

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5946703号
(P5946703)

(45) 発行日 平成28年7月6日(2016.7.6)

(24) 登録日 平成28年6月10日(2016.6.10)

(51) Int.Cl. F 1
C 1 2 P 19/30 (2006.01) C 1 2 P 19/30

請求項の数 3 (全 32 頁)

(21) 出願番号	特願2012-142681 (P2012-142681)	(73) 特許権者	000002288
(22) 出願日	平成24年6月26日(2012.6.26)		三洋化成工業株式会社
(65) 公開番号	特開2013-31433 (P2013-31433A)		京都府京都市東山区一橋野本町11番地の
(43) 公開日	平成25年2月14日(2013.2.14)		1
審査請求日	平成27年3月5日(2015.3.5)	(72) 発明者	柳原 芳充
(31) 優先権主張番号	特願2011-145500 (P2011-145500)		京都市東山区一橋野本町11番地の1 三
(32) 優先日	平成23年6月30日(2011.6.30)		洋化成工業株式会社内
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	審査官	吉岡 沙織

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 変性多糖の製造方法

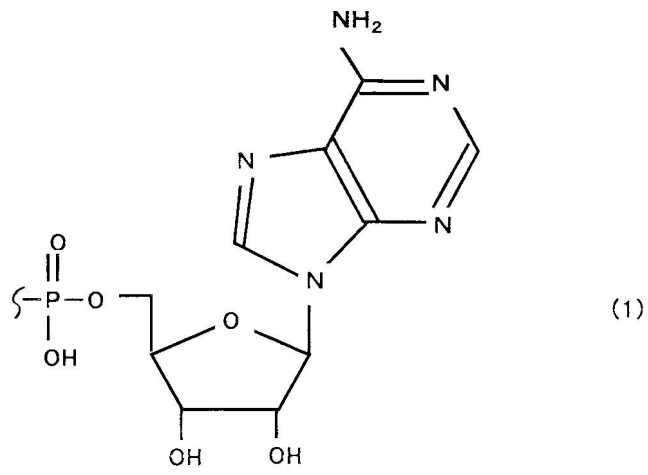
(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

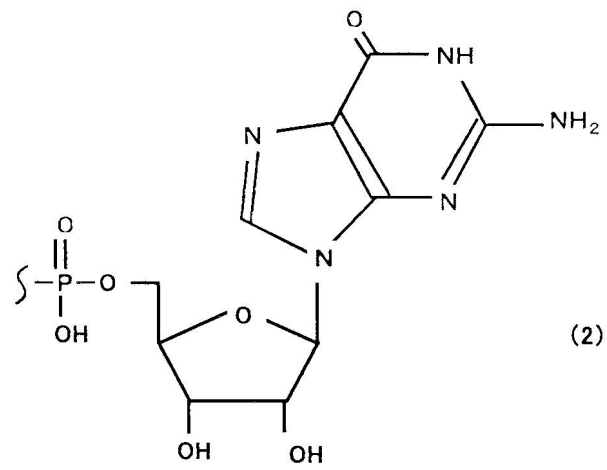
ヒドロキシル基及び/又はカルボキシル基を有する化合物によりアセチル化されたヒアルロン酸である化学修飾された多糖(A)及び下記リボヌクレオシド2リン酸-単糖(B)を多糖合成酵素(C)の存在下で反応させる変性多糖の製造方法。

リボヌクレオシド2リン酸-単糖(B): トリオース(b-1)、テトロース(b-2)、ペントース(b-3)、ヘキソース(b-4)、ヘプトース(b-5)及び下記単糖(b-6)からなる群より選ばれる少なくとも1種の単糖(b)が有する少なくとも1つのヒドロキシル基の水素原子が下記化学式(1)~(5)のいずれか1つの官能基で置換された糖ヌクレオチド。

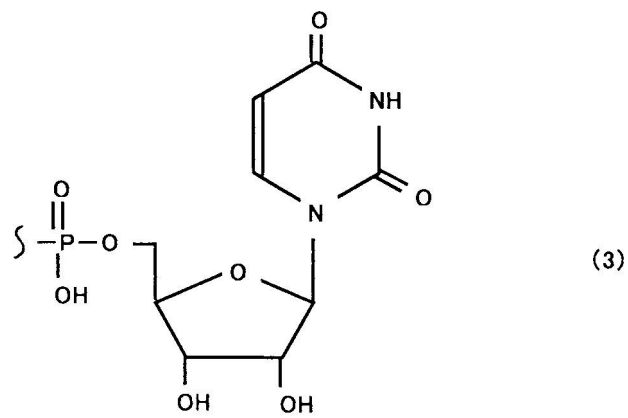
【化 1】



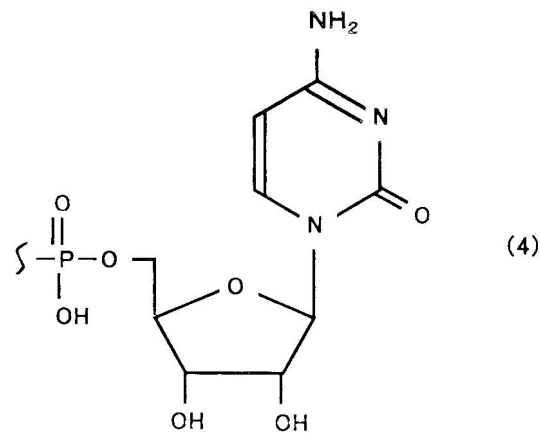
【化 2】



【化 3】

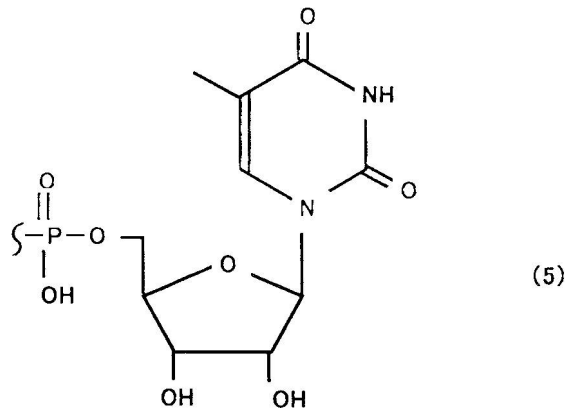


【化 4】



10

【化 5】



20

30

単糖 (b - 6) : (b - 1)、(b - 2)、(b - 3)、(b - 4) 及び (b - 5) からなる群より選ばれる単糖において、この単糖が有する水素原子、ヒドロキシル基及びヒドロキシメチル基からなる群より選ばれる少なくとも 1 種が下記置換基 (D) で置換された単糖。

置換基 (D) : カルボキシル基、アミノ基、N - アセチルアミノ基、スルホ基、メチルエステル基、N - グリコリル基、メチル基、1, 2, 3 - トリヒドロキシプロピル基、リン酸基及び 2 - カルボキシ - 2 - ヒドロキシエチル基からなる群より選ばれる少なくとも 1 種の置換基。

40

【請求項 2】

化学修飾された多糖 (A) 中に、(A) 1 分子の糖鎖を構成する末端の単糖のうち、少なくとも 2 つの末端の単糖が化学修飾されていない多糖分子を含む請求項 1 に記載の変性多糖の製造方法。

【請求項 3】

ヒドロキシル基及びノ又はカルボキシル基を有する化合物によりアセチル化されたヒアルロン酸である化学修飾された多糖 (A) 及びリボヌクレオシド 2 リン酸 - 単糖 (B) に多糖合成酵素 (C) を作用させる時間中の 10 ~ 100 % の時間において、反応溶液中のリボヌクレオシド 2 リン酸の濃度が多糖合成酵素 (C) の下記阻害濃度 IC_{50} の 100 倍未満である請求項 1 又は 2 に記載の変性多糖の製造方法。

50

阻害濃度 IC_{50} : リボヌクレオシド 2 リン酸 - 単糖 (B) を多糖合成酵素 (C) の存在下で反応させる際の (C) の濃度において、基質としてリボヌクレオシド 2 リン酸 - 単糖 (B) を用いて、阻害剤としてリボヌクレオシド 2 リン酸を用いて求めた、(C) の酵素活性が半減するときのリボヌクレオシド 2 リン酸の濃度。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は変性多糖の製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

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

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

【0003】

ヒアルロン酸は、特に保湿性が優れることから、化粧品添加剤として多用されている。しかし、汗などによって皮膚表面から流れ去ってしまう問題がある。

また、ヒアルロン酸分子中のヒドロキシル基及び / 又はカルボキシル基に、カルボン酸及び / 又はアルコール等を反応させてエステル化する等により、ヒアルロン酸を化学修飾したヒアルロン酸誘導体の製造方法が知られている (特許文献 1)。しかしながら、ヒアルロン酸にエステル化反応等の化学修飾を行うと、分子全体が化学修飾されてしまうため、ヒアルロン酸の親水性が極端に低下する問題がある。また、ヒアルロン酸の保湿性等の優れた性質が失われてしまう問題もある。そこで、ヒアルロン酸を含む多糖において、分子全体でなく、分子の一部を化学修飾した変性多糖の製造方法の開発が望まれている。

【0004】

【特許文献 1】特開平 06 - 298804 号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、一部を化学修飾した変性多糖の製造方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

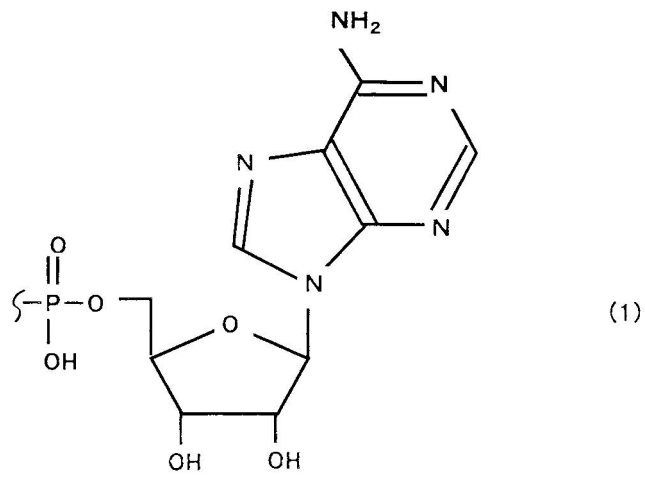
【0006】

本発明者は、上記の目的を達成するべく検討を行った結果、本発明に到達した。

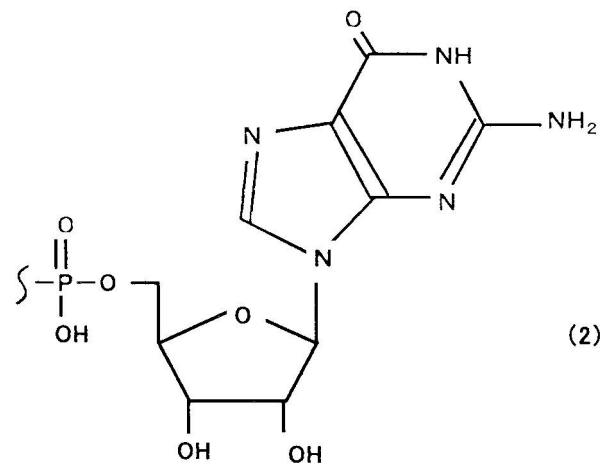
すなわち本発明は、ヒドロキシル基及び / 又はカルボキシル基を有する化合物によりアセチル化されたヒアルロン酸である化学修飾された多糖 (A) 及び下記リボヌクレオシド 2 リン酸 - 単糖 (B) を多糖合成酵素 (C) の存在下で反応させる変性多糖の製造方法である。

リボヌクレオシド 2 リン酸 - 単糖 (B) : トリオース (b - 1)、テトロース (b - 2)、ペントース (b - 3)、ヘキソース (b - 4)、ヘプトース (b - 5) 及び下記単糖 (b - 6) からなる群より選ばれる少なくとも 1 種の単糖 (b) が有する少なくとも 1 つのヒドロキシル基の水素原子が下記化学式 (1) ~ (5) のいずれか 1 つの官能基で置換された糖ヌクレオチド。

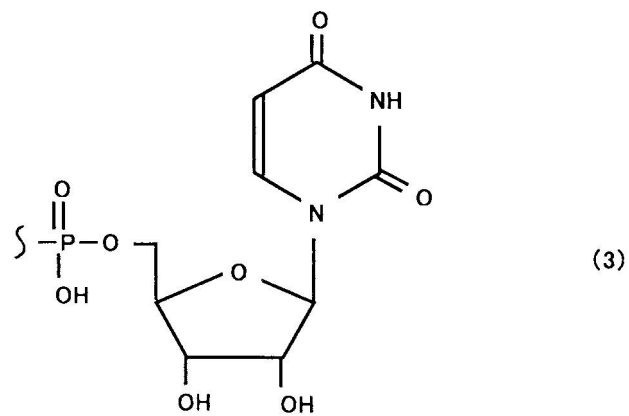
【化 1】



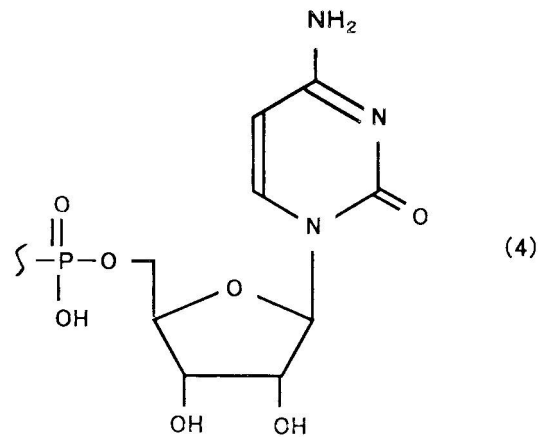
【化 2】



【化 3】

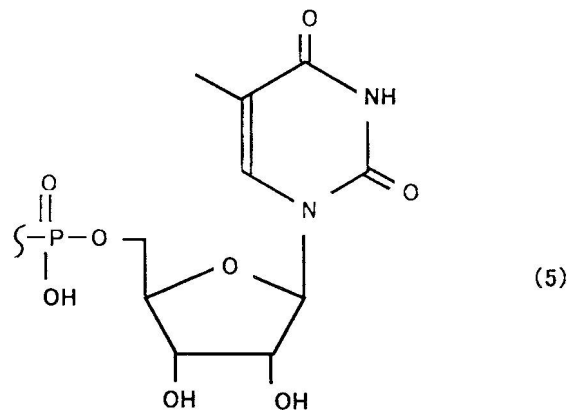


【化 4】



10

【化 5】



20

30

単糖 (b - 6) : (b - 1)、(b - 2)、(b - 3)、(b - 4) 及び (b - 5) からなる群より選ばれる単糖において、この単糖が有する水素原子、ヒドロキシル基及びヒドロキシメチル基からなる群より選ばれる少なくとも 1 種が下記置換基 (D) で置換された単糖。

