



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115769076 A

(43) 申请公布日 2023.03.07

(21) 申请号 202180020389.4

(72) 发明人 安德烈亚斯·贝格曼

(22) 申请日 2021.03.15

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限
责任公司 11219

(30) 优先权数据

20163419.3 2020.03.16 EP

20179763.6 2020.06.12 EP

62/990,166 2020.03.16 US

63/015,205 2020.04.24 US

专利代理师 杨青 郭翠霞

(51) Int.Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

G01N 33/573 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 45/00 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.09.09

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2021/056579 2021.03.15

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/185786 EN 2021.09.23

(71) 申请人 4TEEN4制药有限公司

地址 德国亨尼希斯多夫

权利要求书2页 说明书42页

序列表13页 附图17页

(54) 发明名称

感染冠状病毒的患者中的DPP3

(57) 摘要

本发明的主题是一种用于在感染冠状病毒的患者中 (a) 诊断或预测危及生命的恶化或不良事件的风险或 (b) 诊断或预后严重程度或 (c) 预测或监测治疗或干预的成功性或 (d) 进行治疗指导或治疗分层或 (e) 进行患者管理的方法, 该方法包括: 确定所述患者的体液样品中的二肽基肽酶3 (DPP3) 水平; 将所述确定的DPP3水平与预定阈值进行比较; 以及将所述确定的DPP3水平与危及生命的恶化或不良事件的风险相关联; 或将所述确定的DPP3水平与严重程度相关联; 或将所述确定的DPP3水平与治疗或干预的成功性相关联; 或将所述DPP3水平与某种治疗或干预相关联; 或将所述DPP3水平与对所述患者的所述管理相关联。本发明的主题是一种用于在感染冠状病毒的患者中进行治疗或干预的DPP3活性抑制剂。

1. 一种用于在感染冠状病毒的患者中 (a) 诊断或预测危及生命的恶化或不良事件的风险或 (b) 诊断或预后严重程度或 (c) 预测或监测治疗或干预的成功性或 (d) 进行治疗指导或治疗分层或 (e) 进行患者管理的方法, 所述方法包括:

- 确定所述患者体液样品中的二肽基肽酶3 (DPP3) 水平,
- 将所述确定的DPP3水平与预定阈值进行比较, 以及
- 将所述确定的DPP3水平与所述危及生命的恶化或不良事件的风险相关联, 或
- 将所述确定的DPP3水平与所述严重程度相关联, 或
- 将所述确定的DPP3水平与所述治疗或干预的成功性相关联,
- 将所述DPP3水平与某种治疗或干预相关联, 或
- 将所述DPP3水平与对所述患者的所述管理相关联。

2. 根据权利要求1所述的用于在感染冠状病毒的患者中 (a) 诊断或预测危及生命的恶化或不良事件的风险或 (b) 诊断或预后严重程度或 (c) 预测或监测治疗或干预的成功性或 (d) 进行治疗指导或治疗分层或 (e) 进行患者管理的方法, 其中所述冠状病毒选自SARS-CoV-1、SARS-CoV-2、MERS-CoV, 特别地为SARS-CoV-2。

3. 根据权利要求1或2所述的用于在感染冠状病毒的患者中 (a) 诊断或预测危及生命的恶化或不良事件的风险或 (b) 诊断或预后严重程度或 (c) 预测或监测治疗或干预的成功性或 (d) 进行治疗指导或治疗分层或 (e) 进行患者管理的方法, 其中所述不良事件选自死亡、器官功能障碍、休克、ARDS、肾损伤、ALI (急性肺损伤) 或心血管衰竭。

4. 根据权利要求1至3所述的用于在感染冠状病毒的患者中 (a) 诊断或预测危及生命的恶化或不良事件的风险或 (b) 诊断或预后严重程度或 (c) 预测或监测治疗或干预的成功性或 (d) 进行治疗指导或治疗分层或 (e) 进行患者管理的方法, 其中所述确定的DPP3水平高于预定阈值。

5. 根据权利要求1至4所述的用于在感染冠状病毒的患者中 (a) 诊断或预测危及生命的恶化或不良事件的风险或 (b) 诊断或预后严重程度或 (c) 预测或监测治疗或干预的成功性或 (d) 进行治疗指导或治疗分层或 (e) 进行患者管理的方法, 其中通过使所述体液样品与特异性结合DPP3的捕获结合剂接触来确定所述DPP3水平。

6. 根据权利要求1至5所述的用于在感染冠状病毒的患者中 (a) 诊断或预测危及生命的恶化或不良事件的风险或 (b) 诊断或预后严重程度或 (c) 预测或监测治疗或干预的成功性或 (d) 进行治疗指导或治疗分层或 (e) 进行患者管理的方法, 其中所述确定包括使用特异性结合全长DPP3的捕获结合剂, 其中所述捕获结合剂可选自抗体、抗体片段或非IgG支架。

7. 根据权利要求1至6所述的用于在感染冠状病毒的患者中 (a) 诊断或预测危及生命的恶化或不良事件的风险或 (b) 诊断或预后严重程度或 (c) 预测或监测治疗或干预的成功性或 (d) 进行治疗指导或治疗分层或 (e) 进行患者管理的方法, 其中用DPP3活性抑制剂和/或血管紧张素受体激动剂和/或所述血管紧张素受体激动剂的前体对所述患者进行治疗。

8. 一种用于在感染冠状病毒的患者中进行治疗或干预的DPP3活性抑制剂和/或血管紧张素受体激动剂和/或所述血管紧张素受体激动剂的前体。

9. 根据权利要求8所述的用于在感染冠状病毒的患者中进行治疗或干预的DPP3活性抑制剂和/或血管紧张素受体激动剂和/或所述血管紧张素受体激动剂的前体, 其中所述冠状病毒选自Sars-CoV-1、Sars-CoV-2、MERS-CoV, 特别地为Sars-CoV-2。

10. 根据权利要求18或19所述的用于在感染冠状病毒的患者中进行治疗或干预的DPP3活性抑制剂和/或血管紧张素受体激动剂和/或所述血管紧张素受体激动剂的前体,其中当通过根据权利要求1-7中任一项所述的方法进行确定时,在所述受试者的体液样品中所述患者的DPP3水平高于预定阈值。

11. 根据权利要求8-10所述的用于在感染冠状病毒的患者中进行治疗或干预的DPP3活性抑制剂,其中所述DPP3活性抑制剂选自抗DPP3抗体或抗DPP3抗体片段或抗DPP3非Ig支架。

12. 根据权利要求8-11所述的用于在感染冠状病毒的患者中进行治疗或干预的DPP3活性抑制剂,其中所述抑制剂是与包含在SEQ ID No.1中的长度为至少4至5个氨基酸的表位结合的抗DPP3抗体或抗DPP3抗体片段或抗DPP3非Ig支架。

13. 根据权利要求8-12所述的用于在感染冠状病毒的患者中进行治疗或干预的DPP3活性抑制剂,其中所述抑制剂是与包含在SEQ ID No.2中的长度为至少4至5个氨基酸的表位结合的抗DPP3抗体或抗DPP3抗体片段或抗DPP3非Ig支架。

14. 根据权利要求8-13所述的用于在感染冠状病毒的患者中进行治疗或干预的DPP3活性抑制剂,其中所述抗体是单克隆抗体或单克隆抗体片段。

15. 根据权利要求14所述的用于在感染冠状病毒的患者中进行治疗或干预的DPP3活性抑制剂,其中重链中的互补决定区(CDR)包含序列:

SEQ ID NO.:7、SEQ ID NO.:8和/或SEQ ID NO.:9

并且轻链中的互补决定区(CDR)包含序列:

SEQ ID NO.:10、KVS和/或SEQ ID NO.:11。

16. 根据权利要求15所述的用于在感染冠状病毒的患者中进行治疗或干预的DPP3活性抑制剂,其中所述单克隆抗体或抗体片段是人源化单克隆抗体或人源化单克隆抗体片段。

17. 根据权利要求16所述的用于在感染冠状病毒的患者中进行治疗或干预的DPP3活性抑制剂,其中所述重链包含序列:

SEQ ID NO.:12

并且其中轻链包含序列:

SEQ ID NO.:13。

18. 根据权利要求8至17所述的用于在感染冠状病毒的患者中进行治疗或干预的血管紧张素受体激动剂和/或其前体,其中所述血管紧张素受体激动剂和/或其前体选自血管紧张素I、血管紧张素II、血管紧张素III、血管紧张素IV。

感染冠状病毒的患者中的DPP3

技术领域

[0001] 本发明的主题是一种用于在感染冠状病毒的患者中 (a) 诊断或预测危及生命的恶化或不良事件的风险或 (b) 诊断或预后严重程度或 (c) 预测或监测治疗或干预的成功性或 (d) 进行治疗指导或治疗分层或 (e) 进行患者管理的方法, 该方法包括:

- [0002] • 确定所述患者体液样品中的二肽基肽酶3 (DPP3) 水平,
- [0003] • 将所述确定的DPP3水平与预定阈值进行比较, 以及
- [0004] • 将所述确定的DPP3水平与所述危及生命的恶化或不良事件的风险相关联, 或
- [0005] • 将所述确定的DPP3水平与所述严重程度相关联, 或
- [0006] • 将所述确定的DPP3水平与所述治疗或干预的成功性相关联, 或
- [0007] • 将所述DPP3水平与某种治疗或干预相关联, 或
- [0008] • 将所述DPP3水平与对所述患者的所述管理相关联。

[0009] 本发明的主题是一种用于在感染冠状病毒的患者中进行治疗或干预的DPP3活性抑制剂。

背景技术

[0010] 二肽基肽酶3--也称为二肽基氨基肽酶III、二肽基芳基酰胺酶III、二肽基肽酶III、脑啡肽酶B或红细胞血管紧张素酶;简称:DPP3, DPPIII--是一种从生理活性肽(如脑啡肽和血管紧张素)中去除二肽的金属肽酶。1967年, Ellis&Nuenke首次鉴定了DPP3, 并在经纯化的牛垂体前叶提取物中测量了其活性。被列为EC 3.4.14.4的该酶具有约为83kDa的分子量, 在原核生物和真核生物中是高度保守的 (Prajapati&Chauhan 2011)。在SEQ ID NO 1中描述了人变体的氨基酸序列。二肽基肽酶III是被普遍表达的主要胞质肽酶。尽管缺乏信号序列, 但一些研究报告了膜活性 (Lee&Snyder1982)。

[0011] DPP3是一种锌依赖性外肽酶, 属于肽酶家族M49。它对各种组成的三/四至十个氨基酸的寡肽具有广泛的底物特异性, 并且还能够能够在脯氨酸之后切割。已知DPP3会水解其底物的N端的二肽, 底物包括血管紧张素II、III和IV; Leu-脑啡肽和Met-脑啡肽; 内啡肽1和2。金属肽酶DPP3在pH 8.0-9.0具有最适活性, 可以通过添加二价金属离子(如Co²⁺和Mg²⁺)来激活。

[0012] DPP3的结构分析显示了催化基序HELLGH(人DPP3[hDPP3]450-455)和EECRAE(hDPP3 507-512)以及以下对底物结合和水解重要的氨基酸:Glu316、Tyr318、Asp366、Asn391、Asn394、His568、Arg572、Arg577、Lys666和Arg669 (Prajapati&Chauhan2011; Kumar等人2016; 编号是指人DPP3的序列, 参见SEQ ID NO.1)。考虑到所有已知的参与底物结合和水解的氨基酸或序列区域, 可以将人DPP3的活性位点定义为氨基酸316和669之间的区域。

[0013] DPP3的最突出的底物是血管紧张素II (Ang II), 它是肾素-血管紧张素系统(RAS)的主要效应物。RAS在心血管疾病 (Dostal等人1997. *J Mol Cell Cardiol*; 29:2893-902; Roks等人1997. *Heart Vessels*. 增刊12:119-24)、脓毒症和脓毒性休克 (Corrêa等人2015. *Crit Care* 19:98) 中被激活。特别地, 已表明Ang II用于调节许多心血管功能, 包括

控制血压和心脏重塑。

[0014] 最近,产生、表征和验证了两种测定法,用于特异性检测人体体液(例如血液、血浆、血清)中的DPP3:用于检测DPP3蛋白浓度的发光免疫测定法(LIA)和用于检测特定的DPP3活性的酶捕获活性测定法(ECA)(Rehfeld等人2019.*JALM* 3(6):943-953)。在进行DPP3活性的实际检测之前,洗涤步骤会去除所有干扰物质。这两种方法都具有高度特异性,并且允许在血液样品中进行DPP3的可重现性检测。

[0015] 在心源性休克患者中,显示循环DPP3水平升高,并且DPP3水平与短期死亡率和严重器官功能障碍的风险增加有关(Deaniau等人2019.*Eur J Heart Fail.inpress*)。此外,入组时测量的DPP3会区分发生难治性休克与非难治性休克的心源性休克患者,并且DPP3浓度 ≥ 59.1 ng/mL与更高的死亡风险相关(Takagi等人2020.*Eur J Heart Fail.*22(2):279-286)。

[0016] W02017/182561描述了用于确定患者样品中的总量或活性DPP3以诊断与坏死过程相关的疾病的方法。它进一步描述了通过针对DPP3的抗体治疗坏死相关疾病的方法。

[0017] W02019/081595描述了针对并结合特定DPP3表位的DPP3结合剂及其在预防或治疗与氧化应激相关的疾病中的用途。

[0018] Procizumab是一种特异性结合循环DPP3的人源化单克隆IgG1抗体,靶向并调节DPP3活性,是心血管功能的重要调节剂。其作用方式适于与大量细胞死亡和细胞内DPP3到血流中的不受控制的释放有关的急性疾病。易位的DPP3在循环中保持活性,在此它以不受控制的方式切割生物活性肽。Procizumab能够阻断循环DPP3,抑制血流中的生物活性肽降解。这种阻断导致心血管和肾功能的稳定和短期死亡率的降低。如实施例部分所示,对于Procizumab在心血管衰竭动物模型中的临床前研究显示令人印象深刻的即时疗效。作为示例,在休克诱发的心血管衰竭大鼠中注射Procizumab会导致缩短的立即正常化。在多个临床前心血管衰竭模型中,Procizumab已显示会改善体内所有临床相关终点。它使射血分数和肾功能正常化并降低死亡率。

[0019] 冠状病毒广泛存在于人类和多种其他脊椎动物中,并引起呼吸道、肠道、肝脏和神经系统疾病。值得注意的是,2003年的严重急性呼吸综合征冠状病毒(SARS-CoV)和2012年的中东呼吸综合征冠状病毒(MERS-CoV)已经引起了人类流行病。与SARS-CoV的比较显示出许多显著的差异和相似之处。MERS CoV和SARS-CoV都具有高得多的病死率(分别为40%和10%)(de Wit等人2016.SARS和MERS:对新兴冠状病毒的最新见解(SARS and MERS:recent insights into emerging coronaviruses.)*Nat Rev Microbiol* 14(8):523-34;Zhou等人2020.A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin.*Nature* 579(7798):270-273)。尽管当前的SARS CoV-2与SARS-CoV共享其79%的基因组,但它似乎更具传染性。两种SARS-CoV均通过血管紧张素转换酶2(ACE2)受体进入细胞(Wan等人2020.*J Virol* 94(7):e00127-20)。由SARS-CoV-2引起的疾病称为2019冠状病毒病(COVID-19)。

[0020] SARS-CoV-2首先主要感染下呼吸道并与肺泡上皮细胞上的ACE2结合。这两种病毒都是炎性细胞因子的有效诱导剂。“细胞因子风暴”或“细胞因子级联反应”是器官损伤的假定机制。该病毒激活免疫细胞并诱导炎性细胞因子和趋化因子分泌到肺血管内皮细胞中。

[0021] SARS-CoV-2感染的临床范围似乎很广,包括无症状感染、轻度上呼吸道疾病和伴

有呼吸衰竭甚至死亡的严重病毒性肺炎,其中许多患者因肺炎住院 (Huang等人2020Lancet 395:497-506;Wang等人2020JAMA 323 (11):1061-1069;Chen等人2020.Lancet 395:507-13)。

[0022] 最近,建议将较大年龄、升高的d-二聚体水平和高SOFA评分用于帮助临床医生在早期鉴别那些预后不良的COVID-19患者 (Zhou等人2020.The Lancet, 395 (10229):1054-1062.)

[0023] 本发明令人惊讶的发现是,在感染冠状病毒的患者中,体液样品中的DPP3水平可用于在感染冠状病毒的患者中 (a) 诊断或预测危及生命的恶化或不良事件的风险 (b) 预后严重程度或 (c) 预测或监测治疗或干预的成功性的方法。此外,本发明的主题是用于在感染冠状病毒的患者中进行治疗或干预的DPP3活性抑制剂。

发明内容

[0024] 本发明的主题是一种用于在感染冠状病毒的患者中 (a) 诊断或预测危及生命的恶化或不良事件的风险或 (b) 诊断或预后严重程度或 (c) 预测或监测治疗或干预的成功性或 (d) 进行治疗指导或治疗分层或 (e) 进行患者管理的方法,该方法包括:

[0025] • 确定所述患者体液样品中的二肽基肽酶3 (DPP3) 水平,

[0026] • 将所述确定的DPP3水平与预定阈值进行比较,以及

[0027] • 将所述确定的DPP3水平与所述危及生命的恶化或不良事件的风险相关联,或

[0028] • 将所述确定的DPP3水平与所述严重程度相关联,或

[0029] • 将所述确定的DPP3水平与所述治疗或干预的成功性相关联,或

[0030] • 将所述DPP3水平与某种治疗或干预相关联,或

[0031] • 将所述DPP3水平与对所述患者的所述管理相关联。

[0032] 本申请的主题是用于在感染冠状病毒的患者中 (a) 诊断或预测危及生命的恶化或不良事件的风险或 (b) 诊断或预后严重程度或 (c) 预测或监测治疗或干预的成功性或 (d) 进行治疗指导或治疗分层或 (e) 进行患者管理的方法,其中所述冠状病毒选自SARS-CoV-1、SARS-CoV-2、MERS-CoV,特别地为SARS-CoV-2。

[0033] 本申请的主题是根据本发明的用于在感染冠状病毒的患者中 (a) 诊断或预测危及生命的恶化或不良事件的风险或 (b) 诊断或预后严重程度或 (c) 预测或监测治疗或干预的成功性或 (d) 进行治疗指导或治疗分层或 (e) 进行患者管理的方法,其中所述不良事件选自死亡、器官功能障碍和休克。

[0034] 本申请的主题是根据本发明的用于在感染冠状病毒的患者中 (a) 诊断或预测危及生命的恶化或不良事件的风险或 (b) 诊断或预后严重程度或 (c) 预测或监测治疗或干预的成功性或 (d) 进行治疗指导或治疗分层或 (e) 进行患者管理的方法,其中所述确定的DPP3水平高于预定阈值。

[0035] 本申请的主题是根据本发明的用于在感染冠状病毒的患者中 (a) 诊断或预测危及生命的恶化或不良事件的风险或 (b) 诊断或预后严重程度或 (c) 预测或监测治疗或干预的成功性或 (d) 进行治疗指导或治疗分层或 (e) 进行患者管理的方法,其中所述受试者的体液样品中的DPP3的所述预定阈值为20至120ng/mL,更优选地为30至80ng/mL,甚至更优选地为40至60ng/mL,最优选地,所述阈值是50ng/mL。

[0036] 本申请的主题是根据本发明的用于在感染冠状病毒的患者中 (a) 诊断或预测危及生命的恶化或不良事件的风险或 (b) 诊断或预后严重程度或 (c) 预测或监测治疗或干预的成功性或 (d) 进行治疗指导或治疗分层或 (e) 进行患者管理的方法, 其中所述患者的SOFA评分等于或大于3, 优选地等于或大于7, 或所述患者的快速SOFA评分等于或大于1, 优选地等于或大于2。

[0037] 本申请的主题是根据本发明的用于在感染冠状病毒的患者中 (a) 诊断或预测危及生命的恶化或不良事件的风险或 (b) 诊断或预后严重程度或 (c) 预测或监测治疗或干预的成功性或 (d) 进行治疗指导或治疗分层或 (e) 进行患者管理的方法, 其中所述患者的D-二聚体水平等于或大于 $0.5\mu\text{g/ml}$, 优选地等于或大于 $1.0\mu\text{g/ml}$ 。

[0038] 本申请的主题是根据本发明的用于在感染冠状病毒的患者中 (a) 诊断或预测危及生命的恶化或不良事件的风险或 (b) 诊断或预后严重程度或 (c) 预测或监测治疗或干预的成功性或 (d) 进行治疗指导或治疗分层或 (e) 进行患者管理的方法, 其通过使所述体液样品与特异性结合DPP3的捕获结合剂接触来确定所述DPP3水平。

[0039] 本申请的主题是根据本发明的用于在感染冠状病毒的患者中 (a) 诊断或预测危及生命的恶化或不良事件的风险或 (b) 诊断或预后严重程度或 (c) 预测或监测治疗或干预的成功性或 (d) 进行治疗指导或治疗分层或 (e) 进行患者管理的方法, 其中所述确定包括使用特异性结合全长DPP3的捕获结合剂, 其中所述捕获结合剂可选自抗体、抗体片段或非IgG支架。

[0040] 本申请的主题是根据本发明的用于在感染冠状病毒的患者中 (a) 诊断或预测危及生命的恶化或不良事件的风险或 (b) 诊断或预后严重程度或 (c) 预测或监测治疗或干预的成功性或 (d) 进行治疗指导或治疗分层或 (e) 进行患者管理的方法, 其中在所述受试者的体液样品中确定DPP3蛋白的量和/或DPP3活性并且其中所述确定包括使用特异性结合全长DPP3的捕获结合剂, 其中所述捕获结合剂是抗体。

[0041] 本申请的主题是根据本发明的用于在感染冠状病毒的患者中 (a) 诊断或预测危及生命的恶化或不良事件的风险或 (b) 诊断或预后严重程度或 (c) 预测或监测治疗或干预的成功性或 (d) 进行治疗指导或治疗分层或 (e) 进行患者管理的方法, 其中在所述受试者的体液样品中确定DPP3蛋白的量和/或DPP3活性并且其中所述确定包括使用特异性结合全长DPP3的捕获结合剂, 其中所述捕获结合剂被固定在表面上。

[0042] 本申请的主题是根据本发明的用于在感染冠状病毒的患者中 (a) 诊断或预测危及生命的恶化或不良事件的风险或 (b) 诊断或预后严重程度或 (c) 预测或监测治疗或干预的成功性或 (d) 进行治疗指导或治疗分层或 (e) 进行患者管理的方法, 其中在所述受试者的体液样品中确定DPP3蛋白的量和/或DPP3活性并且其中所述分离步骤是从被捕获的DPP3中去除样品中未与所述捕获结合剂结合的成分的洗涤步骤。

[0043] 本申请的主题是根据本发明的用于在感染冠状病毒的患者中 (a) 诊断或预测危及生命的恶化或不良事件的风险或 (b) 诊断或预后严重程度或 (c) 预测或监测治疗或干预的成功性或 (d) 进行治疗指导或治疗分层或 (e) 进行患者管理的方法, 其中用于确定所述受试者的体液样品中的DPP3活性的方法包括以下步骤:

[0044] • 使所述样品与特异性结合全长DPP3的捕获结合剂接触,

[0045] • 将与所述捕获结合剂结合的DPP3分离,

[0046] • 将DPP3的底物添加到所述经分离的DPP3中，

[0047] • 通过测量和量化DPP3底物的转化来量化所述DPP3活性。

[0048] 本申请的主题是根据本发明的用于在感染冠状病毒的患者中 (a) 诊断或预测危及生命的恶化或不良事件的风险或 (b) 诊断或预后严重程度或 (c) 预测或监测治疗或干预的成功性或 (d) 进行治疗指导或治疗分层或 (e) 进行患者管理的方法，其中在所述受试者的体液样品中确定DPP3活性，并且其中通过选自下组的方法检测DPP3底物转化：产荧光底物（例如Arg-Arg-βNA、Arg-Arg-AMC）的荧光、显色底物的颜色变化、与氨基荧光素偶联的底物的发光、质谱、HPLC/FPLC（反相色谱、尺寸排阻色谱）、薄层色谱、毛细管区带电泳、凝胶电泳后进行活性染色（固定化、活性DPP3）或蛋白质印迹（裂解产物）。

[0049] 本申请的主题是根据本发明的用于在感染冠状病毒的患者中 (a) 诊断或预测危及生命的恶化或不良事件的风险或 (b) 诊断或预后严重程度或 (c) 预测或监测治疗或干预的成功性或 (d) 进行治疗指导或治疗分层或 (e) 进行患者管理的方法，其中在所述受试者的体液样品中确定DPP3活性并且其中所述底物可以选自：血管紧张素II、III和IV、Leu-脑啡肽、Met-脑啡肽、内啡肽1和2、valorphin、β-酪啡肽、强啡肽、原肠肽、ACTH和MSH，或与荧光团、发色团或氨基荧光素偶联的二肽，其中所述二肽是Arg-Arg。

[0050] 本申请的主题是根据本发明的用于在感染冠状病毒的患者中 (a) 诊断或预测危及生命的恶化或不良事件的风险或 (b) 诊断或预后严重程度或 (c) 预测或监测治疗或干预的成功性或 (d) 进行治疗指导或治疗分层或 (e) 进行患者管理的方法，其中在所述受试者的体液样品中确定DPP3活性并且其中所述底物可以选自：与荧光团、发色团或氨基荧光素偶联的二肽，其中所述二肽是Arg-Arg。

[0051] 在本发明的一个具体实施方案中，至少两次确定所述DPP3水平。

[0052] 在本发明的另一个具体实施方案中，所述DPP3水平的至少第二次确定是在2小时内，优选地在4小时内，更优选地在6小时内，甚至更优选地在12小时内，甚至更优选地在24小时内，最优选地在48小时内确定的。

[0053] 这意味着，根据术语“先前测量的DPP3水平”，在本发明的所有主题中应理解，所述先前测量的量是在2小时内、优选地在4小时内、更优选地在6小时内、甚至更优选地在12小时内，甚至更优选地在24小时内、最优选地在48小时内测量的量。测量值与先前测量值之间的差异是在不同时间点取自所述患者的不同样品中的所述DPP3水平之间的相对差异。

[0054] 在本发明的另一个具体实施方案中，在不同时间点取自所述患者的不同样品中确定所述DPP3水平。

[0055] 在本发明的另一个具体实施方案中，确定在不同时间点取自所述患者的不同样品中的所述DPP3水平之间的差异。可以将所述差异确定为绝对差异或相对差异。

[0056] 在本发明的另一个具体实施方案中，当在不同时间点取自所述患者的不同样品中的所述DPP3水平之间的所述相对差异为100%或更大，更优选地为75%或更大，甚至更优选地为50%、最优选地为25%或更大时，开始进行治疗。

[0057] 本申请的主题是根据本发明的用于在感染冠状病毒的患者中 (a) 诊断或预测危及生命的恶化或不良事件的风险或 (b) 诊断或预后严重程度或 (c) 预测或监测治疗或干预的成功性或 (d) 进行治疗指导或治疗分层或 (e) 进行患者管理的方法，其中用DPP3活性抑制剂治疗所述患者。

[0058] 本申请的主题是用于在感染冠状病毒的患者中进行治疗或干预的DPP3活性抑制剂。

[0059] 本申请的主题是根据本发明的用于在感染冠状病毒的患者中进行治疗或干预的DPP3活性抑制剂,其中所述冠状病毒选自SARS-CoV-1、SARS-CoV-2、MERS-CoV,特别地为SARS-CoV-2。

[0060] 本申请的主题是根据本发明的用于在感染冠状病毒的患者中进行治疗或干预的DPP3活性抑制剂,其中当通过根据本发明任一项所述的方法确定时,在所述受试者的体液样品中所述患者的DPP3水平高于预定阈值。

[0061] 本申请的主题是根据本发明的用于在感染冠状病毒的患者中进行治疗或干预的DPP3活性抑制剂,其中所述患者的SOFA评分等于或大于3,优选地等于或大于7,或所述患者的快速SOFA评分等于或大于1,优选地等于或大于2。

[0062] 本申请的主题是根据本发明的用于在感染冠状病毒的患者中进行治疗或干预的DPP3活性抑制剂,其中所述患者的D-二聚体水平等于或大于 $0.5\mu\text{g/ml}$,优选地等于或大于 $1.0\mu\text{g/ml}$ 。

[0063] 本申请的主题是根据本发明的用于在感染冠状病毒的患者中进行治疗或干预的DPP3活性抑制剂,其中所述DPP3活性抑制剂选自抗DPP3抗体或抗DPP3抗体片段或抗DPP3非Ig支架。

