

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 541**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/415** (2006.01)

**C07K 1/34** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.04.2010 E 10713337 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.11.2014 EP 2417153**

54 Título: **Filtración de un líquido que comprende una proteína de estrés de plantas**

30 Prioridad:

**09.04.2009 EP 09157774**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**10.12.2014**

73 Titular/es:

**ALFA BIOGENE INTERNATIONAL B.V. (100.0%)  
Industrie Strasse 9  
48455 Bad Bentheim, DE**

72 Inventor/es:

**SEIFARTH, FRIEDRICH C. y  
LAX, JULIA**

74 Agente/Representante:

**LAZCANO GAINZA, Jesús**

**ES 2 524 541 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

Filtración de un líquido que comprende una proteína de estrés de plantas

5 La invención se refiere a un método para recuperar una proteína de estrés a partir de una planta.

10 Las proteínas de estrés (denominadas además proteínas chaperonas) se forman por microorganismos, plantas y animales especialmente cuando, como resultado de un cambio en el medio ambiente tal como la exposición al calor, radiación o productos químicos, se expresan los denominados genes susceptibles al estrés. De acuerdo con los puntos de vista actuales, tales proteínas pueden contribuir a una protección contra los efectos perjudiciales resultantes de tales cambios ambientales. Por esa razón, el uso de proteínas de estrés está en el centro de interés de, *entre otras cosas*, la medicina, la biología molecular, la industria cosmética y la industria que desarrolla productos para la protección de plantas.

15 Se sabe que las proteínas de estrés tienen una serie de importantes funciones terapéuticas naturales en plantas y animales, que incluyen a los seres humanos. Estas proteínas están implicadas como reguladoras en la síntesis de proteínas y el plegamiento de proteínas. Además, una función importante reside en la regulación de la función de genes durante el crecimiento, pero además durante la muerte celular. Las proteínas de estrés son capaces de estimular el sistema inmunológico tanto en seres humanos como en animales, y la investigación clínica ha demostrado que las proteínas chaperonas contribuyen positivamente en la lucha contra el cáncer.

20 Sin embargo, la disponibilidad de proteínas de estrés tales como la HSP70 y otras proteínas de choque térmico es un problema ya que frecuentemente se aíslan a partir de cerebro bovino. Además de las pequeñas cantidades que pueden aislarse a partir de allí y el extremadamente alto costo acompañante, la posible presencia de BSE en el encéfalo es un gran impedimento para el uso de estas proteínas. La HSP70 puede producirse además a partir de microorganismos y células cancerosas, pero estos métodos de producción también son caros y sólo dan un rendimiento bajo.

25 Las alternativas a la producción de las proteínas de estrés, particularmente para usos médicos, se encuentran en el campo de la producción de proteínas de fusión con la ayuda de sistemas de expresión. Los posibles problemas que pueden continuar existiendo son el precio elevado y las pequeñas cantidades que se pueden producir.

30 Las proteínas de estrés de origen vegetal podrían ofrecer una alternativa. Debido a que la producción de proteínas de estrés depende de la condición en que está la célula, un cambio en las circunstancias fuera de la célula puede aumentar enormemente la síntesis de las proteínas de estrés en la célula vegetal.

35 El documento WO 2005/049645 describe un método para recuperar una proteína de choque térmico, que comprende someter un fluido que comprende la proteína de choque térmico a (a) precipitación; después de eso a (b) al menos una separación por intercambio de iones; y después de eso a (c) al menos una separación por afinidad. Aunque tal método es adecuado para obtener proteínas de choque térmico con un alto grado de pureza y actividad, pueden presentarse problemas con respecto a un bloqueo de la línea del proceso después de la precipitación, particularmente cuando el proceso se lleva a cabo a escala industrial.

40 Los inventores han evaluado varias técnicas de separación para el precipitado, tales como centrifugación o una técnica de filtrado convencional las que se han encontrado ser problemáticas, especialmente cuando se emplean a escala industrial.

45 Particularmente se han observado problemas con respecto al bloqueo durante una purificación adicional de la proteína, especialmente en una unidad de concentración de proteína de estrés (*por ejemplo* una unidad de ultrafiltración), una unidad de diálisis y/o una unidad de cromatografía después del precipitado. Es un hallazgo de los inventores que tal problema ocurre especialmente cuando la proteína de estrés se recupera a partir de hojas.

50 Adicionalmente, se encontró que la separación basada en fuerzas centrífugas (usando un separador de discos (SC6-06-576, Westfalia), 12000 rpm) fue insatisfactoria. Se contempla que la fuerza g requerida para efectuar la separación es mayor que la alcanzable con el separador de discos que se usó, para hacer que esta técnica sea práctica a escala industrial. Cuando se usó la decantación, se observó una considerable formación de espuma en el flujo inferior que comprende la HSP, dicha formación de espuma no se desea ya que puede causar desbordamientos de espuma fácilmente (con la pérdida de producto) y debido al contacto íntimo con el aire la proteína de estrés tiende a sufrir oxidación.

55 Es un objetivo de la invención proporcionar un nuevo método para recuperar una proteína de estrés, en particular un método que pueda emplearse satisfactoriamente a una escala industrial.

Es un objetivo adicional de la invención proporcionar un nuevo método con menor tendencia al bloqueo de los equipos usados en una etapa de purificación de la proteína de estrés.

5 Es un objetivo adicional de la invención proporcionar un nuevo método que permita la recuperación de una proteína de estrés a partir de un líquido, particularmente de un jugo de la planta, con un alto rendimiento y una pureza satisfactoria.

Uno o más de otros objetivos que pueden resolverse de acuerdo con la invención son evidentes a partir de la presente descripción y/o reivindicaciones.

10 Ahora se ha encontrado que es posible cumplir con uno o más de dichos objetivos mediante la adición de agentes auxiliares específicos al líquido que comprende la proteína de estrés, obtenido a partir de una planta.

15 En consecuencia, la presente invención se refiere a un método para recuperar una proteína de estrés a partir de una planta, que comprende someter a filtración un líquido que comprende proteína de estrés, obtenido a partir de una planta, en donde para la filtración se usa un agente auxiliar de filtro fibroso y un polvo mineral.

En particular, la presente invención se refiere a un método para recuperar una proteína de estrés a partir de una planta, que comprende

- 20
- a) obtener un líquido que comprende la proteína de estrés a partir de la planta;
  - b) precipitar uno o más componentes distintos de la proteína de estrés del líquido;
  - c) adicionar un auxiliar de filtro fibroso y un polvo mineral al líquido; después
  - 25 d) someter el líquido que comprende la proteína de estrés, el(los) componente(s) precipitado(s), el auxiliar de filtro fibroso y el polvo mineral a una primera etapa de filtración, lo que separa de esta manera el(los) componente(s) precipitado(s), el auxiliar de filtro fibroso y el polvo mineral del filtrado que comprende la proteína de estrés; después de eso
  - e) someter el filtrado de la filtración (d) a una segunda etapa de filtración, particularmente una etapa de pulido; y
  - 30 f) purificar la proteína de estrés.

La invención se refiere además al uso de al menos un polvo mineral seleccionado del grupo de tierra de diatomeas y perlita para eliminar al menos un compuesto seleccionado del grupo de clorofila, carotenoides y lípidos de un líquido, particularmente de un jugo de la planta, que contiene una proteína de estrés, particularmente una proteína de choque

35 térmico. En una modalidad específica, el polvo mineral se usa en combinación con partículas fibrosas orgánicas.

