

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 569 343**

51 Int. Cl.:

C07K 1/36 (2006.01)

C07K 14/765 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.08.2011 E 11851327 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.03.2016 EP 2655397**

54 Título: **Procedimiento para extraer albúmina sérica humana a partir de grano de arroz transgénico**

30 Prioridad:

20.12.2010 CN 201010597544

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.05.2016

73 Titular/es:

**WUHAN HEALTHGEN BIOTECHNOLOGY CORP.
(100.0%)
No.666 Gaoxin Avenue, East Lake, High-Tech
Development Zone
Wuhan, Hubei 430079, CN**

72 Inventor/es:

**YANG, DAICHANG;
HE, YANG y
LI, GUANGFEI**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 569 343 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

Procedimiento para extraer albúmina sérica humana a partir de grano de arroz transgénico.

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al campo de la biotecnología, y más particularmente a un procedimiento para extraer albúmina sérica humana recombinante (rHSA) a partir de grano de arroz transgénico.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La albúmina sérica humana (HSA) es una proteína no glicosilada de cadena simple que consiste en 585 aminoácidos, que tienen un peso molecular de 66,5 kD y un punto isoeléctrico entre 4,7~4,9. Es la proteína más abundante en el plasma sanguíneo humano, constituyendo el 60% aproximadamente de las proteínas plasmáticas totales. Hay 40 g aproximadamente de HSA por litro de sangre humana. Además de estar presente en el plasma, la HSA también se encuentra en tejidos y secreciones corporales, pieles y cavidades linfáticas. Bajo condiciones fisiológicas normales, la HSA tiene un efecto de mantener la presión coloidosmótica del plasma, nutrir, acelerar la concrescencia de heridas, y como vehículo, participar en el transporte de muchas moléculas biológicas hidrofóbicas como hormonas, sustancias biológicas activas y fármacos en la sangre. Por lo tanto, la HSA es una proteína médica importante que se usa principalmente de manera clínica para el tratamiento de la hipoproteinemia causada por la pérdida de sangre, quemadura, escaldadura, cirugía plástica y lesión cerebral, así como para el tratamiento de la cirrosis hepática, la hidronefrosis, etcétera.

En la actualidad, la HSA para el uso clínico se prepara principalmente mediante la extracción y el aislamiento de plasma humano. Sin embargo, este planteamiento de preparación tiene las siguientes desventajas: por un lado, la fuente de plasma es insuficiente, es decir el suministro de sangre limitado es incapaz de satisfacer las demandas de producción de HSA y las preparaciones relevantes de la misma; por otro lado, la propia sangre puede ser potencialmente un factor de riesgo, por ejemplo puede contener patógenos infecciosos peligrosos como el virus de la hepatitis, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), etcétera, lo cual causa enormemente preocupaciones acerca de la aplicación de HSA extraída de plasma. Por lo tanto, es urgente desarrollar un proceso alternativo para producir HSA.

Con el desarrollo de técnicas modernas de ADN recombinante y de síntesis, los investigadores toman un profundo interés en la producción y la aplicación de albúmina sérica humana recombinante (rHSA). Hasta ahora, se han estado usando experimentalmente diversos sistemas de expresión para la producción en masa de rHSA. Por ejemplo, procariotas como el colibacilo (Latta, M. y col., *Bio/Technology*, 5:1309-1314, (1987)), el bacillus subtilis (Saunders, C. W. y col., *J. Bacteriol.* 169: 2917-2925, (1987)), eucariotas como levaduras (WO-00/44772, EP0683233A2, US-5612196) y también el cultivo de células animales se han estado usando para la producción de rHSA. Sin embargo, tales planteamientos antes mencionados no son adecuados para la producción industrializada debido al bajo nivel de expresión o bien al alto coste de producción.

La solicitud de patente china núm. 200510019084 de los presentes inventores da a conocer un procedimiento para producir rHSA usando células del endospermo del arroz como biorreactor, que comprende: usar promotores y péptidos señal expresados específicamente en el endospermo del arroz para actuar de mediadores en la entrada de rHSA en el sistema de endomembranas de las células del endospermo del arroz y almacenar la rHSA en los cuerpos proteicos del endospermo del arroz, permitiéndose de ese modo que se acumule rHSA extensivamente en la semilla de arroz y alcance un nivel de expresión más alto finalmente. El nivel de expresión de la rHSA obtenida es al menos superior al 0,3% en base al peso de la semilla de arroz. El procedimiento tiene las ventajas del alto nivel de expresión y el bajo coste, por lo que proporciona la posibilidad de desarrollar una estrategia novedosa para la producción de fármacos proteicos.

En la actualidad, no hay un proceso de producción desarrollado para extraer rHSA a partir de grano de arroz transgénico. Establecer un procedimiento y un proceso para extraer proteínas a partir de grano de arroz transgénico, mejorar la eficiencia de extracción de proteínas objetivo y reducir el rendimiento de extracción de proteínas no objetivo son elementos críticos de la investigación y el desarrollo de la tecnología. La presente invención establece una tecnología y un proceso para la extracción de alta eficiencia de rHSA a partir de grano de arroz transgénico a gran escala.

RESUMEN DE LA INVENCION

El objeto de la invención es proporcionar un procedimiento para extraer albúmina sérica humana recombinante (rHSA) a partir de grano de arroz transgénico.

5 Para conseguir el objeto anterior, la presente invención proporciona la siguiente solución técnica:

Un procedimiento para extraer albúmina sérica humana recombinante a partir de grano de arroz transgénico, que comprende las etapas de:

10 1) retirar la cáscara del arroz con cáscara transgénico que contiene albúmina sérica humana recombinante, moler el grano de arroz descascarillado, seguido de la mezcla del grano de arroz transgénico molido con un buffer de extracción y la extracción mediante agitación para obtener la mezcla I.

15 2) ajustar el pH de la mezcla I de la etapa 1) a 4,0~4,5 y precipitarla durante 1~12 horas para obtener la mezcla II;

3) filtrar la mezcla II de la etapa 2) y recoger el filtrado para obtener una solución que contenga una alta concentración de albúmina sérica humana recombinante.

