

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】令和 3 年 2 月 4 日 (2021.2.4)

【公表番号】特表 2020-505944 (P2020-505944A)

【公表日】令和 2 年 2 月 27 日 (2020.2.27)

【年通号数】公開・登録公報 2020-008

【出願番号】特願 2019-555724 (P2019-555724)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/52 (2006.01)

C 1 2 N 9/52 (2006.01)

C 1 2 N 15/63 (2006.01)

C 1 2 P 21/00 (2006.01)

A 2 3 K 20/189 (2016.01)

【F I】

C 1 2 N 15/52 Z

C 1 2 N 9/52 Z N A

C 1 2 N 15/63 Z

C 1 2 P 21/00 C

A 2 3 K 20/189

【手続補正書】

【提出日】令和 2 年 12 月 21 日 (2020.12.21)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 配列番号 1 に記載のクマモリシン A S に由来するアミノ酸配列、もしくはタンパク質分解活性を維持するそのフラグメント、部分もしくはシャッフル変異体を含むか、または

(b) 配列番号 1 と少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列、もしくはタンパク質分解活性を維持するそのフラグメント、部分もしくはシャッフル変異体を含む、プロテアーゼ変異体であって、

該プロテアーゼ変異体は、1 つ以上のアミノ酸置換を有し、少なくとも 1 つのアミノ酸置換が配列番号 1 の残基位置 A 5 1 7 にある、プロテアーゼ変異体。

【請求項 2】

(i) 配列番号 4 に記載のクマモリシン A S 野生型、または

(ii) 配列番号 1 ~ 3 のいずれか 1 つに記載のクマモリシン A S 主鎖

と比較して少なくとも 1 つの改変されたまたは改善された安定性を示す、請求項 1 に記載のプロテアーゼ変異体。

【請求項 3】

配列番号 1 の残基位置 D 4 4 7 および / または A 4 4 9 に少なくとも 1 つのさらなるアミノ酸置換を有する、請求項 1 または 2 に記載のプロテアーゼ変異体。

【請求項 4】

配列番号 1 に記載のクマモリシン A S 主鎖と比較して、少なくとも 2 つのアミノ酸置換を有する、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のプロテアーゼ変異体。

【請求項 5】

D 4 4 7 S、A 4 4 9 Y、A 5 1 7 T、N 5 1 0 H、E 3 6 0 L、E 3 6 0 V、E 3 6 0 C、V 5 0 2 C、E 4 5 3 W、A 5 1 4 T、A 5 1 4 Y、A 5 1 4 D、A 5 1 4 S、A 4 6 0 W、A 3 8 6 I からなる群から選択される、少なくとも 1 つ、好ましくは少なくとも 2 つ、より好ましくは少なくとも 3 つ、より好ましくは少なくとも 4 つ、より好ましくは少なくとも 5 つ、最も好ましくは少なくとも 6 つのアミノ酸置換を有する、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のプロテアーゼ変異体。

【請求項 6】

配列番号 1 に記載のクマモリシン A S 主鎖中の選択された残基に置換の組を有し、前記置換の組は、

- a) 3 6 0、4 4 7、4 4 9、および 5 1 0
- b) 4 4 7、4 4 9、および 5 1 4、および / または
- c) 4 4 7、4 4 9、4 5 3、および 5 1 7

の少なくとも 1 つである、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のプロテアーゼ変異体。

【請求項 7】

前記改善された安定性が、活性化酵素またはチモーゲンのいずれかの改善された熱安定性 (IT<sub>50</sub>) である、請求項 2 ~ 6 のいずれか一項に記載のプロテアーゼ変異体。

【請求項 8】

前記プロテアーゼ変異体が 7 5 および 1 0 5 の IT<sub>50</sub> を有する、請求項 7 に記載のプロテアーゼ変異体。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のプロテアーゼ変異体をコードする、核酸分子。

【請求項 10】

請求項 9 に記載の核酸分子を含む、プラスミドまたはベクター系。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のプロテアーゼ変異体またはプロテアーゼを含む組成物であって、5 の pH を有する組成物。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のプロテアーゼ変異体もしくはプロテアーゼを含む、飼料添加剤、配合原料、飼料補給剤、および / または飼料。

【請求項 13】

飼料の製造のための請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のプロテアーゼ変異体の使用。

【請求項 14】

i) 配列番号 1 ~ 4 のいずれかに 1 つに記載のクマモリシン A S アミノ酸配列をコードする DNA、cDNA または mRNA を突然変異誘発すること、

ii) 得られたクマモリシン A S の 1 つ以上の突然変異体を発現すること、および

iii) 安定性、好ましくは熱安定性について、クマモリシン A S の 1 つ以上の突然変異体を試験すること

を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のプロテアーゼ変異体を製造する方法。

【請求項 15】

N 5 1 0、V 5 0 2、E 4 5 3、E 3 6 0、A 5 1 4、および / または A 4 6 0 からなる群から選択される配列番号 1 の 1 つ以上の残基位置に、1 つ以上のアミノ酸置換をさらに含む、請求項 2 に記載のプロテアーゼ変異体。

【請求項 16】

配列番号 1 に記載のクマモリシン A S と比較して、A 4 4 9、A 5 1 7、N 5 1 0、V 5 0 2、E 4 5 3、E 3 6 0、A 5 1 4、および / または A 4 6 0 における 1 つ以上の置換が A 4 4 9 Y、A 5 1 7 T、N 5 1 0 H、E 3 6 0 L、E 3 6 0 V、E 3 6 0 C、V 5 0 2 C、E 4 5 3 W、A 5 1 4 T、A 5 1 4 Y、A 5 1 4 D、A 5 1 4 S、A 4 6 0 W からなる群から選択される、請求項 2 または 15 に記載のプロテアーゼ変異体。