De acuerdo con la invención, se ha encontrado que es posible aumentar la productividad del fluido a partir del que se va a aislar la proteína de estrés en comparación con un método de acuerdo con WO 2005/049645 (empleado en una escala comparable), mientras que se mantiene una pureza y una actividad de la proteína de estrés satisfactorias. Al menos en

40 algunas modalidades, un método de acuerdo con la invención resulta en un rendimiento mejorado de la proteína de estrés.

Adicionalmente, se ha encontrado que un método de acuerdo con la invención puede operarse durante un largo tiempo, sin un bloqueo inaceptable en la etapa de filtración o de otra etapa del método.

45 Particularmente, se ha encontrado que la fracción que comprende la proteína de estrés (enriquecida en proteína de estrés, en comparación con el líquido antes de la primera filtración) después de la segunda etapa de filtración adicional tiene una alta claridad óptica. Particularmente se ha encontrado que es posible que la filtración sea muy adecuada para rubisco, clorofila y/o enzimas proteolíticas.

50 Un método de acuerdo con la invención es particularmente adecuado para recuperar una proteína de choque térmico de una planta, más particularmente una o más proteínas de choque térmico seleccionadas del grupo de HSP40, HSP60, HSP70 y HSP90.

El término "o" como se usa en la presente se define como "y/o" a menos que se especifique de cualquier otra manera.

55 El término "un" o "una" como se usa en la presente se define como "al menos uno" a menos que se especifique de cualquier otra manera.

60 Cuando se hace referencia a una porción (*por ejemplo*, un compuesto) en singular, el plural está destinado a ser incluido, a menos que se especifique de cualquier otra manera.

Como se refiere en la presente, los compuestos en abundancia son compuestos que se encuentran en gran cantidad (en comparación con la proteína de estrés) en el líquido a partir del que puede producirse la proteína de estrés deseada, tales como proteínas y otros compuestos peptídicos y otros contaminantes que no son las proteínas de estrés. Ejemplos típicos de compuestos en abundancia son la clorofila y proteínas tales como los complejos de clorofila con "proteínas de unión a la clorofila", rubisco, enzimas (por ejemplo proteasas, fosfatasa y polifenol oxidasas) y otras proteínas presentes en el líquido en un grado tal que impiden la producción eficiente de la proteína de estrés. En la presente las proteínas inconvenientes, tal como rubisco, "proteína de unión a la clorofila" y complejos de proteínas con clorofila se denominan como proteínas en abundancia. Adicionalmente, el término 'compuestos en abundancia' incluye restos celulares de la planta, tales como restos de la pared celular y ADN.

Particularmente el líquido puede ser a partir de al menos una parte de la planta seleccionada de hojas, tallos, raíces y flores. Antes de obtener el líquido a partir del material vegetal el material de la planta (cosechada) puede tratarse mediante un tratamiento de inducción de HSP. Ejemplos de tales tratamientos son conocidos en la técnica, *por ejemplo* de WO 00/70931 o WO 02/98910. Un tratamiento térmico se puede llevar a cabo al someter el material vegetal cosechado a una temperatura en el intervalo de 20 a 60 °C, preferentemente 30 a 50 °C con mayor preferencia 35 a 45 °C. La duración puede elegirse en un amplio intervalo, *por ejemplo* de 0.1-100 horas, preferentemente 1-12 horas.

El líquido puede obtenerse de una manera conocida *per se*, *por ejemplo* al comprimir/presionar o mediante una extracción de líquido. Métodos de preparación adecuados para tal líquido se conocen, *por ejemplo* de WO 00/70931 y S. Lewis y otros, *Ecotoxicology* 8, 351 - 368 (1999). La extracción puede llevarse a cabo *por ejemplo* con agua u otro disolvente en el que se disuelvan las proteínas de estrés. A partir del líquido en bruto obtenido a partir de la planta, pueden eliminarse los restos celulares y otras partículas relativamente grandes, antes de la precipitación. Con tal propósito el tamizado es particularmente adecuado (*por ejemplo* mediante el uso de una malla con un tamaño de malla de 20 µm o más).

Preferentemente la proteína de estrés se obtiene a partir de una planta seleccionada del grupo de *Fabaceae*, *Chenopodiaceae*, *Solanaceae* y *Poaceae*, particularmente del grupo de la alfalfa (mielga), el trigo, el maíz, el arroz, la soya, la remolacha, la cebada, la avena, más particularmente del grupo de la alfalfa, el trébol, la avena y la cebada. En particular se han logrado buenos resultados con un líquido (jugo de la planta) obtenido de alfalfa, especialmente de las hojas y/o tallos de esta.

El material vegetal utilizado para obtener el líquido puede haber sido tratado después de la cosecha mediante un tratamiento de inducción de HSP. Los ejemplos de tales tratamientos son conocidos en la técnica, *por ejemplo* de WO 00/70931 o WO 02/98910.

El líquido que comprende la proteína de estrés que se obtiene a partir de la planta usualmente será un líquido acuoso. Aunque una o más de otras sustancias líquidas, particularmente una o más de otras sustancias líquidas polares (*por ejemplo* glicerol (que es un líquido por encima de 18 °C), mercapto-etanol, isopropanol, ver más abajo) pueden añadirse al líquido antes de la filtración, el agua será usualmente el disolvente principal en el líquido que se somete a filtración. Particularmente, el contenido de agua del líquido que se filtra puede ser de 60-100 % en peso, basado en el total de sustancias líquidas, más particularmente 80-100 % en peso, basado en el total de sustancias líquidas, incluso más particularmente 95-100 % en peso basado en el total de sustancias líquidas. Una sustancia líquida, como se usa en la presente es un compuesto que tiene un punto de fusión por debajo de la temperatura de filtración y un punto de ebullición por encima de la temperatura de filtración, *por ejemplo* una sustancia con un punto de fusión por debajo de 20 °C, o por debajo de 4 °C a 1 atmósfera y un punto de ebullición por encima de 40 °C.

El pH del líquido sometido a filtración, medido a 25 °C con un medidor de pH (pH 3301 WTW) usualmente está en el intervalo de pH de 5-9, particularmente en el intervalo de 6-9; el pH del líquido puede llevarse a dicho intervalo al añadir un ácido o una base. Pueden añadirse uno o más aditivos al líquido, particularmente al menos un aditivo seleccionado de tampones (preferentemente tamponar el disolvente a un pH alcalino) inhibidores de proteasa tales como el fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), Pefabloc SC, leupeptina, pepstatina, estabilizadores de proteínas tales como iones metálicos mono- y divalentes (*por ejemplo*, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>), antioxidantes tales como ascorbato, ditiotreitolo, ditiogeritrol, β-mercaptoetanol, ditionito sódico, dietilditiocarbamato sódico, *etc.* y anti-desnaturalizantes tales como glicerol, mono-, di-, y oligosacáridos (*por ejemplo*, glucosa, sacarosa, trehalosa), alcoholes de azúcar (*por ejemplo* sorbitol, inositol), etilenglicol y polietilenglicol (particularmente los que tienen un peso molecular en el intervalo de 2 a 40 kDa), agentes quelantes tales como EDTA y EGTA y similares.

El experto sabrá cómo elegir las concentraciones y combinaciones adecuadas de dichos aditivos, en base al conocimiento general común y la información descrita en la presente.

5 Como orientación, las concentraciones típicas para inhibidores de proteasas pueden ser de aproximadamente 0.05 µg/ml a aproximadamente 1 mg/ml, para iones metálicos divalentes aproximadamente 0.1 a aproximadamente 10 mM, para antioxidantes aproximadamente 0.1 a aproximadamente 30 mM, anti-desnaturalizantes aproximadamente 5 a aproximadamente 30 % (p/v), y para los agentes quelantes aproximadamente 0.1 a aproximadamente 50 mM.

