



Señor

SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. _____ S. _____ D. _____

Re: PI.-APEIRON BIOLOGICS AG.-Solicitud de Patente de Invención en Fase Nacional PCT para "POLIPÉPTIDO ECA-2 RECOMBINANTE DIMÉRICO".-Clase C12N 9/64.-Expediente número 10-001.879.-

Yo, **ALICIA LLORED A RICAURTE**, mayor de edad, vecina de esta ciudad, identificada con la cédula de ciudadanía número 39.690.713 de Usaquén, Representante Legal en Bogotá para todos los asuntos relacionados con la Propiedad Industrial de la sociedad **APEIRON BIOLOGICS AG**, organizada y existente de conformidad con las leyes de Austria, domiciliada en Viena, Austria, atentamente manifiesto a usted que interpongo **RECURSO DE REPOSICIÓN** contra la Resolución Número **27349**, dictada por el señor Superintendente de Industria y Comercio el 10 de Mayo de 2013, en relación con la negación del privilegio de patente de invención para la solicitud en referencia, por una supuesta falta de **Nivel Inventivo** de dicha solicitud.

I. FUNDAMENTOS DE DERECHO

Me permito manifestar ante ese Despacho que el mencionado Recurso de Reposición encuentra fundamento en que el contenido de la Resolución Número **27349** evidencia que durante el examen técnico realizado a la solicitud denegada de ninguna manera se consideró en su verdadera dimensión el alcance e importancia del polipéptido ECA-2 recombinante dimérico que es objeto de la invención allí reclamada.

Es así que, a pesar de los argumentos proporcionados por el solicitante en el memorial de Enero 10 de 2013 que fue presentado en respuesta al Oficio No.

18307, en la Resolución impugnada ese Despacho mantiene las objeciones frente al Nivel Inventivo de la solicitud.

En vista de lo anterior, a continuación me permito brindar argumentos técnicos que no sólo demostrarán a ese Despacho que la presente invención sí cumple con el requisito de Nivel Inventivo exigido por el Artículo 18 de la Decisión 486 de 2000, sino que además establecerán que el análisis realizado es incorrecto, toda vez que se interpreta de manera errónea tanto la invención como el arte previo; constituyéndose por lo tanto la negación de la solicitud en una clara violación al mencionado Artículo 18 de la Decisión Andina 486 de 2000.

1. **Argumentos que demuestran el nivel inventivo de la invención denegada de acuerdo con lo establecido en el Artículo 18 de la Decisión Andina 486 de 2000**

En relación con el nivel inventivo de la presente solicitud me permito manifestar que esa Oficina no repara en los argumentos que fueron presentados en mi memorial de 10 de Enero de 2013, los cuales establecen de forma incontrovertible el nivel inventivo que conlleva la solicitud denegada frente al estado del arte más próximo, y por lo tanto ese Despacho afirma en la Resolución impugnada que el polipéptido ECA-2 dimérico de la reivindicación 1 de la solicitud resultaría obvio a la luz de la combinación de las enseñanzas de los documentos **US 20050147600 (D1)** y Kost O. A. et al., "New feature of angiotensin-converting enzyme: carbohydrate-recognizing domain", **J. Mol. Recognit., 2000, Vol. 13, No. 6, pp. 360-369 (D2)**.

Respecto al documento D1 ese Despacho señala que esta referencia revela péptidos ECA-2 (enzima convertidora de angiotensina) en donde la SEQ ID No. 2 de los mismos es idéntica a la SEQ ID No. 1 del polipéptido de la presente solicitud (Párr. [0011] de D1), y que dicho polipéptido puede estar o no glicosilado (Párr: [0019] y [0138] de D1).

A lo anterior, el señor Examinador añade que *"El documento D1 sugiere que dicho polipéptido ECA-2 puede ser modificado químicamente para crear derivados de ECA-2 que formen agregados, dentro de dichas modificaciones se menciona la glicosilación."*

Así las cosas, ese Despacho sostiene que *"La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 1 y el método para obtener polipéptidos divulgado en el*

documento D1 consiste en que la solicitud se refiere específicamente a que dichos polipéptidos ECA-2 son dímeros." (Sic).

En conexión con lo anterior, el señor Examinador asegura que *"el documento D2 divulga que el estado natural de las enzimas convertidoras de angiotensina es dimérico y que dicha dimerización es dependiente de la glicosilación del péptido (Pág. 361 Col. izquierda Párr. [002])."*

Continuando con su análisis el señor Examinador afirma que *"Una persona de nivel medio versada en la materia se vería motivada a controlar la glicosilación de ECA-2 por medio de la glicosilación del péptido tal como se divulga en el documento D2, puesto que ECA y ECA-2 son proteínas homologas."* Para soportar su afirmación de la homología entre ECA y ECA-2 el señor Examinador indica el documento *"The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. Trends Pharmacol. Sci. 2002 Apr; 23(4): 177-83. Pág. 178 último Párr."*

Finalmente esa Oficina concluye que *"la persona del oficio normalmente versada en la materia, se vería motivada a controlar la glicosilación de ECA-2 como se divulga en el documento D2 y aplicarlo en el procedimiento de obtención de péptidos ECA-2 como lo divulga el documento D1 para llegar así al objeto de la reivindicación 1 de la solicitud. Las reivindicaciones dependientes 2 a 25 no mencionan alguna característica que confiera nivel inventivo a la molécula de la reivindicación 1, por lo cual se considera que no cumplen con el requisito de nivel inventivo."*

Visto lo anterior y con el ánimo de demostrar que el polipéptido ECA-2 recombinante **dimérico** objeto de la solicitud en cuestión presenta un inequívoco carácter inventivo frente a la combinación de las enseñanzas de los documentos D1 y D2, atentamente me permito presentar las siguientes consideraciones técnicas:

- Para comenzar, de manera respetuosa me permito dirigir la atención de ese Despacho al hecho que el señor Examinador parecer no haber identificado las diferencias que existen entre ECA y ECA-2.

En este sentido, me permito manifestar que ECA y ECA-2 son dos proteínas separadas y distintas, que aunque tienen algo de homología en sus secuencias tienen actividades muy diferentes y hasta pueden tener un impacto fisiológico contrario entre sí.

Para demostrar lo anterior me permito dirigir la atención de esa Oficina al documento de Imai et al.¹ que se adjunta al presente escrito. En dicha referencia se muestra un número de comparaciones entre ECA y ECA-2 en cuanto a sus funciones y su impacto fisiológico.

El hecho que ECA-2 sea un homólogo de ECA se encuentra en la página 112 del documento de Imai (columna izquierda). No obstante, **el documento de Imai muestra que ECA y ECA-2 tienen actividades diferentes** (véase la columna izquierda de la página 113) **e incluso funciones fisiológicas inversas en lesión pulmonar** (véase la columna izquierda de la página 115).

Por lo tanto la persona versada en la materia reconocerá que aun cuando ECA y ECA-2 son homologas es a todas luces evidente que es técnicamente incorrecto afirmar que ECA y ECA-2 sean lo mismo o que puedan ser intercambiables entre sí, toda vez que sus actividades pueden ser diferentes e incluso sus funciones fisiológicas pueden ser inversas entre sí tal como lo demuestra el documento de Imai.

