



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 318 137**

51 Int. Cl.:
A61K 48/00 (2006.01)
C12N 9/64 (2006.01)
A61K 38/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03729747 .0**
96 Fecha de presentación : **19.06.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1515752**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.03.2005**

54 Título: **Activación de ACE2 para el tratamiento de enfermedades cardíacas, pulmonares y renales e hipertensión.**

30 Prioridad: **19.06.2002 US 389709 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2009

73 Titular/es: **University Health Network
Room 7-504, 610 University Avenue
Toronto, Ontario M5G 2M9, CA**

72 Inventor/es: **Penninger, Joseph, M. y
Crackower, Michael, A.**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 318 137 T3

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

DESCRIPCIÓN

Activación de ACE2 para el tratamiento de enfermedades cardíacas, pulmonares y renales e hipertensión.

5 **Campo de la invención**

La presente invención proporciona composiciones y procedimientos para uso en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades cardíacas, pulmonares y renales, incluyendo hipertensión, enfermedad cardíaca coronaria, insuficiencia cardíaca y renal, edema pulmonar, y lesión pulmonar tal como en choque tóxico o ventilación artificial.

10 **Antecedentes de la invención**

La enfermedad cardiovascular será la mayor carga social de cuidados sanitarios del siglo 21, y se predice que sea la causa más común de muerte en todo el mundo en 2020. Un factor de riesgo principal es de enfermedad cardíaca es la alta presión sanguínea. La hipertensión es un carácter cuantitativo multifactorial controlado tanto por factores genéticos como ambientales. Mientras se conoce mucho acerca de los factores ambientales que pueden contribuir a la alta presión sanguínea, tales como la dieta y actividad física, se conoce menos sobre los factores genéticos que son responsables de la predisposición a enfermedades cardiovasculares. A pesar de la identificación de varios loci de carácter cuantitativo genético supuestos (QTL) asociados a la hipertensión en modelos animales, ninguno de estos loci se han traducido en genes. De este modo, los mecanismos moleculares y genéticos que subyacen a la hipertensión y otras enfermedades cardiovasculares permanecen en gran medida oscuros.

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

Recientemente se ha identificado un homólogo de ACE, denominado ACE2, que se expresa predominantemente en las células endoteliales vasculares del riñón y corazón. De manera interesante, dos homólogos de ACE también existen en las moscas. De manera similar las funciones de ACE, ACE2 como una carboxipeptidasa, que escinde un único resto de AngI, que genera Ang1-9, y un único resto de AngII para generar Ang1-7. Estos datos bioquímicos *in vitro* sugieren que, ACE2 modula el RAS y de este modo juegan un papel en la regulación de la presión sanguínea. Se conoce el papel *in vivo* de ACE2 en el sistema cardiovascular y el RAS.

Oonoghue *et al.* (Circulation Research 87 (5): e1 - e9, 2000) describen la identificación de ACE2 a partir de una genoteca de ADNc.

Yagil *et al.* (Hypertension 33 (1): 261 - 265, 1999) realizaron una selección genética de los loci cromosómicos asociados a la hipertensión en ratas.

Acton *et al.* en la Patente de Estados Unidos N° 6.194.556 (documento WO 02/12471), describe el uso de ACE2 en la diagnosis y terapéutica de los estados asociados a ACE2. La patente estableció que los niveles de expresión ACE2 se incrementan con la hipertensión y de este modo los antagonistas o inhibidores de ACE2 serían útiles en el tratamiento de un incremento de la presión sanguínea o trastornos relacionados. La solicitud de patente canadiense n° 2.372.387 proporciona ejemplos específicos de inhibidores de ACE2 que, se pretende que sean útiles para el tratamiento de enfermedad cardíaca enfermedad cardíaca, tal como hipertensión. Esto de nuevo enfatiza la necesidad de inhibir, en lugar de incrementar, la actividad de ACE2. Estas referencias, que enseñan la necesidad de inhibir la actividad de ACE2, se basan solamente en los datos experimentales *in vitro*. No proporcionan datos *in vivo*, tales como los datos de mamíferos inactivados, para caracterizar ACE2. Hasta la fecha, no se ha aprobado ningún inhibidor de ACE2 como compuesto farmacéutico para el tratamiento de hipertensión. Además, el papel *in vivo* de ACE2 en el sistema cardiovascular y el RAS permanece en gran medida desconocido. Permanece una necesidad de caracterizar la función de ACE2 con el fin de sea capaz de diseñar ensayos de diagnóstico apropiados y compuestos farmacéuticos para el tratamiento de enfermedad cardíaca y renal.

60 **Sumario de la invención**

La invención proporciona un nuevo paradigma para la regulación del sistema renina - angiotensina y muestra un uso completamente nuevo e inesperado de ACE2, en contraste a la predicción basada en los datos *in vitro* (patente Acton) y no esperada en la técnica anterior, como un regulador crítico negativo del RAS requerido para la función cardíaca y control de la presión sanguínea. La activación de ACE2 es crítica para el tratamiento y prevención de enfermedad cardíaca, pulmonar y renal. La invención muestra la primera vez que la administración de un activador de ACE2 a un animal previene y trata la hipertensión y enfermedad cardíaca y renal, y lesión pulmonar. El ámbito de la presente invención se define en las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

Las realizaciones preferidas de la invención se describirán en relación a los dibujos que siguen:

5 **Figura 1***Secuencia y mapeo cromosómico de ACE2 de rata*

10 *a*, alineación de proteína de ACE2 de rata, de ratón y ser humano, con ACE de testículos humanos y de ratón (T-ACE). Lo sombreado en negro indica la identidad de aminoácidos y lo sombreado en gris indica el grado de similitud de aminoácidos. *b*, Estructura del dominio esquemático de ACE y ACE2. Hay que observar que ACE2 solamente contiene el dominio ACE con el sitio de unión de cinc de consenso HEMGH. Los centros catalíticos se indican en negro, el péptido señal se indica en gris y el dominio transmembrana en líneas discontinuas. *c*, Patrones de Expresión de los genes de ACE2 de rata y ratón en tejidos adultos diferentes y días diferentes de desarrollo embrionario 15 (E7 = día embrionario 7). Hay que observar que están presentes dos isoformas para ACE2 en ratones, pero no en rato o ser humano (no mostrado), una característica similar a la observada para ACE15. *d*, Resultados de mapa de híbrido de radiación de ACE2 de rata, comparado con el mapa de QTL identificado en los animales sensibles a sal ratas Sabra (SS-X), SHRSP (BP3), y SHR (BB.Xs). Los nombres de los marcadores polimórficos se indican a la izquierda del ideograma. Se muestran las puntuaciones de LOD y los valores theta para los marcadores unidos a ACE2. cR = 20 centiRads.

Figura 2*Niveles de expresión de ACE2 en modelos de ratas de hipertensión*

25 *a*, análisis de transferencia Northern de ARNm de ACE2 de riñones de ratas Sabra SBH/y y SBN/y. La sección anterior muestra la representación de transferencias de Northern con niveles de control de actina. El panel inferior muestra los niveles relativos de mensaje de ace2 normalizado para los niveles de actina. *b*, Análisis de transferencia de Western de los nivel proteína de ACE2 de riñones de Sabra SBH/y y sus ratas control SBN/y, así como SHR y SHRSP 30 y sus ratas control WKY. La sección superior muestra transferencias de Western representativas. Se indica la presión sanguínea sistólica (BP) en mmHg para las respectivas ratas Sabra. El panel inferior muestra los niveles de proteína relativos de ACE2 corregidos para actina. Las barras muestran los valores medios +/- ETM. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$. (n = 4, para todos los grupos).

35 **Figura 3***Rotura dirigida de ACE2 de ratón mediante recombinación homóloga*

40 *a*, Estrategia de dirección de genes. Se muestra una parte del locus de tipo salvaje de *ace2* murino (parte superior). Los recuadros en negro indican exones. El vector de dirección se diseñó para reemplazar el exón 9 que codifica el dominio catalítico de unión a cinc con el módulo del gen de resistencia a neomicina (neo) colocado en la orientación de sentido contrario. Se usó la timidita quinasa (TK) para la selección negativa. Las sondas flanqueantes de 3' y 5' usadas para los análisis de Southern se indican con un recuadro de línea discontinuo. *b*, análisis de transferencia Southern de células *ace2+/y* y *ace2-/y* ES. Se digirió el ADN genómico con EcoRI y se hibridizó con la sonda flanqueante de 3' y 5' 45 mostrada en (a). *c*, Análisis de transferencia de Western de la proteína de expresión de ACE2 en los riñones de ratones *ace2+/y* *ace2-/y*. El anti-ACE2 Ab es reactivo con una región N-terminal a la supresión. *d*, análisis de RT-PCR de la expresión de ARNm de ACE en el corazón y riñones de ratones *ace2+/y* y *ace2-/y*. Se muestran diferentes ciclos de PCR para la amplificación lineal y los niveles de ARNm de GAPDH como control.

50 **Figura 4***Presión sanguínea normal y funciones renales*

55 *a*, Se muestran mediciones de la presión sanguínea en ratones de 3 meses de edad *ace2+/y* (n = 8) y *ace2-/y* (n = 8) en la ausencia (paneles izquierdos) o la presencia del bloqueador de ACE Captopril. Las presiones sanguíneas se determinaron mediante el uso de los extremos de cola y se muestran los valores medios +/- D E. Se administró Captopril a los ratones durante 2 semanas antes de las mediciones de presión sanguínea como se describe en los Procedimientos. Estas presiones sanguíneas se confirmaron usando mediciones hemodinámicas y de Langendorf invasivas (no mostradas). Las diferencias en los ratones tanto los ratones tratados con captopril *ace2+/y* como *ace2-/y* son sig- 60 nificativamente diferentes de de los grupos no tratados respectivos (** $p < 0,01$). *b*, Las histologías de riñón normales se observan en los ratones de 6 meses de edad *ace2+/y* y *ace2-/y*. Las flechas indican glomérulos.

Figura 565 *Morfología del corazón*

a, Secciones teñidas H&E de corazones aislados de ratones de 6 meses de edad *ace2+/y* y *ace2-/y*. Los ventrículos izquierdos agrandados (LV) y ventrículos derechos (RV) se observaron en los ratones *ace2-/y*. Sin embargo,

el tamaño global del corazón era comparable entre ambos genotipos y no existía evidencia de hipertrofia cardíaca, microscópicamente o en cardiomiocitos aislados.

b, Cuantificación de las relaciones de peso de corazón/cuerpo de los ratones de 6 meses de edad *ace2^{+/-}* (n= 8) y *ace2^{-/-}* (n = 8) como un indicador de hipertrofia cardíaca. Se debe observar que los pesos del cuerpo, pesos del corazón, longitudes de la tibia, y las relaciones de peso del corazón/longitud e la tibia no cambiaron entre los grupos genéticos diferentes a todas las edades analizadas (no mostrado). *c*, *d*, Existía una fibrosis intersticial en los ratones *ace2^{-/-}*. Una característica de sello para la cardiopatía dilatada es la fibrosis intersticial. Sin embargo, la fibrosis intersticial era comparable entre los corazones de ratones *ace2^{+/-}* (n = 8) y *ace2^{-/-}* (n = 8). (c) muestra la tinción de PSR de corazones individuales. Hay que observar que la fibrosis perivascular, teñido en rojo, tanto en animales de tipo salvaje como mutantes. (d) cuantificación de cambios fibróticos en el intersticio.

Figura 6

15 *Pérdida de los resultados de ACE2 en la insuficiencia cardíaca contráctil grave*

a, mediciones ecocardiográficas de corazones en contracción en ratones *ace2^{+/-}* de 6 meses de edad y dos *ace2^{-/-}*. Los máximos y valles indican la sístole y diástole de los ritmos cardíacos individuales. Las flechas indican la distancia entre la contracción sistólica (LVESD) y la relajación sistólica (LVEDD), valores que determinan el porcentaje de acortamiento (% FS). Hay que observar que el incremento de las dimensiones diastólicas y sistólicas en los ratones *ace2^{-/-}* son indicativos de la dilatación cardíaca. Los datos experimentales se pueden observar en la Tabla 1. *b*, Se observó el porcentaje de acortamiento fraccional y velocidad de acortamiento circunferencial de fibra, dos parámetros de sello para la contracción del corazón, en ratones de 6 meses de edad *ace2^{+/-}* (n = 8) y *ace2^{-/-}* (n = 8) y ratones de 6 meses de edad *ace2^{+/-}* (n = 5) y ratones hembra *ace2^{-/-}* (n = 5). Se determinaron los valores mediante ecocardiografía. Se muestran los valores medios +/-DE. * p < 0,05 y ** p < 0,01 entre grupos genéticos. Loas datos experimentales se pueden ver en la Tabla 1. *c*, Mediciones de la presión sanguínea en ratones macho de 6 meses de edad *ace2^{+/-}* (n = 8) y *ace2^{-/-}* (n = 8) y ratones hembra de 6 meses de edad *ace2^{+/-}* (n = 5) y ratones hembra *ace2^{-/-}* (n = 5). Se muestran los valores medios +/- DE. Se confirmaron las presiones sanguíneas usando las mediciones hemodinámicas invasivas como se puede observar en la Tabla 2..* p < 0,05.

Figura 7. La regulación hacia arriba de los marcadores de hipoxia e incremento de los niveles de la angiotensina II en la ausencia de ACE2 *a*, *b*, análisis de transferencia de Northern de BNIP3 y niveles de expresión de ARNm de PAI-1, dos genes inducibles por hipoxia en ratones macho de 6 meses de edad *ace2^{+/-}* (n=5) y ratones *ace2^{-/-}* (n = 5). (a) muestra datos de transferencia de Northern individuales (b) niveles relativos de BNIP3 y niveles de ARNm de PAI-1 normalizados para el control de gráfico. ** p < 0,01. *c*, los niveles de péptido de Angiotensina I (AngI) y Angiotensina II (AngII) en el corazón y riñones de ratones macho de camada *ace2^{+/-}* (n = 8) y *ace2^{-/-}* (n = 8). Los niveles en tejido de AngI y AngII se determinaron mediante radioinmunoensayos.

Se muestran los niveles de péptido medios +/- DE. ** p < 0,01.

Figura 8

Ratones doble mutantes ACE-ACE2 no desarrollan insuficiencia cardíaca

a, Mediciones de presión sanguínea en ratones macho de 6 meses de edad *ace2^{+/-}* (n = 8), *ace^{-/-}* (n = 8), y ratones doble mutantes *ace^{-/-} ace2^{-/-}* (n = 6). Se muestran los valores medios +/- DE. Las Presiones sanguíneas se confirmaron usando mediciones hemodinámicas invasivas. ** p<0.01 de mutante cuando se compara con los ratones de *tipo salvaje* *b*, Porcentaje de acortamiento fraccional y velocidad de acortamiento circunferencial de fibra en ratones macho *ace2^{+/-}* (n = 8), *ace2^{-/-}* (n = 8), *ace^{-/-}* (n = 8) y *ace^{-/-} ace2^{-/-}* doble mutantes (n = 6) de la misma camada. Se determinaron los valores mediante ecocardiografía. Se muestran los valores medios +/- DE.

** p < 0,01 entre los grupos genéticos. Se pueden observar los datos experimentales en la Tabla 3. *c*, mediciones ecocardiográficas de las contracciones de corazón en los ratones machos de 6 meses de edad *ace2^{+/-}*, *ace2^{-/-}*, *ace^{-/-}*, y *ace^{-/-} ace2^{-/-}* doble mutante de la misma camada. Se analizaron los ecocardiogramas y se marcaron como se describe en la Figura 6a. Hay que observar que la ablación de ACE en un fondo nulo de *ace2* completamente rescata los defectos del corazón contráctil observado en los ratones *ace2^{-/-}* mutantes individuales.

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

Figura 10. *a*, ADN de ACE2 humano (SEQ ID NO:1). *b*, polipéptido de ACE2 humano (SEQ ID NO:2).

Figura 11. *a*, ADN de ACE2 de ratón (SEQ ID NO:3). *b*, polipéptido de ACE2 de ratón (SEQ ID NO:4)

Figura 12. Polimorfismos y secuencias de nucleótidos ACE2.

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona un nuevo paradigma para la regulación del sistema RAS y muestra que ACE2 es un regulador crítico negativo del RAS requerido para la función cardíaca y función cardiovascular, función renal y lesión pulmonar. La invención enseña por primera vez el uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de ACE2 o ácido nucleico de ACE2. Para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un estado de disminución de ACE2 seleccionado entre hipertensión, insuficiencia cardíaca congestiva, insuficiencia cardíaca crónica, insuficiencia cardíaca aguda, infarto de miocardio, arteriosclerosis, insuficiencia renal o una enfermedad pulmonar en un mamífero, en el que la enfermedad pulmonar es enfermedad pulmonar obstructiva crónica, neumonía, asma, bronquitis crónica, enfisema pulmonar, fibrosis quística, enfermedad pulmonar intersticial, hipertensión pulmonar crítica, Embolia pulmonar, sarcoidosis pulmonar, tuberculosis, edema pulmonar, ARDS o cáncer de pulmón.

Este resultado es completamente inesperado en vista de las referencias de la técnica anterior, tal como la Patente de Estados Unidos n° 6.194.556 y la Solicitud de Patente Canadiense n° 2.372.387, descrita anteriormente, que enseña que la actividad de ACE2 se debe inhibir con el fin de tratar enfermedad cardíaca. De este modo es sorprendente que la enfermedad cardíaca se trate realmente mediante la activación de la expresión de y/o actividad de ACE2.

La invención también incluye ensayos de selección para detectar un agonista de la actividad de ACE2, que se puede usar para tratar las enfermedades mencionadas anteriormente. Estos ensayos son *in vitro* o *in vivo*. En una realización preferida la invención incluye un ensayo de células huésped endotelial, de riñón, pulmón o corazón para evaluar si un compuesto candidato es capaz de incrementar la expresión o actividad de ACE2. Se cultivan las células en la presencia de al menos un compuesto cuya habilidad para activar la expresión o actividad se busca que se determine y las células se miden para determinar un incremento en el nivel de expresión de ACE2. Otro aspecto de la invención implica un ratón con inactivación de ACE2 para identificar los compuestos que pueden superar los efectos de la pérdida de ACE2. Los polipéptidos y moléculas orgánicas se ensayan en estos ensayos. La invención incluye todos los compuestos que se identifican con los procedimientos de selección de la invención y que son adecuados para la administración a animales en las composiciones farmacéuticas.

Procedimientos terapéuticos

Como se ha mencionado anteriormente en el presente documento, los presentes inventores han mostrado que la expresión del gen ACE2 está regulado hacia abajo en la hipertensión, enfermedad cardíaca y renal. De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona el uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de ACE2 o ácido nucleico de ACE2 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una disminución del estado de ACE2 seleccionado entre hipertensión, insuficiencia cardíaca congestiva, insuficiencia cardíaca crónica, insuficiencia cardíaca aguda, infarto de miocardio, arteriosclerosis, insuficiencia renal o una enfermedad pulmonar en un mamífero, en el que la enfermedad pulmonar es enfermedad pulmonar obstructiva crónica, neumonía, asma, bronquitis crónica, enfisema pulmonar, fibrosis quística, enfermedad pulmonar intersticial, hipertensión pulmonar primaria, embolia pulmonar, sarcoidosis pulmonar, tuberculosis, edema pulmonar, ARDS o cáncer de pulmón. La cantidad terapéuticamente eficaz puede ser de moléculas de ácido nucleico (incluyendo ACE2 o sus fragmentos), proteínas (incluyendo Ace2 o sus fragmentos) o péptidos. Si o no el gen de ACE2 se incrementa se puede determinar fácilmente por los expertos en la técnica usando procedimientos conocidos incluyendo transferencia de Western SDSPAGE, inmunquímica, RT-PCR, transferencia de Northern e hibridación *in situ*.

El término “animal” como se usa en el presente documento incluye todos los miembros del reino animal. Los animales son preferiblemente seres humanos.

El término “cantidad eficaz” como se usa en el presente documento significa una cantidad eficaz a dosificaciones y durante períodos de tiempo necesarios para potenciar el nivel de ACE2. El término “tratamiento o tratar” como se usa en el presente documento significa un planteamiento para obtener resultados beneficiosos o deseados, incluyendo los resultados clínicos. Los resultados clínicos o beneficiosos deseados pueden incluir, pero no se limitan a, alivio o mejora de de uno o más síntomas o afecciones, disminución o extinción de la enfermedad, estado patológico estabilizado (es decir no empeoramiento), prevención de la extensión de la enfermedad, retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado patológico, y remisión del estado patológico, y remisión (bien parcial o total), bien detectable o indetectable. “tratamiento” también puede significar prolongación de la supervivencia comparado con la supervivencia esperada si no recibe tratamiento.

