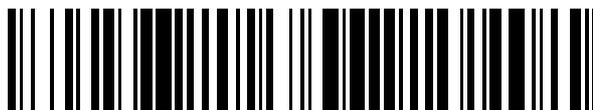


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 670 938**

51 Int. Cl.:

C12N 9/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.06.2008** **E 12165189 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.03.2018** **EP 2543724**

54 Título: **Polipéptido de ACE2**

30 Prioridad:

12.06.2007 AT 9132007
08.04.2008 EP 08450052

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.06.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

SCHUSTER, MANFRED;
LOIBNER, HANS;
JANZEK-HAWLAT, EVELYNE;
PEBALL, BERNHARD;
STRANNER, STEFAN;
WAGNER, BETTINA y
WEIK, ROBERT

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 670 938 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

Polipéptido de ACE2

La presente invención se refiere al campo de la producción de proteínas recombinantes.

5 La enzima convertidora de angiotensina (ACE2) representa una enzima clave del sistema de renina-angiotensina. Como carboxipeptidasa se expresa de manera anclada a membrana, como receptor sobre todo en células de pulmón, riñón y corazón, sin embargo también en células endoteliales y disocia diversos sustratos peptídicos. Ciertos representantes de sustrato prominentes son angiotensina II (AngII), que se disocia para dar angiotensina 1-7 (Ang 1-7), angiotensina-I, que se disocia para dar angiotensina 1-9, sin embargo igualmente apelina y bradiquinina. Ang II y Ang 1-7 son antagonistas del sistema de renina-angiotensina. ACE2 es responsable, a través del control de las proporciones de péptido, significativamente de la regulación del espesor íntima-media carotídeo así como de la permeabilidad endotelial e influye según esto en la homeostasis del organismo. La expresión de ACE2 está controlada entre otras cosas por citocinas y se reduce en diversas enfermedades inflamatorias, lo que conduce en consecuencia a un enriquecimiento patológico de Ang II, uno de los sustratos más importantes de ACE2.

15 ACE2 sirve para el tratamiento de ARDS o ALI, dos formas de una enfermedad pulmonar aguda, de la que va acompañada una expresión de ACE2 regulada por disminución en el pulmón. Para esta terapia se usa ACE2 humana soluble recombinante que se proporciona sistémicamente y está a disposición en el más breve tiempo en todo el organismo para degradar una concentración elevada de Ang II y a este respecto generar Ang 1-7. Esto compensa los efectos negativos de concentraciones elevadas de Ang II. Para ello es deseable contar con un producto que presente un perfil farmacológico adecuado: de manera correspondiente a esto se caracteriza una sustancia adecuada por una buena distribución en el organismo, un tiempo de vida medio farmacológicamente conveniente así como por una baja inmunogenicidad. En particular, el producto debe ser enzimáticamente activo, muy soluble así como también estable en disolución y puede prepararse en alta pureza de manera reproducible y económica.

25 Tipnis *et al.* (J Biol Chem. 275 (43) (2000): 33238-43) describen el aislamiento de ACE2 (designada en este caso aún como ACEH) y su aislamiento de ADNc. Mediante la producción en células CHO se obtuvo un monómero de proteína glicosilado con una masa molar de 120 kDa. Tras la desglicosilación, esta proteína presentaba una masa de 85 kDa.

30 Donoghue (Circ Res. 87 (5) (2000): 1-9) describe la expresión de ACE2 soluble en células CHO, que no está completamente glicosilada y se caracterizó con una masa molar de aproximadamente 90 kDa. Este documento se refiere además a la comparación de secuencias de diversas secuencias de ACE2 y anticuerpos anti-ACE2.

El documento WO 2004/023270 A2 se refiere a la cristalización de ACE2 tras la expresión de monómeros de ACE2 en células de insecto Sf9. La masa molar de la proteína se indicó a este respecto con 89,6 kDa según un análisis de espectrometría de masas.

35 Warner *et al.* (J. Biol. Chem. 280 (47) 2005: 39353-39362) describen la expresión recombinante de ACE2 y ACE en células CHO y células MDCKII.

40 La realización terapéutica de una terapia de sustitución de enzima eficaz requiere un procedimiento de preparación que prepare de manera económica y reproducible un producto altamente puro farmacológicamente eficaz. El segmento soluble, extracelular de ACE2 contiene 7 sitios de N-glicosilación. ACE2 no glicosilada es poco soluble, tiende a la agregación, es con más frecuencia inmunógena y presenta un tiempo de vida media acortado. Además tiene un diámetro hidrodinámico más pequeño, que influye negativamente sobre todo en la purificación. Por tanto un objetivo de la presente invención es poner a disposición ACE2 altamente activa con un tiempo de vida medio in vivo bueno. Este objetivo se cumple mediante los objetos de las reivindicaciones.

45 La presente invención se refiere a un polipéptido de ACE2 recombinante, que se encuentra como dímero. Preferentemente, el polipéptido de ACE2 recombinante está glicosilado, presentando preferentemente los grupos glicosilos de un monómero de polipéptido de ACE2 en total al menos 10, 11, 12, 13, 14, 15, o al menos 16, restos de ácido siálico, preferentemente al menos 14 restos de ácido siálico, y encontrándose el polipéptido de ACE2 como dímero. Igualmente la presente invención comprende un monómero de ACE2 con las glicosilaciones, los pesos molares y otras especificaciones mencionadas en el presente documento. El dímero es preferentemente un homo-dímero, sus unidades monoméricas tienen en especial una secuencia idéntica y glicosilación. Por regla general, las unidades monoméricas del dímero están unidas de manera no covalente. Un monómero puede obtenerse a partir del dímero o mediante etapas de desnaturalización sin más. Todas las glicosilaciones preferentes mencionadas en el presente documento se refieren tanto al dímero como al monómero, incluyendo uno o los dos monómeros del complejo dimérico. En particular, preferentemente, el dímero contiene dos iones de cinc.

Por restos de ácido siálico se entiende en particular restos del tipo ácido N-acetilneurámico (Neu5Ac), en especial de N-glicosilaciones u O-glicosilaciones.

Básicamente, la estabilidad de un agente terapéutico es un criterio muy importante para su tiempo de vida media y por consiguiente su actividad.

- 5 La ACE2 humana recombinante se ha identificado hasta ahora exclusivamente como monómero y se ha descrito también como tal en la bibliografía con respecto a su funcionalidad, su estructura cristalina así como con respecto a su interacción con un inhibidor altamente específico.

Así describen por ejemplo Towler *et al.* (J Biol Chem 279(17), 2004: 17996-18007) con referencia a Vickers *et al.* (J Biol Chem 277(17), 2002: 14838-14843) la expresión de ACE2 en células de insecto Sf9, que se obtuvieron como monómeros tras cromatografía de exclusión molecular suave como última etapa de la purificación. La masa molar de un monómero ascendía a 89,6 kDa.

10 La ACE2 que puede adquirirse comercialmente se encuentra igualmente en forma monomérica (de R&D Systems, número de catalogo 933-ZN, número de lote FIU035071) que se prepara según el procedimiento mencionado en Tipnis *et al.* (2000, anteriormente), con la diferencia de que como sistema de expresión se usan células NS0 en lugar de células CHO. Se describen monómeros que presentan tanto en condiciones reductoras y no reductoras un peso molar de 120 kDa.

De acuerdo con Donoghue *et al.* (Circ Res 87, 2000: e1-e9) se expresaron monómeros de ACE2 en células CHO, que tras la secreción mostraban un peso molecular de 90 kDa.

20 Todos los documentos y publicaciones mencionados en el presente documento se incorporan en el presente documento como referencia.

Para la estabilización del agente terapéutico divulgado se desarrolló un procedimiento que conduce exclusivamente a dímeros de ACE2 estables, que presentan ventajas tanto de producción técnica como farmacológicas en comparación con monómeros de ACE2.

La dimerización aporta las siguientes ventajas:

- 25 • mejor solubilidad y biodegradabilidad en soluciones fisiológicas: debido a las cadenas laterales altamente cargadas, que están orientadas hacia afuera en el complejo ACE2, el dímero también es más soluble en soluciones asimismo cargadas (por ejemplo, soluciones de infusión fisiológicas, suero, soluciones salinas) que el monómero, que tendría que presentar estructuras asimismo hidrófobas en el exterior..
- 30 • ninguna formación de agregado: el dímero de ACE2 forma complejos estables sin adición de otras moléculas de ACE2 al dímero.
- reducción de la intervención de proteasa: después de que fragmentos de proteína individuales y con esto con toda probabilidad la parte C terminal se hayan dirigido hacia el interior del dímero, no se degrada este extremo C terminal.
- 35 • aumento del tiempo de vida media: mediante la inmunogenicidad más baja, la mejor solubilidad y la reducida propensión a degradación proteolítica se eleva el tiempo de vida media de la proteína.
- purificación de proteínas más fácil: el diámetro hidrodinámico del dímero de ACE2 es mayor que el calculado debido a su estructura y a una envoltura de solvatación pronunciada. Por tanto pueden separarse dímeros de ACE2 de manera excelente de impurezas clásicas de la expresión de proteínas, tales como por ejemplo albúmina sérica (67 kDa) mediante columnas de separación por tamaño.

40 Preferentemente, el polipéptido de ACE2 recombinante está glicosilado en al menos el 80 % de las posibles posiciones de N-glicosilación y presenta una proporción de azúcar superior al 10 % (% en masa de la ACE2 total) o al 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, preferentemente superior al 15 % o al 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, en particular superior al 20 % o al 21 %, 22 %, 23 % 24 % o al 25 %.

45 Se desarrolló un procedimiento de producción que preparaba de manera reproducible ACE2 altamente pura y enzimáticamente activa, glicosilada de manera muy compleja. El producto se caracteriza por su alta proporción en azúcar (>20 % en masa) y las estructuras complejas, muy ramificadas, parcialmente cargadas de manera negativa. Éstas repercuten positivamente en la solubilidad, la biodisponibilidad, la actividad enzimática así como las propiedades farmacológicas del producto. Mediante la elección de un constructo de expresión adecuado, de un huésped de expresión adecuado, de una estrategia de selección optimizada, mediante un medio adaptado al metabolismo celular así como mediante análisis de clones y selección concomitantes minuciosos pudo prepararse una línea celular que segregaba el producto deseado.

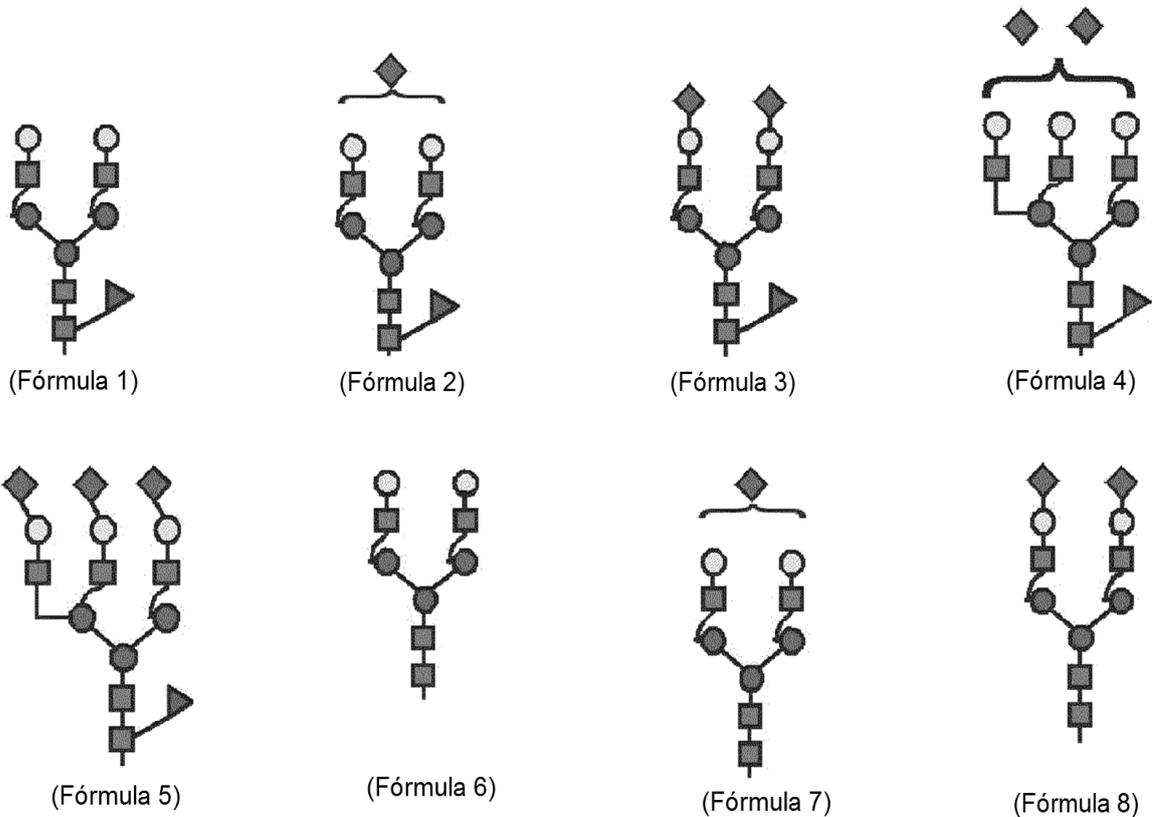
55 La ACE2 se expresó ya en células de insecto Sf9 y células de ratón NS0. El material se usó sobre todo en ensayos *in vitro*. Hay también resultados sobre la expresión temporal de ACE2 en células CHO. Hasta ahora no se ha preparado ninguna línea celular con productividad apropiada para el proceso. Además no se realizó aún ninguna selección de clones correspondiente con respecto a las propiedades del producto, en especial con

respecto a la N-glicosilación.

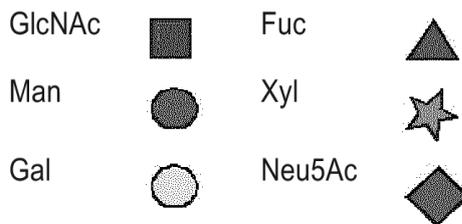
La solubilidad de una proteína se determina no solo mediante su secuencia de aminoácidos, sino también mediante su plegamiento así como mediante modificaciones post-traduccionales. Son sobre todo estructuras de azúcar cargadas que aumentan decisivamente la solubilidad de una proteína e influyen en su perfil farmacológico. Así pudo mostrarse para EPO que la presencia de glicoestructuras ramificadas complejas influye positivamente en el tiempo de vida media de esta proteína.

En principio se tienen en cuenta para la expresión recombinante de ACE2 distintos sistemas de expresión, no sometiéndose a prueba posteriormente las células huéspedes procariontas debido a la falta de procesamiento de sitios de N-glicosilación. Ya se ha realizado una expresión de ACE2 eucariota exitosa en células de insecto Sf9 y células de ratón NS0.

Preferentemente, al menos el 70 % de las posiciones de N-glicosilación glicosiladas presentan una estructura seleccionada independientemente entre sí de las fórmulas 1-8:



15 en las que



Preferentemente, todas las posibles posiciones de N-glicosilación están glicosiladas.

Preferentemente, al menos el 80 %, preferentemente al menos el 90 %, en particular el 100 %, de las posiciones de N-glicosilación glicosiladas presentan una estructura de las fórmulas 1-8.

