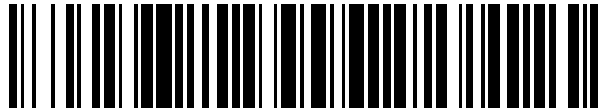


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 845**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/573** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.10.2007 E 07815155 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **19.08.2009 EP 2089715**

54 Título: **Procedimiento para la determinación de la actividad de ACE2**

30 Prioridad:

**19.10.2006 AT 17582006**

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

**06.02.2013**

73 Titular/es:

**APEIRON BIOLOGICS AG (100.0%)  
Campus-Vienna-Biocenter 5  
1030 Wien , AT**

72 Inventor/es:

**LOIBNER, HANS;  
SCHUSTER, MANFRED y  
JANZEK-HAWLAT, EVELYNE**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 394 845 T3**

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

**DESCRIPCIÓN**

Procedimiento para la determinación de la actividad de ACE2

La presente invención se refiere a la determinación inmunológica de la actividad enzimática de enzimas.

5 Los procedimientos actuales para la determinación de actividades enzimáticas en procedimientos de cribado rápidos se ven influidos fuertemente por factores interferentes de diversas fuentes. Los ensayos habituales para la medición de actividades enzimáticas prevén el uso de compuestos fluorescentes o cromógenos. Por ejemplo en la detección de proteasa del VIH se usa un sustrato fluorescente que se modificó con un grupo dansilo fluorescente en un extremo del péptido y un inhibidor de la fluorescencia en el otro extremo del péptido. Un aumento de la señal de fluorescencia medida se realiza rompiendo el péptido mediante la proteasa, dado que la parte emisora del inhibidor supresor se divide. Algunos sustratos fluorescentes para otras enzimas pueden modificarse mediante modificaciones similares de los sustratos de la respectiva enzima, tal como se dan a conocer por ejemplo en los documentos US 6.037.137, EP 1 557 474 A y WO 90/00618.

15 Estos ensayos, particularmente en el área de alto rendimiento, son propensos a dar problemas con la autofluorescencia de componentes biológicos, en parte de manera condicionada por las propias moléculas medidas. Muchos de los compuestos y extractos naturales son incluso de colores o fluorescen y se encuentran en solución durante la medición de la señal del ensayo. Esto conduce a que esta interferencia limita la detección y la sensibilidad o la zona de medición dinámica del procedimiento. La interferencia puede interpretarse también como inhibición de la enzima, siendo difícil en el ensayo de inhibición diferenciar la inhibición medida de la inhibición (bio)química real de la enzima.

20 El documento US 5.591.591 describe un ensayo para la detección de proteasas, en el que se añade un componente de dioxetano con un aminoácido específico de enzima proteolítica o un péptido unido a una muestra que contiene posiblemente la proteasa, en el que el aminoácido se separa mediante la reacción enzimática, lo que produce a su vez la degradación del dioxetano y quimioluminiscencia.

El documento JP 8160046 se refiere al uso de un kit para la determinación de la actividad de ACE.

25 El documento WO 2002/098448 A1 se refiere a compuestos que se unen específicamente a ACE2 y modifican su actividad.

El documento US 2003/0124622 describe la medición de la actividad de una proteasa, uniéndose la proteasa inicialmente a un anticuerpo inmovilizado y añadiéndose un sustrato cromógeno que cambia de color con la acción de la actividad enzimática. La modificación de la extinción puede correlacionarse con la actividad enzimática.

30 El documento US 6.610.497 describe el aislamiento de ACE2 y menciona también una pluralidad de posibilidades para la determinación de ACE2 o complejos de ACE2-componente de unión.

El documento US 2005/0287066 A1 se refiere a anticuerpos monoclonales que se unen específicamente al dominio N de ACE, o sea no a ACE2.

Guy *et al.* (Biochemistry 42 (45)(2003): 13185-13192) describen la actividad y la especificidad de ACE2.

35 Vickers *et al.* (Biological Chemistry 277 (17)(2002): 14838-14843) mencionan información antecedente con respecto a ACE2 y describen también sustratos para la medición de la actividad de ACE2.

Es un objetivo desarrollar sistemas de medición rápidos que no se vean influidos por impurezas, particularmente para sistemas para la medición rápida de actividades enzimáticas.

40 La presente invención se refiere a un procedimiento para la determinación de la actividad de ACE2, de una enzima del sistema renina-angiotensina-aldosterona, que comprende las siguientes etapas:

- facilitar unidades que se unen a ACE2 inmovilizadas en un soporte sólido, que son específicas para una parte de ACE2 que no está implicada en la actividad catalítica de ACE2,
- poner en contacto las unidades que se unen a ACE2 inmovilizadas con una muestra que contiene posiblemente ACE2, uniéndose la ACE2 por la unidad que se une a ACE2,
- 45 • eliminar la proporción no unida de la muestra de la enzima unida a las unidades que se unen a ACE2,
- añadir un sustrato de ACE2 que se convierte mediante actividad enzimática y la conversión proporciona una señal,
- medir la modificación de la señal en un intervalo de tiempo determinado, pudiéndose correlacionar la modificación con la actividad de ACE2.

50 Con el procedimiento según la invención es posible determinar cuantitativamente la actividad enzimática en soluciones complejas, tales como líquidos corporales o sobrenadantes de cultivo, mediante el uso de la actividad endógena de la enzima que va a cuantificarse con la conversión de un sustrato que proporciona señales.

Para la determinación directa de enzimas activas en soluciones complejas, tales como líquidos corporales, se construyó un procedimiento que combina dos etapas esenciales y permite una alta producción de muestras: la unión inmunológica de la enzima a un soporte, tal como por ejemplo una placa de microtitulación, de manera que se consigue la reducción de todos los otros componentes, seguida de una reacción enzimática específica a base de un sustrato marcado con fluorescencia que proporciona una señal medible.