Específicamente, en la etapa 1), ya que la albúmina sérica humana recombinante se presenta entre los gránulos de almidón en las células del endospermo del arroz, con el fin de reducir el rendimiento de extracción de proteínas no objetivo, el grano de arroz transgénico que contiene rHSA es descascarillado y el grano de arroz descascarillado se muele hasta obtener arroz en polvo o arroz molido con una finura de tamaño de malla de 80~120 para aumentar el rendimiento de extracción de albúmina sérica humana recombinante.

25 El buffer de extracción comprende buffer fosfato (PBS) 10~30 mM, acetato de sodio 10~20 mM, sulfato de amonio 10~50 mM y caprilato de sodio 5~40 mM, y el buffer de extracción tiene un pH de 6,5~8.

En el buffer de extracción, dicho sulfato de amonio preferentemente tiene una concentración de 10~30 mM, más preferentemente 15~30 mM, y más preferentemente 20~30 mM.

30 En el buffer de extracción, dicho caprilato de sodio preferentemente tiene una concentración de 5~30 mM, más preferentemente 5~20 mM, y más preferentemente 10~20 mM.

Por ejemplo, en una forma de realización, el buffer de extracción comprende buffer fosfato (PBS) 10~30 mM, acetato de sodio 10~20 mM, sulfato de amonio 15~30 mM y caprilato de sodio 5~20 mM; y el buffer de extracción tiene un pH de 6,5~8.

40 En una forma de realización preferida, el buffer de extracción comprende buffer fosfato 25 mM, acetato de sodio 20 mM, sulfato de amonio 20 mM y caprilato de sodio 20 mM, y tiene un pH de 7,5.

Con el fin de obtener el mayor rendimiento de extracción de albúmina sérica humana recombinante y equilibrar la relación entre el volumen de extracción y la eficiencia de extracción, el arroz en polvo se mezcla con el buffer de extracción en una relación de p/v (kg/L, peso del arroz molido/volumen del buffer de extracción) de 1:5 a 1:10, después se extrae con remoción a 60 revoluciones por minuto (rpm) durante 1~3 horas. Se muestra por los experimentos que la relación que oscila entre 1:5 y 1:10 no tiene ninguna influencia obvia sobre la eficiencia de extracción de la albúmina sérica humana recombinante. Con el fin de reducir el coste y el volumen de extracción, el arroz transgénico molido se mezcla preferentemente con el buffer de extracción en una relación de p/v (kg/L) de 1:5, y el tiempo de extracción es preferentemente de 1~1,5 horas.

50 Con el fin de extraer albúmina sérica humana recombinante a partir de grano de arroz molido con una eficiencia máxima, de acuerdo con el rasgo característico de que la albúmina sérica humana es estable a 60°C, un incremento de la temperatura de extracción obviamente aumenta los rendimientos de extracción de proteínas totales y albúmina sérica humana recombinante siempre y cuando la HSA no se desnaturalice a la temperatura. Por lo tanto, se emplea tratamiento de calor en la presente invención para incrementar de forma efectiva el rendimiento de extracción de la albúmina sérica humana recombinante. Dicha temperatura de extracción es de 45~60°C, y preferentemente de 55~60°C.

Ya que ambas extracciones de la albúmina sérica humana recombinante y proteínas no objetivo se aumentan bajo las condiciones de calentamiento y pH elevado, la retirada de las proteínas no objetivo adicionales del proceso antes

mencionado se podría realizar precipitando proteínas de reserva del endospermo del arroz en el punto isoelectrico de la albúmina sérica humana. El proceso de precipitación en la etapa 2) de acuerdo con la presente invención se lleva a cabo a un pH bajo. Después de la extracción, la mezcla extraída se ajusta a pH 4,0~4,5, después la mezcla se precipita a temperatura ambiente durante al menos 1 hora para eliminar los efectos negativos del exceso de proteínas no objetivo producido por el proceso de extracción bajo calentamiento y pH elevado. En una forma de realización, se usa ácido acético para ajustar el pH a 4,0~4,5, preferentemente a 4,5; el tiempo de precipitación es de 1~12 horas, preferentemente de 3~12 horas, y más preferentemente de 6 horas.

De acuerdo con las diferentes características físicas entre los gránulos de almidón existentes en el arroz molido y la porción líquida, las técnicas y equipos de rutina se pueden usar para separar sustancias indeseables de la extracción de proteínas. La mezcla extraída obtenida del proceso de precipitación en la etapa 2) se somete a una separación de sólido-líquido a través de la filtración a presión u otros equipos equivalentes, consiguiéndose el propósito de separar el almidón residual de la proteína objetivo de forma efectiva a gran escala. La invención proporciona un procedimiento simple, rápido y de bajo coste para obtener una solución que contenga una alta concentración de albúmina sérica humana recombinante finalmente.

En una forma de realización, dicha filtración comprende las etapas de filtrar por filtración a presión con un filtro prensa de placas y marcos de tipo tela filtrante, seguido del filtrado por microfiltración con una membrana de fibras huecas. Dicha membrana de fibras huecas está hecha de una membrana de fibras huecas de poliétersulfona, que tiene un tamaño de poro de 0,20 µm~0,45 µm de diámetro, y preferentemente de 0,22 µm.

En la solución que contiene albúmina sérica humana recombinante preparada de acuerdo con el procedimiento de la presente invención, la concentración de la albúmina sérica humana recombinante es de 0,65~0,66 mg/mL; la concentración inicial de proteínas totales es de 6,90~7,05 mg/mL y se reduce a 2,8 mg/mL aproximadamente después de la etapa de precipitación; el contenido de proteínas no objetivo se reduce sustancialmente.

