



**Industria y Comercio**  
**SUPERINTENDENCIA**



SOLICITUD  
PATENTE DE INVENCION

**10-1879**

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO "POLIPÉPTIDO ACE2"

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL C12N 9/64

71. SOLICITANTE APEIRON BIOLOGICS AG

DOMICILIO WIEN, AUSTRIA

74. REPRESENTANTE LEGAL ALICIA LLOREDA RICAURTE  
T.P. 53.215

- 8 FEB 2010

22. BOGOTÁ, D.C.

(FORMA P 10)

Titular, Roberto Casin, Anexos  
12-01-2010  
en Expediente

# PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-001879- -00000-0000

Fecha: 2010-01-08 16:35:22 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYI Eve: 379 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 90

## FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

①

### SOLICITUD DE:



Patente de Invención



Patente de Modelo de Utilidad



Capítulo I.



Capítulo II.

②

### SOLICITANTE (71)

Nombre: APEIRON BIOLOGICS AG

Dirección: Campus-Vienna-Biocenter 5, A-1030 Wien, Austria.

Nacionalidad o Domicilio: Wien, Austria.

Lugar de Constitución:

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jlloco@lloredacamacho.com

### IDENTIFICACION

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual

Número

③

### REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: ALICIA LLOREDA RICAURTE

Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º, Bogotá, Colombia

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jlloco@lloredacamacho.com

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual

Número 39.690.713 TP 53.215

④

### INVENTOR(ES) (72)

Nombre: SCHUSTER, Manfred; LOIBNER, Hans; JANZEK-HAWLAT, Evelyne; PEBALL, Bernhard; STRANNER, Stefan; WAGNER, Bettina y WEIK, Robert.

Dirección: Josef Weilandstrasse 84, A-2191 Schrick; Heimgasse 23, A-1230 Wien; Korbasse 2-4/1/2, A-1230 Wien; Burggasse 99, A-1070 Wien; Zwerggraben 18-24/25, A-1230 Wien; Brüder Renner-Gasse 3 Stg. 4/4, A-2700 Wiener Neustadt y Hauptstrasse 122 A-2724 Hohe Wand-Stollhof.

Nacionalidad o Domicilio: Australia.

⑤

### PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/AT2008/000211

Fecha: 12/06/03

Publicación Internacional No. WO 2008/151647 A1

Fecha: 15/12/08

⑥

Título (54) "POLIPÉPTIDO ACE2"

⑦

Clasificación Internacional (51) C12N 9/64

⑧

### Prioridad

SI



NO



(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

AT

EP

12/06/07

08/04/08

A 913/2007

08450052.9

⑨

Comprobante de Pago No. 09-89.948 y 10-571

Fecha: 30-11-2009 y 05-01-2009

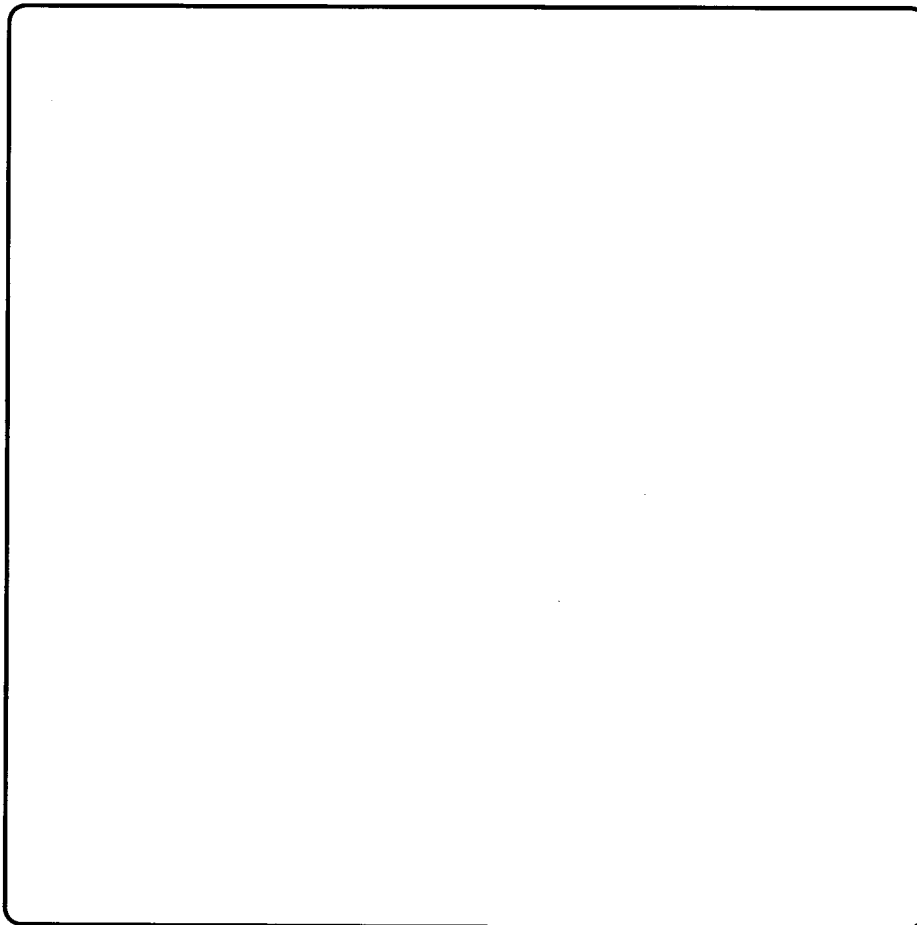
10

## ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Documento de Representación Legal.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones)
- ☐ Copia del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☐ Traducción del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Reporte de Búsqueda Internacional, Publicación, Notificaciones de Cambio de Nombre del Solicitante y Adición del Inventor WEIK, Robert y Opinión Escrita. y Dibujos.

11

### FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALICIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA:

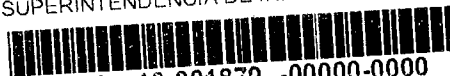
C.C. 39.690.713 Usaqué T.P. 53.215

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 890174089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 89,948  
FECHA : NOVIEMBRE 30 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-001879- -00000-0000

Fecha: 2010-01-08 16:35:22 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 90

\*\*\*\*\* CONSIGNACION \*\*\*\*\*

| DEPOSITANTE        | TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | Nº. PAGO | FECHA PGO  | Vr. PAGO      |
|--------------------|--------------|-----------------|-----------|----------|------------|---------------|
| LLOREDA Y CIA S. A | CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 99913463 | 30/11/2009 | 14,030,000.00 |

\*\*\*\*\* C O N C E P T O \*\*\*\*\*

| CANT. | RENTISTICO  | CONCEPTO                          | TOTAL CONCEPTO |
|-------|-------------|-----------------------------------|----------------|
| 1     | 50005-01-01 | SOLICITUDES                       |                |
| 1     |             | TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN | 540,000.00     |
|       |             | TOTAL :                           | \$ 540,000.00  |

SON: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

RESPONSABLE: \_\_\_\_\_

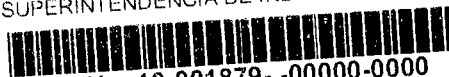
RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. \_\_\_\_\_

## SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 900176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 571  
FECHA : ENERO 5 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-001879- -00000-0000

Fecha: 2010-01-08 16:35:22  
Tra: 11 PATENTEIYII  
Act: 411 PRESENTACIONDep: 2020 DIR.NUEVASCR  
Eve: 379 FASENACIONALII  
Folios: 90

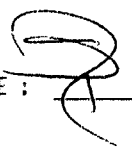
## \*\*\*\*\* CONSIGNACION \*\*\*\*\*

| DEPOSITANTE       | TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | Nº. PAGO | FECHA PGO  | Vr. PAGO     |
|-------------------|--------------|-----------------|-----------|----------|------------|--------------|
| LOREDA Y CIA S. A | CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 36907964 | 05/01/2010 | 5.238.400.00 |

## \*\*\*\*\* CONCEPTO \*\*\*\*\*

| CANT. | RENTISTICO  | CONCEPTO                              | TOTAL CONCEPTO |
|-------|-------------|---------------------------------------|----------------|
| 1     | 50005-01-01 | SOLICITUDES                           |                |
|       |             | 998 VALOR COMPLEMENTO TARIFA A#0 ANTR | 14,000.00      |
|       |             | TOTAL :                               | 14,000.00      |

SON: CATORCE MIL PESOS

RESPONSABLE : 

VALOR DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE N°. \_\_\_\_\_

|                                                                                                                                                                                                                                                                 |  |                                                                                                                                                                                                                                                                                              |  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| <br><b>Industria y Comercio</b><br>SUPERINTENDENCIA                                                                                                                            |  | <b>SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO</b><br><b>DIVISION DE NUEVAS CREACIONES</b><br><b>EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN</b><br><b>SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT</b>                                                                                                                  |  |
| (21) N° de solicitud: <b>10-1899</b><br>(22) Fecha de solicitud: <b>08-01-2010</b><br>(30) Prioridad (31) <b>No. Prioridad</b> (32) <b>Fecha</b> (33) <b>País</b><br><b>A 913/2007</b> <b>12-06-07</b> <b>AT</b><br><b>00450052.9</b> <b>08-04-08</b> <b>EP</b> |  | (51) Int Cl: <b>G12N 9/64</b><br>(71) Solicitante(s) <b>APEIRON BIOLOGICS AG</b><br>(72) Inventor(es) <b>SCHUSTER, Manfred; LOIBNER, Hans; JANZEK-HAWLAT, Evelyne; PEBALL, Bernhard; STRANNER, Stefan; WAGNER, Bettina y WEIK, Robert.</b><br>(74) Apoderado: <b>ALICIA LLOREDA RICAURTE</b> |  |
| (85) Fecha limite inicio fase nacional: <b>12-01-2010</b><br>(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT<br>Fecha de presentación de la solicitud: <b>12/06/08</b><br>No. de solicitud <b>PCT/AT2008/000211</b>                                  |  | (87) Publicación internacional<br>Fecha: <b>18/12/08</b><br>N° publicación: <b>WO 2008/151347 A1</b>                                                                                                                                                                                         |  |
| (54) Título: <b>"POLIPÉPTIDO ACE2"</b>                                                                                                                                                                                                                          |  |                                                                                                                                                                                                                                                                                              |  |

Resumen - Reivindicación(es):

Reivindicación número 1:

Un polipéptido ACE2 recombinante, caracterizado porque está presente como un dímero, en donde en ambos polipéptidos ACE2, todos los sitios de N-glicosilación posibles son glicosilados, ambos polipéptidos ACE2 cada uno tiene por lo menos 10 residuos de ácido siálico, ningún polipéptido ACE2 tiene un dominio de transmembrana y el dímero tiene Zn<sup>2+</sup>.



**Industria y Comercio**

**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO**

**DIVISION DE NUEVAS CREACIONES**

**TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS**

**SUPERINTENDENCIA**

**PATENTE DE INVENCION**

**PCT**

**X**

**MODELO DE UTILIDAD**

**DISEÑO INDUSTRIAL**

(21) N° de solicitud:

(22) Fecha de solicitud: 08-01-2010

(51) Clasificación Internacional: C12N 9/84

(71) Solicitante(s) APEIRON BIOLOGICS AG

(72) Inventor(es) SCHUSTER, Manfred; LOIBNER, Hans; JANZER-HAWLAT, Evelyn; PEBALL, Bernhard; STRANNER, Stefan; WAGNER, Bettina y WEIK, Robert.

(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE

(30) Prioridad

(31) **No. Prioridad**

(32)

**Fecha**

(33) **País**

**A 913/2007**

**12-06-07**

**AT**

**08450052.9**

**08-04-08**

**EP**

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 12-01-2010

(87) Publicación internacional

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha: **18-12-08**

Fecha de presentación de la solicitud: **12-06-08**

N° publicación: **WO 2008/151347 A1**

No. de solicitud **PCT/AT2008/000211**

(54) Título: **"POLIPÉPTIDO ACE2"**



**Industria y Comercio**

**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO**

**DIVISION DE NUEVAS CREACIONES**

**TARJETA ARCHIVO TEMATICO**

SUPERINTENDENCIA

PATENTE DE INVENCION

PCT X

MODELO DE UTILIDAD

DISEÑO INDUSTRIAL

(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 08-01-2010

(51) Clasificación Internacional: C12N 9/64

(71) Solicitante(s) APEIRON BIOLÓGICOS AG

(72) Inventor(es) SCHUSTER, Manfred; LOIBNER, Hans; JANZEK-HAWLAT, Evelyn; PEBALL, Bernhard; STRANNER, Stefan; WAGNER, Bettina y WEIL, Robert.

(74) Apoderado: ALICIA LLOPEDA RICAURTE

| (30) Prioridad | (31) No. Prioridad | (32) Fecha      | (33) País |
|----------------|--------------------|-----------------|-----------|
|                | <b>A 913/2007</b>  | <b>12-06-07</b> | <b>AT</b> |
|                | <b>08450052.9</b>  | <b>08-04-08</b> | <b>EP</b> |

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 12-01-2010

(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT  
Fecha de presentación de la solicitud: 12-06-08  
No. De solicitud **PCT/AT2008/000211**

(87) Publicación internacional:

Fecha: 11-12-08

No. Publicación: **WO 2008/151347 A1**

**FIGURA CARACTERISTICA**

**6 x 6 cm**

(54) Título: **"POLIPEPTIDO ACE2"**

(57) Resumen:

Reivindicación número 1:

Un polipéptido ACE2 recombinante, caracterizado porque está presente como un dímero, en donde en ambos polipéptidos ACE2, todos los sitios de N-glicosilación posibles son glicosilados, ambos polipéptidos ACE2 cada uno tiene por lo menos 10 residuos de ácido siálico, ningún polipéptido ACE2 tiene un dominio de transmembrana y el dímero tiene Zn<sup>2+</sup>.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/AT2008/000211

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12N9/64 A61K35/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal; BIOSIS, EMBASE, WPI Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                   | Relevant to claim No. |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | VINCENT M J ET AL: "Chloroquine is a potent inhibitor of SARS coronavirus infection and spread"<br>VIROLOGY JOURNAL 20050822 GB,<br>vol. 2, 22 August 2005 (2005-08-22),<br>XP021010915<br>ISSN: 1743-422X 1743-422X<br>figure 5<br>page 6 - page 7<br>-----<br>-/-- | 1-41                  |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- \*S\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 September 2008

Date of mailing of the international search report

30/09/2008

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.O. 5016 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tr. 31 651 ext. 41  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Schmitz, Till

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/AT2008/000211

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Relevant to claim No. |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | <p>WARNER FIONA J ET AL:<br/>"Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2),<br/>but not ACE, is preferentially localized<br/>to the apical surface of polarized kidney<br/>cells."<br/>THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 25 NOV<br/>2005,<br/>vol. 280, no. 47,<br/>25 November 2005 (2005-11-25), pages<br/>39353-39362, XP002490917<br/>ISSN: 0021-9258<br/>figure 5<br/>page 39355, left-hand column<br/>page 39358, left-hand column</p> <p>-----</p>                        | 1-41                  |
| X         | <p>PEPTIDE AND PROTEIN-BASED THERAPEUTICS<br/>Pioneering New Frontiers January 7-9, 2008<br/>- Hotel Del Coronado - San Diego,<br/>California<br/>Downloaded 30.07.2008 from<br/><a href="http://www.infoshop-japan.com/conference/peptalk/pdf/peptide-proteinbased.pdf">http://www.infoshop-japan.com/conference/peptalk/pdf/peptide-proteinbased.pdf</a><br/>page 11, Development of an ACE2 Enzyme<br/>Substitution Therapy<br/>XP002490920<br/>abstract</p> <p>-----</p> | 1-41                  |
| A         | <p>KOST O A ET AL: "New feature of<br/>angiotensin-converting enzyme:<br/>carbohydrate-recognizing domain."<br/>JOURNAL OF MOLECULAR RECOGNITION : JMR<br/>2000 NOV-DEC,<br/>vol. 13, no. 6, November 2000 (2000-11),<br/>pages 360-369, XP002490918<br/>ISSN: 0952-3499<br/>table 1</p> <p>-----</p>                                                                                                                                                                        |                       |
| A         | <p>PRABAKARAN P ET AL: "A model of the ACE2<br/>structure and function as a SARS-CoV<br/>receptor"<br/>BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH<br/>COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC.<br/>ORLANDO, FL, US,<br/>vol. 314, no. 1,<br/>30 January 2004 (2004-01-30), pages<br/>235-241, XP004483586<br/>ISSN: 0006-291X<br/>figure 1<br/>page 236, right-hand column</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>                                                     |                       |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/AT2008/000211

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Relevant to claim No. |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A         | <p>VICKERS CHAD ET AL: "Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase"<br/> JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOCHEMICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM,; US,<br/> vol. 277, no. 17,<br/> 26 April 2002 (2002-04-26), pages 14838-14843, XP002464545<br/> ISSN: 0021-9258<br/> cited in the application<br/> the whole document</p> <p>-----</p> |                       |
| A         | <p>IMAI Y ET AL: "Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure"<br/> NATURE, NATURE PUBLISHING GROUP, LONDON, UK,<br/> vol. 436, no. 7047,<br/> 7 July 2005 (2005-07-07), pages 112-116, XP002349987<br/> ISSN: 0028-0836<br/> the whole document</p> <p>-----</p>                                                                                                                    |                       |
| A         | <p>TIPNIS ET AL: "A human homolog of Angiotensin-converting enzyme"<br/> JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOCHEMICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM,; US,<br/> vol. 275, no. 43,<br/> 27 October 2000 (2000-10-27), pages 33238-33243, XP002207551<br/> ISSN: 0021-9258<br/> the whole document</p> <p>-----</p>                                                                                    |                       |
| A         | <p>GUY J L ET AL: "Membrane-associated zinc peptidase families: comparing ACE and ACE2"<br/> BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA (BBA) - PROTEINS &amp; PROTEOMICS, ELSEVIER,<br/> vol. 1751, no. 1,<br/> 1 August 2005 (2005-08-01), pages 2-8, XP004995171<br/> ISSN: 1570-9639<br/> the whole document</p> <p>-----</p>                                                                                             |                       |

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
18. Dezember 2008 (18.12.2008)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2008/151347 A1**

(51) Internationale Patentklassifikation:

C12N 9/64 (2006.01) A61K 38/48 (2006.01)

(74) Anwalt: SONN & PARTNER; Eiemergasse 14, A-1010  
Wien (AT).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT2008/000211

(22) Internationales Anmeldedatum:

12. Juni 2008 (12.06.2008)

(25) Einreichungssprache:

Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache:

Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:

A 913/2007 12. Juni 2007 (12.06.2007) AT  
08450052.9 8. April 2008 (08.04.2008) EP

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für  
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,  
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BE, BG, BH, BR, BY,  
CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,  
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,  
HU, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ,  
LA, LC, LI, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, ME, MG, MK,  
ML, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG,  
PH, PL, PT, QA, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM,  
SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,  
VN, ZA, ZM, ZW.

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme  
von US): APEIRON BIOLOGICS FORSCHUNGS-  
UND ENTWICKLUNGSGESELLSCHAFT M.B.H.  
[AT/AT]; Brunner Strasse 59, A-1230 Wien (AT).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHUSTER, Man-  
fred [AT/AT]; Josef Weilandstrasse 84, A-2191 Schrick  
(AT). LOIBNER, Hans [AT/AT]; Heimgasse 23, A-1230  
Wien (AT). JANZEK-HAWLAT, Evelyne [AT/AT]; Kor-  
bgasse 2-4/1/2, A-1230 Wien (AT). PEBALL, Bernhard  
[AT/AT]; Burggasse 99, A-1070 Wien (AT). STRANNER,  
Stefan [AT/AT]; Zwerggrabeng. 18-24/25, A-1230 Wien  
(AT). WAGNER, Bettina [AT/AT]; Brüder Penner-Gasse  
3 Sig. 4/4, A-2700 Wiener Neustadt (AT).

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für  
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,  
GH, GM, KE, LS, MW, ME, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,  
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, EG, EC, MD, RU,  
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,  
EE, ES, FI, FR, GE, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,  
MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF,  
BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,  
TD, TG).

Erklärung gemäß Regel 4.17:

— Erfindersklärung (Regel 4.17 Ziffer iv)

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchebericht

(54) Title: ACE2 POLYPEPTIDE

(54) Bezeichnung: ACE2 POLYPEPTID

(57) Abstract: The present invention relates to recombinant ACE2 polypeptide, where the ACE2 polypeptide is present as a dimer. The dimer is formed specifically from glycosylated monomers and is used for producing pharmaceutical products with an extended half-life.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft rekombinantes ACE2 Polypeptid, wobei das ACE2 Polypeptid als Di-  
mer vorliegt. Das Dimer wird im speziellen aus glykosylierten Monomeren gebildet und zur Herstellung pharmazeutischer Produkte  
mit verlängerter Halbwertszeit eingesetzt.

