

(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
2015 年 2 月 5 日(05.02.2015)



(10) 国際公開番号

WO 2015/015613 A1

- (51) 国際特許分類:
C12P 19/26 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/070826
- (22) 国際出願日: 2013 年 7 月 31 日(31.07.2013)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (71) 出願人: 三洋化成工業株式会社(SANYO CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒6050995 京都府京都市東山区一橋野本町 1 1 番地の 1 Kyoto (JP).
- (72) 発明者: 柳原 芳充(YANAGIHARA Fusamitsu); 〒6050995 京都府京都市東山区一橋野本町 1 1 番地の 1 三洋化成工業株式会社内 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人 安富国際特許事務所(YASUTOMI & ASSOCIATES); 〒5320003 大阪府大阪市淀川区宮原 3 丁目 5 番 3 6 号 Osaka (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, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

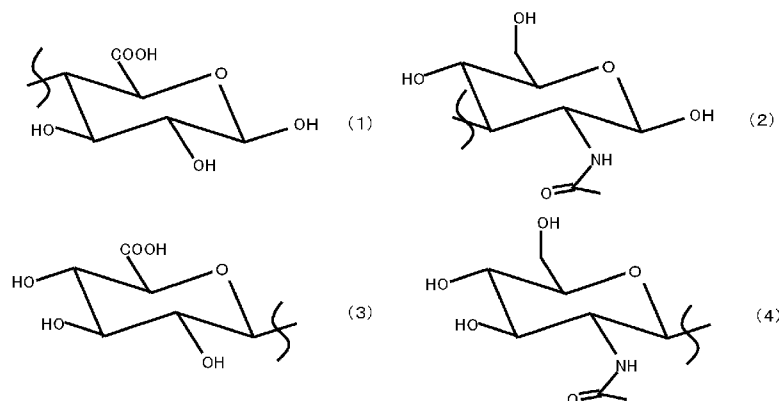
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロシヤ (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

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))

(54) Title: BRANCHED HYALURONIC ACID AND METHOD OF MANUFACTURING SAME

(54) 発明の名称: 分岐ヒアルロン酸及びその製造方法



(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a branched hyaluronic acid the moisture-retaining properties of which are improved without any increase in viscosity. This branched hyaluronic acid is characterized in that glucuronic acid and N-acetylglucosamine are alternately bonded by β -1,3 bonds and β -1,4 bonds to a compound (S) having a total of three or more of at least one species of base out of bases represented in any of general formulae (1) to (4).

(57) 要約: 本発明の目的は、粘度を上げずに保湿性を向上した分岐ヒアルロン酸を提供することであって、本発明の分岐ヒアルロン酸は、下記一般式 (1) ~ (4) のいずれかで表される基のうち少なくとも 1 種の基を合計 3 つ以上有する化合物 (S) にグルクロン酸と N-アセチルグルコサミンとを β 1, 3 結合及び β 1, 4 結合で交互に結合させた分岐ヒアルロン酸であることを特徴とする。

WO 2015/015613 A1

明 細 書

発明の名称：分岐ヒアルロン酸及びその製造方法

技術分野

[0001] 本発明は分岐ヒアルロン酸及びその製造方法に関する。

背景技術

[0002] ヒアルロン酸は牛の眼球、鶏冠、動物の緩衝組織、胎盤、癌細胞及び皮膚などの生体組織に多量に含まれているもので、グルクロン酸とN-アセチルグルコサミンとが β 1, 3結合と β 1, 4結合で交互に結合した直鎖状の多糖であり、分子量が $10^5 \sim 10^6$ Daの高分子量のグルコサミノグリカンである。ヒアルロン酸は、粘度が高く、高い保湿効果を有し、物理的摩擦に対する潤滑効果及び細菌などの侵入に対する保護効果が優れているという性質を持つ。

ヒアルロン酸はこれらの性質を持つので、化粧品添加剤、関節炎治療剤、創傷被覆剤、眼科手術用手術補助剤及び外科手術後の癒着阻止剤などの医薬品として広範囲に使用されている。

[0003] ヒアルロン酸の特性の一つである保湿性を向上させるためには、ヒアルロン酸の分子量を大きくすることが有効である（特許文献1）。しかしながら、分子量を大きくすると、ヒアルロン酸の粘度が高くなり、化粧品等を製造する際、他の成分との配合の自由度が制約される、ベタツキ感がでるという問題がある。

したがって、ヒアルロン酸の粘度を上げずに、保湿性を向上する必要がある。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：国際公開第2006/072243号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

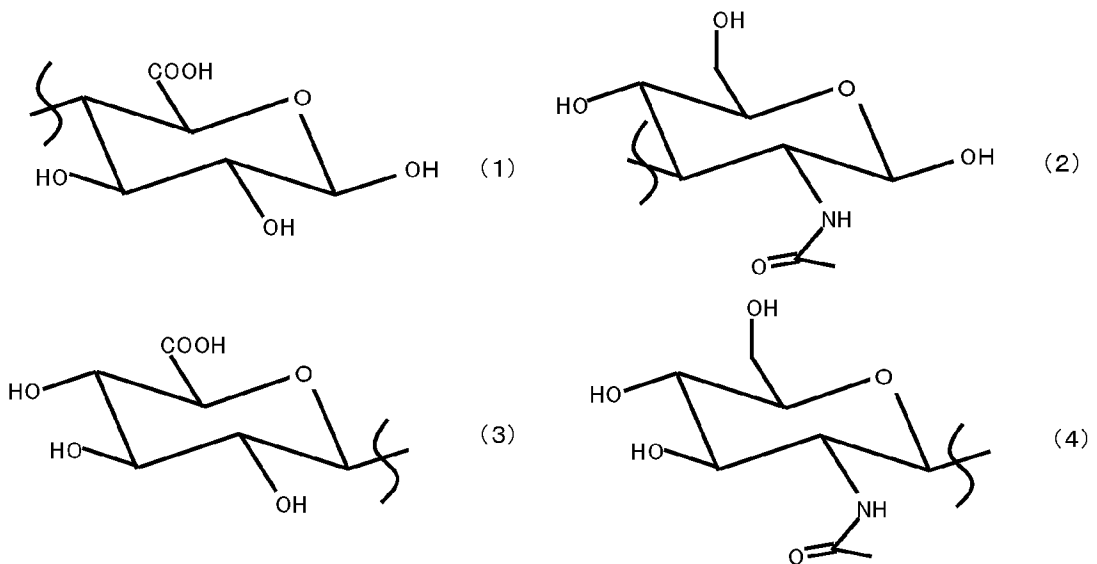
[0005] 本発明は、粘度を上げずに保湿性を向上した分岐ヒアルロン酸を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者は、上記の目的を達成するべく検討を行った結果、本発明に到達した。

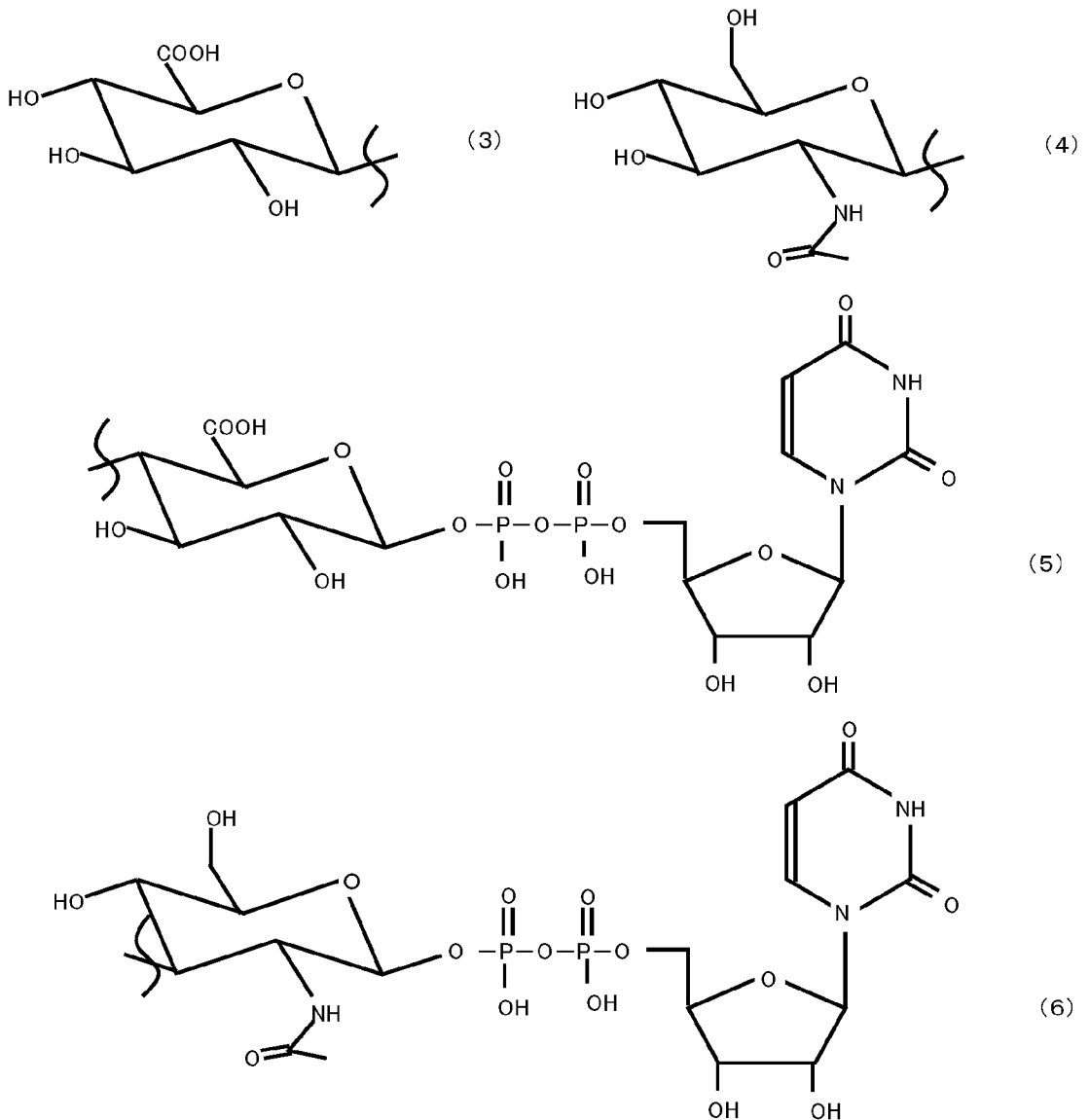
すなわち、本発明は、下記一般式（１）～（４）のいずれかで表される基からなる群より選ばれる少なくとも１種の基を合計３つ以上有する化合物（Ｓ）にグルクロン酸とＮ－アセチルグルコサミンとを β １，３結合及び β １，４結合で交互に脱水縮合させた分岐ヒアルロン酸；下記一般式（３）～（６）のいずれかで表される基からなる群より選ばれる少なくとも１種の基を合計３つ以上有する化合物（Ｓ'）、ウリジン二リン酸－グルクロン酸及びウリジン二リン酸－Ｎ－アセチルグルコサミンにヒアルロン酸合成酵素（Ａ）を作用させる分岐ヒアルロン酸の製造方法である。

[0007] [化１]



[0008]

[化2]



発明の効果

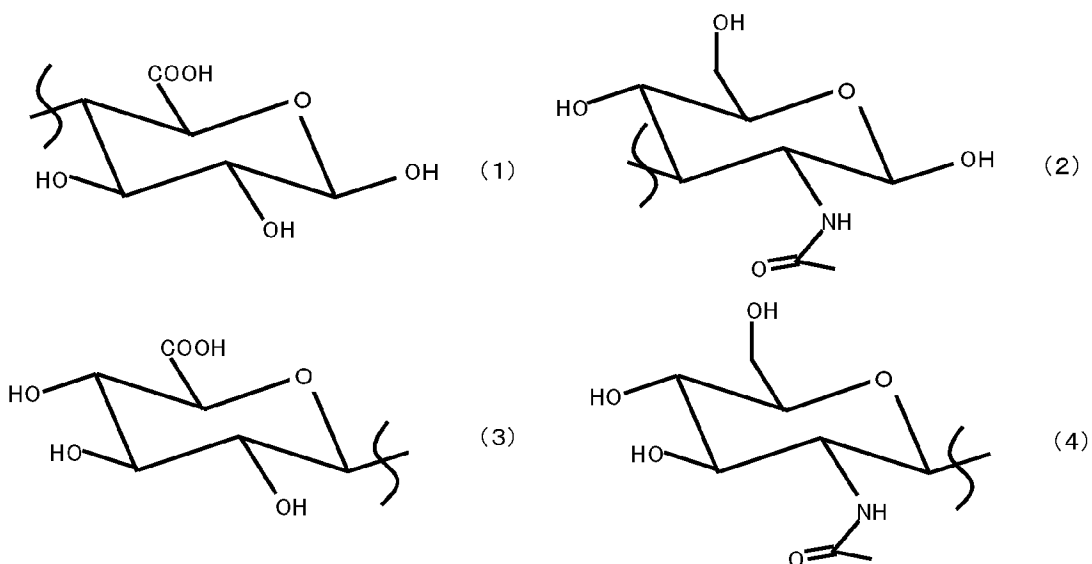
[0009] 本発明の分岐ヒアルロン酸は、保湿性の機能を向上しているにもかかわらず粘度が低い。また、本発明の分岐ヒアルロン酸の製造方法は、保湿性の機能を向上した粘度の低い分岐ヒアルロン酸を製造することができる。

発明を実施するための形態

[0010] 本発明の分岐ヒアルロン酸は、下記一般式（１）～（４）のいずれかで表される基からなる群より選ばれる少なくとも１種を合計３つ以上有する化合物（Ｓ）にグルクロン酸とＮ－アセチルグルコサミンとをβ１，３結合及び

β 1, 4 結合で交互に脱水縮合させた分岐ヒアルロン酸である。分岐ヒアルロン酸としては、分岐ヒアルロン酸分子中のカルボキシル基のプロトンの一部又は全部がアルカリ金属（リチウム、ナトリウム及びカリウム等）イオン及び／又はアルカリ土類金属（カルシウム等）イオンで置換された分岐ヒアルロン酸塩を含む。

[0011] [化3]



[0012] 化合物（S）は、上記一般式（1）～（4）のいずれかで表される基からなる群より選ばれる少なくとも1種の官能基を合計3つ以上有する化合物である。すなわち、（1）～（4）のいずれかで表される基の1種の官能基を3つ以上有してもよいし、複数種の官能基を合計3つ以上有しても良い。（S）には、下記（S1）～（S4）が含まれる。

（S1）グルクロン酸及び／又はN-アセチルグルコサミンが合計2～10,000個結合したものの（SS1）に化合物（T）を反応させたもの。

（S2）グルクロン酸が2～10,000個結合したものの又はグルクロン酸とN-アセチルグルコサミンとが合計2～10,000個結合したものの（SS2）に化合物（U）を反応させたもの。

（S3）グルクロン酸及び／又はN-アセチルグルコサミンが合計2～10,000個結合したものの（SS3）に化合物（V）を反応させて反応性単体（V'）とし、（V'）を重合したもの。

(S 4) グルクロン酸が2～10,000個結合したものの又はグルクロン酸及びN-アセチルグルコサミンが合計2～10,000個結合したものの(S S 4)に化合物(W)を反応させて反応性単量体(W')とし、(W')を重合したものの。

[0013] 化合物(S)の分子中の上記一般式(1)～(4)のいずれかで表される基の数は、合計3つ以上であるが、保湿能及び粘度の観点から、4～1,000,000が好ましく、さらに好ましくは6～1,000,000である。

[0014] 化合物(T)としては、グルクロン酸及び／又はN-アセチルグルコサミンが合計2～10,000個結合したものの(S S 1)の分子中のヒドロキシル基と反応する官能基を2個以上有する化合物が含まれ、有機ポリイソシアネート化合物(T 1)、多価カルボン酸(無水物)(T 2)、多官能エポキシ樹脂(T 3)、アルデヒド基含有化合物(T 4)及びジビニルスルホン(T 5)が含まれる。

[0015] 有機ポリイソシアネート化合物(T 1)としては、1分子中に2個以上のイソシアネート基を有する化合物が含まれ、芳香族ポリイソシアネート、脂肪族ポリイソシアネート、脂環式ポリイソシアネート、芳香脂肪族ポリイソシアネート、これらの変性物(ウレタン基、カルボジイミド基、アロファネート基、ウレア基、ビウレット基、イソシアヌレート基及びオキサゾリドン基含有変性物等)及びこれらの2種以上の混合物が含まれる。

[0016] 芳香族ポリイソシアネートとしては、炭素数(NCO基中の炭素を除く；以下のポリイソシアネートも同様)が6～16の芳香族ジイソシアネート、炭素数6～20の芳香族トリイソシアネート及びこれらのイソシアネートの粗製物等が挙げられる。具体例としては、ジエチルベンゼンジイソシアネート、1,3-及び1,4-フェニレンジイソシアネート、2,4-及び2,6-トリレンジイソシアネート(TDI)、粗製TDI、2,4'-及び4,4'-ジフェニルメタンジイソシアネート(MDI)並びにポリメチレンポリフェニレンポリイソシアネート(粗製MDI)等が挙げられる。

[0017] 脂肪族ポリイソシアネートとしては、炭素数2～18の脂肪族ジイソシアネート等が挙げられる。具体例としては、エチレンジイソシアネート、テトラメレンジイソシアネート及びヘキサメレンジイソシアネート（HDI）等が挙げられる。

[0018] 脂環式ポリイソシアネートとしては、炭素数4～16の脂環式ジイソシアネート等が挙げられる。具体例としては、イソホロンジイソシアネート（IPDI）、4,4'-ジシクロヘキシルメタンジイソシアネート（水添MDI）及び1,4-シクロヘキサンジイソシアネート等が挙げられる。

[0019] 芳香脂肪族イソシアネートとしては、炭素数8～12の芳香脂肪族ジイソシアネート等が挙げられる。具体例としては、キシリレンジイソシアネート（XDI）及び α , α , α' , α' -テトラメチルキシリレンジイソシアネート（TMXDI）等が挙げられる。

変性ポリイソシアネートの具体例としては、カルボジイミド変性MDI等が挙げられる。

有機ポリイソシアネート化合物（T1）としては、1種単独でも、2種以上を併用してもよい。

[0020] 多価カルボン酸（無水物）（T2）としては、非環式多価カルボン酸（無水物）、芳香族多価カルボン酸（無水物）及び脂環式多価カルボン酸（無水物）が含まれる。

なお、カルボン酸（無水物）とはカルボン酸及び／又はカルボン酸無水物を意味する。

非環式多価カルボン酸（無水物）としては、炭素数2～20の2価又は3価以上のカルボン酸（無水物）が挙げられ、具体的には、シュウ酸、マロン酸、コハク酸及びこれらの無水物等が挙げられる。