En la primera etapa se incubaba la solución compleja por ejemplo en una placa de microtitulación, en la que se inmovilizó anteriormente por ejemplo un anticuerpo específico de ACE2. Un anticuerpo de este tipo reconoce preferentemente una parte de la enzima que no está implicada en la reacción catalítica, y no altera la reacción enzimática. Cuando el anticuerpo reconoce, por el contrario, regiones de la enzima que están implicadas directamente en la reactividad enzimática, se reduce la sensibilidad del ensayo o el ensayo ya no funciona, dado que está bloqueada la actividad enzimática. Todos los componentes adicionales de la muestra compleja (por ejemplo suero) no se unen al soporte sólido, por ejemplo una superficie de placa, y se separan en una etapa posterior del sistema, preferentemente se lavan de la placa. Las etapas de lavado pueden repetirse eventualmente, por ejemplo 1, 2, 3 o varias veces. Finalmente queda exclusivamente la enzima unida de manera correcta en la placa. Tras la adición de un sustrato marcado con fluorescencia que se rompe mediante la enzima y el estado roto presenta una fluorescencia claramente superior, se mide tras un tiempo de incubación definido la fluorescencia y se compara con un patrón de actividad y una concentración conocidos. Habitualmente se consigue esto mediante sistemas de inhibición de la fluorescencia de dos componentes, en los que se eleva la fluorescencia mediante la ruptura del inhibidor.

Mediante la acción o la conversión de la enzima sobre el sustrato se modifica éste preferentemente en la extinción o fluorescencia que puede medirse con procedimientos ópticos. Ciertos sustratos cromógenos que pueden modificarse para un fin de este tipo para observar una modificación de la extinción (o absorción) se conocen por ejemplo a partir del documento US 2003/0124622. En otras formas de realización, el sustrato presenta una parte fluorescente y una parte inhibidora de la fluorescencia que pueden separarse mediante la actividad enzimática. Mediante la conversión por la enzima puede observarse y medirse por tanto una modificación de la fluorescencia.

La unidad que se une a ACE2 es preferentemente un anticuerpo o un receptor sintético o natural de la enzima que no impide la actividad de ACE2.

La enzima determinada según la invención es ACE2, una peptidasa o proteasa del sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS), también denominada sistema renina-angiotensina (RAS). La actividad proteolítica de RAS representa una cascada de etapas enzimáticas para la regulación de la tensión arterial. ACE (enzima convertidora de angiotensina) es en este caso la enzima mejor conocida que convierte angiotensina I en angiotensina II. La angiotensina II actúa aumentando la tensión arterial, por lo que con frecuencia se usan inhibidores de ACE para el tratamiento de tensión arterial elevada. Inmediatamente tras el descubrimiento de ACE2 se supuso que debía presentar la misma actividad que ACE (US 6.194.556), por lo que se denominó según esta enzima. Tanto ACE como ACE2 son metaloproteasas con un átomo de zinc catalítico en el centro. Deseo supuesto, sin embargo, resultó ser erróneo. Tanto por la actividad como por su mecanismo, ACE y ACE2 son completamente distintas. Mientras que ACE actúa aumentando la tensión arterial, ACE2 provoca una disminución de la tensión arterial (1). Desde el punto de vista de su mecanismo ACE es una peptidil-dipeptidasa, ACE2 por el contrario una carboxipeptidasa (9). Por consiguiente, ACE y ACE2 son dos enzimas completamente distintas con condiciones previas distintas para la medición de su actividad.

ACE2 (enzima convertidora de angiotensina 2) representa una enzima clave del sistema renina-angiotensina. Como carboxipeptidasa se expresa de manera anclada a la membrana (mACE2), como receptor sobre todo en células de pulmón, riñón y corazón y rompe diversos sustratos peptídicos. Sin embargo ACE2 se produce también como proteína soluble (ACE2 segregada, seACE2) sin dominio transmembrana y proporción citoplasmática en líquidos corporales. Representantes de sustrato prominentes son apelina, bradiquinina sin embargo también angiotensina-I, que se rompe para dar angiotensina 1-9, o ang-II, que se rompe para dar ang 1-7 (1, 2). ACE2 es responsable decisivamente de la homeostasis del organismo (3).

Apeiron Biologics desarrolló ACE2 soluble como producto terapéutico para el tratamiento de ARDS o ALI, dos enfermedades pulmonares agudas, de las que va acompañado un título de ACE2 regulado por disminución como síntoma acompañante (4, 5), tal como confirman varios estudios. Sin embargo está previsto también que ACE2 soluble se use también para el tratamiento de enfermedades cardíacas o renales (1, 6). Según esto ACE2 desempeña en todas estas enfermedades un papel esencial, proporcionando un procedimiento de determinación robusto para la cuantificación de ACE2 soluble, activa, conocimientos importantes de la investigación de estas indicaciones. Además, un procedimiento de este tipo para la determinación de la farmacocinética y la farmacodinámica ofrece una terapia con ACE2 soluble. El contenido en ACE2 enzimáticamente activa en líquidos corporales representa además un resultado clave que abre el acceso a diversas áreas terapéuticas y diagnósticas.

Los procedimientos de determinación inmunológicos clásicos (ELISA) de concentraciones de ACE2 proporcionan sólo un resultado incompleto, dado que estos procedimientos pueden detectar tanto enzima activa, como enzimáticamente inactiva. La explicación sobre la función de ACE2 puede obtenerse sin embargo exclusivamente mediante la determinación de la proporción enzimáticamente activa. La determinación de la actividad de peptidasas

en líquidos complejos, tal como muestras de sangre completa, suero o plasma, resulta difícil, sin embargo, hasta ahora en el estado de la técnica, ya que numerosos componentes de estas soluciones complejas pueden influir en la reacción enzimática. Ciertos componentes inhibidores así como peptidasas de baja especificidad pueden distorsionar la conversión de sustrato medida en ambas direcciones, lo que impide habitualmente un planteamiento de la determinación de la actividad directamente de estos sistemas complejos. Particularmente para ACE2 no pudo facilitarse por tanto hasta ahora tampoco ningún sistema satisfactorio, que considere sobre todo también la complejidad de las muestras en las que puede medirse ACE2.

