

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2024年6月20日(20.06.2024)



(10) 国際公開番号

WO 2024/128195 A1

- (51) 国際特許分類:  
C12P 21/00 (2006.01) C40B 40/10 (2006.01)  
C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2023/044244
- (22) 国際出願日: 2023年12月11日(11.12.2023)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2022-198158 2022年12月12日(12.12.2022) JP
- (71) 出願人: 中外製薬株式会社(CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1158543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 田中 翔太(TANAKA Shota); 〒2478530 神奈川県鎌倉市梶原200番地 中外製薬株式会社内 Kanagawa (JP). 篠原 正次郎(SHINOHARA Shojiro); 〒2478530 神奈川県鎌倉市梶原200番地 中外製薬株式会社内 Kanagawa (JP). 中野 効彦(NAKANO Kazuhiko); 138623 バイオポリス ドライブ 3 シナプス #07-11 / 16 中外ファーマボディ・リサーチ・ピーティーイー・リミテッド内 Singapore (SG).
- (74) 代理人: 長谷川 芳樹, 外(HASEGAWA Yoshiki et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内二丁目1番1号丸の内 M Y P L A Z A (明治安田生命ビル) 9階 創英国際特許法律事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT,

(54) Title: PEPTIDE PRODUCTION METHOD COMPRISING STEP FOR TRANSLATING AMINO ACID HAVING OXYGEN ATOM AT SPECIFIC POSITION

(54) 発明の名称: 特定位置に酸素原子を有するアミノ酸を翻訳する工程を含む、ペプチドの製造方法

(57) Abstract: This peptide production method comprises a step for translating a nucleic acid which contains a codon encoding a first unnatural amino acid and a codon encoding a second unnatural amino acid so as to be adjacent to each other, wherein: at least one among the first unnatural amino acid and the second unnatural amino acid is an unnatural amino acid U1; and the unnatural amino acid U1 is an unnatural amino acid which satisfies the following requirement (A) and satisfies at least one selected from the group consisting of the following requirements (B) and (C). (A) A nitrogen atom (nitrogen atom N1) constituting a main-chain amino group and an oxygen atom (oxygen atom O1) other than an oxygen atom constituting a main-chain carboxy group are bonded via two atoms. (B) The oxygen atom O1 constitutes an alkoxy group or an aryloxy group. (C) The nitrogen atom N1 is bonded to a linear or branched C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alkyl group.

(57) 要約: 第一の非天然アミノ酸をコードするコドン及び第二の非天然アミノ酸をコードするコドンが隣接して含まれている核酸を翻訳する工程を含み、前記第一の非天然アミノ酸及び前記第二の非天然アミノ酸の少なくとも一つが非天然アミノ酸U1であり、前記非天然アミノ酸U1が、下記要件(A)を満たし、かつ、下記要件(B)及び(C)からなる群より選ばれる少なくとも一つを満たす非天然アミノ酸である、ペプチドの製造方法: (A) 主鎖アミノ基を構成する窒素原子(窒素原子N1)と、主鎖カルボキシ基を構成する酸素原子以外の酸素原子(酸素原子O1)とが、2つの原子を介して結合している; (B) 酸素原子O1が、アルコキシ基又はアリーロキシ基を構成している; (C) 窒素原子N1が、直鎖状又は分岐鎖状のC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル基と結合している。

RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

規則4.17に規定する申立て：

- 出願し及び特許を与えられる出願人の資格に関する申立て（規則4.17(ii)）

添付公開書類：

- 国際調査報告（条約第21条(3)）
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則5.2(a)）

## 明 細 書

発明の名称：

特定位置に酸素原子を有するアミノ酸を翻訳する工程を含む、ペプチドの製造方法

### 技術分野

[0001] 本発明は、特定位置に酸素原子を有するアミノ酸を翻訳する工程を含む、ペプチドの製造方法に関する。

### 背景技術

[0002] 無細胞系における非天然アミノ酸の翻訳導入については多数の報告が存在するが、その多くは各種翻訳因子の改変に着目したものである。天然アミノ酸の翻訳装置として存在している各種翻訳因子を用いた効率的な非天然アミノ酸の翻訳は難しく、意図する非天然アミノ酸に対応する各種翻訳因子の改変体の調製がこれまでに試みられてきた。

[0003] 実際にリボソーム改変により、Dアミノ酸又はβアミノ酸の翻訳効率が改善することが報告されている（非特許文献1、4参照）。またEF-Tu改変により、未改変体では翻訳できないような嵩高い芳香環を側鎖に持つ非天然アミノ酸の翻訳導入が可能になることも報告されている（非特許文献2参照）。その他にも、アミノアシルtRNA合成酵素の改変により、Nメチルアミノ酸の翻訳導入が可能になることが報告されている（特許文献1参照）。

[0004] また、tRNA<sup>Pro1E2</sup>改変体の使用により、Dアミノ酸又はβアミノ酸の連続的翻訳導入が達成されたことが報告されている（非特許文献7、8、14及び15、特許文献2参照）。また、環状βアミノ酸の連続的翻訳導入（非特許文献10参照）、環状γアミノ酸又はアミノ安息香酸の単独翻訳導入に関しても、同様にtRNA<sup>Pro1E2</sup>改変体の使用が効果的であったことが報告されている（非特許文献11、12参照）。

[0005] このように、tRNA等の各種翻訳因子の改変により、それぞれの目的に

応じた非天然アミノ酸の単独または連続的な翻訳導入が報告されている。一方、一部のDアミノ酸又はβアミノ酸については、天然の翻訳因子を用いた場合であっても、連続的翻訳導入は困難であるものの、単独翻訳導入であれば可能であることが報告されている（非特許文献3、5、及び6参照）

[0006] また、β位に水酸基を持つ直鎖γアミノ酸が同水酸基の無い直鎖γアミノ酸に対して翻訳効率に優れることが報告された（非特許文献13参照）。

### 先行技術文献

#### 特許文献

[0007] 特許文献1：国際公開第2016/148044号

特許文献2：国際公開第2019/077887号

#### 非特許文献

[0008] 非特許文献1：Biochemistry 2006, 45, 51, 15541

非特許文献2：J. Am. Chem. Soc. 2007, 129, 46, 14458

非特許文献3：J. Am. Chem. Soc. 2013, 135, 5, 1830

非特許文献4：Bioorganic & Medicinal Chemistry 21 (2013) 1088

非特許文献5：Nucleic Acids Research, 2015, Vol. 43, No. 12, 5687

非特許文献6：J. Am. Chem. Soc. 2016, 138, 6, 1962

非特許文献7：Nucleic Acids Research, 2017, Vol. 45, No. 22, 12601

非特許文献8：J. Am. Chem. Soc. 2018, 140, 12159

非特許文献9：Int. J. Mol. Sci. 2019, 20, 522

非特許文献10：Nature Chemistry volume 12, 1081

非特許文献11：J. Am. Chem. Soc. 2020, 142, 39, 16518

非特許文献12：J. Am. Chem. Soc. 2020, 142, 11, 4965

非特許文献13：ACS Chem. Biol. 2021, 16, 1325

非特許文献14：Cell Chem. Biol. 24, 46-54 (2017)

非特許文献15：Nature Communications volume 7, Article number: 11657 (2016)

非特許文献16：ACS Chem. Biol. 2021, 16, 1011-1018

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0009] そこで、本発明は、非天然アミノ酸の連続的翻訳導入に関して、優れた翻訳効率を示すペプチドの製造方法を提供することを目的とする。

### 課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らが鋭意検討した結果、特定位置に酸素原子を有するアミノ酸を翻訳する場合に、非天然アミノ酸が連続するペプチド翻訳における翻訳効率が向上することを見出した。

[0011] 本発明はこのような知見に基づくものであり、具体的には〔1〕～〔123〕に関する。

〔1〕

第一の非天然アミノ酸をコードするコドン及び第二の非天然アミノ酸をコードするコドンが隣接して含まれている核酸を翻訳する工程を含み、

前記第一の非天然アミノ酸及び前記第二の非天然アミノ酸の少なくとも1つが非天然アミノ酸U1であり、前記非天然アミノ酸U1が、下記要件(A)を満たし、かつ、下記要件(B)及び(C)からなる群より選ばれる少なくとも1つを満たす非天然アミノ酸である、ペプチドの製造方法：

(A) 主鎖アミノ基を構成する窒素原子(窒素原子N1)と、主鎖カルボキシ基を構成する酸素原子以外の酸素原子(酸素原子O1)とが、2つの原子を介して結合している；

(B) 酸素原子O1が、アルコキシ基又はアリアルコキシ基を構成している；

(C) 窒素原子N1が、直鎖状又は分岐鎖状のC<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル基と結合している。

〔2〕

前記非天然アミノ酸U1が前記要件(A)及び(B)を満たす、〔1〕に記載の方法。

〔3〕

前記非天然アミノ酸U 1が前記要件(A)及び(C)を満たす、〔1〕に記載の方法。

〔4〕

前記非天然アミノ酸U 1が前記要件(A)、(B)及び(C)を満たす、〔1〕に記載の方法。

〔5〕

前記酸素原子O 1が前記窒素原子N 1に置換された置換基中に存在する、〔1〕～〔4〕のいずれか一項に記載の方法。

〔6〕

前記酸素原子O 1が前記非天然アミノ酸U 1の側鎖中に含まれる、〔1〕～〔4〕のいずれか一項に記載の方法。

〔7〕

前記非天然アミノ酸U 1において、前記窒素原子N 1、前記非天然アミノ酸U 1の主鎖を構成する炭素原子及び前記非天然アミノ酸U 1の側鎖を構成する原子が共に環を形成している、〔1〕～〔4〕のいずれか一項に記載の方法。

〔8〕

前記酸素原子O 1が直鎖状又は分岐鎖状のC<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル基、C<sub>3</sub>～C<sub>10</sub>シクロアルキル基、C<sub>6</sub>～C<sub>10</sub>アリール基、C<sub>7</sub>～C<sub>12</sub>アリールアルキル基、又はC<sub>7</sub>～C<sub>12</sub>アルキルアリール基と共に、対応するC<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルコキシ基、C<sub>3</sub>～C<sub>10</sub>シクロアルコキシ基、C<sub>6</sub>～C<sub>10</sub>アリールオキシ基、C<sub>7</sub>～C<sub>12</sub>アリールアルコキシ基、又はC<sub>7</sub>～C<sub>12</sub>アルキルアリールオキシ基を構成している、〔1〕～〔7〕のいずれか一項に記載の方法。

〔9〕

前記酸素原子O 1がメチル基、エチル基、フェニル基、又はベンジル基と共に、対応するメトキシ基、エトキシ基、フェノキシ基又はベンジルオキシ基を構成している、〔1〕～〔7〕のいずれか一項に記載の方法。

〔10〕

前記酸素原子O 1 がメチル基又はフェニル基と共に、対応するメトキシ基又はフェノキシ基を構成している、〔1〕～〔7〕のいずれか一項に記載の方法。

〔1 1〕

前記酸素原子O 1 が直鎖状又は分岐鎖状のC<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル基と共に、対応するC<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルコキシ基を構成している、〔1〕～〔7〕のいずれか一項に記載の方法。

〔1 2〕

前記酸素原子O 1 がメチル基又はエチル基と共に、対応するメトキシ基又はエトキシ基を構成している、〔1〕～〔7〕のいずれか一項に記載の方法。

〔1 3〕

前記酸素原子O 1 がメチル基と共に、メトキシ基を構成している、〔1〕～〔7〕のいずれか一項に記載の方法。

〔1 4〕

前記酸素原子O 1 がC<sub>6</sub>～C<sub>10</sub>アリール基と共に、対応するC<sub>6</sub>～C<sub>10</sub>アリールオキシ基を構成している、〔1〕～〔7〕のいずれか一項に記載の方法。

〔1 5〕

前記酸素原子O 1 がフェニル基と共に、フェノキシ基を構成している、〔1〕～〔7〕のいずれか一項に記載の方法。

〔1 6〕

前記酸素原子O 1 が水酸基を構成している、〔1〕～〔7〕のいずれか一項に記載の方法。

〔1 7〕

前記窒素原子N 1 がメチル基又はエチル基で置換されている、〔1〕～〔1 6〕のいずれか一項に記載の方法。

〔1 8〕

前記窒素原子N 1 がメチル基で置換されている、〔1〕～〔16〕のいずれか一項に記載の方法。

〔19〕

前記窒素原子N 1 が非置換のアミノ基を構成している、〔1〕～〔16〕のいずれか一項に記載の方法。

〔20〕

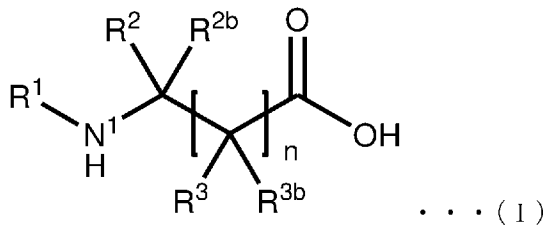
前記非天然アミノ酸U 1 が $\alpha$ アミノ酸である、〔1〕～〔19〕のいずれか一項に記載の方法。

〔21〕

第一の非天然アミノ酸をコードするコドン及び第二の非天然アミノ酸をコードするコドンが隣接して含まれている核酸を翻訳する工程を含み、

前記第一の非天然アミノ酸及び前記第二の非天然アミノ酸の少なくとも1つが非天然アミノ酸U 1 であり、前記非天然アミノ酸U 1 が、下記式(1)で表される非天然アミノ酸である、ペプチドの製造方法：

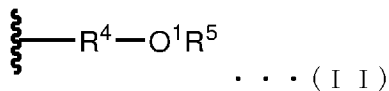
[化1]



[式中、nは0以上2以下の整数であり、

R<sup>1</sup>は式(11)で表される基、水素原子又は直鎖状若しくは分岐鎖状のC<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル基であり、

[化2]



R<sup>2</sup>及びR<sup>3</sup>はそれぞれ独立して、(a)式(11)で表される基、(b)水素原子又は(c)直鎖状若しくは分岐鎖状のC<sub>1</sub>～C<sub>4</sub>アルキル基、であり、

$R^{2b}$ 及び $R^{3b}$ は、それぞれ独立して、水素原子又は直鎖状若しくは分岐鎖状の $C_1 \sim C_4$ アルキル基であり、

$R^2$ 及び $R^{2b}$ 又は $R^3$ 及び $R^{3b}$ は、それらが結合している炭素原子と共に環を形成していてもよく、

$R^1$ 、 $R^2$ 及び $R^3$ のいずれか1つ以上は式(11)で表される基であり、

式(1)における $N^1$ (窒素原子 $N^1$ )と式(11)における $O^1$ (酸素原子 $O^1$ )は、2つの原子を介して結合しており、

$R^1$ が式(11)で表される置換基である場合、 $R^4$ 及び $R^2$ は、 $R^2$ が結合している炭素原子及び $N^1$ と共に環を形成していてもよく、

$R^3$ が複数存在する場合は、それぞれが独立して互いに同じであっても異なってもよく、

$R^{3b}$ が複数存在する場合は、それぞれが独立して互いに同じであっても異なってもよく、

式(11)において、

[化3]



は $N^1$ との結合位置を表し、

$R^4$ は $C_1 \sim C_2$ アルキレン基であり、

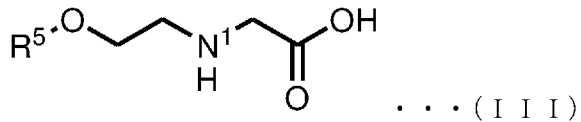
$R^5$ は水素原子、直鎖状又は分岐鎖状の $C_1 \sim C_6$ アルキル基、 $C_3 \sim C_{10}$ シクロアルキル基、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール基、 $C_7 \sim C_{12}$ アリールアルキル基、又は $C_7 \sim C_{12}$ アルキルアリール基であり、

$R^2$ が式(11)で表される置換基である場合、式(1)における $R^1$ 及び式(11)における $R^5$ の少なくとも1つは水素原子ではない。]

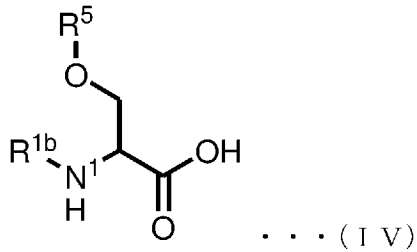
[22]

前記非天然アミノ酸U1が、下記式(111)、(1V)又は(V)で表される非天然アミノ酸である、[21]に記載の方法：

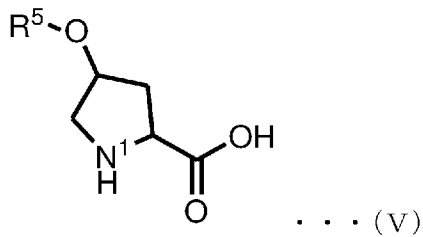
[化4]



[化5]



[化6]



[式 (III)、(IV) 及び (V) 中、R<sup>1b</sup>は水素原子又は直鎖状若しくは分岐鎖状のC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキルであり、R<sup>5</sup>は式 (I) におけるR<sup>5</sup>と同義である。]

〔23〕

前記非天然アミノ酸U1が、前記式 (III) で表される非天然アミノ酸である、〔22〕に記載の方法。

〔24〕

前記非天然アミノ酸U1が、前記式 (IV) で表される非天然アミノ酸である、〔22〕に記載の方法。

〔25〕

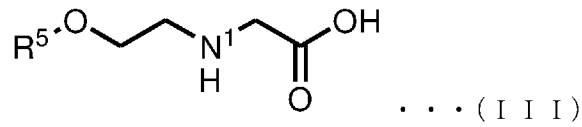
前記非天然アミノ酸U1が、前記式 (V) で表される非天然アミノ酸である、〔22〕に記載の方法。

〔26〕

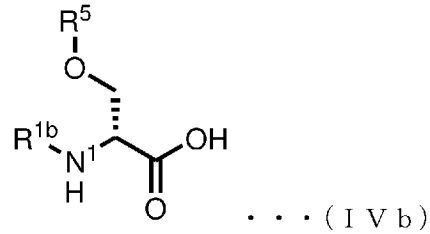
前記非天然アミノ酸U1が、下記式 (III)、(IVb) 又は (Vb)

で表される非天然アミノ酸である、〔21〕又は〔22〕に記載の方法：

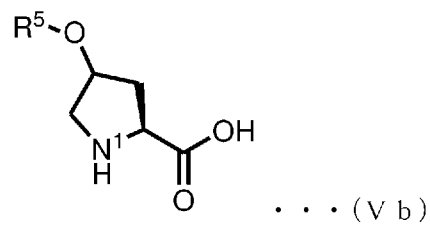
[化7]



[化8]



[化9]



[式 (I I I)、(I V b) 及び (V b) 中、R<sup>1b</sup>は水素原子又は直鎖状若しくは分岐鎖状のC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキルであり、R<sup>5</sup>は式 (I I) におけるR<sup>5</sup>と同義である。]

[27]

前記非天然アミノ酸U1が、前記式 (I V b) で表される非天然アミノ酸である、〔26〕に記載の方法。

[28]

前記非天然アミノ酸U1が、前記式 (V b) で表される非天然アミノ酸である、〔26〕に記載の方法。

[29]

前記式 (I I) において、R<sup>5</sup>が直鎖状又は分岐鎖状のC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル基、C<sub>3</sub>~C<sub>10</sub>シクロアルキル基、C<sub>6</sub>~C<sub>10</sub>アリール基、C<sub>7</sub>~C<sub>12</sub>アリールアルキル基、又はC<sub>7</sub>~C<sub>12</sub>アルキルアリール基である、〔21〕~〔28〕のいずれか一項に記載の方法。

## 〔30〕

前記式(1)において、 $R^1$ が式(11)で表される基、又は直鎖状若しくは分岐鎖状の $C_1 \sim C_6$ アルキル基である、〔21〕～〔28〕のいずれか一項に記載の方法。

## 〔31〕

前記式(1)において、 $R^1$ が式(11)で表される基、又は直鎖状若しくは分岐鎖状の $C_1 \sim C_6$ アルキル基であり、

前記式(11)において、 $R^5$ が直鎖状又は分岐鎖状の $C_1 \sim C_6$ アルキル基、 $C_3 \sim C_{10}$ シクロアルキル基、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール基、 $C_7 \sim C_{12}$ アリールアルキル基、又は $C_7 \sim C_{12}$ アルキルアリール基である、〔21〕～〔28〕のいずれか一項に記載の方法。

## 〔32〕

$R^1$ が式(11)で表される基である、〔21〕～〔31〕のいずれか一項に記載の方法。

## 〔33〕

$R^2$ が式(11)で表される基である、〔21〕～〔31〕のいずれか一項に記載の方法。

## 〔34〕

$R^1$ が式(11)で表される基を含み、 $R^4$ 及び $R^2$ が、 $R^2$ が結合している炭素原子及び $N^1$ と共に環を形成している、〔21〕～〔31〕のいずれか一項に記載の方法。

## 〔35〕

$R^5$ が、直鎖状又は分岐鎖状の $C_1 \sim C_6$ アルキル基、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール基、又は $C_7 \sim C_{12}$ アリールアルキル基である、〔21〕～〔34〕のいずれか一項に記載の方法。

## 〔36〕

$R^5$ がメチル基、エチル基、フェニル基又はベンジル基である、〔21〕～〔34〕のいずれか一項に記載の方法。

[ 3 7 ]

R<sup>5</sup>がメチル基、又はフェニル基である、[ 2 1 ] ~ [ 3 4 ] のいずれか一項に記載の方法。

[ 3 8 ]

R<sup>5</sup>が直鎖状又は分岐鎖状のC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル基である、[ 2 1 ] ~ [ 3 4 ] のいずれか一項に記載の方法。

[ 3 9 ]

R<sup>5</sup>がメチル基又はエチル基である、[ 2 1 ] ~ [ 3 4 ] のいずれか一項に記載の方法。

[ 4 0 ]

R<sup>5</sup>がメチル基である、[ 2 1 ] ~ [ 3 4 ] のいずれか一項に記載の方法。

[ 4 1 ]

R<sup>5</sup>がC<sub>6</sub>~C<sub>10</sub>アリール基である、[ 2 1 ] ~ [ 3 4 ] のいずれか一項に記載の方法。

[ 4 2 ]

R<sup>5</sup>がフェニル基である、[ 2 1 ] ~ [ 3 4 ] のいずれか一項に記載の方法。

[ 4 3 ]

R<sup>5</sup>が水素原子である、[ 2 1 ] ~ [ 3 4 ] のいずれか一項に記載の方法。

[ 4 4 ]

R<sup>1</sup>及びR<sup>1b</sup>がメチル基又はエチル基である、[ 2 1 ] ~ [ 4 3 ] のいずれか一項に記載の方法。

[ 4 5 ]

R<sup>1</sup>及びR<sup>1b</sup>がメチル基である、[ 2 1 ] ~ [ 4 3 ] のいずれか一項に記載の方法。

[ 4 6 ]

R<sup>1</sup>及びR<sup>1b</sup>が水素原子である、[ 2 1 ] ~ [ 4 3 ] のいずれか一項に記載の方法。

[47]

nが0である、〔21〕～〔46〕のいずれか一項に記載の方法。

[48]

前記第一の非天然アミノ酸及び前記第二の非天然アミノ酸の両方が前記非天然アミノ酸U1である、〔1〕～〔47〕のいずれか一項に記載の方法。

[49]

前記第一の非天然アミノ酸が前記非天然アミノ酸U1であり、前記第二の非天然アミノ酸が非天然アミノ酸U1とは異なる非天然アミノ酸（非天然アミノ酸U2）である、〔1〕～〔47〕のいずれか一項に記載の方法。

[50]

前記第一の非天然アミノ酸をコードするコドンが、前記第二の非天然アミノ酸をコードするコドンより先に翻訳される、〔1〕～〔49〕のいずれか一項に記載の方法。

[51]

前記第一の非天然アミノ酸をコードするコドンが、前記第二の非天然アミノ酸をコードするコドンより後に翻訳される、〔1〕～〔49〕のいずれか一項に記載の方法。

[52]

前記第一の非天然アミノ酸が前記非天然アミノ酸U1であり、前記第二の非天然アミノ酸が前記非天然アミノ酸U2であり、

前記非天然アミノ酸U1が前記要件（A）及び（B）を満たし、前記酸素原子O1が前記窒素原子N1に置換された置換基中に存在し、前記酸素原子O1がメトキシ基又はフェノキシ基を構成しており、

前記第一の非天然アミノ酸をコードするコドンが、前記第二の非天然アミノ酸をコードするコドンより先に翻訳される、〔1〕、〔2〕、〔5〕、〔10〕、〔17〕～〔19〕、〔20〕、〔49〕、及び〔50〕のいずれか一項に記載の方法。

[53]

前記第一の非天然アミノ酸が前記非天然アミノ酸U1であり、前記第二の非天然アミノ酸が前記非天然アミノ酸U2であり、

前記非天然アミノ酸U1が前記要件(A)及び(B)を満たし、前記酸素原子O1が前記非天然アミノ酸U1の側鎖中に含まれ、前記酸素原子O1がメトキシ基又はフェノキシ基を構成しており、前記窒素原子N1が非置換のアミノ基を構成しており、

前記第一の非天然アミノ酸をコードするコドンが、前記第二の非天然アミノ酸をコードするコドンより先に翻訳される、〔1〕、〔2〕、〔6〕、〔10〕、〔19〕、〔20〕、〔49〕、及び〔50〕のいずれか一項に記載の方法。

〔54〕

前記第一の非天然アミノ酸が前記非天然アミノ酸U1であり、前記第二の非天然アミノ酸が前記非天然アミノ酸U2であり、

前記非天然アミノ酸U1が前記要件(A)及び(C)を満たし、前記酸素原子O1が前記非天然アミノ酸U1の側鎖中に含まれ、前記酸素原子O1が水酸基を構成しており、前記窒素原子N1がメチル基又はエチル基で置換されており、

前記第一の非天然アミノ酸をコードするコドンが、前記第二の非天然アミノ酸をコードするコドンより先に翻訳される、〔1〕、〔3〕、〔6〕、〔16〕、〔17〕、〔20〕、〔49〕、及び〔50〕のいずれか一項に記載の方法。

〔55〕

前記第一の非天然アミノ酸が前記非天然アミノ酸U1であり、前記第二の非天然アミノ酸が前記非天然アミノ酸U2であり、

前記非天然アミノ酸U1が前記要件(A)及び(B)を満たし、前記非天然アミノ酸U1において、前記窒素原子N1、前記非天然アミノ酸U1の主鎖を構成する炭素原子及び前記非天然アミノ酸U1の側鎖を構成する原子が共に環を形成しており、前記酸素原子O1がメトキシ基又はフェノキシ基を

構成しており、

前記第一の非天然アミノ酸をコードするコドンが、前記第二の非天然アミノ酸をコードするコドンより先に翻訳される、〔1〕、〔2〕、〔7〕、〔10〕、〔17〕～〔20〕、〔49〕、及び〔50〕のいずれか一項に記載の方法。

〔56〕

第一の非天然アミノ酸をコードするコドン及び第二の非天然アミノ酸をコードするコドンが隣接して含まれている核酸を翻訳する工程を含み、

前記第一の非天然アミノ酸が前記非天然アミノ酸U1であり、前記第二の非天然アミノ酸が前記非天然アミノ酸U2であり、

前記非天然アミノ酸U1が $\alpha$ アミノ酸であり、前記非天然アミノ酸U1において、主鎖アミノ基を構成する窒素原子（窒素原子N1）と、主鎖カルボキシ基を構成する酸素原子以外の酸素原子（酸素原子O1）とが、2つ又は3つの原子を介して結合しており、前記酸素原子O1が前記非天然アミノ酸U1の側鎖中に含まれ、前記酸素原子O1が水酸基を構成しており、前記窒素原子N1がメチル基又はエチル基で置換されており、

前記第一の非天然アミノ酸をコードするコドンが、前記第二の非天然アミノ酸をコードするコドンより先に翻訳される、ペプチドの製造方法。

〔57〕

前記第一の非天然アミノ酸が前記非天然アミノ酸U1であり、前記第二の非天然アミノ酸が前記非天然アミノ酸U2であり、

前記非天然アミノ酸U1が前記要件（A）及び（B）を満たし、前記酸素原子O1が前記窒素原子N1に置換された置換基中に存在し、前記酸素原子O1がメトキシ基又はフェノキシ基を構成しており、

前記第一の非天然アミノ酸をコードするコドンが、前記第二の非天然アミノ酸をコードするコドンより後に翻訳される、〔1〕、〔2〕、〔5〕、〔10〕、〔17〕～〔20〕、〔49〕、及び〔51〕のいずれか一項に記載の方法。

## 〔58〕

前記第一の非天然アミノ酸が前記非天然アミノ酸U1であり、前記第二の非天然アミノ酸が前記非天然アミノ酸U2であり、

前記非天然アミノ酸U1が前記要件(A)及び(B)を満たし、前記酸素原子O1が前記非天然アミノ酸U1の側鎖中に含まれ、前記酸素原子O1がメトキシ基又はフェノキシ基を構成しており、前記窒素原子N1が非置換のアミノ基を構成しており、

前記第一の非天然アミノ酸をコードするコドンが、前記第二の非天然アミノ酸をコードするコドンより後に翻訳される、〔1〕、〔2〕、〔6〕、〔10〕、〔19〕、〔20〕、〔49〕、及び〔51〕のいずれか一項に記載の方法。

## 〔59〕

前記第一の非天然アミノ酸が前記非天然アミノ酸U1であり、前記第二の非天然アミノ酸が前記非天然アミノ酸U2であり、

前記非天然アミノ酸U1が前記要件(A)及び(C)を満たし、前記酸素原子O1が前記非天然アミノ酸U1の側鎖中に含まれ、前記酸素原子O1が水酸基を構成しており、前記窒素原子N1がメチル基又はエチル基で置換されており、

前記第一の非天然アミノ酸をコードするコドンが、前記第二の非天然アミノ酸をコードするコドンより後に翻訳される、〔1〕、〔3〕、〔6〕、〔16〕、〔17〕、〔20〕、〔49〕、及び〔51〕のいずれか一項に記載の方法。

## 〔60〕

前記第一の非天然アミノ酸が前記非天然アミノ酸U1であり、前記第二の非天然アミノ酸が前記非天然アミノ酸U2であり、

前記非天然アミノ酸U1が前記要件(A)及び(B)を満たし、前記非天然アミノ酸U1において、前記窒素原子N1、前記非天然アミノ酸U1の主鎖を構成する炭素原子及び前記非天然アミノ酸U1の側鎖を構成する原子が

共に環を形成しており、前記酸素原子O1がメトキシ基又はフェノキシ基を構成しており、

前記第一の非天然アミノ酸をコードするコドンが、前記第二の非天然アミノ酸をコードするコドンより後に翻訳される、〔1〕、〔2〕、〔7〕、〔10〕、〔17〕～〔20〕、〔49〕、及び〔51〕のいずれか一項に記載の方法。

〔61〕

第一の非天然アミノ酸をコードするコドン及び第二の非天然アミノ酸をコードするコドンが隣接して含まれている核酸を翻訳する工程を含み、

前記第一の非天然アミノ酸が前記非天然アミノ酸U1であり、前記第二の非天然アミノ酸が前記非天然アミノ酸U2であり、

前記非天然アミノ酸U1が $\alpha$ アミノ酸であり、前記非天然アミノ酸U1において、主鎖アミノ基を構成する窒素原子（窒素原子N1）と、主鎖カルボキシ基を構成する酸素原子以外の酸素原子（酸素原子O1）とが、2つ又は3つの原子を介して結合しており、前記酸素原子O1が前記非天然アミノ酸U1の側鎖中に含まれ、前記酸素原子O1が水酸基を構成しており、前記窒素原子N1がメチル基又はエチル基で置換されており、

前記第一の非天然アミノ酸をコードするコドンが、前記第二の非天然アミノ酸をコードするコドンより後に翻訳される、ペプチドの製造方法。

〔62〕

前記第一の非天然アミノ酸が前記非天然アミノ酸U1であり、前記第二の非天然アミノ酸が前記非天然アミノ酸U2であり、

前記非天然アミノ酸U1が、前記式(111)で表される非天然アミノ酸であり、前記式(111)において、R<sup>5</sup>がメチル基、又はフェニル基であり、

前記第一の非天然アミノ酸をコードするコドンが、前記第二の非天然アミノ酸をコードするコドンより先に翻訳される、〔21〕、〔23〕、〔29〕、〔32〕、〔37〕、〔44〕～〔47〕、〔49〕、及び〔50〕の

いずれか一項に記載の方法。

[63]

前記第一の非天然アミノ酸が前記非天然アミノ酸U1であり、前記第二の非天然アミノ酸が前記非天然アミノ酸U2であり、

前記非天然アミノ酸U1が、前記式(IV)で表される非天然アミノ酸であり、前記式(IV)において、R<sup>5</sup>がメチル基又はフェニル基であり、R<sup>1b</sup>が水素原子であり、

前記第一の非天然アミノ酸をコードするコドンが、前記第二の非天然アミノ酸をコードするコドンより先に翻訳される、[21]、[24]、[29]、[33]、[37]、[46]、[47]、[49]、及び[50]のいずれか一項に記載の方法。

[64]

前記第一の非天然アミノ酸が前記非天然アミノ酸U1であり、前記第二の非天然アミノ酸が前記非天然アミノ酸U2であり、

前記非天然アミノ酸U1が、前記式(IV)で表される非天然アミノ酸であり、前記式(IV)において、R<sup>5</sup>が水素原子であり、R<sup>1b</sup>がメチル基又はエチル基であり、

前記第一の非天然アミノ酸をコードするコドンが、前記第二の非天然アミノ酸をコードするコドンより先に翻訳される、[21]、[24]、[30]、[33]、[43]、[44]、[47]、[49]、及び[50]のいずれか一項に記載の方法。

[65]

前記第一の非天然アミノ酸が前記非天然アミノ酸U1であり、前記第二の非天然アミノ酸が前記非天然アミノ酸U2であり、

前記非天然アミノ酸U1が、前記式(V)で表される非天然アミノ酸であり、前記式(V)において、R<sup>5</sup>がフェニル基であり、

前記第一の非天然アミノ酸をコードするコドンが、前記第二の非天然アミノ酸をコードするコドンより先に翻訳される、[21]、[25]、[29]

〕、〔34〕、〔37〕、〔44〕～〔46〕、〔47〕、〔49〕、及び  
〔50〕のいずれか一項に記載の方法。

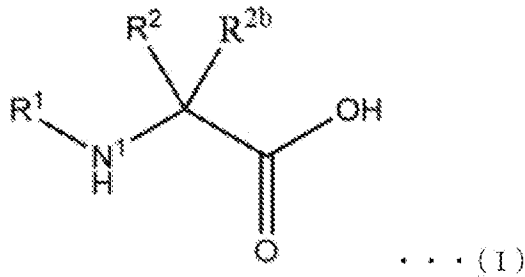
〔66〕

第一の非天然アミノ酸をコードするコドン及び第二の非天然アミノ酸をコードするコドンが隣接して含まれている核酸を翻訳する工程を含み、

前記第一の非天然アミノ酸をコードするコドンが、前記第二の非天然アミノ酸をコードするコドンより先に翻訳され、

前記第一の非天然アミノ酸が前記非天然アミノ酸U1であり、前記第二の非天然アミノ酸が前記非天然アミノ酸U2であり、前記非天然アミノ酸U1が、下記式(1)で表される非天然アミノ酸である、ペプチドの製造方法：

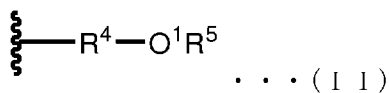
〔化10〕



〔式中、

R<sup>1</sup>はメチル基又はエチル基であり、

〔化11〕



R<sup>2</sup>は式(11)で表される基であり、

R<sup>2b</sup>は水素原子又は直鎖状若しくは分岐鎖状のC<sub>1</sub>～C<sub>4</sub>アルキル基であり、

、

式(1)におけるN<sup>1</sup>(窒素原子N1)と式(11)におけるO<sup>1</sup>(酸素原子O1)は、2つ又は3つの原子を介して結合しており、

式(11)において、

[化12]



はN<sup>1</sup>との結合位置を表し、

R<sup>4</sup>はC<sub>1</sub>~C<sub>2</sub>アルキレン基であり、

R<sup>5</sup>は水素原子である。]

[67]