[0064] 本申请的主题是根据本发明的用于在感染冠状病毒的患者中进行治疗或干预的DPP3活性抑制剂,其中所述抑制剂是与包含在SEQ ID No.1中的长度为至少4至5个氨基酸的表位结合的抗DPP3抗体或抗DPP3抗体片段或抗DPP3非Ig支架。

[0065] 本申请的主题是根据本发明的用于在感染冠状病毒的患者中进行治疗或干预的DPP3活性抑制剂,其中所述抑制剂是与包含在SEQ ID No.2中的长度为至少4至5个氨基酸的表位结合的抗DPP3抗体或抗DPP3抗体片段或抗DPP3非Ig支架。

[0066] 本申请的主题是根据本发明的用于在感染冠状病毒的患者中进行治疗或干预的DPP3活性抑制剂,其中所述抑制剂是表现出对DPP3的最小结合亲和力等于或小于 10^{-7}M 的抗DPP3抗体或抗DPP3抗体片段或抗DPP3非Ig支架。

[0067] 本申请的主题是根据本发明的用于在感染冠状病毒的患者中进行治疗或干预的DPP3活性抑制剂,其中所述抑制剂是抗DPP3抗体或抗DPP3抗体片段或抗DPP3非Ig支架,并且抑制至少10%,或至少50%,更优选地至少60%,甚至更优选地超过70%,甚至更优选地超过80%,甚至更优选地超过90%,甚至更优选地超过95%的DPP3活性。

[0068] 本申请的主题是根据本发明的用于在感染冠状病毒的患者中进行治疗或干预的DPP3活性抑制剂,其中所述抗体是单克隆抗体或单克隆抗体片段。

[0069] 本申请的主题是根据本发明的用于在感染冠状病毒的患者中进行治疗或干预的DPP3活性抑制剂,其中重链中的互补决定区(CDR)包含序列:

[0070] SEQ ID NO.:7、SEQ ID NO.:8和/或SEQ ID NO.:9

[0071] 并且轻链中的互补决定区(CDR)包含序列:

[0072] SEQ ID NO.:10、KVS和/或SEQ ID NO.:11。

[0073] 本申请的主题是根据本发明的用于在感染冠状病毒的患者中进行治疗或干预的DPP3活性抑制剂,其中所述单克隆抗体或抗体片段是人源化单克隆抗体或人源化单克隆抗

体片段。

[0074] 本申请的主题是用于在感染冠状病毒的患者中进行治疗或干预的DPP3活性抑制剂,其中重链包含序列:

[0075] SEQ ID NO.:12

[0076] 并且其中轻链包含序列:

[0077] SEQ ID NO.:13。

[0078] 在本发明的一个实施方案中,确定DPP3蛋白水平和/或活性DPP3水平并将其与阈值水平进行比较。

[0079] 在本发明的一个具体实施方案中,所述患者的体液样品中DPP3的阈值为20至120ng/mL,更优选地为30至80ng/mL,甚至更优选地为40至60ng/mL,最优选地,所述阈值为50ng/mL。

[0080] 在本发明的一个具体实施方案中,DPP3水平的阈值是正常健康人群的5倍中值浓度,优选地4倍中值浓度,更优选地3倍中值浓度,最优选地2倍中值浓度。

[0081] 所述受试者的体液样品中作为DPP3蛋白的量和/或DPP3活性的DPP3水平可以通过不同的方法来确定,例如免疫测定法、活性测定法、质谱法等。

[0082] 可以通过检测DPP3特异性底物的切割产物来测量DPP3活性。已知的肽激素底物包括Leu-脑啡肽、Met-脑啡肽、内啡肽1和2、valorphin、 β -酪啡肽、强啡肽、原肠肽、ACTH(促肾上腺皮质激素)和MSH(黑素细胞刺激性激素;Abramić等人2000,Baršun等人2007,Dhanda等人2008)。可以通过检测相应的切割产物来监测所提到的肽激素以及其他未经标记的寡肽(例如,Ala-Ala-Ala-Ala,Dhanda等人2008)的切割。检测方法包括但不限于HPLC分析(例如,Lee&Snyder 1982)、质谱法(例如,Abramić等人2000)、H1-NMR分析(例如,Vandenberg等人1985)、毛细管区带电泳(CE;例如,Baršun等人2007)、薄层色谱法(例如,Dhanda等人2008)或反相色谱法(例如,Mazocco等人2006)。

[0083] 检测由于DPP3对产荧光底物的水解而产生的荧光是监测DPP3活性的标准程序。这些底物是与荧光团偶联的特定的二肽或三肽(Arg-Arg、Ala-Ala、Ala-Arg、Ala-Phe、Asp-Arg、Gly-Ala、Gly-Arg、Gly-Phe、Leu-Ala、Leu-Gly、Lys-Ala、Phe-Arg、Suc-Ala-Ala-Phe)。荧光团包括但不限于 β -萘酰胺(2-萘酰胺、BNA、2NA)、4-甲氧基- β -萘酰胺(4-甲氧基-2-萘酰胺)和7-氨基-4-甲基香豆素(AMC、MCA;Abramić等人2000,Ohkubo等人1999)。这些产荧光底物的切割分别导致荧光 β -萘胺或7-氨基-4-甲基香豆素的释放。在液相测定法或ECA中,将底物和DPP3在例如96孔板形式中温育,并使用荧光检测器测量荧光(Ellis&Nuenke 1967)。此外,可以在凝胶上固定携带DPP3的样品,并通过电泳分离,用产荧光底物(例如,Arg-Arg- β NA)和Fast Garnet GBC染色凝胶,并且由荧光读取器检测荧光蛋白条带(Ohkubo等人1999)。相同的肽(Arg-Arg、Ala-Ala、Ala-Arg、Ala-Phe、Asp-Arg、Gly-Ala、Gly-Arg、Gly-Phe、Leu-Ala、Leu-Gly、Lys-Ala、Phe-Arg、Suc-Ala-Ala-Phe)可以与发色团,例如对硝基苯胺二乙酸酯偶联。检测由于显色底物水解引起的颜色变化可用于监测DPP3活性。

[0084] 检测DPP3活性的另一种选择是Protease-GloTM测定法(可在Promega商购)。在所述方法的该实施方案中,DPP3特异性二肽或三肽(Arg-Arg、Ala-Ala、Ala-Arg、Ala-Phe、Asp-Arg、Gly-Ala、Gly-Arg、Gly-Phe、Leu-Ala、Leu-Gly、Lys-Ala、Phe-Arg、Suc-Ala-Ala-Phe)与氨基荧光素偶联。在被DPP3切割后,氨基荧光素被释放并用作偶联的荧光素酶反应的底

物,该反应发出可检测的发光。

[0085] 在一个优选的实施方案中,通过添加产荧光底物Arg-Arg-βNA并实时监测荧光来测量DPP3活性。

[0086] 在用于确定受试者体液样品中活性DPP3的所述方法的一个具体实施方案中,与DPP3反应的所述捕获结合剂被固定在固相上。

[0087] 使测试样品通过固定的结合剂,DPP3(如果存在)与结合剂结合并使其自身被固定以进行检测。然后可以添加底物,并且可以检测反应产物以指示测试样品中DPP3的存在或量。为了本说明书的目的,术语“固相”可用于包括可在其中或在其上进行测定的任何材料或容器,并且包括但不限于:多孔材料、无孔材料、试管、孔、载玻片、琼脂糖树脂(例如,来自GE Healthcare Life Sciences的琼脂糖)、磁性粒子(例如,来自Thermo Fisher Scientific的Dynabeads™或Pierce™磁珠)等。

[0088] 在本发明的另一个实施方案中,通过使所述体液样品与特异性结合DPP3的捕获结合剂接触来确定DPP3水平。

[0089] 在本发明的另一个优选实施方案中,用于确定DPP3水平的所述捕获结合剂可以选自抗体、抗体片段或非IgG支架。

[0090] 在本发明的一个具体实施方案中,所述捕获结合剂是抗体。

[0091] 所述受试者的体液样品中的DPP3蛋白的量 and/or DPP3活性可以例如通过以下方法中的一个来确定:

[0092] 1. 用于定量DPP3蛋白浓度的发光免疫测定法(LIA) (Rehfeld 等人2019JALM 3(6):943-953)。

[0093] LIA是一种一步法化学发光夹心免疫测定,其使用白色高结合性聚苯乙烯微量滴定板作为固相。这些板涂覆有单克隆抗DPP3抗体AK2555(捕获抗体)。用MA70-吡啶鎓-NHS-酯标记示踪物抗DPP3抗体AK2553,并以20ng/孔的浓度使用。将20微升样品(例如,来自患者血液的血清、肝素血浆、柠檬酸盐血浆或EDTA血浆)和校准物移液到经涂覆的白色微量滴定板中。添加示踪物抗体AK2553后,将微量滴定板在室温和600rpm下温育3h。然后通过4个洗涤步骤(350μL/孔)去除未结合的示踪物。使用微量滴定板光度计以1秒/孔测量剩余的化学发光。用6点校准曲线确定DPP3的浓度。校准物和样品优选地一式两份运行。

[0094] 2. 用于定量DPP3活性的酶捕获活性测定法(ECA) (Rehfeld等人2019JALM 3(6):943-953)。

[0095] ECA是一种DPP3特异性活性测定法,其使用黑色高结合性聚苯乙烯微量滴定板作为固相。这些板涂覆有单克隆抗DPP3抗体AK2555(捕获抗体)。将20微升样品(例如,血清、肝素血浆、柠檬酸盐血浆、EDTA血浆、脑脊液和尿液)和校准物移液到经涂覆的黑色微量滴定板中。加入测定缓冲液(200μL)后,将微量滴定板在22°C和600rpm下温育2小时。样品中存在的DPP3通过与捕获抗体结合而被固定。通过4个洗涤步骤(350μL/孔)去除未结合的样品成分。通过如下来测量经固定的DPP3的比活性:在反应缓冲液中加入产荧光底物Arg-Arg-β-萘酰胺(Arg2-βNA),然后在37°C温育1小时。DPP3将Arg2-βNA特异性地切割成Arg-Arg二肽和荧光β-萘胺。用荧光计使用340nm的激发波长并在410nm处检测发光来测量荧光。用6点校准曲线确定DPP3活性。校准物和样品优选地一式两份运行。

[0096] 3. 用于定量DPP3活性的液相测定法(LAA) (修改自Jones等人,Analytical

Biochemistry, 1982)。

[0097] LAA是一种液相测定法,其使用黑色非结合性聚苯乙烯微量滴定板来测量DPP3活性。将20 μ l样品(例如血清、肝素血浆、柠檬酸盐血浆)和校准物移液到非结合性黑色微量滴定板中。在测定缓冲液(200 μ L)中添加产荧光底物Arg2- β NA后,在荧光计中使用340nm的激发波长并在410nm处检测发光来测量初始 β NA荧光(T=0)。然后将板在37 $^{\circ}$ C温育1小时。测量(T=60)的最终荧光。计算最终荧光和初始荧光之间的差异。用6点校准曲线确定DPP3活性。校准物和样品优选地一式两份运行。

[0098] 在一个具体实施方案中,使用测定法确定DPP3水平,其中所述测定法的测定灵敏度能够量化健康受试者的DPP3并且为<20ng/ml,优选地<30ng/ml,更优选地<40ng/ml。

[0099] 在一个具体实施方案中,所述结合剂表现出对DPP3的结合亲和力为至少 10^7M^{-1} ,优选地为 10^8M^{-1} ,更优选地亲和力大于 10^9M^{-1} ,最优选地大于 10^{10}M^{-1} 。本领域技术人员知道,可以考虑通过应用更高剂量的化合物来补偿较低的亲和力,并且该措施将不会导致超出本发明的范围。

[0100] 在本发明的另一个实施方案中,所述体液样品选自全血、血浆和血清。

[0101] 在一个特定实施方案中,根据本发明的体液是血液样品。血液样品可以选自全血、血清和血浆。在所述方法的一个具体实施方案中,所述样品选自人柠檬酸盐血浆、肝素血浆和EDTA血浆。

[0102] 为了确定抗体对DPP3的亲和力,使用Biacore 2000系统(GE Healthcare Europe GmbH,德国弗莱堡)通过无标记的表面等离子体共振确定DPP3与经固定的抗体结合的动力学。根据制造商的说明(小鼠抗体捕获试剂盒;GE Healthcare),使用以高密度共价偶联到CM5传感器表面的抗小鼠Fc抗体进行抗体的可逆固定(Lorenz等人2011.Antimicrob Agents Chemother.55(1):165-173)。

[0103] 在一个实施方案中,用于确定DPP3水平的此类测定法是使用任何种类的检测技术的夹心免疫测定法,包括但不限于酶标记、化学发光标记、电化学发光标记,优选地为全自动化测定法。在诊断方法的一个实施方案中,此测定法是酶标记的夹心测定法。自动化或全自动化测定法的示例包括可用于以下系统中的一个的测定法:Roche Elecsys[®]、Abbott Architect[®]、Siemens Centaur[®]、Brahms Kryptor[®]、Biomerieux Vidas[®]、Alere Triage[®]。

[0104] 多种免疫测定法是已知的并且可以用于本发明的测定法和方法,这些测定和方法包括:质谱法(MS)、发光免疫测定法(LIA)、放射免疫测定法("RIA")、均相酶放大免疫测定法("EMIT")、酶联免疫吸附测定法("ELISA")、脱辅酶再激活免疫测定法("ARIS")、基于发光的珠粒阵列、基于磁珠的阵列、蛋白质微阵列测定法、快速测试形式(例如试纸条免疫测定法、免疫色谱试纸条测试)、稀有穴状化合物测定法和自动化系统/分析仪。

[0105] 在本发明的一个实施方案中,可以是所谓的POC测试(即时测定法),这是一种测试技术,其允许在患者附近在不到1小时内执行测试,而不需要全自动化测定系统。该技术的一个示例是免疫色谱测试技术,例如微流体装置。

[0106] 在优选的实施方案中,所述标记选自化学发光标记、酶标记、荧光标记、放射碘标记。

[0107] 测定法可以是均相或非均相测定法、竞争性和非竞争性测定法。在一个实施方案

中,该测定法是夹心测定法的形式,这是一种非竞争性免疫测定法,其中待检测和/或经定量的分子与第一抗体和第二抗体结合。第一抗体可以与固相例如珠粒、孔或其他容器的表面、芯片或条带结合,并且第二抗体是用染料、放射性同位素或反应性部分或催化活性部分标记的抗体。然后通过适当的方法测量与分析物结合的经标记抗体的量。与“夹心测定法”有关的一般组成和程序是已确立的并且为本领域技术人员所知(《免疫测定手册》(The Immunoassay Handbook),David Wild编著,Elsevier LTD,Oxford;第三版(2005年5月),ISBN-13:978-0080445267;Hultschig C等人,Curr Opin Chem Biol.2006年2月;10(1):4-10.PMID:16376134)。

[0108] 在另一个实施方案中,所述测定法包括两种捕获分子,优选地抗体,它们都作为分散体存在于液体反应混合物中,其中第一标记组分附接至第一捕获分子,其中所述第一标记组分是基于荧光淬灭或化学发光淬灭或扩增的标记系统的一部分,并且所述标记系统的第二标记组分附接到第二捕获分子,使得在两种捕获分子与分析物结合时产生可测量的信号,允许检测在包含样品的溶液中形成的夹心复合物。

[0109] 在另一个实施方案中,所述标记系统包含稀土穴状化合物或稀土螯合物与荧光染料或化学发光染料,特别地花青型染料的组合。

[0110] 在本发明的上下文中,基于荧光的测定法包括使用染料,染料可以例如选自FAM(5-或6-羧基荧光素)、VIC、NED、荧光素、荧光素异硫氰酸酯(FITC)、IRD-700/800、花青染料(例如CY3、CY5、CY3.5、CY5.5、Cy7)、咕吨、6-羧基-2',4',7',4,7-六氯荧光素(HEX)、TET、6-羧基-4',5'-二氯-2',7'二甲氧基荧光素(JOE)、N,N,N',N'-四甲基-6-羧基罗丹明(TAMRA)、6-羧基-X-罗丹明(ROX)、5-羧基罗丹明-6G(R6G5)、6-羧基罗丹明-6G(RG6)、罗丹明、罗丹明绿、罗丹明红、罗丹明110、BODIPY染料例如BODIPY TMR、俄勒冈绿、香豆素类例如伞形酮、苯甲亚胺类例如Hoechst 33258;菲啉类例如德克萨斯红、亚基马黄、Alexa Fluor、PET、溴化乙锭、吡啶鎓染料、咪唑染料、吩噻嗪染料、卟啉染料、聚甲炔染料等。

[0111] 在本发明的上下文中,基于化学发光的测定法包括使用染料,其基于在(Kirk-Othmer,《化学技术百科全书》(Encyclopedia of chemical technology),第四版,J.I.Kroschwitz执行编辑;M.Howe-Grant编著,JohnWiley&Sons,1993,第15卷,第518-562页,通过引用并入本文,包括第551-562页的引文)。优选的化学发光染料是吡啶鎓酯。

[0112] 如本文所述,“测定法”或“诊断测定法”可以是应用于诊断领域的任何类型。此类测定法可以基于待检测的分析物与具有一定亲和力的一种或多种捕获探针的结合。关于捕获分子与目标分子或感兴趣的分子之间的相互作用,亲和力常数优选地大于 10^8M^{-1} 。

[0113] 在具体实施方案中,将所述两种结合剂中的至少一种标记以进行检测。

[0114] 已使用实施例中概述的所述DPP3测定法确定了本发明的DPP3水平(Rehfeld等人2019.JALM 3(6):943-953)。如果已与本发明中使用的测定系统不同地对上面提到的阈值进行了校准,则这些阈值在其他测定法中可能不同。因此,考虑到校准的差异,上述截止值应相应地适用于此类经不同校准的测定法。量化校准差异的一种可能性是通过使用两种方法测量样品中的相应生物标志(例如,DPP3)而进行的所讨论的测定法与本发明中使用的相应生物标志物测定法的方法比较分析(相关性)。另一种可能性是用所讨论的测定法(假定该测试具有足够的分析灵敏度)确定具有代表性的正常人群的中位数生物标志物水平,将结果与文献中所述的中位数生物标志物水平进行比较,并基于通过该比较获得的差异重新

计算校准。通过本发明中使用的校准,已测量了来自5,400名正常(健康)受试者(瑞典单中心基于前瞻性人群的研究(MPP-RES))的样品:血浆DPP3中位数(四分位距)为14.5ng/ml(11.3ng/ml-19ng/ml)。

[0115] 例如可以从Kaplan-Meier分析中获得阈值水平,其中疾病的发生与人群中生物标志物的四分位数相关。根据该分析,生物标志物水平高于第75个百分位数的受试者罹患根据本发明的疾病的风险显著增加。对经典风险因素进行全面调整的Cox回归分析进一步支持了该结果:相对于所有其他受试者,最高四分位数与罹患根据本发明的疾病的风险增加高度显著相关。

[0116] 其他优选的截止值是例如正常人群的第90、95或99个百分位数。通过使用比第75个百分位数更高的百分位数,减少了鉴别出的假阳性受试者的数量,但可能会遗漏鉴别处于中等风险的受试者(尽管风险增加仍然存在)。因此,可以根据以下标准来采用截止值:是否认为更适合以也鉴别“假阳性”为代价来鉴别大多数处于风险中的受试者,或者是否认为更适合以遗漏若干处于中等风险的受试者为代价来主要鉴别处于高风险的受试者。

[0117] 本发明的方法的一个特别的优点是可以根据所需的治疗对感染冠状病毒的患者进行分层,其中所述治疗选自施用DPP3活性抑制剂和血管紧张素受体激动剂和/或其前体。经分层的患者组可以包括需要开始治疗的患者和不需要开始治疗的患者。

[0118] 本发明的另一个特定优点是该方法可以区分更有可能从所述治疗中受益的患者和不太可能从所述治疗中受益的患者。

[0119] 在优选的实施方案中,在提供指示样品中DPP3水平的样品分析结果后立即开始或改变用DPP3活性抑制剂和/或血管紧张素受体激动剂和/或其前体进行的治疗。在进一步的实施方案中,可以在收到样品分析结果后12小时内开始治疗,优选地在收到样品分析结果后6、4、2、1、0.5、0.25小时内或立即开始治疗。

[0120] 在一些实施方案中,该方法包括或由以下组成:在单个样品和/或在基本上相同的时间点获得的多个样品中对来自患者的样品中的DPP3进行单次和/或多次测量,以对治疗进行指导和/或监测和/或分层,其中所述治疗是施用DPP3活性抑制剂和/或血管紧张素受体激动剂和/或其前体。

[0121] 在一个实施方案中,所述血管紧张素受体激动剂和/或其前体选自血管紧张素I、血管紧张素II、血管紧张素III、血管紧张素IV。

[0122] 在优选的实施方案中,血管紧张素II是血管紧张素II乙酸盐。血管紧张素II乙酸盐是L-天冬氨酰-L-精氨酰-L-缬氨酰-L-酪氨酰-L-异亮氨酰-L-组氨酰-L-脯氨酰-L-苯基丙氨酸乙酸盐。抗衡离子乙酸根以非化学计量比例存在。血管紧张素II乙酸盐的分子式为 $C_{50}H_{71}N_{13}O_{12} \cdot (C_2H_4O_2)_n$; (n=乙酸根分子数;理论上n=3),平均分子量为1046.2(作为游离碱)。

[0123] 本发明还涉及一种用于实施本发明方法的试剂盒,包括用于确定患者样品中DPP3水平的检测试剂。

[0124] 它还可以优选地被确定为可以直接在患者遇到医务人员的地方,例如急诊室或初级监护室进行的即时测定法。此外,用于检测的测定法可以是自动化或半自动化的测定法,优选地双重测定法和/或即时测定法。

[0125] 在优选的实施方案中,本发明涉及用于确定来自患者的样品中的DPP3水平和任选

的另外的生物标志物水平的的方法和试剂盒。

[0126] 所述另外的生物标志物可以选自D-二聚体、降钙素原(PCT)、C-反应蛋白(CRP)、乳酸盐、bio-ADM、penKid、NT-proBNP、白细胞计数、淋巴细胞计数、嗜中性粒细胞计数、血红蛋白、血小板计数、白蛋白、丙氨酸转氨酶、肌酐、血尿素、乳酸脱氢酶、肌酐激酶、心肌肌钙蛋白I、凝血酶原时间、血清铁蛋白、白细胞介素6(IL-6)、IL-10、IL-2、IL-7、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、粒细胞集落刺激因子(GCSF)、IP-10、MCP-1、MIP-1 α 。

[0127] 本发明还涉及一种用于实施本发明方法的试剂盒,包括用于确定来自患者的样品中的DPP3的检测试剂,以及参考数据(例如,对应于所述样品中的DPP3水平的参考和/或阈值水平),所述参考数据为20至120ng/mL,更优选地为30至80ng/mL,甚至更优选地为40至60ng/mL,最优选地为50ng/mL,其中所述参考数据优选地被存储在计算机可读介质和/或以计算机可执行代码的形式使用,该计算机可执行代码被配置用于将确定的DPP3与所述参考数据进行比较。

[0128] 在本文所述方法的一个实施方案中,所述方法另外地包括将感染冠状病毒的患者中确定的DPP3水平与参考和/或阈值水平进行比较,其中在计算机处理器中使用计算机可执行代码进行所述比较。本发明的方法可以部分地由计算机实现。例如,可以在计算机系统中执行将检测到的标志物水平(例如,DPP3)与参考和/或阈值水平进行比较的步骤。例如,可以将所确定的值输入(由健康专业人员手动或从已经确定了一种或多种相应标记物水平的设备自动输入)到计算机系统中。计算机系统可以直接位于即时医护点(例如初级监护室或急诊科(ED)),也可以位于通过计算机网络连接的远程位置(例如,通过互联网或专门的医疗云系统,任选地与其他IT系统或平台例如医院信息系统(HIS)相结合)。替选地或附加地,为用户(通常是诸如医师的健康专业人员)显示和/或打印相关联的治疗指导和/或治疗分层。

[0129] 在本发明的具体实施方案中,所述患者已被诊断为患有冠状病毒感染。

[0130] 术语“冠状病毒感染”被定义为冠状病毒(冠状病毒科)的感染,冠状病毒是有包膜的正义单链RNA病毒家族。病毒基因组长度为26-32千碱基。这些颗粒通常装饰有大的(约20nm)、棒状或花瓣状的表面突起(“膜粒”或“刺突”),在球形颗粒的电子显微照片中,它们会产生与日冕相像的图像。冠状病毒会导致哺乳动物和鸟类疾病。在人类中,所述病毒会引起呼吸道感染,包括普通感冒,这些感染通常是轻微的,但罕见的形式如SARS、MERS和COVID-19可能是致命的。最新增的人类冠状病毒株是SARS-CoV-2。

[0131] 在一个具体实施方案中,所述冠状病毒感染选自SARS-CoV-1、SARS-CoV-2、MERS-CoV,特别地为SARS-CoV-2的感染。

[0132] 根据WHO,目前将严重急性呼吸道感染(SARI)定义为有发热史或测量温度 $\geq 38^{\circ}\text{C}$ 和咳嗽,在过去约10天内发病并需要住院治疗的急性呼吸道感染(ARI)。然而,没有发烧并不排除病毒感染。

[0133] SARS-CoV感染可能出现轻度、中度或重度疾病;后者包括重症肺炎、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、脓毒症和脓毒性休克。早期鉴别具有严重表现(见表1)的患者允许根据机构或国家方案立即优化支持性护理治疗并安全、快速地进入(或转诊)到重症监护病房。对于病情较轻的人,除非担心迅速恶化,否则可能不需要住院。对于所有出院的患者,如果他们出现任何病情恶化,应指示他们返回医院。

[0134] 表1. 与2019-nCoV感染相关的临床综合征 (根据WHO指南)

无并发症的病情	患者具有无并发症的上呼吸道病毒感染，可能有诸如发热、咳嗽、咽痛、鼻塞、不适、头痛、肌肉痛或不适的非特异性症状。老年人和免疫抑制者可能出现非典型症状。这些患者没有任何脱水、脓毒症或呼吸短促的体征。
轻度肺炎	患者具有肺炎且没有严重肺炎体征。 非重症肺炎患儿具有咳嗽或呼吸困难+呼吸急促：呼吸急促（以呼吸次数/分计）：<2个月， ≥ 60 ；2-11个月， ≥ 50 ；1-5年， ≥ 40 且无重症肺炎体征。
重症肺炎	青少年或成人：发烧或疑似呼吸道感染，加上呼吸频率 >30 次呼吸/min、严重呼吸窘迫或室内空气时 $SpO_2 < 90\%$ 中的一项（从[1]调整）。 儿童具有咳嗽或呼吸困难，加上以下中的至少一项：中心性紫绀或 $SpO_2 < 90\%$ ；严重的呼吸窘迫（例如打咕噜、非常严重的胸部内

[0136]

	<p>陷); 具有一般危险体征的肺炎体征: 无法母乳喂养或饮水, 嗜睡或失去知觉, 或抽搐。可能存在肺炎的其他体征: 胸部内陷、呼吸急促 (以呼吸次数/分钟计): <2个月, ≥60; 2-11个月, ≥50; 1-5年, ≥40.2临床诊断; 胸部影像学检查可以排除并发症。</p>
<p>急性呼吸窘迫综合征 (ARDS)</p>	<p>发作: 已知临床损伤后一周内出现新的或恶化的呼吸道症状。 胸部影像学检查 (射线照片、CT扫描或肺部超声): 双侧混浊, 不能完全通过积液、肺叶或肺塌陷或结节解释。 水肿的起源: 不能完全通过心力衰竭或体液超负荷解释的呼吸衰竭。如果不存在风险因素, 则需要客观评估 (例如超声心动图) 以排除水肿的静水力学原因。 氧合 (成人): -轻度ARDS: 200 mmHg<PaO₂/FiO₂≤300 mmHg (其中PEEP或CPAP≥5 cmH₂O, 7或无通气8) -中度ARDS: 100 mmHg<PaO₂/FiO₂≤200 mmHg, 其中PEEP≥5 cmH₂O, 7或无通气8) -重度ARDS: PaO₂/FiO₂≤100 mmHg, 其中PEEP≥5 cmH₂O, 7或无通气8) -当PaO₂不可用时, SpO₂/FiO₂≤315提示ARDS (包括无通气患者) 氧合 (儿童; 注意OI=氧合指数且OSI=使用SpO₂的氧合指数): -通过全面罩的双水平NIV或CPAP≥5 cmH₂O: PaO₂/FiO₂≤300 mmHg或SpO₂/FiO₂≤264 -轻度ARDS (有创通气): 4≤OI<8或5≤OSI<7.5 -中度ARDS (有创通气): 8≤OI<16或7.5≤OSI<12.3 -重度ARDS (有创通气): OI≥16或OSI≥12.3</p>
<p>脓毒症</p>	<p>成人: 由于宿主对伴有器官功能障碍的疑似或已证实感染的反应失调引起的危及生命的器官功能障碍。器官功能障碍的体征包括: 精神状态改变、呼吸困难或呼吸急促、氧饱和度低、排尿减少、心率加快、脉搏微弱、四肢冰冷或低血压、皮肤斑驳或凝血障碍的实验室证据、血小板减少症、酸中毒、高乳酸或高胆红素血症。 儿童: 疑似或证实感染且≥2 SIRS标准, 其中一项必须是体温异常或白细胞计数异常。</p>
<p>脓毒性休克</p>	<p>成人: 尽管进行了容量复苏, 但仍存在持续低血压, 需要血管加压药以维持MAP≥65 mmHg并且血清乳酸水平>2 mmol/L。 儿童 (任何低血压 (SBP<第5百分位数或对于年龄低于正常>2 SD) 或以下中的2-3项: 精神状态改变; 心动过速或心动过缓 (婴儿HR<90 bpm或>160 bpm和儿童HR<70 bpm或>150 bpm); 毛细血管再充盈时间延长 (>2秒) 或强烈的血管舒张伴随有洪脉; 呼吸急促; 斑驳的皮肤或瘀点或紫癜性皮炎; 乳酸增加; 少尿; 体温过高或体温过低。</p>

