

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7104628号

(P7104628)

(45)発行日 令和4年7月21日(2022.7.21)

(24)登録日 令和4年7月12日(2022.7.12)

(51)国際特許分類

F I

C 0 8 B 37/02 (2006.01)

C 0 8 B 37/02

C 1 2 N 9/10 (2006.01)

C 1 2 N 9/10

A 6 1 L 15/28 (2006.01)

A 6 1 L 15/28 1 0 0

A 6 1 P 17/02 (2006.01)

A 6 1 P 17/02

A 6 1 L 15/60 (2006.01)

A 6 1 L 15/60 1 0 0

請求項の数 7 (全54頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-543063(P2018-543063)

(86)(22)出願日 平成28年11月4日(2016.11.4)

(65)公表番号 特表2018-532875(P2018-532875  
A)

(43)公表日 平成30年11月8日(2018.11.8)

(86)国際出願番号 PCT/US2016/060579

(87)国際公開番号 WO2017/079595

(87)国際公開日 平成29年5月11日(2017.5.11)

審査請求日 令和1年10月28日(2019.10.28)

(31)優先権主張番号 62/251,183

(32)優先日 平成27年11月5日(2015.11.5)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

(73)特許権者 520346620

ニュートリション・アンド・バイオサイ  
エンシーズ・ユーエスエー・フォー、イ  
ンコーポレイテッドアメリカ合衆国ニューヨーク州1462  
3・ロチェスター・ウィントン・プレイ  
ス3490

(74)代理人 100127926

弁理士 結田 純次

(74)代理人 100140132

弁理士 竹林 則幸

(72)発明者 ナタエル・ベハブトゥ

アメリカ合衆国デラウェア州19801  
・ウィルミントン・クリスティーナ・ラ  
ンディング・ドライブ150

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 デキストラン - ポリ - 1, 3 - グルカングラフトコポリマーおよびそれらの合成方法

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

(i) 少なくとも100000ダルトンの重量平均分子量(Mw)を有するデキストランを含む主鎖、ここで、当該デキストランは少なくとも90%の - 1, 6 - グリコシド結合を含む、および、

(ii) 少なくとも95%の - 1, 3 - グリコシド結合を含むポリ - 1, 3 - グルカン側鎖、ここで、1またはそれ以上のポリ - 1, 3 - グルカン側鎖の個々の分子量は少なくとも100000ダルトンである；

を含み、水性条件下で不溶性である、グラフトコポリマーを含む組成物。

## 【請求項2】

前記ポリ - 1, 3 - グルカン側鎖が、少なくとも99%の - 1, 3 - グリコシド結合を含む、請求項1に記載の組成物。

## 【請求項3】

前記デキストランが、配列番号6または配列番号7と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含むグルコシルトランスフェラーゼ酵素の生成物である、請求項1または2に記載の組成物。

## 【請求項4】

赤ちゃん用おむつ、幼児用トレーニングパンツ、失禁用品、女性用衛生用品、創傷治癒帯、および生理用ナフキンからなる群から選択される水性液体吸収用製品である、請求項1～3のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 5】

前記組成物が、パーソナルケア製品、家庭用製品、医薬製品、または工業製品である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 6】

請求項 1 に記載のグラフトコポリマーの製造方法であって、( i ) 水、( i i ) スクロース、( i i i ) 少なくとも 90 % の - 1 , 6 - グリコシド結合と少なくとも 10000 ダルトンの重量平均分子量 ( Mw ) を有するデキストラン、および ( i v ) 少なくとも 95 % の - 1 , 3 - グリコシド結合と少なくとも 100000 ダルトンの重量平均分子量を含むポリ - 1 , 3 - グルカンを含むグルコシルトランスフェラーゼ酵素を反応させる、方法。

10

## 【請求項 7】

前記グルコシルトランスフェラーゼ酵素が、配列番号 1 ~ 5 から選択されたアミノ酸配列と少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 6 に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本出願は、参照により本明細書に全体として組み込まれる米国仮特許出願第 62 / 251 , 183 号明細書 ( 2015 年 11 月 5 日出願 ) の利益を主張するものである。

## 【0002】

本開示は、多糖の分野の開示である。例えば、本開示は、デキストラン - ポリ - 1 , 3 - グルカングラフトコポリマーの生成と、水性液体の吸収力および濾過性の有利な機能を有する組成物におけるそれらの使用とに関する。

20

## 【0003】

電子的手段によって提出された配列表の参照

配列表の正式な写しは、2016 年 10 月 31 日作成の CL6500WOPCT\_\_Sequence Listing\_\_ST25 . txt のファイル名の、79 . 4 キロバイトのサイズを有する ASCII フォーマットの配列表として EFS - Web を介して電子的に提出され、本明細書と同時に提出される。この ASCII フォーマットの文書内に含まれる配列表は、本明細書の一部であり、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

## 【背景技術】

30

## 【0004】

微生物もしくは植物宿主の酵素合成または遺伝子工学を使用して新規な構造の多糖類を見出したいという欲求に推進されて、研究者らは、生分解性であって、再生可能な起源の供給原料から経済的に製造できる多糖類を発見するに至った。このような多糖の 1 つは、ポリ - 1 , 3 - グルカンであり、- 1 , 3 - グリコシド結合を備えることを特徴とするグルカンポリマーである。このポリマーは、スクロースの水溶液とストレプトコッカス・サリバリウス ( Streptococcus salivarius ) から単離されたグルコシルトランスフェラーゼ ( GTF ) 酵素とを接触させることによって単離されてきた ( 非特許文献 1 ) 。

## 【0005】

40

特許文献 1 は、S . サリバリウス ( salivarius ) gtf J 酵素を使用する多糖類繊維の調製物を開示した。この繊維のポリマー内の少なくとも 50 % のヘキソース単位は、- 1 , 3 - グリコシド結合を介して連結された。S . サリバリウス ( salivarius ) gtf J 酵素は、最終生成物としてのポリ - 1 , 3 - グルカンおよびフルクトースを生成する重合反応における基質としてスクロースを利用する ( Simpson et al . , 1995 ) 。開示されたポリマーは、溶媒中または溶媒を含む混合液中に臨界濃度を超過して溶解されると、液晶溶液を形成した。この溶液から、繊維用途において紡糸して使用することができる長く強い綿様繊維が得られた。

## 【0006】

ポリ - 1 , 3 - グルカンの生成において進歩がみられる一方、経済的な手法でのこのグ

50

ルカン生成物を単離することに関しては、問題が残っている。そのために、増強された濾過性および水性液体の吸収力を有するグラフトコポリマーの形態でのポリ - 1, 3 - グルカンが本明細書に開示される。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【文献】米国特許第7000000号明細書

【非特許文献】

【0008】

【文献】Simpson et al., Microbiology 141: 1451 - 1460, 1995

10

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0009】

一実施形態において、開示は

(i) 少なくとも約100000ダルトンの重量平均分子量(Mw)を有するデキストランを含む主鎖、

(ii) 少なくとも約95%の - 1, 3 - グリコシド結合を含むポリ - 1, 3 - グルカン側鎖

を含むグラフトコポリマーを含む組成物に関する。

20

【0010】

別の実施形態は、(i) 水、(ii) スクロース、(iii) 少なくとも約100000ダルトンの重量平均分子量(Mw)を有するデキストラン、および(iv) 少なくとも約95%の - 1, 3 - グリコシド結合を含むポリ - 1, 3 - グルカンを含むグルコシルトランスフェラーゼ酵素を含む酵素反応であって、その酵素反応が、本開示のグラフトコポリマーを生成する酵素反応に関する。

【0011】

別の実施形態は、グラフトコポリマーを調製する方法に関する。この方法は、以下の(a)および(b)を備える：(a) 少なくとも(i) 水、(ii) スクロース、(iii) 少なくとも約100000ダルトンの重量平均分子量(Mw)を有するデキストラン、および(iv) 少なくとも約95%の - 1, 3 - グリコシド結合を含むポリ - 1, 3 - グルカンを含むグルコシルトランスフェラーゼ酵素を接触させて、それにより、本開示のグラフトコポリマーが生成されるステップ；(b) 場合により、ステップ(a)で生成したグラフトコポリマーを単離するステップ。

30

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】本開示のデキストラン - ポリ - 1, 3 - グルカングラフトコポリマーのいくつかの例。この特定の例証において、ポリ - 1, 3 - グルカン鎖(「グルカングラフト」)は、デキストラン主鎖に - 1, 4 - 結合したペンダントグルコースから、グルコシルトランスフェラーゼ酵素(GTF)により合成される。

40

【図2】いくつかの態様におけるデキストラン - ポリ - 1, 3 - グルカングラフトコポリマーの写実的表現。デキストラン主鎖とポリ - 1, 3 - グルカン側鎖は、互いにほぼ同じ量で示される。例えば、主鎖は、約1000DPwであり得、また側鎖のそれぞれは、約1000DPwであり得る。

【図3】グラフは、2時間および24時間のグルコシルトランスフェラーゼ反応において生成したデキストラン - ポリ - 1, 3 - グルカングラフトコポリマーのDPwに与える出発デキストランの濃度(g/L)の影響を例証する。実施例2を参照されたい。

【図4】10.6wt%のデキストランを含有するデキストラン - ポリ - 1, 3 - グルカングラフトコポリマー試料の写真を示す。実施例6を参照されたい。

【図5】0.9wt%のデキストランを含有するデキストラン - ポリ - 1, 3 - グルカ

50

ングラフトコポリマー試料の写真を示す。実施例 6 を参照されたい。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 3 】

【表 1】

表 1. タンパク質配列番号の要約

説明	タンパク質 配列番号
「GTF 7527」、(GtfJ の短縮バージョン)、ストレプトコッカス・サリバリウス( <i>Streptococcus salivarius</i> )。タンパク質の最初の 178 個のアミノ酸が、GENBANK 識別番号 47527 との比較で欠失しており、開始メチオニンが含まれる。	1 (1341 aa)
「GTF 2678」、ストレプトコッカス・サリバリウス( <i>Streptococcus salivarius</i> ) K12。タンパク質の最初の 188 個のアミノ酸が、GENBANK 識別番号 400182678 との比較で欠失しており、開始メチオニンが含まれる。	2 (1341 aa)
「GTF 6855」、ストレプトコッカス・サリバリウス( <i>Streptococcus salivarius</i> ) SK126。タンパク質の最初の 178 個のアミノ酸が、GENBANK 識別番号 228476855 との比較で欠失しており、開始メチオニンが含まれる。	3 (1341 aa)
「GTF 2919」、ストレプトコッカス・サリバリウス( <i>Streptococcus salivarius</i> ) PS4。タンパク質の最初の 92 個のアミノ酸が、GENBANK 識別番号 383282919 との比較で欠失しており、開始メチオニンが含まれる。	4 (1340 aa)
「GTF 2765」、ストレプトコッカス族の種不明 C150 (unknown <i>Streptococcus</i> sp. C150)。タンパク質の最初の 193 個のアミノ酸が、GENBANK 識別番号 322372765 との比較で欠失しており、開始メチオニンが含まれる。	5 (1340 aa)
「GTF 0768」ロイコノストック・シュードメセンテロイデス( <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> )。GENBANK 識別番号 497964659 の成熟型。	6 (1447 aa)
「GTF 0768」、 <i>L. シュードメセンテロイデス</i> ( <i>L. pseudomesenteroides</i> )。GENBANK 識別番号 497964659 の成熟型、しかし開始メチオニンと、追加の N 末端および C 末端アミノ酸を含む。	7 (1457 aa)

【 0 0 1 4 】

引用する全ての特許文献および非特許文献は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【 0 0 1 5 】

別段の開示がなされていないならば、本明細書で使用する用語「1つの(a)」および「1つの(an)」は、1つ以上の(すなわち、少なくとも1つの)参照されるものを包含するものとする。

【 0 0 1 6 】

存在する場合、他に特に記載されていない限り、全ての範囲は、包括的および結合可能で

10

20

30

40

50

ある。例えば、「1～5」と記載されている場合、記載範囲は「1～4」、「1～3」、「1～2」、「1～2および4～5」、「1～3および5」等の範囲を含むと解釈されたい。

#### 【0017】

本明細書における用語「コポリマー」は、少なくとも異なる2種類の - グルカン、例えばデキストランおよびポリ - 1, 3 - グルカン等を含むポリマーを意味する。

#### 【0018】

本明細書における用語「グラフトコポリマー」、「分岐のコポリマー」等は、一般的に、「主鎖」（または「主な鎖」）と主鎖から分かれる側鎖とを含むコポリマーを意味する。側鎖は、主鎖とは構造的に異なる。本明細書におけるグラフトコポリマーの例は、少なくとも約10000ダルトンのM<sub>w</sub>を有するデキストランを含む主鎖と、少なくとも約95%の - 1, 3 - グリコシド結合を含むポリ - 1, 3 - グルカンの側鎖とを含む。いくつかの態様においては、デキストランの非還元性末端は、グルコシルトランスフェラーゼ酵素によってポリ - 1, 3 - グルカン合成をプライムできるので、デキストラン主鎖は、ポリ - 1, 3 - グルカンの鎖延長を有することがある。従って、主鎖は、場合によっては、デキストラン - ポリ - 1, 3 - グルカン鎖状コポリマーであり得る。いくつかの態様においては、主鎖は、それ自体以下に開示するように分岐構造であることがある；そのような主鎖へのポリ - 1, 3 - グルカンの付加が、元来の分岐構造の分岐を増大させる。

#### 【0019】

用語「ポリ - 1, 3 - グルカン側鎖」と「ポリ - 1, 3 - グルカン分岐鎖」は、本明細書においては互換可能に使用できる。デキストラン分岐鎖は、グルコシルトランスフェラーゼ酵素によりポリ - 1, 3 - グルカン合成をプライムできる非還元性末端を有するので、ポリ - 1, 3 - グルカン側鎖は、通常、デキストラン分岐鎖（例えば、ペンダント基のグルコースまたは短鎖）の延長鎖である。

#### 【0020】

本明細書において使用される用語「ポリ - 1, 3 - グルカンホモポリマー」等は、(i)グラフトコポリマーの一部でなく(ii)デキストラン - ポリ - 1, 3 - グルカン鎖状コポリマーの一部でもないポリ - 1, 3 - グルカンの意味する。

#### 【0021】

用語「 - グルカン」、「 - グルカンポリマー」等は、本明細書においては互換可能に使用される。 - グルカンは、 - グリコシド結合により一緒に連結されるグルコースモノマー単位を含むポリマーである。デキストランおよびポリ - 1, 3 - グルカンは、 - グルカンの例である。

#### 【0022】

本明細書では、「グリコシド結合(linkage)」、「グリコシド結合(bond)」などの用語は同義語として使用され、炭水化物分子を他の炭水化物分子に結合する共有結合を意味する。「グリコシド結合(linkage)」、「グリコシド結合(bond)」などの用語は、本明細書では互換可能に使用され、2つのグルコース分子間のグリコシド結合を意味する。本明細書で使用する用語「 - 1, 6 - グリコシド結合」は、隣接する - D - グルコース環の1位と6位の炭素によって、 - D - グルコース分子を相互に結合する共有結合を意味する。本明細書で使用する用語「 - 1, 3 - グリコシド結合」は、隣接する - D - グルコース環の1位と3位の炭素によって、 - D - グルコース分子を相互に結合する共有結合を意味する。本明細書で使用する用語「 - 1, 2 - グリコシド結合」は、隣接する - D - グルコース環の1位と2位の炭素によって、 - D - グルコース分子を相互に結合する共有結合を意味する。本明細書で使用する用語「 - 1, 4 - グリコシド結合」は、隣接する - D - グルコース環の1位と4位の炭素によって、 - D - グルコース分子を相互に結合する共有結合を意味する。本明細書では、「 - D - グルコース」は、「グルコース」と呼ばれることとなる。本明細書で開示する全てのグリコシド結合は、別段の記載がない限り、 - グリコシド結合である。

## 【 0 0 2 3 】

用語「ポリ - 1, 3 - グルカン」、「 - 1, 3 - グルカンポリマー」、「グルカンポリマー」等は、本明細書において互換可能に使用される。本明細書におけるポリ - 1, 3 - グルカンは、少なくとも95%の - 1, 3 - グリコシド結合を含む。95%、96%、97%、98%、または99%の - 1, 3 - グリコシド結合を含むポリ - 1, 3 - グルカンは、大部分未分岐であると推定され、100% - 1, 3 - グリコシド結合を含むポリ - 1, 3 - グルカンは、鎖状/未分岐である。

## 【 0 0 2 4 】

用語「デキストラン」、「デキストランポリマー」、「デキストラン分子」等は、本明細書においては互換可能に使用され、一般的に、 - 1, 3 結合、 - 1, 2 結合、および / または - 1, 4 結合により、主鎖に連結した周期的な分岐を伴う実質的に（ほぼ） - 1, 6 - 結合したグルコースモノマーを有する主鎖を含む - グルカン进行を意味する。

## 【 0 0 2 5 】

いくつかの態様においては、本明細書におけるデキストラン主鎖は、デキストランポリマーの全てのグルコースモノマーのうち約90~95%超を含む。デキストラン主鎖は、場合によっては、実質的に「またはほぼ」 - 1, 6 結合を含むことができ、それは、 - 1, 6 結合を少なくとも約98.0%有することが可能であることを意味する。いくつかの態様においては、デキストラン主鎖は、少量の - 1, 3 結合を含むことが可能であり、それは、約2.0%未満の - 1, 3 結合を有することが可能であることを意味する。

## 【 0 0 2 6 】

デキストランの分岐鎖は、通常短く、グルコースモノマー3つ分の長さの分岐鎖（ペンダント）であり、デキストランポリマーのグルコースモノマーのうち約10%未満を含む。そのような短い分岐鎖は、 - 1, 2 - グリコシド結合、 - 1, 3 - グリコシド結合、および / または - 1, 4 - グリコシド結合を含むことが可能である。いくつかの実施形態のデキストランはまた、主に - 1, 6 結合を含む分岐鎖を有することがある。そのような分岐鎖の長さは、そこから分岐が始まる点での鎖の長さと同じくらいであってもよい。

## 【 0 0 2 7 】

本明細書の - グルカンのグリコシド結合プロファイルは、当技術分野で既知の任意の方法を使用して求めることができる。例えば、結合プロファイルは、核磁気共鳴（NMR）分光法（例えば、 $^{13}\text{C}$  NMRまたは $^1\text{H}$  NMR）を使用する方法を用いて求めることができる。使用することができるこれらの方法や他の方法は、Food Carbohydrates: Chemistry, Physical Properties, and Applications (S.W. Cui, Ed, Chapter 3, S.W. Cui, Structural Analysis of Polysaccharides, Taylor & Francis Group LLC, Boca Raton, FL, 2005) に開示されており、この文献は参照により本明細書に組み込まれる。

## 【 0 0 2 8 】

本明細書のデキストランの「分子量」は、数平均分子量（ $M_n$ ）または重量平均分子量（ $M_w$ ）として表すことができ、それらの単位はダルトンもしくはg / モルである。或いは、分子量は、 $DP_w$ （重量平均重合度）または $DP_n$ （数平均重合度）として表すことができる。これらの分子量測定値を算出するためには、当該技術分野では、例えば、高圧液体クロマトグラフィー（HPLC）、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）、またはゲル透過クロマトグラフィー（GPC）を用いるなどの様々な手段が知られている。

## 【 0 0 2 9 】

本明細書では、「スクロース」という用語は、 - 1, 2 - グリコシド結合により連結した、 - D - グルコース分子および - D - フルクトース分子からなる非還元性二糖類を意味する。スクロースは、一般には砂糖として知られている。

## 【 0 0 3 0 】

用語「グルコシルトランスフェラーゼ酵素」、「GTF 酵素」、「GTF」、「グルカンスクラーゼ」等は、本明細書では互換可能に使用される。本明細書のグルコシルトランス

10

20

30

40

50

フェラーゼの活性は、生成物である - グルカンおよびフルクトースを作製するための基質スクロースの反応を触媒する。グルコシルトランスフェラーゼ反応の他の生成物（副生成物）としては、グルコースと、ロイクロースをはじめとする様々な可溶性オリゴ糖（DP2～DP7）を挙げることができる。野生型形態のグルコシルトランスフェラーゼ酵素は、一般的に（N末端からC末端の方向に）、シグナルペプチド、可変ドメイン、触媒ドメイン、およびグルカン結合ドメインを含む。本明細書のグルコシルトランスフェラーゼは、CAZy（Carbohydrate - Active Enzymes）データベース（Cantarel et al., Nucleic Acids Res. 37: D233 - 238, 2009）によると、グリコシドヒドロラーゼファミリー70（GH70）の下に分類される。用語「デキストランスクラーゼ」は、場合により使用して、デキストランを生成するグルコシルトランスフェラーゼ酵素を特徴付けることができる。

10

#### 【0031】

本明細書の用語「グルコシルトランスフェラーゼ触媒ドメイン」は、グルコシルトランスフェラーゼ酵素に - グルカン合成活性を提供するグルコシルトランスフェラーゼ酵素のドメインを意味する。グルコシルトランスフェラーゼ触媒ドメインは、好ましくはこの活性を有する任意の他のドメインの存在を必要としない。

#### 【0032】

用語「酵素反応」「グルコシルトランスフェラーゼ反応」、「グルカン合成反応」、「反応溶液」等は、本明細書においては互換可能に使用され、水、スクロース、少なくとも1種の活性グルコシルトランスフェラーゼ酵素、および場合によりデキストラン等の他の成分を最初を含む反応を一般的に意味する。通常、グルコシルトランスフェラーゼ反応が開始した後に、グルコシルトランスフェラーゼ反応にさらに存在できる成分としては、フルクトース、グルコース、可溶性オリゴ糖（例えば、DP2～DP7）、例えばロイクロース等、並びに、DP8以上（例えば、DP100およびそれ以上）の可溶性および/または不溶性 - グルカン生成物が挙げられる。本明細書の酵素反応は、自然に起こるとは考えられていない。

20

#### 【0033】

本明細書で使用される用語「吸収する」は、水性液体を吸い上げる（吸い込む）作用を意味する。本開示の組成物による吸収性は、例えば、保水度（WRV）の観点から、またはg水性液体/gグラフトコポリマー（一定量のグラフトコポリマーに染み込みそれにより保持できる最大量の水溶性液体）として測定できる。WRVは、例えば以下の式を用いて、本明細書の任意の水溶性液体に対して算出できる：
$$\left( \left( \text{湿潤ポリマーの容量} - \text{乾燥ポリマーの容量} \right) / \text{乾燥ポリマーの容量} \right) \times 100$$
。

30

#### 【0034】

本明細書で使用される用語「水性液体」、「水性流体」等は、水または水溶液を意味し得る。本明細書の「水溶液」は、1種もしくは複数種の溶解塩を含むことが可能であり、いくつかの実施形態において、全ての塩の最大濃度は、約3.5wt%であり得る。本明細書の水性液体は、通常、液体中の唯一の溶媒として水を含むが、水性液体は、場合により、1種もしくは複数種の、水に混和する他の溶媒（例えば、極性有機溶媒）を含むことができる。従って、水溶液は、少なくとも約10wt%の水を有する溶媒を含むことができる。

40

#### 【0035】

本明細書の「濾過率」は、ポリ - 1, 3 - グルカンホモポリマーまたは他の対照材料の濾過性よりも少なくとも約10%速いグラフトコポリマーの濾過性を特徴とする。

#### 【0036】

「体積パーセント（percent by volume）」、「体積パーセント（volume percent）」、「vol%」、「v/v%」などの用語は、本明細書では同義語として使用される。溶液中の溶質の体積パーセントは、以下の式を用いて求めることができる：
$$\left[ \left( \text{溶質の体積} \right) / \left( \text{溶液の体積} \right) \right] \times 100\%$$
。

#### 【0037】

50

「重量パーセント (percent by weight)」、「重量パーセント (weight percentage) (wt%)」、「重量 - 重量パーセント (% w/w)」等は、本明細書では同義語として使用される。重量パーセントとは、組成物、混合物、または溶液中に含まれる質量を基準とした物質のパーセンテージを指す。

