

(12) **Patentschrift**

(21) Anmeldenummer: A 1758/2006 (51) Int. Cl.⁸: **C12Q 1/37** (2006.01)
G01N 33/573 (2006.01)
(22) Anmeldetag: 2006-10-19 **G01N 21/31** (2006.01)
(43) Veröffentlicht am: 2008-11-15

(56) Entgegenhaltungen:
JP 8160046A WO 2002/098448A1

(73) Patentanmelder:
APEIRON BIOLOGICS FORSCHUNGS-
UND ENTWICKLUNGSGESELLSCHAFT
M.B.H.
A-1230 WIEN (AT)

(54) **VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG DER AKTIVITÄT VON ACE2**

- (57) Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur Bestimmung der Aktivität des ACE2, umfassend folgende Schritte:
- zur Verfügung stellen von an einen festen Träger immobilisierten ACE2-bindenden Einheiten, die spezifisch für einen Teil des ACE2 sind, der nicht an der katalytischen Aktivität von ACE2 beteiligt ist,
 - Kontaktieren der immobilisierten ACE2-bindenden Einheiten mit einer Probe, die potentiell das ACE2 enthält, wobei das ACE2 von der ACE2-bindenden Einheit gebunden wird,
 - Entfernen der nicht-bindenden Anteile der Probe von dem an die ACE2-bindenden Einheiten gebundenen ACE2,
 - Zufügen eines Substrates des ACE2, das durch die ACE2-Aktivität umgesetzt wird und die Umsetzung ein Signal liefert,
 - Messen der Änderung des Signals in einer bestimmten Zeitspanne, wobei die Änderung mit der ACE2-Aktivität korreliert werden kann.

Die vorliegende Erfindung betrifft die immunologische Bestimmung der enzymatischen Aktivität von Enzymen.

Derzeitige Methoden zur Bestimmung von Enzymaktivitäten in raschen Screeningverfahren werden stark von interferierenden Faktoren von diversen Quellen beeinflusst. Übliche Assays zur Messung von Enzymaktivitäten sehen die Verwendung von fluoreszierenden oder chromogenen Verbindungen vor. Beispielsweise wird bei der Detektion von HIV Protease ein fluoreszierendes Substrat verwendet, das mit einer fluoreszierenden Dansyl-Gruppe an einem Ende des Peptids und einem Fluoreszenzquencher am anderen Ende des Peptids modifiziert wurde. Ein Anstieg an gemessenem Fluoreszenzsignal erfolgt durch Spaltung des Peptids durch die Protease, da der Emitterteil vom unterdrückenden Quencher geteilt wird. Fluoreszierende Substrate für andere Enzyme können durch ähnliche Modifizierungen der Substrate des jeweiligen Enzyms modifiziert werden, wie beispielsweise in der US 6,037,137, EP 1 557 474 A und WO 90/00618 offenbart werden.

Diese Assays, insbesondere im High-throughput Bereich, neigen zu Problemen mit Autofluoreszenz von biologischen Komponenten, zum Teil bedingt durch die gemessenen Moleküle selbst. Viele der Verbindungen und natürlichen Extrakte sind selbst farbig oder fluoreszieren und befinden sich während der Signalmessung des Assays in Lösung. Das führt dazu, dass diese Interferenz die Detektion und die Sensitivität bzw. den dynamischen Messbereich der Methode limitiert. Die Interferenz kann auch als Inhibition des Enzyms interpretiert werden, wobei es in Inhibitionsassays schwer ist, die gemessene Inhibition von der tatsächlichen (bio)chemischen Inhibition des Enzyms zu unterscheiden.

Die US 5,591,591 beschreibt einen Assay zur Detektion von Proteasen, wobei eine Dioxetan-Komponente mit einer proteolytischen Enzym-spezifischen Aminosäure oder einem Peptid verbunden zu einer Probe die potentiell die Protease enthält, zugefügt wird, wobei die Aminosäure durch die enzymatische Reaktion entfernt wird, was wiederum die Zersetzung des Dioxetans und Chemilumineszenz bewirkt.

Die US 2003/0124622 beschreibt die Messung der Aktivität einer Protease, wobei die Protease zunächst an einen immobilisierten Antikörper gebunden wird und ein chromogenes Substrat zugegeben wird, das sich unter der Einwirkung der Enzymaktivität verfärbt. Die Änderung der Extinktion kann mit der Enzymaktivität korreliert werden.

Die JP8160046A betrifft ein Verfahren zur Bestimmung von ACE. Die WO02/098448 A1 betrifft Verbindungen, die spezifisch ACE2 binden und dessen Aktivität verändern.

Es ist ein Ziel schnelle Messsysteme zu entwickeln, die von Verunreinigungen unbeeinflusst sind, insbesondere für Systeme zur raschen Messung von Enzymaktivitäten.

