

(11) Número de Publicação: **PT 1515752 E**

(51) Classificação Internacional:

A61K 48/00 (2006.01) **A61K 38/43** (2006.01)
A61K 38/48 (2006.01) **C12N 9/48** (2006.01)
C12N 9/64 (2006.01) **C12Q 1/68** (2006.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2003.06.19**

(30) Prioridade(s): **2002.06.19 US 389709 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2005.03.23**

(45) Data e BPI da concessão: **2008.11.26**
045/2009

(73) Titular(es):

UNIVERSITY HEALTH NETWORK
610 UNIVERSITY AVENUE, ROOM 7-504
TORONTO, ONTARIO M5G 2M9

CA

(72) Inventor(es):

JOSEPH M. PENNINGER
MICHAEL A. CRACKOWER

AT

CA

(74) Mandatário:

ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º AND 1249-235 LISBOA

PT

(54) Epígrafe: **ACTIVAÇÃO DE ACE2 PARA O TRATAMENTO DE DOENÇA CARDÍACA, PULMONAR E RENAL E DE HIPERTENSÃO**

(57) Resumo:

RESUMO

**"Activação de ACE2 para o tratamento de doença cardíaca,
pulmonar e renal e de hipertensão"**

A invenção refere-se a compostos de activação de ACE2 para a prevenção e tratamento de doença cardiovascular, doença renal, doença pulmonar e hipertensão. A invenção inclui também métodos de diagnóstico de doença cardiovascular, doença renal, doença pulmonar e hipertensão por medição da expressão de ACE2 ou análise de polimorfismo de nucleótidos.

DESCRIÇÃO

"Activação de ACE2 para o tratamento de doença cardíaca, pulmonar e renal e de hipertensão"

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção proporciona composições e métodos para utilização no diagnóstico e tratamento de doenças cardíacas, pulmonares e renais, incluindo hipertensão, doença cardíaca coronária, insuficiência cardíaca e renal, edema pulmonar e lesão pulmonar tal como no choque tóxico ou na ventilação artificial.

ANTERIORIDADE DA INVENÇÃO

A doença cardiovascular será o principal encargo dos cuidados de saúde do século XXI, e prevê-se que venha a ser a causa mais comum de morte em todo o mundo em 2020. Um dos principais factores de risco para a doença cardíaca é a pressão sanguínea elevada. A hipertensão é um traço quantitativo multifactorial controlado tanto por factores genéticos como ambientais. Embora muito se conheça acerca dos factores ambientais que podem contribuir para uma elevada pressão sanguínea, tais como a dieta e a actividade física, conhece-se menos acerca dos factores genéticos que são responsáveis pela predisposição a doença cardiovascular. Apesar da identificação de vários *loci* de traços quantitativos (QTL) genéticos putativos associados à hipertensão em modelos animais, nenhum destes *loci* foi traduzido em genes. Assim, os mecanismos moleculares e genéticos subjacentes à hipertensão e a outras doenças cardiovasculares permanecem grandemente obscuros.

Um regulador crítico da homeostase da pressão sanguínea é o sistema renina-angiotensina (RAS). A protease renina cliva o angiotensinogénio no péptido decaamérico inactivo angiotensina I (AngI). A acção da enzima de conversão da angiotensina (ACE) catalisa então a clivagem da AngI no octómero activo angiotensina II (AngII), que pode contribuir para a hipertensão promovendo a vasoconstrição do músculo liso vascular e a reabsorção do sódio nos túbulos renais. Ratinhos mutantes para ACE exibem hipotensão espontânea, infertilidade

parcial dos machos e malformações renais. Em seres humanos, um polimorfismo de ACE foi associado a determinantes da função renal e cardiovascular, e a inibição farmacológica de ACE e receptores de AngII é eficaz para baixar a pressão sanguínea e a doença renal. Em adição, a inibição de ACE e receptores de AngII tem efeitos benéficos na insuficiência cardíaca.

Recentemente foi identificado um homólogo de ACE, denominado ACE2, que é predominantemente expresso nas células endoteliais vasculares do rim e do coração. É interessante que dois homólogos de ACE existem também em moscas. Ao contrário da ACE, a ACE2 funciona como uma carboxipeptidase, clivando um único resíduo de AngI, gerando Ang1-9, e um único resíduo de AngII para gerar Ang1-7. Estes resultados bioquímicos *in vitro* sugerem que a ACE2 modula o RAS e desse modo pode desempenhar um papel na regulação da pressão sanguínea. O papel *in vivo* da ACE2 no sistema cardiovascular e no RAS não é conhecido.

Oonoghue *et al.* (Circulation Research 87(5):e1-e9, 2000) descrevem a identificação de ACE2 a partir de uma biblioteca de ADNc.

Yagil *et al.* (Hypertension 33(1):261-265, 1999) realizaram um rastreio genético para os *loci* cromossômicos associados a hipertensão em ratos.

Acton *et al.* na Patente U.S. 6,194,556 (WO 02/12471), descrevem a utilização de ACE2 no diagnóstico e terapêutica de estados associados a ACE2. Na patente afirma-se que os níveis de expressão de ACE2 aumentam com a hipertensão e que antagonistas ou inibidores da actividade de ACE2 seriam úteis no tratamento da pressão sanguínea aumentada ou desordens relacionadas. O pedido de patente canadiana n.º 2372387 proporciona exemplos específicos de inibidores de ACE2 que se pretendem úteis para o tratamento de doença cardíaca, tal como hipertensão. Isto enfatiza novamente a necessidade de inibir, e não aumentar, a actividade de ACE2. Estas referências, que ensinam a necessidade de inibir a actividade de ACE2, baseiam-se apenas em resultados experimentais *in vitro*. Não proporcionam resultados *in vivo*, tais como resultados em mamíferos *knock out*, para caracterizar a ACE2. Até à data, não foram aprovados inibidores de ACE2 como produtos farmacêuticos

para o tratamento de hipertensão. Adicionalmente, o papel *in vivo* da ACE2 no sistema cardiovascular e no RAS permanece largamente desconhecido. Permanece uma necessidade de caracterizar a função da ACE2 para se poder desenhar testes de diagnóstico e produtos farmacêuticos apropriados para o tratamento de doença cardíaca e renal.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A invenção proporciona um novo paradigma para a regulação do sistema renina-angiotensina e mostra uma utilização da ACE2 completamente nova e inesperada, em contraste com a previsão baseada em resultados *in vitro* (patente de Acton) e inesperada relativamente ao estado da técnica, como um regulador negativo crítico do RAS necessário para o controlo da função cardíaca e da pressão sanguínea. A activação de ACE2 é crítica para o tratamento e prevenção de doença cardíaca, pulmonar e renal. A invenção mostra pela primeira vez que a administração de um activador de ACE2 a um animal previne e trata a hipertensão e a doença cardíaca e renal e a lesão pulmonar. O âmbito da presente invenção é definido nas reivindicações.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Serão descritas concretizações preferidas da invenção em relação aos desenhos nos quais:

Figura 1. Sequência e mapeamento cromossómico da ACE2 de rato.

a, Alinhamento da proteína ACE2 de rato, ratinho e humana, com ACE de testículos (T-ACE) de ratinho e humana. A zona a sombreado escuro indica identidade de aminoácidos e o sombreado cinzento indica grau de semelhança de aminoácidos. b, Estrutura esquemática dos domínios de ACE e ACE2. Note-se que a ACE2 apenas contém um domínio de ACE com o local de ligação de zinco de consenso HEMGH. Os centros catalíticos estão indicados a preto, o péptido de sinal está indicado a cinzento e o domínio transmembranar com linhas tracejadas. c, Padrões de expressão de genes de ACE2 de ratinho e de rato em diferentes tecidos adultos e em diferentes dias de desenvolvimento embrionário (E7 = dia 7 embrionário). Note-se que estão presentes duas isoformas para ACE2 em ratinhos, mas não no rato ou no ser humano (não mostrado), uma

característica similar à observada para ACE15. d, Resultados do mapeamento de híbridos de radiação de ACE2 de rato, comparativamente com o mapeamento de um QTL identificado em animais Sabra sensíveis ao sal (SS-X), ratos SHRSP (BP3) e SHR (BB.Xs). Os nomes dos marcadores polimórficos estão indicados à esquerda do ideograma. As pontuações LOD e os valores de teta para marcadores ligados a ACE2 estão mostrados. cR = centiRads.

Figura 2. Níveis de expressão de ACE2 em modelos de rato de hipertensão.

a, Análise *Northern blot* de ARNm de ACE2 de rins de ratos Sabra SBH/y e SBN/y. A secção superior mostra a representação de *Northern blots* com níveis de controlo de actina. O painel inferior mostra os níveis relativos de mensagem de ace2 normalizados para os níveis de actina. b, Análise *Western blot* dos níveis de proteína ACE2 de rins de Sabra SBH/y e seus ratos SBN/y de controlo, assim como SHR e SHRSP e seus ratos WKY de controlo. A secção superior mostra *Western blots* representativos. A pressão sanguínea (PS) sistólica em mmHg para os respectivos ratos Sabra está indicada. O painel inferior mostra os níveis relativos de proteína de ACE2 corrigidos para a actina. As barras mostram valores médios $\pm$ SEM. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$. (n=4, para todos os grupos).

Figura 3. Ruptura direccionada de ACE2 de ratinho por recombinação homóloga.

a, Estratégia de direccionamento génico. É mostrada uma porção do locus de ace2 murino de tipo selvagem (topo). As caixas a preto indicam exões. O vector de direccionamento foi desenhado para substituir o exão 9 que codifica o domínio catalítico de ligação de zinco com a cassete do gene de resistência a neomicina (neo) colocado na orientação anti-sentido. Utilizou-se timidina-quinase (TK) para selecção negativa. As sondas flanqueadoras a 3' e 5' utilizadas para a análise de *Southern* estão indicadas com uma caixa a tracejado. b, Análise *Southern blot* de células ES ace^{+/y} e ace^{-/y}. Digeriu-se ADN genómico com EcoRI e hibridou-se com a sonda flanqueadora a 3' e 5' mostrada em (a). c, Análise *Western blot* da expressão de proteína ACE2 nos rins de ratinhos ace2^{+/y} ace^{-/y}. O Ab anti-ACE2 é reactivo com uma região N-terminal para a deleção. d,

Análise RT-PCR da expressão de ARNm de ACE no coração e rins de ratinhos $ace2^{+/y}$ e $ace2^{-/y}$. Mostram-se diferentes ciclos de PCR para amplificação linear e níveis de ARNm de GAPDH como controle.

Figura 4. Pressão sanguínea e funções renais normais

a, Medições da pressão sanguínea em ratinhos $ace2^{+/y}$ (n= 8) e $ace2^{-/y}$ (n = 8) de 3 meses de idade na ausência (painéis da esquerda) ou presença do bloqueador de ACE captopril. As pressões sanguíneas foram determinadas utilizando *Tail cuffing* e estão mostrados os valores médios $\pm$ DP. O captopril foi administrado a ratinhos durante 2 semanas antes das medições da pressão sanguínea como descrito em Métodos. Estas pressões sanguíneas foram confirmadas utilizando medições hemodinâmicas invasivas e Langendorf (não mostrado). As diferenças em ambos os ratinhos $ace2^{+/y}$ e $ace2^{-/y}$ tratados com captopril foram significativamente diferentes às dos respectivos grupos não tratados (** $p < 0,01$). b, Observaram-se histologias renais normais em ratinhos $ace2^{+/y}$ e $ace2^{-/y}$ de 6 meses de idade. As setas indicam glomérulos.

Figura 5. Morfologia do coração

a, Secções coradas com H&E de corações isolados de ratinhos $ace2^{+/y}$ e $ace2^{-/y}$ de 6 meses de idade. Observaram-se ventrículos esquerdos (VE) e ventrículos direitos (VD) aumentados em ratinhos $ace2^{-/y}$. Contudo, a dimensão global do coração era comparável entre ambos os genótipos e não houve evidência de hipertrofia cardíaca, macroscopicamente ou em cardiomiócitos isolados. b, Quantificação das razões coração/peso corporal de ratinhos $ace2^{+/y}$ (n= 8) e $ace2^{-/y}$ (n=8) de 6 meses de idade como indicador de hipertrofia cardíaca. Deverá notar-se que os pesos corporais, os pesos dos corações, os comprimentos das tíbias e as razões de peso do coração/comprimento da tíbia também não se alteraram entre os diferentes grupos genéticos grupos em todas as idades analisadas (não mostrado). c,d, Houve uma ausência de fibrose intersticial em ratinhos $ace2^{-/y}$. Uma característica fundamental para a cardiomiopatia dilatada é a fibrose intersticial. Contudo, a fibrose intersticial foi comparável entre os corações de ratinhos $ace2^{+/y}$ (n= 8) e $ace2^{-/y}$ (n=8). (c) mostra a coloração PSR de corações individuais. Note-se a fibrose perivascular normal, corada de

vermelho, em ambos os animais, de tipo selvagem e mutante.
(d) quantificação de alterações fibróticas no interstício.

Figura 6. A perda de ACE2 resulta em grave insuficiência cardíaca contráctil

a, Medições ecocardiográficas de corações em contracção num ratinho $ace2^{+/y}$ e dois $ace2^{-/y}$ de 6 meses de idade. Os picos e as depressões indicam a sístole e a diástole de batimentos cardíacos individuais. As setas indicam a distância entre contracção sistólica (DSFVE) e relaxamento diastólico (DDFVE), valores que determinam a percentagem da fracção de encurtamento (%FE). Note-se as reduzidas dimensões diastólica e sistólica nos ratinhos $ace2^{-/y}$ indicativas de dilatação cardíaca. Os resultados experimentais podem ser observados na Tabela 1. b, Fracção percentual do encurtamento e velocidade de encurtamento de fibras circunferenciais, dois parâmetros fundamentais para a contracção cardíaca, foram observados em ratinhos $ace2^{+/y}$ (n=8) e $ace2^{-/y}$ (n=8) de 6 meses de idade e ratinhos fêmea $ace2^{+/-}$ (n=5) e $ace2^{-/-}$ (n=5) de 6 meses de idade. Os valores foram determinados por ecocardiografia. Estão mostrados os valores médios $\pm$ DP. *p < 0,05 e **p < 0,01 entre grupos genéticos. Os resultados experimentais podem ser observados na Tabela 1. c, Medições de pressão sanguínea em ratinhos machos $ace2^{+/y}$ (n = 8) e $ace2^{-/y}$ (n = 8) de 6 meses de idade e ratinhos fêmea $ace2^{+/-}$ (n = 5) e $ace2^{-/-}$ (n = 5) de 6 meses de idade. Estão mostrados os valores médios $\pm$ DP. As pressões sanguíneas foram confirmadas utilizando medições hemodinâmicas invasivas como se pode observar na Tabela 2. *p < 0,05.

Figura 7. Supra-regulação de marcadores de hipoxia e níveis aumentados de angiotensina II na ausência de ACE2

a,b, Análise *Northern blot* de BNIP3 e níveis de expressão de ARNm de PAI-1, dois genes indutíveis por hipoxia em ratinhos machos $ace2^{+/y}$ (n=5) e $ace2^{-/y}$ (n=5) de 6 meses de idade. (a) mostra resultados de *Northern blot* individuais e (b) níveis relativos de BNIP3 e níveis de ARNm de PAI-1 normalizados para o controlo de gapdh. **p<0,01.

c, Níveis de péptidos de Angiotensina I (AngI) e Angiotensina II (AngII) no coração e rins de ratinhos machos

$ace2^{+/y}$ (n = 8) e $ace2^{-/y}$ (n = 8) da mesma ninhada, de 6 meses de idade. Os níveis de AngI e AngII nos tecidos foram determinados por radioimunoensaios. Estão mostrados os níveis médios de péptido $\pm$ DP. $**p < 0,01$.

Figura 8. Ratinhos mutantes duplos para ACE-ACE2 não desenvolvem insuficiência cardíaca

a, Medições de pressão sanguínea em ratinhos machos de 6 meses de idade, $ace2^{+/y}$ (n = 8), $ace^{-/-}$ (n = 8) e duplos mutantes $ace^{-/-} ace2^{-/y}$ (n = 6). São mostrados os valores médios $\pm$ DP. Confirmaram-se as pressões sanguíneas utilizando medições hemodinâmicas invasivas. $**p < 0,01$ de ratinhos mutantes comparativamente com ratinhos de *tipo selvagem*. b, Fracção percentual de encurtamento e velocidade de encurtamento de fibras circunferenciais em ratinhos machos da mesma ninhada de 6 meses de idade $ace2^{+/y}$ (n = 8), $ace2^{-/y}$ (n = 8), $ace^{-/-}$ (n = 8) e duplos mutantes $ace^{-/-} ace2^{-/y}$ (n = 6). Os valores foram determinados por ecocardiografia. Mostram-se os valores médios $\pm$ DP. $**p < 0,01$ entre grupos genéticos. Os resultados experimentais podem ser observados na Tabela 3. c, Medições ecocardiográficas de corações em contracção em ratinhos machos $ace2^{+/y}$, $ace2^{-/y}$, $ace^{-/-}$ e duplo mutante $ace^{-/-} ace2^{-/y}$ da mesma ninhada e de 6 meses de idade. Analisaram-se os ecocardiogramas e marcam-se como descrito na Figura 6a. Note-se que a ablação de ACE num fundo de $ace2$ nulo recupera completamente os defeitos cardíacos contrácteis observados em ratinhos mutantes únicos para $ace2^{-/y}$.

Figura 9. Alterações em percentagem da elastância a partir da linha de base calculadas ao longo do tempo. A elastância pulmonar foi calculada dividindo a pressão de pico traqueal pelo volume.

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

Figura 11. a, ADN de ACE2 de ratinho (SEQ ID NO:3). b, Polipéptido de ACE2 de ratinho (SEQ ID NO:4)

Figura 12. Polimorfismos e sequências de nucleótidos de ACE2.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A invenção proporciona um novo paradigma para a regulação do sistema RAS e mostra que a ACE2 é um regulador negativo crítico do RAS necessário para a função cardíaca e para a função cardiovascular, a função renal e a função pulmonar. A invenção ensina pela primeira vez a utilização de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um polipéptido de ACE2 ou ácido nucleico de ACE2 para a preparação de um medicamento para o tratamento de um estado de ACE2 reduzida seleccionado entre hipertensão, insuficiência cardíaca congestiva, insuficiência cardíaca crónica, insuficiência cardíaca aguda, enfarte do miocárdio, arteriosclerose, insuficiência renal ou uma doença pulmonar num mamífero, em que a doença pulmonar é doença pulmonar obstrutiva crónica, pneumonia, asma, bronquite crónica, enfisema pulmonar, fibrose quística, doença pulmonar intersticial, hipertensão pulmonar primária, embolia pulmonar, sarcoidose pulmonar, tuberculose, edema pulmonar, ARDS ou cancro pulmonar.

Este resultado é completamente inesperado tendo em conta as referências do estado da técnica, tais como a Patente US 6194556 e o pedido de patente canadiana 2372387, descritos acima, que ensinam que a actividade de ACE2 tem que ser *inibida* para tratar a doença cardíaca. É portanto surpreendentemente que a doença cardíaca seja realmente tratada por *activação* da expressão e/ou da actividade de ACE2.