#### 【0038】

用語「ポリヌクレオチド」、「ポリヌクレオチド配列」および「核酸配列」、「ヌクレオチド配列」等は、本明細書では互換可能に使用される。ポリヌクレオチドは、一本鎖もしくは二本鎖であり、場合により合成、非天然もしくは改変ヌクレオチド塩基を含有するDNAもしくはRNAのポリマーであってよい。ポリヌクレオチドは、cDNA、ゲノムDNA、合成DNAまたはそれらの混合物のうちの1つまたは複数のセグメントから構成されてよい。ヌクレオチド（リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチド）は、次の一文字略称によって呼ぶことができる：アデニル酸またはデオキシアデニル酸（それぞれRNAまたはDNAに対して）に対して「A」、シチジル酸またはデオキシシチジル酸（それぞれRNAまたはDNAに対して）に対して「C」、グアニル酸またはデオキグアニル酸（それぞれRNAまたはDNAに対して）に対して「G」、ウリジル酸（RNAに対して）に対して「U」、デオキシチミジル酸（DNAに対して）に対して「T」、プリン（AまたはG）に対して「R」、ピリミジン（CまたはT）に対して「Y」、GまたはTに対して「K」、AまたはCまたはTに対して「H」、イノシンに対して「I」、AまたはTに対して「W」、そして任意のヌクレオチドに対して「N」（例えば、DNA配列に言及する場合は、Nは、A、C、TまたはGであってよく；RNA配列に言及する場合は、Nは、A、C、UまたはGであってよい）。

#### 【0039】

本明細書で使用される「遺伝子」という用語は、コード領域からRNA（RNAはDNAポリヌクレオチド配列から転写される）を発現するポリヌクレオチド配列を指し、このRNAはメッセンジャーRNA（タンパク質をコードする）または非タンパク質コードRNAであり得る。遺伝子は、コーディング領域単独を意味する場合がある、またはコーディング領域への上流および/または下流の調節配列（例えば、プロモーター、5'非翻訳領域、3'転写ターミネーター領域）を含む場合がある。本明細書では、タンパク質をコードするコード領域を、また、「オープンリーディングフレーム」（ORF）と呼び得る。「天然の」または「内在性の」遺伝子は、それ自体の調節配列とともに天然に見出されたままの遺伝子を指し；そのような遺伝子は宿主細胞のゲノムの本来の場所に位置する。「キメラ」遺伝子は、天然には一緒に見出されることがない（すなわち、調節領域およびコード領域は互いに非相同である）調節配列およびコード配列を含む、天然遺伝子でない遺伝子を指す。従って、キメラ遺伝子は、異なる起源に由来する調節配列およびコーディング配列、または同一起源に由来するが自然に見いだされるのとは異なる方法で配列された調節配列およびコーディング配列を含む可能性がある。「外来」または「異種」遺伝子は、遺伝子導入によって宿主有機体に導入された遺伝子を指す。外来/異種遺伝子は、非天然生物に挿入された天然遺伝子、天然宿主の新規な場所に導入された天然遺伝子またはキメラ遺伝子を含む可能性がある。本明細書の所定の実施形態内のポリヌクレオチド配列は、異種である。「導入遺伝子」は、遺伝子導入手順（例えば、形質転換）によりゲノムに導入された遺伝子である。「コドン最適化」オープンリーディングフレームは、宿主細胞の好ましいコドン使用頻度を模倣するように設計されたコドン使用頻度を有する。

#### 【0040】

本明細書の細胞または生物に含まれる本明細書の「非天然」アミノ酸配列もしくはポリヌクレオチド配列は、そのような細胞もしくは生物の天然（自然）対応物中では発生しない。

#### 【0041】

本明細書で使用する「調節配列」は、遺伝子の転写開始部位の上流に位置するヌクレオチド配列（例えば、プロモーター）、5'非翻訳領域、イントロンおよび3'非コーディング領域を指し、遺伝子から転写されたRNAの翻訳、プロセッシングもしくは安定性および/または翻訳に影響を及ぼす可能性がある。本明細書の調節配列は、プロモーター、エンハ

10

20

30

40

50



ンサー、サイレンサー、5'非翻訳リーダー配列、イントロン、ポリアデニル化認識配列、RNAプロセシング部位、エフェクター結合部位、ステムループ構造および遺伝子発現の調節に関連する他の要素を含む可能性がある。本明細書の1つまたは複数の調節要素は、本明細書のコーディング領域に対して異種であってよい。

#### 【0042】

本明細書中で使用する「プロモーター」は、遺伝子からのRNAの転写を制御することができるDNA配列を意味する。一般に、プロモーター配列は、遺伝子の転写開始部位の上流にある。プロモーターは、その全体が天然遺伝子に由来してよい、自然界で見出される様々なプロモーターに由来する様々な要素から構成されてよい、またはいっそう合成DNAセグメントを含んでいてもよい。あらゆる状況下のほとんどの時点で遺伝子が細胞内で発現することを誘発するプロモーターは、一般に「構成的プロモーター」と呼ばれる。本明細書の1つまたは複数のプロモーターは、本明細書のコーディング領域にとって異種であってよい。

10

#### 【0043】

本明細書で使用する「強力プロモーター」は、単位時間当たり相当に多数の生成開始を指示できるプロモーター、および/または細胞内の遺伝子の平均転写レベルよりも高いレベルの遺伝子転写を駆動するプロモーターである。

#### 【0044】

本明細書中で使用される用語「3'非コーディング配列」、「転写ターミネーター」、「ターミネーター」等は、コーディング配列の下流に位置するDNA配列を指す。これには、ポリアデニル化認識配列、およびmRNAプロセシングもしくは遺伝子発現に影響を及ぼすことができる調節シグナルをコードする他の配列が含まれる。

20

#### 【0045】

本明細書で使用するように、第1核酸配列は、第1核酸配列の一本鎖形が好適なアニーリング条件（例えば、温度、溶液イオン強度）下で第2核酸配列にアニーリングできる場合は第2核酸配列に「ハイブリダイズする」ことができる。ハイブリダイゼーションおよび洗浄条件は、よく知られており、Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY (1989)で例証されており、この文献、特に11章および表11.1が参照により本明細書に組み込まれる。

30

#### 【0046】

用語「カセット」、「発現カセット」、「遺伝子カセット」等は、本明細書では互換可能に使用される。カセットは、タンパク質コーディングRNAをコードするDNA配列に機能的に連結したプロモーターを意味することができる。カセットは、場合により3'非コーディング配列に機能的に連結していてもよい。本明細書のカセットの構造は、場合により、「X::Y::Z」の単純な表記方式によって表すことができる。詳細には、Xはプロモーターを表し、Yはコーディング配列を表し、およびZはターミネーター（任意選択的）を表す；XはYに機能的に連結しており、およびYはZに機能的に連結している。

40

#### 【0047】

ポリヌクレオチドに関して本明細書で使用する用語「上流」および「下流」は、それぞれ、「5'」および「3'」を意味する。

#### 【0048】

本明細書で使用する用語「発現」は、(i)コーディング領域からのRNA（例えば、mRNAもしくは非タンパク質コーディングRNA）の転写、および/または(ii)mRNAからのポリペプチドの翻訳を意味する。ポリヌクレオチド配列のコーディング領域の発現は、所定の実施形態では、アップレギュレートまたはダウンレギュレートすることができる。

#### 【0049】

50

本明細書で使用する用語「機能的に連結した」は、一方の機能が他方の機能によって影響されるような2つ以上の核酸配列の会合を意味する。例えば、プロモーターは、それがコーディング配列の発現に影響を及ぼすことができる場合、コーディング配列と機能的に連結している。すなわち、コーディング配列は、プロモーターの転写調節下にある。コーディング配列は、例えば、1つ（例えば、プロモーター）または2つ以上（例えば、プロモーターおよびターミネーター）の調節配列と機能的に連結させることができる。

#### 【0050】

「組み換え」という用語は、プラスミド、ベクターまたはコンストラクトなどのDNA配列を特徴付けるために本明細書で使用されるとき、そうしなければ配列の2つの別々のセグメントであったものを、例えば化学合成により、および/または核酸の分離したセグメントを遺伝子工学の手法で操作することにより人工的に組み合わせることを指す。本明細書に記載の、組み換えコンストラクト/ベクターを調製する方法は、例えばJ. Sambrook and D. Russell (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001); T.J. Silhavy et al. (Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1984); およびF.M. Ausubel et al. (Short Protocols in Molecular Biology, 5th Ed. Current Protocols, John Wiley and Sons, Inc., NY, 2002) により記載される、標準組み換えDNAおよび分子クローニング技術に従って行うことができる。

#### 【0051】

本明細書で使用される「形質転換」という用語は、任意の方法により核酸分子を宿主有機体または宿主細胞に移行させることを指す。生物/細胞に形質転換されている核酸分子は、生物/細胞中で自律的に複製する分子、生物/細胞のゲノムに組み込まれる分子または複製もしくは組み込みされずに細胞内に一時的に存在する分子であってよい。例えばプラスミドおよび直鎖状DNA分子などの、形質転換のために好適な核酸分子の非限定的な例は、本明細書に開示されている。形質転換核酸配列を含有する、本明細書に記載の宿主有機体/細胞は、例えば、「トランスジェニックの」、「組み換えの」、「形質転換されている」、遺伝子操作されている、「形質転換体」、および/または「外因性遺伝子発現のために改変され」と称することができる。

#### 【0052】

ポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列に関して、本明細書で使用される「配列相同性」または「相同性」という用語は、特定の比較窓上で最大の一致が得られるよう整理させたときに同一である2つの配列中の核酸塩基またはアミノ酸残基を指す。従って、「配列相同性のパーセント」または「パーセント相同性」は、比較窓上で最適に整理させた2つの配列を比較することにより決定された値を指すが、比較窓内のポリヌクレオチドまたはポリペプチドの配列部分は、2つの配列の最適なアライメントのために参照配列（これは付加または欠失を含まない）と比較すると、付加または欠失（すなわちギャップ）を含み得る。パーセンテージは、配列同一性のパーセンテージを得るために、マッチした位置数を生じさせるために両方の配列内で同一の核酸塩基もしくはアミノ酸残基が発生する位置の数を決定し、マッチした位置数を比較窓内の位置の総数で割り、その結果に100を掛けることによって計算される。DNA配列とRNA配列との間の配列相同性を計算するとき、DNA配列のT残基は、RNA配列のU残基と合致し、したがってRNA配列のU残基と「同一である」と見なし得ることは理解されよう。第1および第2のポリヌクレオチドの「パーセント相補性」を決定する目的では、これは、(i) 例えば、第1のポリヌクレオチドと第2のポリヌクレオチドとの相補配列間のパーセント相同性（逆も同じ）、および/または(ii) 標準的なワトソン・クリック塩基対を形成し得る第1および第

10

20

30

40

50

2 のポリヌクレオチド間の塩基のパーセントを決定することにより得ることができる。

【0053】

オンラインにより全米バイオテクノロジー情報センター (National Center for Biotechnology Information) (NCBI) ウェブサイトで利用できる Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) のアルゴリズムを使用すると、例えば、本明細書で開示する、2 つ以上のポリヌクレオチド配列 (BLASTN アルゴリズム) またはポリペプチド配列 (BLASTP アルゴリズム) 間の同一性率を測定することができる。または、配列間の同一性率は、Clustal アルゴリズム (例えば、ClustalW、ClustalV もしくは Clustal - Omega) を使用して実施することができる。Clustal アラインメント法を使用するマルチプルアラインメントについては、デフォルト値は GAP PENALTY = 10 および GAP LENGTH PENALTY = 10 に対応する可能性がある。Clustal 法を使用するタンパク質配列のペアワイズアラインメントおよび同一性率の計算のためのデフォルトパラメーターは、KTUPLE = 1、GAP PENALTY = 3、WINDOW = 5 および DIAGONALS SAVED = 5 であってよい。核酸については、これらのパラメーターは、KTUPLE = 2、GAP PENALTY = 5、WINDOW = 4 および DIAGONALS SAVED = 4 であってよい。或いはさらに、配列間の同一性パーセントは、BLOSUM マトリックス (例えば BLOSUM62) を使用して、GAP OPEN = 10、GAP EXTEND = 0.5、END GAP PENALTY = 偽、END GAP OPEN = 10、END GAP EXTEND = 0.5 等のパラメーターで、EMBOSS アルゴリズム (例えば needle) を使用して遂行してもよい。

【0054】

本明細書では、様々なポリペプチドアミノ酸配列が、特定の実施形態の特徴として開示されている。本明細書に開示した配列と少なくとも約 70 ~ 85 %、85 ~ 90 % もしくは 90 % ~ 95 % 同一であるこれらの配列の変異体は、使用または参照することができる。或いは、変異アミノ酸配列は、本明細書に開示した配列と少なくとも 70 %、71 %、72 %、73 %、74 %、75 %、76 %、77 %、78 %、79 %、80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 % もしくは 99 % の同一性を有することができる。変異アミノ酸配列は、開示した配列と同一の機能 / 活性または開示した配列の少なくとも約 80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 % もしくは 99 % の機能 / 活性を有する。メチオニンで始まらない、本明細書に開示した任意のポリペプチドアミノ酸配列は、通常、アミノ酸配列の N 末端で少なくとも 1 つの開始メチオニンをさらに含むことができる。メチオニンで始まる、本明細書に開示のポリペプチドアミノ酸配列はいずれも、場合により、このメチオニン残基なしで考えることができる (すなわち、ポリペプチド配列は、配列の C - 末端残基の 2 位の残基に関して参照することができる)。

【0055】

本明細書で使用する用語「単離 (された)」は、その天然源から完全に、または部分的に精製されているポリペプチド分子 (例、グルコシルトランスフェラーゼ) を意味する。いくつかの例では、単離ポリペプチド分子は、より大きな組成物、バッファ系または試薬ミックスの一部である。例えば、単離ポリペプチド分子は、異種方法で細胞内または生体内に含まれる可能性がある。本明細書のグラフトコポリマー (およびそれを合成する反応) は、合成 / 人造であり、および / または自然発生しない特性を有するので、単離されているとみなすこともできる。

【0056】

本明細書で使用する「増加した」という用語は、増加した量または活性が比較される量または活性より、少なくとも約 1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、6 %、7 %、8 %、9 %

10

20

30

40

50

、 10 %、 11 %、 12 %、 13 %、 14 %、 15 %、 16 %、 17 %、 18 %、 19 %、 20 %、 50 %、 100 %または200 %多い量または活性を指すことができる。本明細書では、「増加した」、「高められた」、「優れた」、「より大きい」、「向上した」などの用語は同義語として使用される。

【0057】

ポリ - 1, 3 - グルカンの生成において進歩がなされている中で、このグルカン生成物を経済的な方法で単離することに関することがいまだに問題になっている。従って、本明細書に開示されるこの必要性への取り組みは、グラフトコポリマーの形態でのポリ - 1, 3 - グルカンである。そのようなコポリマーの様々な実施形態は、濾過性および/または水性液体の吸収性を高めてきた。

10

【0058】

本開示の特定の実施形態は、

(i) 少なくとも約100000ダルトンの重量平均分子量(Mw)を有するデキストランを含む主鎖、

(ii) 少なくとも約95%の - 1, 3 - グリコシド結合を含むポリ - 1, 3 - グルカン側鎖

を含むグラフトコポリマーを含む組成物に関する。

【0059】

本明細書のグラフトコポリマーの主鎖を形成するデキストランは、例えば、約もしくは少なくとも約50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の - 1, 6 - グルコシド結合を含むことができる。 - 1, 6 結合プロファイルのそのようなパーセントは、デキストラン(主鎖と分岐部を合わせた)の全ての結合の総計を考慮に入れる。本明細書での用語「デキストラン分岐」等は、本開示のグラフトコポリマーを調製するのに使用する前に、デキストランポリマーに存在する分岐のいずれも包含することを意味する。いくつかの実施形態においては、デキストランは、約もしくは少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の - 1, 6 - グルコシド結合を含む主鎖を含む。

20

30

【0060】

本明細書のデキストランは、例えば、約もしくは少なくとも約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、または20%の - 1, 4 グルコシド結合、 - 1, 3 グルコシド結合および/または - 1, 2 グルコシド結合を含むことができる。通常、そのような結合は、分岐点を含むデキストランの分岐部に全体的に、またはほぼ全体的に存在する。いくつかの実施形態においては、デキストラン分岐は、1つ、2つ(例えば、 - 1, 4 と - 1, 3 ; - 1, 4 と - 1, 2 ; - 1, 3 と - 1, 2)、またはこれらの種類の結合の3つ全て含んでもよい。本明細書のデキストランにおける - 1, 4 グルコシド結合、 - 1, 3 グルコシド結合および/または - 1, 2 グルコシド結合の総パーセントは、通常、50%以下である。いくつかの態様においては、例えば、約もしくは少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の - 1, 6 - グルコシド結合を有する主鎖を含むデキストランに関しては、そのようなデキストランは、約、もしくは少なくとも約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、または10%の - 1, 4 グルコシド結合、 - 1, 3 グルコシド結合および/または - 1, 2 グルコシド結合を含む。

40

【0061】

本明細書のデキストランの分岐点は、1つの - 1, 4 グルコシド結合、 - 1, 3 グルコシド結合、または - 1, 2 グルコシド結合(例えば、1つの分岐は、デキストラン主

50

鎖に - 1, 3 - 結合した分岐であってよい)を含むことができる。いくつかの実施形態においては、これらの分岐点の3つ全てが存在することがあるが、いくつかの実施形態においては、これらの分岐点のうち1つだけまたは2つ(例えば、- 1, 4と- 1, 3; - 1, 4と- 1, 2; - 1, 3と- 1, 2)の種類が存在する。分岐点が、例えば、デキストラン主鎖のグルコース単位の平均(または少なくとも)5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、10~30、15~25、20~30、または20~40毎に生じることが考えられる。本明細書における- 1, 4グルコシド結合、- 1, 3グルコシド結合、および/または- 1, 2グルコシド結合を含むデキストラン分子の分岐鎖は、通常、1つ~3つのグルコースモノマーの長さであり、デキストランポリマーの全てのグルコースモノマーの約5~10%未満を含む。グルコース単位を1つ含む分岐鎖は、場合により、ペンダントグルコース基と称することがある。いくつかの実施形態においては、デキストラン分子の分岐鎖は、デキストラン分子の全てのグルコースモノマーのうち約10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、または1%未満を含むことができる。特定の実施形態におけるデキストランは、このポリマーにおけるグルコシド結合のパーセントとして、約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、または10%の分岐点を有することができる。本明細書における分岐鎖のグルコシド結合プロファイルは、場合により、分岐鎖を他の鎖に連結することによるグルコシド結合を含むことを特徴とできる。

#### 【0062】

特定の実施形態におけるグラフトコポリマーの主鎖は、全体的に本開示のデキストランからなることが可能である。しかし、いくつかの態様においては、主鎖が、他の要素を含むことがある。例えば、グラフトコポリマー主鎖は、デキストラン主鎖の非還元性側鎖から始まるポリ- 1, 3 - グルカンを含んでもよく、主鎖(その非還元性末端で)のお蔭で、グラフトコポリマーの合成中に主要なポリ- 1, 3 - グルカン合成をプライムするのを助力する。

#### 【0063】

本明細書におけるグラフトコポリマーの主鎖を形成するデキストランの分子量(Mw[重量平均分子量])は、少なくとも約100000ダルトンであり得る。特定の実施形態におけるデキストランは、約もしくは少なくとも約100000、125000、150000、175000、200000、240000、250000、500000、750000、もしくは1000000ダルトンのMwを有することが可能であり、または約100000~200000、125000~175000、130000~170000、135000~165000、140000~160000、または145000~155000ダルトンの範囲であり得る。いくつかの態様においては、デキストランは、約もしくは少なくとも約、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、もしくは200ミリオンダルトンのMwを有することが可能であり、またはいくつかの点で、約10~80、20~70、30~60、40~50、50~200、60~200、70~200、80~200、90~200、100~200、110~200、120~200、50~180、60~180、70~180、80~180、90~180、100~180、110~180、120~180、50~160、60~160、70~160、80~160、90~160、100~160、110~160、120~160、50~140、60~140、70~140、80~140、90~140、100~140、110~140、120~140、50~120、60~120、70~120、80~120、90~120、90~110、100~120、110~120、50~110、60~110、70~110、80~110、90~110、100~110、50~100、60~100、70~100、80~100、90~100、もしくは95~105ミリオンダルトンの範囲であり得る。本明細書において少なくとも約50ミリオンのMwを有するデキストランを、場合により、「巨大デキストラン」と呼ぶことがある。本明細書のデキストランのMwは、100

000ダルトン以上であり、従って、例えばT10 ( $M_w = 10000$ )、T25 ( $M_w = 25000$ )、またはT40 ( $M_w = 40000$ )デキストランではない。本明細書のいずれのデキストランの $M_w$ も、場合により、重量平均重合度 ( $DP_w$ ) として表すことができ、 $DP_w$ は、 $M_w$ を162.14で割った商である。上述のデキストランの $M_w$ のいずれも、例えば、デキストラン試料中のデキストラン分子の平均 $M_w$ とみなすことができる。

#### 【0064】

いくつかの態様の巨大デキストランは、(i) 1位および6位でのみ連結した約87~93wt%のグルコース；(ii) 1位および3位でのみ連結した約0.1~1.2wt%のグルコース；(iii) 1位および4位でのみ連結した約0.1~0.7wt%のグルコース；(iv) 1位、3位および6位でのみ連結した約7.7~8.6wt%のグルコース；並びに(v)(a) 1位、2位および6位、または(b) 1位、4位および6位でのみ連結した約0.4~1.7wt%のグルコースを含むことができる。特定の実施形態においては、デキストランは、(i) 1位および6位でのみ連結したグルコース、約89.5~90.5wt%；(ii) 1位および3位でのみ連結したグルコース、約0.4~0.9wt%；(iii) 1位および4位でのみ連結したグルコース、約0.3~0.5wt%；(iv) 1位、3位および6位でのみ連結したグルコース、約8.0~8.3wt%；並びに(v)(a) 1位、2位および6位、または(b) 1位、4位および6位でのみ連結したグルコース、約0.7~1.4wt%を含むことができる。

#### 【0065】

いくつかの態様における巨大デキストランは、1位および6位でのみ連結したグルコースを、約87、87.5、88、88.5、89、89.5、90、90.5、91、91.5、92、92.5または93wt%含むことができる。いくつかの例では、1位および6位でのみ連結した約87~92.5、87~92、87~91.5、87~91、87~90.5、87~90、87.5~92.5、87.5~92、87.5~91.5、87.5~91、87.5~90.5、87.5~90、88~92.5、88~92、88~91.5、88~91、88~90.5、88~90、88.5~92.5、88.5~92、88.5~91.5、88.5~91、88.5~90.5、88.5~90、89~92.5、89~92、89~91.5、89~91、89~90.5、89~90、89.5~92.5、89.5~92、89.5~91.5、89.5~91、もしくは89.5~90.5wt%のグルコースが存在してよい。

#### 【0066】

いくつかの態様における巨大デキストランは、1位および3位でのみ連結した約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、もしくは1.2wt%のグルコースを含むことができる。いくつかの例では、1位および3位でのみ連結した約0.1~1.2、0.1~1.0、0.1~0.8、0.3~1.2、0.3~1.0、0.3~0.8、0.4~1.2、0.4~1.0、0.4~0.8、0.5~1.2、0.5~1.0、0.5~0.8、0.6~1.2、0.6~1.0、もしくは0.6~0.8wt%のグルコースが存在してよい。

#### 【0067】

いくつかの態様における巨大デキストランは、1位および4位でのみ連結した約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、もしくは0.7wt%のグルコースを含むことができる。いくつかの例では、1位および4位でのみ連結した約0.1~0.7、0.1~0.6、0.1~0.5、0.1~0.4、0.2~0.7、0.2~0.6、0.2~0.5、0.2~0.4、0.3~0.7、0.3~0.6、0.3~0.5、もしくは約0.3~0.4重量%のグルコースが存在してよい。

#### 【0068】

いくつかの態様における巨大デキストランは、1位、3位および6位でのみ連結した約7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、もしくは8.6wt%のグルコースを含むことができる。いくつかの例では、1位、3位および6位

