

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6389470号  
(P6389470)

(45) 発行日 平成30年9月12日(2018.9.12)

(24) 登録日 平成30年8月24日(2018.8.24)

(51) Int.Cl.

C08B 37/00 (2006.01)

F 1

C08B 37/00

J

請求項の数 6 (全 33 頁)

(21) 出願番号	特願2015-549524 (P2015-549524)
(86) (22) 出願日	平成25年12月16日 (2013.12.16)
(65) 公表番号	特表2016-503096 (P2016-503096A)
(43) 公表日	平成28年2月1日 (2016.2.1)
(86) 國際出願番号	PCT/US2013/075285
(87) 國際公開番号	W02014/099724
(87) 國際公開日	平成26年6月26日 (2014.6.26)
審査請求日	平成28年12月12日 (2016.12.12)
(31) 優先権主張番号	61/740,087
(32) 優先日	平成24年12月20日 (2012.12.20)
(33) 優先権主張国	米国(US)
(31) 優先権主張番号	61/740,106
(32) 優先日	平成24年12月20日 (2012.12.20)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	390023674 イー・アイ・デュポン・ドウ・ヌムール・ アンド・カンパニー E. I. DU PONT DE NEMO URS AND COMPANY アメリカ合衆国デラウエア州19805. ウィルミントン. センターロード974. ピー・オー・ボックス2915. チェスナ ット・ラン・プラザ
(74) 代理人	100127926 弁理士 結田 純次
(74) 代理人	100140132 弁理士 竹林 則幸

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ポリα-1, 3-グルカンエーテルの調製

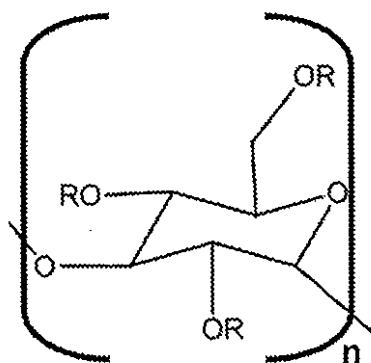
(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物であつて、

構造 :

【化 1】



10

(式中、

( i ) n は少なくとも 10 であり、

( i i ) 各 R は、独立に、H 又は有機基であり、且つ

20

( i i i ) 前記化合物は 0 . 0 5 から 3 . 0 の置換度を有する)により表され、2種類以上の有機基を含む前記化合物を含む組成物。

**【請求項 2】**

2種類以上の有機基が、ヒドロキシアルキル基、アルキル基、又はカルボキシアルキル基から選択される、請求項1に記載の組成物。

**【請求項 3】**

2種類以上の有機基が、ヒドロキシプロピル、ジヒドロキシプロピル、ヒドロキシエチル、メチル、エチル、又はカルボキシメチル基から選択される、請求項2に記載の組成物。

**【請求項 4】**

nが少なくとも800である、請求項2又は3に記載の組成物。

10

**【請求項 5】**

置換度が、0 . 2 から 2 . 0 である、請求項1~4のいずれか1項に記載の組成物。

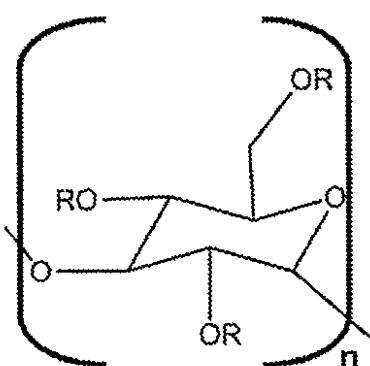
**【請求項 6】**

ポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物を製造する方法であって：

( a ) アルカリ条件下での反応物中で、ポリ - 1 , 3 - グルカンを、有機基を含む少なくとも1種のエーテル化剤と接触させることであって、前記有機基が前記ポリ - 1 , 3 - グルカンにエーテル化され、それにより、以下の構造：

**【化 2】**

20



30

(式中、

( i ) nは少なくとも10であり、

( i i ) 各Rは、独立に、H又は前記有機基であり、且つ

( i i i ) 前記化合物は0 . 0 5 から 3 . 0 の置換度を有する)により表され、2種類以上の有機基を含む前記ポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物を製造すること；及び

( b ) 任意選択で、工程(a)で製造された前記ポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物を単離すること

を含む方法。

**【発明の詳細な説明】**

40

**【技術分野】**

**【0001】**

本願は、全て引用により本明細書にその全体が組み込まれる、それぞれ2012年12月20日に出願された米国仮特許出願第61/740,076号明細書；同第61/740,087号明細書；同第61/740,106号明細書；同第61/740,119号明細書、及び同第61/740,127号明細書の利益を主張する。

**【0002】**

本発明は、ポリ - 1 , 3 - グルカン誘導体の分野にある。具体的には、本発明は、ポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル及びその調製方法に関する。

**【背景技術】**

50

**【0003】**

酵素的合成又は微生物若しくは植物宿主の遺伝子操作を利用して新しい構造多糖類を見出したいという欲求に駆られて、研究者らは、生分解性であり再生可能な資源に基づく原材料から経済的に製造可能な多糖類を発見してきた。そのような多糖の1つはポリ-1,3-グルカンであり、-1,3-グリコシド連結を有するという特徴があ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を、ストレプトコッカス・サリバリウス (*S treptococcus salivarius*) から単離されたグルコシルトランスフェラーゼ酵素と接触させることにより単離されてきた(非特許文献1)。ポリ-1,3-グルカンから調製されたフィルムは、150までの温度に耐え、-1,4-結合多糖類から得られたポリマーより優れた利点を与える(非特許文献2)。

10

**【0004】**

特許文献1は、ヘキソース単位を含む多糖纖維であって、ポリマー内の少なくとも50%のヘキソース単位が、*S. salivarius* (*S. salivarius*) gtfJ酵素を利用して-1,3-グリコシド連結により結合している多糖纖維の調製を開示した。この酵素は、ポリ-1,3-グルカン及びフルクトースを最終生成物として生み出す重合反応においてスクロースを基質として利用する(Simpson et al., 1995)。開示されたポリマーは、溶媒又は溶媒を含む混合物中に臨界濃度を超えて溶解すると、液晶溶液を形成した。この溶液から、織物における使用に非常に好適な、連続的で、強く、綿のような纖維が紡糸され、使用された。

**【0005】**

20

非特許文献3は、真菌、アグロサイブ・シリンドラセア (*Agrocybe cylindracea*) からのポリ-1,3-グルカンのアルカリ性抽出及び単離を開示したが、それはカルボキシメチルグルカン(CMG)ナトリウムにさらに誘導体化された。このエーテル誘導体は、肉腫に対する抗腫瘍特性を示した。同様に、Zhangら(特許文献2)は、医薬用真菌、ガノデルマ・ルキドウム (*Ganoderma lucidum*) からのポリ-1,3-グルカンの抽出及びCMGへのその誘導体化を記載した。

**【0006】**

新しいポリ-1,3-グルカンエーテル誘導体の開発及びそのような誘導体を調製する方法は、種々の用途におけるそれらの潜在的な有用性を仮定すると望ましい。

**【先行技術文献】**

30

**【特許文献】****【0007】**

【特許文献1】米国特許第7,000,000号明細書

【特許文献2】Int'l. Publ. No. CN1283633

**【非特許文献】****【0008】**

【非特許文献1】Simpson et al., *Microbiology* 141: 1451-1460, 1995

【非特許文献2】Ogawa et al., *Fiber Differentiation Methods* 47: 353-362, 1980

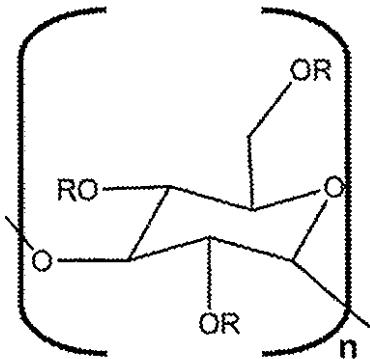
40

【非特許文献3】Kihōら(*Carb. Res.* 189: 273-270, 1989)

**【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、本発明は、以下の構造により表されるポリ-1,3-グルカンエーテル化合物を含む組成物に関する:

【化 1】



10

(式中、

( i )  $n$  は少なくとも 6 であり、

( i i ) 各 R は、独立に、 H 又は有機基であり、且つ

( i i i ) 化合物は、約 0 . 0 5 から約 3 . 0 の置換度を有する)。

【 0 0 1 0 】

第二の実施形態において、有機基は、ヒドロキシアルキル基、アルキル基、又はカルボキシアルキル基である。この実施形態における化合物は、1種類の有機基を有しても、2種類以上の有機基も有してもよい。有機基は、例えば、ヒドロキシプロピル、ジヒドロキシプロピル、ヒドロキシエチル、メチル、エチル、又はカルボキシメチル基でよい。第三の実施形態において、化合物は1種類の有機基を含むが、化合物は第四の実施形態において2種類以上の有機基を含む。

20

[ 0 0 1 1 ]

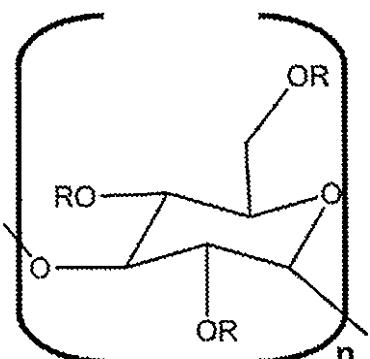
第五の実施形態において、ポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物の置換度は約 0 . 2 から約 2 . 0 である。

[ 0 0 1 2 ]

第六の実施形態において、本発明は、ポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物を製造する方法に関する。この方法は、ポリ - 1 , 3 - グルカンを、アルカリ条件下での反応物中で、有機基を含む少なくとも 1 種類のエーテル化剤と接触させることを含む。エーテル化剤は、この接触工程において、ポリ - 1 , 3 - グルカンにエーテル化され、それににより、以下の構造により表されるポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物を生み出す：

30

【化2】



40

(式中、

( i )  $n$  は少なくとも 6 であり、

( i i ) 各 R は、独立に H 又は有機基であり、且つ

( i i i ) 化合物は、約 0 . 05 から約 3 . 0 の置換度を有する)。この方法により製造

50

されたポリ - 1 , 3 - グルカンエーテルは、任意選択で単離できる。

【0013】

第七の実施形態において、反応のアルカリ条件は、アルカリ水酸化物溶液を含む。

【0014】

第八の実施形態において、反応は有機溶媒を含む。有機溶媒は、第九の実施形態においてイソプロパノールである。

【0015】

第十の実施形態において、本方法の接触工程は、反応物を加熱すること、及び／又は反応物のpHを中性化することをさらに含む。

【0016】

本方法の第十一の実施形態において、有機基は、ヒドロキシアルキル基、アルキル基、又はカルボキシアルキル基である。この実施形態における化合物は、1種類の有機基を有しても、2種類以上の有機基を有してもよい。

【0017】

第十二の実施形態において、本方法に使用されるポリ - 1 , 3 - グルカンは、スラリーの形態である。スラリーは、本方法の第十三の実施形態において、ポリ - 1 , 3 - グルカン、スクロース、グルコース、フルクトース、及びグルコシルトランスフェラーゼ酵素を含む。

【0018】

第十四の実施形態において、本方法に使用されるポリ - 1 , 3 - グルカンは、ウェットケーキの形態である。

【発明を実施するための形態】

【0019】

本明細書に引用される特許文献及び非特許文献の全ての開示は、引用によりその全体として本明細書に組み込まれる。

【0020】

本明細書では、用語「発明」又は「開示された発明」は、限定的なものではなく、請求項に定義され、又は本明細書に記載される本発明のいずれにも全般的に当てはまる。これらの用語は、本明細書において互換的に使用される。

【0021】

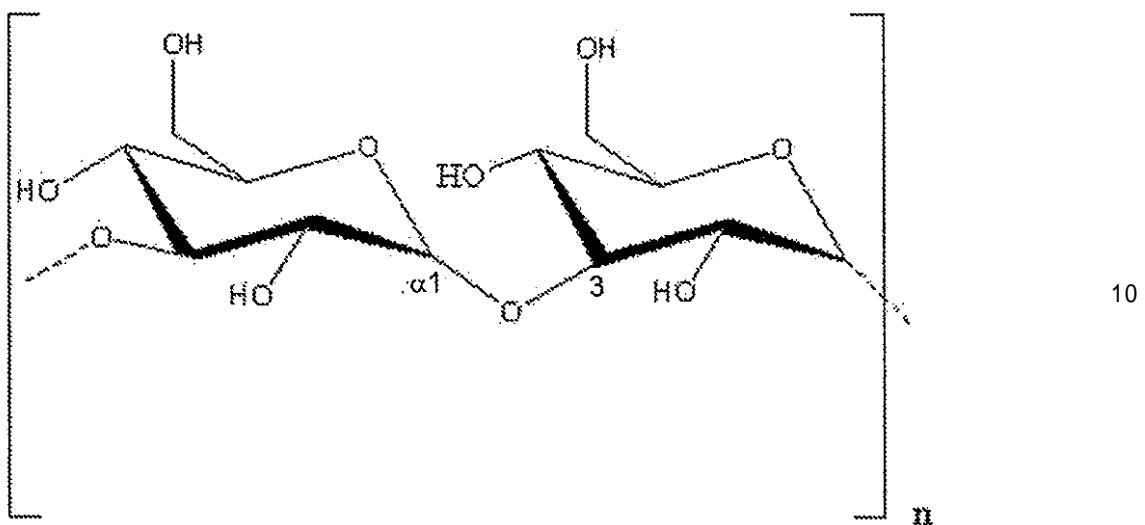
用語「ポリ - 1 , 3 - グルカン」、「 - 1 , 3 - グルカンポリマー」、及び「グルカンポリマー」は、本明細書において互換的に使用される。ポリ - 1 , 3 - グルカンは、グリコシド連結により互いに結合しているグルコースモノマー単位を含むポリマーであって、少なくとも約50%のグリコシド連結が - 1 , 3 - グリコシド連結であるポリマーである。ポリ - 1 , 3 - グルカンは、多糖の1種である。ポリ - 1 , 3 - グルカンの構造は、以下の通り表すことができる。

