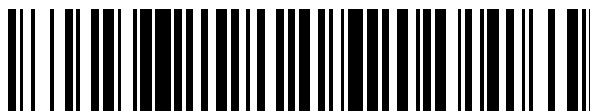


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 282**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/48** (2006.01)

**C12N 9/48** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.01.2014** **PCT/EP2014/050457**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.07.2014** **WO14108530**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.01.2014** **E 14700370 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2019** **EP 2943216**

54 Título: **Polipéptidos de ECA2 modificados**

30 Prioridad:

**14.01.2013 US 201361752023 P**

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

**21.11.2019**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**LOIBNER, HANS;**  
**PEBALL, BERNHARD;**  
**SCHUSTER, MANFRED y**  
**STRANNER, STEFAN**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 732 282 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

Polipéptidos de ECA2 modificados

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a variantes modificadas de la enzima 2 convertidora de angiotensina (ECA2) y a usos farmacéuticos y analíticos de las mismas. En particular, la presente invención se refiere a ECA2 empobrecida en  $Zn^{2+}$ , libre de  $Zn^{2+}$ , sustituida con una mezcla de iones y sustituida con iones metálicos, así como a métodos para la fabricación de estas variantes y usos de las mismas, tales como usos terapéuticos y analíticos de estas variantes de ECA2.

**Antecedentes de la invención**

10 ECA2 (enzima 2 convertidora de angiotensina, también conocida como carboxipeptidasa relacionada con la enzima convertidora de angiotensina; Número EC: 3.4.17.23) es una metaloproteasa clave del sistema renina angiotensina (SAR), véase Donoghue *et al.*, Circ. Res. 87, 2002: e1-e9; Tipnis *et al.*, J. Biol. Chem., 275 (43), 2000, 33238-43). ECA2 se identificó inicialmente como un análogo de ECA. Tipnis *et al.* describen el aislamiento de ECA2 (en ese caso, todavía denominada ACEH) a partir de células CHO y el aislamiento de su ADNc.

15 Tanto la ECA como la ECA2 son metaloproteasas con un átomo de zinc catalítico en el centro. Posteriormente, se descubrió que ECA y ECA2 eran diferentes en términos de actividad y mecanismo de acción. ECA aumenta la presión arterial, mientras que ECA2 disminuye la presión arterial. Desde el punto de vista del mecanismo de acción, ECA es una peptidil dipeptidasa, mientras que ECA2 es una carboxipeptidasa (Towler *et al.*, J. Biol Chem 279, 2004, 17996-18007).

20 ECA2 existe principalmente como una zinc metaloproteasa anclada en la membrana, que actúa en la circulación sanguínea e induce efectos locales en los órganos afectados, así como efectos sistémicos a través de la circulación sanguínea. ECA2 se expresa en el sistema vascular, así como en la mayoría de los órganos, pero predominantemente en los riñones, el hígado, el corazón, los pulmones y los testículos. Se escinde, como una mono-peptidasa, por lo que activa o inactiva una gran cantidad de sustratos, incluidos los péptidos del sistema SAR, como la angiotensina II (Ang II), que se escinde a angiotensina 1-7 (Ang1-7), y la angiotensina I (Ang I), que se escinde a angiotensina 1-9 (Ang 1-9), así como a la Apelina, la Prodinorfina, la des-Arg-Bradicinina, y otros (Vickers, C. *et al.*, J. Biol. Chem., 277, 2002, 14838-14843). ECA2 desempeña un papel central dentro del sistema SAR como contrarregulador del eje ECA-Ang II-receptor AT1. ECA2 actúa desplazando el eje proinflamatorio, hipertensivo, proliferativo y vasoconstrictor, que está mediado por la angiotensina II, al eje contrarregulador desencadenado por la escisión de Ang II por ECA2 para generar Ang 1-7 (Danilczyk, U. & Penninger, Circ. Res., 98, 2006, 463-471; Vickers, C. *et al.*, J. Biol. Chem., 277, 2002, 14838-14843) y, en menor medida, la escisión de Ang I por ECA2 para generar Ang 1-9. Se considera que ECA2 es un importante modulador de la homeostasis (Ferrario, C.M., *et al.*, J. Am. Soc. Nephrol., 9, 1998, 1716-1722). La actividad catalítica de ECA2 es aproximadamente 400 veces mayor con Ang II que con Ang I (Vickers, C. *et al.*, J. Biol. Chem., 277, 2002, 14838-14843). También se encuentra en la circulación una forma soluble de ECA2, que carece del dominio transmembrana. Esta forma soluble es más adecuada que la forma unida a la membrana para utilizarse como un compuesto activo en una amplia variedad de estrategias terapéuticas.

Se han desarrollado formas solubles y recombinantes de ECA2 para tratar enfermedades potencialmente mortales, tales como afecciones pulmonares y cardíacas agudas, así como enfermedades fibróticas y oncológicas.

40 La función de ECA2 como contrarregulador de ECA se describió por primera vez en la solicitud de patente internacional, número de publicación WO2004/000367. La solicitud describe tratamientos terapéuticos de diversas enfermedades, como hipertensión, insuficiencia cardíaca congestiva, insuficiencia cardíaca crónica, insuficiencia cardíaca aguda, infarto de miocardio, arteriosclerosis e insuficiencia renal y enfermedad pulmonar, incluido el síndrome de dificultad respiratoria del adulto (SDRA).

La solicitud de patente internacional, número de publicación WO2004/023270 describe la cristalización de ECA2.

45 La solicitud de patente internacional, número de publicación WO2008/151347, y la solicitud de patente estadounidense, número de publicación US2010/310546, describen la glicosilación de ECA2 y los dímeros de ECA2.

Los métodos para determinar la actividad de ECA2 se describen, por ejemplo, en la solicitud de patente internacional, número de publicación WO 2008/046125 A y la solicitud de patente estadounidense, número de publicación US 2010/0261214.

50 La solicitud de patente internacional, número de publicación WO2009/086572 describe el uso de ECA2 en el tratamiento de enfermedades hepáticas, en particular enfermedades inflamatorias del hígado y fibrosis.

La solicitud de patente internacional, número de publicación WO2009/076694 describe terapias inmunológicas con ECA2.

La solicitud de patente internacional, número de publicación WO2009/124330 describe el tratamiento de diversos

tumores con ECA2.

ECA2 está descrita como una metaloproteasa que contiene zinc, también denominada zinc-proteasa. Las actuales formulaciones totalmente activas para uso clínico contienen una proporción equimolar de zinc / proteína. El zinc así está complejoado en el centro activo de la enzima. La formulación del producto farmacológico se complementa generalmente con  $\text{ZnCl}_2$  para estabilizar la actividad enzimática mediante la inhibición de la pérdida de zinc unido a la enzima.

### Descripción breve de la invención

Según una primera realización, se proporciona una población de polipéptidos de la enzima 2 convertidora de angiotensina (ECA2) que tienen niveles reducidos de  $\text{Zn}^{2+}$  en los sitios activos, en donde la relación de  $\text{Zn}^{2+}$ :polipéptidos de ECA2 es menor que 1:1, preferiblemente  $\leq 0,99:1$ ,  $\leq 0,98:1$ ,  $\leq 0,95:1$ ,  $\leq 0,92:1$  o  $\leq 0,90:1$ .

Según un primer aspecto de la invención, se proporciona una población de polipéptidos de ECA2 de la presente invención, en la que los sitios activos están sustancialmente libres de cualquier ion metálico.

Según un segundo aspecto de la invención, se proporciona una población de polipéptidos de ECA2 de la presente invención, en donde los sitios activos están ocupados por un ion metálico de transición, o un ion metálico de post-transición seleccionado de  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Al}$ ,  $\text{Ga}$ ,  $\text{In}$ ,  $\text{Sn}$ ,  $\text{Tl}$ ,  $\text{Pb}$ ,  $\text{Bi}$  y  $\text{Po}$ , preferiblemente  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{2+}$  y  $\text{Sn}^{2+}$ , por ejemplo  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{Al}^{3+}$ .

Según un tercer aspecto de la invención, se proporciona una población de polipéptidos de ECA2 de la presente invención, en donde los sitios activos que no están ocupados por zinc, están ocupados por uno o más iones metálicos de transición o iones metálicos de post-transición seleccionados de  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Al}$ ,  $\text{Ga}$ ,  $\text{In}$ ,  $\text{Sn}$ ,  $\text{Tl}$ ,  $\text{Pb}$ ,  $\text{Bi}$  y  $\text{Po}$ , preferiblemente  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{2+}$  y  $\text{Sn}^{2+}$ , por ejemplo  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{Al}^{3+}$ .

Según una segunda realización, se proporciona el uso de una población de polipéptidos de ECA2 de la presente invención para escindir un sustrato de ECA2 en una solución que comprende un ion metálico.

Según una tercera realización, se proporciona un método para la preparación de una población de polipéptidos de ECA2 de la presente invención, que comprende las etapas de:

- a. Expresar los polipéptidos de ECA2 en un sistema celular;
- b. Aislar los polipéptidos expresados;
- c. Separar algunos o todos los iones metálicos unidos al sitio activo mediante la adición de un agente quelante de metales.

Según una cuarta realización, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una población de polipéptidos de ECA2 de la presente invención y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Según una quinta realización, se proporciona una población de polipéptidos de ECA2 de la presente invención para uso en terapia.

Según una sexta realización, se proporciona una población de polipéptidos de ECA2 de la presente invención para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad seleccionada de hipertensión (incluida la presión arterial alta), insuficiencia cardíaca congestiva, insuficiencia cardíaca crónica, insuficiencia cardíaca aguda, insuficiencia cardíaca contráctil, infarto de miocardio, arteriosclerosis, insuficiencia renal, insuficiencia renal y enfermedad pulmonar, como el síndrome de dificultad respiratoria del adulto (SDRA), lesión pulmonar aguda (LPA), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), hipertensión pulmonar, fibrosis renal, insuficiencia renal crónica, insuficiencia renal aguda, lesión renal aguda y síndrome de disfunción multiorgánica.

Según una séptima realización, se proporciona el uso de una población de polipéptidos de ECA2 de la presente invención en la fabricación de un medicamento para tratamiento o prevención de una enfermedad seleccionada de hipertensión (incluida la presión arterial alta), insuficiencia cardíaca congestiva, insuficiencia cardíaca crónica, insuficiencia cardíaca aguda, insuficiencia cardíaca contráctil, infarto de miocardio, arteriosclerosis, insuficiencia renal, insuficiencia renal y enfermedad pulmonar, tales como el síndrome de dificultad respiratoria del adulto (SDRA), lesión pulmonar aguda (LPA), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), hipertensión pulmonar, fibrosis renal, insuficiencia renal crónica, insuficiencia renal aguda, lesión renal aguda y síndrome de disfunción multiorgánica.

Según una octava realización, se proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad seleccionada de hipertensión (incluida la presión arterial alta), insuficiencia cardíaca congestiva, insuficiencia cardíaca crónica, insuficiencia cardíaca aguda, insuficiencia cardíaca contráctil, infarto de miocardio, arteriosclerosis, insuficiencia renal, insuficiencia renal y enfermedad pulmonar, tales como el síndrome de dificultad respiratoria del adulto (SDRA), lesión pulmonar aguda (LPA), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), hipertensión pulmonar, fibrosis renal, insuficiencia renal crónica, insuficiencia renal aguda, lesión renal aguda y síndrome de disfunción multiorgánica que

comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de una población de polipéptidos de ECA2 de la presente invención.