De manera especialmente preferente se selecciona ACE2 de ACE2 unida a membrana (mACE2) y ACE2 segregada (seACE2), siendo preferentemente la unidad que se une a enzima específica para la parte de extremo C terminal del dominio extracelular de ACE2. ACE2 que se mantiene aún con el dominio de membrana mediante la ayuda de detergentes en solución debería exponer la parte de extremo C terminal, debido a la proximidad de la región hidrófoba, de manera claramente más baja en la solución hidrófila. La secuencia de ACE2 está indicada en la figura 4 (SEC ID N.º: 1), estando marcado mediante subrayado el centro activo, el motivo que se une a zinc HEXXH. El procedimiento según la invención funciona cuando la ACE2 unida tiene aún actividad enzimática. Según la secuencia, la unidad que se une a ACE2 es específica para una secuencia parcial de al menos 4, preferentemente al menos 5 ó 6, de manera especialmente preferente al menos 7, de manera especialmente preferente al menos 8 aminoácidos consecutivos de los 373 aminoácidos del extremo N terminal de ACE2 o de los 362 aminoácidos del extremo C terminal de ACE2. En formas de realización especiales, se selecciona esta secuencia parcial de los 360, preferentemente 340 o 320 aminoácidos del extremo N terminal o del extremo C terminal. Una secuencia de este tipo, frente a la que puede dirigirse una unidad que se une a ACE2, es por ejemplo EFLGIQPTLGPPN (SEC ID N.º: 2).

Además está publicada la estructura cristalina de ACE2 (9) y se conoce como enzima nativa (entrada de banco de datos PDB: 1R42) y como enzima unida a inhibidor (entrada de banco de datos PDB: 1R4L). Esta estructura nativa muestra como punto central del centro activo un átomo de Zn y sirve a continuación como referencia para ACE2. Otra estructura cristalina se conoce por ejemplo con la entrada de banco de datos PDB 108A (ACE humana nativa), en la que igualmente es evidente un átomo de zinc catalítico. Preferentemente, la unidad que se une a enzima es específica para una parte de al menos 4, 5, 6, 7 u 8 aminoácidos de la enzima, que presenta una distancia mínima de 0,5 nm, preferentemente 0,6 nm, de manera especialmente preferente 0,7 nm o 0,8 nm, particularmente 0,9 nm o 1,0 nm del centro activo (según la estructura cristalina de la enzima). Para ello puede incluirse el punto central geométrico de la secuencia parcial, no debiendo estar constituida la secuencia parcial forzosamente de aminoácidos consecutivos secuencialmente, dado que por ejemplo los anticuerpos no reconocen secuencias sino estructuras espaciales. Para la determinación de la posición del centro activo puede incluirse el valor central de las coordenadas de los aminoácidos o la posición del ion metálico catalítico que están implicadas en la reacción enzimática.

Las partes o secuencias parciales de ACE2 pueden presentar en determinadas formas de realización hasta 10, hasta 12, hasta 15, hasta 20, hasta 30 o también hasta 40 ó 50 aminoácidos de la enzima.

Una unidad que se une a ACE2 es preferentemente un anticuerpo que se une a la parte de extremo C terminal del dominio extracelular de ACE2 natural. Esto conduce, por consiguiente, a una presentación dirigida de la enzima en la superficie de la placa, en analogía a la presentación en la superficie celular pueden influirse de manera sensible sin la actividad de ACE2.

En procedimientos de determinación de la actividad pueden usarse tanto sustratos fluorescentes o sustratos cromógenos, prefiriéndose fluorescentes debido a la sensibilidad en muestras de sangre.

En el procedimiento según la invención, las unidades que se unen a ACE2 se seleccionan preferentemente de anticuerpos, fragmentos de anticuerpo o derivados de anticuerpos. Tales unidades contienen partes de Fv, Fab o F(ab)<sub>2</sub> de anticuerpos así como anticuerpos de cadena sencilla (*single chain antibodies*, SCA), tal como se da a conocer en el documento US 4.946.778, o fragmentos que se unen a antígeno de cadenas sencillas (ScFv).

En formas de realización especiales, los anticuerpos, fragmentos o derivados de anticuerpos son policlonales, reduciéndose preferentemente anticuerpos, fragmentos o derivados de anticuerpos que son específicos para los centros activos de la enzima, hasta por debajo del 20 %, preferentemente hasta por debajo del 10 %, más preferentemente hasta por debajo del 5 %, lo más preferentemente hasta por debajo del 1 %, por ejemplo mediante inmunoabsorción, presentándose las partes con centros activos de la enzima de manera inmovilizada y conteniendo el eluido los anticuerpos reducidos, preferentes.

En otras formas de realización los anticuerpos, fragmentos o derivados de anticuerpos son monoclonales. Según esto se seleccionan anticuerpos especiales que no pueden influir en la actividad de ACE2 (o pueden modificarla poco). En determinadas enzimas no pueden evitarse pérdidas de actividad mediante la unión a anticuerpos. Según esto es posible sin embargo con procedimientos de selección habituales (por ejemplo procedimientos de presentación en fagos) mantener baja esta inhibición. Así se inhibe preferentemente la actividad enzimática no más del 30 %, preferentemente no más del 20 % de manera especialmente preferente no más del 10 %, de manera especialmente preferente no más del 5 %, lo más preferentemente no más del 1 % mediante el anticuerpo, el derivado o el fragmento del anticuerpo. Los anticuerpos especialmente preferentes pueden incluso aumentar la

actividad enzimática.

