

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 443 305**

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 10178474 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2013 EP 2332582**

54 Título: **Activación de la ECA2 para el tratamiento de enfermedades cardíacas, pulmonares, 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:

**18.02.2014**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**PENNINGER, JOSEF y  
CRACKOWER, MICHAEL, A.**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 443 305 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 la ECA2 para el tratamiento de enfermedades cardíacas, pulmonares, renales e hipertensión

### **Campo de la invención**

5 La presente invención y divulgación proporciona composiciones y procedimientos para 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 choque tóxico o ventilación artificial.

### **Antecedentes de la invención**

10 La enfermedad cardiovascular será la número uno de la carga sanitaria del siglo XX1 y se ha predicho que será la causa más frecuente de muerte en el mundo en 2020. Un factor de riesgo principal para la enfermedad cardíaca es la hipertensión.

15 La hipertensión es un rasgo cuantitativo multifactorial controlado tanto por factores genéticos como ambientales. Aunque se conoce mucho acerca de los factores ambientales que pueden contribuir a la presión arterial alta, tales como la dieta y la 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 supuestos loci genéticos de rasgo cuantitativo (QTL) asociados a la hipertensión en modelos animales, ninguno de estos loci se ha traducido en genes. De este modo, los mecanismos moleculares y genéticos que subyacen a la hipertensión y a otras enfermedades cardiovasculares permanecen en gran medida oscuros.

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

30 Recientemente se ha identificado un homólogo de la ECA, denominado ECA2, que se expresa predominantemente en las células endoteliales vasculares del riñón y del corazón. De manera interesante, también existen dos homólogos de la ECA en las moscas. Al contrario que la ECA, la ECA2 funciona como carboxipeptidasa, que escinde un único resto de AngI y genera Ang1-9, y un único resto de AngII para generar Ang1-7. Estos datos bioquímicos in Vitro han sugerido que la ECA2 modula el RAS y, de este modo, desempeña un papel en la regulación de la presión arterial. Se conoce el papel in vivo de la ECA2 en el sistema cardiovascular y el RAS.

35 Acton y col., en la patente de Estados Unidos N° 6.194.556 describen el uso de la ECA2 en la diagnosis y terapéutica de los estados asociados a la ECA2. La patente estableció que los niveles de expresión de la ECA2 se incrementan con la hipertensión y que los antagonistas o los inhibidores de la ECA2 serían útiles en el tratamiento de un incremento de la presión arterial o de trastornos relacionados. La solicitud de patente canadiense n° 2.372.387 proporciona ejemplos específicos de inhibidores de la 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 la ECA2. Estas referencias, que enseñan la necesidad de inhibir la actividad de la 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 la ECA2 como compuesto farmacéutico para el tratamiento de hipertensión. Además, el papel in vivo de la ECA2 en el sistema cardiovascular y el RAS permanece en gran medida desconocido. Permanece una necesidad de caracterizar la función de la 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 divulgación 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) y no esperada en la técnica anterior, como un regulador crítico negativo del RAS requerido para la función cardíaca y el control de la presión arterial. La activación de la ECA2 es crítica para el tratamiento y la prevención de enfermedad cardíaca, pulmonar y renal. La divulgación muestra por 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.

### **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.

a, alineación proteica de la ECA2 de rata, de ratón y ser humano, con ECA de testículos humanos y de ratón (T-ACE). El sombreado en negro indica la identidad de aminoácidos y el sombreado en gris indica el grado de similitud de aminoácidos. b, Estructura esquemática del dominio de la ECA y la ECA2. Se debe hacer notar que la ECA2 solamente contiene el dominio de la ECA con el sitio de unión de cinc de consenso 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 diferentes tejidos adultos y en días diferentes del desarrollo embrionario (E7 = día embrionario 7). Se debe hacer notar que están presentes dos isoformas para la ECA2 en ratones, pero no en rata o en ser humano (no mostrado), una característica similar a la observada para la ECA15. d, Resultados del mapeo de híbrido de radiación de la ECA2 de rata, comparado con el mapeo de QTL identificado en animales sensibles a sal Sabra (SS-, SHRSP (BP3), y SHR (BB.Xs). Los nombres de los marcadores polimórficos se indican a la izquierda del ideograma. Se muestran las puntuaciones LOD y los valores theta para los marcadores unidos a la ECA2. cR = centiRadianes.

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

a, análisis de transferencia Northern de 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 la *eca2* normalizado para los niveles de actina. b, Análisis de transferencia de Western de los niveles de proteína de la 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 arterial sistólica (BP) en mmHg para las respectivas ratas Sabra. El panel inferior muestra los niveles de proteína relativos de la ECA2 corregidos para actina. Las barras muestran los valores medios +/- ETM. \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ . (n = 4, para todos los grupos).

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

a, Estrategia de dirección de genes. Se muestra una parte del locus de tipo salvaje de la *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 *eca+/y* y *eca-/y* ES. Se digirió el ADN genómico con EcoRI y se hibridó con la sonda flanqueante de 3' y 5' mostrada en (a). c, Análisis de transferencia de Western de la proteína de expresión de la ECA2 en los riñones de ratones *eca2 eca'*. 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 la ECA en el corazón y riñones de ratones *eca2* y *eca2'*. Se muestran diferentes ciclos de PCR para la amplificación lineal y los niveles de ARNm de GAPDH como control.

Figura 4. Presión arterial y funciones renales normales. a, se muestran mediciones de la presión arterial en ratones de 3 meses de edad *eca2+/y* (n = 8) y *eca2'* (n = 8) en ausencia (paneles izquierdos) o presencia del bloqueador de la 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 arterial como se describe en los Procedimientos. Estas presiones arteriales se confirmaron usando mediciones hemodinámicas y de Langendorf invasivas (no mostradas). Las diferencias en los ratones tanto los ratones tratados con captopril *eca2* y *eca2NY* son significativamente diferentes de las 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 *eca2'*. Las flechas indican glomérulos.

Figura 5. Morfología del corazón

a, Secciones teñidas con H y E de corazones aislados de ratones de 6 meses de edad *ECA2* y *ECA2'/Y*. En ratones *ECA2'* se observaron ventrículos izquierdos (VI) y ventrículos derechos (VD) agrandados. Sin embargo, el tamaño global del corazón era comparable entre ambos genotipos y no existía evidencia de hipertrofia cardíaca, microscópicamente o en cardiomiocitos aislados. b, Cuantificación de las relaciones de peso de corazón/cuerpo de los ratones de 6 meses de edad *eca2* (n = 8) y *eca2'* (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 principal de la miocardiopatía dilatada es la fibrosis intersticial. Sin embargo, la fibrosis intersticial era comparable entre los corazones de ratones *eca2* (n = 8) y *eca2'* (n = 8). (c) muestra la tinción de PSR de corazones individuales. Se debe hacer notar 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

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). Se debe hacer notar 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 y *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. Los datos experimentales se pueden ver en la Tabla 1.c, Mediciones de la presión arterial 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. Regulación por aumento de los marcadores de hipoxia y el incremento de los niveles de la angiotensina II en ausencia de la 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'* (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.

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

a, Mediciones de la presión arterial en ratones macho de 6 meses de edad *ECA2* (n = 8), *ECA -/-* (n = 8), y ratones doble mutantes *eca-/- ECA2-/-y* (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-/-y* ( n = 8), *eca'* (n = 8) y *eca-/- eca2-/-y* 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-/-y*, *eca-/-*, y *eca<sup>+/+</sup> eca2-/-y* doble mutante de la misma camada. Se analizaron los ecocardiogramas y se marcaron como se describe en la Figura 6a. Se debe hacer notar que la ablación de la ECA en un fondo nulo de la ECA2 completamente rescata los defectos del corazón contráctil observado en los ratones *ECA2-/-y* mutantes individuales.

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

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

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

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

### **Descripción detallada de la invención**

Se 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 invención y 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

Este resultado es completamente inesperado en vista de las referencias de la técnica anterior, tal como la Patente de Estados Unidos n° 6.194.556 y la Solicitud de Patente Canadiense n° 2.372.387, descrita anteriormente, que enseña que la actividad de la 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 la ECA2.

La invención y divulgación también incluye activadores que incluyen, entre otros, activadores de la función de la ECA2 y/o del ARNm de la ECA2 y la expresión proteica de la ECA2, y composiciones farmacéuticas que incluyen los activadores. La invención y divulgación también incluye procedimientos de tratamiento médico de enfermedades cardíacas, enfermedades pulmonares y enfermedades renales 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, sarcoidosis 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 enfermedades cardíacas y renales, e hipertensión y enfermedades pulmonares. Estos ensayos son *in vitro* o *in vivo*. En una realización preferida la divulgación incluye un ensayo de células huésped endoteliales, de riñón, pulmón o corazón 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 del que se busca determinar su capacidad para activar la expresión o actividad y las células se miden para determinar un incremento en el nivel de expresión de la ECA2. Otro aspecto de la divulgación implica un ratón con inactivación de la ECA2 para identificar los compuestos que pueden superar los efectos de la pérdida de la ECA2. Los polipéptidos y moléculas orgánicas se analizan en estos ensayos. La divulgación incluye todos los compuestos que se identifican con los procedimientos de selección de la invención y que son adecuados para la administración a animales en las composiciones farmacéuticas.

Otro aspecto de la divulgación 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 divulgación 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 invención es útil para tratar y diagnosticar enfermedades asociadas con una expresión o actividad menor de ECA2. El diagnóstico también se realiza opcionalmente mediante el análisis de polimorfismos cadena arriba o cadena abajo del y dentro del gen de la ECA2 que están asociados con un estado de disminución de la ECA2. Todos los reactivos requeridos para la detección de uno o más nucleótidos que distinguen los polimorfismos, por medios descritos en el presente documento, se pueden proporcionar en un único kit para el análisis de ADN genómico aislado de un 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 de la ECA2 está regulada por disminución en la hipertensión y la enfermedad cardíaca y renal.

De acuerdo con lo anterior, se proporciona un procedimiento de tratar o prevenir la hipertensión, la enfermedad cardíaca, la enfermedad pulmonar o renal, que comprende administrar una cantidad eficaz de un agente que pueda aumentar la expresión de la ECA2 a un animal que lo necesite.

La expresión "un agente que pueda aumentar la expresión de la ECA2", como se usa en el presente documento significa cualquier agente que pueda aumentar el nivel o la actividad de un gen o proteína ECA2 en comparación con el nivel o la actividad del gen o proteína ECA2 en el mismo tipo de célula en ausencia del agente. El agente puede ser cualquier tipo de sustancia, incluidas, entre otras, moléculas de ácido nucleico (incluyendo ECA2 o sus fragmentos), proteínas (incluyendo ECA2 o sus fragmentos), péptidos, hidratos de carbono, moléculas pequeñas o compuestos orgánicos. Si o no el gen de la ECA2 se incrementa se puede determinar fácilmente por los expertos en la técnica usando procedimientos conocidos incluyendo transferencia de Western SDSPAGE, 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 preferentemente seres humanos.

La expresión "cantidad eficaz" como se usa en el presente documento significa una cantidad eficaz a dosificaciones y durante períodos de tiempo necesarios para potenciar el nivel de la ECA2.

La expresión "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 la ECA2

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

En otra realización, la expresión del gen de la 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.

5 Ya que un animal que sufre 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 la 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 la ECA2 para el tratamiento de enfermedades, trastornos o estados físicos anormales caracterizados por la disminución de la expresión de la ECA2 o niveles de la actividad del polipéptido de la ECA2.

10 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 la ECA2 en las células proporciona la actividad biológica o fenotipo del polipéptido de la 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 la ECA2 a las células. Por ejemplo, el procedimiento puede preferentemente 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 la ECA2 mediante la administración de ADN que codifica ECA2. El 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 EE.UU. N° 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 preferentemente implica la transfección de células que permiten la replicación de virus (conteniendo el virus la molécula de ácido nucleico) y recoger el virus producido.

30 Los procedimientos y composiciones se pueden usar *in vivo* o *in vitro*.

También se incluyen composiciones (preferentemente composiciones farmacéuticas para 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 basados en lentivirus, o plásmidos. La invención 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.

40 La divulgación también incluye una célula transformada que contiene el vector y las secuencias de moléculas de ácido nucleico de la ECA2 recombinantes.

#### *Uso de variantes de la ECA2 – Modificaciones a la secuencia de polipéptido*

Las variantes de la ECA2 se pueden usar en los procedimientos divulgados en el presente documento. Los cambios que dan como resultado la producción de una secuencia de aminoácidos químicamente similar equivalente están incluidas dentro del ámbito de la invención. Los polipéptidos que tienen identidad de secuencias con el receptor de la ECA2 se ensayan para asegurar que son adecuados para el uso en el procedimiento de la invención. Se pueden producir de manera natural variantes de polipéptidos de la invención, 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 sustituir por otro aminoácido cargado positivamente tal como arginina.

55 Por lo tanto, la invención 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 invención 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 invención. 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 invención también se pueden preparar de acuerdo a otras técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, tratando un polipéptido de la invención con una agente que altera químicamente un grupo lateral convirtiendo un grupo hidrógeno en otro grupo tal como un grupo hidroxilo o amino. Los miméticos preferentemente 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 invención también incluye procedimientos de uso de fragmentos de polipéptidos de la ECA2 que se pueden usar para conferir actividad del compuesto si los fragmentos retienen actividad. La invención también incluye polipéptidos y fragmentos de los polipéptidos de la invención que se pueden usar como una herramienta de investigación para caracterizar el polipéptido o su actividad. Tales polipéptidos preferentemente 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.

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

La actividad de la ECA2 se aumenta o se 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 preferentemente 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 un sistema de expresión y se controla su actividad.

La invención y 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 preferentemente 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. Preferentemente aproximadamente: 1, 2, 3, 4, 5, 6 a 10, 10 a 25, 26 a 50 o 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 preferentemente 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.

Preferentemente 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 invención 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 la ECA2**

Se seleccionan pequeñas moléculas orgánicas para determinar si incrementan la expresión o actividad de la ECA2. Los fragmentos de polipéptidos de la ECA2 así como los polipéptidos que tienen identidad de secuencia con ECA2 también se ensayan para determinar si incrementan la actividad de la ECA2 en ensayos *in vitro* e *in vivo* en líneas celulares. Los activadores se dirigen preferentemente hacia dominios específicos de ECA2 para incrementar la activación de la 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 la ECA2. Se pueden ensayar muestras biológicas y genotecas comercialmente disponibles para sustancias tales como proteínas que se unen a un gen o proteína de la ECA2. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de una proteína de la 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 la 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 la 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 poli(acrilamida), 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 la ECA2 son útiles en los procedimientos de la presente invención para potenciar la expresión de la 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 la ECA2. En particular, los procedimientos se pueden usar para identificar sustancias, que son capaces de unirse y aumentar o potenciar la expresión de la ECA2. De acuerdo con lo anterior, la divulgación proporciona un procedimiento de identificación de sustancias que se unen a un gen o proteína de la ECA2 que comprende las etapas de:

(a) hacer reaccionar un gen o proteína de la ECA2, preferentemente inmovilizado, y una sustancia de ensayo en condiciones que permitan la formación de un complejo, y

(b) analizar complejos en busca de sustancia libre y para gen o proteína sin formar complejos.

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 cristalográficos 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 invención 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 y col., 1992, J. Mol. Biol. 227: 711; Devlin y col., 1990 Science 249: 404; Cwirla y col., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6378). También se pueden construir genotecas mediante la síntesis concurrente de péptidos de superposición (véase la Patente de Estados Unidos N° 4.708.871). Se analizan 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 la ECA2 mediante el cultivo de células (preferentemente células renales o cardíacas) en 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 la ECA2. La expresión y / o actividad de la 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 la ECA2. El aumento de expresión y / o actividad de la ECA2 indica que el compuesto candidato es útil para tratar enfermedad cardíaca o renal.

Un procedimiento de determinar si un compuesto candidato aumenta la actividad de la ECA2 (y es útil para tratar la enfermedad cardiovascular y/o la enfermedad renal y/o a enfermedad pulmonar y/o la hipertensión) también puede incluir:

5 a) poner en contacto (i) ECA2, un fragmento de la ECA2 o un derivado de los anteriores con (ii) una sustrato de la ECA2 en presencia del compuesto candidato; y

10 b) determinar si está aumentada la actividad de la ECA2 en el sustrato, de modo que se indica que el compuesto aumenta la actividad de la ECA2. un incremento en la actividad de la ECA2 indica que el compuesto es útil para tratar enfermedades cardiacas o enfermedades renales o pulmonares enumeradas en la presente solicitud o hipertensión. La determinación de un incremento en la actividad de la ECA2 preferentemente implica la determinación de si el compuesto incrementa la actividad proteolítica de ECA2 (incremento de la hidrólisis de sustratos). Los ensayos se someten a la condición de que el compuesto candidato no sea una sal de sodio - halógeno o una sal de potasio - halógeno y el ensayo no se dirige a la medición del efecto de incrementar la concentración de iones en la proteólisis de ECA2. Los sustratos de la ECA2 incluyen AngII, Angil, des-Ang, AngII, apelina-13, dinordina 13, beta-casomorfina y neurotensina.

15 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 la ECA2 se muestra en Vickers y col., 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 esta invención 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)

40 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.

45 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 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.

60 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.

5 Includo en el ámbito 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

15 Los activadores de la expresión y actividad de la ECA2 se combinan preferentemente con otros componentes, tal como un vehículo, en una composición farmacéutica. Estas composiciones se pueden administrar a un animal, preferentemente 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, SDRA o cáncer de pulmón. La enfermedad renal incluye insuficiencia renal. Los activadores de la ECA2 son útiles para regular la presión arterial e hipertensión arterial. La presión arterial normal tiene una presión arterial diastólica menor que 85 mm Hg. La alta presión arterial normal tiene una presión arterial diastólica entre 85 y 89 mm Hg. La hipertensión leve corresponde a una presión arterial diastólica entre 90 - 104 mm Hg. La hipertensión moderada tiene hasta una presión arterial diastólica entre 105 y 114 mm Hg.

25 La hipertensión grave tiene una presión arterial diastólica mayor que 115 mm Hg. La presión arterial anormal también se determina a partir de la presión arterial sistólica (cuando la presión diastólica es menor que 90 mmHg). La presión arterial normal tiene una presión arterial 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 arterial sistólica mayor que 160 mm Hg. (Cecil: Essentials of Medicine, Tercera edición por Andreoli y col., W.B. Saunders Company (1993)). Se diagnostica hipertensión en un adulto mayor de 18 años de edad si la media de dos o más mediciones de presión arterial 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 arterial menor, así una presión arterial por encima de 120/80 (es decir, 120 mm Hg de presión arterial sistólica /80 mm Hg de presión arterial diastólica ) indica hipertensión.

