

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 425 308**

51 Int. Cl.:

A61K 38/48 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.04.2009** **E 09730771 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2013** **EP 2274005**

54 Título: **Tratamiento de enfermedades tumorales mediante enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2)**

30 Prioridad:

09.04.2008 AT 5662008

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

14.10.2013

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

JANZEK-HAWLAT, EVELYNE;
LOIBNER, HANS;
SCHUSTER, MANFRED y
PEBALL, BERNHARD

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 425 308 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

Tratamiento de enfermedades tumorales mediante enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2)

La invención se refiere al tratamiento de enfermedades tumorales.

5 Según los datos de la Sociedad Americana contra el Cáncer (American Cancer Society), cada año desarrollan cáncer por primera vez 5,4 millones de personas en los países industrializados y en los países menos desarrollados en total 6,7 millones, por lo que el número de nuevos casos de cáncer puede ascender a más de 12 millones al año. En total, 7,7 millones de personas mueren actualmente al año en el mundo por dolencias tumorales. Las tres enfermedades tumorales más frecuentes en los países industrializados son tumores de próstata, pulmón e intestino, padeciendo las mujeres más frecuentemente cáncer de mama, intestino y pulmón. Puesto que las enfermedades

10 infecciosas se han vuelto controlables y las personas envejecen cada vez más, las enfermedades cancerosas cobran una importancia cada vez mayor en las estadísticas de mortalidad de los países industrializados.

En los países en desarrollo, el cuadro cambia: aquí son los cánceres de pulmón, estómago y hígado las enfermedades cancerosas más frecuentes en hombres. Las mujeres padecen lo más frecuentemente cáncer de mama, cervicouterino y de estómago. Los cánceres de estómago y cervicouterino son a este respecto generalmente

15 la consecuencia de una infección.

En total un 15 % de todos los casos de cáncer han de atribuirse a agentes patógenos, de los que las personas que viven en los países en desarrollo se encuentran afectados con mayor frecuencia. En ellos, un 26 % de los tumores son consecuencia de infecciones, en los países industrializados solo un 6 %.

En Austria, como también en otros países industrializados, las enfermedades cancerosas son la segunda causa más frecuente de mortalidad, solo superada por las enfermedades del sistema circulatorio. En Alemania, enferman aproximadamente 395.000 personas al año de cáncer, de ellas redondeando 195.000 mujeres y 200.000 hombres. La mayoría de casos aparecen a edades de más de 60 años. Los de menos de 60 años constituyen aproximadamente 107.000 casos, redondeando solo un cuarto de las nuevas enfermedades cancerosas.

20

Muchas terapias tumorales, como por ejemplo, radioterapia, quimioterapia o extirpación quirúrgica del tumor, están establecidas desde hace años y se están refinando y mejorando constantemente. Las nuevas terapias comprenden inmunoterapias, terapias que se orientan a la formación de nuevos vasos sanguíneos o también a marcadores específicos de células tumorales, por ejemplo, usando anticuerpos monoclonales.

25

A pesar de las posibilidades mejoradas de terapia para muchos tumores que se han desarrollado en los últimos 30 años, la lucha contra el cáncer no se ha ganado, como se esperaba en el futuro cercano a principios de los 70.

Incluso en los países industrializados, el índice de curación del cáncer actual es de aproximadamente un 30 a un 65 % (en EE.UU. de un 65 %), cuando se combinan todas las enfermedades cancerosas distintas de ambos sexos. Sin embargo, en casos individuales, las posibilidades de curación se diferencian mucho: a menudo las posibilidades son buenas siempre que la enfermedad cancerosa permanezca localmente limitada; cuando el tumor se ha extendido ya a varios órganos del cuerpo, las posibilidades son esencialmente menores. Generalmente, la detección temprana de una enfermedad cancerosa es extremadamente importante. También los pacientes pueden responder

30

35 diferentemente a una quimioterapia, en algunos pacientes ciertas clases de principios activos son total o casi totalmente ineficaces.

Tanto el documento US 6.94.556 como US 7.482.171 (ambos incorporados a la presente como referencia) describen secuencias de ácido nucleico y aminoácidos de ACE2, variantes funcionales así como ensayos para determinar la actividad de ACE2.

40

Zhou *et al.* (Tohoku J. Exp. Med. 217 (2009): 123-131; incorporado a la presente como referencia) describen alteraciones de los valores de concentración de Ang II y expresión de ACE2 en tejidos de adenocarcinoma de páncreas (adenocarcinoma ductal pancreático - PDAC). Se ha encontrado que Ang II se acumula en líneas celulares de PDAC y regula negativamente la expresión de proteína ACE2. Se ha reseñado a este respecto que la relación de ACE/ACE2 es de especial importancia y que un desequilibrio de la misma puede conducir a diversas enfermedades y está implicado en la patogénesis de PDAC. Por tanto, se ha propuesto ACE2 como diana molecular para el tratamiento de PDAC.

45

Es un problema especial en muchos procedimientos de tratamiento los graves efectos secundarios. A menudo, los pacientes de cáncer no fallecen a causa de la enfermedad tumoral, sino a causa de los agentes y procedimientos usados para combatir el tumor.

50

Por tanto, sigue existiendo una gran necesidad de mejoras innovadoras de la terapia tumoral, particularmente de terapias realizadas basándose en agentes endógenos y que tengan pocos o ningún efecto secundario. Es por tanto objetivo de la presente invención poner a disposición terapias de enfermedades tumorales que sean eficaces y que no presenten efectos secundarios o al menos no graves.

Por consiguiente, la presente invención se refiere al uso de un polipéptido con actividad de enzima convertidora de angiotensina 2 (angiotensin converting enzyme 2; ACE2) para la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades tumorales, excepto cáncer de pulmón.