10

20

30

## 【化3】



## 【0022】

本明細書においてポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物の調製に利用できるポリ - 1 , 3 - グルカンは、化学的方法を利用して調製できる。或いは、それは、ポリ - 1 , 3 - グルカンを產生する真菌などの種々の生物からの抽出により調製できる。さらに別法としては、例えば、米国特許第 7 , 0 0 0 , 0 0 0 号明細書並びに米国特許出願公開第 2 0 1 3 / 0 2 4 4 2 8 8 号明細書及び同第 2 0 1 3 / 0 2 4 4 2 8 7 号明細書（全て引用により本明細書に組み込まれる）に記載の通り、ポリ - 1 , 3 - グルカンは、1 種以上のグルコシルトランスフェラーゼ（g t f）酵素（例えば、g t f J）を利用してスクロースから酵素的に製造できる。

## 【0023】

用語「グルコシルトランスフェラーゼ酵素」、「g t f 酵素」、「g t f 酵素触媒」、「g t f」、及び「グルカンスクラーゼ」は、本明細書において互換的に使用される。本明細書での g t f 酵素の活性は、基質であるスクロースの反応を触媒して、生成物であるポリ - 1 , 3 - グルカン及びフルクトースを生み出す。g t f 反応の他の生成物（副生成物）は、グルコース（グルコースが、グルコシル - g t f 酵素中間複合体から加水分解される場合）、種々の可溶性オリゴ糖（D P 2 - D P 7 ）、及びロイクロース（グルコシル - g t f 酵素中間複合体のグルコースがフルクトースに結合している場合）を含み得る。ロイクロースは、 - 1 , 5 連結により結合しているグルコースとフルクトースから構成される二糖である。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、及びグルカン結合ドメインを含む。本明細書での g t f は、C A Z y (Carbohydrate - Active Enzymes) データベース（Cantarel et al., Nucleic Acids Res. 37 : D233 - 238, 2009）に従って、グリコシドヒドロラーゼファミリー 70 (GH70) に分類される。

## 【0024】

本明細書においてポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物を調製するのに使用されるポリ - 1 , 3 - グルカンのグルコースモノマー単位の間の、 - 1 , 3 であるグリコシド連結のパーセンテージは、少なくとも約 50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 %（又は 50 % と 100 % の間の任意の整数値）である。したがって、そのような実施形態において、ポリ - 1 , 3 - グルカンは、約 50 % 未満、40 %、30 %、20 %、10 %、5 %、4 %、3 %、2 %、1 %、又は 0 %（又は 0 % と 50 % の間の任意の整数値）の - 1 , 3 でないグリコシド連結を有する。

## 【0025】

本明細書でのポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物を製造するのに使用されるポリ - 1 , 3 - グルカンは、好ましくは直鎖 / 非分岐型である。特定の実施形態において、ポリ - 1 , 3 - グルカンは、分岐点が全くないか、又は、ポリマー中のグリコシド連結のパーセントとして約 10 % 未満、9 %、8 %、7 %、6 %、5 %、4 %、3 %、2 %、若しくは 1 % の分岐点を有する。分岐点の例には、ムタンポリマーに存在するものなどの - 1 , 6 分岐点がある。

## 【0026】

用語「グリコシド連結」及び「グリコシド結合」は本明細書において互換的に使用され、炭水化物（糖）分子を、別な炭水化物などの別な基に結合させる共有結合の種類を指す。本明細書での用語「 - 1 , 3 - グリコシド連結」は、 - D - グルコース分子を、隣接する - D - グルコース環の炭素 1 及び 3 を介して互いに結合させる共有結合の種類を指す。この連結は、先に与えられたポリ - 1 , 3 - グルカン構造中に示されている。本明細書では、「 - D - グルコース」は、「グルコース」と称される。

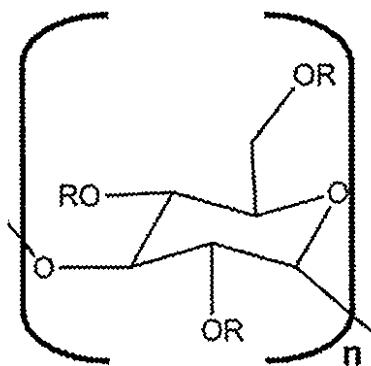
10

## 【0027】

用語「ポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物」、「ポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル」、及び「ポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル誘導体」は本明細書において互換的に使用される。本明細書でのポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物は、以下の構造により表すことができる。

## 【化4】

20



30

この構造の式に関して、n は少なくとも 6 でよく、各 R は、独立に、水素原子 (H) でも、有機基でもよい。本明細書でのポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物は、約 0 . 0 5 から約 3 . 0 の置換度を有する。

## 【0028】

ポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物は、基礎構造 - C<sub>G</sub> - O - C - を含むことに基づいて、本明細書において「エーテル」と呼ばれるが、「 - C<sub>G</sub> - 」はポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物のグルコースモノマー単位の炭素 2、4、又は 6 を表し、「 - C - 」は有機基に含まれる。

40

## 【0029】

本明細書に開示されるポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物は、合成の人工化合物である。

## 【0030】

本明細書での「有機基」基は、(i) 式 - C<sub>n</sub>H<sub>2n+1</sub> (すなわち、完全に飽和しているアルキル基) を有するか、又は (ii) ほとんど飽和しているが、別な原子若しくは官能基により置換された 1 つ以上の水素を有する (すなわち、「置換されたアルキル基」) 1 つ以上の炭素の鎖を指す。そのような置換は、1 つ以上のヒドロキシリル基、酸素原子 (それにより、アルデヒド又はケトン基を形成する)、カルボキシリル基、又は他のアルキル基によることがある。換言すると、R が有機基である場合、R は、1 つ以上の飽和炭素の鎖

50

でも、ヒドロキシル基、酸素原子（それにより、アルデヒド又はケトン基を形成する）、カルボキシル基、又はアルキル基により置換された1つ以上の水素を有する炭素の鎖でもよい。

#### 【0031】

本明細書での「ヒドロキシアルキル」基は、アルキル基の1つ以上の水素原子がヒドロキシル基により置換されている、置換されたアルキル基を指す。本明細書での「カルボキシアルキル」基は、アルキル基の1つ以上の水素原子がカルボキシル基により置換されている、置換されたアルキル基を指す。

#### 【0032】

本明細書での「ハライド」は、1つ以上のハロゲン原子（例えば、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素）を含む化合物を指す。本明細書でのハライドは、フルオリド、クロリド、ブロミド、又はヨージドなど1つ以上のハライド基を含む化合物を指すことがある。ハライド基は、エーテル化剤の反応性基として作用し得る。10

#### 【0033】

用語「反応物」、「反応組成物」、及び「エーテル化反応物」は本明細書において互換的に使用され、少なくともポリ - 1 , 3 - グルカン及びエーテル化剤を含む反応物を指す。これらの成分は、典型的には、アルカリ水酸化物水溶液に溶解及び／又は混合される。反応物は、エーテル化剤が、ポリ - 1 , 3 - グルカンのグルコース単位の1つ以上のヒドロキシル基を有機基によりエーテル化するのに好適な条件（例えば、時間、温度）下に置かれ、それによりポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物が生じる。20

#### 【0034】

本明細書での用語「アルカリ条件」は、少なくとも11又は12の溶液又は混合物のpHを指す。アルカリ条件は、アルカリ水酸化物を溶液又は混合物に溶解させるなど、当技術分野に公知であるどのような手段によっても調製できる。

#### 【0035】

用語「エーテル化剤」及び「アルキル化剤」は本明細書において互換的に使用される。本明細書でのエーテル化剤は、ポリ - 1 , 3 - グルカンのグルコース単位の1つ以上のヒドロキシル基を有機基によりエーテル化するのに使用できる作用剤を指す。そのため、エーテル化剤は有機基を含む。

#### 【0036】

本明細書での用語「ポリ - 1 , 3 - グルカンスラリー」は、グルコシルトランスフェラーゼ酵素反応物の成分、例えば、ポリ - 1 , 3 - グルカン、スクロース、1種以上のグルコシルトランスフェラーゼ酵素、グルコース、及びフルクトースを含む水性混合物を指す。30

#### 【0037】

本明細書での用語「ポリ - 1 , 3 - グルカンウェットケーキ」は、スラリーから分離され水又は水溶液で洗浄されたポリ - 1 , 3 - グルカンを指す。ウェットケーキを調製する場合、ポリ - 1 , 3 - グルカンは乾燥されない。

#### 【0038】

本明細書での用語「置換度」(D o S)は、ポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物の各モノマー単位(グルコース)中で置換されたヒドロキシル基の平均数を指す。ポリ - 1 , 3 - グルカンの各モノマー単位には3つのヒドロキシル基があるため、本明細書でのポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物の置換度は3以下になり得る。40

#### 【0039】

本明細書での用語「モル置換数」(M . S .)は、ポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物のモノマー単位当たりの有機基のモル数を指す。或いは、M . S . は、ポリ - 1 , 3 - グルカン中の各モノマー単位との反応に使用されるエーテル化剤の平均モル数を指すことがある（そのため、M . S . は、エーテル化剤の誘導体化の程度を説明することがある）。ポリ - 1 , 3 - グルカンのM . S . 値が上限値を有し得ないことに留意される。例えば、ヒドロキシル基を含む有機基（例えば、ヒドロキシエチル又はヒドロキシプロ

ピル)がポリ-1,3-グルカンにエーテル化された場合、有機基のヒドロキシル基はさらに反応を受けて、さらなる有機基をポリ-1,3-グルカンに結合させことがある。

#### 【0040】

本明細書での「接触させること」は、例えば、溶解、混合、振とう、又は均質化など、当技術分野に公知であるどのような手段によっても実施できる。

#### 【0041】

本明細書でのポリ-1,3-グルカン及びポリ-1,3-グルカンエーテル化合物の「分子量」は、数平均分子量( $M_n$ )としても、重量平均分子量( $M_w$ )としても表すことができる。或いは、分子量は、ダルトン、グラム/モル、D P w(重量平均重合度)、又はD P n(数平均重合度)としても表すことができる。これらの分子量測定値を計算するために、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)、又はゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)などの様々な手段が当技術分野に公知である。10

#### 【0042】

用語「体積によるパーセント」、「体積パーセント」、「v o l %」、及び「v / v %」は本明細書において互換的に使用される。溶液中の溶質の体積によるパーセントは、式:[(溶質の体積)/(溶液の体積)] × 100%を利用して決定できる。

#### 【0043】

用語「重量によるパーセント」、「重量パーセンテージ(w t %)」、及び「重量-重量パーセンテージ(% w / w)」は本明細書において互換的に使用される。重量によるパーセントは、組成物、混合物、又は溶液中に含まれる質量基準の物質のパーセンテージを指す。20

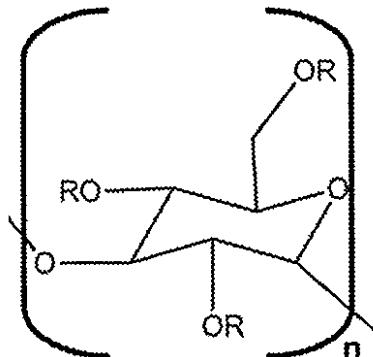
#### 【0044】

用語「増加した」、「増大した」、及び「向上した」は本明細書において互換的に使用される。これらの用語は、元の量若しくは活性よりもわずかに多い量若しくは活性、又は、元の量若しくは活性に比べて大過剰である量若しくは活性など、及びその間の全ての量若しくは活性を含む、より多くの量又は活性を指す。或いは、これらの用語は、例えば、増加した量又は活性が比較される量又は活性より、少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、125%、150%、175%、又は200%(又は1%と200%の間の任意の整数)多い量又は活性を指すことがある。30

#### 【0045】

開示された発明の実施形態は、以下の構造により表されるポリ-1,3-グルカンエーテル化合物を含む組成物に関する。

#### 【化5】



この構造の式に関して、nは少なくとも6でよく、各Rは、独立に、Hでも、有機基でもよい。さらに、ポリ-1,3-グルカンエーテル化合物は、約0.05から約3.0の50

置換度を有する。重要なことには、本明細書でのポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物は、ポリ - 1 , 3 - グルカンのアルキルエーテル及び / 又はヒドロキシアルキルエーテル誘導体でよい。

#### 【 0 0 4 6 】

本明細書に開示されるポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物の置換度 (D o S) は、或いは、約 0 . 2 から約 2 . 0 でよい。さらに或いは、D o S は、少なくとも約 0 . 2 、 0 . 3 、 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 、 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 、 又は 3 . 0 でよい。本明細書に開示されるポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物が約 0 . 0 5 から約 3 . 0 の置換度を有し、エーテルであることから、化合物の R 基が水素のみではあり得ないことが当業者には理解されるだろう。 10

#### 【 0 0 4 7 】

ポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物のグルコースモノマー単位の間の、 - 1 , 3 であるグリコシド連結のパーセンテージは、少なくとも約 5 0 % 、 6 0 % 、 7 0 % 、 8 0 % 、 9 0 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 、 又は 1 0 0 % (又は 5 0 % と 1 0 0 % の間の任意の整数) である。したがって、そのような実施形態において、化合物は、約 5 0 % 未満、 4 0 % 、 3 0 % 、 2 0 % 、 1 0 % 、 5 % 、 4 % 、 3 % 、 2 % 、 1 % 、 又は 0 % (又は 0 % と 5 0 % の間の任意の整数値) の - 1 , 3 でないグリコシド連結を有する。 20

#### 【 0 0 4 8 】

本明細書に開示されるポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物の骨格は、好ましくは直鎖 / 非分岐型である。特定の実施形態において、化合物は、分岐点を全く持たないか、又は、ポリマー中のグリコシド連結のパーセントとして約 1 0 % 未満、 9 % 、 8 % 、 7 % 、 6 % 、 5 % 、 4 % 、 3 % 、 2 % 、 若しくは 1 % の分岐点を有する。分岐点の例には、 - 1 , 6 分岐点がある。

