

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 741 723**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/64** (2006.01)

**C12N 15/59** (2006.01)

**A23C 19/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.05.2013 PCT/EP2013/060460**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.11.2013 WO13174840**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.05.2013 E 13727539 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2019 EP 2855674**

54 Título: **Variantes de quimosina con propiedades mejoradas de coagulación de leche**

30 Prioridad:

**25.05.2012 EP 12169503**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**12.02.2020**

73 Titular/es:

**CHR. HANSEN A/S (100.0%)  
Boege Allé 10-12  
2970 Hoersholm, DK**

72 Inventor/es:

**VAN DEN BRINK, JOHANNES MAARTEN;  
LUND, MARTIN;  
JACOBSEN, JONAS;  
HANSEN, SARI CHARLOTTE y  
JEPPESEN, IBEN**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 741 723 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Variantes de quimosina con propiedades mejoradas de coagulación de leche

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a variantes de quimosina con propiedades mejoradas de coagulación de leche.

10 **Antecedentes técnicos**

10 La coagulación enzimática de la leche por las enzimas coagulantes de la leche, tal como quimosina y pepsina, es uno de los procesos más importantes en la fabricación de quesos. La coagulación enzimática de la leche es un proceso de dos fases: una primera fase donde una enzima proteolítica, quimosina o pepsina, ataca  $\kappa$ -caseína, produciendo un estado metaestable de la estructura micelar de la caseína y una segunda fase, donde la leche posteriormente coagula y forma un coágulo.

15 La quimosina (EC 3.4.23.4) y la pepsina (EC 3.4.23.1), las enzimas coagulantes de la leche del estómago mamífero, son proteasas aspárticas que pertenecen a una clase amplia de peptidasas.

20 Cuando se producen en las células de la mucosa gástrica, la quimosina y la pepsina se producen como pre-proquimosina y pre-pepsinógeno enzimáticamente inactivas, respectivamente. Cuando la quimosina se excreta, un fragmento peptídico N-terminal, el fragmento pre (péptido señal) se corta para dar proquimosina que incluye un fragmento pro. La proquimosina es una forma sustancialmente inactiva de la enzima que, sin embargo, se activa en condiciones ácidas a la quimosina activa por eliminación autocatalítica del fragmento pro. Esta activación se produce *in vivo* en la luz gástrica en condiciones apropiadas de pH o *in vitro* en condiciones ácidas.

25 Las características estructurales y funcionales de la pre-proquimosina, proquimosina y quimosina bovinas, es decir de *Bos taurus*, se han estudiado extensamente. La parte pre de la molécula de pre-proquimosina bovina comprende 16 residuos de aa y la parte pro de la correspondiente proquimosina tiene una longitud de 42 residuos de aa. La quimosina bovina activa comprende 323 aa es una mezcla de dos formas, A y B, ambas de las cuales son activas.

30 La quimosina se produce de forma natural en especies de mamíferos tal como bovinos, camellos, caprinos, búfalos, oveja, cerdos, seres humanos, monos y ratas.

35 La quimosina bovina ha estado comercialmente disponible durante un número de años para la industria láctea.

El documento WO02/36752A2 (Chr. Hansen) describe la producción recombinante de quimosina de camello.

40 Las referencias enumeradas a continuación se pueden ver en el presente contexto como referencias que describen mutantes de quimosina:

- Suzuki et al: Site directed mutagenesis reveals functional contribution of Thr218, Lys220 and Asp304 in chymosin, Protein Engineering, vol. 4, Enero 1990, páginas 69-71;
- Suzuki et al: Alteration of catalytic properties of chymosin by site-directed mutagenesis, Protein Engineering, vol. 2, Mayo 1989, páginas 563-569;
- van den Brink et al: Increased production of chymosin by glycosylation, Journal of biotechnology, vol. 125, Septiembre 2006, páginas 304-310;
- Pitts et al: Expression and characterisation of chymosin pH optima mutants produced in *Trichoderma reesei*, Journal of biotechnology, vol. 28, Marzo 1993, páginas 69-83;
- 50 - M.G. Williams et al: Mutagenesis, biochemical characterization and X-ray structural analysis of point mutants of bovine chymosin, Protein engineering design and selection, vol. 10, Septiembre 1997, páginas 991-997;
- Strop et al: Engineering enzyme subsite specificity: preparation, kinetic characterization, and x-ray analysis at 2.0 Å resolution of Va1111phe site mutated calf chymosin, Biochemistry, vol. 29, Octubre 1990, páginas 9863-9871;
- 55 - Supanee et al: Site-specific mutations of calf chymosin B which influence milk-clotting activity, Food Chemistry, vol. 62, Junio 1998, páginas 133-139;
- Zhang et al: Functional implications of disulfide bond, Cys45-Cys50, in recombinant prochymosin, Biochimica et biophysica acta, vol. 1343, Diciembre 1997, páginas 278-286.

60 El documento WO2013/164479A2 (DSM) divulga una variante de quimosina bovina H124Q (numerada H76Q).

Los artículos "J. of Agricultural and Food Chemistry, vol. 56, no. 22, 26 Noviembre 2008" y "Nucleic Acids Research, vol. 18, No. 15, 11 Agosto 1990, pp. 4602-4602" se refieren a secuencias de quimosina de tipo salvaje conocidas (polipéptido parental), tal como, por ejemplo, la secuencia de quimosina de oveja.

65

Ninguna de las referencias del estado de técnica mencionadas anteriormente describe de forma directa e inequívoca ninguno de los mutantes/variantes de quimosina como los descritos/reivindicados posteriormente en el presente documento.

## 5 Compendio de la invención

El problema que se va a resolver por la presente invención es proporcionar variantes de quimosina con propiedades de coagulación de leche mejoradas.

10 Como se discute en los ejemplos de trabajo en el presente documento – los presentes inventores han identificado un número de variantes mejoradas de quimosina de camello (véase el ejemplo 6 en el presente documento) y bovina (véase el ejemplo 7 en el presente documento).

15 Basándose en un análisis comparativo de las variantes de camello y bovina – los presentes inventores identificaron un número de posiciones de aminoácidos adicionales que son importantes en el presente documento en el sentido de que al hacer una variante en una o más de estas posiciones se puede conseguir una variante mejorada de quimosina (véase el ejemplo 8 en el presente documento).

20 Como se sabe en la técnica – diferentes secuencias polipeptídicas de quimosina de tipo salvaje naturales obtenidas de diferentes especies de mamíferos (tal como, por ejemplo, bovinos, camellos, oveja, cerdos o ratas) tienen una similitud/identidad de secuencia relativamente alta.

25 En la figura 1 en el presente documento esto se ejemplifica mediante un alineamiento de diferentes secuencias de quimosina relevantes en el presente documento.

En vista de esta relación de secuencia relativamente cercana – se cree que las estructuras 3D de diferentes quimosinas de tipo salvaje naturales también sean relativamente similares.

30 En el presente contexto – una quimosina de tipo salvaje obtenida natural (tal como quimosina bovina o quimosina de camello) puede ser en el presente documento un ejemplo de un polipéptido parental – es decir, un polipéptido parental al que se hace una alteración para producir un polipéptido de quimosina variante de la presente invención.

35 Sin querer estar limitado por la teoría – se cree que las posiciones de aminoácidos relacionadas de quimosina discutidas en el presente documento son de importancia general en cualquier enzima quimosina de interés relevante en el presente documento (por ejemplo, quimosinas de, por ejemplo, bovinos, camellos, oveja, cerdos, ratas, etc.) – en el sentido de que al hacer una variante en una o más de estas posiciones se puede conseguir una variante mejorada de quimosina en general (por ejemplo, una variante mejorada de quimosina bovina, de camello, oveja, cerdo o rata).

40 Como se discute en el presente documento – como secuencia de referencia para determinar la posición de aminoácido de un polipéptido quimosina parental de interés (por ejemplo, camello, oveja, bovino, etc.) se usa en el presente documento la secuencia de preproquimosina de quimosina B bovina pública conocida (número de acceso de Genbank P00794 – divulgada como SEQ ID NO: 1 en el presente documento).

45 La preproquimosina de quimosina B bovina de SEQ ID NO: 1 se puede denominar alternativamente en el presente documento quimosina B bovina (*Bos bovis*) o simplemente quimosina bovina. La secuencia también se muestra en la figura 1 en el presente documento.

50 Otra secuencia de quimosina relevante en el presente documento es la secuencia de quimosina de *Camelius dromedarius* públicamente conocida de SEQ ID NO: 2 en el presente documento. Se puede denominar alternativamente en el presente documento quimosina de camello. La secuencia también se muestra en la figura 1 en el presente documento.

55 En el presente contexto se cree que un polipéptido de quimosina parental (por ejemplo, de oveja o rata) que tiene al menos el 65% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 1 (quimosina bovina) se puede ver en el presente documento como suficiente estructuralmente relacionado con, por ejemplo, la quimosina bovina o de camello para ser mejorado al hacer una variante en cualquiera de las posiciones de aminoácidos descritas en el presente documento.