El sustrato que se usa según la invención es preferentemente un péptido de bajo peso molecular con una longitud de 1 a 30 aminoácidos, preferentemente de 1 a 20 aminoácidos, de manera particularmente preferente de 1 a 10 aminoácidos que puede romperse por la enzima y está unido covalentemente a un producto de ruptura que va a esperarse de la parte fluorescente y a otro producto de ruptura que va a esperarse del inhibidor, preferentemente Mca-Ala-Pro-Lys(Dnp)-OH (Mca: (7-metoxicumarin-4-il)acetilo) siempre que la enzima sea ACE2. Otros sustratos peptídicos se dan a conocer por ejemplo en (7) y (8). Para ACE2 es especialmente adecuado el sistema cumarin-di-nitro-fenilo. Otros sistemas se dan a conocer por ejemplo en el documento US 6.037.137, el documento EP 1 557 474 A y el documento WO 90/00618.

La muestra puede contener impurezas cromóforas y/o fluorescentes. Es una ventaja esencial del procedimiento según la invención que estas sustancias interferentes se eliminen de manera sencilla en el ensayo.

Preferentemente, la muestra se selecciona de líquidos corporales, muestras de tejido fluidas homogeneizadas y sobrenadantes de cultivo celular, preferentemente de muestras de sangre completa, suero o plasma.

En otro aspecto, la presente invención prevé el uso del procedimiento según la invención para la determinación *in vitro* de títulos de ACE2 en muestras de sangre completa, suero o plasma o de una enzima en tales muestras.

Otro aspecto se refiere a un procedimiento para el diagnóstico de un síntoma de enfermedad que está asociado con la actividad de ACE2 anómala, que está caracterizado por que se facilita una muestra de un animal o ser humano, y con un procedimiento *in vitro* según la presente invención se determina la actividad de ACE2, indicando una modificación de la actividad de ACE2 de más del 40 % o el 50 %, preferentemente de más del 50 %, de manera especialmente preferente de más del 75 %, en comparación con la actividad de ACE2 en el estado sano, una enfermedad o el riesgo de padecer una enfermedad. Los estados patológicos indicados por ACE2 pueden indicarse tanto a través de un aumento de la actividad de ACE2, por ejemplo infarto de miocardio (10,11) o a través de una actividad de ACE2 reducida, por ejemplo ARDS (4). En el caso de un aumento de la actividad de ACE2, la modificación de la actividad es preferentemente al menos del 100 %, particularmente al menos del 150 %. El valor de la actividad en el estado sano depende fuertemente de las especies y del tejido y puede determinarse igualmente con el procedimiento según la invención, por ejemplo como valor promedio de organismos sanos o en un tejido de referencia del propio organismo no afectado por la enfermedad. Por consiguiente, con el procedimiento según la invención pueden determinarse de manera sencilla y fiable síntomas de una enfermedad o puede diagnosticarse una enfermedad.

Enfermedades que pueden determinarse o indicarse según la invención son por ejemplo enfermedades cardiovasculares (particularmente infarto de miocardio), enfermedades renales y enfermedades pulmonares, particularmente ARDS o ALI. Enfermedades pulmonares influidas por ACE2 especiales conducen a la acumulación de líquido en el pulmón, en el que puede determinarse también la actividad de ACE2. En este sentido está incluido en las muestras de líquidos corporales un líquido en el pulmón o en los alvéolos pulmonares de manera explícita.

Además, el presente documento describe un kit (que es adecuado para la realización del procedimiento según la invención), constituido por un soporte sólido con unidades que se unen a enzima inmovilizadas que son específicas para una parte de la enzima que no está implicada en la actividad catalítica de la enzima. La enzima es, tal como se describió ya anteriormente, una proteasa o peptidasa de RAS, preferentemente ACE2.

Preferentemente, el kit comprende además un sustrato de ACE2 que presenta una parte fluorescente y una parte inhibidora de la fluorescencia que pueden separarse mediante la actividad de ACE2.

La ACE2 inmovilizada del kit así como las unidades que se unen a ACE2 y el sustrato pueden preverse tal como se describió anteriormente.

La presente invención se explica en más detalles mediante la siguiente figura y ejemplos sin limitarse a estas realizaciones.

Figura 1: determinación inmunológica de la actividad enzimática de ACE2 en soluciones complejas: se incubaron soluciones de distinta concentración de ACE2 (0 ng/ml: gris; 125 ng/ml: azul; 250 ng/ml: verde; 500 ng/ml: amarillo y 1 µg/ml: rojo) tras el enriquecimiento inmunológico de ACE2 durante 17 horas con el sustrato peptídico Mca-Ala-Pro-Lys(Dnp)-OH. Se midió el aumento de la fluorescencia a 320 nm / 430 nm y se correlacionó con la cantidad enzimática presente en las mezclas de reacción.

Figura 2: determinación inmunológica de la actividad enzimática de ACE2 en soluciones complejas en el planteamiento de combinación: se mezclaron muestras de suero de distintos momentos de un modelo de ARDS con 0,2 µg/ml de ACE2 y se midieron por medio del planteamiento de combinación (rayas azules) y prueba de actividad "clásica" en solución (rayas grises).

Figura 3: comparación de la intensidad de la señal dependiente de matriz del planteamiento de combinación con respecto a ELISA y prueba de la actividad en solución.

Figura 4: secuencia de ACE2 humana (SEC ID N.º: 1); el centro activo con el motivo de unión HEXXH-Zn está subrayado y en negrita, una secuencia parcial del extremo C terminal (EFLGIQPTLGPPN; (SEC ID N.º: 2) como

epítopo de anticuerpo está destacada como impresión en negrita.

