

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 584 184**

51 Int. Cl.:

A61M 1/36 (2006.01)
C12N 11/06 (2006.01)
A61L 33/00 (2006.01)
A61M 1/34 (2006.01)
C12N 9/52 (2006.01)
C12N 11/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2014** **E 14198204 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.05.2016** **EP 2886142**

54 Título: **Equipo para el tratamiento extracorporal de la sangre**

30 Prioridad:

17.12.2013 EP 13197790

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

26.09.2016

73 Titular/es:

UNIVERSITY OF LIMERICK (100.0%)
Plassey Technological Park
Limerick, IE

72 Inventor/es:

COONEY, JAKKI;
KAGAWA, TODD FUMIO y
MAGNER, EDMOND

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 584 184 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

Equipo para el tratamiento extracorporeal de la sangre

Antecedentes de la invención

La septicemia se trata en la actualidad en los hospitales mediante la aplicación de «Los seis de la septicemia» (PMID 21398303). Estos son una serie de procedimientos para estabilizar al paciente, que incluyen la administración de antibióticos, el cultivo microbiano, la administración de un elevado flujo de oxígeno, y líquidos. Hasta la fecha, han fracasado los procedimientos para mitigar el daño de los órganos con la septicemia. El tratamiento con drotrecogina α activada, una serina proteasa que interviene en la desactivación de la coagulación, era, hasta hace muy poco, el principal procedimiento autorizado por la FDA para el tratamiento de la septicemia en los humanos. Sin embargo, en 2011, la FDA anunció que Eli Lilly había retirado Xigris (drotrecogina α). El 8 de agosto de 2012, AstraZeneca anunció que un estudio de fase IIb donde se analizaba la eficacia del CytoFabTM, un fragmento de anticuerpo policlonal anti-TNF α , para el tratamiento de la septicemia grave y/o el choque séptico, no mostraba ninguna mejora significativa frente al placebo, y AstraZeneca paralizó los futuros desarrollos.

Se han propuesto dos tratamientos más sobre la base de una estrategia de purificación de la sangre con alguna similitud al propuesto en este documento. El casete de adsorción de la IL-8 de Cytosorb se basa en un material poroso que adsorbe la citocina IL-8, pero la técnica no es selectiva y retira otros componentes proteicos pequeños de la sangre (<http://www.cytosorbents.com/tech.htm>). La segunda estrategia es una resina de adsorción específica que retira el LPS bacteriano de la sangre que se hace circular por dentro de un casete (http://www.altecomedical.com/market_product.php), y es un tratamiento limitado a la septicemia ocasionada por bacterias gramnegativas.

La solicitud de patente internacional WO-A-2010039690 describe el uso de inhibidores, incluidos los anticuerpos, para la purificación de la sangre.

Existe un gran cuerpo de resultados que establecen la función del C5a en la septicemia. La ScpA, una proteasa de la envoltura celular bacteriana, actúa selectivamente sobre el mediador proinflamatorio inmunitario C5a y escinde específicamente el mediador, con lo que lo activa.

Es un objeto de la invención solucionar al menos uno de los problemas citados más arriba.

Compendio de la invención

La invención se basa en un método y un producto sanitario para el tratamiento extracorporeal de las afecciones inflamatorias de un paciente, en especial las enfermedades autoinmunitarias, las infecciones generalizadas o la septicemia, que implica hacer reaccionar la sangre extraída de un paciente con una enzima proteásica inmovilizada en un soporte, en donde la enzima es específica de un mediador proinflamatorio presente en la sangre del paciente y es capaz de escindir el mediador proinflamatorio, y con esto reduce la abundancia del mediador proinflamatorio en la sangre del paciente antes de devolverle al paciente la sangre tratada.

En un primer aspecto, la invención se refiere a un equipo para el tratamiento extracorporeal de la sangre, que comprende:

- un circuito extracorporeal de sangre;
- opcionalmente, una bomba configurada para desplazar el líquido dentro del circuito extracorporeal de sangre; y
- una cámara de reacción conectada al circuito extracorporeal de sangre y configurada para recibir la sangre o una fracción de sangre que contiene el mediador proinflamatorio desde el circuito, y tratar la sangre o la fracción de sangre que contiene el mediador proinflamatorio,

caracterizado por que la cámara de reacción comprende una enzima proteásica inmovilizada de forma irreversible a un soporte, en donde la enzima proteásica es específica de un mediador proinflamatorio de humanos presente en la sangre o en el plasma, y es capaz de escindirlo de forma irreversible, de tal modo que se reduce, o preferiblemente queda destruida, la capacidad quimiotáctica del mediador proinflamatorio, en donde la abundancia del mediador proinflamatorio funcional en la sangre o el plasma tratados es menor que en la sangre o el plasma sin tratar.

El equipo de la invención tiene una serie de ventajas cuando se compara con los productos sanitarios extracorporales de tratamiento que operan en función de la adsorción de los mediadores proinflamatorios. Cada molécula de enzima es capaz de escindir un gran número de moléculas de sustrato durante un procedimiento de tratamiento; esto contrasta con el proceso de adsorción, en el que el ligando, una vez fijado a su molécula diana, es incapaz de fijarse a otras moléculas diana. Segundo, las estrategias de la técnica anterior basadas en la afinidad de

los anticuerpos son proclives a dar una reacción cruzada con moléculas que no son las deseadas, lo que implica costes importantes para el desarrollo y la generación de los anticuerpos idóneos. Por el contrario, en la bibliografía se conocen las enzimas que son específicas de los mediadores proinflamatorios y se pueden producir con facilidad mediante la tecnología del ADN recombinante.

- 5 Preferiblemente, el mediador proinflamatorio se selecciona de un grupo que consiste en, pero sin limitarse a ellos: C3a, C4a, C5a, IL-8, IL-6, TNF α , IL-1 o Mig. Así pues, en una realización, la enzima proteásica es capaz de escindir un mediador proinflamatorio de humanos seleccionado de un grupo que consiste en, pero sin limitarse a ellos, C3a, C4a, C5a, IL-8, IL-6, TNF α , IL-1 y Mig.

10 En una realización preferida, la invención da a conocer un equipo para el tratamiento extracorporal de la sangre, que comprende:

un circuito extracorporal de sangre;

opcionalmente, una bomba configurada para desplazar el líquido dentro del circuito extracorporal de sangre; y

15 una cámara de reacción conectada al circuito extracorporal de sangre y configurada para recibir sangre o una fracción de sangre que contiene el C5a de humano desde el circuito y tratar la sangre o la fracción de sangre que contiene el C5a de humano,

20 caracterizado por que la cámara de reacción comprende una enzima proteásica inmovilizada de forma irreversible a un soporte, en donde la enzima proteásica es específica del C5a de humano presente en la sangre o en la fracción de sangre, y es capaz de escindirlo de forma irreversible, de tal manera que se reduce la capacidad quimiotáctica del C5a de humano escindido, en donde la abundancia del C5a de humano funcional en la sangre o la fracción de sangre tratadas es menor que en la sangre o la fracción de sangre sin tratar.

25 Tal y como se usa en la presente memoria, la terminología «C5a de humano funcional» se debe entender que significa que el C5a de humano que tiene capacidad quimiotáctica según se determina con el ensayo de capacidad quimiotáctica que se describe a continuación. Asimismo, la terminología «C5a de humano afuncional» se debe entender que significa que la proteína escindida de C5a ha reducido, o está desprovista, de la capacidad quimiotáctica, según se determina con el ensayo de la capacidad quimiotáctica que se describe a continuación.

30 La invención también da a conocer un equipo para tratar la sangre humana, o una fracción de sangre que contiene el mediador proinflamatorio, en donde el equipo comprende una enzima proteásica fijada de forma irreversible a un soporte, en donde la enzima proteásica es específica de un mediador proinflamatorio presente en la sangre o en la fracción de sangre, y es capaz de escindirlo de forma irreversible, de tal manera que se reduce la capacidad quimiotáctica del mediador proinflamatorio de humano escindido.

35 La invención también da a conocer un equipo para tratar la sangre humana o una fracción de sangre que contiene el C5a, en donde el equipo comprende una enzima proteásica fijada de forma irreversible a un soporte, en donde la enzima proteásica es específica del C5a de humano presente en la sangre o en la fracción de sangre, y es capaz de escindirlo de forma irreversible, de tal manera que se reduce la capacidad quimiotáctica del C5a de humano escindido.

La invención también da a conocer una enzima proteásica que comprende la secuencia de A-B-C-D, en la que:

- 40 – A es una enzima proteásica que es específica de un mediador proinflamatorio humano presente en la sangre, y es capaz de escindirlo de forma irreversible, de tal manera que se reduce la capacidad quimiotáctica del mediador proinflamatorio escindido, B es un motivo de polilisina, policisteína o poliglutamato, C es un espaciador y D es un motivo de polihistidina.

Preferiblemente, la enzima proteásica es una proteasa bacteriana recombinante de C5a que comprende una secuencia de SEQ ID n.º 3 o una variante funcional de la misma, que tiene típicamente una identidad de secuencia de al menos el 70%, 80% o 90% con la SEQ ID n.º 3.

45 El término «variante funcional», tal y como se aplica a la SEQ ID n.º 3, hace referencia a una proteasa que es específica del C5a de humano, y es capaz de escindirlo de forma irreversible, de tal manera que se reduce, o preferiblemente se destruye, la capacidad quimiotáctica del C5a de humano escindido.

Los ejemplos de variantes funcionales de la SEQ ID n.º 3 se seleccionan de la SEQ ID n.º 4 y la SEQ ID n.º 5.

50 En una realización, el equipo de la invención incluye medios de separación adaptados para separar la sangre en una fracción que contiene el C5a y una fracción que no contiene el C5a, en donde la cámara de reacción recibe la fracción que contiene el C5a. Los medios de separación podrían ser, por ejemplo, un filtro configurado para separar la sangre o una fracción de la misma en una fracción que contiene una masa molecular baja y una segunda fracción,

en donde la fracción que contiene la masa molecular baja es la fracción que contiene el C5a.

Idóneamente, el equipo de la invención incluye medios configurados para volver a combinar la fracción que contiene el C5a tratado (a saber, la fracción de masa molecular baja) con la segunda fracción que no contiene el C5a. Una vez que se han vuelto a unir las fracciones, se devuelven al paciente.

- 5 En una realización preferida de la invención, un extremo carboxilo de la enzima proteásica comprende una primera etiqueta y una segunda etiqueta localizada distalmente de la primera etiqueta y separada de la primera etiqueta por un espaciador. Típicamente, el soporte comprende un ion coordinado de metal de transición y uno o varios grupos funcionales. Idóneamente, la primera etiqueta comprende un motivo capaz de reaccionar covalentemente con uno o grupos funcionales, y en donde la segunda etiqueta comprende un motivo capaz de interactuar con el ion coordinado del metal de transición.

De esta forma, la enzima proteásica se puede orientar con respecto a la superficie, de tal manera que el extremo carboxilo de la enzima está dispuesto adyacente a la superficie (esto se consigue mediante la interacción entre la segunda etiqueta y el metal de transición coordinado de la superficie del soporte), lo que permite que la primera etiqueta adyacente se una de forma covalente a los grupos funcionales de la superficie. Esto impedirá la fijación inespecífica entre los grupos funcionales de la superficie y los restos de lisina de la enzima proteásica.

Preferiblemente, la primera etiqueta se selecciona de una etiqueta de polilisina, poliglutamato o policisteína, y los grupos funcionales de la superficie son grupos que son capaces de fijarse de forma covalente a estos motivos.

Idóneamente, la segunda etiqueta comprende una etiqueta de polihistidina u otra etiqueta capaz de interactuar con un metal de transición.

- 20 Preferiblemente, el ion coordinado de metal de transición se selecciona de níquel o cobalto.

Típicamente, el soporte comprende un material de sílice, preferiblemente un material de sílice mesoporoso, preferiblemente material de silicato mesoporoso monodisperso modificado, e idealmente un material de sílice mesoporoso modificado con Ni^{2+} .

- 25 Idóneamente, el soporte comprende una perla. Preferiblemente, la cámara de reacción comprende una columna que contiene muchas perlas.

La invención también se refiere a un equipo de la invención para ser usado en un método para el tratamiento *ex vivo* de la sangre en un mamífero, típicamente un humano. Preferiblemente, el mamífero tiene una afección inflamatoria, tal como septicemia.

