

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 424 971**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.06.2003 E 08019249 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2013 EP 2047867**

54 Título: **Activación de ECA2 para el tratamiento de enfermedades cardíacas, pulmonares y renales e hipertensión**

30 Prioridad:

19.06.2002 US 389709 P

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

10.10.2013

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**CRACKOWER, MICHAEL A. y
PENNINGER, JOSEPH M**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 424 971 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

Activación de ECA2 para el tratamiento de enfermedades cardíacas, pulmonares y renales e hipertensión

Campo de la invención

5 La presente divulgación proporciona composiciones y procedimientos para su uso en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades cardíacas, pulmonares y renales, incluyendo hipertensión, enfermedad cardíaca coronaria, insuficiencia cardíaca y renal, edema pulmonar, y lesión pulmonar, tal como en el choque tóxico o la ventilación artificial.

Antecedentes de la invención

10 La enfermedad cardiovascular será la mayor carga social de cuidados sanitarios del siglo 21, y se predice que sea la causa más común de muerte en todo el mundo en 2020. Un factor de riesgo principal de la enfermedad cardíaca es la alta presión sanguínea. La hipertensión es un carácter cuantitativo multifactorial controlado tanto por factores genéticos como ambientales.

15 Mientras se conoce mucho acerca de los factores ambientales que pueden contribuir a la alta presión sanguínea, tales como la dieta y actividad física, se conoce menos sobre los factores genéticos que son responsables de la predisposición a enfermedades cardiovasculares. A pesar de la identificación de varios loci de carácter cuantitativo genético supuestos (QTL) asociados a la hipertensión en modelos animales, ninguno de estos loci se han traducido en genes. De este modo, los mecanismos moleculares y genéticos que subyacen a la hipertensión y otras enfermedades cardiovasculares siguen siendo desconocidos en gran medida.

20 Un regulador crucial de la homeostasis de la presión sanguínea es el sistema renina - angiotensina (RAS). La protease renina escinde el angiotensinógeno en el péptido angiotensina I (AngI) decaamérico inactivo. La acción de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) después cataliza la escisión de la AngI en la angiotensina II (AngII) octómera activa, que puede contribuir a la hipertensión promoviendo la vasoconstricción vascular del músculo liso y la reabsorción de sodio del túbulo renal. Los ratones mutantes ECA muestran hipotensión espontánea, infertilidad masculina parcial, y malformaciones renales. En los seres humanos, un polimorfismo ECA se ha asociado a determinantes de función renal y cardiovascular, y la inhibición farmacológica de ECA y receptores de AngII son eficaces en la reducción de la presión sanguínea y enfermedad renal. Además, la inhibición de ECA y los receptores de AngII tienen efectos beneficiosos en la insuficiencia cardíaca.

30 Recientemente se ha identificado un homólogo de ACE, denominado ECA2, que se expresa predominantemente en las células endoteliales vasculares del riñón y corazón. De manera interesante, dos homólogos de ECA también existen en las moscas. De manera similar las funciones de ACE, ECA2 como una carboxipeptidasa, que escinde un único resto de AngI, que genera Ang1-9, y un único resto de AngII para generar Ang1-7. Estos datos bioquímicos in vitro sugieren que, ECA2 modula el RAS y de este modo desempeñan un papel en la regulación de la presión arteria. No se conoce el papel in vivo de la ECA2 en el sistema cardiovascular y el RAS.

35 Acton et al., en la Patente de Estados Unidos N° 6.194.556, describe el uso de ECA2 en la diagnosis y terapéutica de los estados asociados a ECA2. La patente estableció que los niveles de expresión ECA2 se incrementan con la hipertensión y de este modo los antagonistas o inhibidores de ECA2 serían útiles en el tratamiento de un incremento de la presión sanguínea o trastornos relacionados. La solicitud de patente canadiense n° 2.372.387 proporciona ejemplos específicos de inhibidores de ECA2 que, se pretende que sean útiles para el tratamiento de enfermedad cardíaca, enfermedad cardíaca, tal como hipertensión. Esto de nuevo enfatiza la necesidad de inhibir, en lugar de incrementar, la actividad de ECA2. Estas referencias, que enseñan la necesidad de inhibir la actividad de ECA2, se basan solamente en los datos experimentales in vitro. No proporcionan datos in vivo, tales como los datos de mamíferos inactivados, para caracterizar ECA2. Hasta la fecha, no se ha aprobado ningún inhibidor de ECA2 como compuesto farmacéutico para el tratamiento de hipertensión. Además, el papel in vivo de ECA2 en el sistema cardiovascular y el RAS permanece en gran medida desconocido. Permanece una necesidad de caracterizar la función de ECA2 con el fin de sea capaz de diseñar ensayos de diagnóstico apropiados y compuestos farmacéuticos para el tratamiento de enfermedad cardíaca y renal.

Sumario de la invención

50 La invención proporciona un nuevo paradigma para la regulación del sistema renina - angiotensina y muestra un uso completamente nuevo e inesperado de la ECA2, en contraste con la predicción basada en los datos in vitro (patente de Acton) e imprevista en la técnica anterior, como regulador negativo crucial del RAS requerido para la función cardíaca y el control de la presión arterial. La activación de la ECA2 es crucial para el tratamiento y la prevención de enfermedad cardíaca, pulmonar y renal. La divulgación muestra la primera vez que la administración de un activador de la ECA2 a un animal previene y trata la hipertensión y la enfermedad cardíaca y renal, y la lesión pulmonar.

55

Breve descripción de las figuras

Las realizaciones preferidas de la invención se describirán en relación con las figuras, en las que:

Figura 1. Secuencia y mapeo cromosómico de la ECA2 de rata.

5 a, Alineación de la proteína ECA2 de rata, de ratón y de ser humano, con ECA de testículos humanos y de ratón (T-ECA). La parte sombreada en negro indica la identidad de aminoácidos y la parte sombreada en gris indica el grado de similitud de aminoácidos. b, Estructura esquemática del dominio de la ECA y la ECA2. Hay que observar que la ECA2 solo contiene un dominio de la ECA con el sitio consenso de unión a cinc HEMGH. Los centros catalíticos se indican en negro, el péptido señal se indica en gris y el dominio transmembrana en líneas discontinuas. c, Patrones de expresión de los genes de la ECA2 de rata y ratón en tejidos adultos diferentes y días diferentes de desarrollo embrionario (E7 = día embrionario 7). Hay que observar que están presentes dos isoformas para ECA2 en ratones, pero no en rata o ser humano (no mostrado), una característica similar a la observada para ACE15. d, Resultados de mapa de híbrido de radiación de ECA2 de rata, comparado con el mapa de QTL identificado en los animales sensibles a sal ratas Sabra (SS-X), SHRSP (BP3), y SHR (BB.Xs). Los nombres de los marcadores polimórficos se indican a la izquierda del ideograma. Se muestran las puntuaciones de LOD y los valores theta para los marcadores unidos a la ECA2. cR = centiRads.

Figura 2. Niveles de expresión de la ECA2 en modelos de ratas de hipertensión.

20 a, análisis de transferencia de tipo Northern del ARNm de la ECA2 de riñones de ratas Sabra SBH/y y SBN/y. La sección anterior muestra la representación de transferencias de Northern con niveles de control de actina. El panel inferior muestra los niveles relativos de mensaje de ECA2 normalizado para los niveles de actina. b, Análisis de transferencia de Western de los nivel proteína de ECA2 de riñones de Sabra SBH/y y sus ratas control SBN/y, así como SHR y SHRSP y sus ratas control WKY. La sección superior muestra transferencias de Western representativas. Se indica la presión sanguínea sistólica (BP) en mmHg para las respectivas ratas Sabra. El panel inferior muestra los niveles de proteína relativos de ECA2 corregidos para actina. Las barras muestran los valores medios +/- ETM. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$. (n = 4, para todos los grupos).

25 Figura 3. Rotura dirigida de la ECA2 de ratón mediante recombinación homóloga.

30 a, Estrategia de dirección de genes. Se muestra una parte del locus de tipo salvaje de ECA2 murino (parte superior). Los recuadros en negro indican exones. El vector de dirección se diseñó para reemplazar el exón 9 que codifica el dominio catalítico de unión a cinc con el módulo del gen de resistencia a neomicina (neo) colocado en la orientación de sentido contrario. Se usó la timidita quinasa (TK) para la selección negativa. Las sondas flanqueantes de 3' y 5' usadas para los análisis de Southern se indican con un recuadro de línea discontinuo. b, análisis de transferencia Southern de células *ace⁺Y* y *ace⁻ES*. Se digirió el ADN genómico con EcoRI y se hibridizó con la sonda flanqueante de 3' y 5' mostrada en (a). c, Análisis de transferencia de Western de la proteína de expresión de ECA2 en los riñones de ratones *eca2⁺ace⁻*. El anti-ECA2 Ab es reactivo con una región N-terminal a la supresión. d, análisis de RT-PCR de la expresión de ARNm de ECA en el corazón y riñones de ratones *eca2⁺/y* y *eca2⁻/y*. Se muestran diferentes ciclos de PCR para la amplificación lineal y los niveles de ARNm de GAPDH como control.

Figura 4. Presión sanguínea normal y funciones renales

40 a, Se muestran mediciones de la presión sanguínea en ratones de 3 meses de edad *eca2⁺Y* (n = 8) y *eca2⁻* (n = 8) en la ausencia (paneles izquierdos) o la presencia del bloqueador de ECA Captopril. Las presiones sanguíneas se determinaron mediante el uso de los extremos de cola y se muestran los valores medios +/- D E. Se administró Captopril a los ratones durante 2 semanas antes de las mediciones de presión sanguínea como se describe en los Procedimientos. Estas presiones sanguíneas se confirmaron usando mediciones hemodinámicas y de Langendorf invasivas (no mostradas). Las diferencias en los ratones tanto los ratones tratados con captopril *eca2* como *eca2^{MY}* son significativamente diferentes de de los grupos no tratados respectivos (** $p < 0,01$). b, Las histologías de riñón normales se observan en los ratones de 6 meses de edad *eca2* y *eca⁻*. Las flechas indican glomérulos.

45 Figura 5. Morfología del corazón

a, Secciones teñidas H&E de corazones aislados de ratones de 6 meses de edad *eca2* y *eca2^Y*. Los ventrículos izquierdos agrandados (LV) y ventrículos derechos (RV) se observaron en los ratones *eca2⁻*. Sin embargo, el tamaño global del corazón era comparable entre ambos genotipos y no existía evidencia de hipertrofia cardíaca, microscópicamente o en cardiomiocitos aislados.

50 b, Cuantificación de las relaciones de peso de corazón/cuerpo de los ratones de 6 meses de edad *eca2* (n= 8) y *eca2^Y* (n = 8) como un indicador de hipertrofia cardíaca. Se debe observar que los pesos del cuerpo, pesos del corazón, longitudes de la tibia, y las relaciones de peso del corazón / longitud e la tibia no cambiaron entre los grupos genéticos diferentes a todas las edades analizadas (no mostrado). c, d, Existía una fibrosis intersticial en los ratones *eca2⁻/y*. Una característica de sello para la cardiopatía dilatada es la fibrosis intersticial. Sin embargo, la fibrosis intersticial era comparable entre los corazones de ratones *eca2* (n = 8) y *eca2^Y* (n = 8). (c) muestra la tinción

de PSR de corazones individuales. Hay que observar que la fibrosis perivascular, teñido en rojo, tanto en animales de tipo salvaje como mutantes. (d) cuantificación de cambios fibróticos en el intersticio.

Figura 6. Pérdida de los resultados de la ECA2 en la insuficiencia cardíaca contráctil grave

5 a, mediciones ecocardiográficas de corazones en contracción en ratones *eca2+Y* de 6 meses de edad y dos *eca2-Y*. Los máximos y valles indican la sístole y diástole de los ritmos cardíacos individuales. Las flechas indican la distancia entre la contracción sistólica (LVESD) y la relajación sistólica (LVEDD), valores que determinan el porcentaje de acortamiento (% FS). Hay que observar que el incremento de las dimensiones diastólicas y sistólicas en los ratones *eca2* son indicativos de la dilatación cardíaca. Los datos experimentales se pueden observar en la Tabla 1. b, Se observó el porcentaje de acortamiento fraccional y velocidad de acortamiento circunferencial de fibra, dos parámetros de sello para la contracción del corazón, en ratones de 6 meses de edad *eca2* (n = 8) y *eca2*´ (n = 8) y ratones de 6 meses de edad *eca2+* (n = 5) y ratones hembra *eca2* (n = 5). Se determinaron los valores mediante ecocardiografía. Se muestran los valores medios +/-DE. * p < 0,05 y ** p < 0,01 entre grupos genéticos. Loas datos experimentales se pueden ver en la Tabla 1.c, Mediciones de la presión sanguínea en ratones macho de 6 meses de edad *eca2+Y* (n = 8) y *eca2*´ (n = 8) y ratones hembra de 6 meses de edad *eca2+*´ (n = 5) y ratones hembra *eca2-/-* (n = 5). Se muestran los valores medios +/- DE. Se confirmaron las presiones sanguíneas usando las mediciones hemodinámicas invasivas como se puede observar en la Tabla 2.* p < 0,05.

Figura 7. La regulación por aumento de los marcadores de hipoxia e incremento de los niveles de la angiotensina II en la ausencia de ECA2 a,b, análisis de transferencia de Northern de BNIP3 y niveles de expresión de ARNm de PAI-1, dos genes inducibles por hipoxia en ratones macho de 6 meses de edad *eca2+Y* (n=5) y ratones *eca2*´ (n = 5). (a) muestra datos de transferencia de Northern individuales (b) niveles relativos de BNIP3 y niveles de ARNm de PAI- 1 normalizados para el control de gráfico. ** p < 0,01. c, los niveles de péptido de Angiotensina I (AngI) y Angiotensina II (AngII) en el corazón y riñones de ratones macho de camada *eca2+Y* (n = 8) y *eca2*´*Y* (n = 8). Los niveles en tejido de AngI y AngII se determinaron mediante radioinmunoensayos.

Se muestran los niveles de péptido medios +/- DE. ** p < 0,01.

25 Figura 8. Ratones doble mutantes ECA-ECA2 no desarrollan insuficiencia cardíaca

a, Mediciones de presión sanguínea en ratones macho de 6 meses de edad *eca2* (n = 8), *ace* (n = 8), y ratones doble mutantes *ace-/- eca2-ly* (n = 6). Se muestran los valores medios +/- DE. Las Presiones sanguíneas se confirmaron usando mediciones hemodinámicas invasivas. ** p<0.01 de mutante cuando se compara con los ratones de *tipo salvaje* b, Porcentaje de acortamiento fraccional y velocidad de acortamiento circunferencial de fibra en ratones macho *eca2* (n = 8), *eca2-ly* (n = 8), *ace-/-* (n = 8) y *ace-/- eca2-ly* doble mutantes (n = 6) de la misma camada. Se determinaron los valores mediante ecocardiografía. Se muestran los valores medios +/- DE.

** p < 0,01 entre los grupos genéticos. Se pueden observar los datos experimentales en la Tabla 3. c, mediciones ecocardiográficas de las contracciones de corazón en los ratones machos de 6 meses de edad *eca2+Y*, *eca2-ly*, *ace-/-*, y *ace-/- eca2-ly* doble mutante de la misma camada. Se analizaron los ecocardiogramas y se marcaron como se describe en la Figura 6a. Hay que observar que la ablación de ECA en un fondo nulo de *eca2* completamente rescata los defectos del corazón contráctil observado en los ratones *eca2-ly* mutantes individuales.

Figura 9. Se calculó el porcentaje de cambio en elastancia desde el comienzo con el tiempo. Se calculó la elastancia del pulmón dividiendo la presión máxima traqueal por el volumen.

Figura 10. a, ADN de la ECA2 humano (SEC ID N° 1). b, polipéptido de la ECA2 humano (SEC ID N°:2).

40 Figura 11. a, ADN de la ECA2 de ratón (SEC ID N° 3). b, polipéptido de ECA2 de ratón (SEC ID N° 4)

Figura 12. Polimorfismos y secuencias de nucleótidos de la ECA2.

Descripción detallada de la invención

45 La invención proporciona un nuevo paradigma para la regulación del sistema RAS y muestra que la ECA2 es un regulador crítico negativo del RAS requerido para la función cardíaca y la función cardiovascular, la función renal y la lesión pulmonar.

La activación de la ECA2 es crucial para el tratamiento y la prevención de la enfermedad cardíaca y renal, y la hipertensión y las enfermedades pulmonares. La divulgación enseña por primera vez que administrar un activador de la ECA2 a un animal previene y trata la insuficiencia cardíaca y la hipertensión, la enfermedad renal y la lesión pulmonar.

50 Este resultado es completamente inesperado en vista de las referencias de la técnica anterior, tal como la Patente de Estados Unidos nº 6.194.556 y la Solicitud de Patente Canadiense nº 2.372.387, descrita anteriormente, que enseña que la actividad de ECA2 se debe inhibir con el fin de tratar enfermedad cardíaca. De este modo es sorprendente que la enfermedad cardíaca se trate realmente mediante la activación de la expresión de y / o actividad de ECA2.

La divulgación incluye activadores que incluyen, entre otros, activadores de la función de la ECA2 y/o de la expresión del ARNm de la ECA2 y de la expresión de la proteína ECA2, y las composiciones farmacéuticas que incluyen los activadores. La divulgación también incluye procedimientos de tratamiento médico de enfermedad cardíaca, enfermedad pulmonar y enfermedad renal e hipertensión mediante la administración de una cantidad eficaz de un activador a un animal que necesite tratamiento. La enfermedad pulmonar incluye, entre otras, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, neumonía, asma, bronquitis crónica, enfisema pulmonar, fibrosis quística, enfermedad pulmonar intersticial, hipertensión pulmonar primaria, embolia pulmonar, sacoidosis pulmonar, tuberculosis y cánceres de pulmón.

La divulgación también incluye ensayos de selección para detectar activadores de la ECA2, que se pueden usar para tratar las enfermedades cardíacas y renales e hipertensión y enfermedad pulmonar. Estos ensayos son *in vitro* o *in vivo*. En una realización preferida, la divulgación incluye un ensayo de células endoteliales, renales, pulmonares o cardíacas para evaluar si un compuesto candidato es capaz de incrementar la expresión o la actividad de la ECA2. Se cultivan las células en presencia de al menos un compuesto cuya capacidad para activar la expresión o la actividad se busca determinar y las células se miden para determinar un incremento en el nivel de expresión de la ECA2. Otro aspecto implica un ratón defectivo en la ECA2 para identificar los compuestos que pueden superar los efectos de la pérdida de ECA2. Los polipéptidos y las moléculas orgánicas pequeñas se analizan en estos ensayos. La divulgación incluye todos los compuestos que se identifican con los procedimientos de selección y que son adecuados para la administración a animales en las composiciones farmacéuticas.

Otro aspecto es el diagnóstico del inicio o riesgo de enfermedad cardíaca y/o renal y/o hipertensión y/o enfermedad pulmonar. Esta se puede diagnosticar midiendo los niveles de ECA2 en corazón, suero o riñón u otros tejidos. Niveles de ECA2 inferiores a los niveles silvestres son indicativos de un "estado de disminución de ECA2", que la presente invención muestra que está conectado directamente con la enfermedad cardíaca y/o renal y/o hipertensión y/o enfermedad pulmonar, o un riesgo de enfermedad. Niveles silvestres de ECA2 y niveles disminuidos serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica. Un estado de disminución de los niveles de ECA2 también viene indicado por los polimorfismos ECA2a-ECA2m que se describen más adelante. La divulgación es útil para tratar y diagnosticar enfermedades asociadas con una expresión o actividad menor de ECA2. El diagnóstico también se consigue mediante el análisis de polimorfismos cadena arriba y cadena abajo y dentro del gen de la ECA2 que se asocian con un estado reducido de ECA2. Todos los reactivos requeridos para la detección de nucleótido(s) que distinguen los polimorfismos por medios descritos en el presente documento se pueden proporcionar en un único kit para analizar el ADN genómico aislado de una animal. El kit contendría sondas marcadas que distinguen polimorfismos de ECA2 con el fin de permitir el genotipado y el fenotipado para el diagnóstico del riesgo o el inicio de enfermedad. Las sondas específicas de polimorfismos se pueden marcar adecuadamente y añadir a los segmentos de ADN generados en condiciones de hibridación, de un modo tal que solo una de las sondas específicas del polimorfismo hibrida y se puede detectar, de modo que se identifica el polimorfismo de la ECA2 específico.

Procedimientos terapéuticos

Como se ha mencionado anteriormente en el presente documento, los presentes inventores han mostrado que la expresión del gen ECA2 está regulado hacia abajo en la hipertensión, enfermedad cardíaca y renal.

Por lo tanto, la presente divulgación proporciona un procedimiento de tratamiento o prevención de la hipertensión, enfermedad cardíaca, de pulmón o riñón que comprende administrar una cantidad eficaz de un agente que pueda incrementar la expresión de ECA2 en un animal que lo necesite.

La expresión "agente que pueda incrementar la expresión de ECA2" como se usa en el presente documento significa cualquier agente que pueda incrementar el nivel o actividad de un gen o proteína de ECA2 en comparación con el nivel o actividad de un gen o proteína de ECA2 en el mismo tipo de célula en ausencia del agente. El agente puede ser cualquier tipo de sustancia incluyendo, pero sin limitación, moléculas de ácido nucleico (incluyendo ECA2 o sus fragmentos), proteínas (incluyendo Ace2 o sus fragmentos), péptidos, carbohidratos, pequeñas moléculas o compuestos orgánicos. Si el gen ECA2 es incrementado o no lo es lo podrá determinar fácilmente un experto en la técnica usando procedimientos conocidos, incluyendo transferencia Western SDS-PAGE, inmunquímica, RT-PCR, transferencia de Northern e hibridación *in situ*.

El término "animal" como se usa en el presente documento incluye todos los miembros del reino animal. Los animales son preferiblemente seres humanos.

El término "cantidad eficaz" como se usa en el presente documento significa una cantidad eficaz a dosis y durante períodos de tiempo necesarios para potenciar el nivel de ECA2.

El término "tratamiento o tratar" como se usa en el presente documento significa un planteamiento para obtener resultados beneficiosos o deseados, incluyendo los resultados clínicos. Los resultados clínicos o beneficiosos deseados pueden incluir, pero no se limitan a, alivio o mejora de uno o más síntomas o afecciones, disminución o extinción de la enfermedad, estado patológico estabilizado (es decir no empeoramiento), prevención de la extensión de la enfermedad, retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado patológico, y remisión del estado patológico, y remisión (bien parcial o total), bien detectable o indetectable.

"Tratamiento" también puede significar prolongación de la supervivencia comparado con la supervivencia esperada si no recibe tratamiento.

Administración de molécula de ácido nucleico de ECA2

5 En una realización, la expresión del gen de ECA2 se incrementa mediante la administración de un ácido nucleico que comprende un gen de ECA2 o una parte del mismo.

En otra realización, la expresión del gen de ECA2 se puede incrementar mediante la administración de un agente que incrementa la expresión del gen de ECA2 incluyendo cualesquiera agentes identificados usando los ensayos de selección en esta solicitud.

10 Dado que un animal que sufre de la enfermedad, trastorno o estado físico anormal se puede tratar mediante la regulación hacia arriba de ECA2, la terapia génica para incrementar la expresión de ECA2 es útil para modificar el desarrollo / progresión de enfermedad pulmonar renal o pulmonar

La divulgación incluye procedimientos y composiciones para proporcionar la terapia génica de ECA2 para el tratamiento de enfermedades, trastornos o estados físicos anormales caracterizados por la disminución de la expresión de ECA2 o niveles de la actividad del polipéptido de ECA2.

