammuthus trogontherii), в контексте настоящей заявки, если явно не указано иное.

В одном варианте осуществления миоглобин в заменителе мяса или в пищевом ингредиенте получен из мамонта или является его производным.

В предпочтительном варианте осуществления миоглобин в заменителе мяса или в пищевом ингредиенте получен из шерстистого мамонта или является его производным.

В предпочтительном варианте осуществления миоглобин в заменителе мяса или в пищевом ингредиенте получен из степного мамонта или является его производным.

В одном варианте осуществления миоглобин в заменителе мяса или в пищевом ингредиенте представлен одной из следующих аминокислотных последовательностей:

- a) характеризующейся по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 3 и имеющей по меньшей мере одну из следующих комбинаций аминокислот:
- 5 о F в положении 30, и/или

30

- о Q в положении 65, и/или
- о Н в положении 92, и/или
- о Н в положении 94, и/или
- о F в положении 30 и Q в положении 65, и/или
- 10 о F в положении 30 и H в положении 92, и/или
 - о F в положении 30 и H в положении 94, и/или
 - о Q в положении 65 и H в положении 92, и/или
 - о Q в положении 65 и H в положении 94, и/или
 - О Н в положении 92 и Н в положении 94, и/или
- 15 о F в положении 30, и Q в положении 65, и H в положении 92, и/или
 - о F в положении 30, и Q в положении 65, и H в положении 94, и/или
 - F в положении 30, и Н в положении 92, и Н в положении 94, и/или
 - О В положении 65, и Н в положении 92, и Н в положении 94, и/или
 - о F в положении 30, и Q в положении 65, и H в положении 92, и H в положении 94;
- 20 b) характеризующейся по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 2 или 3, имеющей Q или H в положении 65 и H в положении 94 и необязательно имеющей по меньшей мере одну из следующих аминокислот в следующих местах в SEQ ID NO: 2 или 3: Е в положении 9, К в положении 13, Т в положении 14, Р в положении 23, L в положении 27, V в положении 31, G в положении 54, Q в положении 25 65, V в положении 67, Q в положении 84, Q в положении 88, I в положении 102, Е в положении 123 и/или I в положении 143;
 - с) характеризующейся по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1, имеющей Q или H в положении 65 и H в положении 94 и необязательно имеющей по меньшей мере одну из следующих аминокислот в следующих местах в SEQ ID NO: 1: Е в положении 9, К в положении 13, Т в положении 14, Р в положении 23, L в положении 27, V в положении 31, G в положении 54, Q в положении 65, V в положении

67, Q в положении 84, Q в положении 88, I в положении 102 и/или Е в положении 123;

- d) характеризующейся по меньшей мере 70% идентичностью с SEQ ID NO: 4, 5 или 6, имеющей Q или H в положении 65 и H в положении 94 и необязательно имеющей по меньшей мере одну из следующих аминокислот в следующих местах в SEQ ID NO: 4, 5 или 6: N в положении 13, Q в положении 27, I в положении 31, N в положении 67, A в положении 128, S в положении 133, A в положении 145 и/или L в положении 150;

5

10

15

20

25

30

- е) характеризующейся по меньшей мере 70% идентичностью с SEQ ID NO: 7, имеющей Q или H в положении 65 и H в положении 94 и необязательно имеющей по меньшей мере одну из следующих аминокислот в следующих местах в SEQ ID NO: 7: Q в положении 6, Q в положении 10, T в положении 13, I в положении 14, H в положении 27, M в положении 31, H в положении 35, D в положении 36, D в положении 42, R в положении 43, G в положении 49, P в положении 53, Q в положении 55, G в положении 58, A в положении 67, Q в положении 72, K в положении 75, Q в положении 79, N в положении 82, S в положении 85, T в положении 93, V в положении 111, I в положении 116, A в положении 117, E в положении 118, A в положении 121, S в положении 128, K в положении 133, S в положении 145 и/или F в положении 150; или
- f) характеризующейся по меньшей мере 70% идентичностью с SEQ ID NO: 8, имеющей Q или H в положении 65 и H в положении 94.
- SEQ ID NO: 1 представляет собой часть аминокислотной последовательности миоглобина шерстистого мамонта, SEQ ID NO: 2 представляет собой аминокислотную последовательность шерстистого мамонта; SEQ ID NO: 3 представляет собой аминокислотную последовательность миоглобина степного мамонта, SEQ ID NO: 4 представляет собой аминокислотную последовательность миоглобина овцы, SEQ ID NO: 5 представляет собой аминокислотную последовательность миоглобина крупного рогатого скота (коровы), SEQ ID NO: 6 представляет собой аминокислотную последовательность NO: 7 миоглобина свиньи, SEQ ID представляет собой аминокислотную последовательность миоглобина курицы, и SEQ ID NO: 8 представляет собой аминокислотную последовательность миоглобина тунца. Понятно, что SEQ ID NO: 1, представляющая собой часть аминокислотной последовательности миоглобина шерстистого мамонта (т. е. частичную последовательность), содержится в SEQ ID NO: 2, представляющей собой (полную) аминокислотную последовательность миоглобина шерстистого мамонта.
- SEQ ID NO: 9 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую SEQ ID NO: 1. SEQ ID NO: 10 представляет собой последовательность

нуклеиновой кислоты, кодирующую SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 11 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую SEQ ID NO: 3. SEQ ID NO: 12 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую SEQ ID NO: 4. SEQ ID NO: 13 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую SEQ ID NO: 5. SEQ ID NO: 14 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую SEQ ID NO: 6. SEQ ID NO: 15 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую SEQ ID NO: 7. SEQ ID NO: 16 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую SEQ ID NO: 8.

10

15

5

Заменитель мяса по определению не является мясом, не является природным мясом, не является натуральным мясом. Заменитель мяса может рассматриваться как не встречающийся в природе пищевой продукт или продукт питания. Это означает, что в контексте настоящего изобретения заменитель мяса не является мясом, происходящим от свиньи, овцы, коровы, курицы или тунца или полученным из них (или происходящим от мамонта или полученным из него, если бы это животное все еще существовало, что не так). Заменитель мяса является синонимом реплики мяса, или продукта, являющегося аналогом мяса, или мясоподобного продукта.

20 Заменитель мяса может иметь такой же облик (как, например, узор, тиснение), форму, структуру, состав (как, например, сходное содержание жира, белка и/или гемового железа), текстуру, цвет, вкус, аромат и/или внешний вид, что и мясо.

В качестве альтернативы он может иметь облик, форму, структуру, текстуру, цвет, вкус, аромат и/или внешний вид, которые отличаются от таковых у мяса.

25

Заменители мяса могут быть составлены в виде жидкого, твердого, полутвердого пищевого продукта.

Подходящие примеры жидкого пищевого продукта включают суп.

30 Подходящие примеры твердых пищевых продуктов включают мясо на клеточной основе, или культивированное мясо, или мясо на растительной основе. Такое мясо на растительной основе может содержать растительные белки, такие как соевые белки. Кроме того, они содержат миоглобин животного происхождения, определенный в данном

документе. В одном варианте осуществления этот миоглобин животного происхождения является единственным источником гемсодержащего белка.

Подходящие примеры легких закусок включают протеиновый батончик или протеиновый коктейль.

5

20

25

30

Пищевой ингредиент может представлять собой любой питательный ингредиент, который может быть добавлен в продукт питания для получения отдельного продукта питания. В качестве альтернативы пищевой ингредиент может употребляться сам по себе. Термин "пищевой ингредиент" может быть заменен термином "пищевая добавка".

Подходящими примерами пищевых ингредиентов, содержащих указанный выше миоглобин, могут быть твердые (такие как порошок, смесь специй), или жидкие (такие как экстракт), или полужидкие или полутвердые (такие как паста, или гель, или соус, или бульон, или крем) пищевые ингредиенты, которые могут продаваться потребителям.
 Потребители могут добавлять эти пищевые ингредиенты в свои собственные продукты питания, чтобы дополнить свои продукты питания миоглобином, предусмотренным в данном документе, для создания своих собственных заменителей мяса.

Подходящие примеры твердой пищевой добавки включают таблетку, или пилюлю, или порошок, содержащие указанный выше миоглобин животного происхождения. Таблетка, или пилюля, или порошок могут быть составлены с другими соединениями, такими как витамины или минералы.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что "впечатление от мяса" можно имитировать в заменителе мяса по настоящему изобретению с помощью миоглобина животного происхождения, определенного в данном документе.

В одном варианте осуществления ожидается, что заменитель мяса по настоящему изобретению будет имитировать облик (как, например, узор, тиснение), форму, структуру, состав (как, например, сходное содержание жира, белка и/или гемового железа), вкус, текстуру, цвет, аромат, внешний вид и/или пищевую ценность мяса. Обычно это имеет место, если заменитель мяса представляет собой мясо на клеточной основе, или культивированное мясо, или мясо на растительной основе. Это обусловлено главным образом присутствием миоглобина животного происхождения, описанного в данном документе. Заменитель мяса может не иметь всех недостатков мяса. Например, заменитель мяса полезнее для здоровья, чем мясо. Кроме того, ожидается, что влияние

заменителя мяса на окружающую среду (долгосрочное прямое/косвенное воздействие на изменение климата) будет менее пагубным, чем известное влияние мяса.

В одном варианте осуществления ожидается, что заменитель мяса по настоящему изобретению будет имитировать облик (как, например, узор, тиснение), форму, структуру, состав (как, например, сходное содержание жира, белка и/или гемового железа), вкус, текстуру, цвет, аромат и/или внешний вид мяса. Обычно это имеет место, если заменитель мяса представляет собой мясо на клеточной основе, или культивированное мясо, или мясо на растительной основе. Это обусловлено главным образом присутствием миоглобина животного происхождения, описанного в данном документе. Заменитель мяса может не иметь всех недостатков мяса. Например, заменитель мяса полезнее для здоровья, чем мясо. Кроме того, ожидается, что влияние заменителя мяса на окружающую среду (долгосрочное прямое/косвенное воздействие на изменение климата) будет менее пагубным, чем известное влияние мяса.

5

10

15

20

25

30

В одном варианте осуществления ожидается, что заменитель мяса по настоящему изобретению будет имитировать состав (как, например, сходное содержание жира, белка и/или гемового железа), вкус, цвет и/или аромат мяса, не имея при этом всех его недостатков. Это обусловлено главным образом присутствием миоглобина животного происхождения, описанного в данном документе.

В одном варианте осуществления ожидается, что заменитель мяса по настоящему изобретению будет имитировать вкус и/или аромат мяса, не имея при этом всех его недостатков. Это обусловлено главным образом присутствием миоглобина животного происхождения, описанного в данном документе.

В одном варианте осуществления ожидается, что заменитель мяса по настоящему изобретению будет имитировать вкус мяса, не имея при этом всех его недостатков. Это обусловлено главным образом присутствием миоглобина животного происхождения, описанного в данном документе.

В одном варианте осуществления ожидается, что заменитель мяса по настоящему изобретению будет имитировать аромат мяса, не имея при этом всех его недостатков. Это обусловлено главным образом присутствием миоглобина животного происхождения, описанного в данном документе.

Кроме того, авторы настоящего изобретения обнаружили, что "впечатление от мяса" можно имитировать с помощью пищевого ингредиента, описанного в данном документе.

В одном варианте осуществления ожидается, что пищевой ингредиент по настоящему изобретению будет имитировать состав (как, например, сходное содержание жира, белка и/или гемового железа), вкус, цвет, аромат и/или пищевую ценность мяса, не имея при этом всех его недостатков. Это обусловлено главным образом присутствием миоглобина животного происхождения, описанного в данном документе.

5

10

30

В одном варианте осуществления ожидается, что пищевой ингредиент по настоящему изобретению будет имитировать состав (как, например, сходное содержание жира, белка и/или гемового железа), вкус, цвет и/или аромат мяса, не имея при этом всех его недостатков. Это обусловлено главным образом присутствием миоглобина животного происхождения, описанного в данном документе.

В одном варианте осуществления ожидается, что пищевой ингредиент по настоящему изобретению будет имитировать вкус, цвет и/или аромат мяса, не имея при этом всех его недостатков. Это обусловлено главным образом присутствием миоглобина животного происхождения, описанного в данном документе.

- В одном варианте осуществления ожидается, что пищевой ингредиент по настоящему изобретению будет имитировать состав (как, например, сходное содержание жира, белка и/или гемового железа), вкус и/или аромат мяса, не имея при этом всех его недостатков. Это обусловлено главным образом присутствием миоглобина животного происхождения, описанного в данном документе.
- 20 В одном варианте осуществления ожидается, что пищевой ингредиент по настоящему изобретению будет имитировать состав (как, например, сходное содержание жира, белка и/или гемового железа), вкус мяса, не имея при этом всех его недостатков. Это обусловлено главным образом присутствием миоглобина животного происхождения, описанного в данном документе.
- 25 В одном варианте осуществления ожидается, что пищевой ингредиент по настоящему изобретению будет имитировать состав (как, например, сходное содержание жира, белка и/или гемового железа), аромат мяса, не имея при этом всех его недостатков. Это обусловлено главным образом присутствием миоглобина животного происхождения, описанного в данном документе.

В контексте настоящего изобретения впечатление от мяса можно имитировать, если заменитель мяса и/или пищевой ингредиент создает ароматическое и/или вкусовое соединение, узнаваемое человеком и характерное для некоторых одорантов, и/или

вкусовое соединение, высвобождаемое при приготовлении мяса. Например, образование некоторых из этих одорантов может катализироваться железом гема, присутствующим в миоглобине. Не ограничиваясь этой теорией, полагают, что это образование может быть обусловлено окислением липидов и/или реакциями Майяра. Эту ситуацию можно имитировать с помощью миоглобина из заменителя мяса и/или пищевого ингредиента по настоящему изобретению.

5

10

15

20

25

В одном варианте осуществления ожидается, что заменитель мяса или пищевой ингредиент по настоящему изобретению, предпочтительно заменитель сырого мяса по настоящему изобретению, будет имитировать кровяной и/или металлический аромат мяса, предпочтительно сырого мяса. Заменитель мяса или пищевой ингредиент по настоящему изобретению предпочтительно способен имитировать кровяной и/или металлический аромат мяса в большей степени, чем другие заменители мяса или пищевые ингредиенты (т. е. не в соответствии с настоящим изобретением). В контексте настоящего изобретения под сырыми понимаются не подвергнутые термической обработке, предпочтительно невареные и нежареные.

В одном варианте осуществления ожидается, что заменитель мяса или пищевой ингредиент по настоящему изобретению, предпочтительно заменитель жареного мяса по настоящему изобретению, будет имитировать запеченный аромат мяса, в частности жареного мяса. Заменитель мяса или пищевой ингредиент по настоящему изобретению предпочтительно способен имитировать запеченный аромат мяса в большей степени, чем другие заменители мяса или пищевые ингредиенты (т. е. не в соответствии с настоящим изобретением).

В контексте настоящего изобретения и, в частности, в вариантах осуществления в этом разделе "другой заменитель мяса" или "заменитель мяса не в соответствии с настоящим изобретением" предпочтительно представляет собой бифштекс на растительной основе, содержащий рекомбинантный соевый леггемоглобин (LegH), более предпочтительно коммерчески доступный бифштекс от Impossible.

30 В одном варианте осуществления заменитель мяса или пищевой ингредиент по настоящему изобретению, предпочтительно заменитель жареного мяса по настоящему изобретению, имеет аромат, характеризующийся более высокой концентрацией окисленных липидов, продуктов окисления липидов, пиразинов и/или пирролов в летучих

соединениях, полученных из заменителя (жареного) мяса или пищевого ингредиента, по сравнению с другими заменителями мяса или пищевыми ингредиентами (т. е. не в соответствии с настоящим изобретением). Более высокий предпочтительно означает на по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 210%, 220%, 230%, 240%, 250%, 260%, 270%, 280%, 290% или 300%. Предпочтительными пиразинами являются метилпиразин, 2,5-диметилпиразин, 2-этил-6-метилпиразин. Предпочтительным пирролом является пиррол. Предпочтительными продуктами окисления липидов являются 2-метилбутаналь и 3-метилбутаналь.

10

15

5

В одном варианте осуществления заменитель мяса или пищевой ингредиент по настоящему изобретению, предпочтительно заменитель жареного мяса по настоящему изобретению, имеет аромат, характеризующийся более высокой концентрацией 2,5-диметилпиразина в летучих соединениях, полученных из заменителя (жареного) мяса или пищевого ингредиента, по сравнению с другими заменителями мяса или пищевыми ингредиентами (т. е. не в соответствии с настоящим изобретением). Более высокий предпочтительно означает на по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 200%, 210%, 220%, 230%, 240%, 250%, 260%, 270%, 280%, 290% или 300%.

20

25

В одном варианте осуществления заменитель мяса или пищевой ингредиент по настоящему изобретению, предпочтительно заменитель жареного мяса по настоящему изобретению, имеет аромат, характеризующийся более высокой концентрацией 2-этил-6-метилпиразина в летучих соединениях, полученных из заменителя (жареного) мяса или пищевого ингредиента, по сравнению с другими заменителями мяса или пищевыми ингредиентами (т. е. не в соответствии с настоящим изобретением). Более высокий предпочтительно означает на по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 200%, 210%, 220%, 230%, 240%, 250%, 260%, 270%, 280%, 290% или 300%.

30

В одном варианте осуществления заменитель мяса или пищевой ингредиент по настоящему изобретению, предпочтительно заменитель жареного мяса по настоящему изобретению, имеет аромат, характеризующийся более высокой концентрацией пиррола в

летучих соединениях, полученных из заменителя (жареного) мяса или пищевого ингредиента, по сравнению с другими заменителями мяса или пищевыми ингредиентами (т. е. не в соответствии с настоящим изобретением). Более высокий предпочтительно означает на по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 210%, 220%, 230%, 240%, 250%, 260%, 270%, 280%, 290% или 300%.

5

10

15

20

25

30

В одном варианте осуществления заменитель мяса или пищевой ингредиент по настоящему изобретению, предпочтительно заменитель жареного мяса по настоящему изобретению, имеет аромат, характеризующийся более высокой концентрацией 2-метилбутаналя в летучих соединениях, полученных из заменителя (жареного) мяса или пищевого ингредиента, по сравнению с другими заменителями мяса или пищевыми ингредиентами (т. е. не в соответствии с настоящим изобретением). Более высокий предпочтительно означает на по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 200%, 210%, 220%, 230%, 240%, 250%, 260%, 270%, 280%, 290% или 300%.

В одном варианте осуществления заменитель мяса или пищевой ингредиент по настоящему изобретению, предпочтительно заменитель жареного мяса по настоящему изобретению, имеет аромат, характеризующийся более высокой концентрацией 3-метилбутаналя в летучих соединениях, полученных из заменителя (жареного) мяса или пищевого ингредиента, по сравнению с другими заменителями мяса или пищевыми ингредиентами (т. е. не в соответствии с настоящим изобретением). Более высокий предпочтительно означает на по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 200%, 210%, 220%, 230%, 240%, 250%, 260%, 270%, 280%, 290% или 300%.

В примере 2.5 представлен анализ ароматических веществ заменителя мяса в соответствии с настоящим изобретением. Аромат мяса и заменителей мяса, а также концентрацию в летучих соединениях можно определить посредством способов, описанных в этом примере, т. е. с помощью газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией летучих соединений.

В контексте настоящего изобретения впечатление от мяса можно имитировать, если цвет заменителя мяса сходен с цветом мяса. Цвет мяса определяется концентрацией гемсодержащего белка и/или степенью его окисления в мясе. Следовательно, миоглобин, определенный в данном документе, будет определять цвет заменителя мяса. То же самое справедливо для пищевого ингредиента по настоящему изобретению.

5

10

15

20

25

30

В одном варианте осуществления ожидается, что заменитель мяса или пищевой ингредиент по настоящему изобретению, предпочтительно заменитель сырого мяса по настоящему изобретению, будет имитировать цвет мяса, предпочтительно сырого мяса. Не ограничиваясь этой теорией, полагают, что цвет заменителя мяса обусловлен главным образом присутствием миоглобина животного происхождения. Заменитель мяса или пищевой ингредиент по настоящему изобретению предпочтительно способен имитировать цвет мяса в большей степени, чем другие заменители мяса или пищевые ингредиенты (т. е. не в соответствии с настоящим изобретением).

В предпочтительном варианте осуществления цвет заменителя мяса или пищевого ингредиента по настоящему изобретению, предпочтительно заменителя сырого мяса по настоящему изобретению, является по существу стабильным в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 дней, предпочтительно при хранении при постоянном освещении при 4°C, более предпочтительно в условиях и при измерении с помощью методик из примера 2.4. Цвет заменителя мяса или пищевого ингредиента по настоящему изобретению предпочтительно является стабильным на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 дней дольше, чем период времени, в течение которого цвет мяса или других заменителей мяса или пищевых ингредиентов (т. е. не в соответствии с настоящим изобретением) является стабильным, где более предпочтительно изменение ΔE , составляющее от 0% до 10%, определяется как стабильное (см. далее). По существу стабильный в течение по меньшей мере Х дней предпочтительно означает изменение ΔE заменителя мяса или пищевого ингредиента, составляющее от 0% до 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4%, 4,5%, 5%, 5,5%, 6%, 6,5%, 7%, 7,5%, 8%, 8,5%, 9%, 9,5%, 10%, 10,5%, 11%, 11,5%, 12%, 12,5%, 13%, 13,5%, 14%, 14,5%, 15%, 15,5%, 16%, 16,5%, 17%, 17,5%, 18%, 18,5%, 19%, 19,5% или 20% от дня 0 до дня X, где ΔE определено в примере 2.4. ΔE заменителя мяса или пищевого ингредиента наиболее предпочтительно изменяется на не более чем 10% при хранении в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 дней.

В примере 2.4 представлены анализы стабильности цвета заменителя мяса в соответствии с настоящим изобретением. Цвет и стабильность цвета мяса и заменителей мяса можно определить посредством способов, описанных в этом примере.

В контексте настоящего изобретения впечатление от мяса можно имитировать, если состав заменителя мяса сходен с составом мяса. Состав заменителя мяса может рассматриваться как сходный с составом мяса, если присутствуют те же самые или сходные компоненты и необязательно если количества, в которых они присутствуют, являются такими же или сходными с количествами, присутствующим в мясе. Например, в заменителе мяса может присутствовать содержание жира, белка и/или гемового железа, сходное с таковым в мясе.

Ожидается, что эти миоглобины животного происхождения при включении в состав заменителя мяса или в качестве пищевого ингредиента будут обеспечивать примерно такое же количество общего доступного железа или гемового железа, что и мясо. В данном контексте "примерно" означает по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100% или больше. Обычно количество общего биодоступного железа или гемового железа в заменителе мяса по настоящему изобретению составляет не более 120% от количества общего биодоступного железа или гемового железа в натуральном мясе. Это означает, что данные миоглобины животного происхождения могут рассматриваться как уникальный альтернативный обогатитель для улучшения статуса железа в популяции.

15

20

25

Ожидается также, что эти миоглобины животного происхождения будут обеспечивать примерно более высокое количество общего биодоступного железа или гемового железа, чем количество общего биодоступного железа или гемового железа, представленное в продукте, являющемся аналогом мяса, на растительной основе. В данном контексте "более высокий" означает на по меньшей мере 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30% или больше.

30 В предпочтительном определении пищевая ценность означает количество общего доступного железа или гемового железа. В соответствии с этим предпочтительным определением "имитирование пищевой ценности мяса" следует интерпретировать как

"обеспечение примерно того же количества общего доступного железа или гемового железа, что и в мясе", как изложено выше.

В примере 2.6 представлен анализ пищевой ценности заменителя мяса в соответствии с настоящим изобретением, в котором оценивается биодоступность железа.

- В контексте настоящего изобретения общее железо представляет собой общее количество биодоступного железа в заменителе мяса. Гемовое железо представляет собой часть железа, которая транспортируется белком, содержащим гемовый домен. Гемовое железо доступно для всасывания в организме человека. Такой белок представляет собой миоглобин, определенный в данном документе. Доступность железа можно оценить согласно описанному в Proulx A.K., et al (2006)., J. Agric. Food. Chem., (54), 1518-1522), и/или посредством способов из примера 2.6. Вкратце, концентрацию ферритина в препарате вначале нормализуют к концентрации клеточного белка. Затем процентное содержание нормализованного ферритина сравнивают с процентным содержанием FeSO4 и выражают в виде относительной биологической оценки (RBV).
- В одном варианте осуществления заменитель мяса не содержит леггемоглобин, продуцированный бактерией, живущей в симбиозе в корневых клубеньках растения сои, и/или содержит в качестве единственного гемсодержащего белка миоглобин животного происхождения, определенный в данном документе ранее.
- В одном варианте осуществления миоглобин животного происхождения, раскрытый в данном документе, может быть единственным источником гемсодержащего белка, присутствующим в заменителе мяса по настоящему изобретению. Это означает, что заменитель мяса по настоящему изобретению может содержать белки, отличные от миоглобина животного происхождения, раскрытого в данном документе. Примеры белков, которые могут присутствовать, включают соевые белки.
- 25 В контексте настоящего изобретения определено, что гемсодержащий белок может относиться ко всем белкам или белковым субъединицам, которые способны ковалентно или нековалентно связывать гемовый компонент. Гемсодержащие полипептиды могут транспортировать или запасать кислород. Некоторые примеры гемсодержащего белка включают глобин, гемоглобин, леггемоглобин.
- 30 В другом варианте осуществления заменитель мяса не содержит леггемоглобин, продуцированный бактерией, живущей в симбиозе в корневых клубеньках растения сои. В одном варианте осуществления заменитель мяса не содержит симбиотический гемоглобин. В одном варианте осуществления заменитель мяса не содержит

леггемоглобин. В одном варианте осуществления заменитель мяса не содержит белок, продуцированный бактерией, живущей в симбиозе в корневых клубеньках растения сои.

В одном варианте осуществления заменитель мяса не содержит леггемоглобин, продуцированный бактерией, живущей в симбиозе в корневых клубеньках растения сои, и содержит в качестве единственного гемсодержащего белка миоглобин животного происхождения, определенный в данном документе ранее.

5

10

15

В одном варианте осуществления заменитель мяса содержит количество миоглобина животного происхождения, сходное с таковым в эквивалентном натуральном мясе. В одном варианте осуществления такое количество находится в диапазоне от 0,1 до 5 весовых % миоглобина животного происхождения. В одном варианте осуществления количество составляет по меньшей мере 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0 или больше весовых % миоглобина животного происхождения. Настоящее изобретение также охватывает количество, составляющее по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50% конечного веса продукта. Специалисту известно, что в зависимости от заменителя мяса количество может варьироваться.

В одном варианте осуществления весовое процентное содержание миоглобина в заменителе мяса в соответствии с настоящим изобретением составляет от 0,1% до 5%, 4,9%, 4,8%, 4,7%, 4,6%, 4,5%, 4,4%, 4,3%, 4,2%, 4,1%, 4%, 3,9%, 3,8%, 3,7%, 3,6%, 3,5%, 3,4%, 3,3%, 3,2%, 3,1%, 3%, 2,95%, 2,9%, 2,85%, 2,8%, 2,75%, 2,75%, 2,7%, 2,65%, 2,6%, 2,55%, 2,5%, 2,45%, 2,4%, 2,35%, 2,3%, 2,25%, 2,2%, 2,15%, 2,1%, 2,05%, 2%, 1,95%, 1,9%, 1,85%, 1,8%, 1,75%, 1,7%, 1,65%, 1,6%, 1,55%, 1,5%, 1,45%, 1,4%, 1,35%, 1,3%, 1,25%, 1,2%, 1,15%, 1,1%, 1,05%, 1%, 0,95%, 0,9%, 0,85%, 0,8%, 0,75%, 0,7%, 0,65%, 0,6%, 0,55% или 0,5%.

В одном варианте осуществления весовое процентное содержание миоглобина в заменителе мяса в соответствии с настоящим изобретением составляет от 0,5% до 5%, 4,9%, 4,8%, 4,7%, 4,6%, 4,5%, 4,4%, 4,3%, 4,2%, 4,1%, 4%, 3,9%, 3,8%, 3,7%, 3,6%, 3,5%, 3,4%, 3,3%, 3,2%, 3,1%, 3%, 2,95%, 2,9%, 2,85%, 2,8%, 2,75%, 2,7%, 2,65%, 2,6%, 2,55%, 2,5%, 2,45%, 2,4%, 2,35%, 2,3%, 2,25%, 2,2%, 2,15%, 2,1%, 2,05%, 2%, 1,95%, 1,9%, 1,85%, 1,8%, 1,75%, 1,7%, 1,65%, 1,6%, 1,55%, 1,5%, 1,45%, 1,4%, 1,35%, 1,3%, 1,25%, 1,2%, 1,15%, 1,1%, 1,05%, 1%, 0,95%, 0,9%, 0,85%, 0,8%, 0,75%, 0,7%, 0,65% или 0,6%.

