

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-540849

(P2022-540849A)

(43)公表日 令和4年9月20日(2022.9.20)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 P 19/04 (2006.01)	C 1 2 P 19/04	Z N A 4 B 0 6 4
C 1 2 N 15/54 (2006.01)	C 1 2 N 15/54	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全151頁)

(21)出願番号	特願2022-501200(P2022-501200)	(71)出願人	521313533 オプティムヴィア、エルエルシー OPTIMVIA, LLC アメリカ合衆国オハイオ州 45103 、バタヴィア、ダブリュー・メインス トリート 458 458 W. Main Street, Batavia, OH 45103 US
(86)(22)出願日	令和2年7月9日(2020.7.9)	(74)代理人	100094640 弁理士 紺野 昭男
(85)翻訳文提出日	令和4年3月9日(2022.3.9)	(74)代理人	100103447 弁理士 井波 実
(86)国際出願番号	PCT/US2020/041404	(74)代理人	100111730 弁理士 伊藤 武泰
(87)国際公開番号	WO2021/007429	(74)代理人	100180873
(87)国際公開日	令和3年1月14日(2021.1.14)		
(31)優先権主張番号	63/033,687		
(32)優先日	令和2年6月2日(2020.6.2)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(31)優先権主張番号	62/871,980		
(32)優先日	令和1年7月9日(2019.7.9)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA 最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗凝固性多糖類の合成方法

(57)【要約】

本発明は、天然基質 3' - ホスホアデノシン 5' - ホスホ硫酸の代わりにアリール硫酸化合物と反応するように設計した、非天然改変型スルホトランスフェラーゼ酵素のいくつかを用いてスルホ基を多糖スルホ基受容体に転化することを助長する抗凝固性多糖の調製方法を含む。好ましいアリール硫酸化合物として、p - ニトロフェニル硫酸又は 4 - ニトロ硫酸を挙げることができるがこれらに限定されない。本発明の方法により生産した抗凝固性多糖は、N - 、3 - O - 、6 - O - 硫酸化グルコサミン残基及び 2 - O 硫酸化ヘキスロン酸残基を有し、市販入手可能な抗凝固性多糖と比較して同等の抗凝固性を有し、減少した分子量を有する短い抗凝固性多糖を形成するのに利用することができる。

【選択図】図 6

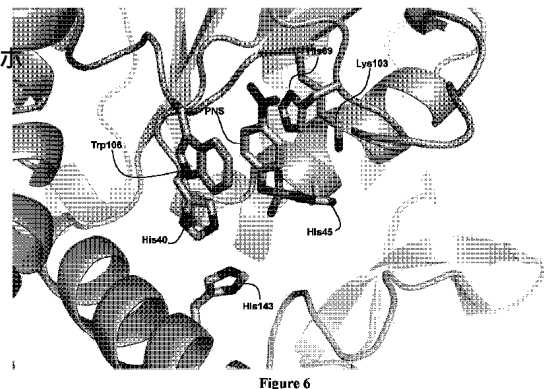


Figure 6

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗凝固性 N - , 2 - O , 3 - O , 6 - O 硫酸化ヘパラン硫酸 (N , 2 , 3 , 6 - H S) 生成物を酵素的に合成する方法であって、

(a) N - 脱アセチル化ヘパロサンを有する出発多糖反応混合物を提供する工程；

(b) 前記出発多糖反応混合物を改変型グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ酵素及びアリール硫酸化合物からなるスルホ基供与体を有する反応混合物と組み合わせて、N - 硫酸化ヘパロサンを含む第 1 の生成物混合物を形成する工程；

(c) 前記第 1 の生成物混合物を改変型ヘキサロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼ酵素及びアリール硫酸化合物からなるスルホ基供与体を有する反応混合物と組み合わせて、N - , 2 - O 硫酸化ヘパラン硫酸 (N , 2 - H S) 生成物を有する第 2 の生成物混合物を形成する工程；

10

(d) 前記第 2 の生成物混合物を改変型グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素及びアリール硫酸化合物からなるスルホ基供与体を有する反応混合物と組み合わせて、N - , 2 - O , 6 - O 硫酸化ヘパラン硫酸 (N , 2 , 6 - H S) 生成物を有する第 3 の生成物混合物を形成する工程；

(e) 前記第 3 の生成物混合物を改変型グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素及びアリール硫酸化合物からなるスルホ基供与体を有する反応混合物と組み合わせて、前記 N - , 2 - O , 3 - O , 6 - O 硫酸化ヘパラン硫酸 (N , 2 , 3 , 6 - H S) 生成物を有する第 4 の生成物混合物を形成する工程；

20

を有し、

前記改変型グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ酵素、改変型ヘキサロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼ酵素、改変型グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素及び改変型グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素の各々の生物学的活性が、アリール硫酸化合物と結合し且つ反応して、スルホ基をヘパロサン系多糖へ転移させることからなる、上記方法。

【請求項 2】

抗凝固性 N - , 2 - O , 3 - O , 6 - O 硫酸化ヘパラン硫酸 (N , 2 , 3 , 6 - H S) 生成物を酵素的に合成する方法であって、

(a) N - 硫酸化ヘパロサンを有する出発多糖反応混合物を提供する工程；

30

(b) 前記出発多糖反応混合物を改変型ヘキサロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼ酵素及びアリール硫酸化合物からなるスルホ基供与体を有する反応混合物と組み合わせて、N , 2 - H S 生成物を有する第 1 の生成物混合物を形成する工程；

(c) 前記第 1 の生成物混合物を改変型グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素及びアリール硫酸化合物からなるスルホ基供与体を含む反応混合物と組み合わせて、N , 2 , 6 - H S 生成物を有する第 2 の生成物混合物を形成する工程；

(d) 前記第 2 の生成物混合物を改変型グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素及びアリール硫酸化合物からなるスルホ基供与体を有する反応混合物と組み合わせて、前記 N - , 2 - O , 3 - O , 6 - O 硫酸化ヘパラン硫酸 (N , 2 , 3 , 6 - H S) 生成物を有する第 3 の生成物混合物を形成する工程；

40

を有し、

前記改変型ヘキサロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼ酵素、改変型グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素及び改変型グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素の各々の生物学的活性が、アリール硫酸化合物と結合し且つ反応して、スルホ基をヘパロサン系多糖に転移させることからなる、上記方法。

【請求項 3】

N - 硫酸化ヘパロサンを有する前記出発多糖反応混合物を提供する工程が

(i) ヘパロサンを有する前駆体多糖組成物を提供する工程；

(i i) 前記ヘパロサン内の N - アセチル化グルコサミン残基のうちの少なくとも 1 つを N - 脱アセチル化して N - 脱アセチル化ヘパロサン組成物を形成するのに十分な時間、

50

好ましくは前記組成物内の前記グルコサミン残基の少なくとも５％から６０％まで、さらには好ましくは少なくとも１２％から１８％まで、さらになお好ましくは１５％がＮ－アセチル化されたままであるＮ－脱アセチル化ヘパロサン組成物を形成するのに十分な時間、前記前駆体多糖組成物を塩基、好ましくは水酸化リチウム又は水酸化ナトリウムを有する反応混合物と組み合わせる工程；及び

(i i i) 前記Ｎ－脱アセチル化ヘパロサン組成物をＮ－硫酸化剤を有する、好ましくは三酸化硫黄－トリメチルアミン付加物を有する反応混合物と組み合わせることによりＮ－硫酸化ヘパロサンを有する前記出発多糖反応混合物を形成する工程；

をさらに有する、請求項２に記載の方法。

【請求項４】

ヘパロサンを有する前記前駆体多糖組成物を提供する工程が細菌細胞培養物又は真核細胞培養物、好ましくは細菌細胞培養物、さらには好ましくは大腸菌のＫ５株及び大腸菌のＢＬ２１株からなる群から選択される細菌を有する細菌細胞培養物からヘパロサンを単離するサブ工程をさらに有する請求項３に記載の方法。

【請求項５】

前記Ｎ－脱アセチル化ヘパロサン組成物内のＮ－脱アセチル化ヘパロサンの重量平均分子量が少なくとも９，０００Ｄａ及び１２，５００Ｄａ以下である請求項３に記載の方法。

【請求項６】

前記改変型グルコサミニルＮ－スルホトランスフェラーゼ酵素が配列番号２、配列番号４、配列番号６、配列番号８、配列番号１０、配列番号１２、配列番号３３、配列番号３４、配列番号３５、配列番号３６、配列番号３７、配列番号３８、配列番号３９、及び配列番号４０からなる群から選択されるアミノ酸配列を有し；

前記改変型ヘキサロニル２－Ｏスルホトランスフェラーゼ酵素が配列番号１４、配列番号１６、配列番号４１、及び配列番号４２からなる群から選択されるアミノ酸配列を有し；

前記改変型グルコサミニル６－Ｏスルホトランスフェラーゼ酵素が配列番号１８、配列番号２０、配列番号２２、配列番号４３、配列番号４４、配列番号４５、配列番号４６、配列番号４７、配列番号４８、配列番号４９、配列番号５０、配列番号５９、配列番号６０、及び配列番号６１からなる群から選択されるアミノ酸配列を有し；

前記改変型グルコサミニル３－Ｏスルホトランスフェラーゼ酵素が配列番号２４、配列番号２６、配列番号２８、配列番号５１、配列番号５２、配列番号５３、配列番号５４、配列番号５６、配列番号５７、及び配列番号５８からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する請求項１～５のいずれか一項に記載の方法。

【請求項７】

各反応混合物中の前記アリール硫酸化合物がｐ－ニトロフェニル硫酸及び４－ニトロカテコール硫酸からなる群から選択される請求項１～６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項８】

前記改変型ヘキサロニル２－Ｏスルホトランスフェラーゼ酵素を有する前記反応混合物がグルクロニルＣ_５－エピメラーゼ酵素、好ましくは配列番号２９のアミノ酸配列を有するグルクロニルＣ_５－エピメラーゼ酵素、さらには好ましくは配列番号２９の残基３４～６１７を有するエピメラーゼをさらに有する請求項１～７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項９】

前記Ｎ，２，３，６－ＨＳ生成物が下記式Ⅰ（式中、Ｘがスルフリル基又はアセテート基のいずれかであり、Ｙがスルフリル基又はヒドロキシル基のいずれかである）による構造を有する請求項１～８のいずれか一項に記載の方法。

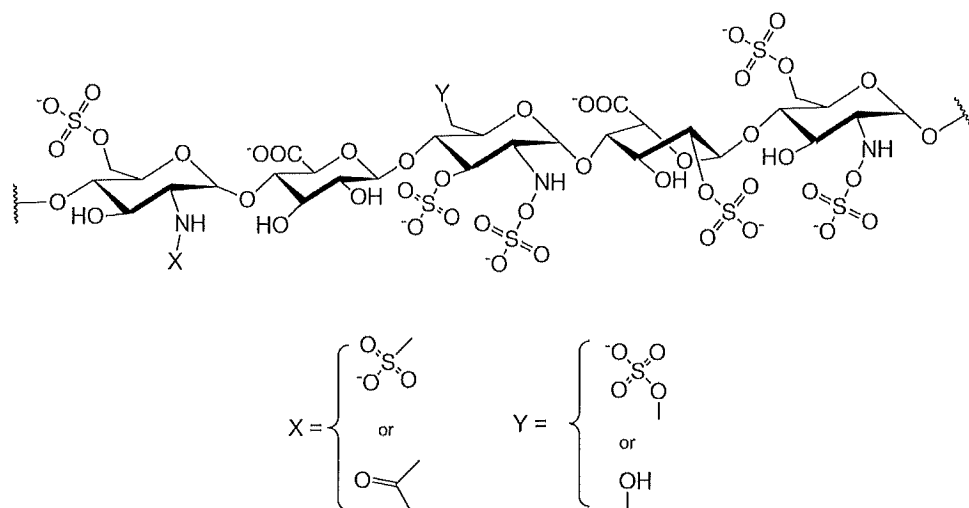
10

20

30

40

【化 1】



10

【請求項 10】

前記 N, 2, 3, 6 - HS 生成物の重量平均分子量が少なくとも 2,000 Da であり且つ 50,000 Da 以下であり、好ましくは 2,000 Da ~ 24,000 Da の範囲内である請求項 9 に記載の方法。

20

【請求項 11】

前記 N, 2, 3, 6 - HS 生成物は、抗 Xa 活性が少なくとも 1 IU mg⁻¹、好ましくは少なくとも 180 IU mg⁻¹ であり且つ 500 IU mg⁻¹ 以下である請求項 9 又は請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記 N, 2, 3, 6 - HS 生成物は、抗 IIa 活性が少なくとも 1 IU mg⁻¹、好ましくは少なくとも 180 IU mg⁻¹ であり且つ 500 IU mg⁻¹ 以下である請求項 9 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記 N, 2, 3, 6 - HS 生成物の抗 Xa 活性と抗 IIa 活性との比が、少なくとも 0.5 : 1 であり且つ 100 : 1 以下であり、好ましくは 0.9 : 1 ~ 1.1 : 1 の範囲内である請求項 11 又は 12 に記載の方法。

30

【請求項 14】

前記 N, 2, 3, 6 - HS 生成物内のグルコサミン残基の少なくとも 45 % から 90 % まで、好ましくは少なくとも 65 % から 80 % までが N - 硫酸化及び 6 - O 硫酸化され、前記 N, 2, 3, 6 - HS 生成物内のグルコサミン残基の少なくとも 1 % から 8 % まで、好ましくは少なくとも 4 % から 5 % までが N - 硫酸化、3 - O 硫酸化及び 6 - O 硫酸化される請求項 9 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

前記 N, 2, 3, 6 - HS 生成物内の二糖単位の少なくとも 1 % から 30 % まで、好ましくは 3 % が 2 - O 硫酸化イズロン酸及び N - 硫酸化グルコサミンからなる請求項 14 に記載の方法。

40

【請求項 16】

前記 N, 2, 3, 6 - HS 生成物の重量平均分子量が少なくとも 15,000 Da であり且つ 19,000 Da 以下であり、前記 N, 2, 3, 6 - HS 生成物内の多糖鎖の 20 % 以下が 24,000 Da を超える分子量を有し、前記 N, 2, 3, 6 - HS 生成物内の 8,000 Da ~ 16,000 Da の分子量を有する多糖鎖の数が 16,000 Da ~ 24,000 Da の分子量を有する多糖鎖の数よりも多い請求項 9 ~ 15 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

50

前記 N , 2 , 3 , 6 - H S 生成物をデルマトン硫酸及びコンドロイチン硫酸からなる群から選択される少なくとも1つのグリコサミノグリカン (G A G) を有する G A G 組成物と組み合わせて、H S - G A G 混合物を形成する工程をさらに有する請求項 1 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 8】

(a) デルマトン硫酸が前記 H S - G A G 混合物内の多糖鎖の 2 0 % を有し；

(b) 前記 H S - G A G 混合物内の前記 N , 2 , 3 , 6 - H S 生成物の重量平均分子量が少なくとも 7 , 0 0 0 D a から 8 , 0 0 0 D a までの範囲内であり；

(c) 前記 N , 2 , 3 , 6 - H S 生成物は、硫酸基とカルボキシル基との比が少なくとも 2 . 0 : 1 から 2 . 2 : 1 までである；請求項 1 7 に記載の方法。

10

【請求項 1 9】

(a) デルマトン硫酸が前記 H S - G A G 混合物内の多糖鎖の少なくとも 1 0 % から 1 5 % まで、好ましくは 1 2 % を有し；

(b) コンドロイチン硫酸が前記 H S - G A G 混合物内の多糖鎖の少なくとも 3 % から 5 % まで、好ましくは 4 % を有し；

(c) 前記 H S - G A G 混合物内の全多糖の重量平均分子量が少なくとも 4 , 0 0 0 D a から 7 , 0 0 0 D a までの範囲内であり、好ましくは少なくとも 5 , 0 0 0 D a から 6 , 0 0 0 D a までの範囲内であり；

(d) 前記 N , 2 , 3 , 6 - H S 生成物は、硫酸基とカルボキシル基との比が少なくとも 2 . 0 : 1 から 2 . 2 : 1 までである；請求項 1 7 に記載の方法。

20

【請求項 2 0】

未分画 N , 2 , 3 , 6 - H S 生成物から抗凝固性低分子量ヘパラン硫酸 (L M W - H S) 生成物を合成する方法であって、

(a) 請求項 1 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の方法、好ましくは請求項 1 6 に記載の方法に従って未分画 N , 2 , 3 , 6 - H S 生成物を合成する工程；

(b) 1 つ以上の解重合剤を提供する工程；及び

(c) 前記 N , 2 , 3 , 6 - H S 生成物内の多糖の少なくとも一部を解重合するのに十分な時間、前記 1 つ以上の解重合剤を用いて前記 N , 2 , 3 , 6 - H S 生成物を処理し、それによって前記 L M W - H S 生成物を形成する工程；
を有する、上記方法。

30

【請求項 2 1】

前記 L M W - H S 生成物の重量平均分子量が少なくとも 2 , 0 0 0 D a から 1 2 , 0 0 0 D a までの範囲内であり、好ましくは少なくとも 3 , 0 0 0 D a から 8 , 0 0 0 D a までの範囲内である請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記解重合剤が少なくとも1つの炭素 - 酸素リアーゼ酵素、好ましくは配列番号 3 0 、配列番号 3 1 及び配列番号 3 2 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する少なくとも1つの炭素 - 酸素リアーゼ酵素を有する炭素 - 酸素リアーゼ反応混合物を有し、前記未分画 N , 2 , 3 , 6 - H S 生成物の β 脱離開裂を触媒するのに十分な時間、前記炭素 - 酸素リアーゼ反応混合物を用いて前記未分画 N , 2 , 3 , 6 - H S 生成物を処理し、それにより酵素的に解重合された L M W - H S 生成物、好ましくは非還元末端に 4 , 5 - 不飽和ウロン酸残基を有する多糖鎖を有する酵素的に解重合された L M W - H S 生成物を形成する請求項 2 0 又は請求項 2 1 に記載の方法。

40

【請求項 2 3】

(A) 前記酵素的に解重合された L M W - H S 生成物の重量平均分子量が少なくとも 5 , 5 0 0 D a から 7 , 5 0 0 D a までの範囲内、好ましくは 6 , 5 0 0 D a であり、

(B) 前記酵素的に解重合された L M W - H S 生成物は、抗 X a 活性が少なくとも 7 0 I U m g ⁻¹ から 1 2 0 I U m g ⁻¹ までの範囲であり、抗 X a 活性と抗 I I a 活性との比が少なくとも 1 . 5 : 1 から 2 . 5 : 1 までの範囲内、好ましくは 1 . 6 : 1 である；請求項 2 2 に記載の方法。

50

【請求項 24】

前記解重合剤が塩基、好ましくは水酸化ナトリウム、水酸化第四級アンモニウム及びホスファゼン化合物からなる群から選択される塩基を有し、前記未分画 N, 2, 3, 6 - HS 生成物の β 脱離開裂を引き起こすのに十分な時間、前記塩基を用いて前記未分画 N, 2, 3, 6 - HS 生成物を処理し、それにより化学的 β 脱離 LMW - HS 生成物、好ましくは非還元末端に 4, 5 - 不飽和ウロン酸残基を有する多糖鎖を有する化学的 β 脱離 LMW - HS 生成物を形成する請求項 20 又は請求項 21 に記載の方法。

【請求項 25】

前記塩基が水酸化第四級アンモニウム、好ましくはベンジルトリメチルアンモニウムヒドロキシドであり、前記解重合剤を用いて前記未分画 N, 2, 3, 6 - HS 生成物を処理する工程が、

10

(i) 前記未分画 N, 2, 3, 6 - HS 生成物をベンゼトニウム塩、好ましくは塩化ベンゼトニウムと反応させて、ベンゼトニウム HS 塩を形成するサブ工程；及び

(ii) 前記ベンゼトニウム HS 塩を前記水酸化第四級アンモニウム及びメタノールを有する反応混合物と組み合わせて、前記化学的 β 脱離 LMW - HS 生成物を形成するサブ工程；

をさらに有する請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

(A) 前記化学的 β 脱離 LMW - HS 生成物の重量平均分子量が少なくとも 3,000 Da から 4,200 Da までの範囲内であり、好ましくは 3,600 Da であり；

20

(B) 前記化学的 β 脱離 LMW - HS 生成物は、抗 Xa 活性が少なくとも 80 IU mg⁻¹ から 120 IU mg⁻¹ までの範囲であり、抗 IIa 活性が少なくとも 5 IU mg⁻¹ から 20 IU mg⁻¹ までの範囲であり、且つ抗 Xa 活性と抗 IIa 活性との比が少なくとも 8.0 : 1 から 10.0 : 1 までの範囲である；請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記塩基がホスファゼン塩基、好ましくは 2-tert-ブチルイミノ-2-ジエチルアミノ-1,3-ジメチルペルヒドロ-1,2,3-ジアザ-ホスホリンであり、前記解重合剤を用いて前記未分画 N, 2, 3, 6 - HS 生成物を処理する工程が、

(i) 前記未分画 N, 2, 3, 6 - HS 生成物をベンゼトニウム塩、好ましくは塩化ベンゼトニウムと反応させて、ベンゼトニウム HS 塩を形成するサブ工程；

30

(ii) 前記ベンゼトニウム HS 塩をハロゲン化ベンジル、好ましくは塩化ベンジルと組み合わせて、ベンジルエステル HS を形成するサブ工程；

(iii) 前記ベンジルエステル HS をベンゼトニウム塩、好ましくは塩化ベンゼトニウムと反応させることによって、前記ベンジルエステル HS のトランス塩化を開始して、ベンゼトニウムベンジルエステル HS を形成するサブ工程；

(iv) 前記ホスファゼン塩基を用いて前記ベンゼトニウムベンジルエステル HS を解重合して、ベンジルエステル化学的 β 脱離 LMW - HS 生成物を形成するサブ工程；及び

(v) 前記ベンジルエステル化学的 β 脱離 LMW - HS 生成物を鹼化し、それにより前記化学的 β 脱離 LMW - HS 生成物を形成するサブ工程；

40

をさらに有する請求項 24 に記載の方法。

【請求項 28】

(A) 前記化学的 β 脱離 LMW - HS 生成物の重量平均分子量が少なくとも 2,000 Da から 3,000 Da までの範囲内であり、好ましくは 2,400 Da であり；

(B) 前記化学的 β 脱離 LMW - HS 生成物は、抗 Xa 活性が 160 IU mg⁻¹ であり、抗 IIa 活性が 2 IU mg⁻¹ であり、且つ前記化学的 β 脱離 LMW - HS 生成物の抗 Xa 活性と抗 IIa 活性との比が 80 : 1 である；請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記塩基が水酸化ナトリウムであり、前記解重合剤を用いて前記未分画 N, 2, 3, 6 - HS 生成物を処理する工程が、

50

(i) 前記未分画 N , 2 , 3 , 6 - H S 生成物をベンゼトニウム塩、好ましくは塩化ベンゼトニウムと反応させて、ベンゼトニウム H S 塩を形成するサブ工程；

(i i) 前記ベンゼトニウム H S 塩をハロゲン化ベンジル、好ましくは塩化ベンジルと組み合わせて、ベンジルエステル H S を形成するサブ工程；及び

(i i i) 前記ベンジルエステル H S を水酸化ナトリウムを有する反応混合物と組み合わせて、前記化学的 β 脱離 L M W - H S 生成物、好ましくは還元末端に 1 , 6 - アンヒドロマンノース残基又は 1 , 6 - アンヒドログルコサミン残基を有する多糖鎖を有する化学的 β 脱離 L M W - H S 生成物を形成するサブ工程；

をさらに有する請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 3 0】

10

(A) 前記化学的 β 脱離 L M W - H S 生成物の重量平均分子量が少なくとも 3 , 8 0 0 D a から 5 , 0 0 0 D a までの範囲内であり、好ましくは 4 , 5 0 0 D a であり；

(B) 前記化学的 β 脱離 L M W - H S 生成物は、抗 X a 活性が少なくとも 9 0 I U m g ⁻¹ から 1 2 5 I U m g ⁻¹ までの範囲であり、抗 I I a 活性が少なくとも 2 0 I U m g ⁻¹ から 3 5 I U m g ⁻¹ までの範囲であり、且つ抗 X a 活性と抗 I I a 活性との比が少なくとも 3 . 3 : 1 から 5 . 3 : 1 までの範囲、好ましくは少なくとも 3 . 7 : 1 から 4 . 0 : 1 までの範囲内である；請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記解重合剤が脱アミノ化剤、好ましくは硝酸イソアミル及び亜硝酸からなる群から選択される脱アミノ化剤を有する脱アミノ化反応混合物を有し、前記未分画 N , 2 , 3 , 6 - H S 生成物の脱アミノ化開裂を引き起こすのに十分な時間、前記脱アミノ化反応混合物を用いて前記未分画 N , 2 , 3 , 6 - H S 生成物を処理し、それにより脱アミノ化 L M W - H S 生成物、好ましくは還元末端に 2 , 5 - アンヒドロ - D - マンノース残基を有する多糖鎖を有する脱アミノ化 L M W - H S 生成物を形成する請求項 2 0 又は請求項 2 1 に記載の方法。

20

【請求項 3 2】

(i) 前記脱アミノ化剤が亜硝酸であり；

(i i) 前記脱アミノ化反応混合物が化学量論量の酸、好ましくは酢酸又は塩酸、及びアルカリ金属亜硝酸塩又はアルカリ土類金属亜硝酸塩、好ましくは亜硝酸ナトリウムをさらに有し；

30

(i i i) 前記酸を前記アルカリ金属亜硝酸塩又はアルカリ土類金属亜硝酸塩と反応させることによって、前記亜硝酸が前記反応混合物内でインサイチュ (in situ) で生成される；

請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記脱アミノ化 L M W - H S 生成物は、

(A) 重量平均分子量が少なくとも 5 , 6 0 0 D a から 6 , 4 0 0 D a までの範囲内であり、好ましくは 6 , 0 0 0 D a であり；

(B) 抗 X a 活性が少なくとも 1 1 0 I U m g ⁻¹ から 2 1 0 I U m g ⁻¹ 以下までの範囲であり、抗 I I a 活性が少なくとも 3 5 I U m g ⁻¹ から 1 0 0 I U m g ⁻¹ 以下までの範囲であり、且つ抗 X a 活性と抗 I I a 活性との比が少なくとも 1 . 9 : 1 から 3 . 2 : 1 までの範囲である；請求項 3 1 又は請求項 3 2 に記載の方法。

40

【請求項 3 4】

前記脱アミノ化 L M W - H S 生成物は、

(A) 重量平均分子量が少なくとも 3 , 6 0 0 D a から 5 , 0 0 0 D a までの範囲内であり、好ましくは 4 , 3 0 0 D a であり；

(B) 抗 X a 活性が 9 5 I U m g ⁻¹ 以上 1 3 0 I U m g ⁻¹ 以下までの範囲であり、且つ抗 X a 活性と抗 I I a 活性との比が少なくとも 2 . 5 : 1 から 4 . 0 : 1 までの範囲である；請求項 3 1 又は請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 5】

50

前記脱アミノ化 L M W - H S 生成物は、

(A) 重量平均分子量が少なくとも 4 , 2 0 0 D a から 4 , 6 0 0 D a までの範囲内であり、好ましくは 4 , 4 0 0 D a であり；

(B) 抗 X a 活性が $98 \text{ IU } \text{mg}^{-1}$ 以上 $155 \text{ IU } \text{mg}^{-1}$ 以下までの範囲であり、且つ抗 X a 活性と抗 I I a 活性との比が少なくとも 4 . 0 : 1 から 4 . 5 : 1 までの範囲である；請求項 3 1 又は請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記脱アミノ化 L M W - H S 生成物は、

(A) 重量平均分子量が少なくとも 5 , 0 0 0 D a から 5 , 6 0 0 D a までの範囲内であり、好ましくは 5 , 4 0 0 D a であり；

(B) 抗 X a 活性が $80 \text{ IU } \text{mg}^{-1}$ 以上 $120 \text{ IU } \text{mg}^{-1}$ 以下までの範囲であり、且つ抗 X a 活性と抗 I I a 活性との比が少なくとも 2 . 0 : 1 から 2 . 5 : 1 までの範囲である；請求項 3 1 又は請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記解重合剤が酸化剤、好ましくは過酸化物化合物、さらに好ましくは過酸化水素を有する酸化反応混合物を有し、前記未分画 N , 2 , 3 , 6 - H S 生成物の酸化的開裂を引き起こすのに十分な時間、前記酸化反応混合物を用いて前記未分画 N , 2 , 3 , 6 - H S 生成物を処理し、それにより酸化 L M W - H S 生成物を形成する請求項 2 0 又は請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記酸化剤を用いて前記未分画 N , 2 , 3 , 6 - H S 生成物を処理する工程が、

(i) 好ましくは酸、さらに好ましくはアスコルビン酸の添加時に、前記未分画 N , 2 , 3 , 6 - H S 生成物を酸性化して、酸性化未分画 N , 2 , 3 , 6 - H S 生成物を形成するサブ工程；

(i i) 前記酸性化未分画 N , 2 , 3 , 6 - H S 生成物を前記酸化反応混合物と組み合わせるサブ工程；及び

(i i i) 少なくとも 5 0 の温度で、前記酸化 L M W - H S 生成物を形成するのに十分な時間、前記酸化反応混合物内で前記酸性化未分画 N , 2 , 3 , 6 - H S 生成物をインキュベートするサブ工程；を有する請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記酸化 L M W - H S 生成物は、

(A) 重量平均分子量が少なくとも 4 , 0 0 0 D a から 6 , 0 0 0 D a までの範囲内であり、好ましくは 5 , 0 0 0 D a であり；

(B) 抗 X a 活性が少なくとも $95 \text{ IU } \text{mg}^{-1}$ から $110 \text{ IU } \text{mg}^{-1}$ 以下までの範囲であり、且つ抗 X a 活性と抗 I I a 活性との比が少なくとも 1 . 5 : 1 から 3 . 0 : 1 までの範囲である；請求項 3 7 又は請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記酸化 L M W - H S 生成物は、

(A) 重量平均分子量が少なくとも 5 , 5 0 0 D a から 6 , 5 0 0 D a までの範囲内であり、好ましくは 6 , 0 0 0 D a であり；

(B) 抗 X a 活性が $120 + / - 25 \text{ IU } \text{mg}^{-1}$ であり、且つ抗 X a 活性と抗 I I a 活性との比が少なくとも 2 . 0 : 1 から 2 . 5 : 1 までの範囲である；請求項 3 7 又は請求項 3 8 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、スルホ基供与体としてのアリール硫酸化合物と反応するように設計された非天然スルホトランスフェラーゼ酵素を用いる抗凝固性多糖類を合成する方法に関する。

【0 0 0 2】

配列表の参照

本願は電子形式で配列表と共に出願されている。配列表は、2020年7月9日に作成された「OPT-002X PCT_sequence_disclosure.txt」という名称のファイルとして提供され、サイズは175,283バイトである。配列表の電子形式の情報はその全体が参照により組み込まれる。

【背景技術】

【0003】

抗凝固性多糖類は、血液凝固を予防するのに臨床の場で薬剤として一般に処方されている化合物の一種である。これらの化合物は、典型的には、ブタやウシなどの動物の内臓器官から単離、精製される。しかしながら、世界供給量における近年の混乱により、抗凝固性多糖類の潜在的な汚染により（2007年米国のみで汚染された化合物の結果として200人超が死亡している）、又は世界的な供給業者での地政学的緊張のため、抗凝固性多糖類をインビトロ（in vitro）で合成しようとする最近の趨勢がある。

10

【0004】

動物内で、抗凝固性を有する硫酸化多糖類を含む硫酸化多糖類は、スルホ基供与体からスルホ基受容体として機能する多糖への硫酸官能基（「スルホ基」ともいう）の触媒的転位によって合成される。各スルホ基転位は、スルホトランスフェラーゼ酵素によって触媒化され、多数のスルホトランスフェラーゼ酵素によって触媒化される多数のスルホトランスファー反応がしばしば起こり、究極的に各硫酸化多糖生成物に至る。スルホトランスフェラーゼは、自然界ではほぼ遍在的であり、細菌、酵母、及びヒトを含む動物を含むほぼ全ての種類の生物に存在する。同様に、スルホトランスフェラーゼ酵素は、多くの種類のステロイド、多糖類、タンパク質、生体異物、及び他の分子を含む、広範囲のスルホ基受容体の硫酸化において不可欠な役割を果たす。

20

【0005】

特に多糖類に関して、スルホ基受容体として利用することができる多糖類はいくつかあり、例えば、デルマタン、ケラタン、ヘパロサン、及びコンドロイチンが挙げられる。一般に、抗凝固性を有する硫酸化多糖類は、ヘパロサンに基づき、該ヘパロサンは、1→4グリコシド結合したグルクロン酸残基及びN-アセチル化グルコサミン残基の反復二糖単位を有する。天然において、ヘパロサン系多糖類は、N-アセチル基の除去、グルクロン酸残基の立体化学の反転、及び多糖類内の複数の位置へスルホ基を転位する4つの異なるスルホトランスフェラーゼ酵素との反応の際に抗凝固性を獲得する。

30

【0006】

一連のスルホ基受容体が広範囲かつ膨大であり得るので、スルホトランスフェラーゼ酵素により触媒化される反応にスルホ基供与体として用いられる分子の数は比較的小さい。最も典型的には、3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸は、スルホ基供与体として利用され、多糖がスルホ基受容体である反応において、3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸は、たった1つの公知のスルホ基供与体である。しかしながら、3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸は、硫酸化多糖類のインビトロ酵素合成、特に大規模合成を触媒化するのにスルホ基供与体としてしばしば適さない。なぜなら、3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸は半減期が短く、スルホトランスフェラーゼの生物活性を能動的に阻害するアデノシン3', 5'-二リン酸へと容易に分解するからである。一方、インビボ系は、3'-40-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸と排他的且つ効率的に反応するように進化した。なぜなら、アデノシン3', 5'-二リン酸が3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸へと即座に変換することができるか、又はスルホトランスフェラーゼ活性を阻害しない1以上の化合物へと分解されるからである。結果として、3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸をスルホ基供与体として排他的に利用するスルホトランスフェラーゼ酵素の天然の活性は、抗凝固性多糖類のインビトロ化学酵素合成に対する急峻な障壁を提示する。

【0007】

一方、p-ニトロフェニル硫酸（PNS）及び4-メチルウンベリフェリル硫酸（4-methylumbelliferyl sulfate：MUS）などのアリール硫酸化合物は、ある特定の小分子生成物を合成するための非常に限られた数のスルホトランスフェラーゼを有するスル

50

ホ供与体として限定された状況において有用であり得る、安価で広く利用可能な化合物として同定されている (Malojcic, G., et al. (2008) Proc. Nat. Acad. Sci. 105 (49): 19217-19222 及び Kaysser, L., et al., (2010) J. Biol. Chem. 285 (17): 12684-12694 を参照のこと。これらの開示はその全体が参照により本明細書に組み込まれる)。Malojcic に記載されるように、これらのアリール硫酸スルホトランスフェラーゼは、該酵素がまず該アリール硫酸化合物からスルホ基を除去し、スルホ基が活性部位内のアミノ酸側鎖、典型的にはヒスチジン残基と共有結合するスルホヒスチジン中間体を形成する 2 段階のメカニズムを呈する。該酵素の硫酸結合形態はその後、スルホ基受容体を認識し、結合することができ、スルホ基転位を完了することができる。

【0008】

10

しかし、少数の細菌性スルホトランスフェラーゼのみが、スルホ基供与体としてのアリール硫酸化合物と反応することが示されており、スルホ基受容体としての多糖類と反応する真核生物スルホトランスフェラーゼ酵素は、アリール硫酸化合物がスルホ基供与体として用いられると、生物活性を示さない。その代わりに、そのようなスルホトランスフェラーゼ酵素は、上述したように、スルホ供与体としての 3' - ホスホアデノシン 5' - ホスホ硫酸と排他的に反応する。結果として、スルホトランスフェラーゼを硫酸化多糖類のインビトロ合成に使用する場合、スルホトランスフェラーゼは、アリール硫酸化合物から多糖類へと直接にスルホ基の転位を触媒化することができない。その代わりに、3' - ホスホアデノシン 5' - ホスホ硫酸でこの系を再配置するためにアリール硫酸化合物を間接的にのみ使用することができる (米国特許第 6,255,088 号を参照のこと。この開示は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)。

20

【0009】

その結果、スルホ供与体としての 3' - ホスホアデノシン 5' - ホスホ硫酸を利用しない、硫酸化多糖類、特に抗凝固性を有する硫酸化多糖類の容易なインビトロ合成方法を開発する必要がある。特に、スルホ基供与体としてのアリール硫酸化合物及びスルホ基受容体としての多糖類の両方と反応することができるスルホトランスフェラーゼ酵素の開発は、硫酸化多糖類、特に臨床の場で利用することができる抗凝固性多糖類の大規模合成の開発に向けて大きな前進をもたらすであろう。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

30

【0010】

本発明は、スルホ基供与体としてのアリール硫酸化合物からのスルホ基の転移を触媒して、スルホ基受容体としての多糖と反応するように改変された非天然スルホトランスフェラーゼ酵素を使用して、インビトロで硫酸化多糖類を生成する方法を提供する。本発明によれば、多糖類は、抗凝固活性を有する硫酸化多糖を形成するのに利用することができるヘパロサン系多糖とすることができる。本発明によれば、本明細書に記載の方法によって合成された抗凝固性多糖類は、血液凝固を予防するために臨床現場で処方及び投与することができる。

【0011】

本発明の一面において、硫酸化多糖生成物は、(a) 多糖を提供する工程；(b) アリール硫酸化合物を提供する工程；(c) スルホ基供与体としてのアリール硫酸化合物及びスルホ基受容体としての多糖を認識し、それらと結合し、反応するように構成された改変型スルホトランスフェラーゼ酵素を提供する工程；(d) 改変型スルホトランスフェラーゼ酵素を多糖及びアリール硫酸化合物と組み合わせることによって反応混合物を形成する工程；及び(e) 改変型スルホトランスフェラーゼ酵素を用いて、アリール硫酸化合物から多糖へのスルホ基の酵素的転移を触媒して、硫酸化多糖生成物を形成する工程；を有する方法によって酵素的に合成することができる。本発明によれば、多糖は、GlcA がグルクロン酸であり、GlcNAc が N - アセチルグルコサミンであるヘパロサン [β(1, 4) GlcA - α(1, 4) GlcNAc]_n 由来のヘパロサン系多糖とすることができる。ヘパロサン系多糖は、1 → 4 グリコシド結合したヘキスロン酸残基及びグルコサミ

40

50

ン残基の反復二量体を有し、各ヘキスロン酸は、グルクロン酸（GlcA、上記）又はイズロン酸（IdoA）のいずれかであり、各グルコサミン残基は、N - アセチル化、N - 硫酸化、又はN - 非置換とすることができる。グルコサミン残基のうちの少なくとも1つがN - 非置換であるヘパロサン系多糖は、N - 脱アセチル化ヘパロサンとも称することができる。さらに、様々な態様において、改変型スルホトランスフェラーゼ酵素と反応させる前に、GlcA残基又はIdoA残基のいずれかを2 - O位で硫酸化することができるか、及び/又はグルコサミン残基のいずれかをN - 、6 - O、又は3 - O位で硫酸化することができる。ヘキスロン酸残基又はグルコサミン残基内に、上記のいずれかの位置に少なくとも1つの硫酸基を含むヘパロサン系多糖類はヘパラン硫酸（HS）とも称することができる。

10

【0012】

本発明によれば、上記の面及び態様のうちのいずれか1つ以上と組み合わせで有用であり、第1のスルホ転移反応（sulfotransfer reaction）で形成された硫酸化多糖生成物は、別のスルホトランスフェラーゼ酵素との後続の反応ではスルホ基受容体として利用することができる。この後続の反応は、第1のスルホ転移反応と同じ反応混合物中で、又は硫酸化多糖生成物を単離し、それをスルホ基供与体及びスルホトランスフェラーゼ酵素と組み合わせた後の別個の反応混合物中で行われてもよい。様々な態様において、複数のスルホ転移反応は、少なくとも2つ、少なくとも3つ、又は少なくとも4つのスルホ転移反応を含む、単一のヘパロサン系多糖を用いて、連続的に又は同時に行うことができる。ヘパロサン系多糖での複数のスルホ転移反応の各々は、少なくとも2つ、少なくとも3つ、又は最大4つのスルホトランスフェラーゼ酵素によって触媒化することができる。様々な態様において、スルホ転移反応のうちの少なくとも1つ、好ましくは全部が、スルホ基供与体としてのアリール硫酸化合物を認識し、それと結合し、反応する改変型スルホトランスフェラーゼ酵素によって触媒される。さらなる態様において、スルホ転移反応のうちの少なくとも1つ、好ましくは全部が、アリール硫酸化合物のみを硫酸供与体として含み、3' - ホスホアデノシン5' - ホスホ硫酸を含まない反応混合物中で行われる。

20

【0013】

本発明の他の面において、各改変型スルホトランスフェラーゼ酵素は、該酵素の生物学的活性を、スルホ基供与体としての3' - ホスホアデノシン5' - ホスホ硫酸との反応から、スルホ基供与体としてのアリール硫酸化合物との反応に移行させるために、対応する野生型スルホトランスフェラーゼ酵素の活性部位内に作製されたいくつかのアミノ酸変異を有する。ただし、様々な態様において、各改変型スルホトランスフェラーゼ酵素は、その特定のスルホ受容体多糖との野生型酵素の生物学的活性を保持する。非限定的な例として、該酵素がスルホ基供与体としての3' - ホスホアデノシン5' - ホスホ硫酸及びスルホ基受容体としてのN - 硫酸化HSと反応する生物学的活性を有する野生型HSヘキシロニル2 - Oスルホトランスフェラーゼを複数のアミノ酸位置で変異させて、スルホ基供与体としてのアリール硫酸化合物を認識し、それと結合し、反応するが、依然としてスルホ基受容体としてのN - 硫酸化HSと反応する改変型スルホトランスフェラーゼ酵素を生成することができる。そのような改変型アリール硫酸依存性ヘキシロニル2 - Oスルホトランスフェラーゼ酵素及び他の改変型アリール硫酸依存性酵素を、以下にさらに詳述する。

30

40

【0014】

本発明の他の面において、N - 、2 - O - 、3 - O - 、6 - O - 硫酸化ヘパラン硫酸（N, 2, 3, 6 - HS）生成物を合成することができ、該方法は、（a）N - 脱アセチル化ヘパロサンを有する出発多糖反応混合物を提供する工程；（b）出発多糖反応混合物をスルホ基供与体とグルコサミニルN - スルホトランスフェラーゼ酵素、ヘキシロニル2 - Oスルホトランスフェラーゼ酵素及びグルコサミニル6 - Oスルホトランスフェラーゼ酵素からなる群から選択される第1のスルホトランスフェラーゼ酵素とを有する反応混合物と組み合わせ、第1の硫酸化多糖を形成する工程；（c）第1の硫酸化多糖をスルホ基供与体と工程（b）で選択されなかった2つの酵素のうちの1つである第2のスルホトランスフェラーゼ酵素とを有する反応混合物と組み合わせ、第2の硫酸化多糖を形成する

50

工程；(d)第2の硫酸化多糖をスルホ基供与体と工程(b)又は工程(c)で選択されなかった酵素である第3のスルホトランスフェラーゼ酵素とを有する反応混合物と組み合わせて、第3の硫酸化多糖を形成する工程；及び(e)第3の硫酸化多糖をスルホ基供与体とグルコサミニル3-Oスルホトランスフェラーゼ酵素とを有する反応混合物と組み合わせて、N, 2, 3, 6-HS生成物を形成する工程を有し、(i)スルホトランスフェラーゼ酵素のうちの少なくとも1つは、スルホ転移反応を触媒するためにスルホ基供与体としてのアリール硫酸化合物と反応することに依存する改変型スルホトランスフェラーゼ酵素であり、(ii)改変型スルホトランスフェラーゼ酵素を有する反応混合物において、該反応混合物はスルホ基供与体としてアリール硫酸化合物を有する。様々な態様において、第1のスルホトランスフェラーゼ酵素はグルコサミニルN-スルホトランスフェラーゼ酵素であり、第2のスルホトランスフェラーゼ酵素はヘキサロニル2-Oスルホトランスフェラーゼ酵素であり、第3のスルホトランスフェラーゼ酵素はグルコサミニル6-Oスルホトランスフェラーゼ酵素である。

10

【0015】

本発明の他の面において、N, 2, 3, 6-HS生成物を合成する方法は、以下の工程を有することができる。すなわち、(a)N-硫酸化ヘパロサンを有する出発多糖反応混合物を提供する工程；(b)出発多糖反応混合物をスルホ基供与体とヘキサロニル2-Oスルホトランスフェラーゼ酵素及びグルコサミニル6-Oスルホトランスフェラーゼ酵素からなる群から選択される第1のスルホトランスフェラーゼ酵素とを有する反応混合物と組み合わせて、第1の硫酸化多糖生成物を形成する工程；(c)第1の硫酸化多糖生成物をスルホ基供与体と工程(b)で選択されなかった酵素である第2のスルホトランスフェラーゼ酵素とを有する反応混合物と組み合わせて、第2の硫酸化多糖生成物を形成する工程；及び(d)第2の硫酸化多糖生成物をスルホ基供与体とグルコサミニル3-Oスルホトランスフェラーゼ酵素とを有する反応混合物と組み合わせて、N, 2, 3, 6-HS生成物を形成する工程；を有することができ、(i)スルホトランスフェラーゼ酵素のうちの少なくとも1つは、スルホ転移反応を触媒するためにスルホ基供与体としてのアリール硫酸化合物と反応することに依存する改変型スルホトランスフェラーゼ酵素であり、(ii)改変型スルホトランスフェラーゼ酵素を有する反応混合物において、該反応混合物はスルホ基供与体としてアリール硫酸化合物を有する。様々な態様において、第1のスルホトランスフェラーゼ酵素はヘキサロニル2-Oスルホトランスフェラーゼ酵素であり、第2のスルホトランスフェラーゼ酵素はグルコサミニル6-Oスルホトランスフェラーゼ酵素である。

20

30

【0016】

様々な態様において、N-硫酸化ヘパロサンを有する出発多糖反応混合物は、N-脱アセチル化ヘパロサン、スルホ基供与体及びグルコサミニル-N-スルホトランスフェラーゼ酵素を反応混合物中に組み合わせることによって提供することができる。様々な態様において、グルコサミニル-N-スルホトランスフェラーゼ酵素は、3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸の非存在下でスルホ基供与体としてのアリール硫酸化合物と反応する改変型スルホトランスフェラーゼである。様々な態様において、N-硫酸化ヘパロサンは、野生型グルコサミニルN-デアセチラーゼ/N-スルホトランスフェラーゼ酵素、3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸及びヘパロサンを組み合わせることによって提供することができる。

40

【0017】

様々な態様において、出発多糖反応混合物を提供する工程は、以下のサブ工程、すなわち、(i)ヘパロサンを含む前駆体多糖組成物を提供するサブ工程；(ii)ヘパロサン内のN-アセチル化グルコサミン残基のうちの少なくとも1つをN-脱アセチル化するのに十分な時間、前駆体多糖組成物を塩基、好ましくは水酸化リチウム又は水酸化ナトリウムを有する反応混合物と組み合わせて、N-脱アセチル化ヘパロサン組成物を形成するサブ工程；及び(iii)N-脱アセチル化ヘパロサン組成物をN-硫酸化剤を有する反応混合物と組み合わせて、それによりN-硫酸化ヘパロサンを形成するサブ工程；を有する

50

、N - 硫酸化ヘパロサンの化学合成を有することができる。

【0018】

様々な態様において、ヘパロサンを有する前駆体多糖組成物を提供する工程は、細菌細胞培養物又は真核細胞培養物、好ましくは細菌細胞培養物、さらに好ましくは大腸菌 (*Escherichia coli*) (*E. coli*) の K 5 株及び大腸菌の B L 2 1 株からなる群から選択される細菌を有する細菌細胞培養物からヘパロサンを単離するサブ工程をさらに有することができる。ヘパロサンは、少なくとも 10,000 Da から少なくとも 500,000 Da までの重量平均分子量を有する多糖の多分散混合物として大腸菌から単離することができる。様々な態様において、ヘパロサン内のグルコサミン残基の少なくとも 90% が N - アセチル化される。

10

【0019】

塩基、例えば水酸化リチウム又は水酸化ナトリウムを用いてヘパロサンを処理すると、N - アセチルグルコサミン残基からアセチル基が除去され、続いて N - 硫酸化することができる N - 非置換グルコサミン残基が形成される。様々な態様において、N - アセチル化グルコサミン残基の相対数を所望のレベルまで減少させるのに十分な時間、塩基を用いて前駆体多糖を処理することができる。反応時間は、前駆体多糖組成物内のヘパロサンの平均分子量、塩基と反応する前のヘパロサンの N - アセチルグルコサミン含有量、N - 脱アセチル化ヘパロサン組成物内の所望の N - アセチル含有量、並びに塩基自体の濃度及び同一性などの要因に依存することができる。様々な態様において、前駆体多糖組成物内のヘパロサンを N - 脱アセチル化するのに十分な時間は、グルコサミン残基の 60% 未満から 5% 未満まで、好ましくは 12% ~ 18% の範囲、さらに好ましくは 15% が N - アセチル化されたままである N - 脱アセチル化ヘパロサン組成物を形成するのに十分な時間とすることができる。

20

【0020】

さらに、塩基を用いて前駆体多糖組成物を処理して N - アセチル化グルコサミン残基の数を減少させることは、ヘパロサンを解重合し、N - 脱アセチル化ヘパロサン組成物の平均分子量を前駆体多糖組成物よりも低くする効果も有することができる。したがって、様々な態様において、所望の平均分子量を有する N - 脱アセチル化ヘパロサン組成物を形成するのに十分な時間、塩基を用いて前駆体多糖組成物を処理することができる。上記と同様に、反応時間は、前駆体多糖組成物内のヘパロサンの平均分子量、及び N - 脱アセチル化ヘパロサン組成物自体内の多糖の所望の平均分子量を含むいくつかの要因に依存することができる。様々な態様において、前駆体多糖組成物内のヘパロサンを N - 脱アセチル化するのに十分な時間は、1,500 Da ~ 100,000 Da、例えば少なくとも 9,000 Da から 12,500 Da までの範囲の重量平均分子量を有する N - 脱アセチル化多糖組成物を形成するのに十分な時間とすることができる。

30

【0021】

様々な態様において、N - 脱アセチル化ヘパロサンが形成されると、得られた N - 非置換グルコサミン残基は、N - 硫酸化剤、例えば、改変型又は野生型グルコサミン N - スルホトランスフェラーゼ酵素などからスルホ基を受容することができる。様々な態様において、N - 脱アセチル化ヘパロサン内の N - 非置換グルコサミン残基のうちの 1 つ以上は、化学的に N - 硫酸化することができる。様々な態様において、化学的 N - 硫酸化は、グルコサミン N - スルホトランスフェラーゼ酵素によって触媒される酵素的 N - 硫酸化を補完又は置換することができる。化学的 N - 硫酸化剤の非限定的な例として、三酸化硫黄含有化合物又は付加物、特に三酸化硫黄 - トリメチルアミン付加物を含む反応混合物を挙げることができる。

40

【0022】

様々な態様において、化学的及び / 又は酵素的 N - 硫酸化のいずれかによって、N - 脱アセチル化ヘパロサン内のグルコサミン残基の少なくとも約 10% から少なくとも約 95% までが、N - 硫酸化剤によって N - 硫酸化されてから、2 - O、3 - O 又は 6 - O 位のいずれかで硫酸化される。

50

【0023】

様々な態様において、本明細書に記載の方法のいずれかによるN, 2, 3, 6-HS生成物の合成中に、2-O硫酸化工程の後に、ヘパロサン系多糖の3-O硫酸化を触媒してN, 2, 3-HS生成物を形成し、続いて6-O硫酸化を触媒してN, 2, 3, 6-HS生成物を形成することができる。さらに、本明細書に記載の方法内のスルホ転移反応工程のいずれかでは、改変型スルホトランスフェラーゼ酵素を有さない反応混合物は、3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸及びスルホ基供与体としての3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸との生物学的活性を有する野生型HSスルホトランスフェラーゼ酵素を有することができる。様々な態様において、N, 2, 3, 6-HS生成物を形成するのに用いられるグルコサミニルN-スルホトランスフェラーゼ酵素、ヘキサロニル2-Oスルホトランスフェラーゼ酵素及びグルコサミニル6-Oスルホトランスフェラーゼ酵素のうちの1つ以上が野生型HSスルホトランスフェラーゼ酵素であっても、3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸の非存在下で、スルホ基供与体としてアリール硫酸化合物を用い、改変型グルコサミニル3-Oスルホトランスフェラーゼ酵素を用いて合成が完了する。様々な態様において、N, 2, 3, 6-HS生成物の合成の全スルホ転移工程におけるスルホトランスフェラーゼ酵素は、改変型スルホトランスフェラーゼ酵素であり、各工程におけるスルホ基供与体は、1つ以上のアリール硫酸化合物からなる。様々な態様において、スルホ転移反応のうちの1つ以上のための反応混合物は、単一の反応容器又は「ポット」内に組み合わせることができる。他の態様において、スルホ転移反応の各々は、別個の反応容器内で連続的に行うことができる。

【0024】

様々な態様において、スルホ基供与体として利用することができるアリール硫酸化合物は、C-O結合を有する硫酸エステル結合と共に結合した、芳香族部分に共有結合したスルホ基を含むオルガノスルフェートである。本発明の改変型酵素の好適な基質であるアリール硫酸化合物の非限定的な例には、p-ニトロフェニル硫酸(PNS)、4-メチルウンベリフェリル硫酸(MUS)、7-ヒドロキシクマリン硫酸、フェニル硫酸、4-アセチルフェニル硫酸、インドキシル硫酸、1-ナフチル硫酸、2-ナフチル硫酸(2NapS)及び4-ニトロカテコール硫酸(NCS)が挙げられる。様々な態様において、本発明の方法のいずれかに従って利用される改変型酵素は、PNSを認識し、それと結合し、反応することができる。いくつかの態様において、PNSは、N, 2, 3, 6-HS生成物の合成中のあらゆるスルホ転移反応においてアリール硫酸化合物として使用することができる。本発明によれば、本発明の方法のいずれかに従って利用される改変型酵素は、NCSを認識し、それと結合し、反応することができる。いくつかの態様において、NCSは、N, 2, 3, 6-HS生成物の合成中のあらゆるスルホ転移反応においてアリール硫酸化合物として使用することができる。本発明によれば、本発明の方法のいずれかに従って利用される単一の改変型酵素は、複数のアリール硫酸化合物を認識し、それと結合し、反応することができる。

【0025】

様々な態様において、本明細書に記載の方法のいずれかによるN, 2, 3, 6-HS生成物の合成に利用される改変型スルホトランスフェラーゼ酵素の各々は、スルホ基供与体と同じアリール硫酸化合物と反応するように選択することができる。他の態様において、改変型スルホトランスフェラーゼ酵素のうちの1つ以上は、N, 2, 3, 6-HS生成物の同じ合成で利用される他の酵素とは異なるアリール硫酸化合物との生物学的活性を有することができる。非限定的な例として、単一の反応混合物中で複数のスルホ転移反応が起こる、N, 2, 3, 6-HS生成物の合成では、PNS及びNCSはともに、反応混合物内に含めることができる。

【0026】

様々な態様において、アリール硫酸化合物と反応する改変型酵素のいずれかによって触媒されるスルホ転移反応の進行は、スルホ基がアリール硫酸化合物から除去された後に形成される脱硫酸化芳香族化合物による蛍光、及び/又は光の吸収をモニタリングすること

によって部分的に決定することができる。例えば、アリール硫酸化合物として P N S を含むスルホ転移反応の進行は、反応混合物による 405 nm での光の吸収をモニタリングすることによって、P N S から多糖へのスルホ基の転移の結果としての p - ニトロフェノールの生成を追跡する紫外可視 (U V - V i s) 分光光度アッセイを使用することによって評価することができる。同様に、アリール硫酸化合物として N C S を含むスルホ転移反応の進行は、U V - V i s アッセイを使用して、反応混合物による 515 nm での光の吸収をモニタリングすることによって、N C S から多糖へのスルホ基の転移の結果としての 4 - ニトロカテコールの生成を追跡することによって評価することができる。当業者であれば、4 - メチルウンベリフェリル硫酸、7 - ヒドロキシクマリン硫酸、フェニル硫酸、4 - アセチルフェニル硫酸、インドキシル硫酸、1 - ナフチル硫酸及び 2 - ナフチル硫酸を含む特定のアリール硫酸化合物の同一性及びスペクトル特性に基づいて反応の進行をモニタリングするために、U V - V i s 分光光度アッセイ又は蛍光分光アッセイを選択するかどうかを容易に決定することができる。

10

【0027】

様々な態様において、限定するものではないが、前駆体多糖、出発多糖、硫酸化多糖生成物及び / 又は抗凝固性多糖を含む、本発明の方法のいずれかを実施している間に出発材料として使用されるか生成物として形成されるヘパロサン系多糖を含む任意の反応混合物又は組成物内で、多糖は、可変の鎖長、分子量、N - アセチル化及び / 又は N - 、2 - O 、6 - O 又は 3 - O 硫酸化を有する多糖の多分散混合物として存在することができる。あるいは、上記の多糖のいずれも、同一の鎖長、分子量、N - アセチル化及び / 又は N - 、2 - O 、6 - O 又は 3 - O 硫酸化を有する多糖から構成される均質な組成物として存在することができるか、提供することができる。

20

【0028】

様々な態様において、本明細書に記載のスルホ転移反応のいずれかにおいてスルホ基受容体として使用することができるヘパロサン系多糖は、一般に、1,000 Da 超、例えば 1,000,000 Da 超の任意の分子量とすることができる。様々な態様において、N - 脱アセチル化ヘパロサン多糖を含む組成物又は混合物は、好ましくは少なくとも 9,000 Da から 12,500 Da までの範囲の重量平均分子量を有することができる。様々な態様において、上記の方法のいずれかによる反応のいずれかの硫酸化多糖生成物は、スルホ基受容体として使用される多糖の分子量に基づいて、単一のスルホ基 (約 80 Da) の付加、並びにあらゆる利用可能な N、2 - O、3 - O 及び / 又は 6 - O 位へのスルホ基の付加までに関連する分子量を有することができる。

30

【0029】

様々な態様において、本明細書に記載の N、2、3、6 - H S 生成物を合成するための方法のいずれかにおいて、改変型スルホトランスフェラーゼ酵素及びアリール硫酸化合物を有する任意の反応混合物は、アリール硫酸化合物を再配置するための 1 つ以上の成分をさらに有することができる。様々な態様において、アリール硫酸化合物を再配置するための 1 つ以上の成分は、アリール硫酸スルホトランスフェラーゼ (A S S T) 酵素及び第二級アリール硫酸化合物を有することができる。本発明によれば、改変型スルホトランスフェラーゼ酵素は、スルホ基供与体としての第二級アリール硫酸化合物との活性が最小限であるか又は全くない。任意の細菌由来の A S S T 酵素を利用することができ、細菌から直接単離するか、又はインビトロで発現宿主から組換え生成することができる。様々な態様において、A S S T 酵素は、配列番号 55 のアミノ酸配列を有する大腸菌株 C F T 0 7 3 由来の組換え A S S T とすることができる。

40

【0030】

非限定的な一例では、N、2、6 - H S 生成物、N C S、及び配列番号 28 のアミノ酸配列を有する改変型グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素を有する反応混合物は、A S S T 酵素及び P N S をさらに有することができ、配列番号 28 のアミノ酸配列を有する改変型酵素は活性ではない。4 - ニトロカテコールは、スルホ転移反応の生成物として形成されると、次いで、P N S と A S S T 酵素との反応のためのスルホ基受容体

50

として作用し、それによって、配列番号 28 のアミノ酸配列を有する改変型酵素とのその後の反応のために NCS を改質することができる。あるいは、N, 2, 3, 6 - HS 生成物を形成するためのスルホ転移反応に利用される NCS は、配列番号 28 のアミノ酸配列を有する改変型グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素、4 - ニトロカテコール、PNS、及び ASS T 酵素を有する反応混合物を形成することによってインサイチュで生成することができる。

【0031】

様々な態様において、本明細書に記載の方法のいずれかで利用される改変型グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ酵素は、アリール硫酸化合物から、ヘパロサン系多糖、好ましくは N - 脱アセチル化ヘパロサンの N - 非置換グルコサミン残基のアミン官能基へのスルホ基の転移を触媒する限り、任意のアミノ酸配列を有することができる。さらなる態様において、改変型グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ酵素は、酵素クラス (EC) 2.8.2.8 のメンバーである、HS グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ活性を有する天然スルホトランスフェラーゼの変異体とすることができる。本発明によれば、改変型グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ酵素、又は単一の N - スルホトランスフェラーゼドメインは、3' - ホスホアデノシン 5' - ホスホ硫酸の代わりにスルホ基供与体としてのアリール硫酸化合物と結合し、反応するように活性部位を再構成するために、1 つ以上の天然 EC 2.8.2.8 酵素と比較していくつかのアミノ酸変異を有することができる。

10

20

【0032】

本明細書に記載の方法のいずれかに従って利用される改変型グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ酵素は、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 33、配列番号 34、配列番号 35、配列番号 36、配列番号 37、配列番号 38、配列番号 39、及び配列番号 40 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有することができ、これらは各々、EC 2.8.2.8 内の天然グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ酵素の N - スルホトランスフェラーゼドメイン内の高度に保存された領域と比較して作製されたいくつかのアミノ酸変異を含む。様々な態様において、本明細書に記載の方法のいずれかに従って利用される改変型グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ酵素はまた、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 33、配列番号 34、配列番号 35、配列番号 36、配列番号 37、配列番号 38、配列番号 39、及び配列番号 40 からなる群から選択されるアミノ酸配列からの 1 つ以上のアミノ残基の差又は変異を有するアミノ酸配列、及び / 又はその生物学的機能的等価物であるアミノ酸配列を含むことができる。そのような残基の差の非限定的な例には、アミノ酸の挿入、欠失、置換、又はそのような変化の任意の組合せが挙げられる。

30

40

【0033】

様々な態様において、上記の改変型グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ酵素のいずれも、EC 2.8.2.8 内の天然 N - デアセチラーゼ / N - スルホトランスフェラーゼ酵素のいずれかに存在する N - デアセチラーゼドメインと同一であるか、又はそれらと比較して変異している N - デアセチラーゼドメインをさらに含むことができる。様々な態様において、改変型グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ酵素のいずれも、溶解性又は二次生化学反応を促進するために、他のドメイン、又は他のタンパク質との融合物をさらに含むことができる。

【0034】

様々な態様において、EC 2.8.2.8 内の任意の天然グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ酵素を用いて HS 生成物、特に N, 2, 3, 6 - HS 生成物の合成中に、N - 硫酸化を触媒することができ、そこで改変型スルホトランスフェラーゼ酵素を利用して多糖の 2 - O、6 - O 及び / 又は 3 - O 硫酸化を触媒する。天然グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ酵素は、N - デアセチラーゼドメイン及び N - スルホトランスフェラーゼドメインの両方、単一の N - スルホトランスフェラーゼドメイン、又はその生

50

物学的に活性な断片を含むことができる。天然グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ酵素を有する反応混合物はまた、スルホ基供与体として 3' - ホスホアデノシン 5' - ホスホ硫酸を有する。

【0035】

スルホ基を受容しないヘパロサン系多糖内のグルコサミン残基は、N - 、3 - O 及び / 又は 6 - O 硫酸化、N - アセチル化するか、又は N - 非置換とすることができ、ヘキシロン酸残基は、GlcA 又は IdOAc を含むことができ、GlcA 又は IdOAc のいずれも 2 - O 位で硫酸化することができる。好ましくは、本発明によれば、ヘパロサン系多糖は N - 脱アセチル化ヘパロサンである。様々な態様において、N - 非置換グルコサミン残基の 6 - O 基は、N - 硫酸化反応の前に既に硫酸化されていてもよい。

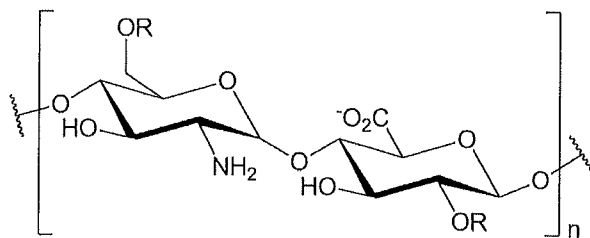
10

【0036】

スルホ基受容体として天然又は改変型グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ酵素と反応することができるヘパロサン系多糖内の二糖単位の子非限定的な一例は、以下の式 I I (式中、n は整数であり、R は水素原子又はスルホ基からなる群から選択される) の構造を含むことができる。

【0037】

【化 1】



20

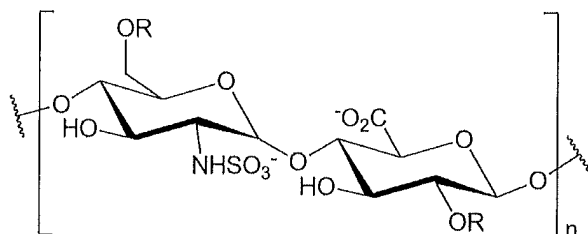
【0038】

様々な態様において、ある二糖単位内、好ましくはあらゆる二糖単位の両 R 基は、水素原子とすることができる。スルホ受容体多糖が式 I I の構造を有する場合、アリール硫酸化合物からスルホ基を転移させると、硫酸化多糖生成物は、以下の式 I I I (式中、n は整数であり、R は、水素原子又はスルホ基からなる群から選択される) の構造を有する。様々な態様において、二糖単位内の両 R 基は水素原子である。

30

【0039】

【化 2】



40

【0040】

様々な態様において、本明細書に記載の方法のいずれかで利用される改変型ヘキシロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼ酵素は、アリール硫酸化合物から、ヘパロサン系多糖、特に N - 硫酸化 HS 多糖内のヘキシロン酸残基の 2 - O 位へのスルホ基の転移を触媒する限り、任意のアミノ酸配列を有することができる。さらなる態様において、改変型ヘキシロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼ酵素は、酵素クラス EC 2 . 8 . 2 . - のメンバーである、HS ヘキシロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼ活性を有する天然スルホトランスフェラーゼの変異体とすることができる。本発明によれば、改変型ヘキシロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼ酵素は、3' - ホスホアデノシン 5' - ホスホ硫酸の代わりにスルホ基供与体としてのアリール硫酸化合物と結合し、反応するように活性部位を再

50

構成するために、H S ヘキシロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼ活性を有する天然 E C 2 . 8 . 2 . - 酵素のうちの 1 つ以上と比較していくつかのアミノ酸変異を有することができる。

【 0 0 4 1 】

本明細書に記載の方法のいずれかに従って利用される改変型ヘキシロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼ酵素は、配列番号 1 4、配列番号 1 6、配列番号 4 1、及び配列番号 4 2 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有することができ、これらは各々、E C 2 . 8 . 2 . - 内の天然 H S ヘキシロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼ酵素内の高度に保存された領域と比較して作製されたいくつかのアミノ酸変異を含む。様々な態様において、本明細書に記載の方法のいずれかに従って利用される改変型ヘキシロニル 2 - O - スルホトランスフェラーゼ酵素はまた、配列番号 1 4、配列番号 1 6、配列番号 4 1、及び配列番号 4 2 からなる群から選択されるアミノ酸配列からの 1 つ以上のアミノ残基の差又は変異を有するアミノ酸配列、及び / 又はその生物学的機能的等価物であるアミノ酸配列を有することができる。そのような残基の差の非限定的な例には、アミノ酸の挿入、欠失、置換、又はそのような変化の任意の組合せが挙げられる。

10

【 0 0 4 2 】

様々な態様において、E C 2 . 8 . 2 . - 内の任意の天然 H S ヘキシロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼ酵素又はその生物学的に活性な断片を利用して、H S 生成物、特に N , 2 , 3 , 6 - H S 生成物の合成中に、2 - O 硫酸化を触媒することができ、そこで改変型スルホトランスフェラーゼ酵素を利用して多糖の N -、6 - O 及び / 又は 3 - O 硫酸化を触媒する。天然 H S ヘキシロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼ酵素を有する反応混合物はまた、スルホ基供与体として 3 ' - ホスホアデノシン 5 ' - ホスホ硫酸を有する。

20

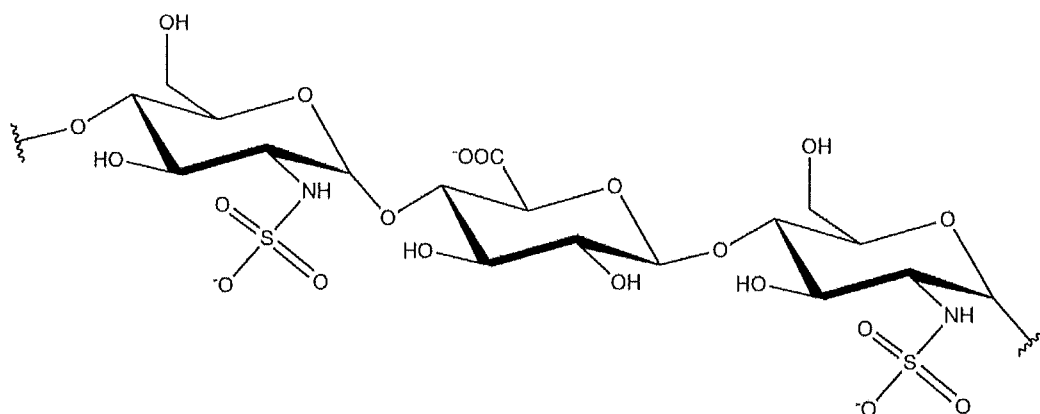
【 0 0 4 3 】

様々な態様において、ヘキシロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼ酵素からスルホ基を受容することができるヘキシロン酸残基は、グルクロン酸又はイズロン酸のいずれか、好ましくはイズロン酸とすることができるが、多糖内の他のヘキシロン酸残基は、いずれも 2 - O 硫酸化することができるグルクロン酸又はイズロン酸とすることができる。スルホ基を受容するヘキシロン酸残基に隣接する両グルコサミン残基は、改変型又は天然ヘキシロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼと反応する前に N - 硫酸化されていてもよく、好ましくは N - 硫酸化されている。スルホ基を受容するヘキシロン酸残基に隣接していないグルコサミン残基は、場合により、N -、3 - O 及び / 又は 6 - O 硫酸化、N - アセチル化されていてもよいが、又は N - 非置換であってよい。スルホ基受容体として天然又は改変型ヘキシロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼ酵素と反応することができるヘパロサン系多糖の一部の非限定的な一例として下記式 I V の構造を挙げるることができる。

30

【 0 0 4 4 】

【 化 3 】



40

【 0 0 4 5 】

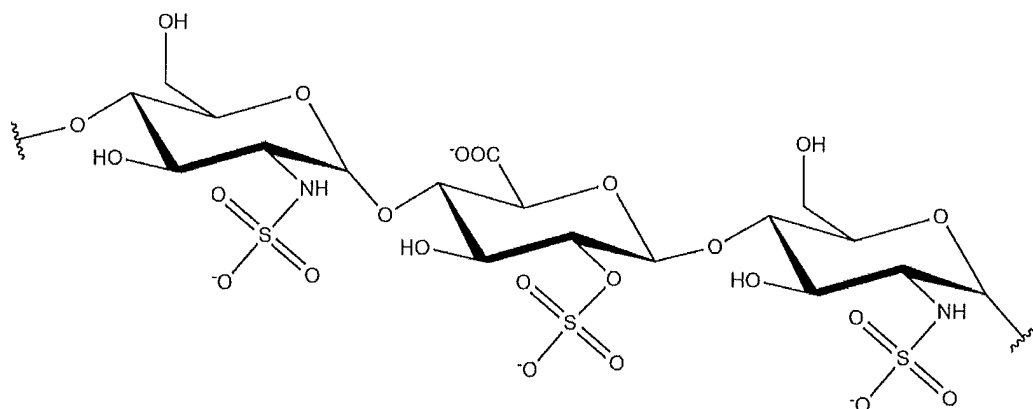
ヘパロサン系多糖が式 I V の構造を有する場合、2 - O 硫酸化多糖生成物は下記式 V I

50

の構造を有する。

【 0 0 4 6 】

【 化 4 】



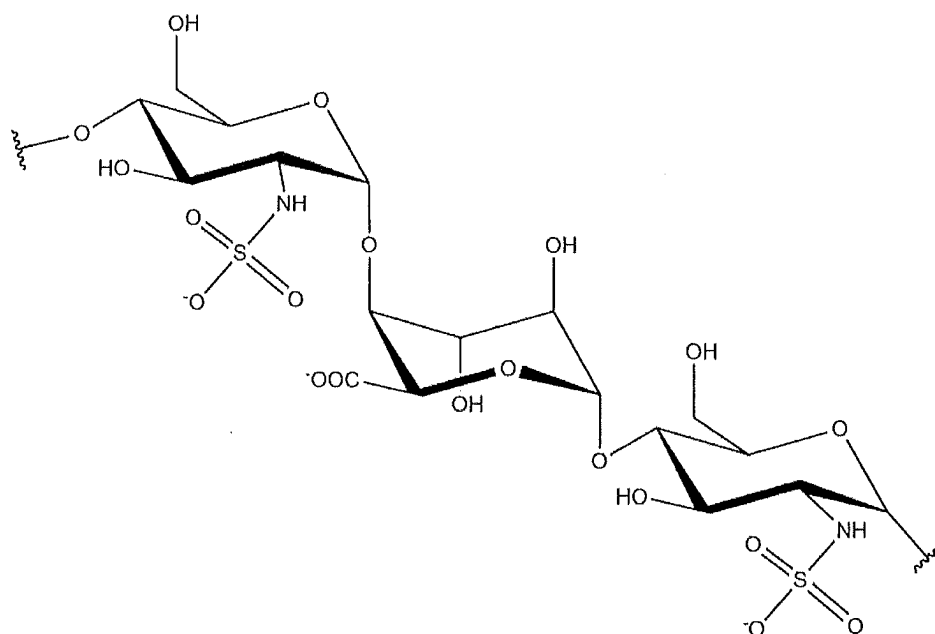
10

【 0 0 4 7 】

別の非限定的な例として、ヘキスロン酸残基が、式 I V に示されるようなグルクロン酸ではなく、イズロン酸である場合、ヘパロサン系多糖は、下記式 V の構造を有する。

【 0 0 4 8 】

【 化 5 】



20

30

【 0 0 4 9 】

ヘパロサン系多糖が式 V の構造を有する場合、2 - O 硫酸化多糖生成物は、下記式 V I

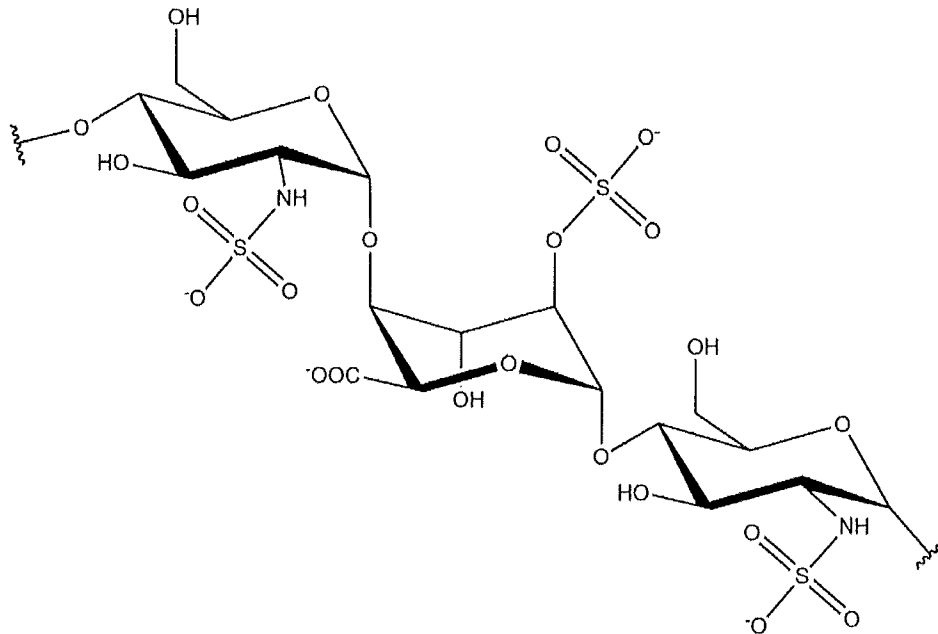
40

I の構造を有する。

【 0 0 5 0 】

50

【化 6】



10

【0051】

20

様々な態様において、グルクロニル C₅ - エピメラーゼ酵素は、改変型又は天然ヘキサロニル 2 - Oスルホトランスフェラーゼの前に、又はそれと同時に、式 I V 及び / 又は式 V の構造を有するヘパロサン系多糖と組み合わせることができる。いくつかの態様において、グルクロニル C₅ - エピメラーゼ酵素は、配列番号 29 のアミノ酸配列、好ましくは配列番号 29 の残基 34 ~ 617 を有することができる。さらなる態様において、配列番号 29 のアミノ酸配列又は配列番号 29 の残基 34 ~ 617 のいずれかを有するグルクロニル C₅ - エピメラーゼ酵素を、N - 硫酸化ヘパロサン及び改変型又は天然ヘキサロニル 2 - Oスルホトランスフェラーゼを有する反応混合物内に含めて、2 - O硫酸化イズロン酸及び N - スルホグルコサミンの 1 つ以上の二糖単位を含む N - 硫酸化 2 - O硫酸化 H S (N, 2 - H S) を形成することができる。