▪ Por otro lado, me permito señalar que de la lectura atenta del documento D1 se encuentra que tal documento únicamente hace referencia a agregados en el párrafo [0206] de la página 21, el cual dice:

*"Los polipéptidos ECA-2 también pueden ser químicamente modificados para crear derivados de ECA-2 mediante la formación de conjugados covalentes o agregados con **otras fracciones químicas**, tal como grupos glicosil, lípidos, fosfato, grupos acetilo y similares. Derivados covalentes de proteínas ECA-2 pueden ser preparados por la unión de fracciones químicas a grupos funcionales sobre cadenas laterales de aminoácidos de la proteína o en el N-terminal o en el C-terminal del polipéptido."* (Énfasis añadido)

Este párrafo de D1 especifica que los conjugados se forman con **otras fracciones químicas**, es decir con **moléculas diferentes a la molécula de ECA-2**. Las "otras fracciones" son especificadas como grupos glicosilo.

Consecuentemente, es evidente que D1 no revela ni sugiere la existencia de ECA-2 como una estructura dimérica y mucho menos hace mención alguna sobre la posibilidad de hacer tales moléculas diméricas de

¹ Imai Y. et al., "Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure", Nature, Vol. 436, 7 de Julio de 2005, pp. 112-116.

ECA-2, por lo tanto la persona medianamente versada en la materia no encontraría en el documento D1 ninguna motivación que lo condujera de manera obvia a la obtención del polipéptido ECA-2 recombinante dimérico que es objeto de la presente invención.

Del mismo modo, **salta a la vista que el documento D1 es completamente silencioso sobre las propiedades mejoradas que tiene el polipéptido ECA-2 objeto de la solicitud denegada en cuanto al aumento de su solubilidad y su disponibilidad en soluciones fisiológicas y la mejora en su actividad enzimática, tal y como se evidencia en la figura 20 de la solicitud en cuestión. Por lo tanto la persona versada en la materia tampoco podría haber deducido de manera evidente tales propiedades del polipéptido ECA-2 dimérico a partir de las enseñanzas de D1.**

Por otro lado, la persona versada en la materia reconocerá que en el caso de un agregado es difícil de controlar la estequiometría de agregación y por lo tanto se utiliza el término agregado en vez de dímero, trímero, pentámero, etc lo que no es lo mismo que presentar un dímero.

- Con relación al documento D2, me permito resaltar que esta referencia divulga un estudio sobre la estructura de la enzima ECA pero es completamente silenciosa en cuanto a ECA-2.

Además, la persona versada en la materia reconocerá de la atenta lectura de D2 que a partir de este documento no se puede establecer que su enseñanza sea que *"el estado natural de las enzimas convertidoras de angiotensina es dimérico"* tal como lo manifiesta el señor Examinador en la Resolución impugnada, en cambio, se evidencia que no existe ninguna enseñanza clara en D2 de que ECA exista naturalmente como un dímero o que hayan beneficios de la forma dimérica.

En conexión con lo anterior, el documento D2 enseña que generalmente *"las proteínas de membrana tienden a construir estructuras supramoleculares como homo- y heterocomplejos"* (véase la columna derecha de la página 360 de D2), y que *"ECA de pulmón de bovino puede ser detectado en micelas reversas, no solo como un monómero sino también como un homodímero"* (véase la columna izquierda de la página 361 de D2).

En este sentido me permito señalar que las micelas reversas es uno de los muchos modelos pensados para tener propiedades que asemejen el ambiente biológico celular (véase la columna derecha de la página 360 de D2).

Así las cosas, para ECA de bovino, existe la posibilidad de que pudieran existir tanto ECA monomérico como ECA dimérico.

- Sumado a lo anterior, el documento D2 también compara ECA aislado de pulmón bovino y riñón humano. En las secciones de Resultados y Discusión se reconoce que ha sido demostrado que las formas monoméricas, agregadas y diméricas existen en diferentes condiciones, véase la columna derecha de la página 362 de D2 en donde se revela que:

"En soluciones acuosas, el ECA purificado normalmente se comporta como un monómero (Miska et al., 1988; Meng et al., 1989; Naim, 1992), pero en extractos crudos (Lanzillo et al. 1985) o en soluciones concentradas (Bull et al., 1985) el ECA también fue encontrado en agregados. Además, fueron reportados ECAs de varias fuentes (Ripka et al., 1993) que se comportaban como homodímeros en electroforesis bajo condiciones no desnaturalizantes. Nosotros también demostramos la capacidad de ECA bovino de formar un dímero en un sistema de micela reversa" (énfasis añadido).

Adicionalmente, en los experimentos de D2 se *"probó que solo el ECA monomérico realmente ocurre en los grados de hidratación menores de 30 (micelas pequeñas), mientras que la capacidad de ECA para formar el dímero puede ser apreciada en micelas grandes"*, véase la columna derecha de la página 362 de D2. **Por lo tanto, incluso en los sistemas de micelas investigados en D2, la existencia de ECA monomérico o dimérico dependió del tamaño del sistema de micela.**

Aunado a lo anterior, el documento revela que la dimerización de ECA es independiente de sialilación al señalar que *"Asialo-ECA se comporta tanto como un monómero como un dímero, mostrando que la sialilación no es crucial para la interacción ECA-ECA"*, véase la columna izquierda de la página 363 de D2. En contraste, cuando ECA de bovino es parcialmente deglicosilada, esta funciona en las micelas reversas preferiblemente en forma monomérica.

- No obstante las revelaciones del documento D2, los mismos realizadores de D2 concluyen que **"hay razones insuficientes incluso para la afirmación que**

las moléculas de ECA forman dímeros en una membrana celular real, es decir, esta CRD es para el autoreconocimiento ECA-ECA. Es posible que sea necesario el CRD para la unión de cadenas de carbohidratos de otros glicoconjugados, por ejemplo para la formación de ensamblajes supramoleculares complejos dentro de biomembranas y para la participación de la enzima en el reconocimiento del ligando por la superficie celular" (énfasis añadido, columna izquierda de la página 368 de D2).

Consecuentemente, la persona versada en la materia reconocerá que el propio documento D2 concluye por sí mismo que no existe ninguna certeza sobre el estado natural de ECA, pudiendo esta ser monomérica, dimérica o agregada. Asimismo D2 tampoco proporciona alguna conclusión sobre si alguno de estos estados podría ser aplicable a ECA-2 pues D2 no hace absolutamente ninguna mención sobre ECA-2.

Sumado a lo anterior, para la persona versada en la materia saltará a la vista que el documento D2 no revela ni sugiere algún beneficio sobre la presencia de una estructura dimérica frente a una monomérica.

Así las cosas, la persona versada en la materia reconocerá con relación a la combinación de las enseñanzas de D1 y D2, teniendo en cuenta las diferencias que existen entre ECA y ECA-2 en cuanto a sus actividades y funciones fisiológicas pese a su homología estructural, que:

(a) un técnico medianamente versado en la materia no tendría ninguna motivación para creer que el estado natural de ECA-2 es en forma de dímero y mucho menos a partir de D1 y D2 dicha persona podría tener una expectativa razonable de éxito en la obtención del polipéptido ECA-2 en forma dimérica, y esto debido a que a pesar que las dos proteínas comparten alguna homología estas dos proteínas tienen especificidades catalíticas diferentes y funciones fisiológicas diferentes, a lo que se suma que (i) el documento D2 ni siquiera concluye que ECA exista naturalmente como un dímero, lo que impide aún más que la persona medianamente versada en la materia pudiera esperar de manera obvia que ECA-2 exista naturalmente como un dímero; y que (ii) D1 no proporciona ninguna motivación para mirar a los agregados de ECA-2 por encima de cualquiera del gran número de posibles opciones de derivados de ECA-2, a lo que se suma el hecho que D1 no hace ninguna mención de la posibilidad de una forma dimérica.

(b) Además, cuando se toman en consideración las enseñanzas de D2 es claro que esta referencia no proporciona ninguna conclusión clara sobre el estado natural de ECA y por lo tanto mucho menos puede existir a partir de sus enseñanzas una expectativa razonable de que la ECA-2 fuera un dímero en estado natural.