35 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, del efecto deseado y de la vía de administración elegida.

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

45 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).

50 Sobre 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 la ECA2

55 Los vectores de expresión son útiles para proporcionar altos niveles de expresión de la 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 la ECA2. Se incluyen vectores selectivos para las células cardíacas y células de riñón preferentemente células endoteliales que normalmente constituyen ECA2. Los ejemplos de vectores para las células cardíacas y renales se describen, por ejemplo, en Rosengart y col., Patente de Estados Unidos nº 6.322.536; March y col., Patente de Estados Unidos nº 6.224.584; Hammond y col., Patente de

Estados Unidos nº 6.174.871; Wolfgang-M. Franz y col., Analysis of tissue - specific gene delivery by recombinant adenoviruses containing cardiac-specific promoters. Cardiovascular Research 35 (1997) 560 - 566; Rothmann T. y col., Heart muscle-specific gene expression using replication defective recombinant adenovirus. Gene Ther 1996 Oct;3 (10): 919 - 26; Phillips MI y col., Vigilant vector: heart-specific promoter in an adeno-associated virus vector for cardioprotection. Hypertension 2002, Feb; 39 (2 Pt 2):651-5; Herold BC y col., 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 y col., 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 y col., Tissue- specific gene therapy directed to tumor angiogenesis. Gene Ther 2001 Jun;8 (11): 819-27; Scott-Taylor TH y col., Adenovirus facilitated infection of human cells with ecotropic retrovirus. Gene Ther mayo de 1998; 5 (5):621 - 9; Langer JC y col., 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 y col., Gene therapy for renal diseases. Kidney Int Suppl 1997 Oct; 61:S85-8; y Ohno K y col., 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, preferentemente 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 la 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 la ECA2**

La medición de la expresión o actividad de la 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 invención 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 la ECA2 en la muestra; y (c) correlacionar la presencia de niveles de la 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 la ECA2 por debajo de lo normal o por debajo de la actividad de la ECA2 indican la presencia de riesgo o enfermedad.

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

La presente divulgación 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 encuentra dentro de la región de codificación de la ECA2. Todos están cadena arriba o cadena debajo 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	Afroamericano	Asiáticos	Caucásico	Referencia
ECA2a rs879922	C(C/G)	60	100	70	C
ECA2b rs757056	T(C/T)	100	100	70	T
ECA2c rs714205	C(C/G)	70	50	80	C
ECA2d rs329442	C(A/C)	50	90	90	A/C

## ES 2 443 305 T3

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)	Faillido	100	70	A
ECAI 2rs1514280	C(C/T)	80	100	50	C
ECA2m rs233575	C(C/T)	100	100	50	C

El número de nucleótidos de los polimorfismos que controlan la expresión génica de la 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 de la invención 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 de la invención se puede convertir en una sonda mediante marcado en el extremo usando digoxigenina-11- deoxiridina 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-indoil 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.

25 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, 30 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.

Se proporciona un kit de ensayo para genotipado 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
- 35 (b) una sonda polinucleotídica que distingue un polimorfismo de ECA2 del otro.

El "medio para amplificar" 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 tipado 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 de acuerdo con la invención), 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, 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 pueden usar para tratar este estado.

### **Caracterización de la 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 arterial y niveles de la 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 la 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 arterial.**

La mayoría de las enfermedades cardiovasculares son caracteres cuantitativos multifactoriales controlados por factores tanto genéticas 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 la *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 la ECA2 están regulados hacia abajo. El locus SS-X identificado en el análisis de QTL en ratas Sabra también se identifica como un locus que confiere resistencia a la carga de sal. La reducción en ECA2 in 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 arterial 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 la ECA2 en nuestros ratones no dio como resultado ningún cambio directo en la presión arterial incluso cuando la función de la ECA estaba bloqueada. Los cambios de la presión arterial 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 arterial. En su lugar, estos QTL definen los determinantes individuales de la presión arterial, que de acuerdo con otros polimorfismos genéticos promueven el cambio en la presión arterial. Los inventores han identificado la asociación de los polimorfismos ECA2 con alta presión arterial 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 arterial.

### ECA2 y el control de la función cardíaca.

De manera inesperada, la pérdida de la ECA2 en ratones da como resultado una disfunción profunda contráctil que conduce a una reducción intensa de la presión arterial 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 la ECA desencadena una alteración contráctil en ausencia de la ECA2. dado que estos defectos de contracción se pueden producir en ausencia de hipertrofia o cualesquiera cambios detectables en la presión arterial, 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 arterial e hipertrofia cardíaca.

Los inhibidores de la 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 *eca/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 la 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 la ECA2. De manera interesante, los resultados de los investigadores en moscas muestran que una mutación del elemento P asociada al homólogo de la ECA, ACER, da como resultado un defecto grave y letal de morfogénesis del corazón (datos no mostrados) que muestran que las funciones de la ECA/ECA2 en el corazón se han conservado a lo largo de la evolución.

El defecto en los corazones mutantes de la 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 la 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 la ECA2 se confinen a la vasculatura. Por ejemplo, incrementos locales en AngII podrían conducir a la vasoconstricción que da como resultado hipoperfusion 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.

5 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.

10 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  
15 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.

20 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.

25 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.

30 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:

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

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

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

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.

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

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.
- 5 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.
- 10 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 debajo 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.
- 15 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.
- 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.
- 20 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.
- 25 Definición 35. Un polinucleótido que comprende una secuencia de una específicamente a i); región cadena arriba o cadena debajo 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.
- 30 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.
- 35 Definición 38. 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:
- 40 a. 8-50 nucleótidos de una región cadena arriba o cadena debajo 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
- 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.
- 45 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.
- 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:
- 50 a. un pigmento fluorogénico; y/o

b. una modificación de biotinilación; y/o

c. un radiomarcador.

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.

5 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.

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

10 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.

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

15 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.

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.

20 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.

25 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:

a. obtener una muestra de ácido nucleico de ECA2 derivado del animal, que incluye regiones cadena arriba y cadena debajo de la región de codificación de la ECA2; y

30 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.

35 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.

40 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.

45 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.

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.

5 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

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

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 mapeado cromosómico de la ECA2 de ratas, se clonó el ADNc de la 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 la 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).

El mapeado 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 mapeado comparativo mostró que la posición del mapa de la 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 la 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 congénito (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.

#### Regulación por disminución de la expresión de la ECA2 en ratas hipertensas

Dado que el riñón es un sitio principal de regulación de la presión arterial, se determinaron los niveles de expresión de la ECA2 en los riñones de tres razas de ratas hipertensas. Los niveles de ARNm de la 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 la 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 la ECA2 cuando se compara con las ratas SBN/y normotensas (Fig. 2a). Hay que hacer notar que el ARNm de la 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 arterial observada entre ratas SBH/y y SBN/y alimentadas con dieta normal.

Para medir los niveles de proteína de la ECA2, se generó un antisuero de conejo específico de la 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 Hermn de la ECA2 disminuida, la expresión de proteína de la ECA2 se redujo de manera notable en los animales SBH/y que se alimentaron con dieta normal (Fig. 2b). El incremento en la presión arterial de ratas SBH/y después de una dieta de 4 semanas de sal DOCA correlacionada además disminuyó la expresión de proteína de la ECA2 (Fig. 2b). la carga de sal no desencadenó un incremento en la presión arterial ni alteraba la expresión de ECA2 en ratas de control SBN/y resistentes a sal (Fig. 2b). Los niveles de proteína de la 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 la ECA2 en ratas SHRSP y SHR hipertensas (no mostrado). La clonación y secuenciación de la región codificante de la 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 la ECA2. La posición del mapa y expresión reducida de la 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 la ECA2 en las tres razas de ratas hipertensas sugirió que esta enzima funciona como un regulador negativo.

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

Para validar la candidatura de la 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 y ECA2 humano, ECA2 murino también se mapea para el cromosoma X (no mostrado contiene un único dominio de la 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 la 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 la 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 la ECA2 se confirmó mediante análisis de transferencia de Southern (Fig. 3b). la mutación nula de la ECA2 se verificó mediante la ausencia de transcripciones de *ARNm de la ECA2* y análisis de transferencia de Northern (no mostrado) y de Western (Fig. 3c). La expresión de ARNm de la 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 ( $ECA2^{+/y}$ ) 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  $ECA2^{+/y}$  indican que no existe un efecto aparente de de heterocigosis de la 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  $eca^{-/-}$  que muestran una fertilidad significativamente reducida, tanto los machos como las hembras sin ECA2 son fértiles.

#### Presión arterial en ratones mutantes ECA2

Se ha mostrado previamente que los ratones mutantes ECA2 muestran reducción de presión arterial y patología renal. Por lo tanto, se ensayó primero si la pérdida de la expresión de la ECA2 afecta a la homeostasis de la presión arterial y / o desarrolló o función renal. De manera intrigante, la pérdida de la ECA2 no dio como resultado la reducción de la presión arterial 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 pueda compensar la pérdida de ECA2, los inventores trataron ratones deficientes en ECA2 con captopril que bloquea la ECA pero no la función ECA2. Sin embargo, la inhibición *in vivo* de la ECA con captopril redujo la presión arterial de ratones macho  $eca^{-/y}$  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 la ECA, la pérdida de la ECA2 no tiene efecto directo evidente sobre la homeostasis de presión arterial 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 arterial similar a los antecedentes genéticos en seres humanos.

#### Función renal alterada en ratones mutantes ECA2

Dado que la 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:  $1,45 \pm 0,2$  frente a  $0,25 \pm 0,06$ ;  $n = 6$ ;  $p < 0,01$ . La microscopía electrónica mostró un aumento en la deposición de fibrillas 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- $\alpha$ ) 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 ( $1001 \pm 161$  frente a  $115 \pm 13$  nmol/g;  $n = 5$ ;  $p < 0,01$ ) y malondialdehído ( $48 \pm 6,4$  frente a  $24,3 \pm 2,8$  nmol/g;  $n = 5$ ;  $p < 0,01$ ).

Estos resultados muestran que la pérdida de la 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 la ECA2. La disminución de la expresión de la ECA2 juega un papel patológico importante en la enfermedad renal.

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

La inhibición farmacológica de la 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 la *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 diastólica del extremo del ventrículo izquierdo (LVEDD) 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<sup>-/-</sup>* y *ECA2<sup>+/-</sup>* (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,  $\alpha$ -MHC,  $\beta$ -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 leve dilatación de los corazones en los ratones sin *ECA2* de 6 meses de edad, no había evidencia de hipertrofia cardíaca o miocardiopatía dilatada.

De manera interesante, la determinación de la función cardíaca mediante ecocardiografía reveló que todos los ratones macho *ECA2<sup>-/-</sup>* y hembras *ECA2<sup>-/-</sup>* 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<sup>-/-</sup>* mostraron una presión arterial reducida (Fig. 6c), una característica no encontrada en hembras de la misma edad *ECA2<sup>-/-</sup>* y machos de 3 meses de edad, sugiriendo que la reducción en la presión arterial puede ser el resultado de la disfunción cardíaca grave y no un efecto directo de la pérdida de la *ECA2* sobre la presión arterial 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 la *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 la *ECA2* se producen en ausencia de cualquier hipertrofia cardíaca manifiesta y puede estar no acoplada genéticamente con las alteraciones de la presión arterial.

### **Regulación por aumento de los genes inducibles por hipoxia en ratones sin *ECA2***

La disfunción contráctil grave de y dilatación leve en 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 la *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 la *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 la *ECA2* funciona como una carboxipeptidasa, que escinde 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 radioinmunoensayos, los niveles de AngII se encontraron de hecho que estaban incrementados de manera significativa en los riñones y corazones de ratones mutantes de la *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 la *ECA2* *in vivo*. No se encontraron diferencias en los niveles de ARNm de la *ECA* en los corazones y riñones de ratones mutantes de la *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 la 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 la ECA en ratones deficientes en ECA2 rescata la insuficiencia cardíaca**

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

10 Dado que la función cardíaca de los ratones con inactivación de la ECA no se había reseñado anteriormente se analizaron primero los parámetros cardíacos en estos ratones. En los ratones *eca*<sup>-/-</sup>, 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 la 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 *eca- 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 *eca-ECA2* tanto machos como hembras. Estos datos genéticos muestran que la expresión de la ECA se requiere y es necesaria para desencadenar la insuficiencia cardíaca contráctil en ausencia de la ECA2. De manera importante, no existe ninguna diferencia en la presión arterial entre los ratones ECA e inactivados *eca/ECA2* (Fig. 8a), implicando además que la reducción de la presión arterial en ratones macho de mayor edad *ECA2* se debe a la disminución dramática en la función cardíaca.

#### **ECA2 controla negativamente la lesión pulmonar**

15 El síndrome de dificultad respiratoria en adultos (SDRA) 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 SDRA, 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 SDRA 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 SDRA con el fin de tratar la precipitación de enfermedad o lesión, que conduce a una disminución en la tasa de mortalidad de SDRA.

20 Dado que ECA2 se expresa en pulmones, los inventores han determinado si la pérdida de la 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 la ECA2 murieron en 2 - 3 horas. El reflejo de la diferencia de ratones sobrevivientes, con inactivación de la 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 SDRA y enfermedad pulmonar.

#### **Procedimientos**

##### **Clonación de mapeo de la ECA2 de rata y de ratón y QTL cromosómico.**

25 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 la ECA2 de rata para seleccionar una genoteca PAC de rata (RPCI-31, Research Genetics), identificando dos clones positivos (6M6 y 125K9).

30 Las secuencias del 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 la 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 SHRSF 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 la ECA2 parcial de rata (9-1). La sonda de acción  $\beta$ -y transferencias de Northern de tejidos múltiples se compraron en Clontech. Para el análisis de western, se homogeneizaron los riñones en tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, EDTA 20 mM, y 1% triton-X 100) complementado con "cóctel inhibidor de proteasa completo (Roche) y 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ - 100 mg de proteína se resolvió mediante SDS-PAGE sobre ges de 8% tris-glicina. Se obtuvo ECA2 inmuno-suero a partir de conejos inmunizados con un péptido específico de ratón de la ECA2 DYEAEGADGYNYNRNQLIED. El suero se purificó por afinidad con el péptido de inmunización que usa el kit unido a sulfato (Pierce). Se usó un anticuerpo comercialmente disponible de  $\beta$  como control de carga (Santa Cruz).

**Generación de ratones mutantes en ECA2.** Un vector de dirección (brazo corto de 559 pares de bases, y un brazo largo de 8,1 kilobases) se construyó usando el vector pKO ScramblerNTKV-1907 (Stratagene). Una parte de los nucleótidos que contiene ADN genómico de la ECA2 que contiene +1069 a +1299 se reemplazó con el módulo de resistencia a neomicina en la orientación de sentido contrario. La construcción de dirección se sometió a electroporación en las células E14K ES, y la selección para clones ES recombinantes homólogos positivos se realizó mediante transferencia de Southern de ADN genómico digerido con EcoRI -se hibridó a las sondas flanqueantes 5' y 3'. Se inyectaron dos líneas celulares independientes *eca*<sup>-y</sup> 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<sup>31</sup>. Los ratones mutantes de la ECA completos se han descrito previamente<sup>8</sup> y se obtuvieron de los Laboratorios Jackson. Se mantuvieron los ratones en las instalaciones de animales del Ontario Cancer Institute de acuerdo con las directrices institucionales.

**Morfometría, ecocardiografía, hemodinámica del corazón y determinaciones de la presión arterial.** Para la morfometría de corazón, se perfundieron los corazones con formalina al 10% a 60 mmHg y posteriormente se incrustaron en parafina. Se determinó la fibrosis intersticial de miocardio mediante la 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 describe<sup>32</sup> usando hermanos de camada de tipo salvaje y mutantes. Se anestesiaron los ratones con isoflurano/oxígeno y se examinaron mediante ecocardiografía transtorácica usando un Acuson® Sequoia C256 equipado con un transductor lineal 15MHz. FS se calculó como:  $FS = [(EDD - ESD)/EDD] * 100$ . El Vcfc se calculó como el tiempo de FS/expulsión corregido para el tiempo cardíaco. Las mediciones hemodinámicas se realizaron como se ha descrito. En resumen se anestesiaron 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 eran ritmo cardíaco, presión aórtica, presión ventricular izquierda (LV), presión y sistólica, presión diastólica LV, y los primeros máximos y mínimos derivados de la presión LV (+dP/dtmax y dP/dtmax, respectivamente). La medición de la presión arterial extremo de cola se realizaron usando un sistema de análisis de Presión arterial Usitech BP- 2000 fabricado por Visitech Systems (Apex, NC). Para tratamiento de captopril, se suplementó en el agua de bebida con 400mg/l de captopril (Sigma) durante dos semanas antes de la medición de la presión arterial.

**Niveles de péptido de angiotensina en tejidos.** Se homogeneizaron corazones y riñones sobre hielo sobre hielo en etanol al 80% /0,1 N HCl que contiene los inhibidores de peptidasa descrito anteriormente que incluye 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 centrifuga de vacío Savant (Savant, Farmingdale, NY) y los extractos concentrados se aplicaron a Sep-Paks activado, se lavaron con 0,1% HFBA, y se fluyeron con 5 ml de metanol al 80% / 0,1% de HFBA. Se realizó el análisis de radioinmunoensayo del contenido en péptido de angiotensina en los extractos de los tejidos de corazón y riñón. Los límites de detección para los RIAs Ang II y Ang I eran 0,5 fmol/tubo y Ang I 5 fmol/tubo, respectivamente.

**Modelo de lesión de pulmón aguda.** Se usaron en este estudio ratones con inactivación de la 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 hacer convencional la historia de volumen y se realizaron mediciones como datos iniciales. Los ratones anestesiados y ventilados mecánicamente recibían inyección intratraqueal de 2 ml/kg 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 conformidad de pulmón) midiendo la presión prevista traqueal, flujo, y volumen. EL se calculó dividiendo la presión prevista traqueal por el volumen. Los cambios en EL reflejan alteraciones en el parénquima de pulmón y entumecimiento de los pulmones.

**Referencias**

5 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).

10 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. y col., 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)

15 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. y col., Male-female differences in fertility and presión arterial in ACE-deficient mice. *Nature* 375, 146 - 148 (1995).

20 Esther, C.R. y col., Mice lacking angiotensin-converting enzyme have low blood pressure, renal pathology, and reduced male fertility. *Lab Invest.* 74, 953 - 965 (1996).

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).

25 Hollenberg, N.K. Angiotensina converting enzyme inhibition and the kidney. *Curr Opin. Cardiol.* 3(Suppl 1), S19-29 (1988).

Garg, R., & Yusuf, S. Overview of randomized trials of angiotensin-converting enzyme inhibitors on mortality and morbidity in patients with Herat failure. *JAMA.* 273, 1450-1456 (1995).