芳香族多価カルボン酸（無水物）としては、炭素数8～20の2価又は3価以上のカルボン酸（無水物）が挙げられ、具体的には、フタル酸、イソフタル酸、テレフタル酸及びこれらの無水物等が挙げられる。

脂環式多価カルボン酸（無水物）としては、炭素数8～20の2価又は3

価以上のカルボン酸（無水物）が挙げられ、具体的には、シクロヘキサノー 1, 2-ジカルボン酸、シクロヘキサノー 1, 3-ジカルボン酸、シクロヘキサノー 1, 4-ジカルボン酸、テトラヒドロフタル酸及びこれらの無水物等が挙げられる。

多価カルボン酸（無水物）（T 2）としては、1 種単独でも、2 種以上を併用してもよい。

[0021] 多官能エポキシ樹脂（T 3）としては、炭素数 5～100 のエポキシ基を 2 個以上有する化合物が含まれ、具体的には、エチレングリコールジグリシジルエーテル、ジエチレングリコールジグリシジルエーテル、プロピレングリコールジグリシジルエーテル、ジプロピレングリコールジグリシジルエーテル、グリセロールジグリシジルエーテル、トリメチロールプロパントリグリシジルエーテル、ソルビトールポリグリシジルエーテル、コハク酸ジグリシジルエステル、アジピン酸ジグリシジルエステル、ビスフェノール A 型エポキシ樹脂、フェノールノボラック型エポキシ樹脂及び水添ビスフェノール A 型エポキシ樹脂等が挙げられる。

多官能エポキシ樹脂（T 3）としては、1 種単独でも、2 種以上を併用してもよい。

[0022] アルデヒド基含有化合物（T 4）としては、炭素数 1～100 のアルデヒド基を 1 個以上有する化合物が含まれ、具体的には、ホルムアルデヒド、炭素数 2～4 のアルキル及び／又はアルケニル基を有する脂肪族アルデヒド（アセトアルデヒド、プロピオンアルデヒド、n-ブチルアルデヒド及びイソブチルアルデヒド等）、炭素数 7～100 の芳香族アルデヒド（ベンズアルデヒド及びシンナムアルデヒド等）、並びに炭素数 4～100 の脂環式アルデヒド（シクロプロパンアルデヒド、シクロペンタンアルデヒド、3-メチルシクロペンタンアルデヒド及び 1-フェニルシクロペンタンアルデヒド等）等が挙げられる。

アルデヒド基含有化合物（T 4）としては、1 種単独でも、2 種以上を併用してもよい。

[0023] 化合物（Ｔ）としては、製造の容易性及び保湿性の観点から、ジビニルスルホン（Ｔ５）が好ましい。

[0024] （Ｓ１）において、（ＳＳ１）と化合物（Ｔ）とを結合させる場合において、化合物（Ｔ）の結合量は、保湿性の観点から、（ＳＳ１）分子中のグルクロン酸単位及びＮ－アセチルグルコサミン単位の合計モル数を基準として、０．０００１～１００モル％が好ましく、さらに好ましくは０．０１～３０モル％である。

化合物（Ｔ）の使用量を多くすれば、分岐の数を増やすことができ、少なくすれば分岐の数を少なくすることができる。

[0025] （Ｓ１）は、グルクロン酸及び／又はＮ－アセチルグルコサミンが合計２～１０，０００個結合したもの（ＳＳ１）と上記化合物（Ｔ）とを反応させることにより得ることができる。反応条件は、ヒドロキシル基を有する化合物と上記化合物（Ｔ）とを反応させる際の一般的な条件と同じでよく、特に限定されない。

（Ｓ１）における、グルクロン酸及び／又はＮ－アセチルグルコサミンが合計２～１０，０００個結合したもの（ＳＳ１）において、（ＳＳ１）の１分子当たりのグルクロン酸単位とＮ－アセチルグルコサミン単位の合計数は、保湿性及び粘度の観点から、２～１，０００個であることが好ましく、さらに好ましくは２～１００個、次にさらに好ましくは２～３０個である。

[0026] 化合物（Ｕ）としては、グルクロン酸が２～１０，０００個結合したもの又はグルクロン酸及びＮ－アセチルグルコサミンが合計２～１０，０００個結合したもの（ＳＳ２）の分子中のカルボキシル基と反応する官能基を２個以上有する化合物が含まれ、多価アルコール（Ｕ１）、１級及び／又は２級アミノ基を２個以上有する化合物（Ｕ２）、アミノアルコール（Ｕ３）及びチオール基を２個以上有する化合物（Ｕ４）が含まれる。

[0027] 多価アルコール（Ｕ１）としては、脂肪族多価アルコール及び脂環式多価アルコールが含まれる。

脂肪族多価アルコールとしては、炭素数２～２０の２価又は３価以上のア

ルコール及びこれらのアルキレンオキサイド（以下、A Oと略記する）付加物が挙げられ、具体的には、エチレングリコール、1，2－又は1，3－プロピレングリコール、ジエチレングリコール、ネオペンチルグリコール、グリセリン、トリメチロールエタン、トリメチロールプロパン、1，2，6－ヘキサントリオール、ペンタエリスリトール、ジグリセリン、トリグリセリン、ジペンタエリスリトール、ソルビトール、マンニトール及びこれらのA O付加物等が挙げられる。

A Oとしては、炭素数2～6の1，2－A O、例えば、エチレンオキサイド（以下、E Oと略す）、炭素数3以上の1，2－A O {1，2－プロピレンオキサイド（以下、P Oと略す）及び1，2ブチレンオキサイド} 等が挙げられる。A Oは2種以上を併用（ランダム付加及び／又はブロック付加）してもよい。以下において同じである。

脂環式多価アルコールとしては、炭素数6～20の2価又は3価以上のアルコール及びこれらのA O付加物が挙げられ、具体的には、1，4－シクロヘキサンジオール、1，3－シクロヘキサンジメタノール、1，4－シクロヘキサンジメタノール、水添ビスフェノールA、水添ビスフェノールF、スピログリコール、ジヒドロキシメチルトリシクロデカン及びこれらのA O付加物等が挙げられる。

多価アルコール（U 1）としては、1種単独でも、2種以上を併用してもよい。

[0028] （U 2）としては、エチレンジアミン、トリメチレンジアミン、ヘキサメチレンジアミン及びジエレントリアミン等の脂肪族ポリアミン；ピペラジン、N－アミノエチルピペラジン及びその他特公昭55－21044号公報記載の複素環式ポリアミン；ジシクロヘキシルメタンジアミン及びイソホロンジアミン等の脂環式ポリアミン；フェニレンジアミン、トリレンジアミン、ジエチルトリレンジアミン、キシリレンジアミン、ジフェニルメタンジアミン、ジフェニルエーテルジアミン及びポリフェニルメタンポリアミン等の芳香族ポリアミン；ポリアミドポリアミン〔例えばジカルボン酸（ダイマー

酸等)と過剰の(酸1モル当り2モル以上の)ポリアミン(上記アルキレンジアミン及びポリアルキレンポリアミン等)との縮合により得られる低分子量ポリアミドポリアミン]; ポリエーテルポリアミン[ポリエーテルアルコール(ポリアルキレングリコール等)のシアノエチル化物の水素化物]; シアノエチル化ポリアミン[例えばアクリロニトリルとポリアミン(上記アルキレンジアミン及びポリアルキレンポリアミン等)との付加反応により得られるシアノエチル化ポリアミン。例えばビスシアノエチルジエチレントリアミン等]等が挙げられる。

1級及び/又は2級アミノ基を2個以上有する化合物(U2)としては、1種単独でも、2種以上を併用してもよい。

[0029] (U3)としては、アルカノールアミン、例えばモノー、ジー及びトリアルカノールアミン(モノエタノールアミン、モノイソプロパノールアミン、モノブタノールアミン、トリエタノールアミン及びトリプロパノールアミン等); これらのアルキル(炭素数1~4)置換体[N, N-ジアルキルモノアルカノールアミン(N, N-ジメチルエタノールアミン及びN, N-ジエチルエタノールアミン等)及びN-アルキルジアルカノールアミン(N-メチルジエタノールアミン及びN-ブチルジエタノールアミン等)]; 及びこれらのジメチル硫酸又はベンジルクロリド等の4級化剤による窒素原子4級化物等が挙げられる。

アミノアルコール(U3)としては、1種単独でも、2種以上を併用してもよい。

[0030] (U4)としては、炭素数2~20の2~8価の多価チオールが挙げられる。具体的にはエタンジチオール、プロパンジチオール、1, 3-ブタンジチオール、1, 4-ブタンジチオール、1, 6-ヘキサンジチオール及び3-メチルペンタンジチオール等が挙げられる。

チオール基を2個以上有する化合物(U4)としては、1種単独でも、2種以上を併用してもよい。

[0031] (S2)は、グルクロン酸が2~10, 000個結合したものの又はグルク

ロン酸及びN-アセチルグルコサミンが合計2～10,000個結合したものの(S S 2)と化合物(U)とを反応させたものである。反応条件は、カルボキシル基を有する化合物と上記化合物(U)とを反応させる際の一般的な条件と同じでよく、特に限定されない。

[0032] (S 2)において、グルクロン酸が2～10,000個結合したものの又はグルクロン酸及びN-アセチルグルコサミンが合計2～10,000個結合したものの(S S 2)と化合物(U)とを結合させる場合の化合物(U)の結合量は、保湿能及び粘度の観点から、(S S 2)の分子中のグルクロン酸単位のモル数を基準として、0.00001～50モル%が好ましく、さらに好ましくは0.001～20モル%である。

化合物(U)の使用量を多くすれば、分岐の数を増やすことができ、少なくすれば分岐の数を少なくすることができる。

[0033] (S 2)において、グルクロン酸が2～10,000個結合したものの又はグルクロン酸及びN-アセチルグルコサミンが合計2～10,000個結合したものの(S S 2)において、(S S 2)の1分子当たりのグルクロン酸単位及びN-アセチルグルコサミン単位の合計数は、保湿性及び粘度の観点から、2～1,000個であることが好ましく、さらに好ましくは2～100個、次にさらに好ましくは2～30個である。

[0034] 化合物(V)としては、グルクロン酸及び／又はN-アセチルグルコサミンが合計2～10,000個結合したものの(S S 3)の分子中のヒドロキシル基と反応する官能基を1個以上有し、重合性官能基を1個以上有する化合物が含まれ、不飽和カルボン酸(V 1)、不飽和エポキシド(V 2)、不飽和ヒドロカルビル基を有するハライド(V 3)及び不飽和イソシアネート(V 4)が含まれる。

[0035] (V 1)としては、重合性不飽和基を1個有する不飽和モノカルボン酸及び不飽和ジカルボン酸(無水物)を含む。なお、本発明において不飽和ジカルボン酸(無水物)は、不飽和ジカルボン酸及び／又は不飽和ジカルボン酸無水物を意味する。

不飽和モノカルボン酸としては、炭素数 3 ～ 12 の不飽和モノカルボン酸が挙げられ、具体的には、（メタ）アクリル酸及びクロトン酸等が挙げられる。

不飽和ジカルボン酸（無水物）としては、炭素数 4 ～ 30 のものが挙げられ、例えば脂肪族のもの（炭素数 4 ～ 24、例えばマレイン酸、フマル酸、イタコン酸、シトラコン酸、メサコン酸及びこれらの無水物等）、並びに脂環式のもの（炭素数 8 ～ 24、例えばシクロヘキサンジカルボン酸及びシクロヘプテンジカルボン酸等）等が挙げられる。

不飽和カルボン酸（V 1）は 1 種単独でも、2 種以上を併用してもよい。

[0036] （V 2）としては、重合性不飽和基を 1 個有する不飽和エポキシが含まれ、不飽和ヒドロカルビル基を有するグリシジルエーテル（例えば、ビニルグリシジルエーテル、プロペニルグリシジルエーテル、（メタ）アリルグリシジルエーテル及び p-ビニルフェニルグリシジルエーテル等）；不飽和モノカルボン酸アシル基を有するグリシジリエステル（例えば、グリシジル（メタ）アクリレート等）等が挙げられる。

不飽和エポキシド（V 2）は 1 種単独でも、2 種以上を併用してもよい。

[0037] （V 3）としては、炭素数 2 ～ 20 の不飽和ヒドロカルビル基を有するハライド（クロライド及びブロマイド等）が含まれ、例えば、ビニルクロライド、プロペニルクロライド及び（メタ）アリルクロライド等が挙げられる。

不飽和ヒドロカルビル基を有するハライド（V 3）としては、1 種単独でも、2 種以上を併用してもよい。

[0038] （V 4）としては、炭素数 3 ～ 20 の不飽和イソシアネートが含まれ、例えば、（メタ）アリルイソシアネート；（メタ）アクリロイロキシアルキル（C 2 ～ 6）イソシアネート [2-（メタ）アクリロイロキシエチルイソシアネート等] 等が挙げられる。

不飽和イソシアネート（V 4）としては、1 種単独でも、2 種以上を併用してもよい。

[0039] (S3) は、グルクロン酸及び／又はN-アセチルグルコサミンが合計2～10,000個結合したものの(SS3)と上記化合物(V)とを反応させて得られた反応性単量体(V')を重合したものである。グルクロン酸及び／又はN-アセチルグルコサミンが合計2～10,000個結合したものの(SS3)と上記化合物(V)とを反応させる反応条件としては、ヒドロキシル基を有する化合物と上記化合物(V)とを反応させる際の一般的な条件と同じでよく、特に限定されないが、グルクロン酸及び／又はN-アセチルグルコサミンが合計2～10,000個結合したものの(SS3)と上記化合物(V)とを等モル量反応させることが好ましい。また、反応性単量体(V')の重合反応の反応条件としては、重合性不飽和基を有する化合物を重合反応させる際の一般的な条件と同じでよく、特に限定されない。また、(S3)としては、(V')を1種重合させたものでもよく、2種以上共重合させたものでもよく、重合したものを混合してもよい。

[0040] (S3)において、グルクロン酸及び／又はN-アセチルグルコサミンが合計2～10,000個結合したものの(SS3)において、(SS3)の1分子当たりのグルクロン酸単位及びN-アセチルグルコサミン単位の合計数は、保湿性の観点から、2～1,000個であることが好ましく、さらに好ましくは2～100個、次にさらに好ましくは2～30個である。

[0041] 化合物(W)としては、グルクロン酸が2～10,000個結合したオリゴマー又はグルクロン酸及びN-アセチルグルコサミンが合計2～10,000個結合したものの(SS4)の分子中のカルボキシル基と反応する官能基を1個以上有し、重合性官能基を1個以上有する化合物が含まれ、不飽和アルコール(W1)及び不飽和アミン(W2)等が挙げられる。

[0042] (W1)としては、不飽和アルコール及び不飽和アルコールのAO付加物が含まれる。

不飽和アルコールとしては、炭素数3～20の不飽和アルコールが含まれ、例えば、(メタ)アリルアルコール、クロチルアルコール、イソクロチルアルコール、1-ブテン-3-オール、2-ブテン1-オール及びプロパギ

ルアルコール等；不飽和ハイドロカルビレンジオール（アルケンジオール、例えば2-ブテン1,4-ジオール等）；これらの（ポリ）オキシアルキレンエーテル（アルキレン基はC2～4、重合度1～100）、例えば2-ヒドロキシエチルプロペニルエーテル等；水酸基含有（メタ）アクリル酸エステル、例えばヒドロキシアルキル（C2～4）（メタ）アクリレート〔ヒドロキシエチル（メタ）アクリレート及びヒドロキシプロピル（メタ）アクリレート等〕、ポリオキシアルキレン（アルキレン基はC2～4、重合度2～100）（メタ）アクリレート〔ポリエチレングリコール（メタ）アクリレート及びポリプロピレングリコール（メタ）アクリレート等〕；並びに水酸基含有（メタ）アクリルアミド、例えばN-もしくはN,N-ヒドロキシアルキル（C1～4）置換（メタ）アクリルアミド〔N-メチロール（メタ）アクリルアミド及びN,N-ジヒドロキシエチル（メタ）アクリルアミド等〕が挙げられる。

（W1）としては、1種単独でも、2種以上を併用してもよい。

[0043] （W2）としては、炭素数2～20の不飽和アミンが含まれ、具体的には、不飽和ハイドロカルビルモノアミン（例えば、（メタ）アリルアミンおよびクロチルアミン）；N-不飽和ハイドロカルビル置換ポリアミン〔炭素数2～20の脂肪族、脂環式、脂肪芳香族または芳香族ポリアミンのN-ビニル、プロペニルもしくは（メタ）アリル置換体〕（例えば、（メタ）アリルフェニレンジアミン）；アミノ基含有（メタ）アクリル酸エステル及び（メタ）アクリルアミド（例えば、アミノアルキル（炭素数2～4）（メタ）アクリレート〔アミノエチル（メタ）アクリレート等〕、アミノアルキル（炭素数2～4）（メタ）アクリルアミド〔アミノエチル（メタ）アクリルアミド等〕及びこれらのN-アルキル（炭素数1～4）置換体〔t-ブチルアミノエチル（メタ）アクリレート等〕）等が挙げられる。

（W2）としては、1種単独でも、2種以上を併用してもよい。

[0044] （S4）は、グルクロン酸が2～10,000個結合したものの又はグルクロン酸及びN-アセチルグルコサミンが合計2～10,000個結合したも

の（S S 4）と化合物（W）とを反応させて得られた反応性単量体（W'）を重合したものである。グルクロン酸が2～10,000個結合したものの又はグルクロン酸及びN-アセチルグルコサミンが合計2～10,000個結合したものの（S S 4）と化合物（W）とを反応させる反応条件としては、カルボキシル基を有する化合物と上記化合物（W）とを反応させる一般的な条件と同じでよく、特に限定されないが、グルクロン酸が2～10,000個結合したものの又はグルクロン酸及びN-アセチルグルコサミンが合計2～10,000個結合したものの（S S 4）と化合物（W）とを等モル量反応させることが好ましい。また、反応性単量体（W'）の重合反応の反応条件としては、重合性不飽和基を有する化合物を重合反応させる際の一般的な条件と同じでよく、特に限定されない。また、（S 4）としては、（W'）を1種重合させたものでもよく、2種以上共重合させたものでもよく、重合したものを混合してもよい。

[0045] （S 4）において、グルクロン酸が2～10,000個結合したものの又はグルクロン酸及びN-アセチルグルコサミンが合計2～10,000個結合したものの（S S 4）において、（S S 4）の1分子当たりのグルクロン酸単位及びN-アセチルグルコサミン単位の合計数は、保湿性及び粘度の観点から、2～100個であることが好ましく、さらに好ましくは2～30個である。

[0046] 上記化合物（S）のうち、製造の容易性及び保湿性の観点から、（S 1）及び（S 2）が好ましく、さらに好ましくは（S 1）であり、特に好ましくは（S S 1）にジビニルスルホン（T 5）を反応させたものである。

[0047] 本発明の分岐ヒアルロン酸は、上記化合物（S）にグルクロン酸とN-アセチルグルコサミンとを β 1,3結合及び β 1,4結合で交互に脱水縮合させた分岐ヒアルロン酸である。