10

20

30

40

50

でのみ連結した約 7.7 ~ 8.6、7.7 ~ 8.5、7.7 ~ 8.4、7.7 ~ 8.3、7.7 ~ 8.2、7.8 ~ 8.6、7.8 ~ 8.5、7.8 ~ 8.4、7.8 ~ 8.3、7.8 ~ 8.2、7.9 ~ 8.6、7.9 ~ 8.5、7.9 ~ 8.4、7.9 ~ 8.3、7.9 ~ 8.2、8.0 ~ 8.6、8.0 ~ 8.5、8.0 ~ 8.4、8.0 ~ 8.3、8.0 ~ 8.2、8.1 ~ 8.6、8.1 ~ 8.5、8.1 ~ 8.4、8.1 ~ 8.3、または 8.1 ~ 8.2 w t % のグルコースが存在してよい。

#### 【0069】

いくつかの態様における巨大デキストランは、(a) 1 位、2 位および 6 位または (b) 1 位、4 位および 6 位でのみ連結した約 0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、もしくは 1.7 w t % のグルコースを含むことができる。いくつかの例では、(a) 1 位、2 位および 6 位または (b) 1 位、4 位および 6 位でのみ連結した約 0.4 ~ 1.7、0.4 ~ 1.6、0.4 ~ 1.5、0.4 ~ 1.4、0.4 ~ 1.3、0.5 ~ 1.7、0.5 ~ 1.6、0.5 ~ 1.5、0.5 ~ 1.4、0.5 ~ 1.3、0.6 ~ 1.7、0.6 ~ 1.6、0.6 ~ 1.5、0.6 ~ 1.4、0.6 ~ 1.3、0.7 ~ 1.7、0.7 ~ 1.6、0.7 ~ 1.5、0.7 ~ 1.4、0.7 ~ 1.3、0.8 ~ 1.7、0.8 ~ 1.6、0.8 ~ 1.5、0.8 ~ 1.4、0.8 ~ 1.3 w t % のグルコースが存在してよい。

#### 【0070】

本明細書の「1 位および 6 位で連結したグルコース（グルコースモノマー）」は、2 つの隣接グルコースモノマーとの各グルコシド結合に、グルコースモノマーの 1 位と 6 位の炭素のみが関与しているデキストランのグルコースモノマーを意味する。この定義は、(i) 「1 位および 3 位で連結した」、および (ii) 「1 位および 4 位で連結した」グルコースに同様に適用され、各結合に関与する炭素位がそれぞれに応じて異なることが考慮される。

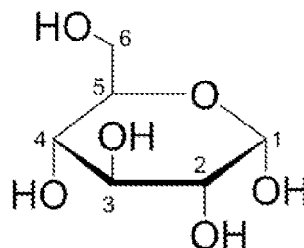
#### 【0071】

本明細書の「1 位、3 位および 6 位で連結したグルコース（グルコースモノマー）」は、3 つの隣接グルコースモノマーとの各グルコシド結合に、グルコースモノマーの 1 位、3 位および 6 位の炭素が関与しているデキストランのグルコースモノマーを意味する。1 位、3 位および 6 位でのみ連結したグルコースは、分岐点である。この定義は、(i) 1 位、2 位および 6 位で連結した、並びに (ii) 1 位、4 位および 6 位で連結したグルコースに同様に適用されるが、各結合に関与する炭素位置がそれぞれに応じて異なることが考慮される。

#### 【0072】

本明細書でのグルコースの位置（グルコースの炭素位）1、2、3、4 および 6 は、当該技術分野で知られている通りである（下記の構造式に描かれている）。

#### 【化 1】



#### 【0073】

巨大デキストランのグルコシド結合プロファイルは、本明細書に開示した任意のプロトコルに従って生成されたデキストランを使用して求めることができる。好適な結合決定プロトコルの例は、実施例 8 に開示したプロトコルに類似または同一であってよい。例えば、約 5 ~ 30 分間（例えば、10 分間）、約 70 ~ 90 （例えば、80 ）で反応系を加

熱することによって不活化した 0768 gtf 酵素反応系を、MOCO12~14 kDa の透析チューブ（例えば、再生セルロース製）（例えば、Spectra/Por（登録商標）4 透析チューブ、製品番号 132706、Spectrum Laboratories, Inc.）内に配置する。次に、不活化した反応系を、約 4~10 日間（例えば、7 日間）にわたり約 20~25（室温）で大量の水（例えば、3~5 L）に対して透析する。この水は、透析中、毎日交換することができる。次に、デキストラン生成物を、（i）透析した不活化反応系を反応体積の約 1~2 倍（1.5 倍）量の 100%メタノールと混合することにより沈降させ、（ii）同一体積の 100%メタノールを用いて少なくとも 2 回洗浄し、（iii）（場合により、真空中で）約 40~50（例えば、45）で乾燥させる。乾燥デキストランの溶解可能量を、ジメチルスルホキシド（DMS）または DMSO/5%LiCl 中に溶解し、その後、全ての遊離ヒドロキシル基を（例えば、NaOH/DMSO スラリー、次いでヨードメタンを連続的に添加することによって）メチル化する。メチル化したデキストランを、次に、（例えば、塩化メチレン中に）抽出し、約 110~125（例えば、120）でトリフルオロ酢酸（TFA）水溶液を使用してモノマー単位に加水分解する。次に、TFA を留去し、重水素化ホウ素ナトリウムを使用して還元的開環を実施する。グリコシド結合を加水分解することにより生成したヒドロキシル基を、次に、約 40~60（例えば、50）の温度で塩化アセチルおよび TFA で処理することによってアセチル化する。次に、誘導体化試薬を留去し、生じたメチル化/アセチル化モノマーをアセトニトリル中で再構成させる。その後、この調製物を適切なカラム（例えば、ビスシアノプロピルシアノプロピルフェニルポリシロキサン）を使用して GC/MS により分析する。メチルおよびアセチル官能基の相対測位は、独特の保持時間を有する種に、公表データベースと比較し得る指数および質量スペクトルを提供する。このような方法で、モノマー単位の誘導体は、各モノマーがデキストランポリマーにおいて最初にどのように連結されたかを示す。

#### 【0074】

本明細書の巨大デキストランは、相互から反復して分岐する長鎖（大多数または全部が -1, 6-結合を含有する）が存在する分枝状構造（例えば、長鎖は、順にそれ自体が他の長鎖から分岐することができ、さらにそれ自体が、他の長鎖からの分岐鎖であってよい等）であってよいと考えられる。分岐構造はまた、長鎖からの短い分岐鎖を含んでよく、これらの短鎖は、大部分が、例えば -1, 3 結合および 1, 4-結合を含むと考えられる。巨大デキストラン中の分岐点は、他の長鎖から分岐した長鎖からであろうと、長鎖から分岐した短鎖からであろうと、-1, 6-結合内に含まれるグルコースからの -1, 3 結合、-1, 4 結合または -1, 2 結合を含むと思われる。平均すると、いくつかの実施形態では、巨大デキストランの全分岐点の約 20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、15~35%、15~30%、15~25%、15~20%、20~35%、20~30%、20~25%、25~35% または 25~30% が長鎖に分岐する。他の分岐点の大部分（>98% もしくは 99%）または全部が、短鎖に分岐する。

#### 【0075】

いくつかの態様では、巨大デキストラン分岐構造の長鎖は、類似し得る。長さが類似しているとは、分岐構造内の全長鎖の少なくとも 70%、75%、80%、85% または 90% の長さ（DP）が、分岐構造の全長鎖の平均長の  $\pm 15\%$ （または 10%、5%）の範囲内にあることを意味する。いくつかの態様では、巨大デキストランの長鎖の平均（mean）長（平均（average）長）は、約 10~50 DP（すなわち、10~50 グルコースモノマー）である。例えば、長鎖の平均個別長は、約 10、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、10~50、10~40、10~30、10~25、10~20、15~50、15~40、15~30、15~25、15~20、20~50、20~40、20~30 もしくは 20~25 DP の可能性がある。

#### 【0076】



特定の実施形態では、巨大デキストランの長鎖は、大部分の  $\alpha$ -1,6-グルコシド結合と、少量(2.0%未満)の  $\alpha$ -1,3-グルコシド結合および/または  $\alpha$ -1,4-グルコシド結合とを含むことができる。例えば、巨大デキストランの長鎖は、 $\alpha$ -1,6-グルコシド結合を、約、または少なくとも約、98%、98.25%、98.5%、98.75%、99%、99.25%、99.5%、99.75%または99.9%含むことができる。特定の実施形態では、デキストラン長鎖は、 $\alpha$ -1,4-グルコシド結合を含まない(すなわち、そのような長鎖は、大部分の  $\alpha$ -1,6-結合と、少量の  $\alpha$ -1,3-結合とを有する)。これとは逆に、いくつかの実施形態では、デキストラン長鎖は、 $\alpha$ -1,3-グルコシド結合を含まない(すなわち、そのような長鎖は、大部分の  $\alpha$ -1,6-結合と、少量の  $\alpha$ -1,4-結合とを有する)。上述の実施形態のデキストラン長鎖のいずれかは、さらに、例えば、 $\alpha$ -1,2-グルコシド結合を含まない場合がある。さらにいくつかの態様では、デキストラン長鎖は、 $\alpha$ -1,6-グルコシド結合を100%含むことが可能である(他の鎖から分岐するためにそのような長鎖によって使用される結合を除く)。

#### 【0077】

いくつかの態様における巨大デキストラン分子の短鎖は、1~3つのグルコースモノマーの長さであり、デキストランポリマーの全グルコースモノマーの約5~10%未満を含んでいる。本明細書の短鎖の少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または全部は、1~3つのグルコースモノマーの長さである。デキストランモノマーの短鎖は、例えば、巨大デキストラン分子の全グルコースモノマーの約10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%もしくは1%未満を含むことができる。

#### 【0078】

いくつかの態様における巨大デキストラン分子の短鎖は、 $\alpha$ -1,2-グルコシド結合、 $\alpha$ -1,3-グルコシド結合および/または  $\alpha$ -1,4-グルコシド結合を含むことができる。短鎖は、全部を一緒に(個別にではなく)検討した場合、(i)これらの結合の3つ全て、または(ii)例えば、 $\alpha$ -1,3-グルコシド結合および  $\alpha$ -1,4-グルコシド結合を含んでよい。

#### 【0079】

巨大デキストランを使用して本開示のコポリマーを生み出す実施形態において、「主鎖」は、巨大デキストランの長鎖であると考えられている。ポリ  $\alpha$ -1,3-グルカン側鎖は、至る所で本開示の方法で巨大デキストランの長鎖に連結できる(例えば、短鎖または長鎖の非還元性末端から伸びる)。

#### 【0080】

本明細書の巨大デキストランのM<sub>w</sub>は、約50~200ミリオンであり、または既に開示したいかなるM<sub>w</sub>も、この範囲内に入る。

#### 【0081】

本明細書の巨大デキストランのz平均慣性半径は、約200~280nmであってよい。例えば、z平均R<sub>g</sub>は、約200、205、210、215、220、225、230、235、240、245、250、255、260、265、270、275もしくは280nm(または、200~280nmの間の任意の整数)であってよい。他の例として、z平均R<sub>g</sub>は、約200~280、200~270、200~260、200~250、200~240、200~230、220~280、220~270、220~260、220~250、220~240、220~230、230~280、230~270、230~260、230~250、230~240、240~280、240~270、240~260、240~250、250~280、250~270もしくは250~260nmであってよい。

#### 【0082】

本明細書の用語「半径慣性」(R<sub>g</sub>)は、デキストランの平均半径を意味し、分子の重心からのデキストラン分子の成分(原子)の平均二乗距離平方根として算出される。R<sub>g</sub>は

、例えば、オングストロームまたはナノメートル (nm) 単位で表すことができる。本明細書のデキストランの「z 平均慣性半径」は、光散乱法 (例えば、MALS) を使用して測定されるデキストランの  $R_g$  を意味する。z 平均  $R_g$  を測定する方法は知られており、従って本明細書で使用する。例えば、z 平均  $R_g$  は、米国特許第 7531073 号明細書、米国特許出願公開第 2010/0003515 号明細書および米国特許出願公開第 2009/0046274 号明細書、Wyatt (Anal. Chim. Acta 272: 1-40)、並びに Mori および Barth (サイズ排除クロマトグラフィー、Springer-Verlag, Berlin, 1999) に開示されるように測定でき、それらの全ては、参照により本明細書に組み込まれている。

#### 【0083】

いくつかの態様における巨大デキストランの  $M_w$  および / または z 平均  $R_g$  は、実施例 8 に開示したプロトコルと類似または同一のプロトコルに従って測定できる。例えば、本明細書の  $M_w$  および / または z 平均  $R_g$  は、最初に、150 ~ 250 ppm (例えば、約 200 ppm) の  $\text{NaN}_3$  を含む 0.05 ~ 1.0 M (例えば、約 0.075 M) のトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタンバッファ中に、0.768 g tf によって生成されたデキストランを 0.4 ~ 0.6 mg/mL (例えば、約 0.5 mg/mL) の濃度に溶解させることによって測定することができる。乾燥デキストランの溶媒和は、45 ~ 55 (例えば、約 50) で 12 ~ 18 時間振盪することによって達成することができる。3 台のオンライン検出器と一体となった分離モジュール (例えば、Waters Corporation, Milford, MA 製の Alliance (商標) 2695 分離モジュール) を備える好適なフローインジェクションクロマトグラフ装置内に、得られたデキストラン溶液を入れることができる：示差屈折率検出器 (例えば、Waters 2414 示差屈折率検出器)、準弾性光散乱 (QELS) 検出器 (例えば、Wyatt Technologies, Santa Barbara, CA 製の QELS 検出器) を装備する多角度光散乱 (MALS) 光度計 (例えば、Heleos (商標) - 218 - アングルマルチアングル MALS 光度計)、および示差毛管粘度検出器 (例えば、Wyatt 製の Viscostar (商標) 示差毛管粘度検出器)。デキストランポリマーピークをインジェクションピークから分離するのに、2 つの好適なサイズ排除カラム (例えば、CA、Santa Clara の Agilent Technologies 製の AQUAGEL-OH GUARD カラム) を使用することができ、この場合、移動相は試料溶媒 (上述) と同じとし、流量は約 0.2 mL/min、注入量は約 0.1 mL、そしてカラム温度は約 30 とすることができる。データの取得 (例えば、Waters の Empower TM バージョン 3 ソフトウェア) および多検出器データ整理 (Wyatt 製の Astra (商標) バージョン 6 ソフトウェア) に好適なソフトウェアを使用することができる。MALS データは、重量平均分子量 ( $M_w$ ) および z 平均慣性半径 ( $R_g$ ) を提供することができ、QELS データは、例えば、z 平均流体力学的半径を提供することができる。

#### 【0084】

本明細書の巨大デキストランは、配列番号 6 もしくは配列番号 7 と 100% 同一であるか、または少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは 99% 同一である (かつ巨大デキストラン合成活性を有する) アミノ酸配列を含むか、またはそのアミノ酸配列からなるグルコシルトランスフェラーゼ酵素の生成物であり得る。配列番号 6 (または、関連配列) を含むグルコシルトランスフェラーゼ酵素の非限定的な例には、配列番号 7 と 100% 同一であるか、または少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% もしくは 99% 同一である (かつ、巨大デキストラン合成活性を有する) アミノ酸配列を含むか、またはそのアミノ酸配列からなるグルコシルトランスフェラーゼ酵素が含まれる。特定の実施形態において、巨大デキストランは、ロイコノストック・メゼンテロイデス (Leuconostoc mesenteroides) グルコシルトランスフェラーゼ酵素ではなく、ロイコノストック・シュードメゼンテロイデス (Leuconostoc pseudomesenteroides) グルコシルトランスフェラーゼ酵素であり得る。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 8 5 】

本明細書のデキストランを生成するために使用されるグルコシルトランスフェラーゼ酵素は、通常、N末端シグナルペプチドが欠如する成熟形態である。本明細書の成熟グルコシルトランスフェラーゼ酵素を生成する発現系は、細胞外分泌を指示するN末端シグナルペプチドをコードする配列をさらに含む、酵素コードポリヌクレオチドを使用することがある。そのような実施形態におけるシグナルペプチドは、分泌工程中に酵素から切断される。シグナルペプチドは、グルコシルトランスフェラーゼに対して天然または異種のどちらかであってもよい。

## 【 0 0 8 6 】

配列番号 6 は、N末端シグナルペプチドが欠如する成熟グルコシルトランスフェラーゼ酵素の例である。このアミノ酸配列や関連するアミノ酸配列はメチオニン残基で始まらないので、シグナルペプチドを使用せずに（例えば、酵素が細胞内で発現し、細胞溶解液から得られる発現系を用いて）任意のこれらの酵素を発現させる場合は、N末端開始メチオニンを配列に（直接、または、エピトープなどの介在異種アミノ酸配列を介して）付加することが好ましいことは理解されよう。

## 【 0 0 8 7 】

特定の実施形態においてデキストランを生成するグルコシルトランスフェラーゼ酵素は、当技術分野で既知の任意の手段、例えば、ポリ - 1 , 3 - グルカン合成する酵素を生成するための以下に開示する手段により生成できる。

## 【 0 0 8 8 】

特定の実施形態においてデキストランを生成するグルコシルトランスフェラーゼ酵素は、ポリ - 1 , 3 - グルカン合成する酵素を生成するための以下に開示する、任意の精製状態（例えば、純粋または非純粋）で使用してよい。

## 【 0 0 8 9 】

デキストランを生成するグルコシルトランスフェラーゼ酵素の活性は、当該技術分野で既知の任意の方法を用いて求めることができる。例えば、そのような酵素活性は、スクロース（約 50 g / L）、デキストラン T 10（約 1 mg / mL）およびリン酸カリウムバッファ（pH 約 6.5、50 mM）を含有する反応系において、還元糖（フルクトースおよびグルコース）の生成を測定することによって求めることができるが、このとき、溶液は約 22 ~ 25 で約 24 ~ 30 時間保持される。還元糖は、約 1 N の NaOH、および約 0.1 % の塩化トリフェニルテトラゾリウムを含有する混合物に 0.01 mL の反応系を加え、次に約 5 分間にわたって OD<sub>480 nm</sub>での吸光度の増加を監視することによって測定できる。また、例えば、本明細書の g t f 0 7 6 8（配列番号 1 を含む）等の酵素の 1 単位は、100 g / L のスクロースを用いて、26、pH 6.5、1 時間で、1 g のスクロースを消費するために必要な酵素量と定義できる。

## 【 0 0 9 0 】

巨大デキストランは、デキストランを生成するグルコシルトランスフェラーゼ反応において含まれるグルコシルトランスフェラーゼの生成物であり得る。

## 【 0 0 9 1 】

デキストランを生成するグルコシルトランスフェラーゼ反応の温度は、所望ならば、制御できる。特定の実施形態においては、その温度は、約 5 ~ 約 50 である。特定の他の実施形態における温度は、約 20 ~ 約 40 である。或いは、その温度は、約 20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、または 40 であってよい。

## 【 0 0 9 2 】

デキストランを生成する本明細書のグルコシルトランスフェラーゼ反応におけるスクロースの初期濃度は、約 20 g / L ~ 900 g / L、20 g / L ~ 400 g / L、75 g / L ~ 175 g / L もしくは 50 g / L ~ 150 g / L であり得る。スクロースの初期濃度は、例えば、約 20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、12

10

20

30

40

50

0、130、140、150、160、200、300、400、500、600、700、800、900、50～150、75～125、90～110、50～500、100～500、200～500、300～500、400～500、50～400、100～400、200～400、300～400、50～300、100～300、200～300、50～200、100～200もしくは50～100 g/L（または20～900 g/Lの任意の整数）であり得る。スクロースは、ポリ - 1, 3 - グルカンを生産する反応に関して以下に開示する純度であり得る。

#### 【0093】

デキストランを生産する特定の実施形態におけるグルコシルトランスフェラーゼ反応のpHは、約4.0～約8.0であり得る。或いは、pHは、約4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5もしくは8.0であってよい。pHは、好適なバッファ、例えば、限定はされないが、ホスフェート、トリス、シトレート、またはそれらの組み合わせを添加または混入することによって調節または制御できる。g t f 反応におけるバッファ濃度は、例えば、0 mM～約100 mM、または約10、20もしくは50 mMであり得る。

10

#### 【0094】

デキストランを生産する本明細書のグルコシルトランスフェラーゼ反応は、場合により、攪拌もしくは旋回振盪によってかき混ぜることができる。そのようなかき混ぜは、例えば、約50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、50～150、60～140、70～130、80～120もしくは90～110 rpm

20

#### 【0095】

デキストランを生産する反応でのグルコシルトランスフェラーゼ酵素の濃度は、例えば、少なくとも15、20、25、30、35もしくは40 U/Lであってよい。いくつかの実施形態においては、15～35、15～30、15～25、20～35、20～30、20～25、25～35、25～30もしくは30～35 U/Lのグルコシルトランスフェラーゼを使用することができる。

#### 【0096】

デキストランを生産する本明細書のグルコシルトランスフェラーゼ反応は、完了するために約2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、18、24、30、36、48、60、72、84、96、18～30、20～28もしくは22～26時間を要する可能性がある。反応時間は、例えば、反応において使用されるスクロールおよびグルコシルトランスフェラーゼ酵素の量等の特定のパラメーターに応じて異なることがある。

30

#### 【0097】

従って、デキストランを生産するグルコシルトランスフェラーゼ反応を定める本明細書における全ての特徴は、兼ね合わせることがある。単純に1つの例として、0768グルコシルトランスフェラーゼ（配列番号1もしくはその関連配列を含む）を使用する反応は、最初に90～110 g/L（例えば、約100 g/L）のスクロース、pH 6.0～7.0（例えば、約pH 6.5）で10～30 mM（例えば、約20 mM）のリン酸カリウムバッファおよび20～30 U/L（例えば、約25 U/L）の酵素を含有することができる。そのような反応は、24～28（例えば、約26）で、50～150 rpm（例えば、約100 rpm）で振盪しながら約20～28時間（例えば、約24時間）保持することができる。

40

#### 【0098】

本明細書のグラフトコポリマーは、デキストラン主鎖を含み、その主鎖から、少なくとも約95%の - 1, 3 - グリコシド結合を含むポリ - 1, 3 - グルカン側鎖が存在する。これらの側鎖は、通常、本明細書においてここに開示されるデキストランを、ポリ - 1, 3 - グルカン合成できるグルコシルトランスフェラーゼと反応させることにより、生じる。明確な目的上、これらの側鎖は、デキストランの分岐鎖としてみなされるべきではない。

50

## 【 0 0 9 9 】

特定の態様におけるポリ - 1 , 3 - グルカン側鎖は、約もしくは少なくとも約 9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、9 9 . 5 %または 1 0 0 %の - 1 , 3 グルコシド結合を含むことができる。そのような側鎖は、いくつかの態様においては、ペンダントグルコースもしくはデキストランの他の分岐部（それらの両方とも、伸長の為に酵素に非還元性末端を与える）をプライマーとして用いて、グルコシルトランスフェラーゼ酵素で合成され则认为られる。側鎖が、デキストラン主鎖にそれ自体が - 1 , 3 - 結合したペンダントグルコースから合成される場合には、得られる側鎖は、1 0 0 %の - 1 , 3 - グリコシド結合、または非常に高いパーセント（例えば、9 8 %以上）の - 1 , 3 - グリコシド結合を有する可能性がある。いくつかの実施形態においては、デキストラン主鎖とペンダントグルコースもしくはそれより長い分岐鎖と間のグルコシド結合は、側鎖の結合であるとみなされる。いくつかの実施形態においては、デキストラン主鎖と分岐鎖との間のグルコシド結合も、またそれから側鎖が合成される分岐鎖内のグルコシド結合も、側鎖の結合プロファイルを定める際に考慮される。いくつかの実施形態においては、側鎖は、例えば、グラフトコポリマー中のデキストラン成分が 1 0 0 0 0 0 ~ 2 0 0 0 0 0 ダルトンであるグラフトコポリマーとの - 1 , 6 グルコシド結合を伴わない。