5 Según la presente invención, se tratan enfermedades tumorales con actividad de ACE2. A este respecto, se ha probado que la actividad de ACE2 es capaz de suprimir eficazmente el crecimiento de células tumorales sin tener que temer a este respecto los efectos secundarios basados en esta actividad.

10 Durante décadas, se han atribuido al sistema de renina-angiotensina (RAS) principalmente funciones de hemostasis y sobre todo de regulación de la presión sanguínea. Durante los últimos años, sin embargo, se han identificado otras propiedades del RAS y ampliado su radio de acción a funciones esenciales como proliferación celular, angiogénesis, inflamación y remodelación de tejido patológico. La angiotensina II (Ang II) representa en este sentido un péptido clave del RAS "activado", que como regulador positivo del RAS presenta propiedades vasoconstrictoras, hipertensivas, proinflamatorias, proliferativas y proangiogénicas. Además, Ang II contribuye a la generación de superóxido reactivo. Todas estas propiedades favorecen la degeneración celular y contribuyen a la generación de células hija malignas. Así, las células degeneradas de vascularización sirven para hacer crecer un tumor primario.
15 Se ha mostrado que Ang II está presente en diversas enfermedades tumorales sólidas en cantidades aumentadas.

20 La enzima responsable fundamental de la producción de Ang II es la "enzima convertidora de angiotensina" (ACE), que transforma el decapeptido angiotensina I en Ang II. La ACE ocupa una posición clave como parte de la cascada reguladora de la presión sanguínea (a su vez del RAS), particularmente en la regulación de la presión sanguínea. Una actividad de ACE alta aumenta el tono vascular sanguíneo y por tanto la presión sanguínea. La inhibición de ACE es por tanto un enfoque terapéutico exitoso para el tratamiento de la presión sanguínea alta (hipertensión). Los inhibidores de ACE, o sea sustancias inhibitoras (inhibidores) de ACE, como captopril, enalapril, lisinopril y ramipril, se cuentan entre los fármacos más vendidos en conjunto. Por tanto, los inhibidores de ACE se han propuesto y usado ya desde hace mucho tiempo también en el campo de la terapia tumoral

25 En este contexto, ha podido mostrarse también que, además de una concentración aumentada de Ang II, también se sobreexpresan significativamente sus receptores de AT1 y AT2 (AT1R y AT2R) en muchas enfermedades tumorales sólidas. Ang II contribuye en este sentido significativamente a la neovascularización tumoral y de ahí en adelante hasta la invasión tumoral. Promueve adicionalmente la fosforilación de cinasas de proteína activada por mitógeno (MAP) así como la secreción de VEGF. Ambos mecanismos son reconocidos como relevantes en la generación y alimentación de tumores sólidos. Clínicamente, se correlaciona una expresión aumentada de AT1R con un título aumentado de VEGF y con un pronóstico de supervivencia claramente acortada.
30

Por tanto, en relación con los inhibidores de ACE, también se han propuesto en el campo del tratamiento tumoral un número creciente de antagonistas de AT1R (o sea sustancias inhibitoras específicas de subtipo 1 del receptor de angiotensina II, cuya estimulación por Ang II conduce a un efecto elevador de la presión sanguínea) como, por ejemplo, losartán, valsartán, candesartán, eprosartán, irbesartán, telmisartán u olmesartán.

35 A pesar de su éxito (comercial) en el campo de la reducción de la presión sanguínea, el uso de inhibidores de ACE o antagonistas de AT1R está también ligado a desventajas como, por ejemplo, sus efectos secundarios ocasionalmente graves.

40 Tampoco se han impuesto hasta ahora los conceptos de tratamiento tumoral propuestos basados en inhibidores de ACE o antagonistas de AT1R, aunque dichas propuestas se han realizado poco después del desarrollo del primer inhibidor de ACE (captopril 1974, desde 1981 en el mercado) o antagonista de AT1R (losartán desde 1996 en el mercado). En cualquier caso, aunque ciertamente este mecanismo parece ser científicamente interesante, no se ha podido realizar hasta ahora un uso práctico exitoso en el tratamiento clínico de tumores de amplia aplicación.

45 Otro péptido efector esencial del RAS es angiotensina 1-7 (Ang 1-7). Este péptido es el antagonista perfecto de Ang II: mientras que Ang II es un regulador positivo del RAS, Ang 1-7 puede considerarse como un modulador negativo del RAS. Ang 1-7 atenúa los efectos de Ang II y presenta propiedades antihipertensivas, antiinflamatorias, antiproliferativas, antiangiogénicas y vasodilatadoras. Activa la NO sintetasa y reduce también la expresión del receptor de AT1. Ang 1-7 inhibe igualmente la fosforilación de MAP-cinasas inducida por Ang II. Ang 1-7 previene además el crecimiento *in vitro* de líneas celulares de cáncer de pulmón y el crecimiento de tumores en modelos tumorales experimentales en ratón. De forma interesante, ACE, la enzima que es la responsable fundamental de la producción de Ang II, se inhibe por Ang 1-7. Ang 1-7 previene por consiguiente la síntesis de su antagonista Ang II.
50 Se ha propuesto también usar Ang 1-7 para el tratamiento tumoral pero, a causa del corto tiempo de vida medio de este péptido, es necesaria una infusión continua que en la práctica es muy complicada y está ligada a grandes limitaciones para los pacientes.