置換基 (D) : カルボキシル基、アミノ基、N - アセチルアミノ基、スルホ基、メチルエステル基、N - グリコシル基、メチル基、1, 2, 3 - トリヒドロキシプロピル基、リン酸基及び 2 - カルボキシ - 2 - ヒドロキシエチル基からなる群より選ばれる少なくとも 1 種の置換基。

40

【発明の効果】

【0007】

本発明の変性多糖の製造方法は、一部を化学修飾した新規な変性多糖を製造することができる。

【発明を実施するための形態】

【0008】

本発明の変性多糖の製造方法は、化学修飾された多糖 (A) 及びリボヌクレオシド 2 リン酸 - 単糖 (B) を多糖合成酵素 (C) の存在下で反応させるものである。

【0009】

化学修飾された多糖 (A) としては、多糖に化学反応によって他の化合物を化学結合さ

50

せたものが含まれる。

多糖は、後述する単糖 (b - 1) ~ (b - 6) が複数連なったものであり、具体的には、ヒアルロン酸、デンプン、アミロース、アミロペクチン、グリコーゲン、セルロース、キチン、キトサン、アガロース、カラギーナン、ヘパリン、ペクチン、キシログルカン及びキシランタンガム等が含まれる。

(A) として具体的には、下記化合物 (E) と多糖とを反応させた反応生成物等が挙げられる。

化合物 (E) : ヒドロキシル基、カルボキシル基、アミノ基、スルホ基及びリン酸基からなる群より選ばれる少なくとも 1 種を有する化合物と反応する官能基 (e) を有する化合物。

10

化合物 (E) としては、官能基 (e) として、ヒドロキシル基、カルボキシル基、アミノ基、スルホ基、ホスホン酸基及びリン酸基からなる群より選ばれる少なくとも 1 種を有する化合物 (E 1) が含まれる。

【 0 0 1 0 】

(E 1) としては、下記 (E 1 1) ~ (E 1 5) が含まれる。

(E 1 1) : ヒドロキシル基を有する化合物

(E 1 2) : カルボキシル基を有する化合物

(E 1 3) : アミノ基を有する化合物

(E 1 4) : スルホ基を有する化合物

(E 1 5) : ホスホン酸基又はリン酸基を有する化合物

20

(E 1 6) : ヒドロキシル基及びカルボキシル基を有する化合物

【 0 0 1 1 】

(E 1 1) としては、炭素数 1 ~ 1 0 0 の 1 価のアルコール (E 1 1 1) 及び炭素数 2 ~ 1 0 0 の 2 価以上のアルコール (E 1 1 2) が含まれる。

(E 1 1 1) としては、1 価の脂肪族アルコール (E 1 1 1 - 1)、1 価の芳香脂肪族アルコール (E 1 1 1 - 2)、1 価の脂肪族アルコールのアルキレンオキサイド付加物 (E 1 1 1 - 3)、1 価のアルキルフェノールのアルキレンオキサイド付加物 (E 1 1 1 - 4)、1 価のモノアルキル又は 1 価のジアルキルアミンのアルキレンオキサイド付加物 (E 1 1 1 - 5) が含まれる。

【 0 0 1 2 】

30

(E 1 1 1 - 1) としては、炭素数 1 ~ 3 0 の脂肪族モノオールが含まれ、具体的には、炭素数 1 ~ 5 の低級アルコール (メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノール、ペンタノール等)、炭素数 6 ~ 3 0 の高級アルコール (ヘキシルアルコール、オクチルアルコール、デカノール、ウンデカノール、ドデカノール、トリデカノール、テトラデカノール、ペンタデシルアルコール、ヘキサデシルアルコール、ヘプタデカノール、オクタデカノール、オレイルアルコール、ノナデカノール、エイコサノール、セリルアルコール、ミリシルアルコール等) 及びそれぞれの分岐鎖アルコール等が挙げられる。これらのうち 2 種以上を組み合わせてもよい。

【 0 0 1 3 】

(E 1 1 1 - 2) としては、炭素数 7 ~ 3 0 の芳香脂肪族モノオールが含まれ、具体的には、ベンジルアルコール等が挙げられる。

40

【 0 0 1 4 】

(E 1 1 1 - 3) としては、上記 (E 1 1 1 - 1) のアルキレンオキサイド (以下 A O と略記する) 付加物 (重合度 = 1 ~ 1 0 0) が含まれる。A O としては、炭素数 2 ~ 1 0 のものが含まれ、具体的には、エチレンオキサイド (以下、E O と略記する)、1, 2 - プロピレンオキサイド (以下、P O と略記する)、ブチレンオキサイド及びスチレンオキサイド等が挙げられる。A O としてはこれら 2 種以上を併用してもよい。(E 1 1 1 - 3) として、具体的には、オレイルアルコール E O P O 付加物等が挙げられる。

【 0 0 1 5 】

(E 1 1 1 - 4) としては、炭素数 7 ~ 3 0 のアルキルフェノールの A O 付加物 (重合

50

度 = 1 ~ 100) が含まれる。炭素数 7 ~ 30 のアルキルフェノールとして、具体的には、ノニルフェノール及びオクチルフェノール等が挙げられる。AO としては、炭素数 2 ~ 10 のものが含まれ、EO、PO、ブチレンオキサイド及びスチレンオキサイド等が挙げられる。AO としてはこれら 2 種以上を併用してもよい。(E 111 - 4) として、具体的には、ノニルフェノールの EO 付加物及びオクチルフェノールの EO 付加物等が挙げられる。

【0016】

(E 111 - 5) としては、炭素数 1 ~ 30 のモノアルキル又はジアルキルアミンの AO 付加物 (重合度 = 1 ~ 100) が含まれる。AO としては、炭素数 2 ~ 10 のものが含まれ、EO、PO、ブチレンオキサイド及びスチレンオキサイド等が挙げられる。AO としてはこれら 2 種以上を併用してもよい。具体的には、ヘキサデシルアミン EOPO 付加物、ラウリルアミン EO 付加物及びステアリルアミン EOPO 付加物等が挙げられる。

10

【0017】

(E 112) として、具体的には、エチレングリコール、プロピレングリコール、1, 3 及び 1, 4 - ブタンジオール、1, 6 - ヘキサジオール、1, 10 - デカンジオール、ジエチレングリコール、ネオペンチルグリコール、シクロヘキサジオール、シクロヘキサジメタノール、1, 4 - ビス(ヒドロキシメチル)シクロヘキサン及び 1, 4 - ビス(ヒドロキシエチル)ベンゼン等の 2 価アルコール; グリセリン及びトリメチロールプロパン等の 3 価アルコール; ペンタエリスリトール、ソルビトール、マンニトール、ソルピタン、ジグリセリン、ジペンタエリスリトール等、ショ糖、グルコース、マンノース、フルクトース、メチルグルコシド及びその誘導体等の 4 ~ 8 価のアルコール; フェノール、フロログルシン、クレゾール、ピロガロール、カテコール、ヒドロキノン、ビスフェノール A、ビスフェノール F、ビスフェノール S、1 - ヒドロキシナフタレン、1, 3, 6, 8 - テトラヒドロキシナフタレン、アントロール、1, 4, 5, 8 - テトラヒドロキシアントラセン及び 1 - ヒドロキシピレン等のフェノール; ポリブタジエンポリオール; ひまし油系ポリオール等が挙げられる。

20

上記 (E 11) のうち、化学修飾し易さの観点から、(E 111) が好ましい。

【0018】

カルボキシル基を有する化合物 (E 12) としては、炭素数 1 ~ 100 の 1 価のカルボン酸 (E 121) 及び炭素数 1 ~ 100 の 2 価以上のカルボン酸 (E 122) が含まれる。

30

(E 121) としては、1 価の脂肪族カルボン酸 (E 121 - 1)、1 価の芳香族カルボン酸 (E 121 - 2) 及び 1 価の芳香脂肪族カルボン酸 (E 121 - 3) が含まれる。

【0019】

(E 121 - 1) としては、炭素数 1 ~ 100 の脂肪族モノカルボン酸が挙げられ、具体的には、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、ブチル酸、バレリアン酸、カブロン酸、エナント酸、カプリル酸、ペラルゴン酸、カプリン酸、クロトン酸、イソクロトン酸、ソルビン酸、オブツシル酸及びカプロレイン酸等が挙げられる。

【0020】

(E 121 - 2) としては、炭素数 7 ~ 100 の芳香族モノカルボン酸が挙げられ、具体的には、安息香酸、メチル安息香酸、プロピル安息香酸、ヘキシル安息香酸及びドデシル安息香酸等が挙げられる。

40

【0021】

(E 121 - 3) としては、炭素数 8 ~ 100 の芳香脂肪族モノカルボン酸が挙げられ、具体的には、フェニル酢酸、フェニルプロピオン酸及びフェニルデカン酸等が挙げられる。

【0022】

2 価以上のカルボン酸 (E 122) としては、炭素数 4 ~ 100 のアルカンジカルボン酸 (コハク酸、アジピン酸、セバシン酸、アゼライン酸、ドデカンジカルボン酸、オクタデカンジカルボン酸及びデシルコハク酸等); 炭素数 6 ~ 100 の脂環式ジカルボン酸 [

50

ダイマー酸（２量化リノール酸）等]；炭素数４～１００のアルケンジカルボン酸（ドデセニルコハク酸、ペンタデセニルコハク酸及びオクタデセニルコハク酸等のアルケニルコハク酸、マレイン酸、フマル酸及びシトラコン酸等）；炭素数８～１００の芳香族多価カルボン酸（フタル酸、イソフタル酸、テレフタル酸、２，２'-ビベンジルジカルボン酸、トリメリット酸、ヘメリット酸、トリメシン酸、ピロメリット酸及びナフタレン-１，４ジカルボン酸、ナフタレン-２，３，６トリカルボン酸、ジフェン酸、２，３-アントラセンジカルボン酸、２，３，６-アントラセントリカルボン酸及びピレンジカルボン酸等の炭素数８～１８の芳香族ポリカルボン酸等）等が挙げられる。

上記の（Ｅ１２）のうち、化学修飾し易さの観点から、（Ｅ１２１）が好ましい。

【００２３】

アミノ基を有する化合物（Ｅ１３）としては、炭素数１～１００のアミン（Ｅ１３１）が含まれる。

（Ｅ１３１）としては、１価の脂肪族アミン（Ｅ１３１-１）、２価以上の脂肪族アミン（Ｅ１３１-２）、脂環式アミン（Ｅ１３１-３）、芳香族アミン（Ｅ１３１-４）及び複素環式アミン（Ｅ１３１-５）が含まれる。

【００２４】

（Ｅ１３１-１）として、具体的には、炭素数１～１００のモノアルキルアミン（メチルアミン、エチルアミン、プロピルアミン及びブチルアミン等）；炭素数１～１００のジアルキルアミン（ジメチルアミン、ジエチルアミン、ジプロピルアミン、プロピルメチルアミン及びプロピルエチルアミン等）；炭素数１～１００のトリアルキルアミン（トリメチルアミン、エチルジメチルアミン、ジエチルメチルアミン、トリエチルアミン、トリｎ-プロピルアミン及びトリｎ-ブチルアミン等）等が挙げられる。

【００２５】

（Ｅ１３１-２）としては、炭素数１～１００のものが含まれ、具体的には、１，２ジアミノエタン、１，２-プロパンジアミン、１，３-プロパンジアミン、１，４-ブタンジアミン、１，６-ジアミノヘキサン、１，２-ビス(２-アミノエトキシ)エタン、トリエチレンテトラミン、テトラエチレンペンタミン、ペンタエチレンヘキサミン、イミノビスプロピルアミン及びビス(ヘキサメチレン)トリアミン等が挙げられる。

【００２６】

（Ｅ１３１-３）としては、炭素数３～１００のものが含まれ、具体的には、イソホロンジアミン及び１，２-シクロヘキサンジアミン等が挙げられる。

【００２７】

（Ｅ１３１-４）としては、炭素数６～１００のものが含まれ、具体的には、アニリン、１，３-フェニレンジアミン、２，４-トリレンジアミン、１，３-キシリレンジアミン、１，５-ナフタレンジアミン及び２，３-アントラセンジアミン等が挙げられる。

【００２８】

（Ｅ１３１-５）としては、炭素数３～１００のものが含まれ、具体的には、ピペラジン、N-アミノエチルピペラジン及び１，４-ジアミノエチルピペラジン等が挙げられる。

上記（Ｅ１３）のうち、化学修飾し易さの観点から、（Ｅ１３１-１）が好ましい。

【００２９】

（Ｅ１４）としては、スルホ基を１個有する炭素数１～１００の化合物（Ｅ１４１）及びスルホ基を２個以上有する炭素数１～１００の化合物（Ｅ１４２）が含まれる。

（Ｅ１４１）としては、炭素数１～１００の脂肪族モノスルホン酸（メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、プロパンスルホン酸、ブタンスルホン酸、ヘキサンスルホン酸、デカンスルホン酸、ウンデカンスルホン酸及びドデカンスルホン酸等）；炭素数６～３０芳香族モノスルホン酸（ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、o-トルエンスルホン酸、m-トルエンスルホン酸、４-ドデシルベンゼンスルホン酸、４-オクチルベンゼンスルホン酸及びナフタレンスルホン酸等）；炭素数１～２０のパーフルオロアルカンスルホン酸（トリフルオロメタンスルホン酸等）等が挙げられる。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 0 】

