

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 650 463**

51 Int. Cl.:

A61K 38/48 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2008 PCT/AT2008/000460**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2009 WO09076694**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2008 E 08863153 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.10.2017 EP 2222330**

54 Título: **Tratamiento de enfermedades inflamatorias con ACE2**

30 Prioridad:

18.12.2007 AT 20582007

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

18.01.2018

73 Titular/es:

**APEIRON BIOLOGICS AG (100.0%)
CAMPUS-VIENNA-BIOCENTER 5
1030 WIEN, AT**

72 Inventor/es:

**LOIBNER, HANS y
SCHUSTER, MANFRED**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 650 463 T3

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

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de enfermedades inflamatorias con ACE2

La presente invención se refiere al sector del tratamiento de enfermedades inflamatorias.

Una reacción inflamatoria es un proceso en el que células de defensas se ponen en camino hacia una fuente de infección y allí garantizan la eliminación de la causa. Con ello, se liberan diferentes sustancias mediadoras que cooperan en la eliminación, pero también generan los síntomas de una inflamación. En el caso de regulaciones defectuosas de la reacción, estos síntomas pueden provocar daños principales o bien pueden ser, en general, la fuente de la enfermedad (p. ej., en el caso de alergias). También se puede hacer una diferenciación entre inflamaciones agudas (tal como sepsis) e inflamaciones crónicas latentes (tal como, por ejemplo, reumatismo). Las inflamaciones pueden ser provocadas también de manera artificial, p. ej., en el caso de trasplantes de órganos que en última instancia pueden conducir al rechazo del órgano extraño. Asimismo, pueden provocarse inflamaciones como efecto secundario por determinados medicamentos.

En el caso de todos estos estados puede ser conveniente una regulación artificial de la respuesta inmunológica para el tratamiento principal o también sólo para aliviar los síntomas.

Durante una inflamación, una serie de citoquinas participan de manera determinante en el progreso de una reacción inmunológica. Células CD4-T activadas producen interleuquina-2, que es esencial para la activación tanto de las células CD8-T como también de las células B. Además, células CD4-T producen otras citoquinas tales como IFN-gamma, la cual potencia la actividad de macrófagos. TNF-alfa regula la actividad de diferentes células inmunes y puede excitar la muerte de la célula, la proliferación celular, la diferenciación de la célula y la secreción de otras citoquinas. En particular, coopera de manera desencadenante a síntomas tales como fiebre.

Es también un objetivo de la presente invención proporcionar un regulador del sistema inmunitario, en particular para el tratamiento de inflamaciones.

Por lo tanto, la invención se refiere a una proteína o a un ácido nucleico que codifica la proteína, en donde la proteína es ACE2, para el tratamiento terapéutico o la prevención de una inflamación (o bien enfermedad inflamatoria). Asimismo, la presente invención se refiere al uso de una proteína ACE2 o de un ácido nucleico que codifica ACE2 para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de una inflamación. Igualmente, se prevé el uso de proteína ACE2 o de un ácido nucleico que codifica ACE2 para la inmunomodulación en un paciente, tal como el tratamiento o la prevención de una inflamación.

La enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) es una enzima esencial del sistema renina-angiotensina-aldosterona que es expresada en forma de una glicoproteína anclada a la membrana en diversos órganos tales como el corazón, el riñón, el hígado y los pulmones, pero también en los vasos sanguíneos.

ACE2 se descubrió en 1997 como una enzima homóloga a ACE (Acc. Genbank: BAB40370, codificada por un ácido nucleico con la secuencia según Acc. Genbank: AB046569). Inicialmente, se le otorgó la misma actividad enzimática que ACE (documento US 6.989.363). Sólo después se descubrió que ACE2 presenta un modo de acción totalmente diferente, incluso antagonista, a ACE (documento WO 2004/000367). ACE2 es una carboxipeptidasa que disocia numerosos sustratos peptídicos con una selectividad y actividad fuertemente diferentes. ACE2 es también un participante celular en la unión de coronavirus SARS. La regulación a la baja de ACE2 o la administración de ACE2 con el fin de bloquear receptores de virus puede reducir, por lo tanto, la susceptibilidad de células que presentan ACE2 (documento WO 2006/122819, Lang et al., Virology (2006) 353(2): 474, resumen). Las funciones descritas para ACE2 son, ante todo, la transformación de Ang II en Ang 1-7, presentando el sustrato y el producto de esta reacción propiedades antagonistas. Ang II actúa esencialmente de forma vasoconstrictora e hipertensora. Ang 1-7 actúa de forma vasodilatadora y presenta, en el caso de enfermedades renales, pulmonares y coronarias, un efecto protector (documento WO 2004/000367).

El producto de ACE2 Ang 1-7 inhibe, además, ACE, la enzima que es la responsable de manera determinante de la producción de Ang II. La expresión de ACE2 es controlada por diversos estímulos. Se encontró entonces que ACE2 es regulada a la baja por la aparición de citoquinas inflamatorias tales como TNF-alfa, IFN-gamma o IL-4, lo cual conduce posteriormente a diversas enfermedades y a una acumulación de Ang II en los compartimientos afectados y a un potenciamiento de la respuesta inmunológica iniciada. Las citoquinas sirven esencialmente para la comunicación de diferentes tipos de células del sistema inmunológico. Habitualmente, una de las primeras etapas de una inflamación naciente consiste en que sustancias antigénicas son absorbidas por células presentadoras de antígenos (APCs) y son clasificadas como extrañas. Posteriormente, se produce una primera expulsión de citoquinas inflamatorias por parte de las APCs afectadas, las cuales alarman con ello a otras células del sistema inmunitario. Este mecanismo está altamente regulado y controlado con el fin de iniciar sólo una respuesta inmunológica cuando ésta esté también realmente justificada, y desconectar a ésta de nuevo cuando se neutralizó la sustancia antigénica. A pesar de ello, puede ocurrir que esta respuesta inmunológica iniciada se descontrola y se dirija contra el propio organismo. La acumulación de Ang II, p. ej., en diversas enfermedades renales, de corazón y pulmonares, condiciona una inflamación progresiva y también una infiltración incrementada del tejido afectado por parte de células del sistema inmunitario y posteriormente un exceso de la respuesta inmunológica. Un ejemplo es la

