



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 359 645**

51 Int. Cl.:

C07K 14/435 (2006.01) **A23L 1/305** (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01) **A61P 3/00** (2006.01)
A61P 17/16 (2006.01) **A61P 31/04** (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01) **C07K 1/113** (2006.01)
C07K 1/14 (2006.01) **C12P 21/02** (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06796377 .7**

96 Fecha de presentación : **11.08.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1947111**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.07.2008**

54 Título: **Glucoproteína de tipo mucina y su uso.**

30 Prioridad: **12.08.2005 JP 2005-234108**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.05.2011

73 Titular/es: **RIKEN**
2-1 Hirosawa
Wakou-shi, Saitama 351-0198, JP

72 Inventor/es: **Ushida, Kiminori;**
Masuda, Akiko;
Dohmae, Naoshi;
Furukawa, Hidemitsu y
Miyawaki, Atsushi

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 359 645 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Glucoproteína de tipo mucina y su uso.

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a una nueva glucoproteína de tipo mucina, y a un método para producir la misma. La presente invención también se refiere a una composición que comprende la nueva glucoproteína de tipo mucina. Además, la presente invención se refiere a un marcador de peso molecular que comprende la nueva glucoproteína de tipo mucina.

Antecedentes de la invención

10 Entre las glucoproteínas, los compuestos de glucoproteínas de pesos moleculares elevados, en los que una cadena de azúcar que comprende aproximadamente uno a diez monosacáridos está unida, vía un enlace O-glucosídico, a intervalos regulares, a una cadena peptídica que tiene una estructura repetida simple, se denominan colectivamente mucinas. Diversas mucinas están presentes en las células o como componentes en el moco de plantas y animales en el mundo natural, y se sabe que desempeñan diversos papeles importantes en los sistemas vivos. Además, se sabe que las mucinas procedentes de plantas y animales, y contenidas en componentes del moco en alimentos, dan efectos biológicos importantes en la actividad de la vida o en procesos de digestión y absorción, incluso cuando se ingieren como alimentos.

15 Hasta la fecha, se han identificado en seres humanos aproximadamente diez tipos de mucinas. Estas mucinas están distribuidas y presentes principalmente en porciones mucosales tales como la saliva y la mucosa gástrica. Los tejidos mucosales formados por estas mucinas presentan papeles biológicos tales como efectos antibacterianos como una matriz extracelular, mediante los cuales se bloquean las infecciones víricas o similares, además de efectos físicos tales como la retención de humedad, protección, y lubricación de células y tejidos (H. Nakata, Diversity of Mucin and Mucin-type Sugar Chain and Its Meaning: Understandable Glycobiology in Post-Genomic Era, Wakaru Jikken-Igaku Series (Understandable Experimental Medicine) (en Japonés), N. Taniguchi ed., Capítulo 3, Yodosha Co., Ltd., 2002; K. Hotta, K. Ishihara, Search for Attractiveness of Gastric Mucus: Elucidation of Mucin using Newest Approach (en Japonés), Medical View Co., Ltd., 1999).

20 Los efectos fisiológicos de estas mucinas no siempre resultan de reacciones químicas específicas. También se considera que sus efectos biológicos derivan de sus propiedades físicas como sustancia, es decir, morfología, incluyendo plasticidad, viscosidad, propiedades humectantes, etc., y de su capacidad para reconocer una amplia variedad de moléculas (por ejemplo, lecitina) debido a la porción de cadena de azúcar amorfa unida a la cadena peptídica que tiene una estructura tridimensional. De este modo, las propiedades físicas y la estructura tridimensional de la porción polimérica comprendida por la cadena peptídica de mucinas, así como la capacidad de reconocimiento molecular por la porción de cadena de azúcar amorfa, son necesarias para ejercer sus funciones.

25 Por otro lado, tales compuestos que constituyen componentes parciales o principales de la mucosa o una matriz extracelular ejercen sus efectos incluso cuando se ingieren desde el exterior. Por lo tanto, actualmente se ha considerado que estos compuestos tienen una gran ventaja por cuanto se pueden producir artificialmente y suministrar al mercado como fármacos, cosméticos, alimentos, etc. (documento JP 8-269091A (1996)). Entre los compuestos de la cadena de azúcar, por encima de todos los demás, se han extraído y purificado de diversas materias primas la condroitina, el sulfato de condroitina, y el ácido hialurónico, etc., componentes principales de una matriz extracelular, y se han proporcionado al mercado como alimentos, fármacos, cosméticos, etc. Sin embargo, las mucinas se toman meramente de la dieta procedente, por ejemplo, de algunos alimentos (aróide, ocrea, oreja de Judas) o animales (ganado vacuno y cerdos) (véanse los documentos JP 7-33623A (1995); JP 8-256788A (1996); JP 6-199900A (1994); JP 5-310799A (1993); y JP 7-126292A (1995)), y todavía no se han suministrado como compuestos a gran escala y en grandes cantidades.

35 Las glucoproteínas que incluyen mucinas tienen la capacidad de reconocimiento molecular, y se espera que sean útiles en diversos usos, tales como en fármacos. No obstante, no se ha encontrado un método apropiado para sintetizarlas. En algunos casos, se han identificado los genes que codifican las secuencias peptídicas. Sin embargo, los enfoques tales como la transferencia o clonación génica han logrado poco éxito debido a la dificultad para introducir cadenas de azúcar tras la síntesis de la cadena peptídica (Polysaccharide Separation/Purification Method, Biological and Chemical Experimental Methods 20 (en Japonés), editado por K. Matsuda, Japanese Scientific Societies Press, 1987). Para la mayoría de las glucoproteínas, sus métodos sintéticos tienen sin excepción un enfoque que implica sintetizar sólo la cadena peptídica mediante uso de *E. coli* o similar e introducir secuencialmente en ella cadenas de azúcar (véase el documento WO 96/13516). Tal enfoque tiene la desventaja de que es inadecuado para la producción a gran escala.

40 Las glucoproteínas incluyen aquellas con cadenas de azúcar de tipo mucina, o aquellas con cadenas de azúcar de tipo asparagina. Se identifican moléculas de chaperona que median la unión de la cadena de azúcar para algunas cadenas de azúcar de tipo asparagina, y en algunos casos se han identificado los sitios de unión de tales cadenas

de azúcar. No obstante, es difícil especificar los sitios de la introducción de las cadenas de azúcar en la síntesis. Incluso si las cadenas de azúcar se pueden introducir secuencialmente en una cadena peptídica ya sintetizada, se espera que la estructura de orden superior de la cadena peptídica se vea tremendamente alterada debido a la unión del azúcar. De este modo, no hay ninguna garantía de que la cadena peptídica forme la estructura de orden superior nativa mediante repliegamiento.

Mientras tanto, restringido a glucoproteínas de tipo mucina, la cadena peptídica forma una estructura de orden superior mediante plegamiento, y después sufre una modificación con la cadena de azúcar. Por lo tanto, la cadena de azúcar se puede unir a la cadena peptídica, con la estructura tridimensional y funciones mantenidas de la proteína. De este modo, la cadena de azúcar se puede introducir con poca pérdida de la estructura de orden superior general de la cadena peptídica (M. Fukuda, Mucin-type Sugar Chain, p. 35-56, Y. Kohata, S. Hakomori, y K. Nagai ed., "Diverse World of Sugar Chain" (en Japonés), Kodansha Scientific, Ltd., 1993). De este modo, parece que las glucoproteínas de tipo mucina tienen ventajas en el uso para el desarrollo de fármacos. Sin embargo, se encuentra que las secuencias de aminoácidos de los sitios de unión en glucoproteínas de tipo mucina actualmente conocidas no tienen ninguna regla, y esto hace difícil introducir una cadena de azúcar en una posición pretendida. Además, aunque las glucoproteínas de tipo mucina tienen una estructura primaria relativamente simple, también es difícil sintetizar las glucoproteínas de tipo mucina completas mediante un enfoque de química orgánica sintética. Por estas razones, parece que todavía no se ha desarrollado un enfoque industrial para suministrar glucoproteínas de tipo mucina en grandes cantidades, aunque las glucoproteínas de tipo mucina tienen muchas características superiores.

Un método de filtración en gel, también denominado cromatografía de exclusión de tamaños (SEC), se ha usado ampliamente durante un largo tiempo como un enfoque conveniente y exacto para medir los pesos moleculares de compuestos poliméricos. Este método se ha usado no sólo como análisis usando columnas abiertas, sino también como cromatografía de líquidos de altas prestaciones, y también permite el fraccionamiento basándose en los pesos moleculares, particularmente el fraccionamiento automático (A. Fallon, R. F. G. Booth, L. D. Bell, traducido por T. Osawa, High-Performance Liquid Chromatography, Biochemical Experimental Method 9 (en Japonés), Capítulo 5, Tokyo Kagaku Dojin Co., Ltd. 1989). Sin embargo, es técnicamente difícil determinar el valor absoluto del peso molecular de una sustancia desconocida sólo llevando a cabo estas medidas. Específicamente, hay dos requisitos: que se use un soporte de columna, con lo cual se asegura que la filtración en gel se puede realizar con una buena reproducibilidad según una curva de calibración teórica, y que se use un marcador de peso molecular estándar exacto. De este modo, la combinación de una sustancia de ensayo y un soporte de columna, y la combinación de una sustancia de ensayo y un marcador de peso molecular, se deben elegir suficientemente con mucho cuidado.

En años recientes, se ha extendido un método de medida que usa un espectrómetro de masas con analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS) como tal enfoque para la medición absoluta de los pesos moleculares. Este enfoque puede lograr una medición absoluta, mediante la cual se pueden determinar de forma exacta los pesos moleculares de compuestos poliméricos. Sin embargo, el aparato para este método es mucho más caro que los cromatógrafos de líquidos. Actualmente es imposible generalizar el aparato en todos los laboratorios de síntesis química, factorías, instalaciones médicas, etc. El análisis se puede realizar centralmente en una localización en la que se encuentra el equipo caro, o se puede subcontratar. Sin embargo, los laboratorios, que requieren una realimentación rápida y desean una medida rápida, todavía utilizan el análisis, usando con frecuencia la SEC. En tal caso, se prefiere usar una sustancia normal, que se puede medir tanto mediante MALDI-TOF MS como SEC, como un patrón para la medida absoluta de los pesos moleculares.

En tanto en cuanto se use el enfoque de SEC, una sustancia estándar usada en la combinación de una sustancia de ensayo de un marcador de peso molecular debe ser tan similar en propiedad física a una sustancia de ensayo como sea posible. El principio de SEC es que la separación se logra basándose en un tamaño del soluto (peso molecular) mediante el uso de efectos de los tamices moleculares provocados por una red de carga polimérica. Por lo tanto, la separación depende de las propiedades físicas tales como el tamaño o la forma, pero no de las propiedades químicas, que dan la interacción entre el soluto y una fase estacionaria. Específicamente, para uso como el estándar, se deben seleccionar sustancias similares en radio hidrodinámico y forma de un polímero en un disolvente (fase móvil). Los usuarios de SEC habitualmente seleccionan y utilizan, a partir de catálogos, marcadores de peso molecular poliméricos que toman una conformación tan similar entre ellos como sea posible. Sin embargo, para formar previamente un marcador que tiene una distribución estrecha de pesos moleculares y tiene un peso molecular controlado en cierto grado, es más conveniente usar un polímero sintético para el cual se conozca un método para controlar el proceso de polimerización. De este modo, hay comercialmente disponible un número muy limitado de sustancias como marcadores de peso molecular. Específicamente, actualmente están en el mercado sólo aquellos polímeros que tienen una estructura lineal, tales como poliestireno, polimetacrilato de metilo (PMMA), polietileno, polietilenglicol, polióxido de etileno, poliácido acrílico, y pululano (por ejemplo, patente JP nº 3012917 (JP 10-60005A (1998))). En tales circunstancias, es imposible cubrir todos los numerosos compuestos poliméricos.

Entre otros, las glucoproteínas (por ejemplo, enzimas, mucinas, y hormonas), cuyas acciones fisiológicas han recibido atención en años recientes, no tienen marcadores de peso molecular estándar apropiados. Las glucoproteínas están distribuidas universalmente en el mundo natural, y están presentes en números mucho

mayores que las proteínas libres de azúcares. Algunas de ellas tienen una pluralidad de cadenas de azúcar unidas a la cadena peptídica y muestran una forma similar a un cepillo, mientras que existen glucoproteínas con una sola cadena de azúcar unida por molécula, e incluso estas tienen una porción de cadena de azúcar muy voluminosa que cubre la superficie de la molécula. Cuando tal glucoproteína se analiza usando SEC para la separación basándose en un "tamaño y forma molecular", es obvio que es inapropiado el uso de marcadores convencionales de pesos moleculares que tienen una estructura lineal. Por ejemplo, el pululano, un polisacárido, se ha usado como un marcador de peso molecular debido a que contiene azúcares. Sin embargo, no ha habido garantía hasta ahora de que tal marcador de peso molecular proporcione un peso molecular exacto. En las circunstancias presentes, el peso molecular evaluado, que sin embargo puede ser erróneo, sólo indica la relación relativa con otros marcadores usados. Específicamente, la estimación de pesos moleculares sólo mediante SEC fue básicamente inexacta y necesitó una confirmación usando otro método.

Los métodos electroforéticos tales como SDS-PAGE son también enfoques para el análisis de la separación de proteínas, que se pueden usar convenientemente en laboratorios. También pueden ser necesarios marcadores apropiados de pesos moleculares, y generalmente se usan para tal enfoque analítico, como en SEC. Tales marcadores de peso molecular también se usan en los campos de diversos análisis bioquímicos habituales distintos de SEC y de los métodos electroforéticos.

Las medusas, que se ven predominantemente en el período estival, algunas veces se ven en gran número y pueden por lo tanto reducir significativamente la eficacia o efectos económicos del sistema de captación/drenaje en plantas de energía nuclear o de energía térmica, del sistema de captación/drenaje para agua industrial en una variedad de factorías frente al océano, de los puertos, de la pesquería con redes de pesca tales como redes fijas de la costa, etc. Particularmente, la medusa común (*Aurelia aurita*) o similar, que tiene una mala capacidad para nadar, se debe erradicar activamente, de forma particular cuando se ve en gran número. Las grandes medusas, tales como la medusa Echizen-kurage (*Nemopilema nomurai*), cuando se ve en gran número, requieren, debido a sus pesos, una enorme operación para sacarlas para evacuarlas del océano usando maquinarias pesadas o similares. Como resultado de tales operaciones, las medusas se sacan del océano en grandes cantidades de una sola vez. Sin embargo, las medusas, una vez sacadas, se consideran desechos bajo la actual ley japonesa, y está prohibido que se devuelvan al océano. Por lo tanto, se deben llevar a tierra y acumular. Se han propuesto métodos para utilizar tales medusas acumuladas como alimentos o como fertilizantes (por ejemplo, documentos JP 2004-99513A; JP 2003-321497A; JP 2001-178492A; JP 2002-370991A; WO 95/17428; JP 2002-143824A; JP 6-217737A (1994); y V. Schmidt, A. Bally, K. Beck, M. Haller, W. K. Schlage, C. Weber "The extracellular matrix (mesoglea) of hydrozoan jellyfish and its ability to support cell adhesion and spreading. Hydrobiologia 216-217, p. 3-10 (1997)). Sin embargo, debido a la ausencia de otros medios eficaces para usarlas, su eliminación por razones de protección medioambiental provoca una enorme carga económica en las corporaciones o municipios a cargo de la eliminación. Para obtener costes para la eliminación, se desea que los costes para promover la eliminación del residuo se recuperen aislando productos valiosos caros de ellos, incluso en pequeñas cantidades. Sin embargo, todavía no se han obtenido soluciones eficaces para ello.

La cantidad de medusa común (*Aurelia aurita*) vista en gran número se estima mediante observación aérea o similar, y en algunos casos supuestamente alcanza varios cientos de miles de toneladas por golfo (T. Yasuda ed., "Marine UFO Jellyfish" (en Japonés), p. 41-77 VII Emergence and Distribution, Kouseisha Kouseikaku Co., Ltd., 2003). Puesto que las medusas están presentes como fuentes marinas con rica abundancia en la Tierra, no sólo se usan los desechos acumulados, sino que se puede tener en cuenta su utilización mediante cosecha activa.

Ducklow et al., Limnology and Oceanography 24(4), 1979, 706-714, describen la composición de moco liberado por celenterados de arrecifes de coral. El documento WO 99/63964 describe un método para preparar fibrilina a partir de Cnidaria, en particular medusa congelada y triturada.

Descripción de la invención

Problemas a resolver por la invención

Un objetivo de la presente invención consiste en proporcionar una glucoproteína de tipo mucina que se puede usar en cuidados médicos, alimentos, etc., mediante producción a gran escala, y sea útil como una sustancia sustituta para mucina humana, un método para producirla, y su uso. Además, otro objetivo de la presente invención consiste en proporcionar un marcador de peso molecular que se puede usar en la medida de pesos moleculares de glucoproteínas.