- 30 La secuencia de ácido nucleico que codifica la propeptasa bacteriana de C5a, ScpA de *Streptococcus pyogenes*, se da a conocer en la SEQ ID n.º 1 que viene a continuación:

Secuencia de ADN (SEQ ID n.º 1)

```
GGATCCAATACTGTGACAGAAGACACTCCTGCTACCGAACAAGCCGTAGAAACCCACAACCAACAGCGGTTTC
TGAGGAAGCACCATCATCATCAAAGGAAACCAAAATCCCACAAACTCCTGGTGATGCAGAAGAAACAGTAGCAG
ATGACGCTAATGATCTAGCCCCTCAAGCTCCTGCTAAACTGCTGATACACCAGCAACCTCAAAAGCGACTATTA
35 GGGATTTGAACGACCCCTTCTCAGGTCAAACCCCTGCAGGAAAAAGCAGGCAAGGGAGCTGGGACTGTTGTTGC
AGTGATTGATGCTGGTTTTGATAAAAAATCATGAAGCGTGGCGCTTAACAGACAAAATAAGCACGTTACCAATC
AAAAGAAGATCTTGAAAAAGCTAAAAAAGAGCACGGTATTACCTATGGCGAGTGGGTCAATGATAAGGTTGCTTA
TTACCACGATTATAGTAAAGATGGTAAAACCGCTGTGCGATCAAGAGCACGGCACACACGTGTCAGGGATCTTGT
CAGGAAATGCTCCATCTGAAACGAAAGAACCTTACCGCCTAGAAGGTGCGATGCCTGAGGCTCAATTGCTTTTG
40 ATGCGTGTGCGAAATTGTAATGGACTAGCAGACTATGCTCGTAACTACGCTCAAGCTATCAGAGATGCTGTCAAC
TTGGGAGCTAAGGTGATTAATATGAGCTTTGGTAATGCTGCACTAGCTTACGCCAACCTTCCAGACGAAACCAAA
AAAGCCTTTGACTATGCCAAATCAAAGGTGTTAGCATTGTGACCTCAGCTGGTAATGATAGTAGCTTTGGGGGC
AAAACCCGCTACCTCTAGCAGATCATCCTGATTATGGGGTGGTTGGGACGCCTGCAGCGGCAGACTCAACATT
GACAGTTGCTTCTTACAGCCAGATAAAAGACTCACTGAACTGCTACGGTCAAAACAGACGATCATCAAGCTAA
45 AGAAATGCCTGTTCTTTCAACAAACCGTTTTGAGCCAAACAAGGCTTACGACTATGCTTATGCTAATCGTGGGAT
GAAAGAAGATGATTTTAAGGATGTCAAAGGCAAAATTGCCCTTATTGAACGTGGTGATATTGATTTCAAAGATAAG
ATTGCAAACGCTAAAAAGCTGGTGCTGTAGGGGTCTTGATCTATGACAATCAAGACAAGGGCTTCCCGATTGAA
TTGCCAAATGTTGATCAGATGCCTGCGGCTTTATCAGTCGAAAAGACGGTCTTATTAAAAGACAATTCTAAAA
AAACCATCACCTTCAATGCGACACCTAAGGTATTGCCAACAGCAAGTGACACCAAACTAAGCCGCTTCTCAAGCT
50 GGGGTTTGACAGCTGACGGCAATATTAAGCCAGATATTGCAGCACCCGGCCAAGATATTTGTATCAGTGGCT
AACAACAAGTATGCCAACTTTCTGGAAGTATGTCTGCGCCATTGGTAGCGGGTATCATGGGACTTTGCAA
AAGCAATATGAGACAGATATCCTGATATGACACCATCAGAGCGTCTTGATTTAGCTAAAAAAGTATTGATGAGCT
CAGCAACTGCCTTATATGATGAAGATGAAAAAGCTTATTTTTCTCCTCGCCAACAAGGAGCAGGAGCAGTCGATG
CTAAAAAAGCTTCAGCAGCAACGATGTATGTGACAGATAAGGACAATACCTCAAGCAAGGTTACCTGAACAATG
```

TTTCTGATAAATTTGAAGTAACAGTAACAGTTCACAACAAATCTGATAAACCTCAAGAGTTGTATTACCAAGCAAC
TGTTCAAACAGATAAAGTAGATGGAAAACACTTTGCCTTGGCTCCTAAAGCATTGTATGAGACATCATGGCAAAA
AATCACAATTCAGCCAATAGCAGCAAAACAAGTCACCGTTCCAATCGATGCTAGTGCATTTAGCAAGGACTTGCT
5 TGCCCAAATGAAAAATGGCTATTTCTTAGAAGGTTTTGTTCTGTTTCAAACAAGATCCTAAAAAAGAAGAGCTTATG
AGCATTCCATATATTGGTTTCCGAGGTGATTTTGGCAATCTGTCAGCCTTAGAAAAACCAATCTATGATAGCAAAG
ACGGTAGCAGCTACTATCATGAAGCAAATAGTGATGCCAAAGACCAATTAGATGGTGATTGATTACAGTTTTACG
CTCTGAAAAATAACTTTACAGCACTTACCACAGAGTCTAACCCATGGACGATTATTAAGCTGTCAAAGAAGGGG
TTGAAAACATAGAGGATATCGAATCTTCAGAGATCACAGAAACCATTTTGCAGGTACTTTTGCAAAACAAGACGA
10 TGATAGCCACTACTATATCCACCGTCACGCTAATGGCAAACCATATGCTGCGATCTCTCCAAATGGGGACGGTAA
CAGAGATTATGTCCAATTCCAAGGTACTTTCTTGCGTAATGCTAAAAACCTTGTGGCTGAAGTCTTGGACAAAGA
AGGAAATGTTGTTTGGACAAGTGAGGTAACCGAGCAAGTTGTTAAAACTACAACAATGACTTGGCAAGCACACT
TGGTTCAACCCGTTTGAACCAACGCGTTGGGACGGTAAAGATAAAGACGGCAAAGTTGTTGTTAACGGAACCTA
CACCTTACGTCGCTACACTCCGATTAGCTCAGGTGCAAAGAACAACACACTGATTTTGATGTGATTGATAGTA
15 CAATACGACACCTGAAGTCGCAACATCGGCAACATTCTCAACAGAAGATCGTCGTTTGACACTTGCATCTAAACC
AAAAACCAGCCAACCGATTTACCGTGAGCGTATTGCTTACACTTATATGGATGAGGATCTGCCAACACAGAGTA
TATTTCTCCAAATGAAGATGGTACCTTTACTCTTCTGAAAGAGGCTGAAACAATGGAAGGCGGTACTGTTCCATT
GAAAATGTCAGACTTTACTTATGTTGTTGAAGATATGGCTGGTAACATCACTTATACACCAGTGACTAAGCTATTG
GAGGGCCACTCTTAA

La secuencia de aminoácidos de la propeptasa bacteriana de C5a, ScpA de *Streptococcus pyogenes*, se da a
conocer en la SEQ ID n.º 2 que viene a continuación:

Secuencia de proteína (SEQ ID n.º 2)

GPLGSNTVTEDETPATEQAVETPQPTAVSEEAPSSSKETKIPQTPGDAEETVADDANDLAPQAPAKTADTPATSKATIR
DLNDPSQVKTLQEKASKGAGTVVAVIDAGFDKNHEAWRLTDKTKARYQSKEDLEKAKKEHGITYGEWVNDKVAYYH
DYSKDGKTAVDQEHGTHVSGILSGNAPSETKEPYRLEGAMPEAQLLLMRVEIVNGLADYARNYAQAIRDAVNLAGKVI
25 NMSFGNAALAYANLPDETKKAFDYAKSKGVSIVTSAGNDSSFGGKTRPLADHPDYGVVGTAAADSTLTVASYS
KQLTETATVKTDHQAEMPVLTNRFEPNKAYDYAYANRGMKEDDFKDVKGKIALIERGDIDFKDKIANAKKAGAVG
VLIYDNQDKGFPIELPNVDQMPAAAFISRKDGLLLKDNSKKTITFNATPKVLPTASDTKLSRFSSWGLTADGNIKP
QDILSSVANNKYAKLSGTSMSAPLVAGIMGLLQKQYETQYPDMPSERLDLAKKVLMSATALYDEDEKAYFSPRQ
30 QGAGAVDAKKASAATMYVTDKNTSSKVLHNNVSDKFEVTVTVHNKSDKPQELYYQATVQTDKVDGKHFALAPKAL
YETSWQKITIPANSSKQVTVPIDASRFSKDLAQMKNGYFLEGFVRFKQDPKKEELMSIPYIGFRGDFGNLSALEKPIY
DSKDGSSYYHEANSADKDLQDGLQFYALKNNFTALTTESNPWTIIKAVKEGVENIEDIESSEITETIFAGTFAKQDD
DSHYIHRHANGKPYAAISPNGDGNRDYVQFGTFLRNAKNLVAEVLDEKGNVVWTSEVTEQVVKNNYNDLASTLG
STRFEKTRWDGKDKDGKVVVNGTYTYRVRYTPISSGAKEQHTDFDVIDNTTPEVATSATFSTEDRRLTLASKPKTSQ
PIYRERIAYTYMDEDLPTTEYISPNEGTFTLPEEAETMEGGTVPLKMSDFTYVVEDMAGNITYTPVTKLLEGHS

La secuencia de aminoácidos de la proteasa bacteriana madura de C5a, ScpA de *Streptococcus pyogenes*, se da a
conocer en la SEQ ID n.º 3 que viene a continuación:

AEETVADDANDLAPQAPAKTADTPATSKATIRDLNDPSQVKTLQEKASKGAGTVVAVIDAGFDKNHEAWRLTDKTKA
RYQSKEDLEKAKKEHGITYGEWVNDKVAYYHDYSKDGKTAVDQEHGTHVSGILSGNAPSETKEPYRLEGAMPEAQL
LLMRVEIVNGLADYARNYAQAIRDAVNLAGKVINMSFGNAALAYANLPDETKKAFDYAKSKGVSIVTSAGNDSSFGGK
40 TRPLADHPDYGVVGTAAADSTLTVASYSKQLTETATVKTDHQAEMPVLTNRFEPNKAYDYAYANRGMKE
DDFKDVKGKIALIERGDIDFKDKIANAKKAGAVGVLIDNQDKGFPIELPNVDQMPAAAFISRKDGLLLKDNSKKTITFNAT
PKVLPTASDTKLSRFSSWGLTADGNIKPDIAPGQDILSSVANNKYAKLSGTSMSAPLVAGIMGLLQKQYETQYPDMP
SERLDLAKKVLMSATALYDEDEKAYFSPRQQGAGAVDAKKASAATMYVTDKNTSSKVLHNNVSDKFEVTVTVHN
KSDKPQELYYQATVQTDKVDGKHFALAPKALYETSWQKITIPANSSKQVTVPIDASRFSKDLAQMKNGYFLEGFVR
45 KQDPKKEELMSIPYIGFRGDFGNLSALEKPIYDSKDGSSYYHEANSADKDLQDGLQFYALKNNFTALTTESNPWTII
KAVKEGVENIEDIESSEITETIFAGTFAKQDDDSHYIHRHANGKPYAAISPNGDGNRDYVQFGTFLRNAKNLVAEVL
DKEGNVVWTSEVTEQVVKNNYNDLASTLGSTRFEKTRWDGKDKDGKVVVNGTYTYRVRYTPISSGAKEQHTDFDVI
VDNTTPEVATSATFSTEDRRLTLASKPKTSQPIYRERIAYTYMDEDLPTTEYISPNEGTFTLPEEAETMEGGTVPLKM
SDFTYVVEDMAGNITYTPVTKLLEGHS

La secuencia de aminoácidos de una primera variante de la proteasa bacteriana madura de C5a, ScpA de
Streptococcus pyogenes, se da a conocer en la SEQ ID n.º 4 que viene a continuación:

DANDLAPQAPAKTADTPATSKATIRDLNDPSQVKTLQEKASKGAGTVVAVIDAGFDKNHEAWRLTDKTKARYQSKED
LEKAKKEHGITYGEWVNDKVAYYHDYSKDGKTAVDQEHGTHVSGILSGNAPSETKEPYRLEGAMPEAQLLLMRVEIV
NGLADYARNYAQAIRDAVNLAGKVINMSFGNAALAYANLPDETKKAFDYAKSKGVSIVTSAGNDSSFGGKTRPLADH
55 PDYGVVGTAAADSTLTVASYSKQLTETATVKTDHQAEMPVLTNRFEPNKAYDYAYANRGMKEDDFKDVKG
KIALIERGDIDFKDKIANAKKAGAVGVLIDNQDKGFPIELPNVDQMPAAAFISRKDGLLLKDNSKKTITFNATPKVLPTAS
DTKLSRFSSWGLTADGNIKPDIAPGQDILSSVANNKYAKLSGTSMSAPLVAGIMGLLQKQYETQYPDMPSERLDLA
KKVLMSATALYDEDEKAYFSPRQQGAGAVDAKKASAATMYVTDKNTSSKVLHNNVSDKFEVTVTVHNKSDKPQE

LYYQATVQTDKVDGKHFALAPKALYETSWQKITIPANSSKQVTPIDASRFSKDLLAQMKNGYFLEGFVRFKQDPKKE
ELMSIPYIGFRGDFGNLSALEKPIYDSKDGSSYYHEANSDAKDQLDGDGLQFYALKNNFTALTTESNPWTIIKAVKEGV
ENIEDIESSEITETIFAGTFAKQDDSHYIHRHANGKPYAAISPNGDGNRDYVQFQGTFLRNAKNLVAEVLDEKGNV
WTSEVTEQVVKYNNDLASTLGSTRFEKTRWDGKDKDGKVVVNGTYTYRVRYTPISSGAKEQHTDFDVIDNTTPEV
5 ATSATFSTEDRRLLTASPKTSQPIYRERIAITYMDEDLPTTEYISPNEGDGFTLPEEAETMEGGTVPLKMSDFTYVVE
DMAGNITYTPVTKLLEGHS