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der Aktivität des ACE2, umfassend folgende Schritte:

- zur Verfügung stellen von an einen festen Träger immobilisierten ACE2-bindenden Einheiten, die spezifisch für einen Teil des ACE2 sind, der nicht an der katalytischen Aktivität von ACE2 beteiligt ist,
- Kontaktieren der immobilisierten ACE2-bindenden Einheiten mit einer Probe, die potentiell das ACE2 enthält, wobei das ACE2 von der ACE2-bindenden Einheit gebunden wird,
- Entfernen der nicht-bindenden Anteile der Probe von dem an die ACE2-bindenden Einheiten gebundenen ACE2,
- Zufügen eines Substrates des ACE2, das durch die ACE2-Aktivität umgesetzt wird und die Umsetzung ein Signal liefert,
- Messen der Änderung des Signals in einer bestimmten Zeitspanne, wobei die Änderung mit der ACE2-Aktivität korreliert werden kann.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es möglich, quantitativ die enzymatische Aktivität in komplexen Lösungen, wie Körperflüssigkeiten oder Kulturüberständen, zu bestimmen unter Verwendung der endogenen Aktivität des zu quantifizierenden Enzyms (ACE2) unter Umsetzung eines Signal-liefernden Substrates.

Zur direkten Bestimmung von aktiven ACE2 in komplexen Lösungen, wie Körperflüssigkeiten, wurde eine Methode aufgebaut, welche zwei wesentliche Schritte kombiniert und einen hohen Probendurchsatz erlaubt: Die immunologische Bindung von ACE2 an einen Träger, wie beispielsweise eine Mikrotiterplatte, wodurch die Abreicherung sämtlicher anderer Komponenten erreicht wird, gefolgt von einer spezifischen enzymatischen Reaktion auf Basis eines fluoreszenzmarkierten Substrates, welches ein messbares Signal liefert.

Im ersten Schritt wird die komplexe Lösung z.B. in einer Mikrotiterplatte inkubiert, in der zuvor z.B. ein ACE2-spezifischer Antikörper immobilisiert wurde. Ein solcher Antikörper erkennt vorzugsweise einen Teil von ACE2, der nicht an der katalytischen Reaktion beteiligt ist, und beeinträchtigt nicht die enzymatische Reaktion. Wenn der Antikörper hingegen Regionen von ACE2 erkennt, die in die enzymatische Reaktivität direkt involviert sind, wird die Empfindlichkeit des Assays herabgesetzt bzw. der Assay funktioniert nicht mehr, da die Enzymaktivität blockiert ist. Sämtliche weitere Bestandteile der komplexen Probe (z.B. Serum) binden nicht an die Plattenoberfläche und werden in einem nachfolgenden Schritt aus dem System entfernt, vorzugsweise von der Platte gewaschen. Waschschritte können gegebenenfalls wiederholt werden, z.B. 1, 2, 3 oder mehrere Male. Letztendlich verbleibt ausschließlich korrekt gebundenes ACE2 auf der Platte. Nach Zugabe eines fluoreszenzmarkierten Substrates, welches durch ACE2 gespalten wird und das im gespaltenen Zustand eine deutlich höhere Fluoreszenz aufweist, wird nach einer definierten Inkubationszeit die Fluoreszenz gemessen und mit einem Standard bekannter Aktivität und Konzentration verglichen. Üblicherweise wird dies durch Zweikomponenten-Fluoreszenz-Quenching-Systeme erzielt, wobei die Fluoreszenz durch Abspaltung des Quenchers erhöht wird.

Durch die Einwirkung bzw. Umsetzung von ACE2 auf das Substrat wird dieses vorzugsweise in der Extinktion oder Fluoreszenz verändert, die mit optischen Methoden gemessen werden kann. Chromogene Substrate die zu einem solchen Zweck modifiziert werden können um eine Änderung der Extinktion (oder Absorption) zu verfolgen sind beispielsweise aus der US 2003/0124622 bekannt. Im weiteren Ausführungsformen weist das Substrat einen fluoreszierenden Teil und einen Fluoreszenzquencherteil auf die durch die Enzymaktivität getrennt werden können. Durch die Umsetzung durch ACE2 kann daher eine Änderung der Fluoreszenz gemessen und verfolgt werden.

Die ACE2-bindende Einheit ist vorzugsweise ein Antikörper oder ein künstlicher oder natürlicher Rezeptor von ACE2, der die Aktivität von ACE2 nicht verhindert.

ACE2 ist eine Peptidase des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) - auch als Renin-Angiotensin-System (RAS) bezeichnet. Die proteolytische Aktivität des RAS stellt eine Kaskade von enzymatischen Schritten zur Regulierung des Blutdrucks dar. ACE ist hierin das wohl bekannteste Enzym, das Angiotensin I zu Angiotensin II umsetzt. Angiotensin II wirkt blutdrucksteigernd, weswegen ACE-Hemmer häufig zur Behandlung von erhöhtem Blutdruck eingesetzt werden. Sowohl ACE als auch ACE2 sind Metalloproteasen mit einem katalytischen Zink-Atom im Zentrum. Mechanistisch ist ACE eine Peptidyl-Dipeptidase, ACE2 hingegen eine Carboxypeptidase (9).