Administración de molécula de ácido nucleico de ACE2

En una realización, la expresión del gen de ACE2 se incrementa mediante la administración de un ácido nucleico que comprende un gen de ACE2 o una parte del mismo.

En otra realización, la expresión del gen de ACE2 se puede incrementar mediante la administración de un agente que incrementa la expresión del gen de ACE2 incluyendo cualesquiera agentes identificados usando los ensayos de selección en esta solicitud.

Ya que un animal que sufre de la enfermedad, trastorno o estado físico anormal se puede tratar mediante la regulación hacia arriba de ACE2, la terapia génica para incrementar la expresión de ACE2 es útil para modificar el desarrollo/progresión de enfermedad pulmonar renal o pulmonar.

5 La invención incluye procedimientos y composiciones para proporcionar la terapia génica de ACE2 para el tratamiento de enfermedades, trastornos o estados físicos anormales caracterizados por la disminución de la expresión de ACE2 o niveles de la actividad del polipéptido de ACE2.

10 La invención incluye procedimientos y composiciones para proporcionar una molécula de ácido nucleico que codifica ACE2 o molécula de ácido nucleico equivalente a las células de un animal de manera que la expresión de ACE2 en las células proporciona la actividad biológica o fenotipo del polipéptido de ACE2 a esas células. Se administran suficientes cantidades de la molécula de ácido nucleico y se expresan a niveles suficientes para proporcionar la actividad biológica o fenotipo del polipéptido de ACE2 a las células. Por ejemplo, el procedimiento puede preferiblemente implicar un procedimiento de distribución de una molécula de ácido nucleico que codifica ACE2 a las células de un animal que tiene enfermedad cardiovascular o renal, o pulmonar, que comprende la administración al sujeto de un vector que comprende ADN que codifica ACE2. El procedimiento también se puede referir a un procedimiento para proporcionar un animal que tiene enfermedad cardiovascular o renal, o pulmonar con el polipéptido biológicamente activo de ACE2 mediante la administración de ADN que codifica ACE2. El procedimiento se puede realizar *in vivo* o *ex vivo* (por ejemplo, con células del tronco de corazón, pulmón, endoteliales o de riñón, células progenitoras u otras células que van a ser células transplantada). Se explican los procedimientos y composiciones para administrar ACE2 (que se incluyen en terapia) a célula aislada o un animal, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos números 5.672.344, 5.645.829, 5.741.486, 5.656.465, 5.547.932, 5.529.774, 5.436.146, 5.399.346, 5.670.488, 5.240.84, 6.322.536, 6.306.830 y 6.071.890.

25 El procedimiento también se refiere a un procedimiento para producir una reserva de virus recombinante mediante la producción de virus adecuado para terapia génica que comprende el ADN que codifica ACE2. Este procedimiento preferiblemente implica la transfección de células que permiten la replicación de virus (conteniendo el virus la molécula de ácido nucleico) y recoger el virus producido.

30 Los procedimientos y composiciones se pueden usar *in vivo* o *in vitro*. La invención también incluye composiciones (preferiblemente composiciones farmacéuticas para la terapia génica). Las composiciones incluyen un vector que contiene ACE2. El vehículo puede ser un vehículo farmacéutico o un transformante de célula huésped que incluye el vector. Los vectores conocidos en la técnica incluyen pero no se limitan a retrovirus, adenovirus, virus asociado a adeno (AAV), vectores herpes virus, tales como vectores de virus vaccinia, VIH y vectores basados en lentivirus, o plásmidos. La invención también incluye líneas celulares de empaquetamiento y auxiliares que se requieren para producir el vector. Los procedimientos de producción del vector y procedimientos de terapia génica que usan el vector y procedimientos de la terapia génica que usan el vector también se incluyen en la invención.

40 La invención también incluye una célula transformada que contiene el vector y las secuencias de moléculas de ácido nucleico de ACE2 recombinantes.

Uso de variantes de ACE2 - Modificaciones a la secuencia de polipéptido

45 Las variantes de ACE2 se pueden usar en los procedimientos de la invención. Los cambios que dan como resultado la producción de de una secuencia de aminoácidos químicamente similar equivalente están incluidas dentro del alcance de la invención. Los polipéptidos que tienen identidad de secuencias con el receptor de ACE2 se ensayan para asegurar que son adecuados para el uso en el procedimiento de la invención. Se pueden producir de manera natural variantes de polipéptidos de la invención, por ejemplo, mediante mutación, o se pueden preparar, por ejemplo, con técnicas de ingeniería genética de polipéptido tales como mutagénesis dirigida al sitio, que se conocen bien en la técnica para sustitución de aminoácidos. Por ejemplo, un resto hidrófobo, tal como glicina se puede sustituir por otro resto hidrófobo tal como alanina. Un resto alanina puede estar sustituido con un resto más hidrófobo tal como leucina, valina o isoleucina. Un aminoácido cargado negativamente tal como ácido aspártico se puede sustituir por ácido glutámico. Un aminoácido cargado positivamente tal como lisina se puede sustituir por otro aminoácido cargado positivamente tal como arginina.

55 Por lo tanto, la invención incluye polipéptidos que tienen cambios o sustituciones conservadores en secuencias de aminoácidos. Las sustituciones conservadoras insertan uno o más aminoácidos, que tienen propiedades químicas similares que los aminoácidos reemplazados. La invención incluye secuencias donde las sustituciones conservadoras se hacen de manera que no destruyan la actividad del compuesto.

60 Los polipéptidos que comprenden uno o más d-aminoácidos se contemplan con la invención. También se contemplan polipéptidos donde uno o más aminoácidos están acetilados en el extremo N. Los expertos en la técnica reconocen que está disponible una diversidad de técnicas para construir miméticos de polipéptidos con la misma o similar actividad del compuesto deseado pero con actividad más favorable que el polipéptido con respecto a la solubilidad estabilidad, y/o susceptibilidad a hidrólisis y proteólisis. Véase, por ejemplo, Morgan y Gainor, Ann. Rep. Med. Chem., 24: 243 - 252 (1989). Los ejemplos de miméticos de polipéptido se describen en la patente de estados Unidos N° 5.643.873. Otras patentes que describen cómo preparar y usar miméticos se incluyen, por ejemplo en, 5.786.322, 5.767.075, 5.763.571, 5.753.226, 5.683.983, 5.677.280, 5.672.584, 5.668.110, 5.654.276, 5.643.873. Los

ES 2 318 137 T3

miméticos de los polipéptidos de la invención también se pueden preparar de acuerdo a otras técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, tratando un polipéptido de la invención con una agente que altera químicamente un grupo lateral convirtiendo un grupo hidrógeno en otro grupo tal como un grupo hidroxilo o amino. Los miméticos preferiblemente incluyen las secuencias que son o bien enteramente hechos de aminoácidos o secuencias que son híbridos incluyendo los aminoácidos y aminoácidos modificados u otras moléculas orgánicas.

La invención también incluye híbridos y polipéptidos, por ejemplo donde una secuencia de nucleótidos se combina con una segunda secuencia.

La invención también incluye procedimientos de uso de fragmentos de polipéptidos de ACE2 que se pueden usar para conferir actividad del compuesto si los fragmentos retienen actividad. La invención también incluye polipéptidos y fragmentos de los polipéptidos de la invención que se pueden usar como una herramienta de investigación para caracterizar el polipéptido o su actividad. Tales polipéptidos preferiblemente constan de al menos 5 aminoácidos. En realizaciones preferidas, pueden constar de 6 a 10, 11 a 15, 16 a 25, 26 a 50, 51 a 75, 76 a 100 ó 101 a 250 ó 250 a 500 aminoácidos. Los fragmentos pueden incluir secuencias con más aminoácidos eliminados, por ejemplo, aminoácidos del extremo C en una secuencia del compuesto.

Potenciación de la actividad del polipéptido ACE2

La actividad de ACE2 aumenta o disminuye llevando a cabo mutagénesis dirigida al sitio selectiva. Un plásmido de ADN o vector de expresión que contiene la molécula de ácido nucleico o una molécula de ácido nucleico que tiene identidad de secuencia se usa preferiblemente para estos estudios usando el kit de mutagénesis U.S.E. (Eliminación de sitio único) de Pharmacia Biotech u otros kits de mutagénesis que están comercialmente disponibles, o usando PCR. Una vez que se crea y confirma la mutación mediante análisis de secuencia de ADN, el polipéptido mutante se expresa usando un sistema de expresión y se controla su actividad.

La invención también incluye procedimientos de uso de polipéptidos que tienen identidad de secuencia al menos aproximadamente: > 20%, > 25%, > 28%, > 30%, > 35%, > 40%, > 50%, > 60%, > 70%, > 80% o > 90% más preferiblemente al menos aproximadamente > 95%, > 99% o > 99,5%, a ACE2 humano o de ratón (o una secuencia parcial del mismo). Las moléculas de polipéptido modificadas se describen más adelante. Preferiblemente aproximadamente: 1, 2, 3, 4, 5, 6 a 10, 10 a 25, 26 a 50 ó 51 a 100, o 101 a 250 nucleótidos o aminoácidos están modificados.

Se calcula la identidad de acuerdo con conocidos en la técnica. La identidad de secuencia se determina lo más preferiblemente mediante la investigación avanzada del programa BLAST versión 2.1 (parámetros como antes). BLAST es una serie de programas que están disponibles en la línea <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>. La investigación de BLAST avanzada (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi?Jform=1>) se establece para los parámetros por defecto. (es decir, Matrix BLOSUM62; Coste de existencia de hueco 11; Por coste de hueco de residuo 1; relación Lambda 0,85 defecto).

Las referencias a investigaciones BLAST son: Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool". J. Mol. Biol. 215: 403 - 410; Gish, W. & States, D.J. (1993) "Identification of protein coding regions by database similarity search". Nature Genet. 3: 266 - 272; Madden, T.L., Tatusov, R.L. & Zhang, J. (1996) "Applications of network BLAST server" Meth. Enzymol. 266: 131 - 141; Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs". Ácido nucleicos Res. 25: 3389 - 3402; Zhang, J. & Madden, T.L. (1997) "PowerBLAST: A new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation". Genome Res. 7: 649 - 656.

Preferiblemente aproximadamente: 1, 2, 3, 4, 5, 6 a 10, 10 a 25, 26 a 50 ó 51 a 100, ó 101 a 250 nucleótidos o aminoácidos están modificados. La invención incluye polipéptidos con mutaciones que provocan un cambio de aminoácidos en una parte del polipéptido implicado que proporciona la actividad de manera que la mutación aumenta o disminuye la actividad del polipéptido.

Selección de los activadores de ACE2

Se seleccionan pequeñas moléculas orgánicas para determinar si incrementan la expresión o actividad de ACE2. Los fragmentos de polipéptidos de ACE2 así como los polipéptidos que tienen identidad de secuencia con ACE2 también se ensayan para determinar si incrementan la actividad de ACE2 en ensayos *in vitro* e *in vivo* en líneas celulares. Los activadores se dirigen preferiblemente hacia dominios específicos de ACE2 para incrementar la activación de ACE2. Para lograr la especificidad, los activadores deben dirigir las secuencias únicas de ACE2.

La presente invención también incluye el aislamiento de sustancias que incrementan la expresión de ACE2. En particular se pueden aislar los ligandos o sustancias que se unen al gen o proteína de ACE2. Se pueden ensayar muestras biológicas y genotecas comercialmente disponibles para sustancias tales como proteínas que se unen a un gen o proteína de ACE2. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de una proteína de ACE2 se puede usar para sondar genotecas de péptidos mientras una secuencia de ácido nucleico que codifica ACE2 se puede usar para sondar genotecas de ácidos nucleicos. Además, los anticuerpos preparados para ACE2 se pueden usar para aislar otros péptidos

ES 2 318 137 T3

con afinidad para ACE2. Por ejemplo, se pueden usar anticuerpos marcados se pueden usar para sondar genotecas de despliegue en fago o muestras biológicas.

5 Las condiciones que permiten la formación de complejos con una sustancia y un gen o proteína de ACE2 se pueden seleccionar para que tengan relación con los factores tales como la naturaleza y cantidades de la sustancia y el gen o proteína de ACE2. El complejo sustancia - proteína o sustancia - gen, sustancia libre o sustancia sin formar complejo se pueden aislar mediante técnicas de aislamiento convencionales, por ejemplo, precipitación con sales, cromatografía, electroforesis, filtración en gel, fraccionamiento, absorción, electroforesis en gel de poliacrilamida, aglutinación, o combinaciones de las mismas. Para facilitar el ensayo de de los componentes, se pueden utilizar anticuerpo contra
10 ACE2 o la sustancia, o proteína marcada, o una sustancia marcada. Los anticuerpos, proteínas, o sustancias se pueden marcar, según sea apropiado, con una sustancia detectable como se describe más adelante.

Una vez que se han aislado las parejas de unión potenciales, se pueden diseñar procedimientos de selección para determinar si las sustancias que se unen a los genes o proteínas de ACE2 son útiles en los procedimientos de la presente invención para potenciar la expresión de ACE2 sobre una célula y por lo tanto útiles en el tratamiento de enfermedad.
15

Por lo tanto, la invención también proporciona procedimientos para identificar sustancias que son capaces de unirse a genes o proteínas de ACE2. En particular, los procedimientos se pueden usar para identificar sustancias, que son capaces de unirse y aumentar o potenciar la expresión de ACE2. De acuerdo con lo anterior la invención proporciona un procedimiento para seleccionar un compuesto que es un agonista de la actividad de ACE2, que comprende:
20

- a. proporcionar: i) una preparación purificada que comprende ACE2, ii) un sustrato, y iii) un compuesto de ensayo;
- 25 b. mezclar dicho ACE2 y dicho sustrato en condiciones tales que dicho ACE2 pueda actuar sobre dicho sustrato para producir un producto, en el que dicha mezcla se realiza en presencia y ausencia de dicho compuesto de ensayo; y
- c. medir directa o indirectamente la cantidad de dicho producto producido en la presencia o ausencia de dicho compuesto de ensayo, caracterizado porque dicho sustrato es angiotensina II.
30

Se puede usar cualquier sistema de ensayo o procedimiento de ensayo que detecta interacciones proteína-proteína incluyendo la co-inmunoprecipitación, reticulación y copurificación mediante gradientes o columnas cromatográficas. De manera adicional, los estudios cristalográficos de rayos x se pueden usar como un medio de evaluar las interacciones con sustancias y moléculas. Por ejemplo, moléculas recombinantes purificadas en un complejo de la invención cuando se cristaliza en una forma adecuada son apropiados para la detección de interacciones intra-moleculares mediante cristalografía de rayos x. También se puede usar espectroscopía para detectar interacciones y en particular, se puede usar instrumentación Q-TOF. Se pueden ensayar muestras biológicas y genotecas comercialmente disponibles para los péptidos de unión a ACE2. Además, los anticuerpos preparados para el ACE2 se pueden usar para aislar otros péptidos con afinidad de unión a ACE2. Por ejemplo, se pueden usar anticuerpos marcados para sondar genotecas de despliegue en fago o muestras biológicas. A este respecto los péptidos se pueden usar para desarrollar un sistema de expresión biológico. El uso de estos sistemas permite la producción de grandes genotecas de secuencias de péptido al azar y la selección de estas genotecas para las secuencias de péptidos que se unen a proteínas particulares. Las genotecas se pueden producir mediante clonación de ADN sintético que codifica secuencias de péptido al azar en vectores de expresión adecuados (véase Christian *et al.* 1992, J. Mol. Biol. 227: 711; Devlin *et al.*, 1990 Science 249: 404; Cwirla *et al.* 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6378). También se pueden construir genotecas mediante la síntesis concurrente de péptidos de superposición (véase Patente de Estados Unidos N° 4.708.871). Se ensayan activadores en modelos de animales de hipertensión, enfermedad cardíaca o renal.
35
40
45

Se contempla un ensayo para evaluar si un compuesto candidato es capaz de incrementar la expresión o actividad de ACE2 mediante el cultivo de células (preferiblemente células renales o cardíacas) en la presencia de al menos un compuesto cuya capacidad para activar la expresión o actividad se pretende para que se determine y después de esto controlar las células para evaluar un incremento en el nivel de la expresión y/o actividad de ACE2. La expresión y/o actividad de ACE2 indica que el compuesto candidato es útil para tratar enfermedad cardíaca o renal e hipertensión.
50
55

Un ensayo similar de selección se puede realizar con los mamíferos conocidos en la técnica son propensos a enfermedad cardíaca o enfermedad renal. El compuesto candidato se administra al mamífero y se mide la expresión y/o actividad de ACE2. El aumento de expresión y/o actividad de ACE2 indica que el compuesto candidato es útil para tratar enfermedad cardíaca o renal.
60

La determinación de un incremento en la actividad de ACE2 preferiblemente implica la determinación de si el compuesto incrementa la actividad proteolítica de ACE2 (incremento de la hidrólisis de sustratos). En una variación de la invención, los ensayos de la invención se someten a la condición de que el compuesto candidato no sea una sal de sodio - halógeno o una sal de potasio - halógeno y el ensayo no se dirige a la medición del efecto de incrementar la concentración de iones en la proteólisis de ACE2.
65

Los procedimientos para producir ACE2 se describen en el documento CA 2.372.387. un ejemplo de un ensayo *in vitro* para la activación de ACE2 se muestra en Vickers *et al.*, Hydrolysis of biological péptidos by human angio-

tensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol. Chem.* 2002, 277(17): 14838. Otros ensayos (así como variaciones de los ensayos anteriores) serán evidentes para la descripción de esta invención y las técnicas tales como las descritas en las Patentes de Estados Unidos números 5.851.788, 5.736.337 y 5.767.075.

5 *Composiciones farmacéuticas*

Los activadores de la expresión y actividad de ACE2 se combinan preferiblemente con otros componentes, tal como un vehículo, en una composición farmacéutica. Estas composiciones se pueden administrar a un animal, preferiblemente un ser humano, en forma soluble para evitar o tratar hipertensión, insuficiencia cardíaca congestiva, insuficiencia cardíaca crónica, insuficiencia cardíaca aguda, infarto de miocardio, arteriosclerosis, insuficiencia renal o una enfermedad pulmonar en un mamífero, en el que la enfermedad pulmonar es enfermedad pulmonar obstructiva crónica, neumonía, asma, bronquitis crónica, enfisema pulmonar, fibrosis quística, enfermedad intersticial pulmonar, hipertensión pulmonar primaria, embolia pulmonar, sarcoidosis pulmonar, tuberculosis, edema pulmonar, ARDS o cáncer de pulmón. La enfermedad renal incluye insuficiencia renal. Los activadores de ACE2 son útiles para regular la presión sanguínea e hipertensión arterial. La presión sanguínea normal tiene una presión sanguínea diastólica menor que 85 mm Hg. La alta presión sanguínea normal tiene una presión sanguínea diastólica entre 85 y 89 mm Hg. La hipertensión suave corresponde a una presión de sangre diastólica entre 90 - 104 mm Hg. La hipertensión moderada tienen hasta una presión sanguínea diastólica entre 105 y 114 mm Hg. La hipertensión grave tiene una presión sanguínea diastólica mayor que 115 mm Hg. La presión sanguínea anormal también se determina a partir de la presión sanguínea sistólica (cuando la presión diastólica es menor que 90 mmHg). La presión sanguínea normal tiene una presión sanguínea sistólica de menos de 140 mm Hg. La hipertensión sistólica límite muestra una presión sistólica sanguínea entre 140 y 159 mm Hg. La hipertensión sistólica aislada tiene una presión sanguínea sistólica mayor que 160 mm Hg. (Cecil: Essentials of Medicine, Tercera edición por Andreoli *et al.* W.B. Saunders Company (1993)). Hipertensión se diagnostica en un adulto mayor de 18 años de edad si la media de dos o más mediciones de presión sanguínea durante al menos dos visitas es 90 mm Hg o mayor diastólica o 140 mm Hg sistólica. Los niños y mujeres embarazadas tienen una presión sanguínea menor, así una presión sanguínea por encima de 120/80 (es decir, 120 mm Hg de presión sanguínea sistólica/80 mm Hg de presión sanguínea diastólica) indica hipertensión.