本発明の分岐ヒアルロン酸は、化合物（S）が上記一般式（1）で表される基を有する場合は、上記一般式（1）の1位の炭素原子に結合しているヒドロキシル基とN-アセチルグルコサミンの3位の炭素原子に結合している

ヒドロキシル基とが脱水縮合によりエーテル結合を形成し (β 1, 3 結合)、さらに、この N-アセチルグルコサミンの 1 位の炭素原子に結合しているヒドロキシル基とグルクロン酸の 4 位の炭素原子に結合しているヒドロキシル基とが脱水縮合によりエーテル結合を形成し (β 1, 4 結合)、同様に N-アセチルグルコサミンとグルクロン酸とが β 1, 3 結合及び β 1, 4 結合で交互に結合したものである。

[0048] また、化合物 (S) が上記一般式 (2) で表される基を有する場合は、上記一般式 (2) の 1 位の炭素原子に結合しているヒドロキシル基とグルクロン酸の 4 位の炭素原子に結合しているヒドロキシル基とが脱水縮合によりエーテル結合を形成し (β 1, 4 結合)、さらに、このグルクロン酸の 1 位の炭素原子に結合しているヒドロキシル基と N-アセチルグルコサミンの 3 位の炭素原子に結合しているヒドロキシル基とが脱水縮合によりエーテル結合を形成し (β 1, 3 結合)、同様にグルクロン酸と N-アセチルグルコサミンとが β 1, 4 結合及び β 1, 3 結合で交互に結合したものである。

[0049] また、化合物 (S) が上記一般式 (3) で表される基を有する場合は、上記一般式 (3) の 4 位の炭素原子に結合しているヒドロキシル基と N-アセチルグルコサミンの 1 位の炭素原子に結合しているヒドロキシル基とが脱水縮合によりエーテル結合を形成し (β 1, 4 結合)、さらに、この N-アセチルグルコサミンの 3 位の炭素原子に結合しているヒドロキシル基とグルクロン酸の 1 位の炭素原子に結合しているヒドロキシル基とが脱水縮合によりエーテル結合を形成し (β 1, 3 結合)、同様に N-アセチルグルコサミンとグルクロン酸とが β 1, 4 結合及び β 1, 3 結合で交互に結合したものである。

[0050] また、化合物 (S) が上記一般式 (4) で表される基を有する場合は、上記一般式 (4) の 3 位の炭素原子に結合しているヒドロキシル基とグルクロン酸の 1 位の炭素原子に結合しているヒドロキシル基とが脱水縮合によりエーテル結合を形成し (β 1, 3 結合)、さらに、このグルクロン酸の 4 位の炭素原子に結合しているヒドロキシル基と N-アセチルグルコサミンの 1 位

の炭素原子に結合しているヒドロキシル基とが脱水縮合によりエーテル結合を形成し (β 1, 4 結合)、同様に、グルクロン酸と N-アセチルグルコサミンとが β 1, 3 結合及び β 1, 4 結合で交互に結合したものである。

[0051] 本発明の分岐ヒアルロン酸において、化合物 (S) の有する基 (上記一般式 (1) ~ (4) のそれぞれ) 1 つ当たりに交互に結合させるグルクロン酸単位及び N-アセチルグルコサミン単位の合計数は、保湿性の観点から、10 ~ 1,000,000 個が好ましく、さらに好ましくは 100 ~ 1,000,000 個である。

また、本発明の分岐ヒアルロン酸の重量平均分子量は、保湿性の観点から、1 ~ 10,000,000 kDa が好ましく、さらに好ましくは 10 ~ 1,000,000 kDa である。

[0052] 本発明の分岐ヒアルロン酸は、上記化合物 (S) にグルクロン酸と N-アセチルグルコサミンとが β 1, 3 結合及び β 1, 4 結合で交互に脱水縮合したものであればよく、特に限定されない。

また、上記分岐ヒアルロン酸を合成することができれば製造方法は特に限定されないが、例えば、後述する分岐ヒアルロン酸の製造方法により製造することができる。

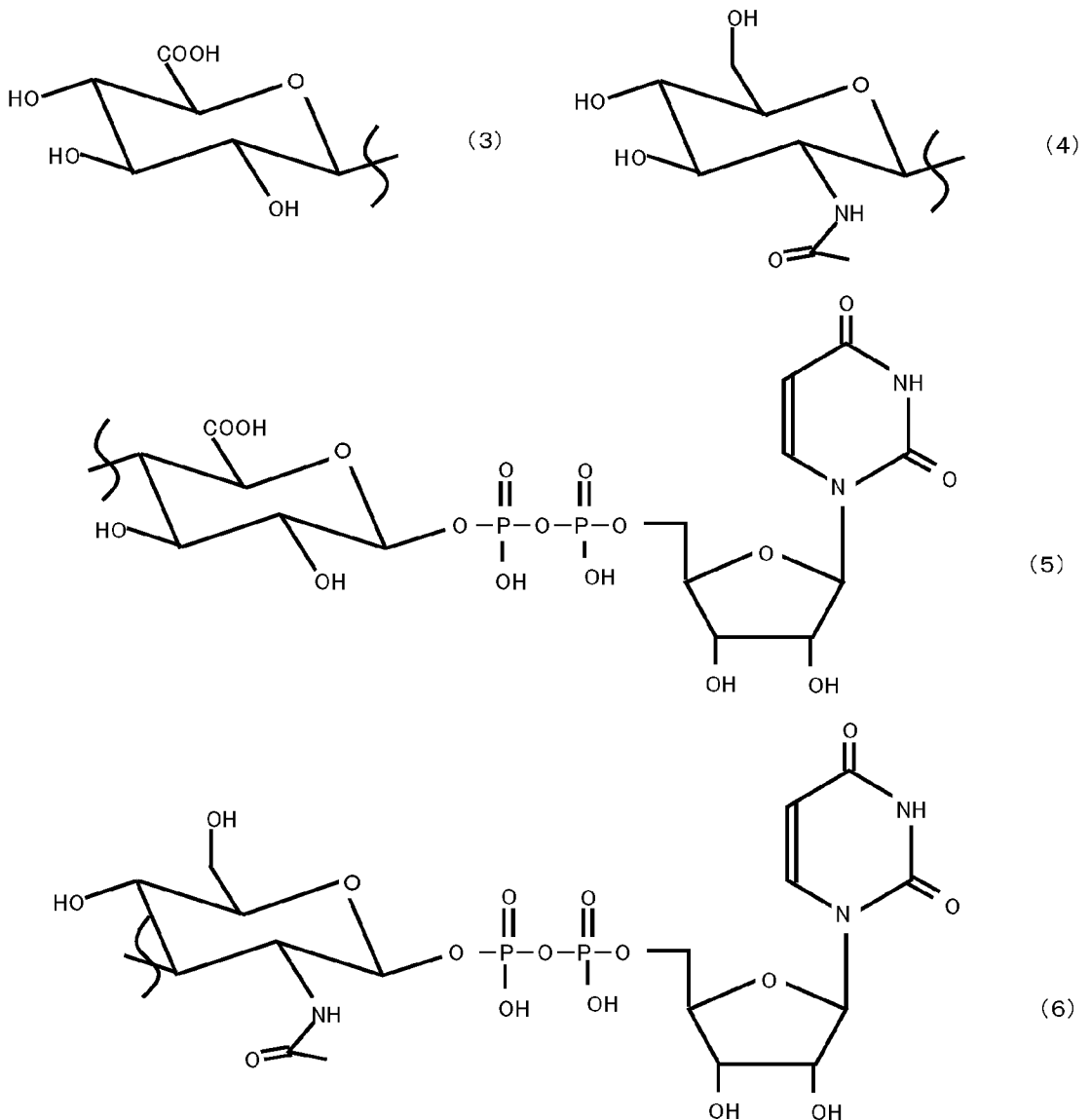
[0053] 本発明の分岐ヒアルロン酸は、同じ数のグルクロン酸及び N-アセチルグルコサミンが直線上に結合した通常のヒアルロン酸と比較して、分岐構造を有していることにより、保湿性は同程度以上であるものの、粘度が低くなる。

また、本発明の分岐ヒアルロン酸は、ヒアルロン酸の優れた性質を保持しつつ、分岐の数を調整することにより、ヒアルロン酸の粘度を調整することができる。したがって、本発明の分岐ヒアルロン酸は、化粧品、医薬部外品、関節炎治療剤、創傷被覆剤、眼科手術用手術補助剤及び外科手術後の癒着阻止剤などの医薬品、医療機器として広範囲に使用できる。

[0054] 本発明の分岐ヒアルロン酸の製造方法は、下記一般式 (3) ~ (6) のいずれかで表される基からなる群より選ばれる少なくとも 1 種の基を合計 3 つ

以上有する化合物（S'）、ウリジンニリン酸－グルクロン酸並びにウリジンニリン酸－N－アセチルグルコサミンにヒアルロン酸合成酵素（A）を作用させる分岐ヒアルロン酸の製造方法である。

[0055] [化4]



[0056] 醗酵生産後のヒアルロン酸を化学的に架橋して分岐ヒアルロン酸とした場合、ゲル化してしまい目的的分岐ヒアルロン酸を得ることができないが、本発明の分岐ヒアルロン酸の製造方法によれば、保湿性の機能を向上させた、粘度の低い分岐ヒアルロン酸を、ゲル化させずに生産率高く製造することができる。

[0057] 本発明の製造方法において、化合物（S'）は上記一般式（3）で表され

る基及び／又は上記一般式（４）で表される基を合計３つ以上有する化合物（Ｓ' １）、上記一般式（５）で表される基及び／又は（６）で表される基を合計３つ以上有する化合物（Ｓ' ２）、並びに上記一般式（３）で表される基及び／又は（４）で表される基と上記一般式（５）で表される基及び／又は（６）で表される基とを合計３つ以上有する化合物（Ｓ' ３）からなる群より選ばれる少なくとも１種の化合物である。

[0058] 化合物（Ｓ' ）として、化合物（Ｓ' １）を用いる場合は、後述するクラスⅡのヒアルロン酸合成酵素を用いることで分岐ヒアルロン酸を製造することができる。また、化合物（Ｓ' ２）を用いる場合は、後述するクラスⅠのヒアルロン酸合成酵素を用いることで分岐ヒアルロン酸を製造することができる。また、（Ｓ' ３）を用いる場合は、クラスⅠのヒアルロン酸合成酵素及びクラスⅡのヒアルロン酸合成酵素を用いることで、分岐ヒアルロン酸を製造することができる。

[0059] 化合物（Ｓ' １）は、上述の（Ｓ）において、上記一般式（３）及び／又は（４）で表される基を合計３つ以上有する化合物である。

化合物（Ｓ' １）として好ましいものは上記（Ｓ）と同様である。

[0060] 化合物（Ｓ' ２）は、ウリジンニリン酸－グルクロン酸及びウリジンニリン酸－Ｎ－アセチルグルコサミンにヒアルロン酸合成酵素（Ａ）を作用させてグルクロン酸とＮ－アセチルグルコサミンとが β １， ３結合又は β １， ４結合で結合したヒアルロン酸を製造することで、末端が上記一般式（５）及び／又は（６）で表される基であるヒアルロン酸が得られ、このヒアルロン酸を化合物（ＳＳ１）～（ＳＳ４）の代わりに用いて、上記（Ｔ）～（Ｗ）を用いて反応させることで、化合物（Ｓ' ２）を製造することができる。

（Ｓ' ２）において、末端が上記一般式（５）及び／又は（６）で表される基であるヒアルロン酸の好ましいものについては、（ＳＳ１）～（ＳＳ４）におけるグルクロン酸単位及びＮ－アセチルグルコサミン単位の好ましい合計結合数、（Ｔ）～（Ｗ）の結合量の好ましい範囲と同じである。

[0061] 化合物（Ｓ' ３）は、上記化合物（Ｓ' ２）と同様にして製造することが

でき、好ましいものも同様である。

[0062] 化合物 (S') としては、反応特異性の観点から、(S' 2) が好ましい。

[0063] 本発明において、ウリジンニリン酸－グルクロン酸とは、ウリジンニリン酸のリン酸基にグルクロン酸が結合した化合物である。ウリジンニリン酸－グルクロン酸は、例えば、ウリジン三リン酸とグルクロン酸－リン酸から合成することができる。また、ウリジンニリン酸－グルコースの酸化によって得ることができる。さらに、ウリジンニリン酸－グルコースの酸化を行うウリジンニリン酸デヒドロゲナーゼを過剰発現した微生物を用いた微生物培養方法によっても生産可能である。

[0064] ウリジンニリン酸－N－アセチルグルコサミンとは、ウリジンニリン酸のリン酸基にN－アセチルグルコサミンが結合した化合物である。ウリジンニリン酸－N－アセチルグルコサミンは、例えば、ウリジン三リン酸とN－アセチルグルコサミン－リン酸からウリジンニリン酸－N－アセチルグルコサミンピロホスホリラーゼによって合成することができる。

[0065] ヒアルロン酸合成酵素 (A) とは、ウリジンニリン酸－グルクロン酸とウリジンニリン酸－N－アセチルグルコサミンとからヒアルロン酸を合成するヒアルロン酸合成活性を有する酵素である。ヒアルロン酸合成活性は、具体的には、ウリジンニリン酸－グルクロン酸及びウリジンニリン酸－N－アセチルグルコサミンを糖供与体として、グルクロン酸が β 1, 3 結合でN－アセチルグルコサミンに結合した二糖単位の、 β 1, 4 結合による繰り返し構造を有するオリゴ糖を合成する能力をいう。

ヒアルロン酸合成酵素 (A) としては、従来のヒアルロン酸合成酵素を使用でき、ヒアルロン酸合成活性を有するものであれば特に限定されないが、例えば、非特許文献 (The Journal of Biological Chemistry, 2007, Vol. 282, No. 51, P36777-36781) に記載されているクラス I 及びクラス II のヒアルロン酸合成酵素が挙げられる。クラス I 及びクラス II は、酵素のアミノ酸配

列の相同性によって分類されたものである。

クラスⅠのヒアルロン酸合成酵素には、ストレプトコッカス・ピロジェネシスやストレプトコッカス・エキシミリス及び藻類ウイルス由来のヒアルロン酸合成酵素等が含まれ、上記化合物（S' 2）及び（S' 3）中の上記一般式（5）及び／又は（6）で表される基におけるウリジンニリン酸基と、ウリジンニリン酸－グルクロン酸及びウリジンニリン酸－N－アセチルグルコサミンにおけるウリジンニリン酸基を脱離させながらグルクロン酸及びN－アセチルグルコサミンを1，3結合及び1，4結合させる反応を触媒する酵素である。

また、クラスⅠⅠのヒアルロン酸合成酵素には、パスツレラ・ムルトシダ由来のヒアルロン酸合成酵素等が含まれ、上記化合物（S' 1）及び（S' 3）中の上記一般式（3）及び／又は（4）で表される基に、ウリジンニリン酸－グルクロン酸及びウリジンニリン酸－N－アセチルグルコサミンにおけるウリジンニリン酸基を脱離させながらグルクロン酸及びN－アセチルグルコサミンを1，3結合及び1，4結合させる反応を触媒する酵素である。

ヒアルロン酸合成酵素（A）のうち、反応特異性の観点から、クラスⅠのヒアルロン酸合成酵素が好ましい。

[0066] 本発明の分岐ヒアルロン酸合成酵素の製造方法において、反応特異性の観点から、化合物（S'）として（S' 2）を用いて、クラスⅠのヒアルロン酸合成酵素を用いた製造方法が好ましい。

[0067] 本発明の製造方法は、化合物（S'）、ウリジンニリン酸－グルクロン酸及びウリジンニリン酸－N－アセチルグルコサミンにヒアルロン酸合成酵素（A）を作用させる製造方法であるが、ヒアルロン酸合成酵素（A）を作用させる際、ウリジンニリン酸を下記化合物（K）に変換する活性を有するウリジンニリン酸変換酵素（B）の存在下でヒアルロン酸合成酵素（A）を作用させることが好ましい。（B）の存在下でヒアルロン酸合成酵素（A）を作用させることにより、分岐ヒアルロン酸をさらに効率よく製造することができる。

化合物（Ｋ）：ウラシル、ウリジン、ウリジナーリン酸、ウリジン三リン酸、ポリウリジル酸、デオキシウリジン二リン酸及びウリジン二リン酸－糖からなる群より選ばれる少なくとも１種の化合物。

[0068] ウリジン二リン酸変換酵素（Ｂ）には、下記（Ｂ－１）～（Ｂ－７）が含まれる。

（Ｂ－１）ウリジン二リン酸をウラシルに変換する活性を有する酵素

（Ｂ－２）ウリジン二リン酸をウリジンに変換する活性を有する酵素

（Ｂ－３）ウリジン二リン酸をウリジナーリン酸に変換する活性を有する酵素

（Ｂ－４）ウリジン二リン酸をウリジン三リン酸に変換する活性を有する酵素

（Ｂ－５）ウリジン二リン酸をポリウリジル酸に変換する活性を有する酵素

（Ｂ－６）ウリジン二リン酸をデオキシウリジン二リン酸に変換する活性を有する酵素

（Ｂ－７）ウリジン二リン酸をウリジン二リン酸－糖に変換する活性を有する酵素

[0069] （Ｂ－２）は、リボヌクレオチド中の糖とリン酸との間のリン酸エステル結合を加水分解して、ヌクレオシドとリン酸にする反応を触媒する酵素である。（Ｂ－２）として、具体的には、ヌクレオチダーゼ及びアピラーゼ等が挙げられる。

[0070] （Ｂ－３）は、ウリジン二リン酸等のリン酸ジエステルを加水分解してリン酸モノエステルとする反応を触媒する酵素である。（Ｂ－３）として、具体的には、アデノシン二リン酸（ＡＤＰ）特異的ホスホフルクトキナーゼ及びヌクレオチダーゼ等が挙げられる。

[0071] （Ｂ－４）は、リン酸基を有する化合物から、ウリジン二リン酸等のリボヌクレオシド二リン酸にリン酸基を転移させる反応を触媒する酵素である。

（Ｂ－４）として、具体的には、ヌクレオシド二リン酸キナーゼ、ポリリン酸キナーゼ、アルギニンキナーゼ、ピルビン酸キナーゼ、カルバミン酸キナ

ーゼ、ホスホグリセリン酸キナーゼ及びホスホクレアチンキナーゼ等が挙げられる。

[0072] ヌクレオシドニリン酸キナーゼは、ヌクレオシド三リン酸からヌクレオシドニリン酸にリン酸基を転移する酵素である。ヌクレオシドニリン酸キナーゼとして、具体的には、生物由来のもの {動物由来のもの (例えば、ヒト由来、ウシ由来及びラット由来のもの等)、植物由来のもの (例えば、シロイヌナズナ由来及びコメ由来のもの等) 及び微生物由来のもの (例えば、エシェリヒア (*Escherichia*) 属由来、サッカロマイセス (*Saccharomyces*) 属由来、バシルス (*Bacillus*) 属由来及びサーマス (*Thermus*) 属由来のもの等) 等}、生物由来のものを化学修飾したもの (例えば、カルボジイミド化合物、無水コハク酸、ヨード酢酸及びイミダゾール化合物からなる群より選ばれる少なくとも1種を作用させて化学修飾したもの等) 及び生物由来のものを遺伝子的に修飾したもの {例えば、Smithらの方法 (*The Journal of Biological Chemistry*, 1978, Vol. 253, No. 18, P 6551-6560) を用いて遺伝子を改変して得たもの等が挙げられる。以下同じ} 等が挙げられる。

