

SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
EIDGENÖSSISCHES INSTITUT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

(11) CH 713 803 B1

(19)

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

(51) Int. Cl.: G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)

(12) PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 001280/2018

(73) Inhaber:
4TEEN4 Pharmaceuticals GmbH, Neuendorfstrasse 15A
16761 Hennigsdorf (DE)

(22) Anmeldedatum: 20.04.2017

(72) Erfinder:
Andreas Bergmann, 13465 Berlin (DE)

(43) Anmeldung veröffentlicht: 26.10.2017

(74) Vertreter:
Isler & Pedrazzini AG, Postfach 1772
8027 Zürich (CH)

(30) Priorität: 21.04.2016 EP 16166476.8

(86) Internationale Anmeldung:
PCT/EP 2017/059377

(24) Patent erteilt: 15.08.2023

(87) Internationale Veröffentlichung:
WO 2017/182561

(45) Patentschrift veröffentlicht: 15.08.2023

(54) Verfahren zur Diagnose durch Bestimmung von DPP3, Hemmer der Aktivität von DPP3 und Zusammensetzung mit einem Hemmer.

(57) Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf Verfahren zur Bestimmung von aktiver DPP3 in einer Körperflüssigkeitsprobe, ein Assay zur Bestimmung von aktiver DPP3 in einer Körperflüssigkeitsprobe, sowie ein Verfahren zur Diagnose eines Zustands bei einem Subjekt, mit dem nekrotische Prozesse einhergehen bzw. der mit solchen im Zusammenhang stehen.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf Verfahren zur Bestimmung von aktiver DPP3 in einer Körperflüssigkeitsprobe, ein Assay oder Kit zur Bestimmung von aktiver DPP3 in einer Körperflüssigkeitsprobe, sowie ein Verfahren zur Diagnose eines Zustands bei einem Subjekt, mit dem nekrotische Prozesse einhergehen bzw. der mit solchen im Zusammenhang steht.

Stand der Technik

[0002] Dipeptidylpeptidase 3 - auch als Dipeptidylaminopeptidase III, Dipeptidylarylamidase III, Dipeptidylpeptidase III, Enkephalinase B oder Erythrozyten-Angiotensinase bezeichnet; Kurzbezeichnung: DPP3, DPPIII - ist eine Metallopeptidase, die Dipeptide aus physiologisch aktiven Peptiden wie zum Beispiel Enkephalinen und Angiotensinen entfernt.

[0003] DPP3 wurde erstmals 1967 von Ellis & Nuenke identifiziert und in Extrakten aus gereinigter Rinderhypophyse aus dem Vorderlappen auf seine Aktivität gemessen. Das Enzym, das als EC 3.4.14.4 aufgeführt ist, hat ein Molekulargewicht von ca. 83 kDa und ist in Prokaryoten und Eukaryoten in hohem Maße konserviert (Prajapati & Chauhan 2011). Die Aminosäuresequenz der menschlichen Variante ist in SEQ ID Nr. 1 dargestellt. Dipeptidylpeptidase III ist hauptsächlich eine zytosolische Peptidase, die ubiquitär exprimiert wird. Trotz des Fehlens einer Signalfolge haben einige Studien von einer Membranaktivität berichtet (Lee & Snyder 1982).

[0004] DPP3 ist eine zinkabhängige Exopeptidase, die zur Peptidase-Familie M49 gehört. Es verfügt über eine breite Substratspezifität für Oligopeptide von drei/vier bis zehn Aminosäuren verschiedener Zusammensetzung und ist ebenfalls in der Lage, nach Prolinzugabe zu spalten. Es ist bekannt, dass DPP3 Dipeptide aus dem N-Terminus seiner Substrate hydrolysiert, einschließlich Angiotensin II, III und IV, Leu- und Met-Enkephalin; Endomorphin 1 und 2. Als Metallopeptidase entfaltet DPP3 ihre optimale Aktivität bei einem pH-Wert von 8,0-9,0 und kann durch Zugabe von divalenten Metallionen wie zum Beispiel Co^{2+} und Mg^{2+} aktiviert werden. Strukturelle Analysen von DPP3 haben die Katalyse-Motive HELLGH (hDPP3 450-455) und EECRAE (hDPP3 507-512) sowie folgende Aminosäuren, die für die Substratbindung und Hydrolyse wichtig sind, ergeben: Glu316, Tyr, 318, Asp366, Asn391, Asn394, His568, Arg572, Arg577, Lys666 und Arg669 (Prajapati & Chauhan 2011; Kumar et al. 2016; Nummerierung bezieht sich auf die Sequenz in menschlicher DPP3, siehe SEQ ID Nr. 1). Angesichts aller bekannten Aminosäuren- oder Sequenzregionen, die mit der Substratbindung und Hydrolyse im Zusammenhang stehen, kann das aktive Zentrum in menschlicher DPP3 als die Region zwischen den Aminosäuren 316 und 669 definiert werden.

[0005] Die Aktivität von DPP3 kann unspezifisch mit verschiedenen allgemeinen Proteasehemmern (z. B. PMSF, TPCK), Sulfhydryl-Reagenzien (z. B. pHMB, DTNB) und metallischen Chelatbildnern gehemmt werden (EDTA, o-Phenanthrolin; Abrami et al. 2000).

[0006] Die Aktivität von DPP3 kann spezifisch mit verschiedenen Arten von Verbindungen gehemmt werden: Das Peptid Spinorphin ist ein endogener DPP3-Hemmer. Mehrere synthetische Derivate von Spinorphin wie z. B. Tynorphin wurden hergestellt und können nachweislich die Aktivität von DPP3 in unterschiedlichem Ausmaß hemmen (Yamamoto et al. 2000). Weitere veröffentlichte Peptidhemmer von DPP3 sind u. a. Propioxatin A und B (US 4804676) und Propioxatin-A-Analoga (Inaoka et al. 1988).

[0007] DPP3 kann ebenfalls durch kleine Moleküle wie Fluostatine und Benzimidazol-Derivate gehemmt werden. Die Fluostatine A und B sind Antibiotika, die in Streptomyces sp. TA-3391 erzeugt werden, ungiftig sind und die DPP3-Aktivität stark hemmen. Bisher sind 20 verschiedene Derivate von Benzimidazol synthetisiert und veröffentlicht worden (Agi et al. 2007; Rastija et al. 2015), wobei die beiden Verbindungen 1' und 4' die stärkste Hemmwirkung zeigen (Agi et al. 2007). Tabelle 2 enthält eine vollständige Liste der DPP3-Hemmer.

[0008] Die genaue biologische Funktion von DPP3 in der Zellphysiologie ist bisher unbekannt. Die jüngsten Ergebnisse zeigen jedoch, dass DPP3 eine Rolle im Proteinstoffwechsel sowie bei der Blutdruckregelung, Schmerzmodulation und in entzündlichen Prozessen spielt (Prajapati & Chauhan 2011).

[0009] Es konnte in mehreren Publikationen, die sich alle auf intrazelluläre DPP3 beziehen, gezeigt werden, dass DPP3 ein vielversprechender Biomarker ist. Es konnte ebenso nachgewiesen werden, dass die DPP3-Aktivität in Homogenaten von ovarianen und endometrialen Tumoren erhöht ist. Die DPP3-Aktivität erhöht sich sogar mit zunehmender Schwere/Bösartigkeit dieser Tumore noch weiter (Şimaga et al. 1998 und 2003). Die Immunhistologie und Western-Blot-Analyse von Glioblastom-Zelllinien konnten ebenfalls erhöhte DPP3-Werte nachweisen (Singh et al. 2014).

[0010] Es wurde ebenso vorgeschlagen, intrazelluläre oder membranöse DPP3 als einen möglichen arteriellen Risikomarker (US2011008805) und Marker für rheumatoide Arthrose (US2006177886) zu verwenden. Die Patentanmeldung WO2005106486 beansprucht Folgendes: DPP3-Expression und Aktivität als diagnostischer Marker und DPP3 als therapeutisches Ziel für alle Arten von Krankheiten, aufgrund der ubiquitären Expression von DPP3 in oder an der Oberfläche der Zelle. EP1498480 erwähnt die möglichen diagnostischen und therapeutischen Einsatzmöglichkeiten hydrolytischer Enzyme, einschließlich DPP3.

[0011] DPP3 wurde aufgrund ihrer Fähigkeit, mehrere bioaktive Peptide zu spalten, nicht nur als potenzieller Biomarker, sondern auch als potenzielles therapeutisches Ziel ins Gespräch gebracht. Die Überexpression von DPP3 schützt Neu-

roblastomzellen vor oxidativem Stress (Liu et al. 2007). Das Influenza-A Virus ändert seine Host-DPP3-Werte für seine eigene Replikation (Untersuchungen an Zellkulturen, Meliopoulos et al. 2012). Enkephalin- und/oder Angiotensin-abbauende Enzyme, einschließlich DPP3, haben im Allgemeinen ein therapeutisches Potenzial als Ziele für die Behandlung von Schmerzen, Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Krebs, wobei die entsprechenden Hemmer als mögliche Behandlungsmittel gegen Schmerzen, psychische Erkrankungen und Herz-Kreislauf-Erkrankungen in Betracht gezogen werden (Khaket et al. 2012, Patel et al. 1993, Igic et al. 2007).