前記第一の非天然アミノ酸が前記非天然アミノ酸U1であり、前記第二の非天然アミノ酸が前記非天然アミノ酸U2であり、

前記非天然アミノ酸U1が、前記式(III)で表される非天然アミノ酸であり、前記式(III)において、R<sup>5</sup>がメチル基、又はフェニル基であり、

前記第一の非天然アミノ酸をコードするコドンが、前記第二の非天然アミノ酸をコードするコドンより後に翻訳される、[21]、[23]、[29]、[32]、[37]、[44]~[47]、[49]、及び[51]のいずれか一項に記載の方法。

[68]

前記第一の非天然アミノ酸が前記非天然アミノ酸U1であり、前記第二の非天然アミノ酸が前記非天然アミノ酸U2であり、

前記非天然アミノ酸U1が、前記式(IV)で表される非天然アミノ酸であり、前記式(IV)において、R<sup>5</sup>がメチル基又はフェニル基であり、R<sup>1b</sup>が水素原子であり、

前記第一の非天然アミノ酸をコードするコドンが、前記第二の非天然アミノ酸をコードするコドンより後に翻訳される、[21]、[24]、[29]、[33]、[37]、[46]、[47]、[49]、及び[51]のいずれか一項に記載の方法。

[69]

前記第一の非天然アミノ酸が前記非天然アミノ酸U1であり、前記第二の

非天然アミノ酸が前記非天然アミノ酸U2であり、

前記非天然アミノ酸U1が、前記式(IV)で表される非天然アミノ酸であり、前記式(IV)において、R<sup>5</sup>が水素原子であり、R<sup>1b</sup>がメチル基又はエチル基であり、

前記第一の非天然アミノ酸をコードするコドンが、前記第二の非天然アミノ酸をコードするコドンより後に翻訳される、[21]、[24]、[30]、[33]、[43]、[44]、[47]、[49]、及び[51]のいずれか一項に記載の方法。

[70]

前記第一の非天然アミノ酸が前記非天然アミノ酸U1であり、前記第二の非天然アミノ酸が前記非天然アミノ酸U2であり、

前記非天然アミノ酸U1が、前記式(V)で表される非天然アミノ酸であり、前記式(V)において、R<sup>5</sup>がフェニル基であり、

前記第一の非天然アミノ酸をコードするコドンが、前記第二の非天然アミノ酸をコードするコドンより後に翻訳される、[21]、[25]、[29]、[34]、[37]、[44]～[47]、[49]、及び[51]のいずれか一項に記載の方法。

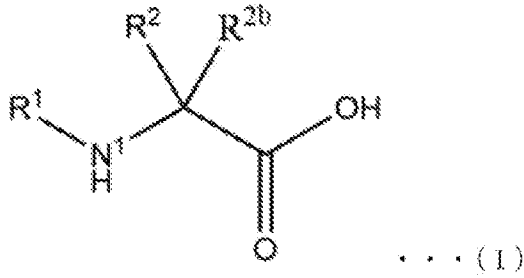
[71]

第一の非天然アミノ酸をコードするコドン及び第二の非天然アミノ酸をコードするコドンが隣接して含まれている核酸を翻訳する工程を含み、

前記第一の非天然アミノ酸をコードするコドンが、前記第二の非天然アミノ酸をコードするコドンより後に翻訳され、

前記第一の非天然アミノ酸が前記非天然アミノ酸U1であり、前記第二の非天然アミノ酸が前記非天然アミノ酸U2であり、前記非天然アミノ酸U1が、下記式(I)で表される非天然アミノ酸である、ペプチドの製造方法：

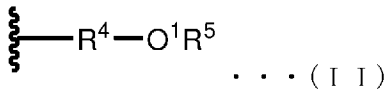
[化13]



[式中、

R<sup>1</sup>はメチル基又はエチル基であり、

[化14]

R<sup>2</sup>は式(II)で表される基であり、R<sup>2b</sup>は水素原子又は直鎖状若しくは分岐鎖状のC<sub>1</sub>~C<sub>4</sub>アルキル基であり、

式(1)におけるN<sup>1</sup>(窒素原子N1)と式(II)におけるO<sup>1</sup>(酸素原子O1)は、2つ又は3つの原子を介して結合しており、

式(II)において、

[化15]

はN<sup>1</sup>との結合位置を表し、R<sup>4</sup>はC<sub>1</sub>~C<sub>2</sub>アルキレン基であり、R<sup>5</sup>は水素原子である。]

〔72〕

前記非天然アミノ酸U1がD体である、〔1〕~〔71〕のいずれか一項に記載の方法。

〔73〕

前記非天然アミノ酸U1がL体である、〔1〕~〔71〕のいずれか一項

に記載の方法。

[74]

前記窒素原子N1と前記酸素原子O1とが、2つの炭素原子を介して結合している、[1]～[73]のいずれか一項に記載の方法。

[75]

前記非天然アミノ酸U1が窒素原子及び酸素原子以外のヘテロ原子を含まない、[1]～[74]のいずれか一項に記載の方法。

[76]

前記非天然アミノ酸U1が、前記酸素原子O1を1つのみ有する、[1]～[75]のいずれか一項に記載の方法。

[77]

前記非天然アミノ酸U2の主鎖アミノ基を構成する窒素原子が、直鎖状若しくは分岐鎖状のC<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル基で置換されている、[1]～[20]、[48]～[60]、及び[68]～[76]のいずれか一項に記載の方法。

[78]

前記非天然アミノ酸U2の主鎖アミノ基を構成する窒素原子が、メチル基又はエチル基で置換されている、[1]～[20]、[48]～[60]、及び[72]～[77]のいずれか一項に記載の方法。

[79]

前記非天然アミノ酸U2の主鎖アミノ基を構成する窒素原子が、メチル基で置換されている、[1]～[20]、[48]～[60]、及び[72]～[78]のいずれか一項に記載の方法。

[80]

前記非天然アミノ酸U2が、側鎖として、5～10員アリアル基で置換されていてもよい直鎖状若しくは分岐鎖状のC<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル基又はC<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>の直鎖状若しくは分岐鎖状アルキル基で置換されていてもよい5～10員アリアル基を有する、[1]～[20]、[48]～[60]、及び[72]

～〔79〕のいずれか一項に記載の方法。

〔81〕

前記非天然アミノ酸U2が、側鎖として、直鎖状若しくは分岐鎖状のC<sub>1</sub>～C<sub>4</sub>アルキル基又はC<sub>1</sub>～C<sub>3</sub>の直鎖状アルキル基で置換されている5～10員アリアル基を有する、〔1〕～〔20〕、〔48〕～〔60〕、及び〔72〕～〔80〕のいずれか一項に記載の方法。

〔82〕

前記非天然アミノ酸U2が、側鎖として、メチル基又はベンジル基を有する、〔1〕～〔20〕、〔48〕～〔60〕、及び〔72〕～〔81〕のいずれか一項に記載の方法。

〔83〕

前記非天然アミノ酸U2が、側鎖として、メチル基を有する、〔1〕～〔20〕、〔48〕～〔60〕、及び〔72〕～〔82〕のいずれか一項に記載の方法。

〔84〕

前記非天然アミノ酸U2が、側鎖として、ベンジル基を有する、〔1〕～〔20〕、〔48〕～〔60〕、及び〔72〕～〔82〕のいずれか一項に記載の方法。

〔85〕

前記非天然アミノ酸U2が $\alpha$ アミノ酸である、〔1〕～〔20〕、〔48〕～〔60〕、及び〔72〕～〔84〕のいずれか一項に記載の方法。

〔86〕

前記非天然アミノ酸U2の主鎖アミノ基を構成する窒素原子が、メチル基で置換されており、かつ前記非天然アミノ酸U2が、側鎖としてメチル基を有する $\alpha$ アミノ酸である、〔1〕～〔20〕、〔48〕～〔60〕、〔72〕～〔83〕、及び〔85〕のいずれか一項に記載の方法。

〔87〕

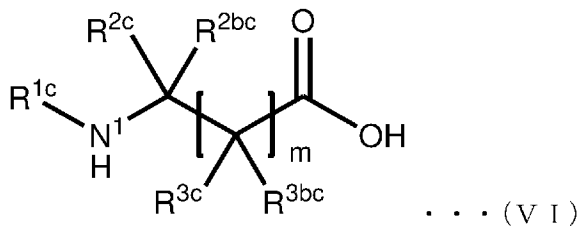
前記非天然アミノ酸U2の主鎖アミノ基を構成する窒素原子がメチル基で

置換されており、かつ前記非天然アミノ酸U2が、側鎖としてベンジル基を有する $\alpha$ アミノ酸である、〔1〕～〔20〕、〔48〕～〔60〕、〔72〕～〔82〕、及び〔84〕～〔85〕のいずれか一項に記載の方法。

〔88〕

前記非天然アミノ酸U2が下記式(V1)で表される非天然アミノ酸である、〔21〕～〔51〕、及び〔61〕～〔87〕のいずれか一項に記載の方法：

[化16]



[式(V1)において、

$m$ は0以上2以下の整数であり、

$R^{1c}$ は水素原子又は直鎖状若しくは分岐鎖状の $C_1 \sim C_6$ アルキル基であり、

、

$R^{2c}$ は水素原子、5～10員アリール基で置換されていてもよい直鎖状若しくは分岐鎖状の $C_1 \sim C_6$ アルキル基、又は直鎖状若しくは分岐鎖状の $C_1 \sim C_6$ アルキル基で置換されていてもよい5～10員アリール基であり、

$R^{2bc}$ は水素原子又は直鎖状若しくは分岐鎖状の $C_1 \sim C_4$ アルキル基、であり、

$R^{2c}$ 及び $R^{2bc}$ は、それらが結合している炭素原子と共に環を形成していてもよく、

$R^{1c}$ が結合している窒素原子、 $R^{1c}$ 、 $R^{2c}$ が結合している炭素原子及び $R^{2c}$ は共に環を形成していてもよい。]

〔89〕

$R^{1c}$ が直鎖状若しくは分岐鎖状の $C_1 \sim C_6$ アルキル基である、〔21〕～〔51〕、及び〔61〕～〔88〕に記載の方法。

[90]

R<sup>1</sup>がメチル基又はエチル基である、[21]～[51]、及び[62]～[89]のいずれか一項に記載の方法。

[91]

R<sup>1</sup>がメチル基である、[21]～[51]、及び[62]～[90]のいずれか一項に記載の方法。

[92]

R<sup>2</sup>が、5～10員アリアル基で置換されていてもよい直鎖状若しくは分岐鎖状のC<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル基、又はC<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>の直鎖状若しくは分岐鎖状アルキル基で置換されていてもよい5～10員アリアル基である、[21]～[51]、及び[62]～[91]のいずれか一項に記載の方法。

[93]

R<sup>2</sup>が、直鎖状若しくは分岐鎖状のC<sub>1</sub>～C<sub>4</sub>アルキル基又はC<sub>1</sub>～C<sub>3</sub>の直鎖状アルキル基で置換されている5～10員アリアル基である、[21]～[51]、及び[62]～[92]のいずれか一項に記載の方法。

[94]

R<sup>2</sup>が、メチル基又はベンジル基である、[21]～[51]、及び[62]～[93]のいずれか一項に記載の方法。

[95]

R<sup>2</sup>がメチル基である、[21]～[51]、及び[62]～[94]のいずれか一項に記載の方法。

[96]

R<sup>2</sup>がベンジル基である、[21]～[51]、及び[62]～[94]のいずれか一項に記載の方法。

[97]

mが0である、[21]～[51]、及び[62]～[94]のいずれか一項に記載の方法。

[98]

R<sup>1c</sup>及びR<sup>2c</sup>がメチル基であり、mが0である、〔21〕～〔51〕、〔62〕～〔95〕、及び〔97〕のいずれか一項に記載の方法。

〔99〕

R<sup>1c</sup>がメチル基であり、R<sup>2c</sup>がベンジル基であり、mが0である、〔21〕～〔51〕、〔62〕～〔94〕、及び〔96〕～〔98〕のいずれか一項に記載の方法。

〔100〕

前記ペプチドが、前記非天然アミノ酸U1および前記非天然アミノ酸U2を含む、〔1〕～〔99〕のいずれか一項に記載の方法。

〔101〕

前記ペプチドの分子量が500g/mol以上である、〔1〕～〔100〕のいずれか一項に記載の方法。

〔102〕

前記ペプチドを構成するアミノ酸残基の数が2以上100以下である、〔1〕～〔101〕のいずれか一項に記載の方法。

〔103〕

前記ペプチドが環状ペプチドである、〔1〕～〔102〕のいずれか一項に記載の方法。

〔104〕

前記環状ペプチドの環状部を構成するアミノ酸残基の数が5以上30以下である、〔103〕に記載の方法。

〔105〕

前記ペプチドが、1つ以上のN置換アミノ酸残基を含有する、〔1〕～〔104〕のいずれか一項に記載の方法。

〔106〕

前記ペプチドのClogPが4以上25以下である、〔1〕～〔105〕のいずれか一項に記載の方法。

〔107〕

前記ペプチドのC l o g Pが、シクロスポリンAのC l o g Pの値に対して28%以上174%以下である、〔1〕～〔106〕のいずれか一項に記載の方法。

〔108〕

前記ペプチドのC l o g P／アミノ酸残基数が1.0以上である、〔1〕～〔107〕のいずれか一項に記載の方法。

〔109〕

無細胞翻訳系により翻訳を行う、〔1〕～〔108〕のいずれか一項に記載の方法。

〔110〕

前記無細胞翻訳系が、再構成無細胞翻訳系である、〔109〕に記載の方法。

〔111〕

前記無細胞翻訳系が、大腸菌由来の因子で再構成された翻訳系である、〔109〕又は〔110〕に記載の方法。

〔112〕

前記無細胞翻訳系が、大腸菌由来のリボソームを含む、〔109〕～〔111〕のいずれか一項に記載の方法。

〔113〕

前記無細胞翻訳系が、第一の非天然アミノ酸が結合した第一のtRNA及び第二の非天然アミノ酸が結合した第二のtRNAを含む、〔109〕～〔112〕のいずれか一項に記載の方法。

〔114〕

前記第一のtRNAが、前記第一の非天然アミノ酸をコードするコドンに相補的なアンチコドンを含み、かつ、前記第二のtRNAが、前記第二の非天然アミノ酸をコードするコドンに相補的なアンチコドンを含む、〔113〕に記載の方法。

〔115〕

前記第一の tRNA 及び前記第二の tRNA が人工 tRNA である、〔113〕又は〔114〕に記載の方法。

〔116〕

前記第一の tRNA 及び前記第二の tRNA が転写 tRNA である、〔113〕又は〔114〕に記載の方法。

〔117〕

前記第一の tRNA 及び前記第二の tRNA が天然に存在する tRNA に由来するボディーを含む、〔113〕～〔115〕のいずれか一項に記載の方法。

〔118〕

pCpA法により前記 tRNA を調製する工程をさらに含む、〔113〕～〔117〕のいずれか一項に記載の方法。

〔119〕

前記核酸が mRNA である、〔1〕～〔118〕のいずれか一項に記載の方法。

〔120〕

〔1〕～〔119〕のいずれか一項に記載の方法を含む、ペプチド複合体の製造方法。

〔121〕

ペプチド複合体がペプチド-核酸複合体である、〔120〕に記載の方法。

〔122〕

〔1〕～〔119〕のいずれか一項に記載の方法によりペプチドを得る工程と、

前記ペプチドに核酸、リボソーム、スペーサー、及びリンカーからなる群より選ばれる1つ以上を結合させる工程と、を含む、ペプチド複合体の製造方法。

〔123〕

〔1〕～〔119〕のいずれか一項に記載の方法によりペプチドを得る工程と、

前記ペプチドに核酸を結合させる工程と、を含む、ペプチド-核酸複合体の製造方法。

### 発明の効果

[0012] 本発明によれば、非天然アミノ酸が連続して配置されるペプチドを翻訳導入する際に、特定位置に酸素原子を有するアミノ酸を結合した tRNA を使用することにより、優れた翻訳効率を示す。アミノアシル化 tRNA は、翻訳の際にリボソーム中に取り込まれるため、適切な位置に酸素原子（特にオキシ基）が存在するアミノ酸であると、リボソーム中で安定化しやすくなり、翻訳効率が向上すると考えられる。

### 図面の簡単な説明

[0013] [図1]アミノアシル化 tRNA を用いてペプチドの翻訳を行ったときの翻訳量を示すグラフである。

### 発明を実施するための形態

[0014] 以下、本発明の実施形態について、詳細に説明する。

#### [0015] アミノ酸

本開示においてペプチドを構成する「アミノ酸」は、 $\alpha$ -アミノ酸などの「天然アミノ酸」および $\beta$ -アミノ酸、 $\gamma$ -アミノ酸などの「非天然アミノ酸」を含む。アミノ酸の立体構造は、L型アミノ酸、D型アミノ酸のいずれであってもよい。「アミノ酸」、「天然アミノ酸」、「非天然アミノ酸」はそれぞれ、「アミノ酸残基」、「天然アミノ酸残基」、「非天然アミノ酸残基」ということがある。

[0016] 本明細書において、「天然アミノ酸」とは、 $\alpha$ -アミノカルボン酸（ $\alpha$ -アミノ酸）であり、グリシン（Gly）、アラニン（Ala）、セリン（Ser）、スレオニン（Thr）、バリン（Val）、ロイシン（Leu）、イソロイシン（Ile）、フェニルアラニン（Phe）、チロシン（Tyr）、トリプトファン（Trp）、ヒスチジン（His）、グルタミン酸（G

Iu)、アスパラギン酸 (Asp)、グルタミン (Gln)、アスパラギン (Asn)、システイン (Cys)、メチオニン (Met)、リシン (Lys)、アルギニン (Arg)、及びプロリン (Pro) を意味する。

[0017] 本明細書において、「非天然アミノ酸」とは、上記「天然アミノ酸」に含まれないアミノカルボン酸を意味する。非天然アミノ酸の例として、 $\beta$ -アミノ酸 (D型、L型を含む)、 $\gamma$ -アミノ酸 (D型、L型を含む)、D- $\alpha$ -アミノ酸、天然アミノ酸とは異なる側鎖を有するL- $\alpha$ -アミノ酸、 $\alpha$ ,  $\alpha$ -二置換アミノ酸、主鎖のアミノ基が置換されているアミノ酸 (N置換アミノ酸) などを挙げることができる。非天然アミノ酸の側鎖は、特に限定されないが、水素原子の他に、例えば、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、アラルキル、シクロアルキルなどを有していてもよい。また、 $\alpha$ ,  $\alpha$ -二置換アミノ酸の場合、2つの側鎖が環を形成していてもよい。さらに、これらの側鎖は、1つ以上の置換基を有していてもよい。特定の態様において、置換基は、ハロゲン原子、O原子、S原子、N原子、B原子、Si原子、またはP原子を含む任意の官能基の中から選択することができる。例えば、本開示において「ハロゲンを置換基に有するC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル」とは、アルキルにおける少なくとも一つの水素原子がハロゲン原子で置換された「C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル」を意味し、具体的には、例えば、トリフルオロメチル、ジフルオロメチル、フルオロメチル、ペンタフルオロエチル、テトラフルオロエチル、トリフルオロエチル、ジフルオロエチル、フルオロエチル、トリクロロメチル、ジクロロメチル、クロロメチル、ペンタクロロエチル、テトラクロロエチル、トリクロロエチル、ジクロロエチル、クロロエチルなどを含む。また、例えば「置換基を有するC<sub>5</sub>~C<sub>10</sub>アリールC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル」とは、アリールおよび/またはアルキルにおける少なくとも一つの水素原子が置換基により置換された「C<sub>5</sub>~C<sub>10</sub>アリールC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル」を意味する。さらに、「置換基を2つ以上有している」とは、ある官能基 (例えばS原子を含む官能基) を置換基として有し、さらにその官能基が別の置換基 (例えばアミノやハロゲンなどの置換基) を有していること

も含む。

[0018] 非天然アミノ酸の主鎖のアミノ基は、非置換のアミノ基 ( $-NH_2$ 基) でもよく、置換されたアミノ基 ( $-NHR$ 基) であってもよい。ここで、Rは、置換基を有していてもよいアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、アラルキル、シクロアルキルを示す。また、プロリンのように主鎖のアミノ基のN原子に結合した炭素鎖と $\alpha$ 位の炭素原子とが環を形成していてもよい。アミノ基のアルキル置換の例としては、N-メチル化、N-エチル化、N-プロピル化、N-ブチル化などが、アラルキル置換の例としては、N-ベンジル化などが挙げられる。N-メチルアミノ酸の具体的な例としては、N-メチルアラニン、N-メチルグリシン、N-メチルフェニルアラニン、N-メチルチロシン、N-メチル-3-クロロフェニルアラニン、N-メチル-4-クロロフェニルアラニン、N-メチル-4-メトキシフェニルアラニン、N-メチル-4-チアゾールアラニン、N-メチルヒスチジン、N-メチルセリン、N-メチルアスパラギン酸などを挙げるができる。

[0019] ハロゲンを含む置換基としては、ハロゲンを置換基に有するアルキル基、シクロアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、ヘテロアリール基、アラルキル基などが例示され、より具体的には、フルオロアルキル、ジフルオロアルキル、トリフルオロアルキルなどが例示される。

[0020] O原子を含む置換基としては、ヒドロキシル ( $-OH$ )、オキシ ( $-OR$ )、カルボニル ( $-C(=O)-R$ )、カルボキシ ( $-CO_2H$ )、オキシカルボニル ( $-C(=O)-OR$ )、カルボニルオキシ ( $-O-C(=O)-R$ )、チオカルボニル ( $-C(=O)-SR$ )、カルボニルチオ基 ( $-S-C(=O)-R$ )、アミノカルボニル ( $-C(=O)-NHR$ )、カルボニルアミノ ( $-NH-C(=O)-R$ )、オキシカルボニルアミノ ( $-NH-C(=O)-OR$ )、スルホニルアミノ ( $-NH-SO_2-R$ )、アミノスルホニル ( $-SO_2-NHR$ )、スルファモイルアミノ ( $-NH-SO_2-NHR$ )、チオカルボキシ ( $-C(=O)-SH$ )、カルボキシカルボニル ( $-$

C (=O) - CO<sub>2</sub>H) が挙げられる。

[0021] オキシ (-OR) の例としては、アルコキシ、シクロアルコキシ、アルケニルオキシ、アルキニルオキシ、アリールオキシ、ヘテロアリールオキシ、アラルキルオキシなどが挙げられる。

[0022] カルボニル (-C (=O) - R) の例としては、ホルミル (-C (=O) - H)、アルキルカルボニル、シクロアルキルカルボニル、アルケニルカルボニル、アルキニルカルボニル、アリールカルボニル、ヘテロアリールカルボニル、アラルキルカルボニルなどが挙げられる。

[0023] オキシカルボニル (-C (=O) - OR) の例としては、アルキルオキシカルボニル、シクロアルキルオキシカルボニル、アルケニルオキシカルボニル、アルキニルオキシカルボニル、アリールオキシカルボニル、ヘテロアリールオキシカルボニル、アラルキルオキシカルボニルなどが挙げられる。

[0024] カルボニルオキシ (-O-C (=O) - R) の例としては、アルキルカルボニルオキシ、シクロアルキルカルボニルオキシ、アルケニルカルボニルオキシ、アルキニルカルボニルオキシ、アリールカルボニルオキシ、ヘテロアリールカルボニルオキシ、アラルキルカルボニルオキシなどが挙げられる。

[0025] チオカルボニル (-C (=O) - SR) の例としては、アルキルチオカルボニル、シクロアルキルチオカルボニル、アルケニルチオカルボニル、アルキニルチオカルボニル、アリールチオカルボニル、ヘテロアリールチオカルボニル、アラルキルチオカルボニルなどが挙げられる。

[0026] カルボニルチオ (-S-C (=O) - R) の例としては、アルキルカルボニルチオ、シクロアルキルカルボニルチオ、アルケニルカルボニルチオ、アルキニルカルボニルチオ、アリールカルボニルチオ、ヘテロアリールカルボニルチオ、アラルキルカルボニルチオなどが挙げられる。

[0027] アミノカルボニル (-C (=O) - NHR) の例としては、アルキルアミノカルボニル、シクロアルキルアミノカルボニル、アルケニルアミノカルボニル、アルキニルアミノカルボニル、アリールアミノカルボニル、ヘテロアリールアミノカルボニル、アラルキルアミノカルボニルなどが挙げられる。

これらに加えて、 $-C(=O)-NHR$ 中のN原子と結合したH原子が、アルキル、シクロアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、アラルキルでさらに置換された基が挙げられる。

[0028] カルボニルアミノ ( $-NH-C(=O)-R$ ) の例としては、アルキルカルボニルアミノ、シクロアルキルカルボニルアミノ、アルケニルカルボニルアミノ、アルキニルカルボニルアミノ、アリールカルボニルアミノ、ヘテロアリールカルボニルアミノ、アラルキルカルボニルアミノなどが挙げられる。これらに加えて $-NH-C(=O)-R$ 中のN原子と結合したH原子が、アルキル、シクロアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、アラルキルでさらに置換された基が挙げられる。

[0029] オキシカルボニルアミノ ( $-NH-C(=O)-OR$ ) の例としては、アルコキシカルボニルアミノ、シクロアルコキシカルボニルアミノ、アルケニルオキシカルボニルアミノ、アルキニルオキシカルボニルアミノ、アリールオキシカルボニルアミノ、ヘテロアリールオキシカルボニルアミノ、アラルキルオキシカルボニルアミノなどが挙げられる。これらに加えて、 $-NH-C(=O)-OR$ 中のN原子と結合したH原子がアルキル、シクロアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、アラルキルでさらに置換された基が挙げられる。

[0030] スルホニルアミノ ( $-NH-SO_2-R$ ) の例としては、アルキルスルホニルアミノ、シクロアルキルスルホニルアミノ、アルケニルスルホニルアミノ、アルキニルスルホニルアミノ、アリールスルホニルアミノ、ヘテロアリールスルホニルアミノ、アラルキルスルホニルアミノなどが挙げられる。これらに加えて、 $-NH-SO_2-R$ 中のN原子と結合したH原子がアルキル、シクロアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、アラルキルでさらに置換された基が挙げられる。

[0031] アミノスルホニル ( $-SO_2-NHR$ ) の例としては、アルキルアミノスルホニル、シクロアルキルアミノスルホニル、アルケニルアミノスルホニル、アルキニルアミノスルホニル、アリールアミノスルホニル、ヘテロアリール

アミノスルホニル、アラルキルアミノスルホニルなどが挙げられる。これらに加えて、 $-SO_2-NHR$ 中のN原子と結合したH原子がアルキル、シクロアルキル、アルケニル、アルキニル、アリーール、ヘテロアリーール、アラルキルでさらに置換された基が挙げられる。

[0032] スルファモイルアミノ ( $-NH-SO_2-NHR$ ) の例としては、アルキルスルファモイルアミノ、シクロアルキルスルファモイルアミノ、アルケニルスルファモイルアミノ、アルキニルスルファモイルアミノ、アリーールスルファモイルアミノ、ヘテロアリーールスルファモイルアミノ、アラルキルスルファモイルアミノなどが挙げられる。さらに、 $-NH-SO_2-NHR$ 中のN原子と結合した2つのH原子はアルキル、シクロアルキル、アルケニル、アルキニル、アリーール、ヘテロアリーール、およびアラルキルからなる群より独立して選択される置換基で置換されていてもよく、またこれらの2つの置換基は環を形成してもよい。

[0033] S原子を含む置換基として、チオール ( $-SH$ )、チオ ( $-S-R$ )、スルフィニル ( $-S(=O)-R$ )、スルホニル ( $-S(O)_2-R$ )、スルホ ( $-SO_3H$ ) が挙げられる。

[0034] チオ ( $-S-R$ ) の例としては、アルキルチオ、シクロアルキルチオ、アルケニルチオ、アルキニルチオ、アリーールチオ、ヘテロアリーールチオ、アラルキルチオなどが挙げられる。

[0035] スルフィニル ( $-S(=O)-R$ ) の例としては、アルキルスルフィニル、シクロアルキルスルフィニル、アルケニルスルフィニル、アルキニルスルフィニル、アリーールスルフィニル、ヘテロアリーールスルフィニル、アラルキルスルフィニルなどが挙げられる。

[0036] スルホニル ( $-S(O)_2-R$ ) の例としては、アルキルスルホニル、シクロアルキルスルホニル、アルケニルスルホニル、アルキニルスルホニル、アリーールスルホニル、ヘテロアリーールスルホニル、アラルキルスルホニルなどが挙げられる。

N原子を含む置換基として、アジド ( $-N_3$ 、「アジド基」ともいう)、シア

ノ ( $-CN$ )、1級アミノ ( $-NH_2$ )、2級アミノ ( $-NH-R$ )、3級アミノ ( $-NR(R')$ )、アミジノ ( $-C(=NH)-NH_2$ )、置換アミジノ ( $-C(=NR)-NR'R''$ )、グアニジノ ( $-NH-C(=NH)-NH_2$ )、置換グアニジノ ( $-NR-C(=NR''')-NR'R''$ )、アミノカルボニルアミノ ( $-NR-CO-NR'R''$ ) が挙げられる。

[0037] 2級アミノ ( $-NH-R$ ) の例としては、アルキルアミノ、シクロアルキルアミノ、アルケニルアミノ、アルキニルアミノ、アリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、アラルキルアミノなどが挙げられる。

[0038] 3級アミノ ( $-NR(R')$ ) の例としては、例えばアルキル (アラルキル) アミノなど、アルキル、シクロアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、アラルキルなどの中からそれぞれ独立して選択される、任意の2つの置換基を有するアミノ基が挙げられ、これらの任意の2つの置換基は環を形成しても良い。

[0039] 置換アミジノ ( $-C(=NR)-NR'R''$ ) の例としては、N原子上の3つの置換基R、R'、およびR''が、アルキル、シクロアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、アラルキルの中からそれぞれ独立して選択された基、例えばアルキル (アラルキル) (アリール) アミジノなどが挙げられる。

[0040] 置換グアニジノ ( $-NR-C(=NR''')-NR'R''$ ) の例としては、R、R'、R''、およびR'''が、アルキル、シクロアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、アラルキルの中からそれぞれ独立して選択された基、あるいはこれらが環を形成した基などが挙げられる。

[0041] アミノカルボニルアミノ ( $-NR-C(=O)-NR'R''$ ) の例としては、R、R'、およびR''が、水素原子、アルキル、シクロアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、アラルキルの中からそれぞれ独立して選択された基、あるいはこれらは環を形成した基などが挙げられる。

[0042] B原子を含む置換基として、ボリル ( $-BR(R')$ ) やジオキシボリル (

-B (OR) (OR') ) などが挙げられる。これらの2つの置換基RおよびR'は、アルキル、シクロアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、アラルキルなどの中からそれぞれ独立して選択されるか、あるいはこれらは環を形成してもよい。

[0043] ペプチドを構成する「アミノ酸」を構成する少なくとも1つの原子は、原子番号（陽子数）が同じで、質量数（陽子と中性子の数の和）が異なる原子（同位体）であってもよい。当該ペプチドを構成する「アミノ酸」に含まれる同位体の例としては、水素原子、炭素原子、窒素原子、酸素原子、リン原子、硫黄原子、フッ素原子、塩素原子などがあり、それぞれ、 $^2\text{H}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{17}\text{O}$ 、 $^{18}\text{O}$ 、 $^{31}\text{P}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{36}\text{Cl}$ 等が含まれる。

[0044] 本明細書における「ハロゲン原子」としては、F、Cl、BrまたはIが例示される。

[0045] 本明細書において「アルキル」とは、脂肪族炭化水素から任意の水素原子を1個除いて誘導される1価の基であり、骨格中にヘテロ原子（炭素原子及び水素原子以外の原子をいう。）または不飽和の炭素-炭素結合を含有せず、水素原子及び炭素原子を含有するヒドロカルビルまたは炭化水素基構造の部分集合を有する。アルキルは直鎖状のものだけでなく、分枝鎖状のものも含む。アルキルとして具体的には、炭素原子数1~20 ( $\text{C}_1\sim\text{C}_{20}$ 、以下「 $\text{C}_p\sim\text{C}_q$ 」とは炭素原子数がp~q個であることを意味する)のアルキルであり、好ましくは $\text{C}_1\sim\text{C}_{10}$ アルキル、より好ましくは $\text{C}_1\sim\text{C}_6$ アルキルが挙げられる。アルキルとして、具体的には、メチル、エチル、n-プロピル、i-プロピル、n-ブチル、s-ブチル、t-ブチル、イソブチル（2-メチルプロピル）、n-ペンチル、s-ペンチル（1-メチルブチル）、t-ペンチル（1, 1-ジメチルプロピル）、ネオペンチル（2, 2-ジメチルプロピル）、イソペンチル（3-メチルブチル）、3-ペンチル（1-エチルプロピル）、1, 2-ジメチルプロピル、2-メチルブチル、n-ヘキシル、1, 1, 2-トリメチルプロピル、1, 2, 2-トリメチルプロピル、

1, 1, 2, 2-テトラメチルプロピル、1, 1-ジメチルブチル、1, 2-ジメチルブチル、1, 3-ジメチルブチル、2, 2-ジメチルブチル、2, 3-ジメチルブチル、3, 3-ジメチルブチル、1-エチルブチル、2-エチルブチル等が挙げられる。

[0046] 本明細書において「アルキレン」とは、前記「アルキル」からさらに任意の水素原子を1個除いて誘導される二価の基を意味する。アルキレンとして具体的には、 $-\text{CH}_2-$ 、 $-(\text{CH}_2)_2-$ 、 $-(\text{CH}_2)_3-$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$ 、 $-(\text{CH}_2)_4-$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)-$ 、 $-(\text{CH}_2)_5-$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)-$ 、 $-(\text{CH}_2)_6-$ 、 $-(\text{CH}_2)_7-$ 、 $-(\text{CH}_2)_8-$ などが挙げられる。アルキレンとして、 $\text{C}_1\sim\text{C}_8$ アルキレン例示され、 $\text{C}_1\sim\text{C}_6$ が好ましく、 $\text{C}_1\sim\text{C}_4$ アルキレンがより好ましく、 $\text{C}_1\sim\text{C}_2$ アルキレンが最も好ましい。

[0047] 本明細書において「アルケニル」とは、少なくとも1個の二重結合（2個の隣接 $\text{SP}^2$ 炭素原子）を有する1価の基である。二重結合および置換分（存在する場合）の配置によって、二重結合の幾何学的形態は、エントゲーゲン（E）またはツザンメン（Z）、シスまたはトランス配置をとることができる。アルケニルは、直鎖状のものだけでなく、分枝鎖状ものも含む。アルケニルとして好ましくは $\text{C}_2\sim\text{C}_{10}$ アルケニル、より好ましくは $\text{C}_2\sim\text{C}_6$ アルケニルが挙げられ、具体的には、たとえば、ビニル、アリル、1-プロペニル、2-プロペニル、1-ブテニル、2-ブテニル（シス、トランスを含む）、3-ブテニル、ペンテニル、3-メチル-2-ブテニル、ヘキセニルなどが挙げられる。

[0048] 本明細書において「アルキニル」とは、少なくとも1個の三重結合（2個の隣接 $\text{SP}$ 炭素原子）を有する、1価の基である。アルキニルは、直鎖状のものだけでなく、分枝鎖状のものも含む。アルキニルとして好ましくは $\text{C}_2\sim\text{C}_{10}$ アルキニル、より好ましくは $\text{C}_2\sim\text{C}_6$ アルキニルが挙げられ、具体的に

は、たとえば、エチニル、1-プロピニル、プロパルギル、3-ブチニル、ペンチニル、ヘキシニル、3-フェニル-2-プロピニル、3-(2'-フルオロフェニル)-2-プロピニル、2-ヒドロキシ-2-プロピニル、3-(3-フルオロフェニル)-2-プロピニル、3-メチル-(5-フェニル)-4-ペンチニルなどが挙げられる。

[0049] 本明細書において「シクロアルキル」とは、飽和または部分的に飽和した環状の1価の脂肪族炭化水素基を意味し、単環、ビスクロ環、スピロ環を含む。シクロアルキルとして好ましくは $C_3 \sim C_8$ シクロアルキルが挙げられ、具体的には、たとえば、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、ビスクロ[2, 2, 1]ヘプチル、スピロ[3, 3]ヘプチルなどが挙げられる。

[0050] 本明細書において「アリール」とは1価の芳香族炭化水素環を意味し、好ましくは $C_6 \sim C_{10}$ アリールが挙げられる。アリールとして具体的には、たとえば、フェニル、ナフチル（たとえば、1-ナフチル、2-ナフチル）などが挙げられる。