A invenção inclui também ensaios de rastreio para a detecção de um agonista da actividade de ACE2, que pode ser utilizado para tratar as doenças acima mencionadas. Estes ensaios são *in vitro* ou *in vivo*. Numa concretização preferida, a invenção inclui um ensaio de células endoteliais, renais, pulmonares ou cardíacas para avaliar se um composto candidato é capaz de aumentar a expressão ou a actividade de ACE2. As células são cultivadas na presença de pelo menos um composto cuja capacidade para activar a expressão ou a actividade se pensa estar determinada e as células são medidas quanto a um aumento do nível de expressão de ACE2. Outro aspecto da invenção envolve um ratinho *knock-out* para ACE2 para a identificação de compostos que possam ultrapassar os efeitos da perda de ACE2. São testados nestes ensaios polipéptidos e moléculas orgânicas pequenas. A invenção inclui todos os

compostos que são identificados com os métodos de rastreio da invenção e que são adequados para administração a animais em composições farmacêuticas.

Métodos Terapêuticos

Como acima mencionado, os presentes inventores mostraram que a expressão do gene de ACE2 está infra-regulada na hipertensão, doença cardíaca e doença renal. Assim, a presente invenção proporciona a utilização de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um polipéptido de ACE2 ou ácido nucleico de ACE2 para a preparação de um medicamento para o tratamento de um estado de ACE2 reduzida selecionado entre hipertensão, insuficiência cardíaca congestiva, insuficiência cardíaca crónica, insuficiência cardíaca aguda, enfarte do miocárdio, arteriosclerose, insuficiência renal ou uma doença pulmonar num mamífero, em que a doença pulmonar é doença pulmonar obstrutiva crónica, pneumonia, asma, bronquite crónica, enfisema pulmonar, fibrose quística, doença pulmonar intersticial, hipertensão pulmonar primária, embolia pulmonar, sarcoidose pulmonar, tuberculose, edema pulmonar, ARDS ou cancro pulmonar. A quantidade terapêuticamente eficaz pode ser de moléculas de ácido nucleico (incluindo de ACE2 ou seus fragmentos), proteínas (incluindo Ace2 ou seus fragmentos) ou péptidos. Se o gene de ACE2 está ou não aumentado pode ser determinado prontamente por um perito na especialidade utilizando métodos conhecidos incluindo *Western blotting* SDS-PAGE, imunoquímica, RT-PCR, *Northern blotting* e hibridação *in situ*.

O termo "animal", como aqui utilizado, inclui todos os membros do reino animal. Os animais são preferivelmente seres humanos.

O termo "quantidade eficaz", como aqui se utiliza, significa uma quantidade eficaz em dosagens e por períodos de tempo necessários para aumentar o nível de ACE2. Os termos "tratamento ou tratar", como aqui se utilizam, significam uma abordagem para obtenção de resultados benéficos ou desejados, incluindo resultados clínicos. Os resultados clínicos benéficos ou desejados podem incluir, mas não se lhes limitam, alívio ou melhoria de um ou mais sintomas ou condições, diminuição da extensão da doença, estado estabilizado (*i.e.*

não agravado) de doença, prevenção da disseminação da doença, atraso ou retardamento da progressão da doença, melhoria ou palição do estado de doença e remissão (parcial ou total), detectável ou não detectável. "Tratamento" pode também significar o prolongamento da sobrevivência em comparação com a sobrevivência esperada sem receber tratamento.

Administração da molécula de ácido nucleico de ACE2

Numa concretização, a expressão do gene de ACE2 é aumentada por administração de um ácido nucleico que compreende um gene de ACE2 ou uma sua porção.

Noutra concretização, a expressão do gene de ACE2 pode ser aumentada por administração de um agente que aumenta a expressão do gene de ACE2 incluindo quaisquer agentes identificados utilizando os ensaios de rastreio no presente pedido de patente.

Como um animal que sofre de uma doença, uma desordem ou um estado físico anormal, pode ser tratado por supra-regulação de ACE2, a terapia génica para aumentar a expressão de ACE2 é útil para modificar o desenvolvimento/progressão da doença cardíaca ou renal ou pulmonar.

A invenção inclui métodos e composições para proporcionar terapia com o gene de ACE2 para tratamento de doenças, desordens ou estados físicos anormais caracterizadas por expressão de ACE2 ou níveis de actividade de polipéptido de ACE2 reduzidos.

A invenção inclui métodos e composições para proporcionar uma molécula de ácido nucleico que codifica ACE2 ou uma molécula de ácido nucleico funcionalmente equivalente às células de um animal, de modo a que a expressão de ACE2 nas células proporcione a actividade biológica ou o fenótipo de polipéptido de ACE2 a essas células. Quantidades suficientes da molécula de ácido nucleico são administradas e expressas em níveis suficientes para proporcionar a actividade biológica ou o fenótipo de polipéptido de ACE2 às células. Por exemplo, o método pode preferivelmente envolver um método de entrega de uma molécula de ácido nucleico que codifica ACE2 às células de um animal com doença cardiovascular ou renal, ou pulmonar,

compreendendo a administração ao indivíduo de um vector compreendendo ADN que codifica ACE2. O método pode também relacionar-se com um método para proporcionar a um animal com doença cardiovascular ou renal, ou pulmonar, um polipéptido de ACE2 biologicamente activo, por administração de ADN que codifica ACE2. O método pode ser realizado *in vivo* ou *ex vivo* (e.g. com células cardíacas, pulmonares, endoteliais ou renais estaminais, células progenitoras ou outras células a transplantar). São explicados métodos e composições para administração de ACE2 (incluindo em terapia génica) a células isoladas ou um animal, por exemplo, na Patente U.S. 5672344, 5645829, 5741486, 5656465, 5547932, 5529774, 5436146, 5399346, 5670488, 524084, 6322536, 6306830 e 6071890.

O método refere-se também a um método para a produção de uma reserva de vírus recombinante por produção de vírus adequado para terapia génica compreendendo ADN que codifica ACE2. Este método envolve preferivelmente a transfecção de células permissivas a replicação do vírus (o vírus contendo a molécula de ácido nucleico) e a colheita do vírus produzido.

Podem ser utilizados métodos e composições *in vivo* ou *in vitro*. A invenção inclui também composições (preferivelmente composições farmacêuticas para terapia génica). As composições incluem um vector contendo ACE2. O transportador pode ser um transportador farmacêutico ou uma célula hospedeira transformante incluindo o vector. Os vectores conhecidos na especialidade incluem, mas não se restringem a vectores de retrovírus, adenovírus, vírus adeno-associados (AAV), vírus de herpes, tais como vectores de vírus *vaccinia*, HIV e vectores à base de lentivírus ou plasmídeos. A invenção inclui também linhas celulares de empacotamento e auxiliares que são necessárias para produzir o vector. Os métodos de produção do vector e os métodos de terapia génica utilizando o vector estão também incluídos na invenção.

A invenção inclui também uma célula transformada contendo o vector e as sequências da molécula de ácido nucleico de ACE2 recombinante.

Utilização de Variantes de ACE2 - Modificações na sequência polipeptídica

Podem-se utilizar variantes de ACE2 nos métodos da invenção. Alterações que resultam na produção de uma sequência de aminoácidos quimicamente equivalente ou quimicamente similar estão incluídas no âmbito da invenção. Os polipéptidos com identidade de sequência com o receptor de ACE2 são testados para assegurar que são adequados para utilização no método da invenção. As variantes dos polipéptidos da invenção podem ocorrer naturalmente, por exemplo, por mutação, ou podem ser preparadas, por exemplo, com técnicas de manipulação de polipéptidos tais como mutagénese dirigida ao local, que são bem conhecidas na especialidade para substituição de aminoácidos. Por exemplo, um resíduo hidrófobo, tal como glicina pode substituir outro resíduo hidrófobo tal como alanina. Um resíduo de alanina pode ser substituído por um resíduo mais hidrófobo tal como leucina, valina ou isoleucina. Um aminoácido negativamente carregado tal como ácido aspártico pode substituir ácido glutâmico. Um aminoácido positivamente carregado tal como lisina pode substituir outro aminoácido positivamente carregado tal como arginina.

Portanto, a invenção inclui polipéptidos possuindo alterações ou substituições conservativas nas sequências de aminoácidos. As substituições conservativas inserem um ou mais aminoácidos, que têm propriedades químicas similares às dos aminoácidos substituídos. A invenção inclui sequências onde são feitas substituições conservativas que não destroem a actividade do composto.

Polipéptidos compreendendo um ou mais d-aminoácidos estão contemplados na invenção. Estão também contemplados polipéptidos onde um ou mais aminoácidos estão acetilados no terminal N. Os peritos na especialidade reconhecem que estão disponíveis uma variedade de técnicas para a construção de miméticos de polipéptidos com a mesma ou similar actividade do composto desejada que o correspondente composto polipeptídico da invenção mas com actividade mais favorável do que o polipéptido em relação a solubilidade, estabilidade e/ou susceptibilidade a hidrólise e proteólise. Veja-se, por exemplo, Morgan e Gainor, Ann. Rep. Med. Chem., 24:243-252

(1989). Os exemplos de miméticos de polipéptidos estão descritos na Patente U.S. 5643873. Outras patentes que descrevem como preparar e utilizar miméticos incluem, por exemplo em, 5786322, 5767075, 5763571, 5753226, 5683983, 5677280, 5672584, 5668110, 5654276, 5643873. Os miméticos dos polipéptidos da invenção podem também ser preparados de acordo com outras técnicas conhecidas na especialidade. Por exemplo, por tratamento de um polipéptido da invenção com um agente que altera quimicamente um grupo lateral por conversão de um grupo hidrogénio noutro grupo tal como um grupo hidroxil ou amino. Os miméticos incluem preferivelmente sequências que são ou inteiramente compostas de aminoácidos ou sequências que são híbridos incluindo aminoácidos e aminoácidos modificados ou outras moléculas orgânicas.

A invenção também inclui híbridos e polipéptidos, por exemplo quando uma sequência nucleotídica é combinada com uma segunda sequência.

A invenção também inclui métodos de utilização de fragmentos polipeptídicos de ACE2 que podem ser utilizados para conferir actividade de composto se os fragmentos retiverem a actividade. A invenção também inclui polipéptidos e fragmentos dos polipéptidos da invenção que podem ser utilizados como uma ferramenta de rastreio para caracterizar o polipéptido ou a sua actividade. Estes polipéptidos preferivelmente consistem em pelo menos 5 aminoácidos. Em concretizações preferidas, podem consistir em 6 a 10, 11 a 15, 16 a 25, 26 a 50, 51 a 75, 76 a 100 ou 101 a 250 ou 250 a 500 aminoácidos. Os fragmentos podem incluir sequências com um ou mais aminoácidos removidos, por exemplo, aminoácidos do terminal C numa sequência de composto.

Melhoria da actividade de polipéptidos de ACE2

A actividade de ACE2 é aumentada ou diminuída realizando uma mutagénese selectiva dirigida ao local. Utiliza-se para estes estudos preferivelmente um plasmídeo de ADN ou um vector de expressão contendo a molécula de ácido nucleico ou uma molécula de ácido nucleico com identidade de sequência utilizando o kit de mutagénese U.S.E. (eliminação de um único local) da Pharmacia Biotech ou outros kits de mutagénese que estão comercialmente disponíveis, ou utilizando PCR. Uma vez

criada a mutação e confirmada por análise da sequência de ADN, o polipéptido mutante é expresso utilizando um sistema de expressão e a sua actividade é monitorada.

A invenção também inclui métodos de utilização de polipéptidos que têm identidade de sequência pelo menos cerca de: >20%, >25%, >28%, >30%, >35%, >40%, >50%, >60%, >70%, >80% ou >90% mais preferivelmente pelo menos cerca de >95%, >99% ou >99,5%, relativamente a ACE2 humana ou de ratinho (ou uma sua sequência parcial). As moléculas polipeptídicas modificadas são discutidas adiante. Preferivelmente, são modificados cerca de: 1, 2, 3, 4, 5, 6 a 10, 10 a 25, 26 a 50 ou 51 a 100, ou 101 a 250 nucleótidos ou aminoácidos.

A identidade é calculada de acordo com métodos conhecidos na especialidade. A identidade de sequências é mais preferivelmente avaliada através de pesquisa avançada no programa BLAST versão 2.1 (parâmetros como acima). O BLAST é uma série de programas que está disponível *online* em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>. A pesquisa avançada em BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi?Jform=1>) é estabelecida com os parâmetros predeterminados. (*i.e.* Matriz BLOSUM62; penalidade por existência de hiato 11; penalidade por hiato por resíduo 1; razão lambda 0,85 predeterminados).

As referências a pesquisas BLAST são: 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., Schaffer, 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." Nucleic Acids 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.

Preferivelmente, são modificados cerca de: 1, 2, 3, 4, 5, 6 a 10, 10 a 25, 26 a 50 ou 51 a 100, ou 101 a 250 nucleótidos

ou aminoácidos. A invenção inclui polipéptidos com mutações que causam uma alteração de aminoácidos numa porção do polipéptido não envolvida na conferência de actividade ou uma alteração de aminoácidos numa porção do polipéptido envolvida na conferência de actividade de modo que a mutação aumenta ou diminui a actividade do polipéptido.

Rastreamento de activadores de ACE2

Rastreiam-se moléculas orgânicas pequenas para determinar se aumentam a expressão ou a actividade de ACE2. Fragmentos polipeptídicos de ACE2 assim como polipéptidos com identidade de sequência com ACE2 são também testados para determinar se aumentam a actividade de ACE2 em ensaios *in vitro* e *in vivo* em linhas celulares. Os activadores são preferivelmente dirigidos no sentido de domínios específicos de ACE2 para aumentar a activação de ACE2. Para se conseguir especificidade, os activadores deverão ter como alvo as sequências únicas de ACE2.

A presente invenção também inclui o isolamento de substâncias que aumentam a expressão de ACE2. Em particular, podem ser isolados ligandos ou substâncias que se podem ligar ao gene ou à proteína de ACE2. Amostras biológicas e bibliotecas comercialmente disponíveis podem ser testadas quanto a substâncias tais como proteínas que se ligam a um gene ou uma proteína de ACE2. Por exemplo, a sequência de aminoácidos de uma proteína ACE2 pode ser utilizada para sondar bibliotecas de péptidos enquanto uma sequência de ácido nucleico que codifica ACE2 pode ser utilizada para sondar bibliotecas de ácido nucleico. Em adição, anticorpos preparados contra ACE2 podem ser utilizados para isolar outros péptidos com afinidade para com ACE2. Por exemplo, podem utilizar-se anticorpos marcados para sondar bibliotecas de exibição em fagos ou amostras biológicas.

As condições que permitem a formação de complexos com uma substância e um gene ou uma proteína de ACE2 podem ser seleccionadas tendo em conta factores como a natureza e as quantidades da substância e o gene ou proteína de ACE2. O complexo substância-proteína ou substância-gene, a substância livre ou a substância não complexada, podem ser isolados por técnicas convencionais de isolamento, por exemplo,

dessalinização, cromatografia, electroforese, filtração em gel, fraccionamento, absorção, electroforese em gel de poliacrilamida, aglutinação ou suas combinações. Para facilitar o ensaio dos componentes, podem ser utilizados um anticorpo contra ACE2 ou contra a substância, ou proteína marcada, ou uma substância marcada. Os anticorpos, proteínas ou substâncias podem ser marcados, conforme apropriado, com uma substância detectável como se descreve adiante.

Uma vez isolados os potenciais parceiros de ligação, podem ser desenhados métodos de rastreio para determinar se as substâncias que se ligam aos genes ou proteínas de ACE2 são úteis nos métodos da presente invenção para melhorar a expressão de ACE2 numa célula e portanto úteis no tratamento de doenças.

Portanto, a invenção proporciona também métodos para a identificação de substâncias que são capazes de se ligar a genes ou proteínas de ACE2. Em particular, os métodos podem ser utilizados para identificar substâncias, que são capazes de se ligar a, e aumentar ou melhorar a expressão da ACE2. Deste modo, a invenção proporciona um método para o rastreio de um composto que é um agonista da actividade de ACE2, compreendendo:

- a. proporcionar: i) uma preparação purificada compreendendo ACE2, ii) um substrato, e iii) um composto de teste;
- b. misturar a referida ACE2 e o referido substrato sob condições tais que a referida ACE2 possa actuar sobre o referido substrato para produzir um produto, em que a referida mistura é realizada na presença e na ausência do referido composto de teste; e
- c. medir directa ou indirectamente a quantidade do referido produto produzido na presença ou ausência do referido composto de teste, caracterizado por o referido substrato ser angiotensina II.

Qualquer sistema de ensaio ou método de teste que detecte interacções proteína-proteína pode ser utilizado incluindo co-imunoprecipitação, reticulação e co-purificação através de gradientes ou colunas cromatográficas. Adicionalmente, podem

ser utilizados estudos cristalográficos de raios-x como um meio para avaliar interacções com substâncias e moléculas. Por exemplo, moléculas recombinantes purificadas num complexo da invenção quando cristalizadas numa forma adequada são susceptíveis de detecção de interacções intramoleculares por cristalografia de raios-x. Pode também utilizar-se espectroscopia para detectar interacções e em particular, pode utilizar-se instrumentação Q-TOF. Amostras biológicas e bibliotecas disponíveis comercialmente podem ser testadas quanto a péptidos de ligação a ACE2. Em adição, anticorpos preparados contra a ACE2 podem ser utilizados para isolar outros péptidos com afinidade de ligação com ACE2. Por exemplo, anticorpos marcados podem ser utilizados para sondar bibliotecas de exibição em fagos ou amostras biológicas. A este respeito, podem ser desenvolvidos péptidos utilizando um sistema de expressão biológico. A utilização destes sistemas permite a produção de grandes bibliotecas de sequências peptídicas aleatórias e o rastreio destas bibliotecas quanto a sequências peptídicas que se ligam a proteínas particulares. As bibliotecas podem ser produzidas por clonagem de ADN sintético que codifica sequências peptídicas aleatórias em vectores de expressão apropriados. (veja-se 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). As bibliotecas podem também ser construídas por síntese simultânea de péptidos com sobreposição (veja-se a Pat. U.S. 4708871). Os activadores são testados em modelos animais de hipertensão, doença cardíaca ou renal.

Está contemplado um ensaio para avaliar se um composto candidato é capaz de aumentar a expressão ou a actividade de ACE2 por cultura de células (preferivelmente células de rim ou coração) na presença de pelo menos um composto cuja capacidade para activar a expressão ou a actividade se pensa estar determinada e depois monitoração das células quanto a um aumento no nível de expressão e/ou actividade de ACE2. Expressão e/ou actividade de ACE2 aumentadas indicam que o composto candidato é útil para o tratamento de doença cardíaca ou renal, ou hipertensão.

Um ensaio de rastreio similar pode ser realizado com mamíferos que se sabe na especialidade serem propensos a

doença cardíaca ou doença renal. O composto candidato é administrado ao mamífero e a expressão e/ou actividade de ACE2 é medida. Expressão e/ou actividade de ACE2 aumentadas indicam que o composto candidato é útil para tratamento de doença cardíaca ou renal.

A determinação de um aumento na actividade de ACE2 preferivelmente envolve determinar se o composto aumenta a actividade proteolítica de ACE2 (hidrólise aumentada de substratos). Numa variação da invenção, os ensaios da invenção são sujeitos à condição de o composto candidato não ser um sal de sódio de halogéneo ou um sal de potássio de halogéneo e o ensaio não ser dirigido à medição do efeito de aumento da concentração iónica por proteólise de ACE2.

Estão descritos métodos de produção de ACE2 em CA 2372387. Um exemplo de um ensaio *in vitro* para activação de ACE2 é mostrado em Vickers *et al.*, Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. J Biol. Chem. 2002, 277(17):14838. Outros ensaios (assim como variações dos ensaios anteriores) serão evidentes da descrição da presente invenção e técnicas como as reveladas nas Patentes U.S. 5851788, 5736337 e 5767075.