[0073] ポリリン酸キナーゼは、リボヌクレオシドニリン酸とポリリン酸とから、リボヌクレオシドニリン酸と、重合度の1つ少ないポリリン酸とを生成する活性を有する酵素である。ポリリン酸キナーゼとして、具体的には、生物由来のもの {植物由来のもの (例えば、タバコ由来のもの等) 及び微生物由来のもの (例えば、エシェリヒア (*Escherichia*) 属由来、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属由来、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属由来及びサーマス (*Thermus*) 属由来のもの等) 等}、生物由来のものを化学修飾したもの (例えば、カルボジイミド化合物、無水コハク酸、ヨード酢酸及びイミダゾール化合物からなる群より選ばれる少なくとも1種を作用させて化学修飾したもの等) 並びに生物由来のものを遺伝子的に修飾したもの等が挙げられる。

[0074] アルギニンキナーゼは、リボヌクレオシド三リン酸とω-ホスホノーレーアルギニンからリボヌクレオシド三リン酸とL-アルギニンを生成する活性を有する酵素である。アルギニンキナーゼとして、具体的には、生物由来のもの {動物由来のもの (例えば、ショウジョウバエ由来、エビ由来及びノミ由来のもの等)、植物由来のもの (例えば、ケヤリ由来のもの等) 及び微生物由来のもの (例えば、バシルス (*Bacillus*) 属由来のもの等) 等}、生物由来のものを化学修飾したもの (例えば、カルボジイミド化合物、無水コハク酸、ヨード酢酸及びイミダゾール化合物からなる群より選ばれる少なくとも1種を作用させて化学修飾したもの等) 並びに生物由来のものを遺伝子的に修飾したもの等が挙げられる。

[0075] ピルビン酸キナーゼは、リボヌクレオシド三リン酸とホスホエノールピルビン酸からリボヌクレオシド三リン酸とピルビン酸を生成する活性を有する酵素である。ピルビン酸キナーゼとして、具体的には、生物由来のもの {動物由来のもの (例えば、ヒト由来、ウシ由来及びラット由来のもの等)、植物由来のもの (例えば、シロイヌナズナ由来及びトウゴマ由来のもの等) 及び微生物由来のもの (例えば、エシェリヒア (*Escherichia*) 属由来及びサッカロマイセス (*Saccharomyces*) 属由来のもの等) 等}、生物由来のものを化学修飾したもの (例えば、カルボジイミド化合物、無水コハク酸、ヨード酢酸及びイミダゾール化合物からなる群より選ばれる少なくとも1種を作用させて化学修飾したもの等) 並びに生物由来のものを遺伝子的に修飾したもの等が挙げられる。

[0076] カルバミン酸キナーゼは、カルバモイルリン酸とリボヌクレオシド三リン酸からリボヌクレオシド三リン酸、二酸化炭素、及びアンモニアを生成する活性を有する酵素である。カルバミン酸キナーゼとして、具体的には、生物由来のもの {動物由来のもの (例えば、ラット由来のもの等) 及び微生物由来のもの (例えば、ピロコッカス (*Pyrococcus*) 属由来、及びラクトバチルス (*Lactobacillus*) 属由来のもの等) 等}、生物由来のものを化学修飾したもの (例えば、カルボジイミド化合物、無水コハ

ク酸、ヨード酢酸及びイミダゾール化合物からなる群より選ばれる少なくとも1種を作用させて化学修飾したもの等）並びに生物由来のものを遺伝子的に修飾したもの等が挙げられる。

[0077] ホスホグリセリン酸キナーゼは、3-ホスホグリセロールリン酸とリボヌクレオシド三リン酸からリボヌクレオシド三リン酸及び3-ホスホグリセリン酸を生成する活性を有する酵素である。ホスホグリセリン酸キナーゼとして、具体的には、生物由来のもの（動物由来のもの（例えば、ラット由来のもの等）及び微生物由来のもの（例えば、サッカロマイセス（*Saccharomyces*）属由来のもの等）等）、生物由来のものを化学修飾したもの（例えば、カルボジイミド化合物、無水コハク酸、ヨード酢酸及びイミダゾール化合物からなる群より選ばれる少なくとも1種を作用させて化学修飾したもの等）並びに生物由来のものを遺伝的に修飾したもの等が挙げられる。

[0078] ホスホクレアチンキナーゼは、ホスホクレアチンとリボヌクレオシド三リン酸からリボヌクレオシド三リン酸及びクレアチンを生成する活性を有する酵素である。ホスホクレアチンキナーゼとして、具体的には、生物由来のもの（動物由来のもの（例えば、ラット由来のもの等）等）、生物由来のものを化学修飾したもの（例えば、カルボジイミド化合物、無水コハク酸、ヨード酢酸及びイミダゾール化合物からなる群より選ばれる少なくとも1種を作用させて化学修飾したもの等）並びに生物由来のものを遺伝的に修飾したもの等が挙げられる。

[0079] ウリジン二リン酸変換酵素（B）として（B-4）を用いる場合、必要により、ウリジン二リン酸にリン酸基を与えるリン酸基含有化合物（b-4）を用いてもよい。（b-4）としては、例えば、ホスホエノールピルビン酸、カルバモイルリン酸、3-ホスホグリセロールリン酸、ホスホクレアチン、トリアミノホスフィンオキシド、リン酸化したアミノ酸（例えばω-ホスホノーレーアルギニン等）、ポリリン酸及びヌクレオシド三リン酸（例えばウリジン三リン酸及びグアノシン三リン酸等）等が挙げられる。（B-4）

と（b-4）の好ましい組み合わせは上述の通りである。

[0080] （B-5）は、ウリジン二リン酸等のリボヌクレオシド二リン酸をリボヌクレオシドーリン酸の共重合体及び無機リン酸とする反応を触媒する酵素である。（B-5）として、具体的には、ポリリボヌクレオチドヌクレオチジルトランスフェラーゼ等が挙げられる。

[0081] （B-6）は、ウリジン二リン酸等のリボヌクレオチドを還元してデオキシリボヌクレオチドとする反応を触媒する酵素である。（B-6）として、具体的には、リボヌクレオシドジホスホリダクターゼ等が挙げられる。

ウリジン二リン酸変換酵素（B）として（B-6）を用いる場合、還元剤（b-6）を用いる必要がある。（b-6）としては、電子伝達タンパク質を用いることができ、例えば、還元型チオレドキシン等が挙げられる。

[0082] （B-7）は、ウリジン二リン酸等のリボヌクレオシド二リン酸と糖リン酸とから糖核酸を合成する反応を触媒する酵素である。（B-7）として、具体的には、スクロースシンターゼ及びN-アシルニューラミネートシチジルトランスフェラーゼ等が挙げられる。

[0083] ウリジン二リン酸変換酵素（B）として（B-7）を用いる場合、糖核酸の原料である糖リン酸（b-7）を用いる必要がある。（b-7）は、単糖又はオリゴ糖の水酸基にリン酸が結合した化合物であり、例えば、グルクロン酸一リン酸（1-ホスホ- α -D-グルクロン酸等）、N-アセチルグルコサミン一リン酸（N-アセチル-D-グルコサミン-1-ホスファート等）等が挙げられる。

[0084] 上記ウリジン二リン酸変換酵素（B）のうち、分岐ヒアルロン酸を効率よく製造する観点及び工業化しやすいという観点から、（B-2）、（B-3）、（B-4）、（B-5）及び（B-7）が好ましく、さらに好ましくは（B-4）である。

[0085] 本発明において、ウリジン二リン酸変換酵素（B）を用いる場合、下記酵素活性 V_{max1} 及び下記酵素活性 V_{max2} を用いて下記数式（1）から算出した酵素活性比（Y）が、分岐ヒアルロン酸を効率よく製造する観点及び

基質（ウリジンニリン酸－グルクロン酸及びウリジンニリン酸－N－アセチルグルコサミン）を有効利用する観点から、0.1以上であることが好ましく、さらに好ましくは1.0以上である。

$$\text{酵素活性比 (Y)} = V_{\text{max}1} / V_{\text{max}2} \quad (1)$$

酵素活性 $V_{\text{max}1}$: ウリジンニリン酸変換酵素 (B) のウリジンニリン酸に対する酵素活性。

酵素活性 $V_{\text{max}2}$: ウリジンニリン酸変換酵素 (B) のウリジンニリン酸－グルクロン酸及びウリジンニリン酸－N－アセチルグルコサミンに対する酵素活性。

なお、酵素活性 $V_{\text{max}1}$ 及び $V_{\text{max}2}$ は下記酵素活性 V_{max} の測定法により測定できる。

[0086] <酵素活性 V_{max} の測定法>

一定量の基質（ウリジンニリン酸、ウリジンニリン酸－グルクロン酸又はウリジンニリン酸－N－アセチルグルコサミン）、ウリジンニリン酸変換酵素 (B)、pH調整剤 (P) 及び水を含む、一定の温度及び一定の pH に調製した酵素反応溶液 (I I) を作成する。酵素反応溶液 (I I) 中に、(B) が (B-4) である場合は必要によりリン酸基含有化合物 (b-4) を添加し、(B) が (B-6) である場合は還元剤 (b-6) を添加し、(B-7) である場合は糖核酸の原料 (b-7) を添加する。

酵素反応溶液 (I I) を作成後、静置し、1分～100時間酵素反応させる。次に、反応後の反応生成物量 (X) を測定して酵素反応初速度 v を求める。同様に、基質の濃度が異なる酵素反応溶液 (I I) を用いて、酵素反応初速度 v を求める。得られた酵素反応初速度 v と基質の濃度とからラインウェバーバークプロットを作成し、酵素活性 V_{max} を求める。

ここで、酵素反応溶液 (I I) の温度は、0～100℃の範囲内で、(B) の活性が失活せず、活性がある温度で、酵素反応溶液 (I I) 作成時から測定終了までの間、一定温度に保つことができればよい。

酵素反応溶液 (I I) の pH は、pH 3～12の範囲内であればよい。ヒ

アルロン酸合成酵素（A）の最適 pH がわかっている場合は最適 pH であることが好ましい。

酵素反応溶液（I I）に用いる pH 調整剤（P）は、扱いやすさ及び（B）の安定性の観点から、H E P E S バッファー、M E S バッファー等の G o o d バッファーが好ましい。酵素反応溶液（I I）中の pH 調整剤（P）の濃度（モル濃度）は、25～500 mM である。

酵素反応溶液（I I）中の（B）の濃度（モル濃度）は、使用する（B）の種類によって適宜選択されるが、後述する反応生成物量（X）を縦軸に、時間 h を横軸にプロットした場合、プロットが一次関数となる濃度を選ぶ。

（B）が（B-4）であり、リン酸基含有化合物（b-4）を添加する場合、酵素反応溶液（I I）中の（b-4）の濃度（モル濃度）は、1 nM～10 M である。また、（b-4）の濃度は、（b-4）の濃度を2倍又は1／2倍に変化させても、反応速度が変化しない程度の濃度とする。

（B）が（B-6）である場合、酵素反応溶液（I I）中の還元剤（b-6）の濃度（モル濃度）は、1 nM～10 M である。また、（b-6）の濃度は、（b-6）の濃度を2倍又は1／2倍に変化させても、反応速度が変化しない程度の濃度とする。

（B）が（B-7）である場合、酵素反応溶液（I I）中の糖リン酸（b-7）の濃度（モル濃度）は、1 nM～10 M である。また、（b-7）の濃度は、（b-7）の濃度を2倍又は1／2倍に変化させても、反応速度が変化しない程度の濃度とする。

酵素反応溶液（I I）中の基質の濃度（モル濃度）は、経時的に反応生成物量（X）を観測できる最小の基質濃度から最大の基質濃度の間で3点以上選ばばよい。

反応時間は、短すぎると、反応生成物量（X）の正確な値が測定できない。また、反応時間が長すぎると、酵素が失活したり基質が枯渇するという問題が存在する。したがって、反応時間は反応生成物量（X）を縦軸に、時間を横軸にプロットした場合、プロットが一次関数となる反応時間とする。

反応生成物量（X）は、反応生成物の量を定量的に測定する目的で適切な条件下でHPLCを用いて解析を行うことにより求める。ここにおいて、反応生成物とは、ウリジンニリン酸変換酵素（B）が有する活性により基質が変換されて生成したものである。

酵素活性 V_{max} （M／s）はミカエリスメンテン式から派生したラインウェバーバーク（Lineweaver-Burk）プロットを用いて求める。ラインウェバーバークプロットは、横軸（x軸）にそれぞれの基質の濃度の逆数（ $1/[S]$ ）、縦軸（y軸）にそれぞれの基質濃度での酵素反応初速度の逆数（ $1/v$ ）をプロットしたものであり、プロットの近似直線とy軸との交点が酵素活性 V_{max} の逆数（ $1/V_{max}$ ）である。

[0087] 上記測定において、基質としてウリジンニリン酸を用いて求めたものが V_{max_1} である。また、基質としてウリジンニリン酸－グルクロン酸又はウリジンニリン酸－N－アセチルグルコサミンをそれぞれ用いて V_{max_2} をそれぞれ求めて、算出した酵素活性比（Y）のうち少なくとも1つが0.1以上であることが好ましく、さらに好ましくは、算出した酵素活性比（Y）の全てが0.1以上であることである。

[0088] 本発明の分岐ヒアルロン酸の製造方法は、化合物（S'）を用いる以外は、従来のウリジンニリン酸－グルクロン酸及びウリジンニリン酸－N－アセチルグルコサミンにヒアルロン酸合成酵素（A）を作用させるヒアルロン酸の製造方法と同様でよい。例えば、下記工程（i）～（iii）により製造する方法が含まれる。

（i）所定量の化合物（S'）、ウリジンニリン酸－グルクロン酸、ウリジンニリン酸－N－アセチルグルコサミン、溶剤（D）及びヒアルロン酸合成酵素（A）を混合して反応溶液（L）とし、所定の温度、所定のpHに調整する。必要により、ウリジンニリン酸変換酵素（B）を加えてもよい。また、本工程では、必要により攪拌してもよい。

上記工程においては、化合物（S'）、ウリジンニリン酸－グルクロン酸、ウリジンニリン酸－N－アセチルグルコサミン及び溶剤（D）を混合し、

温度及びpHを調整した後、ヒアルロン酸合成酵素（A）を添加してもよい。さらに、ヒアルロン酸合成酵素（A）は、そのまま添加してもよく、溶剤（D）で希釈してから添加してもよい。

また、反応溶液（L）中には（B）を含んでもよい。（B）が（B-4）である場合は、（b-4）を含んでもよい。使用する（B）が（B-6）である場合は、（b-6）を含む。使用する（B）が（B-7）である場合は、（b-7）を含む。

さらに、反応溶液（L）中には、脂質（M）、糖類（N）及びオリゴ糖（O）を含んでもよい。

（i i）反応溶液（L）の温度を調整しながら、所定の時間、化合物（S'）、ウリジン二リン酸-グルクロン酸及びウリジン二リン酸-N-アセチルグルコサミンにヒアルロン酸合成酵素（A）を作用させる。本工程では、必要により攪拌してもよい。

（i i i）生成した分岐ヒアルロン酸を精製する。分岐ヒアルロン酸の精製方法としては、適量のアルコール（炭素数1～10のアルコール）等の溶剤（D）を加えて沈殿させる方法や膜（具体的には、セラミック膜等）を用いて溶液交換をする方法等が挙げられる。

[0089] 反応溶液（L）中の化合物（S'）の含有量（重量%）は、分岐ヒアルロン酸を効率よく製造する観点及びヒアルロン酸合成酵素（A）を効率よく作用させる観点から、0.000001～1重量%が好ましい。

反応溶液（L）中のウリジン二リン酸-グルクロン酸の含有量（モル濃度）は、分岐ヒアルロン酸を効率よく製造する観点及びヒアルロン酸合成酵素（A）を効率よく作用させる観点から、0.1mM～2Mが好ましい。

反応溶液（L）中のウリジン二リン酸-N-アセチルグルコサミンの含有量（モル濃度）は、分岐ヒアルロン酸を効率よく製造する観点及びヒアルロン酸合成酵素（A）を効率よく作用させる観点から、0.1mM～2Mが好ましい。

反応溶液（L）中のヒアルロン酸合成酵素（A）の含有量（ユニット/L

）は、分岐ヒアルロン酸を効率よく製造する観点及びヒアルロン酸合成酵素（A）を効率よく作用させる観点から、0.1～1,000,000ユニット/Lが好ましい。

1ユニットとは、1分間に1 μmol のウリジン二リン酸-グルクロン酸及び1 μmol のウリジン二リン酸-N-アセチルグルコサミンからヒアルロン酸を合成する活性を1ユニットと定義する。

[0090] 溶剤（D）としては、水、有機溶剤及びこれらの混合物が含まれる。水としては、特に限定されるものではなく、例えば、水道水、イオン交換水、蒸留水及び逆浸透水等が挙げられる。また、水中にpH調整剤（P）を含むバッファー水溶液等が挙げられる。

pH調整剤（P）としては、従来のpH調整剤が使用でき、ホウ酸バッファー、リン酸バッファー、酢酸バッファー、Trisバッファー、HEPESバッファー、MESバッファー、硫酸、塩酸、クエン酸、乳酸、ピルビン酸、蟻酸、モノエタノールアミン及びジエタノールアミン等が挙げられる。

有機溶剤としては、アルコール（炭素数1～18のアルコールが挙げられ、具体的には、メタノール、エタノール、ブタノール及びエチレングリコール等）、ケトン（アセトン、メチルエチルケトン等）、エーテル（テトラヒドロフラン、ジエチルエーテル及びエチレングリコールモノアルキルエーテル等）、スルホキシド（ジメチルスルホキシド等）、脂肪族または脂環式炭化水素（n-ヘキサン、n-ヘプタン、ミネラルスピリット、シクロヘキサン等）及びふっ素含有化合物（テトラフルオロエチレン等）等が挙げられる。これらの溶剤（D）のうち、タンパク質の安定性の観点からバッファー水溶液が好ましい。