Tipnis, S.R. y col., A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and funcional expresión as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J. Biol. Chem.* 275, 33238 - 33243 (2000).

30 Donoghue, M. y col., A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ECA2) converts angiotensin to angiotensin 1-9. *Circ. Res.* 87, e1-e8 (2000)

Yagil C. y col., Role of chromosome X in the Sabra rat model of salt-sensitive hypertension. *Hypertension* 33 (part II), 261 - 265 (1999).

35 Hilbert, P. y col., Chromosomal mapping of two genetic loci associated with blood-pressure regulation in hereditary hypertensive rats. *Nature* 353, 521 - 529 (1991).

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).

40 Yagil, C. y col., 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).

Tanimoto, K. y col., 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).

45 Murphy, A.M. y col., Transgenic mouse model of stunned myocardium. *Science* 287, 488 - 491 (2000).

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 expression by mild hypoxia via a hypoxia response element binding the hypoxia-inducible factor-1 in rat hepatocytes. *Blood* 94, 4177 - 4185 (1999).
- 5 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. y col., A cardiac myocyte vascular endothelial growth factor paracrine pathway is required to maintain cardiac function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 5780 - 5785 (2001).
- 10 Weiss, D., Sorescu, D., & Taylor, W.R. Angiotensin II and atherosclerosis. *Am. J. Cardiol.* 87, 25C-32C (2001).
- Enseleit, F., Hurlimann, D., & Luscher, T.F. Vascular protective effects of angiotensin converting enzyme inhibitors and their relation to clinical events. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 37(suppl. 1), S21-S30 (2001).
- Kong, Y.Y. y col., OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 397, 315 - 23 (1999).
- 15 Wickenden, A.D. y col., 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. y col., The transgenic expression of highly inhibitory monomeric forms of phospholamban in mouse heart impairs cardiac contractility. *J. Biol. Chem.* 275, 14985 - 14991 (2000).
- 20 Rosengart y col., Patente de Estados Unidos nº 6.322.536. March y col., Patente de Estados Unidos nº 6.224.584. Hammondo y col., Patente de Estados Unidos nº 6.174.871.
- Wolfgang-M. Franz y col., Analysis of tissue-specific gene delivery by recombinant adenoviruses containing cardiac-specific promoters. *Cardiovascular Research* 35(1997) 560 - 566
- Rothmann T. y col., Heart muscle-specific gene expression using replication defective recombinant adenovirus. *Gene Ther* 1996 Oct;3(10):919 - 26
- 25 Phillips MI y col., Vigilant vector: heart-specific promoter in an adeno-associated virus vector for cardioprotection. *Hypertension* 2002, Feb; 39 (2 Pt 2):651 - 5
- Herold BC y col., Herpes simplex virus as a model vector system for gene therapy in renal disease. *Kidney Int* enero de 2002;61 Suppl 1: 3 - 8
- 30 Figlin RA y col., 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-Bloom N y col., Tissue-specific gene therapy directed to tumor angiogenesis. *Gene Ther* junio de 2001;8(11):819 - 27
- Scott-Taylor TH y col., Adenovirus facilitated infection of human cells with ecotropic retrovirus. *Gene Ther* mayo de 1988; 5(5):621 - 9
- 35 Langer JC y col., 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 y col., Gene therapy for renal diseases. *Kidney Int Suppl* octubre de 1997;61:S85-8
- Ohno K y col., Cell-specific targeting of Sindbis virus vectors displaying IgG-binding domains of protein A. *Nat Biotechnol* agosto de 1997;15 (8): 763 - 7
- 40

**LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> University Health Network

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

<130> R 57421

5 <140> 2003-06-19

<150> EP 08019249.5

<151> 2003-06-19

<150> US 60/389,709

<151> 2002-06-19

10 <160> 24

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 3405

<212> ADN

15 <213> Homo sapiens

<400>

1

<b>cgcccaaccc aagttcaaag gctgataaga gagaaaatct catgaggagg ttttagtcta</b>	<b>60</b>
<b>gggaaagtca ttcagtgat gtgatcttg ctcacagggg acgatgtcaa gctcttcctg</b>	<b>120</b>
<b>gctccttctc agccttgttg ctgtaactgc tgctcagtcc accattgagg aacaggccaa</b>	<b>180</b>
<b>gacatTTTTg gacaagTTta accacgaagc cgaagacctg ttctatcaaa gttcacttgc</b>	<b>240</b>
<b>ttcttggaat tataacacca atattactga agagaatgtc caaaacatga ataatgctgg</b>	<b>300</b>
<b>ggacaaatgg tctgcctttt taaaggaaca gtccacactt gcccaaatgt atccactaca</b>	<b>360</b>
<b>agaaattcag aatctcacag tcaagcttca gctgcaggct cttcagcaaa atgggtcttc</b>	<b>420</b>
<b>agtgctctca gaagacaaga gcaaacggtt gaacacaatt ctaaatacaa tgagcaccat</b>	<b>480</b>
<b>ctacagtact ggaaaagttt gtaaccaga taatccacaa gaatgcttat tacttgaacc</b>	<b>540</b>
<b>aggtttgaat gaaataatgg caaacagttt agactacaat gagaggctct gggcttggga</b>	<b>600</b>

ES 2 443 305 T3

aagctggaga tctgaggtcg gcaagcagct gaggccatta tatgaagagt atgtggtcct 660  
gaaaaatgag atggcaagag caaatcatta tgaggactat ggggattatt ggagaggaga 720  
ctatgaagta aatggggtag atggctatga ctacagccgc ggccagttga ttgaagatgt 780  
ggaacatacc tttgaagaga ttaaaccatt atatgaacat cttcatgcct atgtgagggc 840  
aaagttgatg aatgcctatc cttcctatat cagtccaatt ggatgcctcc ctgctcattt 900  
gcttgggtgat atgtggggta gattttggac aaatctgtac tctttgacag ttccccttgg 960  
acagaaacca aacatagatg ttactgatgc aatggtggac caggcctggg atgcacagag 1020  
aatattcaag gaggccgaga agttctttgt atctgttggc cttcctaata tgactcaagg 1080  
attctgggaa aattccatgc taacggaccc aggaaatggt cagaaagcag tctgccatcc 1140  
cacagcttgg gacctgggga agggcgactt caggatcctt atgtgcacaa aggtgacaat 1200  
ggacgacttc ctgacagctc atcatgagat ggggcatatc cagtatgata tggcatatgc 1260  
tgcacaacct tttctgctaa gaaatggagc taatgaagga ttccatgaag ctgttgggga 1320  
aatcatgtca ctttctgcag ccacacctaa gcatttaaaa tccattgggc ttctgtcacc 1380  
cgattttcaa gaagacaatg aaacagaaat aaacttcctg ctcaaacaag cactcacgat 1440  
tgttgggact ctgccattta cttacatggt agagaagtgg aggtggatgg tctttaaagg 1500  
ggaaattccc aaagaccagt ggatgaaaaa gtggtgggag atgaagcgag agatagttgg 1560  
ggtggtggaa cctgtgcccc atgatgaaac atactgtgac cccgcatctc tgttccatgt 1620  
ttctaatagat tactcattca ttcgatatta cacaaggacc ctttaccaat tccagtttca 1680  
agaagcactt tgtcaagcag ctaaactga aggccctctg cacaaatgtg acatctcaaa 1740  
ctctacagaa gctggacaga aactgttcaa tatgtgagg cttggaaaat cagaaccctg 1800  
gaccctagca ttggaaaatg ttgtaggagc aaagaacatg aatgtaaggc cactgctcaa 1860  
ctactttgag cccttattta cctggctgaa agaccagaac aagaattctt ttgtgggatg 1920  
gagtaccgac tggagtccat atgcagacca aagcatcaaa gtgaggataa gcctaaaatc 1980  
agctcttggg gataaagcat atgaatggaa cgacaatgaa atgtacctgt tccgatcatc 2040  
tgttgcatat gctatgaggc agtacttttt aaaagtaaaa aatcagatga ttctttttgg 2100  
ggaggaggat gtgagagtgg ctaatttgaa accaagaatc tcctttaatt tctttgtcac 2160  
tgcacctaaa aatgtgtctg atatcattcc tagaactgaa gttgaaaagg ccatcaggat 2220  
gtcccggagc cgtatcaatg atgctttccg tctgaatgac aacagcctag agtttctggg 2280  
gatacagcca aacttggac ctctaacca gccccctggt tccatatggc tgattgtttt 2340  
tggagttgtg atgggagtga tagtggttgg cattgtcatc ctgatcttca ctgggatcag 2400  
agatcggaag aagaaaaata aagcaagaag tggagaaaat ccttatgcct ccatcgatat 2460  
tagcaaagga gaaaataatc caggattcca aaactctgat gatgttcaga cctcctttta 2520  
gaaaaatcta tgtttttcct cttgaggtga ttttgttgta tgtaaatggt aatttcatgg 2580  
tatagaaaat ataagatgat aaagatatca ttaaagtca aaactatgac tctgttcaga 2640  
aaaaaattg tccaaagaca acatggccaa ggagagagca tcttcattga cattgctttc 2700

ES 2 443 305 T3

```

agttattatt tctgtctctg gatttgactt ctgttctgtt tcttaataag gattttgtat 2760
tagagtatat tagggaaagt gtgtatttgg tctcacaggc tgttcagggg taatctaaat 2820
gtaaatgtct gttgaatttc tgaagttgaa aacaaggata tatcattgga gcaagtgttg 2880
gatcttgtat ggaatatgga tggatcactt gtaaggacag tgcctgggaa ctggtgtagc 2940
tgcaaggatt gagaatggca tgcattagct cactttcatt taatccattg tcaaggatga 3000
catgctttct tcacagtaac tcagttcaag tactatggtg atttgcctac agtgatgttt 3060
ggaatcgatc atgcttttct caaggtgaca ggtctaaaga gagaagaatc cagggaacag 3120
gtagaggaca ttgctttttc acttccaagg tgcttgatca acatctccct gacaacacaa 3180
aactagagcc aggggcctcc gtgaactccc agagcatgcc tgatagaaac tcatttctac 3240
tgttctctaa ctgtggagtg aatggaaatt ccaactgtat gttcacctc tgaagtgggt 3300
accagtctc ttaaactttt tgtatttctc cacagtgttt gagcagtgct gagcacaag 3360
cagacactca ataaatgcta gatttacaca ctcaaaaaaa aaaaa 3405

```

<210> 2

<211> 805

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 2

ES 2 443 305 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Gly Lys Val Cys Asn Pro Asp Asn Pro Gln Glu Cys Leu Leu Leu

ES 2 443 305 T3

130					135					140					
Glu 145	Pro	Gly	Leu	Asn	Glu 150	Ile	Met	Ala	Asn	Ser 155	Leu	Asp	Tyr	Asn	Glu 160
Arg	Leu	Trp	Ala	Trp 165	Glu	Ser	Trp	Arg	Ser 170	Glu	Val	Gly	Lys	Gln 175	Leu
Arg	Pro	Leu	Tyr 180	Glu	Glu	Tyr	Val	Val 185	Leu	Lys	Asn	Glu	Met 190	Ala	Arg
Ala	Asn	His 195	Tyr	Glu	Asp	Tyr	Gly 200	Asp	Tyr	Trp	Arg	Gly 205	Asp	Tyr	Glu
Val	Asn 210	Gly	Val	Asp	Gly	Tyr 215	Asp	Tyr	Ser	Arg	Gly 220	Gln	Leu	Ile	Glu
Asp 225	Val	Glu	His	Thr	Phe 230	Glu	Glu	Ile	Lys	Pro 235	Leu	Tyr	Glu	His	Leu 240
His	Ala	Tyr	Val	Arg 245	Ala	Lys	Leu	Met	Asn 250	Ala	Tyr	Pro	Ser	Tyr 255	Ile
Ser	Pro	Ile	Gly 260	Cys	Leu	Pro	Ala	His 265	Leu	Leu	Gly	Asp	Met 270	Trp	Gly
Arg	Phe	Trp 275	Thr	Asn	Leu	Tyr	Ser 280	Leu	Thr	Val	Pro	Phe 285	Gly	Gln	Lys
Pro	Asn 290	Ile	Asp	Val	Thr	Asp 295	Ala	Met	Val	Asp	Gln 300	Ala	Trp	Asp	Ala
Gln 305	Arg	Ile	Phe	Lys	Glu 310	Ala	Glu	Lys	Phe	Phe 315	Val	Ser	Val	Gly	Leu 320
Pro	Asn	Met	Thr	Gln 325	Gly	Phe	Trp	Glu	Asn 330	Ser	Met	Leu	Thr	Asp 335	Pro
Gly	Asn	Val	Gln 340	Lys	Ala	Val	Cys	His 345	Pro	Thr	Ala	Trp	Asp 350	Leu	Gly
Lys	Gly	Asp 355	Phe	Arg	Ile	Leu	Met 360	Cys	Thr	Lys	Val	Thr 365	Met	Asp	Asp
Phe 370	Leu	Thr	Ala	His	His	Glu 375	Met	Gly	His	Ile	Gln 380	Tyr	Asp	Met	Ala
Tyr 385	Ala	Ala	Gln	Pro	Phe 390	Leu	Leu	Arg	Asn	Gly 395	Ala	Asn	Glu	Gly	Phe 400
His	Glu	Ala	Val	Gly 405	Glu	Ile	Met	Ser	Leu 410	Ser	Ala	Ala	Thr	Pro 415	Lys

His Leu Lys Ser Ile Gly Leu Leu Ser Pro Asp Phe Gln Glu Asp Asn  
 420 425 430

Glu Thr Glu Ile Asn Phe Leu Leu Lys Gln Ala Leu Thr Ile Val Gly  
 435 440 445

Thr Leu Pro Phe Thr Tyr Met Leu Glu Lys Trp Arg Trp Met Val Phe  
 450 455 460

Lys Gly Glu Ile Pro Lys Asp Gln Trp Met Lys Lys Trp Trp Glu Met  
 465 470 475 480

Lys Arg Glu Ile Val Gly Val Val Glu Pro Val Pro His Asp Glu Thr  
 485 490 495

Tyr Cys Asp Pro Ala Ser Leu Phe His Val Ser Asn Asp Tyr Ser Phe  
 500 505 510

Ile Arg Tyr Tyr Thr Arg Thr Leu Tyr Gln Phe Gln Phe Gln Glu Ala  
 515 520 525

Leu Cys Gln Ala Ala Lys His Glu Gly Pro Leu His Lys Cys Asp Ile  
 530 535 540

Ser Asn Ser Thr Glu Ala Gly Gln Lys Leu Phe Asn Met Leu Arg Leu  
 545 550 555 560

Gly Lys Ser Glu Pro Trp Thr Leu Ala Leu Glu Asn Val Val Gly Ala  
 565 570 575

Lys Asn Met Asn Val Arg Pro Leu Leu Asn Tyr Phe Glu Pro Leu Phe  
 580 585 590

Thr Trp Leu Lys Asp Gln Asn Lys Asn Ser Phe Val Gly Trp Ser Thr  
 595 600 605

Asp Trp Ser Pro Tyr Ala Asp Gln Ser Ile Lys Val Arg Ile Ser Leu  
 610 615 620

Lys Ser Ala Leu Gly Asp Lys Ala Tyr Glu Trp Asn Asp Asn Glu Met  
 625 630 635 640

Tyr Leu Phe Arg Ser Ser Val Ala Tyr Ala Met Arg Gln Tyr Phe Leu  
 645 650 655

Lys Val Lys Asn Gln Met Ile Leu Phe Gly Glu Glu Asp Val Arg Val  
 660 665 670

Ala Asn Leu Lys Pro Arg Ile Ser Phe Asn Phe Phe Val Thr Ala Pro  
 675 680 685

Lys Asn Val Ser Asp Ile Ile Pro Arg Thr Glu Val Glu Lys Ala Ile

690		695		700											
Arg 705	Met	Ser	Arg	Ser	Arg 710	Ile	Asn	Asp	Ala	Phe 715	Arg	Leu	Asn	Asp	Asn 720
Ser	Leu	Glu	Phe	Leu 725	Gly	Ile	Gln	Pro	Thr 730	Leu	Gly	Pro	Pro	Asn 735	Gln
Pro	Pro	Val	Ser 740	Ile	Trp	Leu	Ile	Val 745	Phe	Gly	Val	Val	Met 750	Gly	Val
Ile	Val	Val 755	Gly	Ile	Val	Ile	Leu 760	Ile	Phe	Thr	Gly	Ile 765	Arg	Asp	Arg
Lys	Lys 770	Lys	Asn	Lys	Ala	Arg 775	Ser	Gly	Glu	Asn	Pro 780	Tyr	Ala	Ser	Ile
Asp 785	Ile	Ser	Lys	Gly	Glu 790	Asn	Asn	Pro	Gly	Phe 795	Gln	Asn	Thr	Asp	Asp 800
Val	Gln	Thr	Ser	Phe 805											