[0137] 氧合指数;OSI,使用SpO₂的氧合指数;PaO₂,氧气分压;PEEP,呼气末正压;SBP,收缩血压;SD,标准偏差;SIRS,全身炎症反应综合征;SpO₂,氧饱和度。*如果海拔高于1000m,则修正系数应计算如下:PaO₂/FiO₂×气压/760。

[0138] 脓毒性休克是一种潜在的致命医疗病况,其当作为对感染的反应的器官损伤或损

害的脓毒症导致危险的低血压和细胞代谢异常时发生。脓毒症和脓毒性休克的第三个国际共识定义(脓毒症-3)将脓毒性休克定义为脓毒症的一个子集,其中特别严重的循环、细胞和代谢异常与单独的脓毒症相比与更高的死亡风险相关。在不存在血容量过低的情况下,脓毒性休克患者可以通过需要血管加压药以维持平均动脉压为65mmHg或更高并且血清乳酸水平大于2mmol/L (>18mg/dL)来进行临床鉴别。这种组合与超过40%的医院死亡率相关(Singer等人2016.*JAMA*.315(8):801-10)。原发感染最常由细菌引起,但也可由真菌、病毒或寄生虫引起。它可位于身体的任何部位,但最常见于肺部、大脑、泌尿道、皮肤或腹部器官。它可导致多器官功能障碍综合征(以前称为多器官衰竭)和死亡。通常,在重症监护病房对患有脓毒性休克的人进行护理。它最常影响儿童、免疫功能低下的个体和老年人,因为他们的免疫系统无法像健康成年人的免疫系统那样有效地应对感染。脓毒性休克的死亡率为约25-50%。

[0139] 如本文所用,器官功能障碍表示器官不执行其预期功能的病况或健康状态。“器官衰竭”表示达到一定程度的器官功能障碍,以至于在没有外部临床干预的情况下无法维持正常的体内平衡。所述器官衰竭可涉及选自下组的器官:肾、肝、心脏、肺、神经系统。相比之下,器官功能代表了相应器官在生理范围内的预期功能。本领域技术人员在医疗检查期间了解器官的相应功能。

[0140] 器官功能障碍可以通过序贯器官衰竭评估评分(SOFA-评分)或其分量来定义。以前称为脓毒症相关器官衰竭评估评分(Singer等人2016.*JAMA* 315(8):801-10)的SOFA评分用于跟踪个人在重症监护病房(ICU)停留期间的状态以确定个人的器官功能的程度或衰竭率。该评分基于六种不同的评分,对于呼吸、心血管、肝脏、凝血、肾脏和神经系统各自评分为0至4,评分越高,反映器官功能障碍更加恶化。例如,在Lamden等人(综述参见Lamden等人2019.*Critical Care* 23:374)中描述了评估SOFA评分的标准。传统上,可以在入住ICU时和随后的每个24h时段计算SOFA评分。特别地,所述器官功能障碍选自肾功能减退、心脏功能障碍、肝功能障碍或呼吸道功能障碍。

[0141] 快速SOFA评分(快速SOFA或qSOFA)由脓毒症-3组于2016年2月引入,作为SOFA评分的简化版本,作为用于鉴别感染后结果不良的高风险患者的初始方法(Angus等人2016.*Critical Care Medicine*.44(3):e113-e121)。qSOFA通过仅包括其三个临床标准并通过包括“任何改变的精神状态”而不是要求GCS<15,大大简化了SOFA评分。可以容易且快速地对患者进行连续重复qSOFA。分数范围为0至3分。对于低血压(SBP≤100mmHg)、高呼吸频率(≥22次呼吸/分钟)和精神状态改变(GCS≤15)给1分。在感染开始不久后出现2分或更高qSOFA分与更高的死亡风险或延长重症监护病房住院时间相关。这些是在可能是脓毒症的感染患者中比无并发症的感染患者中更常见的结果。基于这些发现,对于脓毒症第三个国际共识定义推荐qSOFA作为鉴别ICU外可能是脓毒症的感染患者的简单提示(Seymour等人2016.*JAMA* 315(8):762-774)。

[0142] 将危及生命的恶化定义为与高死亡风险相关的患者病况,其涉及重要器官系统衰竭,包括中枢神经系统衰竭、肾衰竭、肝脏衰竭、代谢衰竭或呼吸衰竭。

[0143] 将不良事件定义为死亡、器官功能障碍或休克、ARDS、肾损伤、ALI(急性肺损伤)或心血管衰竭。

[0144] 在本发明中,术语“预后”或“预断”表示对受试者(例如,患者)的医疗状况会如何

进展的预测。这可以包括对所述受试者的康复机会或不良结果的机会的估计。

[0145] 可以在定义的时间段内进行包括死亡的不良事件的所述预后,定义的时间段例如长达1年,优选地长达6个月,更优选地长达3个月,更优选地长达90天,更优选地长达60天,更优选地长达28天,更优选地长达14天,更优选地长达7天,更优选地长达3天。

[0146] 在具体实施方案中,在长达28天的时间段内进行包括死亡的不良事件的所述预后。

[0147] 本发明上下文中的术语“治疗监测”是指例如通过获得关于治疗功效的反馈来监测和/或调整所述患者的治疗性处理。

[0148] 如本文所用,术语“治疗指导”是指基于一种或多种生物标志物的值和/或临床参数和/或临床评分施用某些治疗或医疗干预。

[0149] 所述临床参数或临床评分选自血压过低病史、血管加压药需求、插管、机械通气、Horowitz指数、SOFA评分、快速SOFA评分。

[0150] 术语“治疗分层”特别地涉及将患者分组或分类为不同组,例如根据其分类接受或不接受治疗措施的治疗组。

[0151] 所述治疗或干预可以选自药物治疗、无创通气、机械通气或体外膜氧合(ECMO)。

[0152] 无创通气是通过面罩、鼻罩或头盔施用的呼吸支持。在正压下通过面罩提供通常添加氧气的空气。

[0153] 机械通气或辅助通气,是人工通气的医学术语,其中使用机械手段以辅助或替代自主呼吸。这可能涉及称为呼吸机的机器,或者可以由适当合格的专业人员例如麻醉师、呼吸治疗师(RT)、注册护士或护理人员通过压缩袋阀式面罩装置来手动辅助呼吸。如果机械通气涉及通过口(例如气管内插管)或皮肤(例如气管造口术插管)进入气管内的任何器械,则它被称为“侵入性的”。在适当选择的有意识的患者中,采用面罩或鼻罩进行无创通气。

[0154] 体外膜肺氧合(ECMO),也称为体外生命支持(ECLS),是一种体外技术,其为心脏和肺部无法提供足够量的气体交换或灌注的人提供延长的心脏和呼吸支持以维持生命。ECMO技术主要来源于心肺转流,其提供短期支持并抑制自然循环。ECMO如下进行工作:从人体中取出血液,并从患者的红细胞中人工去除二氧化碳并向其添加氧气。通常,它用于心肺转流术后或对严重心力衰竭和/或肺衰竭患者的晚期治疗,但它现在在某些中心被用作治疗心脏骤停,从而允许在支持循环和氧合的同时治疗骤停的根本病因。在人工通气不足以维持血氧水平的情况下,ECMO还用于支持患有与COVID-19相关的急性病毒性肺炎的患者。

[0155] 所述药物治疗可以选自抗病毒药物、来自治愈的COVID-19肺炎患者的免疫球蛋白、针对冠状病毒的中和性单克隆抗体、免疫增强剂、甲磺酸卡莫司他、冠状病毒蛋白酶抑制剂(例如糜蛋白酶样抑制剂、木瓜蛋白酶样蛋白酶抑制剂)、刺突(S)蛋白-血管紧张素转换酶-2(ACE2)阻断剂(例如氯喹、羟氯喹、大黄素、普马嗪)、DPP3活性抑制剂和血管紧张素受体激动剂和/或其前体。

[0156] 所述靶向SARS-CoV和MERS-CoV的中和性单克隆抗体可以选自Shanmugaraj等人总结的组。(Shanmugaraj等人2020.Asian Pac J.allergy Immunol 38:10-18)。

[0157] 所述抗病毒药物可以选自洛匹那韦、利托那韦、瑞德西韦、奈莫司他、利巴韦林、奥司他韦、喷昔洛韦、阿昔洛韦、更昔洛韦、法匹拉韦、硝唑尼特、奈非那韦、阿比多尔。

[0158] 所述免疫增强剂可选自干扰素、静脉内丙种球蛋白、胸腺素 α -1、左旋咪唑、环孢菌

素-A的非免疫抑制衍生物。

[0159] 在一个实施方案中,所述血管紧张素受体激动剂和/或其前体选自血管紧张素I、血管紧张素II、血管紧张素III、血管紧张素IV。

[0160] 在具体实施方案中,如果所述DPP3的预定水平高于阈值,则将所述血管紧张素受体激动剂和/或其前体施用于所述患者。

[0161] Horowitz指数(同义词:Horowitz后的氧合,Horowitz商,P/F比)是用于评估患者、特别是那些借助呼吸机的患者的肺功能的比率。它可用于评价对肺部的损害程度。Horowitz指数定义为以毫米汞柱计的血液中氧分压(P_{aO_2})与吸入空气中氧分数(F_{iO_2})的比率,即 P_{aO_2}/F_{iO_2} 比率。在健康的肺部,Horowitz指数取决于年龄,通常介于350和450之间。低于300的值是轻度肺损伤的阈值,200表示中等严重的肺损伤。低于100的值作为严重损伤的标准。Horowitz指数在急性呼吸窘迫综合征(ARDS)的诊断中起主要作用。根据柏林定义(Matthay等人2012.JClinInvest.122(8):2731-2740),使用Horowitz指数根据血氧不足程度对ARDS的三种严重程度进行分类。

[0162] 急性呼吸窘迫综合征(ARDS)是一种呼吸衰竭,其特征是肺部出现广泛炎症的快速发作。症状包括呼吸短促、呼吸急促和皮肤显色呈淡蓝色。对于那些幸存者来说,生活质量下降是很常见的。病因可包括脓毒症、胰腺炎、创伤、肺炎和误吸。潜在的机制涉及对形成肺部微观气囊屏障的细胞的弥漫性损伤、表面活性剂功能障碍、免疫系统的激活以及身体对凝血的调节功能障碍。实际上,ARDS损害了肺交换氧气和二氧化碳的能力。尽管呼气末正压(PEEP)超过5cm H_2O ,但诊断是基于 P_{aO_2}/F_{iO_2} 比率(动脉氧分压与吸入氧级分的比率)小于300mmHg。主要治疗包括机械通气以及针对根本病因的治疗。通气策略包括使用低容量和低压。如果氧合仍然不足,则可以使用肺复张策略和神经肌肉阻断剂。如果这还不够,体外膜肺氧合(ECMO)可以是一种选择。该综合征与35%至50%的死亡率相关。

[0163] 术语“疾病严重程度”与疾病对患者的影响范围和程度有关。可以根据患者的症状来划分疾病的严重程度,例如划分为无症状、轻度、重度和危重。

[0164] 根据疾病严重程度可将COVID-19分类如下(<https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/overview/clinical-spectrum/>):

[0165] • 无症状型感染或症状发生前感染:使用病毒学检验(即核酸扩增检验或抗原检验)检验SARS-CoV-2呈阳性但没有与COVID-19相符的症状的个体。

[0166] • 轻度疾病:有COVID-19的各种体征和症状(例如发烧、咳嗽、喉咙痛、不适、头痛、肌肉疼痛、恶心、呕吐、腹泻、味觉和嗅觉丧失)中的任一个但没有呼吸短促、呼吸困难或胸部影像学检查异常。

[0167] • 中度疾病:在临床评估或影像学检查期间显示出下呼吸道疾病迹象并且具有在海平面的室内空气中氧饱和度(SpO_2) $\geq 94\%$ 的个体。

[0168] • 重度疾病:具有在海平面的室内空气中 $SpO_2 < 94\%$ 、动脉氧分压与吸入氧级分(P_{aO_2}/F_{iO_2})的比值 $< 300\text{mmHg}$ 、呼吸频率 > 30 次呼吸/分钟或肺浸润 $> 50\%$ 。

[0169] • 危重疾病:具有呼吸衰竭、脓毒性休克和/或多器官功能障碍的个体。

[0170] 如本文所用,术语“患者”是指因疾病而正在接受医疗护理或应接受医疗护理的活的人类或非人类生物体。这包括没有明确疾病但正在进行病理学体征调查的人。因此,本文所述的方法和测定法适用于人类疾病和兽医疾病两者。

[0171] 本发明上下文中的术语“患者管理”是指：

- [0172] • 决定入院或进入重症监护病房，
- [0173] • 决定将患者重新安置到专科医院或专科医院病房，
- [0174] • 评估从重症监护病房或医院提早出来，
- [0175] • 资源分配(例如，医生和/或护理人员、诊断、治疗)，
- [0176] • 决定进行治疗性处理。

[0177] 在本发明的一个实施方案中，所述患者是在采集所述患者的体液样品时感染冠状病毒的危重患者。

[0178] 抑制剂是优选地显著抑制DPP3活性的分子。这些分子可以是肽和小分子、抗体、抗体片段或非Ig支架。

[0179] 显著抑制意指抑制DPP3活性超过60%，优选地超过70%，更优选地超过80%，优选地超过90%，更优选地几乎或实际上为100%抑制。

[0180] 可以通过不同的通用蛋白酶抑制剂(例如PMSF、TPCK)、巯基试剂(例如pHMB、DTNB)和金属螯合剂(EDTA、邻二氮菲)非特异性地抑制DPP3活性(Abramić等人2000.Biological Chemistry, 381:1233-1243;EP 2949332)。

[0181] DPP3活性可以被不同种类的化合物进一步特异性地抑制：内源性DPP3抑制剂是肽spinorphin。已经制备了spinorphin的多种合成衍生物，例如tynorphin，并且其已显示出在不同程度上抑制DPP3活性(Yamamoto等人2000.Life sciences 62(19):1767-1773)。其他已公开的DPP3肽抑制剂是propioxatinA和B(US 4804676)和propioxatinA类似物(Inaoka等人1988.J.Biochem 104(5):706-711)。

[0182] 也可以通过小分子例如氟他汀(fluostatin)和苯并咪唑衍生物来抑制DPP3。氟他汀A和B是在链霉菌属物种(*Streptomyces* sp.) TA-3391中产生的抗生素，无毒且会强烈抑制DPP3活性。到目前为止，已经合成并公开了20种不同的苯并咪唑衍生物(Agić等人2007.Bioorganic Chemistry 35(2):153-169;Rastija等人2015.Acta Chimica Slovenica 62:867-878)，其中两种化合物1'和4'显示出最强的抑制作用(Agić等人2007.Bioorganic Chemistry 35(2):153-169)。也已显示多种二肽基异羟肟酸也会抑制DPP3活性(Cvitešić等人2016.J Enzyme Inhib Med Chem 31(增刊2):40-45)。

[0183] 在本发明的具体实施方案中，所述DPP3活性抑制剂是抗DPP3抗体或抗DPP3抗体片段或抗DPP3非Ig支架。

[0184] 在整个说明书中，根据本发明的“抗体”或“抗体片段”或“非Ig支架”能够结合DPP3，因此针对DPP3，因此可以被称为“抗DPP3抗体”、“抗DPP3抗体片段”或“抗DPP3非Ig支架”。

[0185] 术语“抗体”通常包括单克隆和多克隆抗体及其结合片段，特别是Fc片段以及所谓的“单链抗体”(Bird等人1988)、嵌合的、人源化的、特别是CDR移植的抗体和二体抗体或四体抗体(Holliger等人1993)。还包括通过技术(包括例如噬菌体展示)选择的免疫球蛋白样蛋白质，用于特异性结合样品中所含的目标分子。在本文中，术语“特异性结合”是指针对目标分子或其片段产生的抗体。如果抗体对目标分子或其上述片段的亲和力是对在含有目标分子的样品中所包含的其他分子的亲和力至少50倍高，更优选地100倍高，最优选地至少1000倍高，则认为该抗体是特异性的。本领域熟知如何制备抗体和选择具有给定特异性的

抗体。

[0186] 在本发明的一个实施方案中,抗DPP3抗体或抗DPP3抗体片段或抗DPP3非Ig支架是单特异性的。

[0187] 单特异性抗DPP3抗体或单特异性抗DPP3抗体片段或单特异性抗DPP3非Ig支架意指所述抗体或抗体片段或非Ig支架与靶DPP3 (SEQ ID No.1) 内包含至少5个氨基酸的一个特定区域结合。单特异性抗DPP3抗体或单特异性抗DPP3抗体片段或单特异性抗DPP3非Ig支架是对相同抗原均具有亲和力的抗DPP3抗体或抗DPP3抗体片段或抗DPP3非Ig支架。单克隆抗体是单特异性的,但也可以通过其他方式产生单特异性抗体,而不是从共同胚细胞中产生单特异性抗体。

[0188] 在具体的实施方案中,所述抗DPP3抗体、抗DPP3抗体片段或抗DPP3非Ig支架是抑制性抗体、片段或非Ig支架。所述抗DPP3抗体、抗DPP3抗体片段或抗DPP3非Ig支架抑制DPP3活性超过60%、优选地超过70%、更优选地超过80%、优选地超过90%、更优选地几乎或实际上100%。

[0189] 根据本发明的抗体或片段是包括一种或多种基本上由免疫球蛋白基因编码的多肽的蛋白质,其特异性结合抗原。公认的免疫球蛋白基因包括 κ 、 λ 、 α (IgA)、 γ (IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄)、 δ (IgD)、 ϵ (IgE) 和 μ (IgM) 恒定区基因,以及无数种免疫球蛋白可变区基因。全长免疫球蛋白轻链的长度通常为约25Kd或214个氨基酸。

[0190] 全长免疫球蛋白重链的长度通常为约50Kd或446个氨基酸。轻链在NH₂端由可变区基因(长度为约110个氨基酸)并且在COOH端由 κ 或 λ 恒定区基因编码。重链类似地由可变区基因(长度为约116个氨基酸)和其他恒定区基因中的一个编码。

[0191] 抗体的基本结构单元通常是由两个相同的免疫球蛋白链对组成的四聚体,每个免疫球蛋白链对具有一条轻链和一条重链。在每个免疫球蛋白链对中,轻链和重链可变区与抗原结合,恒定区介导效应子功能。免疫球蛋白还以多种其他形式存在,包括例如Fv、Fab和(Fab')₂,以及双功能杂合抗体和单链(例如,Lanzavecchia等人1987.Eur.J.Immunol.17:105;Huston等人1988.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,85:5879-5883;Bird等人1988.Science 242:423-426;Hood等人1984,Immunology,Benjamin,N.Y.,第2版;Hunkapiller和Hood 1986.Nature 323:15-16)。免疫球蛋白轻链或重链可变区包括被三个高变区(也称为互补决定区(CDR))中断的框架区(参见,Sequences of Proteins of Immunological Interest,E.Kabat等人1983,U.S.Department of Health and Human Services)。如上所述,CDR主要负责与抗原的表位结合。免疫复合物是与抗原特异性结合的抗体,例如单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体或人抗体,或功能性抗体片段。

[0192] 嵌合抗体是其轻链和重链基因通常通过基因工程由属于不同物种的免疫球蛋白可变区和恒定区基因构建的抗体。例如,来自小鼠单克隆抗体的基因的可变片段可以连接到人恒定片段,例如 κ 和 γ 1或 γ 3。在一个示例中,治疗性嵌合抗体因此是由来自小鼠抗体的可变结构域或抗原结合结构域和来自人抗体的恒定结构域或效应结构域构成,但可以使用其他哺乳动物物种,或者可以通过分子技术产生可变区。制备嵌合抗体的方法是本领域众所周知的,例如参见美国专利5,807,715号。“人源化”免疫球蛋白是一种包括人框架区和来自非人类(例如小鼠、大鼠或合成的)免疫球蛋白的一个或多个CDR的免疫球蛋白。提供CDR的非人类免疫球蛋白被称为“供体”,而提供框架的人免疫球蛋白被称为“受体”。在一个

实施方案中,人源化免疫球蛋白中的所有CDR都来自供体免疫球蛋白。不一定存在恒定区,但如果存在,它们必须与人免疫球蛋白恒定区基本相同,即具有至少约85-90%,例如约95%或更高的同一性。因此,人源化免疫球蛋白的所有部分,可能除了CDR,与天然人免疫球蛋白序列的相应部分基本相同。“人源化抗体”是包含人源化轻链和人源化重链免疫球蛋白的抗体。人源化抗体与提供CDR的供体抗体和相同抗原结合。人源化免疫球蛋白或抗体的受体框架可具有有限数量的取自供体框架的氨基酸替换。人源化或其他单克隆抗体可以具有另外的保守氨基酸替换,这对抗原结合或其他免疫球蛋白功能基本上没有影响。示例性的保守替换是诸如gly、ala;val、ile、leu;asp、glu;asn、gln;ser、thr;lys、arg;和phe、tyr。可以通过基因工程构建人源化免疫球蛋白(例如,参见U.S.专利5,585,089号)。人抗体是其中轻链和重链基因来源于人的抗体。可以使用本领域已知的方法产生人抗体。人抗体可以通过使分泌目标抗体的人B细胞永生化来产生。例如,可以通过EBV感染或通过将人B细胞与骨髓瘤或杂交瘤细胞融合以产生三源杂交瘤细胞来实现永生化。人抗体也可以通过噬菌体展示方法产生(参见,例如,W091/17271;W092/001047;W092/20791),或选自人组合性单克隆抗体文库(参见Morphosys网站)。也可以通过使用携带人免疫球蛋白基因的转基因动物来制备人抗体(例如,参见W093/12227;W0 91/10741)。

[0193] 因此,抗DPP3抗体可以具有本领域已知的形式。示例是人抗体、单克隆抗体、人源化抗体、嵌合抗体、CDR移植抗体。在优选的实施方案中,根据本发明的抗体是重组产生的抗体,例如,作为一种典型的全长免疫球蛋白的IgG,或作为化学偶联抗体(片段抗原结合)的至少包含重链和/或轻链的F可变结构域的抗体片段,包括但不限于Fab片段,包括Fab微抗体、单链Fab抗体、具有表位标签的单价Fab抗体例如Fab-V5Sx2;用CH3结构域二聚化的二价Fab(微抗体);二价Fab或多价Fab(例如借助异源结构域通过多聚化,例如通过dHLX结构域的二聚化形成),例如Fab-dHLX-FSx2;F(ab')₂-片段、scFv-片段、多聚化多价或/和多特异性scFv-片段、二价和/或双特异性双体抗体、**BITE**[®](双特异性T细胞衔接子)、三功能抗体、多价抗体(例如来自与G不同的类别);单结构域抗体,例如来自骆驼科或鱼类免疫球蛋白的纳米抗体,等等。

[0194] 在优选的实施方案中,抗DPP3抗体形式选自Fv片段、scFv片段、Fab片段、scFab片段、F(ab)₂片段和scFv-Fc融合蛋白。在另一个优选的实施方案中,抗体形式选自scFab片段、Fab片段、scFv片段及其生物利用度优化的缀合物,例如聚乙二醇化片段。最优选的形式中的一个scFab形式。

[0195] 非Ig支架可以是蛋白支架并且可以用作抗体模拟物,因为它们能够结合配体或抗原。非Ig支架可选自基于四粘蛋白的非Ig支架(例如描述于US 2010/0028995)、纤连蛋白支架(例如描述于EP 1 266 025);基于脂质运载蛋白的支架(例如描述于W0 2011/154420);泛素支架(例如描述于W0 2011/073214)、转铁蛋白支架(例如描述于US 2004/0023334)、蛋白A支架(例如描述于EP 2 231 860)、基于锚蛋白重复序列的支架(例如描述于W0 2010/060748)、微蛋白(优选地,形成半胱氨酸结的微蛋白)支架(例如描述于EP 2314308)、基于Fyn SH3结构域的支架(例如描述于W0 2011/023685)、基于EGFR-A结构域的支架(例如描述于W0 2005/040229)和基于Kunitz结构域的支架(例如描述于EP 1 941 867)。

[0196] 在本发明的一个实施方案中,可以如实施例1所概述通过合成DPP3片段作为抗原或全长DPP3来产生根据本发明的抗DPP3抗体。此后,使用下述方法或本领域已知的其他方

法鉴别所述片段的结合剂。

[0197] 可根据以下程序进行鼠抗体的人源化：

[0198] 对于鼠来源抗体的人源化，分析抗体序列的框架区 (FR) 与互补决定区 (CDR) 和抗原的结构相互作用。基于结构建模，选择合适的人源FR，并将鼠CDR序列移植到人FR中。可以引入CDR或FR的氨基酸序列的变体以重新获得已被FR序列的物种转换所消除的结构相互作用。这种结构相互作用的恢复可以通过使用噬菌体展示文库的随机方法或经由通过分子建模指导的定向方法来实现 (Almagro和Fransson 2008.Humanization of antibodies.Front Biosci.2008年1月1日;13:1619-33)。

[0199] 在另一个优选的实施方案中，抗DPP3抗体、抗DPP3抗体片段或抗DPP3非Ig支架是全长抗体、抗体片段或非Ig支架。

[0200] 在优选的实施方案中，抗DPP3抗体或抗DPP3抗体片段或抗DPP3非Ig支架针对并且可以结合DPP3 (SEQ ID No.1) 中包含的优选地至少4个或至少5个氨基酸长度的表位。

[0201] 在优选的实施方案中，抗DPP3抗体或抗DPP3抗体片段或抗DPP3非Ig支架针对并且可以结合优选地至少4个或至少5个氨基酸长度的表位，其中所述抗体、片段或非Ig支架针对并且可以结合包含在SEQ ID NO.:2中的表位，并且其中所述表位包含在如SEQ ID NO.:1中描绘的DPP3中。

[0202] 在优选的实施方案中，抗DPP3抗体或抗DPP3抗体片段或抗DPP3非Ig支架针对并且可以结合优选地至少4个或至少5个氨基酸长度的表位，其中所述抗体、片段或非Ig支架针对并且可以结合包含在SEQ ID NO.:3中的表位，并且其中所述表位包含在如SEQ ID NO.:1中描绘的DPP3中。

[0203] 在优选的实施方案中，抗DPP3抗体或抗DPP3抗体片段或抗DPP3非Ig支架针对并且可以结合优选地至少4个或至少5个氨基酸长度的表位，其中所述抗体、片段或非Ig支架针对并且可以结合包含在SEQ ID NO.:4中的表位，并且其中所述表位包含在如SEQ ID NO.:1中描绘的DPP3中。

[0204] 在本发明的一个具体实施方案中，提供用于在感染冠状病毒的患者中进行治疗或干预的抗DPP3抗体或抗DPP3抗体片段或抗DPP3非Ig支架，其中所述抗体或片段或支架与在DPP3 SEQ ID No.:1的序列内优选地至少4个或至少5个氨基酸的区域结合。

[0205] 在本发明的优选实施方案中，所述抗DPP3抗体或抗DPP3抗体片段或抗DPP3非Ig支架与位于SEQ ID No.2中的DPP3的区域或表位结合。

[0206] 在本发明的另一个优选实施方案中，所述抗DPP3抗体或抗DPP3抗体片段或抗DPP3非Ig支架与位于SEQ ID No.3中的DPP3的区域或表位结合。