#### Descripción breve de las figuras

La Figura 1 muestra un análisis SEC-HPLC de ECA2 dializada libre de Zn (curva con un pico principal en el tiempo de retención de 8,4 min), en comparación con un patrón de referencia de peso molecular (curva con múltiples picos).

La Figura 2 muestra la actividad de ECA2 medida por detección de un producto de escisión fluorescente en diferentes formulaciones.

La Figura 3 muestra las unidades de fluorescencia relativa (UFR) medidas representadas por ciclo (1 min) para muestras de rACE2, concentración 1  $\mu$ M de ion metálico e incubación durante 15 min.

La Figura 4 muestra las unidades de fluorescencia relativa (UFR) medidas representadas por ciclo (1 min) para muestras de rACE2, concentración 1  $\mu$ M de ion metálico e incubación durante 80 min.

Figura 5 muestra la secuencia completa de aminoácidos de la ECA2 humana (SEC ID No: 1). Los aminoácidos 1-17 son la secuencia señal, 18-740 forman el dominio extracelular, 741-761 forman el dominio transmembrana y 762-805 forman el dominio citoplasmático.

#### Descripción detallada de la invención

Se ha descubierto que el zinc no es un requisito absoluto para la estructura y actividad de ECA2. Además, el zinc puede ser reemplazado por otros iones metálicos mientras se mantiene la actividad enzimática. Por lo tanto, la presente invención proporciona variantes adicionales de polipéptidos de ECA2, en particular polipéptidos de ECA2 que tienen niveles reducidos de zinc en el sitio activo, o en donde el sitio activo está sustancialmente libre de zinc (o cualquier otro ion metálico), polipéptidos de ECA2 en los que el sitio activo está ocupado por otro ion metálico, distinto del zinc, y una población de polipéptidos de ECA2 que tienen una mezcla de zinc y otro ion metálico en los sitios activos.

"(Polipéptidos de) ECA2 empobrecida en  $Zn^{2+}$ " también mencionados como "(polipéptidos de) ECA2 empobrecida en zinc" o "(polipéptidos de) ECA2 que tienen niveles reducidos de  $Zn^{2+}$  (o zinc) en el sitio activo" son términos que se usan indistintamente en toda la memoria. Tal ECA2 empobrecida en zinc se caracteriza por la falta o la reducción de los niveles de zinc, especialmente un ion  $Zn^{2+}$ , en el sitio de unión a zinc de ECA2. El sitio de unión a zinc se denomina alternativamente "sitio activo" en la presente memoria. Cuando el polipéptido de ECA2 está en forma dimerica, un ejemplo de un dímero empobrecido en zinc es tal que al menos uno de los monómeros de ECA2 dentro del dímero carece de un átomo de zinc en el sitio activo (es decir, en el sitio de unión a zinc) del monómero. El término también se refiere a una población de polipéptidos de ECA2, en donde la estequiometría molar de zinc:ECA2 es menor que 1:1. Un experto en la materia apreciará fácilmente cuando una frase en la presente memoria puede referirse al polipéptido en forma individualizada y cuando dicha frase se refiere necesariamente a una población de polipéptidos.

En una realización, se proporciona un polipéptido de ECA2 empobrecido en zinc que es un polipéptido de ECA2 libre de iones metálicos. Como se emplean en la presente memoria, "(polipéptidos de) ECA2 libres de zinc" y "(polipéptidos de) ECA2 libres de iones metálicos" se usan indistintamente. Tal polipéptido de ECA2 libre de iones metálicos no tiene sustancialmente zinc ni otro ion metálico presente en el sitio activo. En una realización, el polipéptido de ECA2 libre de iones metálicos no tiene niveles detectables de zinc ni otros iones metálicos en el sitio activo.

En otra realización, se proporciona un polipéptido de ECA2 empobrecido en zinc que es un polipéptido de ECA2 sustituido con metal. Como se emplea en la presente memoria, "(polipéptidos de) ECA2 sustituida con metal" se refiere a un polipéptido de ECA2 o una población de polipéptidos de ECA2 en donde el sitio o sitios activos están ocupados por uno o más iones metálicos de transición o iones metálicos de post-transición distintos del ion nativo  $Zn^{2+}$ .

En otra realización, se proporciona un polipéptido de ECA2 empobrecido en zinc que es un polipéptido de ECA2 de metal mixto. Como se emplea en la presente memoria, "(polipéptidos de) ECA2 de metal mixto" se usa para describir una población de polipéptidos de ECA2 en donde una proporción del zinc unido de forma natural en el sitio activo se ha eliminado y reemplazado con otro ion metálico de transición o ion metálico de post-transición. En una población de polipéptidos de ECA2 de metal mixto, por lo tanto, se presentará una cantidad sub-equimolar de zinc a polipéptido en los sitios activos, así como una proporción adicional de iones metálicos de transición o iones metálicos de post-transición en otros sitios activos. Se apreciará claramente que no es posible que un único sitio activo se ocupe por más de un ion metálico en un momento dado, por lo tanto, en un polipéptido de ECA2 de metal mixto, la ocupación del sitio activo se evalúa en toda la población.

"Población" como se usa en la presente memoria se refiere a más de un polipéptido, en donde las características de esa población se toman como promedio. En particular, se usa en la presente memoria para referirse a poblaciones de polipéptidos de ECA2, por ejemplo, que tienen una relación particular de sitios activos vacíos en comparación con sitios activos que están ocupados, por ejemplo, por un ion metálico de transición. Dentro de la población, los

polipéptidos individuales de ECA2 pueden tener únicamente sitios activos ocupados o vacíos, pero en toda la población, se logran las proporciones dadas.

Por "zinc libre" o "ion(es) metálico(s) libre(s)" debe entenderse zinc, u otro ion metálico en consecuencia, que está libre y, por lo tanto, disponible para entrar en el (los) sitio(s) de unión a zinc del polipéptido de ECA2, p. ej. un ion metálico o un ion de zinc que no está ocupado por otros componentes, tales como quelantes, en una preparación o composición.

En la presente solicitud "metal (elemento/ion) pobre" y "metal de post-transición (elemento / ion)" se usan indistintamente. Debe entenderse que este término abarca los siguientes iones metálicos: aluminio (Al), galio (Ga), indio (In), estaño (Sn), talio (Tl), plomo (Pb), bismuto (Bi) y polonio. (Po). Preferiblemente, el metal de post-transición se selecciona de aluminio y estaño, p. ej.  $Al^{2+}$ ,  $Al^{3+}$  y  $Sn^{2+}$ . El término se destina a cubrir los metales de post-transición en todos los estados posibles de oxidación con carga positiva, preferiblemente iones en el estado de oxidación  $2+$  o  $3+$ , pero más particularmente en el estado de oxidación  $2+$ .

"Metal (elemento/ion) de transición" se refiere a los elementos de los grupos 3 a 12, y en los períodos 4, 5, 6 y 7 de la tabla periódica, incluidos, pero no limitados a, cromo (Cr), cobalto (Co), níquel (Ni), manganeso (Mn), cobre (Cu), hierro (Fe), zinc (Zn), molibdeno (Mo), rutenio (Ru), rodio (Rh), paladio (Pd), plata (Ag) y cadmio (Cd). El término pretende cubrir los metales de transición en todos los estados posibles de oxidación con carga positiva, preferiblemente iones en el estado de oxidación  $2+$  o  $3+$ . En una realización, el elemento de metal de transición es un elemento del período 4 o 5 de los grupos 3 a 12 de la tabla periódica. En otra realización, el metal de transición se selecciona de  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Fe^{2+}$  y  $Pb^{2+}$ . En una realización adicional, el metal de transición se selecciona de  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  y  $Pb^{2+}$ . En una realización adicional, el ion metálico se selecciona de  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$  y  $Mn^{2+}$ . En una realización adicional, el metal de transición se selecciona de  $Co^{2+}$  y  $Ni^{2+}$ . En otra realización, el metal de transición se selecciona de  $Fe^{3+}$  y  $Mn^{2+}$ .

El polipéptido de ECA2 humano (entrada en la base de datos de secuencia UniProt: Q9BYF1) comprende un péptido señal (aminoácidos 1 a 17; subrayado en la SEQ ID N° 1), un dominio extracelular (aminoácidos 18 a 740), un dominio transmembrana helicoidal (aminoácidos 741 a 761) y un dominio citoplasmático (aminoácidos 762 a 805).

La región de unión a zinc de ECA2 contiene un motivo de unión a zinc; HEXXH, que corresponde a los aminoácidos 374 a 378 (en negrita) de la secuencia completa de ECA2 de 805 aminoácidos de longitud según la SEQ ID N° 1. La estructura cristalizada de ECA2 está publicada para la enzima nativa (entrada de base de datos PDB: 1R42), y como enzima unida a inhibidor (entrada en la base de datos PDB: 1R4L), que ilustra el ion zinc en el sitio de unión a  $Zn^{2+}$ .

Según la presente invención, el polipéptido de ECA2 puede ser un polipéptido de ECA2 de longitud completa o un fragmento del mismo. En una realización, el fragmento comprende los aminoácidos 374 a 378 de SEQ ID N°: 1. En una realización, el polipéptido de ECA2 comprende los aminoácidos 1 a 740 de SEQ ID N°: 1. En otra realización, el polipéptido de ECA2 es ECA2 soluble que carece de un dominio transmembrana y/o que carece del péptido señal N-terminal. En otra realización de la invención, el polipéptido de ECA2 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de ECA2. En otra realización, el polipéptido de ECA2 comprende o consiste en los aminoácidos 18 a 740, o de los aminoácidos 18 a 615 de la SEQ ID N°: 1.

Los polipéptidos de ECA2 o los fragmentos de polipéptidos de ECA2 incluyen ECA2 humano o fragmentos del mismo o cualquier ortólogo homólogo de los mismos, con la misma o similar actividad cualitativa nativa. Por lo tanto, la presente invención también abarca ECA2 originaria de ratones, ratas, hámsteres, cerdos, primates o vacas. En una realización, el polipéptido de ECA2 es de origen humano. ECA2 es una enzima universal en todos los mamíferos que tiene el mismo sustrato Ang II. Para usos terapéuticos, el polipéptido de ECA2 también se puede usar en organismos extraños. Así, por ejemplo, según la presente invención seres humanos, ratones, ratas, hámsteres, cerdos, primates o vacas pueden tratarse con ECA2, independientemente de la fuente de ECA2. Preferiblemente, el polipéptido de ECA2 terapéutico se origina en el mismo organismo que se va a tratar, para minimizar el riesgo de una respuesta inmunogénica, por ejemplo, un polipéptido de ECA2 de origen humano para el tratamiento de un paciente humano.

Los polipéptidos de ECA2 de la presente invención pueden estar glicosilados opcionalmente. El dominio soluble de ECA2 humano nativo tiene siete sitios de N-glicosilación. En una realización, 3, 4, 5, 6 o 7 de las posibles posiciones de N-glicosilación de los polipéptidos de ECA2 según la invención, que corresponden a Asn53, Asn90, Asn103, Asn322, Asn432, Asn546, Asn690 de SEQ ID N° 1, están glicosilados y/o el polipéptido de ECA2 tiene un contenido de azúcar superior al 10% (porcentaje en peso de polipéptidos de ECA2 total) o 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, en particular mayor que 20%, 21%, 22%, 23%, 24% o 25% en peso.

Los polipéptidos de ECA2 pueden estar en forma monomérica o dimérica. Cuando está presente como un dímero, uno o dos iones zinc pueden estar agotados, ausentes y/o sustituidos con otro ion metálico.

Los métodos para producir polipéptidos de ECA2 se describen en la solicitud de patente internacional, número de publicación WO2008/151347, véase el ejemplo 1 y las páginas 12, segundo párrafo completo a la página 13, final del segundo párrafo completo.