<210> 3

<211> 2739

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<400> 3

ES 2 443 305 T3

catattggtc	cagcagcttg	tttactgttc	tcttctgttt	cttcttctgc	tttttttttc	60
ttctcttctc	agtgcccaac	ccaagttcaa	aggctgatga	gagagaaaaa	ctcatgaaga	120
gattttactc	tagggaaagt	tgctcagtgg	atgggatcct	ggcgcacggg	gaaagatgtc	180
cagctcctcc	tggctccttc	tcagccttgt	tgctgttact	actgctcagt	ccctcaccga	240
ggaaaatgcc	aagacatttt	taaacaactt	taatcaggaa	gctgaagacc	tgtcttatca	300
aagttcactt	gcttcttggg	attataatac	taacattact	gaagaaaatg	cccaaaagat	360
gagtgaggct	gcagccaaat	ggctctgcctt	ttatgaagaa	cagtctaaga	ctgccccaaag	420
ttctcacta	caagaaatcc	agactccgat	catcaagcgt	caactacagg	cccttcagca	480
aagtgggtct	tcagcactct	cagcagacaa	gaacaaacag	ttgaacacaa	ttctgaacac	540
catgagcacc	atttacagta	ctggaaaagt	ttgcaacca	aagaaccac	aagaatgctt	600
attacttgag	ccaggattgg	atgaaataat	ggcgacaagc	acagactaca	actctaggct	660
ctgggcatgg	gagggctgga	gggctgaggt	tggcaagcag	ctgaggccgt	tgtatgaaga	720
gtatgtggtc	ctgaaaaacg	agatggcaag	agcaaacaat	tataacgact	atggggatta	780
ttggagaggg	gactatgaag	cagagggagc	agatggctac	aactataacc	gtaaccagtt	840

gattgaagat gtagaacgta ccttcgcaga gatcaagcca ttgtatgagc atcttcatgc 900  
ctatgtgagg aggaagttga tggataccta cccttcctac atcagcccca ctggatgcct 960  
ccctgcccac ttgcttggtg atatgtgggg tagatttttg acaaatctgt accctttgac 1020  
tgttcccttt gcacagaaac caaacataga tgttactgat gcaatgatga atcagggctg 1080  
ggatgcagaa aggatatttc aagaggcaga gaaattcttt gtttctgttg gccttcctca 1140  
tatgactcaa ggattctggg caaactctat gctgactgag ccagcagatg gccggaaagt 1200  
tgtctgccac cccacagctt gggatctggg acacggagac ttcagaatca agatgtgtac 1260  
aaaggtcaca atggacaact tcttgacagc ccatcacgag atgggacaca tccaatatga 1320  
catggcatat gccaggcaac ctttcctgct aagaaacgga gccaatgaag ggttccatga 1380  
agctgttggg gaaatcatgt cactttctgc agctaccccc aagcatctga aatccattgg 1440  
tcttctgcca tccgattttc aagaagatag cgaaacagag ataaacttcc tactgaaaca 1500  
ggcattgaca attgttggaa cactaccgtt tacttacatg ttagagaagt ggaggtggat 1560  
ggtctttcgg ggtgaaattc ccaaagagca gtggatgaaa aagtgggtggg agatgaagcg 1620  
ggagatcgtt ggtgtggtgg agcctctgcc tcatgatgaa acatactgtg accctgcac 1680  
tctgttccat gtttctaatag attactcatt cattcgatat tacacaagga ccatttacca 1740  
attccagttt caagaagctc tttgtcaagc agctaagtat aatggttctc tgcacaaatg 1800  
tgacatctca aattccactg aagctgggca gaagttgctc aagatgctga gtcttggaaa 1860  
ttcagagccc tggaccaaaag ccttggaaaa tgtggttagga gcaaggaata tggatgtaaa 1920  
accactgctc aattacttcc aaccgttggt tgactggctg aaagagcaga acagaaattc 1980  
ttttgtgggg tggaaactg aatggagccc atatgccgac caaagcatta aagtgaggat 2040  
aagcctaaaa tcagctcttg gagctaatagc atatgaatgg accaacaacg aatgttcct 2100  
gttccgatca tctgttgcac atgccatgag aaagtatttt tcaataatca aaaaccagac 2160  
agttcctttt ctagaggaag atgtacgagt gagtgtattg aaaccaagag tctccttcta 2220  
cttctttgtc acctcaccac aaaatgtgtc tgatgtcatt cctagaagtg aagttgaaga 2280  
tgccatcagg atgtctcggg gccgcatcaa tgatgtcttt ggcctgaatg ataacagcct 2340  
ggagtttctg gggattcacc caacacttga gccaccttac cagcctcctg tcaccatatg 2400  
gctgattatt tttggtggtg tgatggcact ggtagtgggt ggcacatca tcctgattgt 2460  
cactggcatc aaaggtcgaa agaagaaaaa tgaacaaaa agagaagaga acccttatga 2520  
ctcgatggac attggaagag gagaaagcaa tgcaggattc caaacagtg atgatgctca 2580  
gacttccttt tagcaaagca cttgtcatct tcctgtatgt aaatgctaac ttcatagtac 2640  
acaaaatag agagtataca catgtcatta gctatcaaaa ctatgatctg ttcagtaaac 2700  
gttgtccaaa gagcatcaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2739

<210> 4

<211> 805

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Met Ser Ser Ser Ser Trp Leu Leu Leu Ser Leu Val Ala Val Thr Thr  
 1 5 10 15  
 Ala Gln Ser Leu Thr Glu Glu Asn Ala Lys Thr Phe Leu Asn Asn Phe  
 20 25 30  
 Asn Gln Glu Ala Glu Asp Leu Ser Tyr Gln Ser Ser Leu Ala Ser Trp  
 35 40 45  
 Asn Tyr Asn Thr Asn Ile Thr Glu Glu Asn Ala Gln Lys Met Ser Glu  
 50 55 60  
 Ala Ala Ala Lys Trp Ser Ala Phe Tyr Glu Glu Gln Ser Lys Thr Ala  
 65 70 75 80  
 Gln Ser Phe Ser Leu Gln Glu Ile Gln Thr Pro Ile Ile Lys Arg Gln  
 85 90 95  
 Leu Gln Ala Leu Gln Gln Ser Gly Ser Ser Ala Leu Ser Ala Asp Lys  
 100 105 110  
 Asn Lys Gln Leu Asn Thr Ile Leu Asn Thr Met Ser Thr Ile Tyr Ser  
 115 120 125  
 Thr Gly Lys Val Cys Asn Pro Lys Asn Pro Gln Glu Cys Leu Leu Leu  
 130 135 140  
 Glu Pro Gly Leu Asp Glu Ile Met Ala Thr Ser Thr Asp Tyr Asn Ser  
 145 150 155 160  
 Arg Leu Trp Ala Trp Glu Gly Trp Arg Ala Glu Val Gly Lys Gln Leu  
 165 170 175  
 Arg Pro Leu Tyr Glu Glu Tyr Val Val Leu Lys Asn Glu Met Ala Arg  
 180 185 190  
 Ala Asn Asn Tyr Asn Asp Tyr Gly Asp Tyr Trp Arg Gly Asp Tyr Glu  
 195 200 205  
 Ala Glu Gly Ala Asp Gly Tyr Asn Tyr Asn Arg Asn Gln Leu Ile Glu  
 210 215 220  
 Asp Val Glu Arg Thr Phe Ala Glu Ile Lys Pro Leu Tyr Glu His Leu  
 225 230 235 240  
 His Ala Tyr Val Arg Arg Lys Leu Met Asp Thr Tyr Pro Ser Tyr Ile  
 245 250 255

Ser Pro Thr Gly Cys Leu Pro Ala His Leu Leu Gly Asp Met Trp Gly  
 260 265 270

Arg Phe Trp Thr Asn Leu Tyr Pro Leu Thr Val Pro Phe Ala Gln Lys  
 275 280 285

Pro Asn Ile Asp Val Thr Asp Ala Met Met Asn Gln Gly Trp Asp Ala  
 290 295 300

Glu Arg Ile Phe Gln Glu Ala Glu Lys Phe Phe Val Ser Val Gly Leu  
 305 310 315 320

Pro His Met Thr Gln Gly Phe Trp Ala Asn Ser Met Leu Thr Glu Pro  
 325 330 335

Ala Asp Gly Arg Lys Val Val Cys His Pro Thr Ala Trp Asp Leu Gly  
 340 345 350

His Gly Asp Phe Arg Ile Lys Met Cys Thr Lys Val Thr Met Asp Asn  
 355 360 365

Phe Leu Thr Ala His His Glu Met Gly His Ile Gln Tyr Asp Met Ala  
 370 375 380

Tyr Ala Arg Gln Pro Phe Leu Leu Arg Asn Gly Ala Asn Glu Gly Phe  
 385 390 395 400

His Glu Ala Val Gly Glu Ile Met Ser Leu Ser Ala Ala Thr Pro Lys  
 405 410 415

His Leu Lys Ser Ile Gly Leu Leu Pro Ser Asp Phe Gln Glu Asp Ser  
 420 425 430

Glu Thr Glu Ile Asn Phe Leu Leu Lys Gln Ala Leu Thr Ile Val Gly  
 435 440 445

Thr Leu Pro Phe Thr Tyr Met Leu Glu Lys Trp Arg Trp Met Val Phe  
 450 455 460

Arg Gly Glu Ile Pro Lys Glu Gln Trp Met Lys Lys Trp Trp Glu Met  
 465 470 475 480

Lys Arg Glu Ile Val Gly Val Val Glu Pro Leu Pro His Asp Glu Thr  
 485 490 495

Tyr Cys Asp Pro Ala Ser Leu Phe His Val Ser Asn Asp Tyr Ser Phe  
 500 505 510

Ile Arg Tyr Tyr Thr Arg Thr Ile Tyr Gln Phe Gln Phe Gln Glu Ala  
 515 520 525

Leu Cys Gln Ala Ala Lys Tyr Asn Gly Ser Leu His Lys Cys Asp Ile



<210> 5  
 <211> 73  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 5 <400> 5  
  
**ttaacttgaa gtccaaaaac atatgttctt cacctacgta accccagtcc ttgaatttgc 60**  
**tggagctcag ttt 73**  
  
 <210> 6  
 <211> 64  
 <212> ADN  
 10 <213> Homo sapiens  
 <400> 6  
  
**gtatctcacc atcagaaaac acaagcttgt gtctaggata ttagctaata aagtttgtaa 60**  
**acat 64**  
  
 <210> 7  
 <211> 77  
 15 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (44)..(44)  
 20 <223> n= c o g  
 <400> 7  
  
**ccatgagttc tagccagact ttcttcaacc agcacctgct ccnntttacc agagagcatt 60**  
**ctcagaccac aagatcc 77**  
  
 <210> 8  
 <211> 101  
 25 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (51)..(51)  
 30 <223> n= c o a  
 <400> 8

**acaggtttgt cttaaaactt catatcagag ttatgtgaaa actgcacatc ncactattgg 60**  
**aatattctgg tgttatcttt gtatttaatt tctcagtggg t 101**

<210> 9

<211> 74

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> misc\_feature

<222> (43)..(43)

<223> n= c o t

10 <400> 9

**attgtgccac tgccctctag cctaggtgac agagcaagac tcngtttcaa aaaaaaaaaa 60**  
**aaggaatata cacc 74**

<210> 10

<211> 89

<212> ADN

15 <213> Homo sapiens

<220>

<221> misc\_feature

<222> (55)..(55)

<223> n= c o t

20 <400> 10

**ctttggaaac ctgttttaac caagcttttt ttccatatc tctatctgat ggaentctcc 60**  
**acacttctac atcagcagct ttatgacac 89**

<210> 11

<211> 89

<212> ADN

25 <213> Homo sapiens

<220>

<221> misc\_feature

<222> (53)..(53)

<223> n= g o a

30 <400> 11

**ctttggaaac ctgtttaac caagcttttt tttccatata tctatctgat ggnccctctcc 60**  
**acacttctac atcagcagct ttatgacac 89**

<210> 12

<211> 112

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> misc\_feature

<222> (54)..(54)

<223> n= g o a

10 <400> 12

**aacacagcag tcacaaatga ataaatgccca accatttata catttccaca cttncactc 60**  
**aattttccaa tggagctggt gatgaacctata atctagggtg caaggcatga aa 112**

<210> 13

<211> 114

<212> ADN

15 <213> Homo sapiens

<220>

<221> misc\_feature

<222> (57)..(57)

<223> n=g o a

20 <400> 13

**ttcttgccaa atatgataac tttgccctta aacacagcag tcacaaatga ataaatncca 60**  
**accatttata catttccaca cttacaactc aattttccaa tggagctggt gatg 114**

<210> 14

<211> 121

<212> ADN

25 <213> Homo sapiens

<220>

<221> misc\_feature

<222> (65)..(65)

<223> n= g o a

30 <400> 14

**gaaattcttg ccaaatatga taactttgcc cttaaacaca gcagtcacaa atgaataaat 60**  
**accanaccat ttatacattt ccacacttac aactcaattt tccaatggag ctgttgatga 120**  
**a 121**  
 <210> 15  
 <211> 120  
 <212> ADN  
 5 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (61)..(61)  
 <223> n= g o a  
 10 <400> 15  
**gaaattcttg ccaaatatga taactttgcc cttaaacaca gcagtcacaa atgaataaat 60**  
**nccaaccatt tatacatttc cacacttaca actcaatttt ccaatggagc tgttgatgaa 120**  
 <210> 16  
 <211> 69  
 <212> ADN  
 15 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (37)..(37)  
 <223> n= g o a  
 20 <400> 16  
**atagtcaacta aatgtattg caccaggtac tatgctntat cttatatgat ggttctttat 60**  
**gaatatctg 69**  
 <210> 17  
 <211> 68  
 <212> ADN  
 25 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (29)..(29)  
 <223> n= c o t  
 30 <400> 17

**gtttacaag tggtatTTTT catttgaang tcaagTTTT cttttacact tatagataag 60**  
**tacatttc 68**

<210> 18

<211> 76

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> misc\_feature

<222> (41)..(41)

<223> n= c o t

10 <400> 18

**gtgctacctc caaatgcca taccttttat ttggaaaata ntactataga gacttgggtca 60**  
**taggacctga ttcatt 76**

<210> 19

<211> 20

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 19

tcaattact gctgagggg 20

20 <210> 20

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Sintética

<400> 20

gagggataac ccagtcaaa 20

<210> 21

<211> 20

30 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 21

ES 2 443 305 T3

Asp Tyr Glu Ala Glu Gly Ala Asp Gly Tyr Asn Tyr Asn Arg Asn Gln  
1 5 10 15

Leu Ile Glu Asp  
20

<210> 22

<211> 732

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 22

Met Gly Gln Gly Trp Ala Thr Pro Gly Leu Pro Ser Phe Leu Phe Leu

ES 2 443 305 T3

1				5						10					15
Leu	Leu	Cys	Cys	Gly	His	His	Leu	Leu	Val	Leu	Ser	Gln	Val	Ala	Thr
			20					25					30		
Asp	His	Val	Thr	Ala	Asn	Gln	Gly	Ile	Thr	Asn	Gln	Ala	Thr	Thr	Arg
		35					40					45			
Ser	Gln	Thr	Thr	Thr	His	Gln	Ala	Thr	Ile	Asp	Gln	Thr	Thr	Gln	Ile
	50					55					60				
Pro	Asn	Leu	Glu	Thr	Asp	Glu	Ala	Lys	Ala	Asp	Arg	Phe	Val	Glu	Glu
65					70					75				80	
Tyr	Asp	Arg	Thr	Ala	Gln	Val	Leu	Leu	Asn	Glu	Tyr	Ala	Glu	Ala	Asn
				85					90					95	
Trp	Gln	Tyr	Asn	Thr	Asn	Ile	Thr	Ile	Glu	Gly	Ser	Lys	Ile	Leu	Leu
			100					105					110		
Glu	Lys	Ser	Thr	Glu	Val	Ser	Asn	His	Thr	Leu	Lys	Tyr	Gly	Thr	Arg
		115					120					125			
Ala	Lys	Thr	Phe	Asp	Val	Ser	Asn	Phe	Gln	Asn	Ser	Ser	Ile	Lys	Arg
	130					135					140				
Ile	Ile	Lys	Lys	Leu	Gln	Asn	Leu	Asp	Arg	Ala	Val	Leu	Pro	Pro	Lys
145					150					155					160
Glu	Leu	Glu	Glu	Tyr	Asn	Gln	Ile	Leu	Leu	Asp	Met	Glu	Thr	Thr	Tyr
				165					170					175	
Ser	Leu	Ser	Asn	Ile	Cys	Tyr	Thr	Asn	Gly	Thr	Cys	Met	Pro	Leu	Glu
			180					185					190		
Pro	Asp	Leu	Thr	Asn	Met	Met	Ala	Thr	Ser	Arg	Lys	Tyr	Glu	Glu	Leu
		195					200					205			
Leu	Trp	Ala	Trp	Lys	Ser	Trp	Arg	Asp	Lys	Val	Gly	Arg	Ala	Ile	Leu
	210					215					220				
Pro	Phe	Phe	Pro	Lys	Tyr	Val	Glu	Phe	Ser	Asn	Lys	Ile	Ala	Lys	Leu
225					230					235					240
Asn	Gly	Tyr	Thr	Asp	Ala	Gly	Asp	Ser	Trp	Arg	Ser	Leu	Tyr	Glu	Ser
				245					250					255	
Asp	Asn	Leu	Glu	Gln	Asp	Leu	Glu	Lys	Leu	Tyr	Gln	Glu	Leu	Gln	Pro
			260					265					270		
Leu	Tyr	Leu	Asn	Leu	His	Ala	Tyr	Val	Arg	Arg	Ser	Leu	His	Arg	His
		275					280					285			

ES 2 443 305 T3

Tyr Gly Ser Glu Tyr Ile Asn Leu Asp Gly Pro Ile Pro Ala His Leu  
 290 295 300  
 Leu Gly Asn Met Trp Ala Gln Thr Trp Ser Asn Ile Tyr Asp Leu Val  
 305 310 315 320  
 Ala Pro Phe Pro Ser Ala Pro Asn Ile Asp Ala Thr Glu Ala Met Ile  
 325 330 335  
 Lys Gln Gly Trp Thr Pro Arg Arg Ile Phe Lys Glu Ala Asp Asn Phe  
 340 345 350  
 Phe Thr Ser Leu Gly Leu Leu Pro Val Pro Pro Glu Phe Trp Asn Lys  
 355 360 365  
 Ser Met Leu Glu Lys Pro Thr Asp Gly Arg Glu Val Val Cys His Pro  
 370 375 380  
 Ser Ala Trp Asp Phe Tyr Asn Gly Lys Asp Phe Arg Ile Lys Gln Cys  
 385 390 395 400  
 Thr Ser Val Asn Met Glu Asp Leu Val Ile Ala His His Glu Met Gly  
 405 410 415  
 His Ile Gln Tyr Phe Met Gln Tyr Lys Asp Leu Pro Val Thr Phe Arg  
 420 425 430  
 Glu Gly Ala Asn Pro Gly Phe His Glu Ala Ile Gly Asp Ile Met Ala  
 435 440 445  
 Leu Ser Val Ser Thr Pro Lys His Leu Tyr Ser Leu Asn Leu Leu Ser  
 450 455 460  
 Thr Glu Gly Ser Gly Tyr Glu Tyr Asp Ile Asn Phe Leu Met Lys Met  
 465 470 475 480  
 Ala Leu Asp Lys Ile Ala Phe Ile Pro Phe Ser Tyr Leu Ile Asp Gln  
 485 490 495  
 Trp Arg Trp Arg Val Phe Asp Gly Ser Ile Thr Lys Glu Asn Tyr Asn  
 500 505 510  
 Gln Glu Trp Trp Ser Leu Arg Leu Lys Tyr Gln Gly Leu Cys Pro Pro  
 515 520 525  
 Val Pro Arg Ser Gln Gly Asp Phe Asp Pro Gly Ser Lys Phe His Val  
 530 535 540  
 Pro Ala Asn Val Pro Tyr Val Arg Tyr Phe Val Ser Phe Ile Ile Gln  
 545 550 555 560  
 Phe Gln Phe His Glu Ala Leu Cys Arg Ala Ala Gly His Thr Gly Pro