[0012] Obwohl DPP3 als ein intrazelluläres Protein bekannt ist, wurde DPP3-Aktivität in einigen Körperflüssigkeiten nachgewiesen: retroplazentares Serum (Shimamori et al. 1986), Samenplasma (Vanha-Perttula et al. 1988) und Liquor (Aoyagi et al. 1993). Erhöhte DPP3-Aktivitätswerte im Liquor wurden bei Patienten mit Alzheimer festgestellt (AD, Aoyagi et al. 1993). Wattiaux et al. (2007) haben die Freisetzung von intrazellulärer DPP3 als Marker für abgestorbene und/oder sterbende Zellen in einem Zellkultursystem vorgeschlagen. Es wurde auch vorgeschlagen, dass die Freisetzung von DPP3 aus nekrotischen Zellen die Immunantwort in einem Mausmodell beeinflusst (Gamrekelashvili et al. 2013).

[0013] Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung eines Verfahrens zur spezifischen Bestimmung von aktiver DPP3 in einer Körperflüssigkeitsprobe, d. h. nur die aktive DPP3, aber keine weitere Aminopeptidase außer DPP3 wird bestimmt.

[0014] Es ist eine Aufgabe der Erfindung, entsprechende Assays und Kits zur Verfügung zu stellen.

[0015] Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist die Bereitstellung eines Verfahrens zur Diagnose eines Zustands bei einem Subjekt, mit dem nekrotische Prozesse einhergehen bzw. der mit solchen im Zusammenhang steht.

[0016] Der Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Bestimmung von aktiver DPP3 in einer Körperflüssigkeitsprobe eines Subjekts, umfassend die Schritte

- Kontaktieren der Probe mit einem Fänger-Binder, der spezifisch an Volllängen-DPP3 bindet,
- Trennung der an den Fänger-Binder gebundenen DPP3,
- Hinzufügen des DPP3-Substrats zu der abgetrennten DPP3,
- Quantifizieren der aktiven DPP3 durch Messen der Umwandlung eines DPP3-Substrats.

[0017] In einer spezifischen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist dieses Verfahren ein Enzymfänger-Assay (Enzyme Capture Assay, ECA, siehe z. B. US5612186A, US5601986A).

[0018] Spezifische Bindung an Volllängen-DPP3 bedeutet, dass dieser Fänger-Binder an kein anderes Protein bindet als DPP3. Spezifische Bindung an Volllängen-DPP3 bedeutet, dass dieser Fänger-Binder an keine andere Aminopeptidase bindet als DPP3.

[0019] Ein Binder, der an Volllängen-DPP3 bindet, ist ein Binder, der an das Protein von SEQ ID Nr. 1 bindet. Ein Binder, der an Volllängen-DPP3 bindet, ist ein Binder, der an SEQ ID Nr. 1 bindet.

[0020] In einer spezifischen Ausführungsform hemmt dieser Fänger-Binder die DPP3-Aktivität in einem Flüssigphasenassay weniger als 50 %, bevorzugt weniger als 40 %, bevorzugt weniger als 30 %. Ein Flüssigphasenassay ist ein Assay, in dem die Spaltung der Substrate durch DPP3 in der Flüssigphase stattfindet.

[0021] Die Hemmung der DPP3-Aktivität in einem Flüssigphasenassay durch einen Binder kann erfindungsgemäß wie folgt bestimmt werden: Mögliche DPP3-Fänger-Binder werden mit rekombinanter oder gereinigter nativer DPP3 und spezifischen DPP3-Substraten in einem Flüssigphasenassay inkubiert. Vorzugsweise wird der Fänger-Binder mit der geringsten Hemmfähigkeit für die ECA gewählt. Der Fänger-Binder sollte die DPP3-Aktivität weniger als 50 %, bevorzugt weniger als 40 %, bevorzugt weniger als 30 % hemmen. Der spezifische DPP3-Aktivitäts-Flüssigphasenassay zur Bestimmung der Hemmfähigkeit von möglichen Fänger-Bindern ist detailliert in Beispiel 1 beschrieben und umfasst die folgenden Schritte:

- o Inkubation von 25 ng/ml rekombinantem GST-hDPP3 mit 5 µg/ml des jeweiligen Fänger-Binders und der Pufferkontrolle in 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 und 100 µM ZnCl₂ für 1 Stunde bei Raumtemperatur.
- o Zugabe des fluorogenen Substrats Arg-Arg-βNA (20 µl, 2 mM).
- o Inkubation bei 37 °C und Überwachung der Erzeugung von freiem βNA in einem Twinkle LB 970 Mikroplattenfluorometer (Berthold Technologies GmbH) für 1 Stunde. Die Fluoreszenz des βNA wird durch Anregung mit 340 nm und Messung der Emission bei 410 nm bestimmt.
- o Berechnung des Fluoreszenz-Anstiegsgrads (in relativen Fluoreszenzeinheiten, RFU/min) der verschiedenen Proben. Der Anstiegsgrad von GST-hDPP3 mit Pufferkontrolle wird als 100 %-ige Aktivität festgelegt. Die Hemmfähigkeit eines möglichen Fänger-Binders ist als die Abnahme der GST-hDPP3 Aktivität durch Inkubation mit dem Fänger-Binder in Prozent definiert.

[0022] Im Gegensatz dazu ist ein Festphasenassay ein Assay, bei dem die entsprechenden Bindervorgänge in der Festphase stattfinden (siehe Beispiel 4 und 5).

[0023] Zur Klärung wird noch hinzugefügt, dass das Verfahren zur Bestimmung von aktiver DPP3 als Flüssigphasenassay oder als Festphasenassay durchgeführt werden kann. Die Hemmung der DPP3-Aktivität kann dennoch mit einem Flüssigphasenassay nach dem oben beschriebenen Verfahren bestimmt werden.

[0024] Demnach ist ein Festphasenassay eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung. Kontaktieren der Probe mit einem Fänger-Binder, der spezifisch an Volllängen-DPP3 bindet, kann in einer Flüssigphase (Flüssigphasenfängerassay) stattfinden, wobei der nachfolgende Trennschritt die Immobilisierung des Fänger-Binder-DPP3-Komplexes umfassen kann. Alternativ kann der Fänger-Binder auf einer Oberfläche immobilisiert werden und der Bindervorgang - Fänger-Binder an DPP3 - findet in einer Festphase statt (Festphasenfängerassay).

[0025] In einer spezifischen Ausführungsform sollte der Fänger-Binder das DPP3 vorzugsweise nicht bei oder an die Aminosäurenregion 316-669 aus SEQ ID Nr. 1 binden, um die völlige Hemmung der DPP3 zu vermeiden und um die DPP3-Aktivität um weniger als 50 %, bevorzugt um weniger als 40 %, bevorzugt um weniger als 30 % im oben erklärten Flüssigphasenassay zu hemmen. Die Aminosäurenregion 316-669 aus SEQ ID Nr. 1 umfasst das aktive Zentrum von DPP3 und den Bereich der Substratbindung (Prajapati & Chauhan 2011; Kumar et al. 2016).

[0026] Die DPP3-Aktivität kann durch den Nachweis der Abspaltungsprodukte von DPP3-spezifischen Substraten gemessen werden.

[0027] Zu den bekannten Peptidhormon-Substraten gehören Angiotensin II, III und IV, Leu-enkephalin, Met-enkephalin, Endomorphin 1 und 2, Valorphin, β -Casomorphin, Dynorphin, Proctolin, ACTH (adenocorticotropisches Hormon) und MSH (Melanozytenstimulierendes Hormon; Abrami et al. 2000, Bar şun et al. 2007, Dhanda et al. 2008). Die Spaltung der genannten Peptidhormone sowie anderer nicht markierter Oligopeptide (z. B. Ala-Ala-Ala-Ala, Dhanda et al. 2008) kann durch den Nachweis der jeweiligen Abspaltungsprodukte überwacht werden. Nachweisverfahren umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf HPLC-Analyse (z. B. Lee & Snyder 1982), Massenspektrometrie (z. B. Abrami et al. 2000), H1-NMR Analyse (z. B Vandenberg et al. 1985), Kapillarzonenelektrophorese (CE; z. B. Bar şun et al. 2007), Dünnschichtchromatografie (z. B. Dhanda et al. 2008) oder Umkehrphasen-Chromatografie (z. B. Mazocco et al. 2006).