Besonders bevorzugt ist ACE2 ausgewählt aus Membran-gebundenem ACE2 (mACE2) und sekretiertem ACE2 (seACE2), wobei vorzugsweise die ACE2-bindende Einheit spezifisch für den C-terminalen Teil der extrazellulären Domain von ACE2 ist. ACE2, welches noch mit der Membrandomäne durch Hilfe von Detergentien in Lösung gehalten wird, sollte den C-terminalen Teil aufgrund der Nähe der hydrophoben Region deutlich geringer in die hydrophile Lösung

exponieren. Die Sequenz von ACE2 ist in Fig. 4 (SEQ ID NO: 1) angegeben, wobei das aktive Zentrum - Zink-bindende-Motif HEXXH durch Unterstreichen gekennzeichnet ist. Das erfindungsgemäße Verfahren funktioniert, wenn das gebundene ACE2 noch Enzymaktivität hat. Gemäß der Sequenz ist die ACE2-bindende Einheit für eine Teilsequenz von mindestens 4, vorzugsweise mindestens 5 oder 6, besonders bevorzugt mindestens 7, speziell wird bevorzugt mindestens 8 aufeinander folgenden Aminosäuren der 373 N-terminalen Aminosäuren von ACE2 oder der 362 C-terminalen Aminosäuren von ACE2 spezifisch. In besonderen Ausführungsformen ist diese Teilsequenz aus den 360, bevorzugt 340 oder 320 N-terminalen oder C-terminalen Aminosäuren ausgewählt. Eine solche Sequenz gegen die ein ACE2-bindende Einheit gerichtet werden kann ist z.B. EFLGIQPTLGPPN (SEQ ID NO: 2).

Des Weiteren ist die Kristallstruktur von ACE2 veröffentlicht (9) und als natives Enzym (PDB-Datenbank-Eintrag: 1R42) und als Inhibitor-gebundenes Enzym bekannt (PDB-Datenbank-Eintrag: 1R4L). Diese native Struktur zeigt als Mittelpunkt des aktiven Zentrums ein Zn-Atom und dient im folgenden als Referenz für ACE2. Eine weitere Kristallstruktur ist beispielsweise unter dem PDB-Datenbank-Eintrag 1O8A (natives menschliches ACE) bekannt, in der ebenfalls ein katalytisches Zink-Atom ersichtlich ist. Bevorzugt ist die ACE2-bindende Einheit für einen Teil von mindestens 4, 5, 6, 7 oder 8 Aminosäuren des Enzyms spezifisch, der einen Mindestabstand von 0,5 nm, vorzugsweise 0,6 nm, besonders bevorzugt 0,7 nm oder 0,8 nm, insbesondere 0,9 nm oder 1,0 nm vom aktiven Zentrums aufweist (gemäß der Kristallstruktur des Enzyms). Hierzu kann der geometrische Mittelpunkt der Teilsequenz hinzugezogen werden - wobei die Teilsequenz nicht unbedingt aus sequentiell aufeinanderfolgenden Aminosäuren bestehen muss, da z.B. Antikörper nicht Sequenzen sondern räumliche Strukturen erkennen. Zur Ermittlung der Position des aktiven Zentrums kann der Mittelwert der Koordinaten der Aminosäuren hinzugezogen werden oder die Position des katalytischen Metallions, die an der Enzymreaktion beteiligt sind.

Die Teile oder Teilsequenzen von ACE2 können in bestimmten Ausführungsformen bis zu 10, bis zu 12, bis zu 15, bis zu 20, bis zu 30 oder auch bis zu 40 oder 50 Aminosäuren ACE2 aufweisen.

ACE2 (Angiotensin Converting Enzyme 2) stellt ein Schlüsselenzym des Renin-Angiotensin-Systems dar. Als Carboxypeptidase wird es membranverankert (mACE2), als Rezeptor vor allem auf Lungen-, Nieren- und Herzzellen exprimiert und spaltet diverse Peptidsubstrate. ACE2 kommt jedoch auch als lösliches Protein (sekretiertes ACE2, seACE2) ohne Transmembrandomäne und cytoplasmischen Anteil in Körperflüssigkeiten vor. Prominente Substratvertreter sind Apellin, Bradykinin aber ebenso Angiotensin-I, welches zu Angiotensin 1-9, oder Ang-II, welches zu Ang 1-7 gespalten wird (1, 2). ACE2 ist maßgeblich für die Homeostasis des Organismus verantwortlich (3).

Apeiron Biologics entwickelte lösliches ACE2 als Therapeutikum zur Behandlung von ARDS oder ALI, zwei akuten Lungenerkrankungen, mit welchen als Begleitsymptom ein herunter regulierter ACE2 Titer einhergeht (4, 5), wie mehrere Studie bestätigen. Allerdings ist durchaus auch vorgesehen, dass lösliches ACE2 auch zur Behandlung von Herz- oder Nierenerkrankungen eingesetzt wird (1, 6). Nachdem ACE2 in all diesen Erkrankungen eine wesentliche Rolle spielt, liefert eine robuste Bestimmungsmethode zur Quantifizierung von löslichem, aktiven ACE2 wichtige Erkenntnisse in der Erforschung dieser Indikationen. Ferner bietet sich eine solche Methode zur Ermittlung der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik einer Therapie mit löslichem ACE2 an. Der Gehalt an enzymatisch aktivem ACE2 in Körperflüssigkeiten stellt außerdem ein Schlüsselergebnis dar, welches den Zugriff auf diverse therapeutische und diagnostische Bereiche eröffnet.