55 Resulta interesante la existencia de una enzima clave del RAS que regula la relación entre Ang II activadora y Ang 1-7 inactivador: esta enzima, ACE2, se descubrió en 1997, pero se ha identificado su importante función como modulador del RAS solo en el año 2000. Como glucoproteína anclada a membrana en diversos órganos como corazón, riñones, hígado y pulmones y también en vasos sanguíneos, transforma Ang II en Ang 1-7. La expresión de ACE2 se controla mediante diversos estímulos, no estando completamente elucidados hasta ahora los mecanismos

subyacentes. Se han descrito ya otras distintas rutas de reacción de colaboración/regulación de ACE2. Existen posiblemente muchas rutas de reacción, además de la transformación de Ang II en Ang 1-7, todavía desconocidas. ACE2 se regula negativamente en presencia de citocinas inflamatorias, lo que puede conducir como consecuencia a la acumulación patológica de Ang II en los compartimentos afectados y a un daño orgánico.

- 5 Debido a los procesos inflamatorios como consecuencia del daño orgánico o de infecciones víricas o bacterianas, aparece la liberación de citocinas inflamatorias, que reducen la expresión de ACE2 endógena y por tanto la generación de Ang 1-7 protector. La Ang II reactiva se acumula como consecuencia y potencia el proceso inflamatorio naciente. Igualmente, aumenta la concentración de especies de oxígeno reactivas en el tejido. En combinación con las propiedades proliferativas y vascularizantes, se genera un clima proliferativo creciente que potencia la acumulación de Ang II adicional. Para escapar a este círculo vicioso, se ha probado sorprendentemente el empleo de la actividad de ACE2 según la invención como exitoso para inhibir el crecimiento de células tumorales. Por tanto, con una ampliación terapéutica de esta actividad, puede prevenirse o incluso impedirse exitosamente la acumulación de Ang II, y así también amortiguarse la inflamación y el medio proliferativo: mediante una actividad de ACE2 aumentada o reconstituida, se controlan inmediatamente concentraciones de Ang II aumentadas patológicas.
- 10 Se replica Ang 1-7 y mitiga igualmente la inflamación mediante su efecto antiinflamatorio. Además, por su propiedad de inhibir ACE, Ang 1-7 limita la producción posterior de Ang II. El Ang 1-7 inhibe la proliferación celular y reduce como consecuencia la expresión de AT1R. El empleo de la actividad de ACE2 es por consiguiente una estrategia terapéutica eficaz para el tratamiento de diversas enfermedades tumorales, puesto que así puede suprimirse tanto la degeneración celular y la neovascularización de tumores crecientes como la metastatización de tumores sólidos.
- 15
- 20 Mediante el empleo según la invención de la actividad enzimática de ACE2, pueden llevarse de nuevo en dirección del estado de partida estable los sistemas de regulación molecular apartados del equilibrio por una enfermedad tumoral mediante una actividad enzimática conocida por el cuerpo, y por tanto que no representa una propiedad extraña. En contraposición con las "moléculas pequeñas" más artificiales, cuya especificidad de acción está limitada a menudo y cuyos productos de degradación pueden presentar problemas para el metabolismo de los pacientes, la actividad enzimática de ACE2 está implicada con los procesos de equilibrado y regulación del cuerpo, con lo que son muy improbables reacciones secundarias inesperadas. Se ha mostrado también de forma sorprendente que ACE2 es ciertamente capaz de llevar de nuevo procesos apartados del equilibrio en dirección del estado de partida estable, no pudiendo sin embargo conseguirse un efecto continuo sobre este equilibrio en la otra dirección, a pesar de una alta dosificación de la actividad de ACE2.
- 25
- 30 La excepción formal del cáncer de pulmón de los tipos tumorales para tratar según la invención se atribuye al documento WO 2004/000367, en el que se describe el uso de ACE2 para el tratamiento de enfermedades pulmonares. A este respecto, se observaron graves daños pulmonares en ratones con eliminación génica de ACE2, que pudieron prevenirse o reducirse en dichos ratones mediante la toma de ACE2. Por tanto, se confirmó un concepto terapéutico para el tratamiento sintomático de dichos daños pulmonares, sobre todo en el "síndrome de dificultadores respiratorias agudas (SDRA)", porque en el SDRA se observaron daños pulmonares análogos. Eran conocidos daños pulmonares análogos también en otras enfermedades pulmonares, así que en el documento WO 2004/000367 se propuso también el uso de la actividad de ACE2 para otras enfermedades pulmonares basándose en el modelo animal allí dado a conocer, entre ellas también el tratamiento de cáncer de pulmón. Sin embargo, resulta evidente que la divulgación del documento WO 2004/000367 no proporciona indicación alguna al experto para extender el uso propuesto para el tratamiento de cáncer de pulmón también a otras enfermedades tumorales. La divulgación del documento WO 2004/000367 se agota con la sugerencia al experto de usar la actividad de ACE2 para el tratamiento o la prevención de daños pulmonares concretos que pueden observarse en distintas enfermedades pulmonares. El documento WO 2004/000367 no contiene sin embargo ninguna divulgación dirigida al tratamiento específico y causal de cáncer de pulmón o a la reducción del crecimiento de tumor pulmonar o de células degeneradas de este tumor. La propuesta del documento WO 2004/000367 de conseguir una mejora de la función pulmonar en cáncer de pulmón mediante ACE2 no ofrece por tanto ninguna enseñanza técnica para la presente invención, sino que representa solo una superposición formal puntual accidental en cáncer de pulmón.
- 35
- 40
- 45

La presente invención es aplicable a un amplio espectro de enfermedades tumorales, en cualquier caso básicamente en todas en las que el tumor por Ang II esté acompañado por neovascularización, que es el caso en todos los tumores sólidos y muchas enfermedades cancerosas hematopoyéticas (al menos en algunos estados de dichas enfermedades malignas de la sangre).