[0028] Der Nachweis der Fluoreszenz durch Hydrolyse von fluorogenen Substraten durch DPP3 ist ein Standardverfahren zur Überwachung der DPP3-Aktivität. Diese Substrate sind spezifische Di- oder Tripeptide (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), die an ein Fluorophor gekoppelt sind. Fluorophore umfassen, sind aber nicht beschränkt auf β -Naphtylamid (2-Naphtylamid, β NA, 2NA), 4-Methoxy- β -naphtylamid (4-Methoxy-2-naphtylamid) und 7-Amido-4-methylcumarin (AMC, MCA; Abrami et al. 2000, Ohkubo et al. 1999). Die Spaltung dieser fluorogenen Substrate führt zur Freisetzung von fluoreszierendem β -Naphtylamin bzw. 7-Amino-4-methylcumarin. In einem Flüssigphasenassay oder einem ECA werden das Substrat und DPP3 inkubiert, zum Beispiel in einer Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten, wobei die Fluoreszenz mit einem Fluoreszenzdetektor (Ellis & Nuenke 1967) gemessen wird. Zusätzlich können die mit DPP3 beladenen Proben immobilisiert und mit Elektrophorese auf einem Gel verteilt werden, wonach die Gele mit fluorogenen Substraten (z. B. Arg-Arg- β NA) und Fast Garnet GBC gefärbt werden und die fluoreszierenden Proteinbänder mit einem Fluoreszenzreader nachgewiesen werden (Ohkubo et al. 1999).

[0029] Die gleichen Peptide (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) können an Chromophoren wie zum Beispiel p-Nitroanilid-Diazetat gekoppelt werden. Der Nachweis der Farbänderung aufgrund der Hydrolyse von chromogenen Substraten kann zur Überwachung der DPP3-Aktivität eingesetzt werden.

[0030] Eine weitere Option für den Nachweis der DPP3-Aktivität ist ein Protease-Glo™-Assay (im Handel erhältlich bei Promega). In dieser Ausführungsform des Verfahrens werden DPP3-spezifische Di- oder Tripeptide (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) an Aminoluciferin gekoppelt. Nach der Spaltung durch DPP3 wird Aminoluciferin freigesetzt und dient als Substrat für eine gekoppelte Luciferase-Reaktion, die eine nachweisbare Lumineszenz emittiert.

[0031] In einer bevorzugten Ausführungsform wird die DPP3-Aktivität durch Zugabe des fluorogenen Substrats Arg-Arg- β NA und die Überwachung der Fluoreszenz in Echtzeit gemessen.

[0032] In einer spezifischen Ausführungsform des Verfahrens zur Bestimmung der Hemmwirkung von DPP3-Bindern und/oder der DPP3-Aktivität in einer Körperflüssigkeitsprobe eines Subjekts kann der Binder aus der Gruppe von Antikörper, Antikörperfragment oder nicht-Ig-Gerüst ausgewählt werden.

[0033] Ein Antikörper gemäß der vorliegenden Erfindung ist ein Protein mit einem oder mehreren Polypeptiden, die wesentlich von Immunglobulinen codiert sind, die spezifisch ein Antigen binden. Zu den anerkannten Immunglobulinen gehören die Kappa-, Lambda-, Alpha- (IgA), Gamma- (IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄), Delta- (IgD), Epsilon- (IgE) und Mu- (IgM)-Gene der konstanten Region sowie die unzähligen Immunglobulinge der variablen Region. Leichte Immunglobulinketten der vollen Länge sind in der Regel ca. 25 kD oder 214 Aminosäuren lang. Schwere Immunglobulinketten der vollen Länge sind in der Regel ca. 50 kD oder 446 Aminosäuren lang. Leichte Ketten werden durch ein Gen der variablen Region am NH₂-Terminus (ca. 110 Aminosäuren lang) und durch ein Kappa- oder Lambda-Gen der konstanten Region am COOH-

Terminus codiert. Schwere Ketten werden in ähnlicher Weise durch ein Gen der variablen Region (ca. 116 Aminosäuren lang) und durch ein Gen der anderen konstanten Region codiert.

[0034] Die grundlegende strukturelle Einheit eines Antikörpers ist in der Regel ein Tetramer, das aus zwei identischen Paaren von Immunglobulinketten besteht, wobei jedes Paar eine leichte und eine schwere Kette enthält. In jedem Paar binden die variablen Regionen der leichten und der schweren Kette an ein Antigen und die konstanten Regionen vermitteln Effektorfunktionen. Immunglobuline treten auch in einer Vielfalt von anderen Formen, darunter zum Beispiel Fv, Fab, und (Fab')₂, sowie als bifunktionelle hybride Antikörper und Einzelketten auf (z. B., Lanzavecchia et al. 1987; Huston et al. 1988; Bird et al. 1988; Hood et al. 1984; Hunkapiller & Hood, 1986). Eine variable Region einer leichten oder schweren Kette eines Immunglobulins umfasst eine Rahmenregion, die von drei hypervariablen Regionen, auch als Komplementarität bestimmende Regionen (Complementarity Determining Regions, CDR) bekannt, unterbrochen wird (siehe Kabat et al. 1983). Wie oben bereits angemerkt, sind die CDR in erster Linie verantwortlich für die Bindung an ein Epitop eines Antigens. Ein Immunkomplex ist ein Antikörper wie zum Beispiel ein monoklonaler Antikörper, chimärer Antikörper, humanisierter Antikörper oder humaner Antikörper oder ein funktionales Antikörperfragment, der spezifisch an das Antigen gebunden ist.

[0035] Chimäre Antikörper sind Antikörper, deren leichte und schwere Kettengene aus Immunglobulingenen der variablen und konstanten Region aus verschiedenen Spezies hergestellt wurden, in der Regel durch gentechnische Verfahren. Zum Beispiel können die variablen Segmente der Gene aus einem monoklonalen Antikörper (Maus) mit menschlichen konstanten Segmenten wie z. B. Kappa und Gamma 1 und Gamma 3 verbunden werden. Ein Beispiel eines therapeutischen chimären Antikörpers ist somit ein hybrides Protein, das aus der variablen oder Antigen-bindenden Domäne eines Maus-Antikörpers und der konstanten oder Effektor-Domäne eines humanen Antikörpers zusammengesetzt ist, obwohl auch andere Säugetierarten verwendet werden können, oder die variable Region kann durch molekulare Techniken hergestellt werden. Verfahren zur Herstellung chimärer Antikörper sind im Stand der Technik bekannt, siehe z. B. US-Patent Nr. 5,807,715. Ein „humanisiertes“ Immunglobulin ist ein Immunglobulin, das eine menschliche Rahmenregion sowie eine oder mehrere CDRs aus nicht-menschlichem Immunglobulin (wie zum Beispiel Maus, Ratte oder synthetisch) umfasst. Das nichtmenschliche Immunglobulin, das die CDRs bereitstellt, wird als „Spender“ bezeichnet, während das menschliche Immunglobulin, das den Rahmen zur Verfügung stellt, als „Akzeptor“ bezeichnet wird. In einer Ausführungsform stammen alle CDRs aus dem Spender-Immunglobulin in einem humanisierten Immunglobulin. Konstante Regionen müssen nicht vorhanden sein, müssen aber, wenn sie vorhanden sind, im Wesentlichen mit den konstanten Regionen des menschlichen Immunglobulins identisch sein, d. h. mindestens 85-90 %, z. B. ca. 95 % oder mehr identisch sein. Daher sind alle Teile eines humanisierten Immunglobulins, außer möglicherweise der CDRs, im Wesentlichen identisch mit den entsprechenden Teilen der natürlichen menschlichen Immunglobulin-Sequenzen. Ein „humanisierter Antikörper“ ist ein Antikörper, der eine humanisierte leichte Immunglobulinkette und eine humanisierte schwere Immunglobulinkette enthält.

[0036] Ein humanisierter Antikörper bindet an das gleiche Antigen wie der Spender-Antikörper, der die CDRs zur Verfügung stellt. Der Akzeptor-Rahmen eines humanisierten Immunglobulins oder Antikörpers kann ggf. eine begrenzte Anzahl von Substitutionen durch Aminosäuren aus dem Spender-Rahmen enthalten. Humanisierte oder andere monoklonale Antikörper können zusätzliche konservative Aminosäuresubstitutionen enthalten, die im Wesentlichen keine Auswirkung auf die Antigenbindung oder andere Immunglobulinfunktionen haben. Beispiele solcher konservativer Substitutionen sind u. a. gly, ala; val, ile, leu; asp, glu; asn, gln; ser, thr; lys, arg; und phe, tyr. Humanisierte Immunglobuline können mithilfe von gentechnischen Verfahren hergestellt werden (z. B. siehe US-Patent Nr. 5,585,089). Ein humaner Antikörper ist ein Antikörper, in dem die leichten und schweren Kettengene menschlichen Ursprungs sind. Humane Antikörper können mit Verfahren, die aus dem Stand der Technik bekannt sind, hergestellt werden. Humane Antikörper können durch das Immortalisieren einer humanen B-Zelle, die den Antikörper von Interesse absondert, hergestellt werden. Zum Beispiel kann eine Immortalisierung durch eine EBV-Infektion oder durch Fusionieren einer humanen B-Zelle mit einer Myelom- oder Hybridomzelle zur Herstellung einer Triomzelle erreicht werden. Humane Antikörper können auch mit Phage-Display-Verfahren erzeugt werden (siehe z. B. PCT Veröffentlichung Nr. WO91/17271; PCT Veröffentlichung Nr. WO92/001047; PCT Veröffentlichung Nr. WO92/20791, auf die hiermit verwiesen wird) oder aus einer humanen kombinatorischen monoklonalen Antikörper-Bibliothek ausgewählt werden (siehe Morphosys-Webseite). Humane Antikörper können auch unter Verwendung von transgenen Tieren erzeugt werden, die ein menschliches Immunglobulin-Gen tragen (siehe zum Beispiel PCT Veröffentlichung Nr. WO93/12227; PCT Veröffentlichung Nr. WO91/10741, auf die hiermit verwiesen wird).