Klassische, immunologische Bestimmungsmethoden (ELISA) von ACE2-Konzentrationen liefern nur ein unvollständiges Resultat, da diese Methoden sowohl aktives, als auch enzymatisch inaktives Enzym erfassen können. Aufschluss über die Funktion von ACE2 kann aber

ausschließlich durch Bestimmung des enzymatisch aktiven Anteils erlangt werden. Die Bestimmung der Aktivität von Peptidasen in komplexen Flüssigkeiten, wie Vollblut, Serum oder Plasmaproben, erwies sich bislang jedoch im Stand der Technik als schwierig, weil zahlreiche Komponenten dieser komplexen Lösungen die enzymatische Reaktion beeinflussen können. Inhibierende Bestandteile sowie Peptidasen geringer Spezifität können den gemessenen Substratsatz in beide Richtungen verfälschen, was einen Aktivitätsbestimmungsansatz direkt aus diesen komplexen Systemen üblicherweise verhindert. Insbesondere für ACE2 konnte daher bislang auch kein zufriedenstellendes System zur Verfügung gestellt werden, welches vor allem auch der Komplexität der Proben, in denen ACE2 gemessen werden kann, Rechnung trägt.

Eine ACE2-bindende Einheit ist vorzugsweise ein Antikörper, der den C-terminalen Teil der extrazellulären Domäne von natürlichem ACE2 bindet. Dies führt somit zu einer gerichteten Präsentation des Enzyms auf der Plattenoberfläche, in Analogie zur Präsentation an der Zelloberfläche sind ohne die ACE2-Aktivität empfindlich zu beeinflussen.

Aktivitätsbestimmungsverfahren können sowohl fluoreszierende Substrate oder chromogene Substrate verwendet werden, wobei fluoreszierende aufgrund der Sensitivität bei Blutproben bevorzugt werden.

Im erfindungsgemäßen Verfahren ist die ACE2-bindenden Einheiten bevorzugt ausgewählt aus Antikörpern, Antikörperfragmenten oder Antikörperderivaten. Solche Einheiten beinhalten Fv, Fab oder F(ab)₂-Teile von Antikörpern sowie Einzelkettenantikörper (Single chain antibodies, SCA), wie in der US 4,946,778 offenbart, oder Einzelketten-Antigen-bindende Fragmente (ScFv).

In speziellen Ausführungsformen sind die Antikörper, -fragmente oder -derivate polyklonal, wobei, vorzugsweise Antikörper, -fragmente oder -derivate, die für die aktiven Zentren des Enzyms spezifisch sind, auf unter 20% bevorzugt auf unter 10%, mehr bevorzugt auf unter 5%, am meisten bevorzugt auf unter 1% abgereichert sind - z.B. durch Immunoabsorption, wobei Teile mit aktiven Zentren der Enzyme immobilisiert präsentiert werden und das Eluat die abgereicherten, bevorzugten Antikörper enthält.

In anderen Ausführungsformen sind die Antikörper, -fragmente oder -derivate monoklonal. Hierbei werden spezielle Antikörper selektiert, die die Enzymaktivität unbeeinflusst (oder gering verändert) lassen. Bei bestimmten Enzymen können Aktivitätseinbußen durch die Antikörperbindung nicht vermieden werden. Hierbei ist es jedoch mit gängigen Auswahlverfahren (z.B. Phagendisplay-Methoden) möglich, diese Inhibierung niedrig zu halten. So wird bevorzugt die enzymatische Aktivität nicht mehr als 30%, bevorzugt nicht mehr als 20% besonders bevorzugt nicht mehr als 10%, speziell bevorzugt nicht mehr als 5%, am meisten bevorzugt nicht mehr als 1% durch den Antikörper, das -derivat oder das -fragment inhibiert. Besonders bevorzugte Antikörper können bei speziellen Enzymen die enzymatische Aktivität sogar erhöhen.

Das Substrat, das erfindungsgemäß verwendet wird, ist bevorzugt ein niedermolekulares Peptid mit einer Länge von 2 bis 30 Aminosäuren, bevorzugt 2 bis 20 Aminosäuren, insbesondere bevorzugt 2 bis 10 Aminosäuren ist, das von dem Enzym gespalten werden kann, und an einem zu erwartenden Spaltprodukt der Fluoreszenzteil und an einem anderen zu erwartenden Spaltprodukt der Quencher kovalent verbunden ist, bevorzugt Mca-Ala-Pro-Lys(Dnp)-OH (Mca: (7-methoxycoumarin-4-yl)acetyl) sofern das Enzym ACE2 ist. Andere Peptidsubstrate sind beispielsweise in (7) und (8) offenbart. Für ACE2 ist das Cumarin-di-Nitro-Phenyl System besonders geeignet. Andere Systeme werden beispielsweise in der US 6,037,137, der EP 1 557 474 A und der WO 90/00618 offenbart.

Die Probe kann chromophore und/oder fluoreszierende Verunreinigungen enthalten. Es ist ein wesentlicher Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens, dass diese Störsubstanzen im Assay auf einfache Weise entfernt werden.

Bevorzugt ist die Probe ausgewählt aus Körperflüssigkeiten, homogenisierten fluiden Gewebeproben und Zellkulturüberständen, vorzugsweise aus Vollblut, Serum- oder Plasmaproben.