565 570 575  
 Leu His Lys Cys Asp Ile Tyr Gln Ser Lys Glu Ala Gly Lys Leu Leu  
 580 585 590  
 Ala Asp Ala Met Lys Leu Gly Tyr Ser Lys Pro Trp Pro Glu Ala Met  
 595 600 605  
 Lys Leu Ile Thr Gly Gln Pro Asn Met Ser Ala Ser Ala Met Met Asn  
 610 615 620  
 Tyr Phe Lys Pro Leu Thr Glu Trp Leu Val Thr Glu Asn Arg Arg His  
 625 630 635 640  
 Gly Glu Thr Leu Gly Trp Pro Glu Tyr Asn Trp Ala Pro Asn Thr Ala  
 645 650 655  
 Arg Ala Glu Gly Ser Thr Ala Glu Ser Asn Arg Val Asn Phe Leu Gly  
 660 665 670  
 Leu Tyr Leu Glu Pro Gln Gln Ala Arg Val Gly Gln Trp Val Leu Leu  
 675 680 685  
 Phe Leu Gly Val Ala Leu Leu Val Ala Thr Val Gly Leu Ala His Arg  
 690 695 700  
 Leu Tyr Asn Ile Arg Asn His His Ser Leu Arg Arg Pro His Arg Gly  
 705 710 715 720  
 Pro Gln Phe Gly Ser Glu Val Glu Leu Arg His Ser  
 725 730

<210> 23

<211> 732

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 23

Met Gly Gln Gly Trp Ala Thr Ala Gly Leu Pro Ser Leu Leu Phe Leu  
1 5 10 15  
Leu Leu Cys Tyr Gly His Pro Leu Leu Val Pro Ser Gln Glu Ala Ser  
20 25 30  
Gln Gln Val Thr Val Thr His Gly Thr Ser Ser Gln Ala Thr Thr Ser  
35 40 45  
Ser Gln Thr Thr Thr His Gln Ala Thr Ala His Gln Thr Ser Ala Gln  
50 55 60

ES 2 443 305 T3

Ser Pro Asn Leu Val Thr Asp Glu Ala Glu Ala Ser Lys Phe Val Glu  
 65 70 75 80  
 Glu Tyr Asp Arg Thr Ser Gln Val Val Trp Asn Glu Tyr Ala Glu Ala  
 85 90 95  
 Asn Trp Asn Tyr Asn Thr Asn Ile Thr Thr Glu Thr Ser Lys Ile Leu  
 100 105 110  
 Leu Gln Lys Asn Met Gln Ile Ala Asn His Thr Leu Lys Tyr Gly Thr  
 115 120 125  
 Gln Ala Arg Lys Phe Asp Val Asn Gln Leu Gln Asn Thr Thr Ile Lys  
 130 135 140  
 Arg Ile Ile Lys Lys Val Gln Asp Leu Glu Arg Ala Ala Leu Pro Ala  
 145 150 155 160  
 Gln Glu Leu Glu Glu Tyr Asn Lys Ile Leu Leu Asp Met Glu Thr Thr  
 165 170 175  
 Tyr Ser Val Ala Thr Val Cys His Pro Asn Gly Ser Cys Leu Gln Leu  
 180 185 190  
 Glu Pro Asp Leu Thr Asn Val Met Ala Thr Ser Arg Lys Tyr Glu Asp  
 195 200 205  
 Leu Leu Trp Ala Trp Glu Gly Trp Arg Asp Lys Ala Gly Arg Ala Ile  
 210 215 220  
 Leu Gln Phe Tyr Pro Lys Tyr Val Glu Leu Ile Asn Gln Ala Ala Arg  
 225 230 235 240  
 Leu Asn Gly Tyr Val Asp Ala Gly Asp Ser Trp Arg Ser Met Tyr Glu  
 245 250 255  
 Thr Pro Ser Leu Glu Gln Asp Leu Glu Arg Leu Phe Gln Glu Leu Gln  
 260 265 270  
 Pro Leu Tyr Leu Asn Leu His Ala Tyr Val Arg Arg Ala Leu His Arg  
 275 280 285  
 His Tyr Gly Ala Gln His Ile Asn Leu Glu Gly Pro Ile Pro Ala His  
 290 295 300  
 Leu Leu Gly Asn Met Trp Ala Gln Thr Trp Ser Asn Ile Tyr Asp Leu  
 305 310 315 320  
 Val Val Pro Phe Pro Ser Ala Pro Ser Met Asp Thr Thr Glu Ala Met  
 325 330 335  
 Leu Lys Gln Gly Trp Thr Pro Arg Arg Met Phe Lys Glu Ala Asp Asp

			340					345							350
Phe	Phe	Thr	Ser	Leu	Gly	Leu	Leu	Pro	Val	Pro	Pro	Glu	Phe	Trp	Asn
		355					360					365			
Lys	Ser	Met	Leu	Glu	Lys	Pro	Thr	Asp	Gly	Arg	Glu	Val	Val	Cys	His
	370					375					380				
Ala	Ser	Ala	Trp	Asp	Phe	Tyr	Asn	Gly	Lys	Asp	Phe	Arg	Ile	Lys	Gln
385					390					395					400
Cys	Thr	Thr	Val	Asn	Leu	Glu	Asp	Leu	Val	Val	Ala	His	His	Glu	Met
				405					410					415	
Gly	His	Ile	Gln	Tyr	Phe	Met	Gln	Tyr	Lys	Asp	Leu	Pro	Val	Ala	Leu
			420					425					430		
Arg	Glu	Gly	Ala	Asn	Pro	Gly	Phe	His	Glu	Ala	Ile	Gly	Asp	Val	Leu
		435					440					445			
Ala	Leu	Ser	Val	Ser	Thr	Pro	Lys	His	Leu	His	Ser	Leu	Asn	Leu	Leu
	450					455					460				
Ser	Ser	Glu	Gly	Gly	Ser	Asp	Glu	His	Asp	Ile	Asn	Phe	Leu	Met	Lys
465					470					475					480
Met	Ala	Leu	Asp	Lys	Ile	Ala	Phe	Ile	Pro	Phe	Ser	Tyr	Leu	Val	Asp
				485					490					495	
Gln	Trp	Arg	Trp	Arg	Val	Phe	Asp	Gly	Ser	Ile	Thr	Lys	Glu	Asn	Tyr
			500					505					510		
Asn	Gln	Glu	Trp	Trp	Ser	Leu	Arg	Leu	Lys	Tyr	Gln	Gly	Leu	Cys	Pro
		515					520					525			
Pro	Val	Pro	Arg	Thr	Gln	Gly	Asp	Phe	Asp	Pro	Gly	Ala	Lys	Phe	His
	530					535					540				
Ile	Pro	Ser	Ser	Val	Pro	Tyr	Ile	Arg	Tyr	Phe	Val	Ser	Phe	Ile	Ile
545					550					555					560
Gln	Phe	Gln	Phe	His	Glu	Ala	Leu	Cys	Gln	Ala	Ala	Gly	His	Thr	Gly
				565					570					575	
Pro	Leu	His	Lys	Cys	Asp	Ile	Tyr	Gln	Ser	Lys	Glu	Ala	Gly	Gln	Arg
			580					585					590		
Leu	Ala	Thr	Ala	Met	Lys	Leu	Gly	Phe	Ser	Arg	Pro	Trp	Pro	Glu	Ala
		595					600					605			
Met	Gln	Leu	Ile	Thr	Gly	Gln	Pro	Asn	Met	Ser	Ala	Ser	Ala	Met	Leu
	610					615					620				

Ser Tyr Phe Lys Pro Leu Leu Asp Trp Leu Arg Thr Glu Asn Glu Leu  
 625 630 635 640

His Gly Glu Lys Leu Gly Trp Pro Gln Tyr Asn Trp Thr Pro Asn Ser  
 645 650 655

Ala Arg Ser Glu Gly Pro Leu Pro Asp Ser Gly Arg Val Ser Phe Leu  
 660 665 670

Gly Leu Asp Leu Asp Ala Gln Gln Ala Arg Val Gly Gln Trp Leu Leu  
 675 680 685

Leu Phe Leu Gly Ile Ala Leu Leu Val Ala Thr Leu Gly Leu Ser Gln  
 690 695 700

Arg Leu Phe Ser Ile Arg His Arg Ser Leu His Arg His Ser His Gly  
 705 710 715 720

Pro Gln Phe Gly Ser Glu Val Glu Leu Arg His Ser  
 725 730

<210> 24

<211> 805

<212> PRT

5 <213> Rattus rattus

<400> 24

ES 2 443 305 T3

Met Ser Ser Ser Cys Trp Leu Leu Leu Ser Leu Val Ala Val Ala Thr  
1 5 10 15  
Ala Gln Ser Leu Ile Glu Glu Lys Ala Glu Ser Phe Leu Asn Lys Phe  
20 25 30  
Asn Gln Glu Ala Glu Asp Leu Ser Tyr Gln Ser Ser Leu Ala Ser Trp  
35 40 45  
Asn Tyr Asn Thr Asn Ile Thr Glu Glu Asn Ala Gln Lys Met Asn Glu  
50 55 60  
Ala Ala Ala Lys Trp Ser Ala Phe Tyr Glu Glu Gln Ser Lys Ile Ala  
65 70 75 80  
Gln Asn Phe Ser Leu Gln Glu Ile Gln Asn Ala Thr Ile Lys Arg Gln  
85 90 95  
Leu Lys Ala Leu Gln Gln Ser Gly Ser Ser Ala Leu Ser Pro Asp Lys  
100 105 110  
Asn Lys Gln Leu Asn Thr Ile Leu Asn Thr Met Ser Thr Ile Tyr Ser

ES 2 443 305 T3

115					120					125					
Thr	Gly	Lys	Val	Cys	Asn	Ser	Met	Asn	Pro	Gln	Glu	Cys	Phe	Leu	Leu
	130					135					140				
Glu	Pro	Gly	Leu	Asp	Glu	Ile	Met	Ala	Thr	Ser	Thr	Asp	Tyr	Asn	Arg
145					150					155					160
Arg	Leu	Trp	Ala	Trp	Glu	Gly	Trp	Arg	Ala	Glu	Val	Gly	Lys	Gln	Leu
				165					170					175	
Arg	Pro	Leu	Tyr	Glu	Glu	Tyr	Val	Val	Leu	Lys	Asn	Glu	Met	Ala	Arg
			180					185					190		
Ala	Asn	Asn	Tyr	Glu	Asp	Tyr	Gly	Asp	Tyr	Trp	Arg	Gly	Asp	Tyr	Glu
		195					200					205			
Ala	Glu	Gly	Val	Glu	Gly	Tyr	Asn	Tyr	Asn	Arg	Asn	Gln	Leu	Ile	Glu
	210					215					220				
Asp	Val	Glu	Asn	Thr	Phe	Lys	Glu	Ile	Lys	Pro	Leu	Tyr	Glu	Gln	Leu
225					230					235					240
His	Ala	Tyr	Val	Arg	Thr	Lys	Leu	Met	Glu	Val	Tyr	Pro	Ser	Tyr	Ile
				245					250						255
Ser	Pro	Thr	Gly	Cys	Leu	Pro	Ala	His	Leu	Leu	Gly	Asp	Met	Trp	Gly
			260					265					270		
Arg	Phe	Trp	Thr	Asn	Leu	Tyr	Pro	Leu	Thr	Thr	Pro	Phe	Leu	Gln	Lys
		275					280					285			
Pro	Asn	Ile	Asp	Val	Thr	Asp	Ala	Met	Val	Asn	Gln	Ser	Trp	Asp	Ala
	290					295					300				
Glu	Arg	Ile	Phe	Lys	Glu	Ala	Glu	Lys	Phe	Phe	Val	Ser	Val	Gly	Leu
305					310					315					320
Pro	Gln	Met	Thr	Pro	Gly	Phe	Trp	Thr	Asn	Ser	Met	Leu	Thr	Glu	Pro
				325					330					335	
Gly	Asp	Asp	Arg	Lys	Val	Val	Cys	His	Pro	Thr	Ala	Trp	Asp	Leu	Gly
			340					345					350		
His	Gly	Asp	Phe	Arg	Ile	Lys	Met	Cys	Thr	Lys	Val	Thr	Met	Asp	Asn
		355					360					365			
Phe	Leu	Thr	Ala	His	His	Glu	Met	Gly	His	Ile	Gln	Tyr	Asp	Met	Ala
	370					375					380				
Tyr	Ala	Lys	Gln	Pro	Phe	Leu	Leu	Arg	Asn	Gly	Ala	Asn	Glu	Gly	Phe
385					390					395					400

His Glu Ala Val Gly Glu Ile Met Ser Leu Ser Ala Ala Thr Pro Lys  
 405 410 415  
 His Leu Lys Ser Ile Gly Leu Leu Pro Ser Asn Phe Gln Glu Asp Asn  
 420 425 430  
 Glu Thr Glu Ile Asn Phe Leu Leu Lys Gln Ala Leu Thr Ile Val Gly  
 435 440 445  
 Thr Leu Pro Phe Thr Tyr Met Leu Glu Lys Trp Arg Trp Met Val Phe  
 450 455 460  
 Gln Asp Lys Ile Pro Arg Glu Gln Trp Thr Lys Lys Trp Trp Glu Met  
 465 470 475 480  
 Lys Arg Glu Ile Val Gly Val Val Glu Pro Leu Pro His Asp Glu Thr  
 485 490 495  
 Tyr Cys Asp Pro Ala Ser Leu Phe His Val Ser Asn Asp Tyr Ser Phe  
 500 505 510  
 Ile Arg Tyr Tyr Thr Arg Thr Ile Tyr Gln Phe Gln Phe Gln Glu Ala  
 515 520 525  
 Leu Cys Gln Ala Ala Lys His Asp Gly Pro Leu His Lys Cys Asp Ile  
 530 535 540  
 Ser Asn Ser Thr Glu Ala Gly Gln Lys Leu Leu Asn Met Leu Ser Leu  
 545 550 555 560  
 Gly Asn Ser Gly Pro Trp Thr Leu Ala Leu Glu Asn Val Val Gly Ser  
 565 570 575  
 Arg Asn Met Asp Val Lys Pro Leu Leu Asn Tyr Phe Gln Pro Leu Phe  
 580 585 590  
 Val Trp Leu Lys Glu Gln Asn Arg Asn Ser Thr Val Gly Trp Ser Thr  
 595 600 605  
 Asp Trp Ser Pro Tyr Ala Asp Gln Ser Ile Lys Val Arg Ile Ser Leu  
 610 615 620  
 Lys Ser Ala Leu Gly Lys Asn Ala Tyr Glu Trp Thr Asp Asn Glu Met  
 625 630 635 640  
 Tyr Leu Phe Arg Ser Ser Val Ala Tyr Ala Met Arg Glu Tyr Phe Ser  
 645 650 655  
 Arg Glu Lys Asn Gln Thr Val Pro Phe Gly Glu Ala Asp Val Trp Val  
 660 665 670  
 Ser Asp Leu Lys Pro Arg Val Ser Phe Asn Phe Phe Val Thr Ser Pro

675		680		685											
Lys	Asn 690	Val	Ser	Asp	Ile	Ile 695	Pro	Arg	Ser	Glu	Val 700	Glu	Glu	Ala	Ile
Arg 705	Met	Ser	Arg	Gly	Arg 710	Ile	Asn	Asp	Ile	Phe 715	Gly	Leu	Asn	Asp	Asn 720
Ser	Leu	Glu	Phe	Leu 725	Gly	Ile	Tyr	Pro	Thr 730	Leu	Lys	Pro	Pro	Tyr 735	Glu
Pro	Pro	Val	Thr 740	Ile	Trp	Leu	Ile	Ile 745	Phe	Gly	Val	Val	Met 750	Gly	Thr
Val	Val	Val 755	Gly	Ile	Val	Ile	Leu 760	Ile	Val	Thr	Gly	Ile 765	Lys	Gly	Arg
Lys	Lys 770	Lys	Asn	Glu	Thr	Lys 775	Arg	Glu	Glu	Asn	Pro 780	Tyr	Asp	Ser	Met
Asp 785	Ile	Gly	Lys	Gly	Glu 790	Ser	Asn	Ala	Gly	Phe 795	Gln	Asn	Ser	Asp	Asp 800
Ala	Gln	Thr	Ser	Phe 805											

**REIVINDICACIONES**

1. Uso de un polipéptido de la ECA2 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de lesión pulmonar aguda.
2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polipéptido ECA2 es un polipéptido ECA2 humano.
- 5 3. Uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el polipéptido ECA2 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 2 o un fragmento del mismo, en el que el fragmento consiste en al menos 5 aminoácidos y conserva actividad.
- 10 4. Uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el polipéptido ECA2 comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos un 80% con la SEC ID N° 2 y los cambios de aminoácidos están en una porción del polipéptido no implicado en proporcionar actividad o están en una porción del polipéptido implicada en proporcionar actividad, de modo que la mutación aumenta o disminuye la actividad del polipéptido.
- 15 5. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido ECA2 que comprende la SEC ID N° 2, o un fragmento del mismo, combinado con un vehículo farmacéuticamente aceptable, en la que la composición es adecuada para inyección intravenosa y en la que el fragmento consiste en al menos 5 aminoácidos y conserva actividad, para el tratamiento de ALI.
6. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5 para el tratamiento del SDRA (Síndrome de dificultad respiratoria del adulto).