#### 【 0 0 4 9 】

特定の実施形態におけるポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物の式は、少なくとも 6 の n 値を有し得る。或いは、n は、少なくとも 1 0 、 5 0 、 1 0 0 、 2 0 0 、 3 0 0 、 4 0 0 、 5 0 0 、 6 0 0 、 7 0 0 、 8 0 0 、 9 0 0 、 1 0 0 0 、 1 1 0 0 、 1 2 0 0 、 1 3 0 0 、 1 4 0 0 、 1 5 0 0 、 1 6 0 0 、 1 7 0 0 、 1 8 0 0 、 1 9 0 0 、 2 0 0 0 、 2 1 0 0 、 2 2 0 0 、 2 3 0 0 、 2 4 0 0 、 2 5 0 0 、 2 6 0 0 、 2 7 0 0 、 2 8 0 0 、 2 9 0 0 、 3 0 0 0 、 3 1 0 0 、 3 2 0 0 、 3 3 0 0 、 3 4 0 0 、 3 5 0 0 、 3 6 0 0 、 3 7 0 0 、 3 8 0 0 、 3 9 0 0 、 又は 4 0 0 0 (又は、 1 0 と 4 0 0 0 の間の任意の整数) の値を有し得る。 30

#### 【 0 0 5 0 】

本明細書に開示されるポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物の分子量は、数平均分子量 (M<sub>n</sub>) としても、重量平均分子量 (M<sub>w</sub>) としても測定できる。或いは、分子量は、ダルトン又はグラム / モルで測定できる。化合物のポリ - 1 , 3 - グルカンポリマー成分の D P<sub>w</sub> (重量平均重合度) 又は D P<sub>n</sub> (数平均重合度) に言及することが有用なこともある。 40

#### 【 0 0 5 1 】

本明細書に開示されるポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物の M<sub>n</sub> 又は M<sub>w</sub> は、少な  
くとも約 1 0 0 0 になり得る。或いは、M<sub>n</sub> 又は M<sub>w</sub> は、少なくとも約 1 0 0 0 から約 6 0 0 0 0 0 になり得る。さらに或いは、M<sub>n</sub> 又は M<sub>w</sub> は、例えば、少なくとも約 1 0 0 0 0 、 2 5 0 0 0 、 5 0 0 0 0 、 7 5 0 0 0 、 1 0 0 0 0 0 、 1 5 0 0 0 0 、 2 0 0 0 0 0 、 2 5 0 0 0 0 、 3 0 0 0 0 0 、 3 5 0 0 0 0 、 4 0 0 0 0 0 、 4 5 0 0 0 0 、 5 0 0 0 0 0 、 5 5 0 0 0 0 、 又は 6 0 0 0 0 0 (又は 1 0 0 0 0 と 6 0 0 0 0 0 の間の任意の整数) になり得る。

#### 【 0 0 5 2 】

10

20

30

40

50

ポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物の式における各 R 基は、独立に、 H でも有機基でもよい。有機基は、例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチル、ヘキシリル、ヘプチル、オクチル、ノニル、又はデシル基などのアルキル基でよい。

#### 【 0 0 5 3 】

或いは、有機基は、アルキル基の 1 つ以上の炭素に置換がある、置換されたアルキル基でよい。置換は、 1 つ以上のヒドロキシリル、アルデヒド、ケトン、及び / 又はカルボキシリル基でよい。例えば、置換されたアルキル基は、ヒドロキシアルキル基、ジヒドロキシアルキル基、又はカルボキシアルキル基でよい。

#### 【 0 0 5 4 】

好適なヒドロキシアルキル基の例は、ヒドロキシメチル ( - CH<sub>2</sub>OH ) 、ヒドロキシエチル ( 例えは、 - CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH 、 - CH(OH)CH<sub>3</sub> ) 、ヒドロキシプロピル ( 例えは、 - CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH 、 - CH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>3</sub> 、 - CH(OH)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> ) 、ヒドロキシブチル、及びヒドロキシペンチル基である。他の例には、ジヒドロキシメチル、ジヒドロキシエチル ( 例えは、 - CH(OH)CH<sub>2</sub>OH ) 、ジヒドロキシプロピル ( 例えは、 - CH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>2</sub>OH 、 - CH(OH)CH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>3</sub> ) 、ジヒドロキシブチル、及びジヒドロキシペンチル基などのジヒドロキシアルキル基 ( ジオール ) がある。

#### 【 0 0 5 5 】

好適なカルボキシアルキル基の例は、カルボキシメチル ( - CH<sub>2</sub>COOH ) 、カルボキシエチル ( 例えは、 - CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH 、 - CH(COOH)CH<sub>3</sub> ) 、カルボキシプロピル ( 例えは、 - CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH 、 - CH<sub>2</sub>CH(COOH)CH<sub>3</sub> 、 - CH(COOH)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> ) 、カルボキシブチル、及びカルボキシペンチル基である。

#### 【 0 0 5 6 】

さらに或いは、アルキル基の 1 つ以上の炭素は、別なアルキル基による置換を有し得る。そのような置換できるアルキル基の例は、メチル、エチル、及びプロピル基である。説明すると、 R 基は、例えは - CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> 又は - CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>3</sub> でよく、どちらもメチル置換を有するプロピル基である。

#### 【 0 0 5 7 】

種々の置換されたアルキル基の上記の例から明らかなはずであるとおり、特定の実施形態におけるアルキル基上の置換 ( 例えは、ヒドロキシ又はカルボキシ基 ) は、アルキル基の末端炭素原子に結合することがあり、末端炭素基は、上記式中のグルコース基へのエーテル連結中にある末端の反対にある。この末端置換の例は、ヒドロキシプロピル基 - CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH である。或いは、置換は、アルキル基の内部炭素原子上でよい。内部置換の例は、ヒドロキシプロピル基 - CH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>3</sub> である。アルキル基は 1 つ以上の置換を有してよく、それらは同じでも ( 例えは、 2 つのヒドロキシリル基 [ ジヒドロキシ ] ) 、異なっていてもよい ( 例えは、ヒドロキシリル基とカルボキシリル基 ) 。

#### 【 0 0 5 8 】

本明細書に開示される特定の実施形態におけるポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物は、 1 種類の有機基を含み得る。例えは、上記式中のグルコース基にエーテル結合した 1 つ以上の R 基は、メチル基でよい。そのため、この特定の例における R 基は、独立に、水素及びメチル基であろう。 1 種類の有機基のみを含むポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物の特定の実施形態は、カルボキシアルキル基 ( 例えは、カルボキシメチル基 ) を、有機基として有さない。

#### 【 0 0 5 9 】

或いは、本明細書に開示されるポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物は、 2 つ以上の異なる種類の有機基を有し得る。そのような化合物の例は、( i ) R 基として、 2 種の異なるアルキル基、( ii ) R 基として、アルキル基及びヒドロキシアルキル基 ( 総称すると、アルキルヒドロキシアルキルポリ - 1 , 3 - グルカン ) 、( iii ) R 基として、アルキル基及びカルボキシアルキル基 ( 総称すると、アルキルカルボキシアルキルポリ - 1 , 3 - グルカン ) 、( iv ) R 基として、ヒドロキシアルキル基及びカルボキシア

10

20

30

40

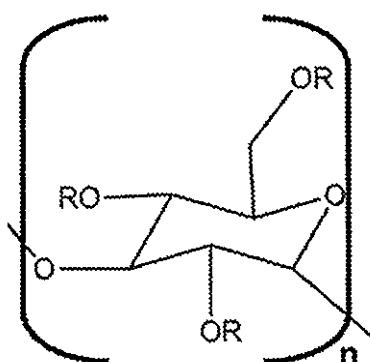
50

ルキル基（総称すると、ヒドロキシアルキルカルボキシアルキルポリ - 1 , 3 - グルカン）、(v) R 基として、2種の異なるヒドロキシアルキル基、又は(vi) R 基として、2種の異なるカルボキシアルキル基を含む。そのような化合物の具体的な非限定的な例には、エチルヒドロキシエチルポリ - 1 , 3 - グルカン（すなわち、R 基が、独立に、H、エチル、又はヒドロキシエチルである場合）、ヒドロキシアルキルメチルポリ - 1 , 3 - グルカン（すなわち、R 基が、独立に、H、ヒドロキシアルキル、又はメチルである場合）、カルボキシメチルヒドロキシエチルポリ - 1 , 3 - グルカン（すなわち、R 基が、独立に、H、カルボキシメチル、又はヒドロキシエチルである場合）、及びカルボキシメチルヒドロキシプロピルポリ - 1 , 3 - グルカン（すなわち、R 基が、独立に、H、カルボキシメチル、又はヒドロキシプロピルである場合）がある。2つ以上の異なる種類の有機基を含むポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物の特定の実施形態は、カルボキシアルキル基（例えば、カルボキシメチル基）を、有機基の1つとして有さない。  
10

## 【0060】

開示された発明は、ポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物を製造する方法にも関する。この方法は、ポリ - 1 , 3 - グルカンを、アルカリ条件下での反応物中で、有機基を含む少なくとも1種のエーテル化剤と接触させることを含み、エーテル化剤は、ポリ - 1 , 3 - グルカンにエーテル化されて、それにより、以下の構造により表されるポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物を生み出す：

## 【化6】



20

30

(式中、

(i) n は少なくとも6であり、

(ii) 各 R は、独立に、H 又は有機基であり、且つ

(iii) 化合物は、約0.05から約3.0の置換度を有する）。この方法により製造されたポリ - 1 , 3 - グルカンエーテルは、任意選択で単離できる。

## 【0061】

ポリ - 1 , 3 - グルカンは、アルカリ条件下の反応物中で、有機基を含む少なくとも1種のエーテル化剤と接触されられる。この工程は、例えば、最初に、ポリ - 1 , 3 - グルカンを、溶媒及び1種以上のアルカリ水酸化物と接触させて溶液又は混合物を与えることにより、アルカリ条件を準備することにより実施できる。そのため、反応のアルカリ条件は、アルカリ水酸化物溶液を含む。アルカリ条件の pH は、少なくとも約11.0、11.2、11.4、11.6、11.8、12.0、12.2、12.4、12.6、12.8、又は13.0であり得る。  
40

## 【0062】

水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化カルシウム、水酸化リチウム、及び / 又は水酸化テトラエチルアンモニウムなど、様々なアルカリ水酸化物を使用できる。ポリ - 1 , 3 - グルカン及び溶媒を含む調合物中のアルカリ水酸化物の濃度は、約1~70wt%、5~50wt%、10~50wt%、10~40wt%、又は10~30wt%（又は1と70wt%の間の任意の整数）になり得る。或いは、水酸化ナトリウムなどのアル  
50

カリ水酸化物の濃度は、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、又は30wt%になり得る。アルカリ条件を準備するために使用されるアルカリ水酸化物は、完全な水溶液中でも、エタノール又はイソプロパノールなどの1種以上の水溶性有機溶媒を含む水溶液中でもよい。或いは、アルカリ水酸化物を固体として加えて、アルカリ条件を与えることができる。

#### 【0063】

反応物を調製する際に任意選択で含まれてよい様々な有機溶媒には、例えば、アルコール、アセトン、ジオキサン、イソプロパノール及びトルエンがある。これらの溶媒はいずれも、ポリ-1,3-グルカンを溶解しない。トルエン又はイソプロパノールを、特定の実施形態において使用できる。有機溶媒を加えるのは、アルカリ水酸化物の添加の前でも後でもよい。ポリ-1,3-グルカン及びアルカリ水酸化物を含む調合物中の有機溶媒（例えば、イソプロパノール又はトルエン）の濃度は、少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、又は90wt%（又は10と90wt%の間の任意の整数）になり得る。10

#### 【0064】

或いは、ポリ-1,3-グルカンを溶解できる溶媒を、反応物調製の際に使用できる。これらの溶媒には、塩化リチウム(LiCl)/N,N-ジメチル-アセトアミド(DMAc)、SO<sub>2</sub>/ジエチルアミン(DEA)/ジメチルスルホキシド(DMSO)、LiCl/1,3-ジメチル-2-イミダゾリジノン(DMI)、N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)/N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>、DMSO/テトラブチル-アンモニウムフルオリド三水和物(TBAF)、N-メチルモルホリン-N-オキシド(NMMO)、Ni(トレン)(OH)<sub>2</sub>[トレン1/4トリス(2-アミノエチル)アミン]水溶液及びLiClO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>Oのメルト、NaOH/尿素水溶液、水酸化ナトリウム水溶液、水酸化カリウム水溶液、ギ酸、及びイオン液体があるが、これらに限定されない。20

#### 【0065】

ポリ-1,3-グルカンを、混合により、溶媒及び1種以上のアルカリ水酸化物と接触させることができる。そのような混合は、これらの成分を互いに加える間にでも、その後にでも実施できる。混合は、例えば、手作業の混合、オーバーヘッドミキサーを使用する混合、磁気攪拌子を使用する混合、又は振とうにより実施できる。特定の実施形態において、ポリ-1,3-グルカンを、溶媒及び/又はアルカリ水酸化物との混合の前に、最初に水又は水溶液に混合できる。30

#### 【0066】

ポリ-1,3-グルカン、溶媒、及び1種以上のアルカリ水酸化物を互いに接触させた後、生じた組成物を、任意選択で、周囲温度で、最長14日間保つことができる。本明細書での用語「周囲温度」は、約15~30又は20~25（又は15と30の間の任意の整数）の温度を指す。或いは、組成物を、還流あり又は還流なしで、約30から約150（又は30と150の間の任意の整数）の温度で、最長約48時間加熱することができる。特定の実施形態における組成物は、約55で約30分間又は60分間加熱できる。このように、ポリ-1,3-グルカン、溶媒、及び1種以上のアルカリ水酸化物を互いに混合して得られた組成物は、約50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、又は60で、約30~90分間加熱できる。40

#### 【0067】

ポリ-1,3-グルカン、溶媒、及び1種以上のアルカリ水酸化物を互いに接触させた後、生じた組成物を、（温度処理工程を適用して、又は適用せずに）任意選択で濾過できる。そのような濾過は、漏斗、遠心分離機、プレスフィルター、又は当技術分野に公知である、固体から液体を除去できる任意の他の方法及び/若しくは装置を利用して実施できる。濾過はアルカリ水酸化物の多くを除去するだろうが、濾過されたポリ-1,3-グルカンはアルカリ性のままであり（すなわち苛性処理されたポリ-1,3-グルカン）、それによりアルカリ条件を与えるだろう。50