La solución técnica de la presente invención tiene las siguientes ventajas:

1. La eficiencia de extracción de albúmina sérica humana recombinante se aumenta por la combinación de diferentes pH y diferentes concentraciones de sal. Los datos mostraron que la concentración de albúmina sérica humana recombinante en el extracto obtenido de acuerdo con la presente invención es de 0,65~0,66 mg/mL, mientras que la concentración obtenida por la técnica previa es de sólo 0,30~0,315 mg/mL. De ese modo, aplicando el procedimiento mejorado de la presente invención, la cantidad de extracción de albúmina sérica humana recombinante a partir del mismo peso de arroz molido se incrementa en 1,15 veces.

2. La eficiencia de extracción de proteína no objetivo se reduce. La concentración de proteínas totales en el extracto inicial de acuerdo con la presente invención es de 6,90~7,05 mg/mL y el contenido de proteína total es de 2,8 mg/mL después de la etapa de precipitación, lo cual se reduce en 2,46 veces.

3. El efecto aséptico o el efecto de esterilización se aumenta debido a la mejora de la etapa de microfiltración, que elimina la contaminación microbiana que se puede introducir en la etapa de purificación posterior y reduce la cantidad de endotoxinas bacterianas que se puedan producir en el proceso de producción.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Fig. 1 es una gráfica que muestra los efectos de combinar las diferentes temperaturas y tiempos de extracción sobre el rendimiento de extracción de proteínas totales a partir de grano de arroz transgénico molido.

La Fig. 2 es una gráfica que muestra los efectos de combinar las diferentes temperaturas y tiempos de extracción sobre el rendimiento de extracción de rHSA a partir de grano de arroz transgénico molido.

La Fig. 3 es una imagen de SDS-PAGE de muestras obtenidas por combinaciones ortogonales de diferentes temperaturas y tiempos de extracción.

La Fig. 4 es una gráfica que muestra los efectos de combinar diferentes pH y concentraciones de sal de sulfato de amonio sobre el rendimiento de extracción de proteínas totales a partir de grano de arroz transgénico molido.

La Fig. 5 es una gráfica que muestra los efectos de combinar diferentes pH y concentraciones de sal de sulfato de amonio sobre el rendimiento de extracción de rHSA a partir de grano de arroz transgénico molido.

La Fig. 6 es una imagen de SDS-PAGE de muestras obtenidas por combinaciones ortogonales de diferentes pH y concentraciones de sal de sulfato de amonio.

5 La Fig. 7 es una gráfica que muestra los efectos de diferentes concentraciones de caprilato de sodio y tiempos de precipitación sobre el rendimiento de extracción de proteínas totales.

La Fig. 8 es una imagen de SDS-PAGE de las muestras de extracción obtenidas en diferentes concentraciones de caprilato de sodio y tiempos de precipitación.

10

La Fig. 9 es una imagen de SDS-PAGE de las muestras de extracción obtenidas a diferentes pH y tiempos de precipitación.

La Fig. 10 es un esquema que muestra los porcentajes de rHSA en las proteínas totales de la solución extraída antes y después de la filtración con diferente tamaño de poro de las membranas.

15

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Las características y ventajas de la presente invención se pueden entender más aún por los siguientes ejemplos.

20 Los ejemplos son sólo ilustrativos y no deberían interpretarse como que limitan la invención de ningún modo.

Ejemplo 1: Extracción de rHSA de acuerdo con el procedimiento mejorado de la presente invención

El arroz transgénico se podría preparar de acuerdo con el procedimiento dado a conocer en la solicitud de patente china núm. 200510019084 de los presentes inventores. El arroz con cáscara se descascaró para obtener arroz semipulido y se molió para obtener arroz molido con una finura de malla de 80~100. El arroz molido se mezcló con un buffer de extracción en una relación de 1:5 (p/v, kg/L), y se extrajo durante 1,5 horas a 60°C. Los componentes del buffer de extracción son: buffer fosfato 25 mM, acetato de sodio 20 mM, sulfato de amonio 10 mM, caprilato de sodio 10 mM; pH 7,5. La mezcla resultante se reguló a pH 4,5 con ácido acético y se depositó durante al menos 3 horas para precipitar proteínas no objetivo. Después la mezcla resultante se sometió secuencialmente a filtración a presión usando un filtro prensa de placas y marcos (tipo de tela filtrante) y a microfiltración por una columna de fibras huecas con un tamaño de poro de 0,22 µm, para obtener sobrenadantes que contuviesen rHSA. La concentración de rHSA fue de 0,66 mg/mL aproximadamente.

30

Ejemplo 2: Extracción de rHSA de acuerdo con el procedimiento previo en la técnica

El arroz transgénico se puede preparar de acuerdo con el procedimiento dado a conocer en la solicitud de patente china núm. 200510019084 de los presentes inventores. El arroz con cáscara se descascaró para obtener arroz no pulido y se molió para obtener arroz molido con una finura de malla de 80~100. El arroz molido se mezcló con un buffer de extracción en una relación de 1:5 (p/v, kg/L), y se extrajo al menos durante 1 hora a temperatura ambiente. Los componentes del buffer de extracción son: buffer fosfato 25 mM y acetato de sodio 20 mM; pH 6,5. La mezcla resultante se reguló a pH 4,5 con ácido acético y se depositó durante 1 hora para producir la precipitación. Después la mezcla resultante se sometió secuencialmente a filtración a presión usando un filtro prensa de placas y marcos (tipo de tela filtrante) y a microfiltración por una columna de fibras huecas con un tamaño de poro de 0,45 µm, para obtener sobrenadantes que contuviesen rHSA. La concentración de rHSA fue de 0,314 mg/mL aproximadamente. En comparación con los resultados de acuerdo con el procedimiento mejorado de la presente invención, el contenido de proteínas totales fue sólo del 45,5%, y el contenido de rHSA fue del 47,7% (Figs. 1 a 3).

40

45

Ejemplo 3: Efectos de la temperatura y el tiempo de extracción sobre el rendimiento de extracción de rHSA

50

Este ejemplo empleó un buffer de extracción constante y llevó a cabo una combinación ortogonal en diferentes temperaturas (45°C, 50°C, 55°C, 60°C, respectivamente) y diferentes tiempos de extracción (20 min, 40 min, 60 min, 80 min, respectivamente) para obtener diferentes muestras de extracto. El procedimiento BCA se usó para determinar la concentración de proteínas totales en cada muestra y ELISA se usó para determinar la concentración de rHSA en cada muestra. Los resultados se mostraron en las Figs. 1 y 2, respectivamente. Cada muestra se sometió a SDS-PAGE y la fotografía de electroforesis se mostró en la Fig. 3.