Las composiciones farmacéuticas se puede administrar a seres humanos o animales mediante una diversidad de procedimientos que incluyen, pero no se limitan a la administración tópica, administración oral, administración por aerosol, instilación intratraqueal, inyección intraperitoneal, e inyección intravenosa. Las dosificaciones a administrar dependen de las necesidades del paciente, sobre el efecto deseado y de la vía de administración elegida. Los polipéptidos se pueden introducir en las células usando vehículos de administración de *in vivo* tales como pero sin exclusión a liposomas.

Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar mediante procedimientos conocidos para la preparación de composiciones farmacéuticamente aceptables que se pueden administrar a pacientes, de manera que una cantidad eficaz de la molécula de ácido nucleico o polipéptido se combina en una mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos adecuados se describen, por ejemplo en Remington's Pharmaceutical Sciences (Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., Estados Unidos).

En esta base, las composiciones farmacéuticas pueden incluir un compuesto o sustancia activo, tal como una molécula de ácido nucleico o polipéptido, en asociación con uno o más vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, y contenidos en soluciones tamponadas con un pH adecuado isoosmótico con los fluidos biológicos. Los procedimientos de combinación de las moléculas activas con los vehículos o combinación de ellos con diluyentes son bien conocidos por los expertos en la técnica. La composición puede incluir un agente de dirección para el transporte del compuesto activo a sitios específicos dentro del tejido.

50 *Sobreexpresión heteróloga de ACE2*

Los vectores de expresión son útiles para proporcionar altos niveles de expresión de ACE2. Los cultivos de células transformadas con las moléculas de ácido nucleico son útiles como herramientas de investigación, particularmente para los estudios de los estados disminución de ACE2. Se incluyen vectores selectivos para las células cardíacas y células de riñón preferiblemente células endoteliales que normalmente constituyen ACE2. Los ejemplos de vectores para las células cardíacas y renales se describen, por ejemplo, en Rosengart *et al.* Patente de Estados Unidos n° 6.322.536; March *et al.* Patente de Estados Unidos n° 6.224.584; Hammond *et al.* Patente de Estados Unidos n° 6.174.871; Wolfgang-M. Franz *et al.* Analysis of tissue - specific gene delivery by recombinant adenoviruses containing cardiac-specific promoters. *Cardiovascular Research* 35 (1997) 560 - 566; Rothmann T. *et al.* Heart muscle-specific gene expression using replication defective recombinant adenovirus. *Gene Ther* 1996 Oct;3 (10): 919 - 26; Phillips MI *et al.* Vigilant vector: heart-specific promoter in an adeno-associated virus vector for cardioprotection. *Hypertension* 2002, Feb; 39 (2 Pt 2):651-5; Herold BC *et al.* Herpes simplex virus as a model vector system for gene therapy in renal disease. *Kidney Int* 2002 Jan;61 Suppl 1:3-8; Figlin RA *et al.* Technology evaluation: interleukin-2 gene therapy for the treatment of renal cell carcinoma. *Curr Opin Mol Ther* 1999 Apr; 1 (2): 271 - 8; Varda-Bloom N *et al.* Tissue-specific gene therapy directed to tumor angiogenesis. *Gene Ther* 2001 Jun;8 (11): 819-27; Scott-Taylor TH *et al.*, Adenovirus facilitated infection of human cells with ecotropic retrovirus. *Gene Ther* mayo de 1998; 5 (5):621 - 9; Langer JC *et al.* Adeno-associated virus gene transfer into renal cells: potential for *in vivo* gene delivery. *Exp Nephrol* mayo - junio de 1998;6(3):189 - 94; Lien YH *et al.* Gene therapy for renal diseases. *Kidney Int Suppl* 1997 Oct;

61:S85-8; y Ohno K *et al.* Cell-specific targeting of Sindbis virus vectors displaying IgG-binding domains of protein A. *Nat Biotechnol* agosto de 1997;15(8): 763 - 7.

Se usan cultivos celulares, preferiblemente cultivos de células cardíacas y renales y cultivos celulares endoteliales, en la sobreexpresión e investigación de acuerdo con numerosas técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, una línea celular (o bien una célula inmortalizada o un cultivo de células primarias) se pueden transfectar con un vector que contiene una molécula de ácido nucleico de ACE2 (o molécula que tiene identidad de secuencia) para medir los niveles de expresión de la molécula de ácido nucleico y la actividad de la molécula de ácido nucleico y polipéptido. Las células también son útiles para identificar los compuestos que se unen a y activan el polipéptido.

Kits de Diagnóstico que miden la actividad y/o expresión de ACE2

La medición de la expresión o actividad de ACE2 también se usa en: i) diagnosis de enfermedad cardíaca o renal, enfermedad pulmonar y/o hipertensión ii) identificación de pacientes en riesgo de desarrollar tal enfermedad antes del desarrollo de la enfermedad iii) medir la respuesta terapéutica en pacientes que tienen enfermedad cardíaca tal como enfermedad cardíaca coronaria, insuficiencia cardíaca crónica, o enfermedad renal y/o hipertensión y/o lesión pulmonar iv). Medir el éxito de las estrategias preventivas de enfermedad experimental en tales pacientes en riesgo. La invención incluye un procedimiento para determinar los niveles de ACE2 en un animal que comprende las siguientes etapas: (a) preparar una muestra de corazón o de riñón o de pulmón de un espécimen recogido del animal; (b) ensayar la presencia de ACE2 en la muestra; y (c) correlacionar la presencia de niveles de ACE2 en la muestra con la presencia (o riesgo) de enfermedad tal como enfermedad cardíaca o renal o pulmonar en el animal. Los niveles de ACE2 por debajo de lo normal o por debajo de la actividad de ACE2 indican la presencia de riesgo o enfermedad.

El número de nucleótidos de los polimorfismos que controlan la expresión génica de ACE2, como se ha descrito en el gráfico anterior y en la Figura 11, se puede determinar fácilmente por los expertos en la técnica.

Por ejemplo, un polinucleótido de la invención se puede convertir en una sonda mediante marcado en el extremo usando digoxigenina-11-deoxiuridina trifosfato. Tales sondas se pueden detectar inmunológicamente usando fragmentos de antidigoxigenina F (ab) de oveja policlonal conjugados a fosfato alcalino y tetrazolio azul nitro con 5-bromo-4-cloro-3-indoil fosfato como sustrato cromogénico.

Caracterización de ACE2 como un regulador negativo del RAS

ACE2 se mapea en un QTL asociado a la hipertensión en tres modelos de ratas de alta presión sanguínea y niveles de ACE2 se reducen en todas las razas de ratas hipertensivas. En ratones, la inactivación genética de ACE2 que usa recombinación homóloga da como resultado un incremento de los niveles del péptido de AngII en tejidos, regulación hacia arriba de genes de hipoxia en la disfunción cardíaca, y cardíaca severa.

La ablación de la expresión de ACE sobre un antecedente deficiente de *ace2* completamente abolía el fenotipo de insuficiente cardíaca de los ratones con inactivación única a *ace2*. Estos datos proporcionan un nuevo paradigma para la regulación del RAS e identificar ACE2 como un regulador negativo de RAS que controla la función cardíaca.

ACE2 y control de la presión sanguínea

La mayoría de las enfermedades cardiovasculares son caracteres cuantitativos multifactoriales controlados por factores tanto genéticos como ambientales. Un factor principal para la enfermedad cardiovascular es el RAS. En contraste a ACE que se expresa de manera ubicua, el ACE2 recientemente identificado muestra la expresión específica de tejido. ACE2 regula los niveles endógenos de AngII, compitiendo con ACE por su sustrato de AngI y/o mediante la escisión de AngII para generar Ang1-7. Antes de esta invención, no se conocía nada sobre el papel *in vivo* de ACE2 en el sistema cardiovascular. ACE2 regula los niveles endógenos de AngII. También funciona como un regulador negativo del RAS.

En tres razas de rata diferentes que desarrollan hipertensión espontánea o inducida por dieta y enfermedad cardiovascular, ACE2 se mapea dentro de un QTL definido en el cromosoma X. En todas estas razas de ratas susceptibles a hipertensión, los niveles de ARNm y de proteína de ACE2 están regulados hacia abajo. El locus SS-X identificado en el análisis de QTL en ratas Sabra también se identifican como un locus que confiere resistencia a la carga de sal. La reducción en ACE2 in en la raza sensible a la sal y la ausencia de cualquier alteración en su expresión en la raza resistente muestra que ACE2 confiere resistencia a los cambios de presión sanguínea inducidos por la dieta.

La posición del mapa y expresión reducida muestra que ACE2 es el gen que contribuye a QTL hipertenso sobre el cromosoma X. Además, el incremento de la expresión de AngI y AngII en ratones sin *ace2* confirman que ACE2 es un regulador del sistema RAS *in vivo*. Sin embargo, la pérdida de ACE2 en nuestros ratones no dieron como resultado ningún cambio directo en la presión sanguínea incluso cuando la función de ACE estaba bloqueada. Los cambios de la presión sanguínea solamente se producen cuando la disfunción cardíaca extrema estaba presente en los ratones mayos de mayor edad. Los factores genéticos que contribuyen a la hipertensión ellos mismos no alteran la presión sanguínea. En su lugar, estos QTL definen los determinantes individuales de la presión sanguínea, que de acuerdo con otros polimorfismos genéticos promueven el cambio en la presión sanguínea. Los inventores han identificado la asociación de los polimorfismos ACE2 con alta presión sanguínea en la población humana. De manera importante,

los datos de los inventores muestran que ACE2 funciona como un regulador negativo del aumento de la presión sanguínea.

ACE2 y el control de la función cardíaca

5 De manera inesperada, la pérdida de ACE2 en ratones da como resultado una disfunción profunda contráctil que conduce a una reducción intensa de la presión sanguínea sistémica en los ratones de mayor edad. De manera importante, esta disfunción cardíaca está completamente invertida mediante la rotura de ACE que sugiere que un producto catalítico de ACE desencadena una alteración contráctil en la ausencia de ACE2. ya que estos defectos de contracción
10 se pueden producir en la ausencia de hipertrofia o cualesquiera cambios detectables en la presión sanguínea, los datos de los investigadores también proporcionan prueba genética de que el fenotipo de la enfermedad cardíaca regulado por RAS puede no estar relacionado de manera genética con sus efectos sobre la presión sanguínea e hipertrofia cardíaca.

15 Los inhibidores de ACE y bloqueadores del receptor de AngII se ha mostrado que tienen un papel cardioprotector en la insuficiencia cardíaca en seres humanos, implicando de este modo AngII en la enfermedad cardíaca. La abolición completa de la disfunción cardíaca en el doble mutante *ace/ace2* de los investigadores muestra que el RAS controla directamente la función cardíaca y que ACE2 es un regulador negativo crítico que antagoniza el RAS e insuficiencia cardíaca. Los experimentos de los investigadores sobre experimentos de rescate genéticos indican de una manera notable que es de hecho un producto de ACE que dirige la insuficiencia cardíaca, es decir, el incremento en AngII
20 observado en los corazones de ratones sin *ace2* es causante de la disfunción cardíaca. Necesita determinarse si la inhibición farmacológica del receptor de AngII rescata los fenotipos cardíacos de ratones mutantes de *ace2*. De manera interesante, o los resultados de los investigadores en moscas muestran que una mutación del elemento P asociada al homólogo de ACE, ACER, da como resultado un defecto grave y letal de morfogénesis del corazón (datos no mostrados) que muestran que las funciones de ACE/ACE2 en el corazón se han conservado a lo largo de la evolución.

25 El defecto en los corazones mutantes de *ace2* se caracteriza por la disfunción contráctil grave y regulación hacia arriba de los genes regulados por hipoxia con solamente ligera remodelación en los ratones de mayor edad, sin hipertrofia y sin evidencia de pérdida de miocitos. Estos parámetros fenotípicos y moleculares de corazones con insuficiencia en ratones mutantes de *ace2* son diferentes de hipertrofia y cardiomiopatía dilatada. Bastante más intrigante,
30 los corazones de mutantes *ace2* se parecen a la atrofia e hibernación cardíaca encontrado en los casos humanos de enfermedad arterial coronaria y en los casos de cirugía de desviación. En estas enfermedades humanas y en modelos animales de atrofia/hibernación cardíaca, condiciones hipóxicas crónicas conducen a cambios compensatorios en el metabolismo de miocitos, regulación hacia arriba de los genes inducidos por hipoxia, y función cardíaca reducida. Ya que ACE2 se expresa en el endotelio vascular, y no miocitos cardíacos, es probable que los efectos de ACE2 se
35 confinen a la vasculatura. Por ejemplo, incrementos locales en AngII podrían conducir a la vasoconstricción que da como resultado hipoperfusión e hipoxia. También se ha mostrado que AngII provoca disfunción endotelial mediante la inducción de estrés oxidativo. Los mecanismos por los que se la pérdida de ACE2 puede dar como resultado la regulación hacia arriba de los genes inducibles por hipoxia necesita determinarse. De manera importante, los datos de los investigadores muestran que los polimorfismos de ACE2 provocan la patología de enfermedad cardíaca coronaria
40 en seres humanos.

Ejemplos

45 *ACE2 se mapea en un QTL sobre el cromosoma X en tres razas de ratas hipertensas*

La hipertensión y la mayoría de las enfermedades cardiovasculares son multifactoriales por naturaleza y patogénesis de la enfermedad está influenciada por múltiples loci de susceptibilidad genética. En diversos modelos de ratas recombinantes, se han identificado QTL múltiples para hipertensión. Ya que ACE2 se mapea en el cromosoma X en seres humanos y un QTL se ha mapeado para el cromosoma X en varios modelos de ratas de hipertensión sin ningún gen candidato atribuido a él todavía, ACE2 puede ser un gen candidato para este QTL. Para facilitar el mapeado cromosómico de ACE2 de ratas, se clonó el ADNc de ACE2 de rata de longitud completa mediante la selección de una genoteca de ADNc de riñón de rata. ACE2 de rata es altamente homólogo con ACE2 humano y tiene un 32% de identidad y es un 42% similar a ACE humano y de ratón (Fig. 1a). ACE2 de tipo humano, el gen de rata está constituido por un único dominio de ACE con un sitio de unión a cinc conservado, un péptido de señal y un dominio de transmembrana (Fig. 1b). Similar al ser humano, ACE2 en ratón y rata se expresa de manera predominante en riñón y corazón, con una expresión débil en pulmón e hígado (Fig. 1c).

El mapeado del híbrido de radiación mostró que el gen ACE2 de rata se mapea en el cromosoma X con puntuaciones de LOD significativas para los marcadores *DXRat9*, *DXWox14*, *DXWox15* y *DXRat42*, colocando *ace2* entre *DXRat9* y *DXRat42* (Fig. 1d). El mapeado comparativo mostró que la posición del mapa de *ace2* se solapa con un intervalo QTL para la hipertensión identificado en ratas sensibles a la sal Sabra encontrado entre los marcadores *DXMgh12* y *DXRat8* (*SS-X*). Además, la región de *ace2* cromosómica se mapea en el intervalo B P3 QTL definido en ratas espontáneamente hipertensas propensas a apoplejía (SHRSP), y un BB.Xs QTL hipertenso previamente
65 identificado sobre el cromosoma X de ratas hipertensas espontáneas (SHR) mediante análisis congénico (Fig. 1d). De este modo, ACE2 se mapea en un QTL sobre el cromosoma X de rata identificado en tres modelos separados de hipertensión espontánea e inducida por la dieta.

Regulación hacia abajo de la expresión de ACE2 en ratas hipertensas

Ya que el riñón es un sitio principal de regulación de la presión sanguínea, se determinaron los niveles de expresión de ACE2 en los riñones de tres razas de ratas hipertensas. Los niveles de ARNm de ACE2 se midieron inicialmente en los riñones de las ratas hipertensas sensibles a sal Sabra (SBH/y) y ratas Sabra normotensas (SBN/y) de control resistentes a sal. La carga de sal (con sal DOCA) no tenía efecto sobre la expresión de ARNm de ACE2 en ratas SBN/y normotensas. De manera intrigante, en las ratas SBH/y, la carga de sal y el desarrollo de hipertensión estaban asociados a una reducción significativa de la expresión de ARNm de ACE2 cuando se compara con las ratas SBN/y normotensas (Fig. 2a). Hay que hacer notar que el ARNm de ACE2 también era menor en la dieta regular de alimentación de SBH/y cuando se compara con los controles SBN/y alimentados con una dieta similar. Este último hallazgo es consistente con la diferencia de 10 - 20 mmHg en la presión sanguínea observada entre ratas SBH/y y SBN/y alimentadas con dieta normal.

Para medir los niveles de proteína de ACE2, se generó un antisuero de conejo específico de ACE2 (aa206 - aa225 de ACE2 de ratón), que reacciona de manera cruzada con ACE2 tanto de ratón como humano (no mostrado). En línea con la expresión de ARNm de ACE2 disminuida, la expresión de proteína de ACE2 se redujo de manera notable en los animales SBH/y que se alimentaron con dieta normal (Fig. 2b). El incremento en la presión sanguínea de ratas SBH/y después de una dieta de 4 semanas de sal DOCA correlacionada además disminuyó la expresión de proteína de ACE2 (Fig. 2b). La carga de sal no desencadenó un incremento en la presión sanguínea ni alteraba la expresión de ACE2 en ratas de control SBN/y resistentes a sal (Fig. 2b). Los niveles de proteína de ACE2 también disminuyeron de manera significativa en los riñones de animales SHRSP y SHR espontáneamente hipertensos cuando se compara con sus controles WKY (Fig. 2b). Además, los niveles de ARNm de ACE2 en ratas SHRSP y SHR hipertensas (no mostrado). La clonación y secuenciación de la región codificante de ACE2 en las razas de ratas hipertensas no reveló ningún cambio de secuencias, indicando que la reducción de la expresión de ACE2 probablemente se produce a partir de polimorfismos que controlan la expresión del gen de ACE2. La posición del mapa y expresión reducida de ACE2 en tres razas diferentes de ratas indican que *ace2* es un gen candidato fuerte para este QTL hipertenso sobre el cromosoma X. Además, la expresión reducida de ACE2 en las tres razas de ratas hipertensas sugirieron que esta enzima funciona como un regulador negativo.

Clonación de ACE2 de ratón y generación de ratones con inactivación de ACE2

Para validar la candidatura de ACE2 como un QTL y para ensayar si ACE2 tiene de hecho, un papel esencial en la fisiología cardiovascular y la patogénesis de enfermedades cardiovasculares, se clonó el gen ACE2 de ratón (Fig. 1a). Similar a y ACE2 humano, ACE2 murino también se mapea para el cromosoma X (no mostrado contiene un único dominio de ACE (Fig. 1b), y de manera predominante se expresa en riñones y corazón tl (Fig. 1c). De manera interesante, los investigadores observaron dos isoformas para ACE2 en ratón en todos los tejidos positivos. La sobreexpresión de ACE2 murino en COS mostró que ACE2 escinde AngI en Ang1-9 (no mostrado) indicando que ACE2 murino tiene la misma especificidad bioquímica que ACE2 humano. Para determinar el papel *in vivo* de ACE2, el gen *ace2* en ratón se interrumpió reemplazando el exón 9 con el gen de resistencia a neomicina suprimiendo de manera eficaz el dominio catalítico de unión a cinc Procedimientos y Fig. 3a). Se usaron dos líneas de células ES mutadas en el locus *ace2* para generar ratones quiméricos, que se retrocruzaron con C57BL/6 para obtener la transmisión germinal. Ambas líneas de ratón mostraron fenotipos idénticos. La transmisión de la mutación de *ace2* se confirmó mediante análisis de transferencia de Southern (Fig. 3b). la mutación nula de *ace2* se verificó mediante la ausencia de transcripciones de ARNm de ACE2 y análisis de transferencia de Northern (no mostrado) y de Western (Fig. 3c). La expresión de ARNm de ACE en los riñones y corazones no se alteró en ratones mutantes *ace2* (Fig. 3d).

Ya que el gen ACE2 se mapea en el cromosoma X, toda la prole de machos eran o bien no mutantes (*ace2*^{-ly}) o de tipo salvaje para ACE2 (*ace2*^{+ly}) mientras que las hembras eran o bien de tipo salvaje (*ace2*^{+/+}), heterocigóticas (*ace2*^{+/-}), u homocigóticas (*ace2*^{-/-}) para la mutación *ace2*. Se debe observar que en todos los experimentos descritos más adelante, hembras *ace2*^{+/-} se comportaron de manera similar a las hembras *ace2*^{+/+} y los machos *ace2*^{+ly} indican que no existe un efecto aparente de heterocigosis de *ace2*. Los ratones sin ACE2 no nacieron con la frecuencia de las leyes de Mendel esperada, aparecieron sanos, y no mostraron ninguna alteración detectable global en todos los órganos analizados. Además, al contrario que los ratones macho *ace*^{-/-} que muestran una fertilidad significativamente reducida, tanto los machos como las hembras sin *ace2* son fértiles.