15 La divulgación incluye procedimientos y composiciones para proporcionar una molécula de ácido nucleico que codifica ECA2 o molécula de ácido nucleico equivalente a las células de un animal de manera que la expresión de ECA2 en las células proporciona la actividad biológica o fenotipo del polipéptido de ECA2 a esas células. Se administran suficientes cantidades de la molécula de ácido nucleico y se expresan a niveles suficientes para proporcionar la actividad biológica o fenotipo del polipéptido de ECA2 a las células. Por ejemplo, el procedimiento
20 puede preferiblemente implicar un procedimiento de distribución de una molécula de ácido nucleico que codifica ECA2 a las células de un animal que tiene enfermedad cardiovascular o renal, o pulmonar, que comprende la administración al sujeto de un vector que comprende ADN que codifica ECA2. El procedimiento también se puede referir a un procedimiento para proporcionar un animal que tiene enfermedad cardiovascular o renal, o pulmonar con el polipéptido biológicamente activo de ECA2 mediante la administración de ADN que codifica ECA2. El
25 procedimiento se puede realizar *in vivo* o *ex vivo* (por ejemplo, con células del tronco de corazón, pulmón, endoteliales o de riñón, células progenitoras u otras células que van a ser células transplantada). Se explican los procedimientos y composiciones para administrar ECA2 (que se incluyen en terapia) a célula aislada o un animal, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos números 5.672.344, 5.645.829, 5.741.486, 5.656.465, 5.547.932, 5.529.774, 5.436.146, 5.399.346, 5.670.488, 5.240.84, 6.322.536, 6.306.830 y 6.071.890 y la solicitud de patente de
30 EE.UU. nº 20010029040.

El procedimiento también se refiere a un procedimiento para producir una reserva de virus recombinante mediante la producción de virus adecuado para terapia génica que comprende el ADN que codifica ECA2. Este procedimiento preferiblemente implica la transfección de células que permiten la replicación de virus (conteniendo el virus la molécula de ácido nucleico) y recoger el virus producido.

35 Los procedimientos y composiciones se pueden usar *in vivo* o *in vitro*. La divulgación también incluye composiciones (preferiblemente composiciones farmacéuticas para la terapia génica). Las composiciones incluyen un vector que contiene ECA2. El vehículo puede ser un vehículo farmacéutico o un transformante de célula huésped que incluye el vector. Los vectores conocidos en la técnica incluyen pero no se limitan a retrovirus, adenovirus, virus asociado a adeno (AAV), vectores herpes virus, tales como vectores de virus vaccinia, VIH y vectores
40 basados en lentivirus, o plásmidos. La divulgación también incluye líneas celulares de empaquetamiento y auxiliares que se requieren para producir el vector. Los procedimientos de producción del vector y procedimientos de terapia génica que usan el vector y procedimientos de la terapia génica que usan el vector también se incluyen en la divulgación.

La divulgación también incluye una célula transformada que contiene el vector y las secuencias de moléculas de ácido nucleico de ECA2 recombinantes. El uso de variantes de ECA2 y modificaciones a la secuencia de polipéptido de variantes de ECA2 se pueden usar en los procedimientos de la divulgación. Los cambios que dan como resultado la producción de una secuencia de aminoácidos químicamente similar equivalente están incluidas dentro del alcance de la divulgación. Los polipéptidos que tienen identidad de secuencias con el receptor de ECA2 se ensayan para asegurar que son adecuados para el uso en el procedimiento de la divulgación. Se pueden producir
50 de manera natural variantes de polipéptidos de la divulgación, por ejemplo, mediante mutación, o se pueden preparar, por ejemplo, con técnicas de ingeniería genética de polipéptido tales como mutagénesis dirigida al sitio, que se conocen bien en la técnica para sustitución de aminoácidos. Por ejemplo, un resto hidrófobo, tal como glicina se puede sustituir por otro resto hidrófobo tal como alanina. Un resto alanina puede estar sustituido con un resto más hidrófobo tal como leucina, valina o isoleucina. Un aminoácido cargado negativamente tal como ácido aspártico se puede sustituir por ácido glutámico. Un aminoácido cargado positivamente tal como lisina se puede
55 sustituir por otro aminoácido cargado positivamente tal como arginina.

Por lo tanto, la divulgación incluye polipéptidos que tienen cambios o sustituciones conservadores en secuencias de aminoácidos. Las sustituciones conservadoras insertan uno o más aminoácidos, que tienen propiedades químicas

similares que los aminoácidos reemplazados. La divulgación incluye secuencias donde las sustituciones conservadoras se hacen de manera que no destruyan la actividad del compuesto.

Los polipéptidos que comprenden uno o más d-aminoácidos se contemplan con la divulgación. También se contemplan polipéptidos donde uno o más aminoácidos están acetilados en el extremo N. Los expertos en la técnica reconocen que está disponible una diversidad de técnicas para construir miméticos de polipéptidos con la misma o similar actividad del compuesto deseado pero con actividad más favorable que el polipéptido con respecto a la solubilidad estabilidad, y / o susceptibilidad a hidrólisis y proteólisis. Véase, por ejemplo, Morgan y Gainor, Ann. Rep. Med. Chem., 24: 243 - 252 (1989). Los ejemplos de miméticos de polipéptido se describen en la patente de estados Unidos N° 5.643.873. Otras patentes que describen cómo preparar y usar miméticos se incluyen, por ejemplo en, 5.786.322, 5.767.075, 5.763.571, 5.753.226, 5.683.983, 5.677.280, 5.672.584, 5.668.110, 5.654.276, 5.643.873. Los miméticos de los polipéptidos de la divulgación también se pueden preparar de acuerdo a otras técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, tratando un polipéptido de la divulgación con un agente que altera químicamente un grupo lateral convirtiendo un grupo hidrógeno en otro grupo tal como un grupo hidroxilo o amino. Los miméticos preferiblemente incluyen las secuencias que son o bien enteramente hechos de aminoácidos o secuencias que son híbridos incluyendo los aminoácidos y aminoácidos modificados u otras moléculas orgánicas.

La divulgación también incluye híbridos y polipéptidos, por ejemplo donde una secuencia de nucleótidos se combina con una segunda secuencia.

La divulgación también incluye procedimientos de uso de fragmentos de polipéptidos de ECA2 que se pueden usar para conferir actividad del compuesto si los fragmentos retienen actividad. La divulgación también incluye polipéptidos y fragmentos de los polipéptidos de la divulgación que se pueden usar como una herramienta de investigación para caracterizar el polipéptido o su actividad. Tales polipéptidos preferiblemente constan de al menos 5 aminoácidos. En realizaciones preferidas, pueden constar de 6 a 10, 11 a 15, 16 a 25, 26 a 50, 51 a 75, 76 a 100 ó 101 a 250 ó 250 a 500 aminoácidos. Los fragmentos pueden incluir secuencias con más aminoácidos eliminados, por ejemplo, aminoácidos del extremo C en una secuencia del compuesto.

25 **Potenciación de la actividad del polipéptido ECA2**

La actividad de ECA2 aumenta o disminuye llevando a cabo mutagénesis dirigida al sitio selectiva. Un plásmido de ADN o vector de expresión que contiene la molécula de ácido nucleico o una molécula de ácido nucleico que tiene identidad de secuencia se usa preferiblemente para estos estudios usando el kit de mutagénesis U.S.E. (Eliminación de sitio único) de Pharmacia Biotech u otros kits de mutagénesis que están comercialmente disponibles, o usando PCR. Una vez que se crea y confirma la mutación mediante análisis de secuencia de ADN, el polipéptido mutante se expresa usando u sistema de expresión y se controla su actividad.

La divulgación también incluye procedimientos de uso de polipéptidos que tienen identidad de secuencia al menos aproximadamente: > 20%, > 25%, > 28%, > 30%, > 35%, > 40%, > 50%, > 60%, > 70%, > 80% o > 90% más preferiblemente al menos aproximadamente > 95%, > 99% o > 99,5%, a ECA2 humano o de ratón (o una secuencia parcial del mismo). Las moléculas de polipéptido modificadas se describen más adelante. Preferiblemente aproximadamente: 1, 2, 3, 4, 5, 6 a 10, 10 a 25, 26 a 50 ó 51 a 100, o 101 a 250 nucleótidos o aminoácidos están modificados.

Se calcula la identidad de acuerdo con conocidos en la técnica. La identidad de secuencia se determina lo más preferiblemente mediante la investigación avanzada del programa BLAST versión 2.1 (parámetros como antes). BLAST es una serie de programas que están disponibles en la línea <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>. La investigación de BLAST avanzada (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi?Jform=1>) se establece para los parámetros por defecto. (es decir, Matrix BLOSUM62; Coste de existencia de hueco 11; Por coste de hueco de residuo 1; relación Lambda 0,85 defecto).

Las referencias a investigaciones BLAST son: Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool." J. Mol. Biol. 215: 403 - 410; Gish, W. & States, D.J. (1993) "Identification of protein coding regions by database similarity search." Nature Genet. 3: 266 - 272; Madden, T.L., Tatusov, R.L. & Zhang, J. (1996) "Applications of network BLAST server" Meth. Enzymol. 266: 131 - 141; Altschul, S.F., Madden, T.L., Scha" ffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." Ácido nucleicos Res. 25: 3389 - 3402; Zhang, J. & Madden, T.L. (1997) "PowerBLAST: A new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation." Genome Res. 7: 649 - 656.

Preferiblemente aproximadamente: 1, 2, 3, 4, 5, 6 a 10, 10 a 25, 26 a 50 ó 51 a 100, ó 101 a 250 nucleótidos o aminoácidos están modificados. La divulgación incluye polipéptidos con mutaciones que provocan un cambio de aminoácidos en una parte del polipéptido implicado que proporciona la actividad de manera que la mutación aumenta o disminuye la actividad del polipéptido.

Selección de los activadores de ECA2

Se seleccionan pequeñas moléculas orgánicas para determinar si incrementan la expresión o actividad de ECA2. Los fragmentos de polipéptidos de ECA2 así como los polipéptidos que tienen identidad de secuencia con ECA2 también se ensayan para determinar si incrementan la actividad de ECA2 en ensayos *in vitro* e *in vivo* en líneas celulares. Los activadores se dirigen preferiblemente hacia dominios específicos de ECA2 para incrementar la activación de ECA2. Para lograr la especificidad, los activadores deben dirigir las secuencias únicas de ECA2.

La presente divulgación también incluye el aislamiento de sustancias que incrementan la expresión de ECA2. En particular se pueden aislar los ligandos o sustancias que se unen al gen o proteína de ECA2. Se pueden ensayar muestras biológicas y genotecas comercialmente disponibles para sustancias tales como proteínas que se unen a un gen o proteína de ECA2. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de una proteína de ECA2 se puede usar para sondar genotecas de péptidos mientras una secuencia de ácido nucleico que codifica ECA2 se puede usar para sondar genotecas de ácidos nucleicos. Además, los anticuerpos preparados para ECA2 se pueden usar para aislar otros péptidos con afinidad para ECA2. Por ejemplo, se pueden usar anticuerpos marcados se pueden usar para sondar genotecas de despliegue en fago o muestras biológicas.

Las condiciones que permiten la formación de complejos con una sustancia y un gen o proteína de ECA2 se pueden seleccionar para que tengan relación con los factores tales como la naturaleza y cantidades de la sustancia y el gen o proteína de ECA2. El complejo sustancia - proteína o sustancia - gen, sustancia libre o sustancia sin formar complejo se pueden aislar mediante técnicas de aislamiento convencionales, por ejemplo, precipitación con sales, cromatografía, electroforesis, filtración en gel, fraccionamiento, absorción, electroforesis en gel de poliacrilamida, aglutinación, o combinaciones de las mismas. Para facilitar el ensayo de los componentes, se pueden utilizar anticuerpo contra ECA2 o la sustancia, o proteína marcada, o una sustancia marcada. Los anticuerpos, proteínas, o sustancias se pueden marcar, según sea apropiado, con una sustancia detectable como se describe más adelante.

Una vez que se han aislado las parejas de unión potenciales, se pueden diseñar procedimientos de selección para determinar si las sustancias que se unen a los genes o proteínas de ECA2 son útiles en los procedimientos de la presente divulgación para potenciar la expresión de ECA2 sobre una célula y por lo tanto útiles en el tratamiento de enfermedad.

Por lo tanto, la divulgación también proporciona procedimientos para identificar sustancias que son capaces de unirse a genes o proteínas de ECA2. En particular, los procedimientos se pueden usar para identificar sustancias, que son capaces de unirse y aumentar o potenciar la expresión de ECA2. De acuerdo con lo anterior la divulgación proporciona un procedimiento para identificar sustancias que se unen con un gen o proteína ECA2, que comprende las etapas de

(a) hacer reaccionar un gen o proteína ACE2, preferentemente inmovilizada, y una sustancia de ensayo, en condiciones que permita la formación de un complejo, y

(b) ensayar complejos para sustancia libre y para gen o proteína no complejada.

Se puede usar cualquier sistema de ensayo o procedimiento de ensayo que detecta interacciones proteína -proteína incluyendo la co- inmunoprecipitación, reticulación y copurificación mediante gradientes o columnas cromatográficas. De manera adicional, los estudios cristallográficos de rayos x se pueden usar como un medio de evaluar las interacciones con sustancias y moléculas. Por ejemplo, moléculas recombinantes purificadas en un complejo de la divulgación cuando se cristaliza en una forma adecuada son apropiados para la detección de interacciones intramoleculares mediante cristalografía de rayos x. También se puede usar espectroscopía para detectar interacciones y en particular, se puede usar instrumentación Q-TOF. Se pueden ensayar muestras biológicas y genotecas comercialmente disponibles para los péptidos de unión a ECA2. Además, los anticuerpos preparados para el ECA2 se pueden usar para aislar otros péptidos con afinidad de unión a ECA2. Por ejemplo, se pueden usar anticuerpos marcados para sondar genotecas de despliegue en fago o muestras biológicas. A este respecto los péptidos se pueden usar para desarrollar un sistema de expresión biológico. El uso de estos sistemas permite la producción de grandes genotecas de secuencias de péptido al azar y la selección de estas genotecas para las secuencias de péptidos que se unen a proteínas particulares. Las genotecas se pueden producir mediante clonación de ADN sintético que codifica secuencias de péptido al azar en vectores de expresión adecuados (véase Christian et al. 1992, J. Mol. Biol. 227: 711; Devlin et al., 1990 Science 249: 404; Cwirla et al. 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6378). También se pueden construir genotecas mediante la síntesis concurrente de péptidos de superposición (véase Patente de Estados Unidos N° 4.708.871). Se ensayan activadores en modelos de animales de hipertensión, enfermedad cardíaca o renal.

En una realización, la divulgación incluye un ensayo para evaluar si un compuesto candidato es capaz de incrementar la expresión o actividad de ECA2 mediante el cultivo de células (preferiblemente células renales o cardíacas) en la presencia de al menos un compuesto cuya capacidad para activar la expresión o actividad se pretende para que se determine y después de esto controlar las células para evaluar un incremento en el nivel de la expresión y / o actividad de ECA2. La expresión y / o actividad de ECA2 indica que el compuesto candidato es útil para tratar enfermedad cardíaca o renal e hipertensión.

Un ensayo similar de selección se puede realizar con los mamíferos conocidos en la técnica son propensos a enfermedad cardíaca o enfermedad renal. El compuesto candidato se administra al mamífero y se mide la expresión y / o actividad de ECA2. El aumento de expresión y / o actividad de ECA2 indica que el compuesto candidato es útil para tratar enfermedad cardíaca o renal.

5

Un procedimiento para determinar si un compuesto candidato incrementa la actividad de ECA2 (y si es útil para tratar enfermedades cardiovasculares y/o de riñón y/o de pulmón y/o hipertensión) también puede incluir:

- a) poner en contacto (i) ECA2, un fragmento de ECA2 o un derivado de cualquiera de los anteriores con (ii) un sustrato de de ECA2 en presencia del compuesto candidato; y
- b) determinar si se incrementa la actividad de ECA2 en el sustrato, indicando de dicha forma que el compuesto incrementa la actividad de ECA2. La actividad incrementada de ECA2 indica que el compuesto es útil para tratar enfermedades cardíacas, de riñón o pulmón listadas en la presente solicitud o hipertensión. La determinación de un incremento en la actividad de ECA2 preferentemente indica determinar si el compuesto incrementa la actividad proteolítica de ECA2(hidrólisis incrementada de sustratos). En una variante de la divulgación, los ensayos de la divulgación están sometidos a la codición de que el compuesto candidato no sea una sal de halógeno-sodio o una sal de halógeno-potasio y el ensayo no esté dirigido a medir el efecto de incrementar la concentración de iones en la proteólisis de ECA2. Los sustratos de ECA2 incluyen Angll, Angil, des-Ang, Angll, apelin-13, dinorphin 13, beta-casomorphin y neurotensin.

Los procedimientos para producir ECA2 se describen en el documento CA 2.372.387. un ejemplo de un ensayo *in vitro* para la activación de ECA2 se muestra en Vickers et al., Hydrolysis of biological péptidos by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. J Biol. Chem. 2002, 277(17): 14838. Otros ensayos (así como variaciones de los ensayos anteriores) serán evidentes para la descripción de la presente divulgación y las técnicas tales como las descritas en las Patentes de Estados Unidos números 5.851.788. 5.736.337 y 5.767.075.

20

Mamíferos defectivos

En los siguientes ejemplos se describen ejemplos de trabajo de la clonación de ECA2 de ratón y la generación de ratones defectivos en ECA2. El término “defectivo” hace referencia a una reducción parcial o completa de la expresión de al menos una porción de un polipéptido codificado por un gen de la ECA2 de una única célula, determinadas células o todas las células de un mamífero. El mamífero puede ser un “heterocigoto defectivo”, en el que se ha alterado un alelo del gen endógeno y todavía existe un alelo. En la ECA2 sobre el cromosoma X, las hembras pueden ser heterocigotas. En machos, solo hay un alelo y los machos son homocigotos. Como alternativa, el mamífero puede ser un “homocigoto defectivo”, en el que se ha alterado ambos alelos del gen endógeno.

30

La expresión “construcción defectiva” hace referencia a una secuencia de nucleótidos que se ha diseñado para disminuir o suprimir la expresión de un polipéptido codificado por un gen endógeno en una o más células de un mamífero. La secuencia de nucleótidos usada como construcción defectiva normalmente está compuesta por (1) ADN de alguna porción del gen endógeno (una o más secuencias exónicas, secuencias intrónicas y/o secuencias promotoras) que se va a suprimir y (2) una secuencia marcadora usada para detectar la presencia de la construcción defectiva en la célula. La construcción defectiva se inserta en una célula que contiene el gen endógeno que se va a inactivar. A continuación, la construcción defectiva se puede integrar en uno o ambos alelos del gen de la ECA2 endógena y dicha integración de la construcción defectiva de la ECA2 puede prevenir o interrumpir la transcripción del gen de la ECA2 endógena de longitud completa. La integración de la construcción defectiva de la ECA2 en el ADN cromosómico celular normalmente se consigue mediante recombinación homóloga (es decir, regiones de la construcción defectiva en la ECA2 que son homólogas o complementarias a las secuencias de ADN de la ECA2 endógena pueden hibridar entre sí cuando la construcción defectiva se inserta en la célula; estas regiones se pueden recombinar después de modo que la construcción defectiva se incorpora en la posición correspondiente del ADN endógeno)

35

40

45

Normalmente, la construcción defectiva se inserta en una célula indiferenciada denominada célula madre embrionaria (células ME). Las células ME normalmente derivan de un embrión o blastocisto de la misma especie que el embrión en desarrollo en el que se puede introducir, como se trata más adelante.

50

Las expresiones “alteración del gen”, “alteración génica”, “supresión de la expresión” y “supresión génica” hacen referencia a la inserción de una construcción defectiva en la secuencia de nucleótidos de la ECA2 en una región homóloga de la región de codificación del gen de la ECA2 endógena (que normalmente contiene uno o más exones) y/o la región promotora de este gen para disminuir o prevenir la expresión de la molécula de la ECA2 de longitud completa en la célula. Normalmente la inserción se realiza mediante recombinación homóloga. A modo de ejemplo, una construcción defectiva en la secuencia de nucleótidos se puede preparar insertando una secuencia de nucleótidos que comprende un gen de resistencia a antibióticos en una porción de una secuencia de nucleótidos aislada que codifica la ECA2 que se va a alterar. Cuando esta construcción defectiva se inserta después en una célula madre embrionaria (“célula ME”), la construcción se puede integrar en el ADN genómico de al menos un alelo de la ECA2. Por tanto, mucha progenie de la célula ya no expresará ECA2 al menos en algunas células o la

55

expresará a un nivel menor y/o en una forma truncada, dado que al menos parte de la región de codificación endógena de ECA2 está ahora alterada por el gen de resistencia a antibióticos.

La expresión "secuencia marcador" se refiere a una secuencia de nucleótidos que (1) se usa como parte de una construcción de la secuencia de nucleótidos más larga (es decir, la "construcción defectiva" para alterar la expresión de ECA2 y (2) se usa como medio para identificar las células que tienen incorporada la construcción defectiva en ECA2 en el ADN cromosómico. La secuencia marcadora puede ser cualquier secuencia que sirve los fines, aunque normalmente será una secuencia que codifica una proteína que confiere un rasgo detectable en la célula, tal como un gen de resistencia a antibióticos o una enzima analizable que no se encuentra de forma natural en la célula. La secuencia marcadora también contendrá normalmente un promotor homólogo o heterólogo que regula su expresión.

Incluido en el alcance de la presente divulgación está un mamífero en el que uno o ambos alelos de ECA2, así como uno o ambos alelos de otro(s) gen(es) se han inactivado. Dicho mamífero se puede generar repitiendo los procedimientos establecidos en el presente documento para generar un mamífero defectivo en ECA2 pero usando otro gen, o curando dos mamíferos, uno con uno o los dos alelos de la ECA2 inactivada y uno con uno o los dos alelos de un segundo gen inactivado, entre sí, y realizando una detección selectiva en la descendencia que tiene el genotipo con doble inactivación (ya sea un genotipo defectivo doble heterocigoto o doble homocigoto, o una variación de los mismos).

Otros animales y células defectivos se pueden fabricar usando técnicas similares.

Composiciones farmacéuticas

Los activadores de la expresión y actividad de ECA2 se combinan preferiblemente con otros componentes, tal como un vehículo, en una composición farmacéutica. Estas composiciones se pueden administrar a un animal, preferiblemente un ser humano, en forma soluble para evitar o tratar hipertensión, insuficiencia cardíaca congestiva, insuficiencia cardíaca crónica, insuficiencia cardíaca aguda, infarto de miocardio, arteriosclerosis, insuficiencia renal o una enfermedad pulmonar en un mamífero, en el que la enfermedad pulmonar es enfermedad pulmonar obstructiva crónica, neumonía, asma, bronquitis crónica, enfisema pulmonar, fibrosis quística, enfermedad intersticial pulmonar, hipertensión pulmonar primaria, embolia pulmonar, sarcoidosis pulmonar, tuberculosis, edema pulmonar, ARDS o cáncer de pulmón. La enfermedad renal incluye insuficiencia renal. Los activadores de ECA2 son útiles para regular la presión sanguínea e hipertensión arterial. La presión sanguínea normal tiene una presión sanguínea diastólica menor que 85 mm Hg. La alta presión sanguínea normal tiene una presión sanguínea diastólica entre 85 y 89 mm Hg. La hipertensión suave corresponde a una presión de sangre diastólica entre 90 - 104 mm Hg. La hipertensión moderada tienen hasta una presión sanguínea diastólica entre 105 y 114 mm Hg.