La secuencia de aminoácidos de una segunda variante de la proteasa bacteriana madura de C5a, ScpA de *Streptococcus pyogenes*, se da a conocer en la SEQ ID n.º 5 que viene a continuación:

KTADTPATSKATIRDLNDPSQVKTLQEKASKGAGTVVAVIDAGFDKNHEAWRLTDKTKARYQSKEDLEKAKKEHGITY
10 GEWVNDKVAYYHDYSKDGKTAVDQEHGTHVSGILSGNAPSETKEPYRLEGAMPEAQLLLMRVEIVNGLADYARNYA
QAIRDAVNLAGKVINMSFGNAALAYANLPDETCKAFDYAKSKGVSVTSAGNDSSFGGKTRLPLADHPDYGVVGTAA
ADSTLTVASYSPPDKQLTETATVKTDDHQAKEMPVLSTNRFEPNKAYDYAYANRGMKEDDFKDVKGKIALIERGDIDFK
DKIANAKKAGAVGVLIYDNQDKGFIELPNVDQMPAAFISRKDGLLLKDNSKKTITFNATPKVLPTASDTKLSRFSSWG
LTADGNIKPDIAAPGQDILSSVANNKYAKLSGTSMSAPLVAGIMGLLQKQYETQYPMTPSERLDLAKKVLMSATY
15 DEDEKAYFSPRQAGAGAVDAKKASAATMYVTDKNTSSKVHLNNVSDKFEVTVTVHNKSDKPQELYYQATVQTDKV
DGKHFALAPKALYETSWQKITIPANSSKQVTPIDASRFSKDLLAQMKNGYFLEGFVRFKQDPKKEELMSIPYIGFRGD
FGNLSALEKPIYDSKDGSSYYHEANSDAKDQLDGDGLQFYALKNNFTALTTESNPWTIIKAVKEGVENIEDIESSEITETI
FAGTFAKQDDSHYIHRHANGKPYAAISPNGDGNRDYVQFQGTFLRNAKNLVAEVLDEKGNVWTSEVTEQVVK
YNNDLASTLGSTRFEKTRWDGKDKDGKVVVNGTYTYRVRYTPISSGAKEQHTDFDVIDNTTPEVATSATFSTEDRR
20 LTASPKTSQPIYRERIAITYMDEDLPTTEYISPNEGDGFTLPEEAETMEGGTVPLKMSDFTYVVEDMAGNITYTPVT
KLLEGHS

Las proteasas de SEQ ID n.ºs 2, 3, 4 y 5 son capaces de escindir el C5a de humano, de tal manera que se destruye la capacidad quimiotáctica de la proteasa escindida.

La secuencia de aminoácidos de la proteína del C5a se da a conocer en la SEQ ID n.º 6 que viene a continuación.

25 Proteína del C5a (SEQ ID n.º 6)

MLQKKIEEIAAKYKHSVVKCCYDGACVNNDETCEQRAARISLGPRIKAFTECCVVASQLRANISHKMDQLGR

Otras proteasas que son específicas del C5a de humano, y capaces de escindirlos, incluyen ScpB de *Streptococcus agalactiae* y las variantes funcionales de las mismas.

30 Los ejemplos de enzimas proteásicas capaces de escindir específicamente la IL-8 incluyen ScpC de *Streptococcus pyogenes*, SpyCEP de *Streptococcus agalactiae* y las variantes funcionales de las mismas.

Los ejemplos de enzimas proteásicas capaces de escindir específicamente la IL-6 incluyen una enzima de *Pseudomonas* publicada que la degrada completamente (PMID 16913841). Las gingipainas K y R también parecen tener actividad de degradación de varios mediadores, pero carecen de la especificidad necesaria.

35 Idóneamente, el equipo comprende además medios para separar la sangre completa en una fracción de plasma y una fracción de células, y los medios para volver a combinar la fracción de células con la fracción de plasma tratada. En un proceso de separación, el plasma de la sangre del paciente se separa típicamente de los demás constituyentes. El plasma separado se mezcla con un tampón de acetato saturado con heparina. Esto disminuye el grado de acidez del plasma (valor de pH) a 5,12, lo que precipita selectivamente del plasma el colesterol LDL, la Lp(a) y el fibrinógeno. Junto con el aditivo heparina, los constituyentes separados forman precipitados insolubles que se pueden retirar del plasma con una simple etapa de filtración. El excedente de heparina sin utilizar queda retenido en un adsorbente independiente y se utiliza la ultrafiltración en bicarbonato para restaurar el plasma purificado al nivel fisiológicamente aceptable. El plasma purificado y tratado selectivamente se vuelve a mezclar a continuación con los demás constituyentes de sangre y se le reincorporan al paciente. Durante la aféresis H.E.L.P., estas cuatro etapas (separación del plasma, precipitación con la posterior filtración, adsorción a la heparina y ultrafiltración) se realizan en un único producto sanitario, el PLASMAT Futura. Los ejemplos de productos sanitarios capaces de separar la sangre completa en una fracción de plasma y una fracción de células en circuitos extracorporales de sangre los conocen los expertos en la técnica e incluyen el equipo de plasmáforésis (por ejemplo, PLASMAT Futura de B Braun) y el equipo de hemodiálisis (por ejemplo, Gambro PHEONIX <http://www.gambro.com/en/global/Products/Hemodialysis/Monitors/Phoenix-dialysis-system/>).

50 Típicamente, la cámara de reacción comprende una columna que comprende perlas, en donde la enzima se inmoviliza en las perlas. Como alternativa, la cámara de reacción puede comprender un cartucho.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para el tratamiento o la prevención de una afección inflamatoria en un humano, que comprende las etapas de hacer reaccionar la sangre que se ha extraído al paciente, o una fracción de la sangre que contiene el mediador proinflamatorio, con una enzima proteásica inmovilizada en un

soporte, en el que la enzima proteásica es específica de, y capaz escindirlo de forma irreversible, un mediador proinflamatorio humano presente en la sangre o fracción, de tal manera que se reduce, o preferiblemente se destruye, la capacidad quimiotáctica del mediador proinflamatorio, en donde la abundancia del mediador proinflamatorio funcional en la sangre o fracción tratadas es menor que en la sangre o fracción sin tratar.

- 5 Típicamente, el mediador proinflamatorio de humano se selecciona del grupo que consiste en, pero sin limitarse a ellos, C3a, C4a, C5a, IL-8, IL-6, TNF α , IL-1 y Mig.

En un aspecto más, la invención se refiere a un método para el tratamiento o la prevención de una afección inflamatoria en un humano, que comprende las etapas de hacer reaccionar la sangre que se ha extraído al paciente, o una fracción de la sangre que contiene el mediador proinflamatorio, con una enzima proteásica inmovilizada en un soporte, en donde la enzima proteásica es específica del C5a de humano, y es capaz escindirlo de forma irreversible, en la sangre o fracción, de tal manera que la capacidad quimiotáctica del C5a de humano escindido queda reducida o preferiblemente destruida, en donde la abundancia del C5a funcional en la sangre o fracción tratadas es menor que en la sangre o plasma sin tratar.

10 Idóneamente, el método incluye las etapas de separar la sangre en una fracción de plasma y una fracción de células, tratar la fracción de plasma y a continuación volver a combinar la fracción de células con la fracción de plasma tratada antes de devolverle la sangre al paciente.

Como alternativa, o adicionalmente, el método incluye las etapas de separar la sangre en una fracción que contiene el C5a (por ejemplo, una fracción de masa molecular baja) y una segunda fracción, tratar la fracción que contiene el C5a y, a continuación, volver a combinar la segunda fracción con la fracción que contiene el C5a tratado antes de devolverle la sangre al paciente.

Típicamente, el método se realiza de una manera continua en un circuito extracorporeal de sangre.

Idóneamente, la enzima proteásica es una proteína recombinante.

La invención también se refiere al soporte y a una enzima proteásica recombinante inmovilizada en el soporte, en donde la enzima proteásica recombinante comprende una etiqueta de polihistidina en el extremo carboxilo y una etiqueta de polilisina en el extremo carboxilo, y en donde la enzima proteásica recombinante comprende una proteasa que es específica de un mediador proinflamatorio humano presente en la sangre o el plasma, y es capaz de escindirlo de forma irreversible.

En esta especificación, la terminología «circuito extracorporeal de sangre» se debe entender que hace referencia a una disposición de conductos capaces de retirar la sangre del cuerpo para el tratamiento fuera del cuerpo y devolver la sangre así tratada al cuerpo.

En esta especificación, la terminología «cámara de reacción» se debe entender que hace referencia a una cámara adaptada para recibir la sangre o el plasma del circuito extracorporeal de sangre y permitir el contacto entre la sangre o el plasma y las enzima proteásica que está inmovilizada en un soporte dentro de la cámara de reacción.

En esta especificación, el término «plasma» se debe entender que hace referencia a la sangre de la cual se han retirado total o parcialmente las células.

En esta especificación, la terminología «mediador proinflamatorio» se debe entender que hace referencia a una entidad proteínica del hospedador producida por la respuesta autoinmunitaria o por la septicemia que estimula otros componentes del sistema inmunitario del hospedador, que provoca en particular la migración o la estimulación de los leucocitos de cualquier clase y las formas progenitoras de estas células. Los ejemplos específicos de los mediadores proinflamatorios específicos de la respuesta inflamatoria humana incluyen C3a, C4a, C5a, IL-8, IL-6, TNF α , IL-1 y Mig.

En la especificación, la terminología «enzima proteásica que es específica de un mediador proinflamatorio de humano» se debe entender que hace referencia a una enzima con la capacidad de hidrolizar selectivamente, o, de forma ideal, únicamente, enlaces peptídicos de los mediadores proinflamatorios de origen humano. La proteasa también puede proceder de la proteasa madre y haber sido modificada para incluir un grupo de funcionalización, por ejemplo, una o más etiquetas de polihistidina, polilisina o poliglutamato.

En esta especificación, la terminología «variante funcional de la misma», cuando se aplica a una enzima proteásica específica, se debe entender que hace referencia a una variante de la enzima proteásica que conserva la capacidad de fijarse de forma específica y escindir de forma irreversible el mediador proinflamatorio deseado, de tal manera que se reduce o destruye la actividad quimiotáctica del mediador proinflamatorio escindido. Así pues, por ejemplo, una variante funcional de ScpA de *Streptococcus pyogenes* incluye proteasas ScpA variantes que tienen la capacidad de fijarse de forma específica y escindir de forma irreversible la proteína del C5a de humano, de tal manera que se reduce o destruye la capacidad quimiotáctica de la proteasa escindida, e incluye proteasas ScpA de

Streptococcus pyogenes (SEQ ID n.º 3, 4, 5) y de otras especies de *Streptococcus*. El término «variante» se debe entender que hace referencia a proteínas o polipéptidos que tienen una homología de secuencia de al menos el 70% con la proteasa de referencia, y que están alteradas con respecto a uno o más restos aminoacídicos. Preferiblemente, tales alteraciones implican la inserción, adición, delección y/o sustitución de 20, 10, 5 o menos aminoácidos, más preferiblemente de 4 o menos, incluso más preferiblemente de 3 o menos, lo más preferiblemente de 1 o 2 aminoácidos únicamente. Se contempla la inserción, adición y sustitución con aminoácidos modificados y naturales. La variante puede tener cambios conservativos de aminoácidos, en donde el aminoácido que se introduce es similar, desde los puntos de vista estructural, químico o funcional, al que se sustituye. Típicamente, las proteínas que se han alterado por la sustitución o la delección de restos importantes para la actividad catalítica se excluirán del término «variante». Para cualquier enzima proteásica dada, los detalles de tales restos importantes desde el punto de vista catalítico serán conocidos por los expertos en la técnica. Por lo general, la variante tendrá al menos una homología de secuencia de aminoácidos del 70%, preferiblemente una homología de secuencia de al menos el 80%, más preferiblemente una homología de secuencia de al menos el 90%, e idealmente una homología de secuencia de al menos el 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la proteasa de referencia. En este contexto, la homología de secuencia comprende tanto la identidad como la similitud de secuencia, a saber, una secuencia polipeptídica que comparte una homología de aminoácidos del 90% con la peptidasa bacteriana madura de tipo silvestre de C5a es una en la que cualquiera del 90% de los restos alineados son idénticos a los restos correspondientes de la peptidasa bacteriana de tipo silvestre de C5a, o bien sustituciones conservativas de los mismos. La sustitución puede ser una sustitución conservativa o no conservativa, y puede implicar el uso de aminoácidos naturales o análogos de aminoácidos.

El término «variante» también pretende incluir los derivados químicos de una proteasa, a saber, donde uno o más restos de una proteasa se transforman químicamente al hacer reacción a través de un grupo lateral funcional. También se incluyen dentro del término variante las moléculas de proteasas en las que los restos aminoacídicos que aparecen de forma natural están reemplazados por los análogos de aminoácidos.