WO 2008/151347 A1

From the INTERNATIONAL BUREAU

**PCT****NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE**(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

To:

SONN & PARTNER  
Riemergasse 14  
A-1010 Wien  
AUTRICHE

|                                                                   |                                                                         |
|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| Date of mailing (day/month/year)<br>03 December 2009 (03.12.2009) | <b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>                                           |
| Applicant's or agent's file reference<br>R 52100                  |                                                                         |
| International application No.<br>PCT/AT2008/000211                | International filing date (day/month/year)<br>12 June 2008 (12.06.2008) |

## 1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant
                     ☐ the inventor
                     ☐ the agent
                     ☐ the common representative

|                                                                                                                                                 |                            |                          |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|--------------------------|
| Name and Address<br>APEIRON BIOLOGICS FORSCHUNGS- UND<br>ENTWICKLUNGSGESELLSCHAFT M.B.H.<br>Campus-Vienna-Biocenter 5<br>A-1030 Wien<br>Austria | State of Nationality<br>AT | State of Residence<br>AT |
|                                                                                                                                                 | Telephone No.              |                          |
|                                                                                                                                                 | Facsimile No.              |                          |
|                                                                                                                                                 | E-mail address             |                          |

## 2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person
                     ☒ the name
                     ☐ the address
                     ☐ the nationality
                     ☐ the residence

|                                                                                                 |                                                                               |                          |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| Name and Address<br>APEIRON BIOLOGICS AG<br>Campus-Vienna-Biocenter 5<br>A-1030 Wien<br>Austria | State of Nationality<br>AT                                                    | State of Residence<br>AT |
|                                                                                                 | Telephone No.                                                                 |                          |
|                                                                                                 | Facsimile No.                                                                 |                          |
|                                                                                                 | E-mail address<br><input type="checkbox"/> Notifications by e-mail authorized |                          |

## 3. Further observations, if necessary:

## 4. A copy of this notification has been sent to:

- ☐
- the receiving Office
- 
- ☐
- the International Searching Authority
- 
- ☐
- the Authority(ies) specified for supplementary search

- ☐
- the International Preliminary Examining Authority
- 
- ☐
- the designated Offices concerned
- 
- ☒
- the elected Offices concerned
- 
- ☐
- other:

|                                                                                               |                                                                                                        |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| The International Bureau of WIPO<br>34, chemin des Colombettes<br>1211 Geneva 20, Switzerland | Authorized officer<br><br>Tolu Catherine<br>e-mail pt05.pct@wipo.int<br>Telephone No. +41 22 338 74 05 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Facsimile No. +41 22 338 89 75

From the INTERNATIONAL BUREAU

**PCT**NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

To:

SONN & PARTNER  
Riemergasse 14  
A-1010 Wien  
AUTRICHE

|                                                               |                                                                         |
|---------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| Date of mailing (day/month/year)<br>11 June 2008 (11.06.2008) | <b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>                                           |
| Applicant's or agent's file reference<br>R 52100              |                                                                         |
| International application No.<br>PCT/AT2008/000211            | International filing date (day/month/year)<br>12 June 2008 (12.06.2008) |

## 1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant
                    
 ☒ the inventor
                    
 ☐ the agent
                    
 ☐ the common representative

|                  |                      |                    |
|------------------|----------------------|--------------------|
| Name and Address | State of Nationality | State of Residence |
|                  | Telephone No.        |                    |
|                  | Facsimile No.        |                    |
|                  | E-mail address       |                    |

## 2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person
                    
 ☐ the name
                    
 ☐ the address
                    
 ☐ the nationality
                    
 ☐ the residence

|                                                                                              |                                                                               |                          |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| Name and Address<br>WEIK, Robert<br>Hauptstrasse 122<br>A-2724 Hohe Wand-Stollhof<br>Austria | State of Nationality<br>AT                                                    | State of Residence<br>AT |
|                                                                                              | Telephone No.                                                                 |                          |
|                                                                                              | Facsimile No.                                                                 |                          |
|                                                                                              | E-mail address<br><input type="checkbox"/> Notifications by e-mail authorized |                          |

## 3. Further observations, if necessary:

The person identified in Box 2 should be added to the record as applicant for the United States of America only and inventor for all designated States.

## 4. A copy of this notification has been sent to:

|                                                                                |                                                                                       |
|--------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> the receiving Office                                  | <input checked="" type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority |
| <input type="checkbox"/> the International Searching Authority                 | <input type="checkbox"/> the designated Offices concerned                             |
| <input type="checkbox"/> the Authority(ies) specified for supplementary search | <input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned                     |
|                                                                                | <input type="checkbox"/> other:                                                       |

|                                                                                               |                                                                                                     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| The International Bureau of WIPO<br>34, chemin des Colombettes<br>1211 Geneva 20, Switzerland | Authorized officer<br><br>Nibut Aicha<br>e-mail pt05.pct@wipo.int<br>Telephone No. +41 22 338 74 05 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|

# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Absender: INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE

An:

siehe Formular PCT/ISA/220

PCT

## SCHRIFTLICHER BESCHIED DER INTERNATIONALEN RECHERCHENBEHÖRDE (Regel 43bis.1 PCT)

Absendedatum  
(Tag/Monat/Jahr)  
210 (Blatt 2)

siehe Formular PCT/ISA/

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts  
siehe Formular PCT/ISA/220

**WEITERES VORGEHEN**  
siehe Punkt 2 unten

Internationales Aktenzeichen  
PCT/AT2008/000211

Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)  
12.06.2008

Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)  
12.06.2007

Internationale Patentklassifikation (IPC) oder nationale Klassifikation und IPC  
INV. C12N9/64 A61K38/48

Anmelder  
APEIRON BIOLOGICS FORSCHUNGS- UND ...

### 1. Dieser Bescheid enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- ☒ Feld Nr. I Grundlage des Bescheids
- ☒ Feld Nr. II Priorität
- ☐ Feld Nr. III Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- ☐ Feld Nr. IV Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- ☒ Feld Nr. V Begründete Feststellung nach Regel 43bis.1 a) i) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- ☐ Feld Nr. VI Bestimmte angeführte Unterlagen
- ☐ Feld Nr. VII Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- ☒ Feld Nr. VIII Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

### 2. WEITERES VORGEHEN

Wird ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung gestellt, so gilt dieser Bescheid als schriftlicher Bescheid der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde ("IPEA"); dies trifft nicht zu, wenn der Anmelder eine andere Behörde als diese als IPEA wählt und die gewählte IPEA dem Internationalen Büro nach Regel 66.1 bis b) mitgeteilt hat, dass schriftliche Bescheide dieser Internationalen Recherchenbehörde nicht anerkannt werden.

Wenn dieser Bescheid wie oben vorgesehen als schriftlicher Bescheid der IPEA gilt, so ist der Anmelder aufgefordert, bei der IPEA vor Ablauf von 3 Monaten ab dem Tag, an dem das Formblatt PCT/ISA/220 abgesandt wurde oder vor Ablauf von 22 Monaten ab dem Prioritätsdatum, je nachdem, welche Frist später abläuft, eine schriftliche Stellungnahme und, wo dies angebracht ist, Änderungen einzureichen.

Weitere Optionen siehe Formblatt PCT/ISA/220.

### 3. Nähere Einzelheiten siehe die Anmerkungen zu Formblatt PCT/ISA/220.

Name und Postanschrift der  
Internationalen Recherchenbehörde



Europäisches Patentamt - P.B. 5918 Patentamt  
NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas  
Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl  
Fax: +31 70 340 - 3016

Datum der Fertigstellung  
dieses Bescheids

siehe Formular  
PCT/ISA/210

Bevollmächtigter Bediensteter

Schmitz, Till

Tel. +31 70 340-4484



**SCHRIFTLICHER BESCHEID DER  
INTERNATIONALEN RECHERCHEBEHÖRDE**

Internationales Aktenzeichen  
PCT/AT2008/000211

---

**Feld Nr. 1 Grundlage des Bescheids**

---

1. Hinsichtlich der **Sprache** beruht der Bescheid auf

- ☒ der internationalen Anmeldung in der Sprache, in der sie eingereicht wurde
- ☐ einer Übersetzung der internationalen Anmeldung in die folgende Sprache, bei der es sich um die Sprache der Übersetzung handelt, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (Regeln 12.3 a) und 23.1 b)).

2. ☐ Dieser Bescheid wurde erstellt unter Berücksichtigung der **Berichtigung eines offensichtlichen Fehlers**, die nach Regel 91 von dieser Behörde genehmigt wurde bzw. dieser Behörde mitgeteilt wurde (Regel 43bis.1 a)).

3. Hinsichtlich der **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz**, die in der internationalen Anmeldung offenbart wurde und für die beanspruchte Erfindung erforderlich ist, ist der Bescheid auf folgender Grundlage erstellt worden:

a. Art des Materials:

- ☒ Sequenzprotokoll
- ☐ Tabelle(n) zum Sequenzprotokoll

b. Form des Materials:

- ☒ in Papierform
- ☒ in elektronischer Form

c. Zeitpunkt der Einreichung:

- ☒ in der eingereichten internationalen Anmeldung enthalten
- ☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in elektronischer Form eingereicht
- ☐ bei der Behörde nachträglich für die Zwecke der Recherche eingereicht

4. ☐ Wurden mehr als eine Version oder Kopie eines Sequenzprotokolls und/oder einer dazugehörigen Tabelle eingereicht, so sind zusätzlich die erforderlichen Erklärungen, dass die Information in den nachgereichten oder zusätzlichen Kopien mit der Information in der Anmeldung in der eingereichten Fassung übereinstimmt bzw. nicht über sie hinausgeht, vorgelegt worden.

5. Zusätzliche Bemerkungen:

**SCHRIFTLICHER BESCHEID DER  
INTERNATIONALEN RECHERCHEBEHÖRDE**

Internationales Aktenzeichen  
PCT/AT2008/000211

---

**Feld Nr. II    Priorität**

---

1. ☐ Die Gültigkeit des Prioritätsanspruchs wurde nicht geprüft, weil der Internationalen Recherchenbehörde keine Kopie der früheren Anmeldung, deren Priorität beansprucht worden ist, bzw. keine gegebenenfalls erforderliche Übersetzung der früheren Anmeldung vorliegt. Der Bescheid wurde trotzdem in der Annahme erstellt, dass das beanspruchte Prioritätsdatum das maßgebliche Datum (Regeln 43*bis*.1 und 64.1) ist.
2. ☐ Dieser Bescheid ist ohne Berücksichtigung der beanspruchten Priorität erstellt worden, da sich der Prioritätsanspruch als ungültig erwiesen hat (Regeln 43*bis*.1 und 64.1). Für die Zwecke dieses Bescheids gilt daher das vorstehend genannte internationale Anmeldedatum als das maßgebliche Datum.
3. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

siehe Beiblatt

---

**Feld Nr. V    Begründete Feststellung nach Regel 43*bis*.1 a) i) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

---

1. Feststellung

|                           |                                                            |
|---------------------------|------------------------------------------------------------|
| Neuheit                   | Ja: Ansprüche <u>40, 41</u><br>Nein: Ansprüche <u>1-39</u> |
| Erfinderische Tätigkeit   | Ja: Ansprüche <u>-</u><br>Nein: Ansprüche <u>1-41</u>      |
| Gewerbliche Anwendbarkeit | Ja: Ansprüche: <u>1-41</u><br>Nein: Ansprüche: <u>-</u>    |

2. Unterlagen und Erklärungen:

siehe Beiblatt

---

**Feld Nr. VIII    Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung**

---

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

siehe Beiblatt

**Zu Punkt II**

**Priorität**

Das beanspruchte Prioritätsdatum erscheint gültig.

**Zu Punkt V**

**Begründete Feststellung hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

Folgende Dokumente werden als relevant betrachtet:

- D1: VINCENT M J ET AL: "Chloroquine is a potent inhibitor of SARS coronavirus infection and spread" VIROLOGY JOURNAL 20050822 GB, Bd. 2, 22. August 2005 (2005-08-22), XP002490916 ISSN: 1743-422X 1743-422X
- D2: WARNER FIONA J ET AL: "Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), but not ACE, is preferentially localized to the apical surface of polarized kidney cells." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 25 NOV 2005, Bd. 280, Nr. 47, 25. November 2005 (2005-11-25), Seiten 39353-39362, XP002490917 ISSN: 0021-9258
- D3: PEPTIDE AND PROTEIN-BASED THERAPEUTICS Pioneering New Frontiers January 7-9, 2008 - Hotel Del Coronado - San Diego, California Downloaded 30.07.2008 from <http://www.infoshop-japan.com/conference/peptalk/pdf/peptide-proteinbased.pdf> page 11, Development of an ACE2 Enzyme Substitution Therapy XP002490920
- D4: KOST O A ET AL: "New feature of angiotensin-converting enzyme: carbohydrate-recognizing domain." JOURNAL OF MOLECULAR RECOGNITION : JMR 2000 NOV-DEC, Bd. 13, Nr. 6, November 2000 (2000-11), Seiten 360-369, XP002490918 ISSN: 0952-3499

1. a) Die vorliegenden Ansprüche beziehen sich u.a. auf hochglykosyliertes ACE2. Das natürlich vorkommende ACE2 wird, wie auch in der Beschreibung genannt, heterogen glykosyliert. Daraus folgt unter anderem, dass auch hochglykosyliertes ACE2 vorliegt. So wurde in Dokument D1 (Abbildung 5; Seiten 6 und 7 des Ausdrucks) glykosyliertes ACE2 mit 120

kDa beobachtet. Nach Neuramidasebehandlung lag das Gewicht bei 92 kDa. Daraus folgt, dass ACE2 überwiegend sialysiert ist. Die Dimerisierung kann nur als implizites Merkmal betrachtet werden. Ansprüche 1-38 sind daher nicht neu (Artikel 33(2) PCT).

- b) Der Anmelder nennt Vorzüge der erfindungsgemäßen ACE2 Präparation (besser löslich, homogene Zuckerstruktur, stabil, längerer Lagerungszeitraum, keine Aggregation (ausser Dimer), weniger immunogen). Gegenwärtig ist jedoch kein eindeutiger Unterschied zwischen den im Stand der Technik bekannten ACE2-Präparationen einerseits und dem erfindungsgemäßen ACE2-Präparationen andererseits erkennbar. Auf möglicherweise bestehende Unterschiede sollte vorzugsweise durch experimentelle Belege hingewiesen und die Ansprüche entsprechend beschränkt werden.
2. Dokument D2 offenbart (Abbildung 5) ein Molekulargewicht von etwa 120 kDa für glykosyliertes ACE2 und ein Gewicht von etwa 92 kDa nach Behandlung mit N-glycosidase F. ACE2 wurde in CHO Zellen stabil exprimiert. In Analogie mit dem obenstehendem Einwand entsprechen die Ansprüche 1-39 nicht den Erfordernissen von Artikel 33(2) PCT.
3. Mit Blick auf die obenstehenden Offenbarungen, kann der Gegenstand der Ansprüche 40, 41 nicht als erfinderisch betrachtet werden (Artikel 33(3) PCT).
4. Das Dokument D3 (Seite 11) offenbart:  
"Development of an ACE2 Enzyme Substitution Therapy  
Manfred Schuster, Ph.D., Chief Scientific Officer, Apeiron Biologics  
Our most advanced project is the development of an Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) based enzyme substitution therapy to treat lung, kidney and heart diseases. We have established an industrial and scalable CHO-based production process to generate highly soluble, fully active, complex N-glycosylated and not immunogenic recombinant, human soluble ACE2. This purpose was achieved by a comprehensive clone selection

strategy including productivity and product quality analysis at each selection round, including also intracellular FACS, activity and N-glycosylation analysis. Systemic administration of ACE2 previously has confirmed its pharmacological properties and proven a therapeutic benefit in ARDS in an LPS induced sepsis model in piglets."

Der Gegenstand der Ansprüche 32-38 ist daher nicht neu (Artikel 33(2) PCT).

### **Zu Punkt VIII**

#### **Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung**

5. Der Begriff "Sialylsäure-Reste" ist unklar, da nicht eindeutig ist, ob damit ausschließlich N-acetylneuraminsäure (Neu5Ac, NANA) oder sämtliche Derivate der Neuraminsäure gemeint sind.

Siehe z.B. Wikipedia.de (Zugriff am 30.07.2008, Auszug):

*Sialinsäuren (Synonym: Sialsäure) ist der Oberbegriff für die N- und O-Derivate der Neuraminsäure. Häufig wird die im Menschen vorkommenden N-Acetylneuraminsäure (NeuNAc oder NANA) als Sialinsäure bezeichnet. Der Begriff Sialinsäure umfasst aber auch eine Reihe weiterer Neuraminsäurederivate, auch wenn N-Acetylneuraminsäure die überwiegend vorkommende ist. [...]*

Der Anspruch 1 sollte wahrscheinlich N-Acetylneuraminsäure nennen, Grundlage in der Beschreibung vorausgesetzt (Anspruch 2; Artikel 6 PCT).

6. Aus Anspruch 21 sollte klar werden, dass "Dimere" nicht unter den Begriff "Multimer" fallen (Artikel 6 PCT).
7. Rekombinantes ACE2 ist allgemein bekannt, der Gegenstand der Ansprüche 32-41 im derzeitigen Wortlaut kann daher nicht als neu / erfinderisch betrachtet werden. Ausserdem ist gegenwärtig nicht deutlich welches besondere technische Merkmal die genannten Ansprüche mit den übrigen Ansprüchen verbindet (Artikel 33(2), 33(3), Regel 13 PCT).

## **POLIPÉPTIDO ACE2**

### **RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION**

5           La presente invención se relaciona al polipéptido ACE2 recombinante, donde el polipéptido ACE2 está presente como un dímero. El dímero se forma específicamente de monómeros glicosilados y se usa para producir productos farmacéuticos con una vida media prolongada.

**POLIPÉPTIDO ACE2**

La presente invención se relaciona al campo de producción de proteína recombinante.

5 La enzima que convierte angiotensina (ACE2) es una enzima clave en el sistema de renina-angiotensina. Esta es fijada a la membrana como una carboxipeptidasa, y expresada como un receptor principalmente en las células del pulmón, riñón y corazón, pero también en células  
10 endoteliales y segmenta varios sustratos de péptido. Representativos prominentes de los sustratos son angiotensina II (Ang II), que se segmenta a angiotensina 1-7 (Ang 1-7), angiotensina I, que se segmenta a angiotensina 1-9, y también apelina y bradiquinina. Ang II y Ang 1-7 son  
15 antagonistas del sistema de renina-angiotensina. Al controlar las relaciones de péptido, ACE2 es responsable para regular el grosor del vaso y para la permeabilidad endotelial, para influenciar de esta manera la homeostasis del organismo. La expresión de ACE2 es controlada con  
20 citoquina, inter alia, y es disminuida en varias enfermedades inflamatorias que subsecuentemente da por resultado un enriquecimiento patológico de Ang II, uno de los sustratos mucho más importantes para ACE2.

ACE2 se utiliza para tratar ARDS o ALI, dos  
25 formas de una enfermedad de pulmón aguda que está asociada con la expresión de ACE2 regulada hacia abajo en el pulmón. Esta terapia utiliza ACE2 humana soluble recombinante que se administra sistémicamente y está muy rápidamente disponible para el organismo completo con el fin de reducir  
30 una concentración elevada de Ang II y así producir Ang 1-7. Esto compensa los efectos negativos de las concentraciones

de Ang II incrementadas. En este caso, sería deseable tener un producto disponible que tenga un perfil farmacológico adecuado: por consiguiente, una sustancia adecuada sería caracterizada por buena distribución en el organismo, un tiempo medio farmacológicamente útil así como baja inmunogenicidad. En particular, el producto debe ser enzimáticamente activo, tener buena solubilidad y también ser estable en solución y ser capaz de ser reproduciblemente y económicamente producido con alta pureza.

Tipnis y colaboradores (J Biol Chem 275, (43) (2000): 33238-43) describe el aislamiento de ACE2 (en ese caso todavía referido como ACEH) y su aislamiento de cDNA. Al llevar a cabo la producción en células CHO, se produjo un monómero de proteína glicosilada con una masa molecular de 120 kDa. Después de la desglicosilación, la masa de esa proteína fue 85 kDa.

Donoghue (Circ Res 87, (5) (2000): 1-9) describe la expresión de ACE2 soluble en células CHO; esta no fue completamente glicosilada y se caracterizó por tener una masa molecular de aproximadamente 90 kDa. Además, ese documento se relaciona a comparaciones de secuencia de varias secuencias de ACE2 y anticuerpos anti-ACE2.

El documento 2004/023270 A2 describe la cristalización de ACE2 después de la expresión de monómeros de ACE2 en células de insecto Sf9. La masa molecular de la proteína fue dada como 89.6 kDa después del análisis mediante la espectrometría de masas.

La acción terapéutica de una terapia de sustitución de enzima eficiente demanda un proceso de producción que puede producir un producto

farmacológicamente eficiente, muy puro, económicamente y reproductiblemente. La fracción extra-celular, soluble de ACE2 contiene 7 sitios de N-glicosilación. La ACE2 no glicosilada tiene baja solubilidad, tiende hacia la  
5 agregación, es más inmunogénica y tiene un tiempo medio acortado. Además, tiene un diámetro hidrodinámico más pequeño que principalmente tiene un efecto perjudicial sobre la purificación. Así, un objetivo de la presente invención es proporcionar ACE2 altamente activa con un buen  
10 tiempo medio in vivo. Este objetivo se logra por la materia sujeto de las reivindicaciones.

La presente invención se relaciona a un polipéptido ACE2 recombinante que está presente como un dímero. De preferencia, el polipéptido ACE2 recombinante es  
15 glicosilado, en donde los grupos glicosilo de un monómero de polipéptido ACE2 están presentes en un total de por lo menos 10, 11, 12, 13, 14, 15 o por lo menos 16 residuos de ácido siálico, de preferencia por lo menos 14 residuos de ácido siálico, y en donde el polipéptido ACE2 está presente  
20 como un dímero. La presente invención también abarca un monómero ACE2 con las glicosilaciones, pesos moleculares y especificaciones adicionales definidas en la presente. El dímero es de preferencia un homo-dímero; en particular, sus unidades monoméricas tienen una secuencia idéntica y  
25 glicosilación. En general, las unidades monoméricas del dímero son enlazadas no covalentemente. Un monómero se puede obtener directamente del dímero o mediante etapas de desnaturalización. Todas las glicosilaciones preferidas citadas en la presente son aplicables a tanto el dímero  
30 como al monómero, incluyendo uno o ambos monómeros del complejo dimérico. Particularmente de preferencia, el

dímero contiene dos iones de zinc.

El término "residuos de ácido siálico" significa residuos del tipo de ácido N-acetil-neuramínico (Neu5Ac) en particular, especialmente N- u O-glicosilaciones.

5 Básicamente, la estabilidad de un terapéutico es un criterio muy importante cuando se considera su tiempo medio y así su efectividad.

La ACE2 humana recombinante hasta ahora no se ha identificado exclusivamente como un monómero y se ha  
10 descrito como tal en la literatura en cuanto a su funcionalidad, su estructura de cristal y también su interacción con un inhibidor altamente específico.

Así, por ejemplo, Towler y colaboradores (J Biol Chem 279(17), 2004:17996-18007), haciendo referencia a  
15 Vickers y colaboradores (J Biol Chem 277(17), 2002: 14838-14843), describe la expresión de ACE2 en células de insecto Sf9, que se obtuvo con un monómero después de la cromatografía de exclusión de tamaño de purificación como la etapa de purificación final. La masa molecular de un  
20 monómero fue 89.6 kDa.

ACE2 comercialmente disponible (de R&D Systems, número de catálogo 933-ZN, número de lote FIU035071) también está en la forma monomérica y se produce utilizando el método citado en Tipnis y colaboradores (2000, supra),  
25 la diferencia es que el sistema de expresión es NS0 en lugar de células CHO. Los monómeros se describieron que tienen un peso molecular de 120 kDa bajo condiciones tanto de reducción como de no reducción.

De acuerdo con Donoghue y colaboradores (Circ Res  
30 87, 2000: e1-e9), los monómeros ACE2 se expresaron en células CHO, que después de la secreción tuvo un peso

molecular de 90 kDa.

Todos los documentos y publicaciones citadas en la presente son incorporados aquí por referencia.

Con el fin de estabilizar el terapéutico de acuerdo con la invención, de acuerdo con la invención se ha desarrollado un método que exclusivamente produce dímeros de ACE2 estables, y que se beneficia de tanto la producción como las ventajas farmacológicas comparadas con los monómeros ACE2.