30

【0052】

様々な態様において、本明細書に記載の方法のいずれかで利用される改変型グルコサミニル 6 - Oスルホトランスフェラーゼ酵素は、アリール硫酸化合物から、ヘパロサン系多糖、特に式 V I 及び / 又は式 V I I の構造を有する N, 2 - H S 多糖内のグルコサミン残基の 6 - O 位へのスルホ基の転移を触媒する限り、任意のアミノ酸配列を有することができる。さらなる態様において、改変型グルコサミニル 6 - Oスルホトランスフェラーゼ酵素は、酵素クラス E C 2 . 8 . 2 . - のメンバーである、H S グルコサミニル 6 - Oスルホトランスフェラーゼ活性を有する天然スルホトランスフェラーゼの変異体とすることができる。本発明によれば、改変型グルコサミニル 6 - Oスルホトランスフェラーゼ酵素は、3' - ホスホアデノシン 5' - ホスホ硫酸の代わりにスルホ基供与体としてのアリール硫酸化合物と結合し、反応するように活性部位を再構成するために、H S グルコサミニル 6 - Oスルホトランスフェラーゼ活性を有する天然 E C 2 . 8 . 2 . - 酵素のうちの 1 つ以上と比較していくつかのアミノ酸変異を有することができる。

40

【0053】

本明細書に記載の方法のいずれかに従って利用される改変型グルコサミニル 6 - Oスルホトランスフェラーゼ酵素は、配列番号 18、配列番号 20、配列番号 22、配列番号 43、配列番号 44、配列番号 45、配列番号 46、配列番号 47、配列番号 48、配列番号 49、配列番号 50、配列番号 59、配列番号 60、及び配列番号 61 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有することができ、これらは各々、E C 2 . 8 . 2 . - 内の天然 H S グルコサミニル 6 - Oスルホトランスフェラーゼ酵素内の高度に保存された領域と

50

比較して作製されたいくつかのアミノ酸変異を有する。様々な態様において、改変型グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼは、配列番号 20 のアミノ酸配列を有する。様々な態様において、本明細書に記載の方法のいずれかに従って利用される改変型グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素はまた、配列番号 18、配列番号 20、配列番号 22、配列番号 43、配列番号 44、配列番号 45、配列番号 46、配列番号 47、配列番号 48、配列番号 49、配列番号 50、配列番号 59、配列番号 60、及び配列番号 61 からなる群から選択されるアミノ酸配列からの 1 つ以上のアミノ残基の差又は変異を有するアミノ酸配列、及び / 又はその生物学的機能的等価物であるアミノ酸配列を有することができる。そのような残基の差の非限定的な例には、アミノ酸の挿入、欠失、置換、又はそのような変化の任意の組合せが挙げられる。

10

【0054】

様々な態様において、EC 2.8.2. - 内の任意の天然 HS グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素又はその生物学的に活性な断片を利用して HS 生成物、特に N, 2, 3, 6 - HS 生成物の合成中に、6 - O 硫酸化を触媒することができ、ここで改変型スルホトランスフェラーゼ酵素を利用して多糖の N -、2 - O 及び / 又は 3 - O 硫酸化を触媒する。本発明によれば、天然グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素を有する反応混合物はまた、スルホ基供与体として 3' - ホスホアデノシン 5' - ホスホ硫酸を有する。

【0055】

様々な態様において、グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素からスルホ基を受容することができるグルコサミン残基は、酵素と反応する前に、N - 非置換とするか、又は N - 硫酸化及び / 又は 3 - O 硫酸化とすることができる。スルホ受容体多糖内の任意の他のグルコサミン残基は、場合により、N -、3 - O 及び / 又は 6 - O 硫酸化、N - アセチル化されていてもよい、又は N - 非置換であってよい。ヘパロサン系多糖内のヘキスロン酸残基のいずれも、イズロン酸又はグルクロン酸のいずれかとすることができ、グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素と反応する前に、場合により、2 - O 硫酸化されていてもよい。様々な態様において、6 - O 位にスルホ基を受容するグルコサミン残基は、N - 硫酸化されており、グルコサミン残基の非還元末端及び還元末端のいずれか又は両方において、2 - O 硫酸化イズロン酸残基に隣接している。天然又は改変型グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素と反応することができるヘパロサン系多糖の一部の非限定的な一例として、下記式 V I I I (式中、X は、式 V I I I に示すヘキスロン酸残基のいずれかを含む) の構造を挙げることができる。

20

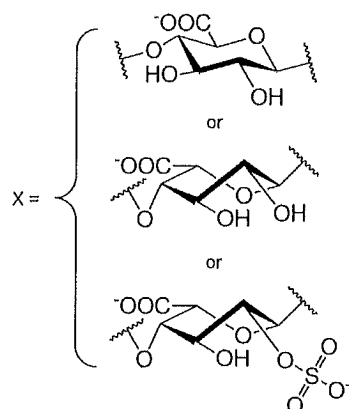
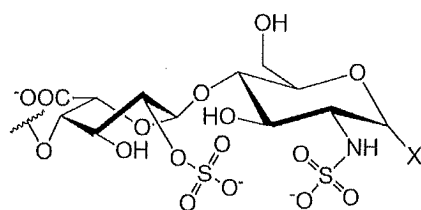
30

【0056】

40

50

【化 7】



10

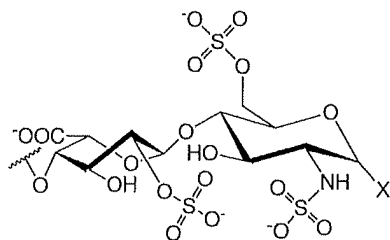
20

【 0 0 5 7 】

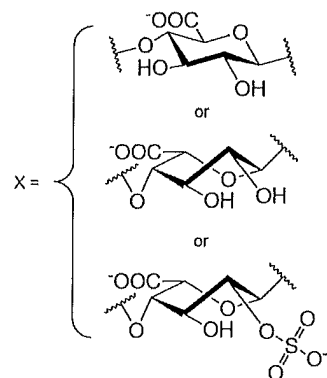
ヘパロサン系多糖が式ⅤⅠⅠⅠの構造を有する場合、6 - O - 硫酸化多糖生成物は、下記式ⅠⅩ（式中、Xは、式ⅠⅩに示すヘキスロン酸残基のいずれかを有する）の構造を有する。

【 0 0 5 8 】

【化 8】



30



40

【 0 0 5 9 】

様々な態様において、式ⅤⅠⅠⅠの構造を有するHS多糖は、グルコサミニル6 - Oスルホトランスフェラーゼと反応すると、N - 硫酸化、2 - O硫酸化、6 - O硫酸化HS（N，2，6 - HS）生成物を形成する、6 - O又は3 - O硫酸化グルコサミン残基を含まないN，2 - HS多糖とすることができる。いくつかの態様において、2 - O硫酸化が6 - O硫酸化の前に確実に起こるように、別個の反応混合物中でグルコサミニル6 - Oスル

50

ホトランスフェラーゼと反応させる前に、ヘキサロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼ反応の生成物として生成された N , 2 - H S 多糖を単離及び精製することができる。他の態様において、ヘキサロン酸残基の 2 - O 硫酸化とグルコサミン残基の 6 - O 硫酸化とを同じ反応混合物中で行うことができる。

【 0 0 6 0 】

様々な態様において、本明細書に記載の方法のいずれかで利用される改変型グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素は、アリール硫酸化合物から、ヘパロサン系多糖、特に N , 2 - H S、N , 2 , 6 - H S 多糖、及び / 又は式 I X の構造を有する H S 多糖内のグルコサミン残基の 3 - O 位へのスルホ基の転移を触媒する限り、任意のアミノ酸配列を有することができる。さらなる態様において、改変型グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素は、酵素クラス E C 2 . 8 . 2 . 2 3 のメンバーである、H S グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ活性を有する天然スルホトランスフェラーゼの変異体とすることができる。本発明によれば、改変型グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素は、3' - ホスホアデノシン 5' - ホスホ硫酸の代わりにスルホ基供与体としてのアリール硫酸化合物と結合し、反応するように活性部位を再構成するために、H S グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ活性を有する天然 E C 2 . 8 . 2 . 2 3 酵素のうちの 1 つ以上と比較していくつかのアミノ酸変異を有することができる。

【 0 0 6 1 】

本明細書に記載の方法のいずれかに従って利用される改変型グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素は、配列番号 2 4、配列番号 2 6、配列番号 2 8、配列番号 5 1、配列番号 5 2、配列番号 5 3、配列番号 5 4、配列番号 5 6、配列番号 5 7、及び配列番号 5 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有することができ、これらは各々、E C 2 . 8 . 2 . 2 3 内の天然 H S グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素内の高度に保存された領域と比較して作製されたいくつかのアミノ酸変異を有する。様々な態様において、本明細書に記載の方法のいずれかに従って利用される改変型グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素はまた、配列番号 2 4、配列番号 2 6、配列番号 2 8、配列番号 5 1、配列番号 5 2、配列番号 5 3、配列番号 5 4、配列番号 5 6、配列番号 5 7、及び配列番号 5 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列からの 1 つ以上のアミノ残基の差又は変異を有するアミノ酸配列、及び / 又はその生物学的機能的等価物であるアミノ酸配列を有することができる。そのような残基の差の非限定的な例には、アミノ酸の挿入、欠失、置換、又はそのような変化の任意の組合せが挙げられる。様々な態様において、改変型グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素は、配列番号 2 8 のアミノ酸配列を有する。

【 0 0 6 2 】

様々な態様において、E C 2 . 8 . 2 . 2 3 内の任意の天然 H S グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素又はその生物学的に活性な断片を利用して H S 生成物、特に N , 2 , 3 , 6 - H S 生成物の合成中に、3 - O 硫酸化を触媒することができ、ここで改変型スルホトランスフェラーゼ酵素を利用して多糖の N -、2 - O 及び / 又は 6 - O 硫酸化を触媒する。様々な態様において、天然 H S グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素を含む反応混合物はまた、3' - ホスホアデノシン 5' - ホスホ硫酸を有する。様々な態様において、天然 H S スルホトランスフェラーゼが N , 2 , 3 , 6 - H S 生成物を形成するために N -、2 - O 又は 6 - O 硫酸化工程のうちの 1 つ以上で利用される場合であっても、改変型グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素が、H S 多糖の 3 - O 硫酸化を触媒するために利用される。

【 0 0 6 3 】

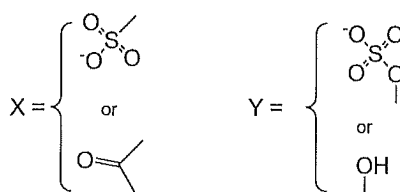
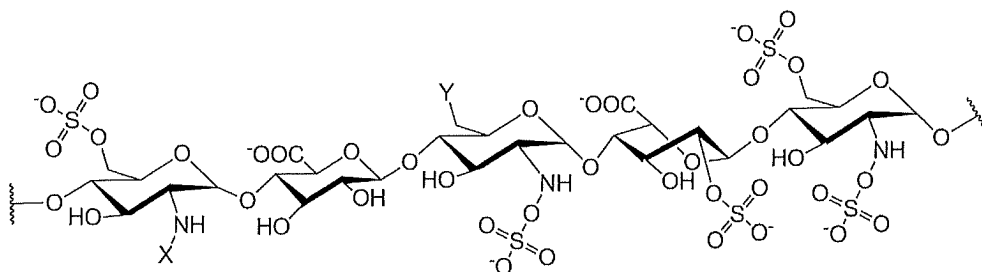
様々な態様において、3 - O 位にスルホ基を受容することができる、H S 多糖内のグルコサミン残基は、N - 硫酸化されており、場合により、6 - O スルホ基も含むことができる。スルホ受容体多糖内の任意の他のグルコサミン残基は、場合により、N -、3 - O 及び / 又は 6 - O 硫酸化、N - アセチル化されていてもよいが、又は N - 非置換であってもよい。様々な態様において、3 - O 硫酸化されているグルコサミン残基を含む、H S 多糖内

のグルコサミン残基のうちの 1 つ以上が、N - 硫酸化及び 6 - O 硫酸化することができる。本発明によれば、3 - O 硫酸化されているグルコサミン残基は、非還元末端の非硫酸化グルクロン酸残基及び還元末端の場合により 2 - O 硫酸化されていてもよいイズロン酸残基に隣接している。HS 多糖内の他のヘキサロン酸残基のいずれも、場合によりイズロン酸又はグルクロン酸とすることができ、場合により 2 - O 硫酸化されていてもよい。スルホ基受容体として天然又は改変型グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素と反応することができる HS 多糖の一部の非限定的な一例として、下記式 X (式中、X はスルホ基又はアセテート基のいずれかであり、Y はスルホ基又はヒドロキシル基のいずれかである) の構造を有することができる。

【 0 0 6 4 】

10

【 化 9 】



20

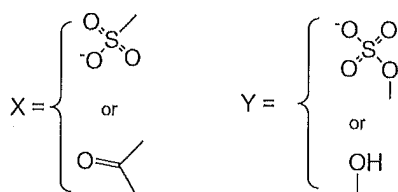
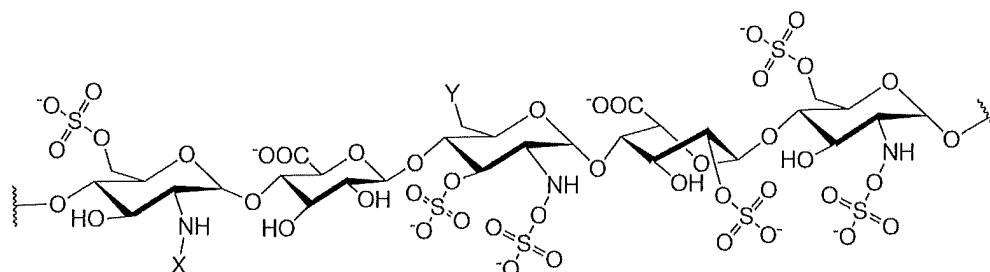
【 0 0 6 5 】

本発明によれば、X はスルホ基とすることができ、Y はスルホ基とすることができ。HS 多糖が式 X の構造を有する場合、3 - O 硫酸化多糖生成物は、下記式 I (式中、X は、スルホ基又はアセテート基のいずれかであり、Y は、スルホ基又はヒドロキシル基のいずれかである。) の構造を含む。様々な態様において、X はスルホ基とし、Y はスルホ基とすることができ。

30

【 0 0 6 6 】

【 化 1 0 】



40

【 0 0 6 7 】

50

様々な態様において、本明細書に記載の方法のいずれかによって合成されたH S生成物は、各二糖単位内に1、2、3又は4個のスルホ基を含むことができ、各二糖単位は、ヘキスロン酸残基(GlcA又はIdoA)及びグルコサミン残基を有する。非限定的な例では、二糖単位の少なくとも45%から90%まで、好ましくは65%~80%の範囲が、N-硫酸化及び6-O硫酸化されているグルコサミン残基を有する。様々な態様において、N-硫酸化及び6-O硫酸化されているグルコサミン残基の少なくとも1%から少なくとも8%まで、好ましくは4%~5%の範囲はまた、3-O硫酸化される。別の非限定的な例では、硫酸化多糖生成物内の二糖単位の少なくとも1%から30%まで、好ましくは3%が、2-O硫酸化イズロン酸及びN-スルホグルコサミンを有する。

【0068】

10

様々な態様において、式Iの構造を有し、本発明の方法のいずれかによって生成されるN, 2, 3, 6-H S多糖は、限定するものではないが、アンチトロンピンに結合し、これを活性化する能力を含む抗凝固活性を有することができる。本発明によれば、上記の面及び態様のうちのいずれか1つ以上と組み合わせて有用であるN, 2, 3, 6-H S生成物は、CAS番号: 9005-49-6又はCAS番号: 9041-08-1によって記載される抗凝固剤化合物のいずれかと実質的に同等である。

【0069】

様々な態様において、アンチトロンピン活性化の抗凝固効果は、特に第IIa因子及び第Xa因子の活性に対するその後続の効果の関数として、1ミリグラム当たりの活性の国際単位(IU mg⁻¹)で定量することができる。様々な態様において、本発明の方法によって作製された抗凝固性多糖は、抗第IIa因子(抗IIa)活性が少なくとも約1 IU mg⁻¹から約500 IU mg⁻¹まで、例えば少なくとも180 IU mg⁻¹とすることができる。様々な態様において、本発明の方法によって作製された抗凝固性多糖は、抗第Xa因子(抗Xa)活性が少なくとも約1 IU mg⁻¹から約500 IU mg⁻¹まで、例えば少なくとも180 IU mg⁻¹とすることができる。様々な態様において、本発明の方法のいずれかによって生成された抗凝固性多糖の抗凝固活性は、少なくとも0.5:1から少なくとも100:1まで、例えば0.9:1~1.1:1の範囲の抗Xa活性と抗IIa活性との比として表すことができる。

20

【0070】

様々な態様において、上記の方法のいずれかによって生成された、抗凝固活性を有するもの有するN, 2, 3, 6-H S生成物混合物は、スルホ基受容体として利用される多糖の重量平均分子量に応じて、少なくとも1,500 Daの平均分子量を有することができる。様々な態様において、抗凝固性N, 2, 3, 6-H S生成物混合物は、2,000 Da~24,000 Daの範囲の重量平均分子量を有することができる。

30

【0071】

一般に、スルホ基受容体として利用される多糖の平均分子量、特に、N-脱アセチル化ヘパロサンの平均分子量は、本明細書に記載の方法のいずれかによって生成されたN, 2, 3, 6-H S生成物の平均分子量に影響を及ぼし得る。様々な態様において、N-脱アセチル化ヘパロサン組成物が少なくとも9,000 Daから12,500 Daまでの重量平均分子量を有するまでヘパロサンを解重合する時間の量を制御することによって、得られたN, 2, 3, 6-H S生成物は、少なくとも15,000 Daから19,000 Daまでの重量平均分子量を有することができる。様々な態様において、N, 2, 3, 6-H S生成物内の多糖鎖の20%以下が、24,000 Daを超える分子量を有することができる。様々な態様において、上記の面及び態様のうちのいずれか1つ以上と組み合わせて有用である、8,000 Da~16,000 Daの分子量を有するN, 2, 3, 6-H S生成物内の多糖鎖の数は、16,000 Da~24,000 Daの分子量を有する多糖鎖の数より多くてよい。

40

【0072】

様々な態様において、本明細書に記載の方法のいずれかによって生成された抗凝固性N, 2, 3, 6-H S生成物混合物は、(a)抗凝固性N, 2, 3, 6-H S生成物混合物

50

の重量平均分子量が少なくとも 15,000 Da から 19,000 Da までであり；(b) 抗凝固性 N, 2, 3, 6-HS 生成物混合物内の多糖の 20% 以下が 24,000 Da を超える分子量を有し；(c) 8,000 Da ~ 16,000 Da の分子量を有する抗凝固性 N, 2, 3, 6-HS 生成物混合物内の多糖鎖の数が、16,000 Da ~ 24,000 Da の分子量を有する多糖鎖の数よりも多いような分子量プロファイルを有することができる。様々な態様において、上記の分子量プロファイルを有する抗凝固性 N, 2, 3, 6-HS 生成物混合物はまた、抗 Xa 活性と抗 IIa 活性との比が少なくとも 0.9 : 1 から 1.1 : 1 まで、好ましくは 1 : 1 とすることができる。様々な態様において、抗凝固性 N, 2, 3, 6-HS 生成物混合物は、ナトリウム塩として調製することができる。様々な態様において、抗凝固性 N, 2, 3, 6-HS 生成物混合物は、米国薬局方 (USP) 参照標準 (CAS 番号 : 9041-08-1) の分子量プロファイル及び抗凝固活性と実質的に同等とすることができる。様々な態様において、コンドロイチン硫酸又はデルマトン硫酸を含有しない抗凝固性 N, 2, 3, 6-HS 生成物混合物を合成することができる。

10

【0073】

様々な態様において、スルホ基供与体としてのアリール硫酸化合物との生物学的活性を有する改変型スルホトランスフェラーゼ酵素は、上記のアミノ酸配列のいずれかをコードするヌクレオチド配列を有する核酸から発現することができる。そのようなヌクレオチド配列の非限定的な例として、配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、配列番号 11、配列番号 13、配列番号 15、配列番号 17、配列番号 19、配列番号 21、配列番号 23、配列番号 25、及び配列番号 27 が挙げられる。当業者であれば、上記ヌクレオチド配列に基づいて、配列番号 33 ~ 54 及び 56 ~ 61 のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする適切なヌクレオチド配列を決定することができる。

20

【0074】

様々な態様において、上記の改変型スルホトランスフェラーゼ酵素のいずれかをコードする任意のヌクレオチド配列を有する核酸は、発現ベクターを保持し、所望の酵素を過剰発現するように構成された生物学的宿主細胞に挿入されるように改変された発現ベクターに挿入することができる。本発明によれば、発現ベクターに挿入される核酸は、上記のアミノ酸配列のいずれかをコードするヌクレオチド配列を有することができる。本発明によれば、発現ベクターに挿入される核酸は、上記のヌクレオチド配列のいずれかを有することができる。

30

【0075】

様々な態様において、発現ベクターは、本発明の改変型スルホトランスフェラーゼ酵素の産生を補うタンパク質又は宿主認識部位をコードする 1 つ以上の核酸配列又は遺伝子の場合によりさらに有することができる。非限定的な例として、プロモータ配列、抗生物質耐性遺伝子、並びに改変型スルホトランスフェラーゼ酵素のフォールディング及び安定性を補助する融合タンパク質をコードする遺伝子が挙げられる。様々な態様において、発現ベクターは、マルトース結合タンパク質 (MBP) をコードする、大腸菌由来の maltE 遺伝子をさらに有することができる。例えば、発現ベクターは、maltE 遺伝子、並びにヌクレオチド配列、配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、配列番号 11、配列番号 13、配列番号 15、配列番号 17、配列番号 19、配列番号 21、配列番号 23、配列番号 25、若しくは配列番号 27 のいずれか、又は配列番号 33 ~ 54 及び 56 ~ 61 のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする任意のヌクレオチド配列を有することができる。それらのベクターからのタンパク質発現は、MBP と融合された改変型スルホトランスフェラーゼ酵素を生成することができる。

40

【0076】

発現ベクターは、典型的には、該酵素が過剰発現及び抽出され得る宿主細胞に形質転換される。様々な態様において、宿主細胞は、上記の発現ベクターのいずれかによって形質転換することができ、上記の発現ベクターの非限定的な例として、配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、配列番号 11、配列番号 13、配列番号 15

50

、配列番号 17、配列番号 19、配列番号 21、配列番号 23、配列番号 25、配列番号 27 に記載の核酸配列、又は配列番号 33 ~ 54 及び 56 ~ 61 のアミノ酸配列を有する酵素をコードする任意の配列を有する発現ベクターが挙げられる。様々な態様において、形質転換宿主細胞は、細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞又は哺乳動物細胞とすることができる。様々な態様において、宿主細胞は細菌細胞とすることができる。様々な態様において、細菌細胞は、大腸菌 (E. coli) の非病原性株に由来することができる。

【0077】

様々な態様において、上記の方法のいずれかにおけるスルホトランスフェラーゼ反応は、少なくとも上記の任意のアミノ酸配列の機能的断片を有する改変型酵素によって行うことができる。様々な態様において、本発明は、その機能的断片を含む、上記のアミノ酸配列のいずれかを有する改変型スルホトランスフェラーゼ酵素の実質的に純粋なタンパク質精製を提供する。

10

【0078】

本発明の別の面において、HS 生成物、特に抗凝固性 N, 2, 3, 6 - HS 生成物が上記の方法のいずれかによって形成されると、それをデルマトン硫酸及びコンドロイチン硫酸からなる群から選択される少なくとも 1 つのグリコサミノグリカン (GAG) を有する GAG 組成物と組み合わせて、HS - GAG 混合物を形成することができる。例えば、抗凝固性 N, 2, 3, 6 - HS 生成物は、HS - GAG 混合物内に少なくとも 10 % から 90 % までの多糖鎖を有することができ、HS - GAG 混合物内の抗凝固性 N, 2, 3, 6 - HS 生成物の抗凝固活性を維持することができる。様々な態様において、硫酸とカルボキシルとの比は、抗凝固性 N, 2, 3, 6 - HS 生成物を構成する二糖単位内のカルボキシル基の相対存在量と比較したスルホ基の平均相対存在量として表すことができる。

20

【0079】

非限定的な一例では、HS - GAG 混合物は、抗凝固性 N, 2, 3, 6 - HS 生成物を有するように形成することができ、(a) デルマトン硫酸は、HS - GAG 混合物内の多糖の 20 % を構成し、(b) HS - GAG 混合物内の抗凝固性 N, 2, 3, 6 - HS 生成物の重量平均分子量は、7,000 Da ~ 8,000 Da の範囲内であり、(c) 抗凝固性 N, 2, 3, 6 - HS 生成物は、2.0 : 1 ~ 2.2 : 1 の範囲の硫酸基とカルボキシル基との比を有する。さらなる態様において、HS - GAG 混合物は、スロデキシドと比較して実質的に同等の組成、重量平均分子量及び / 又は抗凝固活性を有することができる。

30

【0080】

別の非限定的な例では、HS - GAG 混合物は、抗凝固性 N, 2, 3, 6 - HS 生成物を有するように形成することができ、(a) デルマトン硫酸は、HS - GAG 混合物内の多糖の少なくとも 10 % から 15 % まで、好ましくは 12 % を構成し、(b) コンドロイチン硫酸は、HS - GAG 混合物内の多糖の少なくとも 3 % から 5 % まで、好ましくは 4 % を構成し、(c) HS - GAG 混合物内の全多糖の重量平均分子量は、4,000 Da ~ 7,000 Da の範囲内、好ましくは 5,000 Da ~ 6,000 Da の範囲内であり、(d) 抗凝固性 N, 2, 3, 6 - HS 生成物は、硫酸基とカルボキシル基との比が 2.0 : 1 ~ 2.2 : 1 の範囲である。さらなる態様において、HS - GAG 混合物は、ダナパロイド (danaparoid) と比較して実質的に同等の組成、重量平均分子量及び / 又は抗凝固活性を有することができる。

40

【0081】

本発明の別の面において、上記の方法のいずれかによって生成された HS 生成物のいずれも、HS 生成物を解重合及び / 又は修飾して、それ自体が抗凝固活性を有することができる二次生成物、特に低分子量 (LMW) - HS 生成物を形成するための 1 つ以上の後続のプロセスによってさらに修飾することができる。様々な態様において、抗凝固性 LMW - HS 生成物の抗 Xa 活性、抗 IIa 活性、及び抗 Xa 活性と抗 IIa 活性との比は、上記のように、未分画抗凝固性 N, 2, 3, 6 - HS 生成物と同様に決定することができる。様々な態様において、抗凝固性 LMW - HS 生成物は、抗 Xa 活性と抗 IIa 活性との

50

比が少なくとも 0.5 : 1 から少なくとも 100 : 1 までの範囲とすることができる。様々な態様において、いくつかの抗凝固性 LMW-HS 生成物は、抗 Xa 活性と抗 IIa 活性との比が少なくとも 1.5 : 1 から少なくとも 10 : 1 までの範囲とすることができる。様々な態様において、いくつかの抗凝固性 LMW-HS 生成物は、抗 Xa 活性と抗 IIa 活性との比が少なくとも 20 : 1 から少なくとも 100 : 1 までの範囲とすることができる。そのような抗凝固性 LMW-HS 生成物を、以下にさらに詳述する。

【0082】

様々な態様において、上記の任意の方法によって生成された N, 2, 3, 6-HS 生成物は、N, 2, 3, 6-HS 生成物から生成される LMW-HS 生成物と比較して、「未分画」N, 2, 3, 6-HS 生成物ということができる。

10

【0083】

一般に、LMW-HS 生成物を合成するための本発明の方法は、以下の工程、すなわち、(a) 上記の方法のいずれかに従って N, 2, 3, 6-HS 生成物を合成する工程；(b) 1 つ以上の解重合剤を提供する工程；及び (c) N, 2, 3, 6-HS 生成物内の多糖の少なくとも一部を解重合するのに十分な時間、1 つ以上の解重合剤を用いて N, 2, 3, 6-HS 生成物を処理し、それにより LMW-HS 生成物を形成する工程；を有することができる。様々な態様において、LMW-HS 生成物の重量平均分子量は、少なくとも 2,000 Da から 12,000 Da までであり、好ましくは 3,000 Da ~ 8,000 Da の範囲内である。

【0084】

20

様々な態様において、1 つ以上の解重合剤は、未分画 N, 2, 3, 6-HS 生成物と組み合わせて N, 2, 3, 6-HS 生成物を化学的及び / 又は酵素的に解重合し、LMW-HS 生成物を形成することができる、1 つ以上の反応混合物内の 1 つ以上の反応成分によって形成することができるか、及び / 又はそれから構成することができる。様々な態様において、解重合剤の選択によって、どの化学的又は酵素的解重合プロセスが起こるか、及び解重合の結果として形成される LMW-HS 生成物の化学構造及び / 又は抗凝固活性を決めることができる。そのような解重合プロセスとして、化学的及び / 又は酵素的 β 脱離反応；脱アミノ化反応；及び酸化反応（それらの組合せを含む）を挙げることができるが、これらに限定されない。様々な態様において、LMW-HS 生成物を形成するために、未分画 N, 2, 3, 6-HS 生成物は、解重合剤の任意の組合せを用いて処理することができる。

30

【0085】

様々な態様において、未分画 N, 2, 3, 6-HS 生成物が 1 つ以上の解重合剤を用いて処理される時間の量は、所望の分子量、化学構造及び / 又は抗凝固活性を有する LMW-HS 生成物を形成するように制御することができる。本発明によれば、同じ解重合剤に関して、未分画 N, 2, 3, 6-HS 生成物が解重合剤を用いて処理される時間の量を変化させて、同様の化学構造を有するが、互いに異なる分子量及び抗凝固活性を有する LMW-HS 生成物を形成することができる。

【0086】

非限定的な一例では、未分画 N, 2, 3, 6-HS 生成物を酵素的 β 脱離反応によって解重合して、LMW-HS 生成物を形成することができる。様々な態様において、解重合剤は、少なくとも 1 つの炭素 - 酸素リアーゼ酵素、好ましくは、配列番号 30、配列番号 31 及び配列番号 32 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する少なくとも 1 つの炭素 - 酸素リアーゼ酵素を有する炭素 - 酸素リアーゼ反応混合物を有することができる。様々な態様において、未分画 N, 2, 3, 6-HS 生成物は、未分画 N, 2, 3, 6-HS 生成物の β 脱離開裂を触媒し、酵素的に解重合された LMW-HS 生成物を形成するのに十分な時間、炭素 - 酸素リアーゼ反応混合物を用いて処理することができる。様々な態様において、酵素的に解重合された LMW-HS 生成物の重量平均分子量は、2,000 Da ~ 10,000 Da、好ましくは 5,500 Da ~ 7,500 Da の範囲内、さらに好ましくは 6,500 Da とすることができる。様々な態様において、酵素的に解重合さ

40

50

れた L M W - H S 生成物は、抗凝固活性、特に抗 X a 活性が少なくとも $70 \text{ IU } \text{mg}^{-1}$ から $120 \text{ IU } \text{mg}^{-1}$ までの範囲、及び抗 X a 活性と抗 I I a 活性との比が $1.5 : 1 \sim 2.5 : 1$ の範囲とすることができる。様々な態様において、酵素的に解重合された L M W - H S 生成物は、非還元末端に 4, 5 - 不飽和ウロン酸残基を有する多糖を有することができる。様々な態様において、酵素的に解重合された L M W - H S 生成物は、チンザパリンと比較して実質的に同等の化学構造、重量平均分子量及び / 又は抗凝固活性を有することができる。

【0087】

別の非限定的な例では、未分画 N, 2, 3, 6 - H S 生成物は、化学的 β 脱離反応によって解重合することができる。様々な態様において、化学的 β 脱離反応のための解重合剤は、塩基、好ましくは水酸化ナトリウム、水酸化第四級アンモニウム及びホスファゼン塩基（それらの任意の組合せを含む）からなる群から選択される塩基を有することができ、未分画 N, 2, 3, 6 - H S 生成物の β 脱離開裂を引き起こし、化学的 β 脱離 L M W - H S 生成物を形成するのに十分な時間、塩基を用いて未分画 N, 2, 3, 6 - H S 生成物を処理することができる。

10

【0088】

様々な態様において、解重合剤を用いて未分画 N, 2, 3, 6 - H S 生成物を処理する工程は、(i) 未分画 N, 2, 3, 6 - H S 生成物をベンゼトニウム塩、好ましくは塩化ベンゼトニウムと反応させて、ベンゼトニウム H S 塩を形成するサブ工程；及び (ii) 化学的 β 脱離 L M W - H S 生成物を形成するのに十分な時間、ベンゼトニウム H S 塩を、塩基を含む反応混合物と組み合わせるサブ工程；を有することができる。様々な態様において、化学的 β 脱離 L M W - H S 生成物の重量平均分子量は、少なくとも $2,000 \text{ Da}$ から $10,000 \text{ Da}$ まで、好ましくは $2,000 \text{ Da} \sim 6,000 \text{ Da}$ の範囲内とすることができる。様々な態様において、化学的 β 脱離 L M W - H S 生成物は、非還元末端に 4, 5 - 不飽和ウロン酸残基を有する多糖を有することができる。本発明によれば、上記の面及び態様のうちのいずれか 1 つ以上と組み合わせる有用である化学的 β 脱離 L M W - H S 生成物は、抗凝固活性、特に抗 X a 活性が $80 \text{ IU } \text{mg}^{-1}$ から $160 \text{ IU } \text{mg}^{-1}$ までの範囲、抗 I I a 活性が $2 \text{ IU } \text{mg}^{-1}$ から $40 \text{ IU } \text{mg}^{-1}$ までの範囲、及び / 又は抗 X a 活性と抗 I I a 活性との比が $3.0 : 1 \sim 100 : 1$ の範囲とすることができる。

20

30

【0089】

様々な態様において、ベンゼトニウム H S 塩は、形成されると、その後、化学的 β 脱離 L M W - H S 生成物を形成するのに十分な時間、塩基を用いて処理することができる。様々な態様において、塩基は、水酸化第四級アンモニウム、好ましくはベンジルトリメチルアンモニウムヒドロキシド (Triton (登録商標) B) とすることができる。様々な態様において、化学的 β 脱離 L M W - H S 生成物の重量平均分子量は、 $3,000 \text{ Da} \sim 4,200 \text{ Da}$ の範囲内、好ましくは $3,600 \text{ Da}$ とすることができる。様々な態様において、化学的 β 脱離 L M W - H S 生成物の抗 X a 活性は少なくとも $80 \text{ IU } \text{mg}^{-1}$ から $120 \text{ IU } \text{mg}^{-1}$ までの範囲内とし、抗 I I a 活性は少なくとも $5 \text{ IU } \text{mg}^{-1}$ から $20 \text{ IU } \text{mg}^{-1}$ までの範囲内とし、及び / 又は化学的 β 脱離 L M W - H S 生成物の抗 X a 活性と抗 I I a 活性との比は $8.0 : 1 \sim 10.0 : 1$ の範囲内とすることができる。様々な態様において、L M W - H S 生成物は、ベミパリンと比較して実質的に同等の化学構造、重量平均分子量及び / 又は抗凝固活性を有することができる。

40

【0090】

様々な態様において、ベンゼトニウム H S 塩は、代わりに、塩基と反応する前に、さらに修飾することができる。非限定的な一例では、ベンゼトニウム H S 塩は、ハロゲン化ベンジル、特に塩化ベンジルと反応すると、H S のベンジルエステル形態に変換することができる。様々な態様において、ベンジルエステルへの変換は、塩化メチレン及びクロロホルムを含む塩素化溶媒内で行うことができるが、これに限定されない。

【0091】

50

様々な態様において、ベンジルエステルHSは、形成されると、その後、塩基と反応して解重合を開始することができる。様々な態様において、塩基は水酸化ナトリウムとすることができる。様々な態様において、化学的β脱離LMW-HS生成物は、非還元末端の4, 5-不飽和ウロン酸残基に加えて、還元末端に1, 6-アンヒドロマンノース残基又は1, 6-アンヒドログルコサミン残基を有する多糖を有することができる。様々な態様において、化学的β脱離LMW-HS生成物の重量平均分子量は、3, 800Da~5, 000Daの範囲内、好ましくは4, 500Daとすることができる。様々な態様において、化学的β脱離LMW-HS生成物の抗Xa活性は少なくとも90IU mg⁻¹から125IU mg⁻¹までの範囲内とし、抗IIa活性は少なくとも20IU mg⁻¹から35IU mg⁻¹までの範囲内とし、及び/又は化学的β脱離LMW-HS生成物の抗Xa活性と抗IIa活性との比は3.3:1~5.3:1の範囲内とすることができる。様々な態様において、化学的β脱離LMW-HS生成物は、エノキサパリンと比較して実質的に同等の化学構造、重量平均分子量及び/又は抗凝固活性を有することができる。

【0092】

様々な態様において、ベンジルエステルHSは、代わりに、ベンゼトニウムベンジルエステルHSを形成するために、ベンゼトニウム塩、好ましくは塩化ベンゼトニウムの存在下でトランス塩化(transalified)することができ、ベンゼトニウムベンジルエステルHSは、その後、塩基を使用して解重合することができる。様々な態様において、塩基は、ホスファゼン塩基、好ましくは2-tert-ブチルイミノ-2-ジエチルアミノ-1, 3-ジメチルペルヒドロ-1, 2, 3-ジアザ-ホスホリン(BEMP)である。解重合が完了した後、化学的β脱離LMW-HS生成物内の残りのベンジルエステルを鹸化し、除去することができる。様々な態様において、化学的β脱離LMW-HS生成物の重量平均分子量は、2, 000Da~3, 000Daの範囲内とし、好ましくは2, 400Daとすることができる。様々な態様において、化学的β脱離LMW-HS生成物の抗Xa活性は160IU mg⁻¹以下とし、及び/又は抗Xa活性と抗IIa活性との比は少なくとも20:1から100:1まで、好ましくは80:1とすることができる。様々な態様において、化学的β脱離LMW-HS生成物は、セムロパリンと比較して実質的に同等の化学構造、重量平均分子量及び/又は抗凝固活性を有することができる。

【0093】

様々な態様において、未分画N, 2, 3, 6-HS生成物は、酵素的及び化学的β脱離反応の両方によって、場合により解重合されていてもよい。例えば、酵素的に解重合されたLMW-HS生成物は、その後、塩基と反応することによって化学的β脱離反応に供することができる。別の例では、化学的β脱離LMW-HS生成物は、その後、1つ以上の炭素-酸素リアーゼ酵素を反応させることによって酵素的β脱離反応に供することができる。

【0094】

別の非限定的な例では、未分画N, 2, 3, 6-HS生成物は、脱アミノ化反応によって解重合することができる。様々な態様において、解重合剤は、未分画N, 2, 3, 6-HS生成物の脱アミノ化開裂を引き起こし、それによって脱アミノ化LMW-HS生成物を形成するのに十分な時間、脱アミノ化剤、好ましくは硝酸イソアミル及び亜硝酸からなる群から選択される脱アミノ化剤を有する脱アミノ化反応混合物を有することができる。

【0095】

様々な態様において、脱アミノ化剤は亜硝酸とすることができる。様々な態様において、脱アミノ化反応混合物は、インサイチュで亜硝酸を形成するために、化学量論量の酸、好ましくは酢酸又は塩酸、及びアルカリ金属亜硝酸塩又はアルカリ土類金属亜硝酸塩、好ましくは亜硝酸ナトリウムを有することができる。様々な態様において、脱アミノ化LMW-HS生成物は、還元末端に2, 5-アンヒドロ-D-マンノース残基を有する多糖を有することができる。様々な態様において、脱アミノ化LMW-HS生成物の重量平均分子量は、2, 000Da~10, 000Daの範囲内、好ましくは4, 000Da~6, 000Daの範囲内、

000 Daの範囲内とすることができる。本発明によれば、上記の面及び態様のうちのいずれか1つ以上と組み合わせる有用である脱アミノ化LMW-HS生成物は、特に抗Xa活性と抗IIa活性との比が2.0:1~4.5:1の範囲である抗凝固活性を有することができる。

【0096】

非限定的な一例では、脱アミノ化LMW-HS生成物の重量平均分子量は、3,600 Da~5,500 Daの範囲内、好ましくは4,300 Daとすることができる。様々な態様において、脱アミノ化LMW-HS生成物の抗Xa活性は少なくとも95 IU mg⁻¹から130 IU mg⁻¹以下までの範囲内とし、及び/又は抗Xa活性と抗IIa活性との比は少なくとも2.5:1から4.0:1までの範囲内とすることができる。様々な態様において、脱アミノ化LMW-HS生成物は、ナドロパリンと比較して実質的に同等の化学構造、重量平均分子量及び/又は抗凝固活性を有することができる。

10

【0097】

別の非限定的な例では、脱アミノ化LMW-HS生成物の重量平均分子量は5,600 Da~6,400 Daの範囲内、好ましくは6,000 Daとすることができる。様々な態様において、脱アミノ化LMW-HS生成物の抗Xa活性は少なくとも110 IU mg⁻¹から210 IU mg⁻¹以下までの範囲内とし、抗IIa活性は少なくとも35 IU mg⁻¹から100 IU mg⁻¹以下までの範囲内とし、及び/又は脱アミノ化LMW-HS生成物の抗Xa活性と抗IIa活性との比は少なくとも1.9:1から3.2:1までとすることができる。様々な態様において、脱アミノ化LMW-HS生成物は、ダルテパリンと比較して実質的に同等の化学構造、重量平均分子量及び/又は抗凝固活性を有することができる。

20

【0098】

別の非限定的な例では、脱アミノ化LMW-HS生成物の重量平均分子量は4,200 Da~4,600 Daの範囲内、好ましくは4,400 Daとし、抗Xa活性は少なくとも98 IU mg⁻¹から155 IU mg⁻¹までの範囲内とし、脱アミノ化LMW-HS生成物の抗Xa活性と抗IIa活性との比は少なくとも4.0:1から4.5:1まで、好ましくは4.2:1とすることができる。様々な態様において、脱アミノ化LMW-HS生成物は、レビパリンと比較して実質的に同等の化学構造、重量平均分子量及び/又は抗凝固活性を有することができる。

30

【0099】

別の非限定的な例では、脱アミノ化剤は硝酸イソamilであり、脱アミノ化LMW-HS生成物の重量平均分子量は5,000 Da~5,600 Daの範囲内、好ましくは5,400 Daとし、抗Xa活性は少なくとも80 IU mg⁻¹から120 IU mg⁻¹までの範囲内とし、脱アミノ化LMW-HS生成物の抗Xa活性と抗IIa活性との比は少なくとも2.0:1から2.5:1まで、好ましくは2.4:1とすることができる。様々な態様において、脱アミノ化LMW-HS生成物は、セルトパリン(certoparin)と比較して実質的に同等の化学構造、重量平均分子量及び/又は抗凝固活性を有することができる。

【0100】

別の非限定的な例では、未分画N_{2,3,6}-HS生成物は、酸化反応によって解重合することができる。様々な態様において、解重合剤は、酸化LMW-HS生成物を形成するために、酸化剤、好ましくは過氧化物又は超氧化物、さらに好ましくは過酸化水素からなる群から選択される酸化剤を有することができる。様々な態様において、酸化剤を用いて未分画N_{2,3,6}-HS生成物を処理する工程は、(i)未分画N_{2,3,6}-HS生成物を酸性化して、酸性化HS生成物を形成するサブ工程；(ii)酸性化HS生成物を酸化反応混合物と組み合わせるサブ工程；及び(iii)少なくとも50の温度で、酸化LMW-HS生成物を形成するのに十分な時間、酸化反応混合物内で酸性化HS生成物をインキュベートするサブ工程；を有することができる。

40

【0101】

50

様々な態様において、未分画 N, 2, 3, 6 - HS 生成物を酸性化するサブ工程は、酸性化 HS 生成物を形成するために、酸、好ましくはアスコルビン酸を有する反応混合物を HS 生成物に加えることを有することができる。あるいは、未分画 N, 2, 3, 6 - HS 生成物を酸性化するサブ工程は、未分画 N, 2, 3, 6 - HS 生成物をカチオン交換樹脂、好ましくはクロマトグラフカラム内で懸濁したカチオン交換樹脂に充填するサブ工程；及び未分画 N, 2, 3, 6 - HS 生成物をカチオン交換樹脂から溶出し、酸性化 HS 生成物を形成するサブ工程をさらに有することができる。様々な態様において、酸性化 HS 生成物の pH は、少なくとも 3.0 から 5.0 まで、好ましくは 3.0 ~ 3.5 の範囲内とすることができる。

【0102】

10

様々な態様において、酸化 LMW - HS 生成物の重量平均分子量は、2,000 Da ~ 12,000 Da の範囲内、好ましくは 4,000 Da ~ 6,000 Da の範囲内とすることができる。様々な態様において、酸化 LMW - HS 生成物は、特に抗 Xa 活性と抗 IIa 活性との比が 1.5 : 1 ~ 3.0 : 1 の範囲内である抗凝固活性を有することができる。

【0103】

非限定的な一例では、酸化 LMW - HS 生成物の重量平均分子量は少なくとも 4,000 Da から 6,000 Da までの範囲内、好ましくは 5,000 Da とし、酸化 LMW - HS 生成物の抗 Xa 活性は少なくとも 95 IU mg^{-1} から 110 IU mg^{-1} 以下までの範囲内とし、抗 Xa 活性と抗 IIa 活性との比は少なくとも 1.5 : 1 から 3.0 : 1 までとすることができる。様々な態様において、酸化 LMW - HS 生成物は、パルナパリンと比較して実質的に同等の化学構造、pH、重量平均分子量及び / 又は抗凝固活性を有することができる。

20

【0104】

別の非限定的な例では、酸化 LMW - HS 生成物の重量平均分子量は 5,500 Da ~ 6,500 Da の範囲内、好ましくは 6,000 Da とし、抗 Xa 活性と抗 IIa 活性との比は少なくとも 2.0 : 1 から 2.5 : 1 までとすることができる。様々な態様において、酸化 LMW - HS 生成物は、アルデパリンと比較して実質的に同等の化学構造、pH、重量平均分子量及び / 又は抗凝固活性を有することができる。

【0105】

30

本発明の別の面において、上記の方法のいずれかによる N, 2, 3, 6 - HS 生成物又は LMW - HS 生成物、特に抗凝固性 N, 2, 3, 6 - HS 生成物又は抗凝固性 LMW - HS 生成物を形成するためのキットを提供する。様々な態様において、キットは、少なくとも 1 つの改変型アリアル硫酸依存性スルホトランスフェラーゼ及び少なくとも 1 つのアリアル硫酸化合物、好ましくは PNS 又は NCS を有することができる。様々な態様において、キットは、改変型グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ、改変型ヘキサロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼ、改変型グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ及び / 又は改変型グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼを有することができる。これらは各々、スルホ基供与体としてのアリアル硫酸化合物と反応して、多糖、好ましくはヘパロサン系多糖へのスルホ基の転移を触媒することに依存する。様々な態様において、キットは、ヘパロサン及び / 又は他の HS 多糖を有する、上記の出発多糖又は出発硫酸化多糖のいずれかをさらに有することができる。様々な態様において、キットは、エピメラーゼ、好ましくは配列番号 29 のアミノ酸配列を有するエピメラーゼ、さらに好ましくは配列番号 29 のアミノ酸残基 34 ~ 617 を有するエピメラーゼをさらに有することができる。様々な態様において、キットは、ヘパロサン系多糖、特に N - 脱アセチル化ヘパロサンを化学的に N - 硫酸化するための成分及び / 又は反応混合物のいずれかを有することができる。様々な態様において、キットは、宿主、好ましくは細菌宿主、さらに好ましくは大腸菌からヘパロサンを単離及び精製するための成分及び / 又は反応混合物のいずれかを有することができる。

40

様々な態様において、キットは、酵素的に解重合された LMW - HS 生成物、化学的 β

50

脱離 L M W - H S 生成物、脱アミノ化 L M W - H S 生成物、又は酸化 L M W - H S 生成物のいずれかを形成するために、上記の方法のいずれかに従って N , 2 , 3 , 6 - H S 生成物を解重合するための成分及び / 又は反応混合物のいずれかを有することができる。

【 0 1 0 6 】

本発明によれば、上記の面及び態様のうちのいずれか 1 つ以上と組み合わせて有用である、上記の方法のいずれかに従って調製された非抗凝固性又は抗凝固性の H S 生成物、 N , 2 , 3 , 6 - H S 生成物及び / 又は L M W - H S 生成物のいずれも、薬学的に許容される塩、特に、限定するものではないが、ナトリウム塩、リチウム塩又はカルシウム塩を有するアルカリ塩又はアルカリ土類塩として調製することができる。

【 0 1 0 7 】

本発明のこれら及び他の態様は、以下の詳細な説明から当業者には明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

【 0 1 0 8 】

【図 1 A】図 1 A ~ 図 4 C は、ヒトグルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素、 3 ' - ホスホアデノシン 5 ' - ホスホ硫酸、及びスルホ受容体多糖の間の、例示反応機構を示す。

【図 1 B】図 1 A ~ 図 4 C は、ヒトグルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素、 3 ' - ホスホアデノシン 5 ' - ホスホ硫酸、及びスルホ受容体多糖の間の、例示反応機構を示す。

【図 1 C】図 1 A ~ 図 4 C は、ヒトグルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素、 3 ' - ホスホアデノシン 5 ' - ホスホ硫酸、及びスルホ受容体多糖の間の、例示反応機構を示す。

【図 2】図 2 は、本発明の方法に利用することができる、アミノ官能基がアセチル基で置換されている改変型アリール硫酸依存性グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼに対する多糖スルホ受容体の非限定的な例を示す。

【図 3 A】図 3 A ~ 図 3 C は、全体的な配列同一性に関係なく存在する保存されたアミノ酸配列モチーフを示す、 1 5 個の野生型 E C 2 . 8 . 2 . 8 酵素の N - スルホトランスフェラーゼドメインの多重配列アラインメントを示す。

【図 3 B】図 3 A ~ 図 3 C は、全体的な配列同一性に関係なく存在する保存されたアミノ酸配列モチーフを示す、 1 5 個の野生型 E C 2 . 8 . 2 . 8 酵素の N - スルホトランスフェラーゼドメインの多重配列アラインメントを示す。

【図 3 C】図 3 A ~ 図 3 C は、全体的な配列同一性に関係なく存在する保存されたアミノ酸配列モチーフを示す、 1 5 個の野生型 E C 2 . 8 . 2 . 8 酵素の N - スルホトランスフェラーゼドメインの多重配列アラインメントを示す。

【図 4 A】図 4 A ~ 図 4 C は、天然グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ酵素、 3 ' - ホスホアデノシン 5 ' - ホスホ硫酸、及び N - 脱アセチル化ヘパロサン内の保存された残基間の反応機構を示す。

【図 4 B】図 4 A ~ 図 4 C は、天然グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ酵素、 3 ' - ホスホアデノシン 5 ' - ホスホ硫酸、及び N - 脱アセチル化ヘパロサン内の保存された残基間の反応機構を示す。

【図 4 C】図 4 A ~ 図 4 C は、天然グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ酵素、 3 ' - ホスホアデノシン 5 ' - ホスホ硫酸、及び N - 脱アセチル化ヘパロサン内の保存された残基間の反応機構を示す。

【図 5】図 5 は、 E C . 2 . 8 . 2 . 8 酵素クラス由来の天然酵素の N - スルホトランスフェラーゼドメインの結晶構造に重ね合わせた、改変型グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ酵素の活性部位内に結合したアリール硫酸化合物の三次元モデルを示す。

【図 6】図 6 は、活性部位内に存在するアミノ酸変異を示す、図 5 でモデル化された、改変型酵素の三次元モデルを示す。

【図 7】図 7 は、 E C . 2 . 8 . 2 . 8 酵素クラス由来の天然酵素の N - スルホトランスフェラーゼドメインの結晶構造に重ね合わせた、改変型グルコサミニル N - スルホトラン

10

20

30

40

50

スフェラーゼ酵素の活性部位内に結合したアリール硫酸化合物の別の三次元モデルを示す。

【図 8】図 8 は、活性部位内に存在するアミノ酸変異を示す、図 7 でモデル化された、改変型酵素の三次元モデルを示す。

【図 9】図 9 は、図示した各配列間のアミノ酸残基差異の位置及び同一性をそれぞれ示す、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 のアミノ酸配列を有するポリペプチドの配列アラインメントを示す。

【図 10】図 10 は、ヘキシロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼと反応可能であり、N - 硫酸化、N - アセチル化、及び未置換グルコサミニル残基を有する多糖スルホ受容体を示す。

【図 11】図 11 は、本発明の方法に利用することができる、硫酸基が多糖内のグルクロン酸残基の 2 - O 位に転移したヘキシロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼへの多糖スルホ受容体の非限定的な例を示す。

【図 12】図 12 は、本発明の方法に利用することができる、硫酸基が多糖内のイズロン酸残基の 2 - O 位に転移したヘキシロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼへの多糖スルホ受容体であって多糖スルホ受容体の他の非限定的な例を示す。

【図 13】図 13 は、本発明の方法に利用することができる、硫酸基が多糖内のグルクロン酸残基の 2 - O 位及びイズロン酸残基の 2 - O 位の双方に転移したヘキシロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼへの多糖スルホ受容体の他の非限定的な例を示す。

【図 14 A】図 14 A ~ 図 14 D は、全体的な配列同一性にかかわらず存在する保存されたアミノ酸配列モチーフを示す、EC 2.8.2. - 内の 12 個の野生型 HS ヘキシロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼ酵素の多重配列アラインメントを示す。

【図 14 B】図 14 A ~ 図 14 D は、全体的な配列同一性にかかわらず存在する保存されたアミノ酸配列モチーフを示す、EC 2.8.2. - 内の 12 個の野生型 HS ヘキシロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼ酵素の多重配列アラインメントを示す。

【図 14 C】図 14 A ~ 図 14 D は、全体的な配列同一性にかかわらず存在する保存されたアミノ酸配列モチーフを示す、EC 2.8.2. - 内の 12 個の野生型 HS ヘキシロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼ酵素の多重配列アラインメントを示す。

【図 14 D】図 14 A ~ 図 14 D は、全体的な配列同一性にかかわらず存在する保存されたアミノ酸配列モチーフを示す、EC 2.8.2. - 内の 12 個の野生型 HS ヘキシロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼ酵素の多重配列アラインメントを示す。

【図 15 A】図 15 A ~ 図 15 C は、天然 2 - O スルホトランスフェラーゼ酵素及び 3' - ホスホアデノシン 5' - ホスホ硫酸内の保存された残基間の反応機構を示す。

【図 15 B】図 15 A ~ 図 15 C は、天然 2 - O スルホトランスフェラーゼ酵素及び 3' - ホスホアデノシン 5' - ホスホ硫酸内の保存された残基間の反応機構を示す。

【図 15 C】図 15 A ~ 図 15 C は、天然 2 - O スルホトランスフェラーゼ酵素及び 3' - ホスホアデノシン 5' - ホスホ硫酸内の保存された残基間の反応機構を示す。

【図 16】図 16 は、天然 2 - O スルホトランスフェラーゼ酵素の結晶構造に重ね合わされた、改変型ヘキシロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼ酵素の活性部位内のアリール硫酸化合物との結合を可能にする変異アミノ酸配列モチーフの三次元モデルを示す。

【図 17】図 17 は、本発明の方法に利用することができる HS グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼの多糖スルホ受容体であって複数のグルコサミン残基の 6 - O 位が硫酸基を受容することができる多糖スルホ受容体の非限定的な例を示す。

【図 18 A】図 18 A ~ 図 18 C は、全体的な配列同一性にかかわらず存在する保存されたアミノ酸配列モチーフを示す、EC 2.8.2. - 内の 15 個の野生型 HS グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素の多重配列アラインメントを示す。

【図 18 B】図 18 A ~ 図 18 C は、全体的な配列同一性にかかわらず存在する保存されたアミノ酸配列モチーフを示す、EC 2.8.2. - 内の 15 個の野生型 HS グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素の多重配列アラインメントを示す。

【図 18 C】図 18 A ~ 図 18 C は、全体的な配列同一性にかかわらず存在する保存され

10

20

30

40

50

たアミノ酸配列モチーフを示す、EC 2.8.2. - 内の15個の野生型HSグルコサミニル6-Oスルホトランスフェラーゼ酵素の多重配列アラインメントを示す。

【図19A】図19A～図19Cは、天然HSグルコサミニル6-Oスルホトランスフェラーゼ酵素及び3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸内の保存された残基間の反応機構を示す。

【図19B】図19A～図19Cは、天然HSグルコサミニル6-Oスルホトランスフェラーゼ酵素及び3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸内の保存された残基間の反応機構を示す。

【図19C】図19A～図19Cは、天然HSグルコサミニル6-Oスルホトランスフェラーゼ酵素及び3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸内の保存された残基間の反応機構 10を示す。

【図20】図20は、天然グルコサミニル6-Oスルホトランスフェラーゼ酵素の結晶構造に重ね合わされた、改変型グルコサミニル6-Oスルホトランスフェラーゼ酵素の活性部位内のアリアル硫酸化合物の結合を可能にする、変異アミノ酸配列モチーフの三次元モデルを示す。

【図21】図21は、図示した各配列間のアミノ酸残基差異の位置及び同一性をそれぞれ示す、配列番号18、配列番号20、及び配列番号22のアミノ酸配列を有するポリペプチドの配列アラインメントを示す。

【図22】図22は、本発明の方法に利用し、式Iの構造を有するN, 2, 3, 6-HS生成物を形成することができるHSグルコサミニル3-Oスルホトランスフェラーゼの多糖スルホ受容体の非限定的な例を示す。 20

【図23A】図23A～図23Cは、全体的な配列同一性にかかわらず存在する保存されたアミノ酸配列モチーフを示す、EC 2.8.2.23内の15個の野生型HSグルコサミニル3-Oスルホトランスフェラーゼ酵素の多重配列アラインメントを示す。

【図23B】図23A～図23Cは、全体的な配列同一性にかかわらず存在する保存されたアミノ酸配列モチーフを示す、EC 2.8.2.23内の15個の野生型HSグルコサミニル3-Oスルホトランスフェラーゼ酵素の多重配列アラインメントを示す。

【図23C】図23A～図23Cは、全体的な配列同一性にかかわらず存在する保存されたアミノ酸配列モチーフを示す、EC 2.8.2.23内の15個の野生型HSグルコサミニル3-Oスルホトランスフェラーゼ酵素の多重配列アラインメントを示す。 30

【図24】図24は、天然グルコサミニル3-Oスルホトランスフェラーゼ酵素の結晶構造に重ね合わされた、改変型グルコサミニル3-Oスルホトランスフェラーゼ酵素の活性部位内のアリアル硫酸化合物の結合を可能にする、変異アミノ酸配列モチーフの三次元モデルを示す。

【図25】図25は、図示した各配列間のアミノ酸残基差異の位置及び同一性をそれぞれ示す、配列番号24、配列番号26、及び配列番号28のアミノ酸配列を有するポリペプチドの配列アラインメントを示す。

【図26】図26は、業界標準と比較した、改変型アリアル硫酸依存性グルコサミニルN-スルホトランスフェラーゼを用いて合成したN-硫酸化多糖生成物の一連のオーバーレイDSAX-HPLCクロマトグラムを示す。 40

【図27A】図27A～図27Bは、改変型アリアル硫酸依存性ヘキサロニル2-Oスルホトランスフェラーゼ酵素を用いて合成した、硫酸化多糖生成物の一連のLCMSクロマトグラムを示す。

【図27B】図27A～図27Bは、改変型アリアル硫酸依存性ヘキサロニル2-Oスルホトランスフェラーゼ酵素を用いて合成した、硫酸化多糖生成物の一連のLCMSクロマトグラムを示す。

【図28A】図28Aは、配列番号18のアミノ酸配列を有する改変型アリアル硫酸依存性グルコサミニル6-Oスルホトランスフェラーゼを用いて合成した、硫酸化多糖生成物のLCMSクロマトグラムを示す。

【図28B】図28Bは、配列番号20のアミノ酸配列を有する改変型アリアル硫酸依存 50

性グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼを用いて合成した、硫酸化多糖生成物の LCMS クロマトグラムを示す。

【図 28C】図 28C は、配列番号 22 のアミノ酸配列を有する改変型アリアル硫酸依存性グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼを用いて合成した、硫酸化多糖生成物の LCMS クロマトグラムを示す。

【図 29A】図 29A ~ 図 29B は、一連の二糖及び多糖標準と比較した、改変型アリアル硫酸依存性グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素を用いて合成した硫酸化多糖生成物の一連のオーバーレイ LCMS クロマトグラムを示す。

【図 29B】図 29A ~ 図 29B は、一連の二糖及び多糖標準と比較した、改変型アリアル硫酸依存性グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素を用いて合成した硫酸化多糖生成物の一連のオーバーレイ LCMS クロマトグラムを示す。 10

【図 30】図 30 は、核磁気共鳴 (NMR) 試験のための、目的のプロトンの重水素標識のための反応スキームを示す。

【図 31】図 31 は、PNS 又は NCS のいずれかとの、改変型グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素の ^1H - NMR スペクトルの拡大図を示す。

【図 32】図 32 は、活性改変型グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素の ^1H - NMR スペクトルの 3.5 ppm ~ 4.5 ppm 領域の拡大図を示す。

【図 33】図 33 は、業界標準と比較した、化学的 N - 硫酸化多糖生成物の SAX - HPLC クロマトグラムを示す。

【図 34】図 34 は、業界標準と比較した、実施例 7 の化学的 N - 硫酸化多糖生成物をスルホ受容体多糖として用いて調製した酵素的 2 - O 硫酸化多糖生成物の SAX - HPLC クロマトグラムを示す。 20

【図 35】図 35 は、業界標準と比較した、実施例 7 の化学的 N - 硫酸化多糖生成物をスルホ受容体多糖として用いて、反応混合物に C₅ - ヘキサロニルエピメラーゼを含めて調製した、酵素的 2 - O 硫酸化多糖生成物の SAX - HPLC クロマトグラムを示す。

【図 36】図 36 は、業界標準と比較した、実施例 8 の 2 - O 硫酸化多糖生成物をスルホ基受容体として用いて調製した酵素的 6 - O 硫酸化多糖生成物の SAX - HPLC クロマトグラムを示す。

【発明を実施するための形態】

【0109】 30

定義

「活性部位」という用語は、触媒作用が起こる触媒タンパク質の部位を指し、1つ以上の基質結合部位を含むことができる。活性部位は、特定のポリペプチドと特異的に相互作用し、特定のポリペプチドの活性を調節する化合物の同定において、著しく有用である。天然リガンド又は基質と、それらの対応する受容体又は酵素の活性部位との会合は、作用の多くの生物学的機構の基礎である。同様に、多くの化合物は、受容体及び酵素の活性部位との会合によってそれらの生物学的効果を発揮する。このような会合は、活性部位の全部又は任意の部分で起こり得る。そのような会合の理解は、3' - ホスホアデノシン 5' - ホスホ硫酸の代わりにアリアル硫酸化合物に結合し、それと反応することができるスルホトランスフェラーゼ内の、改変型活性部位の設計を導くのに役立つ。 40

【0110】

「アミノ酸」という用語は、中心炭素原子 (アルファ炭素原子) が、水素原子、カルボン酸基 (この炭素原子は、本明細書では「カルボキシル炭素原子」という)、アミノ基 (この窒素原子は、本明細書では「アミノ窒素原子」という)、及び側鎖基 R に結合した構造を有する分子を指す。ペプチド、ポリペプチド、又はタンパク質に組み込まれる場合、アミノ酸は、1つのアミノ酸を互いに結合する脱水反応において、そのアミノ基及びカルボン酸基の1つ以上の原子を失う。その結果、タンパク質に組み込まれる場合、アミノ酸は「アミノ酸残基」と呼ばれる。天然に存在するタンパク質の場合、アミノ酸残基の R 基は、タンパク質が合成される 20 個のアミノ酸を区別するが、タンパク質中の 1つ以上のアミノ酸残基は、生物系におけるタンパク質への組み込み後に誘導体化又は修飾することが 50

できる（例えば、グリコシル化によって及び／又は隣接していない２つのシステインアミノ酸残基のチオール側鎖の酸化によるシステインの形成によって、タンパク質のフォールディング立体配座の安定化などにおいて重要な役割を果たすことが多い、ジスルフィド共有結合をもたらす）。加えて、アルファ炭素原子が４つの異なる基を有する場合（炭素原子に結合した２個の水素原子を有するグリシンを除いて、タンパク質を合成するために生物系によって使用される２０個のアミノ酸の場合のように）、Ｄ及びＬと命名された各アミノ酸の２つの異なるエナンチオマ型が存在する。哺乳動物では、Ｌ－アミノ酸のみが天然に存在するポリペプチドに組み込まれる。本発明の方法で利用される改変型スルホトランスフェラーゼ酵素は、１つ以上のＤ－アミノ酸及びＬ－アミノ酸を組み込むことができ、又はＤ－アミノ酸残基若しくはＬ－アミノ酸残基のみから構成することができる。

10

【０１１１】

非天然アミノ酸はまた、方法で利用される改変型スルホトランスフェラーゼ酵素のいずれか、特にアリアル硫酸依存性活性を有する改変型スルホトランスフェラーゼ酵素に組み込むことができる。そのようなアミノ酸の例として、 α アミノイソ酪酸、４－アミノ酪酸、Ｌ－アミノ酪酸、６－アミノヘキサ酸、２－アミノイソ酪酸、３－アミノプロピオン酸、オルニチン、ノルロイシン、ノルバリン、ヒドロキシプロリン、サルコシン、シトルリン、システイン酸、*t*－ブチルグリシン、*t*－ブチルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、 β アラニン、フルオロ－アミノ酸、デザイナアミノ酸（designer amino acid）（例えば、 β メチルアミノ酸、 α メチルアミノ酸、 α メチルアミノ酸）、及び一般的なアミノ酸類似体が挙げられるが限定されない。

20

【０１１２】

「及び／又は」という用語は、実体の列挙の文脈で使用される場合、実体が単独で又は組み合わせで存在することを指す。したがって、例えば、「Ａ、Ｂ、Ｃ、及び／又はＤ」という句は、Ａ、Ｂ、Ｃ、及びＤを個別に含むが、Ａ、Ｂ、Ｃ、及びＤのあらゆる全ての組合せ及び部分的な組合せをも含む。

【０１１３】

「アリアル硫酸」又は「アリアル硫酸化合物」という用語は、芳香環に直接結合した水素原子の１つ以上が硫酸エステル官能基によって置き換えられている、芳香環に由来する任意の化合物、官能基、又は置換基を指す。典型的には、硫酸エステル官能基は、硫酸エステル結合を介してアリアル硫酸化合物の芳香族部分に共有結合している。改変型酵素のいずれかを用いて、多糖、特にヘパロサン系多糖にスルホ基を供与することができるアリアル硫酸化合物の例として、*p*－ニトロフェニル硫酸（*PNS*）、４－メチルウンベリフェリル硫酸（*MUS*）、７－ヒドロキシクマリン硫酸、フェニル硫酸、４－アセチルフェニル硫酸、インドキシル硫酸、１－ナフチル硫酸、２－ナフチル硫酸、及び４－ニトロカテコール硫酸（*NCS*）が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【０１１４】

「アリアル硫酸依存性スルホトランスフェラーゼ」という用語は、スルホ供与体としてのアリアル硫酸化合物との生物学的活性又は触媒活性を保有する、改変型スルホトランスフェラーゼの集合的な群を指す。スルホトランスフェラーゼの生物活性が依存し得るアリアル硫酸化合物の非限定的な例として、*PNS*及び*NCS*が挙げられる。本明細書に記載するように、スルホ基供与体としてのアリアル硫酸化合物との生物活性を有する改変型スルホトランスフェラーゼは、スルホ基受容体としての多糖類、特にヘパロサン系多糖類との生物活性を保有することができる。「アリアル硫酸依存性スルホトランスフェラーゼ」はまた、本明細書に開示する配列に由来する変異体を含む、任意のアリアル硫酸依存性スルホトランスフェラーゼをコードする核酸及びポリペプチドの両方を含む。

40

【０１１５】

本発明の方法のいずれかに従って使用又は製造される多糖出発物質、中間体、及び／又は生成物のいずれかに関して「平均分子量」という用語は、特に明示されない限り、「数平均分子量」、「質量平均分子量」、「重量平均分子量」、「*Z*（遠心分離）平均モル質量」、又は「粘度平均モル質量」を含むがこれらに限定されない、様々な重合度、官能化

50

度、及びモル質量を有するポリマーの混合物のモル質量分布又はモル質量平均を決定する、任意の許容される尺度を指すことができる。

【 0 1 1 6 】

「重量平均分子量」 M_w という用語は、下記式を使用して、試料内の多糖類のモル分率分布を用いて計算された、混合物中の多糖類の平均分子量を報告する方法を指す。式中、 N_i は分子質量 M_i の多糖類の数である。

【 0 1 1 7 】

【 数 1 】

$$\bar{M}_w = \frac{\sum_i N_i M_i^2}{\sum_i N_i M_i}$$

10

【 0 1 1 8 】

「数平均分子量」 M_n という用語は、下記式を使用して、試料中の全ての多糖類の総重量を試料中の多糖類の数で割ることによって計算される、混合物中の多糖類の平均分子量を報告する方法を指す。ここで、 N_i は分子質量の多糖類の数 M_i である。

【 0 1 1 9 】

【 数 2 】

$$\bar{M}_n = \frac{\sum_i N_i M_i}{\sum_i N_i}$$

20

【 0 1 2 0 】

したがって、重量平均分子量 M_w は、必然的に、同じ混合物内の他の多糖類よりも大きい試料内の多糖類に対応するより高い値に向かって傾斜し、試料が単分散であり、 M_w が M_n に等しい場合を除いて、常に数平均分子量 M_n よりも大きい。試料内の多糖類の特定の試料が実重量の大きな分散を有する場合、 M_w は M_n よりもはるかに大きい。逆に、試料中の多糖類の重量分散が狭くなるにつれて、 M_w は M_n に近づく。

【 0 1 2 1 】

「相対分子量」又は「相対モル質量」(M_r)という用語は、混合物中の多糖類の平均分子量を無単位量として報告する別の方法を指し、最も広義には、分子の平均質量を1原子質量単位(amu)又は1ダルトン(Da)などの原子質量定数で割ることによって決定される。多糖類に関して、 M_r は、試料中の多糖類の異なる鎖長、官能化、及び/又は重量分布を考慮せず、代わりに、小分子と同様に、試料中の多糖類の真の平均質量を単に表す。

30

【 0 1 2 2 】

「生物活性」又は「触媒活性」という用語は、1つ又は複数の特定の基質の特異的認識によって特定の化学反応を触媒して、1つ又は複数の特定の生成物を産生する、酵素の能力を指す。ある態様において、本発明の改変型酵素は、基質としてのアリール硫酸化合物、特にPNSとの結合及び反応に依存する、生物活性又は触媒活性を保有する。さらに、いくつかの改変型酵素は、MUS、7-ヒドロキシマリン硫酸、フェニル硫酸、4-アセチルフェニル硫酸、インドキシル硫酸、1-ナフチル硫酸、2-ナフチル硫酸、及びNCsを含むがこれらに限定されない、PNSに加えて1つ以上の代替のアリール硫酸化合物との乱雑な触媒活性を有することができる。

40

【 0 1 2 3 】

「コード配列」という用語は、タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸、例えば遺伝子の部分を指す。

【 0 1 2 4 】

「コドン最適化された」という用語は、コードされたタンパク質が目的の生物において効率的に発現されるように、特定の生物において優先的に使用されるものに対する、タンパク質をコードするポリヌクレオチドのコドンの変化を指す。遺伝コードは、ほとんどのアミノ酸がいくつかのコドンによって表されるという点で縮重しているが、特定の生物に

50

よるコドン使用頻度は非ランダムであり、特定のコドントリプレットに偏っていることは周知である。本発明のある態様において、改変型酵素をコードするポリヌクレオチドは、発現のために選択された宿主生物からの最適な産生のためにコドン最適化することができる。

【0125】

「に対応する」、「を参照する」、又は「と比較して」という用語は、所与のアミノ酸又はポリヌクレオチド配列の番号付けの文脈で使用される場合、所与のアミノ酸又はポリヌクレオチド配列を参照配列と比較した場合の特定の参照配列の残基の番号付けを指す。換言すれば、所与のポリマーの残基番号又は残基位置は、所与のアミノ酸又はポリヌクレオチド配列内の残基の実際の数値位置によってではなく、参照配列に関して指定される。

10

【0126】

「欠失」という用語は、参照ポリペプチドからの1つ以上のアミノ酸の除去によるポリペプチドの修飾を指す。欠失は1つ以上のアミノ酸の除去を有することができ、その最終結果は、参照ポリペプチドの触媒活性を保持している。欠失はポリペプチドの内部部分及び/又は末端部分が対象とすることができる。加えて、欠失は、連続的なセグメントを有することができるか、又は不連続とすることができる。

【0127】

「二糖単位」という用語は、線状多糖類を含む多くの多糖類内の最小反復骨格単位を指し、最小反復単位は、2つの糖残基からなる。ヘパロサン系多糖に関して、二糖単位は、ヘキサロン酸残基及びグルコサミン残基からなり、これらはいずれも官能化することができる。ヘキサロン酸残基はグルクロン酸又はイズロン酸のいずれかとするすることができる。ヘパロサン系多糖内の各二糖単位は、その骨格構造、並びに存在するスルホ基の数及び位置によって説明することができる。さらに、同じ多糖内及び/又は多糖類の同じ試料内の同じ構造を有する二糖単位の相対存在量を特徴付けて、本明細書に記載のスルホトランスフェラーゼのいずれかと反応した結果として特定の位置での硫酸化の量を決定することができる。

20

【0128】

「フラグメント」又は「セグメント」という用語は、アミノ末端又はカルボキシ末端の欠失を有するが、残りのアミノ酸配列が参照配列中の対応する位置と同一である、ポリペプチドを指す。フラグメントは、少なくとも50アミノ酸長以上とすることができ、完全長のアリアル硫酸依存性スルホトランスフェラーゼ酵素又は完全長の天然スルホトランスフェラーゼ酵素のアミノ酸配列の最大70%、80%、90%、95%、98%、及び99%まで有する。

30

【0129】

「機能部位」又は「機能ドメイン」という用語は、一般に、タンパク質に機能を付与するタンパク質中の任意の部位を指す。代表的な例として、活性部位（すなわち、触媒作用が起こる触媒タンパク質中の部位）及びリガンド結合部位が挙げられる。リガンド結合部位には、金属結合部位、補因子結合部位、抗原結合部位、基質チャネル及びトンネル、並びに基質結合ドメインが含まれるが、これらに限定されない。酵素において、基質結合ドメインであるリガンド結合部位もまた活性部位とすることができる。機能部位はまた、複数の機能部位の複合体であってもよく、ここで、複合体を含む1つ以上の部位が存在しないと、機能が失われる。非限定的な例として、特定のスルホトランスフェラーゼ酵素の活性部位は、スルホ供与体に対する1つの部位及びスルホ受容体に対する1つの部位を含む、複数の結合部位又はクレフトを有することができる。