[0091] 反応溶液（L）の温度は、酵素（A）及び（B）の安定性並びに反応速度の観点から0～100℃が好ましい。

[0092] 反応溶液（L）のpHは、反応の至適条件の観点から、pH3～12が好ましい。

[0093] 上記工程（i）及び（ii）において、上記ウリジン二リン酸-グルクロ

ン酸、ウリジンニリン酸-N-アセチルグルコサミン及びヒアルロン酸合成酵素（A）以外に、分岐ヒアルロン酸を効率よく製造する観点から、ウリジンニリン酸変換酵素（B）を用いてもよい。また、（B）として（B-4）を用いる場合は（b-4）を用いてもよく、（B）として（B-6）を用いる場合は（b-6）を用いる必要があり、（B）として（B-7）を用いる場合は（b-7）を用いる必要がある。

ウリジンニリン酸変換酵素（B）を用いる場合、反応溶液（L）中の（B）の含有量（ユニット/L）は、分岐ヒアルロン酸を効率よく製造する観点及びヒアルロン酸合成酵素（A）を効率よく作用させる観点から、0.1～1,000,000ユニット/Lが好ましい。

1ユニットとは、1分間に1 μmol のウリジンニリン酸を化合物（K）に変換する活性を1ユニットと定義する。

[0094] 反応溶液（L）中の（b-4）、（b-6）又は（b-7）の含有量（モル濃度）は、分岐ヒアルロン酸を効率よく製造する観点及びヒアルロン酸合成酵素（A）を効率よく作用させる観点から、0.01 nM～10 Mが好ましい。

[0095] また、上記以外に、酵素の安定化及び酵素の活性化の観点から、脂質（M）、糖類（N）及びオリゴ糖（O）を用いてもよい。

脂質（M）としては、例えば、カルディオピン及びオレイン酸等が挙げられる。

糖類（N）としては、例えば、グリセリン等が挙げられる。

オリゴ糖（O）としては、例えば、オリゴヒアルロン酸等が挙げられる。

[0096] 反応溶液（L）中の脂質（M）の含有量（重量%）は、酵素の安定化及び酵素の活性化の観点から、0～1重量%が好ましい。

反応溶液（L）中の糖類（N）の含有量（重量%）は、酵素の安定化及び酵素の活性化の観点から、0～30重量%が好ましい。

反応溶液（L）中のオリゴ糖（O）の含有量（重量%）は、酵素の安定化及び酵素の活性化の観点から、0～1重量%が好ましい。

[0097] 工程 (i i) において、ヒアルロン酸合成酵素 (A) を作用させる時間は、ヒアルロン酸合成酵素 (A) の活性、反応溶液 (L) の温度、ヒアルロン酸合成酵素 (A)、ウリジンニリン酸－グルクロン酸及びウリジンニリン酸－N－アセチルグルコサミンの量比等によって異なる。反応溶液 (L) の温度を、ヒアルロン酸合成酵素 (A) の活性が高く、反応速度が速い温度に調整すれば、反応時間を短くすることができる。また、反応溶液 (L) 中のウリジンニリン酸－グルクロン酸及びウリジンニリン酸－N－アセチルグルコサミンに対するヒアルロン酸合成酵素 (A) の量が多いほど、反応は早くなり、反応時間は短くなる。

[0098] 本発明の分岐ヒアルロン酸の製造方法としては、分岐ヒアルロン酸を効率よく製造する観点から、下記工程 (1) ～ (3) を (1)、(2)、(3) 及び (1) の順に含む又は下記工程 (1) ～ (3) を同時に行う分岐ヒアルロン酸の製造方法が好ましく、さらに好ましくは下記ミカエリス定数 K_m が下記阻害濃度 $I_{C_{50}}$ の 100 倍未満である製造方法である。

工程 (1) : 上記化合物 (S')、ウリジンニリン酸－グルクロン酸及びウリジンニリン酸－N－アセチルグルコサミンにヒアルロン酸合成酵素 (A) を作用させて (A)、分岐ヒアルロン酸及びウリジンニリン酸を含む組成物 (Z') を得る工程。

工程 (2) : ウリジンニリン酸とリン酸基含有化合物 (b-4) とにウリジンニリン酸変換酵素 (B-4) を作用させてウリジン三リン酸を得る工程。

工程 (3) : ウリジン三リン酸と 1-ホスホ－グルクロン酸とにウリジン三リン酸－モノサッカリド－1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ (C) を作用させてウリジンニリン酸－グルクロン酸を得る工程。

ミカエリス定数 K_m : ウリジンニリン酸を基質とし、ウリジンニリン酸変換酵素 (B-4) を酵素とし、リン酸基含有化合物 (b-4) を作用させてウリジン三リン酸を合成する反応におけるミカエリス定数。

阻害濃度 $I_{C_{50}}$: ヒアルロン酸合成酵素 (A) をウリジンニリン酸－グルクロン酸及びウリジンニリン酸－N－アセチルグルコサミンに作用させる際の

(A) の濃度において、基質としてウリジンニリン酸－グルクロン酸及びウリジンニリン酸－N－アセチルグルコサミンを用いて、阻害剤としてウリジンニリン酸を用いて求めた、(A) の酵素活性が半減するときのウリジンニリン酸の濃度。

[0099] 上記製造方法において、下記ミカエリス定数 K_m は下記阻害濃度 IC_{50} の 100 倍未満であることが好ましい。

ミカエリス定数 K_m : ウリジンニリン酸を基質とし、ウリジンニリン酸変換酵素 (B-4) を酵素とし、リン酸基含有化合物 (b-4) を作用させてウリジンニリン酸を合成する反応におけるミカエリス定数。

阻害濃度 IC_{50} : ヒアルロン酸合成酵素 (A) をウリジンニリン酸－グルクロン酸及びウリジンニリン酸－N－アセチルグルコサミンに作用させる際の (A) の濃度において、基質としてウリジンニリン酸－グルクロン酸及びウリジンニリン酸－N－アセチルグルコサミンを用いて、阻害剤としてウリジンニリン酸を用いて求めた、(A) の酵素活性が半減するときのウリジンニリン酸の濃度。

2 種以上の (B-4) を用いる場合は、それぞれの (B-4) について K_m を求め、全ての (B-4) について K_m が IC_{50} の 100 倍未満であることが好ましい。

また、2 種以上の (A) を用いる場合は、それぞれの (A) について IC_{50} を求め、 K_m が、求めた IC_{50} の中で最も大きい IC_{50} の 100 倍未満であることが好ましい。

[0100] ミカエリス定数 K_m は、Agarwal らによって報告された方法 (Methods of enzymology, 1978, Vol. 51, P483-491 に記載の方法) で酵素反応初速度の基質濃度依存性を求めることによって求められる。ミカエリス定数 K_m の測定に用いる (B-4) の形態としては、精製酵素を用いる。

[0101] 阻害濃度 IC_{50} は、酵素反応初速度の阻害剤に対する濃度依存性を求めることによって求められる。具体的には、下記阻害濃度 IC_{50} の測定法によっ

て求めたものである。阻害濃度 IC_{50} の測定に用いる (A) の形態としては、精製酵素を用いる。

[0102] 阻害濃度 IC_{50} は、上記の製造方法において、(A) を作用させる際の濃度と同様の (A) の濃度、温度及び pH の条件下において、下記測定方法によって求められる。

＜(A) の酵素活性が半減するときのウリジンニリン酸の濃度である阻害濃度 IC_{50} の測定方法＞

一定量のヒアルロン酸合成酵素 (A)、ウリジンニリン酸、ウリジンニリン酸－グルクロン酸、ウリジンニリン酸－N－アセチルグルコサミン、pH 調整剤 (P) 及び水を含む一定の温度及び pH に調製した液量 1 mL 以下の酵素反応溶液 (III) を作成する。

酵素反応溶液 (III) の温度は、分岐ヒアルロン酸を製造する際に (A) を作用させる温度と同じ温度を選ぶ。

酵素反応溶液 (III) の pH は、分岐ヒアルロン酸を製造する際に (A) を作用させる pH と同じ pH を選ぶ。

酵素反応溶液 (III) 中のヒアルロン酸合成酵素 (A) のモル濃度は、分岐ヒアルロン酸を製造する際に (A) を作用させる濃度に調整する。

酵素反応溶液 (III) 中のウリジンニリン酸の含有量 (モル濃度) は、ウリジンニリン酸が 0 M の酵素反応溶液 (III)、及びウリジンニリン酸の濃度が 0 M からヒアルロン酸合成酵素 (A) の活性が 0 になる (ヒアルロン酸の生成が観測できなくなる) ウリジンニリン酸の濃度との間で、ウリジンニリン酸の濃度が異なる 4 種類以上の酵素反応溶液 (III)、合計 5 種類以上の酵素反応溶液 (III) を作成すればよい。また、類似のヒアルロン酸合成酵素に対するウリジンニリン酸の阻害定数 K_i が分かっている場合は、ウリジンニリン酸の濃度が 0 M のもの、類似ヒアルロン酸合成酵素の 0 より大きく K_i 未満の濃度範囲で 2 種類以上、 K_i 以上及び K_i の 10 倍以下の濃度範囲で 2 種類以上、合計 5 種類以上作成すればよい。

酵素反応溶液 (III) 中のウリジンニリン酸－グルクロン酸及びウリジ

ンニリン酸-N-アセチルグルコサミンの含有量は、経時的なピーク面積変化を観測できる点を1点選ばばよい。測定に使用する(A)と類似のヒアルロン酸合成酵素のミカエリス定数 K_m が分かっている場合は、 K_m 以上及び K_m の5倍以下の濃度範囲の間で選ばばよい。

酵素反応溶液(111)に用いるpH調整剤(P)は、扱いやすさ及び酵素の安定性の観点から、リン酸塩、ホウ酸塩、HEPESバッファー及びMESバッファー等のGoodバッファーが好ましい。酵素反応溶液(111)中の(P)の含有量(モル濃度)は、100~500mMである。

酵素反応溶液(111)について、(111)を作成直後及び一定時間(例えば5分)ごとに溶液の一部(例えば100 μ L)を取り出し、取り出したものを100℃で1分間熱処理し、酵素反応を停止する。液体クロマトグラフィーを用いて取り出した反応溶液中のヒアルロン酸の量を定量する。酵素反応溶液(111)を作成直後のピーク面積を P_0 、h時間後のピーク面積を P_h とし、ピーク面積の変化 ΔP ($\Delta P = P_h - P_0$)とヒアルロン酸のピーク面積に対する検量線を用いて酵素反応初速度 v (M/s)を算出する。

さらに、ウリジンニリン酸の濃度が異なる酵素反応溶液(111)を用いて、同様に測定し、酵素反応初速度 v を算出する。

阻害濃度 IC_{50} は、横軸に(x軸)にそれぞれのウリジンニリン酸の濃度、縦軸(y軸)にウリジンニリン酸濃度が0の時の酵素反応初速度 v を100(%)としたときの相対活性をプロットする。プロットを直線でつなぎ、 $y = 50$ (%)となるときのウリジンニリン酸濃度を阻害濃度 IC_{50} とする。

[0103] 分岐ヒアルロン酸を効率よく生産する観点から、ミカエリス定数 K_m は、阻害濃度 IC_{50} の100倍未満であることが好ましく、さらに好ましくは10倍以下であることである。

ウリジンニリン酸の(B-4)に対するミカエリス定数 K_m が、ウリジンニリン酸のヒアルロン酸合成酵素(A)に対する阻害濃度 IC_{50} の100倍未満であることで、ウリジンニリン酸がウリジンニリン酸変換酵素(B-4

）に触媒されてウリジン三リン酸を合成する活性が高く、効率よくウリジン三リン酸が合成され、ウリジン三リン酸からウリジン二リン酸ーグルクロン酸、しいては分岐ヒアルロン酸を効率良く製造できる。また、ウリジン二リン酸がヒアルロン酸合成酵素（A）との結合で消費されることなく、ウリジン二リン酸を効率よく再利用できる。

例えば、無精製のウリジン二リン酸ーグルクロン酸とウリジン二リン酸ーNーアセチルグルコサミンとにヒアルロン酸合成酵素（A）を作用させる際に、 K_m が $I C_{50}$ の100倍（ $K_m = 100 \times I C_{50}$ ）であるウリジン二リン酸変換酵素（Bー4）とヒアルロン酸合成酵素（A）とが等モル量存在している場合、ウリジン二リン酸変換酵素（Bー4）に触媒されるウリジン二リン酸のモル量は、ヒアルロン酸合成酵素（A）と結合するウリジン二リン酸のモル量のおよそ100分の1程度であると推察される。

[0104] 上記分岐ヒアルロン酸の製造方法において、工程（3）で用いる1ーホスホーグルクロン酸は、グルクロン酸の1位のヒドロキシル基がリン酸でリン酸エステル化されたものである。

[0105] 工程（3）で用いるウリジン三リン酸ーモノサッカリドー1ーリン酸ウリジリルトランスフェラーゼ（C）は、ウリジン三リン酸と1ーホスホーグルクロン酸とからウリジン二リン酸ーグルクロン酸を生成する活性を有する酵素であれば特に限定されない。動物起源の動物ウリジン三リン酸ーモノサッカリドー1ーリン酸ウリジリルトランスフェラーゼ（Cー1）、植物起源の植物ウリジン三リン酸ーモノサッカリドー1ーリン酸ウリジリルトランスフェラーゼ（Cー2）、微生物起源の微生物ウリジン三リン酸ーモノサッカリドー1ーリン酸ウリジリルトランスフェラーゼ（Cー3）、（Cー1）～（Cー3）が化学的に修飾された変異体（Cー4）及び（Cー1）～（Cー3）が遺伝子的に修飾された変異体（Cー5）が含まれる。

[0106] 動物ウリジン三リン酸ーモノサッカリドー1ーリン酸ウリジリルトランスフェラーゼ（Cー1）としては、例えば、ブタ由来のもの等が挙げられる。

[0107] 植物ウリジン三リン酸ーモノサッカリドー1ーリン酸ウリジリルトランス

フェラーゼ（C-2）としては、例えば、シロイヌナズナ由来、エンドウマメ由来、オオムギ由来のもの等が挙げられる。

[0108] 微生物ウリジン三リン酸ーモノサッカリドー１ーリン酸ウリジリルトランスフェラーゼ（C-3）としては、例えば、サーマス（*Thermus*）属由来のもの等が挙げられる。

[0109] 化学的に修飾したウリジン三リン酸ーモノサッカリドー１ーリン酸ウリジリルトランスフェラーゼ（C-4）として、例えば上記ウリジン三リン酸ーモノサッカリドー１ーリン酸ウリジリルトランスフェラーゼにカルボジイミド化合物、無水コハク酸、ヨード酢酸及びイミダゾール化合物等を作用させて化学修飾したもの等が挙げられる。

[0110] 遺伝子的に修飾したウリジン三リン酸ーモノサッカリドー１ーリン酸ウリジリルトランスフェラーゼ（C-5）として、Smithらの方法（*The Journal of Biochemistry*, 1998, Vol. 253, No. 18, P6551-6560）で上記ウリジン三リン酸ーモノサッカリドー１ーリン酸ウリジリルトランスフェラーゼの遺伝子を改変してアミノ酸を置換したもの等が挙げられる。

[0111] 上記ウリジン三リン酸ーモノサッカリドー１ーリン酸ウリジリルトランスフェラーゼ（C）のうち、ウリジンニリン酸ーグルクロン酸を合成する活性の高さの観点から、（C-2）が好ましく、さらに好ましくはシロイヌナズナ由来のヌクレオシドニリン酸キナーゼである。

また、ウリジン三リン酸ーモノサッカリドー１ーリン酸ウリジリルトランスフェラーゼ（C）は、２種以上を用いてもよい。

[0112] 本発明の分岐ヒアルロン酸の製造方法に使用する（A）、（B）及び（C）の酵素は、上記の活性を有するものであれば、どのような形態であっても良い。具体的には、酵素を含む細胞（細胞には菌体を含む）を、破碎（ホモジナイザー、フレンチプレス、ワーリングブレンダー及び乳鉢等）、凍結融解、自己消化、乾燥、酵素処理、超音波処理若しくは化学処理（酸、アルカリ及び界面活性剤等）等の一般的処理法に従って処理して得られる処理物、

精製酵素（処理物を、塩析、等電点沈殿、有機溶媒沈殿、透析又は各種クロマトグラフィー等により精製した酵素）、膜結合型タンパク（細胞の細胞壁若しくは細胞膜の変性物）及び固定化触媒（酵素を一般的な包括法、架橋法、担体結合法等で固定化したもの。固定化する際の固定化担体の例としては、ガラスビーズ、シリカゲル、ポリウレタン、ポリアクリルアミド、ポリビニルアルコール、カラギーナン、アルギン酸等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。）等が挙げられる。

[0113] 上記分岐ヒアルロン酸の製造方法において、上記工程（１）は、化合物（ S' ）、ウリジンニリン酸－グルクロン酸及びウリジンニリン酸－ N －アセチルグルコサミンにヒアルロン酸合成酵素（ A ）を作用させて、分岐ヒアルロン酸及びウリジンニリン酸を含む組成物（ Z' ）を得ることができれば制限なく実施できる。工程（１）の具体的な一例としては、ウリジンニリン酸－グルクロン酸、ウリジンニリン酸－ N －アセチルグルコサミン、ヒアルロン酸合成酵素（ A ）及び溶剤（ D ）を混合して反応溶液（ E ）とし、所定の温度、所定の pH に調整し、反応を行うものである。

[0114] 反応溶液（ E ）中のウリジンニリン酸－グルクロン酸の含有量（モル濃度）は、分岐ヒアルロン酸を効率よく製造する観点から、 $0.0001\text{ mM} \sim 1\text{ M}$ が好ましく、さらに好ましくは $0.001\text{ mM} \sim 500\text{ mM}$ である。

反応溶液（ E ）中のウリジンニリン酸－ N －アセチルグルコサミンの含有量（モル濃度）は、分岐ヒアルロン酸を効率よく製造する観点から、 $0.0001\text{ mM} \sim 1\text{ M}$ が好ましく、さらに好ましくは $0.001\text{ mM} \sim 500\text{ mM}$ である。

反応溶液（ E ）中のヒアルロン酸合成酵素（ A ）の含有量（ユニット／ mL ）は、反応効率の観点から、 $0.00001\text{ ユニット／mL} \sim 10,000\text{ ユニット／mL}$ が好ましく、さらに好ましくは $0.001\text{ ユニット／mL} \sim 1,000\text{ ユニット／mL}$ である。

１ユニットとは、１分間に $1\text{ }\mu\text{mol}$ のウリジンニリン酸－グルクロン酸及び $1\text{ }\mu\text{mol}$ のウリジンニリン酸－ N －アセチルグルコサミンをヒアルロ