La dimerización tiene las siguientes ventajas:

- mejor solubilidad y biodisponibilidad en soluciones fisiológicas: el dímero tiene alta solubilidad y un tiempo medio in vivo más largo y disponibilidad;
- nada de formación de agregados: el dímero ACE2 forma complejos estables sin la adición de moléculas ACE2 adicionales al dímero;
- ataque de proteasa reducida: puesto que las fracciones de proteína individuales y de esta manera más probablemente la porción C-terminal, son dirigidas hacia el interior del dímero, este extremo C-terminal no es degradado;
- tiempo medio incrementado: la inmunogenicidad inferior, mejor solubilidad y la susceptibilidad reducida a la degradación proteolítica incrementa el tiempo medio de la proteína;
- purificación de proteína más simple: el diámetro hidrodinámico del dímero ACE2 es más alto que el esperado debido a su estructura y una cubierta de solvatación pronunciada. Así, los dímeros ACE2 se pueden separar fácilmente de las impurezas convencionales que surgen de la expresión de proteína, por ejemplo albúmina

de suero (67 kDa), al utilizar columnas de separación de tamaño.

De preferencia, el polipéptido ACE2 recombinante es glicosilado en por lo menos 80 % de los sitios de N-glicosilación posibles y tiene una proporción de azúcar de más de 10% (% en peso de ACE2 total) o 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, de preferencia más de 15 % o 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, en particular más de 20 % o 21 %, 22 %, 23 %, 24 % o 25 %.

Se ha desarrollado un método de producción que reproductiblemente produce ACE2 glicosilada altamente formada en complejo, muy pura y enzimáticamente activa. El producto se caracteriza por su alta proporción de azúcar (> 20% en peso) y las estructuras de azúcar de manera parcial negativamente cargadas, altamente ramificadas, complejas. Estos tienen un efecto positivo sobre la solubilidad, biodisponibilidad, actividad enzimática así como las propiedades farmacológicas del producto. Al seleccionar una construcción de expresión adecuada, un hospedero de expresión adecuado, una estrategia de selección optimizada, utilizando un medio que es adaptado para el metabolismo celular así como el análisis y selección de clon acompañante cuidadoso, una línea de células ha sido capaz de ser producida la cual secreta el producto deseado.

ACE2 ya se ha expresado en células de insecto Sf9 y células de ratón NS0. El ratón se utilizó principalmente en experimentos en vitro. También existen resultados que consideran la expresión transiente de ACE2 en células CHO. Hasta ahora, nada de líneas celulares se han producido con una alta productividad adecuadamente. Además, nada de selección de clon correspondiente todavía se ha llevado a

cabo considerando las propiedades del producto, en particular habiendo considerado la N-glicosilación.

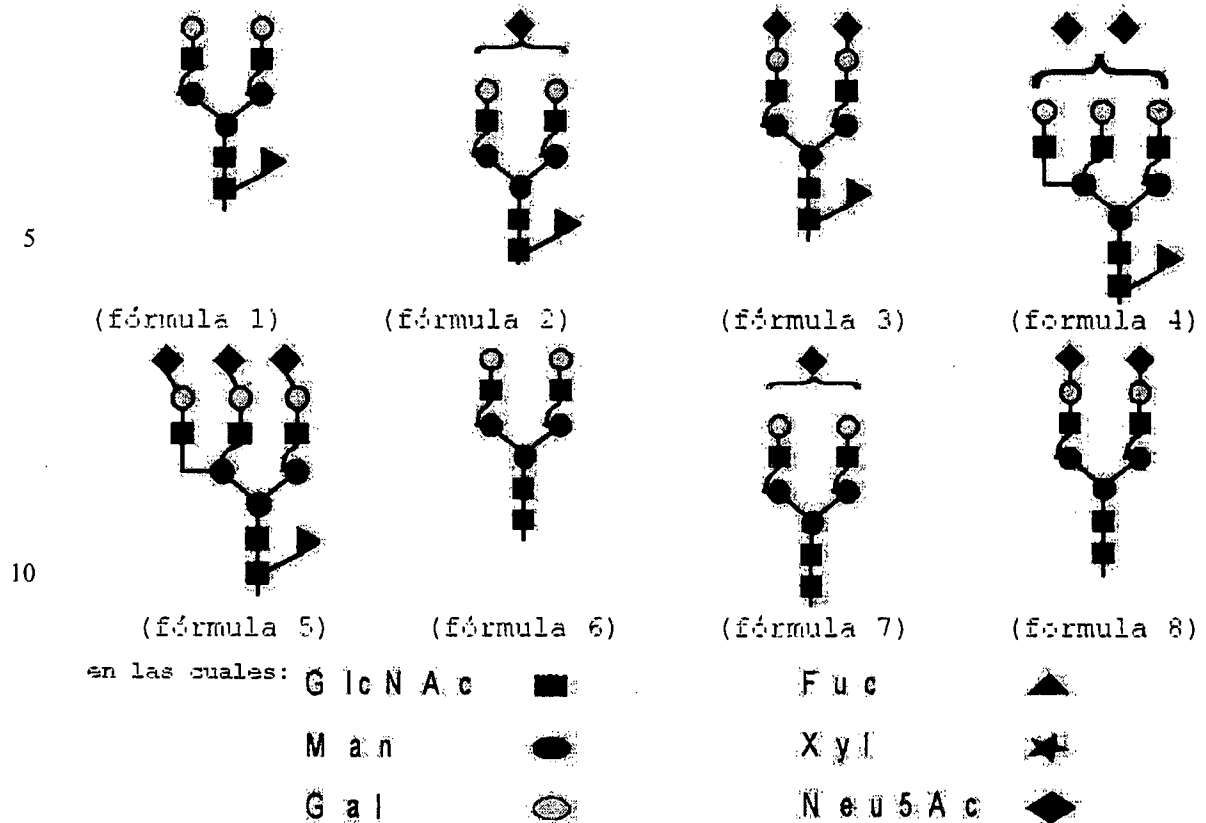
La solubilidad de una proteína no es solamente determinada por medio de su secuencia de aminoácidos, sino también por su plegamiento así como sus modificaciones post-traduccionales. Las estructuras de azúcar cargadas son la causa principal de un incremento en la solubilidad de una proteína y tiene una mayor influencia en su perfil farmacológico. Así, se ha mostrado para EPO que la presencia de glicoestructuras ramificadas complejas tiene un efecto positivo en el tiempo medio de esta proteína.

En principio, varios sistemas de expresión se pueden considerar para la expresión recombinante de ACE2; las células hospederas procarióticas no se han probado adicionalmente debido a la carencia de procesamiento de sitios de N-glicosilación.

De preferencia, por lo menos 70% de los sitios de N-glicosilación glicosilados tienen una estructura, independientemente entre sí, seleccionada de las fórmulas 1 a 8:

25

30



15 De preferencia, todos los sitios de N-glicosilación posibles son glicosilados.

De preferencia, por lo menos 80%, de preferencia por lo menos 90%, en particular 100% de los sitios de N-glicosilación glicosilados tienen una estructura, con las  
20 fórmulas 1-8.

De preferencia, una unidad de monómero ACE2 del dímero tiene un peso molecular de por lo menos 90 kDa, de preferencia por lo menos 92 kDa, particularmente de preferencia por lo menos 94 kDa, en particular por lo menos  
25 96 kDa, y altamente de preferencia por lo menos 98 kDa, mucho más de preferencia por lo menos 100 kDa, 100.5 kDa, 101 kDa, 101.5 kDa o por lo menos 102 kDa. Una masa molecular absoluta - es decir del péptido per se sin la cubierta de hidrato - puede ser determinada mediante el  
30 mapeo de péptido. Las formas más altamente glicosiladas también pueden tener masas moleculares de por lo menos 103

kDa, 104 kDa, 105 kDa, 106 kDa, 107 kDa o por lo menos 108 kDa.

Las determinaciones de peso molecular que son influenciadas por factores adicionales tales como la cubierta de hidrato, tal como la cromatografía o electroforesis de gel en sistemas acuosos - también puede dar resultados más altos. En modalidades adicionales, la unidad de monómero ACE2 del dímero tiene un peso molecular aparente de por lo menos 101 kDa o por lo menos 102 kDa, de preferencia por lo menos 105 kDa, particularmente de preferencia por lo menos 109 kDa, en particular por lo menos 113 kDa, y altamente de preferencia por lo menos 117 kDa, y mucho más de preferencia por lo menos 119 kDa, como es determinado mediante la electroforesis de gel.

En otras modalidades, el peso molecular del monómero (aparente o absoluto) es un máximo de 102 kDa, 103 kDa, 104 kDa, 108 kDa, 110 kDa, 112 kDa, 116 kDa, 120 kDa, 125 kDa, 130 kDa, 135 kDa o 140 kDa. Los pesos moleculares más altos son posibles mediante la modificación de ACE2, por ejemplo PEGilación.

De preferencia, el monómero (que no forma un dímero) tiene un peso molecular de por lo menos 82 kDa, de preferencia por lo menos 86 kDa, particularmente de preferencia por lo menos 90 kDa, en particular por lo menos 94 kDa, altamente de preferencia por lo menos 98 kDa, y mucho más de preferencia por lo menos 101 kDa o un máximo de 102 kDa, 103 kDa, 104 kDa, 108 kDa, 110 kDa o un máximo de 112 kDa. Estos pesos moleculares se pueden determinar, por ejemplo, utilizando el método de mapeo de péptido.

De preferencia, el polipéptido ACE2 no tiene dominios de trans-membrana. Así, este es ACE2 soluble. Las

modalidades particularmente preferidas así comprenden polipéptidos ACE2 solubles de las cadenas de polipéptidos que consisten de los aminoácidos 18-740 o fragmentos enzimáticamente activos del mismo. Un polipéptido adicional  
5 consiste de los aminoácidos 18-615 de la SEQ ID NO: 1.

Aunque la ACE2 humana (SEQ ID NO:1) es preferida para la mayoría de aplicaciones terapéuticas, ACE2 de otros mamíferos, por ejemplo ratón, rata, hámster, cerdo, primates o ganado vacuno, también se puede utilizar. ACE2  
10 es una enzima universal en todos los mamíferos con el sustrato de Ang II que es idéntico en las diversas especies. Por consiguiente, en principio también se puede utilizar en organismos extraños. Así, la proteína de acuerdo con la invención se puede utilizar sin considerar  
15 el origen de la ACE2, por ejemplo de humanos, ratones, ratas, hámsters, cerdos, primates o ganado vacuno. Sin embargo, en modalidades preferidas, el origen de la ACE2 y el organismo a ser tratado es el mismo.

De preferencia, una serina (o aminoácido C-terminal) del polipéptido ACE2 correspondiente a Ser740 de la SEQ ID NO: 1 (por ejemplo del extremo C-terminal) es O-glicosilada.  
20

De preferencia, por lo menos 70 %, de preferencia por lo menos 80 %, en particular por lo menos 90 % y mucho más de preferencia 100 % de los sitios N-glicosilación glicosilados que exhiben ácido siálico; de preferencia, los  
25 sitios de N-glicosilación correspondientes a Asn53, Asn90, Asn103, Asn322, Asn432, Asn546, Asn690 de la SEQ ID NO: 1 son sializados.

30 En modalidades específicas, una asparagina correspondiente a Asn53 de la SEQ ID NO: 1 es mono-, bi-,

tri- o tetra-sializada. De preferencia, en una preparación de ACE2 por lo menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o 100 % de los aminoácidos son ya sea mono-, bi-, tri-, o tetra-sializados.

5           En modalidades específicas, una asparagina correspondiente a Asn90 de la SEQ ID NO: 1 es mono-, bi-, tri- o tetra-sializada. De preferencia, en una preparación de ACE2 por lo menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o 100 % de los aminoácidos son ya sea mono-, bi-, tri-, o  
10 tetra-sializados.

          En modalidades específicas, una asparagina correspondiente a Asn103 de la SEQ ID NO: 1 es mono-, bi-, tri- o tetra-sializada. De preferencia, en una preparación de ACE2 por lo menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99  
15 % o 100 % de los aminoácidos son ya sea mono-, bi-, tri-, o tetra-sializados.

          En modalidades específicas, una asparagina correspondiente a Asn322 de la SEQ ID NO: 1 es mono-, bi-, tri- o tetra-sializada. De preferencia, en una preparación  
20 de ACE2 por lo menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o 100 % de los aminoácidos son ya sea mono-, bi-, tri-, o tetra-sializados.

          En modalidades específicas, una asparagina correspondiente a Asn432 de la SEQ ID NO: 1 es mono-, bi-,  
25 tri- o tetra-sializada. De preferencia, en una preparación de ACE2 por lo menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o 100 % de los aminoácidos son ya sea mono-, bi-, tri-, o tetra-sializados.

          En modalidades específicas, una asparagina  
30 correspondiente a Asn546 de la SEQ ID NO: 1 es mono-, bi-, tri- o tetra-sializada. De preferencia, en una preparación

de ACE2 por lo menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o 100 % de los aminoácidos son ya sea mono-, bi-, tri-, o tetra-sializados.

En modalidades específicas, una asparagina correspondiente a Asn690 de la SEQ ID NO: 1 es mono-, bi-, tri- o tetra-sializada. De preferencia, en una preparación de ACE2 por lo menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o 100 % de los aminoácidos son ya sea mono-, bi-, tri-, o tetra-sializados.

En modalidades específicas, una asparagina correspondiente a Ser740 de la SEQ ID NO: 1 es mono-, bi-, tri- o tetra-sializada. De preferencia, en una preparación de ACE2 por lo menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o 100 % de los aminoácidos son ya sea mono-, bi-, tri-, o tetra-sializados.

De preferencia, por lo menos 30%, de preferencia por lo menos 40 %, en particular por lo menos 55 % y mucho más de preferencia por lo menos 60 % de los sitios de N-glicosilación glicosilados tienen por lo menos dos ácidos siálicos. De preferencia, en una preparación de ACE2 por lo menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o 100 % de los aminoácidos son de esta manera sializados.

De preferencia, una asparagina correspondiente a Asn53 de la SEQ ID NO: 1 es N-glicosilada, de preferencia con un glicano que tiene una estructura de acuerdo con la fórmula 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8.

De preferencia, una asparagina correspondiente a Asn90 de la SEQ ID NO: 1 es N-glicosilada, de preferencia con un glicano que tiene una estructura de acuerdo con la fórmula 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8.

De preferencia, una asparagina correspondiente a

Asn103 de la SEQ ID NO: 1 es N-glicosilada, de preferencia con un glicano que tiene una estructura de acuerdo con la fórmula 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8.

De preferencia, una asparagina correspondiente a  
5 Asn322 de la SEQ ID NO: 1 es N-glicosilada, de preferencia con un glicano que tiene una estructura de acuerdo con la fórmula 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8.

De preferencia, una asparagina correspondiente a  
Asn432 de la SEQ ID NO: 1 es N-glicosilada, de preferencia  
10 con un glicano que tiene una estructura de acuerdo con la fórmula 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8.

De preferencia, una asparagina correspondiente a  
Asn546 de la SEQ ID NO: 1 es N-glicosilada, de preferencia  
con un glicano que tiene una estructura de acuerdo con la  
15 fórmula 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8.

De preferencia, una asparagina correspondiente a  
Asn690 de la SEQ ID NO: 1 es N-glicosilada, de preferencia  
con un glicano que tiene una estructura de acuerdo con la  
fórmula 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8.

20 En un aspecto adicional, la presente invención se relaciona a una preparación de polipéptidos ACE2 recombinantes, que comprende un polipéptido como se define en la presente (monómeros o dímeros ACE2 o unidades de monómeros de dímeros), en donde la porción de los  
25 polipéptidos ACE2 con un peso molecular aparente que puede ser determinada mediante la electroforesis de gel menor que 100 kDa, o menor que 101 kDa, de preferencia menor que 104 kDa, altamente de preferencia menor que 108 kDa, en particular menor que 112 kDa, particularmente de  
30 preferencia menor que 117 kDa, mucho más de preferencia menor que 119 kDa, es menor que 20 %, de preferencia menor

que 10 %, particularmente de preferencia menor que 5 %, y mucho más de preferencia menor que 1 %, especialmente 0 %, y cualquier combinación de los mismos. Por ejemplo, los polipéptidos ACE2 de menos de 100 kD se pueden presentar en una cantidad de 0 % y los polipéptidos ACE2 de menos de 100 kDa se pueden presentar en una cantidad menor que 20 %. La fracción con respecto a todas las formas ACE2 involucradas y es, por ejemplo, determinada utilizando la electroforesis de gel nativa.

De manera similar, la masa molecular puede ser la masa molecular absoluta que puede ser determinada mediante el mapeo de péptido. Así, la fracción de polipéptidos ACE2 con un peso molecular de menor que 86 kDa, o menor que 89 kDa, de preferencia menor que 92 kDa, altamente de preferencia menor que 94 kDa, en particular menor que 97 kDa, particularmente de preferencia menor que 100 kDa, y mucho más de preferencia menor que 101 kDa, es menor que 20 %, de preferencia menor que 10 %, particularmente de preferencia menor que 5 %, mucho más de preferencia menor que 1 %, especialmente 0 %, y cualquier combinación de los mismos. Por ejemplo, los polipéptidos ACE2 de menor que 86 kD se pueden presentar una cantidad de 0 %; y los polipéptidos ACE2 de menor que 97 kDa se pueden presentar en una cantidad de menor que 20 %.

De preferencia, la fracción de polipéptidos ACE2 con dominios de trans-membrana es menor que 20 %, de preferencia menor que 10 %, particularmente de preferencia menor que 5 %, mucho más de preferencia menor que 1 %, especialmente 0 %.

De preferencia, la fracción de multímeros ACE2 es menor que 20 %, de preferencia menor que 10 %,

particularmente de preferencia menor que 5 %, mucho más de preferencia menor que 1 %, especialmente 0 %. El término "multímeros ACE2" significa complejos con 3 o más polipéptidos ACE2. Además, en una preparación de dímeros

5 ACE2, la fracción de monómeros ACE2 es de preferencia menor que 20 %, de preferencia menor que 10 %, particularmente de preferencia menor que 5 %, mucho más de preferencia menor que 1 %, especialmente 0 %. Además, en una preparación de monómeros ACE2, la fracción de dímeros ACE2 es de

10 preferencia menor que 20 %, de preferencia menor que 10 %, particularmente de preferencia menor que 5 %, mucho más de preferencia menor que 1 %, especialmente 0 %.

De preferencia, la fracción de dímeros ACE2 en las moléculas ACE2 es por lo menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o por lo menos 99 %. En

15 modalidades adicionales, en combinación con la misma o independientemente, la fracción de monómeros ACE2 en moléculas ACE2 puede ser por lo menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o por lo menos 99 %.

20 De preferencia, la fracción de polipéptidos ACE2 con asparagina N-glicosilada correspondiente a Asn53 de la SEQ ID NO: 1 es más de 60 %, de preferencia más de 70 %, particularmente de preferencia más de 80 %, altamente de preferencia más de 90 %, mucho más de preferencia más de 99

25 % y especialmente 100 %, y de preferencia con un glicano que tiene una estructura de acuerdo con las fórmulas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8.

De preferencia, la fracción de polipéptidos ACE2 con asparagina N-glicosilada correspondiente a Asn90 de la

30 SEQ ID NO: 1 es más de 60 %, de preferencia más de 70 %, particularmente de preferencia más de 80 %, altamente de

preferencia más de 90 %, mucho más de preferencia más de 99 % y especialmente 100 %, y de preferencia con un glicano que tiene una estructura de acuerdo con las fórmulas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8.

5 De preferencia, la fracción de polipéptidos ACE2 con asparagina N-glicosilada correspondiente a Asn103 de la SEQ ID NO: 1 es más de 60 %, de preferencia más de 70 %, particularmente de preferencia más de 80 %, altamente de preferencia más de 90 %, mucho más de preferencia más de 99  
10 % y especialmente 100 %, y de preferencia con un glicano que tiene una estructura de acuerdo con las fórmulas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8.

De preferencia, la fracción de polipéptidos ACE2 con asparagina N-glicosilada correspondiente a Asn322 de la  
15 SEQ ID NO: 1 es más de 60 %, de preferencia más de 70 %, particularmente de preferencia más de 80 %, altamente de preferencia más de 90 %, mucho más de preferencia más de 99 % y especialmente 100 %, y de preferencia con un glicano que tiene una estructura de acuerdo con las fórmulas 1, 2,  
20 3, 4, 5, 6, 7 o 8.

De preferencia, la fracción de polipéptidos ACE2 con asparagina N-glicosilada correspondiente a Asn432 de la SEQ ID NO: 1 es más de 60 %, de preferencia más de 70 %, particularmente de preferencia más de 80 %, altamente de  
25 preferencia más de 90 %, mucho más de preferencia más de 99 % y especialmente 100 %, y de preferencia con un glicano que tiene una estructura de acuerdo con las fórmulas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8.

De preferencia, la fracción de polipéptidos ACE2  
30 con asparagina N-glicosilada correspondiente a Asn546 de la SEQ ID NO: 1 es más de 60 %, de preferencia más de 70 %, y de preferencia con un glicano que tiene una estructura de acuerdo con las fórmulas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8.

particularmente de preferencia más de 80 %, altamente de preferencia más de 90 %, mucho más de preferencia más de 99 % y especialmente 100 %, y de preferencia con un glicano que tiene una estructura de acuerdo con las fórmulas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8.

De preferencia, la fracción de polipéptidos ACE2 con asparagina N-glicosilada correspondiente a Asn690 de la SEQ ID NO: 1 es más de 60 %, de preferencia más de 70 %, particularmente de preferencia más de 80 %, altamente de preferencia más de 90 %, mucho más de preferencia más de 99 % y especialmente 100 %, y de preferencia con un glicano que tiene una estructura de acuerdo con las fórmulas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8.

De preferencia, la fracción de polipéptidos ACE2 con asparagina N-glicosilada correspondiente a Asn740 de la SEQ ID NO: 1 es más de 60 %, de preferencia más de 70 %, particularmente de preferencia más de 80 %, altamente de preferencia más de 90 %, mucho más de preferencia más de 99 % y especialmente 100 %, y de preferencia con un glicano que tiene una estructura de acuerdo con las fórmulas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8.

De preferencia, la actividad catalítica del polipéptido ACE2 o preparación,  $k_{cat}$ , es por lo menos  $4 \text{ s}^{-1}$ , de preferencia por lo menos  $5 \text{ s}^{-1}$ , particularmente de preferencia por lo menos  $6 \text{ s}^{-1}$ , altamente de preferencia por lo menos  $7 \text{ s}^{-1}$ , y mucho más de preferencia por lo menos  $7.6 \text{ s}^{-1}$  con respecto a la conversión de Ang 1-7 (angiotensina 1-7). Ang 1-7 se forma de Ang II (angiotensina II) por medio de ACE2. La conversión se puede probar de una manera simple, como es descrito en los ejemplos. Esta conversión o la actividad catalítica de ACE2

también puede ser extrapolada de otros datos de análisis. La actividad, por ejemplo, puede ser medida como es descrito en el documento WO-2008/04615 A.