sepsis, en donde cantidades muy grandes de citoquinas inflamatorias son secretadas y se inicia sistemáticamente una respuesta inmunológica desbordante, lo cual conduce a un deterioro masivo de casi todos los órganos. Además, también puede tratarse o prevenirse una erupción o brote alérgico de una enfermedad autoinmune. En este caso, un punto clave es siempre, no obstante, la respuesta inmunológica celular como reacción a un estímulo que en una cascada de amplificación que se potencia excede con mucho a la finalidad primaria de neutralizar una sustancia extraña y posteriormente daña al organismo.

La primera etapa de la respuesta inmunológica germinativa es la emisión de señales inflamatorias en forma de citoquinas. Representantes esenciales para ello son, por ejemplo, IL-4, IFN-gamma o TNF-alfa. Sustancias que tienen la propiedad de suprimir o debilitar esta expresión de citoquinas después de la estimulación de la célula inmunológica son agentes terapéuticos utilizables para la atenuación de una respuesta inmunológica excesiva. La expresión de ACE2 disminuye fuertemente en presencia de citoquinas inflamatorias en el plano celular, lo cual conduce a una potenciación de la inflamación, ante todo mediante la acumulación de Ang II, mediante la disminución de Ang 1-7 y mediante la supresión condicionada con ello de una disminución de la formación posterior de Ang II (Fig. 1). Las concentraciones de Ang II fuertemente crecientes por ello fomentan, en virtud de las propiedades fuertemente inflamatorias de Ang II, la potenciación ulterior de la inflamación, la cual, posteriormente, conduce a una atenuación todavía más clara de la expresión de ACE2. Con el fin de escapar de este círculo vicioso, ACE2 es administrada terapéuticamente conforme a la invención y, con ello, se previene una acumulación de Ang II y, con ello, se atenúa la inflamación: ACE2 reduce directamente los títulos elevados de Ang II, lo cual debilita la inflamación constantemente creciente por parte de Ang II. Ang 1-7 se continúa formando y debilita debido a este efecto anti-inflamatorio asimismo a la inflamación. Además, Ang 1-7 limita, mediante su propiedad de inhibir a ACE, la producción posterior de Ang II. El transcurso de la inflamación determina que las citoquinas segregadas vuelvan a una medida normal y que se produzca de nuevo una expresión endógena de ACE2, que procura de forma duradera la degradación de Ang II y la formación de Ang 1-7 y conduce de nuevo a una RAS funcional estable. Posteriormente, se ajusta de nuevo un equilibrio permanente autorregulante de los componentes activos de la RAS. Por consiguiente, puede evitarse por completo una administración renovada de ACE2 cuando se neutralizó el estímulo original del sistema inmunitario. Una representación esquemática de los mecanismos mencionados se reproduce en la Fig. 1. Mediante la administración de ACE2 se crea una salida de la inflamación que se potencia.

Preferiblemente, la inflamación es una inflamación local de un tejido u órgano y/o una inflamación sistémica. Además, en base al mecanismo general es posible tanto el tratamiento de inflamaciones crónicas como agudas. En particular, la inflamación puede comprender reumatitis, sepsis, artritis, lupus eritematoso sistémico reumatoide o esclerodermia. Puede ser provocada por lesiones de células o de tejidos mecánicas o químicas o heridas, infecciones, en particular de agentes patógenos tales como virus, bacterias u hongos, por implantes, implantes de órganos inclusivos, así como medicamentos.

Preferiblemente, la ACE2 recombinante se emplea como proteína ACE2. Secuencias de ACE2 son suficientemente conocidas y pueden ser producidas sin problema mediante la incorporación de vectores adecuados que codifican ACE2, en sistemas de expresión, en particular eucarióticos. Sistemas de este tipo son, p. ej., líneas celulares de mamíferos tales como líneas CHO (ovario de hámster chino) y células de ratón NS0 o células de insectos, p. ej., Sf9. Para la expresión, un vector de este tipo puede presentar determinados promotores específicos para la célula o generales.

Preferiblemente, la proteína es ACE2 soluble en agua (para la que también codifica el ácido nucleico ACE2), en particular sin dominios de membrana. La secuencia ACE2 humana se indica mediante la SEQ ID NO: 1:

