

【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3部門第2区分

【発行日】令和5年12月18日(2023.12.18)

【公開番号】特開2023-99039(P2023-99039A)

【公開日】令和5年7月11日(2023.7.11)

【年通号数】公開公報(特許)2023-129

【出願番号】特願2023-68770(P2023-68770)

【国際特許分類】

C 0 7 K 1/02(2006.01)

C 0 7 K 14/245(2006.01)

C 1 2 N 15/31(2006.01)

C 1 2 P 21/02(2006.01)

C 1 2 N 1/15(2006.01)

C 1 2 N 1/19(2006.01)

C 1 2 N 1/21(2006.01)

C 1 2 N 5/10(2006.01)

10

【F I】

C 0 7 K 1/02 Z N A

C 0 7 K 14/245

C 1 2 N 15/31

C 1 2 P 21/02 C

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/10

20

【手続補正書】

【提出日】令和5年12月8日(2023.12.8)

【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】

ペプチドの製造方法であって、改変されたL31タンパク質を含むリボソームを含む翻訳系中で、1種または複数種の非天然アミノ酸を含むペプチドをコードするmRNAを翻訳する工程を含み、前記改変されたL31タンパク質が、以下の(1)から(3)に記載のタンパク質からなる群：

40

(1) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列において、C末端から6以上45以下のアミノ酸残基が欠失したアミノ酸配列を含むタンパク質、

(2) 前記(1)に記載のタンパク質のアミノ酸配列において、1または複数のアミノ酸が挿入、置換、欠失および/または付加されたアミノ酸配列を含むタンパク質、

(3) 前記(1)に記載のタンパク質のアミノ酸配列と80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むタンパク質

より選択され、

前記(2)および前記(3)に記載のタンパク質を含むリボソームが、配列番号：1のアミノ酸配列を含む大腸菌野生型L31を含むリボソームと比較して、非天然アミノ酸を含むペプチドの翻訳活性が大きい、前記方法。

50

## 【請求項 2】

前記翻訳系における、全リボソームに対する前記改変された L 3 1 タンパク質を含むリボソームの割合が 5 0 % 以上である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記ペプチドを環化する工程をさらに含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記ペプチドが、その開始アミノ酸の位置に非天然アミノ酸を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 5】

以下の ( a ) ~ ( c ) に記載の工程：

( a ) 請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載された方法によってペプチドを製造する工程、  
( b ) 前記ペプチドまたは前記ペプチドを含むライブラリに標的物質を接触させる工程、  
および

( c ) 前記標的物質に結合するペプチドを選択する工程  
を含む、標的物質に結合するペプチドのスクリーニング方法。

10

## 【請求項 6】

以下の ( 1 ) から ( 3 ) に記載のタンパク質 ( 但し、配列番号：1 で表されるアミノ酸配列において、C 末端から 8 アミノ酸残基が欠失したアミノ酸配列を含むタンパク質を除く。 ) ；

( 1 ) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列において、C 末端から 9 以上 4 5 以下のアミノ酸残基が欠失したアミノ酸配列からなるタンパク質、

( 2 ) 前記 ( 1 ) に記載のタンパク質のアミノ酸配列において、1 ~ 9 のアミノ酸が挿入、置換、欠失および / または付加されたアミノ酸配列を含むタンパク質、

( 3 ) 前記 ( 1 ) に記載のタンパク質のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むタンパク質

からなる群より選択される、改変された L 3 1 タンパク質であって、

前記 ( 2 ) および前記 ( 3 ) に記載のタンパク質を含むリボソームが、配列番号：1 のアミノ酸配列を含む大腸菌野生型 L 3 1 を含むリボソームと比較して、非天然アミノ酸を含むペプチドの翻訳活性が大きい、改変された L 3 1 タンパク質。