Se apreciará que, según la presente invención, los polipéptidos de ECA2 empobrecidos en zinc, los polipéptidos de

ECA2 libres de iones metálicos, los polipéptidos de ECA2 sustituidos con metales y los polipéptidos de ECA2 metálicos mixtos pueden comprender cualquiera de los polipéptidos o fragmentos de ECA2 descritos anteriormente, en particular en términos de secuencias de aminoácidos, patrones de glicosilación, origen y forma dimérica/monomérica.

En una realización, el polipéptido de ECA2 es un polipéptido de ECA2 dimérico humano que comprende los aminoácidos 18 a 740 de la SEQ ID N°: 1, está glicosilado en una o más posiciones seleccionadas independientemente del grupo que comprende Asn53, Asn90, Asn103, Asn322, Asn322, Asn546, Asn690 de SEQ ID N°: 1, y tiene un contenido de azúcar superior al 20% en peso.

Según un primer aspecto de la invención, se proporciona un polipéptido de ECA2 que tiene niveles empobrecidos de  $Zn^{2+}$  en el sitio activo. En una realización, la relación molar de  $Zn^{2+}$ :ECA2 es  $\leq 1:1$ , por ejemplo  $\leq 0,99:1$ ,  $\leq 0,98:1$ ,  $\leq 0,95:1$ ,  $\leq 0,92:1$  o  $\leq 0,90:1$ .

Según un segundo aspecto de la invención, las moléculas de ECA2 empobrecidas en zinc están sustancialmente libres de zinc ( $Zn^{2+}$ ). Sin embargo, pequeñas impurezas pueden permanecer y están abarcadas por la presente invención. En otra realización, la relación molar de  $Zn^{2+}$ :ECA2 es  $\leq 0,50:1$ ,  $\leq 0,45:1$ ,  $\leq 0,40:1$ ,  $\leq 0,35:1$ ,  $\leq 0,30:1$ ,  $\leq 0,25:1$ ,  $\leq 0,20:1$ ,  $\leq 0,15:1$ ,  $\leq 0,10:1$ ,  $\leq 0,05:1$ ,  $\leq 0,02:1$ , o  $\leq 0,01:1$ . La relación  $Zn^{2+}$ :ECA2 se refiere al zinc que se encuentra en el sitio de unión a zinc de ECA2. Esto puede medirse, por ejemplo, mediante purificación nativa del polipéptido o mediante diálisis, y luego someter el material sólido resultante a análisis ICP-MS. En un método, la ECA2 empobrecida en zinc se puede capturar mediante la unión a perlas recubiertas con anticuerpo anti-ECA2, luego eluir con un eluyente libre de zinc y luego someter a un análisis ICP-MS. Usando estos métodos, se puede determinar que la relación resultante de zinc a polipéptido de ECA2 se debe a la formación de complejos del zinc al polipéptido en el sitio activo.

Con el fin de evitar que el  $Zn^{2+}$  migre al sitio de unión, una preparación o composición que comprende una población de polipéptidos de ECA2 empobrecidos en zinc de la invención también comprende poco (según las relaciones anteriores) o nada de zinc libre. Los niveles de zinc libre (así como el zinc unido al sitio activo de ECA2) pueden reducirse en una preparación o composición particular mediante la adición de quelantes como EDTA, EGTA, 8-hidroxiquinolina, fenantrolina y/o dimercaprol (también llamado anti-lewisita británica o BAL). El exceso particular de agente quelante requerido es determinado fácilmente por un experto en la técnica, y dependerá, entre otras cosas, de la naturaleza del agente quelante empleado, el valor de pH y el tipo de ion metálico que se va a separar. Para la separación del zinc nativo del sitio activo, es apropiado un exceso en la región de 1000 veces de EDTA (consúltese el Ejemplo 2 a continuación).

Por lo tanto, en una preparación o composición que comprende una población de polipéptidos de ECA2 empobrecidos en zinc, las relaciones  $Zn^{2+}$ :ECA2 anteriores se refieren a la cantidad de zinc en el sitio de unión de ECA2. En una realización adicional, la cantidad de iones de zinc en la preparación se reduce mediante la adición de agentes quelantes de metales. Las cantidades de dichos quelantes pueden ser como se describen a continuación.

La presente invención también proporciona métodos para producir polipéptidos de ECA2 empobrecidos en  $Zn^{2+}$ , que comprenden las etapas de expresar el(los) polipéptido(s) de ECA2 en una célula, aislar el(los) polipéptido(s) de ECA2 y eliminar  $Zn^{2+}$  de dicho(s) polipéptido(s) de ECA2, preferiblemente con un agente quelante de metales. El(los) polipéptido(s) de ECA2 pueden expresarse en presencia o ausencia de zinc. Sin embargo, en la mayoría de los sistemas celulares, los iones zinc pueden estar presentes y, por lo tanto, los polipéptidos de ECA2 expresados generalmente contienen zinc en el sitio activo. Este zinc unido puede eliminarse posteriormente, p.ej. mediante el uso de un agente quelante de metales, como EDTA, EGTA, 8-hidroxiquinolina, fenantrolina y/o dimercaprol, o mediante el uso de cromatografía de intercambio iónico. En otra realización, el agente quelante de metales se usa en exceso, p.ej. en concentraciones de al menos 2 veces, 5 veces, 10 veces, 25 veces, 50 veces, 75 veces, 100 veces, 200 veces, 300 veces, 400 veces, 500 veces, 600 veces, 700 veces, 800 veces, 900 veces, 1000 veces la concentración total de zinc en la preparación o composición, p.ej., la concentración de zinc en la solución y en el sitio activo.

Según un tercer aspecto de la presente invención, el sitio o los sitios activos de los polipéptidos de ECA2 están sustancialmente libres de cualquier ion metálico, incluido el zinc. Sin embargo, pequeñas impurezas pueden permanecer y están abarcadas por la presente invención. En otra realización, la relación molar de iones metálicos:ECA2 es  $\leq 0,50:1$ ,  $\leq 0,45:1$ ,  $\leq 0,40:1$ ,  $\leq 0,35:1$ ,  $\leq 0,30:1$ ,  $\leq 0,25:1$ ,  $\leq 0,20:1$ ,  $\leq 0,15:1$ ,  $\leq 0,10:1$ ,  $\leq 0,05:1$ ,  $\leq 0,02:1$ , o  $\leq 0,01:1$ . La relación de ion metálico:ECA2 se refiere a los iones metálicos que se encuentran en el sitio activo de ECA2. Esto puede medirse, por ejemplo, mediante purificación nativa del polipéptido o mediante diálisis, y luego someter el material sólido resultante a análisis ICP-MS. En un método, el ECA2 libre de iones metálicos se puede capturar mediante la unión a perlas recubiertas con anticuerpo anti-ECA2, luego se eluye con un eluyente libre de iones metálicos y luego se somete a un análisis ICP-MS. Usando estos métodos, se puede determinar que la proporción resultante de iones metálicos a polipéptido de ECA2 se debe a la formación de complejos de los iones metálicos al polipéptido en el sitio activo.

Los polipéptidos de ECA2 libres de iones metálicos son enzimáticamente inactivos, pero estructuralmente estables. No se agregan ni se desintegran y pueden reconstituirse en ECA2 activa proporcionando iones metálicos adecuados. La alta estabilidad de los polipéptidos puede tener beneficios durante el almacenamiento con una vida útil prolongada, incluso durante condiciones de almacenamiento deficientes, tales como los periodos de enfriamiento interrumpidos (por ejemplo, durante el tránsito). Sin limitarse a la teoría, puede ser que la estabilidad a largo plazo pueda mejorarse

debido a la falta de actividad, lo que puede prevenir la autoproteólisis y/ o puede reducir la oxidación del sitio activo mediada por zinc al actuar como un ácido de Lewis. Además, con los polipéptidos de ECA2 según la presente invención, es posible regular o ajustar la actividad o biodisponibilidad de ECA2 por agotamiento o sustitución de metales.

5 Los polipéptidos de ECA2 empobrecidos en zinc, libres de zinc y libres de iones metálicos de la presente invención se pueden usar como peptidasas para escindir un sustrato de ECA2 en una solución que comprende un ion metálico. Alternativamente, se proporciona un método para escindir un sustrato de ECA2 que comprende poner en contacto dicho sustrato de ECA2 con un polipéptido(s) de ECA2 empobrecido en zinc, libre de zinc y/o libre de iones metálicos en una solución que comprende un ion metálico. En la solución que comprende un ion metálico, los polipéptidos de ECA2 empobrecidos en zinc, libres de zinc y/o libres de iones metálicos absorberán el ion metálico libre, lo quelarán en el sitio activo y, por lo tanto, se reconstituirán en un polipéptido de ECA2 sustituido con metales, como un ECA2 reconstituido con zinc, y recuperar su actividad catalítica.

En tales soluciones que comprenden metales, el ion metálico se selecciona de un elemento metálico de transición o un elemento metálico de post-transición de la tabla periódica de elementos. El ion metálico está, en una realización, cargado positivamente, en particular  $2+$  o  $3+$ . Cualquier metal de este tipo puede ocupar el sitio de unión a zinc de ECA2 para retener la actividad de ECA2. El zinc también puede ser reemplazado por otros iones metálicos para restablecer la actividad del ECA2. Los elementos de transición de la tabla periódica de elementos son de los grupos 3 a 12 en los periodos 4, 5, 6 y 7, incluidos Cr, Co, Ni, Mn, Cu, Fe, Zn, Mo, Ru, Rh, Pd, Ag y Cd, por ejemplo,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Pb}^{2+}$ . En otras realizaciones, el elemento de transición es un elemento del periodo 4 o 5. En una realización adicional, el metal de transición se selecciona de  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Pb}^{2+}$ . En una realización adicional, el ion metálico se selecciona de  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$ . En una realización adicional, el metal de transición se selecciona de  $\text{Co}^{2+}$  y  $\text{Ni}^{2+}$ . En otra realización, el metal de transición se selecciona de  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$ . Los metales posteriores a los de transición, también conocidos como metales pobres, se seleccionan de Al, Ga, In, Sn, Tl, Pb, Bi y Po, por ejemplo.  $\text{Al}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  y  $\text{Sn}^{2+}$ . En una realización, el metal de post-transición se selecciona de aluminio y estaño.

Los ejemplos de sustratos de ECA2 incluyen, entre otros, Apelina, Pro-Dinorfina, Des-Arg-Bradiquinina, Bradiquinina, angiotensina I (Ang I, que se escinde en angiotensina 1-9 [Ang1-9]), angiotensina II (Ang II, que se escinde a angiotensina 1-7 [Ang1-7]) y otros. Además, existe una serie de sustratos artificiales, como los descritos en US2010/0261214 (ver párrafo 32, en página 3), p.ej. Mca-Ala-Pro-Lys(Dnp)-OH (Mca: (7-metoxi cumarina-4-il)acetilo). Los sustratos artificiales pueden estar marcados, p. ej. comprender tanto un fluoróforo como un inhibidor, de manera que al dividirse se genera una señal óptica. Los métodos y usos de polipéptidos de ECA2 exentos de zinc y/o de iones metálicos para escindir los sustratos de ECA2 pueden comprender además la etapa de detección de productos de escisión.