Composições farmacêuticas

Os activadores da expressão e actividade de ACE2 são preferivelmente combinados com outros componentes, tais como um transportador, numa composição farmacêutica. Estas composições podem ser administradas a um animal, preferivelmente um ser humano, na forma solúvel, para prevenir ou tratar hipertensão, insuficiência cardíaca congestiva, insuficiência cardíaca crónica, insuficiência cardíaca aguda, enfarte do miocárdio, arteriosclerose, insuficiência renal ou uma doença pulmonar num mamífero, em que a doença pulmonar é doença pulmonar obstrutiva crónica, pneumonia, asma, bronquite crónica, enfisema pulmonar, fibrose quística, doença pulmonar intersticial, hipertensão pulmonar primária, embolia pulmonar, sarcoidose pulmonar, tuberculose, edema pulmonar, ARDS ou cancro do pulmão. A doença renal inclui insuficiência renal. Os activadores de ACE2 são úteis para regulação da pressão sanguínea e da hipertensão arterial. A pressão sanguínea normal tem uma pressão sanguínea diastólica inferior a

85 mmHg. A pressão sanguínea normal elevada tem uma pressão sanguínea diastólica entre 85 e 89 mmHg. A hipertensão suave corresponde a uma pressão sanguínea diastólica entre 90-104 mmHg. Uma hipertensão moderada tem uma pressão sanguínea diastólica entre 105 e 114 mmHg. A hipertensão grave tem uma pressão sanguínea diastólica superior a 115 mmHg. A pressão sanguínea anormal é também determinada a partir da pressão sanguínea sistólica (quando a pressão diastólica é inferior a 90 mmHg). A pressão sanguínea normal tem uma pressão sanguínea sistólica inferior a 140 mmHg. A hipertensão sistólica limítrofe mostra uma pressão sanguínea sistólica entre 140 e 159 mmHg. A hipertensão sistólica isolada tem uma pressão sanguínea sistólica superior a 160 mmHg. (Cecil: Essentials of Medicine, Third Edition by Andreoli et al. W.B. Saunders Company (1993)). É diagnosticada hipertensão num adulto com mais de 18 anos de idade se a média de duas ou mais medições de pressão sanguínea em pelo menos duas visitas é 90 mmHg ou mais diastólica ou 140 mmHg sistólica. As crianças e as mulheres grávidas têm uma pressão sanguínea inferior, pelo que uma pressão sanguínea superior a 120/80 (*i.e.*, pressão sanguínea sistólica de 120 mmHg/ pressão sanguínea diastólica de 80 mmHg) indica hipertensão.

As composições farmacêuticas podem ser administradas a seres humanos ou animais através de uma variedade de métodos incluindo, mas não restritos a, administração tópica, administração oral, administração por aerossol, instilação intratraqueal, injeção intraperitoneal e injeção intravenosa. As dosagens a administrar dependem das necessidades do paciente, do efeito desejado e da via de administração escolhida. Os polipéptidos podem ser introduzidos em células utilizando veículos de entrega *in vivo* tais como, mas não exclusivamente, lipossomas.

As composições farmacêuticas podem ser preparadas por métodos conhecidos para a preparação de composições farmacêuticamente aceitáveis que podem ser administradas a pacientes, de tal modo que uma quantidade eficaz da molécula de ácido nucleico ou do polipéptido é combinada numa mistura com um veículo farmacêuticamente aceitável. Os veículos adequados estão descritos, por exemplo em Remington's

Pharmaceutical Sciences (Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., EUA).

Nesta base, as composições farmacêuticas podem incluir um composto ou substância activos, tais como uma molécula de ácido nucleico ou um polipéptido, em associação com um ou mais veículos ou diluentes farmacêuticamente aceitáveis, e contidos em soluções tamponadas com um pH adequado e iso-osmóticas com os fluidos fisiológicos. Os métodos de combinação das moléculas activas com os veículos ou a sua combinação com diluentes são bem conhecidos dos peritos na especialidade. A composição pode incluir um agente de direccionamento para o transporte do composto activo para locais especificados no interior do tecido.

Sobre-expressão heteróloga de ACE2

Os vectores de expressão são úteis para proporcionar níveis elevados de expressão de ACE2. Culturas de células transformadas com as moléculas de ácido nucleico são úteis como ferramentas de rastreio, particularmente para estudos de estados de ACE2 reduzida. Estão incluídos vectores selectivos para células cardíacas e células renais, preferivelmente células endoteliais que normalmente produzem ACE2. Exemplos de vectores para células cardíacas e renais estão descritos, por exemplo, em Rosengart *et al.* Patente US 6322536; March *et al.* Patente US 6224584; Hammond *et al.* Patente US 6174871; 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 Supl. 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 1998 May; 5(5):621-9; Langer JC et al. Adeno-associated virus gene transfer into renal cells: potential for in vivo gene delivery. Exp Nephrol 1998 May-Jun; 6(3):189-94; Lien YH et al. Gene therapy for renal diseases. Kidney Int Suppl 1997 Oct; 61:S85-8; e Ohno K et al. Cell-specific targeting of Sindbis virus vectors displaying IgG-binding domains of protein A. Nat Biotechnol 1997 Aug; 15(8):763-7.

Culturas celulares, preferivelmente culturas de células cardíacas e renais, e culturas de células endoteliais, são utilizadas na sobre-expressão e rastreio de acordo com numerosas técnicas conhecidas na especialidade. Por exemplo, uma linha celular (quer uma cultura celular imortalizada ou uma cultura celular primária) pode ser transfectada com um vector contendo uma molécula de ácido nucleico de ACE2 (ou uma molécula possuindo identidade de sequência) para medir os níveis de expressão da molécula de ácido nucleico e a actividade da molécula de ácido nucleico e do polipéptido. As células são também úteis para identificar compostos que se ligam e activam o polipéptido.

Kits de Diagnóstico que Medem a Actividade e/ou a Expressão de ACE2

A medição da expressão ou actividade de ACE2 é também utilizada em: i) diagnóstico de doença cardíaca ou renal, doença pulmonar e/ou hipertensão ii) identificação de pacientes em risco de desenvolver esta doença antes do desenvolvimento da doença iii) medição da resposta terapêutica em pacientes com doença cardíaca tal como doença das artérias coronárias, insuficiência cardíaca crónica, ou doença renal e/ou hipertensão e/ou lesão pulmonar e iv) medição do sucesso de estratégias preventivas de doenças intervencionais nestes pacientes em risco. A invenção inclui um método para avaliar os níveis de ACE2 num animal compreendendo os passos seguintes: (a) preparação de uma amostra cardíaca ou renal ou pulmonar de um espécime colhido do animal; (b) teste quanto à presença de ACE2 na amostra; e (c) correlação da presença ou níveis de ACE2 na amostra com a presença (ou risco) de doença tal como doença cardíaca, renal ou pulmonar, no animal. Os níveis de ACE2 abaixo do normal ou fraca actividade de ACE2 indicam a presença ou risco de doença.

O número do nucleótido dos polimorfismos que controlam a expressão do gene de ACE2, como descrito no quadro acima e na Figura 11, pode ser prontamente determinado por um perito na especialidade.

Por exemplo, um polinucleótido da invenção pode ser convertido numa sonda marcando-o numa extremidade utilizando digoxigenina-11-desoxiuridina-trifosfato. Estas sondas podem ser detectadas imunologicamente utilizando fragmentos F(ab) de antidigoxigenina policlonal de ovelha conjugados com fosfato alcalino e Azul nitro de tetrazólio com fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo como substrato cromogénico.

Caracterização de ACE2 como Regulador Negativo do RAS

A ACE2 está mapeada num QTL associado a hipertensão em três modelos de rato de pressão sanguínea elevada e os níveis de ACE2 estão reduzidos em todas estas linhagens de ratos hipertensos. Em ratinhos, a inativação genética de ACE2 utilizando resultados de recombinação homóloga em níveis aumentados de péptidos de AngII em tecidos, supra-regulação de genes de hipoxia no coração e disfunção cardíaca grave.

A ablação da expressão de ACE num fundo deficiente em *ace2* elimina completamente o fenótipo de insuficiência cardíaca de ratinhos *knockout* simples de *ace2*. Estes resultados proporcionam um novo paradigma para a regulação do RAS e identificam a ACE2 como regulador negativo do RAS que controla a função cardíaca.

ACE2 e controlo da pressão sanguínea.

A maioria das doenças cardiovasculares são traços quantitativos multifactoriais controlados quer por factores genéticos quer ambientais. Um factor principal para a doença cardiovascular é o RAS. Em contraste com a ACE que é ubiquamente expressa, a recentemente identificada ACE2 exhibe expressão específica de tecidos. A ACE2 regula os níveis endógenos de AngII, competindo com a ACE pelo seu substrato AngI e/ou clivando AngII para gerar Ang1-7. Antes da presente invenção, nada se sabia acerca do papel *in vivo* da ACE2 no sistema cardiovascular. A ACE2 regula os níveis endógenos de AngII. Também funciona como um regulador negativo do RAS.

Em três linhagens diferentes de rato que desenvolvem hipertensão e doença cardiovascular espontâneas ou induzidas pela dieta, a ACE2 está mapeada no interior de um QTL definido no cromossoma X. Em todas estas linhagens de ratos susceptíveis a hipertensão, os níveis de ARNm e proteína de ACE2 estavam infra-regulados. O locus SS-X identificado em análise de QTL em ratos Sabra foi também identificado como um locus que confere resistência a carga de sal. A redução de ACE2 na linhagem sensível ao sal e a ausência de qualquer alteração na sua expressão na linhagem resistente mostram que a ACE2 confere resistência a alterações de pressão sanguínea induzidas pela dieta.

A posição no mapa e a expressão reduzida mostram que a ACE2 é o gene que contribui para o QTL hipertensor no cromossoma X. Adicionalmente, uma expressão aumentada de AngI e AngII em ratinhos nulos para *ace2* confirma que a ACE2 é um regulador do sistema RAS *in vivo*. Contudo, a perda de ACE2 nos nossos ratinhos não resultou em quaisquer alterações directas na pressão sanguínea mesmo quando a função da ACE foi bloqueada. Apenas ocorreram alterações de pressão sanguínea quando estava presente uma disfunção cardíaca extrema em ratinhos machos mais velhos. Os factores genéticos que contribuem para a hipertensão não alteram por si mesmos a pressão sanguínea. Em vez disso, estes QTL definem determinantes individuais de pressão sanguínea, que em consonância com outros polimorfismos genéticos promovem a alteração na pressão sanguínea. Identificámos a associação de polimorfismos de ACE2 com pressão sanguínea elevada na população humana. É importante o facto dos nossos resultados mostrarem que a ACE2 funciona como um regulador negativo de pressão sanguínea aumentada.

ACE2 e o controlo da função cardíaca.

Inesperadamente, a perda de ACE2 em ratinhos resulta em profunda disfunção contráctil que conduz a grave redução da pressão sanguínea sistémica em ratinhos mais velhos. É importante que esta disfunção cardíaca é completamente invertida pela ruptura de ACE sugerindo que um produto catalítico de ACE desencadeia danos contrácteis na ausência de ACE2. Como estes defeitos de contractilidade podem ocorrer na ausência de hipertrofia ou de quaisquer alterações detectáveis

na pressão sanguínea, os nossos resultados proporcionam também a prova genética de que o fenótipo da doença cardíaca regulada por RAS pode ser geneticamente desacoplado dos seus efeitos sobre a pressão sanguínea e a hipertrofia cardíaca.

Mostrou-se que os inibidores de ACE e os bloqueadores do receptor de AngII têm um papel cardioprotector na insuficiência cardíaca em seres humanos, implicando assim a AngII na doença cardíaca. A eliminação completa da disfunção cardíaca nos nossos ratinhos mutantes duplos para *ace/ace2* mostra que o RAS controla directamente a função cardíaca e que a ACE2 é um regulador negativo crítico que antagoniza o RAS e a insuficiência cardíaca. As nossas experiências de recuperação genética indicam fortemente que é de facto um produto de ACE que acciona a insuficiência cardíaca, *i.e.*, o aumento de AngII observado nos corações de ratinhos nulos para *ace2* é causador de disfunção cardíaca. É preciso determinar se a inibição farmacológica do receptor de AngII recupera os fenótipos do coração de ratinhos mutantes para *ace2*. É interessante que os nossos resultados em moscas mostram que uma mutação do elemento P associada com o homólogo de ACE, ACER, resulta num defeito grave e letal de morfogénese cardíaca (resultados não mostrados) mostrando que as funções de ACE/ACE2 no coração foram conservadas ao longo da evolução.

O defeito nos corações mutantes para *ace2* é caracterizado por grave disfunção contráctil e supra-regulação de genes regulados por hipoxia com apenas ligeira remodelação em ratinhos mais velhos, sem hipertrofia e sem evidência de perda de miócitos. Estes parâmetros fenotípicos e moleculares de insuficiência cardíaca em ratinhos mutantes para *ace2* são diferentes da hipertrofia e da cardiomiopatia dilatada. De modo bastante intrigante, os corações mutantes para *ace2* assemelham-se ao atordoamento cardíaco e à hibernação encontrados em casos humanos de doença das artérias coronárias e em casos de cirurgia de derivação (*by-pass*). Nestas doenças humanas e em modelos animais de atordoamento cardíaco/hibernação, condições hipóxicas crónicas conduzem a alterações compensatórias no metabolismo de miócitos, supra-regulação de genes induzidos por hipoxia, e função cardíaca reduzida. Como a ACE2 é expressa no endotélio vascular, e não em miócitos cardíacos, é provável que os efeitos de ACE2

estejam confinados à vasculatura. Por exemplo, aumentos locais de AngII podem conduzir a vasoconstrição resultando em hipoperfusão e hipoxia. Mostrou-se também que a AngII causa disfunção endotelial através da indução de *stress* oxidativo. É necessário determinar os mecanismos através dos quais a perda de ACE2 pode resultar na supra-regulação de genes indutíveis por hipoxia. É importante que os nossos resultados mostram que os polimorfismos de ACE2 causam a patologia de doença cardíaca coronária em seres humanos.

EXEMPLOS

A ACE2 está mapeada num QTL no cromossoma X em três linhagens de ratos hipertensos.

A hipertensão e a maioria das doenças cardiovasculares são de natureza multifactorial e a patogénese da doença é influenciada por múltiplos *loci* de susceptibilidade genética. Em vários modelos de ratos recombinantes, foram identificados múltiplos QTL para hipertensão. Como a ACE2 está mapeada no cromossoma X no ser humano e um QTL foi mapeado no cromossoma X em vários modelos de rato de hipertensão sem um gene candidato lhe fosse ainda atribuído, a ACE2 podia ser um gene candidato para este QTL. Para facilitar o mapeamento cromossómico da ACE2 de rato, o ADNc de ACE2 de rato de comprimento completo foi clonado por rastreio de uma biblioteca de ADNc de rim de rato. A ACE2 de rato é altamente homóloga à ACE2 humana e é 32% idêntica e 42% similar à ACE humana e de ratinho (Fig. 1a). Tal como a ACE2 humana, o gene de rato é constituído por um único domínio de ACE com um local de ligação de zinco conservado, um péptido de sinal e um domínio transmembranar (Fig. 1b). Similar à humana, a ACE2 no ratinho e no rato é predominantemente expressa no rim e no coração, com expressão mais fraca no pulmão e no fígado (Fig. 1c).

O mapeamento de híbridos de radiação mostrou que o gene de ACE de rato está mapeado no cromossoma X com pontuações LOD significativas para marcadores *DXRat9*, *DXWox14*, *DXWox15* e *DXRat42*, colocando o *ace2* entre *DXRat9* e *DXRat42* (Fig. 1d). O mapeamento comparativo mostrou que a posição de *ace2* no mapa se sobrepõe a um intervalo de QTL para hipertensão identificado em ratos Sabra sensíveis a sal encontrado entre

os marcadores *DXMgh12* e *DXRat8* (*SS-X*). Adicionalmente, a região cromossômica de *ace2* está mapeada no intervalo de QTL B P3 definido em ratos espontaneamente hipertensos propensos a icto (*SHRSP*), e um QTL *BB.Xs* hipertenso previamente identificado no cromossoma X de ratos hipertensos espontâneos (*SHR*) por análise congénica (Fig. 1d). Assim, a *ACE2* está mapeada num QTL no cromossoma X de rato identificado em três modelos separados de hipertensão espontânea e induzida pela dieta.

Infra-regulação da expressão de ACE2 em ratos hipertensos

Como o rim é um dos principais locais de regulação da pressão sanguínea, foram determinados os níveis de expressão de *ACE2* nos rins destas três linhagens de ratos hipertensos. Os níveis de ARNm de *ACE2* foram inicialmente medidos nos rins de ratos Sabra hipertensos sensíveis ao sal (*SBH/y*) e ratos Sabra de controlo normotensos resistentes ao sal (*SBN/y*). A carga de sal (com DOCA-sal) não teve efeito na expressão de ARNm de *ACE2* em ratos normotensos *SBN/y*. De forma intrigante, em ratos *SBH/y*, a carga de sal e o desenvolvimento de hipertensão estavam associados com uma redução significativa na expressão de ARNm de *ACE2* em comparação com os ratos normotensos *SBN/y* (Fig. 2a). É de notar que o ARNm de *ACE2* era também inferior nos *SBH/y* alimentados com dieta regular quando comparado com controlos *SBN/y* alimentados com uma dieta similar. Esta última verificação é consistente com a diferença de 10–20 mmHg na pressão sanguínea observada entre ratos *SBH/y* e *SBN/y* alimentados com dieta normal.

Para medir os níveis de proteína *ACE2*, foi gerado um anti-soro de coelho específico de *ACE2* (aa206–aa225 de *ACE2* de ratinho), que reage de modo cruzado tanto com *ACE2* de rato como humana (não mostrado). Em linha com a expressão diminuída de ARNm de *ACE2*, a expressão de proteína *ACE2* foi marcadamente reduzida em animais *SBH/y* que foram alimentados com uma dieta normal (Fig. 2b). O aumento na pressão sanguínea de ratos *SBH/y* após uma dieta de 4 semanas de DOCA-sal estava correlacionado com uma diminuição adicional na expressão da proteína *ACE2* (Fig. 2b). A carga de sal não desencadeou uma pressão sanguínea aumentada nem alterou a expressão de *ACE2* em ratos de controlo *SBN/y* resistentes ao sal (Fig. 2b). Os níveis de proteína *ACE2* estavam também significativamente

diminuídos nos rins de animais SHRSP e SHR espontaneamente hipertensos em comparação com os seus controlos WKY (Fig. 2b). Adicionalmente, os níveis de ARNm de ACE2 estavam marcadamente reduzidos em ratos SHRSP e SHR hipertensos (não mostrado). A clonagem e a sequenciação da região de codificação de ACE2 nas linhagens de ratos hipertensos não revelaram quaisquer alterações na sequência, indicando que a expressão reduzida de ACE2 provavelmente resulta de polimorfismos que controlam a expressão do gene ACE2. A posição no mapa e a expressão reduzida de ACE2 em três diferente linhagens de ratos indicam que o *ace2* é um forte gene candidato para este QTL hipertenso no cromossoma X. Adicionalmente, a expressão reduzida de ACE2 em todas as três linhagens de ratos hipertensos sugeriu que esta enzima funciona como um regulador negativo.