5 Preferentemente, una unidad monomérica de ACE2 del dímero tiene un peso molecular de al menos 90 kDa, preferentemente al menos 92 kDa, de manera especialmente preferente al menos 94 kDa, en particular al menos 96 kDa, de manera especialmente preferente al menos 98 kDa, lo más preferentemente al menos 100 kDa, 100,5 kDa, 101 kDa, 101,5 kDa o también al menos 102 kDa. Una masa molar absoluta (o sea del péptido en sí sin envoltura de hidrato) puede determinarse mediante mapa de péptidos. Las formas glicosiladas superiores pueden presentar también masas molares de al menos 103 kDa, 104 kDa, 105 kDa, 106 kDa, 107 kDa o al menos 108 kDa.

15 Las determinaciones de masa molar, que se ven influidas por otros factores, tales como envolturas de hidrato (tales como por ejemplo cromatografías o electroforesis en gel en sistemas acuosos) pueden conducir también a resultados superiores. En otras formas de realización, una unidad monomérica de ACE2 del dímero tiene un peso molecular aparente de al menos 101 kDa o al menos 102 kDa, preferentemente al menos 105 kDa, de manera especialmente preferente al menos 109 kDa, en particular al menos 113 kDa, de manera especialmente preferente al menos 177 kDa, lo más preferentemente al menos 119 kDa, tal como se determina mediante electroforesis en gel.

20 En otras formas de realización, el peso molecular del monómero (aparente o absoluto) es como máximo 102 kDa, 103 kDa, 104 kDa, 108 kDa, 110 kDa, 112 kDa, 116 kDa, 120 kDa, 125 kDa, 130 kDa, 135 kDa o 140 kDa. Son posibles pesos moleculares superiores mediante modificaciones de ACE2, por ejemplo PEGilación.

25 Preferentemente, el monómero (que no forma ningún dímero) tiene un peso molecular de al menos 82 kDa, preferentemente al menos 86 kDa, de manera especialmente preferente al menos 90 kDa, en particular al menos 94 kDa, de manera especialmente preferente al menos 98 kDa, lo más preferentemente al menos 101 kDa o como máximo 102 kDa, 103 kDa, 104 kDa, 108 kDa, 110 kDa o como máximo 112 kDa. Estos pesos moleculares pueden determinarse por ejemplo según el procedimiento de mapa de péptidos.

30 Preferentemente, el polipéptido de ACE2 no presenta ningún dominio transmembrana. Se trata por tanto de ACE2 soluble. Las formas de realización especialmente preferentes comprenden a este respecto polipéptidos de ACE2 solubles, cuyas cadenas polipeptídicas están constituidas por los aminoácidos 18-740 o fragmentos enzimáticamente activos de los mismos. Otro polipéptido está constituido por los aminoácidos 18-615 de la SEC ID N.º: 1.

35 Aunque ACE2 humana (SEC ID N.º: 1) se prefiere para la mayoría de usos terapéuticos, puede usarse también ACE2 de otros mamíferos, tales como ratón, rata, hámster, cerdo, primates o ganado vacuno. ACE2 es una enzima universal en todos los mamíferos con el sustrato Ang II idéntico en distintas especies. Por tanto puede usarse básicamente también en organismos foráneos. Por consiguiente pueden tratarse con la proteína de acuerdo con la invención independientemente del origen de ACE2, por ejemplo seres humanos, ratones, ratas, hámsters, cerdos, primates o ganados vacunos. En formas de realización preferentes, sin embargo, es igual el origen de ACE2 y del organismo tratado.

Preferentemente, una serina (o aminoácido C-terminal) que corresponde a la Ser740 de la SEC ID N.º: 1 (por ejemplo del extremo C terminal) del polipéptido de ACE2 está O-glicosilada.

40 Preferentemente al menos el 70 %, preferentemente al menos el 80 %, en particular al menos el 90 %, lo más preferentemente el 100 % de los sitios de N-glicosilación glicosilados presentan ácido siálico, preferentemente los sitios de N-glicosilación que corresponden a Asn53, Asn90, Asn103, Asn322, Asn432, Asn546, Asn690 de la SEC ID N.º: 1 están sialilados.

45 En realizaciones especiales, una asparagina que corresponde a Asn53 de la SEC ID N.º: 1 está mono-, di-, tri- o tetra-sialilada. En una preparación de ACE2 preferentemente al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o el 100 % de estos aminoácidos están o bien mono-, di-, tri- o tetra-sialilados.

En realizaciones especiales, una asparagina que corresponde a Asn90 de la SEC ID N.º: 1 está mono-, di-, tri- o tetra-sialilada. En una preparación de ACE2 preferentemente al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o el 100 % de estos aminoácidos están o bien mono-, di-, tri- o tetra-sialilados.

50 En realizaciones especiales, una asparagina que corresponde a Asn103 de la SEC ID N.º: 1 está mono-, di-, tri- o tetra-sialilada. En una preparación de ACE2 preferentemente al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o el 100 % de estos aminoácidos están o bien mono-, di-, tri- o tetra-sialilados.

En realizaciones especiales, una asparagina que corresponde a Asn322 de la SEC ID N.º: 1 está mono-, di-, tri- o tetra-sialilada. En una preparación de ACE2 preferentemente al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o el 100 % de estos aminoácidos están o bien mono-, di-, tri- o tetra-sialilados.

5 En realizaciones especiales, una asparagina que corresponde a Asn432 de la SEC ID N.º: 1 está mono-, di-, tri- o tetra-sialilada. En una preparación de ACE2 preferentemente al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o el 100 % de estos aminoácidos están o bien mono-, di-, tri- o tetra-sialilados.

En realizaciones especiales, una asparagina que corresponde a Asn546 de la SEC ID N.º: 1 está mono-, di-, tri- o tetra-sialilada. En una preparación de ACE2 preferentemente al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o el 100 % de estos aminoácidos están o bien mono-, di-, tri- o tetra-sialilados.

10 En realizaciones especiales, una asparagina que corresponde a Asn690 de la SEC ID N.º: 1 está mono-, di-, tri- o tetra-sialilada. En una preparación de ACE2 preferentemente al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o el 100 % de estos aminoácidos están o bien mono-, di-, tri- o tetra-sialilados.

15 En realizaciones especiales, una serina que corresponde a Ser740 de la SEC ID N.º: 1 está mono-, di-, tri- o tetra-sialilada. En una preparación de ACE2 preferentemente al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o el 100 % de estos aminoácidos están o bien mono-, di-, tri- o tetra-sialilados.

Preferentemente al menos el 30 %, preferentemente al menos el 40 %, en particular al menos el 55 %, lo más preferentemente al menos el 70 % de los sitios de N-glicosilación glicosilados presentan al menos dos ácidos siálicos. En una preparación de ACE2 preferentemente al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o el 100 % de estos aminoácidos están sialilados de esta manera.

20 Preferentemente, una asparagina que corresponde a Asn53 de la SEC ID N.º: 1 está N-glicosilada, preferentemente con un glicano de las estructuras según la fórmula 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8.

Preferentemente, una asparagina que corresponde a Asn90 de la SEC ID N.º: 1 está N-glicosilada, preferentemente con un glicano de las estructuras según la fórmula 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8.

25 Preferentemente, una asparagina que corresponde a Asn103 de la SEC ID N.º: 1 está N-glicosilada, preferentemente con un glicano de las estructuras según la fórmula 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8.

Preferentemente, una asparagina que corresponde a Asn322 de la SEC ID N.º: 1 está N-glicosilada, preferentemente con un glicano de las estructuras según la fórmula 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8.

Preferentemente, una asparagina que corresponde a Asn432 de la SEC ID N.º: 1 está N-glicosilada, preferentemente con un glicano de las estructuras según la fórmula 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8.

30 Preferentemente, una asparagina que corresponde a Asn546 de la SEC ID N.º: 1 está N-glicosilada, preferentemente con un glicano de las estructuras según la fórmula 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8.

Preferentemente, una asparagina que corresponde a Asn690 de la SEC ID N.º: 1 está N-glicosilada, preferentemente con un glicano de las estructuras según la fórmula 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8.

35 En otro aspecto, la presente invención se refiere a una preparación de polipéptidos de ACE2 recombinantes, que comprende un polipéptido tal como se define en el presente documento (monómeros o dímeros de ACE2 o unidades monoméricas de los dímeros), en la que la proporción de polipéptidos de ACE2 con un peso molecular aparente, tal como puede determinarse mediante electroforesis en gel, por debajo de 100 kDa o por debajo de 101 kDa, preferentemente por debajo de 104 kDa, de manera especialmente preferente por debajo de 108 kDa, en particular por debajo de 112 kDa, de manera especialmente preferente por debajo de 117 kDa, 40 lo más preferentemente por debajo de 119 kDa, se encuentra por debajo del 20 %, preferentemente por debajo del 10 %, en particular preferentemente por debajo del 5 %, lo más preferentemente por debajo del 1 %, en especial al 0 %, así como todas las combinaciones de esto. Por ejemplo, los polipéptidos de ACE2 por debajo de 100 kD pueden encontrarse en el 0 %, los polipéptidos de ACE2 por debajo de 100 kDa pueden estar representados por debajo del 20 %. La proporción se refiere a todas las respectivas formas de ACE2 y se 45 determina para ello por ejemplo mediante electroforesis en gel nativa.

De manera análoga a esto puede servir como medida de masa molar la masa molar absoluta que puede determinarse mediante mapa de péptidos. Así, preferentemente la proporción de polipéptidos de ACE2 con un peso molecular por debajo de 86 kDa, o por debajo de 89 kDa, preferentemente por debajo de 92 kDa, de manera especialmente preferente por debajo de 94 kDa, en particular por debajo de 97 kDa, de manera 50 especialmente preferente por debajo de 100 kDa, lo más preferentemente por debajo de 101 kDa, se encuentra

por debajo del 20 %, preferentemente por debajo del 10 %, en particular preferentemente por debajo del 5 %, lo más preferentemente por debajo del 1 %, en especial al 0 %, así como todas las combinaciones de esto. Por ejemplo, los polipéptidos de ACE2 por debajo de 86 kD pueden encontrarse en el 0 %; los polipéptidos de ACE2 por debajo de 97 kDa pueden estar representados por debajo del 20 %.

- 5 Preferentemente, la proporción de polipéptidos de ACE2 con dominios transmembrana se encuentra por debajo del 20 %, preferentemente por debajo del 10 %, en particular preferentemente por debajo del 5 %, lo más preferentemente por debajo del 1 %, en especial al 0 %.

- 10 Preferentemente, la proporción de multímeros de ACE2 se encuentra por debajo del 20 %, preferentemente por debajo del 10 %, en particular preferentemente por debajo del 5 %, lo más preferentemente por debajo del 1 %, en especial al 0 %. Por multímeros de ACE2 se entiende complejos con 3 o más polipéptidos de ACE2. En una preparación de dímeros de ACE2 se encuentra además preferentemente la proporción de monómeros de ACE2 por debajo del 20 %, preferentemente por debajo del 10 %, en particular preferentemente por debajo del 5 %, lo más preferentemente por debajo del 1 %, en especial al 0 %. En una preparación de monómeros de ACE2 se encuentra además preferentemente la proporción de dímeros de ACE2 por debajo del 20 %, preferentemente por debajo del 10 %, en particular preferentemente por debajo del 5 %, lo más preferentemente por debajo del 1 %, en especial al 0 %.

- 20 Preferentemente, la proporción de dímeros de ACE2 en moléculas de ACE2 asciende al menos al 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o al menos al 99 %. En otras formas de realización, en combinación o independientemente, la proporción de monómeros de ACE2 en moléculas de ACE2 puede ser al menos el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o al menos el 99 %

- 25 Preferentemente, la proporción de polipéptidos de ACE2 con asparagina N-glicosilada que corresponde a Asn53 de la SEC ID N.º: 1 es superior al 60 %, preferentemente superior al 70 %, en particular preferentemente superior al 80 %, de manera especialmente preferente superior al 90%, lo más preferentemente superior al 99%, en particular del 100 %, y preferentemente con un glicano de las estructuras según la fórmula 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8.

- 30 Preferentemente, la proporción de polipéptidos de ACE2 con asparagina N-glicosilada que corresponde a Asn90 de la SEC ID N.º: 1 es superior al 60 %, preferentemente superior al 70 %, en particular preferentemente superior al 80 %, de manera especialmente preferente superior al 90 %, lo más preferentemente superior al 99 %, en particular del 100 %, y preferentemente con un glicano de las estructuras según la fórmula 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8.

- 35 Preferentemente, la proporción de polipéptidos de ACE2 con asparagina N-glicosilada que corresponde a Asn103 de la SEC ID N.º: 1 es superior al 60 %, preferentemente superior al 70 %, en particular preferentemente superior al 80 %, de manera especialmente preferente superior al 90 %, lo más preferentemente superior al 99 %, en particular del 100 %, y preferentemente con un glicano de las estructuras según la fórmula 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8.

- 40 Preferentemente, la proporción de polipéptidos de ACE2 con asparagina N-glicosilada que corresponde a Asn322 de la SEC ID N.º: 1 es superior al 60 %, preferentemente superior al 70 %, en particular preferentemente superior al 80 %, de manera especialmente preferente superior al 90 %, lo más preferentemente superior al 99 %, en particular del 100 %, y preferentemente con un glicano de las estructuras según la fórmula 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8.

- 45 Preferentemente, la proporción de polipéptidos de ACE2 con asparagina N-glicosilada que corresponde a Asn432 de la SEC ID N.º: 1 es superior al 60 %, preferentemente superior al 70 %, en particular preferentemente superior al 80 %, de manera especialmente preferente superior al 90 %, lo más preferentemente superior al 99 %, en particular del 100 %, y preferentemente con un glicano de las estructuras según la fórmula 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8.

- 50 Preferentemente, la proporción de polipéptidos de ACE2 con asparagina N-glicosilada que corresponde a Asn546 de la SEC ID N.º: 1 es superior al 60 %, preferentemente superior al 70 %, en particular preferentemente superior al 80 %, de manera especialmente preferente superior al 90 %, lo más preferentemente superior al 99 %, en particular del 100 %, y preferentemente con un glicano de las estructuras según la fórmula 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8.

- 55 Preferentemente, la proporción de polipéptidos de ACE2 con asparagina N-glicosilada que corresponde a Asn546 de la SEC ID N.º: 1 es superior al 60 %, preferentemente superior al 70 %, en particular preferentemente superior al 80 %, de manera especialmente preferente superior al 90 %, lo más preferentemente superior al 99 %, en particular del 100 %, y preferentemente con un glicano de las estructuras según la fórmula 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8.

Preferentemente, la proporción de polipéptidos de ACE2 con asparagina N-glicosilada que corresponde a Asn690 de la SEC ID N.º: 1 es superior al 60 %, preferentemente superior al 70 %, en particular preferentemente superior al 80 %, de manera especialmente preferente superior al 90 %, lo más preferentemente superior al 99%, en particular del 100 %, y preferentemente con un glicano de las estructuras según la fórmula 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8.

Preferentemente, la proporción de polipéptidos de ACE2 con serina O-glicosilada que corresponde a Ser740 de la SEC ID N.º: 1 es superior al 60 %, preferentemente superior al 70 %, en particular preferentemente superior al 80 %, de manera especialmente preferente superior al 90 %, lo más preferentemente superior al 99 %, en particular del 100 %.