En un aspecto adicional, la presente invención se relaciona a un método para producir polipéptidos ACE2 recombinantes o una preparación de ACE2 recombinante, que comprende las etapas de llevar un polinucleótido que codifica una ACE2 de preferencia un polinucleótido que codifica para una ACE2 sin dominio de transmembrana, en células eucarióticas, expresar el polipéptido ACE2 y recolectar el ACE2, en particular en la forma dimérica. Las células luego se pueden seleccionar con el fin de producir un polipéptido ACE2 de acuerdo con la invención como se describe en la presente, en particular con un alto peso molecular.

De preferencia, el polinucleótido que codifica para la ACE2 se proporciona sobre un vector.

De preferencia, la expresión ACE2 se selecciona con un marcador, de preferencia de DHFR. De preferencia, el marcador está sobre un vector.

De preferencia, el vector tiene un IRES para el mRNA de ACE2 expresado (o codifica para este).

De preferencia, las células eucarióticas son células CHO.

La presente invención también se relaciona a polipéptido ACE2 recombinante o una preparación de polipéptido ACE2 recombinante obtenible por tal método.

En un aspecto adicional, la invención proporciona una línea de células eucarióticas estables (o células) que tiene un polinucleótido transfectado que codifica para una ACE2, de preferencia una línea de células CHO (o células)

que expresa ACE2, en particular como se definieron en lo anterior. La línea de células puede ser seleccionada para las propiedades deseadas, como se ve en lo anterior, por ejemplo la producción de dímeros a partir de unidades de  
5 monómero con un peso molecular de por lo menos 102 kDa.

Las células de preferencia tienen una productividad de ACE2 de por lo menos 10 pg/célula/día, de preferencia por lo menos 15 pg/célula/día, particularmente de preferencia por lo menos 20 pg/célula/día.

10 La expresión de ACE2 de preferencia ocurre en la presencia de suficientes iones  $Zn^{2+}$ . De preferencia, por lo menos 0.5 micromolar, en particular hasta 5 micromolar de  $Zn^{2+}$  es utilizado; en particular, la fermentación se puede llevar a cabo utilizando 2.5-3.5 micromolar  $Zn^{2+}$ . La  
15 concentración de  $Zn^{2+}$  en el medio nutriente para las células expresadas, por ejemplo, puede ser por lo menos 0.5  $\mu M$ , 0.75  $\mu M$ , 1.0  $\mu M$ , 1.25  $\mu M$ , 1.5  $\mu M$ , 1.75  $\mu M$ , 2.0  $\mu M$ , 2.25  $\mu M$  o por lo menos 2.5  $\mu M$  o 3.0  $\mu M$ . Las etapas de tratamiento adicional de preferencia también se llevan a cabo en la  
20 presencia de iones  $Zn^{2+}$ .

En un aspecto adicional, la presente invención se relaciona a medicinas o preparaciones farmacéuticas del producto ACE2 de acuerdo con la invención, en particular para el tratamiento o la prevención de la alta presión  
25 sanguínea, insuficiencia cardíaca tal como insuficiencia cardíaca congestiva, aguda o crónica, infarto miocardiaco o arterosclerosis, o insuficiencia de riñón, enfermedad de riñón policística, PKD, o enfermedades de pulmón tal como la enfermedad de pulmón obstructiva crónica, neumonía,  
30 asma, bronquitis crónica, enfisema, fibrosis cística, enfermedad de pulmón intersticial, hipertensión pulmonar,

embolismo de pulmón, sarcoidosis del pulmón, tuberculosis, edema del pulmón, ALI, ARDS o cáncer de pulmón. Las indicaciones de tratamiento generales para ACE2 se citan en el documento WO2004/000367 A, por ejemplo; el producto ACE2  
5 de la invención también es adecuado en este caso.

De acuerdo con la invención, se puede proporcionar una composición farmacéutica o medicina que comprende la proteína ACE2. Tales composiciones pueden ser sales farmacéuticamente aceptables por si mismas, con  
10 soluciones reguladoras adicionales, componentes de tonicidad o portadores farmacéuticamente aceptables. Las sustancias portadoras farmacéuticas sirven para mejorar la compatibilidad de la composición y proporcionar mejor solubilidad así como mejor biodisponibilidad de los  
15 ingredientes activos. Ejemplos son: emulsificantes, espesantes, componentes de redox, almidones, soluciones alcohólicas, polietilenglicol y lípidos. La selección de un portador farmacéutico adecuado es altamente dependiente de la ruta de administración. Para la administración oral, los  
20 portadores líquidos o sólidos pueden ser utilizados; para inyecciones, se requieren composiciones finales líquidas.

De preferencia, la composición de ACE2 de acuerdo con la invención comprende soluciones reguladoras o sustancias tónicas. La solución reguladora puede ajustar el  
25 pH de la medicina a las condiciones fisiológicas y además, puede reducir o amortiguar las variaciones en el pH. Un ejemplo es una solución reguladora de fosfato. Las sustancias tónicas pueden ajustar la osmolaridad y pueden incluir sustancias iónicas, tales como sales inorgánicas,  
30 por ejemplo NaCl o KCl, o sustancias no iónicas tales como glicerina o carbohidratos.

De preferencia, la composición o la medicina para uso de acuerdo con la invención se prepara adecuadamente para administración sistémica, tópica, oral o intranasal o como una preparación inhalada. Estas formas de administración para la composición de la presente invención permiten la toma no complicada rápida. Cuando la composición de ACE2 se propone para administración oral, esta de preferencia se proporciona en una formulación que es resistente al ácido estomacal o es encapsulada. Para la administración oral, las medicinas sólidas o líquidas pueden ser tomadas directamente o disueltas o diluidas, por ejemplo.

La medicina para el uso de acuerdo con la invención es de preferencia producida para administración intravenosa, intra-arterial, intramuscular, intravascular, intraperitoneal o subcutánea. Las inyecciones o transfusiones, por ejemplo, son adecuadas para este propósito. La administración directamente a la corriente sanguínea tiene la ventaja de que el ingrediente activo de la medicina puede ser distribuido por todo el cuerpo completo y el tejido objetivo es alcanzado rápidamente.

La presente invención ahora será ilustrada adicionalmente utilizando las siguientes figuras y ejemplos no limitativos.

Figuras:

Figura 1: Expresión de ACE2 y casete de selección;

Figura 2: Análisis de manchado de Western específico de ACE2 de la historia del clon de producción;

Figura 3: Análisis de SD-PAGE del monómero ACE2;

Figura 4: Selección del clon;

Figura 5: Análisis de glicosilación de LC-MS;

Figura 6: Preparación de tamaño preparativa de ACE2;

Figura 7: Farmacocinética de ACE2 en 3 especies;

5        Figura 8: Curvas de calibración para la cuantificación de Ang 1-7 y Ang II. Los péptidos se separaron en el intervalo de concentración establecido utilizando RP-HPLC sobre columnas Waters C18  $\mu$ Bondapak RP, 2.1 x 300 mm, 10  $\mu$ m, 125 Å;

10        Figura 9: Espectro MS/MS del péptido N-terminal.  
Nota: Q y K tienen la misma masa.

Figura 10: Secuencia de ACE2 y predicción de N-glicosilación.

Figura 11: Espectro detallado para el sitio de  
15 glicosilación 103 (A), sitio 432 (B), sitio 546 (C), sitio 690 (D), sitio 90 (E);

Figura 12: Espectro del péptido O-glicosilado C-terminal. La asignación estructural debe ser clasificada como provisional;

20        Figura 13: Glicanos liberados de LC-MS;

Figura 14: Determinación de la estructura  
dimérica ACE2 utilizando PAGE nativa (izquierda, bandas de proteína visualizadas utilizando manchado de plata) y SEC  
(derecha, separación en la columna Zorbax G-450 en la  
25 presencia de Na-fosfato 220 mM a pH 7.0 en acetonitrilo al 10 %, el cromatograma se registró en 214 nm);

Figura 15: Cromatograma de la cromatografía de exclusión de tamaño del dímero ACE2 (tiempo de retención 8.55 min, 8.93 min). Estándar: tiroglobulina (670 kDa, 7.43  
30 min), gamma-globulina (158 kDa), ovalbumina (43 kDa, 10.08 min), mioglobulina (17 kDa, 11.08 min), vitamina B-12 (1.3

kDa, 12.71 min);

Figura 16: Análisis de manchado de Western específico de ACE2 de extractos de células de la corteza (A), cerebro (B) y un clon de expresión de dímero ACE2 (C).

5 D muestra un dímero ACE2 puro;

Figura 17: Cromatograma SEC-HPLC analítico de la forma de monómero ACE2. Condiciones de corrida: columna: Zorbax GF250, solución reguladora:  $\text{Na}_2\text{H-PO}_4$  220mM +  $\text{CH}_3\text{CN}$  al 10%, pH 8.0 a 1 mL/min;

10 Figura 18: Análisis de PAGE de dímeros ACE2 (A) y monómeros ACE2 (B); proteínas reveladas utilizando la mancha de plata (a) y el manchado de Western específico de ACE2 (b); Figura 19: Determinación de la actividad enzimática de los monómeros ACE2 en comparación con los  
15 dímeros ACE2. Una concentración inicial constante del sustrato marcado con fluorescencia cumarina-APK-DNP y cuatro concentraciones de enzima diferentes se utilizaron y las curvas de fluorescencia correspondientes se compararon;

Figura 20: Actividad de suero de ACE2 medida 24 y  
20 48 horas después de la administración del dímero ACE2 (2.5 mg/kg, columnas azules) o la administración de forma monomérica ACE2 (2.5 mg/kg, columnas grises).

#### EJEMPLOS

Ejemplo 1: Expresión del dímero ACE altamente  
25 glicosilado

La fracción soluble de la secuencia ACE2 humana (SEQ ID NO: 1) se clonó en un vector de expresión en el cual el marcador de selección DHFR amplificado ya se ha adicionado, para dar por resultado la expresión aumentada  
30 del gen ACE2. Con este fin, entre los genes que codifican para ACE2 y dhfr, un IRES atenuado se insertó el cual

permitió la transcripción bi-cistronica de ACE2 y DHFR sobre el mismo mRNA. La expresión de ACE2 y el casete de selección se muestran gráficamente en la Figura 1. Puesto que ambas proteínas son expresadas bajo el control del mismo promotor, la expresión de ACE2 puede ser intencionalmente aumentada por medio de la selección de DHFR utilizando el antagonista MTX. Esta estrategia puede producir líneas de células de expresión particularmente estables que proporcionan altos rendimientos de un producto con una calidad constante. Esto también significa que los títulos de productos razonables también se pueden obtener en líneas de células que pueden ser posiblemente menos adecuadas para la expresión recombinante de una proteína objetivo específica.

Este vector se transfectó en células CHOdhfr y el número de copias del ACE2 se amplificó bajo presión de MTX continuamente incrementada. Varios ciclos de selección y subclonación se utilizaron para seleccionar los mejores productos con propiedades de producto optimada utilizando en análisis FACS intracelular y proteína-química así como el análisis enzimático: en particular, para seleccionar los clones mucho más adecuados, la actividad enzimática específica, que se midió con 3 diferentes sustratos, la homogeneidad de producto y la productividad celular, y también la complejidad del azúcar se tomaron en cuenta. La Figura 2 muestra un resumen del análisis de manchado de Wertern de los residuos de cultivo sucesivos de clones individuales que se utilizaron para establecer la línea de células de producción. Las propiedades del producto de los clones individuales difieren en que la proporción de azúcar en el producto de expresión se incrementa de la derecha a

la izquierda, como se muestra por el incremento sustancial en la masa. Esto se obtuvo mediante la selección específica de clones altamente glicosilados. Finalmente, un clon (clon 5B9) que tuvo el producto de expresión con el peso molecular más alto se utilizó para establecer la línea de células de producción (184).

Se decidió considerar las materias con 6 clones con ACE2 enzimáticamente expresada altamente activa y N-glicosilada compleja. Mientras que ACE2 soluble tiene un peso molecular de 83 kDa, los clones se seleccionaron de modo que estuvieron en el intervalo de hasta 120 kDa en SDS-PAGE desnaturalizante, como es determinado por su estructura de azúcar. La Figura 3 muestra un ACE2 (franja B) producido por el proceso de producción presente comparado con un ACE2 estándar producido en NSO (franja A). Mientras que el polipéptido ACE2 de acuerdo con la invención - analizado aquí como el monómero - es homogéneo y altamente glicosilado y de esta manera aparece como una sola banda en aproximadamente 120 kDa, las bandas para el material de referencia son de 83 kDa a 120 kDa, indicando glicosilación altamente heterogénea.

Los clones preliminares luego se transfirieron sobre el medio de crecimiento libre de proteína (Polymun). Este medio comercialmente disponible es químicamente definido, libre de suero, libre de proteínas animales y optimizado para la expresión recombinante de glicoproteínas en CHO. La fermentación se llevo a cabo con 2.5 - 3.5  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$ . Todos los 6 clones se conservaron bajo cultivo y se probaron para su adecuadabilidad del proceso de producción. En particular, las proporciones de crecimiento se registraron y las cantidades de productos y metabolitos se

examinaron (Figura 4). Además, los productos de expresión y los clones se analizaron precisamente. Todos los clones expresaron ACE2 altamente activa y tuvieron productividades de 20-30 pg/célula/día. Además, las estructuras de azúcar y la heterogeneidad de las mismas se analizaron. Finalmente, se seleccionó el clon 1B4. Durante el proceso de producción completo, este exhibió una estructura de azúcar homogéneo. Todos los 7 sitios de N-glicosilación se procesaron; ellos tuvieron por lo menos una glicosilación compleja bi-, pero ocasionalmente a un tri-ramificada con ácidos siálicos terminales.

Un banco de células maestro se produjo y se probó basado en este clon, y un proceso de purificación de clase GMP y además, un proceso de producción de clase GMP se construyeron.

La SEQ ID NO: 1 (secuencia de proteína ACE2; la secuencia de señal autóloga (subrayada) es segmentada por la célula hospedera para la expulsión):

MSSSSWLLLSLVAVTAA  
 QSTIEEQAKTFLDFNHEAEDLFYQSSLAZWYINTNITEENVQNMNAGDK-  
 20 WSAFLKEQSTLAQMYPQLQEIQLTVELQLQALQNGSSVLSEDESFELNTILNTMETIYSTGK-  
 VCNFENPQECLLLEPGLNEIMANSLDYNEFLWAWESWFSEVGRQLFPLYEEVVLFINEMAFANH  
 YEDYGDYWFPGDYEVNGVLDGYDISEGQLIEDVEHTFEEIKFLYEHHLHAYVPAFLMNAYPEYIS-  
 FIGCLFAHLLGDMWGFRTWNLVSLTVFPGQKFNIDVTDAMVDQAWDAQPIFHEAEKFFVS-  
 VGLFNMTQGFWENSMLTDFGNVQKAVCHPTAWDLGKGDFRILMCTKVMTMDFLTARHEMGGHIQY  
 DMAYAAQPFLLNGANEGFHEAVGEIMLSAATEKHLK3IGLLSPOFQEDNETEINFLKQAL-  
 TIVGTLEFTYMLEKFWFMVFEHGEIPIKQWMMFWWEMFEIVGVVEIVPHDETYCDPASLF-  
 25 HVSNDYSEFIRYYTETLYQFQFQALCQAAHHEGFLHKCLISNSTEAGQKLFNMLRLGFSPEWTL  
 ALENVVGAKNMNVFELLNYFEPLFTWLFQDNFNSFVGWSTDWSPYADQSIKVRISLKSALG-  
 DEAYEWNDNEMYLFPSVAYAMEQYFLIVNQMLFGGEELVFEVANLEFPRISNFFVTAPFIVS-  
 DIIPRTEVEKAIFMSESEINDAFFELNDNSLEFLGIQPTLGFFNQPEVS

La dimerización de ACE2 dirige todas las unidades de proteína hidrofóbica dentro del interior del complejo, después de lo cual los residuos cargados, tales como cadenas de azúcar N-enlazadas, se proyectan hacia afuera y

solvatan la estructura en el medio fisiológico cargado. La dimerización mediante la expresión de un ACE2 completamente N-glicosilado se observó en la presencia de  $\text{Zn}^{2+}$ . En este caso, el complejo de dímero consistió de 2 subunidades  
5 idénticas, que fueron electrostáticamente enlazadas entre sí y también no separadas por más tiempo en soluciones fisiológicas. Esto conduce a la secreción de una glicoproteína cada tiempo con 14 estructuras de ácido siálico altamente cargadas sobre cada molécula de ACE2 así  
10 como 28 estructuras de ácido siálico en el dímero. Dos iones  $\text{Zn}^{2+}$  son cada tiempo insertados en el complejo y estabilizan su estructura. La alta carga de las cadenas de azúcar solvatan la molécula en soluciones fisiológicas acuosas y forzan los dominios de proteína cargados  
15 asociados hacia afuera. El proceso de producción se construye de modo que solamente los dímeros ACE2 están presentes en el producto final.

Esto se vuelve posible por el simple hecho de que en la generación del ACE2, suficientes iones de  $\text{Zn}^{2+}$  están  
20 presentes (de preferencia 1.5 - 5 micromolar  $\text{Zn}^{2+}$  se utiliza; en particular, la fermentación se puede llevar a cabo en 2.5 - 3.5  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$ ); las etapas de tratamiento subsecuentes se llevan a cabo en la presencia de iones  $\text{Zn}^{2+}$ .

25 La purificación se lleva a cabo utilizando una etapa de intercambio aniónico, una precipitación de sulfato de amonio, una etapa HIC, una etapa de intercambio catiónico luego una etapa de intercambio aniónico de alta resolución adicional. Todo de los medios en el proceso  
30 fueron regulados con fosfato y contuvieron cloruro de sodio. La solución reguladora de muestra final es una

solución de glicina fisiológica para la inyección.

#### Ejemplo 2: Propiedades del producto

El monómero ACE2 altamente glicosilado, formado en complejo, o unidades de monómeros del dímero tienen un peso molecular mucho más alto que aquel indicado por la secuencia de aminoácidos debido a las estructuras de azúcar covalentemente enlazadas. Así, el mapeo de péptido proporciona una masa molecular de 102 kDa, mientras que aquel de ACE2 no glicosilado es solamente 83 kDa. La proporción de azúcar es correspondientemente 23 % y es esencial para las propiedades del producto descritas en seguida. Debido a la fuerte hidratación, la unidad de monómero aparece en SDS-PAGE en 120 kDa (Figura 3) con respecto al estándar de referencia.

El ACE2 enlazado a la membrana, natural no es expresado, sino solamente la fracción soluble de ACE2. Debido a la pérdida del dominio de membrana, este es completamente glicosilado.

Debido a las estructuras de azúcar complejas, altamente sializadas y de esta manera de forma alta negativamente cargadas, ACE2 tiene una solubilidad mucho más grande comparada con la ACE2 no glicosilada o incompletamente glicosilada. Así, las formaciones de proteína reguladas fisiológicas de hasta 15 mg/mL se pueden producir fácilmente.

Además, el producto es estable en solución y cuando se almacena a largo plazo, éste no pierde la actividad ni tiende a degradarse o agregarse, aparte de la dimerización estable. ACE2 desglicosilado, por otra parte, precipita uniformemente en intervalos de concentración bajos. Esto se puede mostrar en un experimento de

desglicosilación preparativo utilizando PNGasaF. El índice de estabilidad teórico calculado para ACE2 es 41.2 y clasifica la proteína como inestable; las estructuras de azúcar no se consideran para este cálculo. Sin embargo, 5 puesto que las formulaciones permanecen estables durante meses, esto es claramente debido a la alta proporción de azúcar. La mejor solvatación de ACE2 también significa que esta formulación exclusivamente consiste de dímeros ACE2 (o después de la separación artificial al monómero, 10 exclusivamente de monómeros) mientras que ACE2 no glicosilado tiende a formar multímeros y agregados.

Debido a la fracción grande de residuos de azúcar cargados se incrementa el diámetro hidrodinámico, la cubierta de solvatación de la presente preparación de ACE2 15 se incrementa sustancialmente. Esta situación se puede explotar para la purificación preparativa de ACE2 mediante columnas de separación de tamaño; aquí, la proteína que está exclusivamente presente como un dímero tiene un peso molecular aparente de 250 kDa comparado con el 83 kDa 20 calculado. Un cromatograma de una purificación de ACE2 preparativa se muestra en la Figura 6. ACE2 (primer dibujo) eluye con un tiempo de retención de 69 minutos. Esto corresponde a un peso molecular aparente entre aquel de la trioglobulina (primer dibujo, 58 minutos, 670 kDa) y 25 gamma-globulina (primer dibujo, 74 minutos, 158 kDa). En esta región de alto peso molecular, prácticamente no hay contaminación en los residuos de cultivo, y así producto muy puro se puede separar en una etapa de separación muy simple.

30 Ejemplo 3: Propiedades del producto farmacológico  
La preparación de ACE2 de la invención está

presente en soluciones reguladoras fisiológicas como una solución de proteína estable, muy pura y concentrada, y se puede almacenar y se puede administrar sin estabilización adicional. Una solución reguladora de fosfato, por ejemplo,  
5 puede ser empleada.

ACE2 es estable como el monómero o dímero en solución y debido a la alta proporción de azúcar, éste no exhibe agregación. Además, la preparación de ACE2 tiene actividad enzimática completa.

10 Debido a su solubilidad, ACE2 se puede administrar i.v. como un bolo. Por las mismas razones la biodisponibilidad es garantizada inmediatamente después de la administración.

Debido a la proporción alta, altamente ramificada  
15 y de complejo de azúcar, ACE2 es degradado solo lentamente. Eso da por resultado un tiempo medio largo de por lo menos 10.5 horas, que se ha medido en varias especies, en particular el macaco rhesus. La Figura 7 muestra los tiempos medios medidos para el ACE2 administrado i.v. en 3  
20 especies.

El alto contenido de ácido siálico también significa que nada de respuesta inmune neutralizante se monta contra ACE2. Esto no solamente sería contraproductivo para la administración de un exógeno de ACE2, sino también  
25 podría neutralizar el ACE2 autólogo presente en las células.

La formulación de ACE2 descrita junto con todas las propiedades del producto asociadas de esta manera proporciona una terapia efectiva con rhACE2.