La clasificación estadística internacional de enfermedades y problemas relacionados con la salud (CIE 10) clasifica los tumores malignos según su localización. Los grupos preferidos de tumores para tratar según la invención se asignan por consiguiente igualmente a dichos grupos locales.

- 55 Por consiguiente, la enfermedad tumoral para tratar según la invención se selecciona preferiblemente de enfermedades tumorales del tracto reproductivo, particularmente cáncer de ovario, cáncer de testículo, cáncer de próstata o cáncer de mama, enfermedades tumorales del tracto digestivo, particularmente cáncer de estómago, cáncer de intestino, carcinoma rectal, cáncer de páncreas, cáncer de esófago y cáncer de hígado, cáncer de riñón, melanomas o neuroblastomas (en los que aquí las expresiones "cáncer", "tumor", "carcinoma" etc. se usan siempre como sinónimos y se refieren a enfermedades malignas).
- 60

La presente invención es especialmente adecuada para la prevención o reducción del crecimiento de células tumorales. Este efecto puede usarse de forma ventajosa en combinación con conceptos terapéuticos conocidos. Preferiblemente, se usa por tanto el tratamiento con ACE2 según la invención en combinación con una terapia tumoral convencional, particularmente en combinación con radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal, terapia de anticuerpos, "terapia orientada" como por ejemplo inhibidor de tirosina cinasa y/o extirpación quirúrgica del tumor. El tratamiento según la invención puede usarse también en un estado muy temprano de las enfermedades tumorales, con lo que las oportunidades de curación aumentan considerablemente.

Las terapias tumorales convencionales comprenden la operación, o sea la extirpación quirúrgica del tumor y nódulos linfáticos adyacentes, la radioterapia (mediante sustancias radiactivas (por ejemplo, yodo radiactivo, que se capta activamente por la tiroides), por rayos X, por terapia de protones o radiación iónica (radiación con protones o iones que conservan el tejido circundante del tumor), por microondas (calentamiento del tejido afectado)) y el tratamiento con medicamentos (mediante productos citostáticos ("quimioterapia", con la que las células cancerosas reducen o detienen su propagación), por terapia hormonal (por ejemplo, eliminación de testosterona en carcinoma de próstata), por bloqueo de la transducción de señal inducida por receptor de crecimiento, por inhibición del crecimiento de vasos sanguíneos (agente antiangiogénico) o por inmunoterapia (para aumentar la respuesta inmunitaria contra células tumorales o con el empleo de anticuerpos específicos (monoclonales) contra antígenos tumorales o radioinmunoterapia)).

Según la invención, el tratamiento con ACE2 puede emplearse también en el marco del tratamiento paliativo o del fomento de la calidad de vida de pacientes de tumores, particularmente en el estado terminal de estas enfermedades. El tratamiento paliativo puede comprender la toma de analgésicos, el aseguramiento de una nutrición suficiente, la inhibición de la degradación ósea, el aumento de la hematopoyesis en médula ósea, los tratamientos sintomáticos (por ejemplo, distensión de estenosis mediante dilatación o inserción de prótesis endovasculares) y la fisioterapia de dichos pacientes.

Se usa con especial preferencia la actividad de ACE2 según la invención para el tratamiento de las secuelas o efectos secundarios de la terapia tumoral, particularmente para el tratamiento de las secuelas de radioterapia, quimioterapia u operación tumoral. En este sentido, es decisiva sobre todo la capacidad de la actividad de ACE2 de volver a "calmar" los sistemas de regulación endógenos descontrolados.

A causa de la toma sistémica preferida de la actividad de ACE2 y del efecto sobre la reducción del crecimiento de células tumorales, la presente invención es especialmente bien adecuada para la prevención de la metastatización de tumores.

Preferiblemente, se tratan enfermedades tumorales según la invención que se caracterizan por una concentración aumentada de angiotensina II en el tumor, en el entorno tumoral o en los pacientes de tumor. Las concentraciones aumentadas de Ang II pueden reducirse mediante ACE2 en presencia de inhibidores de ACE o antagonistas de AT1R sin efectos secundarios y así suprimirse los efectos negativos de Ang II en la enfermedad tumoral, así como elevarse simultáneamente la concentración de Ang 1-7 de acción antiproliferativa y antiinflamatoria.

Preferiblemente, se tratan según la presente invención derrames malignos, distintos edemas o una permeabilidad vascular aumentada en el marco de las enfermedades tumorales.

Como se ha mencionado, la actividad de ACE2 se administra preferiblemente en una forma aplicable por vía sistémica, con especial preferencia en una forma aplicable por vía intravenosa o en forma de un pulverizador nasal, particularmente en forma de liposoma. Sin embargo, la actividad de ACE2 puede administrarse también en forma aplicable por vía local, particularmente en forma intratumoral o intradérmica. Se prefiere especialmente en la administración a pacientes el uso de una forma soluble de ACE2.

"Polipéptido con actividad de ACE2", "polipéptido de ACE2", "ACE2" o "actividad de ACE2" se entienden aquí como sinónimos de una actividad enzimática que corresponde en el sentido químico a la actividad de la ACE2 humana natural. La ACE2 humana natural es una carboxipeptidasa anclada a membrana que se expresa como receptor sobre todo en células de pulmones, riñones y corazón, pero también de células endoteliales. La ACE2 escinde diversos sustratos peptídicos como apelina, bradicipina pero igualmente angiotensina I, que se escinde hasta angiotensina 1-9 o particularmente Ang II, que se escinde hasta Ang 1-7. Ang II y Ang 1-7 son, como se ha mencionado, antagonistas del RAS. La ACE2 es responsable del control de las relaciones peptídicas principalmente para la regulación del grosor de vasos así como para la permeabilidad endotelial, e influye en este sentido en la homeostasis del organismo. La expresión de ACE2 está controlada por citocinas y se reduce en diversas enfermedades inflamatorias, lo que conduce como consecuencia a un enriquecimiento patológico de Ang II, uno de los sustratos más importantes de ACE2. Una "actividad de ACE2" según la presente invención se refiere por tanto a un polipéptido ("polipéptido de ACE2" que en cualquier caso es capaz de hacer reaccionar Ang II específicamente hasta Ang 1-7.