MSSSSWLLLSLVAVTAAQSTIEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQSSLASWNYNTNITEENVQNM-
 NNAGDKWSAFLKEQSTLAQMYPLOEIQNLTVKLQLQALQQNGSSVLSSEDKSKRLNTILNTMS-
 TIYSTGKVCNPDNPQECLLLEPGLNEIMANSLDYNERLWAWESWRSEVKGQLRPLYEYEVVLKN
 EMARANHYEDYGDYWRGDYEVNGVDGYDYSRQQLIEDVEHTFEEIKPLYEHLHAYVRAKLM-
 NAYPSYISPIGCLPAHLLGDMWGRFWTNLYSLTVPFGQKPNIDVTDAMVDQAWDAQRIF-
 KEAEKFFVSVGLPNMTQGFWENSMLTDPGNVQKAVCHPTAWDLGKGFRIILMCTKVTMDDDELTA
 HHEMGHIQYDMAYAAQPFLLRNGANEGFHEAVGEIMSLSAATPKHLKLSIGLLSPDFQEDNE-
 TEINFLKQALTIVGTLPFTYMLEKWRWVMFKGEIPKDQWMKKWEMKREIVGVVEPVPHDE-
 TYCDPASLFHVSNDYSFIRYYTRTLYQFQFQEALCQAAKHEGPHKCDISNSTEAGQKLFNMLR
 LGKSEPWTALALENVGAKNMNVRPLLNYFEPLFTWLKQNKNSFVGWSTDWSPYADQSIK-
 VRISLKSALGDKAYEWNDEMFLFRSSVAYAMRQYFLKVKNQMILFGEDVRVANLK-
 PRISFNFFVTAPKNVSDIIPRTEVEKAI RMSRSRINDAFRLNDNSLEFLGIQPTLGPPNQPPVS

En este caso, la secuencia señal autóloga (subrayada) es disociada por la célula huésped para la exclusión. Preferiblemente, por lo tanto, la proteína ACE2 conforme a la invención comprende una secuencia ACE2 correspondiente a la SEQ ID NO: 1 a partir de la posición 18. En formas de realización adicionales, el polipéptido ACE2 no presenta dominios de transmembrana. Estos dominios de transmembrana se encuentran en el extremo C de SEQ ID NO: 1. Se trata, por lo tanto, entonces de ACE2 soluble. Formas de realización particularmente preferidas

comprenden en este caso polipéptidos ACE2 solubles, cuya cadena polipeptídica se compone de los aminoácidos que comprenden la SEQ ID NO: 1 hasta la posición del aminoácido 740, o fragmentos enzimáticamente activos de la misma. Otra proteína ACE2 soluble se compone de los aminoácidos 18-615 de SEQ ID NO: 1.

5 La solubilidad de una proteína no se determina sólo por su secuencia de aminoácidos, sino también por su plegamiento, así como por modificaciones post-traduccion. Ante todo, se trata de estructuras de azúcares cargadas que aumentan de manera determinante la solubilidad de una proteína y afectan a su perfil farmacológico. El segmento soluble de ACE2 contiene 7 lugares de N-glicosilación. Preferiblemente, al menos el 80% de las posibles posiciones de N-glicosilación está glicosilado y/o la proteína ACE2 presenta una proporción de azúcar mayor que 10% (% en masa de toda la ACE2) u 11%, 12%, 13%, 14%, preferiblemente mayor que 15% o 16%, 17%, 18%, 19%, en particular mayor que 20%, 21%, 22%, 23%, 24% o 25%.

10 A pesar de que ACE2 humana es la preferida para la mayoría de las formas de realización, también es posible ACE2 de ratón, rata, hámster, cerdo, primates o ganado vacuno. ACE2 es una enzima universal en todos los mamíferos con el sustrato idéntico Ang II. Por lo tanto, también se puede emplear en organismos extraños. Por consiguiente, con la proteína de acuerdo con la invención (o su ácido nucleico) se pueden tratar, independientemente del origen de ACE2, p. ej., seres humanos, ratones, ratas, hámsters, cerdos, primates o ganado vacuno.

15 De acuerdo con la invención, puede proporcionarse una composición farmacéutica que comprende la proteína ACE2 o un ácido nucleico que codifica ACE2. Composiciones de este tipo pueden comprender sales farmacéuticamente adecuadas de las mismas, adicionalmente tampones, componentes de tonicidad o soportes farmacéuticamente adecuados. En particular, ácido nucleico de ACE2 puede preverse en sistemas de vectores terapéuticos adecuados. Sustancias de soporte farmacéuticas sirven para la mejor compatibilidad de la composición y posibilitan una mejor solubilidad así como una mejor biodisponibilidad de las sustancias activas. Ejemplos de ello son emulsionantes, agentes espesantes, componentes redox, almidón, sus disoluciones alcohólicas, polietilenglicol o lípidos. La elección de un soporte farmacéutico adecuado depende fuertemente del tipo de administración. Para administraciones orales pueden utilizarse soportes líquidos o sólidos, para inyecciones se requieren composiciones finales líquidas.

20 Preferiblemente, el medicamento a utilizar de acuerdo con la invención comprende sustancias tampón o sustancias tónicas. Por medio de tampones se puede ajustar el valor del pH del medicamento a condiciones fisiológicas y, además, pueden debilitarse o bien amortiguarse oscilaciones del pH. Un ejemplo de ello es un tampón fosfato. Sustancias tónicas sirven para el ajuste de la osmolaridad y pueden comprender sustancias iónicas tales como, por ejemplo, sales inorgánicas tales como NaCl, o también sustancias no iónicas tales como, por ejemplo, glicerol o hidratos de carbono.

25 Preferiblemente, la composición a utilizar de acuerdo con la invención está preparada de manera adecuada para la administración sistémica, tópica, oral o intranasal. Estas formas de administración del medicamento de la presente invención posibilitan una absorción rápida y no complicada. Para la administración oral pueden tomarse, por ejemplo, medicamentos sólidos o bien líquidos directamente o disueltos o bien diluidos.

30 El medicamento a utilizar de acuerdo con la invención está preparado de manera adecuada preferiblemente para la administración intravenosa, intra-arterial, intramuscular, intravascular, intraperitoneal o subcutánea. Para ello se adecúan, por ejemplo, inyecciones o transfusiones. Administraciones directamente en el torrente sanguíneo tienen la ventaja de que los principios activos del medicamento se distribuyen en todo el cuerpo y alcanzan rápidamente el tejido diana.