ン酸にする酵素量である。

反応溶液（E）の温度は、ヒアルロン酸合成酵素（A）の酵素活性の安定性の観点から、0℃～100℃が好ましく、さらに好ましくは30℃～70℃である。

反応溶液（E）のpHは、ヒアルロン酸合成酵素（A）の酵素活性の安定性の観点から、pH2～12が好ましく、さらに好ましくはpH4～9である。

反応溶液（E）において、ヒアルロン酸合成酵素（A）を作用させる時間は、（A）の酵素活性の安定性の観点から、1分～1,000時間が好ましい。

[0115] 上記工程（2）は、ウリジン二リン酸とリン酸基含有化合物（b-4）とにウリジン二リン酸変換酵素（B-4）を作用させてウリジン三リン酸を得ることができれば制限なく実施できる。工程（2）の具体的な一例としては、工程（1）での反応後の反応溶液（E）、リン酸基含有化合物（b-4）及びウリジン二リン酸変換酵素（B-4）を混合して反応溶液（F）とし、所定の温度、所定のpHに調整し、反応を行うものである。

[0116] 反応溶液（F）中のリン酸基含有化合物（b-4）の含有量（モル濃度）は、反応しやすさの観点から、0.0001mM～1Mが好ましく、さらに好ましくは0.001mM～500mMである。

反応溶液（F）中のウリジン二リン酸変換酵素（B-4）の含有量（ユニット／mL）は、ウリジン三リン酸を合成する反応を触媒しやすさの観点から、0.00001ユニット／mL～10,000ユニット／mLが好ましく、さらに好ましくは0.001ユニット／mL～1,000ユニット／mLである。

1ユニットとは、1分間に1μmolのウリジン二リン酸及び1μmolのリン酸基含有化合物（b-4）をウリジン三リン酸にする酵素量である。

反応溶液（F）の温度は、（B-4）の酵素活性の安定性の観点から、0℃～100℃が好ましく、さらに好ましくは30℃～70℃である。

反応溶液（F）のpHは、（B-4）の酵素活性の安定性の観点から、pH 2～12が好ましく、さらに好ましくはpH 4～9である。

反応溶液（F）において、ウリジン三リン酸変換酵素（B-4）を作用させる時間は、（B-4）の酵素活性の安定性の観点から、10分～1,000時間が好ましい。

[0117] 反応溶液（F）中には、ピロリン酸分解酵素を含有してもよい。工程（2）では副生成物としてピロリン酸が生成し、ピロリン酸が（B-4）の活性を阻害してしまう場合がある。ピロリン酸分解酵素を用いると、ピロリン酸が分解され、ピロリン酸が（B-4）の酵素活性の阻害することを緩和することができる。

ピロリン酸分解酵素としては、EC 3. 1. 3 及び EC 3. 6. 1 に分類される酵素が挙げられ、具体的にはアルカリホスファターゼ、アピラーゼ、フィターゼ及びジホスファターゼ等が挙げられる。

ピロリン酸分解酵素としては、反応生成物（ウリジン三リン酸及び分岐ヒアルロン酸）を分解しにくいという観点から、ジホスファターゼが好ましい。

反応溶液（F）中のピロリン酸分解酵素の含有量（ユニット／mL）は、反応生成物（ウリジン三リン酸及び分岐ヒアルロン酸）を分解せずにピロリン酸を分解する観点から、0.00001～100ユニット／mLが好ましい。

ピロリン酸分解酵素において、ユニットは、1分間に1 μ molのピロリン酸を分解する酵素量である。

[0118] 上記工程（3）は、ウリジン三リン酸と1-ホスホグルクロン酸とにウリジン三リン酸-モノサッカリド-1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ（C）を作用させてウリジン二リン酸-グルクロン酸を得ることができれば制限なく実施できる。工程（3）の具体的な一例としては、工程（2）での反応後の反応溶液（F）、1-ホスホグルクロン酸及びウリジン三リン酸-モノサッカリド-1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ（C）を混

合して反応溶液（G）とし、所定の温度、所定のpHに調整し、反応を行うものである。

[0119] 反応溶液（G）中の1-ホスホグルクロン酸の含有量（モル濃度）は、ウリジン三リン酸-グルクロン酸を効率よく製造する観点から、0.0001mM～1Mが好ましく、さらに好ましくは0.001mM～500mMである。

反応溶液（G）中のウリジン三リン酸-モノサッカリド-1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ（C）の含有量（ユニット／mL）は、ウリジン三リン酸-グルクロン酸を効率よく製造する観点から、0.00001ユニット／mL～10,000ユニット／mLが好ましく、さらに好ましくは0.001ユニット／mL～1,000ユニット／mLである。

反応溶液（G）の温度は、（C）の酵素活性の安定性の観点から、0℃～100℃が好ましく、さらに好ましくは30℃～70℃である。

反応溶液（G）のpHは、（C）の酵素活性の安定性の観点から、pH2～12が好ましく、さらに好ましくはpH4～9である。

反応溶液（G）において、ウリジン三リン酸-モノサッカリド-1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ（C）を作用させる時間は、（C）の酵素活性の安定性の観点から、10分～1,000時間が好ましい。

[0120] 反応溶液（G）中には、ピロリン酸分解酵素を含有してもよい。工程（3）では副生成物としてピロリン酸が生成し、ピロリン酸が（C）の活性を阻害してしまう場合がある。ピロリン酸分解酵素を用いると、ピロリン酸が分解され、ピロリン酸が（C）の酵素活性の阻害することを緩和することができる。

ピロリン酸分解酵素として好ましいものは上述と同様である。

反応溶液（G）中のピロリン酸分解酵素の含有量（ユニット／mL）は、反応生成物（ウリジン三リン酸-グルクロン酸）を分解せずにピロリン酸を分解する観点から、0.00001～100ユニット／mLが好ましい。

ピロリン酸分解酵素において、ユニットは、1分間に1μmolのピロリ

ン酸を分解する酵素量である。

[0121] 反応後の反応溶液（G）に、必要により、ウリジンニリン酸－グルクロン酸、ウリジンニリン酸－N－アセチルグルコサミン及びヒアルロン酸合成酵素（A）等を追加して、反応溶液（E）とし、工程（1）の反応を行う。

また、反応後の反応溶液（G）に、上記に加えて、さらに必要によりリン酸基含有化合物（b－4）及びウリジンニリン酸変換酵素（B－4）を添加して反応溶液（F）とし、工程（1）及び（2）の反応を同時に行ってもよい。

[0122] 上記工程（1）、（2）、（3）及び（1）の順に含んでいれば上記工程（1）～（3）は何回含んでもよい。また、（1）、（2）、（3）及び（1）の間に別の工程が入ってもよい。

[0123] また、上記工程（1）～（3）を同時に行ってもよい。

上記工程（1）～（3）を同時に行う製造方法は、工程（1）～（3）の反応を同じ反応溶液中で行ってあれば特に制限なく実施できる。具体的一例としては、リン酸基含有化合物（b－4）、ウリジンニリン酸変換酵素（B－4）、1－ホスホ－グルクロン酸、ウリジン三リン酸－モノサッカリド－1－リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ（C）、ウリジンニリン酸－グルクロン酸、ウリジンニリン酸－N－アセチルグルコサミン、ヒアルロン酸合成酵素（A）及び溶剤（D）を仕込んで反応溶液（H）として、分岐ヒアルロン酸を製造するものである。

[0124] 反応溶液（H）中のウリジンニリン酸－グルクロン酸の含有量（モル濃度）は、分岐ヒアルロン酸の合成効率の観点から、0.0001 mM～1 Mが好ましく、さらに好ましくは0.01 mM～1 mMである。

反応溶液（H）中のウリジンニリン酸－N－アセチルグルコサミンの含有量（モル濃度）は、分岐ヒアルロン酸の合成効率の観点から、0.0001 mM～1 Mが好ましく、さらに好ましくは0.01 mM～1 mMである。

反応溶液（H）中のヒアルロン酸合成酵素（A）の含有量（ユニット／mL）は、分岐ヒアルロン酸を効率よく製造する観点から、0.00001ユ

ニット／mL～10,000ユニット／mLが好ましく、さらに好ましくは0.001ユニット／mL～1,000ユニット／mLである。

反応溶液（H）中のリン酸基含有化合物（b-4）の含有量（モル濃度）は、ウリジン二リン酸変換酵素（B-4）との結合しやすさの観点から、0.0001mM～1Mが好ましく、さらに好ましくは0.01mM～10mMである。

反応溶液（H）中のウリジン二リン酸変換酵素（B-4）の含有量（ユニット／mL）は、ウリジン二リン酸を効率よくウリジン三リン酸に変換する観点から、0.00001ユニット／mL～10,000ユニット／mLが好ましく、さらに好ましくは0.001ユニット／mL～1,000ユニット／mLである。

反応溶液（H）中の1-ホスホグルクロン酸の含有量（モル濃度）は、ウリジン二リン酸-グルクロン酸に変換されやすくする観点から、0.0001mM～1Mが好ましく、さらに好ましくは0.01mM～100mMである。

反応溶液（H）中のウリジン三リン酸-モノサッカライド-1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ（C）の含有量（ユニット／mL）はウリジン二リン酸-グルクロン酸の変換効率を良くする観点から、0.00001ユニット／mL～10,000ユニット／mLが好ましく、さらに好ましくは0.001ユニット／mL～1,000ユニット／mLである。

1ユニットとは、1分間に1μmolのウリジン三リン酸及び1μmolの1-ホスホグルクロン酸をウリジン二リン酸-グルクロン酸にする酵素量である。

反応溶液（H）の温度は、酵素 {（C）、（B-4）及び（A）} の安定性の観点から、0℃～100℃が好ましく、さらに好ましくは30℃～70℃である。

反応溶液（H）のpHは、酵素 {（C）、（B-4）及び（A）} の安定性の観点から、pH2～12が好ましく、さらに好ましくはpH4～9であ

る。

[0125] 反応溶液（H）中にはピロリン酸分解酵素を用いてもよい。副生成物としてピロリン酸が生成し、ピロリン酸が酵素 {（C）、（B-4）及び（A）} の活性を阻害してしまう場合がある。ピロリン酸分解酵素を用いると、ピロリン酸を分解し、ピロリン酸が（C）、（B-4）及び（A）の酵素活性を阻害することを緩和することができる。

好ましいピロリン酸分解酵素としては、上記反応溶液（F）に用いるピロリン酸分解酵素と同様である。

反応溶液（H）中のピロリン酸分解酵素の含有量（ユニット／mL）は、反応生成物（ウリジン三リン酸、ウリジン二リン酸－グルクロン酸及び分岐ヒアルロン酸）を分解せずにピロリン酸を分解する観点から、0.00001～100ユニット／mLが好ましい。

[0126] 反応溶液（H）を作成する場合、上記原料 {（b-4）、1-ホスホーグルクロン酸、ウリジン二リン酸－グルクロン酸及びウリジン二リン酸－N-アセチルグルコサミン} 並びに酵素 {（B-4）、（C）及び（A）} を同時に仕込んで反応溶液（H）を作成してもよく、逐次的に投入して反応溶液（H）としてもよい。

[0127] 反応溶液（H）において、ウリジン二リン酸変換酵素（B-4）、ウリジン三リン酸－モノサッカリド－1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ（C）及びヒアルロン酸合成酵素（A）を作用させる時間は、それぞれの酵素活性、反応溶液（H）の温度、原料の量比等によって異なる。反応溶液（H）の温度を、全て酵素の活性が高く、反応速度が速い温度に調整すれば、反応時間を短くすることができる。また、反応溶液（H）中のそれぞれの基質に対する酵素の量が多いほど、反応は早くなり、反応時間は短くなる。

反応溶液（H）において、反応時間は、酵素の安定性の観点から、10分～1,000時間が好ましい。

[0128] 本発明の分岐ヒアルロン酸の製造方法によれば、新規な分岐ヒアルロン酸を得ることができる。また、本発明の製造方法により得られた分岐ヒアルロ

ン酸は、ヒアルロン酸の優れた性質を保持しつつ、分岐の数を調整する事により、ヒアルロン酸の粘度を調整することができる。したがって、本発明の製造方法により得られる分岐ヒアルロン酸は、化粧品、医薬部外品、関節炎治療剤、創傷被覆剤、眼科手術用手術補助剤及び外科手術後の癒着阻止剤などの医薬品、医療機器として広範囲に使用できる。

実施例

[0129] 以下、実施例及び比較例により本発明をさらに説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

[0130] <製造例 1>

○ヒアルロン酸合成酵素（A-1）の製造

パスツレラ・ムルトシダ由来のヒアルロン酸合成酵素（配列番号 1）に FLAG タグを融合した遺伝子を pKK223-3 に組み込んだプラスミドを大腸菌 E. coli SURE に形質転換して、培養し、培養液の濁度（濁度計：（株）島津製作所製「UV-1700」、1 ml の石英セル）が 0.5 に達したところで、発現誘導した後、遠心分離機〔久保田商事（株）製「ユニバーサル冷却遠心機 5922」（以下同じ）、4℃、6000×g、15 分間〕を用いて大腸菌を回収した。回収した大腸菌を、緩衝液 A {100 mM リン酸緩衝液（pH 7.0）、100 mM 塩化ナトリウム、10 mM 塩化マグネシウム、10 mM ドデシルマルトシド、5 mM オレイン酸} に再懸濁して、超音波破碎（130W、10 分）を行った。その後、抗 FLAG 抗体カラムで精製を行い、ヒアルロン酸合成酵素（A-1）の水溶液を得た。

[0131] <製造例 2>

○ヒアルロン酸合成酵素（A-2）の製造

製造例 1 において、「パスツレラ・ムルトシダ由来のヒアルロン酸合成酵素（配列番号 1）」に代えて「ストレプトコッカス・ピオジェネシス由来のヒアルロン酸合成酵素（配列番号 2）」を用いた以外は同様にして、ヒアルロン酸合成酵素（A-2）の水溶液を得た。

[0132] <ヒアルロン酸合成酵素（A-1）の水溶液の濃度測定>

水溶液 Z { 1 mM ウリジンニリン酸－グルクロン酸 (^{14}C でラベルした放射性同位体を含むウリジンニリン酸－グルクロン酸、放射能 $300\text{ mCi} / \text{mmol}$)、1 mM ウリジンニリン酸－N－アセチルグルコサミン、50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)、100 mM 塩化ナトリウム、10 mM 塩化マグネシウム、10 mM ドデシルマルトシド、5 mM オレイン酸} 1 mL に、製造例 1 で得たヒアルロン酸合成酵素 (A-1) の水溶液を $10\text{ }\mu\text{L}$ 加えて、反応溶液 (1-1) とし、 30°C で 1 時間反応を行った。ろ紙を用いたペーパークロマトグラフィー法で未反応の基質とヒアルロン酸を分離した後、原点部を切り出し、液体シンチレーションカクテルに浸漬させた後、液体シンチレーションカウンターを用いて放射性同位体を測定し、 ^{14}C でラベルしたグルクロン酸の取り込み量からヒアルロン酸の合成量を算出した。その結果から、ヒアルロン酸合成酵素 (A-1) の水溶液中の濃度を求めたところ $1\text{ ユニット} / \text{mL}$ であった。

[0133] 上記ヒアルロン酸合成酵素 (A-1) の水溶液の濃度測定において、ヒアルロン酸合成酵素 (A-1) の水溶液に代えてヒアルロン酸合成酵素 (A-2) の水溶液を用いて、ヒアルロン酸合成酵素 (A-2) の水溶液の濃度を測定したところ、 $1\text{ ユニット} / \text{mL}$ であった。

[0134] <ヒアルロン酸合成酵素 (A-1) の阻害濃度 IC_{50} の測定>

1. 5 mL 容量のチューブ中で $940\text{ }\mu\text{L}$ の水溶液 1 [5 mM の塩化マグネシウムと 0.05 mM のウリジンニリン酸ナトリウムを含む 50 mM のリン酸緩衝液 (pH 7.5、 25°C)] に、製造例 1 で得たヒアルロン酸合成酵素水溶液 (A-1) を $20\text{ }\mu\text{L}$ 溶解し、恒温水槽を用いてチューブを 40°C で 20 分静置した。ここに、 40°C に温調した基質溶液 [1-1] [ウリジンニリン酸－グルクロン酸ナトリウム塩及びウリジンニリン酸－N－アセチルグルコサミンを緩衝液 B {50 mM のリン酸緩衝液 (pH 7.5、 25°C) } に溶解してそれぞれ 20 mM の濃度にしたもの] を $50\text{ }\mu\text{L}$ 添加し、酵素反応溶液 (111-1) とした。(111-1) を作成直後及び 5 分おきに $100\text{ }\mu\text{L}$ ずつ取り出し、取り出した溶液は、 100°C で 2 分間加熱し

て酵素反応を停止した。酵素反応を停止した溶液について、遠心分離器（4℃、12,000×g、10分）を用いて遠心し、不純物を沈殿させた。上清80μLを下記条件でHPLCにより分析し、ヒアルロン酸のピーク面積を記録した。

＜HPLCの測定条件＞

以下において、HPLCの測定条件は全て同じである。

装置：ACQUITY UPLCシステム（Waters社製）

カラム：Shodex OHpak SB-806M HQ

移動相：0.1M NaNO₃

流速：1.0ml/min

検出器：ACQUITY UPLC RID検出器

温度：40℃

水溶液1において、ウリジン二リン酸ナトリウムの濃度が異なる溶液 {0mM（水溶液2）、0.15mM（水溶液3）、0.3mM（水溶液4）、1mM（水溶液5）及び3mM（水溶液6）} を作成した。水溶液1に代えて水溶液2～6を用いる以外は同様にして酵素反応溶液（111-2）～（111-6）を作成した。酵素反応溶液（111-2）～（111-6）についても、酵素反応溶液（111-1）の場合と同様にして、ヒアルロン酸のピーク面積を記録した。

ヒアルロン酸ナトリウム（フナコシ（株）製、「ヒアロース」、分子質量：175kDa）を緩衝液Bに溶解し、それぞれ0.001μg/mL、0.01μg/mL、0.1μg/mL及び5μg/mLの濃度にしたものを作成し、ヒアルロン酸標準溶液（1）～（4）とした。（1）～（4）を、HPLCにより分析し、ヒアルロン酸のピーク面積をそれぞれ記録した。横軸（x軸）にそれぞれのヒアルロン酸濃度（μg）、縦軸（y軸）にそれぞれのピーク面積Pをプロットし、直線の傾き「k」を算出した。

（111-1）～（111-6）を作成直後のウリジン二リン酸のピーク面積をP₀、「m」分後のピーク面積をP_nとし、それぞれピーク面積の変化

ΔP ($\Delta P = P_h - P_o$) と上記直線の傾きを用いて下記数式 (2) からそれぞれの酵素反応初速度 v ($\mu\text{g} / \text{s}$) を算出した。

$$v = \Delta P / (k \times m \times 60) \quad (2)$$

酵素反応溶液 (111-2) を用いて測定した酵素反応初速度 v を 100% とし、酵素反応溶液 (111-1) 及び (111-3) ~ (111-6) を用いて測定した酵素反応初速度の相対値 (%) を算出した。算出した相対値を用いて、横軸 (x 軸) にそれぞれのウリジン二リン酸濃度 $[S]$ 、縦軸 (y 軸) に酵素反応溶液 (111-1) ~ (111-6) での酵素反応初速度 v の相対値をプロットした。プロットの近似曲線と直線 $y = 50$ (%) との交点でのウリジン二リン酸の濃度が阻害濃度 IC_{50} であり、阻害濃度 IC_{50} は 0.2 mM であった。

