

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 668 719**

51 Int. Cl.:

C07K 1/18 (2006.01)

C07K 1/34 (2006.01)

C07K 1/36 (2006.01)

C07K 14/79 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.04.2014 PCT/CN2014/074539**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.10.2014 WO14169760**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.04.2014 E 14785187 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.03.2018 EP 2987800**

54 Título: **Método para separar y purificar lactoferrina humana recombinada a partir de semillas de arroz**

30 Prioridad:

16.04.2013 CN 201310131488

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

21.05.2018

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;
SHI, JINGNI y
OU, JIQUAN**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 668 719 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

Método para separar y purificar lactoferrina humana recombinada a partir de semillas de arroz

5 Campo de la invención

La presente invención pertenece al campo de la biotecnología, y particularmente se refiere a un método para separar y purificar lactoferrina humana recombinante.

10 Antecedentes de la invención

La lactoferrina (LF) es una proteína de unión al hierro que está ampliamente presente en la leche y en diversos tejidos diferentes, que secretan los mamíferos, tiene muchas funciones fisiológicas tales como antibacteriana, antiinflamatoria y mejora de la inmunidad. Las investigaciones in vitro y los experimentos con animales han demostrado que la lactoferrina tiene un efecto preventivo sobre la infección microbiana intestinal, tal como la infección por rotavirus de tipo rueda, Giardia, Shigella y Salmonella. El efecto inhibitorio de lactoferrina sobre las bacterias patógenas intestinales se logra principalmente a través de dos mecanismos: inhibir el crecimiento de bacterias; destruir las funciones del factor de virulencia en la superficie de las bacterias y, por lo tanto, debilitar la capacidad del virus para adherirse o invadir las células de los mamíferos. Las investigaciones muestran que la adición de lactoferrina en los alimentos para lactantes es de gran importancia, y no solo puede satisfacer las necesidades del crecimiento y desarrollo infantil, sino que también beneficia la salud del bebé. Los países desarrollados en el mundo como Nueva Zelanda, Suiza, Australia, los Países Bajos, tienen la fuente de leche de mejor calidad del mundo entero, la mayoría de los preparados lácteos para lactantes de alta gama de estos países contienen lactoferrina, que es un ingrediente importante en leche humana.

Debido a la limitación de la fuente de leche, el suministro de lactoferrina no puede satisfacer la demanda del mercado, y es necesario encontrar formas alternativas de obtener lactoferrina. Por lo tanto, muchos investigadores han expresado lactoferrina en una diversidad de sistemas de expresión diferentes para obtener lactoferrina recombinante, por ejemplo, en plantas de arroz transgénicas (Fujiyama, Biosci. Biotechnol. Biochem. 68 (12), 2565-2570, 2004). Sin embargo, todavía existen problemas tales como bajo rendimiento y gran dificultad en la purificación. El presente solicitante se dedica a estudiar el sistema de expresión de arroz y ha expresado con éxito la lactoferrina humana recombinante en semillas de arroz.

Resumen de la invención

Es un objeto de la presente invención proporcionar un método de cromatografía para separar y purificar la lactoferrina humana recombinante a partir de semillas de arroz transgénicas. El método de cromatografía comprende las siguientes etapas de:

1) extraer lactoferrina humana recombinante a partir de semillas de arroz transgénico, para obtener extracto en bruto que contiene lactoferrina humana recombinante;

2) someter el extracto en bruto que contiene lactoferrina humana recombinante a cromatografía de intercambio catiónico para realizar la purificación primaria, para obtener una fracción de elución que contiene lactoferrina humana recombinante; donde, la cromatografía de intercambio catiónico se realiza en una resina de intercambio catiónico débil, la etapa de cromatografía comprende:

2A) equilibrar la columna de cromatografía con 5-15 veces el volumen de columna de tampón que contiene Tris 10-25 mM, NaAC 10-25 mM, NaCl 0-250 mM, pH 6,0-7,5, a un caudal de 50-200 cm/h;

2B) usar el extracto en bruto de la etapa 1) como una muestra de carga, donde la muestra tiene una conductancia de 2-25 ms/cm, y un pH de 6,0-7,5; lavar las impurezas con un tampón de lavado de impurezas, conteniendo el tampón de lavado de impurezas NaH_2PO_4 3-10 mM, Na_2HPO_4 3-10 mM, NaCl 200-300 mM, pH 6,5-8,0, y siendo el caudal de elución de 50-200 cm/h;

2C) eluir lactoferrina con un tampón de elución que contenía NaH_2PO_4 3-10 mM, Na_2HPO_4 3-10 mM, NaCl 400-650 mM, pH 6,5-8,0 a un caudal de 50-200 cm/h, para obtener una fracción de elución;

3) recoger la fracción de elución de la etapa 2), para obtener la solución que contenía lactoferrina humana recombinante.

Preferiblemente, la resina de intercambio catiónico débil de la etapa 2) es CM sepharose FF.

El método de cromatografía de la presente invención comprende además las siguientes etapas de regeneración de resina de cromatografía de:

- a) lavar la columna con 3-10 veces el volumen de columna de solución alta en sal que contiene NaCl 1-2 M, pH 6,5-10,0 a un caudal de 50-200 cm/h hasta que la UV280 no tenga un cambio obvio;
- b) lavar la columna con 3-10 veces el volumen de la columna de tampón que contiene citrato sódico 5-25 mM, pH 2,0-4,0 a un caudal de 50-200 cm/h;
- c) lavar la columna con 2-5 veces el volumen de la columna de una solución 0,5-1,0 M de NaOH a un caudal de 30-100 cm/h;
- d) lavar la columna con 8-15 veces el volumen de la columna de agua ultrapura a un pH de menos de 10,0, manteniendo la resina en una solución al 20% de etanol.