Medios para resolver los problemas

Como resultado de estudios minuciosos para lograr los objetivos, ahora se ha aislado y purificado con éxito una nueva glucoproteína de tipo mucina a partir de medusas, y también se ha encontrado que la glucoproteína de tipo mucina puede servir como una sustancia sustituta para mucina humana, como resultado de analizar la estructura y propiedades de la glucoproteína de tipo mucina. Además, ahora se ha encontrado que las glucoproteínas de tipo mucina procedentes de medusas se pueden usar como marcadores de peso molecular para la medida de pesos

moleculares de glucoproteínas, debido a que estas glucoproteínas de tipo mucina tienen una amplia distribución de pesos moleculares. Basándose en estos hallazgos, se ha completado la presente invención.

Específicamente, la presente invención se refiere a los siguientes apartados (1) a (9):

- 5 (1) una glucoproteína de tipo mucina que tiene una estructura repetida que comprende tres a 2000 unidades que se repiten, teniendo cada una una secuencia de aminoácidos representada por la fórmula I:



[en la que Xaa representa Val o Ile],

en la que uno o más restos de aminoácidos en la estructura están unidos a una cadena de azúcar que consiste en uno o más monosacáridos.

- 10 Cuando la glucoproteína de tipo mucina está presente en el mundo natural, es de esperar que la glucoproteína tenga aproximadamente 3 a 2000 unidades que se repiten, preferentemente 3 a 700 unidades que se repiten. Además, aproximadamente 50% de los componentes principales tienen una estructura repetida que comprende 40 a 180 unidades que se repiten. En este contexto, las unidades que se repiten se pueden unir juntas directamente, o se pueden unir vía enlazadores.

- 15 Para la glucoproteína de tipo mucina, se prefiere que el resto de aminoácido unido a una cadena de azúcar sea treonina (Thr). Por ejemplo, el 98% o más de los restos de aminoácidos unidos a una cadena de azúcar pueden ser treonina (Thr).

- 20 En la glucoproteína de tipo mucina, la cadena de azúcar comprende, por ejemplo, pero no se limita a, un monosacárido seleccionado de entre el grupo constituido por N-acetilgalactosamina, galactosa, N-acetilglucosamina, ácido siálico, arabinosa, y fucosa. Preferentemente, la cadena de azúcar comprende N-acetilgalactosamina. Aún preferentemente, la cadena de azúcar comprende N-acetilgalactosamina y galactosa.

En la glucoproteína de tipo mucina, uno o varios aminoácidos, por ejemplo Val, se pueden eliminar en el término N de la estructura que se repite.

- 25 Se prefiere que la glucoproteína de tipo mucina se extraiga de medusas, por ejemplo medusa común (*Aurelia aurita*), medusa Echizen-kurage (*Nemopilema nomurai*) o medusa marrón (*Chrysaora melanaster*).

(3) Un método para producir una glucoproteína de tipo mucina como se define anteriormente, que comprende las siguientes etapas que consisten en:

cortar las porciones sólidas de una medusa;

extraer los cortes de la medusa con una disolución salina;

- 30 separar mediante centrifugación mucina bruta del extracto;

extraer con etanol la mucina bruta;

separar mediante centrifugación un precipitado obtenido de la extracción;

disolver en agua el precipitado;

separar un sobrenadante mediante centrifugación y diálisis; y

- 35 purificar una glucoproteína de tipo mucina como se define anteriormente,

en el que todas las etapas se llevan a cabo a 0 a 25°C.

Para el método de producción de una glucoproteína de tipo mucina, se prefiere que todas las etapas se realicen a baja temperatura, próxima a la temperatura del hielo (0 a 25°C, preferentemente 4°C) sin calentamiento.

(4) Una composición que comprende cualquiera de las glucoproteínas de tipo mucina anteriores.

- 40 La composición se usa, por ejemplo, en células y en la protección de tejidos, la retención o absorción de humedad de la superficie de la piel, promoción de la salud, administración de fármacos, tratamiento o prevención de enfermedades, o aplicaciones antibacterianas. Además, se prefiere que la composición esté en forma de una disolución acuosa, membrana, o resina.

(5) Un método para modificar una glucoproteína de tipo mucina, caracterizado por modificar la cadena de azúcar de

cualquiera de la glucoproteínas de tipo mucina anteriores mediante la acción de glucosiltransferasa.

(6) Una proteína que tiene una estructura repetida que comprende 1 a 2000 unidades que se repiten, teniendo cada una una secuencia de aminoácidos representada por la fórmula I:



5 [en la que Xaa representa Val o Ile].

(7) Un método para producir una glucoproteína, uniendo por lo menos un resto de aminoácidos en la proteína como se define anteriormente a una cadena de azúcar que comprende uno o más monosacáridos.

10 (8) Un marcador de peso molecular que comprende una glucoproteína de tipo mucina y que tiene medianas de distribución de peso molecular y una distribución molecular como se mide mediante un método de determinación absoluta de pesos moleculares, teniendo la glucoproteína de tipo mucina una estructura repetida que comprende 3 a 2000 unidades que se repiten, teniendo cada una, una secuencia de aminoácidos representada por la fórmula I:



[en la que Xaa representa Val o Ile],

15 en la que uno o más restos de aminoácidos en la estructura están unidos a una cadena de azúcar que consiste en uno o más monosacáridos.

Los marcadores de peso molecular pueden tener un peso molecular que oscila desde 10 hasta 1.400 kDa. Además, se prefiere que los marcadores de peso molecular estén liofilizados.

(9) Un método para producir un marcador de peso molecular, que comprende las siguientes etapas de:

20 someter a una glucoproteína de tipo mucina a una cromatografía de exclusión de tamaños para fraccionamiento, teniendo la glucoproteína de tipo mucina una estructura repetida que comprende 3 a 2000 unidades que se repiten, teniendo cada una, una secuencia de aminoácidos representada por la fórmula I:



[en la que Xaa representa Val o Ile],

25 en la que uno o más restos de aminoácidos en la estructura están unidos a una cadena de azúcar que consiste en uno o más monosacáridos;

recoger y purificar las fracciones; y

medir los pesos moleculares absolutos de las fracciones purificadas.

El método para producir un marcador de peso molecular puede comprender además la etapa de liofilizar las fracciones purificadas.

30 **Ventajas de la invención**

La presente invención proporciona una nueva glucoproteína de tipo mucina. La glucoproteína de tipo mucina se puede usar, por ejemplo, como sustancia sustituta para mucina humana, y es útil en campos tales como los campos farmacéutico, agrícola, y alimentario. Además, la glucoproteína de tipo mucina se produce fácilmente en grandes cantidades a partir de medusas, y por lo tanto es superior en cuanto a técnicas de conservación económica y medioambiental.

La presente invención proporciona asimismo marcadores de peso molecular que comprenden glucoproteínas de tipo mucina. Los marcadores de peso molecular tienen cadenas poliméricas ramificadas obtenidas de polímeros naturales. El uso de los presentes marcadores de peso molecular permite la determinación exacta de los pesos moleculares de polímeros ramificados, tales como glucoproteínas.

40 **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 muestra el sumario de procedimientos para tratar medusa para aislar una glucoproteína de tipo mucina;

la Figura 2 muestra los procedimientos específicos para aislar una glucoproteína de tipo mucina;

45 la Figura 3 muestra el resultado de someter a mucinas brutas procedentes de medusa común (*Aurelia aurita*; línea continua) y medusa marrón (*Chrysaora melanaster*; línea discontinua) a cromatografía de

líquidos de intercambio iónico. Los asteriscos representan picos de la glucoproteína de tipo mucina;

la Figura 4 muestra los resultados de analizar los aminoácidos constituyentes de glucoproteínas de tipo mucina purificadas procedentes de medusa común (*Aurelia aurita*) y medusa marrón (*Chrysaora melanaster*) con un analizador automático de aminoácidos;

5 la Figura 5-1 muestra el resultado de analizar la secuencia de aminoácidos de una glucoproteína de tipo mucina purificada procedente de medusa común (*Aurelia aurita*) mediante un método en fase líquida de pulsos;

10 la Figura 5-2 muestra el resultado de analizar la secuencia de aminoácidos de una glucoproteína de tipo mucina purificada procedente de medusa marrón (*Chrysaora melanaster*) mediante un método en fase líquida de pulsos;

la Figura 6-1 muestra el resultado del análisis de monosacáridos de una glucoproteína de tipo mucina purificada procedente de medusa común (*Aurelia aurita*);

la Figura 6-2 muestra el resultado del análisis de monosacáridos de una glucoproteína de tipo mucina purificada procedente de medusa marrón (*Chrysaora melanaster*);

15 la Figura 7 muestra el resultado de un análisis de HPLC de filtración en gel (exclusión molecular) de una glucoproteína de tipo mucina purificada procedente de medusa común (*Aurelia aurita*);

la Figura 8 muestra los resultados de los análisis de la cromatografía de exclusión molecular de glucoproteínas de tipo mucina procedentes de una variedad de medusas o sus partes;

20 la Figura 9 muestra las fracciones obtenidas sometiendo a glucoproteína de tipo mucina procedente de medusa común (*Aurelia aurita*) a cromatografía de exclusión molecular, seguido de fraccionamiento;

la Figura 10-1 muestra el resultado de una medida del peso molecular de cada fracción mediante un método de MS MALDI-TOF;

la Figura 10-2 muestra el resultado de una medida del peso molecular de cada fracción mediante un método de MS MALDI-TOF;

25 la Figura 10-3 muestra el resultado de una medida del peso molecular de cada fracción mediante un método de MS MALDI-TOF; y

la Figura 11 es la representación gráfica de los pesos moleculares de una glucoproteína de tipo mucina

Mejor modo de poner en práctica la invención

A continuación, la presente invención se describirá con mayor detalle.

30 La presente invención proporciona una nueva glucoproteína de tipo mucina. La glucoproteína de tipo mucina se refiere a una glucoproteína que tiene una estructura repetida que comprende secuencias de aminoácidos particulares como unidades, y tiene una cadena de azúcar de tipo mucina (también denominada una cadena de azúcar enlazada mediante O). En la glucoproteína de tipo mucina, la N-acetilgalactosamina se une generalmente, vía un enlace O-glucosídico, al grupo hidroxilo de un resto de serina o treonina en la proteína, y a su vez un monosacárido se une a la N-acetilgalactosamina para formar una cadena de azúcar.

35 A continuación se describirán la estructura y propiedades de la glucoproteína de tipo mucina según la presente invención (la presente glucoproteína de tipo mucina). La presente glucoproteína de tipo mucina tiene una estructura repetida que comprende tres a 2000 unidades que se repiten que tienen una secuencia de aminoácidos representada mediante la siguiente fórmula I (SEC ID NO: 1):

40 Val-Xaa-Glu-Thr-Thr-Ala-Ala-Pro (I)

[en la que Xaa representa Val o Ile].

45 La glucoproteína de tipo mucina es un compuesto polimérico que tiene un peso molecular indefinido según sus características. Incluso si las glucoproteínas de tipo mucina se obtienen de la misma especie y se obtienen en el mismo experimento, el número de unidades que se repiten difiere entre las moléculas individuales. Como resultado del análisis mediante filtración en gel, el peso molecular de la glucoproteína de tipo mucina aislada por los presentes inventores fue 10 a 1200 kDa, cuando el resultado del análisis de filtración en gel se corrigió mediante el uso de una media numérica obtenida mediante análisis de secuencias de aminoácidos. Por lo tanto, tomando también en cuenta una estructura de cadena de azúcar descrita más tarde, se espera que puedan estar presentes en el mundo natural polímeros con un peso molecular de aproximadamente tres veces mayor que los obtenidos por el experimento (que

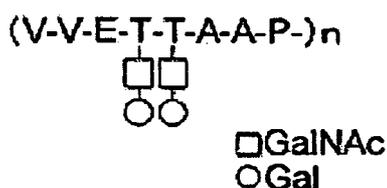
tienen aproximadamente 3 a 700 unidades que se repiten). Incluso no es probable que tales glucoproteínas de tipo mucina más grandes difieran en gran medida de las pequeñas en la propiedad física o la función. De este modo, el número estimado de las unidades que se repiten es aproximadamente 3 a 2000, preferentemente 3 a 700. En este contexto, el número estimado de unidades que se repiten es, por ejemplo, aproximadamente 3 en una glucoproteína de tipo mucina que tiene un peso molecular de aproximadamente 4,5 kDa, y aproximadamente 40 en una glucoproteína de tipo mucina que tiene un peso molecular de aproximadamente 750 kDa, suponiendo que todos los restos de treonina (Thr) estén unidos a una cadena de azúcar, y la porción de la cadena de azúcar sea la secuencia más típica –GalNAc-Gal. En la presente memoria descriptiva, el número de las unidades que se repiten se calcula a partir de un peso molecular basándose en la misma suposición, excepto que se especifique de otro modo.

- 5 El cromatograma de la filtración en gel de la glucoproteína de tipo mucina obtenida a partir de una medusa en el experimento (Ejemplo 6) muestra que el 50% de la cantidad total tiene un peso molecular de 60 kDa a 270 kDa, esto es, 40 a 180 unidades repetidas, como resultado de la corrección por el valor obtenido como un peso molecular absoluto usando MALDI-TOF. De forma similar, el cromatograma muestra que los componentes que tienen un peso molecular de 90 kDa a 210 kDa, esto es, 60 a 150 unidades que se repiten, dan cuenta del 30% de la cantidad total.
- 10 Las unidades que se repiten pueden estar unidas directamente, o se pueden unir vía un enlazador o enlazadores. El enlazador puede ser, por ejemplo, pero no se limita a, un enlace S-S usando cisteína.

Además, los resultados de los análisis mostrados en los Ejemplos 3 y 4 muestran que la glucoproteína de tipo mucina aislada contenía diferentes aminoácidos de la estructura repetida mencionada anteriormente. Sin embargo, su cantidad fue 5% o menor en términos de una relación molar. Estos aminoácidos adicionales son probablemente de impurezas, o están presentes principalmente en el término o en la unión de las unidades que se repiten, y sirven como porciones que imparten funciones adicionales, tales como funciones de fijación *in vivo* atribuidas a la unión a la membrana. De este modo, la presente glucoproteína de tipo mucina puede contener aminoácidos adicionales, además de la estructura repetida, sin influir en sus funciones como mucina (por ejemplo, viscosidad, propiedades antibacterianas, y propiedades humectantes). Adicionalmente, las unidades que se repiten en la estructura repetida pueden tener un desplazamiento de aminoácidos. Específicamente, como se muestra en el Ejemplo 4, una glucoproteína de tipo mucina procedente de medusa marrón (*Chrysaora melanaster*) tiene las unidades que se repiten VEXXAAPV, que están desplazadas por un aminoácido de las unidades que se repiten representadas por la fórmula I. De este modo, la presente glucoproteína de tipo mucina también engloba una proteína que comprende las unidades que se repiten con desplazamiento de aminoácidos como resultado de la supresión de uno o varios aminoácidos presentes en el término N de la estructura repetida. Preferentemente, tal proteína es una glucoproteína de tipo mucina en la que se suprime Val presente en el término N de la estructura repetida.

En la presente glucoproteína de tipo mucina, uno o más restos de aminoácidos en la estructura repetida están unidos a una cadena de azúcar que consiste en uno o más monosacáridos. El resto de aminoácido unido a una cadena de azúcar no está particularmente limitado. Se prefiere que un resto de treonina (Thr) se una a una cadena de azúcar. Por ejemplo, en la presente glucoproteína de tipo mucina, el 98 a 100% de todos los restos de aminoácidos unidos a una cadena de azúcar pueden ser treonina (Thr). Además, la glucoproteína de tipo mucina es un compuesto polimérico que tiene un peso molecular indefinido según sus características, como se describe anteriormente. Por lo tanto, el número de los restos de aminoácidos unidos a una cadena de azúcar difiere entre moléculas individuales. Sin embargo, es de esperar que casi todos de dos restos de treonina en la unidad repetida estén unidos a una cadena de azúcar. De este modo, el número de cadenas de azúcar unidas en la presente glucoproteína de tipo mucina difiere dependiendo del número de las unidades que se repiten.

El monosacárido que constituye la cadena de azúcar no está particularmente limitado, en tanto que sea aquel encontrado en glucoproteínas de tipo mucina generales. Sus ejemplos incluyen N-acetilgalactosamina, galactosa, N-acetilglucosamina, ácido siálico, arabinosa, y fucosa. Se prefiere particularmente que la cadena de azúcar comprenda N-acetilgalactosamina y/o galactosa. Específicamente, se prefiere que los restos de treonina (Thr) en las unidades que se repiten estén unidos a N-acetilgalactosamina y a galactosa para que tengan la estructura Thr-GalNAc-Gal, o estén unidos sólo a N-acetilgalactosamina para que tengan la estructura Thr-GalNAc. Por ejemplo, tal glucoproteína de tipo mucina se representa mediante la siguiente fórmula:



50 [en la que se puede suprimir Gal representada por un círculo en blanco].