40

【0130】

「遺伝子」、「遺伝子配列」、及び「遺伝子セグメント」という用語は、機能性タンパク質、ポリペプチド、又はペプチドをコードする核酸単位の機能単位を指す。当業者によって理解されるように、この機能用語は、ゲノム配列及びcDNA配列の両方を含む。「遺伝子」、「遺伝子配列」、及び「遺伝子セグメント」という用語は、さらに、改変型酵素遺伝子産物、タンパク質又は多糖をコードする本明細書に開示のポリヌクレオチド配列

50

と実質的に同一であり、関連する制御配列の任意の組合せを有することができる、任意の DNA 配列を指す。この用語はまた、そのような DNA 配列に相補的な RNA 又はアンチセンス配列を指す。本明細書で使用される場合、「DNA セグメント」という用語は、プラスミド、コスミド、ファージ、及びウイルスを含むがこれらに限定されない組換えベクターを含まずに単離されている、単離された DNA 分子を含む。

【0131】

「グリコサミノグリカン」という用語は、反復二糖単位からなる長い線状多糖類を指す。グリコサミノグリカン (GAG) の例として、コンドロイチン、デルマタン、ヘパロサン、ヒアルロン酸、及びケラタンが挙げられる。GAG は、一般に、質量、長さ、二糖単位構造及び官能化、硫酸化の程度に関して不均一である。

10

【0132】

「ヘパロサン」という用語は、GlcA がグルクロン酸であり、GlcNAc が N - アセチルグルコサミンである、反復 $[\beta(1,4)\text{GlcA} - \alpha(1,4)\text{GlcNAc}]_n$ 二糖単位を有する特定の GAG を指す。

【0133】

「ヘパロサン系多糖」という用語は、二糖単位が 1 → 4 グリコシド結合したヘキスロン酸及びグルコサミン残基を含む、ヘパロサンと同じ骨格構造を有する多糖類を指す。ヘキスロン酸残基は、ヘパロサンのように GlcA であっても、又はイズロン酸 (IdoA) であってもいずれでもよく、任意に 2 - O 位にスルホ基を有していてもよい。グルコサミン残基は、ヘパロサンの場合のように、N - アセチル化であっても、N - 硫酸化、又は N - 非置換のいずれかであってもよく、N - 、3 - O、又は 6 - O の位置で任意に硫酸化することができる。本明細書で使用される場合、グルコサミン残基に関して「N - 非置換」という用語は、「N - 脱アセチル化」グルコサミン残基と同等であり、グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼを使用して化学的又は酵素的のいずれかでスルホ基を受容することができる、アミン官能基を指す。本発明によれば、ヘパロサン系多糖類は、出発物質として利用することができ、中間体として形成することができ、スルホ基受容体として作用し、及び / 又は本明細書に記載の方法のいずれかによる生成物として合成することができる。

20

【0134】

「挿入」という用語は、参照ポリペプチドへの 1 つ以上のアミノ酸の付加によるポリペプチドの修飾を指す。挿入は、ポリペプチドの内部部分、又はポリペプチドの C 末端若しくは N 末端への挿入とすることができる。挿入は、当技術分野で公知であり、後述する融合タンパク質を有することができる。挿入は、参照ポリペプチド中のアミノ酸の 1 つ以上によって分離された、アミノ酸の連続セグメント又は複数の挿入を有することができる。

30

【0135】

天然に存在する配列に由来する核酸に関して、本明細書で使用される「単離された核酸」という用語は、天然に存在するヌクレオチド配列を有し、標準的な組換え DNA 技術によって操作することができるが、それが由来する生物の天然に存在するゲノムのその 5' 及び 3' 末端に直接隣接するヌクレオチド配列に共有結合していない、リボ核酸又はデオキシリボ核酸を意味する。合成核酸に関して本明細書で使用される場合、「単離された核酸」という用語は、天然には存在せず、標準的な組換え DNA 技術によって操作することができるヌクレオチド配列を有する、リボ核酸又はデオキシリボ核酸を意味する。単離された核酸は、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) による増幅、インビトロ翻訳、他の核酸 (例えば、クローニングベクター又は発現ベクター) へのライゲーション、他の核酸 (例えば、クローニングベクター又は発現ベクター) からの制限、細胞の形質転換、ハイブリダイゼーション・スクリーニング・アッセイなどに使用することができる場合、標準的な組換え DNA 技術によって操作することができる。

40

【0136】

「天然に存在する」又は「野生型」という用語は、自然で見出される酵素の形態を指す。例えば、天然に存在する又は野生型のポリペプチド又はポリヌクレオチド配列は、天然

50

の供給源から単離することができ、ヒトの操作によって意図的に改変されていない生物に存在する配列である。野生型ポリペプチド又はポリヌクレオチド配列はまた、インビトロで合成、増幅、及び／又は発現することができ、インビボで産生される酵素と同じ配列及び生物活性を有する、組換えタンパク質又は核酸を指すことができる。天然に存在するか又は野生型スルホトランスフェラーゼ酵素とは対照的に、本発明の方法に従って利用される改変型アリール硫酸依存性スルホトランスフェラーゼ酵素は、異なるアミノ酸及び核酸配列を有し、スルホ基供与体としての3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸の代わりにアリール硫酸化合物との生物活性を有し、自然界では見出すことができない。

【0137】

「オリゴ糖」という用語は、各分子内に少数、典型的には3～9個の糖残基を含む、糖ポリマーを指す。 10

【0138】

「パーセント同一性」という用語は、2つ以上の核酸又はアミノ酸配列間の類似性の定量的測定を指す。非限定的な例として、本発明の2つ以上の改変型酵素間、2つ以上の天然に存在する酵素間、又は1つ以上の改変型酵素と1つ以上の天然に存在する酵素との間の、パーセント同一性を評価することができる。パーセント同一性は、2つ以上の全長配列、2つ以上の切断配列、又は全長配列と切断配列との組合せに関して評価することができる。

【0139】

「多糖」という用語は、グリコシド結合によって互いに結合された反復単位、典型的には単糖又は二糖単位で形成されたポリマー炭水化物構造を指し、直鎖から高度に分岐した三次元構造までの範囲にわたることができる。当業界で用いられる「多糖」という用語は、1分子あたり10個超の糖残基を有する糖ポリマーを指すことができるが、「多糖」は、当業界で「オリゴ糖」として定義することができる3～9個の糖残基を有する糖ポリマーを含む、1個超の糖残基を有する糖ポリマーを説明するために本明細書で用いられる。本発明によれば、「多糖」という用語はまた、コンドロイチン、デルマタン、ヘパロサン、ヒアルロン酸、及びケラタン化合物を含むGAG及びGAG系の化合物を一般的に説明するために使用される。 20

【0140】

「タンパク質」、「遺伝子産物」、「ポリペプチド」、及び「ペプチド」という用語は、1つ以上のアミノ酸残基の鎖からなる生体分子を説明するために交換可能に使用することができる。さらに、複数のポリペプチドサブユニット（例えば、二量体、三量体、又は四量体）を含むタンパク質、並びに他の非タンパク質性触媒分子もまた、本明細書で使用する「タンパク質」の意味の範囲内に含まれると理解される。同様に、「タンパク質フラグメント」、すなわちタンパク質の全てのアミノ酸残基よりも少ないアミノ酸残基を含むアミノ酸残基のストレッチもまた、本発明の範囲内であり、本明細書では「タンパク質」と呼ばれることがある。さらに、「タンパク質ドメイン」もまた、「タンパク質」という用語に含まれる。「タンパク質ドメイン」は、疎水性コア及び極性外面を有するそれ自体特徴的な球形形状を有する、それ自体半独立したフォールディング領域から構成されるタンパク質の一部を表す。 30 40

【0141】

「組換え」という用語は、例えば、細胞、核酸、又はポリペプチドに関して使用される場合、別段では自然界に存在しない様式で修飾された材料を指す。非限定的な例として、とりわけ、細胞の天然（非組換え）形態内に見られない遺伝子を発現する組換え細胞、又はそうでなければ異なるレベルで発現される天然遺伝子を発現する組換え細胞が挙げられる。

【0142】

「参照配列」という用語は、配列比較の基礎として使用される開示又は定義された配列を指す。参照配列は、より大きな配列のサブセット、例えば全長遺伝子又はポリペプチド配列のセグメントとすることができる。一般に、参照配列は、全長配列の少なくとも一部 50

、典型的には少なくとも20個のアミノ酸、又は核酸若しくはポリペプチドの全長配列を指す。

【0143】

「糖(saccharide)」という用語は、糖(sugar)としても知られる炭水化物を指し、炭素、水素、及び酸素を有してなる化学物質の広義の用語である。ここで、水素原子の数は、本質的に酸素原子の数の2倍である。多くの場合、反復単位の数糖間で異なってもよい。したがって、二糖、オリゴ糖、及び多糖類は全て、スルホ基受容体として本発明の改変型スルホトランスフェラーゼ酵素によって認識される糖単位で構成される、鎖の全ての例である。

【0144】

出発物質として利用するか、中間体として形成されるか、スルホ基受容体として作用するか、及び/又は本明細書に記載する方法のいずれかに従って生成物として合成される多糖類に関して、「実質的に等価」という用語は、先行技術で特徴付けられる多糖試料で見られるものと同じの多糖試料の1つ以上の特性を指す。そのような特性として、化学構造、硫酸化頻度及び位置、二糖単位組成、分子量プロファイル、及び/又は抗凝固活性を挙げることができるがこれらに限定されない。2つの多糖試料が異なる可能性のある追加の特性を有する場合でも、そのような違いはそれらの実質的な同等性に著しくは影響しない。非限定的な例として、本発明の方法に従って合成される抗凝固性N, 2, 3, 6-HS生成物は、化学構造、分子量プロファイル、及び/又は抗凝固活性に関して米国薬局方(USP)参照標準(CAS番号9041-08-1)と実質的に等価とすることができるが、天然源から単離され、同じ試料中に非微量の他のGAGを含有することができるUSP参照標準とは異なる純度で製造することができる。

【0145】

タンパク質調製物に関して「実質的に純粋」という用語は、他の意図的に含まれる化合物の重量を除いて、目的のタンパク質を(乾燥重量で)少なくとも60%含有する調製物を指す。特に、調製物は、他の意図的に含まれる化合物の重量を除いて、目的のタンパク質の乾燥重量で少なくとも75%、より具体的には少なくとも90%、最も具体的には少なくとも99%である。純度は、任意の適切な方法、例えばカラムクロマトグラフィ、ゲル電気泳動又は高速液体クロマトグラフィ(HPLC)分析によって測定することができる。調製物が本発明の2つ以上の異なるタンパク質を意図的に含む場合、「実質的に純粋な」調製物は、本発明のタンパク質の総乾燥重量が、他の意図的に含まれる化合物の重量を除いて、総乾燥重量の少なくとも60%である調製物を意味する。特に、本発明の2つ以上のタンパク質を含有するそのような調製物について、本発明のタンパク質の総重量は、他の意図的に含まれる化合物の重量を除いて、調製物の総乾燥重量の少なくとも75%、より具体的には少なくとも90%、最も具体的には少なくとも99%とすることができる。

【0146】

「スルホ」又は「スルフリル」という用語は、アリール硫酸化合物から除去することができるか、及び/又は供与体化合物から受容体化合物に転移することができる化学式 SO_3H^- を有する官能基、置換基、又は部分を指す。ある態様において、本発明の改変型スルホトランスフェラーゼは、アリール硫酸化合物から多糖、特にヘパロサン及び/又はヘパロサン系多糖へのスルホ基の転移を触媒する。

【0147】

「スルホトランスフェラーゼ」という用語は、スルホ供与体化合物からスルホ受容体化合物へのスルホ基の転移を触媒するのに用いられるインビボ又はインビトロプロセスにおける任意の酵素を指す。「スルホトランスフェラーゼ」は、インビボでスルホ転移反応を触媒する酵素を記載するために、又はインビトロでスルホ転移反応を触媒する本発明の改変型酵素を記載するために、互換的に使用することができる。

【0148】

「形質転換」という用語は、形質転換、トランスフェクション、電気穿孔、マイクロイ

10

20

30

40

50

ンジェクション、ネイキッド核酸の直接注入、粒子媒介送達、ウイルス媒介形質導入、又は該核酸の一過性若しくは安定な発現、若しくは該核酸の該宿主細胞若しくはその子孫のゲノムへの組込みをもたらす核酸を宿主細胞に送達する任意の他の手段を含むが、これらに限定されない、外因性核酸を細胞に導入する任意の方法を指す。

【0149】

自然界では、ヘパロサンは、1つ以上のスルホトランスフェラーゼによって修飾されてヘパラン硫酸(HS)生成物を形成する前に、グルクロン酸及びN-アセチル化グルコサミンのコポリマーとしてゴルジ体内で合成される。そのような修飾には、グルコサミンのN-脱アセチル化及びN-硫酸化、イズロン酸残基を形成するためのグルクロン酸のC₅エピマー化、イズロン酸及び/又はグルクロン酸の2-O-硫酸化、並びにグルコサミン残基の6-O-硫酸化及び3-O-硫酸化が含まれる。インビボでヘパロサン及びHS多糖のN-硫酸化、2-O-硫酸化、6-O-硫酸化及び3-O-硫酸化を触媒する天然スルホトランスフェラーゼは、ほぼすべてのスルホトランスフェラーゼによって認識されるほぼ遍在性のスルホ基供与体である3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸を排他的にインビボで、特に真核生物で認識し、それと結合する。ヒトグルコサミニル3-Oスルホトランスフェラーゼ酵素、3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸、及び多糖の間のスルホ転移反応機構の例を図1A~図1Cに示す。特に、43位のグルタミン酸残基は、多糖内のN-スルホグルコサミン残基の3-O位からプロトンを引き抜き、求核攻撃及び3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸からのスルホ基の除去を可能にするが、His-45及びAsp-48は、硫酸化多糖生成物が活性部位から放出される前に、配位して酵素の遷移状態を安定化させる。

【0150】

しかしながら、3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸は、真核生物では排他的なスルホ基供与体であるが、短い半減期を有し、スルホ転移反応中に競合阻害剤として作用するアデノシン3', 5'-ニリン酸へと容易に分解することができる。動物は、アデノシン3', 5'-ニリン酸を代謝して競合阻害を防ぎ、また、必要に応じて各スルホ転移反応のために3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸を補充することができるため、3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸を効率的に利用することができる。一方、限られた数の細菌系ではスルホ基供与体として利用することができるアリール硫酸化合物(上記のMalojcic, G., et al.を参照のこと)は、インビボでのHS多糖の合成に関与するものを含め、真核生物では公知の天然スルホトランスフェラーゼ酵素のいずれとも反応することができない。特定の理論に制限されるものではないが、真核生物のスルホトランスフェラーゼの活性部位内の3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸に対する結合ポケットは、アリール硫酸化合物に対して、結合を促進するのに十分に高い親和性を有しないか、及び/又はアリール硫酸化合物は活性部位に入るのを立体的に全く妨げられていると考えられる。

【0151】

本開示は、スルホ基供与体としてのアリール硫酸化合物を認識し、それと結合するように改変されたスルホトランスフェラーゼ酵素を用い、硫酸化多糖、特にHS多糖を合成するための方法及びキットを含む。特に、改変型スルホトランスフェラーゼ酵素は、アリール硫酸化合物から、1→4グリコシド結合したヘキサロン酸残基及びグルコサミン残基の交互ポリマーを含有するヘパロサン系多糖にスルホ基を転移させてHS多糖を形成するように設計される。インビボで、HS多糖類は、ウイルス感染の補助、血液凝固及び胚発生の調節、腫瘍増殖の抑制、及び特定の調節タンパク質と相互作用することによる試験対象の摂食行動の制御を含む、様々な重要な生物学的プロセスに重要な役割を果たす。HS多糖類は、役割に応じて、特定の生物学的プロセスに関与する特定のタンパク質によって認識される1つ以上の固有のパターン又はモチーフを含むことができる。本発明のある面において、本明細書に記載の方法又はキットのいずれかによって生成されたHS多糖は、抗凝固活性を有することができる。

【0152】

例示的な態様を参照し、それらを説明するために特定の用語が使用されているが、本発

明の範囲の限定は意図されていないことを理解されたい。本明細書に記載する方法のさらなる修正、並びに当業者が想到し、本開示を有するであろう記載された本発明の原理のさらなる適用は、本発明の範囲内であると考えられるべきである。さらに、特に定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、この特定の発明の態様が関係する当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。使用される用語は、それらの態様を説明することのみを目的としており、そのように指定されない限り、限定することを意図しない。見出しは便宜上提供されているにすぎず、決して本発明を限定するものと解釈されるべきではない。さらに、本明細書及び特許請求の範囲を通して、所与の化学式又は名称は、全ての光学異性体及び立体異性体、並びにそのような異性体及び混合物が存在する場合はラセミ混合物を包含するものとする。

10

【0153】

ヘパラン硫酸多糖のインビトロ合成

本発明のある態様において、HS多糖類の合成は、スルホ基供与体としてのアリール硫酸化合物を認識し、それと結合し、反応するように改変されたスルホトランスフェラーゼ酵素及びアリール硫酸化合物を用いてヘパロサン系多糖を処理することによって達成することができる。改変型スルホトランスフェラーゼ酵素の各々は、それらの配列、構造及び生物学的活性を含め、以下にさらに詳述する。特定の理論に制限されるものではないが、多糖をスルホ基受容体として認識するが、スルホ供与体としてのアリール硫酸化合物とも結合及び反応するスルホトランスフェラーゼ酵素は、自然界では観察されておらず、以前に記載もされていないと考えられる。

20

【0154】

当業者であれば、本発明の方法で利用される改変型スルホトランスフェラーゼ酵素が、スルホ転移を触媒するためにアリール硫酸化合物と結合及び反応することができないインビトロ及びインビボ反応機構を超えるいくつかの利点を有することを理解するであろう。現在、抗凝固活性を有するHS多糖類を含め、大量の硫酸化多糖類を得るには、ブタ及びウシなどの動物供給源からインビボで産生された硫酸化多糖類を単離する必要がある(Xu, Y., et al., (2011) Science 334 (6055): 498-501を参照)。しかし、抗凝固性HS多糖類の世界的な汚染危機は、動物供給源からそれらを得ることのみに依存するという脆弱性に焦点を当てた。その結果、近年、動物由来の生成物を補完又は置換するのに十分な量で抗凝固性HS多糖類を合成するための合成経路の開発が促されている。

30

【0155】

硫酸化多糖類をインビトロで合成するために、従来、2つの反応スキーム、すなわち、完全化学合成及び化学酵素合成が存在した。両タイプの反応スキームは、場合によっては均質である精製生成物をもたらしたが、合成経路は、全体として工業規模で硫酸化多糖類、特に抗凝固性HS多糖類を生成するには不十分であった。実際、完全化学合成を用いるそのような多糖類の生成は、従来60もの工程を必要とし、収率が非常に低かった(Balagurunathan, K., et al., (eds.) (2015) Glycosaminoglycans: Chemistry and Biology, Methods in Molecular Biology, vol. 1229, DOI 10.1007/978-1-4939-1714-3_2, c Springer Science+Business Media New Yorkを参照)。

【0156】

40

一方、化学酵素合成経路は一般に、はるかに少ない工程を利用し、生成された抗凝固性生成物の規模を多ミリグラム量へと増大させる(その開示全体が参照により組み込まれる米国特許第8,771,995号及び米国特許第9,951,149号を参照)。得られる生成物の量の改善は、ヘパロサン系多糖へのスルホ基の転移を触媒するために、反応容器内で組換えHSスルホトランスフェラーゼを3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸と組み合わせる能力に寄与することができる。ただし、この時点までの化学酵素法は、野生型スルホトランスフェラーゼの活性が3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸に依存しているため、グラムスケール又は大量の抗凝固性HS多糖類を合成するには依然として適していない。3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸は、pH 8.0での3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸の半減期がわずかに約20時間であるため、抗凝固性HS多糖を含む酵素的に硫酸

50

化された生成物の大規模生成の障害となる、非常に高価かつ不安定な分子である。

【0157】

なお、アデノシン3', 5'-ニリン酸による生成物阻害もまた、硫酸化生成物の大規模合成に対する制限要因であった。アデノシン3', 5'-ニリン酸による生成物阻害の非常に悪い影響は、アデノシン3', 5'-ニリン酸を3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸に変換する、3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸再生系（上記米国特許第6,255,088号、及びBurkhart, et al. (2000) J. Org. Chem. 65: 5565-5574を参照）を使用することによっていくらか低減することができる。しかし、3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸再生系をよそに、天然スルホトランスフェラーゼとの化学反応を開始するために3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸を供給することの絶対的な必要性は、それで10
もなお、抗凝固性HS多糖類を含む硫酸化生成物を工業的な生産グレードの規模で合成するためには桁違いに高いコスト障壁を作り出す。

【0158】

活性を促進するためにスルホ供与体として3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸を必要とする、硫酸化多糖の従来の化学酵素合成とは対照的に、本発明の方法は、スルホトランスフェラーゼの各々がスルホ供与体としてのアリール硫酸化合物を認識し、それと結合し、反応するように改変されているため、3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸を使用する必要性を完全に回避する。上記のように、PNS又はMUSなどのいくつかのアリール硫酸化合物は、安価で広く入手可能であり、スルホ供与体として一部の細菌性スルホトランスフェラーゼと反応することが示されている（上記のMalojcic, G., et al.を参照20）。しかし、これらの細菌性スルホトランスフェラーゼは、他の芳香族化合物のみを認識し、スルホ基受容体としていかなる種類の多糖類も認識しないか、いかなる種類の多糖とも結合しないため、硫酸化多糖類、特に抗凝固性HS多糖類の合成には適していない。そのため、特定の理論に制限されるものではないが、本発明の方法で利用される改変型スルホトランスフェラーゼは、スルホ基供与体としてのアリール硫酸化合物、及びスルホ基受容体としての多糖類、特にヘパロサン系多糖類と結合することができる唯一の公知のスルホトランスフェラーゼであると考えられる。改変型グルコサミニルN-、6-O若しくは3-Oスルホトランスフェラーゼ又は改変型ヘキサロニル2-Oスルホトランスフェラーゼは、その生物学的活性がスルホ基供与体としてのアリール硫酸化合物との結合及びスルホ基受容体としてのヘパロサン系多糖との結合に依存する限り、任意のアミノ酸配列を有30
することができる。各スルホトランスフェラーゼ酵素によって認識される特定の多糖類を以下にさらに詳述する。

【0159】

自然界では、HS多糖類は、多糖内の任意のヘキサロン酸残基の2-O位及び任意のグルコサミン残基のN-、3-O、6-O位で硫酸化されることができる。さらに、同じHS多糖内のヘキサロン酸残基又はグルコサミン残基のいくつかは、上記の位置のいずれかで硫酸化されることができ、HS多糖の局所環境内の1つ以上の酵素又は補因子によって認識することができる特徴的な硫酸化パターンを形成することができる。非限定的な例として、抗凝固性HS多糖類は、アンチトロンビンによって認識される特定の硫酸化パターンを有する特徴的な五糖配列を含む。そのような抗凝固性HS多糖類は、それらの特徴的な五糖配列を含め、以下にさらに詳述する。40

【0160】

本発明のある態様において、N-、2-O-、3-O-、6-O-硫酸化-HS(N, 2, 3, 6-HS)生成物、特に抗凝固活性を有するものを合成する方法が提供される。N-、2-O-、3-O-及び6-O硫酸化工程のうちの1つ以上、好ましくは全部が、3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸の非存在下で、アリール硫酸化合物と反応するように改変されたスルホトランスフェラーゼ酵素を使用して触媒することができる。これらの酵素は各々、以下にさらに詳述する。出発材料として利用されるヘパロサン系多糖類の分子量及びN-アセチルグルコサミン含有量を制御することによって、血液凝固を予防するために一般的に処方される未分画N, 2, 3, 6-HS生成物のための米国薬局方(U50

S P) 参照標準 (C A S 番号: 9 0 4 1 - 0 8 - 1) に匹敵する分子量、硫酸化及び抗凝固活性を有する N, 2, 3, 6 - H S 生成物組成物を形成することができる。

【0161】

インビトロ及びインビボで生成される抗凝固性 N, 2, 3, 6 - H S 多糖類は、多くが特定の順序で硫酸化される、以下にさらに詳述する統一された五糖モチーフを有する。したがって、抗凝固性 N, 2, 3, 6 - H S 生成物が合成される本発明の方法では、五糖モチーフ内の硫酸化の順序は、典型的には、(1) N - 硫酸化; (2) 2 - O - 硫酸化; (3) 6 - O - 硫酸化; 及び (4) 3 - O 硫酸化である。ただし、多糖の他の部分は任意の順序で硫酸化することができ、他の N, 2, 3, 6 - H S 生成物は、任意の順序で H S 多糖を硫酸化することによって合成することができる。抗凝固活性を有するものを含む任意の N, 2, 3, 6 - H S 生成物を合成するために利用される反応混合物の各々は、単一のポット内で行うことができるか、硫酸化工程のうちの 1 つ以上の生成物は、次の硫酸化工程に移る前に単離及び精製することができる。

10

【0162】

一般に、上記のように、大部分の天然スルホトランスフェラーゼ、特に真核生物のスルホトランスフェラーゼは、スルホ供与体としての 3' - ホスホアデノシン 5' - ホスホ硫酸と反応する。そのため、各スルホトランスフェラーゼは一般に、その特定のスルホ受容体を特徴とする。H S 多糖類を合成するのに利用されるスルホトランスフェラーゼに関して、スルホ受容体多糖は一般に、ヘパロサン系多糖である。しかし、スルホ基受容体として作用する特定のヘパロサン系多糖が 1 つ以上の N - 又は O - 置換官能基を含む場合であっても、多糖は、スルホ転移反応が起こるために特定のスルホトランスフェラーゼによって認識されなければならない特徴的な構造モチーフを有する。改変型アリアル硫酸依存性スルホトランスフェラーゼ、及びそれらが認識し、結合し、反応するスルホ受容体多糖の各々は、以下にさらに詳述する。

20

【0163】

改変型グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ

自然界では、グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼは、二重の N - デアセチラーゼ及び N - スルホトランスフェラーゼ活性を有し、同じ酵素が最初に、ヘパロサン内のグルコサミン残基からの N - アセチル基の除去を触媒し、次いで、3' - ホスホアデノシン 5' - ホスホ硫酸から第 1 の工程において N - 脱アセチル化された同じグルコサミン残基へのスルホ基の転移を触媒する。酵素の二重の N - デアセチラーゼ活性及び N - スルホトランスフェラーゼ活性は、2 つの別個の構造ドメイン、すなわち N - デアセチラーゼドメイン及び N - スルホトランスフェラーゼドメインを介して達成される。しかしながら、一方のドメインの活性は他方のドメインの活性のための必要条件ではなく、N - デアセチラーゼ又は N - スルホトランスフェラーゼ活性のいずれかを有する組換え単一ドメインタンパク質を発現及び精製することができる。一般に、単一ドメイン組換え N - スルホトランスフェラーゼ酵素を利用して H S 多糖類の合成を行う。同様に、本発明のある態様において、N - 脱アセチル化ヘパロサンの N - 硫酸化を触媒するために、単一の N - スルホトランスフェラーゼドメインを有するように改変型アリアル硫酸依存性グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ酵素を発現及び精製することができる。

30

40

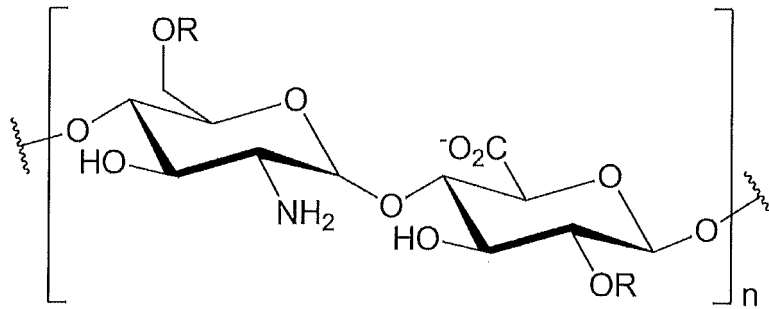
【0164】

スルホ基供与体として 3' - ホスホアデノシン 5' - ホスホ硫酸を利用する天然のグルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ酵素は、E C 2 . 8 . 2 . 8 酵素クラスのメンバーである。スルホ転移反応の開始前に、E C 2 . 8 . 2 . 8 内、特に E C 2 . 8 . 2 . 8 内の酵素の N - スルホトランスフェラーゼドメイン内の酵素によってスルホ受容体として認識される N - 脱アセチル化ヘパロサンは、下記式 I I (式中、n は整数であり、R は水素原子又はスルホ基からなる群から選択される) の構造を有する 1 つ以上の二糖単位を有することができる。

【0165】

50

【化 1 1】



10

【0 1 6 6】

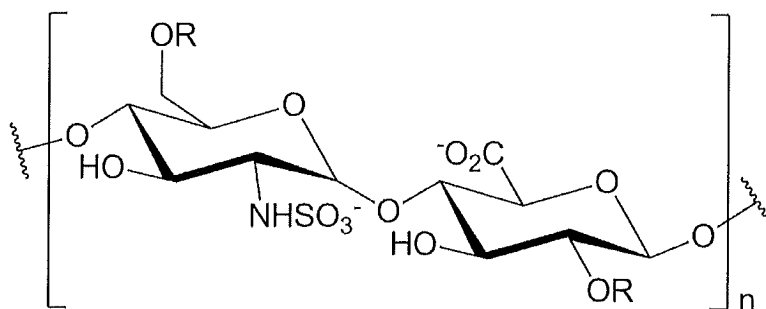
該酵素と反応する多糖の一部は式 I I の構造を有するが、多糖内の他の部分は、N - 置換又は O - 置換されていてもよい。典型的には、式 I I の構造を有する N - 脱アセチル化ヘパロサンは、合計で少なくとも 4 つの二糖単位、又は 8 つの糖残基を有する。N - 脱アセチル化ヘパロサンをスルホ基受容体として利用するスルホ転移反応は、Sheng, J., et al., (2011) J. Biol. Chem. 286 (22): 19768-76, 及び Gesteira, T. F., et al., (2013) PLoS One 8 (8): e70880 にて考察されており、これらの開示はその全体が参照により組み込まれる。

【0 1 6 7】

3' - ホスホアデノシン 5' - ホスホ硫酸と N - 脱アセチル化ヘパロサンとの結合に成功すると、グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ酵素は、スルホ基の非置換グルコサミンへの転移を触媒し、下記式 I I I (式中、n は整数であり、R は水素原子又はスルホ基からなる群から選択される。) の構造を有する N - 硫酸化ヘパロサン生成物を形成することができる。

【0 1 6 8】

【化 1 2】



30

【0 1 6 9】

他の態様において、EC 2.8.2.8 内の天然グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ酵素のいずれか又は改変型アリール硫酸依存性グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ酵素のいずれかと反応する N - 脱アセチル化ヘパロサン内の反復二糖単位の各々は、式 I I の構造を有する。さらなる態様において、グルコサミニル残基の 6 - O 位及びグルクロン酸残基の 2 - O 位の R 基の両方が、多糖内の二糖単位の全てにおいて、水素原子である。他の態様において、多糖内のいくつかの位置では、図 2 に示すように、グルコサミン残基の少なくとも一部が依然として N - アセチル化されているが、N - アセチル化されているポリマー内のグルコサミニル残基は、本発明の改変型スルホトランスフェラーゼとスルホ基受容体として直接関与することはできない。しかしながら、多糖内の N - アセチル化残基の存在は、同じ多糖内の非アセチル化残基に対して改変型スルホトランスフェラーゼが有する結合親和性に影響を及ぼさない。他の態様において、式 I I の構造を有する部分に隣接するヘパロサン系多糖の構造にかかわらず、野生型又は天然グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼと反応することによって生じる N - 硫酸化多糖生成物は、式 I I I の構造を有する。

40

50

【0170】

他の態様において、多糖内に式ⅠⅠの構造を有する複数の二糖単位が存在する場合、任意のグルコサミニルアミンをN-硫酸化することができる。同様に、同じ多糖を、存在する利用可能な未置換グルコサミニル残基の全てを含む及び最大全てまで、複数回N-硫酸化することができる。

【0171】

別の態様において、式ⅠⅠの構造を有するヘパロサン系多糖類は、均質な組成物として提供することができる。さらに他の態様において、式ⅠⅠの構造を有するスルホ受容体多糖類は、可変の鎖長、分子量並びに単糖の組成及び官能化を有する多糖類の多分散混合物を有する組成物内に有することができる。

10

【0172】

別の態様において、式ⅠⅠの構造を有し、本発明の方法に従って利用されるヘパロサン系多糖類は、商業的供給源から得ることができるか、及び/又は修飾することができる。他の態様において、ヘパロサンは、式ⅠⅠの構造を有するN-脱アセチル化多糖を生成するために、細菌供給源又は真核生物供給源から単離され、続いて化学処理することができる。そのようなプロセスを以下の説明及び実施例で詳述する。

【0173】

野生型EC2.8.2.8酵素のN-スルホトランスフェラーゼドメインは典型的には、それらの配列が大きく異なり得るおよそ300~350個のアミノ酸残基を有するが、最終的には全く同じ機能、すなわちN-脱アセチル化ヘパロサン内の非置換グルコサミン残基のN-硫酸化を触媒する機能を有する。特定の理論に制限されるものではないが、野生型EC2.8.2.8酵素の各々は、全ての種にわたって同一か又は高度かのいずれかで保存されている複数のアミノ酸配列モチーフ及び二次構造があるため、同じ化学反応を触媒できると考えられる。

20

【0174】

さらに、保存されたアミノ酸配列モチーフのいくつかは、3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸及び/又は多糖のいずれかの結合に直接関与するか、又は化学反応自体に関与すると考えられる。天然酵素のN-スルホトランスフェラーゼドメイン間の保存されたアミノ酸配列モチーフの同一性は、活性部位内のアミノ酸残基が同定された既知の結晶構造(PDBコード:1NST)を有するヒトEC2.8.2.8酵素のN-スルホトランスフェラーゼドメインのアミノ酸配列を、EC2.8.2.8酵素クラス内の他の天然スルホトランスフェラーゼのN-スルホトランスフェラーゼドメインのアミノ酸配列と比較することによって実証することができる。いくつかの真核生物及びヒト酵素のいくつかのアイソフォームを含む、15個の酵素のN-スルホトランスフェラーゼドメインの多重配列アラインメントを、ヒトN-スルホトランスフェラーゼ酵素(UniProtKB寄託番号P52848)と比較してのパーセント同一性と共に図3A~3Cに示す。図3A~3Cに示すように、配列は、ラットN-スルホトランスフェラーゼドメインについてはP52848参照配列(エントリsp|Q02353|NDST1__RAT)と98.4%の配列同一性を有するものから、ショウジョウバエN-スルホトランスフェラーゼドメインについては最低で55.6%の配列同一性(エントリsp|Q9V3L1|NDST__DROME)までの範囲である。当業者は、多重配列アラインメントは明確化のために15配列に限定されており、同定され、高度に保存された活性部位及び/又は結合領域も有する他の野生型EC2.8.2.8酵素のN-スルホトランスフェラーゼドメインをコードする数百のアミノ酸配列が存在することを理解するであろう。

30

40

【0175】

図3A~3Cにおいて、特定の位置で黒背景に白色で示すアミノ酸は、全ての配列にわたって100%同一である。特定の位置でアミノ酸が同一であること、又は化学的若しくは構造的に類似していることのいずれかを意味する、高度に保存されているアミノ酸は、黒い縁取りで囲まれている。高度に保存された領域内では、配列の大部分に存在するコンセンサスアミノ酸は太字である。同一でないか又は高度に保存されていない特定の位置の

50

アミノ酸は、典型的には可変である。配列内の期間 (period) は、高度に保存された又は同一の領域の間にさらなる残基を有する他の配列 (複数可) との配列アラインメントを容易にするために、配列に挿入されたギャップを示す。最後に、各配列ブロックの上には、アラインメント内のアミノ酸の同一性に基づいて、野生型ヒト N - スルホトランスフェラーゼ酵素の構造を参照として使用して、全ての配列にわたり保存されている二次構造を示す一連の矢印及びコイルがある。矢印に隣接する β 記号は β シートを指し、 α 記号又は η 記号に隣接するコイルは螺旋二次構造を指す。

【0176】

図 3 A ~ 3 C の 15 個の整列した配列内には、ヒト N - スルホトランスフェラーゼドメインの結晶構造に基づいて、活性部位を有する 1 つ以上のアミノ酸を含むいくつかの保存されたアミノ酸モチーフが存在する。図 3 A ~ 3 C 内のアミノ酸残基の番号付けに基づくこれらの保存されたアミノ酸配列モチーフは、残基 40 ~ 46 (Q - K - T - G - T - T - A) ; 残基 66 ~ 69 (T - F - E - E) ; 残基 101 ~ 105 (F - E - K - S - A) ; 残基 139 ~ 143 (S - W - Y - Q - H) ; 及び残基 255 ~ 262 (C - L - G - K / R - S - K - G - R) を含む。さらなる態様において、保存されたアミノ酸配列モチーフ Q - K - T - G - T - T - A を有する EC 2 . 8 . 2 . 8 内の野生型スルホトランスフェラーゼ酵素のいくつかのアイソフォームは、残基 40 ~ 49 からの拡張保存されたアミノ酸配列モチーフ Q - K - T - G - T - T - A - L - Y - L をさらに有する。

10

【0177】

特定の理論に制限されるものではないが、これらの残基は、化学反応を促進するか若しくはそれに関与するか、又は活性部位内の 3' - ホスホアデノシン 5' - ホスホ硫酸又は多糖の結合を可能にするかのいずれかであると考えられる。特に図 4 A ~ 4 C に示すように、143 位のヒスチジン残基 (N - デアセチラーゼドメインも含む全長天然スルホトランスフェラーゼ酵素のアミノ酸配列の 716 位に対応する) は、多糖内の非置換グルコサミニル残基のアミン官能基内の 2 つのプロトンのうちの一方を引き抜き、窒素原子が 3' - ホスホアデノシン 5' - ホスホ硫酸の求核攻撃を開始してスルフィリル基を除去することを可能にする位置にある。さらに、41 位及び 260 位のリジン残基も普遍的に保存されており、スルフィリル部分と配位すると考えられ、活性部位内の 3' - ホスホアデノシン 5' - ホスホ硫酸の結合を促進し、反応の過程で遷移状態を安定化する (上記の Gesteira, T. F., et al., 及び Sueyoshi, T., et al., (1998) FEBS Letters 433: 211-214 を参照のこと。これらの開示は、その全体が参照により組み込まれる)。

20

30

【0178】

しかしながら、上記のように、EC 2 . 8 . 2 . 8 内の天然スルホトランスフェラーゼ酵素は、天然スルホトランスフェラーゼの活性部位内の 3' - ホスホアデノシン 5' - ホスホ硫酸の結合ポケットが、結合を促進するのに充分高いアリール硫酸化合物に対する親和性を有しないか、及び / 又はアリール硫酸化合物が活性部位に入るのを立体的に妨げられるかのいずれかと考えられるので、アリール硫酸化合物から多糖への硫酸基の転移を触媒することができない。その結果、及び他の態様において、EC 2 . 8 . 2 . 8 酵素を、そのアミノ酸配列内のいくつかの位置で変異させて、活性部位内のアリール硫酸化合物の結合を可能にし、及び / 又は多糖への硫酸基の転移が起こることができるようにアリール硫酸化合物を最適に配置することができる。

40

【0179】

したがって、他の態様において、本発明の方法により利用することができる改変型グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ酵素は、図 3 A ~ 3 C に例示するアミノ酸配列を有する酵素を含めて、EC 2 . 8 . 2 . 8 内の天然酵素のいずれかの N - スルホトランスフェラーゼドメインと比較して変異している単一の N - スルホトランスフェラーゼドメインを有することができる。他の態様において、本発明の方法により利用することができる改変型グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ酵素は、EC 2 . 8 . 2 . 8 内の天然酵素のいずれかの N - デアセチラーゼドメインと同一又は変異したアミノ酸配列を有する、N - デアセチラーゼドメインをさらに有することができる。

50

【 0 1 8 0 】

他の態様において、改変型酵素のアミノ酸配列に操作された変異は、アリール硫酸化合物がスルホ基供与体として改変型グルコサミニルスルホトランスフェラーゼ酵素に結合及び反応することができる生物活性を促進する。さらに他の態様において、改変型グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ酵素は、スルホ基供与体としてのアリール硫酸化合物と結合及び反応することができるが、スルホ基受容体としてのヘパロサン及び / 又は N - 脱アセチル化ヘパロサンとの対応する野生型スルホトランスフェラーゼ生物活性を保持する。特定の理論に制限されるものではないが、改変型グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ酵素のアミノ酸配列に挿入された変異のために、それらのスルホトランスフェラーゼ活性は、3' - ホスホアデノシン 5' - ホスホ硫酸がアリール硫酸化合物で置換さ 10
れていることを除いて、上記の図 4 A ~ 図 4 C に記載されているのと同様の機構を用いる、アリール硫酸化合物からスルホ受容体多糖へのスルフリル基の直接転移を有することができると考えられる。そうでなければ、変異のために、スルホトランスフェラーゼ活性は、アリール硫酸化合物の加水分解及びスルホヒスチジン中間体の形成、続いて N - 硫酸化生成物を形成するための N - 脱アセチル化ヘパロサン内の N - 非置換グルコサミンによるスルホヒスチジン中間体の求核攻撃を含む、2 工程のプロセスを有することができると考えられる。いずれの機構によっても、改変型グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ酵素は、実施例に後述するように、アリール硫酸化合物から多糖へのスルホ転移を達成する。

【 0 1 8 1 】

他の態様において、改変型グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ酵素は、上述のように、図 3 の多重配列アラインメントに示すように、E C 2 . 8 . 2 . 8 内の天然酵素の N - スルホトランスフェラーゼドメインに見られる上述の保存アミノ酸配列モチーフと比較して 1 つ以上の変異アミノ酸配列モチーフを有することができる。他の態様において、改変型グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ酵素のアミノ酸配列に存在する各変異アミノ酸配列モチーフは、E C 2 . 8 . 2 . 8 内の天然酵素の N - スルホトランスフェラーゼドメイン内の対応する保存アミノ酸配列モチーフと比較して、少なくとも 1 つのアミノ酸変異を有する。他の態様において、改変型グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ酵素は、1 つの変異アミノ酸配列モチーフを有する。他の態様において、改変型グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ酵素は、2 つの変異アミノ酸配列モチーフ 30
を有する。他の態様において、改変型グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ酵素は、3 つの変異アミノ酸配列モチーフを有する。他の態様において、改変型グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ酵素は、4 つの変異アミノ酸配列モチーフを有する。他の態様において、改変型グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ酵素は、5 つの変異アミノ酸配列モチーフを有する。他の態様において、E C 2 . 8 . 2 . 8 内の天然グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ酵素のいずれかの N - スルホトランスフェラーゼドメインと比較して少なくとも 1 つの変異アミノ酸配列モチーフを有する、改変型グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ酵素は、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 33、配列番号 34、配列番号 35、配列番号 36、配列番号 37、配列番号 38、配列番号 39、及び配列番号 40 か 40
らなる群から選択されるアミノ酸配列を有することができる。

【 0 1 8 2 】

他の態様において、三次元分子視覚化システム（非限定的な例として、オープンソースソフトウェアである P y M O L ）においてヒト N - デアセチラーゼ / N - スルホトランスフェラーゼ酵素（P D B コード：1 N S T ）の N - スルホトランスフェラーゼドメインの結晶構造を見ると、ヒト N - スルホトランスフェラーゼドメインと比較して 1 つ以上の変異アミノ酸配列モチーフを含有する改変型グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ酵素の配列などの関連配列の構造を、図 5 ~ 図 8 に示す比較のためにモデル化することができる。非限定的な一例では、図 5 は、配列番号 10 のアミノ酸配列を有する改変型グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ酵素が重ねられた、ヒト N - スルホトランスフ 50

ェラーゼドメインの活性部位の拡大図を示す。ここで、改変型酵素の構造は、ヒト N - スルホトランスフェラーゼドメインアミノ酸配列と比較して変異を作製した際に計算される。3' - ホスホアデノシン 5' - ホスホ硫酸がスルホ供与体であり、ヒト N - スルホトランスフェラーゼドメインと共結晶化したスルホ転移反応の生成物である、アデノシン 3' , 5' - ニリン酸もまた、活性部位内に示されている。P N S はまた、そのような解が可能である場合、多糖結合部位（図示せず）に隣接する酵素活性部位内のリガンドの最適化された位置及び配向を計算するように設計された分子動力学（M D）シミュレーションの共通解を使用して、改変型酵素活性部位にモデル化される。

【0183】

図 5 に示すように、図 3 に示すヒト N - スルホトランスフェラーゼドメイン（U n i P r o t K B 寄託番号 P 5 2 8 4 8）の配列と比較して、配列番号 10 内にいくつかの変異があるが、それぞれのタンパク質骨格は、互いにほぼ同一の位置にあり、活性部位の一対一比較を可能にする。配列番号 10 の配列を有する改変型酵素の構造内において、M D シミュレーションからの共通解は、P N S 内の硫酸部分は、同様に E C 2 . 8 . 2 . 8 内で普遍的に保存されている天然アミノ酸残基トレオニンと比較して変異しているヒスチジン残基 H i s - 4 5 に隣接して結合するのに有利であることを示す。一方、ヒト N - スルホトランスフェラーゼドメイン内では、アデノシン 3' , 5' - ニリン酸は、上記の保存された H i s - 1 4 3 の近くに位置する。3' - ホスホアデノシン 5' - ホスホ硫酸基質内に含まれるであろうスルホ基は示されていないが、3' - ホスホアデノシン 5' - ホスホ硫酸が存在する場合、硫酸基は H i s - 1 4 3 にすぐ隣の位置に配向し、P N S 内の硫酸基と部分的に重複するであろうことが当業者には理解されよう。特定の理論に制限されるものではないが、硫酸基のほぼ重複する位置は、多糖内のグルコサミニル残基からプロトンを除くために H i s - 1 4 3 を塩基として使用することによって、スルホ基転移を促進する改変型酵素の能力を説明すると考えられる。

【0184】

しかしながら、硫酸基が活性部位内のほぼ同一の位置で結合することができるとしても、多糖へのスルホ基転移を促進するために、アリール硫酸化合物を E C 2 . 8 . 2 . 8 酵素と共に利用することはできない。上記のように、天然酵素の活性部位内のアミノ酸残基は、3' - ホスホアデノシン 5' - ホスホ硫酸に対して強い結合親和性を有するように進化しており、結合及び続く反応性を駆動するのに十分なアリール硫酸化合物に対する親和性を有していない可能性がある。したがって、活性部位内のアリール硫酸化合物の結合を進めるために、改変型酵素内に他の変異が存在しなければならない。図 6 は、T r p - 1 0 6、H i s - 6 9、及び H i s - 4 0 を含む、配列番号 10 のアミノ酸配列を有する改変型酵素内の P N S を取り囲む、他の変異を示す図である。T r p - 1 0 6 及び H i s - 6 9 は、P N S 内の芳香族部分との π - π スタッキング結合接点を提供するように配置される。さらに、H i s - 6 9 及び H i s - 4 0 内の ϵ 2 窒素原子は、スルフリル基と直接配位する。天然の酵素配列から保持されたリジン残基である、L y s - 4 1（明確化のため図示せず）及び L y s - 1 0 3 は、遷移状態を安定化するために転移中に硫酸基と配位する位置にある。注目すべきことに、天然アミノ酸残基である L y s - 2 6 0 は、3' - ホスホアデノシン 5' - ホスホ硫酸中の硫酸基とも配位しており、改変型酵素配列内のバリ ン残基に変異している。特定の理論に制限されるものではないが、P N S との反応に必要な H i s - 4 5 は、位置 2 6 0 のリジン残基との電荷反発を呈し、バリ ン残基への変異は、電荷反発を排除しながら結合部位内にいくらかの立体容積を保持するものと考えられる。それにもかかわらず、L y s - 1 0 3 は、図 6 に示すように、特にスルフリル基が H i s - 4 5 と会合又は結合している場合、スルフリル基と配位するように配置される。

【0185】

別の非限定的な例では、図 7 は、配列番号 2 のアミノ酸配列を有する異なる改変型グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ酵素がオーバーレイされた、ヒト N - スルホトランスフェラーゼドメイン（U n i P r o t K B 寄託番号 P 5 2 8 4 8）の活性部位の拡大図を示す。上記のように、P N S を、改変型酵素活性部位にモデル化する。配列番号 1

0の改変型酵素と同様に、配列番号2の改変型酵素のタンパク質骨格もまた、ヒト酵素のN-スルホトランスフェラーゼドメインとほぼ同一の構造を有する。しかしながら、MDシミュレーションからの共通解は、PNS内の硫酸部分が、いくつかのEC2.8.2.8酵素のN-スルホトランスフェラーゼドメインの活性部位に保存されている天然ロイシン残基から変異している、異なるヒスチジン変異(His-49)に隣接して結合することが好ましいことを示している。結果として、PNSとの結合接点を形成した配列番号10内の変異は、配列番号2には必ずしも存在しない。図8に例示するように、そして配列番号10と同様に、PNSの芳香族部分Trp-45及びHis-67を取り囲む π - π スタッキング結合接点を形成する2つの変異が配列番号2内に存在する。PNSと配位する側鎖を有する他の変異には、Ser-69(PNSのニトロ官能基と配位)及びHis-260(硫酸部分と配位)が含まれる。配列番号10と同様に、260位の天然のリジン残基が変異しているため、天然のLys-103残基を配列番号2内で利用して、PNS内の硫酸部分と配位させる。

10

【0186】

当業者は、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号12、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、及び配列番号40によって記載されるものを含むがこれらに限定されない任意の他のアミノ酸配列の改変型グルコサミニルN-スルホトランスフェラーゼ酵素が、ヒトN-スルホトランスフェラーゼドメイン、並びに配列番号2及び配列番号10のアミノ酸配列を有する改変型グルコサミニルN-スルホトランスフェラーゼ酵素と同様の構造を呈する可能性が高いことを理解するであろう。特定の理論に制限されるものではないが、NCsはまた、改変型グルコサミニルN-スルホトランスフェラーゼ酵素のいずれかの活性部位内のPNSと同様の位置で結合すると考えられる。これは、2つのアリール硫酸化合物の構造が、硫酸基はニトロ基に対してパラではなく、むしろニトロ基に対して芳香環上のオルトに位置することを除いて、非常に類似しているからである。

20

【0187】

さらに、本発明の方法により利用することができる改変型グルコサミニルN-スルホトランスフェラーゼ酵素は、上記変異を含む変異アミノ酸配列モチーフ、並びに基質の結合、スルホ転移反応、又はタンパク質発現中の酵素の安定性を促進する他の変異を含むことができる。他の態様において、改変型グルコサミニルN-スルホトランスフェラーゼ酵素は、EC2.8.2.8内の保存されたアミノ酸配列Q-K-T-G-T-T-A-L-Y-Lから変異した、変異アミノ酸配列モチーフ X_1 -K-T-G-A-W/F-A/L-L- X_2 -Hを含むことができる。ここで、 X_1 はグルタミン、セリン、及びアラニンからなる群から選択され、 X_2 はチロシン、トレオニン、及びヒスチジンからなる群から選択される。変異アミノ酸配列モチーフ X_1 -K-T-G-A-W/F-A/L-L- X_2 -Hを含む改変型グルコサミニルN-スルホトランスフェラーゼ酵素には、配列番号2(上記)、並びに配列番号4、配列番号12、配列番号33、配列番号35、配列番号36、及び配列番号40が含まれるが、これらに限定されない。さらなる態様において、改変型グルコサミニルN-スルホトランスフェラーゼ酵素は、保存されたアミノ酸配列T-F-E-Eから変異した変異アミノ酸配列モチーフT- X_3 - X_4 -Sをさらに含むことができる。ここで、 X_3 は、ヒスチジン及びグリシンからなる群から選択されるEC2.8.2.8内の天然スルホトランスフェラーゼ酵素と比較しての変異であり、 X_4 は、グリシン、ヒスチジン、及びセリンからなる群から選択されるEC2.8.2.8内の天然スルホトランスフェラーゼ酵素と比較しての変異であり、 X_3 及び X_4 の少なくとも1つは、ヒスチジン残基である。いくつかのなおさらなる態様において、 X_1 はグルタミンであり、 X_2 はチロシンであり、 X_3 はヒスチジンであり、 X_4 はグリシンであり、改変型グルコサミニルN-スルホトランスフェラーゼ酵素は、変異アミノ酸配列モチーフC-L-G-K/R-S-H-G-Rをさらに有する。他のなおさらなる態様において、 X_1 はセリンであり、 X_2 はトレオニンであり、 X_3 はグリシンであり、 X_4 はヒスチジンであり、改変型グルコサミニルN-スルホトランスフェラーゼ酵素は、変異アミノ酸配列モチ

30

40

50

ーフ C - H - G - K / R - R - W - G - R をさらに有する。また他のなおさらなる態様において、X₁ はアラニンであり、X₂ はヒスチジンであり、X₃ はヒスチジンであり、X₄ はセリンであり、改変型グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ酵素は、変異アミノ酸配列モチーフ C - A - H - K / R - G - L - G - R をさらに有する。

【0188】

他の態様において、改変型グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ酵素は、保存されたアミノ酸配列 Q - K - T - G - T - T - A から変異した、変異アミノ酸配列モチーフ H - X₅ - T - G - X₆ - H - A を有することができる。ここで、X₅ は、リジン及びグリシンからなる群から選択され、X₆ は、グリシン及びバリンからなる群から選択される、EC2.8.2.8 内の天然スルホトランスフェラーゼ酵素と比較しての変異である。変異アミノ酸配列モチーフ H - X₅ - T - G - X₆ - H - A を有する改変型グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ酵素には、配列番号 10（上記）、並びに配列番号 6、配列番号 8、配列番号 34、配列番号 37、配列番号 38、及び配列番号 39 が含まれるが、これらに限定されない。さらなる態様において、X₅ はグリシンであり、X₆ はグリシンである。いくつかのなおさらなる態様において、改変型グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ酵素は、変異アミノ酸配列モチーフ C - G - G - K / R - H - L - G - R をさらに有する。他のなおさらなる態様において、改変型グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ酵素は、変異アミノ酸配列モチーフ F - E - H - S - G をさらに有する。

【0189】

他の態様において、変異アミノ酸配列モチーフ H - X₅ - T - G - X₆ - H - A を含む改変型グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ酵素のいくつかで、X₅ はリジン及びグリシンからなる群から選択され、X₆ はグリシン及びバリンからなる群から選択される、EC2.8.2.8 内の天然スルホトランスフェラーゼ酵素と比較しての変異である。さらなる態様において、X₅ はリジンであるように選択され、X₆ はバリンであるように選択され、改変型グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ酵素は、変異アミノ酸配列モチーフ T - G - N - H をさらに有する。

【0190】

なおに、スルホ基供与体としてのアリール硫酸化合物で活性であると実験的に決定されている、6つの改変型グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ酵素のアミノ酸配列（配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12）（以下の実施例 2 参照）を、多重配列アラインメントにおいてヒトグルコサミニル N - デアセチラーゼ / N - スルホトランスフェラーゼ酵素の N - スルホトランスフェラーゼドメインのアミノ酸配列（エントリ s p | P 5 2 8 4 8 | N D S T 1 _ H U M A N）と比較して、各酵素の間に変異間の関係があるかどうかを決定することができる。改変型酵素のアミノ酸配列内の期間は、特定の位置におけるヒト N - スルホトランスフェラーゼドメインとの同一性を示す。図 9 に示すように、配列アラインメントは、6つのスルホトランスフェラーゼ配列内のアミノ酸残基の 90% 超が同一であるが、複数のアミノ酸を選択することができるいくつかの位置があることを実証する。特定の理論に制限されるものではないが、これらの酵素は、EC2.8.2.8 を含む N - デアセチラーゼ / N - スルホトランスフェラーゼ酵素の N - スルホトランスフェラーゼドメインとして互いに同様の関係を有する。結果として、他の態様において、複数のアミノ酸を定義された位置において選択することができるアミノ酸配列を有する改変型グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ酵素を配列番号 33 及び配列番号 34 として開示する。アミノ酸の同一性が可能な残基の選択から選択できる位置は、「X_{aa}」、「X_n」、又は「位置 n」という用語で示し、n は残基位置を指す。

【0191】

他の態様において、配列番号 33 又は配列番号 34 のアミノ酸配列を有する改変型グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ酵素内で、41 位のアミノ酸残基はリジンであり、44 位のアミノ酸残基はアラニンであり、45 位のアミノ酸残基は、芳香族アミノ酸

残基、好ましくはチロシン又はフェニルアラニンであり、49位のアミノ酸残基はヒスチジンである。他の態様において、改変型グルコサミニルN-スルホトランスフェラーゼ酵素が41~49位の上記残基を有する場合、67位のアミノ酸残基はグリシン又はヒスチジンであり、68位のアミノ酸残基はグリシン、ヒスチジン、及びセリンからなる群から選択され、69位のアミノ酸残基はセリンである。

【0192】

他の態様において、配列番号33又は配列番号34のアミノ酸配列を有する改変型グルコサミニルN-スルホトランスフェラーゼ酵素内で、40位のアミノ酸残基はヒスチジンであり、45位のアミノ酸残基はヒスチジンである。さらなる態様において、41位のアミノ酸残基はグリシンであり、44位のアミノ酸残基はグリシンである。他のさらなる態様において、41位のアミノ酸残基はリジンであり、44位のアミノ酸残基はバリンである。なおさらなる面において、67位のアミノ酸残基はグリシンであり、69位のアミノ酸残基はヒスチジンである。よりさらなる態様において、106位のアミノ酸残基は、トリプトファンである。なおよりさらなる態様において、260位のアミノ酸残基は、バリンである。

10

【0193】

他の態様において、配列番号33又は配列番号34のアミノ酸配列を有する改変型グルコサミニルN-スルホトランスフェラーゼ酵素内で、任意のそのような変異が酵素のグルコサミニルN-スルホトランスフェラーゼ及び/又はアリール硫酸依存性活性を排除しない限り、アミノ酸配列は、「X_n」又は「X_aa」によって特定されない残基位置に1つ以上の変異を任意に有することができる。他の態様において、「X_n」又は「X_aa」によって特定されない位置でのアリール硫酸依存性活性を排除しないそのような変異は、置換、欠失及び/又は付加を含むことができる。

20

【0194】

したがって、他の態様において、本発明の方法のいずれかに従って利用される改変型グルコサミニルN-スルホトランスフェラーゼ酵素は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、及び配列番号40からなる群から選択されるアミノ酸配列を有することができる。他の態様において、任意の上記酵素は、アリール硫酸化合物と反応することができる。さらなる態様において、アリール硫酸化合物は、PNS、MUS、7-ヒドロキシクマリン硫酸、フェニル硫酸、4-アセチルフェニル硫酸、インドキシル硫酸、1-ナフチル硫酸、2-ナフチル硫酸、及びNCSからなる群から選択される。いくつかのなおさらなる態様において、アリール硫酸化合物はPNSである。他のなおさらなる態様において、アリール硫酸化合物はNCSである。

30

【0195】

ヘキサロニル2-Oスルホトランスフェラーゼ

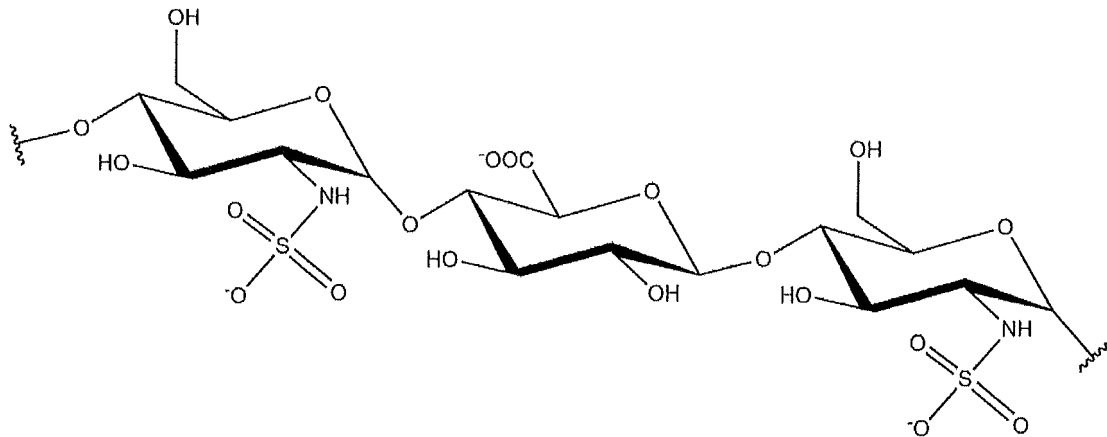
自然界では、HSヘキサロニル2-Oスルホトランスフェラーゼは、スルホ基受容体としてN-硫酸化ヘパロサン系多糖類を認識し、結合し、それと反応する。一般に、グルコサミニル残基の大部分はN-硫酸化されており、スルホ基は、ヘキサロン酸残基、一般にはグルクロン酸又はイズロン酸の2-O位に転移される。上記の野生型グルコサミニルN-スルホトランスフェラーゼと同様に、野生型HSヘキサロニル2-Oスルホトランスフェラーゼは、スルホ基供与体としての3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸と反応する際に、スルホ基を多糖に転移させる。しかしながら、野生型HSヘキサロニル2-Oスルホトランスフェラーゼは、EC2.8.2.-酵素クラスのメンバーである。野生型HSヘキサロニル2-Oスルホトランスフェラーゼ酵素によって認識されるHS多糖類は典型的には、2つの異なる構造モチーフを有する。第1の非限定的な例では、HSヘキサロニル2-Oスルホトランスフェラーゼ酵素は、下記式IVの構造を有する多糖類を認識し、結合し、それと反応することができる。

40

【0196】

50

【化 1 3】



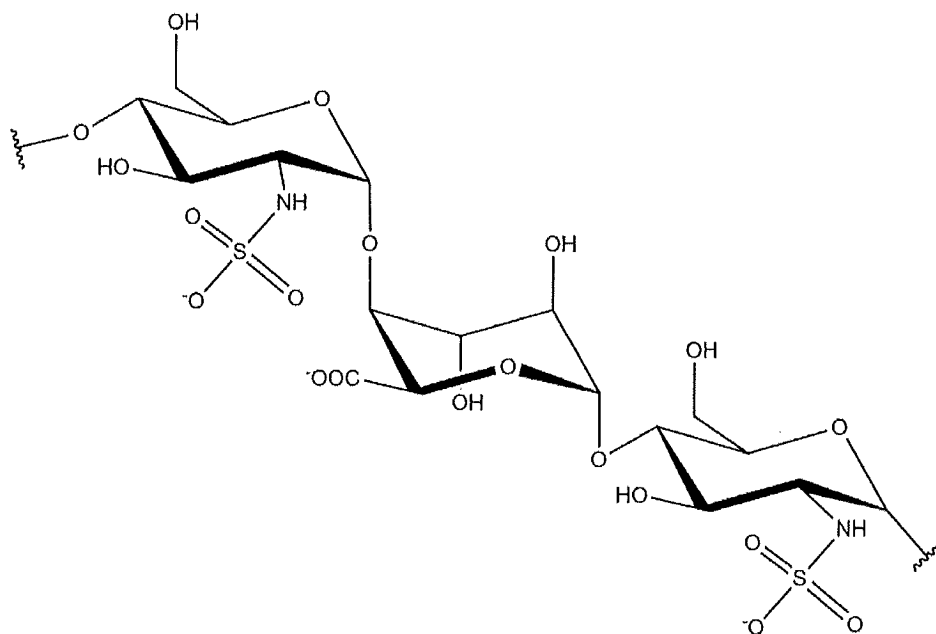
10

【 0 1 9 7】

別の非限定的な例では、H S ヘキシロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼ酵素は、下記式 V の構造を有する多糖類を認識し、結合し、それと反応することができる。

【 0 1 9 8】

【化 1 4】



20

30

【 0 1 9 9】

どちらの場合においても、ヘキシロン酸残基（式 I V 中のグルクロン酸、式 V 中のイズロン酸）は、そうでなければ 3 - O 及び 6 - O 位で置換されていない N - 硫酸化グルコサミン残基が両側に隣接している。野生型 H S ヘキシロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼ酵素、及び式 I V 又は式 V の構造を有する多糖類とのそれらの生物活性は、Rong, J., et al., (2001) Biochemistry 40 (18): 5548-5555 に記載され、この開示はその全体が参照により組み込まれる。

40

【 0 2 0 0】

上記のように、酵素と反応するヘパロサン系多糖の部分は式 I V 又は式 V の構造を有するが、多糖の他の部分は、N - 置換又は O - 置換とすることができる。同様に、ヘパロサン系多糖類は、同じ多糖内に式 I V の構造及び式 V の構造の双方を有することができ、式 I V 及び式 V の多糖の構造内のヘキシロニル残基のいずれか又は双方は、同じ酵素分子によって硫酸化することができる。典型的には、式 I V 及び / 又は式 V の構造を有する N - 硫酸化 H S 多糖類は、少なくとも 8 個の単糖残基を有する。他の態様において、本発明の

50

方法により利用することができる改変型ヘキサロニル 2 - オスルホトランスフェラーゼは、EC 2 . 8 . 2 . - 内の野生型ヘキサロニル 2 - オスルホトランスフェラーゼと同様に、ヘパロサン系多糖類、特にスルホ受容体として式 I V 及び式 V の構造を有する野生型 H S ヘキサロニル 2 - オスルホトランスフェラーゼと同じ生物活性を有する。

【 0 2 0 1 】

式 I V 又は式 V の構造を有する N - 硫酸化ヘパロサン系多糖類中のヘキサロン酸残基の同一性は、ヘキサロニル C₅ - エピメラーゼの存在によって制御することができ、これは、C₅ - 炭素の立体化学を可逆的に反転させる。しかしながら、式 I V 又は式 V の構造を有する多糖内のヘキサロニル残基がヘキサロニル 2 - オスルホトランスフェラーゼ酵素により硫酸化されると、エピマー化がもはや起きることができない。真核細胞系において、H S ヘキサロニル 2 - オスルホトランスフェラーゼと反応することができる N - 硫酸化多糖類は、ほぼ排他的に N - スルホグルコサミン及びグルクロン酸の二糖単位として合成される。結局、グルクロン酸残基は、ヘキサロニル 2 - オスルホトランスフェラーゼ酵素と反応する前に、イズロン酸残基にエピマー化されるに違いない。しかしながら、特定の理論に制限されるものではないが、野生型ヘキサロニル 2 - オスルホトランスフェラーゼ酵素は、概して、式 V の構造を有するヘパロサン系多糖類と結合して反応することが好ましく、そしてインビボで産生されるほとんどの N - , 2 - O 硫酸化 H S (N , 2 - H S) 多糖類は一般に、2 - O 硫酸化イズロン酸を有すると考えられる。

10

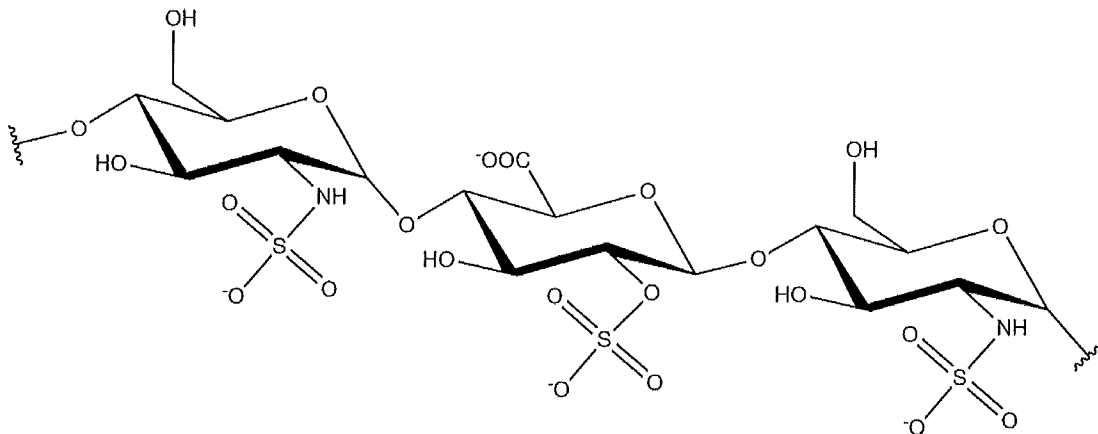
【 0 2 0 2 】

3' - ホスホアデノシン 5' - ホスホ硫酸と、式 I V の構造を有する N - 硫酸化 H S 多糖との結合に成功すると、野生型 H S ヘキサロニル 2 - オスルホトランスフェラーゼ酵素は、グルクロン酸残基の 2 - O 位へのスルホ基の転移を触媒し、下記式 V I の構造を有する N , 2 - H S 生成物を形成することができる。

20

【 0 2 0 3 】

【 化 1 5 】



30

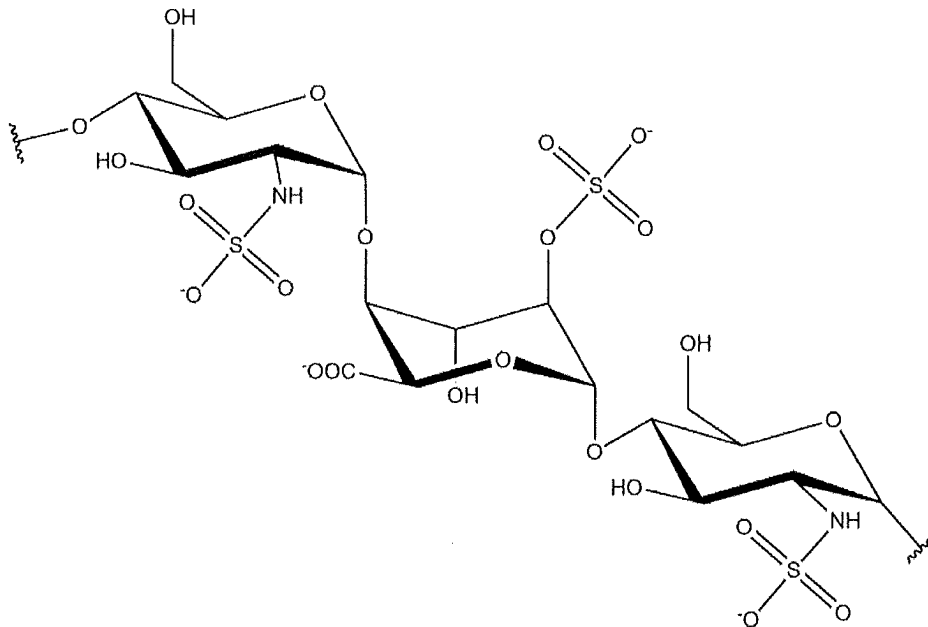
【 0 2 0 4 】

3' - ホスホアデノシン 5' - ホスホ硫酸と、式 V の構造を有する N - 硫酸化 H S 多糖との結合に成功すると、野生型 H S ヘキサロニル 2 - オスルホトランスフェラーゼ酵素は、イズロン酸残基の 2 - O 位へのスルホ基の転移を触媒し、下記式 V I I の構造を有する N , 2 - H S 生成物を形成することができる。

40

【 0 2 0 5 】

【化 1 6】



10

【0206】

他の態様において、ポリマー内のヘキシロニル残基は2つのN - スルホグルコサミン残基間に存在しなければならないが、N - 硫酸化受容体多糖内の他の場所において、グルコサミニル残基のいくつかは、スルホ基、アセチル基、又は水素に置換することができる。1つのそのような多糖の非限定的な例を図10に示す。図10において、多糖40内のヘキシロニル残基10は、それぞれ、N - 硫酸化、N - アセチル化、又は非置換のいずれかであるグルコサミニル残基20、21、及び22に隣接している。野生型又は改変型ヘキシロニル2 - Oスルホトランスフェラーゼのいずれかと多糖を反応させると、2つのN - スルホグルコサミニル残基20に隣接するヘキシロニル残基10のみが硫酸化され、最終的に、生成多糖41内に2 - O硫酸化ヘキシロニル残基110を形成することができる。

20

【0207】

別の非限定的な例において、式IV及び式Vの構造を有するスルホ受容体多糖類を図11、図12、及び図13の多糖50によって示す。触媒に必要なさらなる単糖基は明確化のために割愛する。図11、図12、及び図13では、ヘキシロニル残基10及びエピマー化ヘキシロニル残基30は、多糖50内の3つのN - スルホグルコサミニル残基20の間である。ヘキシロニル残基10及び30は椅子型配座で表されているが、より長いオリゴ糖鎖又は多糖鎖内のそのような単糖残基は、椅子型、半椅子型、ボート型、スキュー型、及びスキュー舟型配座を含むいくつかの異なる立体配座をとることができ、それらのさらなる立体配座は、明確化のために省略されていることを、当業者は理解することができる。

30

【0208】

本発明の方法により利用することができる改変型アリール硫酸依存性ヘキシロニル2 - Oスルホトランスフェラーゼ酵素のいずれかと多糖50を反応させると、酵素は、生成多糖51内に硫酸化ヘキシロニル残基110を形成するためのヘキシロニル残基10へのスルホ基転移(図11)、生成物多糖52内に硫酸化エピマー化ヘキシロニル残基130を形成するためのエピマー化ヘキシロニル残基30へのスルホ基転移(図12)、又は生成物多糖53内に硫酸化ヘキシロニル残基110及び硫酸化エピマー化ヘキシロニル残基130をそれぞれ形成するためのヘキシロニル残基10及びエピマー化ヘキシロニル残基30の両方へのスルホ基転移(図13)を触媒することができる。

40

【0209】

他の態様において、式IV及び/又は式Vの構造を有する多糖類は、均質な組成物として提供することができる。さらに他の態様において、式IV及び/又は式Vの構造を有す

50

る多糖類は、可変の鎖長、分子量、式ⅠⅤ及び／又は式Ⅴの相対存在量並びに全体的な単糖の組成及び官能化を有する多糖の多分散混合物を含む組成物内に有してなることができる。

【0210】

ある態様において、式ⅠⅤ及び／又は式Ⅴの構造を有し、本発明の方法により利用する多糖類は、市販のものから得ることができるか、及び／又は修飾することができる。他の態様において、式ⅠⅤ及び／又は式Ⅴの構造を有する多糖類は、細菌源又は真核生物源から単離し修飾した多糖類を酵素的又は化学的にN-硫酸化することによって得ることができる。さらに他の態様において、式ⅠⅤ及び／又は式Ⅴの構造を有する多糖類は、本発明の方法と組み合わせて利用される他の改変型アリール硫酸依存性スルホトランスフェラーゼのいくつかの硫酸化多糖生成物を単離及び精製することによって得ることができる。

10

【0211】

EC2.8.2.-酵素クラス内の天然HSヘキサロニル2-Oスルホトランスフェラーゼは一般に、およそ325~375個のアミノ酸残基を有し、場合によってはそれらの配列が大きく異なるが、最終的には全く同じ機能を有し、すなわち、3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸から、特に式ⅠⅤ及び／又は式Ⅴの構造を有するものであるヘパロサン系多糖類内のヘキサロニル残基の2-O位へのスルホ基の転移を触媒する。特定の理論に制限されるものではないが、EC2.8.2.-酵素クラス内の天然HSヘキサロニル2-Oスルホトランスフェラーゼの各々は、全ての種にわたって同一又は高度に保存されたかのいずれかである複数のアミノ酸配列モチーフ及び二次構造が存在するので、同じ化学反応を触媒することができると考えられる。