[0207] 在本发明的另一个优选实施方案中，所述抗DPP3抗体或抗DPP3抗体片段或抗DPP3非Ig支架与位于SEQ ID No.4中的DPP3的区域或表位结合。

[0208] 表位，也称为抗原决定簇，是抗原中被免疫系统特别是抗体识别的部分。例如，表位是抗体所结合的抗原的特定片段。与表位结合的抗体部分称为互补位。蛋白抗原的表位基于其结构和与互补位的相互作用被划分为构象表位和线性表位两类。构象表位和线性表位基于表位采用的3-D构象与互补位相互作用，这由所涉及的表位残基的表面特征和抗原其他片段的形状或三级结构决定。构象表位通过不连续氨基酸残基相互作用而采用3-D构象形成。线性或连续表位是通过其氨基酸的线性序列或一级结构由抗体识别的表位，并通

过连续氨基酸残基相互作用而采用3-D构象形成。

[0209] 在本发明的具体实施方案中,抗体是单克隆抗体或其片段。在本发明的一个实施方案中,抗DPP3抗体或抗DPP3抗体片段是人或人源化抗体或衍生自人或人源化抗体。在一个具体实施方案中,一个或多个(鼠)CDR被移植到人抗体或抗体片段中。

[0210] 本发明的主题在一方面是与DPP3结合的人或人源化CDR移植抗体或其抗体片段,其中人或人源化CDR移植抗体或其抗体片段包含抗体重链(H链),其包括:

[0211] GFSLSTSGMS (SEQ ID No.:7),

[0212] IWWNDNK (SEQ ID No.:8),

[0213] ARNYSYDY (SEQ ID No.:9)

[0214] 和/或还包含抗体轻链(L链),其包括:

[0215] RSLVHSIGSTY (SEQ ID No.:10)。

[0216] KVS (不是序列表的一部分),

[0217] SQSTHVPWT (SEQ ID No.:11)。

[0218] 在本发明的一个具体实施方案中,本发明的主题是与DPP3结合的人或人源化单克隆抗体或与DPP3结合的其抗体片段,其中重链包含至少一个选自下组的CDR:

[0219] GFSLSTSGMS (SEQ ID No.:7),

[0220] IWWNDNK (SEQ ID No.:8),

[0221] ARNYSYDY (SEQ ID No.:9)

[0222] 并且其中所述轻链包含至少一个选自下组的CDR:

[0223] RSLVHSIGSTY (SEQ ID No.:10),

[0224] KVS (不是序列表的一部分),

[0225] SQSTHVPWT (SEQ ID No.:11)。

[0226] 根据本发明的抗DPP3抗体或抗DPP3抗体片段或抗DPP3非Ig支架表现出对人DPP3的亲合力,使得亲合力常数大于 10^{-7} M,优选地为 10^{-8} M,优选地亲合力大于 10^{-9} M,最优选地大于 10^{-10} M。本领域技术人员知晓可以考虑通过应用更高剂量的化合物来补偿较低的亲合力,并且该措施不会导致超出本发明的范围。可以根据实施例1中描述的方法确定亲合力常数。

[0227] 本发明的主题是用于在感染冠状病毒的患者中进行治疗或干预的与ADM或其抗体片段结合的单克隆抗体或片段,其中所述抗体或片段包含以下序列作为可变重链:

[0228] SEQ ID NO.:5

[0229] QVTLKESGPGILQPSQTLTLTCSFSGFSLSTSGMSVWIRQPSGKGLEWLAHIWWNDNKSYNPALKSRLTISRDTSNQVFLKIASVVTADTGTYFCARNYSYDYWGQGTTLTVSS

[0230] 并且包含以下序列作为可变轻链:

[0231] SEQ ID NO.:6

[0232] DVVVTQTPLSLSVSLGDPASISCRSSRSLVHSIGSTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPWTFGGGTKLEIK。

[0233] 本发明的主题是用于在感染冠状病毒的患者中进行治疗或干预的与ADM或其抗体片段结合的人或人源化单克隆抗体或片段,其中所述抗体或片段包含以下序列作为重链:

[0234] SEQ ID NO.:12

[0235] MDPKGSLSWRILLFLSLAFELSYGQITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMSVWIRQPPGK

ALEWLAHIWWDNKSYPALKSRLTITRDTSKNQVVLMTNMDPVDGTYYCARNYSYDYWGQGLVTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYLSVSVTVPSSSLGTQTYIC
NVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPG

[0236] 并且包含以下序列作为轻链:

[0237] SEQ ID NO.:13

[0238] METDTLLLWVLLLWVPGSTGDIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSRSLVHSIGSTYLYWYLQKPGQS
PQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFP
PSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACE
VTHQGLSSPVTKSFNRGEC。

[0239] 在本发明的具体实施方案中,抗体包含以下序列SEQ ID NO:12或与其具有>95%,
优选地>98%,优选地>99%同一性的序列作为重链,

[0240] 并且包含以下序列SEQ ID NO:13或与其具有>95%,优选地>98%,优选地>99%同
一性的序列作为轻链。

[0241] 为了评估两个氨基酸序列之间的同一性,进行了成对比对。同一性定义了比对中
直接匹配的氨基酸百分比。

[0242] 术语“药物制剂”是指与至少一种药学上可接受的赋形剂组合的药物成分,其形式
使得其中所含药物成分的生物活性有效,并且不包含对施用该制剂的受试者来说有不可接
受毒性的其他成分。术语“药物成分”是指可以任选地与药学上可接受的赋形剂组合以提供
药物制剂或剂型的治疗组合物。

[0243] 本发明的主题是用于在感染冠状病毒的患者中进行治疗或干预的药物制剂,其包
含根据本发明的抗体或片段或支架。

[0244] 本发明的主题是根据本发明的用于在感染冠状病毒的患者中进行治疗或干预的
药物制剂,其中所述药物制剂是溶液,优选地为即用型溶液。

[0245] 本发明的主题是根据本发明的用于在感染冠状病毒的患者中进行治疗或干预的
药物制剂,其中所述药物制剂处于冷冻干燥状态。

[0246] 本发明的主题是根据本发明的用于在感染冠状病毒的患者中进行治疗或干预的
药物制剂,其中所述药物制剂经肌肉内施用。

[0247] 本发明的主题是根据本发明的用于在感染冠状病毒的患者中进行治疗或干预的
药物制剂,其中所述药物制剂经血管内施用。

[0248] 本发明的主题是根据本发明的用于在感染冠状病毒的患者中进行治疗或干预的
药物制剂,其中所述药物制剂通过输注施用。

[0249] 本发明的主题是根据本发明的用于在感染冠状病毒的患者中进行治疗或干预的
药物制剂,其中所述药物制剂经全身施用。

[0250] 在上述上下文中,以下连续编号的实施方案提供了本发明的进一步的具体方面:

[0251] 实施方案

[0252] 1.一种用于在感染冠状病毒的患者中(a)诊断或预测危及生命的恶化或不良事件

的风险或 (b) 诊断或预后严重程度或 (c) 预测或监测治疗或干预的成功性或 (d) 进行治疗指导或治疗分层或 (e) 进行患者管理的方法,所述方法包括:

- [0253] • 确定所述患者体液样品中的二肽基肽酶3 (DPP3) 水平,
- [0254] • 将所述确定的DPP3水平与预定阈值进行比较,以及
- [0255] • 将所述确定的DPP3水平与所述危及生命的恶化或不良事件的风险相关联,或
- [0256] • 将所述确定的DPP3水平与所述严重程度相关联,或
- [0257] • 将所述确定的DPP3水平与所述治疗或干预的成功性相关联。
- [0258] • 将所述DPP3水平与某种治疗或干预相关联,或
- [0259] • 将所述DPP3水平与对所述患者的所述管理相关联。

[0260] 2. 根据实施方案1所述的用于在感染冠状病毒的患者中 (a) 诊断或预测危及生命的恶化或不良事件的风险或 (b) 诊断或预后严重程度或 (c) 预测或监测治疗或干预的成功性或 (d) 进行治疗指导或治疗分层或 (e) 进行患者管理的方法,其中所述冠状病毒选自 SARS-CoV-1、SARS-CoV-2、MERS-CoV,特别地为SARS-CoV-2。

[0261] 3. 根据实施方案1或2所述的用于在感染冠状病毒的患者中 (a) 诊断或预测危及生命的恶化或不良事件的风险或 (b) 诊断或预后严重程度或 (c) 预测或监测治疗或干预的成功性或 (d) 进行治疗指导或治疗分层或 (e) 进行患者管理的方法,其中所述不良事件选自死亡、器官功能障碍、休克、ARDS、肾损伤、ALI (急性肺损伤) 或心血管衰竭。

[0262] 4. 根据实施方案1至3所述的用于在感染冠状病毒的患者中 (a) 诊断或预测危及生命的恶化或不良事件的风险或 (b) 诊断或预后严重程度或 (c) 预测或监测治疗或干预的成功性或 (d) 进行治疗指导或治疗分层或 (e) 进行患者管理的方法,其中所述确定的DPP3水平高于预定阈值。

[0263] 5. 根据实施方案1至4所述的用于在感染冠状病毒的患者中 (a) 诊断或预测危及生命的恶化或不良事件的风险或 (b) 诊断或预后严重程度或 (c) 预测或监测治疗或干预的成功性或 (d) 进行治疗指导或治疗分层或 (e) 进行患者管理的方法,其中所述受试者的体液样品中的DPP3的所述预定阈值为20至120ng/mL,更优选地为30至80ng/mL,甚至更优选地为40至60ng/mL,最优选地所述阈值是50ng/mL。

[0264] 6. 根据实施方案1至5所述的用于在感染冠状病毒的患者中 (a) 诊断或预测危及生命的恶化或不良事件的风险或 (b) 诊断或预后严重程度或 (c) 预测或监测治疗或干预的成功性或 (d) 进行治疗指导或治疗分层或 (e) 进行患者管理的方法,其中所述患者的SOFA评分等于或大于3,优选地等于或大于7,或者所述患者的快速SOFA评分等于或大于1,优选地等于或大于2。

[0265] 7. 根据实施方案1至6所述的用于在感染冠状病毒的患者中 (a) 诊断或预测危及生命的恶化或不良事件的风险或 (b) 诊断或预后严重程度或 (c) 预测或监测治疗或干预的成功性或 (d) 进行治疗指导或治疗分层或 (e) 进行患者管理的方法,其中所述患者的D-二聚体水平等于或大于0.5 μ g/ml,优选地等于或大于1 μ g/ml。

[0266] 8. 根据实施方案1至7所述的用于在感染冠状病毒的患者中 (a) 诊断或预测危及生命的恶化或不良事件的风险或 (b) 诊断或预后严重程度或 (c) 预测或监测治疗或干预的成功性或 (d) 进行治疗指导或治疗分层或 (e) 进行患者管理的方法,其中通过使所述体液样品与特异性结合DPP3的捕获结合剂接触来确定所述DPP3水平。

[0267] 9. 根据实施方案1至8所述的用于在感染冠状病毒的患者中 (a) 诊断或预测危及生命的恶化或不良事件的风险或 (b) 诊断或预后严重程度或 (c) 预测或监测治疗或干预的成功性或 (d) 进行治疗指导或治疗分层或 (e) 进行患者管理的方法, 其中所述确定包括使用特异性结合全长DPP3的捕获结合剂, 其中所述捕获结合剂可以选自抗体、抗体片段或非IgG支架。

[0268] 10. 根据实施方案1至9所述的用于在感染冠状病毒的患者中 (a) 诊断或预测危及生命的恶化或不良事件的风险或 (b) 诊断或预后严重程度或 (c) 预测或监测治疗或干预的成功性或 (d) 进行治疗指导或治疗分层或 (e) 进行患者管理的方法, 其中在所述受试者的体液样品中确定DPP3蛋白的量和/或DPP3活性, 并且其中所述确定包括使用特异性结合全长DPP3的捕获结合剂, 其中所述捕获结合剂是抗体。

[0269] 11. 根据实施方案1至10任一项所述的用于在感染冠状病毒的患者中 (a) 诊断或预测危及生命的恶化或不良事件的风险或 (b) 诊断或预后严重程度或 (c) 预测或监测治疗或干预的成功性或 (d) 进行治疗指导或治疗分层或 (e) 进行患者管理的方法, 其中在所述受试者的体液样品中确定DPP3蛋白的量和/或DPP3活性, 并且其中所述确定包括使用特异性结合全长DPP3的捕获结合剂, 其中所述捕获结合剂被固定在表面上。

[0270] 12. 根据实施方案1至11所述的用于在感染冠状病毒的患者中 (a) 诊断或预测危及生命的恶化或不良事件的风险或 (b) 诊断或预后严重程度或 (c) 预测或监测治疗或干预的成功性或 (d) 进行治疗指导或治疗分层或 (e) 进行患者管理的方法, 其中在所述受试者的体液样品中确定DPP3蛋白的量和/或DPP3活性, 并且其中所述分离步骤是从捕获的DPP3中去除样品中未与所述捕获结合剂结合的成分的洗涤步骤。

[0271] 13. 根据实施方案1至12所述的用于在感染冠状病毒的患者中 (a) 诊断或预测危及生命的恶化或不良事件的风险或 (b) 诊断或预后严重程度或 (c) 预测或监测治疗或干预的成功性或 (d) 进行治疗指导或治疗分层或 (e) 进行患者管理的方法, 其中用于确定所述受试者的体液样品中DPP3活性的方法包括以下步骤:

[0272] • 使所述样品与特异性结合全长DPP3的捕获结合剂接触,

[0273] • 分离与所述捕获结合剂结合的DPP3,

[0274] • 将DPP3的底物添加到所述分离的DPP3中,

[0275] • 通过测量和量化DPP3的底物的转化来量化所述DPP3活性。

[0276] 14. 根据实施方案1至13所述的用于在感染冠状病毒的患者中 (a) 诊断或预测危及生命的恶化或不良事件的风险或 (b) 诊断或预后严重程度或 (c) 预测或监测治疗或干预的成功性或 (d) 进行治疗指导或治疗分层或 (e) 进行患者管理的方法, 其中在所述受试者的体液样品中确定DPP3活性并且其中通过选自下组的方法检测DPP3底物转化: 产荧光底物 (例如Arg-Arg-βNA、Arg-Arg-AMC) 的荧光、显色底物的颜色变化、与氨基荧光素偶联的底物的发光、质谱法、HPLC/FPLC (反相色谱法、尺寸排阻色谱法)、薄层色谱法、毛细管区带电泳、凝胶电泳后进行活性染色 (固定化, 活性DPP3) 或蛋白质印迹法 (裂解产物)。

[0277] 15. 根据实施方案1至14所述的用于在感染冠状病毒的患者中 (a) 诊断或预测危及生命的恶化或不良事件的风险或 (b) 诊断或预后严重程度或 (c) 预测或监测治疗或干预的成功性或 (d) 进行治疗指导或治疗分层或 (e) 进行患者管理的方法, 其中在所述受试者的体液样品中确定DPP3活性并且其中所述底物可以选自: 血管紧张素II、III和IV、Leu-脑啡肽、

Met-脑啡肽、内啡肽1和2、valorphin、 β -酪啡肽、强啡肽、原肠肽、ACTH和MSH,或与荧光团、发色团或氨基荧光素偶联的二肽,其中所述二肽是Arg-Arg。

[0278] 16. 根据实施方案1至15所述的用于在感染冠状病毒的患者中(a) 诊断或预测危及生命的恶化或不良事件的风险或(b) 诊断或预后严重程度或(c) 预测或监测治疗或干预的成功性或(d) 进行治疗指导或治疗分层或(e) 进行患者管理的方法,其中在所述受试者的体液样品中确定所述DPP3活性,并且其中所述底物可以选自:与荧光团、生色团或氨基荧光素偶联的二肽,其中所述二肽是Arg-Arg。

[0279] 17. 根据实施方案1至16所述的用于在感染冠状病毒的患者中(a) 诊断或预测危及生命的恶化或不良事件的风险或(b) 诊断或预后严重程度或(c) 预测或监测治疗或干预的成功性或(d) 进行治疗指导或治疗分层或(e) 进行患者管理的方法,其中用DPP3活性抑制剂和/或血管紧张素受体激动剂和/或所述血管紧张素受体激动剂的前体治疗所述患者。

[0280] 18. 一种用于在感染冠状病毒的患者中进行治疗或干预的DPP3活性抑制剂和/或血管紧张素受体激动剂和/或所述血管紧张素受体激动剂的前体。

[0281] 19. 根据实施方案18所述的用于在感染冠状病毒的患者中进行治疗或干预的DPP3活性抑制剂和/或血管紧张素受体激动剂和/或所述血管紧张素受体激动剂的前体,其中所述冠状病毒选自Sars-CoV-1、Sars-CoV-2、MERS-CoV,特别地为Sars-CoV-2。

[0282] 20. 根据实施方案18或19所述的用于在感染冠状病毒的患者中进行治疗或干预的DPP3活性抑制剂和/或血管紧张素受体激动剂和/或所述血管紧张素受体激动剂的前体,其中所述当通过根据实施方案1-17中任一项所述的方法确定时,在所述受试者的体液样品中所述患者的DPP3水平高于预定阈值。

[0283] 21. 根据实施方案18至20所述的用于在感染冠状病毒的患者中进行治疗或干预的DPP3活性抑制剂和/或血管紧张素受体激动剂和/或所述血管紧张素受体激动剂的前体,其中所述患者的SOFA评分等于或大于3,优选地等于或大于7,或者所述患者的快速SOFA评分等于或大于1,优选地等于或大于2。

[0284] 22. 根据实施方案18至21所述的用于在感染冠状病毒的患者中进行治疗或干预的DPP3活性抑制剂和/或血管紧张素受体激动剂和/或所述血管紧张素受体激动剂的前体,其中所述患者的D-二聚体水平等于或大于 $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$,优选地为 $1.0\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0285] 23. 根据实施方案20-22所述的用于在感染冠状病毒的患者中进行治疗或干预的DPP3活性抑制剂,其中所述DPP3活性抑制剂选自抗DPP3抗体或抗DPP3抗体片段或抗DPP3非Ig支架。

[0286] 24. 根据实施方案20-23所述的用于在感染冠状病毒的患者中进行治疗或干预的DPP3活性抑制剂,其中所述抑制剂是与包含在SEQ IDNo.1中的长度为至少4至5个氨基酸的表位结合的抗DPP3抗体或抗DPP3抗体片段或抗DPP3非Ig支架。

[0287] 25. 根据实施方案20-24所述的用于在感染冠状病毒的患者中进行治疗或干预的DPP3活性抑制剂,其中所述抑制剂是与包含在SEQ IDNo.2中的长度为至少4至5个氨基酸的表位结合的抗DPP3抗体或抗DPP3抗体片段或抗DPP3非Ig支架。

[0288] 26. 根据实施方案20-25所述的用于在感染冠状病毒的患者中进行治疗或干预的DPP3活性抑制剂,其中所述抑制剂是表现出对DPP3的最小结合亲和力等于或小于 10^{-7}M 的抗DPP3抗体或抗DPP3抗体片段或抗DPP3非Ig支架。

[0289] 27. 根据实施方案20-26所述的用于在感染冠状病毒的患者中进行治疗或干预的DPP3活性抑制剂,其中所述抑制剂是抗DPP3抗体或抗DPP3抗体片段或抗DPP3非Ig,并且抑制至少10%,或至少50%,更优选地至少60%,甚至更优选地超过70%,甚至更优选地超过80%,甚至更优选地超过90%,甚至更优选地超过95%的DPP3活性。

[0290] 28. 根据实施方案20-27所述的用于在感染冠状病毒的患者中进行治疗或干预的DPP3活性抑制剂,其中所述抗体是单克隆抗体或单克隆抗体片段。

[0291] 29. 根据实施方案28所述的用于在感染冠状病毒的患者中进行治疗或干预的DPP3活性抑制剂,其中重链中的互补决定区(CDR)包含序列:

[0292] SEQ ID NO.:7、SEQ ID NO.:8和/或SEQ ID NO.:9

[0293] 并且轻链中的互补决定区(CDR)包含序列:

[0294] SEQ ID NO.:10、KVS和/或SEQ ID NO.:11。

[0295] 30. 根据实施方案29所述的用于在感染冠状病毒的患者中进行治疗或干预的DPP3活性抑制剂,其中所述单克隆抗体或抗体片段是人源化单克隆抗体或人源化单克隆抗体片段。

[0296] 31. 根据实施方案30所述的用于在感染冠状病毒的患者中进行治疗或干预的DPP3活性抑制剂,其中所述重链包含序列:

[0297] SEQ ID NO.:12

[0298] 并且其中所述轻链包含序列:

[0299] SEQ ID NO.:13。

[0300] 32. 根据实施方案17至22所述的用于在感染冠状病毒的患者中进行治疗或干预的血管紧张素受体激动剂和/或其前体,其中所述血管紧张素受体激动剂和/或其前体选自血管紧张素I、血管紧张素II、血管紧张素III、血管紧张素IV。

附图说明

[0301] 图1:与低($<68.6\text{ng/mL}$)和高($\geq 68.6\text{ng/mL}$) DPP3血浆浓度相关的Kaplan Meyer存活率图

[0302] (A) 脓毒症/脓毒性休克患者的7天存活率与DPP3血浆浓度(截止值 68.6ng/mL)的关联;(B) 心源性休克患者的7天存活率与DPP3血浆浓度(截止值 68.6ng/mL)的关联;(C) 急性心肌梗死患者的7天存活率与DPP3血浆浓度(截止值 68.6ng/mL)的关联;(D) 呼吸困难患者的3个月存活率与DPP3血浆浓度的关联;(E) 烧伤患者的4周存活率与DPP3血浆浓度的关联。

[0303] 图2:从人红细胞裂解物中纯化的天然hDPP3在梯度凝胶(4-20%)上的SDS-PAGE。分子量标记用箭头表示。

[0304] 图3:实验设计-天然DPP3在动物模型中的作用。

[0305] 图4:(A) DPP3注射导致缩短分数降低,因此导致心脏功能劣化。(B) 通过增加的肾阻力指数也观察到肾功能下降。

[0306] 图5:使用Octet的AK1967-DPP3结合分析的缔合和解离曲线。将负载AK1967的生物传感器浸入一系列稀释的重组的经GST标记的人DPP3(100、33.3、11.1、3.7nM)中并监测缔合和解离。

- [0307] 图6:用AK1967作为一抗对血细胞裂解物的稀释物进行的蛋白质印迹分析和DPP3检测。
- [0308] 图7:在抑制性抗体AK1967的情况下对来自血细胞的天然DPP3的抑制曲线。特异性抗体对DPP3的抑制是浓度依赖性的,其中当针对15ng/ml DPP3进行分析时,IC₅₀为约15ng/ml。
- [0309] 图8:实验设置-Procizumab在脓毒症诱导的心力衰竭中的作用。
- [0310] 图9:Procizumab显著改善了脓毒症诱导的心力衰竭大鼠的缩短分数(A)和死亡率(B)。
- [0311] 图10:实验设计-在鼠中经异丙肾上腺素诱导心脏应激,随后进行Procizumab治疗(B)和对照(A)。
- [0312] 图11:在异丙肾上腺素诱导的心力衰竭小鼠中,Procizumab分别在施用后1小时和6小时内改善了缩短分数(A)和降低了肾阻力指数(B)。
- [0313] 图12:实验设置-缬沙坦在注射了DPP3的健康小鼠中的作用。
- [0314] 图13:缬沙坦治疗挽救了由DPP3导致的缩短分数降低。
- [0315] 图14:脓症患者入院后24小时的高DPP3浓度与最差的SOFA评分相关。
- [0316] 图15:高cDPP3血浆水平与脓毒症患者的器官功能障碍相关。在ICU住院期间,AdrenOSS-1中SOFA评分根据DPP3水平的演变的条形图。HH:入院时和24小时之时DPP3高于中位数;HL:入院时高于中位数,但在24小时之时低于中位数;LL:入院时和24小时之时低于中位数;LH:入院时低于中位数,但在24小时之时高于中位数。
- [0317] 图16:脓症患者入院后24小时的高cDPP3浓度与器官的最差SOFA评分相关。根据入院和24小时之间cDPP3动态水平的(A)心脏、(B)肾脏、(C)呼吸、(D)肝脏、(E)凝血和(F)中枢神经系统SOFA评分值(HH:高/高,HL:高/低,LH:低/高,LL:低/低)。
- [0318] 图17:入住ICU时的高DPP3水平与随后48h内肾功能恶化有关。Y轴:在第1天(入住ICU)测量的DPP3。X轴:KDIGO阶段0或1或KDIGO阶段2或3(p=0.002)。
- [0319] 图18:ICU期间DPP3的连续测量与COVID-19患者的疾病严重程度相关。对于A,在入住ICU第3天测量DPP3水平(p=0.02),对于B,在入住ICU第7天测量DPP3水平(p=0.013)。X轴:FALSE=P/F比>150;TRUE=P/F比<150。
- [0320] 图19:ICU住院期间的高DPP3值与COVID-19患者的不良结果相关。对于A,在入住ICU第3天测量DPP3水平,对于B,在入住ICU第7天测量DPP3水平。X轴:0=存活;1=死亡。
- [0321] 图20:入住ICU时高DPP3水平与ICU住院期间需要血管加压药治疗相关(第3天,p=0.05)。Y轴:在第1天(入住ICU)测量的DPP3。X轴:non:无血管加压药治疗,或any:ICU住院期间进行血管加压药治疗。
- [0322] 图21:ICU期间DPP3的连续测量与需要器官支持治疗,特别是静脉-静脉ECMO相关。对于A,在入住ICU第3天测量DPP3水平(p=0.03),对于B,在入住ICU第7天测量DPP3水平(p=0.04)。X轴:0=无ECMO;1=ECMO。

具体实施方式

[0323] 实施例

[0324] 实施例1-DPP 3蛋白和DPP3活性的测量方法

[0325] 抗体的产生和DPP3结合能力的确定:制备了多种鼠抗体,并通过它们在特异性结合测定法中结合人DPP3的能力进行筛选(见表2)。

[0326] 用于免疫接种的肽/缀合物:

[0327] 合成了用于免疫接种的DPP3肽,参见表2,(JPT Technologies,德国柏林),这些DPP3肽带有额外的N末端半胱氨酸残基(如果在选定的DPP3序列中不存在半胱氨酸),用于使肽与牛血清白蛋白(BSA)缀合。通过使用Sulfolink偶联凝胶(Perbio-science,德国柏林)将肽共价连接到BSA。根据Perbio的手册进行偶联程序。重组GST-hDPP3由USBio(United States Biological,塞伦,MA,USA)制备。

[0328] 小鼠的免疫接种、免疫细胞融合与筛选:

[0329] 在第0天向Balb/c小鼠经腹膜内(ip)注射84μg GST-hDPP3或100μg DPP3-肽-BSA-缀合物(在TiterMax Gold Adjuvant中乳化),在第14天注射84μg或100μg(在完全弗氏佐剂中乳化)并且在第21天和第28天注射42μg或50μg(在不完全弗氏佐剂中)。在第49天,动物接受静脉内(i.v.)注射溶解在盐水中的42μgGST-hDPP3或50μg DPP3-肽-BSA-缀合物。三天后处死小鼠,并进行免疫细胞融合。

[0330] 在37°C将经免疫接种小鼠的脾细胞和骨髓瘤细胞系SP2/0的细胞与1ml 50%聚乙二醇融合30秒。洗涤后,将细胞接种在96孔细胞培养板中。通过在HAT培养基[补充有20%胎牛血清和HAT补充剂的RPMI 1640培养基]中生长来选择杂交克隆。一周后,将HAT培养基更换为HT培养基,传代3代,然后返回正常细胞培养基。

[0331] 在融合后两周,主要筛选细胞培养物上清液中的重组DPP3结合IgG抗体。因此,将重组的经GST标记的hDPP3(USBiologicals,塞伦,USA)固定在96孔板(100ng/孔)中,并与每孔50μl细胞培养物上清液在室温下温育2小时。洗涤板后,加入50μl/孔POD-兔抗小鼠IgG,并在室温下(RT)温育1h。在下一个洗涤步骤后,向每个孔中加入50μl发色团溶液(在柠檬酸盐/磷酸氢盐缓冲液中的3.7mM邻苯二胺,0.012% H₂O₂),在室温下温育15分钟,然后通过加入50μl 4N硫酸停止显色反应。在490nm处检测吸光度。