Clonagem de ACE2 de ratinho e geração de ratinhos *knock-out* para ACE2

Para validar a candidatura de ACE2 como um QTL e para testar se a ACE2 tem inde, um papel essencial na fisiologia cardiovascular e na patogénese de doenças cardiovasculares, clonou-se o gene de ACE2 de ratinho (Fig. 1a). Tal como a ACE2 humana, a ACE2 murina também está mapeada no cromossoma X (não mostrado), contém um único domínio de ACE (Fig. 1b), e é predominantemente expressa em rins e coração tl (Fig. 1c). É interessante que observámos duas isoformas de ACE2 no ratinho em todos os tecidos positivos. A sobre-expressão de ACE2 murina em células COS mostrou que a ACE2 cliva a AngI em AngI-9 (não mostrado) indicando que a ACE2 murina tem a mesma especificidade bioquímica que a ACE2 humana. Para determinar o papel *in vivo* da ACE2, o gene *ace2* no ratinho foi corrompido substituindo o exão 9 pelo gene de resistência a neomicina, eliminando eficazmente o domínio catalítico de ligação de zinco (Métodos e Fig. 3a). Utilizaram-se duas linhas de células ES mutadas no *locus ace2* para gerar ratinhos quiméricos, que foram cruzados com C57BL/6 para obter transmissão germinal. Ambas as linhas de ratinhos apresentaram idênticos fenótipos. A transmissão da mutação de *ace2* foi confirmada por análise *Southern blot* (Fig. 3b). O mutante nulo para *ace2* foi verificado pela ausência de transcritos de ARNm de *ace2* e análises de *Northern* da proteína (não mostrado) e *Western blot* (Fig. 3c). A expressão de ARNm de ACE dos rins e

corações não foi alterada em ratinhos mutantes para *ace2* (Fig. 3d).

Como o gene de ACE2 está mapeado no cromossoma X, todos os descendentes machos eram ou mutantes nulos ($ace2^{-/y}$) ou de tipo selvagem para ACE2 ($ace2^{+/y}$) enquanto as fêmeas eram ou de tipo selvagem ($ace2^{+/+}$), heterozigotas ($ace2^{+/-}$) ou homozigotas ($ace2^{-/-}$) para a mutação de *ace2*. Deverá notar-se que em todas as experiências descritas adiante, as fêmeas $ace2^{+/-}$ se comportaram de forma similar às fêmeas $ace2^{+/+}$ e aos machos $ace2^{+/y}$ indicando que não existe um efeito evidente de heterozigotia de *ace2*. Os ratinhos nulos para ACE2 nasceram com a frequência mendeliana esperada, pareciam saudáveis e não apresentavam quaisquer alterações visíveis detectáveis em nenhum dos órgãos analisados. Adicionalmente, em contraste com os ratinhos $ace^{-/-}$ machos que exibem fertilidade significativamente reduzida, os ratinhos nulos para *ace2*, tanto machos como fêmeas, são férteis.

Pressão sanguínea em ratinhos mutantes para *ace2*

Mostrou-se anteriormente que os ratinhos mutantes para *ace2* exibem uma pressão sanguínea reduzida e patologia renal. Portanto, testou-se primeiro se a perda de expressão de ACE2 afecta a homóstase da pressão sanguínea e/ou o desenvolvimento ou a função renais. De forma intrigante, a perda de ACE2 não resultou em alteração de pressão sanguínea em ratinhos de 3 meses de idade $ace2^{-/y}$ machos (Fig. 4a) ou $ace2^{-/-}$ fêmeas (não mostrado) em comparação com os seus parceiros de ninhada de controlo. Como era possível que a ACE pudesse compensar a perda de ACE2, tratámos os ratinhos deficientes em *ace2* com captopril, que bloqueia a função da ACE mas não a da ACE2. Contudo, a inibição *in vivo* de ACE com captopril reduziu a pressão sanguínea de ratinhos $ace^{-/y}$ machos numa extensão similar à observada em parceiros de ninhada de tipo selvagem tratados com captopril (Fig. 4a). Assim, mesmo num cenário de inibição de ACE, a perda de ACE2 não tem um efeito directo evidente sobre a homóstase da pressão sanguínea neste fundo definido de ratinho. Com base nos nossos resultados de QTL de RAS, cruzámos os nossos ratinhos mutantes com outros fundos de ratinho para mostrar o papel da ACE2 no controlo da pressão sanguínea similar aos fundos genéticos em seres humanos.

Função renal prejudicada em ratinhos mutantes para *ace2*

Como a ACE2 é altamente expressa nos rins, examinámos a morfologia e a função renais. Todos os ratinhos *ace2*^{-/-} machos e *ace2*^{-/-} fêmeas de 3 meses de idade e 6 meses de idade apresentaram morfologia renal normal sem alterações evidentes de quaisquer ultra-estruturas renais (Fig. 4b). A celularidade e estruturas renais normais do sistema ductal e glomérulos foram também confirmadas utilizando morfometria de secções em série.

Os rins de ratinhos machos deficientes em *ace2* e de parceiros de ninhada com idades correspondentes de controlo foram examinados utilizando microscopia óptica (coloração com PAS) e electrónica (TEM) aos 3 e 12 meses de idade. A gravidade da esclerose para cada glomérulo foi pontuada de 0 a 4+ de uma maneira cega como se segue: 0 representa ausência de lesão, 1+ esclerose de <25% dos glomérulos, enquanto 2+, 3+ e 4+ representam esclerose de 25 a 50%, 50 a 75%, e >75% dos glomérulos, respectivamente. Aos 3 meses de idade, não houve evidência de alterações patológicas nos rins dos ratinhos deficientes em *ace2*. Contudo, aos 12 meses de idade, a microscopia óptica revelou esclerose/lesão glomerular aumentada: $1,45 \pm 0,2$ vs $0,25 \pm 0,06$; $n=6$; $p<0,01$. A microscopia electrónica mostrou uma deposição aumentada de fibrilhas de colagénio no mesângio renal e uma membrana basal espessada. A exposição crónica a níveis elevados de AngII conduz a stress por hipoxia e oxidativo nos rins dos ratinhos deficientes em *ace2*. A análise *Western blot* revelou uma expressão aumentada de factor-1 alfa indutível por hipoxia (HIF1- α) e factor de crescimento endotelial vascular (VEGF) nos rins dos ratinhos deficientes em *ace2*. A medição de produtos de peroxidação lipídica mostrou um grau aumentado de stress oxidativo nos ratinhos deficientes em *ace2* aos 6 meses de idade: hexanal (1001 ± 161 vs 115 ± 13 nmol/g; $n=5$; $p<0,01$) e malonodialdeído ($48 \pm 6,4$ vs $24,3 \pm 2,8$ nmol/g; $n=5$; $p<0,01$).

Estes resultados mostram que a perda de ACE2 conduz a sinalização aumentada por angiotensina II de uma maneira específica dos tecidos que no final medeia efeitos prejudiciais nos rins dos ratinhos deficientes em *ace2*. A expressão diminuída de ACE2 desempenha um importante papel patológico na doença renal.

Perda de ACE2 resulta num grave defeito na função cardíaca

A inibição farmacológica de ACE ou de receptores de AngII sugeriu um papel para o RAS na regulação da função cardíaca e da hipertrofia cardíaca. Contudo, nem ratinhos nulos para *ace* nem para *angiotensinogénio* desenvolveram qualquer doença cardíaca declarada. Como a ACE2 é altamente expressa na vasculatura do coração, analisaram-se os corações de ratinhos deficientes em *ace2*. Os corações de ratinhos mutantes para *ace2* exibem uma ligeira diminuição da espessura das paredes do ventrículo esquerdo e dimensões aumentadas da câmara (Fig. 5a). A diminuição da espessura da parede ventricular anterior (PA) esquerda e o aumento da dimensão diastólica final do ventrículo esquerdo (DDFVE) em corações deficientes em *ace2* podem ser também observados por ecocardiografia (Tabela 1). Estas alterações estruturais são principalmente observadas em ratinhos machos de 6 meses de idade. Contudo, as razões coração/peso corporal foram comparáveis entre ratinhos *ace2*^{-/-} e *ace2*^{+/-} de idade comparável, de 3 meses de idade (não mostrado) e de 6 meses de idade (Fig. 5a,b). A ecocardiografia também mostrou que a massa do ventrículo esquerdo (MVE) e as razões MVE/peso corporal eram normais (Tabela 1). Não foram observadas alterações estruturais e bioquímicas características de cardiomiopatia dilatada pois não houve indicação de fibrose cardíaca intersticial (Fig. 5c,d) nem alterações prototípicas em ANF, BNP, α -MHC, β -MHC e expressão do gene da actina em músculo esquelético (não mostrado). Em adição, os cardiomiócitos individuais de ratinhos nulos para ACE2 não exibiram evidência de hipertrofia e não observámos qualquer evidência de apoptose alterada de cardiomiócitos em ratinhos nulos para ACE2 como detectado por coloração TUNEL (não mostrado). Assim, apesar da suave dilatação dos corações em ratinhos nulos para ACE2 de 6 meses de idade, não houve evidência de hipertrofia cardíaca ou cardiomiopatia dilatada.

É interessante que a avaliação da função cardíaca por ecocardiografia revelou que todos os ratinhos machos *ace2*^{-/-} e fêmeas *ace2*^{-/-} exibiram insuficiência cardíaca contráctil grave como determinado pela reduzida fracção de encurtamento (FE), e diminuída velocidade de encurtamento de fibras circunferenciais (Tabela 1 e Fig. 6a,b). Verificou-se que a diminuição na função era mais grave em ratinhos machos e fêmeas de 6 meses de idade comparativamente com ratinhos de

idade correspondente de 3 meses de idade, sugerindo uma progressão no fenótipo (Tabela 1). Consistentemente com a reduzida contractilidade cardíaca, os ratinhos *ace2*^{-/-} de 6 meses de idade exibiram uma pressão sanguínea reduzida (Fig. 6c), uma característica não encontrada em fêmeas *ace2*^{-/-} de idade correspondente e machos de 3 meses de idade, sugerindo que a redução na pressão sanguínea pode ser o resultado de disfunção cardíaca grave e não um efeito directo de perda de ACE2 na pressão sanguínea sistémica. Estes resultados surpreendentes mostram que a ACE2 é um regulador negativo crítico da contractilidade cardíaca.

Para confirmar os defeitos ecocardiográficos na função cardíaca, realizaram-se medições hemodinâmicas invasivas em ratinhos nulos para *ace2*. É importante que as medições hemodinâmicas invasivas mostraram que tanto dP/dT-max como dP/dT-min foram marcadamente reduzidas nos ratinhos mutantes para *ace2* (Tabela 2), indicando um grave prejuízo da função cardíaca contráctil. A perda de ACE2 resultou também numa diminuição significativa nas pressões aórtica e ventricular consistente com as reduções observadas na contractilidade cardíaca (Tabela 2). É notável que os resultados estabelecem que os defeitos na contractilidade cardíaca de ratinhos mutantes para *ace2* ocorrem na ausência de qualquer hipertrofia cardíaca declarada e podem ser geneticamente desacoplados das alterações na pressão sanguínea.

Supra-regulação de genes indutíveis por hipoxia em ratinhos nulos para *ace2*

A disfunção contráctil grave e a dilatação suave na ausência de hipertrofia ou fibrose cardíaca em ratinhos nulos para *ace2* assemelham-se a atordoamento cardíaco/hibernação em seres humanos e modelos animais. O atordoamento cardíaco e a hibernação são respostas adaptativas a hipoxia crónica tal como doença das artérias coronárias ou após cirurgia de derivação (*bypass*). Como a ACE2 é altamente expressa em células endoteliais vasculares mas a contractilidade é controlada por cardiomiócitos, especulou-se que a perda de ACE2 poderia resultar em hipoxia cardíaca. Portanto, analisaram-se as alterações nos níveis de expressão de genes indutíveis por hipoxia tais como BNIP3²⁵ e PAI-1 por *Northern blotting*. Nos corações de todos os ratinhos nulos para *ace2*

analisados, a expressão de ARNm de BNIP3 e PAI-1 foi marcadamente supra-regulada comparativamente com os seus parceiros de ninhada de *tipo selvagem* (Fig. 7a). Assim, a perda de ACE2 resulta na indução de um perfil de expressão de genes regulados por hipoxia.

Níveis aumentados de angiotensina II em tecidos de ratinhos nulos para *ace2*

Como a ACE2 funciona como uma carboxipeptidase, clivando um único resíduo de AngI, para gerar Ang1-9, e um único resíduo de AngII para gerar Ang1-7, colocou-se a hipótese de que a ACE2 podia funcionar como um regulador negativo do RAS competindo com a ACE pelo substrato AngI e/ou clivando e inactivando AngII. Se correcta, a perda de ACE2 deverá aumentar os níveis de AngII *in vivo*. Utilizando radioimunoensaios, verificou-se de facto que os níveis de AngII estão significativamente aumentados nos rins e corações de ratinhos mutantes para *ace2* (Fig. 7b). Em adição, foi também observado um aumento na AngI (Fig. 7b) consistente com a AngI ser um substrato da acção de ACE2 *in vivo*. Não se encontraram diferenças nos níveis de ARNm de ACE nos corações e nos rins de ratinhos mutantes para *ace2* comparativamente com controlos indicando que os níveis aumentados de AngII tissular não se deviam a uma expressão aumentada de ACE (Fig. 3d). Estes resultados mostram que a ACE2 funciona como um regulador negativo do RAS e controla os níveis endógenos de AngII.

A ablação da expressão de ACE em ratinhos deficientes em *ace2* recupera de insuficiência cardíaca

Se o fenótipo nos corações de ratinhos mutantes para *ace2* era devido ao aumento dos níveis de AngII, então a ablação genética de ACE em combinação com a ruptura de ACE2 podem servir para reduzir os níveis de AngII e recuperar o fenótipo observado nos ratinhos mutantes para ACE2. Para testar esta noção, geraram-se ratinhos mutantes duplos *ace/ace2*. Estes ratinhos mutantes duplos nasceram com as razões mendelianas esperadas e pareciam saudáveis. A pressão sanguínea (Fig. 8a) e os defeitos renais (não mostrado) nos ratinhos duplamente nulos para *ace-ace2* foram similares aos dos ratinhos mutantes simples para *ace*. A fertilidade dos ratinhos mutantes duplos *ace-ace2* não foi avaliada. Assim, a perda simultânea de ACE e

ACE2 não causa qualquer doença evidente em adição à observada em ratinhos mutantes simples para *ace*.

Como a função cardíaca de ratinhos *knockout* para ACE não foi previamente relatada, foram primeiro analisados os parâmetros cardíacos nestes ratinhos. Em ratinhos *ace*^{-/-}, os corações são histologicamente normais (não mostrado) e não foi detectado nenhum defeito na função cardíaca aos 6 meses de idade (Fig. 8b,c). É importante que a ablação da expressão de ACE num fundo mutante para *ace2* elimina completamente o fenótipo de insuficiência cardíaca de ratinhos *knock-out* simples para *ace2* (Fig. 8b,c). Adicionalmente, utilizando ecocardiografia, todas as funções cardíacas de ratinhos mutantes duplos *ace-ace2* de idade comparável de 6 meses de idade, foram comparáveis às dos seus parceiros de ninhada mutantes simples para *ace* e de tipo *selvagem* (Tabela 1). O restabelecimento das funções cardíacas ocorreu em ratinhos mutantes duplos *ace-ace2* tanto machos como fêmeas. Estes resultados genéticos mostram que a expressão de ACE é requerida e necessária para desencadear insuficiência cardíaca contráctil na ausência de ACE2. É importante que também não houve diferença na pressão sanguínea entre ratinhos *knockout ace* e *ace/ace2* (Fig. 8a), implicando adicionalmente que a pressão sanguínea reduzida em ratinhos *ace2* machos mais velhos se deve à drástica diminuição da função cardíaca.

A ACE2 controla negativamente a lesão pulmonar

A síndrome da dificuldade respiratória do adulto (ARDS) é uma forma grave de lesão pulmonar aguda e tem taxas de mortalidade de 40-70% mesmo quando estão disponíveis cuidados intensivos. O traumatismo, a sepsia grave (infecção sistémica), a pneumonia difusa e o choque são as causas mais sérias de ARDS, e entre estas a lesão pulmonar induzida por ácidos é uma das causas mais comuns. Os potenciais mecanismos causadores de lesão pulmonar associada à aspiração de ácido incluem danos induzidos por HCl na membrana alvéolo-capilar, e adesão, activação e sequestro de neutrófilos polimorfonucleares (PMN), que resultam em edema pulmonar e na deterioração da permuta gasosa. O tratamento para a ARDS consiste em ventilação mecânica e tratamento continuado da enfermidade ou lesão precipitante. O tratamento de suporte utilizando novos fármacos que protegem o pulmão de mais danos

na membrana alvéolo-capilar preservaria a função pulmonar dos pacientes de ARDS de modo a tratar a enfermidade ou lesão precipitante, conduzindo a uma diminuição da taxa de mortalidade da ARDS.

Como a ACE2 é expressa nos pulmões, avaliámos se a perda de ACE2 tem algum papel nas lesões pulmonares agudas. A Figura 9 mostra as alterações na elastância pulmonar (EP) em ratinhos tratados com HCl e de controlo ao longo de um período de 3 horas. Após a administração de HCl, os ratinhos de tipo selvagem sobreviveram mais de 4 horas, enquanto os ratinhos *knockout* para ACE2 morreram em 2-3 horas. Reflectindo a diferença na sobrevivência, os ratinhos *knockout* para ACE2 apresentaram uma resposta significativamente mais séria na elastância pulmonar do que os ratinhos de tipo selvagem. Assim, a ACE2 desempenha um papel significativo na protecção dos pulmões contra lesão aguda induzida por ácido. Assim, aumentar a função e/ou a expressão de ACE2 constitui um novo e não antecipado alvo para o tratamento da ARDS e da doença pulmonar.

Métodos

Clonagem de ACE2 de ratinho e de rato e mapeamento cromossómico de QTL. Clonou-se ACE2 murina a partir de uma base de dados de EST patenteada. Utilizando uma sonda de ACE2 de ratinho, rastreámos depois um ADNc de rim de rato (Invitrogen) para obter um ADNc de rato de comprimento completo como determinado por sequenciação do ADN. Para o mapeamento cromossómico, utilizou-se uma sonda específica para o ADNc de ACE2 de rato para rastrear uma biblioteca de PAC de rato (RPCI-31, Research Genetics), identificando dois clones positivos (6M6 e 125K9).

As sequências finais destes clones foram determinadas e desenharam-se indiciadores específicos de rato (mc2L: 5'-TCAATTTACTGCTGAGGGGG-3', mc2R: 5'-GAGGGATAACCCAGTGCAAA-3') para determinar a posição no mapa cromossómico de ACE2 no rato rastreando um painel de híbridos de radiação (RH07.5, Research Genetics). Os ratos SHR e WKY de controlo foram obtidos de Harlan e mantidos nas instalações para animais do Ontario Cancer Institute de acordo com as orientações institucionais. Os tecidos de ratos SHRSP foram gentilmente proporcionados

pelo Dr. Detlev Ganten, Alemanha. Os ratos Sabra resistentes ao sal e sensíveis ao sal foram criados e mantidos nas instalações para animais do Ben-Gurion University Barzilai Medical Center, Israel. O tratamento com DOCA-sal foi conforme previamente descrito.

Análise da expressão. Preparou-se o ARN total de rins de rato utilizando reagente Tri. Resolveram-se 20 mg de ARN num gel de formamida a 0,8%. Transferiu-se para membrana de *nylon* (Amersham), e sondou-se com um ADNc parcial de ACE2 de rato, pistas (9-1). A sonda com acção β e os *Northern blots* de múltiplos tecidos foram adquiridos a Clontech. Para a análise de *Western*, homogeneizaram-se os rins em tampão de lise (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, EDTA 20mM e Triton-X 100 a 1%) suplementado com *cocktail* inibidor de protease "Completo" (Roche) e Na_3VO_4 1 mM - resolveram-se 100 mg de proteína por SDS-PAGE em géis de tris-glicina a 8%. Obteve-se soro imune para ACE2 a partir de coelhos imunizados com um péptido de ACE2 específico de ratinho DYEAEGADGYNYNRNQLIED. O soro foi purificado por afinidade com o péptido de imunização utilizando o kit Sulpho-link (Pierce). Foi utilizado um anticorpo com acção β comercialmente disponível como controlo de carga (Santa Cruz).