20

【0212】

さらに、保存されたアミノ酸配列モチーフのいくつかは、3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸及び／又は多糖のいずれかの結合に直接関与するか、又は化学反応自体に関与すると考えられる。天然HSヘキサロニル2-Oスルホトランスフェラーゼ酵素間の同一性は、活性部位内のアミノ酸残基が同定されている既知の結晶構造(ニワトリ2-Oスルホトランスフェラーゼ、PDBコード:3F5F及び4NDZ)を有する酵素のアミノ酸配列を、EC2.8.2.-酵素内の他のヘキサロニル2-Oスルホトランスフェラーゼのアミノ酸配列と比較することによって実証することができる。ニワトリ、ヒト、及び他の真核生物のHSヘキサロニル2-Oスルホトランスフェラーゼ酵素を含む12種類の酵素の多重配列アラインメントを、ニワトリHSヘキサロニル2-Oスルホトランスフェラーゼ参照配列(UniProtKB寄託番号Q76KB1)と比較してのパーセント同一性と共に、図14A~14Dに示す。図14A~14Dに例示するように、配列は、ヨコシマガラガラヘビの2-OスルホトランスフェラーゼについてはQ76KB1参照配列(エントリtr|T1DMV2|T1DMV2__CROHD)と94.9%の配列同一性を有するものから、ブラウンイヤーマダニ(brown ear tick)の2-Oスルホトランスフェラーゼについては最低で56.3%の配列同一性(エントリtr|A0A131Z2T4|A0A131Z2T4__RHIA P)までの範囲である。ヒト酵素(エントリsp|Q7LGA3|HS2ST__HUMAN)は、Q76KB1参照配列と94.1%の配列同一性を有する。当業者は、多重配列アラインメントが明確化のために12配列に限定されており、同定され、高度に保存された活性部位及び／又は結合領域も有する天然HSヘキサロニル2-Oスルホトランスフェラーゼ酵素をコードする数百のアミノ酸配列が存在することを理解するであろう。

30

40

【0213】

図14A~14Dにおいて、特定の位置で黒背景に白色で示すアミノ酸は、全ての配列にわたって100%同一である。特定の位置で、アミノ酸が同一であること、又は化学的若しくは構造的に類似していることのいずれかを意味する、高度に保存されているアミノ酸は、黒い縁取りで囲まれている。高度に保存された領域内では、配列の大部分に存在するコンセンサスアミノ酸は太字である。同一でないか又は高度に保存されていない特定の位置のアミノ酸は、典型的には可変である。配列内の期間は、高度に保存された又は同一

50

の領域の間にさらなる残基を有する他の配列（複数可）との配列アラインメントを容易にするために、配列に挿入されたギャップを示す。最後に、各配列ブロックの上には、アラインメント内のアミノ酸の同一性に基づいて、天然ニワトリHSヘキサロニル2-Oスルホトランスフェラーゼ酵素の構造を参照として使用し、全ての配列にわたり保存されている二次構造を示す一連の矢印及びコイルがある。矢印に隣接するβ記号はβシートを指し、α記号又はη記号に隣接するコイルは螺旋二次構造を指す。

【0214】

図14A～14Dの12個の整列した配列内には、上記のニワトリHSヘキサロニル2-Oスルホトランスフェラーゼ酵素の結晶構造に基づいて、活性部位を有する1つ以上のアミノ酸を有するいくつかの保存されたアミノ酸モチーフが存在する。図14A～14D内のアミノ酸残基の番号付けに基づいて、これらのモチーフは、残基12～19（R-V-P-K-T-A/G-S-T）、残基40～44（N-T-S/T-K-N）、残基71～74（Y-H-G-H）、残基108～115（F-L-R-F/H-G-D/N-F/Y）、残基121～125（R-R-K/R-Q-G）、及び残基217～222（S-H-L-R-K/R-T）を含む。特定の理論に制限されるものではないが、これらの残基は、化学反応を促進するか若しくはそれに関与するか、又は活性部位内の3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸若しくは多糖の結合を可能にするかのいずれかであると考えられる。特に、図15A～15Cに示すように、74位のヒスチジン残基は多糖内のイズロン酸残基の2-O位からプロトンを引き抜き、求核攻撃及び3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸からのスルホ基の除去を可能にする一方、15位のリジン残基は3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸のリン酸部分と配位して、N₂O-HS生成物が活性部位から放出される前に酵素の遷移状態を安定化させる。

【0215】

しかしながら、上記のように、EC2.8.2.-内の天然ヘキサロニル2-Oスルホトランスフェラーゼ酵素は、アリール硫酸化合物から多糖への硫酸基の転移を触媒することができない。グルコサミニルN-スルホトランスフェラーゼと同様に、天然スルホトランスフェラーゼの活性部位内の3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸の結合ポケットは、結合を促進するのに十分に高いアリール硫酸化合物に対する親和性を有していないか、及び/又はアリール硫酸化合物が活性部位に入るのを立体的に妨げられているかのいずれかと考えられる。その結果、及び他の態様において、EC2.8.2.-内の野生型HSヘキサロニル2-Oスルホトランスフェラーゼ酵素を、そのアミノ酸配列内のいくつかの位置で変異させて、活性部位内のアリール硫酸化合物の結合を可能にするか、及び/又は多糖類への硫酸基の転移が起こることができるようにアリール硫酸化合物を最適に配置することができる。

【0216】

したがって、他の態様において、本発明の方法に利用することができる改変型ヘキサロニル2-Oスルホトランスフェラーゼ酵素は、図14A～14Dに例示するアミノ酸配列を有する酵素を含む、EC2.8.2.-内の天然ヘキサロニル2-Oスルホトランスフェラーゼ酵素の変異体であってもよい。他の態様において、アリール硫酸依存性HSヘキサロニル2-Oスルホトランスフェラーゼは、スルホ基供与体としてのアリール硫酸化合物を認識し、それと結合し、反応するように改変されている一方、N-硫酸化ヘパロサン系多糖、特にスルホ基受容体としての式IV及び/又は式Vの構造を有するものであるヘパロサン系多糖類を認識し、それと結合し、反応する天然の酵素の能力を保持する。特定の理論に制限されるものではないが、改変型HSヘキサロニル2-Oスルホトランスフェラーゼ酵素のアミノ酸配列に挿入された変異のために、それらのスルホトランスフェラーゼ活性は、3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸がアリール硫酸化合物で置換されていることを除いて、上記図15A～図15Cに記載されていると同様の機構を用いる、アリール硫酸化合物からスルホ受容体多糖へのスルフリル基の直接転移を有することができると考えられる。そうでなければ、変異のために、スルホトランスフェラーゼ活性は、アリール硫酸化合物の加水分解及びスルホヒスチジン中間体の形成、続いてN₂-HS生

成物を形成するためのヘキサロン酸残基の 2 - O 位の酸素原子によるスルホヒスチジン中間体の求核攻撃を有する、2 工程のプロセスを有することができると考えられる。いずれの機構によっても、改変型 H S ヘキサロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼ酵素は、実施例に後述するように、アリール硫酸化合物から多糖へのスルホ転移を達成する。

【 0 2 1 7 】

他の態様において、改変型 H S ヘキサロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼ酵素は、上述のように、図 1 4 A ~ 1 4 D の多重配列アラインメントに示すように、E C 2 . 8 . 2 . - 内の天然 H S ヘキサロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼ酵素に見られる上述の保存アミノ酸配列モチーフと比較して 1 つ以上の変異アミノ酸配列モチーフを有することができる。他の態様において、改変型酵素のアミノ酸配列に存在する各変異アミノ酸配列モチーフは、天然 H S ヘキサロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼ酵素内の対応する保存アミノ酸配列モチーフと比較して、少なくとも 1 つのアミノ酸変異を有する。他の態様において、改変型ヘキサロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼ酵素は、1 つの変異アミノ酸配列モチーフを有することができる。他の態様において、改変型ヘキサロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼ酵素は、2 つの変異アミノ酸配列モチーフを有することができる。他の態様において、改変型ヘキサロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼ酵素は、3 つの変異アミノ酸配列モチーフを有することができる。他の態様において、改変型ヘキサロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼ酵素は、4 つの変異アミノ酸配列モチーフを有することができる。他の態様において、改変型ヘキサロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼ酵素は、5 つの変異アミノ酸配列モチーフを有することができる。他の態様において、改変型ヘキサロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼ酵素は、6 つの変異アミノ酸配列モチーフを有することができる。他の態様において、E C 2 . 8 . 2 . - 内の野生型 H S ヘキサロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼ酵素のいずれかと比較して少なくとも 1 つの変異アミノ酸配列モチーフを有する、改変型ヘキサロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼ酵素は、配列番号 1 4、配列番号 1 6、配列番号 4 1、及び配列番号 4 2 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有することができる。

【 0 2 1 8 】

他の態様において、三次元分子視覚化システム（非限定的な例として、オープンソースソフトウェアである P y M O L ）においてニワトリ H S ヘキサロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼ（P D B コード：3 F 5 F）の結晶構造を見ると、ニワトリスルホトランスフェラーゼ構造と比較して 1 つ以上の変異アミノ酸配列モチーフを含有する改変型ヘキサロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼ酵素の配列などの関連配列の構造を、図 1 6 に示す比較のためのモデル化をすることができる。図 1 6 は、配列番号 1 4 及び配列番号 1 6 のアミノ酸配列を有する 2 つの改変型 H S ヘキサロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼ酵素で重ね合わされた、ニワトリ H S ヘキサロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼアミノ酸配列と比較して変異を作製した際に計算される。3' - ホスホアデノシン 5' - ホスホ硫酸がスルホ供与体であり、ニワトリヘキサロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼと共結晶化したスルホ転移反応の生成物である、アデノシン 3' , 5' - ニリン酸もまた、活性部位内に示す。天然の基質、3' - ホスホアデノシン 5' - ホスホ硫酸中に存在するであろう硫酸基は、反応を開始する前の活性部位内のそのおおよその位置を示すために、5' - ホスフェート官能基上にモデル化される。N C S はまた、そのような解が可能である場合、多糖結合部位（図示せず）に隣接する酵素活性部位内のリガンドの最適化された位置及び配向を計算するように設計された分子動力学（M D）シミュレーションの共通解を使用して、改変型酵素の活性部位にモデル化される。水素原子は示されていない。

【 0 2 1 9 】

図 1 6 に示すように、ニワトリ H S ヘキサロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼに関して、配列番号 1 4 及び配列番号 1 6 と比較して行われたいくつかの変異があるが、それぞれのタンパク質骨格は互いにほぼ同一の位置にあり、活性部位の対一比較を可能にす

る。2つの活性部位を比較すると、3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸はバックグラウンドに位置し、リジン残基に隣接している(図14A~14DのQ76KB1配列の15位)一方、上記のMDシミュレーションからの収束解は、改変型酵素内のNCS結合が活性部位の反対側で有利であることを示している。しかしながら、NCSの結合は、天然酵素において、リジン残基及び近傍の α ヘリックス上に位置するフェニルアラニン残基(図14A~14DのQ76KB1配列の108位)によって、部分的に立体障害されるであろう。特定の理論に制限されるものではないが、配列番号14のアミノ酸配列を有する改変型酵素の活性部位におけるNCSの結合は、リジン残基のヒスチジン残基への変異によって促進され、これにより活性部位内にさらなる空間が形成され、NCS内の芳香環に π - π スタッキングパートナーが提供されるものと考えられる。また、特定の理論に制限されるものではないが、配列番号16のアミノ酸配列を有する改変型酵素の活性部位におけるNCSの結合は、ヒスチジン残基へのプロリン残基(図14A~14DのQ76KB1配列の14位)の隣接変異と協調した、アルギニン残基へのリジンの変異によって促進されるものと考えられる。アルギニン側鎖の立体配座自由度数の増加は、転移反応中に遷移状態を安定化するための極性接触を提供する位置に依然としてありながら、NCSの進入を容易にする一方、隣接するヒスチジンはNCSのための他の結合接点を提供する。

10

【0220】

注目すべき別の変異には、アルギニン残基(図14A~14DのQ76KB1配列の220位)からヒスチジン残基への変異、配列番号14及び配列番号16の両方において221位で見られる変異が含まれる。特定の理論に制限されるものではないが、変異ヒスチジン残基は、NCSからの硫酸基の除去を容易にするための好ましい位置にある。ニワトリHSヘキサロニル2-Oスルホトランスフェラーゼ酵素からの他の図示された変異、特に配列番号16に存在する変異(His-20、Ser-114、Lys-116、Met-122)は、NCS(His-20)内の硫酸部分と接触する直接結合接点を提供することによって、他の変異残基(His-221と配位するSer-114)と配位することによって、又はNCS(Met-122)付近の疎水性環境を増加させることによってのいずれかで、活性部位内のNCSの結合を同様に促進することができる。

20

【0221】

当業者は、配列番号41及び配列番号42によって開示するものを含むが、これらに限定されない、任意の他のアミノ酸配列の改変型HSヘキサロニル2-Oスルホトランスフェラーゼ酵素は、ニワトリHSヘキサロニル2-Oスルホトランスフェラーゼ、並びに配列番号14及び配列番号16のアミノ酸配列を有する改変型HSヘキサロニル2-Oスルホトランスフェラーゼと同様の構造を示す可能性が高いことを理解するであろう。特定の理論に制限されるものではないが、PNSは、改変型HSヘキサロニル2-Oスルホトランスフェラーゼ酵素のいずれかの活性部位内のNCSと同様の位置で結合すると考えられる。これは、2つのアリール硫酸化合物の構造が、硫酸基はPNSのニトロ基に対してパラではなく、むしろNCSのニトロ基に対して芳香環上のオルトに位置することを除いて、非常に類似しているからである。

30

【0222】

したがって、他の態様において、本発明の方法のいずれかにより利用される改変型ヘキサロニル2-Oスルホトランスフェラーゼ酵素は、配列番号14、配列番号16、配列番号41、又は配列番号42からなる群から選択されるアミノ酸配列を有することができる。他の態様において、上記ヘキサロニル2-Oスルホトランスフェラーゼ酵素は、スルホ基供与体として、3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸の代わりに、アリール硫酸化合物と反応する。さらなる態様において、アリール硫酸化合物は、PNS、MUS、7-ヒドロキシクマリン硫酸、フェニル硫酸、4-アセチルフェニル硫酸、インドキシル硫酸、1-ナフチル硫酸、2-ナフチル硫酸、及びNCSからなる群から選択される。いくつかのなおさらなる態様において、アリール硫酸化合物はPNSである。他のなおさらなる態様において、アリール硫酸化合物はNCSである。

40

【0223】

50

他の態様において、任意の天然又は改変型 H S ヘキシロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼ酵素、特に配列番号 14、配列番号 16、配列番号 41、又は配列番号 42 のアミノ酸配列を有する改変型ヘキシロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼ酵素を有する反応混合物内で、反応混合物は、N, 2 - H S 生成物の形成を触媒するヘキシロニル C₅ - エピメラーゼをさらに有することができる。ある態様において、N, 2 - H S 生成物は、式 V I の構造を有することができる。他の態様において、N, 2 - H S 生成物は、式 V I I の構造を有することができる。他の態様において、ヘキシロニル C₅ - エピメラーゼは、配列番号 29 のアミノ酸配列を有することができる。他の態様において、ヘキシロニル C₅ - エピメラーゼは、配列番号 29 の残基 34 ~ 617 を有することができる。

【0224】

10

グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ

自然界では、H S グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼは、スルホ基受容体としてヘパロサン系多糖類を認識し、結合し、反応する。一般に、グルコサミニル残基の大多数は N - 硫酸化されるが、酵素は、N - アセチル化したグルコサミニル残基の 6 - O 位ヘスルホ基をいまだ転位することができる。さらに、隣接するいずれかのヘキシロン酸残基は、グルクロン酸又はイズロン酸のいずれかとすることができ、場合により、2 - O 硫酸化することができる。一般に、6 - O スルホ基を受けるグルコサミン残基の非還元末端のヘキシロン酸は、2 - O 硫酸化イズロン酸であり、多くの場合、グルコサミン残基自体もまた N - 硫酸化されている。グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ及び H S ヘキシロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼと同様に、天然に生じる H S グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素は、スルホ基供与体としての 3' - ホスホアデノシン 5' - ホスホ硫酸と反応すると、スルホ基を多糖に転移させる。野生型 H S ヘキシロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼと同様に、野生型 H S グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素もまた、E C 2.8.2. - 酵素クラスのメンバーである。非限定的な例では、E C 2.8.2. - 内のグルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素は、下記式 V I I I (式中、6 - O スルホ基を受容するグルコサミン残基は、N - 硫酸化されており、その非還元末端で 2 - O 硫酸化イズロン酸残基に隣接しており、X は式 V I I I に示すヘキシロニル残基のいずれかを有する) の構造を有するヘパロサン系多糖類を認識し、結合し、反応させることができる。式 V I I I の構造を有する多糖類と生物活性を有する E C 2.8.2. - 内のグルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素は、Xu, Y., et al., (2017) ACS Chem. Biol. 12 (1): 73-82 及び Holmborn, K., et al., (2004) J. Biol. Chem. 279, (41): 42355-42358 によって記載され、これらの開示はその全体が参照により組み込まれる。

20

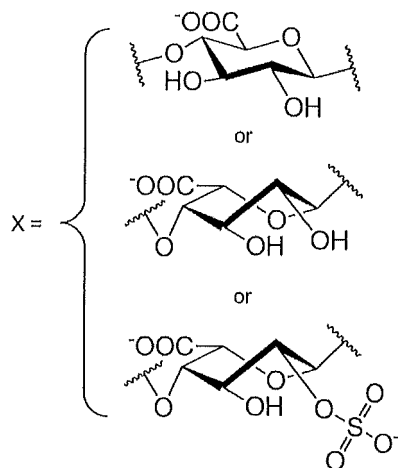
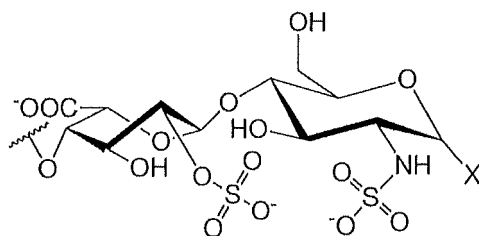
30

【0225】

40

50

【化 1 7】



10

20

【0 2 2 6】

上記のように、H S グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素と反応するヘパロサン系多糖の部分は式 V I I I 構造を有することができるが、多糖の他の部分は、N - 置換又は O - 置換されていてもよく、酵素と反応することもできる他の構造モチーフを有してもよい。上記の他の酵素と同様に、H S 型グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素は、同じ多糖分子内の位置にスルホ基を転移させることができ、同じ多糖分子内の複数の位置は、同じ酵素分子によって 6 - O 硫酸化することができる。典型的には、式 V I I I の構造を有するものを含む、H S グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素と反応することができるヘパロサン系多糖類は、少なくとも 3 つの単糖残基を有することができる。

30

【0 2 2 7】

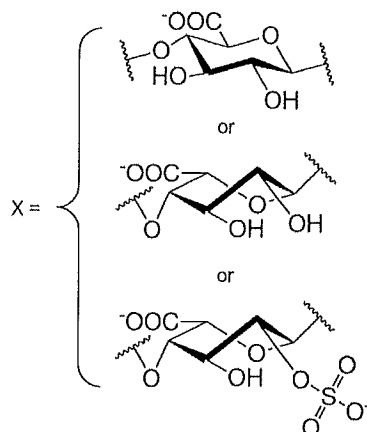
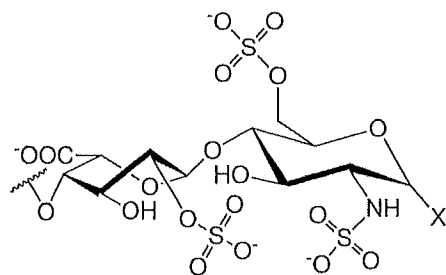
3' - ホスホアデノシン 5' - ホスホ硫酸と、式 V I I I の構造を有するヘパロサン系多糖との結合に成功すると、野生型グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素は、グルコサミン残基の 6 - O 位へのスルホ基の転移を触媒して、下記式 I X (式中、X は、式 I X に示すヘキシロニル残基のいずれかを有する) の構造を有する N, 2, 6 - H S 生成物を形成することができる。

【0 2 2 8】

40

50

【化 1 8】



10

20

【0229】

H S グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素と反応することができる 1 つのそのような多糖スルホ基受容体の非限定的な例を図 17 に示す。図 17 は、アセチル基 211 又は硫酸基 212 のいずれかで N - 置換することができる 3 つの N - 置換グルコサミン残基 210 を含む、多糖 240 を示す。多糖 240 内で、スルホ受容体として作用することができる N - 置換グルコサミン残基 210 は、2 つのヘキシロニル残基に隣接している。ヘキシロニル残基は、式 V I I I の官能基「X」によって表される任意の残基、特にグルクロニル残基 220 及びイズロニル (iduronyl) 残基 230 を含むことができる。グルクロニル残基 220 又はイズロニル残基 230 のいずれかは、2 - O 位で硫酸基 231 によってさらに置換することができる。多糖 240 を H S グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素及びスルホ基供与体と反応させると、グルコサミン残基 210 のいずれかの 6 - O 位 213 を硫酸化し、最終的に生成多糖 241 内に 6 - O 硫酸化グルコサミン残基 310 を形成することができる。他の態様において、H S グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素は、改変型アリール硫酸依存性酵素とすることができ、スルホ基供与体はアリール硫酸化合物である。

30

【0230】

他の態様において、本発明の方法により利用することができる改変型 H S グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼは、野生型 H S グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼと同じ、ヘパロサン系スルホ受容体多糖、特に式 V I I I の構造を含むヘパロサン系多糖との生物学的活性を有することができる。他の態様において、スルホ受容体多糖内に式 V I I I の構造を有する多糖の複数の部分が存在する場合、任意のグルコサミン残基が、改変型グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素によって硫酸化することができる。同様に、同じ多糖が、多糖内に存在するあらゆるグルコサミン残基まで、改変型グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼによって複数回硫酸化することができる。

40

【0231】

他の態様において、式 V I I I の構造を挙げることができるがそれに限定されない、改変型又は野生型 H S グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼと反応することがで

50

きるスルホ受容体多糖類は、均質な組成物として提供することができる。さらに他の態様において、改変型又は野生型 H S グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼと反応することができるスルホ受容体多糖は、可変の鎖長、分子量、式 V I I I の相対存在量並びに全体的な単糖の組成及び官能化を有する多糖の多分散混合物を有する組成物内に有することができる。

【 0 2 3 2 】

他の態様において、改変型又は野生型 H S グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素とともに本発明の方法により利用される、式 V I I I の構造を含むものを挙げることができるがこれに限定されない、N , 2 - H S 多糖類は、商業的供給源から得ることができるか、及び / 又は修飾することができる。他の態様において、本発明の方法により利用することができる改変型又は野生型 H S グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼのいずれかは、1 つ以上の前の工程でグルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼによって生成された N - 硫酸化ヘパロサン生成物と反応することができる。他の態様において、本発明の方法により利用することができる改変型又は野生型 H S グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼのいずれかは、1 つ以上の前の工程でグルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ及び / 又はヘキサロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼによって生成された N , 2 - H S 生成物と反応することができる。他の態様において、改変型アリアル硫酸依存性スルホトランスフェラーゼによって、N , 2 - H S 生成物を生成するための硫酸化工程のうちの 1 つ以上を触媒した。これらのプロセスの各々は、以下の説明及び実施例で詳述する。

【 0 2 3 3 】

E C 2 . 8 . 2 . - 酵素クラス内の天然 H S グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素は一般に、それらの配列においていくつかの場合に大きく変動し得る 3 0 0 ~ 7 0 0 個のアミノ酸残基を有するが、最終的には全く同じ機能、すなわち、3' - ホスホアデノシン 5' - ホスホ硫酸から、ヘパロサン系多糖類、特に式 V I I I の構造を有する多糖類内のグルコサミン残基の 6 - O 位へのスルフリル基の転移を触媒する機能を有する。特定の理論に制限されるものではないが、E C 2 . 8 . 2 . - 酵素クラス内の天然 H S グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼの各々は、全ての種にわたって同一又は高度のいずれかで保存されている複数のアミノ酸配列モチーフ及び二次構造があるため、同じ化学反応を触媒することができると考えられる。

【 0 2 3 4 】

さらに、保存されたアミノ酸配列モチーフのいくつかは、3' - ホスホアデノシン 5' - ホスホ硫酸及び / 又は多糖のいずれかの結合に直接関与するか、又は化学反応自体に関与すると考えられる。天然 H S グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素間の同一性は、活性部位内のアミノ酸残基が同定されている既知の結晶構造（ゼブラフィッシュグルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼアイソフォーム 3 - B、P D B コード：5 T 0 3、5 T 0 5、及び 5 T 0 A）を有する酵素のアミノ酸配列を、E C 2 . 8 . 2 . - 酵素クラス内の他の天然 H S グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼのアミノ酸配列と比較することによって実証することができる。15 個の酵素の多重配列アラインメントを、マウス H S グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ（アイソフォーム 1）参照配列（UniProtKB 寄託番号 Q 9 Q Y K 5）と比較しての各配列のパーセント同一性と共に、図 1 8 A ~ 1 8 C に示す。図 1 8 A ~ 1 8 C に示すように、配列は、Q 9 Q Y K 5 参照配列（エントリ O 6 0 2 4 3 | H 6 S T 1 _ H U M A N）との 9 7 . 3 % の同一性から、最低で 5 3 . 7 % の同一性（エントリ A 0 A 3 P 8 W 3 M 9 | A 0 A 3 P 8 W 3 M 9 _ C Y S N E）までの範囲である。比較のために、ゼブラフィッシュ H S グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼアイソフォーム 3 - B 酵素（エントリ A 0 M G Z 7 | H 6 S 3 B _ D A N R E）は、Q 9 Q Y K 5 参照配列と 6 0 . 4 % の配列同一性を有する。当業者は、多重配列アラインメントは明確化のために 15 配列に限定されており、同定され、高度に保存された活性部位及び / 又は結合領域も有する天然 H S グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素をコードする数百のアミノ酸配列が存在す

ることを理解するであろう。

【0235】

図18A～18Cにおいて、特定の位置で黒背景に白色で示すアミノ酸は、全ての配列にわたって100%同一である。特定の位置で、アミノ酸が同一であること、又は化学的若しくは構造的に類似していることのいずれかを意味する、高度に保存されているアミノ酸は、黒い縁取りで囲まれている。高度に保存された領域内では、配列の大部分に存在するコンセンサスアミノ酸は太字である。同一でないか又は高度に保存されていない特定の位置のアミノ酸は、典型的には可変である。配列内の期間は、高度に保存された又は同一の領域の間にさらなる残基を有する他の配列（複数可）との配列アラインメントを容易にするために、配列に挿入されたギャップを示す。最後に、各配列ブロックの上には、アラインメント内のアミノ酸の同一性に基づいて、天然マウスHSグルコサミニル6-Oスルホトランスフェラーゼ酵素の構造を参照として使用して、全ての配列にわたり保存されている二次構造を示す一連の矢印及びコイルがある。矢印に隣接するβ記号はβシートを指し、α記号に隣接するコイルは螺旋二次構造を指す。図18A～18Cに示す15個の整列された配列の各々は、本発明の改変型酵素、特に配列番号18、配列番号20、及び配列番号22と一致するように、それらの天然の全長配列に対して切断されている。特に、図18A～18Cに示す残基は、マウスHSグルコサミニル6-OスルホトランスフェラーゼのQ9QYK5参照配列の残基67～377と整列されている。

10

【0236】

図18A～18Cの15個の整列した配列内には、上記のゼブラフィッシュグルコサミニル6-Oスルホトランスフェラーゼ酵素（エントリA0MGZ7 | H6S3B__DANRE）の結晶構造に基づいて、活性部位を有する1つ以上のアミノ酸を含む、いくつかの保存されたアミノ酸配列モチーフが存在する。図18A～18C内のアミノ酸残基の番号付けに基づいて、これらの保存されたアミノ酸配列モチーフは、アミノ酸残基29～34（Q-K-T-G-G-T）；81～86（C-G-L-H-A-D）；127～139（S-E-W-R/K-H-V-Q-R-G-A-T-W-K）；178～184（N-L-A-N-N-R-Q）；及び227～231（L-T-E-F/Y-Q）を含む。特に、図19A～19Cの反応機構に示すように、C-G-L-H-A-D保存アミノ酸配列モチーフ内のヒスチジン残基は、N-スルホグルコサミン残基の6'-ヒドロキシル基から水素原子を引き抜く位置にあり、負に荷電した酸素原子が次いで3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸の求核攻撃を開始し、硫酸基を除去することを可能にする。さらに、Q-K-T-G-G-T保存アミノ酸配列モチーフ内の普遍的に保存されたリジン残基は、3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸中の5'-リン酸と配位するが、131位及び138位の普遍的に保存されたヒスチジン残基及びトリプトファン残基は、N-スルホグルコサミン残基と配位する（上記のXu, Y., et al.を参照のこと）。

20

30

【0237】

しかしながら、上記のように、EC2.8.2.-内の天然グルコサミニル6-Oスルホトランスフェラーゼ酵素は、アリール硫酸化合物から多糖への硫酸基の転移を触媒することができない。特定の理論に制限されるものではないが、上記のグルコサミニルN-スルホトランスフェラーゼ及びヘキサロニル2-Oスルホトランスフェラーゼと同様に、天然グルコサミニル6-Oスルホトランスフェラーゼの活性部位内の3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸の結合ポケットは、結合を促進するのに十分に高いアリール硫酸化合物に対する親和性を有していないか、及び/又はアリール硫酸化合物が活性部位に入るのを立体的に妨げられているかのいずれかと考えられる。その結果、及び他の態様において、EC2.8.2.-内の野生型グルコサミニル6-Oスルホトランスフェラーゼ酵素を、そのアミノ酸配列内のいくつかの位置で変異させて、活性部位内のアリール硫酸化合物の結合を可能にするか、及び/又は多糖への硫酸基の転移が起こることができるようにアリール硫酸化合物を最適に配置することができる。

40

【0238】

したがって、他の態様において、本発明の方法に利用することができる改変型グルコサ

50

ミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素は、図 18 A ~ 18 C に例示するアミノ酸配列を有する酵素を含む、EC 2 . 8 . 2 . - 内の天然グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素の変異体であってもよい。他の態様において、改変型グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素は、スルホ基供与体としてのアリール硫酸化合物を認識し、それと結合し、反応するように改変され、スルホ基受容体としての式 V I I I の構造を有するものを含むがこれに限定されない、上述の H S 多糖類のいずれかを認識し、それと結合し、反応する天然の酵素の能力を保持する。特定の理論に制限されるものではないが、改変型グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素のアミノ酸配列に挿入された変異のために、それらのスルホトランスフェラーゼ活性は、3' - ホスホアデノシン 5' - ホスホ硫酸がアリール硫酸化合物で置換されていることを除いて、上記の図 19 A ~ 19 C に記載されていると同様の機構を用いる、アリール硫酸化合物からスルホ受容体多糖へのスルフリル基の直接転移を有することができると考えられる。そうでなければ、変異のために、スルホトランスフェラーゼ活性は、アリール硫酸化合物の加水分解及びスルホヒスチジン中間体の形成、続いて 6 - O 硫酸化 H S 生成物を形成するためのグルコサミン残基の 6 - O 位の酸素原子によるスルホヒスチジン中間体の求核攻撃を含む、2 工程のプロセスを有することができると考えられる。他の態様において、スルホ転移機構のいずれかの 6 - O 硫酸化 H S 生成物は、N , 2 , 6 - H S 生成物である。

10

【 0 2 3 9 】

他の態様において、改変型グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素は、上述のように、図 18 A ~ 18 C の多重配列アラインメントに示すように、EC 2 . 8 . 2 . - 内の天然グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素に見られる保存アミノ酸配列モチーフと比較して 1 つ以上の変異アミノ酸配列モチーフを有することができる。他の態様において、改変型酵素のアミノ酸配列に存在する各変異アミノ酸配列モチーフは、天然グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素内の対応する保存アミノ酸配列モチーフと比較して、少なくとも 1 つのアミノ酸変異を有する。他の態様において、改変型グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素は、1 つの変異アミノ酸配列モチーフを有することができる。他の態様において、改変型グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素は、2 つの変異アミノ酸配列モチーフを有することができる。他の態様において、改変型グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素は、3 つの変異アミノ酸配列モチーフを有することができる。他の態様において、改変型グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素は、4 つの変異アミノ酸配列モチーフを有することができる。他の態様において、改変型グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素は、5 つの変異アミノ酸配列モチーフを有することができる。他の態様において、EC 2 . 8 . 2 . - 内の野生型 H S グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素のいずれかと比較して少なくとも 1 つの変異アミノ酸配列モチーフを含む、改変型グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素は、配列番号 18、配列番号 20、配列番号 22、配列番号 43、配列番号 44、配列番号 45、配列番号 46、配列番号 47、配列番号 48、配列番号 49、配列番号 50、配列番号 59、配列番号 60、及び配列番号 61 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有することができる。

20

30

【 0 2 4 0 】

他の態様において、三次元分子視覚化システム（非限定的な例として、オープンソースソフトウェアである P y M O L ）においてゼブラフィッシュグルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ（UniProtKB 寄託番号 A 0 M G Z 7 ）の結晶構造のいずれかを見ると、ゼブラフィッシュグルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ構造のいずれかと比較して 1 つ以上の変異アミノ酸配列モチーフを含有する改変型グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素の配列などの関連配列の構造を、図 20 に示す比較のためにモデル化することができる。図 20 は、配列番号 228 のアミノ酸配列を有する本発明の改変型酵素の 1 つを有するゼブラフィッシュグルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素（PDB コード：5 T 0 3 ）の活性部位の拡大図を示し、ここで、改変型グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素の構造は、ゼブラフィッシュグルコ

40

50

サミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼアミノ酸配列と比較して変異を生成した際に計算される。3' - ホスホアデノシン 5' - ホスホ硫酸がスルホ供与体であり、ゼブラフィッシュグルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼと共結晶化したスルホ転移反応の生成物である、アデノシン 3' , 5' - ニリン酸もまた、活性部位内に示されている。PNS はまた、そのような解が可能である場合、多糖結合部位（図示せず）に隣接する酵素活性部位内のリガンドの最適化された位置及び配向を計算するように設計された分子動力学（MD）シミュレーションの共通解を使用して、改変型酵素の活性部位にモデル化される。水素原子は、明確化のために示されていない。

【0241】

図 20 に示すように、ゼブラフィッシュグルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素に関して、配列番号 22 を作製したいくつかの変異があるが、それぞれのタンパク質骨格は互いにほぼ同一の位置にあり、活性部位の対一比較を可能にする。しかしながら、2 つの活性部位を比較すると、上記の MD シミュレーションからの収束解によって決定されるように、アデノシン 3' , 5' - ニリン酸生成物は、PNS 分子としての中心 α ヘリックスの反対側に位置する。特定の理論に制限されるものではないが、収束 MD シミュレーション解は、ゼブラフィッシュ酵素内の 3' - ホスホアデノシン 5' - ホスホ硫酸と同じ又は類似の位置の PNS に対する親和性が充分ではないため、 α ヘリックスの反対側に PNS を配置すると考えられる。上記 Xu, Y., et al. に記載されるように、全長アミノ酸配列の 158 位の保存されたヒスチジンは、N - スルホグルコサミンの 6' ヒドロキシル基からプロトンを引き抜く触媒ヒスチジンであり、これはその後、3' - ホスホアデノシン 5' - ホスホ硫酸と反応してスルホ基転移を開始することができる。しかし、3' - ホスホアデノシン 5' - ホスホ硫酸及び PNS の結合ポケットの明らかな違いにもかかわらず、配列番号 18、配列番号 20、及び配列番号 22 のアミノ酸配列を有する改変型グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素は全て、実施例で後述するように、アリール硫酸化合物からヘパロサン系多糖内のグルコサミニル 6 - O 位へのスルホ転移を達成した。

【0242】

結果として、特定の理論に制限されるものではないが、改変型グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素の活性部位内に存在する 1 つ以上の変異は、スルホ受容体 HS 多糖類に転移することができる位置で、アリール硫酸化合物の硫酸部分の結合を補助し得る。図 20 に示すように、改変型酵素は配列番号 22 のアミノ酸配列を有し、アリール硫酸化合物は PNS である。しかしながら、ヘパロサン系多糖は図示していない。非限定的な例では、配列番号 22 の 31 位に操作されたヒスチジン残基は、上記 Malojcic, et al に記載された機構と同様のピンポン機構を使用して、PNS からの硫酸基の除去を容易にする位置にあり得る。さらに、配列番号 22 の 133 位に操作されたヒスチジン残基は、配列番号 22 の 132 位の保存されたヒスチジン（図 18A ~ 18C の各配列の 131 ~ 132 位に対応する）と共に硫酸部分とさらに配位し得る。配列番号 22 の 137 位 ~ 139 位での G - A - N への変異（図 18A ~ 18C の配列の 136 位 ~ 138 位での保存された A - T - W モチーフに対応）は、配列番号 22 の 31 位で操作されたヒスチジンによって硫酸が引き抜かれ得る位置での PNS の結合を妨げ得る立体容積を除去する。A - T - W を含有するループ内の G - A - N への変異はまた、ループを PNS から遠ざけるようにし、これは PNS がその結合ポケットに到達するのをさらに補助し得る。最後に、上記の全長ゼブラフィッシュグルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼの His - 158 に対応する天然ヒスチジンに直接隣接する、配列番号 108 の 84 位に操作されたセリン残基は、さらなる水素結合接点を形成して、ゼブラフィッシュ酵素のスルホ受容体多糖との天然の活性の保持における改変型酵素を補助することができる。

【0243】

当業者は、配列番号 18、配列番号 20、配列番号 43、配列番号 44、配列番号 45、配列番号 46、配列番号 47、配列番号 48、配列番号 49、配列番号 50、配列番号 59、配列番号 60、及び配列番号 61 によって開示するものを含むがこれらに限定され

ない任意の他のアミノ酸配列の、改変型グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素が、特に活性部位内で同様の構造モチーフを示すことを理解するであろう。特定の理論に制限されるものではないが、N C S は、改変型酵素のいずれかの活性部位内の P N S と同様の位置で結合すると考えられる。これは、2つのアリール硫酸化合物の構造が、硫酸基はニトロ基に対してパラではなく、むしろニトロ基に対して芳香環上のオルトに位置することを除いて、非常に類似しているからである。

【0244】

他の態様において、本発明の方法に従って利用することができる改変型グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素は、1つ以上の変異アミノ酸配列モチーフを有することができ、これは、図 18 A ~ 18 C の多重配列アラインメントにおいて示す保存されたアミノ酸配列モチーフを、非限定的な例として、図 20 に示す酵素を含むがこれらに限定されない野生型酵素及び/又はモデル化された改変型酵素の既知の構造と比較することによって部分的に決定することができる。他の態様において、改変型グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素内に有することができる変異アミノ酸配列モチーフは、(a) G - H - T - G - G - T ; (b) C - G - X₁ - X₂ - A - D (式中、X₁はトレオニン及びセリンからなる群から選択され、X₂はアスパラギン、アルギニン、及びヒスチジンからなる群から選択される) ; (c) X₃ - X₄ - W - R - H - X₅ - Q - R - G - G - X₆ - N - K (式中、X₃はセリン及びグリシンからなる群から選択され、X₄はグリシン及びヒスチジンからなる群から選択され、X₅はヒスチジン及びトレオニンからなる群から選択され、X₆はアラニン及びトレオニンからなる群から選択される) ; 及び (d) N - L - X₇ - N - N - R - Q (式中、X₇はアラニン及びグリシンからなる群から選択される) ; (これらの任意の組合せ含む) からなる群から選択することができる。変異アミノ酸配列モチーフの各々は上記図 18 A ~ 18 C に示す保存アミノ酸モチーフに対応する：配列モチーフ (a) は保存アミノ酸配列モチーフ Q - K - T - G - G - T に対応する；変異アミノ酸配列モチーフ (b) は保存アミノ酸配列モチーフ C - G - L - H - A - D に対応する；変異アミノ酸配列モチーフ (c) は保存アミノ酸配列モチーフ S - E - W - (R / K) - H - V - Q - R - G - A - T - W - K に対応する；変異アミノ酸配列モチーフ (d) は保存アミノ酸配列モチーフ N - L - A - N - R - Q に対応する。他の態様において、上記の少なくとも1つの変異アミノ酸配列モチーフを有する改変型グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素は、配列番号 18、配列番号 20、配列番号 22、配列番号 43、配列番号 44、配列番号 45、配列番号 46、配列番号 47、配列番号 48、配列番号 49、配列番号 50、配列番号 59、配列番号 60、及び配列番号 61 からなる群から選択することができる。

【0245】

他の態様において、また非限定的な一例では、改変型グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素は、同じアミノ酸配列内に変異アミノ酸配列モチーフ (b) 及び (c) を有することができる。変異アミノ酸配列モチーフ (b) 及び (c) を含む改変型酵素は、配列番号 18、配列番号 20、配列番号 22、配列番号 43、配列番号 44、配列番号 45、配列番号 46、配列番号 47、配列番号 48、配列番号 49、及び配列番号 50 のアミノ酸配列を有する酵素を含むが、これらに限定されない。他の態様において、変異アミノ酸配列モチーフ (b) 及び (c) を含む改変型グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素の各々は、図 20 に示すように、配列番号 22 と同様の活性部位を有する。別の理論に限定されるものではないが、変異アミノ酸配列モチーフ (b) 及び (c) 内に含まれる変異のいくつかは、これらに限定されないが、スルホトランスフェラーゼ活性中に以下の1つ以上の機能を有すると考えられる：結合ポケットのサイズを減少させることによって活性部位に対するアリール硫酸化合物の親和性を増加させること、ポケットの疎水性を増加させること、極性若しくは水素結合接点を除去又は作成すること、及び/又はアリール硫酸化合物の芳香族部分との π - π 相互作用を作成すること、化学反応中の酵素の遷移状態を安定化させること、並びに/又は化学反応自体に関与すること。

【0246】

10

20

30

40

50

他の態様において、変異アミノ酸配列モチーフ (b) 及び (c) を有する改変型グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素内で、X₄ はグリシンであり、X₅ はヒスチジンである。他の態様において、X₄ はヒスチジンであり、X₅ はトレオニンである。

【0247】

他の態様において、変異アミノ酸配列モチーフ (b) 及び (c) を有する改変型グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素内で、X₃ はセリンであり、X₆ はアラニンであり、X₇ はグリシンである。他の態様において、X₃ はグリシンであり、X₆ はトレオニンであり、X₇ はアラニンである。

【0248】

さらに、スルホ基供与体としてのアリール硫酸化合物と活性であると実験的に決定された 3 つの改変型グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素のアミノ酸配列 (配列番号 18、配列番号 20、配列番号 22) (以下の実施例 4 参照) を、多重配列アラインメントでマウスグルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素のアミノ酸配列 (エントリ Q9QYK5 | H6ST1__MOUSE) と比較して、各酵素の間に変異間の関係があるかどうかを決定することができる。改変型酵素のアミノ酸配列内の期間は、特定の位置におけるマウスグルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素との同一性を示す。図 21 に示すように、配列アラインメントは、3 つのスルホトランスフェラーゼ配列内のアミノ酸残基の 90% 超が同一であるが、複数のアミノ酸を選択することができるいくつかの位置があることを実証する。特定の理論に制限されるものではないが、これらの酵素は、EC2.8.2.- を含むグルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素として互いに同様の関係を有する。結果として、他の態様において、複数のアミノ酸を定義された位置において選択することができるアミノ酸配列を有する改変型グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素を配列番号 43 及び配列番号 44 として開示する。アミノ酸の同一性が可能な残基の選択から選択できる位置は、「Xaa」、「Xn」、又は「位置 n」という用語で示し、n は残基位置を指す。

【0249】

他の態様において、配列番号 43 内で、「Xaa」という名称を有する残基は、配列番号 18、配列番号 20、及び配列番号 22 のアミノ酸配列内の特定の位置において同一性を欠く、公知の例を示す。他の態様において、アミノ酸配列、配列番号 44 はまた、配列番号 18、配列番号 20、及び配列番号 22 のアミノ酸配列内の特定の位置に同一性の欠如がある既知の例を示すが、配列番号 44 は、EC2.8.2.- 内のいくつかの全長グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素の N 末端残基 1 ~ 66 及び C 末端残基 378 ~ 411 をさらに有し、非限定的な例として、マウス、ヒト、及びブタのグルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素を含む。対照的に、配列番号 18、配列番号 20、配列番号 22、及び配列番号 43 のアミノ酸残基は、EC2.8.2.- 内のいくつかの全長グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素の残基 67 ~ 377 に対応し、非限定的な例として、マウス、ヒト、及びブタのグルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素を含む。タンパク質発現を促進するために、N 末端メチオニン残基を、マウス、ヒト、及びブタのグルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素の残基 67 ~ 377 に対して、配列番号 18、配列番号 20、配列番号 22、及び配列番号 43 のアミノ酸配列のそれぞれに付加した。

【0250】

他の態様において、得られた酵素がスルホ基供与体としてのアリール硫酸化合物と反応したときにグルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ活性を維持する限り、配列番号 43 又は配列番号 44 のアミノ酸配列によって定義される Xaa 残基に対して、任意の選択を行うことができる。

【0251】

他の態様において、配列番号 43 のアミノ酸配列を有する改変型グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素内で、129 位のアミノ酸残基はグリシンであり、133 位のアミノ酸残基はヒスチジンである。他の態様において、配列番号 43 のアミノ酸配列

10

20

30

40

50

を有する改変型グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素内で、129 位のアミノ酸残基はヒスチジンであり、133 位のアミノ酸残基はトレオニンである。他の態様において、配列番号 44 のアミノ酸配列を有する改変型グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素内で、194 位のアミノ酸残基はグリシンであり、198 位のアミノ酸残基はヒスチジンである。他の態様において、配列番号 44 のアミノ酸配列を有する改変型グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素内で、194 位のアミノ酸残基はヒスチジンであり、198 位のアミノ酸残基はトレオニンである。

【0252】

他の態様において、配列番号 43 のアミノ酸配列を有する改変型グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素内で、128 位のアミノ酸残基はセリンであり、138 位のアミノ酸残基はアラニンであり、181 位のアミノ酸残基はグリシンである。他の態様において、配列番号 43 のアミノ酸配列を有する改変型グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素内で、128 位のアミノ酸残基はグリシンであり、138 位のアミノ酸残基はトレオニンであり、181 位のアミノ酸残基はアラニンである。他の態様において、配列番号 44 のアミノ酸配列を有する改変型グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素内で、193 位のアミノ酸残基はセリンであり、203 位のアミノ酸残基はアラニンであり、246 位のアミノ酸残基はグリシンである。他の態様において、配列番号 44 のアミノ酸配列を有する改変型グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素内で、193 位のアミノ酸残基はグリシンであり、203 位のアミノ酸残基はトレオニンであり、246 位のアミノ酸残基はアラニンである。

【0253】

他の態様において、配列番号 43 又は配列番号 44 のアミノ酸配列を有する改変型グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素内で、任意のそのような変異が酵素のグルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ及び / 又はアリール硫酸依存性活性を排除しない限り、アミノ酸配列は、「Xn」又は「Xaa」によって特定されない残基位置に 1 つ以上の変異を任意に有することができる。他の態様において、「Xn」又は「Xaa」によって特定されない位置でのアリール硫酸依存性活性を排除しないそのような変異は、置換、欠失及び / 又は付加を有することができる。

【0254】

したがって、他の態様において、本発明の方法のいずれかに従って利用される改変型グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素は、配列番号 18、配列番号 20、配列番号 22、配列番号 43、配列番号 44、配列番号 45、配列番号 46、配列番号 47、配列番号 48、配列番号 49、配列番号 50、配列番号 59、配列番号 60、及び配列番号 61 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有することができる。他の態様において、上記改変型グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素のいずれかは、スルホ基供与体として、3' - ホスホアデノシン 5' - ホスホ硫酸の代わりに、アリール硫酸化合物と反応する。さらなる態様において、アリール硫酸化合物は、PNS、MUS、7 - ヒドロキシクマリン硫酸、フェニル硫酸、4 - アセチルフェニル硫酸、インドキシル硫酸、1 - ナフチル硫酸、2 - ナフチル硫酸、及び NCS からなる群から選択される。いくつかのなおさらなる態様において、アリール硫酸化合物は PNS である。他のなおさらなる態様において、アリール硫酸化合物は NCS である。

【0255】

グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ

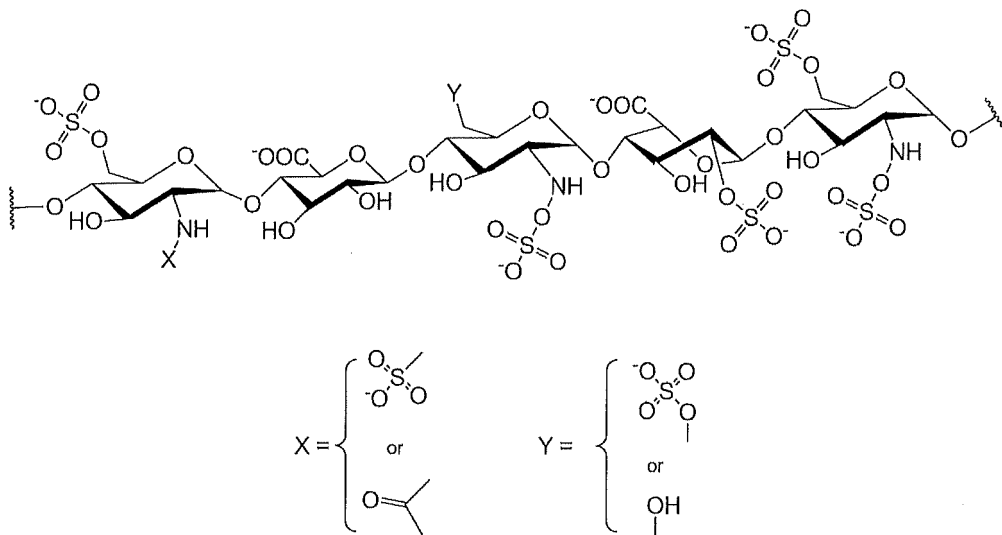
自然界では、HS グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼは、一般に、スルホ基受容体としての N, 2 - HS 多糖類及び N, 2, 6 - HS 多糖類を認識し、結合し、反応する。一般に、3 - O 位でスルホ基を受容するグルコサミン残基は N - 硫酸化されており、場合により、6 - O 硫酸化もされていてもよい。さらに、隣接するいずれかのヘキスロン酸残基は、グルクロン酸又はイズロン酸のいずれかであってもよく、場合により 2 - O 硫酸化されていてもよい。ある態様において、グルコサミン残基の非還元末端のヘキスロン残基は、非置換のグルクロン酸である一方、グルコサミン残基の還元末端のヘキスロ

ン酸残基は 2 - O 硫酸化イズロン酸である。上記の野生型スルホトランスフェラーゼの各々と同様に、天然に存在するグルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼは、スルホ基供与体としての 3' - ホスホアデノシン 5' - ホスホ硫酸と反応すると、スルホ基を多糖に転移する。スルホ基供与体として 3' - ホスホアデノシン 5' - ホスホ硫酸を利用する野生型 HS グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素は、EC 2.8.2.23 酵素クラスのメンバーである。非限定的な例では、EC 2.8.2.23 内の HS グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素は、下記式 X (式中、中心グルコサミン残基は、N - 硫酸化されており、その非還元末端で未置換グルクロン酸残基に隣接し、その還元末端で 2 - O 硫酸化イズロン酸残基に隣接しており、X は場合により硫酸基又はアセチル基であってもよく、Y は場合により硫酸基又はヒドロキシル基であってもよい。) の構造を有する N, 2, 6 - HS 多糖類を認識し、結合し、反応することができる。

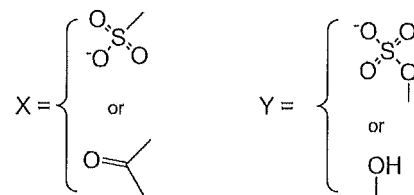
10

【0256】

【化19】



20



【0257】

上記のように、酵素と反応する多糖の部分は式 X の構造を有し、多糖の他の部分は、N - 置換又は O - 置換されていてもよく、酵素と反応することもできる他の構造モチーフを有してもよい。上記の他の酵素と同様に、HS グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素は、同じ多糖分子内の複数の部分にスルホ基を転移させることができ、同じ多糖分子内の複数の部分は、酵素分子によって 3 - O 硫酸化することができる。典型的には、スルホ基受容体としてのグルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼと反応することができる HS 多糖類は典型的には、式 X に示すように、少なくとも 5 個の単糖残基を有する。他の態様において、HS 多糖類は式 X の構造を有し、そして少なくとも 32 個の単糖残基を有することができるスルホ基受容体としてのグルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼと反応することができる。

30

【0258】

3' - ホスホアデノシン 5' - ホスホ硫酸と、式 X の構造を有する N, 2, 6 - 多糖との結合に成功すると、野生型グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素は、中心グルコサミン残基の 3 - O 位へのスルホ基の転移を触媒し、下記式 I (式中、X はスルホ基又はアセテート基のいずれかであり、Y はスルホ基又はヒドロキシル基のいずれかである。) の構造を有する N, 2, 3, 6 - HS 生成物を形成することができる。さらなる態様において、N, 2, 3, 6 - HS 生成物の官能基 X は硫酸基である。他のさらなる態様において、N, 2, 3, 6 - HS 生成物の官能基 Y は硫酸基である。他の態様において、ポリマー内のある位置において、グルコサミン残基のスクとなくとも一部は N - アセチル化している。スルホ基受容体として式 X の構造を有する N, 2, 6 - HS 多糖類と生物活性を有し、式 I の構造を有する N, 2, 3, 6 - HS 生成物を形成する、EC 2.8.2

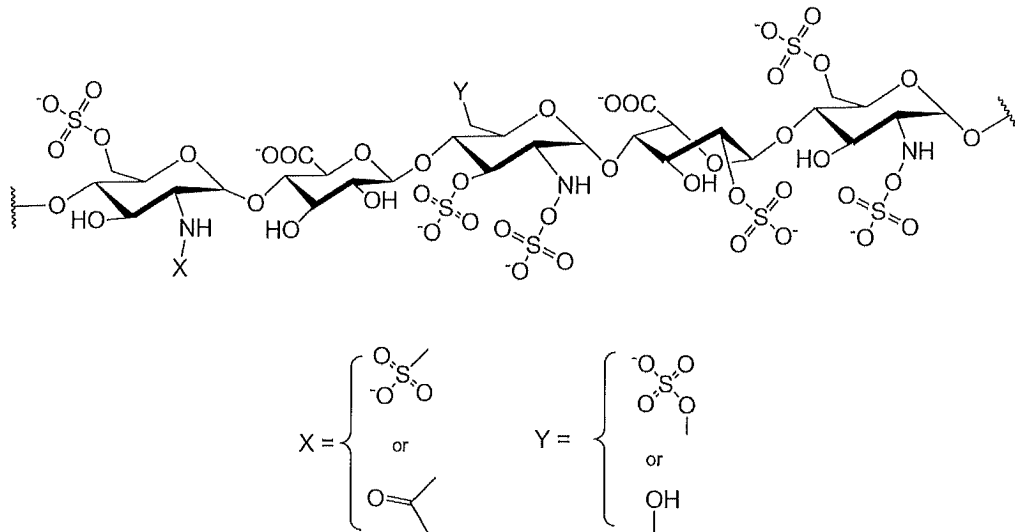
40

50

． 2 3 内の野生型 H S グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素は、Xu, D., et al., (2008) Nat. Chem. Biol. 4 (3): 200-202 及び Edavettal, S. C., et al., (2004) J. Biol. Chem. 24 (11): 25789-25797 に記載され、これらの開示はその全体が参照により組み込まれる。

【 0 2 5 9 】

【 化 2 0 】



10

20

【 0 2 6 0 】

EC 2 . 8 . 2 . 2 3 内の H S グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素に対するそのような N , 2 , 6 - H S スルホ基受容体の 1 つの非限定的な例を図 2 2 に示す。図 2 2 は、各 N 位に N - スルホ基 4 1 1 及び各 6 - O 位に O - スルホ基 4 1 2 を有する、3 つのグルコサミン残基 4 1 0 を含む多糖 4 4 0 を示す。多糖 4 4 0 内で、スルホ受容体として作用することができるグルコサミン残基 4 1 0 は、2 つのヘキスロン酸残基に隣接していなければならない。ヘキスロン酸残基は、式 X 中の官能基「X」によって表される任意の残基を含むことができ、図 2 2 にグルクロン酸残基 4 2 0 及びイズロン酸残基 4 3 0 として示されている。いずれのヘキスロン酸残基も、2 - O 位においてスルホ基 4 3 1 でさらに置換することができる。多糖 4 4 0 を H S グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素及びスルホ基供与体と反応させると、グルコサミニル残基 4 1 0 のいずれかの 3 - O 位置 4 1 3 を硫酸化することができる。図 2 2 に示すように、中心グルコサミン残基 4 1 0 はスルホ基を受容し、最終的に硫酸化生成多糖 4 4 1 内に 3 - O 硫酸化グルコサミニル残基 5 1 0 を形成する。また示すように、硫酸化生成多糖 4 4 1 は、式 I の構造を有する。

30

【 0 2 6 1 】

他の態様において、本発明の方法により利用することができる改変型 H S グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼは、野生型 H S グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼと同じ、ヘパロサン系スルホ受容体多糖、特に式 X の構造を有するヘパロサン系多糖との生物学的活性を有することができる。他の態様において、スルホ受容体多糖内に式 X の構造を有する多糖類の複数の部分が存在する場合、任意の N - 硫酸化グルコサミン残基が、改変型グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素によって 3 - O 硫酸化することができる。同様に、同じ多糖類が、多糖内に存在するあらゆる N - 硫酸化グルコサミン残基まで、改変型グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼによって複数回硫酸化することができる。

40

【 0 2 6 2 】

他の態様において、式 X の構造を有するものを挙げるができるが限定されない、改変型又は野生型 H S グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼと反応することができるスルホ受容体多糖類は、均質な組成物として提供することができる。さらに他の態様

50

において、改変型又は野生型 H S グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼと反応することができるスルホ受容体多糖類は、可変の鎖長、分子量、式 X の相対存在量並びに全体的な単糖の組成及び官能化を有する多糖の多分散混合物を有する組成物内に有してなることができる。

【 0 2 6 3 】

他の態様において、改変型又は野生型 H S グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素とともに本発明の方法により利用されるものであって式 X の構造を含むものを挙げることができるがこれに限定されない、N , 2 - H S 及び N , 2 , 6 - H S 多糖類は、商業的供給源から得ることができるか、及び / 又は修飾することができる。他の態様において、本発明の方法により利用することができる改変型又は野生型 H S グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼのいずれは、1 つ以上の前の工程でグルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ及び / 又はヘキサロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼによって生成された N , 2 - H S 生成物と反応することができる。他の態様において、本発明の方法により利用することができる改変型又は野生型 H S グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼのいずれは、1 つ以上の前の工程でグルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ、ヘキサロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼ及び / 又はグルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼによって生成された N , 2 , 6 - H S 生成物と反応することができる。他の態様において、改変型アリール硫酸依存性スルホトランスフェラーゼによって、N , 2 - H S 又は N , 2 , 6 - H S 生成物を生成するための硫酸化工程のうちの 1 つ以上を触媒した。他の態様において、改変型アリール硫酸依存性スルホトランスフェラーゼによって、N , 2 - H S 又は N , 2 , 6 - H S 生成物を生成するための全硫酸化工程を触媒した。これらのプロセスの各々は、以下の説明及び実施例で詳述する。

【 0 2 6 4 】

EC 2 . 8 . 2 . 2 3 酵素クラスを有する天然 H S グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素は一般に、およそ 3 0 0 ~ 3 2 5 個のアミノ酸残基を有し、場合によってはそれらの配列が大きく異なり得るが、最終的には全く同じ機能を有し、すなわち 3 ' - ホスホアデノシン 5 ' - ホスホ硫酸から、特に式 X の構造を有するものである N , 2 - H S 又は N , 2 , 6 - H S 多糖類内の N - スルホグルコサミン残基の 3 - O 位へのスルフル基の転移を触媒する。特定の理論に制限されるものではないが、EC 2 . 8 . 2 . 2 3 酵素クラス内の天然 H S グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼの各々は、全ての種にわたって同一又は高度に保存されたかのいずれかである複数のアミノ酸配列モチーフ及び二次構造が存在するので、同じ化学反応を触媒することができると考えられる。

【 0 2 6 5 】

さらに、保存されたアミノ酸配列モチーフのいくつかは、3 ' - ホスホアデノシン 5 ' - ホスホ硫酸及び / 又は多糖のいずれかの結合に直接関与するか、又は化学反応自体に関与すると考えられる。天然 H S グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素間の同一性は、2 つの酵素が互いに 8 3 % の配列同一性しか有さない場合であっても、両方の酵素がほぼ同一の活性部位及び全体的な構造を有する、マウス (P D B コード : 3 U A N) 酵素及びヒト (P D B コード : 1 Z R H) 酵素を含む、活性部位内のアミノ酸残基が同定されている既知の結晶構造を有する H S グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素と、特定の酵素のアミノ酸配列を比較することによって実証することができる。マウス及びヒト酵素を含む、EC 2 . 8 . 2 . 2 3 内の 1 5 個の酵素の多重配列アラインメントを、ヒトグルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ (アイソフォーム 1) 参照配列 (U n i P r o t K B 寄託番号 O 1 4 7 9 2) と比較しての各配列のパーセント同一性と共に、図 2 3 A ~ 2 3 C に示す。図 2 3 A ~ 2 3 C に示すように、配列は、アカゲザル H S グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼについては O 1 4 7 9 2 参照配列 (エントリ t r | H 9 Z G 3 9 | H 9 Z G 3 9 _ M A C M U) と 9 8 % の同一性を有するものから、ヒト H S グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼの異なるアイソフォームについては最低で 5 3 % の同一性 (エントリ s p | Q 8 I Z T 8 | H S 3 S 5 _ H U M A N) までの範囲である。当業者は、多重配列アラインメントは明確化のために 1 5 配列

に限定されており、同定され、高度に保存された活性部位及び／又は結合領域も有する天然HSグルコサミニル3-Oスルホトランスフェラーゼ酵素をコードする数百のアミノ酸配列が存在することを理解するであろう。

【0266】

図23A～23Cにおいて、特定の位置で黒背景に白色で示すアミノ酸は、全ての配列にわたって100%同一である。特定の位置で、アミノ酸が同一であること、又は化学的若しくは構造的に類似していることのいずれかを意味する、高度に保存されているアミノ酸は、黒い縁取りで囲まれている。高度に保存された領域内では、配列の大部分に存在するコンセンサスアミノ酸は太字である。同一でないか又は高度に保存されていない特定の位置のアミノ酸は、典型的には可変である。配列内の期間は、高度に保存された又は同一の領域の間にさらなる残基を有する他の配列（複数可）との配列アラインメントを容易にするために、配列に挿入されたギャップを示す。最後に、各配列ブロックの上には、アラインメント内のアミノ酸の同一性に基づいて、天然型ヒトスルホトランスフェラーゼ酵素の構造を参照として使用して、全ての配列にわたり保存されている二次構造を示す一連の矢印及びコイルがある。矢印に隣接するβ記号はβシートを指し、α記号又はη記号に隣接するコイルは螺旋二次構造を指す。

10

【0267】

図23A～23Cの15個の整列した配列内には、上記のマウス（エントリsp|O35310|HS3S1__MOUSE）及びヒトのHSグルコサミニル3-Oスルホトランスフェラーゼ（エントリsp|O14792|HS3S1__HUMAN）酵素の結晶構造に基づいて、活性部位を含む1つ以上のアミノ酸を含むいくつかの保存されたアミノ酸配列モチーフが存在する。図23A～23C内のアミノ酸残基の番号付けに基づいて、これらのモチーフは、残基16～27（残基18～23由来のG-V-R-K-G-Gを含む）、残基43～48（E-V/I-H-F-D）、残基78～81（P-A/G-Y-F）、残基112～117（S-D-Y-T-Q-Vを含む）、及び残基145～147（Y-K-A）を含む。これらの残基は、化学反応を促進するか若しくはそれに関与するか、又は活性部位内の3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸若しくは多糖の結合を可能にするかのいずれかであると考えられる。特に、残基43～48内では、上記のように、並びに図1に示すように、43位のグルタミン酸残基は、多糖内のN-スルホグルコサミン残基の3-O位からプロトンを引き抜き、求核攻撃及び3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸からのスルホ基の除去を可能にする一方、isp-45及びasp-48は、スルフリル化（sulfurylated）多糖生成物が活性部位から放出される前に、酵素の遷移状態を安定化するように配位する。

20

30

【0268】

しかしながら、上記のように、EC2.8.2.23内の天然HSグルコサミニル3-Oスルホトランスフェラーゼ酵素は、アリール硫酸化合物から多糖への硫酸基の転移を触媒することができない。特定の理論に制限されるものではないが、上記のグルコサミニルN-スルホトランスフェラーゼ、ヘキサロニル2-Oスルホトランスフェラーゼ、及びグルコサミニル6-Oスルホトランスフェラーゼと同様に、天然スルホトランスフェラーゼの活性部位内の3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸の結合ポケットは、結合を促進するのに十分に高いアリール硫酸化合物に対する親和性を有していないか、及び／又はアリール硫酸化合物が活性部位に入るのを立体的に妨げられているかのいずれかと考えられる。その結果、及び他の態様において、EC2.8.2.23内の野生型HSグルコサミニル3-Oスルホトランスフェラーゼ酵素を、そのアミノ酸配列内のいくつかの位置で変異させて、活性部位内のアリール硫酸化合物の結合を可能にし、及び／又は多糖への硫酸基の転移が起こることができるようにアリール硫酸化合物を最適に配置することができる。

40

【0269】

したがって、他の態様において、本発明の方法に利用することができる改変型グルコサミニル3-Oスルホトランスフェラーゼ酵素は、図23A～23Cに例示するアミノ酸配列を有する酵素を含む、EC2.8.2.23内の天然グルコサミニル3-Oスルホトラ

50

ンスフェラーゼ酵素の変異体であってもよい。他の態様において、改変型グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素は、スルホ基供与体としてのアリール硫酸化合物を認識し、それと結合し、反応するように改変されている一方、スルホ基受容体としての、式 X の構造を有するものを挙げることができるがそれに限定されない、上述の H S 多糖類のいずれかを認識し、結合し、反応する天然の酵素の能力を保持する。特定の理論に制限されるものではないが、改変型グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素のアミノ酸配列に挿入された変異のために、それらのスルホトランスフェラーゼ活性は、3' - ホスホアデノシン 5' - ホスホ硫酸がアリール硫酸化合物で置換されていることを除いて、上記の図 1 に記載されていると同様の機構を用いる、アリール硫酸化合物からスルホ受容体多糖へのスルフリル基の直接転移を有することができると考えられる。そうでなければ、変異のために、スルホトランスフェラーゼ活性は、アリール硫酸化合物の加水分解及びスルホヒスチジン中間体の形成、続いて 3 - O 硫酸化 H S 生成物を形成するためのグルコサミン残基の 3 - O 位の酸素原子によるスルホヒスチジン中間体の求核攻撃を含む、2 工程のプロセスを有することができると考えられる。他の態様において、スルホ転移機構のいずれかの 3 - O 硫酸化 H S 生成物は、N , 2 , 3 , 6 - H S 生成物である。

10

【 0 2 7 0 】

他の態様において、改変型グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素は、上述のように、図 2 3 A ~ 2 3 C の多重配列アラインメントに示すように、E C 2 . 8 . 2 . 2 3 内の天然グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素に見られる保存アミノ酸配列モチーフと比較して 1 つ以上の変異アミノ酸配列モチーフを有することができる。他の態様において、改変型酵素のアミノ酸配列に存在する各変異アミノ酸配列モチーフは、天然グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素内の対応する保存アミノ酸配列モチーフと比較して、少なくとも 1 つのアミノ酸変異を含む。他の態様において、改変型グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素は、1 つの変異アミノ酸配列モチーフを有することができる。他の態様において、改変型グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素は、2 つの変異アミノ酸配列モチーフを有することができる。他の態様において、改変型グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素は、3 つの変異アミノ酸配列モチーフを有することができる。他の態様において、改変型グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素は、4 つの変異アミノ酸配列モチーフを有することができる。他の態様において、改変型グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素は、5 つの変異アミノ酸配列モチーフを有することができる。他の態様において、E C 2 . 8 . 2 . 2 3 内の野生型 H S グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素のいずれかと比較して少なくとも 1 つの変異アミノ酸配列モチーフを含む、改変型グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素は、配列番号 2 4、配列番号 2 6、配列番号 2 8、配列番号 5 1、配列番号 5 2、配列番号 5 3、配列番号 5 4、配列番号 5 6、配列番号 5 7、及び配列番号 5 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有することができる。

20

30

【 0 2 7 1 】

他の態様において、三次元分子視覚化システム（非限定的な例として、オープンソースソフトウェアである P y M O L ）においてマウス H S グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼの結晶構造を見ると、マウス H S グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ（U n i P r o t K B 寄託番号 O 3 5 3 1 0 ）構造と比較して 1 つ以上の変異アミノ酸配列モチーフを含有する改変型グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素の配列などの関連配列の構造を、図 2 4 に示す比較のためにモデル化することができる。図 2 4 は、配列番号 2 4、配列番号 2 6、及び配列番号 2 8 のアミノ酸配列を有する、3 つの改変型グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素を有するマウスグルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素（P D B コード：3 U A N ）の活性部位の拡大図を示す。3' - ホスホアデノシン 5' - ホスホ硫酸がスルホ供与体であり、マウスグルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼと共結晶化したスルホ転移反応の生成物である、アデノシン 3' , 5' - ニリン酸もまた、活性部位内に示されている。P N S はまた、

40

50

そのような解が可能である場合、多糖結合部位（図示せず）に隣接する酵素活性部位内のリガンドの最適化された位置及び配向を計算するように設計された分子動力学（MD）シミュレーションの共通解を使用して、改変型酵素の活性部位にモデル化される。水素原子は、明確化のために示されていない。

【0272】

図24に示すように、天然マウススルホトランスフェラーゼに関して、配列番号24、配列番号26、及び配列番号28と比較して行われたいくつかの変異があるが、それぞれのタンパク質骨格は互いにほぼ同一の位置にあり、活性部位の対一比較を可能にする。しかしながら、2つの活性部位を比較すると、天然のスルホ転移反応由来のアデノシン3'，5'-ニリン酸生成物はリジン残基に隣接しているが、上記のMDシミュレーションからの収束解は、改変型酵素内のPNS結合が活性部位の反対側で有利であることを示している。特定の理論に制限されるものではないが、収束MDシミュレーション解は、3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸と同じ又は類似の位置のPNSに対する親和性が充分ではないため、活性部位の反対側にPNSを配置すると考えられる。しかし、3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸及びPNSの結合ポケットの明らかな違いにもかかわらず、配列番号24、配列番号26、及び配列番号28のアミノ酸配列を有する改変型グルコサミニル3-Oスルホトランスフェラーゼ酵素は全て、実施例で後述するように、アリール硫酸化合物からヘパロサン系多糖内のグルコサミニル3-O位へのスルホ転移を達成した。

【0273】

さらに、マウスHSグルコサミニル3-Oスルホトランスフェラーゼの20位に対応し、図23A～23Cに示す他のグルコサミニル3-Oスルホトランスフェラーゼ酵素の全てにおいて保存されているアルギニン残基は、改変型グルコサミニル3-Oスルホトランスフェラーゼ酵素に存在する場合、図24に示す位置におけるPNSの結合を阻止するようである。したがって、他の態様において、PNSに結合する改変型グルコサミニル3-Oスルホトランスフェラーゼ酵素は、PNSが結合ポケット内に結合するための全ての立体障害を除去する、活性部位アルギニン残基のグリシン残基への変異を有することができる。配列番号24、配列番号26、配列番号28、配列番号51、配列番号52、配列番号53、及び配列番号54のアミノ酸配列に示すように、アルギニンからグリシンへの変異は21位にある。配列番号56、配列番号57、及び配列番号58のアミノ酸配列に示すように、アルギニンからグリシンへの変異は99位にある。

【0274】

同様に、配列番号24、配列番号26、配列番号28、配列番号51、配列番号52、配列番号53、及び配列番号54のアミノ酸配列の22位に対応する各改変型酵素の次のアミノ酸残基は、ヒスチジン残基に変異している。特定の理論に制限されるものではないが、保存されたリジン残基からヒスチジン残基への変異（図23A～23Cのアミノ酸配列の各々の21位に対応）は、上記Malojcic, et alに記載されたのと同様の機構を使用して、PNSからの硫酸基の除去を促進すると考えられる。配列番号56、配列番号57、及び配列番号58のアミノ酸配列に示すように、リジンからヒスチジン残基は、100位にある。

【0275】

当業者は、配列番号51、配列番号52、配列番号53、配列番号54、配列番号56、配列番号57、及び配列番号58によって開示するものを含むがこれらに限定されない、任意の他のアミノ酸配列の改変型グルコサミニル3-Oスルホトランスフェラーゼ酵素が、特に活性部位内で、配列番号24、配列番号26、及び配列番号28のアミノ酸配列を有する改変型酵素と同様の構造モチーフを示すことを理解するであろう。特定の理論に制限されるものではないが、NCSはまた、改変型酵素のいずれかの活性部位内のPNSと同様の位置で結合するとも考えられる。これは、2つのアリール硫酸化合物の構造が、硫酸基はニトロ基に対してパラではなく、むしろニトロ基に対して芳香環上のオルトに位置することを除いて、非常に類似しているからである。

【 0 2 7 6 】

他の態様において、本発明の方法により利用することができる改変型グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素は、1 つ以上の変異アミノ酸配列モチーフを有することができ、これは、図 2 3 A ~ 2 3 C の多重配列アラインメントにおいて示す保存されたアミノ酸配列モチーフを、図 2 4 に示す、非限定の例としての酵素を含むがこれらに限定されない野生型酵素及び / 又はモデル化された改変型酵素の既知の構造と比較することによって部分的に決定することができる。他の態様において、改変型グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素内に有することができる変異アミノ酸配列モチーフは、(a) G - V - G - H - G - G ; (b) H - S - Y - F ; (c) S - X₁ - X₂ - T - H - X₃ (式中、X₁ はアラニン及びロイシンからなる群から選択され、X₂ はチロシン及びグリシンからなる群から選択され、X₃ はメチオニン及びロイシンからなる群から選択される) ; 及び (d) Y - X₄ - G (式中、X₄ はバリン及びトレオニンからなる群から選択される) ; (これらの任意の組合せを含む) からなる群から選択することができる。変異アミノ酸配列モチーフの各々は、上記の図 2 3 A ~ 2 3 C に示す保存アミノ酸モチーフに対応する。変異アミノ酸配列モチーフ G - V - G - H - G - G は保存アミノ酸配列モチーフ G - V - R - K - G - G に対応する ; 変異アミノ酸配列モチーフ H - S - Y - F は保存アミノ酸配列モチーフ P - A / G - Y - F に対応する ; 変異アミノ酸配列モチーフ S - X₁ - X₂ - T - H - X₃ は保存アミノ酸配列モチーフ S - D - Y - T - Q - V に対応する ; 変異アミノ酸配列モチーフ Y - X₄ - G は保存アミノ酸配列モチーフ Y - K - A に対応する。他の態様において、上記の各変異アミノ酸配列モチーフを有する改変型グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素は、配列番号 2 4、配列番号 2 6、配列番号 2 8、配列番号 5 1、配列番号 5 2、配列番号 5 3、配列番号 5 4、配列番号 5 6、配列番号 5 7、及び配列番号 5 8 からなる群から選択することができる。

【 0 2 7 7 】

他の態様において、変異アミノ酸配列モチーフの各々は、E C 2 . 8 . 2 . 2 3 内の天然グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素に見られる保存アミノ酸と比較して作られる、少なくとも 1 つの変異を有することができる。他の態様において、変異アミノ酸配列モチーフ (a) は、保存アミノ酸配列モチーフ G - V - R - K - G - G と比較して、R - K から G - H への変異を含む。他の態様において、変異アミノ酸配列モチーフ (b) は、保存アミノ酸配列モチーフ P - A / G - Y - F と比較して、P - A / G から H - S への変異を含む。他の態様において、X₁ 位、X₂ 位、及び X₃ 位で行われる潜在的変異に加えて、変異アミノ酸配列モチーフ (c) は、保存アミノ酸配列モチーフ S - D - Y - T - Q - V と比較して、Q から H への変異を有する。他の態様において、X₄ 位の変異に加えて、変異アミノ酸配列モチーフ (d) は、保存アミノ酸配列モチーフ Y - K - A と比較して、A から G への変異を有する。