15 Específicamente, de acuerdo con el método de cromatografía de la invención, donde la extracción de lactoferrina humana recombinante de la etapa 1) comprende las siguientes etapas de:

(1) usar semillas de arroz transgénico que contienen lactoferrina humana recombinante como materia prima, descascarillar los granos de arroz en arroz integral y molerlo en polvo de arroz con una finura de malla de 80-100;

(2) mezclar el polvo de arroz y el tampón de extracción en una relación peso/volumen de 1:5-1:10 a temperatura ambiente durante 0,5-2 h, para obtener una mezcla; conteniendo el tampón de extracción Tris 10-25 mM, NaAC 10-25 mM, NaCl 0-250 mM, pH 6,0-7,5;

(3) filtrar la mezcla, para obtener extracto en bruto que contiene lactoferrina humana recombinante.

De acuerdo con el método de cromatografía de la invención, donde la etapa de cromatografía de la etapa 2) comprende:

2a) equilibrar la columna de cromatografía con 10 veces el volumen de la columna de tampón de equilibrio que contiene Tris 25 mM, NaAC 25 mM, NaCl 200 mM, pH 6,5, a un caudal de 150 cm/h;

2b) usar el extracto en bruto de la etapa 1) como una muestra de carga, donde la muestra tiene una conductancia de 22,5 ms/cm, y un pH de 6,5; lavar las impurezas con un tampón de lavado de impurezas, conteniendo el tampón de lavado de impurezas NaH_2PO_4 4 mM, Na_2HPO_4 6 mM, NaCl 300 mM, pH 7,5 a un caudal de 150 cm/h;

2c) eluir lactoferrina con un tampón de elución, conteniendo el tampón de elución NaH_2PO_4 4 mM, Na_2HPO_4 6 mM, NaCl 600 mM, pH 7,5 a un caudal de 50-200 cm/h, para recoger la fracción de elución que contiene lactoferrina humana recombinante;

Es otro objeto de la presente descripción proporcionar un método de extracción para preparar lactoferrina humana recombinante a partir de semillas de arroz transgénico, que comprende secuencialmente las siguientes etapas de:

(1) usar semillas de arroz transgénico que contienen lactoferrina humana recombinante como materia prima, descascarillar los granos de arroz en arroz integral y molerlo en polvo de arroz con una finura de malla de 80-100;

(2) mezclar el polvo de arroz y el tampón de extracción en una relación peso/volumen de 1:5-1:10 a temperatura ambiente durante 0,5-2 h, para obtener una mezcla; conteniendo el tampón de extracción Tris 10-25 mM, NaAC 10-25 mM, NaCl 0-250 mM, pH 6,0-7,5;

(3) filtrar la mezcla, para obtener extracto en bruto que contiene lactoferrina humana recombinante.

Descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra una imagen de electroforesis de cromatografía de intercambio catiónico en flujo rápido CM sepharose; donde, M: muestra molecular, S: muestra de carga, FT: pico de flujo pasante, Elu: pico de elución de rLF, Lavado: pico de lavado de impurezas.

La Fig. 2 muestra una imagen de electroforesis de cromatografía de intercambio catiónico en UNO Sphere S; donde, S: muestra de carga, FT: pico de flujo pasante, CIP: limpieza in situ, 20%, 40%, 60%, 100% son relaciones porcentuales de NaCl 1,5 M, respectivamente.

5 La Fig. 3 muestra una imagen de electroforesis de determinación de la capacidad de carga real de flujo rápido CM sepharose;

donde, M: muestra molecular, Elu: pico de elución de rLF, Lavado: pico de lavado de impurezas, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 430, 450 son volumen de flujo pasante del extracto en bruto (ml), L: muestra de carga.

10 La Fig. 4 muestra una imagen de electroforesis de elución por etapas en flujo rápido CM sepharose; donde, M: muestra molecular, L: muestra de carga, FT: pico de flujo pasante, 10%, 20%, 40% eran concentraciones de sal de elución, respectivamente.

La Fig. 5 muestra una imagen de electroforesis de un grupo de condiciones de lavado de impurezas en flujo rápido
15 CM sepharose;

donde, M: muestra molecular, L: muestra de carga, FT: pico de flujo pasante, 10%, 20%, 40% son concentraciones de sal para las impurezas de lavado, respectivamente, Elu: pico de elución de rLF.

La Fig. 6 muestra la pureza por HPLC del producto rLF purificado obtenido (RP -HPLC); donde, la pureza es mayor
20 del 95%.

Descripción detallada de la invención

Las características y ventajas de la presente invención se pueden comprender mejor a través de la siguiente
25 descripción detallada junto con los dibujos adjuntos. Se proporcionan ejemplos para ilustrar el método de la invención, y no deben interpretarse como limitativos de la invención de ningún modo.

A menos que se indique otra cosa, el equipo y el aparato usados en los siguientes ejemplos estaban disponibles
30 comercialmente.