Geração de ratinhos mutantes para ACE2. Construiu-se um vector de direccionamento (ramo curto de 559 pares de bases, e ramo longo de 8,1 quilobases) utilizando o vector pKO Scrambler NTKV-1907 (Stratagene). Uma porção do ADN genómico de *ace2* contendo os nucleótidos +1069 a +1299 foi substituído pela cassette de resistência a neomicina na orientação anti-sentido. A construção de direccionamento foi electroporada em células ES E14K, e efectuou-se o rastreio de clones ES recombinantes homólogos positivos por *Southern blotting* de ADN genómico digerido com EcoRI hibridado com sondas flanqueadoras a 5' e 3'. As duas linhas de células ES *ace*^{-/*y*} independentes foram injectadas em blastocistos derivados de C57BU6 para gerar ratinhos quiméricos, que foram cruzados com ratinhos C57BU6. Duas linhas de células ES originaram transmissão de linha germinal independente. Os resultados relatados neste manuscrito são consistentes entre as duas linhas de ratinhos mutantes. A ablação da expressão de ACE2 foi confirmada por análise RT-PCR, *Northern blot* e *Western blot*. Apenas ratinhos parceiros de ninhada foram utilizados para todas as

experiências. A histologia de todos os tecidos, os ensaios de apoptose, a serologia sanguínea e as morfometrias renais foram como descrito³¹. Os ratinhos mutantes para ACE completos foram anteriormente descritos⁸ e foram obtidos de Jackson Laboratories. Os ratinhos foram mantidos nas instalações para animais do Ontario Cancer Institute de acordo com as orientações institucionais.

Medições de morfometria do coração, ecocardiografia, hemodinâmica e pressão sanguínea. Para a morfometria cardíaca, os corações foram perfundidos com formalina tamponada a 10% a 60 mmHg e subsequentemente embebidos em parafina. Determinou-se a fibrose intersticial do miocárdio por morfometria quantitativa utilizando a análise por imagem assistida por computador subtrativa de cor utilizando o *Kit Image Processing Tool Kit* versão 2.5, acoplado com *software* Photoshop 6.0. Utilizaram-se secções coradas de vermelho Picro-Sirius para calcular a fibrose intersticial como a razão das áreas com coloração de PSR positiva comparativamente com a totalidade do campo visual. As avaliações ecocardiográficas foram realizadas como descrito³² utilizando parceiros de ninhada de *tipo selvagem* e *mutantes*. Os ratinhos foram anestesiados com isofluorano/oxigénio e foram examinados por ecocardiografia transtorácica utilizando um Acuson® Sequoia C256 equipado com um transdutor linear de 15MHz. Calculou-se a FE como: $FE = [(DDF - DSF)/DDF] * 100$. Calculou-se a Vcef como FE/tempo de ejeção corrigido para a frequência cardíaca. As medições hemodinâmicas foram realizadas como descrito. Resumidamente, os ratinhos foram anestesiados, e a artéria carótida direita foi isolada e canulada com um cateter 1.4 French Millar (Millar Inc., Houston) ligado a um amplificador (TCP-500, Millar Inc.). Após a inserção do cateter na artéria carótida, o cateter foi feito avançar para a aorta e depois para o ventrículo esquerdo para registrar as pressões aórtica e ventricular. Os parâmetros medidos e analisados foram a frequência cardíaca, a pressão aórtica, a pressão sistólica ventricular esquerda (VE), a pressão diastólica VE, e as primeiras derivadas máxima e mínima da pressão VE (+dP/dtmax e dP/dtmax, respectivamente). Efectuou-se a medição da pressão sanguínea por *tail-cuff* utilizando um sistema de análise de pressão sanguínea Usitech BP-2000 fabricado por Visitech Systems (Apex, NC). Para o tratamento com captopril,

suplementou-se a água de beber com 400 mg/L de captopril (Sigma) durante duas semanas antes da medição da pressão sanguínea.

Níveis de péptidos de angiotensina nos tecidos.

Homogeneizaram-se corações e rins sobre gelo em etanol a 80%/HCl 0,1 N contendo os inibidores de peptidase descritos acima incluindo fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF, 100 µM). Centrifugaram-se os homogenatos de proteína a 30 000 g durante 20 minutos, decantaram-se os sobrenadantes, e acidificaram-se com 1% (v/v) de ácido heptafluorobutírico (HFBA, Pierce, Rockford, IL). Concentrou-se o sobrenadante para 5 ml numa centrífuga a vácuo Savant (Savant, Farmingdale, NY) e aplicaram-se os extractos concentrados a Sep-Paks activados, lavaram-se com HFBA a 0,1%, e eluíram-se com 5 ml de metanol a 80%/HFBA a 0,1%. Realizou-se a análise por radioimunoensaio do teor de péptidos de angiotensina nos extractos dos tecidos de coração e rim. Os limites de detecção para os RIA de AngII e AngI eram de 0,5 fmol/tubo e AngI 5 fmol/tubo, respectivamente.

Modelo de lesão pulmonar aguda. Utilizaram-se neste estudo ratinhos *knockout* para ACE2 e seus parceiros de ninhada (8-12 semanas de idade). Um minuto antes da provocação por aspiração, administraram-se 2 inalações profundas (3 vezes o volume corrente) para normalizar o historial volumétrico e fizeram-se as medições da linha de base. Os ratinhos anestesiados e ventilados mecanicamente, receberam injeção intratraqueal de 2 mL/kg de HCl (pH = 1,5), seguida de um *bolus* de ar. No grupo de controlo, os ratinhos receberam injeção de solução salina ou não receberam injeção. Em todos os grupos, fizeram-se medições com intervalos de 30 minutos durante 3 horas. Para avaliar fisiologicamente a lesão pulmonar, avaliou-se a elastância pulmonar (EP; o recíproco da complacência pulmonar) por medição da pressão traqueal de pico, do fluxo e do volume. Calculou-se a EP dividindo a pressão de pico traqueal pelo volume. As alterações na EP reflectem as alterações do parênquima pulmonar e a rigidez dos pulmões.

A presente invenção foi descrita com detalhes e com particular referência às concretizações preferidas. Por

exemplo, quando no pedido se referem proteínas, é evidente que podem ser frequentemente utilizados péptidos e polipéptidos. Do mesmo modo, quando se descreve um gene no pedido, é evidente que podem ser frequentemente utilizadas moléculas de ácido nucleico ou fragmentos de genes.

Referências

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).

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

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

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

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

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

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

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

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).

Wuyts, B., Delanghe, J., & De Buyzere, M. "Angiotensin 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).

Hollenberg, N.K. "Angiotensin converting enzyme inhibition and the kidney". Curr Opin. Cardiol. 3(Supl. 1), S19-29 (1988).

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

Tipnis, S.R. et al. "A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression 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 I 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. Hypertension 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 expression 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. "Angiotensin II and atherosclerosis". Am. J. Cardiol. 87, 25C-32C (2001).

Enseleit, F., Hurlimann, D., & Luscher, T.F. "Vascular protective effects of angiotensin converting enzyme inhibitors and their relation to clinical events". J. Cardiovasc. Pharmacol. 37(supl. 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 expression of highly inhibitory monomeric forms of phospholamban in mouse heart impairs cardiac contractility". J. Biol. Chem. 275, 14985-14991 (2000).

Rosengart et al. Patente US 6322536

March et al. Patente US 6224584

Hammond et al. Patente US 6174871

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 1998 May; 5(5):621-9

Langer JC et al. "Adeno-associated virus gene transfer into renal cells: potential for in vivo gene delivery". Exp Nephrol 1998 May-Jun; 6(3):189-94

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

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

Tabela 1. Funções cardíacas de ratinhos nulos para ace2

	3 meses - machos		6 meses - machos		6 meses - fêmeas	
	<i>ace2^{+/y}</i>	<i>ace2^{-/y}</i>	<i>ace2^{+/y}</i>	<i>ace2^{-/y}</i>	<i>ace2^{+/-}</i>	<i>ace2^{-/-}</i>
	n=7	n=7	n=8	n=8	n=3	n=3
Frequência cardíaca, bpm	469 ±12	466±18	495 ±15	482 ±12	460 ±6	452 ±14
PA, 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
DDFVE, 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*
DSFVE, 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**
%FE	48,42 até	36,73 ±0,89**	48,12 ±0,84	26,76 ±1,78**	53,00 ±1,68	34,85 ±1,76**
VPA, 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
Vcef, circ/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**
MVE, 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
MVE/PC, 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}* ou *ace2^{-/-}* vs *ace2^{+/-}*

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

bpm = batimentos cardíacos por minuto; PA = espessura da parede anterior; DDFVE = dimensão final ventricular esquerda diastólica; DSFVE = dimensão final ventricular esquerda sistólica; %FE = fracção de encurtamento percentual; VPA = velocidade de pico de fluxo aórtico; Vcef = Velocidade de encurtamento de fibras circunferenciais; MVE = massa ventricular esquerda calculada; PC = peso corporal.

Tabela 2. Parâmetros hemodinâmicos invasivos de ratinhos $ace2^{-/y}$ de 6 meses de idade

	$ace2^{+/y}$	$ace2^{-/y}$
	N=8	N=8
Frequência cardíaca, bpm	303 $\pm$ 16	298 $\pm$ 8
PSS, mmHg	111,5 $\pm$ 2,4	91,6 $\pm$ 3,0
PSD, mmHg	70,5 $\pm$ 3,0	50,3 32,4**
PSM, mmHg	84,2 $\pm$ 2,8	64,0 $\pm$2,6**
PSSVE, mmHg	107,4 $\pm$ 4,5	87,5 $\pm$2,3**
PSDFVE, mmHg	5,5 $\pm$ 0,8	5,3 $\pm$ 0,7
dP/dT max	5579 $\pm$ 422	3034 $\pm$124**
dP/dT min	-5055 $\pm$ 257	-2929 $\pm$271**

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

PSS = pressão sanguínea sistólica; PSD = pressão sanguínea diastólica; PSM = pressão sanguínea arterial média; PSSVE = pressão sanguínea sistólica ventricular esquerda; PSDFVE = pressão sanguínea diastólica final ventricular esquerda; dP/dT_{max} = 1ª derivada máxima da alteração de pressão ventricular esquerda/tempo; dP/dT_{min} = 1ª derivada mínima da alteração de pressão ventricular esquerda/tempo

Tabela 3. Funções cardíacas de ratinhos nulos para ace e ace/ace2 de 6 meses de idade

	$ace^{-/-}$	$ace^{-/-} ace2^{-/y}$
	n=8	n=8
Frequência cardíaca, bpm	507 $\pm$ 17	491 $\pm$ 10
PA, mm	0,63 $\pm$ 0,01	0,65 $\pm$ 0,02
DDFVE, mm	3,86 $\pm$ 0,04	3,79 $\pm$ 0,07
DSFVE, mm	2,11 $\pm$ 0,04	2,13 $\pm$ 0,07
%FE	45,34 $\pm$ 1,11	43,95 $\pm$ 1,24
VPA, M/s	0,995 $\pm$ 0,064	0,931 $\pm$ 0,040
Vcef, circ/s	8,94 $\pm$ 0,25	8,40 $\pm$ 0,27

PA = espessura da parede anterior; DDFVE = dimensão ventricular esquerda final diastólica;

DSFVE = dimensão ventricular esquerda final sistólica; %FE = fracção de encurtamento percentual; VPA = velocidade de pico de fluxo aórtico de saída; Vcef = Velocidade de encurtamento de fibras circunferenciais.

REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um polipéptido de ACE2 ou de um ácido nucleico de ACE2, para a preparação de um medicamento para o tratamento de um estado de ACE2 diminuída seleccionado entre hipertensão, insuficiência cardíaca congestiva, insuficiência cardíaca crónica, insuficiência cardíaca aguda, enfarte do miocárdio, arteriosclerose, insuficiência renal ou uma doença pulmonar, num mamífero, em que a doença pulmonar é doença pulmonar obstrutiva crónica, pneumonia, asma, bronquite crónica, enfisema pulmonar, fibrose quística, doença pulmonar intersticial, hipertensão pulmonar primária, embolia pulmonar, sarcoidose pulmonar, tuberculose, edema pulmonar, ARDS ou cancro do pulmão.

2. Utilização de acordo com a reivindicação 1 em que o mamífero é um ser humano.

3. Utilização de uma quantidade eficaz de um transgene que codifica para ACE2 para a preparação de um medicamento para uma terapia génica para um estado de ACE2 diminuída seleccionado entre hipertensão, insuficiência cardíaca congestiva, insuficiência cardíaca crónica, insuficiência cardíaca aguda, enfarte do miocárdio, arteriosclerose, insuficiência renal ou uma doença pulmonar num paciente, em que a doença pulmonar é doença pulmonar obstrutiva crónica, pneumonia, asma, bronquite crónica, enfisema pulmonar, fibrose quística, doença pulmonar intersticial, hipertensão pulmonar primária, embolia pulmonar, sarcoidose pulmonar, tuberculose, edema pulmonar, ARDS ou cancro do pulmão.

4. Utilização de acordo com a reivindicação 3, em que o órgão afectado pela doença é o coração ou o rim ou o pulmão ou vasos sanguíneos.

5. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 ou 4, em que o transgene de ACE2 é preparado num vector de terapia génica.

6. Utilização de acordo com a reivindicação 5, em que o vector de terapia génica compreende um vector viral.

7. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 a 6, em que o paciente é um ser humano.

8. Método para o rastreio de um composto que é um agonista da actividade de ACE2, compreendendo:

- a. proporcionar: i) uma preparação purificada compreendendo ACE2, ii) um substrato, e iii) um composto de teste;
- b. misturar a referida ACE2 e o referido substrato sob condições tais que a referida ACE2 possa actuar sobre o referido substrato para produzir um produto, em que a referida mistura é realizada na presença e na ausência do referido composto de teste; e
- c. misturar directa ou indirectamente a quantidade do referido produto produzido na presença ou ausência do referido composto de teste,

caracterizado por o referido substrato ser angiotensina II.

9. Método de acordo com a reivindicação 8 em que o referido produto compreende Ang1-7.

10. Utilização de um polipéptido de ACE2 ou de um ácido nucleico de ACE2 para a preparação de um medicamento para o tratamento de hipertensão, insuficiência cardíaca congestiva, insuficiência cardíaca crónica, insuficiência cardíaca aguda, enfarte do miocárdio, arteriosclerose, insuficiência renal ou uma doença pulmonar num mamífero, em que a doença pulmonar é doença pulmonar obstrutiva crónica, pneumonia, asma, bronquite crónica, enfisema pulmonar, fibrose quística, doença pulmonar intersticial, hipertensão pulmonar primária, embolia pulmonar, sarcoidose pulmonar, tuberculose, edema pulmonar, ARDS ou cancro do pulmão.

Lisboa, 2009-02-25

Figura 1

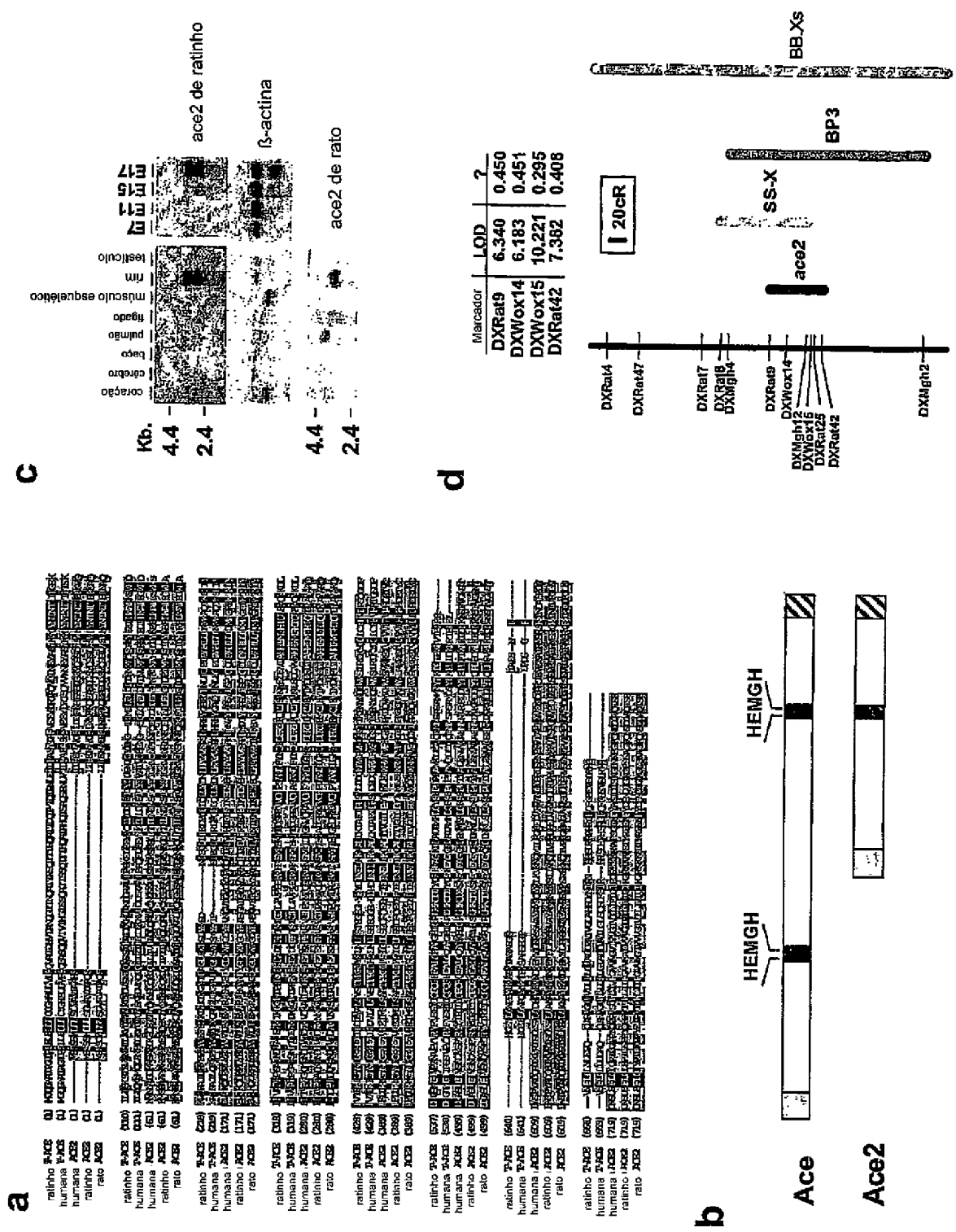
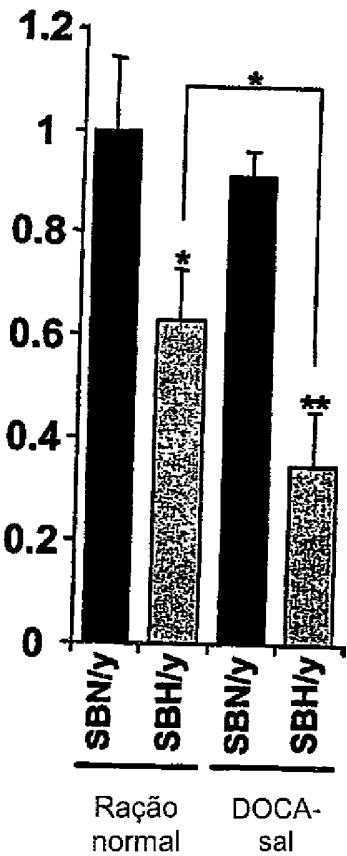
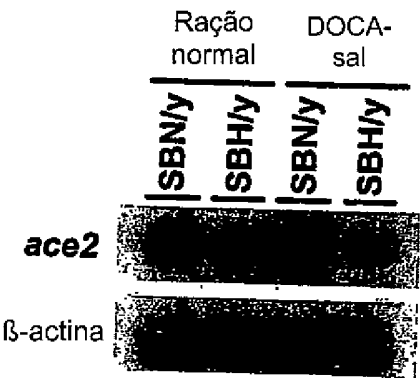