60 Según esto, un primer aspecto de la invención se refiere a un método para hacer una variante de un polipéptido de quimosina aislado de la reivindicación 1.

65 Como se sabe en la técnica – el experto en la materia puede basar en su conocimiento general común producir y purificar rutinariamente quimosina y variantes de quimosina. Dicho en otras palabras, una vez que el experto en la materia está en posesión de un polipéptido parental relevante en el presente documento que tiene actividad quimosina de interés (por ejemplo, de bovinos, camellos, oveja, cerdos, o ratas) es trabajo rutinario para el experto en la materia hacer una variante de tal quimosina parental de interés.

Como se discute en el presente documento – en los ejemplos de trabajo en el presente documento se hicieron variantes usando el polipéptido de secuencia SEQ ID NO: 1 (bovino) como polipéptido parental – tal variante se puede denominar en el presente documento variantes de quimosina bovina.

5 Como se discute en el presente documento – en los ejemplos de trabajo en el presente documento se hicieron variantes usando el polipéptido de secuencia SEQ ID NO: 2 (quimosina de camello) como polipéptido parental – tal variante se puede denominar en el presente documento variante de quimosina de camello.

10 Según esto, un segundo aspecto de la invención se refiere a una variante polipeptídica de quimosina aislada de la reivindicación 5.

15 Una variante polipeptídica de quimosina aislada como se describe en el presente documento se puede usar según la técnica – por ejemplo, para hacer un producto alimenticio o de pienso de interés (tal como, por ejemplo, un producto basado en leche de interés que, por ejemplo, podría ser un producto de queso).

20 Según esto, un tercer aspecto de la invención se refiere a un método para hacer un producto alimenticio o de pienso que comprende añadir una cantidad eficaz de la variante polipeptídica de quimosina aislada como se describe en el presente documento al ingrediente(s) del alimento o pienso y llevar a cabo etapas adicionales de fabricación para obtener el producto alimenticio o de pienso.

Se describe a continuación una forma de realización de la presente invención, a modo de ejemplos solo.

### Definiciones

25 Todas las definiciones de términos relevantes en el presente documento son según lo que entendería el experto en la materia en relación al contexto técnico relevante en el presente documento.

30 El término “quimosina” se refiere a una enzima de la clase EC 3.1.23.4. La quimosina tiene una alta especificidad y coagula leche por corte de un único enlace 105-Ser-Phe-|-Met-Ala-108 en la cadena kappa de la caseína. Un nombre alternativo usado en la técnica es renina.

35 El término “actividad quimosina” se refiere a la actividad quimosina de una enzima quimosina como entiende el experto en la materia en el presente contexto.

40 El experto en la materia sabe cómo determinar la actividad quimosina relevante en el presente documento. En el ejemplo de trabajo 4 en el presente documento se proporciona un ejemplo de un método estándar para determinar la actividad quimosina específica – alternativamente llamada actividad de coagulación o actividad de coagulación de la leche.

En el ejemplo de trabajo 5 en el presente documento se proporciona un ejemplo de un método estándar para determinar la actividad proteolítica.

45 Como se sabe en la técnica – el denominado cociente C/P relevante en el presente documento se determina dividiendo la actividad de coagulación específica (C) por la actividad proteolítica (P).

50 Como se sabe en la técnica – un mayor cociente C/P implica en general que la pérdida de proteína durante, por ejemplo, la fabricación de queso debida a degradación no específica de proteína se reduce, es decir, el rendimiento del queso se mejora, y que el desarrollo de un sabor amargo en el queso durante la maduración se reduce.

El término “variante aislada” significa que está modificada por la mano del hombre. En un aspecto, la variante es al menos el 1% pura, por ejemplo, al menos el 5% pura, al menos el 10% pura, al menos el 20% pura, al menos el 40% pura, al menos el 60% pura, al menos el 80% pura, y al menos el 90% pura, determinado por SDS-PAGE.

55 El término “polipéptido maduro” significa un péptido en su forma final después de la traducción y cualquier modificación postraducciona, tal como procesamiento N terminal, truncamiento C terminal, glucosilación, fosforilación, etc. En el presente contexto un polipéptido de quimosina maduro relevante en el presente documento se puede ver como la secuencia polipeptídica de quimosina activa – es decir, sin las secuencias de la parte pre y/o la parte pro. Los ejemplos relevantes en el presente documento de un polipéptido maduro son, por ejemplo, el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 1 (quimosina bovina), que es desde la posición de aminoácido 59 hasta la posición de aminoácido 381 de SEQ ID NO: 1 o el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 2 (quimosina de camello), que es desde la posición de aminoácido 59 hasta la posición de aminoácido 381 de SEQ ID NO: 2.

65 El término “parental” o “polipéptido parental que tiene actividad quimosina” significa un polipéptido al que se hace una alteración para producir las variantes de enzima de la presente invención. El parental puede ser un polipéptido natural (de tipo salvaje) o una variante del mismo.

El término “identidad de secuencia” se refiere a la relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos.

5 Para los fines de la presente invención, el grado de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos se determina usando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48: 443-453) implementado en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice *et al.*, 2000, *Trends Genet.* 16: 276-277), preferiblemente la versión 3.0.0 o posterior. Los parámetros opcionales usados son penalización por apertura de hueco de 10, penalización por extensión de hueco de 10  
10 0,5, y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (la versión de EMBOSS de BLOSUM62). La salida de Needle marcada “la identidad más larga” (obtenida usando la opción nobrief) se usa como el porcentaje de identidad y se calcula como sigue:

15 
$$(\text{Residuos idénticos} \times 100) / (\text{Longitud del alineamiento} - \text{Número total de huecos en el alineamiento})$$

Para los fines de la presente invención, el grado de identidad de secuencia entre dos secuencias de desoxirribonucleótidos se determina usando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, anteriormente) implementado en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice *et al.*, 2000, anteriormente), preferiblemente la versión 3.0.0 o posterior. Los parámetros opcionales usados son penalización por apertura de hueco de 10, penalización por extensión de hueco de 20 0,5, y la matriz de sustitución EDNAFULL (versión de EMBOSS de NCBI NUC4.4). La salida de Needle marcada “la identidad más larga” (obtenida usando la opción nobrief) se usa como el porcentaje de identidad y se calcula como sigue:

25 
$$(\text{Desoxirribonucleótidos idénticos} \times 100) / (\text{Longitud del alineamiento} - \text{Número total de huecos en el alineamiento}).$$

El término “variante” significa un péptido que tiene actividad quimosina que comprende una alteración, es decir, una sustitución, inserción, y/o delección, en una o más (varias) posiciones. Una sustitución significa un reemplazo de un aminoácido que ocupa una posición con un aminoácido diferente; una delección significa la eliminación de un aminoácido que ocupa una posición; y una inserción significa añadir 1-3 aminoácidos adyacentes a un aminoácido que ocupa una posición.

El aminoácido puede ser aminoácidos naturales o no naturales – por ejemplo, la sustitución con, por ejemplo, particularmente isómeros D (o formas D) de, por ejemplo, D-alanina podría ser teóricamente posible.

El término péptido de quimosina “de tipo salvaje” significa una quimosina expresada por un organismo natural, tal como un mamífero (por ejemplo, camello o bovino) encontrado en la naturaleza.

## 40 Dibujos

Figura 1: Un alineamiento de las diferentes secuencias de quimosina relevantes en el presente documento. La “quimosina\_B\_Bos\_bovis” es la quimosina bovina de SEQ ID NO: 1 en el presente documento y la “Camelus\_dromedarius” mostrada es la quimosina de camello de SEQ ID NO: 2 en el presente documento. Usando la quimosina bovina de SEQ ID NO: 1 como secuencia de referencia como se describe en el presente documento se puede ver, por ejemplo, que la quimosina bovina tiene “V” en la posición 10 y la quimosina de camello tiene “A” en la misma posición 10. También se puede ver, por ejemplo, que bovina/rata tienen “Q” en la posición 352 y camello/C.\_bactrianus tienen “E” en la misma posición 352.

Respecto a las secuencias de quimosina mostradas en la figura 1 – oveja tiene un 94,5% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 bovina; C.\_bactrianus tiene un 83,2% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 bovina; Camelus\_dromedarius (quimosina de camello de SEQ ID NO: 2) tiene un 84% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 bovina; cerdo tiene un 80,3% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 bovina y rata tiene un 71,9% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 bovina.

55 Como entiende el experto en la materia en el presente contexto – los porcentajes de identidad de secuencia relevantes en el presente documento de las secuencias de polipéptidos maduros de, por ejemplo, quimosina de oveja, C.\_bactrianus, camello, cerdo o rata con el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 1 (quimosina bovina – es decir, las posiciones de aminoácidos 59 a 381 e SEQ ID NO: 1) son relativamente similares a los porcentajes de identidad de secuencia mencionados anteriormente.