Figura 1

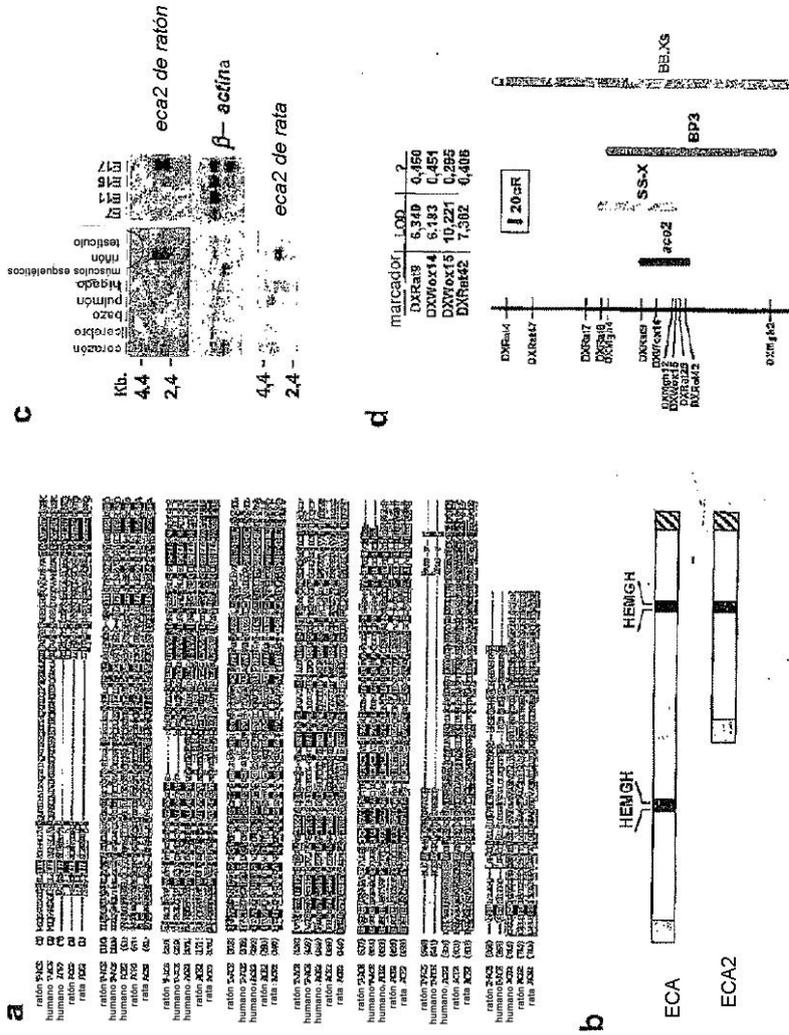




Figura 2a

a

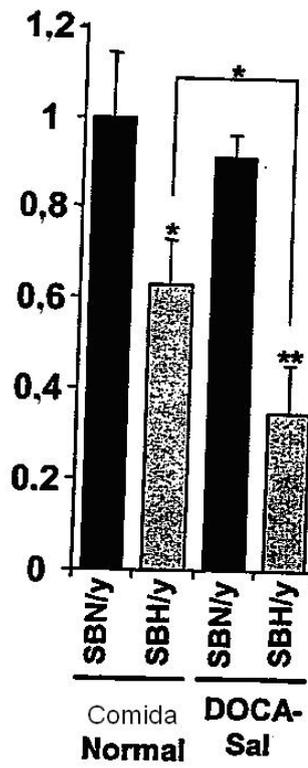
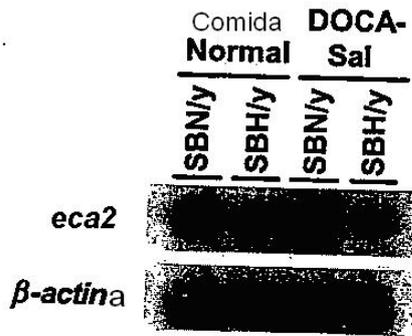


Figura 2b

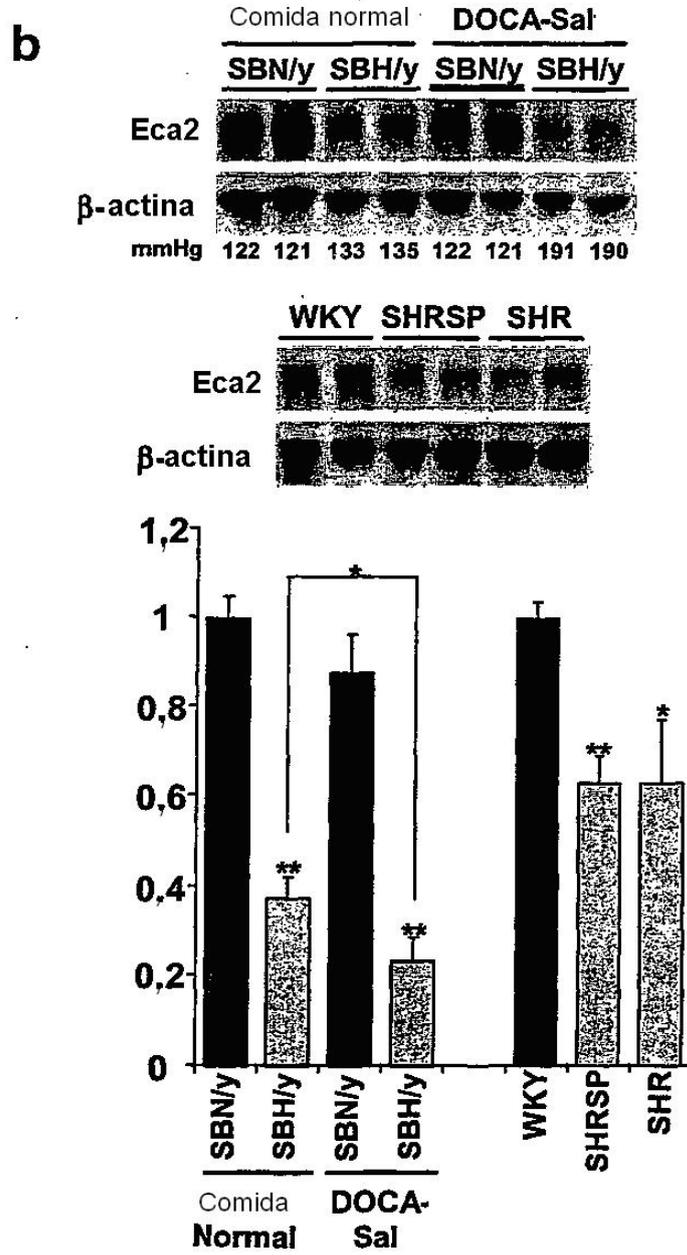


Figura 3 a

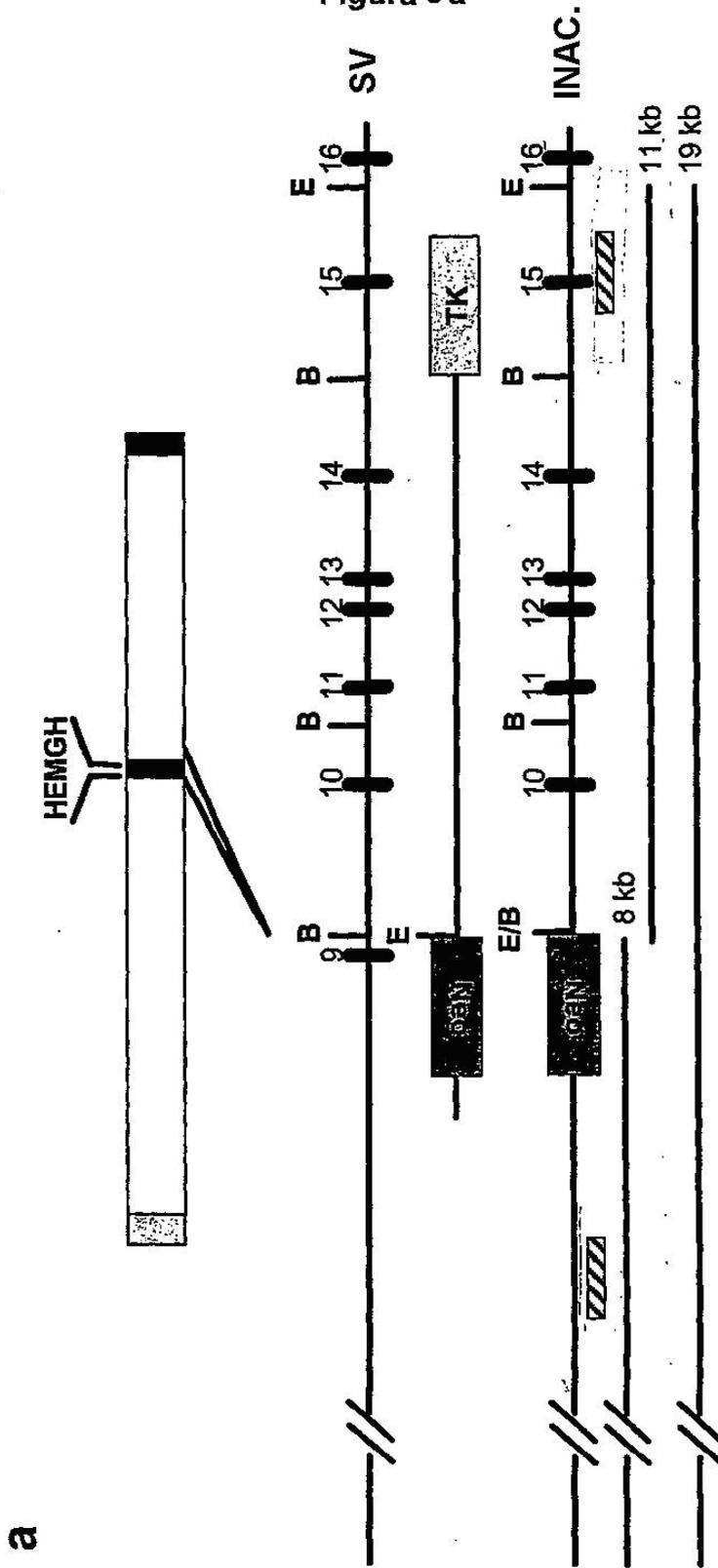


Figura 3b, 3c, 3d

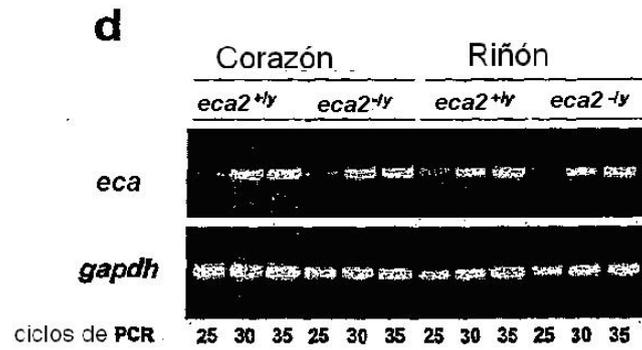
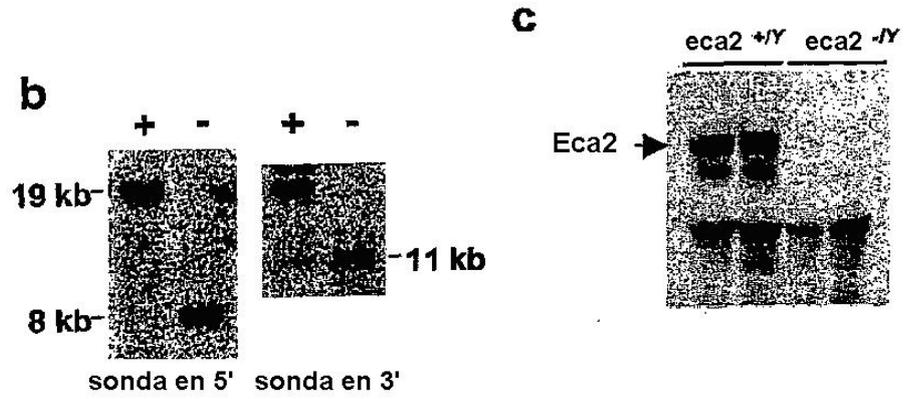
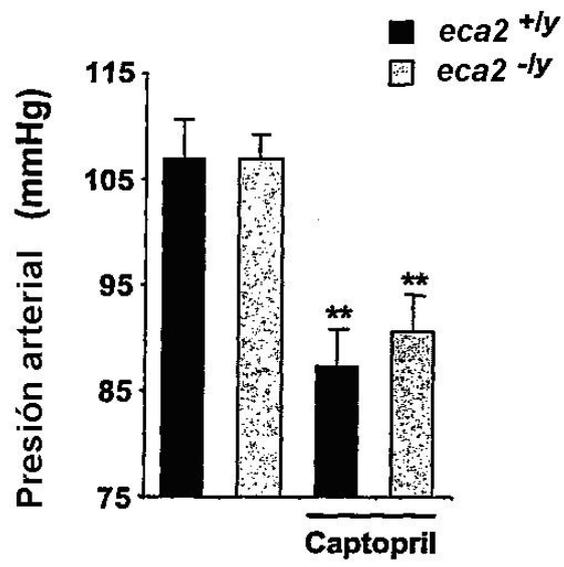


Figura 4a, 4b

a



b

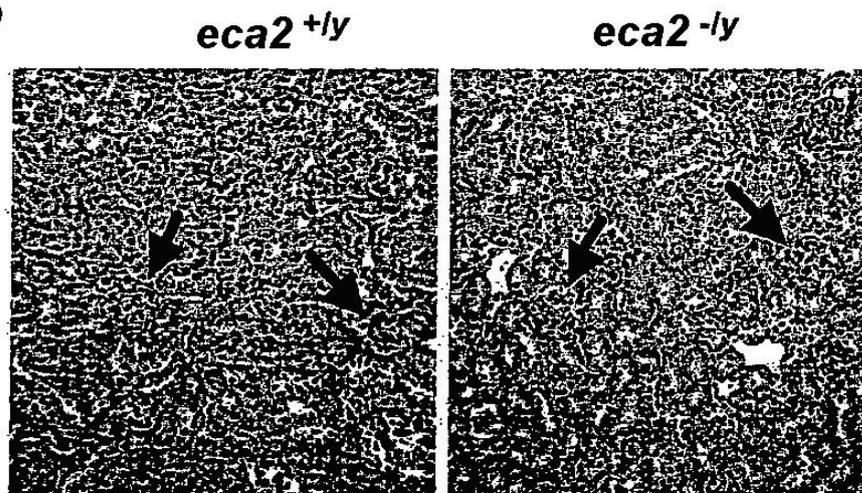
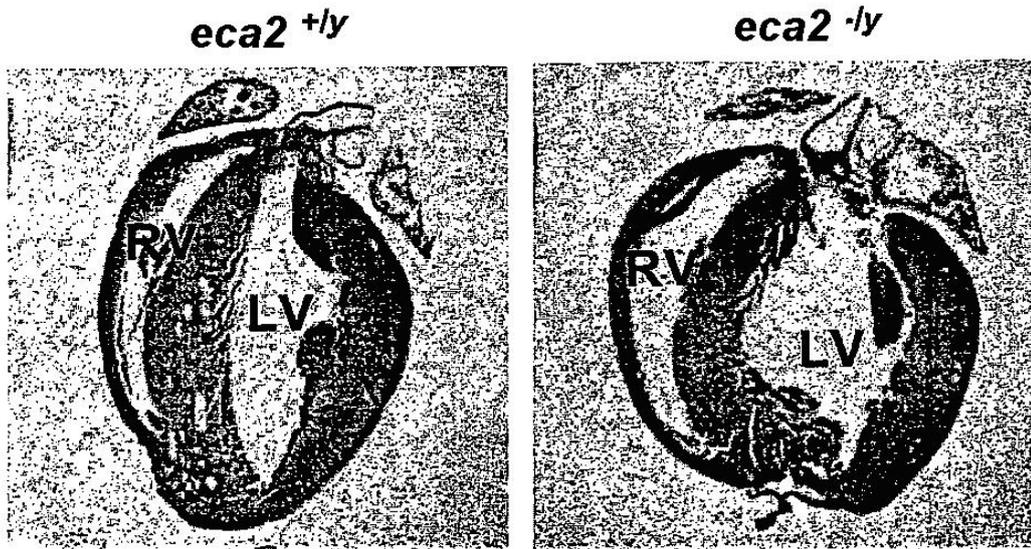


Figura 5a, 5b

a



b

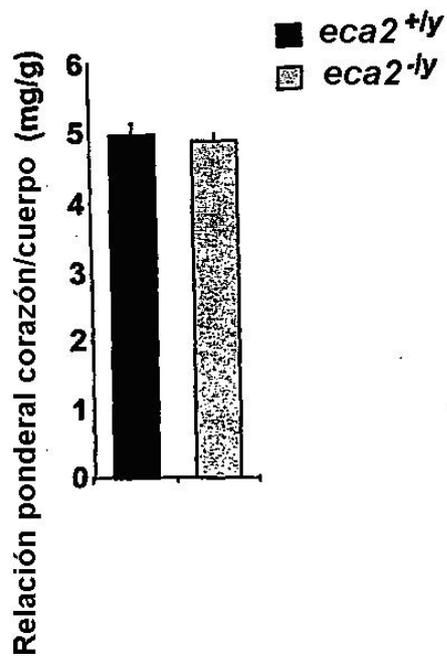


Figura 5c,5d

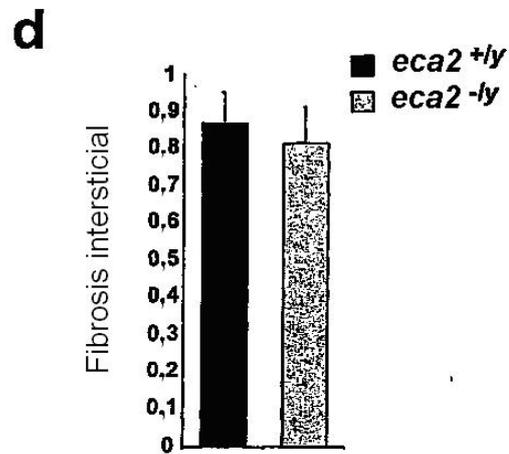
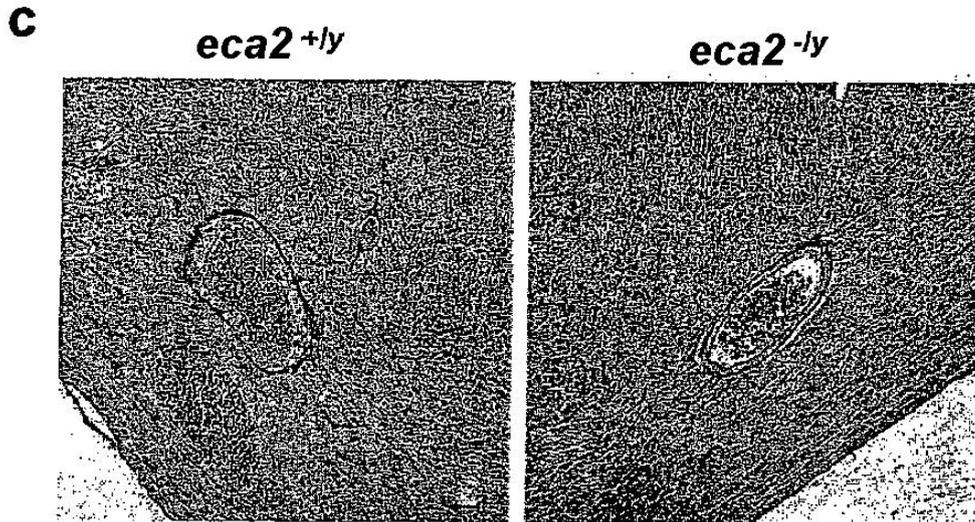