【 0 2 7 8 】

他の態様において、X₁ はアラニンであり、X₂ はチロシンであり、X₃ はメチオニンであり、X₄ はバリン又はトレオニンである。他の態様において、X₁ はロイシンであり、X₂ はグリシンであり、X₃ はロイシンであり、X₄ はトレオニンである。別の理論に限定されるものではないが、変異アミノ酸配列モチーフ (b)、(c)、及び (d) 内に含まれる 1 つ以上の変異は、化学反応中の酵素の遷移状態の安定化において、又は活性部位に対するアリール硫酸化合物の親和性の増加において、例えば、結合ポケットのサイズの縮小、ポケットの疎水性の増加、及び / 若しくはアリール硫酸化合物の芳香族部分との π - π 相互作用の作成によって役割を果たすと考えられる。

【 0 2 7 9 】

なお、スルホ基供与体としてのアリール硫酸化合物で活性であると実験的に決定された 3 つの改変型グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素のアミノ酸配列 (配列番号 2 4、配列番号 2 6、及び配列番号 2 8) (以下の実施例 5 参照) を、多重配列アラインメントでヒトグルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素の第 1 のアイソフォームのアミノ酸配列 (エントリ s p | O 1 4 7 9 2 | H S 3 S 1 _ H U M A N) と比較

して、各酵素の間に変異間の関係があるかどうかを決定することができる。改変型酵素のアミノ酸配列内の期間は、特定の位置におけるヒトグルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素との同一性を示す。図 25 に示すように、配列アラインメントは、3 つのスルホトランスフェラーゼ配列内のアミノ酸残基の 90 % 超が同一であるが、複数のアミノ酸を選択することができるいくつかの位置があることを実証する。特定の理論によって限定されないが、これらの酵素は、EC 2.8.2.23 を有するグルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素として、互いに同様の関連性を有する。結果として、他の態様において、複数のアミノ酸を定義された位置において選択することができるアミノ酸配列を有する改変型グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素を配列番号 51 として開示する。アミノ酸の同一性が可能な残基の選択から選択できる位置は、「Xaa」10
、「Xn」、又は「位置 n」という用語で示し、n は残基位置を指す。

【0280】

他の態様において、配列番号 51 のアミノ酸配列を有する改変型グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素内で、114 位のアミノ酸残基はアラニンであり、118 位のアミノ酸残基はメチオニンである。さらなる態様において、147 位のアミノ酸残基は、バリン及びトレオニンからなる群から選択される。

【0281】

他の態様において、配列番号 51 のアミノ酸配列を有する改変型グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素内で、114 位のアミノ酸残基はロイシンであり、118 位のアミノ酸残基はロイシンであり、121 位のアミノ酸残基はバリンである。さらなる態様において、115 位のアミノ酸残基はグリシンである。なおさらなる態様において、147 位のアミノ酸残基はトレオニンである。20

【0282】

他の態様において、配列番号 51 のアミノ酸配列を有する改変型グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素内で、任意のそのような変異が酵素のグルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ及び / 又はアリール硫酸依存性活性を排除しない限り、アミノ酸配列は、「Xn」又は「Xaa」によって特定されない残基位置に 1 つ以上の変異を任意に有することができる。他の態様において、「Xn」又は「Xaa」によって特定されない位置でのアリール硫酸依存性活性を排除しないそのような変異は、置換、欠失及び / 又は付加を有することができる。30

【0283】

したがって、他の態様において、本発明の方法のいずれかに従って利用される改変型グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素は、配列番号 24、配列番号 26、配列番号 28、配列番号 51、配列番号 52、配列番号 53、配列番号 54、配列番号 56、配列番号 57、及び配列番号 58 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有することができる。他の態様において、上記改変型グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素は、スルホ基供与体として、3' - ホスホアデノシン 5' - ホスホ硫酸の代わりに、アリール硫酸化合物と反応する。さらなる態様において、アリール硫酸化合物は、PNS、MUS、7 - ヒドロキシクマリン硫酸、フェニル硫酸、4 - アセチルフェニル硫酸、インドキシル硫酸、1 - ナフチル硫酸、2 - ナフチル硫酸、及び NCS からなる群から選択される。いくつかのなおさらなる態様において、アリール硫酸化合物は PNS である。他のなおさらなる態様において、アリール硫酸化合物は NCS である。40

【0284】

硫酸化多糖のインビトロ合成

上記のように、スルホ基受容体としてのヘパロサン系多糖を認識し、それと結合し、反応する天然スルホトランスフェラーゼは、抗凝固活性を有する N, 2, 3, 6 - HS 生成物を含む広範囲の硫酸化多糖生成物をインビボで生成する能力を有する (Desai, U. R., et al., (1998) J. Biol. Chem. 273 (13): 7478-7487 を参照)。抗凝固性 N, 2, 3, 6 - HS 多糖の医学的使用は、数十年にわたって十分に実証されている。N, 2, 3, 6 - HS 多糖の抗凝固活性のいくつかには、限定するものではないが、血液凝固カス50

ケードに不可欠な2つのタンパク質である第ⅠⅠa因子(トロンビン)及び/又は第Ⅹa因子の不活性化が含まれる。特に、N, 2, 3, 6-HS多糖がアンチトロンビン(AT)に結合すると、多糖、AT、及びトロンビン又は第Ⅹa因子のいずれかの間の三元複合体の形成を可能にする酵素の立体構造変化を引き起こす(その開示全体が参照により組み込まれるLi, W., et al., (2004) Nat. Struct. Mol. Biol. 11 (9): 857-862を参照)。ATと結合し、その立体構造変化を誘導するために、N, 2, 3, 6-HS多糖は典型的には、式Ⅰの構造を含む特定の5残基AT認識配列を有する。

【0285】

AT認識配列のみからなるオリゴ糖にアンチトロンビンを結合させることによって抗凝固を誘導することができるが、N, 2, 3, 6-HS多糖が5個を超える糖残基を含む場合、典型的には、血液凝固の障害が増強される(その開示全体が参照により組み込まれるGrey, E., et al., (2008) Thromb. Haemost. 99: 807-818を参照)。Grey, et al.によって報告されているように、N, 2, 3, 6-HS多糖がAT認識配列の両側に少なくとも13個の糖残基を含み、多糖がトロンビンに結合しながらATにも結合することを可能にする「ブリッジ」として作用する場合、N, 2, 3, 6-HS多糖とトロンビンとの間に二次結合相互作用が形成することができる。結果として、抗凝固性N, 2, 3, 6-HS多糖類は、N, 2, 3, 6-HS多糖、AT及びトロンビンの間に三元複合体を潜在的に形成するために、典型的には最低18個の糖残基を必要とする。ただし、特定の理論に制限されるものではないが、特定の多糖分子内のAT認識配列の分布はランダムであるため、18~31個の糖残基を含むいくつかのN, 2, 3, 6-HS多糖は、理論的には、両側に13個の隣接する糖残基を有しない分子の中心に向かってAT認識配列を有することができると考えられる。そのため、抗凝固性N, 2, 3, 6-HS多糖類は典型的には、AT認識配列が分子内のどこにあっても、AT認識配列に隣接する13残基の「ブリッジ」が形成できることを確実にするために、少なくとも32個の糖残基を有さなければならない。

【0286】

上記のように、インビトロ又はインビボのいずれかのスルホ転移反応で利用されるかにかかわらず、ほぼすべてのスルホトランスフェラーゼの特徴は、その開示全体が参照により組み込まれる米国特許第5,541,095号、米国特許第5,817,487号、米国特許第5,834,282号、米国特許第6,861,254号、米国特許第8,771,995号、米国特許第9,951,149号並びに米国特許公開第2009/0035787号、米国特許公開第2013/0296540号及び米国特許公開第2016/0122446号に記載されているように、スルホ基供与体として3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸を普遍的かつ排他的に認識することである。これらには、多糖がスルホ基受容体であるスルホトランスフェラーゼ、特に、抗凝固性及び非抗凝固性N, 2, 3, 6-HS生成物の生成に関与するHSスルホトランスフェラーゼが含まれる。現在、3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸は高価であり、溶液中で不安定であるため、抗凝固性N, 2, 3, 6-HS多糖類を大量に得るための最も便利で経済的に実行可能な方法は、カップリングされた酵素的3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸再生系(上記の米国特許第6,255,088号を参照)が使用される場合であっても、それらをインビトロで合成するのではなく、動物供給源、特にブタ及びウシから単離することである。特定の理論に制限されるものではないが、N, 2, 3, 6-HS多糖の生成に、スルホ転移反応のうちの1つ以上を触媒するために上記の改変型アリアル硫酸依存性スルホトランスフェラーゼのいずれかを利用することにより、スルホ基供与体として3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸を使用することへの業界の依存を減らすことができ、改変型アリアル硫酸依存性スルホトランスフェラーゼがあらゆる酵素的スルホ転移工程で利用される場合、3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸を使用する必要性を完全になくすることができる。

【0287】

したがって、N, 2, 3, 6-HS生成物を合成するための方法は、反応のうちの少なくとも1つが改変型アリアル硫酸依存性スルホトランスフェラーゼ酵素及びアリアル硫酸

化合物を含む限り、天然又は改変型スルホトランスフェラーゼ酵素の任意の組合せを有することができる。いくつかの態様において、N, 2, 3, 6-HS生成物を合成するための方法は、以下の工程、(a) N-脱アセチル化ヘパロサンを有する出発多糖反応混合物を提供する工程；(b) 出発多糖反応混合物を、スルホ基供与体とグルコサミニルN-スルホトランスフェラーゼ酵素、ヘキサロニル2-Oスルホトランスフェラーゼ酵素及びグルコサミニル6-Oスルホトランスフェラーゼ酵素からなる群から選択される第1のスルホトランスフェラーゼ酵素とを有する反応混合物と組み合わせて、第1の硫酸化多糖を形成する工程；(c) 第1の硫酸化多糖を、スルホ基供与体と工程(b)で選択されなかった2つの酵素のうちの1つである第2のスルホトランスフェラーゼ酵素とを有する反応混合物と組み合わせて、第2の硫酸化多糖を形成する工程；(d) 第2の硫酸化多糖を、スルホ基供与体と工程(b)又は工程(c)で選択されなかった酵素である第3のスルホトランスフェラーゼ酵素とを有する反応混合物と組み合わせて、第3の硫酸化多糖を形成する工程；並びに(e) 第3の硫酸化多糖を、スルホ基供与体とグルコサミニル3-Oスルホトランスフェラーゼ酵素とを有する反応混合物と組み合わせて、N, 2, 3, 6-HS生成物を形成する工程を有することができる。改変型スルホトランスフェラーゼ酵素を有さない反応混合物は、3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸と、スルホ基供与体としての3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸との生物学的活性を有する野生型HSスルホトランスフェラーゼ酵素とを有することができる。他の態様において、ヘキサロニル2-Oスルホトランスフェラーゼ酵素を有する反応混合物は、グルクロニルC₅-エピメラゼ酵素をさらに有する。

10

20

【0288】

他の態様において、グルコサミニルN-スルホトランスフェラーゼ酵素が改変型酵素である場合、該酵素は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39及び配列番号40からなる群から選択されるアミノ酸配列を有することができる。他の態様において、ヘキサロニル2-Oスルホトランスフェラーゼ酵素が改変型酵素である場合、該酵素は、配列番号14、配列番号16、配列番号41及び配列番号42からなる群から選択されるアミノ酸配列を有することができる。他の態様において、グルコサミニル6-Oスルホトランスフェラーゼ酵素が改変型酵素である場合、該酵素は、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号59、配列番号60及び配列番号61からなる群から選択されるアミノ酸配列を有することができる。他の態様において、グルコサミニル3-Oスルホトランスフェラーゼ酵素が改変型酵素である場合、該酵素は、配列番号24、配列番号26、配列番号28、配列番号51、配列番号52、配列番号53、配列番号54、配列番号56、配列番号57及び配列番号58からなる群から選択されるアミノ酸配列を有することができる。

30

【0289】

他の態様において、グルコサミニルN-スルホトランスフェラーゼ酵素は第1のスルホトランスフェラーゼ酵素であり、ヘキサロニル2-Oスルホトランスフェラーゼ酵素は第2のスルホトランスフェラーゼ酵素であり、グルコサミニル6-Oスルホトランスフェラーゼ酵素は第3のスルホトランスフェラーゼ酵素である。

40

【0290】

他の態様において、スルホ基供与体として用いられるアリール硫酸化合物は、PNS、MUS、7-ヒドロキシクマリン硫酸、フェニル硫酸、4-アセチルフェニル硫酸、インドキシル硫酸、1-ナフチル硫酸、2-ナフチル硫酸及びNCSからなる群から選択することができる。なおさらなる態様において、アリール硫酸化合物はPNSである。他のなおさらなる態様において、アリール硫酸化合物はNCSである。

【0291】

他の態様において、出発多糖混合物内のN-脱アセチル化ヘパロサンは、式IIの構造

50

を有する。他の態様において、第3の硫酸化多糖はN, 2, 6-HS生成物である。他の態様において、N, 2, 6-HS生成物は式IXの構造を有する。他の態様において、N, 2, 6-HS生成物は式Xの構造を有する。他の態様において、N, 2, 3, 6-HS生成物は抗凝固活性を有する。他の態様において、N, 2, 3, 6-HS生成物は式Iの構造を有するAT認識配列を有する。他の態様において、AT認識配列を有するN, 2, 3, 6-HS生成物は、少なくとも5個の糖残基を有するN, 2, 3, 6-HS多糖類を有する。他の態様において、AT認識配列を有するN, 2, 3, 6-HS生成物は、少なくとも8個の糖残基を有するN, 2, 3, 6-HS多糖類を有する。他の態様において、AT認識配列を有するN, 2, 3, 6-HS生成物は、少なくとも18個の糖残基を有するN, 2, 3, 6-HS多糖類を有する。他の態様において、AT認識配列を有するN, 2, 3, 6-HS生成物は、少なくとも32個の糖残基を有するN, 2, 3, 6-HS多糖類を有する。

【0292】

他の態様において、本発明の方法によって生成される抗凝固性N, 2, 3, 6-HS多糖類は、それぞれ「抗Xa」活性及び「抗IIa」活性と呼ばれる、第Xa因子及びトロンビンに対してそれらが有する阻害活性の程度を特徴とすることができる。抗凝固性多糖によって誘導される阻害量は、多くの場合、国際単位/ミリグラム(IU mg⁻¹)で測定され、あまり頻繁ではないが国際単位/ミリリットル(IU mL⁻¹)として測定される。いずれの場合も、国際単位は、ネコの体液1mLを0で24時間維持するのに必要な量にほぼ等しい量である。典型的には、抗凝固性N, 2, 3, 6-HS多糖類の測定可能な抗Xa活性は、少なくとも約1IU mg⁻¹、例えば、少なくとも約50IU mg⁻¹、少なくとも約75IU mg⁻¹、100IU mg⁻¹、150IU mg⁻¹、200IU mg⁻¹又は500IU mg⁻¹から少なくとも約1,000IU mg⁻¹までであり、抗凝固性N, 2, 3, 6-HS多糖類の測定可能な抗IIa活性は、少なくとも約1IU mg⁻¹、例えば、少なくとも約10IU mg⁻¹、25IU mg⁻¹、50IU mg⁻¹、100IU mg⁻¹、150IU mg⁻¹又は180IU mg⁻¹から少なくとも約200IU mg⁻¹までである。32個以上の糖残基であり、AT及びトロンビンと三次複合体を形成することができる抗凝固性N, 2, 3, 6-HS多糖の場合、抗Xa活性と抗IIa活性との比は通常1:1に近く、特に0.9:1~1.1:1の範囲内である(その開示全体が参照により組み込まれるKeire, D. A., et al., (2011) Anal. Bioanal. Chem. 399: 581-591を参照)。ただし、鎖長が32個未満の糖残基になり、抗凝固性N, 2, 3, 6-HS多糖がトロンビンと相互作用することが保証されないため、抗Xaと抗IIaとの比は、少なくとも約10.0:1まで、少なくとも100:1まで増加することができる。そのため、他の態様において、N, 2, 3, 6-HS生成物の抗Xa活性と抗IIa活性との比は、少なくとも0.5:1、例えば、少なくとも0.75:1、0.9:1、1:1、1.1:1、1.3:1、1.5:1、2.0:1、3.0:1、4.0:1、5.0:1、6.0:1、7.0:1、8.0:1、9.0:1、10.0:1、20:1、40:1、60:1又は80:1から少なくとも100:1までである。他の態様において、N, 2, 3, 6-HS生成物の抗Xa活性と抗IIa活性との比は、100:1未満、例えば、80:1、60:1、40:1、20:1、10.0:1、9.0:1、8.0:1、7.0:1、6.0:1、5.0:1、4.0:1、3.0:1、2.0:1、1.5:1、1.3:1、1.1:1、0.9:1又は0.75:1未満から0.5:1未満までである。他の態様において、特に約0.9~約1.1である。他の態様において、32個以上の糖残基を有する多糖類を有するN, 2, 3, 6-HS生成物の抗Xa活性と抗IIa活性との比は、0.5:1から0.75:1、又は0.9:1、又は1:1、又は1.1:1、又は1.3:1、又は1.5:1、又は2.0:1、又は3.0:1、又は4.0:1、又は5.0:1、又は6.0:1、又は7.0:1、又は8.0:1、又は9.0:1、又は10.0:1までの範囲内である。他の態様において、32個以上の糖残基を有する多糖を有するN, 2, 3, 6-HS生成物の抗Xa活性と抗IIa活性との比は、0.75:1から0.9:

1、又は1：1、又は1．1：1、又は1．3：1、又は1．5：1、又は2．0：1、又は3．0：1、又は4．0：1、又は5．0：1、又は6．0：1、又は7．0：1、又は8．0：1、又は9．0：1、又は10．0：1までの範囲内である。他の態様において、32個以上の糖残基を有する多糖を有するN，2，3，6-HS生成物の抗Xa活性と抗IIa活性との比は、0．9：1から1：1、又は1．1：1、又は1．3：1、又は1．5：1、又は2．0：1、又は3．0：1、又は4．0：1、又は5．0：1、又は6．0：1、又は7．0：1、又は8．0：1、又は9．0：1、又は10．0：1までの範囲内である。他の態様において、32個以上の糖残基を有する多糖を有するN，2，3，6-HS生成物の抗Xa活性と抗IIa活性との比は、0．5：1以上10．0：1以下の上記の任意の範囲内である。いくつかの好ましい態様において、32個以上の糖残基を有する多糖を有するN，2，3，6-HS生成物の抗Xa活性と抗IIa活性との比は、0．9：1から1：1までの範囲内である。

【0293】

同様に、N，2，3，6-HS生成物混合物を有するあらゆる多糖混合物は、それらの重量平均分子量(Mw)を特徴とすることができる。動物供給源から単離されるか又はインビトロで合成される抗凝固性N，2，3，6-HS生成物は実質的にいずれも、異なる鎖長及び硫酸化度を有する多糖の多分散混合物として得られるため、数平均(すなわち、真の算術平均(Mn))ではなく重量平均として平均分子量を表すと、比較的大きな分子が抗凝固に及ぼす効果を説明するため、最も有利であることが多い。多糖混合物のMwは、光散乱法又は分析用超遠心を使用して実験的に測定することができる(その開示全体が参照により組み込まれるMulloy, B., et al., (2014) Anal. Bioanal. Chem. 406: 4815-4823を参照)。ただし、典型的にはサイズ排除クロマトグラフィーによってMnを決定することは、MwとMnとの比が、特定の多糖試料中の多分散性の量に関する貴重な洞察を提供することができるため、依然として有用とすることができる。

【0294】

特に、抗凝固剤として医学的に処方されるN，2，3，6-HS多糖類は一般に、それらの平均分子量、特にそれらのMwに基づいて複数のクラスに分けられる。低分子量抗凝固性N，2，3，6-HS多糖(LMW-HS)の試料は、典型的には、8，000Da未満のMwを有し、試料内の全多糖分子の60%超が8，000Da未満の実際の分子量を有する(その開示全体が参照により組み込まれるLinhardt, R. J. and Gunay, N. S., (1999) Seminars in Thrombosis and Hemostasis 25 (Suppl. 3): 5-16を参照)。LMW-HS多糖類は典型的には、インビボで産生され、動物供給源から単離された、「未分画」と呼ばれる比較的大きな抗凝固性N，2，3，6-HS多糖類を化学的又は酵素的に修飾することによって調製される。未分画抗凝固性N，2，3，6-HS多糖類(UF-HS)は典型的には、8，000Da超のMwを有する。UF-HS組成物は、医療処置に使用するのに承認されるために、満たされなければならない厳しい分子量ガイドラインを有する。すなわち、(1)組成物内の24，000Daを超える分子量を有する多糖の割合は20%以下である；(2)組成物自体のMwは、15，000Da～19，000Daである；(3)組成物内の8，000Da～16，000Daの分子量を有する多糖の数と、組成物内の16，000Da～24，000Daの分子量を有する多糖の数との比は、1．0：1以上である(上記のMulloy, B., et al.を参照)。

【0295】

したがって、他の態様において、本発明の方法に従って合成されるN，2，3，6-HS生成物は、複数のN，2，3，6-HS多糖類を含むことができ、抗凝固剤として医学的に処方されるUF-HS生成物と同一の1つ以上の分子量特性を有することができる。他の態様において、抗凝固性N，2，3，6-HS生成物は、少なくとも1，000Da、例えば、少なくとも2，000Da、3，000Da、4，000Da、5，000Da、6，000Da、7，000Da、8，000Da、9，000Da、10，000Da、11，000Da、12，000Da、13，000Da、14，000Da、15，000Da、16，000Da、17，000Da、18，000Da、19，000Da、20，000Da、21，000Da、22，000Da、23，000Da、24，000Da、25，000Da、26，000Da、27，000Da、28，000Da、29，000Da、30，000Da、31，000Da、32，000Da、33，000Da、34，000Da、35，000Da、36，000Da、37，000Da、38，000Da、39，000Da、40，000Da、41，000Da、42，000Da、43，000Da、44，000Da、45，000Da、46，000Da、47，000Da、48，000Da、49，000Da、50，000Da、51，000Da、52，000Da、53，000Da、54，000Da、55，000Da、56，000Da、57，000Da、58，000Da、59，000Da、60，000Da、61，000Da、62，000Da、63，000Da、64，000Da、65，000Da、66，000Da、67，000Da、68，000Da、69，000Da、70，000Da、71，000Da、72，000Da、73，000Da、74，000Da、75，000Da、76，000Da、77，000Da、78，000Da、79，000Da、80，000Da、81，000Da、82，000Da、83，000Da、84，000Da、85，000Da、86，000Da、87，000Da、88，000Da、89，000Da、90，000Da、91，000Da、92，000Da、93，000Da、94，000Da、95，000Da、96，000Da、97，000Da、98，000Da、99，000Da、100，000Da、101，000Da、102，000Da、103，000Da、104，000Da、105，000Da、106，000Da、107，000Da、108，000Da、109，000Da、110，000Da、111，000Da、112，000Da、113，000Da、114，000Da、115，000Da、116，000Da、117，000Da、118，000Da、119，000Da、120，000Da、121，000Da、122，000Da、123，000Da、124，000Da、125，000Da、126，000Da、127，000Da、128，000Da、129，000Da、130，000Da、131，000Da、132，000Da、133，000Da、134，000Da、135，000Da、136，000Da、137，000Da、138，000Da、139，000Da、140，000Da、141，000Da、142，000Da、143，000Da、144，000Da、145，000Da、146，000Da、147，000Da、148，000Da、149，000Da、150，000Da、151，000Da、152，000Da、153，000Da、154，000Da、155，000Da、156，000Da、157，000Da、158，000Da、159，000Da、160，000Da、161，000Da、162，000Da、163，000Da、164，000Da、165，000Da、166，000Da、167，000Da、168，000Da、169，000Da、170，000Da、171，000Da、172，000Da、173，000Da、174，000Da、175，000Da、176，000Da、177，000Da、178，000Da、179，000Da、180，000Da、181，000Da、182，000Da、183，000Da、184，000Da、185，000Da、186，000Da、187，000Da、188，000Da、189，000Da、190，000Da、191，000Da、192，000Da、193，000Da、194，000Da、195，000Da、196，000Da、197，000Da、198，000Da、199，000Da、200，000Da、201，000Da、202，000Da、203，000Da、204，000Da、205，000Da、206，000Da、207，000Da、208，000Da、209，000Da、210，000Da、211，000Da、212，000Da、213，000Da、214，000Da、215，000Da、216，000Da、217，000Da、218，000Da、219，000Da、220，000Da、221，000Da、222，000Da、223，000Da、224，000Da、225，000Da、226，000Da、227，000Da、228，000Da、229，000Da、230，000Da、231，000Da、232，000Da、233，000Da、234，000Da、235，000Da、236，000Da、237，000Da、238，000Da、239，000Da、240，000Da、241，000Da、242，000Da、243，000Da、244，000Da、245，000Da、246，000Da、247，000Da、248，000Da、249，000Da、250，000Da、251，000Da、252，000Da、253，000Da、254，000Da、255，000Da、256，000Da、257，000Da、258，000Da、259，000Da、260，000Da、261，000Da、262，000Da、263，000Da、264，000Da、265，000Da、266，000Da、267，000Da、268，000Da、269，000Da、270，000Da、271，000Da、272，000Da、273，000Da、274，000Da、275，000Da、276，000Da、277，000Da、278，000Da、279，000Da、280，000Da、281，000Da、282，000Da、283，000Da、284，000Da、285，000Da、286，000Da、287，000Da、288，000Da、289，000Da、290，000Da、291，000Da、292，000Da、293，000Da、294，000Da、295，000Da、296，000Da、297，000Da、298，000Da、299，000Da、300，000Da、301，000Da、302，000Da、303，000Da、304，000Da、305，000Da、306，000Da、307，000Da、308，000Da、309，000Da、310，000Da、311，000Da、312，000Da、313，000Da、314，000Da、315，000Da、316，000Da、317，000Da、318，000Da、319，000Da、320，000Da、321，000Da、322，000Da、323，000Da、324，000Da、325，000Da、326，000Da、327，000Da、328，000Da、329，000Da、330，000Da、331，000Da、332，000Da、333，000Da、334，000Da、335，000Da、336，000Da、337，000Da、338，000Da、339，000Da、340，000Da、341，000Da、342，000Da、343，000Da、344，000Da、345，000Da、346，000Da、347，000Da、348，000Da、349，000Da、350，000Da、351，000Da、352，000Da、353，000Da、354，000Da、355，000Da、356，000Da、357，000Da、358，000Da、359，000Da、360，000Da、361，000Da、362，000Da、363，000Da、364，000Da、365，000Da、366，000Da、367，000Da、368，000Da、369，000Da、370，000Da、371，000Da、372，000Da、373，000Da、374，000Da、375，000Da、376，000Da、377，000Da、378，000Da、379，000Da、380，000Da、381，000Da、382，000Da、383，000Da、384，000Da、385，000Da、386，000Da、387，000Da、388，000Da、389，000Da、390，000Da、391，000Da、392，000Da、393，000Da、394，000Da、395，000Da、396，000Da、397，000Da、398，000Da、399，000Da、400，000Da、401，000Da、402，000Da、403，000Da、404，000Da、405，000Da、406，000Da、407，000Da、408，000Da、409，000Da、410，000Da、411，000Da、412，000Da、413，000Da、414，000Da、415，000Da、416，000Da、417，000Da、418，000Da、419，000Da、420，000Da、421，000Da、422，000Da、423，000Da、424，000Da、425，000Da、426，000Da、427，000Da、428，000Da、429，000Da、430，000Da、431，000Da、432，000Da、433，000Da、434，000Da、435，000Da、436，000Da、437，000Da、438，000Da、439，000Da、440，000Da、441，000Da、442，000Da、443，000Da、444，000Da、445，000Da、446，000Da、447，000Da、448，000Da、449，000Da、450，000Da、451，000Da、452，000Da、453，000Da、454，000Da、455，000Da、456，000Da、457，000Da、458，000Da、459，000Da、460，000Da、461，000Da、462，000Da、463，000Da、464，000Da、465，000Da、466，000Da、467，000Da、468，000Da、469，000Da、470，000Da、471，000Da、472，000Da、473，000Da、474，000Da、475，000Da、476，000Da、477，000Da、478，000Da、479，000Da、480，000Da、481，000Da、482，000Da、483，000Da、484，000Da、485，000Da、486，000Da、487，000Da、488，000Da、489，000Da、490，000Da、491，000Da、492，000Da、493，000Da、494，000Da、495，000Da、496，000Da、497，000Da、498，000Da、499，000Da、500，000Da、501，000Da、502，000Da、503，000Da、504，000Da、505，000Da、506，000Da、507，000Da、508，000Da、509，000Da、510，000Da、511，000Da、512，000Da、513，000Da、514，000Da、515，000Da、516，000Da、517，000Da、518，000Da、519，000Da、520，000Da、521，000Da、522，000Da、523，000Da、524，000Da、525，000Da、526，000Da、527，000Da、528，000Da、529，000Da、530，000Da、531，000Da、532，000Da、533，000Da、534，000Da、535，000Da、536，000Da、537，000Da、538，000Da、539，000Da、540，000Da、541，000Da、542，000Da、543，000Da、544，000Da、545，000Da、546，000Da、547，000Da、548，000Da、549，000Da、550，000Da、551，000Da、552，000Da、553，000Da、554，000Da、555，000Da、556，000Da、557，000Da、558，000Da、559，000Da、560，000Da、561，000Da、562，000Da、563，000Da、564，000Da、565，000Da、566，000Da、567，000Da、568，000Da、569，000Da、570，000Da、571，000Da、572，000Da、573，000Da、574，000Da、575，000Da、576，000Da、577，000Da、578，000Da、579，000Da、580，000Da、581，000Da、582，000Da、583，000Da、584，000Da、585，000Da、586，000Da、587，000Da、588，000Da、589，000Da、590，000Da、591，000Da、592，000Da、593，000Da、594，000Da、595，000Da、596，000Da、597，000Da、598，000Da、599，000Da、600，000Da、601，000Da、602，000Da、603，000Da、604，000Da、605，000Da、606，000Da、607，000Da、608，000Da、609，000Da、610，000Da、611，000Da、612，000Da、613，000Da、614，000Da、615，000Da、616，000Da、617，000Da、618，000Da、619，000Da、620，000Da、621，000Da、622，000Da、623，000Da、624，000Da、625，000Da、626，000Da、627，000Da、628，000Da、629，000Da、630，000Da、631，000Da、632，000Da、633，000Da、634，000Da、635，000Da、636，000Da、637，000Da、638，000Da、639，000Da、640，000Da、641，000Da、642，000Da、643，000Da、644，000Da、645，000Da、646，000Da、647，000Da、648，000Da、649，000Da、650，000Da、651，000Da、652，000Da、653，000Da、654，000Da、655，000Da、656，000Da、657，000Da、658，000Da、659，000Da、660，000Da、661，000Da、662，000Da、663，000Da、664，000Da、665，000Da、666，000Da、667，000Da、668，000Da、669，000Da、670，000Da、671，000Da、672，000Da、673，000Da、674，000Da、675，000Da、676，000Da、677，000Da、678，000Da、679，000Da、680，000Da、681，000Da、682，000Da、683，000Da、684，000Da、685，000Da、686，000Da、687，000Da、688，000Da、689，000Da、690，000Da、691，000Da、692，000Da、693，000Da、694，000Da、695，000Da、696，000Da、697，000Da、698，000Da、699，000Da、700，000Da、701，000Da、702，000Da、703，000Da、704，000Da、705，000Da、706，000Da、707，000Da、708，000Da、709，000Da、710，000Da、711，000Da、712，000Da、713，000Da、714，000Da、715，000Da、716，000Da、717，000Da、718，000Da、719，000Da、720，000Da、721，000Da、722，000Da、723，000Da、724，000Da、725，000Da、726，000Da、727，000Da、728，000Da、729，000Da、730，000Da、731，000Da、732，000Da、733，000Da、734，000Da、735，000Da、736，000Da、737，000Da、738，000Da、739，000Da、740，000Da、741，000Da、742，000Da、743，000Da、744，000Da、745，000Da、746，000Da、747，000Da、748，000Da、749，000Da、750，000Da、751，000Da、752，000Da、753，000Da、754，000Da、755，000Da、756，000Da、757，000Da、758，000Da、759，000Da、760，000Da、761，000Da、762，000Da、763，000Da、764，000Da、765，000Da、766，000Da、767，000Da、768，000Da、769，000Da、770，000Da、771，000Da、772，000Da、773，000Da、774，000Da、775，000Da、776，000Da、777，000Da、778，000Da、779，000Da、780，000Da、781，000Da、782，000Da、783，000Da、784，000Da、785，000Da、786，000Da、787，000Da、788，000Da、789，000Da、790，000Da、791，000Da、792，000Da、793，000Da、794，000Da、795，000Da、796，000Da、797，000Da、798，000Da、799，000Da、800，000Da、801，000Da、802，000Da、803，000Da、804，000Da、805，000Da、806，000Da、807，000Da、808，000Da、809，000Da、810，000Da、811，000Da、812，000Da、813，000Da、814，000Da、815，000Da、816，000Da、817，000Da、818，000Da、819，000Da、820，000Da、821，000Da、822，000Da、823，000Da、824，000Da、825，000Da、826，000Da、827，000Da、828，000Da、829，000Da、830，000Da、831，000Da、832，000Da、833，000Da、834，000Da、835，000Da、836，000Da、837，000Da、838，000Da、839，000Da、840，000Da、841，000Da、842，000Da、843，000Da、844，000Da、845，000Da、846，000Da、847，000Da、848，000Da、849，000Da、850，000Da、851，000Da、852，000Da、853，000Da、854，000Da、855，000Da、856，000Da、857，000Da、858，000Da、859，000Da、860，000Da、861，000Da、862，000Da、863，000Da、864，000Da、865，000Da、866，000Da、867，000Da、868，000Da、869，000Da、870，000Da、871，000Da、872，000Da、873，000Da、874，000Da、875，000Da、876，000Da、877，000Da、878，000Da、879，000Da、880，000Da、881，000Da、882，000Da、883，000Da、884，000Da、885，000Da、886，000Da、887，000Da、888，000Da、889，000Da、890，000Da、891，000Da、892，000Da、893，000Da、894，000Da、895，000Da、896，000Da、897，000Da、898，000Da、899，000Da、900，000Da、901，000Da、902，000Da、903，000Da、904，000Da、905，000Da、906，000Da、907，000Da、908，000Da、909，000Da、910，000Da、911，000Da、912，000Da、913，000Da、914，000Da、915，000Da、916，000Da、917，000Da、918，000Da、919，000Da、920，000Da、921，000Da、922，000Da、923，000Da、924，000Da、925，000Da、926，000Da、927，000Da、928，000Da、929，000Da、930，000Da、931，000Da、932，000Da、933，000Da、934，000Da、935，000Da、936，000Da、937，000Da、938，000Da、939，000Da、940，000Da、941，000Da、942，000Da、943，000Da、944，000Da、945，000Da、946，000Da、947，000Da、948，000Da、949，000Da、950，000Da、951，000Da、952，000Da、953，000Da、954，000Da、955，000Da、956，000Da、957，000Da、958，000Da、959，000Da、960，000Da、961，000Da、962，000Da、963，000Da、964，000Da、965，000Da、966，000Da、967，000Da、968，000Da、969，000Da、970，000Da、971，000Da、972，000Da、973，000Da、974，000Da、975，000Da、976，000Da、977，000Da、978，000Da、979，000Da、980，000Da、981，000Da、982，000Da、983，000Da、984，000Da、985，000Da、986，000Da、987，000Da、988，000Da、989，000Da、990，000Da、991，000Da、992，000Da、993，000Da、994，000Da、995，000Da、996，000Da、997，000Da、998，000Da、999，000Da、1000，000Da、1001，000Da、1002，000Da、1003，000Da、1004，000Da、1005，000Da、1006，000Da、1007，000Da、1008，000Da、1009，000Da、1010，000Da、1011，000Da、1012，000Da、1013，000Da、1014，000Da、1015，000Da、1016，000Da、1017，000Da、1018，000Da、1019，000Da、1020，000Da、1021，000Da、1022，000Da、1023，000Da、1024，000Da、1025，000Da、1026，000Da、1027，000Da、1028，000Da、1029，000Da、1030，000Da、1031，000Da、1032，000Da、1033，000Da、1034，000Da、1035，000Da、1036，000Da、1037，000Da、1038，000Da、1039，000Da、1040，000Da、1041，000Da、1042，000Da、1043，000Da、1044，000Da、1045，000Da、1046，000Da、1047，000Da、1048，000Da、1049，000Da、1050，000Da、1051，000Da、1052，000Da、1053，000Da、1054，000Da、1055，000Da、1056，000Da、1057，000Da、1058，000Da、1059，000Da、1060，000Da、1061，000Da、1062，000Da、1063，000Da、1064，000Da、1065，000Da、1066，000Da、1067，000Da、1068，000Da、1069，000Da、1070，000Da、1071，000Da、1072，000Da、1073，000Da、1074，000Da、1075，000Da、1076，000Da、1077，000Da、1078，000Da、1079，000Da、1080，000Da、1081，000Da、1082，000Da、1083，000Da、1084，000Da、1085，000Da、1086，000Da、1087，000Da、1088，000Da、1089，000Da、1090，000Da、1091，000Da、1092，000Da、1093，000Da、1094，000Da、1095，000Da、1096，000Da、1097，000Da、1098，000Da、1099，000Da、1100，000Da、1101，000Da、1102，000Da、1103，000Da、1104，000Da、1105，000Da、1106，000Da、1107，000Da、1108，000Da、1109，000Da、1110，000Da、1111，000Da、1112，000Da、1113，000Da、1114，000Da、1115，000Da、1116，000Da、1117，000Da、1118，000Da、1119，000Da、1120，000Da、1121，000Da、1122，000Da、1123，000Da、1124，000Da、1125，000Da、1126，000Da、1127，000Da、1128，000Da、1129，000Da、1130，000Da、1131，000Da、1132，000Da、1133，000Da、1134，000Da、1135，000Da、1136，000Da、1137，000Da、1138，000Da、1139，000Da、1140，000Da、1141，000Da、1142，000Da、1143，000Da、1144，000Da、1145，000Da、1146，000Da、1147，000Da、1148，000Da、1149，000Da、1150，000Da、1151，000Da、1152，000Da、1153，000Da、1154，000Da、1155，000Da、1156，000Da、1157，000Da、1158，000Da、1159，000Da、1160，000Da、1161，000Da、1162，000Da、1163，000Da、1164，000Da、1165，000Da、1166，000Da、1167，000Da、1168，000Da、1169，000Da、1170，000Da、1171，000Da、1172，000Da、1173，000Da、1174，000Da、1175，000Da、1176，000Da、1177，000Da、1178，000Da、1179，000Da、1180，000Da、1181，000Da、1182，000Da、1183，000Da、1184，000Da、1185，000Da、1186，000Da、1187，000Da、1188，000Da、1189，000Da、1190，000Da、1191，000Da、1192，000Da、1193，000Da、1194，000Da、1195，000Da、1196，000Da、1197，000Da、1198，000Da、11

0 Da、20,000 Da、21,000 Da、22,000 Da、23,000 Da又は24,000 Daから少なくとも50,000 DaまでのMwを有する。他の態様において、抗凝固性N, 2, 3, 6-HS生成物は、50,000 Da未満、例えば、24,000 Da、23,000 Da、22,000 Da、21,000 Da、20,000 Da、19,000 Da、18,000 Da、17,000 Da、16,000 Da、15,000 Da、14,000 Da、13,000 Da、12,000 Da、11,000 Da、10,000 Da、9,000 Da、8,000 Da、7,000 Da、6,000 Da、5,000 Da、4,000 Da又は3,000 Da未満から2,000 Da未満までのMwを有する。他の態様において、抗凝固性N, 2, 3, 6-HS生成物は、1,000から2,000 Da、又は3,000 Da、又は4,000 Da、又は5,000 Da、又は6,000 Da、又は7,000 Da、又は8,000 Da、又は9,000 Da、又は10,000 Da、又は11,000 Da、又は12,000 Da、又は13,000 Da、又は14,000 Da、又は15,000 Da、又は16,000 Da、又は17,000 Da、又は18,000 Da、又は19,000 Da、又は20,000 Da、又は21,000 Da、22,000 Da、又は23,000 Da、又は24,000 Daまでの範囲のMwを有する。他の態様において、抗凝固性N, 2, 3, 6-HS生成物は、2,000 Daから3,000 Da、又は4,000 Da、又は5,000 Da、又は6,000 Da、又は7,000 Da、又は8,000 Da、又は9,000 Da、又は10,000 Da、又は11,000 Da、又は12,000 Da、又は13,000 Da、又は14,000 Da、又は15,000 Da、又は16,000 Da、又は17,000 Da、又は18,000 Da、又は19,000 Da、又は20,000 Da、又は21,000 Da、22,000 Da、又は23,000 Da、又は24,000 Daまでの範囲のMwを有する。他の態様において、抗凝固性N, 2, 3, 6-HS生成物は、未分画N, 2, 3, 6-HS生成物である。他の態様において、未分画抗凝固性N, 2, 3, 6-HS生成物は、8,000 Daから9,000 Da、又は10,000 Da、又は11,000 Da、又は12,000 Da、又は13,000 Da、又は14,000 Da、又は15,000 Da、又は16,000 Da、又は17,000 Da、又は18,000 Da、又は19,000 Da、又は20,000 Da、又は21,000 Da、22,000 Da、又は23,000 Da、又は24,000 Daまでの範囲のMwを有する。他の態様において、抗凝固性N, 2, 3, 6-HS生成物は、LMW-HS生成物である。他の態様において、抗凝固性LMW-HS生成物は、2,000 Daから3,000 Da、又は4,000 Da、又は5,000 Da、又は6,000 Da、又は7,000 Da、又は8,000 Daまでの範囲のMwを有する。他の態様において、抗凝固性N, 2, 3, 6-HS生成物は、15,000 Daから16,000 Da、又は17,000 Da、又は18,000 Da、又は19,000 Daまでの範囲のMwを有する。他の態様において、抗凝固性N, 2, 3, 6-HS生成物は、1,000 Da以上24,000 Da以下の上記の任意の範囲、好ましくは15,000 Da以上約19,000 Da以下の上記の任意の範囲のMwを有することができる。

【0296】

他の態様において、N, 2, 3, 6-HS生成物内の50%未満、例えば45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、3%又は2%未満から1%未満までのN, 2, 3, 6-HS多糖類は、24,000 Daを超える分子量を有する。いくつかの好ましい態様において、N, 2, 3, 6-HS生成物内の20%以下のN, 2, 3, 6-HS多糖類は24,000 Daを超える分子量を有する。他の態様において、N, 2, 3, 6-HS生成物内の20%以下のN, 2, 3, 6-HS多糖類が24,000 Daを超える分子量を有する場合、抗凝固性N, 2, 3, 6-HS生成物は、1,000 Da以上24,000 Da以下の上記の任意の範囲、好ましくは15,000 Da以上約19,000 Da以下の上記の任意の範囲のMwを有することができる。

【0297】

他の態様において、N, 2, 3, 6-HS生成物内の8,000 Da~16,000 D 50

a の分子量を有する N , 2 , 3 , 6 - H S 多糖類の相対量は、同じ N , 2 , 3 , 6 - H S 生成物内の 16 , 000 Da ~ 24 , 000 Da の分子量を有する N , 2 , 3 , 6 - H S 多糖類の相対量との比として比較することができる。他の態様において、組成物内の 8 , 000 Da ~ 16 , 000 Da の分子量を有する多糖類の数と、組成物内の 16 , 000 Da ~ 24 , 000 Da の分子量を有する多糖類の数との比は、0.5 : 1 以上、例えば、0.75 : 1、0.9 : 1、1.0 : 1、1.1 : 1、1.3 : 1 又は 1.5 : 1 以上から 2.0 : 1 以上まで、好ましくは 1.0 : 1 以上である。他の態様において、組成物内の 8 , 000 Da ~ 16 , 000 Da の分子量を有する多糖類の数と、組成物内の 16 , 000 Da ~ 24 , 000 Da の分子量を有する多糖類の数との比が 1.0 : 1 以上である N , 2 , 3 , 6 - H S 生成物はまた、1 , 000 Da 以上 24 , 000 Da 以下の上記の任意の範囲、好ましくは 15 , 000 Da 以上約 19 , 000 Da 以下の上記の任意の範囲の Mw を有することができ、N , 2 , 3 , 6 - H S 生成物内の 20 % 以下の N , 2 , 3 , 6 - H S 多糖類は、24 , 000 Da を超える分子量を有する。

【0298】

他の態様において、本発明の方法のいずれかによって調製される抗凝固性 N , 2 , 3 , 6 - H S 生成物は、抗凝固活性及び分子量特性を含む、医薬 UF - H S 組成物について米国薬局方 (USP) によって決定された基準要件のいずれかを満たすことができる。他の態様において、抗凝固性 N , 2 , 3 , 6 - H S 生成物は、180 IU mg⁻¹ 以上の抗 I I a 活性；180 IU mg⁻¹ 以上の抗 X a 活性；0.9 : 1 から 1.1 : 1 まで、好ましくは 1 : 1 の範囲の抗 X a 活性と抗 I I a 活性との比；15 , 000 Da から 19 , 000 Da までの範囲の Mw；24 , 000 Da を超える分子量を有する 20 % 以下の多糖；及び組成物内の 8 , 000 Da ~ 16 , 000 Da の分子量を有する多糖類と、組成物内の 16 , 000 Da ~ 24 , 000 Da の分子量を有する多糖類の数の比が 1.0 : 1 以上であること；(それらの任意の組合せを含む) からなる群から選択される特性のいずれかを有することができる。他の態様において、本発明の方法のいずれかによって調製される抗凝固性 N , 2 , 3 , 6 - H S 生成物は、以下の抗凝固活性及び分子量特性、すなわち、180 IU mg⁻¹ 以上の抗 I I a 活性；180 IU mg⁻¹ 以上の抗 X a 活性；0.9 : 1 から 1.1 : 1 まで、好ましくは 1 : 1 の範囲の抗 X a 活性と抗 I I a 活性との比；15 , 000 Da から 19 , 000 Da までの範囲の Mw；24 , 000 Da を超える分子量を有する 20 % 以下の多糖類；及び組成物内の 8 , 000 Da ~ 16 , 000 Da の分子量を有する多糖類と、組成物内の 16 , 000 Da ~ 24 , 000 Da の分子量を有する多糖類の数の比が 1.0 : 1 以上であること；のすべてを有することができる。他の態様において、本発明の方法のいずれかによって調製される抗凝固性 N , 2 , 3 , 6 - H S 生成物は、広く市販されている USP 参照標準 (CAS 番号：9041-08-1) と比較して実質的に同等の抗凝固活性及び分子量特性を有する。

【0299】

他の態様において、抗凝固性 N , 2 , 3 , 6 - H S 生成物は、生成物純度、限定するものではないが、コンドロイチン硫酸を含む他の硫酸化多糖類からの純度に関して、医薬 UF - H S 組成物について USP によって決定された基準要件を満たすことができる。特に、過硫酸化コンドロイチン硫酸 (OSCS) は、2007 年及び 2008 年に世界中で数百人の死を引き起こした医薬 UF - H S 組成物内の汚染源であると判定された。他の態様において、特定の理論に制限されるものではないが、本発明の方法のいずれかによって形成される N , 2 , 3 , 6 - H S 生成物の調製物は、コンドロイチン硫酸、特に OSCS を実質的に含まずに調製することができるが、これは、商業的に得ることができるか、又は細菌から単離されたヘパロサンを修飾した後に得ることができる (以下にさらに詳述する) N - 脱アセチル化ヘパロサン出発材料自体がコンドロイチン硫酸を実質的に含まないと考えられるためである。

【0300】

他の態様において、USP 分子量基準のいずれかを満たす抗凝固性 N , 2 , 3 , 6 - H S 生成物に到達するために、スルホ基受容体として利用される多糖類のいずれかの分子量

を制御することができる。非限定的な例、かつ他の態様において、分子量特性の目標セットに達するまでヘパロサンを化学的に修飾することによって、出発材料として使用されるヘパロサン系多糖類の分子量特性を制御することができる。後述するように、ヘパロサン及び他のヘパロサン系多糖類は、商業的供給源から得ることができるか、細菌供給源又は真核生物供給源から単離することができる。

【0301】

特に、ヘパロサン系多糖類は、いくつかの形態の生命体に見出され、いくつかの異なる機能を有する。真核生物では、それらは、インビボでのHS生成物及びUF-HS生成物の形成時にスルホ受容体及び/又は前駆体として作用する。ヘパロサン及びヘパロサン系多糖類はまた、代謝産物及び他の外因性物質による細胞侵入を調節するカプセルとして細菌内に見出すことができる。そのような細菌には、限定するものではないが、パストレラ・ムルトシダ (*Pasteurella multocida*) 及び大腸菌 (*E. coli*) が含まれる。いくつかの態様において、ヘパロサンは、様々な分子量を有する多糖分子の多分散混合物として、大腸菌、特に大腸菌のK5株から抽出及び精製することができる。大腸菌のK5株からヘパロサンを単離するための手順は、その開示全体が参照により組み込まれるWang, Z., et al., (2010) *Biotechnol. Bioeng.* 107 (6): 964-973に説明され、提供されている。同じくその開示全体が組み込まれるDeAngelis, P. L. (2015) *Expert Opinion on Drug Delivery* 12 (3): 349-352; Ly, M., et al., (2010) *Anal. Bioanal. Chem.* 399: 737-745; 及びZhang, C., et al., (2012) *Metabolic Engineering* 14: 521-527も参照のこと。しかし、大腸菌を含む細菌から単離されたヘパロサンは実質的にいずれもN-アセチル化されているため、本明細書に記載され、本発明の方法に従って利用されるスルホトランスフェラーゼのいずれかのスルホ受容体として直接使用することはできない。結果として、ヘパロサンは、スルホ基受容体として利用することができる前に、少なくとも部分的にN-脱アセチル化されなければならない。

【0302】

結果として、及び他の態様において、ヘパロサンは、塩基、特に水酸化リチウム又は水酸化ナトリウムで処理することによって、少なくとも部分的にN-脱アセチル化することができる (Wang, Z., et al., (2011) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91 (1): 91-99 (この開示はその全体が参照により組み込まれる) 参照; さらに、PCT公開第PCT/US2012/026081号 (この開示はその全体が参照により組み込まれる) も参照)。他の態様において、塩基は、水酸化ナトリウムである。所望のN-脱アセチル化の程度、ヘパロサンの濃度、及び塩基の濃度に応じて、当業者は、上記Wang, et al., (2011)に記載される手順に従って、ヘパロサンを塩基とどのくらい長くインキュベートするかを決定することができる。

【0303】

他の態様において、所望量のN-アセチル化グルコサミン残基がN-脱アセチル化生成物内に残るまで、ヘパロサンを、塩基、好ましくは水酸化ナトリウムとインキュベートすることができる。他の態様において、N-アセチルグルコサミン残基は、N-脱アセチル化ヘパロサン生成物内のグルコサミン残基の30%未満、20%未満、18%未満、16%未満、14%未満、12%未満、又は10%未満を含む60%未満と、最低で5%未満まで、好ましくは12%~最大18%までの範囲のグルコサミン残基を有することができる。他の態様において、N-アセチルグルコサミンは、N-脱アセチル化ヘパロサン生成物内にグルコサミン残基の約15%を有することができる。

【0304】

さらに、特定の理論に制限されるものではないが、N-脱アセチル化グルコサミン残基に加えて、ヘパロサンと塩基との間の反応は、ヘパロサン多糖類を同時に解重合し、それらの分子量を減少させることができ、これによりN-脱アセチル化ヘパロサン組成物のMwを減少させることができると考えられる。典型的には、大腸菌を含むがこれに限定されない細菌から単離したヘパロサン多糖類は、約3,000 Da~約150,000 Daの範囲の分子量を有し、単離したヘパロサンの組成物は、約25,000 Daから約50,000 Daの範囲の分子量を有する。

000Daまでの範囲のMwを有することができる(上記のLy, M., et al. and Wang, et al., (2011)を参照)。他の態様において、その出発Mw及び全体的な分子量特性とは無関係に、商業的供給源から得られるか、又は大腸菌を含むがこれに限定されない細菌から単離したヘパロサン組成物は、N-脱アセチル化ヘパロサン生成物Mwを標的レベル又は所望のレベルまで減少させるのに十分な時間、塩基、好ましくは水酸化ナトリウムを用いて処理することができる。他の態様において、解重合されたN-脱アセチル化ヘパロサン生成物は、少なくとも1,000Da、例えば、少なくとも2,000Da、4,000Da、6,000Da、7,000Da、8,000Da、8,500Da、9,000Da、9,500Da、10,000Da、10,500Da、11,000Da、11,500Da、12,000Da、12,500Da、13,000Da、13,500Da、14,000Da、15,000Da、16,000Da又は18,000Daから少なくとも20,000DaまでのMwを有する。他の態様において、解重合されたN-脱アセチル化ヘパロサン生成物は、20,000Da未満、例えば、18,000Da、16,000Da、15,000Da、14,000Da、13,500Da、13,000Da、12,500Da、12,000Da、11,500Da、11,000Da、10,500Da、10,000Da、9,500Da、9,000Da、8,500Da、8,000Da、7,000Da、6,000Da又は4,000Da未満から2,000Da未満までのMwを有する。他の態様において、解重合されたN-脱アセチル化ヘパロサン生成物は、1,000から2,000Da、又は4,000Da、又は6,000Da、又は7,000Da、又は8,000Da、又は8,500Da、又は9,000Da、又は9,500Da、又は10,000Da、又は10,500Da、又は11,000Da、又は11,500Da、又は12,000Da、又は12,500Da、又は13,000Da、又は13,500Da、又は14,000Da、又は15,000Da、又は16,000Da、又は18,000Da、又は20,000Daまでの範囲のMwを有する。他の態様において、抗凝固性N,2,3,6-HS生成物は、7,000Daから8,000Da、又は8,500Da、又は9,000Da、又は9,500Da、又は10,000Da、又は10,500Da、又は11,000Da、又は11,500Da、又は12,000Da、又は12,500Da、又は13,000Da、又は13,500Da、又は14,000Da、又は15,000Daまでの範囲のMwを有する。他の態様において、解重合されたN-脱アセチル化ヘパロサン生成物は、9,000Daから9,500Da、又は10,000Da、又は10,500Da、又は11,000Da、又は11,500Da、又は12,000Da、又は12,500Daまでの範囲のMwを有する。他の態様において、解重合されたN-脱アセチル化ヘパロサン生成物は、1,000Da以上20,000Da以下の上記の任意の範囲、好ましくは9,000Da以上12,500Da以下の上記の任意の範囲のMwを有することができる。

【0305】

他の態様において、ヘパロサン組成物は、N-脱アセチル化ヘパロサン生成物のMwを標的レベル又は所望のレベルまで減少させ、N-脱アセチル化ヘパロサン生成物内にN-アセチル化されたままである所望の量のグルコサミン残基を得るのに十分な時間、塩基、好ましくは水酸化ナトリウムを用いて処理することができる。他の態様において、N-脱アセチル化ヘパロサン生成物は、N-脱アセチル化ヘパロサン生成物内にN-アセチルグルコサミン残基として存在する60%未満のグルコサミン残基を有すると同時に、1,000Da以上20,000Da以下の上記の任意の範囲のMwを有することができる。他の態様において、N-脱アセチル化ヘパロサン生成物は、9,000Da以上12,500Da以下の上記の任意の範囲のMwを有することができ、N-脱アセチル化ヘパロサン生成物内の12%から18%までのグルコサミン残基はN-アセチル化されている。このような分子量特性及びN-アセチル含有量を有するN-脱アセチル化ヘパロサンの調製は、上記のWang, et al., (2011)に詳述されている。他の態様において、ヘパロサンを塩基、好ましくは水酸化ナトリウムと反応させて、9,000Da~12,500Daの

範囲の Mw と、12% から 18% までの範囲の N - アセチルグルコサミン含有量とを有する N - 脱アセチル化ヘパロサン生成物を形成するのに十分な時間は、ヘパロサン出発材料の分子量特性及び濃度、並びに反応を行うために使用される塩基の同一性及び濃度に応じて、少なくとも 1 時間、例えば、少なくとも 2、4、6、8、10、12 又は 18 時間から少なくとも 24 時間までとすることができる。

【0306】

他の態様において、上記の Wang, et al., (2011) に記載の手順に従って、塩基、特に水酸化ナトリウムを用いてヘパロサンを処理することによって調製された N - 脱アセチル化ヘパロサン組成物は、本明細書に記載の硫酸化多糖を形成する方法のいずれかにおける出発材料として利用することができる。そのため、他の態様において、N - 脱アセチル化ヘパロサンを有する出発多糖反応混合物を提供する方法は、以下のサブ工程、(a) ヘパロサンを有する前駆体多糖組成物を提供するサブ工程；及び (b) ヘパロサン内の N - アセチル化グルコサミン残基のうちの少なくとも 1 つを N - 脱アセチル化するのに十分な時間、前駆体多糖組成物を、塩基、好ましくは水酸化リチウム又は水酸化ナトリウムを有する反応混合物と組み合わせ、N - 脱アセチル化ヘパロサン組成物を形成するサブ工程を有する。他の態様において、N - 脱アセチル化ヘパロサン組成物は、9,000 Da ~ 12,500 Da の範囲の Mw と、12% から 18% までの範囲の N - アセチルグルコサミン含有量とを有する。

10

【0307】

他の態様において、N - 硫酸化剤を有する反応混合物内で N - 脱アセチル化ヘパロサンを反応させて、N - 硫酸化多糖を形成することができる。上記のように、他の態様において、N - 硫酸化剤は、上記の野生型又は改変型グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ酵素のいずれかを有することができる。他の態様において、N - 硫酸化剤が野生型グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼである場合、反応混合物は、スルホ基供与体として 3' - ホスホアデノシン 5' - ホスホ硫酸を有することもできる。他の態様において、N - 硫酸化剤が改変型グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼである場合、反応混合物は、スルホ基供与体として、アリアル硫酸化合物、好ましくは P N S 又は N C S を有することもできる。

20

【0308】

他の態様において、N - 脱アセチル化ヘパロサンは、酵素的に N - 硫酸化されるのではなく、化学的に N - 硫酸化することができる。他の態様において、N - 硫酸化剤は化学剤、好ましくは三酸化硫黄及び / 又は 1 つ以上の三酸化硫黄含有化合物又は付加物である。三酸化硫黄を使用する多糖類内のグルコサミン残基の化学的 N - 硫酸化は、当技術分野で一般的に知られている (上記の Lloyd, A. G., et al., (1971) Biochem. Pharmacol. 20 (3): 637-648; Nadkarni, V. D., et al., (1996) Carbohydrate Research 290: 87-96; Kuberan, B., et al., (2003) J. Biol. Chem. 278 (52): 52613-52621; Zhang, Z., et al., (2008) J. Am. Chem. Soc. 130 (39): 12998-13007; 及び Wang, et al., (2011) を参照；また、その開示全体が参照により組み込まれる米国特許第 6,991,183 号及び米国特許公開第 2008/020789 号を参照)。三酸化硫黄錯体は一般に、水酸化ナトリウムとは異なり、解重合を引き起こすことなく多糖類の選択された N - 硫酸化を可能にするのに十分に穏やかな塩基である (Gilbert, E. E., (1962) Chem. Rev. 62 (6): 549-589 を参照)。三酸化硫黄含有錯体の非限定的な例には、二酸化硫黄 - ピリジン、二酸化硫黄 - ジオキサン、二酸化硫黄 - トリメチルアミン、二酸化硫黄 - トリエチルアミン、二酸化硫黄 - ジメチルアニリン、二酸化硫黄 - チオキサン、二酸化硫黄 - ビス (2 - クロロエチル) エーテル、二酸化硫黄 - 2 - メチルピリジン、二酸化硫黄 - キノリン又は二酸化硫黄 - ジメチルホルムアミドが挙げられる。他の態様において、N - 硫酸化剤は、三酸化硫黄 - トリメチルアミン付加物及び三酸化硫黄 - ピリジン付加物からなる群から選択される三酸化硫黄含有付加物を有する。他の態様において、N - 硫酸化剤は三酸化硫黄 - トリメチルアミン付加物を有する。

30

40

【0309】

50

他の態様において、N - 硫酸化、特に化学的 N - 硫酸化は、N - - 脱アセチル化ヘパロサンに関して、第 1 の硫酸化工程を有することができる。続いて、N - 脱アセチル化ヘパロサンを酵素的又は化学的に N - 硫酸化した後、次いで、ヘキサロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼ、グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ及びグルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼを使用して、N - 硫酸化ヘパロサンをさらに硫酸化することができる。N , 2 , 3 , 6 - H S 生成物が形成される態様において、酵素的硫酸化工程は、2 - O、6 - O 及び 3 - O 硫酸化の順序で行われる。上記のように、グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素、好ましくはあらゆるスルホトランスフェラーゼ酵素は、改変型アリール硫酸依存性スルホトランスフェラーゼ酵素であり、反応は 3' - ホスホアデノシン 5' - ホスホ硫酸の非存在下で行われる。他の態様において、ヘキサロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼ酵素を有する反応混合物は、グルクロニル C₅ - エピメラーゼ酵素、好ましくは配列番号 29 のアミノ酸配列を有するグルクロニル C₅ - エピメラーゼ酵素、さらに好ましくは配列番号 29 の残基 34 ~ 617 のアミノ酸配列を有するグルクロニル C₅ - エピメラーゼ酵素をさらに有する。他の態様において、N , 2 , 3 , 6 - H S 生成物は抗凝固活性を有する。他の態様において、N , 2 , 3 , 6 - H S 生成物は、式 I の構造を有する A T 認識配列を有する。

10

【0310】

他の態様において、上記の N , 2 , 3 , 6 - H S 生成物を形成するための方法のいずれも連続的に行うことができ、各硫酸化多糖生成物は、単離及び精製した後、後続の工程で別のスルホトランスフェラーゼを用いて処理することができる。他の態様において、工程のうちの少なくとも 2 つが単一のポット内で行うことができ、硫酸化多糖生成物は、そのポットから単離及び精製した後、後続のスルホ転移工程で利用することができる。他の態様において、単一のポット内で行うことができるスルホ転移反応の 1 つの非限定的な組合せは、N - 硫酸化工程及び 2 - O 硫酸化工程を有し、その後、N , 2 - H S 生成物は、グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼと反応する前に単離及び精製する。特定の理論に制限されるものではないが、N - 硫酸化 H S 生成物は、ヘキサロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼ酵素のためのスルホ受容体として直接利用することができるか、及び/又は反応混合物は、式 I V 及び式 V の構造を有する多糖類間の変換を触媒するために上記のグルクロニル C₅ - エピメラーゼ酵素のいずれかを有することができる。ただし、なおさらなる態様において、4 つ全部の硫酸化反応のための反応混合物及び酵素、並びに少なくともヘキサロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼ、グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ及びグルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼを含む、スルホトランスフェラーゼ反応の任意の組合せのための反応混合物及び酵素は、単一のポット内で組み合わせることができる。

20

30

【0311】

他の態様において、上記の N , 2 , 3 , 6 - H S 生成物を形成する方法のいずれかにおいて、改変型スルホトランスフェラーゼ及びスルホ基供与体としてのアリール硫酸化合物を有する反応混合物のいずれも、アリール硫酸化合物を再配置するための 1 つ以上の反応成分をさらに有することができる。他の態様において、1 つ以上の反応成分は、アリールスルホトランスフェラーゼ (A S S T) 酵素及び第二級アリール硫酸化合物を有する。自然界では、アリールスルホトランスフェラーゼ酵素は、芳香族化合物の硫酸化を触媒して、アリール硫酸化合物を形成することができる。典型的には、スルホ供与体自体がアリール硫酸化合物である。A S S T 酵素の反応性は一般に、例えば、その開示全体が参照により組み込まれる上記の米国特許第 6,225,088 号及び米国特許第 8,771,995 号並びに Malojcic, et al. に記載されている。特定の理論に制限されるものではないが、改変型スルホトランスフェラーゼを有する反応混合物内に A S S T 及び第二級アリール硫酸化合物をさらに含めることは、脱硫酸化芳香族生成物による改変型スルホトランスフェラーゼの潜在的な競合阻害を減少させるとともに、スルホ基供与体を有する反応混合物を再配置するという利点を有することができると考えられる。

40

【0312】

50

他の態様において、第二級アリール硫酸化合物は、上記のものを含む任意のアリール硫酸化合物とすることができる。他の態様において、第二級アリール硫酸化合物は、改変型スルホトランスフェラーゼ酵素のためのスルホ基供与体として使用されるのと同じアリール硫酸化合物である。他の態様において、第二級アリール硫酸化合物は、改変型スルホトランスフェラーゼ酵素のためのスルホ基供与体として使用されるものとは異なるアリール硫酸化合物である。非限定的な例として、他の態様において、改変型スルホトランスフェラーゼがスルホ基供与体としての N C S との生物学的活性を有する場合、第二級アリール硫酸化合物は P N S である。別の非限定的な例、かつ他の態様において、改変型スルホトランスフェラーゼがスルホ基供与体としての P N S と生物学的活性を有する場合、第二級アリール硫酸化合物は N C S である。

10

【 0 3 1 3 】

他の態様において、スルホ供与体アリール硫酸化合物を再配置するために上記の方法のいずれかと併せて利用される A S S T 酵素は、インビボ供給源から単離されるか、又はインビトロで組換え的に生成され、スルホ基をアリール硫酸化合物から芳香族化合物に転移させる任意の細菌酵素とすることができる。他の態様において、かつ非限定的な一例では、A S S T は、大腸菌、好ましくは大腸菌株 C F T 0 7 3 由来の、配列番号 5 5 のアミノ酸配列を有する組換え A S S T である。他の態様において、A S S T 酵素、好ましくは配列番号 5 5 のアミノ酸配列を有する A S S T 酵素は、上記の改変型スルホトランスフェラーゼのいずれかにカップリングされると、第二級アリール硫酸化合物から、改変型スルホトランスフェラーゼによって形成された脱硫酸化芳香族化合物に硫酸基を転移させることができる。特定の理論に制限されるものではないが、A S S T を利用することにより、脱硫酸化芳香族化合物による潜在的な生成物阻害を低減することができるほか、H S 多糖又はヘパロサン系多糖へのその後のスルホ転移反応のためにスルホ基供与体を再生することもできると考えられる。

20

【 0 3 1 4 】

他の態様において、また特定の理論に制限されるものではないが、改変型スルホトランスフェラーゼ触媒反応を A S S T とカップリングさせることにより、非硫酸化芳香族化合物からアリール硫酸スルホ供与体を直接生成するという追加の利点を提供することができると考えられる。改変型スルホトランスフェラーゼによって触媒される特定の反応のための反応混合物は、反応混合物に改変型スルホトランスフェラーゼを加える前又はそれと同時に、非硫酸化芳香族化合物を A S S T 及び第二級アリール硫酸化合物と組み合わせるように配合することができる。非限定的な例、かつ他の態様において、改変型スルホトランスフェラーゼ酵素によって触媒されるスルホ転移反応は、改変型スルホトランスフェラーゼ及び多糖スルホ基受容体と同じ反応混合物中で非硫酸化芳香族化合物、アリール硫酸化合物及び A S S T を組み合わせることによって開始することができる。A S S T、アリール硫酸化合物及び非硫酸化芳香族化合物の間の反応は、スルホ供与体アリール硫酸化合物を生成することができ、次いで、これを改変型スルホトランスフェラーゼ酵素と反応させて硫酸基を多糖に転移させることができる。他の態様において、A S S T 酵素との反応によって生成されるアリール硫酸化合物は、A S S T 自体と反応するアリール硫酸化合物とは異なる化合物である。非限定的な例では、非硫酸化芳香族化合物は N C S であり、A S S T と反応するアリール硫酸化合物は P N S である。N C S は P N S と A S S T との間の反応によって形成されるため、次いで、改変型スルホトランスフェラーゼを使用して、スルホ基を N C S から多糖に転移させることができる。

30

40

【 0 3 1 5 】

N , 2 , 3 , 6 - H S 生成物の合成後処理

上記のように、抗凝固剤として医療現場で処方される U F - H S 生成物は一般に、厳密に規制された一連の分子量及び活性要件に準拠するが、L M W - H S 生成物は、典型的には 8 , 0 0 0 D a 未満の平均分子量を有し、試料内の全多糖分子の 6 0 % 超が 8 , 0 0 0 D a 未満の実際の分子量を有する (上記の Linhardt, R. J. and Gunay, N. S. を参照) 。さらに、抗凝固剤として処方される L M W - H S 生成物は、それ自体、独自の規制さ

50

れた一連の分子量及び活性要件を有し、一般に抗凝固性UF-HS医薬組成物から調製される。したがって、他の態様において、上記の方法のいずれかによって生成されたN, 2, 3, 6-HS生成物は、当技術分野における任意の周知の手段を使用して、LMW-HS生成物を生成するために利用することができる。他の態様において、上記の方法のいずれかによって生成され、LMW-HS生成物の合成に利用されるN, 2, 3, 6-HS生成物は、抗凝固活性を有する。他の態様においては、上記の方法のいずれかによって生成され、LMW-HS生成物の合成に利用されるN, 2, 3, 6-HS生成物は、医薬UF-HSと同一の分子量及び/又は抗凝固活性特性を有する。他の態様において、上記の方法のいずれかによって生成されたN, 2, 3, 6-HS生成物から合成されたLMW-HS生成物も抗凝固活性を有する。N, 2, 3, 6-HS生成物からLMW-HS生成物を合成するための非限定的な例示的方法は、以下にさらに詳述する。 10

【0316】

非限定的な一例、かつ他の態様において、低分子量、特に15,000Da未満、例えば、14,000Da、13,000Da、12,000Da、11,000Da、10,000Da、9,000Da、8,000Da、7,000Da、6,000Da、5,000Da、4,000Da又は3,000Da未満から2,000Da未満までの分子量を有するN, 2, 3, 6-HS生成物混合物内のN, 2, 3, 6-HS多糖類は、同じ混合物内の他のN, 2, 3, 6-HS多糖類から分離することができる。他の態様において、N, 2, 3, 6-HS生成物混合物内のN, 2, 3, 6-HS多糖類は、ゲル電気泳動を使用する電気泳動移動度によって分離することができる。他の態様において、N, 2, 3, 6-HS生成物混合物内のN, 2, 3, 6-HS多糖類は、サイズ排除クロマトグラフィーによって分離することができる。他の態様において、N, 2, 3, 6-HS生成物混合物内のN, 2, 3, 6-HS多糖類は、バリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩、ストロンチウム塩、銅塩、ニッケル塩、カドミウム塩、亜鉛塩、水銀塩、ベリリウム塩、パラジウム塩、白金塩、鉄塩及びスズ塩を挙げることができるがこれらに限定されない二価カチオン及び弱アニオンの塩を用いた沈殿によって分離することができる。他の態様において、多糖類は、非限定的な例として、15,000Da未満のあらゆるそのようなN, 2, 3, 6-HS多糖類を15,000Daを超えるものから分離することによって高分子量多糖類からバルクで分離することができる。他の態様において、多糖類は、別の非限定的な例として、10,000Da~15,000Da、5,000Da~10,000Da、及び5,000Da未満のあらゆるN, 2, 3, 6-HS多糖類などの1つ以上の画分に分離することができる。 20 30

【0317】

他の態様において、8,000Da未満の平均分子量を有するN, 2, 3, 6-HS多糖生成物混合物が、LMW-HS生成物として直接利用することができる。他の態様において、8,000Da未満の平均分子量を有するN, 2, 3, 6-HS多糖生成物混合物を他のグリコサミノグリカン(GAG)と組み合わせて、HS-GAG混合物を形成することができる。上記の方法のいくつか、特に、ヘパロサン出発材料を大腸菌から単離及び精製する方法の利点には、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸及び他の硫酸化GAGを含まないN, 2, 3, 6-HS生成物を合成する能力が含まれるが、コンドロイチン硫酸及び/又はデルマタン硫酸を有するいくつかの高度に精製されたHS-GAG混合物は、UF-HSと同程度の抗凝固活性を有しないとしても、UF-HSと比較して有益な薬理学的特性を有するため、過去に患者に首尾よく処方されてきた。医学的に処方されているHS-GAG混合物の非限定的な例には、スロデキシド(CAS番号: 57821-29-1)及びダナパロイド(CAS番号: 308068-55-5)が挙げられる。他の態様において、本発明の方法のいずれかによって合成された抗凝固性N, 2, 3, 6-HS生成物と1つ以上のGAGとの間に形成されたHS-GAG混合物は、抗凝固活性を有することができる。 40

【0318】

従来、スロデキシドは、ブタの腸粘膜から抽出されてきたが(参照によりその全体が本 50

明細書に組み込まれる米国特許第3,936,351号を参照)、デルマタン硫酸(CAS番号: 24967-94-0)を、塩沈殿(Volpi, N., (1993) Carbohydr. Res. 247: 263-278を参照)を使用してUF-HSから分離することができる「高速移動」HS画分、特にバリウム塩と組み合わせることによっても調製することができる。非限定的な例として、高速移動HS画分(FM-HS)は、UF-HSの塩沈殿時にも形成される比較的重い「低速移動」HS(SM-HS)と比較したそれらの電気泳動移動度に基づいて「高速移動」と考えられ、超遠心分離を使用してSM-HSから精製することができる。さらに、FM-HS画分は、約8,000の高速サイズ排除クロマトグラフィー(HPSEC)によって決定されるように、UF-HSと比較して抗凝固活性及び全体的な硫酸化、並びに相対分子量 M_r が低下している(上記のVolpi, N.を参照)。ただし、FM-HS画分自体の平均分子量は約7,000 Daである(Coccheri, S. and Mannello, F., (2014) Drug Design, Development, and Therapy 8: 49-65を参照)。

10

【0319】

さらに、UF-HSから分離されたFM-HS画分は一般に、UF-HSと比較して半減期が長く、経口バイオアベイラビリティが高いことを含め、他のLMW-HS組成物と同様の化学的特性を有する。一方、デルマタン硫酸は一般に、抗凝固活性が最小であるか全くなく、平均分子量が25 kDaであるが、動脈血栓症及び静脈血栓症を阻止し、血管壁損傷及び炎症に対する保護、並びに創傷治癒の促進をもたらすことが示されている。併せて、また特定の理論に制限されるものではないが、スロデキシド内のFM-HSとデルマタン硫酸との組合せは、組合せ的、かつ潜在的に相乗的な様式を与えることができると考えられる(上記のCoccheri, S. and Mannello, F.を参照)。

20

【0320】

したがって、他の態様において、改変型アリール硫酸依存性スルホトランスフェラーゼ酵素を使用して、本発明の方法のいずれかによって合成された抗凝固性N, 2, 3, 6-HS生成物からFM-HS画分を調製する。他の態様において、改変型スルホトランスフェラーゼ酵素を使用して調製されたN, 2, 3, 6-HS生成物は、上記のVolpiによって記載された同様の手順を使用して、二価カチオン塩、特にバリウム塩又はカルシウム塩を用いて沈殿させることができる。他の態様において、N, 2, 3, 6-HS生成物は、UF-HSと実質的に同等である。UF-HSの塩沈殿を行ってFM-HSを形成し、その後精製する方法は、その開示全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第7,687,479号及び米国特許第8,609,632号にも記載されている。他の態様において、得られたFM-HS画分を精製すると、これをデルマタン硫酸と組み合わせてHS-GAG混合物を形成することができる。他の態様において、本発明の方法のいずれかを利用してFM-HSを直接合成することができ、次いで、これをデルマタン硫酸と組み合わせてHS-GAG混合物を形成することができる。他の態様において、いずれかの方法によって調製されたHS-GAG混合物は、限定するものではないが、80%のFM-HS画分及び20%のデルマタン硫酸を含み(Lauver, D. A. Lucchesi, B. R., Cardio. Drug Rev. 24 (3-4): 214-216を参照)、7,000 Daの平均分子量、約8,000の M_r 、及び/又は2.0:1~2.2:1の範囲の硫酸基とカルボキシル基との比を有する組成物を含め、スロデキシドと同一の1つ以上の特性を有することができる。

30

40

【0321】

スロデキシドとは対照的に、HS-GAG混合物であるダナパロイドは、UF-HSではなく、ブタ供給源から単離された天然HSから従来調製されてきた(参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許第5,164,377号を参照; また、“Danaparoid Sodium”(2010) European Pharmacopoeia 7.0, 1789-1792を参照)。HS多糖は、UF-HSとは対照的に、一般に非硫酸化されているか、N-、2-O及び/又は6-O硫酸化されている二糖単位を含む。ただし、特定の理論に制限されるものではないが、3-O硫酸化グルコサミン残基を有する二糖単位はHS内ではまれであり、UF-HSと比較して抗凝固活性が劇的に低下すると考えられる。したがって、ダナパロイドはまた、UF-HSと比較して活性が低く、一般に、抗Xa活性が11~20 IU mg^{-1} で