10 La precipitación (b) puede llevarse a cabo de una manera conocida *per se*, *por ejemplo* de WO 2005/049645. La fracción de la proteína de estrés usualmente es el sobrenadante de al menos una etapa de precipitación; el precipitado usualmente comprende uno o más de otros biopolímeros, tales como otras proteínas, y/o componentes en abundancia, tales como restos de la pared celular, etc.

El sobrenadante que comprende la proteína de estrés puede someterse a la filtración o puede someterse a una etapa de precipitación adicional. Tal proceso de precipitación se denomina precipitación diferencial.

15 El término de precipitación diferencial se usa en la presente para describir un procedimiento de precipitación, en donde primero los componentes distintos de la proteína de estrés preferentemente se precipitan y preferentemente se eliminan del sobrenadante (que comprende la proteína de estrés) en al menos una etapa de precipitación. La precipitación diferencial en la práctica se lleva a cabo al aumentar gradualmente o por etapas el grado de saturación o la concentración de un agente de precipitación. El grado de saturación puede aumentarse al añadir un agente de precipitación, al cambiar la temperatura, al añadir otro disolvente o una combinación de estos.

20 Usualmente, el sobrenadante que comprende la proteína de estrés se somete a la filtración sin precipitación adicional, aunque en principio es posible precipitar la proteína de estrés. En una modalidad en donde la proteína de estrés se precipita, normalmente se resuspende en líquido y después se somete a filtración (después que se han añadido los auxiliares de filtro al líquido).

25 La temperatura durante la precipitación y el resto del proceso de purificación pueden ser la ambiente (*por ejemplo* aproximadamente 25 °C o menos). Por razones prácticas, la temperatura es preferentemente por debajo de aproximadamente 10 °C, con mayor preferencia entre aproximadamente 0 y aproximadamente 4 °C.

30 Los agentes de precipitación adecuados incluyen sales inorgánicas - en particular, sulfato de amonio, cloruro de sodio, y otros halogenuros, sulfatos y fosfatos de metales alcalinos y amoniaco, sales orgánicas, tales como acetatos y citratos de metales alcalinos, y solventes orgánicos tales como acetona, acetonitrilo, y alcoholes (en particular, metanol, etanol, isopropanol).

35 La precipitación puede llevarse a cabo con un agente de precipitación o con varios. Por ejemplo en una primera etapa (que puede ser la única etapa) puede usarse un agente relativamente suave (*por ejemplo* NaCl) en un grado de saturación o concentración en que la proteína de estrés permanece sustancialmente disuelta. Además es posible usar un agente de precipitación relativamente fuerte (*por ejemplo* sulfato de amonio) a una concentración en la que la proteína de estrés permanece sustancialmente disuelta. precipitación en donde una impureza se precipita en una o más etapas mediante el uso de un agente de precipitación, preferentemente sulfato de amonio, en un grado de saturación relativamente bajo (lo suficientemente bajo para mantener la mayoría de las proteínas de estrés en solución), particularmente en un grado de saturación en el intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 %, más particularmente en el intervalo de aproximadamente 30 a aproximadamente 40 % de saturación, que elimina el precipitado del sobrenadante.

45 El líquido que comprende la proteína de estrés después de eso puede someterse de manera ventajosa a la filtración (después de la adición de auxiliares de filtro) sin una etapa de precipitación adicional. Las partículas precipitadas no necesitan separarse del líquido antes de la filtración (d).

50 La filtración (d) es en general una filtración en profundidad. La filtración (d) puede de aquí en adelante ser denominada además como una filtración primaria. La filtración en profundidad ha sido generalmente conocida en la técnica durante décadas, ver *por ejemplo* Ullmans Encyclopadie der technischen Chemie (Verlag Chemie, Weinheim), ver por ejemplo 4ta edición, volumen 2, el capítulo "Filtration" que comienza en la página 154, en particular § 2.3. Con la filtración en profundidad las partículas se eliminan del líquido dentro de la estructura profunda del propio medio de filtrado. Particularmente, las partículas pueden quedar atrapadas mecánicamente en los poros del medio de filtrado o absorbidas en la superficie interna de los poros del medio de filtración.

55 Generalmente, el medio de filtrado se forma de al menos un material de soporte a través del cual puede pasar el líquido y los auxiliares del filtro (el auxiliar de filtro fibroso y el polvo mineral), que típicamente forman una torta de filtración o capa de pre-revestimiento, que se soporta mediante el material de soporte. El propio material de soporte puede tener además

propiedades de filtrado, o puede ser inerte con respecto a la filtración. Los materiales de soporte adecuados generalmente se conocen en la técnica. Por ejemplo el material de soporte de profundidad puede fabricarse de papel, tela o auxiliares del filtro unidos, o puede ser un tamiz tejido plástico o metálico. El tamaño de las aberturas en el material de soporte debe ser lo suficientemente fino para retener sustancialmente las partículas auxiliares del filtro, especialmente el auxiliar del filtro fibroso, y permitir que se forme rápidamente una torta firme, mientras que al mismo tiempo se produce una baja resistencia al flujo. Adecuadamente, se puede usar un material de soporte que tiene poros en el intervalo de 1-50  $\mu\text{m}$ . En particular, el tamaño de poro puede ser al menos 5  $\mu\text{m}$ , más en particular de 10  $\mu\text{m}$  o más o 15  $\mu\text{m}$  o más. En particular, el tamaño de poro puede ser 30  $\mu\text{m}$  o menos, más en particular al menos 25  $\mu\text{m}$  o menos o 20  $\mu\text{m}$  o menos.

El auxiliar de filtro fibroso y el polvo mineral generalmente se añaden al líquido después de la etapa de precipitación (b). Después de eso el líquido se somete a filtración (d).

Los auxiliares del filtro forman una capa porosa (torta de filtración) sobre el material de soporte en donde los sólidos del líquido quedan atrapados. Con esto, se evita el bloqueo inaceptable del material de soporte.

La filtración primaria (d) es particularmente adecuada para eliminar la mayor parte de la pared celular vegetal restante, las proteínas precipitadas (distintas de la proteína de estrés) y otras partes no deseadas de las células (especialmente la clorofila). Se ha encontrado que si el filtrado de esta etapa de filtración no se somete a una etapa de filtración adicional, pueden ocurrir problemas con respecto a la productividad y/o la pérdida de producto más adelante en el método. Particularmente pueden producirse problemas durante la purificación, *por ejemplo* durante la diálisis y/o la cromatografía. Se contempla que, particularmente, parte del auxiliar del filtro puede pasar a través del filtro primario, especialmente si el material de soporte en la etapa de filtración primaria tiene aberturas relativamente grandes con relación al tamaño de partícula promedio de uno o más de los auxiliares de filtro. El uso de un material de soporte con aberturas más pequeñas es una opción en principio, pero resultará en un aumento del requisito de presión para hacer pasar el líquido, un mayor riesgo de bloqueo, y/o puede conducir a la reducción del rendimiento del producto.

Opcionalmente, al filtrado de la etapa de filtración (d) puede añadirse un auxiliar del filtro fibroso y/o un polvo mineral después de lo cual se repite una etapa de filtración (d) al menos una vez. Particularmente esto puede desearse en caso de que las concentraciones de clorofila y/o carotenoides en el líquido obtenido a partir de la planta son altas.