## 【0068】

有機基を含むエーテル化剤を、ポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物を製造する本明細書での方法において、アルカリ条件下での反応物においてポリ - 1 , 3 - グルカンと接触させる。例えば、エーテル化剤は、上述の通りポリ - 1 , 3 - グルカン、溶媒、及び 1 種以上のアルカリ水酸化物を互いに接触させて調製された組成物に加えることができる。或いは、エーテル化剤を、アルカリ条件を準備する時に含めることができる（例えば、エーテル化剤を、アルカリ水酸化物との混合の前にポリ - 1 , 3 - グルカン及び溶媒と混合できる）。

## 【0069】

本明細書でのエーテル化剤は、ポリ - 1 , 3 - グルカンのグルコース単位の 1 つ以上のヒドロキシル基を、先に定義された有機基でエーテル化するのに使用できる作用剤を指す。そのような有機基の例には、アルキル基、ヒドロキシアルキル基、及びカルボキシアルキル基がある。1 種以上のエーテル化剤を反応物に使用できる。

10

## 【0070】

アルキルポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物の調製に好適なエーテル化剤には、例えば、硫酸ジアルキル、炭酸ジアルキル、ハロゲン化アルキル（例えば、塩化アルキル）、ヨードアルカン、アルキルトリフレート（アルキルトリフルオロメタンスルホネート）、及びアルキルフルオロスルホネートがある。そのため、メチルポリ - 1 , 3 - グルカンエーテルを製造するためのエーテル化剤の例には、硫酸ジメチル、炭酸ジメチル、塩化メチル、ヨードメタン、メチルトリフレート、及びメチルフルオロスルホネートがある。エチルポリ - 1 , 3 - グルカンエーテルを製造するためのエーテル化剤の例には、硫酸ジエチル、炭酸ジエチル、塩化工チル、ヨードエタン、エチルトリフレート、及びエチルフルオロスルホネートがある。プロピルポリ - 1 , 3 - グルカンエーテルを製造するためのエーテル化剤の例には、硫酸ジプロピル、炭酸ジプロピル、塩化プロピル、ヨードプロパン、プロピルトリフレート、及びプロピルフルオロスルホネートがある。ブチルポリ - 1 , 3 - グルカンエーテルを製造するためのエーテル化剤の例には、硫酸ジブチル、炭酸ジブチル、塩化ブチル、ヨードブタン、及びブチルトリフレートがある。

20

## 【0071】

ヒドロキシアルキルポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物を調製するのに好適なエーテル化剤には、例えば、エチレンオキシド、プロピレンオキシド（例えば、1 , 2 - ブロピレンオキシド）、ブチレンオキシド（例えば、1 , 2 - ブチレンオキシド；2 , 3 - ブチレンオキシド；1 , 4 - ブチレンオキシド）、又はこれらの組み合わせなどのアルキレンオキシドがある。例としては、プロピレンオキシドは、ヒドロキシプロピルポリ - 1 , 3 - グルカンを調製するためのエーテル化剤として使用でき、エチレンオキシドは、ヒドロキシエチルポリ - 1 , 3 - グルカンを調製するためのエーテル化剤として使用できる。或いは、ヒドロキシアルキルハライド（例えば、ヒドロキシアルキルクロリド）は、ヒドロキシアルキルポリ - 1 , 3 - グルカンを調製するためのエーテル化剤として使用できる。ヒドロキシアルキルハライドの例には、ヒドロキシエチルハライド、ヒドロキシプロピルハライド（例えば、2 - ヒドロキシプロピルクロリド、3 - ヒドロキシプロピルクロリド）、及びヒドロキシブチルハライドがある。或いは、アルキレンクロロヒドリンを、ヒドロキシアルキルポリ - 1 , 3 - グルカンを調製するためのエーテル化剤として使用できる。使用できるアルキレンクロロヒドリンには、エチレンクロロヒドリン、プロピレンクロロヒドリン、ブチレンクロロヒドリン、又はこれらの組み合わせがあるがこれらに限定されない。

30

## 【0072】

ジヒドロキシアルキルポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物を調製するのに好適なエーテル化剤には、例えば、ジヒドロキシアルキルハライド（例えば、ジヒドロキシアルキルクロリド）、例えば、ジヒドロキシエチルハライド、ジヒドロキシプロピルハライド（例えば、2 , 3 - ジヒドロキシプロピルクロリド [ すなわち 3 - クロロ - 1 , 2 - プロパンジオール ] ）、又はジヒドロキシブチルハライドなどがある。例えば、2 , 3 - ジヒ

40

50

ドロキシプロピルクロリドを使用して、ジヒドロキシプロピルポリ - 1 , 3 - グルカンを調製できる。

【0073】

カルボキシアルキルポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物を調製するのに好適なエーテル化剤は、ハロアルキレート（例えば、クロロアルキレート）を含み得る。ハロアルキレートの例には、ハロアセテート（例えば、クロロアセテート）、3 - ハロプロピオネート（例えば、3 - クロロプロピオネート）、及び4 - ハロブチレート（例えば、4 - クロロブチレート）がある。例えば、クロロアセテート（モノクロロアセテート）（例えば、クロロ酢酸ナトリウム）を、カルボキシメチルポリ - 1 , 3 - グルカンを調製するエーテル化剤として使用できる。

10

【0074】

2つ以上の異なる種類の有機基を有するポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物を製造する場合、それに応じて、2つ以上の異なる種類のエーテル化剤が使用されるだろう。例えば、アルキレンオキシドと塩化アルキルの両方がエーテル化剤として使用されて、アルキルヒドロキシアルキルポリ - 1 , 3 - グルカンエーテルを調製できるだろう。したがって、本明細書に開示されるエーテル化剤のいずれを組み合わせても、2つ以上の異なる種類の有機基を有するポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物を調製できる。そのような2種以上のエーテル化剤を、反応物に同時に使用しても、反応物中に連続的に使用してもよい。連続的に使用される場合、以下に開示される温度処理（例えば、加熱）工程のいずれも、任意選択で、各添加の間に利用できる。各有機基の望ましいDOSを制御するために、エーテル化剤の連続的な導入を選択できる。一般に、あるエーテル化剤がエーテル生成物中に形成する有機基が、加えられる別な有機基のDOSに比べてより高いDOSであることが望ましい場合、その特定のエーテル化剤が最初に使用されるだろう。

20

【0075】

アルカリ条件下での反応物中でポリ - 1 , 3 - グルカンと接触させるべきエーテル化剤の量は、製造されるポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物中で要求される置換度に基づいて決定できる。本明細書で製造されるポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物中の各モノマー単位上のエーテル置換基の量は、核磁気共鳴（NMR）分光法を利用して決定できる。ポリ - 1 , 3 - グルカンのモル置換（MS）値には上限がない。一般に、エーテル化剤は、ポリ - 1 , 3 - グルカンのモルあたり少なくとも約0.05モルの量で使用できる。使用できるエーテル化剤の量に上限はない。

30

【0076】

本明細書でのポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物を製造する反応は、任意選択で、パーリアクター、オートクレーブ、シェーカーチューブなどの圧力容器、又は当技術分野に周知である他の圧力容器で実施できる。シェーカーチューブは、特定の実施形態における反応の実施に使用される。

【0077】

本明細書での反応物は、任意選択で、アルカリ条件下でポリ - 1 , 3 - グルカンをエーテル化剤と接触させる工程の後に加熱できる。反応温度及びそのような温度を適用する時間は、幅広い限度内で変えることができる。例えば、反応物を、任意選択で、周囲温度で最長14日間維持することができる。或いは、反応物を、還流あり又は還流なしで、約25から約200（又は、25と200の間の任意の整数）に加熱できる。反応時間は、それに対応して、低温でより長い時間及び高温でより短い時間など、変えることができる。

40

【0078】

ヒドロキシプロピルポリ - 1 , 3 - グルカンを製造する特定の実施形態において、反応物を、約75に約3時間加熱できる。ヒドロキシエチルポリ - 1 , 3 - グルカンを製造するための反応物を、例えば、約60に約6時間加熱できる。このように、本明細書でのヒドロキシアルキルポリ - 1 , 3 - グルカンを調製するための反応物を、任意選択で、例えば、約55から約80（又は、55と80の間の任意の整数）に、約2

50

時間から約7時間加熱できる。

**【0079】**

メチルポリ - 1 , 3 - グルカンを製造する特定の実施形態において、反応物を、約55又は70に約17時間加熱できる。エチルポリ - 1 , 3 - グルカンを調製するための反応物を、例えば、約90に約17時間加熱できる。このように、本明細書でのアルキルポリ - 1 , 3 - グルカンを調製するための反応混合物を、例えば、約55から約95(又は、55と95の間の任意の整数)に、約15時間から約20時間加熱できる。

**【0080】**

カルボキシメチルポリ - 1 , 3 - グルカンを製造する特定の実施形態において、反応物を、約55に約3時間加熱できる。このように、本明細書でのカルボキシアルキルポリ - 1 , 3 - グルカンを調製するための反応物を、例えば、約50から約60(又は、50と60の間の任意の整数)に、約2時間から約5時間加熱できる。

**【0081】**

ジヒドロキシアルキル(例えば、ジヒドロキシプロピル)ポリ - 1 , 3 - グルカンエーテルを製造する特定の実施形態において、ポリ - 1 , 3 グルカンは、アルカリ水酸化物溶液(例えば、水酸化テトラエチルアンモニウム)(例えば、約20wt%溶液)に、約4、5、6、7、又は8wt%(例えば、約6.5wt%)のポリ - 1 , 3 グルカンの最終濃度又は質量寄与(mass contribution)になるよう加えられる。ポリ - 1 , 3 グルカンを溶解させる加熱/攪拌工程の後で、適切なエーテル化剤(例えば、2,3-ジヒドロキシプロピルクロリドなどのジヒドロキシアルキルクロリド)を、約7、8、9、10、又は11wt%(例えば、約9.5wt%)の最終濃度になるよう加えることができる。生じた反応物を、反応物の中和の前に、例えば、約50から約60(又は、50と60の間の任意の整数、例えば、55)で約1.5~2.5時間(例えば、約2時間)維持できる。水溶性ジヒドロキシアルキルポリ - 1 , 3 - グルカンを、これらの工程を利用することにより製造できる。

**【0082】**

任意選択で、本明細書の反応物を、加熱しながら、又は加熱なしで、不活性ガスの下に維持できる。本明細書では、用語「不活性ガス」は、本明細書での反応物を調製するために開示されたものなど、1組の所与の条件の下で化学反応を受けない気体を指す。

**【0083】**

本明細書に開示される反応物の成分の全てを同時に混合して、所望の反応温度にすることができる、そこで、所望のポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物が形成されるまで、攪拌しながら、又は攪拌なしで前記温度が維持される。或いは、混合された成分を、上述の通り周囲温度のままにすることができる。

**【0084】**

エーテル化の後、反応物のpHを中性化できる。反応物の中和は、1種以上の酸を利用して実施できる。本明細書での用語「中性pH」は、実質的に酸性でも塩基性でもないpH(例えば、約6~8、又は約6.0、6.2、6.4、6.6、6.8、7.0、7.2、7.4、7.6、7.8、若しくは8.0のpH)を指す。この目的に使用できる種々の酸には、硫酸、酢酸、塩化水素酸、硝酸、任意の鉱(無機)酸、任意の有機酸、又はこれらの酸の任意の混合物があるが、これらに限定されない。

**【0085】**

本明細書の反応物中に製造されるポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物を、任意選択で、前記化合物を容易に溶解しない液体で、1回以上洗浄できる。例えば、ポリ - 1 , 3 - グルカンエーテルを、エーテル化合物の溶解度(洗浄には溶解度がないことが望ましい)に応じて、水、アルコール、アセトン、芳香族化合物、又はこれらの組み合わせで洗浄できる。一般に、アルコールなどの有機溶媒を含む溶媒が、ポリ - 1 , 3 - グルカンエーテルの洗浄に好ましい。ポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル生成物を、例えば、メタノール又はエタノールを含む水溶液で、1回以上洗浄できる。例えば、70~95wt

10

20

30

40

50

%エタノールを使用して生成物を洗浄できる。別な実施形態において、ポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル生成物を、メタノール：アセトン（例えば、60 : 40）溶液で洗浄できる。熱水（約95 ~ 100）を、アルキルポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル（例えば、エチルポリ - 1 , 3 - グルカン）及びアルキルヒドロキシアルキルポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル（例えば、エチルヒドロキシエチルポリ - 1 , 3 - グルカン）の洗浄用など、特定の実施形態において使用できる。

#### 【0086】

開示された反応物中で製造されたポリ - 1 , 3 - グルカンエーテルを単離できる。この工程は、中和及び／又は洗浄工程の前又は後に、漏斗、遠心分離機、プレスフィルター、又は当技術分野に公知である、固体から液体を除去できる任意の他の方法若しくは装置を利用して実施できる。例えば、ブフナー漏斗を利用して、ポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル生成物を単離できる。単離されたポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル生成物を、真空乾燥、風乾、又は凍結乾燥などの当技術分野に公知である任意の方法を利用して、乾燥させることができる。10

#### 【0087】

上記のエーテル化反応のいずれも、ポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル生成物をさらなる修飾の出発物質として利用して繰り返すことができる。この手法は、有機基のD o Sを増加させるのに、及び／又は1種以上の異なる有機基をエーテル生成物に付加するのに、好適になり得る。例えば、ジヒドロキシプロピルポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル生成物を、ジヒドロキシプロピル基によるさらなる修飾の基質として使用できる。20

#### 【0088】

ポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル生成物の構造、分子量、及び置換度は、NMR分光法及びサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）など、当技術分野に公知である種々の生理化学的分析を利用して確認できる。

#### 【0089】

本明細書でのポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物を調製するために使用されるポリ - 1 , 3 - グルカンのグルコースモノマー単位の間の、 - 1 , 3 であるグリコシド連結のパーセンテージは、少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%（又は50%と100%の間の任意の整数値）である。したがって、そのような実施形態において、ポリ - 1 , 3 - グルカンは、約50%未満、40%、30%、20%、10%、5%、4%、3%、2%、1%、又は0%（又は0%と50%の間の任意の整数値）の - 1 , 3 でないグリコシド連結を有する。30