40 La presente invención se ilustra mediante las siguientes Figuras y Ejemplos:

Figuras:

Fig. 1: Representación esquemática del restablecimiento de una RAS funcional por parte de terapia mediante ACE2. Las flechas en rojo (+) representan efectos de la reactividad inmune desbordante, mientras que las flechas en azul (-) designan modificaciones condicionadas por la terapia con ACE2.

45 Fig. 2: Analítica FACS específica para ACE2 de preparaciones de células Vero E6 después de incubación durante 48 horas con 10 ng/ml de IL-4 (A), IFN-gamma (B) o TNF-alfa (C) (curvas con un pico medio) en comparación con un grupo control no estimulado (curvas en rojo con un pico a la derecha) y una serie de control (curvas en negro con un pico a la izquierda).

50 Fig. 3: Medición de TNF-alfa en sobrenadantes de cultivo de PBMC 16 horas después de la estimulación con LPS y PHA y LPS + PHA sin (barras en negro, a la izquierda) o en presencia de ACE2 (barras en gris, centro) o ACE2 y Ang II (barras en azul, derecha).

Fig. 4: Concentraciones medidas de Ang II en un modelo de sepsis inducida por LPS en cerdos: curva azul: animales tratados con APN 01 (rACE2), curva gris: animales tratados con placebo, curva gris (puntos negros): animales sanos tras la administración de APN 01.

55 Fig. 5: Actividad medida de ACE2 en ratones, cerdos y macacos Rhesus.

Fig. 6: Concentración en suero de TNF-alfa en un modelo de sepsis inducido por LPS en cerdos. Los animales tratados con ACE2 se representaron en azul, los animales tratados con placebo se representaron en gris. Concentraciones de TNF-alfa se normalizaron a los valores de partida respectivos al comienzo de la terapia (100%).

5 Fig. 7: Concentración en suero de TNF-alfa en un modelo de ARDS inducido mediante aspiración de meconio en cerdos. Los animales tratados con ACE2 se representaron en azul, los animales tratados con placebo se representaron en gris.

Ejemplos:

Ejemplo 1: Pérdida de la expresión de ACE2 en presencia de citoquinas inflamatorias

10 La línea celular de riñón (*Ceropithecus aethiops*) Vero E6 expresa, bajo las condiciones de cultivo habituales, ACE2 como glicoproteína anclada a la membrana. Vero E6 se incubaron durante 48 horas con 10 ng/ml de IL-4, IFN-gamma o TNF-alfa y se analizaron modificaciones en relación con la expresión superficial de ACE2 mediante analítica FACS utilizando un anticuerpo de cabra específico para ACE2 policlonal y un anticuerpo marcado con FITC específico para cabra. En la Fig. 2 se representan los respectivos histogramas. La evaluación correspondiente está recopilada en la Tabla 1. Mediante incubación con IL-4, IFN-gamma o TNF-alfa se redujo claramente la expresión de ACE2. Mientras que se midió un carácter positivo de ACE2 de $51 \pm 3\%$ en células no estimuladas, éste se redujo a 28 ± 2 , 22 ± 1 y $39 \pm 2\%$, en cada caso tras la estimulación con IL-4, IFN-gamma o TNF-alfa (Fig. 2).

Tabla 1: Analítica FACS específica para ACE2 medida después de incubación de Vero E6 tras la incubación durante 48 horas con 10 ng/ml de IL-4, IFN-gamma o TNF-alfa en comparación con un grupo control no estimulado.

20 Estimulación	IL-4	IFN-gamma	TNF-alfa	∅
Carácter positivo	28±3	22±1	39±2	51±3
Control negativo	5	2	4	6

Ejemplo 2: Atenuación de la reactividad inmune de PBMCs

25 En este Ejemplo se expone el efecto de ACE2 sobre la expresión de citoquina de PBMCs (células de la sangre mononuclear periférica) estimuladas. En el planteamiento se utilizó una preparación de PBMC y, por consiguiente, todo el espectro de linfocitos del donante con el fin de posibilitar la interacción de diferentes linfocitos. De un donante sano se tomó sangre entera y las PBMCs contenidas en la misma se separaron mediante centrifugación. Estas células se estimularon posteriormente con sustancias fuertemente inmunógenas tales como lipopolisacárido (LPS, 100 ng/ml) y fitohemaglutinina (PHA, 20 µg/ml) y una combinación de ambas sustancias en presencia de Ang II, ACE2 y ACE2 con Ang II y se incubaron a 37°C durante 16 horas. Los sobrenadantes se examinaron en cuanto a TNF-alfa y se compararon con un planteamiento control que se llevó a cabo en ausencia de ACE2 y péptidos de la RAS. Los resultados de este ensayo se representan gráficamente en la Fig. 3: la incubación con LPS y PHA indujo en todos los casos la secreción de TNF-alfa. Las respectivas tandas control que fueron co-incubadas sin ACE2 mostraron las concentraciones más altas de TNF-alfa (203, 352 y 278 mOD), en cada caso después de estimulación con LPS, PHA y de combinación. En presencia de ACE2, la señal medida era en todos los grupos claramente menor y ya alcanzó valores mOD de 181, 266, 223 en los grupos respectivos. Bajo la presencia de ACE2 y Ang II, las concentraciones de TNF-alfa medidas fueron, no obstante, las más bajas y alcanzaron ya sólo mOD 144, 247 y 183. Estos resultados indican que la presencia de ACE2 conduce a una producción de citoquinas inflamatorias claramente debilitada incluso cuando para la estimulación se utilizan sustancias particularmente inmunógenas tales como LPS o PHA. Esto confirma un efecto anti-inflamatorio de ACE2. Sorprendentemente, el mecanismo funciona ya sin la presencia de Ang II y se potencia en su presencia, lo cual apunta a un principio dual. Una parte del efecto es determinado por Ang II y su producto de degradación Ang 1-7, en donde otra parte funciona evidentemente a través de la degradación de uno de los otros sustratos de ACE2 y no está unido a Ang II presente (Fig. 3).