Los métodos y usos de polipéptidos de ECA2 exentos de zinc, libres de zinc y/o de iones metálicos para escindir los sustratos de ECA2 se pueden realizar in vivo, por ejemplo, para usos terapéuticos o para lograr un cierto efecto fisiológico en un sujeto. Alternativamente, los métodos y usos pueden usarse in vitro para escindir un sustrato de ECA2 en una muestra, por ejemplo para detectar AngI o AngII escindiendo dicho AngI o AngII con los polipéptidos de ECA2 de la invención. Opcionalmente, se detectan los productos de escisión. En una realización, la muestra es una muestra de plasma o suero. Los polipéptidos de ECA2 libres de iones metálicos en plasma humano muestran la misma actividad enzimática que el ECA2 saturado de zinc o que contiene zinc (ver Ejemplo 3). Se cree que hay cantidades suficientes de zinc libre en el plasma humano para ser recogido en el sitio activo y reconstituir la actividad enzimática.

Según un cuarto aspecto de la presente invención, se proporciona un polipéptido de ECA2 sustituido con iones metálicos o una población de polipéptidos de ECA2 sustituidos con iones metálicos, en el que el sitio activo está ocupado por uno o más iones de metales de transición, o iones de metales de post-transición, con la condición de que el sitio activo no esté ocupado por  $\text{Zn}^{2+}$ . El ion metálico está, en una realización, cargado positivamente, en particular  $2+$  o  $3+$ . En otra realización, un elemento de transición de la tabla periódica de elementos es de los grupos 3 a 12 en los periodos 4, 5, 6 y 7, incluyendo Cr, Co, Ni, Mn, Cu, Fe, Mo, Ru, Rh, Pd, Ag y Cd, por ejemplo,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Pb}^{2+}$ . En otras realizaciones, el elemento de transición es un elemento del periodo 4 o 5. En una realización adicional, el metal de transición se selecciona de  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Pb}^{2+}$ . En una realización adicional, el ion metálico se selecciona de  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$ . En una realización adicional, el metal de transición se selecciona de  $\text{Co}^{2+}$  y  $\text{Ni}^{2+}$ . En otra realización, el metal de transición se selecciona de  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$ . Los metales posteriores a la transición, también conocidos como metales pobres, se seleccionan de Al, Ga, In, Sn, Tl, Pb, Bi y Po, por ejemplo.  $\text{Al}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  y  $\text{Sn}^{2+}$ . En una realización, el metal de post-transición se selecciona de aluminio y estaño. Para evitar dudas, los polipéptidos de ECA2 sustituidos con iones metálicos pueden comprender cualquier combinación de iones metálicos de los metales de transición y metales de post-transición como se describe anteriormente en la presente memoria.

El ion zinc nativo unido al sitio activo de ECA2 puede sustituirse por otros iones metálicos mientras retiene la actividad catalítica. El ion metálico se selecciona de un ion de metal de transición o un ion de metal de post-transición como se define aquí anteriormente. Los polipéptidos de ECA2 sustituidos con metal pueden comprender cualquiera de estos metales o combinaciones de los mismos.

Los polipéptidos de ECA2 sustituidos con metal pueden proporcionarse en preparaciones o composiciones en las que la enzima ECA2 está sustancialmente libre de zinc. Sin embargo, pueden quedar pequeñas impurezas de zinc, y se

considera que están dentro del alcance de la presente invención.

Por lo tanto, en una realización, el zinc nativo se reemplaza sustancialmente por completo por otro metal de transición o ion de metal de post-transición como se definió anteriormente. En otra realización, la relación molar de dicho ion metálico:ECA2 es  $\geq 0,10:1$ ,  $\geq 0,15:1$ ,  $\geq 0,20:1$ ,  $\geq 0,25:1$ ,  $\geq 0,30:1$ ,  $\geq 0,35:1$ ,  $\geq 0,40:1$ ,  $\geq 0,45:1$ ,  $\geq 0,50:1$ ,  $\geq 0,55:1$ ,  $\geq 0,60:1$ ,  $\geq 0,65:1$ ,  $\geq 0,75:1$ ,  $\geq 0,80:1$ ,  $\geq 0,85:1$ ,  $\geq 0,90:1$ ,  $\geq 0,92:1$ ,  $\geq 0,95:1$ ,  $\geq 0,98:1$ ,  $\geq 0,99:1$  o aproximadamente 1,00:1. En otra realización más, cada polipéptido de ECA2 individual contiene un ion metálico de reemplazo. Una preparación o composición de polipéptidos de ECA2 sustituidos con metal puede comprender iones metálicos en exceso de cualquier sustituto de metal o combinaciones de los mismos. Una preparación o composición puede comprender además iones metálicos adicionales en concentraciones de al menos 1,1 veces, 1,3 veces, 1,5 veces, 1,8 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 3,5 veces, 4 veces, 4,5 veces, 5 veces, 7,5 veces 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces o incluso 100 veces la concentración de polipéptidos de ECA2 sustituidos con metal.

En un cuarto aspecto de la presente invención, se proporciona una población de polipéptidos de ECA2 metálicos mixtos cuyos polipéptidos comprenden una proporción de  $Zn^{2+}$ , y una proporción de uno o más iones de metales de transición o iones de metales de post-transición (que pueden estar cargados positivamente, en particular  $2+$  o  $3+$ ), en el sitio activo. En una realización, la población de polipéptidos de ECA2 metálicos mixtos comprende  $Zn^{2+}$  y al menos un ion metálico seleccionado de entre los elementos de transición seleccionados de Cr, Co, Ni, Mn, Cu, Fe, Mo, Ru, Rh, Pd, Ag y Cd. por ejemplo,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Fe^{2+}$  y  $Pb^{2+}$ . En otras realizaciones, el elemento de transición es un elemento del periodo 4 o 5. En una realización adicional, el metal de transición se selecciona de  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  y  $Pb^{2+}$ . En una realización adicional, el ion metálico se selecciona de  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$  y  $Mn^{2+}$ . En una realización adicional, el metal de transición se selecciona de  $Co^{2+}$  y  $Ni^{2+}$ . En otra realización, el metal de transición se selecciona de  $Fe^{3+}$  y  $Mn^{2+}$ . Los metales posteriores a la transición se seleccionan de Al, Ga, In, Sn, Tl, Pb, Bi y Po, por ejemplo,  $Al^{2+}$ ,  $Al^{3+}$  y  $Sn^{2+}$ . En una realización, el metal de post-transición se selecciona de aluminio y estaño. Para evitar dudas, los polipéptidos de ECA2 de metales mixtos pueden comprender cualquier combinación de iones metálicos del metal de transición y el metal de post-transición, con o sin zinc como se describe anteriormente en la presente memoria.

Los polipéptidos de ECA2 de metales mixtos se preparan a partir de un polipéptido de ECA2 empobrecido en zinc como se describe anteriormente en la presente memoria. Por lo tanto, en una realización, la relación molar de  $Zn^{2+}$ :ECA2 en el polipéptido de ECA2 sustituido con metal es  $\leq 0,50:1$ ,  $\leq 0,45:1$ ,  $\leq 0,40:1$ ,  $\leq 0,35:1$ ,  $\leq 0,30:1$ ,  $\leq 0,25:1$ ,  $\leq 0,20:1$ ,  $\leq 0,15:1$ ,  $\leq 0,10:1$ ,  $\leq 0,05:1$ ,  $\leq 0,02:1$ , o  $\leq 0,01:1$ . La relación  $Zn^{2+}$ :ECA2 se refiere al zinc que se encuentra en el sitio de unión de zinc de ECA2. Esto puede medirse como se describe anteriormente en la presente memoria.

Con el fin de evitar que  $Zn^{2+}$  migre al sitio de unión, una preparación o composición que comprende una población de polipéptidos de ECA2 empobrecidos en zinc de la invención también comprende poco (según las relaciones anteriores) o ningún zinc libre. Los niveles de zinc libre (así como el zinc unido al sitio activo de ECA2) pueden reducirse en una preparación o composición particular mediante la adición de quelantes también como se describió anteriormente.

La presente invención proporciona además un método para producir un polipéptido de ECA2 sustituido con metal o un polipéptido de ECA2 de metal mixto, que comprende las etapas de expresar un polipéptido de ECA2 en una célula, aislar dicho polipéptido de ECA2 y eliminar, o eliminar parcialmente,  $Zn^{2+}$  de dicho polipéptido de ECA2, preferiblemente con un agente quelante de metales, para obtener un polipéptido de ECA2 libre de zinc o empobrecido de zinc, y posteriormente poner en contacto dicho polipéptido con iones de metales de transición o iones de metales de post-transición. Los polipéptidos de ECA2 pueden expresarse en presencia o ausencia de zinc. Sin embargo, en la mayoría de los sistemas celulares, los iones zinc pueden estar presentes y, por lo tanto, la proteína de ECA2 expresada generalmente contiene zinc en el sitio activo. Este zinc unido puede eliminarse posteriormente, p.ej. mediante el uso de un agente quelante de metales, como EDTA, EGTA, 8-hidroxiquinolina, fenantrolina y/o dimercaprol, o mediante el uso de cromatografía de intercambio iónico. En otra realización, el agente quelante de metales se usa en exceso, p.ej. en concentraciones de al menos 2 veces, 5 veces, 10 veces, 25 veces, 50 veces, 75 veces, 100 veces, 200 veces, 300 veces, 400 veces, 500 veces, 600 veces, 700 veces, 800 veces, 900 veces, 1000 veces la concentración total de zinc en la preparación o composición, es decir, la concentración de zinc en la solución y en el sitio activo. Después de la eliminación total o parcial de zinc (y opcionalmente del agente quelante de metales), un ion de metal de transición o un ion de metal de post-transición se pone en contacto con el polipéptido de ECA2 empobrecido de zinc o libre de zinc, que se absorbe fácilmente en el sitio de unión de zinc de la enzima.

La actividad enzimática de los polipéptidos de ECA2 de metales mixtos y sustituidos con metales es diferente para cada uno de los sustitutos metálicos. Algunos iones metálicos, a bajas concentraciones, muestran actividades idénticas en comparación con los polipéptidos de ECA2 nativos que contienen zinc, pero se muestra que tienen una actividad catalítica reducida en concentraciones más altas. Otros iones metálicos logran una actividad catalítica similar a los polipéptidos de ECA2 nativos que contienen zinc solo en concentraciones más altas (ver Ejemplo 4). Por lo tanto, la actividad catalítica específica de un polipéptido de ECA2 sustituido por metal o metal mixto puede ajustarse mediante la elección entre diferentes iones metálicos y su concentración dada. Está dentro de la capacidad de un experto en la técnica seleccionar y seleccionar iones metálicos y concentraciones adecuados para cualquier aplicación particular.

Por lo tanto, también se proporciona el uso de un ion de metal de transición o un ion de metal de post-transición (como se define anteriormente) para modular la actividad catalítica de una población de polipéptido de ECA2, que comprende sustituir una proporción de iones zinc por dicho ion metálico. Además, se proporciona un método para modular la



actividad catalítica de una población de polipéptido de ECA2, que comprende sustituir una proporción de iones zinc por un ion de metal de transición o un ion de metal de post-transición (como se define anteriormente). Se proporciona además el uso de un polipéptido de ECA2 sustituido con metal o una población de polipéptidos de ECA2 de metal mixto para escindir un sustrato de ECA2 en una solución. También se proporciona un método para escindir un sustrato de ECA2 que comprende poner en contacto dicho sustrato de ECA2 con un ECA2 sustituido con metal o una población de polipéptido(s) de ECA2 de metal mixto en una solución.