55

Se puede observar por las Figs. 1 y 2 que con un incremento del tiempo y la temperatura de extracción, las concentraciones de proteínas totales y rHSA en el extracto del arroz molido tienden a incrementar

proporcionalmente. La temperatura de extracción tuvo una mayor influencia sobre la eficiencia de extracción que el tiempo de extracción. La mayor eficiencia de extracción de rHSA se obtuvo cuando la extracción se llevó a cabo a 60°C durante 60 mins. Se observó por la fotografía de electroforesis en la Fig. 3, bajo diferentes condiciones de temperatura y de tiempo, que las bandas espectrales de las proteínas extraídas tenían una diferencia significativa en el área en la que el peso molecular era mayor que el de la rHSA, mientras que las bandas espectrales eran idénticas en el área en la que el peso molecular era inferior al de la rHSA en diferentes condiciones de extracción.

Ejemplo 4: Efectos del valor de pH del buffer de extracción y de la concentración de sal de sulfato de amonio sobre el rendimiento de extracción de rHSA

Este ejemplo empleó una condición constante para extraer a 55°C durante 60 min. La relación entre el arroz molido y el buffer de extracción (p/v, kg/L) era de 1:5. Se llevaron a cabo combinaciones ortogonales en diferentes concentraciones de sulfato de amonio (0, 10, 30, 50 mM, respectivamente) y pH del buffer de extracción (pH 6,5, 7, 7,5, 8, respectivamente). El procedimiento BCA se usó para determinar la concentración de proteínas totales y ELISA se usó para determinar la concentración de rHSA en cada muestra. Los resultados se mostraron en las Figs. 4 y 5, respectivamente. El SDS-PAGE de las muestras obtenidas por combinaciones ortogonales de diferentes concentraciones de sulfato de amonio y pH del buffer de extracción se mostró en la Fig. 6.

Se puede observar por los resultados de las Figs. 4 y 5 que con un incremento de pH del buffer de extracción y de la concentración de sal, las concentraciones de proteínas totales y rHSA en el extracto de arroz molido tendían a incrementar proporcionalmente, con una desviación en casos individuales. El pH del buffer de extracción tuvo una influencia significativamente mayor sobre el rendimiento de extracción de rHSA que la concentración de sal del buffer de extracción. Bajo tal condición en la que el pH del buffer de extracción era de 7,5 y la concentración de sal era de 10 mM, la eficiencia de extracción de rHSA fue la más alta. En comparación con diferentes tiempos y temperaturas de extracción, diferentes pH y concentraciones de sal tuvieron sólo una influencia inferior sobre las bandas de las proteínas extraídas. A un pH más alto, hubo bandas ligeramente más pequeñas por encima de la banda principal de rHSA, mientras que otras bandas principales permanecieron idénticas, como se muestra en la Fig. 6.

Ejemplo 5: Efectos del tiempo de precipitación y de la concentración de caprilato de sodio sobre el rendimiento de extracción de rHSA

Las concentraciones de caprilato de sodio se proporcionaron como 10 mM, 20 mM, 30 mM y 40 mM respectivamente para comprobar si un incremento de la concentración de caprilato de sodio tenía un mejor efecto de protección sobre la rHSA. Después de la extracción, se añadió ácido acético para ajustar el pH a 4,5, y la mezcla resultante se precipitó durante 0h, 1h, 2h, 3h y durante la noche respectivamente para determinar la concentración de la proteína. El efecto de diferentes tiempos de precipitación y concentraciones de caprilato de sodio sobre el extracto de proteínas totales se mostró en la Fig. 7. El patrón de SDS-PAGE de las muestras obtenidas en diferentes concentraciones de caprilato de sodio y tiempos de precipitación se mostró en la Fig. 8. El extracto de las Figs. 7 y 8 se referían a las muestras de la mezcla después de la extracción pero antes de ajustar el pH.

Se puede observar por las Figs. 7 y 8 que el impacto de ajustar el pH de la solución de extracción a 4,5 dio como resultado bastantes rHSA precipitadas. A medida que el tiempo de precipitación incrementa, una porción de rHSA precipitada se volvía a diluir. Después de la precipitación durante la noche, la concentración media de proteínas totales fue del 78% en base al valor antes de la precipitación y no hubo ningún fenómeno de degradación después de la precipitación durante la noche. Por otro lado también se precipitaron en gran medida bandas degradadas y proteínas no objetivo durante el proceso de precipitación. Se mostró que 20 mM de caprilato de sodio tuvo el mejor efecto de protección, mientras que una mayor concentración causa una precipitación incrementada.

Ejemplo 6: Efectos del pH y del tiempo sobre la eficiencia de precipitación

Con el fin de determinar el efecto del pH y del tiempo de precipitación sobre la eficiencia de precipitación, el arroz molido se mezcló con un buffer de extracción (25 mM de buffer fosfato, 10 mM de sulfato de amonio, 10 mM de caprilato de sodio, pH 7,5) en una relación (p/v, kg/L) de 1:5, después se extrajo a 60°C durante 1 hora con remoción. El extracto resultante del grano de arroz molido se dividió en seis partes iguales, que se ajustaron a pH 4,5, 4,4, 4,3, 4,2, 4,1, 4,0, respectivamente. Los extractos con pH ajustado se sacudieron en un banco sacudidor a temperatura ambiente durante 1 y 2 horas respectivamente, seguido del muestreo. El patrón de SDS-PAGE de las muestras se mostró en la Fig. 9. El extracto de la Fig. 9 se refería a la muestra de la mezcla después de la extracción, pero antes de ajustar el pH.