10

## 【 0 1 0 0 】

本明細書におけるポリ - 1 , 3 - グルカン側鎖の M<sub>w</sub> は、例えば約もしくは少なくとも約 1 6 2 0、1 6 5 0、1 7 0 0、2 0 0 0、5 0 0 0、1 0 0 0 0、1 5 0 0 0、1 6 2 0 0、2 0 0 0 0、2 5 0 0 0、3 0 0 0 0、4 0 0 0 0、5 0 0 0 0、6 0 0 0 0、7 0 0 0 0、7 5 0 0 0、8 0 0 0 0、9 0 0 0 0、1 0 0 0 0 0、1 1 0 0 0 0、1 2 0 0 0 0、1 2 5 0 0 0、1 3 0 0 0 0、1 4 0 0 0 0、1 5 0 0 0 0、1 6 0 0 0 0、1 6 2 0 0 0、または 1 6 5 0 0 0 ダルトンであり得る。本明細書におけるグラフトコポリマーの側鎖は、比較的均一なサイズである则认为られる。例えば、グラフトコポリマーの側鎖は、それぞれ少なくとも約 1 0 0 0 0 0、1 2 0 0 0 0、1 4 0 0 0 0、1 6 0 0 0 0、1 6 2 0 0 0、または 1 6 5 0 0 0 ダルトンであってよい。例えば、グラフトコポリマーの側鎖はまた、約 1 5 0 0 0 0 ~ 1 6 5 0 0 0、1 5 5 0 0 0 ~ 1 6 5 0 0 0、または 1 6 0 0 0 0 ~ 1 6 5 0 0 0 ダルトンの範囲の M<sub>w</sub> をそれぞれ有してよい。所望ならば、グラフトコポリマーの側鎖の平均 M<sub>w</sub> はまた、参考にでき、上述の側鎖の M<sub>w</sub> のいずれも、コポリマーの側鎖全ての平均 M<sub>w</sub> とみなすことができる。本明細書に開示される側鎖の M<sub>w</sub> のいずれも（または任意のグルカンの M<sub>w</sub>）、場合により、D P<sub>w</sub> ( M<sub>w</sub> / 1 6 2 . 1 4 ) という点で特徴付けることができる。

20

30

## 【 0 1 0 1 】

本明細書におけるグラフトコポリマーのポリ - 1 , 3 - グルカン側鎖の数は、例えば少なくとも 3、4、5、6、7、8、9、1 0、1 1、1 2、1 3、1 4、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4、2 5、2 6、2 7、2 8、2 9、または 3 0 であり得る。いくつかの実施形態においては、側鎖の数は、例えば 4、5、または 6 である。いくつかの態様において、ポリ - 1 , 3 - グルカン側鎖の上述の数は、少なくとも約 1 0 0 0 0 0、1 2 0 0 0 0、1 4 0 0 0 0、1 6 0 0 0 0、1 6 2 0 0 0、または 1 6 5 0 0 0 ダルトンである側鎖の特徴であり、本明細書の任意のデキストラン成分、例えば、1 0 0 0 0 0 ~ 2 0 0 0 0 0 ダルトンの巨大デキストランまたはデキストランは、そのようなコポリマーに含まれ得る。尚さらなる態様においては、ポリ - 1 , 3 - グルカン側鎖の上述の数は、グラフトコポリマーを特徴付けることができ、そのグラフトコポリマーにおいて、デキストラン成分が、デキストラン主鎖の 1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4、または 2 5 のグルコース単位毎に平均して 1 つ、ペンダントグルコースおよび / または分岐鎖（そこから側鎖をプライム / 合成できる）を有する。デキストラン成分のサイズ（例えば、1 0 0 0 0 0 ~ 2 0 0 0 0 0 ダルトン）、デキストラン主鎖上の分岐鎖 / ペンダントグルコースの位置決め（例えば、2 0 のグルコース単位毎に約 1 つ）、およびグラフトコポリマーのポリ - 1 , 3 - グルカン側鎖の数に応じて、グラフトコポリマーが、ポリ - 1 , 3 - グルカン側鎖に伸びないその元来

40

50

のデキストラン分岐鎖／ペンダントグルコースの大部分（例えば、少なくとも80%、85%、90%、95%）を有する（つまり、分岐鎖／ペンダントグルコースの殆どは、それらを使用して本明細書のグラフトコポリマーを合成する前に、それらは、デキストラン中に存在する）ことが、いくつかの場合に考えられる。さらに、いくつかの他の実施形態において、本明細書のグラフトコポリマーが、最大約50まで、最大100まで、最大500まで、最大1000まで、最大5000まで、最大10000まで、最大15000まで、または最大20000までのポリ - 1, 3 - グルカン側鎖を有する可能性があると思われる。

#### 【0102】

特定の実施形態においては、グラフトコポリマーのデキストラン成分は、少なくとも約50ミリオンドルトンの重量平均分子量（例えば、既に開示したより高い任意のMw）を有するおよび／または（i）1位および6位で連結した約87～93wt%のグルコース；（ii）約1位および3位で連結した0.1～1.2wt%のグルコース；（iii）1位および4位で連結した約0.1～0.7wt%のグルコース；（iv）1位、3位および6位で連結した約7.7～8.6wt%のグルコース；並びに（v）（a）1位、2位および6位、または（b）1位、4位および6位で連結した約0.4～1.7wt%のグルコースを含み、グラフトコポリマーの側鎖は、少なくとも30%の - 1, 3 - グリコシド結合と、側鎖における - 1, 3結合と - 1, 6結合との両方の合計が100%までである百分率の - 1, 6結合とを含んでもよい。例えば、 - 1, 3結合の百分率は、少なくとも30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、または95%であってよく、一方、 - 1, 6結合の百分率は、側鎖における - 1, 3結合と - 1, 6結合との両方の合計が100%までである百分率であってよい。特定の実施形態においては、そのような側鎖は、交互性（1, 3結合と1, 6結合を交互に）を含まない。いくつかの実施形態においては、側鎖は、得られるグラフトコポリマーを不溶性とさせるレベルの - 1, 3結合を有する。上述の少なくとも30%の - 1, 3 - グリコシド結合を含む側鎖を合成するのにいくつかの態様において使用できるグルコシルトランスフェラーゼ酵素は、米国特許出願公開第2015/0232819号明細書に開示され、それらは、参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【0103】

少なくとも95%の - 1, 3 - グリコシド結合を含む側鎖を特徴とする既に開示した（鎖結合プロファイルを除く）全ての特徴（例えば、Mw、側鎖の数、デキストラン主鎖の間隔、分岐点のタイプ）は、同様に、少なくとも30%の - 1, 3 - グリコシド結合を含む本明細書の側鎖を特徴とする。

#### 【0104】

本明細書のデキストラン - ポリ - 1, 3 - グルカングラフトコポリマーの重量平均分子量（つまり、元来のデキストラン分子とグラフトコポリマーのポリ - 1, 3 - グルカン側鎖とを合わせたMw）は、例えば、約もしくは少なくとも約750000、800000、900000、1000000、1100000、1200000、1300000、1400000、1500000、1600000、1700000、1800000、1900000、または2000000ダルトンであってよい。いくつかの実施形態において巨大デキストラン成分を含むデキストラン - ポリ - 1, 3 - グルカングラフトコポリマーの重量平均分子量は、巨大デキストラン成分自体に関して既に開示した重量に類似しているが、約0.5、0.75、1、1.25、1.5、1.75または2ミリオンドルトン（2、3個のポリ - 1, 3 - グルカン側鎖が存在する実施形態において）の追

加を伴うと思われる。尚いくつかのさらなる態様においては、デキストラン - ポリ - 1, 3 - グルカングラフトコポリマーの重量平均分子量は、本明細書の任意のデキストラン分子の Mw と、本明細書に開示した任意のポリ - 1, 3 - グルカン側鎖の Mw (側鎖の数およびそれぞれの Mw を考慮する) との合計であってよい。同様に、本明細書のグラフトコポリマーの Mw は、場合により、デキストラン成分の Mw およびポリ - 1, 3 - グルカン側鎖の Mw の観点で表すことができる。いくつかの態様においては、デキストラン - ポリ - 1, 3 - グルカングラフトコポリマーの重量平均分子量は、600000ダルトン以上、650000ダルトン以上、または700000ダルトン以上である。

#### 【0105】

特定の実施形態においては、デキストラン - ポリ - 1, 3 - グルカングラフトコポリマーは、約もしくは少なくとも約 2.0 wt % のデキストランを含むことができる。いくつかのさらなる実施形態におけるグラフトコポリマー中のデキストランの wt % は、約もしくは少なくとも約 0.5 %、1.0 %、1.5 %、2.0 %、2.1 %、2.2 %、2.3 %、2.4 %、2.5 %、3.0 %、3.5 %、4.0 %、5.5 %、6.0 %、6.5 %、7.0 %、7.5 %、8.0 %、8.5 %、9.0 %、9.5 %、10.0 %、10.5 %、11.0 %、11.5 %、12.0 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、もしくは 99 % (または 1 % ~ 99 % の任意の整数) であってよい。いくつかの実施形態においては、グラフトコポリマー (例えば、2 % ~ 50 %、2 % ~ 11 %、2.5 % ~ 10.5 %、または 2 % 超のデキストランを含むグラフトコポリマー) は、同一タイプであるが重量百分率が低い (例えば、1.6 %、1.5 %、1.4 %、1.3 %、1.2 %、1.1 %、1.0 %、0.9 %、または 0.8 % 未満) デキストランを含むグラフトコポリマーと比較すると、向上した濾過性を呈することができる。本明細書の向上した濾過性は、水および/または水溶液 (例えば、グラフトコポリマーを生成するのに使用する酵素反応の液体部) をグラフトコポリマー粒子の層 (例えば、ウェットケーキ) を介して濾過 (例えば、重力のみ、置換洗浄、印加力) することにより、場合により容易性を指すことがある。本発明のグラフトコポリマーは、(i) 1.6 wt % 未満のデキストランを有する本明細書のグラフトコポリマー (上述) の濾過性、または (ii) 少なくとも 95 %、96 %、97 %、98 %、99 % もしくは 100 % の - 1, 3 - 結合を有する、500、600、700、800、900、もしくは 1000 の DPw のポリ - 1, 3 - グルカンホモポリマーの濾過性よりも、約もしくは少なくとも約 10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、100 %、150 %、200 %、500 %、1000 %、10000 %、もしくは 100000 % 速い濾過性を呈することができる。そのような比較をするための濾過性測定は、ケーキ比抵抗の単位または任意の他の濾過性測定の単位においてであってよい。いくつかの場合において、上述の実施形態におけるデキストラン (少なくとも 2.0 wt % のデキストランを含むグラフトコポリマー) は、少なくとも約 50 ミリオンの Mw または本明細書の Mw よりもいくらか大きい Mw を有する。少なくとも 2.0 wt % の本明細書のデキストランを含むグラフトコポリマーは、例えば約 3.5、3.75、4.0、4.25、4.5、4.75、5.0、5.25、もしくは 5.5 mm の平均直径を有する粒子として現れることがある。特定の態様におけるグラフトコポリマーの向上した濾過性は、通常濾過するのが困難であるポリ - 1, 3 - グルカンホモポリマーに対して利点を示す。

#### 【0106】

本明細書のデキストラン - ポリ - 1, 3 - グルカングラフトコポリマーの多分散指数 (Mw / Mn) (PDI) は、例えば、約、少なくとも約 5.0、4.75、4.5、4.25、4.0、3.75、3.5、3.25、3.0、2.75、2.5、2.25、または 2.0 以下であってよい。そのような PDI は、デキストラン - ポリ - 1, 3 - グルカングラフトコポリマーとポリ - 1, 3 - グルカンホモポリマーの両方を生成できる本明細書のグルコシルトランスフェラーゼ反応の全ての不溶性生成物 (全てを一緒に考え

10

20

30

40

50

て)を別の方法で特徴付けることができる。一般的に、初期の基質デキストランをより多く(例えば、約もしくは少なくとも約7.5、10、12.5、15、17.5、または20 g/L)含む本明細書のグルコシルトランスフェラーゼ反応は、他の全ての変数が等しいならば、初期の基質デキストランをより少なく(例えば、約、5、4、3、2.5、もしくは2 g/Lまたは約5、4、3、2.5、もしくは2 g/L未満)含むグルコシルトランスフェラーゼ反応よりもPDIが低い不溶性生成物をもたらす。

#### 【0107】

本開示のデキストラン-ポリ-1,3-グルカングラフトコポリマーは、通常、水性条件下で不溶性(非水溶性)である。例えば、グラフトコポリマーは、最大約50、60、70、80、90、100、110、または120までの温度で、水もしくは別の水性組成物に不溶であり得、または完全に溶解できない。水溶液等の本明細書の水性組成物は、少なくとも約10 wt %の水を有する溶媒を含むことができる。他の実施形態においては、溶媒は、例えば、少なくとも約20、30、40、50、60、70、80、90もしくは100 wt % (または10~100 wt %の間の任意の整数)の水である。

#### 【0108】

本明細書の組成物に含まれるデキストラン-ポリ-1,3-グルカングラフトコポリマーは、水性液体を吸収できる。水性液体は、例えば水であってよい。特定の態様における水性液体は、塩溶液(塩水)等の水溶液であってよい。塩溶液は、場合により、約もしくは少なくとも約0.01、0.025、0.05、0.075、0.1、0.25、0.5、0.75、1.0、1.25、1.5、1.75、2.0、2.5、3.0、3.5、0.01~3.5、0.5~3.5、0.5~2.5、もしくは0.5~1.5 wt %の塩(そのようなwt %値は、通常1種もしくは複数種の塩の総濃度を指す)を含むことができる。本明細書の水溶液で使用する塩の例としては、1種もしくは複数種のナトリウム塩(例えば、NaCl、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)が挙げられる。塩の他の非限定的な例としては、(i)アルミニウム、アンモニウム、バリウム、カルシウム、クロム(IIもしくはIII)、銅(IIもしくはIII)、鉄(IIもしくはIII)、水素、鉛(II)、リチウム、マグネシウム、マンガン(IIもしくはIII)、水銀(IIもしくはIII)、カリウム、銀、ストロンチウムナトリウム、スズ(IIもしくはIV)または亜鉛カチオン、および(ii)酢酸塩、ホウ酸塩、臭素酸塩、臭化物、炭酸塩、塩素酸塩、塩化物、亜塩素酸塩、クロム酸塩、シアナミド、シアン化物、重クロム酸塩、リン酸二水素、フェリシアン化物、フェロシアン化第二鉄、フッ化物、炭酸水素、リン酸水素、硫酸水素、硫化水素、亜硫酸水素、水素化物、水酸化物、次亜塩素酸塩、ヨウ素酸塩、ヨウ化物、硝酸塩、窒化物、亜硝酸塩、シュウ酸塩、酸化物、過塩素酸塩、過マンガン酸塩、過酸化物、ホスフェート、リン化物、亜リン酸塩、ケイ酸塩、スズ酸塩、亜スズ酸塩、硫酸塩、硫化物、亜硫酸塩、酒石酸塩またはチオシアン酸塩アニオンを含む塩が挙げられる。従って、例えば、上述の(i)からのカチオン、および上述の(ii)からのアニオンを有する任意の塩が、本開示の水性液体中に含まれ得る。吸収レベルは、当技術分野で既知の手段、例えば、WRV(保水度)の測定に関する実施例7(以下)に開示するプロトコルを用いて、測定できる。

#### 【0109】

本明細書の組成物に含まれるデキストラン-ポリ-1,3-グルカングラフトコポリマーによる水性液体の吸収は、例えば組成物のWRVを測定することにより、判定できる。本明細書のWRVは、当技術分野で既知の手段、例えば、実施例7(以下)に開示するプロトコルを用いて、測定できる。簡潔に言えば、WRVは、以下の式を用いて算出できる： $(\text{湿潤ポリマーの質量} - \text{乾燥ポリマーの質量}) / \text{乾燥ポリマーの質量} \times 100$ 。WRVは、例えば本開示の任意の水性液体に対して測定できる。このように、用語WRVは、語「水」を含み、ポリマーWRVは、任意のタイプの本開示の水性液体、例えば水溶液に関して測定できると理解されることとなる。

#### 【0110】

いくつかの実施形態においては、デキストラン-ポリ-1,3-グルカングラフトコポリ



リマーおよび／またはそのポリマーに含まれる組成物は、約もしくは少なくとも約 100 の保水度 (WRV) を有することができる。例えば、本明細書の WRV は、約または少なくとも約 100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、250、500、1000、1500、2000、2500、3000、3500、または 4000 であってよい。

【0111】

本明細書の吸収性は、場合により、一定量のデキストラン - ポリ - 1, 3 - グルカングラフトコポリマー (g 水性液体 / g グラフトコポリマー) に染み込みそれにより保持できる最大量の水性液体の観点から測定できる。いくつかの態様においては、少なくとも 15 g の水性液体 / g グラフトコポリマーの吸収能力を有するグラフトコポリマーは、高吸水性材料としてみなすことができる。

10

【0112】

いかなる特別の信念にも理論にもとらわれることはないが、本明細書のデキストラン - ポリ - 1, 3 - グルカングラフトコポリマーの向上した WRV は、それらのデキストラン成分に少なくとも一部分起因すると思われる。デキストランはまた、個々のグラフトコポリマー分子のポリ - 1, 3 - グルカン成分を「架橋」(本当の化学架橋ではない) するように見える。

【0113】

本開示のデキストラン - ポリ - 1, 3 - グルカングラフトコポリマーを含む組成物は、例えばパーソナルケア製品、家庭用製品、医薬製品、もしくは工業製品の形態であってもよく、またはそれらの製品内に含まれてもよい。これに関連して、特定の実施形態における組成物は、吸収材または超吸収材として使用できる。そのような材料の例としては、低刺激性である材料が挙げられる。本明細書の超吸収材は、例えば少なくとも 15 g の水性液体 / g グラフトコポリマーの、本明細書の水性液体に対する吸収能力を有する。いくつかの実施形態においては、パーソナルケア製品、家庭用製品、医薬製品、または工業製品は、本開示の吸収材または超吸収材を含むことができる。本開示の組成物の 1 つの特別の利点は、この組成物は、生物分解性であるので、環境適応型であることである。

20

【0114】

本明細書におけるパーソナルケア製品および／または使用の例としては、赤ちゃん用おむつ、幼児用トレーニングパンツ、失禁用品 (例えば、パッド、大人用おむつ)、および女性用衛生用品 (例えば、生理用ナフキン / パッド、タンポン、陰唇間製品、パンティーライナー) 等の吸収性個人用衛生製品が挙げられる。

30

【0115】

本明細書における工業製品および／または使用の例としては、通信ケーブルラッピング；食品パッド；土壌に水を保持するためのおよび／または植物根に放水するための等の農業および林業用途；消火装置；並びに酸性水溶液または塩基性水溶液のこぼれの浄化が挙げられる。

【0116】

本明細書における医薬製品および／または使用の例としては、包帯および外科パッド等の創傷治癒帯；超音波系イメージング用のファントム；病院ベッド用シート；生理用ナフキン；制御された薬剤放出デバイス；細胞固定化島 (cell immobilization islets)；三次元の細胞培養基材；再生医療用の生物活性スカフォード (bioactive scaffolds)；胃バルキングデバイス (stomach bulking devices)；および規制薬物の廃棄が挙げられる。

40

【0117】

本明細書のいくつかの実施形態におけるパーソナルケア製品、家庭用製品、および／または医薬製品は、尿、血液、血清、液状糞便物 (例えば、下痢)、胆汁、胃酸 / 胃液、嘔吐物、羊水、母乳、脳脊髄液、滲出液、リンパ液、粘液 (例えば、鼻漏、痰)、腹腔液、胸膜液、膿汁、カタル性分泌物、唾液、喀痰、滑液、汗および／または涙等の体液を吸収できる。

50

## 【 0 1 1 8 】

本開示の組成物の１つの特別の利点は、この組成物が生物分解性であるので、環境適応型であることである。

## 【 0 1 1 9 】

本開示の組成物は、例えば、約または少なくとも約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、99.5、または 99.9 w t % の例えば 1 種もしくは複数種の本明細書のデキストラン - ポリ - 1, 3 - グルカングラフトコポリマーを含むことができる。特定の態様における乾燥組成物は、粉末、顆粒、マイクロカプセル、フレークの形態で、または粒状物質の他の任意の形態であってよい。他の例としては、ペレット、棒、穀粒、ビーズ、タブレット、スティック、または他の凝集体等の、より大きな組成物が挙げられる。本明細書の乾燥組成物は、通常、3、2、1、0.5 または 0.1 w t % 未満のその中に含まれる水を有する。

10

## 【 0 1 2 0 】

本開示のさらなる態様は、以下の ( i ) ~ ( i v ) を含む酵素反応に関する：( i ) 水、( i i ) スクロース、( i i i ) 少なくとも約 1 0 0 0 0 0 ダルトンの重量平均分子量 ( M w ) を有するデキストラン、および ( i v ) 少なくとも約 9 5 % の - 1, 3 - グリコシド結合を含むポリ - 1, 3 - グルカンを含むポリ - 1, 3 - グルコシルトランスフェラーゼ酵素。そのような酵素反応は、本明細書に開示されるデキストラン - ポリ - 1, 3 - グルカングラフトコポリマーを生成する。

20

## 【 0 1 2 1 】

本開示の（例えば、上述または以下の実施例に記載の）少なくとも 1 0 0 0 0 0 ダルトンのデキストランのいずれも、本明細書の酵素反応に使用できる。酵素反応に添加されるデキストランは、例えば、乾燥粉末の形態でも、予め溶解した形態でもよい。反応におけるデキストランの初期濃度は、例えば、約もしくは少なくとも約 0.5 g / L、1.0 g / L、1.5 g / L、2 g / L、2.5 g / L、3 g / L、4 g / L、5 g / L、7.5 g / L、10 g / L、15 g / L、20 g / L、または 25 g / L であってよい。「デキストランの初期濃度」は、反応成分（例えば、少なくとも、水、スクロース、デキストラン、グルコシルトランスフェラーゼ酵素）の全部が加えられた直後のグルコシルトランスフェラーゼ反応におけるデキストラン濃度を意味する。

30

## 【 0 1 2 2 】

いくつかの実施形態においては、酵素反応は、初期濃度が少なくとも約 2 g / L（例えば、既に開示した他の任意の高濃度）の、少なくとも約 5 0 ミリオンダルトンである（例えば、既に開示した他の M w が高い任意の）デキストランを含んでもよい。そのような反応は、向上した濾過性プロファイル（既に開示した濾過性のいずれか）を有するデキストラン - ポリ - 1, 3 - グルカングラフトコポリマーをもたらすことができる。生成物の濾過性に与える有利な効果が、僅か 2 ~ 1 0 g / L（実施例 6）のデキストランの初期濃度で観察されるので、特定の実施形態においては、デキストラン（M w 5 0 ミリオンダルトン）の初期濃度は、いくつかの例において約 2.0 または 2.4 g / L ~ 約 3、4、5、6、7、8、9、もしくは 1 0 g / L であってよい。

40

## 【 0 1 2 3 】

グラフトコポリマーを生成する本開示の酵素反応は、少なくとも約 9 5 % の - 1, 3 - グリコシド結合を含むポリ - 1, 3 - グルカンを含むポリ - 1, 3 - グルコシルトランスフェラーゼ酵素を含む。そのような酵素は、デキストランプライマー位置からポリ - 1, 3 - 側鎖（既に開示）を合成して、本明細書のデキストラン - ポリ - 1, 3 - グルカングラフ

50

トコポリマーを形成できる。従って、例えばグルコシルトランスフェラーゼ酵素は、( i ) 少なくとも約 95 %、96 %、97 %、98 %、もしくは 99 % の - 1, 3 - グリコシド結合を含む、および / または ( i i ) Mw が少なくとも約 16200 ダルトンであるポリ - 1, 3 - グルカン合成できる。

【 0124】

ポリ - 1, 3 - グルカン生成する特定の実施形態におけるグルコシルトランスフェラーゼ酵素は、例えば、米国特許出願公開第 2014/0087431 号明細書に開示されるアミノ酸配列を含むことができるまたはからなることができ、それらは、参照により本明細書に組み込まれる。そのような配列の例としては、配列番号 1、2、3、4、もしくは 5 と 100 % 同一であるか、または少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、98.5 %、99 %、もしくは 99.5 % 同一であり、グルコシルトランスフェラーゼ活性を有する配列が挙げられる。

10

【 0125】

特定の実施形態におけるグルコシルトランスフェラーゼ酵素は、配列番号 1 のアミノ酸 54 ~ 957 位と 100 % 同一である、または少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、98.5 %、99 %、もしくは 99.5 % 同一であり、グルコシルトランスフェラーゼ活性を伴うアミノ酸配列を有するグルコシルトランスフェラーゼ触媒ドメインを含むことができる、またはからなることができる。配列番号 1 のアミノ酸 54 ~ 957 位を有するグルコシルトランスフェラーゼ酵素は、100 % の - 1, 3 結合および少なくとも 400 の DPw を有するポリ - 1, 3 - グルカンを生成できる ( データ示さず、米国特許出願公開第 62/180,779 号明細書の表 6 を参照 ) 。