Las proteínas y los polipéptidos (entre ellos variantes y fragmentos de los mismos) de y para ser usados en la invención se pueden generar total o parcialmente mediante síntesis química o mediante la expresión desde un ácido nucleico. Las proteínas y los péptidos de y para ser usados en la presente invención se pueden preparar con facilidad de acuerdo con métodos conocidos en la técnica de síntesis de péptidos bien establecidos y estándares en líquido o, preferiblemente, en fase sólida [véase, por ejemplo, J. M. Stewart y J. D. Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2.ª edición, Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois (1984) en M. Bodanzsky y A. Bodanzsky, *The Practice of Peptide Synthesis*, Springer Verlag, Nueva York (1984)].

En esta especificación, la terminología «afección inflamatoria» significa una afección en la que el hospedador monta una respuesta contra una agresión. Los ejemplos de afecciones inflamatorias incluyen las afecciones inflamatorias crónicas o agudas que incluyen septicemia, choque septicémico, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, síndrome de disfunción multiorgánica, enfermedad de las vías aéreas hiperreactivas, reacción alérgica.

En un aspecto diferente, la invención da a conocer un método para unir una molécula que comprende una secuencia poliaminoacídica a una superficie, en donde el extremo carboxilo de la enzima proteásica comprende una primera etiqueta y una segunda etiqueta localizada distalmente de la primera etiqueta y separada de la primera etiqueta por un espaciador, y en donde el soporte comprende un ion coordinado de metal de transición y uno o varios grupos funcionales, y en donde la primera etiqueta comprende un motivo capaz de reaccionar covalentemente con uno o varios grupos funcionales, y en donde la segunda etiqueta comprende un motivo capaz de interactuar con el ion coordinado de metal de transición, en donde el método comprende la etapa de hacer reaccionar con la superficie la molécula que comprende una secuencia poliaminoacídica.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Representación esquemática de la invención de purificación de la sangre.

El diagrama muestra los componentes y la ruta del flujo de la sangre concebidos para la aplicación de la invención. Se extrae la sangre del paciente y se fracciona en una fracción de plasma rica en proteínas y una fracción rica en células de la sangre. La primera se hace pasar sobre el material activo (enzima inmovilizada) en la cámara de reacción y a continuación se vuelve a combinar con la última antes de devolverla al paciente. Los componentes de la invención están etiquetados; 1 la invención completa, 2 el producto sanitario extracorporeal de purificación de sangre, 3 línea de extracción de sangre, 4 brazo del paciente, 5 línea de retorno de la sangre, 6 sistema de bombeo, 7 separador de la sangre, 8 cámara de reacción, 9 cámaras de separación de la sangre con alojamiento para cartuchos, 10a y 10b cámaras de separación de la sangre, 11 membrana semipermeable restrictiva para el tamaño biocompatible, 12 línea que introduce el plasma rico en proteínas en la cámara de reacción, 13 línea que introduce la fracción rica en células sanguíneas en la cámara de mezclado, 14 línea que introduce el plasma tratado en la cámara de mezclado, 15 cámara de mezclado para la reconstitución de la sangre, 16 componente activo de la cámara de reacción para alojar los vasos, 17 material reactivo que comprende la enzima inmovilizada que está unida de forma irreversible al material de soporte sólido.

Figura 2. Actividad de ScpA frente al mediador proinflamatorio C5a

El panel a muestra el análisis por SDS-PAGE de C5a sin tratar (–) y tratado (+) con ScpA

El panel b muestra el enlace escindible de la secuencia de C5a confirmado mediante análisis por espectrometría de masas de C5a escindido con ScpA.

5 Figura 3A: construcción del prototipo

El diagrama muestra el prototipo y la ruta del flujo de circulación simple. 1 es la cámara de reacción que contiene ScpA-agarosa empaquetada en un casete, 2 bomba peristáltica, 3 cámara que contiene el suero humano enriquecido con C5a. Las flechas indican la dirección del flujo, * indica el punto donde se tomó la muestra del primer paso (FP).

10 Figura 3B: pruebas de actividad para el prototipo.

Las muestras del régimen de pruebas del prototipo se analizaron por SDS-PAGE. Los puntos temporales se tomaron del agotamiento del reservorio y de la albúmina antes del análisis. FP indica que la muestra se tomó inmediatamente después de la exposición a la cámara de reacción, a saber, antes de la recirculación. La flecha a la derecha del gel indica la posición del C5a sin escindir.

15 Descripción detallada de la invención

Con respecto a la figura 1, se da a conocer un equipo para el tratamiento extracorporeal de la sangre de acuerdo con la invención y se indica por lo general mediante el número 1 de referencia. El equipo 1 comprende un circuito extracorporeal de sangre 2, que tiene una línea de alimentación 3 para extraer la sangre del brazo de un paciente 4 para el tratamiento y una línea de retorno 5 para devolver la sangre tratada al paciente, y una bomba ajustable 6 que se proporciona en la línea de alimentación para que la sangre se desplace por dentro del circuito de sangre 2.

El equipo también incluye un separador de sangre 7 y una cámara de reacción 8 en el circuito 2, en donde el separador 7 se proporciona antes de la cámara de reacción 8. El separador comprende un cartucho 9 que tiene dos cámaras 10a y 10b separadas por una membrana semipermeable 11 adaptada para que las proteínas de la sangre se separen de las células de la sangre. La sangre completa pasa desde el paciente a la primera cámara 10a, donde las proteínas del plasma sanguíneo pasan a la segunda cámara 10b, lo que forma una fracción de plasma rica en proteínas en la segunda cámara y deja las células sanguíneas en la primera cámara 10a. Se proporciona un tubo 12 para transferir el plasma de la fracción rica en proteínas así formada desde la primera cámara 10b a la cámara de reacción 8, donde se trata. Se proporciona además un tubo 13 para transferir la fracción rica en células desde la primera cámara 10a para reagruparse con el plasma tratado distalmente de la cámara de reacción 8 en una cámara de mezclado 15, donde las dos fracciones se mezclan antes de devolverlas al paciente a través de la línea de retorno 5 de la sangre completa.

La cámara de reacción comprende un vaso cilíndrico 16 relleno con un material de soporte funcionalizado 17 que contiene la enzima inmovilizada, con lo que se proporciona una gran superficie para el tratamiento del plasma entrante. Con el tubo 12 se alimenta el vaso cilíndrico 16 por la parte superior, y el plasma se filtra a través del cilindro antes de salir del vaso a través de un tubo 14.

Los materiales de sílice mesoporoso (MPS) (entre ellos, pero sin limitarse a ellos, los materiales de tipo MCM, SBA, MCF y PMO) se preparan con un método de síntesis con modelo. Idealmente, estas partículas tienen una naturaleza monodispersa. Las partículas tendrán un tamaño de partícula específico en el margen de 0,1 a 50 μm , que contienen nanoporos con un diámetro interno final en el margen de 8 a 12 nm y tienen una superficie grande, de 300 a 800 m^2g^{-1} .

Las características de la superficie de los nanovehículos de sílice se modificarán directamente con una serie de grupos funcionales (p. ej., $-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$, $-\text{SH}$) durante la síntesis del material, o mediante el injerto posterior a la síntesis para facilitar el acoplamiento covalente (a través de los restos de polilisina o de poliglutamato o de cisteína, respectivamente) de la enzima a la superficie después de la adsorción específica de la orientación.

El MPS modificado con Ni^{2+} se preparará mediante la adhesión de 3-yodotrimetoxipropilsilano a la superficie del silicato seguido de la reacción con ciclam y la incorporación del ion de metal. Con esto se inmoviliza la proteasa en una orientación controlada.

Al ser usado, el circuito extracorporeal de sangre se conecta a un paciente, por lo general a un brazo de un paciente, y se hace funcionar la bomba para extraer la sangre del paciente y bombearla a través del circuito. La sangre completa del paciente entra al separador 7 y se separa con presión en las dos fracciones. La fracción de plasma se bombea desde la primera cámara (10a) a la cámara de reacción 8, donde la sangre se percola a través del lecho del casete funcionalizado 21. En la cámara de reacción, el mediador en el plasma se fija a la enzima proteásica que está

inmovilizada en el material de soporte y se escinde en una forma inactiva que se devuelve al plasma y deja la enzima inmovilizada libre para otra reacción. Como resultado de pasar el plasma a través de la cámara de reacción, se reduce significativamente la concentración del mediador funcional en el plasma. El plasma así tratado se bombea a continuación a la cámara de mezclado 17, donde se reúne con la fracción rica en células para formar la sangre completa que está significativamente desprovista de la proteína mediadora activa. La sangre completa se devuelve al paciente a través de la línea de retorno 4.

Se apreciará que es opcional el uso de un separador para filtrar la sangre antes del tratamiento, y que el tratamiento de la sangre completa en la cámara de reacción forma parte de la invención.

Experimental

10 Materiales y métodos

Ensayos de actividad de la peptidasa de C5a

Se produjo el C5a recombinante como una fusión con etiqueta de His en el extremo amino (HT-C5a) de acuerdo con el método de Toth et al¹, y la actividad quimiotáctica se comprobó en un ensayo de migración en agarosa (datos sin mostrar). La actividad C5a-asa de ScpA se mostró en las reacciones que consistían en ScpA a 42 nM con HT-C5a a 37 µM, en Tris/HCl a 50 mM (pH 7,5), NaCl a 100 mM y CaCl₂ a 5 mM durante 30 min a 20 °C. La actividad C5a-asa observada era independiente de la presencia del cóctel inhibidor Complete Mini EDTAfree (Roche). Se realizó el análisis de escisión de HT-C5a mediante espectrometría de masas (EM) de tiempo de vuelo acoplada a la ionización/desorción por láser asistida por matriz.

Construcción del prototipo

20 La ScpA se inmovilizó de forma irreversible a una partícula de agarosa. El acoplamiento implicó la unión covalente de la enzima, a través de una cisteína del extremo carboxilo que se introdujo en la proteína por mutagénesis, a la partícula de silicato a través de un conector de yodoacetilo sobre la superficie de la partícula de agarosa.

25 El material de agarosa con la enzima se empaquetó en un reactor de flujo y, mediante una bomba peristáltica, se le aplicó el suero humano enriquecido con C5a (figura 3a). La escisión de C5a se monitorizó mediante la toma de muestras del suero en circulación después del primer contacto y a continuación monitorizando la desaparición del C5a activo desde un reservorio de suero. La pérdida de masa de 830 Da del C5a se confirmó mediante el análisis de MALDI-TOF acoplado a EM.

Resultados

Ensayo de la actividad

30 El ensayo de la actividad mostró que el ScpA escindió el C5a en un solo sitio (figura 2a). El análisis de EM indicó una pérdida de 830 Da, que concordaba con la retirada de siete restos del extremo carboxilo (figura 2b) que eliminan la capacidad quimiotáctica.

Funcionalidad del prototipo

35 Las muestras del pase inicial del suero humano enriquecido a través del prototipo indican que el C5a se escinde a un nivel que se aproxima a una eficacia del 100% (figura 3b). La monitorización del C5a en circulación desde el vaso de reacción indica que 1 hora de circulación da lugar a una escisión completa y a la desaparición de una cantidad de C5a coherente con el C5a total esperado en un humano en el pico de una respuesta a la septicemia (figura 3b). La pérdida de 830 Da del C5a confirmó que se habían retirado del C5a las secuencias estimuladoras.

40

LISTA SECUENCIAS

5 <110> UNIVERSITY OF LIMERICK

<120> Equipo para el tratamiento extracorporal de la sangre

<130> P11172EP01

10

<150> EP 13197790.2

<151> 17-12-2013

<160> 6

15

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

20

<211> 3015

<212> ADN

<213> Streptococcus pyogenes

25

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (1)..(3015)