(c) Sumado a lo ya dicho, no existe absolutamente ninguna enseñanza en cualquiera de los documentos D1 o D2 sobre alguno de los beneficios que son asociados con la forma dimérica de ECA-2 objeto de la presente invención, como son particularmente el tener una solubilidad y disponibilidad aumentadas en soluciones fisiológicas y mejorar así su actividad enzimática (tal y como se evidencia en la Figura 20 de la solicitud denegada).

Por lo tanto la persona versada en la materia reconocerá que la solicitud en cuestión no puede ser obvia o evidente a partir de las enseñanzas de los documentos D1 y D2 por lo que goza de nivel inventivo frente a tales referencias del estado del arte.

En conexión con lo anterior, me permito referirme al señalamiento que hace el Tribunal de Justicia de la Comunidad Andina con respecto a las definiciones de "obvio" y "evidente" en la evaluación del Nivel Inventivo de una solicitud de patente²:

"Resulta pertinente, a los efectos del artículo 4 de la Decisión 344, definir qué se entiende por "obvio" y por "evidente" a fin de determinar qué se debe entender por nivel inventivo.

Lo obvio es aquello que salta a la vista de manera clara y directa; lo "que se encuentra o pone delante de los ojos, muy claro o que no tiene dificultad". Mientras que lo evidente consiste en la "certeza clara y manifiesta de la que no se puede dudar; cierto, claro, patente y sin la menor duda". De forma que algo que resulte obvio no es necesariamente evidente; empero lo que es evidente, es también obvio.

En este orden de ideas, se puede concluir que una invención goza de nivel inventivo cuando a los ojos de un experto medio en el asunto de que se trate, se necesita algo más que la simple aplicación de los conocimientos técnicos en la materia para llegar a ella, es decir, que de conformidad con el estado de la técnica el invento no sea consecuencia clara y directa de dicho estado."

² Tribunal de Justicia de la Comunidad Andina, PROCESO 192-IP-2005

En vista de todo lo anterior, **al no "saltar a la vista de manera clara y directa" a partir de los documentos D1 y D2, por si solos o en combinación, un polipéptido ECA-2 recombinante en forma dimérica como el reclamado por el capítulo reivindicatorio de la solicitud denegada; y al no tenerse "certeza clara y manifiesta" a partir de D1 y D2 y su combinación de que tal forma dimérica del polipéptido ECA-2 le brindaría al polipéptido dimérico en cuestión una solubilidad y disponibilidad aumentadas en soluciones fisiológicas y una mejora en su actividad enzimática, es claro que los documentos D1 y D2 no pueden afectar el Nivel Inventivo del polipéptido reclamado por la solicitud denegada.**

De la misma manera, las reivindicaciones dependientes 2 a 25 del capítulo reivindicatorio de la solicitud también gozan de altura inventiva frente a las enseñanzas de D1 y D2 toda vez que estas reivindicaciones son dependientes de la reivindicación 1.

Aunado a lo anterior, muy respetuosamente me permito llamar la atención a ese Despacho al hecho que el análisis presentado en la Resolución ahora impugnada estaría enmarcado dentro de lo que en el ámbito de las patentes se conoce como "hindsight", o análisis "Ex post facto", toda vez que conociendo de antemano la invención el señor Examinador está seleccionado partes específicas de las enseñanzas contenidas dentro de los documentos D1 y D2 y a partir de ellas supone que era de esperarse que el polipéptido ECA-2 pudiera existir como un dímero, a lo que se suma el hecho que el señor Examinador pasa por alto las ventajas técnicas de dicho dímero de ECA-2 objeto de la invención las cuales resultan completamente inesperadas a partir de las enseñanzas de D1 y D2 pues tales referencias del estado del arte ni siquiera mencionan la existencia de ECA-2 en forma dimérica por lo que mucho menos pueden dar un indicio de las ventajas de tal forma. Sin embargo estas selecciones particulares de las enseñanzas de D1 y D2 y las suposiciones creadas a partir de las mismas de ninguna manera podrían ser obvias para la persona versada en la materia en el momento en el cual se desarrolló la invención por lo que no podría tener certeza de la existencia de ECA-2 en forma dimérica y mucho menos podría esperar de manera obvia las ventajas técnicas de la misma.

Consecuentemente, me permito manifestar que el capítulo reivindicatorio de la solicitud denegada goza de nivel inventivo frente a las enseñanzas de D1 y D2 y su combinación.

II. CONCLUSIÓN

En conclusión me permito resaltar que a la luz de los argumentos presentados se estableció de manera incontrovertible que a partir de las enseñanzas de los documentos D1 y D2 la persona versada en la materia no podría obtener de manera obvia el polipéptido ECA-2 recombinante dimérico que es objeto del capítulo reivindicatorio de la presente invención, ni a partir de los documentos del estado del arte sería evidente que tal polipéptido dimérico reclamados por la invención tendría una solubilidad y disponibilidad aumentadas en soluciones fisiológicas y una mejora en su actividad enzimática.

Por lo tanto es irrefutable el Nivel Inventivo que conlleva el capítulo reivindicatorio ahora modificado de la presente solicitud, ajustándose así la presente invención a lo preceptuado por el Artículo 18 de la Decisión 486.

Consecuentemente, la presente solicitud sí goza del requisito de Nivel Inventivo frente al estado del arte más próximo citado en la Resolución Número **27349** ahora impugnada.

III. PETICIÓN

En vista de todo lo anterior, ruego a usted proceder a estudiar nuevamente la solicitud a la luz de las modificaciones y argumentaciones presentadas y proceder a revocar la Resolución Número **27349**, con el fin de que se conceda el privilegio de patente a la presente invención.

IV. PODER

Finalmente me permito recordarle a este Despacho que el documento que acredita mi calidad de representante legal en Bogotá para asuntos relativos a la Propiedad Industrial de la sociedad peticionaria, fue presentado ante dicha entidad junto con mi memorial de 22 de Abril de 2010.

V. ANEXOS

Anexo me permito presentar copia del documento de Imai Y. et al., "Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure", Nature, Vol. 436, 7 de Julio de 2005, pp. 112-116.

V. DOMICILIO

Mi dirección es Calle 72 No. 5-83, Piso 6º, Bogotá D.C.

Del Señor Superintendente,



ALICIA LLORED A RICAURTE

T.P. 53.215

Dirección para Notificaciones: **notificacionespatentes@lloredacamacho.com**

LETTERS

Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure

Yumiko Imai^{1*}, Keiji Kuba^{1*}, Shuan Rao², Yi Huan², Feng Guo², Bin Guan², Peng Yang², Renu Sarao¹, Teiji Wada¹, Howard Leong-Poi³, Michael A. Crackower⁴, Akiyoshi Fukamizu⁵, Chi-Chung Hui⁶, Lutz Hein⁷, Stefan Uhlig⁸, Arthur S. Slutsky⁹, Chengyu Jiang² & Josef M. Penninger¹

Acute respiratory distress syndrome (ARDS), the most severe form of acute lung injury, is a devastating clinical syndrome with a high mortality rate (30–60%) (refs 1–3). Predisposing factors for ARDS are diverse^{1,3} and include sepsis, aspiration, pneumonias and infections with the severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus^{4,5}. At present, there are no effective drugs for improving the clinical outcome of ARDS^{1–3}. Angiotensin-converting enzyme (ACE) and ACE2 are homologues with different key functions in the renin–angiotensin system^{6–8}. ACE cleaves angiotensin I to generate angiotensin II, whereas ACE2 inactivates angiotensin II and is a negative regulator of the system. ACE2 has also recently been identified as a potential SARS virus receptor and is expressed in lungs^{9,10}. Here we report that ACE2 and the angiotensin II type 2 receptor (AT₂) protect mice from severe acute lung injury induced by acid aspiration or sepsis. However, other components of the renin–angiotensin system, including ACE, angiotensin II and the angiotensin II type 1a receptor (AT_{1a}), promote disease pathogenesis, induce lung oedemas and impair lung function. We show that mice deficient for *Ace* show markedly improved disease, and also that recombinant ACE2 can protect mice from severe acute lung injury. Our data identify a critical function for ACE2 in acute lung injury, pointing to a possible therapy for a syndrome affecting millions of people worldwide every year.