La hipertensión grave tiene una presión sanguínea diastólica mayor que 115 mm Hg. La presión sanguínea anormal también se determina a partir de la presión sanguínea sistólica (cuando la presión diastólica es menor que 90 mmHg). La presión sanguínea normal tiene una presión sanguínea sistólica de menos de 140 mm Hg. La hipertensión sistólica límite muestra una presión sistólica sanguínea entre 140 y 159 mm Hg. La hipertensión sistólica aislada tiene una presión sanguínea sistólica mayor que 160 mm Hg. (Cecil: Essentials of Medicine, Tercera edición por Andreoli et al. W.B. Saunders Company (1993)). Hipertensión se diagnostica en un adulto mayor de 18 años de edad si la media de dos o más mediciones de presión sanguínea durante al menos dos visitas es 90 mm Hg o mayor diastólica o 140 mm Hg sistólica. Los niños y mujeres embarazadas tienen una presión sanguínea menor, así una presión sanguínea por encima de 120/80 (es decir, 120 mm Hg de presión sanguínea sistólica /80 mm Hg de presión sanguínea diastólica) indica hipertensión.

Las composiciones farmacéuticas se puede administrar a seres humanos o animales mediante una diversidad de procedimientos que incluyen, pero no se limitan a la administración tópica, administración oral, administración por aerosol, instilación intratraqueal, inyección intraperitoneal, e inyección intravenosa. Las dosificaciones a administrar dependen de las necesidades del paciente, sobre el efecto deseado y de la vía de administración elegida.

Los polipéptidos se pueden introducir en las células usando vehículos de administración de *in vivo* tales como pero sin exclusión a liposomas.

Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar mediante procedimientos conocidos para la preparación de composiciones farmacéuticamente aceptables que se pueden administrar a pacientes, de manera que una cantidad eficaz de la molécula de ácido nucleico o polipéptido se combina en una mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos adecuados se describen, por ejemplo en Remington's Pharmaceutical Sciences (Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., Estados Unidos).

En esta base, las composiciones farmacéuticas pueden incluir un compuesto o sustancia activo, tal como una molécula de ácido nucleico o polipéptido, en asociación con uno o más vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, y contenidos en soluciones tamponadas con un pH adecuado isoosmótico con los fluidos biológicos. Los procedimientos de combinación de las moléculas activas con los vehículos o combinación de ellos con diluyentes son bien conocidos por los expertos en la técnica. La composición puede incluir un agente de dirección para el transporte del compuesto activo a sitios específicos dentro del tejido.

Sobreexpresión heteróloga de ECA2

Los vectores de expresión son útiles para proporcionar altos niveles de expresión de ECA2. Los cultivos de células transformadas con las moléculas de ácido nucleico son útiles como herramientas de investigación, particularmente para los estudios de los estados disminución de ECA2. Se incluyen vectores selectivos para las células cardíacas y células de riñón preferiblemente células endoteliales que normalmente constituyen ECA2. Los ejemplos de vectores para las células cardíacas y renales se describen, por ejemplo, en Rosengart *et al.* Patente de Estados Unidos nº 6.322.536; March *et al.* Patente de Estados Unidos nº 6.224.584; Hammond *et al.* Patente de Estados Unidos nº 6.174.871; Wolfgang-M. Franz *et al.* Analysis of tissue - specific gene delivery by recombinant adenoviruses containing cardiac-specific promoters. Cardiovascular Research 35 (1997) 560 - 566; Rothmann T. *et al.* Heart muscle-specific gene expression using replication defective recombinant adenovirus. Gene Ther 1996 Oct;3 (10): 919 - 26; Phillips MI *et al.* Vigilant vector: heart-specific promoter in an adeno-associated virus vector for cardioprotection. Hypertension 2002, Feb; 39 (2 Pt 2):651-5; Herold BC *et al.* Herpes simplex virus as a model vector system for gene therapy in renal disease. Kidney Int 2002 Jan;61 Suppl 1:3-8; Figlin RA *et al.* Technology evaluation: interleukin-2 gene therapy for the treatment of renal cell carcinoma. Curr Opin Mol Ther 1999 Apr; 1 (2): 271 - 8; Varda-Bloom N *et al.* Tissue- specific gene therapy directed to tumor angiogenesis. Gene Ther 2001 Jun;8 (11): 819-27; Scott-Taylor TH *et al.*, Adenovirus facilitated infection of human cells with ecotropic retrovirus. Gene Ther mayo de 1998; 5 (5):621 - 9; Langer JC *et al.* Adeno-associated virus gene transfer into renal cells: potential for in vivo gene delivery. Exp Nephrol mayo - junio de 1998;6(3):189 - 94; Lien YH *et al.* Gene therapy for renal diseases. Kidney Int Suppl 1997 Oct; 61:S85-8; y Ohno K *et al.* Cell-specific targeting of Sindbis virus vectors displaying IgG-binding domains of protein A. Nat Biotechnol agosto de 1997;15(8): 763 - 7.

Se usan cultivos celulares, preferiblemente cultivos de células cardíacas y renales y cultivos celulares endoteliales, en la sobreexpresión e investigación de acuerdo con numerosas técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, una línea celular (o bien una célula inmortalizada o un cultivo de células primarias) se pueden transfectar con un vector que contiene una molécula de ácido nucleico de ECA2 (o molécula que tiene identidad de secuencia) para medir los niveles de expresión de la molécula de ácido nucleico y la actividad de la molécula de ácido nucleico y polipéptido. Las células también son útiles para identificar los compuestos que se unen a, y activan, el polipéptido.

Kits de Diagnóstico que miden la actividad y / o expresión de ECA2

La medición de la expresión o actividad de ECA2 también se usa en: i) diagnosis de enfermedad cardíaca o renal, enfermedad pulmonar y / o hipertensión ii) identificación de pacientes en riesgo de desarrollar tal enfermedad antes del desarrollo de la enfermedad iii) medir la respuesta terapéutica en pacientes que tienen enfermedad cardíaca tal como enfermedad cardíaca coronaria, insuficiencia cardíaca crónica, o enfermedad renal y / o hipertensión y / o lesión pulmonar iv). Medir el éxito de las estrategias preventivas de enfermedad experimental en tales pacientes en riesgo. La divulgación incluye un procedimiento para determinar los niveles de ECA2 en un animal que comprende las siguientes etapas: (a) preparar una muestra de corazón o de riñón o de pulmón de un espécimen recogido del animal; (b) ensayar la presencia de ECA2 en la muestra; y (c) correlacionar la presencia de niveles de ECA2 en la muestra con la presencia (o riesgo) de enfermedad tal como enfermedad cardíaca o renal o pulmonar en el animal. Los niveles de ECA2 por debajo de lo normal o por debajo de la actividad de ECA2 indican la presencia de riesgo o enfermedad.

Kits diagnósticos basados en polimorfismos en un solo nucleótido de la ECA2

La presente invención también muestra que una expresión disminuida de la ECA2 humana es el resultado de los polimorfismos que controlan la expresión del gen de la ECA2. Los mapeos QTL en ratas muestran que hay una correlación del 100% entre niveles de expresión reducidos de ECA2 e hipertensión y enfermedad cardiovascular y renal. Ninguno de los polimorfismos descritos más adelante se encuentran dentro de la región de codificación de la ECA2. Todos están cadena arriba o cadena abajo de la región de codificación de la ECA2. Ninguno de estos polimorfismos o su papel en la enfermedad cardiovascular, enfermedad renal, enfermedad pulmonar e hipertensión se conocían anteriormente. Un haplotipo de SNP concreto se asocia con un mayor riesgo de enfermedad. Este haplotipo es una herramienta diagnóstica importante para la evaluación del riesgo de enfermedad y para la determinación del tratamiento médico adecuado.

Los polimorfismos son los siguientes:

| Nombre del SNP | Descripción del SNP | Afroamericana | Asiática | Caucásica | Referencia |
|-------------------|---------------------|---------------|----------|-----------|------------|
| ECA2a rs879922 | C(C/G) | 60 | 100 | 70 | c |
| ECA2b rs757066 | T(C/T) | 100 | 100 | 70 | T |

ES 2 424 971 T3

| | | | | | |
|----------------------|--------|-------|-----|-----|-----|
| ECA2c rs714205 | C(C/G) | 70 | 50 | 80 | C |
| ECA2d rs329442 | C(A/C) | 50 | 90 | 90 | A/C |
| ECA2e rs233574 | C(C/T) | 80 | 100 | 60 | C |
| ECA2f rs1978124 | C(C/T) | 90 | 100 | 50 | C |
| ECA2g rs1514282 | A(A/G) | 70 | 100 | 100 | A |
| ECA2h Rs1514282-2 | A(A/G) | 20 | 50 | 30 | A |
| ECA2i rs1514281 | A(A/G) | 70 | 100 | 100 | A |
| ECA2j rs1514281-2 | A(A/G) | 20 | 50 | 50 | A |
| ECA2k rs1514279 | A(A/G) | Fallo | 100 | 70 | A |
| ECAI 2 rs1514280 | C(C/T) | 80 | 100 | 80 | C |
| ECA2m rs233575 | C(C/T) | 100 | 100 | 50 | C |

El número de nucleótidos de los polimorfismos que controlan la expresión génica de ECA2, como se ha descrito en el gráfico anterior y en la Figura 11, se puede determinar fácilmente por los expertos en la técnica.

5 El gráfico muestra el porcentaje de la base de referencia que se encuentra en cada una de las tres poblaciones en el gráfico (afroamericana, caucásica, asiática). Por ejemplo, para SNP rs233574, el SNP predicho es C/T, siendo el pico de referencia C. En este caso, la frecuencia del alelo afroamericano es 80% C; la frecuencia del alelo asiático es 100% C (en otras palabras, un marcador monomórfico) y la frecuencia del alelo caucásico es 60% C.

10 Se proporcionan sondas polinucleotídicas que se pueden usar para determinar el genotipo de un animal que es si una persona es homocigota para uno o el otro polimorfismo o heterocigota de estos polimorfismos y, por extensión, el fenotipo de la persona. El fenotipo indica la cantidad de expresión de ECA2 en las células de la persona. Además, se proporcionan procedimientos de uso de dichos polinucleótidos en las determinaciones de dicho genotipo y fenotipo. Los oligonucleótidos se pueden usar como sondas para detectar moléculas de ácido nucleico de acuerdo con técnicas conocidas en la materia (véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 5.792.851 y 5.851.788).

15 Por ejemplo, un polinucleótido se puede convertir en una sonda mediante marcado en el extremo usando digoxigenina-11- deoxiuridina trifosfato. Tales sondas se pueden detectar inmunológicamente usando fragmentos de antidigoxigenina F (ab) de oveja policlonal conjugados a fosfato alcalino y tetrazolio azul nitro con 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato como sustrato cromogénico.

20 Por tanto, se proporciona una sonda polinucleotídica que hibrida de forma selectiva con una porción de la secuencia de ECA cadena arriba o cadena abajo. Se puede diseñar una sonda para hibridar con un polimorfismo de la ECA2 en condiciones rigurosas pero no los otros polimorfismos con el fin de distinguir un polimorfismo concreto.

Las sondas de hibridación del polinucleótido específico del polimorfismo pueden comprender, por ejemplo, ADN genómico o ADN sintético. Dichas sondas oligonucleotídicas se pueden sintetizar mediante síntesis automática y preferentemente contendrán aproximadamente 10-30 bases, aunque como se entiende en la técnica de ensayo de hibridación de sondas oligonucleotídicas, pueden ser útiles tan pocas como 8 y hasta aproximadamente 50 nucleótidos, dependiendo de la posición dentro de la sonda en la que se localiza el potencial apareamiento erróneo con la diana, la extensión a la cual un marcador en la sonda podría interferir con la hibridación y las condiciones físicas (p. ej., temperatura, pH, fuerza iónica) en las que se lleva a cabo la hibridación de la sonda con la diana. De acuerdo con procedimientos convencionales, el diseño de una sonda polinucleotídica implica, preferentemente, ajustar la longitud de la sonda a acomodar las condiciones de hibridación (temperatura, fuerza iónica, tiempo de exposición) al tiempo que se asegura la especificidad del polimorfismo.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención se proporciona un kit de ensayo para el genotipo, que comprende:

(a) medios para amplificar ácido nucleico que comprende al menos una porción de una región en 5' o 3' de ECA2, en la que la porción incluye un nucleótido correspondiente a uno de ACE2a-ACE2m; y

(b) una sonda polinucleotídica que distingue un polimorfismo de ECA2 del otro.

El "medio para aplicar" dependerá, como entenderá fácilmente el experto, del procedimiento de amplificación que se va a usar. Por tanto, por ejemplo, estos medios podrían incluir cebadores adecuados, una ADN polimerasa adecuada y los cuatro 2'-desoxirribonucleósido trifosfatos (dA, dC, dG, dT), si la amplificación se va a realizar mediante el procedimiento de PCR. Por citar si la amplificación se va a realizar por un procedimiento que depende de la transcripción, tal como el procedimiento 3SR, los medios incluirán dos cebadores, al menos uno de los cuales, cuando se hace bicatenario, proporcionará un promotor, una ARN polimerasa capaz de transcribir a partir de dicho promotor, una transcriptasa inversa para funcionar en polimerización de ADN dirigida por ADN y dirigida por ARN iniciada por cebador y, posiblemente también, en la degradación de con RNasa H del ARN para liberar las hebras de ADN de los híbridos ADN/ARN, los cuatro ribonucleótido trifosfatos (A, C, G y U), y los cuatro 2'-desoxirribonucleósido trifosfatos. En otro ejemplo, si la amplificación se realiza mediante la reacción en cadena de la ligasa, los medios incluirá dos oligonucleótidos (ADN) y una ADN ligasa adecuada se unirá los dos si está presente una diana con la que ambos pueden hibrida adyacentes entre sí en orientación ligable.

Las sondas oligonucleotídicas estarán, preferentemente, marcadas. El marcador puede ser cualquiera de los diversos marcadores disponibles en la técnica para dichas sondas, incluidas, entre otras, 32p ; 35S ; biotina (con la que puede formar un complejo un resto generador de señal, unido o en complejo con avidina); un resto fluorescente; una enzima tal como la fosfatasa alcalina (que es capaz de catalizar una reacción cromogénica); digoxigenina, como se ha descrito anteriormente; o similares.

El análisis RFLP, análisis SSCP electroforético o análisis de secuenciación también se pueden usar para detectar un polimorfismo de ECA2.

También se ha proporcionado un procedimiento de tipaje de una secuencia diana específica del polimorfismo de la ECA2 en un ácido nucleico de la ECA2 derivado de un animal, que comprende las etapas de

(a) obtener mediante un procedimiento de amplificación de ácido nucleico diana aplicado al ADN de corazón o riñón, una cantidad analizable del ácido nucleico amplificado con una secuencia que es la de una subsecuencia (o la complementaria de una subsecuencia) de una región cadena arriba o cadena abajo de ECA2, incluyendo dicha subsecuencia un nucleótido en el que puede estar un polimorfismo de ECA2; y

(b) analizar (p. ej., en un ensayo de hibridación de la sonda de ácido nucleico que usan una sonda polinucleotídica), el ácido nucleico amplificado obtenido en la etapa (a) para determinar la base o bases en la posición del polimorfismo.

En una aplicación de los procedimientos de tipado de la invención, los procedimientos se aplican a un individuo para determinar si el individuo está en riesgo de desarrollar enfermedad de corazón o de riñón.

Las personas con enfermedad de las arterias coronarias y/o tras una cirugía de derivación tienen hipoxia cardíaca. También se conoce como aturdimiento cardíaco o hibernación cardíaca. Estos pacientes muestran pocos cambios estructurales en el corazón pero tienen la función cardíaca reducida. Es muy infrecuente tener la función cardíaca alterada en ausencia de cambios estructurales. En modelos de ratón de aturdimiento cardíaco o hipoxia, los animales tienen un fenotipo que simula de un modo preciso el de los ratones ECA2. Además, los inventores han demostrado que los marcadores de hipoxia están inducidos en los ratones deficientes en ECA2. En conjunto, los datos de los inventores muestran que estos ratones tienen la función cardíaca reducida debido a hipoxia crónica y, por tanto, son modelos de enfermedad de las arterias coronarias. Por tanto, los polimorfismos y/o reducción de la expresión o de la actividad de la ECA2 se pueden usar para diagnosticar este estado en seres humanos. Otro ejemplo es analizar si la función del corazón en pacientes con miocardiopatía dilatada y muestran que el desenlace de la enfermedad se asocia con polimorfismos de la ECA2. El incremento de la expresión y la actividad de la ECA2 se puede usar para tratar este estado.

Caracterización de ECA2 como un regulador negativo del RAS

ECA2 se mapea en un QTL asociado a la hipertensión en tres modelos de ratas de alta presión sanguínea y niveles de ECA2 se reducen en todas las razas de ratas hipertensivas. En ratones, la inactivación genética de ECA2 que usa recombinación homóloga da como resultado un incremento de los niveles del péptido de AngII en tejidos, regulación hacia arriba de genes de hipoxia en la disfunción cardíaca, y cardíaca severa.

La ablación de la expresión de ECA sobre un antecedente deficiente de *eca2* completamente abolía el fenotipo de insuficiente cardíaca de los ratones con inactivación única a *eca2*. Estos datos proporcionan un nuevo paradigma para la regulación del RAS e identificar ECA2 como un regulador negativo de RAS que controla la función cardíaca.

ECA2 y control de la presión sanguínea.

La mayoría de las enfermedades cardiovasculares son caracteres cuantitativos multifactoriales controlados por factores tanto genéticos como ambientales. Un factor principal para la enfermedad cardiovascular es el RAS. En contraste a ECA que se expresa de manera ubicua, el ECA2 recientemente identificado muestra la expresión específica de tejido. ECA2 regula los niveles endógenos de AngII, compitiendo con ECA por su sustrato de AngI y / o mediante la escisión de AngII para generar Ang1-7. Antes de esta invención, no se conocía nada sobre el papel *in vivo* de ECA2 en el sistema cardiovascular. ECA2 regula los niveles endógenos de AngII. También funciona como un regulador negativo del RAS.

En tres razas de rata diferentes que desarrollan hipertensión espontánea o inducida por dieta y enfermedad cardiovascular, ECA2 se mapea dentro de un QTL definido en el cromosoma X. En todas estas razas de ratas susceptibles a hipertensión, los niveles de ARNm y de proteína de ECA2 están regulados hacia abajo. El locus SS-X identificado en el análisis de QTL en ratas Sabra también se identifican como un locus que confiere resistencia a la carga de sal. La reducción en ECA2 *in vivo* en la raza sensible a la sal y la ausencia de cualquier alteración en su expresión en la raza resistente muestra que ECA2 confiere resistencia a los cambios de presión sanguínea inducidos por la dieta.

La posición del mapa y expresión reducida muestra que ECA2 es el gen que contribuye a QTL hipertenso sobre el cromosoma X. Además, el incremento de la expresión de AngI y AngII en ratones sin *eca2* confirman que ECA2 es un regulador del sistema RAS *in vivo*. Sin embargo, la pérdida de ECA2 en nuestros ratones no dieron como resultado ningún cambio directo en la presión sanguínea incluso cuando la función de ECA estaba bloqueada. Los cambios de la presión sanguínea solamente se producen cuando la disfunción cardíaca extrema estaba presente en los ratones mayos de mayor edad. Los factores genéticos que contribuyen a la hipertensión ellos mismos no alteran la presión sanguínea. En su lugar, estos QTL definen los determinantes individuales de la presión sanguínea, que de acuerdo con otros polimorfismos genéticos promueven el cambio en la presión sanguínea. Los inventores han identificado la asociación de los polimorfismos ECA2 con alta presión sanguínea en la población humana. De manera importante, los datos de los inventores muestran que ECA2 funciona como un regulador negativo del aumento de la presión sanguínea.

ECA2 y el control de la función cardíaca.

De manera inesperada, la pérdida de ECA2 en ratones da como resultado una disfunción profunda contráctil que conduce a una reducción intensa de la presión sanguínea sistémica en los ratones de mayor edad. De manera importante, esta disfunción cardíaca está completamente invertida mediante la rotura de ECA que sugiere que un producto catalítico de ECA desencadena una alteración contráctil en la ausencia de ECA2. dado que estos defectos de contracción se pueden producir en la ausencia de hipertrofia o cualesquiera cambios detectables en la presión sanguínea, los datos de los investigadores también proporcionan prueba genética de que el fenotipo de la enfermedad cardíaca regulado por RAS puede no estar relacionado de manera genética con sus efectos sobre la presión sanguínea e hipertrofia cardíaca.

Los inhibidores de ECA y bloqueadores del receptor de AngII se ha mostrado que tienen un papel cardioprotector en la insuficiencia cardíaca en seres humanos, implicando de este modo AngII en la enfermedad cardíaca. La abolición completa de la disfunción cardíaca en el doble mutante *ace/eca2* de los investigadores muestra que el RAS controla directamente la función cardíaca y que ECA2 es un regulador negativo crítico que antagoniza el RAS e insuficiencia cardíaca. Los experimentos de los investigadores sobre experimentos de rescate genéticos indican de una manera notable que es de hecho un producto de ECA que dirige la insuficiencia cardíaca, es decir, el incremento en AngII observado en los corazones de ratones sin *eca2* es causante de la disfunción cardíaca. Necesita determinarse si la inhibición farmacológica del receptor de AngII rescata los fenotipos cardíacos de ratones mutantes de *eca2*. De manera interesante, los resultados de los investigadores en moscas muestran que una mutación del elemento P asociada al homólogo de ACE, ACER, da como resultado un defecto grave y letal de morfogénesis del corazón (datos no mostrados) que muestran que las funciones de ACE/ECA2 en el corazón se han conservado a lo largo de la evolución.

El defecto en los corazones mutantes de *eca2* se caracteriza por la disfunción contráctil grave y regulación hacia arriba de los genes regulados por hipoxia con solamente ligera remodelación en los ratones de mayor edad, sin hipertrofia y sin evidencia de pérdida de miocitos. Estos parámetros fenotípicos y moleculares de corazones con

insuficiencia en ratones mutantes de *eca2* son diferentes de hipertrofia y cardiomiopatía dilatada. Bastante más intrigante, los corazones de mutantes *eca2* se parecen a la atrofia e hibernación cardíaca encontrado en los casos humanos de enfermedad arterial coronaria y en los casos de cirugía de desviación. En estas enfermedades humanas y en modelos animales de atrofia / hibernación cardíaca, condiciones hipóxicas crónicas conducen a cambios compensatorios en el metabolismo de miocitos, regulación hacia arriba de los genes inducidos por hipoxia, y función cardíaca reducida. Dado que ECA2 se expresa en el endotelio vascular, y no miocitos cardíacos, es probable que los efectos de ECA2 se confinen a la vasculatura. Por ejemplo, incrementos locales en AngII podrían conducir a la vasoconstricción que da como resultado hipoperfusión e hipoxia. También se ha mostrado que AngII provoca disfunción endotelial mediante la inducción de estrés oxidativo. Los mecanismos por los que se la pérdida de ECA2 puede dar como resultado la regulación hacia arriba de los genes inducibles por hipoxia necesita determinarse. De manera importante, los datos de los investigadores muestran que los polimorfismos de ECA2 provocan la patología de enfermedad cardíaca coronaria en seres humanos.

Preferentemente, la presente divulgación se define del siguiente modo:

Definición 1. Un procedimiento de tratar un estado de disminución de ECA2, que comprende administrar a un mamífero que tiene dicha afección una cantidad terapéuticamente eficaz de un agonista de ECA2.

Definición 2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el mamífero es un ser humano.