<223> Gen que codifica ScpA

30

<400> 1

ggatccaata ctgtgacaga agacactcct gctaccgaac aagccgtaga aaccccacaa	60
ccaacagcgg tttctgagga agcaccatca tcatcaaagg aaaccaaaat cccacaaact	120
cctggtgatg cagaagaaac agtagcagat gacgctaata atctagcccc tcaagtcct	180
gctaaaactg ctgatacacc agcaacctca aaagcgacta ttagggattt gaacgaccct	240
tctcaggtca aaaccctgca ggaaaaagca ggcaagggag ctgggactgt tgttgagtg	300
attgatgctg gttttgataa aaatcatgaa gcgtggcgct taacagacaa aactaaagca	360
cgttaccaat caaaagaaga tcttgaaaaa gctaaaaaag agcacgggat tacctatggc	420
gagtggtgca atgataaggt tgcttattac cagcattata gtaaagatgg taaaaccgct	480
gtcgatcaag agcacggcac acacgtgtca gggatcttgt caggaaatgc tccatctgaa	540
acgaaaagac cttaccgcct agaaggtgcg atgcctgagg ctcaattgct tttgatgcgt	600
gtcgaaattg taaatggact agcagactat gctcgtaact acgctcaagc tatcagagat	660
gctgtcaact tgggagctaa ggtgattaat atgagctttg gtaatgctgc actagcttac	720
gccaaccttc cagacgaaac caaaaaagcc tttgactatg ccaaatcaaa aggtgttagc	780
attgtgacct cagctggtaa tgatagtagc tttgggggca aaaccgctct acctctagca	840
gatcatcctg attatggggt ggttgggacg cctgcagcgg cagactcaac attgacagtt	900
gcttcttaca gccagataa acagctcact gaaactgcta cggcctcaaac agacgatcat	960
caagctaaag aaatgcctgt tctttcaaca aaccgttttg agccaaacaa ggcttacgac	1020
tatgcttatg ctaatcgtgg gatgaaagaa gatgatttta aggatgtcaa aggcataatt	1080

gcccttattg aacgtggtga tattgatttc aaagataaga ttgcaaacgc taaaaaagct	1140
ggtgctgtag gggctcttgat ctatgacaat caagacaagg gcttcccgat tgaattgccca	1200
aatgttgatc agatgcctgc gccctttatc agtcgaaaag acggctctctt attaaaagac	1260
aattctaaaa aaaccatcac cttcaatgcg acacctaagg tattgccaac agcaagtgc	1320
accaaactaa gccgcttctc aagctggggt ttgacagctg acggcaatat taagccagat	1380
attgcagcac cgggccaaga tttttgtca tcagtggcta acaacaagta tgccaaactt	1440
tctggaacta gtatgtctgc gccattggtg gcggttatca tgggactatt gcaaaagcaa	1500
tatgagacac agtatcctga tatgacacca tcagagcgtc ttgatttagc taaaaaagta	1560
ttgatgagct cagcaactgc cttatatgat gaagatgaaa aagcttattt ttctcctcgc	1620
caacaaggag caggagcagt cgatgctaaa aaagcttcag cagcaacgat gtatgtgaca	1680
gataaggaca atacctcaag caaggttcac ctgaacaatg tttctgataa atttgaagta	1740
acagtaacag ttcacaacaa atctgataaa cctcaagagt tgtattacca agcaactgtt	1800
caaacagata aagtagatgg aaaacacttt gccttggtc ctaaagcatt gtatgagaca	1860
tcattggcaaa aaatcacaaat tccagccaat agcagcaaac aagtcaccgt tccaatcgat	1920
gctagtcgat ttagcaagga cttgcttgcc caaatgaaaa atggctattt cttagaagggt	1980
tttgctcgtt tcaacaaga tcctaaaaaa gaagagctta tgagcattcc atatattggt	2040
ttccgagggtg attttgccaa tctgtcagcc ttgaaaaaac caatctatga tagcaaagac	2100
ggtagcagct actatcatga agcaaatagt gatgccaaag accaattaga tgggtgatgga	2160
ttacagtttt acgctctgaa aaataacttt acagcactta ccacagagtc taaccctagg	2220
acgattatta aagctgtcaa agaaggggtt gaaaacatag aggatatcga atcttcagag	2280
atcacagaaa ccatttttgc aggtactttt gcaaaacaag acgatgatag ccactactat	2340
atccaccgtc acgctaattg caaacatat gctgcgatct ctccaaatgg ggacggtaac	2400
agagattatg tccaattcca aggtactttc ttgcgtaatg ctaaaaacct tgtggctgaa	2460
gtcttgagca aagaaggaaa tgttgtttgg acaagtgagg taaccgagca agttgttaaa	2520
aactacaaca atgacttggc aagcacactt ggttcaaccc gttttgaaaa aacgcgttgg	2580
gacggtaaa ataaagacgg caaagttgtt gttaacggaa cctacaccta tcgtgtccgc	2640
tacactccga ttagctcagg tgcaaaagaa caacacactg attttgatgt gattgtagac	2700
aatacgacac ctgaagtcgc aacatcggca acattctcaa cagaagatcg tcgtttgaca	2760
cttgcatcta aaccaaaaac cagccaaccg atttaccgtg agcgtattgc ttacacttat	2820
atggatgagg atctgccaac aacagagtat atttctcaa atgaagatgg tacctttact	2880
cttctgaag aggctgaaac aatggaaggc ggtactgttc cattgaaaat gtcagacttt	2940
acttatgttg ttgaagatat ggctggtaac atcaattata caccagtgc taagctattg	3000
gagggccact cttaa	3015

5

<210> 2
 <211> 1007
 <212> PRT
 <213> Streptococcus pyogenes

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

5 <222> (1)..(1007)

<223> Pro-proteasa ScpA

<400> 2

Gly Pro Leu Gly Ser Asn Thr Val Thr Glu Asp Thr Pro Ala Thr Glu
1 5 10 15

Gln Ala Val Glu Thr Pro Gln Pro Thr Ala Val Ser Glu Glu Ala Pro
20 25 30

Ser Ser Ser Lys Glu Thr Lys Ile Pro Gln Thr Pro Gly Asp Ala Glu
35 40 45

Glu Thr Val Ala Asp Asp Ala Asn Asp Leu Ala Pro Gln Ala Pro Ala
50 55 60

Lys Thr Ala Asp Thr Pro Ala Thr Ser Lys Ala Thr Ile Arg Asp Leu
65 70 75 80

Asn Asp Pro Ser Gln Val Lys Thr Leu Gln Glu Lys Ala Ser Lys Gly
85 90 95

Ala Gly Thr Val Val Ala Val Ile Asp Ala Gly Phe Asp Lys Asn His
100 105 110

Glu Ala Trp Arg Leu Thr Asp Lys Thr Lys Ala Arg Tyr Gln Ser Lys
115 120 125

Glu Asp Leu Glu Lys Ala Lys Lys Glu His Gly Ile Thr Tyr Gly Glu
130 135 140

Trp Val Asn Asp Lys Val Ala Tyr Tyr His Asp Tyr Ser Lys Asp Gly
145 150 155 160

Lys Thr Ala Val Asp Gln Glu His Gly Thr His Val Ser Gly Ile Leu
165 170 175

Ser Gly Asn Ala Pro Ser Glu Thr Lys Glu Pro Tyr Arg Leu Glu Gly
180 185 190

10

ES 2 584 184 T3

Ala Met Pro Glu Ala Gln Leu Leu Leu Met Arg Val Glu Ile Val Asn
195 200 205

Gly Leu Ala Asp Tyr Ala Arg Asn Tyr Ala Gln Ala Ile Arg Asp Ala
210 215 220

Val Asn Leu Gly Ala Lys Val Ile Asn Met Ser Phe Gly Asn Ala Ala
225 230 235 240

Leu Ala Tyr Ala Asn Leu Pro Asp Glu Thr Lys Lys Ala Phe Asp Tyr
245 250 255

Ala Lys Ser Lys Gly Val Ser Ile Val Thr Ser Ala Gly Asn Asp Ser
260 265 270

Ser Phe Gly Gly Lys Thr Arg Leu Pro Leu Ala Asp His Pro Asp Tyr
275 280 285

Gly Val Val Gly Thr Pro Ala Ala Ala Asp Ser Thr Leu Thr Val Ala
290 295 300

Ser Tyr Ser Pro Asp Lys Gln Leu Thr Glu Thr Ala Thr Val Lys Thr
305 310 315 320

Asp Asp His Gln Ala Lys Glu Met Pro Val Leu Ser Thr Asn Arg Phe
325 330 335

Glu Pro Asn Lys Ala Tyr Asp Tyr Ala Tyr Ala Asn Arg Gly Met Lys
340 345 350

Glu Asp Asp Phe Lys Asp Val Lys Gly Lys Ile Ala Leu Ile Glu Arg
355 360 365

Gly Asp Ile Asp Phe Lys Asp Lys Ile Ala Asn Ala Lys Lys Ala Gly
370 375 380

Ala Val Gly Val Leu Ile Tyr Asp Asn Gln Asp Lys Gly Phe Pro Ile
385 390 395 400

Glu Leu Pro Asn Val Asp Gln Met Pro Ala Ala Phe Ile Ser Arg Lys
405 410 415

Asp Gly Leu Leu Leu Lys Asp Asn Ser Lys Lys Thr Ile Thr Phe Asn
420 425 430

Ala Thr Pro Lys Val Leu Pro Thr Ala Ser Asp Thr Lys Leu Ser Arg

ES 2 584 184 T3

435	440	445
Phe Ser Ser Trp Gly Leu Thr Ala Asp Gly Asn Ile Lys Pro Asp Ile		
450	455	460
Ala Ala Pro Gly Gln Asp Ile Leu Ser Ser Val Ala Asn Asn Lys Tyr		
465	470	475
Ala Lys Leu Ser Gly Thr Ser Met Ser Ala Pro Leu Val Ala Gly Ile		
	485	490
Met Gly Leu Leu Gln Lys Gln Tyr Glu Thr Gln Tyr Pro Asp Met Thr		
	500	505
Pro Ser Glu Arg Leu Asp Leu Ala Lys Lys Val Leu Met Ser Ser Ala		
	515	520
Thr Ala Leu Tyr Asp Glu Asp Glu Lys Ala Tyr Phe Ser Pro Arg Gln		
	530	535
Gln Gly Ala Gly Ala Val Asp Ala Lys Lys Ala Ser Ala Ala Thr Met		
545	550	555
Tyr Val Thr Asp Lys Asp Asn Thr Ser Ser Lys Val His Leu Asn Asn		
	565	570
Val Ser Asp Lys Phe Glu Val Thr Val Thr Val His Asn Lys Ser Asp		
	580	585
Lys Pro Gln Glu Leu Tyr Tyr Gln Ala Thr Val Gln Thr Asp Lys Val		
	595	600
Asp Gly Lys His Phe Ala Leu Ala Pro Lys Ala Leu Tyr Glu Thr Ser		
	610	615
Trp Gln Lys Ile Thr Ile Pro Ala Asn Ser Ser Lys Gln Val Thr Val		
625	630	635
Pro Ile Asp Ala Ser Arg Phe Ser Lys Asp Leu Leu Ala Gln Met Lys		
	645	650
Asn Gly Tyr Phe Leu Glu Gly Phe Val Arg Phe Lys Gln Asp Pro Lys		
	660	665
Lys Glu Glu Leu Met Ser Ile Pro Tyr Ile Gly Phe Arg Gly Asp Phe		
	675	680
		685

ES 2 584 184 T3

Gly Asn Leu Ser Ala Leu Glu Lys Pro Ile Tyr Asp Ser Lys Asp Gly
 690 695 700
 Ser Ser Tyr Tyr His Glu Ala Asn Ser Asp Ala Lys Asp Gln Leu Asp
 705 710 715 720
 Gly Asp Gly Leu Gln Phe Tyr Ala Leu Lys Asn Asn Phe Thr Ala Leu
 725 730 735
 Thr Thr Glu Ser Asn Pro Trp Thr Ile Ile Lys Ala Val Lys Glu Gly
 740 745 750
 Val Glu Asn Ile Glu Asp Ile Glu Ser Ser Glu Ile Thr Glu Thr Ile
 755 760 765
 Phe Ala Gly Thr Phe Ala Lys Gln Asp Asp Asp Ser His Tyr Tyr Ile
 770 775 780
 His Arg His Ala Asn Gly Lys Pro Tyr Ala Ala Ile Ser Pro Asn Gly
 785 790 795 800
 Asp Gly Asn Arg Asp Tyr Val Gln Phe Gln Gly Thr Phe Leu Arg Asn
 805 810 815
 Ala Lys Asn Leu Val Ala Glu Val Leu Asp Lys Glu Gly Asn Val Val
 820 825 830
 Trp Thr Ser Glu Val Thr Glu Gln Val Val Lys Asn Tyr Asn Asn Asp
 835 840 845
 Leu Ala Ser Thr Leu Gly Ser Thr Arg Phe Glu Lys Thr Arg Trp Asp
 850 855 860
 Gly Lys Asp Lys Asp Gly Lys Val Val Val Asn Gly Thr Tyr Thr Tyr
 865 870 875 880
 Arg Val Arg Tyr Thr Pro Ile Ser Ser Gly Ala Lys Glu Gln His Thr
 885 890 895
 Asp Phe Asp Val Ile Val Asp Asn Thr Thr Pro Glu Val Ala Thr Ser
 900 905 910
 Ala Thr Phe Ser Thr Glu Asp Arg Arg Leu Thr Leu Ala Ser Lys Pro
 915 920 925
 Lys Thr Ser Gln Pro Ile Tyr Arg Glu Arg Ile Ala Tyr Thr Tyr Met
 930 935 940

Asp Glu Asp Leu Pro Thr Thr Glu Tyr Ile Ser Pro Asn Glu Asp Gly
945 950 955 960

Thr Phe Thr Leu Pro Glu Glu Ala Glu Thr Met Glu Gly Gly Thr Val
965 970 975

Pro Leu Lys Met Ser Asp Phe Thr Tyr Val Val Glu Asp Met Ala Gly
980 985 990

Asn Ile Thr Tyr Thr Pro Val Thr Lys Leu Leu Glu Gly His Ser
995 1000 1005

<210> 3

<211> 961

5 <212> PRT

<213> Streptococcus pyogenes

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

10 <222> (1)..(961)