Los ejemplos de sustratos de ECA2 incluyen, entre otros, Apelina, Pro-Dinorfina, Des-Arg-Bradiquinina, Bradiquinina, angiotensina I (Ang I, que se escinde en angiotensina 1-9 [Ang1-9]), angiotensina II (Ang II, que se escinde a angiotensina 1-7 [Ang1-7]) y otros. Además, existe una serie de sustratos artificiales, como los descritos en US2010/0261214 (vea el párrafo [32], en la página 3), por ej. Mca-Ala-Pro-Lys (Dnp) -OH (Mca: (7-metoxi cumarina-4-il) acetilo). Los sustratos artificiales pueden estar marcados, p. ej. comprende tanto un fluoróforo como un extintor, de manera que al dividirse se genera una señal óptica. Los métodos y usos de polipéptidos de ECA2 exentos de zinc y/o de iones metálicos para escindir los sustratos de ECA2 pueden comprender además la etapa de detección de productos de escisión.

Los métodos y usos de polipéptidos ECA2 empobrecidos en zinc, libres de zinc y/o de iones metálicos para escindir los sustratos de ECA2 se pueden realizar in vivo, por ejemplo, para usos terapéuticos o para lograr un cierto efecto fisiológico en un sujeto. Alternativamente, los métodos y usos pueden usarse in vitro para escindir un sustrato de ECA2 en una muestra, por ejemplo para detectar AngI o AngII escindiendo dicho AngI o AngII con los polipéptidos de ECA2 de la invención. Opcionalmente, se detectan los productos de escisión. En una realización, la muestra es una muestra de plasma o suero.

En un quinto aspecto de la presente invención, los polipéptidos de ECA2 empobrecidos en zinc, los polipéptidos de ECA2 libres de zinc, los polipéptidos de ECA2 sustituidos con metal y los polipéptidos de ECA2 metálicos mixtos pueden proporcionarse en forma de una composición farmacéutica. La siguiente descripción de composiciones, usos médicos y métodos de tratamiento son aplicables a cada uno de los polipéptidos de ECA2 empobrecidos en zinc, polipéptidos de ECA2 libres de iones metálicos, polipéptidos de ECA2 sustituidos con metales y polipéptidos de ECA2 de metales mixtos, que en lo sucesivo se denominarán "polipéptido(s) de ECA2 de la invención".

De este modo se proporciona una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de ECA2 de la invención y un vehículo o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Dichas composiciones farmacéuticas pueden comprender además sales farmacéuticamente aceptables (y sales de los polipéptidos de ECA2 de la invención) y opcionalmente tampones adicionales, agentes de ajuste de tonicidad, vehículos farmacéuticamente aceptables y/o estabilizantes. Los vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables se utilizan para mejorar la tolerancia de la composición y permitir una mejor solubilidad y una mejor biodisponibilidad de los ingredientes activos. Los ejemplos incluyen emulsionantes, espesantes, componentes redox, almidón, soluciones alcohólicas, polietilenglicol o lípidos. La elección de vehículos o diluyentes farmacéuticos adecuados depende en gran medida de cómo se administre la composición. Los portadores o diluyentes líquidos o sólidos pueden usarse para administración oral; mientras que las composiciones líquidas son necesarias para las inyecciones.

La composición farmacéutica según la invención puede comprender además tampones o agentes de ajuste de tonicidad. El pH de la composición puede ajustarse para ajustarse al pH fisiológico por medio de tampones, y las fluctuaciones en el pH también pueden ser amortiguadas. Los tampones incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, un tampón fosfato o un tampón MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico). En una realización, el pH de la composición farmacéutica está entre 4 y 10, tal como entre 5 y 9.5, tal como entre 6 y 9. Los agentes de ajuste de tonicidad se usan para ajustar la osmolaridad de la composición y pueden contener sustancias iónicas, como sales inorgánicas, p. ej. NaCl, o sustancias no iónicas, como glicerol o carbohidratos.

La composición farmacéutica según la invención se prepara adecuadamente para administración sistémica, tópica, oral o intranasal. Estos modos de administración de la composición farmacéutica permiten una absorción rápida y sin complicaciones de la sustancia activa. Por ejemplo, para la administración oral, los medicamentos sólidos y/o líquidos pueden administrarse directamente o, alternativamente, pueden disolverse y/o diluirse antes de la administración. En una realización, las composiciones farmacéuticas son líquidas, en particular composiciones acuosas.

La composición farmacéutica según la invención puede prepararse adecuadamente para administración intravenosa, intraarterial, intramuscular, intravascular, intraperitoneal o subcutánea. Por ejemplo, pueden usarse inyecciones o transfusiones. La administración directamente en el torrente sanguíneo tiene la ventaja de que la(s) sustancia(s) activa(s) de la composición se distribuyen por todo el cuerpo para la terapia sistémica y alcanzan rápidamente el(los) tejido(s) objetivo. En una realización, la composición farmacéutica se prepara para administración intravenosa, y puede estar en forma líquida.

Los polipéptidos de ECA2 de la invención se pueden usar en el tratamiento de diversas enfermedades como se ha precedido en la técnica para polipéptidos de ECA2 que comprenden zinc.

Según un sexto aspecto de la presente invención, se proporciona un polipéptido de ECA2, o población de polipéptidos de ECA2 de la invención para uso en terapia, tal como para el tratamiento de diversas enfermedades y afecciones.

También se proporcionan métodos de tratamiento de diversas enfermedades y afecciones, que comprenden administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de un polipéptido de ECA2, o población de polipéptidos de ECA2 de la invención. La invención proporciona además el uso de un polipéptido de ECA2, o población de polipéptidos de ECA2 de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de diversas enfermedades y afecciones. Las diversas enfermedades y afecciones se describirán con más detalle a continuación.

Los polipéptidos de ECA2, o las poblaciones de polipéptidos de ECA2 de la invención se pueden usar para tratar o prevenir la hipertensión (incluida la presión arterial alta), insuficiencia cardíaca congestiva, insuficiencia cardíaca crónica, insuficiencia cardíaca aguda, insuficiencia cardíaca contráctil, infarto de miocardio, arteriosclerosis, enfermedad renal, insuficiencia renal y enfermedad pulmonar, como el síndrome de dificultad respiratoria del adulto (SDRA), lesión pulmonar aguda (LPA), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), hipertensión pulmonar, fibrosis renal, insuficiencia renal crónica, insuficiencia renal aguda, insuficiencia renal aguda y síndrome de disfunción multiorgánica (por ejemplo, como se describe en el documento WO2004/000367, vea la página 7, línea 23 a página 8, línea 3 y página 21, línea 3 a línea 26). Los polipéptidos de ECA2, o poblaciones de polipéptidos de ECA2 de la invención se pueden usar para disminuir la presión sanguínea. Preferiblemente, el tratamiento es del corazón o riñón o pulmón o vasos sanguíneos. La invención proporciona el tratamiento de la enfermedad cardíaca, enfermedad pulmonar y enfermedad renal, hipertensión y síndrome de disfunción multiorgánica mediante la administración de los polipéptidos de ECA2, o poblaciones de polipéptidos de ECA2 de la invención. Las enfermedades pulmonares incluyen, entre otras, ARDS, ALI, COPD, neumonía, asma, bronquitis crónica, enfisema pulmonar, fibrosis quística, enfermedad pulmonar intersticial, hipertensión pulmonar primaria, embolia pulmonar, sarcoidosis pulmonar, tuberculosis, cáncer de pulmón, aterosclerosis, enfermedad renal poliquística (PKD), edema pulmonar y, opcionalmente, hipertensión pulmonar. Las enfermedades renales incluyen, entre otras, fibrosis renal, insuficiencia renal crónica, insuficiencia renal aguda y lesión renal aguda.

La presente invención se refiere al tratamiento terapéutico o la prevención de una inflamación como se describe en el documento WO2009/076694, ver página 4 y primer párrafo de la página 5. La inflamación es preferiblemente una inflamación local de un tejido u órgano y/o una inflamación sistémica. Basado en el mecanismo general, es posible tratar inflamaciones tanto crónicas como agudas. En particular, la inflamación puede incluir, pero no se limita a, reumatismo, sepsis, osteoartritis, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, esclerodermia o enfermedad mixta del tejido conectivo. Estas afecciones pueden ser causadas por daños celulares mecánicos o químicos o daños en el tejido o heridas, infecciones, en particular patógenos como virus, bacterias u hongos, por implantes que incluyen implantes de órganos y medicamentos. En una realización, la inflamación es causada por una infección.

La inflamación también puede comprender una enfermedad autoinmune. La enfermedad puede ser, por ejemplo, una enfermedad de membrana basal antiglomerular, enfermedades autoinmunes del sistema nervioso, lupus eritematoso sistémico (LES), enfermedad de Addison, un síndrome antifosfolípido, una glomerulonefritis IgA, un síndrome de Goodpasture, un síndrome miasténico de Lambert-Eaton, púrpura idiopática, una tiroiditis autoinmune, una artritis reumatoide, una diabetes mellitus dependiente de insulina, un pénfigo, una anemia hemolítica autoinmune, una dermatitis herpetiforme de Durhing, una glomerulonefritis membranosa, una enfermedad de Graves, una oftalmia simpática, poliendocrinopatía autoinmune, esclerosis múltiple y/o enfermedad de Reiter.

La presente invención se refiere al tratamiento de la fibrosis, como p. ej. descrito en WO2009/086572 página 3, cuarto párrafo a página 6, primer párrafo. En una realización, la fibrosis es una fibrosis local de un tejido u órgano. Dichas fibrosis específicas de órgano incluyen, pero no se limitan a, fibrosis hepática, fibrosis pulmonar, fibrosis del tejido conjuntivo, en particular fibrosis del septo muscular, fibrosis renal y fibrosis de la piel, por ejemplo, en combinación con una inflamación de la escleroderma. La fibrosis puede ser una fibrosis de un órgano interno, por ejemplo, el hígado, los riñones, los pulmones, el corazón, el estómago, los intestinos, el páncreas, las glándulas, los músculos, cartílagos, tendones, ligamentos o articulaciones. La fibrosis quística o la fibrosis reumática es un tipo de fibrosis. En otra realización, la fibrosis se produce simultáneamente con la inflamación, p. ej. hepatitis (enfermedad inflamatoria del hígado). En otra realización, la fibrosis está asociada con el trasplante de órganos.

La fibrosis se atribuye preferiblemente a un depósito excesivo de los componentes de la matriz extracelular, en particular proteínas tales como el colágeno. El colágeno es una proteína estructural del tejido conectivo, en particular la matriz extracelular. La formación de colágeno, en particular en combinación con el marcador SMA (actina del músculo liso) se correlaciona directamente con la progresión de la fibrosis. Según la invención, se ha observado una inhibición efectiva de la deposición de colágeno por ECA2.

Además, según el mecanismo general, también es posible el tratamiento de la fibrosis crónica. En particular, la fibrosis puede ser causada por daños o lesiones mecánicas o químicas en las células o tejidos, cáncer o tumores, infecciones, en particular patógenos como virus, bacterias u hongos, por implantes, incluidos implantes de órganos y medicamentos. Las infecciones pueden ser específicas de un órgano, por ejemplo, como la infección por el virus de la hepatitis, en particular debido al VHC. Otras enfermedades preferiblemente fibróticas, que pueden tratarse con los polipéptidos de ECA2 de la presente invención, incluyen, por ejemplo, las fibrosis primarias o secundarias, en particular las fibrosas causadas por una respuesta autoinmune, la enfermedad de Ormond (fibrosis retroperitoneal).

La presente invención se refiere al tratamiento de la enfermedad hepática, p. ej. descrito en el documento WO2009/086572. En algunas realizaciones, la fibrosis o enfermedad hepática se produce simultáneamente con la

inflamación, p. ej. hepatitis (enfermedad inflamatoria del hígado).