В одном варианте осуществления пищевой ингредиент содержит миоглобин животного происхождения в количестве, которое может находиться в диапазоне от 0,1 до 100 весовых % миоглобина животного происхождения. В одном варианте осуществления количество составляет по меньшей мере 0,1%, 1,0%, 1,5%, 2,0%, 2,5%, 3,0%, 4,0%, 4,5%, 5,0%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100% конечного веса продукта. Специалисту известно, что в зависимости от пищевого ингредиента количество может варьироваться.

5

10

15

20

30

В одном варианте осуществления заменитель мяса содержит или получен путем смешивания от 10% до 40% источника белка, от 5% до 30% источника липидов, от 0,1% до 5% NaCl, от 0,1% до 5% источника клетчатки и от 0,1% до 5% миоглобина в соответствии с настоящим изобретением. В более предпочтительном варианте осуществления заменитель мяса содержит или получен путем смешивания от 20% до 30% источника белка, от 10% до 20% источника липидов, от 0,5% до 2% NaCl, от 0,5% до 1,5% источника клетчатки и от 0,1% до 3% миоглобина в соответствии с настоящим изобретением.

Источник белка предпочтительно представляет собой текстурированный соевый белок, изолят горохового белка, белок бобов мунг, текстурированный пшеничный белок, рисовый белок или картофельный белок. В этом контексте текстурированный соевый белок представляет собой обезжиренный продукт из соевой муки, также известный как текстурированный растительный белок (TVP) или соевое мясо, как понятно специалисту в данной области.

25 Источник липидов предпочтительно представляет собой подсолнечное масло, кокосовое масло, масло канолы или масло какао.

Источник клетчатки предпочтительно представляет собой метилцеллюлозу или картофельный крахмал.

В более предпочтительном варианте осуществления заменитель мяса содержит или получен путем смешивания от 20% до 30% текстурированного соевого белка, от 10% до 20% подсолнечного масла, от 0,5% до 2% NaCl, от 0,5% до 1,5% метилцеллюлозы и от

0,1% до 10% миоглобина в соответствии с настоящим изобретением. Еще более предпочтительно весовое процентное содержание миоглобина в заменителе мяса в соответствии с более предпочтительным вариантом осуществления составляет от 0,1% до 5%, 4,9%, 4,8%, 4,7%, 4,6%, 4,5%, 4,4%, 4,3%, 4,2%, 4,1%, 4%, 3,9%, 3,8%, 3,7%, 3,6%, 3,5%, 3,4%, 3,3%, 3,2%, 3,1%, 3%, 2,95%, 2,9%, 2,85%, 2,8%, 2,75%, 2,7%, 2,65%, 2,6%, 2,55%, 2,5%, 2,45%, 2,4%, 2,35%, 2,3%, 2,25%, 2,2%, 2,15%, 2,1%, 2,05%, 2%, 1,95%, 1,9%, 1,85%, 1,8%, 1,75%, 1,7%, 1,65%, 1,6%, 1,55%, 1,5%, 1,45%, 1,4%, 1,35%, 1,3%, 1,25%, 1,2%, 1,15%, 1,1%, 1,05%, 1%, 0,95%, 0,9%, 0,85%, 0,8%, 0,75%, 0,7%, 0,65%, 0,6%, 0,55% или 0,5%.

10

20

25

30

5

В одном варианте осуществления заменитель мяса содержит или получен путем смешивания от 20% до 30% текстурированного соевого белка, от 10% до 20% подсолнечного масла, от 1% до 2% NaCl, от 0.5% до 1.5% метилцеллюлозы, от 50% до 70% воды и от 0.2% до 0.8% миоглобина.

В предпочтительном варианте осуществления заменитель мяса содержит или получен путем смешивания от 23% до 27% текстурированного соевого белка, от 13% до 17% подсолнечного масла, от 1,25% до 1,75% NaCl, от 0,75% до 1,25% метилцеллюлозы, от 55% до 60% воды и от 0,45% до 0,55% миоглобина.

В одном варианте осуществления заменитель мяса содержит или получен путем смешивания 25% текстурированного соевого белка, 15% подсолнечного масла, 1,5% NaCl, 1,0% метилцеллюлозы, 57% воды и 0,5% миоглобина, где эти значения весового процентного содержания округлены до двух значащих цифр.

В одном варианте осуществления заменитель мяса содержит или получен путем смешивания от 15% до 35% текстурированного соевого белка, от 10% до 20% подсолнечного масла, от 0.5% до 2.5% NaCl, от 0.5% до 1.5% метилцеллюлозы, от 50% до 70% воды и от 0.5% до 1.5% миоглобина.

В предпочтительном варианте осуществления заменитель мяса содержит или получен путем смешивания от 22% до 27% текстурированного соевого белка, от 13% до 17% подсолнечного масла, от 1,25% до 1,75% NaCl, от 0,75% до 1,25% метилцеллюлозы, от 50% до 60% воды и от 0,75% до 1,25% миоглобина.

В одном варианте осуществления заменитель мяса содержит или получен путем смешивания 25% текстурированного соевого белка, 15% подсолнечного масла, 1,5% NaCl,

1,0% метилцеллюлозы, 57% воды и 1,0% миоглобина, где эти значения весового процентного содержания округлены до двух значащих цифр.

В вышеприведенных заменителях мяса % относится к весовому процентному содержанию. Поскольку значения весового процентного содержания, описывающие состав заменителя мяса, не составляют в сумме 100%, предполагается добавление воды до соответствующего процентного содержания.

5

15

20

25

30

В примере 1.4 представлен пример получения заменителя мяса в соответствии с 10 настоящим изобретением.

В одном варианте осуществления заменитель мяса содержит количество биодоступного железа или гемового железа, сходное с таковым в эквивалентном натуральном мясе. В одном варианте осуществления такое количество находится в диапазоне от 0,3 до 20 мг биодоступного железа или гемового железа на 100 граммов заменителя мяса. В одном варианте осуществления такое количество находится в диапазоне от 0,1 мг до 16,5 мг, 16,17 мг, 15,84 мг, 15,51 мг, 15,18 мг, 14,85 мг, 14,52 мг, 14,19 мг, 13,86 мг, 13,53 мг, 13,2 мг, 12,87 мг, 12,54 мг, 12,21 мг, 11,88 мг, 11,55 мг, 11,22 мг, 10,89 мг, 10,56 мг, 10,23 мг, 9,9 мг, 9,735 мг, 9,57 мг, 9,405 мг, 9,24 мг, 9,075 мг, 8,91 мг, 8,745 мг, 8,58 мг, 8,415 мг, 8,25 мг, 8,085 мг, 7,92 мг, 7,755 мг, 7,59 мг, 7,425 мг, 7,26 мг, 7,095 мг, 6,93 мг, 6,765 мг, 6,6 мг, 6,435 мг, 6,27 мг, 6,105 мг, 5,94 мг, 5,775 мг, 5,61 мг, 5,445 мг, 5,28 мг, 5,115 мг, 4,95 мг, 4,785 мг, 4,62 мг, 4,455 мг, 4,29 мг, 4,125 мг, 3,96 мг, 3,795 мг, 3,63 мг, 3,465 мг, 3,3 мг, 3,135 мг, 2,97 мг, 2,805 мг, 2,64 мг, 2,475 мг, 2,31 мг, 2,145 мг, 1,98 мг, 1,815 мг или 1,65 мг биодоступного железа или гемового железа на 100 граммов заменителя мяса. В другом варианте осуществления такое количество составляет 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1, 1, 1, 2, 1, 3, 1, 4, 1, 5, 1, 6, 1, 7, 1, 8, 1, 9, 2, 2, 1, 2, 2, 2, 3, 2, 4, 2, 5, 2, 6, 2, 7, 2, 8, 2, 9, 3, 3, 1, 3, 2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10, 10,1, 10,2, 10,3, 10,4, 10,5, 10,6, 10,7, 10,8, 10,9, 11, 11,1, 11,2, 11,3, 11,4, 11,5, 11,6, 11,7, 11,8, 11,9, 12, 12,1, 12,2, 12,3, 12,4, 12,5, 12,6, 12,7, 12,8, 12,9, 13, 13,1, 13,2, 13,3, 13,4, 13,5, 13,6, 13,7, 13,8, 13,9, 14, 14,1, 14,2, 14,3, 14,4, 14,5, 14,6, 14,7, 14,8, 14,9, 15, 15,1, 15,2, 15,3, 15,4, 15,5, 15,6, 15,7, 15,8, 15,9, 16, 16,1, 16,2, 16,3, 16,4, 16,5, 16,6, 16,7, 16,8, 16,9, 17, 17,1, 17,2,

17,3, 17,4, 17,5, 17,6, 17,7, 17,8, 17,9, 18, 18,1, 18,2, 18,3, 18,4, 18,5, 18,6, 18,7, 18,8, 18,9, 19, 19,1, 19,2, 19,3, 19,4, 19,5, 19,6, 19,7, 19,8, 19,9 или 20 мг биодоступного железа или гемового железа на 100 граммов заменителя мяса.

- 5 В одном варианте осуществления аминокислотная последовательность миоглобина животного происхождения, указанная ранее данном документе, содержит последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по 10 меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, 15 по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью или сходством с последовательностями, указанными ранее в данном документе, в комбинации с по меньшей мере одной из следующих комбинаций аминокислот:
 - F в положении 30, и/или
 - Q в положении 65, и/или
- 20 Н в положении 92, и/или
 - Н в положении 94, и/или
 - F в положении 30 и Q в положении 65, и/или
 - F в положении 30 и Н в положении 92, и/или
 - F в положении 30 и Н в положении 94, и/или
- 25 Ов положении 65 и Н в положении 92, и/или
 - Q в положении 65 и H в положении 94, и/или
 - Н в положении 92 и Н в положении 94, и/или
 - F в положении 30, и Q в положении 65, и H в положении 92, и/или
 - F в положении 30, и Q в положении 65, и H в положении 94, и/или
- 30 F в положении 30, и Н в положении 92, и Н в положении 94, и/или
 - Q в положении 65, и Н в положении 92, и Н в положении 94, и/или
 - F в положении 30, и Q в положении 65, и H в положении 92, и H в положении 94.

В одном варианте осуществления аминокислотная последовательность миоглобина происхождения, животного указанная ранее в данном документе, последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью или сходством с последовательностями, указанными ранее в данном документе, в комбинации с Q или Н в положении 65 и Н в положении 94 для каждой из указанных последовательностей, предпочтительно дополнительно в комбинации с І в положении 143.

15

20

25

10

5

В одном варианте осуществления аминокислотная последовательность миоглобина животного происхождения, указанная ранее в содержит данном документе, последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью или сходством с последовательностями, указанными ранее в данном документе, в комбинации с Q или Н в положении 65. О в положении 92 и Н в положении 94 для каждой из указанных последовательностей, предпочтительно дополнительно в комбинации с І в положении 143.

30

В одном варианте осуществления аминокислотная последовательность миоглобина животного происхождения, указанная ранее в данном документе, содержит последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 70%, по меньшей мере

71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью или сходством с последовательностями, указанными ранее в данном документе, в комбинации с Q или H в положении 65, H в положении 92 и H в положении 94 для каждой из указанных последовательностей, предпочтительно дополнительно в комбинации с I в положении 143.

5

10

15

20

25

30

В одном варианте осуществления аминокислотная последовательность миоглобина происхождения, указанная ранее в данном документе, последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью или сходством с последовательностями, указанными ранее в данном документе, в комбинации с Н в положении 92 для каждой из указанных последовательностей, предпочтительно дополнительно в комбинации с І в положении 143.

В одном варианте осуществления заменитель мяса или пищевой ингредиент содержит миоглобин, который представлен аминокислотной последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1 в комбинации с Q или H в положении 65 и H в положении 94 и необязательно имеющей по меньшей мере одну из следующих аминокислот в следующих местах в SEQ ID NO: 1: Е в положении 9, К в положении 13, Т в положении 14, Р в положении 23, L в

5

10

15

20

25

30

положении 27, V в положении 31, G в положении 54, Q в положении 65, V в положении 67, Q в положении 84, Q в положении 88, I в положении 102 и/или Е в положении 123. В одном варианте осуществления заменитель мяса или пищевой ингредиент содержит миоглобин, который представлен аминокислотной последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 2 или 3 в комбинации с Q или H в положении 65 и H в положении 94 и необязательно имеющей по меньшей мере одну из следующих аминокислот в следующих местах в SEQ ID NO: 2 или 3: Е в положении 9, К в положении 13, Т в положении 14, Р в положении 23, L в положении 27, V в положении 31, G в положении 54, Q в положении 65, V в положении 67, Q в положении 84, Q в положении 88, I в положении 102, Е в положении 123 и/или I в положении 143. Аминокислотная последовательность указанного миоглобина животного происхождения предпочтительно содержит последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью или сходством с SEQ ID NO: 1, 2 или 3 в комбинации с Q или H в положении 65 и H в положении 94. SEQ ID NO: 1 является частью миоглобина мамонта. SEQ ID NO: 2 и 3 представляют собой миоглобины мамонтов. В одном варианте осуществления заменитель мяса содержит миоглобин, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1. В одном варианте осуществления заменитель мяса содержит миоглобин мамонта, представленный аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 2 или 3. Ожидается, что такой миоглобин будет обладать привлекательными свойствами, поскольку этот миоглобин является стабильным к окислению, особенно при низком рН. Ожидается, что цвет заменителя мяса по настоящему изобретению будет стабильным, поскольку миоглобин мамонта устойчив к окислению. Эта стабильность к окислению также обеспечивает дополнительные полезные для здоровья свойства заменителя мяса по настоящему

изобретению, поскольку он с меньшей вероятностью превратится в канцерогенный продукт, чем натуральное мясо.

5

10

15

20

25

30

В одном варианте осуществления заменитель мяса или пищевой ингредиент содержит миоглобин, который представлен аминокислотной последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 2 в комбинации с Q или H в положении 65, Q в положении 92 и H в положении 94 и необязательно имеющей по меньшей мере одну из следующих аминокислот в следующих местах в SEQ ID NO: 2: Е в положении 9, К в положении 13, Т в положении 14, Р в положении 23, L в положении 27, V в положении 31, G в положении 54, Q в положении 65, V в положении 67, Q в положении 84, Q в положении 88, I в положении 102 и/или Е в положении 123. Аминокислотная последовательность указанного миоглобина животного происхождения предпочтительно содержит последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью или сходством с SEQ ID NO: 2 в комбинации с Q или H в положении 65, Q в положении 92 и H в положении 94. SEQ ID NO: 2 представляет собой миоглобин шерстистого мамонта. В одном варианте осуществления заменитель мяса аминокислотной содержит миоглобин шерстистого мамонта, представленный последовательностью под SEQ ID NO: 2. Ожидается, что этот миоглобин будет обладать привлекательными свойствами, поскольку этот миоглобин является стабильным к окислению, особенно при низком рН. Ожидается, что цвет заменителя мяса по настоящему изобретению будет стабильным, поскольку миоглобин шерстистого мамонта Эта стабильность к окислению окислению. также обеспечивает дополнительные полезные для здоровья свойства заменителя мяса по настоящему изобретению, поскольку он с меньшей вероятностью превратится в канцерогенный продукт, чем натуральное мясо.

5

10

15

20

25

30

В одном варианте осуществления заменитель мяса или пищевой ингредиент содержит миоглобин, который представлен аминокислотной последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 3 в комбинации с Q или H в положении 65, H в положении 92 и H в положении 94 и необязательно имеющей по меньшей мере одну из следующих аминокислот в следующих местах в SEQ ID NO: 3: Е в положении 9, К в положении 13, Т в положении 14, Р в положении 23, L в положении 27, V в положении 31, G в положении 54, Q в положении 65, V в положении 67, Q в положении 84, Q в положении 88, I в положении 102 и/или Е в положении 123. Аминокислотная последовательность указанного миоглобина животного происхождения предпочтительно содержит последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью или сходством с SEQ ID NO: 3 в комбинации с Q или H в положении 65, Н в положении 92 и Н в положении 94. SEQ ID NO: 3 представляет собой миоглобин степного мамонта. В одном варианте осуществления заменитель мяса представленный содержит миоглобин степного мамонта, аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 3. Ожидается, что этот миоглобин будет обладать привлекательными свойствами, поскольку этот миоглобин является стабильным к окислению, особенно при низком рН. Ожидается, что цвет заменителя мяса по настоящему изобретению будет стабильным, поскольку миоглобин степного мамонта Эта стабильность к окислению устойчив к окислению. также обеспечивает дополнительные полезные для здоровья свойства заменителя мяса по настоящему изобретению, поскольку он с меньшей вероятностью превратится в канцерогенный продукт, чем натуральное мясо.

В одном варианте осуществления заменитель мяса или пищевой ингредиент содержит миоглобин, который представлен аминокислотной последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью или сходством с SEQ ID NO: 3 в комбинации с F в положении 30.

5

10

15

20

В одном варианте осуществления заменитель мяса или пищевой ингредиент содержит миоглобин, который представлен аминокислотной последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью или сходством с SEQ ID NO: 3 в комбинации с Q в положении 65.

В одном варианте осуществления заменитель мяса или пищевой ингредиент содержит миоглобин, который представлен аминокислотной последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью или сходством с SEQ ID NO: 3 в комбинации с Н в положении 92.

В одном варианте осуществления заменитель мяса или пищевой ингредиент содержит миоглобин, который представлен аминокислотной последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью или сходством с SEQ ID NO: 3 в комбинации с Н в положении 94.

В одном варианте осуществления заменитель мяса или пищевой ингредиент содержит миоглобин, который представлен аминокислотной последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью или сходством с SEQ ID NO: 3 в комбинации с F в положении 30 и Q в положении 65.

В одном варианте осуществления заменитель мяса или пищевой ингредиент содержит миоглобин, который представлен аминокислотной последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%,

79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью или сходством с SEQ ID NO: 3 в комбинации с F в положении 30 и H в положении 92.

В одном варианте осуществления заменитель мяса или пищевой ингредиент содержит миоглобин, который представлен аминокислотной последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью или сходством с SEQ ID NO: 3 в комбинации с F в положении 30 и H в положении 94.

5

20

25

30

В одном варианте осуществления заменитель мяса или пищевой ингредиент содержит миоглобин, который представлен аминокислотной последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью или сходством с SEQ ID NO: 3 в комбинации с Q в положении 65 и H в положении 92.

В одном варианте осуществления заменитель мяса или пищевой ингредиент содержит миоглобин, который представлен аминокислотной последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью или сходством с SEQ ID NO: 3 в комбинации с Q в положении 65 и H в положении 94.

В одном варианте осуществления заменитель мяса или пищевой ингредиент содержит миоглобин, который представлен аминокислотной последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью или сходством с SEQ ID NO: 3 в комбинации с Н в положении 92 и Н в положении 94.

В одном варианте осуществления заменитель мяса или пищевой ингредиент содержит миоглобин, который представлен аминокислотной последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью или сходством с SEQ ID NO: 3 в комбинации с F в положении 30, и Q в положении 65, и H в положении 92.

В одном варианте осуществления заменитель мяса или пищевой ингредиент содержит миоглобин, который представлен аминокислотной последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью или сходством с SEQ ID NO: 3 в комбинации с F в положении 30, и Q в положении 65, и H в положении 94.

5

10

15

20

25

30

В одном варианте осуществления заменитель мяса или пищевой ингредиент содержит миоглобин, который представлен аминокислотной последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью или сходством с SEQ ID NO: 3 в комбинации с F в положении 30, и H в положении 92, и H в положении 94.

В одном варианте осуществления заменитель мяса или пищевой ингредиент содержит миоглобин, который представлен аминокислотной последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью или сходством с SEQ ID NO: 3 в комбинации с Q в положении 65, и H в положении 92, и H в положении 94.

В одном варианте осуществления заменитель мяса или пищевой ингредиент содержит миоглобин, который представлен аминокислотной последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью или сходством с SEQ ID NO: 3 в комбинации с F в положении 30, и Q в положении 65, и H в положении 92, и H в положении 94.

В одном варианте осуществления заменитель мяса содержит миоглобин степного мамонта, представленный аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 3. Ожидается, что такой миоглобин будет обладать привлекательными свойствами, поскольку этот миоглобин является стабильным к окислению, особенно при низком рН. Ожидается, что цвет заменителя мяса по настоящему изобретению будет стабильным, поскольку миоглобин мамонта устойчив к окислению. Эта стабильность к окислению также обеспечивает дополнительные полезные для здоровья свойства заменителя мяса по

настоящему изобретению, поскольку он с меньшей вероятностью превратится в канцерогенный продукт, чем натуральное мясо и/или чем заменитель мяса, не содержащий миоглобин степного мамонта, представленный аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 3. В примере 2.4 представлены анализы цвета миоглобина степного мамонта в соответствии с настоящим изобретением и заменителя мяса в соответствии с настоящим изобретением, содержащего миоглобин степного мамонта. Кроме того, в примере 2.5 представлен анализ ароматических веществ заменителя мяса, а в примере 2.6 представлен анализ пищевой ценности миоглобина, в котором оценивается биодоступность железа.

10

15

5

В одном варианте осуществления заменитель мяса не содержит одного или нескольких молочных белков, выбранных из группы, состоящей из β -казеина, κ -казеина, α -S2-казеина, α -лактальбумина, β -лактоглобулина, лактоферрина и трансферрина, где указанный молочный белок получен из шерстистого мамонта. В другом варианте осуществления заменитель мяса не содержит одного или нескольких молочных белков, выбранных из группы, состоящей из β -казеина, κ -казеина, α -S1-казеина, α -S2-казеина, α -лактальбумина, β -лактоглобулина, лактоферрина и трансферрина, где указанный молочный белок получен из мамонта.

20 В одном варианте осуществления заменитель мяса не содержит одного или нескольких молочных белков, выбранных из группы, состоящей из β-казеина, к-казеина, α-S1-казеина, α-S2-казеина, α-лактальбумина, β-лактоглобулина, лактоферрина и трансферрина, где указанный молочный белок не был продуцирован млекопитающим или клеткой млекопитающего.

25

30

В более предпочтительном варианте осуществления заменитель мяса не содержит молочный белок, такой как β -казеин, κ -казеин, α -S1-казеин, α -S2-казеин, α -лактальбумин, β -лактоглобулин, лактоферрин или трансферрин, где указанный молочный белок получен из шерстистого мамонта. В другом более предпочтительном варианте осуществления заменитель мяса не содержит молочный белок, такой как β -казеин, κ -казе

В другом более предпочтительном варианте осуществления он не содержит молочный белок, такой как β -казеин, κ -казеин, α -S1-казеин, α -S2-казеин, α -лактальбумин, β -лактоглобулин, лактоферрин или трансферрин, где указанный молочный белок не был продуцирован млекопитающим или клеткой млекопитающего.

5

10

15

25

30

В одном варианте осуществления заменитель мяса не содержит к-казеин шерстистого мамонта. В дополнительном варианте осуществления заменитель мяса не содержит белок, представленный последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 17. В дополнительном варианте осуществления заменитель мяса не содержит белок, представленный под SEQ ID NO: 17.

В одном варианте осуществления заменитель мяса не содержит β-казеин шерстистого мамонта. В дополнительном варианте осуществления заменитель мяса не содержит белок, представленный последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 18. В дополнительном варианте осуществления заменитель мяса не содержит белок, представленный под SEQ ID NO: 18.

20 Мясо

Во втором аспекте предусмотрен мясной продукт, содержащий миоглобин животного происхождения, предпочтительно миоглобин млекопитающего, более предпочтительно из мамонта, свиньи, овцы или коровы, где более предпочтительно указанный мамонт является шерстистым мамонтом (*Mammuthus primigenius*) или степным мамонтом (*Mammuthus trogontherii*), предпочтительно степным мамонтом, или миоглобин птицы, предпочтительно из курицы, или миоглобин рыбы, предпочтительно из тунца, или миоглобин, являющийся его производным; где указанный миоглобин животного происхождения не был продуцирован животным, из которого получен указанный мясной продукт, или какими-либо содержащимися в нем клетками. Другими словами, мясной продукт получен из животного, но содержит миоглобин, который в нем не продуцируется.

В одном варианте осуществления предусмотрен мясной продукт, содержащий экзогенный миоглобин, предпочтительно экзогенный миоглобин животного происхождения, более

предпочтительно из мамонта, свиньи, овцы или коровы, где более предпочтительно указанный мамонт является шерстистым мамонтом (*Mammuthus primigenius*) или степным мамонтом (*Mammuthus trogontherii*), предпочтительно степным мамонтом, или миоглобин птицы, предпочтительно из курицы, или миоглобин рыбы, предпочтительно из тунца. В данном документе экзогенный миоглобин определяется как миоглобин, не присутствующий эндогенно в указанном мясе.

В одном варианте осуществления миоглобин в мясном продукте в вышеприведенных вариантах осуществления представлен одной из следующих аминокислотных последовательностей:

- a) характеризующейся по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 3 и имеющей по меньшей мере одну из следующих комбинаций аминокислот:
- о Q в положении 65, и/или
- 15 Н в положении 92, и/или

5

10

- о Н в положении 94, и/или
- о F в положении 30 и Q в положении 65, и/или
- о F в положении 30 и H в положении 92, и/или
- о F в положении 30 и H в положении 94, и/или
- 20 О В положении 65 и Н в положении 92, и/или
 - о Q в положении 65 и H в положении 94, и/или
 - О Н в положении 92 и Н в положении 94, и/или
 - о F в положении 30, и Q в положении 65, и H в положении 92, и/или
 - F в положении 30, и Q в положении 65, и H в положении 94, и/или
- - О О В положении 65, и Н в положении 92, и Н в положении 94, и/или
 - F в положении 30, и Q в положении 65, и H в положении 92, и H в положении 94;
- b) характеризующейся по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 2 или 3, имеющей Q или H в положении 65 и H в положении 94 и необязательно имеющей по меньшей мере одну из следующих аминокислот в следующих местах в SEQ ID NO: 2 или 3: Е в положении 9, К в положении 13, Т в положении 14, Р в положении 23, L в положении 27, V в положении 31, G в положении 54, Q в положении

- 65, V в положении 67, Q в положении 84, Q в положении 88, I в положении 102, E в положении 123 и/или I в положении 143;
- с) характеризующейся по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1, имеющей Q или H в положении 65 и H в положении 94 и необязательно имеющей по меньшей мере одну из следующих аминокислот в следующих местах в SEQ ID NO: 1: Е в положении 9, К в положении 13, Т в положении 14, Р в положении 23, L в положении 27, V в положении 31, G в положении 54, Q в положении 65, V в положении 67, Q в положении 84, Q в положении 88, I в положении 102 и/или E в положении 123;

5

10

15

20

30

- d) характеризующейся по меньшей мере 70% идентичностью с SEQ ID NO: 4, 5 или 6, имеющей Q или H в положении 65 и H в положении 94 и необязательно имеющей по меньшей мере одну из следующих аминокислот в следующих местах в SEQ ID NO: 4, 5 или 6: N в положении 13, Q в положении 27, I в положении 31, N в положении 67, A в положении 128, S в положении 133, A в положении 145 и/или L в положении 150;
- е) характеризующейся по меньшей мере 70% идентичностью с SEQ ID NO: 7, имеющей Q или H в положении 65 и H в положении 94 и необязательно имеющей по меньшей мере одну из следующих аминокислот в следующих местах в SEQ ID NO: 7: Q в положении 6, Q в положении 10, T в положении 13, I в положении 14, H в положении 27, M в положении 31, H в положении 35, D в положении 36, D в положении 42, R в положении 43, G в положении 49, P в положении 53, Q в положении 55, G в положении 58, A в положении 67, Q в положении 72, K в положении 75, Q в положении 79, N в положении 82, S в положении 85, T в положении 93, V в положении 111, I в положении 116, A в положении 117, E в положении 118, A в положении 121, S в положении 128, K в положении 133, S в положении 145 и/или F в положении 150; или
- f) характеризующейся по меньшей мере 70% идентичностью с SEQ ID NO: 8, имеющей Q или H в положении 65 и H в положении 94.

В одном варианте осуществления предусмотрен мясной продукт, содержащий миоглобин, где концентрация миоглобина в указанном мясном продукте выше, чем средняя концентрация миоглобина в мясе, из которого получен указанный мясной продукт. В данном документе концентрацию миоглобина следует интерпретировать как общую концентрацию всех вариантов миоглобина. Средняя концентрация миоглобина в мясе, из которого получен указанный мясной продукт, означает среднюю концентрацию

миоглобина в указанном мясе, определенную для нескольких соответствующих животных, где экзогенный миоглобин после сбора не добавлялся.

Миоглобин

5 В третьем аспекте в настоящем изобретении предусмотрен белок, который может быть представлен последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 3.

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрен белок, который может быть представлен последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 3, где длина указанной последовательности составляет 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299 или 300 аминокислотных остатков.