Definición 3. Un procedimiento de una cualquiera de las definiciones 1 o 2, en el que el estado disminuido de ECA2 está asociado con un trastorno seleccionado de un grupo que consiste en hipertensión, insuficiencia cardíaca congestiva, insuficiencia cardíaca crónica, insuficiencia cardíaca aguda, infarto de miocardio, arteriosclerosis e insuficiencia renal y enfermedad pulmonar.

Definición 4. Un procedimiento para terapia génica para un estado disminuido de ECA2, que comprende liberar una cantidad eficaz de un transgén que codifica una ECA2 en un órgano.

Definición 5. Un procedimiento de acuerdo con la definición 4, en el que el órgano afectado es el corazón o los riñones o los pulmones o los vasos sanguíneos.

Definición 6. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las definiciones 4 o 5, en el que el transgén de la ECA2 se administra al paciente en un vector de terapia génica.

Definición 7. El procedimiento de la definición 6, en el que el vector de terapia génica comprende un vector.

Definición 8. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las definiciones 4 a 7, en el que el paciente es un ser humano.

Definición 9. El procedimiento de una cualquiera de las definiciones 4 o 8, en el que el estado disminuido de ECA2 está asociado con un trastorno seleccionado de un grupo que consiste en hipertensión, insuficiencia cardíaca congestiva, insuficiencia cardíaca crónica, insuficiencia cardíaca aguda, infarto de miocardio, arteriosclerosis e insuficiencia renal y enfermedad pulmonar.

Definición 10. Un mamífero no humano que comprende el gen de la ECA2, en el que se ha alterado un alelo del gen.

Definición 11. Un mamífero no humano que comprende el gen que codifica la ECA2, en el que se han alterado ambos alelos.

Definición 12. Un mamífero no humano que comprende una mutación de ECA2 alterada, en el que la alteración tiene como resultado una mutación completa del gen que codifica la ECA2.

Definición 13. El mamífero no humano de cualquiera de las definiciones 10 a 12 que es un roedor.

Definición 14. El mamífero no humano de la definición 13, que es un ratón.

Definición 15. El mamífero no humano de las definiciones 10 a 14 caracterizado por hipertensión o defecto de la contractilidad cardíaca o defectos renales o mayor sensibilidad a la lesión pulmonar.

Definición 16. Un ácido nucleico que comprende una construcción defectiva en ECA2.

Definición 17. Un vector que comprende el ácido nucleico de la definición 16.

Definición 18. Una línea de células madres embrionarias murinas que comprende el ácido nucleico de la definición 17.

Definición 19. Un procedimiento de detección selectiva de compuestos que modulan la hipertensión y la contractilidad cardíaca y la insuficiencia renal y la insuficiencia pulmonar, que comprende introducir los compuestos en el mamífero no humano de cualquiera de las definiciones 11 a 14 y determinar el incremento o la disminución de la presión arterial y/o la contractilidad cardíaca y/o las funciones renales y/o la infección pulmonar.

Definición 20. Un procedimiento para la detección selectiva de un compuesto que es un agonista de la actividad de la ECA2, que comprende:

a. proporcionar: i) un preparado purificado que comprende ECA2, ii) un sustrato y iii) un compuesto de ensayo;

5 b. mezclar dicha ECA2 y dicho sustrato en condiciones tales que dicha ECA2 puede actuar sobre dicho sustrato para producir un producto, en el que dicha mezcla se realiza en presencia y ausencia de dicho compuesto de ensayo; y

c. medir directa o indirectamente la cantidad de dicho producto producido en presencia o ausencia de dicho compuesto de ensayo.

10 Definición 21. El procedimiento de la definición 20, en el que dicho sustrato es la angiotensina I o la angiotensina II.

Definición 22.- El procedimiento de la definición 20, en el que dicho producto comprende Ang1-9 o Ang1-7.

Definición 23. Un compuesto aislado de acuerdo con las definiciones 20 a 22.

Definición 24. El uso de un activador de la ECA2 como sustancia farmacéutica.

15 Definición 25. El uso de un activador de la ECA2 para el tratamiento de la enfermedad cardiovascular o la enfermedad renal o la enfermedad pulmonar.

Definición 26. El uso de un activador de la ECA2 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad cardiovascular o la enfermedad renal o la enfermedad pulmonar.

20 Definición 27. Un procedimiento de tratamiento médico de la enfermedad cardiovascular o la enfermedad renal o la enfermedad pulmonar en un mamífero, que comprende administrar al mamífero que necesite el tratamiento una cantidad eficaz de un activador de la ECA2.

Definición 28. El procedimiento de la definición 27, en el que el activador de la ECA2 se coadministra con un inhibidor de la ECA.

25 Definición 29. Una molécula de ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido de la ECA2, comprendiendo el ácido nucleico un polimorfismo de nucleótido cadena arriba o cadena abajo de la región de codificación del ácido nucleico de la ECA2, en el que el polimorfismo reduce la expresión de ECA2 en comparación con la ECA2 silvestre.

Definición 30. Una molécula de ácido nucleico aislado de acuerdo con la definición 1, en la que el polimorfismo se selecciona del grupo que consiste en al menos una de ECA2a- ECA2m.

Definición 31. Un procedimiento de detección un estado disminuido de ECA2 en un animal que comprende obtener una muestra de ADN del animal e identificar un ácido nucleico de la definición 29 o 30 en la muestra de ADN.

30 Definición 32. Un procedimiento para diagnosticar una enfermedad o una predisposición a una enfermedad caracterizada por un estado disminuido de ECA2 en un animal, que comprende identificar un ácido nucleico de la definición 29 o 30 en una muestra de ADN del animal.

Definición 33. Un procedimiento de acuerdo con la definición 31 o 32, que comprende determinar si el animal es homocigoto o heterocigoto para el polimorfismo del nucleótido.

35 Definición 34. Un procedimiento de una cualquiera de las definiciones 31 o 33, en el que el estado disminuido de ECA2 está asociado con una enfermedad cardiovascular o una enfermedad renal o enfermedad pulmonar seleccionadas de un grupo que consiste en hipertensión, insuficiencia cardíaca congestiva, insuficiencia cardíaca crónica, insuficiencia cardíaca aguda, infarto de miocardio, arteriosclerosis e insuficiencia renal y enfermedad pulmonar.

40 Definición 35. Un polinucleótido que comprende una secuencia se une específicamente a i); región cadena arriba o cadena abajo de una región de codificación del ácido nucleico de la ECA2, en la que la región está próxima a un polimorfismo de nucleótido que disminuye la expresión de la ECA2.

Definición 36. El polinucleótido de la definición 35, que comprende de 8 a 10, de 8 a 15, de 8 a 20, 8 a 25, de 25 a 50, de 50 a 75, de 50 a 100, de 100 a 200, de 200 a 500 o de 500 a 1.000 nucleótidos.

45 Definición 37. El polinucleótido de la definición 35 o 36, en el que el ácido nucleico se une específicamente próximo a uno de ECA2a-ECA2m en condiciones de hibridación de alta rigurosidad.

Definición 38. El polinucleótido de la definición 37, en el que las condiciones de hibridación rigurosas comprenden 0,1XSSC, 0,1% de SDS a 65 °C.

Definición 39. El polinucleótido de la definición 35, que comprende una secuencia complementaria a un polimorfismo de ECA2.

Definición 40. El polinucleótido de la definición 39, que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

- 5 a. 8-50 nucleótidos de una región cadena arriba o cadena abajo de la ECA2 que está próxima a un polimorfismo de nucleótido, en el que la secuencia incluye una de ECA2a-ECA2m y comprende toda o parte de una de las secuencias de la Figura 11.
- b. una secuencia que es complementaria a una secuencia especificada en (a); y
- 10 c. una secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos 70% con una secuencia en (a) o (b), en la que la secuencia que tiene identidad es capaz de hibridar con ECA2 en condiciones de hibridación de rigurosidad alta.

Definición 41. El polinucleótido de la definición 35, en el que el ácido nucleico es capaz de usarse como sonda en un ensayo de hibridación.

15 Definición 42. El polinucleótido de la definición 41, en el que la secuencia de ácido nucleico se marca de forma detectable.

Definición 43. El polinucleótido de la definición 42, en el que el marcador detectable comprende:

- a. un pigmento fluorogénico; y/o
- b. una modificación de biotilación; y/o
- c. un radiomarcador.

20 Definición 44. Un kit de genotipado de la ECA2 que comprende un agente de detección para detectar la presencia de un polimorfismo de ECA2 en una muestra de ácido nucleico derivado de un animal.

Definición 45. El kit de la definición 44, en el que el agente de detección comprende un ácido nucleico y/o una enzima de restricción.

25 Definición 46. El kit de la definición 44, que además comprende un contenedor de la muestra biológica para contener el agente de detección.

Definición 47. El kit de la definición 44, que comprende además una placa que tiene una pluralidad de pocillos y que tiene unidas a ellos sondas que tienen una secuencia de ácido nucleico que se une específicamente a una secuencia de ECA2 que incluye un polimorfismo de la ECA2.

30 Definición 48. El kit de la definición 44, que además comprende un agente de amplificación para amplificar el ácido nucleico.

Definición 49. El kit de la definición 48, en el que el agente de amplificación amplifica una región de ácido nucleico de la ECA2 próxima a un polimorfismo en un solo nucleótido de ECA2 del grupo de ECA2a-ECA2m.

35 Definición 50. El kit de la definición 48, en el que el agente de amplificación comprende un conjunto de cebadores, en el que cada cebador es un ácido nucleico que se unirá específicamente próximo a y/o causará la elongación a través de uno de ECA2a-ECA2m.

Definición 51. El kit de la definición 44 para detectar que el animal tiene, o está en riesgo, de una enfermedad de estado disminuido de la ECA2.

Definición 52. El kit de la definición 51, en el que la enfermedad comprende enfermedad cardiovascular o enfermedad renal o enfermedad pulmonar o que afecta a los vasos sanguíneos.

40 Definición 53. El kit de la definición 52, en el que la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en hipertensión, insuficiencia cardíaca congestiva, insuficiencia cardíaca crónica, insuficiencia cardíaca aguda, infarto de miocardio, arteriosclerosis e insuficiencia renal y enfermedad pulmonar.

Definición 54. Un procedimiento de genotipado de ECA2 de un animal, que comprende:

- 45 a. obtener una muestra de ácido nucleico de ECA2 derivado del animal, que incluye regiones cadena arriba y cadena abajo de la región de codificación de la ECA2; y
- b. detectar una región de un ácido nucleico de ECA2 que incluye un polimorfismo en un solo nucleótido de la ECA2.

Definición 55. El procedimiento de la definición 54, en el que el polimorfismo de nucleótido se selecciona del grupo que consiste en ECA2a-ECA2m.

Definición 56. El procedimiento de la definición 55, que comprende determinar si el animal es homocigoto o heterocigoto para el polimorfismo de la ECA2.

5 Definición 57. El procedimiento de la definición 56, en el que el animal es un ser humano y el genotipo de la ECA2 se usa para determinar si el animal tiene, o está en riesgo de sufrir, una enfermedad de estado disminuido de la ECA2.

Definición 58. El procedimiento de la definición 57, en el que la enfermedad comprende una enfermedad cardiovascular o enfermedad renal o enfermedad pulmonar o que afecta a los vasos sanguíneos.

10 Definición 59. El procedimiento de la definición 54, en el que el ácido nucleico se obtiene amplificando el ácido nucleico del animal.

Definición 60. El procedimiento de la definición 59, en el que el ácido nucleico se obtiene mediante amplificación con todo o parte del polinucleótido de cualquiera de las definiciones 7 a 15.

Definición 61. El procedimiento de la definición 54, en el que la etapa de detección comprende determinar la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico de la ECA2.

15 Definición 62. Un procedimiento de la definición 54, en el que la etapa de detección comprende poner en contacto el ácido nucleico con el polinucleótido de cualquiera de las definiciones 7 a 15 en condiciones de rigurosidad alta.

Definición 63. El procedimiento de la definición 62, en el que el polinucleótido hibridará de forma selectiva próximo a (i) una región de ácido nucleico de la ECA2 y que incluye un polimorfismo único distintivo de un polimorfismo de la ECA2.

20 Definición 64. El procedimiento de la definición 54, en el que la etapa de detección comprende:

a. realizar una digestión con endonucleasas de restricción del ácido nucleico, de modo que proporciona un digesto del ácido nucleico; y

b. poner en contacto el digesto con el polinucleótido.

25 Definición 65. El procedimiento de la definición 64, en el que la hibridación se produce durante o después de una amplificación por PCR y el análisis es un análisis de PCR "en tiempo real" o un análisis fluorimétrico.

Definición 66. El procedimiento de la definición 64, en el que la etapa de detección incluye el análisis por tamaño del ácido nucleico.

Ejemplos

ECA2 se mapea en un QTL sobre el cromosoma X en tres razas de ratas hipertensas

30 La hipertensión y la mayoría de las enfermedades cardiovasculares son multifactoriales por naturaleza y patogénesis de la enfermedad está influenciada por múltiples loci de susceptibilidad genética. En diversos modelos de ratas recombinantes, se han identificado QTL múltiples para hipertensión. Dado que ECA2 se mapea en el cromosoma X en seres humanos y un QTL se ha mapeado para el cromosoma X en varios modelos de ratas de hipertensión sin ningún gen candidato atribuido a él todavía, ECA2 puede ser un gen candidato para este QTL. Para facilitar el mapeo cromosómico de ECA2 de ratas, se clonó el ADNc de ECA2 de rata de longitud completa mediante la selección de una genoteca de ADNc de riñón de rata. ECA2 de rata es altamente homólogo con ECA2 humano y tiene un 32% de identidad y es un 42% similar a ECA humano y de ratón (Fig. 1a). ECA2 de tipo humano, el gen de rata está constituido por un único dominio de ECA con un sitio de unión a cinc conservado, un péptido de señal y un dominio de transmembrana (Fig. 1b). Similar al ser humano, ECA2 en ratón y rata se expresa de manera predominante en riñón y corazón, con una expresión débil en pulmón e hígado (Fig. 1c).

45 El mapeo del híbrido de radiación mostró que el gen ECA2 de rata se mapea en el cromosoma X con puntuaciones de LOD significativas para los marcadores *DXRat9*, *DXWox14*, *DXWox15* y *DXRat42*, colocando *eca2* entre *DXRat9* y *DXRat42* (Fig. 1d). El mapeo comparativo mostró que la posición del mapa de *eca2* se solapa con un intervalo QTL para la hipertensión identificado en ratas sensibles a la sal Sabra encontrado entre los marcadores *DXMgh12* y *DXRat8* (SS-X). Además, la región de *eca2* cromosómica se mapea en el intervalo B P3 QTL definido en ratas espontáneamente hipertensas propensas a apoplejía (SHRSP), y un BB.Xs QTL hipertenso previamente identificado sobre el cromosoma X de ratas hipertensas espontáneas (SHR) mediante análisis congénico (Fig. 1d). De este modo, ECA2 se mapea en un QTL sobre el cromosoma X de rata identificado en tres modelos separados de hipertensión espontánea e inducida por la dieta.

50

Regulación por disminución de la expresión de ECA2 en ratas hipertensas

Dado que el riñón es un sitio principal de regulación de la presión sanguínea, se determinaron los niveles de expresión de ECA2 en los riñones de tres razas de ratas hipertensas. Los niveles de ARNm de ECA2 se midieron inicialmente en los riñones de las ratas hipertensas sensibles a sal Sabra (SBH/y) y ratas Sabra normotensas (SBN/y) de control resistentes a sal. La carga de sal (con sal DOCA) no tenía efecto sobre la expresión de ARNm de ECA2 en ratas SBN/y normotensas. De manera intrigante, en las ratas SBH/y, la carga de sal y el desarrollo de hipertensión estaban asociados a una reducción significativa de la expresión de ARNm de ECA2 cuando se compara con las ratas SBN/y normotensas (Fig. 2a). Hay que hacer notar que el ARNm de ECA2 también era menor en la dieta regular de alimentación de SBH/y cuando se compara con los controles SBN/y alimentados con una dieta similar. Este último hallazgo es consistente con la diferencia de 10 - 20 mmHg en la presión sanguínea observada entre ratas SBH/y y SBN/y alimentadas con dieta normal.

Para medir los niveles de proteína de ECA2, se generó un antisuero de conejo específico de ECA2 (aa206 - aa225 de ECA2 de ratón), que reacciona de manera cruzada con ECA2 tanto de ratón como humano (no mostrado). En línea con la expresión de ERNm de ECA2 disminuida, la expresión de proteína de ECA2 se redujo de manera notable en los animales SBH/y que se alimentaron con dieta normal (Fig. 2b). El incremento en la presión sanguínea de ratas SBH/y después de una dieta de 4 semanas de sal DOCA correlacionada además disminuyó la expresión de proteína de ECA2 (Fig. 2b). La carga de sal no desencadenó un incremento en la presión sanguínea ni alteraba la expresión de ECA2 en ratas de control SBN/y resistentes a sal (Fig. 2b). Los niveles de proteína de ECA2 también disminuyeron de manera significativa en los riñones de animales SHRSP y SHR espontáneamente hipertensos cuando se compara con sus controles WKY (Fig. 2b). Además, los niveles de ARNm de ECA2 en ratas SHRSP y SHR hipertensas (no mostrado). La clonación y secuenciación de la región codificante de ECA2 en las razas de ratas hipertensas no reveló ningún cambio de secuencias, indicando que la reducción de la expresión de ECA2 probablemente se produce a partir de polimorfismos que controlan la expresión del gen de ECA2. La posición del mapa y expresión reducida de ECA2 en tres razas diferentes de ratas indican que *eca2* es un gen candidato fuerte para este QTL hipertenso sobre el cromosoma X. Además, la expresión reducida de ECA2 en las tres razas de ratas hipertensas sugirieron que esta enzima funciona como un regulador negativo.

Clonación de ECA2 de ratón y generación de ratones con inactivación de ECA2

Para validar la candidatura de ECA2 como un QTL y para ensayar si ECA2 tiene de hecho, un papel esencial en la fisiología cardiovascular y la patogénesis de enfermedades cardiovasculares, se clonó el gen ECA2 de ratón (Fig. 1a). Similar a *ECA2* humano, *ECA2* murino también se mapea para el cromosoma X (no mostrado contiene un único dominio de ECA (Fig. 1b), y de manera predominante se expresa en riñones y corazón tl (Fig. 1c). De manera interesante, los investigadores observaron dos isoformas para ECA2 en ratón en todos los tejidos positivos. La sobreexpresión de ECA2 murino en COS mostró que ECA2 escinde AngI en Ang1-9 (no mostrado) indicando que ECA2 murino tiene la misma especificidad bioquímica que ECA2 humano. Para determinar el papel *in vivo* de ECA2, el gen *eca2* en ratón se interrumpió reemplazando el exón 9 con el gen de resistencia a neomicina suprimiendo de manera eficaz el dominio catalítico de unión a cinc Procedimientos y Fig. 3a). Se usaron dos líneas de células ES mutadas en el locus *eca2* para generar ratones quiméricos, que se retrocruzaron con C57BL/6 para obtener la transmisión germinal. Ambas líneas de ratón mostraron fenotipos idénticos. La transmisión de la mutación de *eca2* se confirmó mediante análisis de transferencia de Southern (Fig. 3b). la mutación nula de *eca2* se verificó mediante la ausencia de transcripciones de ARNm de ECA2 y análisis de transferencia de Northern (no mostrado) y de Western (Fig. 3c). La expresión de ARNm de ECA en los riñones y corazones no se alteró en ratones mutantes *eca2* (Fig. 3d).

Dado que el gen ECA2 se mapea en el cromosoma X, toda la prole de machos eran o bien no mutantes (*eca2*-Y) o de tipo salvaje para ECA2 (*eca*) mientras que las hembras eran o bien de tipo salvaje (*eca2*+/+), heterocigóticas (*eca2*+), u homocigóticas (*eca2*-/-) para la mutación *eca2*. Se debe observar que en todos los experimentos descritos más adelante, hembras *eca2*+ se comportaron de manera similar a las hembras *eca2* y los machos *eca2* indican que no existe un efecto aparente de heterocigosis de *eca2*. Los ratones sin ECA2 no nacieron con la frecuencia de las leyes de Mendel esperada, aparecieron sanos, y no mostraron ninguna alteración detectable global en todos los órganos analizados. Además, al contrario que los ratones macho *ace*^{-/-} que muestran una fertilidad significativamente reducida, tanto los machos como las hembras sin *eca2* son fértiles.

Presión sanguínea ratones mutantes *eca2*

Se ha mostrado previamente que los ratones mutantes *eca2* muestran reducción de presión sanguínea y patología renal. Por lo tanto, se ensayó primero si la pérdida de la expresión de ECA2 afecta a la homeostasis de la presión sanguínea y / o desarrolló o función renal. De manera intrigante, la pérdida de ECA2 no dio como resultado la reducción de la presión sanguínea en ratones machos de 3 meses de edad *eca2*-Y (Fig. 4a) o hembras *eca2* (no mostrado) cuando se compara con sus hermanos de camada de control. Dado que fue posible que ECA puede compensar la pérdida de ECA2, los inventores trataron ratones deficientes en *eca2* con captopril que bloquea ECA pero no la función ECA2. Sin embargo, la inhibición *in vivo* de ECA con captopril redujo la presión sanguínea de ratones macho *ace*-Y a un grado similar como se observó en los hermanos de camada de tipo salvaje tratados con captopril (Fig. 4a). De este modo, incluso en un escenario de inhibición de ACE, la pérdida de ECA2 no tiene

efecto directo evidente sobre la homeostasis de presión sanguínea en este antecedente de ratón definido. Basándose en los datos de los investigadores de RAS QTL, los investigadores retrocruzaron sus ratones mutantes con otros antecedentes de ratón para mostrar el papel de ECA2 en el control de presión sanguínea similar a los antecedentes genéticos en seres humanos.

5 Función renal alterada en ratones mutantes *eca2*

Dado que ECA2 se expresa en gran medida en los riñones, los inventores examinaron la morfología y función renal. Todos los ratones de 3 meses y 6 meses de edad machos *eca2^{+/y}* y hembras *eca2^{-/-}* mostraron morfología renal normal y ningún cambio aparente en cualesquiera ultraestructuras de riñón (Fig. 4b). Las estructuras celulares y renales normales del sistema ductal y los glomérulos también se confirmaron usando morfometría de sección en serie.

Los riñones de ratones deficientes en *eca2* machos y los hermanos de cama de la misma edad se examinaron usando microscopía óptica (tinción con PAS) y electrónica (TEM) a los 3 y 12 meses de edad. La gravedad de esclerosis para cada glomérulo se clasificaron entre 0 y 4+ de una manera ciega como sigue: 0 representa sin lesión, 1+ esclerosis de < 25% del glomérulo, mientras 2+, 3+, y 4+ representan esclerosis de 25 a 50%, 50 a 75%, y > 75% del glomérulo, respectivamente. A los 3 meses de edad, no existía evidencia de cambios patológicos en los riñones de los ratones deficientes en *eca2*. Sin embargo a los 12 meses de edad, la microscopía óptica reveló un incremento de esclerosis / lesión glomerular: $1,45 \pm 0,2$ vs $0,25 \pm 0,06$; $n = 6$; $p < 0,01$. La microscopía electrónica mostró un aumento en la deposición de fibrilas de colágeno en el mesangio renal y una membrana basal engrosada. La exposición crónica a niveles elevados de AngII conduce a hipoxia y estrés oxidante en los riñones de ratones deficientes en *eca2*. El análisis de transferencia de Western reveló una expresión aumentada de factor-1alfa (HIF1- α) inducible por hipoxia y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en los riñones de los ratones deficientes en *eca2*. La medición de productos de peroxidación de lípidos mostró un grado aumentado de estrés oxidante en los ratones deficientes en *eca2* a los 6 meses de edad: hexanal (1001 ± 161 vs 115 ± 13 nmol/g; $n = 5$; $p < 0,01$) y malondialdehído ($48 \pm 6,4$ vs $24,3 \pm 2,8$ nmol/g; $n = 5$; $p < 0,01$).