[0037] DPP3-Antikörper können somit die im Stand der Technik bekannten Formate haben. Beispiele sind humane Antikörper, monoklonale Antikörper, humanisierte Antikörper, chimäre Antikörper und CDR-transplantierte Antikörper. In einer bevorzugten Ausführungsform sind erfindungsgemäße Antikörper rekombinant erzeugte Antikörper, z. B. als IgG, ein typisches Volllängen-Immunglobulin, oder Antikörperfragmente, die mindestens die F-variable Domäne von schweren und/oder leichten Ketten, z. B. als chemisch gekoppelte Antikörper (Fragment-Antigenbindung) enthalten, einschließlich aber nicht beschränkt auf Fab-Fragmente, einschließlich Fab-Minikörper, einzelkettige Fab-Antikörper, monovalente Fab-Antikörper mit Epitop-Markierungen, z. B. Fab-V5Sx2; bivalente Fab (Mini-Antikörper) dimerisiert mit der CH3-Domäne; bivalente oder multivalente Fab, z. B. gebildet durch Multimerisierung mithilfe einer heterologen Domäne, z. B. über Dimerisierung von dHLX Domänen, z. B. Fab-dHLX-FSx2; F(ab')₂-Fragmente, scFv-Fragmente, multimerisierte multivalente oder/und multispezifische scFv-Fragmente, bivalente und/oder bispezifische Diakörper, BITE® (bispecific T-cell engager - bispezifische T-Zell-Antikörper), trifunktionale Antikörper, polyvalente Antikörper, z. B. aus einer anderen Klasse als G; Einzel-Domänen Antikörper, z. B. Nanokörper aus Kamel- oder Fisch- Immunglobulinen und viele weitere.

[0038] Zusätzlich zu anti-DPP3-Antikörpern, sind andere Biopolymer-Gerüste aus dem Stand der Technik bekannt, um ein Zielmolekül zu komplexieren, und wurden bei der Erzeugung von hochgradig zielspezifischen Biopolymeren eingesetzt. Beispiele sind Aptamere und Spiegelmere, Anticaline und Conotoxine.

[0039] Nicht-Ig-Gerüste können Proteingerüste sein und können zur Nachahmung von Antikörpern verwendet werden, da sie in der Lage sind, an Liganden oder Antigene zu binden. Nicht-Ig-Gerüste können ausgewählt werden aus der Gruppe umfassend Tetranectin-basierte nicht-Ig-Gerüste (z. B. beschrieben in US 2010/0028995), Fibronectin-Gerüste (z. B. beschrieben in EP 1266 025; Lipocalin-basierte Gerüste ((z. B. beschrieben in WO 2011/154420); Ubiquitin-Gerüste (z. B. beschrieben in WO 2011/073214), Übertragungsgerüste (z. B. beschrieben in US 2004/0023334), Protein-A Gerüste (z. B. beschrieben in EP 2231860), Ankyrin Repeat-basierte Gerüste (z.B. beschrieben in WO 2010/060748), Mikroprotein-Gerüste (vorzugsweise Mikroproteine, die einen Zystinknoten bilden) (z. B. beschrieben in EP 2314308), Gerüste auf Basis der Fyn SH3 Domäne (z. B. beschrieben in WO 2011/023685) Gerüste auf Basis der EGFR-A-Domäne (z. B. beschrieben in WO 2005/040229) und Gerüste auf Basis der Kunitz-Domäne (z. B. beschrieben in EP 1941867). Nicht-Ig Gerüste können Peptid- oder Oligonukleotid-Aptamere sein. Aptamere werden in der Regel durch die Auswahl aus einem großen zufällig erstellten Sequenz-Pool erzeugt und sind entweder kurze Stränge von Oligonukleotiden (DNA, RNA oder XNA; Xu et al. 2010, Deng et al. 2014) oder kurze variable Peptid-Domänen, die an einem Proteingerüst befestigt sind (Li et al. 2011).

[0040] In einer Ausführungsform der Erfindung können Anti-DPP3-Antikörper erfindungsgemäß wie folgt erzeugt werden: Mäuse werden entweder mit rekombinantem DPP3 (z. B. GST-hDPP3 von USBio, Salem, USA), mit Peptiden, die Teile der DPP3-Aminosäuresequenz enthalten, z. B. konjugiert an BSA oder mit nativer, gereinigter DPP3 (z. B. aus menschlichen Erythrozyten) geimpft (Abrami et al. 1988).

[0041] Balb/c Mäuse wurden am Tag 0 intraperitoneal (i.p.) mit 100 µg rekombinanter GST-hDPP3, nativer, gereinigter hDPP3 oder DPP3-Peptid-BSA-Konjugaten injiziert (in TiterMax Gold Adjuvans emulgiert), mit 100 µg am Tag 14 (in vollständigem Freund-Adjuvans emulgiert) und mit 50 µg am Tag 21 und 28 (in unvollständigem Freund-Adjuvans). Am 49. Tag erhielten die Tiere eine intravenöse (i. v.) Injektion mit 50 µg GST-hDPP3, nativer, gereinigter hDPP3 oder DPP3-Peptid-BSA-Konjugaten in Kochsalzlösung. Drei Tage später wurden die Mäuse getötet und es wurde eine Immunzellfusion durchgeführt.

[0042] Splenozyten aus den immunisierten Mäusen und Zellen der Myelom-Zelllinie SP2/0 wurden mit 1 ml 50 % Polyethylenglykol für 30 Sekunden bei 37 °C fusioniert. Nach dem Waschen wurden die Zellen in Zellkulturplatten mit 96 Kavitäten angesetzt. Hybridklone wurden durch Anzüchten im HAT-Medium [RPMI 1640 Kulturmedium mit Zusatz von 20 % fötalem Kälberserum und HAT-Zusatz] gewählt. Nach einer Woche wurde das HAT-Medium in drei Durchgängen mit HT-Medium ersetzt. Danach wurde wieder das normale Zellkulturmedium verwendet.

[0043] Zwei Wochen nach der Fusion wurden die Zellkulturüberstände in erster Linie auf rekombinante DPP3-bindende Ig-Antikörper untersucht. Zu diesem Zweck wurde rekombinante GST-markierte DPP3 (USBiologicals, Salem USA) in Platten mit 96 Kavitäten immobilisiert (100 ng / Kavität) und mit 50 µl Zellkulturüberstand pro Kavität für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Waschen der Platte wurden 50 µl/Kavität POD-Kaninchchen Anti-Maus IgG hinzugefügt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschritt wurden jeder Kavität 50 µl einer chromogenen Lösung (3,7 mM o-Phenyldiamin in Citrat-/ Wasserstoff-Phosphatpuffer, 0,012 % H₂O₂) zugegeben, für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und die chromogene Reaktion durch Zugabe von 50 µl 4N Schwefelsäure abgestoppt. Die Absorption wurde bei 490 nm nachgewiesen.

[0044] Die positiv getesteten Mikrokulturen wurden zur Vermehrung auf Platten mit 24 Kavitäten übertragen. Nach erneutem Testen wurden die ausgewählten Kulturen kloniert und mit der verdünnungsbegrenzenden Technik nochmals kloniert. Danach wurden die Isotypen bestimmt.

[0045] Antikörper gegen GST-markierte humane DPP3 oder DPP3-Peptide wurden mit standardmäßigen Herstellungsverfahren für Antikörper erzeugt (Marx et al., 1997) und mit Protein A gereinigt. Die Antikörper-Reinheiten betrugen ≥ 90 % auf Grundlage der SDS-Gelelektrophorese-Analyse.

[0046] Antikörper können mittels Phage-Display gemäß folgendem Verfahren erzeugt werden:

Die humanen nativen Antikörper-Genbibliotheken HAL 7/8 wurden für die Isolierung von rekombinanten einzelkettigen F-variablen Domänen (scFv) gegen DPP3-Peptid verwendet. Die Antikörper-Genbibliotheken wurden mit einer Panning-Strategie, umfassend die Zuhilfenahme von Peptiden mit einem Biotin-Tag, das über zwei verschiedene Spacer mit der DPP3-Peptidsequenz verbunden war, gescreent. Dabei wurde eine Mischung aus Panning-Runden mit nichtspezifisch gebundenem Antigen und Streptavidin-gebundenem Antigen verwendet, um den Hintergrund von nichtspezifischen Bindern zu minimieren. Die eluierten Phagen aus der dritten Panning-Runde wurden zur Erzeugung von monoklonalen scFv-exprimierenden E. coli-Stämmen verwendet. Der Überstand aus der Kultivierung dieser Klonstämme wurde direkt für einen ELISA Antigen-Test verwendet (siehe auch Hust et al. 2011; Schütte et al. 2009).