30 Ejemplo 4: Determinación de la actividad de ACE2 específica

La actividad específica de las preparaciones de ACE2 se determinó al medir la conversión de Ang II (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe). Todas las mediciones se llevaron a cabo por triplicado en alícuotas de 100 µL. La reacción enzimática se inició al adicionar 250 ng/mL de ACE2 a una solución de Ang II 80 µM en MES 50 mM, NaCl 300 mM, ZnCl<sub>2</sub> 10 µM y Brij-30 al 0.01 % a un pH de 6.5. Las mezclas se mezclaron cuidadosamente y se incubaron a 37°C durante exactamente 18 minutos. La reacción enzimática se detuvo al adicionar EDTA 100 mM. Para el análisis, las soluciones se separaron utilizando RP-HPLC (Waters C18 µBondapak, 2.1 (300 mm, 10 µm, 125 Å) utilizando un gradiente lineal de CH<sub>3</sub>CN al 10 % al 60 % en H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 0.08 % durante 20 minutos en un gasto de flujo de 1 mL/min. Además, ambos picos de Ang II y Ang 1-7 se detectaron en el cromatograma y se integraron. Las concentraciones de péptido se determinaron utilizando las curvas de calibración apropiadas mostradas en la Figura 8. Además, la conversión enzimática y la actividad de enzima específica se determinaron.

La actividad del producto ACE2 se determinó como es descrito en lo anterior. La Tabla 1 muestra los resultados de la integración pico así como los datos de enzima calculados.

Tabla 1: Datos de enzima y condiciones de reacción. El valor medio de determinaciones por triplicado es mostrado.

| Reactividad enzimática  |                        |                    |              |                 |                                          |
|-------------------------|------------------------|--------------------|--------------|-----------------|------------------------------------------|
| Área de superficie pico | Conversión             | Tiempo de reacción | conc de ACE2 | Ccat            | Actividad específica                     |
|                         | µmol.min <sup>-1</sup> |                    |              | s <sup>-1</sup> |                                          |
|                         |                        |                    |              |                 | µmol.mg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> |

| mAU.min  |      | min | ng.mL <sup>-1</sup> |           |           |
|----------|------|-----|---------------------|-----------|-----------|
| Ang II   |      |     |                     |           |           |
| 17149890 | 62.1 | 18  | 250                 | 8.0 ± 0.3 | 4.7 ± 0.2 |
| Ang 1-7  |      |     |                     |           |           |
| 4720141  | 23.1 | 18  | 250                 | 8.8 ± 0.2 | 5.2 ± 0.1 |

La preparación de ACE2 tuvo una actividad catalítica, *ccat*, de 8.0 ± 0.3 s<sup>-1</sup> medida utilizando la conversión de Ang II, y 8.8 ± 0.2 s<sup>-1</sup> con respecto a la conversión de Ang 1-7. Ambos valores estuvieron en buen  
5 acuerdo y fueron mucho más altos que los datos dados por Vickers y colaboradores (J Biol Chem 277, (17) (2002): 14838-43), que publicó una actividad de ACE2 catalítica de 3.5 S<sup>-1</sup>. Las condiciones de reacción fueron idénticas. La razón para la actividad más alta de 240 % para la  
10 preparación de los inventores pueden ser las modificaciones post-traduccionales si en este caso principalmente la N-glicosilación, que fue mucho menos pronunciada en el material utilizado por Vickers. Este material se expresó en células de insecto y en realidad tuvo la misma secuencia de  
15 aminoácido, pero fue glicosilado a un grado mucho menor y grado de ramificación. Además, una preparación de ACE2 comercialmente disponible de R&D Systems (cat no 933-ZN) que también tuvo una actividad mucho menor *ccat*, de 2.0 ± 0.1 s<sup>-1</sup>, se examinó. Una propiedad esencial de la  
20 preparación de la invención es la actividad enzimática particularmente alta que se permitió principalmente por las modificaciones post-traduccionales.

Ejemplo 5: Análisis glicoproteómico de la ACE2 recombinante

La muestra de ACE2 expresada en CHO, purificada se analizó en dos maneras:

En primer lugar, los péptidos tripticos se produjeron utilizando SDS-PAGE y S-alquilación y se analizaron utilizando LC-ESI-MS (y MS-MS). El péptido N-terminal y varios péptidos internos se encontraron. Cinco de los siete sitios N-glicosilados potenciales se encontraron en la forma glicosilada con estructuras de glicano que principalmente contuvieron glicanos di-ramificados con fucosa y varias cantidades de ácido siálico. El péptido C-terminal apareció que es O-glicosilado.

En segundo lugar, los N-glicanos reducidos, libres se analizaron utilizando carbono LC-ESI-MS. Para el glicano di-dializado, di-ramificado con fucosa, se mostró que la fucosa fue enlazada al núcleo  $\alpha 1,6$  y el ácido siálico fue  $\alpha 2,3$ -enlazado. Además de los glicanos mono- o di-sialisados di-ramificados, una cantidad considerable de oligosacárido tr-ramificado se encontró. Un estimado grueso de la masa de ACE2 glicosado produjo 101-102 kDa, es decir, que consiste de aproximadamente 17 % de carbohidrato.

Digestión proteolítica de hBChE separado utilizando SDS-PAGE.

Alícuotas de ACE2 sometidas a SDS-PAGE, se desmancharon, se carbamido-metilaron, se digirieron con tripsina de calidad de secuenciación y se extrajeron sobre piezas de gel como es descrito. Los extractos se secaron en un concentrador Speed Vac y se reconstituyeron con agua que contiene ácido fórmico al 0.1 % antes del análisis de LC-MS subsecuente. Para el análisis de oligosacárido, el péptido se digirió con PNGasa F y los glicanos se purificaron

utilizando cartuchos de C18 SPE.

Análisis de MS de péptidos tripticos y péptidos de glicol

El análisis espectrométrico de masas se llevó a cabo en un instrumento Q-TOF Ultima Global (Waters Micromass) proporcionado con una unidad electrorrocío estándar, un sistema Cap-LC (Waters Micromass) y un módulo de intercambio de solvente de 10 orificios (Rheodyne) como es descrito recientemente [Kolarich 2006]. Las muestras se capturaron inicialmente en una columna preliminar Aquasil C18 (30 x 0.32 mm, Thermo Electron) utilizando agua como el solvente. La columna analítica, una columna Biobasic C18 (100 x 0.18 mm, Thermo Electron) se mantuvo antes del intercambio de solvente sobre acetonitrilo al 5 % y luego un gradiente lineal de acetonitrilo al 5 % al 50 % se aplicó con un gasto de flujo de 2 µL/min. Todos los medios de elución contuvieron ácido fórmico al 0.1 %.

Las muestras se analizaron mediante MS- y también por MS-MS. El análisis de datos se llevó a cabo utilizando el software MassLynx 4.0 SP4 (Waters Micromass).

Análisis de N-glicanos libres a partir de ACE2

Los glicanos reducidos con borohidruro se separaron en una columna de carbono grafítico porosa y se analizaron utilizando la espectrometría de masas.

Ejemplo 6: Análisis de glicosilación

El peso molecular, la posición de todos los sitios de glicosilación así como la estructura del azúcar enlazado para la secuencia de proteína ACE2 se determinaron en la presente. La muestra se analizó utilizando la digestión triptica, S-alquilación y LC-ESI-MS.

- La masa de proteína determinada del producto

glicosilado fue 102 kDa, en donde la proporción de azúcar fue 23 % de la masa total;

- el extremo N-terminal y la presencia de todos los péptidos internos de la secuencia se determinaron aquí (ver información de la secuencia);

- todos los 7 sitios de N-glicosilación postulados (posiciones 53, 90, 103, 322, 432, 546 y 690) actualmente contuvieron estructuras de azúcar fucosiladas que contienen ácido siálico, complejas, bi-ramificadas (Figura 13);

- el péptido C-terminal fue O-glicosilado.

La estructura de estos residuos de azúcar se determinó mediante carbono-LC-ESI-MS después de la segmentación y reducción. Cada una y todas las estructuras di-ramificadas contuvieron dos ácidos siálicos  $\alpha$ 2,3-enlazados y una fucosa  $\alpha$ 1,6-enlazada. Cantidades pequeñas de estructuras tri-ramificadas también se encontraron (Figura 11). La estrategia de selección empleada significa que se obtuvo un producto de expresión completamente glicosilado y que contiene ácido siálico.

#### Método:

##### Preparación de la muestra

ACE2 se separó utilizando SDS-PAGE, se desmanchó, se alquiló y se digirió utilizando tripsina (Kolarich y colaboradores, Proteomics 6 (2006):3369-3380). Los extractos de gel se secaron y se disolvieron en ácido fórmico al 0.1% antes del análisis de LC-MS. Para el análisis de azúcar, el péptido se digirió con PNAGasa-F y se purificó en columna C18 SPE.

##### Análisis de MS

Todos los análisis espectroscópicos de masa se

llevaron a cabo utilizando el instrumento Ultima Global Q-TOF (Waters Micromass) con una unidad de electrospray estándar y un sistema Cap-LC (Waters Micromass).

Las muestras se concentraron en una columna preliminar Aquasil C18 (30 x 0.32 mm, Thermo Electron) en agua. La columna de separación utilizada fue una columna C18 (100 x 0.18 mm, Thermo Electron) utilizando un gradiente de acetonitrilo. Las muestras se analizaron en MS y modo MS-MS.

#### 10                   Análisis de N-glicanos libres

Los glicanos reducidos utilizando borohidruro se caracterizaron en una columna de grafito porosa.

#### Ejemplo 7: Dimerización del rhACE2

ACE2 producido de acuerdo con el Ejemplo 1 se obtuvo como el dímero y se analizó en este ejemplo como tal sin la separación de los dímeros. Los medios de tratamiento nativos que el dímero permaneció intacto en contraste al análisis desnaturalizante (Figura 3). El término "dimerización de ACE2" significa todas las unidades de proteína hidrofóbicas que son dirigidas hacia el interior del complejo, en donde los residuos cargados, tales como las cadenas de azúcar N-enlazadas, se proyectan hacia afuera y solvatan la estructura en el medio fisiológico que también es cargado. Esta dimerización mediante la expresión de un ACE2 completamente N-glicosilado se estableció en la presencia de  $Zn^{2+}$ . El complejo de dímero en este caso consiste de dos subunidades idénticas que son enlazadas de manera conjunta electrostáticamente y también no se separan además en soluciones fisiológicas. Estas cantidades para la secreción de una glicoproteína cada tiempo con 14 estructuras de ácido siálico altamente cargadas sobre cada

molécula ACE2 así como las 28 estructuras de ácido siálico en el dímero. Cada una tiene dos átomos de  $Zn^{2+}$  insertadas en el complejo que estabiliza la estructura. La alta carga en la cadena de azúcar solvata la molécula en soluciones fisiológicas acuosas y fuerza los dominios de proteína cargados asociados hacia afuera. El proceso de producción se construye de modo que exclusivamente dímeros de ACE2 están presentes en el producto final.

Esto se hizo posible por el hecho de que en la generación de rACE2s, suficientes iones  $Zn^{2+}$  están presentes (de preferencia, 1.5 - 5 micromolar  $Zn^{2+}$  es utilizado; en particular, la fermentación se puede llevar a cabo en 2.5-3.5  $\mu M$   $Zn^{2+}$ ) y luego las etapas de tratamiento adicionales se llevan a cabo en la presencia de iones  $Zn^{2+}$ .

En las Figuras 14 y 15, la dimerización del complejo ACE2 se determina utilizando diferentes métodos. En la electroforesis de gel de poliacrilamida nativa, después del manchado de plata la proteína se reveló como una sola banda con un tamaño de aproximadamente 250 kDa. La cromatografía de separación de tamaño en una columna Zorbax G-450 en la presencia de acetonitrilo al 10% en solución reguladora DNA-fosfato 220 mM a un pH de 7.0 también produjo un solo pico para el producto en un tiempo de retención correspondiente a un peso molecular de aproximadamente 250 kDa. Debe ser observado que en ambos casos, se determinó la proteína exclusivamente dimerizada. Nada de estructuras de monómero ni agregados de alto peso molecular se observaron.

Ejemplo 8: Dímeros ACE2 - diferencias del ACE2 enlazado a la membrana.

ACE2 se expresa como una proteína de

transmembrana en todas las especies superiores, principalmente en las células del riñón, corazón, pulmón e hígado, como una enzima esencial del sistema de renina angiotensina. Enlace ACE2 enlazado a la membrana circunda  
5 por si mismo en la naturaleza en la capa doble del lípido de membrana con otras proteínas de membrana que estabiliza ACE2 en una conformación activa y también protegen los dominios extracelulares de ACE2 de la degradación proteolítica. Con el fin de aumentar las propiedades  
10 farmacológicas del ACE2 soluble y especialmente la actividad y estabilidad de la proteína soluble, una estrategia de expresión y producción se seleccionó la cual exclusivamente produjo estructuras ACE2 diméricas estables. Este es principalmente el dominio C-terminal de la proteína  
15 y sus modificaciones post-traduccionales que son esencialmente responsables para la dimerización. Con el fin de enfatizar las particularidades de la estructura dimérica ACE2, la estructura de ACE2 enlazado a la membrana se analizó utilizando PAGE nativa y el manchado de Western  
20 específico de ACE2 (Figura 16). Los trazos A y B muestran extractos de células (corteza y cerebro) y el trazo C muestra un extracto celular de un clon de producción para los dímeros ACE2, producidos de acuerdo con el Ejemplo 1. El producto enlazado a la membrana aquí tiene un peso  
25 molecular mucho más bajo comparado con el producto de expresión del Ejemplo 1 (C y D), aunque el primero consiste de solamente la porción extracelular. Esto indica que el ACE2 enlazado a la membrana está presente como el monómero. Por otra parte, el producto de expresión consiste de  
30 dímeros que proporcionan el producto con ventajas farmacológicas. En el trazo de, el producto final

purificado se analiza, esto es solamente una sola banda con un peso molecular de aproximadamente 240 kDa.

Ejemplo 9: Propiedades farmacológicas mejoradas de los dímeros ACE2

5           APN 01 designa una formulación de proteína ACE2 fisiológica que consiste exclusivamente de estructuras diméricas ACE2. Dos monómeros ACE2 en un tiempo en este caso forman complejos no covalentemente enlazados. Las construcciones biológicas moleculares, la línea de células  
10 de expresión, el proceso de fermentación, la purificación y la solución reguladora para el almacenamiento y la aplicación se seleccionan o se diseñan de modo que el producto final exclusivamente contiene dímeros ACE2 estables. El dímero no se agrega a los complejos grandes ni  
15 se disocia bajo condiciones fisiológicas a monómeros.

En la Figura 15 (cromatograma de SEC-HPLC analítico: APN 01 comparado con un estándar de separación de tamaño (Bio-RAD GF-estándar, curva azul). Condiciones de corrida: columna: Zorbax GF250, solución reguladora:  
20  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  220 mM +  $\text{CH}_3\text{CN}$  al 10%, pH 8.0 a 1 mL/min). APN 01 eluida en la forma de un solo pico en 8.6 minutos, el tiempo de retención está entre aquel de tiroglobulina (680 kDa, tiempo de retención 7.4 minutos) y gamma globulina bovina (158 kDa, tiempo de retención 8.9 minutos). La masa  
25 molecular calculada de este complejo es de aproximadamente 214 kDa. Esto aproximadamente corresponde al peso molecular esperado de dos unidades ACE2 cada una de 102 kDa.

Para los propósitos de comparación, los monómeros ACE2 en células CHO se produjeron como un material de  
30 referencia, que también se analizaron utilizando SEC-HPLC. Su cromatograma se muestra en la Figura 17. La forma

monomérica eluye con un tiempo de retención de 9.0 minutos, que corresponde a un peso molecular de aproximadamente 110 kDa. Ambos productos también se compararon utilizando PATE (ver la Figura 18a). Mientras que APN 01 (A) tuvo una banda  
5 de proteína con un peso molecular de aproximadamente 240 kDa, la forma monomérica (B) apareció en aproximadamente 100 kDa. El manchado de Western específico de ACE2 estableció la identidad de ambos productos, como se puede observar en la Figura 18b.

10 Ambos productos exhibieron una actividad de enzima específica idéntica, medida utilizando una prueba de actividad que emplea un sustrato marcado con fluorescencia. Como se puede observar en la Figura 19, las curvas para la misma concentración de enzima de las formas monomérica y  
15 dimérica se sobreponen una a la otra.

Con el fin de comparar las propiedades farmacológicas de ambos productos, ambas preparaciones se administraron a ratones B1-6 intraperitonealmente como una inyección de bolo de 2.5 mg/kg y la actividad de la enzima  
20 ACE2 en muestras de suero se midió después de 24 y 48 horas (ver la Figura 20). La concentración de proteína se ajustó de modo que cada animal recibió 100 µl de una solución de proteína fisiológica. Cada tiempo, 7 animales se trataron con APN 01 (dímero ACE2) y 5 animales con monómero ACE2.  
25 Mientras que previo a la administración de ACE2, nada de actividad de ACE2 podría ser medida en cualquiera de las muestras de suero, después de la administración, la actividad de ACE2 sistémica se midió en todos los casos. Justo 24 horas después de la aplicación, ambos grupos  
30 fueron significativamente diferentes (prueba 5,  $p < 0.001$ ): mientras que los animales que se han tratado con el dímero

ACE2 tuvieron una actividad correspondiente a una concentración de ACE2 de 0.9  $\mu\text{g/mL}$ , actividad correspondiente a una concentración de 0.2  $\mu\text{g/mL}$  se encontró en solamente un animal en el grupo que recibió  
5 ACE2 monomérico. Después de 48 horas, en el grupo que ha recibido el homodímero ACE2, hubo todavía 0.2  $\mu\text{g/mL}$  de actividad, mientras que en el grupo que ha recibido el monómero, no podría ser detectada más actividad de ACE2 sistémica. Estos datos muestran que la forma ACE2 dimérica  
10 tiene una ventaja farmacológica muy significativa.

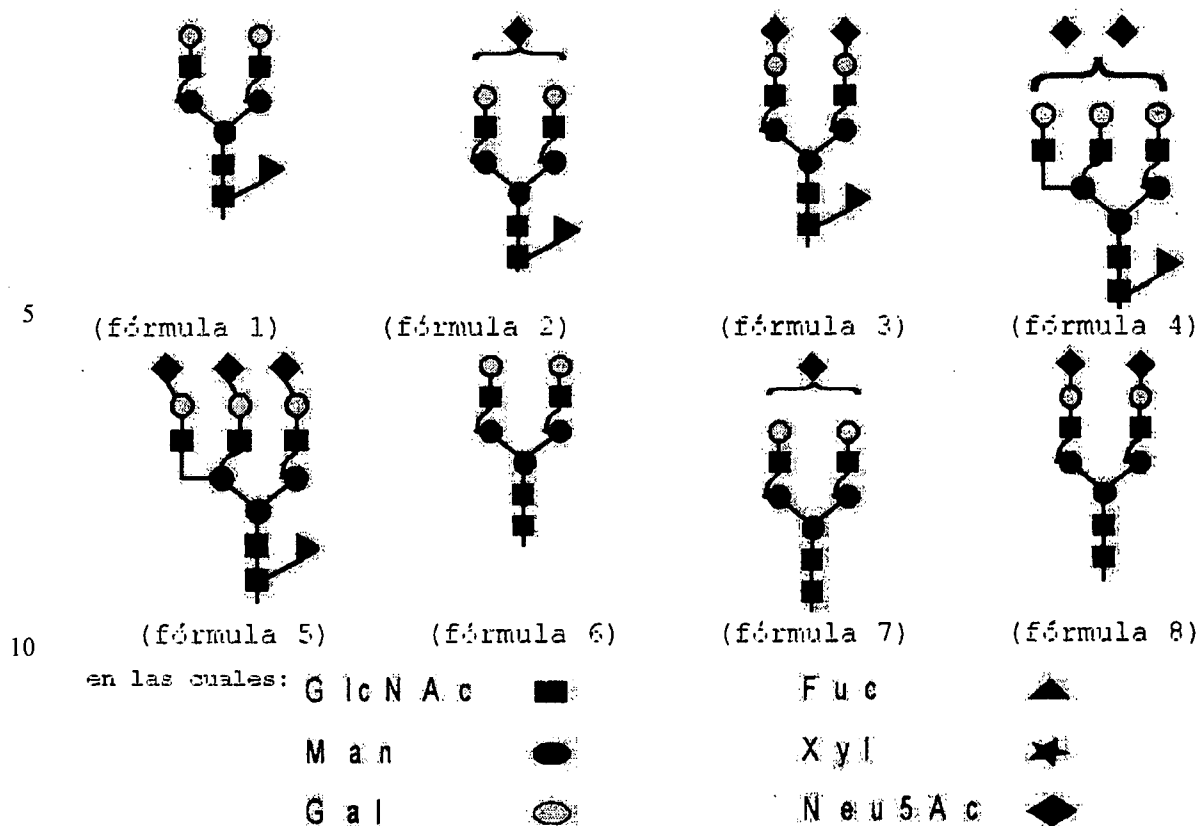
**REIVINDICACIONES**

1. Un polipéptido ACE2 recombinante, caracterizado porque está presente como un dímero, en donde en ambos polipéptidos ACE2, todos los sitios de N-glicosilación posibles son glicosilados, ambos polipéptidos ACE2 cada uno tiene por lo menos 10 residuos de ácido siálico, ningún polipéptido ACE2 tiene un dominio de transmembrana y el dímero tiene  $Zn^{2+}$ .

2. El polipéptido ACE2 recombinante de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque los grupos de glicol de un monómero de polipéptido ACE2 tienen un total de por lo menos 14 residuos de ácido siálico.

3. El polipéptido ACE2 recombinante de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque es glicosilado en por lo menos 80% de los sitios de n-glicosilación posibles y tiene una proporción de azúcar de más de 10% (% en peso con respecto a la molécula ACE2 completa), de preferencia más de 15%, en particular más de 20%.

4. El polipéptido ACE2 recombinante de conformidad con la reivindicación 1, 2 o 3, caracterizado porque por lo menos 70% de los sitios de N-glicosilación glicosilados tienen una estructura, independientemente entre sí, seleccionada de las fórmulas 1 a 8:



15                    5. El polipéptido ACE2 recombinante de conformidad con una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque todos los sitios de N-glicosilación posibles son glicosilados.

20                    6. El polipéptido ACE2 recombinante de conformidad con una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque por lo menos 80%, de preferencia por lo menos 90%, en particular 100% de los sitios de N-glicosilación glicosilados tienen una estructura con las fórmulas 1 a 8.

25                    7. El polipéptido ACE2 recombinante de conformidad con una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque una unidad de monómero ACE2 del dímero tiene un peso molecular de por lo menos 90 kDa, de preferencia por lo menos 92 kDa, particularmente de preferencia por lo menos 94 kDa, en particular por lo menos 96 kDa, altamente de preferencia por lo menos 98 kDa, y

30

mucho más de preferencia por lo menos 101 kDa.

8. El polipéptido ACE2 recombinante de conformidad con una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque el polipéptido ACE2 no tiene dominios  
5 de trans-membrana, y en que la cadena de polipéptido ACE2 consiste de los aminoácidos 18 - 740 de la SEQ ID NO:1 o fragmentos enzimáticamente activos de los mismos.

9. El polipéptido ACE2 recombinante de conformidad con una de las reivindicaciones 1 a 8,  
10 caracterizado porque una serina correspondiente a Ser740 de la SEQ ID NO:1 es O-glicosilada.