La cadena de azúcar comprende 1 a 10, preferentemente 1 a 8, más preferentemente 1 a 5 monosacáridos enlazados a una forma lineal o ramificada. Debido a las características de la glucoproteína de tipo mucina de peso molecular indefinido, el número, tipo, estructura, tamaño, etc. de la cadena de azúcar contenida en la presente glucoproteína de tipo mucina difieren entre glucoproteínas de tipo mucina individuales. Las cadenas de azúcar contenidas en una glucoproteína de tipo mucina también pueden diferir entre sí. Como se describe en los Ejemplos 2 a 6, las glucoproteínas de tipo mucina extraídas de medusa común (*Aurelia aurita*) y medusa marrón (*Chrysaora melanaster*) tuvieron, en su comparación, totalmente las mismas porciones que se repiten en las cadenas peptídicas y difirieron sólo en los tipos y relaciones de componentes de los azúcares constituyentes en las porciones de la cadena de azúcar. Además, estas glucoproteínas de tipo mucina parecen estar presentes para los mismos fines en el mundo natural en el que están presentes la medusa común y la medusa marrón. Se puede considerar que las glucoproteínas de tipo mucina en estas dos medusas no difieren en gran medida entre sí en su función. Por lo tanto, la estructura de la cadena de azúcar no altera las propiedades principales de la presente glucoproteína de tipo mucina, y más bien se puede esperar que desempeñe un papel en controlar finamente la especificidad. De este modo, se incorpora en el alcance de la presente invención incluso una glucoproteína de tipo mucina que difiera en la porción de la cadena de azúcar pero que tenga la estructura repetida de la cadena peptídica.

La cadena de azúcar en la presente glucoproteína de tipo mucina es convertida por glucosiltransferasa presente *in vivo*. De este modo, la cadena de azúcar en la presente glucoproteína de tipo mucina no está limitada a aquellas descritas anteriormente, e incluso se incorpora dentro del alcance de la presente invención una glucoproteína de tipo mucina que tiene una cadena de azúcar modificada, en tanto que tenga una estructura repetida que comprenda tres o más unidades que se repiten que tienen una secuencia de aminoácidos representada por la fórmula I, en la que uno o más restos de aminoácidos en la estructura están unidos a una cadena de azúcar que consiste en uno o más monosacáridos. Esto es debido a que se espera que tal glucoproteína de tipo mucina tenga funciones y propiedades relevantes.

Es probable que la glucoproteína de tipo mucina que comprende una cadena de azúcar modificada por glucosiltransferasa tenga nueva utilidad en virtud de su capacidad adicional de reconocimiento molecular impartida a la misma por la modificación del azúcar. De este modo, la presente invención proporciona un método para modificar la cadena de azúcar de la presente glucoproteína de tipo mucina mediante la acción de glucosiltransferasa. Los ejemplos de glucosiltransferasa que se pueden usar incluyen glucosiltransferasa, galactosiltransferasa, N-acetilgalactosaminiltransferasa, sialiltransferasa, y fucosiltransferasa. En la técnica se conoce un enfoque para modificar una cadena de azúcar usando glucosiltransferasa, y para este fin se puede usar cualquier método.

La presente glucoproteína de tipo mucina es un compuesto que tiene enlaces de Thr-GalNAc-Gal denominado el núcleo de tipo 1 en relación con glucoproteínas de tipo mucina, y/o enlaces que tienen una estructura simple de Thr-GalNAc. Por lo tanto, la presente glucoproteína de tipo mucina se caracteriza porque se puede usar como materia prima para convertir la porción de la cadena de azúcar en una cadena de azúcar deseada usando una enzima conocida. Por ejemplo, el ácido siálico se puede unir a galactosa mediante la acción sobre ella de $\alpha 2 \rightarrow 3$ NeuAc transferasa comercialmente disponible, como en reacciones que se producen en linfocitos normales.

Además, la porción completa o parcial de la cadena de azúcar se puede eliminar para limitar de ese modo la acción de la glucoproteína de tipo mucina, potenciar una eficacia particular, o dar una nueva acción. Adicionalmente, los azúcares parcialmente añadidos se pueden eliminar para potenciar la homogeneidad como sustancia. De este modo, la modificación de la cadena de azúcar proporcionada por la presente invención también engloba la liberación de un azúcar particular a partir de la cadena de azúcar. Los ejemplos de una enzima que liberan azúcar que se pueden usar incluyen glucosidasa, galactosidasa, N-acetilgalactosaminidasa, sialidasa, y fucosidasa.

La conversión de la porción de la cadena de azúcar en la presente glucoproteína de tipo mucina en una cadena de azúcar deseada permite controlar finamente la capacidad de reconocimiento molecular por la cadena de azúcar, de manera que se cambia la capacidad de aquella poseída originalmente por la presente glucoproteína de tipo mucina por aquella que tiene especificidad y afinidad deseadas. Por ejemplo, se han desarrollado actualmente y se han puesto en uso práctico materiales que se adhieren a células, virus, o toxinas producidos de ese modo. Estos se producen introduciendo en diversos materiales poliméricos tales como poliestireno diversas cadenas de azúcar que reconocen lecitina, una proteína que se une a azúcar (K. Kobayashi, Artificial Complex Sugar Chain Polymer, p. 181-195, K. Kobayashi y S. Shoda ed., "The Recent Trends of Glycochemistry" (en Japonés), Parte 2, Capítulo 2.1, CMC Publishing Co., Ltd., 2005). También se puede permitir que la presente proteína de tipo mucina tenga funciones similares a tal material polimérico. Por ejemplo, se sabe que la toxina Shiga, producida por O-157, se une fuertemente a un trisacárido Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β o a un disacárido Gal α 1-4Gal β 1. Por lo tanto, se puede dejar que la presente proteína de tipo mucina tenga efectos antitóxicos sobre la toxina Shiga uniendo una cantidad apropiada de estos azúcares a ella. Se conoce un gran número de cadenas de azúcar que tienen tales efectos. Por lo tanto, las cadenas de azúcar que tienen la capacidad de reconocimiento no están limitadas. También, las dianas para ser reconocidas por las cadenas de azúcar no están limitadas, y pueden ser glucoproteínas (por ejemplo, lectinas), toxinas, agentes, etc., presentes intracelular o extracelularmente, sobre las superficies celulares, dentro de las membranas celulares, dentro o sin virus, y sobre superficies de virus.

La presente invención también se refiere a una proteína que tiene una estructura repetida que comprende 1 a 2000 unidades que se repiten que tienen una secuencia de aminoácidos representada por la fórmula I. De la misma manera que antes, la proteína también se puede unir a una cadena de azúcar mediante uso de glucosiltransferasa.

5 La glucoproteína de tipo mucina de la presente invención se extrae de medusas. Las medusas se refieren a organismos que pertenecen al filo *Cnidaria*. Sus ejemplos típicos incluyen *Aurelia aurita* (medusa común) (familia *Ulmaridae*), *Chrysaora melanaster* (medusa marrón) (familia *Pelagiidae*), *Aequorea coerulea* (medusa Owan-kurage) (familia *Aequoreidae*), *Nemopilema nomurai* (medusa Echizen-kurage) (familia *Stomolophidae*), *Charybdea rastonii* (medusa Andon-kurage) (familia *Carybdeidae*), *Rhopilema esculenta* (medusa Bizen-kurage) (familia *Rhizostomidae*), y *Chiropsalmus quadrigatus* (medusa Habu-kurage) (familia *Chiropsidae*). Se prefiere que las medusas usadas para producir la presente glucoproteína de tipo mucina sean aquellas que se han confirmado que son seguras para seres humanos y animales. Tales medusas pueden ser, por ejemplo, pero sin limitarse a, *Aurelia aurita*, *Rhopilema esculenta* y *Nemopilema nomurai*, que ya se han usado como alimentos. Las medusas se pueden usar en diversos estados. Por ejemplo, se pueden usar medusas brutas, congeladas, secadas, y curadas en sal. Además, la parte de una medusa usada para extraer la glucoproteína de tipo mucina no está particularmente limitada. Por ejemplo, se puede usar la epidermis, brazos orales, cuerpo gástrico, fluidos corporales, y similares, o componentes líquidos generados a partir de la crioconservación o almacenamiento a temperatura ambiente.

Como ejemplo se tomará un método para producir una glucoproteína de tipo mucina usando una medusa congelada, y su sumario se muestra en la Figura 1. En primer lugar, se descongela una medusa congelada y se lava en agua. Por ejemplo, cuando se usa medusa bruta o seca, la medusa se lava en agua de la misma manera. Si es necesario, la materia sólida y el líquido se separan mediante centrifugación.

Subsiguientemente, la medusa (materia sólida) se cortó en fragmentos de aproximadamente 0,5 mm a 2 cm cuadrado, preferentemente de forma aproximada 1 cm cuadrado, con tijeras. Este método de corte o de destrucción debería ser adecuado para el estado de una muestra usada, el comportamiento de una centrífuga usada en los procesos subsiguientes, etc. Cuando se necesitan fragmentos más finos, se puede usar un método de corte-destrucción apropiado, tal como una mezcladora automática. Cuando la epidermis de la muestra comienza a degradarse, o la muestra pierde frescura con porciones fluidas blandas, se prefiere llevar a cabo un desengrasado y deshidratación mediante tratamiento con acetona. Después de este tratamiento con acetona, la muestra deshidratada se debería de hinchar nuevamente con agua para uso.

30 Cuando se usan fluidos corporales o componentes líquidos generados a partir de la crioconservación o almacenamiento a temperatura ambiente, el método de producción puede transcurrir a la siguiente etapa sin llevar a cabo las etapas descritas anteriormente.

Después, la muestra sólida se añade a una disolución salina y se somete a extracción mediante agitación. La disolución salina usada comprende, pero no se limita a, NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂, oxalato de amonio, LiBr, EDTA, o una disolución de tampón neutra (por ejemplo, disolución de tampón de fosfato o de citrato), preferentemente 0,2 a 3,5% de NaCl, particularmente de forma preferible 0,2% de NaCl. En este contexto, cuando la muestra de medusa contiene una gran cantidad de sales, la cantidad de la sal añadida a ella también se ajusta de manera que la concentración final de sales cae dentro de este intervalo. La temperatura de extracción es aproximadamente 2 a 25°C, preferentemente de forma aproximada 4°C.

Después de la extracción, la disolución se centrifuga a 1000 a 10000 g, preferentemente la velocidad más rápida de 10000 g, durante 5 a 20 minutos, manteniéndose la temperatura. A los extractos se añade etanol para dar precipitados. Esta disolución se deja reposar toda la noche a aproximadamente 0 a 4°C, y después se centrifuga a 1000 a 10000 g, preferentemente 10000 g, durante 5 a 20 minutos, manteniéndose la temperatura.

El precipitado obtenido se disuelve en una pequeña cantidad de agua, y la disolución se centrifuga a 1000 a 10000 g, preferentemente 10000 g, durante 5 a 20 minutos, manteniéndose la temperatura. El sobrenadante se elimina entonces de ella y se purifica mediante tratamiento por diálisis. El producto obtenido es una glucoproteína de tipo mucina bruta, y esta glucoproteína de tipo mucina bruta se liofiliza entonces.

En la purificación de la glucoproteína de tipo mucina, se pueden usar, solos u opcionalmente en combinación, métodos bioquímicos usados generalmente en el aislamiento y purificación de proteínas, por ejemplo fraccionamiento usando un disolvente orgánico, métodos de ultrafiltración, una variedad de métodos electroforéticos, una variedad de métodos de diálisis, cromatografía en gel, cromatografía hidrófoba, cromatografía de fase inversa, cromatografía de intercambio iónico, y cromatografía de afinidad. Por ejemplo, se pueden obtener fracciones alrededor de un pico principal mediante cromatografía de líquidos de intercambio iónico, como se muestra en el Ejemplo 2, para purificar la presente glucoproteína de tipo mucina.

En este contexto, se prefiere que la producción de la presente glucoproteína de tipo mucina no comprenda ninguna etapa de calentamiento. Por ejemplo, la producción de la presente glucoproteína de tipo mucina se lleva a cabo a 25°C o menos, preferentemente a 0 a 25°C, más preferentemente a 4°C.

El método para producir la presente glucoproteína de tipo mucina es un método eficaz basado en la extracción a partir de medusas, y tiene además la ventaja de que puede introducir glucoproteínas de tipo mucina en grandes cantidades al mercado mediante un método de producción barato, por ejemplo usando desechos de medusas que resultan de la acuicultura de medusas o en bahías o en la industria de la pesca.

- 5 Comparando la presente glucoproteína de tipo mucina con glucoproteínas de mucina conocidas, parece que la presente glucoproteína de tipo mucina es similar a una glucoproteína de tipo mucina humana MUC5AC, que también tiene una estructura repetida que comprende ocho restos (H. Nakata, Diversity of Mucin and Mucin-type Sugar Chain and Its Meaning: Understandable Glycobiology in Post-Genomic Era, Wakaru Jikken-Igaku Series (Understandable Experimental Medicine) (en Japonés), N. Taniguchi ed., Capítulo 3, Yodosha Co., Ltd., 2002; K. Hotta, K. Ishihara, Search for Attractiveness of Gastric Mucus: Elucidation of Mucin using Newest Approach (en Japonés), Medical View Co., Ltd., 1999). Esta glucoproteína de tipo mucina humana está presente principalmente en aparatos respiratorios y en la mucosa gástrica. La secuencia de aminoácidos de la unidad que se repite en esta proteína se muestra en la siguiente fórmula II (SEC ID NO: 2), junto con la de la presente glucoproteína de tipo mucina (fórmula I):

La presente glucoproteína de tipo mucina:

Val-Val-Glu-Thr-Thr-Ala-Ala-Pro (I)

(Ile)

15

MUC5AC Humana:

Thr-Thr-Ser-Thr-Thr-Ser-Ala-Pro (II)

1 2 3 4 5 6 7 8

- 20 Estas secuencias de aminoácidos, en su comparación, son idénticas en los aminoácidos 4^º, 5^º, 7^º y 8^º de los ocho restos. Mientras que sólo Thr de los restos 4^º y 5^º pueden servir como sitios de unión a cadenas de azúcar en la presente glucoproteína de tipo mucina, los aminoácidos 1^º, 2^º, 3^º, 4^º, 5^º y 6^º (Ser o Thr) pueden servir como sitios de unión a cadenas de azúcar en MUC5AC. Sin embargo, MUC5AC humana tiene de hecho la pequeña relación cuantitativa de azúcares como un todo. Esto sugiere que la presente glucoproteína de tipo mucina se puede usar en una mezcla con MUC5AC, o sola como compuesto sustituto de MUC5AC, debido a que parece que la glucoproteína de tipo mucina es similar en propiedad física a MUC5AC a pesar de la diferencia de secuencias de aminoácidos y estructuras de la cadena de azúcar. La presente glucoproteína de tipo mucina también se puede usar como sustituto para otras glucoproteínas de tipo mucina.

- 25 Por ejemplo, MUC5AC se denomina habitualmente como "mucina formadora de gel". Una de sus funciones principales es mantener la mucosa o el moco en forma de gel. Por ejemplo, la función de mantener la mucosa gástrica en forma de gel y evitar que las paredes gástricas sean dañadas por los jugos gástricos es supuestamente importante sobre la superficie de la protección estomacal. La presente glucoproteína de tipo mucina también forma una sustancia similar en forma de gel en una disolución acuosa, y por lo tanto se puede usar como sustituto para este papel.

- 30 La presente glucoproteína de tipo mucina tiene, como se describe más abajo, propiedades físicas únicas atribuidas a la estructura repetida corta que comprende ocho restos, y muestra fácilmente funciones como un compuesto útil. La longitud unidimensional de los ocho restos en la unidad que se repite es aproximadamente 4 nm, y el tamaño de la unidad constituyente es tan minúsculo como aproximadamente 1 nm. Por lo tanto, la presente glucoproteína de tipo mucina tiene la ventaja de que forma un entorno de matriz suficientemente homogéneo con relación al tamaño de las células, virus y bacterias del orden de 100 nm a 1 µm.

- 35 La presente glucoproteína de tipo mucina se puede usar como una composición. Por ejemplo, la presente glucoproteína de tipo mucina se puede mezclar con, o diluir o suspender en un vehículo apropiado para preparar de ese modo una composición. Los ejemplos del vehículo apropiado incluyen disoluciones de sales (por ejemplo, disolución salina), lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, almidón, goma arábiga, alginato, gelatina, fosfato de calcio, silicato de calcio, celulosa, metilcelulosa, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, agua, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio, y aceite mineral. Sin embargo, la composición puede contener excipientes, tensioactivos, dispersantes, tampones, conservantes, solubilizantes, agentes balsámicos, estabilizantes, agentes de tonicidad, etc., que se usan habitualmente.

- 40 Cuando la composición que comprende la presente glucoproteína de tipo mucina disuelta en una disolución acuosa que contiene una sal en concentración elevada (por ejemplo, disolución salina) se utiliza como sustancia sustituta para el moco humano, puede tener los siguientes efectos y usos:

50

(1) reponer la propia mucosa, es decir, potenciar diversas funciones (protección tisular, retención de humedad, lubricación, etc.) de la mucosa;

(2) uso como un sustituto del moco en el tratamiento para reponer materiales de moco deficientes debido a lesiones (por ejemplo, úlcera de estómago en la protección estomacal) o similar;

5 (3) uso como un vehículo para el suministro de fármacos, para suministrar eficazmente fármacos a tejidos puestos en contacto con materiales de moco; y

(4) uso como una matriz artificial con efectos antibacterianos que atrapa virus, bacterias, y similares, infecciosos para tejidos en contacto con materiales de moco.