Figura 2a

a



b

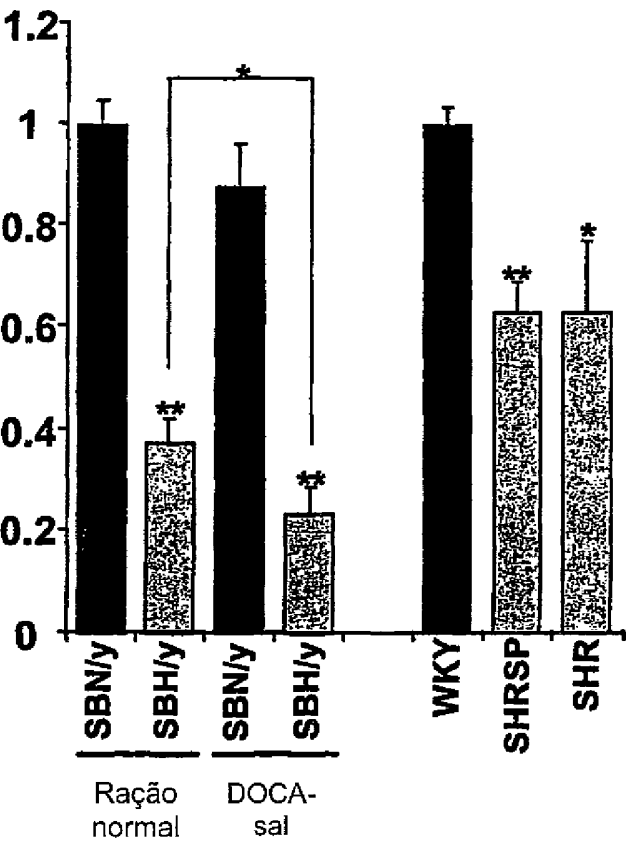
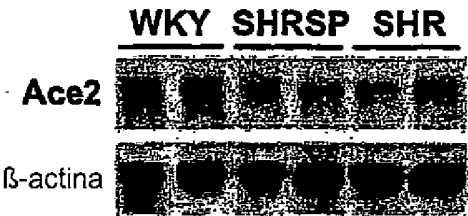
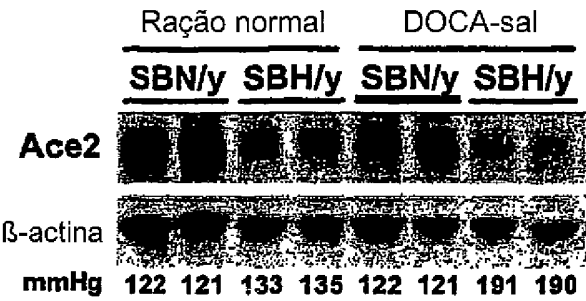


Figura 3a

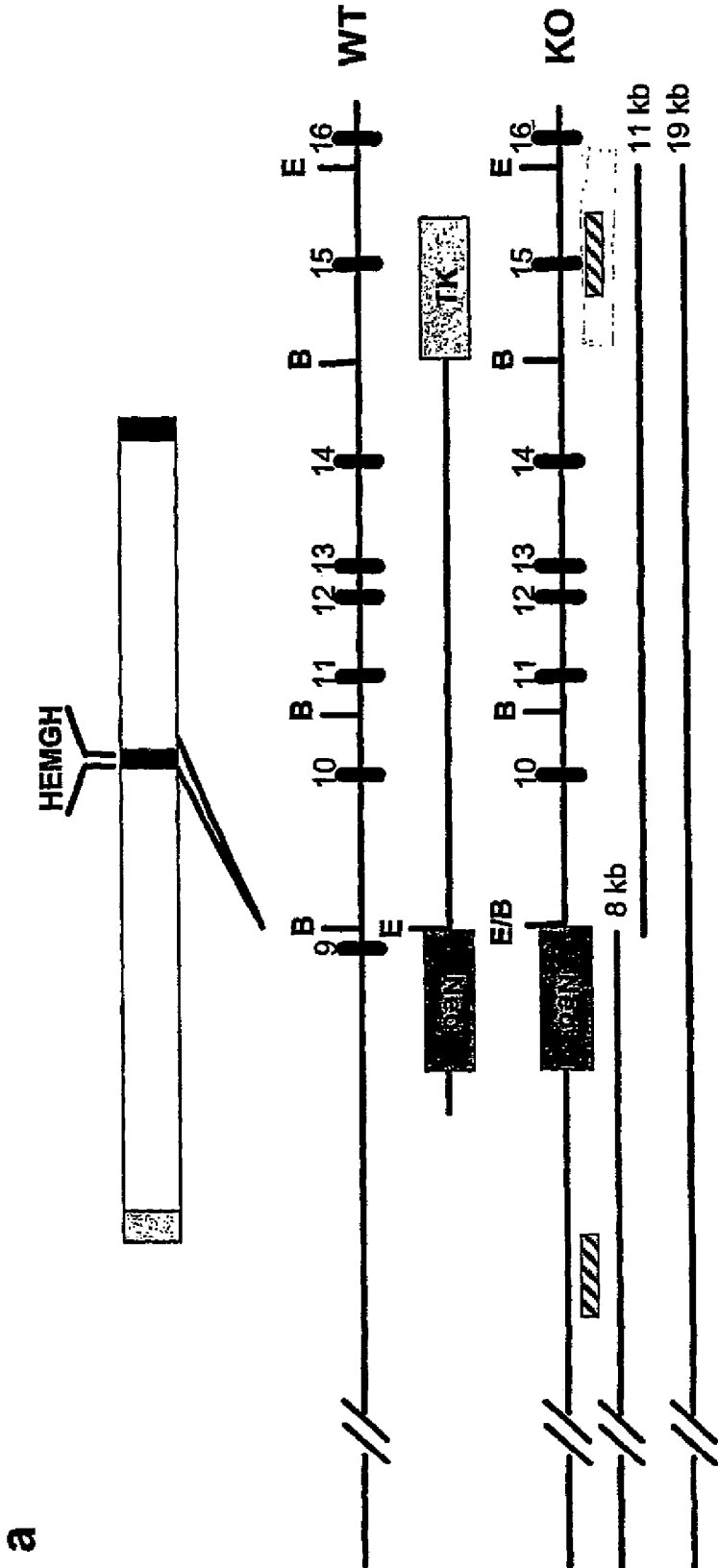


Figura 3b, 3c, 3d

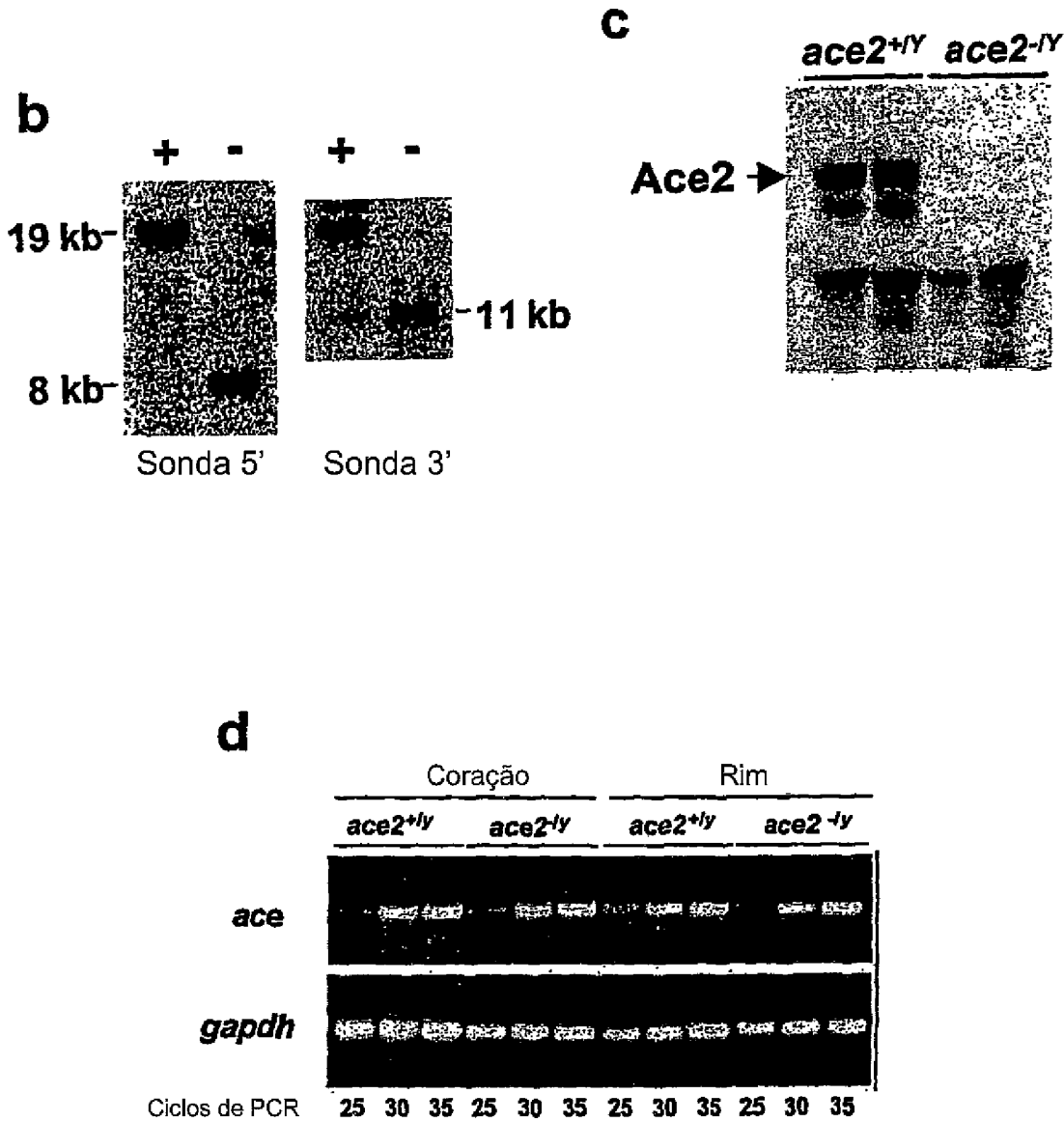


Figura 4a, 4b

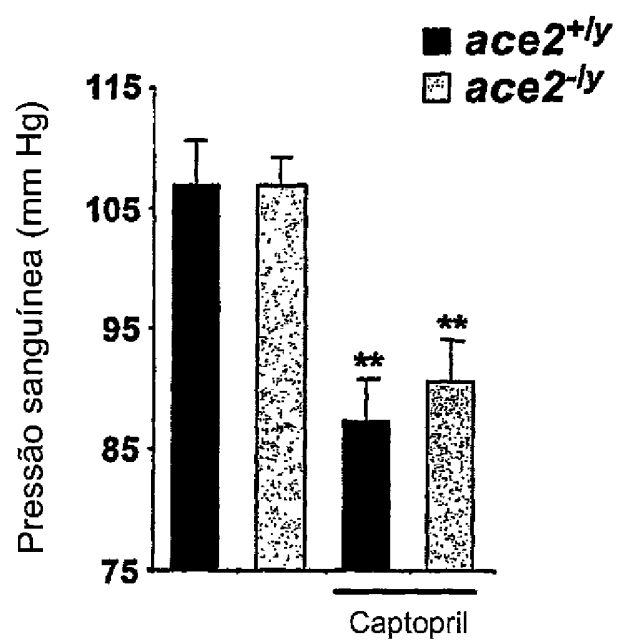
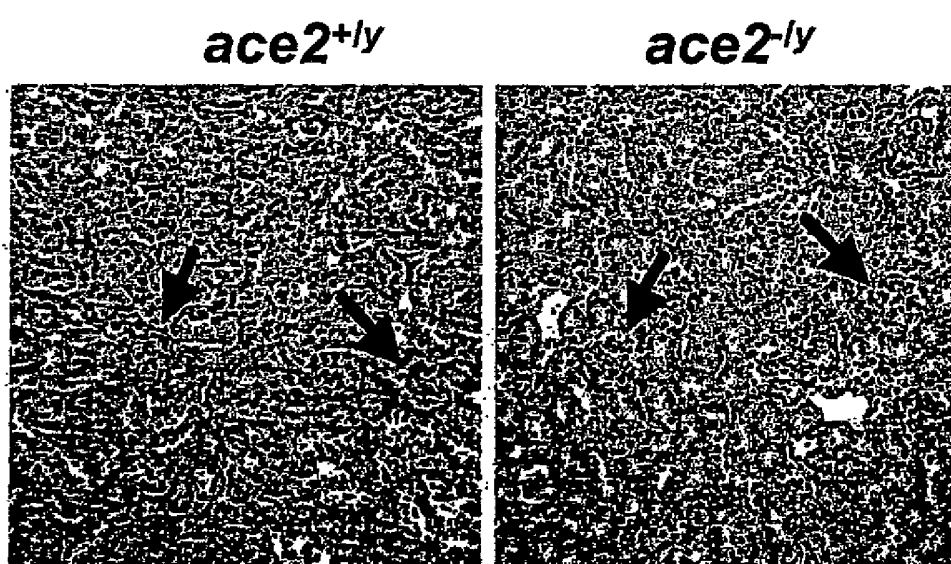
a**b**

Figura 5a, 5b

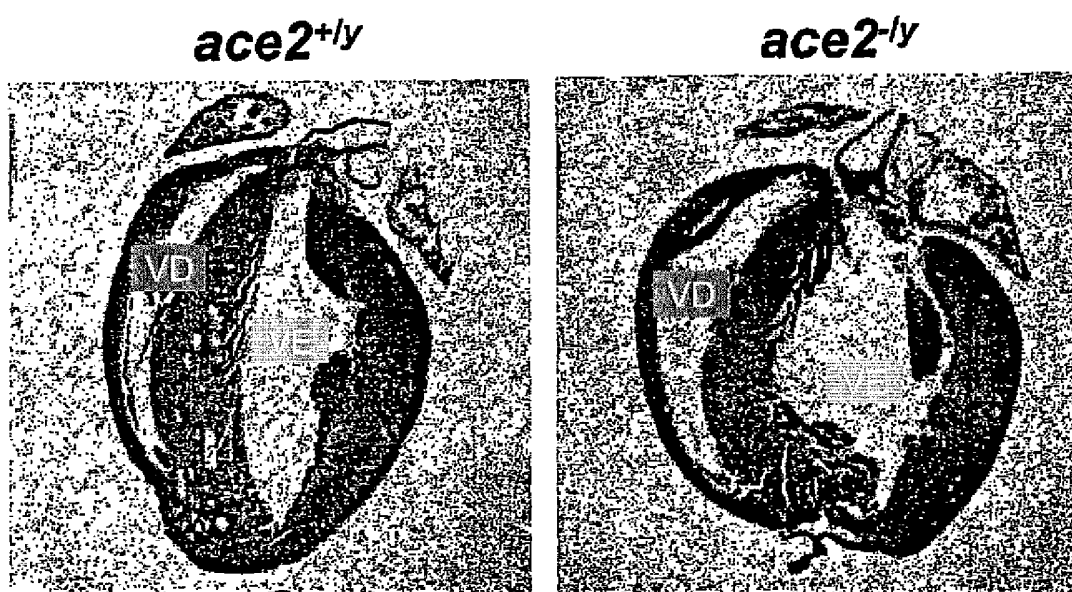
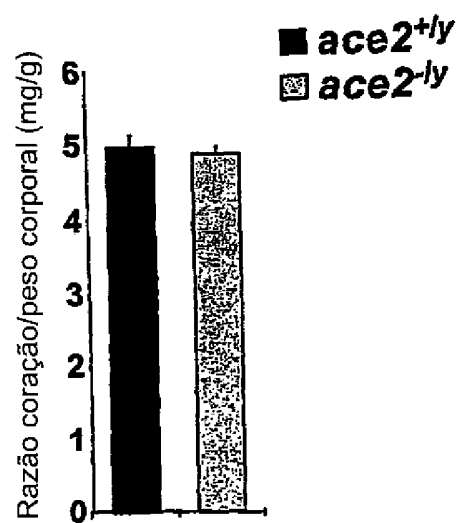
a**b**

Figura 5c, 5d

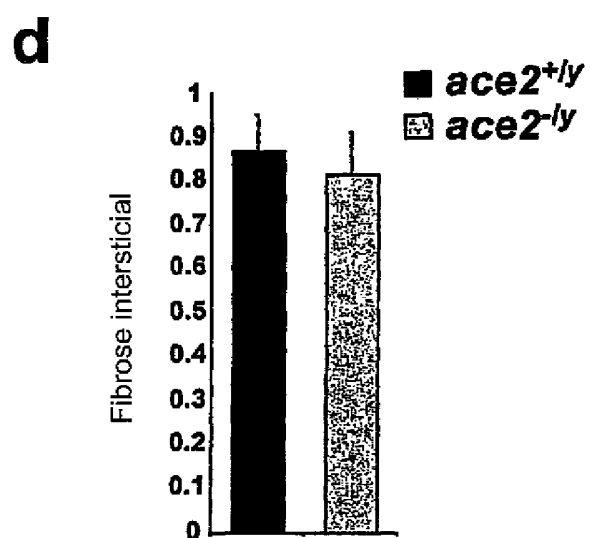
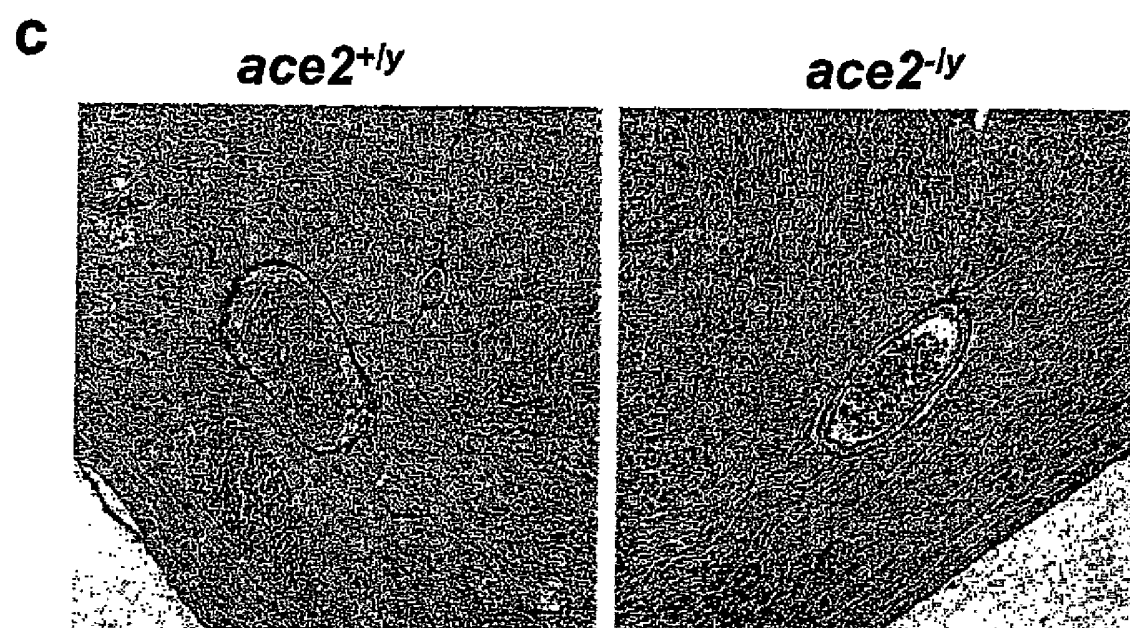