The renin–angiotensin system has an important role in maintaining blood pressure homeostasis, as well as fluid and salt balance^{11–13}. ACE2 is a homologue of ACE, and functions a negative regulator of the renin–angiotensin system^{6–8}. Although ACE2 is expressed in the lungs of humans¹⁰ and mice (see Supplementary Fig. 1a, b), nothing is known about its function in the lungs. However, mortality following SARS coronavirus infections approaches almost 10% owing to the development of ARDS^{14–16}. To elucidate the role of ACE2 in acute lung injury, we examined the effect of *Ace2* gene deficiency in mouse experimental models that mimic the common lung failure pathology observed in several human diseases, including sepsis, acid aspiration and pneumonias such as SARS and avian influenza A¹⁷.

Aspiration of gastric contents with a low pH is a frequent cause of acute lung injury/ARDS^{1–3}. Acid aspiration in wild-type mice, which mimics human acute lung injury^{18,19}, resulted in rapid impairment of lung functions assessed by increased lung elastance (a measure of the change in pressure achieved per unit change in volume, representing the stiffness of the lungs) (Fig. 1a), decreased blood oxygenation

(Fig. 1b) and the development of pulmonary oedema (Fig. 1c). Acid aspiration resulted in increased alveolar wall thickness, oedema, bleeding, inflammatory cell infiltrates and formation of hyaline membranes (Fig. 1d). Notably, acid-treated *Ace2* knockout mice⁸ showed significantly greater lung elastance compared with control wild-type mice, but there were no differences in lung elastance between saline-treated *Ace2* knockout and wild-type mice (Fig. 1a). Moreover, loss of *Ace2* resulted in worsened oxygenation (Fig. 1b), massive lung oedema (Fig. 1c), increased inflammatory cell infiltration and hyaline membrane formations (Fig. 1d) in response to acid aspiration. It should be noted that ACE2 protein expression is typically downregulated in wild-type mice following acid challenge (Fig. 1e).

Sepsis is the most common cause of acute lung injury/ARDS^{1–3}. We therefore examined the effect of *Ace2* gene deficiency on sepsis-induced acute lung injury using caecal ligation and perforation (CLP)²⁰. CLP causes lethal peritonitis and sepsis due to a polymicrobial infection that is accompanied by acute lung failure²⁰. Whereas all CLP-treated wild-type mice survived, only two out of ten CLP-treated *Ace2* knockout mice survived the 6 h experimental observation period (Fig. 2a). CLP resulted in lung failure defined by increased elastance (Fig. 2a), pulmonary oedema (Fig. 2b) and leukocyte accumulation (Fig. 2c) in wild-type mice. CLP-treated *Ace2* knockout mice had a marked worsening of lung functions (Fig. 2a), increased oedema (Fig. 2b) and leukocyte accumulation (Fig. 2c) compared with wild-type mice. In addition, *Ace2* knockout mice also developed markedly enhanced acute lung injury after endotoxin challenge¹⁸ (see Supplementary Fig. 2a–c). *Ace2* maps to the X chromosome, and it should be noted that loss of ACE2 expression resulted in equally severe acute lung injury phenotypes in male (*Ace2*^{−/y}) and female (*Ace2*^{−/−}) mice. Our data from three different acute lung injury models show that loss of *Ace2* expression precipitates severe acute lung failure.

To test whether loss of ACE2 is essential for disease pathogenesis, we performed a rescue experiment using recombinant human ACE2 protein (rhACE2) (see Supplementary Fig. 3a, b). Injection of rhACE2 into acid-treated *Ace2* knockout mice decreased the degree of acute lung injury, as assessed by lung elastance (Fig. 2d) and pulmonary oedema formation (Fig. 2e). When we injected rhACE2 protein into acid-treated wild-type mice, lung function (Fig. 2f) and oedema formation (see Supplementary Fig. 3c) were also rescued. In saline-treated wild-type or *Ace2* knockout mice, injections of

¹IMBA, Institute of Molecular Biotechnology of the Austrian Academy of Sciences, Vienna A-1030, Austria. ²National Laboratory of Medical Molecular Biology, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100005, China. ³Department of Cardiology, St. Michael's Hospital, Toronto, Ontario M5B 1W8, Canada. ⁴Department of Biochemistry and Molecular Biology, Merck Frosst Centre for Therapeutic Research, Montreal, Quebec H3R 4P8, Canada. ⁵Center for Tsukuba Advanced Research Alliance, University of Tsukuba, Tsukuba 305-8577, Japan. ⁶Program in Developmental Biology, The Hospital for Sick Children and Department of Molecular and Medical Genetics, University of Toronto, Toronto, Ontario M5S 1X8, Canada. ⁷Department of Pharmacology, University of Freiburg, Freiburg 79104, Germany. ⁸Division of Pulmonary Pharmacology, Research Center Borstel, Borstel 23845, Germany. ⁹Department of Medicine and Interdepartmental Division of Critical Care, University of Toronto, St. Michael's Hospital, Toronto, Ontario M5B 1W8, Canada. ¹⁰These authors contributed equally to this work.

rhuACE2 did not affect pulmonary functions (Fig. 2d–f). Catalytically inactive ACE2 protein (mut-rhuACE2) (see Supplementary Fig. 3a, b) did not rescue the severe lung phenotype in *Ace2* knockout mice (Fig. 2d, e) and had no effect on the severity of acute lung injury in wild-type animals (Fig. 2f and Supplementary Fig. 3c). These results show that the catalytic activity of ACE2 can directly protect lungs from acute lung injury.

ACE2 is a homologue of ACE, both of which are central enzymes in the renin–angiotensin system^{6–8}. ACE cleaves the decapeptide angiotensin (Ang)I into the octapeptide AngII (refs 11, 12). ACE2 cleaves a single residue from AngI to generate Ang1–9 (refs 6, 7), and a residue from AngII to generate Ang1–7 (ref. 6). In this way, ACE2 negatively regulates the renin–angiotensin system by inactivating AngII (Fig. 3a). Acid aspiration in wild-type mice resulted in marked downregulation of ACE2 protein, but ACE levels remained constant (Fig. 1e). Moreover, only catalytically active ACE2 improved the acute lung injury phenotype in mutant and wild-type mice (Fig. 2d–f). To clarify whether acute lung injury shifts the functional equilibrium between ACE and ACE2, we measured AngII levels in acid-treated and control mice. Acid aspiration markedly increased AngII levels in lungs (Fig. 3b) and plasma (see Supplementary Fig. 4a) of wild-type mice. We observed a further, significant increase in AngII levels in the lungs (Fig. 3b) and plasma (see Supplementary Fig. 4a) of acid-treated *Ace2* knockout mice. Thus, acute lung injury results in decreased ACE2 expression and increased production of AngII.