Estos resultados muestran que la pérdida de ECA2 conduce a una señalización de angiotensina II potenciada de una manera específica de tejido que por último media en los efectos perjudiciales en los riñones de los ratones deficientes de *eca2*. La disminución de la expresión de ECA2 juega un papel patológico importante en la enfermedad renal.

Pérdida de ECA2 da como resultado un defecto grave en la función cardíaca

La inhibición farmacológica de ECA o receptores AngII sugirió un papel RAS en la regulación de la función cardíaca e hipertrofia cardíaca. Sin embargo, ni los ratones sin *eca* ni *angiotensinógeno* desarrollaron ninguna enfermedad cardíaca manifiesta. Dado que ECA2 se expresa en gran medida en la vasculatura del corazón, se analizaron los corazones de ratones deficientes en *eca2*. Los corazones de ratones mutantes de *eca2* muestran un ligero adelgazamiento de la pared del ventrículo izquierdo y un incremento de las dimensiones de la cámara (Fig. 5a). El adelgazamiento de la pared ventricular izquierda anterior (AW) e incremento de la dimensión telediastólica del ventrículo izquierdo (DTDVI) en corazones deficientes en *eca2* también se puede observar mediante ecocardiografía (Tabla 1). Estos cambios estructurales se observan principalmente en ratones macho de 6 meses de edad. Sin embargo, las relaciones de peso corporal corazón eran comparables entre ratones de 3 meses de edad (no mostrado) y de 6 meses de edad *eca2^{-/-}* y *eca2^{+/y}* (Fig. 5a,b). La ecocardiografía también mostró que la masa del ventrículo izquierdo (LVM) y relaciones de LVM/peso corporal eran normales (Tabla 1). Los cambios estructurales y bioquímicos característicos de la cardiomiopatía dilatada no se observaron dado que no existía indicación de fibrosis cardíaca intersticial (Fig. 5c,d) ni cambios prototípicos en ANF, BNP, α -MHC, b-MHC, y la expresión del gen de actina del músculo esquelético (no mostrado). Además, los cardiomiocitos individuales de ratones sin ECA2 no mostraron evidencia de hipertrofia y no se observó ninguna evidencia de apoptosis de cardiomiocitos alterada en ratones sin ECA2 como se detectó mediante la tinción de TUNEL (no mostrado). De este modo, a pesar de la suave dilatación de los corazones en los ratones sin ECA2 de 6 meses de edad, no había evidencia de hipertrofia cardíaca o cardiomiopatía dilatada.

De manera interesante, la determinación de la función cardíaca mediante ecocardiografía reveló que todos los ratones macho *eca2^{-/-}* y hembras *eca2^{-/-}* muestran una insuficiencia cardíaca contráctil grave como se determina por el acortamiento fraccional disminuido (FS), y la velocidad disminuida de acortamiento de fibras diferencial (Tabla 1 y Fig. 6a,b). La disminución en la función se encontró que era más grave en los ratones machos y hembras de 6 meses de edad cuando se compara con los ratones de la misma edad de 3 meses de edad, que sugiere una progresión en el fenotipo (Tabla 1). Consistente con la disminución de la contracción cardíaca, los ratones de 6 meses de edad *eca2^{-/-}* mostraron una presión sanguínea reducida (Fig. 6c), una característica no encontrada en hembras de la misma edad *eca2^{-/-}* y machos de 3 meses de edad, sugiriendo que la reducción en la presión sanguínea puede ser el resultado de la disfunción cardíaca grave y no un efecto directo de la pérdida de ECA2 sobre la presión sanguínea sistémica. Estos resultados sorprendentes muestran que ECA2 es un regulador negativo crítico de la contracción del corazón.

Para confirmar los defectos ecocardiográficos en la función cardíaca, las mediciones hemodinámicas invasivas se realizaron en ratones sin *eca2*. De manera importante, las mediciones hemodinámicas mostraron que dP/dT-max y dP/dT-min se redujeron de manera notable en los ratones mutantes *eca2* (Tabla 2), indicando alteración grave de la función cardíaca contráctil. La pérdida de ECA2 también dio como resultado una disminución significativa en las presiones ventriculares y aórticas consistentes con las reducciones observadas en la contracción cardíaca (Tabla 2). De manera notable, los datos establecen que los defectos en la contracción cardíaca de los ratones mutantes de *eca2* se produce en ausencia de cualquier hipertrofia cardíaca manifiesta y puede estar no acoplada genéticamente con las alteraciones de la presión sanguínea.

Regulación por incremento de los genes inducibles por hipoxia en ratones sin *eca2*

La disfunción contráctil grave de y dilatación suave en la ausencia de hipertrofia o fibrosis cardíaca en ratones sin *eca2* se parece a la atrofia e hibernación cardíaca en modelos de seres humanos y de animales. La atrofia e hibernación cardíaca son respuestas adaptativas a la hipoxia crónica tal como enfermedad arterial coronaria o después de la cirugía de desviación. Dado que ECA2 se expresa en gran medida en las células endoteliales vasculares pero la contracción se controla por los cardiomiocitos, se especuló la pérdida de ECA2 puede dar como resultado hipoxia cardíaca. Por lo tanto los cambios en los niveles de expresión de los genes inducibles por hipoxia tales como BNIP325 y PAI-1 se analizaron mediante transferencia de Northern. En los corazones de ratones sin *eca2*, la expresión de ARNm de BNIP3 y PAI-1 se regularon hacia arriba de manera notable cuando se compara con los hermanos de camada de tipo salvaje (Fig. 7a). De este modo, la pérdida de ECA2 da como resultado la inducción de un perfil de expresión de gen regulado por hipoxia.

Aumento de los niveles de Angiotensina II en tejidos de ratones sin *eca2*

Dado que las funciones de ECA2 como una carboxipeptidasa, que se escinde en un único resto de AngI, para generar Ang1-9, y un único resto forma AngII para generar Ang1-7, se propuso la hipótesis que ECA2 puede funcionar como un regulador negativo del RAS compitiendo con ECA para el sustrato AngI y / o que escinde e inactiva AngII. Si es correcto, la pérdida de ECA2 debe incrementar los niveles AngII *in vivo*.

Usando los radioinmunoensayos, los niveles de AngII se encontraron de hecho que estaban incrementados de manera significativa en los riñones y corazones de ratones mutantes de *eca2* (Fig. 7b). Además, un incremento en AngI se observó también en la (Fig. 7b) consistente con AngI que es un sustrato de la acción de ECA2 *in vivo*. No se encontraron diferencias en los niveles de ARNm de ECA en los corazones y riñones de ratones mutantes de *eca2* cuando se compara con los controles que indican que el incremento de los niveles en los tejidos de AngII no se debían a un incremento de la expresión de ECA (Fig. 3d). Estos datos muestran que ECA2 funciona como un regulador negativo del RAS y que controla los niveles endógenos de AngII.

Ablación de la expresión de ECA en ratones deficientes en ratones deficientes en *eca2* –rescata la insuficiencia cardíaca

Si el fenotipo en los corazones de ratones mutantes *eca2* era debido al incremento en los niveles de AngII, la ablación genética de ECA en combinación con la interrupción de ECA2 puede servir para reducir los niveles de AngII rescate del fenotipo observado en los ratones mutantes de ECA2. Para ensayar esta idea, se generaron los ratones doble mutantes *ace/eca2*. Estos ratones doble mutantes nacieron a la relación mendeliana esperada y parecían sanos. La presión sanguínea (Fig. 8a) y los defectos renales (no mostrado) en los ratones sin doble *ace-eca2* eran similares a la de los ratones de una sola mutación *ace*. No se estableció la fertilidad de los ratones doble mutante *ace- eca2* no se estableció. De este modo, la pérdida de ECA y ECA2 no provoca ninguna enfermedad aparente además de la observada en ratones de una sola mutación *ace*.

Dado que la función cardíaca de los ratones con inactivación de ECA no se había reseñado anteriormente se analizaron primero los parámetros cardíacos en estos ratones. En los ratones *ace^{-/-}*, los corazones son histológicamente normales (no mostrado) y no se pudo detectar ningún defecto en la función cardíaca ningún defecto a los 6 meses de edad (Fig. 8b,c). De manera importante, la ablación de la expresión de ECA sobre un antecedente mutante *eca2* abolía completamente el fenotipo de insuficiencia de ratones inactivados una sola vez *eca2* (Fig. 8b,c). Además, usando ecocardiografía, todas las funciones cardíacas de los ratones doble mutantes de la misma edad de 6 meses de edad *ace- eca2* eran comparables con la de sus hermanos de camada de una sola mutación y de tipo salvaje *eca* (Tabla 1). El reestablecimiento de las funciones cardíacas se produjo en los ratones doble mutantes *ace-eca2* tanto machos como hembras. Estos datos genéticos muestran que la expresión de ECA se requiere y es necesaria para desencadenar la insuficiencia cardíaca contráctil en la ausencia de ECA2. De manera importante, no existe ninguna diferencia en la presión sanguínea entre los ratones *eca* e inactivados *ace/eca2* (Fig. 8a), implicando además que la reducción de la presión sanguínea en ratones macho de mayor edad *eca2* se debe a la disminución dramática en la función cardíaca.

ECA2 controla negativamente la lesión pulmonar

El síndrome de insuficiencia respiratoria de adultos (ARDS) es una forma grave de lesión pulmonar aguda y tiene unas tasas de mortalidad de 40 - 70% incluso cuando está disponible el cuidado intensivo. Trauma, sepsis grave (infección sistémica), neumonía difusa y choque son las causas más principales de ARDS, y entre ellas la lesión

pulmonar inducida por ácido es una de las causas más comunes. Los mecanismos potenciales que provocan la lesión pulmonar asociada a aspiración incluyen daño inducido por HCl a la membrana alveolar - capilar, y adhesión, activación y secuestro de neutrófilos polinucleares (PMN), que da como resultado edema pulmonar y el deterioro de intercambio de gas. El tratamiento para ARDS consta de ventilación mecánica y continuación del tratamiento de la enfermedad o lesión inductora. El tratamiento soporte que usa fármacos novedosos que protegen el pulmón del daño de la membrana alveolar capilar adicional conservaría la función pulmonar de los pacientes de ARDS con el fin de tratar la precipitación de enfermedad o lesión, que conduce a una disminución en la tasa de mortalidad de ARDS.

Dado que ECA2 se expresa en pulmones, los inventores ha determinado si la pérdida de ECA2 tiene algún papel en las lesiones pulmonares agudas. La Figura 9 muestra los cambios en la elasticidad de los pulmones (EL) en ratones tratados con HCl y de control durante un período de 3 horas. Después de la administración de HCl, los ratones de tipo salvaje sobrevivieron más de 4 horas, mientras los ratones con inactivación de ECA2 murieron en 2 - 3 horas. El reflejo de la diferencia de ratones sobrevivientes, con inactivación de ECA2 mostró una respuesta severa significativamente en la elasticidad de los de los pulmones que los ratones de tipo salvaje. De este modo, los ratones inactivados mostraron una respuesta severa más significativa en la elasticidad de los pulmones que los ratones de tipo salvaje. De este modo, ECA2 juega un papel significativo en la protección de los pulmones de la lesión aguda inducida por ácido. De este modo, la potenciación de la función y / o expresión de ECA2 es una diana novedosa y no anticipada para el tratamiento de ARDS y enfermedad pulmonar.

Procedimientos

Clonación de mapeo de ECA2 de rata y de ratón y QTL cromosómico.

Se clonó ECA2 murino a partir de una base de datos de propiedad de EST. Usando una sonda ECA2 de ratón, los investigadores seleccionaron después un ADNc de riñón de rata (invitrogen) para obtener un ADNc de rata de longitud completa como se determina mediante la secuenciación de ADN. Para el mapeo cromosómico, se usó una sonda cromosómica específica de ADNc de ECA2 de rata para seleccionar una genoteca PAC de rata (RPCI- 31, Research Genetics), identificando dos clones positivos (6M6 y 125K9).

Las secuencias de extremo de estos clones se determinaron y se diseñaron cebadores específicos de ratas (mc2L: 5'- TCAATTTACTGCTGAGGGGG-3', mc2R: 5'-GAGGGATAACCCAGTGCAAA- 3') para determinar la posición en el mapa cromosómico de ECA2 en rata mediante selección de un panel híbrido de radiación (RH07.5, Research Genetics). Se obtuvieron ratas SHR y control WKY de Harlan y se mantuvieron en las instalaciones de animales del Instituto de Cáncer de Ontario de acuerdo con las directrices institucionales. Los tejidos de ratas SHRSP fueron proporcionados amablemente por el Dr. Detlev Ganten, Alemania. Ratas Sabra resistentes a sal y sensibles a sal se desarrollaron y se mantuvieron en la instalación de animales del Centro Médico de Barzilai de la Universidad de Ben-Gurion, Israel. El tratamiento de sal Doca era como se ha descrito anteriormente.

Análisis de Expresión. Se preparó el ARN total a partir de riñones de rata que usa agente de trire. 20 mg de ARN se resolvió sobre un gel de formamida al 0,8%. Se transfirió a membrana de nylon (Amersham), y se sondó con una sonda de ADNc de ECA2 parcial de rata (9-1). La sonda de acción β -y transferencias de Northern de tejidos múltiples se compararon en Clontech. Para el análisis de western, se homogeneizaron los riñones en tampón de lisis (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 20 mM EDTA, y 1% triton-X 100) complementado con "cóctel inhibidor de proteasa completo (Roche) y 1 mM Na_3VO_4 - 100 mg de proteína se resolvió mediante SDS-PAGE sobre gel de 8% tris-glicina. Se obtuvo ECA2 inmuno-suero a partir de conejos inmunizados con un péptido específico de ratón de ECA2 DYEAEAGADGYNRNQLIED. El suero se purificó por afinidad con el péptido de inmunización que usa el kit unido a sulfuro (Pierce). Se usó un anticuerpo comercialmente disponible de β como control de carga (Santa Cruz).

Generación de ratones mutantes de ECA2. Se construyó un vector de dirección (brazo corto de 559 pares de bases, y un brazo largo de 8,1 kilobases) usando el vector pKO ScramblerNTKV-1907 (Stratagene). Una parte del ADN genómico de la *eca2* que contiene los nucleótidos +1069 a +1299 se reemplazó con el casete de resistencia a neomicina en la orientación antisentido. La construcción de dirección se sometió a electroporación en células E14K ES y la selección de clones ES recombinantes homólogos positivos se realizó mediante transferencia de tipo Southern de ADN genómico digerido con Ncori hibridado con las sondas flanqueantes en 5' y en 3'. Se inyectaron dos líneas celulares independientes *eca*^{-/-} ES en blastocitos derivados de C57BU6 para generar ratones quiméricos, que se retrocruzaron con ratones C57BU6. Dos líneas celulares ES proporcionaron transmisión de línea germinal independiente. Los datos reseñados en este manuscrito son consistentes con las dos líneas mutantes de ratón. La ablación de la expresión de ECA2 se confirmó mediante RTPCR, análisis de transferencia Northern y Western. Solamente los ratones hermanos de camada se usaron para todos los experimentos. La histología de todos los tejidos, ensayos de apoptosis, serología de sangre, y morfometrías de riñón eran como se ha descrito. Los ratones mutantes de ECA completos se han descrito previamente y se obtuvieron de los Jackson Laboratories. Se mantuvieron los ratones en las instalaciones de animales del Ontario Cancer Institute de acuerdo con las directrices institucionales.

Morfometría del corazón, ecocardiografía, hemodinámica y mediciones de la presión arterial. Para la morfometría de corazón, se profundieron los corazones con formalina al 10% a 60 mmHg y posteriormente se

introdujeron en parafina. Se determinó la fibrosis intersticial de miocardio mediante morfometría cuantitativa que usa el análisis de imagen asistida por ordenador con sustracción de color que usa el kit Image Processing Tool versión 2.5 acoplado al software Photoshop 6.0. Se usaron las secciones teñidas con rojo Picro-Sirius para calcular fibrosis intersticial como la relación de las áreas con tinción PSR positiva comparado con el campo visual completo. Las determinaciones ecocardiográficas se realizaron como se describe³² usando hermanos de camada de tipo salvaje y mutantes. Se anestesiaron los ratones con isoflourano/oxígeno y se examinaron mediante ecocardiografía transtorácica usando un Acuson® Sequoia C256 equipado con un transductor lineal 15MHz. El AF se calculó como: $AF = [(DTD - DTS)/DTD]*100$. El Vcfc se calculó como el tiempo de AF/expulsión corregido para el tiempo cardíaco. Las mediciones hemodinámicas se realizaron como se ha descrito. En resumen, se anestesió a los ratones y la arteria carótida derecha se aisló con un catéter 1,4 French Millar (Millar Inc., Houston) conectado a un amplificador (TCP-500, Millar Inc.). Después de la inserción del catéter en la arteria carótida, se introdujo el catéter en la aorta y después en el ventrículo izquierdo para registrar las presiones aórticas y ventriculares. Los parámetros medidos y analizados fueron el ritmo cardíaco, la presión aórtica, la presión sistólica ventricular izquierda (VI), la presión diastólica del VI y las primeras derivadas máximas y mínimas de la presión VI (+dP/dtmax y dP/dtmax, respectivamente). La medición de la presión arterial en el manguito en la cola se realizó usando un sistema de análisis de la presión arterial Usitech BP- 2000 fabricado por Visitech Systems (Apex, NC). Para el tratamiento con captoprilo se añadió al agua de bebida 400mg/l de captoprilo (Sigma) durante dos semanas antes de la medición de la presión arterial.

Niveles del péptido de angiotensina en tejidos. Se homogeneizaron corazones y riñones sobre hielo en etanol al 80% /HCl 0,1N que contiene los inhibidores de la peptidasa descritos anteriormente, incluidos fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, 100 mM). Se centrifugaron los homogeneizados de proteína a 30.000 g durante 20 minutos, se decantaron los sobrenadantes, y se acidificaron con 1% (v/v) de ácido heptafluorobutírico (HFBA, Pierce, Rockford, IL). Se concentró el sobrenadante hasta 5 ml sobre una centrífuga de vacío Savant (Savant, Farmingdale, NY) y los extractos concentrados se aplicaron a Sep-Paks activado, se lavaron con 0,1% de HFBA, y se eluyeron con 5 ml de metanol al 80% / 0,1% de de HFBA. Se realizó el análisis mediante radioinmunoensayo del contenido en péptido de angiotensina en los extractos de los tejidos de corazón y riñón. Los límites de detección para los RIA de la Ang II y la Ang I eran 0,5 fmol/tubo y Ang I 5 fmol/tubo, respectivamente.

Modelo de lesión de pulmón aguda. En este estudio se usaron ratones defectivos en ECA2 y sus hermanos de camada (8 - 12 semanas de edad). Un minuto antes de la exposición de aspiración, se administraron dos inhalaciones profundas (3 veces por volumen) para normalizar el historial del volumen y se realizaron mediciones como datos iniciales. Los ratones anestesiados y con ventilación mecánica recibieron inyección intratraqueal de 2 ml/kg de HCl (pH = 1,5), seguido de un bolo de aire. En el grupo control, los ratones recibieron inyección de solución salina o ninguna inyección. En todos los grupos, se realizaron mediciones a intervalos de 30 minutos durante 3 horas. Para determinar fisiológicamente la lesión pulmonar, se evaluó la elasticidad pulmonar (EL; una recíproca de la distensibilidad del pulmón) midiendo la presión prevista traqueal, flujo, y volumen. La EL se calculó dividiendo la presión prevista traqueal por el volumen. Los cambios en la EL reflejan alteraciones en el parénquima de pulmón y entumecimiento de los pulmones.

La presente invención se ha descrito con detalle y haciendo referencia particular a las realizaciones preferidas, no obstante, el experto en la técnica entenderá que se pueden realizar cambios sin desviarse del espíritu y el alcance de la invención. Por ejemplo, cuando la solicitud se refiere a proteínas, es evidente que a menudo se pueden usar péptidos y polipéptidos. Del mismo modo, cuando se describe un gen en la solicitud, es evidente que a menudo se pueden usar moléculas de ácido nucleico o fragmentos de gen.

Referencias

Yusuf, S., Reddy, S., Ounpuu, S., & Anand, S. Global burden of cardiovascular diseases Part I: General considerations, the epidemiologic transition, risk factors, and impact of urbanization. *Circulation* 104, 2746 - 2753 (2001).

Carretero, O.A., & Oparil, S. Essential hipertensión Part I: Definition and etiology. *Circulation* 101, 329 - 335 (2000).

Jacob, H.J. Physiological genetics: Application to hipertensión research. *Clin. Exp. Pharm. Phys.* 26, 530 - 535 (1999).

Rapp, J.P. Genetic analysis of inherited hipertensión in the rat. *Physiol. Rev.* 80, 135-172 (2000).

Stoll, M. et al. A genomic-systems biology map for cardiovascular function. *Science* 294, 1723 - 1726 (2001).

Corvol, P., Williams, T.A. in *Handbook of Proteolytic Enzymes* (Barrett, A.J., Rawlings, N.D., and Woessner, J.F., eds) pp. 1066 - 1076. (Academic Press, London, 1998)

Skeggs, L.T., Dorer, F.E., Levine, M., Lentz, K.E., & Kahn J.R. The biochemistry of the renina - angiotensina system. *Adv. Exp. Med. Biol.* 130, 1 - 27 (1980).