45 Ejemplo 3: Restablecimiento de los títulos de Ang II del organismo sano

En este ejemplo se demostró cómo la administración exógena de ACE2 pone de nuevo bajo control una RAS desregulada. APN 01 (ACE2 humana soluble recombinante) se administró para ello en un modelo de sepsis inducido mediante la administración de LPS. A los animales se les infundió de forma continua LPS a partir del instante -120 minutos, lo cual condujo a una inflamación masiva y posteriormente a una sepsis. En función de la segregación masiva de citoquinas inflamatorias se produjo una desconexión de la expresión de ACE2, lo cual condujo posteriormente a una acumulación del péptido inflamatorio Ang II (véase la Fig. 4).

A partir del instante 0 minutos se administró APN 01 en una dosificación de 400 µg/kg en forma de bolo por vía intravenosa. Se produjo inmediatamente una disminución de Ang II en el grupo tratado, y los títulos de Ang II

oscilaron en la subsiguiente hora al mismo nivel que se midió en animales sanos. Además, la administración de APN 01 de la misma dosis en animales sanos proporcionó asimismo una breve caída de los títulos de Ang II que se aproximaban asimismo después de otra hora de nuevo a los valores de los animales sanos. Animales tratados con placebo mostraron, por el contrario, un valor continuo creciente de Ang II hasta el final del experimento. Este fenómeno sorprendente sólo puede ser explicado por un restablecimiento del RAS regulado al alza, dado que hasta el final del experimento, los animales continuaban disponiendo sistémicamente de enzima activa (véase la Fig. 5). Se midió un tiempo de semivida de aprox. 8 horas.

Ejemplo 4: Atenuación de la expresión de citoquinas inflamatorias en la sepsis

En el presente Ejemplo se demuestra cómo la concentración de la citoquina inflamatoria en un modelo de sepsis en cerdos aumenta rápidamente y cae de nuevo al nivel de los animales sanos tras la administración de ACE2. A los animales se les infundió a partir del instante -120 minutos de forma continua LPS en una elevada dosificación, lo cual condujo a una inflamación masiva y, posteriormente, a una sepsis. En virtud de la secreción masiva de citoquinas inflamatorias se produjo la desconexión de la expresión de ACE2, lo cual condujo posteriormente no sólo a una acumulación del péptido inflamatorio Ang II, sino asimismo de la citoquina TNF-alfa inflamatoria (Fig. 6). A partir del instante 0 minutos, se administró a los animales (6 animales en el grupo tratado, 5 animales en el grupo control) ACE2 en una dosificación de 0,4 mg/kg o disolución tampón en forma de bolo por vía intravenosa. Mientras que LPS fue administrada de forma continua además en la misma dosificación elevada, los animales fueron observados durante otras 3 horas y se obtuvieron muestras de suero y se analizaron en cuanto a TNF-alfa. Pudo demostrarse que la concentración de TNF-alfa en el grupo control permanecía siendo elevada hasta el final del experimento, mientras que en el grupo tratado con ACE2 se produjo, ya después de la administración única de ACE2 y durante una administración ininterrumpida de LPS, una clara reducción ($p < 0,001$) de la concentración de TNF-alfa. A pesar de una sepsis masiva se obtuvieron de nuevo aproximadamente los mismos valores que se midieron también en animales sanos. Mediante la administración de ACE2 se pudo incluso reducir por lo tanto en un modelo de sepsis muy agresivo la expresión de TNF-alfa rápidamente al nivel de animales sanos, y se puso coto a una inflamación adicionalmente potenciadora (Fig. 6).

Ejemplo 5: Atenuación de la expresión de todas las citoquinas inflamatorias para la lesión mecánica local de los pulmones

En este Ejemplo se indicó la influencia de ACE2 administrada por vía sistémica sobre la expresión de citoquinas inflamatorias en un modelo de lesión pulmonar en cerdos. En este estudio ciego controlado por placebo se tuvieron en cuenta 14 animales. Todos ellos fueron sometidos en la primera fase del experimento a una aspiración durante tres veces de una disolución al 20% de meconio, en donde, en virtud de parámetros hemodinámicos elevados, se indujo una lesión equiparable en todos los animales. En la segunda fase del experimento, la terapéutica, a una mitad de los animales se administró por vía intravenosa en forma de bolo ACE2 humana soluble recombinante en una dosificación de 0,4 mg/kg. Los otros recibieron una solución de sal común fisiológica. En los instantes -30, 0, 30, 60, 90 y 150 minutos se tomaron muestras de suero en las que se midieron las concentraciones de las citoquinas inflamatorias más significativas. El instante 0 era en este caso el punto de inicio de la terapia a la que todos los animales mostraron ya síntomas de ARDS. Tal como se aclara en la Fig. 7, existe una influencia muy clara de la administración de ACE2 sobre la concentración de suero de TNF-alfa. Mientras que ésta aumenta fuertemente en el grupo de placebo a más de 230 ng/ml, en el grupo tratado disminuye en el espacio de 30 minutos después de la administración a menos de 40 ng/ml y se aproxima en torno a los 90 minutos después de la administración a 25 ng/ml.