Los polipéptidos de ACE2 especialmente preferidos son fragmentos de ACE2 humana natural que presentan actividad de ACE2, es decir, que pueden hacer reaccionar Ang II hasta Ang 1-7, a saber, en relación con la ACE2

humana natural, hasta al menos un 10 %, preferiblemente hasta al menos un 50 %, más preferiblemente hasta al menos un 100 %, particularmente hasta al menos un 150 %, respectivamente referida a la actividad molar.

Se ha destacado según la invención que en tumores puede regularse negativamente la Ang II aumentada mediante la elevación de la actividad de ACE2, con lo que se pone a disposición también Ang 1-7 *in situ*. Por tanto, con ACE2 según la invención es obtenible tanto el efecto positivo de inhibidores de ACE y antagonistas de AT1R como también aprovechable el efecto positivo de Ang 1-7 en pacientes. Por tanto, la elevación de la actividad de ACE2 en pacientes de tumores es perfectamente adecuada como terapia de diversas enfermedades tumorales. La ACE2 exógena puede administrarse para ello, por ejemplo, por vía sistémica como proteína soluble o su actividad endógena puede aumentarse mediante activadores o agonistas adecuados. Se describen ejemplos de activadores de ACE2 o agonistas de ACE2 adecuados, por ejemplo, en los documentos WO 2004/000365 y US 6.194.556 B1. Además, pueden elevarse igualmente mediante una preparación terapéutica adecuada la expresión de ACE2 y por tanto la actividad de ACE2. Por ejemplo, pueden establecerse actividades de ACE2 aumentadas en los pacientes de tumores mediante la incorporación de ácidos nucleicos que codifican una enzima ACE2 funcional (un polipéptido de ACE2).

Preferiblemente, sin embargo, se administra según la invención la actividad enzimática misma, particularmente en forma de un producto de ACE2 recombinante. El producto de ACE2 según la invención es a este respecto como se ha mencionado preferiblemente una forma soluble de la enzima ACE2 humana (que está presente en el cuerpo en forma unida a membrana). La molécula de ACE2 de tipo silvestre (wt) humana tiene 805 restos aminoacídicos. Los aminoácidos 1-17 representan a este respecto una secuencia señal; en el extremo C-terminal la proteína es hidrófoba y está anclada a la membrana también por este extremo. En la forma soluble de ACE2 se eliminan por tanto preferiblemente las zonas C-terminales hidrófobas; el polipéptido de ACE2 usado de forma preferida según la invención no presenta por tanto ningún dominio transmembrana en el extremo C. Las variantes preferidas de actividad de ACE2 según la invención que se usan para tratamiento tumoral presentan por tanto una delección de los 60 a 200 aminoácidos C-terminales. Las formas de realización especialmente preferidas comprenden a este respecto polipéptidos de ACE2 solubles, estando compuesta su cadena polipeptídica por los aminoácidos 18-740 o fragmentos enzimáticamente activos de la misma. Otro polipéptido preferido está compuesto por los aminoácidos 18-615 de la secuencia de ACE2 o fragmentos enzimáticamente activos del mismo.

Es una forma preferida de actividad de ACE2 según la invención la forma dimérica, como se describe en el documento EP 08450052.9. La forma dimérica es, en contraposición con la forma monomérica descrita normalmente en el estado de la técnica, más soluble en soluciones igualmente cargadas (por ejemplo, soluciones de infusión fisiológicas, suero, soluciones salinas,...), no presenta formación de agregados, está expuesta a un ataque por proteasa reducido, presenta una vida media aumentada y es más fácil de purificar.

La fracción soluble de ACE2 contiene 7 sitios de N-glucosilación. La ACE2 no completamente glucosilada es poco soluble, tiende a la agregación, es potencialmente inmunogénica y presenta una vida media acortada. Preferiblemente, el polipéptido de ACE2 recombinante dimérico está por tanto particularmente glucosilado al menos en un 80 % de las posiciones de N-glucosilación posibles y presenta una proporción de azúcar de más de un 10 % (% en masa de la ACE2 total) o de un 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, preferiblemente de más de un 15 % o 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, particularmente de más de un 20 % o 21 %, 22 %, 23 % 24 % o 25 %.

Según el documento EP 08450052.9, se ha descrito un proceso de producción con el que puede prepararse reproduciblemente ACE2 dimérica completamente glucosilada compleja de alta pureza y activa. Este producto se caracteriza por su alta proporción de azúcar (>20 % en masa) y por el tipo complejo y altamente ramificado de estructuras de azúcar parcialmente cargadas negativamente. Estas actúan positivamente sobre la solubilidad, biodisponibilidad, pureza y actividad así como farmacología del producto. Mediante la selección de un constructo de expresión adecuado, un hospedador de expresión adecuado y una estrategia de selección optimizada, mediante un medio adaptado al metabolismo celular así como mediante un análisis simultáneo de clonación y selección minucioso, ha podido prepararse una línea celular que conduce al producto deseado.