10 Preferentemente, la actividad catalítica del polipéptido de ACE2 o de la preparación, kkat, es al menos 4 /s, preferentemente al menos 5 /s, en particular preferentemente al menos 6 /s, de manera especialmente preferente al menos 7 /s, lo más preferentemente al menos 7,6 /s, con respecto a la conversión de Ang 1-7 (angiotensina 1-7). La Ang 1-7 se forma mediante ACE2 de AngII (angiotensina II). La conversión puede controlarse de manera simple tal como se describe en los ejemplos. Esta conversión o la actividad catalítica de ACE2 puede extrapolarse también a partir de otros datos de ensayo. La actividad puede medirse por ejemplo tal como se describe en el documento WO 2008/046125 A.

20 En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un procedimiento para la preparación de polipéptidos de ACE2 recombinantes o de una preparación de ACE2 recombinante, que comprende las etapas de la introducción de un polinucleótido que codifica para ACE2, preferentemente de un polinucleótido que codifica para ACE2 sin dominios transmembrana, en células eucariotas, la expresión del polipéptido de ACE2 y acumulación de la ACE2 expresada, en particular en forma dimérica. Las células pueden seleccionarse después para producir un polipéptido de ACE2 de acuerdo con la invención, tal como se describe en el presente documento, en particular con un alto peso molecular.

Preferentemente, el polinucleótido que codifica para ACE2 está previsto en un vector.

25 Preferentemente se selecciona la expresión de ACE2 con un marcador, preferentemente DHFR. Preferentemente, el marcador se encuentra en el vector.

Preferentemente, el vector presenta un IRES para el ARNm de ACE2 expresado (o codifica para esto).

Preferentemente, las células eucariotas son células CHO.

30 La presente invención se refiere también a polipéptido de ACE2 recombinante o una preparación de polipéptidos de ACE2 recombinantes que pueden obtenerse mediante un procedimiento de este tipo.

35 En otro aspecto, la divulgación proporciona una línea celular (o célula) eucariota transfectada de manera estable con un polinucleótido que codifica para ACE2, preferentemente línea celular (o célula) CHO, que expresa ACE2, en particular tal como se ha definido anteriormente. La línea celular puede seleccionarse con respecto a las propiedades deseadas, tal como se ha indicado anteriormente, por ejemplo la producción de dímeros a partir de unidades monoméricas con un peso molecular de al menos 102 kDa.

La célula presenta preferentemente una productividad de ACE2 de al menos 10 pg/célula/día, preferentemente al menos 15 pg/célula/día, en particular preferentemente de al menos 20 pg/célula/día.

40 La expresión de la ACE2 se realiza preferentemente en presencia de iones Zn^{2+} de manera suficiente. Preferentemente se usan al menos 0,5 micromolar, en particular hasta 5 micromolar, de Zn^{2+} , en particular puede realizarse la fermentación a 2,5-3,5 micromolar de Zn^{2+} . La concentración de Zn^{2+} , por ejemplo en el medio nutritivo de las células expresadas, puede ser al menos 0,5 mM, 0,75 mM, 1,0 mM, 1,25 mM, 1,5 mM, 1,75 mM, 2,0 mM, 2,25 mM o al menos 2,5 mM o 3,0 mM. Otras etapas de tratamiento se realizan preferentemente también en presencia de iones Zn^{2+} .

45 En otro aspecto, la presente invención se refiere a medicamentos o preparaciones farmacéuticas del producto de ACE2 de acuerdo con la invención. En particular para el tratamiento o la prevención de hipertensión, insuficiencias cardíacas, tales como insuficiencia cardíaca congestiva, aguda o crónica, infarto de miocardio o arterioesclerosis, fallo o insuficiencia renal, poliquistosis renal (enfermedad poliquística renal, *polycystic kidney disease*, PKD) o enfermedades pulmonares tales como enfermedad pulmonar obstructiva crónica, neumonía, asma, bronquitis crónica, enfisema pulmonar, fibrosis quística, enfermedad pulmonar intersticial, hipertensión pulmonar, embolia pulmonar, sarcoidosis pulmonar, tuberculosis, edema pulmonar, ALI, ARDS o cáncer de pulmón. Ciertas indicaciones de tratamiento generales de ACE2 se han mencionado por ejemplo en el documento WO 2004/000367 A, para las que es adecuada también el producto de ACE2 de acuerdo con la invención.

De acuerdo con la invención puede facilitarse una composición farmacéutica o medicamento que comprende la proteína ACE2. Tales composiciones pueden comprender sales farmacéuticamente adecuadas de las mismas, adicionalmente tampón, componentes de tonicidad o vehículos farmacéuticamente adecuados. Las sustancias de vehículo farmacéuticas sirven para la mejor compatibilidad de la composición y permiten una mejor solubilidad así como mejor biodisponibilidad de los principios activos. Los ejemplos de esto son emulsionantes, agentes espesantes, componentes redox, almidón, soluciones alcohólicas, polietilenglicol o lípidos. La selección de un vehículo farmacéutico adecuado depende mucho del tipo de administración. Para administraciones orales pueden usarse vehículos líquidos o sólidos, para inyecciones se requieren composiciones finales líquidas.

Preferentemente, la composición de ACE2 divulgada comprende sustancias tampón o sustancias tónicas. Por medio de tampones puede ajustarse el valor de pH del medicamento a condiciones fisiológicas y además pueden atenuarse o tamponarse oscilaciones de pH. Un ejemplo de ello es un tampón fosfato. Las sustancias tónicas sirven para el ajuste de la osmolaridad y pueden comprender sustancias iónicas, tales como por ejemplo sales inorgánicas, tales como NaCl o KCl, o también sustancias no iónicas, tales como por ejemplo glicerol o hidratos de carbono.

De manera preferente, la composición que va a usarse de acuerdo con la invención o el medicamento se prepara de manera adecuada para la administración sistémica, tópica, oral o intranasal o como administración por inhalación. Estas formas de administración de la composición de la presente divulgación permiten una absorción rápida y sencilla. Siempre que la composición de ACE2 esté destinada a la administración oral, se prevé ésta preferentemente en una formulación o encapsulamiento resistente a los jugos gástricos. Para la administración oral pueden tomarse por ejemplo medicamentos sólidos o líquidos directamente o disueltos o diluidos.

El medicamento que va a usarse de acuerdo con la divulgación se prepara de manera adecuada preferentemente para la administración intravenosa, intraarterial, intramuscular, intravascular, intraperitoneal o subcutánea. Para ello son adecuadas por ejemplo inyecciones o transfusiones. Las administraciones directamente en el torrente sanguíneo tienen la ventaja de que los principios activos del medicamento se distribuyen en todo el organismo y alcanzan rápidamente el tejido objetivo.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos, sin limitarse a éstos.

Figuras:

- Figura 1: casete de expresión y selección de ACE2
- Figura 2: análisis de inmunotransferencia de tipo Western específico de ACE2 de la historia de clones de producción
- Figura 3: análisis SDS-PAGE del monómero de ACE2
- Figura 4: selección de clones
- Figura 5: análisis de glicosilación de CL-EM
- Figura 6: separación molecular preparativa de ACE2
- Figura 7: farmacocinética de ACE2 en 3 especies
- Figura 8: curvas de calibración con respecto a la cuantificación de Ang 1-7 y Ang II.
- Los péptidos se separaron en el intervalo de concentración mencionado por medio de RP-HPLC en columna Waters C18 μ bondapak RP, 2,1x300mm, 10 μ m, 125 Å.
- Figura 9: espectro de EM/EM del péptido N-terminal. Observación: Q y K tienen la misma masa.
- Figura 10: secuencia de ACE2 y pronóstico de N-glicosilación
- Figura 11: espectro desglosado de sitios de glicosilación 103 (A), sitio 432 (B), sitio 546 (C), sitio 690 (D), sitio 90 (E).

Figura 12: espectro del péptido O-glicosilado C-terminal. La asignación estructural debe clasificarse como a modo de prueba.

Figura 13: glicanos liberados en CL-EM.

5

Figura 14: determinación de la estructura dimérica de ACE2 por medio de PAGE nativo (izquierda, las bandas de proteína se visualizaron por medio de coloración con plata) y SEC (derecha, separación en una columna Zorbax G-450 en presencia de fosfato de Na 220 mM a pH 7,0 en acetonitrilo al 10 %, el cromatograma se inicio a 214 nm).

10

Figura 15: cromatograma de una cromatografía de exclusión molecular del dímero de ACE2 (retención de 8,55 min, 8,93 min). Patrón: tiroglobulina (670 kDa, 7,43 min), gamma-globulina (158 kDa), ovalbúmina (43 kDa, 10,08 min), mioglobulina (17 kDa, 11,08 min), vitamina B-12 (1,3 kDa, 12,71 min).

15

Figura 16: análisis de inmunotransferencia de tipo Western específico de ACE2 de extractos celulares del córtex (A), cerebro (B) y un clon de expresión de dímero de ACE2 (C). En D se cargó un dímero de ACE2 puro.

20

Figura 17: cromatograma de SEC-HPLC analítico de la forma monomérica de ACE2. Condiciones de funcionamiento: columna: Zorbax GF250, tampón: Na₂H-PO₄ 220 mM + CH₃CN al 10 %, pH 8,0 a 1 ml/min.

Figura 18: análisis PAGE de dímero de ACE2 (A) y monómeros de ACE2 (B), se detectaron proteínas por medio de coloración con plata (a) e inmunotransferencia de tipo Western específica de ACE2 (b).

25

Figura 19: determinación de la actividad enzimática de monómeros de ACE2 en comparación con el dímero de ACE2. Se usaron con concentración inicial constante del sustrato marcado con fluorescencia cumarina-APK-DNP y cuatro concentraciones distintas de enzima y se compararon las respectivas curvas de fluorescencia.

30

Figura 20: actividad sérica de ACE2 medida 24 y 48 horas tras la administración de dímero de ACE2 (2,5 mg/kg, barras azules) o administración de forma monomérica de ACE2 (2,5 mg/kg, barras grises)

Ejemplos:

Ejemplo 1: expresión de dímero de ACE altamente glicosilado

El segmento soluble de la secuencia de ACE2 humana (SEC ID N.º: 1) se clonó en un vector de expresión, en el que se insertó previamente el marcador de selección amplificable DHFR para conducir a una expresión elevada del gen de ACE2. Para ello se introdujo entre los genes que codifican para ACE2 y DFHR un IRES atenuado, que permite la lectura bi-cistrónica de ACE2 y DHFR en el mismo ARNm. El casete de expresión y selección de ACE2 está representado gráficamente en la figura 1. Después de que se expresen ambas proteínas bajo control del mismo promotor, puede aumentarse de manera resuelta la expresión de ACE2 a través de la selección de DHFR usando el antagonista MTX. Mediante esta estrategia es posible obtener líneas celulares de expresión especialmente estables, que proporcionan altos rendimientos de un producto de calidad constante. Esto permite obtener también en líneas celulares títulos de producto razonables, que posiblemente son menos adecuados para la expresión recombinante de una determinada proteína diana.

Este vector se transfectó en células CHOdhfr y con presión de MTX continuamente aumentada se amplificó el número de copias de los genes de ACE2. A través de varios ciclos de selección y subclonación se seleccionaron los mejores productores por medio de análisis FACS intracelular y análisis químico de proteínas así como enzimático para obtener las propiedades de producto óptimas: se consideraron para la elección del clon más adecuado sobre todo la actividad enzimática específica, que se midió con 3 sustratos distintos, la homogeneidad del producto, la productividad celular, sin embargo también la complejidad con azúcares. En la figura 2 está representado un análisis de inmunotransferencia de tipo Western recapitulativo de los clones individuales sobrenadantes de cultivo sucesivos, que se usaron para el establecimiento de las líneas celulares de producción. Las propiedades del producto de los clones individuales se diferencian en la medida que la proporción de azúcar de los productos de expresión aumente de derecha a izquierda, lo que puede distinguirse mediante un claro aumento de masa. Esto se consiguió mediante selección específica de clones de alta glicosilación. Finalmente se usó un clon (clon 5B9), que presentaba el producto de expresión con el peso molecular más alto, para el establecimiento de las líneas celulares de producción (1B4).

Se decidió llevar adelante 6 clones que expresaban enzimáticamente ACE2 altamente activa y N-glicosilada de manera compleja. Mientras ACE2 soluble presenta un peso molecular de 83 kDa, se seleccionan clones que en el SDS-PAGE desnaturante, de manera condicionada por su estructura de azúcar, aparecía en el intervalo de hasta 120 kDa. La figura 3 muestra una ACE2 (carril B) preparada mediante el presente procedimiento de producción en comparación con un patrón de ACE2 (carril A) preparada en NS0. Mientras que el polipéptido de ACE2 de acuerdo con la invención (en este caso analizado como monómero) y está altamente glicosilado y de manera homogénea y por tanto aparece como banda individual a aproximadamente 120 kDa, el material de referencia presenta bandas de 83 kDa hasta 120 kDa, lo que indica una glicosilación muy heterogénea.

Los clones preliminares se colocaron a continuación en medio de crecimiento libre de proteínas (Polymun). Este medio comercial está químicamente definido, libre de suero, libre de proteínas animales y es óptimo en la expresión recombinante de glicoproteínas en CHO. La fermentación se realizó con Zn^{2+} 2,5-3,5 mM. Los 6 clones se mantuvieron en cultivo y se sometieron a prueba para determinar su idoneidad para el procedimiento de producción. En especial se registraron las tasas de crecimiento y se sometieron a estudio los sobrenadantes para determinar el desarrollo del producto y los metabolitos (figura 4). A su vez se analizaron de manera precisa los productos de expresión así como los clones. Todos los clones expresaban ACE2 altamente activa y presentaban productividades de aproximadamente 20-30 pg/célula/día. Además se analizaron igualmente las estructuras de azúcar y su heterogeneidad. Finalmente se seleccionó el clon 1B4. Éste presentaba por todo el desarrollo de la producción una estructura de azúcar homogénea. Los 7 sitios de N-glicosilación estaban procesados, presentando éstos al menos una glicosilación compleja biantenaria, algunas veces sin embargo también una glicosilación compleja triantenaria con ácidos siálicos terminales.

Basándose en este clon se preparó un banco de células madres y se sometió a prueba, así como se estableció un procedimiento de purificación apropiado para GMP y en consecuencia un procedimiento de producción de GMP.

SEC ID N.º: 1 (secuencia de proteínas de ACE2, la secuencia señal autóloga (subrayada) se escinde mediante la célula huésped para la exclusión).