(E 1 4 2) としては、炭素数 1 ~ 1 0 0 の脂肪族ポリスルホン酸 (メチオン酸、 1 , 1 - エタンジスルホン酸、 1 , 2 - エタンジスルホン酸、 1 , 1 - プロパンジスルホン酸、 1 , 3 - プロパンジスルホン酸及びポリビニルスルホン酸等) ; 炭素数 6 ~ 1 0 0 の芳香族ポリスルホン酸 (m - ベンゼンジスルホン酸、 1 , 4 - ナフタレンスルホン酸、 1 , 5 - ナフタレンジスルホン酸、 1 , 6 - ナフタレンジスルホン酸、 2 , 6 - ナフタレンジスルホン酸、 2 , 7 - ナフタレンジスルホン酸及びスルホン化ポリスチレン等) ; ビス (フルオロスルホニル) イミド ; 炭素数 2 ~ 1 0 のビス (パーフルオロアルカンスルホニル) イミド [ビス (トリフルオロメタンスルホニル) イミド、ビス (ペンタフルオロエタンスルホニル) イミド、ビス (ノナフルオロブタンスルホニル) イミド、ペンタフルオロエタンスルホニルトリフルオロメタンスルホニルイミド、トリフルオロメタンスルホニルヘプタフルオロプロパンスルホニルイミド、ノナフルオロブタンスルホニルトリフルオロメタンスルホニルイミド等] 等が挙げられる。

10

上記 (E 1 4) のうち、化学修飾し易さの観点から、(E 1 4 1) が好ましい。

【 0 0 3 1 】

(E 1 5) としては、リン酸、ピロリン酸、トリリン酸、ポリリン酸、炭素数 1 ~ 1 0 0 のホスホン酸 (メチルホスホン酸ジメチル、エチルホスホン酸ジエチル、メチルホスホン酸ジプロピル、メチルホスホン酸トリブチル、ブチルホスホン酸ジブチル、フェニルホスホン酸ジフェニル、フェニルホスホン酸ジクレジル、フェニルホスホン酸ジキシリル、フェニルホスホン酸フェニルクレジル等) 及び炭素数 1 ~ 1 0 0 のリン酸基 (リン酸トリメチル、リン酸トリエチル、リン酸トリプロピル、リン酸トリイソプロピル、リン酸トリブチル、リン酸トリイソブチル、リン酸トリフェニル、リン酸トリクレジル、リン酸トリキシリル、リン酸ジフェニルクレジル、リン酸メチルジフェニル、リン酸フェニルジエチル等) 等が挙げられる。

20

【 0 0 3 2 】

(E 1 6) としては、炭素数 2 ~ 1 0 0 のヒドロキシカルボン酸が含まれ、具体的には、脂肪族ヒドロキシカルボン酸 (グリコール酸、乳酸、2 - ヒドロキシ酪酸、6 - ヒドロキシヘキサノ酸、2 , 8 - ジヒドロキシカプリル酸、1 0 - ヒドロキシカプリン酸、1 2 - ヒドロキシラウリン酸、1 6 - ヒドロキシパルミチン酸、1 8 - ヒドロキシオレイン酸、2 2 - ヒドロキシベヘニン酸、りんご酸及びクエン酸等) ; 芳香族ヒドロキシカルボン酸 (サリチル酸、m - ヒドロキシ安息香酸、p - ヒドロキシ安息香酸、4 - ヒドロキシフタル酸、5 - ヒドロキシトリメリット酸及び 3 - ヒドロキシピロメリット酸等) 等が挙げられる。

30

【 0 0 3 3 】

上記 (E) のうち、原料の入手のしやすさ及び得られる変性多糖の物性の観点から、(E 1 1)、(E 1 2) 及び (E 1 6) が好ましく、さらに好ましくは 1 価の脂肪族アルコール (E 1 1 1 - 1) 及び炭素数 1 ~ 1 0 0 の 1 価のカルボン酸 (E 1 2 1) であり、特に好ましくはメタノール及び酢酸からなる群より選ばれる少なくとも 1 種である。

また、化学修飾された多糖 (A) として、(A) を製造し易い及び得られる変性多糖の物性の観点から、多糖が有するヒドロキシル基及び / 又はカルボキシル基がエステル化された多糖であることが好ましく、さらに好ましくは多糖が有するヒドロキシル基及び / 又はカルボキシル基がアセチル化された多糖であり、次にさらに好ましくは多糖が有するヒドロキシル基及び / 又はカルボキシル基がアセチル化されたヒアルロン酸である。

40

【 0 0 3 4 】

化学修飾された多糖 (A) 中には、変性多糖を大量に得る観点から、(A) 1 分子の糖鎖を構成する末端の単糖のうち、少なくとも 2 つの末端の単糖が化学修飾されていない多糖分子を含むことが好ましい。(A) 分子が、末端の単糖が修飾された多糖分子である場合、多糖合成酵素 (C) が伸長反応を行う効率が悪くなる。したがって、(A) 中に少なくとも 2 つの末端の単糖が化学修飾されていない多糖分子を含むことが好ましい。

(A) 分子の糖鎖を構成する末端の単糖が化学修飾されていない多糖 (A) を作成する

50

方法としては、化学修飾された多糖（A）を合成する際に、後述する置換率が1未満となるように合成する方法等が挙げられる。具体的には、化学修飾させる前の多糖が有する官能基{ヒドロキシル基、カルボキシル基、アミノ基、スルホ基及びリン酸基}のうち、ヒドロキシル基と反応しうる（E）の量を、ヒドロキシル基のモル数よりも少なくすること等が挙げられる。

【0035】

化学修飾された多糖（A）が、多糖が有するカルボキシル基を化合物（E）で修飾したものである場合、（E11）で修飾する方法としては、従来のカルボキシル基を有する化合物とヒドロキシル基を有する化合物からエステル化合物を作成する方法が使用でき、（E13）で修飾する方法としては、従来のカルボキシル基を有する化合物とアミノ基を有する化合物からアミド化合物を作成する方法が使用できる。

10

また、（A）が多糖が有するヒドロキシル基を化合物（E）で修飾したものである場合、（E12）で修飾する方法としては、従来のヒドロキシル基を有する化合物とカルボキシル基を有する化合物からエステル化合物を作成する方法が使用でき、（E14）で修飾する方法としては、従来のヒドロキシル基を有する化合物とスルホ基を有する化合物からスルホン酸エステル化合物を作成する方法が使用でき、（E15）で修飾する方法としては、従来のヒドロキシル基を有する化合物とホスホン酸基又はリン酸基を有する化合物からリン酸エステル化合物を作成する方法が使用できる。

また、化学修飾した多糖を合成する従来の方法{特開平09-110901号、特開平09-124701号及び特開平11-012304号等}を用いることができる。

20

【0036】

化学修飾された多糖（A）は、多糖が有するヒドロキシル基、カルボキシル基、アミノ基、スルホ基及びリン酸基からなる群より選ばれるするなくとも1種を少なくとも1つが修飾されていれればよい。

【0037】

また、化学修飾された多糖（A）が（E）により修飾されている割合（置換率）は、変性多糖の物性を変化させる（適度に疎水性を付与する等）観点から、0.001～1が好ましく、さらに好ましくは0.1～1である。また、効率よく変性多糖を得る観点から、置換率は1未満であることが好ましく、さらに好ましくは0.9以下であり、次にさらに好ましくは0.8以下である。

30

置換率は、下記式によって求められる。

$$\text{置換率} = M2 / M1$$

M1：化学修飾する前の多糖中の、化合物（E）が反応し得る官能基{ヒドロキシル基、カルボキシル基、アミノ基、スルホ基及びリン酸基}のモル数

M2：多糖に付加した化合物（E）のモル数

上記（A）の置換率は、NMRによって測定することができる。例えば、化合物（E）が酢酸であり、ヒアルロン酸を化学修飾し、（A）がアセチル化ヒアルロン酸である場合、アセチル化ヒアルロン酸のNMRを測定し、積分値から、下記式によって求める。

$$\text{置換率} = (\text{アセチル基のピーク積分値} / 3) / \{ (\text{ヒドロキシル基のピーク積分値}) + (\text{アセチル基のピーク積分値} / 3) \}$$

40

【0038】

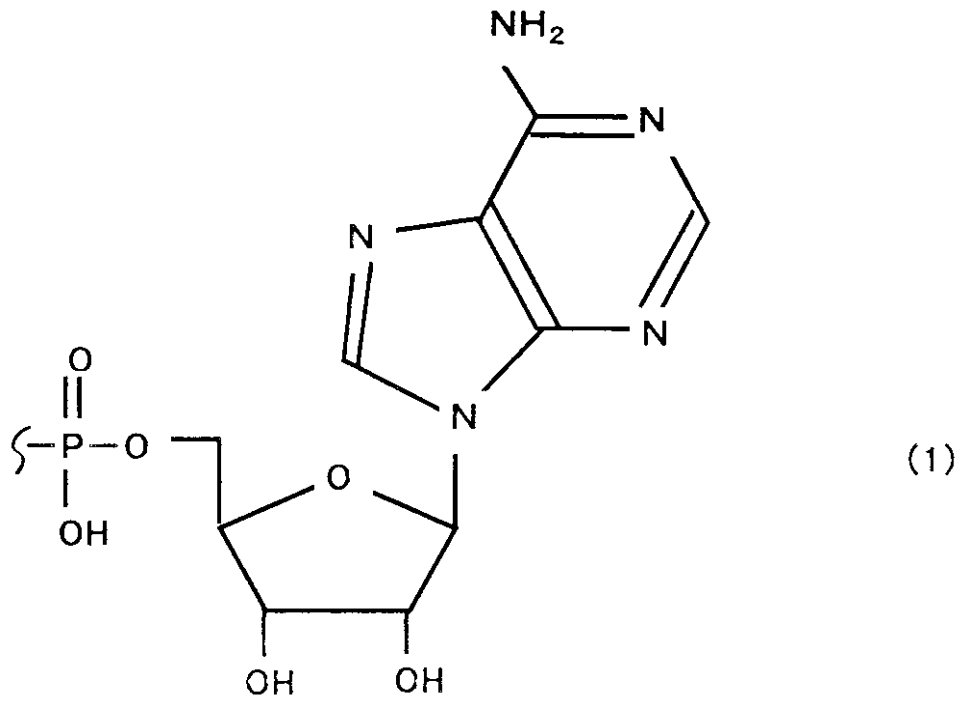
化学修飾された多糖（A）の液体クロマトグラフィー（HPLC）法により測定される重量平均分子量は、改変多糖の製造のしやすさの観点から、500～10,000,000が好ましい。

【0039】

本発明において、リボヌクレオシド2リン酸-単糖（B）は、トリオース（b-1）、テトロース（b-2）、ペントース（b-3）、ヘキソース（b-4）、ヘプトース（b-5）及び下記単糖（b-6）からなる群より選ばれる少なくとも1種の単糖（b）が有する少なくとも1つのヒドロキシル基の水素原子が下記化学式（1）～（5）のいずれか1つの官能基で置換された糖ヌクレオチドである。

50

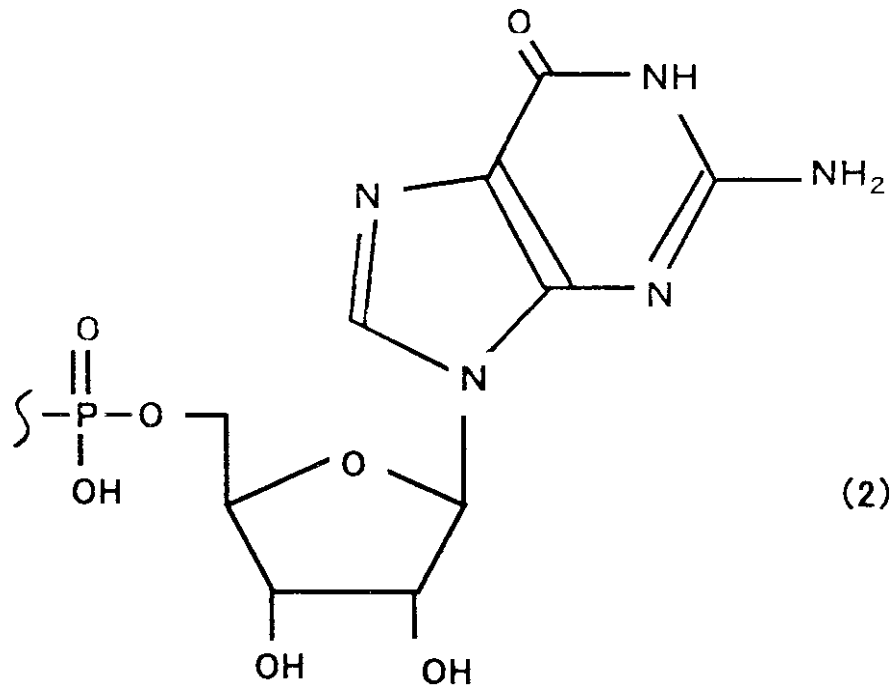
【化1】



10

20

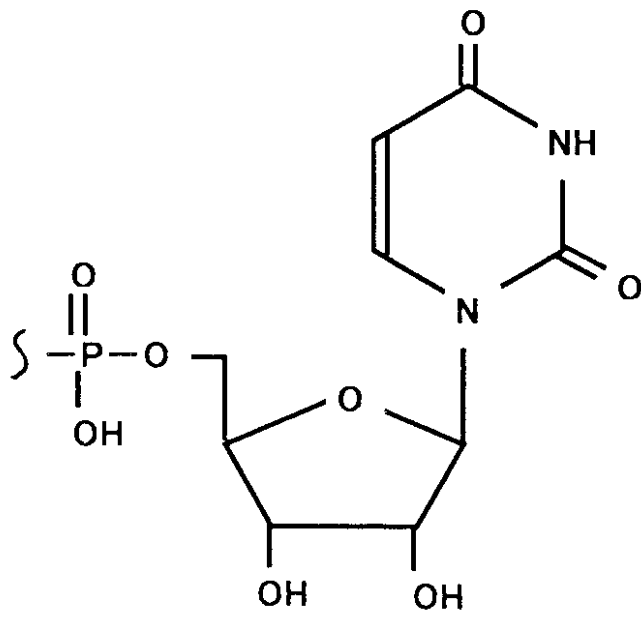
【化2】



30

40

【化 3】

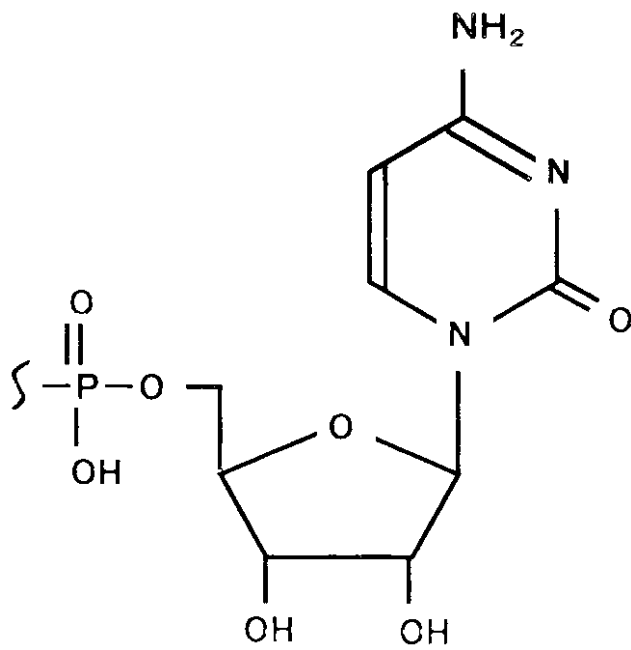


(3)