[0051] 本明細書において「ヘテロアリール」とは、炭素原子に加えて1~5個のヘテロ原子を含有する、芳香族性の環状の1価の基を意味する。環は単環でも、他の環との縮合環でもよく、部分的に飽和されていてもよい。環を構成する原子の数は好ましくは5~10（5~10員ヘテロアリール）であり、より好ましくは5~7（5~7員ヘテロアリール）である。ヘテロアリールとして具体的には、たとえば、フリル、チエニル、ピロリル、イミダゾリル、ピラゾリル、チアゾリル、イソチアゾリル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、オキサジアゾリル、チアジアゾリル、トリアゾリル、テトラゾリル、ピリジル、ピリミジル、ピリダジニル、ピラジニル、トリアジニル、ベンゾフラニル、ベンゾチエニル、ベンゾチアジアゾリル、ベンゾチアゾリル、ベンゾオキサゾリル、ベンゾオキサジアゾリル、ベンゾイミダゾリル、インドリル、イソインドリル、インダゾリル、キノリル、イソキノリル、シンノリニル、キナゾリニル、キノキサリニル、ベンゾジオキサリル、インドリジニ

ル、イミダゾピリジルなどが挙げられる。

- [0052] 本明細書において「アルコキシ」とは、前記定義の「アルキル」が結合したオキシ基を意味し、好ましくは $C_1 \sim C_6$ アルコキシが挙げられる。アルコキシとして具体的には、たとえば、メトキシ、エトキシ、1-プロポキシ、2-プロポキシ、 $n$ -ブトキシ、 $i$ -ブトキシ、 $s$ -ブトキシ、 $t$ -ブトキシ、ペンチルオキシ、3-メチルブトキシなどが挙げられる。
- [0053] 本明細書において「アルケニルオキシ」とは、前記定義の「アルケニル」が結合したオキシ基を意味し、好ましくは $C_2 \sim C_6$ アルケニルオキシが挙げられる。アルケニルオキシとして具体的には、たとえば、ビニルオキシ、アリルオキシ、1-プロペニルオキシ、2-プロペニルオキシ、1-ブテニルオキシ、2-ブテニルオキシ（シス、トランスを含む）、3-ブテニルオキシ、ペンテニルオキシ、ヘキセニルオキシなどが挙げられる。
- [0054] 本明細書において「シクロアルコキシ」とは、前記定義の「シクロアルキル」が結合したオキシ基を意味し、好ましくは $C_3 \sim C_8$ シクロアルコキシが挙げられる。シクロアルコキシとして具体的には、たとえば、シクロプロポキシ、シクロブトキシ、シクロペンチルオキシなどが挙げられる。
- [0055] 本明細書において「アリールオキシ」とは、前記定義の「アリール」が結合したオキシ基を意味し、好ましくは $C_6 \sim C_{10}$ アリールオキシが挙げられる。アリールオキシとして具体的には、たとえば、フェノキシ、1-ナフチルオキシ、2-ナフチルオキシなどが挙げられる。
- [0056] 本明細書において「アリールアルコキシ」とは、前記定義の「アリールアルキル（アラルキル）」が結合したオキシ基を意味し、好ましくは $C_7 \sim C_{12}$ アリールアルコキシ基が挙げられる。アリールアルコキシとして具体的には、たとえば、ベンジルオキシが挙げられる。
- [0057] 本明細書において「アミノ」とは、狭義には $-NH_2$ を意味し、広義には $-NRR'$ を意味し、ここで $R$ および $R'$ は独立して、水素原子、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール、またはヘテロアリールから選択されるか、あるいは $R$ および $R'$ はそれらが結

合している窒素原子と一緒に環を形成する。アミノとして好ましくは、 $-NH_2$ 、モノ $C_1\sim C_6$ アルキルアミノ、ジ $C_1\sim C_6$ アルキルアミノ、4～8員環状アミノなどが挙げられる。

[0058] 本明細書において「モノアルキルアミノ」とは、前記定義の「アミノ」のうち、Rが水素原子であり、かつR'が前記定義の「アルキル」である基を意味し、好ましくは、モノ $C_1\sim C_6$ アルキルアミノが挙げられる。モノアルキルアミノとして具体的には、たとえば、メチルアミノ、エチルアミノ、n-プロピルアミノ、i-プロピルアミノ、n-ブチルアミノ、s-ブチルアミノ、t-ブチルアミノなどが挙げられる。

[0059] 本明細書において「ジアルキルアミノ」とは、前記定義の「アミノ」のうち、RおよびR'が独立して前記定義の「アルキル」である基を意味し、好ましくは、ジ $C_1\sim C_6$ アルキルアミノが挙げられる。ジアルキルアミノとして具体的には、たとえば、ジメチルアミノ、ジエチルアミノなどが挙げられる。

[0060] 本明細書において「アミノアルキル」とは、前記定義の「アルキル」の1つまたは複数の水素原子が前記定義の「アミノ」で置換された基を意味し、 $C_1\sim C_6$ アミノアルキルが好ましい。アミノアルキルとして具体的には、たとえば、1-ピリジルメチル、2-(1-ピペリジル)エチル、3-(1-ピペリジル)プロピル、4-アミノブチルなどが挙げられる。

[0061] 本明細書において「アラルキル(アリールアルキル)」とは、前記定義の「アルキル」の少なくとも一つの水素原子が前記定義の「アリール」で置換された基を意味し、 $C_7\sim C_{14}$ アラルキルが好ましく、 $C_7\sim C_{10}$ アラルキルがより好ましい。アラルキルとして具体的には、たとえば、ベンジル、フェネチル、3-フェニルプロピルなどが挙げられる。

[0062] 本明細書において「アルキルアリール」とは、前記定義の「アリール」の少なくとも一つの水素原子が前記定義の「アルキル」で置換された基を意味する。アルキルアリールとして具体的には、たとえば、オルトトリル、メタトリル及びパラトリルなどが挙げられる。

[0063] アルキルアリールとして、 $C_7 \sim C_{12}$ アルキルアリールが例示され、 $C_7 \sim C_{10}$ アルキルアリールが好ましく、 $C_7 \sim C_9$ アルキルアリールがより好ましく、 $C_7 \sim C_8$ アルキルアリールが最も好ましい。

[0064] 非天然アミノ酸の具体的な例としては、国際公開第2013/100132号、国際公開第2018/143145号なども参照することができる。また、非天然アミノ酸の具体的な例として、Ser(tBuOH)、Ser(iPen)、MeSer(iPen)、Ser(nPr)、Ser(NtBu-Aca)、MeSer(tBuOH)、MeSer(nPr)、MeCys(StBu)、MeGly、nBuGly、MeOEtGly、MeOPrGly、PhPrGly、PhOEtGly、Nie、Ser(3F5MePyr)、Ser(Ph2Cl)、MePhe、MeHph、MeAla、MeAla(3Pyr)、Pic(2)、D-Nva、D-Ser(Me)、Hph、D-Hph、D-Ser(Ph)、D-MeAbu、D-MeSer、Pro4RBn、Hyp(Ph)、MePhe(3-Cl)、MeHph(4-Cl)、Hyp(Et)、EtOEtGly等を例示することもできる。これらの非天然アミノ酸は、例えばペプチドのN末端から数えて2番目または3番目の位置に含まれ得る。

[0065] ペプチドを構成する「アミノ酸」を構成する少なくとも1つの原子は、原子番号（陽子数）が同じで、質量数（陽子と中性子の数の和）が異なる原子（同位体）であってもよい。当該ペプチドを構成する「アミノ酸」に含まれる同位体の例としては、水素原子、炭素原子、窒素原子、酸素原子、リン原子、硫黄原子、フッ素原子、塩素原子などがあり、それぞれ、 $^2\text{H}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{17}\text{O}$ 、 $^{18}\text{O}$ 、 $^{31}\text{P}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{36}\text{Cl}$ 等が含まれる。

[0066] ペプチドの製造方法

本発明の一実施形態は、第一の非天然アミノ酸及び第二の非天然アミノ酸の少なくとも1つが下記要件（A）を満たし、かつ、下記要件（B）及び（C）からなる群より選ばれる少なくとも1つを満たす非天然アミノ酸（非天

然アミノ酸U1)である、ペプチドの製造方法であり、第一の非天然アミノ酸をコードするコドン及び第二の非天然アミノ酸をコードするコドンが隣接して含まれている核酸を翻訳する工程を含む。

(A) 主鎖アミノ基を構成する窒素原子(窒素原子N1)と、主鎖カルボキシ基を構成する酸素原子以外の酸素原子(酸素原子O1)とが、2つの原子を介して結合している。

(B) 酸素原子O1が、アルコキシ基又はアリアルコキシ基を構成している。

(C) 窒素原子N1が、直鎖状又は分岐鎖状のC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル基と結合している。

#### [0067] ペプチド

本明細書において「ペプチド」とは、2以上のアミノ酸がアミド結合によって連結したものをいう。デプシペプチドのように主鎖の一部にエステル結合を有するペプチドも、本明細書における「ペプチド」に含まれる。限定を意図しないが、本開示におけるペプチドには、鎖状ペプチド、及び環状ペプチドが含まれる。また、ペプチドは、その薬学的に許容される塩の形態であってもよい。

[0068] 本明細書においてペプチドは、一態様において、2~100個、3~50個、4~30個、または5~30個のアミノ酸が、アミド結合及び/又はエステル結合により連結されている。例えば、一態様において、ペプチドを構成するアミノ酸の数は30以下、20以下、及び、16以下が例示される。また、ペプチドを構成するアミノ酸の数は5以上、8以上、及び9以上例示される。ペプチドを構成するアミノ酸の数は5~30、8~20、8~16、及び9~16が例示される。

[0069] 一態様において、本明細書における前記ペプチドを構成するアミノ酸の数は、例えば5~30であり、好ましくは8~20であり、より好ましくは8~16であり、最も好ましくは9~16である。

[0070] 本明細書において「環状ペプチド」は、4以上のアミノ酸残基によって構

成される環状構造を有するペプチドである。このような環状構造を「環状部」ともいう。環状ペプチドの環化の態様として、アミド結合のような炭素-窒素結合による環化、エステル結合やエーテル結合のような炭素-酸素結合による環化、チオエーテル結合のような炭素-硫黄結合による環化、炭素-炭素結合による環化、あるいは複素環構築による環化など、どのような形態であってもよい。これらのうちでは、アミド結合、炭素-硫黄結合または炭素-炭素結合などの共有結合を介した環化が好ましい。アミド結合による環化がより特に好ましく、環化に用いられるカルボキシル基やアミノ基の位置は、主鎖上のものでも側鎖上のものでもよい。より好ましくは、側鎖のカルボキシル基とN末端の主鎖のアミノ基によるアミド結合を介した環化である。前記環状構造はフェニルアラニン、チロシン、プロリン等に含まれる環状構造（例えば、ベンゼン環、ピロリジン環）とは異なる。環状ペプチドの環状部を構成するアミノ酸の数は限定されないが、例えば、5以上、6以上、8以上、及び9以上が例示される。また、30以下、20以下、及び16以下11以下が例示される。前記環状部を構成するアミノ酸残基の数は、5~20が好ましく、8~16がより好ましく、9~16が最も好ましい。一態様では、環状ペプチドの環状部を構成するアミノ酸残基の総数は5以上30以下であり、そのうちの5以上15以下のアミノ酸残基で環状構造を構成する。

[0071] 一態様において、環状ペプチドを構成するアミノ酸残基の総数は、例えば5~30であり、好ましくは8~20であり、より好ましくは8~16であり、最も好ましくは9~16である。

[0072] 一態様において、環状ペプチドは、直鎖部を有していてもよい。本明細書において、環状ペプチドの部分構造を指す際に使用される「直鎖部」とは、環状部の主鎖構造に含まれない部分であって、該部分の鎖上に少なくとも一つのアミド結合及び／又はエステル結合を有するものをいう。直鎖部としては、2以上のアミノ酸残基がアミド結合によって連結したものが好ましい。この場合、デプシペプチドのように主鎖の一部にエステル結合を有していてもよい。直鎖部のアミノ酸残基の数（ユニットの数）は例えば0~8であり

、好ましくは0～8であり、より好ましくは0～5であり、最も好ましくは0～3である。なお、非限定の一態様において、本明細書における直鎖部には天然アミノ酸や非天然アミノ酸（化学修飾や骨格変換されたアミノ酸を含む）が含まれる場合がある。

[0073] 一態様において、ペプチドは、1つ以上のN置換アミノ酸残基を有しているペプチドを含む。一態様において、前記ペプチドが有するN置換アミノ酸残基の数は、例えば1～13であり、好ましくは3～12、より好ましくは4～11、最も好ましくは5～10である。

[0074] 一態様において、ペプチドは、そのClogPが、例えば4～25であり、好ましくは6～23であり、より好ましくは8～21であり、最も好ましくは9～20である。ClogPは、コンピューターで計算した分配係数であり、「CLOGP Reference Manual Daylight Version 4.9（リリース日：2011年8月1日、<https://www.daylight.com/dayhtml/doc/clogp/>）」に記載の原則に則って求めることができる。ClogPを計算する方法の一例として、Daylight Chemical Information Systems, Inc.のDaylight Version 4.95（リリース日：2011年8月1日、ClogPアルゴリズムversion5.4、データベースversion28、[https://www.daylight.com/dayhtml/doc/release\\_notes/index.html](https://www.daylight.com/dayhtml/doc/release_notes/index.html)）を用いて計算することが挙げられる。また、一態様において、ペプチドのClogPは、シクロスポリンA（ClogP：14.36）のClogPの値に対して、例えば28%～174%であり、好ましくは42%～160%であり、より好ましくは56%～146%であり、最も好ましくは63%～139%である。

[0075] 一態様において、1構成アミノ酸残基あたりの前記ペプチドのClogP（ClogP／アミノ酸残基数）は、1.0以上であり、好ましくは1.1以上である。本実施形態に係る前記ペプチドのClogP／アミノ酸残基数の上限は、1.8以下であることが好ましく、1.7以下であることがより好ましく、1.6以下であることが更に好ましく、1.5以下であることが更により好ましい。本実施形態に係る前記ペプチドのClogP／アミノ酸

残基数の範囲は、例えば1.0～1.8であり、好ましくは1.0～1.7であり、より好ましくは1.1～1.6であり、最も好ましくは1.1～1.5である。

[0076] 一態様において、ペプチドは、その分子量が、例えば500 g/mol～2000 g/molであり、好ましくは1000 g/mol～1800 g/molであり、より好ましくは1300 g/mol～1600 g/molであり、最も好ましくは1400 g/mol～1500 g/molである。

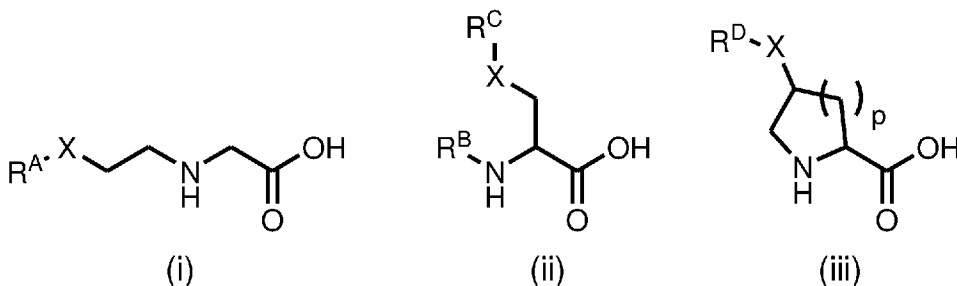
[0077] 本明細書における分子量は、化合物分子を構成する原子の原子量の総和（単位：「g/mol」）を意味し、分子構造式に含まれる原子の原子量の総和を算出することで得られる（単位「g/mol」）。本明細書においては分子量の単位を省略することがある。なお、本実施形態に係る前記ペプチドの分子量は、本技術分野において知られているいずれの方法でも測定することができ、好ましくは液体クロマトグラフィーにより測定することができ、より好ましくは実施例に記載の液体クロマトグラフィー質量分析（LC/MS）により測定することができる。

[0078] 一態様において、ペプチドに含まれる非天然アミノ酸の数は、2以上、4以上、5以上、6以上、7以上、又は8以上が例示される。また、20以下、15以下、14以下、13以下、12以下、10以下、又は9以下が例示される。本開示における前記ペプチドに含まれる非天然アミノ酸の数としては、環状ペプチドの環状部を構成するアミノ酸の数の30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、又は80%以上が例示される。また、本開示における前記ペプチドに含まれる非天然アミノ酸の種類は、1以上、2以上、3以上、4以上、7以上、又は8以上が例示され、また、20以下、15以下、14以下、13以下、12以下、10以下、又は9以下が例示される。

[0079] 一態様において、ペプチドに含まれる非天然アミノ酸の数は、例えば1～13であり、好ましくは3～12であり、より好ましくは4～11であり、最も好ましくは5～10である。

- [0080] 本開示における1種または複数種の非天然アミノ酸を含むペプチドにおいて非天然アミノ酸を含む部位は限定されないが、一態様として開始アミノ酸の位置に非天然アミノ酸を含むことができ、更に、2文字目および／または3文字目のアミノ酸の位置に非天然アミノ酸を含むことができる。
- [0081] 本実施形態に係る方法によって製造されるペプチドは、隣り合った位置に第一の非天然アミノ酸及び第二の非天然アミノ酸を含むアミノ酸配列を有する。また、第一の非天然アミノ酸及び第二の非天然アミノ酸の少なくとも1つは、上記要件(A)を満たし、かつ、上記要件(B)及び(C)からなる群より選ばれる少なくとも1つを満たす非天然アミノ酸(以下、「非天然アミノ酸U1」ともいう。)である。ペプチドは、上記第一の非天然アミノ酸及び第二の非天然アミノ酸の他に、任意の非天然アミノ酸を含んでいてもよい。
- [0082] 本明細書において、「主鎖アミノ基を構成する窒素原子(以下、「窒素原子N1」ともいう。))と、主鎖カルボキシ基を構成する酸素原子以外の酸素原子(以下、「酸素原子O1」ともいう。))とが、2つの原子を介して結合している」とは、アミノ酸の化学構造において、主鎖アミノ基を構成する窒素原子から数えて2つの原子を介して、酸素原子O1が結合していることを意味する。このとき、主鎖アミノ基を構成する窒素原子は数に含まない。「主鎖カルボキシ基を構成する酸素原子」とは、アミノ酸のC末端に相当するカルボキシ基を構成する酸素原子であり、グルタミン酸、アスパラギン酸等の側鎖に存在するカルボキシ基ではない。
- [0083] 具体例として、下記一般式(i)～(iii)中に数字を示して説明する。一般式(i)～(iii)は、要件(A)を説明するための模式図であり、式中、Xは酸素原子O1を示し、R<sup>A</sup>、R<sup>B</sup>、R<sup>C</sup>、及びR<sup>D</sup>は任意の置換基を示し、pは1以上の任意の整数を示す。上記非天然アミノ酸U1は、これらの一般式に限定されるものではなく、これら具体例を参考にして理解される。

[化17]



[0084] 一般式 (i) はN-置換グリシンを示しており、主鎖アミノ基を構成する窒素原子 (式中、NHと表記されている。) から数えて3番目の原子Xが酸素原子O1に相当する。一般式 (ii) はN, O-置換-D-セリンを示しており、主鎖アミノ基を構成する窒素原子 (式中、NHと表記されている。) から数えて、3番目の原子Xが酸素原子O1に相当する。式 (iii) は4-置換-プロリン (p=1の場合) を示しており、ピロリジン環上の炭素原子を最短距離で数えて3番目の原子Xが酸素原子O1に相当する。このように、環状アミノ酸の場合には、窒素原子N1と酸素原子O1と間に存在する原子数が、数え方によって複数考えられるが、その場合には最小の数を採用する。すなわち、原子数のカウントは、窒素原子N1と酸素原子O1が最短距離となるようにカウントする。

[0085] 本明細書において、「酸素原子O1が、アルコキシ基又はアリアルコキシ基を構成している」とは、酸素原子O1がオキシ基であることを意味する。換言すれば、酸素原子O1は、水酸基、カルボニル基、カルボキシ基、ニトロ基等を構成する酸素原子ではない。

[0086] 本明細書において、「窒素原子N1が、直鎖状又は分岐鎖状のC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル基と結合している」とは、N末端のアミノ基が無置換のアミノ基 (-NH<sub>2</sub>) ではなく、直鎖状又は分岐鎖状のC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル基で置換されたアミノ基であることを意味する。上記一般式 (i) ~ (iii) を例に説明すると、R<sup>A</sup>及びR<sup>B</sup>が直鎖状又は分岐鎖状のC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル基である。

[0087] 一態様において、窒素原子N1は非置換のアミノ基であるか、あるいはメチル基又はエチル基で置換されている。好ましい実施形態では、窒素原子N

1はメチル基で置換されている。

- [0088] 一態様において、第一の非天然アミノ酸及び第二の非天然アミノ酸の一方が非天然アミノ酸U1であり、もう一方が非天然アミノ酸U1とは異なる非天然アミノ酸（以下、「非天然アミノ酸U2」ともいう。）である。非天然アミノ酸U2は、非天然アミノ酸U1と同一でない非天然アミノ酸であればよい。また、第一の非天然アミノ酸及び第二の非天然アミノ酸の両方が非天然アミノ酸U1であってもよい。
- [0089] 一態様において、非天然アミノ酸U1は、上記要件（A）及び（B）の両方を満たすものであってよく、上記要件（A）及び（C）の両方を満たすものであってよく、上記要件（A）、（B）及び（C）の全てを満たすものであってよい。好ましい態様では、非天然アミノ酸U1は、D- $\alpha$ -アミノ酸、D-アミノ酸、L-アミノ酸（但し、天然アミノ酸ではない。）であってもよい。
- [0090] 一態様において、非天然アミノ酸U1では、酸素原子O1が窒素原子N1に結合した置換基中に存在していてもよい。この場合の例示として、上記一般式（i）で表されるアミノ酸が挙げられる。
- [0091] 一態様において、非天然アミノ酸U1では、酸素原子O1が非天然アミノ酸U1の側鎖中に存在していてもよい。この場合の例示として、上記一般式（i i）で表されるアミノ酸が挙げられる。
- [0092] 一態様において、非天然アミノ酸U1は、窒素原子N1、非天然アミノ酸U1の主鎖を構成する炭素原子及び非天然アミノ酸U1の側鎖を構成する原子が共に環を形成していてもよい。この場合の例示として、上記一般式（i i i）で表されるアミノ酸が挙げられる。
- [0093] 一態様において、非天然アミノ酸U1では、酸素原子O1に相当する酸素原子が1つのみ存在する。
- [0094] 一態様において、酸素原子O1は、直鎖状又は分岐鎖状のC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル基、C<sub>3</sub>~C<sub>10</sub>シクロアルキル基、C<sub>6</sub>~C<sub>10</sub>アリール基、C<sub>7</sub>~C<sub>12</sub>アリールアルキル基、又はC<sub>7</sub>~C<sub>12</sub>アルキルアリール基と共に、対応するC<sub>1</sub>~

C<sub>6</sub>アルコキシ基、C<sub>3</sub>~C<sub>10</sub>シクロアルコキシ基、C<sub>6</sub>~C<sub>10</sub>アリーロキシ基、C<sub>7</sub>~C<sub>12</sub>アリールアルキルオキシ基、又はC<sub>7</sub>~C<sub>12</sub>アルキルアリーロキシ基を構成していてもよい。一態様において、酸素原子O1は、メトキシ基、エトキシ基、フェノキシ基又はベンジルオキシ基を構成していてもよい。より好ましい実施形態では、メトキシ基又はフェノキシ基を構成していてもよい。

[0095] 一態様において、酸素原子O1は、直鎖状又は分岐鎖状のC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル基と共に、対応するC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルコキシ基を構成していてもよい。好ましい態様では、酸素原子O1は、メトキシ基又はエトキシ基を構成していてもよい。より好ましい態様では、メトキシ基を構成していてもよい。

[0096] 一態様において、酸素原子O1は、酸素原子O1がC<sub>6</sub>~C<sub>10</sub>アリール基と共に、対応するC<sub>6</sub>~C<sub>10</sub>アリーロキシ基を構成していてもよい。好ましい態様では、酸素原子O1は、フェノキシ基を構成していてもよい。一態様において、酸素原子O1は、水素原子と共に、対応するヒドロキシ基を構成していてもよい。

[0097] 特定の実施形態では、非天然アミノ酸U1は、窒素原子及び酸素原子以外のヘテロ原子を含まない。このようなヘテロ原子としては、硫黄原子などが挙げられる。

[0098] 特定の実施形態では、第一の非天然アミノ酸及び第二の非天然アミノ酸の一方が非天然アミノ酸U1であり、もう一方が非天然アミノ酸U2であり、非天然アミノ酸U2が、主鎖アミノ基を構成する窒素原子が直鎖状若しくは分岐鎖状のC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル基で置換されており、好ましくはメチル基又はエチル基で置換されており、より好ましくはメチル基で置換されている。

[0099] 特定の実施形態では、第一の非天然アミノ酸及び第二の非天然アミノ酸の一方が非天然アミノ酸U1であり、もう一方が非天然アミノ酸U2であり、非天然アミノ酸U2が側鎖として、5~10員アリール基で置換されていてもよい直鎖状若しくは分岐鎖状のC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル基、又はC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>の直鎖状若しくは分岐鎖状アルキル基で置換されていてもよい5~10員アリール

基を有しており、好ましくは非天然アミノ酸U2が側鎖として、直鎖状若しくは分岐鎖状のC<sub>1</sub>~C<sub>4</sub>アルキル基、又はC<sub>1</sub>~C<sub>3</sub>の直鎖状アルキル基で置換されている5~10員アリアル基を有しており、より好ましくは非天然アミノ酸U2が側鎖として、メチル基又はベンジル基を有する。

[0100] 特定の実施形態では、第一の非天然アミノ酸及び第二の非天然アミノ酸の一方が非天然アミノ酸U1であり、もう一方が非天然アミノ酸U2であり、非天然アミノ酸U2が $\alpha$ アミノ酸である。特定の実施形態では、非天然アミノ酸U2は、主鎖アミノ基を構成する窒素原子がメチル基で置換されており、側鎖としてメチル基を有する $\alpha$ アミノ酸である。特定の実施形態では、非天然アミノ酸U2は、主鎖アミノ基を構成する窒素原子がメチル基で置換されており、側鎖としてベンジル基を有する $\alpha$ アミノ酸である。

[0101] 本実施形態で製造されるペプチドのアミノ酸配列において、第一の非天然アミノ酸と第二の非天然アミノ酸は隣り合っており、第一の非天然アミノ酸がN末端側であり、第二の非天然アミノ酸がC末端側であってもよく、第二の非天然アミノ酸がN末端側であり、第一の非天然アミノ酸がC末端側であってもよい。また、ペプチドのアミノ酸配列において、非天然アミノ酸U1がN末端側であり、非天然アミノ酸U2がC末端側であってもよく、非天然アミノ酸U2がN末端側であり、非天然アミノ酸U1がC末端側であってもよい。

[0102] 本実施形態に係るペプチドの製造方法は、一態様において、第一の非天然アミノ酸が非天然アミノ酸U1であり、第二の非天然アミノ酸が非天然アミノ酸U2であり、非天然アミノ酸U1が要件(A)及び(B)を満たし、酸素原子O1が窒素原子N1に置換された置換基中に存在し、酸素原子O1がメトキシ基又はフェノキシ基を構成しており、第一の非天然アミノ酸をコードするコドンが、第二の非天然アミノ酸をコードするコドンより先に翻訳される。

[0103] 本実施形態に係るペプチドの製造方法は、一態様において、第一の非天然アミノ酸が非天然アミノ酸U1であり、第二の非天然アミノ酸が非天然アミノ酸U2であり、非天然アミノ酸U1が要件(A)及び(B)を満たし、酸素原子O1が窒素原子N1に置換された置換基中に存在し、酸素原子O1がメトキシ基又はフェノキシ基を構成しており、第一の非天然アミノ酸をコードするコドンが、第二の非天然アミノ酸をコードするコドンより先に翻訳される。

ノ酸U2であり、非天然アミノ酸U1が要件(A)及び(B)を満たし、酸素原子O1が非天然アミノ酸U1の側鎖中に含まれ、酸素原子O1がメトキシ基又はフェノキシ基を構成しており、窒素原子N1が非置換のアミノ基を構成しており、第一の非天然アミノ酸をコードするコドンが、第二の非天然アミノ酸をコードするコドンより先に翻訳される。

[0104] 本実施形態に係るペプチドの製造方法は、一態様において、第一の非天然アミノ酸が非天然アミノ酸U1であり、第二の非天然アミノ酸が非天然アミノ酸U2であり、非天然アミノ酸U1が要件(A)及び(C)を満たし、酸素原子O1が非天然アミノ酸U1の側鎖中に含まれ、酸素原子O1が水酸基を構成しており、窒素原子N1がメチル基又はエチル基で置換されており、第一の非天然アミノ酸をコードするコドンが、第二の非天然アミノ酸をコードするコドンより先に翻訳される。

[0105] 本実施形態に係るペプチドの製造方法は、一態様において、第一の非天然アミノ酸が非天然アミノ酸U1であり、第二の非天然アミノ酸が非天然アミノ酸U2であり、非天然アミノ酸U1が要件(A)及び(B)を満たし、非天然アミノ酸U1において、窒素原子N1、非天然アミノ酸U1の主鎖を構成する炭素原子及び非天然アミノ酸U1の側鎖を構成する原子が共に環を形成しており、酸素原子O1がメトキシ基又はフェノキシ基を構成しており、第一の非天然アミノ酸をコードするコドンが、第二の非天然アミノ酸をコードするコドンより先に翻訳される。

[0106] 本実施形態に係るペプチドの製造方法は、一態様において、第一の非天然アミノ酸をコードするコドン及び第二の非天然アミノ酸をコードするコドンが隣接して含まれている核酸を翻訳する工程を含み、第一の非天然アミノ酸が非天然アミノ酸U1であり、第二の非天然アミノ酸が非天然アミノ酸U2であり、非天然アミノ酸U1が $\alpha$ アミノ酸であり、非天然アミノ酸U1において、主鎖アミノ基を構成する窒素原子(窒素原子N1)と、主鎖カルボキシ基を構成する酸素原子以外の酸素原子(酸素原子O1)とが、2つ又は3つの原子を介して結合しており、酸素原子O1が非天然アミノ酸U1の側鎖

中に含まれ、酸素原子O1が水酸基を構成しており、窒素原子N1がメチル基又はエチル基で置換されており、第一の非天然アミノ酸をコードするコドンが、第二の非天然アミノ酸をコードするコドンより先に翻訳される。

[0107] 本実施形態に係るペプチドの製造方法は、一態様において、第一の非天然アミノ酸が非天然アミノ酸U1であり、第二の非天然アミノ酸が非天然アミノ酸U2であり、非天然アミノ酸U1が要件(A)及び(B)を満たし、酸素原子O1が窒素原子N1に置換された置換基中に存在し、酸素原子O1がメトキシ基又はフェノキシ基を構成しており、第一の非天然アミノ酸をコードするコドンが、第二の非天然アミノ酸をコードするコドンより後に翻訳される。

[0108] 本実施形態に係るペプチドの製造方法は、一態様において、第一の非天然アミノ酸が非天然アミノ酸U1であり、第二の非天然アミノ酸が非天然アミノ酸U2であり、非天然アミノ酸U1が要件(A)及び(B)を満たし、酸素原子O1が非天然アミノ酸U1の側鎖中に含まれ、酸素原子O1がメトキシ基又はフェノキシ基を構成しており、窒素原子N1が非置換のアミノ基を構成しており、第一の非天然アミノ酸をコードするコドンが、第二の非天然アミノ酸をコードするコドンより後に翻訳される。

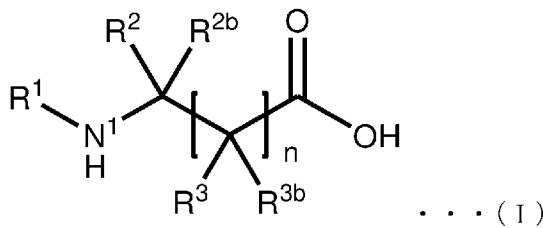
[0109] 本実施形態に係るペプチドの製造方法は、一態様において、第一の非天然アミノ酸が非天然アミノ酸U1であり、第二の非天然アミノ酸が非天然アミノ酸U2であり、非天然アミノ酸U1が要件(A)及び(C)を満たし、酸素原子O1が非天然アミノ酸U1の側鎖中に含まれ、酸素原子O1が水酸基を構成しており、窒素原子N1がメチル基又はエチル基で置換されており、第一の非天然アミノ酸をコードするコドンが、第二の非天然アミノ酸をコードするコドンより後に翻訳される。

[0110] 本実施形態に係るペプチドの製造方法は、一態様において、第一の非天然アミノ酸が非天然アミノ酸U1であり、第二の非天然アミノ酸が非天然アミノ酸U2であり、非天然アミノ酸U1が要件(A)及び(B)を満たし、非天然アミノ酸U1において、窒素原子N1、非天然アミノ酸U1の主鎖を構

成する炭素原子及び非天然アミノ酸U1の側鎖を構成する原子が共に環を形成しており、酸素原子O1がメトキシ基又はフェノキシ基を構成しており、第一の非天然アミノ酸をコードするコドンが、第二の非天然アミノ酸をコードするコドンより後に翻訳される。

[0111] 特定の実施形態では、第一の非天然アミノ酸及び第二の非天然アミノ酸の少なくとも1つが非天然アミノ酸U1であり、非天然アミノ酸U1が下記式(1)で表される非天然アミノ酸である。

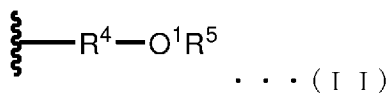
[化18]



[0112] 式(1)において、nは0以上2以下の整数であり、好ましくは0以上2以下の整数であり、より好ましくは0以上1以下の整数であり、最も好ましくは0である。

[0113] 式(1)において、R<sup>1</sup>は(a)式(11)で表される基、(b)水素原子又は(c)直鎖状若しくは分岐鎖状のC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル基である。特定の実施形態では、R<sup>1</sup>は水素原子ではない。

[化19]



[0114] 式(11)において、

[化20]



はN<sup>1</sup>との結合位置を表す。

[0115] 式(11)において、R<sup>4</sup>はC<sub>1</sub>~C<sub>2</sub>アルキレン基である。

[0116] 式(11)において、R<sup>5</sup>は水素原子、直鎖状又は分岐鎖状のC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アル

キル基、 $C_3 \sim C_{10}$ シクロアルキル基、 $C_6 \sim C_{10}$ アリアル基、 $C_7 \sim C_{12}$ アリアルアルキル基、又は $C_7 \sim C_{12}$ アルキルアリアル基であり、好ましくはメチル基、エチル基、フェニル基、又はベンジル基であり、より好ましくはメチル基又はフェニル基である。

[0117] 一態様において、 $R^5$ は直鎖状又は分岐鎖状の $C_1 \sim C_6$ アルキル基であり、好ましくはメチル基又はエチル基であり、より好ましくはメチル基である。特定の実施形態では、 $R^5$ は $C_6 \sim C_{10}$ アリアル基であり、好ましくはフェニル基である。特定の実施形態では、 $R^5$ は水素原子である。

[0118] 式(1)において、 $R^2$ 及び $R^3$ はそれぞれ独立して、式(11)で表される基、水素原子又は直鎖状若しくは分岐鎖状の $C_1 \sim C_4$ アルキル基であり、好ましくは式(11)で表される基又は水素原子である。一態様において、 $R^2$ 及び $R^3$ の少なくとも一方が式(11)で表される基であってもよい。

[0119] 式(1)において、 $R^{2b}$ 及び $R^{3b}$ は、それぞれ独立して、水素原子又は直鎖状若しくは分岐鎖状の $C_1 \sim C_4$ アルキル基であり、好ましくは水素原子である。

[0120] 式(1)において、 $R^2$ 及び $R^{2b}$ 又は $R^3$ 及び $R^{3b}$ は、それらが結合している炭素原子と共に環を形成してよい。

[0121]  $R^1$ 、 $R^2$ 及び $R^3$ のいずれか1つ以上は式(11)で表される基であり、式(1)における $N^1$ (窒素原子 $N^1$ )と式(11)における $O^1$ (酸素原子 $O^1$ )は、2つの原子を介して結合している。なお、 $N^1$ は窒素原子を表し、 $O^1$ は酸素原子を表す。