MSSSSWLLLSLVA/TA

QSTIEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQSSLASWNYNTNITEENVQNMNAGDKWSAFLKEQST-
 LAQMYPLQEIQNLTVKLQALQONGSSVLSEDKSKRLNTILNTMSTIYSTGKVCNPDNPQE-
 CLLLEPGLNEIMANSLDYNERLWAWESWRSEVKGQLRPLYEEYVVLKNEMARANHYEDYGDYWR
 GDYEVNGVDGYDYSRGLIEDVEHTFEEIKPLYEHLHAYVRAKLMNAYPSYISPIGCL-
 PAHLLGDMWGRFWTNLYSLTVPFGQKPNIDVTDAMVDQAWDAQRIFKEAEKFFVSVGLPNMT-
 QGFWENSMLTDPGNVQKAVCHPTAWDLGKGFRIILMCTKVTMDDFLTAHHEMGHIQYDMAYAAQ
 PFLLRNGANEGFHEAVGEIMSLSAATPKHLKSIGLLSPDFQEDNETEINFLKQAL-
 TIVGTLPTFTYMLEKWRWVFKGEIPKDQWMKKWEMKREIVGVVEPVPHDETYCDPASLF-
 HVSNDYSFIRYYTRTLYQFQFQEQALCQAAKHEGPLHKCDISNSTEAGQKLFNMLRLGKSEPWTL
 ALENVVAKNMNVRPLLNYFEPLFTWLKDQNKNSFVGWSTDWSPYADQSIKVRI SLKSALGD-
 KAYEWN DNEMYLFRSSVAYAMRQYFLKVKNQMILFGEEDVRVANLKPRI SFNEFFVTAPKNVS-
 DIIPRTEVEKAIRMSRSRINDAFRLNDNSLEFLGIQPTLGPPNQPPVS

De manera condicionada por la dimerización de ACE2, todas las unidades de proteína hidrófobas están dirigidas hacia el interior del complejo, sobresaliendo hacia fuera los restos cargados, tales como cadenas de azúcar unidas a N y solvatándose la estructura en el medio fisiológico igualmente cargado. Esta dimerización mediante la expresión de una ACE2 completamente N-glicosilada se determinó en presencia de Zn^{2+} . El complejo de dímero está constituido en este caso por 2 subunidades idénticas que están unidas entre sí de manera electrostática y tampoco se separan ya en soluciones fisiológicas. Según esto se produce la selección de una glicoproteína con respectivamente 14 estructuras de ácido siálico fuertemente cargadas en cada molécula de ACE2 así como 28 estructuras de ácido siálico en el dímero. Respectivamente se incorporan en el complejo 2 iones Zn^{2+} y estabilizan su estructura. La fuerte carga de las cadenas de azúcar solvata la molécula en soluciones acuosas fisiológicas y fuerza a los correspondientes dominios de proteína cargados hacia fuera.

El procedimiento de producción se estableció de modo que en el producto final existiera exclusivamente dímeros de ACE2.

5 Esto se posibilita debido a que durante la generación de la ACE2 están presentes iones Zn^{2+} de manera suficiente (preferentemente se usan Zn^{2+} 1,5-5 micromolar, en particular puede realizarse la fermentación con Zn^{2+} 2,5-3,5 μ M) y a continuación se realizan las otras etapas de tratamiento en presencia de iones Zn^{2+} .

La purificación se realizó usando una etapa de intercambio de aniones, una precipitación de sulfato de amonio, una etapa de HIC, una etapa de intercambio de cationes así como otra etapa de intercambio de aniones de alta resolución. Todos los medios en el procedimiento estaban tamponados con fosfato y contenían cloruro de sodio. El tampón de muestra final es una solución fisiológica de glicina para la inyección. **Ejemplo 2:**
10 **propiedades del producto**

El monómero o unidades monoméricas del dímero de ACE2 complejas, altamente glicosiladas presentan debido a las estructuras de azúcar unidas covalentemente un peso molecular claramente más alto que el correspondiente a la secuencia de aminoácidos. Así se midió por medio del mapa de péptidos una masa molar de 102 kDa, mientras que la de ACE2 no glicosilada asciende solo a 83 kDa. La proporción de azúcar se encuentra de manera correspondiente a esto en el 23 % y es esencialmente importante para las propiedades del producto descritas a continuación. Debido a la fuerte hidratación aparece la unidad monomérica en el SDS-PAGE a aproximadamente 120 kDa (figura 3) en comparación con el patrón de referencia.

No se expresó la ACE2 natural, unida a membrana, sino exclusivamente la proporción soluble de ACE2. Debido a la falta de los dominios de membrana se glicosila ésta completamente.

20 Debido a las estructuras de azúcar complejas, altamente sialiladas y por consiguiente fuertemente cargadas negativamente tiene ACE2 una solubilidad claramente más alta en comparación con ACE2 no glicosilada o glicosilada de manera incompleta. Por consiguiente pueden prepararse sin problemas formulaciones de proteínas tamponadas fisiológicamente de hasta 15 mg/ml.

El producto se comporta además también de manera estable en disolución y ni pierde la actividad a lo largo de un espacio de tiempo de almacenamiento mayor, ni tiende a la degradación o a la agregación, a excepción de la dimerización estable. Por el contrario, la ACE2 desglicosilada precipita ya en el intervalo de concentración bajo. Esto puede mostrarse en una mezcla de reacción de reacción de desglicosilación preparativa por medio de PNGasa-F. El índice de estabilidad teórico, calculado para ACE2 asciende a 41,2 y clasifica la proteína como inestable, desconsiderando en este cálculo las estructuras de azúcar. Después de que las formulaciones se comporten estables en disolución, sin embargo, durante algunos meses, puede atribuirse esto aparentemente a la alta proporción de azúcar. La mejor solvatación de ACE2 conduce además a que esta formulación esté constituida exclusivamente por dímeros de ACE2 (o tras separación sintética para dar el monómero exclusivamente por monómeros), mientras que la ACE2 no glicosilada tiende a la multimerización y a la agregación.

Debido a la alta proporción de restos de azúcar cargados aumenta fuertemente además el diámetro hidrodinámico, la envoltura de solvatación de la presente preparación de ACE2. Este hecho puede aprovecharse para la purificación preparativa de ACE2 a través de columnas de separación molecular, donde la proteína que se encuentra en este caso exclusivamente como dímero aparece con un peso molecular aparente de 250 kDa en comparación con el calculado 83 kDa. En la figura 6 está reproducido un cromatograma de una purificación preparativa de ACE2. ACE2 (primera imagen) eluye con un tiempo de retención de 69 minutos. Esto corresponde a un peso molecular aparente entre el de tiroglobulina (primera imagen a 58 minutos, 670 kDa) y gamma-globulina (primera imagen a 74 minutos, 158 kDa). En este intervalo de pesos moleculares altos no se producen prácticamente contaminaciones en sobrenadantes de cultivo, de modo que puede separarse producto altamente puro en una etapa de separación muy sencilla.

Ejemplo 3: propiedades farmacológicas del producto

45 La preparación de ACE2 de acuerdo con la invención se encuentra como solución de proteínas estable, altamente pura y concentrada en tamponamiento fisiológico y puede almacenarse y administrarse sin estabilización adicional. Por ejemplo puede usarse un tampón fosfato.

ACE2 es estable como monómero o dímero en disolución y no muestra ninguna agregación debido a la alta proporción de azúcar. Además, la preparación de ACE2 presenta la actividad enzimática completa.

50 ACE2, debido a su solubilidad, puede administrarse i.v. como bolo. La biodisponibilidad se garantiza por los mismos motivos de manera sistémica inmediatamente tras la administración.

Debido a la proporción de azúcar alta, muy ramificada y compleja se degrada ACE2 solo lentamente. De esto resulta un tiempo de vida media largo de al menos 10,5 horas, que se midió en diversas especies, sobre todo también macacos Rhesus. La figura 7 representa el tiempo de vida medio medido de ACE2 administrado i.v. en 3 especies.

La alta proporción de ácido siálico causa además que no se establezca contra ACE2 ninguna respuesta inmune de neutralización. Esto sería contraproducente no solo para la administración exógena de ACE2, sino que podría neutralizar también ACE2 autóloga, unida a célula.

- 5 La formulación de ACE2 descrita junto con todas las propiedades del producto acompañantes permite por tanto en primer lugar una terapia eficaz de rhACE2.

Ejemplo 4: determinación de la actividad de ACE2 específica

10 La actividad específica de preparaciones de ACE2 se determinó mediante medición de la conversión de Ang II (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe). Todas las mediciones se realizaron como determinaciones triples en un volumen de mezcla de reacción de 100 ml. La reacción enzimática se inició mediante adición de 250 ng/ml de ACE2 a una solución de Ang II 80 μ M en MES 50 mM, NaCl 300 mM, $ZnCl_2$ 10 μ M y el 0,01 % de Brij-30 a pH 6,5. Las muestras se mezclaron cuidadosamente y se incubaron durante exactamente 18 minutos a 37 °C. La reacción enzimática se interrumpió mediante adición de EDTA 100 mM. Para el análisis se separaron las soluciones por medio de RP-HPLC (Waters C18 μ Bondapak, 2,1x300 mm, 10 μ m, 125 Å) usando un gradiente lineal del 10 % al 60 % de CH_3CN en el 0,08 % de H_3PO_4 durante 20 minutos con una velocidad de flujo de 1 ml/min. A continuación se distinguieron y se integraron picos tanto de Ang II como de Ang 1-7 en los cromatogramas. Las concentraciones peptídicas se determinaron por medio de las respectivas curvas de calibración representadas en la figura 8. A continuación se determinó la conversión enzimática así como la actividad enzimática específica.

20 La actividad del producto de ACE2 se determinó tal como se ha descrito anteriormente. En la tabla 1 están representados los respectivos resultados de la integración de picos así como los datos enzimáticos calculados.

Tabla 1: datos enzimáticos y condiciones de reacción. Están indicados los valores medios de determinaciones triples.

<i>Reactividad enzimática</i>						
<i>Área de pico</i>	<i>Conversión</i>	<i>Tiempo de reacción</i>	<i>Conc. de ACE2</i>	<i>k_{kat}</i>	<i>Actividad específica</i>	
mAU.min	μ mol.ml ⁻¹	min	ng.ml ⁻¹	s-1	μ mol.mg ⁻¹ .min ⁻¹	
			Ang II			
17149890	62,1	18	250	8,0±0,3	4,7±0,2	
			Ang 1-7			
4720141	23,1	18	250	8,8±0,2	5,2±0,1	

25 La preparación de ACE2 presenta una actividad catalítica, kkat, de 8,0±0,3 /s medida por medio de la conversión de Ang II y 8,8±0,2 /s en relación a la conversión de Ang 1-7. Los dos valores concuerdan bien y son claramente superiores a las indicaciones de Vickers *et al.*, (J Biol Chem. 277 (17) (2002):14838-43), donde se dio a conocer una actividad catalítica de ACE2 de 3,5 /s. Las condiciones de reacción eran idénticas. El origen de la actividad más alta en un 240 % de esta preparación pudieron ser modificaciones post-traduccionales y en este caso sobre todo la N-glicosilación que en el material que Vickers había usado estaba claramente menos pronunciada. Este material se expresó en células de insecto y si bien presentaba la misma secuencia de aminoácidos, sin embargo estaba glicosilada en una proporción y un grado de ramificación claramente más bajos. Se sometió a estudio a continuación también una preparación de ACE2 que puede obtenerse en el comercio de R&D systems (cat. 933-eN), que presentaba igualmente una actividad, kkat, 35 claramente más baja de 2,0±0,1 /s. Una propiedad esencial de la preparación de acuerdo con la invención es la actividad enzimática especialmente alta que se posibilita sobre todo mediante modificaciones post-traduccionales.

Ejemplo 5: análisis glicoproteómico de ACE2 recombinante

La muestra de ACE2 expresada en CHO, purificada se analizó de dos maneras diferentes:

- 40 En primer lugar se generaron péptidos trípticos tras SDS-PAGE y S-alquilación y se analizaron por medio de CL-ESI-EM (y EM-EM). Se encontraron el péptido N-terminal y varios péptidos internos. Cinco de los siete posibles sitios de N-glicosilación se encontraron en forma glicosilada con estructuras de glicano que contenían principalmente glicanos diantenario con fucosa y distintas cantidades de ácido siálico. El péptido C-terminal parece estar O-glicosilado.
- 45 En segundo lugar se analizaron N-glicanos libres, reducidos por medio de CL-ESI-EM con carbón. Para el glicano diantenario, disialilado con fucosa pudo mostrarse que la fucosa está unida con el núcleo con enlace α 1,6 y el ácido siálico está unido con enlace α 2,3. Adicionalmente a los glicanos mono- o di-sialilados, diantenarios se encontró una cantidad considerable de oligosacárido tri-antenario. Una estimación

aproximada de la masa de la ACE2 glicosilada da como resultado 101-102 kDa, es decir que está constituida por aproximadamente el 17 % de hidrato de carbono.

Digestión proteolítica de hBChE separado por medio de SDS-PAGE

- 5 Se sometieron alícuotas de ACE2 a un SDS-PAGE, se descoloraron, se carbamidometilaron, se digirieron con tripsina de calidad secuencial y se extrajeron en piezas de gel, tal como se describe. Los extractos se llevaron en un concentrador Speed Vac hasta sequedad y se reconstituyeron con agua que contenía el 0,1 % de ácido fórmico, antes del siguiente análisis de CL-EM. Para el análisis de oligosacárido se digirieron los péptidos con PNGasa F y los glicanos se purificaron usando puntas SPE C18.

Análisis de EM de péptidos y glicopéptidos tripticos

- 10 El análisis de espectrometría de masas se realizó en Q-TOF Ultima Global (Waters Micromass), equipado con una unidad de electropulverización estándar, un sistema de Cap-LC (Waters Micromass) y un módulo de cambio de disolvente de 10 orificios (Rheodyne), tal como se ha descrito brevemente [Kolarich 2006]. Las muestras se atraparon en primer lugar en una columna previa Aquasil C18 (30 x 0,32 mm, Thermo Electron) usando agua como disolvente. La columna de análisis, una columna Biobasic C18 (100 x 0,18 mm, Thermo Electron) se mantuvo antes del cambio de disolvente en el 5 % de acetonitrilo y después se aplicó un gradiente lineal del 5 % al 50 % de acetonitrilo con una velocidad de flujo de 2 ml/min. Todos los eluyentes contenían el 0,1 % de ácido fórmico.

Las muestras se analizaron por medio de EM y también por medio de EM-EM. El análisis de datos se realizó con software MassLynx 4.0 SP4 (Waters Micromass).

20 Análisis de N-glicanos libres de ACE2

Los glicanos reducidos con hidruro de boro se separaron en una columna de carbono grafitico poroso y se detectaron por medio de espectrometría de masas.

Se intentó encontrar el N-terminal y el C-terminal. La proteína contiene

Ejemplo 6: análisis de glicosilación

- 25 La secuencia de proteínas de ACE2, su peso molecular, la posición de todos los sitios de glicosilación así como la estructura de los azúcares unidos se determinaron en el presente documento. La muestra se analizó por medio de digestión triptica, S-alquilación y CL-ESI-EM.

- La masa de proteína determinada del producto glicosilado asciende a 102 kDa, correspondiendo la proporción de azúcar al 23 % de toda la masa.
- 30
- El extremo N-terminal así como la presencia de todos los péptidos internos de secuencia se comprobaron según esto (véase la información de secuencia).
 - Todos los 7 sitios de N-glicosilación postulados (posiciones 53, 90, 103, 322, 432, 546 y 690) contenían realmente estructuras de azúcar fucosiladas, que contienen ácido siálico, complejas, di-antenarias (figura 13)
- 35
- El péptido C-terminal estaba O-glicosilado.

La estructura de estos restos de azúcar se determinó mediante CL-ESI-EM con carbón tras su escisión y reducción. Todas las estructuras di-antenarias contenían respectivamente dos ácidos siálicos únicos con enlace α 2,3 y una fucosa unida con enlace α 1,6. Se encontraron igualmente cantidades bajas de estructuras triantenarias (figura 11).

- 40 La estrategia de selección usada permitió producir un producto de expresión completamente glicosilado y que contiene ácido siálico.

Metodología:

Preparación de muestras

- 45 Se separó ACE2 por medio de SDS-PAGE, se descoloró, se alquiló y se digirió por medio de tripsina. (Kolarich *et al.*, Proteomics 6 (2006): 3369-3380). Se secaron extractos de gel y antes del análisis de CL-EM se disolvieron en el 0,1 % de ácido fórmico. Para el análisis de azúcares se digirieron los péptidos por medio de PNGasa-F y se purificaron a través de columnas C18 SPE.