Después de la etapa (final) de filtración (d), se realiza una etapa de filtración secundaria (e). Esta etapa (e) se lleva a cabo generalmente sin adición de polvo mineral. La adición del auxiliar de filtro fibroso no es generalmente requerida. El filtrado de la primera filtración puede someterse a una o más etapas de tratamiento intermedio, pero se han logrado buenos resultados sin tales etapas intermedias, lo que es ventajoso por las razones de proporcionar un proceso relativamente simple. Adicionalmente, la omisión de las etapas intermedias puede ofrecer beneficios ya que mejora el rendimiento de la proteína de estrés. Por ejemplo, la filtración secundaria se lleva a cabo de manera ventajosa sin primero someter el filtrado de la filtración primaria a una etapa de centrifugación.

La filtración secundaria (e) es particularmente adecuada para eliminar el auxiliar del filtro que está presente en el filtrado de la etapa (final) de filtración primaria (d). Además, la filtración secundaria puede ser útil para eliminar uno o más componentes procedentes de la planta que no se han eliminado durante la filtración primaria, de manera que esta etapa puede ser además una parte eficaz en la purificación de la proteína de estrés. Adicionalmente, se ha encontrado que después de la filtración primaria, el filtrado todavía puede comprender impurezas no deseadas, tales como carotenoides y/o lípidos. Sin estar limitados por la teoría, se contempla que, particularmente, si el tamaño de poro del material de soporte en la filtración primaria es tal que una parte (menor) del polvo mineral puede pasar a través de este material, esta parte del polvo mineral después puede contribuir más aún a la eliminación de compuestos no deseados que han pasado a través del filtro primario en el filtrado, junto con la proteína de estrés.

Usualmente se omite la adición de polvo mineral adicional y del auxiliar del filtro fibroso al filtrado de la filtración primaria. Tal filtración secundaria en donde no se añaden auxiliares del filtro al líquido que se va a filtrar (*es decir* al filtrado obtenido de la filtración primaria) puede denominarse además como una etapa de pulido. Para la filtración secundaria puede usarse un filtro (*por ejemplo*, una lámina o membrana de filtro) poroso (*por ejemplo* tejido o no tejido fibroso), *por ejemplo* un material como el descrito anteriormente para el material de soporte. Generalmente, las aberturas en el filtro para la filtración secundaria, son más pequeñas que en la etapa de filtración primaria. Usualmente, el filtro se elige de manera que las aberturas sean de 1  $\mu\text{m}$  o menos. Un tamaño de poro de hasta 0.45  $\mu\text{m}$  se prefiere particularmente ya que este es generalmente suficiente para eliminar los componentes que pueden causar problemas de bloqueo durante una purificación adicional, *por ejemplo*, ultrafiltración, diálisis y/o cromatografía.

Alternativamente, tales componentes pueden eliminarse mediante una filtración por separado, *por ejemplo* al pasar el filtrado

de la filtración secundaria a través de un filtro separado, tal como un medio de filtrado sólido estándar de 0.45  $\mu\text{m}$  o 0.2  $\mu\text{m}$ , como los que están disponibles comercialmente.

5 El límite inferior del tamaño de poro del filtro del filtrado secundario se determina por el tamaño mínimo de poro que permite que la proteína de estrés de interés pase. Para las proteínas de estrés que tienen un peso molecular de 70 g/mol o más, el tamaño de poro usualmente debe ser superior a 0.1  $\mu\text{m}$ , particularmente puede usarse un material de soporte con un tamaño de poro de al menos 0.2  $\mu\text{m}$ . Después de la etapa de filtración secundaria (e), generalmente se obtiene un filtrado transparente que comprende la proteína de estrés. En comparación con el filtrado de la filtración primaria, y particularmente en comparación con el líquido en bruto obtenido a partir del material vegetal (al presionarlo), tal filtrado secundario en particular puede caracterizarse por un bajo coeficiente de extinción a 440 nm y a 676 nm (máximos de absorción de luz de la clorofila), y/o a 330 nm (máximo de absorción de luz de carotenoides), y/o a 260 nm (máximo de absorción de luz del ADN) tal como se miden por Espectroscopía UV/VIS, con relación a la extinción a 280 nm (característica de proteínas).

15 Los inventores han llegado a la conclusión de que es importante usar tanto un auxiliar del filtro fibroso en combinación con un polvo mineral para la eliminación eficiente de componentes no deseados, en particular la clorofila.

20 Una lámina de filtro, un material de soporte para el auxiliar del filtro, un auxiliar del filtro fibroso o un polvo mineral usados en un método de acuerdo con el filtro son preferentemente de naturaleza hidrófila. Los auxiliares hidrófilos del filtro y las láminas hidrófilas del filtro pueden humedecerse por agua, en particular pueden humedecerse mejor con agua que con un líquido apolar (*por ejemplo* hexano u otro hidrocarburo). El experto será capaz de determinar si una lámina de filtro, un filtro fibroso o un polvo mineral son hidrófilos, y por lo tanto si pueden humedecerse con agua, por ejemplo al determinar el ángulo de contacto de una gota de agua sobre una superficie fabricada del mismo material que la lámina de filtro, el auxiliar del filtro fibroso o el polvo mineral, basado en el conocimiento general común y/o en la información proporcionada por el proveedor. Particularmente, el ángulo de contacto  $\theta$  entre una gota de agua y el material (proporcionado como una superficie plana) de un material que puede humedecerse con agua es 0-90  $^\circ$ . Cabe señalar que en la técnica se han descrito auxiliares modificados del filtro cuya superficie se ha fabricado hidrófoba, *por ejemplo* con un surfactante. Como el experto entenderá, tales materiales modificados no son auxiliares hidrófilos del filtro.

30 El porcentaje en peso de auxiliares del filtro fibroso, basado en la suma del peso total del auxiliar del filtro fibroso y el peso total de polvo mineral puede elegirse dentro de amplios límites, típicamente dentro del intervalo de 25 a 95 % en peso. Preferentemente, dicho porcentaje en peso del auxiliar del filtro fibroso es al menos 40 % en peso, en particular al menos 65 % en peso, más particularmente al menos 70 % en peso. Preferentemente, dicho porcentaje en peso del auxiliar del filtro fibroso es 90 % en peso o menos, en particular 85 % en peso o menos, más particularmente 80 % en peso o menos. Un porcentaje relativamente bajo del auxiliar del filtro fibroso - y por lo tanto un porcentaje relativamente alto de polvo mineral - puede ser particularmente ventajoso para eliminar la clorofila de manera eficaz, además si el contenido de clorofila es relativamente alto. Un porcentaje relativamente alto del auxiliar del filtro fibroso - y por lo tanto un porcentaje relativamente bajo del polvo mineral - podría ser particularmente ventajoso para un alto rendimiento de producto.

40 El polvo mineral puede ser un polvo mineral conocido *per se*. Dichos auxiliares del filtro se conocen para usar en la tecnología de filtración por décadas, por ejemplo como se describe en Ullmans Encyclopadie der technischen Chemie (Verlag Chemie, Weinheim), ver, por ejemplo, 4ta edición, volumen 2, en particular páginas 195-198. En particular, puede usarse al menos un polvo mineral seleccionado de entre el grupo de polvos minerales porosos. La permeabilidad de tal polvo puede escogerse dentro de un amplio intervalo, en particular en el intervalo de 0.02-0.26 Darcy. Particularmente, se han logrado buenos resultados con un polvo mineral poroso que tiene una permeabilidad al agua relativamente baja, en particular una permeabilidad en el intervalo de 0.03-0.1 Darcy. De acuerdo con la invención, el polvo mineral se usa de manera ventajosa sin haberse modificado la superficie, para hacer a la superficie más hidrófoba.