10

20

【化 4】

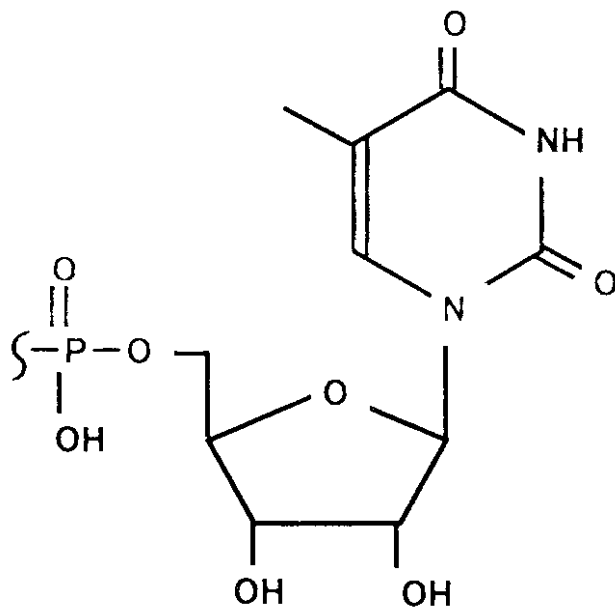


(4)

30

40

【化5】



10

20

単糖 (b - 6) : (b - 1)、(b - 2)、(b - 3)、(b - 4) 及び (b - 5) からなる群より選ばれる単糖において、この単糖が有する水素原子、ヒドロキシル基及びヒドロキシメチル基からなる群より選ばれる少なくとも1種が下記置換基 (D) で置換された単糖。

置換基 (D) : カルボキシル基、アミノ基、N - アセチルアミノ基、スルホ基、メチルエステル基、N - グリコリル基、メチル基、1, 2, 3 - トリヒドロキシプロピル基、リン酸基及び2 - カルボキシ - 2 - ヒドロキシエチル基からなる群より選ばれる少なくとも1種の置換基。

単糖 (b) には、光学異性体及び立体異性体が含まれる。

30

【0040】

トリオース (b - 1) は、炭素数3の単糖であり、具体的には、ジヒドロキシアセトン及びグリセルアルデヒド等が挙げられる。

テトロース (b - 2) は、炭素数4の単糖であり、具体的には、エリトロース、トレオース及びエリトルロース等が挙げられる。

ペントース (b - 3) は、炭素数5の単糖であり、具体的には、アラビノース、キシロース、リボース、キシリロース、リブロース及びデオキシリボース等が挙げられる。

ヘキソース (b - 4) は、炭素数6の単糖であり、具体的には、グルコース、マンノース、ガラクトース、フルクトース、ソルボース、タガトース、フコース、フクロース及びラムノース等が挙げられる。

40

ヘプトース (b - 5) は、炭素数7の単糖であり、具体的には、セドヘプツロース等が挙げられる。

【0041】

置換基 (D) で置換された単糖 (b - 6) には、上記単糖 (b - 1) ~ (b - 5) の分子中の水素原子 (-H)、ヒドロキシル基 (-OH) 及びヒドロキシメチル基 (-CH₂OH) のうち少なくとも1つが、カルボキシル基、アミノ基、N - アセチルアミノ基、スルホ基、メチルエステル基、N - グリコリル基、メチル基、1, 2, 3 - トリヒドロキシプロピル基、リン酸基及び2 - カルボキシ - 2 - ヒドロキシエチル基からなる群より選ばれる少なくとも1種の置換基で置換された下記 (b - 6 - 1) ~ (b - 6 - 10) 及び下記 (b - 6 - 11) が含まれる。

50

- (b - 6 - 1) : カルボキシル基 (- C O O H) で置換された単糖
 (b - 6 - 2) : アミノ基 (- N H ₂) で置換された単糖
 (b - 6 - 3) : N - アセチルアミノ基 (- N H C O C H ₃) で置換された単糖
 (b - 6 - 4) : スルホ基 (- O S O ₃ H) で置換された単糖
 (b - 6 - 5) : メチルエステル基 (- C O O C H ₃) で置換された単糖
 (b - 6 - 6) : N - グリコリル基 (- N H C O C H ₂ O H) で置換された単糖
 (b - 6 - 7) : メチル基で置換された単糖
 (b - 6 - 8) : 1 , 2 , 3 - トリヒドロキシプロピル基 (- C H O H C H O H C H ₂ O H) で置換された単糖
 (b - 6 - 9) : リン酸基 (- O P O ₃ H ₂) で置換された単糖 10
 (b - 6 - 10) : 2 - カルボキシ - 2 - ヒドロキシエチル基 (- C H ₂ C H O H C O O H) で置換された単糖
 (b - 6 - 11) : (b - 1) ~ (b - 5) の分子中の水素原子、ヒドロキシル基及びヒドロキシメチル基のうち少なくとも2つが2種以上の置換基 (D) で置換された単糖
 【 0 0 4 2 】

(b - 6 - 1) として、具体的には、グルクロン酸、イズロン酸、マンヌロン酸及びガラクトン酸等のウロン酸等が挙げられる。

(b - 6 - 2) として、具体的には、グルコサミン、ガラクトサミン及びマンノサミン等のアミノ糖等が挙げられる。

(b - 6 - 3) として、具体的には、N - アセチルグルコサミン、N - アセチルマンノサミン及びN - アセチルガラクトサミン等が挙げられる。 20

(b - 6 - 4) として、具体的には、ガラクトース - 3 - 硫酸等が挙げられる。

(b - 6 - 5) として、具体的には、グルコースメチルエステル及び (b - 6 - 1) 中のカルボン酸をメチルエステル化したもの等が挙げられる。

(b - 6 - 1 1) として、具体的には、N - アセチルムラミン酸、ムラミン酸、N - アセチルグルコサミン - 4 - 硫酸、イズロン酸 - 2 - 硫酸、グルクロン酸 - 2 - 硫酸、N - アセチルガラクトサミン - 4 - 硫酸、シアル酸、ノイラミン酸、N - グライコリルノイラミン酸及びN - アセチルノイラミン酸等が挙げられる。

【 0 0 4 3 】

(b - 6) が、置換基 (D) としてアニオン基であるカルボキシル基、リン酸基、2 - カルボキシ - 2 - ヒドロキシエチル基及びスルホ基からなる群より選ばれる少なくとも1種を有する場合、アニオン基のプロトンがアルカリ金属 (L i 、 N a 及び K 等) カチオン及び / 又はアルカリ土類金属 (C a 等) カチオンで置換されていてもいい。 30

【 0 0 4 4 】

リボヌクレオシド2リン酸 - 単糖 (B) は、上記単糖 (b - 1) ~ (b - 6) の有する少なくとも1つのヒドロキシル基の水素原子が、上記化学式 (1) ~ (5) で置換された糖ヌクレオチド (B - 1) ~ (B - 6) である。

(B - 3) として、具体的には、ウリジン2リン酸 - キシロース等が挙げられる。

(B - 4) として、具体的には、シチジン2リン酸 - グルコース、グアノシン2リン酸 - マンノース、グアノシン2リン酸 - フコース、アデノシン2リン酸 - グルコース、ウリジン2リン酸 - グルコース、ウリジン2リン酸 - ガラクトース及びウリジン2リン酸 - マンノース等が挙げられる。 40

(B - 6) として、具体的には、ウリジン2リン酸 - グルクロン酸、ウリジン2リン酸 - N - アセチルグルコサミン、ウリジン2リン酸 - ウリジン2リン酸 - N - アセチルガラクトサミン及びウリジン2リン酸 - イズロン酸等が挙げられる。

【 0 0 4 5 】

本発明の製造方法において、(B) は1種を使用してもよく、2種以上を使用してもいい。また、1種の(B) を使用して、1種の単糖が複数連なった変性多糖を製造してもよく、2種の(B) を使用して、2種の単糖がランダム又は交互に連なった変性多糖を製造してもよく、3種以上の(B) を使用して、3種以上の単糖がランダム又は規則的に連な 50

った変性多糖を製造してもいい。また、2種以上の(A)、2種以上の(B)及び2種以上の(C)を使用して、複数種類の変性多糖を製造してもいい。

【0046】

多糖合成酵素(C)は、上記(B)から多糖を合成する活性を有する酵素である。本発明の製造方法においては、(A)及び(B)を(C)の存在下で反応させることで、(B)が(A)に糖を転移する反応を(C)が触媒し、(A)に糖を結合させ、変性多糖を製造することができる。また、本発明の製造方法により得られる変性多糖は、化学修飾された多糖(A)に化学修飾されていない糖が複数結合する(例えば、(A)分子が直鎖であれば、2つの末端に化学修飾されていない多糖セグメントが結合し、化学修飾されていない多糖セグメント - 化学修飾された多糖セグメント - 化学修飾されていない多糖セグメントが結合した変性多糖となる)ため、分子の一部が化学修飾された多糖となる。

10

多糖合成酵素(C)には、化学修飾された多糖(A)の化学修飾される前の糖鎖がヒアルロン酸であるヒアルロン酸合成酵素(C-1)、コンドロイチンであるコンドロイチン合成酵素(C-2)、キサンタンであるキサンタン合成酵素(C-3)、セルロースであるセルロース合成酵素(C-4)、デンプンであるデンプン合成酵素(C-5)及びヘパリンであるヘパリン合成酵素(C-6)が含まれる。また、(C)には、(C-1)~(C-6)以外にも、上記(B)から糖を転移させて多糖を合成する活性を有する酵素が含まれる。

【0047】

ヒアルロン酸合成酵素(C-1)とは、リボヌクレオシド2リン酸 - グルクロン酸及びリボヌクレオシド2リン酸 - N - アセチルグルコサミンを糖供与体として、グルクロン酸が1,3結合でN - アセチルグルコサミンに結合した二糖単位の、1,4結合による繰り返し構造を有する糖を合成する酵素である。

20

(C-1)としては、従来のヒアルロン酸合成酵素を使用でき、ヒアルロン酸合成活性を有するものであれば特に限定されない。具体的には、非特許文献(The Journal of Biological Chemistry, 2007, Vol. 282, No. 51, P36777 - 36781)に記載されているクラスI及びクラスIIのヒアルロン酸合成酵素等が挙げられる。クラスI及びクラスIIは、酵素のアミノ酸配列の相同性によって分類されたものである。クラスIのヒアルロン酸合成酵素として、具体的には、ストレプトコッカスピロジェネシス由来、ストレプトコッカスエクイシミス由来及び藻類ウイルス由来のヒアルロン酸合成酵素等が挙げられる。また、クラスIIのヒアルロン酸合成酵素として、具体的には、パストレラ・ムルトシダ由来のヒアルロン酸合成酵素等が挙げられる。

30

【0048】

本発明の製造方法において、(C)として(C-1)を用いてヒアルロン酸を製造する場合、単位酵素あたりの変性多糖の生産量の観点から、用いる(B)としては、リボヌクレオシド2リン酸 - グルクロン酸及びリボヌクレオシド2リン酸 - N - アセチルグルコサミンが好ましく、さらに好ましくはウリジン2リン酸 - グルクロン酸及びウリジン2リン酸 - N - アセチルグルコサミンである。

また、単位酵素あたりの変性多糖の生産量の観点から、用いる(A)としては、ヒアルロン酸が化学修飾された多糖であることが好ましい。

40

【0049】

コンドロイチン合成酵素(C-2)とは、リボヌクレオシド2リン酸 - グルクロン酸及びリボヌクレオシド2リン酸 - N - アセチルガラクトサミンを糖供与体として、グルクロン酸が1,3結合でN - アセチルガラクトサミンに結合した二糖単位の、1,4結合による繰り返し構造を有する糖を合成する酵素である。

(C-2)としては、従来のコンドロイチン合成酵素を使用でき、コンドロイチン合成活性を有するものであれば特に限定されない。具体的には、ストレプトコッカスエクイシミス由来のコンドロイチン合成酵素及びパストレラムルトシダ由来のコンドロイチン合成酵素等が挙げられる。

50

【 0 0 5 0 】

本発明の製造方法において、(C)として(C-2)を用いてコンドロイチンを製造する場合、用いる(B)としては、単位酵素あたりの変性多糖の生産量の観点から、リボヌクレオシド2リン酸-グルクロン酸及びリボヌクレオシド2リン酸-N-アセチルガラクトサミンが好ましく、さらに好ましくはウリジン2リン酸-グルクロン酸及びウリジン2リン酸-N-アセチルガラクトサミンである。

また、単位酵素あたりの変性多糖の生産量の観点から、用いる(A)としては、コンドロイチンが化学修飾された多糖であることが好ましい。

【 0 0 5 1 】

キサンタン合成酵素(C-3)とは、リボヌクレオシド2リン酸-グルコース、リボヌクレオシド2リン酸-マンノース及びリボヌクレオシド2リン酸-グルクロン酸を糖供与体としてキサンタンを合成する酵素である。