10. El polipéptido ACE2 recombinante de conformidad con una de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque por lo menos 70%, de preferencia por  
15 lo menos 80%, en particular por lo menos 90%, mucho más de preferencia 100%, de los sitios de N-glicosilación glicosilados tienen ácidos siálicos, y de preferencia los sitios de N-glicosilación correspondientes a Asn53, Asn90, Asn103, Asn322, Asn432, Asn546, Asn690 de la SEQ ID NO:1  
20 son sializados.

11. El polipéptido ACE2 recombinante de conformidad con una de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque por lo menos 30%, de preferencia por lo menos 40%, en particular por lo menos 55%, mucho más de  
25 preferencia por lo menos 70% de los sitios de N-glicosilación glicosilados tienen por lo menos dos ácidos siálicos.

12. El polipéptido ACE2 recombinante de conformidad con una de las reivindicaciones 1 a 11,  
30 caracterizado porque una asparagina correspondiente a Asn53 de la SEQ ID NO:1 es N-glicosilada, de preferencia con un

glicano con una estructura de acuerdo con la fórmula 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 como se define en la reivindicación 4.

13. El polipéptido ACE2 recombinante de conformidad con una de las reivindicaciones 1 a 12, 5 caracterizado porque una asparagina correspondiente a Asn90 de la SEQ ID NO:1 es N-glicosilada, de preferencia con un glicano con una estructura de acuerdo con la fórmula 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 como se define en la reivindicación 4.

14. El polipéptido ACE2 recombinante de 10 conformidad con una de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado porque una asparagina correspondiente a Asn103 de la SEQ ID NO:1 es N-glicosilada, de preferencia con un glicano con una estructura de acuerdo con la fórmula 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 como se define en la reivindicación 15 4.

15. El polipéptido ACE2 recombinante de conformidad con una de las reivindicaciones 1 a 14, caracterizado porque una asparagina correspondiente a Asn322 de la SEQ ID NO:1 es N-glicosilada, de preferencia 20 con un glicano con una estructura de acuerdo con la fórmula 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 como se define en la reivindicación 4.

16. El polipéptido ACE2 recombinante de conformidad con una de las reivindicaciones 1 a 15, 25 caracterizado porque una asparagina correspondiente a Asn432 de la SEQ ID NO:1 es N-glicosilada, de preferencia con un glicano con una estructura de acuerdo con la fórmula 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 como se define en la reivindicación 4.

17. El polipéptido ACE2 recombinante de 30 conformidad con una de las reivindicaciones 1 a 16,

caracterizado porque una asparagina correspondiente a Asn546 de la SEQ ID NO:1 es N-glicosilada, de preferencia con un glicano con una estructura de acuerdo con la fórmula 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 como se define en la reivindicación 4.

18. El polipéptido ACE2 recombinante de conformidad con una de las reivindicaciones 1 a 17, caracterizado porque una asparagina correspondiente a Asn690 de la SEQ ID NO:1 es N-glicosilada, de preferencia con un glicano con una estructura de acuerdo con la fórmula 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 como se define en la reivindicación 4.

19. Preparación de polipéptidos ACE2 recombinantes, caracterizada porque comprende polipéptidos ACE2 que están presentes como el dímero, en particular en donde la fracción de polipéptidos ACE2 con un peso molecular, determinado mediante electroforesis de gel, de menor que 100 kDa, de preferencia menor que 104 kDa, particularmente de preferencia menor que 108 kDa, en particular menor que 112 kDa, particularmente de preferencia menor que 117 kDa, mucho más de preferencia menor que 119 kDa, es menor que 20%, de preferencia menor que 10%, particularmente de preferencia menor que 5%, mucho más de preferencia menor que 1%, especialmente 0%, en donde el dímero ACE2 de preferencia se caracteriza por una o más de las características de las reivindicaciones 1 a 18.

20. La preparación de conformidad con la reivindicación 19, caracterizada porque la fracción de polipéptidos ACE2 con dominios de transmembrana es menor que 20%, de preferencia menor que 10%, particularmente de preferencia menor que 5%, mucho más de preferencia menor

que 1%, y especialmente 0%.

21. La preparación de conformidad con la reivindicación 19 o reivindicación 20, caracterizada porque la fracción de multímeros ACE2 con la excepción de dímeros  
5 es menor que 20%, de preferencia menor que 10%, particularmente de preferencia menor que 5%, mucho más de preferencia menor que 1% y especialmente 0%.

22. La preparación de conformidad con una de las reivindicaciones 19 a 21, caracterizada porque la fracción  
10 de dímeros ACE2 sobre las moléculas ACE2 es por lo menos 70%, de preferencia por lo menos 80%, particularmente de preferencia por lo menos 90%, altamente de preferencia por lo menos 95% y mucho más de preferencia por lo menos 99%.

23. La preparación de conformidad con una de las  
15 reivindicaciones 19 a 22, caracterizada porque la fracción de polipéptidos ACE2 con asparagina N-glicosilada correspondiente a Asn53 de la SEQ ID NO:1 es más de 60%, de preferencia más de 70%, particularmente de preferencia más de 80%, altamente de preferencia más de 90%, mucho más de  
20 preferencia más de 99%, en particular 100%, y de preferencia con un glicano con una estructura de acuerdo con la fórmula 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 como se define en la reivindicación 4.

24. La preparación de conformidad con una de las  
25 reivindicaciones 19 a 23, caracterizada porque la fracción de polipéptidos ACE2 con asparagina N-glicosilada correspondiente a Asn90 de la SEQ ID NO:1 es más de 60%, de preferencia más de 70%, particularmente de preferencia más de 80%, altamente de preferencia más de 90%, mucho más de  
30 preferencia más de 99%, en particular 100%, y de preferencia con un glicano con una estructura de acuerdo

con la fórmula 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 como se define en la reivindicación 4.

25. La preparación de conformidad con una de las reivindicaciones 19 a 24, caracterizada porque la fracción  
5 de polipéptidos ACE2 con asparagina N-glicosilada correspondiente a Asn103 de la SEQ ID NO:1 es más de 60%, de preferencia más de 70%, particularmente de preferencia más de 80%, altamente de preferencia más de 90%, mucho más de preferencia más de 99%, en particular 100%, y de  
10 preferencia con un glicano con una estructura de acuerdo con la fórmula 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 como se define en la reivindicación 4.

26. La preparación de conformidad con una de las reivindicaciones 19 a 25, caracterizada porque la fracción  
15 de polipéptidos ACE2 con asparagina N-glicosilada correspondiente a Asn322 de la SEQ ID NO:1 es más de 60%, de preferencia más de 70%, particularmente de preferencia más de 80%, altamente de preferencia más de 90%, mucho más de preferencia más de 99%, en particular 100%, y de  
20 preferencia con un glicano con una estructura de acuerdo con la fórmula 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 como se define en la reivindicación 4.

27. La preparación de conformidad con una de las reivindicaciones 19 a 26, caracterizada porque la fracción  
25 de polipéptidos ACE2 con asparagina N-glicosilada correspondiente a Asn432 de la SEQ ID NO:1 es más de 60%, de preferencia más de 70%, particularmente de preferencia más de 80%, altamente de preferencia más de 90%, mucho más de preferencia más de 99%, en particular 100%, y de  
30 preferencia con un glicano con una estructura de acuerdo con la fórmula 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 como se define en la

reivindicación 4.

28. La preparación de conformidad con una de las reivindicaciones 19 a 27, caracterizada porque la fracción de polipéptidos ACE2 con asparagina N-glicosilada correspondiente a Asn546 de la SEQ ID NO:1 es más de 60%, de preferencia más de 70%, particularmente de preferencia más de 80%, altamente de preferencia más de 90%, mucho más de preferencia más de 99%, en particular 100%, y de preferencia con un glicano con una estructura de acuerdo con la fórmula 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 como se define en la reivindicación 4.

29. La preparación de conformidad con una de las reivindicaciones 19 a 28, caracterizada porque la fracción de polipéptidos ACE2 con asparagina N-glicosilada correspondiente a Asn690 de la SEQ ID NO:1 es más de 60%, de preferencia más de 70%, particularmente de preferencia más de 80%, altamente de preferencia más de 90%, mucho más de preferencia más de 99%, en particular 100%, y de preferencia con un glicano con una estructura de acuerdo con la fórmula 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 como se define en la reivindicación 4.

30. La preparación de conformidad con una de las reivindicaciones 19 a 29, caracterizada porque la fracción de polipéptidos ACE2 con serina N-glicosilada correspondiente a Ser740 de la SEQ ID NO:1 es más de 60%, de preferencia más de 70%, particularmente de preferencia más de 80%, altamente de preferencia más de 90%, más de preferencia más de 99%, en particular 100%.

31. El polipéptido ACE2 o preparación de conformidad con una de las reivindicaciones 1 a 30, caracterizado porque tiene una actividad catalítica, ccac,

de por lo menos  $4 \text{ s}^{-1}$ , de preferencia por lo menos  $5 \text{ s}^{-1}$ , particularmente de preferencia por lo menos  $6 \text{ s}^{-1}$ , altamente de preferencia por lo menos  $7 \text{ s}^{-1}$ , mucho más de preferencia por lo menos  $7 \text{ s}^{-1}$ , con respecto a la  
5 conversión de Ang II (angiotensina II) a Ang 1-7 (angiotensina 1-7).

32. Un método para la producción de polipéptidos ACE2 recombinantes o una preparación de ACE2 recombinante de conformidad con una de las reivindicaciones 1 a 31,  
10 caracterizado porque comprende las etapas de insertar un polinucleótido que codifica para un ACE2 sin un dominio de transmembrana, en células eucarióticas, expresar el polipéptido ACE2 y recolectar el ACE2 expresado en la forma dimérica en la presencia de  $\text{Zn}^{2+}$ , en donde en la expresión,  
15 la concentración de  $\text{Zn}^{2+}$  es de preferencia por lo menos 1.5 micromolar.

33. El método de conformidad con la reivindicación 32, caracterizado porque el polinucleótido que codifica para ACE2 se proporciona sobre un vector.

20 34. El método de conformidad con la reivindicación 32 o reivindicación 33, caracterizado porque la expresión de ACE2 se selecciona con un marcador, de preferencia DHFR.

25 35. El método de conformidad con la reivindicación 34, caracterizado porque el marcador está presente sobre el vector.

36. El método de conformidad con la reivindicación 34, caracterizado porque el vector tiene un IRES para el mRNA de ACE2 expresado.

30 37. El método de conformidad con una de las reivindicaciones 32 a 36, caracterizado porque las células

eucarióticas son células CHO.

38. Un polipéptido ACE2 recombinante o preparación de polipéptidos ACE2 recombinantes, caracterizado porque se obtiene utilizando un método de  
5 acuerdo con las reivindicaciones precedentes, en donde el ACE2 está presente como el dímero.

39. Una línea de células eucarióticas estable, caracterizada porque es transfectada con un polinucleótido que codifica para un ACE2, de preferencia una línea de  
10 células CHO, que expresa ACE2 de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 31.

40. La célula de conformidad con la reivindicación 39, caracterizada porque tiene una productividad de ACE2 de por lo menos 10 pg/célula/día, de  
15 preferencia por lo menos 15 pg/célula/día, particularmente de preferencia por lo menos 20 pg/célula/día.

41. Una medicina, caracterizada porque comprende un polipéptido ACE2 recombinante de conformidad con una de las reivindicaciones 1 a 18, 31 o 38 o una preparación de  
20 conformidad con una de las reivindicaciones 19 a 31 o 38.