50 Los polvos minerales preferidos son tierra de diatomeas y perlita. La tierra de diatomeas está por ejemplo comercialmente disponible bajo la marca comercial Becogur® (de Bege row, Alemania). Otros ejemplos de polvos minerales son los polvos de arcilla tales como la bentonita.

55 El auxiliar del filtro fibroso puede ser un auxiliar del filtro fibroso conocido *per se*. Por ejemplo pueden usarse auxiliares de filtro celulósicos fibrilares, borra de algodón, u otro material orgánico fibroso. Tales auxiliares de filtros se han conocido por su uso en la tecnología de filtración por décadas, ver *por ejemplo*, Ullmans Encyclopädie der technischen Chemie (Verlag Chemie, Weinheim), ver, por ejemplo, 4ta edición, volumen 2, páginas 195-198. Otros ejemplos se proporcionan en US 6,615,991. Los tipos de auxiliares del filtro usados en las separaciones sólido-líquido incluyen: polvos minerales inorgánicos, que comprenden tierra de diatomeas procesada, conocida como la diatomita; perlita, un silicato de aluminio vítreo de origen volcánico; y materiales fibrosos orgánicos tales como la celulosa y la borra de algodón. De acuerdo con la invención, el auxiliar del filtro fibroso se usa de manera ventajosa sin haberse modificado la superficie, para hacer a la superficie más hidrófoba.

Para una eliminación ventajosa de los componentes no deseados del método preferido, el auxiliar del filtro fibroso es una mezcla de fibras que tienen una longitud diferente, la mezcla proporciona al menos fibras con una longitud en el intervalo de aproximadamente 20  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 130  $\mu\text{m}$ . Preferentemente, la mayoría (al menos 50 % en peso) del auxiliar del filtro fibroso está formado por tales fibras, con mayor preferencia 75-100 % en peso, particularmente 95-100 % en peso. Preferentemente el equilibrio se forma al menos sustancialmente por fibras con una longitud de 1-500  $\mu\text{m}$ . Particularmente, se han obtenido buenos resultados con un auxiliar del filtro fibroso (mezcla) que comprende, una primera fracción del auxiliar del filtro fibroso que consiste en fibras relativamente pequeñas (20-40  $\mu\text{m}$ ) y una segunda fracción del auxiliar del filtro fibroso que consiste en fibras grandes (80-130  $\mu\text{m}$ ). Además, este tipo de auxiliares de filtro (mezcla) comprende preferentemente una fracción de auxiliar de filtro fibroso adicional que consiste en fibras de longitud intermedia (entre 40 y 80  $\mu\text{m}$ ). En una modalidad de este tipo, las fibras grandes pueden conformar, en particular 33-80 % en peso del auxiliar del filtro fibroso, más particularmente 40-60 % en peso. En una modalidad de este tipo, las fibras pequeñas pueden conformar, en particular 10-50 % en peso del auxiliar del filtro fibroso, más particularmente 20-33 % en peso. En una modalidad de este tipo, las fibras intermedias pueden conformar, en particular 10-50 % en peso del auxiliar del filtro fibroso, más particularmente 20-33 % en peso.

Al seleccionar cuidadosamente el tipo y grado así como la cantidad añadida de los auxiliares de filtro se mejora la productividad a través del filtro y la aclaración (reducción de la turbidez).

La dosificación de los auxiliares del filtro varía con el contenido de sólidos y otras variables específicas de cada aplicación. Usualmente, la cantidad de auxiliar del filtro (auxiliar del filtro fibroso más polvo mineral tomados juntos) añadida a un líquido antes de una filtración a profundidad de acuerdo con la invención es de al menos 2 % en peso basado en el peso total del líquido a filtrar, particularmente al menos 3.5 % en peso, más particularmente al menos 4.5 % en peso. Usualmente, la cantidad es 8 % en peso o menos, en particular 6.5 % en peso o menos, más particularmente 6.0 % en peso o menos. En una modalidad ventajosa, la cantidad del auxiliar del filtro añadido es al menos aproximadamente la mitad de la cantidad de precipitado en el líquido a filtrar. En una modalidad ventajosa, la cantidad del auxiliar del filtrado añadido es aproximadamente la misma que la cantidad de precipitado en el líquido a filtrar, o menos.

En una modalidad específica, el pH del auxiliar del filtro fibroso y/o del polvo mineral (medido a 25 C, 1 % en peso de la dispersión en agua) está en el intervalo de 5-8, particularmente en el intervalo de 6-7.5. Esto se considera ventajoso con respecto a evitar una reacción desfavorable, tal como hidrólisis de la proteína de estrés en la superficie del auxiliar del filtro.

Después de filtraciones (a profundidad) (d, e), el filtrado se somete a un proceso de purificación, en donde la proteína de estrés se purifica.

En una modalidad, el filtrado (que comprende la proteína de estrés) se somete a una etapa de eliminación de agua al concentrar de esta manera la proteína de estrés en la fracción. La eliminación de agua se lleva a cabo preferentemente mediante diálisis, ósmosis inversa o una filtración adicional tal como filtración de flujo cruzado, que puede ser una nanofiltración o una ultrafiltración.

En una modalidad adicional, que puede combinarse con la etapa de eliminación de agua o llevarse a cabo después o antes de eso, el líquido que comprende la proteína de estrés se somete a una etapa de eliminación de sal, preferentemente mediante diálisis.

La purificación de la proteína de estrés, particularmente de una proteína de choque térmico, puede comprender particularmente una o más separaciones mediante cromatografía. La metodología adecuada puede basarse en la tecnología conocida, por ejemplo como se describe en WO 2005/049645, del cual el contenido con respecto a la descripción de una cromatografía adecuada se incorpora como referencia, particularmente, los contenidos de la página 13, línea 8 a la página 20 línea 4.

En un método preferido, la purificación mediante cromatografía comprende un primer intercambio iónico fuerte, después de eso una separación mediante cromatografía de afinidad, y después un segundo intercambio iónico fuerte. En un método particularmente preferido ambas de dichas etapas de intercambio iónico son etapas de intercambio aniónico fuerte. Tal método se considera particularmente ventajoso para un alto rendimiento de producto, en comparación con un método en donde la primera etapa de intercambio iónico es una etapa de intercambio aniónico débil.

Los materiales preferidos del intercambio iónico fuerte incluyen geles resistentes a la presión de perlas tales como agarosa reticulada, sefrosa y sílice derivado con grupos funcionales tales como trimetil amoniometilo (TMAE), (por ejemplo MonoQ™, Resource Q™, TMAE fractogel™).