60 Figura 2: La estructura 3D de la quimosina bovina – la estructura 3D está públicamente disponible. Como ejemplo se muestran dónde están presentes las posiciones 296 y 294 en la quimosina bovina.

## 65 Descripción detallada de la invención

Determinación de la posición de aminoácidos de una quimosina de interés

Como se ha discutido anteriormente – como secuencia de referencia para determinar la posición de aminoácidos de un polipéptido de quimosina de interés relevante en presente documento (por ejemplo, camello, oveja, bovina, etc.) en el presente documento se usa la secuencia de quimosina bovina públicamente conocida divulgada como SEQ ID NO: 1 en el presente documento.

Para los fines de la presente invención, el polipéptido divulgado en SEQ ID NO: 1 (quimosina bovina) se usa para determinar el residuo de aminoácido correspondiente en otro polipéptido de quimosina. La secuencia de aminoácidos de otro polipéptido de quimosina se alinea con el polipéptido divulgado en SEQ ID NO: 1, y basado en el alineamiento, se determina el número de la posición de aminoácido correspondiente a cualquier residuo de aminoácido en el polipéptido divulgado en SEQ ID NO: 1 usando el algoritmo ClustalW como se describe en el ejemplo de trabajo 1 en el presente documento.

La identificación del residuo de aminoácido correspondiente en otro polipéptido de quimosina se puede confirmar usando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48: 443-453) implementada en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice *et al.*, 2000, *Trends Genet.* 16: 276-277), preferiblemente la versión 3.0.0 o posterior.

Basado en los programas informáticos bien conocidos anteriores – es trabajo de rutina para el experto en la materia determinar la posición de aminoácidos de un polipéptido de quimosina de interés relevante en el presente documento (por ejemplo, de camello, oveja, bovina, etc.).

En la figura 1 en el presente documento se muestra un ejemplo de un alineamiento.

Solo como un ejemplo – en la figura 1 se puede ver, por ejemplo, que la SEQ ID NO: 1 de referencia bovina usada en el presente documento tiene una “G” en posición 50 y “Camelus\_dromedarius” (SEQ ID NO: 2 en el presente documento) tiene una “A” en esta posición 50.

#### Nomenclatura de las variantes

Al describir las variantes de la presente invención, la nomenclatura descrita posteriormente se adapta para facilidad de referencia. Se emplean las abreviaturas de aminoácidos de única letra o de tres letras aceptadas por la IUPAC.

Las variantes específicas discutidas en esta sección de “nomenclatura” a continuación pueden no ser variantes relevantes en el presente documento de la presente invención – es decir, esta sección de “nomenclatura” es solo para describir la nomenclatura usada relevante en el presente documento como tal.

Sustituciones. Para una sustitución de aminoácidos, se usa la siguiente nomenclatura: Aminoácido original, posición, aminoácido sustituido. Según esto, una sustitución teórica de treonina con alanina en la posición 226 se designa como “Thr226Ala” o “T226A”. Las mutaciones múltiples se separan por la adición de signos (“+”), por ejemplo, “Gly205Arg + Ser411Phe” o “G205R + S411F”, que representan sustituciones en las posiciones 205 y 411 de glicina (G) con arginina (R) y serina (S) con fenilalanina (F), respectivamente. Una sustitución designada, por ejemplo, “226A” se refiere a una sustitución de un aminoácido parental (por ejemplo, T, Q, S u otro aminoácido parental) con alanina en la posición 226.

Deleciones. Para una deleción de aminoácido, se usa la siguiente nomenclatura: Aminoácido original, posición, \*. Según esto, la deleción de la glicina en la posición 195 se designa como “Gly195\*” o “G195\*”. Las deleciones múltiples se separan por la adición de signos (“+”), por ejemplo, “Gly195\* + Ser411\*” o “G195\* + S411\*”.

Inserciones. Para una inserción de aminoácidos, se usa la siguiente nomenclatura: Aminoácido original, posición, aminoácido original, aminoácido insertado. Según esto, la inserción de lisina después de la glicina en posición 195 se designa “Gly195GlyLys” o “G195GK”. Una inserción de múltiples aminoácidos se designa [Aminoácido original, posición, aminoácido original, aminoácido insertado #1, aminoácido insertado #2; etc.]. Por ejemplo, la inserción de lisina y alanina después de la glicina en la posición 195 se indica como “Gly195GlyLysAla” o “G195GKA”.

En tales casos el/los residuo(s) de aminoácido(s) insertado(s) se numeran mediante la adición de letras minúsculas al número de la posición del residuo de aminoácidos que precede al/los residuo(s) de aminoácido(s) insertado(s). En el ejemplo anterior, la secuencia sería, por tanto:

<u>Parental:</u>	<u>Variante:</u>
195	195 195a 195b
G	G – K – A

Alteraciones múltiples. Las variantes que comprenden múltiples alteraciones se separan por la adición de signos (“+”), por ejemplo, “Arg170Tyr+Gly195Glu” o “R170Y+G195E” representa una sustitución de tirosina y ácido glutámico por arginina y glicina en las posiciones 170 y 195, respectivamente.

Diferentes sustituciones. Donde se pueden introducir diferentes sustituciones en una posición, las diferentes sustituciones se separan por una coma, por ejemplo, "Arg170Tyr,Glu" o "R170Y,E" representa una sustitución de arginina con tirosina o ácido glutámico en la posición 170. Por tanto, "Tyr167Gly,Ala + Arg170Gly, Ala" o "Y167G,A + R170G,A" designa las siguientes variantes:

"Tyr167Gly+Arg170Gly", "Tyr167Gly+Arg170Ala", "Tyr167Ala +Arg 170Gly", y "Tyr167Ala+Arg170Ala".

Un método para hacer una variante polipeptídica de quimosina aislada

Como se ha discutido anteriormente – como se sabe en la técnica, el experto en la materia puede basar en su conocimiento general común producir y purificar rutinariamente quimosina y variantes de quimosina.

Dicho en otras palabras, una vez el experto en la materia está en posesión de un polipéptido parental relevante en el presente documento que tiene actividad quimosina de interés (por ejemplo, de bovinos, camellos, oveja, cerdos o ratas) es trabajo de rutina para el experto en la materia hacer una variante de tal quimosina parental de interés.

Un ejemplo de un método adecuado para producir y aislar una quimosina (variante o parental) puede ser por tecnología bien conocida, por ejemplo, basada en la expresión/producción recombinante en hongos como, por ejemplo, se describe en el documento WO02/36752A2 (Chr. Hansen).

También es trabajo de rutina para el experto en la materia producir una alteración en una o más posiciones en un polipéptido parental que tiene actividad quimosina, en donde la alteración comprende una sustitución, una deleción o una inserción en al menos una posición de aminoácido.

Como sabe el experto en la materia – esto se puede hacer, por ejemplo, mediante la denominada mutagénesis dirigida y tecnología basada en expresión/producción recombinante.

También es trabajo de rutina para el experto en la materia determinar si un polipéptido parental relevante del presente documento (por ejemplo, quimosina de tipo salvaje de camello o bovina) y/o una variante relevante del presente documento tiene actividad quimosina o no.

Como se sabe en la técnica – la actividad quimosina se puede determinar mediante el denominado cociente C/P, que se determina dividiendo la actividad de coagulación específica (C) por la actividad proteolítica (P).

Como se sabe en la técnica – un mayor cociente C/P implica en general que la pérdida de proteína durante, por ejemplo, la fabricación de queso debida a degradación no específica de proteína se reduce, es decir, el rendimiento del queso se mejora, y que el desarrollo de un sabor amargo en el queso durante la maduración se reduce.

En el ejemplo de trabajo 4 en el presente documento se describe un método adecuado para determinar la actividad de coagulación específica (C) y en el ejemplo de trabajo 5 en el presente documento se describe un método adecuado para determinar la actividad proteolítica (P).

Una variante polipeptídica de quimosina aislada como se describe en el presente documento es una variante, en donde la variante tiene una actividad quimosina que da un mayor cociente C/P comparado con el cociente C/P de la quimosina de camello que comprende el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 2 en el presente documento.

Más preferiblemente, una variante polipeptídica de quimosina aislada como se describe en el presente documento es una variante, en donde la variante tiene

- una actividad quimosina que da un cociente C/P mayor en comparación con el cociente C/P de la quimosina de bovina que comprende el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 1 en el presente documento; y
- una actividad quimosina que da un cociente C/P mayor en comparación con el cociente C/P de la quimosina de camello que comprende el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 2 en el presente documento.

Como se ha discutido anteriormente – como secuencia de referencia para determinar la posición de aminoácidos de un polipéptido de quimosina de interés relevante del presente documento (por ejemplo, de camello, bovina, de oveja, etc.) se usa en el presente documento la secuencia de quimosina bovina pública conocida divulgada como SEQ ID NO: 1 en el presente documento.