また、上記において、「ヒアルロン酸合成酵素水溶液 (A-1) を 20 μL 」に代えて「ヒアルロン酸合成酵素水溶液 (A-1) を 200 μL 」とする以外は同様にして、阻害濃度 IC_{50} を測定したところ、0.2 mM であった。

[0135] 「ヒアルロン酸合成酵素 (A-1) の阻害濃度 IC_{50} の測定」において、「ヒアルロン酸合成酵素水溶液 (A-1)」に代えて「ヒアルロン酸合成酵素水溶液 (A-2)」を用いる以外は同様にして阻害濃度 IC_{50} を測定したところ、共に 0.11 mL であった。

[0136] <製造例 3>

○ピルビン酸キナーゼの製造

製造例 1 において、「パスツレラ・ムルトシダ由来のヒアルロン酸合成酵素 (配列番号 1)」に代えて「大腸菌由来のピルビン酸キナーゼ (配列番号 3)」を用いる以外は同様にして、ピルビン酸キナーゼ (B-4) の水溶液を得た。

[0137] <ピルビン酸キナーゼ (B-4) の水溶液の濃度測定>

水溶液 {50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)、100 mM 塩化ナトリウム、10 mM 塩化マグネシウム、1 mM ウリジン二リン酸} 1 mL に、1 M

ホスホエノールピルビン酸 1 カリウム 10 μ L、ピルビン酸キナーゼ (B-4) の水溶液を 10 μ L 加えて、反応溶液とし、30℃で5、10、15分反応を行った。反応生成物 (ウリジン三リン酸) の量は、TLC (S i d m a 社、P E I - C e l l u r o s e プレート) で展開して (展開溶媒、1 M L i C l、1 M ギ酸)、UV (260 nm) で検出して求めた。ウリジン三リン酸の生成量から、ピルビン酸キナーゼ (B-4) の水溶液の濃度を計算したところ、8 ユニット / m l であった。

[0138] <製造例 3 で得られたピルビン酸キナーゼ (B-4) の酵素活性 V_{max1} 、 V_{max2} 、酵素活性比 (Y) の測定>

100 mM の塩化ナトリウム及び 10 mM の塩化マグネシウムを含む 50 mM のリン酸緩衝液 (pH 7.0) 1 mL に、溶液中の濃度が 0.5 mM となるように基質 (ウリジン二リン酸) を加え、ホスホエノールピルビン酸 1 カリウム (和光純薬工業 (株) 製) を溶液中の濃度が 100 mM となるように加え、製造例 3 で得たピルビン酸キナーゼ (B-4) の水溶液を 1 μ L 加えて酵素反応溶液 (I I - 1) とし、反応を開始した。酵素反応溶液 (I I - 1) を 30℃で静置し、HPLC を用いて反応生成物 (ウリジン二リン酸 - グルコース) の量を 5 分毎に測定しながら 30 分酵素反応させ、酵素反応初速度 v を算出した。さらに、酵素反応溶液 (I I - 1) 中のウリジン二リン酸の濃度が 0.3 mM、0.1 mM、0.05 mM のもの (I I - 2) ~ (I I - 4) について、同様に酵素反応初速度 v を算出した。

横軸 (x 軸) にそれぞれ酵素反応溶液 (I I - 1) ~ (I I - 4) の基質 (ウリジン二リン酸) の濃度の逆数 ($1/[S]$)、縦軸 (y 軸) にそれぞれの基質濃度での酵素反応初速度の逆数 ($1/v$) をプロットした *Lineweaver-Burk* プロットを作成した。プロットの近似直線と y 軸との交点から、酵素活性 V_{max1} の逆数 ($1/V_{max1}$) を求めた。

基質として、「ウリジン二リン酸」に代えて「ウリジン二リン酸 - グルクロン酸」を用いる以外は同様にして V_{max2} を求めた。求めた V_{max1} 及び V_{max2} から酵素活性比 (Y) を算出したところ、10 以上であった。

また、基質として、「ウリジン三リン酸」に代えて「ウリジン三リン酸-N-アセチルグルコサミン」を用いる以外は同様にして V_{max2} を求めた。求めた V_{max1} 及び V_{max2} から酵素活性比 (Y) を算出したところ、10以上であった。

[0139] <製造例3で得たピルビン酸キナーゼ (B-4) を用いたウリジン三リン酸を合成する反応におけるミカエリス定数 K_m 測定>

製造例3で得たピルビン酸キナーゼ (B-4) の水溶液 $10\ \mu\text{L}$ を、1.5 mL のチューブ中で $890\ \mu\text{L}$ の水溶液7 [5 mMの塩化マグネシウム、100 mMのホスホエノールピルビン酸1カリウムを含む50 mMのリン酸緩衝液 (pH 7.5、25℃)] に溶解し、恒温水槽を用いてチューブを30℃で3分静置した。ここに、30℃に温調した基質溶液 [2-1] (ウリジン三リン酸ナトリウムを緩衝液Bに溶解して10 mMの濃度にしたもの) を $100\ \mu\text{L}$ 添加し、酵素反応溶液 (IV-2-1) とした。(IV-2-1) を作成直後及び1分おきに $100\ \mu\text{L}$ ずつ取り出し、取り出した溶液を100℃で2分間加熱して酵素反応を停止した。遠心分離器 (4℃、12,000×g、10分) を用いて遠心し、不純物を沈殿させた。上清 $80\ \mu\text{L}$ をHPLCで分析し、ウリジン三リン酸のピーク面積を記録した。

基質溶液 [2-1] において、ウリジン三リン酸ナトリウムのモル濃度を5 mM (基質溶液 [2-2])、2 mM (基質溶液 [2-3])、1 mM (基質溶液 [2-4]) 及び0.3 mM (基質溶液 [2-5]) に変更した溶液を作成した。酵素反応溶液 (IV-2-1) において、基質溶液 [2-1] に代えて基質溶液 [2-2] ~ [2-5] を用いる以外は同様にして酵素反応溶液 (IV-2-2) ~ (IV-2-5) を作成した。酵素反応溶液 (IV-2-2) ~ (IV-2-5) についても、酵素反応溶液 (IV-2-1) と同様にして、ウリジン三リン酸のピーク面積を記録した。

ウリジン三リン酸ナトリウム (和光純薬工業 (株) 製) を緩衝液Bに溶解し、0.005 mM、0.1 mM、1 mM及び5 mMの濃度にしたものを作成し、ウリジン三リン酸標準溶液 (M-1) ~ (M-4) とした。(M-1

）～（M-4）を80 μ L、上記と同条件のHPLCで分析し、ウリジン三リン酸のピーク面積をそれぞれ記録した。横軸（x軸）にそれぞれのウリジン三リン酸濃度（mM）、縦軸（y軸）にそれぞれのピーク面積Pをプロットし、直線の傾き「k'」を算出した。

酵素反応溶液（IV-2-1）～（IV-2-5）を作成直後のウリジン三リン酸のピーク面積を P_0 、「m'」分後のピーク面積を P_h とし、それぞれピーク面積の変化 ΔP （ $\Delta P = P_h - P_0$ ）と上記直線の傾き「k'」を用いて下記数式（3）からそれぞれの酵素反応初速度 v （mM/s）を算出した。

$$v = \Delta P / (k' \times m' \times 60) \quad (3)$$

算出した酵素反応初速度 v を用いて、横軸（x軸）にそれぞれの基質濃度[S]、縦軸（y軸）にそれぞれの基質濃度での酵素反応初速度の逆数 $[S] / v$ をプロットし、Hanes-Woolfプロットを作成した。プロットの近似直線とx軸との交点（ $-K_m$ ）から、ミカエリス定数 K_m は6 mMであった。

[0140] <製造例4>

製造例1において、「パスツレラ・ムルトシダ由来のヒアルロン酸合成酵素（配列番号1）」に代えて「シロイヌナズナ由来の遺伝子（配列番号4）」を用いる以外は同様にしてウリジン三リン酸ーモノサッカリドー1ーリン酸ウリジリルトランスフェラーゼ（C）の水溶液を得た。

[0141] 100 mMの塩化ナトリウム、10 mMの塩化マグネシウム、10 mMのウリジン三リン酸及び10 mMのグルクローリン酸を含む50 mMのリン酸緩衝液（pH 7.0）1 mLに、製造例4で得たウリジン三リン酸ーモノサッカリドー1ーリン酸ウリジリルトランスフェラーゼ（C）の水溶液を10 μ L加えて、反応溶液としたものを3つ作成し、それぞれ30℃で5分、10分、15分反応を行った。生成したウリジンニリン酸ーグルクロン酸の定量はHPLCを用いて、UVライト（260 nm）で検出して求めた。ウリジンニリン酸ーグルクロン酸の生成量から、ウリジン三リン酸ーモノサッ

カリドー１ーリン酸ウリジリルトランスフェラーゼ（Ｃ）のウリジンニリン酸ーグルクロン酸を生成させる活性を求めたところ、５ユニット／ｍｌであった。

[0142] ＜製造例５＞

○分子量１，０００～１０，０００のオリゴヒアルロン酸（ＳＳ１１）の製造

ヒアルロン酸ナトリウム（（株）資生堂製、品名：バイオヒアルロン酸ナトリウムＨＡ９Ｎ）を、酸性条件下で加熱還流を行い加水分解した後、Ｓｅｐｈａｄｅｘ Ｇ－１０（ＧＥヘルスケア社製）で脱塩し、さらに凍結乾燥した。凍結乾燥品を水に溶解して、以下の測定条件下でサイズ排除クロマトグラフィー法を用いて、分子量１，０００未満のもの、分子量１，０００～１０，０００のもの及び分子量１０，０００より大きいものに分けた。

装置：液体クロマトグラフ低圧ＧＥシステム（（株）島津製作所製）

検出器：示差屈折率計

カラム：ＳＢ－８０２．５ＨＱ

カラム温度：４０℃

移動相：０．２Ｍ ＮａＣｌ

流量：０．４ｍＬ／ｍｉｎ

注入量：２００μＬ

クロマトグラフィーで得られたヒアルロン酸ナトリウムのうち、分子量が１，０００～１０，０００のヒアルロン酸ナトリウム（オリゴヒアルロン酸ナトリウム）を、ＰＤ ＭｉｄｉＴｒａｐ Ｇ－１０（ＧＥヘルスケア社製）を用いて脱塩後、凍結乾燥を行い、オリゴヒアルロン酸（ＳＳ１１）とした。

[0143] ＜製造例６＞

○分子量１，０００～１０，０００の上記一般式（５）及び／又は（６）の基を有するオリゴヒアルロン酸（ＳＳ１２）の製造

１ｍＭ ウリジンニリン酸ーグルクロン酸、１ｍＭ ウリジンニリン酸ー

N-アセチルグルコサミン、50 mMリン酸緩衝液 (pH 7.0)、1 M塩化ナトリウム、10 mM塩化マグネシウム、10 mMドデシルマルトシド及び5 mMオレイン酸を含む溶液1 mLに、製造例2で得たヒアルロン酸合成酵素 (A-2) の水溶液を10 μ L加えて、反応溶液とし、30°Cで1時間反応を行った。その後、反応溶液をSephadex G-10 (GEヘルスケア社製) で脱塩し、さらに凍結乾燥し、上記一般式 (5) 及び／又は (6) の基を有するオリゴヒアルロン酸を得た。凍結乾燥品を水に溶解して、製造例5と同様の条件によりサイズ排除クロマトグラフィー法を用いて、分子量1,000未満のもの、分子量1,000~10,000のもの及び分子量10,000より大きいものに分けた。

分子量が1,000~10,000のものを、PD MidiTrap G-10 (GEヘルスケア社製) を用いて脱塩後、凍結乾燥を行い、分子量1,000~10,000の上記一般式 (5) 及び／又は (6) の基を有するオリゴヒアルロン酸 (SS12) とした。

なお、オリゴヒアルロン酸 (SS12) 中のグルクロン酸単位、N-アセチルグルコサミン単位及びウリジン二リン酸単位のモル比をNMRで確認したところ、10:10:1であった。

[0144] <製造例7>

○化合物 (S' 1-1) の合成

精製水1800 μ Lに、2N NaOH水溶液200 μ L、及びジビニルスルホン (和光純薬工業 (株) 製、25°C、比重1.0177 g/mL) 2 μ L (添加するオリゴヒアルロン酸 (SS11) 中のグルクロン酸単位及びN-アセチルグルコサミン単位の合計モル数に対して0.7モル%相当) を加え、さらに製造例5で得たオリゴヒアルロン酸 (SS11) 0.5 gを添加した。この混合物を、室温で5分間攪拌混合した後、PD MidiTrap G-10 (GEヘルスケア社製) を用いて脱塩後、凍結乾燥を行い、化合物 (S' 1-1) を得た。

[0145] <製造例8>

○化合物（S' 2-1）の合成

精製水 1800 μ L に、2 N NaOH 水溶液 200 μ L、及びジビニルスルホン（和光純薬工業（株）製、25℃、比重 1.0177 g/mL）4 μ L（添加するオリゴヒアルロン酸（SS12）中のグルクロン酸単位及び N-アセチルグルコサミン単位の合計モル数に対して 1.6 モル%相当）を加え、さらに製造例 6 で得たオリゴヒアルロン酸（SS12）0.5 g を添加した。この混合物を、室温で 5 分間攪拌混合した後、PD MidiTrap G-10（GEヘルスケア社製）を用いて脱塩後、凍結乾燥を行い、化合物（S' 2-1）を得た。

[0146] <製造例 9>

○化合物（S' 2-2）の合成

精製水 1800 μ L に、2 N NaOH 水溶液 200 μ L、及びジビニルスルホン（和光純薬工業（株）製、25℃、比重 1.0177 g/mL）8 μ L（添加するオリゴヒアルロン酸（SS12）中のグルクロン酸単位及び N-アセチルグルコサミン単位の合計モル数に対して 3.1 モル%相当）を加え、さらに製造例 6 で得たオリゴヒアルロン酸（SS12）0.5 g を添加した。この混合物を、室温で 5 分間攪拌混合した後、PD MidiTrap G-10（GEヘルスケア社製）を用いて脱塩後、凍結乾燥を行い、化合物（S' 2-2）を得た。

[0147] <製造例 10>

○化合物（S' 2-3）の合成

精製水 1800 μ L に、2 N NaOH 水溶液 200 μ L、及びジビニルスルホン（和光純薬工業（株）製、25℃、比重 1.0177 g/mL）16 μ L（添加するオリゴヒアルロン酸（SS12）中のグルクロン酸単位及び N-アセチルグルコサミン単位の合計モル数に対して 6.3 モル%相当）を加え、さらに製造例 6 で得たオリゴヒアルロン酸（SS12）0.5 g を添加した。この混合物を、室温で 5 分間攪拌混合した後、PD MidiTrap G-10（GEヘルスケア社製）を用いて脱塩後、凍結乾燥を行い

、化合物（S' 2-3）を得た。

[0148] <製造例 1 1>

○化合物（S' 2-4）の合成

精製水 1800 μ L に、2 N NaOH 水溶液 200 μ L、及びジビニルスルホン（和光純薬工業（株）製、25℃、比重 1.0177 g/mL）1 μ L（添加するオリゴヒアルロン酸（SS12）中のグルクロン酸単位及び N-アセチルグルコサミン単位の合計モル数に対して 0.4 モル%相当）を加え、さらに製造例 6 で得たオリゴヒアルロン酸（SS12）0.5 g を添加した。この混合物を、室温で 5 分間攪拌混合した後、PD Midi Trap G-10（GEヘルスケア社製）を用いて脱塩後、凍結乾燥を行い、化合物（S' 2-4）を得た。

[0149] <製造例 1 2>

○化合物（S' 2-5）の合成

精製水 1800 μ L に、2 N NaOH 水溶液 200 μ L、及びジビニルスルホン（和光純薬工業（株）製、25℃、比重 1.0177 g/mL）0.5 μ L（添加するオリゴヒアルロン酸（SS12）中のグルクロン酸単位及び N-アセチルグルコサミン単位の合計モル数に対して 0.2 モル%相当）を加え、さらに製造例 6 で得たオリゴヒアルロン酸（SS12）0.5 g を添加した。この混合物を、室温で 5 分間攪拌混合した後、PD Midi Trap G-10（GEヘルスケア社製）を用いて脱塩後、凍結乾燥を行い、化合物（S' 2-5）を得た。

[0150] <製造例 1 3>

○化合物（S' 2-6）の合成

精製水 1800 μ L に、2 N NaOH 水溶液 200 μ L、及びジビニルスルホン（和光純薬工業（株）製、25℃、比重 1.0177 g/mL）2 μ L（添加するオリゴヒアルロン酸（SS12）中のグルクロン酸単位及び N-アセチルグルコサミン単位の合計モル数に対して 0.8 モル%相当）を加え、さらに製造例 6 で得たオリゴヒアルロン酸（SS12）0.5 g を添

加した。この混合物を、室温で5分間攪拌混合した後、PD MidiTrap G-10 (GEヘルスケア社製)を用いて脱塩後、凍結乾燥を行い、化合物(S' 2-6)を得た。

[0151] <製造例14>

製造例7において、「ジビニルスルホン2 μ L」に代えて「ジビニルスルホン8 μ L (添加するオリゴヒアルロン酸(SS 11)中のグルクロン酸単位及びN-アセチルグルコサミン単位の合計モル数に対して2.7モル%相当)」とする以外は同様にして化合物(S' 1-2)を得た。

[0152] <実施例1>

製造例7で得た化合物(S' 1-1) 0.1gをMilliQ水1mLに溶かした水溶液10 μ Lを、反応液R {20mM ウリジン二リン酸-グルクロン酸、20mM ウリジン二リン酸-N-アセチルグルコサミン、50mMリン酸緩衝液(pH7.0)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、10mMドデシルマルトシド、5mMオレイン酸、10mMホスホエノールピルビン酸} 8mLに加え、ピルビン酸キナーゼ(B-4)の水溶液(製造例3で得たもの) 100 μ Lを加え、さらに製造例1で得たヒアルロン酸合成酵素(A-1)の水溶液を0.2mL加えて、30℃で1時間反応を行った。その後、PD MidiTrap G-10 (GEヘルスケア社製)を用いて脱塩後、凍結乾燥を行い分岐ヒアルロン酸(H-1)を2mg得た。

[0153] <実施例2~7>

実施例1において、化合物(S' 1-1)に代えて表1に記載の化合物を用いて、「製造例1で得たヒアルロン酸合成酵素(A-1)」に代えて「製造例2で得たヒアルロン酸合成酵素(A-2)」を用いる以外は同様にして、分岐ヒアルロン酸(H-2)~(H-7)を得た。得られた分岐ヒアルロン酸の量を表1に記載した。