Presión sanguínea ratones mutantes ace2

Se ha mostrado previamente que los ratones mutantes *ace2* muestran reducción de presión sanguínea y patología renal. Por lo tanto, se ensayó primero si la pérdida de la expresión de ACE2 afecta a la homeostasis de la presión sanguínea y/o desarrolló o función renal. De manera intrigante, la pérdida de ACE2 no dio como resultado la reducción de la presión sanguínea en ratones machos de 3 meses de edad *ace2*^{-ly} (Fig. 4a) o hembras *ace2*^{-/-} (no mostrado) cuando se compara con sus hermanos de camada de control. Ya que fue posible que ACE puede compensar la pérdida de ACE2, los inventores trataron ratones deficientes en *ace2* con captopril que bloquea ACE pero no la función ACE2. Sin embargo, la inhibición *in vivo* de ACE con captopril redujo la presión sanguínea de ratones macho *ace*^{-ly} a un grado similar como se observó en los hermanos de camada de tipo salvaje tratados con captopril (Fig. 4a). De este modo, incluso en un escenario de inhibición de ACE, la pérdida de ACE2 no tiene efecto directo evidente sobre la homeostasis de presión sanguínea en este antecedente de ratón definido. Basándose en los datos de los investigadores

de RAS QTL, los investigadores retrocruzaron sus ratones mutantes con otros antecedentes de ratón para mostrar el papel de ACE2 en el control de presión sanguínea similar a los antecedentes genéticos en seres humanos.

*Función renal alterada en ratones mutantes *ace2**

Ya que ACE2 se expresa en gran medida en los riñones, los inventores examinaron la morfología y función renal. Todos los ratones de 3 meses y 6 meses de edad machos *ace2^{-ly}* y hembras *ace2^{-/-}* mostraron morfología renal normal y ningún cambio aparente en cualesquiera ultraestructuras de riñón (Fig. 4b). Las estructuras celulares y renales normales del sistema ductal y los glomérulos también se confirmaron usando morfometría de sección en serie.

Los riñones de ratones deficientes en *ace2* machos y los hermanos de cama de la misma edad se examinaron usando microscopía óptica (tinción con PAS) y electrónica (TEM) a los 3 y 12 meses de edad. La gravedad de esclerosis para cada glomérulo se clasificaron entre 0 y 4+ de una manera ciega como sigue: 0 representa sin lesión, 1+ esclerosis de < 25% del glomérulo, mientras 2+, 3+, y 4+ representan esclerosis de 25 a 50%, 50 a 75%, y > 75% del glomérulo, respectivamente. A los 3 meses de edad, no existía evidencia de cambios patológicos en los riñones de los ratones deficientes en *ace2*. Sin embargo a los 12 meses de edad, la microscopía óptica reveló un incremento de esclerosis/lesión glomerular: $1,45 \pm 0,2$ vs $0,25 \pm 0,06$; $n = 6$; $p < 0,01$. La microscopía electrónica mostró un aumento en la deposición de fibrilas de colágeno en el mesangio renal y una membrana basal engrosada. La exposición crónica a niveles elevados de AngII conduce a hipoxia y estrés oxidante en los riñones de ratones deficientes en *ace2*. El análisis de transferencia de Western reveló una expresión aumentada de factor-1alfa (HIF1- α) inducible por hipoxia y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en los riñones de los ratones deficientes en *ace2*. La medición de productos de peroxidación de lípidos mostró un grado aumentado de estrés oxidante en los ratones deficientes en *ace2* a los 6 meses de edad: hexanal (1001 ± 161 vs 115 ± 13 nmol/g; $n = 5$; $p < 0,01$) y malondialdehído ($48 \pm 6,4$ vs $24,3 \pm 2,8$ nmol/g; $n = 5$; $p < 0,01$).

Estos resultados muestran que la pérdida de ACE2 conduce a una señalización de angiotensina II potenciada de una manera específica de tejido que por último media en los efectos perjudiciales en los riñones de los ratones deficientes de *ace2*. La disminución de la expresión de ACE2 juega un papel patológico importante en la enfermedad renal.

Pérdida de ACE2 da como resultado un defecto grave en la función cardíaca

La inhibición farmacológica de ACE o receptores AngII sugirió un papel RAS en la regulación de la función cardíaca e hipertrofia cardíaca. Sin embargo, ni los ratones sin *ace* ni *angiotensinógeno* desarrollaron ninguna enfermedad cardíaca manifiesta. Ya que ACE2 se expresa en gran medida en la vasculatura del corazón, se analizaron los corazones de ratones deficientes en *ace2*. Los corazones de ratones mutantes de *ace2* muestran un ligero adelgazamiento de la pared del ventrículo izquierdo y un incremento de las dimensiones de la cámara (Fig. 5a). El adelgazamiento de la pared ventricular izquierda anterior (AW) e incremento de la dimensión diastólica del extremo del ventrículo izquierdo (LVEDD) en corazones deficientes en *ace2* también se puede observar mediante ecocardiografía (Tabla 1). Estos cambios estructurales se observan principalmente en ratones macho de 6 meses de edad. Sin embargo, las relaciones de peso corporal corazón eran comparables entre ratones de 3 meses de edad (no mostrado) y de 6 meses de edad *ace2^{-ly}* y *ace2^{+ly}* (Fig. 5a,b). La ecocardiografía también mostró que la masa del ventrículo izquierdo (LVM) y relaciones de LVM/peso corporal eran normales (Tabla 1). Los cambios estructurales y bioquímicos característicos de la cardiomiopatía dilatada no se observaron ya que no existía indicación de fibrosis cardíaca intersticial (Fig. 5c,d) ni cambios prototípicos en ANF, BNP, α -MHC, b-MHC, y la expresión del gen de actina del músculo esquelético (no mostrado). Además, los cardiomiocitos individuales de ratones sin ACE2 no mostraron evidencia de hipertrofia y no se observó ninguna evidencia de apoptosis de cardiomiocitos alterada en ratones sin ACE2 como se detectó mediante la tinción de TUNEL (no mostrado). De este modo, a pesar de la suave dilatación de los corazones en los ratones sin ACE2 de 6 meses de edad, no había evidencia de hipertrofia cardíaca o cardiomiopatía dilatada.

De manera interesante, la determinación de la función cardíaca mediante ecocardiografía reveló que todos los ratones macho *ace2^{-ly}* y hembras *ace2^{-/-}* muestran una insuficiencia cardíaca contráctil grave como se determina por el acortamiento fraccional disminuido (FS), y la velocidad disminuida de acortamiento de fibras diferencial (Tabla 1 y Fig. 6a,b). La disminución en la función se encontró que era más grave en los ratones machos y hembras de 6 meses de edad cuando se compara con los ratones de la misma edad de 3 meses de edad, que sugiere una progresión en el fenotipo (Tabla 1). Consistente con la disminución de la contracción cardíaca, los ratones de 6 meses de edad *ace2^{-ly}* mostraron una presión sanguínea reducida (Fig. 6c), una característica no encontrada en hembras de la misma edad *ace2^{-/-}* y machos de 3 meses de edad, sugiriendo que la reducción en la presión sanguínea puede ser el resultado de la disfunción cardíaca grave y no un efecto directo de la pérdida de ACE2 sobre la presión sanguínea sistémica. Estos resultados sorprendentes muestran que ACE2 es un regulador negativo crítico de la contracción del corazón.

Para confirmar los defectos ecocardiográficos en la función cardíaca, las mediciones hemodinámicas invasivas se realizaron en ratones sin *ace2*. De manera importante, las mediciones hemodinámicas mostraron que dP/dT-max y dP/dTmin se redujeron de manera notable en los ratones mutantes *ace2* (Tabla 2), indicando alteración grave de la función cardíaca contráctil. La pérdida de ACE2 también dio como resultado una disminución significativa en las presiones ventriculares y aórticas consistentes con las reducciones observados en la contracción cardíaca (Tabla 2). De manera notable, los datos establecen que los defectos en la contracción cardíaca de los ratones mutantes de *ace2* se produce en la ausencia de cualquier hipertrofia cardíaca manifiesta y puede estar no acoplada genéticamente con las alteraciones de la presión sanguínea.

Regulación hacia arriba de los genes inducibles por hipoxia en ratones sin ace2

La disfunción contráctil grave de y dilatación suave en la ausencia de hipertrofia o fibrosis cardíaca en ratones sin *ace2* se parece a la atrofia e hibernación cardíaca en modelos de seres humanos y de animales. La atrofia e hibernación cardíaca son respuestas adaptativas a la hipoxia crónica tal como enfermedad arterial coronaria o después de la cirugía de desviación. Ya que ACE2 se expresa en gran medida en las células endoteliales vasculares pero la contracción se controla por los cardiomiocitos, se especuló la pérdida de ACE2 puede dar como resultado hipoxia cardíaca. Por lo tanto los cambios en los niveles de expresión de los genes inducibles por hipoxia tales como BNIP325 y PAI-1 se analizaron mediante transferencia de Northern. En los corazones de ratones sin *ace2*, la expresión de ARNm de BNIP3 y PAI-1 se regularon hacia arriba de manera notable cuando se compara con los hermanos de camada de tipo salvaje (Fig. 7a). De este modo, la pérdida de ACE2 da como resultado la inducción de un perfil de expresión de gen regulado por hipoxia.

Aumento de los niveles de Angiotensina II en tejidos de ratones sin ace2

Ya que las funciones de ACE2 como una carboxipeptidasa, que se escinde en un único resto de AngI, para generar Ang1-9, y un único resto forma AngII para generar Ang1-7, se propuso la hipótesis que ACE2 puede funcionar como un regulador negativo del RAS compitiendo con ACE para el sustrato AngI y/o que escinde e inactiva AngII. Si es correcto, la pérdida de ACE2 debe incrementar los niveles AngII *in vivo*. Usando los radioinmunoensayos, los niveles de AngII se encontraron de hecho que estaban incrementados de manera significativa en los riñones y corazones de ratones mutantes de *ace2* (Fig. 7b). Además, un incremento en AngI se observó también en la (Fig. 7b) consistente con AngI que es un sustrato de la acción de ACE2 *in vivo*. No se encontraron diferencias en los niveles de ARNm de ACE en los corazones y riñones de ratones mutantes de *ace2* cuando se compara con los controles que indican que el incremento de los niveles en los tejidos de AngII no se debían a un incremento de la expresión de ACE (Fig. 3d). Estos datos muestran que ACE2 funciona como un regulador negativo del RAS y que controla los niveles endógenos de AngII.

Ablación de la expresión de ACE en ratones deficientes en ratones deficientes en ace2-rescata la insuficiencia cardíaca

Si el fenotipo en los corazones de ratones mutantes *ace2* era debido al incremento en los niveles de AngII, la ablación genética de ACE en combinación con la interrupción de ACE2 puede servir para reducir los niveles de AngII rescate del fenotipo observado en los ratones mutantes de ACE2. Para ensayar esta idea, se generaron los ratones doble mutantes *ace/ace2*. Estos ratones doble mutantes nacieron a la relación mendeliana esperada y parecían sanos. La presión sanguínea (Fig. 8a) y los defectos renales (no mostrado) en los ratones sin doble *ace-ace2* eran similares a la de los ratones de una sola mutación *ace*. No se estableció la fertilidad de los ratones doble mutante *ace-ace2* no se estableció. De este modo, la pérdida de ACE y ACE2 no provoca ninguna enfermedad aparente además de la observada en ratones de una sola mutación *ace*.

Ya que la función cardíaca de los ratones con inactivación de ACE no se había reseñado anteriormente se analizaron primero los parámetros cardíacos en estos ratones. En los ratones *ace^{-/-}*, los corazones son histológicamente normales (no mostrado) y no se pudo detectar ningún defecto en la función cardíaca ningún defecto a los 6 meses de edad (Fig. 8b,c). De manera importante, la ablación de la expresión de ACE sobre un antecedente mutante *ace2* abolía completamente el fenotipo de insuficiencia de ratones inactivados una sola vez *ace2* (Fig. 8b,c). Además, usando ecocardiografía, todas las funciones cardíacas de los ratones doble mutantes de la misma edad de 6 meses de edad *ace-ace2* eran comparables con la de sus hermanos de camada de una sola mutación y de tipo salvaje *ace* (Tabla 1). El reestablecimiento de las funciones cardíacas se produjo en los ratones doble mutantes *ace-ace2* tanto machos como hembras. Estos datos genéticos muestran que la expresión de ACE se requiere y es necesaria para desencadenar la insuficiencia cardíaca contráctil en la ausencia de ACE2. De manera importante, no existe ninguna diferencia en la presión sanguínea entre los ratones *ace* e inactivados *ace/ace2* (Fig. 8a), implicando además que la reducción de la presión sanguínea en ratones macho de mayor edad *ace2* se debe a la disminución dramática en la función cardíaca.

ACE2 controla negativamente la lesión pulmonar

El síndrome de insuficiencia respiratoria de adultos (ARDS) es una forma grave de lesión pulmonar aguda y tiene unas tasas de mortalidad de 40 - 70% incluso cuando está disponible el cuidado intensivo. Trauma, sepsis grave (infección sistémica), neumonía difusa y choque son las causas más principales de ARDS, y entre ellas la lesión pulmonar inducida por ácido es una de las causas más comunes. Los mecanismos potenciales que provocan la lesión pulmonar asociada a aspiración incluyen daño inducido por HCl a la membrana alveolar - capilar, y adhesión, activación y secuestro de neutrófilos polinucleares (PMN), que da como resultado edema pulmonar y el deterioro de intercambio de gas. El tratamiento para ARDS consta de ventilación mecánica y continuación del tratamiento de la enfermedad o lesión inductora. El tratamiento soporte que usa fármacos novedosos que protegen el pulmón del daño de la membrana alveolar capilar adicional conservaría la función pulmonar de los pacientes de ARDS con el fin de tratar la precipitación de enfermedad o lesión, que conduce a una disminución en la tasa de mortalidad de ARDS.

Ya que ACE2 se expresa en pulmones, los inventores ha determinado si la pérdida de ACE2 tiene algún papel en las lesiones pulmonares agudas. La Figura 9 muestra los cambios en la elasticidad de los pulmones (EL) en ratones tratados con HCl y de control durante un período de 3 horas. Después de la administración de HCl, los ratones de tipo salvaje sobrevivieron más de 4 horas, mientras los ratones con inactivación de ACE2 murieron en 2 - 3 horas. El reflejo

de la diferencia de ratones sobrevivientes, con inactivación de ACE2 mostró una respuesta severa significativamente en la elasticidad de los de los pulmones que los ratones de tipo salvaje. De este modo, los ratones inactivados mostraron una respuesta severa más significativa en la elasticidad de los pulmones que los ratones de tipo salvaje. De este modo, ACE2 juega un papel significativo en la protección de los pulmones de la lesión aguda inducida por ácido. De este modo, la potenciación de la función y/o expresión de ACE2 es una diana novedosa y no anticipada para el tratamiento de ARDS y enfermedad pulmonar.

Procedimientos

Clonación de mapeo de ACE2 de rata y de ratón y QTL cromosómico

Se clonó ACE2 murino a partir de una base de datos de propiedad de EST. Usando una sonda ACE2 de ratón, los investigadores seleccionaron después un ADNc de riñón de rata (invitrogen) para obtener un ADNc de rata de longitud completa como se determina mediante la secuenciación de ADN. Para el mapeo cromosómico, se usó una sonda cromosómica específica de ADNc de ACE2 de rata para seleccionar una genoteca PAC de rata (RPCI- 31, Research Genetics), identificando dos clones positivos (6M6 y 125K9).

Las secuencias de extreme de estos clones se determinaron y se diseñaron cebadores específicos de ratas (mc2L: 5'- TCAATTTACTGCTGAGGGGG-3', mc2R: 5'-GAGGGATAACCCAGTGCAAA- 3') para determinar la posición en el mapa cromosómico de ACE2 en rata mediante selección de un panel híbrido de radiación (RH07.5, Research Genetics). Se obtuvieron ratas SHR y control WKY de Harlan y se mantuvieron en las instalaciones de animales del Instituto de Cáncer de Ontario de acuerdo con las directrices institucionales. Los tejidos de ratas SHRSP fueron proporcionados amablemente por el Dr. Detlev Ganten, Alemania. Ratas Sabra resistentes a sal y sensibles a sal se desarrollaron y se mantuvieron en la instalación de animales del Centro Médico de Barzilai de la Universidad de Ben-Gurion, Israel. El tratamiento de sal Doca era como se ha descrito anteriormente.

Análisis de Expresión. Se preparó el ARN total a partir de riñones de rata que usa agente de trire. 20 mg de ARN se resolvió sobre un gel de formamida al 0,8%. Se transfirió a membrana de nylon (Amersham), y se sondó con una sonda de ADNc de ACE2 parcial de rata (9-1). La sonda de acción β -y transferencias de Northern de tejidos múltiples se compraron en Clontech. Para el análisis de western, se homogeneizaron los riñones en tampón de lisis (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 20 mM EDTA, y 1% triton-X 100) complementado con "cóctel inhibidor" de proteasa completo (Roche) y 1 mM Na_3VO_4 - 100 mg de proteína se resolvió mediante SDS-PAGE sobre ges de 8% tris-glicina. Se obtuvo ACE2 inmuno-suero a partir de conejos inmunizados con un péptido específico de ratón de ACE2 DYEAGADGYNRNQLIED. El suero se purificó por afinidad con el péptido de inmunización que usa el kit unido a sulfuro (Pierce). Se usó un anticuerpo comercialmente disponible de β como control de carga (Santa Cruz).

Generación de ratones mutantes ACE2. Un vector de dirección (brazo corto de 559 pares de bases, y un brazo largo de 8,1 kilobase) se construyó usando el vector pKO ScramblerNTKV-1907 (Stratagene). Una parte de los nucleótidos que contiene ADN genómico de *ace2* que contiene +1069 a +1299 se reemplazó con el módulo de resistencia a neomicina en la orientación de sentido contrario. La construcción de dirección se sometió a electroporación en las células E14K ES, y la selección para clones ES recombinantes homólogos positivos se realizó mediante transferencia de Southern de ADN genómico digerido con EcoRI -se hibridó a las sondas flanqueantes 5' y 3'. Se inyectaron dos líneas celulares independientes *ace*^{-/-} ES en blastocitos derivados de C57BU6 para generar ratones quiméricos, que se retrocruzaron con ratones C57BU6. Dos líneas celulares ES proporcionaron transmisión de línea germinal independiente. Los datos reseñados en este manuscrito son consistentes con las dos líneas mutantes de ratón. La ablación de la expresión de ACE2 se confirmó mediante RTPCR, análisis de transferencia Northern, y Western. Solamente los ratones hermanos de camada se usaron para todos los experimentos. La histología de todos los tejidos, ensayos de apoptosis, serología de sangre, y morfometrías de riñón eran como se ha descrito³¹. Los ratones mutantes de ACE completos se han descrito previamente⁸ y se obtuvieron de los Laboratorios Jackson. Se mantuvieron los ratones en las instalaciones de animales del Ontario Cancer Institute de acuerdo con las directrices institucionales.

Morfometría del corazón, ecocardiografía, hemodinámica y mediciones de la presión sanguínea. Para la morfometría de corazón, se perfundieron los corazones con formalina al 10% a 60 mmHg y posteriormente se incrustaron en parafina. Se determinó la fibrosis intersticial de miocardio mediante la morfometría cuantitativa que usa el análisis de imagen asistida por ordenador con sustracción de color que usa el kit Image Processing Tool version 2.5 acoplado al software Photoshop 6.0. Se usaron las secciones teñidas con rojo Picro-Sirius para calcular fibrosis intersticial como la relación de las áreas con tinción PSR positiva comparado con el campo visual completo. Las determinaciones ecocardiográficas se realizaron como se describe³² usando hermanos de camada de tipo salvaje y mutantes. Se anestesiaron los ratones con isoflourano/oxígeno y se examinaron mediante ecocardiografía transtorácica usando un Acuson® Sequoia C256 equipado con un transductor lineal 15MHz. FS se calculó como: FS = [(EDD - ESD)/EDD]*100.