Como se ha discutido anteriormente – basado en, por ejemplo, los programas de alineamiento de secuencia de ordenador discutidos en el presente documento – es trabajo de rutina para el experto en la materia determinar la posición de aminoácido relevante en el presente documento de un polipéptido de quimosina de interés relevante del presente documento (por ejemplo, de camello, bovina, de oveja, etc.).

El término “el polipéptido parental tiene al menos el 65% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 1 (quimosina bovina)” se puede ver como que se refiere a una limitación basada en la secuencia del polipéptido de quimosina parental usado para hacer una variante del mismo relevante en el presente documento.

5 Dicho en otras palabras – un polipéptido de quimosina parental maduro (por ejemplo, de oveja o cerdo) que tiene al menos el 65% de identidad de secuencia con la quimosina bovina madura se cree que es suficiente estructuralmente idéntico a, por ejemplo, la quimosina bovina o de camello para ser relevante en el presente documento – es decir, en el presente contexto se cree que un polipéptido de quimosina parental maduro (por ejemplo, de oveja o rata) que tiene al menos el 65% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 1 (quimosina  
10 bovina) se puede ver en el presente documento como suficiente estructuralmente relacionado a, por ejemplo, quimosina bovina o de camello para ser mejorado al hacer una variante en cualquiera de las posiciones de aminoácidos descritas en el presente documento.

15 El polipéptido de quimosina de camello de SEQ ID NO: 2 tiene un 84% de identidad de secuencia con el polipéptido bovina de SEQ ID NO: 1 (es decir, la SEQ ID NO: 1 completa desde la posición 1 a la 381, que incluye la secuencia pre y pro).

20 Como entiende el experto en la materia en el presente contexto – un polipéptido parental relevante en el presente documento que tiene actividad quimosina puede ser ya, por ejemplo, una variante de, por ejemplo, una quimosina de tipo salvaje correspondiente.

25 Por ejemplo, una variante de quimosina de camello con, por ejemplo, 5-10 alteraciones (por ejemplo, sustituciones) comparado con el polipéptido de quimosina de camello de tipo salvaje de SEQ ID NO: 2 será todavía un polipéptido parental que tiene al menos un 65% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 1 (bovino).

Dicho en otras palabras, una variante polipeptídica de quimosina aislada relevante en el presente documento puede comprender alteraciones (por ejemplo, sustituciones) en otra posición diferente de las posiciones de, por ejemplo, el primer aspecto del presente documento.

30 Respecto a las secuencias de quimosina mostradas en la figura 1 en el presente documento – oveja tiene un 94,5% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 bovina; C.\_bactrianus tiene un 83,2% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 bovina; cerdo tiene un 80,3% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 bovina y rata tiene un 71,9% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 bovina.

35 Como entiende el experto en la materia en el presente contexto – los porcentajes de identidad de secuencia relevantes en el presente documento de, por ejemplo, quimosina madura de oveja, C.\_bactrianus, camello, cerdo o rata con el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 1 (quimosina bovina – es decir, las posiciones de aminoácidos 59 a 381 de SEQ ID NO: 1) son relativamente similares a los porcentajes de identidad de secuencia mencionados anteriormente.

40 Variantes preferidas:

45 Como se ha discutido anteriormente – por ejemplo, el primer aspecto se refiere a una variante polipeptídica de quimosina aislada, en donde la alteración comprende una sustitución, una deleción o una inserción en al menos una posición de aminoácidos correspondiente a cualquiera de la posición 134.

Se puede preferir que al menos una alteración sea una sustitución – es decir, una forma de realización preferida relevante en el presente documento se refiere a una variante polipeptídica de quimosina aislada, en donde la alteración comprende una sustitución en al menos una posición de aminoácido correspondiente a cualquiera de la posición 134.

50 Preferiblemente, la sustitución es 134Q.

Preferiblemente, la sustitución es H134Q.

55 En una forma de realización preferida, la sustitución es:

H134Q + I154L + D216S;  
H134Q + L280I + G309W;  
Y79S + H134Q + Y365F + V375L; o  
S132F + H134Q + M200I + M215L + G221E.

60 Polipéptido parental preferido que tiene actividad quimosina

65 Solo como un ejemplo – un polipéptido parental relevante adecuado en el presente documento podría ser, por ejemplo, quimosina A bovina – como se sabe en la técnica la quimosina A bovina puede tener solo una diferencia de aminoácido en comparación con la quimosina B bovina de SEQ ID NO: 1 en el presente documento.

Como se ha discutido anteriormente – en los ejemplos de trabajo en el presente documento se hicieron variantes usando el polipéptido de SEQ ID NO: 1 (bovino) como polipéptido parental – tal variante se puede denominar en el presente documento variantes de quimosina bovina.

5 Como entiende el experto en la materia en el presente contexto – un polipéptido parental relevante en el presente documento que tiene actividad quimosina puede ya, por ejemplo, ser una variante de, por ejemplo, una quimosina de tipo salvaje correspondiente.

10 Por ejemplo, una variante de quimosina bovina con, por ejemplo, 5-10 alteraciones (por ejemplo, sustituciones) en comparación con el polipéptido de quimosina bovina de tipo salvaje maduro de SEQ ID NO: 1 será todavía un polipéptido parental que tiene al menos un 95% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 1 (quimosina bovina).

15 El polipéptido maduro de SEQ ID NO: 1 (bovino) tiene 323 aminoácidos de longitud – según esto, una variante de quimosina madura con, por ejemplo, 25 sustituciones de aminoácidos en comparación con el polipéptido maduro de quimosina bovina de tipo salvaje de SEQ ID NO: 1 no será un polipéptido parental que tiene al menos el 95% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 1 (quimosina bovina).

20 Dicho en otras palabras y en general – una variante polipeptídica de quimosina aislada relevante en el presente documento puede comprender alteraciones (por ejemplo, sustituciones) en otras posiciones que las posiciones de, por ejemplo, el primer aspecto del presente documento.

25 Como se ha discutido anteriormente – en los ejemplos de trabajo en el presente documento se hicieron variantes usando el polipéptido de SEQ ID NO: 2 (camello) como polipéptido parental – tal variante se puede denominar en el presente documento variantes de quimosina de camello.

30 Según esto, en una forma de realización preferida – el polipéptido parental tiene al menos el 95% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 2 (quimosina de camello) e incluso más preferiblemente el polipéptido parental tiene al menos el 97% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 2 (quimosina de camello). Puede ser preferido que el polipéptido parental sea el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 2 (quimosina de camello).

35 Como entiende el experto en la materia en el presente contexto – un polipéptido parental que tiene al menos el 90% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 2 (camello) todavía está dentro del requisito de identidad de secuencia basada en SEQ ID NO: 1 (bovino) del punto (ii) del primer aspecto en el presente documento – es decir, será un polipéptido parental que tiene al menos el 65% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 1 (quimosina bovina).

#### 40 Una variante aislada de quimosina bovina

Como se ha discutido anteriormente – en los ejemplos de trabajo en el presente documento se hicieron variantes usando el polipéptido de SEQ ID NO: 1 (bovino) como polipéptido parental – tal variante se puede denominar en el presente documento variantes de quimosina bovina.

#### 45 Una variante aislada de quimosina de camello

Como se ha discutido anteriormente – en los ejemplos de trabajo en el presente documento se hicieron variantes usando el polipéptido de SEQ ID NO: 2 (quimosina de camello) como polipéptido parental – tal variante se puede denominar en el presente documento variantes de quimosina de camello.

50 Como se ha discutido anteriormente – el segundo aspecto según esto se refiere a una variante polipeptídica de quimosina aislada de la reivindicación 5.

55 Las definiciones y formas de realización preferidas descritas anteriormente también son relevantes para este aspecto.

Preferiblemente, una variante polipeptídica de quimosina de camello aislada como se describe en el presente documento es una variante, en donde la variante tiene una actividad quimosina que da un mayor cociente C/P en comparación con el cociente C/P de la quimosina de camello que comprende el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 2.

60 En una forma de realización preferida – el polipéptido parental tiene al menos el 92% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 2 (quimosina de camello), más preferiblemente el polipéptido parental tiene al menos el 95% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 2 (quimosina de camello) e incluso más preferiblemente el polipéptido parental tiene al menos el 97% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 2 (quimosina de camello).

65

Como entiende el experto en la materia en el presente contexto – una variante de quimosina aislada puede comprender alteraciones (por ejemplo, sustituciones) en otras posiciones de aminoácidos que las dadas anteriormente.

5 Por ejemplo, una variante de quimosina de camello con, por ejemplo, 5-10 alteraciones (por ejemplo, sustituciones) en comparación con el polipéptido de quimosina de camello de tipo salvaje de SEQ ID NO: 2 será todavía un polipéptido parental que tiene al menos un 95% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 2 (quimosina de camello).