(C-3)としては、従来のキサンタン合成酵素を使用でき、キサンタン合成活性を有するものであれば特に限定されない。具体的には、キサンタン・カムペストリスから得られるキサンタン合成酵素等が挙げられる。

【 0 0 5 2 】

本発明の製造方法において、(C)として(C-3)を用いてキサンタンを製造する場合、単位酵素あたりの変性多糖の生産量の観点から、用いる(B)としては、リボヌクレオシド2リン酸-グルコース、リボヌクレオシド2リン酸-マンノース及びリボヌクレオシド2リン酸-グルクロン酸が好ましく、さらに好ましくはウリジン2リン酸-グルコース、グアノシン2リン酸-マンノース及びウリジン2リン酸-グルクロン酸である。

また、単位酵素あたりの変性多糖の生産量の観点から、用いる(A)としては、キサンタンが化学修飾された多糖であることが好ましい。

【 0 0 5 3 】

セルロース合成酵素(C-4)とは、リボヌクレオシド2リン酸グルコースを糖供与体として1,4-結合を形成する酵素である。

(C-4)としては、従来のセルロース合成酵素を使用でき、セルロース合成活性を有するものであれば特に限定されない。具体的には、酢酸菌由来のセルロース合成酵素等が挙げられる。

【 0 0 5 4 】

本発明の製造方法において、(C)として(C-4)を用いてセルロースを製造する場合、単位酵素あたりの変性多糖の生産量の観点から、用いる(B)としては、リボヌクレオシド2リン酸-グルコースが好ましく、さらに好ましくはウリジン2リン酸-グルコースである。

また、単位酵素あたりの変性多糖の生産量の観点から、用いる(A)としては、セルロースが化学修飾された多糖であることが好ましい。

【 0 0 5 5 】

デンプン合成酵素(C-5)は、リボヌクレオシド2リン酸-グルコースを糖供与体として1,6-結合を形成する酵素である。

(C-5)としては、従来のデンプン合成酵素を使用でき、デンプン合成活性を有するものであれば特に限定されない。具体的には、トウモロコシ由来のデンプン合成酵素等が挙げられる。

【 0 0 5 6 】

本発明の製造方法において、(C)として(C-5)を用いてデンプンを製造する場合は、単位酵素あたりの変性多糖の生産量の観点から、用いる(B)としては、リボヌクレオシド2リン酸-グルコースが好ましく、さらに好ましくはウリジン2リン酸-グルコースである。

また、単位酵素あたりの変性多糖の生産量の観点から、用いる(A)としては、デンプンが化学修飾された多糖であることが好ましい。

【 0 0 5 7 】

10

20

30

40

50

ヘパリン合成酵素（C - 6）とは、リボヌクレオシド 2 リン酸 - グルクロン酸（ - D - ）又はリボヌクレオシド 2 リン酸イズロン酸（ - L - ）とリボヌクレオシド 2 リン酸 - グルコサミン（D - グルコサミン）を糖供与体として 1, 4 - 結合を形成する酵素である。

（C - 6）としては、従来のヘパリン合成酵素を使用でき、ヘパリン合成活性を有するものであれば特に限定されない。具体的には、ヒト由来のヘパリン合成酵素等が挙げられる。

【0058】

本発明の製造方法において、（C）として（C - 6）を用いてヘパリンを製造する場合、単位酵素あたりの変性多糖の生産量の観点から、用いる（B）としては、リボヌクレオシド 2 リン酸 - グルクロン酸又はリボヌクレオシド 2 リン酸 - イズロン酸とリボヌクレオシド 2 リン酸 - グルコサミンとであることが好ましく、さらに好ましくはウリジン 2 リン酸 - グルクロン酸又はウリジン 2 リン酸 - イズロン酸とウリジン 2 リン酸 - グルコサミンとであることである。

また、単位酵素あたりの変性多糖の生産量の観点から、用いる（A）としては、ヘパリンが化学修飾された多糖であることが好ましい。

【0059】

上記（A）及び糖ヌクレオチド（B）及び上記多糖合成酵素（C）は、製造する変性多糖に応じて適宜選択する。

【0060】

本発明の製造方法において、反応溶液中のリボヌクレオシド 2 リン酸の濃度は、多糖合成酵素（C）の下記阻害濃度 IC_{50} の 100 倍未満である。

阻害濃度 IC_{50} ：リボヌクレオシド 2 リン酸 - 単糖（B）を多糖合成酵素（C）の存在下で反応させる際の（C）の濃度において、基質としてリボヌクレオシド 2 リン酸 - 単糖（B）を用いて、阻害剤としてリボヌクレオシド 2 リン酸を用いて求めた、（C）の酵素活性が半減するときのリボヌクレオシド 2 リン酸の濃度。

阻害濃度 IC_{50} は、（B）を（C）の存在下で反応させる工程の開始時から終了時までのいずれかの時点での、（C）を反応させる際と同じ（C）の濃度、温度及び pH の条件下で、下記測定を行うことにより求められる。

< 阻害濃度 IC_{50} の測定方法 >

一定量の多糖合成酵素（C）、リボヌクレオシド 2 リン酸 - 単糖（B）、リボヌクレオシド 2 リン酸、pH 調整剤（K）及び水を含む一定の温度及び pH に調製した酵素反応溶液（I）を作成する。

酵素反応溶液（I）の温度は、製造工程中で（C）を（B）に作用させる工程の開始時から終了時までのいずれかの時点での温度と同じの温度に調整する。

酵素反応溶液（I）の pH は、製造工程中で（C）を（B）に作用させる工程の開始時から終了時までのいずれかの時点での pH と同じの pH に調整する。

酵素反応溶液（I）中の（C）のモル濃度は、（C）を（B）に作用させる工程の開始時から終了時までのいずれかの時点での濃度と同じ濃度に調整する。

酵素反応溶液（I）中のリボヌクレオシド 2 リン酸の含有量（モル濃度）は、リボヌクレオシド 2 リン酸が 0 M の酵素反応溶液（I）、及びリボヌクレオシド 2 リン酸の濃度が 0 M から多糖合成酵素（C）の活性が 0 になる（多糖の生成が観測できなくなる）リボヌクレオシド 2 リン酸の濃度との間で、リボヌクレオシド 2 リン酸の濃度が異なる 4 種類以上の酵素反応溶液（I）、合計 5 種類以上の酵素反応溶液（I）を作成する。また、類似の多糖合成酵素に対するリボヌクレオシド 2 リン酸の阻害定数 K_i が分かっている場合は、リボヌクレオシド 2 リン酸の濃度が 0 M のもの、類似の多糖合成酵素の K_i 未満で 0 M より大きい濃度範囲で 2 種類以上、 K_i 以上及び K_i の 10 倍以下の濃度範囲で 2 種類以上、合計 5 種類以上作成すればいい。

酵素反応溶液（I）中のリボヌクレオシド 2 リン酸 - 単糖（B）の含有量は、経時的なピーク面積変化を観測できる濃度を 1 点選べばよい。測定に使用する（C）と類似の多糖

10

20

30

40

50

合成酵素のミカエリス定数 K_m が分かっている場合は、 K_m 以上及び K_m の 5 倍以下の濃度範囲の間で選べばよい。

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

作成した酵素反応溶液 (I) について、(I) を作成直後及び一定時間 (例えば 5 分) ごとに溶液の一部 (例えば 100 μ L) を取り出し、取り出したものを 100 で 1 分間熱処理し、酵素反応を停止する。液体クロマトグラフィー (以下、H P L C と略記する) を用いて、取り出した反応溶液中の変性多糖の量を定量する。酵素反応溶液 (I) を作成直後のピーク面積を P_0 、 h 時間後のピーク面積を P_h とし、ピーク面積の変化 $P (= P_h - P_0)$ と変性多糖のピーク面積に対する検量線を用いて酵素反応初速度 $v (M / s)$ を算出する。

10

さらに、リボヌクレオシド 2 リン酸の濃度が異なる酵素反応溶液 (I) を用いて同様に測定し、酵素反応初速度 v を算出する。

阻害濃度 $I C_{50}$ は、横軸に (x 軸) に酵素反応溶液 (I) 中のそれぞれのリボヌクレオシド 2 リン酸の濃度、縦軸 (y 軸) にリボヌクレオシド 2 リン酸の濃度が 0 の時の酵素反応初速度 v を 100 (%) としたときの相対活性をプロットする。プロットを直線で見つなぎ、 $y = 50 (%)$ となるときのリボヌクレオシド 2 リン酸の濃度を阻害剤濃度 $I C_{50}$ とする。

20

【0061】

本発明において、反応溶液中のリボヌクレオシド 2 リン酸の濃度は、変性多糖を効率よく製造する観点から、阻害濃度 $I C_{50}$ の 100 倍未満が好ましく、さらに好ましくは 10 倍以下である。

また、複数種類の (C) を用いる場合は、全ての (C) の阻害濃度 $I C_{50}$ を測定し、少なくとも 1 つの (C) の阻害濃度 $I C_{50}$ について上記範囲であることが好ましい。

また、(A) と (B) とを (C) の存在下で反応させる工程において、リボヌクレオシド 2 リン酸の濃度が上記範囲である時間は、(A) と (B) とを (C) の存在下で反応させる時間中の 10 ~ 100 % の時間であるが、反応効率の観点から、30 ~ 100 % の時間であることが好ましく、さらに好ましくは 50 ~ 100 % の時間であり、特に好ましくは 80 ~ 100 % の時間であり、最も好ましくは 90 ~ 100 % の時間である。

30

(A) と (B) とを (C) の存在下で反応させる際、リボヌクレオシド 2 リン酸が副生成物として生成する。(C) の活性は、リボヌクレオシド 2 リン酸により阻害されやすいため、(A) と (B) とを (C) の存在下で反応させる工程において、リボヌクレオシド 2 リン酸の濃度は上記範囲であることが好ましい。

【0062】

本発明の製造方法において、リボヌクレオシド 2 リン酸の濃度を上記範囲にする方法としては、下記 (i) ~ (iii) の方法等が挙げられる。

(i) リボヌクレオシド 2 リン酸変換酵素 (G) を用いてリボヌクレオシド 2 リン酸を後述する化合物 (H) に変換する方法

40

(ii) シリカゲル担体等を用いて反応溶液中のリボヌクレオシド 2 リン酸を吸着させる方法

(iii) 化学反応によりリボヌクレオシド 2 リン酸を他の化合物に変換する方法

【0063】

(ii) の方法においては、シリカゲル担体以外にも、活性炭及びゼオライトなど、リボヌクレオシド 2 リン酸を吸着できるものであれば制限なく利用できる。

(iii) の方法においては、リボヌクレオシド 2 リン酸を他の化合物に変換することができる化学反応であれば、一般的に知られている化学反応を制限無く用いることができる。

【0064】

50

本発明において、リボヌクレオシド 2 リン酸の濃度を上記範囲にする方法としては、反応の基質特異性が高く、基質（リボヌクレオシド 2 リン酸 - 単糖（B））が分解されるなどの問題が少ないという観点から、（i）の方法が好ましい。

【0065】

（i）のリボヌクレオシド 2 リン酸変換酵素（G）を用いてリボヌクレオシド 2 リン酸を化合物（H）に変換する方法とは、具体的には下記方法が含まれる。

リボヌクレオシド 2 リン酸 - 単糖（B）に多糖合成酵素（C）を作用させて変性多糖を製造する方法において、リボヌクレオシド 2 リン酸を下記化合物（H）に変換する活性を有するリボヌクレオシド 2 リン酸変換酵素（G）の存在下で（C）を作用させる変性多糖の製造方法。

化合物（H）：プリン塩基又はピリミジン塩基（H-1）、リボヌクレオシド（H-2）、リボヌクレオシド 1 リン酸（H-3）、リボヌクレオシド 3 リン酸（H-4）、ポリリボヌクレオチド（H-5）、デオキシリボヌクレオシド 2 リン酸（H-6）及びリボヌクレオシド 2 リン酸 - 単糖（H-7）からなる群より選ばれる少なくとも 1 種の化合物。

【0066】

（H-1）には、プリン塩基（アデニン及びグアニン等）並びにピリミジン塩基（チミン、シトシン及びウラシル等）等が含まれる。

（H-2）は、（H-1）の塩基と単糖が結合した化合物であり、具体的には、ウリジン、アデノシン、リボチミジン、シチジン及びグアノシン等が挙げられる。

（H-3）は、（H-2）のモノリン酸エステル化物であり、具体的には、ウリジル酸（ウリジン 5' - リン酸）、アデノシン 1 リン酸（アデノシン 5' - リン酸）、リボチミジル酸（リボチミジン 5' - リン酸）、シチジン 1 リン酸（シチジン 5' - リン酸）及びグアノシン 1 リン酸（グアノシン 5' - リン酸）等が挙げられる。

（H-4）は、（H-2）のトリリン酸エステル化物であり、具体的には、ウリジン 3 リン酸（ウリジン 5' - 三リン酸）、アデノシン 3 リン酸（アデノシン 5' - 三リン酸）、リボチミジン - 3 リン酸（リボチミジン 5' - 三リン酸）、シチジン 3 リン酸（シチジン 5' - 三リン酸）及びグアノシン 3 リン酸（グアノシン 5' - 三リン酸）等が挙げられる。

（H-5）は、（H-3）がホスホジエステル結合で重合したポリマーであり、具体的には、ポリウリジル酸、ポリアデニル酸、ポリチミジル酸、ポリシチジル酸及びポリグアニル酸等が挙げられる。

（H-6）は、リボヌクレオシド 2 リン酸分子中のリボースが 2 - デオキシリボースとなったものであり、具体的には、デオキシウリジン 2 リン酸、デオキシアデノシン 2 リン酸、デオキシグアノシン 2 リン酸、デオキシシチジン 2 リン酸及びチミジン 2 リン酸等が挙げられる。