Vcfc se calculó como el tiempo de FS/expulsión corregido para el tiempo cardíaco. Las mediciones hemodinámicas se realizaron como se ha descrito. En resumen se anestesiaron los ratones, y la arteria carótida derecha se aisló con un catéter 1.4 French Millar (Millar Inc., Houston) conectado a un amplificador (TCP-500, Millar Inc.). Después de la inserción del catéter en la arteria carótida, se introdujo el catéter en la aorta y después en el ventrículo izquierdo para registrar las presiones aórticas y ventriculares. Los parámetros medidos y analizados eran ritmo cardíaco, presión aórtica, presión ventricular izquierda (LV), presión y sistólica, presión diastólica LV, y los primeros máximos y mínimos derivados de la presión LV (+dP/dtmax y dP/dtmax, respectivamente). La medición de la presión sanguínea extremo

de cola se realizaron usando un sistema de análisis de Presión sanguínea Usitech BP- 2000 fabricado por Visitech Systems (Apex, NC). Para tratamiento de captopril, se suplementó en el agua de bebida con 400 mg/l de captopril (Sigma) durante dos semanas antes de la medición de la presión sanguínea.

5 *Niveles de péptido de angiotensina en tejidos.* Se homogeneizaron corazones y riñones sobre hielo sobre hielo en etanol al 80%/0,1 N HCl que contiene los inhibidores de peptidasa descrito anteriormente que incluye fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, 100 mM). Se centrifugaron los homogenatos de proteína a 30.000 g durante 20 minutos, se decantaron los sobrenadantes, y se acidificaron con 1% (v/v) de ácido heptafluorobutírico (HFBA, Pierce, Rockford, IL). Se concentró el sobrenadante hasta 5 ml sobre una centrifuga de vacío Savant (*Savant*, Farmingdale, NY) y los
10 extractos concentrados se aplicaron a Sep-Paks activado, se lavaron con 0,1% HFBA, y se fluyeron con 5 ml de metanol al 80%/0,1% de HFBA. Se realizó el análisis de radioinmunoensayo del contenido en péptido de angiotensina en los extractos de los tejidos de corazón y riñón. Los límites de detección para los RIAs Ang II y Ang I eran 0,5 fmol/tubo y Ang I 5 fmol/tubo, respectivamente.

15 *Modelo de lesión de pulmón aguda.* Se usaron en este estudio ratones con inactivación de ACE2 y sus hermanos de camada (8 - 12 semanas de edad). Un minuto antes de la exposición de aspiración, se administraron dos inhalaciones profundas (3 veces por volumen) para hacer convencional la historia de volumen y se realizaron mediciones como datos iniciales. Los ratones anestesiados y ventilados mecánicamente recibían inyección intratraqueal de 2 ml/kg HCl (pH = 1,5), seguido de un bolo de aire. En el grupo control, los ratones recibieron inyección de solución salina o
20 ninguna inyección. En todos los grupos, se realizaron mediciones a intervalos de 30 minutos durante 3 horas. Para determinar fisiológicamente la lesión pulmonar, se evaluó la elasticidad pulmonar (EL; una recíproca conformidad de pulmón) midiendo la presión prevista traqueal, flujo, y volumen. EL se calculó dividiendo la presión prevista traqueal por el volumen. Los cambios en EL reflejan alteraciones en el parénquima de pulmón y entumecimiento de los pulmones.

25 La presente invención se ha descrito en detalle con referencia particular las realizaciones particulares. Por ejemplo, cuando la solicitud se refiere a proteínas, es evidente que se pueden a menudo usar los péptidos y polipéptidos. Del mismo modo cuando se describe un gen en la solicitud, es evidente que se pueden usar a menudo las moléculas de ácido nucleico o fragmentos de gen.

30 Referencias

Yusuf, S., Reddy, S., Ounpuu, S., & Anand, S. Global burden of cardiovascular diseases Part I: General considerations, the epidemiologic transition, risk factors, and impact of urbanization. *Circulation* 104, 2746 - 2753 (2001).

35 **Carretero, O.A., & Oparil, S.** Essential hipertensión Part I: Definition and etiology. *Circulation* 101, 329 - 335 (2000).

40 **Jacob, H.J.** Physiological genetics: Application to hipertensión research. *Clin. Exp. Pharm. Phys.* 26, 530 - 535 (1999).

Rapp, J.P. Genetic analysis of inherited hipertensión in the rat. *Physiol. Rev.* 80, 135-172 (2000).

45 **Stoll, M. et al.** A genomic-systems biology map for cardiovascular function. *Science* 294, 1723 - 1726 (2001).

Corvol, P., Williams, T.A. in Handbook of Proteolytic Enzymes (Barrett, A.J., Rawlings, N.D., and Woessner, J.F., eds) pp. 1066 - 1076. (*Academic Press*, London, 1998)

50 **Skeggs, L.T., Dorer, F.E., Levine, M., Lentz, K.E., & Kahn J.R.** The biochemistry of the renina - angiotensina system. *Adv. Exp. Med. Biol.* 130, 1 - 27 (1980).

Krege, J.H. et al. Male-female differences in fertility and presión sanguínea in ACE-deficient mice. *Nature* 375, 146 - 148 (1995).

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

60 **Wuyts, B., Delanghe, J., & De Buyzere, M.** Angiotensina I-converting enzyme insertion/deletion polymorphism: clinical implications. *Acta Clin. Belg.* 52, 338 - 49 (1997).

Elkind, M.S., & Sacco, R.L. Stroke risk factors and stroke prevention. *Semin. Neurol.* 18, 429 - 440 (1998).

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

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

ES 2 318 137 T3

- Tipnis, S.R. et al.** A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expresión as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J. Biol. Chem.* 275, 33238 - 33243 (2000).
- Donoghue, M. et al.** A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin to angiotensin 1-9. *Circ. Res.* 87, e1-e8 (2000).
- Yagil C. et al.** Role of chromosome X in the Sabra rat model of salt-sensitive hypertension. *Hypertension* 33 (part II), 261 - 265 (1999).
- Hilbert, P. et al.** Chromosomal mapping of two genetic loci associated with blood-pressure regulation in hereditary hypertensive rats. *Nature* 353, 521 - 529 (1991).
- Kloting, I., Voigt, B., Kovacs, P.** Metabolic features of newly established congenic diabetes-prone BB.SHR rat strains. *Life Sci.* 62, 973 - 979 (1998).
- Laragh, J.H.** Renovascular hypertension: a paradigm for all hypertension. *J. Hipertensi3n* 4(suppl. 4), S79-S88 (1986).
- Yagil, C. et al.** Development, genotype and phenotype of a new colony of the Sabra hypertension prone (SBH/y) and resistant (SBN/y) rat model of salt sensitivity and resistance. *J. Hypertension* 14, 175 - 82 (1996).
- Tanimoto, K. et al.** Angiotensinogen-deficient mice with hypotension. *J. Biol. Chem.* 269, 31334-31337 (1994).
- Kloner, R.A., Bolli, R., Marban, E., Reinlib, L., & Braunwald, E.** Medical and cellular implications of stunning, hibernation, and preconditioning: an NHLBI workshop. *Circulation* 97, 1848 - 1867 (1998).
- Murphy, A.M. et al.** Transgenic mouse model of stunned myocardium. *Science* 287, 488 - 491 (2000).
- Heusch, G.** Hibernating myocardium. *Physiol. Rev.* 78, 1055-1085 (1998).
- Sowter, H.M., Ratcliffe, P.J., Watson, P., Greenberg, A.H., & Harris, A.L.** HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction of the cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors. *Cancer Res.* 61, 6669 - 6673 (2001).
- Kietzmann, T., Roth, U., & Jungermann, K.** Induction of the plasminogen activator inhibitor-1 gene expresión by mild hypoxia via a hypoxia response element binding the hypoxia-inducible factor-1 in rat hepatocytes. *Blood* 94, 4177 - 4185 (1999).
- Taylor, C.A.M., Coates, D., & Shirras, A.D.** The Acer gene in Drosophila codes for an angiotensin-converting enzyme homologue. *Gene (Amst.)* 181, 191 - 197 (1996).
- Giordano, F.J. et al.** A cardiac myocyte vascular endothelial growth factor paracrine pathway is required to maintain cardiac function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 5780 - 5785 (2001).
- Weiss, D., Sorescu, D., & Taylor, W.R.** Angiotensina II and atherosclerosis. *Am. J. Cardiol.* 87, 25C-32C (2001).
- Enseleit, F., Hurlimann, D., & Luscher, T.F.** Vascular protective effects of angiotensina converting enzyme inhibitors and their relation to clinical events. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 37(suppl. 1), S21-S30 (2001).
- Kong, Y.Y. et al.** OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 397, 315 - 23 (1999).
- Wickenden, A.D. et al.** Targeted expression of a dominant-negative K(v)4.2 K(+) channel subunit in the mouse heart. *Circ. Res.* 85, 1067 - 1076 (1999).
- Zvaritch, E. et al.** The transgenic expresión of highly inhibitory monomeric forms of phospholamban in mouse Herat impairs cardiac contractility. *J. Biol. Chem.* 275, 14985 - 14991 (2000).
- Rosengart et al.** Patente de Estados Unidos n° 6.322.536
- March et al.** Patente de Estados Unidos n° 6.224.584
- Hammond et al.** Patente de Estados Unidos n° 6.174.871
- Wolfgang-M. Franz et al.** Analysis of tissue-specific gene delivery by recombinant adenoviruses containing cardiac-specific promoters. *Cardiovascular Research* 35 (1997) 560 - 566.
- Rothmann T. et al.** Heart muscle-specific gene expresión using replication defective recombinant adenovirus. *Gene Ther* 1996 Oct; 3(10):919 - 26

Phillips MI et al. Vigilant vector: heart-specific promoter in an adeno-associated virus vector for cardioprotection. *Hypertension* 2002, Feb; 39 (2 Pt 2):651 – 5.

Herold BC et al. Herpes simplex virus as a model vector system for gene therapy in renal disease. *Kidney Int* enero de 2002; 61 Suppl 1: 3 – 8.

Figlin RA et al. Technology evaluation: interleukin-2 gene therapy for the treatment of renal cell carcinoma. *Curr Opin Mol Ther* abril de 1999; 1 (2): 271 – 8.

Varda-Bloom N et al. Tissue-specific gene therapy directed to tumor angiogenesis. *Gene Ther* junio de 2001; 8 (11):819 - 27.

Scott-Taylor TH et al. Adenovirus facilitated infection of human cells with ecotropic retrovirus. *Gene Ther* mayo de 1988; 5(5):621 – 9.

Langer JC et al. Adeno-associated virus gene transfer into renal cells: potential for *in vivo* gene delivery. *Exp Nephrol* mayo - junio de 1998; 6(3):189 – 94.

Lien YH et al. Gene therapy for renal diseases. *Kidney Int Suppl* octubre de 1997; 61:S85-8

Ohno K et al. Cell-specific targeting of Sindbis virus vectors displaying IgG-binding domains of protein A. *Nat Biotechnol* agosto de 1997; 15 (8): 763 - 7

TABLA 1

Funciones cardíacas de ratones sin *ace2*

	Machos de 3 meses		Machos de 6 meses		Hembras de 6 meses	
	<i>ace2^{+/y}</i> n = 7	<i>ace2^{-/y}</i> n = 7	<i>ace2^{+/y}</i> n = 8	<i>ace2^{-/y}</i> n = 8	<i>ace2^{+/y}</i> n = 3	<i>ace2^{-/y}</i> n = 3
Ritmo cardíaco, bpm	469 ± 12	466 ± 18	495 ± 15	482 ± 12	460 ± 6	452 ± 14
AW, mm	0,65 ± 0,02	0,62 ± 0,01	0,66 ± 0,01	0,59 ± 0,02*	0,65 ± 0,02	0,57 ± 0,04
LVEDD, mm	4,09 ± 0,04	4,25 ± 0,10,	4,12 ± 0,10	4,49 ± 0,12*	3,71 ± 0,10	4,11 ± 0,07*
LVESD, mm	2,11 ± 0,04	2,69 ± 0,09**	2,13 ± 0,06	3,29 ± 0,14**	1,74 ± 0,07	2,68 ± 0,11**
% FS	48,42 a	36,73 ± 0,89**	48,12 ± 0,84	26,76 ± 1,78**	53,00 ± 1,68	34,85 ± 1,76**
PAV, M/s	0,992 ± 0,029	0,922 ± 0,033	0,902 ± 0,044	0,802 ± 0,037	0,875 ± 0,048	0,809 ± 0,044
Vcfc, ctrc/s	9,49 ± 0,48	7,28 ± 0,45*	9,46 ± 0,26	4,93 ± 0,33**	10,34 ± 0,81	6,16 ± 0,31**
LVM, mg	95,69 ± 1,88	95,50 ± 2,28	102,41 ± 4,00	100,49 ± 3,39	92,27 ± 2,02	89,60 ± 1,54
LVM/BW, mg/g	3,32 ± 0,08	3,53 ± 0,18	3,19 ± 0,10	3,32 ± 0,15	3,29 ± 0,37	3,30 ± 0,09

*p < 0,05 *ace2^{+/y}* vs *ace2^{-/y}* o *ace2^{-/y}* vs *ace2^{+/y}*

**p < 0,01 *ace2^{+/y}* vs *ace2^{-/y}* o *ace2^{-/y}* vs *ace2^{+/y}*

Bpm = pulsaciones del corazón por minuto; AW = espesor de la pared anterior; LVEDD = dimensión diastólica del extremo del ventrículo izquierdo; LVESD = dimensión sistólica del extremo del ventrículo izquierdo; %FS = porcentaje fraccional de acortamiento; PAV = velocidad de salida aórtica máxima; Vcfc = Velocidad de acortamiento de la fibra circunferencial; LVM = masa del ventrículo izquierdo calculada; BW = peso corporal.

ES 2 318 137 T3

TABLA 2

Parámetros hemodinámicos invasivos de machos de 6 meses de edad ace2^{-ly} mice

	ace2^{+ly}	ace2^{-ly}
	N = 8	N = 8
5		
10		
Ritmo cardíaco, bpm	303 ± 16	298 ± 8
SBP, mmHg	111,5 ± 2,4	91,6 ± 3,0
DBP, mmHg	70,5 ± 3,0	50,3 ± 3,4**
MBP, mmHg	84,2 ± 2,8	64,0 ± 2,6**
15		
LVSBP, mmHg	107,4 ± 4,5	87,5 ± 2,3**
LVEDBP, mmHg	5,5 ± 0,8	5,3 ± 0,7
dP/dT max	5579 ± 422	3034 ± 124**
20		
dP/dT min	-5055 ± 257	-2929 ± 271**

****p < 0.01 ace2^{-ly} vs ace2^{+ly}**

SBP = presión sistólica sanguínea; DBP = presión sanguínea diastólica; MBP = presión sanguínea arterial media; LVSBP = presión sistólica sanguínea del ventrículo izquierdo; LVEDBP = presión sanguínea diastólica del extremo del ventrículo izquierdo; dP/dT max = 1^a derivada máxima del cambio en la presión / tiempo del ventrículo izquierdo; dP/dt min = 1^a derivada mínima del cambio en la presión / tiempo del ventrículo izquierdo

TABLA 3

Funciones cardíacas de ratones de 6 meses de edad sin ace y ace/ace2

	ace^{-/-}	ace^{-/-} ace2^{+ly}
	n = 8	n = 8
40		
Heart Rate, bpm	507 ± 17	491 ± 10
45		
AW, mm	0,63 ± 0,01	0,65 ± 0,02
LVEDD, mm	3,86 ± 0,04	3,79 ± 0,07
LVESD, mm	2,11 ± 0,04	2,13 ± 0,07
50		
% FS	45,34 ± 1,11	43,95 ± 1,24
PAV, M/s	0,995 ± 0,064	0,931 ± 0,040
Vcfc, circ/s	8,94 ± 0,25	8,40 ± 0,27

AW = espesor de la pared anterior; LVEDD = dimensión diastólica del extremo del ventrículo izquierdo; LVESD = dimensión sistólica del extremo del ventrículo izquierdo; % FS = porcentaje fraccional de acortamiento; PAV = velocidad de salida aórtica máxima; Vcfc = Velocidad de acortamiento de la fibra circunferencial;

REIVINDICACIONES

5 1. Un uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de ACE2 o ácido nucleico de ACE2 para la
preparación de un medicamento para el tratamiento de un estado disminuido de ACE2 seleccionado entre hipertensión,
insuficiencia cardíaca congestiva, insuficiencia cardíaca crónica, insuficiencia cardíaca aguda, infarto de miocardio,
arteriosclerosis, insuficiencia renal o una enfermedad pulmonar en un mamífero, en el que la enfermedad pulmonar es
10 enfermedad pulmonar obstructiva crónica, neumonía, asma, bronquitis crónica, enfisema pulmonar, fibrosis quística,
enfermedad pulmonar intersticial, hipertensión pulmonar primaria, embolia pulmonar, sarcoidosis pulmonar, tubercu-
losis, edema pulmonar, ARDS o cáncer de pulmón.

2. Un uso de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el mamífero es un ser humano.

15 3. Un uso de una cantidad eficaz de un transgen que codifica ACE2 para la preparación de un medicamento para una
terapia génica para un estado disminuido de ACE2 seleccionado entre hipertensión, insuficiencia cardíaca congestiva,
insuficiencia cardíaca crónica, insuficiencia cardíaca aguda, infarto de miocardio, arteriosclerosis, insuficiencia renal
o una enfermedad pulmonar en un paciente, en el que la enfermedad pulmonar es enfermedad pulmonar obstructiva
crónica, neumonía, asma, bronquitis crónica, enfisema pulmonar, fibrosis quística, enfermedad pulmonar intersticial,
20 hipertensión pulmonar primaria, embolia pulmonar, sarcoidosis pulmonar, tuberculosis, edema pulmonar, ARDS o
cáncer de pulmón.

4. Un uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el órgano afectado enfermo es el corazón o riñón o pulmón
o vasos sanguíneos.

25 5. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 4, en el que el transgen de ACE2 se prepara en un vector de
terapia génica.

6. El uso de reivindicación 5, en el que el vector de terapia génica comprende un vector viral.

30 7. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en el que el paciente es un ser humano.

8. Un procedimiento de selección de un compuesto que es un agonista de la actividad de ACE2, que comprende:

35 a. proporcionar: i) una preparación purificada que comprende ACE2, ii) un sustrato, y iii) un compuesto de ensayo;

b. mezclar dicho ACE2 y dicho sustrato en condiciones tales que dicho ACE2 pueda actuar sobre dicho sustrato
para producir un producto, en el que dicha mezcla se realiza en presencia y ausencia de dicho compuesto de ensayo; y

40 c. medir directa o indirectamente la cantidad de dicho producto producido en la presencia o ausencia de dicho
compuesto de ensayo, **caracterizado** porque dicho sustrato es angiotensina II.

9. El procedimiento de la reivindicación en el que dicho producto comprende AngI-7.

45 10. El uso de un polipéptido de ACE2 o ácido nucleico de ACE2 para la preparación de un medicamento para
el tratamiento de hipertensión, insuficiencia cardíaca congestiva, insuficiencia cardíaca crónica, insuficiencia cardíaca
aguda, infarto de miocardio, arteriosclerosis, insuficiencia renal o una enfermedad pulmonar en un mamífero, en el que
la enfermedad pulmonar es enfermedad pulmonar obstructiva crónica, neumonía, asma, bronquitis crónica, enfisema
pulmonar, fibrosis quística, enfermedad pulmonar intersticial, hipertensión pulmonar primaria, embolia pulmonar,
50 sarcoidosis pulmonar, tuberculosis, edema pulmonar, ARDS o cáncer de pulmón.