10 Se puede preferir que la variante de quimosina de camello aislada comprenda menos de 30 alteraciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones) en comparación con el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 2 (quimosina de camello) o se puede preferir que la variante de quimosina de camello aislada comprenda menos de 20 alteraciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones) en comparación con el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 2 (quimosina de camello) o se puede preferir que la variante de quimosina de camello aislada comprenda menos de 10 alteraciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones) en comparación con el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 2 (quimosina de camello) o se puede preferir que la variante de quimosina de camello aislada comprenda menos de 5 alteraciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones) en comparación con el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 2 (quimosina de camello).

20 Como entiende el experto en la materia en el presente contexto – el término “el polipéptido variante aislado que tiene menos del 100% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 2 (quimosina de camello)” del punto (iii) anteriormente se refiere que la variante de quimosina de camello aislada descrita en el presente documento, por supuesto, no tendrá una secuencia polipeptídica que sea el 100% idéntica a la secuencia de quimosina de camello de tipo salvaje pública conocida de SEQ ID NO: 2.

25 Una forma de realización preferida se refiere a una variante polipeptídica de quimosina de camello aislada, en donde la alteración comprende una sustitución, una delección o una inserción en al menos una posición de aminoácidos correspondiente a cualquiera de la posición 134.

30 Se puede preferir que al menos una alteración sea una sustitución – es decir, una forma de realización preferida relevante en el presente documento se refiere a una variante polipeptídica de quimosina aislada, en donde la alteración comprende una sustitución en al menos una posición de aminoácido correspondiente a cualquiera de la posición 134.

Preferiblemente, la sustitución es 134Q.

35 Preferiblemente, la sustitución es H134Q.

En una forma de realización preferida, la sustitución es:

40 H134Q + I154L + D216S;  
H134Q + L280I + G309W;  
Y79S + H134Q + Y365F + V375L; o  
S132F + H134Q + M200I + M215L + G221E.

45 Un método para hacer un producto basado en leche

Como se ha discutido anteriormente – una variante polipeptídica de quimosina aislada como se describe en el presente documento se puede usar según la técnica – por ejemplo, para hacer un producto basado en leche de interés (tal como, por ejemplo, un producto de queso).

50 Como se ha discutido anteriormente – un aspecto de la invención se refiere a un método para hacer un producto alimenticio o de pienso que comprende añadir una cantidad eficaz de la variante polipeptídica de quimosina aislada como se describe en el presente documento al/los ingrediente(s) alimenticio(s) o de pienso y llevar a cabo etapas de fabricación adicionales para obtener el producto alimenticio o de pienso.

55 Preferiblemente, el producto alimenticio o de pienso es un producto basado en leche y en donde el método comprende añadir una cantidad eficaz de la variante polipeptídica de quimosina aislada como se describe en el presente documento a leche y llevar a cabo etapas de fabricación adicionales para obtener el producto basado en leche.

60 La leche puede ser, por ejemplo, leche de soja, leche de oveja, leche de cabra, leche de búfalo, leche de yak, leche de llama, leche de camello o leche de vaca.

El producto basado en leche puede ser, por ejemplo, un producto de leche fermentada, un quark o un queso.

## Ejemplos

65

Ejemplo 1: Alineamiento y numeración de secuencias de proteína quimosinas y secuencias variantes

Se alinearon las secuencias de proteínas quimosinas usando el algoritmo ClustalW proporcionado por el EBI (EBI, tools, multiple sequence alignment, CLUSTALW", <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) y como se describe en Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007). *Bio-informatics* 23(21), 2947-2948.

Los ajustes de ClustalW2 para alineamientos múltiples de secuencias fueron Matriz de ponderación de proteínas = BLOSUM, apertura de hueco = 10, extensión de hueco = 0,05, distancias de hueco = 8, sin huecos finales, iteración = ninguna, NUMITER = 1, Agrupamiento = NJ.

Como secuencia de referencia se usó la preproquimosina de quimosina B bovina (número de acceso de Genbank P00794 – divulgado en el presente documento como SEQ ID NO: 1), donde la metionina N-terminal tiene el número 1 (MRCL...) y la isoleucina C-terminal (en la secuencia de proteína ...LAKAI) tiene el número 381. Las variantes se alinearon frente a la pre-pro-quimosina B bovina y los residuos se numeraron según el correspondiente residuo de quimosina bovina.

#### Ejemplo 2: Diseño de variantes de quimosina

Las variantes de quimosina se diseñaron usando diferentes estrategias.

Cuando se hace referencia a la quimosina de camello se hace referencia a la quimosina de camello que comprende el polipéptido de SEQ ID NO: 2 en el presente documento.

La quimosina de camello de SEQ ID NO: 2 se puede ver como un polipéptido parental relevante en el presente documento que tiene actividad quimosina usado para hacer variantes de quimosina de camello del mismo.

Cuando se hace referencia a la quimosina bovina se hace referencia a la quimosina bovina que comprende el polipéptido de SEQ ID NO: 1 en el presente documento.

La quimosina bovina de SEQ ID NO: 1 se puede ver como un polipéptido parental relevante en el presente documento que tiene actividad quimosina usado para hacer variantes de quimosina bovina del mismo.

Las variantes de quimosina de camello se diseñaron basadas en un alineamiento de un gran conjunto de secuencias de proteasas aspárticas conocidas públicas que tienen una identidad del 25% o más comparadas con la quimosina B bovina.

Las variaciones en general se introdujeron en las regiones hipervariables, mientras que las regiones conservadas no se cambiaron. Se introdujeron variaciones múltiples en cada construcción variante, asegurando que cada mutación individual estaba presente en construcciones variantes múltiples (para una discusión de los resultados – véase el ejemplo 6 posteriormente).

Las variantes de la quimosina bovina se diseñaron basándose en una comparación de quimosina bovina y de camello. Los residuos bovinos, por ejemplo, se cambiaron al homólogo de camello (para una discusión de los resultados – véase el ejemplo 7 posteriormente).

#### Ejemplo 3: Preparación de material de enzima variante de quimosina

Todas las variantes de quimosina se sintetizaron como genes sintéticos y se clonaron en un vector de expresión fúngico que corresponde esencialmente a pGAMpR-C (descrito en el documento WO02/36752A2).

Los vectores se transformaron en *E. coli* y el ADN plasmídico se purificó usando protocolos estándar de biología molecular, que conoce el experto en la materia.

Los plásmidos variantes se transformaron individualmente en una cepa de *Aspergillus niger* y la proteína se produjo esencialmente como se describe en el documento WO02/36752A2 y se purificó usando técnicas de cromatografía estándar.

Como se sabe en la técnica – el experto en la materia puede basar en su conocimiento general común producir y purificar quimosina y variantes de quimosina – tal como las variantes de quimosina bovina y de camello descritas en el presente documento.

#### Ejemplo 4: Determinación de la actividad específica de quimosina

##### 4.1 Determinación de la actividad de coagulación

La actividad de coagulación de la leche se determinó usando el método REMCAT, que es el método estándar desarrollado por la Federación Lechera Internacional (método IDF, por sus siglas en inglés).

5 La actividad de coagulación de la leche se determina a partir del tiempo necesario para una floculación visible de un sustrato de leche estándar preparado de una leche en polvo baja en grasa, a baja temperatura con una solución de cloruro de calcio de 0,5 g por litro (pH ≈ 6,5). El tiempo de coagulación de una muestra de cuajo se compara con el de un estándar de referencia que tiene actividad de coagulación de la leche conocida y que tiene la misma composición enzimática mediante el Estándar de IDF 110B como la muestra. Las muestras y estándares de referencia se midieron en condiciones químicas y físicas idénticas. Las muestras variantes se ajustaron a aproximadamente 3 IMCU/ml usando un tampón de ácido acético 84 mM pH 5,5. Después de ello, se añadieron 200 µl de enzima a 10 ml de leche precalentada (32°C) en un tubo de ensayo de vidrio colocado en un baño de agua, capaz de mantener una temperatura constante de 32°C ± 1°C con agitación constante.

15 La actividad coagulante de leche total (potencia) de un cuajo se calculó en Unidades Internacionales Coagulantes de Leche (IMCU) por ml relativa a un estándar que tiene la misma composición enzimática que la muestra según la fórmula:

$$\text{Potencia en IMCU/ml} = \frac{\text{Sestándar} \times \text{Testándar} \times \text{Dmuestra}}{\text{Destándar} \times \text{Tmuestra}}$$

20 Sestándar La actividad coagulante de leche del estándar de referencia internacional para cuajo  
 Testándar Tiempo de coagulación en segundos obtenido para la dilución del estándar  
 Dmuestra Factor de dilución para la muestra  
 Destándar Factor de dilución para el estándar  
 25 Tmuestra Tiempo de coagulación en segundos obtenido para la muestra de cuajo diluida desde la adición de la enzima hasta el tiempo de floculación

#### 4.2 Determinación del contenido de proteína total

30 El contenido de proteína total se determinó usando el kit de ensayo de proteína Pierce BCA de Thermo Scientific según las instrucciones de los proveedores.