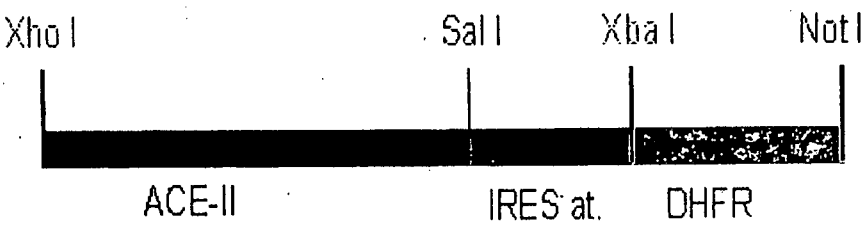


Fig. 1

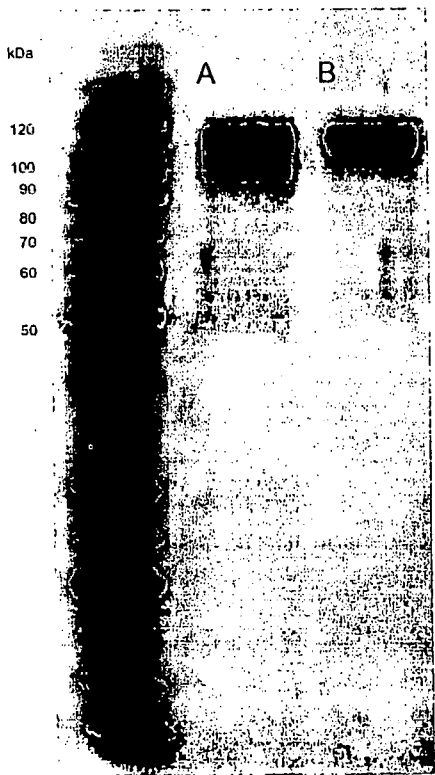


Fig. 3

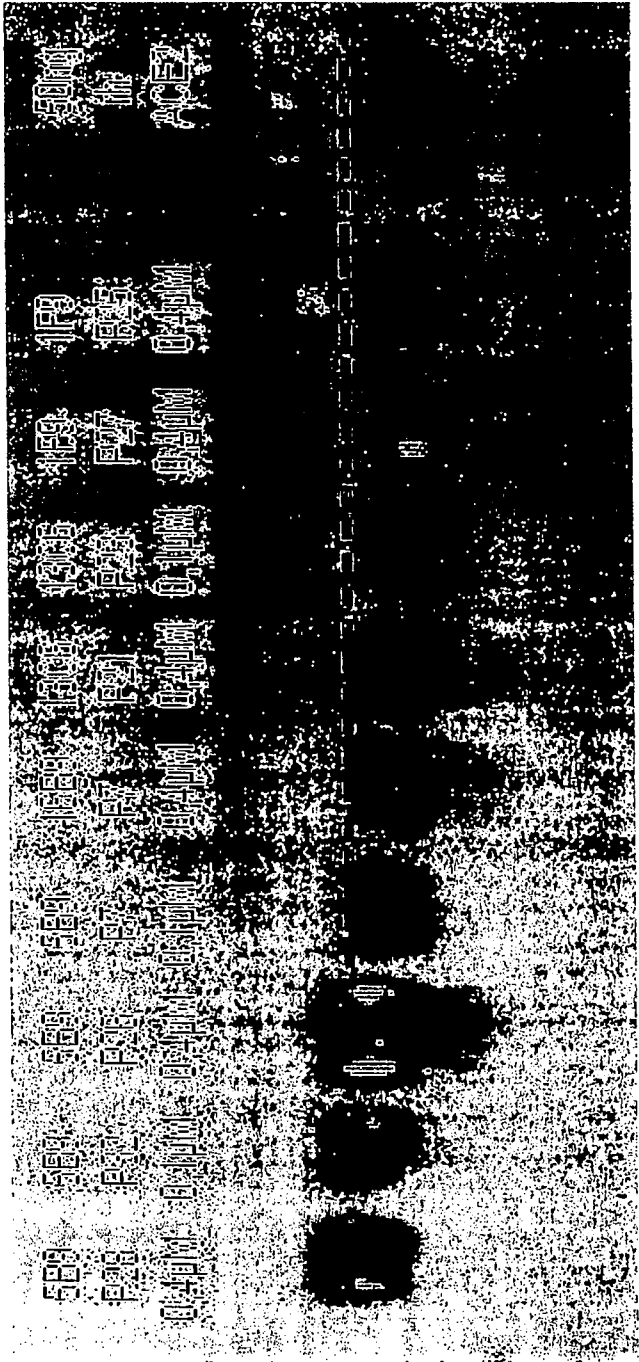


Fig. 2

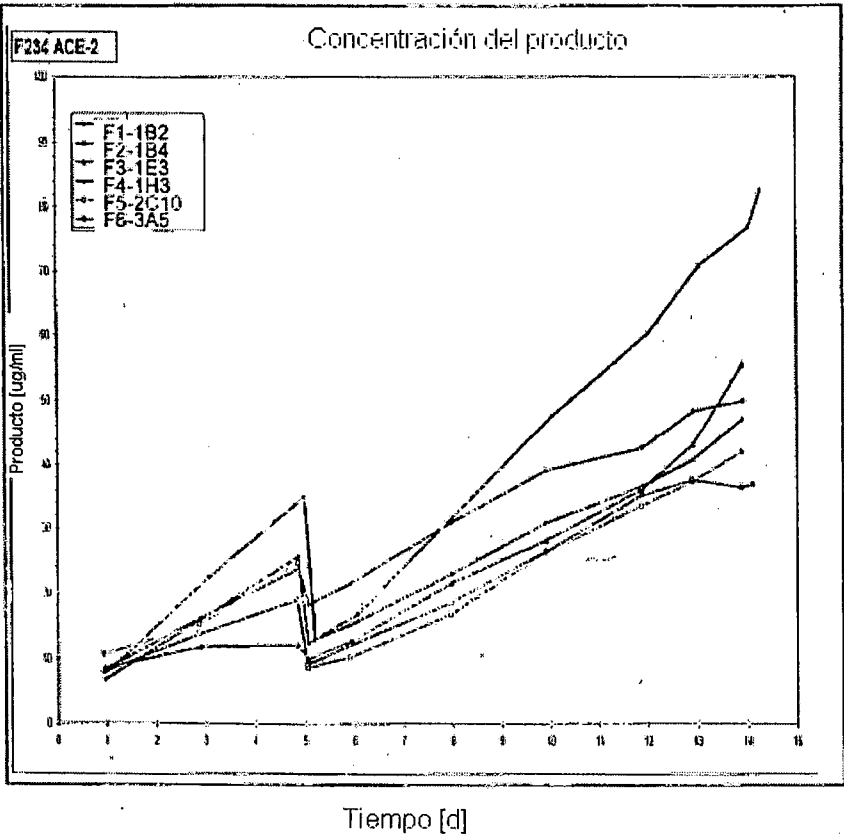


Fig. 4

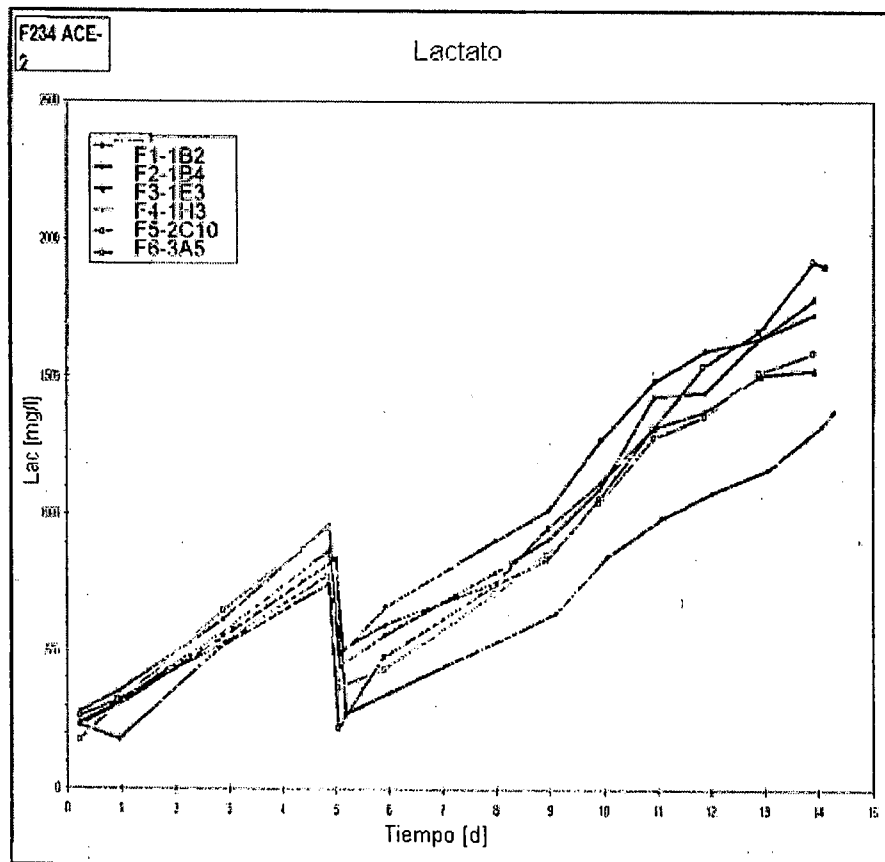


Fig. 4 Continuación

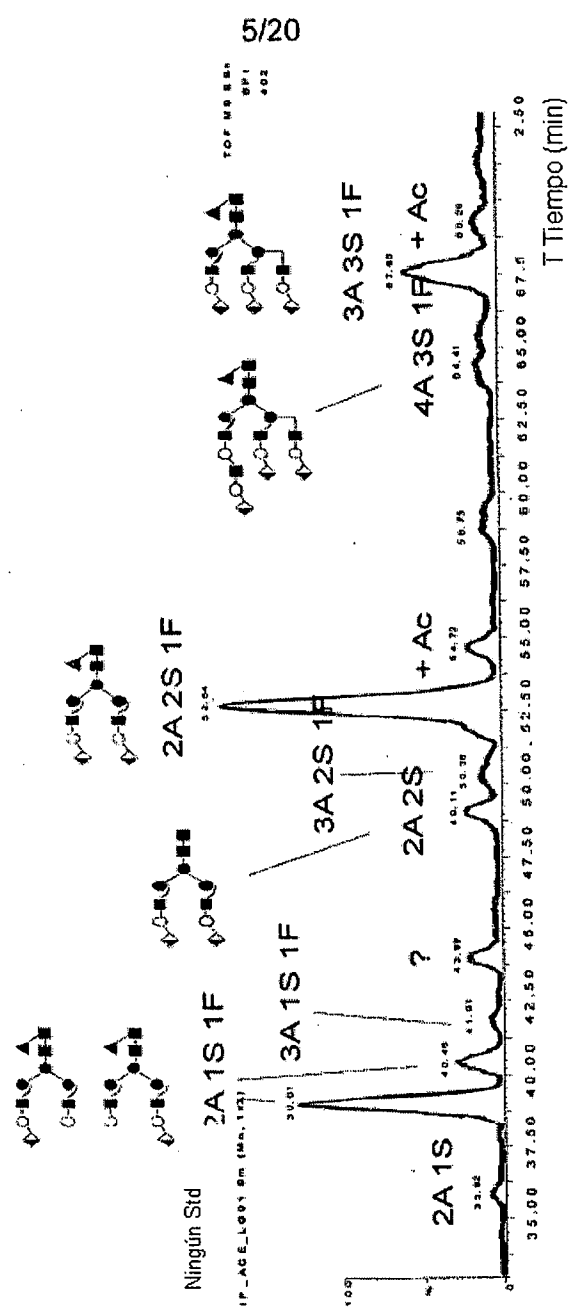


Fig. 5

6/20

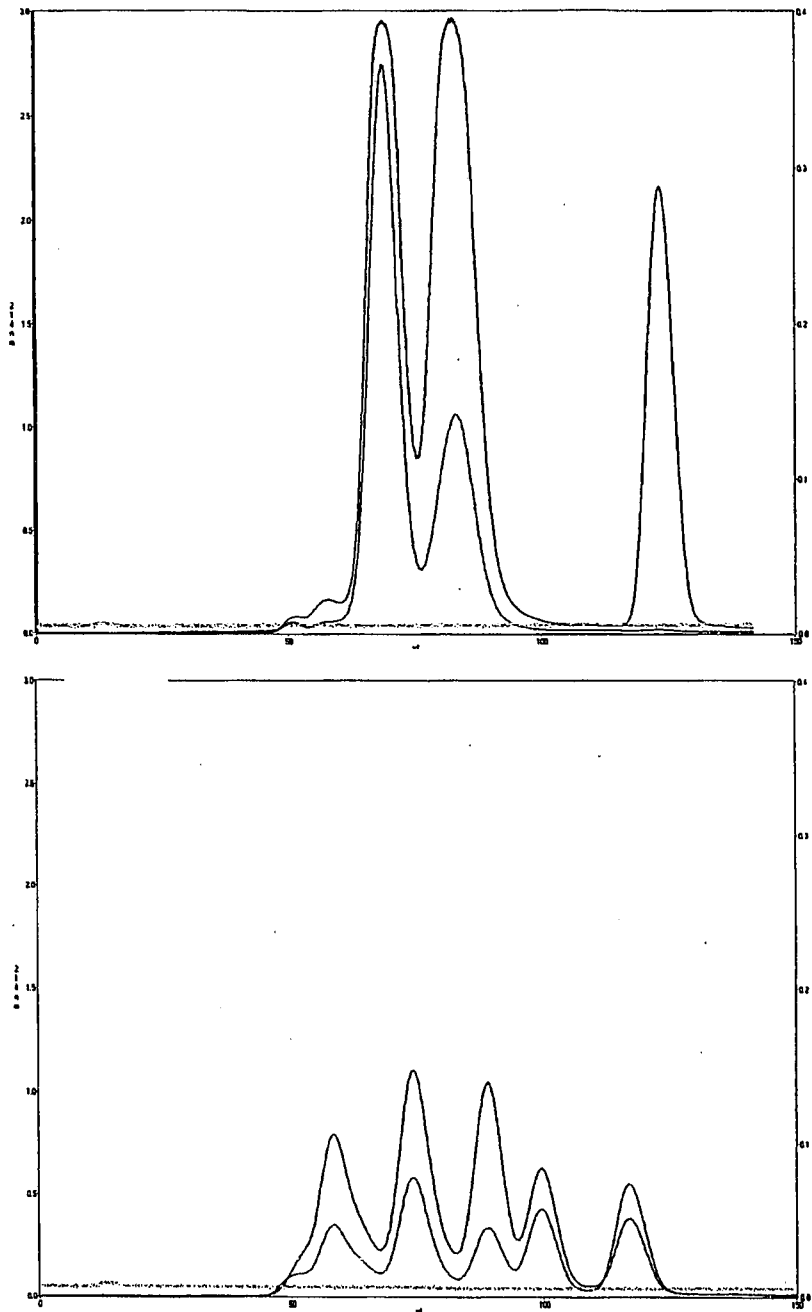


Fig. 6

7/20

# Farmacodinámica de rhACE2

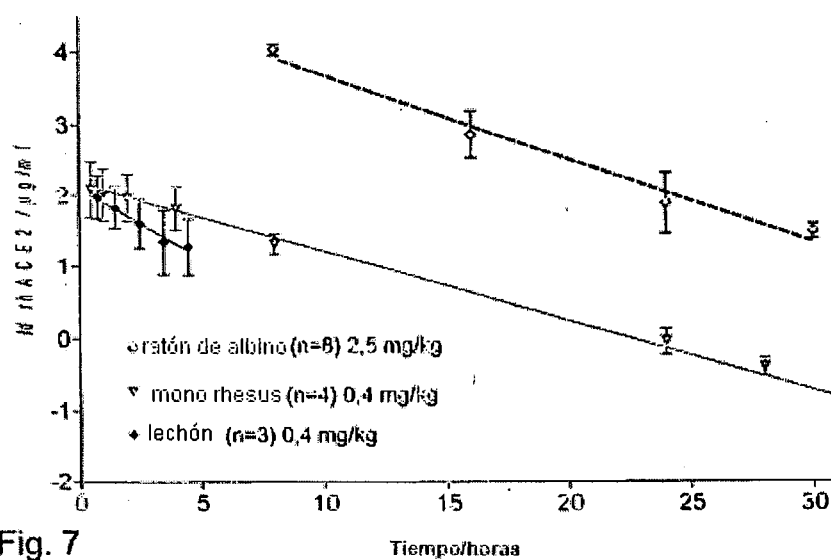
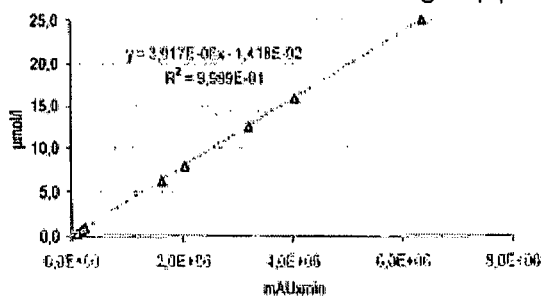


Fig. 7

## Función de correlación de Agn 1-7



## Función de correlación de Agn II

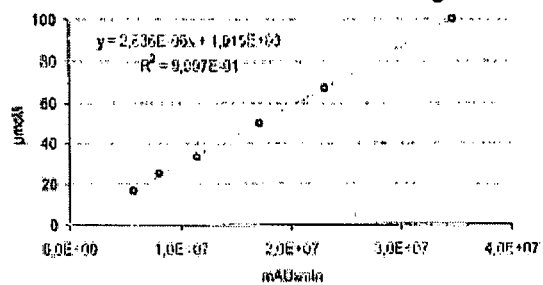


Fig. 8

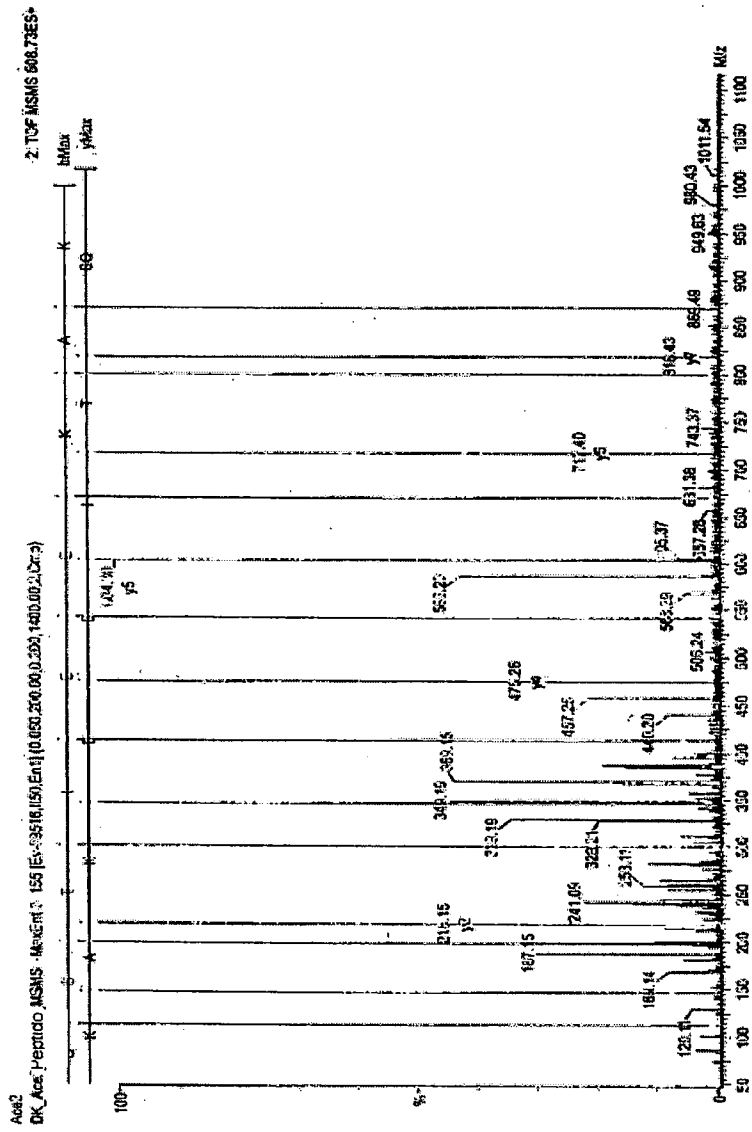


Fig. 9

9/20

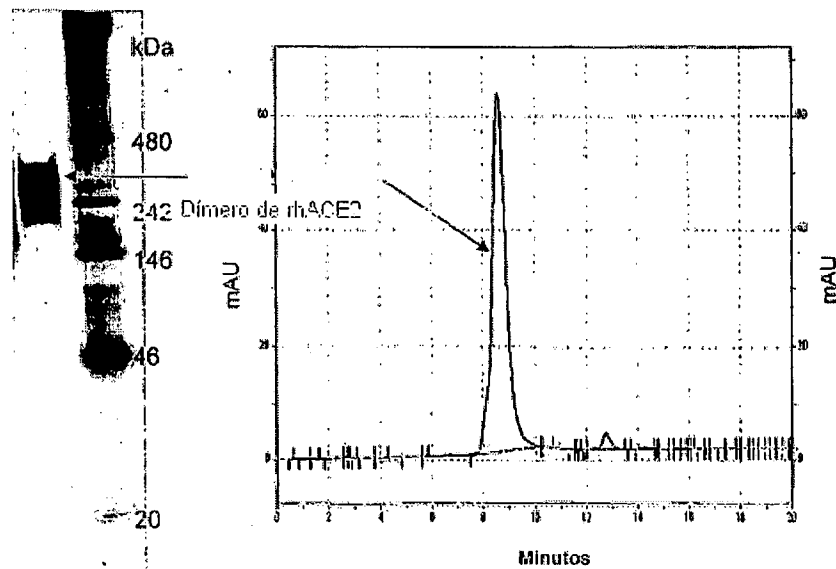
Fig. 10

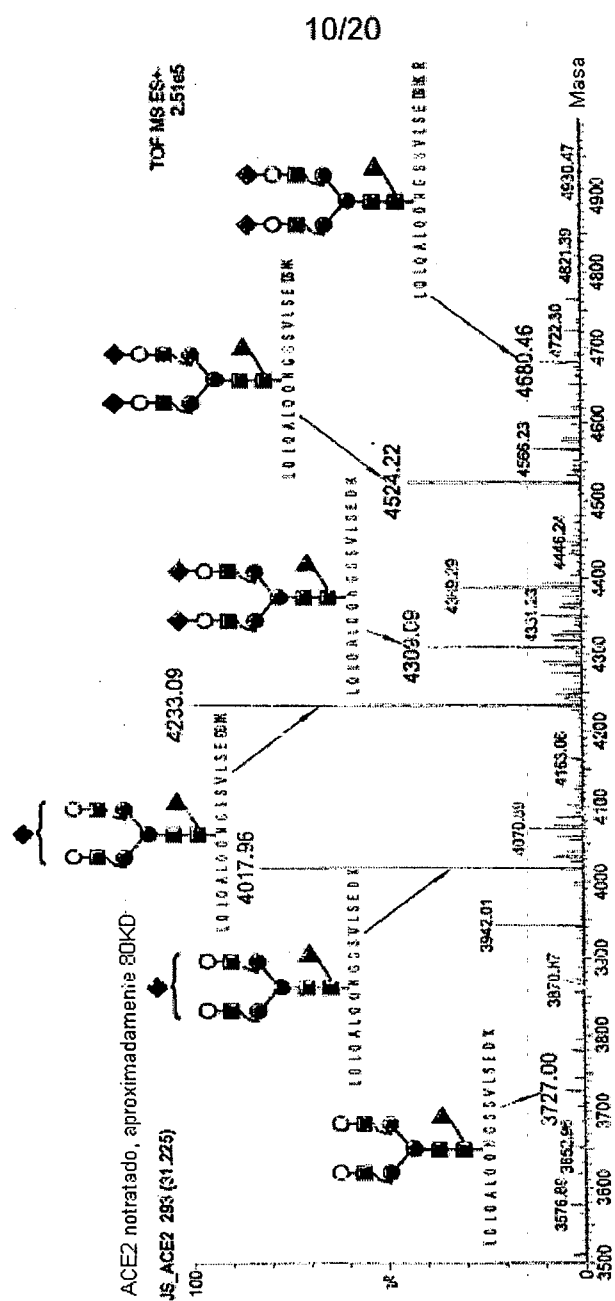
Nombre: secuencia larga :740

MSSSWLLLS LVAITZAGNY IREQAATFL KFNHREDEL FESSIASNY NIMITEENQ NMNLSGQNS AFLPEASTLA  
 QREPLEQIN LIPVLDLAL QAGSSQTE DECEMPTIL NIKSTIISG FVCHVNDPE QLLPQENE IPASLOVNE  
 PUPAFQQRG LAGNQEELI ETVVLINEN KANNTEDYC KAWLQAEVN GVCQVNSFG QI IEDVETG EELNLYNHL  
 DATVAKLNG AYESTISBIC QLEPALLGDH WQWNTNLYS LTVPEQKDN IDVDAVADQ ANAQRIEKE AEFPEUSVL  
 PMFTGIVEN QMLTQGNQI FAVLNPQNG LGSQSTILM CTFTVDEL TANKMENDI YICATVQZF LLPEKANGF  
 NEAVGIMEL SAATKRLNS IALLDQFOS DEETCEMFLI KALITVGL PFTQMLANE WNTKEEINR DQWEGKWH  
 KFTVQVTD VQHEETVCEP ASLETVENR EYETVQTL YQFQDQALQ QANRQSLK EGTENTEDR GRLNLSFL  
 QKSEPTLAL EDVVCAPNN VERLITFED LQWALQNE NQFVQCTW SNTVQSTKV PTLPTALGD KAVKQNNH  
 YLEQSVAYA KATYIKVKN QMLQSENV RVNLEKRS ERTVTATN VERLITFED EYATMQRD INDAFELN  
 SEFLSIQST LGPRKFPVS

| Secuencia | Posición | Potencial Jurado | Resultado |
|-----------|----------|------------------|-----------|
|           |          | determinación    | de N-Glyc |
| Secuencia | 33 NITE  | 0.7657 (9/9)     | +++       |
| Secuencia | 50 NLTV  | 0.7673 (9/9)     | ++ YES    |
| Secuencia | 163 NSES | 0.7636 (9/9)     | ++ YES    |
| Secuencia | 322 NMTQ | 0.6642 (9/9)     | ++ YES    |
| Secuencia | 435 NETE | 0.7101 (7/9)     | + YES     |
| Secuencia | 546 NQPS | 0.1664 (5/9)     | -         |
| Secuencia | 690 PVTD | 0.3631 (7/9)     | + YES     |