Figura 6a

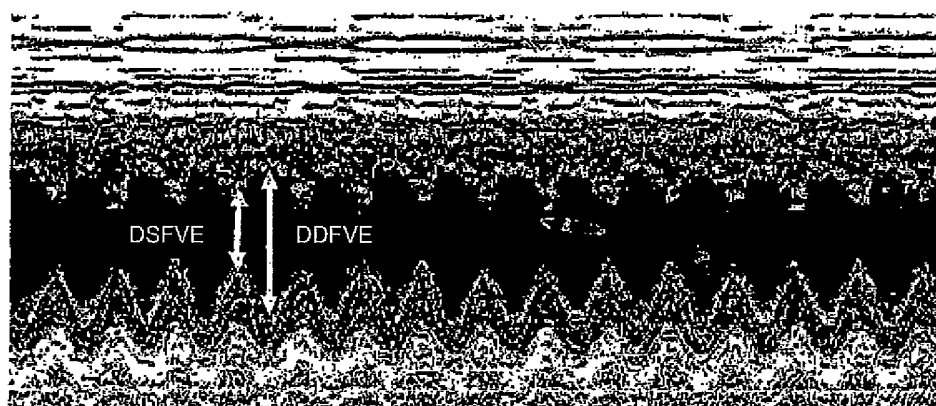
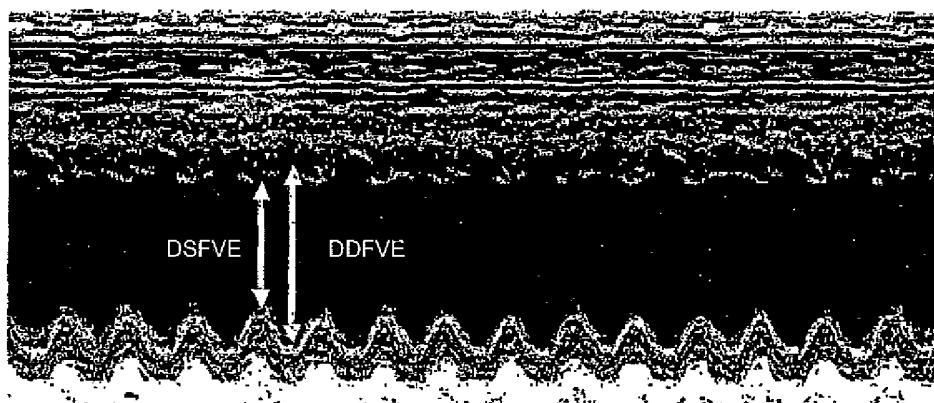
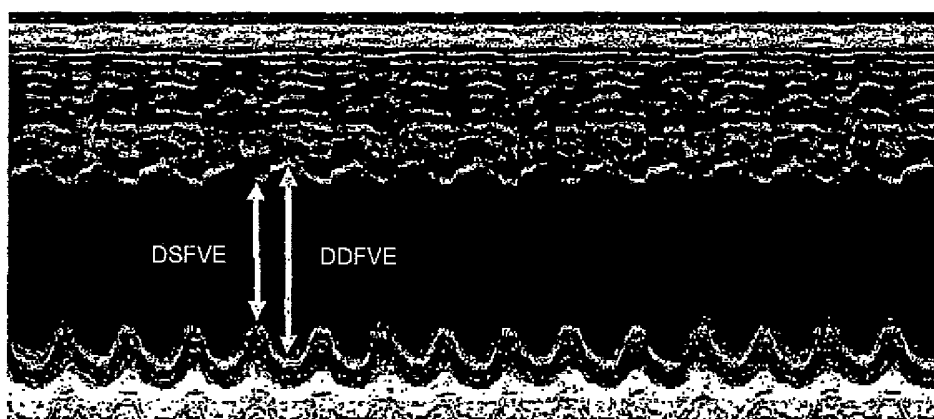
a***ace2^{+ly}******ace2^{-ly}******ace2^{-ly}***

Figura 6b, 6c

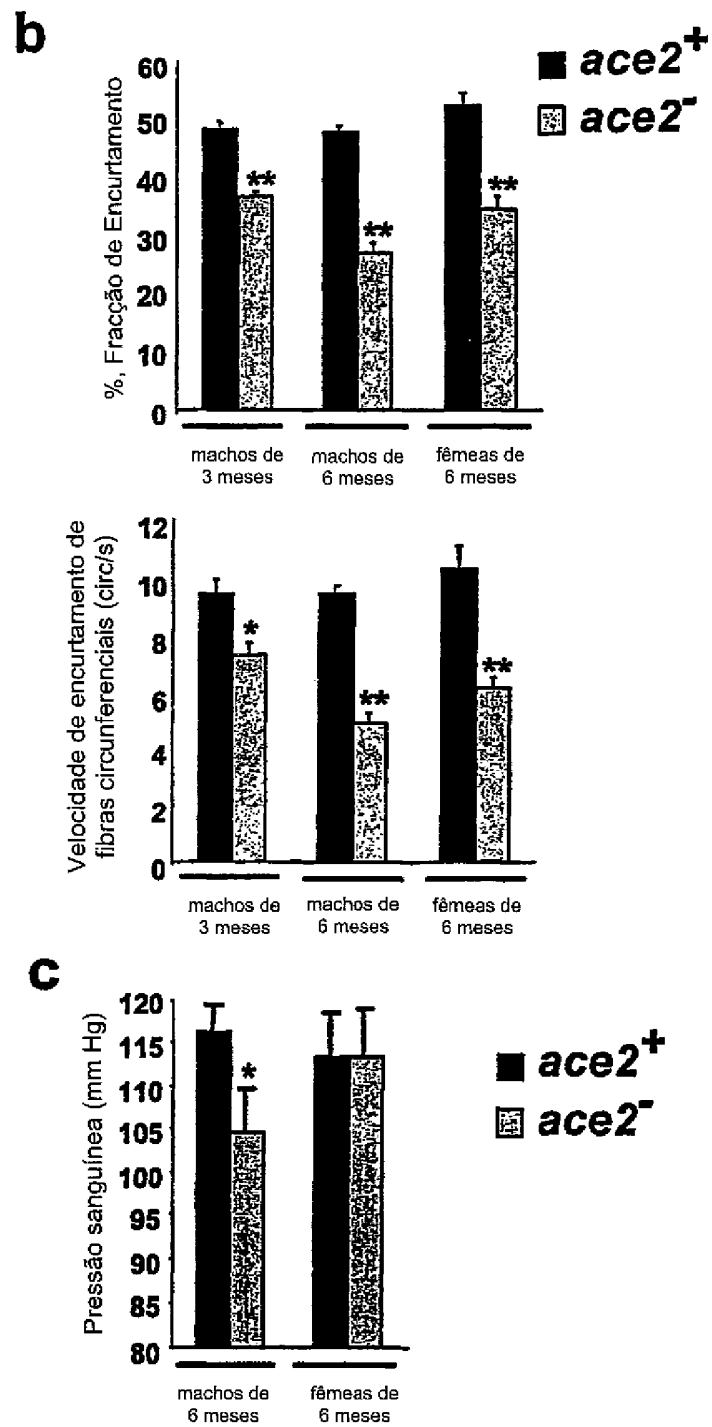
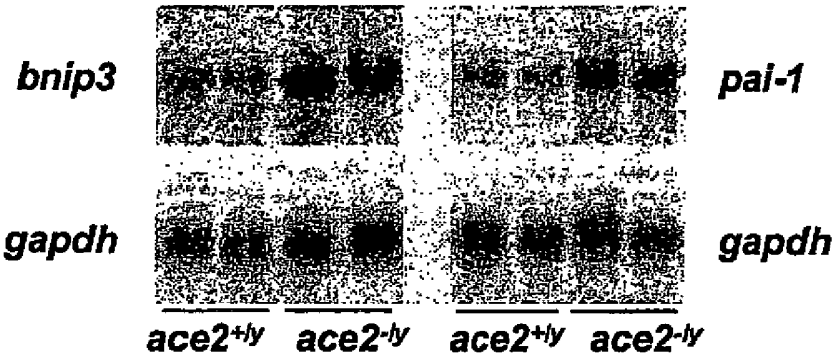