### Ejemplo 1: Realización de ensayo

Se revistió una placa Maxisorp de 96 pocillos (Nunc) con una preparación de anticuerpos específicos para ACE2 policlonales murinos y a continuación se incubó con cuatro soluciones de distinta concentración de ACE2. Tras una etapa de lavado se añadió el sustrato peptídico Mca-Ala-Pro-Lys(Dnp)-OH y se midió la fluorescencia durante un espacio de tiempo de hasta 17 horas, a una longitud de onda de excitación de 320 nm y una longitud de onda de emisión de 430 nm. La figura 1 muestra cuatro curvas patrones de distintas concentraciones de ACE2. Debido a la cinética enzimática subyacente aparece la concentración de producto (proporcional a la fluorescencia medida) en relación lineal con la cantidad enzimática presente, siempre que no se produzca ninguna limitación mediante el sustrato. La pendiente de las rectas corresponde según esto a las cantidades enzimáticas presentes. Según esto se diferencian estas curvas tanto más claramente, cuanto más haya durado el tiempo de incubación, después de lo cual la pendiente de las rectas permanece constante en la zona mencionada. Igualmente, la curva de blanco realizada conjuntamente no destaca según esto, tampoco tras la incubación de 17 horas, de la fluorescencia de partida. Por tanto puede incubarse con distinta duración la mezcla de reacción de ensayo según la sensibilidad deseada en cada caso.

### Ejemplo 2: Medición absoluta de una cantidad de enzima en matriz compleja

El procedimiento presentado debe permitir mediciones independientes de la matriz de la actividad de ACE2. En este planteamiento se midió la cantidad de ACE2 activa tanto por medio de la prueba de combinación descrita como con ayuda de una prueba de actividad "clásica" en solución. Se añadió una cantidad constante de ACE2 en muestras de suero, que se extrajeron en diversos momentos de un modelo de septicemia. Se supone que la concentración de sustancias que inhiben la función de ACE2 aumenta con el empeoramiento creciente de los síntomas de ARDS.

Mientras que los valores de medición de ambos procedimientos de ensayo durante los primeros 90 minutos corresponde casi al valor de partida (100 %), puede detectarse la actividad de ACE2 con respecto al punto de medición de 150 minutos exclusivamente en el planteamiento de combinación (figura 2). Esto puede aclararse debido a que exclusivamente en la prueba de combinación se eliminan los inhibidores de ACE2 mediante una etapa de lavado del sistema y no influyen en la medición de la actividad. Esta observación cualifica este procedimiento para el análisis independiente de los componentes séricos de enzimas activas de soluciones complejas.

### Ejemplo 3: Influencia de la matriz

La influencia condicionada por la matriz de la intensidad de la señal de medición (inhibición) del planteamiento de combinación se comparó con la de un ELISA y la de una prueba de la actividad en solución. Se midieron concentraciones de ACE2 constantes de 0,5 µg/ml, 0,2 µg/ml, 0,1 µg/ml y 0,05 µg/ml en varias diluciones séricas empezando por 1 hasta 1:64. Para la comparación de los procedimientos de medición mencionados se fijó la intensidad de la señal en la dilución de muestras más alta de 1:64 en un 100 % y se compararon con los resultados de las otras etapas de dilución. Con ayuda de estos parámetros comparativos puede caracterizarse la supresión de la señal condicionada por la matriz, específica del procedimiento (figura 3).

El procedimiento ELISA está sujeto con mayor intensidad a la influencia de la matriz. Ya a partir de las dos etapas de dilución más altas se midió una supresión de la señal inferior al 90 %, que aumentaba más rápidamente con concentración sérica superior, de modo que en la mezcla de reacción concentrada pudo medirse únicamente una intensidad de señal residual en un 20 %. El planteamiento de actividad en solución mostró la influencia de matriz más baja. En este caso pudo distinguirse una supresión de la señal claramente más reducida en un 70 % en la muestra concentrada. El planteamiento de combinación muestra semejanzas con los otros dos procedimientos. Se caracteriza por una dependencia de la matriz claramente más fuerte en comparación con el planteamiento de actividad. Sin embargo no disminuye la propia intensidad de la señal en la muestra concentrada por debajo del 50 %.

Este procedimiento permite, por consiguiente, una medición de la actividad específica de ACE2 incluso en muestras de suero concentradas. Mediante la interacción específica de ACE2 inmunológica de la primera etapa se introduce exclusivamente esta enzima en el ensayo. La medición de su actividad no se distorsiona en la segunda etapa mediante otros inhibidores de ACE2 o proteasas presentes en la matriz.

#### Bibliografía:

1. Danilczyk *et al.*, *Circ Res* 98, 463-471 (2006).
2. Vickers *et al.*, *J Biol Chem* 277, 14838-14843 (2002).
3. Ferrario *et al.*, *J Am Soc Nephrol* 9, 1716-1722 (1998).
4. Imai *et al.*, *Nature* 436, 112-116 (2005).
5. Kuba *et al.*, *Curr Opin Pharmacol* (2006).
6. Ye *et al.*, *Hypertension* 43, 1120-1125 (2004).
7. Huang *et al.*, *J Biol Chem* 278, 15532-15540 (2003).
8. Guy *et al.*, *Biochemistry* 42, 13185-13192 (2003).

9. Towler *et al.*, J. Biol Chem 279, 17996-18007 (2004).
10. Burrell *et al.*, Europ Heart J 26, 369-375 (2005).
11. Ishiyama *et al.*, Hypertension 43, 970-976 (2004).