#### 【0090】

本明細書でのポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物を調製するために使用されるポリ - 1 , 3 - グルカンは、好ましくは直鎖／非分岐型である。特定の実施形態において、ポリ - 1 , 3 - グルカンは分岐点を全く有さないか、ポリマー中のグリコシド連結のパーセントとして約10%未満、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、又は1%の分岐点を有する。分岐点の例には、 - 1 , 6 分岐点がある。

#### 【0091】

本明細書でのポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物を調製するために使用されるポリ - 1 , 3 - グルカンのM<sub>n</sub>又はM<sub>w</sub>は、少なくとも約500から約300000になり得る。さらに或いは、M<sub>n</sub>又はM<sub>w</sub>は、例えば、少なくとも約10000、25000、50000、75000、100000、125000、150000、175000、200000、225000、250000、275000、又は300000（又は、10000と300000の間の任意の整数）になり得る。40

#### 【0092】

先に開示された通り、本明細書でのポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物を調製するのに使用されるポリ - 1 , 3 - グルカンは、1種以上のグルコシルトランスフェラーゼ(gtf)酵素を利用して、スクロースから酵素的に製造することができる。この酵素50

反応のポリ - 1 , 3 - グルカン生成物を精製してから、開示されたプロセスを利用しそれを使用してエーテルを調製できる。或いは、g t f 反応のポリ - 1 , 3 - グルカン生成物は、ポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物を調製するために、加工をほとんど又は全くせずに使用できる。

#### 【0093】

ポリ - 1 , 3 - グルカンスラリーを、本明細書に開示されるポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物を製造する上記プロセスのいずれにおいても直接使用できる。本明細書では、「ポリ - 1 , 3 - グルカンスラリー」は、g t f 酵素反応物の成分を含む混合物を指す。g t f 酵素反応物は、ポリ - 1 , 3 - グルカン自体に加えて、種々の成分、例えば、スクロース、1種以上のg t f 酵素、グルコース、フルクトース、ロイクロース、緩衝剤、F e r m a S u r e (登録商標)、可溶性オリゴ糖、オリゴ糖プライマー、細菌酵素抽出成分、ホウ酸塩、水酸化ナトリウム、塩化水素酸、細胞溶解物、タンパク質、及び/又は核酸などを含み得る。最小限では、g t f 酵素反応物の成分は、ポリ - 1 , 3 - グルカン自体に加えて、例えば、スクロース、1種以上のg t f 酵素、グルコース、及びフルクトースを含み得る。別な例において、g t f 酵素反応物の成分は、ポリ - 1 , 3 - グルカン自体に加えて、スクロース、1種以上のg t f 酵素、グルコース、フルクトース、ロイクロース、及び可溶性オリゴ糖(及び任意選択で細菌酵素抽出成分)を含み得る。ポリ - 1 , 3 - グルカンが、本明細書に開示されるスラリー中にある場合、精製も洗浄もされていないことが当然明らかだろう。スラリーが、完結したg t f 酵素反応物、又は観測可能な量のポリ - 1 , 3 - グルカンが製造されたg t f 酵素反応物を表すことも明らかであろうが、それは、水性反応環境(例えば、5~7のpHを有する)中で不溶性であるので固体を形成する。ポリ - 1 , 3 - グルカンスラリーは、例えば、全て引用により本明細書に組み込まれる米国特許第7,000,000号明細書又は米国特許出願公開第2013/0244288号明細書及び同第2013/0244287号明細書に開示されるg t f 反応を準備することにより調製できる。ポリ - 1 , 3 - グルカンスラリーを、例えば、カルボキシメチルポリ - 1 , 3 - グルカンなどのカルボキシアルキルポリ - 1 , 3 - グルカンを調製するための反応物に入れることができる。

#### 【0094】

或いは、ポリ - 1 , 3 - グルカンのウェットケーキを、本明細書に開示されるポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物を製造する上記プロセスのいずれにも直接使用できる。本明細書での「ポリ - 1 , 3 - グルカンのウェットケーキ」は、スラリーから分離され(例えば、濾過され)、水又は水溶液で洗浄されたポリ - 1 , 3 - グルカンを意味する。ウェットケーキは、例えば、少なくとも1、2、3、4、5、又はより多い回数洗浄できる。ポリ - 1 , 3 - グルカンは、ウェットケーキを調製する場合には乾燥されない。ウェットケーキは、洗浄されたポリ - 1 , 3 - グルカンによる水の保持を仮定して「ウェット」と称される。

#### 【0095】

ポリ - 1 , 3 - グルカンのウェットケーキは、濾過器又は遠心分離機など、液体から固体を分離する当技術分野に公知である任意の装置を利用して調製できる。例えば、スラリー中のポリ - 1 , 3 - グルカン固体を、濾紙上の濾過網を使用してブフナー漏斗上で回収できる。濾過されたウェットケーキを、1回以上水(例えば、脱イオン水)に再懸濁させ濾過して、スクロース、フルクトース、及びロイクロースなどのスラリーの可溶性成分を除去できる。ウェットケーキを調製する別な例として、スラリーからのポリ - 1 , 3 - グルカン固体を、遠心分離によりペレットして回収し、水(例えば、脱イオン水)に再懸濁させ、さらに1回以上再ペレット化及び再懸濁をすることができる。ポリ - 1 , 3 - グルカンウェットケーキを、カルボキシアルキルポリ - 1 , 3 - グルカン(例えば、カルボキシメチルポリ - 1 , 3 - グルカン)など、本明細書での任意のエーテル化合物を製造する反応物に入れることができる。

#### 【実施例】

#### 【0096】

10

20

30

40

50

開示された発明は、以下の実施例においてさらに定義される。これらの実施例が、本発明の特定の好ましい態様を示すものの、説明のためにのみ与えられることを理解されたい。上記の議論及びこれらの実施例から、当業者は本発明の本質的な特徴を確かめることができ、その趣旨及び範囲から逸脱せずに、本発明の種々の変更及び改良を行って、それを種々の用途及び条件に適合させることができる。

### 【0097】

#### 材料

アセトン、水酸化ナトリウム、酢酸、及びイソプロパノールは、EMD Chemicals (Billerica, MA) から得た。塩化メチル、酢酸、トルエン、硫酸ジメチル、エタノール、及びプロピレンオキシドは、Sigma Aldrich (St. Louis, MO) から得た。メタノール及び2-プロパノールは、BDH Chemicals (Poole Dorset, UK) から得た。

### 【0098】

#### ポリ-1,3-グルカンの調製

ポリ-1,3-グルカンは、gtfJ酵素調製物を利用して、引用により全体として本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2013/0244288号明細書に記載の通り調製した。

### 【0099】

#### ポリ-1,3-グルカンエーテル誘導体のモル置換数を決定するための<sup>1</sup>H核磁気共鳴(NMR)法

およそ30mgのポリ-1,3-グルカンエーテル誘導体を、化学天秤上でバイアルに量り入れた。バイアルを天秤から取り出し、1.0mLの重水をバイアルに加えた。磁気攪拌子をバイアルに加え、混合物を攪拌して固体を懸濁させた。次いで、重水素化硫酸(D<sub>2</sub>O中50%v/v)、1.0mLをバイアルに加え、ポリマーを脱重合し可溶化するために、混合物を90度1時間加熱した。溶液を室温に放冷し、次いで、ガラスピペットを使用して、0.8mL分の溶液を5mmのNMRチューブに移した。定量的な<sup>1</sup>H

NMRスペクトルを、5-mm Autoswitchable Quadプローブを備えたAgilent VNMR S 400 MHz NMR分光計を利用して取得した。スペクトル周波数399.945MHzで、スペクトルウィンドウ6410.3Hz、取得時間3.744秒、パルス間の遅延10秒、及び64パルスを利用して、スペクトルを得た。時間ドメインデータを、0.50Hzの指數関数的乗算(exponentia1 multiplication)を利用して変換した。

### 【0100】

得られたスペクトルの2つの領域：存在する全イソプロピル基の3つのメチルプロトンを表す1.1ppmから1.4ppmの積分；及びグルコース環のアノマープロトンを表す4.7ppmから5.6ppmの積分を、ヒドロキシプロピルポリ-1,3-グルカンのNMR分析のために積分した。イソプロピルメチル領域の積分を3で割って、存在するOCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)O基の測定値を得た。次いで、OCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)O基によるモル置換数を、OCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)O基の測定値を、存在する全グルコース環の測定値(アノマープロトンの積分値)で割ることにより計算した。

### 【0101】

得られたスペクトルの2つの領域を、メチルポリ-1,3-グルカンのNMR分析のために積分した：3.0ppmから4.2ppmの積分は、6つのグルカンプロトンとOCH<sub>3</sub>プロトンを表し、4.6ppmから5.6ppmの積分は、グルコース環のアノマープロトンを表す。この後者の領域の積分を6倍して、他の6つのグルカンプロトンの面積を得た。6つの非アノマーグルカンプロトンの計算された積分を、3.0ppmから4.2ppm領域の積分から引くと、OCH<sub>3</sub>プロトンの積分寄与を得た。この積分値を3.0で割ると、存在するOCH<sub>3</sub>基の測定値を得た。次いで、メチル化の程度を、OCH<sub>3</sub>基の測定値を、存在する全グルコース環の測定値(アノマープロトンの積分値)で割って計算した。

10

20

30

40

50

## 【0102】

カルボキシメチルポリ - 1 , 3 - グルカンの NMR 分析に関して、スペクトル中の線のケミカルシフトを、C<sub>2</sub>O Hに何も置換がない アノマープロトンのシグナルを基準とした。このシグナルは、スペクトルの一一番左の端から第三のピーク群であるはずである。このピーク群の一一番左のシグナルを 5 . 2 2 2 ppm に設定した。言及されたスペクトルの 5 つの領域を積分した： 5 . 4 4 ppm から 4 . 6 0 ppm の積分は、アノマープロトンの全てを表す； 4 . 4 6 ppm から 4 . 4 1 ppm と 4 . 3 6 ppm から 4 . 3 2 ppm の積分は、又は C<sub>1</sub>H OH のいずれかに隣接した C<sub>2</sub> 位でのカルボキシメチル CH<sub>2</sub> 由来のものであった； 4 . 4 1 ppm から 4 . 3 6 ppm の積分は、C<sub>4</sub> 位でのカルボキシメチル CH<sub>2</sub> 由来のものである；並びに、4 . 2 4 ppm から 4 . 1 7 ppm の積分は、C<sub>6</sub> 位でのカルボキシメチル CH<sub>2</sub> 由来のものであった。次いで、2、4、及び 6 位でのカルボキシメチル化の程度を、OCH<sub>2</sub>COOH 基の積分を 2 で割り、次いでそれらの結果をアノマープロトンの全ての積分で割ることにより計算した。全体的な置換度は、3 つの個別の置換度を足すことにより得た。

## 【0103】

## 重合度の決定

重合度 (DP) を、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) により決定した。SEC 分析のため、乾燥したポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル誘導体を、リン酸緩衝食塩水 (PBS) (0 . 0 2 ~ 0 . 2 mg / mL) に溶解させた。利用したクロマトグラフィーシステムは、3 つのオンライン検出器：Waters の示差屈折計 410、Wyatt Technologies (Santa Barbara, CA) のマルチアングル光散乱光度計 Heleos (商標) 8+、及び Wyatt Technologies の示差毛細管粘度計 (differential capillary viscometer) ViscoStar (商標) と接続している、Waters Corporation (Milford, MA) の Alliance (商標) 2695 液体クロマトグラフであった。SEC に使用したカラムは、水溶性ポリマー用の 2 つの Tosoh Haas Bioscience TSK GMPW<sub>XL</sub> g 3 K 及び g 4 K G 3 0 0 0 PW 及び G 4 0 0 0 PW ポリマーカラムであった。移動相は PBS であった。利用したクロマトグラフの条件は、カラム及び検出器区画で 30 、試料及び注入器区画で 30 、0 . 5 mL / 分の流量、及び 100 μL の注入体積であった。データ整理に使用したソフトウェアパッケージは、Wyatt の Astra バージョン 6 であった (カラム較正のついた三重検出法 (triple detection method))。

## 【0104】

## 実施例 1

## ヒドロキシプロピルポリ - 1 , 3 - グルカンの調製

この実施例は、グルカンエーテル誘導体、ヒドロキシプロピルポリ - 1 , 3 - グルカンの製造を説明する。

## 【0105】

10 g のポリ - 1 , 3 - グルカン (数平均分子量 [M<sub>n</sub>] = 71127) を、101 g のトルエン及び 5 mL の 20 % 水酸化ナトリウムと混合した。この調製物を、磁気攪拌プレート上の 500 mL ガラスビーカー内で、55 度で 30 分間攪拌した。次いで、調合物を、シェーカーチューブリアクターに移し、その後 34 g のプロピレンオキシドを加えた。次いで、反応物を、75 度で 3 時間攪拌した。次いで、反応物を 20 g の酢酸で中和し、このように形成されたヒドロキシプロピルポリ - 1 , 3 - グルカン固体を、ブナ漏斗で濾過した。次いで、固体を、ビーカー内で、70 % エタノールで洗浄し、一定の乾燥状態が得られるまで、わずかな窒素ブリードと共に真空オープン中で乾燥させた。乾燥した生成物のモル置換数 (MS) は、NMR により 3 . 8 9 であると報告された。