[Ejemplo 1] Preparación de extracto en bruto de lactoferrina humana recombinante (rLF)

El arroz con cáscara que contenía lactoferrina humana recombinante se descascaró para obtener arroz integral y se
35 molió para obtener polvo de arroz con una finura de malla de 80-100. El polvo de arroz se mezcló con un tampón de extracción en una relación de 1:10 (p/v, kg/l), y se extrajo a temperatura ambiente durante 1 hora. Los componentes del tampón de extracción fueron: Tris-HCl 25 mM, acetato sódico anhidro 20 mM (NaAC), NaCl 200 mM, pH 6,5. La mezcla obtenida se sometió a filtración a presión usando un filtro de prensa de placas-marcos de tipo de tela de filtro, para obtener un extracto en bruto claro que contenía rLF.

40 [Ejemplo 2] Selección de resina de cromatografía y condiciones de elución en la cromatografía de intercambio catiónico

Selección de resina de cromatografía en cromatografía de intercambio catiónico

45 Dado que las semillas de arroz tienen un mayor contenido de pigmento y polisacárido, una resina catiónica puede evitar la deposición de pigmentos en el medio de cromatografía, mejorando así la disponibilidad de resina y asegurando la pureza de las muestras. Este ejemplo empleó resinas de intercambio catiónico con mayor caudal de trabajo como resina de cromatografía, incluyendo UNO Sphere S de la empresa Bio-Rad y flujo rápido CM Sepharose (CM sepharose FF) de la empresa GE, etc. El extracto en bruto obtenido en el Ejemplo 1 se usó como
50 una muestra de carga de cromatografía de intercambio catiónico.

1. Cromatografía de intercambio catiónico realizado en flujo rápido CM sepharose

Se empaquetaron aproximadamente 18 ml de resina flujo rápido CM sepharose en una columna Econo 15/20, y la
55 columna se equilibró con 200 ml de tampón (Tris-HCl 25 mM, acetato sódico anhidro 20 mM, NaCl 200 mM, pH 6,5) a un caudal de 150 cm/h, hasta que el valor de pH y la conductividad fueron constantes hasta el valor inicial. La muestra tenía una conductividad de 22,5 ms/cm y un pH de 6,5. Después de la carga, la muestra se eluyó con un tampón (NaH₂PO₄ 4 mM, Na₂HPO₄ 6 mM, NaCl 300 mM, pH 7,5) a un caudal de 150 cm/h para eluir las impurezas. Después de eluir las impurezas, la lactoferrina se eluyó con un tampón (NaH₂PO₄ 4 mM, Na₂HPO₄ 6 mM, NaCl 600
60 mM, pH 7,5) a un caudal de 150 cm/h, y las fracciones de elución se recogieron para obtener la fracción que

contenía rLF. La imagen de electroforesis se muestra en la Fig. 1.

2. Cromatografía de intercambio catiónico realizado en UNO Sphere S

5 Se empaquetaron aproximadamente 18 ml de resina UNO Sphere S en una columna Econo 15/20, y la columna se equilibró con 200 ml de tampón (Tris-HCl 25 mM, acetato sódico anhidro 20 mM, NaCl 200 mM, pH 8,0) a un caudal de 150 cm/h, hasta que el valor de pH y la conductividad fueron constantes hasta el valor inicial. La muestra tenía una conductividad de 22,5 ms/cm y un pH de 6,5. Después de la carga, la muestra se sometió a elución por etapas con un tampón que contenía NaH_2PO_4 4 mM, Na_2HPO_4 6 mM, pH 7,5 y que contenía NaCl 300 mM, NaCl 600 mM, NaCl 900 mM, NaCl 1,5 M respectivamente, a un caudal de 150 cm/h, y las fracciones de elución se recogieron. La imagen de electroforesis se muestra en la Fig. 2. En la figura, 20%, 40%, 60%, 100% son relaciones porcentuales de NaCl 1,5 M, respectivamente, que corresponden a NaCl 300 mM, NaCl 600 mM, NaCl 900 mM y NaCl 1,5 M, respectivamente.

15 3. Determinación de la capacidad de carga real de flujo rápido CM sepharose

Se empaquetaron aproximadamente 18 ml de flujo rápido CM sepharose en una columna Econo 15/20, y la columna se equilibró con 200 ml de tampón (Tris-HCl 25 mM, acetato sódico anhidro 20 mM, NaCl 200 mM, pH 6,5) a un caudal de 150 cm/h, hasta que el valor de pH y la conductividad fueron constantes hasta el valor inicial. La muestra del Ejemplo 1 tenía una conductividad de 22,5 ms/cm y un pH de 6,5 y el volumen total era de 450 ml. La muestra se cargó en flujo rápido CM Sepharose a un caudal de 150 cm/h. El valor de absorción de UV280 durante la carga de la muestra se registró hasta el valor de absorción más allá de la meseta en un 10%. El volumen de muestra se registró y se calculó la capacidad de carga real por mililitro de flujo rápido CM Sepharose bajo este caudal; después, la resina se regeneró. La imagen de electroforesis se muestra en la Fig. 3.

25 Se encontró a partir de los experimentos anteriores que bajo las mismas condiciones de carga de muestra, la resina de intercambio catiónico débil flujo rápido CM presentaba una mayor eficacia de resolución y de separación, como una resina de intercambio aniónico más fuerte; mientras tanto, el flujo rápido CM Sepharose se desarrolló antes, y tenía un proceso maduro y una excelente estabilidad química, una vida útil más larga y un coste relativamente bajo. En vista de los diversos factores, se usó flujo rápido CM Sepharose como resina de cromatografía preferida para la cromatografía de intercambio catiónico.