La presente invención se refiere al tratamiento de enfermedades tumorales y cáncer, p.ej. como se describe en el documento WO2009/124330, consulte la página 6 a la página 9, quinto párrafo. Preferiblemente, las enfermedades tumorales se seleccionan de una enfermedad tumoral del tracto reproductivo, en particular cáncer de ovario, cáncer testicular, cáncer de próstata o de mama, enfermedades tumorales del tracto digestivo, en particular cáncer de estómago, cáncer intestinal, carcinoma de recto, cáncer de páncreas, cáncer de esófago y cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer de pulmón, melanomas o neuroblastomas.

En otra realización, la presente invención se refiere al tratamiento de la diabetes, que incluye la nefropatía diabética.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos sin limitarse a estas realizaciones específicas de la invención.

## Ejemplos

### Ejemplo 1: ECA2 patrón

Se obtuvo una formulación de ECA2 como se ha descrito anteriormente (documento WO 2008/151347, ver ejemplo 1) utilizando una relación equimolar de zinc/proteína. Esta relación 1:1 se confirmó mediante análisis cuantitativo de aminoácidos y análisis ICP-MS del contenido de zinc. El análisis de ICP se llevó a cabo de la siguiente manera: Antes del análisis, las muestras se diluyeron con HNO<sub>3</sub> (supra puro, 1:100 v/v) y se acidificaron (lo que resultó en una ligera turbidez, pero sin influir en los resultados de la medición). El contenido de zinc se determinó mediante espectrometría de masas acoplada inductivamente según ONORM EN ISO 17294-2.

Este material se usó como ECA2 patrón completamente activo enzimáticamente. Por lo tanto, la actividad se establece en 100% para todos los estudios comparativos adicionales que investigan la influencia del zinc u otros metales en la actividad enzimática.

### Ejemplo 2: Empobrecimiento en zinc

Se mezclaron 2,0 mg de ECA2 (preparado, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 1; 400 µl), formulado en tampón de glicina 100 mM, pH 7,5 que contenía NaCl 150 mM y ZnCl<sub>2</sub> 50 µM, con 100 µl de EDTA 0,5 M, pH 8,0 para obtener una concentración final de 100 mM de EDTA. La concentración total de zinc en la muestra es de aproximadamente 100 µM. Esto da una relación molar de zinc a EDTA de 1:1000 (p. ej., un exceso de mil veces de EDTA). La solución se mezcló suavemente y se incubó durante 14 horas a temperatura ambiente.

La separación de EDTA se realizó mediante intercambio de tampón usando un dispositivo concentrador Vivaspin, mediante la adición de 1 ml de tampón MES 50 mM pH 6,5 que contenía NaCl 300 mM. Esto se repitió dos veces más.

El volumen final fue de 190 µl y la concentración de ECA2 en esta muestra fue de 8,2 mg/ml, medida por su absorbancia a 280 nm, y calculada utilizando un coeficiente de extinción de 163,680 L/mol\*cm.

La ECA2 empobrecida en zinc se analizó mediante cromatografía de exclusión por tamaño como se muestra en la Figura 1. El peso molecular se determinó mediante comparación directa con un estándar GF (tiroglobulina, IgG, ovoalbúmina y mioglobina) y se encontró que era 270640 Da. ECA2 se eluyó como pico único en el tiempo de retención de 8,4 minutos. Las señales después de 12 minutos de retención se deben a pequeños componentes del tampón. Este estudio confirma la integridad de la preparación de la enzima porque ECA2 se eluyó como un pico único y, en consecuencia, no se produjo agregación o fragmentación de la proteína durante la eliminación del zinc. Curiosamente, una preparación de ECA2 sin zinc es estable y no se agrega ni disgrega.

### Ejemplo 3: Dependencia de la actividad de ECA2 del zinc

La actividad enzimática de ECA2 se investigó en un tampón de reacción con y sin adición de zinc y también en plasma de heparina humana para imitar la situación después de la administración sistémica. Los controles respectivos fueron los mismos tampones sin zinc. Se usó un sustrato de ECA2 marcado de forma fluorescente, Mca-Ala-Pro-Lys-DNP para cuantificar la actividad enzimática. El resto DNP (di-nitro-fenilo) extingue la fluorescencia de Mca (ácido metoxi-cumarin-acético) del péptido nativo, pero, tras la escisión mediante ECA2, se puede detectar una señal fluorescente. Después de la incubación durante aproximadamente 30 minutos, todas las muestras se diluyeron con H<sub>2</sub>O en una proporción de 1:10. Finalmente, se mezclaron 50 µl de cada muestra con 50 µl de Mca-Ala-Pro-Lys-DNP, (predilución 1:5 con tampón MES-NaCl) y se midieron inmediatamente a 430 nm como longitud de onda de emisión, y 320 nm como longitud de onda de excitación. Se registraron las curvas fluorescencia a lo largo del tiempo y se utilizaron pendientes iniciales para cuantificar las actividades respectivas de ECA2. Los resultados se muestran en la Figura 2. Las unidades de fluorescencia relativa medida en función del tiempo (UFR) se representaron para cada muestra. Las curvas se ajustaron con una curva polinomial de segundo orden  $y = B_0 + B_1t + B_2t^2$ , donde B1 es la pendiente inicial de las curvas respectivas en  $t = 0$ . Los valores de B1 se muestran en la Tabla 1 y corresponden a la actividad de escisión máxima.

Tabla 1: Análisis de la actividad ECA2

| Muestra                           | Descripción                                              | B <sub>1</sub> FU/min ± std |
|-----------------------------------|----------------------------------------------------------|-----------------------------|
| ECA2*/MES + Zn                    | ECA2* 10µg/ml en 50mM MES + ZnCl <sub>2</sub> (0,5mg/ml) | 1139±25                     |
| ECA2*/Plasma                      | ECA2* 10µg/ml en plasma humano                           | 1254±12                     |
| ECA2*/MES                         | ECA2* 10µg/ml en 50mM MES                                | 25±4                        |
| ECA2/MES + Zn                     | ECA2 10µg/ml en 50mM MES + ZnCl <sub>2</sub> (0,5mg/ml)  | 1176±27                     |
| ECA2/Plasma                       | ECA2 10µg/ml en plasma humano                            | 1436±18                     |
| ECA2/MES                          | ECA2 10µg/ml en 50mM MES                                 | 708±8                       |
| Plasma                            | Únicamente plasma humano                                 | 4±4                         |
| ECA2* = ECA2 sin Zn <sup>2+</sup> |                                                          |                             |

El plasma humano solo, así como ECA2 empobrecida en Zn en el tampón MES no escindió el sustrato marcado de forma fluorescente en grado significativo. Las actividades máximas fueron  $4 \pm 4$  y  $25 \pm 4$  FU/min, respectivamente. Esto concluye que el plasma humano no muestra una actividad intrínseca importante de ECA2 y que ECA2 empobrecida en Zn pierde su actividad enzimática. En contraste con esta observación, las muestras de ECA2 que contienen Zn<sup>2+</sup> muestran una fuerte actividad en el tampón MES ( $708 \pm 8$  FU/min). Esta actividad casi se duplica en plasma humano ( $1436 \pm 18$  FU/min). La adición de 0,5 mg/ml de Zn<sup>2+</sup> al tampón MES aumenta la actividad de ECA2 hasta  $1176 \pm 27$  FU/min, y devuelve casi por completo la actividad a la ECA2 empobrecida en Zn ( $1139 \pm 25$  FU/min).

Curiosamente, ECA2 empobrecida en zinc se vuelve completamente activa enzimáticamente en plasma humano ( $1254 \pm 12$  FU/min) sin ninguna adición externa de Zn<sup>2+</sup>. Esta actividad es casi idéntica en comparación con la de ECA2 que contiene Zn.

#### Ejemplo 4: Dependencia de la actividad de ECA2 de iones metálicos

La actividad enzimática de ECA2 también se investigó en un conjunto de diferentes tampones de reacción, que se complementaron con diferentes iones metálicos para reemplazar el Zn<sup>2+</sup> por otros iones metálicos cargados positivamente. El mismo sustrato de ECA2 marcado con fluorescencia Mca-Ala-Pro-Lys-DNP que se describió anteriormente se usó para cuantificar la actividad enzimática resultante. Por lo tanto, ECA2 empobrecida se diluyó previamente con tampón MES-NaCl a una concentración de 20 µg/ml. Se generaron diluciones en serie que contenían 10, 5, 2,5, 1,25, 0,63, 0,31, 0,15 y 0,063 µg/ml de ECA2 diluyendo con disoluciones de 50 µM Zn<sup>2+</sup>, 25 µM CO<sup>2+</sup>, 50 µM Ni<sup>2+</sup>, 50 µM Fe<sup>2+</sup>, 25 µM Fe<sup>3+</sup>, 50 µM Pb<sup>2+</sup>, 50 µM Mg<sup>2+</sup>, 50 µM Mn<sup>2+</sup> y 50 µM Cu<sup>2+</sup> y se incubaron durante 30 minutos. Se mezclaron 50 µl de cada muestra con 50 µl de sustrato Mca-Ala-Pro-Lys-DNP, (dilución previa 1:5 con tampón MES-NaCl) y se midieron inmediatamente a 430 nm como longitud de onda de emisión, y 320 nm como longitud de onda de excitación. Se registraron las curvas fluorescencia a lo largo del tiempo y se utilizaron las pendientes iniciales para cuantificar las actividades respectivas de ECA2. Las unidades de fluorescencia relativa medidas en función del tiempo (UFR) se representaron para cada muestra. Las curvas se ajustaron con una curva polinomial de segundo orden  $y = B_0 + B_1t + B_2t^2$ , donde B<sub>1</sub> es la pendiente inicial de las curvas respectivas en  $t = 0$ . B<sub>1</sub> corresponde a las actividades máximas y los valores se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Actividad de ECA2 dependiente de iones metálicos

| Concentración de ECA2 µg/ml | B <sub>1</sub> FU/min |      |     |     |      |
|-----------------------------|-----------------------|------|-----|-----|------|
|                             | 0,625                 | 1,25 | 2,5 | 5,0 | 10,0 |
| Zn <sup>2+</sup>            | 54                    | 122  | 283 | 608 | 1465 |
| Co <sup>2+</sup>            | 38                    | 84   | 211 | 478 | 1139 |
| Ni <sup>2+</sup>            | 36                    | 55   | 125 | 287 | 1010 |
| Pb <sup>2+</sup>            | 6                     | 27   | 56  | 186 | 1007 |
| Mn <sup>2+</sup>            | 54                    | 124  | 245 | 306 | 181  |

| B1 FU/min                   |       |      |     |     |      |
|-----------------------------|-------|------|-----|-----|------|
| Concentración de ECA2 µg/ml | 0,625 | 1,25 | 2,5 | 5,0 | 10,0 |
| Cu <sup>2+</sup>            | 12    | 6    | 23  | 61  | 136  |
| Fe <sup>3+</sup>            | 37    | 117  | 204 | 0   | 3    |
| Fe <sup>2+</sup>            | 13    | 4    | 10  | 53  | 190  |
| Mg <sup>2+</sup>            | 0     | 6    | 0   | 0   | 0    |
| Empobrecida                 | 0     | 0    | 0   | 8   | 0    |

La ECA2 empobrecida en zinc fue enzimáticamente inactiva. La mayor actividad específica de ECA2 se muestra a una concentración de 10 µg/ml de ECA2 y 50 µM de Zn<sup>2+</sup> (correspondiente a una relación molar de 1:250) y, por lo tanto, se estableció como 100%. Se alcanzaron actividades comparables con Co<sup>2+</sup> (78%) y Ni<sup>2+</sup>, así como con Pb<sup>2+</sup> (ambas aproximadamente el 69%).