[0122]  $R^1$ が式(11)で表される基である場合、 $R^4$ 及び $R^2$ は、 $R^2$ が結合している炭素原子及び $N^1$ と共に環を形成していてもよい。この場合の例示として、上記一般式(iii)で表されるアミノ酸が挙げられる。

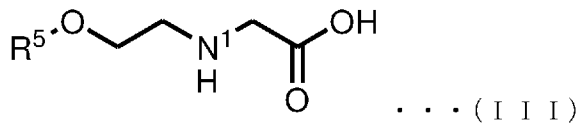
[0123]  $R^2$ が式(11)で表される置換基である場合、式(1)における $R^1$ 及び式(11)における $R^5$ の少なくとも1つは水素原子ではない。一態様において、式(1)における $R^1$ は水素原子ではない。特定の実施形態では、式(11)における $R^5$ は水素原子ではない。他の態様では、式(1)における $R^1$

も式 ( I I ) における  $R^5$  も水素原子ではない。

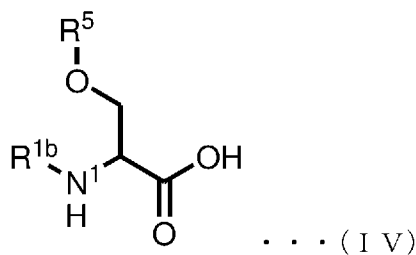
[0124]  $n$  が 2 以上である場合、 $R^3$  及び  $R^{3b}$  は複数存在し得る。 $R^3$  が複数存在する場合は、それぞれが独立して互いに同じであっても異なってもよく、 $R^{3b}$  が複数存在する場合は、それぞれが独立して互いに同じであっても異なってもよい。

[0125] 一態様において、非天然アミノ酸 U 1 は、下記式 ( I I I )、( I V ) 又は ( V ) で表されるアミノ酸である。一態様において非天然アミノ酸 U 1 は、下記式 ( I I I ) で表されるアミノ酸である。一態様において非天然アミノ酸 U 1 は、下記式 ( I V ) で表されるアミノ酸である。一態様において非天然アミノ酸 U 1 は、下記式 ( V ) で表されるアミノ酸である。式 ( I I I )、( I V ) 及び ( V ) 中、 $R^{1b}$  は水素原子又は直鎖状若しくは分岐鎖状の  $C_1 \sim C_6$  アルキルであり、 $R^5$  は式 ( I I ) における  $R^5$  と同義である。

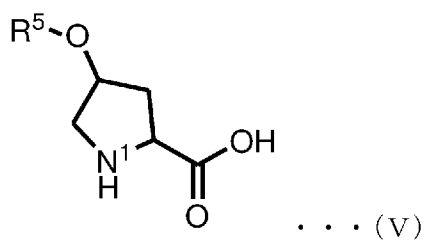
[化21]



[化22]



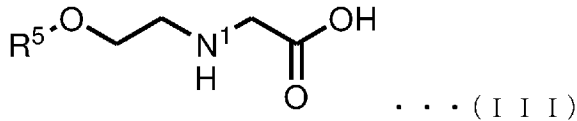
[化23]



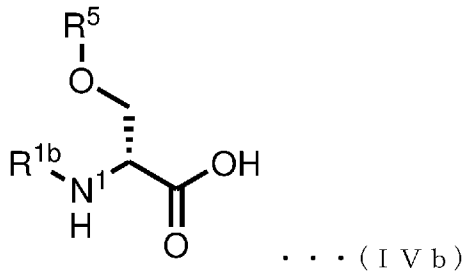
[0126] 一態様において、非天然アミノ酸 U 1 は、式 ( I I I )、( I V b ) 又は ( V b ) で表されるアミノ酸である。一態様において非天然アミノ酸 U 1 は

、下記式 (I V b) で表されるアミノ酸である。一態様において非天然アミノ酸 U 1 は、下記式 (V b) で表されるアミノ酸である。式 (I I I)、(I V b) 及び (V b) 中、R<sup>1b</sup> は水素原子又は直鎖状若しくは分岐鎖状の C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub> アルキルであり、R<sup>5</sup> は式 (I I) における R<sup>5</sup> と同義である。

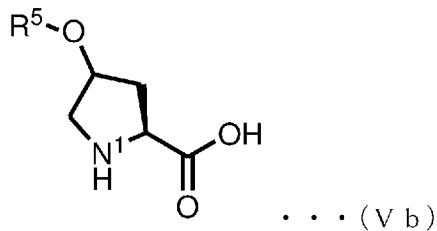
[化24]



[化25]



[化26]



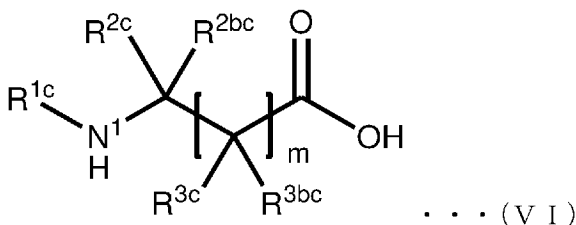
[0127] 一態様において、R<sup>1</sup> 及び R<sup>1b</sup> はメチル基又はエチル基であり、好ましくはメチル基である。一態様において、R<sup>1</sup> 及び R<sup>1b</sup> は水素原子である。

[0128] 一態様において、R<sup>5</sup> は直鎖状又は分岐鎖状の C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub> アルキル基、C<sub>3</sub>~C<sub>10</sub> シクロアルキル基、C<sub>6</sub>~C<sub>10</sub> アリール基、C<sub>7</sub>~C<sub>12</sub> アリールアルキル基、又は C<sub>7</sub>~C<sub>12</sub> アルキルアリール基であり、かつ R<sup>1</sup> 及び R<sup>1b</sup> は水素原子である。好ましい態様では、R<sup>5</sup> は直鎖状又は分岐鎖状の C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub> アルキル基、C<sub>6</sub>~C<sub>10</sub> アリール基、又は C<sub>7</sub>~C<sub>12</sub> アリールアルキル基であり、かつ R<sup>1</sup> 及び R<sup>1b</sup> は水素原子である。より好ましい態様では、R<sup>5</sup> はメチル基、エチル基、フェニル基又はベンジル基であり、かつ R<sup>1</sup> 及び R<sup>1b</sup> は水素原子である。さらに好ましい態様では、R<sup>5</sup> はメチル基又はフェニル基であり、かつ R<sup>1</sup>

及びR<sup>1b</sup>は水素原子である。

[0129] 一態様において、第一の非天然アミノ酸及び第二の非天然アミノ酸の一方が非天然アミノ酸U1であり、もう一方が非天然アミノ酸U2であり、非天然アミノ酸U2は下記式(V1)で表される。

[化27]



[0130] 式(V1)において、mは0以上2以下の整数であり、好ましくは0又は1であり、最も好ましくは0である。

[0131] 式(V1)において、R<sup>1c</sup>は水素原子又は直鎖状若しくは分岐鎖状のC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル基であり、好ましくは直鎖状若しくは分岐鎖状のC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル基であり、より好ましくはメチル基又はエチル基であり、特に好ましくはメチル基である。

[0132] 式(V1)において、R<sup>2c</sup>及びR<sup>3c</sup>はそれぞれ独立して、水素原子、5~10員アリール基で置換されていてもよい直鎖状若しくは分岐鎖状のC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル基、又はC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>の直鎖状若しくは分岐鎖状アルキル基で置換されていてもよい5~10員アリール基であり、好ましくは5~10員アリール基で置換されていてもよい直鎖状若しくは分岐鎖状のC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル基、又はC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>の直鎖状若しくは分岐鎖状アルキル基で置換されていてもよい5~10員アリール基であり、より好ましくは直鎖状若しくは分岐鎖状のC<sub>1</sub>~C<sub>4</sub>アルキル基、又はC<sub>1</sub>~C<sub>3</sub>の直鎖状アルキル基で置換されている5~10員アリール基である。好ましい態様では、R<sup>2c</sup>及びR<sup>3c</sup>がそれぞれ独立して、メチル基又はベンジル基である。一態様において、R<sup>2c</sup>及びR<sup>3c</sup>はメチル基である。一態様において、R<sup>2c</sup>及びR<sup>3c</sup>はベンジル基である。

[0133] 式(V1)において、R<sup>2bc</sup>及びR<sup>3bc</sup>はそれぞれ独立して、水素原子又は直鎖状若しくは分岐鎖状のC<sub>1</sub>~C<sub>4</sub>アルキル基であり、好ましくは水素原子

である。

[0134]  $R^{2c}$ 及び $R^{2bc}$ 又は $R^{3c}$ 及び $R^{3bc}$ は、それらが結合している炭素原子と共に環を形成してよい。

[0135]  $R^{1c}$ が結合している窒素原子及び $R^{1c}$ 、 $R^{2c}$ が結合している炭素原子及び $R^{2c}$ は共に環を形成していてもよい。

[0136]  $m$ が2である場合、 $R^3$ 及び $R^{3b}$ は2つずつ存在し得る。 $R^{3c}$ が複数存在する場合は、それぞれが独立して互いに同じであっても異なってもよく、 $R^{3bc}$ が複数存在する場合は、それぞれが独立して互いに同じであっても異なってもよい。

[0137] 一態様において、 $R^{1c}$ 及び $R^{2c}$ はメチル基であり、 $m$ は0である。別の態様において、 $R^{1c}$ はメチル基であり、 $R^{2c}$ はベンジル基であり、 $m$ は0である。

[0138] [ペプチドの製造方法]

本実施形態に係るペプチドの製造方法は、第一の非天然アミノ酸をコードするコドン及び第二の非天然アミノ酸をコードするコドンが隣接して含まれている核酸を翻訳する工程を含む。第一の非天然アミノ酸をコードするコドンが、第二の非天然アミノ酸をコードするコドンより先に翻訳されてもよく、第一の非天然アミノ酸をコードするコドンが、第二の非天然アミノ酸をコードするコドンより後に翻訳されてもよい。すなわち、第一の非天然アミノ酸及び第二の非天然アミノ酸をコードする各コドンは、どちらがmRNAの5'末端側であってもよい。

[0139] また、第一の非天然アミノ酸及び第二の非天然アミノ酸の一方が非天然アミノ酸U1であり、もう一方が非天然アミノ酸U2である場合、非天然アミノ酸U1をコードするコドンが、非天然アミノ酸U2をコードするコドンより先に翻訳されてもよく、非天然アミノ酸U1をコードするコドンが、非天然アミノ酸U2をコードするコドンより後に翻訳されてもよい。すなわち、非天然アミノ酸U1及び非天然アミノ酸U2をコードする各コドンは、どちらがmRNAの5'末端側であってもよい。好ましくは、非天然アミノ酸U

1 をコードするコドンが、非天然アミノ酸 U 2 をコードするコドンより先に翻訳される。

[0140] ペプチドをコードする mRNA

本明細書においては、特定の非天然アミノ酸を含むペプチドをコードする mRNA を翻訳してペプチドを製造する。mRNA とは、タンパク質に翻訳され得る遺伝情報を持った RNA のことである。遺伝情報はコドン（3つのヌクレオチドの順序）として mRNA 上にコードされており、通常、それらコドンが全 20 種類のアミノ酸にそれぞれ対応している。タンパク質の翻訳は開始コドンから始まり、終止コドンで終了する。真核生物における開始コドンは原則として AUG であるが、原核生物（真正細菌および古細菌）では AUG の他に GUG や UUG など開始コドンとして使用されることがある。AUG はメチオニン (Met) をコードするコドンであり、真核生物および古細菌ではそのままメチオニンから翻訳が開始される。一方、真正細菌では、開始コドンの AUG のみ N-ホルミルメチオニン (fMet) に対応しているため、ホルミルメチオニンから翻訳が開始される。終止コドンには、UAA (オーカー)・UAG (アンバー)・UGA (オパール) の 3 種がある。終止コドンが翻訳終結因子 (release factor : RF) と呼ばれるタンパク質によって認識されると、それまでに合成されたペプチド鎖が tRNA から解離し、翻訳工程は終了する。一態様における特定の非天然アミノ酸を含むペプチドをコードする mRNA として、少なくとも開始アミノ酸の位置に非天然アミノ酸を含むペプチドをコードするコドンを含むものを例示することができる。

[0141] 天然のアミノ酸の翻訳では、64 種類のコドンそれぞれに、20 種類のタンパク質性アミノ酸及び翻訳の終止が割り当てられている。翻訳系から特定のアミノ酸に対応するアミノアシル化 tRNA を除去すると、当該アミノ酸に対応するコドンが空きコドンになる。そこで、その空きコドンに相補的なアンチコドンをもつ tRNA に所望の非天然アミノ酸を結合させ、これを翻訳系に加えて翻訳を行うことにより、当該アミノ酸がそのコドンでコード

されることになり、除去したアミノ酸の代わりに所望の非天然アミノ酸が導入されたペプチドが翻訳される。

[0142] 本開示における一態様において、ペプチドの翻訳には、イニシエーションサプレッション (Initiation Suppression: i S P) 法を利用することが好ましい。通常の翻訳では、一般的に翻訳開始アミノ酸としてメチオニンがN末端アミノ酸として翻訳される。翻訳の開始には専用の「開始 t R N A」があり、開始 t R N A がメチオニン (原核生物ではホルミルメチオニン) と結合しリボソームに運ばれることによって、翻訳が開始され、N末端のアミノ酸がメチオニン (原核生物ではホルミルメチオニン) となる。これに対し、翻訳系内からメチオニンがアミノアシル化された開始 t R N A を除去し (または生成されないにし)、予め調製した所望のアミノ酸がアミノアシル化された開始 t R N A を代わりに翻訳系内に加えることによって、N末端に所望のアミノ酸を持つペプチドを翻訳することをイニシエーションサプレッション法という。非天然アミノ酸の許容度は、アミノ酸の伸長時よりN末端への導入において高く、天然アミノ酸と大きく構造の異なる非天然アミノ酸をN末端アミノ酸として利用できることが知られている (非特許文献: J Am Chem Soc. 2009 Apr 15;131(14):5040-1. Translation initiation with initiator tRNA charged with exotic peptides. Goto Y, Suga H. 参照)。本実施形態における一態様において、翻訳系に含まれる開始 t R N A には非天然アミノ酸がアシル化されていてもよい。

#### [0143] 翻訳系

本明細書において、「翻訳系」とは、ペプチドを翻訳するための組成物として定義される。本明細書における「翻訳系」は、その他、翻訳に関与するタンパク因子群、t R N A、アミノ酸、A T P などのエネルギー源、その再生系を組み合わせたもので、m R N A をタンパク質に翻訳することができるものを含むことが好ましい。また、翻訳が進行している間の系も、本明細書における「翻訳系」に含まれてよい。本明細書における翻訳系は、ペプチドを翻訳する際の鋳型となる核酸を含んでいてよく、これら以外にも、開始因

子、伸長因子、解離因子、アミノアシル tRNA 合成酵素などを含むことができる。これらの因子は、種々の細胞の抽出液から精製することによって得ることができる。因子を精製するための細胞は、例えば原核細胞、または真核細胞を挙げることができる。原核細胞としては、大腸菌細胞、高度好熱菌細胞、または枯草菌細胞を挙げることができる。真核細胞としては、酵母細胞、小麦胚芽、ウサギ網状赤血球、植物細胞、昆虫細胞、または動物細胞を材料にしたものが知られている。また tRNA やアミノアシル tRNA 合成酵素 (ARS) は天然に存在するものに加え、人工 tRNA や非天然アミノ酸を認識する人工アミノアシル tRNA 合成酵素を用いることもできる。人工 tRNA や人工アミノアシル tRNA 合成酵素を用いることにより部位特異的に非天然アミノ酸を導入したペプチドを合成することができる。なお、必要に応じて、翻訳系に T7 RNA polymerase などの RNA ポリメラーゼを加えることで、鋳型 DNA から転写させることもできる。

[0144] 本実施形態における翻訳工程は、無細胞翻訳系で実施してもよい。無細胞翻訳系は、再構成無細胞翻訳系であってよく、具体的には大腸菌由来の因子で構成された翻訳系を使用し得る。また、無細胞翻訳系は、大腸菌由来のリボソームを含むものであってもよい。

[0145] 無細胞翻訳系は、第一の非天然アミノ酸をコードするコドンに相補的なアンチコドンをもつ tRNA を含み、かつ、第二の非天然アミノ酸をコードするコドンに相補的なアンチコドンをもつ tRNA を含むことが好ましい。

[0146] 翻訳系の主な種類としては、生細胞を利用した翻訳系や、細胞抽出液を利用した翻訳系 (無細胞翻訳系) がある。生細胞を利用した翻訳系としては、例えば、アフリカツメガエル卵母細胞や哺乳動物細胞などの生細胞に、所望のアミノアシル tRNA および mRNA をマイクロインジェクション法やリポフェクション法により導入してペプチド翻訳を行う系が知られている (Nowak et al., Science (1995) 268: 439-442)。無細胞翻訳系の例としては、大腸菌 (Chen et al., Methods Enzymol (1983) 101: 674-690)、酵母 (Gas

ior et al., J Biol Chem (1979) 254: 3965-3969)、小麦胚芽 (Erickson et al., Methods Enzymol (1983) 96: 38-50)、ウサギ網状赤血球 (Jackson et al., Methods Enzymol (1983) 96: 50-74)、HeLa細胞 (Barton et al., Methods Enzymol (1996) 275: 35-57)、あるいは昆虫細胞 (Swerdel et al., Comp Biochem Physiol B (1989) 93: 803-806) などからの抽出液を利用した翻訳系が知られている。このような翻訳系は、当業者に公知の方法またはそれに準ずる方法によって適宜調製することができる。無細胞翻訳系には、ペプチド翻訳に必要な因子をそれぞれ単離・精製して、それらを再構成して構築された翻訳系 (再構成型の無細胞翻訳系) も含まれる (Shimizu et al., Nat Biotech (2001) 19: 751-755)。再構成型の無細胞翻訳系には、通常、リボソーム、アミノ酸、tRNA、アミノアシルtRNA合成酵素 (aaRS)、翻訳開始因子 (例えば、IF1、IF2、IF3)、翻訳伸長因子 (例えばEF-Tu、EF-Ts、EF-G)、翻訳終結因子 (例えばRF1、RF2、RF3)、リボソーム再生因子 (ribosome recycling factor: RRF)、エネルギー源としてのNTP類、エネルギー再生系、および翻訳に必要なその他の因子などが含まれ得る。DNAからの転写反応を併せて行う場合は、さらにRNAポリメラーゼなどが含まれ得る。無細胞翻訳系に含まれる種々の因子は、当業者に周知の方法によって単離・精製することが可能であり、それらを用いて再構成型の無細胞翻訳系を適宜構築することができる。あるいは、ジーンフロンティア社のPUREfrex (登録商標) や、New England Biolabs社のPURExpress (登録商標) などの市販されている再構成型の無細胞翻訳系を利用することもできる。再構成型の無細胞翻訳系の場合、翻訳系の構成成分のうち必要な成分だけを再構成して、所望の翻訳系を構築することができる。

[0147] PURESYSTEM (登録商標) (BioComber, Japan) は大腸菌における翻訳に必要な蛋白因子類、エネルギー再生系酵素、リボソームそれぞれを抽出、精製し、tRNA、アミノ酸、ATP、GTPなどと混合した再構成無細胞翻訳系である。不純物の含有量が少ないだけでなく、再構成系であるため排除し

たいタンパク因子、アミノ酸を含まない系を容易に作製することができる ((i) Nat Biotechnol. 2001; 19: 751-5. Cell-free translation reconstituted with purified components. Shimizu Y, Inoue A, Tomari Y, Suzuki T, Yokogawa T, Nishikawa K, Ueda T. (ii) Methods Mol Biol. 2010; 607: 11-21. PURE technology. Shimizu Y, Ueda T.)。

[0148] 例えば、非天然アミノ酸を導入するコドンとして終止コドンを利用する方法が多く報告されているが、前述のPURESYSTEMを用いることで天然アミノ酸、ARSを除いた合成系を構築できる。これにより、除外する天然アミノ酸をコードするコドンに、非天然アミノ酸を対応付けることができる (J Am Chem Soc. 2005; 127: 11727-35. Ribosomal synthesis of unnatural peptides. Josephson K, Hartman MC, Szostak JW.)。さらにコドンの縮重を解くことにより天然アミノ酸を除外することなく非天然アミノ酸を加えることができる (Kwon I, et al. Breaking the degeneracy of the genetic code. J Am Chem Soc. 2003, 125, 7512-3.)。N-メチルアミノ酸を含むペプチドがPURESYSTEMなどの無細胞翻訳系の活用によりリボソームにて合成できる。

[0149] より具体的には、翻訳合成は、例えば、大腸菌における翻訳に必要なタンパク因子類 (メチオニルトRNAトランスフォルミラーゼ、EF-G、RF1、RF2、RF3、RRF、IF1、IF2、IF3、EF-Tu、EF-Ts、ARS (AlaRS、ArgRS、AsnRS、AspRS、CysRS、GlnRS、GluRS、GlyRS、HisRS、IleRS、LeuRS、LysRS、MetRS、PheRS、ProRS、SerRS、ThrRS、TrpRS、TyrRS、ValRSから必要なものを選ぶ)、リボソーム、アミノ酸、クレアチンキナーゼ、ミオキナーゼ、無機ピロフォスファターゼ、ヌクレオシド二リン酸キナーゼ、E. coli由来tRNA、クレアチンリン酸、グルタミン酸カリウム、HEPES-KOH pH7.6、酢酸マグネシウム、スペルミジン、ジチオスレイトール、GTP、ATP、CTP、UTPなどを適宜取捨選択して混合したPURESYSTEM等の公知の無細胞翻訳系にmRNAを加えることによって行うことができる。また、T7 RNA polymera

seを加えておけば、T7プロモーターを含む鋳型DNAからの転写、翻訳を共役して行なうこともできる。また、所望のアミノアシルtRNA群やアミノアシルtRNA合成酵素（ARS）が許容する非天然アミノ酸群（例えばF-Tyr）を系に添加することによって非天然アミノ酸を含むペプチドを翻訳合成することができる（Kawakami T, et al. Ribosomal synthesis of polypeptoids and peptoid-peptide hybrids. *J Am Chem Soc.* 2008, 130, 16861-3., Kawakami T, et al. Diverse backbone-cyclized peptides via codon reprogramming. *Nat Chem Biol.* 2009, 5, 888-90.）。さらに、天然のARSに代えて又はこれらに加えて、ARSの改変体を系に含めるとともに、非天然アミノ酸群を系に含めることによって、非天然アミノ酸を含むペプチドをコードするmRNAを翻訳することができる。あるいは、リボソームやEF-Tuなどの変異体を利用することによって、非天然アミノ酸を含むペプチドをコードするmRNAの翻訳、およびそれに伴う非天然アミノ酸の導入の効率を高めることもできる（Dedkova LM, et al. Construction of modified ribosomes for incorporation of D-amino acids into proteins. *Biochemistry* 2006, 45, 15541-51., Doi Y, et al. Elongation factor Tu mutants expand amino acid tolerance of protein biosynthesis system. *J Am Chem Soc.* 2007, 129, 14458-62., Park HS, et al. Expanding the genetic code of *Escherichia coli* with phosphoserine. *Science* 2011, 333, 1151-4.）。

[0150] また、翻訳系は、国際公開第2021/117848号に記載される改変されたL31タンパク質を含むリボソームを含んでいてもよい。この場合、改変されたL31タンパク質を含むリボソームは、当該翻訳系に含まれる全リボソームに対し、分子数の比率で、少なくとも50%以上、好ましくは60%以上、より好ましくは70%以上、さらに好ましくは80%以上、特に好ましくは90%以上（例えば91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%以上）の割合で含まれることが好ましい。「全リボソーム」としては、翻訳系に含まれるリボソームである限り

特に限定されないが、改変されたL31タンパク質を含むリボソームとそれ以外のリボソーム（例えば、大腸菌野生型L31を含むリボソームおよびそれと機能的に同等なリボソーム）との合計を例示することができる。

[0151] また、翻訳系は、マグネシウムイオンを含むことが好ましい。リボソームのsmallサブユニットとlargeサブユニットの会合状態の維持にはマグネシウムイオンが必要であることが知られている。L31タンパク質はリボソームのlargeサブユニットとsmallサブユニットの相互作用を形成するタンパク質の一つである。L31タンパク質を欠損しているリボソームや、short L31を含むリボソームは、会合状態を保つために必要なマグネシウムイオン濃度が、intactなL31を含むリボソームより高いことが明らかにされている。したがって、改変されたL31タンパク質を含むリボソームが用いられる本開示における製造方法においては、マグネシウムイオン濃度を、intactなL31を含むリボソームが用いられる翻訳系におけるマグネシウムイオン濃度よりも高くすることが好ましい。このような翻訳系を調製するために、本発明の方法においては、マグネシウムイオンを本発明における翻訳系に加える工程をさらに含むことができる。あるいは、本発明においては、マグネシウムイオンがあらかじめ加えられた翻訳系を使用することもできる。加えられるマグネシウムの量は特に限定されないが、例えば、1 mM以上、2 mM以上、3 mM以上、4 mM以上、5 mM以上、6 mM以上または7 mM以上の値から選択される下限と、9 mM以下、8 mM以下、7 mM以下、6 mM以下、5 mM以下、4 mM以下、3 mM以下から選択される上限との任意の組み合わせによって特定可能な範囲を例示することができる。

[0152] 例えば、翻訳系は、原核生物由来の再構成無細胞タンパク質合成系であってもよく、目的に応じて、tRNA（例えば、任意のアミノアシル化tRNA、非天然アミノ酸に対応する人工アミノアシル化tRNA）、タンパク因子類（例えば、GTP、ATP、クレアチンリン酸、pH緩衝液、酢酸カリウム、スペルミジン、ジチオスレイトール、酵素（例えば、クレアチニンキ

ナーゼ、ミオキナーゼ、無機ピロフォスファターゼ、ヌクレオシドニリン酸キナーゼ)、各種アミノ酸)を含み得る。翻訳系の具体的な成分は、当業者に周知の技術に基づいて選択すればよく、市販の翻訳系を使用してもよい。

[0153] 一態様において、無細胞翻訳系は、第一の非天然アミノ酸が結合した第一の tRNA 及び第二の非天然アミノ酸が結合した第二の tRNA を含む。この場合、第一の tRNA は、第一の非天然アミノ酸をコードするコドンに相補的なアンチコドンを含み、第二の tRNA は、第二の非天然アミノ酸をコードするコドンに相補的なアンチコドンを含む。一方、mRNA の核酸配列中には、第一の非天然アミノ酸をコードするコドン及び第二の非天然アミノ酸をコードするコドンが隣り合う形で含まれている。これにより、mRNA の翻訳を行う際、対応する第一の非天然アミノ酸及び第二の非天然アミノ酸が翻訳ペプチド中に導入される。第一の非天然アミノ酸をコードするコドン及び第二の非天然アミノ酸をコードするコドンは、どちらが 5' 側であってもよい。mRNA 中の配列に合わせて、第一の tRNA 及び第二の tRNA 中におけるアンチコドン及び非天然アミノ酸の組み合わせを適宜変更することにより、所望の非天然アミノ酸の組み合わせを所望の順序で翻訳ペプチド中に導入することができる。

[0154] tRNA

非天然アミノ酸を含むペプチドをコードする mRNA を翻訳することにより非天然アミノ酸をペプチドに導入にするにあっては、直交性を有し効率よくリボソームに取り込まれる tRNA ((i) *Biochemistry* 2003; 42: 9598-6008. Adaptation of an orthogonal archaeal leucyl-tRNA and synthetase pair for four-base, amber, and opal suppression. Anderson JC, Schultz PG., (ii) *Chem Biol.* 2003; 10: 1077-84. Using a solid-phase ribozyme aminoacylation system to reprogram the genetic code. Murakami H, Kourouklis D, Suga H.) のアミノアシル化が必要である。tRNA をアミノアシル化する方法として以下の 5 つの方法を用いることができる。

[0155] 細胞内では tRNA のアミノアシル化のための酵素として、アミノ酸別に

アミノアシル tRNA 合成酵素 (ARS) が用意されている。そのため第一の方法としては、ある種の ARS が N-MeHis など非天然アミノ酸を許容することを利用する方法や、非天然アミノ酸を許容する変異アミノアシル tRNA 合成酵素を用意し、これを利用する方法が挙げられる ((i) Proc Natl Acad Sci U S A. 2002; 99: 9715-20. An engineered Escherichia coli tyrosyl-tRNA synthetase for site-specific incorporation of an unnatural amino acid into proteins in eukaryotic translation and its application in a wheat germ cell-free system. Kiga D, Sakamoto K, Kodama K, Kigawa T, Matsuda T, Yabuki T, Shirouzu M, Harada Y, Nakayama H, Taki o K, Hasegawa Y, Endo Y, Hirao I, Yokoyama S. (ii) Science 2003; 301: 964-7. An expanded eukaryotic genetic code. Chin JW, Cropp TA, Anderson JC, Mukherji M, Zhang Z, Schultz PG. Chin, JW. (iii) Proc Natl Acad Sci U S A. 2006; 103: 4356-61. Enzymatic aminoacylation of tRNA with unnatural amino acids. Hartman MC, Josephson K, Szostak JW.)。第二に、試験管内で tRNA をアミノアシル化しその後アミノ酸を化学修飾する方法も用いることができる (J Am Chem Soc. 2008; 130: 6131-6. Ribosomal synthesis of N-methyl peptides. Subtelny AO, Hartman MC, Szostak JW.)。第三に、tRNA の 3' 末端の CCA 配列から CA を除いたものと別途調製したアミノアシル化した pdCpA とを RNA リガーゼで結合させることでアミノアシル tRNA を得ることができる (Biochemistry 1984; 23: 1468-73. T4 RNA ligase mediated preparation of novel "chemically misacylated" tRNAPheS. Heckler TG, Chang LH, Zama Y, Naka T, Chorghade MS, Hecht SM.)。種々の非天然アミノ酸の活性エステルを tRNA に担持させるリボザイムであるフレキシザイムによるアミノアシル化もある (J Am Chem Soc. 2002; 124: 6834-5. Aminoacyl-tRNA synthesis by a resin-immobilized ribozyme. Murakami H, Bonzagni NJ, Suga H.)。第四に、tRNA とアミノ酸活性エステルとをカチオン性ミセル中で超音波混合する方法も用いることができる (Chem Commun (Camb). 2005; (34): 4321-3. Simple and qu

ick chemical aminoacylation of tRNA in cationic micellar solution under ultrasonic agitation. Hashimoto N, Ninomiya K, Endo T, Sisido M. )。第五として、tRNAの3'末端付近に相補的なPNAにアミノ酸活性エステルを結合したものをtRNAに加えることによってもアミノアシル化が可能である(J Am Chem Soc. 2004; 126: 15984-9. In situ chemical aminoacylation with amino acid thioesters linked to a peptide nucleic acid. Ninomiya K, Minohata T, Nishimura M, Sisido M.)。

[0156] より具体的には、以下のような方法を用いてアミノアシルtRNAを作製することができる。所望のtRNA配列をコードし、上流にT7、T3もしくはSP6プロモーターを配置した鋳型DNAを用意し、T7 RNA polymeraseやT3, SP6 RNA polymeraseなどプロモーターに適応したRNAポリメラーゼを利用して転写によってRNAを合成することができる。細胞からtRNAを抽出精製し、tRNAの配列の相補配列のプローブを用いて目的の生成tRNAを抽出することもできる。この際目的のtRNAの発現ベクターで形質転換した細胞をソースにすることもできる。化学合成によって目的の配列のRNAを合成することもできる。例えば、このようにして得られた3'末端のCCA配列からCAを除いたtRNAと別途調製したアミノアシル化したpdCpAまたはpCpAとをRNAリガーゼで結合させることでアミノアシルtRNAを得ることができる(pdCpA法、pCpA法)。当該tRNAは、ペプチドの製造において有用である。あるいは、全長tRNAを用意し、種々の非天然アミノ酸の活性エステルをtRNAに担持させるリボザイムであるフレキシザイムによるアミノアシル化も可能である。また、限定を意図しないが、天然のARS又はその改変体を用いて、アミノアシルtRNAを作製することもできる。天然ARS又はその改変体を用いると、翻訳系内で一旦消費されたアミノアシルtRNAが、天然ARSやその改変体によって再生成され得るため、予め作製したアミノアシルtRNAを翻訳系に大量に存在させる必要がない。このようなARS改変体は、国際公開第2016/148044号に記載される。これらのアミノアシルtRNAの作

製方法を適宜組み合わせることもできる。

[0157] 第一の tRNA 及び第二の tRNA は、人工 tRNA であってもよく、転写 tRNA であってもよい。また、第一の tRNA 及び第二の tRNA は、天然に存在する tRNA に由来するボディーを有していてもよい。本明細書において tRNA の「ボディー」とは、アンチコドンを除く tRNA の本体部分を指す。本明細書において、「天然に存在する tRNA に由来するボディー」とは、tRNA のボディーが天然に存在する tRNA のボディーと同一のポリヌクレオチド配列を有することを意味する。すなわち、一態様において、第一の tRNA 及び第二の tRNA は、天然に存在する tRNA のボディーに、非天然アミノ酸が結合したものであり得る。

[0158] ペプチドの環化

一態様において、ペプチドは環状ペプチドであり、一部又は全部のアミノ酸残基が環状構造を構成している。環状ペプチドを製造する際には、必ずしも翻訳工程のみでは十分ではなく、別途、翻訳されたペプチドを環化する工程をさらに含むことができる。環化の態様として、例えば、アミド結合、炭素-炭素結合、チオエーテル結合、ジスルフィド結合、エステル結合、チオエステル結合、ラクタム結合、トリアゾール構造を介した結合、フルオロフォア構造を介した結合等を利用した環化が挙げられる。中でも代謝安定性が高いことから、アミド結合が好ましい。ペプチドの翻訳工程と環化反応の工程は、分離していても、連続して進行してもよい。環化は、例えば国際公開第 2013/100132 号、国際公開第 2008/117833 号、国際公開第 2012/074129 号等に記載された当業者に公知の方法により行うことができる。

[0159] 環形成における結合の態様は、限定されないが、ペプチドの N 末端と C 末端の結合、ペプチドの N 末端と他のアミノ酸残基の側鎖の結合、ペプチドの C 末端と他のアミノ酸残基の側鎖の結合、又はアミノ酸残基の側鎖同士の結合のいずれであってもよく、これらの二以上を組み合わせ使用してもよい。

## [0160] [ペプチド複合体]

本実施形態に係るペプチドは、核酸等の別の分子と複合体を形成し得る。本明細書においてこの複合体をペプチド複合体と称する。一態様において、ペプチド複合体は、本実施形態に係るペプチドに、核酸、リボソーム、スペーサー、及びリンカーからなる群より選ばれる1つ以上をさらに結合させることで得られる。ペプチド複合体としては、ペプチドと核酸が連結した、ペプチド-核酸複合体が好ましい。当該ペプチド-核酸複合体においては、ペプチドと核酸との間にスペーサー及びリンカーからなる群より選ばれる1つ以上を適宜存在させることができる。リンカーとしてはピューロマイシン及びヘキサエチレングリコール (s p c 1 8) のポリマー (例えば5つのポリマー) が例示され、スペーサーとしてはアミノ酸が例示される。

ここでいう核酸は、表現型であるペプチドをコードする核酸、すなわち当該ペプチドの遺伝子型であるRNAもしくはDNAであることができ、より好ましくはRNAであり、最も好ましくはmRNAである。ペプチド-核酸複合体を製造する方法としては、アミノアシルtRNAのアナログである抗生物質ピューロマイシンがリボソームによるmRNA翻訳伸長中のペプチドに非特異的に連結されることを利用する方法が例示される。例えば、mRNAの3'端に適当なリンカーを介してピューロマイシンを結合させ、無細胞翻訳系で前記mRNAを翻訳させるとピューロマイシンがリボソームによってアミノ酸の代わりにペプチドに取り込まれ、mRNAとこれにコードされるペプチドが連結され、mRNAとその産物であるペプチドが対応付けられたペプチド-核酸複合体になる。一態様において、本実施形態に係るペプチド (目的ペプチド) をコードする塩基配列の下流にスペーサーをコードする塩基配列を含む核酸を、ペプチド-核酸複合体の製造に使用することができる。前記スペーサーとしては、グリシンやセリンを含む配列が挙げられるがこれに限定しない。またピューロマイシンと前記核酸の間には、RNA、DNA、ヘキサエチレングリコール (s p c 1 8) のポリマー (例えば5つのポリマー) などで形成されるリンカーを含むことが好ましい。一態様において