10 De este modo, la presente glucoproteína de tipo mucina es útil como una composición farmacéutica para los usos farmacéuticos descritos anteriormente. Además, la presente glucoproteína de tipo mucina se puede mezclar con una proteína tal como colágeno, o con un hidrato de carbono tal como ácido hialurónico, para preparar una sustancia constituyente en una matriz extracelular artificial. Tal matriz extracelular artificial se puede usar como material para formar una matriz extracelular útil en medicinas de desarrollo y de regeneración.

15 Puesto que la fuente de la presente glucoproteína de tipo mucina son las medusas, la presente glucoproteína de tipo mucina se puede usar como alimentos para seres humanos y animales. De este modo, presente glucoproteína de tipo mucina se puede formular en alimentos o aditivos alimentarios, y se puede usar como espesante alimentario, agente de revestimiento antibacteriano, o alimento sanitario. La formulación en alimentos y aditivos alimentarios se puede realizar mediante un método, por ejemplo mezclamiento, inmersión, aplicación, o pulverización.

20 Además, se sabe que la mucina es un componente humectante o antienvjecimiento. Por lo tanto, la presente glucoproteína de tipo mucina se puede formular en cosméticos. Los ejemplos de los cosméticos en los que se formula la presente glucoproteína de tipo mucina pueden incluir lociones, lociones lechosas, cremas, y bases para maquillajes. Se ha confirmado que la presente glucoproteína de tipo mucina tiene, como se muestra en el Ejemplo 10, capacidades humectantes e higroscópicas equivalentes a las del ácido hialurónico actualmente conocido como un componente higroscópico y humectante típico en cosméticos.

25 La presente glucoproteína de tipo mucina se puede usar como material de partida para sintetizar glucoproteínas de tipo mucina similares. En el proceso de síntesis que usa enzimas o reacciones de síntesis orgánica habituales, se puede usar la propia unidad que se repite (cadena peptídica repetida una vez) como un marcador para predecir rendimientos en la introducción de la cadena de azúcar, o para confirmar la introducción de la cadena de azúcar mediante una espectroscopía tal como RMN.

30 La presente glucoproteína de tipo mucina tiene una viscosidad excelente. Por lo tanto, una disolución acuosa que contiene la presente glucoproteína de tipo mucina se puede moldear en una membrana o forma de resina secando la extensión de la disolución acuosa como una capa fina, o gelando la porción de la cadena de azúcar con glutaraldehído o poliacido carboxílico. La composición resultante en una forma de membrana o de resina es excelente en bioafinidad y biodegradabilidad, y se puede usar en membranas de sutura post-quirúrgica, materiales para la protección de superficies para hueso artificial o similar, lubricantes, etc.

35 La composición que comprende la presente glucoproteína de tipo mucina se puede usar en la protección de tejido celular, la retención de humedad de la superficie de la piel, la promoción de la salud, la administración de fármacos, el tratamiento o prevención de enfermedades, aplicaciones bacterianas, etc., como se describe anteriormente.

40 Además, la presente glucoproteína de tipo mucina tiene características tales como: 1) es posible aislar aquellas con un amplio intervalo de distribución de pesos moleculares; 2) se puede almacenar de forma estable en un estado sólido como un compuesto; 3) las muestras que tienen las mismas medianas de distribución de pesos moleculares y distribución molecular entre sí se pueden purificar reproduciblemente mediante fraccionamiento según un método de cromatografía de líquidos usando una columna apropiada; y 4) puede especificar pesos moleculares absolutos llevando a cabo una medida de MS mediante MALDI-TOF en una muestra de fraccionamiento que tenga un único peso molecular. Una fracción que tiene las medianas distintas de distribución de pesos moleculares y distribución molecular se puede purificar y usar como un marcador de peso molecular.

45 Se prefiere que la glucoproteína de tipo mucina usada como marcador de peso molecular sea extraída de diversas medusas o sus partes. Por ejemplo, una glucoproteína de tipo mucina obtenida de la epidermis de la medusa Echizen-kurage (*Nemopilema nomurai*) tiene una distribución de pesos moleculares particularmente amplia, como se muestra en, por ejemplo, el Ejemplo 7. Por lo tanto, una glucoproteína de tipo mucina se puede aislar de la epidermis de *Nemopilema nomurai* y se puede fraccionar para preparar de ese modo un conjunto de marcadores de peso molecular que tengan un amplio intervalo de pesos moleculares.

El marcador de peso molecular que comprende la presente glucoproteína de tipo mucina se puede preparar según lo siguiente: se aísla una glucoproteína de tipo mucina como se describe anteriormente y después se somete a

5 cromatografía de exclusión en gel (SEC) en condiciones apropiadas usando una columna apropiada (véase el Ejemplo 7) para fraccionar componente de cada tiempo de elución tan finamente como sea posible. Las condiciones de elución que incluyen la columna usada, la composición y caudal del eluyente, y la temperatura de la columna, se pueden determinar de forma apropiada por los expertos en la materia según el intervalo pretendido de pesos moleculares de los marcadores a preparar.

10 Subsiguientemente, las fracciones respectivas se recogen y se purifican. Esta purificación se puede realizar usando, en combinación apropiada, cualesquiera métodos de purificación conocidos en la técnica. Por ejemplo, se prefiere llevar a cabo una desalación usando diálisis. Las fracciones de la glucoproteína de tipo mucina purificadas que tienen un único peso molecular se pueden liofilizar y usar como un sólido. Se prefiere que esta muestra sólida se refrigere a aproximadamente 4°C. Después, cada una de las fracciones de la glucoproteína de tipo mucina se sometió a una medida del peso molecular absoluto usando, por ejemplo, el método de MS según MALDI-TOF, para determinar sus pesos moleculares absolutos (véase el ejemplo 8).

15 Los presentes marcadores de peso molecular engloban un amplio intervalo de pesos moleculares, como se muestra en los Ejemplos 6 y 7. Específicamente, la presente invención permite preparar marcadores de peso molecular que tienen un peso molecular de aproximadamente 10 a 1.400 kDa. Los pesos moleculares de las fracciones de glucoproteína de tipo mucina a preparar se pueden determinar ajustando el tiempo de elución en la etapa de fraccionamiento en la cromatografía de exclusión molecular. Por ejemplo, las fracciones se pueden fraccionar como se muestra en el Ejemplo 8 para preparar marcadores de peso molecular que tienen una distribución de pesos moleculares de aproximadamente 8 a 15 kDa (mediana: 11 kDa), aproximadamente 15 a 25 kDa (mediana: 19 kDa),
20 aproximadamente 28 a 38 kDa (mediana: 32 kDa), aproximadamente 45 a 55 kDa (mediana: 49 kDa), aproximadamente 70 a 100 kDa (mediana: 86 kDa), y aproximadamente 80 a 150 kDa (mediana: 110 kDa), y las distintas medianas.

25 Cuando los presentes marcadores de peso molecular se usan en la medida de pesos moleculares de muestras desconocidas, se pueden manipular de la misma manera como los marcadores habituales de pesos moleculares. En este contexto, se prefiere usar juntos marcadores de peso molecular que tienen pesos moleculares plurales. Los presentes marcadores de peso molecular se pueden usar de forma adecuada en métodos bioquímicos usados generalmente en la medida de pesos moleculares de proteínas, separación de proteínas, etc., por ejemplo una variedad de métodos electroforéticos y métodos cromatográficos (por ejemplo, SEC). Específicamente, por ejemplo,
30 los presentes marcadores de peso molecular se disuelven en un disolvente de elución usado para muestras sólidas, y se someten a medida mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC) en condiciones de elución apropiadas. Las condiciones de elución que incluyen la columna usada, la composición y el caudal del eluyente, y la temperatura de la columna, difieren dependiendo de las propiedades de muestras desconocidas a medir, y pueden ser determinadas apropiadamente por los expertos en la materia.

35 Después, se obtiene una curva de calibración usando los pesos moleculares absolutos y tiempos de elución de los marcadores de peso molecular basándose en los resultados de las medidas. En este procedimiento, se prefiere usar los marcadores de peso molecular en un intervalo de pesos moleculares que establezca la siguiente relación teórica entre el peso molecular y el tiempo de elución (volumen de elución):

$$\log(\text{peso molecular}) = A - B \times \text{tiempo de elución (volumen de elución)}$$

[en la que A y B representan números positivos].

40 Subsiguientemente, las muestras desconocidas se pueden medir usando la curva de calibración (relación entre el peso molecular y el tiempo de elución).

45 Los presentes marcadores de peso molecular difieren en valor absoluto en aproximadamente tres veces del pululano, que se ha usado convencionalmente, como se muestra en el Ejemplo 3. En general, los resultados de MS mediante MALDI-TOF son más fiables. Por lo tanto, por lo menos cuando se mide la distribución de pesos moleculares de glucoproteínas, se puede afirmar que la medida que usa los presentes marcadores de peso molecular es más exacta. Además, este resultado está muy de acuerdo con un valor determinado a partir de un rendimiento en relación con la eficacia de la degradación de Edman en el análisis de secuencia de aminoácidos.

50 La glucoproteína de tipo mucina contenida en el presente marcador de peso molecular es una glucoproteína que comprende una cadena peptídica unida a una cadena de azúcar, como se describe anteriormente, y de este modo es un polímero ramificado. Por otro lado, los marcadores de peso molecular usados convencionalmente son polímeros sintéticos, y son sólo polímeros lineales sin ramificaciones. Por lo tanto, los presentes marcadores de peso molecular pueden determinar de forma más exacta los pesos moleculares de polímeros ramificados (por ejemplo, glucoproteínas), que han sido difíciles de determinar de forma exacta usando los polímeros lineales sintéticos proporcionados como marcadores convencionales de pesos moleculares, puesto que los polímeros
55 lineales son diferentes de los polímeros ramificados en los radios hidrodinámicos o formas.

En lo sucesivo, la presente invención se describirá con más detalle haciendo referencia a los Ejemplos. Sin

embargo, el alcance técnico de la presente invención no pretende estar limitado a estos Ejemplos.

Ejemplo 1

La mucina bruta que sirve como precursora de una nueva glucoproteína de tipo mucina según la presente invención se extrajo de medusa común (*Aurelia aurita*) y medusa marrón (*Chrysaora melanaster*) mediante el siguiente método, como se muestra en la Figura 2:

- 5 1) se descongela una medusa entera en estado congelado y después se lava en agua, y la materia sólida y el líquido se separan mediante centrifugación;
- 2) la porción sólida que queda se cortó en fragmentos de aproximadamente 5 mm por 1 cm cuadrado, con tijeras;
- 10 3) los fragmentos se sometieron a desengrasado y deshidratación mediante tratamiento con acetona, y después se hincharon en agua;
- 4) la muestra sólida se añadió a una disolución acuosa de NaCl al 0,2% y se sometió a extracción mediante agitación a 4°C;
- 5) la disolución procedente de la etapa 4 se centrifugó a 4°C a 10000 g durante 15 minutos;
- 15 6) a los extractos de la etapa 5, se añadió un volumen de 3 veces de etanol para dar precipitados en forma de gel;
- 7) la disolución procedente de la etapa 6 se dejó reposar toda la noche en un refrigerador, y después se centrifugó a 4°C a 10000 g durante 15 minutos;
- 20 8) los precipitados procedentes de la etapa 7 se disolvieron en una pequeña cantidad de agua, y la disolución se centrifugó a 4°C a 10000 g durante 15 minutos;
- 9) el sobrenadante de la etapa 8 se eliminó y purificó mediante diálisis, y se liofilizó para preparar mucina bruta; y
- 10) los precipitados procedentes de la etapa 8 se sometieron adicionalmente a las etapas 7 y 8, repetidas las veces apropiadas, para obtener mucina bruta.

25 Ejemplo 2

Las mucinas brutas procedentes de dos medusas obtenidas en el Ejemplo 1 se sometieron a cromatografía de líquidos de intercambio iónico, y los picos con los asteriscos mostrados en la Figura 3 se purificaron para obtener de ese modo glucoproteínas de tipo mucina con una pureza elevada.

Las condiciones para la cromatografía usadas fueron las siguientes:

- 30 TSK gel DEAE-ToyoPearl 650M 25 mm i.d. x 150 mm
- A: 10 mM de NaPi, pH 7
- B: 0,5 M de NaCl/10 mM de NaPi, pH 7
- caudal 2 ml/min., detector UV (215 nm)
- gradiente 0-60 min. (0% de B: 0-100)
- 35 muestra: medusa común (*Aurelia aurita*)
- 5 ml (2 mg/ml de mucina bruta/10 mM de disolución de NaPi)
- medusa marrón (*Chrysaora melanaster*)
- 1,3 ml

Ejemplo 3

- 40 Los compuestos purificados en el Ejemplo 2 se sometieron a un análisis de los aminoácidos constituyentes usando un analizador automático de aminoácidos. Cada una de las muestras (aproximadamente 12 µg cada una), purificadas mediante cromatografía de intercambio iónico y dializadas como se describe anteriormente, se transfirió a un tubo de hidrólisis y se evaporó hasta sequedad con un evaporador de centrífuga. La muestra seca se colocó en

un tubo exterior que contiene ácido clorhídrico que hierve constantemente (5,7 N), y se cerró herméticamente a presión reducida. La hidrólisis se llevó a cabo a 110°C durante 20 horas mediante un método en fase gaseosa.

5 El tubo exterior se abrió, y el tubo de hidrólisis se sometió a secado de la misma manera. El hidrolizado seco se disolvió en 100 µl de ácido clorhídrico 0,02 N. En el análisis de aminoácidos del hidrolizado, se usó un analizador de aminoácidos de alta velocidad L-8500A (fabricado por (Hitachi Ltd.). Los aminoácidos en el hidrolizado se separaron con cinco disoluciones tampón usando una columna de intercambio iónico según el método de análisis de aminoácidos especial especificado por el fabricante (Hitachi Ltd.). Los aminoácidos separados se hicieron reaccionar con ninhidrina mediante un método de post-columna, y se detectaron con luces visibles a dos longitudes de onda. Basándose en los valores obtenidos analizando 2 nmoles de una mezcla patrón de aminoácidos, se cuantificaron la glucosamina y galactosamina, aminoazúcares y aminoácidos normales usando un cromatograma a 570 nm, mientras que la prolina se cuantificó usando un cromatograma a 440 nm.

10 En la Figura 4 se muestran los resultados del análisis de la composición de aminoácidos. Como se muestra en la relación de concentraciones de aminoácidos en la Figura 4, se demostró que la composición de la porción peptídica en la glucoproteína de tipo mucina fue treonina (Thr):ácido glutámico (Glu):prolina (Pro):alanina (Ala):valina (Val)+isoleucina (Ile):N-acetilgalactosamina (GalNAc) de 2:1:1:2:2:2 en un error de 10% en cada una de medusa común (*Aurelia aurita*) y medusa marrón (*Chrysaora melanaster*). Además, la relación de concentraciones de serina u otros aminoácidos fue tan pequeña como aproximadamente 0,05%. Por lo tanto, estos derivaron probablemente de impurezas o las estructuras terminales, y se consideró que no tenían relación con la estructura repetida de la glucoproteína de tipo mucina.

20 Ejemplo 4

En el presente Ejemplo, se analizaron las proteínas (1,8 µg cada una) purificadas en el Ejemplo 2 mediante un método en fase líquida de pulsos, usando Applied Biosystems Procise 494 HT para representar gráficamente una cantidad de PTH aminoácidos en cada ciclo.

25 Los resultados del análisis de la secuencia de aminoácidos de las glucoproteínas de tipo mucina obtenidas a partir de dos medusas a partir de los términos amino se muestran en la Figura 5 (la Figura 5-1 muestra los resultados de *Aurelia aurita*, y la Figura 5-2 muestra los resultados de *Chrysaora melanaster*). En la Figura 5-1, la línea discontinua larga y corta alterna con cuadrados oscuros representa valina (Val); la línea discontinua representa ácido glutámico (Glu); la línea con cuadrados en blanco representa alanina (Ala); la línea de dos rayas en cadena con círculos en blanco representa prolina (Pro); y la línea con círculos negros representa isoleucina (Ile). Se analizaron treinta restos con un analizador automático de secuencias de aminoácidos proteicos. Como resultado, se identificaron 3,75 ciclos de una estructura repetida que comprende, a partir del término N, Val-Val (Ile)-Glu-X-X-Ala-Ala-Pro (X representa un aminoácido desconocido). Esto demostró que la glucoproteína de tipo mucina comprende las secuencias que se repiten de VVEXXAAP (en algunos casos, VIEXXAAP). Además, a partir de los resultados del Ejemplo 3, es de esperar que X sea treonina. Esta mucina que tiene las secuencias de aminoácidos que se repiten que comprenden 30 ocho restos es una proteína que no se puede encontrar mediante búsqueda en el Protein Data Bank, etc., y no se ha descubierto hasta ahora. De este modo, se concluye que esta proteína es nueva.