In einem weiteren Aspekt sieht die vorliegende Erfindung die Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur *in-vitro*-Bestimmung von ACE2 Titern in Vollblut, Serum- oder Plasmaproben bzw. eines Enzyms in solchen Proben vor.

Beschrieben wird auch ein Verfahren zur Diagnose eines Krankheitsanzeichens, das mit abnormer ACE2 Aktivität verbunden ist, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass eine Probe eines Tieres oder Menschen zur Verfügung gestellt wird, und mit einem *in-vitro*-Verfahren nach der vorliegenden Erfindung die ACE2 Aktivität bestimmt wird, wobei eine Änderung der ACE2 Aktivität von über 40% oder 50%, vorzugsweise von über 50%, besonders bevorzugt von über 75%, im Vergleich zur ACE2 Aktivität im gesunden Zustand eine Krankheit oder die Gefährdung an einer Krankheit zu erkranken anzeigt. ACE2-indizierte Krankheitszustände können sowohl über einen Anstieg der ACE2-Aktivität angezeigt werden, z.B. Mykardinfarkt (10, 11) oder über eine reduzierte ACE2-Aktivität, z.B. ARDS (4). Im Fall eines ACE2-Aktivitätsanstiegs ist die Aktivitätsänderung vorzugsweise mindestens 100%, insbesondere mindestens 150%. Der Aktivitätswert im gesunden Zustand hängt stark vom der Spezies und dem Gewebe ab und kann ebenfalls mit dem Verfahren bestimmt werden - z.B. als Durchschnittswert gesunder Organismen oder in einem nicht von der Krankheit betroffenen Referenzgewebe des selben Organismus. Mit dem Verfahren können somit auf einfache und verlässliche Weise Anzeichen für eine Krankheit festgestellt bzw. eine Krankheit diagnostiziert werden.

Krankheiten, die festgestellt oder angezeigt werden können, sind beispielsweise kardiovaskuläre Erkrankungen (insbesondere Myokardinfarkt), Nierenerkrankungen und Lungenerkrankungen, insbesondere ARDS oder ALI. Spezielle ACE2-beeinflusste Lungenerkrankungen führen zur Ansammlung von Flüssigkeit in der Lunge, in der auch die ACE2-Aktivität bestimmt werden kann. In diesem Sinne ist unter den Körperflüssigkeitsproben eine Flüssigkeit in der Lunge bzw. in den Lungenbläschen explizit eingeschlossen.

In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung einen Kit (der zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens geeignet ist), bestehend aus einem festen Träger mit immobilisierten ACE2-bindenden Einheiten, die spezifisch für einen Teil von ACE2 sind, der nicht an der katalytischen Aktivität von ACE2 beteiligt ist, und ein Substrat von ACE2, das einen fluoreszierenden Teil und einen Fluoreszenzquencherteil aufweist, die durch ACE2-Aktivität getrennt werden können.

Das immobilisierte ACE2 des Kits sowie die ACE2-bindenden Einheiten und das Substrat können wie oben beschrieben vorgesehen werden.

Die vorliegende Erfindung wird durch die folgende Figur und Beispiele näher erläutert ohne auf diese Ausführungen limitiert zu sein.

Figur 1: Immunologische Bestimmung der enzymatischen Aktivität von ACE2 in komplexen Lösungen: Lösungen unterschiedlicher ACE2-Konzentration (0 ng/ml: grau; 125 ng/ml: blau; 250 ng/ml: grün; 500 ng/ml: gelb und 1 µg/ml: rot) wurden nach immunologischer Anreicherung von ACE2 17 Stunden mit dem Peptidsubstrat Mca-Ala-Pro-Lys(Dnp)-OH inkubiert. Der Anstieg der Fluoreszenz wurde bei 320 nm / 430 nm gemessen und korreliert mit der in den Ansätzen vorhandenen Enzymmenge.

Figur 2: Immunologische Bestimmung der enzymatischen Aktivität von ACE2 in komplexen Lösungen im Kombinationsansatz: Serumproben unterschiedlicher Zeitpunkte eines ARDS Modells wurden mit 0.2 µg/ml ACE2 versetzt und mittels Kombinationsansatz (blaue Balken) und „klassischem“ Aktivitätstest in Lösung (graue Balken) vermessen.

Figur 3: Vergleich der matrixabhängigen Signalintensität des Kombinationsansatzes zu ELISA und Aktivitätstest in Lösung.

Figur 4: Menschliche ACE2 Sequenz (SEQ ID NO: 1); Das aktive Zentrum mit dem HEXXH-Zn-Bindungsmotif ist unterstrichen und fett, eine C-terminale Teilsequenz (EFLGIQPTLGPPN; (SEQ ID NO: 2) als Antikörper-Epitop ist als Fettdruck hervorgehoben.