Fig. 14





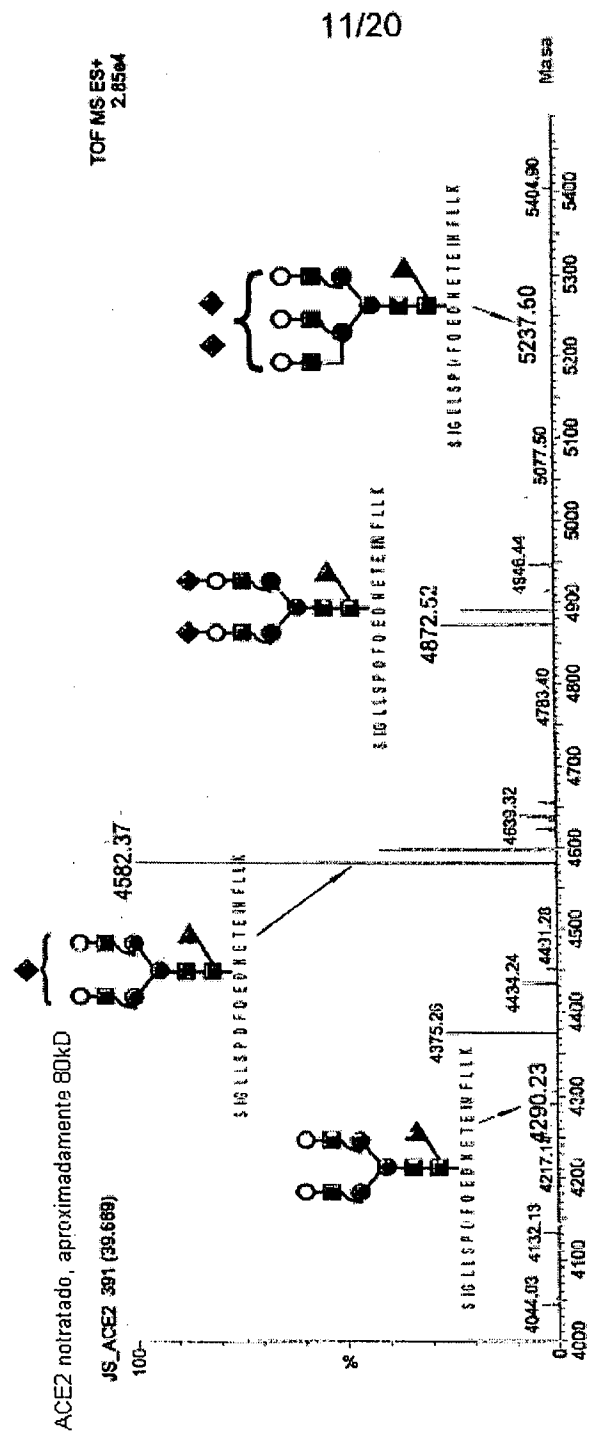


Fig. 11B

12/20

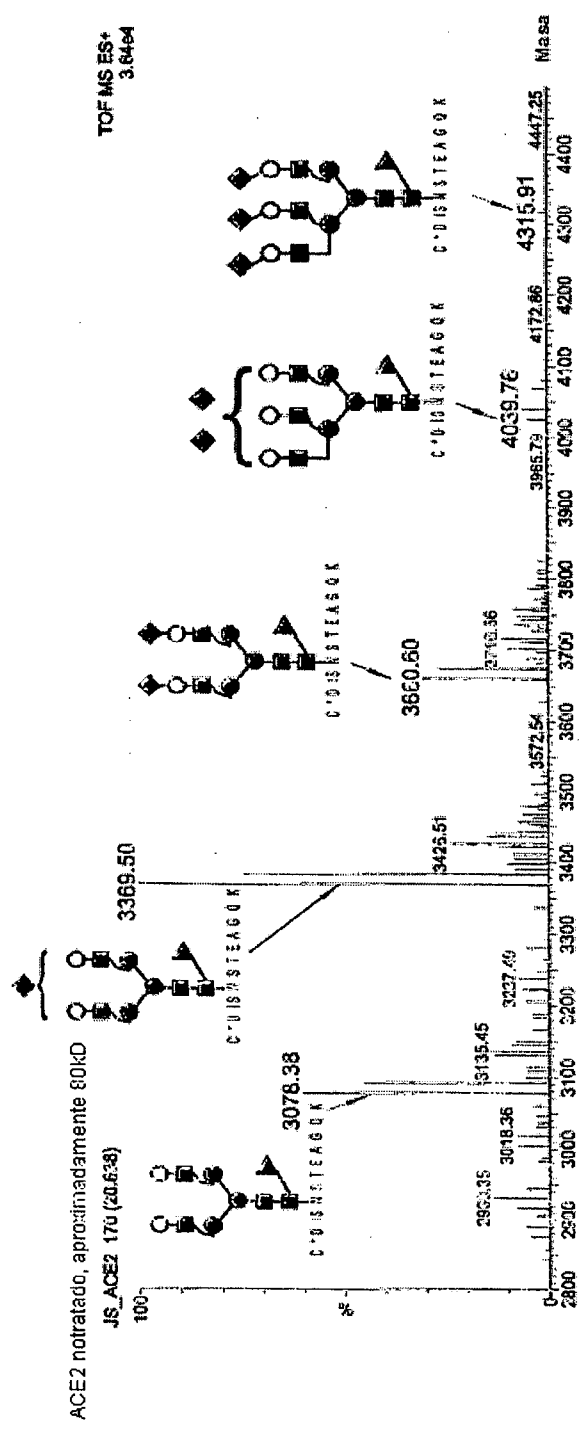


Fig. 11C

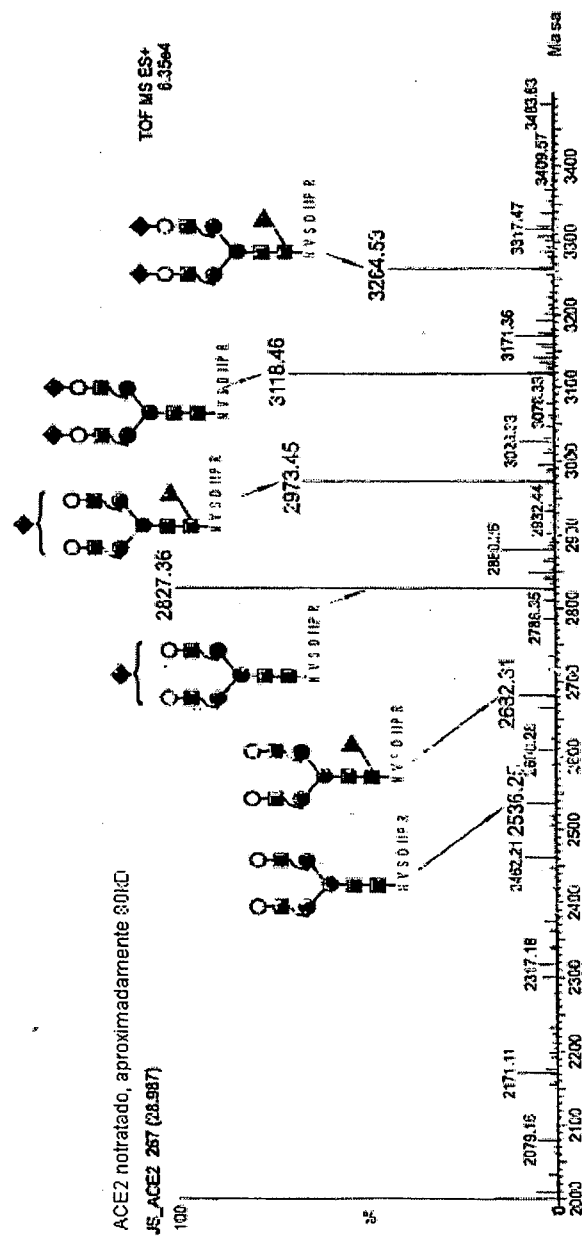


Fig. 11D

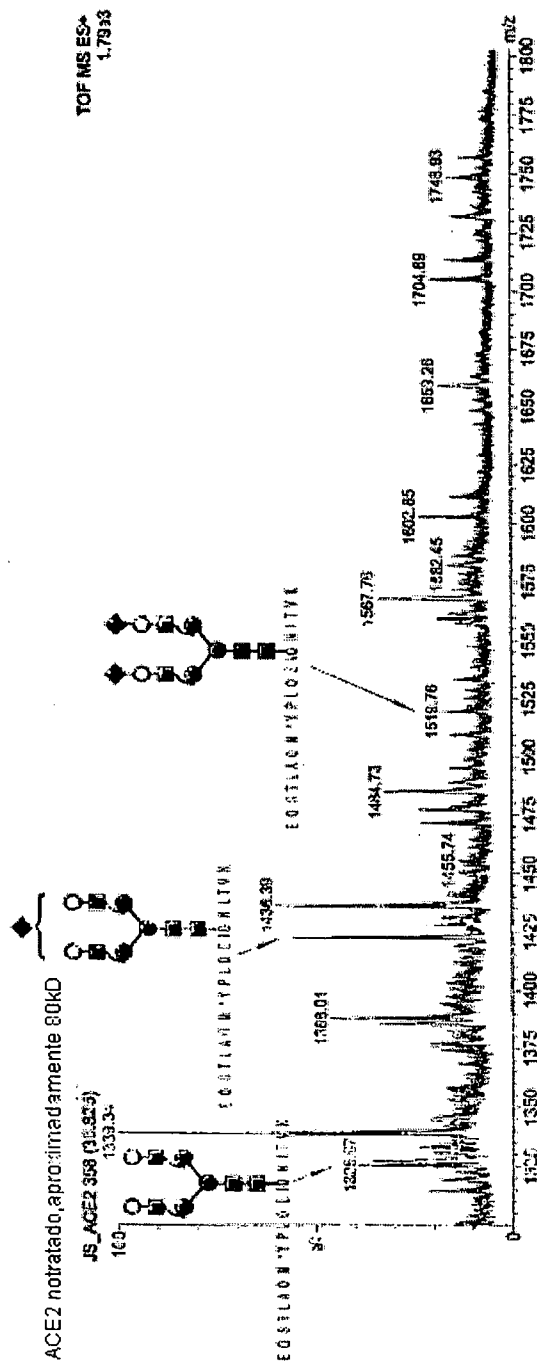


Fig. 11E

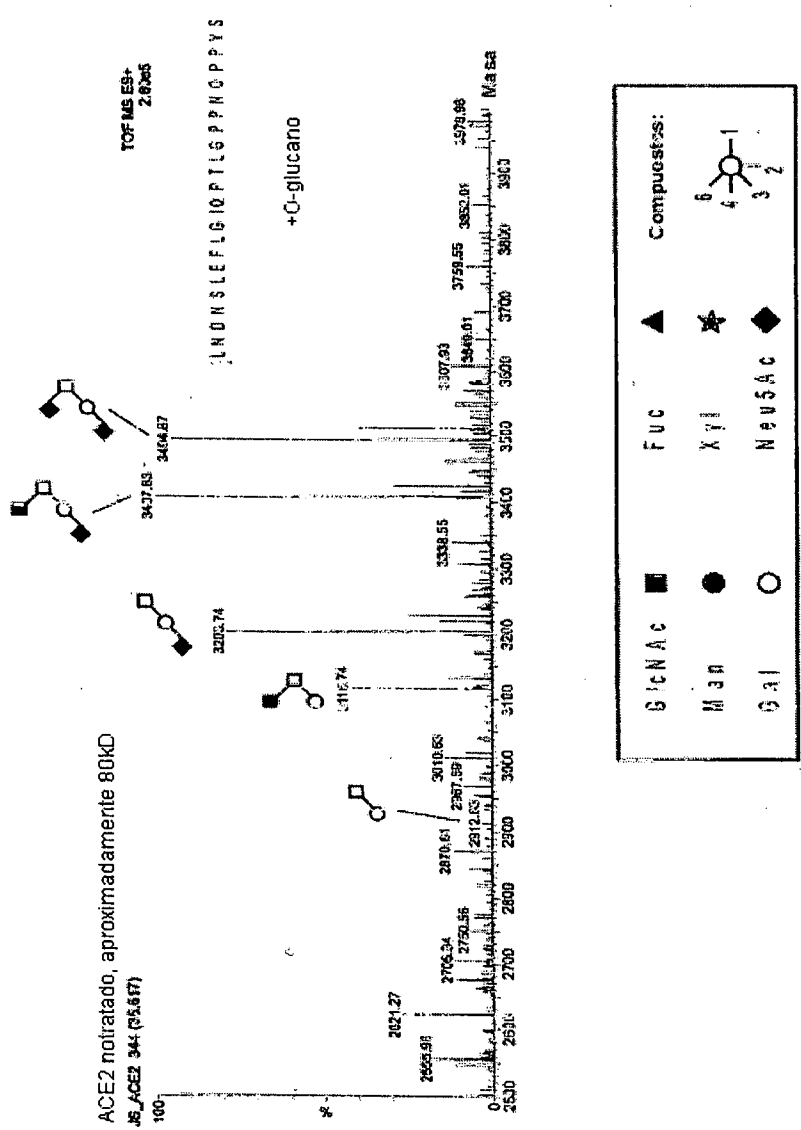


Fig. 12

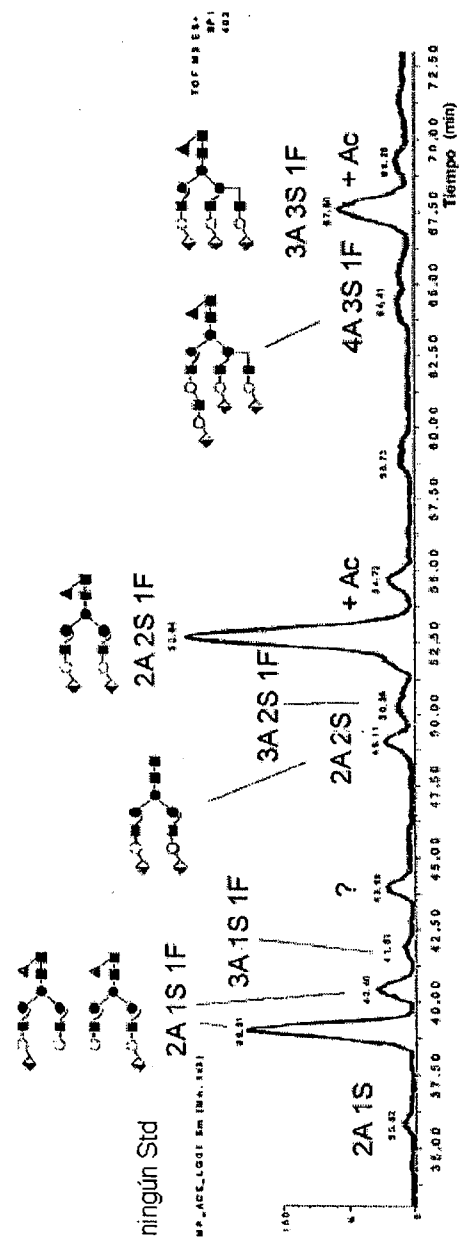


Fig. 13

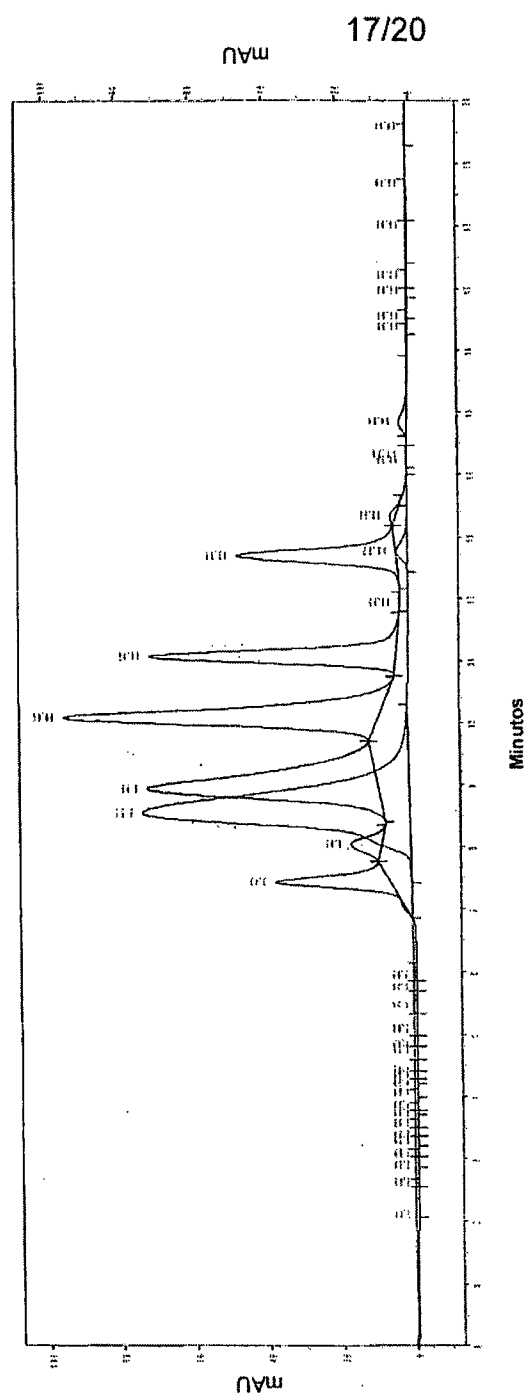


Fig. 15

Fig. 16

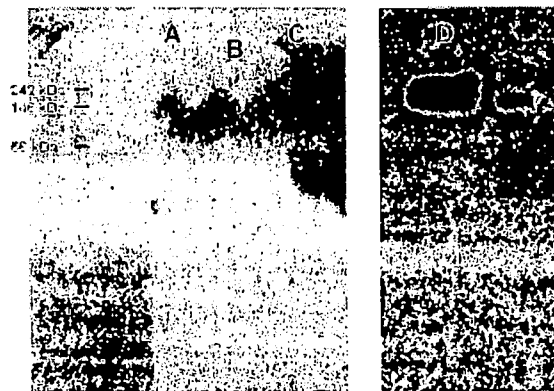
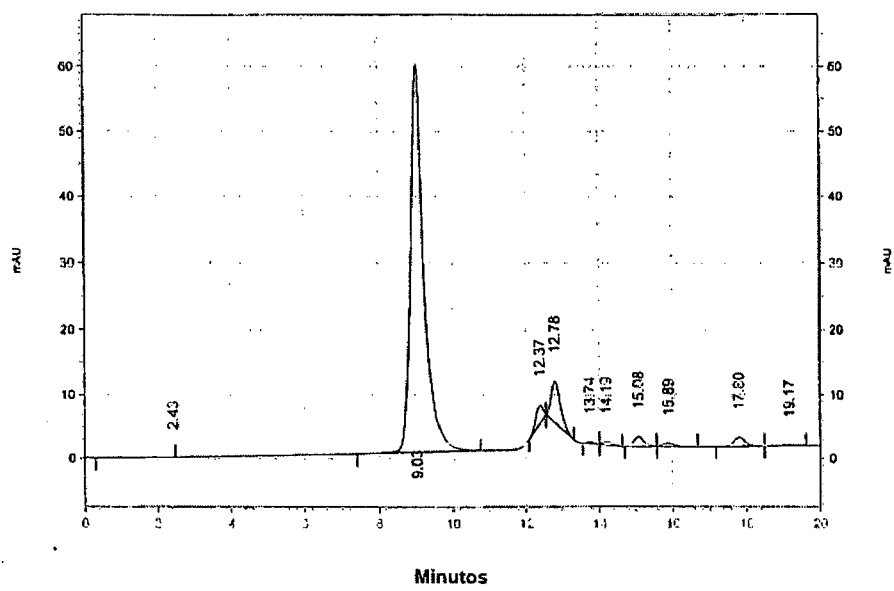


Fig. 17



19/20

Fig. 18

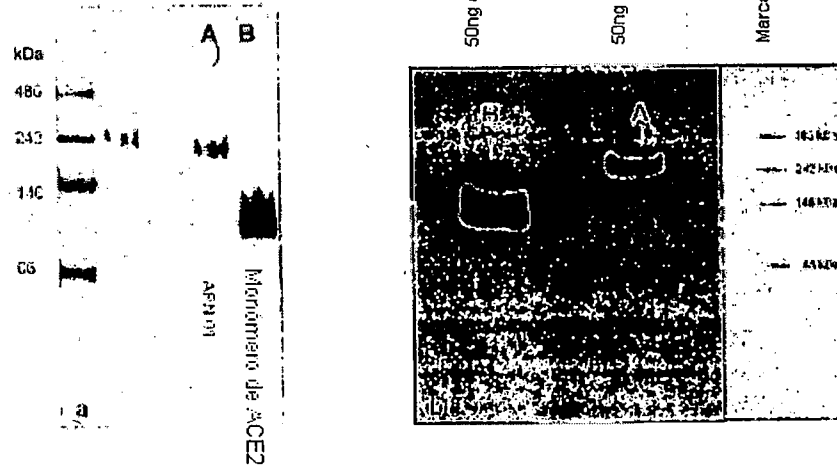
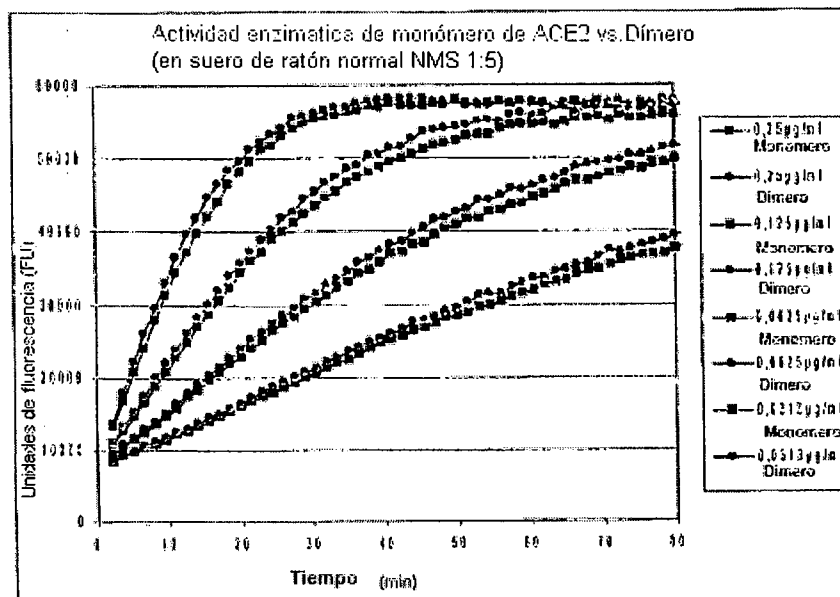
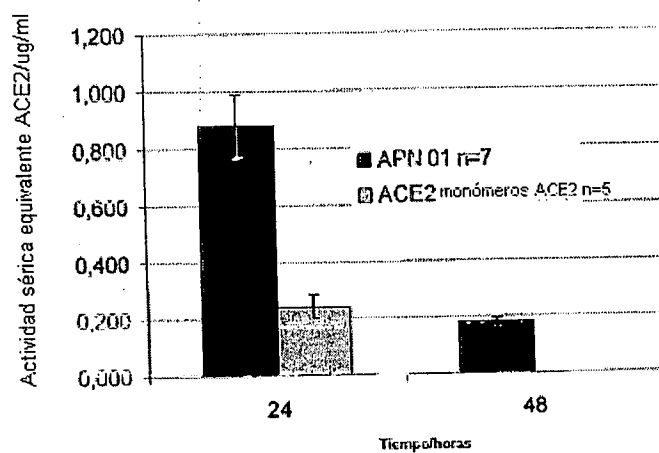


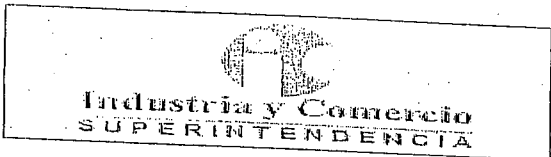
Fig. 19



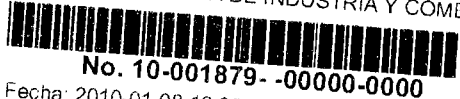
20/20

Fig. 20





SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-001879-00000-0000

Fecha: 2010-01-08 16:35:22 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 90

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

|                                   |                                                                                     |
|-----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/>          | Indicación que se solicita una patente.                                             |
| <input type="checkbox"/>          | Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud   |
| <input type="checkbox"/>          | Descripción de la invención                                                         |
| <input type="checkbox"/>          | Dibujos de ser estos pertinentes                                                    |
| <input type="checkbox"/>          | Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento) |
| Completa <input type="checkbox"/> | Incompleta <input type="checkbox"/>                                                 |

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

|                                              |                                                                                                                              |
|----------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/>          | Indicación que se solicita una PCT (1)                                                                                       |
| <input checked="" type="checkbox"/>          | Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen) (19) |
| <input checked="" type="checkbox"/>          | Dibujos de ser estos pertinentes (71)                                                                                        |
| <input checked="" type="checkbox"/>          | Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento) (243)                                    |
| Completa <input checked="" type="checkbox"/> | Incompleta <input type="checkbox"/>                                                                                          |

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

|                                   |                                                                                                           |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/>          | Indicación que se solicita Diseño Industrial                                                              |
| <input type="checkbox"/>          | Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud                         |
| <input type="checkbox"/>          | Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño |
| <input type="checkbox"/>          | Comprobante de pago de las tasas establecidas                                                             |
| Completa <input type="checkbox"/> | Incompleta <input type="checkbox"/>                                                                       |

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

|                                   |                                                                                   |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/>          | Indicación que se solicita un esquema de trazado                                  |
| <input type="checkbox"/>          | Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud |
| <input type="checkbox"/>          | Representación gráfica de un esquema de trazado                                   |
| <input type="checkbox"/>          | Comprobante de pago de las tasas establecidas                                     |
| Completa <input type="checkbox"/> | Incompleta <input type="checkbox"/>                                               |



Bogotá,  
2020

ep

Doctor(a)  
LLOREDA RICAURTE ALICIA

|            |                            |                   |
|------------|----------------------------|-------------------|
| REFERENCIA | Radicación No.             | 10 1879           |
|            | Solicitud internacional    | PCT/AT2008/000211 |
|            | Fecha inicio fase nacional | 12/01/2010        |
|            | Trámite                    | 11                |
|            | Evento                     | 379               |
|            | Actuación                  | 430               |
|            | Oficio No.                 | 2609              |

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. Si fuere el caso, el solicitante debe adjuntar la traducción de los anexos del reporte de examen preliminar internacional (Art. 36.2.b) del tratado PCT.

2. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

3. El solicitante debe presentar un nuevo título que permita identificar la materia de la cual trata la solicitud, ya que el título relacionado no se encuentra con la precisión necesaria para identificar claramente el objeto de la solicitud de patente. (Regla 4.3 PCT, Art 26-27 D-486, Circular Única 5.2.9)

4. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal b) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se

Continúa en la página siguiente...

Al contestar favor indicar el número  
de radicación consignado en el rótulo

Sede Centro: Carrera 13 No. 27-00 pisos 2, 5, 7 y 10 PBX: 5870000  
Sede CRN: Av. Carrera 50 No. 26 - 55 int.2. Tel 5880070  
Call Center 6513240. Línea 01800-910165  
Web: [www.sic.gov.co](http://www.sic.gov.co) e-mail: [info@sic.gov.co](mailto:info@sic.gov.co)  
Bogotá D.C. Colombia

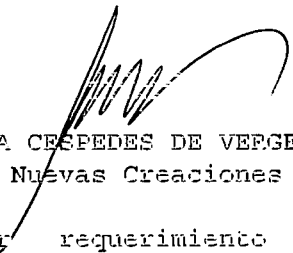


93

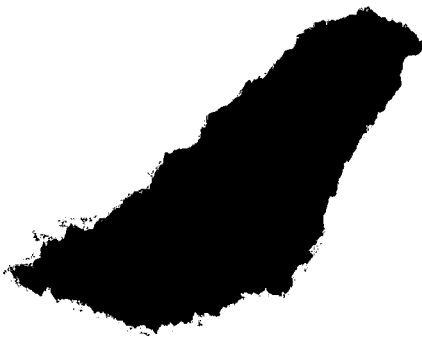
Radicación No.: 10 1879

considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No. 10 de 2001.

  
ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL  
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de  
fecha 25 FEB. 2010  
adpall





Bogotá,  
2020

Industria y Comercio  
SUPERINTENDENCIA

94

Doctor(a)  
LLOREDA RICAURTE ALICIA  
Apoderado(a) y/o Representante de  
APEIRON BIOLOGICS AG

|            |                            |                   |
|------------|----------------------------|-------------------|
| REFERENCIA | Radicación No.             | 10 1879           |
|            | Solicitud internacional    | PCT/AT2008/000211 |
|            | Fecha inicio fase nacional | 12/01/2010        |
|            | Trámite                    | 11                |
|            | Evento                     | 379               |
|            | Actuación                  | 430               |
|            | Oficio No.                 | 2610              |

Teniendo en cuenta que el capítulo reivindicatorio presentado excede de diez reivindicaciones, es necesario que cancele la tasa establecida por cada reivindicación adicional presentada, de conformidad con lo dispuesto en la resolución de tasas vigente para la fecha de presentación de la solicitud, so pena de que no sean tenidas en cuenta dentro del presente trámite administrativo.

En consecuencia, con fundamento en lo previsto por el artículo 12 del Código Contencioso Administrativo, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio atienda el requerimiento aquí señalado. Lo anterior, con el alcance que para tal efecto establece el artículo 13 de la misma codificación, respecto de las reivindicaciones adicionales.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.

ALIX CARMENCA ESPEDES DE VERGEL  
Directora de Nuevas Creaciones (C)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de  
fecha 26 FEB. 2010  
adpall

Al contestar favor indique el número  
de radicación consignado en el rótulo

Carrera 13 No. 27-00 pisos 2, 5, 7 y 10 PBX: 5870000  
Sede Centro: Av. Carrera 50 No. 26 - 55 int. 2. Tel 5880070  
Sede Cali: Center 6513240. Línea 01800-910165  
Cal: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co  
Web: Bogotá D.C. Colombia