- В предпочтительном варианте осуществления предусмотрен белок, который может быть представлен последовательностью, состоящей из SEQ ID NO: 3 и концевой последовательности на N-конце SEQ ID NO: 3. Длина указанной концевой последовательности предпочтительно составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 аминокислотных остатков.
- В альтернативном варианте осуществления предусмотрен белок, который может быть представлен последовательностью, состоящей из SEQ ID NO: 3 и концевой последовательности на С-конце SEQ ID NO: 3. Длина указанной концевой последовательности предпочтительно составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40,

41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 аминокислотных остатков.

5 В предпочтительном варианте осуществления предусмотрен белок, который может быть представлен последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 3 и метку или состоящей из них, где предпочтительно указанная метка представляет собой полигистидиновую метку.

В предпочтительном варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен миоглобин, где указанный миоглобин получен из степного мамонта, где предпочтительно указанный миоглобин может быть представлен под SEQ ID NO: 3. Миоглобин может быть предназначен для применения в заменителе мяса, пищевом ингредиенте или мясном продукте, описанном выше.

15 В примере 2.2 исследуются структурные характеристики миоглобина, представленного под SEQ ID NO:3. В частности, показано, что SEQ ID NO: 3 неожиданно соответствует более высокому положительному поверхностному заряду по сравнению с другими миоглобинами. He ограничиваясь этой теорией, полагают, что миоглобин, представленный под SEQ ID NO: 3, может, следовательно, характеризоваться 20 повышенной стабильностью и пониженной склонностью к агрегации. Это было бы преимущественным для применения этих миоглобинов в заменителе мяса, пищевом ингредиенте или мясном продукте, описанном выше.

В настоящем изобретении дополнительно предусмотрена композиция, содержащая белок 25 в соответствии с этим третьим аспектом, как описано выше.

Нуклеиновая кислота

30

В четвертом аспекте в настоящем изобретении предусмотрена нуклеиновая кислота, где указанная нуклеиновая кислота может быть представлена последовательностью, содержащей подпоследовательность, кодирующую белок, который может быть представлен под SEQ ID NO: 3, где предпочтительно указанная подпоследовательность может быть представлена под SEQ ID NO: 11.

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена нуклеиновая кислота, которая может быть представлена последовательностью, содержащей подпоследовательность, кодирующую белок, который может быть представлен под SEQ ID NO: 3, где предпочтительно указанная подпоследовательность может быть представлена под SEQ ID NO: 11, где длина указанной нуклеиновой кислоты составляет 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 539, 540, 541, 542, 543, 544, 545, 546, 547, 548, 549, 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556, 557, 558, 559, 560, 561, 562, 563, 564, 565, 566, 567, 568, 569, 570, 571, 572, 573, 574, 575, 576, 577, 578, 579, 580, 581, 582, 583, 584, 585, 586, 587, 588, 589, 590, 591, 592, 593, 594, 595, 596, 597, 598, 599 или 600 оснований.

5

10

30

15 В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена нуклеиновая кислота, которая может быть представлена последовательностью, содержащей подпоследовательность, кодирующую белок, который может быть представлен под SEQ ID NO: 3, где предпочтительно указанная подпоследовательность может быть представлена под SEQ ID NO: 11, и концевую последовательность на 5'-конце указанной 20 подпоследовательности. Длина указанной подпоследовательности предпочтительно составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 25 оснований.

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена нуклеиновая кислота, которая может быть представлена последовательностью, содержащей подпоследовательность, кодирующую белок, который может быть представлен под SEQ ID NO: 3, где предпочтительно указанная подпоследовательность может быть представлена под SEQ ID NO: 11, и концевую последовательность на 3'-конце указанной подпоследовательности. Длина указанной подпоследовательности предпочтительно составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25,

26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 оснований.

5

10

20

30

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена нуклеиновая кислота, где указанная нуклеиновая кислота кодирует миоглобин степного мамонта, где предпочтительно указанный миоглобин может быть представлен под SEQ ID NO: 3, где наиболее предпочтительно указанная нуклеиновая кислота может быть представлена под SEO ID NO: 11.

В настоящем изобретении дополнительно предусмотрена композиция, содержащая нуклеиновую кислоту в соответствии с этим четвертым аспектом, как описано выше.

15 Генная конструкция

В пятом аспекте предусмотрена генная конструкция, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую миоглобин, определенный ранее в данном документе.

"Генная конструкция", описанная в данном документе, имеет свое обычное и общепринятое значение, понятное специалисту в данной области с учетом настоящего раскрытия. "Генная конструкция" также может называться "экспрессионной кассетой" или "экспрессионной конструкцией" и относится к гену или группе генов, включая ген, кодирующий представляющий интерес белок, который функционально связан с промотором, контролирующим его экспрессию. Часть настоящей заявки, озаглавленная "Общая информация", содержит более подробную информацию о "генной конструкции".

25 Как используется в данном документе, "функционально связанный" дополнительно описан в части настоящей заявки, озаглавленной "Общая информация".

Нуклеотидная последовательность, кодирующая миоглобин животного происхождения, может быть получена из любого гена миоглобина животного происхождения или последовательности, кодирующей миоглобин животного происхождения, предпочтительно гена миоглобина животного происхождения или последовательности, кодирующей миоглобин животного происхождения, из мамонта, свиньи, овцы, коровы, курицы или тунца; или мутантного гена миоглобина животного происхождения или

последовательности, кодирующей миоглобин животного происхождения, предпочтительно из мамонта, свиньи, овцы, коровы, курицы или тунца.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления предпочтительная нуклеотидная последовательность, кодирующая миоглобин животного происхождения, кодирует представленный аминокислотной последовательностью, полипептид, содержащей последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью или сходством с SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 и имеет соответствующие аминокислоты в положениях, указанных в данном документе ранее (т. е. в комбинации с Q или Н в положении 65 и Н в положении 94). Необязательные аминокислотные положения также могут быть приняты во внимание.

- В осуществления некоторых вариантах предпочтительная нуклеотидная последовательность, кодирующая миоглобин животного происхождения, кодирует полипептид, представленный аминокислотной последовательностью, содержащей последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью или сходством с SEQ ID NO: 3 и имеет по меньшей мере одну из следующих комбинаций аминокислот:
 - F в положении 30, и/или

5

10

15

20

25

30

- Q в положении 65, и/или
- Н в положении 92, и/или
- Н в положении 94, и/или

15

20

25

30

- F в положении 30 и Q в положении 65, и/или
- 5 F в положении 30 и Н в положении 92, и/или
 - F в положении 30 и Н в положении 94, и/или
 - Q в положении 65 и H в положении 92, и/или
 - Q в положении 65 и H в положении 94, и/или
 - Н в положении 92 и Н в положении 94, и/или
- 10 F в положении 30, и Q в положении 65, и H в положении 92, и/или
 - F в положении 30, и Q в положении 65, и H в положении 94, и/или
 - F в положении 30, и Н в положении 92, и Н в положении 94, и/или
 - Q в положении 65, и Н в положении 92, и Н в положении 94, и/или
 - F в положении 30, и Q в положении 65, и H в положении 92, и H в положении 94.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая миоглобин животного происхождения, присутствующая в генной конструкции в соответствии с настоящим изобретением, характеризуется по меньшей мере 60%, по меньшей мере 61%, по меньшей мере 62%, по меньшей мере 63%, по меньшей мере 64%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 66%, по меньшей мере 67%, по меньшей мере 68%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей

Описание терминов "идентичность" или "идентичность последовательностей" и "сходство" или "сходство последовательностей" приведено в разделе, озаглавленном "Общая информация".

В некоторых вариантах осуществления предусмотрена генная конструкция, описанная в данном документе, где нуклеотидная последовательность, кодирующая миоглобин животного происхождения, выбрана из группы, состоящей из:

5

10

15

20

25

30

- (а) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, представленный аминокислотной последовательностью, содержащей последовательность, характеризуется по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью или сходством последовательности c аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 и в комбинации с Q или H в положении 65 и Н в положении 94. Необязательные аминокислотные положения также могут быть приняты во внимание;
 - (b) нуклеотидной последовательности, характеризующейся по меньшей мере 60%, по меньшей мере 61%, по меньшей мере 62%, по меньшей мере 63%, по меньшей мере 64%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 66%, по меньшей мере 67%, по меньшей мере 68%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере
 - (с) нуклеотидной последовательности, которая отличается от последовательности нуклеотидной последовательности из (b) вследствие вырожденности генетического кода.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрена генная конструкция, описанная в данном документе, где нуклеотидная последовательность, кодирующая миоглобин животного происхождения, выбрана из группы, состоящей из:

- (а) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, представленный содержащей аминокислотной последовательностью, последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью или сходством последовательности c аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 3 и имеет по меньшей мере одну из следующих комбинаций аминокислот:
- F в положении 30, и/или

5

10

15

- Q в положении 65, и/или
- Н в положении 92, и/или
- Н в положении 94, и/или
- 20 F в положении 30 и Q в положении 65, и/или
 - F в положении 30 и Н в положении 92, и/или
 - F в положении 30 и Н в положении 94, и/или
 - Q в положении 65 и Н в положении 92, и/или
 - Q в положении 65 и H в положении 94, и/или
- 25 Н в положении 92 и Н в положении 94, и/или
 - F в положении 30, и Q в положении 65, и H в положении 92, и/или
 - F в положении 30, и Q в положении 65, и H в положении 94, и/или
 - F в положении 30, и Н в положении 92, и Н в положении 94, и/или
 - Q в положении 65, и H в положении 92, и H в положении 94, и/или
- 30 F в положении 30, и Q в положении 65, и H в положении 92, и H в положении 94;
 - (b) нуклеотидной последовательности, характеризующейся по меньшей мере 60%, по меньшей мере 61%, по меньшей мере 62%, по меньшей мере 63%, по меньшей мере 64%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 66%, по меньшей мере 67%, по меньшей мере

68%, по меньшей мере 69%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с нуклеотидной последовательностью под SEO ID NO: 11:

5

10

15

20

25

30

(с) нуклеотидной последовательности, которая отличается от последовательности нуклеотидной последовательности из (b) вследствие вырожденности генетического кода.

Миоглобин животного происхождения, кодируемый нуклеотидными последовательностями, описанными в данном документе, или полученный из миоглобина животного происхождения, описанного в данном документе, проявляет по меньшей мере поддающийся обнаружению уровень активности миоглобина животного происхождения, как известно специалисту в данной области.

Активность миоглобина животного происхождения может заключаться в транспортировке железа с помощью его гемового домена. Эту активность можно оценить посредством способов, известных специалисту в данной области, например, как определено в данном документе ранее.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрена генная конструкция, описанная в данном документе, где нуклеотидная последовательность, кодирующая миоглобин животного происхождения, выбрана из SEQ ID NO: 19, 20, 21, 22, 23 и 24.

В данном документе SEQ ID NO: 19 представляет собой нуклеотидную последовательность, кодирующую миоглобин степного мамонта, представленный под SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 20 представляет собой нуклеотидную последовательность, кодирующую миоглобин овцы, представленный под SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 21 представляет собой нуклеотидную последовательность, кодирующую миоглобин крупного рогатого скота, представленный под SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 22 представляет собой нуклеотидную последовательность, кодирующую миоглобин свиньи,

представленный под SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 23 представляет собой нуклеотидную последовательность, кодирующую миоглобин курицы, представленный под SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 24 представляет собой нуклеотидную последовательность, кодирующую миоглобин тунца, представленный под SEQ ID NO: 8, где эти нуклеотидные последовательности являются кодон-оптимизированными для экспрессии в *Pichia pastoris* (*Котаgataella phaffii*). Оптимизация кодонов подробно описана в примере 2.1.

5

10

15

20

25

В некоторых вариантах осуществления генная конструкция дополнительно содержит регуляторную область. В одном варианте осуществления генная конструкция дополнительно содержит промотор. В одном варианте осуществления генная конструкция содержит промотор, терминатор и необязательно сигнальный пептид. Генная конструкция может также содержать маркер. Как используется в данном документе, сигнальный пептид предпочтительно облегчает выведение экспрессируемого миоглобина. Специалисту в данной области известно, что в зависимости от используемой клеткихозяина отличительные особенности регуляторных областей и маркеров должны быть оптимизированы.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрена генная конструкция, описанная в данном документе, где генная конструкция представлена под SEQ ID NO: 25, 26, 27, 28, 29 или 30.

В данном документе SEQ ID NO: 25-30 представляют собой генные конструкции, кодоноптимизированные для экспрессии в *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*), содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую миоглобин степного мамонта, представленную под SEQ ID NO: 19-24 соответственно, и сигнальный пептид фактора спаривания альфа *Saccharomyces cerevisiae*. Другими словами, SEQ ID NO: 25-30 соответствуют генным конструкциям для экспрессии миоглобина степного мамонта, овцы, крупного рогатого скота, свиньи, курицы и тунца соответственно. Оптимизация кодонов подробно описана в примере 2.1.

30 Например, если в качестве клетки-хозяина используется бактерия (предпочтительно E. coli), можно использовать следующие регуляторные области. Промотором, подходящим для использования в бактериях, является lac, trp, tac, T7 (используемый в примере), phoA, ara, xapA, cad, recA, spc, bla, P1 и P2 из оперона рибосомной PHK rrnB, промотор P^L из

фага λ . Терминатором, подходящим для использования в бактериях, является lac, trp, tac, T7 (используемый в примере), phoA, ara, харA, cad, recA, spc, bla, P1 и P2 из оперона рибосомной РНК rrnB, терминатор P^L из фага λ . Предпочтительным используемым промотором является промотор T7, и/или предпочтительным терминатором является терминатор T7. Предпочтительным сигнальным пептидом для выведения является Sec-распознающий пептид (SecA) *E. coli*, Tet-распознающий пептид E. coli, dsbA *E. coli*, phoA E. coli, pelB E. coli, MBP (мальтозосвязывающий белок) E. coli. Маркером, подходящим для *E. coli*, является ампициллин. В качестве альтернативы для облегчения отбора без антибиотиков можно использовать оперон *proBA* из штамма K12 *E. coli*, содержащий его исходные элементы регуляции транскрипции.

5

10

15

20

25

30

В другом примере, если в качестве клетки-хозяина используются дрожжи, можно использовать следующие регуляторные области. Промотор, подходящий для использования в дрожжах, может являться конститутивным промотором. Примеры подходящих конститутивных промоторов включают промотор, участвующий в гликолизе, выбранный из гена FBA1, TPI1, PGK1, PYK1, TDH3, ENO2, HXK2, PGI1, PFK1, PFK2, GPM1, или промотор, не участвующий в гликолизе, из гена TEF2.

Подходящий промотор для использования в дрожжах может быть индуцируемым. Если дрожжи представляют собой *Pichia*, предпочтительным является индуцируемый метанолом промотор AOX1. В противном случае можно использовать промотор GAL1 (индуцируемый галактозой), если дрожжи представляют собой *S. cerevisiae*. Упомянутые гены, из которых можно получить промотор для дрожжей в качестве клетки-хозяина, можно также использовать для получения терминатора для тех же дрожжей. Предпочтительный сигнальный пептид для выведения из *Pichia* (и *Saccharomyces*) включает препропептид, являющийся сигналом секреции фактора спаривания альфа *S. cerevisiae*, сигнальный пептид Ost1 *S. cerevisiae*, сигнальный пептид Aga2 *S. cerevisiae* и их продукты слияния.

В примере 2.1 описывается синтез генной конструкции, кодирующей миоглобин, определенный ранее в данном документе. В данном примере AOX1 используется для экспрессии в штамме GS115 *Pichia pastoris*.

В другом примере, если в качестве клетки-хозяина используется нитчатый гриб, можно использовать следующие регуляторные области. Можно использовать следующие

промоторы: промотор гена глюкоамилазы Aspergillus miger (glaA), промотор гена алкогольдегидрогеназы Aspergillus midulans (alcA) или промотор гена така-амилазы A Aspergillus oryzae (amyB), промотор гена алкогольдегидрогеназы Aspergillus miger (adhA), промотор гена пируваткиназы Trichoderma reesei (pki) или промотор гена глицеральдегид3-фосфатдегидрогеназы Aspergillus midulans (gpdA). Упомянутые гены, из которых можно получить промотор для нитчатого гриба в качестве клетки-хозяина, можно также использовать для получения терминатора для того же нитчатого гриба. Предпочтительный сигнальный пептид для выведения из нитчатых грибов, предпочтительно Aspergillus, включает сигнальный пептид глюкоамилазы Aspergillus niger (glaA), сигнальный пептид а-галактозидазы Aspergillus niger (AglB) и целлобиогидролазы I Trichoderma reesei (CbhI). Предпочтительным промотором и терминатором для Aspergillus (более предпочтительно для Aspergillus niger) являются промотор гена глюкоамилазы и терминатор гена глюкоамилазы Aspergillus niger.

15 Вектор экспрессии

Описанные в данном документе генные конструкции могут быть помещены в векторы экспрессии. Таким образом, в другом аспекте предусмотрен вектор экспрессии, содержащий генную конструкцию, описанную в любом из предыдущих вариантов осуществления.

Описание "вектора экспрессии" приведено в разделе, озаглавленном "Общая информация".

Композиция

25

20

5

10

В дополнительном аспекте предусмотрена композиция, содержащая генную конструкцию, описанную выше, и/или вектор экспрессии, описанный выше, необязательно дополнительно содержащая один или несколько ингредиентов.

30 Клетка-хозяин

В дополнительном аспекте предусмотрена клетка-хозяин, содержащая генную конструкцию, определенную в данном документе. Эта клетка-хозяин может являться прокариотической или эукариотической.

Прокариот может представлять собой бактерию. Бактерия может представлять собой грамположительную/грамотрицательную бактерию, выбранную из следующего перечня: Absidia, Achromobacter, Acinetobacter, Aeribacillus, Aneurinibacillus, Agrobacterium, Aeromonas, Alcaligenes, Arthrobacter, Arzoarcus, Azomonas, Azospirillum, Azotobacter, Bacillus, Beijerinckia, Bradyrhizobium, Brevibacillus, Burkholderia, Byssochlamys, Citrobacter, Cupriavidus, Corynebacterium, Deinococcus, Clostridium, Comamonas, Escherichia, Enterobacter, Flavobacterium, Fusobacterium, Gossypium, Klebsiella, Lactobacillus, Listeria, Megasphaera, Micrococcus, Mycobacterium, Nocardia, Porphyromonas, Propionibacterium, Pseudomonas, Ralstonia, Rhizobium, Rhodopseudomonas, Rhodospirillum, Rodococcus, Roseburia, Shewanella, Streptomyces, Xanthomonas, Xylella, Yersinia, Treponema, Vibrio, Streptococcus, Lactococcus, Zymomonas, Staphylococcus, Salmonella, Sphingomonas, Sphingobium, Novosphingobium, Brucella u Microscilla.

5

10

15

20

30

Предпочтительные бактерии включают Aeribacillus pallidus, Aneurinibacillus terranovensis, Bacillus subtilis, Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus coagulans, Bacillus licheniformis, Bacillus megaterium, Bacillus halodurans, Bacillus pumilus, Brevibacillus thermoruber, Brevibacillus panacihumi, Cupriavidus basilensis, G. kaustophilus, Gluconobacter oxydans, Caulobacter crescentus CB 15, Methylobacterium extorquens, Rhodobacter sphaeroides, Pelotomaculum thermopropionicum, Pseudomonas zeaxanthinifaciens, Pseudomonas putida, Paracoccus denitrificans, Escherichia coli, Corynebacterium glutamicum, Staphylococcus carnosus, Streptomyces lividans, Sinorhizobium melioti, Sphingobium sp., Novosphingobium sp., Sphingomonas hengshuiensis и Rhizobium radiobacter. Предпочтительной бактерией является Escherichia coli.

Предпочтительные штаммы Escherichia coli включают 58, 679, WG1, DH5α, TG1, TOP10, 25 K12 (используемый в примерах), BL21, BL21 DE3, XL1-Blue, XL10-Gold, TB1, REG-12, W945, HB101, DH1, DP50, AB284, JC9387, AG1, C600, Hfr Cavalli, Y10.

Эукариот может представлять собой дрожжи или нитчатый гриб.

Предпочтительные дрожжи включают Saccharomyces, Kluyveromyces, Candida, Pichia, Schizosaccharomyces, Hansenula, Kloeckera, Schwanniomyces, Yarrowia, Cryptococcus, Debaromyces, Saccharomycopsis, Saccharomycodes, Wickerhamia, Debaryomyces, Hanseniaspora, Ogataea, Kuraishia, Komagataella, Metschnikowia, Williopsis, Nakazawaea, Torulaspora, Bullera, Rhodotorula, Sporobolomyces. Среди дрожжей предпочтительными

видами являются Kluyveromyces lactis, Saccharomyces cerevisiae, Hansenula polymorpha (также известен как Ogataea henricii), Yarrowia lipolytica, Candida tropicalis и Pichia pastoris (также известен как Komagataella phaffii).

- Предпочтительные штаммы Pichia выбраны из следующего перечня: Bg09, Bg10, Bg11, Bg12 (приведенный в качестве примера), Bg20, Bg21, Bg22, Bg23, Bg24, Bg25, Bg26, Bg40, Bg43, Bg44, Bg45, Y-11430, X-33, GS115, KM71, SMD1168, SMD1165, MC100-3, при этом наиболее предпочтительными являются Bg10 и его производные.
 - В примере 2.3 в качестве клетки-хозяина используется штамм GS115 (his4) Pichia pastoris.
- Предпочтительные штаммы Saccharomyces выбраны из следующего перечня: S288C, семейство CEN.PK, CBS 2354, ATCC 2360, ATCC 4098, ATCC 4124, ATCC 4126, ATCC 4127, ATCC 4921, ATCC 7754, ATCC 9763, ATCC 20598, ATCC 24855, ATCC 24858, ATCC 24860, ATCC 26422, ATCC 46523, ATCC 56069, ATCC 60222, ATCC 60223, ATCC 60493, ATCC 66348, ATCC 66349, ATCC 96581.
- 15 Предпочтительными дрожжами является штамм *Pichia*, более предпочтительно *Pichia* pastoris.
 - Нитчатый гриб может быть выбран из следующего перечня, включающего: Acremonium, Agaricus, Aspergillus, Aureobasidium, Chrysosporium, Coprinus, Cryptococcus, Filibasidium, Fusarium, Humicola, Magnaporthe, Mucor, Myceliophthora, Neocallinastix, Neurospora, Paecilomyces, Penicillium, Piromyces, Phanerochaete, Pleurotus, Schizophyllum, Talaromyces, Thermoascus, Thielavia, Tolypocladium, Ustilago u Trichoderma.

20

- Предпочтительные нитчатые грибы выбраны из следующего перечня: Aspergillus niger,
 25 Aspergillus nidulans, Aspergillus fumigatus, Aspergillus oryzae, Aspergillus vadensis,
 Penicillium chrysogenum, Penicillium citrinum, Penicillium rubens, Penicillium oxalicum,
 Penicillium subrubescens, Rasamsonia emersonii, Talaromyces emersonii, Acremonium
 chrysogenum, Trichoderma reesei, Aspergillus sojae и Chrysosporium lucknowense.
- Предпочтительные штаммы нитчатых грибов выбраны из следующего перечня: Aspergillus niger - CBS 513.88, N593, CBS 120.49 (используемый в примерах), N402, ATCC 1015, Aspergillus oryzae - ATCC 20423, IFO 4177, ATCC 1011, ATCC 9576, ATCC 14488-14491, ATCC 11601, ATCC12892, Aspergillus vadensis - CBS 113365, CBS 102787, IMI

142717, IBT 24658, CBS 113226, Penicillium chrysogenum - CBS 455.95, Penicillium citrinum - ATCC 38065, Penicillium chrysogenum - P2, Wisconsin 54-1255, Penicillium subrubescens - CBS 132785, FBCC 1632, Talaromyces emersonii - CBS 393.64, Acremonium chrysogenum - ATCC 36225 или ATCC 48272, Trichoderma reesei - ATCC 26921, или ATCC56765, или ATCC 26921, Aspergillus sojae - ATCC11906, Chrysosporium lucknowense - ATCC44006.

В предпочтительном варианте осуществления в качестве нитчатого гриба используется Aspergillus. Более предпочтительно используется штамм Aspergillus niger.

10 Способы

5

15

20

изобретению Клетки-хозяева по настоящему применимы для продуцирования миоглобина. В некоторых вариантах осуществления миоглобин получен из мамонта, предпочтительно из шерстистого мамонта или степного мамонта. В некоторых вариантах осуществления миоглобин получен из свиньи. В некоторых вариантах осуществления миоглобин получен из овцы. В некоторых вариантах осуществления миоглобин получен из коровы. В некоторых вариантах осуществления миоглобин получен из курицы. В некоторых вариантах осуществления миоглобин получен из тунца. Соответственно, в дополнительном аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ получения миоглобина, определенного ранее в данном документе, включающий культивирование клетки-хозяина по настоящему изобретению в подходящей среде и необязательно извлечение клетки-хозяина и/или миоглобина. Продуцируемый миоглобин необязательно не содержит сигнальный пептид, как определено в другом месте данного документа.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ получения миоглобина мамонта, определенного ранее в данном документе, предпочтительно миоглобина, характеризующегося по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1, более предпочтительно миоглобина, характеризующегося по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1 в комбинации с Q или H в положении 65 и H в положении 94 и необязательно имеющего по меньшей мере одну из следующих аминокислот в следующих местах в SEQ ID NO: 1: Е в положении 9, К в положении 13, Т в положении 14, Р в положении 23, L в положении 27, V в положении 31, G в положении 54, Q в положении 65, V в положении

67, О в положении 84, О в положении 88, І в положении 102 и/или Е в положении 123, включающий культивирование клетки-хозяина по настоящему изобретению в подходящей среде и необязательно извлечение клетки-хозяина и/или миоглобина.

5

15

20

25

30

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ получения миоглобина шерстистого мамонта, определенного ранее в данном документе, предпочтительно миоглобина, характеризующегося по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 2, более предпочтительно характеризующегося по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID 10 NO: 2 в комбинации с О или H в положении 65. О в положении 92 и H в положении 94 и необязательно имеющего по меньшей мере одну из следующих аминокислот в следующих местах в SEQ ID NO: 2: Е в положении 9, К в положении 13, Т в положении 14, Р в положении 23, L в положении 27, V в положении 31, G в положении 54, Q в положении 65, V в положении 67, Q в положении 84, Q в положении 88, I в положении 102, E в положении 123 и/или I в положении 143, включающий культивирование клетки-хозяина по настоящему изобретению в подходящей среде и необязательно извлечение клеткихозяина и/или миоглобина.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ получения миоглобина степного мамонта, определенного ранее в данном документе, предпочтительно миоглобина, характеризующегося по меньшей мере 70% идентичностью ID NO: SEQ 3, более последовательности с предпочтительно характеризующегося по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 3 в комбинации с Q или H в положении 65, H в положении 92 и H в положении 94 и необязательно имеющего по меньшей мере одну из следующих аминокислот в следующих местах в SEQ ID NO: 3: Е в положении 9, К в положении 13, Т в положении 14, Р в положении 23, L в положении 27, V в положении 31, G в положении 54, Q в положении 65, V в положении 67, Q в положении 84, Q в положении 88, I в положении 102, Е в положении 123 и/или I в положении 143, включающий культивирование клетки-хозяина по настоящему изобретению в подходящей среде и необязательно извлечение клеткихозяина и/или миоглобина.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ получения миоглобина степного мамонта, определенного ранее в данном документе, предпочтительно миоглобина, характеризующегося по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 3, более предпочтительно миоглобина, характеризующегося по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 3 в комбинации с по меньшей мере одной из следующих комбинаций аминокислот:

- F в положении 30, и/или
- Q в положении 65, и/или
- Н в положении 92, и/или
- 10 Н в положении 94, и/или

5

- F в положении 30 и Q в положении 65, и/или
- F в положении 30 и Н в положении 92, и/или
- F в положении 30 и Н в положении 94, и/или
- Q в положении 65 и Н в положении 92, и/или
- 15 Ов положении 65 и Н в положении 94, и/или
 - Н в положении 92 и Н в положении 94, и/или
 - F в положении 30, и Q в положении 65, и H в положении 92, и/или
 - F в положении 30, и Q в положении 65, и H в положении 94, и/или
 - F в положении 30, и Н в положении 92, и Н в положении 94, и/или
- 20 Ов положении 65, и Н в положении 92, и Н в положении 94, и/или
 - F в положении 30, и Q в положении 65, и H в положении 92, и H в положении 94; включающий культивирование клетки-хозяина по настоящему изобретению в подходящей среде и необязательно извлечение клетки-хозяина и/или миоглобина.
- 25 В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ получения миоглобина овцы, определенного ранее в данном документе, предпочтительно 70% миоглобина. характеризующегося по меньшей мере идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 4. более предпочтительно миоглобина. характеризующегося по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 4 в комбинации с Q или H в положении 65 и H в положении 94 и необязательно 30 имеющего по меньшей мере одну из следующих аминокислот в следующих местах в SEQ ID NO: 4: N в положении 13, Q в положении 27, I в положении 31, N в положении 67, A в положении 128, S в положении 133, A в положении 145 и/или L в положении 150,

включающий культивирование клетки-хозяина по настоящему изобретению в подходящей среде и необязательно извлечение клетки-хозяина и/или миоглобина.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ получения миоглобина коровы, определенного ранее документе, данном предпочтительно миоглобина, характеризующегося по меньшей мере 70% идентичностью предпочтительно миоглобина, SEQ ID5, более последовательности c NO: характеризующегося по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 5 в комбинации с Q или H в положении 65 и H в положении 94 и необязательно имеющего по меньшей мере одну из следующих аминокислот в следующих местах в SEQ ID NO: 5: N в положении 13, Q в положении 27, I в положении 31, N в положении 67, A в положении 128, S в положении 133, A в положении 145 и/или L в положении 150, включающий культивирование клетки-хозяина по настоящему изобретению в подходящей среде и необязательно извлечение клетки-хозяина и/или миоглобина.