Se usa preferiblemente según la invención un polipéptido de ACE2 recombinante que está glucosilado, en el que los grupos glucosilo presentan un monómero de polipéptido de ACE2 con al menos 10, 11, 12, 13, 14, 15 o al menos 16 restos de ácido siálico en total y el polipéptido de ACE2 se presenta como dímero. Preferiblemente, el dímero contiene dos iones de cinc. Se entienden por restos de ácido siálico a este respecto particularmente restos de tipo ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac), en especial en N- u O-glucosilaciones (como es describen en la solicitud austriaca A 913/2007 o la solicitud europea EP 08450052.9).

Los polipéptidos de ACE2 preferidos presentan por consiguiente en al menos un 70 %, preferiblemente al menos un 80 %, particularmente al menos un 90 %, lo más preferiblemente un 100 % de las posiciones de N-glucosilación ácido siálico; se prefieren sializadas las posiciones de N-glucosilación correspondientes a Asn53, Asn90, Asn103, Asn322, Asn432, Asn546, Asn690 de la secuencia de ACE2. En realizaciones especiales, una de estas Asn53, Asn90, Asn103, Asn322, Asn432, Asn546 y/o Asn690 de la secuencia de ACE2 correspondiente a asparagina está individual o conjuntamente sializada una, dos, tres o cuatro veces. En una preparación de ACE2 preferida, están preferiblemente sializados al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o 100 % de estos aminoácidos una, dos, tres o cuatro veces.

Preferiblemente, se usa según la invención una preparación de polipéptidos de ACE2 recombinantes que comprende un polipéptido de ACE2 dimérico, encontrándose la proporción de polipéptidos de ACE2 con un peso molecular de menos de 100 kDa, preferiblemente de menos de 104 kDa, con especial preferencia de menos de 108 kDa, particularmente de menos de 112 kDa, con especial preferencia de menos de 117 kDa, lo más preferiblemente de menos de 119 kDa, por debajo del 20 %, preferiblemente por debajo del 10 %, con particular preferencia por debajo del 5 %, lo más preferiblemente por debajo del 1 %, en especial al 0 %. La proporción se determina para esto, por ejemplo, mediante electroforesis en gel nativo. Preferiblemente, la proporción de polipéptidos de ACE2 con dominios transmembrana se encuentra por debajo del 20 %, preferiblemente por debajo del 10 %, con particular preferencia por debajo del 5 %, lo más preferiblemente por debajo del 1 %, en especial al 0 %.

Preferiblemente, la proporción de multímeros de ACE2 se encuentra por debajo del 20 %, preferiblemente por debajo del 10 %, con particular preferencia por debajo del 5 %, lo más preferiblemente por debajo del 1 %, en especial al 0 %. Se entiende por multímeros de ACE2 complejos de 3 o más polipéptidos de ACE2. Preferiblemente, la proporción de dímeros de ACE2 en las moléculas de ACE2 asciende al menos al 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o al menos al 99 %. En otras formas de realización, la proporción de monómeros de ACE2 en las moléculas de ACE2 puede ser, en combinación o independientemente, de al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o al menos un 99 %.

Los polipéptidos de ACE2 para usar según la invención presentan preferiblemente una actividad catalítica del polipéptido de ACE2 o de la preparación (kcat) de al menos 4/s, preferiblemente de al menos 5/s, con especial preferencia de al menos 6/s, con especial preferencia de al menos 7/s, lo más preferiblemente de al menos 7,6/s, referida a la reacción de Ang II hasta Ang 1-7 (angiotensina 1-7). La reacción puede ensayarse de forma sencilla de modo conocido, pero particularmente como se describe en los ejemplos del documento A 913/2000.

Según una forma de realización preferida de la presente invención, se tratan con actividad de ACE2 según la invención los pacientes de tumor con un mal pronóstico para los pacientes.

La presente invención se ilustra detalladamente mediante los siguientes ejemplos, a los que por supuesto no está limitada.

EJEMPLOS:

Ejemplo 1. Expresión de ACE2 altamente glucosilada

Se clonó la fracción soluble de la secuencia de ACE2 humana en un vector de expresión en que se había insertado anteriormente el marcador de selección amplificable DHFR para conducir a una expresión aumentada del gen ACE2. Para ello, se incorporó entre los genes que codifican ACE2 y DHFR un IRES atenuado, que posibilita la lectura bicistrónica de ACE2 y DHFR en el mismo ARNm. Después de expresar ambas proteínas bajo el control del mismo promotor, puede aumentarse la expresión de ACE2 mediante selección con DHFR usando continuamente el antagonista MTX. Mediante esta estrategia, es posible obtener líneas celulares de expresión especialmente estables que proporcionan altos rendimientos de un producto de calidad constante. Esto posibilita también obtener títulos de producto razonables en líneas celulares que posiblemente sean menos adecuadas para la expresión recombinante de una proteína diana determinada.

Se transfectó este vector en CHOdhfr- y se amplificó el número de copias del gen ACE2 mediante presión continuamente aumentada de MTX. Mediante varias rondas de selección y subclonación, se seleccionaron los mejores productores mediante análisis FACS intracelular y análisis químicos así como enzimáticos de proteínas para propiedades de producto óptimas. Se tuvieron en consideración para la selección del clon mejor posible sobre todo la actividad enzimática específica, que se midió con 3 sustratos diferentes, la homogeneidad de producto, la productividad celular, pero también la complejidad del azúcar. Las propiedades de producto se mejoraron mediante selección específica de clones altamente glucosilados para expresar ACE2 N-glucosilada altamente activa enzimáticamente y compleja.

Aunque la ACE2 soluble presenta un peso molecular de 83 kDa, se seleccionan clones que, en PAGE-SDS debido a su estructura de azúcar, aparecen en el intervalo de hasta 120 kDa. Los clones preliminares se cambiaron después a medio de crecimiento exento de proteína. Este medio está definido químicamente y se adapta para la expresión recombinante de glucoproteínas en CHO. Todos los clones se mantuvieron en cultivo y se examinó su idoneidad para el proceso de producción. En especial, se registraron los índices de crecimiento así como se investigaron los sobrenadantes del desarrollo de producto y metabolitos. Se analizaron con exactitud de nuevo los productos de expresión así como los clones.