On the basis of these results we speculated that, in contrast to ACE2, ACE promotes disease pathogenesis through increased AngII production (Fig. 3a). Indeed, genetic inactivation of *Ace* on an *Ace2* wild-type or *Ace2* knockout background markedly decreased AngII levels in lung and plasma in our acid injury model (see Supplementary Fig. 4b, c). Moreover, treatment with rhuACE2 protein attenuated lung injury (Fig. 2d–f) and further reduced AngII levels in the lungs of acid-treated mice (Supplementary Fig. 4d). In contrast to *Ace2* knockout mice, *Ace*^{−/−} mice²¹ were partly protected against acute lung injury induced by acid-aspiration (Fig. 3c and Supplementary Fig. 5). These effects were dependent on gene dosage and were observed to a lesser extent in *Ace*^{+/-} mice. In addition,

inactivation of *Ace* on an *Ace2* knockout background rescued the severe lung failure (Fig. 3d), oedema formation (Fig. 3e) and histological changes (Fig. 3f) compared with *Ace2* knockout mice. Similarly, in endotoxin-induced acute lung injury, the severe lung impairments in *Ace2* knockout mice were reversed by additional *Ace* gene deficiency (see Supplementary Fig. 6). Thus, ACE promotes acute lung injury pathology and ACE2 alleviates it.

Both ACE and ACE2 are non-specific proteases that cleave additional substrates^{21,22}. Thus, although increased levels of AngII have been correlated with *Ace2* deficiency, it has not been shown that upregulation of the AngII pathway accounts for the observed phenotypes of *Ace2* knockout mice *in vivo*. The receptors for AngII in mice are angiotensin II type 1a (AT₁a) receptor²², the type 1b (AT₁b) receptor and the type 2 (AT₂) receptor²³. AT₁a and AT₂, but not AT₁b receptor expression is found in the lungs²⁵. We therefore explored which AngII receptor subtypes are responsible for ACE/ACE2 regulated acute lung injury, and whether AngII signalling through its receptors is responsible for ACE2-regulated lung pathology (Fig. 3a). Compared with wild-type mice, genetic loss of AT₁a receptor expression in *Agtr1a*^{−/−} mice²⁴ markedly improved lung function (Fig. 4a) and reduced oedema formation (see Supplementary Fig. 7a). In contrast, inactivation of the AT₂ receptor (*Agtr2*^{−/−})²⁵ aggravated acute lung injury (Fig. 4a and Supplementary Fig. 7a). AngII levels induced by acid aspiration in both *Agtr1a*^{−/−} and *Agtr2*^{−/−} mice were comparable to those in wild-type controls (not shown).

We next attempted to rescue acute lung injury in *Ace2* knockout mice using specific AT₁ and AT₂ receptor blockers. Pharmacological inhibition of AT₁ attenuated the severity of acid-induced lung injury in *Ace2* knockout mice (Fig. 4b and Supplementary Fig. 7b). Inhibition of AT₂ had no apparent effect on the acute lung injury phenotypes of *Ace2* knockout mice (Fig. 4b). These data show that the AT₁a and AT₂ receptors have opposite functions in controlling the severity of acute lung injury, and that actions of AngII through the AT₁a receptor have a causative role in acute lung failure.

Pulmonary oedema could arise from increased hydrostatic pressure (due to pulmonary vascular constriction) and/or enhanced

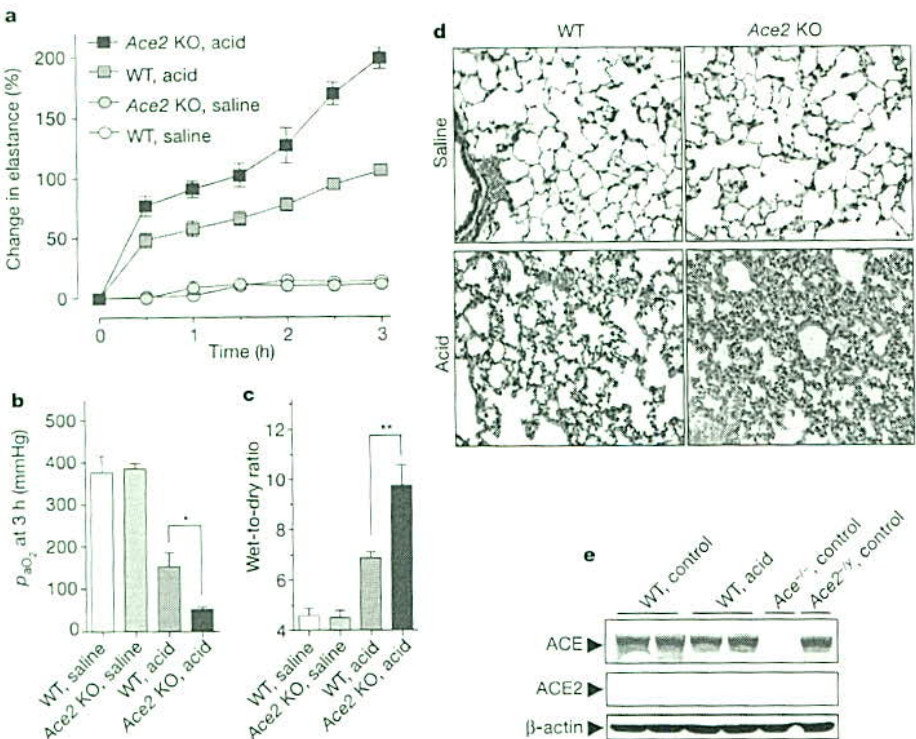


Figure 1 | Loss of ACE2 worsens acid aspiration-induced acute lung injury. **a**, Lung elastance after acid or saline treatment in wild type (WT) and *Ace2* knockout (*Ace2* KO) mice ($n = 10$ for acid-treated groups, $n = 6$ for saline-treated groups). $P < 0.05$ for the whole time course comparing acid-treated WT and *Ace2* knockout mice. **b**, Partial pressure of oxygen in arterial blood (p_{aO_2}) in acid-induced acute lung injury. **c**, Wet-to-dry weight ratios of lungs 3 h after acid injury. Single asterisk, $P < 0.05$; double asterisk, $P < 0.01$. **d**, Lung histopathology. Note the enhanced hyaline membrane formation, inflammatory cell infiltration and lung oedema in acid-treated *Ace2* knockout mice (H&E staining, $\times 200$). **e**, ACE and ACE2 protein expression in total lysates from control lungs and lungs 3 h after acid injury. Error bars indicate s.e.m.