## 【0106】

このように、グルカンエーテル誘導体、ヒドロキシプロピルポリ - 1 , 3 - グルカンを調製し、単離した。

10

20

30

40

50

## 【0107】

## 実施例2

## ヒドロキシエチルポリ-1,3-グルカンの調製

この実施例は、グルカンエーテル誘導体、ヒドロキシエチルポリ-1,3-グルカンの製造を説明する。

## 【0108】

10 g のポリ-1,3-グルカン ( $M_n = 71127$ ) を、150 mL のイソプロパノール及び40 mL の30%水酸化ナトリウムと混合した。この調合物を、磁気攪拌プレート上の500 mL ガラスビーカー中で、55度で1時間攪拌し、次いで、周囲温度で一晩攪拌した。次いで、調合物をシェーカーチューブリアクターに移し、その後15 g のエチレンオキシドを加えた。次いで、反応物を60度で6時間攪拌した。次いで、反応物を密封したシェーカーチューブに一晩(およそ16時間)入れたままにし、その後、20.2 g の酢酸で中和すると、ヒドロキシエチルポリ-1,3-グルカン固体が形成した。35マイクロメートル濾紙を持つブフナー漏斗を利用して固体を濾過した。次いで、固体を、メタノール：アセトン(60:40 v/v)混合物を加え、攪拌子で20分間攪拌することにより、ビーカー内で洗浄した。次いで、メタノール：アセトン混合物を濾過により固体から除いた。この洗浄工程を2回繰り返した。固体は、薄茶/ベージュ色であり、窒素ブリードと共に真空オーブン中で乾燥させた。ヒドロキシエチルポリ-1,3-グルカン生成物は、10%NaOH溶液に可溶性であった。乾燥した生成物のMSは、NMRにより0.72であると報告された。

10

20

## 【0109】

このように、グルカンエーテル誘導体、ヒドロキシエチルポリ-1,3-グルカンを調製し、単離した。

## 【0110】

## 実施例3

## エチルポリ-1,3-グルカンの調製

この実施例は、グルカンエーテル誘導体、エチルポリ-1,3-グルカンの製造を説明する。

## 【0111】

ポリ-1,3-グルカンをシェーカーチューブに加え、その後、水酸化ナトリウム(1~70%溶液)及び塩化工チルを加えて、反応物を与える。反応物を25~200度に加熱し、その温度で1~48時間保ってから、反応物を酢酸で中和する。このように形成された固体を真空濾過により回収し、洗浄し、真空下20~25度で乾燥させ、NMR及びSECにより分析して、エチルポリ-1,3-グルカンの分子量及び置換度(DoS)を決定する。

30

## 【0112】

このように、グルカンエーテル誘導体、エチルポリ-1,3-グルカンを調製し、単離する。

## 【0113】

## 実施例4

40

## エチルヒドロキシエチルポリ-1,3-グルカンの調製

この実施例は、グルカンエーテル誘導体、エチルヒドロキシエチルポリ-1,3-グルカンの製造を説明する。

## 【0114】

ポリ-1,3-グルカンをシェーカーチューブに加え、その後、水酸化ナトリウム(1~70%溶液)を加える。次いで、塩化工チルを、それに続いてエチレンオキシド/塩化工チル混合物を加えて、反応物を与える。反応物を、ゆっくりと25~200度に加熱し、その温度で1~48時間維持してから、酢酸で中和する。このように形成された固体を真空濾過で回収し、熱水で洗浄し、真空下20~70度で乾燥させ、NMR及びSECにより分析して、エチルヒドロキシエチルポリ-1,3-グルカンの分子量及びDoS

50

を決定する。

**【0115】**

このように、グルカンエーテル誘導体、エチルヒドロキシエチルポリ - 1 , 3 - グルカンを調製し、単離する。

**【0116】**

**実施例 5**

**メチルポリ - 1 , 3 - グルカンの調製**

この実施例は、グルカンエーテル誘導体、メチルポリ - 1 , 3 - グルカンの製造を説明する。

**【0117】**

10  
10 g のポリ - 1 , 3 - グルカン ( $M_n = 71127$ ) を、40 mL の 30 % 水酸化ナトリウム及び 40 mL の 2 - プロパノールと混合し、55 度で 1 時間攪拌してアルカリポリ - 1 , 3 - グルカンを与えた。次いで、この調合物を、ブフナー漏斗を使用して濾過した。次いで、アルカリポリ - 1 , 3 - グルカンを 150 mL の 2 - プロパノールと混合して、スラリーをつくった。シェーカーチューブリアクターにこのスラリーを入れて、15 g の塩化メチルを加えて、反応物を与えた。反応物を 70 度で 17 時間攪拌した。生じたメチルポリ - 1 , 3 - グルカン固体を濾過し、20 mL の 90 % 酢酸で中和し、それに続けて 3 回の 200 mL エタノール洗浄を行った。NMR 分析を実施すると、メチルポリ - 1 , 3 - グルカン生成物の DoS が 1.2 であることが示された。

**【0118】**

表 1 は、上記方法に比べて特定の修飾を有する方法を利用して調製したメチルポリ - 1 , 3 - グルカンの種々の試料の DoS 測定値のリストを与える（表 1 参照）。表 1 に列記したプロセスのそれぞれに対する苛性処理工程（メチル化試薬を加える前のポリ - 1 , 3 - グルカンのアルカリ処理）は、上述の通り 1 時間実施した。

**【0119】**

**【表 1】**

表 1

種々の苛性処理及びメチル化条件を利用したメチルポリ - 1 , 3 - グルカンの調製

グルカン $M_n$	苛性処理条件		メチル化条件			DoS
	温度 (°C)	溶媒	試薬	時間 (hr)	温度 (°C)	
71127	室温	トルエン (140 mL)	DMS <sup>a</sup> (50 mL)	17	50	1.51
71127	55	2-プロパノール (150 mL)	CH <sub>3</sub> Cl (15 g)	17	70	1.2
71127	55	2-プロパノール (150 mL)	CH <sub>3</sub> Cl (25 g)	24	70	1.38
25084	55	2-プロパノール (150 mL)	CH <sub>3</sub> Cl (30 g)	34	70	1.0
25084	55	2-プロパノール (150 mL)	CH <sub>3</sub> Cl (25 g)	24	70	0.39

<sup>a</sup> 硫酸ジメチル

**【0120】**

このように、グルカンエーテル誘導体、メチルポリ - 1 , 3 - グルカンを調製し、単離した。

**【0121】**

**実施例 6**

**水溶性メチルポリ - 1 , 3 - グルカンの調製**

この実施例は、水溶性メチルポリ - 1 , 3 - グルカンの製造を説明する。

10

20

30

40

50

## 【0122】

実施例5(表1)で調製した10gのメチルポリ-1,3-グルカン(DoS=1.38)を40mLの30%水酸化ナトリウム及び40mLの2-プロパノールと混合し、55で1時間攪拌した。次いで、この混合物を、ブフナー漏斗を利用して濾過した。150mLの2-プロパノールを加えてスラリーを作り、次いでシェーカーチューブリアクターに入れた。15gの塩化メチルをスラリーに加えて反応物を与えた。反応物を55で17時間攪拌し、その後10mLの酢酸で中和し、200mLのアセトンと混合して生成物を沈殿させた。次いで、生成物を2回の追加の200mLアセトン洗浄液で洗浄した。メチルポリ-1,3-グルカン生成物のNMR分析は、それが2のDoSを有することを示した。

10

## 【0123】

メチルポリ-1,3-グルカン生成物の水溶液を、0.2gの生成物を9.8gの水に溶解させ、室温で混合して調製した。透明な溶液が形成され、それにより、メチルポリ-1,3-グルカン生成物が水溶性であることが示された。

## 【0124】

このように、水溶性メチルポリ-1,3-グルカンを調製し、単離した。

## 【0125】

実施例7

## ヒドロキシアルキルメチルポリ-1,3-グルカンの調製

この実施例は、グルカンエーテル誘導体、ヒドロキシアルキルメチルポリ-1,3-グルカンの製造を説明する。

20

## 【0126】

ポリ-1,3-グルカンを容器に加え、その後水酸化ナトリウム(5~70%溶液)を加える。この調合物を、0.5~8時間攪拌する。次いで、塩化メチルを容器に加えて反応物を与え、次いで、30~100で最長14日間加熱する。次いで、温度を制御しながら、アルキレンオキシド(例えば、エチレンオキシド、プロピレンオキシド、ブチレンオキシドなど)を反応物に加える。反応物を25~100に最長14日間加熱してから、酸により中和する。このように形成された固体生成物を濾過し、洗浄し、乾燥させる。

## 【0127】

30

このように、グルカンエーテル誘導体、ヒドロキシアルキルメチルポリ-1,3-グルカンを調製し、単離する。メチル化工程の後に使用するアルキレンオキシドによって、この誘導体の例には、ヒドロキシエチルメチルポリ-1,3-グルカン、ヒドロキシブロピルメチルポリ-1,3-グルカン、及びヒドロキシブチルメチルポリ-1,3-グルカンがある。

## 【0128】

実施例8

## カルボキシメチルヒドロキシエチルポリ-1,3-グルカンの調製

この実施例は、グルカンエーテル誘導体、カルボキシメチルヒドロキシエチルポリ-1,3-グルカンの製造を説明する。

40

## 【0129】

ポリ-1,3-グルカンを、容量400mLのシェーカーチューブ中でイソプロパノール又はトルエンなどの物質のアリコートに加え、その後水酸化ナトリウム(1~70%溶液)を加える。この調合物を、最長48時間攪拌する。次いで、モノクロロ酢酸を加えて反応物を与え、次いで25~100に最長14日間加熱する。次いで、エチレンオキシドを反応物に加え、次いで25~100に最長14日間加熱してから、酸(例えば、酢酸、硫酸、硝酸、塩化水素酸など)で中和する。このように形成された固体生成物を真空濾過により回収し、洗浄し、乾燥させる。

## 【0130】

このように、グルカンエーテル誘導体、カルボキシメチルヒドロキシエチルポリ-1

50

, 3 - グルカンを調製し、単離する。

**【0131】**

**実施例 9**

カルボキシメチルヒドロキシエチルポリ - 1 , 3 - グルカンナトリウムの調製

この実施例は、グルカンエーテル誘導体、カルボキシメチルヒドロキシエチルポリ - 1 , 3 - グルカンナトリウムの製造を説明する。

**【0132】**

ポリ - 1 , 3 - グルカンを、容量 400 mL のシェーカーチューブ中でイソプロパノールなどのアルコールのアリコートに加え、その後水酸化ナトリウム (1 ~ 70 % 溶液) を加える。この調合物を、最長 48 時間攪拌する。次いで、モノクロロ酢酸ナトリウムを加えて反応物を与える。次いで 25 ~ 100 で最長 14 日間加熱する。次いで、エチレンオキシドを反応物に加え、次いで、25 ~ 100 に最長 14 日間加熱してから、酸(例えば、酢酸、硫酸、硝酸、塩化水素酸など)で中和する。このように形成された固体生成物を真空濾過により回収し、洗浄し、乾燥させる。10

**【0133】**

このように、グルカンエーテル誘導体、カルボキシメチルヒドロキシエチルポリ - 1 , 3 - グルカンナトリウムを調製し、単離する。

**【0134】**

**実施例 10**

カルボキシメチルヒドロキシプロピルポリ - 1 , 3 - グルカンの調製20

この実施例は、グルカンエーテル誘導体、カルボキシメチルヒドロキシプロピルポリ - 1 , 3 - グルカンの製造を説明する。

**【0135】**

ポリ - 1 , 3 - グルカンを、容量 400 mL のシェーカーチューブ中で、イソプロパノール又はトルエンなどの物質のアリコートに加え、その後水酸化ナトリウム (1 ~ 70 % 溶液) を加える。この調合物を最長 48 時間攪拌する。次いで、モノクロロ酢酸を加えて反応物を与える。次いで、25 ~ 100 に最長 14 日間加熱する。次いで、プロピレンオキシドを反応物に加え、次いで、25 ~ 100 に最長 14 日間加熱してから、酸(例えば、酢酸、硫酸、硝酸、塩化水素酸など)で中和する。このように形成された固体生成物を真空濾過により回収し、洗浄し、乾燥させる。30

**【0136】**

このように、グルカンエーテル誘導体、カルボキシメチルヒドロキシプロピルポリ - 1 , 3 - グルカンを調製し、単離する。

**【0137】**

**実施例 11**

カルボキシメチルヒドロキシプロピルポリ - 1 , 3 - グルカンナトリウムの調製

この実施例は、グルカンエーテル誘導体、カルボキシメチルヒドロキシプロピルポリ - 1 , 3 - グルカンナトリウムの製造を説明する。

**【0138】**

ポリ - 1 , 3 - グルカンを、容量 400 mL のシェーカーチューブ中で、イソプロパノール又はトルエンなどの物質のアリコートに加え、その後水酸化ナトリウム (1 ~ 70 % 溶液) を加える。この調合物を、最長 48 時間攪拌する。次いで、モノクロロ酢酸ナトリウムを加えて反応物を与える。次いで 25 ~ 100 に最長 14 日間加熱する。次いで、プロピレンオキシドを反応物に加え、次いで、25 ~ 100 に最長 14 日間加熱してから、酸(例えば、酢酸、硫酸、硝酸、塩化水素酸など)で中和する。このように形成された固体生成物を、真空濾過により回収し、洗浄し、乾燥させる。40

**【0139】**

このように、グルカンエーテル誘導体、カルボキシメチルヒドロキシプロピルポリ - 1 , 3 - グルカンナトリウムを調製し、単離する。

**【0140】**

10

20

30

40

50

## 実施例 1 2

G t f J 酵素を利用するポリ - 1 , 3 - グルカンスラリー及びウェットケーキの調製

この実施例は、グルコシルトランスフェラーゼ酵素、g t f J により触媒された反応を利用する、ポリ - 1 , 3 - グルカンのスラリー又はウェットケーキの製造を説明する。これらの組成物を実施例 1 3 及び 1 4 で使用して、ポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物を調製した。

### 【 0 1 4 1 】

g t f J 酵素に関する追加の情報は、米国特許第 7 , 0 0 0 , 0 0 0 号明細書並びに米国特許出願公開第 2 0 1 3 / 0 2 4 4 2 8 8 号明細書及び同第 2 0 1 3 / 0 2 4 4 2 8 7 号明細書（これらは全て引用により本明細書に組み込まれる）に見出すことができる。 10

### 【 0 1 4 2 】

ポリ - 1 , 3 - グルカンのスラリーを調製するために、スクロース（ 1 0 0 g / L ）、リン酸カリウム緩衝液（ 2 0 mM ）、及び F e r m a S u r e （登録商標）（ 5 0 0 p p m ）を含む水溶液（ 0 . 7 5 L ）を調製し、 pH 6 . 8 ~ 7 . 0 に調整した。次いで、この溶液に g t f J 酵素抽出物（ 5 0 単位 / L ）を入れた。酵素反応溶液を 2 0 ~ 2 5 で 4 8 時間保った。反応中に合成されたポリ - 1 , 3 - グルカンは水に不溶性であるのでスラリーが形成した。次いで、このスラリーを濾過せずに使用して、カルボキシメチルポリ - 1 , 3 - グルカンを調製した（実施例 1 3 参照）。