Figura 7a, 7b

a



b

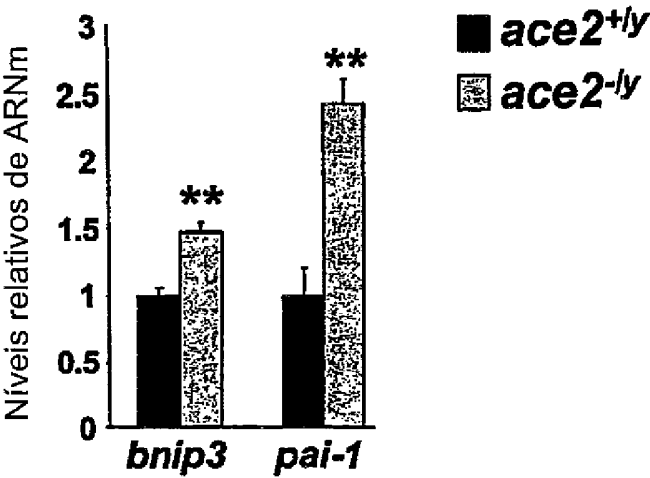


Figura 7c

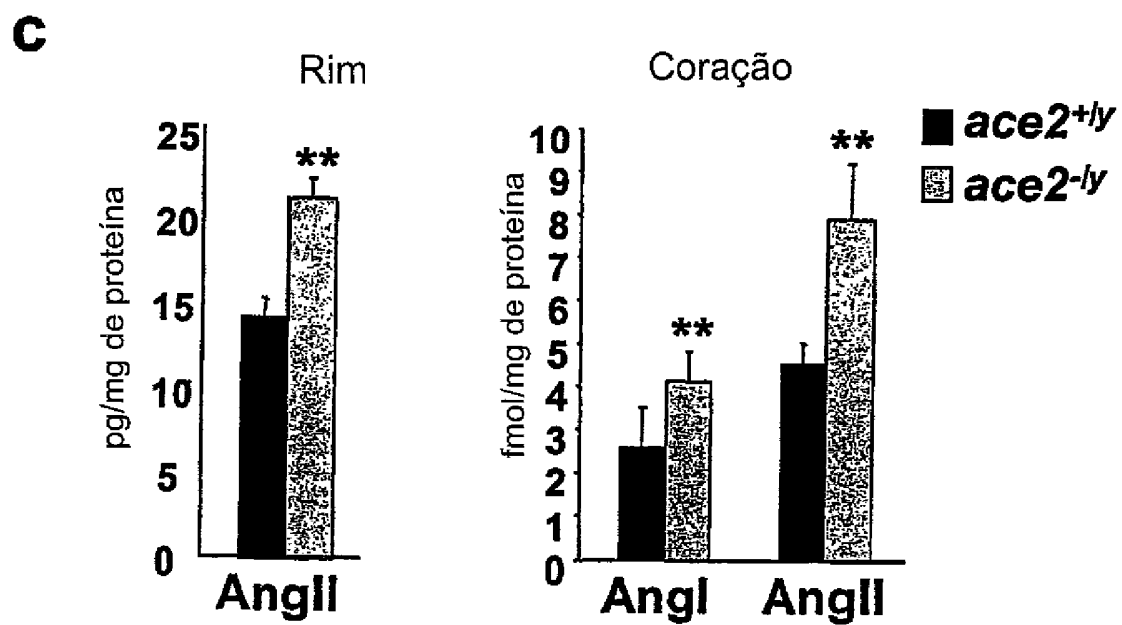


Figura 8a, 8b

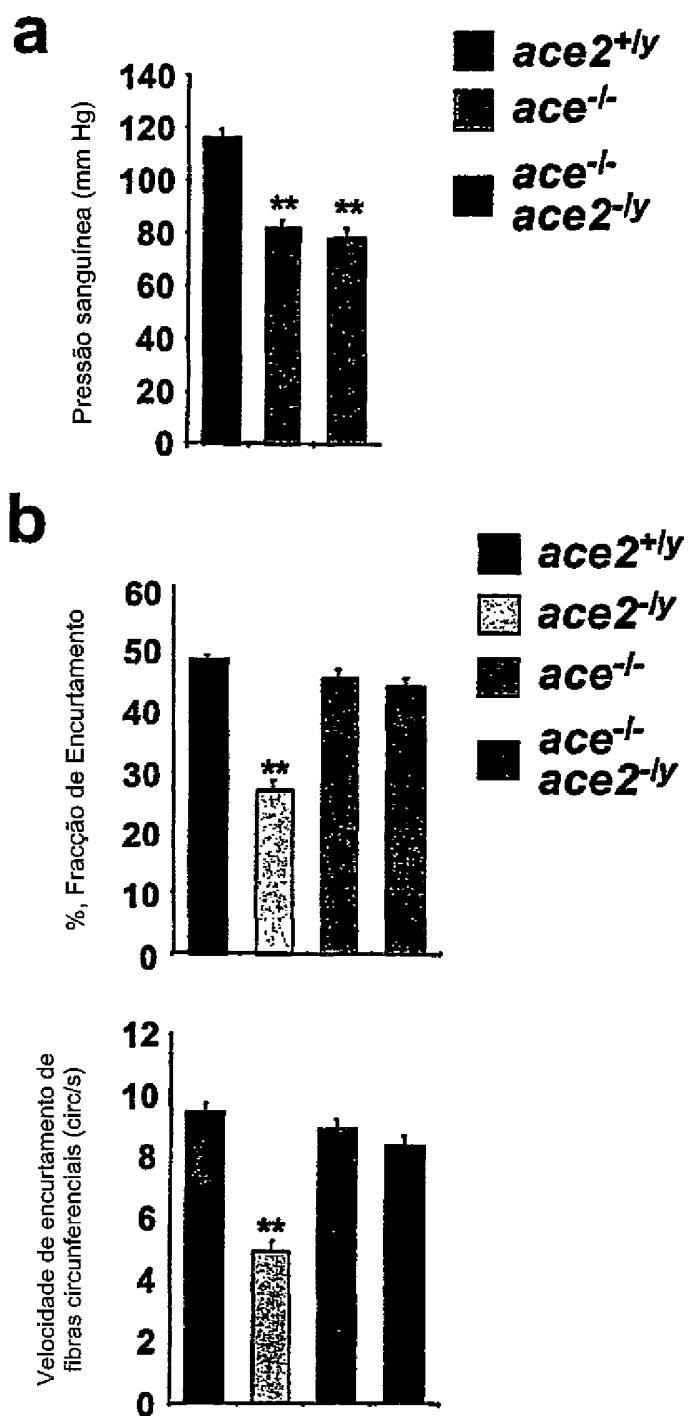


Figura 8c

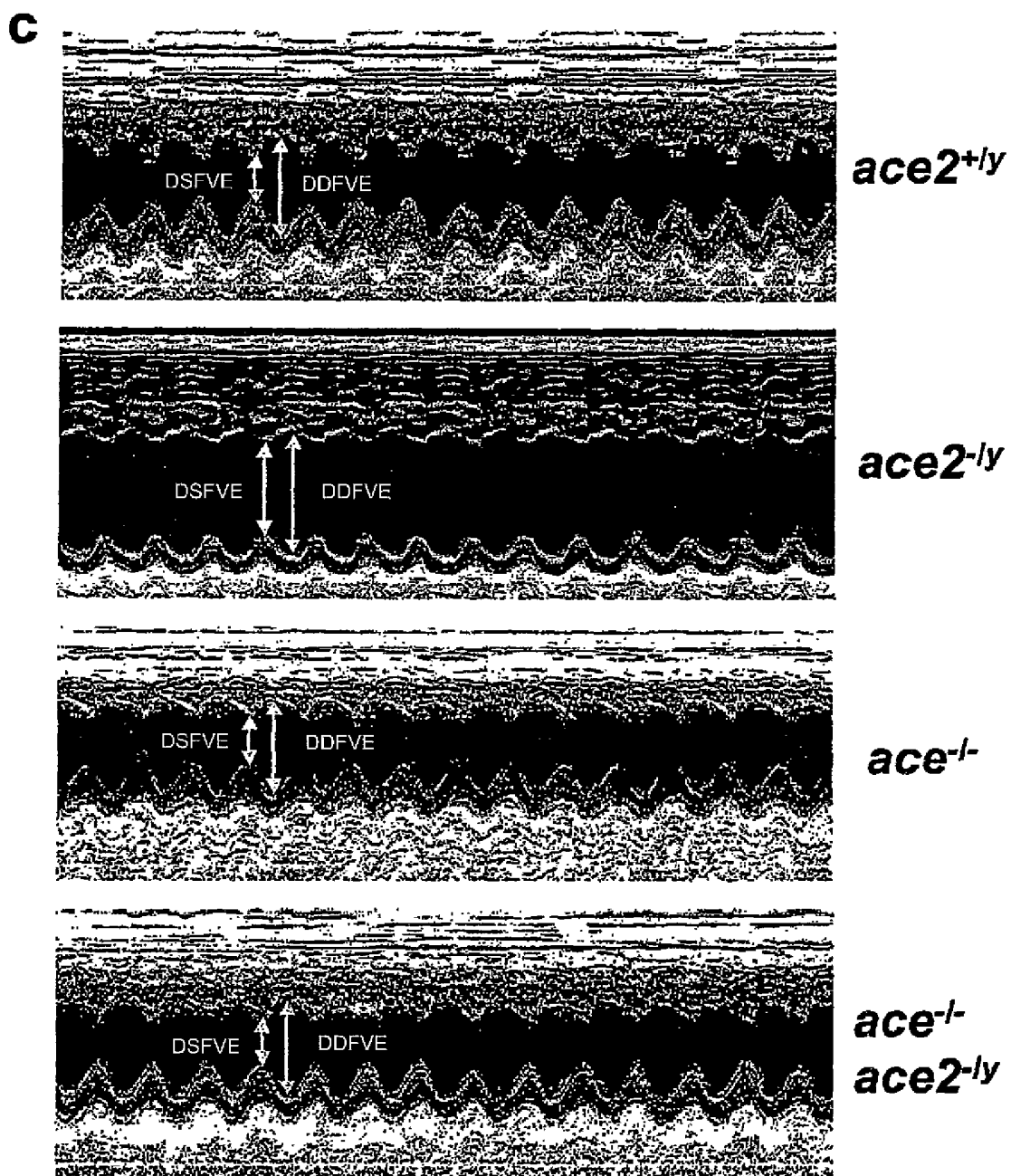


Figura 9

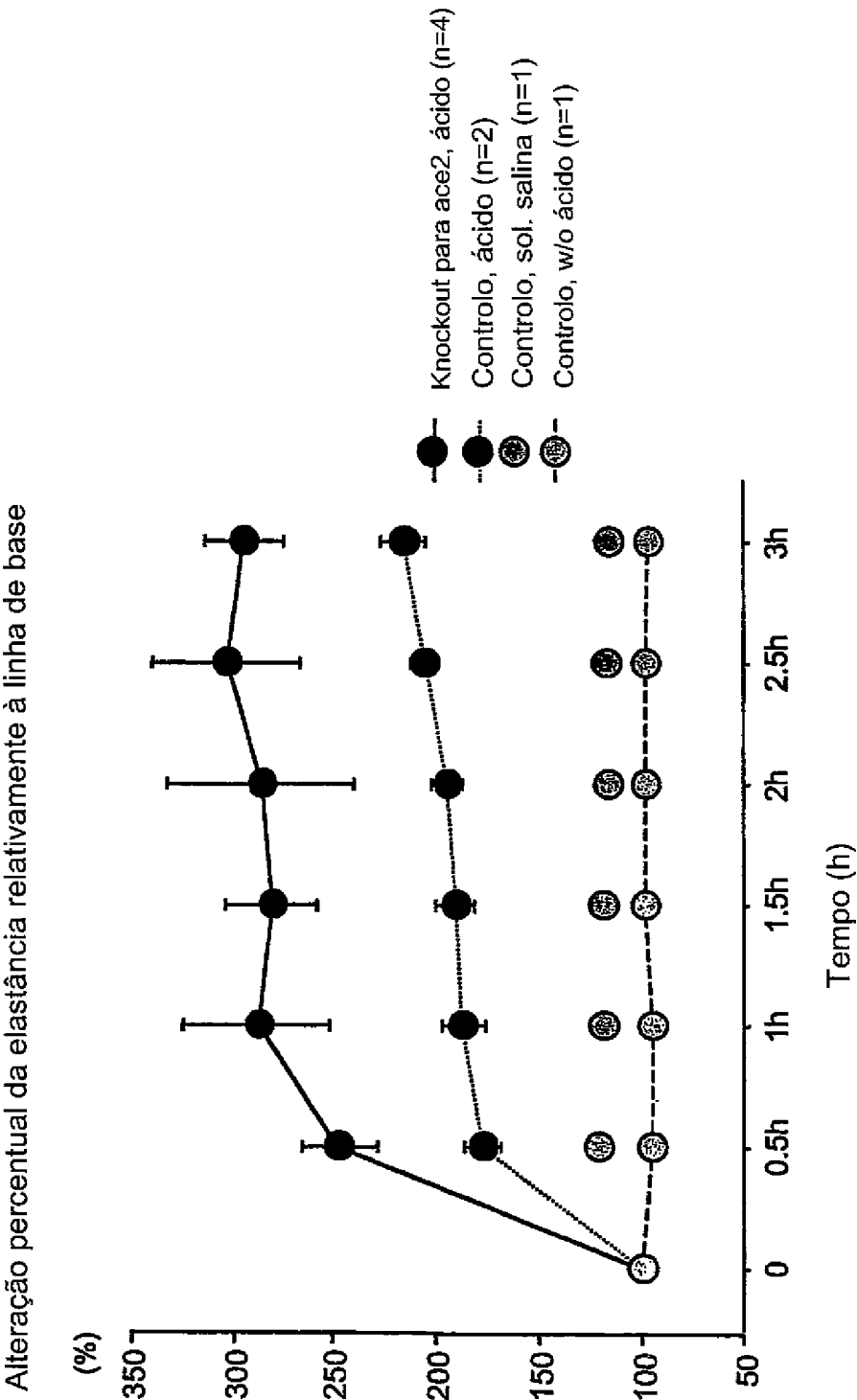


Figura 10a

```

1  cgcccaaccc aagttcaaag gctgataaga gagaaaatct catgaggagg ttttagtcta
61  gggaaagtca ttcaagtggat gtgatcttgg ctcacagggg acgatgtcaa gctcttcctg
121 gctccttctc agccttggtg ctgtaactgc tgctcagttcc accattgagg aacaggccaa
181 gacatttttg gacaagttta accacgaagc cgaagacctg ttctatcaaa gttcacttgc
241 ttcttgggaat tataacaoca atattactga agagaatgtc caaaacatga ataatgctgg
301 ggacaaatgg tctgcctttt taaaggaaca gtccacactt gcccaaatgt atccactaca
361 agaaattcag aatctcacag tcaagcttca gctgcaggct cttcagcaaa atgggtcttc
421 agtgctctca gaagacaaga gcaaacggtt gaacacaatt ctaaatacaa tgagcaccat
481 ctacagtact ggaaaagttt gtaaccacga taatccacaa gaatgcttat tacttgaacc
541 aggtttgaat gaaataatgg caaacagttt agactacaat gagaggctct gggcttggga
601 aagctggaga tctgaggtcg gcaagcagct gaggccatta tatgaagagt atgtggtctt
661 gaaaaatgag atggcaagag caaatcatta tgaggactat ggggattatt ggagaggaga
721 ctatgaagta aatggggtag atggctatga ctacagccgc ggccagtga ttgaagatgt
781 ggaacatacc tttgaagaga ttaaaccatt atatgaacat cttcatgcct atgtgagggc
841 aaagttgatg aatgcctatc cttcctatat cagtccaatt ggatgcctcc ctgctcattt
901 gcttggtgat atgtggggtg gattttggac aaatctgtac tctttgacag ttccctttgg
961 acagaadcca aacatagatg ttactgatgc aatggtggac caggcctggg atgcacagag
1021 aatattcaag gaggccgaga agttctttgt atctgttggg cttcctaata tgactcaagg
1081 attctgggaa aattccatgc taacggaccc aggaaatggt cagaaagcag tctgccatcc
1141 cacagcttgg gacctgggga agggcgactt caggatcctt atgtgcacaa aggtgacaat
1201 ggacgacttc ctgacagctc atcatgagat ggggcataat cagtatgata tggcatatgc
1261 tgcacaacct tttctgctaa gaaatggagc taatgaagga ttccatgaag ctggttgggga
1321 aatcatgtca ctttctgcag ccacaccta aacacttctg ctcaaacaag cactcacgat
1381 cgattttcaa gaagacaatg aaacagaaat aaacttctg ctcaaacaag cactcacgat
1441 tggtgggact ctgccattta cttacatggt agagaagtgg aggtggatgg tctttaaagg
1501 ggaaattccc aaagaccagt ggatgaaaaa gtggtgggag atgaagcgag agatagttgg
1561 ggtggtggaa cctgtgcccc atgatgaaac atactgtgac cccgcattct tgttccatgt
1621 ttctaataat tactcattca ttogatatta cacaaggacc ctttaccat tccagtttca
1681 agaagcactt tgtcaagcag ctaaacatga aggccctctg cacaaatgtg acatctcaaa
1741 ctctacagaa gctggacaga aactgttcaa tatgtgagg cttggaaaat cagaacctg
1801 gaccctagca ttggaaaatg ttgtaggagc aaagaacatg aatgtaaggc cactgctcaa
1861 ctactttgag cccttattta cctggctgaa agaccagaac aagaattctt ttgtgggatg
1921 gagtaccgac tggagtccat atggagacca aagcatcaaa gtgaggataa gcctaaaatc
1981 agctcttgga gataaagcat atgaatggaa cgacaatgaa atgtacctgt tccgatcatc
2041 tgttgcatat gctatgaggc agtacttttt aaaagtaaaa aatcagatga ttctttttgg
2101 ggaggaggat gtgcgagtgg ctaatttgaa accaagaatc tcctttaatt tctttgtcac
2161 tgcacctaaa aatgtgtctg atatcattcc tagaactgaa gttgaaaagg ccatcaggat
2221 gtcccgagc cgtatcaatg atgctttcog tctgaatgac aacagcctag agtttctggg
2281 gatacagcca acacttgga ctcctaacca gcccctgtt tccatatggc tgattgtttt
2341 tggagtgtg atgggagtga tagtggttgg cattgtcatc ctgatcttca ctgggatcag
2401 agatcggaag aagaaaaata aagcaagaag tggagaaaat ccttatgcct ccatcgatat
2461 tagcaaagga gaaaataatc caggattcca aaacactgat gatgttcaga cctcctttta
2521 gaaaaatcta tgtttttcct cttgaggtga ttttgttgta tgtaaagtgt aatttcatgg
2581 tatagaaaat ataagatgat aaagatatca ttaaatgtca aaactatgac tctgttcaga
2641 aaaaaaattg tccaaagaca acatggccaa ggagagagca tcttcattga cattgttttc
2701 agtatattat tctgtctctg gatttgaact ctgttctgtt tcttaataag gattttgtat
2761 tagagtatat tagggaaagt gtgtatttgg tctcacaggc tgttcaggga taatctaaat
2821 gtaaagtgtc gttgaatttc tgaagttgaa aacaaggata tatcattgga gcaagtgttg
2881 gatcttgtat ggaatatgga tggatcactt gtaaggacag tgctgggaa ctggtgtagc
2941 tgcaaggatt gagaatggca tgcattagct cactttcatt taatccattg toaaggatga

```

(continua na página seguinte)

Figura 10a - continuação

```

3001 catgctttct tcacagtaac tcagttcaag tactatggtg atttgctac agtgaatgtt
3061 ggaatcgatc atgctttctt caaggtgaca ggtctaaaga gagaagaatc cagggaaacag
3121 gtagaggaca ttgctttttc acttccaagg tgcttgatca acatctccct gacaacacaa
3181 aactagagcc aggggcctcc gtgaactccc agagcatgcc tgatagaaac tcatttctac
3241 tgttctctaa ctgtggagtg aatggaaatt ccaactgtat gttcaccctc tgaagtgggt
3301 acccagtctc ttaaattctt tgtatttgc cacagtgtt gagcagtgc gagcaciaag
3361 cagacactca ataatgcta gatttacaca ctcaaaaaa aaaaa

```

SEQ ID NO:1

Figura 10b

```

MSSSSWLLLSLVAVTAAQSTIEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQSSLASWNYNTNITEENVQNMNAGDKWSAFLKEQSTLAQMY
PLQETQNLTVKLQALQONGSSVLSEDKSKRLNTILNTMSTIYSTGKVCNPDNPQECILLEPGLNEIMANSLDYNERLWANE
SWRSEVGKQLRPLYEEYVVLKNEMARANHYEDYGDYWRGDYEVNGVDGYDYSRGQLIEDVEHTFEEKPLYEHLHAYVRALM
NAYPSYISPIGCLPAHLLGDMWGRFWTNLYSLTVPFGQKPNIDVTDAMVDQAWDAQRI FKEAEKFFVSVGLPNMTQGFWENSM
LTDPGNVQKAVCHPTAWDLGKGFRI LMCTKVTMDDEFLTARHEMGHIQYDMAYAAQPFLLRNGANEGFHEAVGEIMSLSAATP
KHLKSIGLLSPDFQEDNETEINFLLQALTI VGTLPFTYMLEKWRWMVFKGEI PKDQWMKKWEMKREIVGVVEFVPHDETYC
DPASLFHVSNDYSFIRYYTRTL YQFQFQEQALCOAAKHEGFLHKCDI SNSTEAGQKLFNMLRLGKSEFWTLALENVVGAKNMNV
RPLLNYFEPLFTWLKDQNKNSFVGWSTWSPYADQSIKVRISLKSALGDKAYEWNDNEMYLFRSSVAYAMRQYFLKVKNQMIL
FGEEDVRVANLKPRISFNFFVTAPKNVSDIIPRTEVEKAIRMSRSRINDAFRLNDNSLEFLGIQPTLGPPNQPPVSIWLFVFG
VVMGVIVVGIVILIFTGIRDKKKNKARS GENPYASIDISKGENNPGFQNTDDVQTSF

```

SEQ ID NO:2

Figura 11

```

1 catattgggtc cagcagcttg tttactgttc tcttctgttt cttctctctgc ttttttttttc
61 ttctctctctc agtgcccaac ccaagttcaa aggtgatga gagagaaaaa ctcatgaaga
121 gattttactc tagggaaagt tgctcagtgg atgggatctt ggcgacggg gaaagatgtc
181 cagctcctcc tggctccttc tcagccttgt tgctgttact actgctcagt ccctcacoga
241 ggaaaatgcc aagacatttt taaacaactt taatcaggaa gctgaagacc tgtcttatca
301 aagttcactt gcttcttgga attataatac taacattact gaagaaaatg cccaaagat
361 gagtggaggct gcagccaaat ggtctgcctt ttatgaagaa cagtctaaga ctgccc aaag
421 ttctcacta caagaaatcc agactccgat catcaagcgt caactacagg cccttcagca
481 aagtgggtct tcagcactct cagcagacaa gaacaaacag ttgaacacaa ttctgaacac
541 catgagcacc atttacagta ctggaaaagt ttgcaacca aagaacccac aagaatgctt
601 attacttgag ccaggattgg atgaaataat ggcgacaagc acagactaca actctaggct
661 ctgggcatgg gagggctgga gggctgaggt tggcaagcag ctgaggccgt tgtatgaaga
721 gtatgtggtc ctgaaaaacg agatggcaag agcaaaacat tataacgact atggggatta
781; ttggagaggg gactatgaag cagagggagc agatggctac aactataacc gtaaccagtt
841 gattgaagat gtagaacgta ccttcgcaga gatcaagcca ttgtatgagc atcttcagtc
901 ctatgtgagg aggaagttga tggataccta cccttcctac atcagcccca ctggatgcct
961 ccctgcccac ttgcttggtg atatgtgggg tagatttttg acaaactctgt accctttgac
1021 tgttcccttt gcacagaaac caaacataga tgttactgat gcaatgatga atcagggtctg
1081 ggatgcagaa aggatatttc aagaggcaga gaaattcttt gtttctgttg gcccttctca
1141 tatgactcaa ggattctggg caaactctat gctgactgag ccagcagatg gccggaaagt
1201 tgtctgccac cccacagctt gggatctggg acacgggagc ttcagaatca agatgtgtac
1261 aaaggtcaca atggacaact tcttgacagc ccatcacgag atgggacaca tccaatatga
1321 catggcatat gccaggcaac ctttcctgct aagaaacgga gccaatgaag ggttccatga
1381 agctgttggg gaaatcatgt cactttctgc agctacccc aagcatctga aatccatttg
1441 tcttctgcca tccgattttc aagaagatag cgaaacagag ataaacttcc tactgaaaca
1501 ggcattgaca attgttgga cactaccgtt tacttacatg ttagagaagt ggaggtggat
1561 ggtctttcgg ggtgaaattc ccaaagagca gtggatgaaa aagtgggtgg agatgaagcg
1621 ggagatcgtt ggtgtggtgg agcctctgcc tcatgatgaa acatactgtg accctgcac
1681 tctgttccat gtttctaatt attactcatt cattcgatat tacacaagga ccatttacca
1741 attccagttt caagaagctc tttgtcaagc agctaagtat aatgggtctc tgcacaaatg
1801 tgacatctca aattccactg aagctgggca gaagttgctc aagatgctga gtcttgaaa
1861 ttcagagccc tggaccaaag ccttggaata tgtggttaga gcaaggataa tggatgtaa
1921 accactgtc aattacttcc aaccgttgtt tgactggctg aaagagcaga acagaaattc
1981 ttttgtgggg tggaaactg aatggagccc atatgccgac caaagcatta aagtgaggat
2041 aagcctaaaa tcagctcttg gagctaagtc atatgaatgg accaacaacg aaatgttctt
2101 gttccgatca tctgttgcat atgccatgag aaagtatttt tcaataatca aaaaccagac
2161 agttcctttt ctagaggaag atgtacgagt gagtgatttg aaaccaagag tctccttcta
2221 cttctttgtc acctcacccc aaaatgtgtc tgatgtcatt cctagaagtg aagttgaaga
2281 tgccatcagg atgtctcggg gccgcacaa tgatgtcttt ggctgaatg ataacagcct
2341 ggagtttctg gggattcacc caacacttga gccaccttac cagcctcctg tcaccatatg
2401 gctgattatt tttggtgttg tgatggcact ggtagtgtt ggcatcatca tctgtattgt
2461 cactggcatc aaaggtcgaa agaagaaaaa tgaacaaaaa agagaagaga acccttatga
2521 ctgatgggac attggaaaag gagaaagcaa tgcaggattc caaaacagtg atgatgotca
2581 gacttctttt tagcaaaagc cttgtcatct tctgtatgt aaatgctaac ttcatagtac
2641 acaaaatatg agagtataca catgtcatta gctatcaaaa ctatgatctg ttcagtaaac
2701 gttgtccaaa gagcatcaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

```

SEQ ID NO:3

Referência Africano Am Asiático Caucasiano

rs879922	C(C/G)	60	100	70	C	TAACTTGAAGTCACAAACATATGTTCTTCACCTA[C/G]TAACCCAGT
rs757066	T(C/T)	100	100	70	T	CCTGAATTTGCTGGAGCTCAGTTT SEQ ID NO. 5
rs714205	C(C/G)	70	50	80	C	GTATCTCACCATCAGAAACACAGCTTGIG[C/T]JAGGATATTAGCTA
rs329442	C(A/C)	50	90	90	A/C	ATAAGTTTGTAAACat SEQ ID NO.8
rs233574	C(C/T)	80	100	60	C	CCATGAGTTCTAGCCAGACTTCTTCAACCAGCACCTGCTCC[C/G]TT
rs1978124	C(C/T)	90	100	50	C	TACCAGAGAGCATTCAGACCACAAAGATCC SEQ ID NO. 7
rs1978124-2new	G(G/A)	30	70	40	C	Acgggttcttbaaacttcatactagttatgtaaacctgcacatc[C/A]
rs1514282	A(A/G)	70	100	100	A	CACATATTGGAATATTCTGGTGTATCTTTGTATTAAATTTCTCAGTGGG
rs1514282-2(new)	A(A/G)	20	50	30	A	T SEQ ID NO.8
rs1514281	A(A/G)	70	100	100	A	Attgtccactgcctcctagcclaggtagacagagaagactc[C/T]
rs1514281-2(new)	A(A/G)	20	50	50	A	GTTTCAAAAAAAGAAATATACACC SEQ ID NO.9
rs1514279	A(A/G)	70	100	70	A	CCTTGGAACCTGTTTAAACCAAGCTTTTTTCCATATCTCTATCTGAT
rs1514280	C(C/T)	80	100	80	C	GGAC[C/T]TGTCCACACTTCTACATCAGCAGCTTTATGACAC SEQ ID
rs233575	C(C/T)	100	100	50	C	NO. 10
						CCTTGGAACCTGTTTAAACCAAGCTTTTTTCCATATCTCTATCTGAT
						GG[G/A]CCTCTCCACACTTCTACATCAGCAGCTTTATGACAC SEQ ID
						NO. 11
						AACACAGCAGTCACAAATGAATAATGCCAACCATTTATACATTTCCAC,
						ACTT[G/A]CAACTCAATTTCCAAATGGAGCTGTTGATGAACCTAATCTA
						GGTTGCAAGGCATGAAA SEQ ID NO. 12
						TTCTTGCCAAATATGATACTTTGCCCTTAAACACAGCAGTCACAAATG
						AATAAT[G/A]CCAACCATTTATACATTTCCACACTTACAACTCAATTTT
						CCAATGGAGCTGTTGATG SEQ ID NO.13
						GAAATCTTGCCAAATATGATAACTTTGCCCTTAAACACAGCAGTCACA
						AATGAATAAATGCA[G/A]ACCATTTATACATTTCCACACTTACAACTCA
						ATTTCCAATGGAGCTGTTGATGAA SEQ ID NO. 14
						GAAATCTTGCCAAATATGATAACTTTGCCCTTAAACACAGCAGTCACA
						AATGAATAAATGCA[G/A]ACCATTTATACATTTCCACACTTACAACTCAA
						TTTTCCAATGGAGCTGTTGATGAA SEQ ID NO. 15
						ATAGTCACATAAATGTAITGCACCAGGTACTATGCT[G/A]TATCTTATAT
						GATGGTCTTTATGAAATATCTG SEQ ID NO. 16
						GTTTACAAAGTGTATTTTCAATTTGAA[C/T]GTCAAGTTTTTCTTTTACA
						CTTATAGATAAGTACATTTT SEQ ID NO.17
						GTGCTACCTCCAAATGCCAAATACCTTTTATTTTGGAAATA[C/T]
						TACTATAGAGAGACTTGGTCATAGGACCTGATTCATT SEQ ID NO. 18

Figura 12