Todos los demás iones metálicos investigados tuvieron una actividad significativamente menor a una concentración de 10 µg/ml de ECA2: la actividad de ECA2 complementada con Fe<sup>2+</sup> y Mn<sup>2+</sup> fue del orden del 13% y con Cu<sup>2+</sup> en el 9%. Fe<sup>3+</sup>, Mg<sup>2+</sup> y ECA2 empobrecida en iones metálicos estaban prácticamente inactivos.

Curiosamente, Fe<sup>3+</sup> y Mn<sup>2+</sup>, los cuales fueron significativamente menos activos que la ECA2 que contiene a 10 µg/ml, mostraron prácticamente la misma actividad específica en comparación con el Zn<sup>2+</sup> a concentraciones de ECA2 más bajas de 0,625 y 1,25 µg/ml.

Ejemplo 5: Dependencia de la actividad de ECA2 de iones metálicos

Las soluciones madre de rhACE2 (tal como se prepararon anteriormente en los ejemplos 1 y 2) se diluyeron a una disolución 1 µM con agua de grado cultivo celular. Las disoluciones de iones metálicos de CuCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, NiCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub> y CaCl<sub>2</sub> con una concentración de 1 µM se prepararon a partir de una disolución madre 10 mM. Para lograr una relación equimolar de enzima a ion metálico soluble, se realizó una incubación con soluciones de ion metálico 1 µM durante 15 min y 80 min. Para las pruebas de actividad enzimática, las muestras se diluyeron 1:10 con la disolución de ion metálico correspondiente y se diluyeron adicionalmente 1:10 con tampón MES-NaCl. Las pruebas de actividad se realizaron agregando 50 µl de disolución de sustrato 200 µM en tampón de actividad con suplemento de EDTA 0,5 µM a 50 µl de dilución de la muestra y se midió inmediatamente con un detector de fluorescencia, Anthos Zenyth 3100, número de serie 26001070 con un filtro de longitudes de onda de 320 nm para la excitación y 430 nm para la emisión. Las unidades de fluorescencia relativa medidas (UFR) se representaron por ciclo (1 minuto) para cada muestra de rACE2 (ver Figuras 3 y 4). Para calcular los valores de pendiente, cada curva se ajustó mediante una curva polinomial de segundo orden ( $Y = B_0 + B_1 \cdot X + B_2 \cdot X^2$ ). Los valores de B1 se muestran a continuación.

Tabla 3: Concentración de iones metálicos 1 µM, incubación de 15 minutos:

| Concentración de ion metálico (incubación, 15min) | 1 µM              | 1 µM              | 1 µM              | 1 µM              | 1 µM              | 1 µM             | 1 µM              |
|---------------------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|-------------------|
| Ciclo 1-30                                        | CuCl <sub>2</sub> | ZnCl <sub>2</sub> | NiCl <sub>2</sub> | MnCl <sub>2</sub> | CaCl <sub>2</sub> | H <sub>2</sub> O | Tampón APN01 Tris |
| B1                                                | 1228              | 779,8             | 370,2             | 57,57             | 123,2             | 27,62            | n.d.              |
| B1 (%)                                            | 157               | 100               | 47                | 7                 | 16                | 4                |                   |
| Error típico                                      |                   |                   |                   |                   |                   |                  |                   |
| B1                                                | 58,56             | 65,16             | 105,1             | 6,343             | 28,82             | 9,651            | n.d.              |

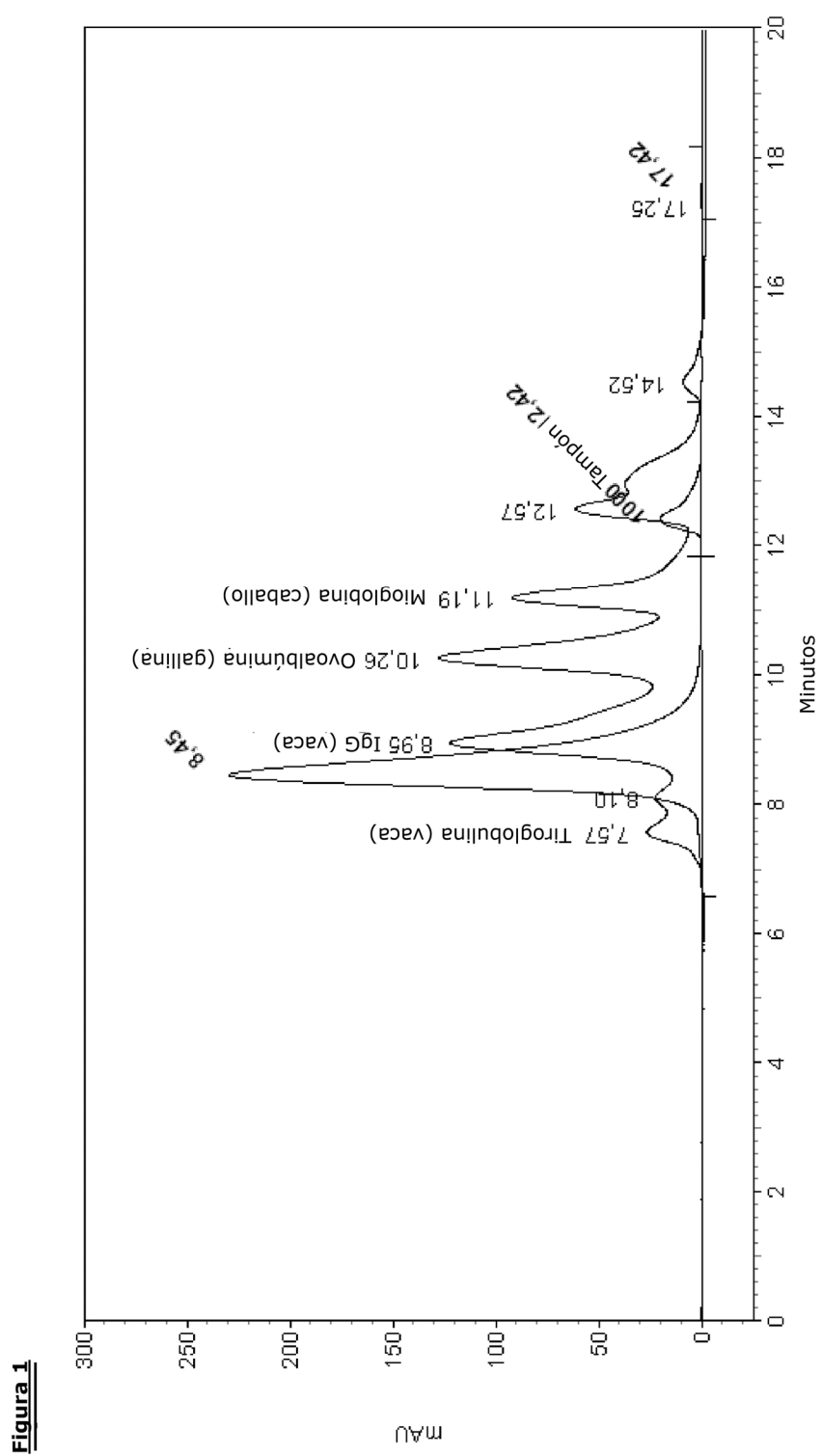
Tabla 4: Concentración de ion metálico 1  $\mu\text{M}$ , incubación 80 min.

| Concentración de ion metálico<br>(incubación, 80 min) | 1 $\mu\text{M}$ | 1 $\mu\text{M}$ | 1 $\mu\text{M}$ | 1 $\mu\text{M}$ | 1 $\mu\text{M}$ | 1 $\mu\text{M}$      | 1 $\mu\text{M}$   |
|-------------------------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------------|-------------------|
| Ciclo 1-30                                            | $\text{CuCl}_2$ | $\text{ZnCl}_2$ | $\text{NiCl}_2$ | $\text{MnCl}_2$ | $\text{CaCl}_2$ | $\text{H}_2\text{O}$ | Tampón APN01 Tris |
| B1                                                    | 1819            | 1619            | 1487            | 383,6           | 653,9           | 4,176                | 1937              |
| B1 (%)                                                | 112             | 100             | 92              | 24              | 40              | 0                    |                   |
| Error típico                                          |                 |                 |                 |                 |                 |                      |                   |
| B1                                                    | 30,91           | 30,49           | 31,93           | 17,03           | 30,63           | 4,288                | 48,55             |

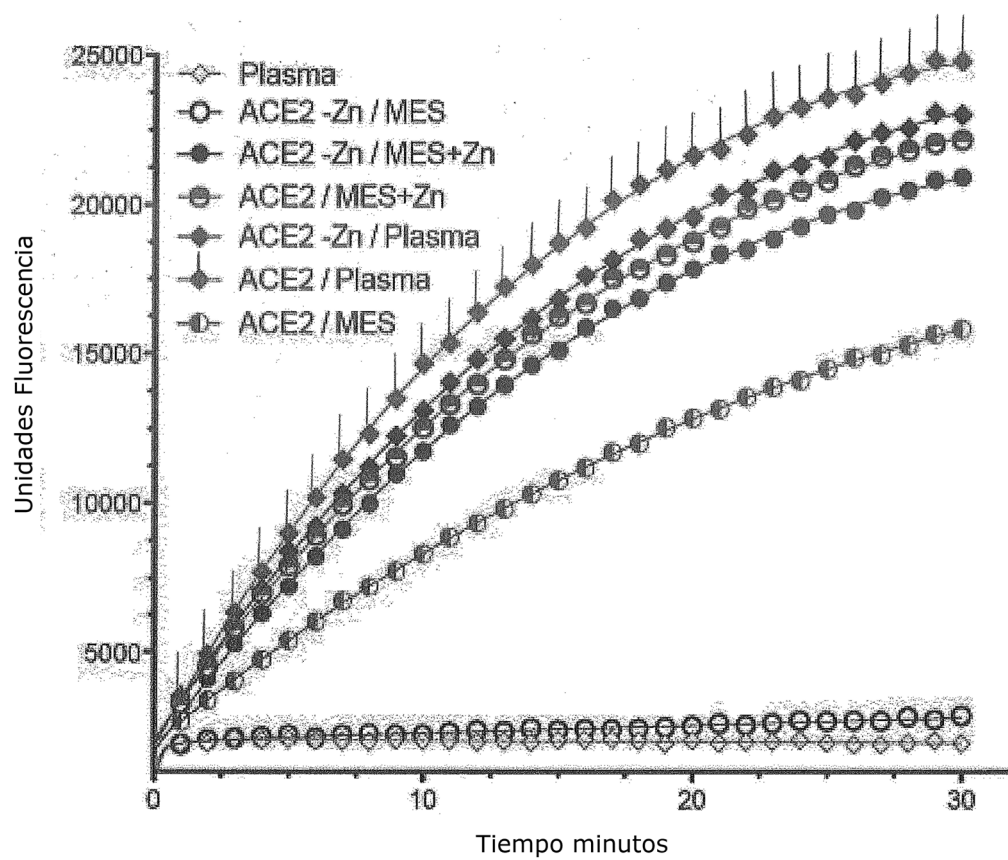
Como control negativo, ECA2 empobrecida en  $\text{Zn}^{2+}$  fue enzimáticamente inactiva. La actividad específica de la muestra incubada con  $\text{Zn}^{2+}$  se ajustó al 100%. Después de 80 minutos de incubación, se alcanzaron actividades similares con  $\text{Cu}^{2+}$  (112%) y  $\text{Ni}^{2+}$  (92%). La incubación con iones  $\text{Mn}^{2+}$  o  $\text{Ca}^{2+}$  dio como resultado una actividad significativamente menor (hasta un 40%).