[0047] Die Humanisierung der murinen Antikörper kann gemäß dem folgenden Verfahren durchgeführt werden: Zur Humanisierung eines Antikörpers mit murinem Ursprung wird die Antikörpersequenz auf die strukturelle Wechselwirkung der

Rahmenregionen (FR) mit den CDR und dem Antigen untersucht. Auf der Grundlage der strukturellen Modellierung wird eine geeignete FR menschlichen Ursprungs ausgewählt und die murinen CDR-Sequenzen werden in die menschliche FR transplantiert. Unterschiede in der Aminosäuresequenz der CDRs oder FRs können eingeführt werden, um strukturelle Wechselwirkungen wiederherzustellen, die durch den Wechsel der Spezies für die FR Sequenzen ausgelöscht wurden. Eine solche Wiedererlangung der strukturellen Wechselwirkungen kann durch einen Zufallsansatz mittels Phage-Display-Bibliotheken oder mit einem direkten Ansatz durch molekulare Modellierung erreicht werden. (Almagro & Fransson 2008).

[0048] In einer alternativen Ausführungsform wird das DPP3-Antikörperformat aus einer Gruppe umfassend Fv-Fragment, scFv-Fragment, Fab-Fragment, scFab-Fragment, F(ab)₂-Fragment und scFv-Fc Fusionsprotein ausgewählt. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform wird das Antikörperformat aus einer Gruppe umfassend scFab-Fragment, Fab-Fragment, scFv-Fragment und deren auf Bioverfügbarkeit optimierte Konjugate wie z. B. PEGylierte Fragmente ausgewählt.

[0049] In einer spezifischen Ausführungsform des Verfahrens zur Bestimmung von aktiver DPP3 in einer Körperflüssigkeitsprobe eines Subjekts ist der Binder ein Antikörper.

[0050] In einer Ausführungsform kann ein Fänger- oder Binder-Assay durchgeführt werden, um die DPP3 zu bestimmen und/oder zu quantifizieren. Ein Binder, der mit DPP3-Protein reagiert, aber in einem Flüssigphasenassay nicht zu mehr als 50 %, bevorzugt zu weniger als 40 %, bevorzugt zu weniger als 30 % in die Peptidase-Aktivität eingreift, kann auf einer Festphase immobilisiert werden. In einer Ausführungsform zur Verhinderung der Hemmung von DPP3 sollte der Fänger-Binder vorzugsweise DPP3 nicht in der Aminosäurenregion 316-669 der SEQ ID Nr. 1 binden. Die Region der Aminosäuren 316-669 aus SEQ ID Nr. 1 umfasst das aktive Zentrum von DPP3 und den Bereich der Substratbindung (Prajapati & Chauhan 2011; Kumar et al. 2016).

[0051] In einer spezifischen Ausführungsform des Verfahrens zur Bestimmung von aktiver DPP3 in einer Körperflüssigkeitsprobe eines Subjekts kann der Binder aus der Gruppe von Antikörper, Antikörperfragment, nicht-Ig-Gerüst oder Aptameren ausgewählt werden.

[0052] In einer spezifischen Ausführungsform des Verfahrens zur Bestimmung von aktiver DPP3 in einer Körperflüssigkeitsprobe eines Subjekts wird dieser Fänger-Binder, der mit DPP3 reagiert, auf einer Festphase immobilisiert.

[0053] Die Probe fließt über den immobilisierten Binder und DPP3, falls vorhanden, bindet an den Binder und wird ebenfalls zum Nachweis immobilisiert. Daraufhin kann ein Substrat hinzugefügt werden und das Reaktionsprodukt kann nachgewiesen werden, um das Vorhandensein oder die Menge von DPP3 in der Probe anzuzeigen. Für die Zwecke der vorliegenden Beschreibung kann der Begriff „Festphase“ verwendet werden, der alle Materialien oder Behälter einschließt, in denen oder auf denen der Assay durchgeführt werden kann, welche einschließen, aber nicht beschränkt sind auf: poröse Materialien, nicht-poröse Materialien, Reagenzgläser, Kavitäten, Glasplättchen, Agarose-Harze (z. B. Sepharose von GE Healthcare Life Sciences), magnetische Materialien (z. B. Dynabeads™ oder Pierce™ Magnetkugeln von Thermo Fisher Scientific) usw.

[0054] Binder aus Proteinen oder aus Peptiden hervorgehen (z. B. Antikörper, Antikörperfragmente, nicht-Ig Gerüst) werden durch Verfahren umfassend physikalische Adsorption (z. B. durch elektrostatische Wechselwirkung oder hydrophobe Wechselwirkung), Bioaffinitäts-Immobilisierung (z. B. Avidin-Biotin, Protein A/G/L, His-Tag und Ni²⁺-NTA, GST-Tag und Gluthation, DNA-Hybridisierung, Aptamere), kovalente Bindung (z. B. Amin und N-Hydroxysuccinimid) oder eine Kombination dieser Immobilisierungsverfahren auf der Festphase immobilisiert (Kim & Herr 2013). Binder, die aus Oligonukleotiden hergestellt wurden (z. B. Aptamere) können durch Nutzung des (Strept-)Avidin-Biotin-Systems auf der Festphase immobilisiert werden (Müller et al. 2012, Deng et al. 2014).

[0055] In einer spezifischen Ausführungsform dieses Verfahrens zur Bestimmung von aktiver DPP3 in einer Körperflüssigkeitsprobe eines Subjekts ist dieser Trennschritt ein Waschschnitt, mittels dessen Bestandteile der Probe, die nicht an den Fänger-Binder gebunden sind, aus der aufgefangenen DPP3 entfernt werden. Dieser Trennschritt kann jeder weitere Schritt sein, der die DPP3, die an diesen Fänger-Binder gebunden ist, von den Bestandteilen dieser Körperflüssigkeitsprobe trennt.

[0056] In einer spezifischen Ausführungsform dieses Verfahrens zur Bestimmung von aktiver DPP3 in einer Körperflüssigkeitsprobe eines Subjekts wird die DPP3-Substratumwandlung durch immobilisierte DPP3 mit einem Verfahren gemessen (ermittelt), das ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend: Fluoreszenz fluorogener Substrate (z. B. Arg-Arg-βNA, Arg-Arg-AMC), Farbveränderung chromogener Substrate, Lumineszenz von Substraten, die an Aminoluciferin (Promega Protease-Glo™ Assay) gekoppelt sind, Massenspektrometrie, HPLC/ FPLC (Umkehrphasen-Chromatografie, Größenausschlußchromatografie), Dünnschichtchromatografie, Kapillarzonenelektrophorese, Gelelektrophorese gefolgt von Aktivitätsfärbung (immobilisierte, aktive DPP3) oder Western-Blot (Abspaltungsprodukte).

[0057] In einer spezifischen Ausführungsform dieses Verfahrens zur Bestimmung von aktiver DPP3 in einer Körperflüssigkeitsprobe eines Subjekts kann das Substrat ausgewählt sein aus der Gruppe umfassend Angiotensin II, III und IV, Leu-enkephalin, Met-enkephalin, Endomorphin 1 und 2, Valorphin, β-Casomorphin, Dynorphin, Proctolin, ACTH und MSH oder Di- und Tripeptiden, die an ein Fluorophor, ein Chromophor oder ein Aminoluciferin (Promega Protease-Glo™-Assay) gekoppelt sind. Di- oder Tripeptide, die von DPP3 gespalten werden, umfassen, sind aber nicht beschränkt auf 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. Fluorophore umfassen, sind aber nicht beschränkt auf β-Naphthylamid (2-Naphthylamid, βNA, 2NA), 4-Methoxy-β-naphthylamid

(4-Methoxy-2-naphtylamid) und 7-Amido-4-methylcumarin (AMC, MCA; Abramic et al. 2000, Ohkubo et al. 1999). Die Spaltung dieser fluorogenen Substrate führt zur Freisetzung von fluoreszierendem β-Naphtylamin bzw. 7-Amino-4-methylcumarin. Chromophore umfassen, sind aber nicht beschränkt auf p-Nitroanilid-diazetat (pNA). Die Hydrolyse einer Peptid-pNA-Bindung in den chromogenen Substraten führt zur Freisetzung von pNA, das dadurch wiederum seine Farbe ändert. Damit ist die Änderung der Absorption (DA/min.) direkt proportional zur enzymatischen Aktivität. Unter Verwendung des Protease-Glo™ Assay von Promega wird nach der Spaltung durch DPP3 Aminoluciferin freigesetzt und dient als Substrat für eine gekoppelte Luciferase-Reaktion, die eine nachweisbare Lumineszenz emittiert.