<223> Proteasa madura ScpA

<400> 3

Ala Glu Glu Thr Val Ala Asp Asp Ala Asn Asp Leu Ala Pro Gln Ala
1 5 10 15

Pro Ala Lys Thr Ala Asp Thr Pro Ala Thr Ser Lys Ala Thr Ile Arg
20 25 30

Asp Leu Asn Asp Pro Ser Gln Val Lys Thr Leu Gln Glu Lys Ala Ser
35 40 45

Lys Gly Ala Gly Thr Val Val Ala Val Ile Asp Ala Gly Phe Asp Lys
50 55 60

Asn His Glu Ala Trp Arg Leu Thr Asp Lys Thr Lys Ala Arg Tyr Gln
65 70 75 80

Ser Lys Glu Asp Leu Glu Lys Ala Lys Lys Glu His Gly Ile Thr Tyr
85 90 95

Gly Glu Trp Val Asn Asp Lys Val Ala Tyr Tyr His Asp Tyr Ser Lys
100 105 110

Asp Gly Lys Thr Ala Val Asp Gln Glu His Gly Thr His Val Ser Gly
115 120 125

Ile Leu Ser Gly Asn Ala Pro Ser Glu Thr Lys Glu Pro Tyr Arg Leu

15

ES 2 584 184 T3

130		135		140
Glu Gly Ala Met Pro Glu Ala Gln Leu Leu Leu Met Arg Val Glu Ile				
145		150		155
				160
Val Asn Gly Leu Ala Asp Tyr Ala Arg Asn Tyr Ala Gln Ala Ile Arg				
	165		170	175
Asp Ala Val Asn Leu Gly Ala Lys Val Ile Asn Met Ser Phe Gly Asn				
	180		185	190
Ala Ala Leu Ala Tyr Ala Asn Leu Pro Asp Glu Thr Lys Lys Ala Phe				
	195		200	205
Asp Tyr Ala Lys Ser Lys Gly Val Ser Ile Val Thr Ser Ala Gly Asn				
	210		215	220
Asp Ser Ser Phe Gly Gly Lys Thr Arg Leu Pro Leu Ala Asp His Pro				
	225		230	235
				240
Asp Tyr Gly Val Val Gly Thr Pro Ala Ala Ala Asp Ser Thr Leu Thr				
	245		250	255
Val Ala Ser Tyr Ser Pro Asp Lys Gln Leu Thr Glu Thr Ala Thr Val				
	260		265	270
Lys Thr Asp Asp His Gln Ala Lys Glu Met Pro Val Leu Ser Thr Asn				
	275		280	285
Arg Phe Glu Pro Asn Lys Ala Tyr Asp Tyr Ala Tyr Ala Asn Arg Gly				
	290		295	300
Met Lys Glu Asp Asp Phe Lys Asp Val Lys Gly Lys Ile Ala Leu Ile				
	305		310	315
				320
Glu Arg Gly Asp Ile Asp Phe Lys Asp Lys Ile Ala Asn Ala Lys Lys				
	325		330	335
Ala Gly Ala Val Gly Val Leu Ile Tyr Asp Asn Gln Asp Lys Gly Phe				
	340		345	350
Pro Ile Glu Leu Pro Asn Val Asp Gln Met Pro Ala Ala Phe Ile Ser				
	355		360	365
Arg Lys Asp Gly Leu Leu Leu Lys Asp Asn Ser Lys Lys Thr Ile Thr				
	370		375	380

ES 2 584 184 T3

Phe Asn Ala Thr Pro Lys Val Leu Pro Thr Ala Ser Asp Thr Lys Leu
 385 390 395 400
 Ser Arg Phe Ser Ser Trp Gly Leu Thr Ala Asp Gly Asn Ile Lys Pro
 405 410 415
 Asp Ile Ala Ala Pro Gly Gln Asp Ile Leu Ser Ser Val Ala Asn Asn
 420 425 430
 Lys Tyr Ala Lys Leu Ser Gly Thr Ser Met Ser Ala Pro Leu Val Ala
 435 440 445
 Gly Ile Met Gly Leu Leu Gln Lys Gln Tyr Glu Thr Gln Tyr Pro Asp
 450 455 460
 Met Thr Pro Ser Glu Arg Leu Asp Leu Ala Lys Lys Val Leu Met Ser
 465 470 475 480
 Ser Ala Thr Ala Leu Tyr Asp Glu Asp Glu Lys Ala Tyr Phe Ser Pro
 485 490 495
 Arg Gln Gln Gly Ala Gly Ala Val Asp Ala Lys Lys Ala Ser Ala Ala
 500 505 510
 Thr Met Tyr Val Thr Asp Lys Asp Asn Thr Ser Ser Lys Val His Leu
 515 520 525
 Asn Asn Val Ser Asp Lys Phe Glu Val Thr Val Thr Val His Asn Lys
 530 535 540
 Ser Asp Lys Pro Gln Glu Leu Tyr Tyr Gln Ala Thr Val Gln Thr Asp
 545 550 555 560
 Lys Val Asp Gly Lys His Phe Ala Leu Ala Pro Lys Ala Leu Tyr Glu
 565 570 575
 Thr Ser Trp Gln Lys Ile Thr Ile Pro Ala Asn Ser Ser Lys Gln Val
 580 585 590
 Thr Val Pro Ile Asp Ala Ser Arg Phe Ser Lys Asp Leu Leu Ala Gln
 595 600 605
 Met Lys Asn Gly Tyr Phe Leu Glu Gly Phe Val Arg Phe Lys Gln Asp
 610 615 620
 Pro Lys Lys Glu Glu Leu Met Ser Ile Pro Tyr Ile Gly Phe Arg Gly
 625 630 635 640

Asp Phe Gly Asn Leu Ser Ala Leu Glu Lys Pro Ile Tyr Asp Ser Lys
 645 650 655
 Asp Gly Ser Ser Tyr Tyr His Glu Ala Asn Ser Asp Ala Lys Asp Gln
 660 665 670
 Leu Asp Gly Asp Gly Leu Gln Phe Tyr Ala Leu Lys Asn Asn Phe Thr
 675 680 685
 Ala Leu Thr Thr Glu Ser Asn Pro Trp Thr Ile Ile Lys Ala Val Lys
 690 695 700
 Glu Gly Val Glu Asn Ile Glu Asp Ile Glu Ser Ser Glu Ile Thr Glu
 705 710 715 720
 Thr Ile Phe Ala Gly Thr Phe Ala Lys Gln Asp Asp Asp Ser His Tyr
 725 730 735
 Tyr Ile His Arg His Ala Asn Gly Lys Pro Tyr Ala Ala Ile Ser Pro
 740 745 750
 Asn Gly Asp Gly Asn Arg Asp Tyr Val Gln Phe Gln Gly Thr Phe Leu
 755 760 765
 Arg Asn Ala Lys Asn Leu Val Ala Glu Val Leu Asp Lys Glu Gly Asn
 770 775 780
 Val Val Trp Thr Ser Glu Val Thr Glu Gln Val Val Lys Asn Tyr Asn
 785 790 795 800
 Asn Asp Leu Ala Ser Thr Leu Gly Ser Thr Arg Phe Glu Lys Thr Arg
 805 810 815
 Trp Asp Gly Lys Asp Lys Asp Gly Lys Val Val Val Asn Gly Thr Tyr
 820 825 830
 Thr Tyr Arg Val Arg Tyr Thr Pro Ile Ser Ser Gly Ala Lys Glu Gln
 835 840 845
 His Thr Asp Phe Asp Val Ile Val Asp Asn Thr Thr Pro Glu Val Ala
 850 855 860
 Thr Ser Ala Thr Phe Ser Thr Glu Asp Arg Arg Leu Thr Leu Ala Ser
 865 870 875 880
 Lys Pro Lys Thr Ser Gln Pro Ile Tyr Arg Glu Arg Ile Ala Tyr Thr
 885 890 895

Tyr Met Asp Glu Asp Leu Pro Thr Thr Glu Tyr Ile Ser Pro Asn Glu
900 905 910

Asp Gly Thr Phe Thr Leu Pro Glu Glu Ala Glu Thr Met Glu Gly Gly
915 920 925

Thr Val Pro Leu Lys Met Ser Asp Phe Thr Tyr Val Val Glu Asp Met
930 935 940

Ala Gly Asn Ile Thr Tyr Thr Pro Val Thr Lys Leu Leu Glu Gly His
945 950 955 960

Ser

<210> 4

<211> 954

5 <212> PRT

<213> Streptococcus pyogenes

<220>

10 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (1)..(954)

<223> Variante de la proteasa ScpA

<400> 4

Asp Ala Asn Asp Leu Ala Pro Gln Ala Pro Ala Lys Thr Ala Asp Thr
1 5 10 15

Pro Ala Thr Ser Lys Ala Thr Ile Arg Asp Leu Asn Asp Pro Ser Gln
20 25 30

Val Lys Thr Leu Gln Glu Lys Ala Ser Lys Gly Ala Gly Thr Val Val
35 40 45

Ala Val Ile Asp Ala Gly Phe Asp Lys Asn His Glu Ala Trp Arg Leu
50 55 60

Thr Asp Lys Thr Lys Ala Arg Tyr Gln Ser Lys Glu Asp Leu Glu Lys
65 70 75 80

Ala Lys Lys Glu His Gly Ile Thr Tyr Gly Glu Trp Val Asn Asp Lys
85 90 95

Val Ala Tyr Tyr His Asp Tyr Ser Lys Asp Gly Lys Thr Ala Val Asp
100 105 110

ES 2 584 184 T3

Gln Glu His Gly Thr His Val Ser Gly Ile Leu Ser Gly Asn Ala Pro
 115 120 125
 Ser Glu Thr Lys Glu Pro Tyr Arg Leu Glu Gly Ala Met Pro Glu Ala
 130 135 140
 Gln Leu Leu Leu Met Arg Val Glu Ile Val Asn Gly Leu Ala Asp Tyr
 145 150 155 160
 Ala Arg Asn Tyr Ala Gln Ala Ile Arg Asp Ala Val Asn Leu Gly Ala
 165 170 175
 Lys Val Ile Asn Met Ser Phe Gly Asn Ala Ala Leu Ala Tyr Ala Asn
 180 185 190
 Leu Pro Asp Glu Thr Lys Lys Ala Phe Asp Tyr Ala Lys Ser Lys Gly
 195 200 205
 Val Ser Ile Val Thr Ser Ala Gly Asn Asp Ser Ser Phe Gly Gly Lys
 210 215 220
 Thr Arg Leu Pro Leu Ala Asp His Pro Asp Tyr Gly Val Val Gly Thr
 225 230 235 240
 Pro Ala Ala Ala Asp Ser Thr Leu Thr Val Ala Ser Tyr Ser Pro Asp
 245 250 255
 Lys Gln Leu Thr Glu Thr Ala Thr Val Lys Thr Asp Asp His Gln Ala
 260 265 270
 Lys Glu Met Pro Val Leu Ser Thr Asn Arg Phe Glu Pro Asn Lys Ala
 275 280 285
 Tyr Asp Tyr Ala Tyr Ala Asn Arg Gly Met Lys Glu Asp Asp Phe Lys
 290 295 300
 Asp Val Lys Gly Lys Ile Ala Leu Ile Glu Arg Gly Asp Ile Asp Phe
 305 310 315 320
 Lys Asp Lys Ile Ala Asn Ala Lys Lys Ala Gly Ala Val Gly Val Leu
 325 330 335
 Ile Tyr Asp Asn Gln Asp Lys Gly Phe Pro Ile Glu Leu Pro Asn Val
 340 345 350
 Asp Gln Met Pro Ala Ala Phe Ile Ser Arg Lys Asp Gly Leu Leu Leu
 355 360 365

Lys Asp Asn Ser Lys Lys Thr Ile Thr Phe Asn Ala Thr Pro Lys Val
 370 375 380
 Leu Pro Thr Ala Ser Asp Thr Lys Leu Ser Arg Phe Ser Ser Trp Gly
 385 390 395 400
 Leu Thr Ala Asp Gly Asn Ile Lys Pro Asp Ile Ala Ala Pro Gly Gln
 405 410 415
 Asp Ile Leu Ser Ser Val Ala Asn Asn Lys Tyr Ala Lys Leu Ser Gly
 420 425 430
 Thr Ser Met Ser Ala Pro Leu Val Ala Gly Ile Met Gly Leu Leu Gln
 435 440 445
 Lys Gln Tyr Glu Thr Gln Tyr Pro Asp Met Thr Pro Ser Glu Arg Leu
 450 455 460
 Asp Leu Ala Lys Lys Val Leu Met Ser Ser Ala Thr Ala Leu Tyr Asp
 465 470 475 480
 Glu Asp Glu Lys Ala Tyr Phe Ser Pro Arg Gln Gln Gly Ala Gly Ala
 485 490 495
 Val Asp Ala Lys Lys Ala Ser Ala Ala Thr Met Tyr Val Thr Asp Lys
 500 505 510
 Asp Asn Thr Ser Ser Lys Val His Leu Asn Asn Val Ser Asp Lys Phe
 515 520 525
 Glu Val Thr Val Thr Val His Asn Lys Ser Asp Lys Pro Gln Glu Leu
 530 535 540
 Tyr Tyr Gln Ala Thr Val Gln Thr Asp Lys Val Asp Gly Lys His Phe
 545 550 555 560
 Ala Leu Ala Pro Lys Ala Leu Tyr Glu Thr Ser Trp Gln Lys Ile Thr
 565 570 575
 Ile Pro Ala Asn Ser Ser Lys Gln Val Thr Val Pro Ile Asp Ala Ser
 580 585 590
 Arg Phe Ser Lys Asp Leu Leu Ala Gln Met Lys Asn Gly Tyr Phe Leu
 595 600 605
 Glu Gly Phe Val Arg Phe Lys Gln Asp Pro Lys Lys Glu Glu Leu Met
 610 615 620