#### 4.3 Calculo de la actividad específica de coagulación

35 La actividad específica de coagulación (IMCU/mg de proteína total) se determinó dividiendo la actividad de coagulación (IMCU/ml) por el contenido total de proteína (mg de proteína total por ml).

#### Ejemplo 5: Determinación de la actividad proteolítica

40 La actividad proteolítica general se midió usando Bodipy-FL caseína marcada con fluorescencia como sustrato (EnzChek; Molecular Bioprobes, E6638). Los derivados de caseína marcados fuertemente con Bodipy-FL fluorescente verde insensible al pH producen extinción casi completa de la fluorescencia del conjugado. La hidrólisis catalizada por proteasa libera Bodipy-FL fluorescente. Este método es muy sensible lo que era esencial para este experimento ya que CHYMAX M tiene la menor actividad proteolítica general de todos los coagulantes conocidos hasta la fecha.

45 El ensayo se realizó en un tampón fosfato 0,2 M ajustado al pH deseado a una concentración final de sustrato de 0,04 mg/ml. Antes de mezclar 1 parte de sustrato con una parte de enzima, ambos preparados en el tampón fosfato, todas las variantes enzimáticas se normalizaron a 50 IMCU/ml (según el ejemplo 4). El sustrato y la enzima se mezclaron en placas de microtitulación de 96 pocillos Nunc Fluoro, se sellaron e incubaron a 32°C durante 60 min. Después de la incubación el sellado se eliminó y la fluorescencia se registró en un fluorímetro.

#### Ejemplo 6: Evaluación de variantes de quimosina de camello

55 Para todas las variantes la actividad coagulante específica (IMCU/mg de proteína total) se determinó a pH 6,5 según el ejemplo 4. Las variantes se clasificaron usando la siguiente estrategia. La variante con la menor actividad específica obtuvo un punto, la segunda menor dos puntos, etc.

La misma estrategia de clasificación se hizo para el cociente C/P. El cociente C/P se determinó para todas las variantes a pH 6,5 dividiendo la actividad coagulante específica (IMCU/mg) por la actividad proteolítica

60 Se determinaron los puntos totales para cada variante usando ambas estrategias de clasificación y se hizo una clasificación final, basada en la suma de los puntos.

65 Como referencia se incluyeron un gen de tipo salvaje de camello y un gen de tipo salvaje bovino.

ES 2 741 723 T3

H05-3	42453	F281V	V306I	I321L	x	x	213
G01-1	42419	H134Q	I154L	D216S	x	x	210
G10-2	42492	V261A	V263I	G309W	L311I	Y326F	204
A09-2	42478	D156V	G309D	M314L	V317I	x	203
E01-1	42416	H134Q	L280I	G309W	x	x	200
G03-2	42436	R119Q	D156V	V375L	x	x	197
B06-2	42455	Y79S	R119S	H204R	x	x	195
B09-2	42479	Y79S	H134Q	Y365F	V375L	x	194
G02-1	42427	Y194I	R213Q	G309D	x	x	194
G04-1	42444	Y79S	D117N	I321L	x	x	193
H02-1	42428	Y185F	D325M	E352Q	x	x	189
A04-2	42438	Y79S	L224V	L311I	x	x	186
H10-2	42493	S132F	H134Q	M200I	M215L	G221E	186
H08-1	42477	F281V	G309W	S331Y	D337E	x	185
A09-2	42478	D156V	G309D	M314L	V317I	x	184
H01-1	42420	G128D	L188I	Y326F	x	x	182
G11-1	42500	R119S	V241I	L280I	L311I	D325M	181
H11-2	42501	R119Q	S284T	T297S	V306I	G309W	178
Camello	42404	x	x	x	x	x	174
G08-2	42476	Q246E	G309D	S329P	D337E	x	174
G06-1	42460	D156V	M215L	V241I	x	x	170
H09-1	42485	R125Q	G128N	H204R	Q246E	S284T	168
H07-2	42469	D117N	V263I	L280I	V306I	x	167
E06-2	42458	G128D	T244S	L311I	x	x	151
C03-2	42431	V90L	I154L	S335N	x	x	148
B07-1	42463	V194I	V279M	L280I	S284T	x	147
A03-2	42429	Y185F	R213Q	Q246E	x	x	146
E05-2	42450	D117N	S329P	T342S	x	x	145
H06-2	42461	G128N	R312S	S313Y	Y326F	x	145
B03-2	42430	R125Q	V279M	M314L	x	x	143
B10-1	42487	D216S	L224V	V263I	F281V	G309D	143
F01-1	42417	V90L	R119Q	H204R	x	x	143
E03-3	42433	H134Q	K289N	G302D	x	x	142
A02-2	42421	I154L	G221E	V279M	x	x	136
F07-2	42467	T297S	I321L	D325M	T342S	x	135
C11-2	42496	G128D	I154L	I258V	D325M	D337E	132
D02-1	42424	V261A	S331Y	L353K	x	x	132
A04-2	42438	Y79S	L224V	L311I	x	x	131
B01-1	42413	N108K	L280I	S313Y	x	x	131
D12-1	42506	S190A	V279M	S313Y	S331Y	V375L	130
A09-2	42478	D156V	G309D	M314L	V317I	x	129

## ES 2 741 723 T3

F09-1	42483	V90L	E352Q	R374L	V375L	x	129
B12-1	42504	N108K	D117N	M215L	M314L	G347S	128
D11-1	42497	D156V	H204R	V261A	I321L	S329P	128
F06-2	42459	D117N	V261A	R312S	x	x	125
H12-1	42502	V90L	L188I	R203Q	L280I	D337E	124
D04-2	42441	L188I	G221E	Y365F	x	x	123
E07-2	42466	R119Q	V279K	K289N	D325M	x	123
C02-2	42423	R119S	R125Q	K289N	x	x	122
D05-1	42449	R119S	L224V	T297S	x	x	122
C08-1	42472	F281V	K289N	L311I	S313Y	x	117
B02-1	42422	S132F	S180A	R203Q	x	x	115

El término "X" indica sin cambio – es decir, sin mutación.

- 5 Como todas las variantes incluían mutaciones múltiples, los datos de las variantes clasificadas se investigaron en más detalle usando métodos estadísticos y análisis de estructura 3D, para determinar los cambios de aminoácidos individuales que tienen un efecto positivo o negativo. En esta investigación también se evaluaron/incluyeron las variantes bovinas discutidas en el ejemplo 7 a continuación.

- 10 Se identificaron las siguientes mutaciones

D117N	++	Lóbulo del esqueleto
H134Q	++	Lóbulo expuesto
L280I	++	En hendidura
D156V	+	Esqueleto
V241I	+	Esqueleto
D325M	+	Esqueleto
R374L	--	Esqueleto
K289N	--	Aleta del otro lado
V279K	--	En hendidura
G302D	--	Aleta
L353K	-	Entrada de la hendidura

L311I	++	Fondo de la hendidura
G309W	+	Fuera del lóbulo pequeño
G309D	+	

V279M +

- 15 El término "+" se refiere a un intercambio de aminoácido positivo – es decir, "++" es más positivo que "+".  
El término "-" se refiere a un intercambio de aminoácido negativo – es decir, "--" es más negativo que "-".

- 20 Las descripciones de la columna derecha de la tabla se refieren a dónde están situadas las mutaciones individuales en la estructura 3D de la quimosina bovina. La estructura 3D de la quimosina bovina está públicamente disponible. Como ejemplo, en la figura 2 se muestran dónde están presentes las posiciones de aminoácidos 296 y 294 en la quimosina bovina.

- 25 Conclusiones:

Los resultados anteriores demuestran que las siguientes mutaciones en la quimosina de camello eran positivas (es decir, con cociente C/P mejorado en comparación con la quimosina de tipo salvaje de camello):

- 5 D117N
- H134Q
- L280I
- D156V
- V241I
- D325M
- 10 L311I
- G309W
- G309D
- V279M

15 Ejemplo 7: Evaluación de variantes de quimosina bovina

Se evaluaron variantes de quimosina bovina basándose en su cociente C/P a pH 6,5 solo

	Mutaciones Bovina → camello	Proteolítica/IMCU	Coagulación/mg	C/P
3	K279V, V281F	127.237	37	0,3
4	Q298E, Q300R	59.942	241	4,0
6	H350N, Q352E, K353L	106.417	191	1,8
7	D307N, D309G	56.349	47	0,8
8	Q141E, I143F	91.011	176	1,9
Bovina (3327)	Ninguna	124,237	157	1,3
Camello (A01)	Ninguna	53.354	197	3,7

20 Como todas las variantes incluían mutaciones múltiples y los datos de las variantes clasificadas se investigaron en más detalle, usando métodos estadísticos y análisis de estructura 3D, para determinar los cambios individuales de aminoácidos que tienen un efecto positivo o negativo. En esta investigación también se evaluaron/incluyeron las variantes de camello discutidas en ejemplo 6.