[0058] In einer bevorzugten Ausführungsform wird die DPP3-Aktivität durch Zugabe des fluorogenen Substrats Arg-Arg-βNA und die Überwachung der Fluoreszenz in Echtzeit gemessen. In einer spezifischen Ausführungsform dieses Verfahrens zur Bestimmung von aktiver DPP3 in einer Körperflüssigkeitsprobe eines Subjekts wird die Probe ausgewählt aus der Gruppe umfassend Vollblut, Serum, Plasma, Liquor, Urin, Speichel, Sputum und Pleuraergüsse.

[0059] In einer spezifischen Ausführungsform des Verfahrens zur Bestimmung von aktiver DPP3 in einer Körperflüssigkeitsprobe eines Subjekts ist diese Probe eine Blutprobe, ausgewählt aus der Gruppe umfassend Vollblut, Serum und Plasma.

[0060] Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist ein Assay oder Kit zur Bestimmung von aktiver DPP3 in einer Körperflüssigkeitsprobe eines Subjekts, umfassend

- Ein Fänger-Binder, der spezifisch an Volllängen-DPP3 bindet
- Ein DPP3-Substrat.

[0061] Das Kit kann zusätzlich einen Kalibrator enthalten:

- Ein Kalibrator kann aus Proben mit bekannter DPP3-Konzentration (nativ, gereinigt oder rekombinant) bestehen.
- Ein Kalibrator kann aus Abspaltungsprodukten selbst bestehen, wie zum Beispiel freie Fluorophore (z. B. 2-Naphthylamin), freie Chromophore (z. B. p-Nitroanilid) oder freies Luciferin.

[0062] Das Kit kann zusätzlich Waschreagenzien enthalten:

- Waschreagenz (jegliche wässrige Pufferlösung mit oder ohne Detergenz. Wir haben 8 mM Tris-HCl, pH 7,5, 60 mM NaCl, 0,02 % Tween 20 verwendet.).

[0063] In einer spezifischen Ausführungsform ist dieser Assay ein Enzymfänger-Assay (ECA, siehe z. B. US5612186A, US5601986A).

[0064] In einer spezifischen Ausführungsform hemmt dieser Fänger-Binder, der spezifisch an Volllängen-DPP3 bindet, weniger als 50 % der DPP3-Aktivität in einem Flüssigphasenassay, bevorzugt weniger als 40 %, weiter bevorzugt 30 %. Für die Definition des Flüssigphasenassays siehe oben. In einer spezifischen Ausführungsform zur Verhinderung der Hemmung von DPP3 sollte der Fänger-Binder DPP3 nicht in der Region um das aktive Zentrum und die Substratbindungsregion (Aminosäuren 316-669 der SEQ ID Nr. 1) binden.

[0065] In einer spezifischen Ausführungsform dieses Assays oder Kits zur Bestimmung von aktiver DPP3 in einer Körperflüssigkeitsprobe eines Subjekts kann dieser Binder aus der Gruppe von Antikörper, Antikörperfragment oder nicht-Ig-Gerüst ausgewählt sein.

[0066] In einer spezifischen Ausführungsform dieses Assays oder Kits zur Bestimmung von aktiver DPP3 in einer Körperflüssigkeitsprobe eines Subjekts ist der Binder ein Antikörper.

[0067] Der Begriff „Antikörper“ umfasst allgemein monoklonale und polyklonale Antikörper und deren bindende Fragmente, insbesondere Fc-Fragmente sowie sogenannte „Einzelketten-Antikörper“ (Bird et al. 1988), chimäre, humanisierte oder insbesondere CDR-transplantierte Antikörper und Dia- oder Tetrakörper (Holliger et al. 1993). Ebenso umfasst der Begriff Immunglobulin-ähnliche Proteine, die mit Techniken wie zum Beispiel Phage-Display ausgewählt werden, um spezifisch an das Molekül von Interesse in einer Probe zu binden. In diesem Zusammenhang bezieht sich der Begriff „spezifische Bindung“ auf Antikörper gegen das Molekül von Interesse oder dessen Fragmente. Ein Antikörper wird als spezifisch betrachtet, wenn seine Affinität zum Molekül von Interesse oder die vorgenannten entsprechenden Fragmente mindestens vorzugsweise 50-mal höher, weiter bevorzugt 100-mal höher, und am meisten bevorzugt mindestens 1000-mal höher ist als gegen andere Moleküle, die in der Probe mit dem Molekül von Interesse enthalten sind. Die Herstellung von Antikörpern und die Auswahl von Antikörpern mit einer bestimmten Spezifität ist im Stand der Technik bekannt.

[0068] In einer spezifischen Ausführungsform dieses Assays oder Kits zur Bestimmung von aktiver DPP3 in einer Körperflüssigkeitsprobe eines Subjekts ist dieser Fänger-Binder auf einer Oberfläche immobilisiert.

[0069] In einer spezifischen Ausführungsform dieses Assays oder Kits zur Bestimmung von aktiver DPP3 in einer Körperlüssigkeitsprobe eines Subjekts kann das Substrat aus der Gruppe umfassend Angiotensin II, III und IV, Leu-enkephalin, Met-enkephalin, Endomorphin 1 und 2, Valorphin, β -Casomorphin, Dynorphin, Proctolin, ACTH und MSH oder Di- und Tripeptiden, die an ein Fluorophor, ein Chromophor oder ein Aminoluciferin (Promega Protease-GloTM-Assay) gekoppelt sind, ausgewählt sein. Di- oder Tripeptide, die durch DPP3 gespalten werden, umfassen, sind aber nicht beschränkt auf 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. Fluorophore umfassen, sind aber nicht beschränkt auf β -Naphtylamid (2-Naphtylamid, β NA, 2NA), 4-Methoxy- β -naphtylamid (4-Methoxy-2-naphtylamid) und 7-Amido-4-methylcumarin (AMC, MCA; Abrami et al. 2000, Ohkubo et al. 1999). Die Spaltung dieser fluorogenen Substrate führt zur Freisetzung von fluoreszierendem β -Naphtylamin bzw. 7-Amino-4-methylcumarin. Chromophore umfassen, sind aber nicht beschränkt auf p-Nitroanilid-diazetat (pNA). Die Hydrolyse einer Peptid-pNA-Bindung in den chromogenen Substraten führt zur Freisetzung von pNA, das dadurch wiederum seine Farbe ändert. Damit ist die Änderung der Absorption (DA/Min.) direkt proportional zur enzymatischen Aktivität. Unter Verwendung des Protease-GloTM Assay von Promega wird nach der Spaltung durch DPP3 Aminoluciferin freigesetzt und dient als Substrat für eine gekoppelte Luciferase-Reaktion, die eine nachweisbare Lumineszenz emittiert.

[0070] In einer bevorzugten Ausführungsform wird die DPP3-Aktivität durch Zugabe des fluorogenen Substrats Arg-Arg- β NA und die Überwachung der Fluoreszenz in Echtzeit gemessen.

[0071] In einer spezifischen Ausführungsform dieses Assays oder Kits zur Bestimmung von aktiver DPP3 in einer Körperlüssigkeitsprobe eines Subjekts ist der Kalibrator aus der Gruppe umfassend: A) rekombinante DPP3 (z. B. GST-hD-PP3 von USBio), gereinigte native DPP3 (z. B. aus menschlichen Erythrozyten, Abrami et al. 1988) oder DPP3-Fragmente (nativ, synthetisch oder rekombinant), B) die Abspaltungsprodukte selbst: freier Fluorophore (z. B. 2-Naphtylamin), freier Chromophore (z. B. p-Nitroanilid) oder freies Luciferin, für die Quantifizierung der Fluoreszenz, des Farbwechsels und der Biolumineszenz-Signale ausgewählt.

[0072] Eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung, in der DPP3 als diagnostischer Biomarker verwendet wird, umfasst Immunoassays in verschiedenen Formaten wie zum Beispiel Radioimmunoassays (RIA), Chemilumineszenz- und Fluoreszenz-Immunoassays, Enzyme-linked Immunoassays (ELISA), Luminex-basierte Bead Arrays, Protein Microarray Assays und Schnelltestformate wie zum Beispiel immunochromatographische Teststreifen.

[0073] Die Assays können homogene oder heterogene sowie kompetitive und nicht-kompetitive Sandwich-Assays sein. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform, in der zwei erfindungsgemäße Antikörper verwendet werden, ist der Assay ein Sandwich-Assay, der aus einem nicht-kompetitiven Immunoassay besteht, in dem DPP3 oder deren Fragment zum Nachweis und/oder zur Quantifizierung an den ersten Antikörper und an den zweiten Antikörper gebunden wird. Der erste Antikörper kann an eine Festphase gebunden sein, z. B. ein Kugelchen, die Oberfläche einer Kavität oder eines anderen Behälters, eines Chips oder eines Streifens, und der zweite Antikörper ist ein Antikörper, der markiert ist, z. B mit einem Farbstoff, einem Radioisotop, oder einem reaktiven oder katalytisch aktiven Rest. Die Menge der markierten Antikörper, die an den Analyten gebunden sind, wird dann mit einem geeigneten Verfahren gemessen. Die allgemeine Zusammensetzung und die Verfahren im Zusammenhang mit „Sandwich-Assays“ stehen fest und sind dem Fachmann bekannt. (The Immunoassay Handbook, Hrsg. David Wild, 2005; Hultschig et al. 2006).