50

あり、抗 I I a 活性が $1 \text{ IU} \cdot \text{mg}^{-1}$ 未満であり、抗 X a 活性と抗 I I a 活性との比が 22 : 1 以上である。

【0322】

さらに、米国特許第5,164,377号の手順に従ってダナパロイドを精製すると、得られた生成物は、HSだけでなく、分子量を減少させるために塩基をヘパロサンと反応させる作用と同様の抽出プロセス中の塩基の添加の結果として分子量が減少したコンドロイチン硫酸及びデルマタン硫酸も含む。欧州薬局方によれば、患者に処方するのに適したダナパロイドHS-GAG組成物内の全GAGの重量平均分子量(Mw)は、少なくとも4,000Daから7,000Daまでの範囲内であり、以下のサイズ分布限界(size distribution limit)を有する：(a) 2,000未満のMrを有する多糖鎖は、ダナパロイド混合物の最大13%(w/w)を有する；(b) 4,000未満のMrを有する多糖鎖は、ダナパロイド混合物の最大39%(w/w)を有する；(c) 4,000~8,000のMrを有する多糖鎖は、ダナパロイド混合物の最低50%(w/w)を有する；(d) 8,000を超えるMrを有する多糖鎖は、ダナパロイド混合物の最大19%(w/w)を有する；及び(e) 10,000未満のMrを有する多糖鎖は、ダナパロイド混合物の最大11%(w/w)を有する。欧州薬局方によって決定されるダナパロイドの特定の組成限界に関して、コンドロイチン硫酸は、ダナパロイド混合物の最大8.5%(w/w)を有することができ、デルマタン硫酸は、ダナパロイド混合物の少なくとも8.0%(w/w)から16.0%(w/w)までの範囲を有することができる。非限定的な例として、ダナパロイド組成物Orgaran(登録商標)は、HSを約84%(w/w)、デルマタン硫酸を約12%(w/w)、及びコンドロイチン硫酸を約4%有する。

【0323】

他の態様において、ダナパロイド(CAS番号：308068-55-5)と同様の特性を有するように、改変型アリール硫酸依存性スルホトランスフェラーゼ酵素、デルマタン硫酸及びコンドロイチン硫酸を使用して本発明の方法のいずれかによって生成されたHS生成物を有するHS-GAG混合物を形成することができる。他の態様において、HS生成物はN,2,6-HS生成物である。他の態様において、HS生成物はN,2,3,6-HS生成物である。他の態様において、反応から直接合成されたHS生成物は、少なくとも4,000Daから8,000Daまでの範囲、好ましくは少なくとも4,000Daから7,000Daまでの範囲のMwを有する。他の態様において、HS生成物は、8,000Daを超えるMwを有し、ヘパロサンを解重合してその分子量を減少させるための上記の方法と同様に、その後、HS生成物を塩基と反応させることによってダナパロイド様HS-GAG混合物に含めるために調製される。他の態様において、コンドロイチン硫酸及びデルマタン硫酸を塩基と反応させて、それらの分子量を減少させる。他の態様において、本発明の方法のいずれかによって生成されたHS生成物、コンドロイチン硫酸、及びデルマタン硫酸を有する組成物を濾過装置を使用して濾過することができる。そのような濾過装置には、Amicon(登録商標)Ultraユニット(EMD Millipore)などの遠心濾過ユニット、又はいずれも所望の分子量カットオフ(MWCO)を有する透析膜を挙げることができるがこれらに限定されない。他の態様において、遠心濾過ユニット又は透析膜のいずれかのMWCOは5,500Daである。他の態様において、ダナパロイドHS-GAG混合物中の全GAGのMwは、少なくとも4,000Daから8,000Daまでの範囲内、好ましくは少なくとも4,000Daから7,000Daまでの範囲内、さらに好ましくは少なくとも5,000Daから6,000Daまでの範囲内である。他の態様において、ダナパロイドHS-GAG混合物内のGAGは、以下のサイズ分布限界を有する：(a) 2,000未満のMrを有する多糖鎖は、ダナパロイドHS-GAG混合物の最大13%(w/w)を有する；(b) 4,000未満のMrを有する多糖鎖は、ダナパロイドHS-GAG混合物の最大39%(w/w)を有する；(c) 4,000~8,000のMrを有する多糖鎖は、ダナパロイドHS-GAG混合物の最低50%(w/w)を有する；(d) 8,000を超えるMrを有する多糖鎖は、ダナパロイドHS-GAG混合物の最大19%(w/w)を有する；及び(e) 10,

000未満の M_r を有する多糖鎖は、ダナパロイドHS-GAG混合物の最大11%(w/w)を有する。

【0324】

他の態様において、ダナパロイドHS-GAG混合物は、ダナパロイド(CAS番号: 308068-55-5)と類似又は同一のGAG組成物を有することができる。他の態様において、ダナパロイドHS-GAG混合物内のGAGの組成物は、デルマタン硫酸を少なくとも8%(w/w)から16%(w/w)まで、好ましくは12%(w/w)、コンドロイチン硫酸を8%(w/w)未満、好ましくは少なくとも3%(w/w)から5%(w/w)までの範囲、さらに好ましくは4%(w/w)を有する。

【0325】

他の態様において、ダナパロイドHS-GAG混合物は、ダナパロイドと類似又は同一の抗凝固活性を有することができる。他の態様において、ダナパロイドHS-GAG混合物は、抗Xa活性を11~20 IU mg^{-1} とし、抗IIa活性を1 IU mg^{-1} 未満とするか、及び/又は抗Xa活性と抗IIa活性との比が22:1以上とすることができる。

【0326】

他の態様において、本発明の方法のいずれかに従って合成されたHS生成物、特に抗凝固性N, 2, 3, 6-HS生成物を組み合わせてHS-GAG混合物を形成するのではなく、代わりに、上記のように、HS生成物を解重合及び/又は修飾する1つ以上の後続のプロセスによってHS生成物をさらに修飾して、LMW-HS生成物を形成することができる。一般に、他の態様において、抗凝固性N, 2, 3, 6-HS生成物からLMW-HSを形成するためのプロセスは、以下の工程、(a)上記の方法のいずれかに従ってN, 2, 3, 6-HS生成物を合成する工程; (b)1つ以上の解重合剤を提供する工程; 及び(c)N, 2, 3, 6-HS生成物の少なくとも一部を解重合するのに十分な時間、1つ以上の解重合剤を用いてN, 2, 3, 6-HS生成物を処理し、それによりLMW-HS生成物を形成する工程;を有する。特定の理論に制限されるものではないが、解重合剤の選択によって、LMW-HS生成物を形成するための化学的機構、並びに生成物の構造、抗凝固活性及び薬理学的特性が決まることができると考えられる。医薬抗凝固性UF-HSからLMW-HS生成物を形成するための公知の化学的機構には、化学的及び/又は酵素的 β 脱離反応; 脱アミノ化反応; 及び酸化反応(それらの組合せを含む)を挙げることができがこれらに限定されない。

【0327】

他の態様において、酵素的 β 脱離反応によって、本発明の方法のいずれかに従って合成されたN, 2, 3, 6-HS生成物を修飾して、酵素的に解重合されたLMW-HS生成物を形成することができる。従来、酵素的に解重合されたLMW-HS生成物は、LMW-HS生成物が所望の化学構造、平均分子量、抗凝固活性及び硫酸化度を有するまで、医薬UF-HSを1つ以上の炭素-酸素リアーゼ酵素とインキュベートすることによって調製されてきた。(“Tinzaparin Sodium”(2010) European Pharmacopoeia 7.0, 3098を参照; また、上記のLinhardt, R.J. and Gunay, N.S.を参照)。1つ以上の炭素-酸素リアーゼとの反応の結果として、UF-HS内の多糖は解重合し、下記式XIで示す特徴的な化学構造を発現する。

【0328】

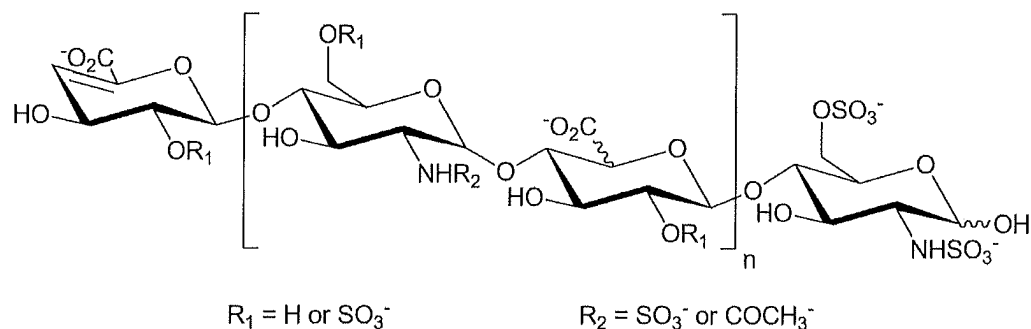
10

20

30

40

【化 2 1】



10

【0329】

上記式 X I に示すように、 n は 1 ~ 25 の任意の整数とすることができる。生成物内の酵素的に解重合された LMW - HS 多糖の大部分の非還元末端の糖残基は、グルクロン酸残基又はウロン酸残基の代わりに、2 - O - スルホ - 4 - エネピラノスルホン酸 (enepyranosulfonic acid) である。さらに、還元末端の各グルコサミン残基は、N - 及び 6 - O 位で硫酸化されている。場合により、二糖単位のうちの 1 つ以上の中のグルコサミン残基の 3 - O 位も 3 - O 硫酸化されていてもよい。特定の理論に制限されるものではないが、酵素的に解重合された LMW - HS 生成物内の多糖の少なくとも一部は、3 - O 硫酸化グルコサミン残基を有し、これにより、その抗凝固活性が最終的にもたらされると考

20

【0330】

さらに、抗凝固性 UF - HS と同様に、抗凝固剤として処方することができる、抗凝固性 UF - HS 由来の酵素的に解重合された LMW - HS 生成物は、厳しい純度及び特性基準を満たさなければならない。特に、そのような酵素的に解重合された LMW - HS 生成物の一種であるチンザパリン (CAS 番号: 9041 - 08 - 1; ATC コード: B01AB10) は、上記式 X I の化学構造に加えて、Mw が少なくとも 5,500 Da から 7,500 Da まで、特徴的には 6,500 Da の範囲; 二糖単位 1 個当たり少なくとも 1.8 個から 2.5 個までの硫酸基; 及び抗 Xa 活性が少なくとも 70 IU mg^{-1} から 120 IU mg^{-1} まで、及び / 又は抗 Xa 活性と抗 IIa 活性との比が少なくとも 1.5 : 1 から 2.5 : 1 までである、特定の一連の分子量、抗凝固活性及び硫酸化含有量特性を有する。

30

【0331】

したがって、他の態様において、上記の本発明の方法のいずれかに従って合成された N, 2, 3, 6 - HS 生成物は、その後、1 つ以上の炭素 - 酸素リアーゼによって解重合されて、酵素的に解重合された LMW - HS 生成物を形成することができる。他の態様において、酵素的に解重合された LMW - HS 生成物は、化学構造、分子量、抗凝固活性及び / 又は硫酸化含有量特性を含むがそれらに限定されない、チンザパリンと同一の 1 つ以上の特性を有する。他の態様において、酵素的に解重合された LMW - HS 生成物は、チンザパリンと実質的に同一である。

40

【0332】

他の態様において、酵素的に解重合された LMW - HS 生成物は、上記の本発明の方法のいずれかに従って合成された N, 2, 3, 6 - HS 生成物から、以下の工程、(a) 上記の方法のいずれかに従って N, 2, 3, 6 - HS 生成物を合成する工程; (b) 少なくとも 1 つの炭素 - 酸素リアーゼを有する反応混合物を提供する工程; 及び (c) N, 2, 3, 6 - HS 生成物の少なくとも一部を解重合するのに十分な時間、炭素 - 酸素リアーゼ反応混合物を用いて N, 2, 3, 6 - HS 生成物を処理し、それにより酵素的に解重合された LMW - HS 生成物を形成する工程; により形成することができる。他の態様において、酵素的に解重合された LMW - HS 生成物は式 X I の構造を有する。他の態様において、N, 2, 3, 6 - HS 生成物は未分画 N, 2, 3, 6 - HS 生成物である。

50

【0333】

他の態様において、少なくとも1つの炭素 - 酸素リアーゼは、該酵素がH S多糖のβ脱離開裂を触媒する限り、任意の種由来の炭素 - 酸素リアーゼとすることができる。他の態様において、少なくとも1つの炭素 - 酸素リアーゼは、配列番号30、配列番号31及び配列番号32のアミノ酸配列を有する、バクテロイデス・エガーシイ (*Bacteroides e ggerthii*) 由来の炭素 - 酸素リアーゼからなる群から選択することができる。他の態様において、少なくとも1つの炭素 - 酸素リアーゼは、それぞれ配列番号30、配列番号31及び配列番号32のアミノ酸配列を有する酵素のうちの1つ、2つ、又は3つ全部を有することができる。

【0334】

10

他の態様において、酵素的に解重合されたL M W - H S生成物を形成するのに十分な時間は、該生成物が所望の平均分子量を有するのに十分な時間である。他の態様において、酵素的に解重合されたL M W - H S生成物のMwは、2,000Da~10,000Da、好ましくは5,500Da~7,500Daの範囲内、さらに好ましくは6,500Daとすることができる。他の態様において、酵素的に解重合されたL M W - H S生成物は、抗凝固活性を有することができる。他の態様において、酵素的に解重合されたL M W - H S生成物は、抗Xa活性が少なくとも70IU mg⁻¹から120IU mg⁻¹までであるか、及び/又は抗Xa活性と抗IIa活性との比が少なくとも1.5:1から2.5:1までである。

【0335】

20

他の態様において、化学的β脱離反応によって、本発明の方法のいずれかに従って合成されたN,2,3,6-H S生成物を修飾して、化学的β脱離L M W - H S生成物を形成することができる。従来、化学的β脱離L M W - H S生成物は、塩基を用いて医薬UF-H S又はその第四級アンモニウム塩を処理することによって調製されてきた。これらの条件下では、化学的β脱離が起こり、式XIの構造を有する酵素的に解重合されたL M W - H S多糖に観察される特徴である、非還元末端に4,5-不飽和ウロン酸残基を含む化学的β脱離L M W - H S生成物が形成される(上記のLinhardt, R. J. and Gunay, N. S.を参照)。この反応条件の制御は、臨床用途のために承認されているか、又は臨床試験中に投与されており、以下にさらに詳述する化学的β脱離L M W - H S組成物の生成をもたらしている。

【0336】

30

第1の非限定的な例では、臨床用途のために処方されている化学的β脱離L M W - H S組成物は、ベミパリン(CAS番号:91449-79-5;ATCコード:B01AB12)である(例えば、Chapman, T. M. and Goa, K. L., (2003) *Drugs* 63 (21): 2357-2377; Sanchez-Ferrer, C. F. (2010) *Drugs* 70 Suppl.2: 19-23; Ciccone, M. M., et al., (2014) *Vascular Pharmacology* 62: 32-37を参照)。ベミパリンは、メタノールの存在下で、医薬UF-H Sのアルカリ解重合によって、特に医薬UF-H Sのベンゼトニウム塩をTriton(登録商標)B(ベンジルトリメチルアンモニウムヒドロキシド)などの水酸化第四級アンモニウムと反応させることによって調製される(その開示全体が参照により組み込まれる米国特許第4,981,955号及び欧州特許EP0293539号を参照)。その後の精製及び沈殿の際に、式XIの構造を含む得られたベミパリン組成物は、少なくとも3,000Daから4,200Daまで、典型的には3,600Daの範囲のMwと、多糖鎖の35%未満が2,000未満のMrを有し、多糖鎖の少なくとも50%から75%までの範囲が少なくとも2,000から6,000までの範囲のMrを有し、多糖鎖の15%未満が6,000を超えるMrを有するようなサイズ分布とを有する。さらに、ベミパリン組成物は、抗Xa活性が少なくとも80IU mg⁻¹から120IU mg⁻¹までとし、抗IIa活性が少なくとも5IU mg⁻¹から20IU mg⁻¹までとするか、及び/又は抗Xa活性と抗IIa活性との比が少なくとも8.0:1から10:1までとすることができる(上記のSanchez-Ferrer, C. F.を参照)。

40

50

【0337】

別の非限定的な例では、臨床試験中に患者に投与されている化学的 β 脱離LMW-HS組成物は、セムロパリン(CAS番号: 9041-08-1)である。セムロパリンは、医薬UF-HSベンゼトニウム塩のベンジルエステルを強ホスファゼン塩基、BEMP(2-tert-ブチルイミノ-2-ジエチルアミノ-1,3-ジメチルペルヒドロ-1,2,3-ジアザ-ホスホリン)と反応させ、その後、ベンジルエステルを鹸化し、精製することによって調製される(Viskov, C., et al., (2009) J. Thromb. Haemost. 7: 1143-1551を参照)。ホスファゼン塩基は、最も強力な公知の有機塩基の1つであり、高度に立体障害があり、非求核性である。その結果、ホスファゼン塩基は、 β 脱離のためにUF-HSの立体障害が最も少ない領域を標的とし、3-O硫酸化グルコサミン残基を含むAT認識配列を回避する。式XIの構造を有する得られたセムロパリン生成物は、少なくとも2,000Daから3,000Daまで、典型的には2,400Daの範囲のMwを有し、セムロパリン生成物の抗凝固活性は、抗Xa活性が約160 IU mg⁻¹であり、抗IIa活性が約2 IU mg⁻¹であり、及び抗Xa活性と抗IIa活性との比が約80:1である(上記のViskov, C.を参照)。

10

【0338】

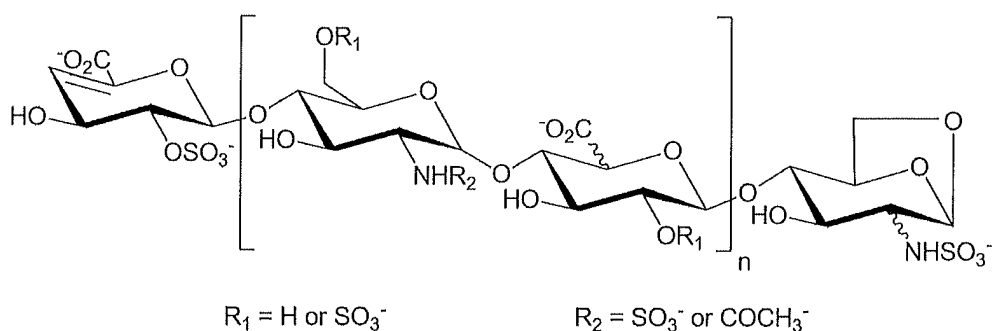
別の非限定的な例では、臨床用途のために処方されている化学的 β 脱離LMW-HS組成物は、エノキサパリン(CAS番号: 679809-58-6; ATCコード: B01AB05)である(例えば、上記のLinhardt, R. J. and Gunay, N. S.を参照)。エノキサパリンは、医薬UF-HSのベンジルエステル形態が塩基と反応させる前に調製されるという点で、セムロパリンと同様に調製される。ベンジルエステルは、塩化ベンジルなどの塩素誘導体の存在下、クロロホルム又は塩化メチレンなどの塩素化有機溶媒中で形成され、これにより、医薬UF-HSの得られたベンジルエステル形態のエステル化の量が制御される(約9~14%の効率)。ベンジルエステルが形成されると、その後、高温で、水酸化ナトリウムなどの強非立体障害塩基を用いて処理される(その開示全体が参照により組み込まれる米国特許第5,389,618号及び米国再発行特許第RE38,743号を参照)。ただし、エノキサパリン内の一部(約15%~25%)の多糖類は、非還元末端の特徴的な4,5-不飽和ウロン酸に加えて、還元末端に末端1,6-アンヒドロ糖残基(1,6-アンヒドロマンノース又は1,6-アンヒドログルコサミンのいずれか)をさらに有することができる(Guerrini, M., (2010) J. Med. Chem. 53: 8030-8040を参照)。その結果、エノキサパリンは、典型的には、式XIの構造を有する多糖類に加えて、下記式XIIに示す特徴的な構造を有する多糖類を有する。

20

30

【0339】

【化22】



40

【0340】

上記式XIIに示すように、nは1~21の任意の整数とすることができる。エノキサパリン多糖の非還元末端の糖残基は、グルクロン酸残基又はウロン酸残基の代わりに、2-O-スルホ-4-エネピラノスルホン酸である。さらに、還元末端の各グルコサミン残基は1,6-アンヒドロ部分を有し、C2炭素の周りの立体化学は、該残基が1,6-アンヒドロマンノース残基又は1,6-アンヒドログルコサミン残基であるかどうかを決定

50

する。場合により、二糖単位のうちの１つ以上の中のグルコサミン残基の３ - Ｏ 位も３ - Ｏ 硫酸化されていてもよい。特定の理論に制限されるものではないが、エノキサパリン内の多糖の少なくとも一部は３ - Ｏ 硫酸化グルコサミン残基を有し、これによりその抗凝固活性が最終的にもたらされると考えられる。

【 0 3 4 1 】

一般的に処方される L M W - H S 薬物として、患者に投与されるエノキサパリンの組成物は、欧州薬局方及び U S P の両方によって確立された一連の厳しいサイズ、活性及び純度要件を満たさなければならない (“ Enoxaparin Sodium ” (2010) European Pharmacopoeia 7.0, 1920-1921 を参照) 。要件を満たすために存在しなければならない特性には、上記式 X I I の構造を有することに加えて、以下が含まれる：少なくとも 3 , 8 0 0 D a から 5 , 0 0 0 D a まで、特徴的には 4 , 5 0 0 D a の範囲の M_w ; 二糖単位 1 個当たり 1 . 8 個以上の硫酸基 ; 及び少なくとも 9 0 I U m g⁻¹ から 1 2 5 I U m g⁻¹ までの抗 X a 活性、少なくとも 2 0 I U m g⁻¹ から 3 5 I U m g⁻¹ までの抗 I I a 活性 ; 及び / 又は少なくとも 3 . 3 : 1 から 5 . 3 : 1 までの抗 X a 活性と抗 I I a 活性との比。さらに、患者に投与するのに適したエノキサパリン組成物は、多糖鎖の少なくとも 1 2 . 0 % から 2 0 . 0 % まで、特徴的には約 1 6 % が 2 , 0 0 0 未満の M_r を有し ; 多糖鎖の少なくとも 6 8 . 0 % から 8 2 . 0 % までの範囲、特徴的には約 7 4 % が、少なくとも 2 , 0 0 0 から 8 , 0 0 0 までの範囲の M_r を有し ; 多糖鎖の 1 8 . 0 % 以下が 8 , 0 0 0 を超える M_r を有するようなサイズ分布を有する。

【 0 3 4 2 】

したがって、他の態様において、上記の本発明の方法のいずれかに従って合成される N , 2 , 3 , 6 - H S 生成物は、その後、１つ以上の塩基によって解重合され、化学的 β 脱離 L M W - H S 生成物を形成することができる。他の態様において、化学的 β 脱離 L M W - H S 生成物は、化学構造、分子量、抗凝固活性及び / 又は硫酸化含有量特性を挙げることができるがこれらに限定されない、ベミパリンと同一の１つ以上の特性を有する。他の態様において、化学的 β 脱離 L M W - H S 生成物は、ベミパリンと実質的に同一である。他の態様において、化学的 β 脱離 L M W - H S 生成物は、化学構造、分子量、抗凝固活性及び / 又は硫酸化含有量特性を挙げることができるがこれらに限定されない、セムロパリンと同一の１つ以上の特性を有する。他の態様において、化学的 β 脱離 L M W - H S 生成物は、セムロパリンと実質的に同一である。他の態様において、化学的 β 脱離 L M W - H S 生成物は、化学構造、分子量、抗凝固活性及び / 又は硫酸化含有量特性をを挙げることができるがこれらに限定されない、エノキサパリンと同一の１つ以上の特性を有する。他の態様において、化学的 β 脱離 L M W - H S 生成物は、エノキサパリンと実質的に同一である。

【 0 3 4 3 】

他の態様において、化学的 β 脱離 L M W - H S 生成物は、上記の本発明の方法のいずれかにより合成される N , 2 , 3 , 6 - H S 生成物から、以下の工程、(a) 上記の方法のいずれかにより N , 2 , 3 , 6 - H S 生成物を合成する工程 ; (b) 塩基を有する反応混合物を提供する工程 ; 及び (c) N , 2 , 3 , 6 - H S 生成物の少なくとも一部を解重合するのに十分な時間、塩基を有する反応混合物を用いて N , 2 , 3 , 6 - H S 生成物を処理し、それにより化学的 β 脱離 L M W - H S 生成物を形成する工程 ; により形成することができる。他の態様において、化学的 β 脱離 L M W - H S 生成物は式 X I の構造を有する。他の態様において、化学的 β 脱離 L M W - H S 生成物は式 X I I の構造を有する。他の態様において、N , 2 , 3 , 6 - H S 生成物は未分画 N , 2 , 3 , 6 - H S 生成物である。

【 0 3 4 4 】

他の態様において、塩基は T r i t o n (登録商標) B であり、T r i t o n (登録商標) B を有する反応混合物を用いて N , 2 , 3 , 6 - H S 生成物を処理する工程は、以下のサブ工程、(i) 未分画 N , 2 , 3 , 6 - H S 生成物をベンゼトニウム塩、好ましくは塩化ベンゼトニウムと反応させて、ベンゼトニウム H S 塩を形成するサブ工程 ; 及び (i

i) ベンゼトニウムHS塩をTriton (登録商標) B及びメタノールを有する反応混合物と組み合わせて、化学的β脱離LMW-HS生成物を形成するサブ工程；をさらに有する。他の態様において、ベンゼトニウムHS塩から化学的β脱離LMW-HS生成物を調製するサブ工程は、米国特許第4,981,955号の実施例のいずれか、好ましくは実施例3に報告されている手順を有する。他の態様において、ベンゼトニウムHS塩を解重合するのに十分な時間は、少なくとも3,000Daから4,200Daまで、好ましくは3,600Daの範囲のM_wと、多糖鎖の35%未満が2,000未満のM_rを有し、多糖鎖の少なくとも50%から75%までの範囲が、少なくとも2,000から6,000までの範囲のM_rを有し、多糖鎖の15%未満が6,000を超えるM_rを有するようなサイズ分布とを有する化学的β脱離LMW-HS生成物を形成するのに十分な時間である。他の態様において、化学的β脱離LMW-HS生成物は式XIの構造を有する。他の態様において、化学的β脱離LMW-HS生成物は、抗Xa活性が少なくとも80IU mg⁻¹から120IU mg⁻¹までであり、抗IIa活性が少なくとも5IU mg⁻¹から20IU mg⁻¹までであるか、及び/又は抗Xa活性と抗IIa活性との比が少なくとも8.0:1から10:1までである。他の態様において、化学的β脱離LMW-HS生成物はベミパリンと実質的に同等である。

10

【0345】

他の態様において、塩基はBEMPであり、BEMPを有する反応混合物を用いてN, 2, 3, 6-HS生成物を処理する工程は、上記のViskov, C., et al.に報告されているように、以下の工程、(i) 未分画N, 2, 3, 6-HS生成物をベンゼトニウム塩、好ましくは塩化ベンゼトニウムと反応させて、ベンゼトニウムHS塩を形成する工程；(ii) 塩化ベンジルを使用してベンゼトニウムHS塩をエステル化して、ベンジルエステルHSを形成する工程；(iii) ベンゼトニウム塩、好ましくは塩化ベンゼトニウムを用いてベンジルエステルHSをトランス塩化(transalification)して、ベンゼトニウムベンジルエステルHSを形成する工程；(iv) BEMPを用いてベンゼトニウムベンジルエステルHSを解重合して、ベンジルエステル化学的β脱離LMW-HS生成物を形成する工程；及び(v) ベンジルエステル化学的β脱離LMW-HS生成物を鹼化して、化学的β脱離LMW-HS生成物を形成する工程；をさらに有する。他の態様において、BEMPを用いてベンゼトニウムベンジルエステルHSを解重合するのに十分な時間は、ベンジルエステルの鹼化時に、得られた化学的β脱離LMW-HS生成物が少なくとも2,000Daから3,000Daまで、好ましくは約2,400Daの範囲のM_wを有するように、ベンジルエステル化学的β脱離LMW-HS生成物を形成するのに十分な時間である。他の態様において、化学的β脱離LMW-HS生成物は式XIの構造を有する。他の態様において、化学的β脱離LMW-HS生成物は、抗Xa活性が約160IU mg⁻¹であり、抗IIa活性が約2IU mg⁻¹であり、及び/又は抗Xa活性と抗IIa活性との比が少なくとも80:1から100:1までである。他の態様において、化学的β脱離LMW-HS生成物はセムロパリンと実質的に同等である。

20

30

【0346】

他の態様において、塩基は水酸化ナトリウムであり、水酸化ナトリウムを有する反応混合物を用いてN, 2, 3, 6-HS生成物を処理する工程は、以下のサブ工程、(i) 未分画N, 2, 3, 6-HS生成物をベンゼトニウム塩、好ましくは塩化ベンゼトニウムと反応させて、ベンゼトニウムHS塩を形成するサブ工程；(ii) 塩素化溶媒、好ましくは塩化メチレン又はクロロホルムの存在下で塩化ベンジルを使用してベンゼトニウムHS塩をエステル化して、ベンジルエステルHSを形成するサブ工程；及び(iii) ベンジルエステルHSを水酸化ナトリウムを有する反応混合物と組み合わせて、化学的β脱離LMW-HS生成物を形成するサブ工程；をさらに有する。他の態様において、ベンジルエステルHSは、少なくとも9%から約14%までのエステル化度を有する。他の態様において、ベンジルエステルHSと水酸化ナトリウムとの間の反応は、少なくとも50 から70 までの範囲内、好ましくは少なくとも55 から65 までの範囲内で選択される温度で行われる。他の態様において、ベンジルエステルHS及び化学的β脱離LMW-H

40

50

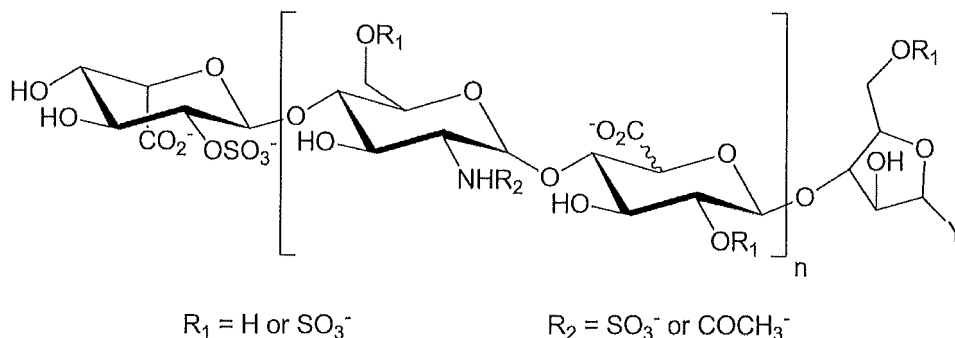
S生成物は、米国再発行特許第RE38,743号内の実施例3の手順によって調製される。他の態様において、ベンジルエステルHSを解重合するのに十分な時間は、少なくとも3,800Daから5,000Daまで、好ましくは4,500Daの範囲のMwを有する化学的β脱離LMW-HS生成物を形成するのに十分な時間である。他の態様において、化学的β脱離LMW-HS生成物は、多糖鎖の少なくとも12.0%から20.0%まで、好ましくは約16%が2,000未満のMrを有し、多糖鎖の少なくとも68.0%から82.0%までの範囲のMrを有し、多糖鎖の18.0%以下が8,000を超えるMrを有するようなサイズ分布を有する。他の態様において、化学的β脱離LMW-HS生成物は、二糖単位1個当たり1.8個以上の硫酸基を有する。他の態様において、化学的β脱離LMW-HS生成物は、抗Xa活性が少なくとも90IU mg⁻¹から125IU mg⁻¹までであり、抗IIa活性が少なくとも20IU mg⁻¹から35IU mg⁻¹までであり、及び/又は抗Xa活性と抗IIa活性との比が少なくとも3.3:1から5.3:1までである。他の態様において、化学的β脱離LMW-HS生成物はエノキサパリンと実質的に同等である。

【0347】

他の態様において、脱アミノ化反応によって、本発明の方法のいずれかにより合成されるN,2,3,6-HS生成物を修飾して、脱アミノ化LMW-HS生成物を形成することができる。従来、脱アミノ化LMW-HS生成物は、亜硝酸を用いて医薬UF-HSを処理することによって調製されてきた。これらの条件下で、非還元末端に2-O-スルホ-α-L-イドピラノースウロン酸(idopyranosuronic acid)残基、及び還元末端に6-O-スルホ-2,5-アンヒドロ-D-マンニトール残基を有する脱アミノ化LMW-HS生成物が形成される(上記のLinhardt, R. J. and Gunay, N. S.を参照)。非還元末端に2-O-スルホ-α-L-イドピラノースウロン酸残基、及び還元末端に6-O-スルホ-2,5-アンヒドロ-D-マンニトール残基を有する脱アミノ化LMW-HS生成物は一般に、下記式XIIIの構造を有する。

【0348】

【化23】



【0349】

上記式XIIIに示すように、nは3~20の任意の整数とすることができ、Yはアルデヒド官能基、ヒドロキシル官能基又はカルボン酸官能基とすることができる。他の態様において、Yはヒドロキシル基である。場合により、二糖単位のうちの1つ以上の中のグルコサミン残基の3-O位も3-O硫酸化されていてもよい。特定の理論に制限されるものではないが、脱アミノ化LMW-HS生成物内の多糖類の少なくとも一部は3-O硫酸化グルコサミン残基を有し、これによりその抗凝固活性が最終的にもたらされると考えられる。

【0350】

臨床用途のために処方されている脱アミノ化LMW-HS組成物の非限定的な例には、ダルテパリン(CAS番号:9041-08-1;ATCコード:B01AB04)、ナドロパリン(CAS番号:9005-49-6;ATCコード:B01AB06)、レピ

パリン（CAS 番号：9005-49-6；ATCコード：B01AB08）及びセルトパリン（CAS 番号：9005-49-6）が挙げられる。一般に、ダルテパリン、ナドロパリン及びレビパリンの各々は、直接加えられるか、酸性組成物に亜硝酸ナトリウムを加えることによってインサイチュで形成される亜硝酸を使用して解重合することによって調製される。セルトパリンは、亜硝酸イソアミルなどの亜硝酸誘導体を使用して同様に調製される（上記のLinhardt, R. J. and Gunay, N. S.を参照）。この反応条件の制御は、互いにわずかに異なる抗凝固活性及び分子量特性を有し、例えば、その開示全体が参照により組み込まれる米国特許第4,303,651号、米国特許第4,351,938号、米国特許第4,438,261号、米国特許第4,500,519号、米国特許第4,686,388号、米国特許第5,019,649号及び米国特許第5,599,801号に記載されている脱アミノ化LMW-HS組成物の生成をもたらしている。

【0351】

第1の非限定的な例では、臨床用途のために処方されている脱アミノ化LMW-HS組成物はダルテパリンである（例えば、Jacobsen, A. F., et al., (2003) Br J Obstet Gynaecol 110: 139-144;及びGuerrini, M., et al., (2007) Seminars in Thrombosis and Hemostasis 33 (5): 478-487を参照）。ダルテパリンは、典型的には、医薬UF-HSの酸解重合によって、特に医薬UF-HSを亜硝酸と反応させることによってナトリウム塩として調製される（例えば、米国特許第5,019,649号を参照）。その後の精製及び沈殿時に、式XIIIの構造を含む得られたダルテパリン組成物は、少なくとも5,600Daから6,400Daまで、典型的には6,000Daの範囲のMwと、3,000未満のMrを有する多糖鎖の割合が13.0%以下であり、鎖の少なくとも15.0%から25.0%までが少なくとも8,000のMrを有するようなサイズ分布とを有する。さらに、ダルテパリン組成物は、少なくとも110IU mg⁻¹及び210IU mg⁻¹以下の抗Xa活性、少なくとも35IU mg⁻¹及び100IU mg⁻¹以下の抗IIa活性、及び/又は少なくとも1.9:1から3.2:1までの抗Xa活性と抗IIa活性との比を有することができる（“Dalteparin Sodium” (2010) European Pharmacopoeia 7.0, 1788-1789を参照）。

【0352】

別の非限定的な例では、臨床用途のために処方されている脱アミノ化LMW-HS組成物はナドロパリンである。ナドロパリンは一般に、pH約2.5を維持するために塩酸の存在下で亜硝酸ナトリウムを使用して、医薬UF-HSの酸解重合によってナトリウム塩又はカルシウム塩として調製される（例えば、その開示全体が参照により組み込まれる米国特許第4,686,388号及び米国特許第5,599,801号）を参照）。その後の精製及び沈殿時に、式XIIIの構造を有する得られたナドロパリン組成物は、少なくとも3,600Daから5,000Daまで、典型的には4,300Daの範囲のMwと、2,000未満のMrを有する鎖の割合が15%以下であり、鎖の少なくとも75%から95%までが、少なくとも2,000から8,000までの範囲のMrを有し、鎖の少なくとも35%から55%までが、少なくとも2,000から4,000までのMrを有するようなサイズ分布とを有する。さらに、ナドロパリン組成物は、95IU mg⁻¹以上130IU mg⁻¹以下の抗Xa活性、及び/又は少なくとも2.5:1から4.0:1までの抗Xa活性と抗IIa活性との比を有することができる（“Nadroparin Sodium” (2010) European Pharmacopoeia 7.0, 1788-1789を参照）。

【0353】

臨床用途のために処方されている脱アミノ化LMW-HS組成物の他の非限定的な例は、レビパリン及びセルトパリンである。レビパリンは、ダルテパリン及びナドロパリンと同様に、インサイチュで亜硝酸を導入するか、亜硝酸を形成することによって調製され（上記のLinhardt, R. J. and Gunay, N. S.を参照）、式XIIIの構造を有する得られたレビパリン組成物は、少なくとも4,200Daから4,600Daまで、典型的には4,400Daの範囲のMwと、少なくとも4.0:1から4.5:1まで、典型的には4.2:1の抗Xa活性と抗IIa活性との比とを有する（上記のGrey, et alを参照

）。セルトパリンは、酢酸又は塩酸の存在下でヘパリンを亜硝酸イソアミルと反応させることによって調製される（Ahsan, A., et al., (2000) Clin. Appl. Thrombosis / Hemostasis 6 (3): 169-174を参照）。式X I I Iの構造を有する得られたセルトパリン組成物は、Mwが少なくとも5,000Daから5,600Daまで、典型的には5,400Daの範囲であり、抗Xa活性と抗I I a活性との比が少なくとも2.0:1から2.5:1まで、好ましくは2.4:1である（上記のGrey, et alを参照）。

【0354】

したがって、他の態様において、上記の本発明の方法のいずれかにより合成されるN, 2, 3, 6-HS生成物は、その後、亜硝酸又は亜硝酸誘導体、例えば亜硝酸イソアミルによって解重合されて、脱アミノ化LMW-HS生成物を形成することができる。他の態様において、脱アミノ化LMW-HS生成物は、化学構造、分子量、抗凝固活性及び/又は硫酸化含有量特性を挙げることができるがこれらに限定されない、ダルテパリンと同一の1つ以上の特性を有する。他の態様において、脱アミノ化LMW-HS生成物はダルテパリンと実質的に同一である。他の態様において、脱アミノ化LMW-HS生成物は、化学構造、分子量、抗凝固活性及び/又は硫酸化含有量特性を挙げることができるがこれらに限定されない、ナドロパリンと同一の1つ以上の特性を有する。他の態様において、脱アミノ化LMW-HS生成物はナドロパリンと実質的に同一である。他の態様において、脱アミノ化LMW-HS生成物は、化学構造、分子量、抗凝固活性及び/又は硫酸化含有量特性を挙げることができるがこれらに限定されない、レビパリンと同一の1つ以上の特性を有する。他の態様において、脱アミノ化LMW-HS生成物はレビパリンと実質的に同一である。他の態様において、脱アミノ化LMW-HS生成物は、化学構造、分子量、抗凝固活性及び/又は硫酸化含有量特性を挙げることができるがこれらに限定されない、セルトパリンと同一の1つ以上の特性を有する。他の態様において、脱アミノ化LMW-HS生成物はセルトパリンと実質的に同一である。

【0355】

他の態様において、脱アミノ化LMW-HS生成物は、上記の本発明の方法のいずれかにより合成されるN, 2, 3, 6-HS生成物から、以下の工程、(a)上記の方法のいずれかによりN, 2, 3, 6-HS生成物を合成する工程；(b)脱アミノ化剤、好ましくは硝酸イソアミル及び亜硝酸からなる群から選択される脱アミノ化剤を有する脱アミノ化反応混合物を提供する工程；及び(c)N, 2, 3, 6-HS生成物の少なくとも一部を解重合するのに十分な時間、脱アミノ化反応混合物を用いてN, 2, 3, 6-HS生成物を処理し、それにより脱アミノ化LMW-HS生成物を形成する工程；により形成することができる。他の態様において、脱アミノ化剤は亜硝酸であり、脱アミノ化反応混合物は、化学量論量の酸、好ましくは酢酸又は塩酸と、アルカリ金属亜硝酸塩又はアルカリ土類金属亜硝酸塩、好ましくは亜硝酸ナトリウムとを有することができ、亜硝酸は、インサイチュで脱アミノ化反応混合物内で形成される。他の態様において、脱アミノ化剤は亜硝酸イソアミルである。他の態様において、脱アミノ化LMW-HS生成物は式X I I Iの構造を有する。他の態様において、N, 2, 3, 6-HS生成物は未分画N, 2, 3, 6-HS生成物である。

【0356】

他の態様において、脱アミノ化LMW-HS生成物を形成するのに十分な時間は、該生成物が所望の平均分子量を有するのに十分な時間である。他の態様において、脱アミノ化LMW-HS生成物のMwは、2,000Da~10,000Daの範囲内、好ましくは4,000Da~6,000Daの範囲内である。他の態様において、脱アミノ化LMW-HS生成物のMwは、4,000Da~4,500Daの範囲内、好ましくは4,300Daである。他の態様において、脱アミノ化LMW-HS生成物のMwは、4,200Da~4,600Daの範囲内、好ましくは4,400Daである。他の態様において、脱アミノ化LMW-HS生成物のMwは、5,000Da~5,600Daの範囲内、好ましくは5,400Daである。他の態様において、脱アミノ化LMW-HS生成物のMwは、5,700Da~6,300Daの範囲内、好ましくは6,000Daである。

【0357】

他の態様において、脱アミノ化LMW-HS生成物は抗凝固活性を有することができる。他の態様において、脱アミノ化LMW-HS生成物は、最大 210 IU mg^{-1} の抗Xa活性を有する。他の態様において、脱アミノ化LMW-HS生成物は、抗Xa活性が少なくとも 110 IU mg^{-1} 及び 210 IU mg^{-1} 以下である。他の態様において、脱アミノ化LMW-HS生成物は、抗Xa活性が 95 IU mg^{-1} 以上 130 IU mg^{-1} 以下である。他の態様において、脱アミノ化LMW-HS生成物は、抗IIa活性が少なくとも 35 IU mg^{-1} 及び 100 IU mg^{-1} 以下である。他の態様において、脱アミノ化LMW-HS生成物は、抗Xa活性と抗IIa活性との比が少なくとも $2.0:1$ から $4.5:1$ までである。他の態様において、脱アミノ化LMW-HS生成物は、抗Xa活性と抗IIa活性との比が少なくとも $3.0:1$ から $3.6:1$ までである。他の態様において、脱アミノ化LMW-HS生成物は、抗Xa活性と抗IIa活性との比が少なくとも $4.0:1$ から $4.5:1$ までである。他の態様において、脱アミノ化LMW-HS生成物は、抗Xa活性と抗IIa活性との比が少なくとも $2.0:1$ から $2.5:1$ までである。他の態様において、脱アミノ化LMW-HS生成物は、抗Xa活性と抗IIa活性との比が少なくとも $2.2:1$ から $2.7:1$ までである。

【0358】

他の態様において、本発明の方法のいずれかにより合成されるN, 2, 3, 6-HS生成物は、酸化反応によって修飾されて、酸化LMW-HS生成物を形成することができる。従来、酸化LMW-HS生成物は、酸を用いて医薬UF-HSを処理し、次いで、酸性化UF-HSを酸化剤、特に過酸化物化合物又は超酸化物化合物、例えば過酸化水素と高温で反応させることによって調製されてきた。これらの条件下で、特に式Iの構造を有する医薬UF-HSの構造を保持するが、他のLMW-HS化合物と同じおおよその分子量及び抗凝固活性範囲にある酸化LMW-HS生成物を形成することができる。

【0359】

この反応条件の制御は、互いに異なる抗凝固活性及び分子量特性を有し、例えば、その開示全体が参照により組み込まれる米国特許第4,281,108号、米国特許第4,629,699号及び米国特許第4,791,195号、並びに欧州特許EP0101141号に記載されている酸化LMW-HS組成物の生成をもたらしている。特に、酸性化UF-HSは、医薬UF-HSを塩酸などの強酸、又はアスコルビン酸などの弱酸と反応させることによって形成されている。酸性化UF-HSはまた、医薬UF-HSを強カチオン交換樹脂に結合させることによって形成されている。同様に、解重合条件は、解重合が起こるpH及び温度、並びに酸化剤自体に関して制御することができる。

【0360】

臨床用途のために処方されている酸化LMW-HS組成物の非限定的な例には、パルナパリン(CAS番号: 91449-79-5; ATCコード: B01AB05)及びアルデパリン(CAS番号: 9005-49-6)が挙げられる。特に、パルナパリンは、静脈血栓塞栓症の予防、慢性静脈障害の治療、並びに静脈血栓症及び動脈血栓症の治療に使用されている(例えば、Camporese, G., et al., (2009) Vascular Health and Risk Management 5: 819-831を参照)。特定の理論に制限されるものではないが、パルナパリンは、アスコルビン酸を使用して酸性化UF-HSを形成し、続いて、酢酸第二銅一水和物及び過酸化水素の存在下、わずかに塩基性の条件下で、 50°C でインキュベートしながら酸性化UF-HSを解重合することによって生成されと考えられる(米国特許第4,791,195号、実施例1を参照)。患者に投与されているパルナパリンは、少なくとも $4,000 \text{ Da}$ から $6,000 \text{ Da}$ まで、典型的には $5,000 \text{ Da}$ の範囲のMwと、 $3,000$ 未満のMrを有する多糖の割合が組成物の30%以下であり、少なくとも $3,000$ から $8,000$ までの範囲のMrを有する多糖の割合が組成物の50%~60%であるようなサイズ分布とを有する。さらに、パルナパリン組成物は、少なくとも 75 IU mg^{-1} 及び 110 IU mg^{-1} 以下の抗Xa活性、及び/又は少なくとも $1.5:1$ から $3.0:1$ までの抗Xa活性と抗IIa活性との比を有することができる(“

Parnaparin Sodium” (2010) European Pharmacopoeia 7.0, 2672を参照)。

一方、患者に処方されているアルデパリン組成物は一般に、少なくとも5,500 Daから6,500 Daまで、典型的には6,000 Daの範囲のMw、 120 ± 25 IU mg⁻¹の抗Xa活性、及び少なくとも2.0:1から2.5:1まで、特徴的には2.3:1の抗Xa活性と抗IIa活性との比を有する。

【0361】

したがって、他の態様において、上記の本発明の方法のいずれかにより合成されるN, 2, 3, 6-HS生成物は、その後、酸化剤によって解重合されて酸化LMW-HS生成物を形成することができる。他の態様において、酸化LMW-HS生成物は、化学構造、分子量、抗凝固活性及び/又は硫酸化含有量特性を挙げることができるがこれらに限定されない、パルナパリンと同一の1つ以上の特性を有する。他の態様において、酸化LMW-HS生成物はパルナパリンと実質的に同一である。他の態様において、酸化LMW-HS生成物は、化学構造、分子量、抗凝固活性及び/又は硫酸化含有量特性を挙げることができるがこれらに限定されない、アルデパリンと同一の1つ以上の特性を有する。他の態様において、酸化LMW-HS生成物はアルデパリンと実質的に同一である。

10

【0362】

他の態様において、酸化LMW-HS生成物は、上記の本発明の方法のいずれかにより合成されるN, 2, 3, 6-HS生成物から、以下の工程、(a)上記の方法のいずれかによりN, 2, 3, 6-HS生成物を合成する工程；(b)酸化剤、好ましくは過酸化水素を有する酸化反応混合物を提供する工程；及び(c)N, 2, 3, 6-HS生成物の少なくとも一部を解重合するのに十分な時間、酸化反応混合物を用いてN, 2, 3, 6-HS生成物を処理し、それにより酸化LMW-HS生成物を形成する工程；により形成することができる。他の態様において、酸化反応混合物を用いてN, 2, 3, 6-HS生成物を処理する工程は、以下のサブ工程、(i)N, 2, 3, 6-HS生成物を酸性化して、酸性化N, 2, 3, 6-HS生成物を形成するサブ工程；(ii)酸性化HS生成物を酸化反応混合物と組み合わせるサブ工程；及び(c)酸化LMW-HS生成物が形成されるまで、少なくとも50の温度で酸化反応混合物内で酸性化HS生成物をインキュベートするサブ工程；を有することができる。他の態様において、酸化反応混合物を用いてN, 2, 3, 6-HS生成物を処理する工程は、米国特許第4,791,195号の実施例1の手順を有することができる。他の態様において、酸化LMW-HS生成物は式Iの構造を有する。他の態様において、N, 2, 3, 6-HS生成物は未分画N, 2, 3, 6-HS生成物である。

20

30

【0363】

他の態様において、酸化LMW-HS生成物を形成するのに十分な時間は、該生成物が所望の平均分子量を有するのに十分な時間である。他の態様において、酸化LMW-HS生成物のMwは2,000 Da~12,000 Daの範囲内、好ましくは4,000 Da~6,500 Daの範囲内である。他の態様において、酸化LMW-HS生成物のMwは4,000 Da~6,000 Daの範囲内、好ましくは5,000 Daである。さらなる態様において、酸化LMW-HS生成物は、3,000未満のMrを有する多糖の割合が組成物の30%以下であり、少なくとも3,000から8,000までの範囲のMrを有する多糖の割合が組成物の50%~60%であるようなサイズ分布を有する。他の態様において、酸化LMW-HS生成物のMwは5,500 Da~6,500 Daの範囲内、好ましくは6,000 Daである。

40

【0364】

他の態様において、酸化LMW-HS生成物は抗凝固活性を有することができる。他の態様において、酸化LMW-HS生成物は、少なくとも75 IU mg⁻¹の抗Xa活性を有する。他の態様において、酸化LMW-HS生成物は、110 IU mg⁻¹以下の抗Xa活性を有する。他の態様において、酸化LMW-HS生成物は、抗Xa活性と抗IIa活性との比が少なくとも1.5:1から3.0:1までである。他の態様において、酸化LMW-HS生成物は、抗Xa活性と抗IIa活性との比が少なくとも2.0:1か

50

ら 2 . 5 : 1 まで、好ましくは 2 . 3 : 1 である。

【 0 3 6 5 】

当業者であれば、L M W - H S 組成物の上記の例、及び 1 つ以上の改変型アリール硫酸依存性スルホトランスフェラーゼ酵素を用いて合成される N , 2 , 3 , 6 - H S 生成物からそれらを形成する方法が非網羅的であり、そのような他の例は、明確さ及び簡潔さのために除外されることを理解するであろう。N , 2 , 3 , 6 - H S 生成物、特に未分画 N , 2 , 3 , 6 - H S 生成物が上記の方法のいずれかにより形成されると、これは、任意の公知のプロセスによって修飾及び / 又は解重合されて、二次生成物、特に L M W - H S 生成物を形成することができる。そのようなプロセスには、限定するものではないが、溶媒を使用した分画（フランス特許第 2,440,376 号、米国特許第 4,692,435 号）；アニオン性樹脂を使用した分画（フランス特許第 2,453,875 号）；ゲル濾過；アフィニティークロマトグラフィー（米国特許第 4,401,758 号）；限定するものではないが、亜硝酸（欧州特許 EP0014184 号、欧州特許 EP0037319 号、欧州特許 EP0076279 号、欧州特許 EP0623629 号、フランス特許第 2,503,714 号、米国特許第 4,804,652 号及び P C T 公開国際公開第 81/03276 号）、ヘパリンエステルからの β 脱離（欧州特許 EP0040144 号、米国特許第 5,389,618 号）、ペリオデート（欧州特許 EP0287477 号）、水素化ホウ素ナトリウム（欧州特許 EP0347588 号、欧州特許 EP0380943 号）、アスコルビン酸（米国特許第 4,533,549 号）、過酸化水素（米国特許第 4,629,699 号、米国特許第 4,791,195 号）、ヘパリンの第四級アンモニウム塩からの水酸化第四級アンモニウム（米国特許第 4,981,955 号）、アルカリ金属水酸化物（欧州特許 EP0380943 号、欧州特許 EP0347588 号）を含む化学剤による、炭素 - 酸素リアーゼ酵素（欧州特許 EP0064452 号、米国特許第 4,396,762 号、欧州特許 EP0244235 号、欧州特許 EP0244236 号；米国特許第 4,826,827 号；米国特許第 3,766,167 号）を使用した、照射による（欧州特許 EP0269981 号）制御された解重合、高速移動 H S 画分の精製及び修飾（米国特許第 7,687,479 号、米国特許第 8,609,632 号）、並びにその開示全体が参照により組み込まれる米国特許第 4,303,651 号、米国特許第 4,757,057 号、米国特許公開第 2007/287683 号、P C T 公開国際公開第 2009/059284 号及び P C T 公開国際公開第 2009/059283 号に記載されているものなどの他の方法、又は方法の組合せが含まれる。

【 0 3 6 6 】

改変型アリール硫酸依存性スルホトランスフェラーゼ酵素の調製

一般に、開示する核酸及びアミノ酸配列によってコードされる改変型スルホトランスフェラーゼは、後述のものを含む、当技術分野で公知の任意の微生物学的技術を使用して発現及び精製することができる。各精製酵素のアリール硫酸依存性スルホトランスフェラーゼ活性は、出発物質及び / 又は硫酸化多糖生成物を特徴付けるために、分光光度的若しくは蛍光的に、及び / 又は質量分析法（M S）若しくは核磁気共鳴（N M R）分光法を使用して決定することができる。そのような方法は実施例の項で後述する。

【 0 3 6 7 】

本発明の方法により利用される改変型遺伝子産物、タンパク質、及びポリペプチドはまた、開示した D N A 又はペプチド配列と比較して、挿入、欠失、又は変異を含み、また、アリール硫酸化合物が基質である反応を触媒する酵素をコードする類似体も有することができる。他の態様において、各類似体は、アリール硫酸化合物がスルホ供与体として利用されるスルホ転移反応を同様に触媒する。類似体は、本明細書に開示するヌクレオチド又はアミノ酸配列から誘導することができ、又はこれらはコンピュータモデリング技術を使用してインシリコ又はデノボで合成的に設計することができる。当業者は、まだ開示されていないか又は発見されていない他の類似体を使用して、本発明の方法により利用することができる異なる硫酸依存性スルホトランスフェラーゼ酵素を設計及び / 又は構築することができることを理解するであろう。遺伝子産物、タンパク質、又はポリペプチドは、本明細書に開示する改変型スルホトランスフェラーゼの核酸又はアミノ酸配列の全て又は実質的に全てを含む必要はない。そのような配列は、本明細書では「セグメント」と呼ばれる。さらに、本明細書で論じられ開示する遺伝子産物、タンパク質、及びポリペプチドは

また、本発明で開示する配列の全長配列又は生物学的に機能的なセグメントを含む融合又は組換えアリール硫酸依存性スルホトランスフェラーゼも有することができる。そのようなタンパク質を調製する方法は当技術分野で公知である。

【0368】

本明細書に開示する核酸及びアミノ酸配列に加えて、本発明の方法は、上記の開示されるアミノ酸配列のいずれかと実質的に同一なアミノ酸配列を有するアリール硫酸依存性スルホトランスフェラーゼにより実行することができるか、又は開示するアミノ酸配列（配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、又は配列番号27）と実質的に同一であるヌクレオチド配列を有する核酸から発現されるアミノ酸配列を有するアリール硫酸依存性スルホトランスフェラーゼによって実行される。当業者は、上記ヌクレオチド配列に基づく、配列番号33～配列番号54及び配列番号56～61のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする適切なヌクレオチド配列をヌクレオチド配列を決定することができる。当技術分野で使用される「実質的に同一」な配列は、1つ以上の欠失、置換、又は付加によって特定の参照配列とは異なる配列を指し、その実際の効果は、参照配列によってコードされる改変型ポリペプチドの生物活性の少なくとも一部を保持することである。すなわち、改変型アリール硫酸依存性スルホトランスフェラーゼの生物活性は、スルホ供与体アリール硫酸化合物からスルホ基受容体として作用する多糖へのスルホ基の転移を有する。他の態様において、多糖は、ヘパロサン系及び/又はHS多糖類である。したがって、本発明のアリール硫酸依存性酵素を記載するのに用いるとき、「実質的な同一性」は、アリール硫酸依存性酵素の特定の遺伝子産物、ポリペプチド、若しくはアミノ酸配列、又はアリール硫酸依存性酵素をコードする遺伝子若しくは核酸配列との同一性のいずれかを指すことができる。そのような配列は、開示した配列の変異、又は生物活性がある程度変化、増強、若しくは減少するが、開示した参照核酸配列によってコードされる開示した参照アミノ酸配列又はポリペプチドの元の生物活性の少なくとも一部を保持する配列を有することができる。

【0369】

あるいは、DNA類似体配列は、(a) DNA類似体配列が、開示する核酸配列のいずれかのコード領域に由来する場合、又は(b) DNA類似体配列が、ストリンジェントな条件下において(a)のDNA配列をハイブリダイゼーション可能であり、生物活性なアリール硫酸依存性スルホトランスフェラーゼ遺伝子産物をコードする場合、又は(c) DNA配列が、(a)及び/又は(b)で定義されたDNA類似体配列に対する代替遺伝子コードの結果として縮重している場合、本明細書に開示する特定のDNA配列と実質的に同一である。実質的に同一の類似体タンパク質は、天然タンパク質の対応する配列と約60%超同一である。より低い程度の同一性を有するが、同等の生物活性を有する配列、すなわち、アリール硫酸化合物から、多糖類、特にヘパロサン系又はHS多糖類へスルホ基を転移させる配列もまた、実質的に同一であると考えられる。核酸配列の実質的な同一性を決定する際に、実質的に同一のアミノ酸配列をコードすることができる全ての対象核酸配列は、生物学的に機能的な等価物を作り出すためのコドン配列又はアミノ酸置換の違いにかかわらず、参照核酸配列と実質的に同一であると見なされる。

【0370】

生物学的レベルでは、同一性とは、すなわち遺伝子ファミリーの所与のファミリーメンバー中の同じ相対位置にある同じアミノ酸のことをいう。相同性及び類似性は、一般に、より広い用語として見なされる。例えば、生化学的に類似したアミノ酸、例えばロイシン及びイソロイシン又はグルタミン酸/アスパラギン酸は、代替的に同じ位置に存在することができ、これらはそれ自体同一ではないが、生化学的に「類似している」。本明細書に開示するように、これらは保存的差異 (conservative difference) 又は保存的置換と呼ばれる。これは、両方ともセリンをコードするコードされたアミノ酸、例えばTCCからTCAへの変化を起こさずにヌクレオチド配列を変化させる、DNAレベルでの保存的変異とは異なる。

10

20

30

40

50

【 0 3 7 1 】

ある態様において、遺伝子及び遺伝子産物は、それぞれの配列内に、アリール硫酸依存性スルホトランスフェラーゼ又はその対応するタンパク質をコードする遺伝子の「本質的に同様」の配列を有する。アリール硫酸依存性スルホトランスフェラーゼをコードする遺伝子の配列と本質的に同様の配列は、開示した核酸配列の一部と実質的に同一又は実質的に類似であり、開示したタンパク質若しくは遺伝子の配列と同一ではないか、又は生物学的に機能的同等物ではない少数の塩基又はアミノ酸（DNA又はタンパク質にかかわらない）を含む、配列を指す。生物学的機能的同等性は、当技術分野において十分に理解されており、以下でさらに詳細に論じられる。ヌクレオチド配列は「本質的に同じ」であり、これらは、開示する遺伝子のヌクレオチド配列と同一である核酸残基の、約 75%～約 85%、又は特に約 86%～約 90%、又はより具体的には 90%超、又はさらにより具体的には約 91%～約 95%、又はさらにより具体的には約 96%～約 99%を有する。同様に、開示したポリペプチド配列のアミノ酸と同一又は機能的に同等若しくは生物学的に機能的に同等である、約 80%、又は 90%、又は特に 90～95%、又はより具体的には 96%超、又はさらにより具体的には 95～98%、又はさらにより具体的には 99%以上のアミノ酸を有するペプチド配列は、「本質的に同じ」配列であろう。

【 0 3 7 2 】

さらに、機能的に等価なコドンを含む代替の核酸配列もまた、本発明に包含される。機能的に等価なコドンとは、同じアミノ酸をコードするコドン、例えば、セリンの ACG 及び AGU コドン を指す。したがって、機能的に等価なコドンを上記ヌクレオチド配列のいずれかに置換することにより、生物学的に機能上等価なスルホトランスフェラーゼをコードする。したがって、本発明は、そのような置換を含むが、便宜上その全体が本明細書に記載されないアミノ酸及び核酸配列を有する。

【 0 3 7 3 】

当業者は、アミノ酸及び核酸配列が、さらなる N 末端若しくは C 末端アミノ酸又は 5' 若しくは 3' 核酸配列などのさらなる残基を有することができるが、それでもなお、配列がスルホ供与体としてのアリール硫酸化合物との結合及び反応に関してその生物活性を保持する限り、本明細書に開示する配列の 1 つに本質的に示す通りとすることができることを認識するであろう。末端配列の付加は、特に、例えばコード領域の 5' 若しくは 3' 部分のいずれかに隣接する様々な非コード配列を有することができるか、又は遺伝子内で生じることが知られている様々な内部配列若しくはイントロンを有することができる核酸配列に適用される。

【 0 3 7 4 】

上述のように、開示したアリール硫酸依存性スルホトランスフェラーゼのいずれかの配列は、同様の又は他の望ましい特徴を有する分子を依然として構成しながら、保存的及び非保存的変異、欠失、及び付加を含む、修飾及び変更を行うことができる。例えば、特定の構造又は化合物、特にアリール硫酸化合物及び/若しくはスルホ受容体多糖類との相互作用能力の顕著な喪失なしに、特定のアミノ酸を、タンパク質構造中の他のアミノ酸で置換することができる。これは、タンパク質がその環境内の他の構造又は化合物を認識し、結合し、反応する能力が、配列自体ではなくそのタンパク質の生物学的機能活性を定義するために起こり得る。したがって、同一の、増強されるか又は減少した特性を有するタンパク質を得るために、そのタンパク質の配列において特定のアミノ酸配列置換を行うことができる。相互作用活性の明らかな喪失なしに起こり得るそのようなアミノ酸置換の 1 つの非限定的な例には、タンパク質のフォールディング及び溶解性に影響を及ぼさないタンパク質の外部ドメイン又は表面における置換が含まれる。同様に、タンパク質がその基質をフォールディングするか又はその基質を認識して結合する能力が、有害に影響されない限り、タンパク質のいずれかの末端にアミノ酸を潜在的に付加することができる。当業者は、いくつかの他の方法及び/又は戦略を利用して、その活性に影響を与えることなく酵素の配列を変更することができることを理解することができる。

【 0 3 7 5 】

したがって、修飾酵素が親酵素の生物活性を保持する親酵素の構造又は配列に対する変異、欠失、付加又は他の改変は、親酵素と生物学的に機能的に同等であると定義することができる。したがって、得られた修飾酵素が多糖類、特にヘパロサン系及びノ又はHS多糖類へのスルホ転移を触媒するために、アリール硫酸化合物、特にPNS又はNCSとの相互作用に依存する限り、改変型アリール硫酸依存性スルホトランスフェラーゼと比較して、生物学的に機能的な同等の酵素は、本明細書に開示するアミノ酸配列の任意の置換又は修飾を有することができる。特に、そのような置換又は修飾は、後述するように、タンパク質の任意の部分のアミノ酸配列における保存的変異から生じることができるが、酵素の非触媒活性領域における非保存的変異もまた企図される。したがって、本発明の方法を実行するのに適した改変型アリール硫酸依存性スルホトランスフェラーゼは、生物学的に機能的な同等の酵素をコードするヌクレオチド配列を有する任意の核酸から発現され得るが、そのようなヌクレオチド配列は、便宜上その全体が本明細書に記載されていない。

10

【0376】

あるいは、組換えDNA技術を使用して、交換されるアミノ酸の特性を考慮してタンパク質構造の変化を操作することができる生物学的に機能的に等価なタンパク質又はペプチドを作製することができる。合理的に設計された変更は、例えば特定の変異が酵素のアリール硫酸依存性触媒活性又は酵素の活性部位内のスルホ供与体若しくは受容体の結合に、正又は負の影響を及ぼすかどうかを試験するために、部位特異的突然変異誘発技術の適用によって導入することができる。

【0377】

20

アミノ酸置換（例えば、本明細書に記載するアリール硫酸依存性スルホトランスフェラーゼのいずれかを修飾する際に使用することができる置換）は、一般に、アミノ酸側鎖置換基の相対的類似性、例えばそれらの疎水性、親水性、電荷、及びサイズなどに基づく。当業者は、アミノ酸側鎖置換基のサイズ、形状、及びタイプなどの特定のアミノ酸間の類似性に精通している。非限定的な例として、アルギニン、リジン、及びヒスチジンが全て正に荷電した残基であること；アラニン、グリシン、及びセリンは全て同じサイズであること；フェニルアラニン、トリプトファン、及びチロシンは全て、概して同様の形状を有することなどの関係が挙げられる。結果として、以下の基（アルギニン、リジン、及びヒスチジン；アラニン、グリシン、及びセリン；並びにフェニルアラニン、トリプトファン、及びチロシン）を含むアミノ酸は、本明細書では、同じ基の他のアミノ酸に対する生物学的に機能的な等価物として定義される。他の生物学的に機能的に等価な変化は、当業者には理解されるであろう。

30

【0378】

他の態様において、本発明は、本発明の改変型酵素の機能的断片をコードする単離された核酸、又は本明細書に記載の改変型スルホトランスフェラーゼ酵素のいずれかのアミノ酸配列内の特定の残基に対して保存的置換が行われたその変異体を提供する。

【0379】

さらに、本発明の方法を実行することができるアリール硫酸依存性スルホトランスフェラーゼを発現するのに用いられる単離された核酸は、様々な用途で使用するために他の核酸配列と結合させることができる。したがって、例えば、単離された核酸は、当技術分野で一般的に知られており、実施例で後述するように、クローニングベクター又は発現ベクターにライゲーションすることができる。さらに、核酸は、当技術分野で一般的に知られているように、融合タンパク質を形成するように別のポリペプチドをコードする配列にインフレームで結合させることができる。融合タンパク質は、溶解性、精製、又は免疫検出などのために、所望の機能を有する他のタンパク質又はペプチドと同じ発現単位内で整列された、アリール硫酸依存性スルホトランスフェラーゼのコード領域を有することができる。したがって、他の態様において、本発明の方法に利用することができるアリール硫酸依存性スルホトランスフェラーゼをコードする上記の核酸のいずれかを含むクローニング、発現、及び融合ベクターもまた提供される。

40

【0380】

50

なお、本発明の核酸セグメントは、コード配列自体の長さにかかわらず、他のDNA配列、例えばプロモータ、エンハンサ、ポリアデニル化シグナル、追加の制限酵素部位、多回クローニングサイト、及び他のコードセグメントなどと、それらの全長がかなり変化し得るように組み合わせることができる。当業者は、ほぼ任意の長さの核酸フラグメントを使用することができ、全長は、典型的には、意図された組換えDNAプロトコルにおける調製及び使用の容易さによって制限されることを認識するであろう。

【0381】

特に、遺伝子又はDNAセグメントのコード部分がプロモータの制御下に位置する組換えベクターが、特に有用である。ある態様において、コードDNAセグメントは、細菌細胞、ウイルス細胞、真核細胞、又は哺乳動物細胞から単離されたプロモータと会合することができる。発現のために選択された細胞型に特異的なプロモータがしばしば最も効果的である。タンパク質発現のためのプロモータと細胞型の組合せの使用は分子生物学の当業者に一般的に知られている（例えば、その全体が参照により組み込まれる、Sambrook et al. (2012) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Fourth Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.を参照のこと）。使用されるプロモータは構成的又は誘導性であってもよく、例えば、組換えタンパク質又はペプチドの大規模生産において有利であるなどの、導入されたDNAセグメントの高レベル発現を指示するために適切な条件下で使用することができる。高レベルの発現に有効であることが多い適切なプロモータ系には、ワクシニア・ウイルス・プロモータ、バキュロウイルスプロモータ、及びPtacプロモータが含まれるが、これらに限定されない。

10

20

【0382】

したがって、ある態様において、本発明に適した生物活性なアリール硫酸依存性スルホトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列を有する発現ベクターを利用することができる。一例では、発現ベクターは、アリール硫酸依存性スルホトランスフェラーゼ遺伝子産物をコードする任意のヌクレオチド配列を有することができる。さらなる態様において、発現ベクターは、上述のヌクレオチド配列のいずれか、又は上記改変型スルホトランスフェラーゼ酵素のいずれかのアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする任意のヌクレオチド配列を有する核酸を有する。なおさらなる態様において、本発明の改変型アリール硫酸依存性スルホトランスフェラーゼ酵素をコードする任意の核酸配列は、酵素を産生するのに用いられる発現宿主に基づいて、コドン最適化することができる。組換えベクターの調製及びコドン最適化は当業者に周知であり、例えばSambrook et al. (2012) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Fourth Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.などの多くの参考文献に記載される。

30

【0383】

当業者は、発現されるDNAコード配列、この場合、アリール硫酸依存性スルホトランスフェラーゼ遺伝子産物をコードするDNAコード配列が、プロモータに隣接し、プロモータの制御下にあるベクターに配置されることを認識するであろう。当技術分野で公知のように、プロモータは、典型的には、転写が開始する点（すなわち、転写開始部位）の上流（すなわち、5'から）の約100ヌクレオチド対以内のDNA分子の領域である。その領域は、典型的には、異なる遺伝子において同様の相対位置に位置するいくつかのタイプのDNA配列エレメントを含む。コード配列をそのようなプロモータの制御下に置くために、選択されたプロモータの約1～約50ヌクレオチド「下流」に（すなわち、3'に）発現される遺伝子産物の転写リーディングフレームの転写開始部位の5'末端を一般に配置することが、当技術分野で理解されている。

40

【0384】

元の挿入されたDNA内に適切なポリアデニル化部位が含まれていない場合、適切なポリアデニル化部位（例えば、5'-AATAAA-3'）をベクターの転写単位に組み込むこともまた望まれ得る。典型的には、ポリA付加部位は、コード配列の約30～2000

50

ヌクレオチド「下流」の転写終結前の位置に配置される。

【0385】

別のタイプの別個の転写調節配列エレメントは、エンハンサである。エンハンサは、特定のコード領域又は遺伝子に時間、位置、及び発現レベルの特異性を課す。エンハンサの主な機能は、そのエンハンサに結合する1つ以上の転写因子を含有する細胞におけるコード配列の転写レベルを増加させることである。エンハンサは、プロモータが存在する限り、転写開始部位から可変距離に位置する場合に機能することができる。

【0386】

場合により、本発明の発現ベクターは、エンハンサプロモータに作動可能に連結されたポリヌクレオチドを含む。本明細書で使用される場合、「エンハンサプロモータ」という語句は、エンハンサエレメントとプロモータエレメントの両方を含有する複合単位を意味する。例えば、発現ベクターは、真核生物プロモータであるエンハンサプロモータに作動可能に連結されたポリヌクレオチドを含むことができ、発現ベクターは、カルボキシ末端アミノ酸の3'及びコードされたポリペプチドの転写単位内に位置するポリアデニル化シグナルをさらに含む。本明細書で使用される場合、「作動可能に連結された」という語句は、コード配列の転写がそのエンハンサプロモータによって制御及び調節されるように、エンハンサプロモータがコード配列に接続されていることを意味する。コード配列にエンハンサプロモータを作動可能に連結するための技術は当技術分野で周知である。目的のコード配列に対する正確な配向及び位置は、とりわけ、エンハンサプロモータの特異的性質に依存する。

【0387】

本発明のベクター構築物に使用されるエンハンサプロモータは、トランスフェクトされる細胞における発現を駆動する任意のエンハンサプロモータとすることができる。周知の特性を有するエンハンサプロモータを使用することによって、遺伝子産物発現のレベル及びパターンを最適化することができる。

【0388】

本発明の方法を実行するのに適したスルホトランスフェラーゼは、それらの核酸のクローン増殖及び/又はそれによってコードされるタンパク質若しくはペプチドの発現を引き起こすように本発明の核酸が導入された、原核生物又は真核生物のいずれかの細胞又は細胞株内で発現することができる。そのような細胞又は細胞株は、核酸を増殖及び産生するのに、また、アリアル硫酸依存性スルホトランスフェラーゼそのものを産生するのに有用である。本明細書で使用される場合、「形質転換細胞」という用語は、形質転換、トランスフェクション、形質導入、感染、又は他の手段によるかどうかにかかわらず、本発明の核酸のいずれかが導入された、任意の細胞又は任意の細胞の子孫を包含するように意図される。適切なベクターを作製し、それらのベクターで細胞を形質転換し、形質転換体を同定する方法は、当技術分野で周知である（例えば、Sambrook et al. (2012) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Fourth Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.を参照のこと）。

【0389】

形質転換細胞の産生に有用な原核細胞には、細菌属エシェキリア (*Escherichia*) (例えば、*E. coli*)、シュードモナス (*Pseudomonas*) (例えば、緑膿菌 (*P. aeruginosa*))、及びバチルス (*Bacillus*) (例えば、枯草菌 (*B. subtilis*)、バチルス・ステアロサーモフィルス (*B. stearothermophilus*)) のメンバー、並びに当技術分野でよく知られており、頻繁に使用されている、他の多くのものが含まれる。原核細胞は、大量のタンパク質又はペプチド (例えば、アリアル硫酸依存性酵素、その配列のフラグメント、それらの配列を含む融合タンパク質) の産生に特に有用である。細菌細胞 (例えば、*E. coli*) は、例えば、T7 RNAポリメラーゼ/プロモータ系、バクテリオファージλ調節配列又はM13ファージ調節エレメントを有するプラスミドを含む様々な発現ベクター系と共に使用することができる。細菌宿主はまた、例えばプロテインA、lacZ、trpE、マルトース結合タンパク質 (MBP)、低分子ユビキチン様修飾因子 (S

10

20

30

40

50

U M O)、ポリ - H i s タグ、又はグルタチオン - S - トランスフェラーゼ (G S T) 融合タンパク質を作製する、融合タンパク質ベクターで形質転換することができる。これらの全て、並びに多くの他の原核生物発現系は、当技術分野で周知であり、広く市販されている (例えば、G S T 融合物の場合、p G E X - 2 7 (A m r a d、米国))。

【 0 3 9 0 】

本発明のある態様において、上記のヌクレオチド配列のいずれかを有する発現ベクターはまた、任意のアリール硫酸依存性スルホトランスフェラーゼとの融合タンパク質をコードする遺伝子又は核酸配列を有することができる。さらなる態様において、発現ベクターは、マルトース結合タンパク質をコードする m a l E 遺伝子をさらに有することができる。そのような発現ベクターからタンパク質発現を誘導する際、発現された遺伝子産物は、マルトース結合タンパク質を含む融合タンパク質と、上記のアリール硫酸依存性スルホトランスフェラーゼ酵素のいずれかと、を有する。他のさらなる態様において、上記アリール硫酸依存性スルホトランスフェラーゼ酵素のいずれかをコードする上記の核酸のいずれかを含む発現ベクターは、S U M O 修飾因子、例えば非限定的な例では、S U M O - 1 をコードする遺伝子をさらに含むことができる。