Optimización de las condiciones de elución

35 El extracto que contenía rLF se cargó en una columna de flujo rápido CM sepharose y se sometió a una elución en gradiente mediante la adición de una sal (Fig. 4). Los resultados mostraron que, bajo el gradiente del 10% de NaCl 1,5 M, se eluyeron las bandas de impurezas obvias y no se perdió ninguna proteína diana; bajo el gradiente del 20% de NaCl 1,5 M, se eluyó una pequeña cantidad de bandas de impurezas, y la pérdida de proteína diana fue menor; la proteína diana se eluyó en forma concentrada bajo el gradiente de NaCl al 40% 1,5 M; no hubo pico de elución por debajo del 60% o mayor concentración de sal, lo que significa que la proteína diana puede eluirse completamente por debajo del 40% de NaCl 1,5 M. A través de un estudio adicional sobre la concentración de elución, se encontró que, cuando la concentración de sal era inferior al 40%, la pureza de la proteína eluida no se veía afectada. El pico de elución tuvo una cola máxima seria y la tasa de recuperación disminuyó. Finalmente, se seleccionó NaCl al 40% 1,5 M como la condición de elución determinada.

Optimización de las condiciones de lavado de impurezas

En las mismas condiciones de equilibrio y condiciones de elución, se compararon las condiciones de lavado de impurezas del 10%, 15% y 20%, respectivamente (Fig. 5). Con el aumento de la concentración de sal para el lavado de impurezas, se aumentó la pérdida de proteína diana, pero se mejoró significativamente la eficacia de eliminación de impurezas. En las tres condiciones, no hubo diferencias significativas en la tasa de recuperación de proteínas. Con el fin de asegurar la pureza de la proteína diana, se determinó el 20% de NaCl 1,5 M como la condición de lavado de impurezas finalmente.

55 Teniendo en cuenta la eficacia de purificación y la velocidad de recuperación, se usaron NaH_2PO_4 4 mM, Na_2HPO_4 6 mM, NaCl 300 mM, pH 7,5 como las condiciones de lavado de impurezas preferidas, y se usaron NaH_2PO_4 4 mM, Na_2HPO_4 6 mM, NaCl 600 mM, pH 7,5 como las condiciones de elución preferidas de la proteína diana.

60 **[Ejemplo 3] Determinación de las condiciones de regeneración de la resina CM sepharose FF después de la purificación de rLF**

- Después de la purificación de rLF mediante intercambio catiónico, se descubrió que había una deposición de pigmento marrón grave en la columna de cromatografía durante CIP (limpieza en el lugar), que no se puede eliminar mediante regeneración convencional con agua, alcohol isopropílico al 30%, etanol al 70%, HCl 0,01 M, NaOH 1 M y urea 8 M. Se supo mediante un análisis que el hierro que estaba unido a rLF formó hidróxido férrico precipitado bajo alcalinidad fuerte. Dado que la resina no puede tolerar una alta concentración de ácido, finalmente los pigmentos depositados se eliminaron con éxito a través de una propiedad quelante de ión férrico más fuerte del citrato sódico en condiciones ácidas.
- 10 Durante la regeneración de CM Sepharose FF usando citrato de sodio, se encontró que el citrato de sodio solo se quelaba con hierro en la columna bajo condiciones de pH bajo. Teniendo en cuenta el intervalo de pH que puede ser tolerado por la resina, finalmente se seleccionó el pH 3,0; bajo el uso normal de la solución de regeneración de resina (aproximadamente 5 veces el volumen de la columna), se determinó la concentración de citrato. Si los iones férricos no se pueden eliminar por completo a esta concentración, durante la posterior regeneración de NaOH, la deposición de pigmento marrón estaría presente en la columna de cromatografía. De lo contrario, la columna de cromatografía mostraría un color normal. Los resultados del experimento se muestran en la Tabla a continuación:

Concentración de citrato sódico	Color de la columna de cromatografía	Uso
10 mM	deposición de pigmento marrón	100 ml
20 mM	normal	100 ml
50 mM	normal	100 ml
100 mM	normal	100 ml

Los resultados mostraron que: 100 ml de citrato sódico 20 mM pueden quelarse con iones férricos en la columna de cromatografía por completo. Por lo tanto, la concentración de citrato sódico se determinó.

En resumen, de acuerdo con la particularidad de la proteína diana, el proceso de regeneración de flujo rápido CM Sepharose se cambió del lavado con alto contenido de sal normal seguido de NaOH en las siguientes etapas: eliminación de rLF que no se eluyó usando alto contenido de sal (NaCl 2 M, pH 7,0), después eliminación del hierro en la rLF residual usando citrato sódico de ácido (citrato sódico 20 mM, pH 3,0), y después realización de un procedimiento de limpieza normal usando NaOH 1 M.

La columna de cromatografía que se empaquetó con 18 ml de resina CM Sepharose FF para cromatografía de intercambio catiónico utilizada en el Ejemplo 1 se lavó primero con 100 ml de solución salina alta (NaCl 2 M, pH 7,0) a un caudal de 150 cm/h hasta que la UV280 no tuvo ningún cambio obvio; luego se lavó con 100 ml de solución de tampón (citrato sódico 20 mM, pH 3,0) a un caudal de 150 cm/h hasta que el pH disminuyó por debajo de 4,0; a continuación, la columna de cromatografía se volvió a lavar con 100 ml de una solución 0,5 M de NaOH a un caudal de 50 cm/h; y luego se lavó con 200 ml de agua ultrapura hasta que el pH fue inferior a 10,0; finalmente, la resina se almacenó en una solución de etanol al 20% durante un tiempo prolongado.