25 Se identificaron las siguientes mutaciones positivas para quimosina bovina:

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

30 El término “+” se refiere a un intercambio de aminoácido positivo – es decir, “++” es más positivo que “+”.

El término “-” se refiere a un intercambio de aminoácido negativo – es decir, “--” es más negativo que “-”.

Conclusiones:

35 Los resultados anteriores demuestran que las siguientes mutaciones en la quimosina bovina eran positivas (es decir, con cociente C/P mejorado en comparación con la quimosina de tipo salvaje bovina):

- 40 Q300R
- H350N
- K353L
- Q141E
- I143F

45 Ejemplo 8: Posiciones para hacer una mutación positiva en quimosina

Una evaluación comparativa de los resultados descritos en los ejemplos 6 y 7 produce los siguientes datos.

Región de la hendidura catalítica 279-281

Como se muestra en el ejemplo 7, la doble mutación K279V y V281F en la quimosina bovina produjo un efecto negativo en el cociente C/P. En la quimosina de camello la mutación V279K también produjo un resultado negativo (ejemplo 6). Por tanto, se concluye que el aminoácido óptimo en la posición 281 es una V. También se observó que la mutación L280I en camello tuvo un efecto positivo.

5 Región del lóbulo pequeño 298-300

Como se muestra en el ejemplo 7, la doble mutación Q298E y Q300R en la quimosina bovina tuvo un efecto positivo sobre el cociente C/P.

10 Región de la hendidura catalítica 350-353

Como se muestra en el ejemplo 7, la triple mutación H350N, Q352E y K353L en la quimosina bovina tuvo un efecto positivo sobre el cociente C/P.

15 En la quimosina de camello se observó (ejemplo 6) que L353Q tuvo un efecto positivo mientras que L353K tuvo un efecto negativo.

20 Región del lóbulo pequeño 307-311

Como se muestra en el ejemplo 7, la doble mutación D307N y D309G en la quimosina bovina tuvo un efecto negativo sobre el cociente C/P.

25 En quimosina de camello G309D y G309W tienen un efecto positivo. Esto implica que la mutación D307N en la quimosina bovina es responsable del efecto negativo.

En quimosina de camello se mostró que una mutación L311I tenía efectos beneficiosos.

30 Región esqueleto 134-143

Como se muestra en el ejemplo 7, la doble mutación Q141E e I143F en la quimosina bovina tuvo un efecto positivo sobre el cociente C/P.

35 Cambiar H134 a Q en quimosina de camello se mostró que tenía un efecto beneficioso.

Posición	Aminoácidos preferidos
280	I
281	V
298	E
300	R
352	Q (menos preferido L)
309	D o W
307	D
141	E
143	F
353	Q
352	Q
311	I
134	Q

### Referencias

40 1: Documento WO02/36752A2 (Chr. Hansen)

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

45 3: Suzuki et al: Alteration of catalytic properties of chymosin by site-directed mutagenesis, Protein Engineering, vol. 2, Mayo 1989, páginas 563-569

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

5: Pitts et al: Expression and characterisation of chymosin pH optima mutants produced in *Trichoderma reesei*, *Journal of biotechnology*, vol. 28, Marzo 1993, páginas 69-83

5 6: M.G. Williams et al: Mutagenesis, biochemical characterization and X-ray structural analysis of point mutants of bovine chymosin, *Protein engineering design and selection*, vol. 10, Septiembre 1997, páginas 991-997

10 7: Strop et al: Engineering enzyme subsite specificity: preparation, kinetic characterization, and x-ray analysis at 2.0 Å resolution of Va1111phe site mutated calf chymosin, *Biochemistry*, vol. 29, Octubre 1990, páginas 9863-9871

10 8: Supanee et al: Site-specific mutations of calf chymosin B which influence milk-clotting activity, *Food Chemistry*, vol. 62, Junio 1998, páginas 133-139

15 9: Zhang et al: Functional implications of disulfide bond, Cys45-Cys50, in recombinant prochymosin, *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1343, Diciembre 1997, páginas 278-286.

**Lista de secuencias**

20 <110> Chr. Hansen A/S

<120> Variantes de quimosina con propiedades mejoradas de coagulación de la leche

<130> P4629PC00

25 <160> 2

<170> BiSSAP 1.0

<210> 1

30 <211> 381

<212> PRT

<213> *Bos taurus*

<220>

35 <221> FUENTE

<222> 1...381

<223> /tipo\_mol = "proteína"

/organismo = "*Bos taurus*"

40 <400> 1

ES 2 741 723 T3

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

<210> 2

5 <211> 381

<212> PRT

<213> Camelus dromedarius

<220>

10 <221> FUENTE

<222> 1...381

<223> /tipo\_mol = "proteína"  
 /organismo = "Camelus dromedarius"

15 <400> 2

ES 2 741 723 T3

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

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para hacer una variante polipeptídica de quimosina aislada que comprende las etapas:
  - 5 (a): hacer una alteración en una o más posiciones en un polipéptido parental que tiene actividad quimosina, en donde la alteración comprende una sustitución, una delección o una inserción en al menos una posición de aminoácido correspondiente a la posición 134; y
  - (b): producir y aislar el polipéptido alterado de la etapa (a) y mediante ello obtener la variante polipeptídica de quimosina aislada, en donde la variante tiene actividad quimosina;
  - 10 y en donde:
    - 15 (i): la posición de aminoácido del polipéptido parental se determina mediante un alineamiento del polipéptido parental con el polipéptido de SEQ ID NO: 1 (quimosina bovina) – es decir, el polipéptido de SEQ ID NO: 1 se usa para determinar la correspondiente secuencia de aminoácidos en el polipéptido parental; y
    - (ii): el polipéptido parental tiene al menos el 90% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 2 (quimosina de camello), que es desde la posición de aminoácido 59 hasta la posición de aminoácido 381 de SEQ ID NO: 2; y
    - 20 en donde la variante polipeptídica de quimosina aislada tiene:
      - una actividad quimosina que da un cociente C/P mayor en comparación con el cociente C/P de quimosina de camello que comprende el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 2.
2. El método para hacer una variante polipeptídica de quimosina aislada de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la alteración es una sustitución en al menos una posición de aminoácido correspondiente a la posición 134.
3. El método para hacer una variante polipeptídica de quimosina aislada de la reivindicación 2 en donde la sustitución es 134Q.
4. El método para hacer una variante polipeptídica de quimosina aislada de la reivindicación 2 en donde la sustitución es H134Q.
5. Una variante polipeptídica de quimosina aislada que comprende:
  - 35 (a): una alteración en una o más posiciones en un polipéptido parental que tiene actividad quimosina, en donde la alteración comprende una sustitución, una delección o una inserción en al menos una posición de aminoácido correspondiente a la posición 134; y
  - (b): en donde la variante tiene actividad quimosina;
  - 40 y en donde:
    - 45 (i): la posición de aminoácido del polipéptido parental se determina mediante un alineamiento del polipéptido parental con el polipéptido de SEQ ID NO: 1 (quimosina bovina) – es decir, el polipéptido de SEQ ID NO: 1 se usa para determinar la correspondiente secuencia de aminoácidos en el polipéptido parental; y
    - (ii): el polipéptido parental tiene al menos el 90% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 2 (quimosina de camello), que es desde la posición de aminoácido 59 hasta la posición de aminoácido 381 de SEQ ID NO: 2; y
    - 50 (iii): el polipéptido variante aislado tiene menos del 100% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 2 (quimosina de camello); y
    - en donde la variante aislada tiene una actividad quimosina que da un cociente C/P mayor en comparación con el cociente C/P de quimosina de camello que comprende el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 2.
6. La variante polipeptídica de quimosina aislada de la reivindicación 5, en donde la variante de quimosina de camello aislada comprende menos de 10 alteraciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones) en comparación con el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 2 (quimosina de camello).
7. La variante polipeptídica de quimosina aislada de cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, en donde la alteración es una sustitución en al menos una posición de aminoácido correspondiente a la posición 134.
8. La variante polipeptídica de quimosina aislada de la reivindicación 7, en donde la sustitución es 134Q.
9. La variante polipeptídica de quimosina aislada de la reivindicación 8, en donde la sustitución es H134Q.
10. La variante polipeptídica de quimosina aislada de la reivindicación 9, en donde la sustitución es:

## ES 2 741 723 T3

H134Q + I154L + D216S;  
H134Q + L280I + G309W;  
Y79S + H134Q + Y365F + V375L; o  
S132F + H134Q + M200I + M215L + G221E.