Ejemplo 6: Discusión

Los datos indicados permiten sacar las siguientes conclusiones en cuanto al efecto de ACE2 como regulador inmunológico. Condicionado por un estímulo antigénico, se produce una secreción de citoquinas inflamatorias. En presencia de citoquinas inflamatorias se produce una pérdida de la expresión de ACE2. En ausencia de ACE2, se acumula el péptido Ang II pro-inflamatorio, dado que no puede ser degradado por parte de ACE2. En ausencia de ACE2 se acumula asimismo la citoquina TNF-alfa pro-inflamatoria. ACE2 posee propiedades anti-inflamatorias y disminuye en linfocitos la expresión de citoquinas inflamatorias. Una administración terapéutica de ACE2 compensa, por lo tanto, la expresión de ACE2 endógena perdida y puede captar una inflamación germinativa mediante la reducción de títulos de Ang II mediante la formación de Ang 1-7 y mediante otros efectos. Una administración terapéutica de ACE2 posibilita, incluso en el caso de una sepsis grave bajo infusión continua de LPS, reducir títulos de Ang II de nuevo al nivel de un animal sano y crear de nuevo de manera correspondiente la regulación de la RAS. Una administración terapéutica de ACE2 posibilita, además, en el caso de una sepsis grave bajo infusión de LPS continua de reducir títulos de TNF-alfa de nuevo al nivel del animal sano. El mismo efecto pudo observarse asimismo en el caso de una lesión pulmonar masiva mecánica mediante aspiración de meconio.

Listado de secuencias

- <110> Apeiron Biologics Forschungs- und Entwicklungsgesellschaft m.b.H. et al.
- 5 <120> Tratamiento de enfermedades inflamatorias
- <130> r53546
- <150> A 2058/2007
- 10 <151> 18 12 2007
- <160> 1
- <170> PatentIn versión 3.4
- 15 <210> 1
- <211> 740
- <212> PRT
- <213> homo sapiens
- 20 <400> 1

```

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
Asn His Glu Ala Glu Asp Leu Phe Tyr Gln Ser Ser Leu Ala Ser Trp
      35      40
Asn Tyr Asn Thr Asn Ile Thr Glu Glu Asn Val Gln Asn Met Asn Asn
      50      55      60
Ala Gly Asp Lys Trp Ser Ala Phe Leu Lys Glu Gln Ser Thr Leu Ala
 65      70      75      80
Gln Met Tyr Pro Leu Gln Glu Ile Gln Asn Leu Thr Val Lys Leu Gln
      85      90      95
Leu Gln Ala Leu Gln Gln Asn Gly Ser Ser Val Leu Ser Glu Asp Lys
      100      105      110
Ser Lys Arg Leu Asn Thr Ile Leu Asn Thr Met Ser Thr Ile Tyr Ser
      115      120      125
Thr Gly Lys Val Cys Asn Pro Asp Asn Pro Gln Glu Cys Leu Leu Leu
      130      135      140
Glu Pro Gly Leu Asn Glu Ile Met Ala Asn Ser Leu Asp Tyr Asn Glu
      145      150      155      160
Arg Leu Trp Ala Trp Glu Ser Trp Arg Ser Glu Val Gly Lys Gln Leu
      165      170      175
Arg Pro Leu Tyr Glu Glu Tyr Val Val Leu Lys Asn Glu Met Ala Arg
      180      185      190

```

ES 2 650 463 T3

Ala Asn His Tyr Glu Asp Tyr Gly Asp Tyr Trp Arg Gly Asp Tyr Glu
 195 200 205

Val Asn Gly Val Asp Gly Tyr Asp Tyr Ser Arg Gly Gln Leu Ile Glu
 210 215 220

Asp Val Glu His Thr Phe Glu Glu Ile Lys Pro Leu Tyr Glu His Leu
 225 230 235 240

His Ala Tyr Val Arg Ala Lys Leu Met Asn Ala Tyr Pro Ser Tyr Ile
 245 250 255

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Gly Glu Ile Pro Lys Asp Gln Trp Met Lys Lys Trp Trp Glu Met

REIVINDICACIONES

1. Proteína ACE2 recombinante o un ácido nucleico que codifica la proteína ACE2 recombinante, para uso en el tratamiento terapéutico o la prevención de una inflamación tal como reumatitis, sepsis, artritis, lupus eritematoso sistémico reumatoide y esclerodermia.
- 5 2. Proteína ACE2 o ácido nucleico que codifica ACE2 para uso según la reivindicación 1, caracterizado por que la inflamación es provocada por una infección.
3. Proteína ACE2 o ácido nucleico que codifica ACE2 para uso según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que la proteína es ACE2 recombinante.
- 10 4. Proteína ACE2 o ácido nucleico que codifica ACE2 para uso según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que la proteína es ACE2 soluble en agua, en particular sin dominios de membrana.
5. Proteína ACE2 o ácido nucleico que codifica ACE2 para uso según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que la proteína ACE2 es de un mamífero, preferiblemente un ser humano, ratón, rata, hámster, cerdo, primate o ganado vacuno.
- 15 6. Uso de proteína ACE2 o de ácido nucleico que codifica ACE2 recombinante, para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una inflamación tal como reumatitis, sepsis, artritis, lupus eritematoso sistémico reumatoide y esclerodermia.