Se puede observar por el patrón de SDS-PAGE de la Fig. 9 que a medida que el pH disminuía, la eficiencia de precipitación de las proteínas no objetivo se aumentaba, junto con la pérdida de rHSA. La extensión del tiempo de precipitación tiene un efecto positivo sobre la eficiencia de precipitación. A un pH por debajo de 4,1, las bandas macromoleculares se precipitaron completamente. Considerando los requisitos técnicos del sistema de proceso y minimizando la pérdida de rHSA objetivo, es preferible la precipitación a pH 4,5.

Ejemplo 7: Comparación entre los efectos de esterilización usando diferentes tamaños de membrana de fibras huecas de poliétersulfona (PES) en la etapa de microfiltración

10

1. Efecto de la microfiltración con diferentes membranas de filtro sobre la retirada de bacterias en el arroz

Las muestras de la solución usadas en este ejemplo eran un filtrado claro de la filtración a presión, que se obtuvo por el tratamiento del arroz transgénico molido usando el proceso mejorado de acuerdo con la presente invención en producción a escala piloto. Las muestras se trataron mediante columnas de fibras huecas pequeñas con un tamaño de poro de 0,20 μm y 0,45 μm respectivamente. Se recogió tanto la solución original antes del tratamiento como el filtrado después del tratamiento. 0,1 ml de la solución original o sus soluciones de dilución se aplicaron respectivamente sobre placas LB para analizar el efecto de esterilización de las dos membranas de filtro. Los resultados se mostraron en la Tabla 1. Se determinaron las concentraciones de albúmina sérica humana recombinante y proteínas totales en las soluciones antes o después del filtrado, y se calcularon los porcentajes de albúmina sérica humana recombinante en las proteínas totales. La gráfica de barras de porcentaje se mostró en la Fig. 10.

15

20

Tabla 1

Grado de dilución	1,0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	UFC
Muestra tras filtración a presión	382	37	2	2	0	1	3800
Muestra tras filtración de 0,45 μm	41	7	0	0	0	0	400-700
Muestra tras filtración de 0,20 μm	0	0	0	0	0	0	0

25

Se puede observar por los resultados de la tabla 1 que una membrana de fibras huecas de 0,45 μm puede retirar el 50%~90% de bacterias vivas en el filtrado de la filtración a presión, en contraste una membrana de fibras huecas de 0,20 μm puede retirar el 100% de bacterias vivas en el filtrado de la filtración a presión, garantizando que la contaminación microbiana no se podría introducir en la etapa de purificación posterior a través del filtrado, reduciéndose de ese modo el contenido de endotoxinas bacterianas en el proceso de producción.

30

Con respecto a la Fig.10, en comparación con las muestras filtradas de membrana de fibras huecas de 0,20 μm y 0,45 μm , cuando se filtran con membrana de 0,20 μm , la pérdida de albúmina sérica humana recombinante es muy inferior a la de proteínas totales. El extracto que se filtró con membrana de 0,20 μm tuvo una concentración relativamente mayor de albúmina sérica humana recombinante.

35

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para extraer albúmina sérica humana recombinante a partir de grano de arroz transgénico, que comprende las etapas de:
- 5
- 1) retirar la cáscara del arroz con cáscara transgénico que contiene albúmina sérica humana recombinante, moler el grano de arroz descascarillado, seguido de la mezcla del grano de arroz transgénico molido con un buffer de extracción que comprende buffer fosfato 10~30 mM, acetato de sodio 10~20 mM, sulfato de amonio 15~30 mM y caprilato de sodio 5~20 mM y un pH de 6,5~8, y la extracción mediante agitación para obtener la mezcla I;
- 10
- 2) ajustar el pH de la mezcla I de la etapa 1) a 4,0~4,5 y precipitarla durante 1~12 horas para obtener la mezcla II;
- 3) filtrar la mezcla II de la etapa 2) y recoger el filtrado para obtener una solución que contenga una alta concentración de albúmina sérica humana recombinante.
- 15
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que en la etapa 1) dicho grano de arroz transgénico molido tiene una finura de malla de 80~120.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho buffer de extracción tiene un pH de 7,0~7,5.
- 20
4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho buffer de extracción comprende buffer fosfato 25 mM, acetato de sodio 20 mM, sulfato de amonio 20 mM y caprilato de sodio 20 mM, y tiene un pH de 7,5.
- 25
5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que en la etapa 1) dicho grano de arroz transgénico molido y dicho buffer de extracción se mezclan en una relación de p/v (kg/L) que oscila entre 1:5 y 1:10; el tiempo de extracción es de 1~3 horas; y la temperatura de extracción es de 45~60°C.
- 30
6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que en la etapa 1) dicho grano de arroz transgénico molido y dicho buffer de extracción se mezclan en una relación de p/v (kg/L) de 1:5; el tiempo de extracción es de 1~1,5 horas; y la temperatura de extracción es de 55~60°C.
7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que en la etapa 2) dicha mezcla I se ajusta a pH 4,0~4,5 y después se precipita durante 3~12 horas a temperatura ambiente.
- 35
8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que en la etapa 2) dicha mezcla I se ajusta a pH 4,5 y se precipita durante la noche.
- 40
9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que en la etapa 3) dicha etapa de filtración comprende las etapas de filtrar por filtración a presión con un filtro prensa de placas y marcos de tipo tela filtrante, después filtrar por microfiltración con una membrana de fibras huecas de poliétersulfona.
- 45
10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que dicha membrana de fibras huecas de poliétersulfona tiene un tamaño de poro de 0,20 µm~0,45 µm.