20

【 0126】

配列番号 1 ( GTF7527 )、2 ( GTF2678 )、3 ( GTF6855 )、4 ( GTF2919 ) および 5 ( GTF2765 ) は、それぞれの野生型対応物と比較して、シグナルペプチドドメインおよび可変ドメインの全部分もしくは実質的部分が欠如するグルコシルトランスフェラーゼを表す。従って、これらのグルコシルトランスフェラーゼ酵素のそれぞれは、後にグルカン結合ドメインが続く触媒ドメインを有する。これらの酵素の触媒ドメイン配列のおおよその位置は、以下の通りである : 7527 ( 配列番号 1 の残基 54 ~ 957 )、2678 ( 配列番号 2 の残基 55 ~ 960 )、6855 ( 配列番号 3 の残基 55 ~ 960 )、2919 ( 配列番号 4 の残基 55 ~ 960 )、2765 ( 配列番号 5 の残基 55 ~ 960 )。GTF2678、6855、2919 および 2765 の触媒ドメインのアミノ酸配列は、GTF7527 の触媒ドメイン配列 ( すなわち、配列番号 1 のアミノ酸 54 ~ 957 ) とのそれぞれ約 94.9 %、99.0 %、95.5 % および 96.4 % の同一性を有する。これらの特別のグルコシルトランスフェラーゼ酵素は、100 % の - 1, 3 結合および少なくとも 400 の DPw を有するポリ - 1, 3 - グルカンを生成できる ( データ示さず、米国特許出願公開第 62/180,779 号明細書の表 4 を参照 )。従って、特定の実施形態におけるグルコシルトランスフェラーゼ触媒ドメイン配列は、GTF2678、6855、2919、もしくは 2765 の触媒ドメインのアミノ酸配列と 100 % 同一である、または少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、98.5 %、99 %、もしくは 99.5 % 同一であり得る。いくつかの別の実施形態においては、グルコシルトランスフェラーゼ触媒ドメイン配列は、配列番号 1 の残基 54 ~ 957、配列番号 2 の残基 55 ~ 960、配列番号 3 の残基 55 ~ 960、配列番号 4 の残基 55 ~ 960 または配列番号 5 の残基 55 ~ 960 を含んでいない。

30

40

【 0127】

本明細書のグルコシルトランスフェラーゼ酵素は、例えば配列番号 1 のアミノ酸 54 ~ 957 位 ( または配列番号 2 の 55 ~ 960 位、配列番号 3 の 55 ~ 960 位、配列番号 4 の 55 ~ 960 位もしくは配列番号 5 の 55 ~ 960 位 ) と少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を含む配列等の触媒ドメイン配列だけを有する必要があると考えられている

50

が、グルコシルトランスフェラーゼ酵素は、より大きなアミノ酸配列内に含めることができる。例えば、触媒ドメインはそのC末端でグルカン結合ドメインに連結できる、および/またはそのN末端で可変ドメインおよび/またはシグナルペプチドに連結できる。

#### 【0128】

本明細書のグルコシルトランスフェラーゼ酵素の触媒ドメインは、グリコシドヒドロラーゼファミリー70 (GH70) の下に分類されるグルコシルトランスフェラーゼの触媒ドメインによって示されるような活性を有することができる。そのようなGH70グルコシルトランスフェラーゼは、例えば、CAZy (炭水化物 - 活性酵素) データベース (Cantarel et al., Nucleic Acids Res. 37: D233 - 238, 2009) に見つけることができる。

10

#### 【0129】

グルコシルトランスフェラーゼ酵素のさらにまた別の例は、本明細書に開示した、およびN末端および/またはC末端上の1~300 (または、その間の任意の整数 [例えば、10、15、20、25、30、35、40、45もしくは50]) 個の残基を含むいずれかであってよい。そのような追加の残基は、それにグルコシルトランスフェラーゼ酵素が由来する対応する野生型配列由来であってよい、または例えば、(N末端もしくはC末端のいずれかでの) エピトープタグもしくは(N末端での) 異種シグナルペプチドなどの異種配列であってよい。

#### 【0130】

本明細書のグルコシルトランスフェラーゼ酵素には、通常N末端シグナルペプチドが欠如する。本明細書のグルコシルトランスフェラーゼ酵素を生成するための発現系は、所望であれば、細胞外分泌を指示するN末端シグナルペプチドをコードする配列をさらに含む、酵素コーディングポリヌクレオチドを使用することができる。そのような実施形態におけるシグナルペプチドは、分泌工程中に酵素から切断される。シグナルペプチドは、グルコシルトランスフェラーゼに対して天然および異種のいずれであってもよい。本明細書において有用なシグナルペプチドの例は、細菌種 (例えば、B. サブチリス (subtilis) 等のバチルス (Bacillus) 種) または真菌種由来のシグナルペプチドである。細菌シグナルペプチドの例は、apreシグナルペプチド、例えば、バチルス属 (Bacillus) (例えば、バチルス・ズブチルス (B. subtilis)、Vogt et al., Protein Expr. Purif. 55: 40 - 52を参照 (この文献は参照により本明細書に組み込まれる)) 由来のものである。

20

30

#### 【0131】

本明細書のグルコシルトランスフェラーゼ酵素は、例えば細菌もしくは真菌等の任意の微生物起源由来であってよい。細菌グルコシルトランスフェラーゼ酵素の例は、ストレプトコッカス (Streptococcus) 種、ロイコノストック (Leuconostoc) 種もしくはラクトバチルス (Lactobacillus) 種に由来する酵素である。ストレプトコッカス (Streptococcus) 種の例としては、S. サリバリウス (salivarius)、S. ソブリナス (sobrinus)、S. デンチロウセッティ (dentirosetti)、S. ダウネイ (downei)、S. ミュータンス (mutans)、S. オラリス (oralis)、S. ガロリティクス (gallolyticus) およびS. サンギニス (sanguinis) が挙げられる。ロイコノストック (Leuconostoc) 種の例としてはL. メセンテロイデス (mesenteroides)、L. アメリピオスム (amelibiosum)、L. アルゲンチナム (argentinum)、L. カルノスム (carnosum)、L. シトレウム (citreum)、L. クレモリス (cremoris)、L. デキストラニカム (dextranicum) およびL. フルクトサム (fructosum) が挙げられる。ラクトバチルス (Lactobacillus) 種の例としては、L. アシドフィルス (acidophilus)、L. デルブリュキイ (delbrueckii)、L. ヘルベチクス (helveticus)、L. サリバリウス (salivarius)、L. カゼイ (casei)、L. クルバツス (curvatus)、L. プランタルム (

40

50

*plantarum*)、*L. sakei* (*sakei*)、*L. brevis* (*brevi*)、*L. buchneri* (*buchneri*)、*L. fermentum* (*fermentum*) および *L. reuteri* (*reuteri*) が挙げられる。

#### 【0132】

本明細書のグルコシルトランスフェラーゼ酵素は、当技術分野で既知の任意の手段により生成できる。例えば、グルコシルトランスフェラーゼ酵素は、微生物異種発現系等の異種発現系内で組換え技術により生成できる。異種発現系の例としては、細菌（例えば、*E. coli* (*coli*)）、例えば TOP10 もしくは MG1655；バチルス (*Bacillus*) 種）および真核生物（例えば、酵母、例えば *Pichia* (*pichia*) 種およびサッカロミセス (*Saccharomyces*) 種）の発現系が挙げられる。

10

#### 【0133】

特定の実施形態においては、異種遺伝子発現系は、タンパク質分泌のために設計される遺伝子発現系であってよい。グルコシルトランスフェラーゼ酵素は、通常、そのような実施形態においてシグナルペプチド（シグナル配列）を含む。シグナルペプチドは、天然シグナルペプチドまたは異種シグナルペプチドのいずれであってよい。いくつかの実施形態におけるグルコシルトランスフェラーゼ酵素は、自然には発生しない；例えば、本明細書の酵素は（それから本明細書のグルコシルトランスフェラーゼ酵素が由来している可能性が高い）微生物から自然に分泌される（すなわち、成熟形）酵素であるとは考えられない。

#### 【0134】

本明細書に記載したグルコシルトランスフェラーゼ酵素は、任意の精製状態（例えば、純粋または非純粋）で使用できる。例えば、グルコシルトランスフェラーゼ酵素は、その使用前に精製および／または単離してよい。非純粋であるグルコシルトランスフェラーゼ酵素の例としては、細胞溶解液の形態にあるグルコシルトランスフェラーゼ酵素が挙げられる。細胞溶解液または抽出物は、酵素を異種発現させるために使用される細菌（例えば、*E. coli* (*coli*)) から調製してよい。例えば、細菌は、フレンチプレッシャーセルを使用して破碎してよい。また別の実施形態では、細菌をホモジナイザー（例えば、APV、Rannie、Gaulin）を用いてホモジナイズすることができる。グルコシルトランスフェラーゼ酵素は、通常、これらのタイプの調製物に可溶性である。本明細書の細菌性の細胞溶解液、抽出物もしくはホモジネートは、分岐の - グルカンを生産するための反応溶液中で、例えば、約 0.15 ~ 0.3 (v/v) % で使用できる。

20

30

#### 【0135】

本明細書のグルコシルトランスフェラーゼ酵素の活性は、当技術分野で既知の任意の方法で求めることができる。例えば、グルコシルトランスフェラーゼ酵素活性は、スクロース（約 50 g/L）、デキストラン T10（約 1 mg/mL）およびリン酸カリウムバッファ（pH 6.5、50 mM）を含有する反応系中で、還元糖（フルクトースおよびグルコース）の生成を測定することによって求めることができるが、このとき溶液を 22 ~ 25 °C で 24 ~ 30 時間保持する。還元糖は、1 N の NaOH および 0.1 % の塩化トリフェニルメチルトリウムを含有する混合物に 0.01 mL の反応溶液を加え、次に 5 分間にわたって OD<sub>480 nm</sub> での吸光度の増加を監視することによって測定することができる。

#### 【0136】

本明細書のグルコシルトランスフェラーゼ反応の温度は、所望ならば制御できる。特定の実施形態においては、反応温度は、約 5 °C ~ 約 50 °C であってよい。特定の他の実施形態における温度は、約 20 °C ~ 約 40 °C、または約 20 °C ~ 約 30 °C（例えば、約 22 ~ 25 °C）であってよい。

40

#### 【0137】

本明細書の反応溶液中のスクロースの初期濃度は、例えば、約 20 g/L ~ 約 400 g/L であってよい。或いは、スクロースの初期濃度は、約 75 g/L ~ 約 175 g/L または約 50 g/L ~ 約 150 g/L であってよい。或いは、スクロースの初期濃度は、約 40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150 もしくは 160 g/L（または 40 ~ 160 g/L の間の任意の整数）であってよい。

50

スクロースの初期濃度」は、反応成分（例えば、少なくとも、水、スクロース、デキストラン、グルコシルトランスフェラーゼ酵素）の全部が加えられた直後のグルコシルトランスフェラーゼ反応におけるスクロース濃度を意味する。

【0138】

本明細書のグルコシルトランスフェラーゼ反応に使用されたスクロースは、高度に純粋（99.5%）またはいずれかの他の純度もしくはグレードであってよい。例えば、スクロースは、少なくとも99.0%の純度を有する可能性がある、または試薬グレードのスクロースであってよい。また別の例として、精製が不完全なスクロースを使用することができる。本明細書の精製が不完全なスクロースは、精白糖まで加工されていないスクロースを意味する。従って、精製が不完全なスクロースは、完全に未精製であってよい、または部分精製されていてよい。未精製スクロースの例は、「粗スクロース」（「粗糖」）およびそれらの溶液である。部分精製スクロースの例は、1回、2回、3回またはそれ以上の結晶化工程を受けていない。本明細書の不完全精製スクロースのICUMSA（International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis（国際砂糖分析法統一委員会））値は、例えば、150より大きい可能性がある。本明細書のスクロースは、サトウキビ、テンサイ、カッサバ澱粉、サトウモロコシ、またはトウモロコシ等の任意の再生可能な糖源の由来であってよい。本明細書において有用なスクロースの好適な形態は、例えば、結晶形態または非結晶形態（例えば、シロップ、サトウキビの搾汁、ビートの搾汁）である。

【0139】

スクロースのICUMSA値を求める方法は、当技術分野で既知であり、例えば、参照により本明細書に組み込まれる、ICUMSA Methods of Sugar Analysis: Official and Tentative Methods Recommended by the International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis (ICUMSA) (Ed. H. C. S. de Whalley, Elsevier Pub. Co., 1964) において国際砂糖分析法統一委員会によって開示されている。ICUMSAは、例えば、参照により本明細書に組み込まれる、R. J. McCowage, R. M. Urquhart and M. L. Burge (Determination of the Solution Colour of Raw Sugars, Brown Sugars and Coloured Syrups at pH 7.0 - Official, Verlag Dr. Albert Bartens, 2011 revision) によって記載されるように、ICUMSA Method GS1/3-7によって測定できる。

【0140】

特定の実施形態における酵素反応のpHは、約4.0～約8.0、または約5.0～約6.0であってよい。或いは、そのpHは、例えば約4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5もしくは8.0であってよい。pHは、好適なバッファ、例えば限定はされないが、ホスフェート、トリス、シトレート、またはそれらの組み合わせを添加または混入することによって調節または制御できる。グルカン合成反応中のバッファ濃度は、例えば、0 mM～約100 mMまたは約10、20もしくは50 mMであってよい。

【0141】

特定の態様においては、1種または複数の異なるグルコシルトランスフェラーゼ酵素を使用してもよい。本明細書の酵素反応は、例えば、1種、2種またはそれ以上のグルコシルトランスフェラーゼ酵素を含有してもよい。

【0142】

本開示はまた、デキストラン-ポリ-1,3-グルカングラフトコポリマーを調製する方法に関し、その方法は、以下の(a)および(b)を備える：

(a) 少なくとも(i) 水、(ii) スクロース、(iii) 少なくとも約100000

10

20

30

40

50

ダルトンの重量平均分子量 (Mw) を有するデキストラン、および (i v) 少なくとも約 95% の - 1, 3 - グリコシド結合を含むポリ - 1, 3 - グルカンを含むグルコシルトランスフェラーゼ酵素を接触させて、それにより、デキストラン - ポリ - 1, 3 - グルカングラフトコポリマーを生成するステップ；

(b) 場合により、ステップ (a) において生成したデキストラン - ポリ - 1, 3 - グルカングラフトコポリマーを単離するステップ。そのような方法におけるステップ (a) は、通常、成分 (i) ~ (i v) のそれぞれを含む酵素反応の調製を伴う。上述の酵素反応条件および / または以下の実施例に開示する酵素反応条件のいずれも、ステップ (a) を特徴づけることができる。同様に、この方法の以下の条件のいずれも、場合により、本明細書の酵素反応を特徴づけることができる。

10

#### 【0143】

本開示のグラフトコポリマーの合成法は、少なくとも水、スクロース、および特定のデキストランと、グルコシルトランスフェラーゼ酵素成分とを互いに接触させることを備える。これらの試薬と場合により他の試薬を全て一緒に加えても、または下記で考察するように任意の順序で加えてもよい。ステップ (a) は、通常反応溶液の形成と共に始まるが、不溶性のグラフトコポリマー生成物の合成後に、この溶液が混合物となることを理解することとなる。本明細書の接触ステップは、多くの方法において実施できる。例えば、所望の量のスクロースおよび / またはデキストランを最初に水に溶解させ (場合により、他の成分、例えばバッファ成分もまたこの調製段階で加えることもできる)、その後グルコシルトランスフェラーゼ酵素を添加することができる。このように調製した反応は、例えば、静置してもよく、攪拌器またはオービタルシェーカーによって攪拌してもよい。通常、本明細書の酵素反応は、無細胞である。

20

#### 【0144】

特定の実施形態における反応の完了は、例えば、視覚的に (例えば、不溶性生成物の蓄積がもはや存在しない)、および / または溶液中に残されたスクロース (残留スクロース) の量を測定することによって決定できるが、このとき約 90% を超えるスクロース消費率は反応完了を指示する可能性がある。通常、開示した方法の反応は、完了するのに約 12、24、36、48、60、72、84 もしくは 96 時間かかることがあり、その時間は、反応に使用されたスクロースおよび / またはグルコシルトランスフェラーゼ酵素の量等の特定のパラメーターに応じて変わる。いくつかの実施形態においては、反応時間は、1、2、3、4、または 5 時間であり得る。

30

#### 【0145】

グラフトコポリマー合成法の特特定の実施形態においては、接触ステップ (a) において、約 60000 ダルトン未満の重量平均分子量を有するデキストランがさらに存在し、少なくとも約 100000 ダルトンの重量平均分子量 (例えば、既に開示した任意の高い Mw) を有するデキストランが、グルコシルトランスフェラーゼ酵素による側鎖合成のための基質として優先的に使用される。従って、様々なデキストラン種が存在し、かつそれらの種の Mw 範囲が、60000 ダルトン未満 (または例えば 90000 ダルトン未満、80000 ダルトン未満、70000 ダルトン未満、50000 ダルトン未満、もしくは 40000 ダルトン未満) から 100000 ダルトンを超えるまでに及ぶ、不均質のデキストラン基質 (例えば、4 を超える PDI、または 4 ~ 15 の PDI) が使用される特定の場合においては、グラフトコポリマー生成物の分布が、100000 ダルトン以上のデキストラン成分を有するグラフトコポリマー生成物に対してより高い歪度を有することとなる。例えば、少なくとも約 75 重量%、76 重量%、77 重量%、78 重量%、79 重量%、80 重量%、81 重量%、82 重量%、83 重量%、84 重量%、85 重量%、86 重量%、87 重量%、88 重量%、89 重量%、90 重量%、91 重量%、92 重量%、93 重量%、94 重量%、もしくは 95 重量% のグラフトコポリマー生成物が、少なくとも 100000 ダルトンの Mw を有するデキストラン成分を含むと考えられる。

40

#### 【0146】

そのような方法の実施形態は、場合により、Mw が低いデキストランから Mw が高いデキ

50

ストランを区分する (partitioning) 方法、分画する (fractionating) 方法、または分離する方法として、特徴付けることができる。Mwが高いデキストランは、不溶性グラフトコポリマーに区分される一方、Mwが低いデキストランは、本明細書のグルコシルトランスフェラーゼ反応の溶液相に残存する。いくつかの実施形態においては、この分画効果が現れる反応時間は、少なくとも約12、15、18、21、または24時間である。不溶性グラフトコポリマー生成物に区分するデキストランのMwは、いくつかの例において、約100000もしくは150000ダルトンから約200000、250000、500000、750000、もしくは1000000ダルトンまでである。

#### 【0147】

特定の実施形態においては、デキストラン - ポリ - 1, 3 - グルカングラフトコポリマーのPDIは、酵素反応に携わるデキストラン基質の量を調節することにより、グラフトコポリマー合成法において制御できる (例えば、表7を参照)。一般的に、本明細書の酵素反応において、出発デキストランの濃度を増大することにより、PDIが低いグラフトコポリマーが生成されることとなり、その濃度を低減させるとPDIが高いグラフトコポリマーが生成されることとなる。例えば、酵素反応におけるデキストランの初期濃度を約もしくは少なくとも約、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、250%、500%、750%、または1000%まで増大させるならば、生成物PDIの減少が、約もしくは少なくとも約5%、10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、または65%まで達成できる。

#### 【0148】

特定の実施形態においては、デキストラン - ポリ - 1, 3 - グルカングラフトコポリマーのMwは、酵素反応に携わるデキストラン基質の量を調節することにより、グラフトコポリマー合成法において制御できる (例えば、表7および図3を参照)。一般的に、本明細書の酵素反応において、出発デキストランの濃度を増大することにより、Mwが低いグラフトコポリマーが生成されることとなり、その濃度を低減させるとMwが高いグラフトコポリマーが生成されることとなる。例えば、酵素反応におけるデキストランの初期濃度を約もしくは少なくとも約、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、250%、500%、750%、または1000%まで増大させるならば、生成物Mwの減少が、約もしくは少なくとも約5%、10%、20%、25%、30%、40%、または50%まで達成できる。

#### 【0149】

開示した合成法において生成したデキストラン - ポリ - 1, 3 - グルカングラフトコポリマーは、場合により単離できる。例えば、不溶性グラフトコポリマーは、濾過または遠心分離により、分離できる。そのようにする際に、グラフトコポリマーは、水、フルクトースおよび特定の副生成物 (例えば、ロイクロース、可溶性オリゴ糖DP2~DP7) を含んでいる可能性がある反応溶液の大部分から分離される。この溶液はまた、残留スクロース (すなわち、未反応のスクロース) も含む。単離は、場合により、グラフトコポリマー生成物を1回、2回、またはそれ以上、水または他の水性液体で洗浄すること、および/または生成物を乾燥することをさらに備えることができる。そのような洗浄は、元来の反応試料または生成試料の体積の約もしくは少なくとも約、0.5倍、1倍、1.5倍、または2倍の洗浄体積を用いることができ、および/または濾過および/または遠心分離を伴う。いくつかの態様における濾過等の洗浄は、置換洗浄を利用でき、その場合、洗浄は、攪拌することなくおよび/またはいかなる力が印加されることもなく、生成物を貫通する。

#### 【0150】

いくつかの実施形態 (「向上した濾過法」) においては、グラフトコポリマー合成法のステップ(a)に携わるデキストランは、少なくとも約50ミリオンダルトンの重量平均分子量と、少なくとも約2g/Lの初期濃度とを有する。そのような実施形態においてステップ(a)で生成したデキストラン - ポリ - 1, 3 - グルカングラフトコポリマーは、



濾過ステップを用いて単離される。これらの実施形態におけるグラフトコポリマー生成物は、ポリ - 1, 3 - グルカンホモポリマーまたは他の対照材料の濾過率と比べてそれらよりも高い濾過率を有する。この向上した濾過法のデキストランの Mw は、約 50 ミリオンダルトン（もしくは本明細書に開示した任意のより大きな Mw）であり得る、および / または酵素反応におけるデキストランの初期濃度は、約 2 g / L（もしくは本明細書に開示した任意のより大きい濃度）であり得る。本明細書の向上した濾過性は、水および / または水溶液（例えば、ステップ [ a ] からの液体部）を不溶性のグラフトコポリマー生成物の層（例えば、ウェットケーキ）を介して濾過（例えば、重力のみ、置換洗浄、印加力）できることにより、場合により容易性を指すことがある。

#### 【 0 1 5 1 】

本明細書における向上した濾過法におけるグラフトコポリマー生成物は、ポリ - 1, 3 - グルカンホモポリマーまたは他の対照材料の濾過率と比べてそれらよりも高い濾過率を有する。例えば、本明細書のグラフトコポリマーは、その他は同じまたは同様な濾過条件（例えば、ウェットケーキ厚、濾過装置）下で、ポリ - 1, 3 - グルカンホモポリマーまたは他の対照材料の濾過性よりも少なくとも約 10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、100 %、150 %、200 %、500 %、1000 %、10000 %、または 100000 % 速い濾過性を呈することが可能である。そのような比較をするための濾過性測定は、ケーキ比抵抗の単位または任意の他の濾過性測定の単位においてであってよい。ケーキ比抵抗（濾過ケーキ比抵抗）は、例えば、Earle, RL (Unit Operations in Food Processing [Chapter 10: Mechanical Separations], Web Edition, 2004, Pergamon Commonwealth and International Library) または Teoh et al. Chem. Eng. Sci. Rev. 61: 4957 - 4965) に従って測定でき、これらの文献は両方とも参照により本明細書に組み込まれる。これらの実施形態におけるポリ - 1, 3 - グルカンホモポリマーは、約 500、600、700、800、900、または 1000 DPw であり得、例えば、少なくとも 95 %、96 %、97 %、98 %、99 % または 100 % の - 1, 3 - 結合を有することができる。他の対照材料は、向上した濾過法で 사용되는のと同じタイプのデキストランを有する本明細書のグラフトコポリマーであってよいが、約 1.6 重量%未満、1.5 重量%未満、1.4 重量%未満、1.3 重量%未満、1.2 重量%未満、1.1 重量%未満、1.0 重量%未満、0.9 重量%未満、または 0.8 重量%未満のグラフトコポリマーの含有量で使用する。