Todos los clones expresaban ACE2 de alta actividad y presentaban productividades de 20-30 pg/célula/día. Además, se analizaron igualmente las estructuras del azúcar y su heterogeneidad. Se seleccionaron los clones en los que se procesaban en ACE2 las 7 posiciones de N-glucosilación, presentando estas al menos una glucosilación compleja de dos, varias o también tres antenas con ácido siálico terminal. Basándose en el último clon seleccionado, se preparó un banco de células primarias y se ensayó, así como se estableció un proceso de purificación de acuerdo con las BPF y como consecuencia un proceso de producción de acuerdo con las BPF.

La ACE2r preparada según este ejemplo se obtiene como dímero. A causa de la dimerización de ACE2, todas las unidades proteicas hidrófobas se dirigen al interior del complejo, con lo que los restos cargados, como cadenas de azúcar N-unidas, se proyectan hacia fuera y la estructura se solvata en medio fisiológico igualmente cargado.

5 Esta dimerización de una ACE2 completamente N-glucosilada se comprobó mediante la expresión en presencia de Zn^{2+} . El complejo dimérico está compuesto en este sentido por 2 subunidades idénticas que están unidas electrostáticamente entre sí y no se separan tampoco ya en soluciones fisiológicas. Se llega en este sentido a la secreción de una glucoproteína respectivamente con 14 estructuras de ácido siálico fuertemente cargadas por cada molécula de ACE2, así como 28 estructuras de ácido siálico en el dímero. Se incorporan respectivamente 2 átomos de Zn^{2+} al complejo y estabilizan su estructura. La fuerte carga de las cadenas de azúcar solvata la molécula en
10 soluciones acuosas fisiológicas y fuerza a los dominios proteicos cargados correspondientes hacia fuera. El proceso de producción se estableció de tal manera que en el producto final existiera exclusivamente dímeros de ACE2. Esto posibilita que en la generación de ACE2r estén presentes suficientes iones Zn^{2+} (preferiblemente se emplea Zn^{2+} 1,5-5 μ M, particularmente la fermentación puede llevarse a cabo a Zn^{2+} 2,5-3,5 μ M) y a continuación se realizan las otras etapas de tratamiento en presencia de iones Zn^{2+} .

15 Ejemplo 2: Propiedades farmacológicas del producto

La preparación de ACE2 dimérico preparado según el ejemplo 1 se presenta en forma de una solución de proteína estable, de alta pureza y concentrada en tampón fisiológico y puede almacenarse sin más estabilización y administrarse.

20 Esta ACE2 no muestra a causa de la alta proporción de azúcar agregación hasta multímeros. Además, la preparación de ACE2 presenta la actividad enzimática completa.

La ACE2 puede administrarse en forma de bolo intravenoso debido a su solubilidad, pero también por vía subcutánea. La biodisponibilidad sistémica está garantizada por las mismas razones inmediatamente después de la toma.

25 Debido a la alta proporción de azúcar fuertemente ramificado y complejo, la ACE2 se degrada lentamente. Esto da como resultado un tiempo de vida medio terminal largo de al menos 10,5 horas, que se midió en diversas especies, entre otras también en monos *Rhesus*.

30 La alta proporción de ácido siálico causa además que no se establezca ninguna respuesta inmunitaria neutralizante contra ACE2 en las personas. Esto sería no solo contraproducente para la toma exógena de ACE2, sino que podría neutralizar también la ACE2 autóloga en la célula. La formulación de ACE2 descrita junto con todas las propiedades acompañantes permite por tanto ahora una terapia eficaz con ACE2rh.

Ejemplo 3: Determinación de la actividad específica de ACE2

35 Se determinó la actividad específica de las preparaciones de ACE2 mediante la medida de la reacción de Ang II (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe). Se llevaron a cabo todas las medidas como determinaciones por triplicado en un volumen de preparación de 100 μ l. Se inició la reacción enzimática mediante la adición de ACE2 250 ng/ml a una solución de Ang II 80 μ M en MES 50 mM, NaCl 300 mM, $ZnCl_2$ 10 μ M y 0,01 % de Brij-30 a pH 6,5. Se mezclaron cuidadosamente las muestras y se incubaron durante exactamente 18 minutos a 37 °C. Se detuvo la reacción enzimática mediante la adición de EDTA 100 mM. Para el análisis, se separaron las soluciones mediante HPLC-FI (Waters C18 μ Bondapak, 2,1 x 300 mm, 10 μ m, 125 Å) usando un gradiente lineal de 10 a 60 % de CH_3CN en 0,08 % de H_3PO_4 durante 20 minutos a un caudal de 1 ml/min. Además, se identificaron tanto los picos de Ang II como de
40 Ang 1-7 en los cromatogramas y se integraron. Se calcularon las concentraciones de péptido mediante curvas de calibración. Además, se determinó la reacción enzimática así como la actividad enzimática específica.

45 La preparación de ACE2 preparada según el ejemplo 1 presenta una actividad catalítica kcat de $8,0 \pm 0,3/s$ medida mediante la reacción de Ang II y de $8,8 \pm 0,2/s$ con relación a la reacción de Ang 1-7. Ambos valores coinciden bien y son claramente mayores que los datos de Vickers *et al.* (*J. Biol. Chem.*, 2002 277(17): 14838-43), que han publicado una actividad de ACE2 catalítica de 3,5/s. Las condiciones de reacción eran idénticas.