- Krege, J.H. et al. Male-female differences in fertility and presión sanguínea in ACE-deficient mice. *Nature* 375, 146 - 148 (1995).
- Esther, C.R. et al. Mice lacking angiotensin-converting enzyme have low blood pressure, renal pathology, and reduced male fertility. *Lab Invest.* 74, 953 - 965 (1996).
- 5 Wuyts, B., Delanghe, J., & De Buyzere, M.. Angiotensina I-converting enzyme insertion/deletion polymorphism: clinical implications. *Acta Clin. Belg.* 52, 338 - 49 (1997).
- Elkind, M.S., & Sacco, R.L. Stroke risk factors and stroke prevention. *Semin. Neurol.* 18, 429 - 440 (1998).
- Hollenberg, N.K. Angiotensina converting enzyme inhibition and the kidney. *Curr Opin. Cardiol.* 3(Suppl 1), S19-29 (1988).
- 10 Garg, R., & Yusuf, S. Overview of randomized trials of angiotensin-converting enzyme inhibitors on mortality and morbidity in patients with Heart failure. *JAMA.* 273, 1450-1456 (1995).
- Tipnis, S.R. et al. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expresión as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J. Biol. Chem.* 275, 33238 - 33243 (2000).
- 15 Donoghue, M. et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ECA2) converts angiotensin to angiotensin 1-9. *Circ. Res.* 87, e1-e8 (2000)
- Yagil C. et al. Role of chromosome X in the Sabra rat model of salt-sensitive hypertension. *Hypertension* 33 (part II), 261 - 265 (1999).
- Hilbert, P. et al. Chromosomal mapping of two genetic loci associated with blood-pressure regulation in hereditary hypertensive rats. *Nature* 353, 521 - 529 (1991).
- 20 Kloting, I., Voigt, B., Kovacs, P. Metabolic features of newly established congenic diabetes-prone BB.SHR rat strains. *Life Sci.* 62, 973 - 979 (1998).
- Laragh, J.H. Renovascular hypertension: a paradigm for all hypertension. *J. Hipertensión* 4(suppl. 4), S79-S88 (1986).
- Yagil, C. et al. Development, genotype and phenotype of a new colony of the Sabra hypertension prone (SBH/y) and resistant (SBN/y) rat model of salt sensitivity and resistance. *J. Hypertension* 14, 175 - 82 (1996).
- 25 Tanimoto, K. et al. Angiotensinogen-deficient mice with hypotension. *J. Biol. Chem.* 269, 31334-31337 (1994).
- Kloner, R.A., Bolli, R., Marban, E., Reinlib, L., & Braunwald, E. Medical and cellular implications of stunning, hibernation, and preconditioning: an NHLBI workshop. *Circulation* 97, 1848 - 1867 (1998).
- Murphy, A.M. et al. Transgenic mouse model of stunned myocardium. *Science* 287, 488 - 491 (2000).
- 30 Heusch, G. Hibernating myocardium. *Physiol. Rev.* 78, 1055-1085 (1998).
- Sowter, H.M., Ratcliffe, P.J., Watson, P., Greenberg, A.H., & Harris, A.L. HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction of the cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors. *Cancer Res.* 61, 6669 - 6673 (2001).
- Kietzmann, T., Roth, U., & Jungermann, K. Induction of the plasminogen activator inhibitor-1 gene expresión by mild hypoxia via a hypoxia response element binding the hypoxia-inducible factor-1 in rat hepatocytes. *Blood* 94, 4177 - 4185 (1999).
- 35 Taylor, C.A.M., Coates, D., & Shirras, A.D. The *Acer* gene in *Drosophila* codes for an angiotensin-converting enzyme homologue. *Gene (Amst.)* 181, 191 - 197 (1996).
- Giordano, F.J. et al. A cardiac myocyte vascular endothelial growth factor paracrine pathway is required to maintain cardiac function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 5780 - 5785 (2001).
- 40 Weiss, D., Sorescu, D., & Taylor, W.R. Angiotensina II and atherosclerosis. *Am. J. Cardiol.* 87, 25C-32C (2001).
- Enseleit, F., Hurlimann, D., & Luscher, T.F. Vascular protective effects of angiotensina converting enzyme inhibitors and their relation to clinical events. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 37(suppl. 1), S21-S30 (2001).
- Kong, Y.Y. et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 397, 315 - 23 (1999).
- 45 Wickenden, A.D. et al. Targeted expression of a dominant-negative K(v)4.2 K(+) channel subunit in the mouse heart. *Circ. Res.* 85, 1067 - 1076 (1999).

Zvaritch, E. et al. The transgenic expresión of highly inhibitory monomeric forms of phospholamban in mouse Herat impairs cardiac contractility. J. Biol. Chem. 275, 14985 - 14991 (2000).

Rosengart *et al.* Patente de Estados Unidos nº 6.322.536

March *et al.* Patente de Estados Unidos nº 6.224.584

5 Hammond *et al.* Patente de Estados Unidos nº 6.174.871

Wolfgang-M. Franz *et al.* Analysis of tissue-specific gene delivery by recombinant adenoviruses containing cardiacspecific promoters. Cardiovascular Research 35(1997) 560 – 566

Rothmann T. *et al.* Heart muscle-specific gene expresión using replication defective recombinant adenovirus. Gene Ther 1996 Oct;3(10):919 - 26

10 Phillips MI *et al.* Vigilant vector: heart-specific promoter in an adeno-associated virus vector for cardioprotection. Hypertension 2002, Feb; 39 (2 Pt 2):651 - 5

Herold BC *et al.* Herpes simplex virus as a model vector system for gene therapy in renal disease. Kidney Int enero de 2002;61 Suppl 1: 3 - 8

15 Figlin RA *et al.* Technology evaluation: interleukin-2 gene therapy for the treatment of renal cell carcinoma. Curr Opin Mol Ther abril de 1999;1 (2): 271 - 8

Varda-BloomN *et al.* Tissue-specific gene therapy directed to tumor angiogenesis. GeneTher junio de 2001;8(11):819 – 27

Scott-Taylor TH *et al.* Adenovirus facilitated infection of human cells with ecotropic retrovirus. Gene Ther mayo de 1988; 5(5):621 - 9

20 Langer JC *et al.* Adeno-associated virus gene transfer into renal cells: potential for in vivo gene delivery. Exp Nephrol mayo - junio de 1998;6(3):189 - 94

Lien YH *et al.* Gene therapy for renal diseases. Kidney Int Suppl octubre de 1997;61:S85-8

Ohno K *et al.* Cell-specific targeting of Sindbis virus vectors displaying IgG-binding domains of protein A. Nat Biotechnol agosto de 1997;15 (8): 763 - 7

25

Tabla 1. Funciones cardíacas de ratones defectivos en ECA2

| | Machos de 3 meses | | Machos de 6 meses | | Hembras de 6 meses | |
|----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
| | <i>eca2^{+ly}</i> | <i>eca2^{-ly}</i> | <i>eca2^{+ly}</i> | <i>eca2^{-ly}</i> | <i>eca2^{-l}</i> | <i>eca2^{-l-}</i> |
| | n = 7 | n = 7 | n = 8 | n = 8 | n = 3 | n = 3 |
| Ritmo cardíaco, lpm | 469 ±12 | 466 ± 18 | 495 ± 15 | 482 ± 12 | 460 ± 6 | 452 ± 14 |
| PA, mm | 0,65 ± 0,02 | 0,62 ± 0,01 | 0,66 ± 0,01 | 0,59 ± 0,02* | 0,65 ± 0,02 | 0,57 ± 0,04 |
| DTDVI mm | 4,09 ± 0,04 | 4,25 ± 0,10, | 4,12 ± 0,10 | 4,49 ± 0,12* | 3,71 ± 0,10 | 4,11 ± 0,07* |
| DTSVI,mm | 2,11 ± 0,04 | 2,69 ± 0,09** | 2,13 ± 0,06 | 3,29 ± 0,14** | 1,74 ± 0,07 | 2,68 ± 0,11** |
| % AF | 48,42 ± 1,14 | 36,73 ± 0,89** | 48,12 ± 0,84 | 26,76 ± 1,78** | 53,00 ± 1,68 | 34,85 ± 1,76** |
| VAM, M/s | 0,992 ± 0,029 | 0,922 ± 0,033 | 0,902 ± 0,044 | 0,802 ± 0,037 | 0,875 ± 0,048 | 0,809 ± 0,044 |

ES 2 424 971 T3

| | | | | | | |
|---|--------------|---------------------|---------------|----------------------|--------------|----------------------|
| | | | | | | |
| Vcfc, ctrc/s | 9,49 ± 0,48 | 7,28 ± 0,45* | 9,46 ± 0,26 | 4,93 ± 0,33** | 10,34 ± 0,81 | 6,16 ± 0,31** |
| MVI, mg | 95,69 ± 1,88 | 95,50 ± 2,28 | 102,41 ± 4,00 | 100,49 ± 3,39 | 92,27 ± 2,02 | 89,60 ± 1,54 |
| MVI/PC, mg/g | 3,32 ± 0,08 | 3,53 ± 0,18 | 3,19 ± 0,10 | 3,32 ± 0,15 | 3,29 ± 0,37 | 3,30 ± 0,09 |
| <p>p < 0,05 <i>eca2^{-y}</i> vs <i>eca2^{+y}</i> o <i>eca2^{-/-}</i> vs <i>eca2^{+/-}</i></p> <p>p < 0,01 <i>eca2^{-y}</i> vs <i>eca2^{+y}</i> o <i>eca2^{-/-}</i> vs <i>eca2^{+/-}</i></p> <p>Lpm = latidos por minuto; PA = espesor de la pared anterior; DTDVI = dimensión telediastólica del ventrículo izquierdo; DTSVI = dimensión telesistólica del ventrículo izquierdo; % AF = porcentaje de acortamiento fraccional; VAM = velocidad de salida aórtica máxima; Vcfc = Velocidad de acortamiento circunferencial de la fibra; MVI = masa del ventrículo izquierdo calculada; PC = peso corporal.</p> | | | | | | |

Tabla 2. Parámetros hemodinámicos invasivos de machos de 6 meses de edad *eca2^{-y}*

| | <i>eca2^{+y}</i> | <i>eca2^{-y}</i> |
|--|--------------------------|--------------------------|
| | N = 8 | N = 8 |
| Ritmo cardíaco, lpm | 303 ± 16 | 298 ± 8 |
| PAS, mmHg | 111,5 ± 2,4 | 91,6 ± 3,0 |
| PAD, mmHg | 70,5 ± 3,0 | 50,3 ± 2,4** |
| PAM, mmHg | 84,2 ± 2,8 | 64,0 ± 2,6** |
| PASVI, mmHg | 107,4 ± 4,5 | 87,5 ± 2,3** |
| PATDVI, mmHg | 5,5 ± 0,8 | 5,3 ± 0,7 |
| dP/dT max | 5579 ± 422 | 3034 ± 124** |
| dP/dT min | -5055 ± 257 | -2929 ± 271** |
| <p>**p < 0,01 <i>eca2^{-y}</i> vs <i>eca2^{+y}</i></p> <p>PAS = presión arterial sistólica; PAD = presión arterial diastólica; PAM = presión arterial media; PASVI = presión arterial sistólica del ventrículo izquierdo; PATDVI = presión arterial telediastólica del ventrículo izquierdo; dP/dT max = 1ª derivada máxima del cambio en la presión / tiempo del ventrículo izquierdo; dP/dt min = 1ª derivada mínima del cambio en la presión / tiempo del ventrículo izquierdo</p> | | |

Tabla 3. Funciones cardíacas de ratones de 6 meses de edad sin eca y ace/eca2

| | <i>eca2</i> ^{+/y} | <i>eca2</i> ^{-/y} |
|---|----------------------------|----------------------------|
| | n = 8 | n = 8 |
| Ritmo cardíaco, lpm | 507 ± 17 | 491 ± 10 |
| PA, mm | 0,63 ± 0,01 | 0,65 ± 0,02 |
| DTDVI, mm | 3,86 ± 0,04 | 3,79 ± 0,07 |
| DTSVI, mm | 2,11 ± 0,04 | 2,13 ± 0,07 |
| % AF | 45,34 ± 1,11 | 43,95 ± 1,24 |
| PAV, M/s | 0,995 ± 0,064 | 0,931 ± 0,040 |
| Vcfc, circ/s | 8,94 ± 0,25 | 8,40 ± 0,27 |
| PA = espesor de la pared anterior; DTDVI = dimensión telediastólica del ventrículo izquierdo; VTSVI = dimensión telesistólica del ventrículo izquierdo; % AF = porcentaje de acortamiento fraccional; VSM = velocidad de salida aórtica máxima; Vcfc = Velocidad de acortamiento circunferencial de la fibra. | | |

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un kit de genotipado de la ECA2 que comprende un agente de detección de la presencia de un polimorfismo en un solo nucleótido de la ECA2 seleccionado del grupo de ECA2a-ECA2m en una muestra de ácido nucleico derivada de un animal, preferentemente un ser humano, en el que ECA2a a ECA2m son los polimorfismos en un solo nucleótido descritos en las secuencias de nucleótidos de las SEC ID N° 5 a 18 y que además comprende una placa que tiene una pluralidad de pocillos y que tiene unidas a los mismos sondas que tienen una secuencia de ácido nucleico que se une específicamente a una secuencia de ECA2 que incluye dicho polimorfismo en un solo nucleótido de ECA2
- 10 2. El kit de la reivindicación 1, en el que el agente de detección comprende un ácido nucleico y/o una enzima de restricción.
3. El kit de la reivindicación 1 o 2, que además comprende un agente de amplificación para amplificar el ácido nucleico.
- 15 4. El kit de la reivindicación 3, en el que el agente de amplificación comprende un primer conjunto, en el que cada cebador es un ácido nucleico que se une específicamente próximo a, y produce la elongación a través de, uno de ECA2a-ECA2m .
- 20 5. Un procedimiento de genotipado de la ECA2 en un animal que es un ser humano, que comprende detectar una región de un ácido nucleico de ECA2 que incluye un polimorfismo en un solo nucleótido de ECA2 en la muestra de ácido nucleico de ECA2 derivada del animal, que incluyen regiones cadena arriba y cadena abajo de la región de codificación de la ECA2, en el que el genotipo de ECA2 se usa para determinar si el animal tiene una enfermedad de disminución de la ECA2 o está en riesgo de sufrirla, preferentemente una enfermedad cardiovascular o una enfermedad renal o una enfermedad pulmonar o una enfermedad que afecta a los vasos sanguíneos, en el que el polimorfismo nucleotídico se selecciona del grupo que consiste en ECA2a-ECA2m, en el que de ECA2a a ECA2m son los polimorfismos de un solo nucleótido descritos en las secuencias de nucleótidos de las SEC ID N° 5 a 18.
- 25 6. El procedimiento de la reivindicación 5, que comprende determinar si el ser humano es homocigoto o heterocigoto para el polimorfismo de ECA2.
7. El procedimiento de la reivindicación 5 o 6, en el que la etapa de detección comprende determinar la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico de la ECA2.

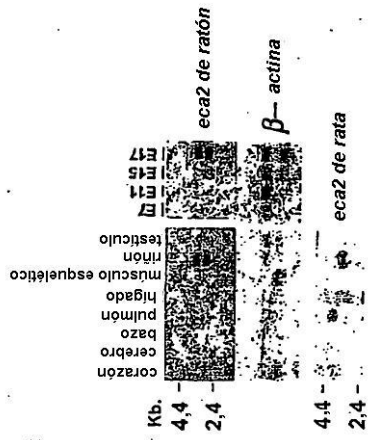
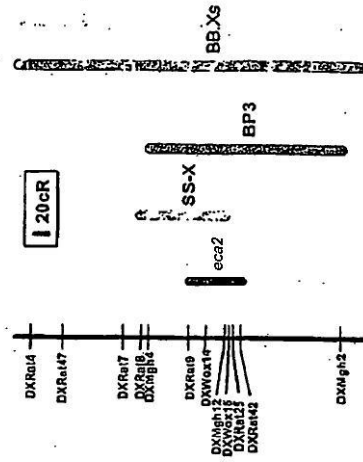


Figura 1

d

| Marcador | LOD | z |
|----------|--------|-------|
| DXRat9 | 6,340 | 0,450 |
| DXWox14 | 6,183 | 0,451 |
| DXWox15 | 10,221 | 0,295 |
| DXRat42 | 7,382 | 0,408 |



b

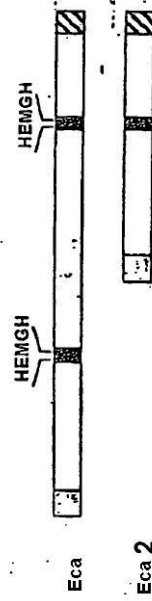


Figura 2a

a

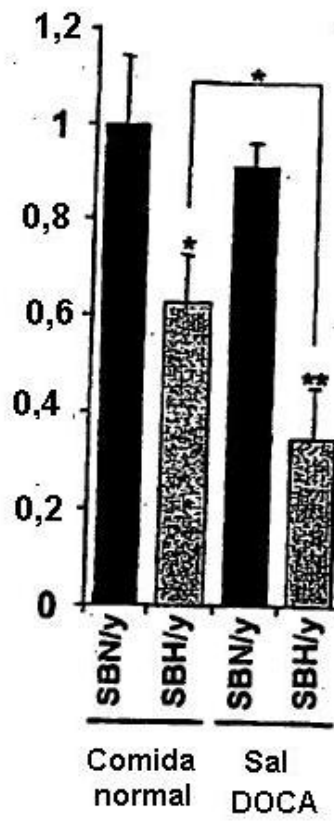
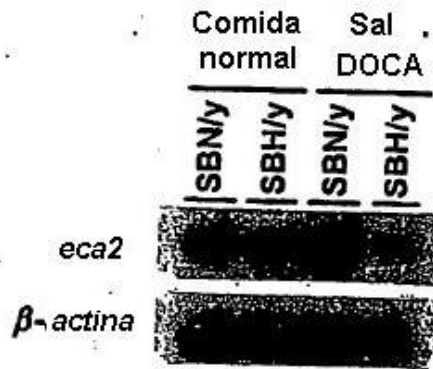
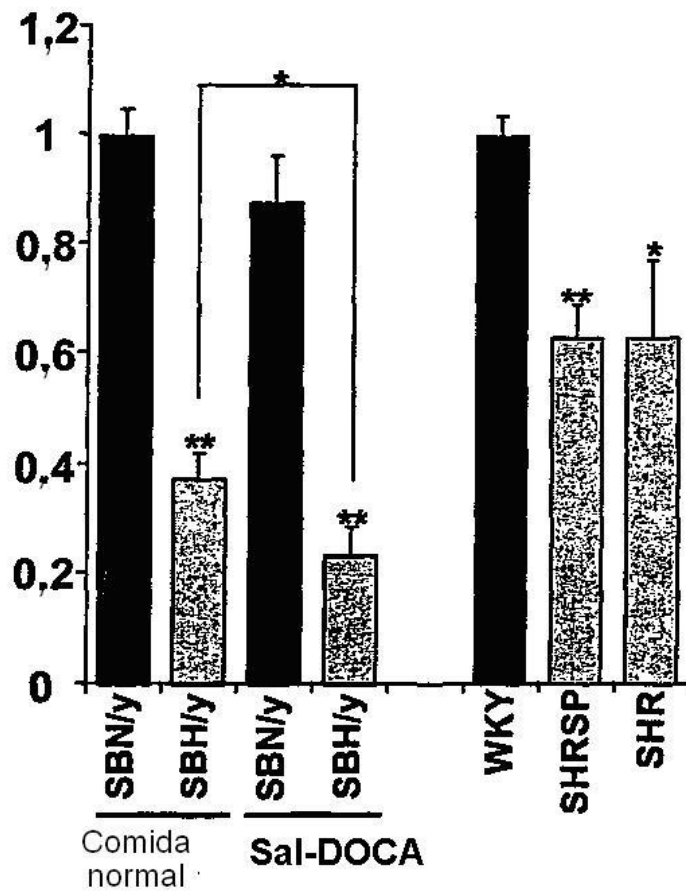
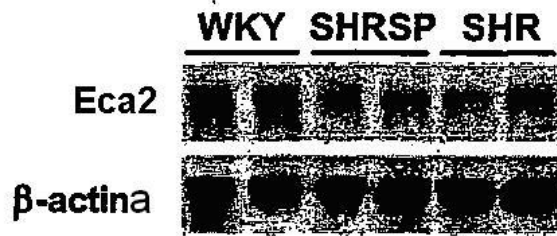
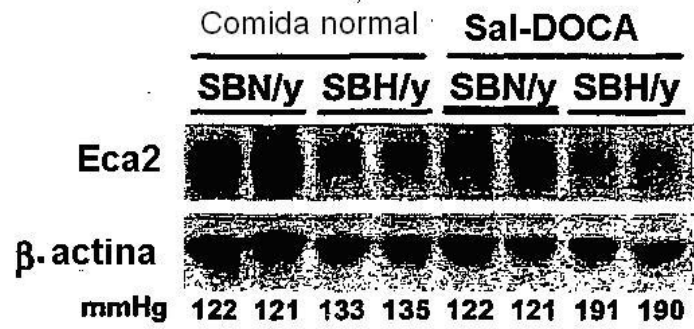


Figura 2b

b



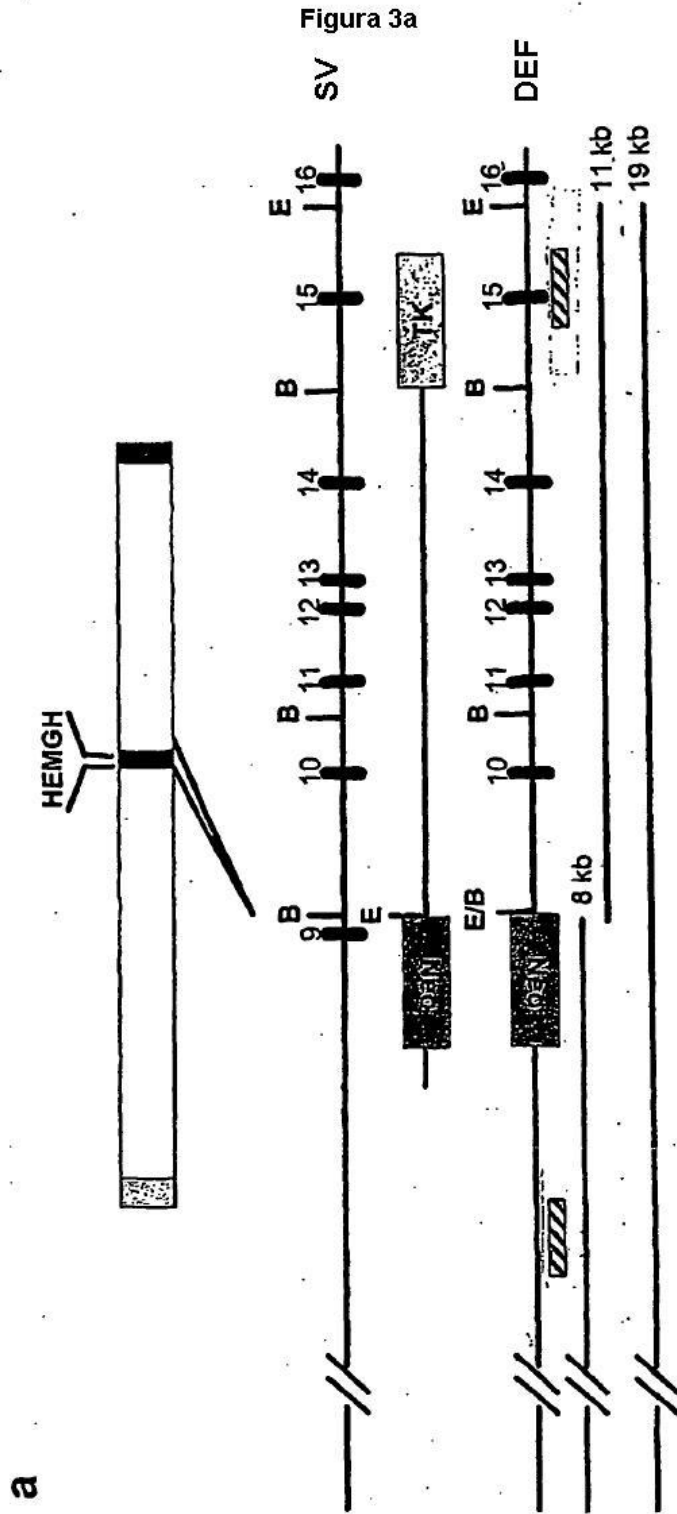


Figura 3b, 3c, 3d

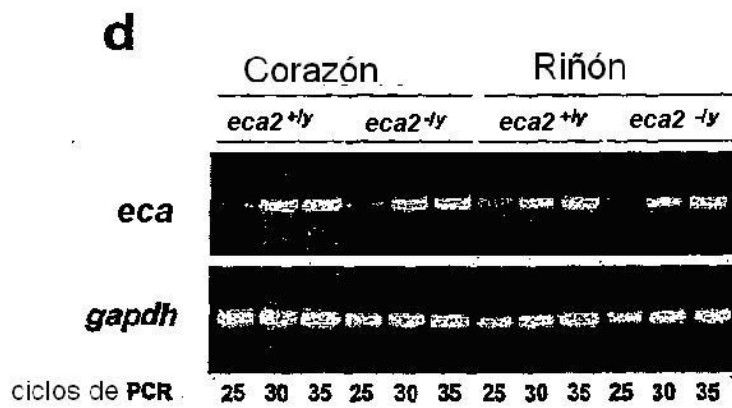
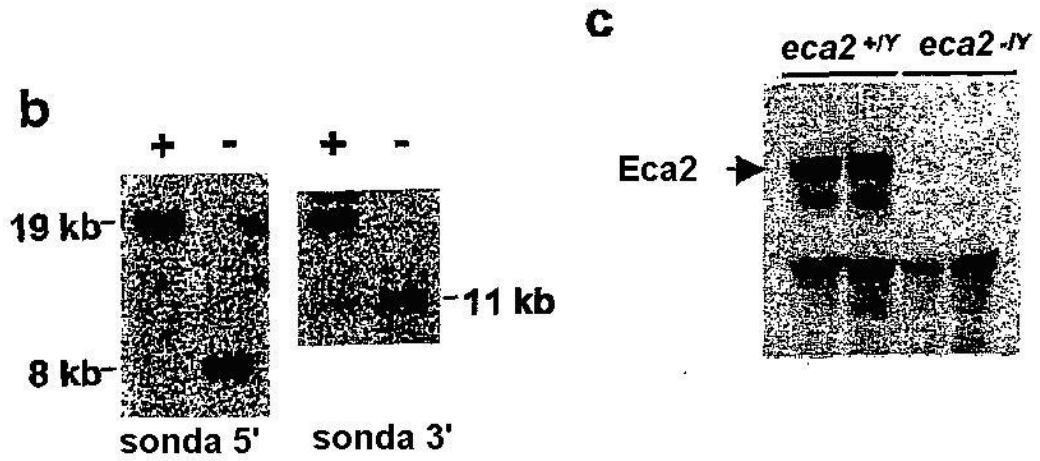