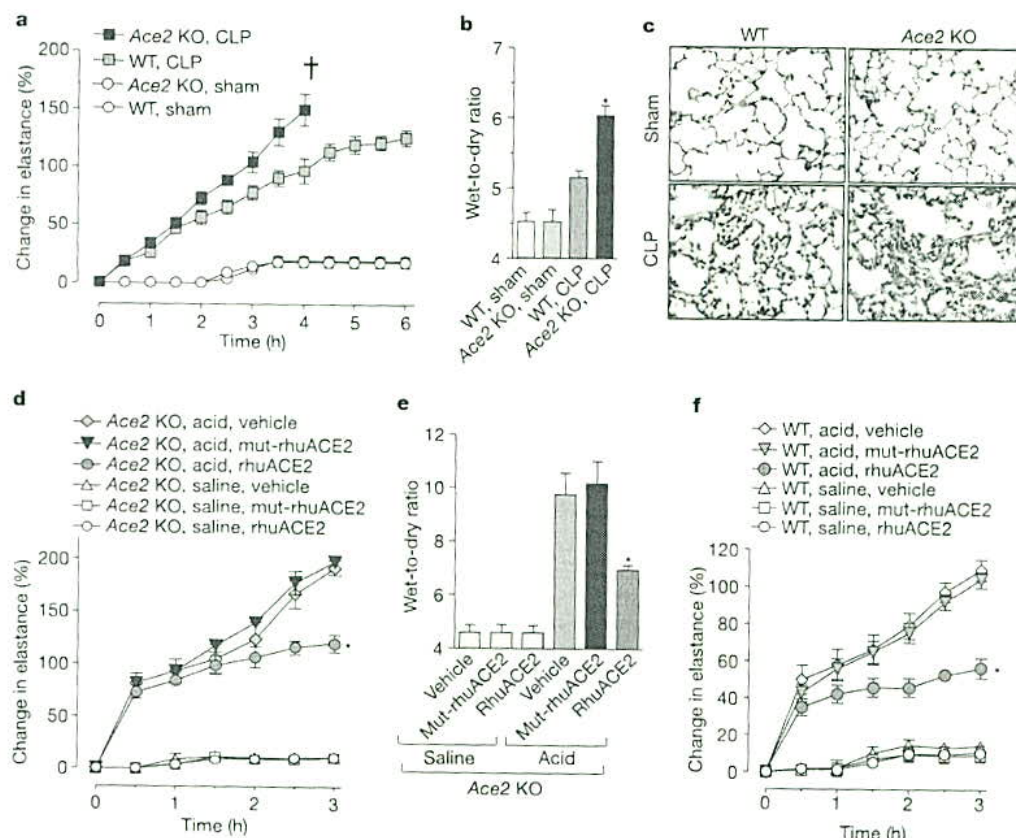


Figure 2 | ACE2 controls acute lung failure. **a**, Lung elastance after acute lung injury in WT and *Ace2* knockout (KO) mice induced by caecal ligation perforation (CLP). Eighteen hours after sham or CLP surgery, animals received mechanical ventilation for 6 h ($n = 10$ in CLP-treated groups, $n = 6$ in sham-treated groups). As 8/10 CLP-treated *Ace2* knockout mice died at 4–4.5 h, only data up to 4 h are shown. CLP-treated *Ace2* knockout mice had significantly higher elastance than CLP-treated WT mice ($P < 0.01$). **b**, **c**, Wet-to-dry weight ratios of lungs (**b**) and lung histopathology (**c**) in sham or CLP-treated WT and *Ace2* knockout mice determined after 4 h of ventilation. Asterisk denotes a significant difference ($P < 0.05$) between CLP-treated WT and *Ace2* knockout mice. Note the enhanced lung oedema and inflammatory infiltrates in *Ace2* knockout mice

(H&E staining, $\times 200$). **d**, **e**, Lung elastance (**d**) and wet-to-dry weight ratios (**e**) after acid or saline instillation of *Ace2* knockout mice injected intraperitoneally with recombinant human ACE2 protein (rhuACE2; 0.1 mg kg^{-1}), mutant rhuACE2 (mut-rhuACE2; 0.1 mg kg^{-1}) or vehicle ($n = 6$ per group). Asterisk denotes a significant difference ($P < 0.05$) comparing rhuACE2-treated *Ace2* knockout mice with mut-rhuACE2-treated and vehicle-treated *Ace2* knockout mice at 3 h. **f**, Lung elastance after acid instillation in WT mice treated with rhuACE2 protein (0.1 mg kg^{-1}), mut-rhuACE2 protein (0.1 mg kg^{-1}) or vehicle ($n = 6$ –8 per group). Asterisk denotes a significant difference ($P < 0.05$) between WT mice treated with rhuACE2 and mut-rhuACE2 or with vehicle at 3 h. Errors bars indicate s.e.m.

microvascular permeability²⁶. We first tested whether AngII can increase hydrostatic pressure using isolated, perfused murine lungs *ex vivo*²⁷. In this system, pulmonary perfusion pressures were comparable between wild-type and *Ace2* knockout mice under baseline control conditions (wild-type $3.0 \pm 1.9 \text{ cm H}_2\text{O}$, $n = 6$ versus *Ace2* knockout $1.8 \pm 1.6 \text{ cm H}_2\text{O}$, $n = 9$; mean $\pm$ s.e.m.), and these values were not changed by either acid-treatment or continuous perfusion of the bacterial endotoxin lipopolysaccharide (LPS). Pulmonary perfusion pressures generated by AngI or AngII injection into lungs of acid-instilled animals or into lungs perfused with LPS were also similar between wild-type and *Ace2* knockout mice (see Supplementary Fig. 8a, b). Moreover, fractional shortening using echocardiography (an indicator of left ventricular systolic function) and mean arterial pressures were comparable between *Ace2* knockout and wild-type mice during the experimental period (see Supplementary Fig. 9a, b). Thus, the severe lung oedemas in *Ace2* knockout mice do not seem to be secondary to systemic haemodynamic alterations.

As enhanced pulmonary vascular permeability is a hallmark of acute lung injury/ARDS in humans², we examined whether loss of *Ace2* results in increased vascular permeability using Evans Blue dye injections as an *in vivo* indicator of albumin leakage²⁸. Acid aspiration increased vascular permeability in wild-type mice. In *Ace2*

knockout mice, pulmonary Evans Blue accumulation was greatly increased after acid aspiration (Fig. 4c, d). These results were confirmed using fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated dextran (40 kDa) as another marker to assess vascular leakage of macromolecules (data not shown). Vascular permeability was significantly attenuated in the lungs of *Agtr1a*^{-/-} mice (Fig. 4e). We suggest that loss of ACE2 expression in acute lung injury leads to leaky pulmonary blood vessels through AT₁a receptor stimulation. However, hydrostatic oedemas cannot be excluded, and the effects of local AngII production on lung blood vessels require further investigation^{27,29}.

ARDS is the most severe form of a wide spectrum of pathological processes designated as acute lung injury². ARDS is characterized by pulmonary oedema due to increased vascular permeability, the accumulation of inflammatory cells and severe hypoxia². Predisposing factors for ARDS include sepsis, aspiration and pneumonias (including infections with SARS coronavirus^{1–5} or avian and human influenza viruses¹⁷). Our data show that acute lung injury results in a marked downregulation of ACE2, a key enzyme involved in the regulation of the renin–angiotensin system.

It has been previously shown that an insertion/deletion ACE polymorphism that affects ACE activity is associated with ARDS susceptibility and outcome³⁰. Our data provide a mechanistic