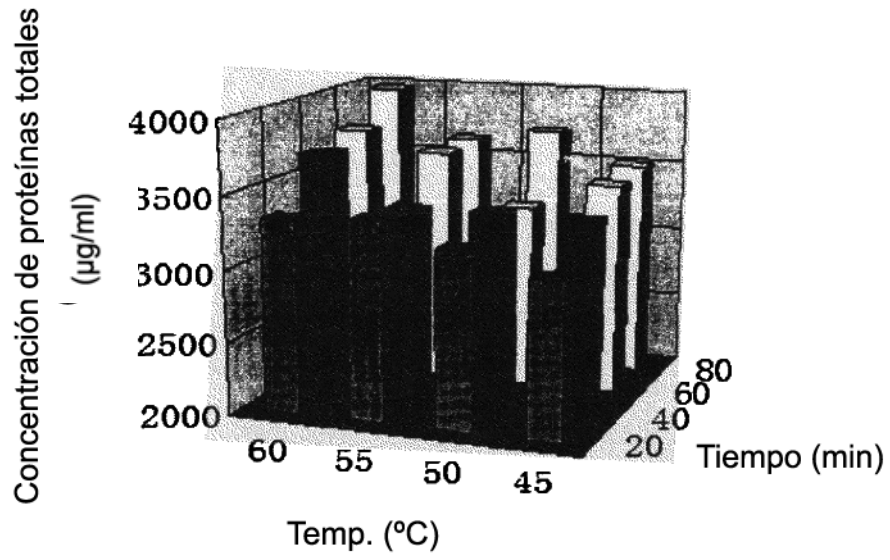


Fig. 1

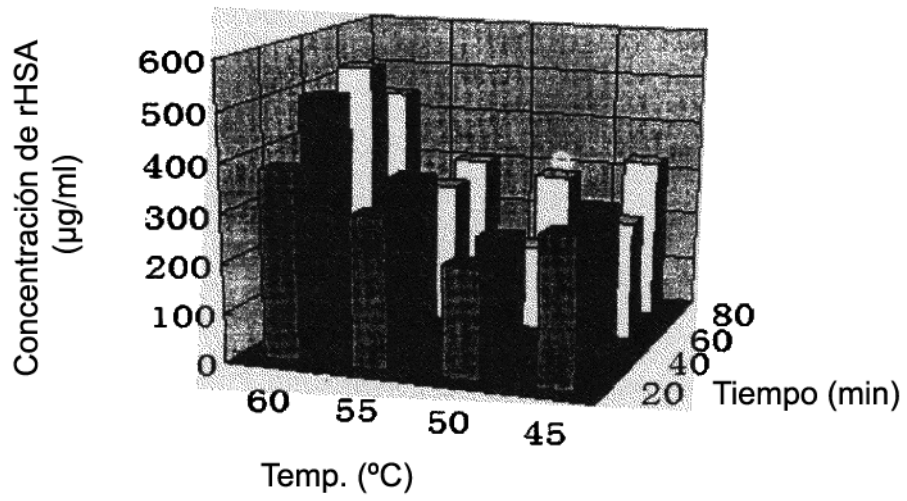


Fig. 2

Temp. /°C	60°C				55°C				50°C				45°C			
Tiempo/min	80	60	40	20	80	60	40	20	80	60	40	20	80	60	40	20