PROTOCOLO DE SECUENCIAS

- 5 <110> Apeiron Biologics Forschungs- und Entwicklungsgesellschaft m.b.H.  
<120> Procedimiento para la determinación de la actividad von ACE2  
<130> r50504  
<150> AT A 1758/2006  
<151> 19-10-2006
- 10 <160> 2  
<170> PatentIn version 3.3  
<210> 1  
<211> 740  
<212> PRT
- 15 <213> *Homo sapiens*  
<400> 1

ES 2 394 845 T3

Met Ser Ser Ser Ser Trp Leu Leu Leu Ser Leu Val Ala Val Thr Ala  
1 5 10 15

Ala Gln Ser Thr Ile Glu Glu Gln Ala Lys Thr Phe Leu Asp Lys Phe  
20 25 30

Asn His Glu Ala Glu Asp Leu Phe Tyr Gln Ser Ser Leu Ala Ser Trp  
35 40 45

Asn Tyr Asn Thr Asn Ile Thr Glu Glu Asn Val Gln Asn Met Asn Asn  
50 55 60

Ala Gly Asp Lys Trp Ser Ala Phe Leu Lys Glu Gln Ser Thr Leu Ala  
65 70 75 80

Gln Met Tyr Pro Leu Gln Glu Ile Gln Asn Leu Thr Val Lys Leu Gln  
85 90 95

Leu Gln Ala Leu Gln Gln Asn Gly Ser Ser Val Leu Ser Glu Asp Lys  
100 105 110

Ser Lys Arg Leu Asn Thr Ile Leu Asn Thr Met Ser Thr Ile Tyr Ser  
115 120 125

Thr Gly Lys Val Cys Asn Pro Asp Asn Pro Gln Glu Cys Leu Leu Leu  
130 135 140

Glu Pro Gly Leu Asn Glu Ile Met Ala Asn Ser Leu Asp Tyr Asn Glu  
145 150 155 160

Arg Leu Trp Ala Trp Glu Ser Trp Arg Ser Glu Val Gly Lys Gln Leu  
165 170 175

Arg Pro Leu Tyr Glu Glu Tyr Val Val Leu Lys Asn Glu Met Ala Arg  
180 185 190

Ala Asn His Tyr Glu Asp Tyr Gly Asp Tyr Trp Arg Gly Asp Tyr Glu



ES 2 394 845 T3

195				200				205							
Val	Asn	Gly	Val	Asp	Gly	Tyr	Asp	Tyr	Ser	Arg	Gly	Gln	Leu	Ile	Glu
	210					215					220				
Asp	Val	Glu	His	Thr	Phe	Glu	Glu	Ile	Lys	Pro	Leu	Tyr	Glu	His	Leu
225					230					235					240
His	Ala	Tyr	Val	Arg	Ala	Lys	Leu	Met	Asn	Ala	Tyr	Pro	Ser	Tyr	Ile
				245					250					255	
Ser	Pro	Ile	Gly	Cys	Leu	Pro	Ala	His	Leu	Leu	Gly	Asp	Met	Trp	Gly
			260					265					270		
Arg	Phe	Trp	Thr	Asn	Leu	Tyr	Ser	Leu	Thr	Val	Pro	Phe	Gly	Gln	Lys
		275					280						285		
Pro	Asn	Ile	Asp	Val	Thr	Asp	Ala	Met	Val	Asp	Gln	Ala	Trp	Asp	Ala
	290					295					300				
Gln	Arg	Ile	Phe	Lys	Glu	Ala	Glu	Lys	Phe	Phe	Val	Ser	Val	Gly	Leu
305					310					315					320
Pro	Asn	Met	Thr	Gln	Gly	Phe	Trp	Glu	Asn	Ser	Met	Leu	Thr	Asp	Pro
				325					330					335	
Gly	Asn	Val	Gln	Lys	Ala	Val	Cys	His	Pro	Thr	Ala	Trp	Asp	Leu	Gly
			340					345					350		
Lys	Gly	Asp	Phe	Arg	Ile	Leu	Met	Cys	Thr	Lys	Val	Thr	Met	Asp	Asp
		355					360						365		
Phe	Leu	Thr	Ala	His	His	Glu	Met	Gly	His	Ile	Gln	Tyr	Asp	Met	Ala
	370					375					380				
Tyr	Ala	Ala	Gln	Pro	Phe	Leu	Leu	Arg	Asn	Gly	Ala	Asn	Glu	Gly	Phe
385					390					395					400
His	Glu	Ala	Val	Gly	Glu	Ile	Met	Ser	Leu	Ser	Ala	Ala	Thr	Pro	Lys
				405					410					415	
His	Leu	Lys	Ser	Ile	Gly	Leu	Leu	Ser	Pro	Asp	Phe	Gln	Glu	Asp	Asn
			420					425					430		
Glu	Thr	Glu	Ile	Asn	Phe	Leu	Leu	Lys	Gln	Ala	Leu	Thr	Ile	Val	Gly
		435					440						445		
Thr	Leu	Pro	Phe	Thr	Tyr	Met	Leu	Glu	Lys	Trp	Arg	Trp	Met	Val	Phe
	450					455					460				
Lys	Gly	Glu	Ile	Pro	Lys	Asp	Gln	Trp	Met	Lys	Lys	Trp	Trp	Glu	Met
465					470					475					480