[0332] 将测试为阳性的微培养物转移到24孔板中进行繁殖。在重新测试后,使用限制稀释技术克隆和重新克隆所选择的培养物,并确定同种型。

[0333] 小鼠单克隆抗体制备

[0334] 通过标准抗体制备方法(Marx等人1997)制备针对经GST标记的人DPP3或DPP3肽产生的抗体并通过蛋白A纯化。基于SDS凝胶电泳分析,抗体纯度为≥90%。

[0335] 抗体表征-与hDPP3和/或免疫肽结合

[0336] 为了分析不同抗体和抗体克隆物结合DPP3/免疫肽的能力,进行了结合测定:

[0337] a) 固相

[0338] 将重组的经GST标记的hDPP3(SEQ ID NO.1)或DPP3肽(免疫肽,SEQ ID NO.2)固定在高结合性微量滴定板表面(96孔聚苯乙烯微孔板,Greiner Bio-One International AG,奥地利,在偶联缓冲液中为1μg/孔[50mM Tris,100mM NaCl,pH7,8],1h at RT)。用5%牛血清白蛋白封闭后,将微孔板真空干燥。

[0339] b) 标记程序(示踪物)

[0340] 将100μg(100μl)不同的抗DPP3抗体(检测抗体,在PBS中为1mg/ml,pH 7.4)与10μl 吡啶鎓NHS-酯(在乙腈中为1mg/ml,InVent GmbH,德国;EP 0 353 971)并在室温下温育30

分钟。通过凝胶过滤HPLC在Shodex蛋白5 μ m KW-803 (Showa Denko, 日本) 上纯化经标记的抗DPP3抗体。在测定缓冲液 (50mmol/l磷酸钾、100mmol/l NaCl、10mmol/l Na₂-EDTA、5g/l牛血清白蛋白、1g/l鼠IgG、1g/l牛IgG、50 μ mol/l氨基酸酶抑制剂、100 μ mol/l亮抑酶肽, pH 7.4) 中稀释经纯化的经标记的抗体。最终浓度为约5-7 $\times 10^6$ 相对光单位 (RLU) 经标记的化合物 (约20ng经标记的抗体) /200 μ l。使用Centro LB 960光度计 (Berthold Technologies GmbH&Co.KG) 测量吡啶鎓酯化学发光。

[0341] c) hDPP3结合测定

[0342] 用200 μ l经标记和稀释的检测抗体 (示踪物) 填充板并在2-8 $^{\circ}$ C温育2-4小时。通过用350 μ l洗涤溶液 (20mM PBS, pH 7.4, 0.1% Triton X-100) 洗涤4次, 去除未结合的示踪物。通过使用Centro LB 960光度计 (Berthold Technologies GmbH&Co.KG) 测量孔结合的化学发光。

[0343] 抗体表征-hDPP3抑制分析

[0344] 为了分析不同抗体和抗体克隆物对DPP3的抑制能力, 使用已知程序 (Jones等人1982) 进行了DPP3活性测定。将重组的经GST标记的hDPP3在测定缓冲液 (在50mM Tris-HCl中的25ng/ml GST-DPP3, pH7.5和100 μ M ZnCl₂) 中稀释, 然后将200 μ l该溶液与10 μ g相应抗体在室温下温育。预温育1小时后, 在37 $^{\circ}$ C向溶液中添加产荧光底物Arg-Arg- β NA (20 μ l, 2mM), 并使用Twinkle LB 970微板荧光计 (Berthold Technologies GmbH&Co.KG) 检测游离 β NA随时间的产生。通过在340nm处激发并在410nm处测量发光来检测 β NA的荧光。计算不同样品的荧光增加的斜率 (以RFU/min计)。将具有缓冲液对照的GST-hDPP3的斜率指定为100%活性。将可能的捕获结合剂的抑制能力定义为通过与所述捕获结合剂温育而降低的GST-hDPP3活性的百分比。

[0345] 下表代表对获得的抗体及其以相对光单位 (RLU) 计的结合率以及它们的相对抑制能力 (%; 表1) 的选择。针对以下描绘的DPP3区域产生的单克隆抗体根据它们结合重组DPP3和/或免疫肽的能力以及它们的抑制潜力来进行选择。

[0346] 针对经GST标记的全长形式的重组hDPP3产生的所有抗体都显示出与固定的经GST标记的hDPP3的强结合。针对SEQ ID No.: 2肽产生的抗体也与GST-hDPP3结合。SEQ ID No.: 2抗体也与免疫肽强烈结合。

序列号	抗原/免疫原	hDPP3区域	克隆物	hDPP3结合[RLU]	免疫肽结合[RLU]	hDPP3的最大抑制
[0347] SEQ ID NO.: 1	经 GST 标记的重组 FL-hDPP3	1-737	2552	3.053.621	0	65%
			2553	3.777.985	0	35%
			2554	1.733.815	0	30%
			2555	3.805.363	0	25%
SEQ ID NO.: 2	CETVINPETGEQIQSWYRSGE	474-493	1963	141.822	2.163.038	60%
			1964	100.802	2.041.928	60%

[0348]		1965	99.493	1.986.794	70%
		1966	118.097	1.990.702	65%
		1967	113.736	1.909.954	70%
		1968	105.696	2.017.731	65%
		1969	82.558	2.224.025	70%

[0349] 表2:针对全长hDPP3全长或hDPP3序列产生的抗体列表及其以RLU计的结合hDPP3 (SEQ ID NO.:1)或免疫肽 (SEQ ID NO.:2)的能力,以及对重组GST-hDPP3的最大抑制。

[0350] 最近描述了对用于定量DPP3蛋白浓度 (DPP3-LIA) 的发光免疫测定法以及用于量化DPP3活性 (DPP3-ECA) 的酶捕获活性测定法的开发 (Rehfeld等人2019.JALM 3 (6) :943-953),其全部内容通过引用并入本文。

[0351] 实施例2-DPP3用于针对短期死亡率的预后

[0352] 使用hDPP3免疫测定法 (Rehfeld等人2019.JALM 3 (6) :943-953) 确定了各种患病患者血浆中的DPP3浓度,并将其与患者的短期死亡率相关联。

[0353] 研究群组-脓毒症和脓毒性休克

[0354] 对来自严重脓毒症和脓毒性休克中的肾上腺髓质素以及结果研究 (AdrenOSS-1) 的574名患者的血浆样品进行了DPP3筛查。AdrenOSS-1是一项前瞻性、观察性、多国研究,包括583名因脓毒症或脓毒性休克入住重症监护病房的患者 (Hollinger等人2018)。292名患者被诊断为脓毒性休克。

[0355] 研究群组-心源性休克

[0356] 对108名被诊断患有心源性休克的患者的血浆样品进行了DPP3筛查。在检测到心源性休克后6小时内抽取血液。跟踪死亡率,持续7天。

[0357] 研究群组-急性冠状动脉综合征

[0358] 对来自720名急性冠状动脉综合征患者的血浆样品进行了DPP3筛查。胸痛发作后24小时抽血。跟踪死亡率,持续7天。

[0359] 研究群组-呼吸困难:

[0360] 收集1440名呈现呼吸困难(呼吸短促)患者的血浆样品,并立即将其送往斯科讷大学医院的急诊科。除其他外,呼吸困难患者可能患有急性冠状动脉综合征或充血性心力衰竭,并且具有器官衰竭和短期死亡率的高风险。在提交到急诊科就诊后,跟踪死亡率,持续3个月。

[0361] 研究群组-烧伤患者:

[0362] 对来自107名严重烧伤患者(超过总身体表面积的15%)的血浆样品进行了DPP3筛查。入院时抽血。跟踪死亡率,持续4周。

[0363] hDPP3免疫测定:

[0364] 将检测人DPP3的量(LIA)或人DPP3的活性(ECA)的免疫测定法(LIA)或活性测定法(ECA)分别用于确定患者血浆中的DPP3水平。如Rehfeld等人所述进行抗体固定、标记和温育。(Rehfeld等人2019.JALM 3 (6) :943-953)。

[0365] 结果

[0366] 脓毒症/脓毒性休克的短期患者存活率与入院时的DPP3血浆浓度有关。具有高于

68.6ng/mL (四分之三位数) 的DPP3血浆浓度的患者与具有低于此阈值的DPP3血浆浓度的患者相比,死亡风险增加(图1A)。当仅分析该群组的脓毒性休克患者的短期结果与DPP3血浆浓度的关联时,可以看到相同的关联(图1F)。与具有低的DPP3血浆浓度的患者相比,具有升高的DPP3血浆浓度的患者死亡风险增加。当对心源性休克患者应用相同的截止值时,在具有高DPP3的患者中也观察到7天内短期死亡率的风险增加(图1B)。

[0367] 此外,当DPP3高并且应用68.6ng/mL的截止值时,与DPP3相关的急性冠状动脉综合征患者的28天存活率也会增加(图1C)。

[0368] 将该68.6ng/mL的截止值应用于患有呼吸困难的患者,在3个月的随访中检测到具有高DPP3的患者的死亡风险显著增加(图1D)。

[0369] 此外,在具有的DPP3浓度高于相应截止值68.6ng/mL的严重烧伤患者中,4周死亡率的风险增加(图1E)。

[0370] 实施例3-人天然DPP3的纯化

[0371] 将人红细胞裂解物施加到总共100ml的Sepahrose 4B树脂(Sigma-Aldrich)上并收集流出物。用总共370mL的pH为7.4的PBS缓冲液洗涤树脂,将洗涤级分与收集的流出物混合,所得总体积为2370mL。

[0372] 对于免疫亲和纯化步骤,根据制造商的方案(GlycoLink固定试剂盒,Thermo Fisher Scientific),将110mg的单克隆抗hDPP3 mAb AK2552与25.5mL的UltraLink酰肼树脂(Thermo Fisher Scientific)偶联。偶联效率为98%,通过Bradford技术对未偶联抗体进行定量确定。用10床体积的洗涤结合缓冲液(PBS,0.1% TritonX-100,pH 7.4)平衡树脂-抗体缀合物,与2370mL澄清的红细胞裂解物混合,并在4°C在连续搅拌下温育2小时。随后,将100mL温育混合物铺展在10个15mL聚丙烯柱上,并通过以1000×g离心30秒收集流出物。将该步骤重复数次,使得每个柱具有2.5mL负载DPP3的树脂。使用重力发光方法,用10mL洗涤结合缓冲液将每个柱洗涤5次。通过如下洗脱DPP3:将每个色谱柱置于含有2mL中和缓冲液(1M Tris-HCl,pH 8.0)的15-mL falcon管中,然后对于每个柱加入10mL洗脱缓冲液(100mM甘氨酸-HCl,0.1% TritonX-100,pH 3.5)并立即以1000×g离心30秒。将洗脱步骤总共重复3次,得到360mL的合并洗脱物。中和的洗脱液的pH为8.0。

[0373] 使用ÄktaStart系统(GE Healthcare)的样品泵将合并的洗脱物加载到用IEX缓冲液A1(100mM甘氨酸,150mM Tris,pH 8.0)平衡的5mL HiTrap Q-sephare HP柱(GE Healthcare)上。上样后,用5倍柱体积的IEX缓冲液A2(12mM NaH₂PO₄,pH 7.4)洗涤柱以去除未结合的蛋白质。通过使用IEX缓冲液B(12mM NaH₂PO₄,1M NaCl,pH 7.4)在0-1M NaCl范围内以超过10个柱体积(50mL)施加氯化钠梯度实现DPP3的洗脱。以2mL级分收集洗脱物。使用0.22μm瓶顶过滤器对用于离子交换色谱的缓冲液进行无菌过滤。

[0374] 表3中给出了每个纯化步骤的各自产率和活性的纯化表。图2示出了从人红细胞裂解物中纯化的天然hDPP3在梯度凝胶(4-20%)上的SDS-PAGE。

[0375] 表3: 从人红细胞中纯化DPP3

步骤	以%(LIA) ^a 计的 DPP3 量	以 mg ^b 计的 总蛋白	以 μmol/min(ECA) ^c 计 的总活性	以 % 计的 收率 ^d	以 U/mg ^e 计 的比活性	纯化因子 ^f
[0376] 裂解物	100	204160	55	100	0.00027	-
IAP	80.6	71.2	46.1	84	0.65	2407
IEX	75	6.6	38.7	70	5.9	21852

[0377] ^a 使用DPP3-LIA测定法在所有级分确定相对DPP3量。将起始材料中DPP3的量设定为100%，纯化级分中剩余的DPP3量与起始材料相关。

[0378] ^b 通过Peterson (Peterson 1977. *Analytical Biochemistry* 356:346-356) 修改的Lowry方法确定总蛋白量。

[0379] ^c 使用DPP3 ECA确定总Arg₂-βNA水解活性(以每分钟转化的μmol底物计),通过β萘胺(0,05-100μM)校准。

[0380] ^d 根据总Arg₂-βNA水解活性计算纯化收率。将起始材料中的Arg₂-βNA水解活性设定为100%。

[0381] ^e 将比活性定义为每分钟和mg总蛋白转化的μmol底物。

[0382] ^f 纯化因子是每个纯化步骤前后的比活性的商。

[0383] 实施例4-天然DPP3在动物模型中的作用

[0384] 通过监测缩短分数和肾阻力指数来研究天然hDPP3注射对健康小鼠的作用。

[0385] 使野生型Black 6小鼠(8-12周,组大小参考表4)在2周期间适应环境并对其进行基线超声心动图检查。将小鼠随机分配到两组中的一组中,随后通过眼眶后注射以600μg/kg的DPP3蛋白剂量静脉内注射天然DPP3蛋白或PBS。

[0386] 注射DPP3或PBS后,在15分钟、60分钟和120分钟时通过超声心动图检查 (Gao等人2011) 评估心脏功能,并通过肾阻力指数 (Lubas等人2014, Dewitte等人,2012) 评估肾功能(图3)。

[0387] 表4:实验组列表

组别	动物数量	处理
WT+PBS	3	PBS
WT+DPP3	4	天然DPP3

[0389] 结果

[0390] 与注射PBS的对照组相比,用天然DPP3蛋白处理的小鼠显示出显著降低的缩短分数(图4A)。WT+DPP3组还表现出肾功能恶化,如通过肾阻力指数增加所观察到的(图4B)。

[0391] 实施例5-Procizumab的开发

[0392] 将针对SEQ ID No.:2产生的抗体更详细地进行表征(表位映射、结合亲和力、特异性、抑制潜力)。这里示出了SEQ ID No.:2的克隆物1967的结果(AK1967;“Procizumab”)作为示例。

[0393] 确定AK1967在DPP3上的表位:

[0394] 对于AK1967的表位映射,合成了许多N或C末端生物素化肽(peptides&elephants GmbH, Hennigsdorf, 德国)。这些肽包括完整免疫肽的序列(SEQ ID No.2)或其从C末端或N

末端逐步去除一个氨基酸的片段(对于肽的完整列表见表6)。

[0395] 用在偶联缓冲液(500mM Tris-HCl, pH 7.8, 100mM NaCl)中的2 μ g亲和素/孔涂覆高结合性96孔板(Greiner Bio-One international AG, 奥地利)。然后洗涤板并用生物素化肽的特定溶液填充(10ng/孔;缓冲液-含0.5% BSA的1 \times PBS)。

[0396] 根据实施例1用化学发光标记物标记抗DPP3抗体AK1967。

[0397] 用200 μ l经标记和稀释的检测抗体(示踪物)填充板,并在室温下温育4小时。通过用350 μ l洗涤溶液(20mM PBS, pH 7.4, 0.1% Triton X-100)洗涤4次,去除未结合的示踪物。使用Centro LB 960光度计(Berthold Technologies GmbH&Co.KG)测量孔结合的化学发光。通过评估相对光单位(RLU)确定AK1967与相应肽的结合。将任何显示出比AK1967的非特异性结合显著更高的RLU信号的肽定义为AK1967结合剂。结合和非结合肽的组合分析揭示了AK1967的特异性DPP3表位。

[0398] 使用Octet确定结合亲和力:

[0399] 使用Octet Red96 (ForteBio) 进行实验。在动力学级抗人Fc (AHC) 生物传感器上捕获AK1967。然后将负载的生物传感器浸入重组的经GST标记的人DPP3的系列稀释物(100、33.3、11.1、3.7nM)中。观察到缔合120秒,然后是180秒解离。用于实验的缓冲液如表5中所示。使用1:1结合模型和全局拟合进行动力学分析。

[0400] 表5:用于Octet测量的缓冲液

缓冲液	组成
测定缓冲液	含0.1%BSA、0.02%Tween-21的PBS
再生缓冲液	10mM甘氨酸缓冲液(pH 1.7)
中和缓冲液	含0.1%BSA、0.02%Tween-21的PBS

[0402] AK1967结合特异性的蛋白印迹分析:

[0403] 洗涤来自人EDTA血液的血细胞(在PBS中3次),在PBS中稀释并通过重复的冻融循环进行裂解。血细胞裂解物的总蛋白浓度为250 μ g/ml, DPP3浓度为10 μ g/ml。对血细胞裂解物的稀释物(1:40、1:80、1:160和1:320)和经纯化的重组人His-DPP3的稀释物(31.25-500ng/ml)进行SDS-PAGE和蛋白印迹分析。在1.) 封闭缓冲液(1 \times PBS-T和5%脱脂奶粉)、2.) 一抗溶液(AK1967 1:2,000,在封闭缓冲液中)和3.) 经HRP标记的二抗(山羊抗小鼠IgG, 1:1,000,在封闭缓冲液中)中温育印迹。使用Amersham ECL蛋白印迹检测试剂和Amersham Imager 600UV(均来自GE Healthcare)检测结合的二抗。

[0404] DPP3抑制测定:

[0405] 为分析AK1967对DPP3的抑制能力,如实施例1所述,使用已知程序(Jones等人1982)进行DPP3活性测定。将AK1967抑制能力定义为通过与所述抗体一起温育而使GST-hDPP3活性降低的百分比。在图7中的抑制曲线中显示了产生的DPP3活性降低。

[0406] 表位映射:

[0407] 对AK1967所结合和不结合的肽的分析揭示了DPP3序列INPETG (SEQ ID No.:3) 是对于AK1967结合必要的表位(参见表6)。

[0408] 结合亲和力:

[0409] AK1967以2.2 $\times 10^{-9}$ M的亲合力与重组GST-hDPP3结合(动力学曲线见图5)。

[0410] 表6:用于AK1967的表位映射的肽

肽ID	肽序列	AK1967结合
#1	生物素 a f n f d q e t v i N p e t g e q i q s w y r s g	是
#2	生物素 a f n f d q e t v i N p e t g e q i q	是
#3	生物素 a f n f d q e t v i N p e t g e q i	是
#4	生物素 a f n f d q e t v i N p e t g e q	是
#5	生物素 a f n f d q e t v i N p e t g e	是
#6	生物素 a f n f d q e t v i n p e t g	是
#7	生物素 a f n f d q e t v i n p e t	否
[0411] #8	生物素 a f n f d q e t v i n p e	否
#9	生物素 a f n f d q e t v i n p	否
#10	生物素 a f n f d q e t v i n	否
#11	e t g e q i q s w y k 生物素	否
#12	p e t g e q i q s w y k 生物素	否
#13	n p e t g e q i q s w y k 生物素	否
#14	i n p e t g e q i q s w y k 生物素	是
#15	v i n p e t g e q i q s w y k 生物素	是
#16	t v i n p e t g e q i q s w y k 生物素	是
#17	e t v i n p e t g e q i q s w y k 生物素	是

[0412] 特异性和抑制潜力:

[0413] 用AK1967作为一抗在血细胞裂解物中检测到的唯一蛋白是80kDa的DPP3(图6)。裂解物的总蛋白浓度为250µg/ml,而估计的DPP3浓度为约10µg/ml。尽管裂解物中的非特异性蛋白为25倍多,但AK1967仍可特异性结合并检测DPP3,并且没有发生其他非特异性结合。

[0414] 在特异性DPP3活性测定中,AK1967抑制了15ng/ml DPP3,其中IC50为约15ng/ml(图7)。

[0415] 嵌合/人源化:

[0416] 将具有抑制DPP3活性达70%的能力的单克隆抗体AK1967(“Procizumab”)选为可能的治疗性抗体,也将其用作嵌合和人源化的模板。

[0417] 可根据以下程序进行鼠抗体的人源化:

[0418] 对于鼠源抗体的人源化,分析抗体序列的框架区(FR)与互补决定区(CDR)和抗原的结构相互作用。基于结构建模,选择合适的人源FR,并将鼠CDR序列移植到人FR中。可以引入CDR或FR的氨基酸序列的变化以重新获得本已被FR序列的物种转换所消除的结构相互作用

用。可以通过使用噬菌体展示文库的随机方法或经由通过分子建模指导的定向方法来实现这种结构相互作用的恢复 (Almagro和Fransson, 2008. Humanization of antibodies. Front Biosci.13:1619-33)。

[0419] 在上述情况下,可变区可以连接到恒定区的任何亚类(IgG、IgM、IgE、IgA),或仅连接到支架、Fab片段、Fv、Fab和F(ab)₂。在下面的实施例6和7中,使用了具有IgG2a骨架的鼠抗体变体。对于嵌合和人源化,使用了人IgG1 κ 骨架。

[0420] 对于表位结合,只有互补决定区(CDR)是重要的。鼠抗DPP3抗体(AK1967;“Procizumab”)的重链和轻链的CDR,分别地,对于重链而言示于SEQ ID No.7、SEQ ID No.8和SEQ ID No.9中,并且对于轻链而言示于SEQ ID No.10、序列KVS和SEQ ID No.11中。

[0421] 对抗DPP3抗体(AK1967;“Procizumab”)的测序揭示了根据SEQ ID No.:12的抗体重链可变区(H链)和根据SEQ ID No.:13的抗体轻链可变区(L链)。

[0422] 实施例6-Procizumab在脓毒症诱导的心力衰竭中的作用

[0423] 在该实验中,通过监测缩短分数来研究Procizumab注射液对脓毒症诱导的心力衰竭大鼠的作用(Rittirsch等人2009)。

[0424] 脓毒性休克的CLP模型:

[0425] 将来自Centre d'élevage Janvier(法国)的雄性Wistar大鼠(2-3个月,300-400g,组大小参考表7)随机分配到三组中的一组中。使用盐酸氯胺酮(90mg/kg)和甲苯噻嗪(9mg/kg)经腹膜内(i.p.)麻醉所有动物。为了诱导多微生物脓毒症,使用经稍作修改的Rittirsch的方案进行盲肠结扎和穿刺(CLP)。进行腹中线切口(1.5cm)以使盲肠外置。然后在回盲瓣正下方结扎盲肠,并用18号针头穿刺一次。然后将腹腔以两层封闭,随后进行液体复苏(3ml/100g体重的盐水皮下注射)并将动物放回笼子。对假手术动物进行手术,但没有刺破其盲肠。将CLP动物在安慰剂和治疗性抗体之间随机分配。

[0426] 研究设计:

[0427] 研究流程如图8所描绘。在CLP或假手术后,允许动物休息20小时,其中进行自由饮水和进食。之后对他们进行麻醉,进行气管切开术并铺开动脉和静脉管线。在CLP手术后24小时,以5mg/kg经推注施用AK1967或介质(盐水),然后以7.5mg/kg输注3小时。作为一项安全措施,从t=0到3小时有创地连续监测血流动力学。

[0428] 在t=0(基线)时,所有CLP动物都处于脓毒性休克并发展成心脏功能下降(低血压、低缩短分数)。在这个时间点注射(i.v.)Procizumab或介质(PBS)并开始盐水输注。下表(表7)总结了1个对照组和2个CLP组。在实验结束时,将动物实施安乐死,并收获器官用于后续分析。

[0429] 表7:实验组列表

[0430]

组别	动物数量	CLP	处理
假手术	7	否	PBS
CLP-PBS	6	是	PBS
CLP-PCZ	4	是	PCZ

[0431] 有创血压:

[0432] 使用AcqKnowledge系统(BIOPAC Systems, Inc., USA)获得血流动力学变量。它提供了一个全自动的血压分析系统。导管通过压力传感器连接到BIOPAC系统。

[0433] 对于该过程,对大鼠进行麻醉(氯胺酮和甲苯噻嗪)。将动物移至加热垫,使所需的体温达到37-37.5°C。将温度反馈探头插入直肠。将大鼠以仰卧位放置在手术台上。打开气管并插入外部呼吸机导管(16G),而不损伤颈动脉和迷走神经。将动脉导管插入右颈动脉。在结扎前将颈动脉与迷走神经分离。

[0434] 通过左颈静脉插入中心静脉导管,允许施用PCZ或PBS。

[0435] 手术后,让动物休息以保持稳定状态,然后进行血液动力学测量。然后记录基线血压(BP)。在数据收集期间,停止通过动脉管线输注盐水。

[0436] 超声心动图检查:

[0437] 使用盐酸氯胺酮麻醉动物。将胸部剃毛,并将以卧位放置大鼠。

[0438] 对于经胸廓的超声心动图(TTE)检查,使用了配备有高频(14-MHz)线性探头和10-MHz心脏探头的商用GE Healthcare Vivid 7超声系统。所有检查均以数字方式记录并存储以供后续离线分析。

[0439] 在2cm的深度记录灰度图像。在胸骨旁长轴视图中开始二维检查,以测量主动脉环直径和肺动脉直径。还使用M模式测量左心室(LV)尺寸并评估缩短分数(FS%)。将LVFS计算为LV舒张末期直径-LV收缩末期直径/LV舒张末期直径并以%表示。因此,将LV最大直径时定义为舒张末期的时间。因此,将收缩末期定义为同一心脏周期中的最小直径。所有参数都经手动测量。对于每次测量,对三个心脏周期进行平均。

[0440] 根据相同的胸骨旁长轴视图,使用脉冲波多普勒记录肺动脉流量。测量肺动脉流出物的速度时间积分。

[0441] 根据心尖五腔视图,使用脉冲多普勒在二尖瓣尖端水平记录二尖瓣血流。

[0442] 结果:

[0443] 与假手术动物相比,用PBS (CLP+PBS) 处理的脓毒症诱导的心力衰竭大鼠显示降低的缩短分数(图9A)。CLP+PBS组也显示出很高的死亡率(图9B)。相反,将Procizumab应用于脓毒症诱导的心力衰竭大鼠改善了缩短分数(图9A)并显著降低了死亡率(图9B)。

[0444] 实施例7-Procizumab对心脏和肾脏功能的作用

[0445] 通过监测缩短分数和肾阻力指数来研究Procizumab在小鼠的异丙肾上腺素诱导的心力衰竭中的作用。

[0446] 异丙肾上腺素诱导的小鼠心脏应激:

[0447] 通过每天两次皮下注射300mg/kg异丙肾上腺素(一种非选择性 β -肾上腺素激动剂(DL-异丙肾上腺素盐酸盐,Sigma Chemical Co)) (ISO)持续两天,在3个月龄的雄性小鼠中诱发急性心力衰竭(Vergaro等人2016)。在NaCl 0.9%中进行ISO稀释。将异丙肾上腺素处理的小鼠随机分配成两组(表8),在第3天进行基线超声心动图检查(Gao等人2011)和肾阻力指数测量(Lubas等人2014,Dewitte等人2012)后经静脉内注射PBS或Procizumab (10mg/kg) (图10A和图10B)。

[0448] 通过超声心动图检查(Gao等人2011)和肾阻力指数(Lubas等人2014,Dewitte等人2012)在1小时、6小时和24小时评估心脏功能(图10A和图10B)。将注射介质(PBS)而不是异丙肾上腺素的小鼠组不进行进一步的药物治疗并作为对照组(表8)。

[0449] 表8:实验组列表

[0450]

组别	动物数量	处理
----	------	----

假手术+PBS	27	PBS
HF+PBS	15	PBS
HF+PCZ	20	PCZ

[0451] 结果:

[0452] 将Procizumab应用于异丙肾上腺素诱导的心力衰竭小鼠可在施用后的第一小时内恢复心脏功能(图11A)。PCZ注射后6小时,患病小鼠的肾功能显示出显著改善,并且在24小时之时与假手术小鼠的肾功能相当(图11B)。

[0453] 实施例8-缬沙坦的作用

[0454] 通过监测缩短分数来研究注射了DPP3的健康小鼠中I型血管紧张素II受体(ATR1)的拮抗剂-缬沙坦的作用。

[0455] 在该实验中,使健康的黑色6只小鼠(8-12周,组大小参考表9)每天饮用含50mg/kg缬沙坦的水或仅用水(表9),持续两周的时段。随后,两组均接受天然DPP3(600 μ g/kg)的静脉注射,并根据Gao等人2011在15分钟、60分钟和120分钟时评估缩短分数(图12)。

[0456] 表9:实验组列表

[0457]