#### 【 0 1 5 2 】

いくつかの実施形態において、本明細書の向上した濾過法でのグラフトコポリマー生成物は、約もしくは少なくとも約 2 wt % のデキストランを含むことができる。例えば、そのようなグラフトコポリマーは、コポリマーの重量の 2 % ~ 50 %、2 % ~ 11 %、または 2.5 % ~ 10.5 % のデキストランを含んでよい。いくつかの例において、グラフトコポリマー生成物は、例えば約 3.5、3.75、4.0、4.25、4.5、4.75、5.0、5.25、もしくは 5.5 mm の平均直径を有する粒子として現れることがある。特定の態様におけるグラフトコポリマーの向上した濾過性は、通常濾過するのが困難であるポリ - 1, 3 - グルカンホモポリマーに対して利点を示す。

#### 【 0 1 5 3 】

本明細書に開示した組成物および方法の非限定的例としては、以下が挙げられる：

1. 以下の ( i ) および ( i i ) を含むグラフトコポリマーを含む組成物：

( i ) 少なくとも約 100000 ダルトンの重量平均分子量 ( Mw ) を有するデキストランを含む主鎖、

( i i ) 少なくとも約 95 % の - 1, 3 - グリコシド結合を含むポリ - 1, 3 - グルカン側鎖。

2. ポリ - 1, 3 - グルカン側鎖が少なくとも約 99 % の - 1, 3 - グリコシド結合を含む実施形態 1 に記載の組成物。

3. 1種もしくは複数種のポリ - 1, 3 - グルカン側鎖の個々の Mw が、少なくとも約 100000 ダルトンである実施形態 1 または 2 に記載の組成物。

4. グラフトコポリマーが、水性条件下で不溶性である実施形態 1 ~ 3 のいずれか 1 つに記載の組成物。

5. デキストランが以下の (i) ~ (v) を含み、

(i) 1 位および 6 位で連結したグルコース、約 87 ~ 93 wt % ;

(ii) 1 位および 3 位で連結したグルコース、約 0.1 ~ 1.2 wt % ;

(iii) 1 位および 4 位で連結したグルコース、約 0.1 ~ 0.7 wt % ;

(iv) 1 位、3 位および 6 位で連結したグルコース、約 7.7 ~ 8.6 wt % ; 並びに

(v) (a) または (a) で連結したグルコース、約 0.4 ~ 1.7 wt %

(a) 1 位、2 位および 6 位、または (b) 1 位、4 位および 6 位 ;

デキストランの Mw が、約 50 ~ 200 ミリオンダルトンである実施形態 1 ~ 4 のいずれか 1 つに記載の組成物。

6. デキストランの Mw が、少なくとも約 100 ミリオンダルトンである実施形態 5 に記載の組成物。

7. デキストランが、配列番号 6 または配列番号 7 と少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を含むグルコシルトランスフェラーゼ酵素の生成物である実施形態 5 または 6 に記載の組成物。

8. グラフトコポリマーが、少なくとも約 2.0 wt % のデキストランを含む実施形態 5 ~ 7 のいずれかに 1 つに記載の組成物。

9. グラフトポリマーが、少なくとも約 100 の保水度 (WRV) を有する実施形態 1 ~ 8 のいずれか 1 つに記載の組成物。

10. 組成物が、パーソナルケア製品、家庭用製品、医薬製品、または工業製品である実施形態 1 ~ 9 のいずれか 1 つに記載の組成物。

11. 酵素反応であって、(i) 水、(ii) スクロース、(iii) 少なくとも約 100000 ダルトンの重量平均分子量 (Mw) を有するデキストラン、および (iv) 少なくとも約 95 % の - 1, 3 - グリコシド結合を含むポリ - 1, 3 - グルカンを含むグルコシルトランスフェラーゼ酵素を含み、

酵素反応が、実施形態 1、2、3、4、5、6、7、8、または 9 の組成物によるグラフトコポリマーを生成する酵素反応。

12. 反応におけるデキストランの初期濃度が、少なくとも約 2 g / L であり、デキストランの Mw が、少なくとも約 50 ミリオンダルトンである実施形態 11 に記載の酵素反応。

13. グラフトコポリマーを調製する方法であって、その方法が以下の (a) および (b) を含む方法 :

(a) 少なくとも (i) 水、(ii) スクロース、(iii) 少なくとも約 100000 ダルトンの重量平均分子量 (Mw) を有するデキストラン、および (iv) 少なくとも約 95 % の - 1, 3 - グリコシド結合を含むポリ - 1, 3 - グルカンを含むグルコシルトランスフェラーゼ酵素を接触させて、それにより、実施形態 1、2、3、4、5、6、7、8、または 9 の組成物によるグラフトコポリマーが生成されるステップ b) 場合により、ステップ (a) で生成したグラフトコポリマーを単離するステップ。

14. 接触ステップ (a) において、約 60000 ダルトン未満の Mw を有するデキストランがさらに存在し、少なくとも約 100000 ダルトンの Mw を有するデキストランが、グルコシルトランスフェラーゼ酵素による側鎖合成のための基質として優先的に使用される実施形態 13 に記載の方法。

15. ステップ (a) に携わるデキストランが、少なくとも約 50 ミリオンダルトンの Mw および少なくとも約 2 g / L の初期濃度を有し、ステップ (a) で生成したグラフトコポリマーを単離する方法であり、単離ステップが、濾過ステップを含み、グラフトコポリマーが、ポリ - 1, 3 - グルカンホモポリマーの濾過率と比較してそれよりも高い濾過率を有する実施形態 13 または 14 に記載の方法。

【実施例】

10

20

30

40

50

## 【 0 1 5 4 】

本開示を実施例 1 ~ 3 および 5 ~ 8 でさらに例示する。これらの実施例は、本明細書の特定の好ましい態様を示しているが、単に説明の目的でのみ記されていると理解すべきである。上述の考察およびこれらの実施例から、当業者であれば、本明細書に開示した実施形態の本質的な特徴を確認することができ、本発明の趣旨および範囲を逸脱しない範囲で、本明細書に開示した実施形態を様々な使用および条件に適合させるために様々な変更および修飾を加えることができる。

## 【 0 1 5 5 】

## 実施例 1

高分子量のデキストランプライマーからポリ - 1 , 3 - グルカンの合成

10

本実施例は、重量平均分子量が高い（平均 1 5 0 k D a ）市販のデキストランをプライマーとして用いる、グルコシルトランスフェラーゼ酵素でのポリ - 1 , 3 - グルカンの合成を記載する。デキストラン主鎖とポリ - 1 , 3 - グルカン側鎖とを含むグラフトコポリマーを生成した。

## 【 0 1 5 6 】

水、スクロース（約 1 0 0 g / L ）、デキストラン、および全てまたはほぼ全て - 1 , 3 - グリコシド結合を有するポリ - 1 , 3 - グルカンを合成するストレプトコッカス・サリバリウス（*Streptococcus salivarius*）系のグルコシルトランスフェラーゼ酵素を含む反応（A および B ）で、2 つの別々のポリ - 1 , 3 - グルカンの重合を実施した。そのような反応に使用されるグルコシルトランスフェラーゼの例としては、米国特許出願公開第 2 0 1 4 / 0 0 8 7 4 3 1 号明細書に開示されるグルコシルトランスフェラーゼが挙げられ、それらは、参照により本明細書に組み込まれる。

20

## 【 0 1 5 7 】

9 4 0 g の D I （脱イオン）水、1 0 0 g のスクロース（*Omni Pur Calbiochem 8550* ; *Lot VF20C* ; *FW 342.30* ）、および 1 . 3 6 g のリン酸カリウム（*MW 136.09* ; *Sigma P5379* ）を混合して、反応系 A と B のそれぞれを調製した。導電率計を用いて、p H を 5 . 6 であると測定し、2、3 滴の 1 N の  $H_2SO_4$  を用いて、5 . 5 4 まで下げるように調節した。H P L C の時間ゼロ（予備添加のデキストラン）のために、1 m L の試料を採取した。その後、5 g および 1 0 g の 1 5 0 k D a （平均）デキストラン（*Sigma D4876* ）を反応系 A と反応系 B にそれぞれ加えた。5 0 0 m L の各反応系を個々のフラスコに装入した。

30

## 【 0 1 5 8 】

各反応系を約 1 9 0 R P M で混合して、添加したデキストランを溶解した後に、時間ゼロ（後に添加するデキストラン）解析のために、1 m L の H P L C 試料を各反応系から採取した。2 5 に設定した循環加熱器 / 冷却器に各反応系を置き、1 5 0 r p m で攪拌を開始した。反応を温度（約 2 4 . 4 ）まで達しさせて、酵素を加える前に、約 4 5 分間攪拌した。次に、5 0 U のグルコシルトランスフェラーゼ酵素をそれぞれの反応系に加えた。

## 【 0 1 5 9 】

2 時間およびそれぞれの反応の終わり（2 4 時間）に、反応系 A および B のそれぞれからの濾液試料（すなわち、不溶性生成物から分離した液体）（1 m L ）を H P L C のために採取した。試料を 9 0 で 1 0 分間の加熱急冷をすることにより、H P L C のために不活性化した。試料を 0 . 4 5  $\mu$  m の P T F E フィルターを通して濾過し、H P L C 分析のために希釈した。

40

## 【 0 1 6 0 】

反応系 B の 2 時間および 2 4 時間の試料を除いて、全ての時点の濾液試料に対して、2 つ全く同一の希釈を行った。2 時間の試料 A、2 時間の試料 B、および 2 4 時間の B は全て 0 . 4 5  $\mu$  m の P T F E フィルターを通して濾過するのが非常に困難であった。様々な H P L C カラムで全ての試料を重複して行った。

## 【 0 1 6 1 】

全反応の試料（5 0 m l ）を反応系 A と反応系 B のそれぞれから 2 時間で採取し、使い捨

50

でのプラスチック製フィルターを介してできるだけ乾燥状態に吸引濾過した。不溶性生成物を 50 mL の熱水で 2 回の洗浄をする前に、濾液を取り出し、別々に保存した。不溶性ポリマーの試料をガラス瓶に保存し、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) による解析で見かけの DP (重合度)、真の DP、見かけの IV (インヘレント粘度)、および真の IV を求める前に、10 で保管した。それぞれ 2 時間の試料からの過剰の不溶性ポリマーを 60 の真空オープン内で、窒素下で 3 日間乾燥させ、秤量して固形分パーセントを求めた。

#### 【0162】

合成したポリマーから吸引で濾液を引くことは、予期したよりも時間がかかり、濾液中に不溶性ポリマーが連続して生成することに関連していると思われ、濾液は、スクロースおよびグルコシルトランスフェラーゼ酵素を依然として含有した。一旦、濾液を全て収集すると、次に 1 mL の試料を採取し、HPLC のために不活性化し (上述を参照のこと)、その間に 70 ~ 80 の水浴内で 15 分間、残留物を不活性化し、冷却させた後、濾過して不溶性ポリマー生成物を除去した。

#### 【0163】

次に、透析チューブ (14 kDa の分画分子量 [MWCO]) に濾液を入れて、流水中で 2 日間透析して、単糖 (フルクトース、グルコース) およびオリゴマー (DP 2 ~ 7) を除去した。透析中に多少の小さな固形物を形成するので、含有物を最初に濾過した後、液状濃縮物になるまでロータリーエバポレーターにかけて (留去) して、その濃縮物を液体窒素中で凍結させた。次に、凍結した濃縮物を 2 日 ~ 3 日凍結乾燥した後、乾燥固形物を秤量して、SEC で解析した。

#### 【0164】

24 時間後、反応系 A および B のそれぞれから生じるポリマー生成物スラリーを吸引濾過した。それぞれの濾液を別々に保存し、HPLC 試料を採取した。ポリマーを 500 mL の蒸留水 (室温) で 2 回洗浄した後、ウェットケーキを残して、全ての水を吸引除去した。ウェットケーキを秤量し、それらの試料を SEC 解析のために採取した。ウェットケーキ試料 (約 5 ~ 6 g) をオープンで乾燥 (60 で 3 日間) して、初期のウェットケーキの重量を基準として、不溶性ポリマー生成物の総収量を算出した。残留するポリマーウェットケーキを後の解析のために凍結した。残留濾液を 90 の水浴内で 15 分間、活性化して、上述のように流水で 2 日間透析した。透析物を濾過し、約 80 mL まで留去し、凍結乾燥し、秤量して、SEC を施した。HPLC 分析ごとに、単糖およびオリゴマー (DP 2 ~ 7) 形成は、正常であり、重合 A と B で類似していた。室温で 10 分間、DMSO / 2% の LiCl 中で振盪することにより、SEC 解析のために、ウェットケーキ試料を溶解した。

#### 【0165】

反応系 A と反応系 B の濾液および不溶性生成物の様々な態様を以下の表 1 ~ 4 に提供する。

#### 【0166】

#### 【表 2】

表 1

#### 濾液中に存在する全固形分

凍結乾燥した濾液中の固形分*		
反応系	2 時間	24 時間
A	0.27 g	3.13 g
B	0.37 g	4.75 g
*オリゴマーを含む		

#### 【0167】

【表 3】

表 2

## スクロースおよびデキストラン変換

反応系	スクロース 変換	デキストラン 変換
A	99.3%	73%
B	99.3%	64%

10

【0168】

【表 4】

表 3

## 濾液中で回収したデキストラン

回収したデキストラン					
反応系/時間	Mn	Mw	DPw	Mz	Mw/Mn
A/2 時間	15196	212556	1312	2644592	13.99
A/24 時間	10195	30003	185	72429	2.94
B/2 時間	15541	190473	1176	1921736	12.26
B/24 時間	11340	45326	280	137362	4.00
出発デキストラン	20120	244127	1507	1260514	12.13

20

【0169】

【表 5】

表 4

デキストラン-ポリ  $\alpha$ -1,3-グルカンコポリマー生成物の分子量プロファイル

デキストラン-ポリ $\alpha$ -1,3-グルカンコポリマー					
反応系/時間	Mn (kDa)	Mw (kDa)	DPw	Mz (kDa)	Mw/Mn
A/2 時間	525	1156	7137	1942	2.2
A/24 時間	322	1011	6244	2126	3.14
B/2 時間	465	1005	6202	1765	2.16
B/24 時間	285	802	4948	1764	2.81

30

【0170】

それぞれの反応で使用した出発デキストランの SEC 解析により、出発デキストランは分岐していたことがわかった。デキストランのモノマー単位ほぼ 20 毎に出発デキストランから分岐するペンダントグルコースが存在することを推測した。それぞれの重合反応（24 時間）から、DPw が高い水不溶性ポリマーを得た：反応系 A（10 g/L のデキストラン投入）では約 6000、反応系 B（20 g/L のデキストラン投入）では約 5000（表 4）。ポリ - 1, 3 - グルカン鎖は、デキストラン分岐点から伸長し、グラフトコポリマーを形成する（図 1 および 2 を参照のこと）。

40

【0171】

デキストラナーゼ劣化解析は、ポリ - 1, 3 - グルカン側鎖はそれぞれ、おおよそ 1000 の DPw を有したことを示した。簡潔に言えば、緩衝反応（pH 5.3 ~ 5.7、室

50

温、章動 ( n u t a t i o n ) ) において、デキストラナーゼとデキストラン - ポリ - 1 , 3 - グルカングラフトコポリマー生成物を約 4 日間、個々に反応させて、デキストラナーゼアッセイを行った。

#### 【 0 1 7 2 】

従って、出発デキストランが、約 1 5 0 0 の測定 D P w ( 表 3 ) を有し、各側鎖が、約 1 0 0 0 の D P w であり、各デキストランに平均約 4 ~ 5 つのポリ - 1 , 3 - グルカン鎖が存在した可能性があると考えられる。この観察に基づくと、デキストランのペンダントグルコース単位のほんの一部だけが、ポリ - 1 , 3 - グルカン側鎖の合成をプライムするのに助力したように見える ( すなわち、約 4 ~ 5 つの鎖だけが存在したようであるが、デキストランのモノマー単位 2 0 毎にペンダントグルコース基の存在をもたらす約 7 5 つ [ D P w 1 5 0 7 を 2 0 で割る ] の側鎖を有していた可能性があり得る ) 。

10

#### 【 0 1 7 3 】

2 4 時間の反応の濾液試料で回収したデキストランの分子量は、出発デキストランの分子量 ( 表 3 ) と比較すると、小さかった。反応においてグルコシルトランスフェラーゼ酵素によりデキストランが劣化した可能性があるとするのは仮説のひとつであるが、これは、そうではないと判明された ( 実施例 3 を参照のこと ) 。従って、ポリ - 1 , 3 - グルカン側鎖の合成をプライムするために、基質として優先的に使用される高分子量のデキストランで、反応中にデキストランを効果的に分画したと思われる。この仮定に従えば、不溶性グラフトコポリマーの合成をプライムするのに使用される大きいデキストラン分子を可溶性プールから除去し、反応濾液中に小さなデキストラン分子を残すこととなる。デキストランの分子量は、グルコシルトランスフェラーゼ酵素による 1 , 3 - グリコシド結合を含むグルカン合成をプライムするデキストランの役割を果たさないと提案する他の特許文献 ( 国際特許出願第 1 5 / 1 1 9 8 5 9 号パンフレット ) を考慮に入れると殊に、この観察は、興味をそそる。

20

#### 【 0 1 7 4 】

従って、デキストラン主鎖およびポリ - 1 , 3 - グルカン側鎖を含むグラフトコポリマーを生成した。比較的に少ない鎖 ( 4 ~ 5 つ ) が存在した、そのことを考慮すると、理論的には少なくとも 1 0 ~ 1 5 倍以上の合成された側鎖が存在した可能性があったことに、潜在的に関心がある。同様に、このグラフトコポリマーを調製する反応においては、高分子量のデキストランは、低分子量のデキストランとは対照的に、大部分 - 1 , 3 - グリコシド結合を含むグルカンを合成するグルコシルトランスフェラーゼによって、基質として優先的に使用されると思われる。

30

#### 【 0 1 7 5 】

##### 実施例 2

グルコシルトランスフェラーゼ酵素反応のデキストラン - ポリ - 1 , 3 - グルカングラフトコポリマー生成物の分子量および多分散性の制御

本実施例は、例えば、グルコシルトランスフェラーゼ酵素反応に携わるデキストランの濃度を修正して、デキストラン - ポリ - 1 , 3 - グルカングラフトコポリマー生成物の分子量および多分散性を制御できることを、実施例 1 に加えて共に例証する。

#### 【 0 1 7 6 】

40

一般的に、下記の場合を除いて、実施例 1 に記載の手順を適用して、デキストラン - ポリ - 1 , 3 - グルカンコポリマーを合成および解析した。

#### 【 0 1 7 7 】

簡潔に言えば、スクロース 1 0 0 g / L と、全てもしくはほぼ全て - 1 , 3 - グリコシド結合を有するポリ - 1 , 3 - グルカンを合成する S . サリバリウス ( S . s a l i v a r i u s ) 系のグルコシルトランスフェラーゼ酵素 1 0 0 U / L を 1 5 0 r p m で撹拌しながら、約 2 5 で、2 つの 5 0 0 m L のグルカン合成反応を行った。これらの反応をセットアップするために、1 0 0 g のスクロース ( O m n i P u r C a l b i o c h e m 8 5 5 0 ) と、1 . 3 6 g のリン酸カリウム ( S i g m a P 5 3 7 9 ) を 9 4 0 g の水道水に溶かし、N a O H で p H を 5 . 5 に調節した。1 m L の試料 ( t = 0 ) H P L C 分

50

析のために採取し、その後に溶液を 500 mL の 2 つの部分に分けた。反応系 A および B のフラスコそれぞれに、500 mL のスクロース溶液およびそれぞれ 1.25 g または 2.5 g の 150 - kDa (平均) デキストラン (Sigma D4876) を装入した。HPLC (t = 0) 試料を採取し、その後にグルコシルトランスフェラーゼ酵素を加えた。  
【0178】

酵素を添加して 2 時間後に、反応系 A および B のそれぞれから、50 mL の試料 (反応溶液および不溶性生成物) を採取し、吸引濾過した。濾液を保存した; HPLC (t = 2 時間) のために各濾液を 1 mL 取り出した。不溶性ポリマー生成物を 50 mL の熱水で 2 回洗浄し、SEC により解析した。80 の水浴内で 15 分間、濾液を不活性化し、再濾過し、18 日間、流水中で透析 (14 kDa の MWCO) して、単糖 (フルクトース、グルコース) およびオリゴマー (DP 2 ~ 7) を取り出した。

10

【0179】

酵素を添加して 24 時間後に、反応系 A および B それぞれで生じたポリマー生成物スラリーを循環浴内で 65 まで加熱し、1 時間攪拌して、酵素を不活性化した。次に、スラリーを吸引濾過した; 各濾液を保存し、1 mL の試料 (t = 24 時間) を HPLC 解析のために採取した。ポリマーを洗浄し、その後ウェットケーキを残して、全ての水を吸引除去した。ウェットケーキを秤量し、それらの試料を SEC 解析のために採取した。ウェットケーキ試料をオープンで乾燥 (60 で 3 日間) して、初期のウェットケーキの重量を基準として、不溶性ポリマー生成物の総収量を算出した。残留するポリマーウェットケーキを後の解析のために凍結した。上述のように、17 日間、濾液を流水中で透析した。透析物を濾過し、約 80 mL まで留去し、凍結乾燥し、秤量して、SEC を施した。HPLC 解析ごとに、単糖およびオリゴマー (DP 2 ~ 7) 形成は、正常であり、重合 A と B で類似していた。

20

【0180】

本実施例の反応系 A と反応系 B の濾液および不溶性生成物の様々な態様を以下の表 5 ~ 7 に提供する。

【0181】

【表 6】

表 5

濾液中に存在する全固形分

30

凍結乾燥した濾液中の固形分*		
反応系	2 時間	24 時間
A	0.057 g	0.086 g
B	0.099 g	0.322 g
*除去した単糖およびオリゴマー		

【0182】

【表 7】

40

表 6

スクロースおよびデキストラン変換

反応系	スクロース 変換	マス バランス	デキストラン 変換
A	99.3%	98.2%	92%
B	99.4%	99.0%	86%

【0183】

50

【表 8】

表 7

デキストラン-ポリ  $\alpha$ -1,3-グルカンコポリマー生成物の分子量プロファイル

			デキストラン-ポリ $\alpha$ -1,3-グルカンコポリマー				
反応系	時間	出発デキストラン の濃度	Mn (kDa)	Mw (kDa)	DPw	Mz (kDa)	Mw/Mn
A (実施例 2)	24 時間	2.5 g/L	261	1198	7394	2520	4.59
B (実施例 2)	24 時間	5 g/L	301	1236	7629	2518	4.10
A (実施例 1)	24 時間	10 g/L	322	1011	6244	2126	3.14
B (実施例 1)	24 時間	20 g/L	285	802	4948	1764	2.81
A (実施例 2)	2 時間	2.5 g/L	177	1762	10873	2814	9.96
B (実施例 2)	2 時間	5 g/L	259	1499	9255	2555	5.78
A (実施例 1)	2 時間	10 g/L	525	1156	7137	1942	2.2
B (実施例 1)	2 時間	20 g/L	465	1005	6202	1765	2.16

## 【0184】

本実施例における 24 時間後の重合反応のそれぞれは、約 7500 の高い DPw (表 7) を有する水不溶性ポリマーを生成した。不溶性ポリマー生成物の多分散性 (Mw/Mn) は、比較的が高く、殊に出発デキストランの濃度が低い反応系ほど高く (表 7)、デキストラン-ポリ - 1, 3 - グルカングラフトコポリマーに加えて不溶性生成物中にポリ - 1, 3 - グルカンホモポリマーが存在することを示す。そのような結果は、デキストランを欠乏する系において予測されることであった；事実、それより多い量の出発デキストランを有する反応系 (実施例 1) は、多分散性が低い生成物をもたらした (表 7)。従って、本明細書において生成したデキストラン-ポリ - 1, 3 - グルカングラフトコポリマーの多分散性は、グルコシルトランスフェラーゼ反応に携わるデキストランの濃度の関数として、制御できると考えられる。