（H-7）には、上記リボヌクレオシド 2 リン酸 - 単糖（B）が含まれる。

【0067】

リボヌクレオシド 2 リン酸変換酵素（G）には、下記（G1）～（G7）が含まれる。

（G1）リボヌクレオシド 2 リン酸をプリン塩基又はピリミジン塩基に変換する活性を有する酵素

（G2）リボヌクレオシド 2 リン酸をリボヌクレオシドに変換する活性を有する酵素

（G3）リボヌクレオシド 2 リン酸をリボヌクレオシド 1 リン酸に変換する活性を有する酵素

（G4）リボヌクレオシド 2 リン酸をリボヌクレオシド 3 リン酸に変換する活性を有する酵素

（G5）リボヌクレオシド 2 リン酸をポリリボヌクレオチドに変換する活性を有する酵素

（G6）リボヌクレオシド 2 リン酸をデオキシリボヌクレオシド 2 リン酸に変換する活性を有する酵素

（G7）リボヌクレオシド 2 リン酸をリボヌクレオシド 2 リン酸 - 単糖に変換する活性を有する酵素

【0068】

(G2)は、リボヌクレオチド中の糖とリン酸との間のリン酸エステル結合を加水分解して、ヌクレオシドとリン酸にする反応を触媒する酵素である。(G2)として、具体的には、アピラーゼ及びアピラーゼ等が挙げられる。

【0069】

(G3)は、リボヌクレオシド2リン酸等のリン酸ジエステルを加水分解してリン酸モノエステルとする反応を触媒する酵素である。(G3)として、具体的には、アデノシン2リン酸(ADP)特異的ホスホフルクトキナーゼ及びヌクレオチダーゼ等が挙げられる。

【0070】

(G4)は、リン酸基を有する化合物から、リボヌクレオシド2リン酸にリン酸基を転移させてリボヌクレオシド3リン酸とする反応を触媒する酵素である。

(G4)として、具体的には、ヌクレオシド2リン酸キナーゼ、ポリリン酸キナーゼ、アルギニンキナーゼ、ピルビン酸キナーゼ、カルバミン酸キナーゼ、ホスホグリセリン酸キナーゼ及びホスホクレアチンキナーゼ等が含まれる。

また、(G4)には、ウリジン3リン酸合成酵素(G4-1)が含まれる。(G4-1)は、作用するリボヌクレオシド2リン酸がウリジン2リン酸であり、ウリジン3リン酸を合成する反応を触媒する酵素である。

【0071】

ヌクレオシド2リン酸キナーゼは、ヌクレオシド3リン酸からヌクレオシド2リン酸にリン酸基を転移する酵素である。ヌクレオシド2リン酸キナーゼとして、具体的には、生物由来のもの{動物由来のもの(例えば、ヒト由来、ウシ由来及びラット由来のもの等)、植物由来のもの(例えば、シロイヌナズナ由来及びコメ由来のもの等)及び微生物由来のもの(例えば、エシェリヒア(*Escherichia*)属由来、サッカロマイセス(*Saccharomyces*)属由来、バシルス(*Bacillus*)属由来及びサーマス(*Thermus*)属由来のもの等)等}、生物由来のものを化学修飾したもの(例えば、カルボジイミド化合物、無水コハク酸、ヨード酢酸及びイミダゾール化合物からなる群より選ばれる少なくとも1種を作用させて化学修飾したもの等)及び生物由来のものを遺伝子的に修飾したもの{例えば、Smithらの方法(*The Journal of Biochemistry*, 1998, Vol. 253, No. 18, P 6551-6560)を用いて遺伝子を改変して得たもの等}等が挙げられる。

【0072】

ポリリン酸キナーゼは、リボヌクレオシド2リン酸とポリリン酸とから、リボヌクレオシド3リン酸と、重合度の1つ少ないポリリン酸とを生成する活性を有する酵素である。ポリリン酸キナーゼとして、具体的には、生物由来のもの{植物由来のもの(例えば、タバコ由来のもの等)及び微生物由来のもの(エシェリヒア(*Escherichia*)属由来、コリネバクテリウム(*Corynebacterium*)属由来、シュードモナス(*Pseudomonas*)属由来及びサーマス(*Thermus*)属由来のもの等)等}、生物由来のものを化学修飾したもの(例えば、カルボジイミド化合物、無水コハク酸、ヨード酢酸及びイミダゾール化合物からなる群より選ばれる少なくとも1種を作用させて化学修飾したもの等)並びに生物由来のものを遺伝的に修飾したもの{例えば、Smithらの方法(*The Journal of Biochemistry*, 1998, Vol. 253, No. 18, P 6551-6560)を用いて遺伝子を改変して得たもの等}等が挙げられる。

【0073】

アルギニンキナーゼは、リボヌクレオシド2リン酸と -ホスホノ-L-アルギニンからリボヌクレオシド3リン酸とL-アルギニンを生成する活性を有する酵素である。アルギニンキナーゼとして、具体的には、生物由来のもの{動物由来のもの(例えば、ショウジョウバエ由来、エビ由来及びノミ由来のもの等)、植物由来のもの(例えば、ケヤリ由来のもの等)及び微生物由来のもの(例えば、バシルス(*Bacillus*)属由来のもの

10

20

30

40

50

の等)等}、生物由来のものを化学修飾したもの(例えば、カルボジイミド化合物、無水コハク酸、ヨード酢酸及びイミダゾール化合物からなる群より選ばれる少なくとも1種を作用させて化学修飾したもの等)並びに生物由来のものを遺伝子的に修飾したもの{例えば、Smithらの方法(The Journal of Biochemistry, 1998, Vol. 253, No. 18, P6551-6560)を用いて遺伝子を改変して得たもの等}等が挙げられる。

【0074】

ピルビン酸キナーゼは、リボヌクレオシド2リン酸とホスホエノールピルビン酸からリボヌクレオシド3リン酸とピルビン酸を生成する活性を有する酵素である。ピルビン酸キナーゼとして、具体的には、生物由来のもの{動物由来のもの(例えば、ヒト由来、ウシ由来及びラット由来のもの等)、植物由来のもの(例えば、シロイヌナズナ由来及びトウゴマ由来のもの等)及び微生物由来のもの(例えば、エシェリヒア(Escherichia)属由来及びサッカロマイセス(Saccharomyces)属由来のもの等)等}、生物由来のものを化学修飾したもの(例えば、カルボジイミド化合物、無水コハク酸、ヨード酢酸及びイミダゾール化合物からなる群より選ばれる少なくとも1種を作用させて化学修飾したもの等)並びに生物由来のものを遺伝子的に修飾したもの{例えば、Smithらの方法(The Journal of Biochemistry, 1998, Vol. 253, No. 18, P6551-6560)を用いて遺伝子を改変して得たもの等}等が挙げられる。

【0075】

カルバミン酸キナーゼは、カルバモイルリン酸とリボヌクレオシド2リン酸からリボヌクレオシド3リン酸、二酸化炭素、及びアンモニアを生成する活性を有する酵素である。カルバミン酸キナーゼとして、具体的には、生物由来のもの{動物由来のもの(例えば、ラット由来のもの等)及び微生物由来のもの(例えば、ピロコッカス(Pyrococcus)属由来、及びラクトバチルス(Lactobacillus)属由来のもの等)等}、生物由来のものを化学修飾したもの(例えば、カルボジイミド化合物、無水コハク酸、ヨード酢酸及びイミダゾール化合物からなる群より選ばれる少なくとも1種を作用させて化学修飾したもの等)並びに生物由来のものを遺伝子的に修飾したもの{例えば、Smithらの方法(The Journal of Biochemistry, 1998, Vol. 253, No. 18, P6551-6560)を用いて遺伝子を改変して得たもの等}等が挙げられる。

【0076】

ホスホグリセリン酸キナーゼは、3-ホスホグリセロールリン酸とリボヌクレオシド2リン酸からリボヌクレオシド3リン酸及び3-ホスホグリセリン酸を生成する活性を有する酵素である。ホスホグリセリン酸キナーゼとして、具体的には、生物由来のもの{動物由来のもの(例えば、ラット由来のもの等)及び微生物由来のもの(例えば、サッカロマイセス(Saccharomyces)属由来のもの等)等}、生物由来のものを化学修飾したもの(例えば、カルボジイミド化合物、無水コハク酸、ヨード酢酸及びイミダゾール化合物からなる群より選ばれる少なくとも1種を作用させて化学修飾したもの等)並びに生物由来のものを遺伝子的に修飾したもの{例えば、Smithらの方法(The Journal of Biochemistry, 1998, Vol. 253, No. 18, P6551-6560)を用いて遺伝子を改変して得たもの等}等が挙げられる。

【0077】

ホスホクレアチンキナーゼは、ホスホクレアチンとリボヌクレオシド2リン酸からリボヌクレオシド3リン酸及びクレアチンを生成する活性を有する酵素である。ホスホクレアチンキナーゼとして、具体的には、生物由来のもの{動物由来のもの(例えば、ラット由来のもの等)等}、生物由来のものを化学修飾したもの(例えば、カルボジイミド化合物、無水コハク酸、ヨード酢酸及びイミダゾール化合物からなる群より選ばれる少なくとも1種を作用させて化学修飾したもの等)並びに生物由来のものを遺伝子的に修飾したもの{例えば、Smithらの方法(The Journal of Biochemist

ry, 1998, Vol. 253, No. 18, P 6551 - 6560) を用いて遺伝子を
 変更して得たもの等}等が挙げられる。

【0078】

(G4) は、1種を使用してもよく、2種以上を使用してもいい。

(G4) のうち、リボヌクレオシド3リン酸合成活性の高さの観点から、アルギニンキ
 ナーゼ、ヌクレオシド2リン酸キナーゼ、ポリリン酸キナーゼ及びカルバミン酸キナーゼ
 が好ましい。

【0079】

(G4) を作用させる際、必要により、リボヌクレオシド2リン酸にリン酸基を与える
 リン酸基含有化合物(F)を用いてもいい。(F)はリン酸基を有する化合物である。(F)と
 しては、(G4)の基質特異性の観点から、リボヌクレオシド2リン酸にリン酸基
 を供与し得る化合物が好ましい。(F)としては、例えば、トリアミノホスフィンオキシ
 ド、リン酸化したアミノ酸(例えば -ホスホノ-L-アルギニン等)、ポリリン酸、ホ
 スホエノールピルピン酸及びその塩(例えば、リチウム塩、ナトリウム塩及びカリウム塩
 等)、カルバモイルリン酸、3-ホスホグリセロールリン酸、ホスホクレアチン並びにヌ
 クレオシド3リン酸(例えばグアノシン3リン酸及びアデノシン3リン酸等)等が挙げら
 れる。

リン酸基含有化合物(F)を用いる場合、(G4)と(F)との組み合わせとしては、
 ヌクレオシド2リン酸キナーゼとヌクレオシド3リン酸との組み合わせ、ポリリン酸キ
 ナーゼとポリリン酸との組み合わせ、アルギニンキナーゼと -ホスホノ-L-アルギニン
 との組み合わせ、ピルピン酸キナーゼとホスホエノールピルピン酸及びその塩との組み
 合わせ、カルバミン酸キナーゼとカルバモイルリン酸との組み合わせ、ホスホグリセリン酸
 キナーゼと3-ホスホグリセロールリン酸との組み合わせ、ホスホグリセリン酸キナーゼ
 と3-ホスホグリセロールリン酸との組み合わせ並びにホスホクレアチンキナーゼとホス
 ホクレアチンとの組み合わせが好ましい。

【0080】

(G5) は、リボヌクレオシド2リン酸等のリボヌクレオシド2リン酸をリボヌクレオ
 シド1リン酸の共重合体(ポリリボヌクレオチド等)及び無機リン酸とする反応を触媒す
 る酵素である。(G5)として、具体的には、ポリリボヌクレオチドヌクレオチジルトラ
 ンスフェラーゼ等が挙げられる。

【0081】

(G6) は、リボヌクレオシド2リン酸等のリボヌクレオチドを還元してデオキシリボ
 ヌクレオチド(デオキシウリジン2リン酸等)とする反応を触媒する酵素である。(G6)
)として、具体的には、リボヌクレオシドジホスホリダクターゼ等が挙げられる。

【0082】

リボヌクレオシド2リン酸変換酵素(G)として(G6)を用いる場合、還元剤(g6)
)を用いる必要がある。(g6)としては、電子伝達タンパク質を用いることができ、例
 えば、還元型チオレドキシシン等が挙げられる。

【0083】

(G7) は、リボヌクレオシド2リン酸等のリボヌクレオシド2リン酸と糖又は糖リン
 酸とから糖核酸(リボヌクレオシド2リン酸-単糖)を合成する反応を触媒する酵素であ
 る。(G7)として、具体的には、スクロースシンターゼ及びN-アシルニューラミネー
 トシチジルトランスフェラーゼ等が挙げられる。

【0084】

リボヌクレオシド2リン酸変換酵素(G)として(G7)を用いる場合、糖核酸の原料
 (g7)として、糖(g7-1)又は糖リン酸(g7-2)を用いる必要がある。

(g7-1)には、単糖、二糖及びオリゴ糖等が含まれ、具体的には、スクロース等が
 挙げられる。

(g7-2)は、単糖の有するヒドロキシル基のうち1つに1つのリン酸が結合した化
 合物であり、例えば、グルクロン酸1リン酸(1-ホスホ-D-グルクロン酸等)、

10

20

30

40

50

N - アセチルグルコサミン 1 リン酸 (N - アセチル - D - グルコサミン - 1 - ホスファート等) 等が挙げられる。

(G 7) により合成されるリボヌクレオシド 2 リン酸 - 単糖は、本発明の製造方法の原料である (B) と同じでもよく、(B) と異なってもいい。糖 (g 7 - 1) 又は糖リン酸 (g 7 - 2) として、本発明の製造方法の原料であるリボヌクレオシド 2 リン酸 - 単糖 (B) と同じ単糖 (b) のヒドロキシル基に、1 つのリン酸が結合した化合物である場合は、(B) が合成される。

【 0 0 8 5 】

上記リボヌクレオシド 2 リン酸変換酵素 (G) のうち、変性多糖を効率よく製造する観点及び工業化しやすいという観点から、(G 2)、(G 3)、(G 4)、(G 5) 及び (G 7) が好ましく、さらに好ましくは (G 4) 及び (G 7) である。