55

60

65

Figura 1

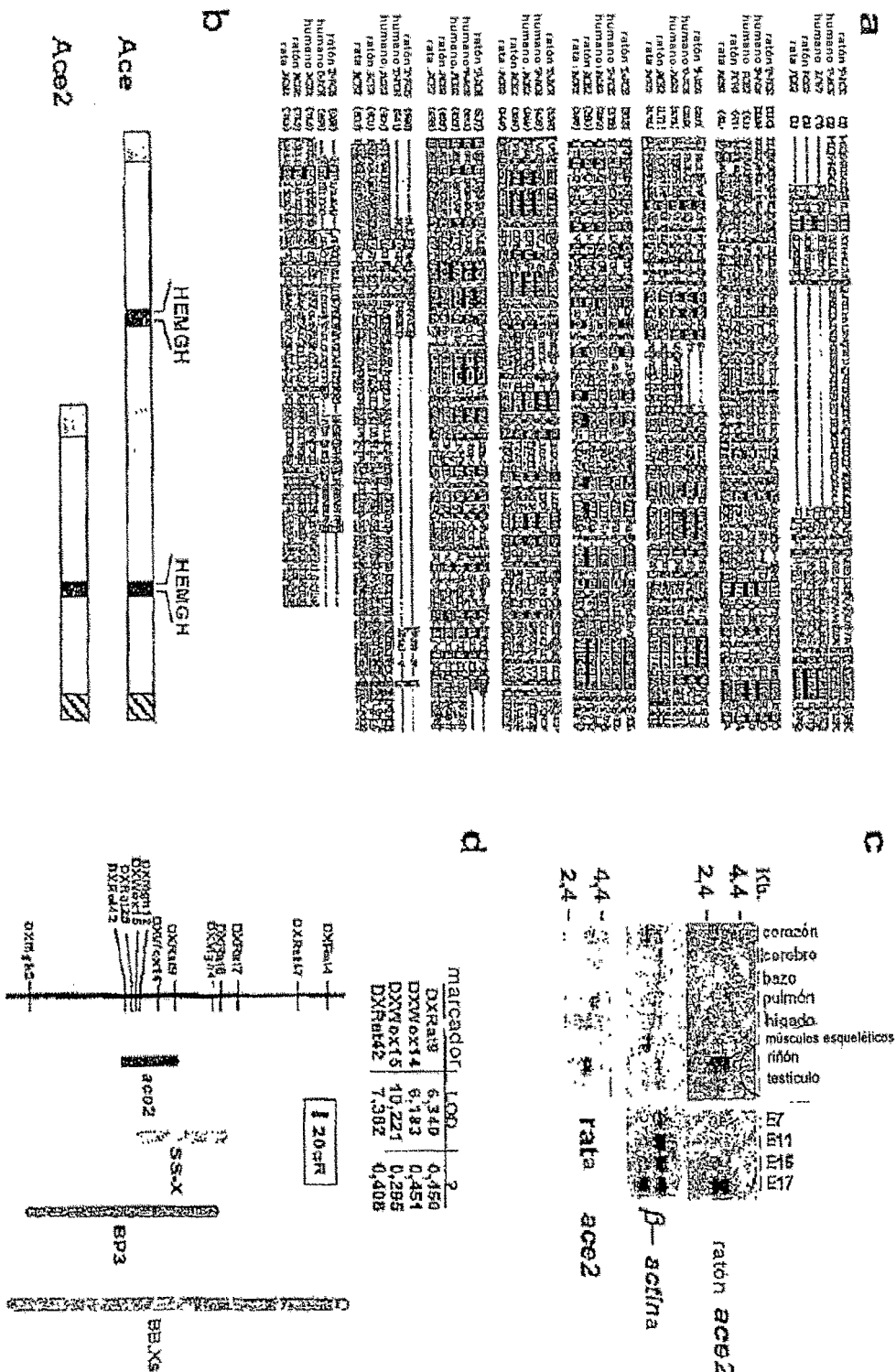


Figura 2a

a

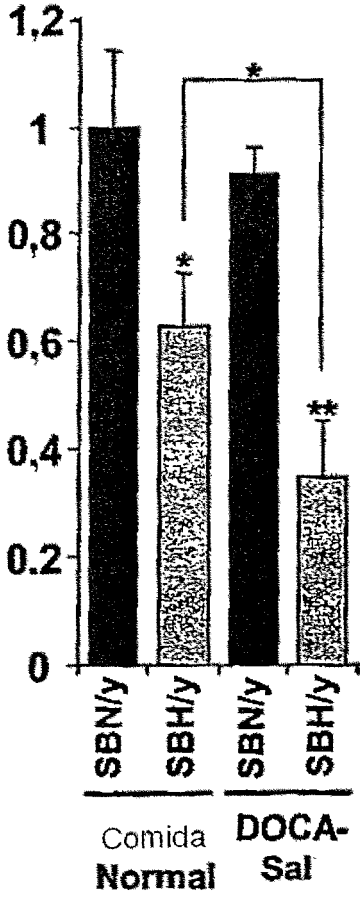
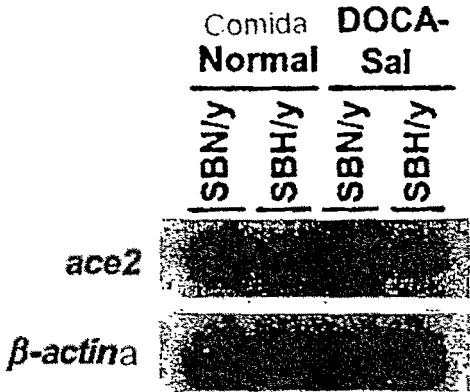
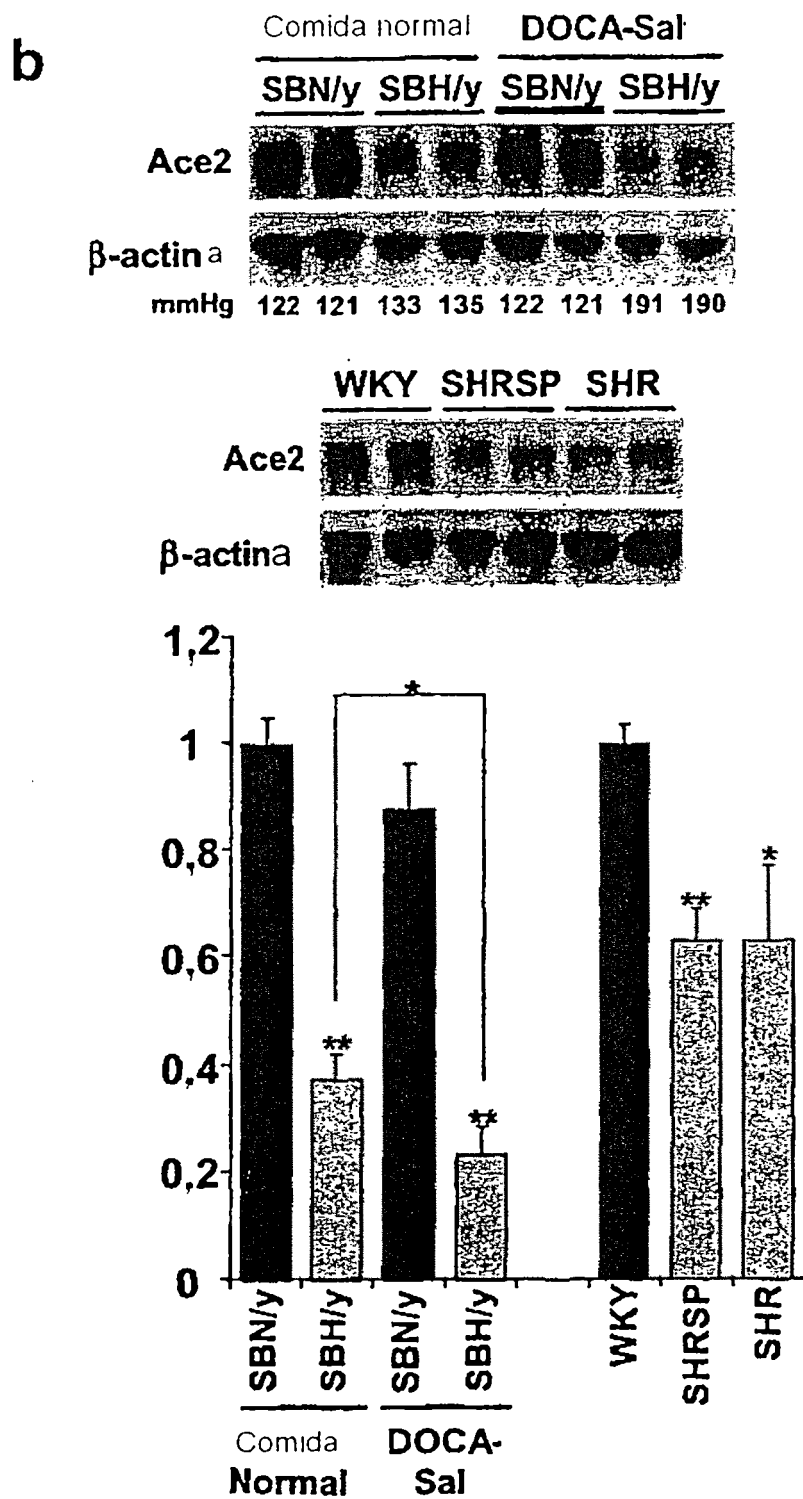


Figura 2b



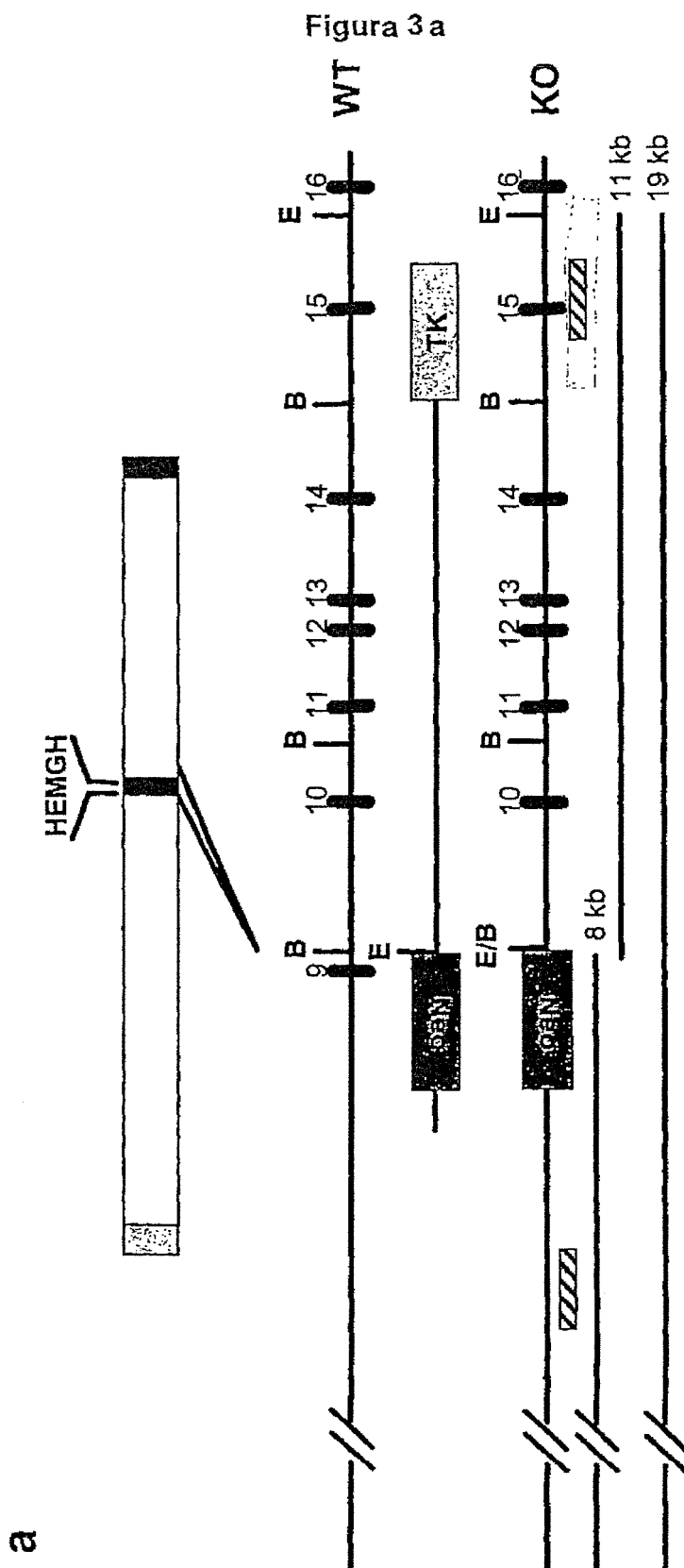


Figura 3b, 3c, 3d

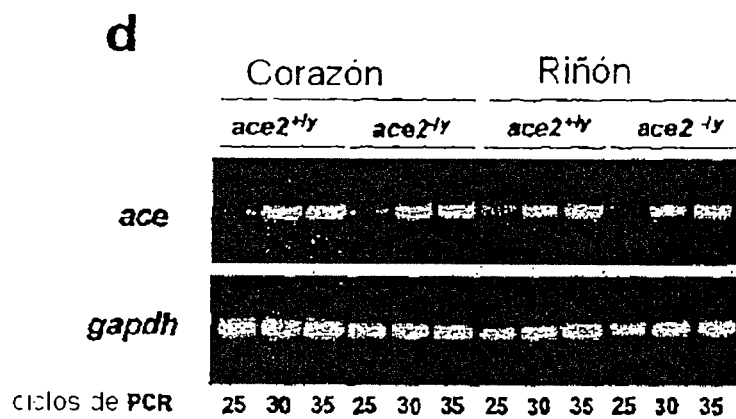
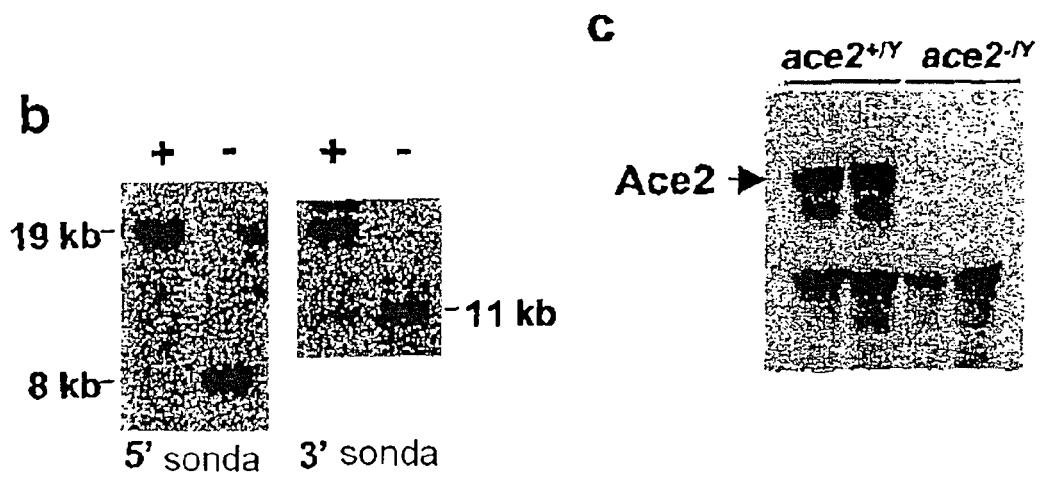


Figura 4a, 4b

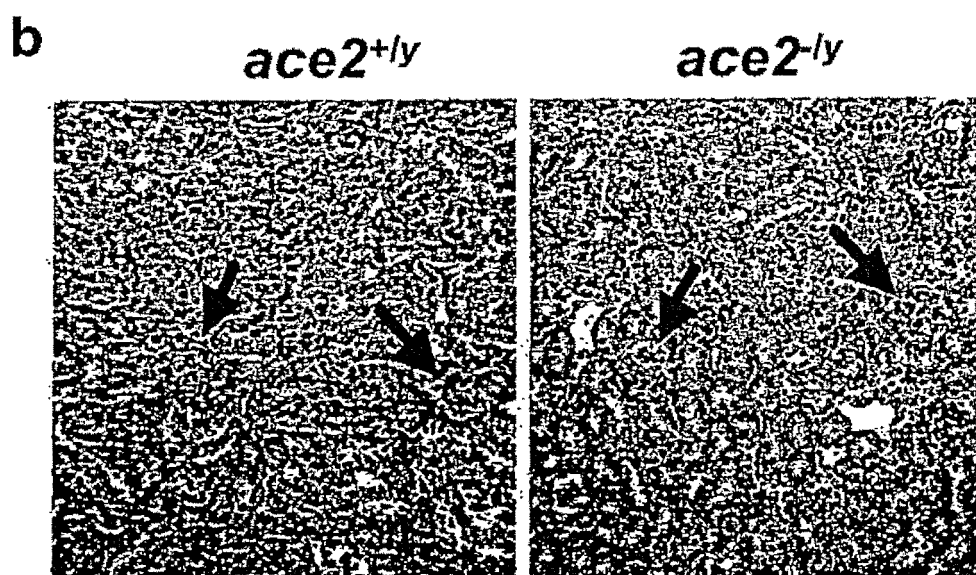
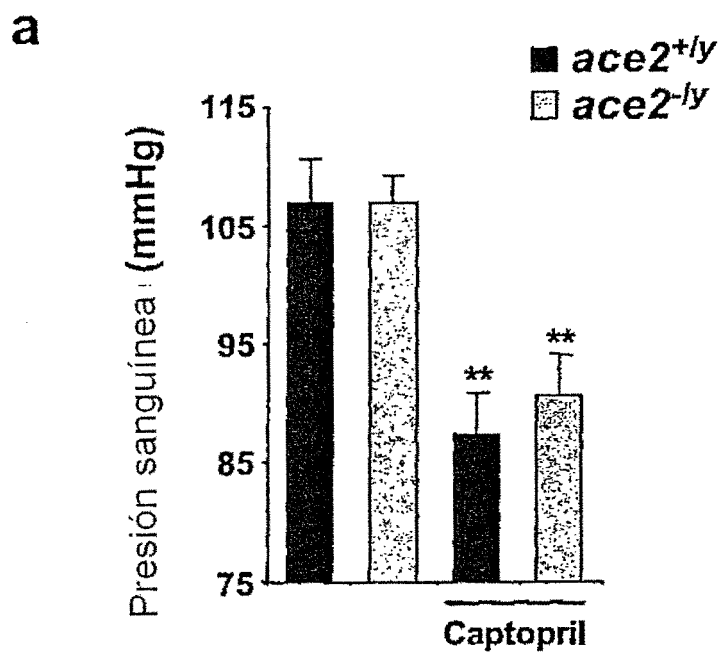


Figura 5a, 5b

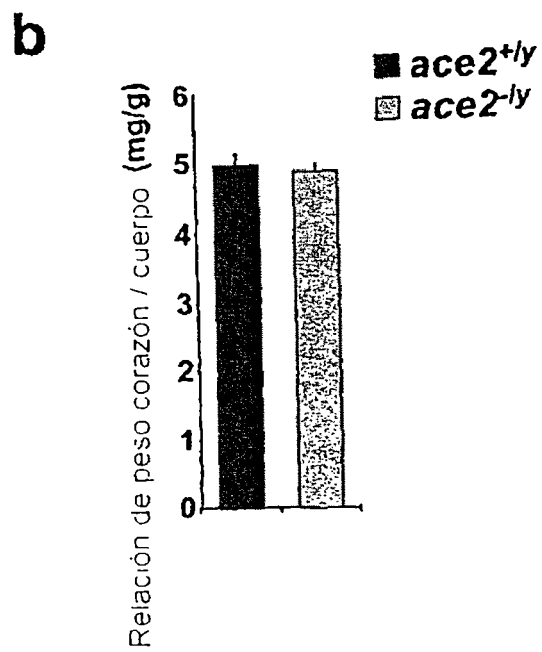
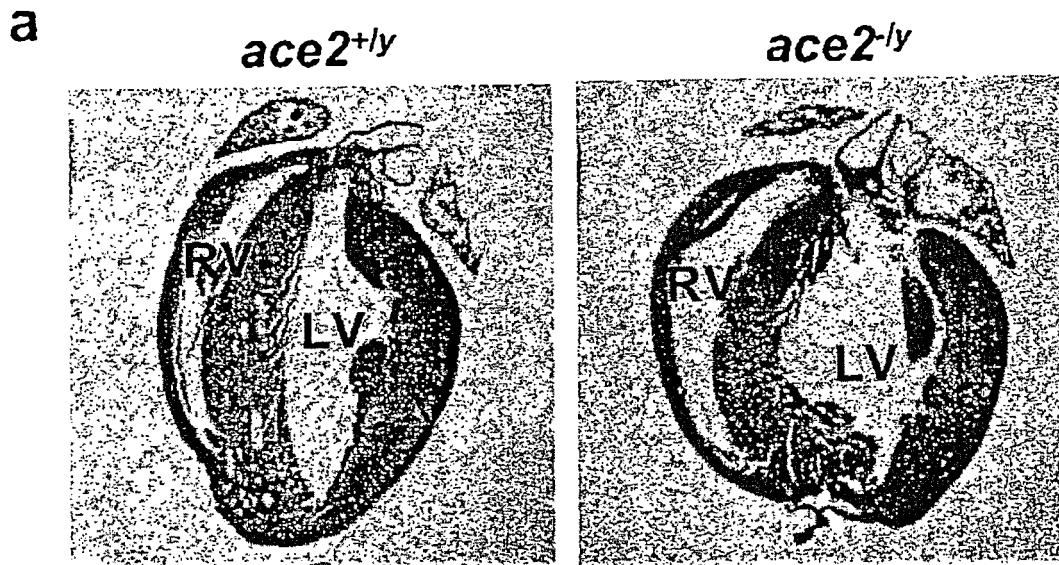