15

20

25

30

10

5

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ миоглобина получения свиньи, определенного ранее данном документе, предпочтительно миоглобина, характеризующегося по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEO ID NO: 6. более предпочтительно миоглобина, характеризующегося по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 6 в комбинации с Q или H в положении 65 и H в положении 94 и необязательно имеющего по меньшей мере одну из следующих аминокислот в следующих местах в SEQ ID NO: 6: N в положении 13, Q в положении 27, I в положении 31, N в положении 67, A в положении 128, S в положении 133, A в положении 145 и/или L в положении 150, включающий культивирование клетки-хозяина по настоящему изобретению в подходящей среде и необязательно извлечение клетки-хозяина и/или миоглобина.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ получения миоглобина курицы, определенного ранее В документе, данном предпочтительно миоглобина, характеризующегося по меньшей мере 70% идентичностью SEQ NO: 7, предпочтительно последовательности c ID более характеризующегося по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 7 в комбинации с Q или H в положении 65 и H в положении 94 и необязательно имеющего по меньшей мере одну из следующих аминокислот в следующих местах в SEQ ID NO: 7: Q в положении 6, Q в положении 10, T в положении 13, I в положении 14, H в положении 27, M в положении 31, H в положении 35, D в положении 36, D в положении 42, R в положении 43, G в положении 49, P в положении 53, Q в положении 55, G в положении 58, A в положении 67, Q в положении 72, K в положении 75, Q в положении 79, N в положении 82, S в положении 85, T в положении 93, V в положении 111, I в положении 116, A в положении 117, E в положении 118, A в положении 121, S в положении 128, K в положении 133, S в положении 145 и/или F в положении 150, включающий культивирование клетки-хозяина по настоящему изобретению в подходящей среде и необязательно извлечение клетки-хозяина и/или миоглобина.

5

10

15

20

25

30

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ получения миоглобина тунца, определенного ранее в данном документе, предпочтительно миоглобина, характеризующегося по меньшей мере 70% идентичностью NO: последовательности с SEQ ID8, более предпочтительно миоглобина, характеризующегося по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 8 в комбинации с Q или H в положении 65 и H в положении 94.

Признаки этого аспекта предпочтительно описаны в другом месте данного документа. Данный способ может в дальнейшем в данном документе в качестве альтернативы называться способом в соответствии с настоящим изобретением. Подходящие способы культивирования клеток для применения в способе в соответствии с настоящим изобретением известны специалисту в данной области и обсуждаются, например, в van't Riet, K. and Tramper, J., 1st edition, Basic Bioreactor Design, CRC Press, NY, 1991. Такие способы включают без ограничения погруженную ферментацию в жидких средах, поверхностную ферментацию на жидких средах и твердофазную ферментацию. Культивирование клеток можно осуществлять, например, путем культивирования в титрационных микропланшетах, встряхиваемых колбах, мелкомасштабных биореакторах в лаборатории и/или в промышленных условиях. Подходящие режимы культивирования клеток включают без ограничения непрерывную, периодическую ферментацию и/или периодическую ферментацию с подпиткой, а также их комбинации. В одном варианте осуществления культивирование клеток осуществляют с помощью непрерывной

ферментации. В предпочтительном варианте осуществления культивирование клеток осуществляют с помощью периодической ферментации. В более предпочтительном варианте осуществления культивирование клеток осуществляют с помощью периодической ферментации с подпиткой.

5

10

15

20

25

30

В контексте настоящего изобретения "культуральная среда", в дальнейшем в данном документе в качестве альтернативы называемая "средой для выращивания", может быть интерпретирована как охватывающая случаи, когда культивируемые клетки отсутствуют, а также случаи, когда культивируемые клетки присутствуют в культуральной среде. "Культуральный бульон" относится к культуральной среде, в которой присутствуют культивируемые клетки. "Надосадочная жидкость культуры" относится к культуральной среде, в которой отсутствуют культивируемые клетки. "Бесклеточный экстракт" относится к клеточному лизату, не содержащему клеточный дебрис. Культивирование клеток в качестве части способа по настоящему изобретению можно осуществлять в условиях, способствующих продуцированию введенных миоглобинов, которые специалисту в данной области. Такие условия зависят не только от химического состава культуральной среды, но также и от других параметров процесса, в том числе продолжительности культивирования, температуры, уровней О2 в культуральном бульоне и/или в свободном пространстве, уровней СО2 в культуральном бульоне и/или в свободном пространстве, рН, ионной силы, скорости перемешивания, гидростатического давления и т. п. Культивирование клеток можно проводить с использованием культуральной среды, содержащей подходящие питательные вещества, такие как источники углерода и азота, и дополнительные соединения, такие как неорганические соли и витамины, с использованием процедур, известных из уровня техники (см., например, Bennett, W. and Lasure, L., 1st edition, More Gene Manipulations in Fungi, Academic Press, CA, 1991). Подходящие среды для выращивания доступны от коммерческих поставщиков или могут быть получены с использованием опубликованных композиций, подходящих для соответствующих хозяев (например, в каталогах коллекции Центрального бюро грибных культур (CBS) или Американской коллекции типовых культур (АТСС)).

Точный состав среды для выращивания и значения параметров процесса культивирования не являются критически важными признаками настоящего изобретения. Можно

5

10

15

20

25

30

рассматривать любой состав среды для выращивания, при условии, что он обеспечивает возможность роста клетки-хозяина и продуцирования введенных миоглобинов. Среда для выращивания обычно содержит источник углерода, который должен использоваться для выращивания культивируемых клеток. Специалисту в данной области понятно, что подходящие источники углерода могут быть добавлены в среду для выращивания извне или могут уже присутствовать в указанной среде. Источники углерода могут присутствовать или добавляться по отдельности или в виде смесей нескольких источников углерода. Примеры подходящих источников углерода, известных из уровня техники, включают простые сахара, такие как глюкоза, мальтоза, сахароза, ксилоза, арабиноза, сложные сахара, такие как мальтодекстрины, гидролизованный крахмал, крахмал, мелассу и сырье вторичной переработки. Сырье вторичной переработки может быть особенно привлекательным ввиду его более низкого углеродного следа. Сырье вторичной переработки обычно будет включать лигноцеллюлозный материал. Такой материал включает любые материалы на основе лигноцеллюлозы и/или гемицеллюлозы. Такой материал может быть получен из потоков сельскохозяйственных, промышленных или бытовых, предпочтительно сельскохозяйственных, отходов. Примеры подходящих материалов включают (сельскохозяйственную) биомассу, коммерческие органические материалы, твердые бытовые отходы, первичную биомассу, такую как макулатура и садовые отходы, или непервичную биомассу. Основные формы биомассы включают деревья, кустарники и пастбищную траву, пшеницу, пшеничную солому, жмых сахарного тростника, просо, мискантус китайский, кукурузу, кукурузную солому, кукурузные початки, стебли канолы, стебли сои, сладкую кукурузу, зерна кукурузы, продукты и побочные продукты помола злаковых культур (включая мокрый помол и сухой помол), таких как кукуруза, пшеница и ячмень, часто называемые "отрубями или клетчаткой", и твердые бытовые отходы. Биомасса также может представлять собой травянистые материалы, сельскохозяйственные отходы, отходы лесного хозяйства, твердые бытовые целлюлозно-бумажного отходы, макулатуру И отходы производства. Сельскох озяйственная биомасса включает ветки, кустарники, паклю, кукурузу и кукурузную солому, энергетические культуры, лесоматериалы, плоды, цветки, злаки, пастбищные травы, травянистые культуры, листья, кору, иголки, бревна, корни, молодые деревья, древесные культуры с короткой ротацией, кустарники, травянистое просо, деревья, овощи, фрукты, виноград, жом сахарной свеклы, пшеничную крупку, мякину овса, твердую и мягкую древесину (не включая токсичную древесину), а также

5

10

15

20

25

30

органические отходы, образующиеся в результате сельскохозяйственных процессов, включая сельскохозяйственную и лесохозяйственную деятельность, в частности хозяйства. древесные отходы лесного Сельскохозяйственная биомасса может представлять собой любое из вышеперечисленного в отдельности или любую их комбинацию или смесь. Такие источники углерода, как органические кислоты, альдегиды, кетоны, сложные эфиры и спирты, также могут рассматриваться. Применение среды для выращивания, содержащей комбинации из нескольких различных источников углерода, также может рассматриваться в способе по настоящему изобретению. Такие среды могут в качестве неограничивающего примера содержать более окисленные источники углерода, такие как органические кислоты, в комбинации с более восстановленными источниками углерода, такими как спирты. Примеры подходящих источников азота, известных из уровня техники, включают соевую муку, жидкий кукурузный экстракт, дрожжевой экстракт, белок молочной сыворотки, яичный белок, гидролизат казеина, мочевину, аммиак, соли аммония и нитратные соли. Примеры дополнительных подходящих соединений, известных из уровня техники, включают фосфаты, сульфаты, металлы, такие как магний, микроэлементы и витамины. Точные требования к среде для выращивания будут варьироваться в зависимости от клетки-хозяина, например, между дрожжами, бактериями и нитчатыми грибами, и указанные требования будут известны специалисту в данной области. Соответственно, среда для выращивания может быть полной (богатой) средой или минимальной средой, т. е. средой, содержащей только абсолютно необходимые для роста компоненты, в зависимости от культивируемой клетки-хозяина.

Подобно составу среды для выращивания, параметрам процесса можно присвоить любое значение, при условии, что они обеспечивают возможность роста клетки-хозяина и продуцирования введенных миоглобинов. Как правило, указанные значения будут различаться в зависимости от культивируемой клетки-хозяина и будут известны специалисту в данной области. Способ в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно представляет собой процесс с ограниченным доступом кислорода или аэробный процесс, что означает, что культивирование клеток осуществляют в условиях с ограниченным доступом кислорода или в аэробных условиях, при этом процесс более предпочтительно проходит с ограниченным доступом кислорода. Условия с ограниченным доступом кислорода, также известные как микроаэробные условия, представляют собой условия культивирования, при которых потребление кислорода

ограничено доступностью кислорода. Степень ограничения доступа кислорода определяется количеством и составом входящего газового потока, а также фактическими свойствами смешивания/массообмена используемого ферментационного оборудования. В условиях ограниченного доступа кислорода в жидкой культуре скорость потребления кислорода предпочтительно составляет по меньшей мере приблизительно 5,5 ммоль/л/ч, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 6 ммоль/л/ч и еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 7 ммоль/л/ч. Аэробные условия представляют собой условия культивирования, при которых потребление кислорода не ограничено доступностью кислорода.

10

15

20

25

30

5

Культивирование клеток можно осуществлять при значении температуры, оптимальном для клетки, обычно в диапазоне температур, составляющем 16-42°С. В некоторых вариантах осуществления температура находится в диапазоне 20-40°С, более предпочтительно 25-38°С, наиболее предпочтительно 28-36°С. В некоторых наиболее предпочтительных вариантах осуществления используют значение температуры, составляющее приблизительно 30 или 36°С.

Культивирование клеток можно осуществлять при значении рН, оптимальном для клетки. В некоторых вариантах осуществления значение рН культуры составляет приблизительно рН 2,5, приблизительно рН 3,0, приблизительно рН 3,5, приблизительно рН 4,0, приблизительно рН 4,5, приблизительно рН 5,5, приблизительно рН 6, приблизительно рН 7, приблизительно рН 7,5, приблизительно рН 8,0, приблизительно рН 8,5, приблизительно рН 9. В предпочтительных вариантах осуществления рН находится в диапазоне от приблизительно рН 3,0 до приблизительно рН 9, более предпочтительно от приблизительно рН 3,5 до рН 7. В некоторых наиболее предпочтительных вариантах осуществления используют значение рН, составляющее приблизительно 6.

Культивирование клеток можно осуществлять при значении ионной силы культуральной среды, оптимальном для клетки, обычно в диапазоне от 50 мМ до 2 М. В некоторых вариантах осуществления ионная сила культуральной среды находится в диапазоне от 75 мМ до 1 М, более предпочтительно от 100 мМ до 750 мМ. В некоторых наиболее

предпочтительных вариантах осуществления используют значение ионной силы, составляющее приблизительно 100 мМ.

Культивирование клеток можно осуществлять в течение продолжительности 14, 13,5, 13, 12,5, 12, 11,5, 11, 10,5, 10, 9,5, 9, 8,5, 8, 7,5, 7, 6,5, 6, 5,5, 5, 4,5, 4, 3,5, 3, 2,5, 2, 1,5 или 1 дня, при этом указанная продолжительность может отклоняться на 20%. Культивирование клеток предпочтительно осуществляют в течение продолжительности 14, 13,5, 13, 12,5, 12, 11,5, 11, 10,5, 10, 9,5, 9, 8,5, 8, 7,5, 7, 6,5, 6, 5,5, 5, 4,5, 4, 3,5, 3, 2,5, 2, 1,5 или 1 дня, при этом указанная продолжительность может отклоняться на 10%. Культивирование клеток более предпочтительно осуществляют в течение 5 дней, при этом указанная продолжительность может отклоняться на 20%, наиболее предпочтительно на 10%.

5

10

15

20

Способ в соответствии с настоящим изобретением обычно приводит к получению по меньшей мере 100 мг/л, 200 мг/л, 300 мг/л, 400 мг/л, 500 мг/л, 600 мг/л, 700 мг/л, 800 мг/л, 900 мг/л, 1 г/л, 2 г/л, 3 г/л, 4 г/л, 5 г/л, 6 г/л, 7 г/л, 8 г/л, 9 г/л, 10 г/л, 11 г/л, 12 г/л, 13 г/л, 14 г/л, 15 г/л, 16 г/л, 17 г/л, 18 г/л, 19 г/л, 20 г/л, 21 г/л, 22 г/л, 23 г/л, 24 г/л, 25 г/л, 50 г/л, 75 г/л, 100 г/л, 200 г/л или 300 г/л миоглобина.

В способе в соответствии с настоящим изобретением обычно по меньшей мере 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100%, предпочтительно по меньшей мере 20%, более предпочтительно по меньшей мере 40%, наиболее предпочтительно по меньшей мере 60% источника углерода в среде для выращивания будет превращено в миоглобин.

Культивирование клеток также можно осуществлять путем реализации многостадийного, предпочтительно двухстадийного, способа культивирования. Например, стадии продуцирования миоглобина может предшествовать стадия роста клеточной биомассы, где происходит только ограниченное продуцирование либо продуцирование вообще не происходит. Различные стадии можно проводить с использованием различных режимов
 культивирования, и/или различных сред для выращивания, и/или различных значений параметров процесса культивирования, в зависимости от цели каждой стадии и/или культивируемой клетки. Биомасса в ходе стадии продуцирования может являться или может не являться активно растущей.

В контексте способа по настоящему изобретению клетки-хозяева и/или миоглобин можно необязательно извлекать из культуральной среды. В случае внутриклеточного присутствия миоглобина его можно необязательно извлекать из извлеченной клеточной биомассы. Извлеченный миоглобин необязательно очищают. Очистка миоглобина предпочтительно будет приводить к чистоте, составляющей по меньшей мере 70%, более предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, наиболее предпочтительно к миоглобину, который является в значительной степени чистым.

10

15

20

25

5

В одном варианте осуществления клетка-хозяин продуцирует миоглобин внеклеточно в способе в соответствии с настоящим изобретением. В способе в соответствии с этим вариантом осуществления миоглобин транспортируется из клетки-хозяина после его синтеза в клетке-хозяине. Способ в соответствии с этим вариантом осуществления может быть назван внеклеточным способом в соответствии с настоящим изобретением. В этом контексте как секреторные, так и внеклеточные виды ферментации рассматриваются как внеклеточное продуцирование.

Не ограничиваясь этой теорией, полагают, что внеклеточный способ в соответствии с настоящим изобретением обладает преимуществом, заключающимся в том, что последующая обработка для извлечения продуцируемого миоглобина является более удобной, действенной и/или эффективной. Кроме того, способ в соответствии с этим продуктом может приводить к получению композиции, содержащей миоглобин высокой чистоты, как, например, по меньшей мере 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, с минимальной последующей обработкой по сравнению с внутриклеточными способами, в которых миоглобин не транспортируется из клетки-хозяина после его синтеза.

Не ограничиваясь этой теорией, полагают, что внеклеточный способ в соответствии с настоящим изобретением обладает преимуществом, заключающимся в том, что необязательная стадия извлечения миоглобина не включает лизис клетки-хозяина. Вследствие этого внеклеточный способ в соответствии с настоящим изобретением может приводить к получению композиции с низкой концентрацией нуклеиновых кислот,

происходящих из клетки-хозяина, как описано в варианте осуществления ниже.

Соответственно, в дополнительном аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ получения миоглобина, определенного ранее в данном документе, включающий культивирование клетки-хозяина по настоящему изобретению в подходящей среде и необязательно извлечение клетки-хозяина и/или миоглобина.

В одном варианте осуществления внеклеточный способ в соответствии с настоящим изобретением приводит к получению композиции с чистотой миоглобина, составляющей по меньшей мере 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, наиболее предпочтительно миоглобина, который является в значительной степени чистым.

Чистоту предпочтительно измеряют в виде весовой процентной доли от фракции общего белка в бесклеточной надосадочной жидкости, полученной в конце процесса или внеклеточного способа в соответствии с настоящим изобретением.

В одном варианте осуществления внеклеточный способ в соответствии с настоящим изобретением приводит к получению композиции, содержащей количество нуклеиновых кислот, происходящих из клетки-хозяина, которое меньше или равняется 5%, 4,9%, 4,8%, 4,7%, 4,6%, 4,5%, 4,4%, 4,3%, 4,2%, 4,1%, 4%, 3,9%, 3,8%, 3,7%, 3,6%, 3,5%, 3,4%, 3,3%, 3,2%, 3,1%, 3%, 2,9%, 2,8%, 2,7%, 2,6%, 2,5%, 2,4%, 2,3%, 2,2%, 2,1%, 2%, 1,9%, 1,8%, 1,7%, 1,6%, 1,5%, 1,4%, 1,3%, 1,2%, 1,1%, 1%, 0,9%, 0,8%, 0,7%, 0,6%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2% или 0,1%.

25

30

5

10

15

20

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен внеклеточный способ в соответствии с настоящим изобретением для получения миоглобина шерстистого мамонта, определенного ранее в данном документе, предпочтительно миоглобина, характеризующегося по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 2, более предпочтительно миоглобина, характеризующегося по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 2 в комбинации с Q или H в положении 65, Q в положении 92 и H в положении 94 и необязательно имеющего по меньшей мере одну из следующих аминокислот в следующих местах в SEQ ID NO: 2: Е в положении 9,

К в положении 13, Т в положении 14, Р в положении 23, L в положении 27, V в положении 31, G в положении 54, Q в положении 65, V в положении 67, Q в положении 84, Q в положении 88, I в положении 102, E в положении 123 и/или I в положении 143, включающий культивирование клетки-хозяина по настоящему изобретению в подходящей среде и необязательно извлечение клетки-хозяина и/или миоглобина.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен внеклеточный способ в соответствии с настоящим изобретением для получения миоглобина степного мамонта, определенного ранее в данном документе, предпочтительно миоглобина, характеризующегося по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 3, более предпочтительно миоглобина, характеризующегося по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 3 в комбинации с по меньшей мере одной из следующих комбинаций аминокислот:

- F в положении 30, и/или
- 15 Q в положении 65, и/или

5

10

- Н в положении 92, и/или
- Н в положении 94, и/или
- F в положении 30 и Q в положении 65, и/или
- F в положении 30 и Н в положении 92, и/или
- 20 F в положении 30 и Н в положении 94, и/или
 - Q в положении 65 и H в положении 92, и/или
 - Q в положении 65 и H в положении 94, и/или
 - Н в положении 92 и Н в положении 94, и/или
 - F в положении 30, и Q в положении 65, и H в положении 92, и/или
- 25 F в положении 30, и Q в положении 65, и H в положении 94, и/или
 - F в положении 30, и Н в положении 92, и Н в положении 94, и/или
 - О в положении 65, и Н в положении 92, и Н в положении 94, и/или
- F в положении 30, и Q в положении 65, и H в положении 92, и H в положении 94; включающий культивирование клетки-хозяина по настоящему изобретению в подходящей среде и необязательно извлечение клетки-хозяина и/или миоглобина.

В примере 2.3 представлено внеклеточное продуцирование миоглобина степного мамонта.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен внеклеточный способ в соответствии с настоящим изобретением для получения миоглобина овцы, определенного документе, предпочтительно ранее В данном характеризующегося по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 4, более предпочтительно миоглобина, характеризующегося по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 4 в комбинации с Q или H в положении 65 и Н в положении 94 и необязательно имеющего по меньшей мере одну из следующих аминокислот в следующих местах в SEQ ID NO: 4: N в положении 13, Q в положении 27, I в положении 31, N в положении 67, А в положении 128, S в положении 133, А в положении 145 и/или L в положении 150, включающий культивирование клетки-хозяина по настоящему изобретению в подходящей среде и необязательно извлечение клеткихозяина и/или миоглобина.

5

10

15

20

25

30

В одном варианте осуществления предусмотрен внеклеточный способ в соответствии с настоящим изобретением для получения миоглобина коровы, определенного ранее в данном документе, предпочтительно миоглобина, характеризующегося по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 5, более предпочтительно 70% миоглобина, характеризующегося ПО меньшей мере идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 5 в комбинации с Q или H в положении 65 и H в положении 94 и необязательно имеющего по меньшей мере одну из следующих аминокислот в следующих местах в SEQ ID NO: 5: N в положении 13, Q в положении 27, I в положении 31, N в положении 67, А в положении 128, S в положении 133, А в положении 145 и/или L в положении 150, включающий культивирование клетки-хозяина по настоящему изобретению в подходящей среде и необязательно извлечение клеткихозяина и/или миоглобина.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен внеклеточный способ в соответствии с настоящим изобретением для получения миоглобина свиньи, определенного ранее в данном документе, предпочтительно миоглобина, характеризующегося по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 6, более предпочтительно миоглобина, характеризующегося по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 6 в комбинации с Q или H в положении 65 и H в положении 94 и необязательно имеющего по меньшей мере одну из следующих

аминокислот в следующих местах в SEQ ID NO: 6: N в положении 13, Q в положении 27, I в положении 31, N в положении 67, A в положении 128, S в положении 133, A в положении 145 и/или L в положении 150, включающий культивирование клетки-хозяина по настоящему изобретению в подходящей среде и необязательно извлечение клетки-хозяина и/или миоглобина.

5

10

15

20

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен внеклеточный способ в соответствии с настоящим изобретением для получения миоглобина курицы, определенного документе, предпочтительно миоглобина, ранее В данном характеризующегося по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 7, более предпочтительно миоглобина, характеризующегося по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 7 в комбинации с Q или H в положении 65 и Н в положении 94 и необязательно имеющего по меньшей мере одну из следующих аминокислот в следующих местах в SEQ ID NO: 7: Q в положении 6, Q в положении 10, Т в положении 13, I в положении 14, Н в положении 27, М в положении 31, Н в положении 35, D в положении 36, D в положении 42, R в положении 43, G в положении 49, P в положении 53, Q в положении 55, G в положении 58, А в положении 67, Q в положении 72, К в положении 75, Q в положении 79, N в положении 82, S в положении 85, T в положении 93, V в положении 111, I в положении 116, А в положении 117, Е в положении 118, A в положении 121, S в положении 128, K в положении 133, S в положении 145 и/или F в положении 150, включающий культивирование клетки-хозяина по настоящему изобретению в подходящей среде и необязательно извлечение клетки-хозяина и/или миоглобина.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен внеклеточный способ в соответствии с настоящим изобретением для получения миоглобина тунца, определенного ранее в данном документе, предпочтительно миоглобина, характеризующегося по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 8, более предпочтительно миоглобина, характеризующегося по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 8 в комбинации с Q или H в положении 65 и H в положении 94.

Соответствующая технология последующей обработки, которая может подходить для

5

10

15

20

25

30

извлечения и/или очистки, не является критически важным признаком настоящего изобретения и будет зависеть от того, накапливается ли миоглобин в культивируемых клетках или выводится. Указанная технология обработки и связанный с ней выбор будут известны специалисту в данной области и обсуждаются, например, в Wesselingh, J.A and Krijgsman, J., 1st edition, Downstream Processing in Biotechnology, Delft Academic Press, NL, 2013. В неограничивающем примере процесса извлечения биомассу извлекают из культуральной среды с помощью, например, центрифугирования или фильтрации. Если продуцируемый миоглобин накапливается внутри клеток, его затем можно извлечь и/или очистить от биомассы. Если он выводится, его можно извлечь из бесклеточной среды или, если стадия отделения биомассы пропущена, непосредственно из культурального бульона. Извлечение и/или очистку можно осуществлять в соответствии с любой традиционной методикой извлечения или очистки, известной из уровня техники. Способы извлечения и/или очистки белков известны специалисту в данной области и обсуждаются в нормативных справочных пособиях, таких как Sambrook and Russel, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 2001 или Ausubel F. et al, eds., Current protocols in molecular biology, Green Publishing and Wiley Interscience, NY, 2003. Примеры широко используемых способов извлечения и/или очистки включают хроматографические способы, такие как гельфильтрационная хроматография, ионообменная хроматография, иммуноаффинная хроматография, металл-аффинная хроматография, гель-фильтрационная хроматография, фракционирование с осадителями, такими как сульфат аммония и полиэтиленгликоль, гель-электрофорез, а также высаливание и диализ. Предпочтительно используют металлаффинную хроматографию или эксклюзионную хроматографию. Извлечение и/или очистку можно необязательно усилить путем связывания полипептидного фермента с последовательностью, облегчающей очистку, как, например, с доменом GST, с использованием хорошо известных методик на основе молекулярного инструментария. Последовательность, облегчающую очистку, и/или сигнальный пептид, облегчающий выведение миоглобина, необязательно удаляют из конечного продукта с помощью методик, известных из уровня техники, например, протеолиза под действием эндопептидаз, нацеливающихся на линкер между последовательностью, облегчающей очистку, и/или сигнальным пептидом и миоглобином. В некоторых вариантах осуществления полипептидный фермент связан (слит) с гексагистидиновым пептидом, таким как, среди прочего, метка, представленная в векторе pET23a(+) (GenScript Biotech,

Лейден, Нидерланды), многие из которых являются коммерчески доступными. Как, например, описано в Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824 (1989), гексагистидиновый пептид обеспечивает удобную очистку слитого белка.

5 В предпочтительном варианте осуществления продуцируемый миоглобин извлекают и/или очищают из культуральной среды. Это может осуществляться непрерывно в процессе получения или после него.

В предпочтительном варианте осуществления продуцируемый миоглобин извлекают и/или очищают из культивируемых клеток. Это может осуществляться непрерывно в процессе получения путем сбора фракций растущих клеток или после него.

10

15

20

25

30

В предпочтительном варианте осуществления культивируемые клетки-хозяева, используемые в способе по настоящему изобретению, иммобилизуют. Иммобилизацию клеток можно осуществлять любыми способами, известными специалисту в данной области, которые обсуждаются в нормативных справочных пособиях, таких как Guisan, J.M., Bolivar, J.M., López-Gallego, F., Rocha-Martín, J. (Eds.), Immobilization of Enzymes and Cells: Methods and Protocols, Springer US, USA, 2020. Как правило, клетки-хозяева можно иммобилизовать на полутвердой или твердой подложке тремя различными способами. Первый способ предусматривает полимеризацию или отверждение раствора, содержащего споры или клетки. Примеры полимеризуемых или отверждаемых растворов включают альгинат, λ -каррагинан, хитозан, полиакриламид, полиакриламид-гидразид, агарозу, полиэтиленгликоль, диметилакрилат, полипропилен, сополимер полистирола дивинилбензола, поливинилбензол, поливиниловый спирт, эпоксидный носитель, целлюлозу, ацетат целлюлозы, фотосшиваемую смолу, форполимеры, уретан и желатин. Второй способ предусматривает адсорбцию клеток на подложке. Примеры таких подложек включают костяной уголь, пробку, глину, смолу, песок, гранулы пористого оксида алюминия, пористый кирпич, пористый кремнезем, целит или древесную стружку. Клетки-хозяева могут колонизировать подложку и образовывать биопленку. Третий способ предусматривает ковалентное связывание клеток-хозяев с подложкой с помощью таких химических средств, как глутаровый альдегид, о-дианизидин (патент США № 3983000), полимерные изоцианаты (патент США № 4071409), силаны (патенты США №№ 3519538 и 3652761), гидроксиэтилакрилат, подложки, активированные переходными

металлами, цианурхлорид, периодат натрия, толуол и т. п. Культивируемые клеткихозяева можно иммобилизовать в любой фазе их роста, например, после достижения желаемой плотности клеток в культуре. Подходящие режимы культивирования и/или различные значения параметров процесса культивирования известны специалисту в данной области и обсуждаются в нормативных справочных пособиях, таких как Colin R. Phillips C.R., Poon Y. C., Immobilization of Cells: в серии книг Biotechnology Monographs (Biotechnology, volume 5), Springer, Berlin, Germany, 1988; Tampion J., Tampion M. D., Immobilized Cells: Principles and Applications, Cambridge University Press, UK, 1987. Иммобилизованные предпочтительно клетки культивируют В биореакторах уплотненным слоем, также известных как поршневые проточные биореакторы, или в биореакторах с расширяющимся (псевдоожиженным) слоем. Подходящие среды для выращивания и способы извлечения и/или очистки дополнительно обсуждаются в другом месте данного документа.