Análisis de EM

Todos los análisis de espectrometría de masas se realizaron por medio de Q-TOF Ultima Global (Waters Micromass) con una unidad de electropulverización convencional y un sistema Cap-LC (Waters Micromass) (Kolarich 2006).

- 5 Las muestras se enriquecieron en una columna previa Aquasil C18 (30 x 0,32 mm, Thermo Electron) en agua. Como columna separadora se usó una columna C18 (100 x 0,18 mm, Thermo Electron) usando un gradiente de acetonitrilo. Las muestras se midieron en el modo EM y en el modo EM-EM.

Análisis de los N-glicanos libres

- 10 Los glicanos reducidos por medio de hidruro de boro se separaron en una columna de grafito poroso y se caracterizaron por medio de su masa.

Ejemplo 7: dimerización de rhACE2

- 15 La ACE2 preparada según el ejemplo 1 se obtiene como dímero y en este ejemplo se analiza como tal, sin separar los dímeros. Mediante tratamiento nativo permanece el dímero a diferencia de análisis de desnaturalización (figura 3). De manera condicionada por la dimerización de ACE2, todas las unidades de proteína hidrófobas están dirigidas hacia el interior del complejo, sobresaliendo hacia fuera los restos cargados, tales como cadenas de azúcar unidas a N y solvatando la estructura en el medio fisiológico igualmente cargado. Esta dimerización mediante expresión de una ACE2 completamente N-glicosilada se determinó en presencia de Zn^{2+} . El complejo dimerico está constituido según esto por 2 subunidades idénticas que están unidas entre sí de manera electrostática y tampoco se separan ya en soluciones fisiológicas. Se produce según esto la secreción de una glicoproteína con respectivamente 14 estructuras de ácido siálico fuertemente cargadas en cada molécula de ACE2 así como 28 estructuras de ácido siálico en el dímero. Respectivamente, 2 átomos de Zn^{2+} se incorporan en el complejo y estabilizan su estructura. La fuerte carga de las cadenas de azúcar solvata la molécula en soluciones acuosas fisiológicas y fuerza a los correspondientes dominios de proteína cargados hacia fuera. El procedimiento de producción se estableció de modo que en el producto final existiera exclusivamente dímeros de ACE2.
- 20
- 25

Esto se posibilita debido a que durante la generación de la rACE2 están presentes iones Zn^{2+} de manera suficiente (preferentemente se usan Zn^{2+} 1,5-5 micromolar, en particular puede realizarse la fermentación con Zn^{2+} 2,5-3,5 uM) y a continuación se realizan las otras etapas de tratamiento en presencia de iones Zn^{2+} .

- 30 En las figuras 14 y 15 se detectó la dimerización del complejo de ACE2 con distintos procedimientos. En la electroforesis en gel de poli-acrilamida nativa se detectó la proteína tras coloración con plata como una sola banda de un tamaño de aproximadamente 250 kDa. Por medio de la cromatografía de separación molecular en una columna Zorbax G-450 en presencia del 10 % de acetonitrilo en tampón fosfato de Na 220 mM a pH 7,0 aparece el producto igualmente como un solo pico en un tiempo de retención que corresponde a un peso molecular de aproximadamente 250 kDa. Es destacable en ambos casos que puede detectarse proteína exclusivamente dimerizada. Ni estructuras monoméricas, ni agregados de peso molecular superior pudieron detectarse.
- 35

Ejemplo 8: diferencias de dímeros ACE2 con respecto a ACE2 unido a membrana

- 40 ACE2 se expresa como proteína de transmembrana en todas las especies superiores predominantemente en células renales, cardíacas, pulmonares y hepáticas como enzima esencial del sistema renina-angiotensina. La ACE2 anclada en la membrana se rodea naturalmente en la doble capa lipídica de membrana con otras proteínas de membrana que estabilizan la ACE2 en una conformación activa e igualmente protegen los dominios extracelulares de frente a la degradación proteolítica. Para elevar las propiedades farmacológicas de ACE2 soluble y en especial la actividad y estabilidad de la proteína soluble, se seleccionó una estrategia de expresión y producción que conduce exclusivamente a una estructura dimerica de ACE2 estable. Esto es sobre todo los dominios C-terminales de la proteína y sus modificaciones post-traduccionales que son responsables de manera decisiva de la dimerización. Para realzar la particularidad de la estructura dimerica de ACE2 se analizó la estructura de ACE2 unida a membrana por medio de PAGE nativo e inmunotransferencia de tipo Western específica de ACE2 (figura 16). En los carriles A y B están cargados extractos celulares (córtez y cerebro) así como en el carril C un extracto celular de un clon de producción para dímeros de ACE2, producido según el ejemplo 1. El producto unido a membrana presenta según esto un peso molecular claramente más bajo en comparación con el producto de expresión según el ejemplo 1 (C y D), aunque el primero está constituido únicamente por la parte extracelular. Esto indica que ACE2 unida a membrana se encuentra como monómero. El producto de expresión por el contrario está constituido por dímeros que confieren al producto ventajas farmacológicas. En el carril D se analizó el producto final purificado. Éste presenta tan solo una única banda de un peso molecular de aproximadamente 240 kDa.
- 45
- 50
- 55

Ejemplo 9: propiedades farmacológicas mejoradas de los dímeros de ACE2

5 APN 01 es la designación de una formulación de proteínas de ACE2 fisiológica que está constituida exclusivamente por estructuras diméricas de ACE2. Respectivamente dos monómeros de ACE2 forman según esto complejos unidos entre sí de manera no covalente. Los constructos biomoleculares, la línea celular de expresión, el procedimiento de fermentación, la purificación y el tampón para el almacenamiento y la aplicación se han seleccionado o concebido de modo que en el producto final existan exclusivamente dímeros de ACE2 estables. El dímero ni se agrega para dar complejos mayores ni se disocia en condiciones fisiológicas para dar monómeros.

10 En la figura 15 (cromatograma de SEC-HPLC analítico: APN 01 en comparación con un patrón de separación molecular (patrón GF de Bio-RAD, curva azul). Condiciones de funcionamiento: columna: Zorbax GF250, tampón: Na₂HPO₄ 220 mM + un 10 % de CH₃CN, pH 8,0 a 1 ml/min), eluye APN 01 en forma de un único pico a 8,6 minutos, que se encuentra con respecto a su tiempo de retención entre tiroglobulina (680 kDa, tiempo de retención de 7,4 minutos) y gamma-globulina bovina (158 kDa, tiempo de retención de 8,9 minutos). La masa molecular calculada de este complejo asciende a aproximadamente 214 kDa. Esto corresponde por ejemplo al peso molecular esperado de dos unidades de ACE2 de respectivamente 102 kDa.

15 Para fines de comparación se prepararon como material de referencia monómeros de ACE2 en células CHO, que se analizaron igualmente por medio de SEC-HPLC. El cromatograma correspondiente a esto está representado en la figura 17. La forma monomérica eluye en un tiempo de retención de 9,0 minutos, lo que corresponde a un peso molecular de aproximadamente 110 kDa. Los dos productos se compararon además por medio de PAGE (véase la figura 18a). Mientras que APN 01 (A) presenta una banda de proteína con un peso molecular de aproximadamente 240 kDa, aparece la forma monomérica (B) en aproximadamente 100 kDa. Por medio de inmunotransferencia de tipo Western específica de ACE2 se confirmó la identidad de los dos productos, tal como es evidente en la figura 18b.

20 Los dos productos muestran una actividad enzimática específica idéntica, medida por medio de un ensayo de actividad usando un sustrato marcado con fluorescencia. Tal como es evidente en la figura 19, se encuentran las curvas de la misma concentración enzimática de la forma monomérica y dimérica una sobre otra.

25 Para comparar las propiedades farmacológicas de los dos productos se administraron las dos preparaciones a ratones BI-6 por vía intraperitoneal como inyección en bolo de 2,5 mg/kg y se midió la actividad enzimática de ACE2 en muestras de suero tras 24 y 48 horas (véase la figura 20). La concentración de proteína se ajustó de modo que todos los animales recibieran respectivamente 100 µl de una solución fisiológica de proteínas. Respectivamente se trataron 7 animales con APN 01 (dímero de ACE2) y 5 animales con monómero de ACE2. Mientras que antes de la administración de ACE2 no podía medirse en ninguna muestra de suero la actividad de ACE2, pudo medirse tras la administración en todos los casos sistémicamente la actividad de ACE2. Ya 24 horas tras la aplicación se diferenciaban significativamente los dos grupos (prueba de t, p<0,001): mientras que en los animales que se trataron con el dímero de ACE2 no se midió una actividad que correspondiera a una concentración de ACE2 de 0,9 µg/ml, pudo encontrarse en el grupo que recibió monómero de ACE2 solo la actividad que corresponde a una concentración de 0,2 µg/ml. Tras 48 horas se encontró en el grupo que recibió homodímeros de ACE2 aún 0,2 µg/ml de actividad, mientras que en el grupo que recibió el monómero no pudo detectarse ya ninguna actividad de ACE2 sistémica. Estos datos muestran una ventaja farmacológica muy clara de la forma dimérica de ACE2.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Apeiron Biologics Forschungs- und Entwicklungs GmbH

5 <120> Polipéptido ACE2
<130> R 61652

<140> DESCONOCIDO
10 <141> 12-06-2008

<150> AT A 913/2007
<151> 12-06-2007

15 <150> EP 08450052.9
<151> 08-04-2008

<160> 1

20 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 740
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

25 <400> 1

ES 2 670 938 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Pro Gly Leu Asn Glu Ile Met Ala Asn Ser Leu Asp Tyr Asn Glu

ES 2 670 938 T3

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

ES 2 670 938 T3

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

Lys Asn Val Ser Asp Ile Ile Pro Arg Thr Glu Val Glu Lys Ala Ile
690 695 700

Arg Met Ser Arg Ser Arg Ile Asn Asp Ala Phe Arg Leu Asn Asp Asn
705 710 715 720

Ser Leu Glu Phe Leu Gly Ile Gln Pro Thr Leu Gly Pro Pro Asn Gln
725 730 735

Pro Pro Val Ser
740

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de ACE2 recombinante, glicosilado, soluble, humano y enzimáticamente activo, que está presente como dímero, en el que el dímero de ACE2 comprende dos unidades monoméricas de ACE2 que están unidas de manera no covalente, para su uso en el tratamiento o la prevención de hipertensión, insuficiencias cardíacas, infarto de miocardio o arterioesclerosis, fallo o insuficiencia renal, enfermedad poliquística renal (PKD) o enfermedad pulmonar.
2. El polipéptido de ACE2 recombinante para su uso según la reivindicación 1, en el que la insuficiencia cardíaca es congestiva, aguda o crónica, o en el que la enfermedad pulmonar es enfermedad pulmonar obstructiva crónica, neumonía, asma, bronquitis crónica, enfisema pulmonar, fibrosis quística, enfermedad pulmonar intersticial, hipertensión pulmonar, embolia pulmonar, sarcoidosis pulmonar, tuberculosis, edema pulmonar, ALI, ARDS o cáncer de pulmón.
3. El polipéptido de ACE2 recombinante para su uso según la reivindicación 2, en el que la enfermedad que va a tratarse o prevenirse es ALI o ARDS.
4. El polipéptido de ACE2 recombinante para su uso según la reivindicación 2, en el que la enfermedad que va a tratarse o prevenirse es hipertensión pulmonar.
5. El polipéptido de ACE2 recombinante para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el polipéptido de ACE2 es un homodímero.
6. El polipéptido de ACE2 recombinante para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el polipéptido de ACE2 contiene dos iones de cinc.
7. El polipéptido de ACE2 recombinante para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, no en el que el polipéptido de ACE2 no tiene un dominio transmembrana.
8. El polipéptido de ACE2 recombinante para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la cadena polipeptídica de ACE2 contiene la SEC ID N.º: 1 o fragmentos enzimáticamente activos de la misma.
9. El polipéptido de ACE2 recombinante para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la cadena polipeptídica de ACE2 consiste en los aminoácidos 18-740 de SEC ID N.º: 1.
10. El polipéptido de ACE2 recombinante para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el polipéptido de ACE2 tiene una proporción de azúcar superior al 10 % (% en masa de todo el ACE2).
11. Preparación que comprende un polipéptido de ACE2 recombinante, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la proporción de dímeros de ACE2 en las moléculas de ACE2 es al menos del 80 %, para el tratamiento o la prevención de hipertensión, insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio o arterioesclerosis, fallo o insuficiencia renal, enfermedad poliquística renal (PKD) o enfermedad pulmonar.
12. Preparación para su uso según la reivindicación 11, en el que la enfermedad que va a tratarse o prevenirse es ALI, ARDS o hipertensión pulmonar.