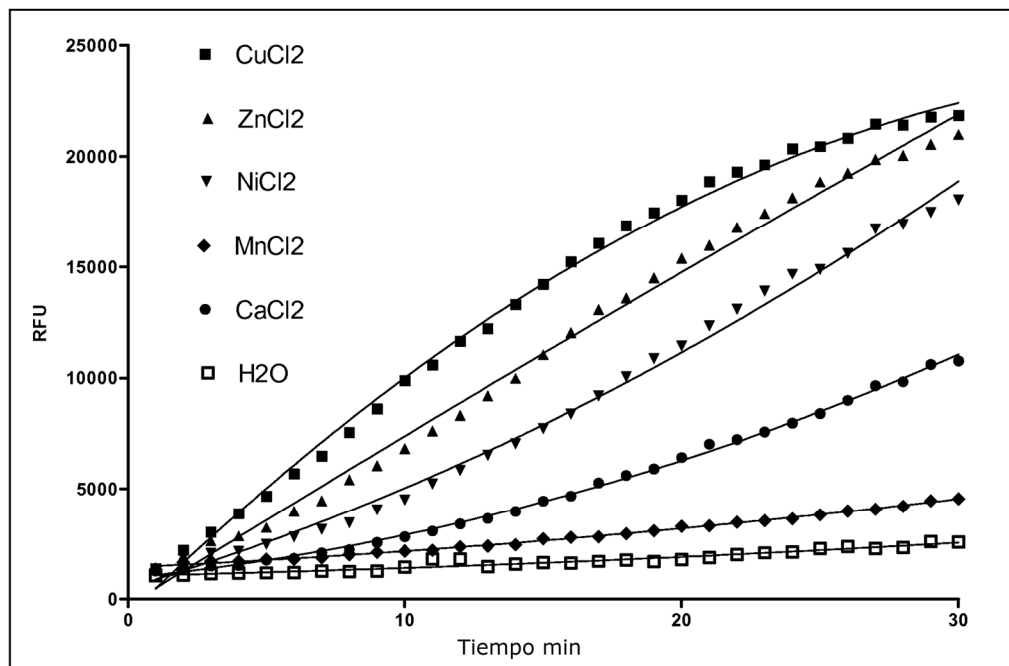
## REIVINDICACIONES

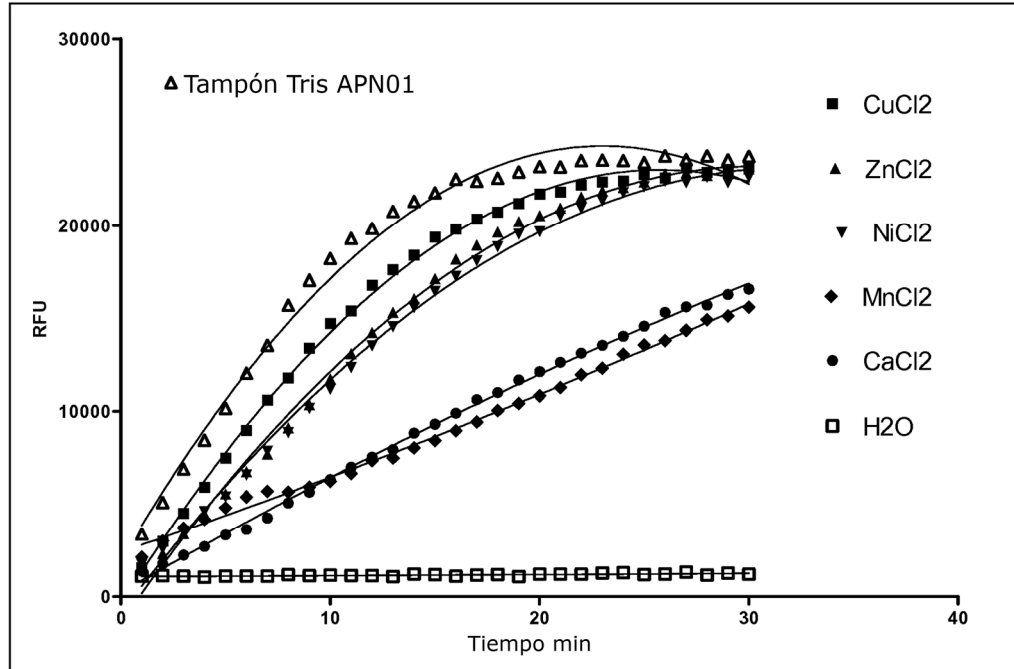
1. Una población de polipéptidos de la enzima 2 convertidora de angiotensina (ECA2) que tiene niveles reducidos de  $Zn^{2+}$  en los sitios activos en los que la proporción de  $Zn^{2+}$ :polipéptidos de ECA2 es menor que 1:1, preferiblemente  $\leq 0,99:1$ ,  $\leq 0,98:1$ ,  $\leq 0,95:1$ ,  $\leq 0,92:1$  o  $\leq 0,90:1$ .
- 5 2. Una población de polipéptidos de ECA2 según la reivindicación 1, en la que la proporción de  $Zn^{2+}$ :polipéptidos de ECA2 es  $\leq 0,50:1$ ,  $\leq 0,45:1$ ,  $\leq 0,40:1$ ,  $\leq 0,35:1$ ,  $\leq 0,30:1$ ,  $\leq 0,25:1$ ,  $\leq 0,20:1$ ,  $\leq 0,15:1$ ,  $\leq 0,10:1$ ,  $\leq 0,05:1$ ,  $\leq 0,02:1$ , o  $\leq 0,01:1$ .
3. Una población de polipéptidos de ECA2 según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que los polipéptidos de ECA2 son polipéptidos de ECA2 humanos.
- 10 4. Una población de polipéptidos de ECA2 según la reivindicación 3, en la que las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos de ECA2 comprenden los aminoácidos 1 a 740 de la SEQ ID N°: 1, o los aminoácidos 18 a 740 de la SEQ ID N°: 1, o los aminoácidos 18 a 615 de la SEQ ID N°: 1.
5. Una población de polipéptidos de ECA2 según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que los polipéptidos de ECA2 están presentes en forma dimérica.
- 15 6. Una población de polipéptidos de ECA2 según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que los sitios activos están sustancialmente libres de  $Zn^{2+}$ .
7. Una población de polipéptidos de ECA2 según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que los sitios activos están sustancialmente libres de cualquier ion metálico.
8. Uso de una población de polipéptidos de ECA2 según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para escindir un sustrato de ECA2 en una disolución que comprende un ion metálico.
- 20 9. Uso según la reivindicación 8, en el que el ion metálico se selecciona de  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Al$ ,  $Ga$ ,  $In$ ,  $Sn$ ,  $Tl$ ,  $Pb$ ,  $Bi$  y  $Po$ , preferiblemente  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Al^{2+}$  y  $Sn^{2+}$ , p.ej.  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  y  $Al^{3+}$ .
10. Uso según la reivindicación 8 o la reivindicación 9, en el que el sustrato de ECA2 se selecciona de Ang II y Mca-Ala-Pro-Lys (Dnp) -OH.
- 25 11. Método para la preparación de una población de polipéptidos de ECA2 según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende las etapas de:
  - a. Expresar los polipéptidos de ECA2 en un sistema celular;
  - b. Aislar los polipéptidos expresados;
  - 30 c. Eliminar algunos o todos los iones metálicos unidos al sitio activo mediante la adición de un agente quelante de metales.
12. Método según la reivindicación 11, en el que el agente quelante de metales se selecciona de EDTA, EGTA, 8-hidroxiquinolina, fenantrolina y/o dimercaprol.
- 35 13. Una composición que comprende una población de polipéptidos de ECA2 según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la composición comprende una relación molar de zinc total u otro ion metálico a ECA2 menor que 1:1, menor que 0,95:1,  $\leq 0,50:1$ ,  $\leq 0,45:1$ ,  $\leq 0,40:1$ ,  $\leq 0,35:1$ ,  $\leq 0,30:1$ ,  $\leq 0,25:1$ ,  $\leq 0,20:1$ ,  $\leq 0,15:1$ ,  $\leq 0,10:1$ ,  $\leq 0,05:1$ ,  $< 0,02:1$ , o  $\leq 0,01:1$ .
14. Una composición que comprende una población de polipéptidos de ECA2 según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la composición comprende quelantes metálicos en un exceso molar de 10 a 1000 en comparación con la cantidad molar de zinc en la composición.
- 40 15. Composición farmacéutica que comprende una población de polipéptidos de ECA2 como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
16. Una población de polipéptidos de ECA2 como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para uso en terapia.
- 45 17. Una población de polipéptidos de ECA2 como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad seleccionada de hipertensión (incluida la presión arterial alta), insuficiencia cardíaca congestiva, insuficiencia cardíaca crónica, insuficiencia cardíaca aguda, insuficiencia cardíaca contráctil, infarto de miocardio, arteriosclerosis, insuficiencia renal, insuficiencia renal y enfermedad pulmonar, como el síndrome de dificultad respiratoria del adulto (SDRA), lesión pulmonar aguda (LPA), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), hipertensión pulmonar, fibrosis renal, insuficiencia renal crónica, insuficiencia renal aguda, lesión renal aguda y síndrome de disfunción multiorgánica.
- 50





**Figura 2**

**Figura 3**

**Figura 4**

5 **Figura 5: SEC ID N°: 1**

MSSSS WLLLS LVAVT AA

QSTIE EQAKT FLDKF NHEAE DLFYQ SSLAS WNYNT NITEE NVQNM NNAGD KWSAF LKEQS TLAQM  
 YPLQE IQNLT VKLQL QALQQ NGSSV LSEDK SKRLN TILNT MSTIY STGKV CNPDN PQECL LLEPG  
 LNEIM ANSLD YNERL WAWES WRSEV GKQLR PLYEE YVVLK NEMAR ANHYE DYGDY WRGDY EVNGV  
 10 DGYDY SRGQL IEDVE HTFEE IKPLY EHLHA YVRAK LMNAY PSYIS PIGCL PAHLL GDMWG RFWTN  
 LYSLT VPFGQ KPNID VTDAM VDQAW DAQRI FKEAE KFFVS VGLPN MTQGF WENSM LTDPG NVQKA  
 VCHPT AWDLG KGDFR ILMCT KVTMD DFLTA **HHEMG** HIQYD MAYAA QPFL RANG EGFHE AVGEI  
 MSLSA ATPKH LKSIG LLSPD FQEDN ETEIN FLLKQ ALTIV GTLPF TYMLE KWRWM VFKGE IPKDQ  
 WMKKW WEMKR EIVGV VEPVP HDETY CDPAS LFHVS NDYSF IRYYT RTLYQ FQFQE ALCQA AKHEG  
 15 PLHKC DISNS TEAGQ KLFNM LRLGK SEPWT LALEN VVGAK NMNVR PLLNY FEPLF TWLKD QNKNS  
 FVGWS TDWSP YADQS IKVRI SLKSA LGDKA YEWND NEMYL FRSSV AYAMR QYFLK VKNQM ILFGE  
 EDVRV ANLKP RISFN FFVTA PKNVS DIIPR TEVEK AIRMS RSRIN DAFRL NDNSL EFLGI QPTLG PPNQP  
 PVSIV LIVFG VVMGV IVVGI VILIF TGIRD RKKKN KARSG ENPYA SIDIS KGENN PGFQN TDDVQ TSF