10

【 0 3 9 1 】

他の態様において、本発明による発現ベクターは、ポリ - H i s タグをコードする核酸配列をさらに含むことができる。そのような発現ベクターからタンパク質発現を誘導する際、発現された遺伝子産物は、ポリ - H i s タグを含む融合タンパク質と、上記アリール硫酸依存性スルホトランスフェラーゼ酵素と、を有する。さらなる態様において、発現ベクターは、ポリ - H i s タグをコードする核酸配列と、m a l E 遺伝子又はS U M O 遺伝子の両方を含むことができ、そこから、ポリ - H i s タグ、M B P、又はS U M O を含む融合タンパク質を任意のアリール硫酸依存性スルホトランスフェラーゼ酵素と共に発現させることができる。

20

【 0 3 9 2 】

形質転換細胞を作製するために有用な真核細胞及び細胞株には、哺乳動物細胞 (例えば、内皮細胞、肥満細胞、C O S 細胞、C H O 細胞、線維芽細胞、ハイブリドーマ、卵母細胞、胚性幹細胞)、昆虫細胞株 (例えば、Drosophila Schneider 細胞)、酵母、及び真菌が含まれる。そのような細胞の非限定的な例には、C O S - 7 細胞、C H O、細胞、マウス初代心臓微小血管内皮細胞 (C M E)、マウス肥満細胞株 C 5 7 . 1、臍帯静脈のヒト初代内皮細胞 (H U V E C)、F 9 胚性がん腫細胞、ラット脂肪パッド内皮細胞 (R F F P E C)、及び L 細胞 (例えば、マウス L T A t k - 細胞) が含まれるが、これらに限定されない。

30

【 0 3 9 3 】

ベクターは、リン酸カルシウムトランスフェクション、リン酸ストロンチウムトランスフェクション、D E A E デキストラントランスフェクション、電気穿孔、リポフェクション、マイクロインジェクション、マイクロビーズへのバリスティック挿入、プロトプラスト融合を含むがこれらに限定されない当技術分野で周知の様々な方法によって、又はウイルス若しくはファージベクターの場合、組換えウイルス若しくはファージによる感染によって、レシピエント又は「宿主」細胞に導入することができる。

40

【 0 3 9 4 】

他の態様において、本発明は、任意の上記改変型スルホトランスフェラーゼアミノ酸配列内にある特定の残基について保存的又は非保存的置換が行われた、アリール硫酸依存性スルホトランスフェラーゼバリエーションを提供する。保存的又は非保存的置換は、酵素が測定可能な触媒活性 (すなわち、アリール硫酸化合物から多糖、特にヘパロサン系及び / 又は H S 多糖類へのスルホ基の転移) を保持する限り、活性部位を取り囲むか又は触媒作用に関与する残基を含む、アミノ酸配列の任意の地点で行うことができる。他の態様において、アリール硫酸化合物は P N S である。さらに他の態様において、アリール硫酸化合物は N C S である。

【 0 3 9 5 】

50

他の態様において、アリール硫酸依存性スルホトランスフェラーゼ酵素は、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、配列番号 16、配列番号 18、配列番号 20、配列番号 22、配列番号 24、配列番号 26、配列番号 28、及び配列番号 33 ~ 配列番号 54 として開示したものを含む、上記改変スルホトランスフェラーゼ酵素のいずれかのアミノ酸配列と比較して、少なくとも 60 %、70 %、80 %、85 %、90 %、又は 95 %、最大で少なくとも 99 % のアミノ酸配列同一性を含む、少なくとも 50 % のアミノ酸配列同一性を有する一方、アリール硫酸化合物から多糖、特にヘパロサン系及び / 又は HS 多糖類へのスルホ基の転移のその触媒活性を維持する。そのような配列を当業者は日常的に生成することができ、スルホトランスフェラーゼ活性は、本明細書に開示するものなどの日常的な方法によって試験することができる。

【0396】

さらに、他の態様において、本明細書に記載の方法のいずれかに従って利用される改変型アリール硫酸依存性スルホトランスフェラーゼのいずれかのアミノ酸配列（複数可）は、スルホトランスフェラーゼがアリール硫酸依存性活性を有する限り、スルホ供与体として 3'-ホスホアデノシン 5'-ホスホ硫酸を使用して同じ反応を触媒する野生型スルホトランスフェラーゼとのパーセント同一性として特徴付けることができる。例えば、他の態様において、本発明の方法のいずれかに従って利用することができる改変型アリール硫酸依存性グルコサミニル N-スルホトランスフェラーゼは、EC 2.8.2.8 酵素クラス内の任意の野生型酵素の N-スルホトランスフェラーゼドメインのアミノ酸配列（その生物学的機能的フラグメントを含む）と、少なくとも 55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、又は 95 %、最大で少なくとも 97 % を含む、少なくとも 50 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有することができる。さらなる態様において、改変型アリール硫酸依存性グルコサミニル N-スルホトランスフェラーゼは、野生型ヒトグルコサミニル N-デアセチラーゼ / N-スルホトランスフェラーゼ酵素（上記の図 3 中の、エントリ s p | P 5 2 8 4 8 | N D S T _ 1 _ H U M A N）の N-スルホトランスフェラーゼドメインのアミノ酸配列と少なくとも 55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、又は 95 %、最大で少なくとも 97 % を含む、少なくとも 50 % の配列同一性を有することができる。

【0397】

他の態様において、本発明の方法のいずれかにより利用することができる改変型アリール硫酸依存性ヘキサロニル 2-Oスルホトランスフェラーゼは、EC 2.8.2.- 酵素クラス内の野生型ヘキサロニル 2-Oスルホトランスフェラーゼ酵素のいずれかのアミノ酸配列（その生物学的機能的フラグメントを含む）と、少なくとも 55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、又は 95 %、最大で少なくとも 97 % の配列同一性を含む、少なくとも 50 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有することができる。さらなる態様において、改変型アリール硫酸依存性ヘキサロニル 2-Oスルホトランスフェラーゼは、野生型ニワトリヘキサロニル 2-Oスルホトランスフェラーゼ酵素（上記の図 14 A ~ 図 14 D のエントリ s p | Q 7 6 K B 1 | H S 2 S T _ C H I C K）のアミノ酸配列と少なくとも 55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、又は 95 %、最大で少なくとも 97 % を含む、少なくとも 50 % の配列同一性を有することができる。

【0398】

他の態様において、本発明の方法のいずれかにより利用することができる改変型アリール硫酸依存性グルコサミニル 6-Oスルホトランスフェラーゼは、EC 2.8.2.- 酵素クラス内の野生型グルコサミニル 6-Oスルホトランスフェラーゼ酵素のいずれかのアミノ酸配列（その生物学的機能的フラグメントを含む）と、少なくとも 55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、又は 95 %、最大で少なくとも 97 % の配列同一性を含む、少なくとも 50 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有することができる。さらなる態様において、改変型グルコサミニル 6-Oスルホトランスフェラ

ーゼは、マウスグルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ (UniProtKB 寄託番号 Q9QYK5) の第 1 のアイソフォームのアミノ酸配列と、少なくとも 55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、又は 95 %、最大で少なくとも 97 % を含む、少なくとも 50 % の配列同一性を有することができる。さらなる態様において、改変型アリアル硫酸依存性グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼは、マウスグルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ (上記の図 18A ~ 図 18C におけるエントリ Q9QYK5 | H6ST1__MOUSE) の第 1 のアイソフォームのアミノ酸配列の残基 67 ~ 377 と、少なくとも 55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、又は 95 %、最大で少なくとも 97 % を含む、少なくとも 50 % の配列同一性を有することができる。

10

【0399】

他の態様において、本発明の方法のいずれかに従って利用することができる改変型アリアル硫酸依存性グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼは、EC 2.8.2.23 酵素クラス内の野生型酵素のいずれかのアミノ酸配列 (その生物学的機能的フラグメントを含む) と、少なくとも 55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、又は 95 %、最大で少なくとも 97 % の配列同一性を含む、少なくとも 50 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有することができる。さらなる態様において、改変型アリアル硫酸依存性グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼは、野生型ヒトグルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ (UniProtKB 受託番号 O14792) の第 1 のアイソフォームのアミノ酸配列の残基 48 ~ 311 と、少なくとも 55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、又は 95 %、最大で少なくとも 97 % を含む、少なくとも 50 % の配列同一性を有することができる。

20

【0400】

実質的に純粋なアリアル硫酸依存性スルホトランスフェラーゼは、様々な用途で使用するために他のポリペプチド配列に結合することができる。したがって、例えば、改変型スルホトランスフェラーゼは、当技術分野で一般的に知られているように、融合タンパク質を形成するように 1 つ以上の追加のポリペプチドに結合することができる。追加のポリペプチドは、アリアル硫酸依存性スルホトランスフェラーゼ酵素の N 末端、C 末端、又は両末端に結合することができる。そのような融合タンパク質は、追加のポリペプチド配列が容易に同定されるか (例えば、抗原決定基を提供することによって)、容易に精製されるか (例えば、親和性精製のためのリガンドを提供することによって)、又は溶液中のアリアル硫酸依存性スルホトランスフェラーゼ酵素の溶解性を高める場合に、特に有用であり得る。

30

【0401】

他の態様において、実質的に純粋なタンパク質は、完全なアリアル硫酸依存性スルホトランスフェラーゼのアミノ酸配列の一部又はフラグメントのみを有してもよい。場合によって、特に最小フラグメントが酵素の溶解性又は反応性を高める場合、アリアル硫酸依存性スルホトランスフェラーゼ活性を保持する最小フラグメントを使用することが好ましい場合がある。したがって、ある態様において、本発明の方法は、全長形態、又はその最小限の機能的フラグメントを含む、任意の長さの実質的に純粋なアリアル硫酸依存性スルホトランスフェラーゼを用いて実施することができる。さらに、これらのタンパク質は、上記の保存的又は非保存的置換バリエーションも有することができる。

40

【0402】

ある態様において、本発明は、上述のアミノ酸配列のいずれかを有するものを含む、アリアル硫酸依存性スルホトランスフェラーゼの実質的に純粋な調製を提供する。改変型スルホトランスフェラーゼは、それらのタンパク質配列によって明らかにされた特性に基づいて選択された様々な方法のいずれかによって実質的に精製することができる。典型的には、アリアル硫酸依存性スルホトランスフェラーゼ、融合タンパク質、又はそのフラグメントは、上記のように、発現ベクターで形質転換又はトランスフェクトされた細胞から精製することができる。昆虫、酵母、真核生物、又は原核生物の発現系を使用することがで

50

き、当技術分野で周知である。タンパク質又はフラグメントが、ゴルジ体、小胞体、又はそのような細胞の他の膜含有構造に由来するミクロソーム内に局在する場合、タンパク質は適切な細胞画分から精製することができる。あるいは、タンパク質がこれらの構造内に局在しないか、又は組換え細胞内の封入体中に凝集しない場合（例えば、原核細胞）、タンパク質は、標準的な手段によって全溶解細胞又は可溶化された封入体から精製することができる。

【0403】

精製は、親和性クロマトグラフィ、ゲル濾過クロマトグラフィ、イオン交換クロマトグラフィ、高速液体クロマトグラフィ（RP-HPLC、イオン交換HPLC、サイズ排除HPLC）、高速クロマトフォーカスクロマトグラフィ、疎水性相互作用クロマトグラフィ、免疫沈降、又は免疫親和性精製を含むが、これらに限定されない、標準的なタンパク質精製手順を使用して達成することができる。ゲル電気泳動（例えば、PAGE、SDS-PAGE）を使用して、その分子量、電荷特性、及び疎水性に基づいてタンパク質又はペプチドを単離することもできる。

10

【0404】

アリール硫酸依存性スルホトランスフェラーゼ、又はそのフラグメントは、抗原決定基、ポリヒスチジンタグ（例えば、QIAexpressベクター、QIAGEN Corp.、Chatsworth、カリフォルニア州）、又はより大きなタンパク質（例えば、pGEX-27ベクターを使用したGST（Amrad、米国）、Green Lanternベクターを使用した緑色蛍光タンパク質（GIBCO/BRL、Gaithersburg、メリーランド州）、pMALベクターを使用したマルトース結合タンパク質（New England Biolabs、Ipswich、マサチューセッツ州）、又はSUMOタンパク質などの別のペプチドに融合した所望の配列を有する融合タンパク質を作製することによっても、簡便に精製することができる。融合タンパク質は、原核細胞又は真核細胞から発現及び回収され、融合ベクター配列に基づく任意の標準的な方法によって精製することができる。例えば、融合タンパク質は、融合物の非アリール硫酸依存性スルホトランスフェラーゼ部分に対する抗体との免疫親和性若しくは免疫沈降によって、又はポリ-Hisタグの場合、ニッケルカラムへの親和性結合によって精製することができる。次いで、所望のアリール硫酸依存性スルホトランスフェラーゼタンパク質又はフラグメントを、融合タンパク質の酵素的切断によって融合タンパク質からさらに精製することができる。タンパク質の精製のため

20

30

【0405】

さらに、ある態様において、任意のアリール硫酸依存性スルホトランスフェラーゼをコードする単離された核酸を使用して、宿主細胞を形質転換することができる。次いで、得られたタンパク質を、以下の実施例に記載する方法を含むがこれらに限定されない周知の方法によって実質的に精製することができる。あるいは、単離された核酸は、無細胞インビトロ翻訳系において利用することができる。このような系もまた当技術分野で周知である。

【0406】

本発明の特定の態様を説明したが、本発明は、本開示の精神及び範囲内でさらに変更することができる。当業者は、本明細書に記載の特定の手順、態様、特許請求の範囲、及び実施例に対する多数の等価物を認識するか、又は日常的な実験のみを使用して確認することができるであろう。したがって、そのような同等物は、本発明の範囲内にあると考えられ、したがって、本出願は、その一般的な原理を使用して本発明の任意の変形、使用、又は適合を網羅することを意図している。さらに、本発明は、本発明が関連し、添付の特許請求の範囲に含まれる技術分野における既知の又は慣習的な実施に含まれるような本開示からの逸脱を網羅することを意図している。

40

【0407】

明確にするために、別個の態様の文脈で説明されている本発明の特定の特徴は、単一の

50

態様において組み合わせで提供されてもよいことが理解される。逆に、簡潔にするために、単一の態様の文脈で記載される本発明の様々な特徴はまた、別個に、又は任意の適切な部分的組合せで、又は本発明の任意の他の記載された態様で適切であるように提供されてもよい。様々な態様の文脈で説明される特定の特徴は、態様がそれらの要素なしでは動作不能でない限り、それらの態様の本質的な特徴と見なされるべきではない。

【0408】

本明細書で言及される全ての参考文献、特許、及び特許出願の内容は、参照により本明細書に組み込まれ、そのような参考文献が本発明の先行技術として利用可能であることの承認として解釈されるべきではない。本明細書に組み込まれた刊行物及び特許出願の全ては、本発明が関連する技術分野の当業者のレベルを示しており、あたかも各個々の刊行物又は特許出願が具体的に示され、個々に参照によって示されたのと同じ程度まで組み込まれる。

10

【0409】

本発明を以下の実施例及び予測例によってさらに説明するが、いずれも本発明を限定するものと解釈すべきではない。さらに、項目の見出しが使用される範囲では、それらは必ずしも限定的であると解釈すべきではない。建設的又は予測的であると別途示されている例を説明するための過去時制のいかなる使用も、建設的又は予測例が実際に実行されたことを反映することを意図していない。

【実施例】

【0410】

20

以下の実施例及び予測例は、現在最もよく知られている本発明の態様を示す。しかしながら、以下は、本発明の原理の適用の単なる例示又は説明であることを理解されたい。本発明の精神及び範囲から逸脱することなく、当業者によって多数の改変及び代替の組成物、方法、及びシステムが考案することができる。したがって、本発明を具体的に上述したが、以下の実施例は、本発明の最も実用的で好ましい態様であると現在考えられているものに関連してさらに詳細を提供する。

【0411】

実施例1：改変型アリール硫酸依存性スルホトランスフェラーゼのクローニング、発現、及び精製

本開示の態様に従って、本発明による遺伝子を、改変型アリール硫酸依存性スルホトランスフェラーゼを過剰発現することができる宿主細胞に形質転換することができるかどうかを決定するための試験を行った。発現後、各アリール硫酸依存性酵素を、宿主細胞から単離し、精製した。

30

【0412】

一般に、任意の配列の遺伝子をコードするDNAは、オリゴヌクレオチド合成及びアニーリングを含むがこれらに限定されない、当技術分野で一般的に公知の方法によってデノボで合成することができる。あるいは、DNAを商業的に合成しても、ThermoFisher Scientific (GenScript、DNA 2.0) 又はOriGeneを含むがこれらに限定されない、所与の配列の遺伝子を定期的に合成するいくつかの実験室のいずれかから購入してもよい。当業者は、同じサービスを提供するいくつかの会社が存在し、上記に提供したリストはそれらのほんの一例にすぎないことを理解するであろう。目的の遺伝子は、独立して合成され、続いて、従来の分子生物学技術を使用して細菌若しくは他の発現ベクターに挿入することができるか、又はこの遺伝子は、発現ベクター自体を有するDNAと同時に合成することができる。目的の遺伝子と同様に、適切な発現ベクターも合成又は商業的に入手することができる。多くの場合、細菌発現ベクターは、宿主細胞に選択的抗生物質耐性を付与する遺伝子、及びイソプロピルβ-D-1-チオガラクトピラノシド (IPTG) の添加に応答して細胞が目的のタンパク質を過剰産生することを可能にする遺伝子を含む。タンパク質発現を誘導するためにIPTGを使用する目的のタンパク質の細菌産生は、当技術分野で広く知られている。

40

【0413】

50

上記のように、発現ベクターはまた、タンパク質フォールディング及び溶解性を補助するために追加の公知のタンパク質と同時発現される所望のタンパク質を含む、融合タンパク質の産生を可能にする遺伝子を含むことができる。一般的に産生され、当技術分野で周知である融合タンパク質の非限定的な例として、MBP、SUMO、又は緑色蛍光タンパク質との融合物が挙げられる。特に、MBP融合タンパク質は、MBPがいくつかの親和性クロマトグラフィカラムで使用されるアミロース系樹脂に対して高い親和性を有するので、より容易な精製を促進する一方、SUMO融合タンパク質は、固定相として Ni^{2+} 系樹脂を用いたカラムでの親和性精製を可能にするポリヒスチジンタグを有することができる。多くの場合、目的のタンパク質とMBP及び/又はSUMOとの間の融合タンパク質は、場合により、2つのタンパク質を連結するアミノ酸連結配列を有することができる。MBP融合タンパク質を産生するために購入することができる市販の発現ベクターの非限定的な例として、New England Biolabsから入手することができるpMAL-c5E（商標）及びpMAL-c5X（商標）ベクターが挙げられる。同様に、別の非限定的な例では、市販の発現ベクターを購入して、Life Sensors, Inc.から入手可能なpE-SUMOpromAMPベクターなどのSUMO融合タンパク質を産生することもできる。融合タンパク質が産生され、単離されると、切断が活性に必要な場合に、プロテアーゼを利用して、融合タンパク質及び任意の関連リンカー配列をスルホトランスフェラーゼから切断することができる。

10

【0414】

さらに、発現ベクターはまた、目的のタンパク質のN末端又はC末端のいずれかで合成することができるポリヒスチジンタグをコードするDNAを有することができる。MBP融合物と同様に、ポリヒスチジンタグを含むタンパク質は、タグが多くの精製カラムで利用される Ni^{2+} 樹脂に対して高い親和性を有するので、酵素精製を単純化する。さらに、酵素の最適な活性に必要な場合、精製後にポリヒスチジンタグを切断してもよい。C末端ポリヒスチジンタグをコードする発現ベクターの非限定的な例は、Novagenから入手可能なpET21bベクターである。ポリヒスチジンタグをコードする発現ベクターの別の非限定的な例は、SUMOタンパク質のN末端にポリヒスチジンタグをコードするpE-SUMOベクターである。

20

【0415】

本実施例では、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号24、配列番号26又は配列番号28のアミノ酸配列を有する改変型アリール硫酸依存性スルホトランスフェラーゼをそれぞれコードする、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、又は配列番号27のヌクレオチド配列を有する二本鎖DNAフラグメントを、Integrated DNA Technologies' (IDT) gBlocks（登録商標）Gene Fragments synthesis serviceを用いて合成した。ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を開始して、発現ベクターへの挿入を容易にするために、適切な制限酵素認識配列を有する順方向及び逆方向プライマを使用し、各二本鎖DNAフラグメントのコピーを生成した。改変型グルコサミニルN-スルホトランスフェラーゼ酵素（配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11）及びグルコサミニル3-Oスルホトランスフェラーゼ酵素（配列番号23、配列番号25、配列番号27）をコードする遺伝子は、NdeI及びBamHI制限酵素認識配列を含有し、NEBによって提供されるクイックライゲーションキットを用いてpMAL-c5x発現ベクターにライゲーションした。次いで、発現ベクターをコンピテントDH5- α 大腸菌細胞に形質転換した。単一クローンを、100 μL / mLのアンピシリンを含むLB培地中でインキュベートした。形質転換宿主細胞内の各遺伝子及び発現ベクターのヌクレオチド配列を、市販のDNAシーケンシング（GeneWiz）によって確認した。

30

40

【0416】

50

グルコサミニル N - 及び 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素のタンパク質発現は、確認された DNA 構築物をコンピテント S H u f f l e (登録商標) T 7 E x p r e s s l y s Y 大腸菌細胞にまず形質転換することによって達成された。グルコサミニル N - 及び 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素のタンパク質発現は、確認された DNA 構築物をコンピテント B L 2 1 (D E 3) 大腸菌細胞に形質転換することによってもまた達成される。いずれかの構築物から、得られたコロニーを使用して L B 培地中 2 5 0 m L の培養物に接種し、これを振盪し、およそ 0 . 4 ~ 0 . 6 の 6 0 0 n M (O D 6 0 0) での光学密度が観察されるまで 3 2 でインキュベートした。1 8 で各培養物に 1 0 0 μ M I P T G を添加することによって発現を誘導した。

【 0 4 1 7 】

1 8 で一晚インキュベートし、3 , 6 2 0 g で遠心分離し、ペレットを再懸濁緩衝液 1 0 m L (2 5 m M T r i s - H C l , p H 7 . 5 ; 0 . 1 5 M N a C l ; 0 . 2 m g / m L リゾチーム ; 1 0 μ g / m L D N a s e I ; 5 m M M g C l 2 ; 及び 0 . 1 % (w / v) T r i t o n - X 1 0 0) 中に再懸濁することによって、発現細胞を回収した。再懸濁した細胞を、氷上で 1 0 秒間 3 回のパルス超音波処理で溶解し、続いて 0 . 4 5 μ m シリンジフィルタに通した。得られた上清を、2 5 m M T r i s - H C l , p H 7 . 5 及び 0 . 1 5 M N a C l を含む結合緩衝液に懸濁した D e x t r i n S e p h a r o s e (登録商標) 樹脂 (G E B i o s c i e n c e s) を有する、5 m L スピнкаラム (G - b i o s c i e n c e s) に充填した。2 5 m M T r i s - H C l , p H 7 . 5 ; 0 . 1 5 M N a C l ; 及び 4 0 m M マルトースを含む溶出緩衝液を添加すると、目的の酵素がカラムから溶出した。

【 0 4 1 8 】

一方、改変型ヘキサロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼ酵素 (配列番号 1 3、配列番号 1 5) 及びグルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素 (配列番号 1 7、配列番号 1 9、配列番号 2 1) をコードする遺伝子は、B s a I 及び X b a I 制限酵素認識配列を含有し、p E - S U M O ベクター (LifeSensors, Inc.) にライゲーションされた。次いで、発現ベクターをコンピテント B L 2 1 - D E 3 大腸菌細胞に形質転換した。単一クロンを、1 0 0 μ L / m L のアンピシリンを含むテリフィックブロス (Terrific Broth) 中でインキュベートした。形質転換宿主細胞内の各遺伝子及び発現ベクターのヌクレオチド配列を、市販の DNA シーケンシング (G e n e W i z) によって確認した。

【 0 4 1 9 】

改変型ヘキサロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼ酵素及びグルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素のタンパク質発現は、5 0 0 m L の培養物をテリフィックブロス中にアンピシリンと共に接種し、培養物をおよそ 0 . 6 ~ 0 . 8 の O D 6 0 0 に達するまで 3 5 で振盪しながらインキュベートすることによって達成した。0 . 2 m M I P T G を 1 8 で添加することによってタンパク質発現を誘導した。次いで、培養物を 1 8 で一晚インキュベートし、続いて溶解し、グルコサミニル N - ルホトランスフェラーゼ酵素及びグルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素への手順を使用して濾過した。その後、ヘキサロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼ酵素及びグルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素を、2 5 m M T r i s - H C l , p H 7 . 5、0 . 1 5 M N a C l、5 m M M g C l 2、及び 3 0 m M イミダゾールを含む結合緩衝液に懸濁した H i s P u r N i - N T A 樹脂 (T h e r m o f i s h e r) を有する、5 m L スピнкаラム (G - b i o s c i e n c e s) で精製した。2 5 m M T r i s - H C l , p H 7 . 5、0 . 1 5 M N a C l、5 m M M g C l 2、及び 3 0 0 m M イミダゾールを含む溶出緩衝液を添加すると、目的の酵素がカラムから溶出した。

【 0 4 2 0 】

実施例 2 : 改変型アリール硫酸依存性グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ酵素の N - 硫酸化多糖生成物の質量分析特性評価

質量分析 (M S) を使用して、それらのスルホ転移反応の結果として形成される N - 硫

10

20

30

40

50

酸化多糖生成物の存在を検出することによって、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、又は配列番号 12 のアミノ酸配列を有する酵素のグルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ活性を確認するために、本開示の態様に従って試験を行った。各改変型酵素を実施例 1 の手順に従って精製した。スルホトランスフェラーゼ活性を、 $50\text{ }\mu\text{M}$ 酵素を含有する反応物 $100\text{ }\mu\text{L}$ においてモニタした。各精製タンパク質溶液について、アリール硫酸化合物 20 mg (PNS 又は NCS のいずれか) を反応緩衝液 2 mL (50 mM MES pH 7.0、 2 mM CaCl_2) に溶解し、タンパク質溶液に添加し、 37°C で 10 分間インキュベートした。N - 脱アセチル化ヘパロサンの 2 mg/mL 溶液 2.5 mL をタンパク質 / 供与体溶液に添加し、 37°C で一晩インキュベートした。N - 脱アセチル化ヘパロサンは、Balagurunathan, K. et al (eds.) (2015), Glycosaminoglycans: Chemistry and Biology, Methods in Molecular Biology, vol. 1229, DOI 10.1007/978-1-4939-1714-3_2, cSpringer Science+Business Media, New York, pp.11-19 (section 3.1)に記載のプロトコルに従って合成した。N - 硫酸化生成物を精製するために、インキュベートした反応混合物を翌日 $5,000\times g$ で 10 分間遠心分離した。フィルタを水 2 mL で 1 回洗浄し、再度遠心分離した。濾液を 1 K MWCO 透析膜に添加し、Milli-Q 水中で 2 日間透析し、 1 時間、 2 時間、 8 時間、 16 時間、 32 時間で水を交換し、次いで凍結乾燥した。

10

【0421】

続いて、各反応からの凍結乾燥 N - 硫酸化生成物を、配列番号 30、配列番号 31、及び配列番号 32 のアミノ酸配列を有する 3 つの炭素 - 酸素リアーゼの混合物で消化した。これは、ヘパロサン系多糖類の β 脱離切断を触媒する。そのようなリアーゼは、数ある化学的及び生物学的な商業団体の中でも、New England Biolabs から入手可能である。各リアーゼ $1\text{ }\mu\text{L}$ を凍結乾燥硫酸化多糖生成物 $50\text{ }\mu\text{g}$ 及び提供された消化緩衝液とインキュベートし、各リアーゼと共に New England Biolabs によって提供された、パッケージされた説明書に従って、 24 時間にわたりインキュベートした。消化後、リアーゼ酵素を 100°C に 5 分間加熱することによって不活性化した。試料を $14,000\text{ rpm}$ で 30 分間遠心分離後、強陰イオン交換高速液体クロマトグラフィ (SAX) 分析に導入した。SAX 分析は Dionex Ultimate 3000 LC システムインターフェースで行った。分離は、粒径 $5.0\text{ }\mu\text{m}$ の $4.6\times 250\text{ mm}$ Waters Spherisorb 分析カラムで 45°C にて行った。移動相溶液 A は 2.5 mM リン酸ナトリウム (pH 3.5) であり、移動相溶液 B は 2.5 mM リン酸ナトリウム (pH 3.5) 及び 1.2 M 過塩素酸ナトリウムであった。各試料をカラムに充填した後、移動相溶液 A を 98% 、移動相溶液 B を 2% の比率にて流速 1.4 mL/分 で 5 分間カラムに適用した。 5 分後、移動相溶液 B を増加させる直線勾配を、移動相溶液 A と移動相溶液 B との比率が $50:50$ になるまで適用した。

20

30

【0422】

SAX 分析を使用して、試験した酵素のうち 6 つ全てがスルホトランスフェラーゼとして活性であることを決定した。しかしながら、各スルホトランスフェラーゼは、PNS 及び NCS の両方で必ずしも活性ではなかった。配列番号 2、配列番号 4、及び配列番号 10 のアミノ酸配列を有する酵素は NCS のみに活性を有し、配列番号 12 のアミノ酸配列を有する酵素は PNS のみに活性を有していた。配列番号 6 及び配列番号 8 のアミノ酸配列を有する酵素は、双方のアリール硫酸化合物に対して活性を有していた。

40

【0423】

反応の結果として生成した N - 硫酸化生成物の存在を示す SAX 分析からの代表的なクロマトグラムを図 26 に示す。出発物質及び生成物の両方を、配列番号 30、配列番号 31、及び配列番号 32 のアミノ酸配列を有するリアーゼで、上記の消化手順に従って消化した。Iduron, Ltd から市販される 2 つの二糖標準 (HD005 及び HD013) もまた SAX を用いて分析した。HD013 二糖は非置換グルコサミン残基及び還元されたヘキスロン酸を有する。HD005 二糖は、グルコサミン残基が N - 硫酸化されていることを除いて、HD013 と同じである。重ね合わされたクロマトグラムは全て標準化されて

50

いるので、各クロマトグラムの最も顕著なピークに標準化相対蛍光値 1.0 が割り当てられる。

【0424】

図 26 に示すように、HD013 二糖の最も顕著なピーク（* 記号で示す）はほぼすぐに溶出するが、HD005 二糖の最も顕著なピーク（** 記号で示す）はおよそ 17 分後に溶出する。正に荷電した種（HD013 など）は典型的にはカラムに結合しないが、負に荷電した種（HD005 など）はカラムに結合するので、これは SAX 条件下で予想される。同様に非硫酸化である N - 脱アセチル化ヘパロサンは、HD013 とほぼ同一の時間に最も顕著に溶出する。同様に、反応中に生成した凍結乾燥試料は、HD005 とほぼ同一の時間にピークを示し、試料が N - 硫酸化生成物を含有するであろうことを示す。各

10

【0425】

実施例 3：改変型アリール硫酸依存性ヘキサロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼ酵素の 2 - O 硫酸化多糖生成物の質量分析特性評価

スルホ受容体多糖は、化学的手段（製品 DSH001 / 2、Galen Laboratory Supplies より入手可能）により 2 - O 硫酸基が選択的に除去された市販の UF - HS であり、硫酸化生成物を含む消化試料の分析は、質量分析を用い、SAX ベースの高速液体クロマトグラフィ（LCMS）と組み合わせて行った以外、本開示の態様に従って、実施例 2 と同様の手順を用いて、スルホ転移反応の結果として形成される 2 - O 硫酸化多糖生成物の存在を検出することにより、配列番号 14 又は配列番号 16 のアミノ酸配列を有する酵素のヘキサロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼ活性を確認するための試験を実施した。

20

【0426】

配列番号 30、配列番号 31、及び配列番号 32 のアミノ酸配列を有する炭素 - 酸素リアーゼを用い、実施例 2 に記載の手順に従って 2 - O 硫酸化生成物を消化して得られた二糖を、Shimadzu LCMS - 8050 Triple Quadrupole Liquid Chromatograph Mass Spectrometer で定量した。消化した各試料 100 ng を、10 mM 炭酸水素アンモニウム（pH 10）で希釈した。二糖を Thermo Hypercarb HPLC カラム（100 × 2.1 mm、5 µm）で分離した。移動相は 10 mM 炭酸水素アンモニウム（pH 10）からなり、二糖を 0 % ~ 20 % のアセトニトリル勾配で 2.5 分間溶出し、次の 2.5 分間は 20 % に保持し、次の注入前に 0 % で 2 分間平衡化した。流速は 0.2 mL / 分であり、総運転時間は 7.1 分であった。

30

【0427】

LCMS からの抽出イオンクロマトグラムを、配列番号 14 又は配列番号 16 のアミノ酸配列を有する改変型酵素との反応から得られた 2 - O 硫酸化生成物に対応する図 27A 及び図 27B に示す。ピークを、一連の 8 つの二糖標準のクロマトグラム、及び同様にリアーゼ混合物も使用して消化した市販の UF - HS 多糖類（CAS コード：9041 - 08 - 1、Millipore Sigma から入手可能）100 ng からのクロマトグラムと比較した。8 つの参照二糖標準（DOA0、DOS0、DOA6、D2A0、DOS6、D2S0、D2A6、D2S6）は、N - 、2 - O、及び 6 - O 位で可変的に硫酸化されている二糖を表す。特に、二糖 D2S0 は、2 - O 位に硫酸化されたヘキサロニル残基と、N - 硫酸化グルコサミン残基とを有する二糖を表す。二糖標準（図示せず）、消化した市販の硫酸化多糖（図示せず）、及び配列番号 14 又は配列番号 16 のアミノ酸配列を有する改変型酵素の硫酸化多糖生成物の全てからのスペクトルからの保持時間及びピーク面積を下記

40

50

表 1 にまとめる。個々の二糖のイオン化は異なるため、E I C クロマトグラムにおける現在のパーセントは、それらの実際の存在量を表していない可能性がある。しかしながら、イオン化効率は、試料ごとに各二糖について同一である。したがって、試料ごとの同じ糖類のピーク面積パーセントの比較は、依然として達成できると考えられる。

【 0 4 2 8 】

【 表 1 】

表 1

ピーク No.	二糖類	ピーク面積%		
		商業標準	配列番号 14	配列番号 16
1	D0A0	3.9	5.9	9.1
2	D0S0	3.9	87.1	85.5
3	D0A6	3.4	ND	ND
4	D2A0	1.8	ND	ND
5	D0S6	11.8	4.1	3.1
6	D2S0	6.6	2.9	2.3
7	D2A6	1.6	ND	ND
8	D2S6	67.0	ND	ND

10

20

【 0 4 2 9 】

改変型酵素のスルホトランスフェラーゼ活性を、反応前に以前に脱硫されていたスルホ受容体多糖内のヘキサロン酸残基の 2 - O 位での再硫酸化によって確認した。これは、改変型酵素及び N C S の両方の反応から単離された生成物内の D 2 S 0 二糖の存在によって示される。特定の理論に制限されるものではないが、改変型酵素の活性は、ヘキサロン酸残基が N - 硫酸化されているが 6 - O 硫酸化されていないグルコサミン残基に隣接している多糖の一部との反応に依存するとも考えられる。これは、単離された硫酸化多糖生成物内に検出された D 2 S 6 (2 - O 硫酸化ヘキサロン酸残基及び N , 6 - 硫酸化グルコサミン残基) 及び D 2 A 6 (2 - O 硫酸化ヘキサロン酸残基及び 6 - O 硫酸化 N - アセチルグルコサミン残基) 二糖の欠如によって示される。これは、E C 2 . 8 . 2 . - 内の野生型ヘキサロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼと同様の反応性であり、式 I V 又は式 V のいずれかの構造を有する N - 硫酸化ヘパロサンと反応すると考えられる。

30

【 0 4 3 0 】

実施例 4 : 改変型アリール硫酸依存性グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素の 6 - O 硫酸化多糖生成物の質量分析特性評価

スルホ受容体多糖は、Kariya, Y., et al., (2000) J. Biol. Chem. 275 (34): 25949-25958 に記載の手順に従って、市販の U F - H S (C A S コード : 9 0 4 1 - 0 8 - 1、Millipore Sigma より入手可能) を 6 - O で化学的に脱硫酸して調製した以外、本開示の態様に従い、実施例 3 と同様の L C M S 手順を用いて、配列番号 1 8、配列番号 2 0、又は配列番号 2 2 のアミノ酸配列を有する酵素のグルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ活性を、それらのスルホ転移反応の結果として 6 - O 硫酸化多糖生成物の存在を検出することによって確認する試験を行った。

40

【 0 4 3 1 】

配列番号 1 8、配列番号 2 0、又は配列番号 2 2 のアミノ酸配列を有する改変型酵素との反応から得られた 6 - O 硫酸化生成物に対応する抽出イオンクロマトグラムをそれぞれ、図 2 8 A、図 2 8 B、及び図 2 8 C に示す。配列番号 1 8 及び配列番号 2 0 の配列を有する酵素は、N C S がスルホ基供与体である場合に活性である一方、配列番号 2 2 の配列を有する酵素は、P N S がスルホ基供与体である場合に活性であった。割り当てたピークは、8 つの参照二糖標準の決定された保持時間に基づいた。8 つの参照二糖標準 (D 0 A 0、D 0 S 0、D 0 A 6、D 2 A 0、D 0 S 6、D 2 S 0、D 2 A 6、及び D 2 S 6) は

50

、N - 、2 - O、及び6 - O位で可变的に硫酸化されている二糖を表す。D O A 6、D O S 6、D 2 A 6、及びD 2 S 6は、6 - O硫酸化グルコサミン残基を有する。S 6はN , 6 - 硫酸化グルコサミン残基を示し、A 6は6 - O硫酸化N - アセチルグルコサミン残基を示す。各クロマトグラムは、N , 6 - 硫酸化グルコサミン残基の合成に相関する2つの積分可能なピークである、D O S 6及びD 2 S 6を示し、それぞれ2 - O位で非硫酸化又は硫酸化のいずれかであるヘキスロン酸残基に隣接する。全ての標識化二糖のピーク面積%を以下の表2に示す。個々の二糖のイオン化は特にD O A 0及びD 2 S 6について異なるため、E I Cクロマトグラムにおける現在のパーセントは、それらの実際の存在量を表していない可能性がある。しかしながら、イオン化効率は、試料ごとに各二糖について同一である。したがって、試料ごとの同じ糖類のピーク面積パーセントの比較は、依然として達成できると考えられる。

10

【0432】

【表2】

表2

ピーク No.	二糖類	RT (分)	ピーク面積%		
			配列番号 18	配列番号 20	配列番号 22
1	D0A0	7.7	4.6	6.0	5.4
2	D0S0	16.4	14.2	18.4	13.0
3	D0A6	ND	ND	ND	ND
4	D2A0	20.0	1.1	1.8	1.3
5	D0S6	23.7	4.0	3.7	5.6
6	D2S0	25.6	73.5	68.4	72.4
7	D2A6	ND	ND	ND	ND
8	D2S6	32.7	2.5	1.7	2.3

20

【0433】

改変型酵素のスルホトランスフェラーゼ活性を、上記のY., et alによる手順によって脱硫酸されたグルコサミン残基の6 - O位での再硫酸化によって確認した。これは、各酵素との反応から単離された生成物中のD O S 6及びD 2 S 6二糖の存在によって示される。各改変型酵素の中で、D O S 6及びD 2 S 6二糖のピーク面積百分率を比較すると、配列番号22のアミノ酸配列を有するグルコサミニル6 - Oスルホトランスフェラーゼが最も活性であったと思われる。しかしながら、D O A 6及びD 2 A 6多糖類は、特定の理論に制限されるものではないが、改変型酵素によって生成した6 - O硫酸化生成物のいずれにおいても観察されなかったが、これらの酵素は、特にE C 2 . 8 . 2 . - . 内の天然の野生型グルコサミニル6 - Oスルホトランスフェラーゼの反応性に基づいて、反応前にN - アセチルグルコサミン残基の存在が確認される酵素及び/又は多糖の濃度を増加させることによって、異なる反応条件でスルホ基をN - アセチルグルコサミン残基に転移させることができると考えられる。

30

40

【0434】

実施例5：改変型アリール硫酸依存性グルコサミニル3 - Oスルホトランスフェラーゼ酵素の3 - O硫酸化多糖生成物の質量分析特性評価

スルホ受容体多糖が市販のU F - H S (C A Sコード：9041 - 08 - 1、Millipore Sigmaより入手可能)であった以外、本開示の態様に従い、実施例3と同様のL C M S手順を用いる反応を用いて、配列番号24、配列番号26、又は配列番号28のアミノ酸配列を有する酵素のグルコサミニル3 - Oスルホトランスフェラーゼ活性を、それらのスルホ転移反応の結果として3 - O硫酸化多糖生成物の存在を検出することによって確認する試験を行った。未修飾U F - H Sは約3 . 5 % (w / w) の3 - O硫酸化グルコサミン残基を含有するが、グルコサミン残基の約60%はN , 6 - 硫酸化されており、式Xの

50

ように 2 - O 硫酸化ヘキサロン酸残基に隣接している。その結果、これらの N , 6 - 硫酸化グルコサミン残基は依然として 3 - O 硫酸化することができる。

【 0 4 3 5 】

抽出したイオンクロマトグラムを、一連の 10 個の参照標準及び市販の多糖 100 ng (これもまたリアーゼ混合物を使用して消化した) のクロマトグラムと共に、図 29 A 及び図 29 B に示す。10 個の参照標準 (D0A0、D0S0、D0A6、D2A0、D0S6、D2S0、D2A6、D2S6、D0A6G0S3、及び D0A6G0S9) は、N - 、2 - O、3 - O、及び 6 - O の位置で可変的に硫酸化されている二糖又は四糖を表す (黒のスペクトル)。明確化のために、3 - O 硫酸化グルコサミン残基 (D0A6G0S3) 及び (D0A6G0S9) を含む参照ピークを、消化した市販の多糖スペクトル (赤で示す) で示す。配列番号 24 (PNS、黄色スペクトル)、配列番号 26 (PNS、紫色スペクトル) (NCS、緑色スペクトル)、及び配列番号 28 (NCS、青色スペクトル) のアミノ酸配列を有する酵素との反応から消化した硫酸化多糖生成物を表す 4 つの質量スペクトルを、消化した市販の多糖スペクトルの下に示す。標識された二糖及び四糖全てのピーク面積 % は下記表 3 に示す。個々の二糖のイオン化は特に D0A0 及び D2S6 について異なるため、EIC クロマトグラムにおける現在のパーセントは、それらの実際の存在量を表していない可能性がある。しかしながら、イオン化効率は、試料ごとに各二糖又は四糖について同一である。したがって、試料ごとの同じ糖類のピーク面積パーセントの比較は、依然として達成できると考えられる。

【 0 4 3 6 】

【表 3】

表 3

ピーク No.	二糖類	RT (分)	ピーク面積 %				
			市販標準	配列番号 24	配列番号 26 (NCS)	配列番号 28	配列番号 26 (PNS)
1	D0A0	4.5	1.9	0.6	0.8	1.4	N.D.
2	D0S0	22.5	3.7	1.4	1.7	2.3	N.D.
3	D0A6	24.6	4.2	2.8	3.1	4.5	N.D.
4	D2A0	26.2	2.2	0.5	0.8	0.5	N.D.
5	D0S6	37.5	16.0	10.9	10.6	13.1	N.D.
6	D2S0	38.5	6.5	4.9	5.4	5.4	N.D.
7	D2A6	40.3	1.6	0.8	0.8	0.9	N.D.
8	D2S6	48.4	60.3	73.4	71.6	64.0	100.0
9	D0A6G0S3	52.9	0.6	0.8	0.9	1.4	N.D.
10	D0A6G0S9	58.2	3.0	4.0	4.1	6.5	N.D.

【 0 4 3 7 】

各改変型酵素のスルホトランスフェラーゼ活性を、市販の UF - HS 試料と比較した、D0A6G0S3 (ヘキサロン酸 - 6 - O - 硫酸化 N - アセチルグルコサミン - グルクロン酸 - N , 3 , 6 - 硫酸化グルコサミン) 及び D0A6G0S9 (ヘキサロン酸 - 6 - O - 硫酸化 N - アセチルグルコサミン - グルクロン酸 - N , 3 - 硫酸化グルコサミン) 四糖の存在量の増加によって確認した。しかしながら、配列番号 26 の PNS 試料中の二糖の総存在量は、他の試料よりもはるかに低かった。その後の試験には、10 倍の注入量で実験を再実行すること、及びリアーゼ混合物で試料を再消化することが含まれた。にもかかわらず、D2S6 二糖のみを見出すことができたことから、最初に単離された配列番号 26 の PNS 硫酸化多糖試料の存在量が非常に低かったこと、及び / 又は多糖がリアーゼ消化に抵抗し、1 時間を超える保持時間でカラムから生成物が溶出する可能性があることが示された。

【 0 4 3 8 】

それでもなお、NMR 試験 (実施例 6 において以下に示す) は、PNS がアリアル硫酸化合物である場合、配列番号 26 のアミノ酸配列を有する酵素による 3 - O スルホトラン

スフェラーゼ活性を示した。また、配列番号 26 のアミノ酸配列を有する酵素は、NCS がアリアル硫酸化合物の場合、スルホトランスフェラーゼとして活性であると判定した。したがって、LCMS 実験中に配列番号 26 の PNS 硫酸化多糖試料について観察された結果は、酵素自体の活性ではなく、実験の目的のために製造された試料からの結果であると考えられる。その他の点では、市販の UF-HS 標準と比較して、配列番号 24、配列番号 26、及び配列番号 28 からの他の硫酸化多糖生成物の全てにおいて、より高い存在量の 3-O 硫酸化が見出された。

【0439】

実施例 6：核磁気共鳴を使用した改変型グルコサミニル 3-O スルホトランスフェラーゼのスルホトランスフェラーゼ活性の確認

10

配列番号 24、配列番号 26、及び配列番号 28 のアミノ酸配列を有する改変型酵素の 3-O スルホトランスフェラーゼ活性、特にスルホ基供与体として PNS を用いる配列番号 26 のアミノ酸配列を有する酵素の活性を確認するために本開示の態様に従って試験を行った。各酵素を実施例 1 の手順に従って精製した。各精製タンパク質溶液に、反応緩衝液 2 mL (50 mM MES pH 7.0、2 mM CaCl₂) に溶解したアリアル硫酸化合物 20 mg (PNS 又は NCS) をタンパク質溶液に添加し、37 で 10 分間インキュベートした。実施例 5 で利用した市販の UF-HS 多糖類の 2 mg/mL 溶液 2.5 mL をタンパク質 / 供与体溶液に添加し、37 で一晩インキュベートした。

【0440】

各反応物を 5,000 × g で 10 分間遠心分離し、予め湿らせた 30 K MWCO Amicon-15 フィルタに適用し、5,000 × g で 10 分間遠心分離した。フィルタを水 2 mL で 1 回洗浄し、再度遠心分離した。濾液を 1 K MWCO 透析膜に添加し、Milli-Q 水中で 2 日間透析し、1 時間、2 時間、8 時間、16 時間、32 時間で水を交換し、次いで凍結乾燥した。乾燥した白色粉末を D₂O 400 µL に再懸濁し、凍結乾燥して交換可能なプロトン除去し、次いで D₂O 600 µL に再懸濁して、NMR チューブ (Wilmad、0.38 mm × 7 インチ) に移した。スルホ転移が生じたかどうかを決定するために、水抑制を伴う Bruker 600 MHz NMR、32 スキャンで ¹H-NMR スペクトルを得た。全体的な反応スキームを図 30 に示す。図 30 において、グルコサミン残基のいずれかの 3-O 位置は、グルコサミニル 3-O スルホトランスフェラーゼ酵素によって硫酸化することができる。硫酸化 3-O 位置は、中心の多糖において丸で囲まれている。重水素交換時に共鳴を示す能力を有する交換可能なプロトンは、底部の多糖において太字で示す。粗混合物ピークを、スルホ受容体多糖及び関連する 3-O 硫酸化生成物の文献参照スペクトルに統合した。

20

30

【0441】

図 31 の重複スペクトルに示すように、市販の UF-HS に存在する 2-O 硫酸化イズロン酸の C2 炭素のプロトンに相関する 5.15 ppm の鋭いピークは、配列番号 24、配列番号 26、及び配列番号 28 のアミノ酸配列を有する酵素と反応すると消失する。目的のプロトンは、スペクトルの上に示す多糖において丸で囲まれている。PNS 及び / 又は NCS のいずれかと反応させた際、配列番号 24、配列番号 26、又は配列番号 28 のアミノ酸配列を有する酵素によって合成した 3-O 硫酸化生成物の ¹H NMR スペクトルを全て示す。各生成物スペクトルにおいて、IdoA_{2S} ピークはおよそ 5.0 ~ 5.05 ppm にシフトする。天然のヒトスルホトランスフェラーゼ酵素を同じ多糖基質及び 3'-ホスホアデノシン 5'-ホスホ硫酸と共にインキュベートした場合、同様の遷移が示される (データ示さず)。

40

【0442】

図 32 に示すように、4.5 ~ 3.5 の領域は、グルコサミン残基の 3-O 位への硫酸基の付加に応答して同様にシフトするいくつかのピークを示し、これらは全て、野生型ヒトグルコサミニル 3-O スルホトランスフェラーゼ酵素を同じ市販の UF-HS 基質及び 3'-ホスホアデノシン 5'-ホスホ硫酸とインキュベートしたときに観察される同じシフトと相関する。シフトするピークを曲線の矢印で示し、配列番号 24、配列番号 26、又

50

は配列番号 28 のアミノ酸配列を有する酵素が生成する 3 - O 硫酸化多糖類由来のピークの位置を直線の矢印で示す。最大のシフトは、G l c N s 3 s 6 s の H 3 について、3 . 7 p p m ~ 4 . 2 p p m に生じる。これは新たに付加された 3 - O 硫酸基に最も近いことに起因する。さらに、I d o 2 s の H 3 プロトン及び G l c N s 3 s 6 s の H 5 は両方とも 4 . 0 7 p p m のピークに向かって収束し、これは 2 つの重複するピークを示す。G l c N s 3 s 6 s の H 4 は、3 . 7 p p m 領域から 3 . 8 p p m 領域へと緩やかに低磁場側にシフトし、参照によると、G l c N s 6 s からの H 3 及び H 4、G l c A からの H 3、H 4、H 5 等の多くのピークが 3 . 7 p p m 領域から 3 . 6 p p m 領域にシフトしている。

【 0 4 4 3 】

実施例 7 : N - 硫酸化ヘパロサンの化学合成

10

本開示の態様に従って、スルホ受容体多糖類として利用することができる N - 硫酸化ヘパロサンを、本発明の改変型アリール硫酸依存性酵素、特に改変型ヘキスロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼ酵素のいずれかと化学合成する試験を行った。上記 Balagurunathan, K. et al. に記載のプロトコルに従って、N - 脱アセチル化ヘパロサンを調製した。特に、D E A E 樹脂から溶出したヘパロサンを、酢酸ナトリウムで飽和したエタノール中において - 3 0 で一晩沈殿させた後、水に再懸濁し、1 , 0 0 0 D a の分画分子量 (M W C O) を有するセルロース透析膜内で透析した。

【 0 4 4 4 】

ヘパロサンを N - 脱アセチル化するために、十分な水酸化ナトリウムペレット (約 4 . 0 g) を溶解して、水中に透析されたヘパロサンの 4 0 m L アリコート中の 2 . 5 M 溶液を作製した。溶液を 1 0 0 r p m で振盪しながら 5 5 で 1 6 時間インキュベートした。次いで、試料中の水酸化ナトリウムを、溶液の p H が約 7 . 0 に達するまで酢酸で中和し、次いで、1 , 0 0 0 M W C O 透析膜内で一晩水中にて透析した。

20

【 0 4 4 5 】

その後、炭酸ナトリウム 1 0 0 m g 及び三酸化硫黄 - トリエチルアミン錯体 1 0 0 m g を添加し、固体の全てが溶解するまで組成物を 4 8 でインキュベートすることによって、N - 脱アセチル化ヘパロサンの N - 硫酸化を達成した。次いで、酢酸を使用して、溶液の p H を約 9 . 5 に再調整した。1 0 0 r p m で振盪しながら 4 8 で一晩インキュベートした後、追加の炭酸ナトリウム 1 0 0 m g 及び三酸化硫黄 - トリエチルアミン錯体 1 0 0 m g を添加し、その後酢酸を使用して p H を約 9 . 5 に再調整した。溶液を 4 8 でさらに 2 4 時間インキュベートした。硫酸化多糖溶液を酢酸で p H を約 7 . 0 に中和し、1 , 0 0 0 M W C O 透析膜内で水中で一晩透析した。次いで、透析した N - 硫酸化ヘパロサンを更に使用する前に凍結乾燥した。次いで、N - 硫酸化ヘパロサンを Z e n i x S E C - 1 0 0 カラムに充填し、0 . 1 M 酢酸アンモニウム (p H 9 . 0) で均一濃度にて溶出することによってさらに精製した。

30

【 0 4 4 6 】

精製したヘパロサン系多糖の官能化を、配列番号 3 0、配列番号 3 1、及び配列番号 3 2 のアミノ酸配列を有する 3 つの炭素 - 酸素リアーゼの混合物で消化し、上記と同様の手順を用いて、S A X を使用して消化された試料を分析することによって特徴付けた。陽性対照として、N - 硫酸化グルコサミン残基を含有する実施例 2 の市販の H D 0 0 5 二糖も分析した。両方の試料の代表的なクロマトグラムを図 3 3 に示す。両クロマトグラムにおいて、約 1 6 . 5 分に強いピークが存在し、これは合成した試料が N - 硫酸化グルコサミン残基を含有することを示す。

40

【 0 4 4 7 】

実施例 8 : N , 2 - H S 多糖生成物の調製

改変型ヘキスロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼを用い、実施例 7 で合成した N - 硫酸化ヘパロサンをスルホ受容体として用いて、N , 2 - H S 多糖生成物を合成するために、本開示の態様に従って試験を行った。円錐底の遠心管中で、N C S の 8 0 m M アリコートを 5 0 m M M E S p H 7 . 0、2 m M C a C l 2 に溶解した。各溶液に、酵素試料の 2 8 0 n m の吸光度に基づいて配列番号 1 4 の配列を有する酵素 2 m g を添加した

50

(約 4 mL)。実施例 7 で合成した凍結乾燥 N - 硫酸化ヘパロサン 5 mg を水 1 mL に再懸濁し、酵素及び NCS を含む反応混合物に添加した。次いで、反応混合物全体を 30 rpm で振盪しながら 34 で 48 時間インキュベートした。インキュベートする前に、配列番号 29 のアミノ酸配列を有する C₅ - ヘキサロニルエピメラーゼ 2 mg も反応混合物に添加したことを除いて、同じ手順を用いて第 2 の組の反応物を調製した。

【0448】

両方の反応セットからの硫酸化多糖生成物を、最初に反応容器を沸騰水中に 10 分間置き、高速で遠心分離してペレットを形成することによって、反応混合物からタンパク質を沈殿させることにより精製した。多糖生成物を含有する上清をペレットからデカントし、1,000 MWCO 透析膜内の水中で一晩透析した。次いで、透析された生成物を、将来の使用のために凍結乾燥した。

10

【0449】

多糖生成物を特徴付けるために、凍結乾燥試料を 400 µL の水に再懸濁し、Q - Sepharose Fast Flow Column (GE Biosciences) を使用して精製した。試料を、20 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) 中、0 ~ 2 M NaCl の範囲の勾配を用いてカラムから溶出した。次いで、精製多糖類を、2 - O 硫酸化ウロン酸の二糖及び N - 硫酸化グルコサミンを含有する市販の多糖 HD002 (Iduron) と共に、上記の実施例 2 の手順に従って SAX によって消化し、分析した。エピメラーゼ酵素を含まないか又は含むかのいずれかの反応の代表的なクロマトグラムをそれぞれ、図 34 及び図 35 に示す。図 34 において、HD002 二糖についてのクロマトグラムは、約 21.1 分に単一の鋭いピークを有し、これは、反応生成物中のほぼ同一の時間における鋭いピークと相関しており、N, 2 - HS が反応の結果として形成された時間を示している。図 35 において、HD002 二糖は、他の二糖標準物質を含有する混合物中に提供され、この二糖は、図 34 の HD002 標準物質の溶出時間に対応する 20.5 分で溶出する HD002 に対応する。エピマー化反応生成物は、HD002 標準とほぼ同一の溶出時間で鋭いピークを有し、N, 2 - HS 生成物が反応の結果として形成されたことを示している。

20

【0450】

実施例 9 : N, 2, 6 - HS 生成物の調製

実施例 8 の N, 2 - HS 生成物をスルホ受容体多糖として使用し、且つ配列番号 18 のアミノ酸配列を有する改変型グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼを酵素として使用したことを除いて、実施例 8 の手順を用いて、N, 2, 6 - HS 生成物を合成するために本開示の態様に従って試験を行った。

30

【0451】

硫酸化多糖生成物及び市販の二糖の混合物の代表的なクロマトグラムを図 36 に示す。市販の混合物のクロマトグラムは、約 23.7 分でピークを示し、これは、2 - O 硫酸化ウロン酸及び N -、6 - O 硫酸化グルコサミンの二糖からなる HD001 (Iduron) と相関する一方、反応生成物は、23.4 分で同様のピークを示し、N, 2, 6 - HS が反応の結果として形成されたことを示す。N, 2, 6 - HS 生成物内に存在する他のピークには、未消化多糖 (2.5 分)、非置換ウロン酸及び N - アセチルグルコサミン (5.5 分)、並びに非置換ウロン酸及び N -、6 - O 硫酸化グルコサミンが含まれる。

40

【0452】

実施例 10 : N, 2, 3, 6 - HS 生成物の調製

実施例 9 の化学合成した N -、2 - O、6 - O 硫酸化多糖をスルホ受容体多糖として使用し、配列番号 28 のアミノ酸配列を有する改変型 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素をスルホトランスフェラーゼ酵素として使用することを除いて、実施例 8 の手順を用いて、N -、6 - O、3 - O 硫酸化グルコサミン及び 2 - O 硫酸化ヘキサロン酸残基を有する硫酸化多糖生成物を合成するために、本開示の態様に従って試験を行った。

【0453】

硫酸化多糖生成物を消化し、LCMS を使用して分析して、N, 2, 3, 6 - HS 生成

50

物の生成を確認した。LCMSを使用した試験を容易にするために、参照によりその開示全体が組み込まれるLawrence, R., et al., (2008) J. Biol. Chem. 283 (48): 33674-33684に記載の手順に従って、配列番号28のスルホトランスフェラーゼ酵素の硫酸化多糖生成物を単離し、アニリタグを用いて誘導体化した。要約すると、硫酸化生成物を化学的に修飾することによって、LCMSを使用して、市販のUF-HS及び他のN, 2, 3, 6-HS多糖を含むいくつかのGAGを比率測定的に(ratiometrically)定量及び比較することができる。Lawrence, R., et al.は、 $[^{12}\text{C}_6]$ -及び $[^{13}\text{C}_6]$ -アニリンによるリアーゼ生成二糖及び四糖の還元末端のタグ付けと、N-非置換グルコサミン残基のプロピオニル化とを記載している。二糖及び四糖の同位体タグ付けは、クロマトグラフィー保持時間に影響を及ぼさないが、質量分析を使用して識別することができる。

【0454】

実施例8に記載されるアニオン交換クロマトグラフィー、及び実施例7に記載される配列番号30、配列番号31及び配列番号32のアミノ酸配列を含む3つの炭素-酸素リアーゼの混合物による消化によって、硫酸化二糖生成物及び硫酸化四糖生成物を調製した。1 pmol及び10 nmolの消化された試料を1.5 mlの微量遠心管に移し、遠心エバポレーター内で乾燥させた。 $[^{12}\text{C}_6]$ -アニリン又は $[^{13}\text{C}_6]$ -アニリン(15 μl 、165 μmol)と、ジメチルスルホキシド：酢酸(7:3、v/v)中で新たに調製した1 M NaCNBH₃ 15 μl を各試料に加えた。反応を65℃で4時間、又は代替的に37℃で16時間行い、次いで、遠心エバポレーター内で乾燥させた。

【0455】

非置換アミンを無水プロピオン酸と反応させた。乾燥した試料を50%メタノール20 μl 中で再構成し、無水プロピオン酸(23.3 μmol)3 μl を加えた。反応を室温で2時間行った。その後、アシル化試料を上記のようにアニリンによりタグ付けした。

【0456】

実施例3に記載のShimadzu LCMS-8050質量分析計と同様の、エレクトロスプレーイオン化源を備えた四重極イオントラップ液体クロマトグラフ質量分析計を二糖分析に使用した。イオンペアリング剤ジブチルアミン(DBA)を用いて、C18逆相カラムで誘導体化及び非誘導体化二糖残基を分離した。イソクラティック工程は、10分間にわたる100%緩衝液A(8 mm酢酸、5 mm DBA)、15分間にわたる17%緩衝液B(70%メタノール、8 mm酢酸、5 mm DBA); 15分間にわたる32%緩衝液B、15分間にわたる40%緩衝液B、15分間にわたる60%緩衝液B; 10分間にわたる100%緩衝液B; 及び10分間にわたる100%緩衝液Aであった。一般に、3-O硫酸化生成物を含有する試料の質量スペクトルは、実施例5で上述したように、炭素-酸素リアーゼによる消化に耐性のある四糖に対応するm/zピークを生成すると予測される。生成され得る四糖には、4, 5-不飽和ウロン酸-N-アセチル化、6-O硫酸化グルコサミン-グルクロン酸-N-硫酸化、3-O硫酸化グルコサミン($\Delta\text{U}-\text{ANAc}_6\text{S}-\text{G}-\text{ANS}_3\text{S}$); 4, 5-不飽和ウロン酸-N-アセチル化、6-O硫酸化グルコサミン-グルクロン酸-N-硫酸化、3-O硫酸化、6-O硫酸化グルコサミン($\Delta\text{U}-\text{ANAc}_6\text{S}-\text{G}-\text{ANS}_3\text{S}_6\text{S}$); 4, 5-不飽和ウロン酸-N-硫酸化、6-O硫酸化グルコサミン-グルクロン酸-N-硫酸化、3-O硫酸化、6-O硫酸化グルコサミン($\Delta\text{U}-\text{ANS}_6\text{S}-\text{G}-\text{ANS}_3\text{S}_6\text{S}$); 4, 5-不飽和、2-O硫酸化ウロン酸-N-スルホグルコサミン-グルクロン酸-N-硫酸化、3-O硫酸化、6-O硫酸化グルコサミン($\Delta\text{U}2\text{S}-\text{ANS}-\text{G}-\text{ANS}_3\text{S}_6\text{S}$); 及び4, 5-不飽和、2-O硫酸化ウロン酸-N-硫酸化、6-O硫酸化グルコサミン-グルクロン酸-N-硫酸化、3-O硫酸化、6-O硫酸化グルコサミン($\Delta\text{U}2\text{S}-\text{ANS}_6\text{S}-\text{G}-\text{ANS}_3\text{S}_6\text{S}$)を挙げることができるがこれらに限定されない。特に、配列番号28のスルホトランスフェラーゼ酵素との反応から収集された消化多糖試料のLCMSは、 $\Delta\text{U}-\text{ANAc}_6\text{S}-\text{G}-\text{ANS}_3\text{S}_6\text{S}$ (m/z = 1036)、 $\Delta\text{U}-\text{ANS}_6\text{S}-\text{G}-\text{ANS}_3\text{S}_6\text{S}$ (m/z = 1074)及び $\Delta\text{U}2\text{S}-\text{ANS}_6\text{S}-\text{G}-\text{ANS}_3\text{S}_6\text{S}$ (m/z = 1154)四糖に対

応する m/z ピークを有する質量スペクトルを生成し（図示せず）、配列番号 28 の改変型スルホトランスフェラーゼ酵素との反応によって N, 2, 3, 6 - HS 生成物が生成されたことが示された。

【0457】

実施例 11：N, 2, 3, 6 - HS 生成物の抗凝固活性の確認

実施例 10 で製造した 3 - O 硫酸化多糖生成物がアンチトロンビンに対する結合親和性を有するかを決定する試験を、Meneghetti, G., et al. (2017) Org. Biomol. Chem. 15: 6792-6799 と同様な手順を用いて、本開示の態様に従って試験を行う。実施例 10 で製造した 3 - O 硫酸化多糖生成物の存在下、アンチトロンビンの融解曲線は、アンチトロンビンだけよりは高い融点を示すであろう。このことは、実施例 10 で製造した 3 - O 硫酸化多糖生成物が式 I の構造を有することを示唆している。

10

【0458】

実施例 12：他の EC 2.8.2.8 酵素の改変型アリール硫酸依存性変異体の決定

さらなるアリール硫酸依存性グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ酵素を操作するために、本開示の態様に従って試験を行う。上述のように、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、及び配列番号 12 のアミノ酸配列を有するアリール硫酸依存性グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ酵素を、酵素クラス EC 2.8.2.8 のメンバーであるヒトグルコサミニル N - デアセチラーゼ / N - スルホトランスフェラーゼ酵素（上記の図 3 のエントリー `sp|P52848|NDST_1_HUMAN` を参照）の N - スルホトランスフェラーゼドメインの変異体とするように操作する。EC 2.8.2.8 内の他のグルコサミニル N - デアセチラーゼ / N - スルホトランスフェラーゼ酵素の 1 つ以上の N - スルホトランスフェラーゼドメインのアミノ酸配列、並びに配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、及び / 又は配列番号 12 のアミノ酸配列を有するアリール硫酸依存性グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ酵素のアミノ酸配列の双方を有する、多重配列アラインメントを生成及び分析することによって、改変型グルコサミニル N - スルホトランスフェラーゼ酵素のアミノ酸配列における変異を、同じアラインメント内の野生型 EC 2.8.2.8 酵素のアミノ酸配列と比較して観察することができる。ヒトグルコサミニル N - デアセチラーゼ / N - スルホトランスフェラーゼ酵素ではない野生型 2.8.2.8 酵素の N - スルホトランスフェラーゼドメインのアミノ酸配列を選択すると、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、及び / 又は配列番号 12 のアミノ酸配列内に存在する変異を野生型配列に操作して、アリール硫酸依存性スルホトランスフェラーゼ活性を有することができるさらなる変異体を形成することができる。

20

30

【0459】

非限定的な例として、ブタグルコサミニル N - デアセチラーゼ / N - スルホトランスフェラーゼ酵素（図 3 の配列アラインメントに示すように、エントリー `tr|M3V841|M3V841_PIG`）の N - スルホトランスフェラーゼドメインをコードするアミノ酸配列を、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、及びは配列番号 12 のアミノ酸配列と整列させる。配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、及びは配列番号 12 に存在するアミノ酸変異は、それぞれ、配列番号 35、配列番号 36、配列番号 37、配列番号 38、配列番号 39、及び配列番号 40 の変異体アミノ酸配列を生成するために、ブタ N - デアセチラーゼ / N - スルホトランスフェラーゼ酵素の N - スルホトランスフェラーゼドメインのアミノ酸配列内のそれらの同等の位置に操作される。それぞれ配列番号 35、配列番号 36、配列番号 37、配列番号 38、配列番号 39、及び配列番号 40 のアミノ酸配列を有する酵素は、以下の実施例 13 及び実施例 14 で利用する。しかしながら、EC 2.8.2.8 酵素クラス内の他のグルコサミニル野生型 N - デアセチラーゼ / N - スルホトランスフェラーゼ酵素のいずれかに関して、同じ手順を適用して N - スルホトランスフェラーゼドメインの変異体又は酵素全体を生成することができ、これらは明確にするために省略されていることを、当業者は理解するであろう。

40

50

【0460】

実施例13：改変型アリール硫酸依存性EC2.8.2.8変異体の発現及び精製

配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、及び配列番号40のアミノ酸配列をそれぞれ有する改変型グルコサミニルN-スルホトランスフェラーゼ酵素をコードする遺伝子が宿主細胞に形質転換することができるかどうか、及びそれらのアミノ酸配列の各々を含む酵素が、その後、上記の実施例1の手順に従って発現、単離及び精製することができるかどうかを決定するために、本開示の態様に従って試験を行う。所望の発現宿主に基づいて、それぞれ配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、及び配列番号40のアミノ酸配列を有する酵素をコードする、コドン最適化ヌクレオチド配列を決定する。適切な発現ベクター内でこれらの遺伝子を合成又は挿入すると、それぞれ配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、及び配列番号40のアミノ酸配列の各々をコードする遺伝子が宿主細胞に形質転換され、その後、それらの配列を有する酵素が、アリール硫酸依存性グルコサミニルN-スルホトランスフェラーゼ活性を決定するのに十分な量及び純度で発現、単離、及び精製されることが予想される。

10

【0461】

実施例14：EC2.8.2.8変異体のスルホトランスフェラーゼ活性

実施例2の手順を用いて、それぞれ配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、及び配列番号40の配列を有する変異型酵素が活性スルホトランスフェラーゼであるかどうかを決定するために、本開示の態様に従って試験を行う。SAX試験により、N-脱アセチル化ヘパロサン及びアリール硫酸化合物を、それぞれ配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、又は配列番号40の配列を有する改変型酵素の各々と反応させた結果形成される、N-硫酸化多糖生成物の存在が確認されると予想される。

20

【0462】

実施例15：EC2.8.2.-の他のヘキサロニル2-Oスルホトランスフェラーゼ酵素の改変型アリール硫酸依存性変異体の決定

さらなるアリール硫酸依存性ヘキサロニル2-Oスルホトランスフェラーゼ酵素を操作するために、本開示の態様に従って試験を行う。上記のように、配列番号14及び配列番号16のアミノ酸配列を有するアリール硫酸依存性ヘキサロニル2-Oスルホトランスフェラーゼ酵素は、酵素クラスEC2.8.2.-のメンバーであるニワトリHSヘキサロニル2-Oスルホトランスフェラーゼ酵素（上記の図14A-図14Dのエントリsp|Q76KB1|HS2ST__CHICKを参照）の変異体となるように操作されている。EC2.8.2.-内の1つ以上の他のHSヘキサロニル2-Oスルホトランスフェラーゼ酵素のアミノ酸配列、並びに配列番号14及び/又は配列番号16のアミノ酸配列を有するアリール硫酸依存性HSヘキサロニル2-Oスルホトランスフェラーゼ酵素のアミノ酸配列の双方を有する、多重配列アラインメントを生成及び分析することによって、改変型HSヘキサロニル2-Oスルホトランスフェラーゼ酵素のアミノ酸配列における変異を、同じアラインメント内の野生型HSヘキサロニル2-Oスルホトランスフェラーゼ酵素のアミノ酸配列と比較して観察することができる。ニワトリHSヘキサロニル2-Oスルホトランスフェラーゼ酵素ではない野生型HSヘキサロニル2-Oスルホトランスフェラーゼ酵素のアミノ酸配列を選択すると、配列番号14及び/又は配列番号16のアミノ酸配列内に存在する変異を野生型配列に操作して、アリール硫酸依存性スルホトランスフェラーゼ活性を有することができる追加の変異体を形成することができる。

30

40

【0463】

非限定的な例として、ヒトHSヘキサロニル2-Oスルホトランスフェラーゼ酵素（上記の図14A-図14Dの配列アラインメントに示すように、エントリsp|Q7LGA3|HS2ST__HUMAN）をコードするアミノ酸配列は、配列番号14及び配列番号16のアミノ酸配列と整列される。配列番号14及び配列番号16に存在するアミノ酸変異は、それぞれ配列番号41及び配列番号42の変異アミノ酸配列を生成するために、ヒ

50

ト H S ヘキシロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼ酵素のアミノ酸配列内のそれらの同等の位置に操作される。配列番号 4 1 及び配列番号 4 2 のアミノ酸配列を有する酵素はそれぞれ、以下の実施例 1 6 及び実施例 1 7 で利用する。しかしながら、E C 2 . 8 . 2 . - 酵素クラス内の H S ヘキシロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼ酵素のいずれかに關して、同じ手順を適用してアリール硫酸依存性変異体を生成することができ、これらは明確にするために省略されていることを、当業者は理解するであろう。

【 0 4 6 4 】

実施例 1 6 : ヘキシロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼ活性を有する E C 2 . 8 . 2 . - 変異体の発現及び精製

配列番号 4 1 及び配列番号 4 2 のアミノ酸配列をそれぞれ有する改変型ヘキシロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼ酵素をコードする遺伝子が宿主細胞に形質転換することができるかどうか、及びそれらのアミノ酸配列の各々を含む酵素が、その後、上記の実施例 1 の手順に従って発現、単離及び精製することができるかどうかを決定するために、本開示の態様に従って試験を行う。所望の発現宿主に基づいて、それぞれ配列番号 4 1 及び配列番号 4 2 のアミノ酸配列を有する酵素をコードする、コドン最適化ヌクレオチド配列を決定する。適切な発現ベクター内でこれらの遺伝子を合成又は挿入すると、それぞれ配列番号 4 1 及び配列番号 4 2 のアミノ酸配列の各々をコードする遺伝子が宿主細胞に形質転換され、その後、それらの配列を有する酵素が、アリール硫酸依存性ヘキシロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼ活性を決定するのに十分な量及び純度で発現、単離、及び精製されることが予想される。

【 0 4 6 5 】

実施例 1 7 : E C 2 . 8 . 2 . - 変異体のヘキシロニル 2 - O スルホトランスフェラーゼ活性

実施例 3 の手順を用いて、それぞれ配列番号 4 1 及び配列番号 4 2 の配列を有する変異型酵素が活性スルホトランスフェラーゼであるかどうかを決定するために、本開示の態様に従って試験を行う。M S 試験により、それぞれ配列番号 4 1 及び配列番号 4 2 の配列を有する各改変型酵素と、N - 硫酸化ヘパロサン系多糖及びアリール硫酸化合物とを反応させた結果形成された、N , 2 - H S 生成物の存在が確認されると予想される。両方の酵素が、式 I V 又は式 V のいずれか又は両方をするヘパロサン系多糖類で活性であることも予想される。

【 0 4 6 6 】

実施例 1 8 : E C 2 . 8 . 2 . - の他のグルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素の改変型アリール硫酸依存性変異体の決定

さらなるアリール硫酸依存性グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素を操作するために、本開示の態様に従って試験を行う。上記のように、配列番号 1 8 、配列番号 2 0 、及び配列番号 2 2 のアミノ酸配列を有するアリール硫酸依存性グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素を、酵素クラス E C 2 . 8 . 2 . - のメンバーであるマウス H S グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素 (上記の図 1 8 A ~ 図 1 8 C のエントリ Q 9 Q Y K 5 | H 6 S T 1 _ M O U S E を参照) のアイソフォーム 1 の変異体とするように操作する。E C 2 . 8 . 2 . - 内の 1 つ以上の他の H S グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素のアミノ酸配列、並びに配列番号 1 8 、配列番号 2 0 、及び / 又は配列番号 2 2 のアミノ酸配列を有するアリール硫酸依存性 H S グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素のアミノ酸配列の両方を含む、多重配列アラインメントを生成及び分析することによって、改変型 H S グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素のアミノ酸配列における変異を、同じアラインメント内の野生型 H S グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素のアミノ酸配列と比較して観察することができる。マウス H S グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素ではない野生型 H S グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素のアミノ酸配列を選択すると、配列番号 1 8 、配列番号 2 0 、及び / 又は配列番号 2 2 のアミノ酸配列内に存在する変異を野生型配列に操作して、アリール硫酸依存性スルホトランスフェラーゼ活性を有

することができるさらなる変異体を形成することができる。

【 0 4 6 7 】

非限定的な例として、ブタ H S グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素 (図 1 8 A ~ 図 1 8 C の配列アラインメントに示す、エントリ I 3 L A M 6 | I 3 L A M 6 _ P I G) をコードするアミノ酸配列は、配列番号 1 8、配列番号 2 0、及び配列番号 2 2 のアミノ酸配列と整列される。配列番号 1 8、配列番号 2 0、及び配列番号 2 2 に存在するアミノ酸変異は、変異アミノ酸配列を生成するために、ブタ H S グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素のアミノ酸配列内のそれらの同等の位置に操作される。図 1 8 A ~ 図 1 8 C に示すように、ブタ H S グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素の残基 6 7 ~ 3 7 7 に対応する生成した変異アミノ酸配列はそれぞれ、配列番号 4 5、配列番号 4 6、及び配列番号 4 7 として開示する。ブタ H S グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素 (図 1 8 A ~ 図 1 8 C には示されず) の全長アミノ酸配列に対応する生成した変異アミノ酸配列はそれぞれ、配列番号 4 8、配列番号 4 9、及び配列番号 5 0 として開示する。