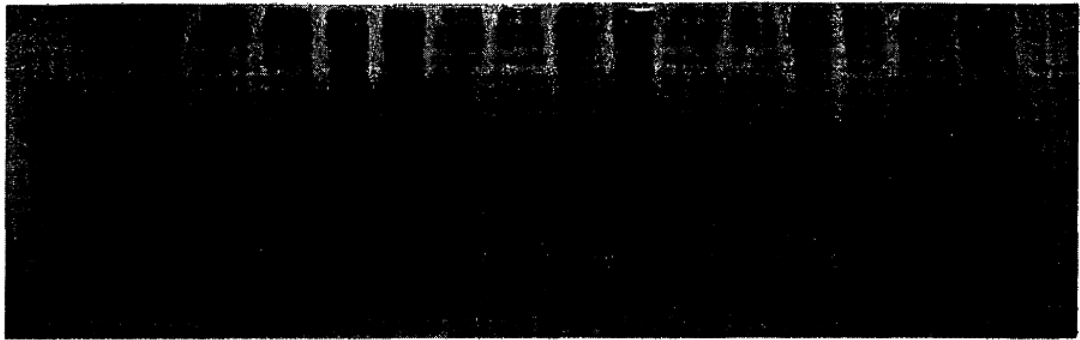


Fig. 3

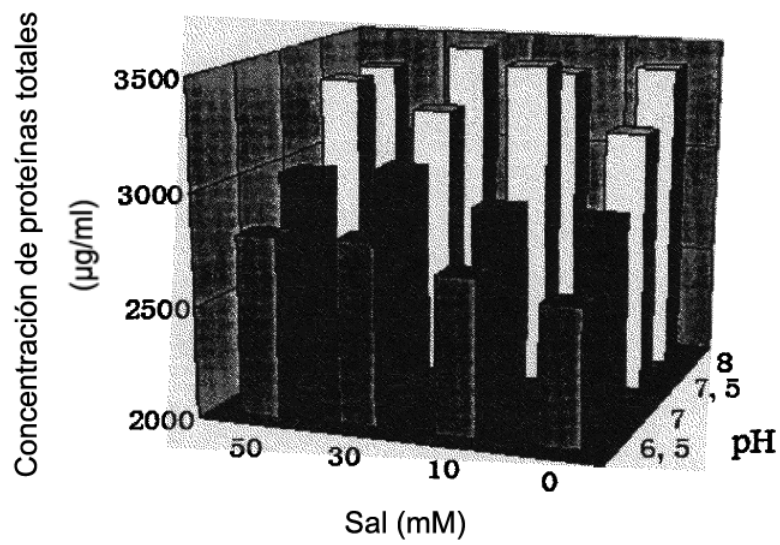


Fig. 4

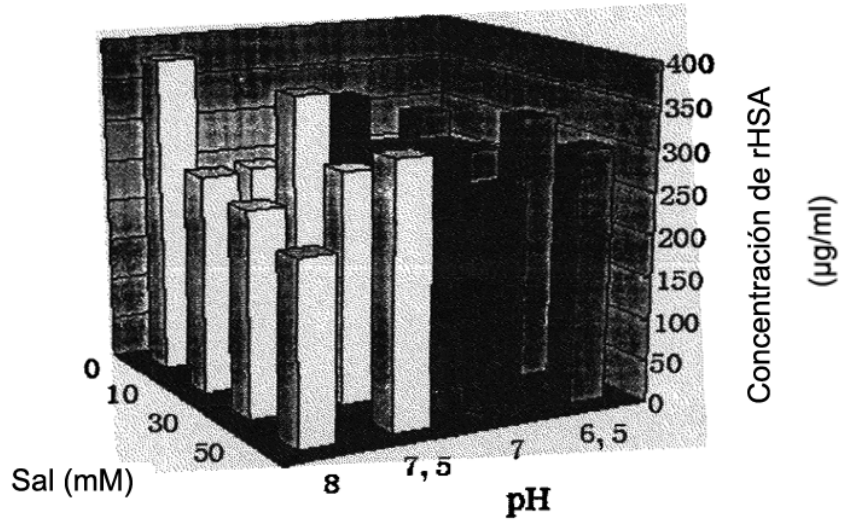


Fig. 5

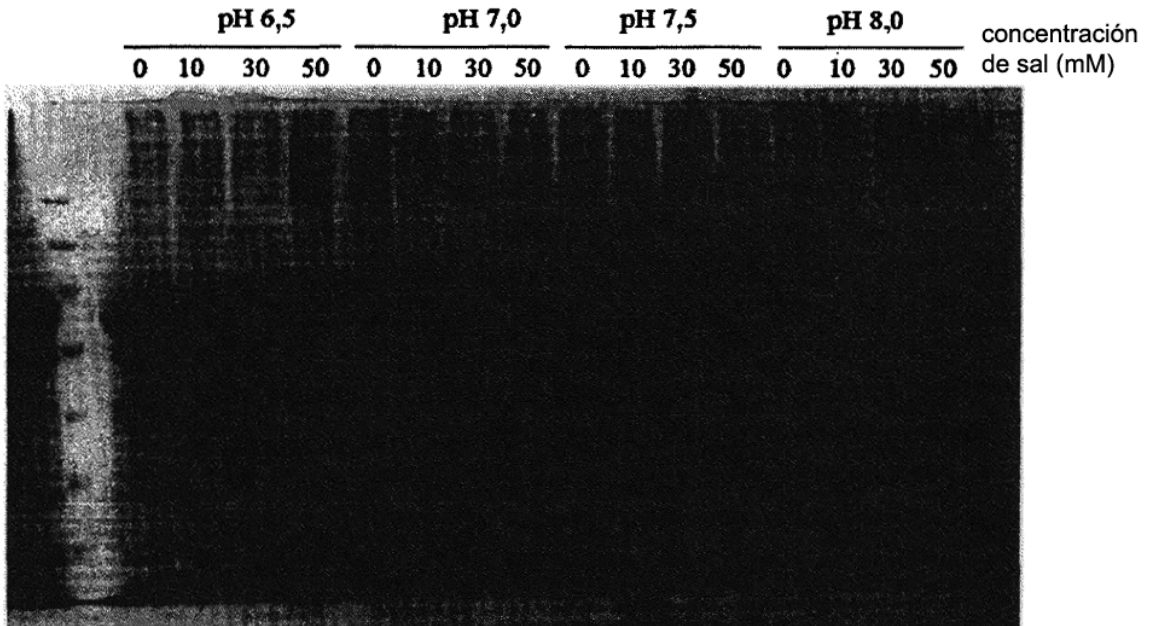


Fig. 6