Beispiel 1: Versuchsdurchführung

Es wurde eine murine polyklonale ACE2-spezifische Antikörperpräparation an eine 96-Well-Maxisorp-Platte (Nunc) gecoatet und anschließend mit vier Lösungen unterschiedlicher ACE2-Konzentration inkubiert. Nach einem Waschschrift wurde das Peptidsubstrat Mca-Ala-Pro-Lys(Dnp)-OH zugesetzt und die Fluoreszenz über einen Zeitraum von bis zu 17 Stunden gemessen, bei einer Anregungswellenlänge von 320 nm und einer Emissionswellenlänge von 430 nm. Figur 1 zeigt vier Standardkurven unterschiedlicher ACE2-Konzentrationen. Aufgrund der zugrunde liegenden Enzymkinetik erscheint die Produktkonzentration (proportional zur gemessenen Fluoreszenz) in linearem Zusammenhang mit der vorhandenen Enzymmenge, insofern keine Limitierung durch das Substrat auftritt. Die Steigung der Geraden entspricht hierbei den vorhandenen Enzymmengen. Hierbei unterscheiden sich diese Kurven umso deutlicher, je länger die Inkubationszeit andauert hat, nachdem die Steigung der Geraden im erwähnten Bereich konstant bleibt. Die ebenfalls mitgeführte Blankkurve hebt sich hierbei nicht, auch nicht nach 17stündiger Inkubation, von der Anfangsfluoreszenz ab. Es kann daher der Versuchsansatz je nach gewünschter Empfindlichkeit unterschiedlich lange inkubiert werden.

Beispiel 2: Absolutmessung einer Enzymmenge in komplexer Matrix

Die vorgestellte Methode soll matrixunabhängige Messungen der ACE2 Aktivität erlauben. In diesem Ansatz wurde die Menge an aktivem ACE2 sowohl mittels des beschriebenen Kombinationstests als auch mithilfe eines „klassischen“ Aktivitätstests in Lösung vermessen. Es wurde eine konstante Menge ACE2 in Serumproben zugefügt, welche zu verschiedenen Zeitpunkten eines Sepsis-Modells gezogen wurden. Es wird angenommen, dass die Konzentration an Substanzen, welche die Funktion von ACE2 inhibieren, mit zunehmender Verschlechterung der ARDS Symptome zunimmt.

Während die Messwerte beider Untersuchungsmethoden während der ersten 90 Minuten nahezu dem Ausgangswert (100%) entsprechen, kann zum 150 Minuten Messpunkt ausschließlich im Kombinationsansatz ACE2 Aktivität nachgewiesen werden (Fig. 2). Dies kann dadurch erklärt werden, dass ausschließlich im Kombinationstest ACE2 Inhibitoren durch einen Waschschrift aus dem System entfernt werden und die Aktivitätsmessung nicht beeinflussen. Diese Beobachtung qualifiziert diese Methode zur Serumkomponenten unabhängigen Analytik aktiver Enzyme aus komplexen Lösungen.

Beispiel 3: Matrixeinflüsse

Die matrixbedingte Beeinflussung der Messsignalintensität (Quenching) des Kombinationsansatzes wurde mit der eines ELISA und der eines Aktivitätstests in Lösung verglichen. Es wurden konstante ACE2 Konzentrationen von 0,5 µg/ml, 0,2 µg/ml, 0,1 µg/ml und 0,05 µg/ml in mehreren Serumverdünnungen beginnend von 1 bis 1:64 gemessen. Zum Vergleich der angeführten Messmethoden wurde die Signalintensität in der höchsten Probenverdünnung von 1:64 auf 100% gesetzt und mit den Resultaten der anderen Verdünnungsstufen verglichen. Mithilfe dieses Vergleichsparameters kann die methodenspezifische matrixbedingte Signalunterdrückung charakterisiert werden (Fig. 3).

Die ELISA Methode unterlag hierbei dem stärksten Matrixeinfluss: Bereits ab den zwei höchsten Verdünnungsstufen wurde eine Signalunterdrückung unter 90% gemessen, welche bei höherer

Serumkonzentration weiter rapide zunahm, sodass im konzentrierten Ansatz lediglich eine Restsignalintensität um 20% gemessen werden konnte. Der Aktivitätsansatz in Lösung zeigte den geringsten Matrixeinfluss. Hier konnte man eine deutlich knappere Signalunterdrückung auf 70% in der konzentrierten Probe erkennen. Der Kombinationsansatz zeigt Ähnlichkeiten zu beiden anderen Methoden: Er kennzeichnet sich durch eine deutlich stärkere Matrixabhängigkeit im Vergleich zum Aktivitätsansatz. Jedoch fällt die Signalintensität selbst in der konzentrierten Probe nicht unter 50%.

Diese Methode ermöglicht somit eine ACE2 spezifische Aktivitätsmessung selbst in konzentrierten Serumproben: Durch die immunologische ACE2 spezifische Interaktion des ersten Schrittes wird ausschließlich dieses Enzym in den Versuch eingebracht. Die Messung dessen Aktivität wird im zweiten Schritt nicht durch andere in der Matrix vorhandene Proteasen oder ACE2 Inhibitoren verfälscht.

Literatur:

1. Danilczyk et al., Circ Res 98, 463-471 (2006).
2. Vickers et al., J Biol Chem 277, 14838-14843 (2002).
3. Ferrario et al., J Am Soc Nephrol 9, 1716-1722 (1998).
4. Imai et al., Nature 436, 112-116 (2005).
5. Kuba et al., Curr Opin Pharmacol (2006).
6. Ye et al., Hypertension 43, 1120-1125 (2004).
7. Huang et al., J Biol Chem 278, 15532-15540 (2003).
8. Guy et al., Biochemistry 42, 13185-13192 (2003).
9. Towler et al., J. Biol Chem 279, 17996-18007 (2004).
10. Burrell et al., Europ Heart J 26, 369-375 (2005).
11. Ishiyama et al., Hypertension 43, 970-976 (2004).