35 Además, la glucoproteína de tipo mucina obtenida corresponde a 60 pmoles, con tal de que el rendimiento primitivo sea aproximadamente 30 pmoles y el rendimiento primitivo en la degradación de Edman sea 50%. De este modo, también se encontró que el número de las unidades que se repiten (el peso molecular de la porción peptídica: 40 aproximadamente 768, el peso molecular que incluye una cadena de azúcar descrita más tarde: aproximadamente 1500) fue aproximadamente 40. El peso molecular de 60 kDa determinado mediante este valor se puede considerar como un peso molecular medio numérico.

45 Las unidades que se repiten de VEXXAAPV (en algunos casos, IEXXAAPV) a partir del término N se obtuvieron de medusa marrón (*Chrysaora melanaster*) (Figura 5-2). Estas fueron las mismas que las unidades que se repiten procedentes de la medusa común (*Aurelia aurita*), excepto que estaba ausente el primer resto. Básicamente, estas unidades que se repiten no difieren entre sí en absoluto.

Ejemplo 5

50 Cada una de las muestras (aproximadamente 6 µg) purificadas mediante cromatografía de intercambio iónico y dializadas como se describe anteriormente se transfirió a un tubo de reacción y se evaporó hasta sequedad con un evaporador de centrifuga. El ácido siálico contenido en ellas se convirtió en azúcares reductores libres mediante la adición de una enzima, y después se hidrolizó a 100°C durante 3 horas usando ácido trifluoroacético (4 M). Después de la N-acetilación, la muestra se marcó fluorescentemente (ABEE) y después se separó con un disolvente mixto de disolución tampón de borato potásico 0,2 M (pH 8,9)/acetonitrilo (93:7) usando una columna Honen Pak C18 (75 mm x 4,6 mm i.d.). La detección se realizó usando fluorescencia a 305 nm. Se cuantificó una relación de composición de monosacáridos basándose en el cromatograma de una mezcla estándar de 11 monosacáridos tratados de la misma manera.

La Figura 6-1 muestra los resultados de *Aurelia aurita*, y la Figure 6-2 muestra los resultados de *Chrysaora melanaster*.

Las proporciones de monosacáridos estimados a partir del análisis de la composición de monosacáridos de la presente glucoproteína de tipo mucina procedente de *Aurelia aurita* mostrado en la Figura 6-1 son las siguientes:

| | (Línea discontinua larga y corta alternas) | (Línea discontinua) |
|----------------------|--|---------------------|
| Galactosa | 0,6 nmoles | 0,9 nmoles |
| N-actilgalactosamina | 0,8 nmoles | 1,2 nmoles |

5

Estos resultados de los análisis sugieren que dos treoninas en las unidades que se repiten del péptido están unidas cada una a N-acetilgalactosaminas, todas o algunas de las cuales están a su vez unidas a galactosa. Suponiendo que otros azúcares no están unidos con ellos, la porción de la cadena de azúcar tiene un peso molecular de 730. De este modo, el peso molecular estimado de la glucoproteína unidad es aproximadamente 1500 (contenido de azúcar: aproximadamente 50%).

10

Por otro lado, el análisis de la composición de monosacáridos de la presente glucoproteína de tipo mucina procedente de *Chrysaora melanaster* mostrado en la Figura 6-2 no tuvo muestras estándar, e implicó azúcares desconocidos no identificables. Por lo tanto, la proporción de monosacárido a todos los azúcares fue desconocida. Las concentraciones de monosacáridos conocidos estimadas a partir del presente análisis son las siguientes:

| | (Línea discontinua) |
|-----------------------|---------------------|
| Galactosa | 0,7 nmoles |
| N-acetilgalactosamina | 0,8 nmoles |

15 Ejemplo 6

Una parte de la muestra de 0,05 ml (1 mg/ml de nueva mucina purificada/disolución de NaPi 0,1 M) se usó para realizar un análisis de HPLC mediante filtración en gel (exclusión molecular) en la presente glucoproteína de tipo mucina procedente de *Aurelia aurita* en Shodex SB-806HQ, eluyente: 0,1 M de NaPi, pH 7, caudal: 0,5 ml/min., detector UV (215 nm) & RI. Como marcador de peso molecular, se usó pululano.

20 En la Figura 7 se muestran los resultados del análisis. Los resultados mostraron que el peso molecular pico fue aproximadamente 450 kDa (Figura 7A). Además, los pesos moleculares medio numérico y medio ponderal calculados a partir del cromatograma son aproximadamente 180 kDa y aproximadamente 500 kDa, respectivamente (Figura 7B). Se demostró que la distribución de pesos moleculares era 10 a 1400 kDa en filtración en gel, usando pululano como sustancia patrón.

25 El peso molecular medio numérico determinado mediante filtración en gel fue aproximadamente 180 kDa, que difirió en 3 veces del peso molecular de 60 kDa estimado a partir del análisis de secuencia de aminoácidos. Actualmente se usan dos métodos de medida muy fiables como la medida de pesos moleculares de los compuestos poliméricos con cadenas de azúcar. Sin embargo, estos dos métodos pueden conducir a errores, de manera que el valor absoluto puede variar varias veces. Tales errores se consideran dentro de un intervalo habitualmente posible bajo
30 técnicas actuales, y se piensa que son inevitables en la medida del peso molecular de compuestos con cadenas de azúcar poliméricos. Considerando el problema de la compatibilidad de la sustancia patrón (pululano) usada en la medida relativa, parece que el valor absoluto del peso molecular medio numérico es más exacto para aquel basado en el número de las unidades que se repiten obtenido a partir del análisis de secuencia de aminoácidos que el
35 procedente de la filtración en gel. Específicamente, en las circunstancias presentes, el análisis de la secuencia de aminoácidos puede determinar el valor absoluto de un peso molecular exacto, pero no puede determinar la distribución de pesos moleculares, mientras que el método de la fijación en gel puede determinar sólo la distribución de pesos moleculares, lo cual es sólo un valor relativo. Esto se podría confirmar realmente por procedimientos más abajo, incluyendo los Ejemplos 7 a 9.

40 La distribución de pesos moleculares determinada mediante filtración en gel se convirtió en un valor absoluto mediante un método que usa MALDI-TOF mostrado en el Ejemplo 9. En la presente memoria descriptiva, este enfoque se usa como un método de medida de referencia para definir pesos moleculares. El valor del peso molecular determinado mediante MALDI-TOF estaba muy de acuerdo con el peso molecular estimado a partir del análisis de la secuencia de aminoácidos. La relación entre los pesos moleculares medios numéricos ((el peso molecular basado en pululano como patrón)/(el peso molecular determinado mediante MALDI-TOF) =
45 aproximadamente 3) determinada mediante estos dos métodos se mantuvo en todos los casos de los pesos moleculares. Después de la corrección mediante este valor, el peso molecular pico es 150 kDa; el peso molecular

medio ponderal es 170 kDa; y el límite superior del peso molecular pico obtenido mediante la cromatografía es 470 kDa. El número de las secuencias de aminoácidos que se repiten correspondientes al mismo es 100 para el valor pico, 110 para el peso molecular medio ponderal, y 700 para el límite superior del peso molecular.

- 5 Además, el cromatograma muestra que 50% del total está incluido en el intervalo de 60 a 270 kDa (después de la corrección) con el peso molecular pico de 150 kDa, y que 30% del total está incluido en el intervalo de 90 a 210 kDa (después de la corrección). Esto es, se demostró que el 50% del total tiene 40 a 180 unidades que se repiten, y que 30% del total tiene 60 a 150 unidades que se repiten.

Ejemplo 7

- 10 En el presente Ejemplo, las glucoproteínas de tipo mucina extraídas a partir de una variedad de medusas se sometieron a cromatografía de exclusión molecular (SEC).

La extracción de la glucoproteína de tipo mucina a partir de medusas se realizó de la misma manera como en el Ejemplo 1. Las condiciones para la cromatografía son las siguientes:

Columna: TSK gel G5000PW_{XL}

Eluyente: disolución acuosa 0,1 M de acetato de amonio

- 15 Caudal: 0,5 ml/min.

Concentración de la muestra: 0,3 a 0,9 mg/ml

- 20 Los resultados se muestran en la Figura 8. Los resultados de la Figura 8 demostraron que las glucoproteínas de tipo mucina procedentes de medusas tienen una amplia distribución de pesos moleculares. Particularmente, la glucoproteína de tipo mucina obtenida de la superficie de paraguas (epidermis) de la medusa *Echizen-kurage* (*Nemopilema nomurai*) mostró un menor peso molecular y un intervalo más amplio de distribución de pesos moleculares que las procedentes de otras especies.

Ejemplo 8

- 25 La glucoproteína de tipo mucina procedente de *Aurelia aurita* sometida a SEC en el Ejemplo 7 se fraccionó en cada fracción mostrada en la Figura 9, y se sometió a espectrometría de masas con MALDI-TOF. La MS con MALDI-TOF se realizó usando el aparato Reflex fabricado por Bruker Daltonics, en modo lineal usando como matriz ácido trans-indol-3-acrílico.

- 30 Los resultados se muestran en la Figura 10. En el diagrama, M + número de dos dígitos, descrito en la porción del título, representa los números de las fracciones en la Figura 9. Puesto que se obtiene en cada fracción un pico claro, los pesos moleculares se pueden determinar basándose en ellos. Específicamente, en la Figura 10, según el cálculo mediante observación visual, la distribución de pesos moleculares (y su mediana) fue aproximadamente 8 a 15 kDa (mediana: 11 kDa) para la fracción M28; aproximadamente 15 a 25 kDa (mediana: 19 kDa) para la fracción M26; aproximadamente 28 a 38 kDa (mediana: 32 kDa) para la fracción M24; aproximadamente 45 a 55 kDa (mediana: 49 kDa) para la fracción M22; aproximadamente 70 a 100 kDa (mediana: 86 kDa) para la fracción M20; y aproximadamente 80 a 150 kDa (mediana: 110 kDa) para la fracción M19.

- 35 **Ejemplo 9**

La glucoproteína de tipo mucina procedente de *Aurelia aurita* sometida a SEC en el Ejemplo 7 se fraccionó en cada fracción mostrada en la Figura 9. Se representaron gráficamente los pesos moleculares medidos en la MS con MALDI-TOF en el Ejemplo 8. Como control, también se representaron gráficamente los resultados de una medida de pululano.

- 40 Los resultados se muestran en la Figura 11. En la Figura 11, los números mostrados debajo de los resultados de la glucoproteína de tipo mucina (cuadrados negros) representan números de fracciones en la Figura 9. Estos resultados demuestran que tanto la glucoproteína de tipo mucina procedente de medusa como el pululano dan una buena relación lineal, mientras que sus valores absolutos difieren en aproximadamente tres veces. De este modo, se demostró que la presente glucoproteína de tipo mucina se puede usar como un marcador de peso molecular, particularmente para la medida de pesos moleculares de compuestos poliméricos tales como glucoproteínas, mediante fraccionamiento como se describe anteriormente.

Ejemplo 10

- 50 La glucoproteína de tipo mucina de la presente invención se examinó en busca de sus propiedades higroscópicas y humectantes. Las propiedades higroscópicas se midieron según lo siguiente: la glucoproteína de tipo mucina purificada procedente de medusa común (*Aurelia aurita*) se secó hasta un peso constante en un secador que

5 contiene gel de sílice, y se recogió una alícuota de la misma de 20 mg en una botella de pesada y se dejó en un secador ajustado a una humedad relativa (RH) de aproximadamente 79% (25°C) con una disolución acuosa saturada de sulfato de amonio. Se midió la ganancia de peso de esta muestra con el tiempo, y la cantidad de la ganancia de peso se mostró como la cantidad de agua absorbida. Los resultados se muestran en la Tabla 1 a continuación.

10 Por otro lado, se midieron las propiedades humectantes de manera similar según lo siguiente: la glucoproteína de tipo mucina purificada procedente de medusa común (*Aurelia aurita*) se secó hasta peso constante en un secador que contiene gel de sílice, y se recogió una alícuota de la misma de 20 mg en una botella de pesada y, tras la adición de 10% de agua, se dejó en un secador ajustado a RH de aproximadamente 49% con una disolución acuosa saturada de hidróxido sódico. La pérdida de peso de esta muestra se midió después de 24 horas, y se calculó la cantidad de agua retenida. Los resultados también se muestran en la Tabla 1 a continuación.

15 Estos dos valores medidos se determinaron como valores relativos usando ácido hialurónico como sustancia patrón, que tiene propiedades humectantes e higroscópicas elevadas y que se ha usado como componente humectante en materiales cosméticos.

Tabla 1

| | Propiedades higroscópicas (RH 79%) | | | Propiedades humectantes (RH 49%) |
|------------------------------|------------------------------------|-----------------------|---------------------|----------------------------------|
| | Después de 6 horas | Después de 19,5 horas | Después de 24 horas | Después de 24 horas |
| Ácido hialurónico | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| Glucoproteína de tipo mucina | 3,0 | 3,0 | 3,0, | 0,6 |

* Los valores se indican como valores relativos con respecto a los valores para ácido hialurónico con un peso molecular nominal de 300 kDa definido como 1.0.

Estos resultados muestran, en cuanto a las propiedades higroscópicas, que la glucoproteína de tipo mucina purificada de la presente invención presenta aproximadamente tres veces las propiedades higroscópicas del ácido hialurónico, y es excelente en propiedades higroscópicas a corto plazo.

20 Estos resultados también muestran, en cuanto a las propiedades humectantes, que la glucoproteína de tipo mucina purificada de la presente invención presenta aproximadamente 60% de las propiedades humectantes del ácido hialurónico, que tiene propiedades humectantes sobradamente elevadas, en una condición de baja humedad de humedad relativa (RH) de 49% o menos.

Aplicabilidad industrial

25 La presente invención proporciona una nueva glucoproteína de tipo mucina. La glucoproteína de tipo mucina se puede usar, por ejemplo, como sustancia sustituta de la mucina humana que tiene una estructura química identificada de forma exacta y es útil en campos tales como campos farmacéutico, agrícola y alimentario. Además, la glucoproteína de tipo mucina se produce fácilmente en grandes cantidades a partir de medusas, y por lo tanto es excelente desde los puntos de vista económico y medioambiental.

30 Además, La presente invención proporciona marcadores de peso molecular que comprenden glucoproteínas de tipo mucina. Los marcadores de peso molecular tienen cadenas poliméricas ramificadas obtenidas a partir de polímeros naturales. El uso de los presentes marcadores de peso molecular permite la determinación exacta de los pesos moleculares de polímeros ramificados tales como glucoproteínas.

Listado de secuencias

- 35 <110> USHIDA, Kiminori MASUDA Akiko DOHMAE Naoshi FURUKAWA Hidemitsu MIYAWAKI Atsushi
- <120> Nueva glucoproteína de tipo mucina y su uso
- <130>
- 40 <140> PCT/JP2006/315939
- <141> 11/08/2006

<150> JP 2005-234108
<151> 12/08/2005

5 <160> 2

<170> PatentIn versión 3.1

10 <210> 1
<211> 8
<212> PRT
<213> *Aurelia aurita, Chrysaora melanaster*

15 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa es Val o Ile

20 <400> 1

Val Xaa Glu Thr Thr Ala Ala Pro
1 5

25 <210> 2
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Thr Thr Ser Thr Thr Ser Ala Pro
1 5

REIVINDICACIONES

1. Glucoproteína de tipo mucina que presenta una estructura repetida que comprende 3 a 2000 unidades que se repiten, teniendo cada una, una secuencia de aminoácidos representada por la fórmula I:



5 [en la que Xaa representa Val o Ile],

en la que uno o más restos de aminoácidos en la estructura están unidos a una cadena de azúcar que consiste en uno o más monosacáridos.

2. Glucoproteína de tipo mucina según la reivindicación 1, en la que la glucoproteína de tipo mucina tiene una estructura repetida que comprende 3 a 700 unidades que se repiten.

10 3. Glucoproteína de tipo mucina según la reivindicación 1 ó 2, en la que la glucoproteína de tipo mucina tiene una estructura repetida que comprende 40 a 180 unidades que se repiten.

4. Glucoproteína de tipo mucina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que las unidades que se repiten están unidas directamente entre sí, o están unidas vía un ligador o ligadores.

15 5. Glucoproteína de tipo mucina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el resto de aminoácido unido a una cadena de azúcar es treonina (Thr).

6. Glucoproteína de tipo mucina según la reivindicación 5, en la que el 98% o más de los restos de aminoácidos unidos a una cadena de azúcar es treonina (Thr).

20 7. Glucoproteína de tipo mucina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la cadena de azúcar comprende un monosacárido seleccionado de entre el grupo constituido por N-acetilgalactosamina, galactosa, N-acetilglucosamina, ácido siálico, arabinosa, y fucosa.

8. Glucoproteína de tipo mucina según la reivindicación 7, en la que la cadena de azúcar comprende N-acetilgalactosamina.

9. Glucoproteína de tipo mucina según la reivindicación 7 u 8, en la que la cadena de azúcar comprende N-acetilgalactosamina y galactosa.

25 10. Glucoproteína de tipo mucina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que se suprimen uno o varios aminoácidos en el término N de la estructura que se repite.