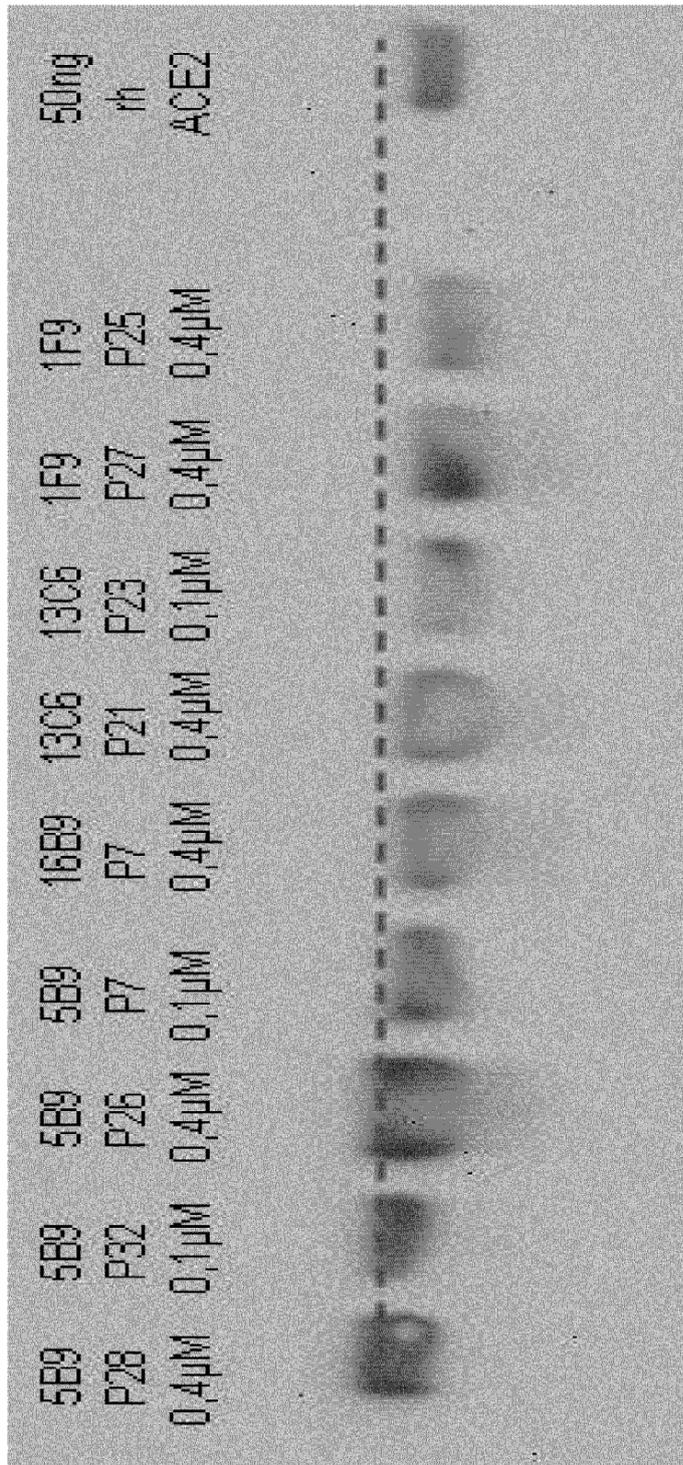


Fig. 2

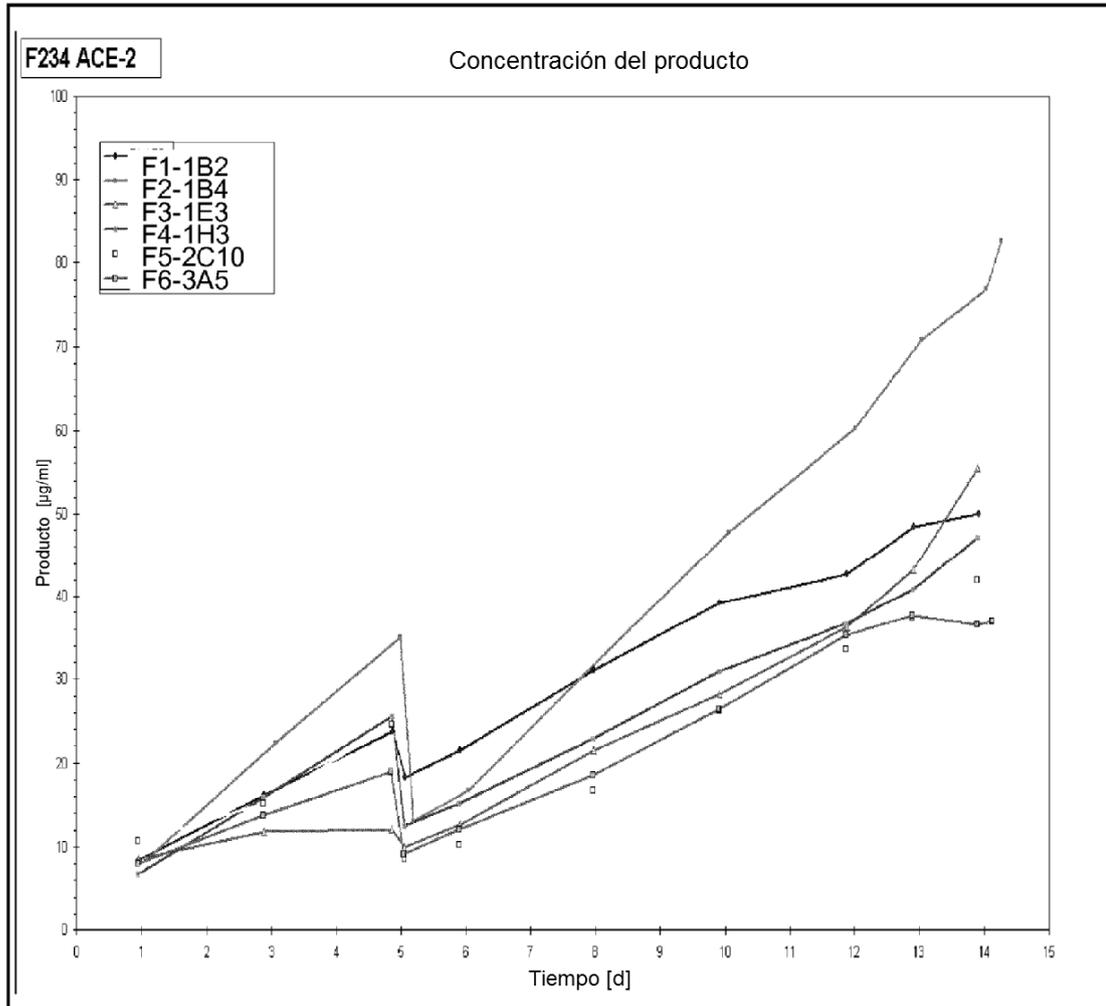


Fig. 4

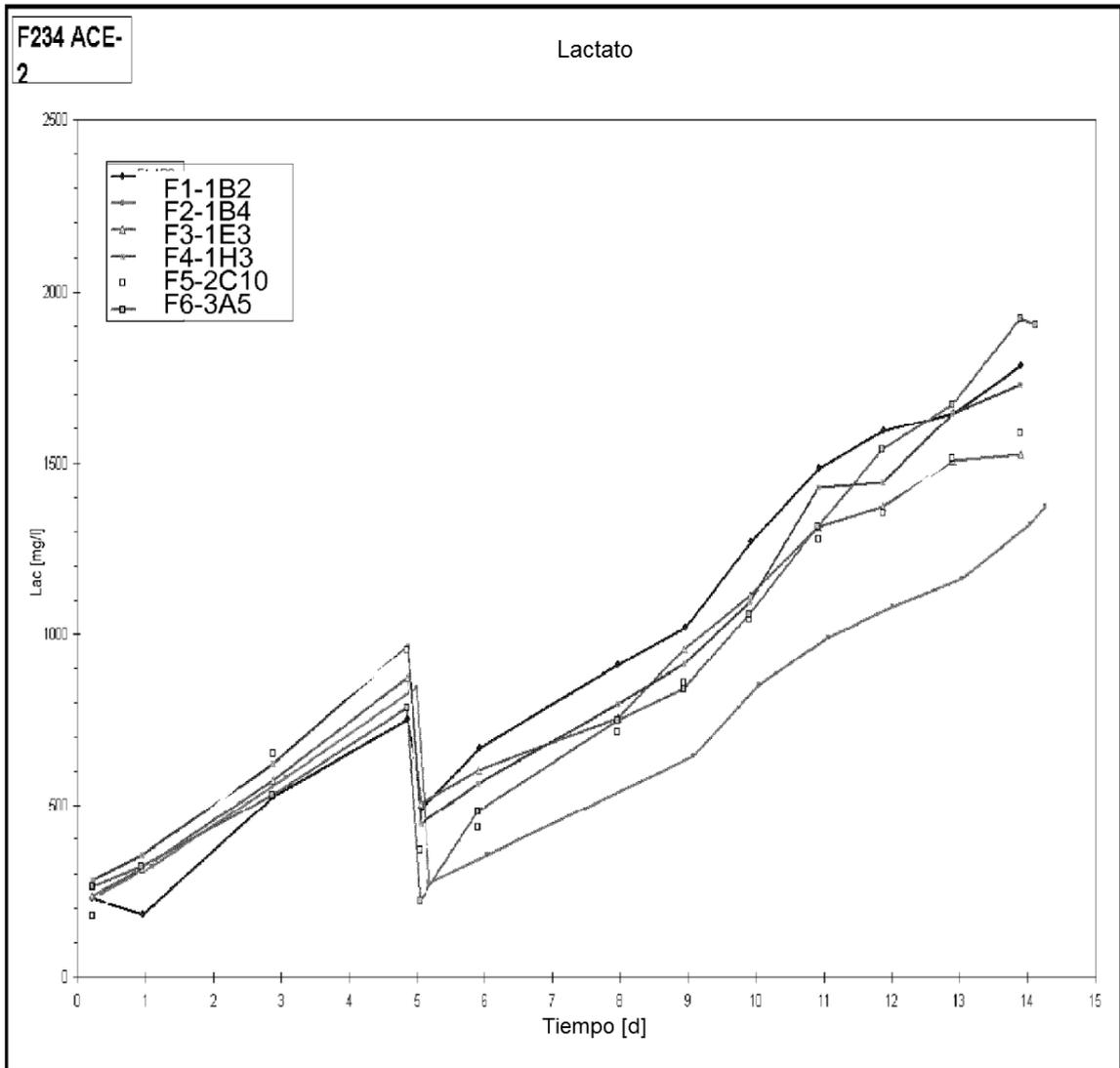


Fig. 4 Continuación

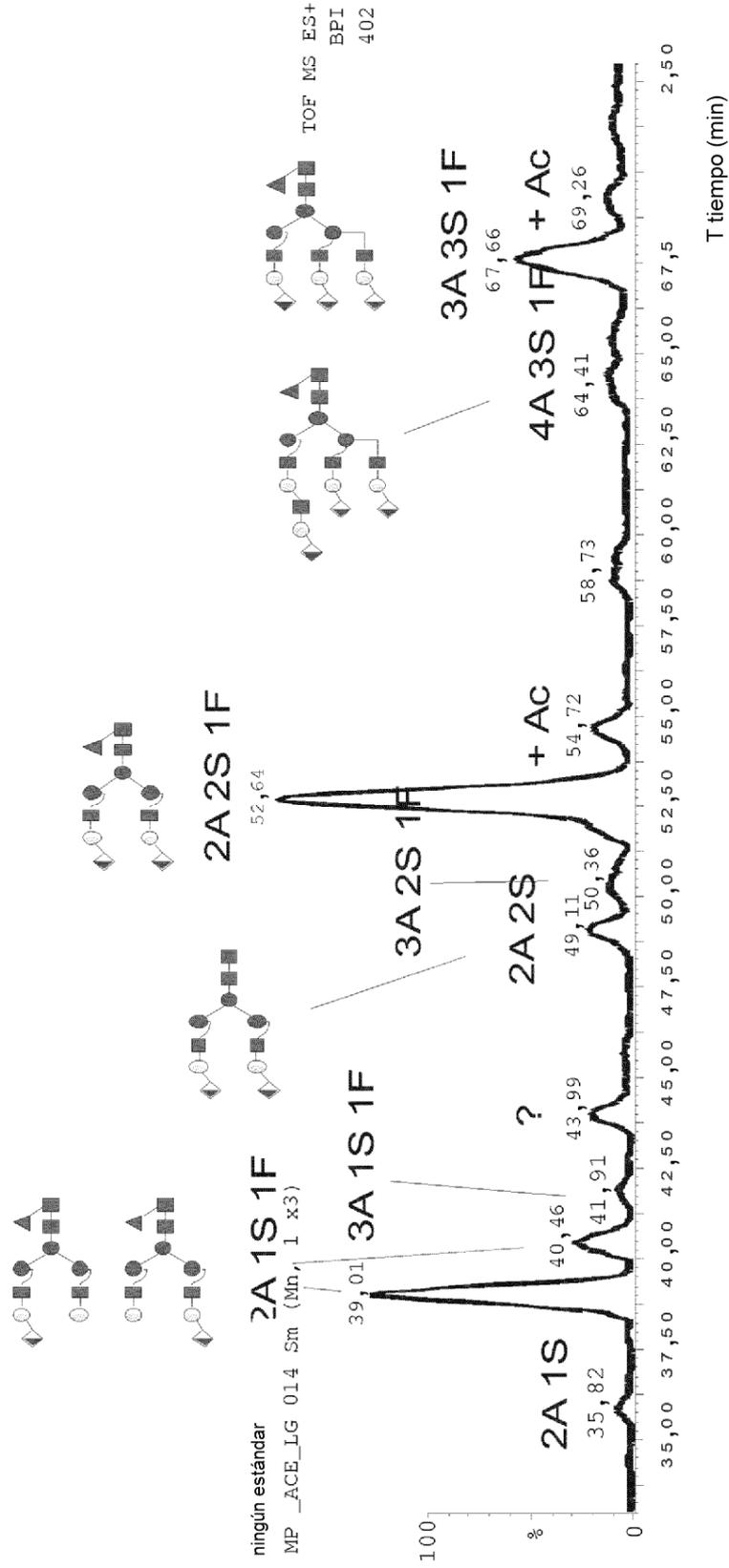


Fig. 5

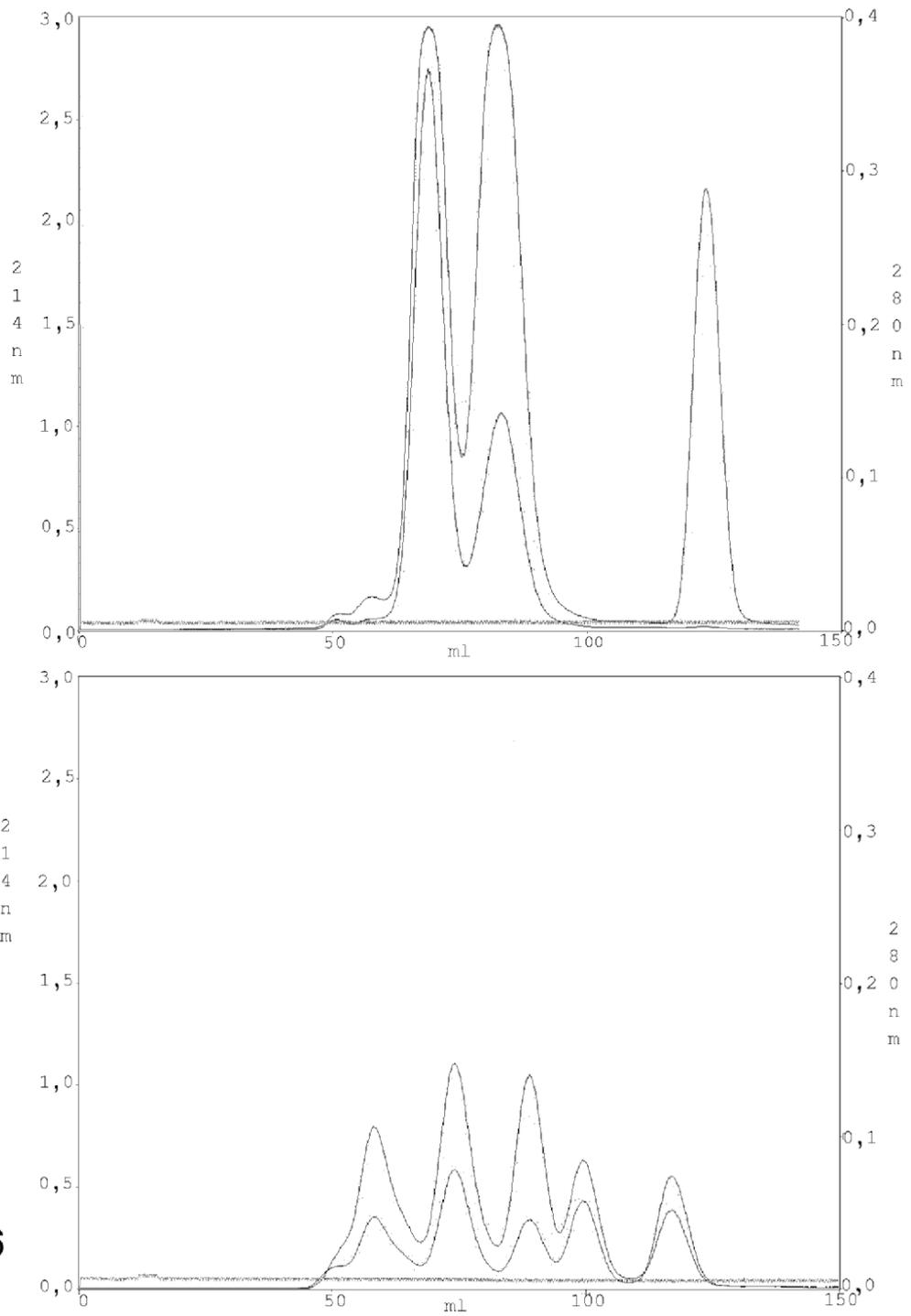


Fig. 6

farmacodinámica de rhACE2

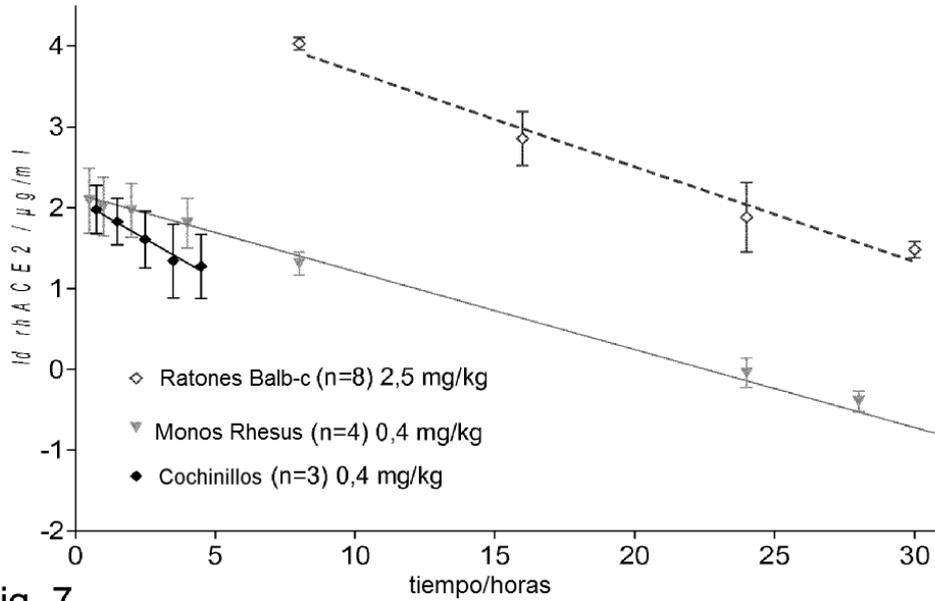
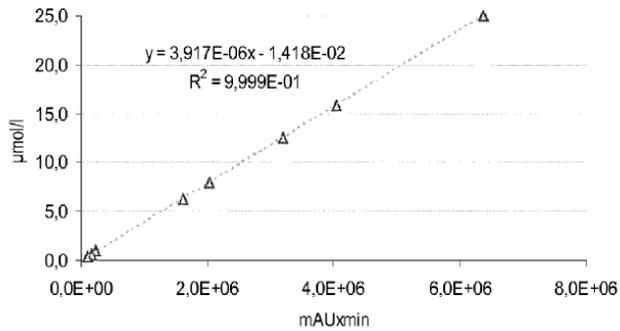