## 【0185】

図 3 は、出発デキストランの大部分が消費された 24 時間の反応系に関する、出発デキストランの濃度と形成したデキストラン-ポリ - 1, 3 - グルカングラフトコポリマー生成物の DPw との関係を示す。ポリ - 1, 3 - グルカンだけの単重合は、低いデキストラン濃度でプライムするデキストランに匹敵するが、デキストラン鎖のそれぞれは、デキストラン濃度が高いほど、小さいグルカングラフトを得る。グラフトコポリマーの最大分子量は、100 g/L のスクロースおよび 100 U/L のグルコシルトランスフェラーゼ酵素を有する反応系において 5 g/L のデキストラン (図 3、表 7) を用いる場合に、生成されるようである。従って、本明細書において生成したデキストラン-ポリ - 1, 3 - グルカングラフトコポリマーの分子量は、グルコシルトランスフェラーゼ反応に携わるデキストランの濃度の関数として、制御できると考えられる。

## 【0186】

従って、デキストラン主鎖およびポリ - 1, 3 - グルカン側鎖を含むグラフトコポリマーを生成した。同様に、デキストラン-ポリ - 1, 3 - グルカンコポリマー生成物の分子量および多分散性は、グルコシルトランスフェラーゼ酵素反応に携わるデキストランの濃度を修正して、制御できる。

## 【0187】

## 実施例 3

デキストランを劣化しないグルコシルトランスフェラーゼ酵素活性

本実施例は、デキストラン-ポリ - 1, 3 - グルカングラフトコポリマーを合成するのに実施例 1 および 2 で用いたグルコシルトランスフェラーゼが、デキストランを劣化しないことを例証する。従って、上述の反応で観察した見かけのデキストラン分画効果は、グ



ルコシルトランスフェラーゼ活性によるデキストランの劣化に起因するのではない。

【 0 1 8 8 】

実施例 1 に記載するように、グルコシルトランスフェラーゼ酵素でのポリ - 1 , 3 - グルカンの合成が、デキストランを用いてプライムされる場合、回収した未反応のデキストランは、反応で最初に使用したデキストランよりもかなり低い分子量を有する。デキストランが、グルコシルトランスフェラーゼ反応において効果的に分画されたかどうか、つまり優先的に大きなデキストラン鎖と反応して不溶性デキストラン - ポリ - 1 , 3 - グルカンコポリマーを形成し、小さな未反応のデキストラン鎖が反応溶液中に残ったかどうかは不明であり、グルコシルトランスフェラーゼ酵素が、デキストランを劣化できたかどうか不明である。

10

【 0 1 8 9 】

この実験の目的は、スクロースを用いないで、標準の反応条件下で、実施例 1 および 2 に使用したグルコシルトランスフェラーゼ酵素にデキストランをさらしたならば、デキストランの劣化が起こるかどうかを調べることであった。2 . 5 g の 1 5 0 k D a ( 平均 ) デキストラン ( S i g m a D 4 8 7 6 ) と 0 . 6 8 g のリン酸カリウム ( S i g m a P 5 3 7 9 ) を、4 9 0 g の水道水に溶かして、p H 5 . 5 9 の溶液をもたらした。この溶液を反応器内において 2 5 で攪拌し、その後、5 0 U のグルコシルトランスフェラーゼ酵素を加えた。次に、溶液を 1 5 0 r p m で 2 4 時間攪拌した後、熱水浴から留去して、湿った固形物を残した。固形物を 2 0 m L の蒸留水中に取り入れて、得られた濁った溶液を吸引濾過により透明にした；非常に少量 ( 約 0 . 1 g ) の淡褐色固体を除去した。濾液を凍結乾燥して、2 . 8 7 g のデキストランを回収し、それを S E C により解析し、出発デキストラン ( 表 8 ) と比較した。

20

【 0 1 9 0 】

【表 9】

表 8

グルコシルトランスフェラーゼ酵素に曝露前と曝露後のデキストラン分子量の解析

デキストラン	Mn (kDa)	Mp (kDa)	Mw (kDa)	Mz (kDa)	Mw/Mn	DPw
出発	60.07	83.6	258	1221	4.29	1593
回収	58.01	83.6	249	1255	4.30	1537

30

【 0 1 9 1 】

表 8 における結果は、グルコシルトランスフェラーゼ酵素は、実施例 1 および 2 で採用した反応条件 ( しかし、スクロースを含まない ) 下で、デキストランを劣化しないことを示す。この結果は、デキストランにグラフト化するポリ - 1 , 3 - グルカンの酵素プロセスが、上述のように分子量に基づいてデキストランを分画するように効果的に働くことを示す。

【 0 1 9 2 】

実施例 4

低分子量デキストラン ( 比較例 ) からのポリ - 1 , 3 - グルカンの合成

本実施例は、重量平均分子量が約 4 0 k D a の市販のデキストランプライマーを用いるグルコシルトランスフェラーゼ酵素でのポリ - 1 , 3 - グルカンの合成を記載する。

【 0 1 9 3 】

この実験の目的は、実施例 1 および 2 で用いたデキストランよりも低分子量のデキストランを用いてデキストラン - ポリ - 1 , 3 - グルカングラフトコポリマーを合成することである。この実験に用いるデキストランは、約 3 5 ~ 4 5 k D a の分子量を有し、その分子量は、実施例 1 および 2 で採用したデキストランの分子量のほぼ 4 分の 1 よりも小さい。

【 0 1 9 4 】

40

50

以下のように、1000 mL のポリ - 1, 3 - グルカンの重合反応を実施した。スクロース (100 g; Omni Pur Calbiochem 8550)、デキストラン (10 g、35 ~ 45 kDa、DPw = 220 ~ 280、Sigma D1662) およびリン酸カリウム (1.36 g、Sigma P5379) を 940 g の水道水に溶かし、pH 5.67 を得た。次に、25 / 150 rpm で の 攪拌 を 開始 した 後、上述の実施例で用いたグルコシルトランスフェラーゼを 100 U 加えた；25 / 150 rpm で の 攪拌 を 24 時間続けた。1.5 時間後、50 mL の不溶性生成物試料を吸引濾過し、洗浄し、湿ったウェットケーキ (8.7 g) に吸着させ、SEC 解析を施した。24 時間で、不溶性生成物スラリーを吸引濾過し、500 mL の熱水道水で 3 回洗浄した。全ての水を吸引除去し、ウェットケーキを秤量した (480 g)。ウェットケーキ試料を SEC 解析のために採取し、固形分のパーセントを求めた (7.6 wt%)、固形分をオープン乾燥した (60 で 3 日間)。初めのウェットケーキの重量および固形分パーセントを基準として、不溶性デキストラン - ポリ - 1, 3 - グルカン生成物の総収量を算出した。1.5 時間および 12 時間での各不溶性生成物の分子量プロファイル求めた (表 9)。

【0195】

【表 10】

表 9

デキストラン-ポリ  $\alpha$ -1,3-グルカンコポリマー生成物の分子量プロファイル

	デキストラン-ポリ $\alpha$ -1,3-グルカンコポリマー					
時間	Mn (kDa)	Mp (kDa)	Mw (kDa)	DPw	Mz (kDa)	Mw/Mn
1.5 時間	359	478	593	3660	946	1.65
24 時間	210	365	474	2926	836	2.26

【0196】

測定した DPw に基づいて、2 個または最大でも 3 個のポリ - 1, 3 - グルカン側鎖が、デキストラン上で合成されると思われる。この実施例で用いるデキストラン (40 kDa) のほぼ 4 倍以上のデキストラン (150 kDa 平均、実施例 1) が、そこで合成されたポリ - 1, 3 - グルカン側鎖を約 4 ~ 5 個有した (実施例 1 を参照のこと) ことから、この結果は、興味深いようである。2 ~ 3 個の側鎖が、40 kDa のデキストラン上で合成できるならば、約 8 ~ 12 個の側鎖 (4 ~ 5 個の代わりに) が、150 kDa のデキストラン上で合成されると期待された可能性がある。

【0197】

本実施例で示すように、約 40 kDa のデキストランを用いて、ポリ - 1, 3 - グルカン側鎖の合成をプライムした。この結果は、同じくらいの分子量のデキストランが、それより大きなデキストラン分子が存在する場合にそのような側鎖合成をプライムしないことを示す実施例 1 を考慮すると、注目すべきである。実施例 1 で観察した分画効果 (partitioning effect) (不溶性生成物の合成をプライムすることにより大きなデキストランを優先的に使用し、一方小さいデキストランが溶液に残る) は、従ってさらに魅力的であり、より小さい分子量のデキストランが、単独である場合に、ポリ - 1, 3 - グルカン側鎖の合成をプライムできることを示す本実施例の結果が得られる。

【0198】

#### 実施例 5

分子量が非常に高いデキストランプライマーからのポリ - 1, 3 - グルカンの重合  
本実施例は、重量平均分子量が非常に高い (少なくとも 50 ミリオンダルトン) のデキストランを用いるグルコシルトランスフェラーゼ酵素でのポリ - 1, 3 - グルカンの合成を記載する。巨大デキストラン主鎖とポリ - 1, 3 - グルカン側鎖とを含むグラフトコポリマーを生成した。

## 【 0 1 9 9 】

300 g / L のスクロースを含む酵素反応系を用いた以外、下の実施例 8 に記載するように、重量平均分子量が非常に高いデキストランを最初に調製した。このデキストランの構造は、( i ) 1 位および 6 位で連結したグルコースを約 87 ~ 93 w t % ; ( i i ) 1 位および 3 位で連結したグルコースを約 0 . 1 ~ 1 . 2 w t % ; ( i i i ) 1 位および 4 位で連結したグルコースを約 0 . 1 ~ 0 . 7 w t % ; ( i v ) 1 位、3 位および 6 位で連結したグルコースを約 7 . 7 ~ 8 . 6 w t % ; ( v ) ( a ) 1 位、2 位および 6 位、または ( b ) 1 位、4 位および 6 位で連結したグルコースを約 0 . 7 ~ 1 . 4 w t % 含む。このデキストランを以下の酵素反応に用いた。

## 【 0 2 0 0 】

100 g / L のスクロースと、9 . 8 g / L のデキストランと、上述の実施例で使用したグルコシルトランスフェラーゼを 100 U / L とを用いて、150 r p m で攪拌しながら、25 で 500 m L のポリ - 1 , 3 - グルカンの合成反応を行った。この反応をセットアップするために、デキストラン ( 4 . 9 g ) を乳鉢と乳棒で粉碎し、50 で 470 g の水道水と 16 時間攪拌し、濁った溶液を得た。次に、スクロース ( 50 g 、O m n i P u r C a l b i o c h e m 8550 ) とリン酸カリウム ( 0 . 68 g 、S i g m a P 5379 ) を加え、攪拌しながら溶かし、p H 5 . 75 を得た。溶液を反応器中 25 で攪拌し、その後、グルコシルトランスフェラーゼ酵素 ( 50 U ) を加えた。約 30 分内に、反応系は、約 5 m m の大きさの堅くスポンジ状の粒子の懸濁液となった。

## 【 0 2 0 1 】

2 時間で、50 m L の試料を反応系から取り出した ( ピペットがポリマー粒子で詰まるので、それほど多くの不溶性生成物は得られなかった ) 。この試料 ( 懸濁液 ) を吸引濾過して、洗浄し、湿ったウェットケーキ ( 1 . 3 g ) に吸着させ、S E C 解析を施す前に、試料を 2、3 時間、放置した。試料は、不活性化されず、酵素活性を弱めなかったもので、試料を吸引濾過する前にさらなるポリ - 1 , 3 - グルカンが形成したようである。濾液を加熱して、濾液中で酵素を不活性化した。その反応を 24 時間続け、その後、不溶性生成物スラリーを吸引濾過した ; 濾液 ( 350 m L ) を保存し、H P L C で解析した。

## 【 0 2 0 2 】

100 m L / 分および 10 p s i g で、M i l l i p o r e P E L L I C O N 2 P L C T K 再生セルロースの直交流膜 ( 30 k D a c u t o f f ; 0 . 1 m <sup>2</sup> ) を横切って循環させて、初期の濾液を透析した。この透析は、単糖およびオリゴマーを ( 透過液を介して ) 除去するのに助力し、未反応の可溶性デキストランを保持液 ( r e t e n t a t e ) 中に残す。再循環する供給原料に脱イオン水を連続して加えて、透過して失った水を補う ; 最終的に、単糖およびオリゴマーを洗い流すのに 3500 m L の水を使用した。次に、保持液を凍結乾燥して、0 . 1 g 未満の未反応のデキストランを回収した。酵素反応において少量の可溶性デキストランのみとなるこれらの結果は、ポリ - 1 , 3 - グルカン合成をプライムするのにデキストランの殆どを使用し、そうしてデキストランが反応の不溶性生成物になることを示す。見かけの分画効果が存在しない ( 実施例 1 と異なる ) ことは、多分、出発デキストランの均質性が比較的に高いことに関連する。

## 【 0 2 0 3 】

グルコシルトランスフェラーゼ反応の不溶性生成物 ( デキストラン - ポリ - 1 , 3 - グルカングラフトコポリマー ) を 500 m L の熱水道水で 3 回洗浄し、その生成物は、大部分 5 m m の粒子と少量の細粒からなった。全ての水を吸引除去し、湿った粒子を秤量した ( 82 . 8 g ; 24 時間試料 ) ; 生成物試料を S E C および固形分パーセント測定のために取り出した。この目的により、ウェットケーキ試料 ( 1 . 105 g ) をオープン乾燥した ( 60 / 2 日 ) 。単離したデキストラン - ポリ - 1 , 3 - グルカングラフトコポリマーは、約 25 % のデキストランと、75 % のポリ - 1 , 3 - グルカンを含んだ。

## 【 0 2 0 4 】

デキストラナーゼの劣化解析 ( 実施例 1 に記載したように実施 ) は、合成したコポリマーのポリ - 1 , 3 - グルカン側鎖はそれぞれ、おおよそ 1000 の D P w を有することを

10

20

30

40

50

示した。この側鎖長の推定分子量は、低分子量のデキストラン（実施例 1 ～ 2）から合成した側鎖を実測した分子量と同じである。

#### 【 0 2 0 5 】

従って、( i ) 巨大な分岐のデキストラン主鎖と、( i i ) ポリ - 1 , 3 - グルカン側鎖とを含むグラフトコポリマーを生成した。そのようなコポリマーは、以下の実施例 6 ～ 7 に記載するように、向上した濾過性および吸収性のプロファイルを有した。

#### 【 0 2 0 6 】

##### 実施例 6

非常に高い分子量のデキストランを含むデキストラン - ポリ - 1 , 3 - グルカングラフトコポリマーの濾過性

本実施例は、デキストラン - ポリ - 1 , 3 - グルカングラフトコポリマー生成物の濾過性を記載する。一般的に、分子量が非常に高いデキストランを高含有量含むコポリマーは、そのようなデキストランを低含有量有するコポリマーと比較すると、より容易に濾過分離した。

#### 【 0 2 0 7 】

8 つのグルコシルトランスフェラーゼ ( 1 0 0 U / L ) 反応をセットアップして、以下の修正をした以外は、概して実施例 5 に記載したように行った。ヘリカルリボン型攪拌器を用いて 1 5 0 r p m で攪拌される 1 L の反応系中でその反応を 2 5 で行った。表 1 0 は、各反応に携わるデキストランおよびスクロースの量を列挙する。反応の p H は、5 . 2 ～ 5 . 8 であり、調節しなかった。反応開始後 2 4 時間で不溶性生成物試料を採取した；これらの試料を濾過および洗浄により調製した。得られたウェットケーキを秤量し、それらの試料を乾燥させて、固形分パーセントと収量を求めた。S E C と N M R により、不溶性生成物試料を解析した。それぞれの反応の結果を表 1 0 にまとめる。

#### 【 0 2 0 8 】

##### 【表 1 1】

表 10

グルコシルトランスフェラーゼ反応で生成したデキストラン-ポリ α-1,3-グルカングラフトコ

ポリマーの濾過性

1-L 反応系			コポリマー生成物のプロファイル		
デキストラン (g)	スクロース (g)	変換したスクロース (%)	コポリマー の収量 (g)	コポリマー中の デキストラン (wt%)	コポリマーの外観
5	100	100	40.0	10.6	攪拌を止めた;大きな粒子(約 5 mm の球体)、非常に粗い粒子、微粒子含まない、沈降した
5	200	100	68.8	5.9	微細なスラリーに懸濁した大きな粒子(約 4 mm); 大部分粒状
2	100	100	38.4	4.5	攪拌を止めた;懸濁したままの大きな粒子
5	300	69	78.9	4.1	微細なスラリーに懸濁した小さな粒子
3	200	100	67.5	3.9	微細なスラリーに懸濁した砂粒子の大きさの粒子
3	300	71	84.5	2.4	微細なスラリーに懸濁した大きな粒子(約 4 mm)
1	200	99	75.8	1.4	微粒子;上述の生成物(列 1~6)よりも濾過し難い
1	300	77	105.3	0.9	微粒子;上述の生成物(列 1~6)よりも濾過し難い

#### 【 0 2 0 9 】

表 1 0 に示すように、異なる反応系のデキストラン - ポリ - 1 , 3 - グルカングラフト

コポリマー生成物は、それらの濾過性により、特徴付けられる。総体的に、デキストラン含有量が高い（例えば、2.4 ~ 10.6 wt %）グラフトコポリマーは、デキストラン含有量が高い（例えば、0.9 ~ 1.4 wt %）のグラフトコポリマーと比べて、大きな粒子として現れ、より容易に濾過される。図4および5は、10.6 wt %のデキストランを含有するグラフトコポリマー試料（表10、列1、濾過し易い）と0.9 wt %のデキストランを含有するグラフトコポリマー試料（表10、列8、濾過し難い）の写真をそれぞれ示す。

#### 【0210】

グラフトコポリマー生成物の濾過性が、少なくとも一部、グラフトコポリマー中のデキストランの含有量に応じて決まることは、興味をそそることである。この結果は、幾分有用である：ポリ - 1, 3 - グルカン合成反応において非常に高い（50ミリオングルトンを超える）分子量のデキストランを含むことにより、主にポリ - 1, 3 - グルカンからなる濾過性生成物の合成をもたらすことができることがわかった（但し、最も高いデキストラン含有量は、10.6 wt %であり、他の濾過性生成物は、それより低いデキストラン含有量を有する）。これは、劣った濾過性を示し易い不溶性ポリ - 1, 3 - グルカンホモポリマーを超える強化である。従って、少なくとも約2.4 wt %（および、おそらく少なくとも約2.0 wt %）のデキストラン（非常に高い分子量）含有量を有するデキストラン - ポリ - 1, 3 - グルカングラフトコポリマーは、例えば、その合成および単離の観点からポリ - 1, 3 - グルカンホモポリマーを超える経済上の利点を提供することがある。さらに、グルコシルトランスフェラーゼ反応において少量の非常に高い分子量のデキストランだけが、この効果を誘導する必要があることが表10からわかる。表10に基づいて、僅か2 g / Lの例えば、非常に高い分子量のデキストランをグルコシルトランスフェラーゼ反応に用いることにより、濾過性のグラフトコポリマー生成物を多く産出できると考えられる。最終的に、濾過性に及ぼすこの効果は、低分子量のデキストラン（150 - kDa [平均]、Sigma D4876）をプライマーとして使用したグルコシルトランスフェラーゼ反応において生成したデキストラン - ポリ - 1, 3 - グルカングラフトコポリマーでは容易に観察されなかった（データなし）。

#### 【0211】

従って、少なくとも約2 wt %の、例えば、非常に高い分子量のデキストランを含むデキストラン - ポリ - 1, 3 - グルカングラフトコポリマーは、デキストラン含有量が高いグラフトコポリマーと比較すると、濾過し易い。

#### 【0212】

##### 実施例7

非常に高い分子量のデキストランを含むデキストラン - ポリ - 1, 3 - グルカングラフトコポリマーによる水性液体の吸収力

本実施例は、様々なデキストラン - ポリ - 1, 3 - グルカングラフトコポリマーの保水度（WRVs）を記載する。これらのコポリマーで測定したWRVは、ポリ - 1, 3 - グルカンホモポリマーで測定したWRVよりも大きい。

#### 【0213】

これらのグルコシルトランスフェラーゼ（100 U / L）反応をセットアップし、概して実施例6に記載するように、100 g / Lのスクロースおよびデキストランを2 g / L、5 g / L、または10 g / Lを用いて、行った。これらの反応（24時間）は、それぞれ、95 %、87.5 %、または75 %の - 1, 3 グルコシド結合を含むデキストラン - ポリ - 1, 3 - グルカングラフトコポリマーを生成した。この生成物の結合プロファイルは、同様の反応条件（初期のスクロースおよびデキストランの濃度）下で作製した、表10の列1および3に列挙する生成物と一致する（但し、各生成物のデキストラン成分は、概して - 1, 6 - グルコシド結合を表す）。

#### 【0214】

これらのグラフトコポリマー生成物のそれぞれのWRVを測定し、ポリ - 1, 3 - グルカンホモポリマー（DPw800）のWRVと比較した（表11）。各ポリマーのWRV

を以下のように測定した。乾燥したポリマー粉末（1 g）を20 mLのDI水中に浸漬させ、2時間放置して平衡状態になった（但し、ポリマーの乾燥は、凍結乾燥ステップを伴わなかった）。次に、チューブの上半分に0.45ミクロンのPVDF挿入フィルターを収容する50 mLのFALCONチューブ中に、固体材料（スラリーに見える）を移した。次に、固定回転子を有するEPPENDORF 5804遠心機内で、4500 rpmで20分間、FALCONチューブを遠心分離した。挿入フィルターにより、遠心分離中に湿潤材料から大量の過剰液体が除去／分離した。次に、湿潤材料の質量を天秤で測定した後、湿潤材料を60のオープン内で終夜乾燥させた。その後、乾燥質量を測定した。以下の式を用いて、各ポリマーのWRVを算出した：（（湿潤ポリマーの質量 - 乾燥ポリマーの質量）／乾燥ポリマーの質量）× 100。

【0215】

【表12】

10

表 11

ポリ α-1,3-グルカンホモポリマーおよびデキストラン-ポリ α-1,3-グルカングラフト

コポリマーの保水度(WRV)

	ポリ α-1,3-グルカンホモポリマー(DPw 800)	デキストラン-ポリ α-1,3-グルカングラフト コポリマー		
反応系中のデキストランの濃度	na	2 g/L	5 g/L	10 g/L
% α-1,3結合	100%	95%	87.5%	75%
WRV	80	132	129	172

20

【0216】

表11における結果は、デキストラン - ポリ - 1, 3 - グルカングラフトコポリマーが、少量の - 1, 6 グルコシド結合（< 5 %）を含有する場合でさえも、ポリ - 1, 3 - グルカンホモポリマーのWRVと比較してかなり高いWRVを有することを示す。

30

【0217】

非常に高い分子量のデキストラン50 g / Lと様々な量のスクロース（20 ~ 200 g / L）とを用いたことを除いて、さらなるグルコシルトランスフェラーゼ（100 U / L）反応（24時間）を上述のように行った。これらの反応で生成した合成デキストラン - ポリ - 1, 3 - グルカングラフトコポリマーそれぞれのWRVを上述のように測定したが、水の添加の際に生成物がゲル様になる（通常、測定したWRVが約1000を超える場合に生じる）ので、以下の修正をして、測定した。このプロトコルの修正を行い、遠心分離中のフィルターの目詰まりを回避した。具体的には、水の添加後、PVDF挿入フィルターを伴わない50 mLのFALCONチューブに膨張した材料を加え、EPPENDORF 5804内で、4500 rpmで20分間、遠心分離した。膨張したゲル相を遠心分離中にチューブの底に沈降させて、過剰の水を容易にデカンテーションできる。次に、湿潤材料の質量を天秤で測定した後、湿潤材料を60のオープン内で終夜乾燥させ、乾燥した材料を秤量した。次に、上述の式に従って、WRVを求め、表12に示す。

40

【0218】

50

## 【表 13】

表 12

多量のデキストランを含む反応で生成したデキストラン-ポリ  $\alpha$ -1,3-グルカン

グラフト コポリマーの保水度 (WRV)

反応系中のスクロースの 濃度	200 g/L	150 g/L	100 g/L	50 g/L	20 g/L
WRV	2811	3562	1988	2685	3186