、ピューロマイシンの代わりにピューロマイシンの類縁体を使用してペプチド-核酸複合体を製造することができる。ペプチド-核酸複合体は、mRNAディスプレイ(Proc Natl Acad Sci USA, 1997; 94: 12297-302, RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins, Roberts R W, Szostak J.W.)ないしはin vitro virus(FEBS Lett, 1997; 414: 405-8, In vitro virus: bonding of mRNA bearing puromycin at the 3'-terminal end to the C-terminal end of its encoded protein on the ribosome in vitro, Nemoto N, Miyamoto-Sato E, Husimi Y, Yanagawa H.)として報告されている。

[0161] 一態様において、本発明は、例えば、以下の工程を含むペプチドまたはペプチドを含むライブラリの製造方法に関する：

(1) 1種または複数種の非天然アミノ酸を含む非環状のペプチドを、本明細書に記載の方法によって製造する工程であって、該非環状のペプチドは、C末端側に側鎖の1つに反応点を有するアミノ酸残基、及び、N末端側にもう1つの反応点を有するアミノ酸残基を含む、工程；及び

(2) N末端側のアミノ酸残基の反応点と、C末端側の側鎖に反応点有するアミノ酸残基の当該反応点とを結合させ、アミド結合、炭素-炭素結合又はチオエーテル結合を形成させる工程。

[0162] なお、これら(1)と(2)の工程は、独立して実施しても、連続的に実施してもよい。また、本明細書におけるライブラリは、核酸によりタグ付け(すなわち、エンコード)されたペプチドのライブラリ(例えば、DNAエンコードライブラリ；DNA-encoded library/DEL、mRNAディスプレイライブラリ、DNAディスプレイライブラリ；例えばMolecules, 2019 Apr; 24(8): 1629,を参照。)であるディスプレイライブラリ又はタグ付けされていないペプチドのライブラリであり、好ましくはディスプレイライブラリであり、より好ましくはmRNAディスプレイライブラリ、DNAディスプレイライブラリ、リボソームディスプレイライブラリであり、最も好ましくはmRNAディスプレイライブラリである。

[0163] 具体的には、アミド結合によるペプチドの環化方法の一態様として、N末端のメチオニンのアミノ基と下流（C末端側）に配置したリジンのアミノ基をジスクシンイミジル・グルタレート（DSG）でクロスリンクさせることによる環化方法、N末端の翻訳開始アミノ酸としてクロロアセチル基を有するアミノ酸誘導体を導入し、下流にCysを配置することによって分子内環化反応によりチオエーテルを形成させることによる環化方法、N末端にシステインまたはシステイン類縁体を持ち、C末端側のアミノ酸の側鎖に活性エステルを持つペプチドを翻訳してネイティブケミカルライゲーションを用いる環化方法が挙げられる。

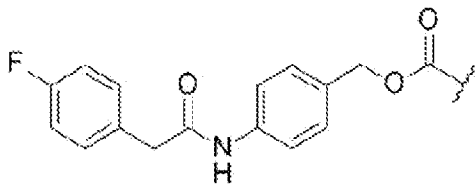
[0164] 一態様において、本開示におけるペプチドのC末端部位はカルボン酸のままではなく、化学修飾されていてよい。例えば、カルボン酸部位をピペリジンなどと反応させ、ピペリジンアミドなどに変換してよい。

### 実施例

[0165] 本発明は、以下の実施例によってさらに例示されるが、下記の実施例に限定されるものではない。なお、実施例中では以下の略号を使用した。

AA	酢酸アンモニウム
CH <sub>2</sub> CN	シアノメチル基
DBU	1, 8-ジアザビシクロ [5. 4. 0] -7-ウンデセン
DCM	ジクロロメタン
DIPEA	N-ジイソプロピルエチルアミン
DMF	ジメチルホルムアミド
DMSO	ジメチルスルホキシド
FA	ギ酸
Fmoc	9-フルオレニルメチルオキシカルボニル基
F-Pnaz	4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジルオキシカルボニル基 :

[化28]



MeCN            アセトニトリル  
 TEA            トリエチルアミン  
 TFA            トリフルオロ酢酸  
 THF            テトラヒドロフラン

[0166] また、本実施例では、以下の略号を用いた。GlyまたはG（グリシン）、IleまたはI（イソロイシン）、LeuまたはL（ロイシン）、PheまたはF（フェニルアラニン）、ProまたはP（プロリン）、ThrまたはT（トレオニン）。

[0167] また、LCMSの分析条件を、表1に示す。

[表1]

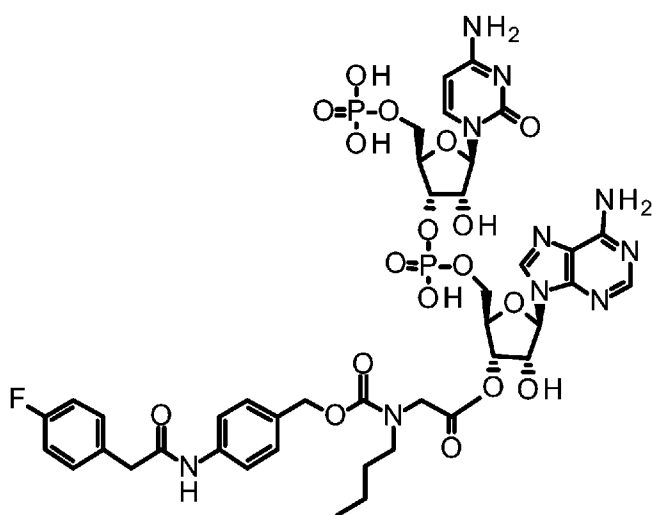
分取条件	SQDFA05
装置	Acquity UPLC/SQD2
カラム (I.D.×長さ(mm))	Aldrich Ascentis Express C18 2.7 μm (2.1×50)
移動相	A) 0.1% ギ酸水溶液 B) 0.1% ギ酸アセトニトリル溶液
勾配(A/B)	95/5 → 0/100 (1.0分間) → 0/100 (0.4分間)
流速(mL/分)	0.9
カラム温度(°C)	35
検出波長	210~440 nm (PDA total)

[0168] 実施例1. 無細胞翻訳系に用いるアミノアシルpCpAの合成

以下のスキームに従い、アミノアシル化pCpA（化合物ST01、ST04、ST07、ST10、ST13、ST16、ST19、ST22、ST25、ST28、ST31、ST34、ST37、ST40、ST41、ST42）を合成した。

[0169] [(2R, 3S, 4R, 5R) - 2 - [ [ [ (2R, 3S, 4R, 5R) - 5 - (4 - アミノ - 2 - オキソピリミジン - 1 - イル) - 4 - ヒドロキシ - 2 - (ホスホノオキシメチル) オキソラン - 3 - イル] オキシ - ヒドロキシホスホリル] オキシメチル] - 5 - (6 - アミノプリン - 9 - イル) - 4 - ヒドロキシオキソラン - 3 - イル] 2 - [ブチル - [ [4 - [ [2 - (4 - フルオロフェニル) アセチル] アミノ] フェニル] メトキシカルボニル] アミノ] アセテート (化合物ST01) の合成

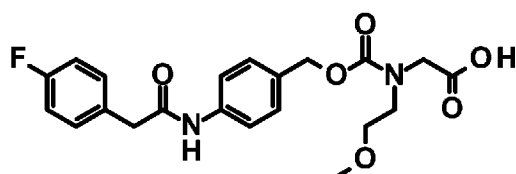
[化29]



[0170] 特許文献 (国際公開第2018/143145号) に記載の方法にしたがい、化合物ST01を合成した。

[0171] 2 - [ [4 - [ [2 - (4 - フルオロフェニル) アセチル] アミノ] フェニル] メトキシカルボニル - (2 - メトキシエチル) アミノ] 酢酸 (化合物ST02) の合成

[化30]



[0172] 窒素雰囲気下、2-ヨード酢酸 (37.2 mg、0.2 mmol) を水 (0.5 mL) に溶解し0°Cで5分間攪拌した。そこへ2-メトキシエタン-

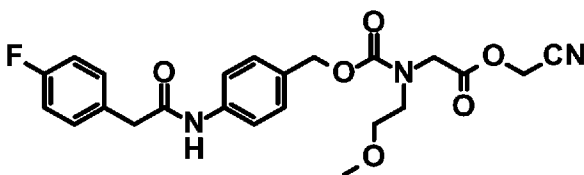
1-アミン (30.0 mg、0.4 mmol) 及び DIPEA (70.0  $\mu$ L、0.4 mmol) のアセトニトリル溶液 (0.5 mL) を 0°C にて加えた。室温にて 60 時間攪拌した後、DMSO (2.0 mL) を加えてから反応液を濃縮しアセトニトリルと水を留去した。得られた DMSO 溶液に対して、特許文献 (国際公開第 2018/143145 号) 記載の方法で合成した炭酸-(4-ニトロフェニル)-4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル (170.0 mg、0.40 mmol) 及び DIPEA (70.0  $\mu$ L、0.4 mmol) を順番に加えて 40°C において 4 時間攪拌した後、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (0.1%ギ酸水溶液/0.1%ギ酸アセトニトリル溶液) にて精製し、表題化合物 (化合物 ST02) (30 mg、収率 36%) を得た。

LCMS (ESI)  $m/z = 417.2$  (M-H)<sup>-</sup>

保持時間: 0.66 分 (分析条件 SQDFA05)

[0173] シアノメチル 2-[[4-[[2-(4-フルオロフェニル)アセチル]アミノ]フェニル]メトキシカルボニル-(2-メトキシエチル)アミノ]アセテート (化合物 ST03) の合成

[化31]



[0174] 窒素雰囲気下、2-[[4-[[2-(4-フルオロフェニル)アセチル]アミノ]フェニル]メトキシカルボニル-(2-メトキシエチル)アミノ]酢酸 (化合物 ST02) (21.0 mg、0.05 mmol) のアセトニトリル溶液 (0.25 mL) に、2-ブロモアセトニトリル (30.0  $\mu$ L、0.45 mmol) 及び DIPEA (11.0  $\mu$ L、0.07 mmol) を室温にて順番に加えた。反応混合物を室温にて 1 時間攪拌したのち反応液を濃縮し、表題化合物 (化合物 ST03) を粗生成物として得た。得られた粗生成物をアセトニトリル (3.0 mL) に溶解し、そのまま次工程に用い

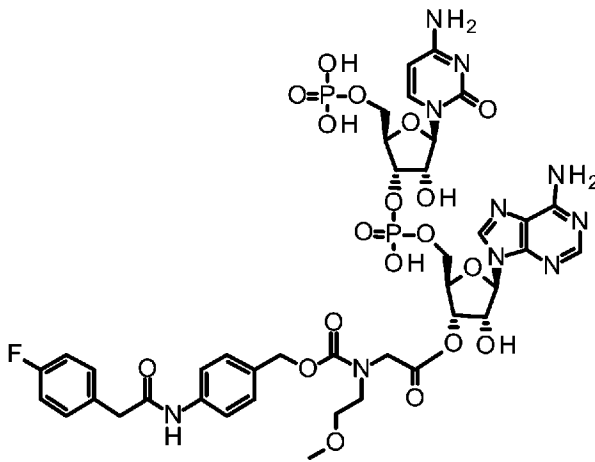
た。

LCMS (ESI)  $m/z = 456.3$  (M-H) -

保持時間：0.77分 (分析条件SQDFA05)

[0175] [(2R, 3S, 4R, 5R) - 2 - [[[(2R, 3S, 4R, 5R) - 5 - (4-アミノ-2-オキソピリミジン-1-イル) - 4-ヒドロキシ-2-(ホスホノオキシメチル) オキソラン-3-イル] オキシ-ヒドロキシホスホリル] オキシメチル] - 5 - (6-アミノプリン-9-イル) - 4-ヒドロキシオキソラン-3-イル] 2 - [[4 - [[2 - (4-フルオロフェニル) アセチル] アミノ] フェニル] メトキシカルボニル - (2-メトキシエチル) アミノ] アセテート (化合物ST04) の合成

[化32]



[0176] 緩衝液A (60.0 mL) に、文献 (Helv. Chim. Acta, 90, 297-310) 記載の方法で合成したリン酸二水素 ((2R, 3R, 4R, 5R) - 5 - (4-アミノ-2-オキソピリミジン-1(2H)-イル) - 3 - (((2R, 3S, 4R, 5R) - 5 - (6-アミノ-9H-プリン-9-イル) - 3, 4-ジヒドロキシテトラヒドロフラン-2-イル) メトキシ) (ヒドロキシ) ホスホリル) オキシ) - 4 - ((テトラヒドロフラン-2-イル) オキシ) テトラヒドロフラン-2-イル) メチル (36 mg、0.05 mmol) を溶解させ、シアノメチル 2 - [[4 - [[2 - (4-フルオロフェニル) アセチル] アミノ] フェニル] メトキシカルボニル - (2-メトキシ

エチル) アミノ] アセテート (化合物ST03) のアセトニトリル溶液 (3.0 mL、0.05 mmol) を加え、室温で90分攪拌した。反応液を0℃に冷却した後に、トリフルオロ酢酸 (3.0 mL) を加えた。反応液を室温にて30分攪拌したのちに、反応液を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィ (0.05%トリフルオロ酢酸水溶液/0.05%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液) にて精製し、表題化合物 (化合物ST04) (11.0 mg、21%) を得た。

LCMS (ESI)  $m/z = 1051.5$  (M-H)<sup>-</sup>

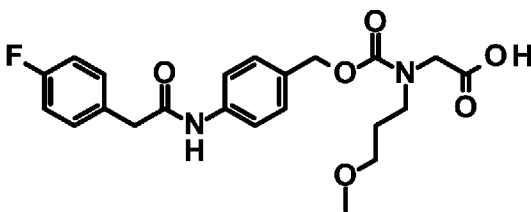
保持時間: 0.49分 (分析条件SQDFA05)

[0177] 緩衝液Aは以下のように調製した。

[0178] N, N, N-トリメチルヘキサデカン-1-アミニウム 塩化物 (6.40 g、20 mmol) とイミダゾール (6.81 g、100 mmol) の水溶液に酢酸を添加し、pH8、20 mM N, N, N-トリメチルヘキサデカン-1-アミニウム、100 mMイミダゾールの緩衝液A (1 L) を得た。

[0179] 2-[[4-[[2-(4-フルオロフェニル)アセチル]アミノ]フェニル]メトキシカルボニル-(3-メトキシプロピル)アミノ]酢酸 (化合物ST05) の合成

[化33]



[0180] 窒素雰囲気下、2-ヨード酢酸 (37.2 mg、0.2 mmol) を水 (0.5 mL) に溶解し0℃で5分間攪拌した。そこへ3-メトキシプロパン-1-アミン (35.7 mg、0.4 mmol) 及びDIPEA (70.0 μL、0.4 mmol) のアセトニトリル溶液 (0.5 mL) を0℃にて加えた。室温にて60時間攪拌した後DMSO (2.0 mL) を加えてから反

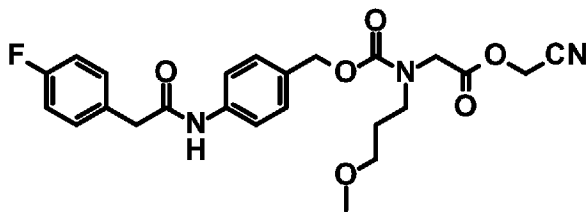
応液を濃縮しアセトニトリルと水を留去した。得られたDMSO溶液に対して特許文献（国際公開第2018/143145号）記載の方法で合成した炭酸-(4-ニトロフェニル)-4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル(170.0mg、0.40mmol)及びDIPEA(70.0μL、0.4mmol)を順番に加え40℃において4時間撹拌したのち、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー(0.1%ギ酸水溶液/0.1%ギ酸アセトニトリル溶液)にて精製し、表題化合物(化合物ST05)(30mg、収率35%)を得た。

LCMS(ESI)  $m/z = 431.7$  (M-H)<sup>-</sup>

保持時間: 0.67分(分析条件SQDFA05)

[0181] シアノメチル 2-[[4-[[2-(4-フルオロフェニル)アセチル]アミノ]フェニル]メトキシカルボニル-(3-メトキシプロピル)アミノ]アセテート(化合物ST06)の合成

[化34]



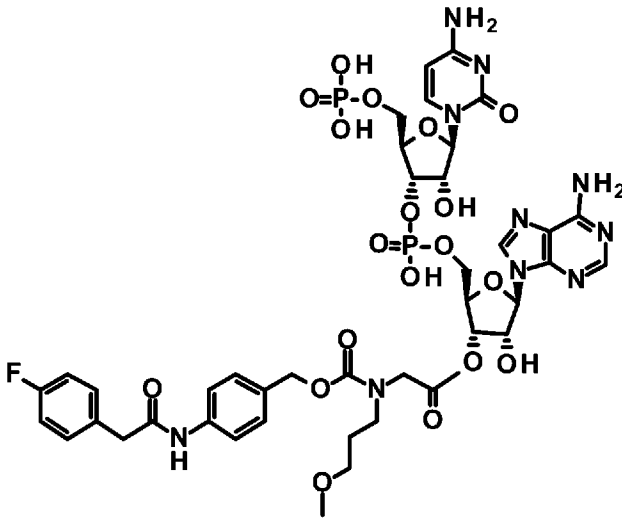
[0182] 窒素雰囲気下、2-[[4-[[2-(4-フルオロフェニル)アセチル]アミノ]フェニル]メトキシカルボニル-(2-メトキシエチル)アミノ]酢酸(化合物ST05)(22.0mg、0.05mmol)のアセトニトリル溶液(0.25mL)に、2-ブロモアセトニトリル(30.0μL、0.45mmol)及びDIPEA(11.0μL、0.07mmol)を室温にて順番に加えた。反応混合物を室温にて1時間撹拌したのち反応液を濃縮し、表題化合物(化合物ST06)を粗生成物として得た。得られた粗生成物をアセトニトリル(3.0mL)に溶解し、そのまま次工程に用いた。

LCMS(ESI)  $m/z = 470.3$  (M-H)<sup>-</sup>

保持時間：0.76分（分析条件SQDFA05）

[0183] [(2R, 3S, 4R, 5R) - 2 - [[[(2R, 3S, 4R, 5R) - 5 - (4-アミノ-2-オキソピリミジン-1-イル) - 4-ヒドロキシ-2-(ホスホノオキシメチル) オキソラン-3-イル] オキシ-ヒドロキシホスホリル] オキシメチル] - 5 - (6-アミノプリン-9-イル) - 4-ヒドロキシオキソラン-3-イル] 2 - [[4 - [[2 - (4-フルオロフェニル) アセチル] アミノ] フェニル] メトキシカルボニル - (3-メトキシプロピル) アミノ] アセテート (化合物ST07) の合成

[化35]



[0184] 緩衝液A (60.0 mL) に、文献 (Helv. Chim. Acta, 90, 297-310) 記載の方法で合成したリン酸二水素 ((2R, 3R, 4R, 5R) - 5 - (4-アミノ-2-オキソピリミジン-1(2H)-イル) - 3 - (((2R, 3S, 4R, 5R) - 5 - (6-アミノ-9H-プリン-9-イル) - 3,4-ジヒドロキシテトラヒドロフラン-2-イル) メトキシ) (ヒドロキシ) ホスホリル) オキシ) - 4 - ((テトラヒドロフラン-2-イル) オキシ) テトラヒドロフラン-2-イル) メチル (36 mg、0.05 mmol) を溶解させ、シアノメチル 2 - [[4 - [[2 - (4-フルオロフェニル) アセチル] アミノ] フェニル] メトキシカルボニル - (2-メトキシエチル) アミノ] アセテート (化合物ST06) のアセトニトリル溶液 (3

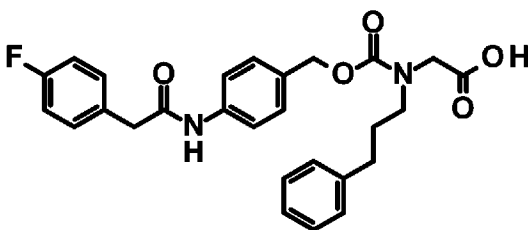
. 0 mL、0.05 mmol) を加え、室温で120分攪拌した。反応液を0°Cに冷却した後に、トリフルオロ酢酸 (3.0 mL) を加えた。反応液を室温にて30分攪拌したのちに、反応液を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (0.05%トリフルオロ酢酸水溶液/0.05%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液) にて精製し、表題化合物 (化合物ST07) (11.0 mg、収率21%) を得た。

LCMS (ESI)  $m/z = 1065.7$  (M-H)<sup>-</sup>

保持時間: 0.50分 (分析条件SQDFA05)

[0185] 2-[[4-[[2-(4-フルオロフェニル)アセチル]アミノ]フェニル]メトキシカルボニル-(3-フェニルプロピル)アミノ]酢酸 (化合物ST08) の合成

[化36]



[0186] 窒素雰囲気下、2-ヨード酢酸 (37.2 mg、0.2 mmol) を水 (0.5 mL) に溶解し0°Cで5分間攪拌した。そこへ3-フェニルプロパン-1-アミン (54.1 mg、0.4 mmol) 及びDIPEA (70.0  $\mu$ L、0.4 mmol) のアセトニトリル溶液 (0.5 mL) を0°Cにて加えた。室温にて16時間攪拌した後DMSO (2.0 mL) を加えてから反応液を濃縮しアセトニトリルと水を留去した。得られたDMSO溶液に対して特許文献 (国際公開第2018/143145号) 記載の方法で合成した炭酸-(4-ニトロフェニル)-4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル (170.0 mg、0.40 mmol) 及びDIPEA (70.0  $\mu$ L、0.4 mmol) を順番に加え40°Cにおいて4時間攪拌したのち、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (0.1%ギ酸水溶液/0.1%ギ酸アセトニトリル溶液) にて精製し、表題化合物 (化合物ST

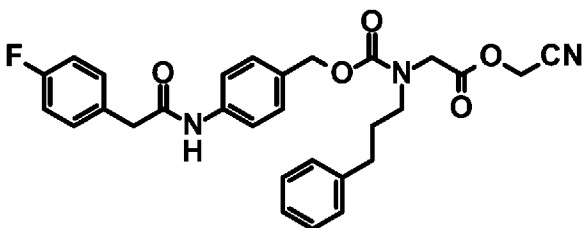
08) (40 mg、収率42%)を得た。

LCMS (ESI)  $m/z = 477.2$  (M-H) -

保持時間: 0.83分 (分析条件SQDFA05)

[0187] シアノメチル 2-[[4-[[2-(4-フルオロフェニル)アセチル]  
アミノ]フェニル]メトキシカルボニル-(3-フェニルプロピル)アミノ  
]アセテート (化合物ST9) の合成

[化37]



[0188] 窒素雰囲気下、2-[[4-[[2-(4-フルオロフェニル)アセチル]  
]アミノ]フェニル]メトキシカルボニル-(3-フェニルプロピル)アミ  
ノ]酢酸 (化合物ST08) (24.0 mg、0.05 mmol) のアセト  
ニトリル溶液 (0.25 mL) に、2-ブロモアセトニトリル (23.0 μ  
L、0.35 mmol) 及びDIPEA (11.0 μL、0.06 mmol)  
) を室温にて順番に加えた。反応混合物を室温にて5時間攪拌したのち反応  
液を濃縮し、表題化合物 (化合物ST9) を粗生成物として得た。得られた  
粗生成物をアセトニトリル (1.5 mL) に溶解し、そのまま次工程に用い  
た。

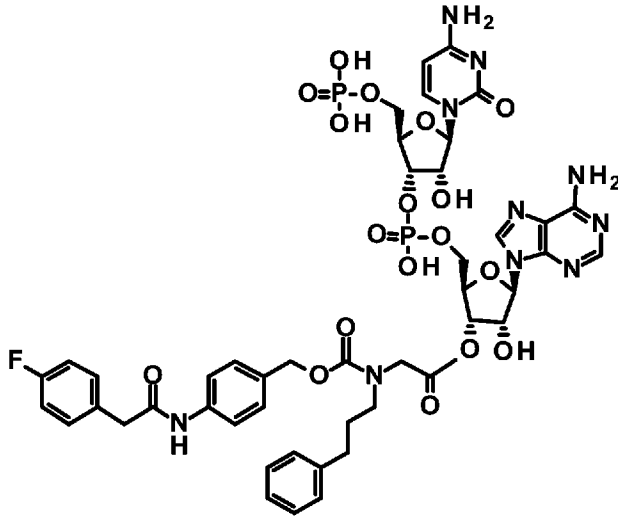
LCMS (ESI)  $m/z = 516.3$  (M-H) -

保持時間: 0.90分 (分析条件SQDFA05)

[0189] [(2R, 3S, 4R, 5R)-2-[[[(2R, 3S, 4R, 5R)-  
5-(4-アミノ-2-オキソピリミジン-1-イル)-4-ヒドロキシ-  
2-(ホスホノオキシメチル)オキソラン-3-イル]オキシ-ヒドロキシ  
ホスホリル]オキシメチル]-5-(6-アミノプリン-9-イル)-4-  
ヒドロキシオキソラン-3-イル] 2-[[4-[[2-(4-フルオロ  
フェニル)アセチル]アミノ]フェニル]メトキシカルボニル-(3-フェ

ニルプロピル) アミノ] アセテート (化合物 S T 1 0) の合成

[化38]



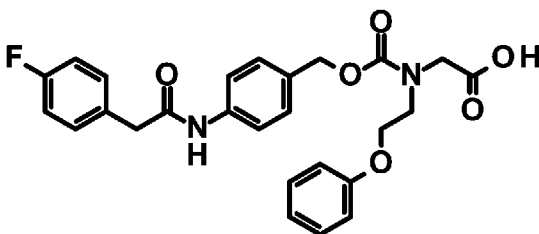
[0190] 緩衝液 A (30.0 mL) に、文献 (Helv. Chim. Acta, 90, 297-310) 記載の方法で合成したリン酸二水素 ((2R, 3R, 4R, 5R) - 5 - (4-アミノ-2-オキソピリミジン-1(2H)-イル) - 3 - (((2R, 3S, 4R, 5R) - 5 - (6-アミノ-9H-プリン-9-イル) - 3, 4-ジヒドロキシテトラヒドロフラン-2-イル) メトキシ) (ヒドロキシ) ホスホリル) オキシ) - 4 - ((テトラヒドロフラン-2-イル) オキシ) テトラヒドロフラン-2-イル) メチル (36 mg、0.05 mmol) を溶解させ、シアノメチル 2-[[4-[[2-(4-フルオロフェニル) アセチル] アミノ] フェニル] メトキシカルボニル-(2-メトキシエチル) アミノ] アセテート (化合物 S T 9) のアセトニトリル溶液 (1.5 mL、0.05 mmol) を加え、室温で90分攪拌した。反応液を0℃に冷却した後に、トリフルオロ酢酸 (1.5 mL) を加えた。反応液を室温にて30分攪拌したのちに、反応液を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (0.05%トリフルオロ酢酸水溶液/0.05%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液) にて精製し、表題化合物 (化合物 S T 1 0) (11.0 mg、収率20%) を得た。

LCMS (ESI)  $m/z = 1111.5$  (M-H) -

保持時間：0.59分（分析条件SQDFA05）

[0191] 2-[[4-[[2-(4-フルオロフェニル)アセチル]アミノ]フェニル]メトキシカルボニル-(2-フェノキシエチル)アミノ]酢酸（化合物ST11）の合成

[化39]



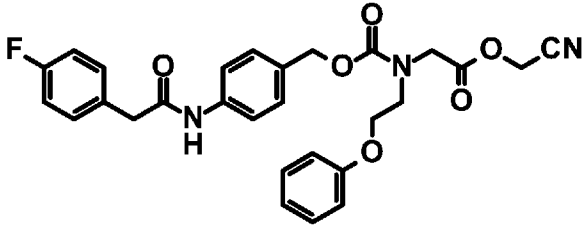
[0192] 窒素雰囲気下、2-ヨード酢酸（37.2mg、0.2mmol）を水（0.5mL）に溶解し0℃で5分間攪拌した。そこへ2-フェノキシエタン-1-アミン（54.9mg、0.4mmol）及びDIPEA（70.0μL、0.4mmol）のアセトニトリル溶液（0.5mL）を0℃にて加えた。室温にて16時間攪拌した後DMSO（2.0mL）を加えてから反応液を濃縮しアセトニトリルと水を留去した。得られたDMSO溶液に対して特許文献（国際公開第2018/143145号）記載の方法で合成した炭酸-(4-ニトロフェニル)-4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル（170.0mg、0.40mmol）及びDIPEA（70.0μL、0.4mmol）を順番に加え40℃において4時間攪拌したのち、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（0.1%ギ酸水溶液/0.1%ギ酸アセトニトリル溶液）にて精製し、表題化合物（化合物ST11）（41mg、収率43%）を得た。

LCMS (ESI)  $m/z = 479.3$  (M-H)<sup>-</sup>

保持時間：0.79分（分析条件SQDFA05）

[0193] シアノメチル 2-[[4-[[2-(4-フルオロフェニル)アセチル]アミノ]フェニル]メトキシカルボニル-(2-フェノキシエチル)アミノ]アセテート（化合物ST12）の合成

[化40]



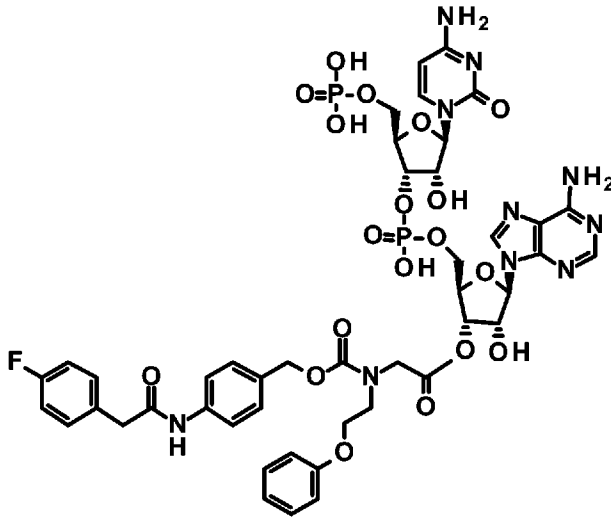
[0194] 窒素雰囲気下、2-[[4-[[2-(4-フルオロフェニル)アセチル]アミノ]フェニル]メトキシカルボニル-(2-フェノキシエチル)アミノ]酢酸(化合物ST11)(24.0mg、0.05mmol)のアセトニトリル溶液(0.25mL)に、2-ブロモアセトニトリル(23.0 $\mu$ L、0.35mmol)及びDIPEA(11.0 $\mu$ L、0.06mmol)を室温にて順番に加えた。反応混合物を室温にて5時間攪拌したのち反応液を濃縮し、表題化合物(化合物ST12)を粗生成物として得た。得られた粗生成物をアセトニトリル(1.5mL)に溶解し、そのまま次工程に用いた。

LCMS(ESI)  $m/z = 518.2$  (M-H)<sup>-</sup>

保持時間: 0.87分(分析条件SQDFA05)

[0195] [(2R, 3S, 4R, 5R)-2-[[[(2R, 3S, 4R, 5R)-5-(4-アミノ-2-オキソピリミジン-1-イル)-4-ヒドロキシ-2-(ホスホノオキシメチル)オキソラン-3-イル]オキシ-ヒドロキシホスホリル]オキシメチル]-5-(6-アミノプリン-9-イル)-4-ヒドロキシオキソラン-3-イル] 2-[[4-[[2-(4-フルオロフェニル)アセチル]アミノ]フェニル]メトキシカルボニル-(2-フェノキシエチル)アミノ]アセテート(化合物ST13)の合成

[化41]



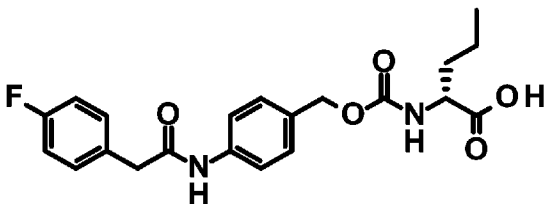
[0196] 緩衝液 A (30.0 mL) に、文献 (Helv. Chim. Acta, 90, 297-310) 記載の方法で合成したリン酸二水素 ((2R, 3R, 4R, 5R) - 5 - (4-アミノ-2-オキソピリミジン-1(2H)-イル) - 3 - (((2R, 3S, 4R, 5R) - 5 - (6-アミノ-9H-プリン-9-イル) - 3, 4-ジヒドロキシテトラヒドロフラン-2-イル) メトキシ) (ヒドロキシ) ホスホリル) オキシ) - 4 - ((テトラヒドロフラン-2-イル) オキシ) テトラヒドロフラン-2-イル) メチル (36 mg、0.05 mmol) を溶解させ、シアノメチル 2-[[4-[[2-(4-フルオロフェニル) アセチル] アミノ] フェニル] メトキシカルボニル-(2-フェノキシエチル) アミノ] アセテート (化合物 ST12) のアセトニトリル溶液 (1.5 mL、0.05 mmol) を加え、室温で90分攪拌した。反応液を0°Cに冷却した後に、トリフルオロ酢酸 (1.5 mL) を加えた。反応液を室温にて30分攪拌したのちに、反応液を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (0.05%トリフルオロ酢酸水溶液/0.05%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液) にて精製し、表題化合物 (化合物 ST13) (11.0 mg、収率20%) を得た。

LCMS (ESI)  $m/z = 1113.4$  (M-H) -

保持時間: 0.57分 (分析条件 SQDFA05)

[0197] (2R)-2-[[4-[[2-(4-フルオロフェニル)アセチル]アミノ]フェニル]メトキシカルボニルアミノ]ペンタン酸 (化合物ST14)  
の合成

[化42]



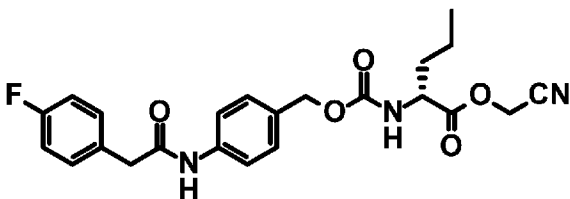
[0198] 窒素雰囲気下、(R)-2-アミノペンタンカルボン酸 (11.7 mg、0.1 mmol) 及び特許文献 (国際公開第2018/143145号) 記載の方法で合成した炭酸-(4-ニトロフェニル)-4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル (42.4 mg、0.1 mmol) をDMSO (0.5 mL) に加え室温で5分間攪拌した。トリエチルアミン (20.9  $\mu$ L、0.15 mmol) を0度にて添加したのち反応混合物を室温で16時間攪拌後、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (0.1%ギ酸水溶液/0.1%ギ酸アセトニトリル溶液) にて精製し、表題化合物 (化合物ST14) (33 mg、収率82%) を得た。

LCMS (ESI)  $m/z = 401.3$  (M-H)<sup>-</sup>

保持時間: 0.71分 (分析条件SQDFA05)

[0199] シアノメチル (2R)-2-[[4-[[2-(4-フルオロフェニル)アセチル]アミノ]フェニル]メトキシカルボニルアミノ]ペンタノアト (化合物ST15) の合成

[化43]



[0200] 窒素雰囲気下、(2R)-2-[[4-[[2-(4-フルオロフェニル)アセチル]アミノ]フェニル]メトキシカルボニルアミノ]ペンタン酸 (

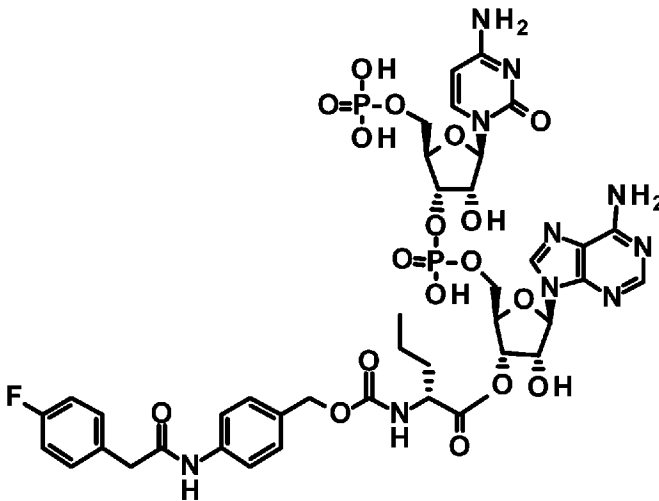
化合物ST14) (20.0 mg、0.05 mmol) のアセトニトリル溶液 (0.25 mL) に、2-ブロモアセトニトリル (10.1  $\mu$ L、0.15 mmol) 及びDIPEA (10.5  $\mu$ L、0.06 mmol) を室温にて順番に加えた。反応混合物を室温にて16時間攪拌したのち反応液を濃縮し、表題化合物 (化合物ST15) を粗生成物として得た。得られた粗生成物をアセトニトリル (1.5 mL) に溶解し、そのまま次工程に用いた。