ES 2 394 845 T3

Lys Arg Glu Ile Val Gly Val Val Glu Pro Val Pro His Asp Glu Thr  
 485 490 495  
 Tyr Cys Asp Pro Ala Ser Leu Phe His Val Ser Asn Asp Tyr Ser Phe  
 500 505 510  
 Ile Arg Tyr Tyr Thr Arg Thr Leu Tyr Gln Phe Gln Phe Gln Glu Ala  
 515 520 525  
 Leu Cys Gln Ala Ala Lys His Glu Gly Pro Leu His Lys Cys Asp Ile  
 530 535 540  
 Ser Asn Ser Thr Glu Ala Gly Gln Lys Leu Phe Asn Met Leu Arg Leu  
 545 550 555  
 Gly Lys Ser Glu Pro Trp Thr Leu Ala Leu Glu Asn Val Val Gly Ala  
 565 570 575  
 Lys Asn Met Asn Val Arg Pro Leu Leu Asn Tyr Phe Glu Pro Leu Phe  
 580 585 590  
 Thr Trp Leu Lys Asp Gln Asn Lys Asn Ser Phe Val Gly Trp Ser Thr  
 595 600 605  
 Asp Trp Ser Pro Tyr Ala Asp Gln Ser Ile Lys Val Arg Ile Ser Leu  
 610 615 620  
 Lys Ser Ala Leu Gly Asp Lys Ala Tyr Glu Trp Asn Asp Asn Glu Met  
 625 630 635 640  
 Tyr Leu Phe Arg Ser Ser Val Ala Tyr Ala Met Arg Gln Tyr Phe Leu  
 645 650 655  
 Lys Val Lys Asn Gln Met Ile Leu Phe Gly Glu Glu Asp Val Arg Val  
 660 665 670  
 Ala Asn Leu Lys Pro Arg Ile Ser Phe Asn Phe Phe Val Thr Ala Pro  
 675 680 685  
 Lys Asn Val Ser Asp Ile Ile Pro Arg Thr Glu Val Glu Lys Ala Ile  
 690 695 700  
 Arg Met Ser Arg Ser Arg Ile Asn Asp Ala Phe Arg Leu Asn Asp Asn  
 705 710 715 720  
 Ser Leu Glu Phe Leu Gly Ile Gln Pro Thr Leu Gly Pro Pro Asn Gln  
 725 730 735  
 Pro Pro Val Ser  
 740

<210> 2  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

5 <400> 2

Glu Phe Leu Gly Ile Gln Pro Thr Leu Gly Pro Pro Asn  
1 5 10

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para la determinación de la actividad de la ACE2, que comprende las siguientes etapas:

- 5 • facilitar unidades que se unen a ACE2 inmovilizadas en un soporte sólido, que son específicas para una parte de la ACE2 que no está implicada en la actividad catalítica de ACE2,
- poner en contacto las unidades que se unen a ACE2 inmovilizadas con una muestra que posiblemente contiene la ACE2, uniéndose la ACE2 por la unidad que se une a ACE2, seleccionándose la muestra de líquidos corporales (tal como sangre completa, suero o plasma), muestras de tejido fluidas homogeneizadas y sobrenadantes de cultivo celular,
- 10 • eliminar mediante lavado la proporción no unida de la muestra de la ACE2 unida a las unidades que se unen a ACE2,
- añadir un sustrato de la ACE2 que se convierte mediante la actividad de ACE2 y la conversión proporciona una señal,
- medir la modificación de la señal en un intervalo de tiempo determinado, pudiéndose correlacionar la modificación con la actividad de ACE2,
- 15 en el que la unidad que se une a ACE2 es un anticuerpo que se une a la parte de extremo C terminal del dominio extracelular de ACE2 natural y es específico para una secuencia parcial de al menos 4 aminoácidos consecutivos de los 362 aminoácidos del extremo C terminal de ACE2.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado porque** el sustrato se modifica en la extinción o fluorescencia, en el que preferentemente el sustrato presenta una parte fluorescente y una parte inhibidora de la fluorescencia que pueden separarse mediante la actividad de ACE2.

3. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 ó 2, **caracterizado porque** la enzima ACE2 se selecciona de ACE2 unida a membrana (mACE2) y ACE2 segregada (seACE2).

4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** la unidad que se une a ACE2 es específica para una parte de al menos 4 aminoácidos, preferentemente 5, 6, 7 u 8 aminoácidos de ACE2, que presenta una distancia mínima de 0,5 nm, preferentemente 0,6 nm, de manera especialmente preferente 0,7 nm o 0,8 nm, particularmente 0,9 nm o 1,0 nm del centro activo.

5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** el sustrato es un péptido de bajo peso molecular con una longitud de 1 a 30 aminoácidos, preferentemente de 1 a 20 aminoácidos, de manera particularmente preferente de 1 a 10 aminoácidos, que puede ser roto por ACE2 y está unido covalentemente a un producto de ruptura que va esperarse de la parte fluorescente y a otro producto de ruptura que va a esperarse del inhibidor, preferentemente Mca-Ala-Pro-Lys(Dnp)-OH.

6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado porque** la muestra contiene impurezas cromóforas y/o fluorescentes.

7. Uso de un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6 para la determinación *in vitro* de títulos de ACE2 en muestras de sangre completa, suero o plasma.