5

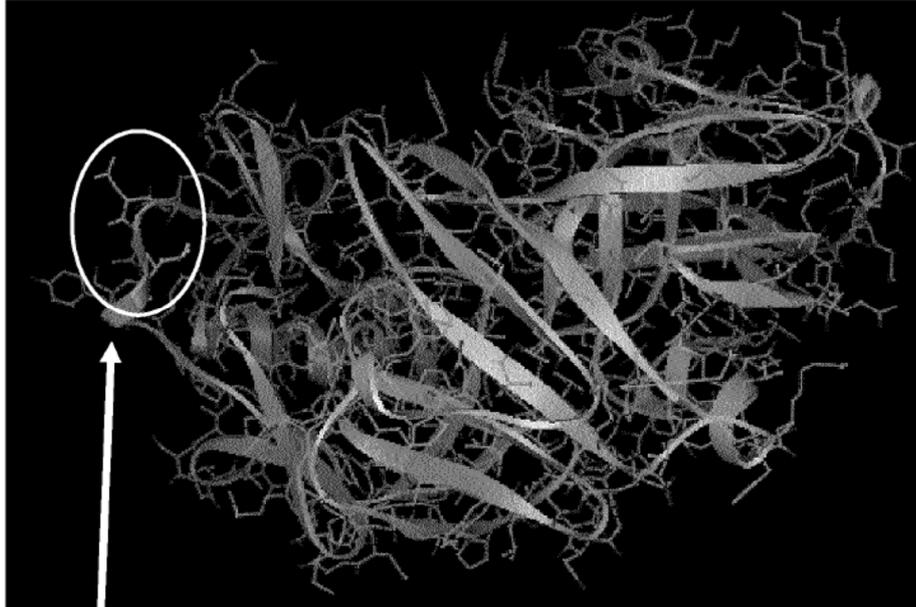
11. Un método para hacer un producto alimenticio o de pienso que comprende añadir una cantidad eficaz de la variante polipeptídica de quimosina aislada según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10 al ingrediente(s) de alimento o pienso y llevar a cabo etapas de fabricación adicionales para obtener el producto alimenticio o de pienso.

10

Figura 1

	1				50
Quimosina_B_Bos_bovis	MRCLVLLAV	FALSQGAET	RIPLYK GKSL	RKALKEHGLL	EDFLQKQQYG
Oveja	MRCLVLLAV	FALSQGAET	RIPLYK GKPL	RKALKERGLL	EDFLQKQQYG
C. bactrianus	MRCLVLLAA	LALSQASGIT	RIPLHKGKTL	RKALKERGLL	EDFLQKQQYA
Camelus_dromedarius	MRCLVLLAA	LALSQASGIT	RIPLHKGKTL	RKALKERGLL	EDFLQKQQYA
Cerdo	.IRGRVLLAV	LALSQSGGIT	RVPLRKGKSL	RKELKERGLL	EDFLQKQPYA
Rata	MRCFVLLAV	LAIASQSHVVT	RIPLHKGKSL	RNTLKEQGLL	EDFLRRHQYE
	51				100
Quimosina_B_Bos_bovis	ISSKYSGFGE	VASVPLTNYL	DSQYFGKIYL	GTPPQEFVTL	FDTGSSDFWV
Oveja	VSSKYSGFGE	VASVPLTNYL	DSQYFGKIYL	GTPPQEFVTL	FDTGSSDFWV
C. bactrianus	VSSKYSSLGK	VAREPLTSYL	DSQYFGKIYI	GTPPQEFVTV	FDTGSSDLWV
Camelus_dromedarius	VSSKYSSLGK	VAREPLTSYL	DSQYFGKIYI	GTPPQEFVTV	FDTGSSDLWV
Cerdo	LSSKYSSFGE	VASEPLTNYL	DTQYFGKIYI	GTPPQEFVTV	FDTGSSSELWV
Rata	FSEKNSNIGM	VASEPLTNYL	DSEYFGLIYV	GTPPQEFKVY	FDTGSSSELWV
	101				150
Quimosina_B_Bos_bovis	PSIYCKSNAC	KNHQRFDPK	SSTFQNLGKP	LSIHYGTGSM	QGILGYDTVT
Oveja	PSIYCKSNAC	KNHQRFDPK	SSTFQNLGKP	LSIRYGTGSM	QGILGYDTVT
C. bactrianus	PSIYCKSNAC	KNHHRFDPK	SSTFRNLGKP	LSIHYGTGSI	EGFLGYDTVT
Camelus_dromedarius	PSIYCKSNVC	KNHHRFDPK	SSTFRNLGKP	LSIHYGTGSM	EGFLGYDTVT
Cerdo	PSVYCKSDAC	QNHHRFPKSK	SSTFQNLDKP	LSIQYGTGSI	QGFLGYDTVM
Rata	PSVYCSSKVC	RNHHRFPKSK	SFTFQNLKSK	LFVQYGTGSV	EGFLAYDTVT
	151				200
Quimosina_B_Bos_bovis	VSNIVDIQQT	VGLSTQEPGD	VFTYAEFDGI	LGMAYPSLAS	EYSIPVFDNM
Oveja	VSNIVDIQQT	VGLSTQEPGD	VFTYAEFDGI	LGMAYPSLAS	EYSVPVFDNM
C. bactrianus	VSNIVDPNQT	VGLSTEQPGE	VFTYSEFDGI	LGLAYPSLAS	EYSVPVFDNM
Camelus_dromedarius	VSNIVDPNQT	VGLSTEQPGE	VFTYSEFDGI	LGLAYPSLAS	EYSVPVFDNM
Cerdo	VAGLVDHQHT	VGLSTQEPGD	IFTYSEFDGI	LGLGYPELAS	EYTVPVFDNM
Rata	VSDLVVPHQHT	VGLSTEEPGD	IFTYSEFDGI	LGLAYPTFAS	KYSVPVFDNM
	201				250
Quimosina_B_Bos_bovis	MNRHLVAQDL	FSVYMDRNGQ	ESMLTLGAI	PSYTTGSLHW	VPVTVQQYWQ
Oveja	MDRRLVAQDL	FSVYMDRNGQ	GSMLTLGAI	PSYTTGSLHW	VPVTLQKYWQ
C. bactrianus	MDRHLVARDL	FSVYMDRNGQ	GSMLTLGATD	PSYTTGSLHW	VPVTVQQYWQ
Camelus_dromedarius	MDRHLVARDL	FSVYMDRNGQ	GSMLTLGAI	PSYTTGSLHW	VPVTVQQYWQ
Cerdo	MHRHLVAQDL	FAVYMSRND	ESMLTLGAI	PSYTTGSLHW	VPVTMLQYWQ
Rata	MNRHLVAQDL	FSVYMSRNDQ	GSMLTLGAI	QSYFIGSLHW	VPVTVQGYWQ
	251				300
Quimosina_B_Bos_bovis	FTVDSVTISG	VVVACEGGCQ	AILDGTGSKL	VGPSDDILNI	QQAIGATQNQ
Oveja	FTVDSVTISG	AVVACEGGCQ	AILDGTGSKL	VGPSDDILNI	QQAIGATQNQ
C. bactrianus	VTVDVSTING	VAVACVGGCQ	AILDGTGTVL	FGPSSDILKI	QMAIGATENR
Camelus_dromedarius	FTVDSVTING	VAVACVGGCQ	AILDGTGTVL	FGPSSDILKI	QMAIGATENR
Cerdo	FTVDSVTING	VVVACNGGCQ	AILDGTGSM	AGPSSDILNI	QMAIGATESQ
Rata	FTVDRITIND	EVVACQGGCP	AVLDTGTALL	TGPRDILNI	QHAIGAVQQQ
	301				350
Quimosina_B_Bos_bovis	YGFDFIDCDN	LSYMPTVVFE	INGKMYPLTP	SAYTSQDQGF	CTSGFQSENH
Oveja	YGFDFIDCDN	LSSMPTVVFE	INGKMYPLTP	YAYTSQEEGF	CTSGFQGENH
C. bactrianus	YGFDFVNCGS	LRSMPVVFE	INGRDFPLAP	SAYTSKDQGF	CTSGFQGDNN
Camelus_dromedarius	YGFDFVNCGN	LRSMPVVFE	INGRDYPLSP	SAYTSKDQGF	CTSGFQGDNN
Cerdo	YGFDFIDCGS	LSSMPTVVFE	ISGRMYPLPP	SAYTNQDQGF	CTSGFQGDSS
Rata	HDQDFIDCWR	LNFMPVVFE	INGREFPLPP	SAYTNQFQGS	CSSGFR..HG
	351				381
Quimosina_B_Bos_bovis	SQKWILGDVF	IREYYSVFDR	ANRLVGLAKA	I	
Oveja	SHQWILGDVF	IREYYSVFDR	ANRLVGLAKA	I	
C. bactrianus	SELWILGDVF	IREYYSVFDR	ANNRVGLAKA	I	
Camelus_dromedarius	SELWILGDVF	IREYYSVFDR	ANNRVGLAKA	I	
Cerdo	SQHWILGVVF	IQEYYSVFDR	ANNRVGLAKA	I	
Rata	SQMWILGDVF	IREFYYSVFDR	ANNRVGLAKA	I	

**Figura 2**



Posiciones 296 y 294 en quimosina bovina