Fig. 7

función de correlación de Ang 1-7



función de correlación de Ang II

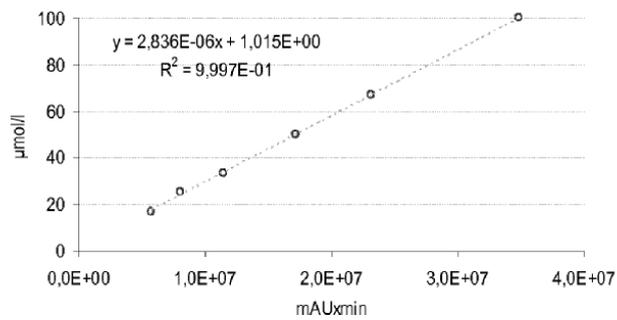


Fig. 8

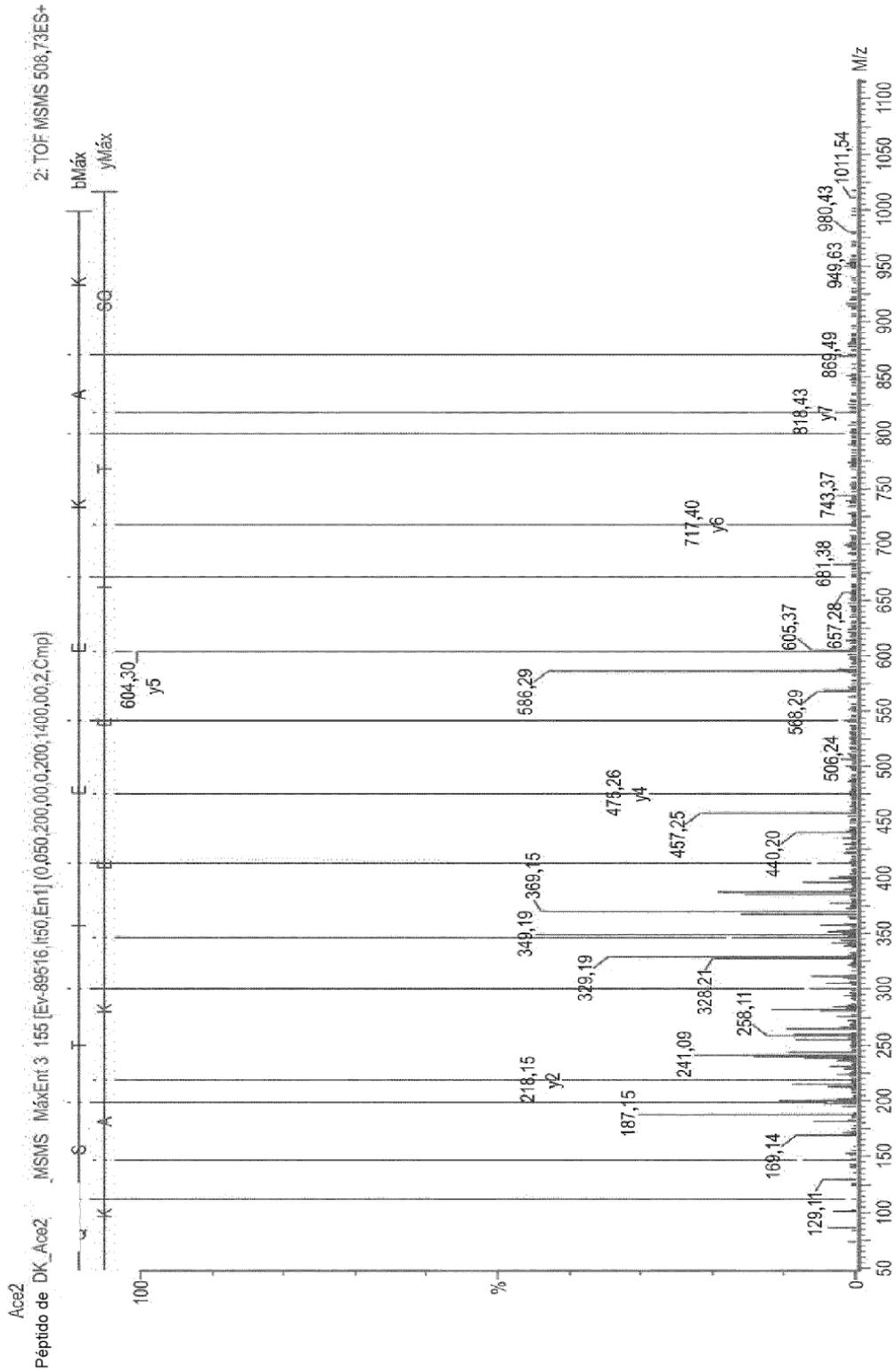


Fig. 9

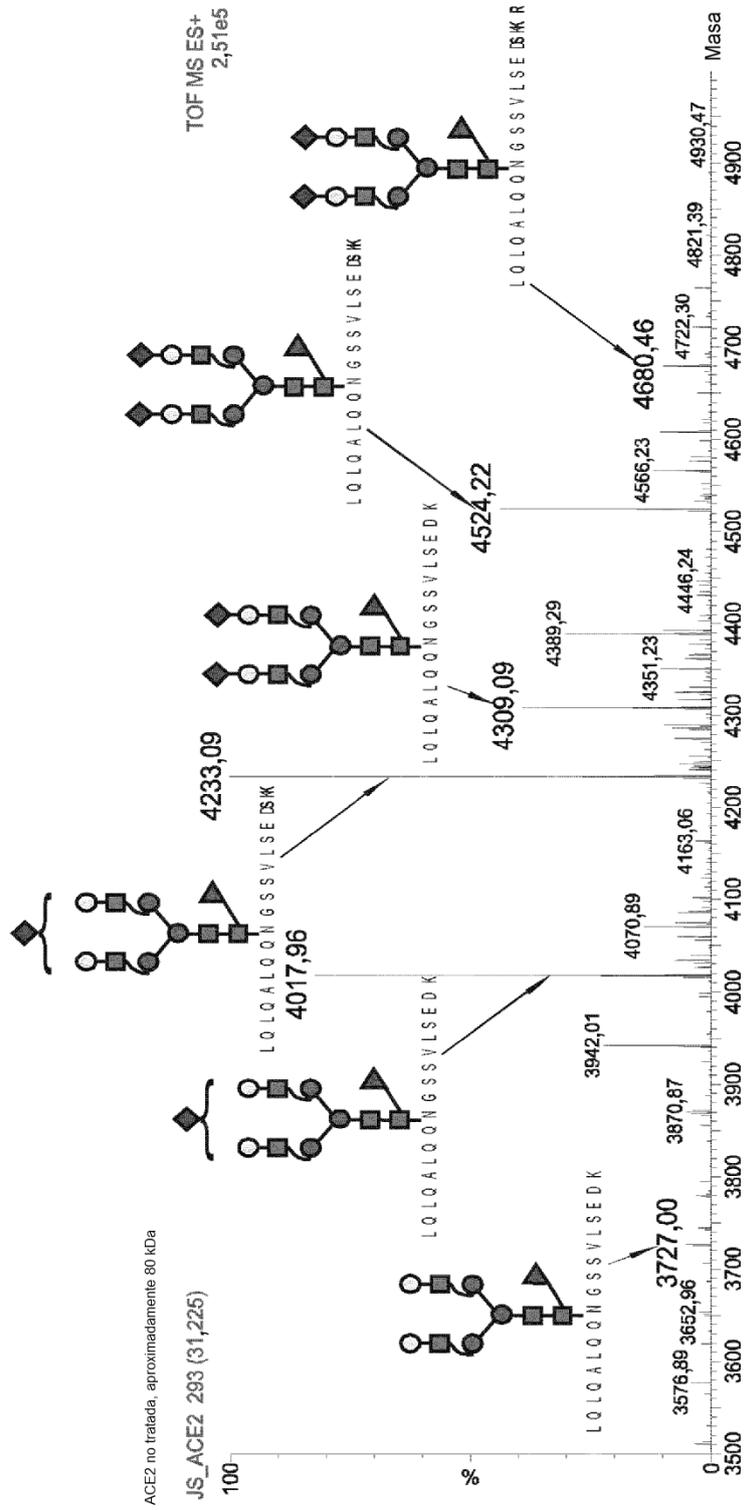


Fig. 11A

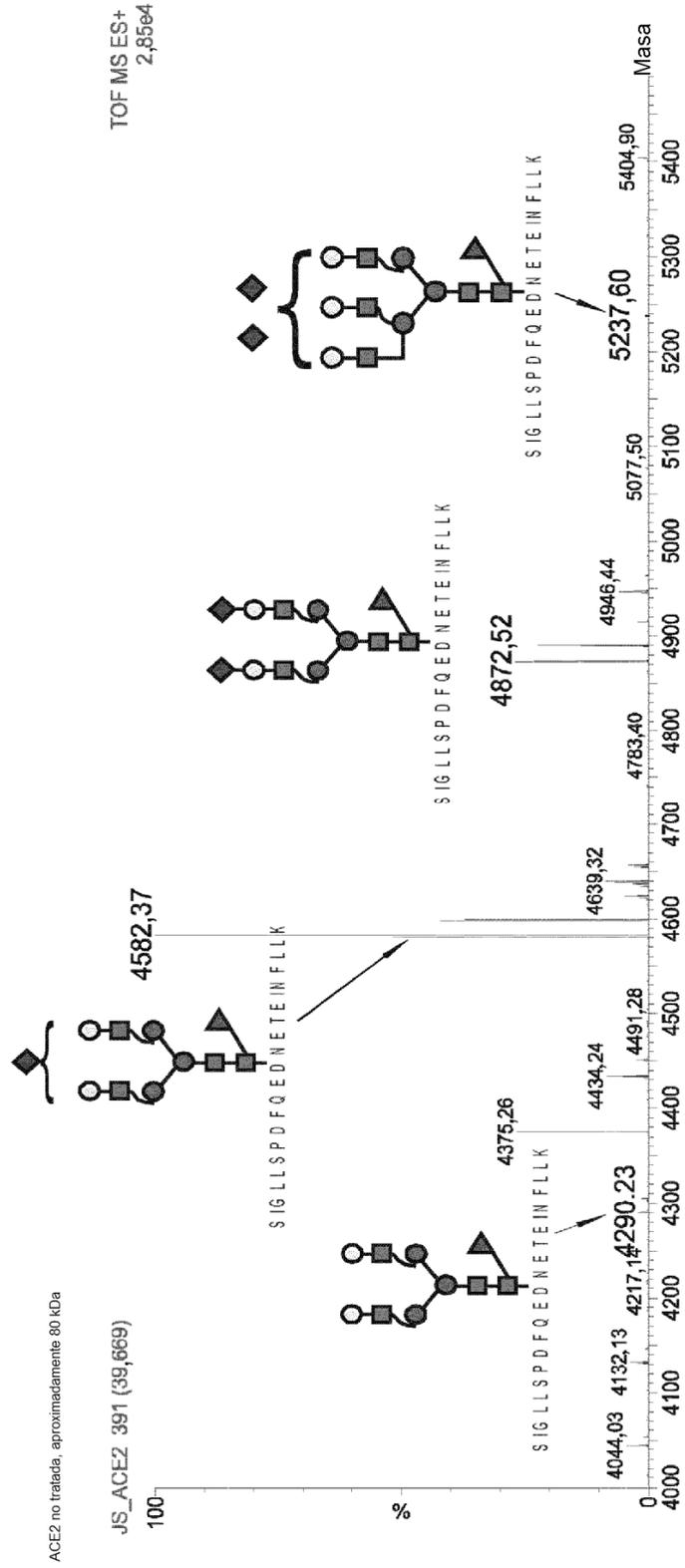


Fig. 11B

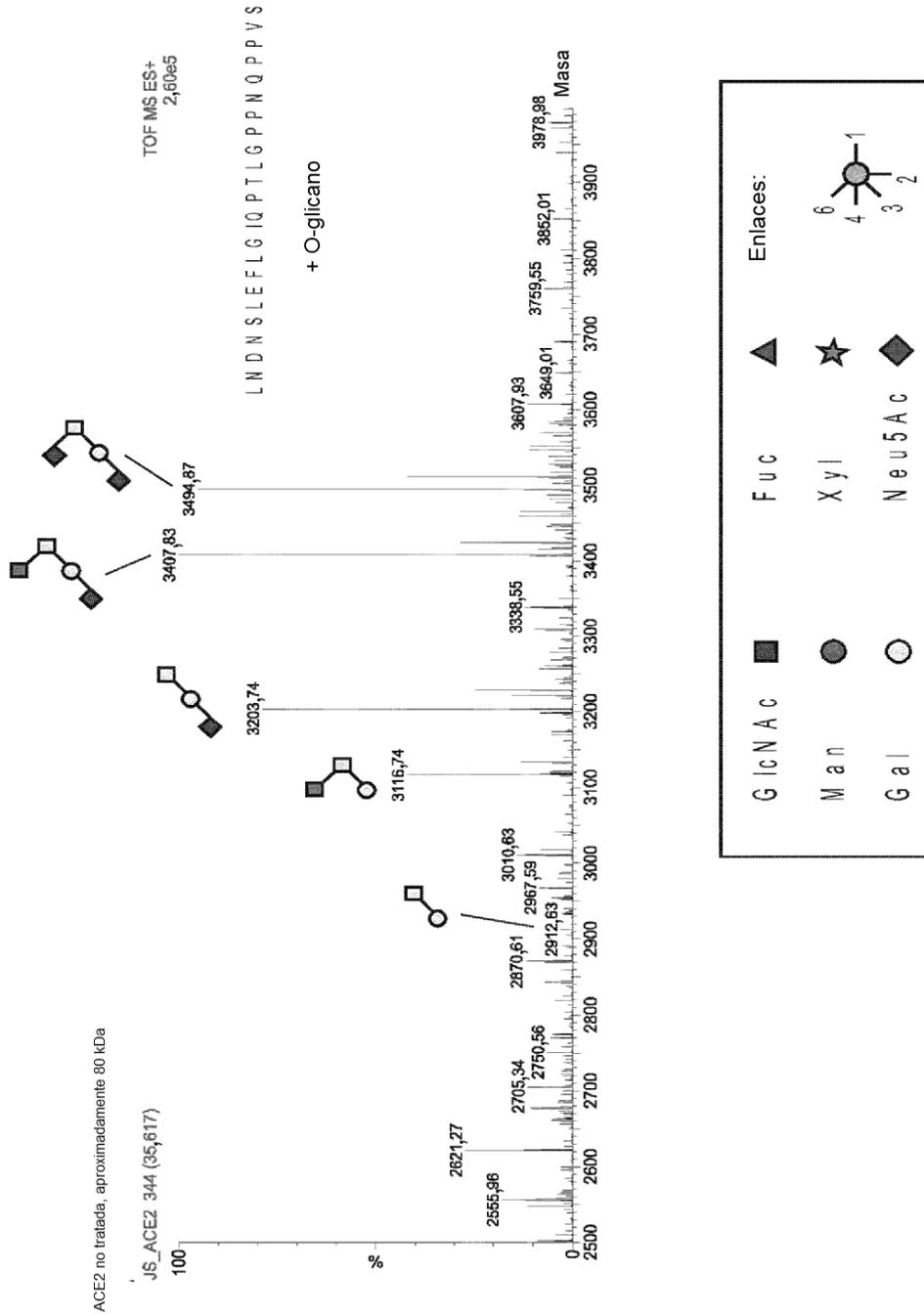