Figura 4a, 4b

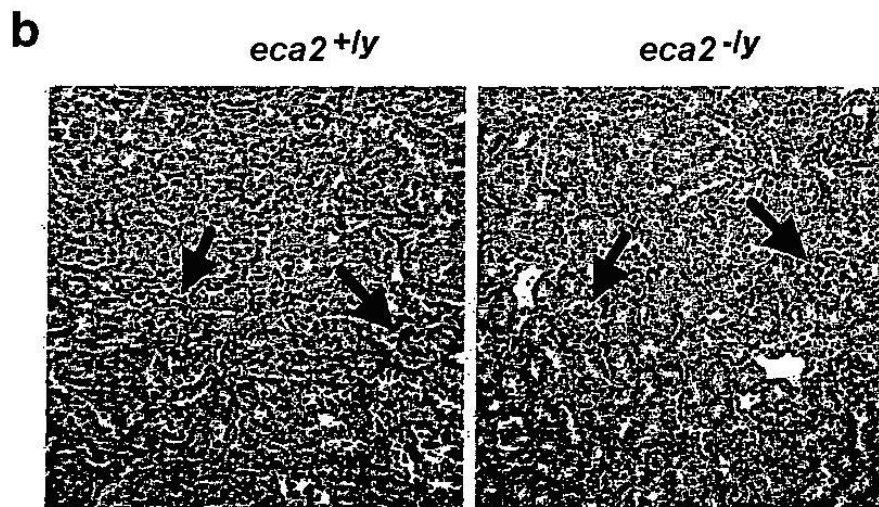
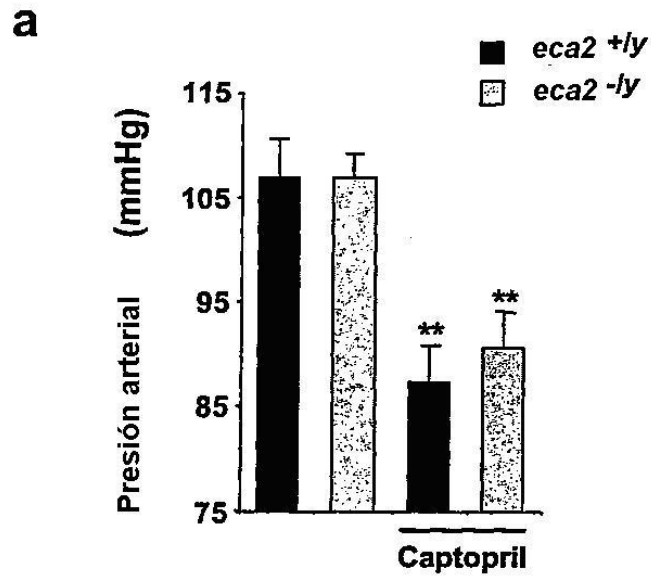


Figura 5a, 5b

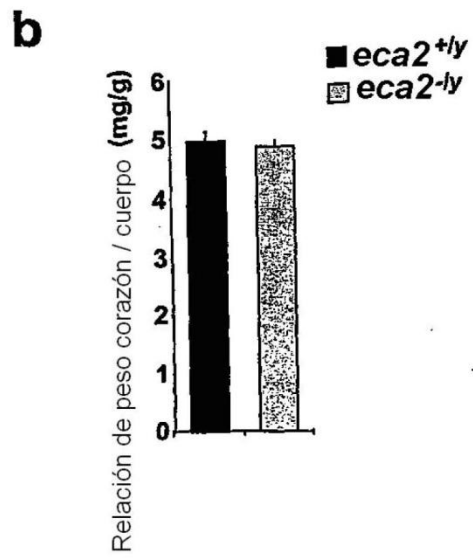
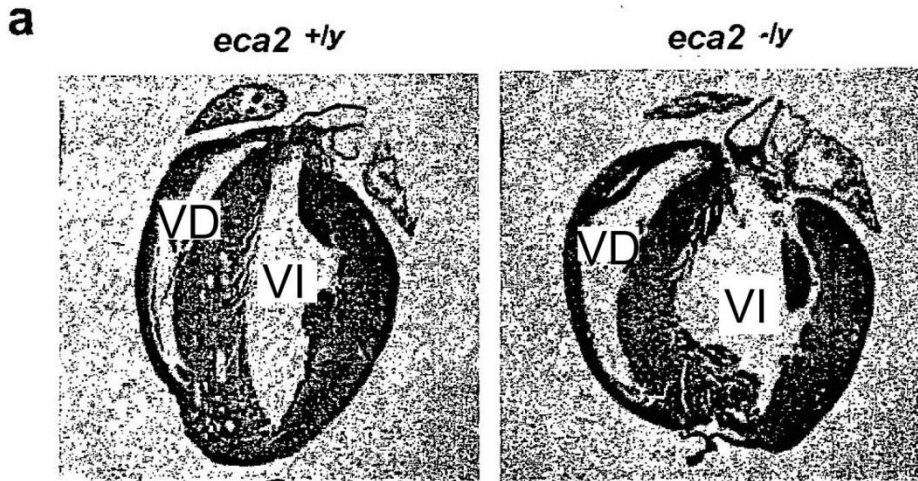


Figura 5c, 5d

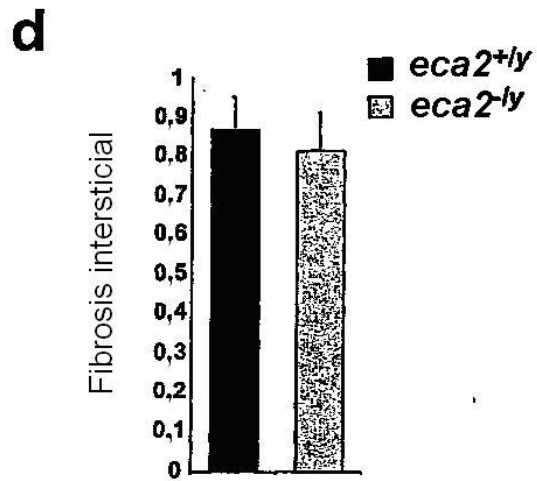
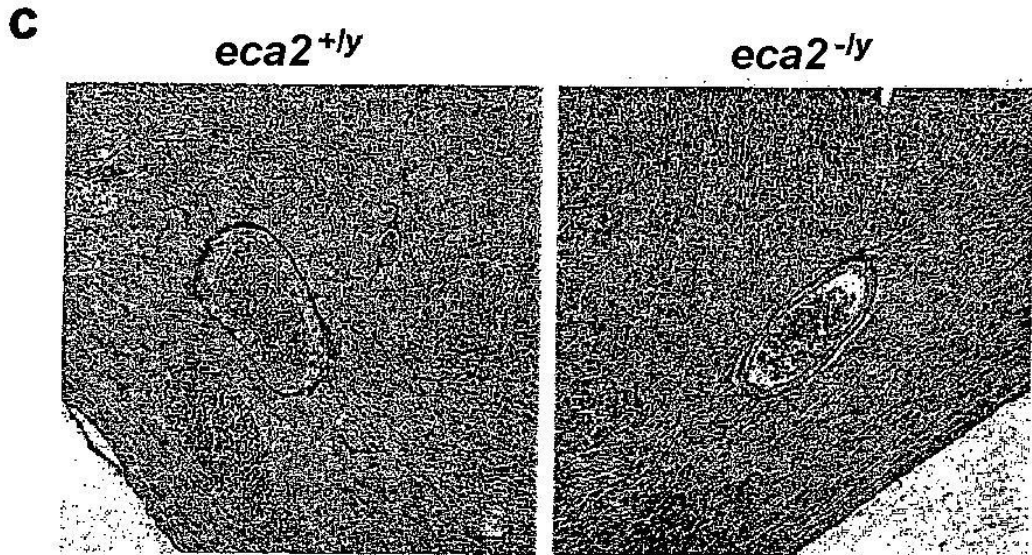


Figura 6a

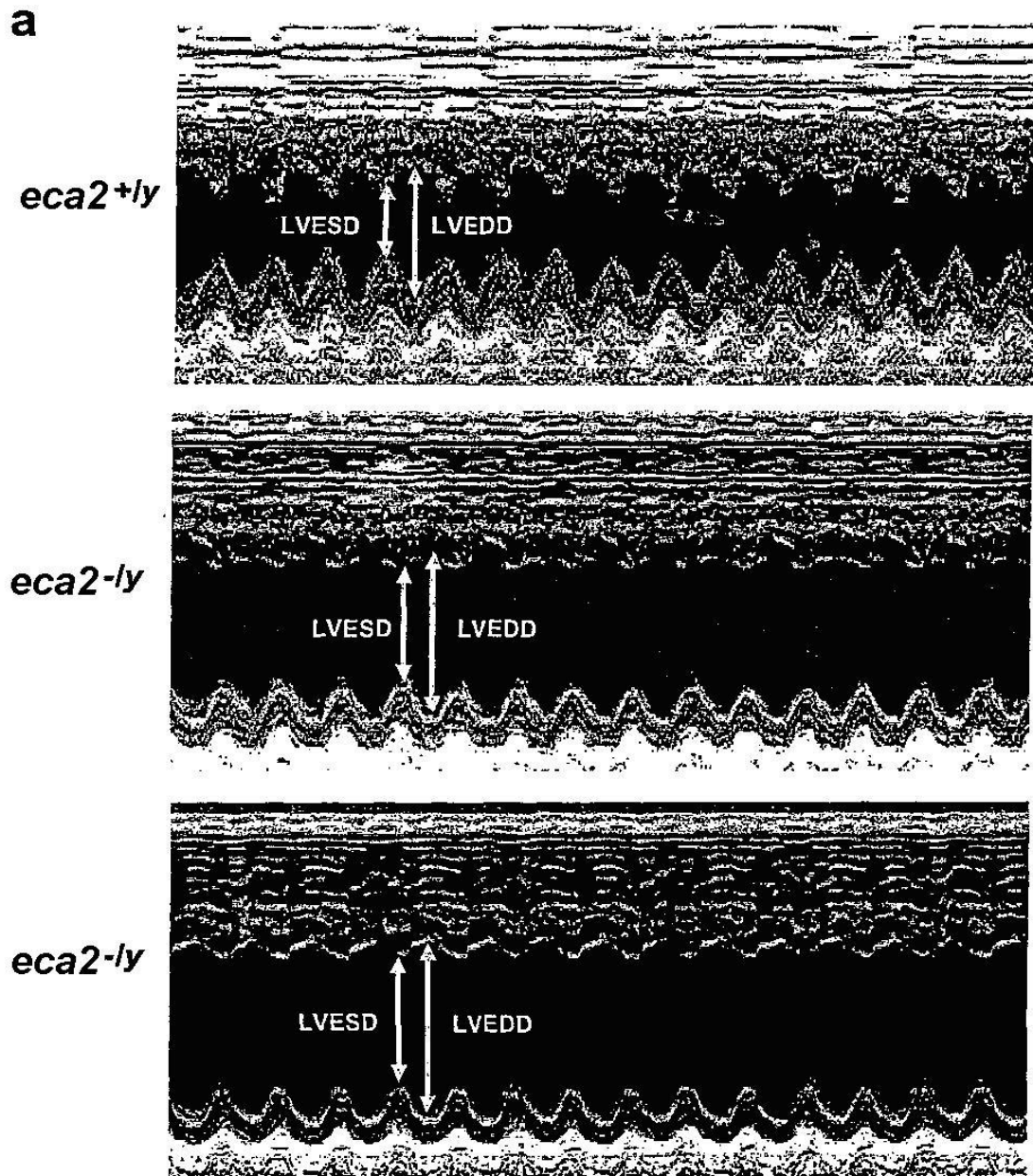


Figura 6b, 6c

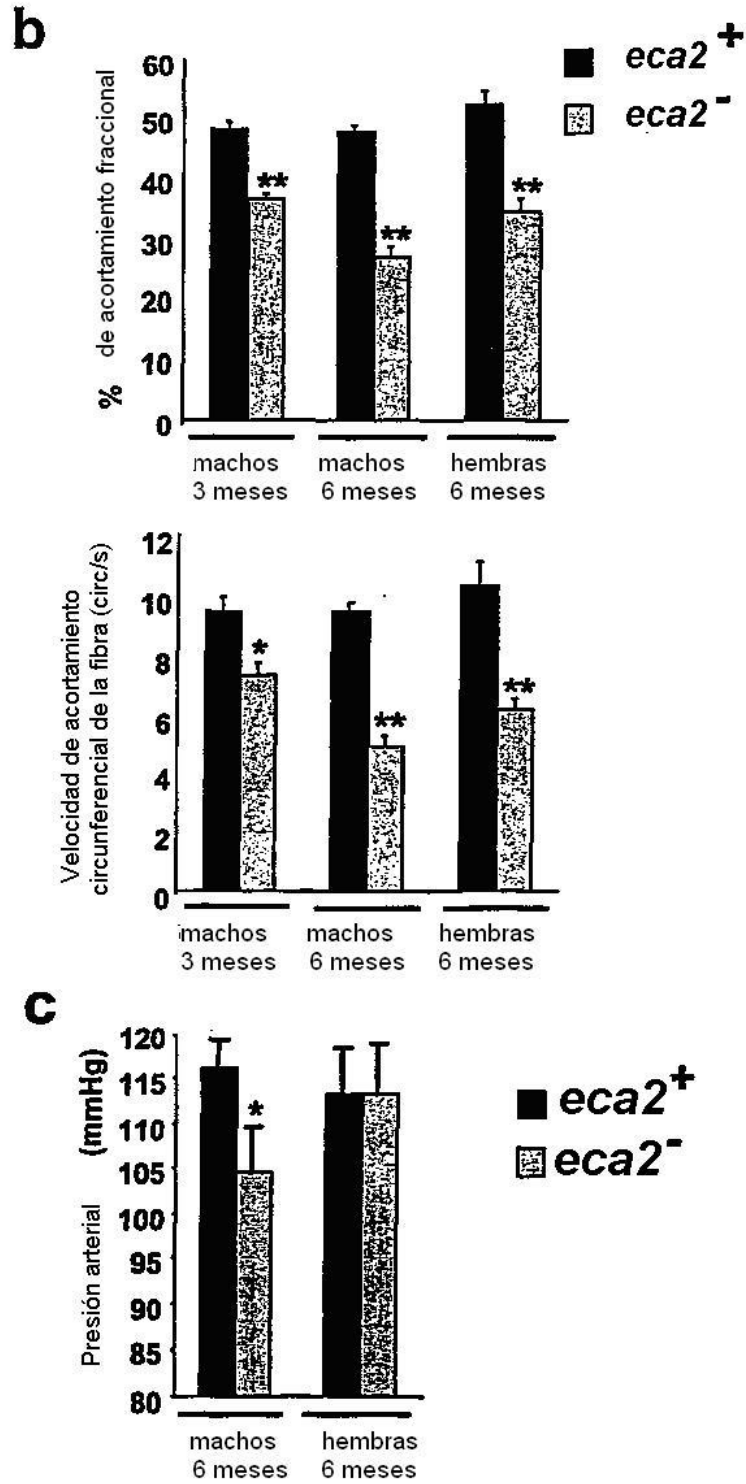
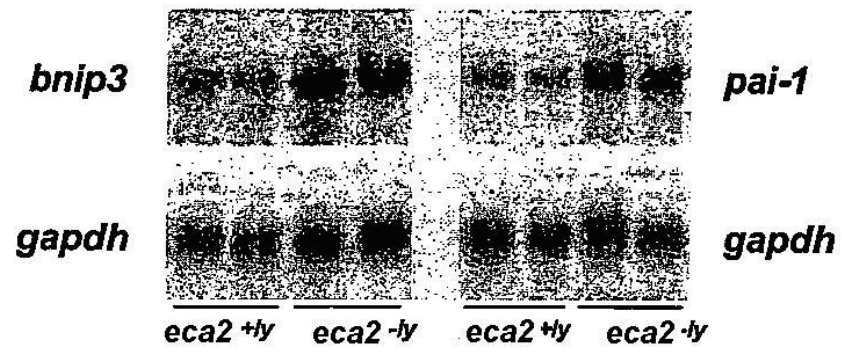


Figura 7a,7b

a



b

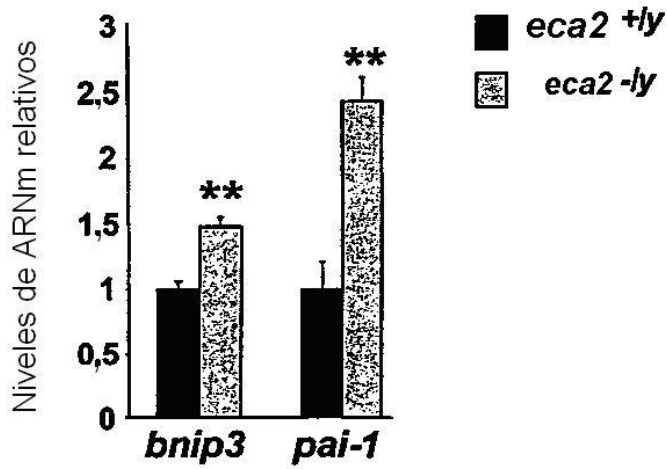


Figura 7c

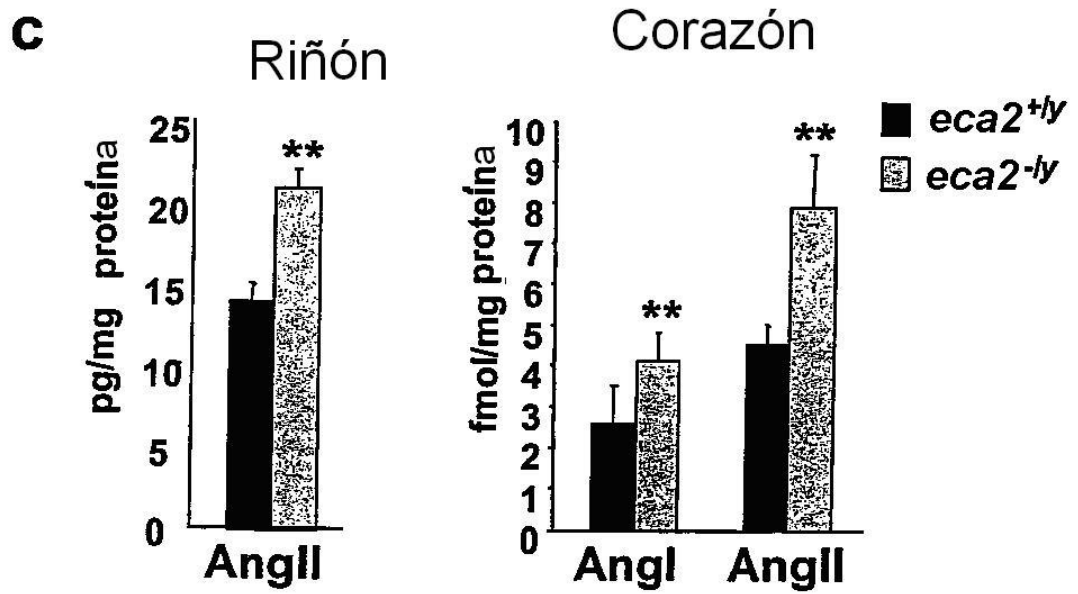


Figura 8a, 8b

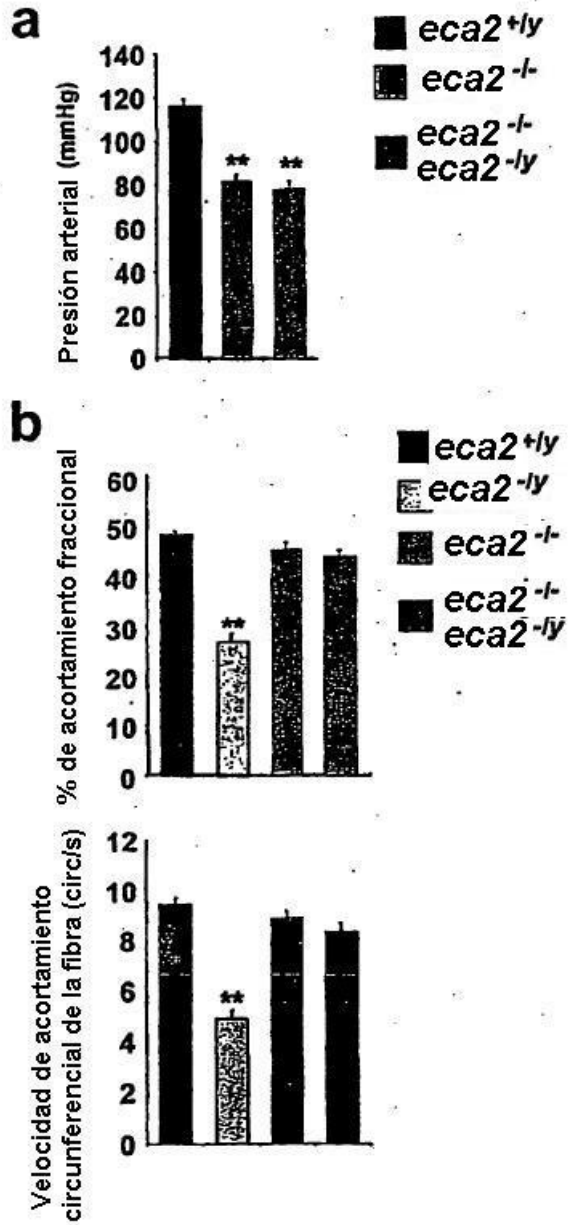
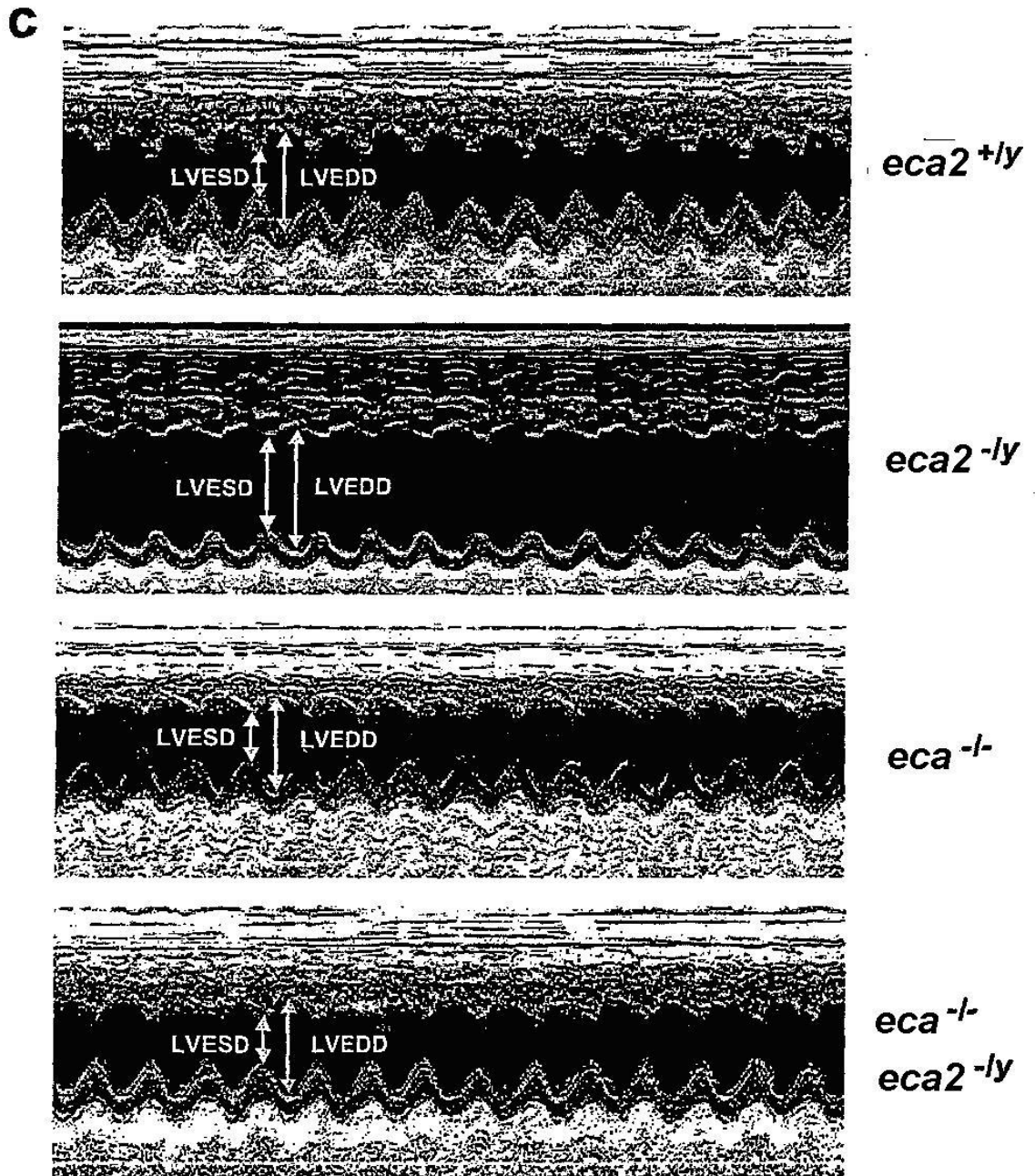