[0074] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfasst der Assay eine flüssige Reaktionsmischung, in der eine erste Markierungskomponente am ersten Antikörper befestigt ist, wobei diese erste Markierungskomponente Teil eines Kennzeichnungssystems auf der Grundlage von Fluoreszenz- oder Chemilumineszenz-Abdämpfung oder Verstärkung ist, und einer zweiten Markierungskomponente dieses Kennzeichnungssystems, die am zweiten Antikörper befestigt ist, sodass auf diese Weise nach dem Binden der beiden Antikörper an den Analyten ein messbares Signal generiert wird, das den Nachweis der gebildeten Sandwich-Komplexe in der Lösung mit der Probe ermöglicht.

[0075] Im Rahmen der vorliegenden Erfindung umfassen Fluoreszenz-basierte Assays die Verwendung von Farbstoffen, die zum Beispiel ausgewählt sein können aus der Gruppe umfassend FAM (5-oder 6-Carboxyfluorescein), VIC, NED, Fluorescein, Fluorescein-Isothiocyanat (FITC), IRD-700/800, Cyanin-Farbstoffe wie z. B. CY3, CY5, CY3,5, CY5,5, Cy7, Xanthen, 6-Carboxy-2', 4', 7', 4,7-Hexachlorofluorescein (HEX), TET, 6-Carboxy-4', 5'-Dichloro-2', 7'-Dimethoxyfluorescein (JOE), N,N,N',N'-Tetramethyl-6-carboxyrhodamin (TAMRA), 6-Carboxy-X-rhodamin (ROX), 5-Carboxyrhodamin-6G (R6G5), 6-Carboxyrhodamin-6G (RG6), Rhodamin, Rhodamin grün, Rhodamin rot, Rhodamin 110, BODIPY Farbstoffe wie z. B. BODIPY TMR, Oregon grün, Cumarine wie z. B. Umbelliferon, Benzimide, wie etwa Hoechst 33258; Phenanthridine, wie z. B. Texas rot, Yakima gelb, Alexa Fluor, PET, Ethidiumbromid, Acridin-Farbstoffe, Carbazol-Farbstoffe, Phenoxazin-Farbstoffe, Porphyrin-Farbstoffe, Polymethin-Farbstoffe u. ä.

[0076] Im Rahmen der vorliegenden Erfindung umfassen Chemilumineszenz-basierte Assays die Verwendung von Farbstoffen auf der Grundlage der physikalischen Prinzipien für chemilumineszente Materialien, wie beschrieben in Kirk-Othmer, Encyclopedia of chemical technology, 4. Ausgabe, Hrsg., J. I. Kroschwitz; Hrsg., M. Howe-Grant, John Wiley & Sons, 1993, Bd. 15, S. 518-562, auf die hiermit verwiesen wird, einschließlich der Zitate auf Seiten 551-562. Acridinester sind bevorzugte chemilumineszente Farbstoffe.

[0077] Eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung beinhaltet einen chemischen Assay für DPP3. Der Assay verwendet ein Enzymsubstrat, das mit DPP3 reagiert, um ein nachweisbares Reaktionsprodukt zu bilden. Alternativ kann die

Reaktionsgeschwindigkeit des Substrats überwacht werden, um das Vorhandensein oder die Menge von DPP3 in einer Probe zu bestimmen. Geeignete Enzymsubstrate umfassen, sind aber nicht beschränkt auf Dipeptid-Substrate wie z. B. Arg-Arg-β -NA oder Arg-Arg-AMC.

[0078] Assays mit solchen Reagenzien und Reaktionen können in jedem geeigneten Reaktionsbehälter durchgeführt werden, zum Beispiel in einem Reagenzglas oder der Kavität einer Mikrotiterplatte. Alternativ können auch Assay-Vorrichtungen zur einmaligen Verwendung in Formaten wie Messstäben oder Teststreifen entwickelt werden, die dem Fachmann bekannt sind und die in der Herstellung und Verwendung leicht zu handhaben sind. Solche Assay-Vorrichtungen zur einmaligen Verwendung können in Form von Kits verpackt werden, die alle notwendigen Materialien, Reagenzien und Gebrauchsanweisungen enthalten.

[0079] Assay-Vorrichtungen für die vorliegende Erfindung könnten vorteilhaft als Messstab oder Teststreifen entwickelt werden. Ein Messstab kann zum Beispiel aus einem Stück saugfähigem Material, das ein chromogenes Substrat für DPP3 enthält, hergestellt werden. Alternativ könnte der Messstab aus einem nicht-porösen Material bestehen, das mit dem Substrat beschichtet wird. Beim Kontaktieren der Vorrichtung mit der gewünschten Probe würde es zu einer Wechselwirkung zwischen dem Substrat und der jeweiligen in der Probe vorhandenen DPP3 kommen, um eine nachweisbare Reaktion auf der Vorrichtung zu bilden.

[0080] In einer alternativen Ausführungsform kann die Vorrichtung ein Teststreifen sein, in dem das Substrat in einer oder mehreren Zonen entlang der Länge eines Streifens aus saugfähigem Material enthalten ist. Tritt ein Ende des Streifens mit der gewünschten Probe in Kontakt, wandert die flüssige Probe am saugfähigem Material entlang. Die Reaktion des Substrats und die Erzeugung eines nachweisbaren Signals zeigt an, dass DPP3 in der Probe vorhanden ist. In einer Vorrichtung mit mehreren Zonen zeigt die Anzahl der diskreten oder isolierten Zonen entlang der Länge des Streifens, die ein nachweisbares Signal erzeugen, auch die Menge von DPP3, die in der Probe vorhanden ist, an. Alternativ kann ein Großteil des Teststreifens das Substrat enthalten. Die Länge der farbigen Reaktion, die sich auf einem Teststreifen mit einer solchen einzigen, ausgedehnten Substratzone bildet, kann dazu verwendet werden, das Vorhandensein oder die Menge von DPP3 in der Probe anzuzeigen.

[0081] In einer alternativen Ausführungsform des Assays kann die Geschwindigkeit, mit der die Reaktion auftritt, als Zeichen der in der Probe enthaltenen Menge von DPP3 gewertet werden. Zum Beispiel kann die Geschwindigkeit, mit der das Substrat reagiert, dazu verwendet werden, die Menge der in der Probe enthaltenen DPP3 anzuzeigen. Alternativ kann die Geschwindigkeit, mit der das Reaktionsprodukt gebildet wird, dazu verwendet werden, die Menge der in der Probe enthaltenen DPP3 anzuzeigen.

[0082] In noch einer weiteren Ausführungsform kann ein Fänger- oder Binder-Assay durchgeführt werden, um die Protease nachzuweisen und/oder zu quantifizieren. Zum Beispiel kann ein Antikörper, der mit DPP3-Protein reagiert, aber nicht in die Peptidase-Aktivität eingreift, auf einer Festphase immobilisiert werden. Die Probe fließt über den immobilisierten Antikörper und DPP3, falls vorhanden, bindet an den Antikörper und wird ebenfalls zum Nachweis immobilisiert. Daraufhin kann ein Substrat hinzugefügt werden und das Reaktionsprodukt kann nachgewiesen werden, um das Vorhandensein und die Menge von DPP3 in der Probe anzuzeigen. Für die Zwecke der vorliegenden Beschreibung kann sich der Begriff „Festphase“ auf alle Materialien oder Behälter beziehen, in denen oder auf denen der Assay durchgeführt wird. Dies umfasst, ist aber nicht beschränkt auf: poröse Materialien, nicht-poröse Materialien, Reagenzgläser, Kavitäten, Glasplättchen usw.

[0083] In einer weiteren spezifischen Ausführungsform kann ein DPP3-ECA als ein Teststreifen-Assay durchgeführt werden. In einer beispielhaften Teststreifen-Vorrichtung ist ein Probeauftragstupfer optional an einem Ende eines porösen Streifens angebracht. Der Streifen enthält einen immobilisierten Antikörper, der an DPP3 an einer vorbestimmten Stelle zum nachfolgenden Nachweis bindet und DPP3 dadurch immobilisiert. Optional kann die Vorrichtung eine Assay-Endanzeige beinhalten, die am distalen Ende des Teststreifens angebracht ist und an der gegenüberliegenden Seite vom Kontakt mit der Probe liegt. Die Assay-Endanzeige erzeugt ein nachweisbares Signal beim Kontakt mit der Probe oder einer Assay-Reagenz und zeigt dadurch an, dass der Assay abgeschlossen ist.