50 El origen de la actividad aumentada un 240 % según la presente preparación podría ser modificaciones postraduccionales, y aquí sobre todo la N-glucosilación, que en el material que ha usado Vickers eran acusada y claramente menores. El material allí descrito se expresaba en células de insecto y presentaba ciertamente la misma secuencia aminoácida, pero glucosilada con una proporción y grado de ramificación claramente menores. Se ha investigado además una preparación de ACE2 obtenible comercialmente de R&D Systems (cat. 933-ZN), que presentaba igualmente una actividad kcat claramente menor de $2,0 \pm 0,1/s$. Es entonces una propiedad esencial de la preparación dimérica para usar preferiblemente según la invención la actividad asombrosamente alta, que se posibilita sobre todo por modificaciones postraduccionales.

Ejemplo 4: Represión del crecimiento de células tumorales

Se sembró una línea celular tumoral a una densidad celular de $2,5 \times 10^4$ células/ml en 200 μ l de RPMI 1640 con 10 % de FCS en placas de 96 pocillos y se incubó a 37 °C y 5 % de CO₂. Se evaluó la influencia de diversos componentes activos del RAS mediante las siguientes preparaciones de ensayo. Se llevaron a cabo todos los análisis como determinaciones por triplicado (ACE2s = ACE2 soluble sin dominios de membrana C-terminales):

5 Condición A. Medio de cultivo RPMI 1640 con 10 % de FCS como control

Condición B. Medio de cultivo suplementado con Ang II 100 nM

Condición C. Medio de cultivo suplementado con Ang 1-7 100 nM

Condición D. Medio de cultivo suplementado con ACE2s 20 μ g/ml

Condición E. Medio de cultivo suplementado con ACE2s 20 μ g/ml y Ang II 100 nM.

10 Se extrajeron diariamente 100 μ l de medio y se sustituyeron por el mismo volumen de medio reciente específico. Se determinó el recuento celular los días 2, 3, 6, 8, 10, 13, 15 y 17 mediante recuento múltiple en hemocitómetro. Se usó para cada determinación una placa de ensayo preparada separadamente.

15 Fueron visibles diferencias significativas en la determinación del recuento celular causadas por las distintas condiciones de crecimiento a partir del cuarto día de cultivo. La adición de Ang II causaba un crecimiento celular claramente aumentado. Ang 1-7 por el contrario reducía el crecimiento celular. Aunque ACE2 sola (comprensiblemente a falta de sustrato) inducía un crecimiento aumentado marginal, la adición de ACE2 en presencia de Ang II reducía el crecimiento celular, similarmente a mediante la adición de Ang 1-7 solo. La ACE2 neutralizaba por consiguiente no solo el crecimiento celular aumentado inducido por Ang II, sino que inhibía aquel bajo el efecto del péptido Ang 1-7. Esto ocurría evidentemente solo cuando además de ACE2 se añadía también

20 Ang II al medio de crecimiento.

Por consiguiente, pudo mostrarse también con este ejemplo que ACE2 amortigua la ruta "activadora" de Ang II y puede establecer el lado "atenuante" de Ang 1-7. Ambos efectos causan, como se documenta experimentalmente, un crecimiento de células tumorales retardado.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un polipéptido con actividad de enzima convertidora de angiotensina 2 (angiotensin converting enzyme 2; ACE2) para la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades tumorales, excepto cáncer de pulmón.
- 5 2. Uso según la reivindicación 1, caracterizado porque la enfermedad tumoral se selecciona de enfermedades tumorales del tracto reproductivo, particularmente cáncer de ovario, cáncer de testículo, cáncer de próstata o cáncer de mama, enfermedades tumorales del tracto digestivo, particularmente cáncer de estómago, cáncer de intestino, carcinoma rectal, cáncer de páncreas, cáncer de esófago y cáncer de hígado, cáncer de riñón, melanomas o neuroblastomas.
- 10 3. Uso según la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque se usa ACE2 para el tratamiento de secuelas o efectos secundarios de la terapia tumoral, particularmente para el tratamiento de las secuelas de radioterapia, de quimioterapia o de operación tumoral.
4. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque se usa un polipéptido con actividad de ACE2 para la prevención de la metástasis de los tumores.
- 15 5. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque las enfermedades tumorales se caracterizan por una concentración aumentada de angiotensina II en el tumor, en el entorno tumoral o en los pacientes de tumor.
6. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque el polipéptido con actividad de ACE2 se usa para el tratamiento de derrames malignos, edemas o permeabilidad vascular aumentada en el marco de enfermedades tumorales.
- 20 7. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque el polipéptido con actividad de ACE2 se presenta en una forma aplicable por vía sistémica, preferiblemente en una forma aplicable por vía intravenosa o en forma de un pulverizador nasal, particularmente en forma de liposoma.
8. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque el polipéptido con actividad de ACE2 se presenta en una forma aplicable por vía local, particularmente en una forma intratumoral, subcutánea o intradérmica.
- 25 9. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque se usa una forma soluble de ACE2.
10. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque se usa una forma dimérica de ACE2.
11. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque se usa el polipéptido con actividad ACE2 en combinación con una terapia tumoral convencional, particularmente en combinación con una radioterapia, una quimioterapia, una terapia de anticuerpos y/o una extirpación quirúrgica del tumor.
- 30 12. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado porque la enfermedad tumoral se caracteriza por un mal pronóstico para los pacientes.
13. Polipéptido con una actividad de enzima convertidora de angiotensina 2 (angiotensin converting enzyme 2; ACE2) para aplicación en el tratamiento de enfermedades tumorales, excepto cáncer de pulmón.
- 35 14. Polipéptido para aplicación según la reivindicación 13, definido además según una de las reivindicaciones 2 a 12.