组别	动物数量	处理
WT+DPP3	4	水+PBS/DPP3注射液
Val+DPP3	3	水+缬沙坦/DPP3注射液

[0458] 结果:

[0459] 向健康小鼠注射DPP3导致缩短分数显著降低(图13)。相比之下,用血管紧张素II受体拮抗剂缬沙坦处理然后进行DPP3注射的健康小鼠,通过缩短分数评估没有显示出心脏功能障碍的迹象。因此,心脏功能通过缬沙坦处理得以恢复,因此DPP3介导的心脏功能障碍是血管紧张素II介导的。

[0460] 用缬沙坦处理两周的动物已适应于I型血管紧张素II受体的阻断,并适应于随后受抑制的血管紧张素II介导的信号传导以及受抑制的AngII介导的心脏功能活性。显然,在缬沙坦处理下,机体转向用于激活心脏功能的其他方式,而与I型血管紧张素II受体信号传导无关,因为这种血管紧张素信号传导系统已被缬沙坦抑制。

[0461] 当DPP3切割Ang II并因此抑制血管紧张素II介导的心脏功能活性时,那些适应下调的血管紧张素系统的动物(经缬沙坦处理的动物)没有显示出如通过缩短分数评估的心脏功能障碍的迹象。与此相反,未用血管紧张素II受体拮抗剂缬沙坦处理且不适应受抑制的AngII介导的信号传导的动物,响应于DPP3注射和随后的AngII切割和失活,显示出缩短分数显著降低。

[0462] 该实验清楚地示出了DPP3与血管紧张素II之间的关联,这意味着DPP3诱导的心脏功能障碍是血管紧张素II介导的。

[0463] 实施例9-脓毒症中的DPP3和器官功能障碍

[0464] 与实施例2(AdrenOSS-1)中所述相同的研究用于评估因脓毒症和脓毒性休克而入院的患者的循环DPP3(cDPP3)与器官(例如心血管和肾功能障碍)之间的关联。AdrenOSS-1是一项欧洲前瞻性、观察性、多国研究(ClinicalTrials.gov NCT02393781),包括583名因脓毒症或脓毒性休克而入住ICU的患者。主要结果(如实施例2中所述)是28天死亡率。次要结果包括由SOFA评分定义的器官衰竭、着重于血管加压药使用的器官支持以及对肾脏替代

治疗的需求。在入住ICU后24小时内和第2天采集中心实验室的血液。

[0465] 对于DPP3蛋白浓度 (DPP3-LIA) 的量化,使用了最近描述的测定法 (Rehfeld等人 2019.JALM 3(6):943-953)。

[0466] 在所有AdrenOSS-1患者中,入院时测量的中位cDPP3为45.1ng/mL (四分位间距 27.5-68.6)。入院时测量的高DPP3水平与较差的代谢参数、肾功能和心脏功能以及SOFA评分相关:与具有高于中位数45.1ng/mL的DPP3水平的患者的中位数SOFA评分为8 (IQR 5-11) 相比,具有低于中位数的DPP3水平的患者具有的中位数SOFA评分 (点数) 为6 (IQR 4-9) (图 14)。

[0467] 无论入院时的cDPP3水平如何,24小时后的高浓度cDPP3水平都与最差的SOFA评分相关,无论是总体 (图15) 还是器官 (图16A-F)。

[0468] 总之,这些数据表明,在大型国际群组的脓毒或脓毒性休克患者中,高水平的cDPP3与存活率和器官功能障碍的程度相关。研究发现,入院时cDPP3<45.1ng/ml与短期存活率之间存在显著关联,并且脓毒症和脓毒性休克的预后临界值均为45.1pg/ml。关于器官功能障碍,入住ICU时cDPP3与SOFA评分呈正相关。更重要的是,cDPP3水平与器官功能障碍程度之间的关联 (参见入住ICU时) 在恢复阶段也是如此。实际上,在入院时具有高cDPP3水平并在第2天表现出向正常cDPP3值下降的患者更有可能恢复所有器官功能,包括心血管、肾脏、肺、肝脏。

[0469] 实施例10-感染冠状病毒 (SARS-CoV-2) 的患者中的DPP3

[0470] 对12名被诊断为感染冠状病毒 (SARS-CoV-2) 的患者的血浆样品进行了DPP3和其他生物标志物的筛查。如最近所描述的,将检测人DPP3的量 (LIA) 或人DPP3活性 (ECA) 的免疫测定法 (LIA) 或活性测定法 (ECA) 分别用于确定患者血浆中的DPP3水平 (Rehfeld等人 2019.JALM 3(6):943-953)。

[0471] 使用Weber等人2017 (Weber等人2017.JALM2(2):222-233) 所述的免疫测定法测量 Bio-ADM水平。

[0472] 在表10中总结了各个样品中相应的DPP3和bio-ADM浓度。

[0473] 表10:感染冠状病毒 (SARS-CoV-2) 患者样品中的DPP3和bio-ADM水平

[0474]

患者编号	DPP3 (ng/ml)	bio-ADM (pg/ml)
1	56	133
2	30	45
3	70	214
4	150	85
5	290	437
6	87	66
7	975	79
8	333	174
9	216	35
10	539	199
11	27	53
12	162	401

中位数	156.0	109.0
平均值	244.6	160.1

[0475] DPP3浓度范围为27-975ng/mL,中位数 (IQR) 为156 (59.5-322.3) ng/ml。Bio-ADM浓度范围为35-437pg/mL,中位数 (IQR) 为109 (56-210) pg/ml。与健康受试者相比,DPP3浓度显著升高。已测量来自5,400名正常 (健康) 受试者 (基于瑞典单中心前瞻性人群的研究 (MPP-RES)) 的样品:血浆DPP3中位数 (四分位距) 为14.5ng/ml (11.3ng/ml-19ng/ml)。来自 (健康) 受试者的样品中的中位数血浆bio-ADM (成熟ADM-NH₂) 为24.7pg/ml,最低值为11pg/ml,第99个百分位数为43pg/ml (Marino等人2014.Critical Care 18:R34)。

[0476] 实施例11-COVID-19患者中的DPP3,用于预后、治疗分层和随访

[0477] 群组说明:

[0478] 本研究纳入了21名SARS-CoV-2PCR结果阳性并进入ICU的患者。患者特征包括中位数年龄63岁,76%为男性,中位数体重指数 (BMI) 为28.6,入院序贯器官衰竭评估 (SOFA) 评分为5。排除标准为年龄<18岁和怀孕。使用实时逆转录PCR (RT-PCR) 进行分析。患者的治疗遵循ICU的护理标准,包括机械通气、静脉-静脉ECMO和RRT (如果需要)。

[0479] 在入院当天和直到第7天每天对血液采样,用于分析DPP3和标准实验室参数。如最近所述 (Rehfeld等人2019.JALM 3 (6) :943-953),使用一步法发光夹心免疫测定法 (LIA) 在EDTA血浆中测量DPP3。

[0480] 结果:

[0481] a) 基线处和连续测量的DPP3与疾病严重程度相关

[0482] 入住ICU时测量的DPP3与如通过KDIGO标准定义的ICU住院期间的肾功能恶化相关,其中0-1阶段表示无肾功能损害到轻度损害和低风险,2-3阶段表示肾损伤和肾衰竭,与0-1阶段中的DPP3值相比,2-3阶段中的DPP3值显著更高 (图17;p=0.005)。基线处的高DPP3值可与其他临床参数一起用于指导肾脏替代治疗的开始。

[0483] 由于COVID-19阳性患者往往会在ICU中平均停留21天,因此在ICU住院期间 (第3天和第7天) DPP3水平测量值也与低PaO₂/FiO₂比率 (<150) 相关,因此,与严重急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 相关 (FALSE=P/F比>150;TRUE=P/F比<150)。

[0484] 此外,在第3天 (图19A,p=0.03) 和第7天 (图19B,p=0.01) 测量的高DPP3值仍然与ICU住院期间的高死亡率相关。

[0485] b) 基线处和连续测量的DPP3与器官支持治疗的需求相关

[0486] 入院时和入住ICU期间的高DPP3值与器官支持治疗的需求显著相关,所述器官支持治疗特别地为血管加压药治疗 (第3天;图20) 和体外膜肺氧合 (ECMO) (第3天和第7天;分别为图21A和图21B)。

[0487] 序列

[0488] SEQ ID No.1-hDPP3 aa 1-737

[0489] MADTQYILPNDIGVSSLDCREAFRLSPETERLYAYHLSRAAWYGGGLAVLLQTSPEAPYIYALLSRLFRAQDPDQLRQHALAEGLTEEEYQAFVLVYAAGVYSNMGNYSFGDTKFVNP LKPKLERVILGSEAAQQHPPEVRGLWQTCGELMFSLEPRLRHLGLGKEGITTYFSGNCTMEDAKLAQDFLDSQNLSAYNTRLFKEVDGEGKPYEVR LASVLGSEPSLDSEVTSKLSYEFGRSPFQVTRGDYAPILQKVVEQLEKAKAYAANSHQGQMLAQYIESFTQGSIEAHKRGRSFWIQDKGPIVESYIGFIESYRDPFGSRGEFEGFVAVVNKAMSAKFERLVAEQLLKELPWPPTFEKDKFLTPDFTSLD

VLTFAGSGIPAGINIPNYDDLQRQTEGFKNVSLGNVLAVAYATQREKLTFLLEDDKDLYILWKGPSFDVQVGLHELLG
HGSGKLFVQDEKGA FNFDQETVINPETGEQIQSWYRSGETWDSKFSTIASSYEECRAESVGLYLCLHPQVLEIFGFE
GADAEDVIYVNWLNMRAGLLALEFYTPFAFNWRQAHMQARFVILRVLLEAGEGLVITPTTGS DGRPDARVRLDRS
KIRSVGKPALERFLRRLQVLKSTGDVAGGRALYEGYATVTDAPPECFLTLRDTVLLRKESRKLIVQPNTRELGSDVQ
LLEYEASAAGLIRSFSEFPEDEGPELEEILTQLATADARFWKGPSEAPSGQA

[0490] SEQ ID No.2-hDPP3 aa 474-493 (N-Cys) -具有另外的N末端半胱氨酸的免疫肽

[0491] CETVINPETGEQIQSWYRSGE

[0492] SEQ ID No.3-hDPP3 aa 477-482-AK1967的表位

[0493] INPETG

[0494] SEQ ID No.4-hDPP3 aa 480-483

[0495] ETGE

[0496] SEQ ID No.5-鼠AK1967重链中的可变区

[0497] QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMSVGVIRQPSGKGLEWLAHIWWDNKNKSYNPALKSRL
TISRDTSNQVFLKIASVVTADTGTYFCARNYSYDYWGQGTTLTVSS

[0498] SEQ ID No.6-鼠AK1967轻链中的可变区

[0499] DVVVTQTPLSLSVSLGDPASISCRSSRSLVHSIGSTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVS NRFSGVPDRFSG
SGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPWTFGGGTKLEIK

[0500] SEQ ID No.7-鼠AK1967重链中的CDR1

[0501] GFSLSTSGMS

[0502] SEQ ID No.8-鼠AK1967重链中的CDR2

[0503] IWWNDNK

[0504] SEQ ID No.9-鼠AK1967重链中的CDR 3

[0505] ARNYSYDY

[0506] SEQ ID No.10-鼠AK1967轻链中的CDR1

[0507] RSLVHSIGSTY

[0508] 鼠AK1967轻链中的CDR2

[0509] KVS

[0510] SEQ ID No.11-鼠AK1967轻链中的CDR3

[0511] SQSTHVPWT

[0512] SEQ ID No.12-人源化AK1967-重链序列(IgG1 κ 骨架)

[0513] MDPKGSLSWRILLFLSLAFELSYGQITLKESGPTLVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMSVGVIRQPPGK
ALEWLAHIWWDNKNKSYNPALKSRLTITRDTSKNQVLTMTNMDPVDGTYYCARNYSYDYWGQGLVTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC
NVNHNKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPG

[0514] SEQ ID No.13-人源化AK1967-轻链序列(IgG1 κ 骨架)

[0515] METDTLLLWVLLLVPGSTGDIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSRSLVHSIGSTYLYWYLQKPGQSP

QLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSDFTLKI SRVEAEDVGVYYCSQSTHVPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTH
QGLSSPVTKSFNRGEC

序列表

<110> 4TEEN4制药有限公司(4TEEN4 PHARMACEUTICALS GMBH)

<120> 感染冠状病毒的患者中的DPP3

<130> T75121W0

<140> EP20163419.3

<141> 2020-03-16

<140> EP20179763.6

<141> 2020-06-12

<140> US62990166

<141> 2020-03-16

<140> US63015205

<141> 2020-04-24

<160> 30

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1

<211> 737

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 1

```

Met Ala Asp Thr Gln Tyr Ile Leu Pro Asn Asp Ile Gly Val Ser Ser
1           5           10           15
Leu Asp Cys Arg Glu Ala Phe Arg Leu Leu Ser Pro Thr Glu Arg Leu
           20           25           30
Tyr Ala Tyr His Leu Ser Arg Ala Ala Trp Tyr Gly Gly Leu Ala Val
           35           40           45
Leu Leu Gln Thr Ser Pro Glu Ala Pro Tyr Ile Tyr Ala Leu Leu Ser
           50           55           60
Arg Leu Phe Arg Ala Gln Asp Pro Asp Gln Leu Arg Gln His Ala Leu
65           70           75           80
Ala Glu Gly Leu Thr Glu Glu Glu Tyr Gln Ala Phe Leu Val Tyr Ala
           85           90           95
Ala Gly Val Tyr Ser Asn Met Gly Asn Tyr Lys Ser Phe Gly Asp Thr
           100          105          110
Lys Phe Val Pro Asn Leu Pro Lys Glu Lys Leu Glu Arg Val Ile Leu
           115          120          125
Gly Ser Glu Ala Ala Gln Gln His Pro Glu Glu Val Arg Gly Leu Trp
           130          135          140
Gln Thr Cys Gly Glu Leu Met Phe Ser Leu Glu Pro Arg Leu Arg His

```

145	150	155	160
Leu Gly Leu Gly Lys Glu Gly Ile Thr Thr Tyr Phe Ser Gly Asn Cys			
	165	170	175
Thr Met Glu Asp Ala Lys Leu Ala Gln Asp Phe Leu Asp Ser Gln Asn			
	180	185	190
Leu Ser Ala Tyr Asn Thr Arg Leu Phe Lys Glu Val Asp Gly Glu Gly			
	195	200	205
Lys Pro Tyr Tyr Glu Val Arg Leu Ala Ser Val Leu Gly Ser Glu Pro			
	210	215	220
Ser Leu Asp Ser Glu Val Thr Ser Lys Leu Lys Ser Tyr Glu Phe Arg			
225	230	235	240
Gly Ser Pro Phe Gln Val Thr Arg Gly Asp Tyr Ala Pro Ile Leu Gln			
	245	250	255
Lys Val Val Glu Gln Leu Glu Lys Ala Lys Ala Tyr Ala Ala Asn Ser			
	260	265	270
His Gln Gly Gln Met Leu Ala Gln Tyr Ile Glu Ser Phe Thr Gln Gly			
	275	280	285
Ser Ile Glu Ala His Lys Arg Gly Ser Arg Phe Trp Ile Gln Asp Lys			
	290	295	300
Gly Pro Ile Val Glu Ser Tyr Ile Gly Phe Ile Glu Ser Tyr Arg Asp			
305	310	315	320
Pro Phe Gly Ser Arg Gly Glu Phe Glu Gly Phe Val Ala Val Val Asn			
	325	330	335
Lys Ala Met Ser Ala Lys Phe Glu Arg Leu Val Ala Ser Ala Glu Gln			
	340	345	350
Leu Leu Lys Glu Leu Pro Trp Pro Pro Thr Phe Glu Lys Asp Lys Phe			
	355	360	365
Leu Thr Pro Asp Phe Thr Ser Leu Asp Val Leu Thr Phe Ala Gly Ser			
	370	375	380
Gly Ile Pro Ala Gly Ile Asn Ile Pro Asn Tyr Asp Asp Leu Arg Gln			
385	390	395	400
Thr Glu Gly Phe Lys Asn Val Ser Leu Gly Asn Val Leu Ala Val Ala			
	405	410	415
Tyr Ala Thr Gln Arg Glu Lys Leu Thr Phe Leu Glu Glu Asp Asp Lys			
	420	425	430
Asp Leu Tyr Ile Leu Trp Lys Gly Pro Ser Phe Asp Val Gln Val Gly			
	435	440	445
Leu His Glu Leu Leu Gly His Gly Ser Gly Lys Leu Phe Val Gln Asp			
450	455	460	

Glu Lys Gly Ala Phe Asn Phe Asp Gln Glu Thr Val Ile Asn Pro Glu
 465 470 475 480
 Thr Gly Glu Gln Ile Gln Ser Trp Tyr Arg Ser Gly Glu Thr Trp Asp
 485 490 495
 Ser Lys Phe Ser Thr Ile Ala Ser Ser Tyr Glu Glu Cys Arg Ala Glu
 500 505 510
 Ser Val Gly Leu Tyr Leu Cys Leu His Pro Gln Val Leu Glu Ile Phe
 515 520 525
 Gly Phe Glu Gly Ala Asp Ala Glu Asp Val Ile Tyr Val Asn Trp Leu
 530 535 540
 Asn Met Val Arg Ala Gly Leu Leu Ala Leu Glu Phe Tyr Thr Pro Glu
 545 550 555 560
 Ala Phe Asn Trp Arg Gln Ala His Met Gln Ala Arg Phe Val Ile Leu
 565 570 575
 Arg Val Leu Leu Glu Ala Gly Glu Gly Leu Val Thr Ile Thr Pro Thr
 580 585 590
 Thr Gly Ser Asp Gly Arg Pro Asp Ala Arg Val Arg Leu Asp Arg Ser
 595 600 605
 Lys Ile Arg Ser Val Gly Lys Pro Ala Leu Glu Arg Phe Leu Arg Arg
 610 615 620
 Leu Gln Val Leu Lys Ser Thr Gly Asp Val Ala Gly Gly Arg Ala Leu
 625 630 635 640
 Tyr Glu Gly Tyr Ala Thr Val Thr Asp Ala Pro Pro Glu Cys Phe Leu
 645 650 655
 Thr Leu Arg Asp Thr Val Leu Leu Arg Lys Glu Ser Arg Lys Leu Ile
 660 665 670
 Val Gln Pro Asn Thr Arg Leu Glu Gly Ser Asp Val Gln Leu Leu Glu
 675 680 685
 Tyr Glu Ala Ser Ala Ala Gly Leu Ile Arg Ser Phe Ser Glu Arg Phe
 690 695 700
 Pro Glu Asp Gly Pro Glu Leu Glu Glu Ile Leu Thr Gln Leu Ala Thr
 705 710 715 720
 Ala Asp Ala Arg Phe Trp Lys Gly Pro Ser Glu Ala Pro Ser Gly Gln
 725 730 735

Ala

<210> 2

<211> 21

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

Cys Glu Thr Val Ile Asn Pro Glu Thr Gly Glu Gln Ile Gln Ser Trp
 1 5 10 15
 Tyr Arg Ser Gly Glu
 20

<210> 3

<211> 6

<212> PRT

<213> 智人

<400> 3

Ile Asn Pro Glu Thr Gly
 1 5

<210> 4

<211> 4

<212> PRT

<213> 智人

<400> 4

Glu Thr Gly Glu
 1

<210> 5

<211> 116

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 5

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asn Asp Asn Lys Ser Tyr Asn Pro Ala
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Asn Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Phe Leu Lys Ile Ala Ser Val Val Thr Ala Asp Thr Gly Thr Tyr Phe
 85 90 95
 Cys Ala Arg Asn Tyr Ser Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser

115

<210> 6

<211> 112

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 6

Asp	Val	Val	Val	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Ser	Val	Ser	Leu	Gly
1				5				10						15	
Asp	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Arg	Ser	Leu	Val	His	Ser
			20				25					30			
Ile	Gly	Ser	Thr	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
		35					40					45			
Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro
	50					55					60				
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
65				70					75					80	
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Val	Tyr	Phe	Cys	Ser	Gln	Ser
			85					90						95	
Thr	His	Val	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
			100					105						110	

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 7

Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Thr	Ser	Gly	Met	Ser
1			5					10	

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 8

Ile	Trp	Trp	Asn	Asp	Asn	Lys
1			5			

<210> 9

<211> 8

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 9

Ala Arg Asn Tyr Ser Tyr Asp Tyr

1 5

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 10

Arg Ser Leu Val His Ser Ile Gly Ser Thr Tyr

1 5 10

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 11

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr

1 5

<210> 12

<211> 938

<212> PRT

<213> 智人

<400> 12

Met Asp Pro Lys Gly Ser Leu Ser Trp Arg Ile Leu Leu Phe Leu Ser

1 5 10 15

Leu Ala Phe Glu Leu Ser Tyr Gly Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly

20 25 30

Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe

35 40 45

Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg

50 55 60

Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asn

65 70 75 80

Asp Asn Lys Ser Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr

85 90 95

Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp

100 105 110

Pro Val Asp Thr Gly Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Tyr Ser Tyr Asp

115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys

130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 145 150 155 160
 Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 165 170 175
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 180 185 190
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 195 200 205
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 210 215 220
 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 225 230 235 240
 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 245 250 255
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 260 265 270
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 275 280 285
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 290 295 300
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 305 310 315 320
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 325 330 335
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 340 345 350
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 355 360 365
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 370 375 380
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 385 390 395 400
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 405 410 415
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 420 425 430
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 435 440 445
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu

450	455	460
Ser Leu Ser Pro Gly Met Asp Pro Lys Gly Ser Leu Ser Trp Arg Ile		
465	470	475
Leu Leu Phe Leu Ser Leu Ala Phe Glu Leu Ser Tyr Gly Gln Ile Thr		
	485	490
Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr		
	500	505
Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Ser		
	515	520
Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala		
530	535	540
His Ile Trp Trp Asn Asp Asn Lys Ser Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser		
545	550	555
Arg Leu Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr		
	565	570
Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Gly Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg		
	580	585
Asn Tyr Ser Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser		
595	600	605
Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser		
610	615	620
Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp		
625	630	635
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr		
	645	650
Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr		
	660	665
Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln		
	675	680
Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp		
690	695	700
Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro		
705	710	715
Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro		
	725	730
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr		
	740	745
Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn		
755	760	765

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 770 775 780
 Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 785 790 795 800
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 805 810 815
 Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 820 825 830
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 835 840 845
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 850 855 860
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 865 870 875 880
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 885 890 895
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 900 905 910
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 915 920 925
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 930 935
 <210> 13
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 13
 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15
 Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser
 20 25 30
 Val Thr Pro Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Arg Ser
 35 40 45
 Leu Val His Ser Ile Gly Ser Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys
 50 55 60
 Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
 65 70 75 80
 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 85 90 95

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
 100 105 110
 Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 115 120 125
 Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 130 135 140
 Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 145 150 155 160
 Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 165 170 175
 Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 180 185 190
 Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 195 200 205
 Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
 210 215 220
 Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 14

<211> 25

<212> PRT

<213> 用于表位映射的肽

<400> 14

Ala Phe Asn Phe Asp Gln Glu Thr Val Ile Asn Pro Glu Thr Gly Glu
 1 5 10 15
 Gln Ile Gln Ser Trp Tyr Arg Ser Gly
 20 25

<210> 15

<211> 19

<212> PRT

<213> 用于表位映射的肽

<400> 15

Ala Phe Asn Phe Asp Gln Glu Thr Val Ile Asn Pro Glu Thr Gly Glu
 1 5 10 15
 Gln Ile Gln

<210> 16

<211> 18

<212> PRT

<213> 用于表位映射的肽

<400> 16

Ala Phe Asn Phe Asp Gln Glu Thr Val Ile Asn Pro Glu Thr Gly Glu
1 5 10 15

Gln Ile

<210> 17

<211> 17

<212> PRT

<213> 用于表位映射的肽

<400> 17

Ala Phe Asn Phe Asp Gln Glu Thr Val Ile Asn Pro Glu Thr Gly Glu
1 5 10 15

Gln

<210> 18

<211> 16

<212> PRT

<213> 用于表位映射的肽

<400> 18

Ala Phe Asn Phe Asp Gln Glu Thr Val Ile Asn Pro Glu Thr Gly Glu
1 5 10 15

<210> 19

<211> 15

<212> PRT

<213> 用于表位映射的肽

<400> 19

Ala Phe Asn Phe Asp Gln Glu Thr Val Ile Asn Pro Glu Thr Gly
1 5 10 15

<210> 20

<211> 14

<212> PRT

<213> 用于表位映射的肽

<400> 20

Ala Phe Asn Phe Asp Gln Glu Thr Val Ile Asn Pro Glu Thr
1 5 10

<210> 21

<211> 13

<212> PRT

<213> 用于表位映射的肽

<400> 21

Ala Phe Asn Phe Asp Gln Glu Thr Val Ile Asn Pro Glu

1	5	10
<210> 22		
<211> 12		
<212> PRT		
<213> 用于表位映射的肽		
<400> 22		
Ala Phe Asn Phe Asp Gln Glu Thr Val Ile Asn Pro		
1	5	10
<210> 23		
<211> 11		
<212> PRT		
<213> 用于表位映射的肽		
<400> 23		
Ala Phe Asn Phe Asp Gln Glu Thr Val Ile Asn		
1	5	10
<210> 24		
<211> 11		
<212> PRT		
<213> 用于表位映射的肽		
<400> 24		
Glu Thr Gly Glu Gln Ile Gln Ser Trp Tyr Lys		
1	5	10
<210> 25		
<211> 12		
<212> PRT		
<213> 用于表位映射的肽		
<400> 25		
Pro Glu Thr Gly Glu Gln Ile Gln Ser Trp Tyr Lys		
1	5	10
<210> 26		
<211> 13		
<212> PRT		
<213> 用于表位映射的肽		
<400> 26		
Asn Pro Glu Thr Gly Glu Gln Ile Gln Ser Trp Tyr Lys		
1	5	10
<210> 27		
<211> 14		
<212> PRT		