В дополнительном аспекте предусмотрен способ получения заменителя мяса, определенного ранее, включающий включение миоглобина, получаемого посредством способа, определенного ранее в данном документе, в состав заменителя мяса. В зависимости от предполагаемого заменителя мяса и/или пищевого ингредиента специалисту в данной области будет известно, какие составы являются наиболее подходящими.

Общая информация

5

10

25

30

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такое же значение, которое традиционно и обычно понимается средним специалистом в области техники, к которой относится настоящее изобретение, и толкуются с учетом настоящего раскрытия.

Используемый документе термин "промотор" "регуляторная данном или последовательность" относится к фрагменту нуклеиновой кислоты, функция которого заключается контроле транскрипции одной ИЛИ нескольких кодирующих последовательностей и который расположен по направлению транскрипции выше сайта инициации транскрипции кодирующей последовательности структурно идентифицируется по наличию сайта связывания ДНК-зависимой РНК-полимеразы, сайтов инициации транскрипции и любых других последовательностей ДНК, включая без ограничения сайты связывания факторов транскрипции, сайты связывания репрессорных и активаторных белков и любые другие последовательности нуклеотидов, которые, как известно специалисту в данной области, действуют прямо или косвенно для регуляции величины транскрипции с промотора. "Конститутивный" промотор представляет собой промотор, который активен в большинстве физиологических условий и условий развития. "Индуцируемый" и/или "репрессируемый" промотор представляет собой промотор, который регулируется физиологически или в процессе развития так, что он индуцируется и/или репрессируется, например, при применении химического индуктора или репрессирующего сигнала.

5

10

15

20

25

30

Используемый в данном документе термин "функционально связанный" относится к соединению элементов полинуклеотида в функциональной взаимосвязи. Нуклеиновая кислота является "функционально связанной", если она расположена в функциональной взаимосвязи с другой последовательностью нуклеиновой кислоты. последовательность регуляции транскрипции, такая как промотор, функционально связана с кодирующей последовательностью, если она влияет на транскрипцию кодирующей последовательности. Функционально связанный означает, что связываемые последовательности ДНК, как правило, являются смежными и, если необходимо соединить две области, кодирующие белок, являются смежными и находятся в рамке считывания.

Как используется в данном документе, "регулятор" или "регулятор транскрипции" представляет собой белок, который контролирует скорость транскрипции генетической информации из ДНК в информационную РНК путем связывания с определенной последовательностью ДНК.

Термины "белок" или "полипептид" используются взаимозаменяемо и относятся к молекулам, состоящим из цепи аминокислот, без ссылки на конкретный принцип действия, размер, 3-мерную структуру или происхождение.

Термин "ген" означает фрагмент ДНК, содержащий область (транскрибируемую область), которая транскрибируется в молекулу РНК (например, мРНК) в клетке, функционально связанную с подходящими регуляторными областями (например, промотором). Ген обычно содержит несколько функционально связанных фрагментов, таких как промотор,

5'-лидерная последовательность, кодирующая область и 3'-нетранслируемая последовательность (3'-конец), например, содержащая сайт полиаденилирования и/или терминации транскрипции.

"Экспрессия гена" относится к процессу, в котором область ДНК, функционально связанная с соответствующими регуляторными областями, в частности с промотором, транскрибируется в РНК, которая является биологически активной, т. е. способна транслироваться в биологически активный белок или пептид.

В описанных в данном документе аминокислотных последовательностях аминокислоты или "остатки" обозначаются трехбуквенными символами. Эти трехбуквенные символы, а также соответствующие однобуквенные символы хорошо известны специалисту в данной области и имеют следующее значение: A (Ala) означает аланин, C (Cys) означает цистеин, D (Asp) означает аспарагиновую кислоту, E (Glu) означает глутаминовую кислоту, F (Phe) означает фенилаланин, G (Gly) означает глицин, H (His) означает гистидин, I (Ile) означает изолейцин, К (Lys) означает лизин, L (Leu) означает лейцин, М (Met) означает метионин, N (Asn) означает аспарагин, P (Pro) означает пролин, Q (Gln) означает глутамин, R (Arg) означает аргинин, S (Ser) означает серин, T (Thr) означает треонин, V (Val) означает валин, W (Тгр) означает триптофан, Y (Туг) означает тирозин. Остаток может представлять собой любую протеиногенную аминокислоту, также любую непротеиногенную аминокислоту, такую как D-аминокислоты и модифицированные аминокислоты, образованные посредством посттрансляционных модификаций, а также любую неприродную аминокислоту, как описано в данном документе.

В контексте настоящей заявки все значения процентного содержания применительно к концентрации или композиции относятся к значениям весового процентного содержания, если не указано иное.

В контексте настоящей заявки такие выражения, как "параметр, имеющий значение по меньшей мере X, Y или Z", следует интерпретировать как указанный параметр, имеющий значение по меньшей мере X, по меньшей мере Y или по меньшей мере Z.

Идентичность последовательностей

5

10

15

20

25

30

В контексте настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты, такая как молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая миоглобин животного происхождения, представлена

последовательностью нуклеиновой кислоты или нуклеотидной последовательностью, которая кодирует фрагмент белка, или полипептид, или пептид, или производный пептид. Следует понимать, что каждая молекула нуклеиновой кислоты, или фрагмент белка, или полипептид, или пептид, или производный пептид, или конструкция, идентифицированные в данном документе с помощью заданного идентификационного номера последовательности (SEQ ID NO), не ограничены этой конкретной раскрытой последовательностью. Каждая кодирующая последовательность, идентифицированная в данном документе, кодирует заданный фрагмент белка, или полипептид, или пептид, или производный пептид, или конструкцию, или сама является фрагментом белка, или полипептидом, или конструкцией, или пептидом, или производным пептидом.

5

10

20

Во всей настоящей заявке каждый раз, когда упоминается конкретная нуклеотидная последовательность под SEQ ID NO (возьмите SEQ ID NO: X в качестве примера), кодирующая заданный фрагмент белка, или полипептид, или пептид, или производный пептид, ее можно заменить на:

- і. нуклеотидную последовательность, содержащую нуклеотидную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 60% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: X;
 - ii. нуклеотидную последовательность, последовательность которой отличается от последовательности молекулы нуклеиновой кислоты (i) вследствие вырожденности генетического кода; или
 - ііі. нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 60% идентичностью или сходством аминокислот с аминокислотной последовательностью, кодируемой нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: X.
- 25 Другой предпочтительный уровень идентичности или сходства последовательностей составляет 70%. Другой предпочтительный уровень идентичности или сходства последовательностей составляет 80%. Другой предпочтительный уровень идентичности или сходства последовательностей составляет 90%. Другой предпочтительный уровень идентичности или сходства последовательностей составляет 95%. Другой предпочтительный уровень идентичности или сходства последовательностей составляет 95%.

Во всей настоящей заявке каждый раз, когда упоминается конкретная аминокислотная последовательность под SEQ ID NO (возьмите SEQ ID NO: У в качестве примера), ее можно заменить на полипептид, представленный аминокислотной последовательностью, содержащей последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 60% идентичностью последовательности c аминокислотной или сходством последовательностью под SEQ ID NO: Ү. Другой предпочтительный 70%. идентичности или сходства последовательностей составляет Другой предпочтительный уровень идентичности или сходства последовательностей составляет 80%. Другой предпочтительный уровень идентичности или сходства последовательностей составляет 90%. Другой предпочтительный уровень идентичности или сходства последовательностей составляет 95%. Другой предпочтительный уровень идентичности или сходства последовательностей составляет 99%.

Каждая нуклеотидная последовательность или аминокислотная последовательность, описанная в данном документе, в силу своего процентного значения идентичности или сходства заданной нуклеотидной последовательностью или аминокислотной последовательностью соответственно характеризуется В дополнительном предпочтительном варианте осуществления идентичностью или сходством с заданной нуклеотидной или аминокислотной последовательностью соответственно, составляющими по меньшей мере 60%, по меньшей мере 61%, по меньшей мере 62%, по меньшей мере 63%, по меньшей мере 64%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 66%, по меньшей мере 67%, по меньшей мере 68%, по меньшей мере 69%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%.

30

5

10

15

20

25

Термины "гомология", "идентичность последовательностей" и т. п. используются в данном документе взаимозаменяемо. Идентичность последовательностей описывается в данном документе как взаимосвязь между двумя или более аминокислотными

(полипептидными или белковыми) последовательностями или двумя или более последовательностями нуклеиновых кислот (полинуклеотидными) согласно определению путем сравнения последовательностей. В предпочтительном варианте осуществления идентичность последовательностей рассчитывают на основе полной длины двух заданных SEQ ID NO или на основе их части. Их часть предпочтительно означает по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, или 100% обоих SEQ ID NO. В данной области техники "идентичность" также относится к степени родства последовательностей между аминокислотными последовательностями или последовательностями нуклеиновых кислот в зависимости от ситуации, определяемой по совпадению между отрезками таких последовательностей. "Сходство" между двумя аминокислотными последовательностями определяют путем сравнения аминокислотной последовательности с ее консервативными аминокислотными заменами в одном полипептиде с последовательностью второго полипептида. "Идентичность" и "сходство" можно без труда рассчитать известными способами, включая без ограничения те, которые описаны в Bioinformatics and the Cell: Modern Computational Approaches in Genomics, Proteomics and transcriptomics, Xia X., Springer International Publishing, New York, 2018; и Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis, Mount D., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2004, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки.

5

10

15

20

25

30

"сходство "Идентичность последовательностей" последовательностей" И онжом определить путем выравнивания двух пептидных или двух нуклеотидных последовательностей с использованием алгоритмов глобального или локального выравнивания в зависимости от длины двух последовательностей. Последовательности одинаковой длины предпочтительно выравнивают с использованием алгоритмов глобального выравнивания (например, Нидлмана-Вунша), которые обеспечивают выравнивание последовательностей ПО всей оптимальное длине, тогда последовательности существенно отличающейся длины предпочтительно выравнивают с использованием алгоритма локального выравнивания (например, Смита-Уотермана). Последовательности впоследствии можно назвать "в значительной степени идентичными" или "по существу сходными", если они (при оптимальном выравнивании, например, с помощью программы EMBOSS Needle или EMBOSS Water с использованием параметров по умолчанию) обладают по меньшей мере определенным минимальным процентным значением идентичности последовательностей (как описано ниже).

Глобальное выравнивание удобно использовать для определения идентичности последовательностей, если две последовательности имеют сходную длину. Если общая длина двух последовательностей существенно отличается, предпочтительными являются локальные выравнивания, как, например, с использованием алгоритма Смита-Уотермана. В EMBOSS Needle используется алгоритм глобального выравнивания Нидлмана-Вунша для выравнивания двух последовательностей по всей их длине (полной длине) с доведением до максимума количества совпадений и сведением к минимуму количества гэпов. В EMBOSS Water используется алгоритм локального выравнивания Смита-Уотермана. Как правило, для EMBOSS Needle и EMBOSS Water используются параметры по умолчанию со штрафом за открытие гэпа = 10 (нуклеотидные последовательности) / 10 (белки) и штрафом за продление гэпа = 0,5 (нуклеотидные последовательности) / 0,5 (белки). Для нуклеотидных последовательностей используемой по умолчанию матрицей замен является DNAfull, а для белков используемой по умолчанию матрицей замен является Blosum62 (Henikoff & Henikoff, 1992, PNAS 89, 915-919, включена в данный документ посредством ссылки).

5

10

15

20

25

30

В качестве альтернативы процентное значение сходства или идентичности можно определить путем поиска в общедоступных базах данных с использованием таких алгоритмов, как FASTA, BLAST и т. д. Таким образом, последовательности нуклеиновых кислот и белков из некоторых вариантов осуществления настоящего изобретения можно дополнительно использовать в качестве "запрашиваемой последовательности" для выполнения поиска в общедоступных базах данных, например, для идентификации других представителей семейства или родственных последовательностей. Такие поиски можно выполнять с использованием программ BLASTn и BLASTx (версии 2.0) из Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10, включенной в данный документ посредством ссылки. Поиски нуклеотидов в BLAST можно выполнять с помощью программы NBLAST, балл = 100, длина слова = 12, чтобы получить нуклеотидные последовательности, гомологичные молекулам нуклеиновой кислоты оксидоредуктазы по настоящему изобретению. Поиски белков в BLAST можно выполнять с помощью программы BLASTx, балл = 50, длина слова = 3, чтобы получить аминокислотные последовательности, гомологичные молекулам белков по настоящему изобретению. Для получения выравнивания с гэпами для целей сравнения можно использовать BLAST с гэпами, как описано в Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17): 3389-3402, включенной в данный документ посредством ссылки. При использовании программ BLAST и BLAST с гэпами можно использовать

5

10

параметры по умолчанию из соответствующих программ (например, BLASTx и BLASTn). См. домашнюю страницу Национального центра биотехнологической информации, доступную во Всемирной паутине по адресу: www.ncbi.nlm.nih.gov/.

При определении степени сходства аминокислот специалист необязательно может также принимать во внимание так называемые консервативные аминокислотные замены. Как используется в данном документе, "консервативные" аминокислотные замены относятся к взаимозаменяемости остатков, имеющих сходные боковые цепи. Примеры классов аминокислотных остатков для консервативных замен приведены в таблицах ниже.

Кислые остатки	Asp (D) и Glu (E)
Основные остатки	Lys (K), Arg (R) и His (H)
Гилпофили и по посердующи по сетети	Ser (S), Thr (T), Asn (N) и
Гидрофильные незаряженные остатки	Gln (Q)
Алифатические незаряженные остатки	Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L)
Алифатические незаряженные остатки	и Ile (I)
Неполярные незаряженные остатки	Cys (C), Met (M) и Pro (P)
Ароматические остатки	Phe (F), Tyr (Y) и Trp (W)

Альтернативные классы консервативных замен аминокислотных остатков:

1	A	S	T
2	D	Е	
3	N	Q	
4	R	K	
5	I	L	M
6	F	Y	W

Альтернативные физические и функциональные классификации аминокислотных остатков:

Остатки,	содержащие	спиртовую	ЅиТ
группу			
Алифатические остатки			I, L, V и M
Остатки, связанные с циклоалкенилом		алкенилом	F, H, W и Y

Гидрофобные остатки	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W и
	Y
Отрицательно заряженные остатки	DиE
Полярные остатки	С, D, E, H, K, N, Q, R, S и Т
Положительно заряженные остатки	Н, Ки R
Малые остатки	A, C, D, G, N, P, S, T и V
Очень малые остатки	А, G и S
Остатки, участвующие в образовании	А, С, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, Р и Т
поворотов	
Гибкие остатки	Q, T, K, S, G, P, D, E и R

Например, группа аминокислот с алифатическими боковыми цепями представляет собой глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; группа аминокислот с алифатическими гидроксильными боковыми цепями представляет собой серин и треонин; группа аминокислот с амидосодержащими боковыми цепями представляет собой аспарагин и глутамин; группа аминокислот с ароматическими боковыми цепями представляет собой фенилаланин, тирозин и триптофан; группа аминокислот с основными боковыми цепями представляет собой лизин, аргинин и гистидин; и группа аминокислот с серосодержащими боковыми цепями представляет собой цистеин и метионин. Предпочтительными группами консервативных аминокислотных замен являются валин-лейцин-изолейцин, фенилаланинтирозин, лизин-аргинин, аланин-валин и аспарагин-глутамин. Варианты аминокислотной последовательности с заменой, раскрытые в данном документе, представляют собой варианты, в которых по меньшей мере один остаток в раскрытых последовательностях был удален, а на его место вставлен другой остаток. Аминокислотная замена предпочтительно является консервативной. Предпочтительными консервативными заменами для каждой из встречающихся в природе аминокислот являются следующие: Ala на Ser; Arg на Lys; Asn на Gln или His; Asp на Glu; Cys на Ser или Ala; Gln на Asn; Glu на Asp; Gly на Pro; His на Asn или Gln; Ile на Leu или Val; Leu на Ile или Val; Lys на Arg; Gln или Glu; Met на Leu или Ile; Phe на Met, Leu или Tyr; Ser на Thr; Thr на Ser; Trp на Tyr; Tyr на Trp или Phe; а также Val на Ile или Leu.

Ген или кодирующая последовательность

5

10

15

20

Термин "ген" означает фрагмент ДНК, содержащий область (транскрибируемую область), которая транскрибируется в молекулу РНК (например, мРНК) в клетке, функционально связанную с подходящими регуляторными областями (например, промотором). Ген обычно содержит несколько функционально связанных фрагментов, таких как промотор, 5'-лидерная последовательность, кодирующая область и 3'-нетранслируемая последовательность (3'-конец), например, содержащая сайт полиаденилирования и/или терминации транскрипции. "Экспрессия гена" относится к процессу, в котором область ДНК, функционально связанная с соответствующими регуляторными областями, в частности с промотором, транскрибируется в РНК, которая является биологически активной, т. е. способна транслироваться в биологически активный белок или пептид.

Промотор

5

10

15

20

25

Используемый в данном документе термин "промотор" или "последовательность регуляции транскрипции" относится к фрагменту нуклеиновой кислоты, функция которого заключается в контроле транскрипции одной или нескольких кодирующих последовательностей и который расположен по направлению транскрипции выше сайта транскрипции кодирующей последовательности инициации И структурно идентифицируется по наличию сайта связывания ДНК-зависимой РНК-полимеразы, сайтов инициации транскрипции и любых других последовательностей ДНК, включая без ограничения сайты связывания факторов транскрипции, сайты связывания репрессорных и активаторных белков и любые другие последовательности нуклеотидов, которые, как известно специалисту в данной области, действуют прямо или косвенно для регуляции величины транскрипции с промотора. "Конститутивный" промотор представляет собой промотор, который активен в большинстве физиологических условий и условий развития. "Индуцируемый" промотор представляет собой промотор, который регулируется физиологически или в процессе развития, например, при применении химического индуктора.

Функционально связанный

30 Используемый в данном документе термин "функционально связанный" относится к соединению элементов полинуклеотида в функциональной взаимосвязи. Нуклеиновая кислота является "функционально связанной", если она расположена в функциональной взаимосвязи с другой последовательностью нуклеиновой кислоты. Например,

последовательность регуляции транскрипции функционально связана с кодирующей последовательностью, если она влияет на транскрипцию кодирующей Функционально последовательности. связанный означает, связываемые что последовательности ДНК, как правило, являются смежными и, если необходимо соединить две области, кодирующие белок, являются смежными и находятся в рамке считывания. Связывание можно осуществить путем лигирования в подходящие сайты рестрикции или в адаптеры или линкеры, вставленные вместо них, или путем синтеза генов.

10 Белки и аминокислоты

5

15

20

25

Термины "белок", или "полипептид", или "аминокислотная последовательность" используются взаимозаменяемо и относятся к молекулам, состоящим из цепи аминокислот, без ссылки на конкретный принцип действия, размер, 3-мерную структуру или происхождение. В описанных В данном документе аминокислотных последовательностях аминокислоты или "остатки" обозначаются трехбуквенными символами. Эти трехбуквенные символы, а также соответствующие однобуквенные символы хорошо известны специалисту в данной области и имеют следующее значение: А (Ala) означает аланин, С (Cys) означает цистеин, D (Asp) означает аспарагиновую кислоту, Е (Glu) означает глутаминовую кислоту, F (Phe) означает фенилаланин, G (Gly) означает глицин, H (His) означает гистидин, I (Ile) означает изолейцин, K (Lys) означает лизин, L (Leu) означает лейцин, М (Met) означает метионин, N (Asn) означает аспарагин, Р (Pro) означает пролин, Q (Gln) означает глутамин, R (Arg) означает аргинин, S (Ser) означает серин, Т (Thr) означает треонин, V (Val) означает валин, W (Trp) означает триптофан, Y (Туг) означает тирозин. Остаток может представлять собой любую протеиногенную аминокислоту, а также любую непротеиногенную аминокислоту, такую как Dмодифицированные аминокислоты, аминокислоты и образованные посредством посттрансляционных модификаций, а также любую неприродную аминокислоту.

Генные конструкции

30 Генные конструкции, описанные в данном документе, можно получить с помощью любых методик клонирования и/или рекомбинантной ДНК, известных специалисту в данной области, в которых нуклеотидная последовательность, кодирующая указанный миоглобин, экспрессируется в подходящей клетке, например, в культивируемых клетках

или клетках многоклеточного организма, таких как описанные в Ausubel *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology", Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York (1987) и в Sambrook and Russell (2001, выше); обе из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Также см. Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. 82:488 (где описывается сайт-направленный мутагенез) и Roberts *et al.* (1987) Nature 328:731-734 или Wells, J.A., *et al.* (1985) Gene 34: 315 (где описывается кассетный мутагенез).

Векторы экспрессии

5

20

- Фраза "вектор экспрессии" или "вектор" обычно относится к инструменту в молекулярной биологии, используемому для достижения экспрессии гена в клетке, например, путем введения нуклеотидной последовательности, которая способна осуществлять экспрессию гена или кодирующей последовательности в хозяине, совместимом с такими последовательностями. Вектор экспрессии несет геном, способный стабилизироваться и оставаться эписомным в клетке. В контексте настоящего изобретения клетка может подразумеваться как охватывающая клетку, используемую для получения конструкции, или клетку, в которую будет вводиться конструкция. В качестве альтернативы вектор способен интегрироваться в геном клетки, например, путем гомологичной рекомбинации или иным образом.
 - Эти векторы экспрессии обычно содержат по меньшей мере подходящие промоторные последовательности и необязательно сигналы терминации транскрипции. Также может использоваться дополнительный фактор, необходимый или полезный для осуществления экспрессии, как описано в данном документе. Нуклеиновую кислоту, или ДНК, или нуклеотидную последовательность, кодирующую миоглобин, включают в состав ДНК-конструкции, которую можно вводить и экспрессировать в культуре клеток *in vitro*. В частности, ДНК-конструкция пригодна для репликации в прокариотическом хозяине, таком как бактерия, например, *E. coli*, или может вводиться в культивируемые линии клеток млекопитающих, растений, насекомых (например, Sf9), дрожжей, грибов или другие линии эукариотических клеток.
- 30 ДНК-конструкция, полученная для введения конкретному хозяину, может содержать систему репликации, распознаваемую хозяином, намеченный сегмент ДНК, кодирующий желаемый полипептид, и регуляторные последовательности инициации и терминации транскрипции и трансляции, функционально связанные с сегментом, кодирующим

полипептид. Термин "функционально связанный" уже был описан в данном документе. Например, промотор или энхансер функционально связан С последовательностью, если он стимулирует транскрипцию последовательности. ДНК для сигнальной последовательности функционально связана с ДНК, кодирующей полипептид, если она экспрессируется в виде белка-предшественника, который участвует в секреции полипептида. Как правило, последовательности ДНК, которые функционально связаны, являются смежными, а в случае сигнальной последовательности - как смежными, так и находящимися в рамке считывания. Однако энхансеры не обязательно должны быть смежными c кодирующей последовательностью, транскрипцию которой ОНИ контролируют. Связывание осуществляется путем лигирования в подходящие сайты рестрикции или в адаптеры или линкеры, вставленные вместо них, или путем синтеза генов.

5

10

15

20

25

30

Выбор подходящей промоторной последовательности обычно зависит от клетки-хозяина, выбранной для экспрессии сегмента ДНК. Примеры подходящих промоторных последовательностей включают прокариотические и эукариотические промоторы, хорошо известные из уровня техники (см., например, Sambrook and Russell, 2001, выше). Последовательность регуляции транскрипции обычно содержит гетерологичный энхансер или промотор, который распознается хозяином. Выбор подходящего промотора зависит от хозяина, но известны и доступны такие промоторы, как промоторы trp, lac и фага, промоторы тРНК и промоторы генов гликолитических ферментов (см., например, Sambrook and Russell, 2001, выше). Вектор экспрессии содержит систему репликации и последовательности регуляции транскрипции и трансляции вместе с сайтом вставки для сегмента, кодирующего полипептид. В большинстве случаев система репликации функционирует только в клетке, которая используется для создания (бактериальной клетке, такой как E. coli). Большинство плазмид и векторов не реплицируются в клетках, инфицированных вектором. Примеры осуществимых комбинаций линий клеток и векторов экспрессии описаны в Sambrook and Russell (2001, выше) и в Metzger et al. (1988) Nature <u>334</u>: 31-36. Например, подходящие векторы экспрессии могут экспрессироваться в дрожжах, например, S. cerevisiae, например, клетках насекомых, например, клетках Sf9, клетках млекопитающих, например, клетках СНО, и бактериальных клетках, например, E. coli. Таким образом, клетка может являться прокариотической или эукариотической клеткой-хозяином. Клетка может быть клеткой, пригодной для культивирования в жидкой или на твердой среде.

В качестве альтернативы клетка-хозяин представляет собой клетку, являющуюся частью многоклеточного организма, такого как трансгенное растение или животное.

Выбор подходящей промоторной последовательности обычно зависит от клетки-хозяина, выбранной для экспрессии сегмента ДНК. Примеры подходящих промоторных последовательностей включают прокариотические и эукариотические промоторы, хорошо известные из уровня техники (см., например, Sambrook and Russell, 2001, выше). Последовательность регуляции транскрипции обычно содержит гетерологичный энхансер или промотор, который распознается хозяином. Выбор подходящего промотора зависит от хозяина, но известны и доступны такие промоторы, как промоторы trp, lac и фага, промоторы тРНК и промоторы генов гликолитических ферментов (см., например, Sambrook and Russell, 2001, выше). Вектор экспрессии содержит систему репликации и последовательности регуляции транскрипции и трансляции вместе с сайтом вставки для сегмента, кодирующего полипептид. В большинстве случаев система репликации функционирует только в клетке, которая используется для создания вектора (бактериальной клетке, такой как E. coli). Большинство плазмид и векторов не реплицируются в клетках, инфицированных вектором. Примеры осуществимых комбинаций линий клеток и векторов экспрессии описаны в Sambrook and Russell (2001, выше) и в Metzger et al. (1988) Nature 334: 31-36. Например, подходящие векторы экспрессии могут экспрессироваться в дрожжах, например, S. cerevisiae, например, и бактериальных клетках, например, E. coli. Таким образом, клетка может являться прокариотической или эукариотической клеткой-хозяином. Клетка может быть клеткой, пригодной для культивирования в жидкой или на твердой среде.

Экспрессия

5

10

15

20

Экспрессию можно оценить любым способом, известным специалисту в данной области. Например, экспрессию можно оценить путем измерения уровней экспрессии трансгена в трансдуцированной ткани на уровне мРНК или белка с помощью стандартных анализов, известных специалисту в данной области, таких как qPCR, секвенирование PHK, нозернблот-анализ, вестерн-блот-анализ, масс-спектрометрический анализ пептидов, 30 полученных из белка, или ELISA.

Экспрессию можно оценить в любое время после введения генной конструкции, вектора экспрессии или композиции, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления в данном документе экспрессию можно оценить через 1 неделю, 2 недели,

3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель, 11 недель, 12 недель, 14 недель, 16 недель, 18 недель, 20 недель, 22 недели, 24 недели, 28 недель, 32 недели, 36 недель, 40 недель или больше.

5

20

25

30

В данном документе и в его формуле изобретения глагол "содержать" и его спряжения используются в их неограничивающем смысле для обозначения того, что элементы, следующие за словом, включены, но элементы, не упомянутые конкретно, не исключены. Кроме того, глагол "состоять" может быть заменен на "состоять по существу из", что означает, что заменитель мяса, генная конструкция, клетка-хозяин (или способы), 10 описанные В данном документе, могут предусматривать дополнительный (дополнительные) компонент(компоненты) (или дополнительные стадии), помимо конкретно указанных, при этом указанный(указанные) дополнительный (дополнительные) компонент (компоненты) не изменяют уникальную характеристику настоящего изобретения. Кроме того, глагол "состоять" может быть 15 заменен на "состоять по существу из", что означает, что способ, описанный в данном документе, может включать дополнительную (дополнительные) стадию (стадии), помимо конкретно указанных, при этом указанная(указанные) дополнительная(дополнительные) стадия(стадии) не изменяют уникальную характеристику настоящего изобретения.