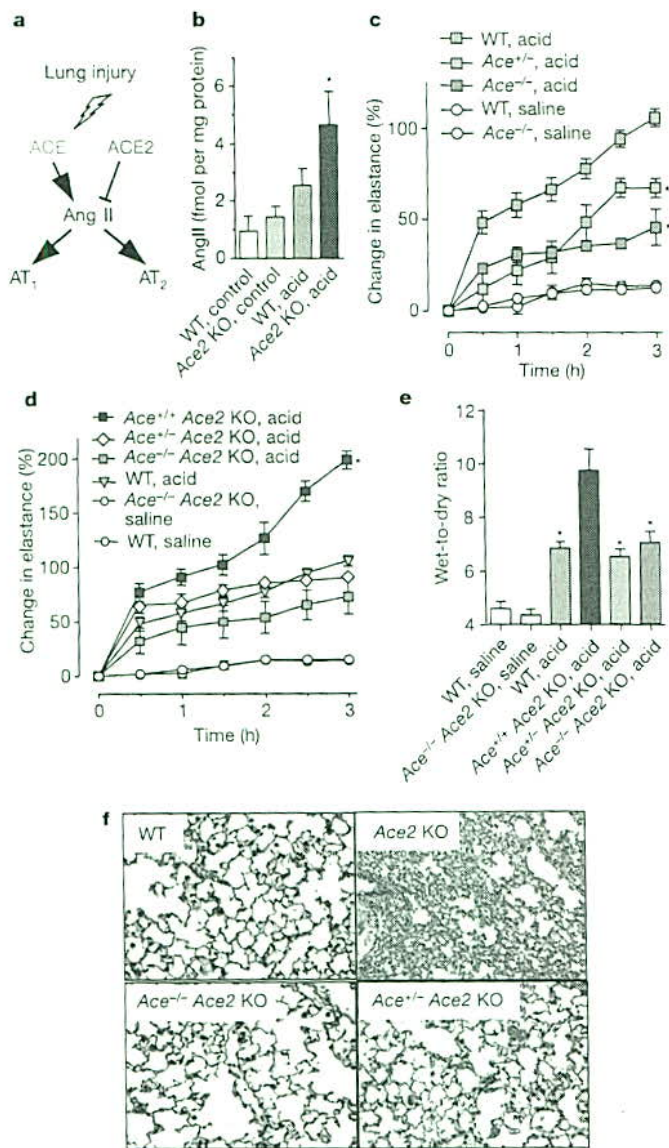


Figure 3 | ACE deficiency reduces the severity of acute lung injury. **a**, Schematic diagram of the renin-angiotensin system. **b**, Lung levels of AngII in control and acid-treated WT and *Ace2* knockout (KO) mice determined at 3 h by enzyme immunoassay ($n = 3-5$ per group). Asterisk denotes a significant difference ($P < 0.05$) between acid-treated WT and *Ace2* knockout mice. **c**, Lung elastance after acid instillation in *Ace*^{+/+} (WT), *Ace*^{+/-} and *Ace*^{-/-} mice ($n = 4-6$ mice per group). Asterisk denotes a significant difference ($P < 0.05$) comparing *Ace*^{+/+} with *Ace*^{+/-} and *Ace*^{-/-} mice at 3 h. **d**, **e**, Lung elastance (**d**) and wet-to-dry lung weight ratios (**e**) in acid- or saline-treated *Ace*^{+/+} *Ace2* KO, *Ace*^{+/-} *Ace2* KO, *Ace*^{-/-} *Ace2* KO and WT mice ($n = 5$ per group). Asterisk denotes a significant difference ($P < 0.05$) comparing *Ace2* KO with WT, *Ace*^{+/-} *Ace2* KO or *Ace*^{-/-} *Ace2* KO mice 3 h after acid-treatment. **f**, Lung histopathology. Severe lung interstitial oedema and leukocyte infiltration in *Ace2* KO mice are attenuated by homozygous (*Ace*^{-/-}) or heterozygous (*Ace*^{+/-}) mutations of *Ace* (H&E staining, ×200). Error bars indicate s.e.m.

explanation for these clinical findings and indicate that, in the pathogenesis of acute lung injury, AngII is upregulated by ACE and drives severe lung failure through the AT₁ receptor. On the other hand, ACE2 and the AT₂ receptor protect against lung injury. Exogenous recombinant human ACE2 attenuates acute lung failure in *Ace2* knockout as well as in wild-type mice. This combination of genetic, pharmacological and protein rescue experiments defines a new and critical role for the renin-angiotensin system in the pathogenesis of acute lung injury, and show that ACE2 is a key

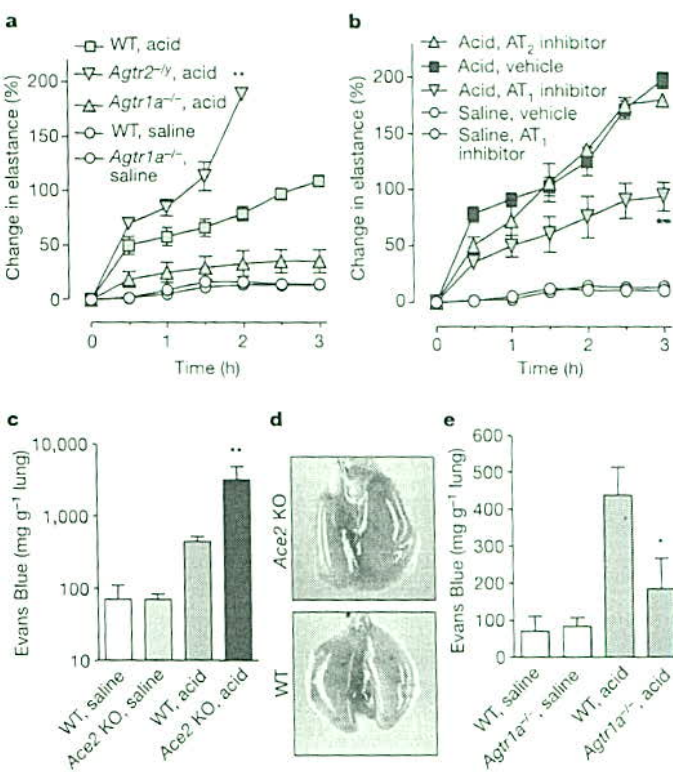


Figure 4 | The AngII receptor AT₁a controls acute lung injury severity and pulmonary vascular permeability. **a**, Lung elastance measurements in *Agtr1a*^{-/-} mice, *Agtr2*^{-/-} mice and WT mice after acid aspiration ($n = 4-6$ per group). All acid-treated *Agtr2*^{-/-} mice died after 2 h. There is a significant difference ($P < 0.01$) between acid-treated WT and acid-treated *Agtr1a*^{-/-} mice over the whole time course. Double asterisk denotes a significant difference ($P < 0.01$) between WT and *Agtr2*^{-/-} mice at 2 h. **b**, Lung elastance measurements in *Ace2* knockout mice treated with vehicle or inhibitors to AT₁ (Losartan, 15 mg kg⁻¹) or AT₂ (PD123.319, 15 mg kg⁻¹) after acid or saline instillation (see Methods, $n = 4-6$ per group). Double asterisk denotes a significant difference ($P < 0.01$) comparing *Ace2* knockout mice treated with vehicle or AT₁ inhibitor treatment at 3 h. **c**, Pulmonary vascular permeability as determined by intravenous injection of Evans Blue. Extravascular Evans Blue in lungs was measured in WT and *Ace2* knockout mice 3 h after acid injury ($n = 5$ per group). Double asterisk denotes a significant difference ($P < 0.01$) between acid-treated WT and *Ace2* knockout mice. **d**, Representative images of Evans Blue-injected lungs of WT and *Ace2* knockout mice 3 h after acid aspiration. **e**, Extravascular Evans Blue in lungs of WT and *Agtr1a*^{-/-} mice 3 h after acid injury ($n = 5$ per group). Asterisk denotes a significant difference ($P < 0.05$) between acid-treated WT and *Agtr1a*^{-/-} mice at 3 h. Error bars indicate s.e.m.

molecule involved in the development and progression of acute lung failure.

METHODS

For detailed methods please refer to the Supplementary Information. **Animals.** *Ace2*, *Ace*, *Agtr1a* and *Agtr2* mutant mice have previously been described^{4,6,9}. Sex-, age-, and background-matched mice were used as controls. Basal lung functions and lung structure were comparable among all the mice tested. Mice were handled in accordance with institutional guidelines. **Experimental murine models of acute lung injury.** For acid aspiration-induced acute lung injury, anaesthetized mice were intratracheally instilled with HCl (pH 1.5; 2 ml kg⁻¹) and ventilated for 3 h (refs 18, 19). To study sepsis-induced acute lung injury, we performed caecal ligation perforation (CLP)²⁰. Sham-operated mice underwent the same procedure without ligation and puncture of the caecum. Eighteen hours after sham/CLP surgery, animals were subjected to mechanical ventilation for up to 6 h. For endotoxin-induced acute lung injury, anaesthetized mice received LPS and zymosan intratracheally immediately after starting mechanical ventilation and 1 h later, respectively²¹. In all acute lung

injury models, total positive end expiratory pressure ($PEEP_t$) and plateau pressure (P_{plat}) were measured at the end of expiratory and inspiratory occlusion, respectively. Elastance was calculated as $(P_{plat} - PEEP_t)$ divided by tidal volume (V_T) every 30 min during the ventilation periods.