ES 2 584 184 T3

Ser Ile Pro Tyr Ile Gly Phe Arg Gly Asp Phe Gly Asn Leu Ser Ala
 625 630 635 640
 Leu Glu Lys Pro Ile Tyr Asp Ser Lys Asp Gly Ser Ser Tyr Tyr His
 645 650 655
 Glu Ala Asn Ser Asp Ala Lys Asp Gln Leu Asp Gly Asp Gly Leu Gln
 660 665 670
 Phe Tyr Ala Leu Lys Asn Asn Phe Thr Ala Leu Thr Thr Glu Ser Asn
 675 680 685
 Pro Trp Thr Ile Ile Lys Ala Val Lys Glu Gly Val Glu Asn Ile Glu
 690 695 700
 Asp Ile Glu Ser Ser Glu Ile Thr Glu Thr Ile Phe Ala Gly Thr Phe
 705 710 715 720
 Ala Lys Gln Asp Asp Asp Ser His Tyr Tyr Ile His Arg His Ala Asn
 725 730 735
 Gly Lys Pro Tyr Ala Ala Ile Ser Pro Asn Gly Asp Gly Asn Arg Asp
 740 745 750
 Tyr Val Gln Phe Gln Gly Thr Phe Leu Arg Asn Ala Lys Asn Leu Val
 755 760 765
 Ala Glu Val Leu Asp Lys Glu Gly Asn Val Val Trp Thr Ser Glu Val
 770 775 780
 Thr Glu Gln Val Val Lys Asn Tyr Asn Asn Asp Leu Ala Ser Thr Leu
 785 790 795 800
 Gly Ser Thr Arg Phe Glu Lys Thr Arg Trp Asp Gly Lys Asp Lys Asp
 805 810 815
 Gly Lys Val Val Val Asn Gly Thr Tyr Thr Tyr Arg Val Arg Tyr Thr
 820 825 830
 Pro Ile Ser Ser Gly Ala Lys Glu Gln His Thr Asp Phe Asp Val Ile
 835 840 845
 Val Asp Asn Thr Thr Pro Glu Val Ala Thr Ser Ala Thr Phe Ser Thr
 850 855 860
 Glu Asp Arg Arg Leu Thr Leu Ala Ser Lys Pro Lys Thr Ser Gln Pro

865 870 875 880

Ile Tyr Arg Glu Arg Ile Ala Tyr Thr Tyr Met Asp Glu Asp Leu Pro
 885 890 895

Thr Thr Glu Tyr Ile Ser Pro Asn Glu Asp Gly Thr Phe Thr Leu Pro
 900 905 910

Glu Glu Ala Glu Thr Met Glu Gly Gly Thr Val Pro Leu Lys Met Ser
 915 920 925

Asp Phe Thr Tyr Val Val Glu Asp Met Ala Gly Asn Ile Thr Tyr Thr
 930 935 940

Pro Val Thr Lys Leu Leu Glu Gly His Ser
945 950

<210> 5
<211> 943
5 <212> PRT
<213> Streptococcus pyogenes

<220>
10 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (1)..(943)
<223> Variante de la proteasa ScpA

<400> 5
Lys Thr Ala Asp Thr Pro Ala Thr Ser Lys Ala Thr Ile Arg Asp Leu
1 5 10 15

Asn Asp Pro Ser Gln Val Lys Thr Leu Gln Glu Lys Ala Ser Lys Gly
 20 25 30

Ala Gly Thr Val Val Ala Val Ile Asp Ala Gly Phe Asp Lys Asn His
 35 40 45

Glu Ala Trp Arg Leu Thr Asp Lys Thr Lys Ala Arg Tyr Gln Ser Lys
50 55 60

Glu Asp Leu Glu Lys Ala Lys Lys Glu His Gly Ile Thr Tyr Gly Glu
65 70 75 80

Trp Val Asn Asp Lys Val Ala Tyr Tyr His Asp Tyr Ser Lys Asp Gly
 85 90 95

Lys Thr Ala Val Asp Gln Glu His Gly Thr His Val Ser Gly Ile Leu
 100 105 110

15

ES 2 584 184 T3

Ser Gly Asn Ala Pro Ser Glu Thr Lys Glu Pro Tyr Arg Leu Glu Gly
 115 120 125
 Ala Met Pro Glu Ala Gln Leu Leu Leu Met Arg Val Glu Ile Val Asn
 130 135 140
 Gly Leu Ala Asp Tyr Ala Arg Asn Tyr Ala Gln Ala Ile Arg Asp Ala
 145 150 155 160
 Val Asn Leu Gly Ala Lys Val Ile Asn Met Ser Phe Gly Asn Ala Ala
 165 170 175
 Leu Ala Tyr Ala Asn Leu Pro Asp Glu Thr Lys Lys Ala Phe Asp Tyr
 180 185 190
 Ala Lys Ser Lys Gly Val Ser Ile Val Thr Ser Ala Gly Asn Asp Ser
 195 200 205
 Ser Phe Gly Gly Lys Thr Arg Leu Pro Leu Ala Asp His Pro Asp Tyr
 210 215 220
 Gly Val Val Gly Thr Pro Ala Ala Ala Asp Ser Thr Leu Thr Val Ala
 225 230 235 240
 Ser Tyr Ser Pro Asp Lys Gln Leu Thr Glu Thr Ala Thr Val Lys Thr
 245 250 255
 Asp Asp His Gln Ala Lys Glu Met Pro Val Leu Ser Thr Asn Arg Phe
 260 265 270
 Glu Pro Asn Lys Ala Tyr Asp Tyr Ala Tyr Ala Asn Arg Gly Met Lys
 275 280 285
 Glu Asp Asp Phe Lys Asp Val Lys Gly Lys Ile Ala Leu Ile Glu Arg
 290 295 300
 Gly Asp Ile Asp Phe Lys Asp Lys Ile Ala Asn Ala Lys Lys Ala Gly
 305 310 315 320
 Ala Val Gly Val Leu Ile Tyr Asp Asn Gln Asp Lys Gly Phe Pro Ile
 325 330 335
 Glu Leu Pro Asn Val Asp Gln Met Pro Ala Ala Phe Ile Ser Arg Lys
 340 345 350
 Asp Gly Leu Leu Leu Lys Asp Asn Ser Lys Lys Thr Ile Thr Phe Asn
 355 360 365

Ala Thr Pro Lys Val Leu Pro Thr Ala Ser Asp Thr Lys Leu Ser Arg
370 375 380

Phe Ser Ser Trp Gly Leu Thr Ala Asp Gly Asn Ile Lys Pro Asp Ile
385 390 395 400

Ala Ala Pro Gly Gln Asp Ile Leu Ser Ser Val Ala Asn Asn Lys Tyr
405 410 415

Ala Lys Leu Ser Gly Thr Ser Met Ser Ala Pro Leu Val Ala Gly Ile
420 425 430

Met Gly Leu Leu Gln Lys Gln Tyr Glu Thr Gln Tyr Pro Asp Met Thr
435 440 445

Pro Ser Glu Arg Leu Asp Leu Ala Lys Lys Val Leu Met Ser Ser Ala
450 455 460

Thr Ala Leu Tyr Asp Glu Asp Glu Lys Ala Tyr Phe Ser Pro Arg Gln
465 470 475 480

Gln Gly Ala Gly Ala Val Asp Ala Lys Lys Ala Ser Ala Ala Thr Met
485 490 495

Tyr Val Thr Asp Lys Asp Asn Thr Ser Ser Lys Val His Leu Asn Asn
500 505 510

Val Ser Asp Lys Phe Glu Val Thr Val Thr Val His Asn Lys Ser Asp
515 520 525

Lys Pro Gln Glu Leu Tyr Tyr Gln Ala Thr Val Gln Thr Asp Lys Val
530 535 540

Asp Gly Lys His Phe Ala Leu Ala Pro Lys Ala Leu Tyr Glu Thr Ser
545 550 555 560

Trp Gln Lys Ile Thr Ile Pro Ala Asn Ser Ser Lys Gln Val Thr Val
565 570 575

Pro Ile Asp Ala Ser Arg Phe Ser Lys Asp Leu Leu Ala Gln Met Lys
580 585 590

Asn Gly Tyr Phe Leu Glu Gly Phe Val Arg Phe Lys Gln Asp Pro Lys
595 600 605

Lys Glu Glu Leu Met Ser Ile Pro Tyr Ile Gly Phe Arg Gly Asp Phe

ES 2 584 184 T3

610	615	620
Gly Asn Leu Ser Ala Leu Glu Lys Pro Ile Tyr Asp Ser Lys Asp Gly 625 630 635 640		
Ser Ser Tyr Tyr His Glu Ala Asn Ser Asp Ala Lys Asp Gln Leu Asp 645 650 655		
Gly Asp Gly Leu Gln Phe Tyr Ala Leu Lys Asn Asn Phe Thr Ala Leu 660 665 670		
Thr Thr Glu Ser Asn Pro Trp Thr Ile Ile Lys Ala Val Lys Glu Gly 675 680 685		
Val Glu Asn Ile Glu Asp Ile Glu Ser Ser Glu Ile Thr Glu Thr Ile 690 695 700		
Phe Ala Gly Thr Phe Ala Lys Gln Asp Asp Asp Ser His Tyr Tyr Ile 705 710 715 720		
His Arg His Ala Asn Gly Lys Pro Tyr Ala Ala Ile Ser Pro Asn Gly 725 730 735		
Asp Gly Asn Arg Asp Tyr Val Gln Phe Gln Gly Thr Phe Leu Arg Asn 740 745 750		
Ala Lys Asn Leu Val Ala Glu Val Leu Asp Lys Glu Gly Asn Val Val 755 760 765		
Trp Thr Ser Glu Val Thr Glu Gln Val Val Lys Asn Tyr Asn Asn Asp 770 775 780		
Leu Ala Ser Thr Leu Gly Ser Thr Arg Phe Glu Lys Thr Arg Trp Asp 785 790 795 800		
Gly Lys Asp Lys Asp Gly Lys Val Val Val Asn Gly Thr Tyr Thr Tyr 805 810 815		
Arg Val Arg Tyr Thr Pro Ile Ser Ser Gly Ala Lys Glu Gln His Thr 820 825 830		
Asp Phe Asp Val Ile Val Asp Asn Thr Thr Pro Glu Val Ala Thr Ser 835 840 845		
Ala Thr Phe Ser Thr Glu Asp Arg Arg Leu Thr Leu Ala Ser Lys Pro 850 855 860		

Lys Thr Ser Gln Pro Ile Tyr Arg Glu Arg Ile Ala Tyr Thr Tyr Met
865 870 875 880

Asp Glu Asp Leu Pro Thr Thr Glu Tyr Ile Ser Pro Asn Glu Asp Gly
885 890 895

Thr Phe Thr Leu Pro Glu Glu Ala Glu Thr Met Glu Gly Gly Thr Val
900 905 910

Pro Leu Lys Met Ser Asp Phe Thr Tyr Val Val Glu Asp Met Ala Gly
915 920 925

Asn Ile Thr Tyr Thr Pro Val Thr Lys Leu Leu Glu Gly His Ser
930 935 940

<210> 6
<211> 74
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (1)..(74)
<223> Proteína C5a humana

<400> 6
Met Leu Gln Lys Lys Ile Glu Glu Ile Ala Ala Lys Tyr Lys His Ser
1 5 10 15