10

## 【0219】

表 12 における結果は、非常に高い分子量のデキストランを多量 (50 g/L) 含むグルコシルトランスフェラーゼ反応において生成したデキストラン-ポリ  $\alpha$ -1,3-グルカングラフトコポリマーが、向上した WRV を有することを示す。

## 【0220】

従って、デキストラン-ポリ  $\alpha$ -1,3-グルカングラフトコポリマーを含む組成物は、水性液体を吸収できる。そのような吸収性は、これらの組成物が、その性能が水性液体の吸収力に一部において基づく様々なパーソナルケア用品 (例えば、おむつ、特定の女性用衛生製品) の使用に好適であり得ると示唆する。さらに、化学変性 (例えば、架橋) を必要とせず、これらの材料が向上した WRV を実現したことは注目すべきことであり、化学変性を行ったならばそれにより、材料が特定のパーソナルケア用途に適切でないようになることがある (例えば、化学処理により、皮膚炎に連結する不純物が残ることがある)。

20

## 【0221】

## 実施例 8

分子量が非常に高いデキストランの合成および解析

本実施例は、分子量が非常に高い (50 ミリオンダルトンを超える) デキストランの生成を記載する。実施例 5 ~ 7 (上述) においてそのようなデキストランを用いて、向上した特徴を有するデキストラン-ポリ  $\alpha$ -1,3-グルカングラフトコポリマーを生成した。

## 【0222】

Gtf0768 の生成

1,484 個のアミノ酸を有する推定上の YGRIP001 含有ヒドロラーゼ (GENBANK で GI 番号 339480768 に分類されたが、現在は GI 番号 497964659 を有する) は、全ゲノムショットガンシーケンシングによってロイコノストック・シュードメセンテロイデス (*Leuconostoc pseudomesenteroides*) 株 KCTC 3652 から同定した。この推定グルコシルトランスフェラーゼ (本明細書では、gtf0768 という) は、グルカン結合ドメインを含有するグリコシルヒドロラーゼの GH70 ファミリーに属する。gtf0768 の N 末端 37 アミノ酸セグメントは、SIGNALP 4.0 プログラム (Petersen et al., Nature Methods 8: 785-786) によって、この酵素のシグナルペプチドであると推定された。gtf0768 の成熟型は、配列番号 6 によって表される。

30

40

## 【0223】

gtf0768 の細菌発現のためのプラスミドを構築するために、シグナルペプチドを使用せずに gtf の成熟型をコードする DNA 配列を、GenScript USA Inc. (Piscataway, NJ) により合成した。合成配列を、pET23D+ベクター (Novagen (登録商標); Merck KGaA, Darmstadt, Germany) の NheI および HindIII 部位内にサブクローニングした。このコンストラクトによってコードされた 0768 gtf (配列番号 7) は、gtf0768 の野生型成熟 (予測) 型 (配列番号 6) と比べると、N 末端で開始メチオニンおよび 3 個の追加アミノ酸 (Ala-Ser-Ala) を、そして C 末端で 6 個のヒスチジン残基を含んで

50

いた（すなわち、配列番号6は配列番号7の中に含まれる）。プラスミドコンストラクトの配列を確認し、アンピシリン選択を行って大腸菌（*E. coli*）BL21 DE3宿主細胞内に形質転換して、発現菌株EC0052を得た。

#### 【0224】

EC0052細胞と、空のpET23D+ベクターだけを含有する対照菌株を、100  $\mu$ g/mLのアンピシリンを加えたLB培地で約0.5のOD<sub>600</sub>増殖させ、次に、1mMのIPTGにより37℃で3時間、または23℃で終夜誘導した。この誘導期間後、細胞を4000  $\times$  g、10分間の遠心分離によって収集し、PBSバッファ（pH6.8）に再懸濁した。次に、細胞を14,000 psi（約96.53MPa）でFrench Pressに2回通すことにより溶解し、その後、細胞破片を15,000  $\times$  gで20分間遠心分離することによりペレット化した。各未精製の細胞溶解液の上清を等分し、-80℃で凍結させた。

10

#### 【0225】

EC0052細胞由来の未精製の細胞溶解液の活性を、スクロースとの反応によってチェックした。対照反応を、空ベクターを含有する細胞から調製した細胞溶解液を用いて同様にセットアップした。10%（v/v）の細胞溶解液を100g/Lのスクロース、10mMのクエン酸ナトリウム（pH5）および1mMのCaCl<sub>2</sub>と共に使用して、各スクロース反応をセットアップした。37℃で数時間、反応系をインキュベートした後、EC0052細胞溶解液を加えた試験管内に、ゲル様生成物（デキストランであると考えられる）が生成した。対照反応系には、ゲル様生成物は生成されなかった。HPLC解析より、EC0052細胞溶解液を含有する反応系中ではスクロースが消費されたが、対照反応系中では消費されなかったことが確認された。この結果は、EC0052未精製細胞溶解液が活性gtf0768酵素を発現すること、およびこのgtfが高粘度を有するデキストラン生成物を生成することを示唆した。

20

#### 【0226】

分子量が非常に高いデキストランの合成および解析

水、スクロースおよびgtf0768を含む反応系をセットアップし、解析を実施して、デキストラン生成物の構造的特徴を求めた。

gtf反応系を調製するための試薬：

- スクロース（Sigma製品番号S-9378）。
- リン酸ナトリウムバッファストック（1M、pH6.5、Teknovaカタログ番号S0276）。
- Gtf0768酵素（配列番号6を含む）溶液（上述のように調製した細胞溶解液）。

30

#### 【0227】

Gtf反応の条件：

20mMのリン酸ナトリウムバッファ（バッファを1Mストック（pH6.5）からddH<sub>2</sub>Oを用いて50倍に希釈した）、100g/Lのスクロース、および0.1mLのgtf0768酵素溶液（配列番号6を含む）を含有する50mLの反応系を調製した。この反応系をインキュベーターシェーカー（Innova, Model 4000）内、100rpm、26℃で43時間振盪した；反応系は、約24時間後、粘性を示した。200、300または800g/Lのスクロースを含有する他の反応（24時間）も実施した（データ示さず）。

40

#### 【0228】

反応を80℃で10分間加熱してgtf酵素を不活化した。次に、不活化した粘性反応系に100%メタノール75mLを混合して、粘性生成物を沈殿させた。白色沈殿を形成した。上清を注意深くデカンテーションした後、白色沈殿を100%メタノール75mLで2回洗浄した。固体生成物を45℃で48時間、オープン内で真空乾燥させた。

#### 【0229】

0、0.5、1、2および24時間後に、反応の試料（1mL）をそれぞれ採取した。80℃で10分間加熱して、各試料においてgtf酵素を不活化した。次に、各試料を殺菌

50



水で10倍に希釈した。500  $\mu$ Lの希釈試料を遠心管フィルター（SPIN-X、0.45  $\mu$ mのナイロン、2.0 mLのポリプロピレンチューブ、Costar #8170）中に移し、卓上遠心分離機により、12,000 rpmで60分間遠心分離し、その後、HPLC解析のために200  $\mu$ Lのフロースルーを使用して反応中のスクロース消費量を測定した。各試料を解析するために次のHPLC条件を適用した：カラム（AMINEX HPX-87C炭水化物カラム、300  $\times$  7.8 mm、Bio-Rad、製品番号125-0095）、溶離液（水）、流量（0.6 mL/分）、温度（85 ）、屈折率検出器。試料のHPLC解析により、0.768 g t fの反応中に、相当量のスクロースが消費されたことが示された。

#### 【0230】

また、HPLCを使用して、反応の他の生成物を解析した。ポリマー収量は、反応において残留した他の全糖類の量を出発スクロースの量から減じることによって逆算した。逆算した数値は、粘性生成物の乾燥重量分析と一致した。スクロース、ロイクロース、グルコースおよびフルクトースは、HPX-87Cカラムを用いるHPLC（上述したHPLC条件）によって定量した。DP2-7二糖類は、次の条件を用いてHPLCによって定量した：カラム（AMINEX HPX-42A炭水化物カラム、300  $\times$  7.8 mm、Bio-Rad、製品番号125-0097）、溶離液（水）、流量（0.6 mL/分）、温度（85 ）、屈折率検出器。これらのHPLC解析により、0.768 g t f反応のグルコシル含有糖生成物が、92.3%のポリマー生成物、1.3%のグルコース、5.0%のロイクロースおよび1.4%のDP2-7オリゴ糖からなることが示された。

#### 【0231】

上述の反応の乾燥デキストラン粉末生成物の試料（約0.2 g）を分子量分析のために使用した。3台のオンライン検出器と一体となったWaters Corporation（Milford, MA）製のAlliance（商標）2695分離モジュールを用いて、フローインジェクションクロマトグラフ法により、分子量を求めた：Waters製の示差屈折率検出器2414、Wyatt Technologies（Santa Barbara, CA）製の準弾性光散乱（QELS）検出器を伴うHeleos（商標）-218-アングルマルチアングル光散乱（MALS）光度計、およびWyatt製のViscoStar（商標）示差毛管粘度検出器。乾燥デキストラン粉末を、200 ppmのNaN<sub>3</sub>を含有する水性トリス（トリス[ヒドロキシメチル]アミノメタン）バッファ（0.075 M）中に0.5 mg/mLで溶解させた。50 で終夜振盪して、デキストランを溶解させた。Agilent Technologies（Santa Clara, CA）製の2本のAQUAGEL-OH GUARDカラムを使用して、インジェクションピークからデキストランポリマーのピークを分離した。この手順の移動相のベースは、デキストランの溶媒と同じであり、流量は0.2 mL/分、注入量は0.1 mL、カラム温度は30 であった。データ収録には、WatersのEmpower（商標）バージョン3ソフトウェアを使用し、マルチ検出器のデータ量削減にはWyattのAstra（商標）バージョン6を使用した。この研究から、デキストランポリマー生成物が1.022（ $\pm$ 0.025） $\times 10^8$  g/モル（すなわち、大まかに100,000,000ダルトン）の重量平均分子量（MALS分析から）、243.33（ $\pm$ 0.42）nmのz平均慣性半径（MALS分析から）および215 nmのz平均流体力学半径（QELS分析から）を有することが判明した。また、QELS分析から、デキストランが約0.259の粒径分布（PSD）標準偏差を有することが判明し、デキストランが流体力学的サイズに関して多分散性である可能性が高いことを示した。

#### 【0232】

グリコシド結合解析のために、反応時間を24時間（反応系が粘性になった）としたことを除いて、本実施例で先に記載したようにして、50 mLのg t f反応を調製した。反応を80 で10分間加熱してg t f酵素を不活化した。次に、不活化した粘性反応を、12~14 kDaの分画分子量（MWCO）を備える、再生セルロース製の頑丈な透析チューブ（Spectra/Por（登録商標）4透析チューブ、製品番号132706、S

10

20

30

40

50

pectrum Laboratories, Inc.) 中に配置し、室温で1週間にわたり4 Lのフィルター水で透析した。透析中、水は毎日交換した。次に、透析した粘性反応系を沈殿させ、本実施例で先に記載したようにして乾燥させた。GC/MS連動解析用に、約0.2 gの乾燥粉末を供した。

# 【0233】

連動解析は、Pettolino et al. (Nature Protocols 7: 1590 - 1607) が報告している方法に従って行った。この文献は参照により本明細書に組み込まれる。簡潔に言えばジメチルスルホキシド(DMSO)または5%塩化リチウムを溶かしたDMSO中に乾燥デキストラン試料を溶解させ、次に、水酸化ナトリウム/DMSOスラリー、その後にヨードメタンを連続的に添加することによって全ての遊離ヒドロキシル基をメチル化した。次に、塩化メチレン中にメチル化ポリマーを抽出し、トリフルオロ酢酸(TFA)水溶液を使用して120 でモノマー単位まで加水分解した。その後、試料からTFAを留去し、還元端を重水素原子で標識した重水素化ホウ素ナトリウムを用いて還元開環を行った。次に、グリコシド結合を加水分解することにより生成したヒドロキシル基を、50 の温度で塩化アセチルおよびTFAで処理することによりアセチル化した。最後に、誘導体化試薬を留去し、得られたメチル化/アセチル化モノマーをアセトニトリル中で再構成し、ビスシアノプロピルシアノプロピルフェニルポリシロキサンカラムを用い、質量分析計を備えたガスクロマトグラフィ(GC/MS)により分析した。重水素標識とともに、メチルおよびアセチル官能基の相対測位から、他とは明確に区別できる保持時間指数および公表データベースと比較できる質量スペクトルを有する化学種を得た。この方法で、モノマー単位の誘導体によって、各モノマーがデキストランポリマー内で最初にどのように連結していたのか、また、モノマーが分岐点であったか否かが示された。これらのサンプル(最初にDMSOまたはDMSO/5%のLiCl中に溶解させたデキストラン)を分析した結果を表13に示す。

# 【0234】

## 【表14】

表 13

Gtf 0768 デキストラン生成物の結合プロファイル

試料	デキストラン中のグルコースモノマーの Wt%/Mol%				
	3-glc <sup>a</sup>	6-glc <sup>b</sup>	4-glc <sup>c</sup>	3,6-glc <sup>d</sup>	2,6- + 4,6-glc <sup>e</sup>
DMSO	0.4	90.2	0.4	8.3	0.7
DMSO/5% LiCl	0.9	89.3	0.4	8.0	1.4

<sup>a</sup>1 および 3 の炭素位で連結したグルコースモノマー。

<sup>b</sup>1 および 6 の炭素位で連結したグルコースモノマー。

<sup>c</sup>1 および 4 の炭素位で連結したグルコースモノマー。

<sup>d</sup>1、3 および 6 の炭素位で連結したグルコースモノマー。

<sup>e</sup>1、2 および 6 または 1、4 および 6 の炭素位で連結したグルコースモノマー。

# 【0235】

一般的に、表13の結果は、既に解析したデキストラン生成物が：

(i) 1位および6位でのみ連結したグルコース、約87~93wt%；

(ii) 1位および3位でのみ連結したグルコース、約0.1~1.2wt%；

(iii) 1位および4位でのみ結合したグルコース、約0.1~0.7wt%；

(iv) 1位、3位および6位でのみ結合したグルコース、約7.7~8.6wt%；並びに

(v) (a) 1位、2位および6位、または(b) 1位、4位および6位でのみ連結したグルコース、約0.4~1.7wt%

を含むことを示している。

#### 【 0 2 3 6 】

この情報および他のいくつかの研究（データは示していない）に基づくと、この生成物は、相互に反復して分岐する（平均）長さが約 2 0 D P の長鎖（大部分または全部が - 1 , 6 - である結合を含有する）が存在する分岐構造（例えば、長鎖が他の長鎖からの分岐で、次にそれ自体が他の長鎖からの分岐であり得るなど）であると考えられる。分岐構造は、また長鎖からの短鎖を含むようである；これらの短鎖は、例えば、長さが 1 ~ 3 D P であり、大部分が例えば - 1 , 3 および - 1 , 4 である結合を含むと考えられる。デキストラン中の分岐点は、他の長鎖から分岐している長鎖からであろうと、または長鎖から分岐している短鎖からであろうと、 - 1 , 6 結合内に含まれるグルコースからの - 1 , 3、 - 1 , 4 または - 1 , 2 結合を含むと思われる。デキストランの全分岐点の大きめに 2 5 % は、長鎖に分岐した。

10

従って、独特な構造特性を有する、分子量が非常に高いデキストランを生成した。実施例 5 ~ 7（上述）においてこのデキストランを用いて、向上した特徴を有するデキストラン - ポリ - 1 , 3 - グルカングラフトコポリマーを生成した。

#### 【 0 2 3 7 】

以上、本発明を要約すると下記のとおりである。

1 . ( i ) 少なくとも約 1 0 0 0 0 0 ダルトンの重量平均分子量 ( M w ) を有するデキストランを含む主鎖、

( i i ) 少なくとも約 9 5 % の - 1 , 3 - グリコシド結合を含むポリ - 1 , 3 - グルカン側鎖

20

を含むグラフトコポリマーを含む組成物。

2 . 前記ポリ - 1 , 3 - グルカン側鎖が、少なくとも約 9 9 % の - 1 , 3 - グリコシド結合を含む上記 1 に記載の組成物。

3 . 1 つまたは複数の前記ポリ - 1 , 3 - グルカン側鎖の個々の M w が、少なくとも約 1 0 0 0 0 0 ダルトンである上記 1 に記載の組成物。

4 . 前記グラフトコポリマーが、水性条件下で不溶性である上記 1 に記載の組成物。

5 . 前記デキストランが、

( i ) 1 位および 6 位で連結したグルコース、約 8 7 ~ 9 3 w t % ;

( i i ) 1 位および 3 位で連結したグルコース、約 0 . 1 ~ 1 . 2 w t % ;

30

( i i i ) 1 位および 4 位で連結したグルコース、約 0 . 1 ~ 0 . 7 w t % ;

( i v ) 1 位、3 位および 6 位で連結したグルコース、約 7 . 7 ~ 8 . 6 w t % ; 並びに

( v ) ( a ) 1 位、2 位および 6 位、または

( b ) 1 位、4 位および 6 位

で連結したグルコース、約 0 . 4 ~ 1 . 7 w t %

を含み、

前記デキストランの前記 M w が、約 5 0 ~ 2 0 0 ミリオンダルトンである上記 1 に記載の組成物。

6 . 前記デキストランの前記 M w が、少なくとも約 1 0 0 ミリオンダルトンである上記 5 に記載の組成物。

40

7 . 前記デキストランが、配列番号 6 または配列番号 7 と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含むグルコシルトランスフェラーゼ酵素の生成物である上記 5 に記載の組成物。

8 . 前記グラフトコポリマーが、少なくとも約 2 . 0 w t % のデキストランを含む上記 5 に記載の組成物。

9 . 前記グラフトコポリマーが、少なくとも約 1 0 0 の保水度 ( W R V ) を有する上記 1 に記載の組成物。

1 0 . 前記組成物が、パーソナルケア製品、家庭用製品、医薬製品、または工業製品である上記 1 に記載の組成物。

1 1 . 酵素反応であって、( i ) 水、( i i ) スクロース、( i i i ) 少なくとも約 1 0

50

0000ダルトンの重量平均分子量（Mw）を有するデキストラン、および（iv）少なくとも約95%の-1,3-グリコシド結合を含むポリ-1,3-グルカンを含むグルコシルトランスフェラーゼ酵素を含み、前記酵素反応が、上記1に記載の組成物によるグラフトコポリマーを生成する酵素反応。

12. 前記反応における前記デキストランの初期濃度が、少なくとも約2g/Lであり、前記デキストランの前記Mwが、少なくとも約50ミリオンドルトンである上記1に記載の酵素反応。

13. グラフトコポリマーを調製する方法であって、

（a）少なくとも（i）水、（ii）スクロース、（iii）少なくとも約100000ダルトンの重量平均分子量（Mw）を有するデキストラン、および（iv）少なくとも約95%の-1,3-グリコシド結合を含むポリ-1,3-グルカンを含むグルコシルトランスフェラーゼ酵素を接触させるステップであって、それにより、上記1に記載の組成物によるグラフトコポリマーが生成されるステップと、

（b）場合により、ステップ（a）で生成したグラフトコポリマーを単離するステップとを備える方法。

14. 接触ステップ（a）において、約60000ダルトン未満のMwを有するデキストランがさらに存在し、少なくとも約100000ダルトンのMwを有する前記デキストランが、前記グルコシルトランスフェラーゼ酵素による側鎖合成のための基質として優先的に使用される上記13に記載の方法。

15. ステップ（a）に携わる前記デキストランが、少なくとも約50ミリオンドルトンのMwと、少なくとも約2g/Lの初期濃度を有し、ステップ（a）において生成した前記グラフトコポリマーが単離され、前記単離ステップが、濾過ステップを備え、前記グラフトコポリマーが、ポリ-1,3-グルカンホモポリマーの濾過率と比較してそれより高い濾過率を有する上記13に記載の方法。

【図面】

【図1】

【図2】

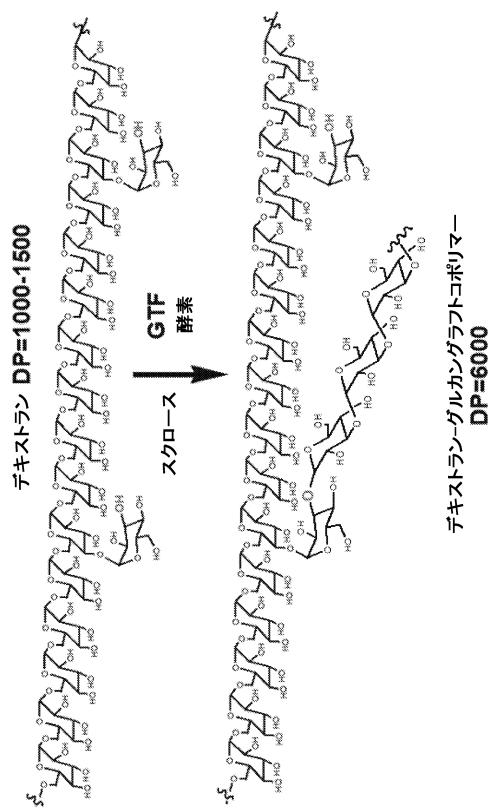


FIG. 1

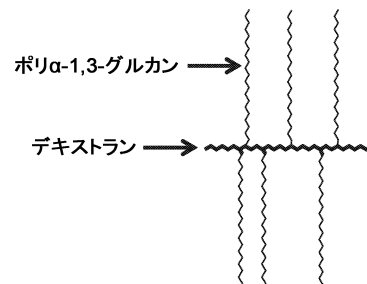


FIG. 2

10

20

30

40

50

【 図 3 】

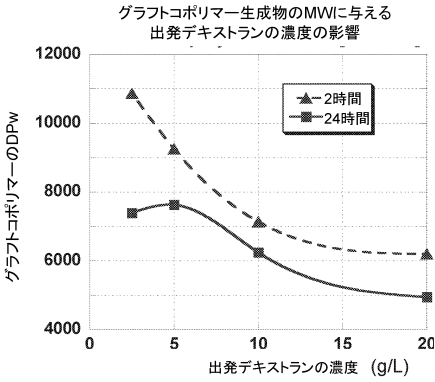


FIG. 3

【 図 4 】

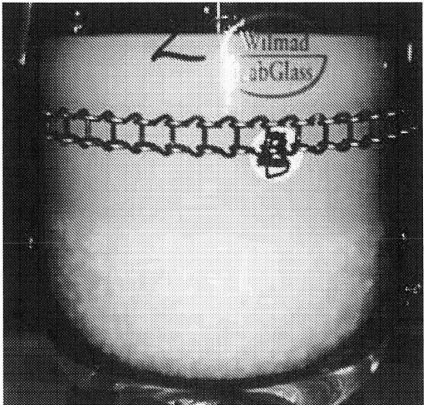


FIG. 4

10

【 図 5 】

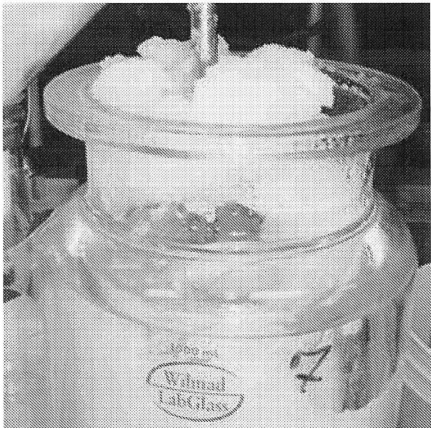


FIG. 5

20

30

【 配列表 】

0007104628000001.app

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 47/36 (2006.01)

A 6 1 K 47/36

A 6 1 L 27/20 (2006.01)

A 6 1 L 27/20

A 6 1 L 27/52 (2006.01)

A 6 1 L 27/52

C 1 2 P 19/18 (2006.01)

C 1 2 P 19/18

Z N A

## (72)発明者 サミュエル・デーヴィッド・アーサー

アメリカ合衆国デラウェア州 1 9 8 0 2 . ウィルミントン . ノース・モンロー・ストリート 3 2 1  
4

審査官 松田 芳子

## (56)参考文献 特表 2 0 0 5 - 5 0 0 8 3 9 ( J P , A )

国際公開第 2 0 1 5 / 1 1 9 8 5 9 ( W O , A 1 )

## (58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 P 1 9 / 0 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )