

【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AS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A517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AS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AS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D447および/またはA449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AS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AS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_{50})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_{50} 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AS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、

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

i i i) 安定性、好ましくは熱安定性について、クマモリシンAS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AS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。