- 5 Las condiciones de separación para la separación por intercambio de iones fuerte (antes y/o después de la separación por afinidad) pueden elegirse tal como se especifica en WO 2005/049645 para la etapa de intercambio iónico débil como se describe a partir de la página 14 línea 20 a la página 16, línea 6, de las que los contenidos se incorporan como referencia. El experto sabrá cómo elegir las condiciones adecuadas en base a la información descrita en la presente y el conocimiento general común.
- 10 Se ha encontrado que la separación por afinidad es muy adecuada para eliminar uno o más de los componentes abundantes restantes, en particular las proteínas restantes.
- 15 Una separación por afinidad se lleva a cabo preferentemente mediante cromatografía de afinidad (que incluye una técnica basada en cromatografía de afinidad tal como extracción en fase sólida basada en extracción por afinidad, cromatografía electrocinética y similares).
- 20 Preferentemente, la separación por afinidad comprende cromatografía de afinidad con un nucleótido acoplado a una matriz.
- 25 Las matrices preferidas incluyen agarosa, sefarosa, poliacrilamida, sílice, y celulosa. Se han logrado muy buenos resultados con agarosa como un material de matriz.
- 30 En principio puede usarse cualquier tipo de nucleótido, particularmente cualquier nucleótido trifosfato (NTP) o nucleótido difosfato (NDP) para la separación por afinidad. Se han obtenido muy buenos resultados con una separación por afinidad basada en adenosina, particularmente una separación por afinidad basada en ATP o ADP. Para más detalles sobre la cromatografía de afinidad, se hace referencia a la página 17, línea 23 a la página 19, línea 25 del documento WO 2005/049645, que se incorpora en la presente como referencia.
- 35 Particularmente, se han logrado buenos resultados en un método en donde el tamaño medio de partícula del material de intercambio usado en el primer intercambio aniónico es mayor que el tamaño medio de partícula del material de intercambio usado en el segundo intercambio aniónico, particularmente al menos 1.5 mayor, más particularmente 2.0-5.0 veces más grande. Se considera que esto es ventajoso para lograr un alto grado de purificación en combinación con una buena productividad de líquido.
- 40 Después de la(s) separación(es) por afinidad y/o la cromatografía de intercambio de iones, el producto purificado que comprende la proteína de estrés puede usarse directamente o procesarse más aún.
- 45 Una purificación adicional puede llevarse a cabo, *por ejemplo*, para eliminar proteínas más grandes o más pequeñas que la proteína de estrés de interés específico. Los procedimientos adecuados de separación por tamaño generalmente se conocen en la técnica e incluyen cromatografía de exclusión por tamaño, diálisis, y electroforesis en estado nativo.
- 50 Adicionalmente, el líquido purificado que comprende la proteína de estrés puede someterse a una etapa de concentración adicional (*por ejemplo* mediante nanofiltración, evaporación de líquido).
- 55 La proteína de estrés así obtenida (en forma seca o líquida) puede usarse después, *por ejemplo*, como un ingrediente para un producto farmacéutico, un producto nutricional o un producto cosmético.
- Por ejemplo, en una modalidad la proteína de estrés se combina con un excipiente farmacéuticamente aceptable para proporcionar un producto farmacéutico, que puede fabricarse de una manera conocida *per se*.
- En una modalidad adicional, la proteína de estrés se combina con uno o más ingredientes alimenticios adicionales en un proceso para preparar la comida de una manera que se conoce de otra manera *per se*. *Por ejemplo* puede combinarse con una o más de otras proteínas y/o péptidos (si están presentes) cuya combinación después puede procesarse adicionalmente para producir el producto alimenticio de interés. En dependencia del producto alimenticio, además es posible añadir la proteína de estrés al producto alimenticio que ya comprende el(los) otro(s) ingrediente(s).
- En una modalidad adicional, la proteína de estrés se combina con uno o más ingredientes adicionales para un producto cosmético, tal como uno para el cuidado de la piel de una manera que se conoce de otra manera *per se*, *por ejemplo* puede combinarse con una o más de otras proteínas y/o péptidos (si están presentes) cuya combinación después puede procesarse adicionalmente para producir el producto de cuidado de la piel de interés. En dependencia del producto de cuidado de la piel, además es posible añadir la proteína de estrés al producto cosmético que ya comprende el(los) otro(s) ingrediente(s).

La invención se ilustrará ahora mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1: Filtración y posterior purificación de HSP

La Hsp70 se purificó a partir de *Medicago sativa*. Aproximadamente 250 kg de la planta recién cortada se indujo con calor durante 2 horas a 43-45 °C. Después se preparó un extracto de la planta al presionarla en una prensa de tornillo Ponndorf.

Los restos celulares y las partículas mayores de 20µm se eliminaron mediante el uso de un tamiz Sweco. Antes de enfriar el jugo en un recipiente de enfriamiento, se añadió tampón de lisis y se enfrió antes en la relación de 1 parte de tampón de lisis a 3 partes de jugo en bruto. La composición del tampón de lisis fue la siguiente:

150 mM Tris HCL pH 8.0	(18.2 g/l)
150 mM (NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>	(19.8 g/l)
15 mM MgCl <sub>2</sub>	(3.1 g/l)
30 mM EDTA	(13.6 g/l)
30 % sacarosa	(45 g/l)
42 mM β-mercaptoetanol	(2.9 g/l)
60 mM de dietilditiocarbamato sódico	(13.5 g/l)
50 mM PMSF disuelto en 1 l isopropanol	(8.71 g/l)

Después de enfriar el jugo en bruto a 4 °C el jugo se sometió a precipitación con sulfato amónico a 4 °C mediante el uso de 194 g de sulfato amónico por litro de jugo en bruto.

Después de 60 minutos de precipitación, se añadieron los auxiliares del filtro (auxiliar del filtro fibroso y polvo mineral) para la etapa de filtrado primario en capa de profundidad en las cantidades siguientes (% en peso basado en el peso total del líquido, que incluye el precipitado en el líquido):

Auxiliares del filtro fibroso: mezcla de 2 % de Arbocel B800 (longitud promedio de 130 µm) 1 % de Vitacel L60 (longitud promedio de 60 µm) y 1 % de Vitacel L20 (longitud promedio de 23 µm).  
Polvo mineral 0.5 % Becogur 100 (permeabilidad de aproximadamente 0.04 Darcy).

El filtrado de la capa de profundidad se realizó con una Placa Begerow Beco-Integra 400 EC con 4, 5 o 6 bastidores (400 x 400 mm) y 4, 5 o 6 láminas. Como material de soporte (sobre el cual se permite que los auxiliares del filtro formen una torta de filtro) se usaron láminas de capa de profundidad con un tamaño de poro de 20 µm de Begerow.

El filtrado de esta etapa de filtración primaria se sometió a una filtración secundaria, al pasar el filtrado a través de una lámina de filtro con un tamaño de poro de 0.2 µm (Begerow).

El efecto de la primera (filtración principal) y la segunda filtración (de pulido) se ilustra por lo siguiente. Con el objetivo de dar una primera revisión de cuáles componentes del extracto vegetal se filtraron mediante el uso de los diferentes componentes del auxiliar del filtro se usó la centrifugación por gradiente de densidad de sacarosa.

Para este experimento una muestra que comprendía 20 mg de proteína de cada fracción (Jugo de la planta, extracto después de la filtración primaria y extracto después de la filtración secundaria) se añadió en un gradiente de densidad de sacarosa de 10 -30 %. Esto se preparó como sigue: 20 % (p/v) sacarosa en tampón (20 mM MES NaOH, pH 6.5, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.03 % (p/v) β-dodecil maltosido). Se introdujo en tubos de ultracentrífuga de 36 ml (tubos de polialómero, 14 x 89 mm, núm. 331372, Beckman). A -20 °C, los tubos llenos se congelaron durante la noche. La descongelación se realizó a temperatura ambiente. Esto dio lugar a un gradiente lineal de 10 - 30 % (p/p) de sacarosa (Lax, 2005). Las muestras se añadieron en el gradiente y el gradiente se centrifugó durante al menos 18 horas (ultracentrífuga Beckman, rotor SW28, 25.000 rpm, 4 °C). Los gradientes se recolectaron al insertar una punta de jeringa en la parte inferior del tubo y recoger fracciones de 2 ml con la ayuda de una bomba peristáltica.