Figura 5c, 5d

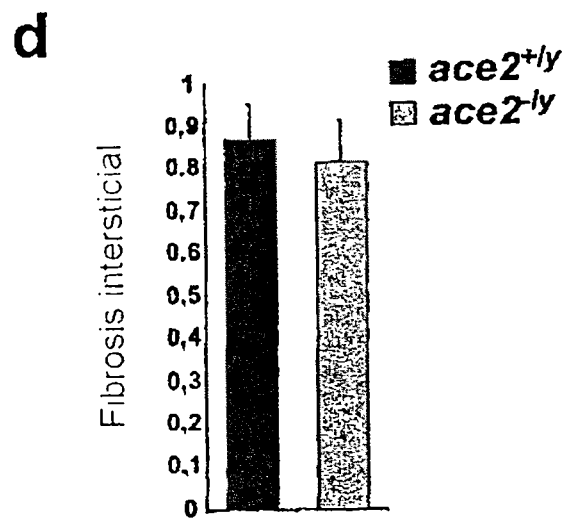
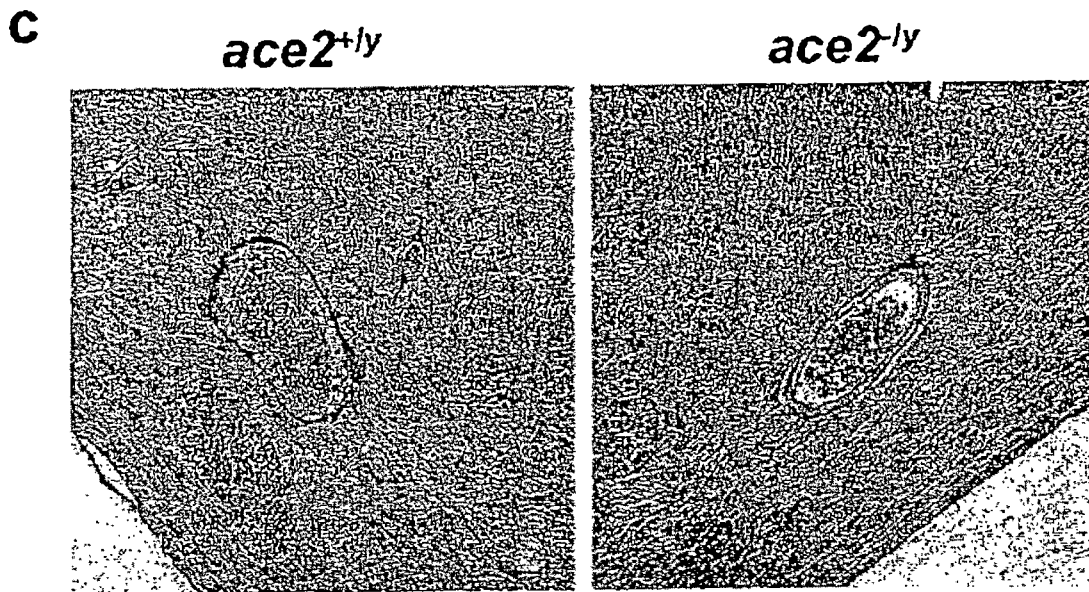


Figura 6a

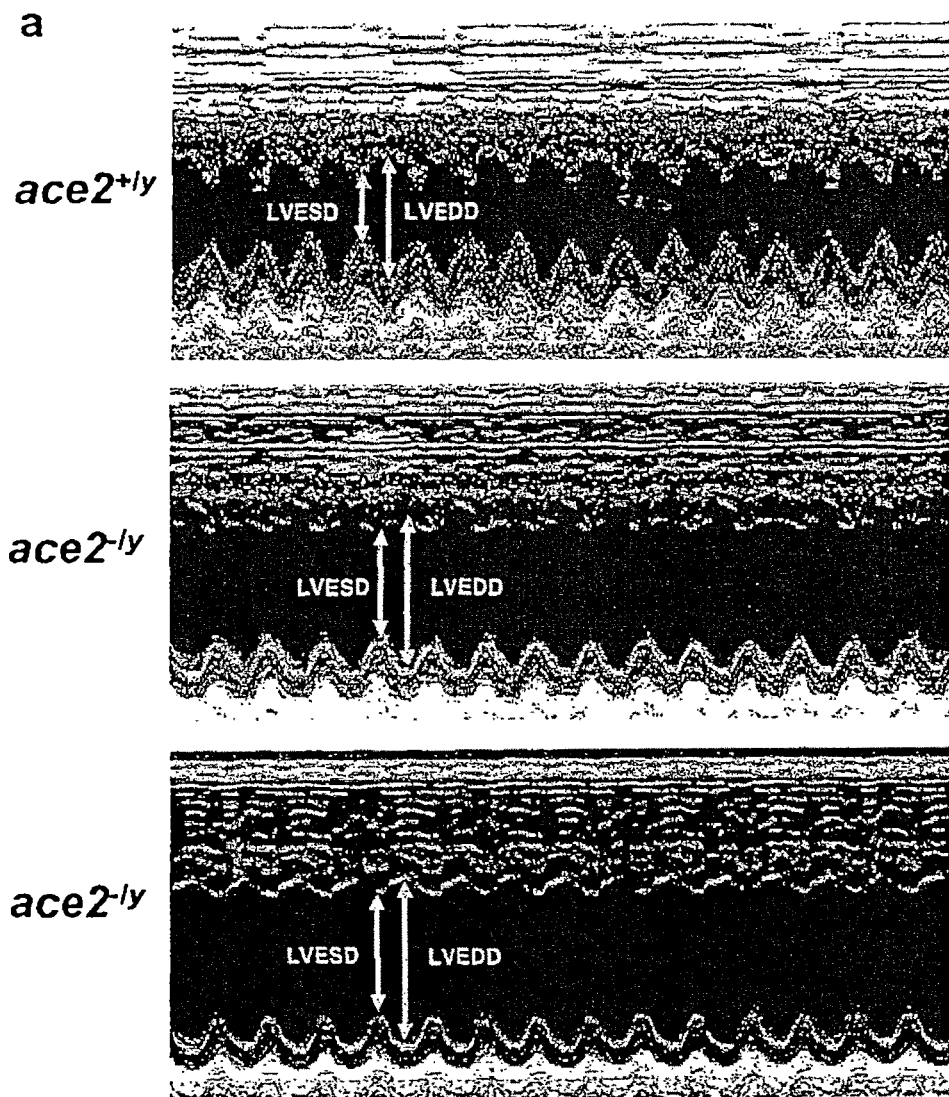


Figura 6b, 6c

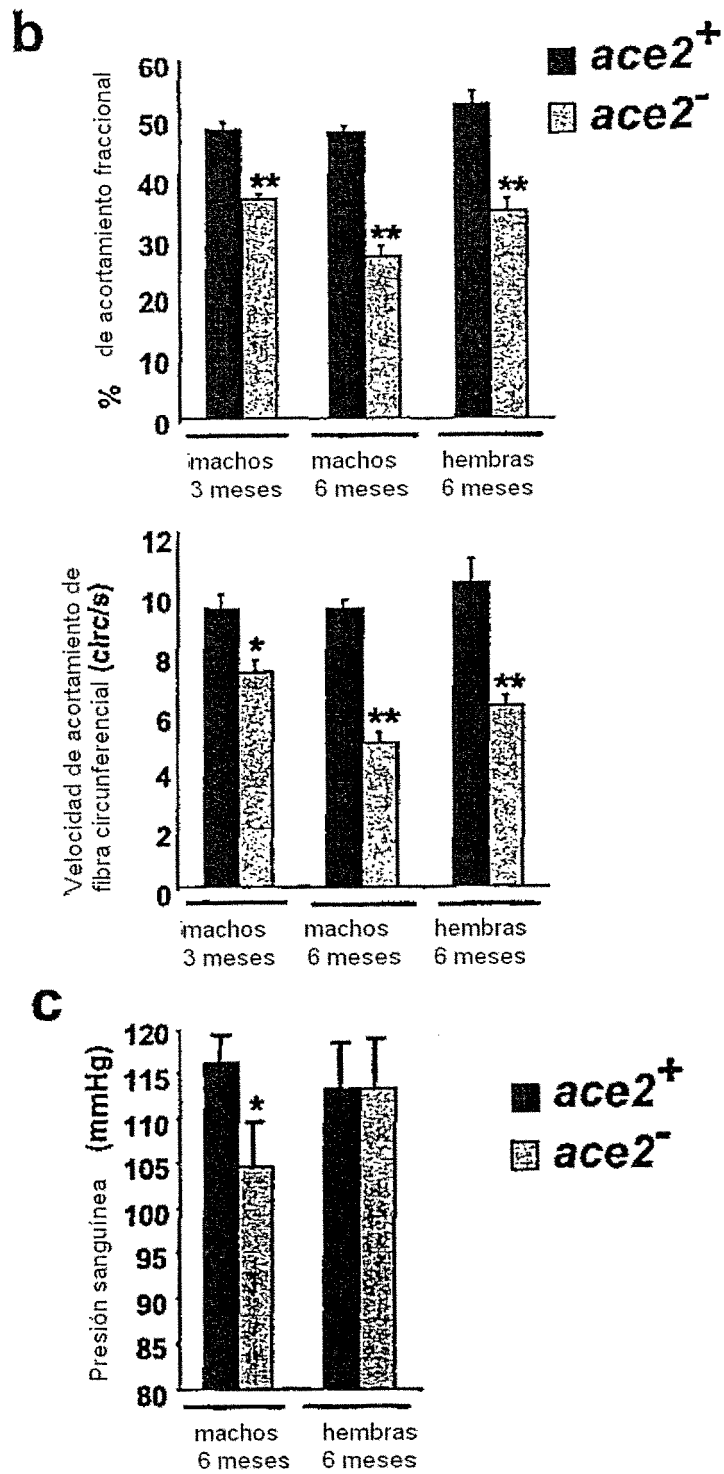
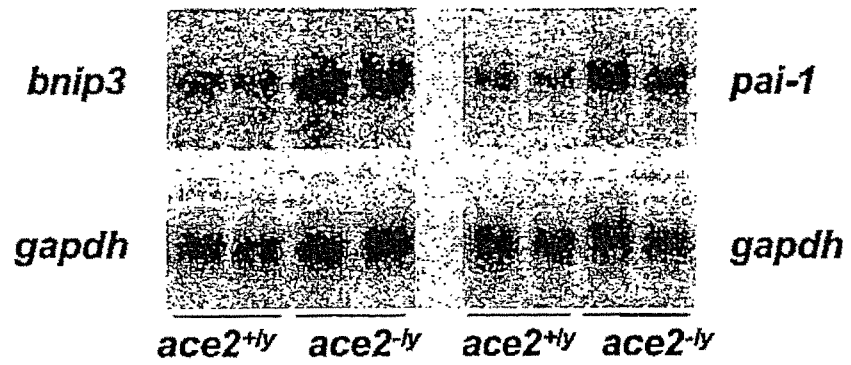


Figura 7a, 7b

a



b

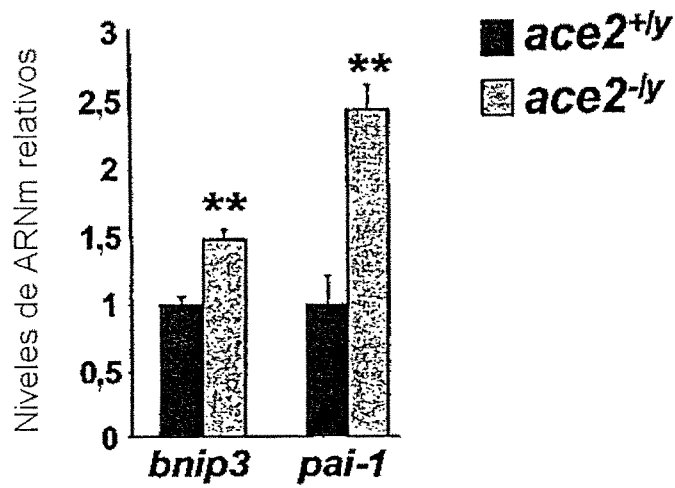


Figura 7c

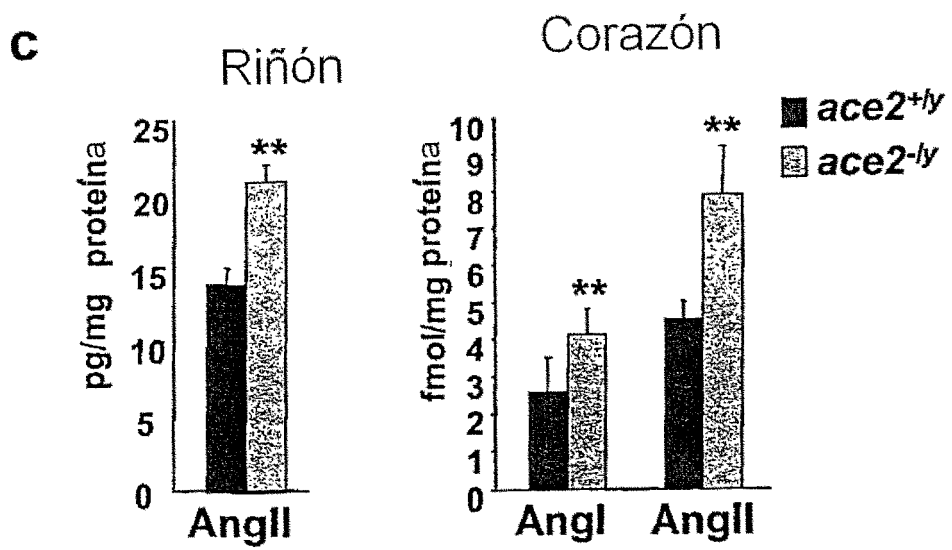


Figura 8a, 8b

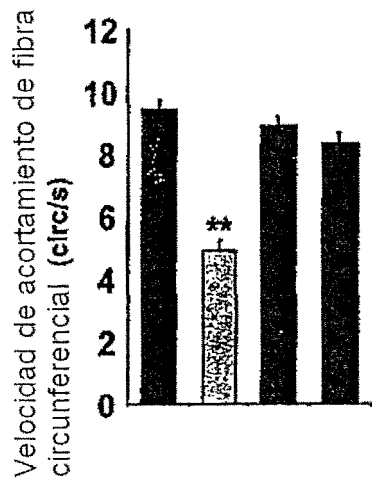
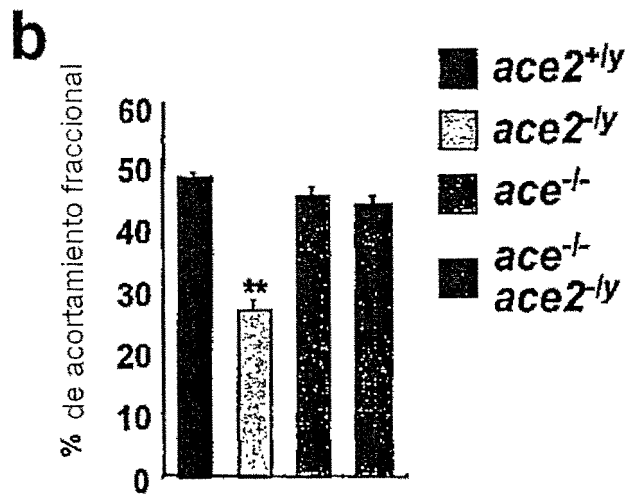
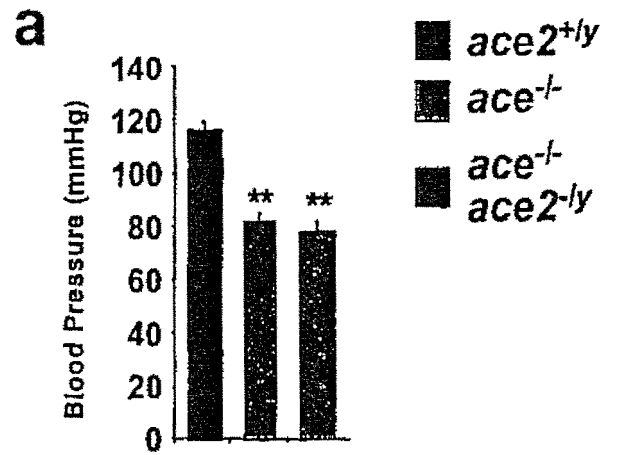
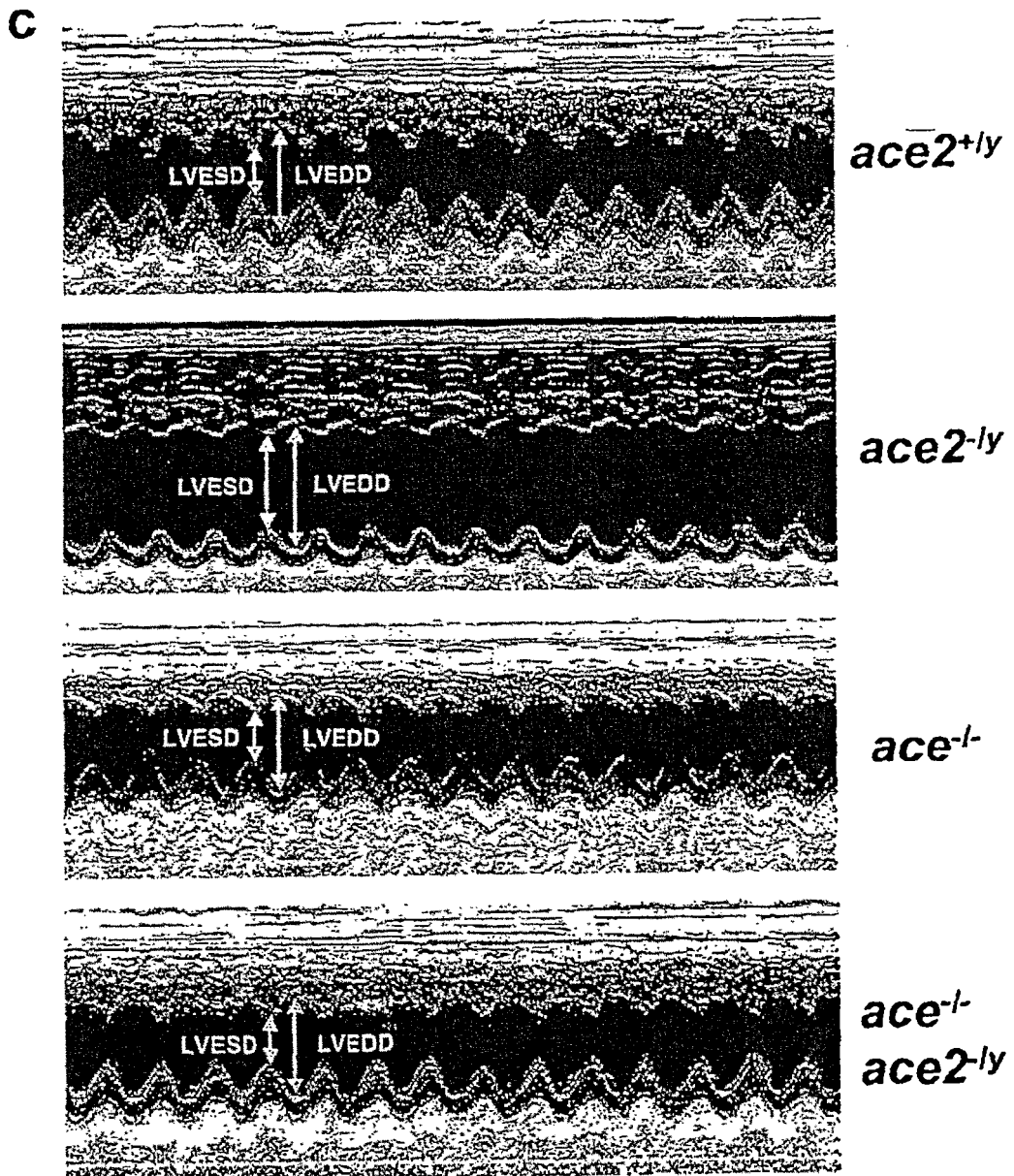