Figura 6a

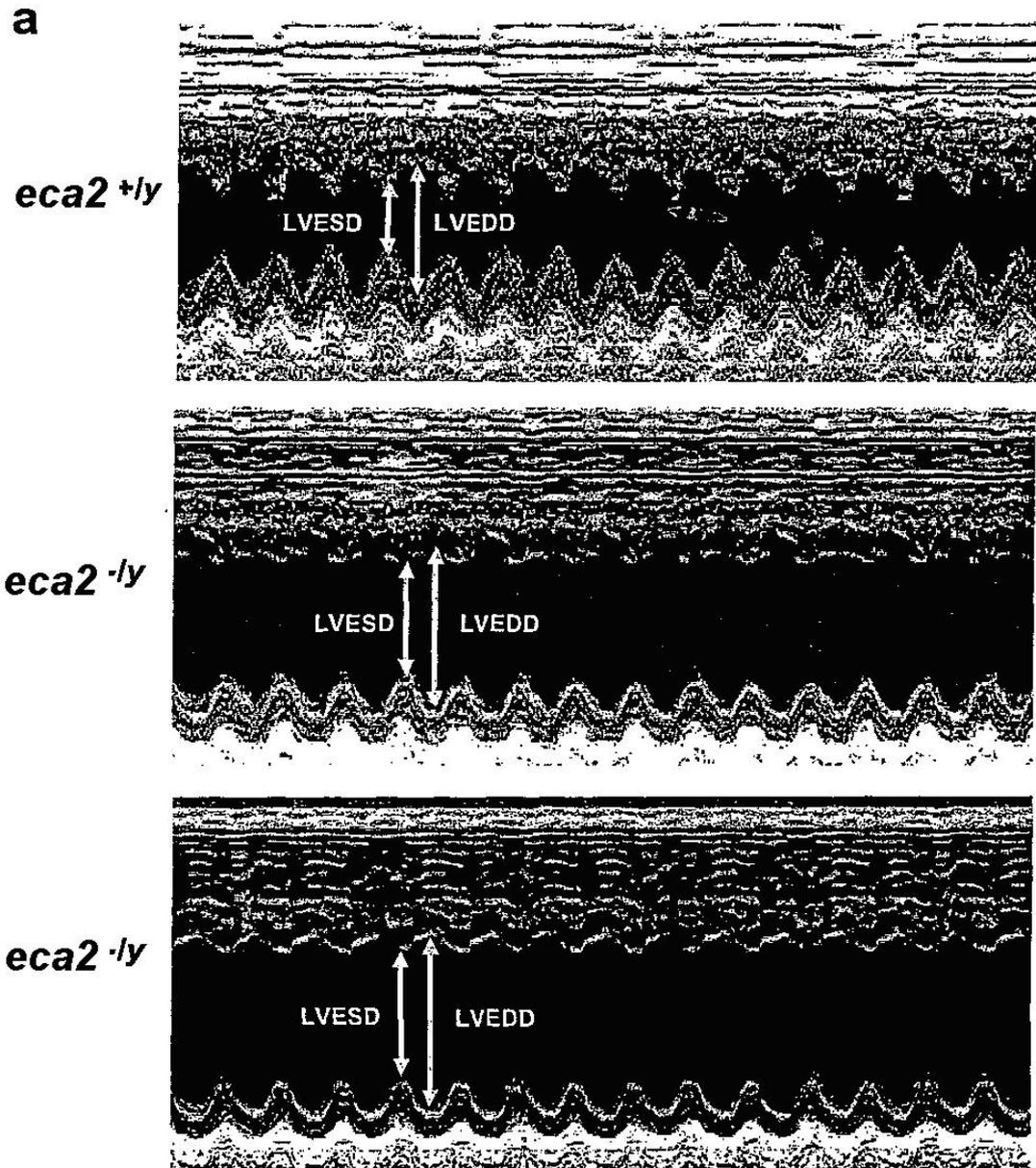


Figura 6b,6c

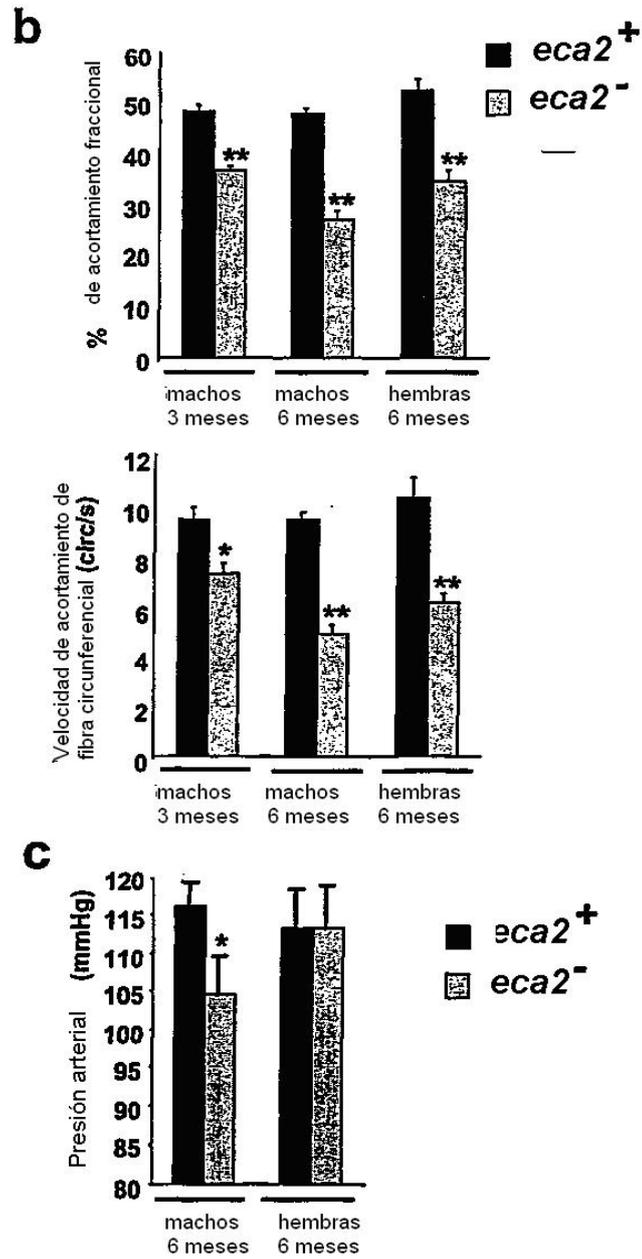
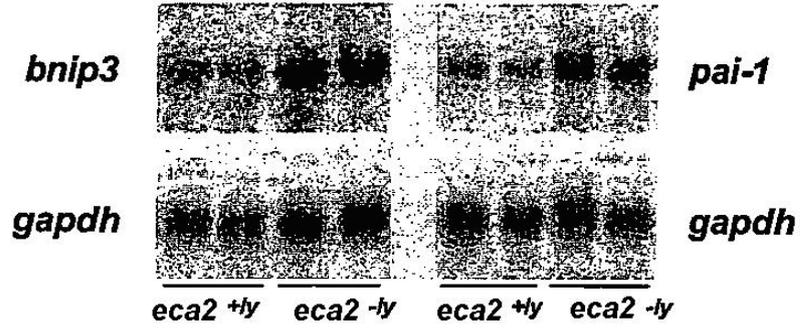


Figura 7a,7b

**a**



**b**

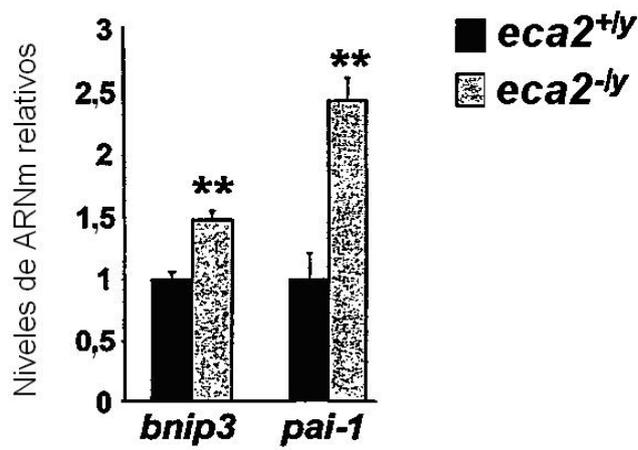


Figura 7c

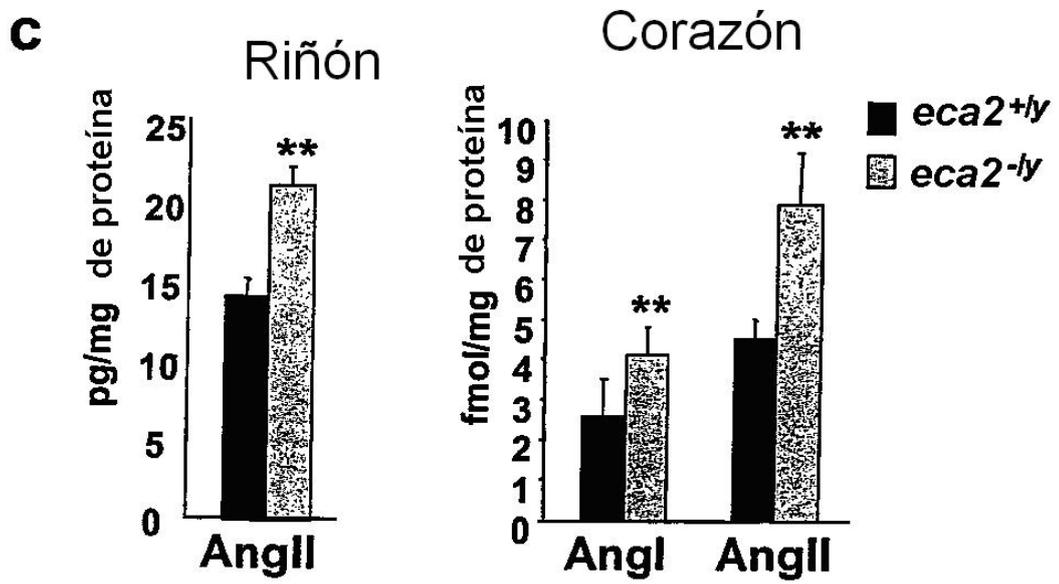


Figura 8a,8b

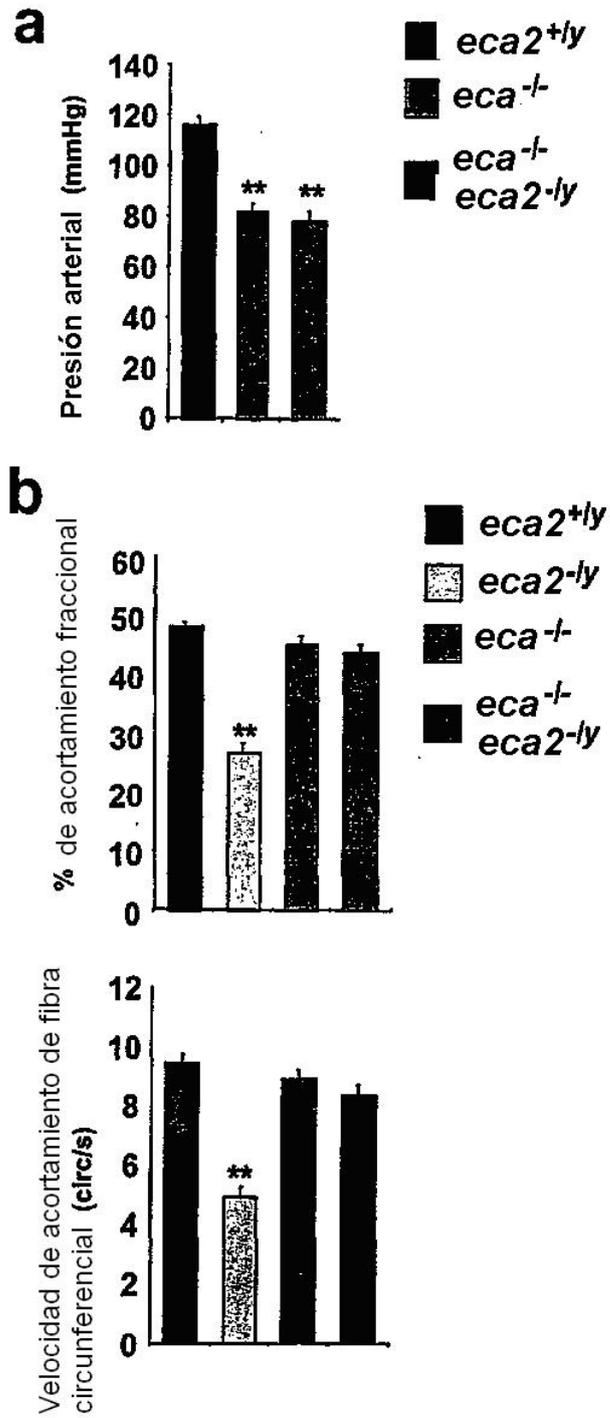
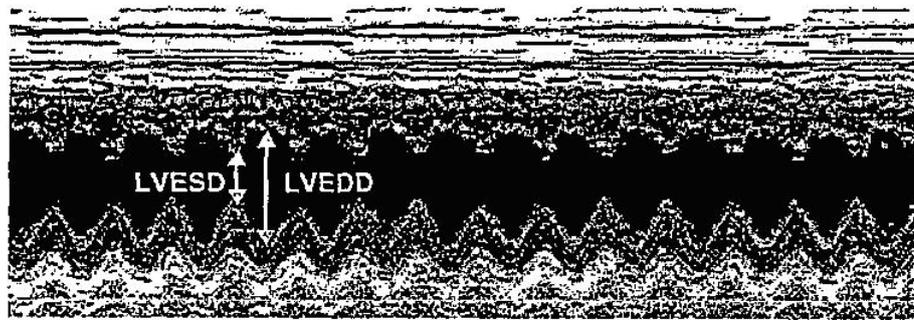
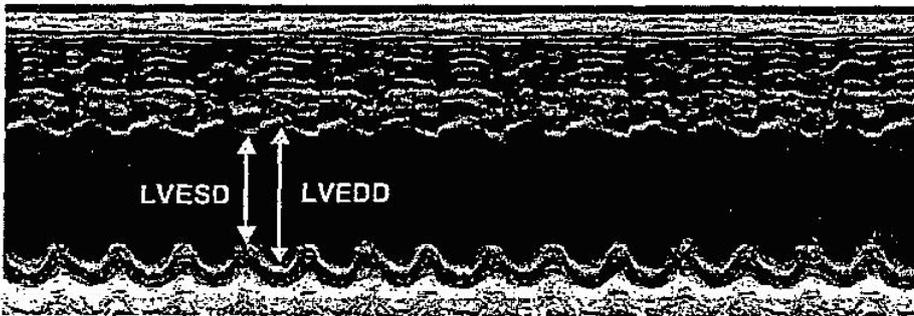