<213> 用于表位映射的肽

<400> 27

Ile Asn Pro Glu Thr Gly Glu Gln Ile Gln Ser Trp Tyr Lys

1 5 10

<210> 28

<211> 15

<212> PRT

<213> 用于表位映射的肽

<400> 28

Val Ile Asn Pro Glu Thr Gly Glu Gln Ile Gln Ser Trp Tyr Lys

1 5 10 15

<210> 29

<211> 16

<212> PRT

<213> 用于表位映射的肽

<400> 29

Thr Val Ile Asn Pro Glu Thr Gly Glu Gln Ile Gln Ser Trp Tyr Lys

1 5 10 15

<210> 30

<211> 17

<212> PRT

<213> 用于表位映射的肽

<400> 30

Glu Thr Val Ile Asn Pro Glu Thr Gly Glu Gln Ile Gln Ser Trp Tyr

1 5 10 15

Lys

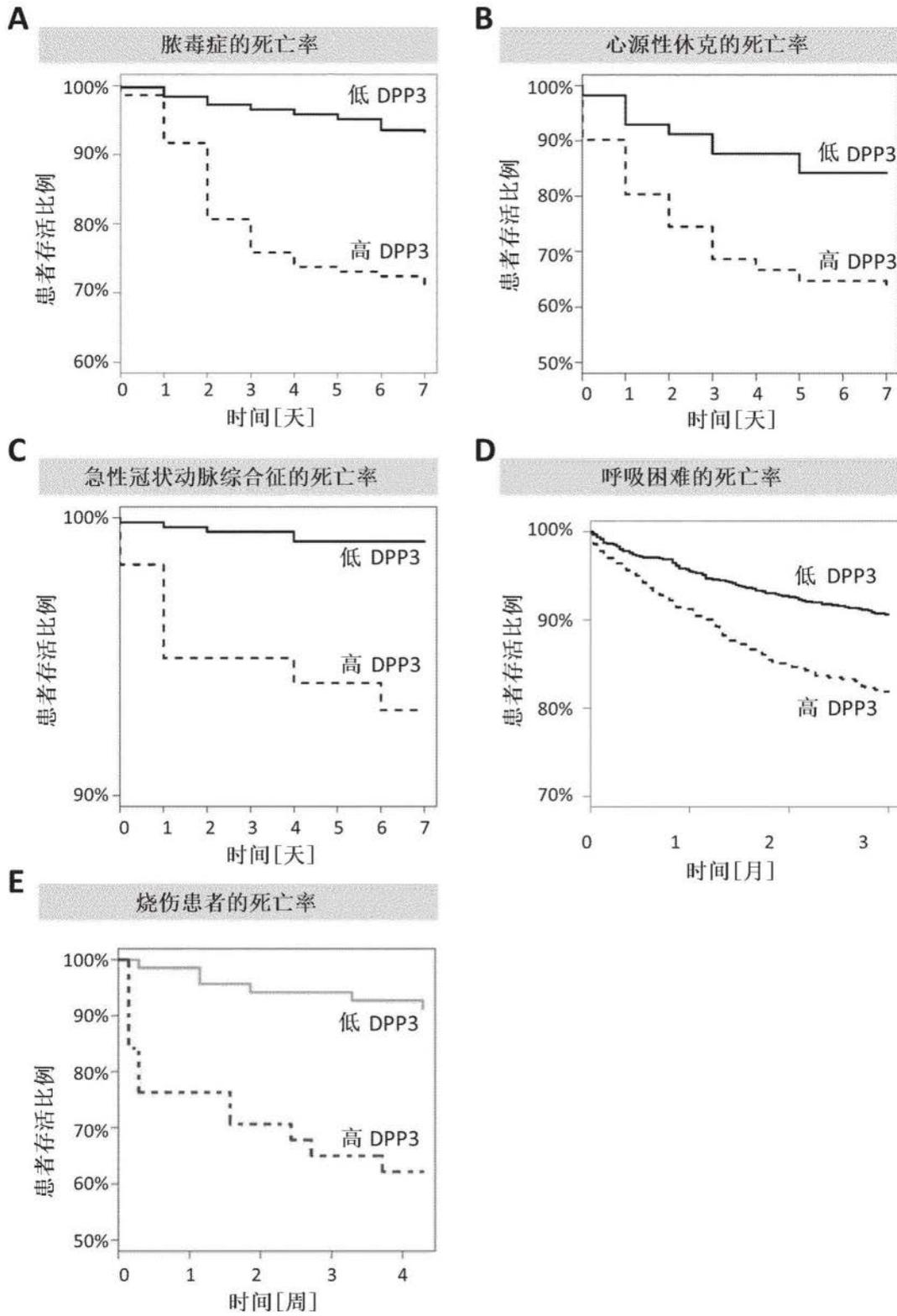


图1

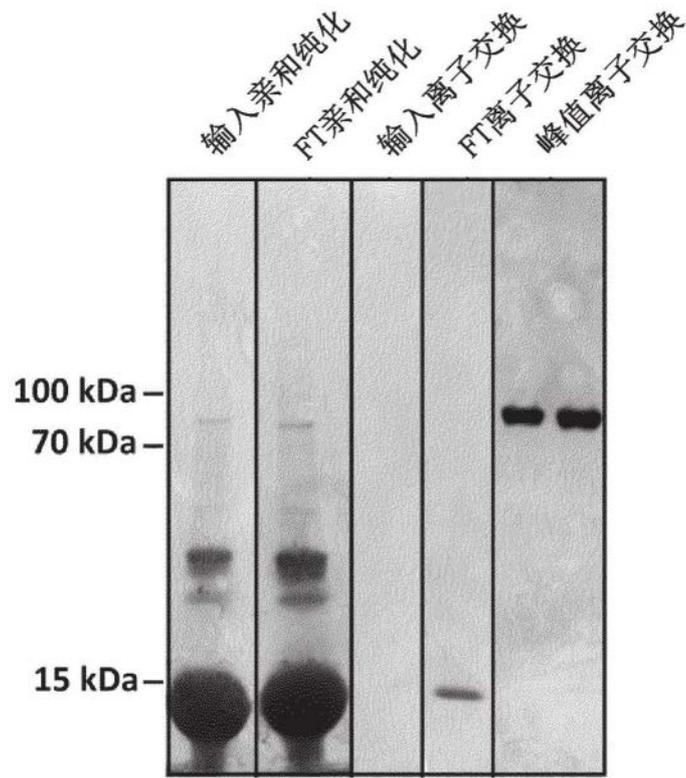


图2

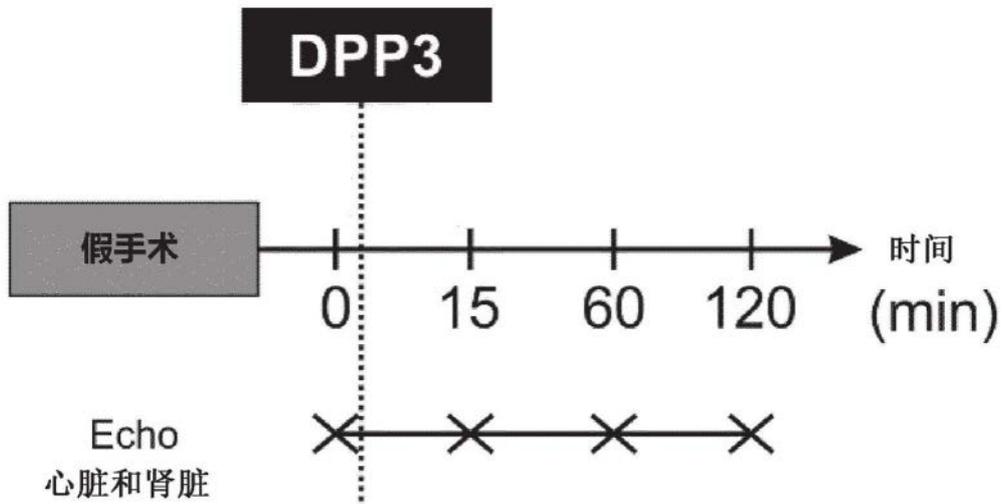


图3

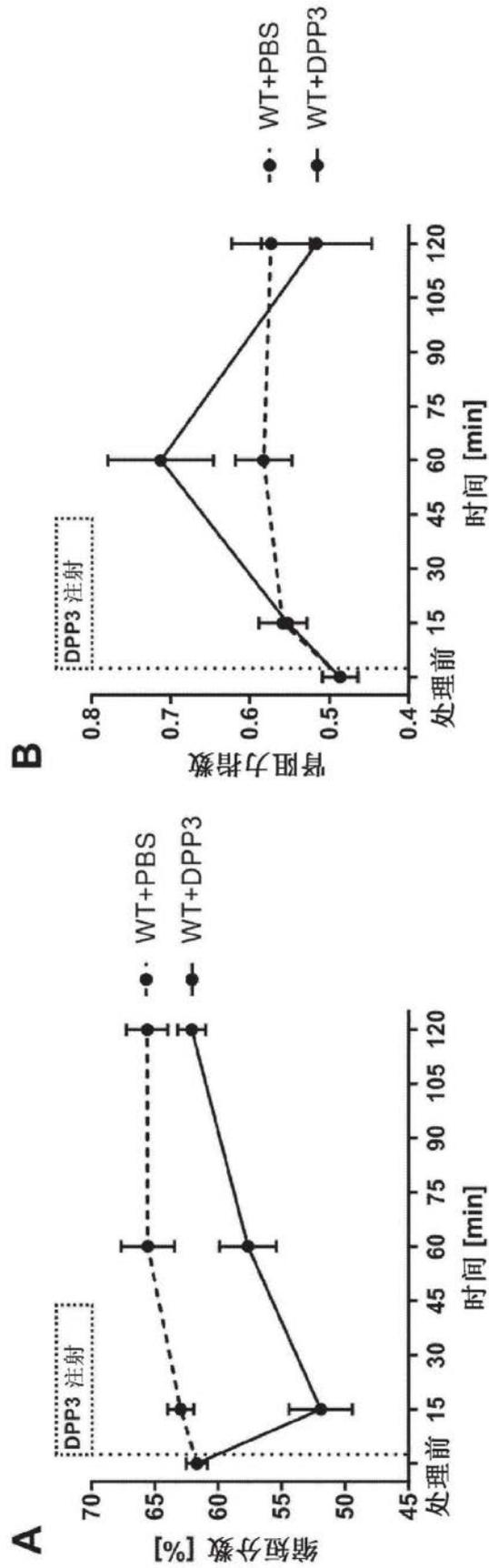


图4

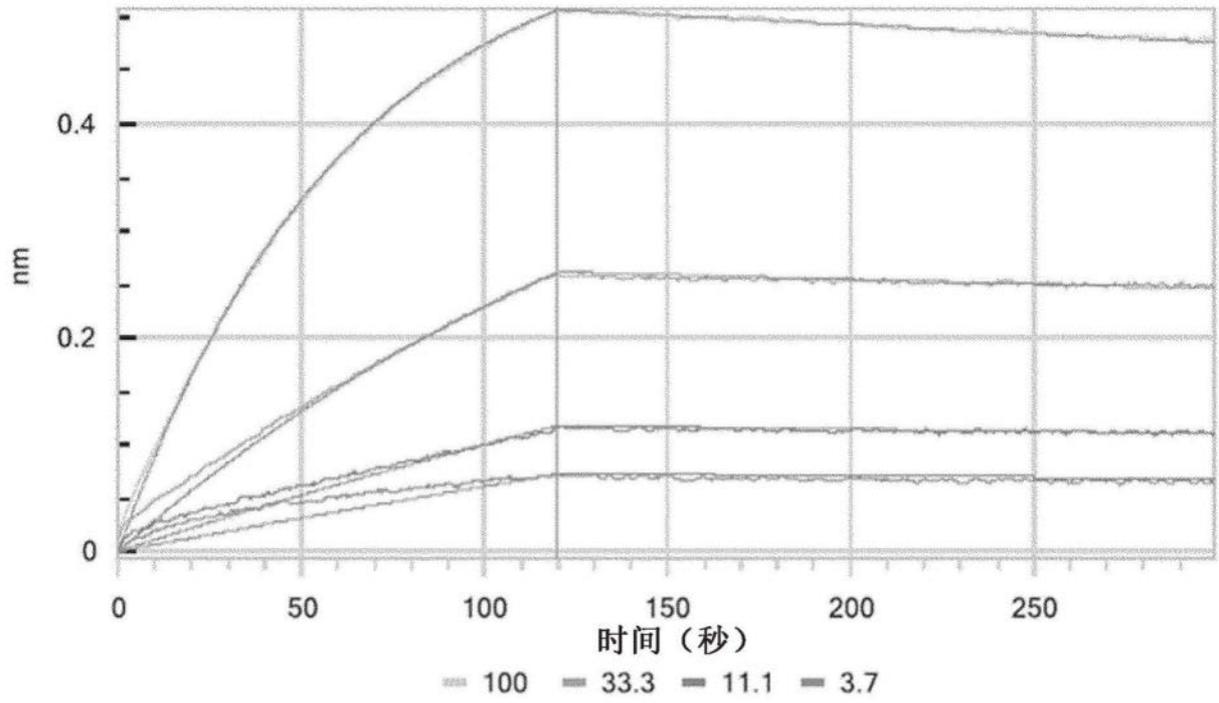


图5

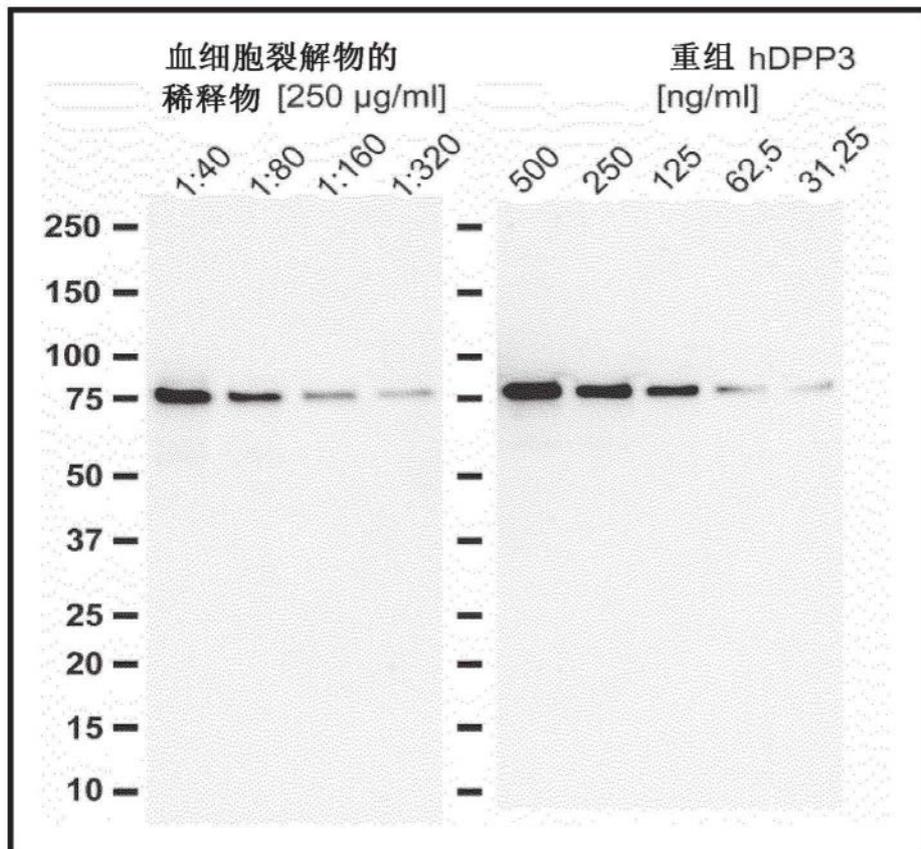


图6

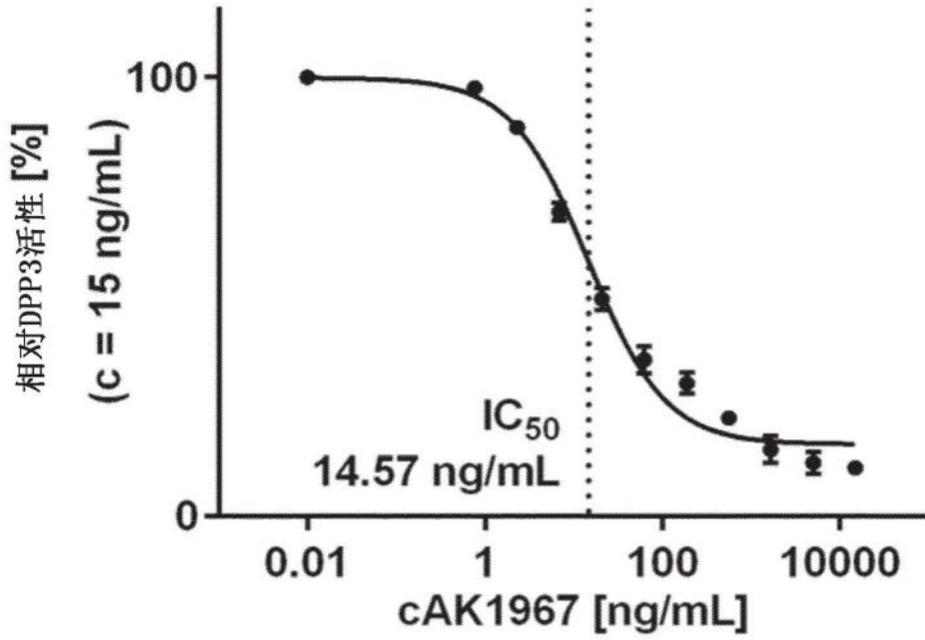


图7

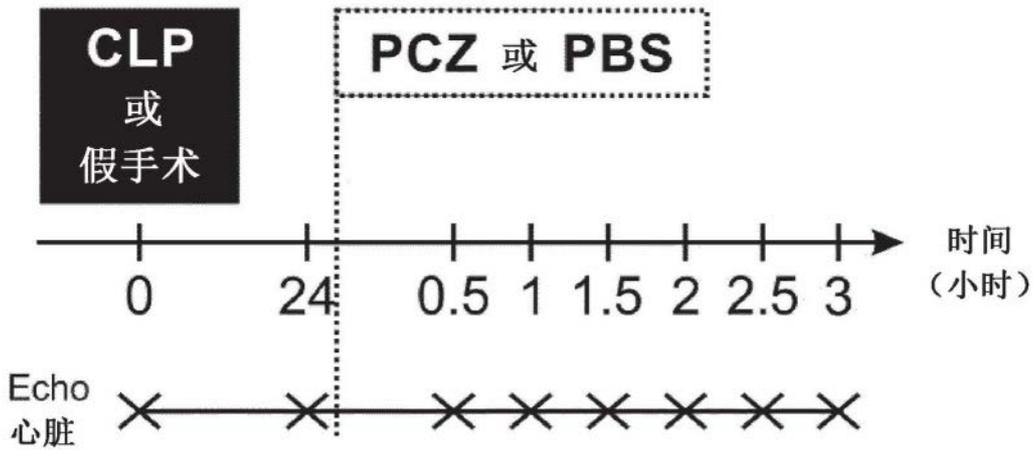


图8

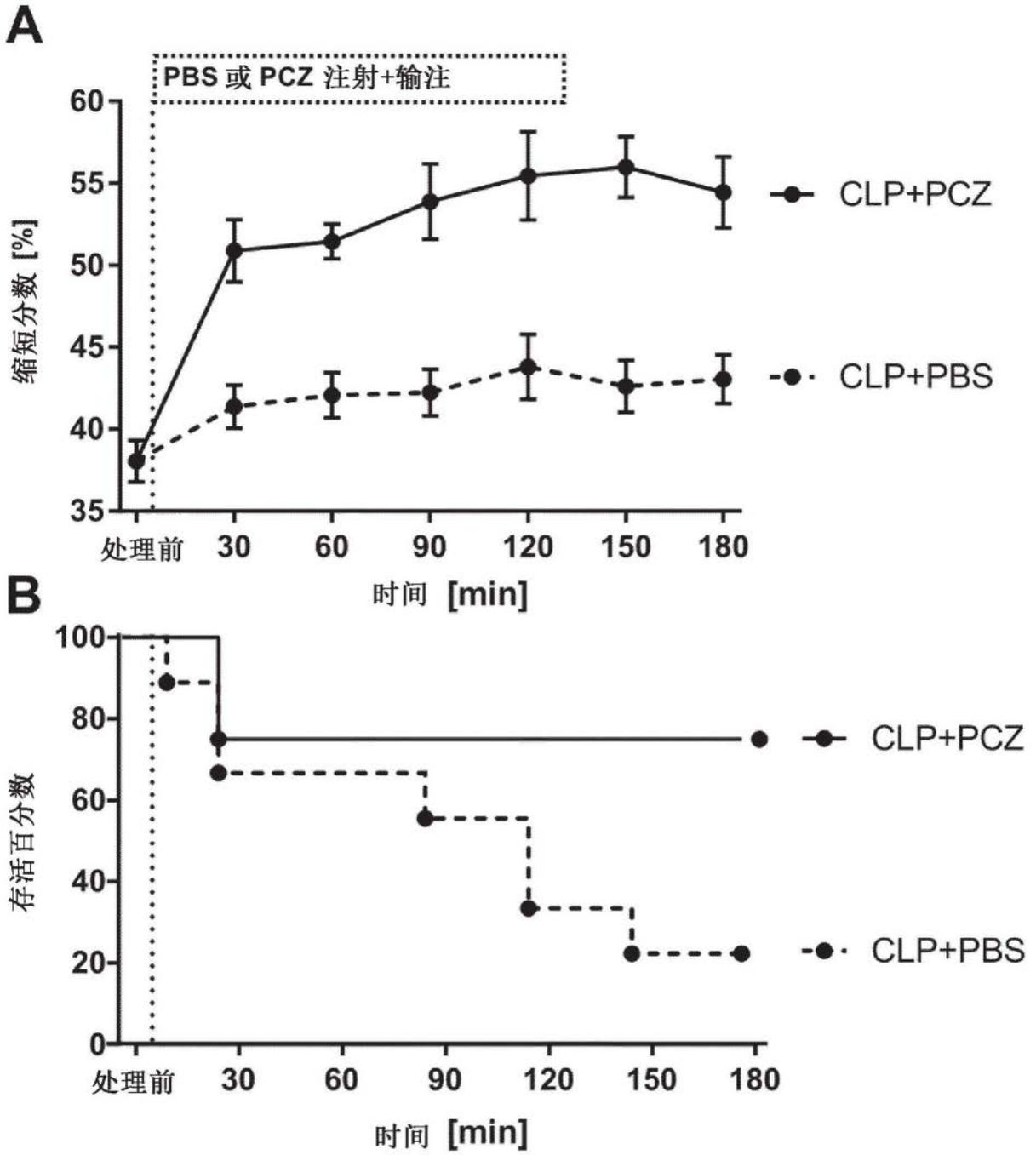


图9

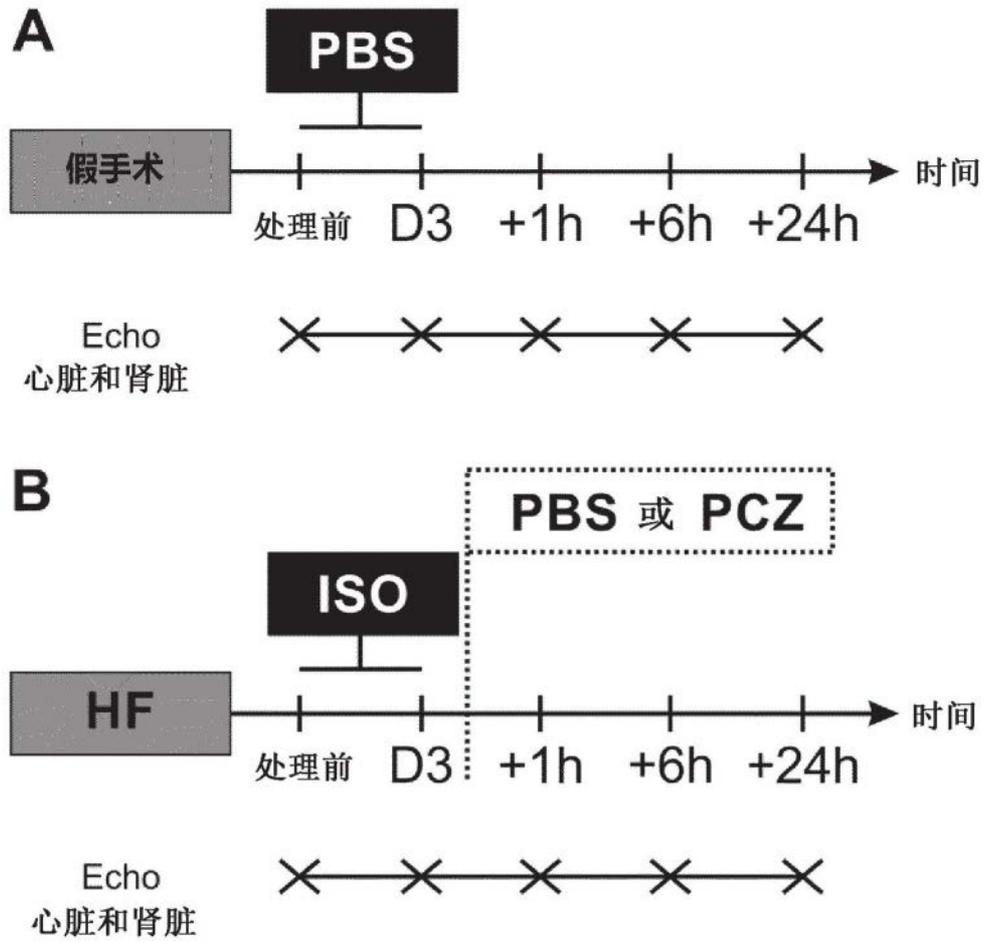