LCMS (ESI)  $m/z = 440.3$  (M-H)<sup>-</sup>

保持時間: 0.80分 (分析条件SQDFA05)

[0201] [(2R, 3S, 4R, 5R) -2-[[[(2R, 3S, 4R, 5R) -5-(4-アミノ-2-オキソピリミジン-1-イル) -4-ヒドロキシ-2-(ホスホノオキシメチル) オキソラン-3-イル] オキシ-ヒドロキシホスホリル] オキシメチル] -5-(6-アミノプリン-9-イル) -4-ヒドロキシオキソラン-3-イル] (2R) -2-[[4-[[2-(4-フルオロフェニル) アセチル] アミノ] フェニル] メトキシカルボニルアミノ] ペンタノアト (化合物ST16) の合成

[化44]



[0202] 緩衝液A (30.0 mL) に、文献 (Helv. Chim. Acta, 90, 297-310) 記載の方法で合成したリン酸二水素 ((2R, 3R, 4R, 5R) -5-(4-アミノ-2-オキソピリミジン-1(2H)-イル) -3-(((2R, 3S, 4R, 5R) -5-(6-アミノ-9H-プリン-9-イル) -

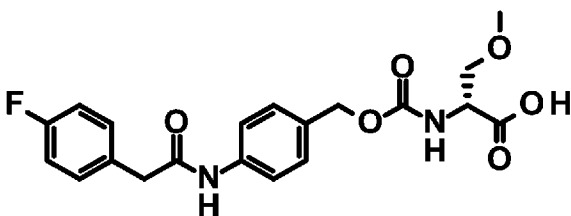
3, 4-ジヒドロキシテトラヒドロフラン-2-イル) メトキシ) (ヒドロキシ) ホスホリル) オキシ) -4- ( (テトラヒドロフラン-2-イル) オキシ) テトラヒドロフラン-2-イル) メチル (36 mg、0.05 mmol) を溶解させ、シアノメチル (2R) -2- [ [4- [ [2- (4-フルオロフェニル) アセチル] アミノ] フェニル] メトキシカルボニルアミノ] ペンタノアト (化合物ST15) のアセトニトリル溶液 (1.5 mL、0.05 mmol) を加え、室温で90分攪拌した。反応液を0℃に冷却した後に、トリフルオロ酢酸 (1.5 mL) を加えた。反応液を室温にて30分攪拌したのちに、反応液を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (0.05%トリフルオロ酢酸水溶液/0.05%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液) にて精製し、表題化合物 (化合物ST16) (9.0 mg、収率17%) を得た。

LCMS (ESI)  $m/z = 1035.4$  (M-H)<sup>-</sup>

保持時間: 0.52分 (分析条件SQDFA05)

[0203] (2R) -2- [ [4- [ [2- (4-フルオロフェニル) アセチル] アミノ] フェニル] メトキシカルボニルアミノ] -3-メトキシプロパン酸 (化合物ST17) の合成

[化45]



[0204] 窒素雰囲気下、O-メチル-D-セリン (11.9 mg、0.1 mmol) 及び特許文献 (国際公開第2018/143145号) 記載の方法で合成した炭酸-(4-ニトロフェニル)-4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル (42.4 mg、0.1 mmol) をDMSO (0.5 mL) に加え室温で5分間攪拌した。トリエチルアミン (20.9 μL、0.15 mmol) を0度にて添加したのち反応混合物を室温で16時間

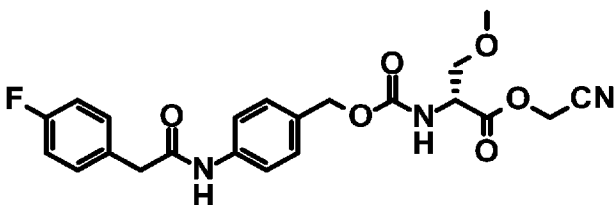
攪拌後、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（0.1%ギ酸水溶液／0.1%ギ酸アセトニトリル溶液）にて精製し、表題化合物（化合物ST17）（36mg、収率89%）を得た。

LCMS (ESI)  $m/z = 403.3$  (M-H)<sup>-</sup>

保持時間：0.63分（分析条件SQDFA05）

[0205] シアノメチル (2R)-2-[[4-[[2-(4-フルオロフェニル)アセチル]アミノ]フェニル]メトキシカルボニルアミノ]-3-メトキシプロパノエート（化合物ST18）の合成

[化46]



[0206] 窒素雰囲気下、(2R)-2-[[4-[[2-(4-フルオロフェニル)アセチル]アミノ]フェニル]メトキシカルボニルアミノ]-3-メトキシプロパン酸（化合物ST17）（20.0mg、0.05mmol）のアセトニトリル溶液（0.25mL）に、2-ブロモアセトニトリル（10.1μL、0.15mmol）及びDIPEA（10.5μL、0.06mmol）を室温にて順番に加えた。反応混合物を室温にて16時間攪拌したのち反応液を濃縮し、表題化合物（化合物ST18）を粗生成物として得た。得られた粗生成物をアセトニトリル（1.5mL）に溶解し、そのまま次工程に用いた。

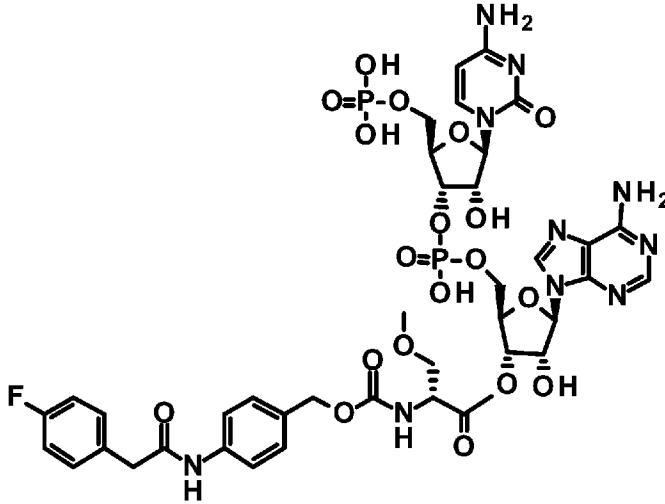
LCMS (ESI)  $m/z = 442.2$  (M-H)<sup>-</sup>

保持時間：0.72分（分析条件SQDFA05）

[0207] [(2R, 3S, 4R, 5R)-2-[[[(2R, 3S, 4R, 5R)-5-(4-アミノ-2-オキソピリミジン-1-イル)-4-ヒドロキシ-2-(ホスホノオキシメチル)オキソラン-3-イル]オキシ-ヒドロキシホスホリル]オキシメチル]-5-(6-アミノプリン-9-イル)-4-

ヒドロキシオキソラン-3-イル] (2R)-2-[[4-[[2-(4-フルオロフェニル)アセチル]アミノ]フェニル]メトキシカルボニルアミノ]-3-メトキシプロパノエート (化合物ST19) の合成

[化47]



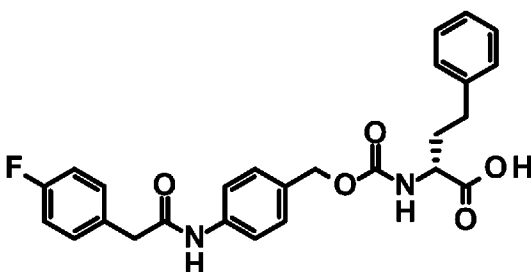
[0208] 緩衝液A (30.0 mL) に、文献 (Helv. Chim. Acta, 90, 297-310) 記載の方法で合成したリン酸二水素 ((2R, 3R, 4R, 5R)-5-(4-アミノ-2-オキソピリミジン-1(2H)-イル)-3-(((2R, 3S, 4R, 5R)-5-(6-アミノ-9H-プリン-9-イル)-3,4-ジヒドロキシテトラヒドロフラン-2-イル)メトキシ)(ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)-4-((テトラヒドロフラン-2-イル)オキシ)テトラヒドロフラン-2-イル)メチル (36 mg、0.05 mmol) を溶解させ、シアノメチル ((2R)-2-[[4-[[2-(4-フルオロフェニル)アセチル]アミノ]フェニル]メトキシカルボニルアミノ]-3-メトキシプロパノエート (化合物ST18) のアセトニトリル溶液 (1.5 mL、0.05 mmol) を加え、室温で90分攪拌した。反応液を0℃に冷却した後に、トリフルオロ酢酸 (1.5 mL) を加えた。反応液を室温にて30分攪拌したのちに、反応液を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (0.05%トリフルオロ酢酸水溶液/0.05%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液) にて精製し、表題化合物 (化合物ST19) (9.0 mg、収率17%) を得た。

LCMS (ESI)  $m/z = 1037.5$  (M-H)<sup>-</sup>

保持時間：0.48分 (分析条件SQDFA05)

[0209] (2R)-2-[[4-[[2-(4-フルオロフェニル)アセチル]アミノ]フェニル]メトキシカルボニルアミノ]-4-フェニルブタン酸 (化合物ST20) の合成

[化48]



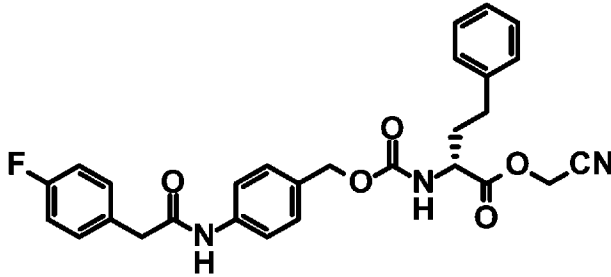
[0210] 窒素雰囲気下、(R)-2-アミノ-4-フェニルブタンカルボン酸 (17.9 mg、0.1 mmol) 及び特許文献 (国際公開第2018/143145号) 記載の方法で合成した炭酸-(4-ニトロフェニル)-4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル (42.4 mg、0.1 mmol) をDMSO (0.5 mL) に加え室温で5分間攪拌した。トリエチルアミン (20.9  $\mu$ L、0.15 mmol) を0度にて添加したのち反応混合物を室温で16時間攪拌後、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (0.1%ギ酸水溶液/0.1%ギ酸アセトニトリル溶液) にて精製し、表題化合物 (化合物ST20) (36 mg、収率78%) を得た。

LCMS (ESI)  $m/z = 463.2$  (M-H)<sup>-</sup>

保持時間：0.78分 (分析条件SQDFA05)

[0211] シアノメチル (2R)-2-[[4-[[2-(4-フルオロフェニル)アセチル]アミノ]フェニル]メトキシカルボニルアミノ]-4-フェニルブタノアト (化合物ST21) の合成

[化49]



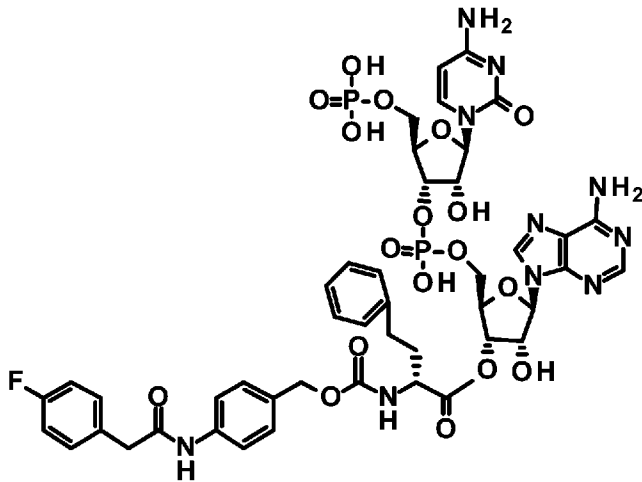
[0212] 窒素雰囲気下、((2R)-2-[[4-[[2-(4-フルオロフェニル)アセチル]アミノ]フェニル]メトキシカルボニルアミノ]-4-フェニルブタン酸(化合物ST20)(23.0mg、0.05mmol)のアセトニトリル溶液(0.25mL)に、2-ブロモアセトニトリル(10.1 $\mu$ L、0.15mmol)及びDIPEA(10.5 $\mu$ L、0.06mmol)を室温にて順番に加えた。反応混合物を室温にて16時間攪拌したのち反応液を濃縮し、表題化合物(化合物ST21)を粗生成物として得た。得られた粗生成物をアセトニトリル(1.5mL)に溶解し、そのまま次工程に用いた。

LCMS(ESI)  $m/z = 502.3$  (M-H)<sup>-</sup>

保持時間: 0.86分(分析条件SQDFA05)

[0213] [(2R, 3S, 4R, 5R)-2-[[[[(2R, 3S, 4R, 5R)-5-(4-アミノ-2-オキソピリミジン-1-イル)-4-ヒドロキシ-2-(ホスホノオキシメチル)オキソラン-3-イル]オキシ-ヒドロキシホスホリル]オキシメチル]-5-(6-アミノプリン-9-イル)-4-ヒドロキシオキソラン-3-イル] (2R)-2-[[4-[[2-(4-フルオロフェニル)アセチル]アミノ]フェニル]メトキシカルボニルアミノ]-4-フェニルブタノアト(化合物ST22)の合成

[化50]



[0214] 緩衝液A (30.0 mL) に、文献 (Helv. Chim. Acta, 90, 297-310) 記載の方法で合成したリン酸二水素 ((2R, 3R, 4R, 5R) - 5 - (4-アミノ-2-オキソピリミジン-1(2H)-イル) - 3 - (((2R, 3S, 4R, 5R) - 5 - (6-アミノ-9H-プリン-9-イル) - 3, 4-ジヒドロキシテトラヒドロフラン-2-イル) メトキシ) (ヒドロキシ) ホスホリル) オキシ) - 4 - ((テトラヒドロフラン-2-イル) オキシ) テトラヒドロフラン-2-イル) メチル (36 mg, 0.05 mmol) を溶解させ、シアノメチル ((2R) - 2 - [[4 - [[2 - (4-フルオロフェニル) アセチル] アミノ] フェニル] メトキシカルボニルアミノ] - 4-フェニルブタノアト (化合物ST 21) のアセトニトリル溶液 (1.5 mL, 0.05 mmol) を加え、室温で90分攪拌した。反応液を0℃に冷却した後に、トリフルオロ酢酸 (1.5 mL) を加えた。反応液を室温にて30分攪拌したのちに、反応液を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (0.05%トリフルオロ酢酸水溶液/0.05%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液) にて精製し、表題化合物 (化合物ST 22) (11.0 mg、収率20%) を得た。

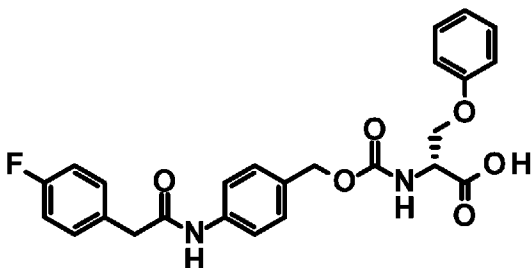
LCMS (ESI)  $m/z = 1097.6$  (M-H) -

保持時間: 0.57分 (分析条件SQDFA05)

[0215] ((2R) - 2 - [[4 - [[2 - (4-フルオロフェニル) アセチル] アミ

ノ] フェニル] メトキシカルボニルアミノ] - 3-フェノキシプロパン酸 (化合物ST23) の合成

[化51]



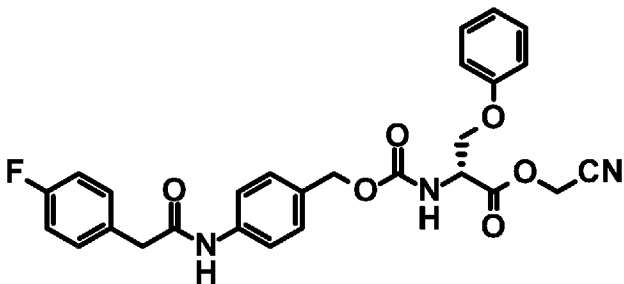
[0216] 窒素雰囲気下、O-フェニル-D-セリン (18.1 mg、0.1 mmol) 及び特許文献 (国際公開第2018/143145号) 記載の方法で合成した炭酸-(4-ニトロフェニル)-4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル (42.4 mg、0.1 mmol) をDMSO (0.5 mL) に加え室温で5分間攪拌した。トリエチルアミン (20.9 μL、0.15 mmol) を0度にて添加したのち反応混合物を室温で16時間攪拌後、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (0.1%ギ酸水溶液 / 0.1%ギ酸アセトニトリル溶液) にて精製し、表題化合物 (化合物ST23) (34 mg、収率73%) を得た。

LCMS (ESI)  $m/z = 465.3$  (M-H)<sup>-</sup>

保持時間: 0.76分 (分析条件SQDFA05)

[0217] シアノメチル (2R)-2-[[4-[[2-(4-フルオロフェニル)アセチル]アミノ]フェニル]メトキシカルボニルアミノ]-3-フェノキシプロパノエート (化合物ST24) の合成

[化52]



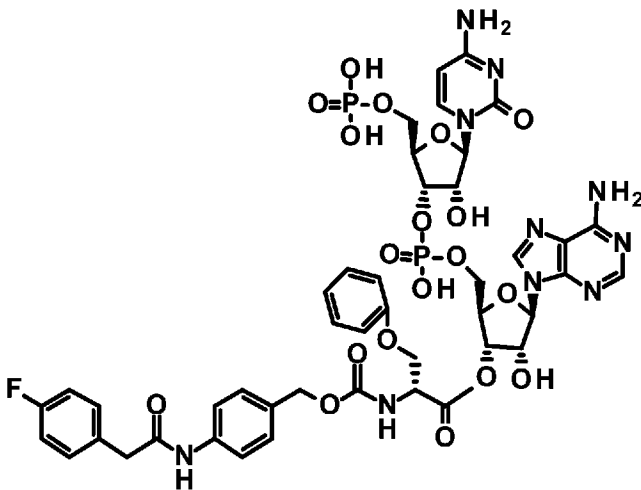
[0218] 窒素雰囲気下、(2R)-2-[[4-[[2-(4-フルオロフェニル)アセチル]アミノ]フェニル]メトキシカルボニルアミノ]-3-フェノキシプロパン酸(化合物ST23)(23.0mg、0.05mmol)のアセトニトリル溶液(0.25mL)に、2-ブロモアセトニトリル(6.7 $\mu$ L、0.10mmol)及びDIPEA(10.5 $\mu$ L、0.06mmol)を室温にて順番に加えた。反応混合物を室温にて16時間攪拌したのち反応液を濃縮し、表題化合物(化合物ST24)を粗生成物として得た。得られた粗生成物をアセトニトリル(1.5mL)に溶解し、そのまま次工程に用いた。

LCMS(ESI)  $m/z = 504.2$  (M-H)<sup>-</sup>

保持時間: 0.84分(分析条件SQDFA05)

[0219] [(2R, 3S, 4R, 5R)-2-[[[(2R, 3S, 4R, 5R)-5-(4-アミノ-2-オキソピリミジン-1-イル)-4-ヒドロキシ-2-(ホスホノオキシメチル)オキソラン-3-イル]オキシーヒドロキシホスホリル]オキシメチル]-5-(6-アミノプリン-9-イル)-4-ヒドロキシオキソラン-3-イル] (2R)-2-[[4-[[2-(4-フルオロフェニル)アセチル]アミノ]フェニル]メトキシカルボニルアミノ]-3-フェノキシプロパノエート(化合物ST25)の合成

[化53]



[0220] 緩衝液A(30.0mL)に、文献(Helv. Chim. Acta, 90, 297-310)記

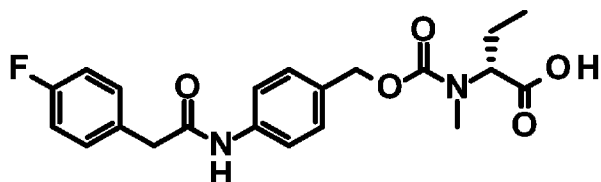
載の方法で合成したリン酸二水素 ((2R, 3R, 4R, 5R) - 5 - (4 - アミノ - 2 - オキソピリミジン - 1 (2H) - イル) - 3 - ( ( ( ( (2R, 3S, 4R, 5R) - 5 - (6 - アミノ - 9H - プリン - 9 - イル) - 3, 4 - ジヒドロキシテトラヒドロフラン - 2 - イル) メトキシ) (ヒドロキシ) ホスホリル) オキシ) - 4 - ( (テトラヒドロフラン - 2 - イル) オキシ) テトラヒドロフラン - 2 - イル) メチル (36 mg, 0.05 mmol) を溶解させ、シアノメチル ((2R) - 2 - [ [4 - [ [2 - (4 - フルオロフェニル) アセチル] アミノ] フェニル] メトキシカルボニルアミノ] - 3 - フェノキシプロパノエート (化合物ST24) のアセトニトリル溶液 (1.5 mL, 0.05 mmol) を加え、室温で60分攪拌した。反応液を0℃に冷却した後に、トリフルオロ酢酸 (1.5 mL) を加えた。反応液を室温にて30分攪拌したのちに、反応液を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (0.05%トリフルオロ酢酸水溶液 / 0.05%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液) にて精製し、表題化合物 (化合物ST25) (7.0 mg, 収率13%) を得た。

LCMS (ESI)  $m/z = 1099.5$  (M-H) -

保持時間: 0.56分 (分析条件SQDFA05)

[0221] ((2R) - 2 - [ [4 - [ [2 - (4 - フルオロフェニル) アセチル] アミノ] フェニル] メトキシカルボニル - メチルアミノ] ブタン酸 (化合物ST26) の合成

[化54]



[0222] 窒素雰囲気下、((2R) - 2 - [9H - フルオレン - 9 - イルメトキシカルボニル (メチル) アミノ] ブタン酸 (67.9 mg, 0.2 mmol) のDMSO溶液 (1.0 mL) に1, 8 - ジアザビシクロ [5. 4. 0] - 7 - ウンデセン (DBU) (45.2 μL, 0.3 mmol) を加え室温にて

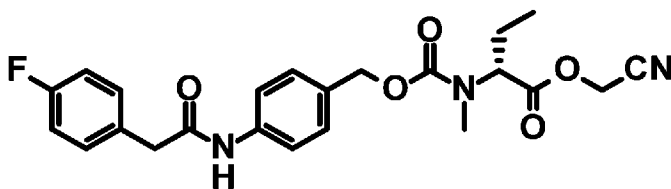
5分間攪拌した。そこへ特許文献（国際公開第2018/143145号）記載の方法で合成した炭酸-（4-ニトロフェニル）-4-（2-（4-フルオロフェニル）アセトアミド）ベンジル（85.0mg、0.2mmol）及びDIPEA（70.0 $\mu$ L、0.4mmol）を順番に加え室温において3時間攪拌したのち、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（0.1%ギ酸水溶液/0.1%ギ酸アセトニトリル溶液）にて精製し、表題化合物（化合物ST26）（60mg、収率75%）を得た。

LCMS (ESI)  $m/z = 401.3$  (M-H)<sup>-</sup>

保持時間：0.71分（分析条件SQDFA05）

[0223] シアノメチル (2R)-2-[[4-[[2-(4-フルオロフェニル)アセチル]アミノ]フェニル]メトキシカルボニル-メチルアミノ]ブタン酸（化合物ST27）の合成

[化55]



[0224] 窒素雰囲気下、(2R)-2-[[4-[[2-(4-フルオロフェニル)アセチル]アミノ]フェニル]メトキシカルボニル-メチルアミノ]ブタン酸（化合物ST26）（40.0mg、0.10mmol）のアセトニトリル溶液（0.50mL）に、2-ブromoアセトニトリル（13.0 $\mu$ L、0.20mmol）及びDIPEA（26.0 $\mu$ L、0.15mmol）を室温にて順番に加えた。反応混合物を室温にて15時間攪拌したのち反応液を濃縮し、表題化合物（化合物ST27）を粗生成物として得た。得られた粗生成物をアセトニトリル（1.25mL）に溶解し、そのまま次工程に用いた。

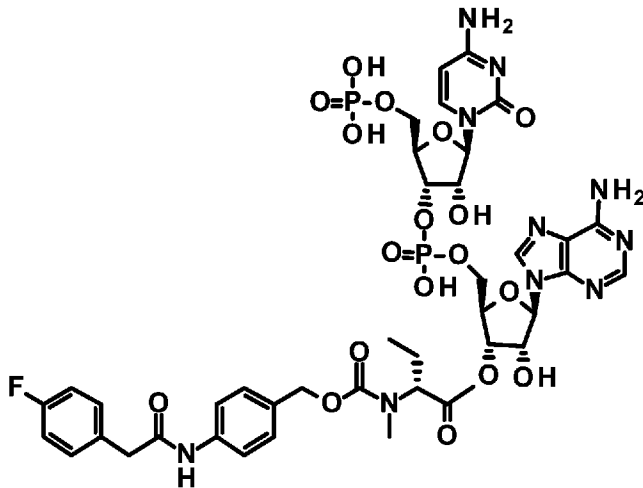
LCMS (ESI)  $m/z = 440.3$  (M-H)<sup>-</sup>

保持時間：0.80分（分析条件SQDFA05）

[0225] [(2R, 3S, 4R, 5R)-2-[[[ (2R, 3S, 4R, 5R) -

5 - (4 - アミノ - 2 - オキソピリミジン - 1 - イル) - 4 - ヒドロキシ - 2 - (ホスホノオキシメチル) オキソラン - 3 - イル] オキシ - ヒドロキシ - ホスホリル] オキシメチル] - 5 - (6 - アミノプリン - 9 - イル) - 4 - ヒドロキシオキソラン - 3 - イル] (2R) - 2 - [[4 - [[2 - (4 - フルオロフェニル) アセチル] アミノ] フェニル] メトキシカルボニル - メチルアミノ] ブタノアト (化合物ST28) の合成

[化56]



[0226] 緩衝液A (25.0 mL) に、文献 (Helv. Chim. Acta, 90, 297-310) 記載の方法で合成したリン酸二水素 ((2R, 3R, 4R, 5R) - 5 - (4 - アミノ - 2 - オキソピリミジン - 1 (2H) - イル) - 3 - ((( (2R, 3S, 4R, 5R) - 5 - (6 - アミノ - 9H - プリン - 9 - イル) - 3, 4 - ジヒドロキシテトラヒドロフラン - 2 - イル) メトキシ) (ヒドロキシ) ホスホリル) オキシ) - 4 - ((テトラヒドロフラン - 2 - イル) オキシ) テトラヒドロフラン - 2 - イル) メチル (36 mg、0.05 mmol) を溶解させ、シアノメチル ((2R) - 2 - [[4 - [[2 - (4 - フルオロフェニル) アセチル] アミノ] フェニル] メトキシカルボニル - メチルアミノ] ブタノアト (化合物ST27) のアセトニトリル溶液 (0.63 mL、0.05 mmol) を加え、30°Cにおいて1時間攪拌した。その後シアノメチル ((2R) - 2 - [[4 - [[2 - (4 - フルオロフェニル) アセチル] アミノ] フェニル] メトキシカルボニル - メチルアミノ] ブタノ

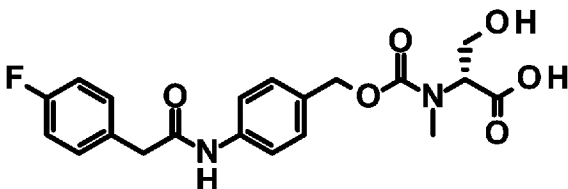
アト（化合物ST27）のアセトニトリル溶液（0.63 mL、0.05 mmol）を再び加え、30℃においてさらに2時間攪拌した。反応液を0℃に冷却した後に、トリフルオロ酢酸（1.25 mL）を加えた。反応液を0℃にて1時間攪拌したのちに、反応液を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（0.05%トリフルオロ酢酸水溶液/0.05%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液）にて精製し、表題化合物（化合物ST28）（12.8 mg、収率25%）を得た。

LCMS (ESI)  $m/z = 1035.7$  (M-H)<sup>-</sup>

保持時間：0.52分（分析条件SQDFA05）

[0227] (2R)-2-[[4-[[2-(4-フルオロフェニル)アセチル]アミノ]フェニル]メトキシカルボニル-メチルアミノ]-3-ヒドロキシプロパン酸（化合物ST29）の合成

[化57]



[0228] 窒素雰囲気下、メチル-D-セリン（100.0 mg、0.64 mmol）及び特許文献（国際公開第2018/143145号）記載の方法で合成した炭酸-(4-ニトロフェニル)-4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル（273.0 mg、0.64 mmol）をDMSO（2.14 mL）に加え室温で5分間攪拌した。トリエチルアミン（296.0 μL、2.12 mmol）を0度にて添加したのち反応混合物を室温で5時間攪拌後、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（0.1%ギ酸水溶液/0.1%ギ酸アセトニトリル溶液）にて精製し、表題化合物（化合物ST29）（215.6 mg、収率83%）を得た。

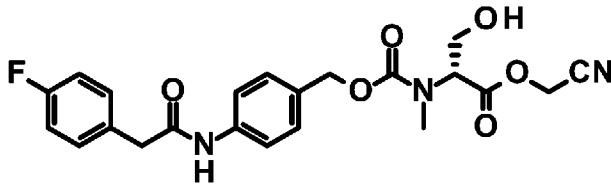
LCMS (ESI)  $m/z = 403.0$  (M-H)<sup>-</sup>

保持時間：0.58分（分析条件SQDFA05）

[0229] シアノメチル (2R)-2-[[4-[[2-(4-フルオロフェニル)

アセチル] アミノ] フェニル] メトキシカルボニル-メチルアミノ] -3-  
ヒドロキシプロパノエート (化合物ST30) の合成

[化58]



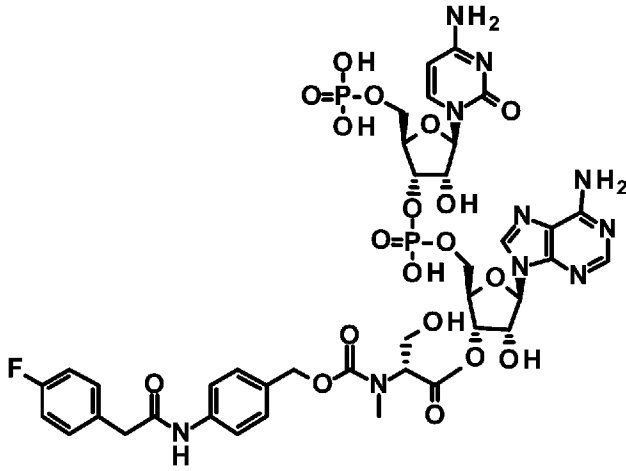
[0230] 窒素雰囲気下、(2R)-2-[[4-[[2-(4-フルオロフェニル)アセチル]アミノ]フェニル]メトキシカルボニル-メチルアミノ]-3-ヒドロキシプロパン酸 (化合物ST29) (215.6 mg、0.53 mmol) のアセトニトリル溶液 (2.67 ml) に、2-ブロモアセトニトリル (361.0 μL、5.33 mmol) 及びDIPEA (186.0 μL、1.07 mmol) を0℃において順番に加えた。反応混合物を室温にて2時間攪拌したのち逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (0.1%ギ酸水溶液/0.1%ギ酸アセトニトリル溶液) にて精製し、表題化合物 (化合物ST30) (220.3 mg、収率93%) を得た。

LCMS (ESI) m/z = 442.0 (M-H)<sup>-</sup>

保持時間: 0.66分 (分析条件SQDFA05)

[0231] [(2R, 3S, 4R, 5R)-2-[[[[(2R, 3S, 4R, 5R)-5-(4-アミノ-2-オキソピリミジン-1-イル)-4-ヒドロキシ-2-(ホスホノオキシメチル)オキソラン-3-イル]オキシ-ヒドロキシホスホリル]オキシメチル]-5-(6-アミノプリン-9-イル)-4-ヒドロキシオキソラン-3-イル] (2R)-2-[[4-[[2-(4-フルオロフェニル)アセチル]アミノ]フェニル]メトキシカルボニル-メチルアミノ]-3-ヒドロキシプロパノエート (化合物ST31) の合成

[化59]

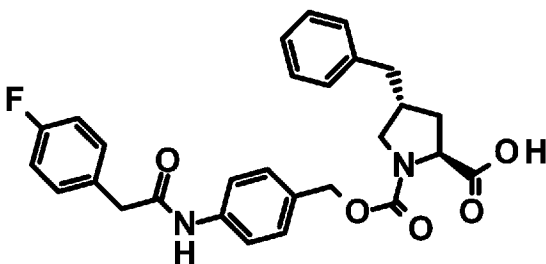


[0232] 緩衝液A (45.0 mL) に、文献 (Helv. Chim. Acta, 90, 297-310) 記載の方法で合成したリン酸二水素 ((2R, 3R, 4R, 5R) - 5 - (4-アミノ-2-オキソピリミジン-1(2H)-イル) - 3 - (((2R, 3S, 4R, 5R) - 5 - (6-アミノ-9H-プリン-9-イル) - 3, 4-ジヒドロキシテトラヒドロフラン-2-イル) メトキシ) (ヒドロキシ) ホスホリル) オキシ) - 4 - ((テトラヒドロフラン-2-イル) オキシ) テトラヒドロフラン-2-イル) メチル (60 mg、0.08 mmol) を溶解させ、シアノメチル ((2R) - 2 - [[4 - [[2 - (4-フルオロフェニル) アセチル] アミノ] フェニル] メトキシカルボニル-メチルアミノ] - 3-ヒドロキシプロパノエート (化合物ST30) のアセトニトリル溶液 (0.5 mL、0.08 mmol) を加え、室温において30分間攪拌した。その後シアノメチル ((2R) - 2 - [[4 - [[2 - (4-フルオロフェニル) アセチル] アミノ] フェニル] メトキシカルボニル-メチルアミノ] - 3-ヒドロキシプロパノエート (化合物ST30) のアセトニトリル溶液 (0.5 mL、0.08 mmol) を再び加え、室温においてさらに1時間半攪拌した。反応液を0°Cに冷却した後に、トリフルオロ酢酸 (2.4 mL) を加えた。反応液を室温において30分間攪拌したのちに、反応液を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (0.05%トリフルオロ酢酸水溶液/0.05%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液) にて精製

し、表題化合物（化合物ST31）（11.5mg、収率13%）を得た。  
 LCMS (ESI)  $m/z = 1037.5$  (M-H)<sup>-</sup>  
 保持時間：0.43分（分析条件SQDFA05）

[0233] (2S, 4R) - 4 - ベンジル - 1 - [ [ 4 - [ [ 2 - ( 4 - フルオロフェニル ) アセチル ] アミノ ] フェニル ] メトキシカルボニル ] ピロリジン - 2 - カルボン酸（化合物ST32）の合成

[化60]



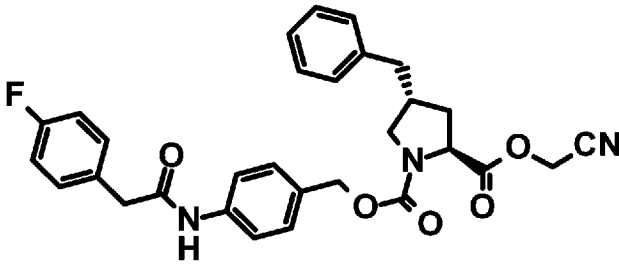
[0234] 窒素雰囲気下、(2S, 4R) - 4 - ベンジル - 1 - (9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニル)ピロリジン-2-カルボン酸（86.0mg、0.2mmol）のDMSO溶液（1.0mL）に1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]-7-ウンデセン（DBU）（45.2 $\mu$ L、0.3mmol）を加え室温にて5分間攪拌した。そこへ特許文献（国際公開第2018/143145号）記載の方法で合成した炭酸-(4-ニトロフェニル)-4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル（85.0mg、0.2mmol）及びDIPEA（70.0 $\mu$ L、0.4mmol）を順番に加え室温において1時間攪拌したのち、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（0.1%ギ酸水溶液/0.1%ギ酸アセトニトリル溶液）にて精製し、表題化合物（化合物ST32）（78mg、収率80%）を得た。

LCMS (ESI)  $m/z = 489.2$  (M-H)<sup>-</sup>  
 保持時間：0.81分（分析条件SQDFA05）

[0235] シアノメチル (2R) - 2 - [ [ 4 - [ [ 2 - ( 4 - フルオロフェニル ) アセチル ] アミノ ] フェニル ] メトキシカルボニル - メチルアミノ ] - 3 -