Ссылка на элемент в форме единственного числа не исключает возможности присутствия более чем одного из этих элементов, если только контекст явно не требует наличия одного и только одного из этих элементов. Таким образом, форма единственного числа обычно означает "по меньшей мере один".

Как используется в данном документе, "по меньшей мере" конкретное значение означает данное конкретное значение или больше. Например, "по меньшей мере 2" понимают как то же самое, что и "2 или больше", т. е. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 и т. д.

Кроме того, термины "первый", "второй", "третий" и т. п. в описании и в формуле изобретения используются для проведения различий между сходными элементами и не обязательно для описания последовательного или хронологического порядка. Следует понимать, что термины, используемые таким образом, являются взаимозаменяемыми при соответствующих обстоятельствах, и что описанные в данном документе варианты осуществления настоящего изобретения могут работать в других последовательностях, отличных от описанных или проиллюстрированных в данном документе.

Слово "приблизительно" или "примерно" при использовании в связи с числовым значением (например, приблизительно 10) предпочтительно означает, что значение может быть заданным значением (10) плюс-минус 0,1% от данного значения.

Используемый в данном документе термин "и/или" указывает на то, что может иметь место один или несколько указанных случаев отдельно или в комбинации с по меньшей мере одним из указанных случаев, вплоть до всех указанных случаев.

В данном документе описаны различные варианты осуществления. Каждый вариант осуществления, указанный в данном документе, можно использовать в комбинации, если не указано иное.

Все патентные заявки, патенты и печатные публикации, цитируемые в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, за исключением любых определений, заявлений об отказе от прав или отказе от ответственности в отношении объекта изобретения, а также за исключением случаев, когда включенный материал не соответствует раскрытию в явной форме в данном документе, и в этом случае формулировка в настоящем раскрытии имеет преимущественную силу.

Специалисту в данной области известны многие способы и материалы, сходные с описанными в данном документе или эквивалентные им, которые можно применять при осуществлении настоящего изобретения на практике. В действительности настоящее изобретение никоим образом не ограничено описанными способами и материалами.

Настоящее изобретение дополнительно описано с помощью следующих примеров, которые не следует истолковывать как ограничивающие объем настоящего изобретения.

Условные обозначения на фигурах

5

10

15

20

30

Фигура 1. Трехмерная структура бычьего миоглобина. Структура свиного Мb дикого типа, определенная методом рентгеновской дифракции с разрешением 1,8 Å (Krzywda et al. 1998). Показаны гем, проксимальный гистидин (His94) и дистальный гистидин (His65).

Фигура 2. Сравнение последовательностей белка миоглобина от шести видов животных. В выравнивании последовательностей показаны последовательности тунца (*Thumus orientalis*), курицы (*Gallus gallus*), степного мамонта (*Mammuthus trogontherii*), свиньи (*Sus scrofa*), крупного рогатого скота (*Bos taurus*) и овцы (*Ovis aries*). Уровень консервативности аминокислот указан синим затушевыванием с использованием балла BLOSUM62. Проксимальный гистидин (His94, в рамке) присутствует у всех шести видов. Степной мамонт несет глутамин (Gln65, в рамке) в положении, обычно занимаемом дистальным гистидином (His65, в рамке), фенилаланин в положении 30 (Phe30, в рамке) и гистидин в положении 92 (His92, в рамке).

10

15

20

25

- **Фигура 3**. Модель трехмерной структуры миоглобина индийского слона (слева) и степного мамонта (справа). Показаны ленточная (вверху) и поверхностная (внизу) проекции. Изображена молекула гема, а также остаток в положении 92 (глутамин у слона, гистидин у мамонта). На поверхностной проекции положительные заряды показаны более темным серым цветом.
- **Фигура 4**. Продуцирование внеклеточного Мb животного происхождения в *Pichia pastoris*. Образцы бесклеточной надосадочной жидкости собирали после ферментации с индукцией метанолом (+) или без нее (-) и концентрировали в 10 раз путем ультрафильтрации. Концентрированные образцы, полученные после индукции метанолом, демонстрировали темно-красный цвет (A), и после анализа методом SDS-PAGE выявили белок с ожидаемой молекулярной массой для Mb (B).
- Фигура 5. Отсутствие рекомбинантной ДНК в препаратах миоглобина, полученных путем ферментации. Один и тот же гель показан при двух разных значениях времени экспозиции (верхняя и нижняя панели). Звездочкой указаны праймеры, оставшиеся после ПЦР-реакции.
- Фигура 6. Охват последовательности при идентификации миоглобина мамонта с помощью масс-спектрометрии. На столбчатой диаграмме (нижняя панель) показана интенсивность сигнала различных пептидов в логарифмическом масштабе. Последовательности пептидов в нижней части графика соответствуют SEQ ID NO: 31-80.

Фигура 7. Спектры поглощения растворов миоглобина мамонта и крупного рогатого скота. (А) Спектры поглощения рекомбинантного Мb степного мамонта (черные кружки), Мb крупного рогатого скота (белые кружки) и коммерчески доступного Мb, очищенного из мышц лошади (треугольники), регистрировали при комнатной температуре. (В) Спектры поглощения Мb лошади в ходе 24-часовой инкубации при pH 5,6 и 25°C. На вставке показано соотношение между поглощением при 580 нм (MbO2) и при 505 нм (MetMb) для рекомбинантного Mb мамонта (черные столбцы), Mb крупного рогатого скота (серые столбцы) и коммерчески доступного Mb лошади (белый столбец). Звездочками представлены статистически значимые различия между рекомбинантным Mb и Mb лошади: (*) = p < 0.05, (**) = p < 0.01.

Фигура 8. Цвет полученных в лаборатории аналогов мяса, содержащих миоглобин. Изображения (A) и количественные оценки (B), демонстрирующие эффект добавления миоглобина в отношении цвета бифштексов на растительной основе.

15

20

25

30

5

10

Фигура 9. Стабильность цвета аналогов мяса, содержащих миоглобин. Изображения (A) и количественные оценки (B), демонстрирующие изменения цвета, наблюдаемые с течением времени в бифштексах на растительной основе, содержащих различные концентрации очищенного Мb лошади, подвергавшихся воздействию постоянного освещения при 4°С. Для сравнения был включен коммерческий бифштекс, содержащий соевый леггемоглобин.

Фигура 10. Летучие соединения, экстрагированные из полученных в лаборатории аналогов мяса, содержащих рекомбинантные гемсодержащие белки. (А) Количественное определение ряда летучих соединений, извлеченных из бифштексов на растительной основе, с помощью HS-SPME с GC-MS. Было обнаружено, что значения, не имеющие одного и того же индекса, значимо отличаются друг от друга при р < 0,05 в соответствии с HSD-критерием Тьюки. (В) Анализ методом главных компонент (РСА) для летучих веществ из полученных в лаборатории бифштексов на растительной основе — сырых (показанных зеленым цветом) либо жареных (показанных синим цветом). В качестве эталона использовали коммерчески доступный бифштекс на растительной основе, содержащий рекомбинантный соевый леггемоглобин (LegH).

Фигура 11. Фигура 11. Летучие соединения, ассоциированные с добавлением рекомбинантного миоглобина к полученным в лаборатории аналогам мяса. (А) Относительные количества летучих вкусоароматических активных соединений, обнаруженных в жареных бифштексах на растительной основе, нормализованные к уровням, наблюдаемым в бифштексах на растительной основе без Mb. Звездочками представлены статистически значимые различия между бифштексами с Mb и без Mb: (*) = p < 0.5, (**) = p < 0.01, (***) = p < 0.001. С помощью \$ представлены статистически значимые различия между Мb мамонта и крупного рогатого скота: (\$) = p < 0.05, (\$\$) = p < 0.05. (В) Описание аромата летучих соединений, которые также обнаруживаются в вареном мясе (van Ba et al. 2021, информационная система The Good Scent Company).

Фигура 12. Биодоступность железа из миоглобина. Поглощение железа (содержание ферритина в нг, нормализованное к содержанию общего белка в мг) клетками кишечника человека Сасо-2, подвергающимися воздействию очищенного бычьего Мb при 0,5 мг/мл, 1,0 мг/мл или 2,0 мг/мл по сравнению с контрольной средой в отдельности (СМ). Звездочками представлены статистически значимые различия между СМ и видами обработки: (****) = p < 0,0001.

Фигура 13. Эффект рекомбинантного миоглобина в отношении монослоев дифференцированных Сасо-2. Цитотоксичность измеряли спустя 24 ч. инкубации в присутствии рекомбинантного Мb мамонта или крупного рогатого скота или полной среды (CM) в качестве контроля. Звездочками представлены статистически значимые различия между CM и видами обработки: (*) = p < 0.05; (**) = p < 0.01.

Примеры

5

10

15

20

25

30

Пример 1. Способ получения А

Пример 1.1. Общее конструирование генных конструкций и векторов

В некоторых случаях полные векторы и/или кассеты геномной интеграции, подходящие для экспрессии в *Pichia pastoris*, *Escherichia coli* и *Aspergillus niger*, получают синтетическим путем коммерческие поставщики. В некоторых случаях конструирование

фрагментов векторов и/или кассет геномной интеграции осуществляют с помощью ПЦР с праймерами, предназначенными для введения совместимых выступающих концов между фрагментами, и коммерчески доступными полимеразами в соответствии с протоколом производителя с последующей полной сборкой вектора и/или кассеты геномной интеграции, осуществляемой in vitro с использованием коммерчески доступных наборов в соответствии с протоколами производителей. В некоторых случаях полная сборка вектора осуществляется in vivo посредством введения фрагментов вектора в клетки дрожжей путем трансформации, как описано ранее в уровне техники (Kuijpers et al. 2013), с последующим выделением полных векторов с использованием коммерчески доступных наборов.

5

10

15

20

25

30

Полные векторы содержат известные необходимые последовательности точек начала репликации для поддержания указанных векторов в соответствующем организме, нуклеотидную последовательность, которая должна экспрессироваться (выбранную из SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16), подходящие регуляторные элементы для экспрессии в соответствующем организме (по меньшей мере промотор и терминатор) и маркер селекции, позволяющий проводить скрининг правильных трансформантов и поддерживать вектор в трансформированных штаммах. Кассеты геномной интеграции нуклеотидную последовательность, которая должна экспрессироваться (выбранную из SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16), подходящие регуляторные элементы для экспрессии в соответствующем организме (по меньшей мере промотор и терминатор) и необязательно 5'- и 3'-области подходящей длины, как, например, от 30 до 3000 п. о., которые гомологичны соответствующему сайту геномной интеграции, для облегчения гомологичной рекомбинации. В некоторых случаях кассеты геномной интеграции сливают и/или вводят посредством совместной трансформации с подходящими маркерами селекции для облегчения скрининга. В некоторых случаях подходящие маркеры селекции, слитые с кассетой геномной интеграции, удаляют из после трансформации конечного штамма-продуцента c помощью общеизвестных из уровня техники, таких как отрицательный отбор в подходящей среде, применение системы рекомбиназы Сте-Lox или применение способов на основе CRISPR/Cas, как, например, для создания безмаркерного штамма. В некоторых случаях нуклеотидные последовательности, которые должны экспрессироваться из векторов и/или кассет геномной интеграции, функционально связаны с последовательностями, облегчения кодирующими подходящие сигнальные пептиды для выведения

экспрессируемого слитого белка и/или метки последовательностей для облегчения очистки экспрессируемого слитого белка после его выведения. В некоторых случаях функционально связанные последовательности таковы, что в результате происходит слияние экспрессируемых пептидов с N-концом слитого белка. В некоторых случаях слитая последовательность содержит сайты распознавания для нативных или синтетических пептидаз, которые облегчают отщепление сигнального пептида и/или метки от слитого белка во время или после выведения экспрессируемого слитого белка клеткой.

Пример 1.2. Общее конструирование штаммов

5

10

15

20

25

30

Штаммы Pichia pastoris, Escherichia coli и Aspergillus niger трансформируют с использованием методик на основе молекулярного инструментария, известных из уровня техники. Отбор правильных трансформантов осуществляют в известных подходящих условиях роста для каждого организма, в подходящих известных селективных средах для выращивания, таких как содержащие антибиотики, в зависимости от того, используется ли маркер селекции и к какому типу он относится (доминантный/ауксотрофный), после обеспечения возможности прохождения достаточного времени для наблюдения роста колонии. Правильные трансформанты в каждом случае подтверждают с помощью диагностической ПЦР или других подходящих известных способов на основе молекулярного инструментария, таких как Саузерн-блоттинг. В некоторых случаях, когда для трансформации используются кассеты геномной интеграции, штаммы, подлежащие трансформации, характеризуются дефицитом аппарата репарации путем негомологичного соединения концов для облегчения гомологичной рекомбинации. В некоторых случаях, когда для трансформации использовали маркер селекции, маркер селекции удаляют, как описано в примере 1, так чтобы получить безмаркерный штамм. Правильно трансформированные штаммы сохраняют в виде исходных культур в глицерине при -80°С для дальнейшего применения.

Пример 1.3. Продуцирование миоглобина трансформированными штаммами

Трансформированные штаммы, полученные в примере 2, тестируют в отношении продуцирования внеклеточного миоглобина. Культивирование клеток осуществляют

путем культивирования во встряхиваемых колбах в общеизвестных условиях, способствующих продуцированию белка, подходящих для каждого хозяина, таких как температура, рН и ионная сила среды для выращивания и скорость перемешивания. В некоторых случаях значение температуры находится в диапазоне 16-40°C, значение рН находится в диапазоне 3-7, значение ионной силы находится в диапазоне 100-1000 мМ, а скорость перемешивания находится в диапазоне 100-300 об/мин. Среда для выращивания, подходящая для культивирования каждого хозяина, общеизвестна и содержит источники углерода и азота, а также дополнительные питательные вещества, такие как неорганические соли и витамины. Культуры инокулируют из замороженных исходных культур трансформированных штаммов. Спустя 12-24 ч. культивирования собирают культуральный бульон и удаляют биомассу посредством центрифугирования. Затем надосадочную жидкость культуры тестируют на присутствие продуцируемого миоглобина с помощью известных методик, таких как электрофорез в SDS-PAGE, путем идентификации полосы правильного размера или с помощью вестерн-блоттинга с использованием коммерчески доступных антител. Результаты продуцирование внеклеточного миоглобина. Затем продуцируемый миоглобин очищают от надосадочной жидкости культуры и очищают с помощью хроматографических методик в соответствии со стандартными протоколами. Отсутствие пептида для выведения (отщепляющегося ходе выведения) подтверждают С помощью массспектрометрического анализа В соответствии co стандартными протоколами секвенирования белков. Очищенный миоглобин хранят при -20°C для последующего применения.

Пример 1.4. Получение заменителя мяса

25

30

5

10

15

20

Очищенный миоглобин, полученный в примере 3, используют для получения мышечной ткани и жировой ткани (жировой клетчатки) в соответствии с известными процедурами. Для получения заменителя мышечной ткани очищенный миоглобин сшивают с белком вицилином гороха с помощью трансглутаминазы. Заменитель мышечной ткани также получают путем образования нагретого геля из белка вицилина гороха, в который добавляют очищенный миоглобин и тщательно перемешивают в ходе охлаждения нагретого геля до комнатной температуры. Заменитель мышечной ткани также получают путем совместной экструзии очищенного миоглобина с белком вицилином гороха.

Заменитель жировой ткани получают путем образования нагретого геля из белка альбумина, масла и лецитина гороха после гомогенизации под высоким давлением, в который добавляют очищенный миоглобин и тщательно перемешивают в ходе охлаждения нагретого геля до комнатной температуры. Заменитель соединительной ткани получают с использованием источника белка зеина путем экструзии в соответствии с известными процедурами. Заменители мышечной, жировой и соединительной ткани объединяют в желаемых соотношениях в

мясорубке с получением заменителя мяса. В некоторых случаях заменитель мяса затем варят.

Пример 1.5. Получение очищенного миоглобина с помощью Escherichia coli

5

10

15

20

25

30

Полноразмерные гены миоглобина шерстистого мамонта, степного мамонта, овцы, коровы, свиньи, курицы и тунца (SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16) синтезируют и клонируют в модифицированный вектор рЕТ-23а(+), содержащий промотор и терминатор T7 и С-концевую гекса-His-метку (GenScript Biotech, Лейден, Нидерланды). В данном документе подразумевается, что SEQ ID NO: 9 кодирует только часть миоглобина, но, тем не менее, может синтезироваться и клонироваться в указанный вектор. Маркерный ген *атр*R, изначально присутствующий в указанном векторе, заменяют опероном *proBA* из штамма K12 E. coli, содержащим его исходные элементы регуляции транскрипции, для облегчения отбора без антибиотиков. Правильно собранные плазмиды подтверждают с помощью ПЦР и используют для трансформации ауксотрофного по пролину штамма E. coli, являющегося продуцентом белка (E. coli K12 ДргоВА). Трансформированные штаммы инкубируют в течение ночи во встряхиваемых колбах, содержащих минимальную среду $(10.5 \text{ г/л } \text{ K}_2\text{HPO}_4, 4.5 \text{ г/л } \text{KH}_2\text{PO}_4, 1.0 \text{ г/л } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4, 0.12 \text{ г/л } \text{MgSO}_4, 0.5 \text{ г/л } \text{цитрата Na, 2}$ г/л глюкозы и 5,0 мг/л тиамина·HCl), при 37°C и 150 об/мин (рН 6). 500 мкл суточной культуры переносят во встряхиваемую колбу объемом 1 л, содержащую 500 мл минимальной среды, и инкубируют при 37°C и 150 об/мин до достижения OD600, составляющей 0,4-1. К культуре добавляют IPTG (изопропил-β-D-тиогалактозид) в концентрации 100 мкМ, после чего культуру инкубируют в течение 24 ч. при 16°C и 150 об/мин. Культуру собирают и центрифугируют при 3500 x g (4°C) в течение 15 мин. Надосадочную жидкость сливают, а осадок растворяют в 50 мл реагента для экстракции белков BugBuster (Novagen), содержащего 1 кЕд/мл лизоцима (Sigma-Aldrich), 25 Ед нуклеазы Benzonase® и не содержащий EDTA коктейль ингибиторов протеаз сOmpleteTM (Roche). Растворенный осадок инкубируют в течение 30 мин. при 4°C на встряхивателе. Стадию центрифугирования повторяют, и бесклеточный экстракт (надосадочную жидкость) собирают и анализируют с помощью SDS-PAGE для подтверждения продуцирования миоглобинов. Продуцирование миоглобинов шерстистого мамонта, степного мамонта, овцы, коровы, свиньи, курицы и тунца соответствующими трансформированными штаммами подтверждается наличием полос белков правильного размера.

Для очистки бесклеточные экстракты, содержащие растворимую фракцию белков, загружают в колонку HisTrap FF объемом 1 мл (Cytiva, Maccaчусетс, США), соединенную с системой АКТА Start. Колонку уравновешивают с помощью 20 мМ HEPES, 0,4 М NaCl и 20 мМ имидазола, рН 7,5, при скорости потока 1 мл/мин. Белок элюируют с помощью 20 мМ HEPES, 0,4 М NaCl и 400 мМ имидазола, рН 7,5. Фракции, содержащие миоглобины, объединяют, концентрируют и подтверждают с помощью SDS-PAGE и вестерн-блоттинга с использованием антитела к гистидиновой метке (Bio-Rad), что позволяет подтвердить успешную очистку всех миоглобинов. Очищенные миоглобины хранят при -20°C для последующего применения.

Пример 1.6. Получение очищенного миоглобина с помощью Aspergillus niger

20

25

30

5

10

15

Синтезируют кассеты экспрессии миоглобина полной длины, содержащие гены шерстистого мамонта, степного мамонта, овцы, коровы, свиньи, курицы и тунца (SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16) под контролем промотора и терминатора glaA A. niger, функционально связанные с сигнальной последовательностью для выведения из пектинметилэстеразы A. niger для облегчения выведения миоглобина. В данном документе подразумевается, что SEQ ID NO: 9 кодирует только часть миоглобина, но, тем не менее, может содержаться в указанной кассете экспрессии. Кассеты геномной интеграции собирают с помощью ПЦР с перекрывающимися праймерами кассет экспрессии миоглобина с последовательностью гена оротидин-5'-фосфатдекарбоксилазы (pyrG) из Aspergillus oryzae, а также с 1000 п. о. на 5'- и 3'-концах, которые являются гомологичными вышерасположенным нативным нижерасположенным И последовательностям гена *pyrG A. niger*.

5

10

15

20

25

30

Кассеты геномной интеграции вводят путем трансформации в протопласты A. niger CBS Перед трансформацией протопласты ∆kusA $\Delta pvrG$. получают культивирования в течение ночи во встряхиваемых колбах в полной среде (2% (масса/объем) глюкозы, 6 г/л NaNO₃, 1,5 г/л KH₂PO₄, 0,5 г/л KCl, 0,5 г/л MgSO₄*7H₂O, 0,2% (масса/объем) триптона, 0,1% (масса/объем) дрожжевого экстракта, 0,1% (масса/объем) казаминовых кислот, 0,05% (масса/объем) РНК дрожжей и микроэлементы по Вишняку (1957)) при 30°С и 250 об/мин. Мицелии собирают путем фильтрации и растворяют в РЅ-буфере (0,2 М натрий-фосфатного буфера, 0,8 М L-сорбита, рН 6), к которому добавляют 0,5 г лизирующего фермента VinoTaste® Pro на г мицелиев с последующей инкубацией при 30°C и 100 об/мин. Нерасщепленные мицелии удаляют путем фильтрации, а протопласты собирают путем мягкого центрифугирования (1500 х g, 3°С), промывают раствором SC (182,2 $\Gamma \cdot \pi^{-1}$ сорбита, 7,35 $\Gamma \cdot \pi^{-1}$ CaCl₂* 2H₂O) и ресуспендируют в том же растворе до концентрации 10^8 протопластов/мл. Свежие протопласты трансформируют путем смешивания 200 мкл суспензии протопластов с 5 мкг кассеты геномной интеграции в смеси, дополнительно содержащей 20 мкл 0,4 М АТА (аммониевой соли ауринтрикарбоновой кислоты) и 100 мкл 20% РЕС-4000, с последующей инкубацией в течение 10 мин. Затем добавляют 5 мл 1,2 М раствора сорбита, и смесь инкубируют в течение еще 10 мин. Трансформированные протопласты собирают путем мягкого центрифугирования и ресуспендируют в 1 мл того же раствора сорбита. Трансформированные протопласты высевают на чашки с минимальной агаровой средой (1,5% (масса/объем) агара, 2% (масса/объем) глюкозы, 6 г/л NaNO₃, 1,5 г/л KH_2PO_4 , 0,5 г/л KCl, 0,5 г/л $MgSO_4*7H_2O$ и микроэлементы по Вишняку (1957)) и инкубируют при 30°C в течение 4 дней (рН 5). ДНК из отобранных трансформантов экстрагируют с помощью стандартной экстракции фенолом/хлороформом. Правильную интеграцию кассет геномной интеграции, содержащих гены миоглобина шерстистого мамонта, степного мамонта, овцы, коровы, свиньи, курицы и тунца, подтверждают с помощью Саузерн-блоттинга.

Споры правильных трансформантов получают путем инкубации на чашках с полной агаровой средой в течение четырех дней при 30°C и собирают с помощью 10 мл буфера на основе N-(2-ацетамидо)-2-аминоэтансульфоновой кислоты (ACES). 2 х 10⁸ спор используют для инокуляции культур во встряхиваемых колбах, содержащих 400 мл минимальной среды, и инкубируют в течение ночи при 30°C, 250 об/мин. Мицелии переносят в свежие культуры во встряхиваемых колбах, содержащие 400 мл минимальной

среды, и выдерживают при 30°C, 250 об/мин в течение 24 ч. Клетки удаляют путем сбора культуры с последующим центрифугированием при 3200×g при 4°C в течение 10 мин. Надосадочную жидкость анализируют с помощью SDS-PAGE для подтверждения продуцирования миоглобинов. Экспрессия миоглобинов шерстистого мамонта, степного мамонта, овцы, коровы, свиньи, курицы и тунца соответствующими трансформированными штаммами подтверждается наличием полос белков правильного размера.

Для очистки образцы надосадочной жидкости культуры, содержащие растворимую фракцию белков, загружают в колонку HiLoad 16/600 Superdex 75 pg (10 мм х 300 мм) (Суtiva, Массачусетс, США). Колонку уравновешивают с помощью 0,15 М ацетата аммония, рН 6,0, при скорости потока 0,75 мл/мин. Фракции, содержащие миоглобины, объединяют, концентрируют и подтверждают с помощью SDS-PAGE и LC-MS в соответствии со стандартными протоколами. Результаты подтверждают присутствие очищенных миоглобинов без сигнального пептида для выведения.

15

20

25

30

10

5

Пример 1.7. Получение очищенного миоглобина с помощью Pichia pastoris

Синтезируют кассеты экспрессии миоглобина полной длины, содержащие гены шерстистого мамонта, степного мамонта, овцы, коровы, свиньи, курицы и тунца (SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16) под контролем нативного промотора и терминатора *pgk1* P. pastoris. Кассеты геномной интеграции собирают c помощью ПЦР перекрывающимися праймерами кассет экспрессии миоглобина с геном, кодирующим нативный ген трифункционального белка пути биосинтеза гистидина P. pastoris (his4) под контролем его собственного промотора и терминатора, а также с 1000 п. о. на 5'- и 3'которые являются гомологичными нативным вышерасположенным нижерасположенным последовательностям локуса his4 P. pastoris. Кассеты геномной интеграции вводят путем трансформации в не содержащий маркеров устойчивости к антибиотикам ауксотрофный по гистидину штамм Bg12 P. pastoris (BioGrammatics Inc., Карлсбад, Калифорния), используя протокол трансформации, опосредованной ацетатом лития, описанный panee в Gietz and Woods (2002) (Gietz RD et al., (2002), Methods Enzymol., 350: 87-96). Правильные трансформанты получают путем инкубации на чашках с 2% вес/об. агара, содержащих синтетическую среду (без гистидина для облегчения отбора), как описано ранее в Verduyn et al. (1992) (Verduyn C., et al. (1992), Yeast, 8: 501517): 5 г/л (NH₄)₂SO₄, 3 г/л KH₂PO₄, 0,5 г/л MgSO₄·7H₂O, 4,5 мг/л ZnSO₄·7H₂O, 0,3 мг/л CoCl₂·6H₂O, 1 мг/л MnCl₂·4H₂O, 0,3 мг/л CuSO₄·5H₂O, 4,5 мг/л CaCl₂·H₂O, 3 мг/л FeSO₄·7H₂O, 0,4 мг/л NaMoO₄·2H₂O, 1 мг/л H₃BO₃, 0,1 мг/л KI, 0,05 г/л биотина, 1 мг/л пантотената кальция, 1 мг/л никотиновой кислоты, 25 мг/л инозитола, 1 мг/л тиамина·HCl, 1 мг/л пиридоксина·HCl, 0,2 мг/л пара-аминобензойной кислоты и 2% вес/об. глюкозы в качестве источника углерода (рН 5). Чашки инкубируют при 30°C в течение 4 дней. Правильную интеграцию кассет геномной интеграции, содержащих гены миоглобина шерстистого мамонта, степного мамонта, овцы, коровы, свиньи, курицы и тунца, подтверждают с помощью ПЦР для отбора колоний после получения ДНК с использованием набора Yeast Protein Kit (Zymo Research, Ирвин, Калифорния) согласно протоколу производителя. Получают исходные культуры правильных трансформантов в глицерине и хранят при -80°C.

5

10

15

20

25

30

Для продуцирования миоглобина замороженные исходные культуры в глицерине используют для инокуляции 1-литровых встряхиваемых колб для предварительного культивирования, содержащих 500 мл синтетической среды, и инкубируют в течение ночи при 30°C и 250 об/мин. Предварительные культуры используют для инокуляции последующих культур во встряхиваемых колбах до начальной ОД660, составляющей 0,2. Культуры инкубируют при 30°С и 250 об/мин в течение 24 ч. Культуры собирают и центрифугируют при 3500×g (4°C) в течение 15 мин. Надосадочную жидкость сливают, клеточный осадок ресуспендируют в ледяной деминерализованной воде, и стадию центрифугирования повторяют. Надосадочную жидкость сливают, а клетки лизируют с использованием набора Yeast Protein Kit (Zymo Research, Ирвин, Калифорния) в соответствии с протоколом производителя наряду с механическим разрушением. Смесь, содержащую клеточный дебрис и растворимые белки, центрифугируют при 3500×g (4°C) в течение 15 мин. Надосадочную жидкость (бесклеточный экстракт), содержащую растворимые белки, собирают и анализируют с помощью SDS-PAGE для подтверждения продуцирования миоглобинов. Продуцирование миоглобинов шерстистого мамонта, степного мамонта, овцы, коровы, свиньи, курицы и тунца соответствующими трансформированными штаммами подтверждается наличием полос белков правильного размера.