[0154] <実施例8>

実施例1において、化合物(S' 1-1)に代えて表1に記載の化合物を

用いる以外は同様にして、分岐ヒアルロン酸（H-8）を得た。得られた分岐ヒアルロン酸の量を表1に記載した。

[0155] <実施例9>

実施例1において、ピルビン酸キナーゼ（B-4）の水溶液を用いなかったこと以外は実施例1と同様にして分岐ヒアルロン酸（H-9）を得た。得られた分岐ヒアルロン酸の量を表1に記載した。

[0156] <実施例10>

製造例7で得た化合物（S'-1-1）0.1gをMilliQ水1mlに溶かした水溶液10μlを、反応液RR {20mM ウリジン三リン酸-グルクロン酸、20mM ウリジン三リン酸-N-アセチルグルコサミン、50mMリン酸緩衝液（pH7.0）、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、10mMドデシルマルトシド、5mMオレイン酸、10mMホスホエノールピルビン酸、100mM グルクロン酸-リン酸、100mM N-アセチルグルコサミン-リン酸} 8mLに加え、ピルビン酸キナーゼ（B-4）の水溶液（製造例3で得たもの）とウリジン三リン酸-モノサッカリド-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ（C）（製造例4で得たもの）をそれぞれ100μlを加え、さらに製造例1で得たヒアルロン酸合成酵素（A-1）の水溶液を0.2mL加えて、30℃で1時間反応を行った。その後、PD MidiTrap G-10（GEヘルスケア社製）を用いて脱塩後、凍結乾燥を行い分岐ヒアルロン酸（H-10）を3mg得た。

[0157] <比較例1>

実施例1において、「製造例7で得た化合物（S'-1-1）」に代えて「製造例5で得たオリゴヒアルロン酸（SS11）」を用いる以外は同様にして、直鎖ヒアルロン酸（H'-1）を合成した。得られた直鎖ヒアルロン酸の量を表1に記載した。

[0158] <比較例2>

実施例1において、「製造例7で得た化合物（S'-1-1）」に代えて「

製造例 5 で得たオリゴヒアルロン酸 (SS11)」を用いて、ヒアルロン酸合成酵素 (A-1) の水溶液を「0.2 mL」に代えて「2 mL」用いる以外は同様にして、直鎖ヒアルロン酸 (H'-2) を合成した。得られた直鎖ヒアルロン酸の量を表 1 に記載した。

[0159] <比較例 3>

実施例 1 において、「製造例 7 で得た化合物 (S'1-1)」に代えて「製造例 6 で得たオリゴヒアルロン酸 (SS12)」を用いて、「製造例 1 で得たヒアルロン酸合成酵素 (A-1) の水溶液を 0.2 mL」に代えて「製造例 2 で得たヒアルロン酸合成酵素 (A-2) の水溶液を 0.2 mL」用いる以外は同様にして、直鎖ヒアルロン酸 (H'-3) を合成した。得られた直鎖ヒアルロン酸の量を表 1 に記載した。

[0160] <比較例 4>

実施例 1 において、「製造例 7 で得た化合物 (S'1-1)」に代えて「製造例 6 で得たオリゴヒアルロン酸 (SS12)」を用いて、「製造例 1 で得たヒアルロン酸合成酵素 (A-1) の水溶液を 0.2 mL」に代えて「製造例 2 で得たヒアルロン酸合成酵素 (A-2) の水溶液を 2 mL」用いる以外は同様にして、直鎖ヒアルロン酸 (H'-4) を合成した。得られた直鎖ヒアルロン酸の量を表 1 に記載した。

[0161] <重量平均分子量の測定>

非特許文献 {Anal Biochem、2006、352 (2)、p 243-251} に記載の SEC-MALLS 法に準じて測定した。結果を表 1 に記載した。

[0162] <粘度測定>

実施例 1 ~ 10 で得た分岐ヒアルロン酸 (H-1) ~ (H-10) 及び比較例 1 ~ 4 で得た直鎖ヒアルロン酸 (H'-1) ~ (H'-4) をそれぞれ蒸留水に溶解して 0.1 重量%水溶液を作成し粘度測定を行った。

粘度は、JIS Z 8803 (B型粘度計、測定温度: 25℃) に準じて測定した。結果を表 1 に記載した。

[0163] <保湿量測定>

23歳から35歳の女性60人をクレンジングミルクと洗顔フォームで洗顔後60分してから、任意に15グループに分けて、それぞれのグループに、実施例1～10及び比較例1～4で得た分岐ヒアルロン酸(H-1)～(H-10)及び直鎖ヒアルロン酸(H'-1)～(H'-4)をそれぞれ蒸留水に溶解して0.05重量%水溶液としたもの1mL又は蒸留水1mLを塗布し、室温28℃、湿度40%に設定し2時間安静にした。その後、コルネオメーターCM825((株)インテグラル製)を用いて(H-1)～(H-10)、(H'-1)～(H'-4)及び蒸留水の塗布部の肌水分量測定を行った。各グループの平均値を算出し、蒸留水のみを塗布したグループの肌水分量の平均値に対する相対値で表1に示した。

[0164]

[表1]

	使用した化合物	化合物の製造に使用したジビニルスルホンの量(μ l)	得られたヒアルロン酸の量(mg)	得られたヒアルロン酸の形態	重量平均分子量(kDa)	粘度(Pa·s)	保湿度	使用したヒアルロン酸合成酵素(A)の種類
実施例1	(S'1-1)	2	2	分岐	1100	0.052	1.12	A-1
実施例2	(S'2-1)	4	1.9	分岐	2000	0.12	1.18	A-2
実施例3	(S'2-2)	8	1.8	分岐	3600	0.25	1.2	A-2
実施例4	(S'2-3)	16	1.7	分岐	55000	0.53	1.25	A-2
実施例5	(S'2-4)	1	2.1	分岐	200	0.032	1.11	A-2
実施例6	(S'2-5)	0.5	2.2	分岐	50	0.015	1.11	A-2
実施例7	(S'2-6)	2	2	分岐	1000	0.052	1.13	A-2
実施例8	(S'1-2)	8	1.7	分岐	3000	0.23	1.19	A-1
実施例9	(S'1-1)	2	1	分岐	500	0.05	1.11	A-1
実施例10	(S'1-1)	2	3	分岐	1600	0.055	1.13	A-1
比較例1	(SS11)	—	2	直鎖	10	0.05	1.02	A-1
比較例2	(SS11)	—	20	直鎖	1000	0.51	1.1	A-1
比較例3	(SS12)	—	2	直鎖	10	0.051	1.02	A-2
比較例4	(SS12)	—	20	直鎖	1000	0.50	1.1	A-2

[0165] 表1の結果から、比較例2及び4で得た直鎖ヒアルロン酸(H' - 2)及

び（H' - 4）は、保湿性は高いものの、粘度が高いことがわかる。また、比較例 1 及び 3 で得た直鎖ヒアルロン酸（H' - 1）及び（H' - 3）は、粘度は低いものの、保湿性が低いことがわかる。

一方、実施例 1 及び 7 で得た分岐ヒアルロン酸（H - 1）及び（H - 7）は、分子量が比較例 2 及び 4 で得た直鎖ヒアルロン酸と同程度であるにもかかわらず、粘度は比較例 2 及び 4 の粘度よりも低く、粘度が比較例 1 及び 3 で得た直鎖ヒアルロン酸と同程度であるにもかかわらず、保湿性が高い。つまり、本発明の分岐ヒアルロン酸は、ヒアルロン酸の粘度を上げずに保湿性を向上させることができることがわかる。

また、実施例 1 ～ 10 から、本発明の分岐ヒアルロン酸は、分子量を高くしても、粘度が高くなりにくく、ヒアルロン酸の粘度を上げずに保湿性を向上させることができることがわかる。

さらに、実施例 1 と実施例 9 とを比較した場合、ピルビン酸キナーゼ（B - 4）を用いることで、得られる分岐ヒアルロン酸が多くなることが分かる。また、実施例 1 と実施例 10 とを比較した場合、ピルビン酸キナーゼ（B - 4）及びウリジン三リン酸－モノサッカリド－1－リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ（C）をさらに用いることで、得られる分岐ヒアルロン酸が多くなることがわかる。

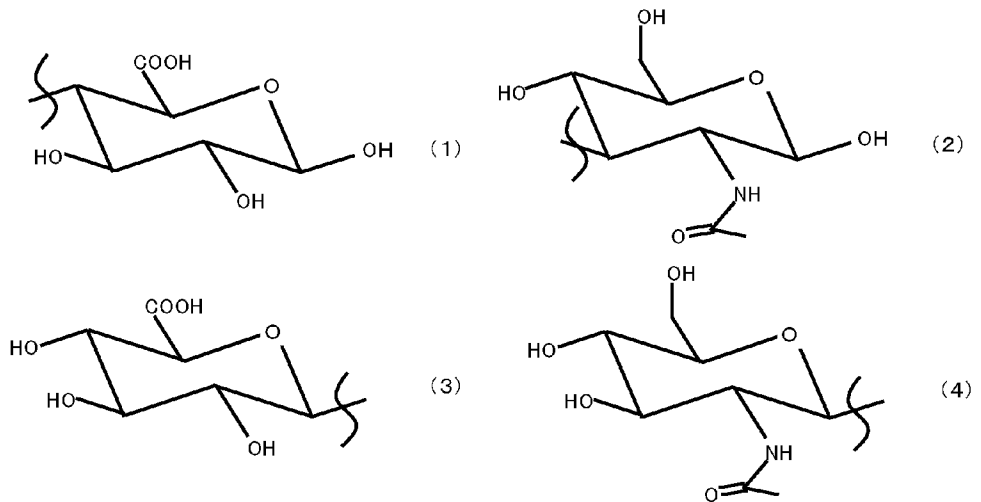
産業上の利用可能性

[0166] 本発明の分岐ヒアルロン酸は、ヒアルロン酸の優れた性質を保持しつつ、分岐の数を調整することにより、ヒアルロン酸の粘度を調整することができる。したがって、本発明の分岐ヒアルロン酸は、化粧品、医薬部外品、医薬品（関節炎治療剤、創傷被覆剤、眼科手術用手術補助剤、外科手術後の癒着阻止剤など）及び医療機器として広範囲に使用できる。また、本発明の分岐ヒアルロン酸の製造方法によれば、分岐したヒアルロン酸誘導体を製造でき、本発明の製造方法により得られたヒアルロン酸誘導体は、化粧品のみならず医薬部外品、医薬品及び医療機器にも用いることができる。

請求の範囲

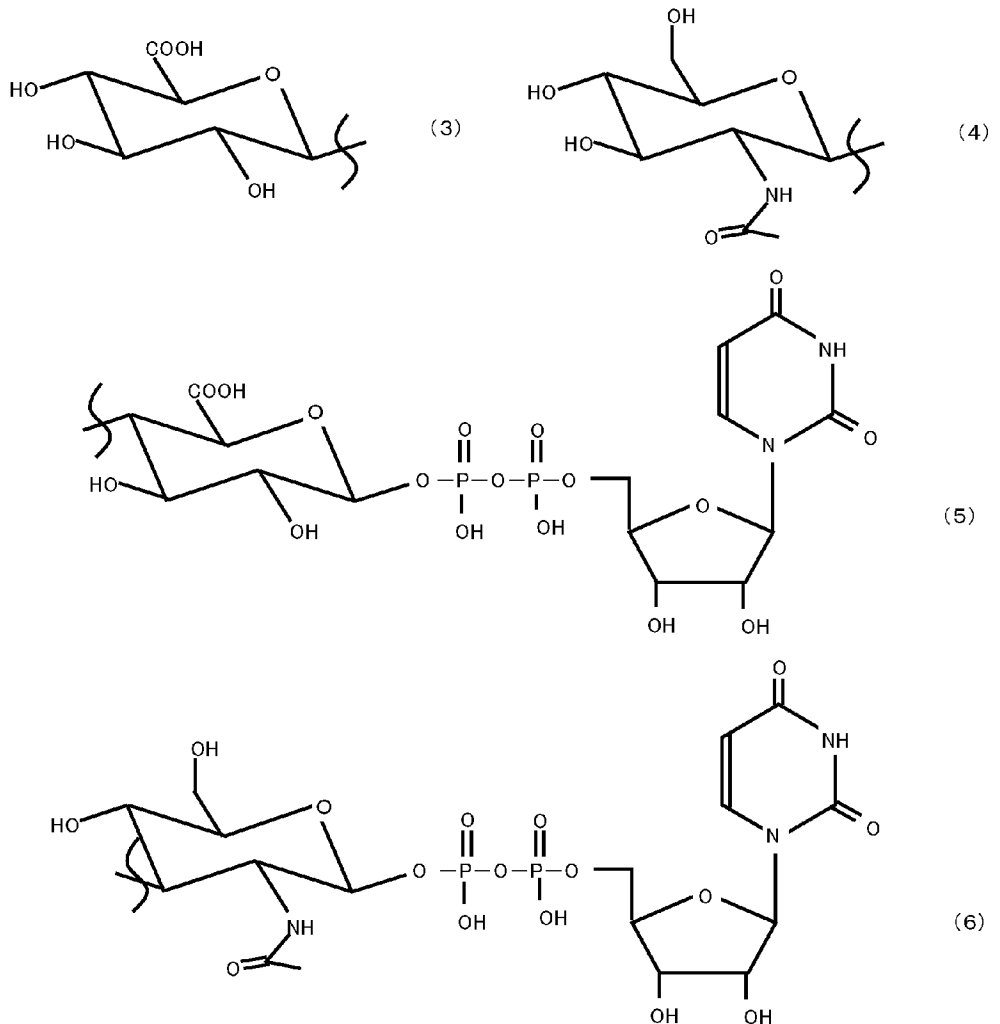
[請求項1] 下記一般式（１）～（４）のいずれかで表される基からなる群より選ばれる少なくとも１種の基を合計３つ以上有する化合物（Ｓ）にグルクロン酸とＮ－アセチルグルコサミンとを β １，３結合及び β １，４結合で交互に脱水縮合させた分岐ヒアルロン酸。

[化1]



[請求項2] 下記一般式（３）～（６）のいずれかで表される基からなる群より選ばれる少なくとも１種の基を合計３つ以上有する化合物（Ｓ'）、ウリジン二リン酸－グルクロン酸及びウリジン二リン酸－Ｎ－アセチルグルコサミンにヒアルロン酸合成酵素（Ａ）を作用させる分岐ヒアルロン酸の製造方法。

[化2]



[請求項3]

ウリジンニリン酸を下記化合物（K）に変換する活性を有するウリジンニリン酸変換酵素（B）の存在下でヒアルロン酸合成酵素（A）を作用させる請求項2に記載の分岐ヒアルロン酸の製造方法。

化合物（K）：ウラシル、ウリジン、ウリジンーリン酸、ウリジン三リン酸、ポリウリジル酸、デオキシウリジンニリン酸及びウリジンニリン酸－糖からなる群より選ばれる少なくとも1種の化合物。

[請求項4]

下記酵素活性 V_{max1} 及び下記酵素活性 V_{max2} を用いて下記数式（1）から算出した酵素活性比（Y）が0.1以上である請求項3に記載の分岐ヒアルロン酸の製造方法。

$$\text{酵素活性比（Y）} = V_{max1} / V_{max2} \quad (1)$$

酵素活性 V_{max1} ：ウリジンニリン酸変換酵素（B）のウリジンニ

リン酸に対する酵素活性。

酵素活性 V_{max2} : ウリジンニリン酸変換酵素 (B) のウリジンニリン酸-グルクロン酸及びウリジンニリン酸-N-アセチルグルコサミンに対する酵素活性。

[請求項5]

下記工程 (1) ~ (3) を (1)、(2)、(3) 及び (1) の順に含む又は下記工程 (1) ~ (3) を同時に行う分岐ヒアルロン酸の製造方法であり、

下記ミカエリス定数 K_m が下記阻害濃度 IC_{50} の 100 倍未満である請求項 2 ~ 4 のいずれかに記載の分岐ヒアルロン酸の製造方法。

工程 (1) : 上記化合物 (S')、ウリジンニリン酸-グルクロン酸及びウリジンニリン酸-N-アセチルグルコサミンにヒアルロン酸合成酵素 (A) を作用させて、分岐ヒアルロン酸及びウリジンニリン酸を含む組成物 (Z') を得る工程。

工程 (2) : ウリジンニリン酸とリン酸基含有化合物 ($b-4$) とにウリジンニリン酸変換酵素 ($B-4$) を作用させてウリジン三リン酸を得る工程。

工程 (3) : ウリジン三リン酸と 1-ホスホ-グルクロン酸とにウリジン三リン酸-モノサッカリド-1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ (C) を作用させてウリジンニリン酸-グルクロン酸を得る工程。

ミカエリス定数 K_m : ウリジンニリン酸を基質とし、ウリジンニリン酸変換酵素 ($B-4$) を酵素とし、リン酸基含有化合物 ($b-4$) を作用させてウリジン三リン酸を合成する反応におけるミカエリス定数。

阻害濃度 IC_{50} : ヒアルロン酸合成酵素 (A) をウリジンニリン酸-グルクロン酸及びウリジンニリン酸-N-アセチルグルコサミンに作用させる際の (A) の濃度において、基質としてウリジンニリン酸-グルクロン酸及びウリジンニリン酸-N-アセチルグルコサミンを

用いて、阻害剤としてウリジン二リン酸を用いて求めた、（A）の酵素活性が半減するときのウリジン二リン酸の濃度。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/070826

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P19/26(2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12P19/26

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/REGISTRY (STN), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN),
JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDREAMIII), PubMed, Thomson Innovation

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	Katsuhiro WADA, "Hyaluronan Chemistry for Applications", Sen'i to Kogyo, 10 December 2009 (10.12.2009), vol.65, no.11, pages 407 to 411	1 2-5
A	JP 2013-075884 A (Sanyo Chemical Industries, Ltd.), 25 April 2013 (25.04.2013), & WO 2012/169437 A	1-5
T	JP 2013-147642 A (Sanyo Chemical Industries, Ltd.), 01 August 2013 (01.08.2013), (Family: none)	1-5

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ 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
 "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
10 September, 2013 (10.09.13)

Date of mailing of the international search report
17 September, 2013 (17.09.13)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12P19/26 (2006.01) i

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 (I P C))

Int.Cl. C12P19/26

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	1971-2013年
日本国実用新案登録公報	1996-2013年
日本国登録実用新案公報	1994-2013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)

CAplus/REGISTRY (STN), CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), PubMed, Thomson Innovation

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 A	和田勝寛, マテリアルとしてのヒアルロン酸, 繊維と工業, 2009. 12. 10, Vol. 65, No. 11, pp. 407-11	1 2-5
A	JP 2013-075884 A (三洋化成工業株式会社) 2013. 04. 25, & WO 2012/169437 A	1-5
T	JP 2013-147642 A (三洋化成工業株式会社) 2013. 08. 01, (ファミリーなし)	1-5

C欄の続きにも文献が列挙されている。

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
「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矛盾するものではなく、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

10.09.2013

国際調査報告の発送日

17.09.2013

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

幸田 俊希

4 N

4671

電話番号 03-3581-1101 内線 3488