Fig. 1

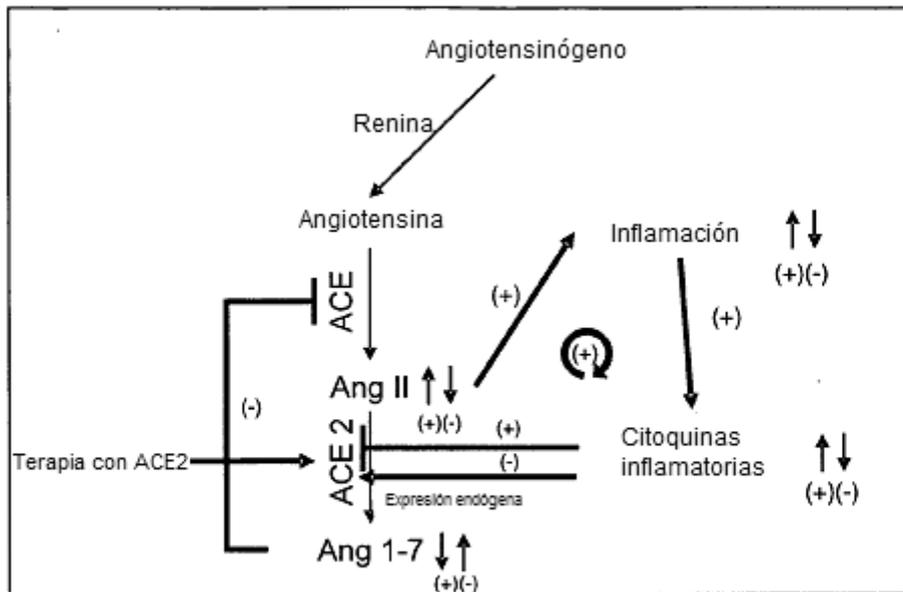


Fig. 2A

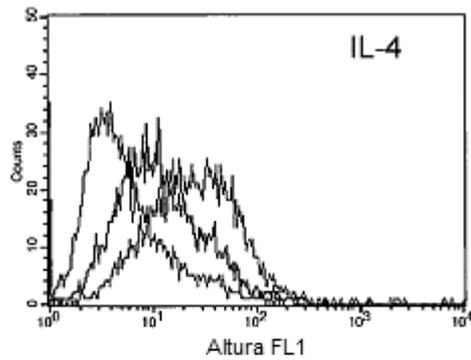


Fig. 2B

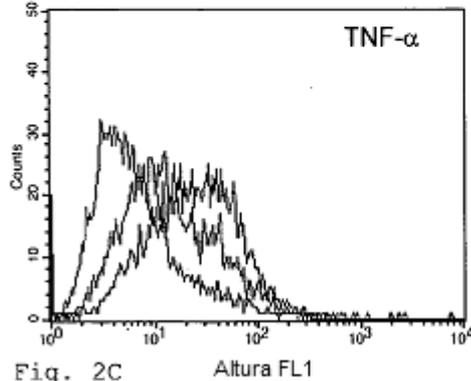
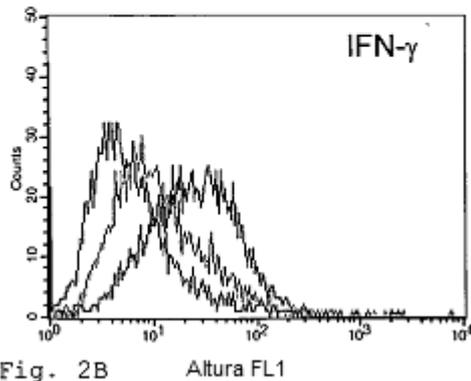