Для очистки бесклеточные экстракты, содержащие растворимую фракцию белков, загружают в колонку HiLoad 16/600 Superdex 75 pg (10 мм х 300 мм) (Cytiva, Maccaчусетс, США). Колонку уравновешивают с помощью 0,15 М ацетата аммония, рН 6,0, при

скорости потока 0,75 мл/мин. Фракции, содержащие миоглобины, объединяют, концентрируют и подтверждают с помощью SDS-PAGE и LC-MS в соответствии со стандартными протоколами. Результаты подтверждают присутствие очищенных миоглобинов.

5

Пример 2. Способ получения В

Если явно не указано иное, "мамонт" и "миоглобин мамонта" относятся к "степному мамонту" и "миоглобину степного мамонта" в примере 2.

10

15

20

30

Пример 2.1. Материалы и способы

Анализ последовательностей

Последовательности, кодирующие миоглобин из *Bos taurus, Gallus gallus, Thumus orientalis, Ovis aries* и *Sus scrofa,* получили из UniProt (номера доступа: P02192, P02197, P68190, P02190, P02189 соответственно). Последовательность, кодирующую миоглобин степного мамонта (*Mammuthus trogontherii*), которая была неизвестна на момент подачи настоящей заявки, авторы настоящего изобретения получили после экстракции ДНК из образца моляра так называемого адычинского образца, секвенирования ДНК с помощью Illumina, объединения ридов и картирования их на геном саваннового слона (*Loxodonta africana*) (van der Valk et al. 2021).

Множественное выравнивание последовательностей выполняли с помощью Clustal Omega (Sievers et al. 2011) и визуализировали с помощью Jalview 2.11.1.4 (Waterhouse et al. 2009).

25 Моделирование белков

Структуру дезоксимиоглобина дикого типа из *Sus scrofa* получили из банка данных о белках RCSB (номер доступа в PDB: 1MWD, цепь A). Структуру миоглобина степного мамонта моделировали с помощью сервера автоматизированного гомологичного моделирования структуры белков SWISS-MODEL (Waterhouse et al. 2018) с использованием кристаллической структуры миоглобина *Elephas maximus* (индийского слона) в качестве матрицы (номер доступа в PDB: 1EMY). Суммарный поверхностный заряд (Z_{Мь}) рассчитывали как сумму зарядов всех ионизируемых групп при рН 6,5 с использованием опубликованных констант сайт-специфической ионизации (Mirceta et al.

2013). Все структуры белков визуализировали, и изображения создавали с помощью DeepView v4.1 (Guex and Peitsch 1997).

Конструирование экспрессионных плазмид

5

10

15

20

25

30

Последовательности, кодирующие миоглобин, подвергали оптимизации кодонов для экспрессии в *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) (Love et al. 2016) (SEQ ID NO: 19-24). Оптимизированные последовательности, которым предшествует последовательность, кодирующая фактор спаривания альфа *Saccharomyces cerevisiae* (SEQ ID NO: 25-30), синтезировали химически в GenScript. Фрагменты гена клонировали в вектор рВDIPp5 ниже промотора *AOX1* и выше терминатора *AOX1*, маркера селекции *HIS4* и 3'-концевого фрагмента *AOX1*. Векторы амплифицировали в *E. coli* (DH10B), очищали с помощью набора для выделения плазмид (Qiagen) и подтверждали с помощью секвенирования по Сэнгеру. Кассеты экспрессии создавали из полученных векторов путем рестрикции плазмид с помощью ВgIII (New England Biolabs), которая производит разрез выше промотора *AOX1* и ниже 3'-концевого фрагмента *AOX1*, и очищали с помощью набора для экстракции из геля QIAquick (Qiagen).

Конструирование штаммов

Штамм GS115 (his4) Pichia pastoris (Komagataella phaffii) получали от Life Technologies. Трансформацию клеток осуществляли с помощью способа электропорации по существу так, как описано ранее (Cregg 2007). Вкратце, клетки штамма GS115 выращивали в среде YPD (1% дрожжевого экстракта, 2% пептона и 2% D-глюкозы). Клетки в экспоненциальной фазе роста инкубировали в течение 30 мин в среде YPD с 200 мМ буфера HEPES (рН 8,0) и 25 мМ дитиотреитола. Затем компетентные клетки промывали ледяным 1 М сорбитом и переносили в стерильную кювету для электропорации (Bio-Rad). Затем клетки подвергали электропорации с 1-5 мкг линейной кассеты экспрессии (см. 3.3) с использованием электропоратора Gene-Pulser (Bio-Rad) и ресуспендировали в 1 мл среды YPD, содержащей 1 М сорбит, перед переносом в стерильную пробирку Eppendorf объемом 1,5 мл. Клетки инкубировали при 28°C без перемешивания в течение 3 ч. перед высеванием на чашки с агаром, содержащие твердую среду МGY (минимальная глицериновая среда: 1,34% основы азотного агара для дрожжей с сульфатом аммония без аминокислот, 2% D-глюкозы, 4·10·5% биотина с 2% агара). Чашки инкубировали в течение периода до 4 дней при 28°C.

Трансформанты, способные расти при отсутствии гистидина, подвергали скринингу в отношении их способности экспрессировать Мb. Клетки выращивали в пробирках Falcon объемом 50 мл в среде BMGY (1% дрожжевого экстракта, 2% пептона, 100 мМ калийфосфатного буфера (рН 6), 1,34% основы азотного агара для дрожжей с сульфатом аммония без аминокислот, 4·10⁻⁵% биотина, 1% глицерина). К экспоненциально растущим клеткам добавляли 1% метанол, чтобы индуцировать экспрессию Мb. Образцы собирали через 24 ч., 48 ч., 72 ч. и 96 ч. после начала индукции метанолом и анализировали с помощью SDS-PAGE для оценки уровней Mb (см. ниже).

Лучшие штаммы-продуценты отбирали для дальнейших экспериментов и криоконсервировали в качестве главного банка клеток при -80°C до применения. Результаты, показанные в данном документе, получали с использованием штаммов PAL-02-02 (Мb мамонта) и PAL-02-03 (Мb крупного рогатого скота).

Получение и очистка рекомбинантных белков

5

10

15

20

25

30

Клетки из главного банка клеток высевали на чашку с агаровой средой YPD (1% дрожжевого экстракта, 2% пептона и 2% D-глюкозы, 2% агара) и инкубировали в течение 2 дней при 28°C. Затем готовили посевную культуру в колбе с перегородками, содержащей 100 мл среды BMGY, и инкубировали в течение 24 ч. при 28°C в орбитальном инкубаторе-встряхивателе. Затем посевную культуру использовали для инокуляции 3-литровой сферической стеклянной колбы или стеклянного ферментационного сосуда (Sartorius), содержащего 900 мл среды BMGY с 0,03% облученного FoamAway^{тм} AOF (ThermoFisher). Фазу размножения проводили в течение приблизительно 24 ч., пока не был израсходован весь глицерин. Затем температуру снижали до 26°C, и каждые 12 ч. добавляли 1% метанол для индукции экспрессии Мb. Содержание растворенного кислорода поддерживали на уровне выше 20% в течение всей ферментации, тогда как рН поддерживали на уровне 6 в ходе фазы размножения и 5 в ходе фазы индукции.

Спустя 96 ч. индукции метанолом клетки удаляли путем центрифугирования при 4000 об/мин при 4°С. Оставшиеся клетки удаляли путем микрофильтрации с использованием нитроцеллюлозных фильтров с диаметром пор 0,45 мкм (Millipore). Образцы бесклеточной надосадочной жидкости хранили замороженными при -20°С. В случае необходимости для анализов образцы бесклеточной надосадочной жидкости дополнительно концентрировали с использованием одноразовых ультрафильтрационных

центрифужных устройств с мембраной из полиэфирсульфона, имеющей порог отсечения по молекулярной массе 10 кДа (концентраторы белков Pierce от Thermo Scientific).

Присутствие рекомбинантной ДНК в бесклеточной надосадочной жидкости тестировали с помощью ПЦР с использованием олигонуклеотидов (Sigma), разработанных таким образом, чтобы они были комплементарны последовательности, кодирующей сигнальный пептид. Фрагмент ДНК, амплифицированный из геномной ДНК штамма PAL-02-02 (Мь мамонта), использовали в качестве положительного контроля наряду с 1 мкл концентрированной бесклеточной надосадочной жидкости, содержащей Мь мамонта или крупного рогатого скота. ПЦР-реакции проводили с использованием 2X мастер-микса OneTaq® Quick-Load® со стандартным буфером (New England Biolabs) в соответствии с инструкциями производителя. Продукты ПЦР визуализировали после миграции при 60 В в течение 60 мин в 2% агарозном геле с ТАЕ с бромидом этидия. Для контроля размера амплифицированного фрагмента использовали ДНК-лэддер Quick-Load® Purple Plus на 1 т. о. (New England Biolabs).

15

20

25

30

10

5

Электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE)

Для электрофореза белков 20 мкл концентрированной бесклеточной надосадочной жидкости смешивали с равным объемом 2X буфера для загрузки белка (100 мМ Трис (рН 6,8), 4 мМ EDTA, 4% SDS, 20% глицерина, 0,02% бромфенолового синего, 4% β-меркаптоэтанола). Образцы инкубировали при 95°С в течение 5 минут, и соответствующий объем загружали в 15% полиакриламидный гель на аппарате для вертикального электрофореза в геле Mini-PROTEAN (Bio-Rad) при 200 В в течение 40 минут. Маркер молекулярной массы (предварительно окрашенный белковый лэддер PageRulerTM) приобретали у ThermoFisher. После электрофореза белки в геле окрашивали кумасси бриллиантовым синим G-250 (Bio-Rad).

Масс-спектрометрия

Для MS-анализа полосу геля SDS-PAGE, соответствующую Mb, вырезали из геля, окрашенного кумасси, с помощью ножа-скальпеля. Образец прополаскивали стерильной водой и хранили при -20°C до обработки для MS-анализа в VIB Proteomics Core (Гент, Бельгия). Пептиды получали путем расщепления с помощью 1 мкг трипсина (Promega) в течение ночи при 37°C и хранили при -20°C до анализа методом LC-MS/MS. Пептиды повторно растворяли в загрузочном растворителе и вводили для анализа методом LC-

MS/MS с использованием масс-спектрометра Q Exactive HF (Thermo Fisher). Анализ данных выполняли с помощью алгоритма MaxQuant (версия 2.0.1.0) с настройками поиска по умолчанию, включающими уровень ложноположительных результатов, установленный на 1% при совпадении пептида и спектра (PSM), на уровне пептидов и белков. Во всех файлах с необработанными спектральными данными совместно проводили поиск теоретической последовательности белка Мb мамонта и следующих эталонных протеомов из базы данных UniProt: *Komagataella phaffii* (выпущенная версия базы данных 2021_11, содержащая 5073 последовательности белков), Bos taurus (TaxID 9913, выпущенная версия базы данных 2021_11, содержащая 37513 последовательностей белков) и Sus scrofa (TaxID 9823, выпущенная версия базы данных 2021_11, содержащая 49792 последовательности белков).

Аналоги мяса на растительной основе

5

10

15

20

30

Бифштексы на растительной основе готовили путем смешивания 25% текстурированных соевых белков, 15% подсолнечного масла, 1,5% NaCl, 1% метилцеллюлозы и 57,5% воды. Рекомбинантный миоглобин или коммерчески доступный миоглобин (очищенный из мышц лошади, Sigma) добавляли в конечной концентрации 0,5% или 1%, сходной с содержанием миоглобина в белом и красном мясе соответственно. Препараты рекомбинантного миоглобина получали путем лиофилизации бесклеточной надосадочной жидкости. Для бифштексов, содержащих 1% Мb, добавляли еще 13,8 г воды на 100 г бифштекса. Коммерчески доступные бифштексы на растительной основе, содержащие соевый леггемоглобин (Impossible Foods), были включены для сравнения в некоторые анализы.

25 Спектрометрия и анализы цвета

Спектры поглощения регистрировали с помощью микропланшет-ридера Synergy (BioTek). Измерения поглощения для определения скорости автоокисления миоглобина выполняли в кварцевых кюветах с использованием спектрофотометра Ultrospec III (Pharmacia). Измерения цвета проводили с использованием портативного MiniScan EZ 4500L 45°/0° (HunterLab, Мурнау, Германия) с размером области обзора 8 мм, осветителем D65 и стандартным наблюдателем 10° для регистрации L*-, а*- и b*-значений (на основе цветового пространства СIELAB). Разницу в цвете с течением времени (Δ E) рассчитывали по формуле СIE76:

$$\Delta$$
Е-значение (-)
 Δ E = $\sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$

Анализы ароматических веществ

5

10

15

20

25

30

Ароматические вещества альтернатив мяса на растительной основе, содержащих различные концентрации рекомбинантного Мb, анализировали с помощью газовой хроматографии/масс-спектрометрии (GC-MS) с твердофазной микроэкстракцией в свободном пространстве (HS-SPME). Образцы анализировали в сыром виде или после жарения. Летучие вещества в свободном пространстве экстрагировали волокнами, покрытыми дивинилбензолом/карбоксеном/полидиметилсилоксаном (DVB/CAR/PDMS), и разделяли на колонке HP-1ms перед идентификацией с помощью масс-спектрометрии. Для анализа данных площадь под пиками различных ароматических соединений оценивали с помощью однофакторного ANOVA (дисперсионного анализа), а затем апостериорного HSD-критерия (критерия достоверно значимой разницы) Тьюки в случае обнаружения статистически значимых различий. Многовариантный статистический анализ выполняли с использованием PCA (анализа методом главных компонент).

Биодоступность и биоусвояемость железа

Анализы выполняли в ProDigest (Гент, Бельгия). Клетки Сасо-2 (НТВ-37; Американская коллекция типовых культур) высевали по 5×105 клеток в 12-луночные планшеты, покрытые 0,1% желатином. Клетки выращивали в течение 14 дней в полной среде (среде Игла в модификации Дульбекко (DMEM), дополненной 20% инактивированной нагреванием фетальной телячьей сывороткой (FBS), 10 мМ НЕРЕЅ и 1х раствором антибиотиков/антимикотиков) с 3 заменами среды в неделю. За 24 ч. до стимуляции клетки однократно промывали минимальной питательной средой (МЕМ), дополненной 10 мМ НЕРЕЅ, 2 мМ L-глутамина, 1х раствором антибиотиков/антимикотиков, 11 мкМ гидрокортизона, 0,87 мкМ инсулина, 0,02 мкМ селенита натрия, 0,05 мкМ натриевой соли 3,3′,5-трийод-L-тиронина, 20 мкг/л эпидермального фактора роста, и дополнительно инкубировали в этой среде в течение 24 ч. Затем клетки инкубировали с бычьим Мb (Теbu-Віо N.V.) в трех концентрациях (0,5, 1 и 2 мг/мл) или с добавлением МЕМ в качестве отрицательного контроля (указанного как СМ). Спустя 24 ч. инкубации при 37°С клетки дважды промывали ледяным PBS и лизировали с помощью CelLytic™ (Sigma Aldrich). Уровни ферритина человека определяли с использованием набора для ELISA

ферритина человека (ThermoScientific) в соответствии с инструкциями производителя. Наконец, концентрации белка определяли с использованием набора для анализа белка с BCA PierceTM (ThermoFisher Scientific) в соответствии с инструкциями для процедур на микропланшетах. Все анализы выполняли в трех повторностях.

5

10

15

20

Анализ токсичности in vitro

Анализы выполняли в ProDigest (Гент, Бельгия). Клетки Caco-2 высевали в 24-луночные планшеты, покрытые 0,1% желатином, и культивировали так же, как и в случае с анализом ферритина. В день тестирования токсичности клетки инкубировали с рекомбинантным Мь мамонта или крупного рогатого скота при 0,5, 1,0 или 2,0 мг/мл. Анализы цитотоксичности проводили спустя 24 ч. инкубации с Мb при 37°С. Для оценки возможной токсичности, индуцируемой продуктами в отношении клеток Сасо-2, в образцах надосадочной жидкости проводили анализ цитотоксичности на основе активности лактатдегидрогеназы (LDH) (Merck Life Science B.V.) в соответствии с инструкциями производителей. Все анализы выполняли в трех повторностях. Чтобы оценить различия между контролем с полной средой (СМ) и продуктами, для каждого момента времени в отдельности проводили обычный однофакторный ANOVA с критерием множественных сравнений Даннетта. С помощью (*) представлены статистически значимые различия между CM и продуктами. (*) = p < 0.05; (**) = p < 0.01; (***) = p < 0.001 и (****) = p < 0.0001. Все статистические анализы выполняли с использованием GraphPad Prism версии 9.1.2 для Windows (GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния, США).

Анализ обратных мутаций у бактерий (тест Эймса)

Анализ генотоксичности проводили в соответствии с Руководством ОЕСО по испытанию химических веществ № 471. Набор FT для тестирования мутагенности по Эймсу (Moltox, Trinova) использовали в соответствии с инструкциями производителя. Все анализы выполняли в трех повторностях. Среднее количество ревертантов для каждого штамма, обработанного средой-носителем, находилось в пределах ожидаемого диапазона, основанного на данных, предоставленных производителем. Частоту мутаций рассчитывали как соотношение между количеством ревертантов, наблюдаемых с тестируемым соединением и со средой-носителем в отдельности.

Пример 2.2. Структурные характеристики миоглобина

5

10

15

30

Миоглобин (Mb) представляет собой относительно небольшой глобулярный белок массой приблизительно 17 кДа, обнаруживаемый в сердечной и скелетных мышцах. Он несет единственную группу гема, способную к обратимому связыванию кислорода (фиг. 1), что позволяет миоглобину транспортировать кислород с поверхности клетки в митохондрии. Мь также является основным пигментом, отвечающим за цвет мяса. В оксигенированном Мь (оксимиоглобине) атом железа группы гема связан координационными связями с четырьмя атомами азота порфиринового кольца, так называемым "проксимальным" гистидином (His94) в цепи Мb и молекулой кислорода. Он может быть дополнительно стабилизирован путем образования водородной связи между молекулой кислорода и другим гистидином в гемсвязывающем кармане Mb — "дистальным" гистидином (His65). В этой форме Мb имеет характерный ярко-красный цвет. При отсутствии кислорода Мb приобретает более темный красный цвет (дезоксимиоглобин). Когда гемовое железо окисляется из двухвалентного (Fe(II)) в трехвалентное (Fe(III)) состояние, оно не способно связывать кислород, и Мь проявляет коричневый цвет (метмиоглобин), как это видно в вареном мясе. Окисление гемового железа также снижает сродство Мв к гему, что приводит к увеличению потери гема и последующему разворачиванию белка.

20 Аминокислотная последовательность Мb была в высокой степени консервативной в ходе эволюции и демонстрирует относительно небольшую изменчивость между видами (фиг. 2). У хоботных в Мb представлен атипичный фенилаланин в положении 30 (Phe30). Примечательно, что последовательность Мb степного мамонта (*Mammuthus trogontherii*), которую авторы настоящего изобретения получили из так называемого адычинского образца, возраст которого датируется от 1,2 до 1,0 млн лет, также включена на фиг. 2.

В дополнение к характерной замене на Phe30 (фиг. 2), авторы настоящего изобретения обнаружили, что Мb степного мамонта демонстрирует более высокий положительный поверхностный заряд (суммарный поверхностный заряд (Z_{Mb}) при pH 6,5 = 2,67), чем Mb, например, индийского слона (Z_{Mb} при pH 6,5 = 2,11), благодаря наличию остатка гистидина вместо глутамина в положении 92 (His92) (фиг. 2, 3). Это напоминает адаптацию Mb к глубоководным погружениям у китообразных, когда увеличение положительного поверхностного заряда приводило к уменьшению притягивающих

взаимодействий между молекулами Мb на контактном расстоянии с увеличением стабильности Мb и предотвращением его агрегации. В целом Мb степного мамонта демонстрирует ряд примечательных характеристик, которые делают его особенно привлекательным. В данном документе авторы настоящего изобретения оценивают продуцирование и характеристики рекомбинантного Мb степного мамонта наряду с другими ныне существующими видами.

Пример 2.3. Внеклеточное продуцирование миоглобина в Pichia pastoris

5

10

15

20

25

30

Последовательности, кодирующие Мь степного мамонта, свиньи, курицы, крупного рогатого скота, свиньи и тунца, клонировали ниже индуцируемого метанолом промотора AOXI Pichia pastoris и выше терминатора AOXI, маркера селекции по признаку прототрофности по гистидину и так называемого 3'-концевого фрагмента гена АОХ1. Миоглобин в естественных условиях обнаруживается в цитоплазме мышечных клеток. Чтобы облегчить очистку рекомбинантного белка, авторы настоящего изобретения слили последовательность, кодирующую сигнальный пептид, внутри рамки считывания с последовательностью, кодирующей миоглобин, чтобы нацелить образующиеся белки Мь на секреторный путь для выведения из клетки. Эти конструкции использовали для трансформации ауксотрофных по гистидину клеток Pichia pastoris, и трансформанты отбирали по их способности расти при отсутствии гистидина. Для каждой конструкции до десяти трансформантов тестировали в отношении их способности продуцировать внеклеточный миоглобин животного происхождения после индукции метанолом в микропланшетах. Лучшие клоны-продуценты дополнительно тестировали в колбах. Индукция метанолом приводила к тому, что бесклеточная надосадочная жидкость проявляла темно-красный цвет, особенно после 10-кратного концентрирования путем ультрафильтрации, как и ожидалось для образцов, содержащих гемсодержащий белок (фиг. 4А). Присутствие индуцируемого метанолом белка с ожидаемой молекулярной массой приблизительно 17 кДа также подтверждали после электрофореза белков и окрашивания кумасси синим (фиг. 4В). Рекомбинантный Мb составлял 75-82% от общего количества белков в концентрированной бесклеточной надосадочной жидкости, тогда как выход продуцируемого Мb варьировался от 0,420 мг до 1,93 г на литр надосадочной жидкости.

Поскольку миоглобин продуцируется внеклеточно, нет необходимости лизировать клетки дрожжей в ходе процесса очистки. Эти клетки удаляют из ферментационного бульона путем центрифугирования с последующей микрофильтрацией (поры диаметром 0,45 мкм). Таким образом, не ожидается, что конечный продукт будет содержать какой-либо рекомбинантный генетический материал. Чтобы убедиться в этом, авторы настоящего изобретения разработали ПЦР-тест, основанный на амплификации короткого фрагмента (130 п. о.) рекомбинантного гена, соответствующего последовательности, кодирующей сигнальный пептид, всего из 1 пг ДНК (фиг. 5). Используя этот тест, авторы настоящего изобретения обнаружить какой-либо рекомбинантной ДНК не смогли концентрированной бесклеточной надосадочной жидкости (фиг. 5).

5

10

15

25

30

Чтобы подтвердить подлинность рекомбинантного Мb и убедиться в том, что сигнальный пептид был правильно процессирован и удален в ходе секреции белка, авторы настоящего изобретения проанализировали полосу геля с Мb мамонта с помощью измерения методом "дробовика" посредством жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией (LC-MS/MS). Авторы настоящего изобретения извлекли пептиды, охватывающие 90,3% полной последовательности белка, и наблюдали полное удаление сигнального пептида и первого метионина, как и ожидалось (фиг. 6).

20 Пример 2.4. Цвет и стабильность цвета рекомбинантного миоглобина

Как обсуждается выше, Мь играет центральную роль в обеспечении цвета мяса. Поэтому параллельно с масс-спектрометрическим анализом авторы настоящего изобретения поглощение концентрированных образцов бесклеточной жидкости в UV- и видимом диапазонах и сравнивали его с поглощением коммерческого миоглобина, очищенного из мышц лошади. Во всех случаях наблюдался пик поглощения (полоса Cope), характерный для присутствия гема (Tang et al. 2004). Полосу Cope обнаружили при 410 нм для Мb крупного рогатого скота и лошади, тогда как для Мb мамонта она была немного смещена в красную сторону до 415 нм (фиг. 7А). Исходя из коэффициентов поглощения при максимумах длин волн, характерных для метмиоглобина, дезоксимиоглобина и оксимиоглобина соответственно (Tang et al. 2004), авторы изобретения настоящего наблюдали, что рекомбинантный миоглобин концентрированной бесклеточной надосадочной жидкости находится главным образом в восстановленной форме: 47,3% оксимиоглобина и 10,0% дезоксимиоглобина для Мь мамонта, 48,3% оксимиоглобина и 9,9% дезоксимиоглобина для Мb крупного рогатого скота. Следует отметить, что пик Соре у Мь мамонта неизменно наблюдался при несколько большей длине волны, чем у Мв крупного рогатого скота и лошади (415 нм в сравнении с 410 нм соответственно). Это согласуется с предыдущими наблюдениями, сделанными для Mb слона (Tada et al. 1998). Чтобы оценить автоокислительное поведение Мь, авторы настоящего изобретения регистрировали спектры поглощения каждые два часа в течение 24-часовой инкубации при рН 5,6 и 25°C (фиг. 7В). Затем авторы настоящего изобретения исследовали соотношение между поглощением при 580 нм (пиковое значение для оксимиоглобина, несущего Fe(II)) и при 505 нм (пиковое значение для метмиоглобина, несущего Fe(III)). В начале инкубации авторы настоящего изобретения наблюдали, что это соотношение было значительно рекомбинантного Mb мамонта и крупного рогатого скота, чем для коммерчески доступного Мb, очищенного из мышц лошади (фиг. 7В, вставка), что указывает на то, что большая часть рекомбинантного Мb присутствует в восстановленной форме. Это различие с Мь лошади сохранялось с течением времени при кислом рН (фиг. 7В, вставка). На протяжении 24 часов коэффициент поглощения уменьшался на 26,0% для Мb мамонта и на 38,3% для Мь крупного рогатого скота, что позволяло предположить, что первый из них демонстрирует большую устойчивость к автоокислению.

20

25

15

5

10

На цвет мяса влияет множество параметров, включая концентрацию Мb, влажность и содержание жира. Для традиционного мяса, которое обычно покупают в сыром виде, красный цвет, придаваемый оксимиоглобином, играет ключевую роль в принятии потребителем решения о покупке. Поэтому авторы настоящего изобретения тестировали эффект рекомбинантного Мb в отношении аналогов мяса с точки зрения цвета. Добавление Мb крупного рогатого скота или мамонта в бифштексы на растительной основе (фиг. 8A-A') вызывало уменьшение светлоты (L*-значения) и увеличение красноты (а*-значения) и желтизны (b*-значения) (фиг. 8B).

30 Затем авторы настоящего изобретения оценивали стабильность цвета аналогов мяса, содержащих различное количество миоглобина, которые хранились в холодильной камере и подвергались воздействию постоянного освещения в течение 5 дней. Для сравнения был включен коммерческий бифштекс на растительной основе, содержащий соевый

гемсодержащий белок. При том, что авторы настоящего изобретения наблюдали значительное изменение цвета бифштекса, приготовленного без Мb, добавление Мb было ассоциировано с большей стабильностью цвета (фиг. 9A-B).

Пример 2.5. Анализ ароматических веществ

Обычно считается, что помимо своей роли в обеспечении цвета мяса миоглобин способствует "кровавому" или "металлическому" запаху сырого мяса. Во время варки мяса формирование аромата происходит в основном за счет окисления липидов и реакции Майяра. Последняя имеет место между аминогруппами белков и карбонильными группами восстановленных сахаров и/или продуктов реакции окисления липидов. Гемовое железо может влиять на эти реакции и/или их кинетику (van Ba et al. 2012). Тем не менее, насколько известно авторам настоящего изобретения, в литературе нет убедительных данных о влиянии миоглобина на формирование аромата в мясе. Используя полученные в выше, лаборатории бифштексы, описанные авторы настоящего анализировали летучие соединения из сырых и вареных бифштексов на растительной основе, содержащих рекомбинантный Мb, с помощью газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что добавление Мb в бифштекс на растительной основе приводило к значительному увеличению количества летучих соединений как в сыром состоянии, так и после жарения (фиг. 10А). Примечательно, что количество образующихся летучих веществ в обоих случаях было выше, чем в коммерческом бифштексе на растительной основе, содержащем соевый леггемоглобин (фиг. 10А), т. е. в бифштексе от Impossible. Используя анализ методом главных компонент (РСА) для данных СG-MS, авторы настоящего изобретения наблюдали четкое разделение между лабораторными бифштексами и коммерчески доступными бифштексами на растительной основе, содержащими соевый леггемоглобин, с одной стороны и между сырыми и печеными продуктами с другой стороны (фиг. 10В).