### 【 0 1 4 3 】

g t f J 酵素反応を上述の通り実施して、ポリ - 1 , 3 - グルカンウェットケーキを調製した。反応中に製造されたポリ - 1 , 3 - グルカン固体を、 4 0 マイクロメートル濾紙上に 3 2 5 メッシュの網を取り付けたブフナー漏斗を使用して回収した。濾過したポリ - 1 , 3 - グルカン固体を、上述の通りさらに 2 回脱イオン水に再懸濁させ濾過し、スクロース、フルクトース、及び他の低分子量の可溶性副生成物を除いた。次いで、ポリ - 1 , 3 - グルカン固体のウェットケーキを使用して、カルボキシメチルポリ - 1 , 3 - グルカンを調製した（実施例 1 4 参照）。 20

### 【 0 1 4 4 】

このように、ポリ - 1 , 3 - グルカンのスラリー及びウェットケーキを調製した。これらの種類のポリ - 1 , 3 - グルカン調合物を、ポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物を調製するための基質として使用できる。 30

### 【 0 1 4 5 】

## 実施例 1 3

ポリ - 1 , 3 - グルカンスラリーからのカルボキシメチルポリ - 1 , 3 - グルカンの調製

この実施例は、実施例 1 2 で調製したポリ - 1 , 3 - グルカンのスラリーを使用した、エーテル化合物、カルボキシメチルポリ - 1 , 3 - グルカンの製造を説明する。このスラリーは濾過も洗浄もしなかったので、ポリ - 1 , 3 - グルカンを合成するために利用したグルコシルトランスフェラーゼ反応の成分を含んでいた。

### 【 0 1 4 6 】

ポリ - 1 , 3 - グルカンスラリー（ 5 0 0 g ）を、温度モニタリングのための熱電対、再循環浴に接続した冷却管、及び磁気攪拌子を備えた 1 L のジャケット付き反応容器に入れた。固体の水酸化ナトリウム（ 7 5 g ）をスラリーに加えると、 1 5 w t % 水酸化ナトリウムを含む調合物が生じた。この調合物を、ホットプレート上で 2 5 に加熱した。次いで、調合物を 1 時間攪拌してから、温度を 5 5 に上げた。クロロ酢酸ナトリウム（ 2 2 7 . 3 g ）を調合物に加え、反応温度を 5 5 で 3 時間保った。次いで、反応物を酢酸（ 9 0 % ）で中和した。固体を真空濾過により回収し、エタノール（ 7 0 % ）で 4 回洗浄し、真空下 2 0 ~ 2 5 で乾燥させ、N M R 及び S E C により分析して、分子量及び D o S を決定した。得られた固体物質を、D o S が 0 . 3 で M <sub>w</sub> が 1 4 0 , 0 0 0 の水溶性カルボキシメチルポリ - 1 , 3 - グルカンと同定した。 40

### 【 0 1 4 7 】

このように、グルコシルトランスフェラーゼ反応の成分を含むポリ - 1 , 3 - グルカンのスラリーを、ポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物を調製する基質として使用できる。この結果は、ポリ - 1 , 3 - グルカンを合成するために利用されるグルコシルトランスフェラーゼ反応の生成物が、ポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物を製造する反応に使用される前に、処理（ポリ - 1 , 3 - グルカン生成物の洗浄又は精製など）を全く必要としないことを示している。

#### 【0148】

##### 実施例 14

ポリ - 1 , 3 - グルカンウェットケーキからのカルボキシメチルポリ - 1 , 3 - グルカンの調製

この実施例は、実施例 12 で調製したポリ - 1 , 3 - グルカンのウェットケーキを使用した、エーテル化合物、カルボキシメチルポリ - 1 , 3 - グルカンの製造を説明する。この実施例での使用前に、このウェットケーキを乾燥させなかった。

#### 【0149】

ポリ - 1 , 3 - グルカンウェットケーキ (500 g) を、温度モニタリングのための熱電対、再循環浴に接続した冷却管、及びオーバーヘッドスターラーを備えた 1 L ジャケット付き反応容器に入れた。イソプロパノール (500 mL) 及び固体の水酸化ナトリウム (79.1 g) をウェットケーキに加えて、15 wt % 水酸化ナトリウムを含む調合物を与えた。この調合物を、ホットプレート上で 25 に加熱し、次いで 1 時間攪拌してから温度を 55 に上げた。クロロ酢酸ナトリウム (227.3 g) を調合物に加え、反応温度を 55 で 3 時間保った。次いで、反応物を酢酸 (90%) で中和した。固体を真空filtration により回収し、エタノール (70%) で 4 回洗浄し、真空下 20 ~ 25 で乾燥させ、NMR 及び SEC により分析して、分子量及び DOS を決定した。得られた固体物質を、DOS が 0.7 で  $M_w$  が 250,000 である水溶性カルボキシメチルポリ - 1 , 3 - グルカンであると同定した。

#### 【0150】

このように、ポリ - 1 , 3 - グルカンのウェットケーキを、ポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物を調製するための基質として使用できる。この結果は、グルコシルトランスフェラーゼ反応のポリ - 1 , 3 - グルカン生成物が、ポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物を製造する反応においてほとんど処理（水による洗浄）なしに使用できることを示している。

#### 【0151】

##### 実施例 15

カルボキシメチルポリ - 1 , 3 - グルカンナトリウムの調製

この実施例は、グルカンエーテル誘導体、カルボキシメチルポリ - 1 , 3 - グルカンナトリウムの製造を説明する。

#### 【0152】

10 g のポリ - 1 , 3 - グルカン ( $M_w$  [重量平均分子量] = 236,854) を、温度モニタリングのための熱電対、再循環浴に接続した冷却管、及び磁気攪拌子を備えた容量 500 mL の丸底フラスコ中で、200 mL のイソプロパノールに加えた。40 mL の水酸化ナトリウム (15% 溶液) を調合物に滴加し、次いで、ホットプレート上で 25

に加熱した。調合物を 1 時間攪拌してから、温度を 55 に上げた。次いで、クロロ酢酸ナトリウム (12 g) を加えて反応物を与え、55 で 3 時間保ってから、90% 酢酸で中和した。このように形成された固体を、真空filtration により回収し、エタノール (70%) で 4 回洗浄し、真空下 20 ~ 25 で乾燥させ、NMR 及び SEC により分析して、分子量及び DOS を決定した。得られた固体物質を、DOS が 0.5 で  $M_w$  が 580,000 である水溶性カルボキシメチルポリ - 1 , 3 - グルカンナトリウムであると同定した。

#### 【0153】

表 2 は、上記方法を利用して調製したカルボキシメチルポリ - 1 , 3 - グルカンナト

10

20

30

40

50

リウムの種々の試料の D o S 測定値のリストを与える。ポリ - 1 , 3 - グルカン出発物質は種々の分子量を有していた（表 2）。

【 0 1 5 4 】

【表 2】

表2

ポリ  $\alpha$ -1,3-グルカンから調製したカルボキシメチルポリ

$\alpha$ -1,3-グルカンナトリウムの D o S

CMG 試料名称	ポリ $\alpha$ -1,3-グルカン出発物質の $M_w$	D o S
1A (35)	140287	0.5
1B (36)	140287	0.9
1C (39)	140287	1
1D (44)	88445	0.7
1E (47)	278858	0.7
1F (58)	248006	
1G (67)	236854	0.5
1H (72)	236854	0.9
1I (-41)	200000	0.5
1J (-39)	168584	0.5

10

20

【 0 1 5 5 】

このように、グルカンエーテル誘導体、カルボキシメチルポリ - 1 , 3 - グルカンナトリウムを調製し、単離した。

【 0 1 5 6 】

実施例 1 6

カルボキシメチルポリ - 1 , 3 - グルカンカリウムの調製

この実施例は、グルカンエーテル誘導体、カルボキシメチルポリ - 1 , 3 - グルカンカリウムの製造を説明する。

30

【 0 1 5 7 】

10 g のポリ - 1 , 3 - グルカン ( $M_w = 168,000$ ) を、温度モニタリングのための熱電対、再循環浴に接続した冷却管、及び磁気攪拌子を備えた容量 500 mL の丸底フラスコ中で、200 mL のイソプロパノールに加えた。40 mL の水酸化カリウム (15 % 溶液) をこの調合物に滴出し、次いで、ホットプレート上で 25 °C に加熱した。調合物を 1 時間攪拌してから、温度を 55 °C に上げた。次いで、クロロ酢酸ナトリウム (12 g) を加えて反応物を与え、55 °C で 3 時間保ってから、90 % 酢酸により中和した。このように形成された固体を真空濾過により回収し、エタノール (70 %) で 4 回洗浄し、真空下 20 ~ 25 °C で乾燥させ、NMR 及び SEC により分析して、分子量及び D o S を決定した。得られた固体物質を、D o S が 0.77 である水溶性カルボキシメチルポリ - 1 , 3 - グルカンカリウムであると同定した。

40

【 0 1 5 8 】

このように、グルカンエーテル誘導体、カルボキシメチルポリ - 1 , 3 - グルカンカリウムを調製し、単離した。

【 0 1 5 9 】

実施例 1 7

カルボキシメチルポリ - 1 , 3 - グルカナリチウムの調製

この実施例は、グルカンエーテル誘導体、カルボキシメチルポリ - 1 , 3 - グルカンリチウムの製造を説明する。

【 0 1 6 0 】

50

10 g のポリ - 1 , 3 - グルカン ( $M_w = 168,000$ ) を、温度モニタリングのための熱電対、再循環浴に接続した冷却管、及び磁気攪拌子を備えた容量 500 mL の丸底フラスコ中で、200 mL のイソプロパノールに加えた。50 mL の水酸化リチウム (11.3% 溶液) をこの調合物に滴加し、次いで、ホットプレート上で 25 °C に加熱した。調合物を 1 時間攪拌してから、温度を 55 °C に上げた。次いで、クロロ酢酸ナトリウム (12 g) を加えて反応物を与え、55 °C で 3 時間保ってから、90% 酢酸で中和した。このように形成された固体を真空濾過により回収し、エタノール (70%) で 4 回洗浄し、真空下 20 ~ 25 °C で乾燥させ、NMR 及び SEC により分析し、分子量及び DoS を決定した。得られた固体物質を、DoS が 0.79 である水溶性 CMG であると同定した。

10

#### 【0161】

試薬の量を調整して別な CMG 試料を調製したが、DoS は 0.36 であった。この実施例で調製した CMG 試料を表 3 に列記する。

#### 【0162】

#### 【表 3】

表3

#### CMG リチウム合成

試料名称	DoS
2A (127)	0.79
2B (130)	0.36

20

#### 【0163】

このように、グルカンエーテル誘導体、カルボキシメチルポリ - 1 , 3 - グルカンリチウムを調製し、単離した。

#### 【0164】

#### 実施例 1 8

30

#### メチルポリ - 1 , 3 - グルカンの調製

この実施例は、グルカンエーテル誘導体、メチルポリ - 1 , 3 - グルカン (MG) の製造を説明する。この実施例は、MG の製造を説明する実施例 5 に追加するものである。

#### 【0165】

#### 試料 1

10 g のポリ - 1 , 3 - グルカン ( $M_w = 168584$ ) を、磁気攪拌子が入った 400 mL ビーカー中で、40 mL のイソプロパノール及び 40 mL の 30 wt % 水酸化ナトリウムに加えた。ビーカーを、磁気攪拌プレート上で 375 rpm で 1 時間攪拌した。次いで、この調合物から得た固体を真空濾過により回収し、150 mL のイソプロパノールと混合し、蓋の付いた容量 200 mL のジャーに入れた。この調合物を一晩放置してから、容量 250 mL のシェーカーチューブリアクターに移した。反応器を 70 °C に加熱し、10 g の塩化メチルを入れた。反応物をその温度で 17 時間保ち、次いで、さらに 20 g の塩化メチルを入れ、その温度で 17 時間保った。冷却後、反応物を、90% 酢酸で中和した。この反応物から得た固体を真空濾過により回収し、メタノールで 3 回洗浄し、真空下 20 ~ 25 °C で乾燥させ、NMR により分析して、DoS を決定した。得られた固体物質を、DoS が 1.75 である MG であると同定した。

40

#### 【0166】

次いで、8 g のこの MG を、磁気攪拌子の入った 400 mL ビーカー中で、50 mL のイソプロパノール及び 32 mL の 30 wt % 水酸化ナトリウムと混合した。ビーカーを磁気攪拌プレート上で 375 rpm で 1 時間攪拌した。次いで、固体を真空濾過により回収

50

し、150mLのイソプロパノールと混合し、蓋の付いた容量200mLのジャーに入れた。この調合物を一晩放置してから、容量250mLのシェーカーチューブリアクターに移した。反応器を70℃に加熱し、12gの塩化メチルを入れた。冷却後、反応物を90%酢酸で中和した。固体を真空濾過により回収し、メタノール：アセトン(60:40)で5回洗浄し、真空下20~25℃で乾燥させ、NMRにより分析して、DOSを決定した。得られた固体物質を、DOSが1.8であるMGであると同定した。このMGを試料1と称した。

#### 【0167】

##### 試料2

20gのポリ-1,3-グルカン( $M_w = 245,000$ )を、磁気攪拌子の入った400mLビーカー中に、50mLのイソプロパノール及び80mLの30wt%水酸化ナトリウムに加えた。ビーカーを、磁気攪拌プレート上で375rpmで1時間攪拌した。次いで、この調合物から得られた固体を真空濾過により回収し、150mLのイソプロパノールと混合し、蓋の付いた容量200mLジャーに入れた。この調合物を一晩放置してから、容量250mLのシェーカーチューブリアクターに移した。反応器を70℃に加熱し、30gの塩化メチルを入れた。反応物をその温度で17時間保った。冷却後、反応物を90%酢酸で中和した。この反応物から得た固体を真空濾過により回収し、メタノール：アセトン(60:40)で5回洗浄し、真空下20~25℃で乾燥させ、NMRにより分析して、DOSを決定した。得られた固体物質を、DOSが1.39であるMGであると同定した。