20

## 【請求項 7】

請求項 6 に記載の改変された L 3 1 タンパク質をコードする単離された核酸。

30

## 【請求項 8】

請求項 7 に記載の核酸を含むベクターまたは細胞。

## 【請求項 9】

以下の ( a ) ~ ( c ) に記載の工程：

( a ) 請求項 8 に記載の細胞を培養する工程、

( b ) 前記細胞の培養物から溶解液を生成する工程、および

( c ) 前記溶解液からリボソームを精製する工程

を含む、改変された L 3 1 タンパク質を含むリボソームの製造方法。

## 【請求項 10】

請求項 6 に記載の改変された L 3 1 タンパク質を含むリボソーム。

40

## 【請求項 11】

請求項 10 に記載のリボソームを含む組成物。

## 【請求項 12】

改変された L 3 1 タンパク質を含む、非天然アミノ酸を含むペプチドをコードする mRNA の翻訳活性が大きい無細胞翻訳のための合成系であって、

改変された L 3 1 タンパク質が、以下の ( 1 ) から ( 3 ) に記載のタンパク質：

( 1 ) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列において、C 末端から 6 以上 4 5 以下のアミノ酸残基が欠失したアミノ酸配列からなるタンパク質、

( 2 ) 前記 ( 1 ) に記載のタンパク質のアミノ酸配列において、1 ~ 9 のアミノ酸が挿入

50

置換、欠失および/または付加されたアミノ酸配列を含むタンパク質、  
(3)前記(1)に記載のタンパク質のアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有する  
アミノ酸配列を含むタンパク質  
からなる群より選択され、  
前記(2)および前記(3)に記載のタンパク質を含むリボソームが、配列番号:1のア  
ミノ酸配列を含む大腸菌野生型L31を含むリボソームと比較して、非天然アミノ酸を含  
むペプチドの翻訳活性が大きい、前記合成系。

【請求項13】

以下の工程:

- (a) 請求項9に記載の方法によりリボソームを製造する工程、および
- (b) 前記リボソームを、非天然アミノ酸がアシル化された開始 tRNA と混合する工程を含む、無細胞翻訳系の製造方法。

10

【請求項14】

以下の工程:

- (a) マグネシウムイオン濃度が5mM以下の条件下において、大腸菌を破砕して溶解液を生成する工程、および
- (b) 前記溶解液からリボソームを精製する工程を含む、無細胞翻訳系の製造方法。

【請求項15】

以下の工程:

- (a) マグネシウムイオン濃度が5mM以下の条件下において、大腸菌を破砕して溶解液を生成する工程、
- (b) 前記溶解液からリボソームを精製する工程、および
- (c) 前記リボソームを、非天然アミノ酸がアシル化された開始 tRNA と混合する工程を含む、無細胞翻訳系の製造方法。

20

【請求項16】

前記無細胞翻訳系が2~8mMのマグネシウムイオンをさらに含む、請求項13~15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項17】

前記無細胞翻訳系が再構成無細胞翻訳系である、請求項13~16のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項18】

以下の工程:

- (i) 請求項13~17のいずれか一項に記載の方法により無細胞翻訳系を製造する工程、および
- (ii) 前記無細胞翻訳系を用いて、1種または複数種の非天然アミノ酸を含むペプチドをコードするmRNAを翻訳する工程を含む、ペプチドの製造方法。

【請求項19】

前記ペプチドが、その開始アミノ酸の位置に非天然アミノ酸を含む、請求項18に記載の方法。

40

【請求項20】

前記翻訳が、イニシエーションサプレッションにより行われる、請求項18または19に記載の方法。

【請求項21】

以下の工程:

- (I) 請求項18~20のいずれか一項に記載された方法によってペプチドを製造する工程、
- (II) 前記ペプチドまたは前記ペプチドを含むライブラリに標的物質を接触させる工程、および

50

( I I I ) 前記標的物質に結合するペプチドを選択する工程を含む、標的物質に結合するペプチドのスクリーニング方法。

【請求項 2 2】

前記ペプチドまたは前記ペプチドを含むライブラリが、前記ペプチドを含むライブラリである、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記ライブラリがディスプレイライブラリである、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記ライブラリが mRNA ディスプレイライブラリである、請求項 2 3 に記載の方法。

10

20

30

40

50