30

5

10

15

20

25

При анализе летучих соединений из полученных в лаборатории жареных бифштексов на растительной основе авторы настоящего изобретения обнаружили, что добавление Мb было ассоциировано с присутствием окисленных липидов, продуктов окисления липидов

и пиразинов. В частности, присутствие Мb степного мамонта или крупного рогатого скота привело к увеличению количества соединений, которые, как известно, придают жареному мясу "запеченный" вкус (van Ba et al. 2012) (фиг. 12). Добавление Мb мамонта было неизменно ассоциировано с более высоким количеством этих соединений, чем то, которое наблюдалось с Мb крупного рогатого скота. Это позволяет предположить, что, без ограничения этой теорией, при использовании в качестве ингредиента для аналогов мяса на растительной основе для получения тех же ароматических свойств можно добавлять меньшее количество Мb мамонта, чем при использовании Мb крупного рогатого скота. Кроме того, Мb мамонта и Мb крупного рогатого скота могут обеспечивать разные сенсорные ощущения.

Пример 2.6. Анализ пищевой ценности

5

10

15

20

25

30

Чтобы оценить биодоступность железа из Мb, авторы настоящего изобретения обратились к линии эпителиоподобных клеток кишечника Caco-2, которая обычно используется для изучения поглощения железа в кишечнике человека. Авторы настоящего изобретения измеряли образование внутриклеточного ферритина в качестве регистрируемой величины поглощения железа монослоем живых клеток Caco-2 и, следовательно, показателя биодоступности железа (Glahn et al., 1998). Авторы настоящего изобретения наблюдали, что увеличение доз Мb приводило к увеличению поглощения железа (фиг. 12), что указывало на то, что гемовое железо, переносимое Мb, является биодоступным для клеток кишечника человека.

Пример 2.7. Тестирование безопасности

Цитотоксичность

Чтобы оценить потенциальную токсичность рекомбинантного Мb, дифференцированные клетки Сасо-2 обрабатывали с помощью Мb мамонта или крупного рогатого скота, очищенным бычьим Мb или полной средой (СМ) в качестве контроля. Затем, чтобы протестировать потенциальные цитотоксические эффекты, авторы настоящего изобретения исследовали уровни лактатдегидрогеназы (LDH) в надосадочной жидкости культуры. LDH представляет собой оксидоредуктазу, присутствующую во всех клетках, которая катализирует взаимопревращение пирувата в лактат с сопутствующим

взаимопревращением NADH в NAD+. При повреждении клеточной мембраны в результате апоптоза или некроза LDH высвобождается в надосадочную жидкость, и ее концентрацию можно определить с помощью колориметрического анализа, основанного на восстановлении NAD+ до NADH под действием LDH (Decker and Lohmann-Matthes 1988). Авторы настоящего изобретения не наблюдали увеличения цитотоксичности при инкубации с Мb мамонта ни в одной из протестированных концентраций (фиг. 13). В отличие от этого, Мb крупного рогатого скота демонстрировал значительно увеличенную токсичность по сравнению со средой в отдельности (фиг. 13). Таким образом, при высоких концентрациях, протестированных в данном документе, Мb мамонта, повидимому, имеет лучший профиль безопасности, чем Мb крупного рогатого скота.

Генотоксичность

Чтобы определить мутагенный потенциал рекомбинантного миоглобина, авторы настоящего изобретения использовали тест обратного мутагенеза у бактерий (тест Эймса) и четыре гистидин-зависимых штамма Salmonella typhimurium (ТА98, ТА100, ТА1535, ТА1537), а также один триптофан-зависимый штамм Escherichia coli (WP2 uvrA) (Ames et al. 1975). Бактерии подвергали воздействию миоглобина мамонта или крупного рогатого скота на уровнях 0,8, 2,5, 8,0, 25,0, 80,0 или 250 мкг/мл с экзогенной метаболической активацией (смесь S9) или без нее (таблица 1). Вещества положительного контроля вызывали ожидаемое увеличение количества ревертантов как при отсутствии, так и в присутствии S9, что подтверждает чувствительность теста и активность смеси S9. Авторы настоящего изобретения не наблюдали какой-либо значительной мутагенной активности Мb крупного рогатого скота или мамонта ни при одной из протестированных концентраций.

25

30

5

10

15

20

Таблица 1. Количество ревертантов и коэффициент мутации после воздействия миоглобина мамонта. Среднее количество ревертантов, наблюдаемое в общей сложности для 48 лунок на условие, указано черным цветом. Соответствующий коэффициент мутации (соотношение количества ревертантов в присутствии соединения и такового количества со средой-носителем в отдельности) указан серым цветом. Все анализы выполняли в трех повторностях. Условия, при которых наблюдался значительный мутагенез, выделены жирным шрифтом. Соединения, используемые в качестве

положительных контролей, представляли собой ^а 2 мкг/мл 2-нитрофлуорена, ^b 4 мкг/мл аминоантрацена, ^c 100 мкг/мл N4-аминоцитидина.

	Тест Эймса										
Штамм	TA98				TA100				TA1535		
Тестируемое	-S9		+ S 9		- S 9		+ S 9		-S9	+ S 9	
соединение											
Среда-носитель	1,33 =	±	1,67	±	8,00	±	6,00	±	2,33 ±	3,00 ±	
	1,53		2,08		2,00		5,20		1,53	1,0	
Mb, 0,003	0,00 =	±	1,00	±	10,0	±	7,00	土	2,33 ±	2,33 ±	
мкг/мкл	0,00		0,00		2,65		2,65		0,58	0,58	
	0,00 =	±	0,60	±	1,25	±	1,17	土	$1,0 \pm 0,25$	0,78 ±	
	0,00		0,00		0,33		0,44			0,19	
Mb, 0,003	2,33 =	±	1,33	±	9,33	±	4,67	土	1,00 ±	2,67 ±	
мкг/мкл	2,52		1,58		2,52		2,08		1,00	0,58	
	1,75 =	±	0,80	±	1,17	±	0,78	±	0,43 ±	0,89 ±	
	1,89		0,35		0,31		0,69		0,43	0,19	
Mb, 0,003	1,33 =	±	1,33	±	12,33	±	9,00	±	2,37 ±	2,33 ±	
мкг/мкл	1,53		2,31		7,77		1,73		1,15	1,15	
	1,00 =	±	0,80	±	1,54	±	1,50	±	1,14 ±	0,78 ±	
	1,15		1,39		0,97		0,58		0,49	0,38	
Mb, 0,003	0,33 =	±	1,00	±	14,67	±	7,00	±	1,00 ±	3,00 ±	
мкг/мкл	0,58		1,00		5,51		2,00		1,00	1,00	
	0,25 =	±	0,60	±	1,83	±	1,17	±	0,43 ±	1,00 ±	
	0,43		0,60		0,69		0,67		0,43	0,33	
Положительный	37,33 =	±	48,00	±	47,67	±	44,00	±	48,00 ±	21,33 ±	
контроль	2,08ª		0,00 ^b		0,58°		5,20 ^b		0,00°	1,50 ^b	
	28,0 =	±	28,80	±	5,96	±	7,33	±	20,57 ±	7,11 ±	
	1,56		0,00		0,07		1,73		0,00	0,51	

Формула изобретения

1. Заменитель мяса или пищевой ингредиент, содержащий миоглобин животного происхождения из мамонта, свиньи, овцы, коровы, курицы или тунца или его производное.

- 2. Заменитель мяса или пищевой ингредиент по п. 1, где миоглобин получен из степного мамонта, шерстистого мамонта или является его производным.
- 3. Заменитель мяса или пищевой ингредиент по п. 1 или п. 2, где указанный миоглобин животного происхождения представлен одной из следующих аминокислотных последовательностей:
 - a) характеризующейся по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 3 и имеющей по меньшей мере одну из следующих комбинаций аминокислот:
 - о F в положении 30, и/или
- 15 о **Q** в положении 65, и/или
 - О Н в положении 92, и/или
 - о Н в положении 94, и/или
 - о F в положении 30 и Q в положении 65, и/или
 - о F в положении 30 и H в положении 92, и/или
- - O Q в положении 65 и H в положении 92, и/или
 - о Q в положении 65 и H в положении 94, и/или
 - О Н в положении 92 и Н в положении 94, и/или
 - о F в положении 30, и Q в положении 65, и H в положении 92, и/или
- 25 о F в положении 30, и Q в положении 65, и H в положении 94, и/или
 - F в положении 30, и H в положении 92, и H в положении 94, и/или
 - О В положении 65, и Н в положении 92, и Н в положении 94, и/или
 - F в положении 30, и Q в положении 65, и H в положении 92, и H в положении 94;
- b) характеризующейся по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 2 или 3, имеющей Q или H в положении 65 и H в положении 94 и необязательно имеющей по меньшей мере одну из следующих аминокислот в следующих местах в SEQ ID NO: 2 или 3: Е в положении 9, К в положении 13, Т в положении 14, Р в

положении 23, L в положении 27, V в положении 31, G в положении 54, Q в положении 65, V в положении 67, Q в положении 84, Q в положении 88, I в положении 102, E в положении 123 и/или I в положении 143;

- с) характеризующейся по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1, имеющей Q или H в положении 65 и H в положении 94 и необязательно имеющей по меньшей мере одну из следующих аминокислот в следующих местах в SEQ ID NO: 1: Е в положении 9, К в положении 13, Т в положении 14, Р в положении 23, L в положении 27, V в положении 31, G в положении 54, Q в положении 65, V в положении 67, Q в положении 84, Q в положении 88, I в положении 102 и/или E в положении 123;

5

15

20

- d) характеризующейся по меньшей мере 70% идентичностью с SEQ ID NO: 4, 5 или 6, имеющей Q или H в положении 65 и H в положении 94 и необязательно имеющей по меньшей мере одну из следующих аминокислот в следующих местах в SEQ ID NO: 4, 5 или 6: N в положении 13, Q в положении 27, I в положении 31, N в положении 67, A в положении 128, S в положении 133, A в положении 145 и/или L в положении 150;
 - е) характеризующейся по меньшей мере 70% идентичностью с SEQ ID NO: 7, имеющей Q или H в положении 65 и H в положении 94 и необязательно имеющей по меньшей мере одну из следующих аминокислот в следующих местах в SEQ ID NO: 7: Q в положении 6, Q в положении 10, T в положении 13, I в положении 14, H в положении 27, M в положении 31, H в положении 35, D в положении 36, D в положении 42, R в положении 43, G в положении 49, P в положении 53, Q в положении 55, G в положении 58, A в положении 67, Q в положении 72, K в положении 75, Q в положении 79, N в положении 82, S в положении 85, T в положении 93, V в положении 111, I в положении 116, A в положении 117, E в положении 118, A в положении 121, S в положении 128, K в положении 133, S в положении 145 и/или F в положении 150; или
- 25 f) характеризующейся по меньшей мере 70% идентичностью с SEQ ID NO: 8, имеющей Q или H в положении 65 и H в положении 94.
 - 4. Заменитель мяса или пищевой ингредиент по любому из пп. 1-3, который не содержит леггемоглобин, продуцированный бактерией, живущей в симбиозе в корневых клубеньках растения сои, и/или который содержит в качестве единственного гемсодержащего белка миоглобин по любому из пп. 1-3.

- 5. Заменитель мяса по любому из пп. 1-4, где заменитель мяса имитирует облик, форму, структуру, состав, вкус, текстуру, цвет, аромат, внешний вид и/или пищевую ценность мяса.
- 5 6. Пищевой ингредиент по любому из пп. 1-4, где пищевой ингредиент имитирует состав, вкус, цвет, аромат и/или пищевую ценность мяса.
 - 7. Генная конструкция, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую миоглобин по любому из пп. 1-4.
 - 8. Генная конструкция по п. 7, где нуклеиновая кислота выбрана из группы, состоящей из:

10

15

- (а) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, представленный аминокислотной последовательностью, содержащей последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 75% идентичностью или сходством последовательности с аминокислотной последовательностью, определенной в п. 3 в а), b), c) или d),
- (b) нуклеотидной последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 60% идентичностью последовательности с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16; и
- 20 (с) нуклеотидной последовательности, последовательность которой отличается от последовательности нуклеотидной последовательности из (b) вследствие вырожденности генетического кода.
 - 9. Генная конструкция по п. 7 или п. 8, дополнительно содержащая промотор.
 - 10. Генная конструкция по любому из пп. 7-9, дополнительно содержащая сигнальный пептид, предпочтительно сигнальный пептид, который облегчает выведение экспрессируемого миоглобина.
- 30 11. Генная конструкция по любому из пп. 6-10, где указанная нуклеотидная последовательность представлена под SEQ ID NO: 19, 20, 21, 22, 23 или 24.

- 12. Генная конструкция по п. 11, где указанная генная конструкция представлена под SEQ ID NO: 25, 26, 27, 28, 29 или 30.
- 13. Вектор, содержащий генную конструкцию по любому из пп. 7-12.

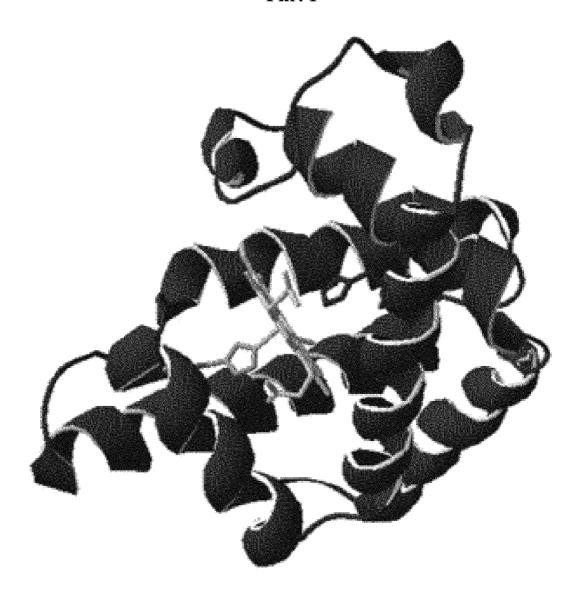
5

15

25

- 14. Клетка-хозяин, содержащая генную конструкцию по любому из пп. 7-12.
 - 15. Клетка-хозяин по п. 14, которая является прокариотической или эукариотической.
- 10 16. Способ получения миоглобина по любому из пп. 1-3, включающий культивирование клетки-хозяина по п. 14 или п. 15 в подходящей среде и необязательно извлечение клетки-хозяина и/или миоглобина.
 - 17. Способ по п. 16, где продуцируемый миоглобин не содержит сигнальный пептид.
 - 18. Способ по п. 16 или п. 17, где извлеченный миоглобин является очищенным, предпочтительно в значительной степени очищенным.
- 19. Способ по любому из пп. 16-18, где клетка-хозяин продуцирует миоглобин 20 внеклеточно.
 - 20. Способ получения заменителя мяса или пищевого ингредиента по любому из пп. 1-6, включающий включение миоглобина, получаемого посредством способа по любому из пп. 16-19, в состав заменителя мяса или пищевого ингредиента.
 - 21. Белок, где указанный белок может быть представлен последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 3.

Фиг. 1



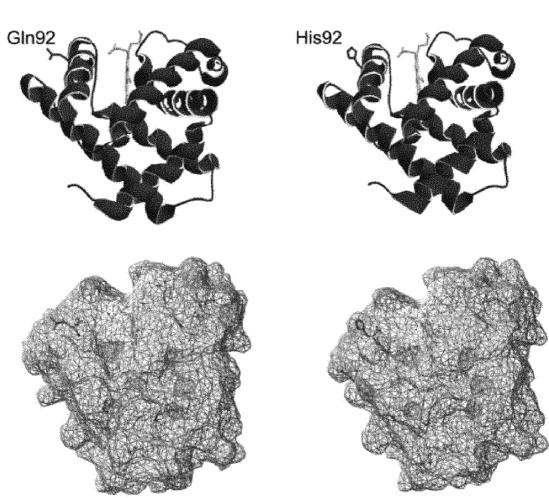
Фиг. 2

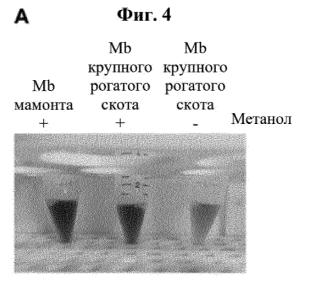
Thunnus orientalis -- MADEDAVLKCWGPVEADYTTIGGLVLTRLFKEHPETQKLFPKFAG Gallus gallus MGL SDQEWQQVL T I WGKVEAD I AGHGHEVLMRL FHDHP Mammuthus trogontherii MGL SDG EWEL VL KTWG KVEAD I PGHGL EVFVRL FTGHP Sus scrofa MGL SDGEWQL VL NVWGKVEADVAGHGQEVL I RL F KGHP Bos taurus MGL SDGEWQL VL NAWGKVEADVAGHGQEVLII RL FTGHPETL Ovis aries MGL SDG EWQL VL NAWG KVEADVAGHGQ EVL I RL FTGHPETL EKFDKFKH 50 90 92 94 Thunnus orientalis IAQA - DIAGNAAVSAHGATVLKKLGELLKAKGSHAAILKPLANSHATKHK Gallus gallus LKTPDQMKGSEDLKKHGATVLTQLGKILKQKGNHESELKPLAQTHATKHK Mammuthus trogontherii LKTEGEMKASEDLKKQGVTVLTALGG I LKKKGHHQAE I QPLAHSHATKHK Sus scrofa LKSEDEMKASEDLKKHGNTVLTALGGILKKKGHHEA Bos taurus LKT EAEMKASEDLKKHGNTVL TALGG I LKKKGHHEAEVKHLAESHANKHK Ovis aries LKTEAEMKASEDLKKHGNTVLTALGGILKKKGHHEAEVKHLAESHANKHK 100 110 Thunnus orientalis Gallus gallus Mammuthus trogontherii I P I KYLEF I SDA I I HVLQSKHPAEFGADAQGAMKKALEL Sus scrofa EAIIQVLQSKHPGDFGADAQGAMSKAL Bos taurus SDAIIHVLHAKHPSDFGADAQAAMSKALELFRNDMAAQYKVLGFHG Ovis aries I P V K Y L E F I S D A I I H V L H A K H P S D F G A D A Q G A M S K A L E L F R N D M A A Q Y K V L G F Q G

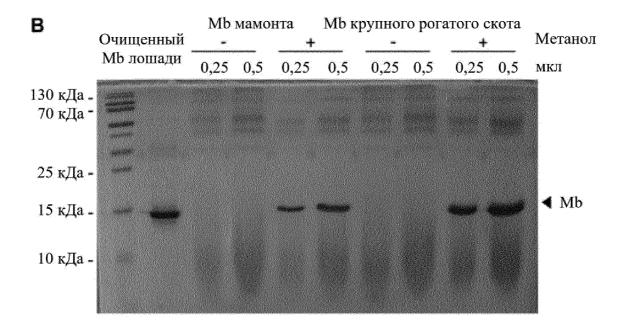
Фиг. 3

Индийский слон

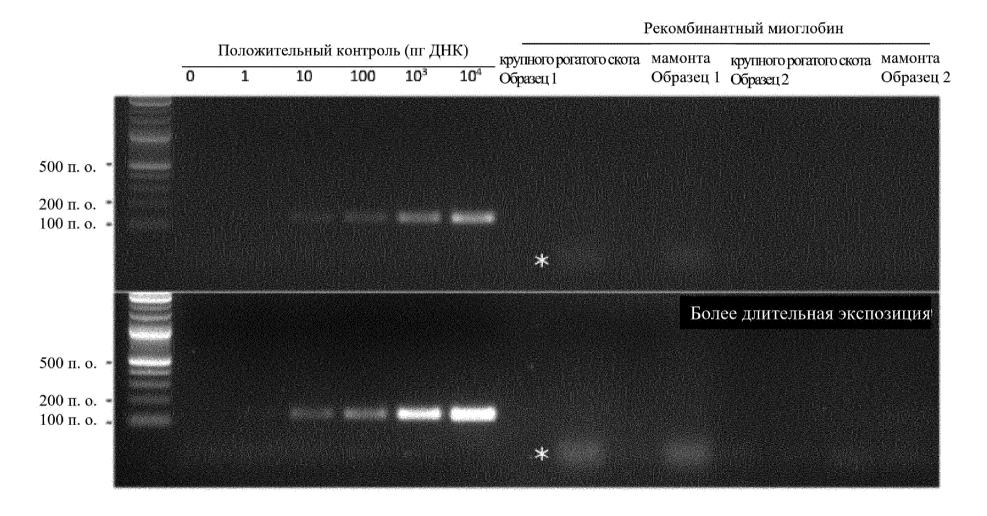
Степной мамонт



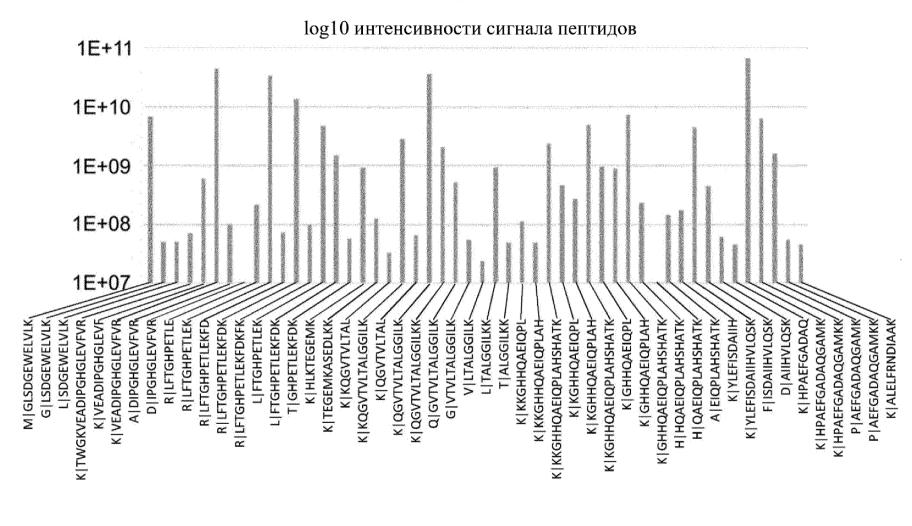




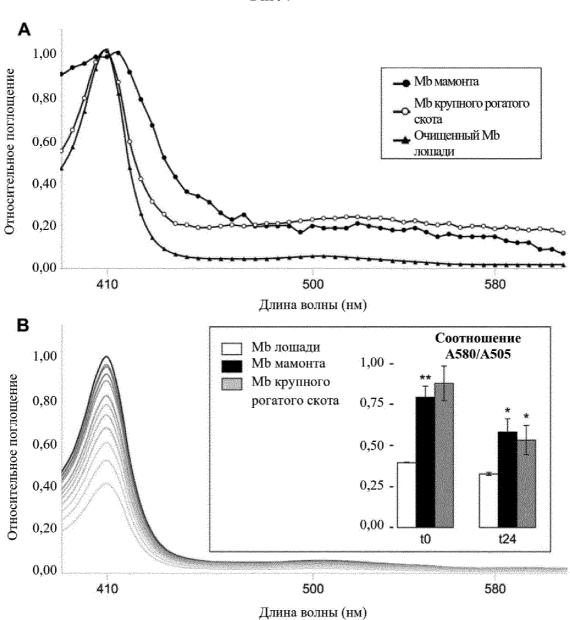
Фиг. 5



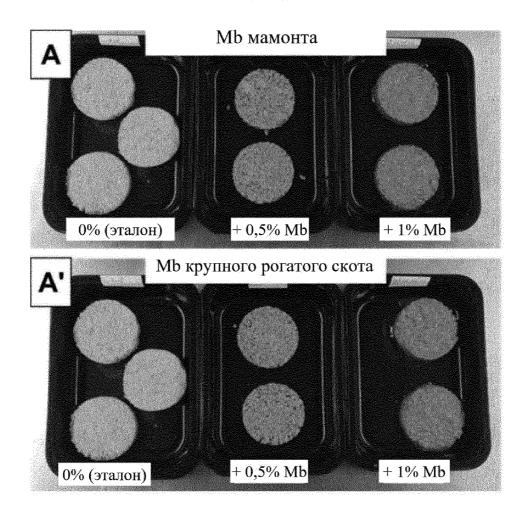
Фиг. 6

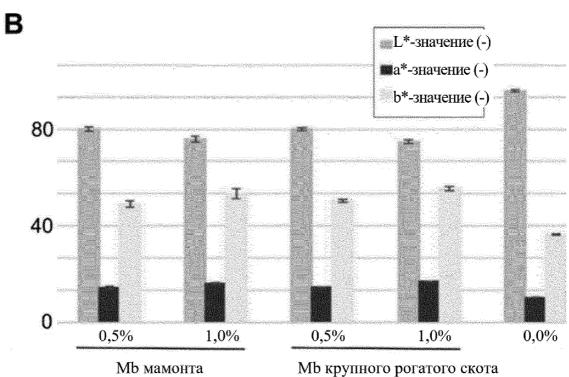




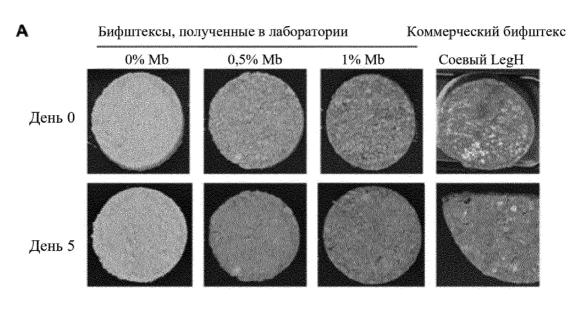


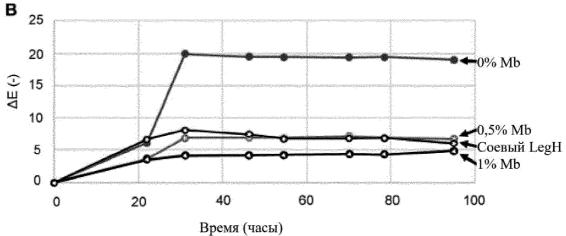
Фиг. 8



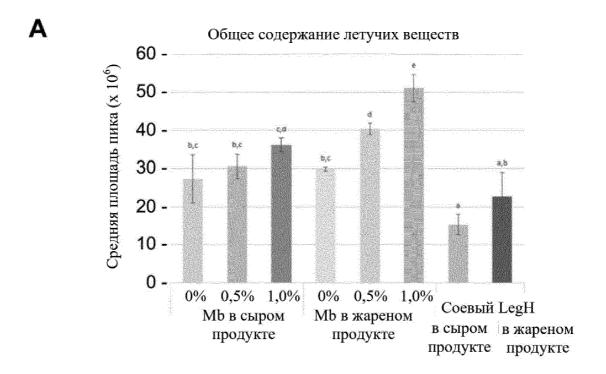


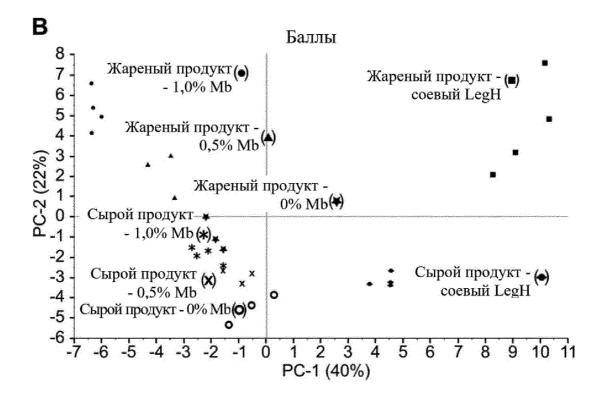
Фиг. 9



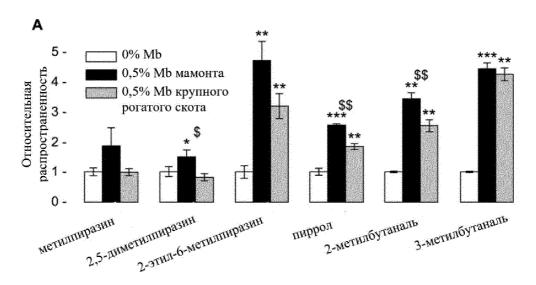


Фиг. 10





Фиг. 11



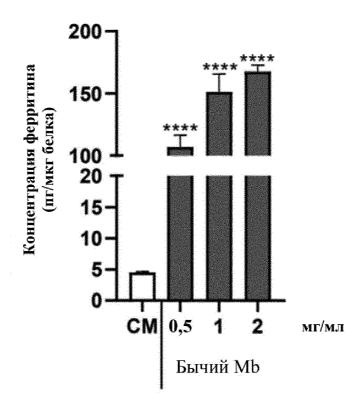
В Название соединения Вкусоароматические характеристики

метилпиразин Запеченный, ореховый, какаовый, шоколадный, арахисовый, сочный 2,5-диметилпиразин Запеченный, мясистый, ореховый, как жареный рис, острый, сочный 2-этил-6-метилпиразин Запеченный, картофельный, как лесной орех

пиррол Сладкий, теплый, ореховый, злакоподобный

2-метилбутаналь Запеченный, острый, сладкий, ореховый, карамельный3-метилбутаналь Мясной, рыбный, жирный, какаовый, острый

Фиг. 12



Фиг. 13