Fig. 12

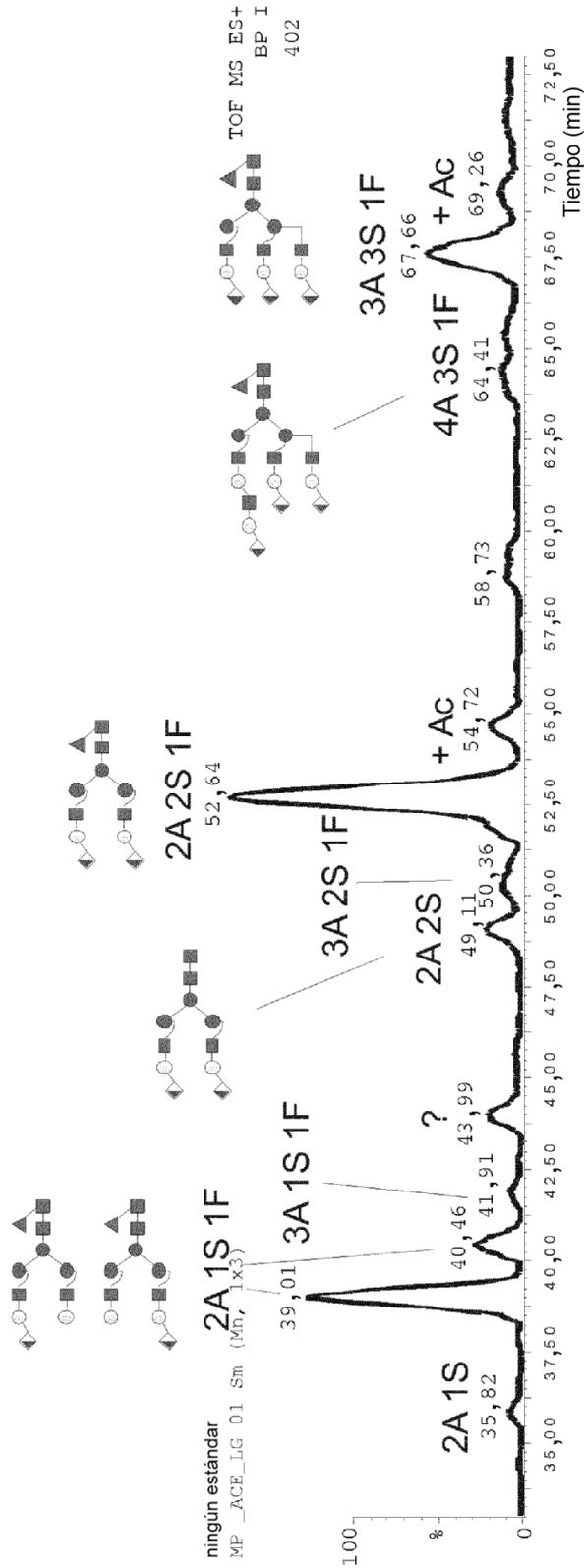


Fig. 13

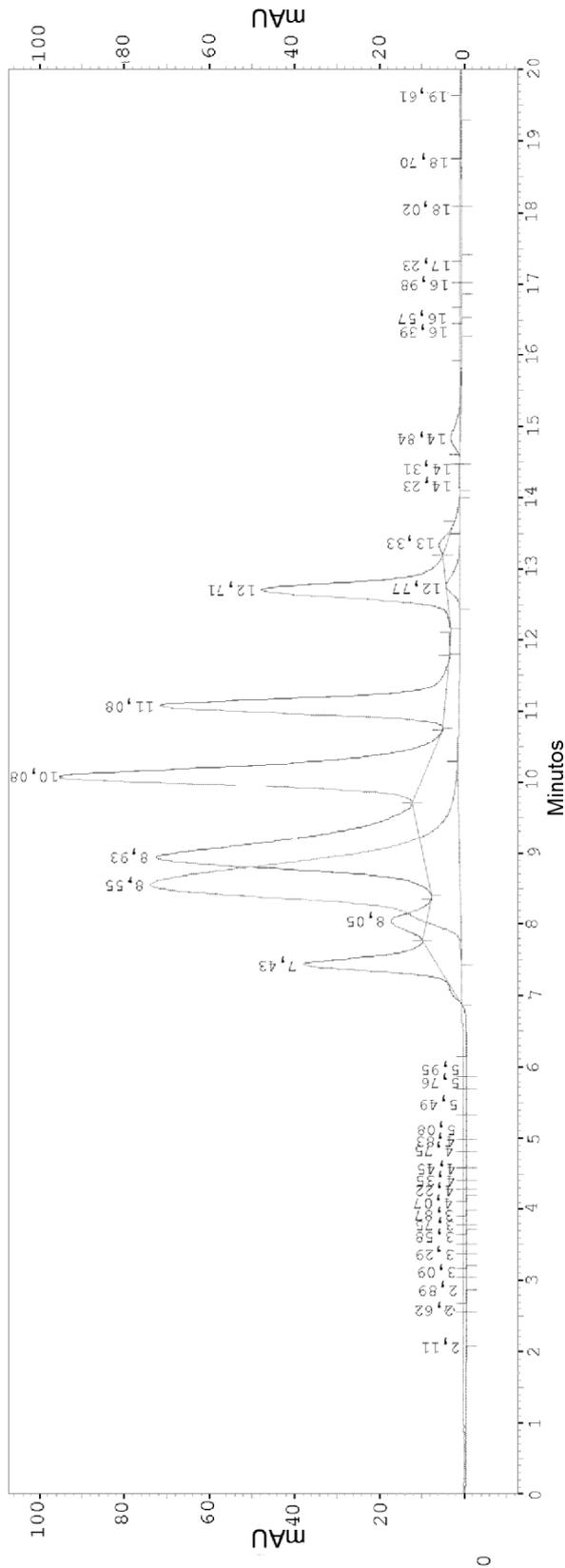


Fig. 15

Fig. 16

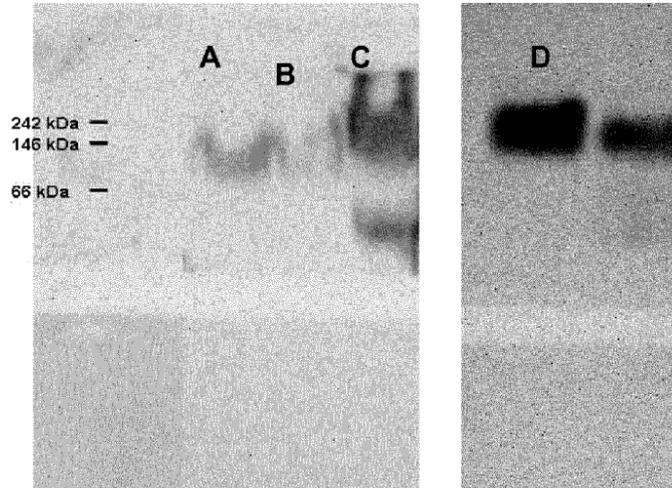


Fig. 17

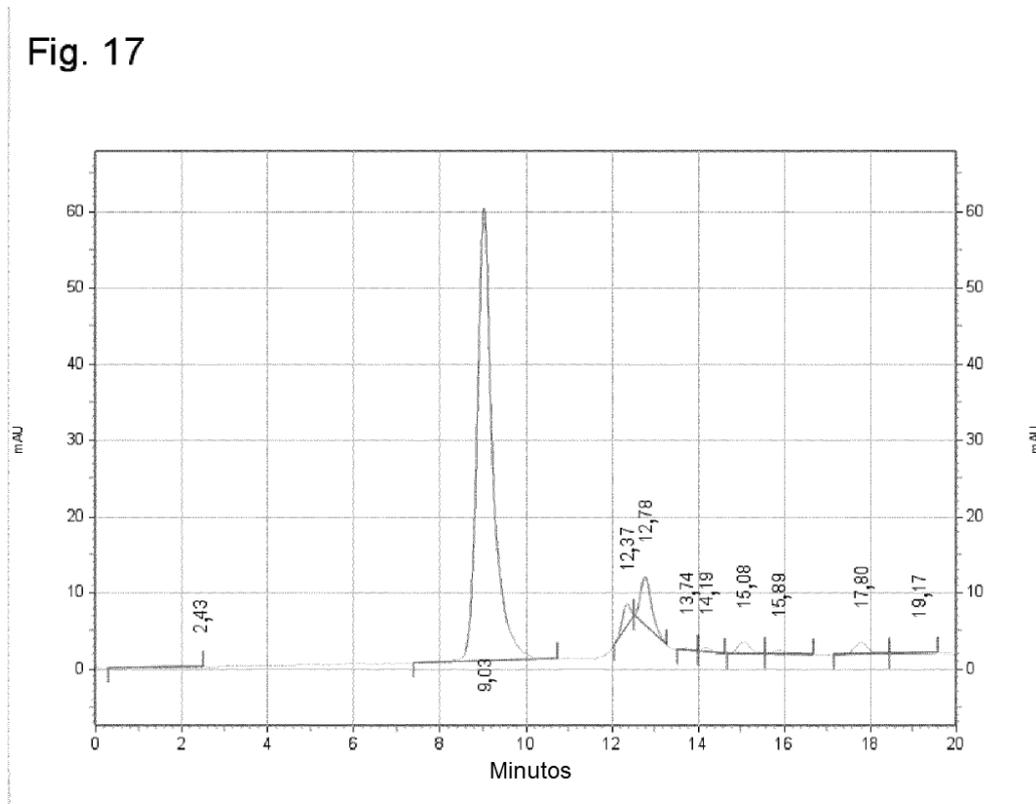


Fig. 18

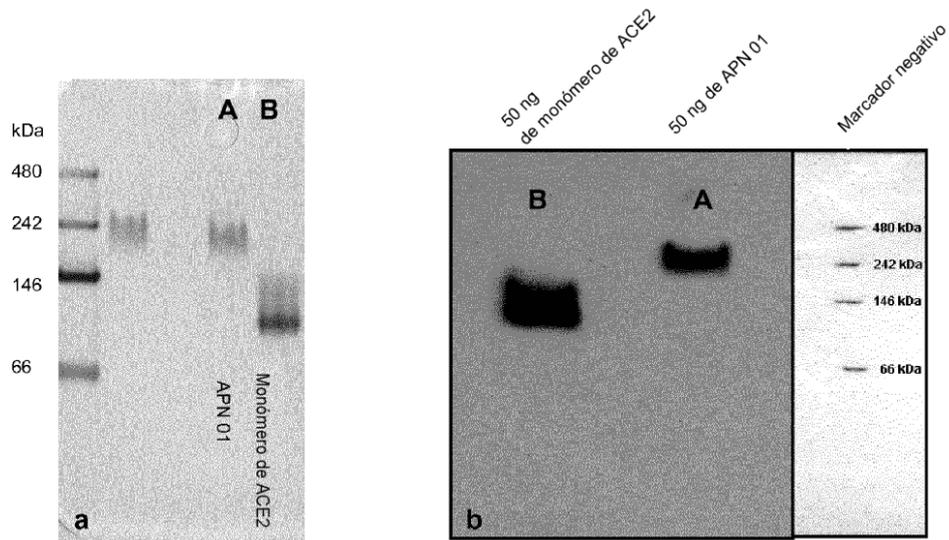


Fig. 19

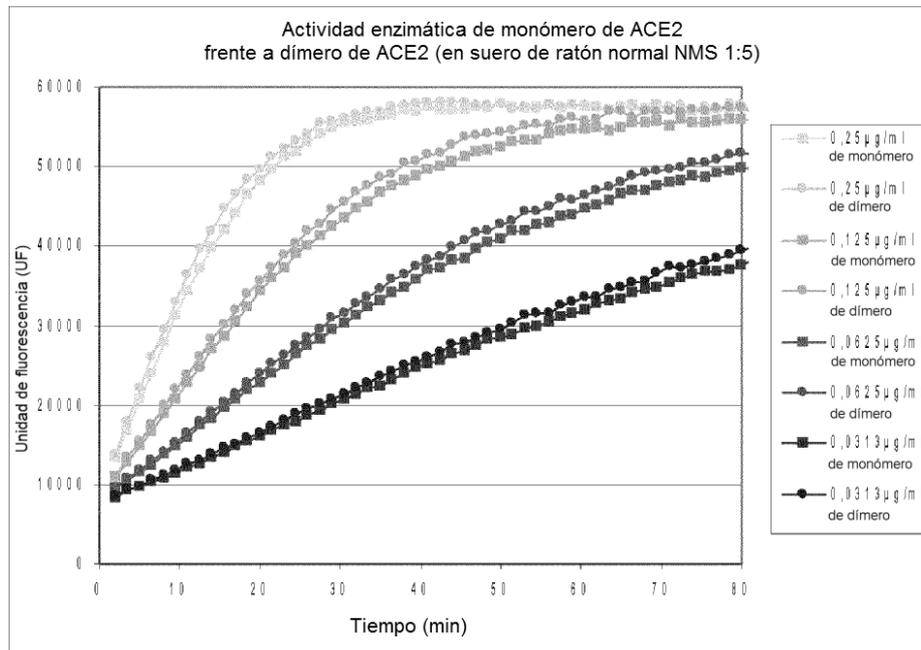


Fig. 20