(G) は、1 種を使用してもよく、2 種以上を併用してもいい。

【 0 0 8 6 】

本発明の変性多糖の製造方法は、化学修飾された多糖 (A) を用いる以外は、従来のリボヌクレオシド 2 リン酸 - 単糖 (B) に多糖合成酵素 (C) を作用させる多糖の製造方法と同様でいい。例えば、下記工程 (1) ~ (3) により製造する方法が含まれる。

(1) 所定量の化学修飾された多糖 (A)、リボヌクレオシド 2 リン鎖 - 単糖 (B)、緩衝液 (I) 及び多糖合成酵素 (C) を混合して反応溶液 (L) とし、所定の温度、所定の pH に調整する。必要により、リボヌクレオシド 2 リン酸変換酵素 (G) を加えてもいい。また、本工程では、必要により攪拌してもいい。

上記工程においては、化学修飾された多糖 (A)、リボヌクレオシド 2 リン酸 - 単糖 (B) 及び緩衝液 (I) を混合し、温度及び pH を調整した後、多糖合成酵素 (C) を添加してもいい。さらに、(C) は、そのまま添加してもよく、緩衝液 (I) で希釈してから添加してもいい。

また、反応溶液 (L) 中にはリボヌクレオシド 2 リン酸変換酵素 (G) を含んでもいい。使用する (G) が (G - 4) である場合は、(g - 4) を含んでもいい。使用する (G) が (G - 6) である場合は、(g - 6) を含む。使用する (G) が (G - 7) である場合は、(g - 7) を含む。

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

(2) 反応溶液 (L) の温度を調整しながら、所定の時間、化学修飾された多糖 (A) 及びリボヌクレオシド 2 リン酸 - 単糖 (B) を多糖合成酵素 (C) の存在下で反応させる。本工程では、必要により攪拌してもいい。

(3) 生成した変性多糖を精製する。変性多糖の精製方法としては、適量のアルコール (炭素数 1 ~ 1 0 のアルコール) などの溶剤を加えて沈殿させる方法や膜 (具体的には、セラミック膜等) を用いて溶液交換をする方法等が挙げられる。

【 0 0 8 7 】

反応溶液 (L) 中の化学修飾された多糖 (A) の含有量 (重量 %) は、変性多糖を効率よく製造する観点及び多糖合成酵素 (C) を効率よく作用させる観点から、0 . 0 0 0 0 0 1 ~ 1 重量 % が好ましい。

反応溶液 (L) 中のリボヌクレオシド 2 リン酸 - 単糖 (B) の含有量 (モル濃度) は、変性多糖を効率よく製造する観点及び多糖合成酵素 (C) を効率よく作用させる観点から、0 . 1 m M ~ 2 M が好ましい。

反応溶液 (L) 中の多糖合成酵素 (C) の含有量 (ユニット / L) は、変性多糖を効率よく製造する観点及び多糖合成酵素 (C) を効率よく作用させる観点から、0 . 1 ~ 1 0 , 0 0 0 , 0 0 0 ユニット / L が好ましい。

1 ユニットとは、1 分間に 1 μ m o l のリボヌクレオシド 2 リン酸 - 単糖 (B) からヒアルロン酸を合成する活性を 1 ユニットと定義する。

【 0 0 8 8 】

緩衝液 (I) としては、緩衝作用を有するバッファー等を含有した水が含まれる。緩衝

10

20

30

40

50

作用を有するバッファー等としては、従来のpH調整剤が使用でき、ホウ酸バッファー、リン酸バッファー、酢酸バッファー、Trisバッファー、HEPESバッファー、硫酸、塩酸、クエン酸、乳酸、ピルビン酸、蟻酸、塩化ナトリウム、塩化カリウム、モノエタノールアミン及びジエタノールアミン等が挙げられる。

【0089】

反応溶液(L)の温度は、(C)及び(G)の安定性並びに反応速度の観点から0~100が好ましい。

【0090】

反応溶液(L)のpHは、反応の至適条件の観点から、pH3~12が好ましい。

【0091】

上記工程(1)及び(2)において、上記化学修飾された多糖(A)、リボヌクレオシド2リン酸-単糖(B)及び多糖合成酵素(C)以外に、変性多糖を効率よく製造する観点から、リボヌクレオシド2リン酸変換酵素(G)を用いてもいい。また、(G)として(G-4)を用いる場合は(g-4)を用いてもよく、(G)として(G-6)を用いる場合は(g-6)を用いる必要があり、(G)として(G-7)を用いる場合は(g-7)を用いる必要がある。

リボヌクレオシド2リン酸変換酵素(G)を用いる場合、反応溶液(L)中の(G)の含有量(ユニット/L)は、変性多糖を効率よく製造する観点及び多糖合成酵素(C)を効率よく作用させる観点から、0.1~1,000,000ユニット/Lが好ましい。

1ユニットとは、1分間に1 μ molのリボヌクレオシド2リン酸を化合物(H)に変換する活性を1ユニットと定義する。

【0092】

反応溶液(L)中の(g-4)、(g-6)又は(g-7)の含有量(モル濃度)は、変性多糖を効率よく製造する観点及び多糖合成酵素(C)を効率よく作用させる観点から、0.01nM~10Mが好ましい。

【0093】

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

脂質(M)としては、例えば、カルディオピン及びオレイン酸等が挙げられる。

糖類(N)としては、例えば、グリセリン等が挙げられる。

オリゴ糖(O)としては、例えば、オリゴヒアルロン酸等が挙げられる。

【0094】

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

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

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

【0095】

工程(2)において、多糖合成酵素(C)を作用させる時間は、多糖合成酵素(C)の活性、反応溶液(L)の温度、多糖合成酵素(C)、リボヌクレオシド2リン酸-単糖(B)の量比等によって異なる。反応溶液(L)の温度を、多糖合成酵素(C)の活性が高く、反応速度が速い温度に調整すれば、反応時間を短くすることができる。また、反応溶液(L)中のリボヌクレオシド2リン酸-単糖(B)に対する多糖合成酵素(C)の量が多いほど、反応は早くなり、反応時間は短くなる。

【0096】

本発明の製造方法によれば、化学修飾された多糖(A)を多糖合成酵素(C)が基質として利用できれば、変性多糖を製造することができる。また、(A)の基質としての利用性は、化学修飾された多糖(A)の置換率が適度であり、化学修飾された多糖(A)分子の末端の単糖が化学修飾されていない多糖分子を多く含んでいる方が高く、変性多糖を大

10

20

30

40

50

量に得ることができる。

【0097】

本発明の変性多糖の製造方法によれば、一部を化学修飾した新規な変性多糖を得ることができる。また、多糖がヒアルロン酸である場合、本発明の製造方法により得られた変性ヒアルロン酸は、ヒアルロン酸の優れた性質を保持しつつ、化学修飾されたヒアルロン酸の置換率、化学修飾する化合物(E)の種類等を変化させることにより、ヒアルロン酸の物性を調整することができる。ヒアルロン酸以外の多糖においても、多糖の有する優れた性質を保持しつつ、化学修飾された多糖(A)の置換率等を変化させることにより、物性を調整することができる。

したがって、本発明の製造方法により得られる変性多糖は、化粧品、医薬部外品、関節炎治療剤、創傷被覆剤、眼科手術用手術補助剤及び外科手術後の癒着阻止剤などの医薬品、医療機器として広範囲に使用できる。

【実施例】

【0098】

以下、実施例及び比較例により本発明をさらに説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。以下、特に定めない限り、%は重量%、部は重量部を示す。

【0099】

<製造例1>

パスツレラ・ムルトシダ由来の配列番号1のヒアルロン酸合成酵素にFLAGタグを融合したアミノ酸配列をコードする遺伝子をpKK223-3に組み込んだプラスミドを大腸菌E.coliSUREに形質転換して、培養し、発現誘導した後、遠心分離機(6000×g、15分間)を用いて大腸菌を回収した。回収した大腸菌を、緩衝液A{100mMリン酸緩衝液(pH7.0)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、10mMドデシルマルトシド、5mMオレイン酸}に再懸濁して、超音波破碎(130W、10分)を行った。その後、抗FLAG抗体カラムで精製を行い、多糖合成酵素(C)であるヒアルロン酸合成酵素(C-1)の水溶液を得た。

【0100】

<製造例2>

ソラマメ由来の配列番号2のスクロースシンターゼにFLAGタグを融合したアミノ酸配列をコードする遺伝子をpET22bに組み込んだプラスミドを大腸菌BL21(DE3)に形質転換した後、培養し、発現誘導した後、遠心分離機(6000×g、15分間)を用いて大腸菌を回収した。緩衝液B{100mMリン酸緩衝液(pH7.0)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム}に再懸濁して、超音波破碎(130W、10分)を行った。その後、抗FLAG抗体カラムで精製を行い、リボヌクレオシド2リン酸変換酵素(G)であるスクロースシンターゼの水溶液を得た。

【0101】

<ヒアルロン酸合成酵素(C-1)水溶液の比活性測定>

水溶液S{1mMウリジン2リン酸-グルクロン酸(¹⁴Cでラベルした放射性同位体を含むウリジン2リン酸-グルクロン酸、放射能300mCi/mmol)、1mMウリジン2リン酸-N-アセチルグルコサミン、50mMリン酸緩衝液(pH7.0)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、10mMドデシルマルトシド、5mMオレイン酸}1mLに、1Mスクロースを10μL、製造例2で得たスクロースシンターゼ水溶液を10μL及び製造例1で得たヒアルロン酸合成酵素(C-1)水溶液を10μL加えて、反応溶液(X-1)とし、30℃で1時間反応を行った。ろ紙を用いたペーパークロマトグラフィー法で未反応の基質とヒアルロン酸を分離した後、原点部を切り出し、液体シンチレーションカクテルに浸漬させた後、液体シンチレーションカウンターを用いて放射性同位体を測定し、¹⁴Cでラベルしたグルクロン酸の取り込み量からヒアルロン酸の合成量を算出した。その結果、ヒアルロン酸の合成量は100μgであった。したがって、製造例1で得られたヒアルロン酸合成酵素(C-1)の水溶液の比活性は0.4ユニット/mLであった。

10

20

30

40

50

【 0 1 0 2 】

<スクロースシンターゼ水溶液の比活性測定>

水溶液 R { 1 0 0 m M の塩化ナトリウム、 1 0 m M の塩化マグネシウム、 1 m M のウリジン 2 リン酸を含む 5 0 m M のリン酸緩衝液 (p H 7 . 0) } 1 m L に、 1 M のスクロース水溶液を 1 0 μ L 及びスクロースシンターゼ水溶液を 1 0 μ L 加えて反応溶液 (1) としたものを 3 つ作成し、それぞれ 3 0 分で 5 分、 1 0 分、 1 5 分反応を行った。反応生成物 (ウリジン 2 リン酸 - グルコース) の量は、 T L C (S i d m a 社、 P E I - C e l l u r o s e プレート) で展開して (展開溶媒 : 1 M の L i C l 、 1 M のギ酸を含む水溶液) 、 U V ライト (2 6 0 n m) で検出して求めた。反応生成量と反応時間との関係から、スクロースシンターゼ水溶液の比活性を計算したところ、 0 . 3 ユニット / m L であった。

10

【 0 1 0 3 】

<ヒアルロン酸合成酵素 (C - 1) の阻害剤濃度 I C ₅₀ の測定>

1 . 5 m L 容量のチューブ中で 9 4 0 μ L の水溶液 1 [5 m M の塩化マグネシウムと 0 . 0 5 m M のウリジン 2 リン酸ナトリウムを含む 5 0 m M のリン酸緩衝液 (p H 7 . 5 、 2 5)] に、製造例 1 で得たヒアルロン酸合成酵素 (C - 1) 水溶液を 1 0 μ L 溶解し、恒温水槽を用いてチューブを 4 0 分で 2 0 分静置した。ここに、 4 0 分に温調した基質溶液 1 [ウリジン 2 リン酸 - グルクロン酸ナトリウム塩及びウリジン 2 リン酸 - N - アセチルグルコサミンを緩衝液 B { 5 0 m M のリン酸緩衝液 (p H 7 . 5 、 2 5) } に溶解してそれぞれ 2 0 m M の濃度にしたもの] を 5 0 μ L 添加し、酵素反応溶液 (I - 1) とした。 (I - 1) を作成直後及び 5 分おきに 1 0 0 μ L ずつ取り出し、取り出した溶液は、 1 0 0 分で 2 分間加熱して酵素反応を停止した。酵素反応を停止した溶液について、遠心分離器 (4 、 1 2 , 0 0 0 × g 、 1 0 分) を用いて遠心し、不純物を沈殿させた。上清 8 0 μ L を下記条件で H P L C により分析し、ヒアルロン酸のピーク面積を記録した。

20

< H P L C の測定条件 >

装置 : A C Q U I T Y U P L C システム

カラム : S h o d e x O H p a k S B - 8 0 6 M H Q

移動相 : 0 . 1 M N a C O ₃

流速 : 1 . 0 m l / m i n

検出器 : A C Q U I T Y U P L C R I D 検出器

30

温度 : 4 0

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

ヒアルロン酸ナトリウム (フナコシ社製、 「ヒアロース」、分子質量 : 1 7 5 k D a) を緩衝液 B に溶解し、それぞれ 0 . 0 0 1 μ g / m L 、 0 . 0 1 μ g / m L 、 0 . 1 μ g / m L 及び 5 μ g / m L の濃度にしたものを作成し、ヒアルロン酸標準溶液 (1) ~ (4) とした。 (1) ~ (4) を、 H P L C により分析し、ヒアルロン酸のピーク面積をそれぞれ記録した。横軸 (x 軸) にそれぞれのヒアルロン酸濃度 (μ g) 、縦軸 (y 軸) にそれぞれのピーク面積 P をプロットし、直線の傾き 「 k 」 を算出した。

40

(I - 1) ~ (I - 6) を作成直後のウリジン 3 リン酸のピーク面積を P₀、 「 m 」 分後のピーク面積を P_n とし、それぞれピーク面積の変化 P (P = P_n - P₀) と上記直線の傾きを用いて下記数式 (1) からそれぞれの酵素反応初速度 v (μ g / s) を算出した。

$$v = P / (k \times m \times 6 0) \quad (1)$$

酵素反応溶液 (I - 2) を用いて測定した酵素反応初速度 v を 1 0 0 % とし、酵素反応溶液 (I - 1) 及び (I - 3) ~ (I - 6) を用いて測定した酵素反応初速度の相対値 (