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Apeiron Biologics Forschungs- und Entwicklungs GmbH

<120> Verfahren zur Bestimmung der Aktivität eines Enzyms

<130> r48050

<160> 2

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 740

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

Ala Gln Ser Thr Ile Glu Glu Gln Ala Lys Thr Phe Leu Asp Lys Phe
20 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
145 150 155 160

Arg Leu Trp Ala Trp Glu Ser Trp Arg Ser Glu Val Gly Lys Gln Leu
165 170 175

Arg Pro Leu Tyr Glu Glu Tyr Val Val Leu Lys Asn Glu Met Ala Arg
180 185 190

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

50 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

55 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
 5
 Ile Arg Tyr Tyr Thr Arg Thr Leu Tyr Gln Phe Gln Phe Gln Glu Ala
 515 520 525
 10
 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
 15
 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
 20
 Thr Trp Leu Lys Asp Gln Asn Lys Asn Ser Phe Val Gly Trp Ser Thr
 595 600 605
 25
 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
 30
 Tyr Leu Phe Arg Ser Ser Val Ala Tyr Ala Met Arg Gln Tyr Phe Leu
 645 650 655
 35
 Lys Val Lys Asn Gln Met Ile Leu Phe Gly Glu Glu Asp Val Arg Val
 660 665 670
 Ala Asn Leu Lys Pro Arg Ile Ser Phe Asn Phe Phe Val Thr Ala Pro
 675 680 685
 40
 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
 45
 Ser Leu Glu Phe Leu Gly Ile Gln Pro Thr Leu Gly Pro Pro Asn Gln
 725 730 735
 50
 Pro Pro Val Ser
 740

<210> 2

<211> 13

<212> PRT

55

9. Verfahren nach Anspruche 7, *dadurch gekennzeichnet*, dass die Antikörper, -fragmente oder -derivate monoklonal sind.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, *dadurch gekennzeichnet*, dass das Substrat ein niedermolekulares Peptid mit einer Länge von 2 bis 30 Aminosäuren, bevorzugt 2 bis 20 Aminosäuren, insbesondere bevorzugt 2 bis 10 Aminosäuren, ist das von ACE2 gespalten werden kann, und an einem zu erwartenden Spaltprodukt der Fluoreszenzteil und an einem anderen zu erwartenden Spaltprodukt der Quencher kovalent verbunden ist, bevorzugt Mca-Ala-Pro-Lys(Dnp)-OH.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, *dadurch gekennzeichnet*, dass die Probe chromophore und/oder fluoreszierende Verunreinigungen enthält.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, *dadurch gekennzeichnet*, dass die Probe ausgewählt ist aus Körperflüssigkeiten, homogenisierten fluiden Gewebeproben und Zellkulturüberständen.
13. Verfahren nach Anspruch 12, *dadurch gekennzeichnet*, dass die Probe ausgewählt ist aus Vollblut, Serum- oder Plasmaproben.
14. Verwendung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 5 bis 13 zur *in vitro* Bestimmung von ACE2 Titern in Vollblut, Serum- oder Plasmaproben.
15. Kit zur Durchführung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 13, bestehend aus einem festen Träger mit immobilisierten ACE2-bindenden Einheiten, die spezifisch für einen Teil des ACE2 sind, der nicht an der katalytischen Aktivität des ACE2 beteiligt ist, und ein Substrat des ACE2, das einen fluoreszierenden Teil und einen Fluoreszenzquencharteil aufweist, die durch ACE2-Aktivität getrennt werden können.
16. Kit nach Anspruch 15, wobei das ACE2 wie in den Ansprüchen 4 oder 5, und/oder die ACE2-bindenden Einheiten wie in einem der Ansprüche 6 bis 9 und/oder das Substrat wie in Anspruch 10 definiert ist.

Hiezu 2 Blatt Zeichnungen



Fig. 1

Immunologische Bestimmungsmethode der enzymatischen Aktivität von
Angiotensin Converting Enzyme 2