10

20

#### 【0168】

次いで、10gのこのMGを、磁気攪拌子が入った400mLビーカー中に、50mLのイソプロパノール及び40mLの30wt%水酸化ナトリウム溶液と混合した。ビーカーを磁気攪拌プレート上で375rpmで1時間攪拌した。次いで、この調合物から得た固体を真空濾過により回収し、100mLのイソプロパノールを混合し、蓋の付いた容量200mLのジャーに入れた。この調合物を一晩放置してから、容量250mLのシェーカーチューブリアクターに移した。反応器を70℃に加熱し、15gの塩化メチルを入れた。冷却後、反応物を90%酢酸で中和した。固体を真空濾過により回収し、メタノール：アセトン(60:40)で5回洗浄し、真空下20~25℃で乾燥させ、NMRにより分析して、DOSを決定した。得られた固体物質をMGであると同定した。このMGを試料2と称した。

30

#### 【0169】

このように、グルカンエーテル誘導体、メチルポリ-1,3-グルカンの追加の試料を調製し、単離した。

#### 【0170】

##### 実施例19

##### エチルポリ-1,3-グルカンの調製

この実施例は、グルカンエーテル誘導体、エチルポリ-1,3-グルカン(EG)の製造を説明する。この実施例は、EGを製造する方法を説明する実施例3に追加するものである。

40

#### 【0171】

20gのポリ-1,3-グルカン( $M_w = 245,000$ )を、磁気攪拌子の入った400mLビーカー中に、200mLのイソプロパノール及び109mLの15wt%水酸化ナトリウムに加えた。ビーカーを磁気攪拌プレート上で375rpmで1時間攪拌した。次いで、この調合物から得た固体を真空濾過により回収し、100mLのアセトンと混合し、蓋の付いた容量200mLのジャーに入れた。この調合物を一晩放置してから、容量250mLのシェーカーチューブリアクターに移した。反応器を90℃に加熱し、85gの塩化エチルを入れた。反応物をその温度で17時間保った。冷却後、反応物を90%酢酸で中和した。固体を真空濾過により回収し、80%アセトンで5回洗浄し、真空下20~25℃で乾燥させ、NMRにより分析して、DOSを決定した。得られた固体物質

50

を、D o S が 1 . 0 3 である E G であると同定した。

【 0 1 7 2 】

このように、グルカンエーテル誘導体、エチルポリ - 1 , 3 - グルカンを調製し、単離した。

【 0 1 7 3 】

実施例 2 0

ヒドロキシプロピルポリ - 1 , 3 - グルカンの調製

この実施例は、グルカンエーテル誘導体、ヒドロキシプロピルポリ - 1 , 3 - グルカン ( H P G ) の製造を説明する。この実施例は、H P G を製造する方法を説明する実施例 1 に追加するものである。

10

【 0 1 7 4 】

1 0 g のポリ - 1 , 3 - グルカン ( $M_w = 1 6 8 5 8 4$ ) を、磁気攪拌子の入った 4 0 0 m L ピーカー中で、1 0 1 m L のトルエン及び 5 m L の 2 0 w t % 水酸化ナトリウムに加えた。ピーカーを、磁気攪拌プレート上で 3 7 5 r p m で 1 時間 5 5 で攪拌した。次いで、この調合物を蓋の付いた容量 2 0 0 m L のジャーに入れ、一晩放置してから、容量 2 5 0 m L のシェーカーチューブリアクターに移した。反応器を 7 5 に加熱し、3 4 g の 1 , 2 - プロピレンオキシドを入れた。反応物をその温度で 4 時間保った。冷却後、反応物を 9 0 % 酢酸で中和した。固体を真空濾過により回収し、熱水で 3 回洗浄し、真空下 2 0 ~ 2 5 で乾燥させ、N M R により分析して、D o S を決定した。固体物質を H P G であると決定した。

20

【 0 1 7 5 】

このように、グルカンエーテル誘導体、ヒドロキシプロピルポリ - 1 , 3 - グルカンの追加試料を調製し、単離した。

【 0 1 7 6 】

実施例 2 1

ジヒドロキシアルキルポリ - 1 , 3 - グルカンの調製

この実施例は、ポリ - 1 , 3 - グルカンのジヒドロキシアルキルエーテル誘導体の製造を説明する。具体的には、ジヒドロキシプロピルポリ - 1 , 3 - グルカンを製造した。

【 0 1 7 7 】

30

1 0 g のポリ - 1 , 3 - グルカン ( $M_w = 1 3 8 , 4 3 8$ ) を、温度モニタリングのための熱電対、再循環浴と接続した冷却器、及び磁気攪拌子を備えた容量 5 0 0 m L の丸底フラスコ中で、1 0 0 m L の 2 0 % 水酸化テトラエチルアンモニウムに加えた ( 約 9 . 1 w t % のポリ - 1 , 3 - グルカンとなつた ) 。この調合物を攪拌し、ホットプレート上で 3 0 に加熱した。調合物を 1 時間攪拌して固体を溶解させてから、温度を 5 5 に上げた。次いで、3 - クロロ - 1 , 2 - プロパンジオール ( 6 . 7 g ) 及び 1 1 g の脱イオン水を加えて、反応物を与えた ( 約 5 . 2 w t % の 3 - クロロ - 1 , 2 - プロパンジオールを含む ) 、それを 5 5 で 1 . 5 時間保ち、その後 5 . 6 g の脱イオン水を反応物に加えた。反応物を 5 5 でさらに 3 時間 4 5 分保ってから、酢酸で中和した。中和の後、過剰なイソプロパノールを加えて、固体を沈殿させた。このように形成された固体を真空濾過により回収し、エタノール ( 9 5 % ) で 4 回洗浄し、真空下 2 0 ~ 2 5 で乾燥させた。得られた固体物質を、水溶性でなく、0 . 6 の置換度を有するジヒドロキシプロピルポリ - 1 , 3 - グルカンであると同定した。

40

【 0 1 7 8 】

上記手順を、いくらかの修飾と共に繰り返し、今回は、上記の通り調製したジヒドロキシプロピルポリ - 1 , 3 - グルカンの試料を出発物質として使用して繰り返した。簡単に述べると、5 g のグルカンエーテルを 5 0 m L の 2 0 % 水酸化テトラエチルアンモニウムに加えた。この調合物を、固体が溶解するまで磁気攪拌子で攪拌し、次いで、ホットプレート上で 1 時間 3 0 に加熱した。次いで、調合物を 5 5 に加熱し、3 - クロロ - 1 , 2 - プロパンジオール ( 8 g ) を加えて、反応物を与えた。次いで、反応物を 2 時間攪

50

拌し、その後、酢酸で中和した。中和後、過剰のイソプロパノールを加えて固体を沈殿させた。このように形成された固体を真空濾過により回収し、エタノール(95%)で4回洗浄し、真空下20~25で乾燥させた。得られた固体物質を、水溶性であり、0.89の置換度を有するジヒドロキシプロピルポリ-1,3-グルカンであると同定した。

【0179】

このように、ポリ-1,3-グルカンの水溶性ジヒドロキシアルキルエーテル誘導体を調製し、単離した。

【0180】

実施例22

ジヒドロキシアルキルポリ-1,3-グルカンの調製

10

この実施例は、ジヒドロキシプロピルポリ-1,3-グルカンの製造を説明する。この実施例は、やはりこのグルカンエーテル誘導体の製造を説明する実施例21に追加するものである。

【0181】

10gのポリ-1,3-グルカン( $M_w = 138,438$ )を、温度モニタリングのための熱電対、再循環浴に接続した冷却管、及び磁気攪拌子を備えた容量500mL丸底フラスコ中で、143gの20%水酸化テトラエチルアンモニウムに加えた(約6.5wt%のポリ-1,3-グルカンとなった)。この調合物を攪拌し、ホットプレート上で30に加熱した。調合物を1時間攪拌して固体を溶解させてから、温度を55に上げた。次いで、3-クロロ-1,2-プロパンジオール(16g)を加えて反応物を与える(約9.5wt%の3-クロロ-1,2-プロパンジオールを含む)、それを55で2時間保ってから酢酸で中和した。中和後、過剰のイソプロパノールを加えて固体を沈殿させた。このように形成された固体を真空濾過により回収し、エタノール(95%)で4回洗浄し、真空下20~25で乾燥させた。得られた固体物質を、水溶性であり0.6の置換度を有するジヒドロキシプロピルポリ-1,3-グルカンであると同定した。

20

このように、ポリ-1,3-グルカンの水溶性ジヒドロキシアルキルエーテル誘導体を調製し、単離した。この実施例で製造したジヒドロキシプロピルポリ-1,3-グルカンが、0.6の置換度を有するが水溶性であったことに留意される。この結果は、上記実施例21に記載された最初のプロセスで製造された、やはり置換度が0.6であるが水不溶性であったジヒドロキシプロピルポリ-1,3-グルカンと対照的である。

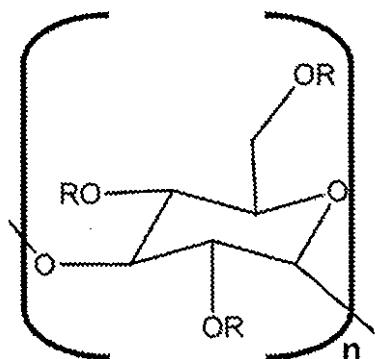
30

【0182】

以上、本発明を要約すると下記のとおりである。

1. 下記の構造：

【化7】



40

(式中、

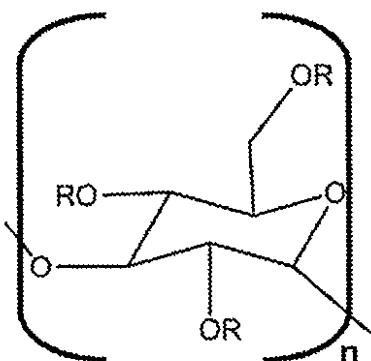
(i) nは少なくとも6であり、

(ii) 各Rは、独立に、H又は有機基であり、且つ

(iii) 前記化合物は約0.05から約3.0の置換度を有する)により表されるポリ

50

- 1 , 3 - グルカンエーテル化合物を含む組成物。
- 2 . 前記有機基が、ヒドロキシアルキル基、アルキル基、又はカルボキシアルキル基であり、前記化合物が、1種類の前記有機基又は2種類以上の前記有機基を含む、上記1に記載の組成物。
- 3 . 前記有機基が、ヒドロキシプロピル、ジヒドロキシプロピル、ヒドロキシエチル、メチル、エチル、又はカルボキシメチル基である、上記2に記載の組成物。
- 4 . 前記化合物が1種類の前記有機基を含む、上記2に記載の組成物。
- 5 . 前記化合物が2種類以上の前記有機基を含む、上記2の記載の組成物。
- 6 . 前記置換度が約0.2から約2.0である、上記1に記載の組成物。
- 7 . ポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物を製造する方法であって：  
( a ) アルカリ条件下での反応物中で、ポリ - 1 , 3 - グルカンを、有機基を含む少なくとも1種のエーテル化剤と接触させることであって、前記エーテル化剤が前記ポリ - 1 , 3 - グルカンにエーテル化され、それにより、以下の構造：  
【化8】



10

20

- (式中、  
( i )  $n$  は少なくとも6であり、  
( ii ) 各Rは、独立に、H又は前記有機基であり、且つ  
( iii ) 前記化合物は約0.05から約3.0の置換度を有する)により表されるポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物を生み出すこと；及び  
( b ) 任意選択で、工程(a)で製造された前記ポリ - 1 , 3 - グルカンエーテル化合物を単離すること  
を含む方法。

8 . 前記アルカリ条件がアルカリ水酸化物溶液を含む、上記7に記載の方法。

9 . 前記反応物が有機溶媒を含む、上記7に記載の方法。

10 . 前記有機溶媒がイソプロパノールである、上記9に記載の方法。

11 . 工程(a)が、

( i ) 前記反応物を加熱すること；及び/又は

( ii ) 前記反応物のpHを中性化すること

30

40

をさらに含む、上記7に記載の方法。

12 . 前記有機基が、ヒドロキシアルキル基、アルキル基、又はカルボキシアルキル基であり、前記化合物が1種類の前記有機基又は2種類以上の前記有機基を含む、上記7に記載の方法。

13 . 前記ポリ - 1 , 3 - グルカンがスラリーの形態にある、上記7に記載の方法。

14 . 前記スラリーが、ポリ - 1 , 3 - グルカン、スクロース、グルコース、フルクトース、及びグルコシルトランスフェラーゼ酵素を含む、上記13に記載の方法。

15 . 前記ポリ - 1 , 3 - グルカンがウェットケーキの形態にある、上記7に記載の方法。

---

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 61/740,076  
(32)優先日 平成24年12月20日(2012.12.20)  
(33)優先権主張国 米国(US)  
(31)優先権主張番号 61/740,127  
(32)優先日 平成24年12月20日(2012.12.20)  
(33)優先権主張国 米国(US)  
(31)優先権主張番号 61/740,119  
(32)優先日 平成24年12月20日(2012.12.20)  
(33)優先権主張国 米国(US)

前置審査

(72)発明者 ジェイミー・エル・パウリン  
アメリカ合衆国デラウェア州 19703 . クレイモント . ウィルソンアベニュー 2308  
(72)発明者 アンドレア・エム・ペルティコーネ  
アメリカ合衆国デラウェア州 19938 . ク莱イトン . ピー . オー . ボックス 476 . トリーティ  
レーン 32  
(72)発明者 ラウル・ビー・カサット  
アメリカ合衆国デラウェア州 19805 . ウィルミントン . ブライヤーアベニュー 511  
(72)発明者 ティ・ジョゼフ・デネス  
アメリカ合衆国ペンシルベニア州 19365 . パークスバーグ . ウエストエイスアベニュー 425

審査官 斎藤 光介

(56)参考文献 特開2000-159806 (JP, A)  
Bao, X. F. et al., Carbohydrate Research, 2001年, vol.336, p.127-140  
Kiho, T. et al., Carbohydrate Research, 1989年, vol.189, p.273-279

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)  
C 08 B  
C 08 L  
D 01 F  
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 )