Como se ilustra en la Figura 1, se visualizaron dos bandas intensas en la muestra del Jugo en bruto de la planta sometida a

centrifugación con gradiente. La banda superior (entre las fracciones 1-6) es de color naranja-marrón y probablemente contiene carotenoides y lípidos. La banda inferior (de la fracción 11 más abajo) es de color verde y contiene al menos clorofila. La filtración primaria es eficaz en eliminar la mayoría, si no toda, la clorofila, pero todavía una fracción naranja fue visible en la muestra de filtrado primario sometida a centrifugaciones con gradiente (fracciones 1-6). La segunda filtración particularmente resultó en una eliminación adicional de impurezas de estas fracciones.

La absorción del filtrado después de la filtración primaria y después de la filtración secundaria se determinó además mediante el uso de un detector Beckman DU 7400 Diodearray para las fracciones 4, 8 y 16 del gradiente de sacarosa (como se indica en la Figura 1). Los valores en longitudes de onda indicativos de ADN (260 nm), proteína (280 nm), clorofila (440 nm, 676 nm), y carotenoides (330 nm) fueron los siguientes:

<b>Fracción 4</b>	<b>Jugo de la planta</b>	<b>Después del filtro primario</b>	<b>Después del filtro secundario</b>
260 nm	7,716	8,0045	2,8068
280 nm	7,157	7,239	2,1638
440 nm	0,405	0,1025	0,0402
676 nm	0,016	0,0225	0,0054
330 nm	5,745	2,3845	0,5328
<b>Fracción 8</b>	<b>Jugo de la planta</b>	<b>Después del filtro primario</b>	<b>Después del filtro secundario</b>
260 nm	1,8975	1,6158	0,7811
280 nm	1,5375	1,4261	0,8133
440 nm	0,0719	0,0261	0,02
676 nm	0,0259	0,0014	0,0225
330 nm	0,4845	0,5064	0,472
<b>Fracción 16</b>	<b>Jugo de la planta</b>	<b>Después del filtro primario</b>	<b>Después del filtro secundario</b>
260 nm	0,3931	0,092	0,118
280 nm	0,3417	0,0743	0,0953
440 nm	0,3307	0,0177	0,0038
676 nm	0,2056	0,0195	0,0047
330 nm	0,2483	0,0418	0,0172

Estos datos y la Figura 1 soportan que después de la filtración primaria se elimina la mayor parte de la clorofila y la mayor parte de proteínas que contienen clorofila (o cualquier otra impureza que tenga una absorción sustancial a la misma longitud de onda) y que la filtración secundaria es eficaz en eliminar la clorofila residual y también los carotenoides (o cualquier otra impureza que tenga una absorción sustancial a la misma longitud de onda).

Después de la filtración secundaria, el filtrado de la filtración secundaria se sometió a ultrafiltración (valor de corte de 50 kD MW (casete de Sartocoon), puede seleccionarse un filtro diferente en dependencia de la proteína de estrés que se va a purificar) para concentrar 10 veces el filtrado de la etapa de filtración secundaria.

El retenido de la ultrafiltración (que comprendía la HSP 70) se sometió a diálisis contra una solución tampón (pH 7.8) que comprendía 10 % de glicerina y 0.25 M de HEPES, 5 mM de KCl, 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 9 mM de 6-mercaptoetanol, 1 mM de EDTA (ajustada a pH 7.8 con KOH), mediante el uso de nuevo de una membrana con un valor de corte de peso molecular de 50 kD (casete de Sartocoon). La sal y los azúcares se eliminaron. Se obtuvo un líquido de diálisis que comprendía la HSP 70 con una conductividad por debajo de 5 mS/cm.

Después de eso, el líquido de diálisis se sometió a cromatografía.

5 Como una primera etapa de cromatografía se usó un intercambio aniónico fuerte con elución por gradiente con un material de intercambio iónico que tenía una mediana de tamaño de 120  $\mu\text{m}$  (soporte UNOsphere Q). El tampón A contenía 10 % de glicerina y 0.25 M de HEPES, 5 mM de KCl, 5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM de EDTA (ajustado a pH 7.8 con KOH) y 0.0007 % en volumen de beta-mercaptoetanol. El tampón B era como el tampón A, pero con un adicional de 75 g/l de KCl. Después de aplicar el sobrenadante a la columna de cromatografía, se aplicó un primer flujo isocrático (A:B 95:5). Después de eluir 5 volúmenes de la columna, se inició la elución por gradiente a partir de una relación A:B de 95:5 a 5:95 durante 2.5 volúmenes de la columna. Después, la fracción que comprendía la proteína de estrés (HSP 70) se eluyó con el tampón B.

15 El eluido que comprendía la HSP 70 se sometió a cromatografía de afinidad con ATP, al añadir 5 ml de sefarosa y ATP a 4.5 litros del eluido. La mezcla se incubó durante 30 min y después de este tiempo se cargó en una columna Econo vacía. Esta etapa se repitió dos veces. Después de lavar con el tampón B y el tampón A, la HSP 70 se eluyó con tampón de elución C, que es como el tampón A pero al que se habían añadido 0.2 mg/ml de  $\text{MgCl}_2$  y 5.5 mg/ml de ATP.

20 El eluido se sometió a otro intercambio aniónico fuerte, esta vez con Macro-Prep® 25 Q (mediana del tamaño de las perlas de 25  $\mu\text{m}$ ), mediante el uso de los mismos tampones A y B como se describió para el primer intercambio de iones. El gradiente fue el siguiente: Primer gradiente: 0 % de B a 10 % de B durante 5 volúmenes de la columna. Segundo gradiente: 10 % de B a 30 % de B durante 20 volúmenes de la columna.

La HSP se eluyó de la columna mediante el tampón B durante el segundo gradiente. La proteína objetivo se concentró y desaló.

25 La HSP puede liofilizarse después de cambiar el tampón a un tampón libre de glicerina.

La proteína aislada se identificó a través de Western Blot y análisis MALDI-ToF. La pureza, mostrada en electroforesis en gel SDS fue al menos de aproximadamente 95 %.

30 La HSP70 aislada mostró una alta actividad ATPasa que fue 3 veces mayor que la actividad del producto competitivo (Sigma Aldrich), ver la Figura 2. El ensayo de ATPasa fue una prueba de actividad de ATPasa-Akt con un sistema regenerador de ATP y se basó en la tesis doctoral de Klaus Richter (2003) "Die ATP-Hydrolyse des molekularen Chaperons Hsp90 und ihre Regulation durch Co-Chaperone."

35 El rendimiento de HSP 70 fue de aproximadamente 15 mg de Hsp70 pura a partir de 250 kg de alfalfa fresca (= 0.06 mg/kg).