10

【 0 4 6 8 】

別の非限定的な例では、マウス H S グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素 (エントリ Q 9 Q Y K 4 | H 6 H S 3 _ M O U S E、これについては図 1 8 A ~ 図 1 8 C における配列アラインメントに例示されている切り捨てられた配列) のアイソフォーム 3 をコードする全長アミノ酸配列を、配列番号 1 8、配列番号 2 0、及び配列番号 2 2 のアミノ酸配列と整列させる。配列番号 1 8、配列番号 2 0、及び配列番号 2 2 に存在するアミノ酸変異は、変異アミノ酸配列を生成するために、マウス H S グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素のアイソフォーム 3 のアミノ酸配列内のそれらの同等の位置に操作される。生成した全長アミノ酸配列は、それぞれ配列番号 5 9、配列番号 6 0、及び配列番号 6 1 として開示する。配列番号 4 5、配列番号 4 6、配列番号 4 7、配列番号 4 8、配列番号 4 9、配列番号 5 0、配列番号 5 9、配列番号 6 0、及び配列番号 6 1 のアミノ酸配列を有する酵素はそれぞれ、以下の実施例 1 9 及び実施例 2 0 で利用する。しかしながら、E C 2 . 8 . 2 . - 酵素クラス内の H S グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素のいずれかに関して、同じ手順を適用してアリアル硫酸依存性変異体を生成することができ、これらは明確にするために省略されていることを、当業者は理解するであろう。

20

30

【 0 4 6 9 】

実施例 1 9 : グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ活性を有する E C 2 . 8 . 2 . - 変異体の発現及び精製

配列番号 4 5、配列番号 4 6、配列番号 4 7、配列番号 4 8、配列番号 4 9、配列番号 5 0、配列番号 5 9、配列番号 6 0、及び配列番号 6 1 のアミノ酸配列をそれぞれ有する改変型グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ酵素をコードする遺伝子が宿主細胞に形質転換することができるかどうか、及びそれらのアミノ酸配列の各々を含む酵素が、その後、上記の実施例 1 の手順に従って発現、単離及び精製することができるかどうかを決定するために、本開示の態様に従って試験を行う。配列番号 4 5、配列番号 4 6、配列番号 4 7、配列番号 4 8、配列番号 4 9、配列番号 5 0、配列番号 5 9、配列番号 6 0、及び配列番号 6 1 のアミノ酸配列を有する酵素をコードするコドン最適化ヌクレオチド配列を、それぞれ、所望の発現宿主に基づいて決定する。適切な発現ベクター内でこれらの遺伝子を合成又は挿入すると、それぞれ配列番号 4 5、配列番号 4 6、配列番号 4 7、配列番号 4 8、配列番号 4 9、配列番号 5 0、配列番号 5 9、配列番号 6 0、及び配列番号 6 1 のアミノ酸配列の各々をコードする遺伝子が宿主細胞に形質転換され、その後、それらの配列を有する酵素が、アリアル硫酸依存性グルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラーゼ活性を決定するのに十分な量及び純度で発現、単離、及び精製されることが予想される。

40

【 0 4 7 0 】

実施例 2 0 : E C 2 . 8 . 2 . - 変異体のグルコサミニル 6 - O スルホトランスフェラー

50

ゼ活性

実施例 5 の手順を用いて、それぞれ配列番号 45、配列番号 46、配列番号 47、配列番号 48、配列番号 49、配列番号 50、配列番号 59、配列番号 60、及び配列番号 61 を含む変異型酵素が活性スルホトランスフェラーゼであるかどうかを決定するために、本開示の態様に従って試験を行う。MS 試験により、N, 2-O-HS 多糖類及びアリール硫酸化合物を、それぞれ配列番号 45、配列番号 46、配列番号 47、配列番号 48、配列番号 49、配列番号 50、配列番号 59、配列番号 60、及び配列番号 61 の配列を有する改変型酵素のそれぞれと反応させた結果形成される、N, 2, 6-HS 生成物の存在が確認されると予想される。

【0471】

実施例 21: EC2.8.2.23 内の他のグルコサミニル 3-O スルホトランスフェラーゼ酵素の改変型アリール硫酸依存性変異体の決定

さらなるアリール硫酸依存性グルコサミニル 3-O スルホトランスフェラーゼ酵素を操作するために、本開示の態様に従って試験を行う。上記のように、配列番号 24、配列番号 26、及び配列番号 28 のアミノ酸配列を有するアリール硫酸依存性グルコサミニル 3-O スルホトランスフェラーゼ酵素を、酵素クラス EC2.8.2.23 のメンバーであるヒト HS グルコサミニル 3-O スルホトランスフェラーゼ酵素 (図 23A ~ 図 23C の エントリ sp | O14792 | HS3S1__HUMAN を参照) のアイソフォーム 1 の変異体とするように操作する。EC2.8.2.23 内の 1 つ以上の他の HS グルコサミニル 3-O スルホトランスフェラーゼ酵素のアミノ酸配列、並びに配列番号 24、配列番号 26、及び / 又は配列番号 28 のアミノ酸配列を有するアリール硫酸依存性 HS グルコサミニル 3-O スルホトランスフェラーゼ酵素のアミノ酸配列の両方を含む、多重配列アラインメントを生成及び分析することによって、改変型 HS グルコサミニル 3-O スルホトランスフェラーゼ酵素のアミノ酸配列における変異を、同じアラインメント内の野生型 HS グルコサミニル 3-O スルホトランスフェラーゼ酵素のアミノ酸配列と比較して観察することができる。ヒト HS グルコサミニル 3-O スルホトランスフェラーゼ酵素ではない野生型 HS グルコサミニル 3-O スルホトランスフェラーゼ酵素のアミノ酸配列を選択すると、配列番号 24、配列番号 26、及び / 又は配列番号 28 のアミノ酸配列内に存在する変異を野生型配列に操作して、アリール硫酸依存性スルホトランスフェラーゼ活性を有することができるさらなる変異体を形成することができる。

【0472】

非限定的な例として、ブタ HS グルコサミニル 3-O スルホトランスフェラーゼ酵素 (図 23A ~ 図 23C の配列アラインメントに示すように、エントリ tr | I3LHH5 | I3LHH5__PIG) のアイソフォーム 1 をコードするアミノ酸配列は、配列番号 24、配列番号 26、及び配列番号 28 のアミノ酸配列と整列される。配列番号 24、配列番号 26、及び配列番号 28 に存在するアミノ酸変異は、それぞれ配列番号 52、配列番号 53、及び配列番号 54 の変異アミノ酸配列を生成するために、ブタ HS グルコサミニル 3-O スルホトランスフェラーゼ酵素のアミノ酸配列内のそれらの等価な位置に操作される。

【0473】

別の非限定的な例では、マウス HS グルコサミニル 3-O スルホトランスフェラーゼ酵素 (図 18A ~ 図 18C には示されず) のアイソフォーム 5 をコードする全長アミノ酸配列を、配列番号 24、配列番号 26、及び配列番号 28 のアミノ酸配列と整列させる。配列番号 24、配列番号 26、及び配列番号 28 に存在するアミノ酸変異は、変異アミノ酸配列を生成するために、マウス HS グルコサミニル 3-O スルホトランスフェラーゼ酵素のアイソフォーム 5 のアミノ酸配列内のそれらの同等の位置に操作される。生成した全長アミノ酸配列はそれぞれ、配列番号 56、配列番号 57、及び配列番号 58 として開示する。

【0474】

配列番号 52、配列番号 53、配列番号 54、配列番号 56、配列番号 57、及び配列

10

20

30

40

50

番号 58 のアミノ酸配列を有する酵素はそれぞれ、以下の実施例 22 及び実施例 23 で利用する。しかしながら、E C 2 . 8 . 2 . 23 酵素クラス内の H S グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素のいずれかに関して、同じ手順を適用してアリール硫酸依存性変異体を生成することができ、これらは明確にするために省略されていることを、当業者は理解するであろう。

【 0 4 7 5 】

実施例 22 : グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ活性を有する E C 2 . 8 . 2 . 23 変異体の発現及び精製

配列番号 52、配列番号 53、配列番号 54、配列番号 56、配列番号 57、及び配列番号 58 のアミノ酸配列をそれぞれ有する改変型グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ酵素をコードする遺伝子が宿主細胞に形質転換することができるかどうか、及びそれらのアミノ酸配列の各々を含む酵素が、その後、上記の実施例 1 の手順に従って発現、単離及び精製することができるかどうかを決定するために、本開示の態様に従って試験を行う。所望の発現宿主に基づいて、それぞれ配列番号 52、配列番号 53、配列番号 54、配列番号 56、配列番号 57、及び配列番号 58 のアミノ酸配列を有する酵素をコードするコドン最適化ヌクレオチド配列を決定する。適切な発現ベクター内でこれらの遺伝子を合成又は挿入すると、それぞれ配列番号 52、配列番号 53、配列番号 54、配列番号 56、配列番号 57、及び配列番号 58 のアミノ酸配列のそれぞれをコードする遺伝子が宿主細胞に形質転換され、その後、それらの配列を有する酵素が、アリール硫酸依存性グルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ活性を決定するのに十分な量及び純度で発現、単離、及び精製されることが予想される。

10

20

【 0 4 7 6 】

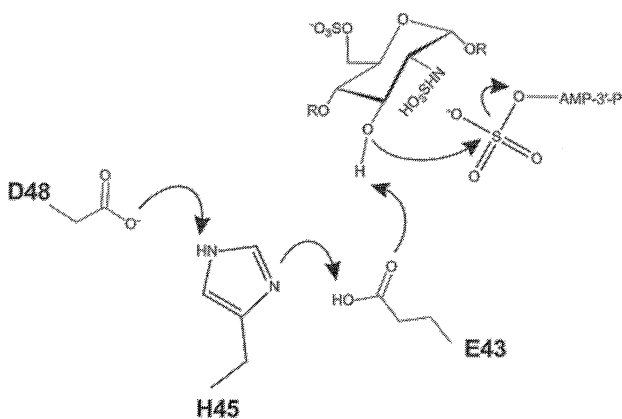
実施例 23 : E C 2 . 8 . 2 . 23 変異体のグルコサミニル 3 - O スルホトランスフェラーゼ活性

実施例 5 及び / 又は実施例 6 の手順を用いて、それぞれ配列番号 52、配列番号 53、配列番号 54、配列番号 56、配列番号 57、及び配列番号 58 の配列を有する変異型酵素が活性スルホトランスフェラーゼであるかどうかを決定するために、本開示の態様に従って試験を行う。MS 及び / 又は NMR 試験は、それぞれ配列番号 52、配列番号 53、配列番号 54、配列番号 56、配列番号 57、及び配列番号 58 の配列を有する改変型酵素の各々と N , 2 , 6 - H S 多糖類及びアリール硫酸化合物を反応させた結果形成される、N , 2 , 3 , 6 - H S 生成物の存在を確認すると予想される。

30

【 図 面 】

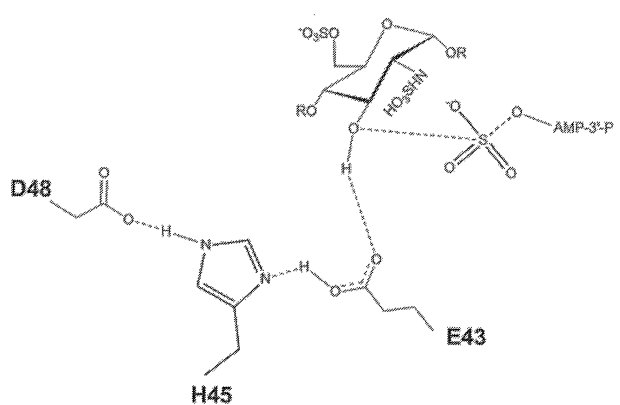
【 図 1 A 】



反応

図 1A

【 図 1 B 】

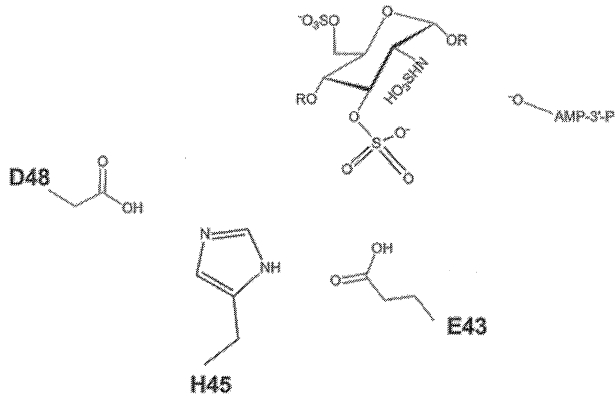


遷移状態

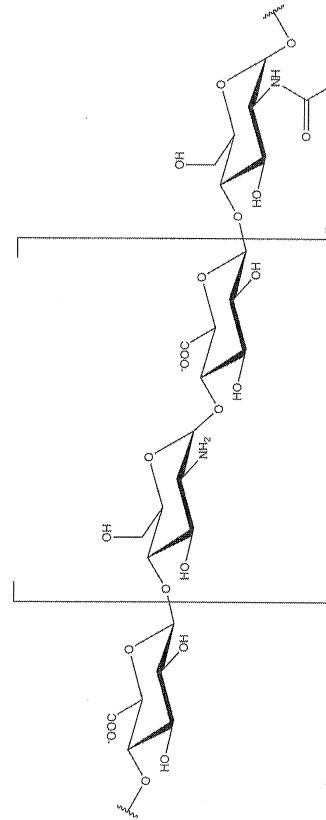
図 1B

40

【図 1 C】



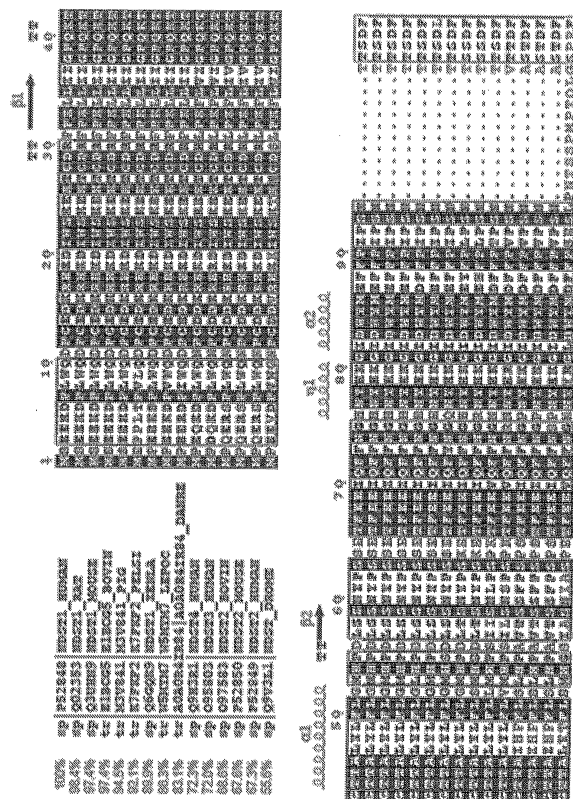
【図 2】



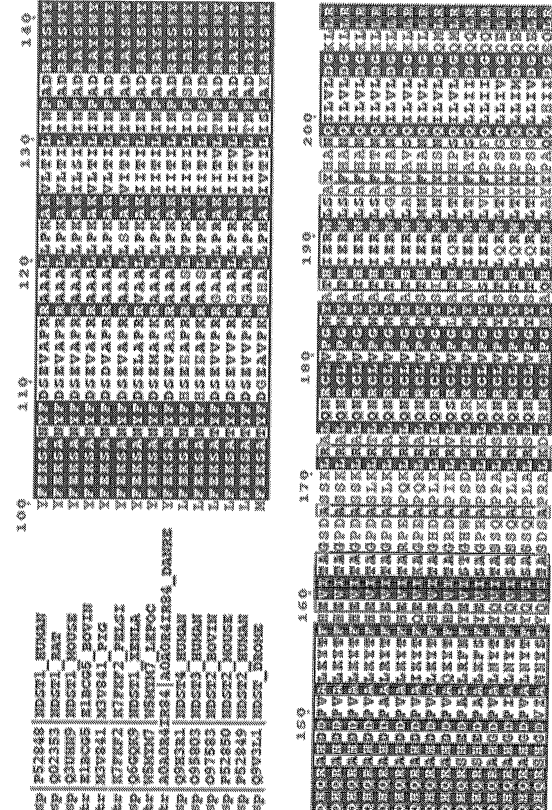
10

20

【図 3 A】



【図 3 B】



30

40

50

【図 3 C】

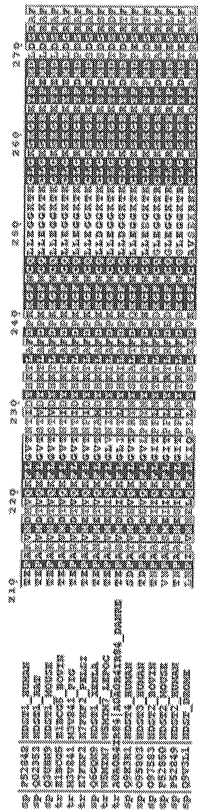
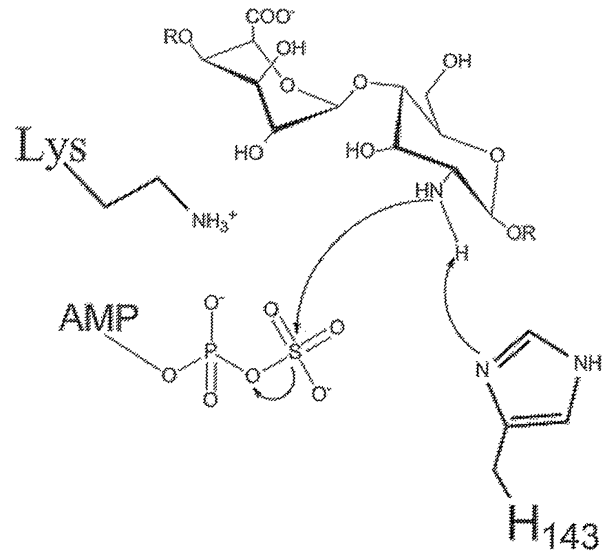


図 3C

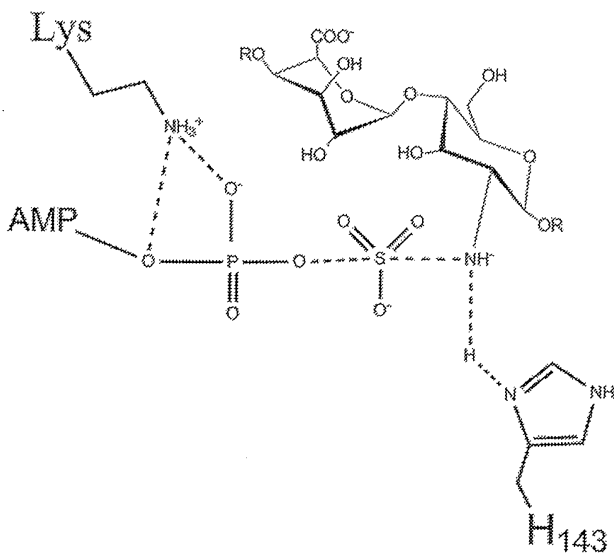
【図 4 A】



反応

図 4A

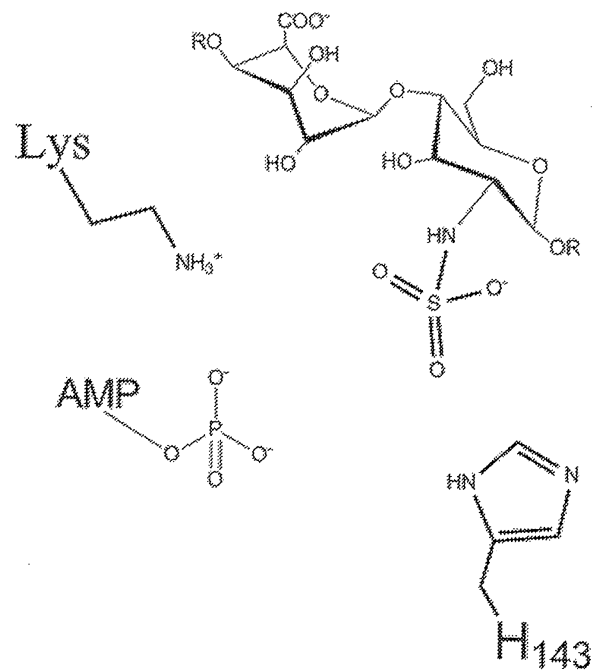
【図 4 B】



遷移状態

図 4B

【図 4 C】



生成物

図 4C

10

20

30

40

50

【 図 5 】

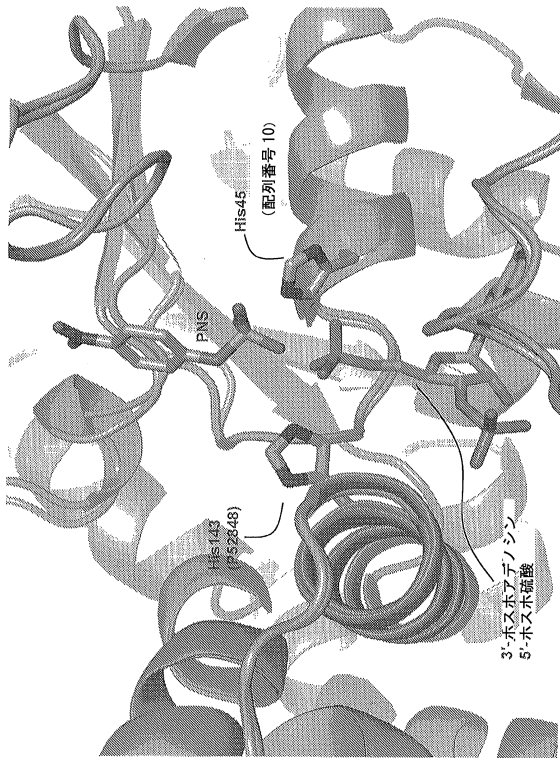


図 5

【 図 6 】

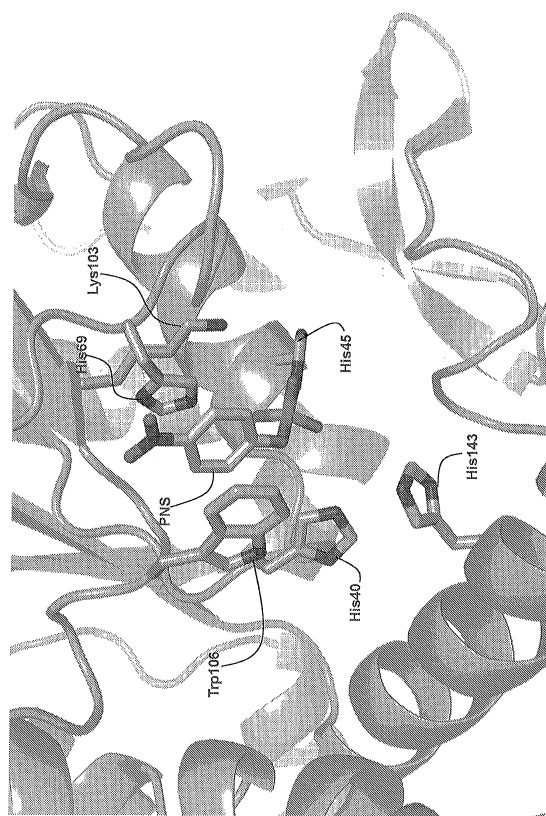


図 6

10

20

【 図 7 】

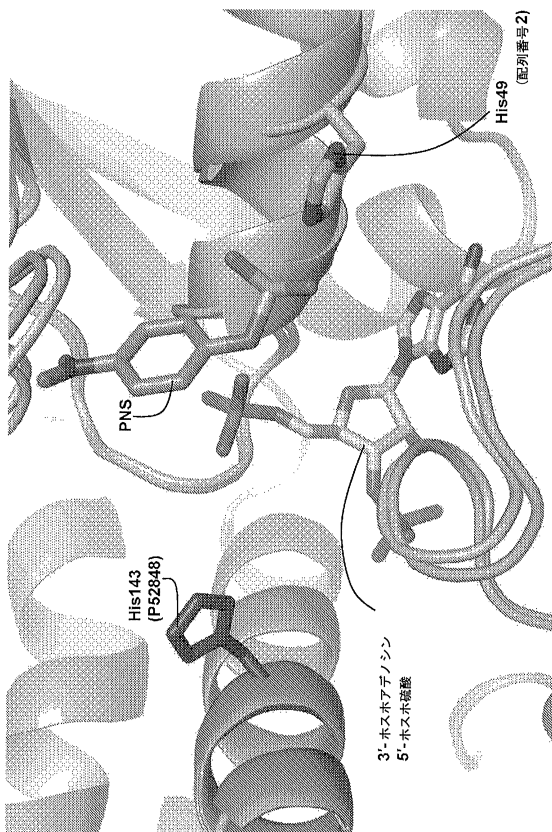


図 7

【 図 8 】

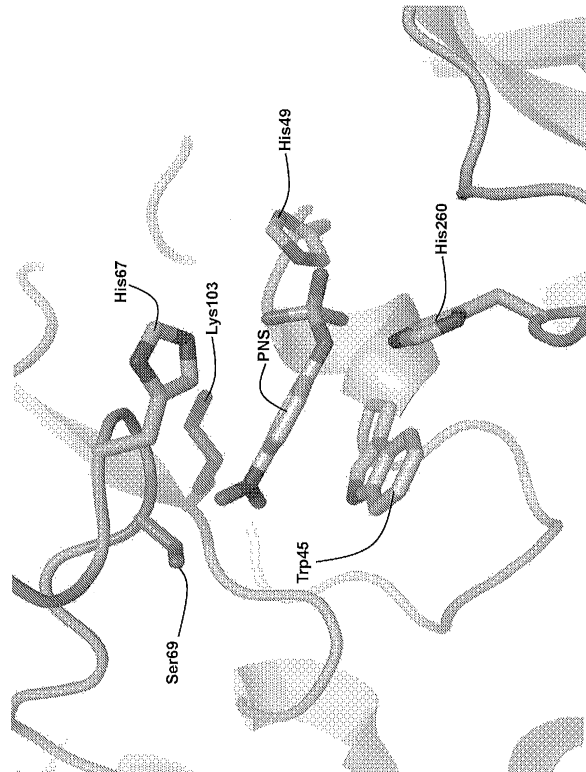


図 8

30

40

50

【 図 9 】

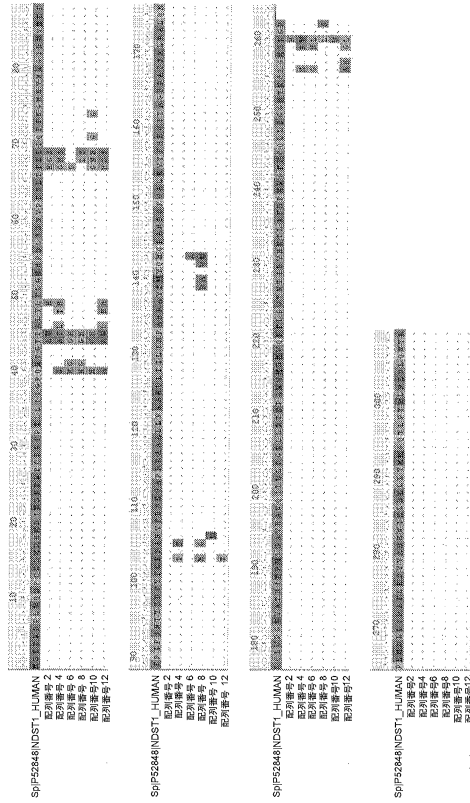


図 9

【 図 10 】

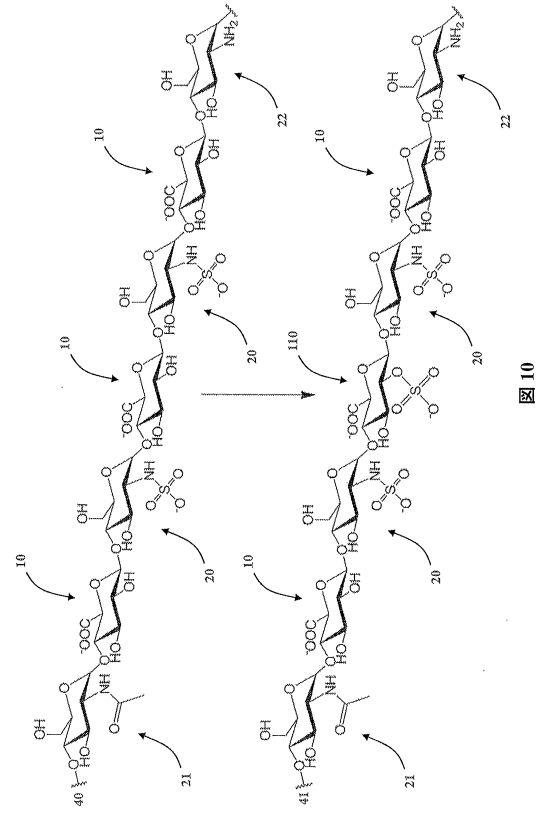


図 10

10

20

【 図 11 】

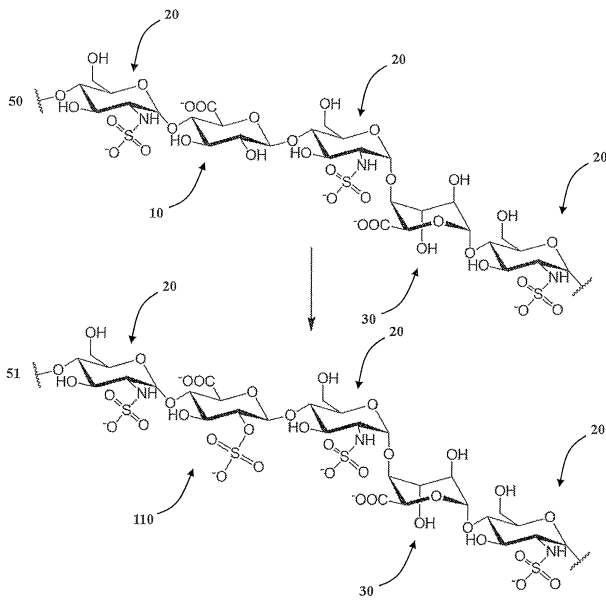


図 11

【 図 12 】

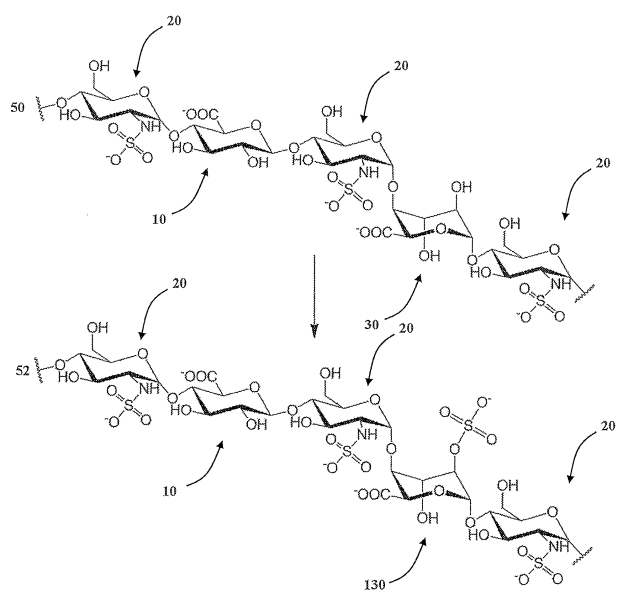


図 12

30

40

50

【図 13】

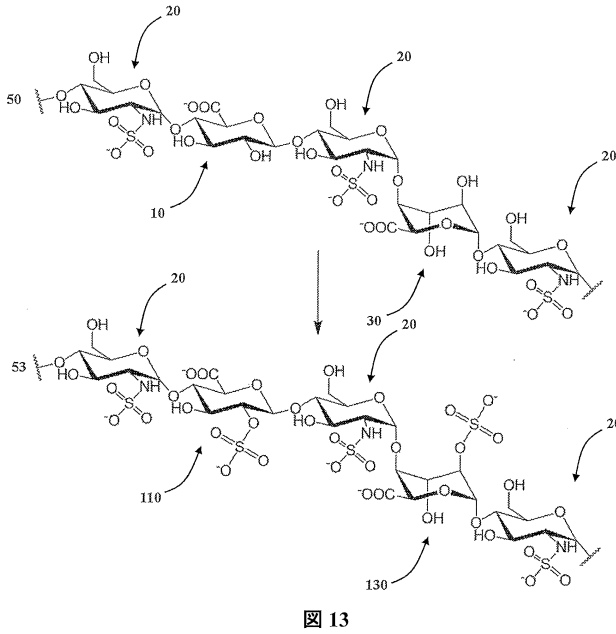


図 13

【図 14 A】

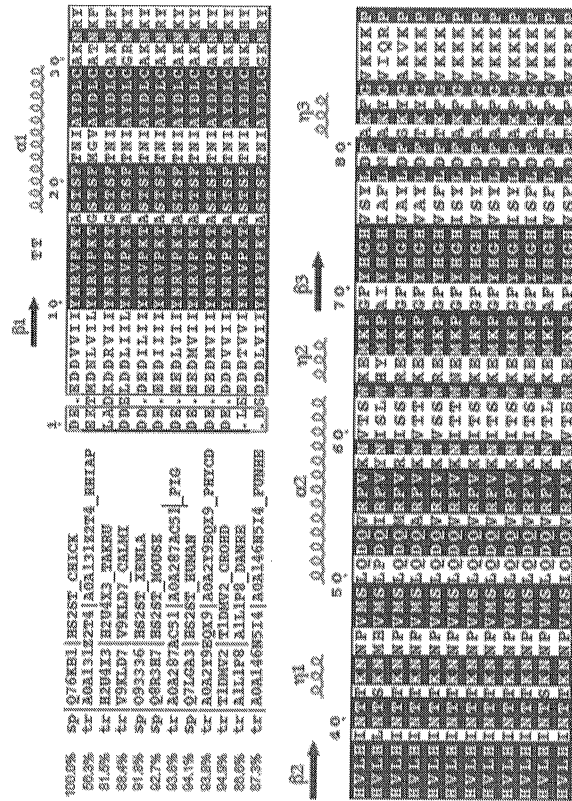


図 14A

10

20

【図 14 B】

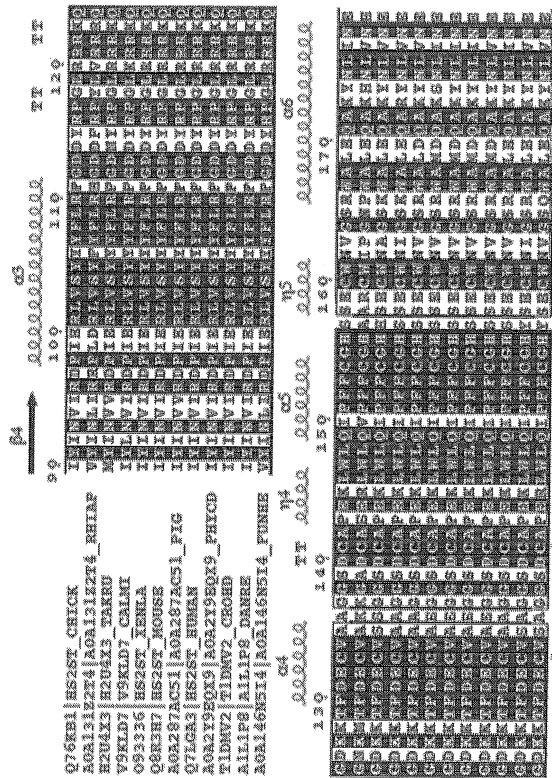


図 14B

【図 14 C】

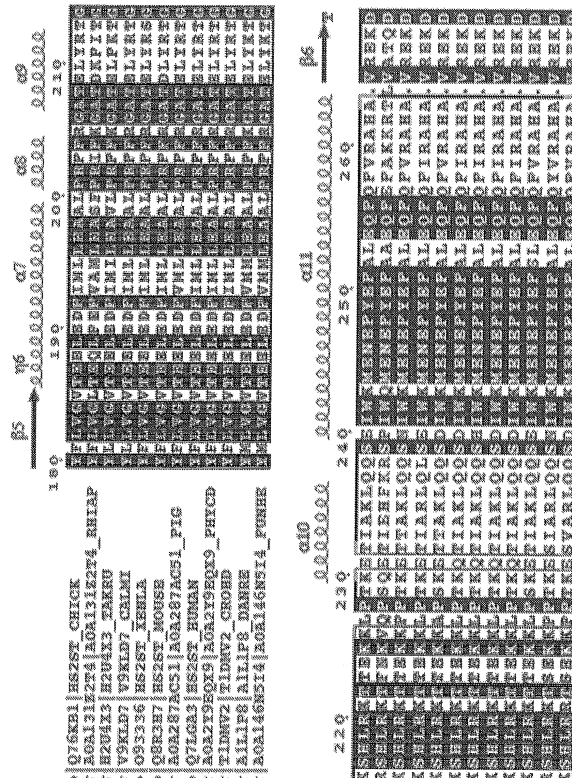


図 14C

30

40

50

【図 14 D】

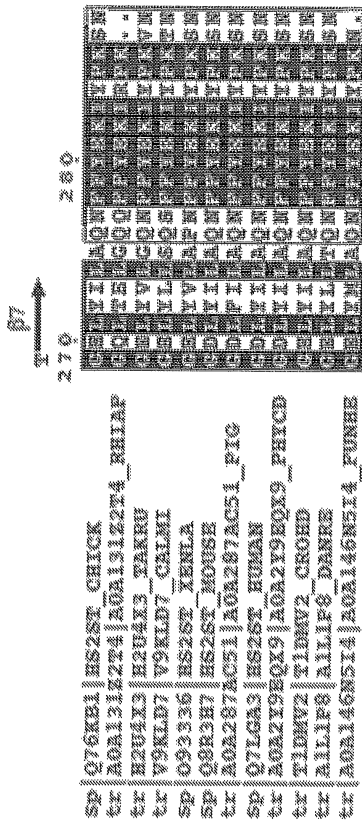
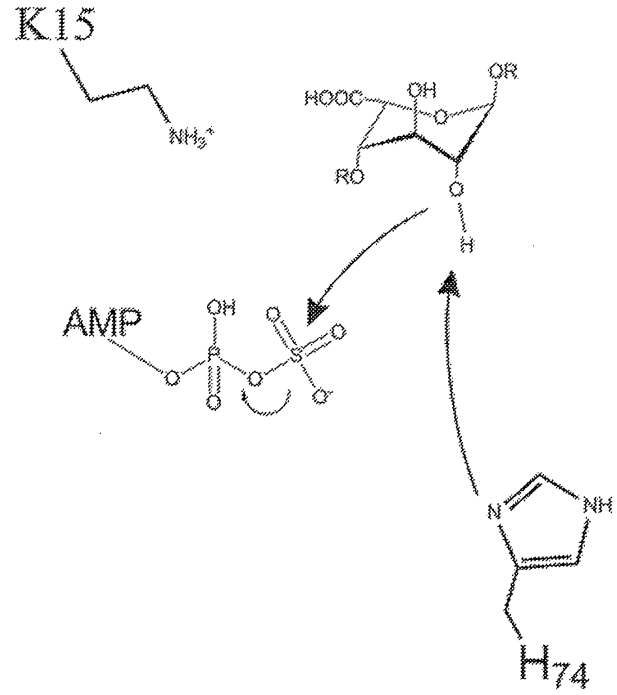


図 14D

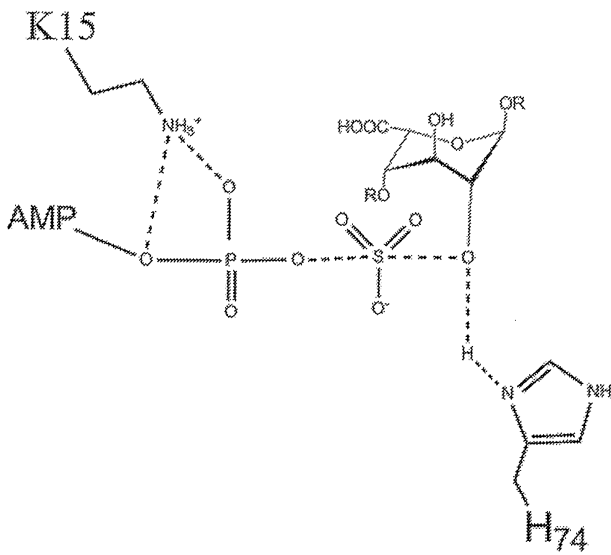
【図 15 A】



反応

図 15A

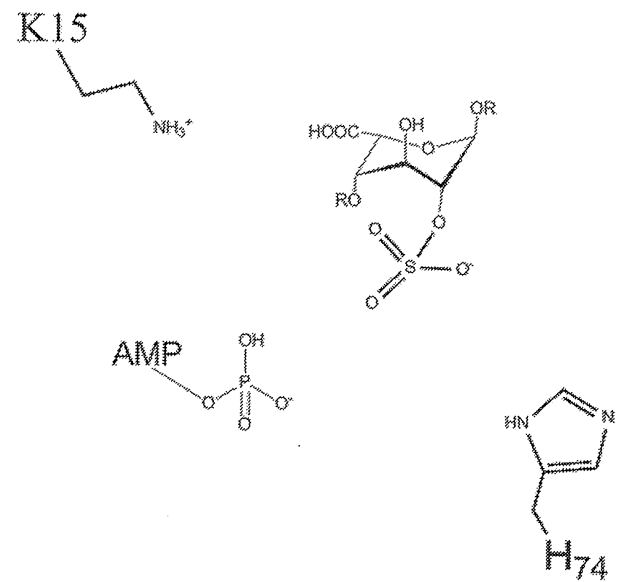
【図 15 B】



遷移状態

図 15B

【図 15 C】



生成物

図 15C

【図 18 C】

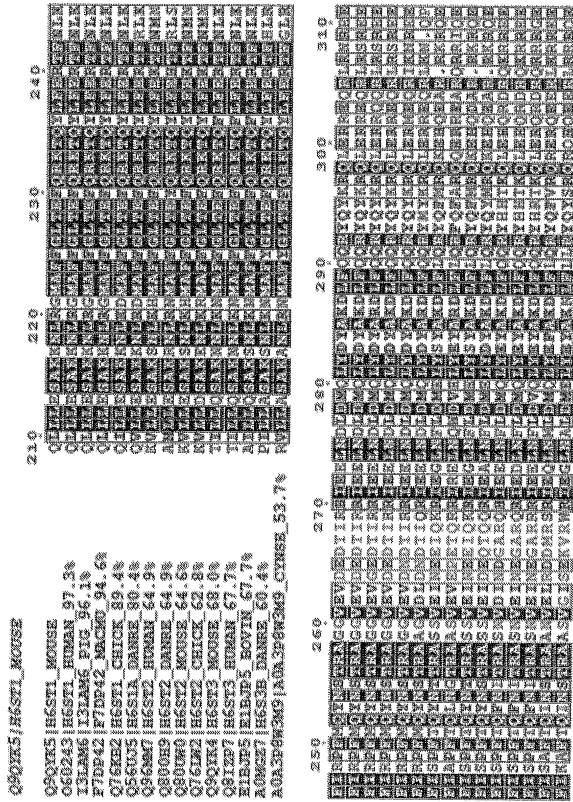
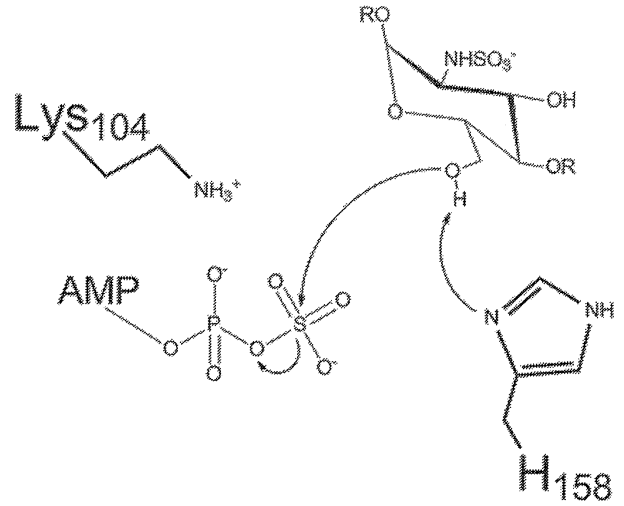


図 18C

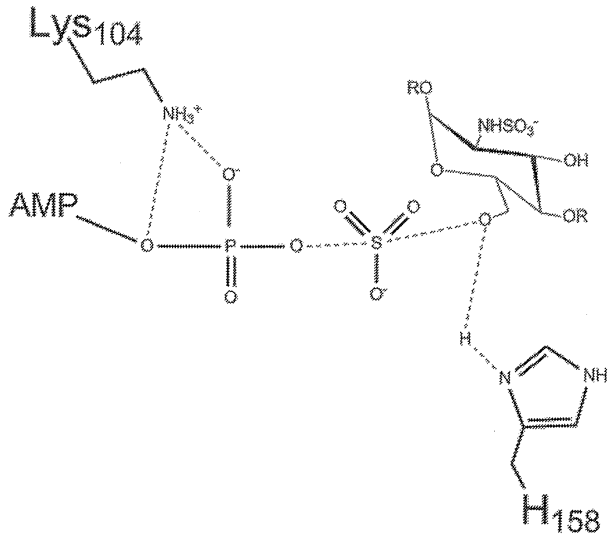
【図 19 A】



反応

図 19A

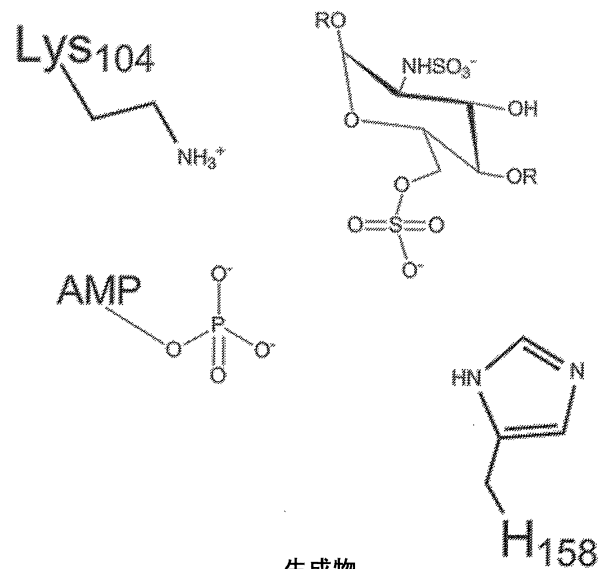
【図 19 B】



遷移状態

図 19B

【図 19 C】



生成物

図 19C

【図 20】

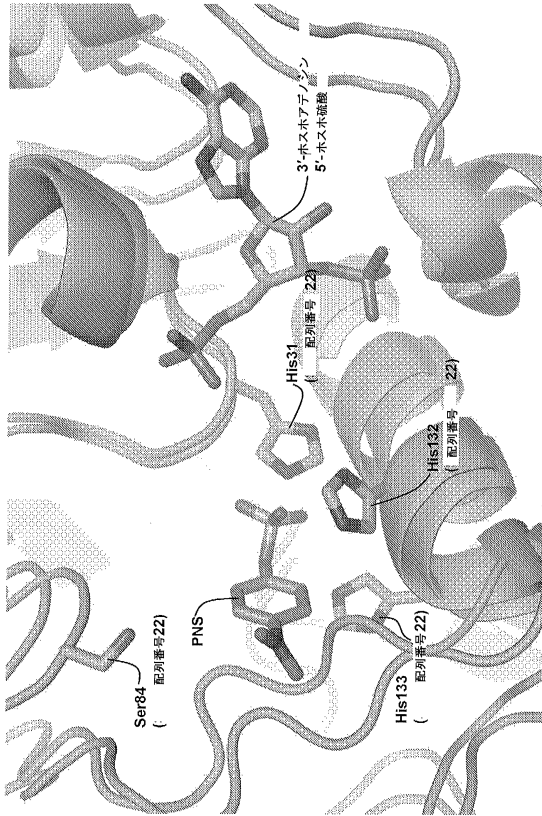


図 20

【図 21】

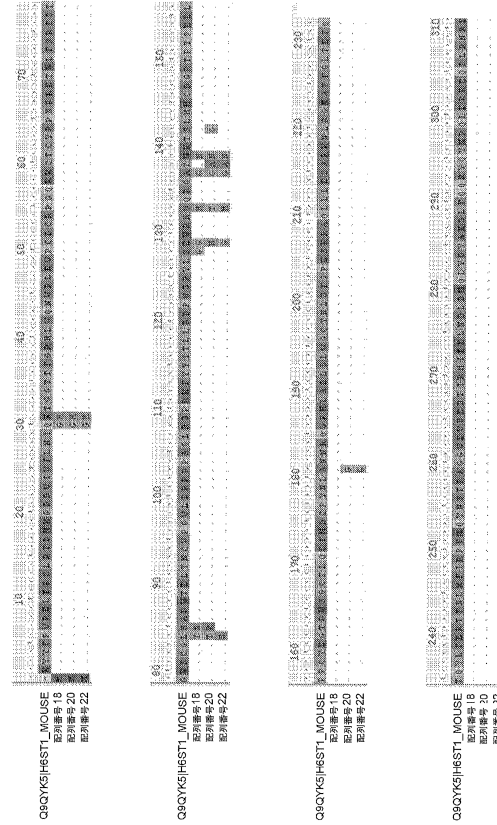


図 21

【図 22】

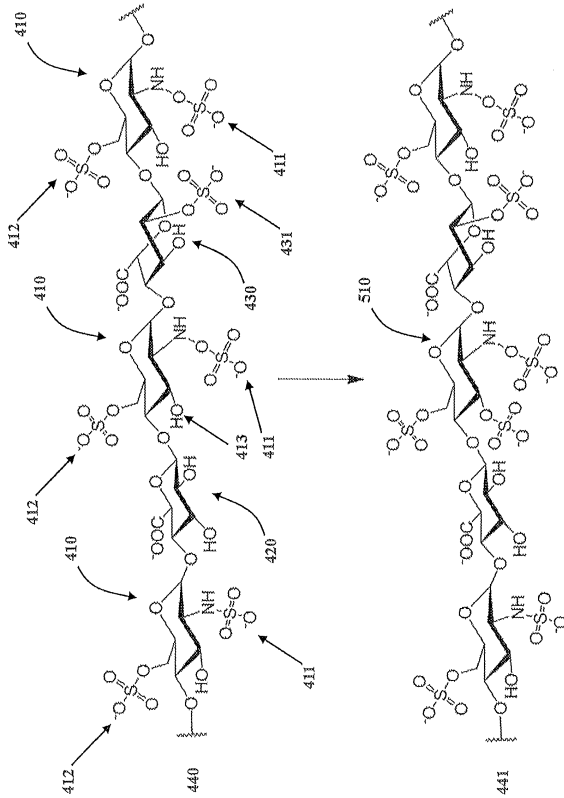


図 22

【図 23 A】

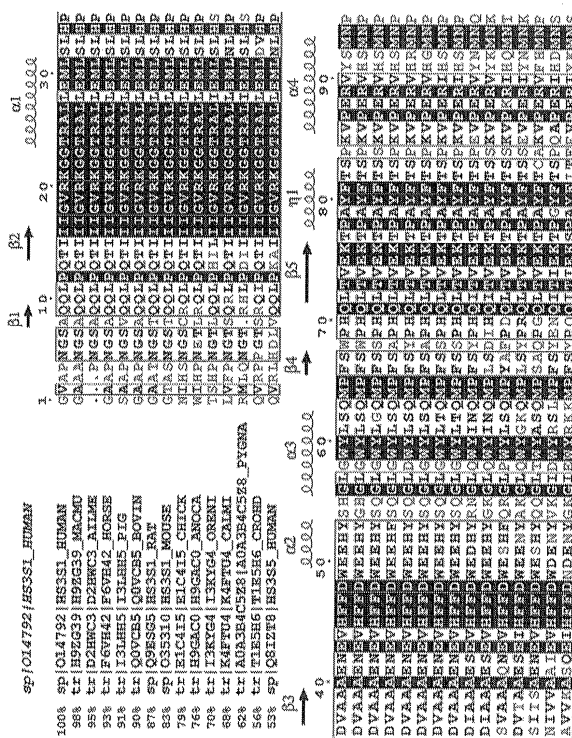


図 23A

【図 26】

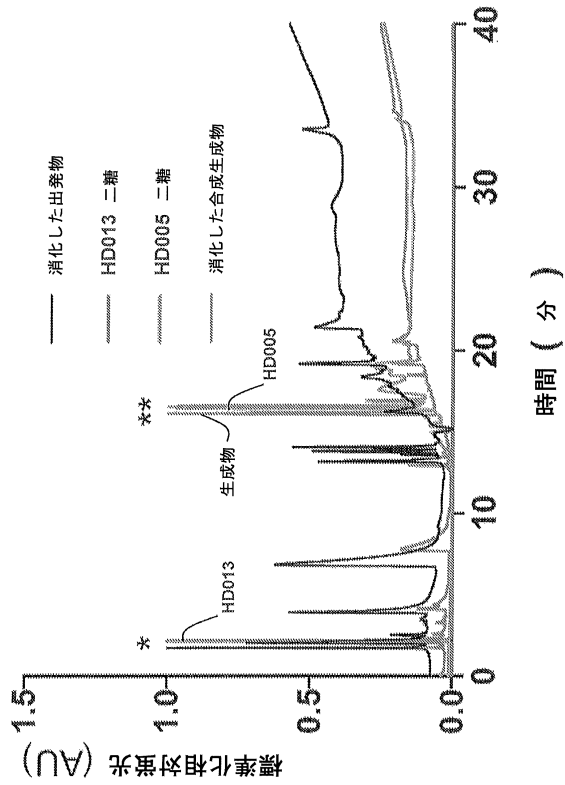


図 26

【図 27 A】

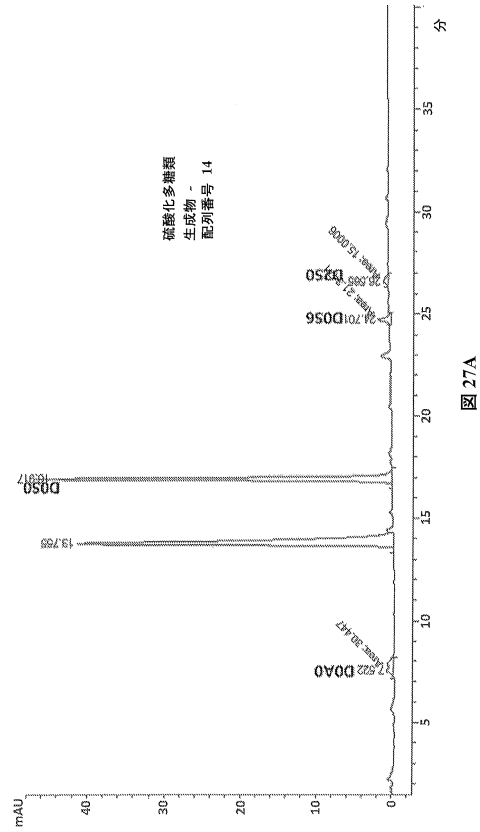


図 27A

【図 27 B】

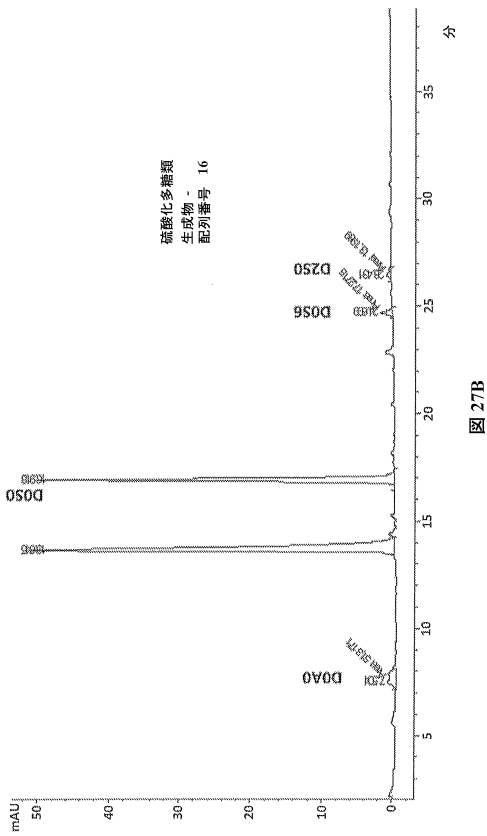


図 27B

【図 28 A】

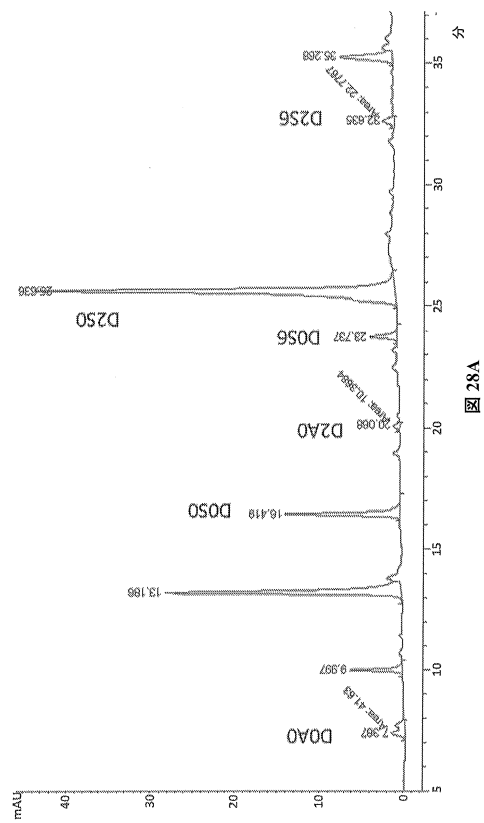


図 28A

10

20

30

40

50

10

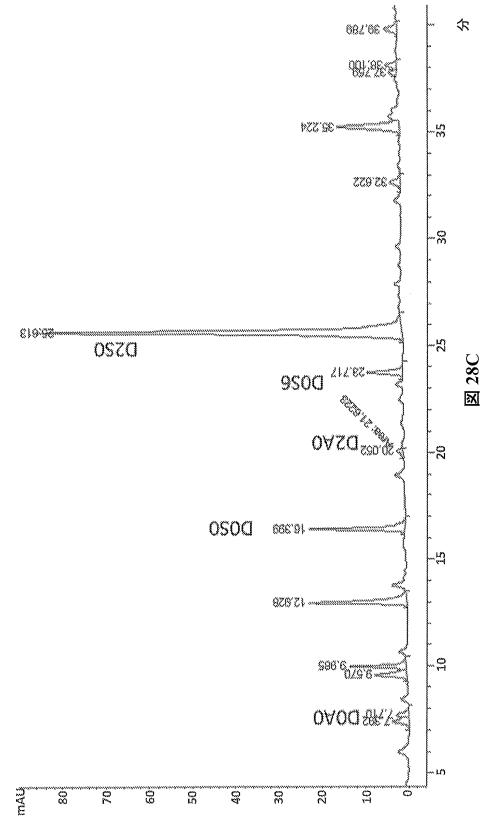
20

30

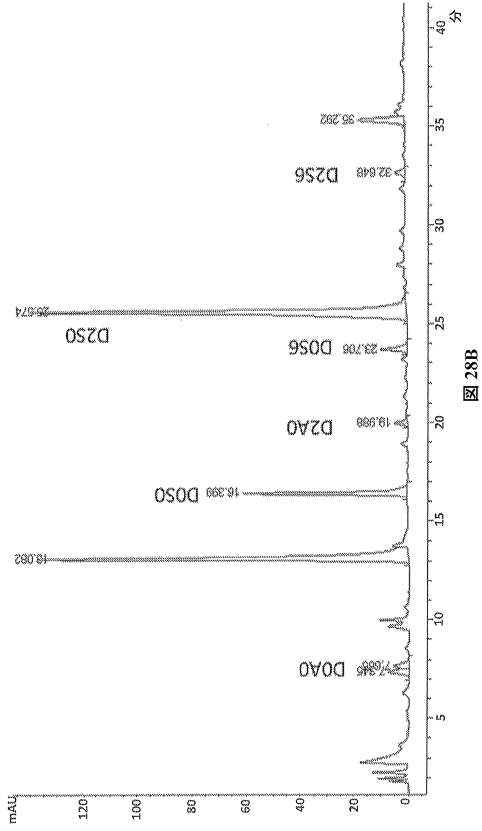
40

50

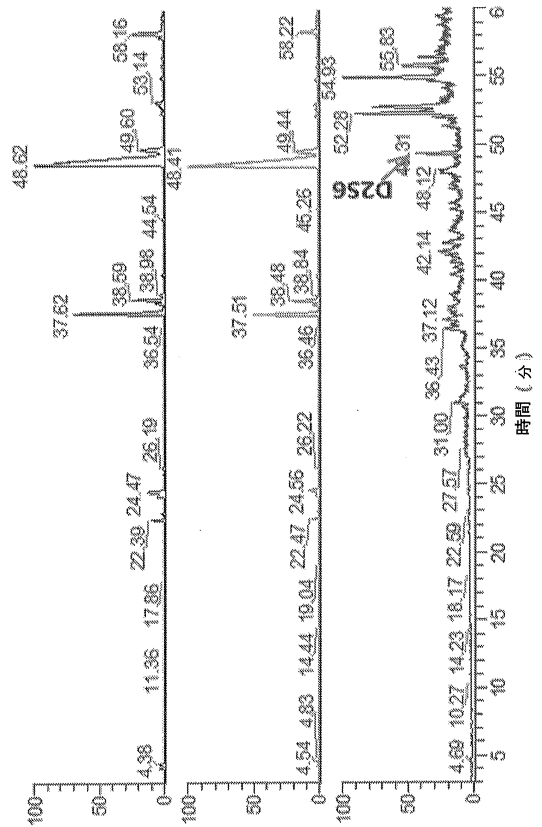
【 図 28 C 】



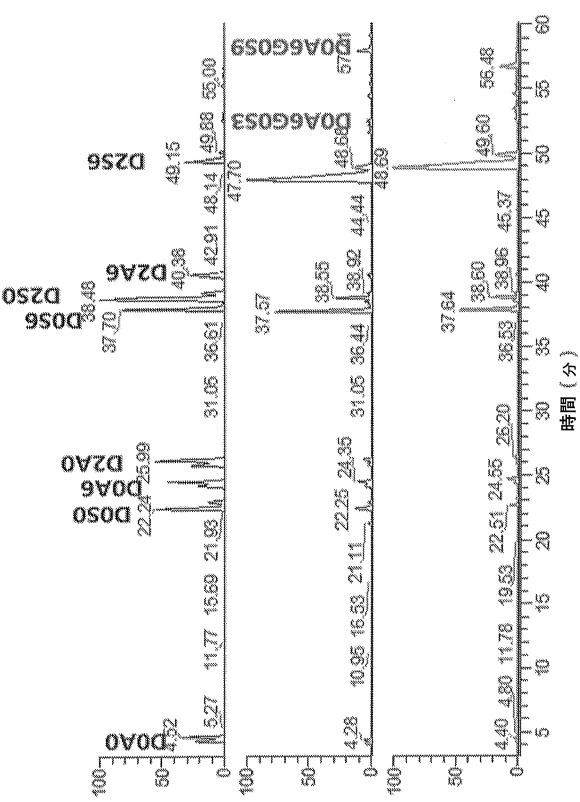
【 図 28 B 】



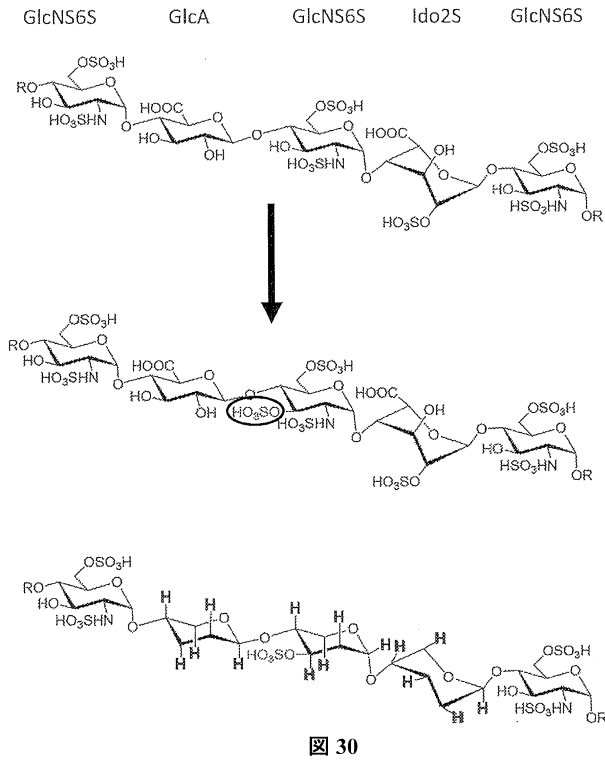
【 図 29 B 】



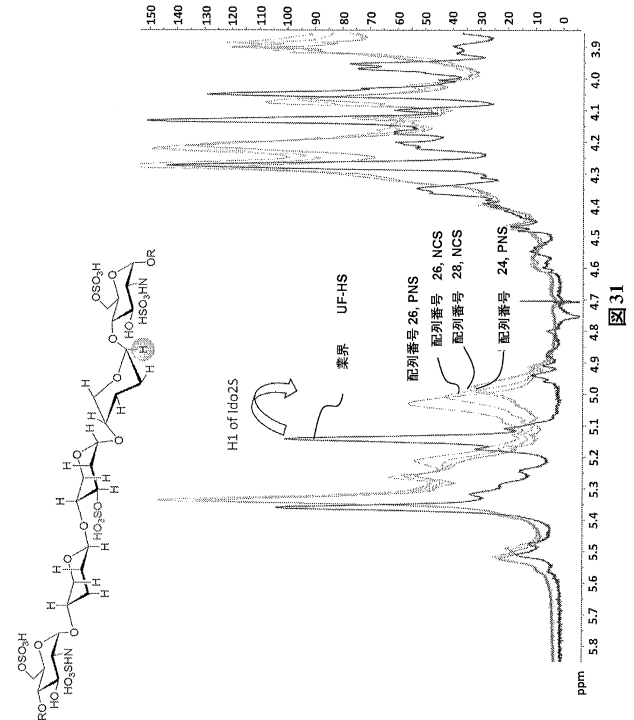
【 図 29 A 】



【 図 30 】



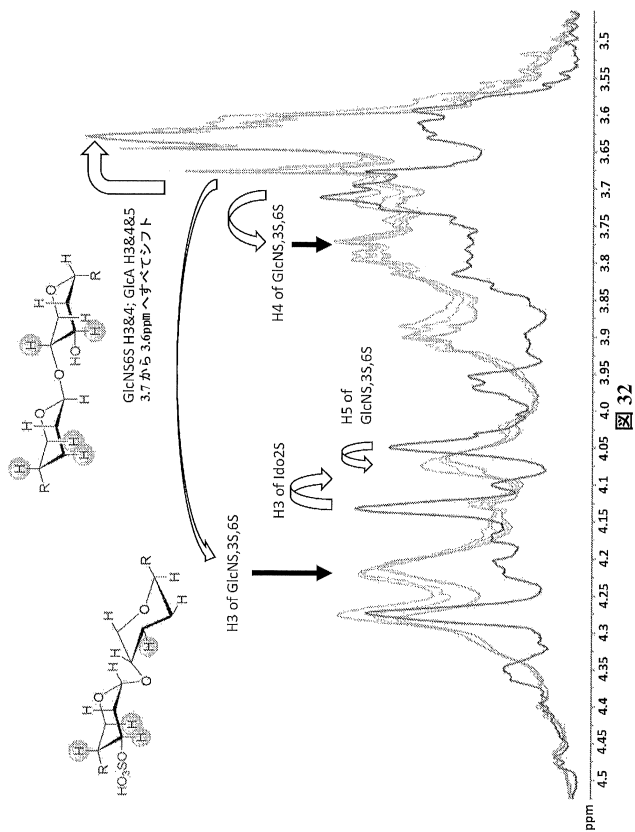
【 図 31 】



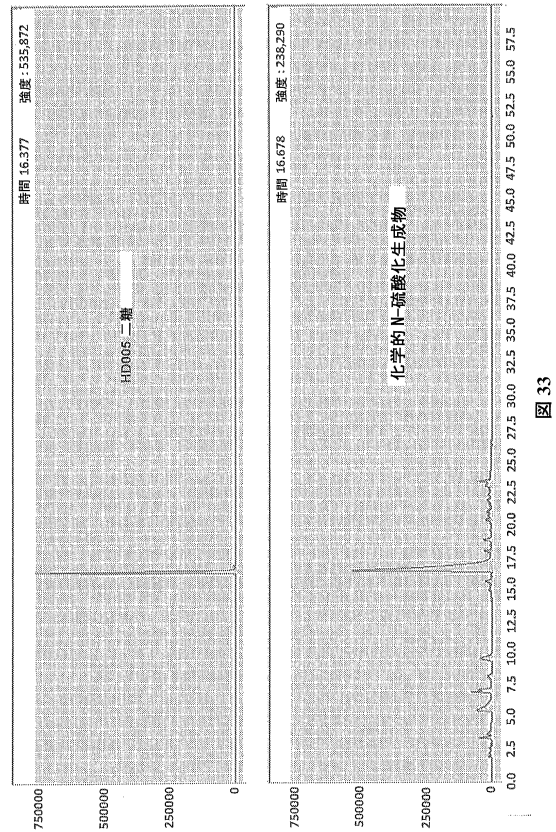
10

20

【 図 32 】



【 図 33 】



30

40

50

【図 3 4】

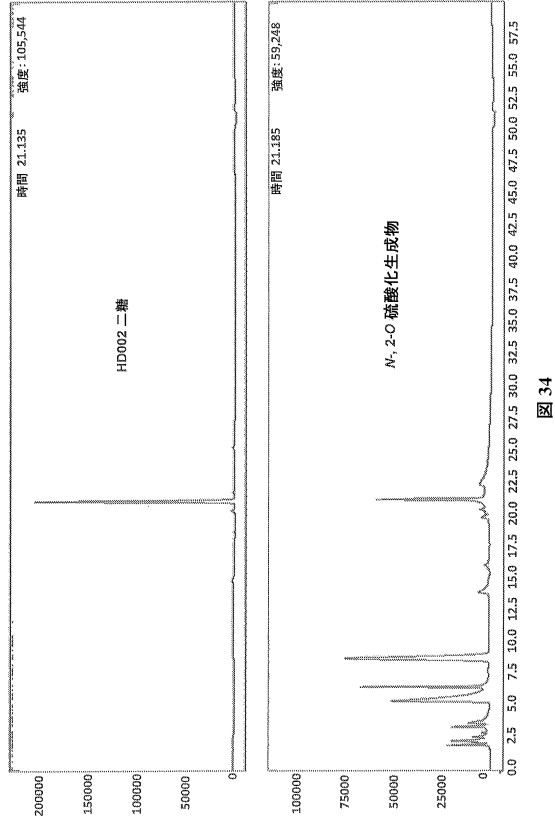


図 34

【図 3 5】

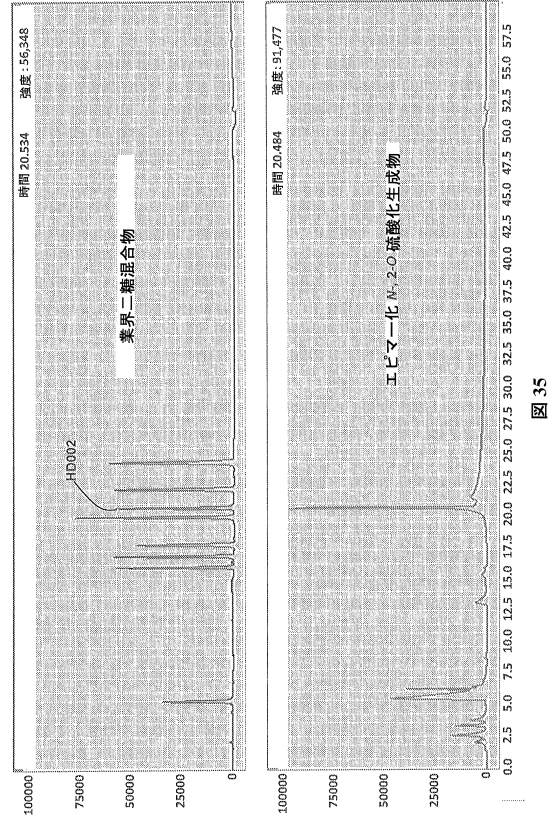


図 35

【図 3 6】

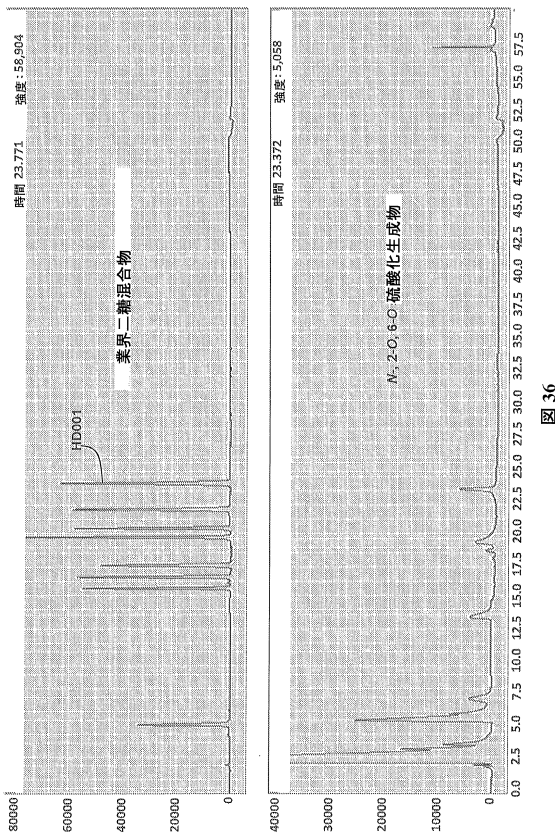


図 36

10

20

30

40

50

【配列表】

2022540849000001.app

10

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2020/041404

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12P19/26 C08B37/00 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12P C09J C08B		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, COMPENDEX, EMBASE, FSTA, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	WO 2020/150350 A1 (OPTIMVIA LLC [US]) 23 July 2020 (2020-07-23) abstract paragraphs [0280] - [0299]; claims 28-49	1-13,16
A	US 8 771 995 B2 (LIU JIAN [US]; LINHARDT ROBERT J [US] ET AL.) 8 July 2014 (2014-07-08) cited in the application abstract; claims 1-6; figure 1	1-40
A	EP 3 399 044 A1 (AJINOMOTO KK [JP]) 7 November 2018 (2018-11-07) abstract; claims 1-13; examples 1-16	20-40
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
26 October 2020		04/11/2020
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Schröder, Gunnar

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2020/041404

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2020/041404

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2020150350	A1	23-07-2020	NONE

US 8771995	B2	08-07-2014	EP 1885865 A2 13-02-2008
			US 2009197308 A1 06-08-2009
			US 2012322114 A1 20-12-2012
			WO 2006124801 A2 23-11-2006

EP 3399044	A1	07-11-2018	EP 3399044 A1 07-11-2018
			JP W02017115674 A1 18-10-2018
			US 2018298411 A1 18-10-2018
			WO 2017115674 A1 06-07-2017

10

20

30

40

50

フロントページの続き

,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,D
K,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),O
A(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,B
B,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD
,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,
LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,
RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,Z
W

弁理士 田村 慶政

(72)発明者 ゲステイラ、タルシス、フェレイラ

アメリカ合衆国オハイオ州 4 5 1 0 3、バタヴィア、ダブリュー . メインストリート 4 5 8

(72)発明者 ラジネス、ダニエル、エイチ

アメリカ合衆国オハイオ州 4 5 2 4 9、シンシナティ、スイート シー、チャペル スクエア ド
ライブ 8 8 3 7

F ターム (参考) 4B064 AF11 CA19 CC24 CD19 CD30 DA01