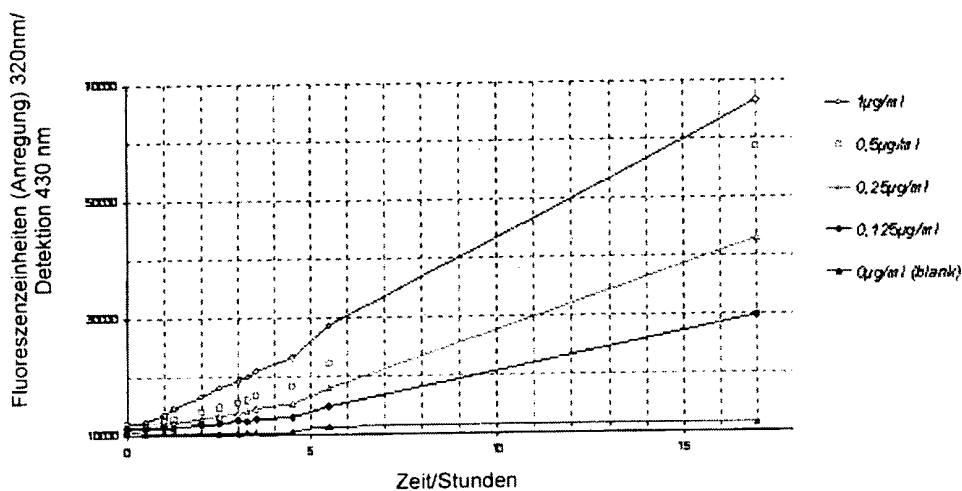


Fig. 2

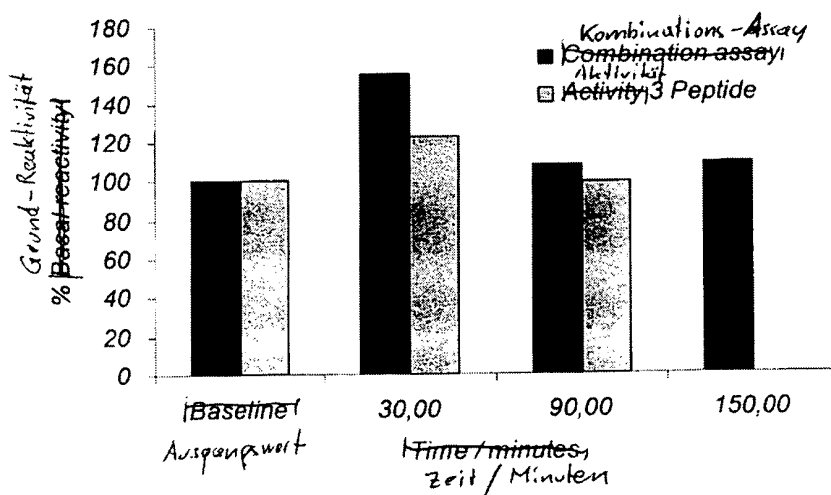




Fig. 3

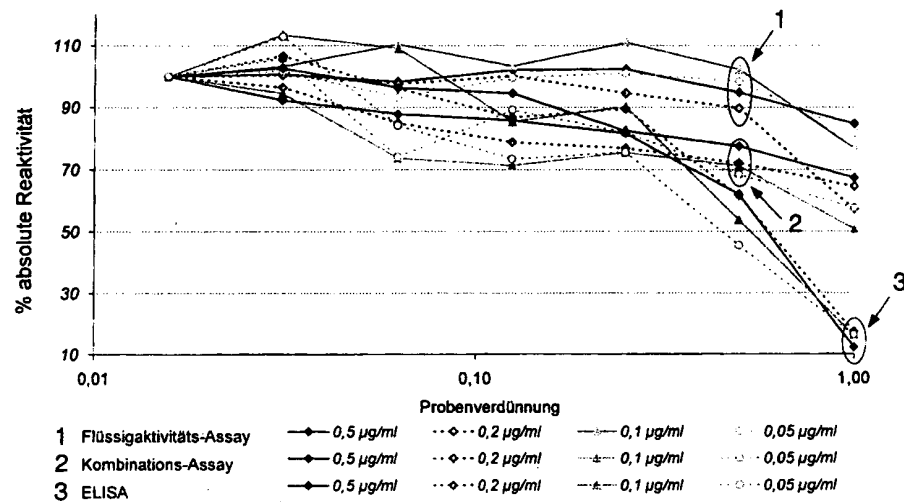


Fig. 4

MSSSSWLLLSLVAVTAAQSTIEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQSSLASWNYNTNITEE
NVQNMNAGDKWSAFLKEQSTLAQMYPLQEIQNLTVKLQLQALQQNGSSVLSEDK
SKRLNTILNTMSTIYSTGKVCNPDNPQECLLLEPGLNEIMANSLDYNERLWAWESW
RSEVGKQLRPLYEYVVLKNEMARANHYEDYGDYWRGDYEVNGVDGYDYSRGQL
IEDVEHTFEEIKPLYEHLHAYVRAKLMNAYPSYISPIGCLPAHLLGDMWGRFWTNLYS
LTPVFGQKPNIDVTDAMVDQAWDAQRIFKEAEKFFVSVGLPNMTQGFWENSMLTDP
GNVQKAVCHPTAWDLGKGDFRILMCTKVTMDDFLTAHHEMGHIQYDMAYAAQ
PFLLRNGANEGFHEAVGEIMSLSAATPKHLKSIGLLSPDFQEDNETEINFLLKQALTIV
GTLPTFTYMLEKWRWMVFKGEIPKDQWMKKWWEMKREIVGVVEPVPHDETYCDPAS
LFHVSNDYSFIRYYTRTLYQFQFQEALCQAAKHEGPHLHKDISNSTEAGQKLFNMLRL
GKSEPWTLALENVVGAKNMNVRPLLNYFEPLFTWLKDQNKNSFVGWSTDWSPYAD
QSIKVRISLKSALGDKAYEWNDEMILFRSSVAYAMRQYFLKVKNQMILFGEEDVRV
ANLKPRISFNFFVTAPKNVSDIIPRTEVEKAIRMSRSRINDAFRLNDNSLEFLGIQPTLG
PPNQPPVS