[Ejemplo 4] Separación y purificación de lactoferrina humana recombinante y regeneración de resina cromatográfica

Purificación de una etapa realizada por intercambio catiónico

Se empaquetaron aproximadamente 150 ml de flujo rápido CM sepharose en una columna XK50, y la columna se equilibró con 2000 ml de tampón (Tris-HCl 25 mM, acetato sódico anhidro 20 mM, NaCl 200 mM, pH 6,5) a un caudal de 150 cm/h, hasta que el valor de pH y la conductividad fueron constantes hasta el valor inicial. El extracto en bruto obtenido en el Ejemplo 1 se usó como una muestra. La muestra tenía una conductividad de 22,5 ms/cm y un pH de 6,46. Después de la carga, la muestra se eluyó con un tampón (NaH₂PO₄ 4 mM, Na₂HPO₄ 6 mM, NaCl 300 mM, pH 7,5) a un caudal de 150 cm/h para eluir las impurezas y recoger la fracción de lavado de impurezas; a continuación, la muestra se eluyó con un tampón (NaH₂PO₄ 4 mM, Na₂HPO₄ 6 mM, NaCl 600 mM, pH 7,5) a un caudal de 150 cm/h, y la fracción de elución se recogió para obtener la fracción que contenía rLF.

Además, la resina se regeneró por las siguientes etapas: se lavó primero con 500 ml de solución salina alta (NaCl 2 M, pH 7,0) a un caudal de 150 cm/h hasta que la UV280 no tuvo ningún cambio obvio; luego se lavó con 500 ml de solución de tampón (citrato sódico 20 mM, pH 3,0) a un caudal de 150 cm/h hasta que el pH disminuyó por debajo de 4,0; a continuación, la columna de cromatografía se volvió a lavar con 500 ml de una solución 0,5 M de NaOH a un caudal de 50 cm/h; y luego se lavó con 1500 ml de agua ultrapura hasta que el pH fue inferior a 10,0; finalmente, la resina se almacenó en una solución de etanol al 20% durante un tiempo prolongado.

La rLF obtenida de la separación y purificación se determinó por HPLC. Mostró que la pureza por HPLC de rLF era del 98%, como se muestra en la Fig. 6; y el rendimiento de rLF podría alcanzar $27,24 \pm 0,77\%$, correspondiente a 2,25 g de rLF por kilogramo de arroz integral, particularmente como se muestra en la tabla a continuación.

5

Etapa de purificación	Volumen total (ml)	Contenido de proteína total (mg)	Lactoferrina total (mg)	Recuperación total de proteína (%)	Recuperación total de LF (%)
Extracto en bruto de rLF	1750	1639	820	100	100
Extracto purificado de rLF	222	450	427	27,5	52,1

REIVINDICACIONES

1. Un método de cromatografía para separar y purificar la lactoferrina humana recombinante a partir de semillas de arroz transgénico, comprende secuencialmente las siguientes etapas de:
- 5
- 1) extraer lactoferrina humana recombinante a partir de semillas de arroz transgénico, para obtener el extracto en bruto que contiene lactoferrina humana recombinante;
 - 2) someter el extracto en bruto que contiene lactoferrina humana recombinante a cromatografía de intercambio catiónico para realizar la purificación primaria, para obtener una fracción de elución que contiene lactoferrina humana recombinante; donde:
la cromatografía de intercambio catiónico se realiza en una resina de intercambio catiónico débil CM sephorse FF, la etapa de cromatografía comprende:
- 10
- 2A) equilibrar la columna de cromatografía con 5-15 veces el volumen de columna de tampón que contiene Tris 10-25 mM, NaAC 10-25 mM, NaCl 0-250 mM, pH 6,0-7,5, a un caudal de 50-200 cm/h;
 - 2B) usar el extracto en bruto de la etapa 1) como una muestra de carga, donde la muestra tiene una conductancia de 2-25 ms/cm, y un pH de 6,0-7,5; eluir las impurezas con un tampón de lavado de impurezas, conteniendo el
20 tampón de lavado de impurezas NaH_2PO_4 3-10 mM, Na_2HPO_4 3-10 mM, NaCl 200-300 mM, pH 6,5-8,0, y siendo el caudal de elución de 50-200 cm/h;
 - 2C) eluir la muestra con un tampón de lavado que contenía NaH_2PO_4 3-10 mM, Na_2HPO_4 3-10 mM, NaCl 400-650 mM, pH 6,5-8,0 a un caudal de 50-200 cm/h, para obtener una fracción de elución;
- 25
- 3) recoger la fracción de elución de la etapa 2), para obtener la solución que contenía lactoferrina humana recombinante.
2. El método de cromatografía de la reivindicación 1, donde comprende además las siguientes etapas de regeneración de resina de cromatografía de:
- 30
- a) lavar la columna con 3-10 veces el volumen de columna de solución alta en sal que contiene NaCl 1-2 M, pH 6,5-10,0 a un caudal de 50-200 cm/h hasta que la UV280 no tenga un cambio obvio;
 - b) lavar la columna con 3-10 veces el volumen de la columna de tampón que contiene citrato sódico 5-25 mM, pH
35 2,0-4,0 a un caudal de 50-200 cm/h;
 - c) lavar la columna con 2-5 veces el volumen de la columna de una solución 0,5-1,0 M de NaOH a un caudal de 30-100 cm/h;
 - d) lavar la columna con 8-15 veces el volumen de la columna de agua ultrapura a un pH de menos de 10,0, y mantener la resina en una solución al 20% de etanol.
- 40
3. El método de cromatografía de la reivindicación 1, donde la extracción de lactoferrina humana recombinante de la etapa 1) comprende las siguientes etapas de:
- (1) usar semillas de arroz transgénico que contienen lactoferrina humana recombinante como materia prima,
45 descascarillar los granos de arroz en arroz integral y molerlo en polvo de arroz con una finura de malla de 80-100;
 - (2) mezclar el polvo de arroz y un tampón de extracción en una relación peso/volumen de 1:5-1:10 a temperatura ambiente durante 0,5-2 h, para obtener una mezcla; conteniendo el tampón de extracción Tris 10-25 mM, NaAC 10-25 mM, NaCl 0-250 mM, pH 6,0-7,5;
- 50
- (3) filtrar la mezcla, para obtener extracto en bruto que contiene lactoferrina humana recombinante.
4. El método de cromatografía de la reivindicación 1, donde la etapa de cromatografía de la etapa 2) comprende:
- 55
- 2a) equilibrar la columna de cromatografía con 10 veces el volumen de la columna de tampón de equilibrio que contiene Tris 25 mM, NaAC 25 mM, NaCl 200 mM, pH 6,5, a un caudal de 150 cm/h;
 - 2b) usar el extracto en bruto de la etapa 1) como una muestra de carga, donde la muestra tiene una conductancia de
60 22,5 ms/cm, y un pH de 6,5; lavar la impureza con un tampón de lavado, conteniendo el tampón de lavado NaH_2PO_4