11. Glucoproteína de tipo mucina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que la glucoproteína de tipo mucina es como se extrae a partir de una medusa.

30 12. Método para producir una glucoproteína de tipo mucina según la reivindicación 1, que comprende las siguientes etapas que consisten en:

cortar las porciones sólidas de una medusa;

extraer los cortes de la medusa con una disolución salina;

separar mediante centrifugación mucina bruta del extracto;

extraer con etanol la mucina bruta;

35 separar mediante centrifugación un precipitado obtenido de la extracción;

disolver en agua el precipitado;

separar un sobrenadante mediante centrifugación y diálisis; y

purificar una glucoproteína de tipo mucina según la reivindicación 1,

en el que todas las etapas se llevan a cabo a 0 a 25°C.

40 13. Composición que comprende una glucoproteína de tipo mucina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

14. Composición según la reivindicación 13, para uso en la protección de células y tejidos, en la retención o absorción de humedad sobre la superficie de la piel, en la promoción de la salud, en la administración de fármacos,

en el tratamiento o prevención de enfermedades, o en aplicaciones antibacterianas.

15. Composición según la reivindicación 13 ó 14, en la que la composición está en forma de una disolución acuosa, membrana, o resina.

5 16. Método para modificar una glucoproteína de tipo mucina, que comprende modificar la cadena de azúcar de una glucoproteína de tipo mucina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 mediante la acción de glucosiltransferasa.

17. Proteína que tiene una estructura repetida que comprende 1 a 2000 unidades que se repiten, teniendo cada una una secuencia de aminoácidos representada por la fórmula I:



10 [en la que Xaa representa Val o Ile].

18. Método para producir una glucoproteína, caracterizado porque comprende la unión de por lo menos un resto de aminoácido en una proteína según la reivindicación 17 a una cadena de azúcar que consiste en uno o más monosacáridos.

15 19. Marcador de peso molecular que comprende una glucoproteína de tipo mucina y que tiene medianas de distribución de pesos moleculares y distribución molecular según se mide mediante un método para determinar el peso molecular absoluto, teniendo la glucoproteína de tipo mucina una estructura repetida que comprende 3 a 2000 unidades que se repiten, teniendo cada una una secuencia de aminoácidos representada por la fórmula I:



[en la que Xaa representa Val o Ile],

20 en la que uno o más restos de aminoácidos en la estructura están unidos a una cadena de azúcar que consiste en uno o más monosacáridos.

20. Marcador de peso molecular según la reivindicación 19, en el que el marcador de peso molecular tiene un peso molecular de 10 a 1.400 kDa.

21. Marcador de peso molecular según la reivindicación 19 ó 20, en el que el marcador de peso molecular se liofiliza.

25 22. Método para producir un marcador de peso molecular, que comprende las siguientes etapas:

someter a una glucoproteína de tipo mucina a cromatografía de exclusión molecular para fraccionamiento, teniendo la glucoproteína de tipo mucina una estructura repetida que comprende 3 a 2000 unidades que se repiten, teniendo cada una una secuencia de aminoácidos representada por la fórmula I:



30 [en la que Xaa representa Val o Ile],

en la que uno o más restos de aminoácidos en la estructura están unidos a una cadena de azúcar que consiste en uno o más monosacáridos;

recoger y purificar las fracciones resultantes; y

medir los pesos moleculares absolutos de las fracciones purificadas.

35 23. Método según la reivindicación 22, que comprende además la etapa de liofilizar las fracciones purificadas.

Fig. 1

Sumario de procedimientos para tratar medusas

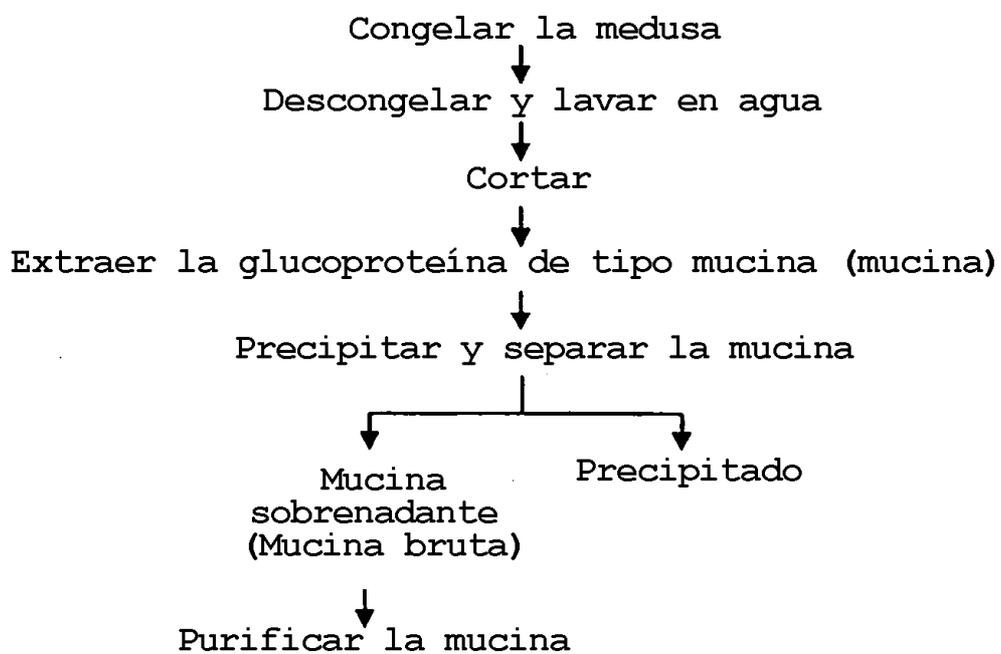


Fig. 2

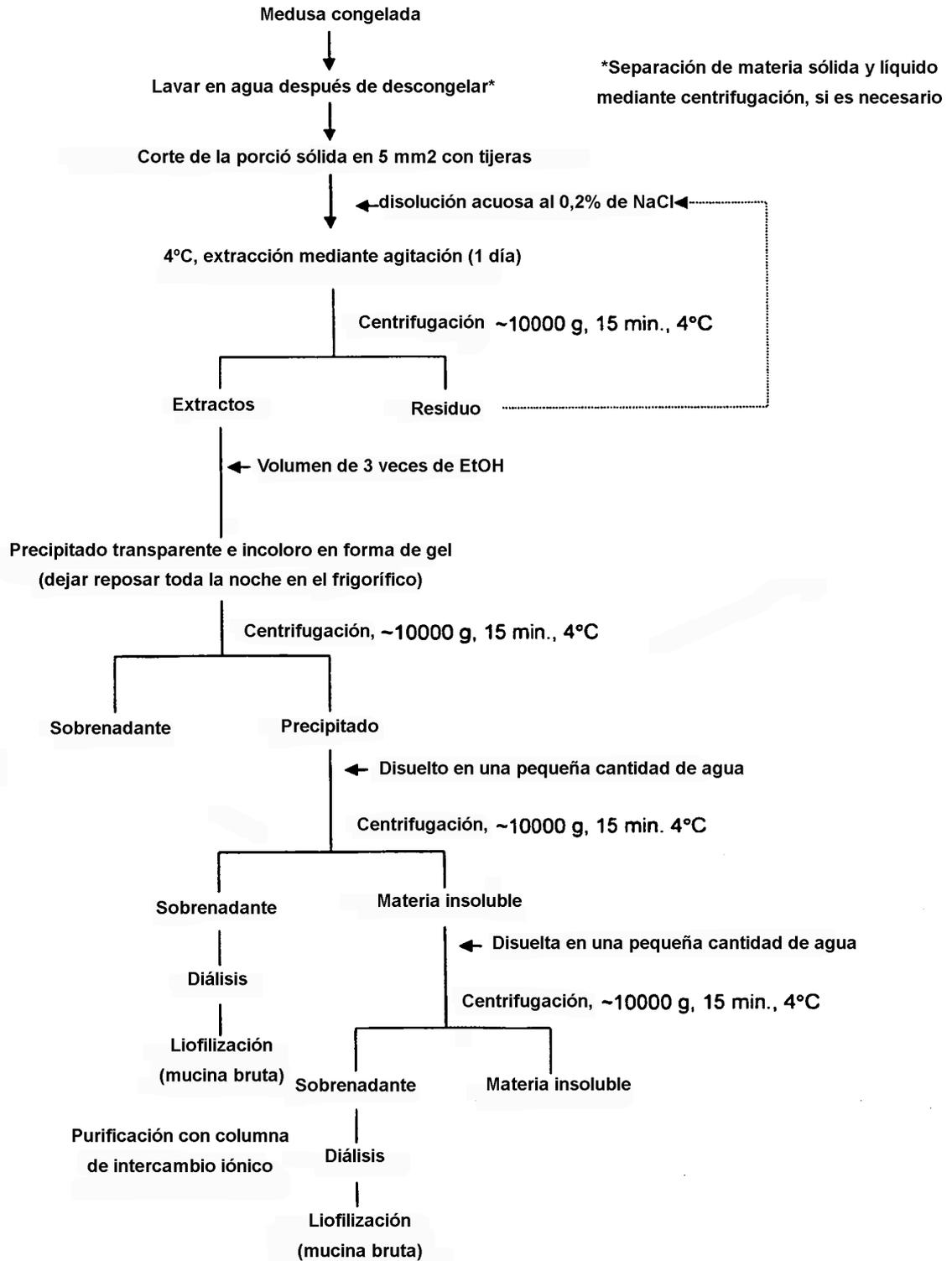


Fig. 3

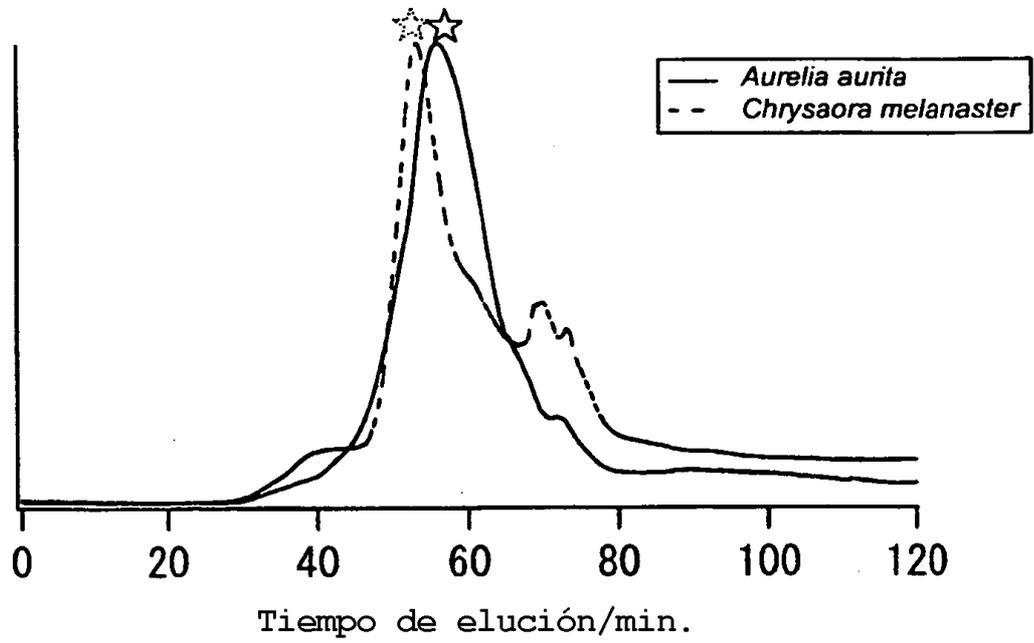
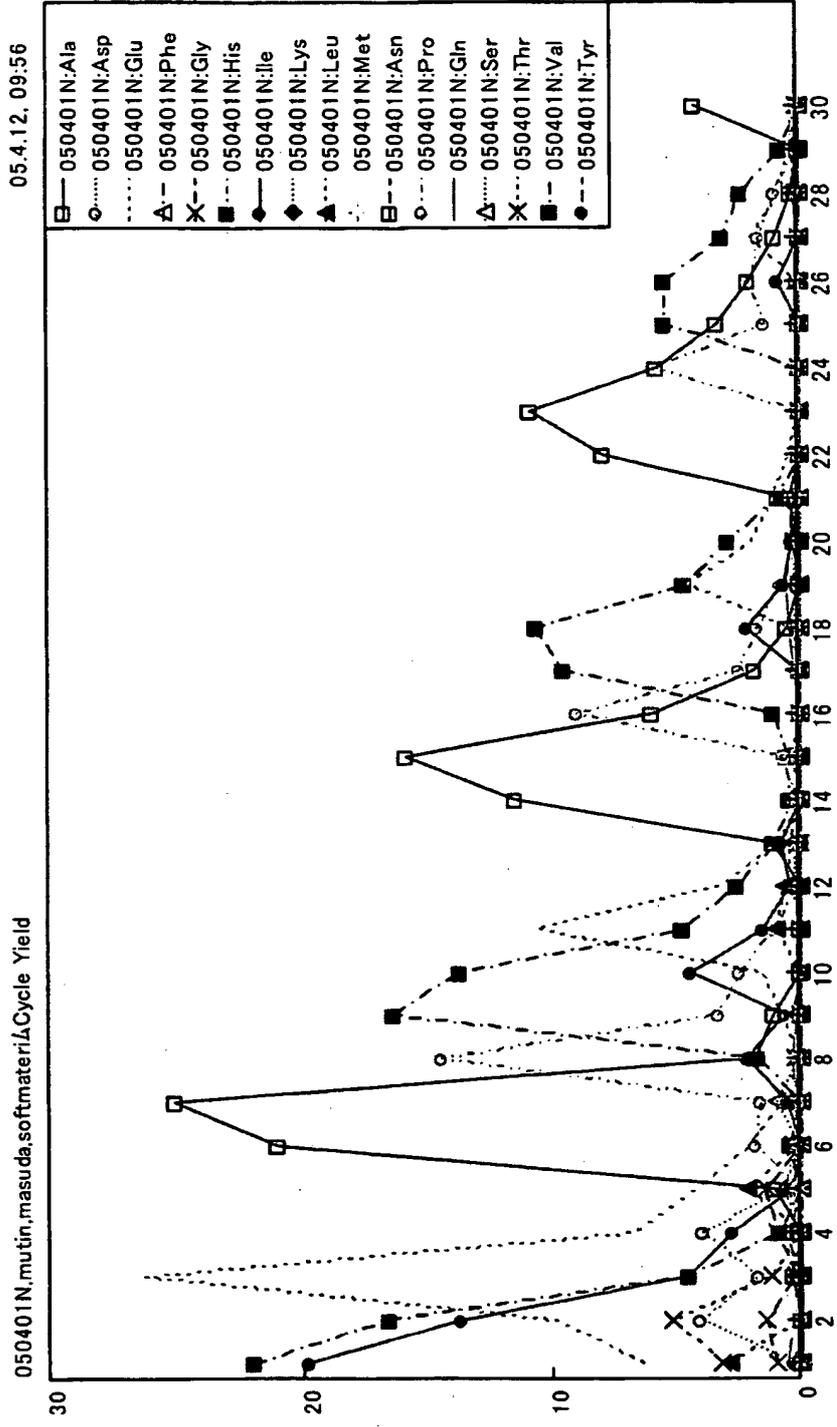


Fig. 4

| Análisis composicional de aminoácidos de <i>Aurelia aurita</i> | | | | Análisis composicional de aminoácidos de <i>Chrysaora melanaster</i> | | | |
|--|------------------------|--------|-----------------------------|--|------------------------|--------|---|
| T.R. | Concentración (nmoles) | Pico | Relación de concentraciones | T.R. | Concentración (nmoles) | Pico | |
| 11,62 | 0,11 | Asp | | 11,59 | 0,03 | Asp | |
| 14,23 | 2,33 | Thr | 2 | 14,327 | 0,78 | Thr | 2 |
| 15,33 | 0,06 | Ser | | 15,473 | 0,05 | Ser | |
| 18,44 | 1,30 | Glu | 1 | 18,657 | 0,46 | Glu | 1 |
| 20,74 | 1,24 | Pro | 1 | 20,883 | 0,39 | Pro | 1 |
| 25,79 | 0,07 | Gly | | 26,207 | 0,06 | Gly | |
| 27,2 | 2,43 | Ala | 2 | 27,563 | 0,80 | Ala | 2 |
| 31,49 | 1,82 | Val | 2 | 31,91 | 0,53 | Val | 2 |
| 35,57 | 0,01 | Met | | 41,167 | 0,14 | Ile | |
| 40,51 | 0,24 | Ile | | 42,967 | 0,02 | Leu | |
| 42,32 | 0,04 | Leu | | 46,31 | 0,01 | Tyr | |
| 45,36 | 0,01 | Tyr | | 49,347 | 0,01 | Phe | |
| 48,3 | 0,04 | Phe | | 55,37 | 0,76 | GaiNH2 | 2 |
| 53,71 | 2,67 | GaiNH2 | 2 | 64,613 | 0,01 | Lys | |
| 54,56 | 0,00 | | | 67,41 | 0,97 | NH3 | |
| 62,61 | 0,08 | Lys | | 69,34 | 0,00 | His | |
| 65,56 | 1,98 | NH3 | | 80,367 | 0,00 | Arg | |
| 79,41 | 0,02 | Arg | | | | | |