50

%)を算出した。算出した相対値を用いて、横軸(x軸)にそれぞれのウリジン2リン酸濃度[S]、縦軸(y軸)に酵素反応溶液(I-1)~(I-6)での酵素反応初速度vの相対値をプロットした。プロットの近似曲線と直線 $y = 50$ (%)との交点でのウリジン2リン酸の濃度が阻害濃度 IC_{50} であり、阻害濃度 IC_{50} は0.8mMであった。

【0104】

<実施例1>

水溶液X{0.001%のアセチル化ヒアルロン酸(資生堂;重量平均分子量約10万、酢酸による置換率0.15、化学修飾された多糖(A-1))、1mMウリジン2リン酸-グルクロン酸、1mMウリジン2リン酸-N-アセチルグルコサミン、50mMリン酸緩衝液(pH7.0)、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム} 1mLに、製造例1で得たヒアルロン酸合成酵素(C-1)の水溶液を10 μ L加えて、反応溶液(L-1)とし、30 $^{\circ}$ Cで1時間反応を行った。限外ろ過膜{Millipore社製、アミコンウルトラ-15(分画分子量10万)}を用いて未反応の基質と変性多糖である変性ヒアルロン酸とを精製した。変性ヒアルロン酸を100mg得た。

10

(A-1)及び得られた変性ヒアルロン酸について、液体クロマトグラフィーで分析した結果、分子量50万以上のピークは、(A-1)が<1%、得られた変性ヒアルロン酸が80%であった。

また、得られた変性ヒアルロン酸について、液体クロマトグラフィーを用いて分子量50万以上のものを分取し、液体クロマトグラフィー分取後の変性ヒアルロン酸(V-1)を得た。(V-1)をNMRを用いて解析した結果、置換率は0.025であり、(A-1)の置換率0.15よりも低かった。

20

その後、液体クロマトグラフィーで分取後の変性ヒアルロン酸(V-1)をヒアルロニダーゼ(-N-アセチルグルコサミナーゼ(生化学工業製)と-グルクロニダーゼ(シグマ社製)の混合物)を用いて分解し、さらに液体クロマトグラフィーで分子量1000~10万のフラクションを分取し、NMRで解析した結果、分解後の変性ヒアルロン酸の置換率は0.155であった。

したがって、液体クロマトグラフィー分取後の変性ヒアルロン酸(V-1)は、(A-1)に化学修飾されていないヒアルロン酸セグメント(グルクロン酸及びN-アセチルグルコサミン)が結合した、一部分が化学修飾された変性多糖である変性ヒアルロン酸を含んでいることがわかった。

30

【0105】

<実施例2>

実施例1において、水溶液X中のアセチル化ヒアルロン酸を、置換率が「約0.15」のものに代えて「約1」のアセチル化ヒアルロン酸(A-2)(資生堂;重量平均分子量約10万)を使用する以外は同様にして実施した。変性ヒアルロン酸を3mg得た。

(A-2)及び得られた変性ヒアルロン酸について、液体クロマトグラフィーで解析を行った結果、分子量50万以上のピークは(A-2)<1%、得られた変性ヒアルロン酸が10%であった。

得られた変性ヒアルロン酸について、液体クロマトグラフィーを用いて分子量50万以上のものを分取し、液体クロマトグラフィー分取後の変性ヒアルロン酸(V-2)を得た。(V-2)をNMRを用いて解析した結果、置換率は0.5であり、(A-2)の置換率1よりも低かった。

40

その後、液体クロマトグラフィー分取後の変性ヒアルロン酸(V-2)をヒアルロニダーゼ(-N-アセチルグルコサミナーゼ(生化学工業製)と-グルクロニダーゼ(シグマ社製)の混合物)を用いて分解した後、液体クロマトグラフィーで分子量1000~10万のフラクションを分取し、NMRで解析した結果、分解後の変性ヒアルロン酸の置換率は0.9であった。

したがって、液体クロマトグラフィー分取後の変性ヒアルロン酸(V-2)は、(A-2)に化学修飾されていないヒアルロン酸セグメント(グルクロン酸及びN-アセチルグルコサミン)が結合した、一部分が化学修飾された変性ヒアルロン酸を含んでいることが

50

わかった。

【 0 1 0 6 】

< 実施例 3 >

実施例 1 において、水溶液 X 中に 9 0 m M のウリジン 2 リン酸を含む以外は同様にして実施した。変性ヒアルロン酸を 1 5 m g 得た。

得られた変性ヒアルロン酸について、液体クロマトグラフィーで解析を行った結果、分子量 5 0 万以上のピークは 5 % であった。

得られた変性ヒアルロン酸について、液体クロマトグラフィーを用いて分子量 5 0 万以上のものを分取し、液体クロマトグラフィー分取後の変性ヒアルロン酸 (V - 3) を得た。(V - 3) を N M R を用いて解析した結果、置換率は 0 . 0 7 であり、(A - 1) の置換率 0 . 1 5 よりも低かった。

その後、液体クロマトグラフィー分取後の変性ヒアルロン酸 (V - 3) をヒアルロニダーゼ (- N - アセチルグルコサミナーゼ (生化学工業製) と - グルクロニダーゼ (シグマ社製) の混合物) を用いて分解した後、液体クロマトグラフィーで分子量 1 0 0 0 ~ 1 0 万のフラクションを分取し、N M R で解析した結果、分解後の変性ヒアルロン酸の置換率は 0 . 1 4 であった。

したがって、液体クロマトグラフィー分取後の変性ヒアルロン酸 (V - 3) は、(A - 1) に化学修飾されていないヒアルロン酸セグメント (グルクロン酸及び N - アセチルグルコサミン) が結合した、一部分が化学修飾された変性ヒアルロン酸を含んでいることがわかった。

【 0 1 0 7 】

< 実施例 4 >

実施例 1 において、水溶液 X 中のアセチル化ヒアルロン酸を、置換率が「約 0 . 1 5 」のものに代えて「約 0 . 8 」のアセチル化ヒアルロン酸 (A - 3) (資生堂 ; 重量平均分子量約 1 0 万) を使用する以外は同様にして実施した。変性ヒアルロン酸を 5 0 m g 得た。

(A - 3) 及び得られた変性ヒアルロン酸について、液体クロマトグラフィーで解析を行った結果、分子量 5 0 万以上のピークは (A - 3) < 1 % 、得られた変性ヒアルロン酸が 3 0 % であった。

得られた変性ヒアルロン酸について、液体クロマトグラフィーを用いて分子量 5 0 万以上のものを分取し、液体クロマトグラフィー分取後の変性ヒアルロン酸 (V - 4) を得た。(V - 4) を N M R を用いて解析した結果、置換率は 0 . 0 5 であり、置換率が原料として用いたアセチル化ヒアルロン酸の置換率である 0 . 8 よりも低かった。

その後、液体クロマトグラフィー分取後の変性ヒアルロン酸 (V - 4) をヒアルロニダーゼ (- N - アセチルグルコサミナーゼ (生化学工業製) と - グルクロニダーゼ (シグマ社製) の混合物) を用いて分解した後、液体クロマトグラフィーで分子量 1 0 0 0 ~ 1 0 万のフラクションを分取し、N M R で解析した結果、分解後の変性ヒアルロン酸の置換率は 0 . 7 5 であった。

したがって、液体クロマトグラフィー分取後の変性ヒアルロン酸 (V - 4) は、(A - 3) に化学修飾されていないヒアルロン酸セグメント (グルクロン酸及び N - アセチルグルコサミン) が結合した、一部分が化学修飾された変性ヒアルロン酸を含んでいることがわかった。

【 0 1 0 8 】

< 実施例 5 >

実施例 1 において、水溶液 X 中にさらに「スクロース (和光純薬社製) を溶液中の濃度が 1 0 0 m M となるように加え、製造例 2 で得たスクロースシンターゼの水溶液を 1 μ L 加える」以外は同様にして実施した。変性ヒアルロン酸を 2 0 0 m g 得た。

得られた変性ヒアルロン酸について、液体クロマトグラフィーで分析した結果、分子量 5 0 万以上のピークは、8 0 % であった。

また、得られた変性ヒアルロン酸について、液体クロマトグラフィーを用いて分子量 5

10

20

30

40

50

0 万以上のものを分取し、液体クロマトグラフィー分取後の変性ヒアルロン酸 (V - 5) を得た。(V - 5) を N M R を用いて解析した結果、置換率は 0 . 0 2 5 であり、(A - 1) の置換率 0 . 1 5 よりも低かった。

その後、液体クロマトグラフィーで分取後の変性ヒアルロン酸 (V - 5) をヒアルロニダーゼ (- N - アセチルグルコサミナーゼ (生化学工業製) と - グルクロニダーゼ (シグマ社製) の混合物) を用いて分解し、さらに液体クロマトグラフィーで分子量 1 0 0 0 ~ 1 0 万のフラクションを分取し、N M R で解析した結果、分解後の変性ヒアルロン酸の置換率は 0 . 1 5 であった。

したがって、液体クロマトグラフィー分取後のヒアルロン酸誘導体 (V - 5) は、(A - 1) に化学修飾されていないヒアルロン酸セグメント (グルクロン酸及び N - アセチルグルコサミン) が結合した、一部分が化学修飾された変性多糖である変性ヒアルロン酸を含んでいることがわかった。

【 0 1 0 9 】

実施例 1 ~ 5 の結果から、得られた変性ヒアルロン酸は原料のアセチルヒアルロン酸よりも分子量が大きく、原料と比較して置換率が低かった。また、実施例 1 ~ 5 で得られた変性ヒアルロン酸はヒアルロニダーゼにより分解され、原料の置換率と同程度になった。したがって、実施例 1 ~ 5 で得た変性ヒアルロン酸は、アセチルヒアルロン酸セグメントにヒアルロン酸セグメントが結合した一部分がアセチル化された変性ヒアルロン酸であることが分かる。

したがって、本発明の変性多糖の製造方法によれば、一部を化学修飾した変性多糖を製造することができることがわかる。

また、置換率 1 とほぼ全てのヒドロキシル基がアセチル化されている実施例 2 と置換率が 0 . 1 5 の実施例 1 及び置換率が 0 . 8 の実施例 4 とを比較した場合、置換率が 0 . 1 5 又は 0 . 8 である実施例 1 及び 4 の方が、変性多糖をより大量に得ることができた。

また、リボヌクレオシド 2 リン酸であるウリジン 2 リン酸を阻害濃度 $I C_{50}$ の 1 1 3 倍含む溶液を用いた実施例 3 とウリジン 2 リン酸を加えていない実施例 1 とを比較した場合、ウリジン 2 リン酸を加えていない実施例 1 の方が、変性多糖をより大量に得ることができた。また、リボヌクレオシド 2 リン酸変換酵素 (G) を用いた実施例 5 は、用いていない実施例 1 と比較して、さらに変性多糖を大量に得ることができた。

【 0 1 1 0 】

< ヒアルロン酸誘導体の汗による流れやすさ試験 >

実施例 1 ~ 5 で液体クロマトグラフィー分取により得られた変性ヒアルロン酸 (V - 1) ~ (V - 5) を、限外ろ過膜 (M i l l i p o r e 社製アミコンウルトラ - 1 5 (分画分子量 1 0 万)) で濃縮して 0 . 1 % の変性ヒアルロン酸水溶液 (Y - 1) ~ (Y - 5) にした。5 0 0 μ L の (Y - 1) ~ (Y - 5) をそれぞれ被験者の右手に塗布して 3 0 分放置した後、サウナで 1 0 分過ごした。水で簡単に汗を流した後、布で変性ヒアルロン酸塗布部位を拭き取った。その後、布から変性ヒアルロン酸を抽出し、液体クロマトグラフィーにより変性ヒアルロン酸量を定量した。同様の試験を変性ヒアルロン酸水溶液 (Y - 1) ~ (Y - 5) についてそれぞれ 1 0 人に行ったところ、布に付着していた (汗で流れずに残った) 変性ヒアルロン酸の量は (V - 1) ~ (V - 5) 全て 0 . 3 \pm 0 . 1 m g であった。

【 0 1 1 1 】

< ヒアルロン酸の汗による流れやすさ試験 >

アセチル化ヒアルロン酸に代えて、ヒアルロン酸 (重量平均分子量 1 0 万) を用いる以外は実施例 1 と同様にして、ヒアルロン酸を作成した。

作成したヒアルロン酸について、液体クロマトグラフィーで分子量 1 0 0 万付近を分取し、液体クロマトグラフィー分取後のヒアルロン酸 (V ' - 1) を得た。さらに限外ろ過膜 (M i l l i p o r e 社製アミコンウルトラ - 1 5 (分画分子量 1 0 0 , 0 0 0)) で濃縮して、0 . 1 % のヒアルロン酸溶液 (Y ' - 1) にした。5 0 0 μ L の (Y ' - 1) を被験者の左手に塗布して 3 0 分放置した後、サウナで 1 0 分過ごした。水で簡単に汗を

10

20

30

40

50

流した後、布でヒアルロン酸塗布部位を拭き取った。その後、布からヒアルロン酸を抽出して液体クロマトグラフィーによりヒアルロン酸量を定量した。同様の試験を10人に行ったところ、布に付着していた（汗で流れずに残った）ヒアルロン酸の量は $< 0.1 \text{ mg}$ であった。

【0112】

変性ヒアルロン酸及びヒアルロン酸の汗による流れやすさ試験の結果から、化学修飾セグメントを有さないヒアルロン酸と比較して、本発明の製造方法により得られた変性ヒアルロン酸は、汗で流されにくいことがわかる。

したがって、本発明の製造方法によれば、機能性の高い変性多糖を得ることができることがわかる。

【産業上の利用可能性】

【0113】

本発明の変性多糖の製造方法によれば、一部を化学修飾した変性多糖を製造できる。また、本発明の製造方法により得られた変性多糖は、化粧品のみならず医薬部外品、医薬品及び医療機器にも用いることができる。

【配列表】

0005946703000001.app

フロントページの続き

(56)参考文献 特表2004-512013(JP,A)
特開2004-000026(JP,A)
国際公開第2007/145197(WO,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12P

B01F 17/

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)