Reivindicaciones

1. Método para recuperar una proteína de estrés a partir de una planta, que comprende
  - obtener un líquido que comprende la proteína de estrés a partir de la planta;
  - precipitar uno o más componentes distintos de la proteína de estrés del líquido;
  - adicionar un auxiliar del filtro fibroso y un polvo mineral al líquido; después
  - someter el líquido que comprende la proteína de estrés, el(los) componente(s) precipitado(s), el auxiliar del filtro fibroso y el polvo mineral a una primera etapa de filtración sobre un filtro, lo que separa de esta manera el precipitado, el auxiliar del filtro fibroso y el polvo mineral del filtrado que comprende la proteína de estrés; después de eso
  - someter el filtrado a una etapa de filtración adicional; y después de eso
  - purificar la proteína de estrés.
2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde en la primera etapa de filtración la clorofila y/o rubisco se separan del líquido.
3. Método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 en donde el polvo mineral comprende al menos un mineral granular.
4. Método de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende al menos un mineral granular seleccionado del grupo de tierra de diatomeas y perlita.
5. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el auxiliar del filtro fibroso comprende fibras de celulosa.
6. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el auxiliar del filtro fibroso es una mezcla de fibras que tienen una longitud diferente, la mezcla proporciona al menos fibras con una longitud en el intervalo de aproximadamente 20  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 130  $\mu\text{m}$ .
7. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la etapa de filtración adicional a la cual se somete el filtrado es una etapa de filtración de profundidad.
8. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde después de la etapa de filtración adicional, una fracción que comprende la proteína de estrés se somete a una etapa de eliminación de fluido lo que concentra así la proteína de estrés en la fracción, preferentemente mediante ósmosis inversa, ultrafiltración o nanofiltración, y/o a una etapa de eliminación de sal, preferentemente mediante diálisis.
9. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde la proteína de estrés se purifica mediante cromatografía.
10. Método de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la cromatografía comprende una primera etapa de intercambio aniónico fuerte, después de eso una etapa de separación mediante cromatografía de afinidad, y después de eso una segunda etapa de intercambio aniónico fuerte.
11. Método de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la mediana del tamaño de partícula del material de intercambio usado en el primer intercambio aniónico es mayor que la mediana del tamaño de partículas del material de intercambio usado en el segundo intercambio aniónico.
12. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la proteína de estrés es una proteína de estrés de una planta seleccionada del grupo de *Fabaceae*, *Chenopodiaceae*, *Solanaceae* y *Poaceae*, particularmente del grupo de la alfalfa, el trigo, el maíz, el arroz, la soya, la patata, la remolacha, más particularmente la alfalfa.
13. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la proteína de estrés se selecciona del grupo de HSP40, HSP60, HSP70 y HSP90.
14. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el filtrado de la primera etapa de filtración se somete a dicha etapa de filtración adicional sin haberse sometido primero a centrifugación.

15. El uso de al menos un mineral granular seleccionado del grupo de tierra de diatomeas y perlita para eliminar clorofila y/o carotenoides de un líquido, particularmente un Jugo de la planta, que contiene una proteína de choque térmico de la planta.

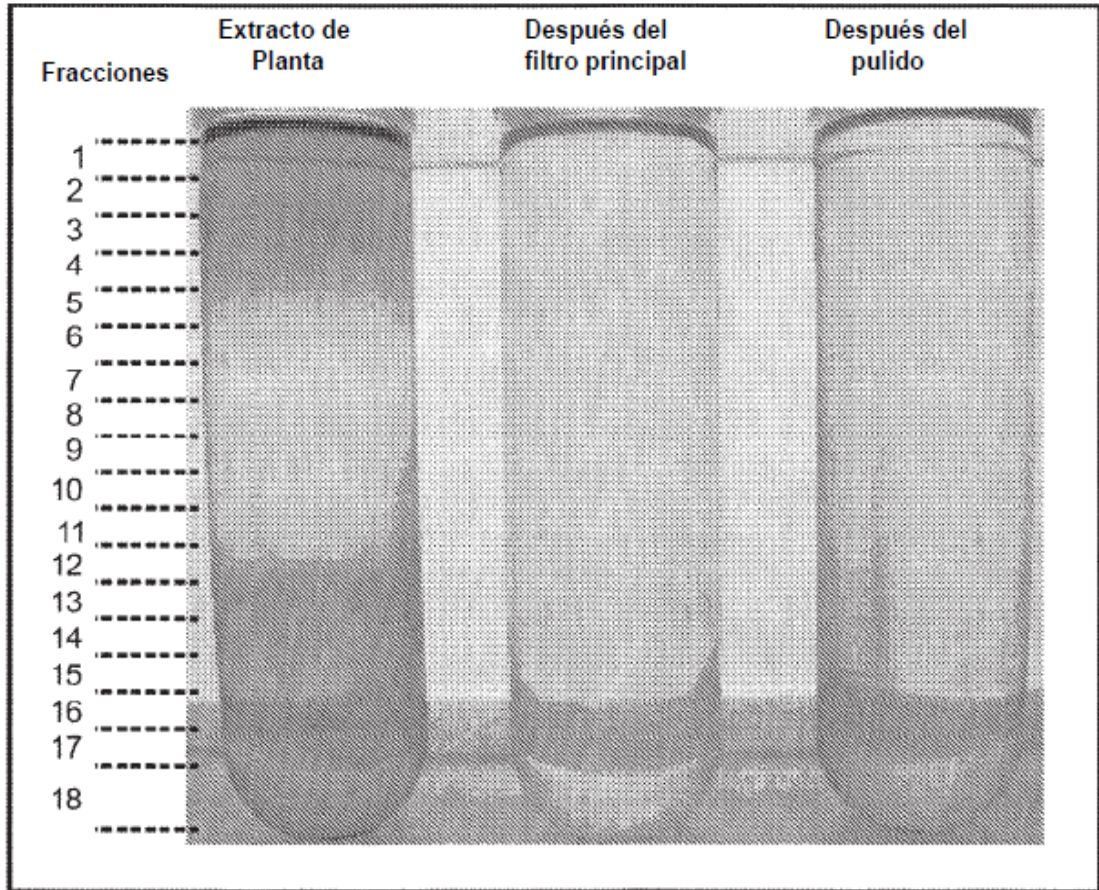


Fig. 1

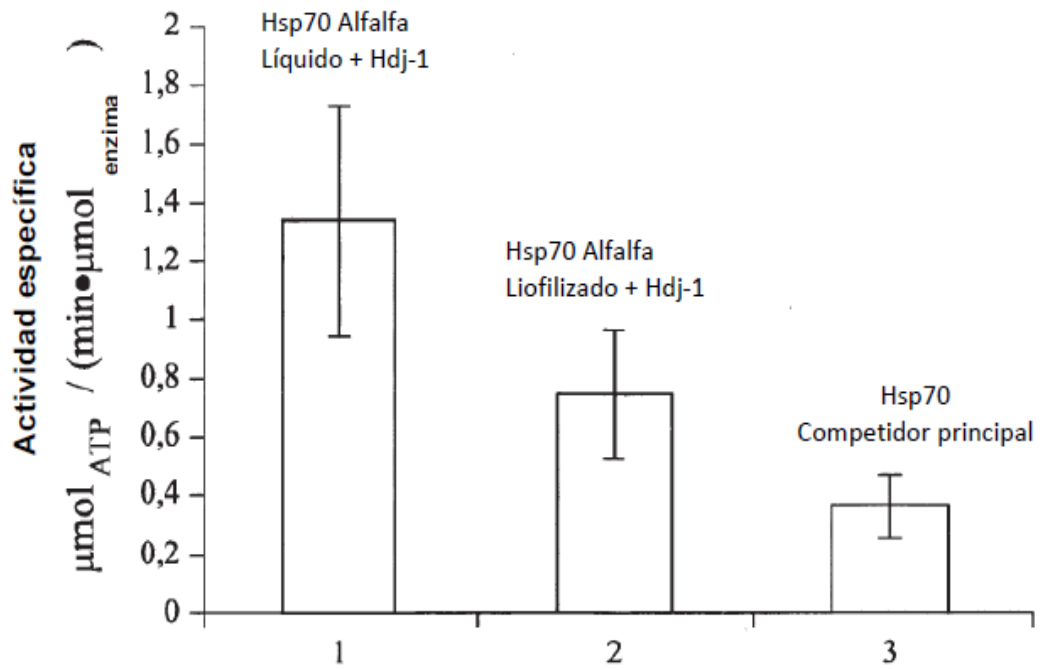


Fig. 2