Figura 8c



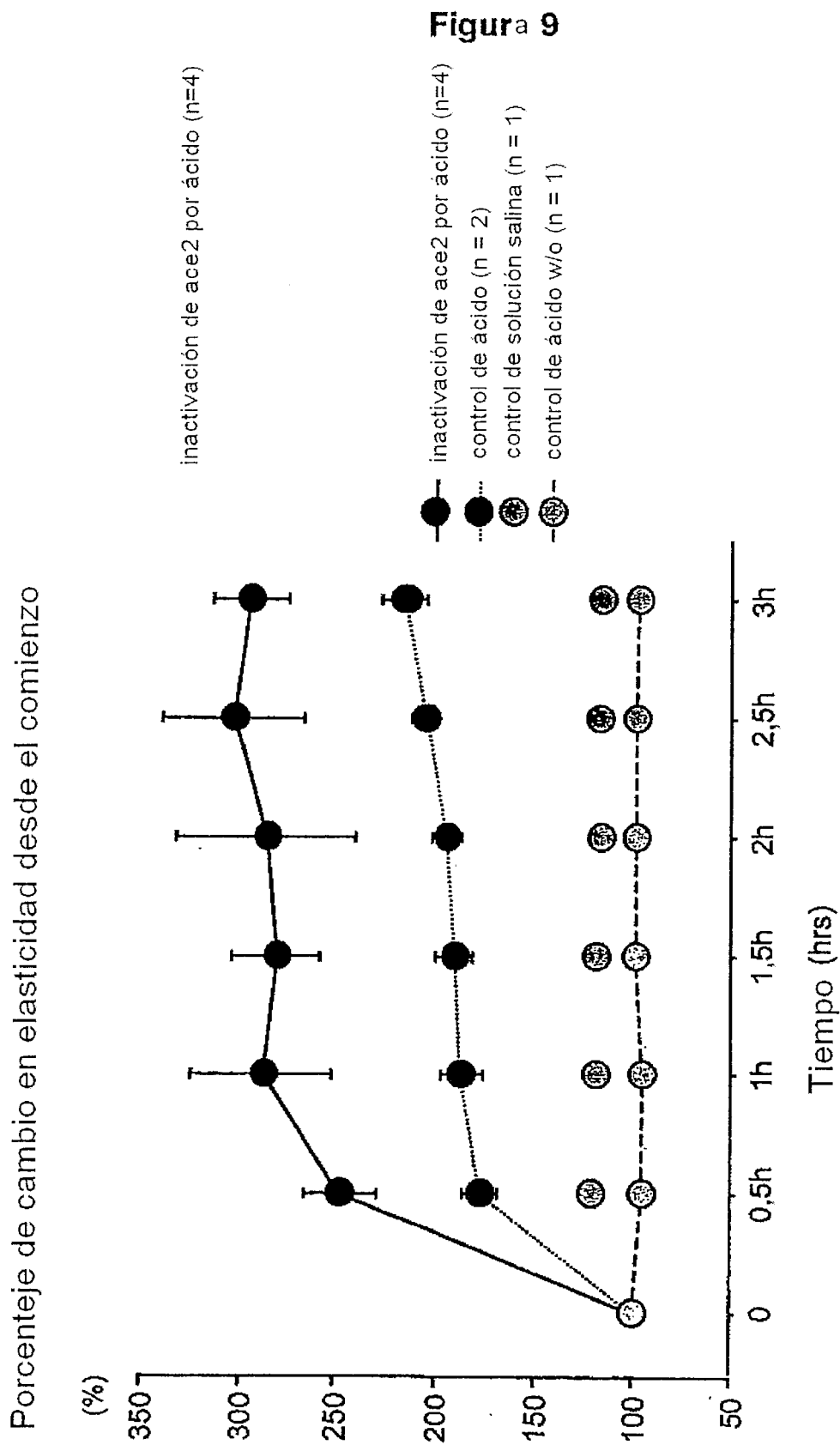


Figura 10a

```

1 cgcccaacc aagttcaaag gctgataaga gagaaaatct catgaggagg ttttagtcta
61 gggaaagtca ftcagtggat gtgatcttgg ctcacagggg acgatgtcaa gctcttcctg
121 gctccttctc agccttggtg ctgtaactgc tgctcagctcc accattgagg aacaggccaa
181 gacatTTTTg gacaagtTta accacgaagc cgaagacctg ttctatcaaa gttcacttgc
241 ttcttggaat tataacacca atattactga agagaatgtc caaaacatga ataagtctgg
301 ggacaaatgg tctgcctttt taaaggaaca gtccacactt gcccaaatgt atccactaca
361 agaaattcag aatctcacag tcaagcttca gctgcaggct cttcagcaaa atgggtcttc
421 agtgccttca gaagacaaga gcaaacgggt gaacacaatt ctaaatacaa tgagcaccat
481 ctacagtaact ggaaaagttt gtaaccgaga taatccacaa gaatgcttat tacttgaacc
541 aggtttgaat gaataatgg caaacagttt agactacaat gagaggctct gggcttggga
601 aagctggaga tctgaggtcg gcaagcagct gaggccatta tatgaagagt atgtggtctt
661 gaaaaatgag atggcaagag caaatcatta tgaggactat ggggattatt ggagaggaga
721 ctatgaagta aatggggtag atggctatga ctacagccgc ggcagttga ttgaagatgt
781 ggaacatacc ttgaagaga ttaaacatt atatgaacat cttcatgcct atgtgagggc
841 aaagttgatg aatgcctatc cttctatat cagtccaatt ggatgcctcc ctgctcattt
901 gcttgggtgat atgtgggta gattttgac aaatctgtac tctttgacag ttccctttgg
961 acagaacca aacatagatg ttactgatgc aatggtggac caggcctggg atgcacagag
1021 aatattcaag gaggccgaga agttctttgt atctgttgg cttcctaata tgactcaagg
1081 attctgggaa aattccatgc taacggaccc aggaaatggt cagaaagcag tctgccatcc
1141 cacagcttgg gacctgggga agggcgactt caggatcctt atgtgcacaa aggtgacaat
1201 ggacgacttc ctgacagctc atcatgagat ggggcatatc cagtatgata tggcatatgc
1261 tgcacaacct ttctctgtaa gaaatggagc taatgaagga ttccatgaag ctgttgggga
1321 aatcatgtca ctttctgac ccacacctaa gcatttaaaa tccattggct cactgtcacc
1381 cgattttcaa gaagacaatg aaacagaaat aaacttctg ctcaacaag cactcacgat
1441 tgttgggact ctgccattta cttacatggt agagaagtgg aggtggatgg tctttaaagg
1501 ggaaattccc aaagaccagt ggatgaaaaa gtgggtggag atgaagcgag agatagttgg
1561 ggtggtggaa cctgtgcccc atgatgaaac atactgtgac cccgcatctc gttccatgt
1621 ttctaagatg tactcattca ttcgatatta cacaaggacc cttaccaat tccagtttca
1681 agaagcactt tgtcaagcag ctaaacatga aggccctctg cacaatgtg acatctcaa
1741 ctctacagaa gctggacaga aactgttcaa tatgctgagg cttggaaaat cagaacctg
1801 gacctagca ttggaaaatg ttgtaggagc aaagaacatg aatgtaaggc cactgctcaa
1861 ctactttgag cccttattta cctggctgaa agaccagaac aagaattctt ttgtgggatg
1921 gagtaccgac tggagtccat atggagacca aagcatcaaa gtgaggataa gcctaaaaatc
1981 agctcttggg gataaagcat atgaatggaa cgacaatgaa atgtacctgt tccgatcatc
2041 tgttgcatat gctatgagcc agtacttttt aaaagtaaaa aatcagatga ttctttttgg
2101 ggaggaggat gtgagagtgg ctaatttgaa accaagaatc tctttaatt tctttgtcac
2161 tgcacctaaa aatgtgtctg atatcattcc tagaactgaa gttgaaaagg ccatcaggat
2221 gtccccggagc cgtatcaatg atgctttccg tctgaatgac aacagcctag agtttctggg
2281 gatacagcca acacttgac ctcctaacca gccctgtt tccataggc tgattgtttt
2341 tggagttgtg atgggagtga tagtgggtgg cattgtcatc ctgatcttca ctgggatcag
2401 agatcggaag aagaaaaata aagcaagaag tggagaaaaa ccttatgcct ccatcgatat
2461 tagcaaaagg gaaaaatac caggattcca aaacactgat gatgttcaga cctccttta
2521 gaaaaatcta tgttttctc cttgaggtga ttttgttga tgtaaatggt aatttcatgg
2581 tatagaaaat ataagatgat aaagatatca ttaaagtca aaactatgac tctgttcaga
2641 aaaaaattg tccaaagaca acatggccaa ggagagagca tcttcattga cattgcttcc
2701 agtatttatt tctgtctctg gatttgactt ctgttctgtt tcttaataag gattttgat
2761 tagagtatat tagggaaagt gtgtatttgg tctcacaggc tgttcaggga taatcctaat
2821 gtaaatgtct gttgaatttc tgaagttaa aacaaggata tatcatggga gcaagtgttg
2881 gatcttgtat ggaatatgga tggatcactt gtaaggacag tgacctggga ctggtgtagc
2941 tgcaaggatt gagaatggca tgcattagct cactttcatt taatccattg tcaagatga

```

(continúa en la siguiente página)

Figura 10a continuación

```

3001 catgctttct tcacagtaac tcagttcaag tactatggty atttgcctac agtgatgttt
3061 ggaatcgatc atgctttctt caaggtgaca ggtctaaaga gagaagaatc cagggaacag
3121 gtagaggaca ttgctttttc acttccaagg tgcttgatca acatctccct gacaacacaa
3181 aactagagcc aggggcctcc gtgaactccc agagcatgcc tgatagaaac tcatttctac
3241 tgtttctctaa ctgtggagtg aatggaaatt ccaactgtat gttcacccctc tgaagtgggt
3301 acccagtctc ttaaatcttt tgtatttgc cagagtgttt gagcagtgct gagcacaag
3361 cagacactca ataaatgcta gatttacaca ctcaaaaaaa aaaaa
    
```

SEQ ID NO:1

Figura 10b

```

MSSSSWLLLSLVAVTAAQSTIEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQSSLASWNYNTNITEENVQNMNAGDKWSAFLKEQSTLAQMY
PLQEIQNLTVKQLQALQONGSSVLSSEKSKRLNTILNTMSTIYSTGKVCNPDNPOECLLLEPGLNEIMANSLDYNERLWANE
SWRSEVKGQLRPLYEYEVVLLKNEMARANHYEDYGDYWRGDYEVNGVDGYDYSRQGLIEDVEHTFEEIKPLYEHLHAYVRAKLM
NAYPSYISPIGCLPAHLGDMWGRFWTNLYSLTVPEFGQKPNIDVTAMVDQAWDAQRIFKEAEKFFVSVGLPNMTQGFWENSM
LTDPGNVQKAVCHPTAWDLGKGFRIIMCTKVTMDELTAHHEMGHIQYDMAYAAQPFLLRNGANEGFEHAEVGEIMSLSAATP
KHLKSIGLLSPDFQEDNETEINFLKQALTI VGTLEFFTYMLEKWRWMVFKGEIPKQWMMKKWEMKREIVGVVEPVPHDETYC
DPASLFHVSNDYSFIRYYTRTYQFQFQALCQAAKHEGPLHKCDISNSTEAGOKLFNMLRLGKSEPWTLALENVVGAKNMNV
RPLLNYFEPLFTWLKDQNKNSFVGWSTDWSPYADQSIKVRISLKSALGDKAYEWNENEMYLFRSSVAYAMRQYFLKVKKQML
FGEEEDVRVANLKPRI SFNFVTPAKNVS DII PRTEVEKAIRMSRSRINDAFRLNDNSLEFLGIQPTLGGPPNPPVSIWLVFV
VVMGVIVVGIVILIFGTGIRD RKKKNKARS GENPYASIDISKGENNPGFQNTDDVQTSF
    
```

SEQ ID NO:2

Figura 11

```

1 catattggtc cagcagcttg tttactgttc tcttctgttt cttctctgfc ttttttttc
61 ttctctctc agtgcccaac ccaagttcaa aggctgatga gagagaaaaa ctcatgaaga
121 gattttactc tagggaaagt tgctcagtgg atgggatctt ggcgcacggg gaaagatgtc
181 cagctctccc tggctccttc tcagccttgt tgctgttact actgctcagt ccctcaccga
241 ggaaatgcc aagacatttt taaacaactt taatcaggaa gctgaagacc tgtcttatca
301 aagtccactt gcttcttggga attataatac taacattact gaagaaaatg cccaaaagat
361 gagtgaagct gcagccaaat ggtctgcctt ttatgaagaa cagtctaaga ctgcccaaag
421 ttctcacta caagaaatcc agactccgat catcaagcgt caactacagg cccttcagca
481 aagtgggtct tcagcactct cagcagacaa gaacaaacag ttgaacacaa ttctgaacac
541 catgagcacc atttacagta ctgaaaaagt ttgcaacca aagaaccac aagaatgctt
601 attacttgag ccaggattgg atgaaataat ggcgacaagc acagactaca actctaggct
661 ctgggcatgg gagggctgga gggctgaggt tggcaagcag ctgaggccgt tgtatgaaga
721 gtatgtggtc ctgaaaaacy agatggcaag agcaaaacat tataacgact atggggatta
781 ttggagaggg gactatgaag cagagggagc agatggctac aactataacc gtaaccagtt
841 gattgaagat gtagaacgta ccttcgcaga gatcaagcca ttgtatgagc atcttcatgc
901 ctatgtgagg aggaagttga tggataccta cccttcttac atcagcccca ctggatgect
961 ccctgcccac ttgcttgggtg atatgtgggg tagattttgg acaaatctgt accctttgac
1021 tgttcccttt gcacagaaac caaacataga tgttactgat gcaatgatga atcagggctg
1081 ggatgcagaa aggatatttc aagaggcaga gaaattcttt gttctgttg gcttccctca
1141 tatgactcaa ggattctggg caaactctat gctgactgag ccagcagatg gccggaaagt
1201 tgtctgccac cccacagctt gggatctggg acacggagac ttcagaatca agatgtgtac
1261 aaaggtcaca atggacaact tcttgacagc ccacacagc atgggacaca tccaatatga
1321 catggcatat gccaggcaac ctttctgct aagaaaagga gccaatgaag ggttccatga
1381 agctgttggg gaaatcatgt cactttctgc agctaccccc aagcatctga aatccattgg
1441 tcttctgcca tccgattttc aagaagatag cgaaaacagag ataaacttcc tactgaaaca
1501 ggcaattgaca attgttggaa cactaccggt tacttacatg ttagagaagt ggaggtggat
1561 ggtctttcgg ggtgaaattc ccaaagagca gtggatgaaa aagtgggtgg agatgaagcg
1621 ggagatcgtt ggtgtggtgg agcctctgcc tcatgatgaa acatactgtg accctgcatc
1681 tctgttccat gtttctaattg attactcatt cattcogatat tacacaagga ccatttacca
1741 attccagttt caagaagctc tttgtcaagc agctaaagtat aatggttctc tgcacaaatg
1801 tgacatctca aattccactg aagctgggca gaagttgctc aagatgctga gtcttggaaa
1861 ttcagagccc tggaccaaag ccttggaaaa tgtggttaga gcaaggaata tggatgtaaa
1921 accactgctc aattacttcc aaccgttgtt tgactggctg aaagagcaga acagaaattc
1981 ttttgtgggg tggaaactg aatggagccc atatgcccac caaagcatta aagtgaggat
2041 aagcctaaaa tcagctcttg gagctaagc atatgaatgg accaacaacg aaatgttctc
2101 gttccgatca tctgttgcac atgccatgag aaagtatttt tcaataatca aaaaccagac
2161 agttcctttt cttagaggaag atgtacagat gagtgatttg aaaccaagag tctccttcta
2221 cttctttgtc acctcaccac aaaatgtgtc tgatgtcatt cctagaagtg aagttgaaga
2281 tgccatcagg atgtctcggg gccgcatcaa tgatgtcttt ggctgaatg ataacagcct
2341 ggagtttctg gggattcacc caacacttga gccacccttac cagcctcctg tcaccatag
2401 gctgattatt tttggtgttg tgatggcact ggtagtgggt ggcatcatca tctgtattgt
2461 cactgcatc aaaggtcgaa agaagaaaaa tgaacaaaaa agagaagaga acccttatga
2521 ctcgatggac attgaaaaag gagaaagcaa tgcaggattc caaaacagtg atgatgctca
2581 gacttccctt tagcaaaagca cttgtcatct tcctgtatgt aaatgctaac ttcatagtac
2641 acaaaatag agagtataca catgtcatta gctatcaaaa ctatgatctg ttcagtaaac
2701 gttgtccaaa gagcatcaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

```

SEQ ID NO:3

	Africana	Am Asiática	Caucásica	Referencia
rs878922	C(C/G)	80	100	70 C
rs757066	T(C/T)	100	100	70 T
rs714205	C(C/G)	70	50	80 C
rs328442	C(A/C)	50	90	80 A/C
rs233574	C(C/T)	80	100	80 C
rs1978124	C(C/T)	90	100	50 C
rs1878124-2(nuevo)	G(G/A)	30	70	40 C
rs1514282	A(A/G)	70	100	100 A
rs1514282-2(nuevo)	A(A/G)	20	50	30 A
rs1514281	A(A/G)	70	100	100 A
rs1514281-2(nuevo)	A(A/G)	20	50	50 A
rs1514279	A(A/G)	Falló	100	70 A
rs1514280	C(C/T)	80	100	80 C
rs233575	C(C/T)	100	100	50 C

TTAACTTGAAGTCCAAAACAATATGTTCTTCCACCTA[G/G]TAACCCCGAGT
 CCTTGAATTTGGCTGGAGCTCAGTTT SEQ ID NO. 5
 GTATCTCACCATCAGAAAACAACAAGCTTGTGTC/JAGGATATTAGCTA
 AATAAGTTTGTAAACat SEQ ID NO. 6
 CCATGAGTTC TAGCCAGACTTTCTTCAACCAGCACCTGCTCC[C/G]TT
 TACCAGAGAGCATTCTCAGACCACAAGATCC SEQ ID NO. 7
 Acaaggttgcttaaaactcalatcagagttatgaaactgcaact[C/A]
 CAGTATTGGAAATATTCTGGGTTTATCTTTGTATTAAATTTCTCAGTGGG
 T SEQ ID NO. 8
 Attgaccactgcccctcctagcctgagcagagcaagact[C/T]
 GTTTCAAAAAAAAGAAATATACACC SEQ ID NO. 9
 CTTGGAAACCTGTTTAAACAAGCTTTTTTTTCCATATCTGTCTGAT
 GGAC[C/T]TCTCCACACTTCTACATCAGCAGCTTTATGACAC SEQ ID
 NO. 10
 CTTTGGAAACCTGTTTAAACAAGCTTTTTTCCATATCTCTATCTGAT
 GG[G/A]CCTCTCCACACTTCTACATCAGCAGCTTTATGACAC SEQ ID
 NO. 11
 AACACAGCAGTCACAAATGAATAAATGCCAACCCATTTATACATTTCCACAC
 ACTT[G/A]CAACTCAAATTTTCCAATGGAGCTGTTGATGAACCTAATCTA
 GGTGGCAAGGCATGAAA SEQ ID NO. 12
 TTCTTGCCAAATATGATAACTTTGCCCTTAAACACACAGCAGTCACAAAATG
 AATAAAT[G/A]CCAACCATTTATACATTTCCACACTTAGAACTCAATTTT
 CCAATGGAGCTGTTGATG SEQ ID NO. 13
 GAAATCTTGGCCAAATATGATAACTTTGCCCTTAAACACACAGCAGTCACA
 AATGAATAAATACCA[G/A]ACCATTTATACATTTCCACACTTAGAACTCA
 ATTTCCAATGGAGCTGTTGATGAA SEQ ID NO. 14
 GAAATCTTGGCCAAATATGATAACTTTGCCCTTAAACACACAGCAGTCACA
 AATGAATAAAT[G/A]CCAACCATTTATACATTTCCACACTTAGAACTCAA
 TTTTCCAATGGAGCTGTTGATGAA SEQ ID NO. 15
 ATAGTCACTAAAATGATTTCCACAGGTTACTATGCT[G/A]TATCTTATAT
 GATGGTCTTTATGAATATCTG SEQ ID NO. 16
 GTTTACAAAGTGTATTTTTTCAATTTGAA[C/G]GTCAAGTTTTTCTTTTACA
 CTTATAGATAAGTACATTTT SEQ ID NO. 17
 GTGCTACCTCCAAATGCCAATACCTTTTATTTGGAAAAA[C/T]
 TACTATAGAGACTTGGTTCATAGGACCTGATTCATT SEQ ID NO. 18