4 mM, Na₂HPO₄ 6 mM, NaCl 300 mM, pH 7,5 a un caudal de 150 cm/h;

2c) eluir la muestra con un tampón de elución, conteniendo el tampón de elución NaH₂PO₄ 4 mM, Na₂HPO₄ 6 mM, NaCl 600 mM, pH 7,5 a un caudal de 150 cm/h, para recoger la fracción de elución que contiene lactoferrina humana recombinante;

5. El método de cromatografía de la reivindicación 1, donde la etapa de regeneración de resina de cromatografía comprende:

10 a1) lavar la columna con 5 veces el volumen de columna de solución alta en sal que contiene NaCl 2 M, pH 7,5 a un caudal de 150 cm/h hasta que la UV280 no tenga un cambio obvio;

b1) lavar la columna con 5 veces el volumen de la columna de tampón que contiene citrato sódico 20 mM, pH 3,0 a un caudal de 50-200 cm/h;

15

c1) lavar la columna con 3 veces el volumen de la columna de una solución 0,5 M de NaOH a un caudal de 50 cm/h;

d1) lavar la columna con 10 veces el volumen de la columna de agua ultrapura a un pH de menos de 10,0, y mantener la resina en una solución al 20% de etanol.

20

6. El método de cromatografía de la reivindicación 3, donde la extracción de lactoferrina humana recombinante comprende las siguientes etapas de:

(1a) usar semillas de arroz transgénico que contienen lactoferrina humana recombinante como materia prima, 25 descascarillar los granos de arroz en arroz integral y molerlo en polvo de arroz con una finura de malla de 80-100;

(2a) mezclar el polvo de arroz y un tampón de extracción a una relación peso/volumen de 1:10 a temperatura ambiente durante 1 h, para obtener una mezcla; conteniendo el tampón de extracción Tris 25 mM, NaAC, 20 mM, NaCl 200 mM, pH 6,5;

30

(3a) filtrar la mezcla, para obtener extracto en bruto que contiene lactoferrina humana recombinante.