Figura 8c

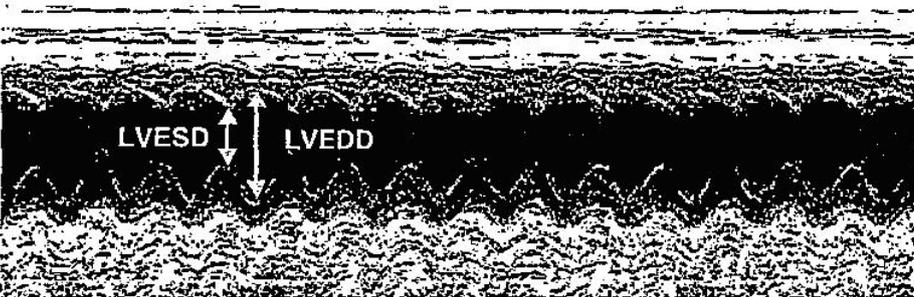
**C**



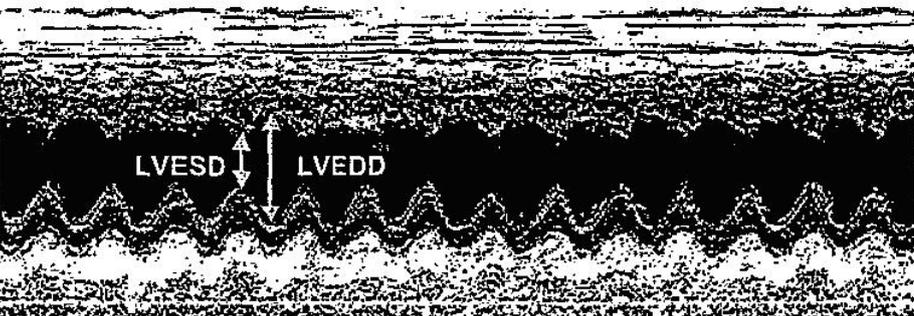
*eca2<sup>+/y</sup>*



*eca2<sup>-/y</sup>*

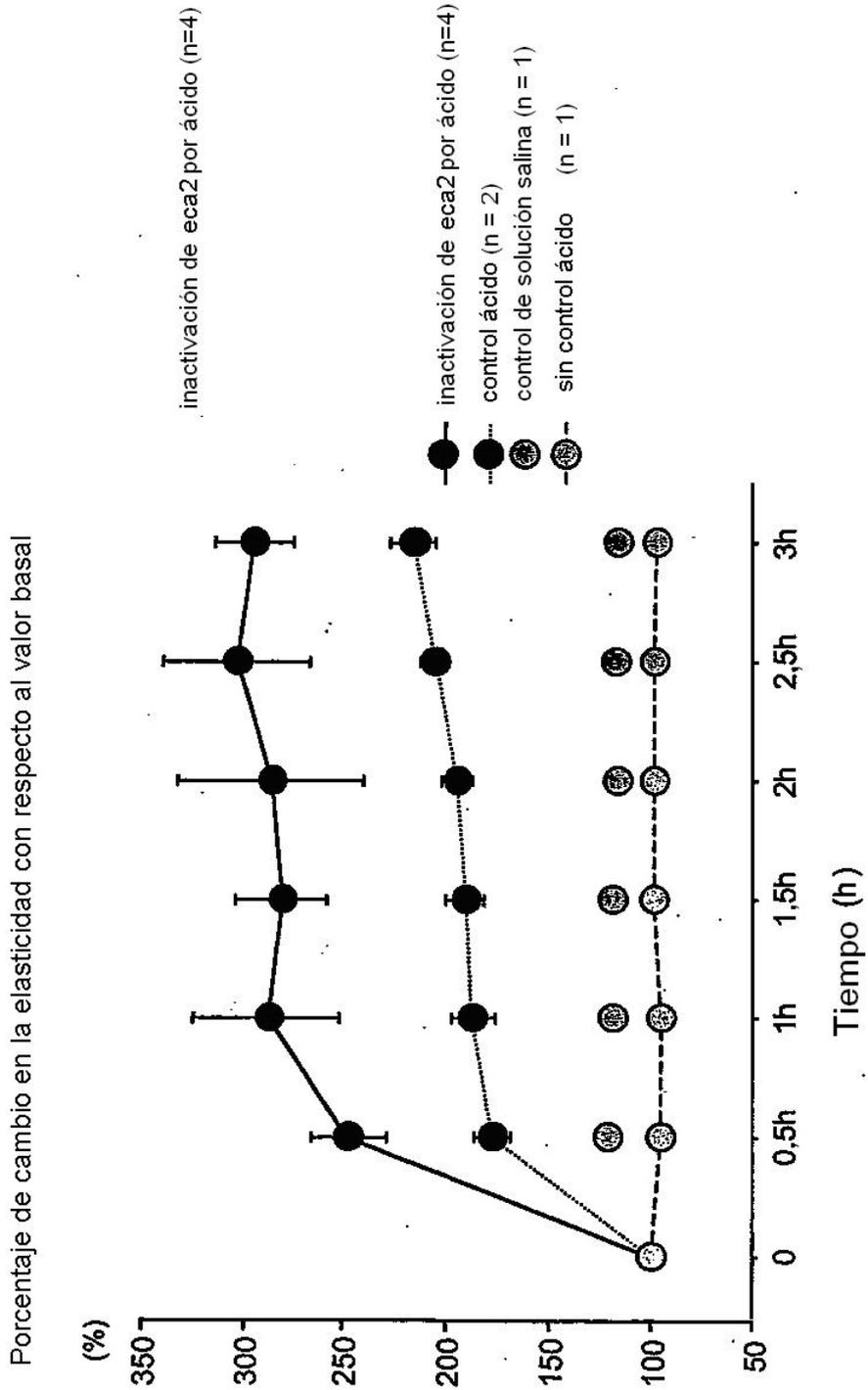


*eca<sup>-/-</sup>*



*eca<sup>-/-</sup>  
eca2<sup>-/y</sup>*

**Figura 9**



## Figura 10a

```

1  cgcccaaccc aagttcaag gctgataaga gagaaaatct catgaggagg ttttagtcta
61  gggaaagtca ttcagtggat gtgatcttgg ctcacagggg acgatgtcaa gctcttctg
121 gctccttctc agccttgttg ctgtaactgc tgctcagtcc accattgagg aacaggccaa
181 gacatititg gacaagtta accacgaagc cgaagacctg ttctatcaaa gttcacttgc
241 ttcttgggat tataacacca atattactga agagaatgtc caaaacatga ataatgctgg
301 ggacaaatgg tctgcctttt taaaggaaca gtccacactt gcccaaatgt atccactaca
361 agaaattcag aatctcacag tcaagttca gctgcaggct cttcagcaaa atgggtcttc
421 agtgctctca gaagacaaga gcaaacgggt gaacacaatt ctaaatacaa tgagcaccat
481 ctacagtact ggaaaagttt gtaaccgaga taatccaca gaatgcttat tacttgaacc
541 aggtttgaat gaaataatgg caaacagttt agactacaat gagaggctct gggcttggga
601 aagctggaga tctgaggtcg gcaagcagct gaggccatta tatgaagagt atgtggtcct
661 gaaaaatgag atggcaagag caaatcatta tgaggactat ggggattatt ggagaggaga
721 ctatgaagta aatggggtag atggctatga ctacagccgc ggccagttga ttgaagatgt
781 ggaacatacc tttgaagaga ttaaaccatt atatgaacat cttcatgcct atgtgagggc
841 aaagttgatg aatgcctatc cttcctatat cagtccaatt ggatgcctcc ctgctcattt
901 gcttgggtgat atgtggggta gattttggac aaatctgtac tctttgacag ttccctttgg
961 acagaaacca aacatagatg ttactgatgc aatgggtggac caggcctggg atgcacagag
1021 aatattcaag gaggccgaga agttctttgt atctgttggc cttcctaata tgactcaagg
1081 attctgggaa aattccatgc taacggaccc aggaaatggt cagaagcag tctgccatcc
1141 cacagcttgg gacctgggga agggcgactt caggatcctt atgtgcacaa aggtgacaat
1201 ggacgacttc ctgacagctc atcatgagat ggggcatatc cagtatgata tggcatatgc
1261 tgcaaacctt tttctgctaa gaaatggagc taatgaagga ttccatgaag ctggttgggga
1321 aatcatgtca ctttctgcag ccacacctaa gcatttaaaa tccattggtc ttctgtcacc
1381 cgattttcaa gaagacaatg aaacagaaat aaacttcctg ctcaacaag cactcacgat
1441 tgttgggact ctgccattta cttacatggt agagaagtgg aggtggatgg tctttaaagg
1501 ggaattccc aaagaccagt ggatgaaaaa gtggtgggag atgaagcag agatagttgg
1561 ggtggtggaa cctgtgcccc atgatgaaac atactgtgac cccgcatctc tgttccatgt
1621 ttctaattgat tactcattca ttcgatatta cacaaggacc ctttaccat tccagtttca
1681 agaagcactt tgtcaagcag ctaaacaatga aggcctctg cacaatgtg acatctcaaa
1741 ctctacagaa gctggacaga aactgttcaa tatgctgagg cttggaaaat cagaaccctg
1801 gaccctagca ttggaaaatg ttgtaggagc aaagaacatg aatgtaaggc cactgctcaa
1861 ctactttgag cccttattta cctggctgaa agaccagaac agaattcct ttgtgggatg
1921 gagtaccgac tggagtccat atgcagacca aagcatcaaa gtgaggataa gcctaaaatc
1981 agctcttggg gataaagcat atgaatggaa cgacaatgaa atgtacctgt tccgatcatc
2041 tgttgcatat gctatgaggc agtacttttt aaaagtaaaa aatcagatga ttctttttgg
2101 ggaggaggat gtgcgagtgg ctaatttgaa accaagaatc tcctttaatt tctttgtcac
2161 tgcacctaaa aatgtgtctg atatcattcc tagaactgaa gttgaaaagg ccatcaggat
2221 gtcccggagc cgtatcaatg atgctttccg tctgaatgac aacagcctag agtttctggg
2281 gatacagcca acacttggac ctcccaacca gccccctgtt tccatattggc tgattgtttt
2341 tggagtgtg atgggagtga tagtgggttg cattgtcatc ctgatcttca ctgggatcag
2401 agatcggag aagaaaaata aagcaagaag tggagaaaat ccttatgcct ccatcgatat
2461 tagcaaagga gaaaataatc caggattcca aaacactgat gatgttcaga cctcctttta
2521 gaaaaatcta tgttttctct cttgaggtga ttttgttga tgtaaattgt aatttcattg
2581 tatagaaaat ataagatgat aaagatatca ttaaattgtc aaactatgac tctgttcaga
2641 aaaaaaattg tccaaagaca acatggccaa ggagagagca tcttcattga cattgctttc
2701 agtatttatt tctgtctctg gatttgactt ctgttctggt tcttaataag gattttgat
2761 tagagtatat tagggaaagt gtgtatttgg tctcacaggc tgttcaggga taatctaaat
2821 gtaaatgtct gttgaatttc tgaagttgaa aacaaggata tatcattgga gcaagtgtg
2881 gatcttgtat ggaatatgga tggatcactt gtaaggacag tgctgggaa ctgggtgtagc
2941 tgcaaggatt gagaatggca tgcattagct cactttcatt taatccattg tcaaggatga

```

(continúa en la siguiente página)

**Figura 10a continuación**

```
3001 catgctttct tcacagtaac tcagttcaag tactatggg atttgctac agtgatggtt
3061 ggaatcgatc atgctttctt caaggtgaca ggtctaaaga gagaagaatc caggaacag
3121 gtagaggaca ttgcttttcc acttccaagg tgcttgatca acatctccct gacaacacaa
3181 aactagagcc aggggcctcc gtgaactccc agagcatgcc tgatagaaac tcatttctac
3241 tgttctctaa ctgtggagtg aatggaaatt ccaactgtat gttcacctc tgaagtgggt
3301 acccagtctc ttaaactctt tgtatttgc caccagtgtt gagcagtgct gagcacaag
3361 cagacactca ataaatgcta gatttacaca ctcaaaaaaa aaaaa
```

SEC ID N° 1

**Figura 10b**

MSSSSWLLLSLVAVTAAQSTIEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQSSLASWNYNTNITEENVQNMNAGDKWSAFLKEQSTLAQMY  
PLQEIQLNTVKLQLQALQONGSSVLSEDKSKRLNTILNTMSTIYSTGKVCNPDNPQECLLLEPGLNEIMANSLDYNERIWAVE  
SWRSEVGGKQLRPLYEYVVLKNEMARANHYEDYGDYWRGDYEVNGVDGYDYSRGQLIEDVEHTFEEIKPLYEHLHAYVRAKIM  
NAYPSYISPIGCLPAHLLGDMWGRFWTNLYSLTVPFQKPNIDVTIDAMVDQAWDAQRI FKEAEKFFVSVGLPNMTQGFWENSM  
LTDPGNVQKAVCHPTAWDLGKGD FRIILMCTKVTMDDELTAHHEMIGHIQYDMAYAAQPFLLRNGANEGFHEAVGEIMSLSAATP  
KHLKSIGLLSPDFQEDNETEINFLKQALTIVGTLPFYMLEKWRWMVFKGEIPKDQWMKKWEMKREIVGVVEPVPHDETYC  
DPASLFHVSNDYSFIRYYTRTYQFQEQEALCOAAKHEGPLHKCDISNSTEAGQKLFNMLRLGKSEPWTLALENVVGAKNMNV  
RPLLNYFEPLETWLKDQNKNSFVGWSTDWSPYADQSIKVRISLKSALGDKAYEWN DNEMYLFRSSVAYAMROYFLKVKNQMLL  
FGEEDVRVANLKPRISFNFFVTAPKNVSDIIPRTEVEKAIRMSRSRINDAFRLNDNSLEFLGIQPTLGPPNQPPVSIWLEVFG  
VVMGVIVVGVILIFTGIRDKKNKARSGENPYASIDISKGENNPGFQNTDDVQTSF

SEC ID N°2

Figura 11

```

1 catattggtc cagcagcttg tttactgttc tcttctgttt cttctttctgc ttttttttctc
61 ttctcttctc agtgcccaac ccaagttcaa aggctgatga gagagaaaaa ctcatgaaga
121 gattttactc tagggaaagt tgctcagtg atgggatctt ggcgcacggg gaaagatgtc
181 cagctcctcc tggctccttc tcagccttgt tgctgttact actgctcagt ccctcaccga
241 ggaaaatgcc aagacatttt taacaactt taatcaggaa gctgaagacc tgtcttatca
301 aagtccaact gcttcttgga attataatac taacattact gaagaaaatg cccaaaagat
361 gagtgaggct gcagccaaat ggtctgcctt ttatgaagaa cagtctaaga ctgccaaag
421 tttctcacta caagaaatcc agactccgat catcaagcgt caactacagg cccttcagca
481 aagtgggtct tcagcactct cagcagacaa gaacaaacag ttgaaacaca ttctgaacac
541 catgagpacc atttacagta ctggaagatg ttgcaacca aagaaccac aagaatgctt
601 attacttgag ccaggattgg atgaataat ggcgacaagc acagactaca actctaggct
661 ctgggcatgg gagggtctga gggctgaggt tggcaagcag ctgaggccgt tgtatgaaga
721 gtatgtggtc ctgaaaaacg agatggcaag agcaacaat tataacgact atggggatta
781 ttggagaggg gactatgaag cagagggagc agatggctac aactataacc gtaaccagtt
841 gattgaagat gtagaacgta ccttcgcaga gatcaagcca ttgatgagc atcttcatgc
901 ctatgtgagg aggaagttga tggataccta cccttcctac atcagcccca ctggatgctt
961 ccctgcccat ttgcttggtg atatgtgggg tagattttgg acaaatctgt accctttgac
1021 tgttcccttt gcacagaaac caaacataga tgttactgat gcaatgatga atcagggtctg
1081 ggatgcagaa aggatatttc aagaggcaga gaaattcttt gtttctgttg gccttcctca
1141 tatgactcaa ggattctggg caaactctat gctgactgag ccagcagatg gccggaaagt
1201 tgtctgccac ccacagctt gggatctggg acacggagac ttcagaatca agatgtgtac
1261 aaaggtcaca atggacaact tcttgacagc ccatcacgag atgggacaca tccaatatga
1321 catggcatat gccaggcaac ctttctgtgt aagaaacgga gccaatgaag ggttccatga
1381 agctgttggg gaaatcatgt cactttctgc agctacccc aagcatctga aatccattgg
1441 tcttctgcca tccgattttc aagaagatag cgaacacagag ataaacttcc tactgaaaca
1501 ggcattgaca attgttggaa cactaccggt tacttacctg ttagagaagt ggaggtggat
1561 ggtctttcgg ggtgaaattc ccaaagagca gtggatgaaa aagtgtggg agatgaagcg
1621 ggagatcgtt ggtgtggtgg agcctctgcc tcatgatgaa acatactgtg accctgcac
1681 tctgttccat gtttctaagt attactcatt cattcgatat tacacaagga ccatttacca
1741 attccagttt caagaagctc tttgtcaagc agctaagtat aatggttctc tgcacaaatg
1801 tgacatctca aattccactg aagctgggca gaagttgctc aagatgctga gtcttggaaa
1861 ttcagagccc tggaccaaag ccttgaaaaa tgtggttaga gcaaggaata tggatgtaaa
1921 accactgctc aattacttcc aaccgttgtt tgactggctg aaagagcaga acagaaattc
1981 ttttgtgggg tggaaactg aatggagccc atatgccgac caaagcatta aagtgaggat
2041 aagcctaaaa tcagctcttg gagctaagc atatgaatgg accaacaacg aaatgttctt
2101 gttccgatca tctgttgcat atgccatgag aaagtatttt tcaataatca aaaaccagac
2161 agttcctttt ctagaggaag atgtacgagt gagtgatttg aaaccaagag tctccttota
2221 cttctttgtc acctcaccac aaaatgtgtc tgatgtcatt cctagaagtg aagttgaaga
2281 tgccatcagg atgtctcggg gccgatcaa tgatgtcttt ggctgaatg ataacagcct
2341 ggagttttct gggattcacc caaacttga gccaccttac cagcctcctg tccatcatg
2401 gctgattatt tttggtgttg tgatggcact ggtagtgttt ggcatcatca tcttgattgt
2461 cactggcatc aaaggtcgaa agaagaaaaa tgaacaaaaa agagaagaga acccttatga
2521 ctogatggac attggaaaag gagaagcaa tgcaaggattc caaacagtg atgatgctca
2581 gacttccttt tagcaaaagca cttgtcatct tcctgtatgt aaatgctaac ttcagtagtac
2641 acaaaatatg agagtataca catgtcatta gctatcaaaa ctatgatctg ttcagtaaac
2701 gttgtccaaa gagcatcaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

```

SEC ID N°3

Africana Am Asiática Caucásica Referencia

rs879922	C(C/G)	80	100	70	C	TAACTGAAGTCCAAAACATATGTTCTTCCACCTA(C/G)TAAACCCAGT CCTTGAATTTGCTGGAGCTAGTT SEC ID N° 5
rs757066	T(C/T)	100	100	70	T	GTA(T)CACCATCAGAAAACACAAAGCTGTGTG(T)TAGGATATTAGCTA ATAAAGTTTGTAAACat SEC ID N° 6
rs714205	C(C/G)	70	50	80	C	CCATGAGTTCTAGCCAGACTTTCTTCAACCAGCACCTGCCTCC(C/G)TT TACCAGAGACTTCTCAGACCACAAGTCC SEC ID N° 7
rs329442	C(A/C)	50	90	90	A/C	Acaaggttgtcttaaaactcatatcagagttatgtaaaactgacatc(C/A) CACTATTGGAAATTTCTGGTGTATCTTTGTATTTAAATTTCTCAGTGGG T SEC ID N° 8
rs233574	C(C/T)	80	100	80	C	Aftgiccactgccctctagcctagggcagagcaagac(C/T) GTTTCAAAAAAATAAAGAAATATACACC SEC ID N° 9
rs1978124	C(C/T)	90	100	50	C	CITGGAAACCTGTTTTAAACCAAGCTTTTTTTTCCATATCTCTATCTGAT GGAC(C/T)TCTCCACACTTCTACATCAGCAGCTTTATGACAC SEC ID N° 10
rs1978124-2(nuevo)	G(G/A)	30	70	40	C	CITGGAAACCTGTTTTAAACCAAGCTTTTTTTTCCATATCTCTATCTGAT GGIG(A)CCTCTCCACACTTCTACATCAGCAGCTTTATGACAC SEC ID N° 11
rs1514282	A(A/G)	70	100	100	A	AACACAGCAGTCACAAATGAATAATGCCAACCAATTTATACATTTCCACG ACTT(G/A)CAACTCAATTTTCCAAATGGAGCTGTGATGAACCTAATCTA GGTTGCCAAGGCATGAAA SEC ID N° 12
rs1514282-2(nuevo)	A(A/G)	20	50	30	A	TTCTTGCCAAATATGATAAACCCTTTGCCCTTAAACACAGCAGTCACAATG AATAAT(G/A)CCAACTTATATACATTTCCACACTTACAACCTCAATTTT CCAATGGAGCTGTTGATG SEC ID N° 13
rs1514281	A(A/G)	70	100	100	A	GAATTTCTGCCAAATGATAACTTTGCCCTTAAACACAGCAGTCACA AATGAATAAATACCA(G/A)ACCATTATACATTTCCACACTTACAACCTCA ATTTCCAAATGGAGCTGTTGATGAAA SEC ID N° 14
rs1514281-2(nuevo)	A(A/G)	20	50	50	A	GAATTTCTGCCAAATGATAAACCCTTTGCCCTTAAACACAGCAGTCACA AATGAATAAAT(G/A)CCAACTTATATACATTTCCACACTTACAACCTCAA TTTTCCAATGGAGCTGTTGATGAAA SEC ID N° 15
rs1514279	A(A/G)	Falló	100	70	A	ATAGTCACTAAATGATTTGCCACCAGGTACTATGCT(G/A)TATCTTATAT GATGGTCTTTATGAATATCTG SEC ID N° 16
rs1514280	C(C/T)	80	100	80	C	GTTTACAAAGTGTATTTTCAATTTGAA(C/T)GTGCAAGTTTTTCTTTTACA CTTATAGATAAGTACATTTCC SEC ID N° 17
rs233575	C(C/T)	100	100	50	C	GTGCTACCTCCAAATGCCAATACCTTTTATTTGGAAAAAT(A/G/T) TACTATAGAGACTTGGTCTATAGGACCTGATTCATT SEC ID N° 18

Figura 12