Val Val Lys Lys Cys Cys Tyr Asp Gly Ala Cys Val Asn Asn Asp Glu
20 25 30

Thr Cys Glu Gln Arg Ala Ala Arg Ile Ser Leu Gly Pro Arg Cys Ile
35 40 45

Lys Ala Phe Thr Glu Cys Cys Val Val Ala Ser Gln Leu Arg Ala Asn
50 55 60

Ile Ser His Lys Asp Met Gln Leu Gly Arg
65 70

REIVINDICACIONES

1. Un equipo para el tratamiento extracorporal de la sangre, que comprende:
un circuito extracorporal de sangre;
- 5 una bomba configurada para desplazar el líquido por dentro del circuito extracorporal de sangre; y
una cámara de reacción conectada al circuito extracorporal de sangre y configurada para recibir la sangre o una fracción de sangre que contiene el C5a de humano desde el circuito y tratar la sangre o la fracción de sangre que contiene el C5a de humano,
caracterizado por que la cámara de reacción comprende una enzima proteásica inmovilizada de forma irreversible a
10 un soporte, en donde la enzima proteásica es específica del C5a de humano presente en la sangre o fracción de sangre, y es capaz de escindirlo de forma irreversible, de tal manera que se reduce la capacidad quimiotáctica del C5a de humano escindido, en donde la abundancia del C5a funcional de humano en la sangre o la fracción de sangre tratada es menor que en la sangre o la fracción de sangre sin tratar.
2. Un equipo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la enzima proteásica es una proteasa bacteriana recombinante de C5a que comprende una secuencia de SEQ ID n.º 3 o una variante funcional de la misma que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con la SEQ ID n.º 3.
3. Un equipo de acuerdo con la reivindicación 2, en donde las variantes funcionales de la SEQ ID n.º 3 se seleccionan de SEQ ID n.º 4 y SEQ ID n.º 5.
4. Un equipo de acuerdo con cualquier reivindicación anterior y que incluye medios de separación adaptados
20 para separar la sangre en una fracción que contiene el C5a y una fracción que no contiene el C5a, en donde la cámara de reacción recibe la fracción que contiene el C5a.
5. Un equipo de acuerdo con la reivindicación 4 y que incluye medios configurados para que la fracción que contiene el C5a tratado se vuelva a combinar con la fracción que no contiene el C5a.
6. Un equipo de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde un extremo carboxilo de la enzima proteásica comprende una primera etiqueta y una segunda etiqueta localizada distalmente de la primera etiqueta y separada de la primera etiqueta por un espaciador, y en donde el soporte comprende un ion coordinado de metal de transición y uno o varios grupos funcionales, en donde la primera etiqueta comprende un motivo capaz de reaccionar covalentemente con uno o varios grupos funcionales, y en donde la segunda etiqueta comprende un motivo capaz de interactuar con el ion coordinado de metal de transición.
7. Un equipo de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la primera etiqueta se selecciona de etiqueta de polilisina, poliglutamato o policisteína, y en donde la segunda etiqueta comprende una etiqueta de polihistidina.
8. Un equipo de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en donde el soporte comprende un material de sílice mesoporoso modificado con Ni^{2+} .
9. Un equipo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el soporte comprende
35 muchas perlas, en donde la enzima proteásica está inmovilizada de forma irreversible en la superficie de las perlas.
10. Un equipo de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 9 para ser usado en un método para el tratamiento ex vivo de la sangre en un humano con septicemia.
11. Un equipo para tratar la sangre humana o una fracción de sangre que contiene el C5a, en donde el equipo comprende una enzima proteásica unida de forma irreversible a un soporte, en donde la enzima proteásica es específica del C5a de humano presente en la sangre o en la fracción de sangre, y es capaz escindirlo de forma irreversible, de tal manera que se reduce la capacidad quimiotáctica de C5a de humano escindido.
- 40 12. Un equipo de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la enzima proteásica es una proteasa bacteriana recombinante de C5a que comprende una secuencia de SEQ ID n.º 3 o una variante funcional de la misma que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con la SEQ ID n.º 3.
13. Un equipo de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, en donde un extremo carboxilo de la enzima proteásica comprende una primera etiqueta y una segunda etiqueta localizada distalmente de la primera etiqueta y separada de la primera etiqueta por un espaciador, y en donde el soporte comprende un ion coordinado de metal y uno o varios grupos funcionales, en donde la primera etiqueta comprende un motivo capaz de reaccionar covalentemente con uno o varios grupos funcionales, y en donde la segunda etiqueta comprende un motivo capaz de interactuar con el

ion coordinado de metal.

14. Una enzima proteásica unida a soporte de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la primera etiqueta se selecciona de la etiqueta de polilisina, poliglutamato o policisteína, y en donde la segunda etiqueta comprende una etiqueta de polihistidina.

- 5 15. Una enzima proteásica que comprende la secuencia de A-B-C-D, en donde A comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 3 o una variante funcional de la misma que tiene una homología de secuencia de al menos el 90% con la SEQ ID n.º 3, B es un motivo de polilisina, policisteína o poliglutamato, C es un espaciador y D es un motivo de polihistidina.

10

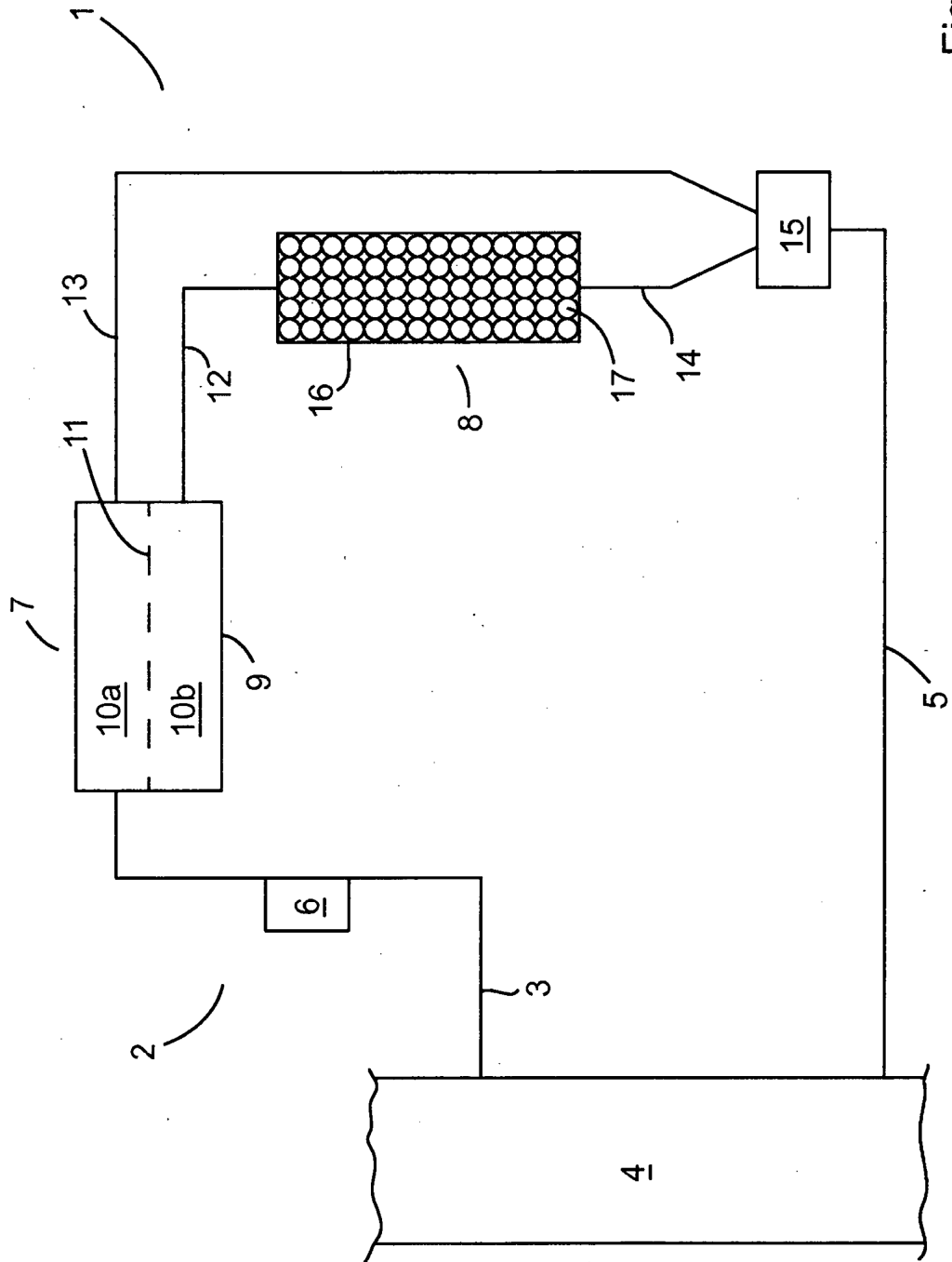


Fig. 1

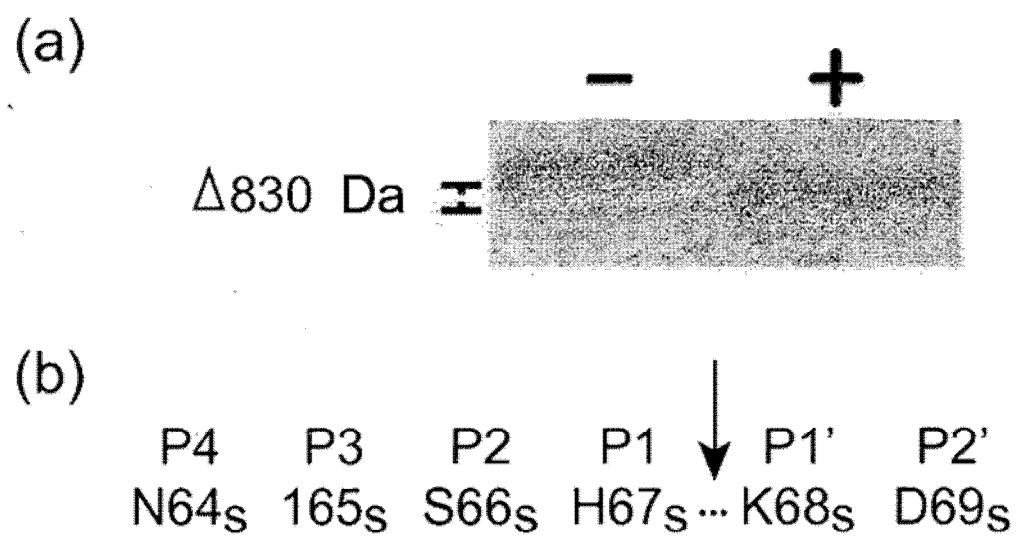


Fig. 2

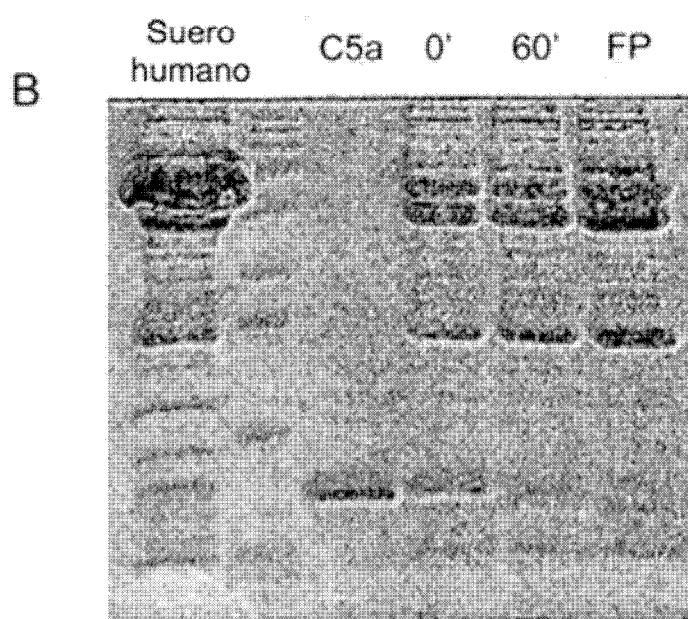
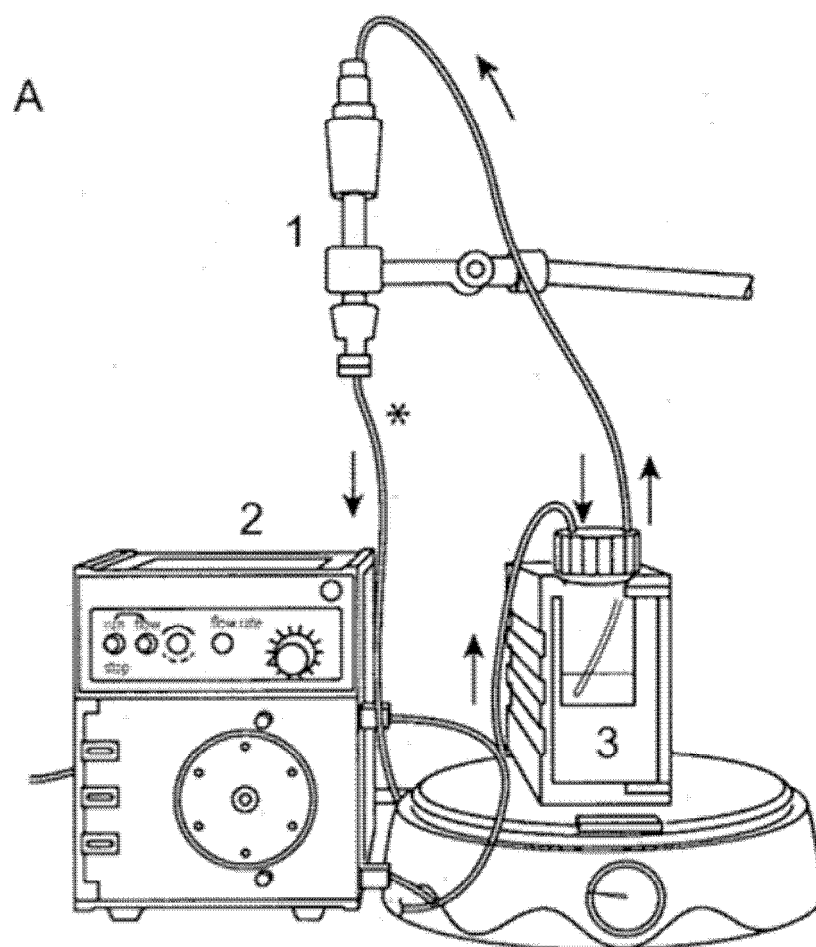


Fig. 3