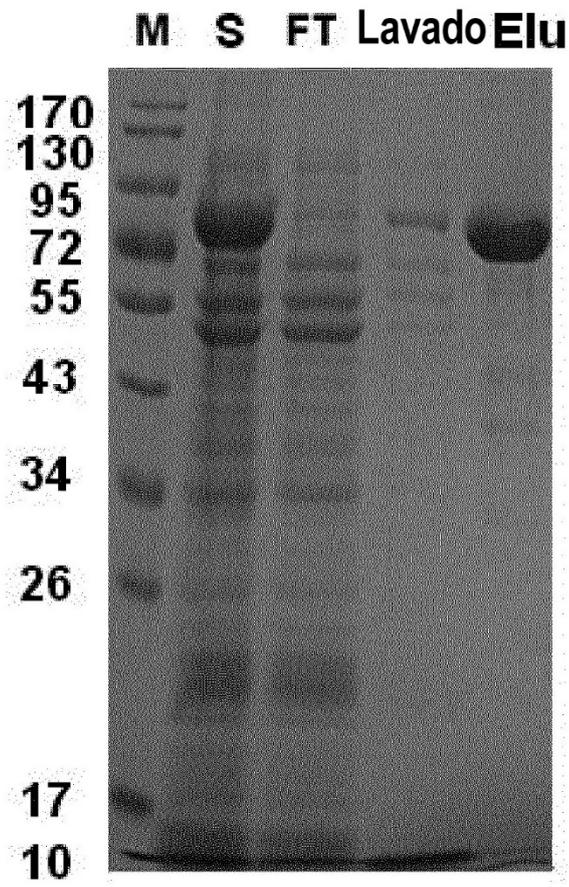


Fig.1

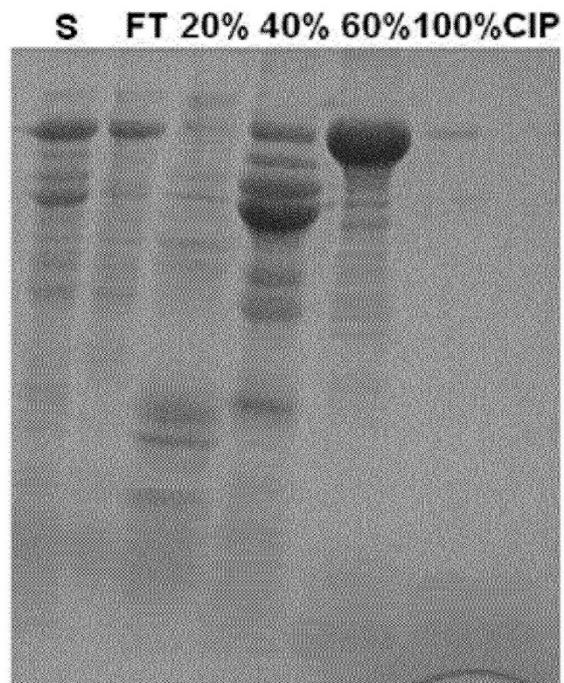


Fig. 2

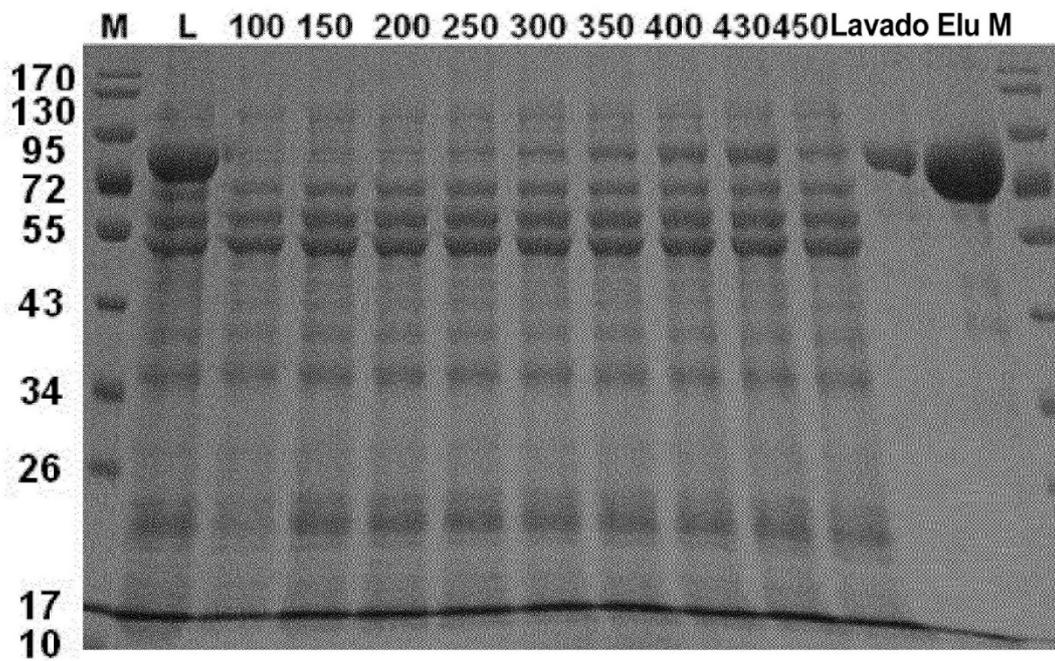


Fig. 3