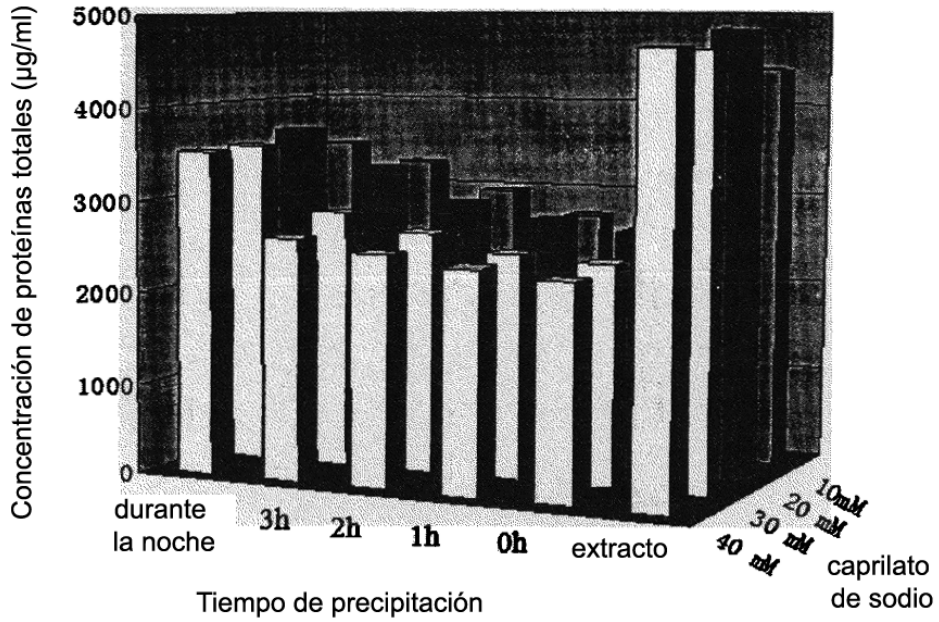


Fig. 7

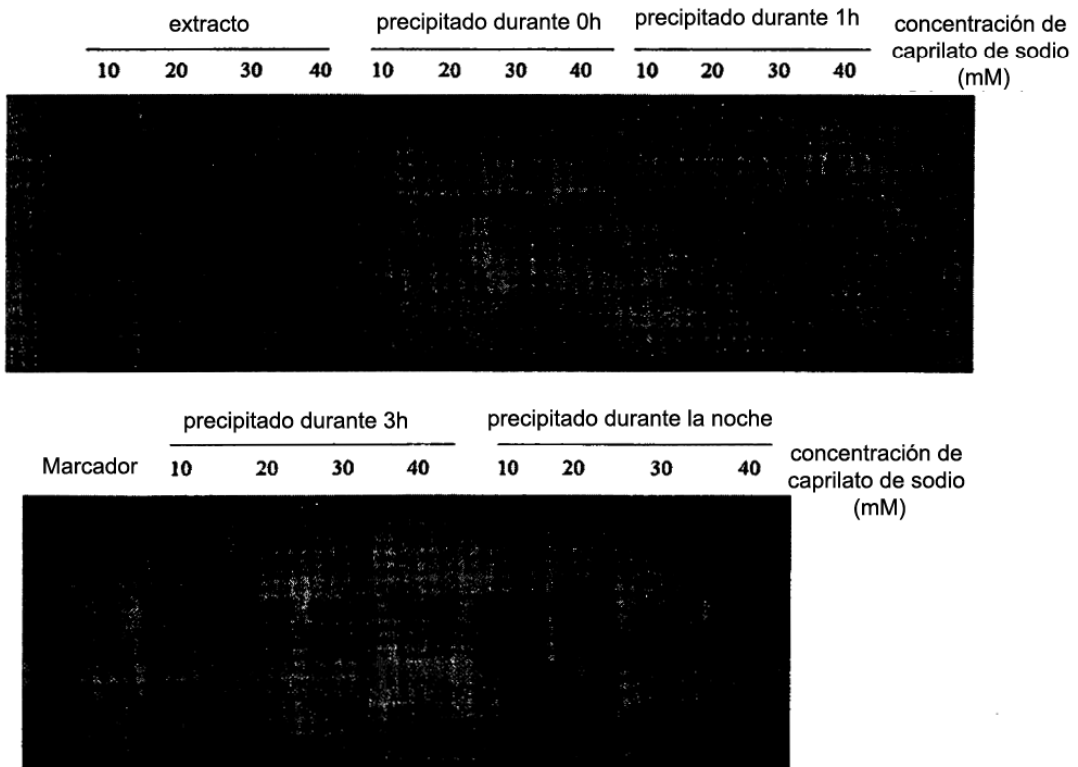


Fig. 8

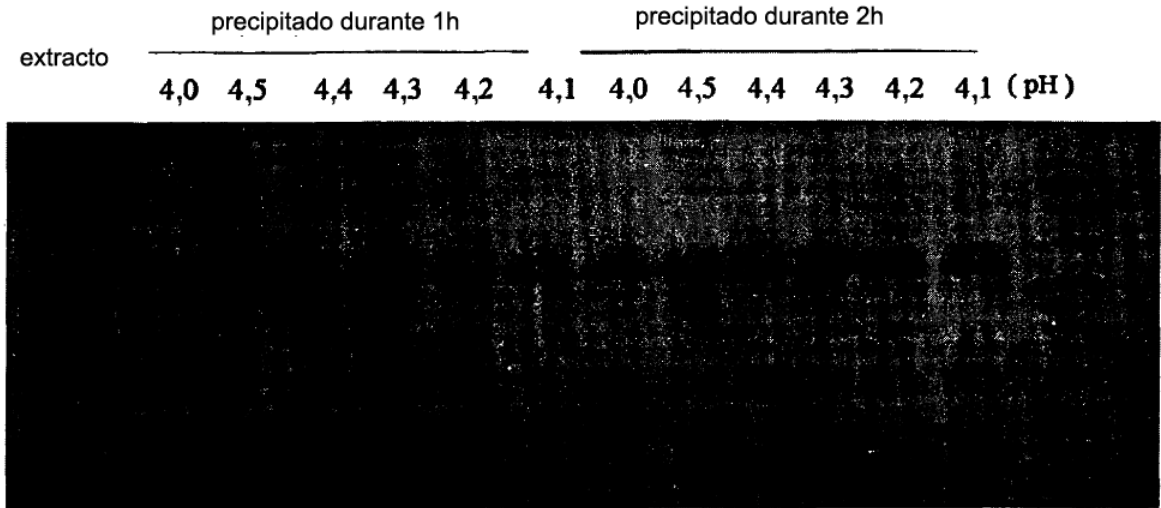


Fig. 9

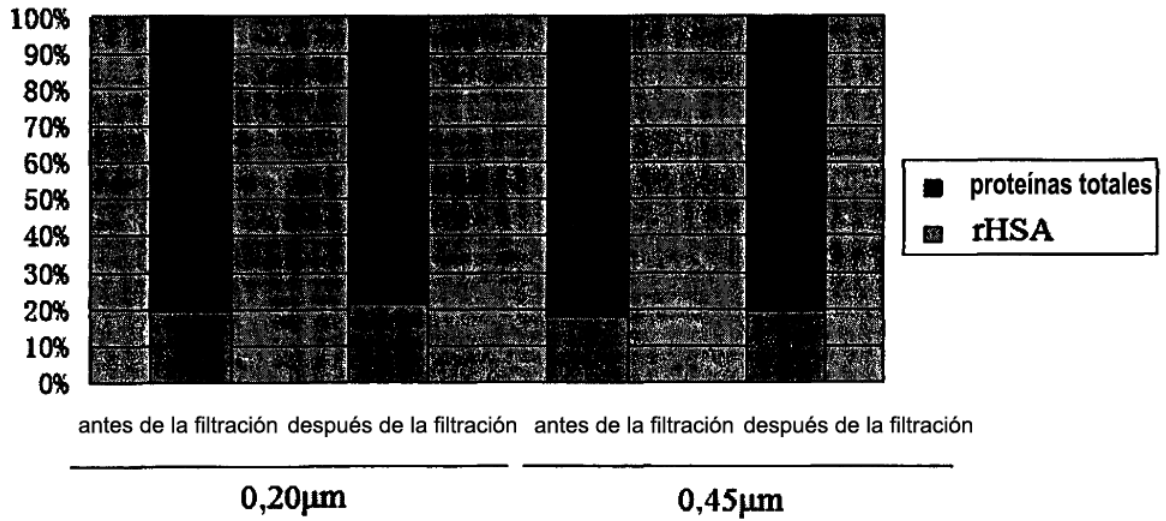


Fig. 10