Fig. 2C

Fig. 3

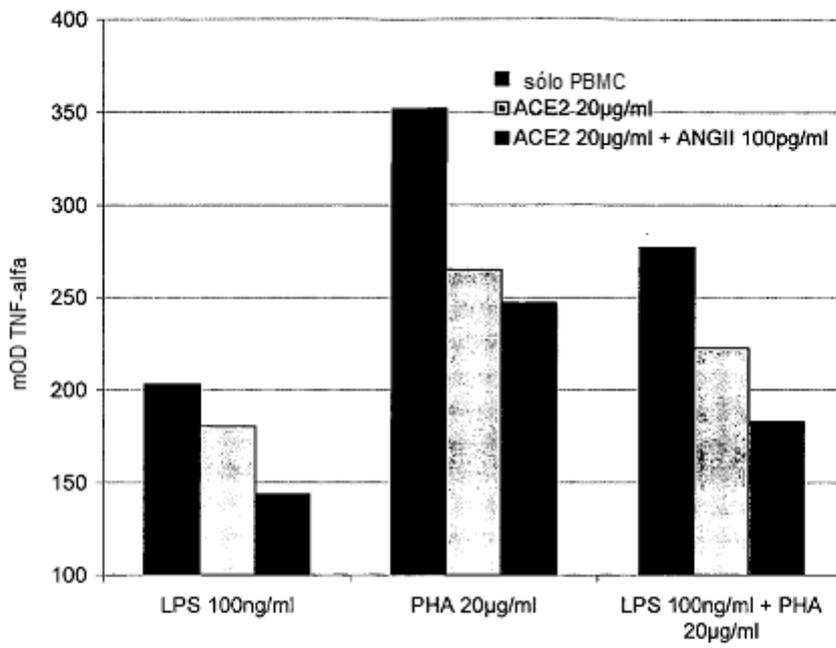


Fig. 4

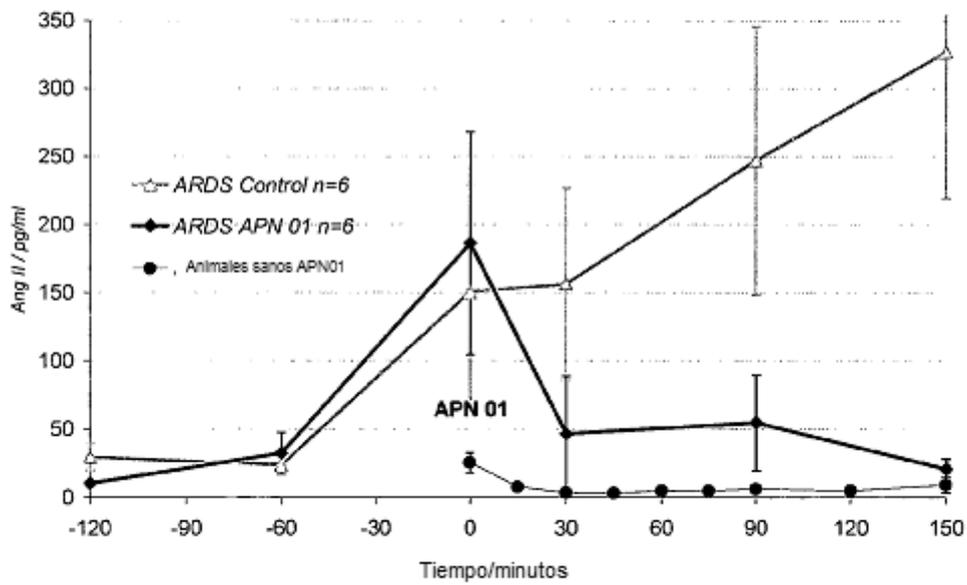


Fig. 5

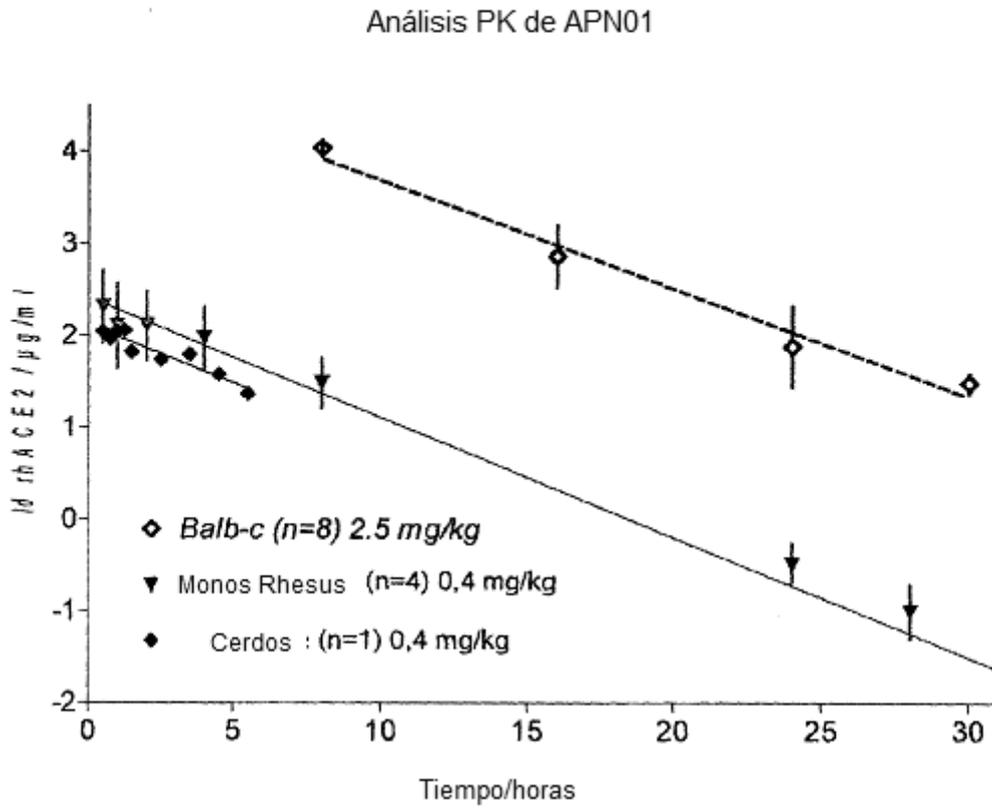


Fig. 6

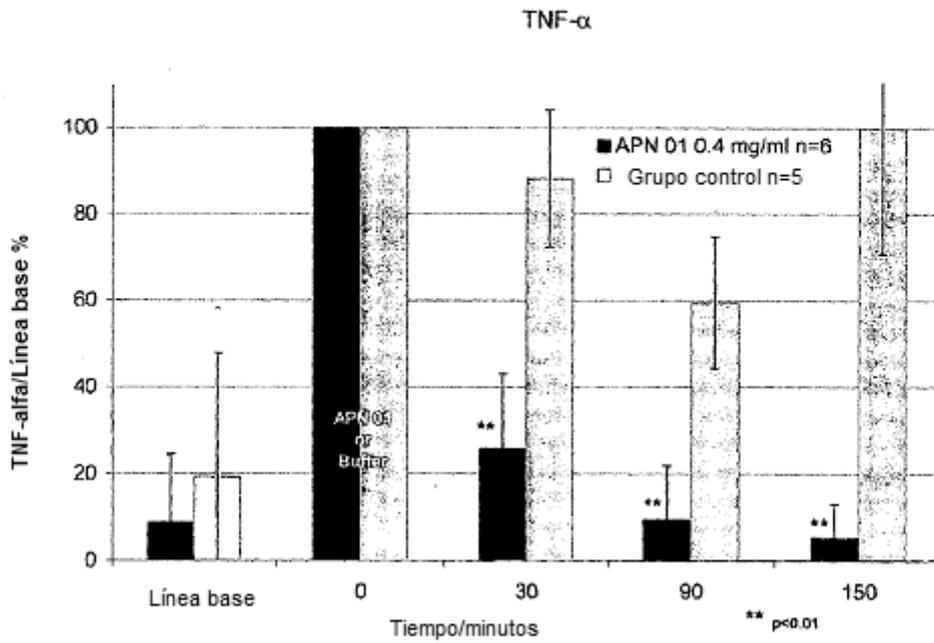


Fig. 7