Fig. 5-1

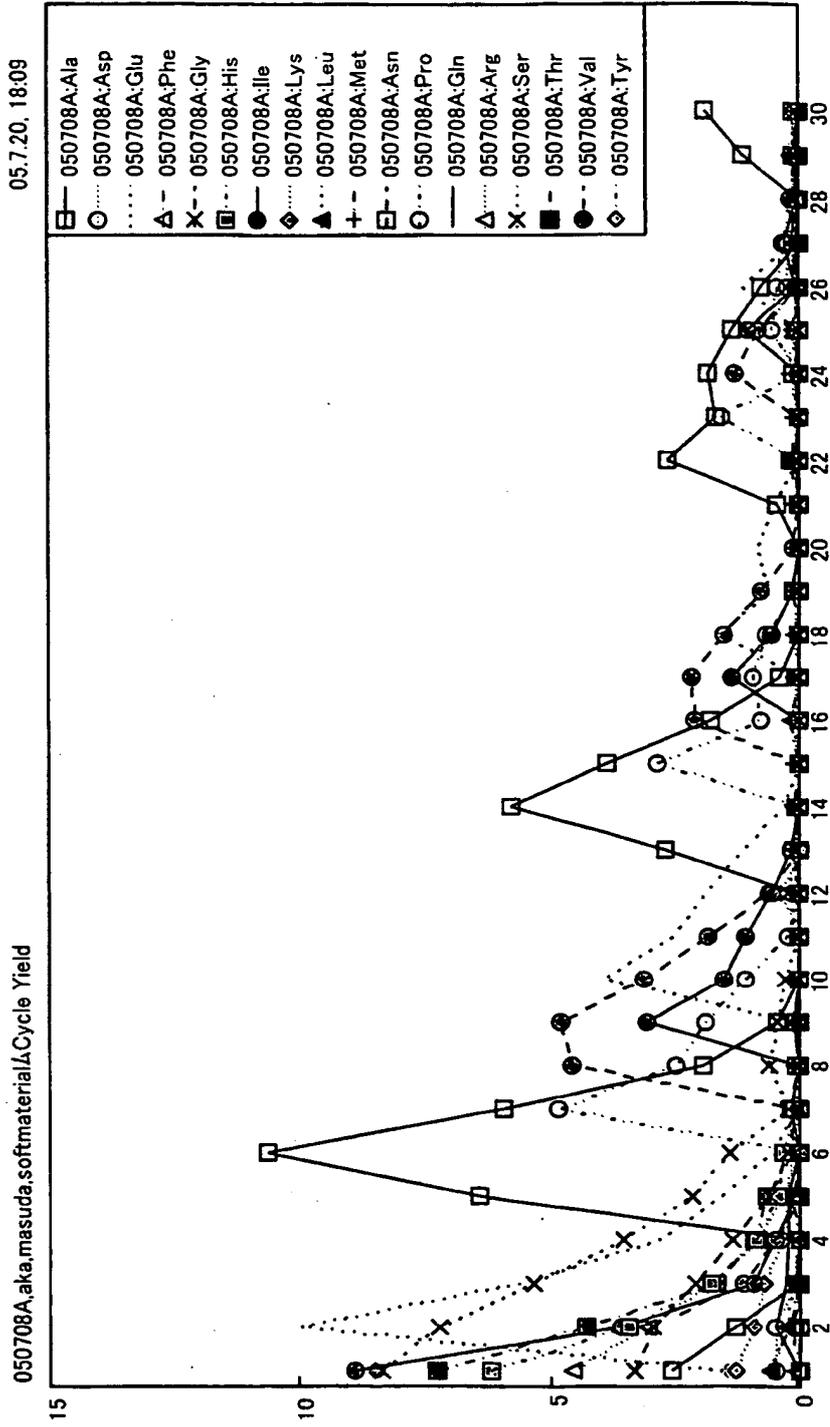
Mucinas de *Aurelia aurita*



Rendimiento corregido del fondo (pmoles) frente a Número de restos

Fig. 5-2

Mucinas de *Chrysaora melanaster*



Rendimiento corregido del fondo (pmoles) frente a Número de restos

Fig. 6-1

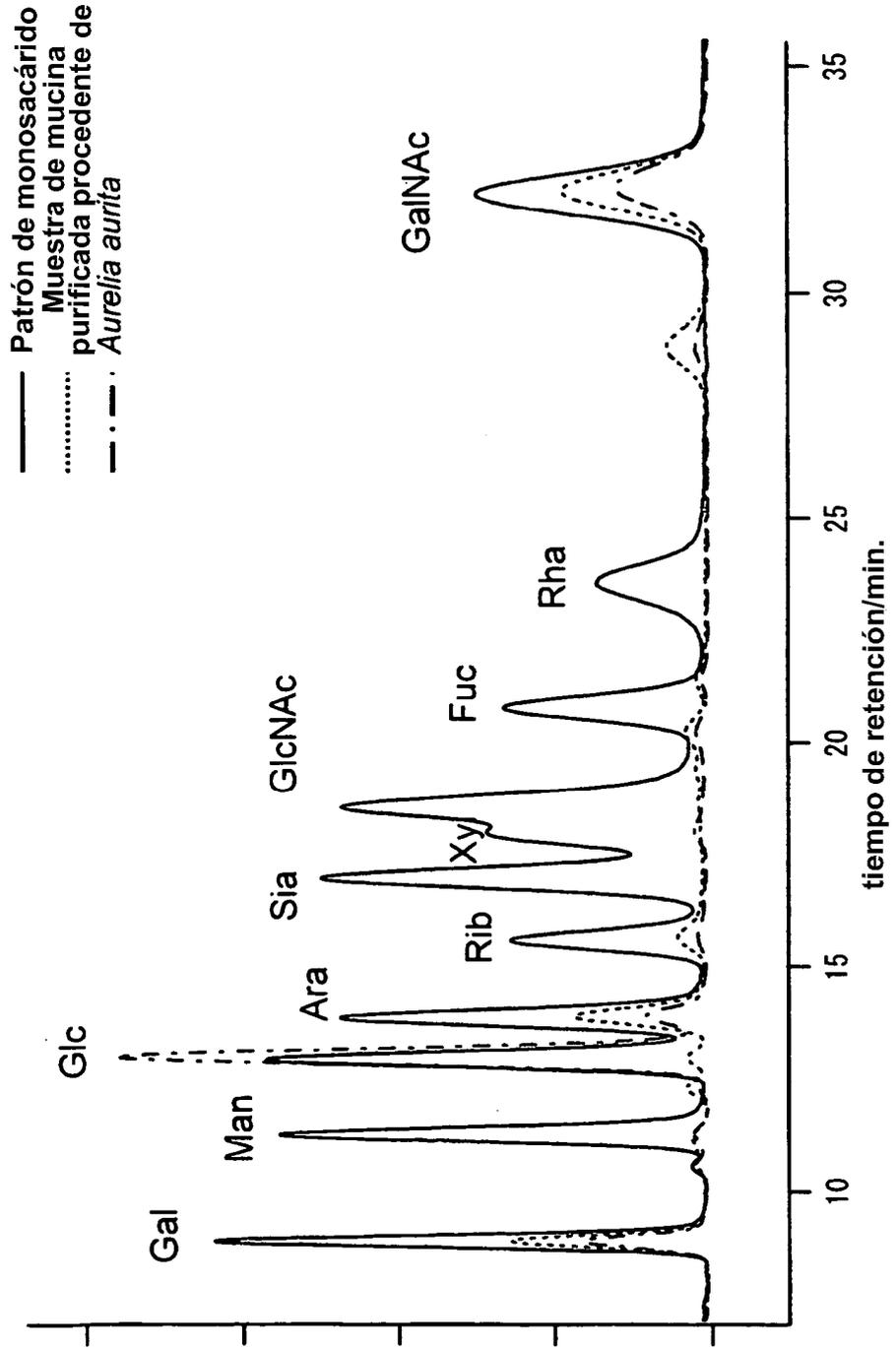


Fig. 6-2

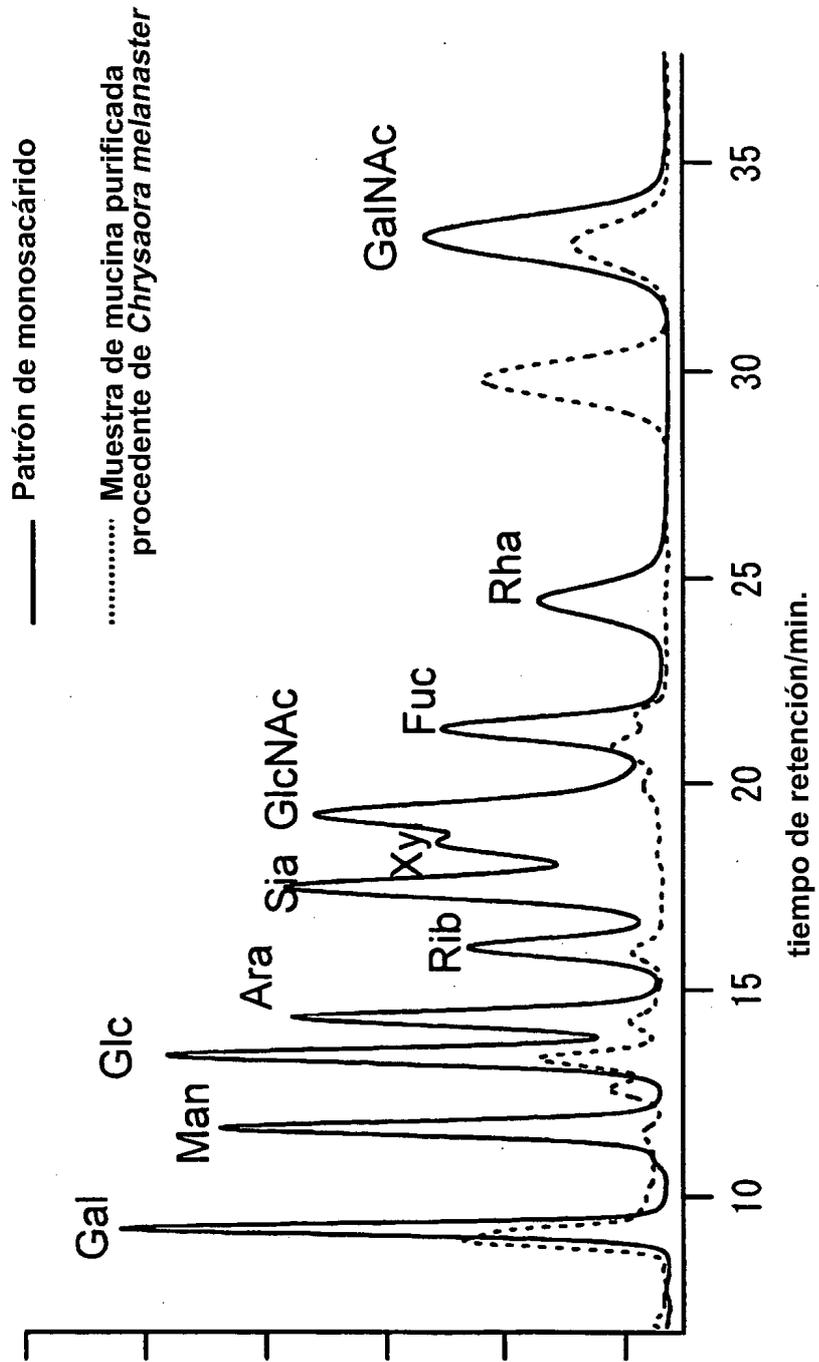
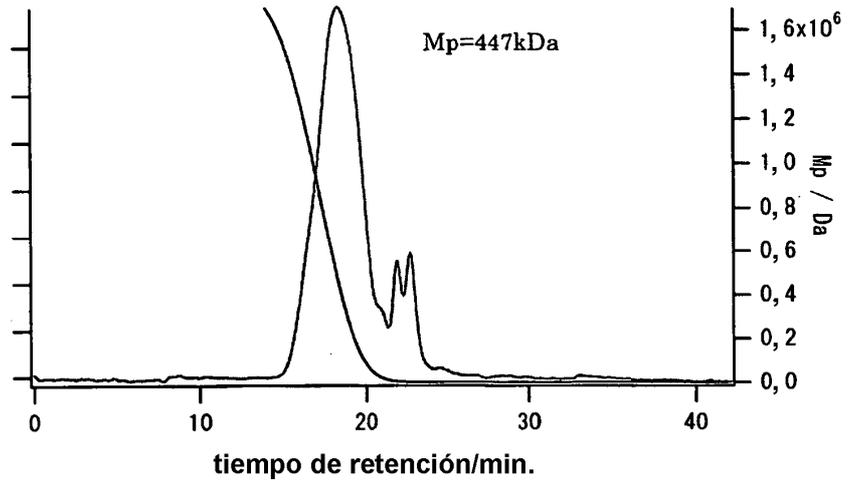