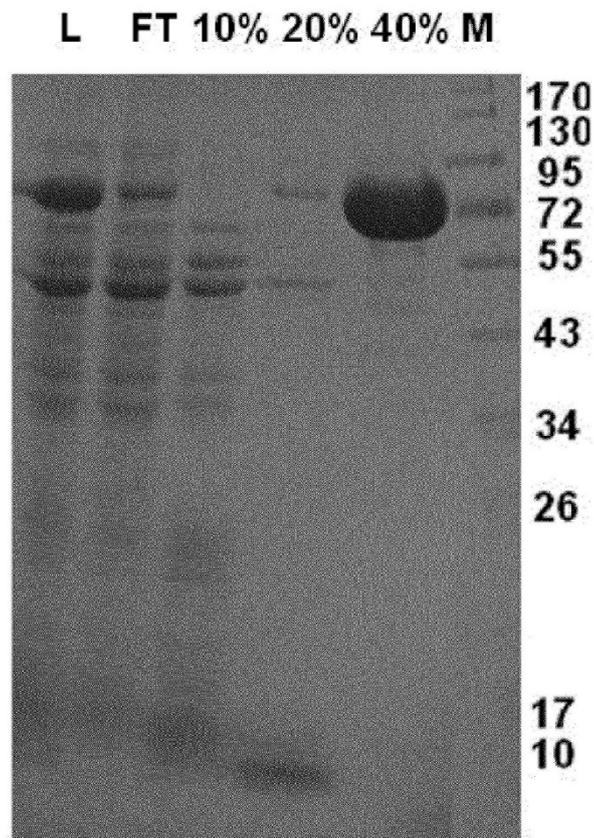


Fig. 4

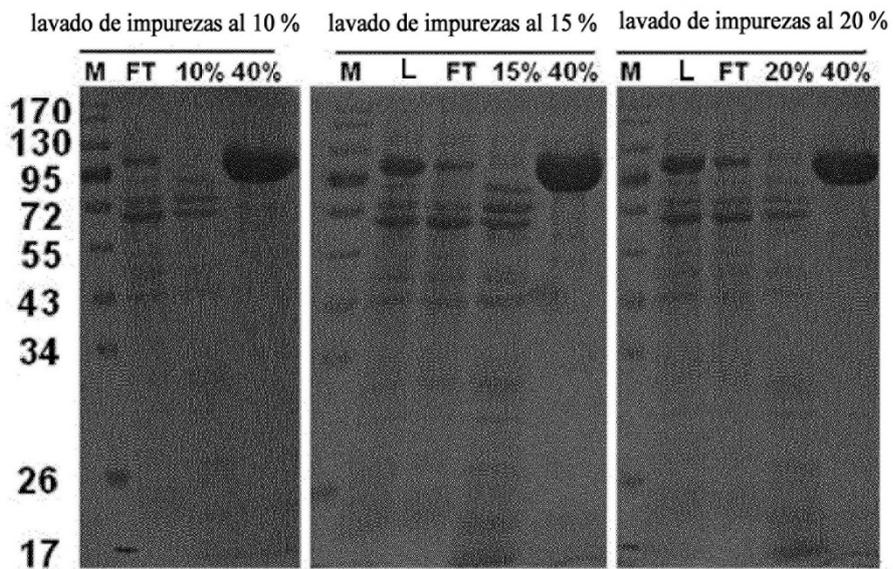


Fig. 5

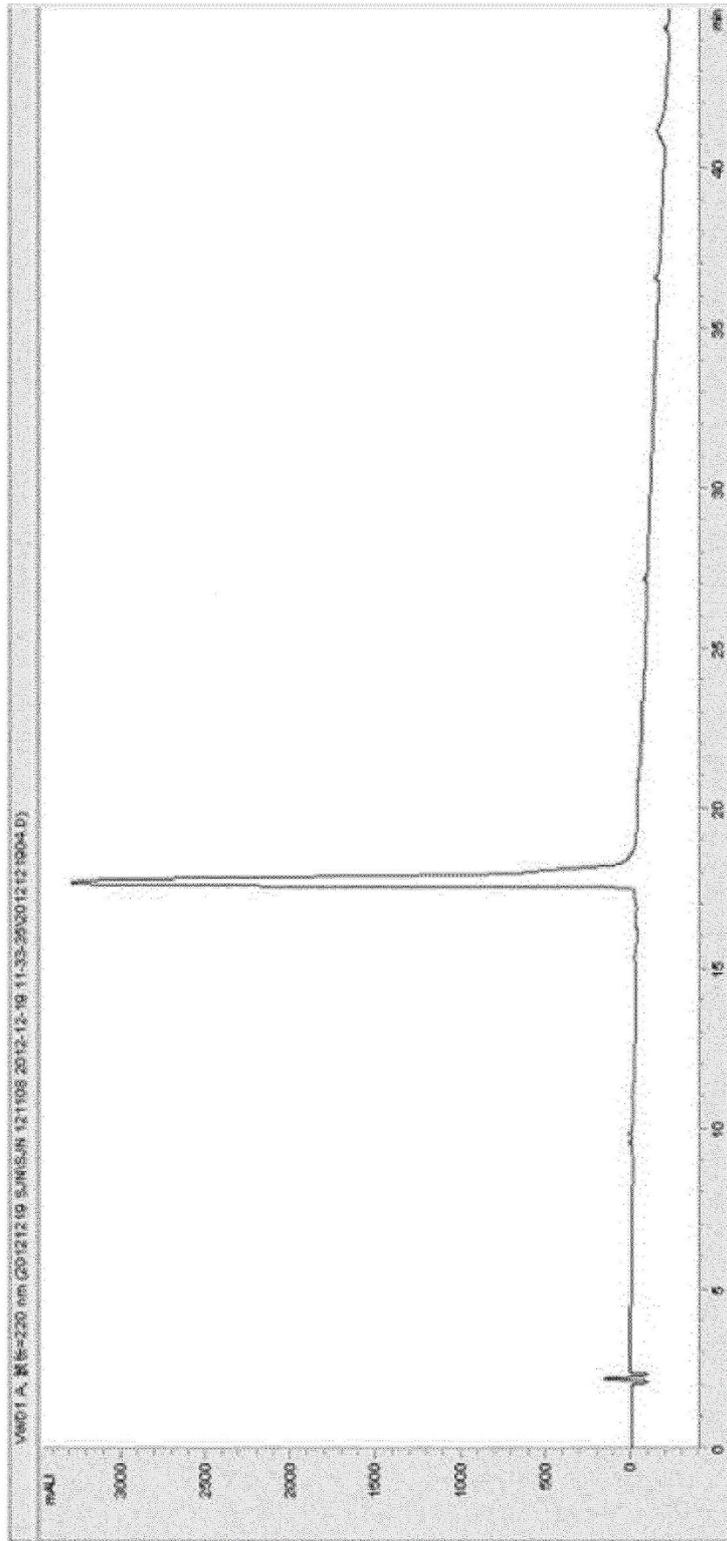


Fig. 6