Figura 8c



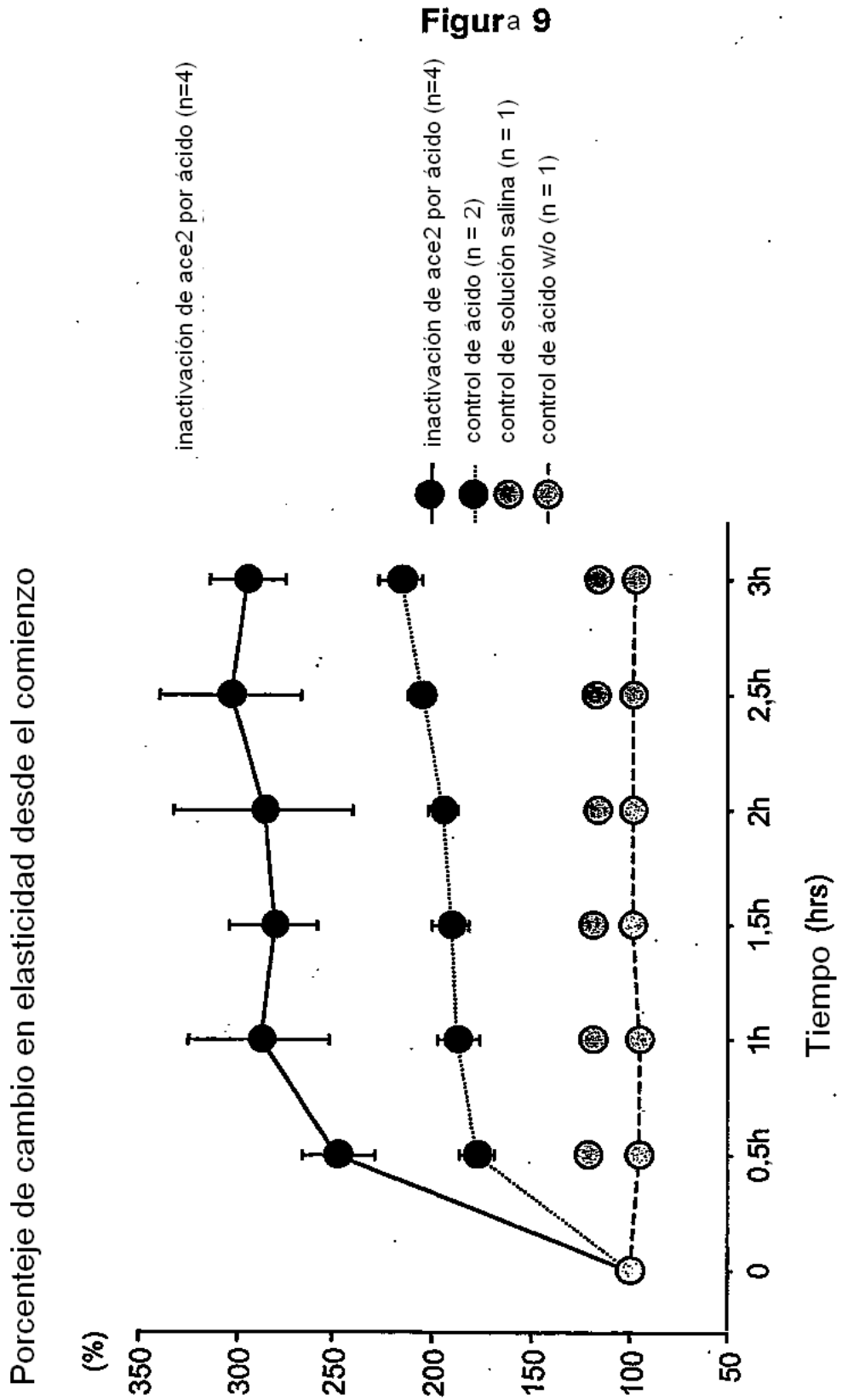


Figura 10a

```

1 cgccaaccc aagttcaaag gctgataaga gagaaaatct catgaggagg ttttagtcta
61 gggaaagtca ttcagtggat gtgatcttgg ctacagggg acgatgtcaa gctcttcctg
121 gctccttctc agccttggtg ctgtaactgc tgctcagtcc accattgagg aacaggccaa
181 gacatttttg gacaagtta accacgaagc cgaagacctg ttctatcaaa gttcacttgc
241 ttcttggaat tataacacca atattactga agagaatgtc caaaacatga ataagctgg
301 ggacaaatgg tctgcctttt taaaggaaca gtccacactt gcccaaatgt atccactaca
361 agaaattcag aatctcacag tcaagcttca gctgcaggct cttcagcaaa atgggtcttc
421 agtgctctca gaagacaaga gcaaacggtt gaacacaatt ctaaatacaa tgagcaccat
481 ctacagtact ggaaaagttt gtaaccaga taatccaaa gaatgcttat tacttgaacc
541 aggtttgaat gaaataatgg caaacagttt agactacaat gagaggctct ggcttggga
601 aagctggaga tctgaggtcg gcaagcagct gaggccatta tatgaagagt atgtggtctt
661 gaaaaatgag atggcaagag caaatcatta tgaggactat ggggattatt ggagaggaga
721 ctatgaagta aatgggtag atggctatga ctacagccgc ggccagttga ttgaagatgt
781 ggaacatacc tttgaagaga ttaaaccatt atatgaacat cttcatgcct atgtgagggc
841 aaagttagtg aatgcctatc ctctctatat cagtccaatt ggatgcctcc ctgctcattt
901 gcttggtgat atgtgggta gattttggac aaatctgtac tctttgacag tccctttgg
961 acagaacca aacatagatg ttactgatgc aatggtggac caggcctggg atgcacagag
1021 aatattcaag gaggcggaga agttctttgt atctgttggc cttcctaata tgactcaagg
1081 attctgggaa aattccatgc taacggacc aggaaatggt cagaaagcag tctgcatcc
1141 cacagcttgg gacctgggga agggcgactt caggatcctt atgtgcacaa aggtgacaat
1201 ggacgacttc ctgacagctc atcatgagat ggggcatatc cagtatgata tggcatatgc
1261 tgcacaacct tttctgctaa gaaatggagc taatgaagga ttccatgaag ctggtgggga
1321 aatcatgtca ctttctgcag ccacacctaa gcatttaaaa tccattggtc ttctgtcacc
1381 cgattttcaa gaagacaatg aaacagaaat aaacttctct ctcaacaag cactcacgat
1441 tgttgggact ctgccattta ctacatggt agagaagtgg aggtggatgy cctttaagg
1501 ggaattccc aaagaccagt ggatgaaaa gtggtgggag atgaagcgag agatagttgg
1561 ggtggtggaa cctgtgccc atgatgaaac atactgtgac cccgatctc tgttccatgt
1621 ttctaatgat tactcattca ttcatatta cacaaggacc ctttaccat tccagtttca
1681 agaagcatt tgtcaagcag ctaaacatga aggcctctg cacaatgtg acatctcaa
1741 ctctacagaa gctggacaga aactgttcaa tatgctgagg cttggaaaat cagaacctcg
1801 gaccctagca ttggaaaatg ttgtaggagc aaagaacatg aatgtaaggc cactgctcaa
1861 ctactttgag cccttattta cctggctgaa agaccagaac aagaattctt ttgtgggatg
1921 gagtaccgac tggagtccat atgcagacca aagcatcaaa gtgaggataa gcctaaaatc
1981 agctcttggg gataaagcat atgaatggaa cgacaatgaa atgtacctgt tccgatcctc
2041 tgttgcata gctatgaggc agtacttttt aaaagtaaaa aatcagatga ttcttttgg
2101 ggaggaggat gtgagagtgg ctaatttgaa accaagaatc tcctttaatt tctttgtcac
2161 tgcacctaaa aatgtgtctg atatcattcc tagaactgaa gttgaaaagg ccatcaggat
2221 gtcccggagc cgtatcaatg atgctttccg tctgaatgac aacagcctag agtttctggg
2281 gatacagcca acacttggac ctctaacca ccccctggt tccatagggc tgattgtttt
2341 tggagtgtg atgggagtga tagtgggtgg cattgtcatc ctgatcttca ctgggatcag
2401 agatcggaag aagaaaaata aagcaagaag tggagaaaat ccttatgcct ccatcgatat
2461 tagcaaagga gaaaaatac caggattcca aaacactgat gatgttcaga cctcctttta
2521 gaaaaatcta tgtttttct cttgaggtga ttttgttga tgtaaatgtt aatttcatgg
2581 tatagaaaat ataagatgat aaagatatca ttaaagtca aaactatgac tctgttcaga
2641 aaaaaaattg tccaaaagca acatggccaa ggagagagca tcttcattga cattgctttc
2701 agtatttatt tctgtctctg gatttgactt ctggtctggt tcttaataag gattttgtat
2761 tagagtatat tagggaaagt gtgtatttgg tctcacaggc tgttcaggga taatctaact
2821 gtaaagtctt gttgaatttc tgaagttgaa aacaaggata tatcattgga gcaagtgtg
2881 gatcttgtat ggaatatgga tggatcactt gtaaggacag tgcctgggaa ctggtgtgac
2941 tgcaaggatt gagaatggca tgcattagct cactttcatt taatccattg tcaaggatga

```

(continúa en la siguiente página)

Figura 10a continuación

```

3001 catgctttct tcacagtaac tcagttcaag tactatggty atttgcctac agtgatgttt
3061 ggaatcgate atgctttctt caaggtgaca ggtctaaaga gagaagaatc caggaacag
3121 gtagaggaca ttgctttttc acttccaagg tgcttgatca acatctcoct gacaacacaa
3181 aactagagcc aggggcctcc gtgaactccc agagcatgcc tgatagaaac tcatttctac
3241 tgttctctaa ctgtggagtg aatggaaatt ccaactgtat gttcaccctc tgaagtgggt
3301 acccagtcctc ttaaatcttt tgtatttgct cacagtgttt gagcagtgct gagcaciaag
3361 cagacactca ataatgcta gatttacaca ctcaaaaaaa aaaaa
    
```

SEQ ID NO:1

Figura 10b

```

MSSSSWLLLSLVAVTAAQSTIEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQSSLASWNYNTNITEENVQNMNAGDKWSAFLKEQSTLAQMY
PLQEIQNLTVKQLQALQONGSSVLSSEDKSKRLNTILNTMSTIYSTGKVCNPDNPQECLELLEPGLNEIMANSLDYNERLWAVE
SWRSEVGGKQLRPLYEYVVLKNEMARANHYEDYGDYWRGDYEVNGVDGYDYSRQQLIEDVEHTFEEIKPLYEHLHAYVRAKLM
NAYPSYISPIGCLPAHLLGDMWGRFWTNLYSLTVFPGQKFNIDVTAMVDQAWDAQRI FKEAEKFFVSVGLPNMTQGFWENSM
LTDPGNVQKAVCHPTAWDLGKGFRI LMCTKVTMDDFLTAHHEMGIQYDMAYAAQPFLLRNGANEGFHEAVGEIMSLSAATP
KHLKSI GLLSPDFQEDNETEINFLKQALTIVGTLFPTYMLEKWRWVFKGEIPKDQWMKKWEMKREIVGVVEPVPHDETYC
DPASLFHVSNDYSFIRYYTRTYQFQFQALCOAAKHEGPHKCDISNSTEAGQKLFNMLRLGKSEPWTALALENVVGAKNMNV
RPLLNYFEPLFTWLKQNKNSFVGVSTDWSPYADQSIVRI SLKSALGDKAYEWNENEMYLFRSSVAYAMRQYFLKVKNQMLL
FGEEDVRVANLKRISFNFFVTAPKNVSDIIPRTEVEKAIMRSRINDAFRLNDNSLEFLGIQPTLGPNNQPPVSIWLEVFV
VVMGVIVVGI VILIFTGIRDRKKKNKARSNGENPYASIDISKGENNPGFQNTDDVQTSF
    
```

SEQ ID NO:2

Figura 11

```

1 catattggtc cagcagcttg tttactgttc tttttctggtt cttttctctgc ttttttttctc
61 ttctcttctc agtgcccaac ccaagttcaa aggctgatga gagagaaaaa ctcattgaaga
121 gattttactc tagggaaagt tgctcagtg atgggatctt ggccgacggg gaaagatgtc
181 cagctcctcc tggtccttc tcagcctgt tgctgttact actgctcagt cctcaccga
241 ggaaaatgcc aagacatttt taaacaact taatcaggaa gctgaagacc tgccttatca
301 aagttcactt gcttcttggg attataatac taacattact gaagaaaatg cccaagaatg
361 gagtgggct gcagccaaat ggtctgcctt ttatgaagaa cagtctaaga ctgcccaaag
421 ttctcacta caagaaatcc agactccgat catcaagcgt caactacagg ccttcagca
481 aagtgggtct tcagcactct cagcagacaa gaacaaacag ttgaaacaaa ttctgaacac
541 catgagcacc atttacagta ctggaaaagt ttgcaacca aagaaccac aagaatgctt
601 attacttgag ccaggattgg atgaaataat ggcgacaagc acagactaca actctaggct
661 ctgggcatgg gagggctgga gggctgaggt tggcaagcag ctgaggccgt tgtatgaga
721 gtatgtggtc ctgaaaaacg agatggcaag agcaaacaat tataacgact atggggatta
781 ttggagaggg gactatgaag cagagggagc agatggctac aactataacc gtaaccagtt
841 gattgaagat gtagaacgta ccttcgcaga gatcaagcca ttgtatgagc atcttcatgc
901 ctatgtgagg aggaagtga tggataccta cccttcctac atcagcccca ctggatgctt
961 cctgcacctt ttgcttgggtg atatgtgggg tagattttgg acaaatctgt accctttgac
1021 tgttcccttt gcacagaaac caaacataga tgttactgat gcaatgatga atcagggctg
1081 ggatgcagaa aggatatttc aagaggcaga gaaattcttt gtttctgttg gccttcctca
1141 tatgactcaa ggattctggg caaactctat gctgactgag ccagcagatg gccggaaagt
1201 tgtctgccac cccacagctt gggatctggg acacggagac ttcagaatca agatgtgtac
1261 aaaggtcaca atggacaact tcttgacagc ccatcacgag atgggacaca tccaatatga
1321 catggcatat gccaggcaac ctttctgct aagaaacgga gccaatgaag ggttccatga
1381 agctgttggg gaaatcatgt cactttctgc agctaccccc aagcatctga aatccattgg
1441 tcttctgcca tccgattttc aagaagatag cgaaacagag ataaacttcc tactgaaaca
1501 ggcattgaca attgttgaa cactaccgtt tacttacatg ttagagaagt ggaggtggat
1561 ggtctttcgg ggtgaaatc ccaagagca gtggatgaaa aagtggggg agatgaagcg
1621 ggagatcgtt ggtgtggtgg agcctctgcc tcatgatgaa acatactgtg accctgcatc
1681 tctgttccat gtttctaag attactcatt cattcgatat tacacaagga ccatttacca
1741 attccagttt caagaagctc tttgtcaagc agctaagtat aatggttctc tgcacaaatg
1801 tgacatctca aattccactg aagctgggca gaagttgctc aagatgctga gtcttgaaa
1861 ttcagagccc tggaccaaag ccttggaaaa tgtggtagg gcaaggaata tggatgtaa
1921 accactgctc aattacttcc aaccgttgtt tgactggctg aaagagcaga acagaaatc
1981 ttttgtgggg tggaaactg aatggagccc atatgccgac caaagcatta aagtgaggat
2041 aagcctaaaa tcagctcttg gagctaatgc atatgaatgg accaacaacg aatgttccct
2101 gttccgatca tctgttgcat atgccatgag aaagtatttt tcaataatca aaaaccagac
2161 agttcctttt cttagggaag atgtacgagt gagtgatttg aaaccaagag tctccttcta
2221 cttctttgtc acctcaccctc aaaatgtgtc tgatgtcatt cctagaagtg aagtgaaga
2281 tgccatcagg atgtctcggg gccgcatcaa tgatgtcttt ggctgaatg ataacagcct
2341 ggagtttctg gggattcacc caacacttga gccaccttac cagcctcctg tcaccatag
2401 gctgattatt tttggtggtg tgatggcact ggtagtgggt ggcatcatca tcctgattgt
2461 cactggcatc aaaggtogaa agaagaaaaa tgaacaaaaa agagaagaga acccttatga
2521 ctogatggac attggaaaag gagaaagcaa tgcaggattc caaaacagtg atgatgctca
2581 gacttctttt tagcaagca cttgtcatct tctgtatgt aaatgctaac ttcatagtac
2641 acaaaatag agagtataca catgtcatta gctatcaaaa ctatgatctg ttcagtaaac
2701 gttgtccaaa gagcatcaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

```

SEQ ID NO:3

Africana Am Asiática Caucásica Referencia

| | | | | | | |
|--------------------|--------|-------|-----|-----|---|--|
| rs1878922 | C(C/G) | 80 | 100 | 70 | C | TTAAGTTGAAGTCCAAACACATATGTTGTTCCACCTA(C/G)TTAACCCCAAGT CCTTGAATTTCTGGAGCTCAGTTT SEQ ID NO. 5 GTATCTCACCATCAGAAACACAAGCTTGTG(C/T)JAGGATATTAGCTA ATAAAGTTGTAAACat SEQ ID NO.6 CCATGAGTTCTAGCCAGACTTCTTCAACCAGCACCTGCTCC(C/G)TT TACCAGAGACTTCTCAGACCAAGATCC SEQ ID NO. 7 Acaagtttcttaaaacctcaatcagagttatgtaaaectgcaatc(C/A) CAGTATTGGAATATTCTGGTGTATCTTTGTATTAAATTTCTCAGTGGG T SEQ ID NO.8 Atgtagcactgccctctagcctggtagcagagcaagactc(C/T) GTTTCAAAAAAAGAAATAACACC SEQ ID NO.9 CITTTGAAACCTGTTTTAAACCAAGCTTTTTTCCATATCTCTATCTGAT GGAC(C/T)TCTCCACACTTCTACATCAGCAGCTTTATGACAC SEQ ID NO. 10 CITTTGAAACCTGTTTTAAACCAAGCTTTTTTCCATATCTCTATCTGAT GG(G/A)JCTCTCCAGACTTCTACATCAGCAGCTTTATGACAC SEQ ID NO. 11 |
| rs1514282 | A(A/G) | 70 | 100 | 100 | A | AACAGCAGTCACAAATGAAATAAATGCCAACCACTTTATACATTTCCAC ACTT(G/A)CAACTCAATTTTCCAATGGAGCTGTTGATGAACCTAATCTA GGTTGCAAGGATGAA SEQ ID NO. 12 TTCCTGCCAAATATGATAACTTTGCCCTTAAACACACAGCAGTCACAAATG AATAAT(G/A)CCAACCATTTATACATTTCCACACTTACAACTCAATTTT CCAAATGGAGCTGTTGATG SEQ ID NO.13 GAAATTTGTTGCCAAATATGATAACTTTGCCCTTAAACACACAGCAGTCACA AATGAAATAATACCA(G/A)ACCATTATACATTTCCACACTTACAACTCA ATTTCCAATGGAGCTGTTGATGAA SEQ ID NO. 14 GAAATTTGCCAAATATGATAACTTTGCCCTTAAACACACAGCAGTCACA AATGAAATAAT(G/A)CCAACCATTTATACATTTCCACACTTACAACTCAA TTTTCCAATGGAGCTGTTGATGAA SEQ ID NO. 15 ATAGTCACTAAATGTATGACCAGGTAATGCT(G/A)TATCTTATAT GATGGTCTTTATGAATATCG SEQ ID NO. 16 GTTTACAAAGTGTATTTTTCATTTGAA(C/T)GTCAAGTTTTTCTTTTACA CTTATAGATAAGTACATTTT SEQ ID NO.17 GTGCTACCTCCAATGCCAATACCTTTTATTTGGAAATA(C/T) TACTATAGAGACTTGGTCAATAGGACCTGATTCATT SEQ ID NO. 18 |
| rs1514281-2(nuevo) | A(A/G) | 20 | 50 | 30 | A | |
| rs1514281 | A(A/G) | 70 | 100 | 100 | A | |
| rs1514281-2(nuevo) | A(A/G) | 20 | 50 | 50 | A | |
| rs1514279 | A(A/G) | Falló | 100 | 70 | A | |
| rs1514280 | C(C/T) | 80 | 100 | 80 | C | |
| rs233575 | C(C/T) | 100 | 100 | 50 | C | |