Fig. 7

A



B

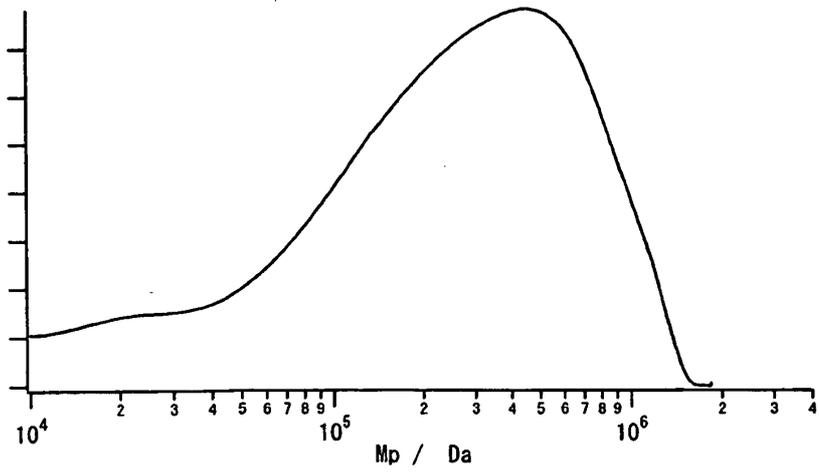


Fig. 8

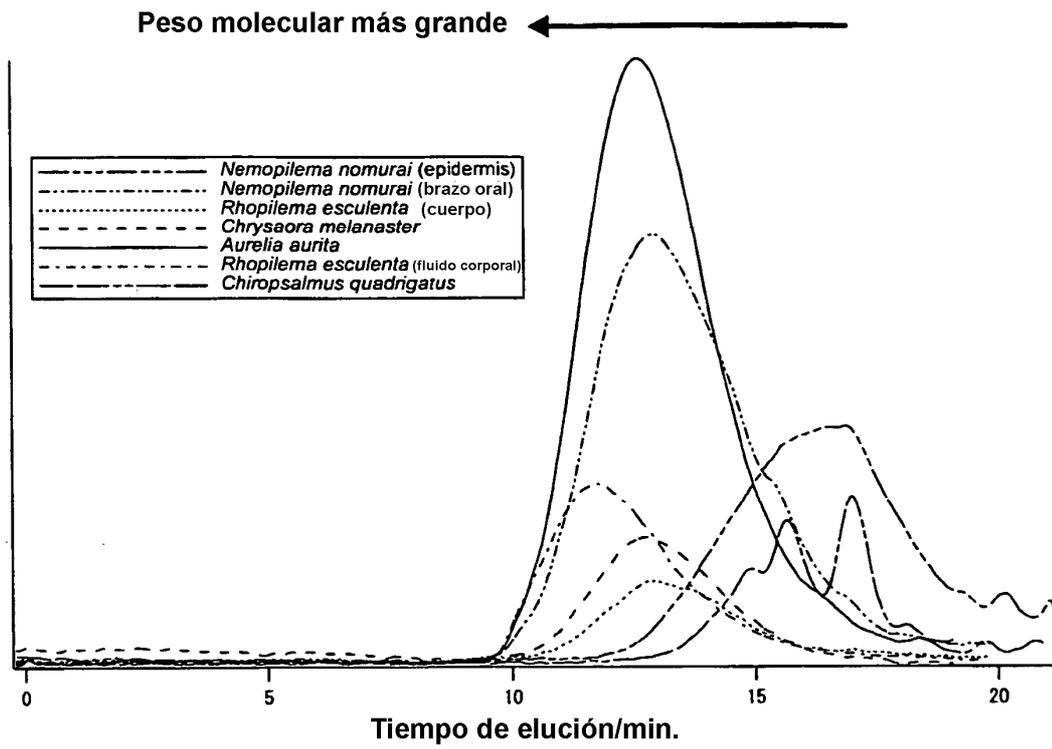


Fig. 9

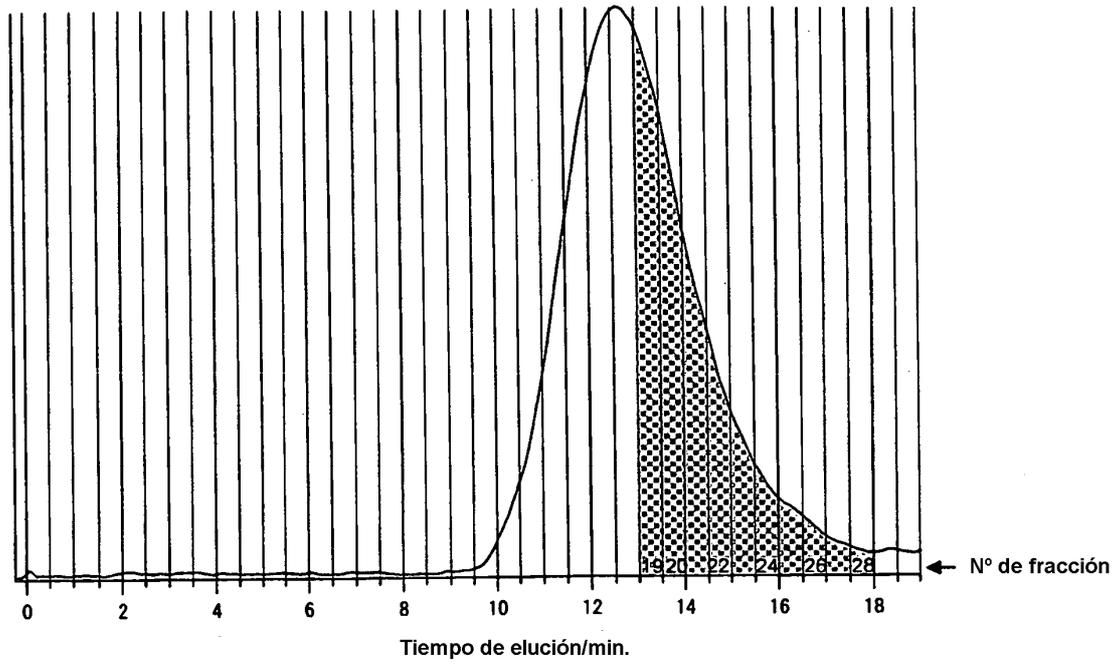


Fig. 10-1

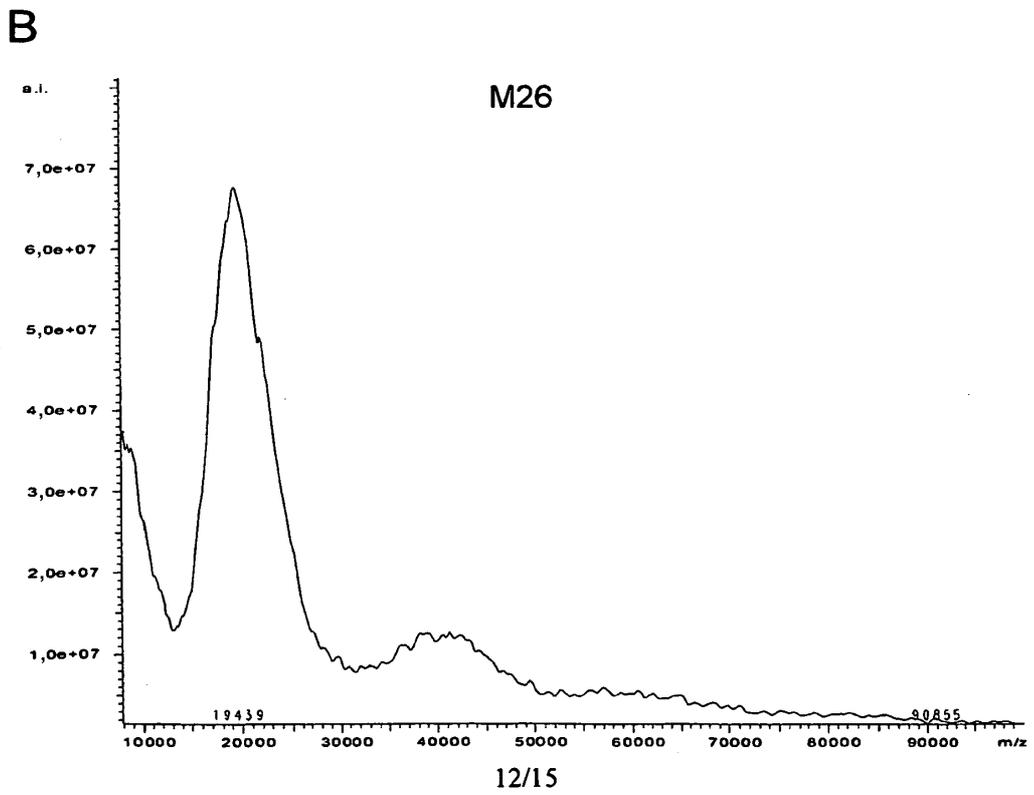
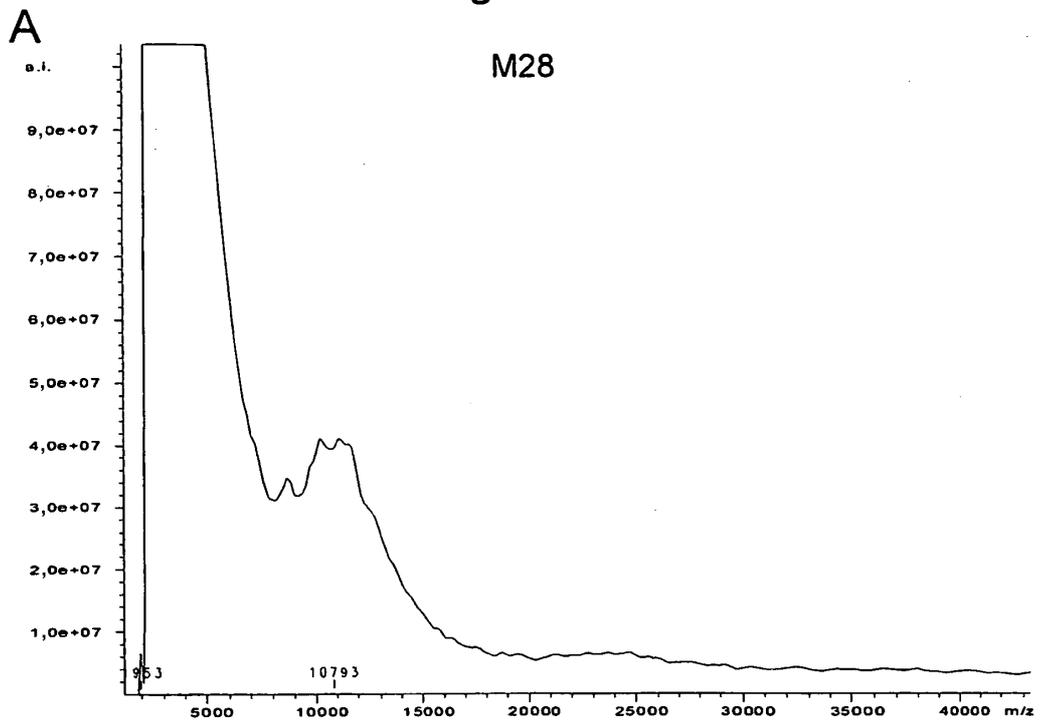
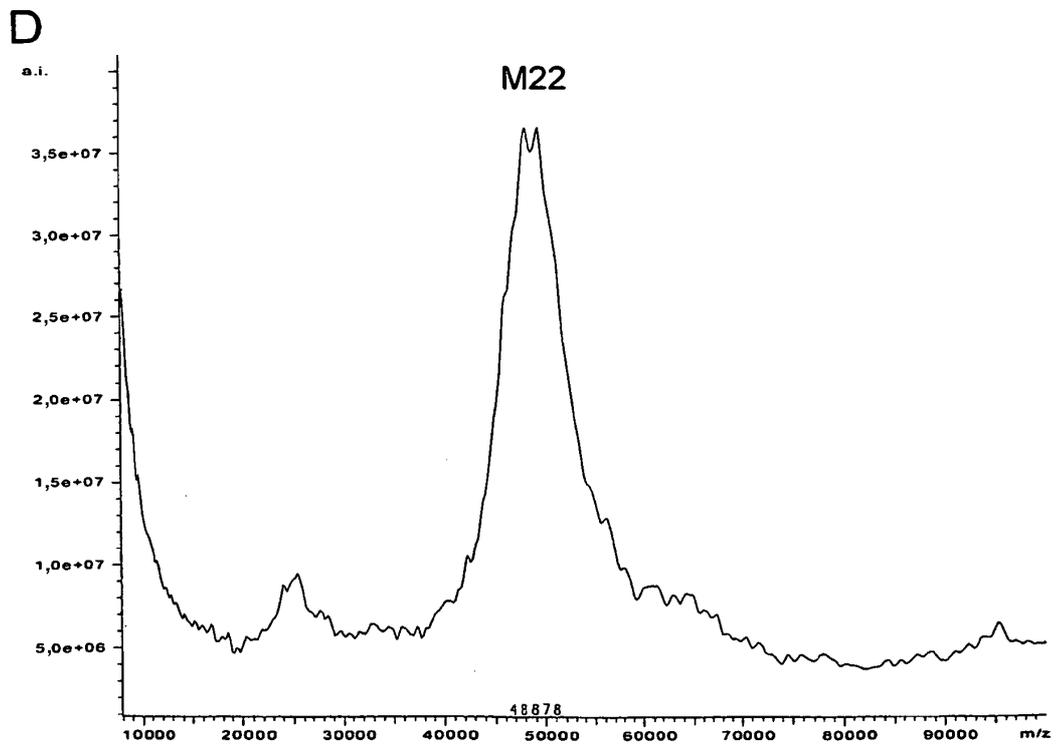
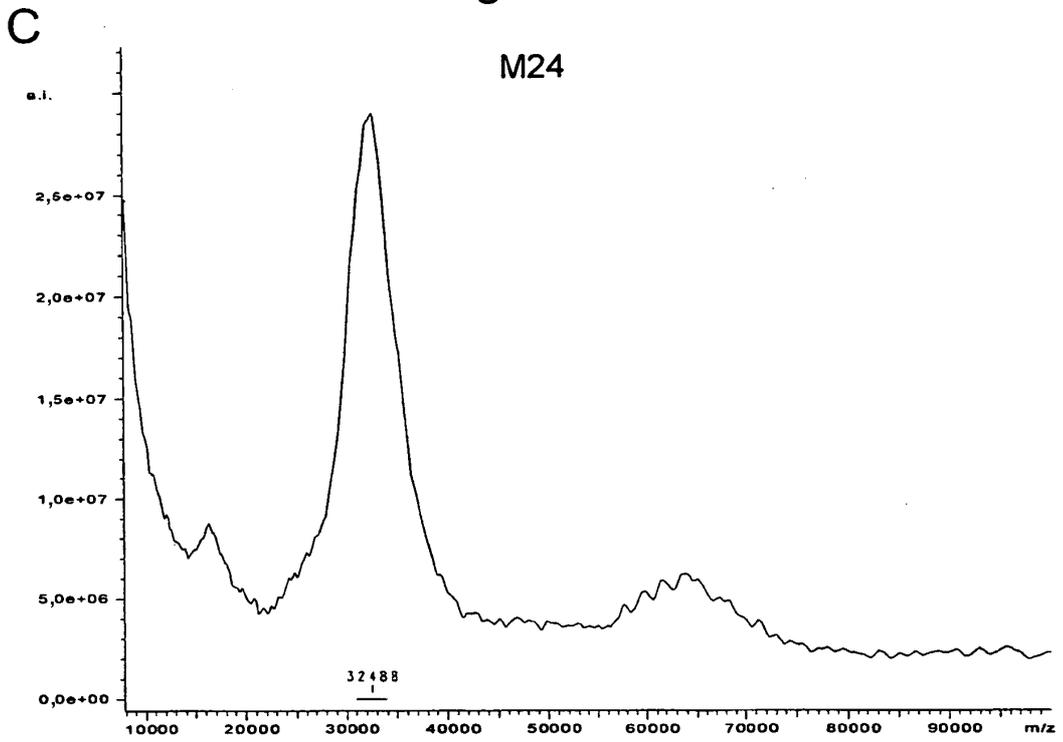
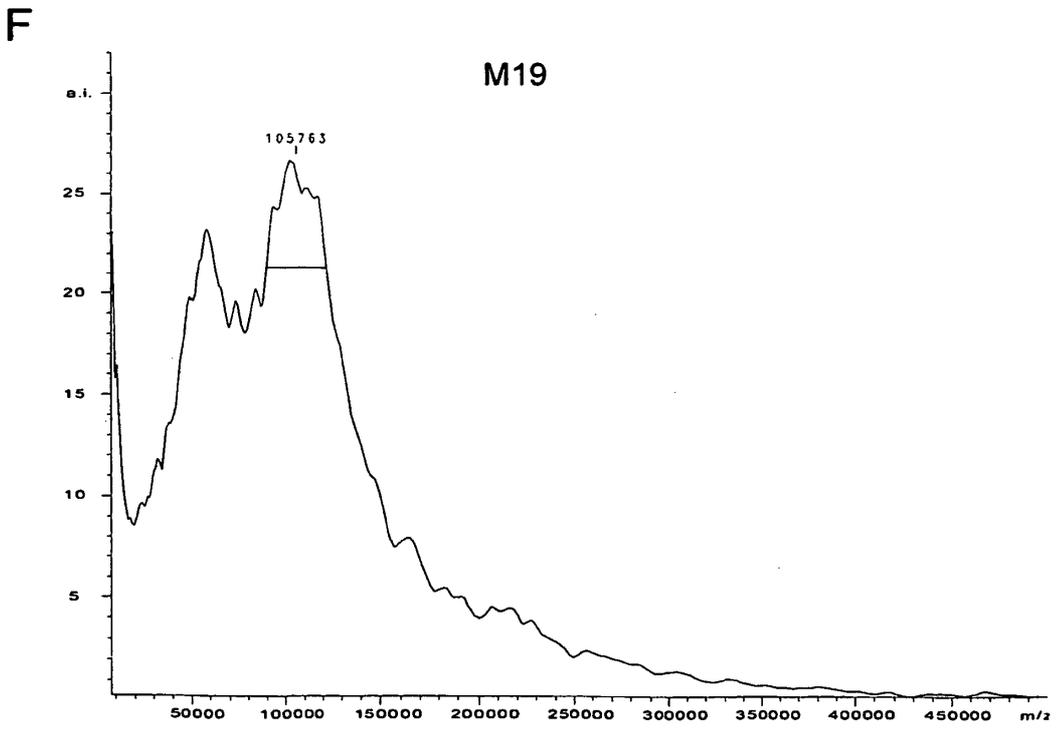
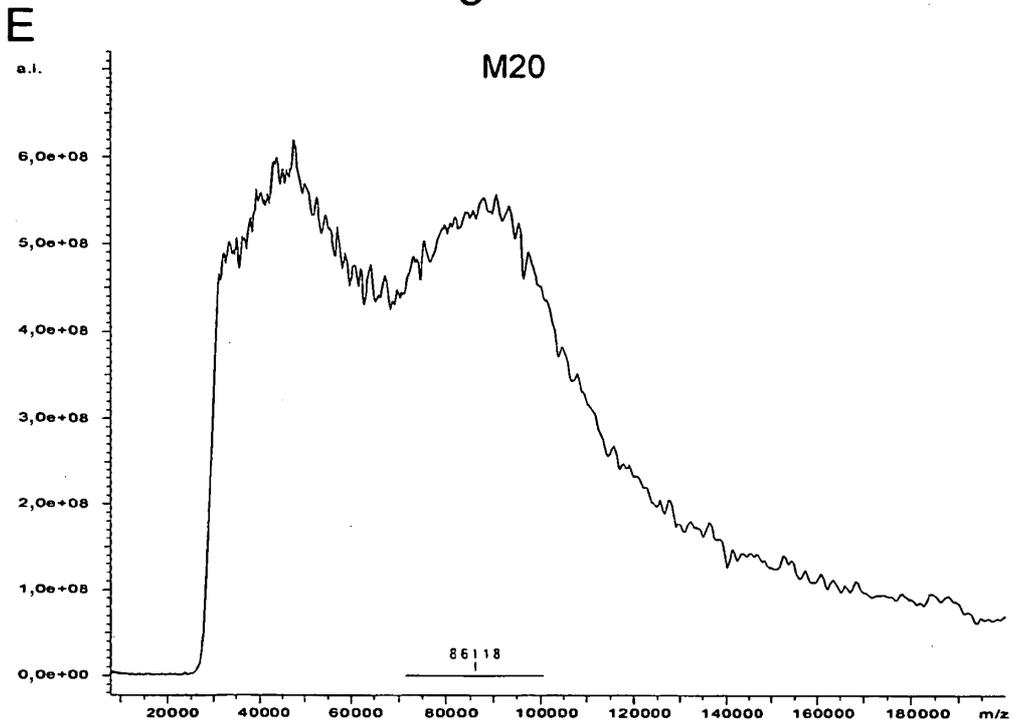


Fig. 10-2



13/15

Fig. 10-3



14/15

Fig. 11