Fig. 1

**Procedimiento de determinación inmunológica de la actividad enzimática de enzima convertidora de angiotensina 2**

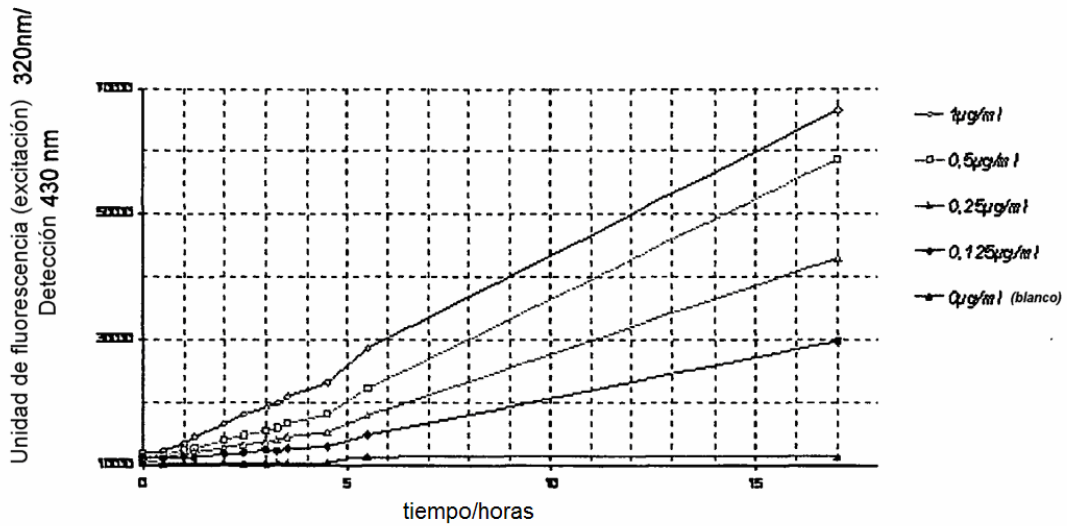


Fig. 2

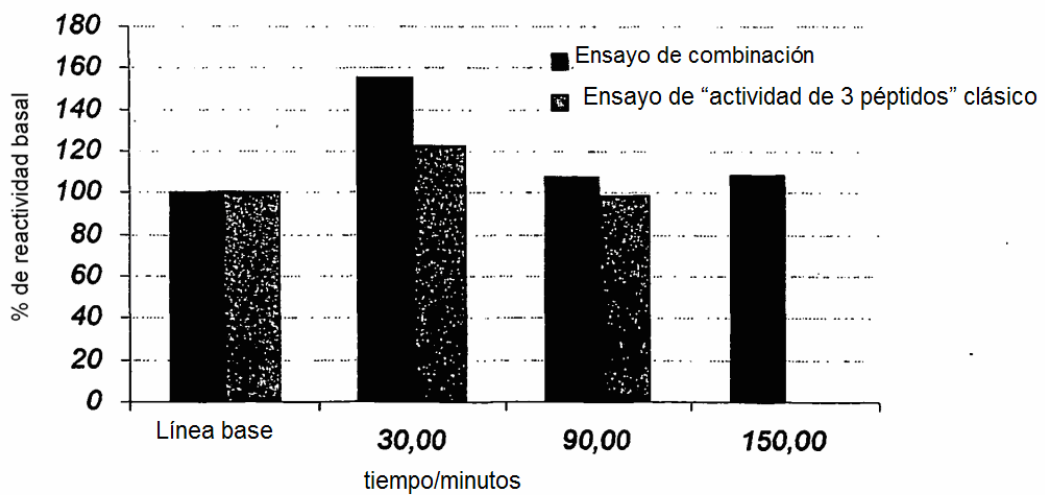


Fig. 3

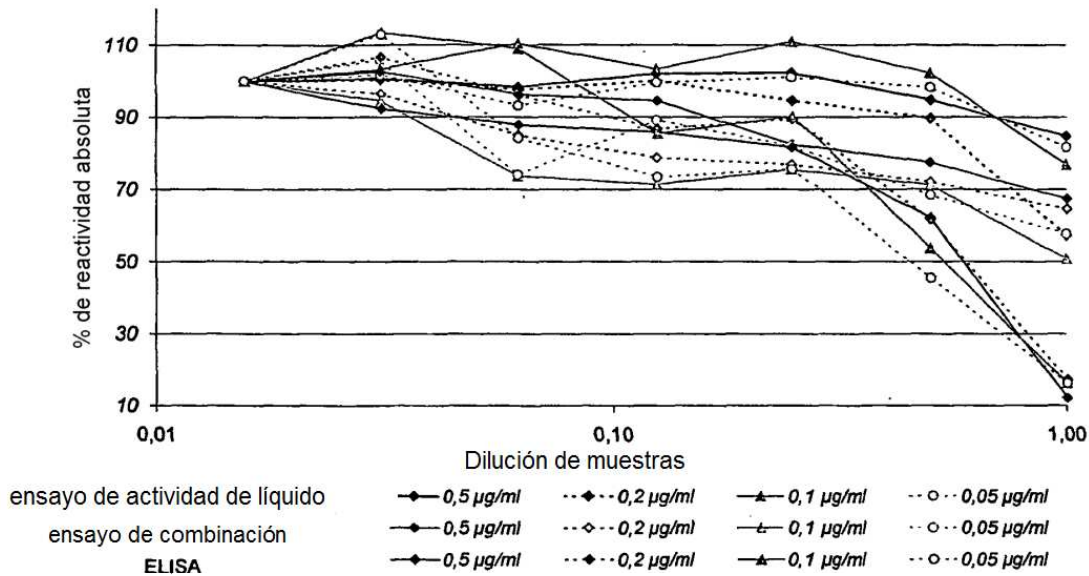


Fig. 4

MSSSSWLLLSLVAVTAAQSTIEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQSSLASWNYNTNITEE  
 NVQNMNAGDKWSAFLKEQSTLAQMYPLQEIQNLTVKLQLQALQQNGSSVLSEDK  
 SKRLNTILNTMSTIYSTGKVCNPDNPQECLLLEPGLNEIMANSLDYNERLWAWESW  
 RSEVGKQLRPLYEEYVVLKNEMARANHYEDYGDYWRGDYEVNGVDGYDYSRGQL  
 IEDVEHTFEEIKPLYEHLHAYVRAKLMNAYPSYISPIGCLPAHLLGDMWGRFWTNLYS  
 LTVPGQKPNIDVTDAMVDQAWDAQRIFKEAEKFFVSVGLPNMTQGFWENSMLTDP  
 GNVQKAVCHPTAWDLGKGDFRILMCTKVMTDDFLTAH**HEM**GHIQYDMAYAAQ  
 PFLLRNGANEGFHEAVGEIMSLSAATPKHLKSIGLLSPDFQEDNETEINFLKQALTIV  
 GTLPFTYMLEKWRWMVFKGEIPKDQWMKKWWEMKREIVGWVPEVPHDETYCDPAS  
 LFHVSNDYSFIRYYTRTLYQFQFQEALCQAAKHEGPHLHKCDISNSTEAGQKLFNMLRL  
 GKSEPWTLALENVGAKNMNVRPLLNYFEPLFTWLKDQNKNSFVGWSTDWSPYAD  
 QSIKVRISLKSALGDKAYEWNDEMFLFRSSVAYAMRQYFLKVKNQMILFGCEEDVRV  
 ANLKPRISFNFFVTAPKNVSDIIPRTEVEKAIRMSRSRINDAFRLNDNSLEFLGIQPTLG  
 PPNQPPVS