ヒドロキシピロパノエート（化合物ST33）の合成

[化61]



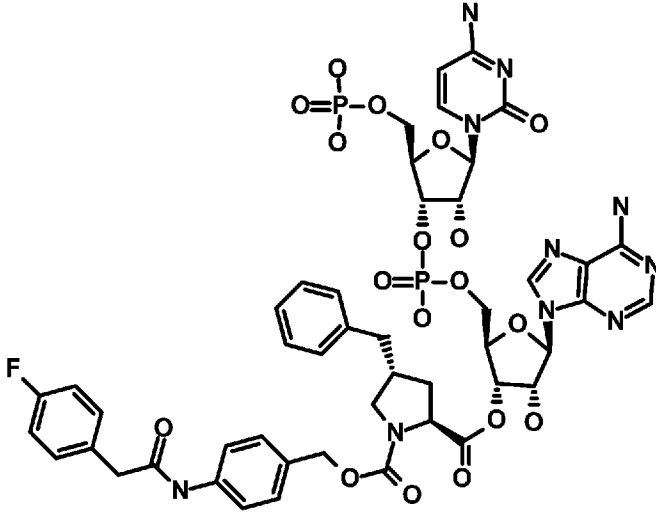
[0236] 窒素雰囲気下、(2S, 4R)-4-ベンジル-1-[[4-[[2-(4-フルオロフェニル)アセチル]アミノ]フェニル]メトキシカルボニル]ピロリジン-2-カルボン酸（化合物ST32）（49.0mg、0.10mmol）のアセトニトリル溶液（0.20mL）に、2-ブロモアセトニトリル（67.0 $\mu$ L、1.0mmol）及びDIPEA（19.0 $\mu$ L、0.11mmol）を室温にて順番に加えた。反応混合物を室温にて1時間攪拌したのち反応液を濃縮し、表題化合物（化合物ST33）を粗生成物として得た。得られた粗生成物をアセトニトリル/DMF=1:1の混合溶液（1.4mL）に溶解し、そのまま次工程に用いた。

LCMS (ESI)  $m/z = 528.4$  (M-H)<sup>-</sup>

保持時間：0.89分（分析条件SQDFA05）

[0237] 2-O-[(2R, 3S, 4R, 5R)-2-[[[(2R, 3S, 4R, 5R)-5-(4-アミノ-2-オキソピリミジン-1-イル)-4-ヒドロキシ-2-(ホスホノオキシメチル)オキソラン-3-イル]オキシ-ヒドロキシホスホリル]オキシメチル]-5-(6-アミノプリン-9-イル)-4-ヒドロキシオキソラン-3-イル] 1-O-[[4-[[2-(4-フルオロフェニル)アセチル]アミノ]フェニル]メチル] (2S, 4R)-4-ベンジルピロリジン-1, 2-ジカルボキシレート（化合物ST34）の合成

[化62]



[0238] 緩衝液A (28.0 mL) に、文献 (Helv. Chim. Acta, 90, 297-310) 記載の方法で合成したリン酸二水素 ((2R, 3R, 4R, 5R) - 5 - (4-アミノ-2-オキソピリミジン-1(2H)-イル) - 3 - (((2R, 3S, 4R, 5R) - 5 - (6-アミノ-9H-プリン-9-イル) - 3, 4-ジヒドロキシテトラヒドロフラン-2-イル) メトキシ) (ヒドロキシ) ホスホリル) オキシ) - 4 - ((テトラヒドロフラン-2-イル) オキシ) テトラヒドロフラン-2-イル) メチル (36.1 mg, 0.05 mmol) を溶解させ、シアノメチル (2R) - 2 - [[4 - [[2 - (4-フルオロフェニル) アセチル] アミノ] フェニル] メトキシカルボニル-メチルアミノ] - 3-ヒドロキシプロパノエート (化合物ST33) のアセトニトリル/DMF = 1 : 1の混合溶液 (0.7 mL, 0.05 mmol) を加え、30℃において150分間攪拌した。その後シアノメチル (2R) - 2 - [[4 - [[2 - (4-フルオロフェニル) アセチル] アミノ] フェニル] メトキシカルボニル-メチルアミノ] - 3-ヒドロキシプロパノエート (化合物ST33) のアセトニトリル/DMF = 1 : 1の混合溶液 (0.7 mL, 0.05 mmol) を再び加え、30℃においてさらに1時間半攪拌した。反応液を0℃に冷却した後に、トリフルオロ酢酸 (1.4 mL) を加えた。反応液を室温において30分間攪拌したのちに、反応液を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (0.05%トリフルオロ酢酸水溶液/

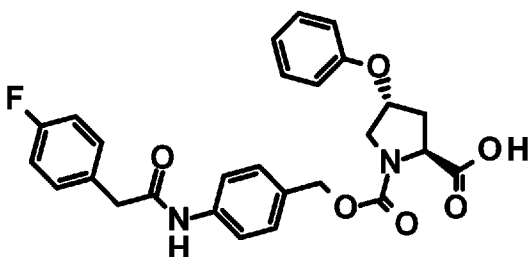
0.05%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液)にて精製し、表題化合物  
(化合物ST34) (6.4mg、収率11%)を得た。

LCMS (ESI)  $m/z = 1123.7$  (M-H) -

保持時間: 0.61分 (分析条件SQDFA05)

[0239] (2S, 4R) - 1 - [ [4 - [ [2 - (4-フルオロフェニル) アセチル]  
] アミノ] フェニル] メトキシカルボニル] - 4-フェノキシピロリジン-  
2-カルボン酸 (化合物ST35) の合成

[化63]



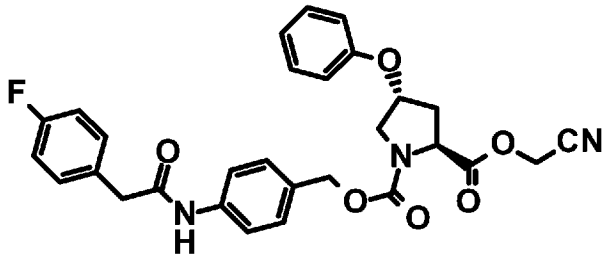
[0240] 窒素雰囲気下、(2S, 4R) - 1 - (9H-フルオレン-9-イルメト  
キシカルボニル) - 4-フェノキシピロリジン-2-カルボン酸 (86.0  
mg、0.2mmol) のDMSO溶液 (1.0ml) に1,8-ジアザビ  
シクロ [5.4.0] -7-ウンデセン (DBU) (45.2μL、0.3  
mmol) を加え室温にて5分間攪拌した。そこへ特許文献 (国際公開第2  
018/143145号) 記載の方法で合成した炭酸-(4-ニトロフェニ  
ル) -4-(2-(4-フルオロフェニル) アセトアミド) ベンジル (85  
.0mg、0.2mmol) 及びDIPEA (70.0μL、0.4mmol)  
を順番に加え室温において1時間攪拌したのち、逆相シリカゲルカラム  
クロマトグラフィー (0.1%ギ酸水溶液/0.1%ギ酸アセトニトリル溶  
液) にて精製し、表題化合物 (化合物ST35) (79mg、収率80%)  
を得た。

LCMS (ESI)  $m/z = 491.4$  (M-H) -

保持時間: 0.79分 (分析条件SQDFA05)

[0241] 2-O-(シアノメチル) 1-O-[ [4 - [ [2 - (4-フルオロフェ  
ニル) アセチル] アミノ] フェニル] メチル] (2S, 4R) - 4-フェ

ノキシピロリジン-1, 2-ジカルボキシラート (化合物ST36) の合成  
[化64]



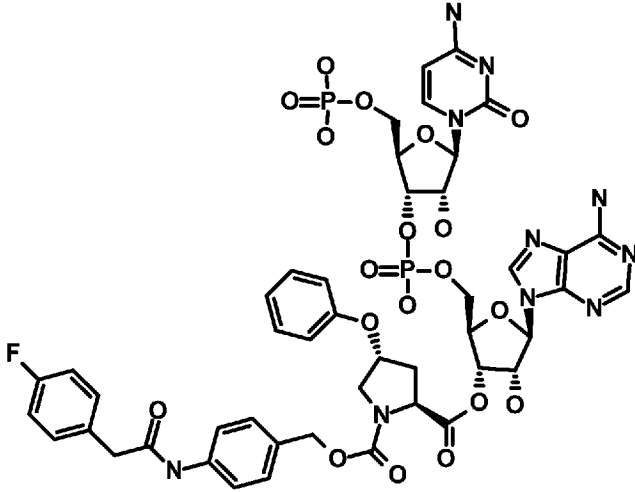
[0242] 窒素雰囲気下、(2S, 4R) - 1 - [ [4 - [ [2 - (4 - フルオロフェニル) アセチル] アミノ] フェニル] メトキシカルボニル] - 4 - フェノキシピロリジン-2-カルボン酸 (化合物ST35) (15.0 mg、0.03 mmol) のアセトニトリル溶液 (0.15 mL) に、2-ブロモアセトニトリル (20.0 μL、0.3 mmol) 及びDIPEA (7.86 μL、0.05 mmol) を室温にて順番に加えた。反応混合物を室温にて1時間攪拌したのち反応液を濃縮し、表題化合物 (化合物ST36) を粗生成物として得た。得られた粗生成物をアセトニトリル (0.75 mL) に溶解し、そのまま次工程に用いた。

LCMS (ESI)  $m/z = 530.3$  (M-H) -

保持時間: 0.87分 (分析条件SQDFA05)

[0243] 2-O-[(2R, 3S, 4R, 5R)-2-[[[(2R, 3S, 4R, 5R)-5-(4-アミノ-2-オキソピリミジン-1-イル)-4-ヒドロキシ-2-(ホスホノオキシメチル)オキソラン-3-イル]オキシ-ヒドロキシホスホリル]オキシメチル]-5-(6-アミノプリン-9-イル)-4-ヒドロキソキソラン-3-イル] 1-O-[ [4 - [ [2 - (4 - フルオロフェニル) アセチル] アミノ] フェニル] メチル] (2S, 4R) - 4 - フェノキシピロリジン-1, 2-ジカルボキシラート (化合物ST37) の合成

[化65]



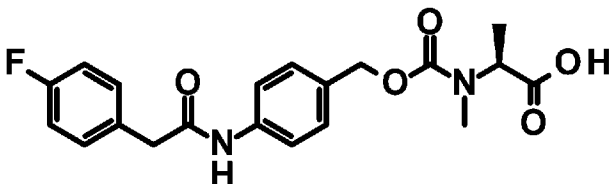
[0244] 緩衝液 A (15.0 mL) に、文献 (Helv. Chim. Acta, 90, 297-310) 記載の方法で合成したリン酸二水素 ((2R, 3R, 4R, 5R) - 5 - (4-アミノ-2-オキソピリミジン-1(2H)-イル) - 3 - (( ( ( (2R, 3S, 4R, 5R) - 5 - (6-アミノ-9H-プリン-9-イル) - 3, 4-ジヒドロキシテトラヒドロフラン-2-イル) メトキシ) (ヒドロキシ) ホスホリル) オキシ) - 4 - ((テトラヒドロフラン-2-イル) オキシ) テトラヒドロフラン-2-イル) メチル (32.5 mg, 0.05 mmol) を溶解させ、2-O-(シアノメチル) 1-O-[[4-[[2-(4-フルオロフェニル) アセチル] アミノ] フェニル] メチル] (2S, 4R) - 4-フェノキシピロリジン-1, 2-ジカルボキシラート (化合物 ST36) のアセトニトリル (0.75 mL, 0.03 mmol) を加え、30°C において 120 分間攪拌した。反応液を 0°C に冷却した後に、トリフルオロ酢酸 (0.75 mL) を加えた。反応液を室温において 30 分間攪拌したのちに、反応液を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (0.05% トリフルオロ酢酸水溶液 / 0.05% トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液) にて精製し、表題化合物 (化合物 ST37) (4.9 mg, 収率 15%) を得た。

LCMS (ESI)  $m/z = 1125.6$  (M-H) -

保持時間: 0.60 分 (分析条件 SQDFA05)

[0245] (2S)-2-[[4-[[2-(4-フルオロフェニル)アセチル]アミノ]フェニル]メトキシカルボニル-N-メチルアミノ]プロパン酸 (化合物ST38) の合成

[化66]



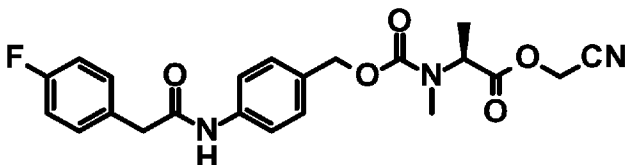
[0246] 窒素雰囲気下、N-メチルアラニン (15.5 mg、0.15 mmol) 及び特許文献 (国際公開第2018/143145号) 記載の方法で合成した炭酸-(4-ニトロフェニル)-4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル (63.7 mg、0.15 mmol) をDMSO (0.38 mL) に加え室温で5分間攪拌した。トリエチルアミン (46.0  $\mu$ L、0.33 mmol) を0℃にて添加したのち反応混合物を30℃において3時間攪拌後、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (0.1%ギ酸水溶液/0.1%ギ酸アセトニトリル溶液) にて精製し、表題化合物 (化合物ST38) (53 mg、収率91%) を得た。

LCMS (ESI)  $m/z = 387.3$  (M-H)<sup>-</sup>

保持時間: 0.69分 (分析条件SQDFA05)

[0247] シアノメチル (2S)-2-[[4-[[2-(4-フルオロフェニル)アセチル]アミノ]フェニル]メトキシカルボニル-N-メチルアミノ]プロパノエート (化合物ST39) の合成

[化67]



[0248] 窒素雰囲気下、(2S)-2-[[4-[[2-(4-フルオロフェニル)アセチル]アミノ]フェニル]メトキシカルボニル-N-メチルアミノ]プロ

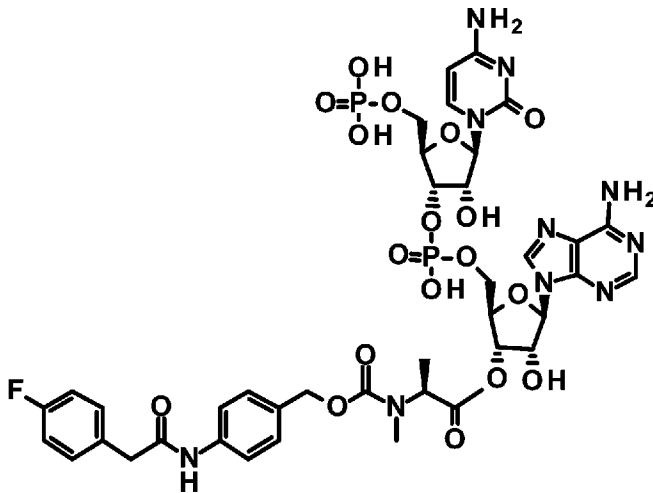
パン酸（化合物ST38）（50.0mg、0.13mmol）のアセトニトリル溶液（0.26mL）に、2-ブロモアセトニトリル（87.0 $\mu$ L、1.30mmol）及びDIPEA（34.0 $\mu$ L、0.20mmol）を0 $^{\circ}$ Cにおいて順番に加えた。反応混合物を室温にて1時間攪拌したのち反応液を濃縮し、表題化合物（化合物ST39）を粗生成物として得た。得られた粗生成物をアセトニトリル（2.50mL）に溶解し、そのまま次工程に用いた。

LCMS (ESI)  $m/z = 426.3$  (M-H)<sup>-</sup>

保持時間：0.77分（分析条件SQDFA05）

[0249] [(2R, 3S, 4R, 5R) - 2 - [ [ [ (2R, 3S, 4R, 5R) - 5 - (4-アミノ-2-オキソピリミジン-1-イル) - 4-ヒドロキシ-2-(ホスホノオキシメチル) オキソラン-3-イル] オキシ-ヒドロキシホスホリル] オキシメチル] - 5 - (6-アミノプリン-9-イル) - 4-ヒドロキシオキソラン-3-イル] (2S) - 2 - [ [ 4 - [ [ 2 - (4-フルオロフェニル) アセチル] アミノ] フェニル] メトキシカルボニル-メチルアミノ] プロパノエート（化合物ST40）の合成

[化68]



[0250] 緩衝液A（50.0mL）に、文献（Helv. Chim. Acta, 90, 297-310）記載の方法で合成したリン酸二水素（(2R, 3R, 4R, 5R) - 5 - (4-アミノ-2-オキソピリミジン-1(2H)-イル) - 3 - ( ( ( ( (2

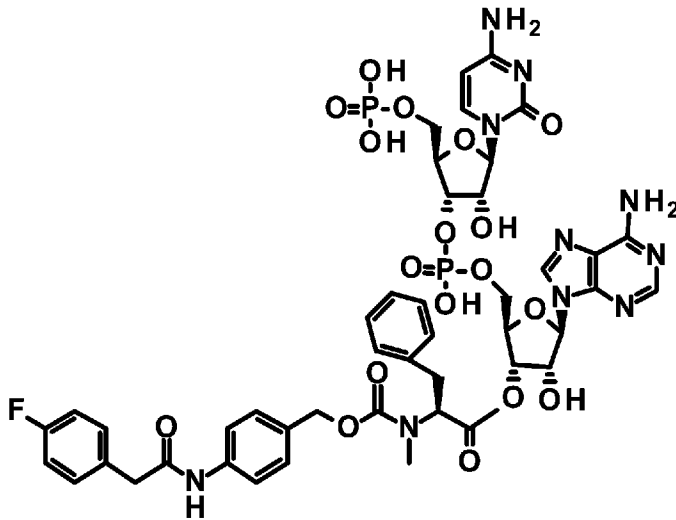
R, 3 S, 4 R, 5 R) - 5 - (6-アミノ-9H-プリン-9-イル) - 3, 4-ジヒドロキシテトラヒドロフラン-2-イル) メトキシ) (ヒドロキシ) ホスホリル) オキシ) - 4 - ( (テトラヒドロフラン-2-イル) オキシ) テトラヒドロフラン-2-イル) メチル (94 mg, 0.13 mmol) を溶解させ、シアノメチル (2 S) - 2 - [ [4 - [ [2 - (4-フルオロフェニル) アセチル] アミノ] フェニル] メトキシカルボニル-メチルアミノ] プロパノエート (化合物 ST 39) のアセトニトリル溶液 (2.50 mL, 0.13 mmol) を加え、30°Cにおいて1時間攪拌した。反応液を0°Cに冷却した後に、トリフルオロ酢酸 (2.50 mL) を加えた。反応液を0°Cにて1時間攪拌したのちに、反応液を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (0.05%トリフルオロ酢酸水溶液/0.05%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液) にて精製し、表題化合物 (化合物 ST 40) (24.0 mg, 収率18%) を得た。

LCMS (ESI)  $m/z = 1021.6$  (M-H) -

保持時間: 0.50分 (分析条件 SQDFA05)

[0251] [ (2 R, 3 S, 4 R, 5 R) - 2 - [ [ [ (2 R, 3 S, 4 R, 5 R) - 5 - (4-アミノ-2-オキソピリミジン-1-イル) - 4-ヒドロキシー-2- (ホスホノオキシメチル) オキソラン-3-イル] オキシー-ヒドロキシホスホリル] オキシメチル] - 5 - (6-アミノプリン-9-イル) - 4-ヒドロキシオキソラン-3-イル] (2 S) - 2 - [ [4 - [ [2 - (4-フルオロフェニル) アセチル] アミノ] フェニル] メトキシカルボニル-メチルアミノ] ブタノアト (化合物 ST 41) の合成

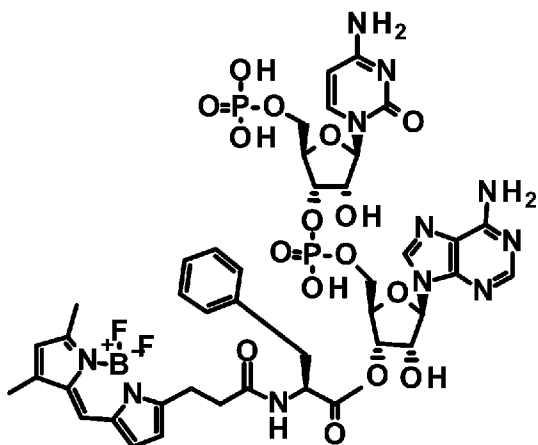
[化69]



[0252] 特許文献（国際公開第2018/225864号）に記載の方法にしたがい、化合物ST41を合成した。

[0253] [(2R, 3S, 4R, 5R) - 2 - [[[(2R, 3S, 4R, 5R) - 5 - (4 - アミノ - 2 - オキソピリミジン - 1 - イル) - 4 - ヒドロキシ - 2 - (ホスホノオキシメチル) オキソラン - 3 - イル] オキシ - ヒドロキシ - ホスホリル] オキシメチル] - 5 - (6 - アミノプリン - 9 - イル) - 4 - ヒドロキシオキソラン - 3 - イル] (2S) - 2 - [3 - (2, 2 - ジフルオロ - 10, 12 - ジメチル - 3 - アザ - 1 - アゾニア - 2 - ボラヌイダトリシクロ [7. 3. 0. 03, 7] ドデカ - 1 (12), 4, 6, 8, 10 - ペンタエン - 4 - イル) プロパノイルアミノ] - 3 - フェニルプロパノエート (化合物ST42) の合成

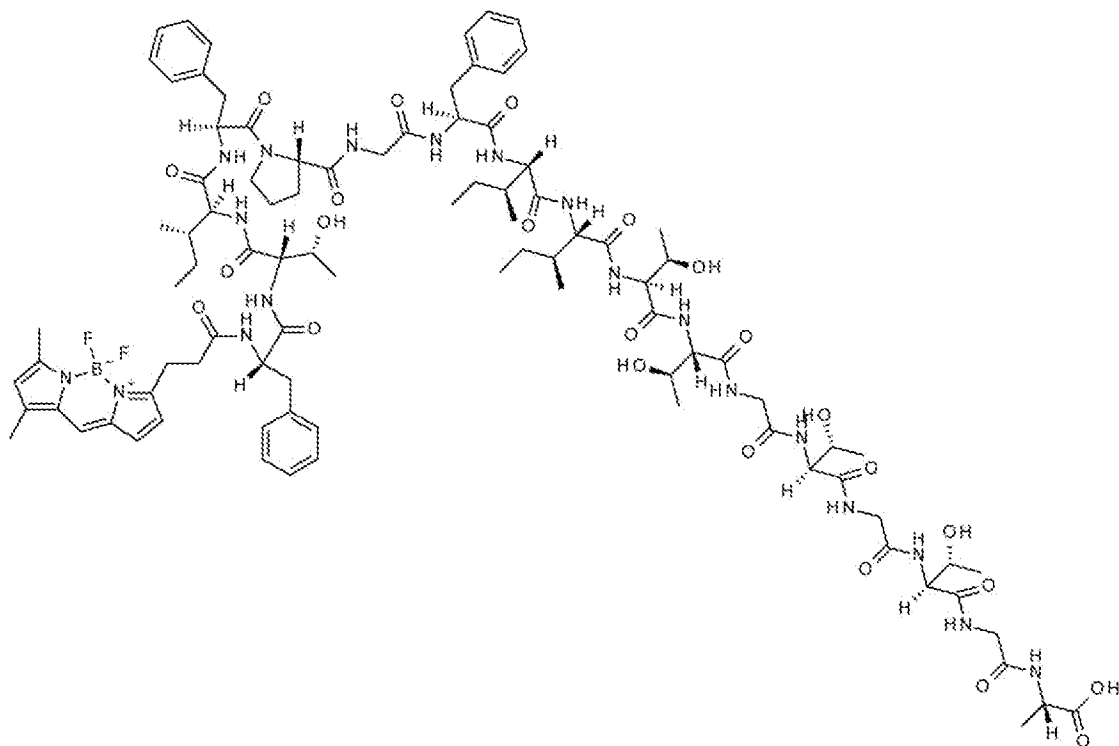
[化70]



[0254] 特許文献（国際公開第2020/138336号）に記載の方法にしたがい、化合物ST42を合成した。

[0255] 実施例2. LC/MSの標品として用いるペプチド（LCT-12）の合成

[化71]



[0256] 特許文献（国際公開第2020/138336号）に記載の方法にしたがい、化合物LCT-12を合成した。

[0257] 実施例3. アミノアシル tRNAの合成

定法により以下の tRNA<sup>Glu</sup>UAG (−CA) を調製した。

配列番号1 (TR-1)

tRNA<sup>Glu</sup>UAG −CA RNA配列:

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCU<sup>uag</sup>ACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG  
GACGC

配列番号2 (TR-2)

tRNA<sup>Glu</sup>cug −CA RNA配列:

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCU<sup>cug</sup>ACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG  
GACGC

配列番号3 (TR-3)

tRNA<sup>fMet</sup>cau −CA RNA配列:

GGCGGGUGGAGCAGCCUGGUAGCUCGUCGGGCU<sup>cau</sup>AACCCGAAGAUCGUCGGUUCAAAUCCGGCCCC  
CGCAAC

[0258] 実施例4. アミノアシルpCpAを用いたアミノアシルtRNA混合液の調製

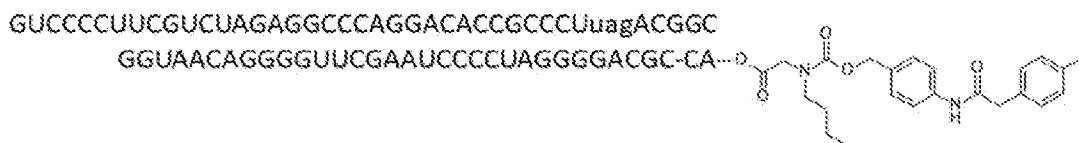
25 μM転写tRNA<sup>Glu</sup>UAG −CA (配列番号1)、50 mM HEPES−KOH pH7.5、20 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM ATP、0.6 unit/μL T4 RNAリガーゼ (New England Biolabs社)、0.25 mM アミノアシルpCpA (DMSO溶液) となるように、Nuclease free waterでメスアップした反応液を調整し、15°Cで45分間ライゲーション反応を行った。ただし、T4 RNAリガーゼおよびアミノアシルpCpAを加える前の反応液は、95°Cで2分間加熱後室温で5分間放置し、予めtRNAのリフォールディングを行った。

[0259] ライゲーション反応液に酢酸ナトリウムを0.3 mMになるように加え、フェノール・クロロホルム抽出を行い、アミノアシル化tRNAをエタノール沈殿により回収した。取得したアミノアシル化tRNAは無細胞翻訳系に添加する直前に1 mM酢酸ナトリウムに溶解した。

[0260] 化合物AA tR-1 (nBuGly-tRNA<sup>Glu</sup>UAG)

前述の方法において、アミノアシルpCpAとして化合物ST01を用いて、下記式で表される化合物AAtR-1を調製した。

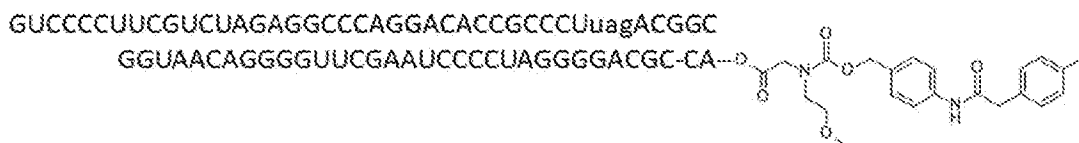
[化72]



[0261] 化合物AAtR-2 (MeOEtGly-tRNA (Glu) uag)

前述の方法において、アミノアシルpCpAとして化合物ST04を用いて、下記式で表される化合物AAtR-2を調製した。

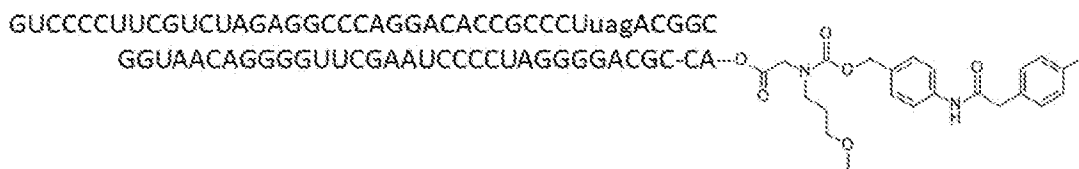
[化73]



[0262] 化合物AAtR-3 (MeOPrGly-tRNA (Glu) uag)

前述の方法において、アミノアシルpCpAとして化合物ST07を用いて、下記式で表される化合物AAtR-3を調製した。

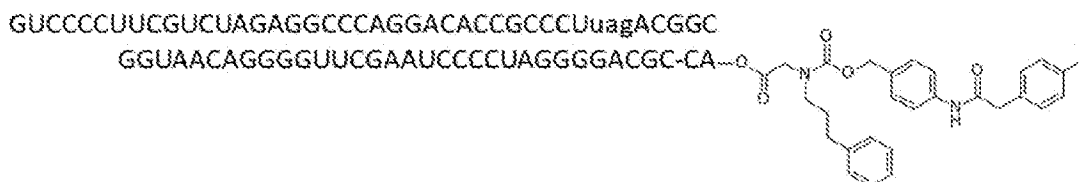
[化74]



[0263] 化合物AAtR-4 (PhPrGly-tRNA (Glu) uag)

前述の方法において、アミノアシルpCpAとして化合物ST10を用いて、下記式で表される化合物AAtR-4を調製した。

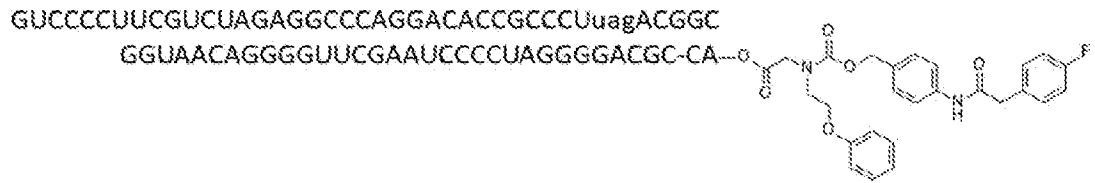
[化75]



## [0264] 化合物 A A t R - 5 ( P h O E t G l y - t R N A ( G l u ) u a g )

前述の方法において、アミノアシル p C p A として化合物 S T 1 3 を用いて、下記式で表される化合物 A A t R - 5 を調製した。

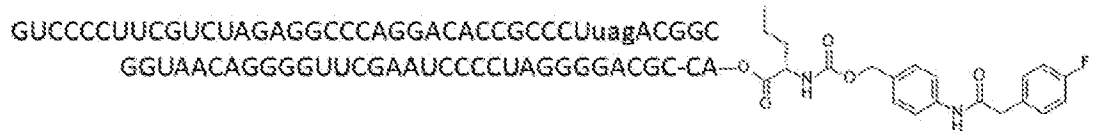
[化76]



## [0265] 化合物 A A t R - 6 ( D - N v a - t R N A ( G l u ) u a g )

前述の方法において、アミノアシル p C p A として化合物 S T 1 6 を用いて、下記式で表される化合物 A A t R - 6 を調製した。

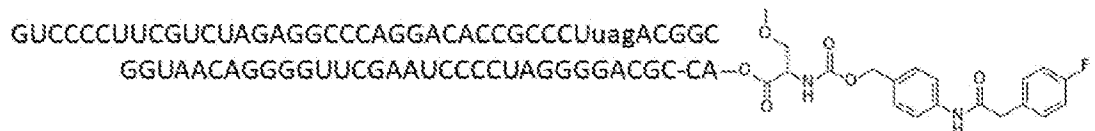
[化77]



## [0266] 化合物 A A t R - 7 ( D - S e r ( M e ) - t R N A ( G l u ) u a g )

前述の方法において、アミノアシル p C p A として化合物 S T 1 9 を用いて、下記式で表される化合物 A A t R - 7 を調製した。

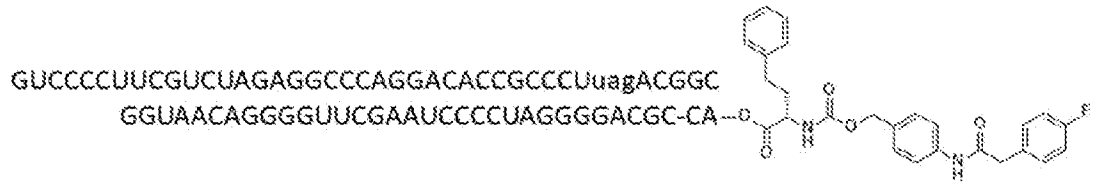
[化78]



## [0267] 化合物 A A t R - 8 ( D - H p h - t R N A ( G l u ) u a g )

前述の方法において、アミノアシル p C p A として化合物 S T 2 2 を用いて、下記式で表される化合物 A A t R - 8 を調製した。

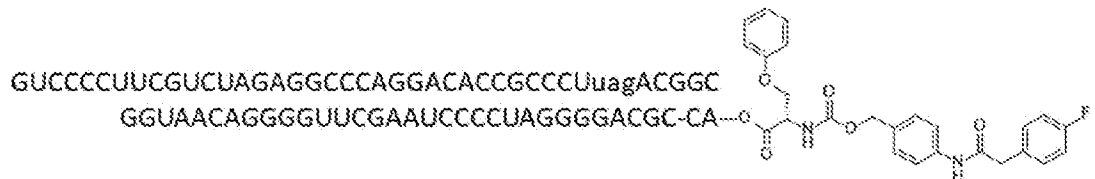
[化79]



[0268] 化合物A A t R - 9 ( D - S e r ( P h ) - t R N A ( G l u ) u a g )

前述の方法において、アミノアシルpCpAとして化合物ST25を用いて、下記式で表される化合物A A t R - 9を調製した。

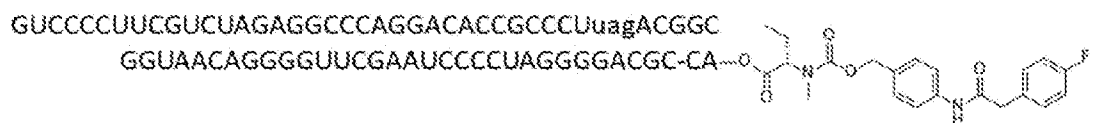
[化80]



[0269] 化合物A A t R - 1 0 ( D - M e A b u - t R N A ( G l u ) u a g )

前述の方法において、アミノアシルpCpAとして化合物ST28を用いて、下記式で表される化合物A A t R - 1 0を調製した。

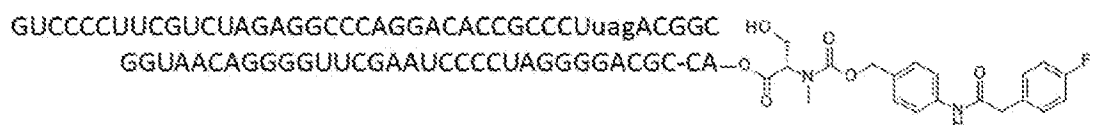
[化81]



[0270] 化合物A A t R - 1 1 ( D - M e S e r - t R N A ( G l u ) u a g )

前述の方法において、アミノアシルpCpAとして化合物ST31を用いて、下記式で表される化合物A A t R - 1 1を調製した。

[化82]

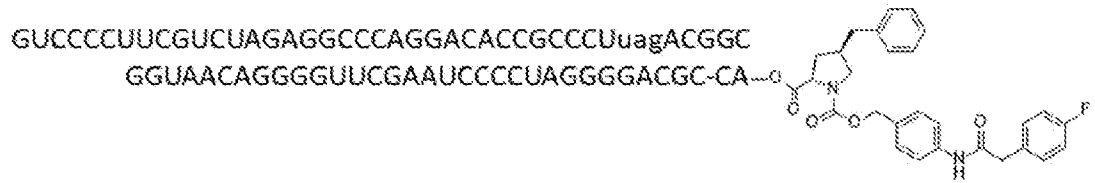


[0271] 化合物A A t R - 1 2 ( P r o 4 R B n - t R N A ( G l u ) u a g )

前述の方法において、アミノアシルpCpAとして化合物ST34を用いて、

て、下記式で表される化合物 A A t R - 1 2 を調製した。

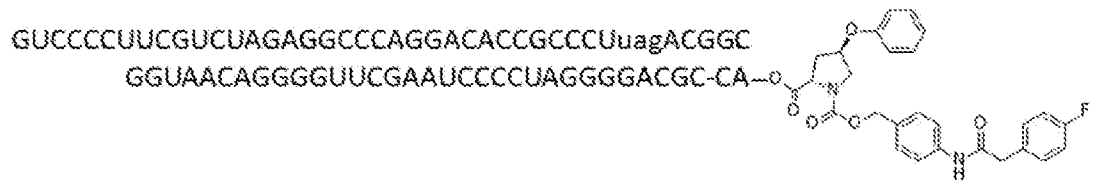
[化83]