图10

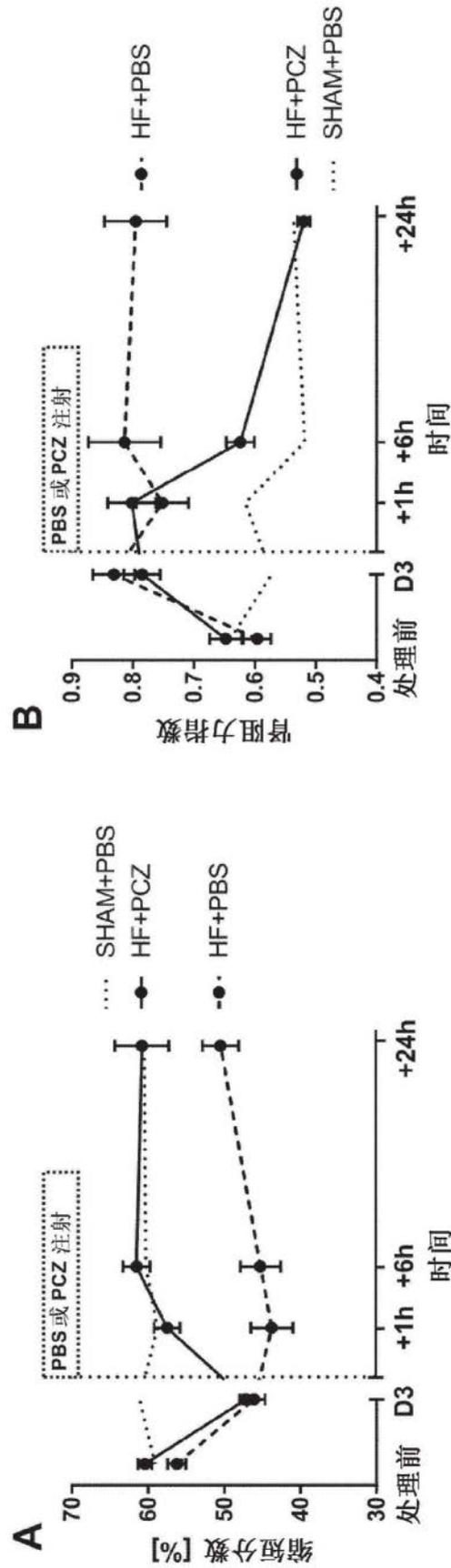


图11

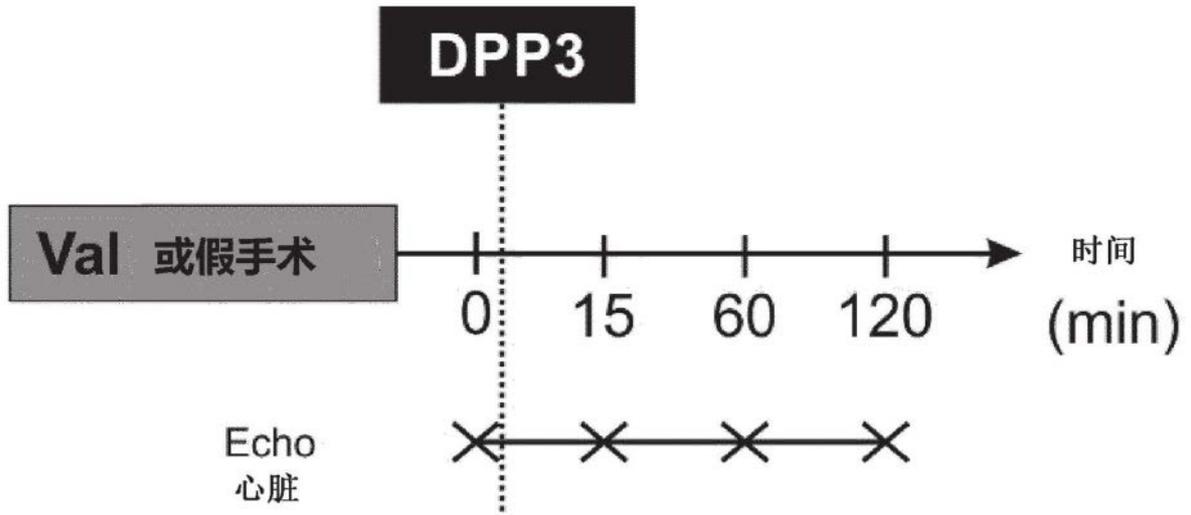


图12

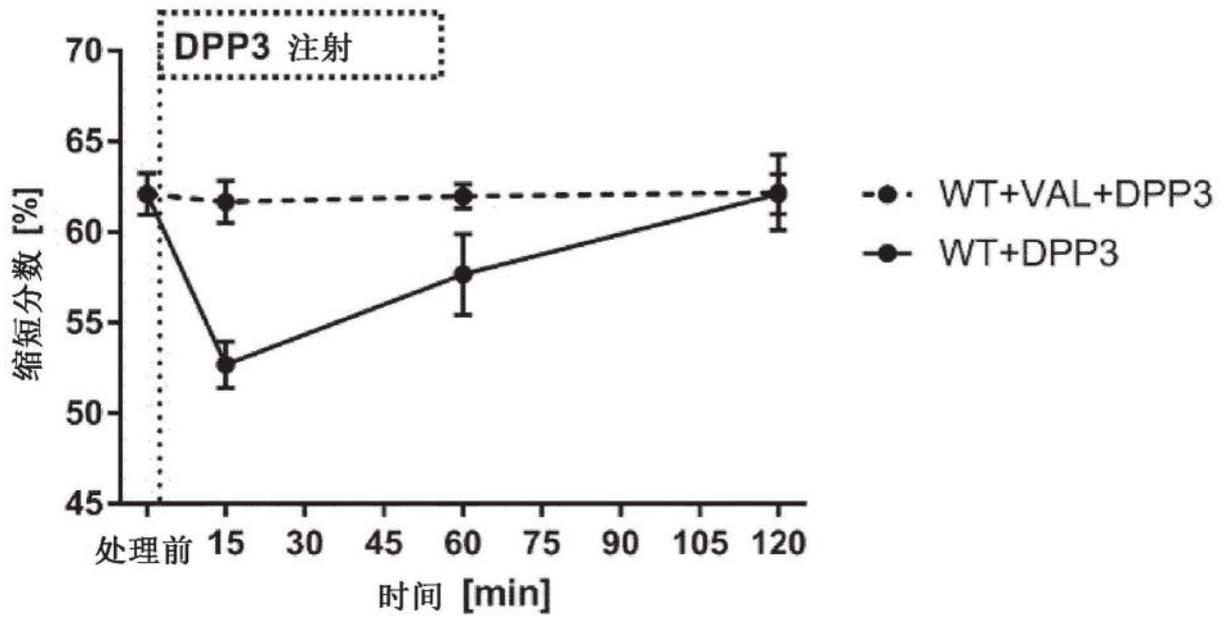


图13

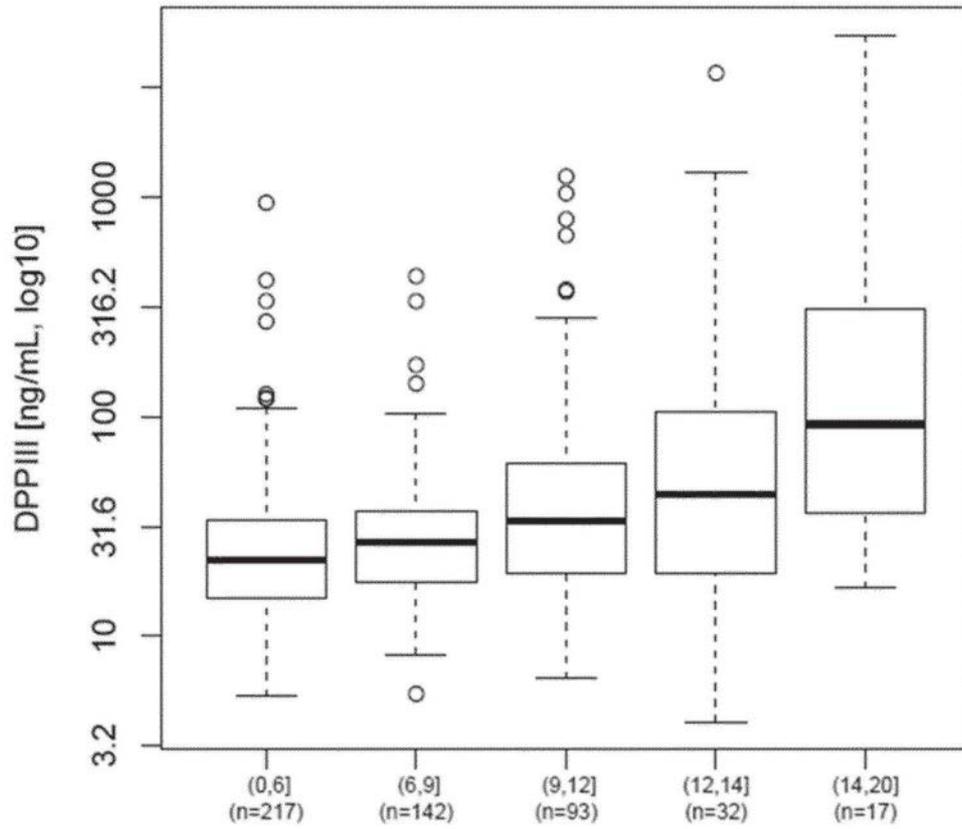


图14

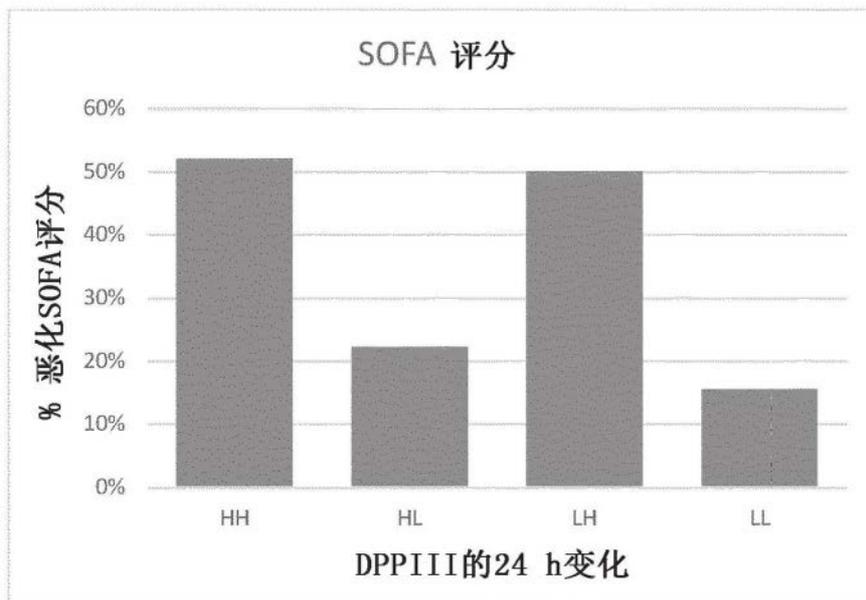


图15

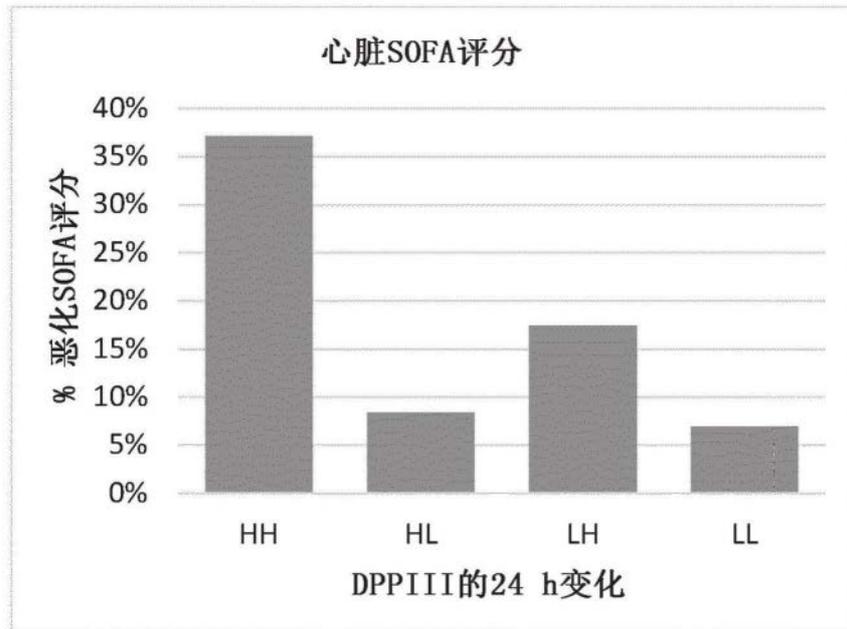


图16A

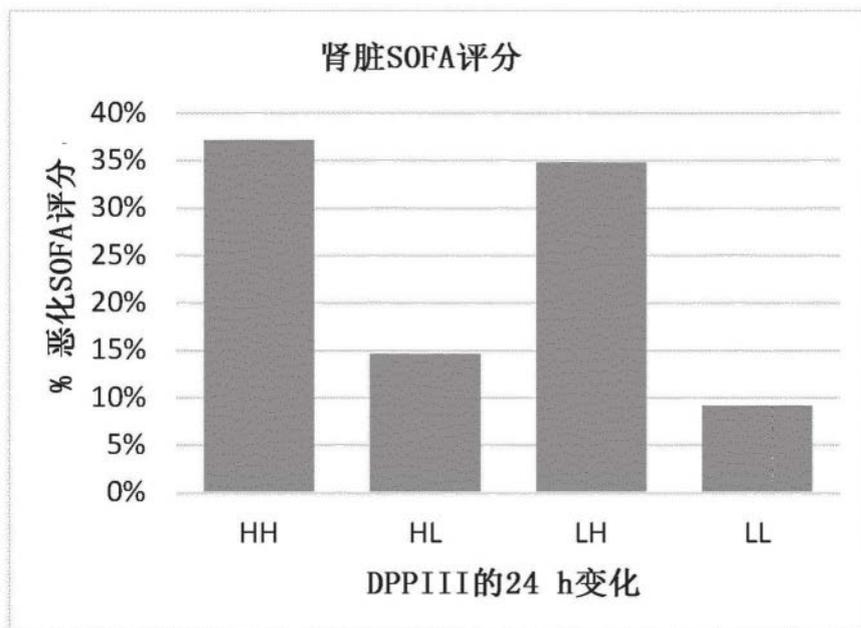


图16B

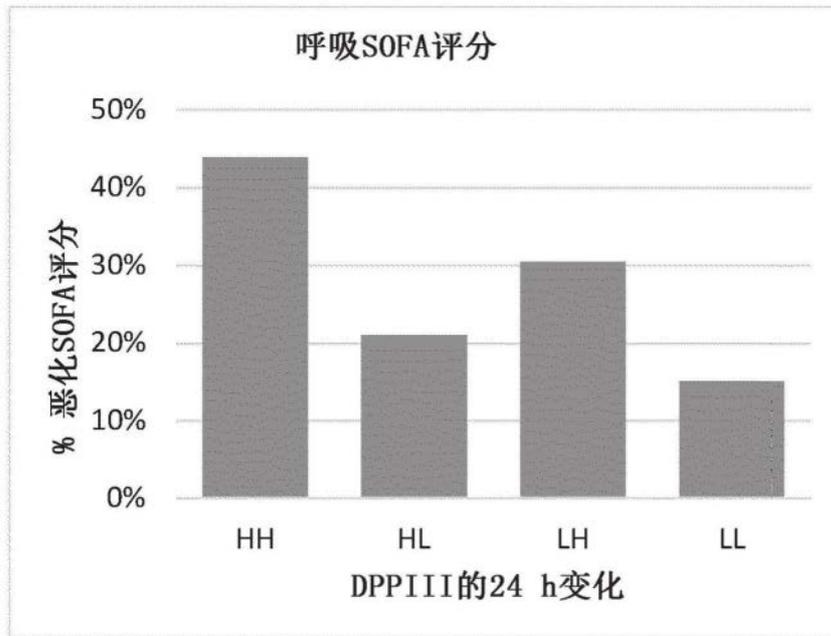


图16C

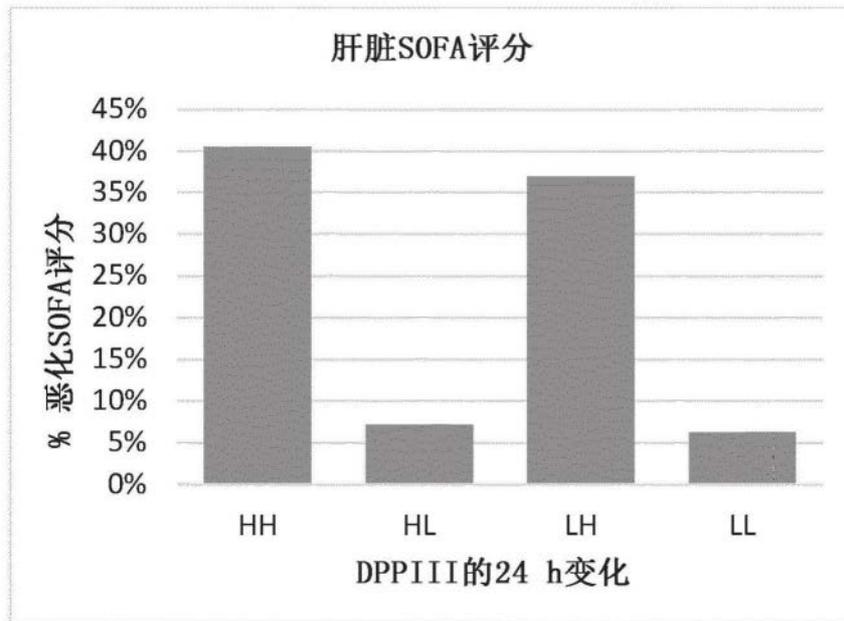


图16D

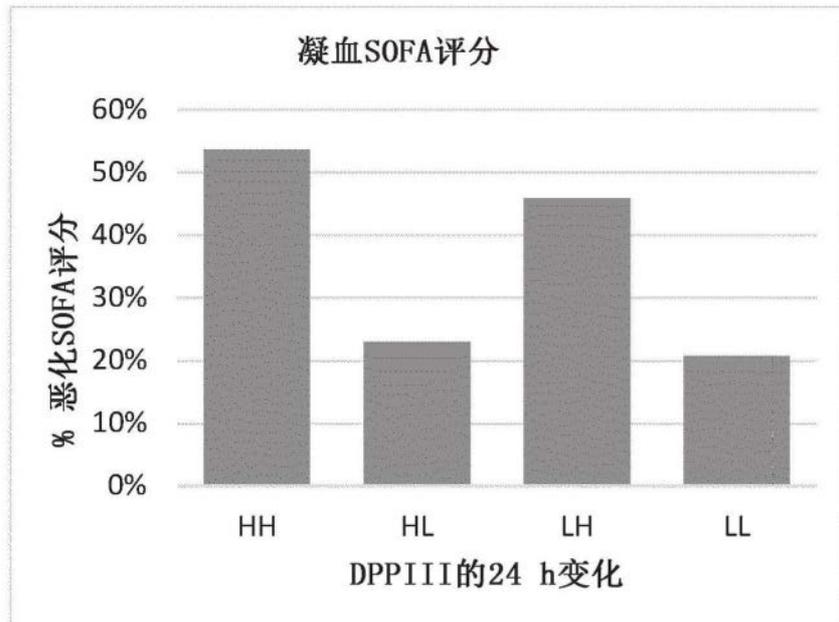


图16E

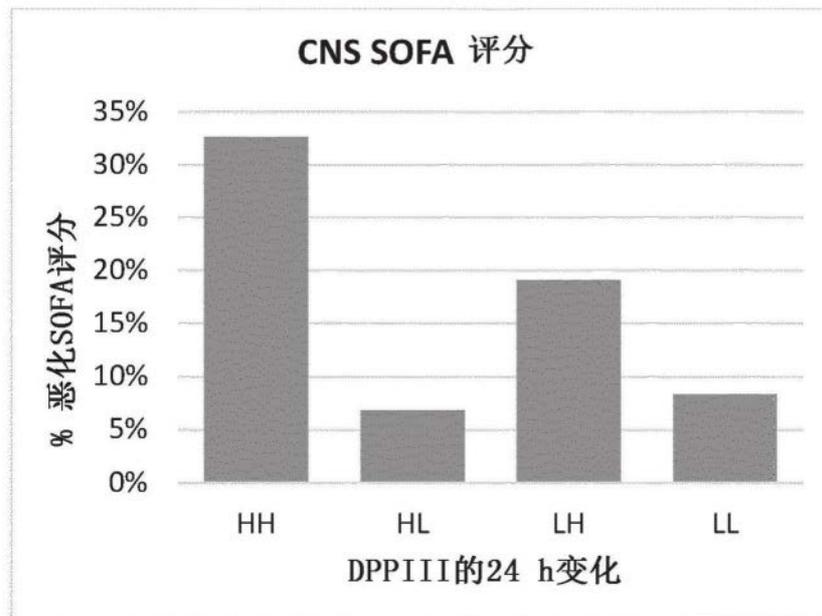


图16F

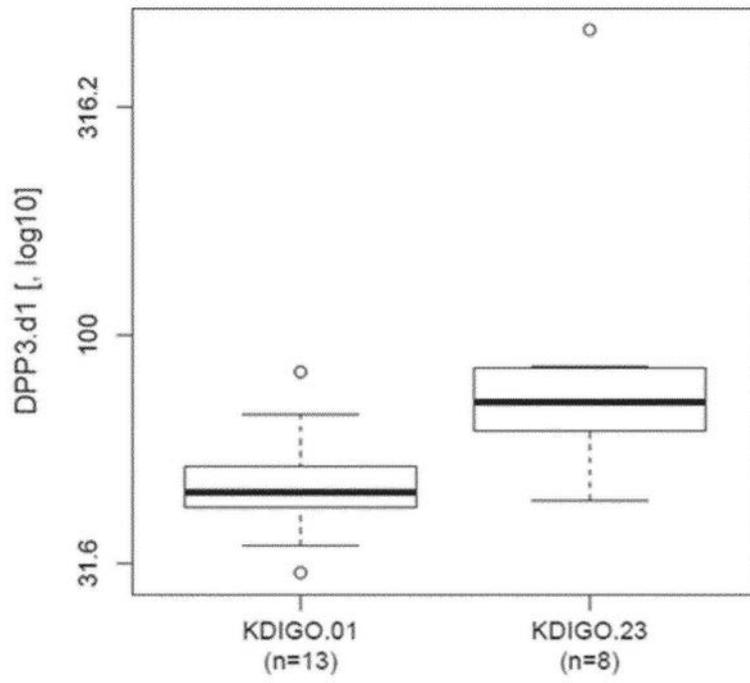


图17

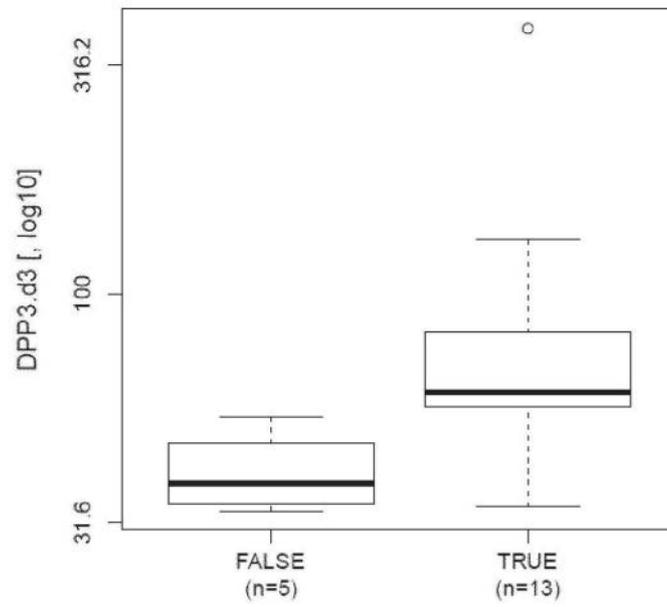


图18A

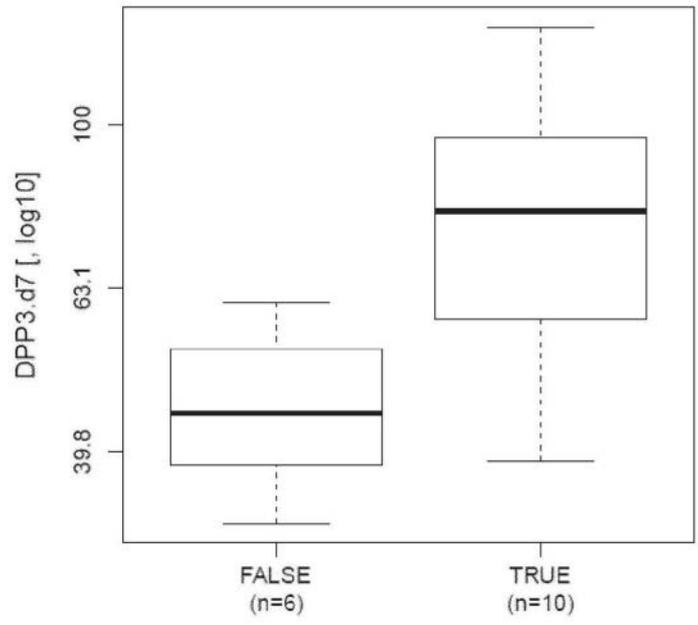


图18B

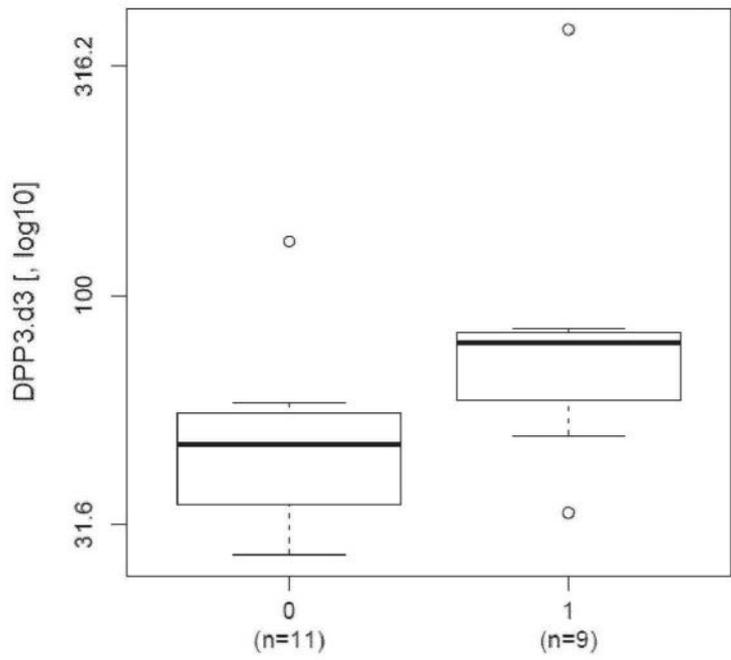


图19A

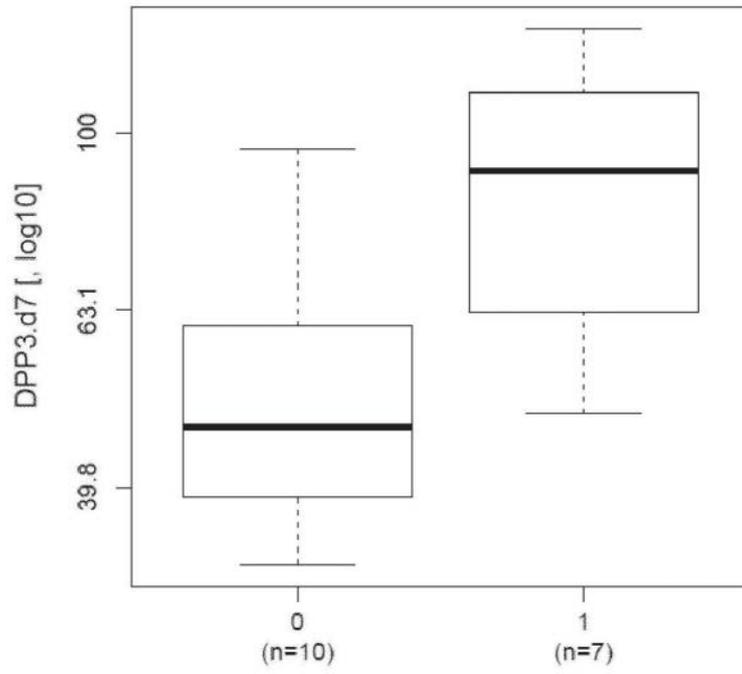


图19B

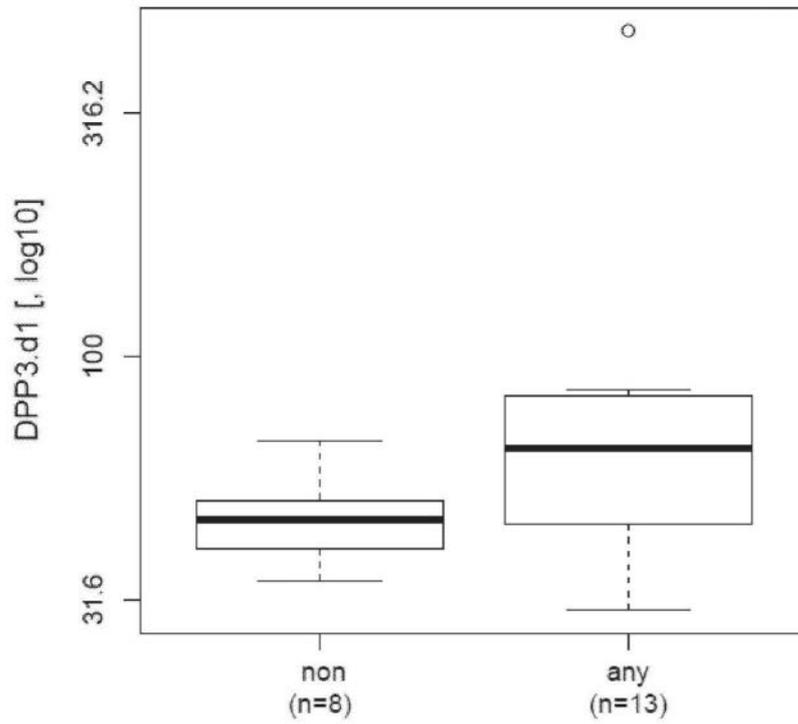


图20

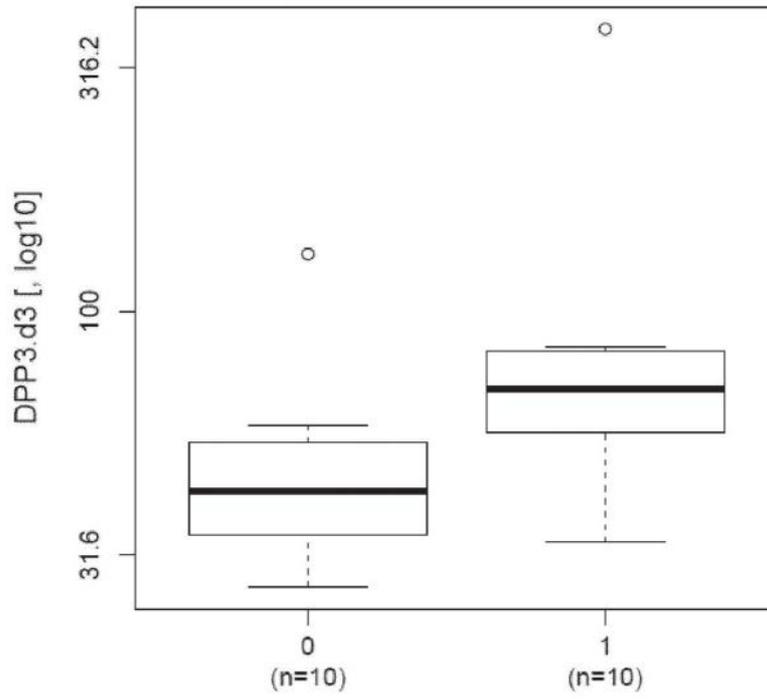


图21A

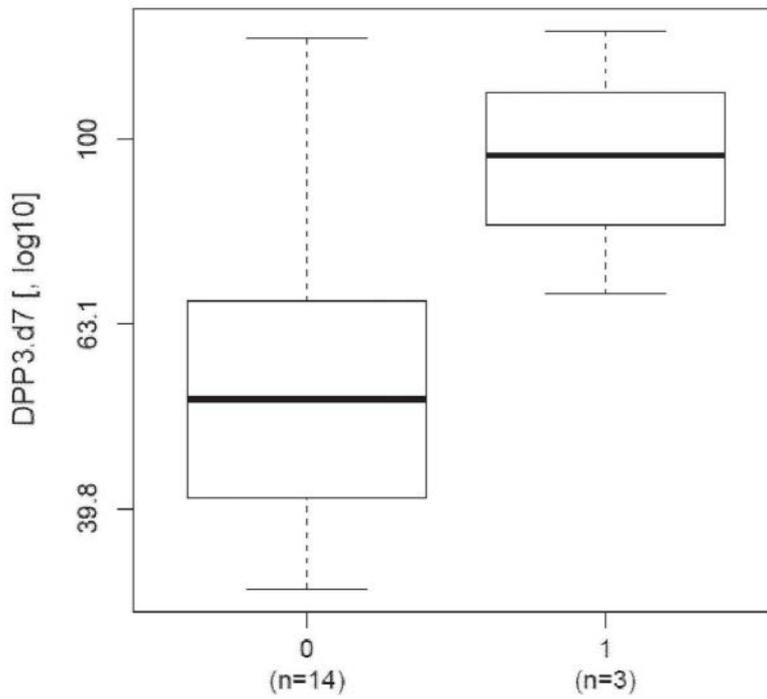


图21B