Blood oxygenation, pulmonary oedema, pulmonary vascular permeability and histology. Blood samples were obtained from the left heart ventricle and partial pressure of oxygen in arterial blood (P_{aO_2}) was measured. To assess pulmonary oedemas, the lung wet-to-dry weight ratios were calculated. Pulmonary vascular permeability was assessed by measuring the pulmonary extravasation of Evans Blue. For histological analysis, 5- μ m thick sections were cut and stained with haematoxylin and eosin (H&E).

Recombinant ACE2 and AT₁/AT₂ receptor inhibitors. Thirty minutes before acid instillation, mice received intraperitoneal injections of recombinant human ACE2 (rhACE2) protein (0.1 mg kg⁻¹) (R&D Systems or our own rhACE2 preparation), catalytically inactive (H374N, H378N)¹⁰ mutant recombinant human ACE2 (mut-rhACE2) or vehicle (0.1% BSA/PBS). All animals were then ventilated for 3 h. RhACE2 protein and mut-rhACE2 protein were purified from transfected CHO cells by affinity chromatography. The catalytic activities of purified recombinant ACE2 proteins were measured using the fluorogenic peptide Substrate VI (R&D Systems). Mut-rhACE2-Fc showed >95% loss of catalytic activity (see Supplementary Fig. 3a). For inhibitor studies, mice received intraperitoneal injections of the AT₁ inhibitor Losartan (15 mg kg⁻¹), the AT₂ inhibitor PD123,319 (15 mg kg⁻¹) or control vehicle 30 min before surgical procedures.

Angiotensin II peptide levels and western blotting. AngII peptide levels were measured as described⁸. For western blotting, rabbit polyclonal anti-ACE2 antibody⁸ and rabbit polyclonal anti-mouse ACE antibody (R&D Systems) were used.

Statistical analyses. All data are shown as mean $\pm$ s.e.m.. Measurements at single time points were analysed by analysis of variance (ANOVA). Time courses were analysed by repeated measurements ANOVA with Bonferroni post-tests.

Received 11 February; accepted 29 April 2005.

- Hudson, L. D., Milberg, J. A., Anardi, D. & Maunder, R. J. Clinical risks for development of the acute respiratory distress syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **151**, 293–301 (1995).
- Ware, L. B. & Matthay, M. A. The acute respiratory distress syndrome. *N. Engl. J. Med.* **342**, 1334–1349 (2000).
- Vincent, J. L., Sakr, Y. & Ranieri, V. M. Epidemiology and outcome of acute respiratory failure in intensive care unit patients. *Crit. Care Med.* **31** (suppl.), S296–S299 (2003).
- Ksiazek, T. G. *et al.* A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* **348**, 1953–1966 (2003).
- Drosten, C. *et al.* Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* **348**, 1967–1976 (2003).
- Donoghue, M. *et al.* A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1–9. *Circ. Res.* **87**, E1–E9 (2000).
- 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).
- Crackower, M. A. *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature* **417**, 822–828 (2002).
- Li, W. *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* **426**, 450–454 (2003).
- Hamming, I. *et al.* Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J. Pathol.* **203**, 631–637 (2004).
- 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).
- Corvol, P., Williams, T. A. & Soubrier, F. Peptidyl dipeptidase A: angiotensin I-converting enzyme. *Methods Enzymol.* **248**, 283–305 (1995).
- Boehm, M. & Nabel, E. G. Angiotensin-converting enzyme 2—a new cardiac regulator. *N. Engl. J. Med.* **347**, 1795–1797 (2002).
- Tsang, K. W. *et al.* A cluster of cases of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *N. Engl. J. Med.* **348**, 1977–1985 (2003).
- Lee, N. *et al.* A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *N. Engl. J. Med.* **348**, 1986–1994 (2003).
- Poutanen, S. M. *et al.* Identification of severe acute respiratory syndrome in Canada. *N. Engl. J. Med.* **348**, 1995–2005 (2003).
- Tran, T. H. *et al.* Avian influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam. *N. Engl. J. Med.* **350**, 1179–1188 (2004).
- Nagase, T. *et al.* Acute lung injury by sepsis and acid aspiration: a key role for cytosolic phospholipase A2. *Nature Immunol.* **1**, 42–46 (2000).
- Imai, Y. *et al.* Injurious mechanical ventilation and end-organ epithelial cell apoptosis and organ dysfunction in an experimental model of acute respiratory distress syndrome. *J. Am. Med. Assoc.* **289**, 2104–2112 (2003).
- Martin, E. L. *et al.* Negative impact of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 null mutation on lung structure and function in response to sepsis. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **285**, L1222–L1232 (2003).
- Krege, J. H. *et al.* Male–female differences in fertility and blood pressure in ACE-deficient mice. *Nature* **375**, 146–148 (1995).
- Inagami, T. *et al.* Cloning, expression and regulation of angiotensin II receptors. *Adv. Exp. Med. Biol.* **377**, 311–317 (1995).
- Gasc, J. M., Shanmugam, S., Sibony, M. & Corvol, P. Tissue-specific expression of type 1 angiotensin II receptor subtypes. An *in situ* hybridization study. *Hypertension* **24**, 531–537 (1994).
- Sugaya, T. *et al.* Angiotensin II type 1a receptor-deficient mice with hypotension and hyperreninemia. *J. Biol. Chem.* **270**, 18719–18722 (1995).
- Hein, L., Barsh, G. S., Pratt, R. E., Dzau, V. J. & Koblika, B. K. Behavioural and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type-2 receptor in mice. *Nature* **377**, 744–747 (1995).
- Plante, G. E., Chakir, M., Ettaouil, K., Lehoux, S. & Sirois, P. Consequences of alteration in capillary permeability. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **74**, 824–833 (1996).
- Roy, B. J., Pitts, V. H. & Townsley, M. I. Pulmonary vascular response to angiotensin II in canine pacing-induced heart failure. *Am. J. Physiol.* **271**, H222–H227 (1996).
- Goggel, R. *et al.* PAF-mediated pulmonary edema: a new role for acid sphingomyelinase and ceramide. *Nature Med.* **10**, 155–160 (2004).
- Hansen, T. N., Le Blanc, A. L. & Gest, A. L. Hypoxia and angiotensin II infusion redistribute lung blood flow in lambs. *J. Appl. Physiol.* **58**, 812–818 (1985).
- Marshall, R. P. *et al.* Angiotensin converting enzyme insertion/deletion polymorphism is associated with susceptibility and outcome in acute respiratory distress syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **166**, 646–650 (2002).

Supplementary Information is linked to the online version of the paper at www.nature.com/nature.

Acknowledgements We thank M. Chappell, C. Richardson, B. Seed, U. Eriksson, J. Ishida and all members of our laboratory for discussions and reagents. This work is supported by the Institute for Molecular Biotechnology of the Austrian Academy of Sciences (IMBA) and the Jubilaeumsfonds of the Austrian National Bank. This work is in part supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and the Canada Foundation for Innovation (CFI). K.K. is supported by a Marie Curie Fellowship from the EU. C.J. is supported a Beijing Committee of Science and Technology grant and the Natural Science Foundation of China. L.H. is supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft.

Author Information Reprints and permissions information is available at npg.nature.com/reprintsandpermissions. The authors declare competing financial interests: details accompany the paper on www.nature.com/nature. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.M.P. (Josef.penninger@imba.oeaw.ac.at).