[0272] 化合物 A A t R - 1 3 ( H y p ( P h ) - t R N A ( G l u ) u a g )

前述の方法において、アミノアシル p C p A として化合物 S T 3 7 を用いて、下記式で表される化合物 A A t R - 1 3 を調製した。

[化84]



[0273] 実施例 5. アミノアシル p C p A を用いたアミノアシル t R N A 混合液の調製

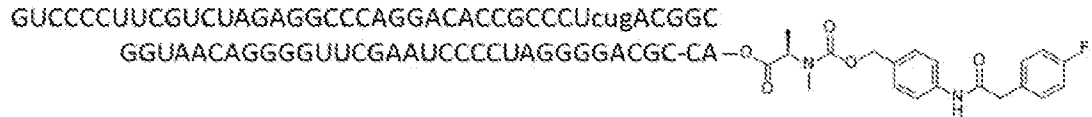
25  $\mu$ M 転写 t R N A ( G l u ) c u g - C A ( 配列番号 2 )、50 mM HEPES-KOH pH7.5、20 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM ATP、0.6 unit/ $\mu$ L T4 RNA リガーゼ (New england bio lab. 社)、0.25 mM アミノアシル p C p A (DMSO 溶液) となるように、Nuclease free water でメスアップした反応液を調整し、15°C で45分間ライゲーション反応を行った。ただし、T4 RNA リガーゼおよびアミノアシル p C p A を加える前の反応液は、95°C で2分間加熱後室温で5分間放置し、予め t R N A のリフォールディングを行った。

[0274] ライゲーション反応液に酢酸ナトリウムを0.3 mM になるように加え、フェノール・クロロホルム抽出を行い、アミノアシル t R N A をエタノール沈殿により回収した。取得したアミノアシル t R N A は無細胞翻訳系に添加する直前に1 mM 酢酸ナトリウムに溶解した。

[0275] 化合物 A A t R - 1 4 ( M e A l a - t R N A ( G l u ) c u g )

前述の方法において、アミノアシルpCpAとして化合物ST40を用いて、下記式で表される化合物AAtR-14を調製した。

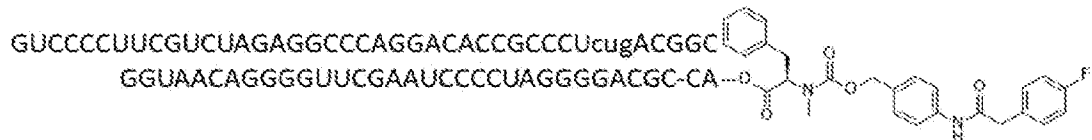
[化85]



[0276] 化合物AAtR-15 (MePhe-tRNA (Glu) cug)

前述の方法において、アミノアシルpCpAとして化合物ST41を用いて、下記式で表される化合物AAtR-15を調製した。

[化86]

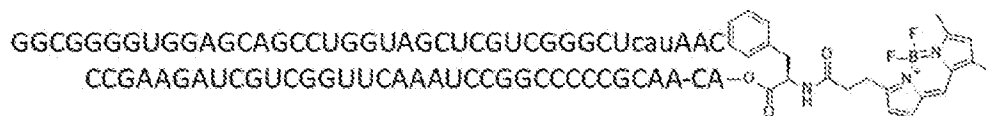


[0277] 実施例6. アミノアシルpCpAを用いたinitiatorアミノアシルtRNA混合液の調製

25  $\mu$ M 転写 tRNA (fMet) cau-CA (配列番号3)、50 mM HEPES-KOH pH7.5、20 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM ATP、0.6 unit/ $\mu$ L T4 RNAリガーゼ (New england bio lab.社)、0.25 mM アミノアシルpCpA (ST45のDMSO溶液) となるように、Nuclease free waterでメスアップした反応液を調整し、15°Cで45分間ライゲーション反応を行った。ただし、T4 RNAリガーゼおよびアミノアシルpCpAを加える前の反応液は、95°Cで2分間加熱後室温で5分間放置し、予めtRNAのリフォールディングを行った。ライゲーション反応液に酢酸ナトリウムを0.3 mMになるように加え、フェノール・クロロホルム抽出を行い、initiatorアミノアシルtRNA (化合物AAtR-19)をエタノール沈殿により回収した。取得したinitiatorアミノアシルtRNAは無細胞翻訳系に添加する直前に1 mM酢酸ナトリウム水溶液に溶解した。

[0278] 化合物 A A t R - 1 6 ( B d p P h e - t R N A ( f M e t ) c a u )

[化87]



[0279] 化合物番号、アミノアシル化 t R N A、及びアミノ酸の対応関係を表 2 に示す。

[表2]

化合物番号	アミノアシル化tRNA	アミノ酸表記
ST01	AAtR-1	nBuGly
ST04	AAtR-2	MeOEtGly
ST07	AAtR-3	MeOPrGly
ST10	AAtR-4	PhPrGly
ST13	AAtR-5	PhOEtGly
ST16	AAtR-6	D-Nva
ST19	AAtR-7	D-Ser(Me)
ST22	AAtR-8	D-Hph
ST25	AAtR-9	D-Ser(Ph)
ST28	AAtR-10	D-MeAbu
ST31	AAtR-11	D-MeSer
ST34	AAtR-12	Pro4RBn
ST37	AAtR-13	Hyp(Ph)
ST40	AAtR-14	MeAla
ST41	AAtR-15	MePhe
ST42	AAtR-16	BdpPhe

[0280] 表 2 中のアミノ酸表記と化学構造の対応関係を表 3 に示す。

[表3]

アミノ酸表記	構造	アミノ酸表記	構造
nBuGly		D-Ser(Ph)	
MeOEtGly		D-MeAbu	
MeOPrGly		D-MeSer	
PhPrGly		Pro4RBn	
PhOEtGly		Hyp(Ph)	
D-Nva		MeAla	
D-Ser(Me)		MePhe	
D-Hgh		BdpPhe	

## [0281] 実施例7. mRNA調製

鋳型DNA（配列番号4または配列番号5）から、RiboMAX Large Scale RNA production System T7（Promega社，P1280）を用いたin vitro転写反応により鋳型mRNA、配列mR-1または配列mR-2を合成し

、RNeasy Mini kit (Qiagen社) により精製した。

鋳型DNA : D-1 (配列番号4)

GTAATACGACTCACTATAGGGTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGATTTTTATTGGTTTTATTAT  
TctacagATTCCGGGTTAAGCTTCG

鋳型DNA : D-2 (配列番号5)

GTAATACGACTCACTATAGGGTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGATTTTTATTGGTTTTATTAT  
TcagctaATTCCGGGTTAAGCTTCG

鋳型mRNA : mR-1 (配列番号6)

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUUAUCAUAUGAUUUUUUAUUGGUUUUAUUUUUcuacagAUUCCGGGUUA  
AGCUUCG

鋳型mRNA : mR-2 (配列番号7)

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUUAUCAUAUGAUUUUUUAUUGGUUUUAUUUUUcagcuaAUUCCGGGUUA  
AGCUUCG

#### [0282] 実施例8. ペプチドの翻訳合成

翻訳系は、原核生物由来の再構成無細胞タンパク質合成系であるPURE SYST  
EM (登録商標) (BioComber社製) を用いた。具体的には、翻訳系には下記  
のものを含む。1 mM GTP、1 mM ATP、20 mM クレアチンリン  
酸、50 mM HEPES-KOH pH7.6、100 mM 酢酸カリウム、2 mM スペ  
ルミジン、1 mM ジチオスレイトール、1.0 mg/ml E. coli MRE60  
0 (RNaseネガティブ) 由来tRNA (Roche社) (非特許文献：(Yokogawa T, Kitamura Y, Nakamura D, Ohno S, Nishikawa K. 2010. Nuclei  
c acids research 38:e89) に記載の方法で、一部のtRNAを除去している  
)、3 μMのin vitro転写大腸菌tRNA Ala1B、0.26 μM E  
F-G、4 μg/ml クレアチンキナーゼ、3 μg/ml ミオキナーゼ  
、2 unit/ml 無機ピロフォスファターゼ、1.1 μg/ml ヌク  
レオシドニリン酸キナーゼ、2.7 μM IF1、0.4 μM IF2、1  
.5 μM IF3、40 μM EF-Tu、35 μM EF-Ts、1 μ  
M EF-P-Lys、0.4 unit/μl RNasein Ribonuclease inhi

bitor (Promega社, N2111)、0.4~0.5  $\mu$ M Penicillin G Amidase (PGA)、2.7  $\mu$ M AlaRS、1  $\mu$ M GlyRS、0.4  $\mu$ M IleRS、0.5  $\mu$ M 変異体PheRS (国際公開第2016/148044号)、0.16  $\mu$ M ProRS、0.09  $\mu$ M ThrRS、1  $\mu$ M 変異体ValRS (国際公開第2016/148044号)、1  $\mu$ M 変異体SerRS (国際公開第2016/148044号)、250  $\mu$ M Gly、250  $\mu$ M Lys、100  $\mu$ M Ile、250  $\mu$ M Pro、250  $\mu$ M Thr、5 mM N-メチルアラニン、5 mM N-メチルフェニルアラニン、5 mM N-メチルセリン、5 mM N-メチルバリン。

[0283] 酢酸マグネシウム濃度が4 mMとなるように、翻訳液に酢酸マグネシウムを加えて、翻訳反応混合物を調製し、initiatorアミノアシル化tRNA (化合物AA t R-16) を25  $\mu$ M、アミノアシル化tRNA (化合物AA t R-1~化合物AA t R-13の中からいずれかひとつ及び、化合物AA t R-14及びAA t R-15のいずれか1つ) を各10  $\mu$ Mになるように添加した。得られた混合物に、mRNA (mR-1又はmR-2) を1  $\mu$ M、リボソームを1.2  $\mu$ Mになるように添加して、37°Cで1時間静置することで行った。

[0284] 鋳型mRNAとしてmR-1又はmR-2を使用した場合、29~31番目のコドン (AUG) から翻訳が開始され、BdpPhe-Ile-MePhe-Ile-Gly-MePhe-Ile-Ile-X1-X2-Ile-Pro-Gly (アミノ酸を一文字表記で表すと、BdpF-I-MeF-I-I-G-MeF-I-I-I-X1-X2-I-I-P-Gとなる。式中、X1及びX2は、使用されたアミノアシル化tRNAに対応する非天然アミノ酸残基を示す。) で表される翻訳ペプチドを生成する。

[0285] 実施例9. 分析概要

実施例8で得られた翻訳ペプチドを含む溶液を10倍希釈し、LC-FLR-MSの装置を用いて分析した。分析データは、MSスペクトルに基づき

、対象となる翻訳ペプチドの保持時間を特定し、当該保持時間に対応する蛍光吸収スペクトルのピーク面積を算出することにより、ペプチド翻訳量を評価した。なお、ペプチド翻訳量の評価は、実施例2で合成したLCT12を標品として作成した検量線により、相対的な含有量として算出した。LC-MSは表4に示す分析条件でおこなった。

[表4]

装置	Aquity UPLC-FLR-Xevo G2-XS Tof
カラム	waters BEHC18(2.1x50mm, $\phi$ 1.7 $\mu$ m)
移動相	A) 0.1% ギ酸水溶液
	B) 0.1% ギ酸アセトニトリル溶液
勾配(A/B)	0~0.2分 10/90
	0.2~3.6分 98/2
	3.6~4.0分 10/90
流速 (mL/分)	0.5
カラム温度(°C)	40
検出波長(Ex/Em)	491nm/515nm
MS mode	ESI-

[0286] 実施例10. 翻訳結果(1)

鋳型mRNAとしてmR-1、アミノアシル化tRNAとして化合物AA tR-1~AA tR-13の中から選択されたいずれか1つと化合物AA tR-14を用いて、各翻訳ペプチド及び翻訳量をそれぞれ評価した。結果を表5に示す。

[表5]

No.	アミノアシル化 tRNA	翻訳ペプチド化合物	配列番号	翻訳量 ( $\mu$ M)	保持時間 (min)	m/z [M-H]
1	AAtR-1	BdpF-IMeFIGMeFII-nBuG-MeA-IPG	8	0.26	3.27	1735.8
	AAtR-14					
2	AAtR-2	BdpF-IMeFIGMeFII-MeOEtG-MeA-IPG	9	0.88	3.1	1737.8
	AAtR-14					
3	AAtR-3	BdpF-IMeFIGMeFII-MeOPrG-MeA-IPG	10	0.11	3.11	1751.8
	AAtR-14					
4	AAtR-4	BdpF-IMeFIGMeFII-PhPrG-MeA-IPG	11	0.10	3.35	1797.9
	AAtR-14					
5	AAtR-5	BdpF-IMeFIGMeFII-PhOEtG-MeA-IPG	12	0.87	3.29	1799.9
	AAtR-14					
6	AAtR-6	BdpF-IMeFIGMeFII-D-Nva-MeA-IPG	13	0	-	-
	AAtR-14					
7	AAtR-7	BdpF-IMeFIGMeFII-D-Ser(Me)-MeA-IPG	14	0.17	3.01	1723.8
	AAtR-14					
8	AAtR-8	BdpF-IMeFIGMeFII-D-Hph-MeA-IPG	15	0.01	3.18	1783.9
	AAtR-14					
9	AAtR-9	BdpF-IMeFIGMeFII-D-Ser(Ph)-MeA-IPG	16	0.35	3.3	1785.9
	AAtR-14					
10	AAtR-10	BdpF-IMeFIGMeFII-D-MeAbu-MeA-IPG	17	0	-	-
	AAtR-14					
11	AAtR-11	BdpF-IMeFIGMeFII-D-MeSer-MeA-IPG	18	0.76	2.98	1723.8
	AAtR-14					
12	AAtR-12	BdpF-IMeFIGMeFII-D-Pro(4R-Bn)-MeA-IPG	19	0.01	3.28	1809.9
	AAtR-14					
13	AAtR-13	BdpF-IMeFIGMeFII-Hyp(Ph)-MeA-IPG	20	0.78	3.23	1811.9
	AAtR-14					

## [0287] 実施例 11. 翻訳結果 (2)

鋳型 mRNA として mR-1、アミノアシル化 tRNA として化合物 AAtR-1 ~ AAtR-13 の中から選択されたいずれか 1 つと化合物 AAtR-15 を用いて、各翻訳ペプチド及び翻訳量をそれぞれ評価した。結果を表 6 に示す。

[表6]

No.	アミノアシル化 tRNA	翻訳ペプチド化合物	配列番号	翻訳量 ( $\mu$ M)	保持時間 (min)	m/z [M-H]
14	AAtR-1	BdpF-IMeFIGMeFII-nBuG-MeF-IPG	21	0.11	3.49	1811.9
	AAtR-15					
15	AAtR-2	BdpF-IMeFIGMeFII-MeOEtG-MeF-IPG	22	0.6	3.33	1813.9
	AAtR-15					
16	AAtR-3	BdpF-IMeFIGMeFII-MeOPrG-MeF-IPG	23	0.05	3.35	1827.9
	AAtR-15					
17	AAtR-4	BdpF-IMeFIGMeFII-PhPrG-MeF-IPG	24	0	-	-
	AAtR-15					
18	AAtR-5	BdpF-IMeFIGMeFII-PhOEtG-MeF-IPG	25	0.52	3.49	1875.9
	AAtR-15					
19	AAtR-6	BdpF-IMeFIGMeFII-D-Nva-MeF-IPG	26	0	-	-
	AAtR-15					
20	AAtR-7	BdpF-IMeFIGMeFII-D-Ser(Me)-MeF-IPG	27	0.17	3.22	1799.9
	AAtR-15					
21	AAtR-8	BdpF-IMeFIGMeFII-D-Hph-MeF-IPG	28	0	-	-
	AAtR-15					
22	AAtR-9	BdpF-IMeFIGMeFII-D-Ser(Ph)-MeF-IPG	29	0.44	3.53	1861.9
	AAtR-5					
23	AAtR-10	BdpF-IMeFIGMeFII-D-MeAbu-MeF-IPG	30	0	-	-
	AAtR-15					
24	AAtR-11	BdpF-IMeFIGMeFII-D-MeSer-MeF-IPG	31	0.38	3.17	1799.9
	AAtR-15					
25	AAtR-12	BdpF-IMeFIGMeFII-D-Pro(AR-Bn)-MeF-IPG	32	0	-	-
	AAtR-15					
26	AAtR-13	BdpF-IMeFIGMeFII-Hyp(Ph)-MeF-IPG	33	0.51	3.53	1887.9
	AAtR-15					

## [0288] 実施例 1 2. 翻訳結果 (3)

鋳型 mRNA として mR-2、アミノアシル化 tRNA として化合物 AAtR-4 又は AAtR-5 と化合物 AAtR-14 又は化合物 AAtR-15 を用いて、各翻訳ペプチド及び翻訳量をそれぞれ評価した。結果を表 7 に示す。

[表7]

No.	アミノアシル化 tRNA	翻訳ペプチド化合物	配列番号	翻訳量 ( $\mu$ M)	保持時間 (min)	m/z [M-H]
27	AAtR-4	BdpF-IMeFIGMeFII-MeA-PhPrG-IPG	34	0.87	3.25	1797.9
	AAtR-14					
28	AAtR-5	BdpF-IMeFIGMeFII-MeA-PhOEtG-IPG	35	0.86	3.2	1799.9
	AAtR-14					
29	AAtR-4	BdpF-IMeFIGMeFII-MeF-PhPrG-IPG	36	0.74	3.39	1874.0
	AAtR-15					
30	AAtR-5	BdpF-IMeFIGMeFII-MeF-PhOEtG-IPG	37	0.85	3.33	1875.9
	AAtR-15					

[0289] 実施例 1 0 ~ 1 3 の翻訳結果を図 1 に示す。

## 請求の範囲

[請求項1] 第一の非天然アミノ酸をコードするコドン及び第二の非天然アミノ酸をコードするコドンが隣接して含まれている核酸を翻訳する工程を含み、

前記第一の非天然アミノ酸及び前記第二の非天然アミノ酸の少なくとも1つが非天然アミノ酸U1であり、前記非天然アミノ酸U1が、下記要件(A)を満たし、かつ、下記要件(B)及び(C)からなる群より選ばれる少なくとも1つを満たす非天然アミノ酸である、ペプチドの製造方法：

(A) 主鎖アミノ基を構成する窒素原子(窒素原子N1)と、主鎖カルボキシ基を構成する酸素原子以外の酸素原子(酸素原子O1)とが、2つの原子を介して結合している；

(B) 酸素原子O1が、アルコキシ基又はアリールオキシ基を構成している；

(C) 窒素原子N1が、直鎖状又は分岐鎖状のC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル基と結合している。

[請求項2] 前記酸素原子O1が直鎖状又は分岐鎖状のC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル基、C<sub>3</sub>~C<sub>10</sub>シクロアルキル基、C<sub>6</sub>~C<sub>10</sub>アリール基、C<sub>7</sub>~C<sub>12</sub>アリールアルキル基、又はC<sub>7</sub>~C<sub>12</sub>アルキルアリール基と共に、対応するC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルコキシ基、C<sub>3</sub>~C<sub>10</sub>シクロアルコキシ基、C<sub>6</sub>~C<sub>10</sub>アリールオキシ基、C<sub>7</sub>~C<sub>12</sub>アリールアルコキシ基、又はC<sub>7</sub>~C<sub>12</sub>アルキルアリールオキシ基を構成している、請求項1に記載の方法。

[請求項3] 前記窒素原子N1がメチル基又はエチル基で置換されている、請求項1又は2に記載の方法。

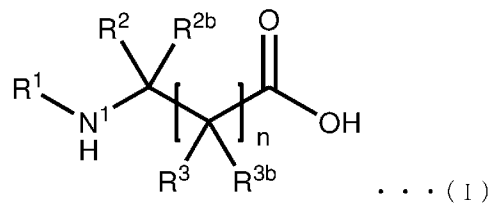
[請求項4] 前記非天然アミノ酸U1がαアミノ酸である、請求項1~3のいずれか一項に記載の方法。

[請求項5] 第一の非天然アミノ酸をコードするコドン及び第二の非天然アミノ

酸をコードするコドンが隣接して含まれている核酸を翻訳する工程を含み、

前記第一の非天然アミノ酸及び前記第二の非天然アミノ酸の少なくとも1つが非天然アミノ酸U1であり、前記非天然アミノ酸U1が、下記式(1)で表される非天然アミノ酸である、ペプチドの製造方法

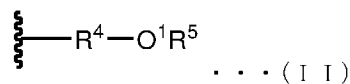
[化1]



[式中、nは0以上2以下の整数であり、

R<sup>1</sup>は式(11)で表される基、水素原子又は直鎖状若しくは分岐鎖状のC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル基であり、

[化2]



R<sup>2</sup>及びR<sup>3</sup>はそれぞれ独立して、(a)式(11)で表される基、(b)水素原子又は(c)直鎖状若しくは分岐鎖状のC<sub>1</sub>~C<sub>4</sub>アルキル基、であり、

R<sup>2b</sup>及びR<sup>3b</sup>は、それぞれ独立して、水素原子又は直鎖状若しくは分岐鎖状のC<sub>1</sub>~C<sub>4</sub>アルキル基であり、

R<sup>2</sup>及びR<sup>2b</sup>又はR<sup>3</sup>及びR<sup>3b</sup>は、それらが結合している炭素原子と共に環を形成してよく、

R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>及びR<sup>3</sup>のいずれか1つ以上は式(11)で表される基であり、

式(1)におけるN<sup>1</sup>(窒素原子N1)と式(11)におけるO<sup>1</sup>(酸素原子O1)は、2つの原子を介して結合しており、

R<sup>1</sup>が式(11)で表される置換基である場合、R<sup>4</sup>及びR<sup>2</sup>は、R

<sup>2</sup>が結合している炭素原子及びN<sup>1</sup>と共に環を形成していてもよく、

R<sup>3</sup>が複数存在する場合は、それぞれが独立して互いに同じであっても異なってもよく、

R<sup>3b</sup>が複数存在する場合は、それぞれが独立して互いに同じであっても異なってもよく、

式(11)において、

[化3]



はN<sup>1</sup>との結合位置を表し、

R<sup>4</sup>はC<sub>1</sub>~C<sub>2</sub>アルキレン基であり、

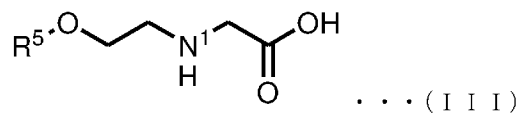
R<sup>5</sup>は水素原子、直鎖状又は分岐鎖状のC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル基、C<sub>3</sub>~C<sub>10</sub>シクロアルキル基、C<sub>6</sub>~C<sub>10</sub>アリール基、C<sub>7</sub>~C<sub>12</sub>アリールアルキル基、又はC<sub>7</sub>~C<sub>12</sub>アルキルアリール基であり、

R<sup>2</sup>が式(11)で表される置換基である場合、式(1)におけるR<sup>1</sup>及び式(11)におけるR<sup>5</sup>の少なくとも1つは水素原子ではない。]

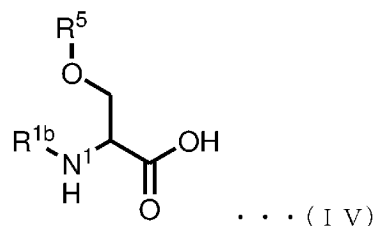
[請求項6]

前記非天然アミノ酸U1が、下記式(111)、(1V)又は(V)で表される非天然アミノ酸である、請求項5に記載の方法：

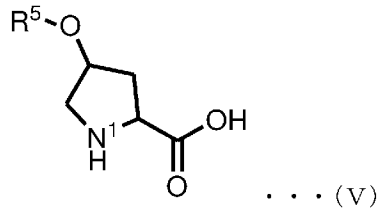
[化4]



[化5]



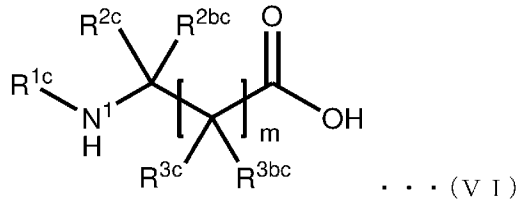
[化6]



[式 (I I I)、(I V) 及び (V) 中、 $R^{1b}$  は水素原子又は直鎖状若しくは分岐鎖状の  $C_1 \sim C_6$  アルキルであり、 $R^5$  は式 (I I) における  $R^5$  と同義である。]

- [請求項7]  $R^5$  が、直鎖状又は分岐鎖状の  $C_1 \sim C_6$  アルキル基、 $C_6 \sim C_{10}$  アリール基、又は  $C_7 \sim C_{12}$  アリールアルキル基である、請求項5又は6に記載の方法。
- [請求項8]  $R^1$  及び  $R^{1b}$  がメチル基又はエチル基である、請求項5～7のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項9]  $n$  が0である、請求項5～8のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項10] 前記第一の非天然アミノ酸が前記非天然アミノ酸U1であり、前記第二の非天然アミノ酸が非天然アミノ酸U1とは異なる非天然アミノ酸（非天然アミノ酸U2）である、請求項1～9のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項11] 前記第一の非天然アミノ酸をコードするコドンが、前記第二の非天然アミノ酸をコードするコドンより先に翻訳される、請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項12] 前記窒素原子N1と前記酸素原子O1とが、2つの炭素原子を介して結合している、請求項1～11のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項13] 前記非天然アミノ酸U1が窒素原子及び酸素原子以外のヘテロ原子を含まない、請求項1～12のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項14] 前記非天然アミノ酸U2が下記式(VI)で表される非天然アミノ酸である、請求項10に記載の方法：

[化7]



[式 (VI) において、

$m$  は 0 以上 2 以下の整数であり、

$R^{1c}$  は水素原子又は直鎖状若しくは分岐鎖状の  $C_1 \sim C_6$  アルキル基であり、

$R^{2c}$  は水素原子、5～10員アリール基で置換されていてもよい直鎖状若しくは分岐鎖状の  $C_1 \sim C_6$  アルキル基、又は直鎖状若しくは分岐鎖状の  $C_1 \sim C_6$  アルキル基で置換されていてもよい5～10員アリール基であり、

$R^{2bc}$  は水素原子又は直鎖状若しくは分岐鎖状の  $C_1 \sim C_4$  アルキル基、であり、

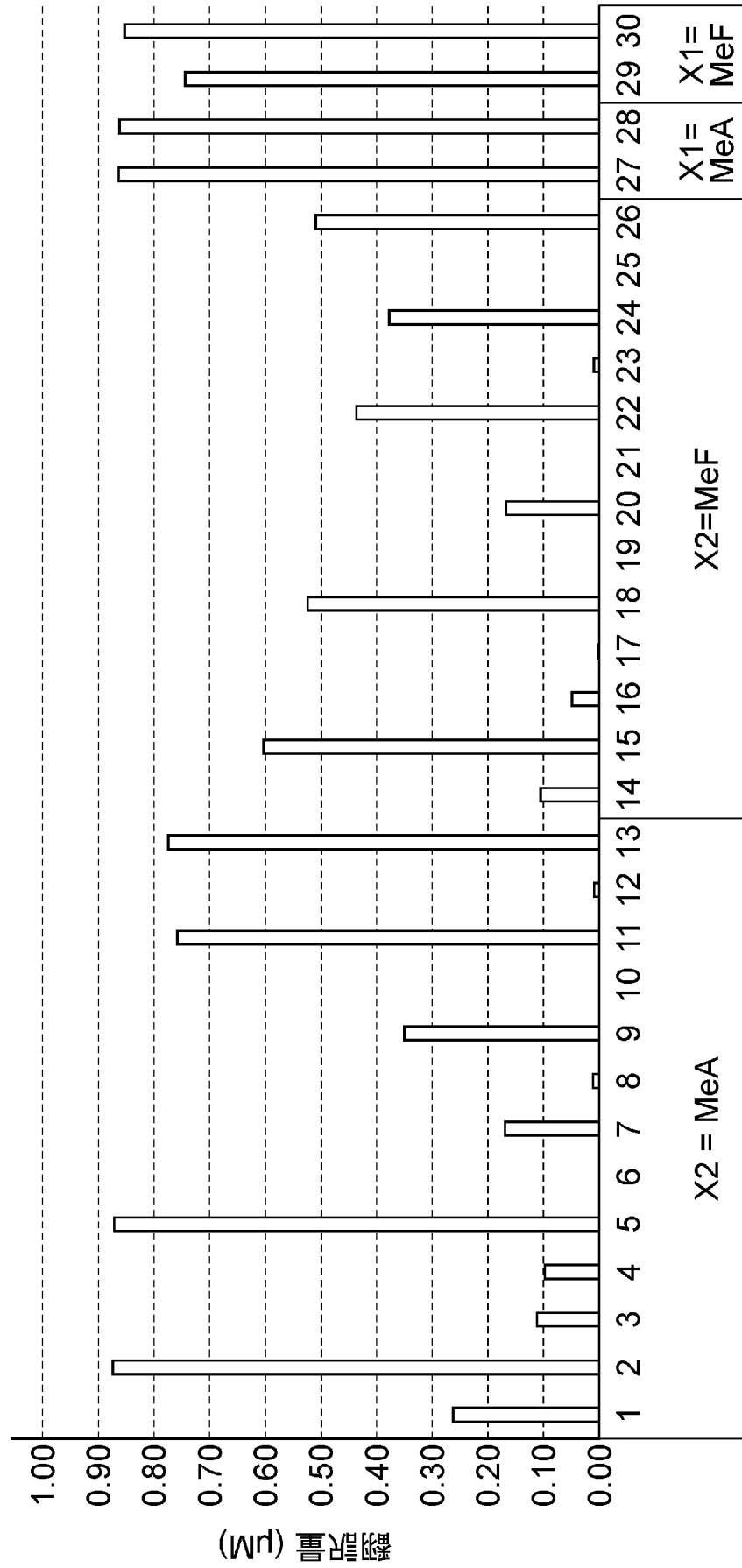
$R^{2c}$  及び  $R^{2bc}$  は、それらが結合している炭素原子と共に環を形成してよく、

$R^{1c}$  が結合している窒素原子、 $R^{1c}$ 、 $R^{2c}$  が結合している炭素原子及び  $R^{2c}$  は共に環を形成していてもよい。]

[請求項15]

請求項 1～14 のいずれか一項に記載の方法を含む、ペプチド複合体の製造方法。

[図1]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/044244

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<i>C12P 21/00</i> (2006.01)i; <i>C12N 15/09</i> (2006.01)i; <i>C40B 40/10</i> (2006.01)i FI: C12P21/00 C; C12N15/09 Z ZNA; C40B40/10		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12P21/00; C12N15/09; C40B40/10		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024 Registered utility model specifications of Japan 1996-2024 Published registered utility model applications of Japan 1994-2024		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KAWAKAMI, Takashi et al. Extensive Reprogramming of the Genetic Code for Genetically Encoded Synthesis of Highly N-Alkylated Polycyclic Peptidomimetics. Journal of the American Chemical Society. 2013, vol. 135, pp. 12297-12304, doi:10.1021/ja405044k abstract, results, fig. 1, 3-5, CNA 3, 4, 16	1-15
Y		1-15
Y	WO 2020/138336 A1 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) 02 July 2020 (2020-07-02) claims, examples, compound AAtR-2, AAtR-3, AAtR-4, AAtR-21, AAtR-22, AAtR-24, AAtR-25, AAtR-31, AAtR-32, AAtR-39, AAtR-40	1-15
Y	WO 2021/261577 A1 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) 30 December 2021 (2021-12-30) claims, examples, compound AAtR-30, AAtR-31, AAtR-33, AAtR-34, AAtR-36, AAtR-37, AAtR-39, AAtR-40, AAtR-42, AAtR-43, AAtR-45, AAtR-46, AAtR-58, AAtR-76, AAtR-77, AAtR-79, AAtR-80, AAtR-82, AAtR-83	1-15
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search <b>16 February 2024</b>		Date of mailing of the international search report <b>27 February 2024</b>
Name and mailing address of the ISA/JP <b>Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan</b>		Authorized officer  Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/044244

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
  - a.  forming part of the international application as filed.
  - b.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),  
 accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2.  With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/JP2023/044244**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO	2020/138336	A1	02 July 2020	US 2022/0205009 A1 claims, examples, compound AAAtR-2, AAAtR-3, AAAtR-4, AAAtR-21, AAAtR-22, AAAtR-24, AAAtR-25, AAAtR-31, AAAtR-32, AAAtR-39, AAAtR-40 EP 3904568 A1 KR 10-2021-0108994 A CN 113423877 A	
-----					
WO	2021/261577	A1	30 December 2021	EP 4166675 A1 claims, examples, compound AAAtR-30, AAAtR-31, AAAtR-33, AAAtR-34, AAAtR-36, AAAtR-37, AAAtR-39, AAAtR-40, AAAtR-42, AAAtR-43, AAAtR-45, AAAtR-46, AAAtR-58, AAAtR-76, AAAtR-77, AAAtR-79, AAAtR-80, AAAtR-82, AAAtR-83 CN 115667539 A KR 10-2023-0028363 A	
-----					

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12P 21/00(2006.01)i; C12N 15/09(2006.01)i; C40B 40/10(2006.01)i FI: C12P21/00 C; C12N15/09 Z ZNA; C40B40/10		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C12P21/00; C12N15/09; C40B40/10 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922 - 1996年 日本国公開実用新案公報 1971 - 2024年 日本国実用新案登録公報 1996 - 2024年 日本国登録実用新案公報 1994 - 2024年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	KAWAKAMI Takashi et al. , Extensive Reprogramming of the Genetic Code for Genetically Encoded Synthesis of Highly N-Alkylated Polycyclic Peptidomimetics, Journal of the American Chemical Society, 2013, Vol.135, p.12297-12304, doi:10.1021/ja405044k ABSTRACT, RESULTS, Figure1,3-5, CNA3,4,16	1-15
Y		1-15
Y	WO 2020/138336 A1 (中外製薬株式会社) 02.07.2020 (2020 - 07 - 02) 特許請求の範囲, 実施例, 化合物AAtR-2, AAtR-3, AAtR-4, AAtR-21, AAtR-22, AAtR-24, AAtR-25, AAtR-31, AAtR-32, AAtR-39, AAtR-40	1-15
Y	WO 2021/261577 A1 (中外製薬株式会社) 30.12.2021 (2021 - 12 - 30) 特許請求の範囲, 実施例, 化合物AAtR-30, AAtR-31, AAtR-33, AAtR-34, AAtR-36, AAtR-37, AAtR-39, AAtR-40, AAtR-42, AAtR-43, AAtR-45, AAtR-46, AAtR-58, AAtR-76, AAtR-77, AAtR-79, AAtR-80, AAtR-82, AAtR-83	1-15
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの “D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献 “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献	“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 16.02.2024	国際調査報告の発送日 27.02.2024	
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官） 坂崎 恵美子 4N 9451 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	

## 第 I 欄          ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
  - a.  出願時における国際出願の一部を構成する配列表
  - b.  国際出願日後に、国際調査のために提出された配列表（PCT規則13の3.1(a）  
 配列表が出願時の国際出願の開示の範囲を超えるものではない旨の陳述書が添付されていた。
2.  この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、この国際調査報告は、WIPO標準ST.26に準拠する配列表なしで有意義な国際調査をすることができる限度において作成された。
3. 補足意見：

国際調査報告  
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2023/044244

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
WO	2020/138336	A1	02.07.2020	US	2022/0205009	A1	
				Claims, examples, Compound AAtR-2, AAtR-3, AAtR-4, AAtR-21, AAtR-22, AAtR-24, AAtR-25, AAtR-31, AAtR-32, AAtR-39, AAtR-40			
				EP	3904568	A1	
				KR	10-2021-0108994	A	
				CN	113423877	A	
-----							
WO	2021/261577	A1	30.12.2021	EP	4166675	A1	
				Claims, examples, compoundAAtR-30, AAtR-31, AAtR-33, AAtR-34, AAtR-36, AAtR-37, AAtR-39, AAtR-40, AAtR-42, AAtR-43, AAtR-45, AAtR-46, AAtR-58, AAtR-76, AAtR-77, AAtR-79, AAtR-80, AAtR-82, AAtR-83			
				CN	115667539	A	
				KR	10-2023-0028363	A	
-----							