[0084] Ein Probeauftragstupfer kann zum Beispiel ein Teil des porösen Streifens selbst sein oder ein Material in Flüssigkeitskontakt mit dem Ende des porösen Streifens, hier als das proximale Ende bezeichnet, sodass die Probe vom Applikationstupfer auf den porösen Streifen übergehen oder migrieren kann. Zum Flüssigkeitskontakt kann physikalischer Kontakt des Applikationstupfers mit dem porösen Streifen sowie die Trennung des Applikationstupfers vom porösen Streifen durch eine Zwischenstelle oder zusätzliches Material, das der Flüssigkeit dennoch erlaubt, zwischen dem Applikationstupfer und dem porösen Streifen zu fließen, gehören. Der Applikationstupfer kann den porösen Streifen wesentlich überlappen, um der Probe ein Passieren durch im Wesentlichen jeglichen Teil des Applikationstupfers zum proximalen Ende des porösen Streifens zu ermöglichen. Alternativ kann nur ein Teil des Applikationstupfers im Flüssigkeitskontakt mit dem porösen Streifen stehen. Der Applikationstupfer kann aus jeglichem Material bestehen, das die Probe auf den porösen Streifen übertragen kann.

[0085] Der poröse Streifen der Assay-Vorrichtung kann aus jeglichem ausreichend absorbierenden, porösen, saugfähigem, chromatografischen oder kapillären Material bestehen, durch das eine Probe mit dem Analyten durch eine Kapillar- oder Ansaugaktivität transportiert werden kann. Natürliche, synthetische oder natürlich vorkommende Stoffe, die synthetisch modifiziert wurden, können als poröser Streifen eingesetzt werden, einschließlich aber nicht beschränkt auf: Zellulosematerialien wie Papier, Zellstoff oder Zellstoffderivate wie zum Beispiel Zelluloseazetat und Nitrozellulose; Glas-

faser; Stoffe, sowohl natürlich vorkommend (zum Beispiel Baumwolle) als auch synthetisch (zum Beispiel Nylon); poröse Gele wie zum Beispiel Kieselgel, Agarose, Dextran und Gelatine; poröse faserige Matrizen; stärkehaltige Materialien wie z. B. vernetzte Dextrans; keramische Werkstoffe; Polyvinylchlorid-Folien und Kombinationen von Polyvinylchlorid und Silica u. ä. Der poröse Streifen sollte die Erzeugung eines nachweisbaren Signals nicht stören. Die porösen Streifen sollten eine angemessene innenwohnende Stärke haben oder können zusätzlich verstärkt sein.

[0086] Die besonderen Maße des porösen Streifens sind eine Sache der Zweckdienlichkeit und hängen von der Größe der entsprechenden Probe, dem Assay-Protokoll, dem Mittel zur Bestimmung und Messung des Signals usw. ab. Zum Beispiel können die Maße so gewählt sein, dass die Geschwindigkeit der Flüssigkeitsmigration sowie die Menge der Probe, die von dem porösen Streifen aufgenommen werden soll, reguliert werden kann.

[0087] In einer möglichen Teststreifen-Vorrichtung der vorliegenden Erfindung kann ein DPP3-Substrat und/oder ein DPP3-Fänger-Antikörper auf dem porösen Streifen immobilisiert sein, um mindestens eine Analyten-Nachweisstelle zu bilden, d. h. diese Region des porösen Streifens weist ein oder mehrere Assay-Reagenzien auf, die daran diffusionslos angebracht sind. In einer weiteren Ausführungsform der Vorrichtung kann die Messungs- oder Nachweiszone auf dem Teststreifen eine Vielzahl von Stellen mit einem DPP3-Substrat und/oder einem immobilisierten anti-DPP3-Antikörper enthalten. Optional können die verschiedenen Nachweisstellen verschiedene Mengen von Substrat und/oder immobilisiertem anti-DPP3-Antikörper enthalten, d. h. eine größere Menge an der ersten Nachweisstelle und geringere Mengen an den nachfolgenden Stellen. Wenn z. B. 20 ng Antikörper das Äquivalent von 1 nmol/min/ml DPP3 fangen, könnte die erste Nachweisstelle einer Assay-Vorrichtung 50 ng eines anti-DPP3-Antikörpers enthalten, während die nachfolgenden Stellen 10, 20, 30 usw. Nanogramm Antikörper enthalten. Nach der Zugabe der Probe ergibt die Anzahl der Stellen mit einem nachweisbaren Signal eine quantitative Angabe der in der Probe enthaltenen DPP3-Menge. Die Nachweisstellen können in jeder geeigneten Form zum Nachweis konfiguriert sein und sind in der Regel in der Form einer Leiste über die Breite des Teststreifens hinweg angeordnet.

[0088] Optional kann auch die Vorrichtung mit mehrfachen Fängerstellen so hergestellt werden, dass die DPP3-Gesamtmenge im Wesentlichen an den Antikörper der ersten Fängerstelle bindet und dadurch an dieser Stelle immobilisiert wird, wenn ein DPP3-Schwellenwert nicht in der Probe vorhanden ist. Wenn die DPP3-Menge in der Probe größer ist als der Schwellenwert, bindet die verbleibende DPP3 an die nachfolgenden Nachweiszonen des immobilisierten Antikörpers entlang der Länge des Teststreifens. Je größer die Menge der DPP3 in der Probe, desto größer die Anzahl der Fängerstellen, die aufgrund des Vorhandenseins der DPP3 ein nachweisbares Signal anzeigen. Der Fachmann wird erkennen, dass Vorrichtungen mit mehrfachen DPP3-Substratstellen auch auf eine Weise erzeugt werden können, in der die Substratmenge an den einzelnen Stellen dazu ausgelegt ist, ein quantitatives oder semiquantitatives Assayergebnis zu erzeugen.

[0089] Eine weitere wichtige Ausführungsform der Erfindung ist ein Verfahren zur Diagnose eines Zustands bei einem Subjekt, mit dem nekrotische Prozesse einhergehen bzw. der mit solchen in Zusammenhang steht, umfassend:

- Bestimmung der Menge an Gesamt-DPP3 oder Bestimmung der Menge der aktiven DPP3 in einer Körperflüssigkeitsprobe des Subjekts,
- Vergleich dieser bestimmten Menge mit einem vorgegebenen Schwellenwert,
- wobei bei dem Subjekt die Diagnose eines Zustands vorliegt, mit dem nekrotische Prozesse einhergehen bzw. der mit solchen in Zusammenhang steht, wenn diese bestimmte Menge den vorbestimmten Schwellenwert übersteigt.

[0090] In einer spezifischen Ausführungsform dieses Verfahrens zur Diagnose eines Zustands bei einem Subjekt, mit dem nekrotische Prozesse einhergehen bzw. der mit solchen in Zusammenhang steht, wird die Menge an Gesamt-DPP3 oder aktiver DPP3 in der Einheit der Konzentration bestimmt.

[0091] Verfahren zur Bestimmung der Gesamt-DPP3 oder der aktiven DPP3 sind aus dem Stand der Technik bekannt. Im Rahmen eines erfindungsgemäßen Verfahrens zur Diagnose eines Zustands bei einem Subjekt, mit dem nekrotische Prozesse einhergehen bzw. der mit solchen im Zusammenhang steht, können entweder Verfahren und Assays aus dem Stand der Technik oder die oben beschriebenen Verfahren und Assays für die Bestimmung von DPP3 eingesetzt werden.

[0092] Der Schwellenwert wird durch Messung der DPP3-Konzentration und/oder der DPP3-Aktivität in gesunden Kontrollgruppen und durch Berechnung z. B. des entsprechenden 75. Perzentils, weiter bevorzugt des 90. Perzentils und noch weiter bevorzugt des 95. Perzentils vorbestimmt. Die Obergrenze des 75. Perzentils, weiter bevorzugt des 90. Perzentils, noch weiter bevorzugt des 95. Perzentils legt den Schwellenwert zur Unterscheidung zwischen gesunden und erkrankten Patienten fest. In Bezug auf diese Perzentile kann der Schwellenwert, der zwischen gesunden und erkrankten Patienten unterscheidet, zwischen 5 und 25 ng/ml, weiter bevorzugt zwischen 7 und 20 ng/ml, weiter bevorzugt zwischen 8 und 18 ng/ml und am meisten bevorzugt zwischen 10 und 15 ng/ml im Plasma liegen, wobei ein anti-DPP3-Immunoassay des Sandwichtyps verwendet wird (siehe Beispiel 3). In einem DPP3-spezifischen Enzymfänger-Aktivitätsassay in Plasma kann der Schwellenwert, der zwischen gesunden und erkrankten Patienten unterscheidet, zwischen 0,5 und 2 nmol β NA $\text{min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$, weiter bevorzugt zwischen 0,7 und 1,8 nmol β NA $\text{min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$, weiter bevorzugt zwischen 0,8 und 1,5 nmol β NA $\text{min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$, und am meisten bevorzugt zwischen 1,0 und 1,3 nmol β NA $\text{min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$ liegen (siehe Beispiel 5).

[0093] Es ist dem Fachmann bekannt, wie solche Schwellenwerte aus zuvor durchgeführten Studien bestimmt werden können. Es ist dem Fachmann bekannt, dass ein bestimmter Schwellenwert, der später routinemäßig verwendet wird, von der Kohorte abhängen kann, die zur Berechnung eines vorbestimmten Schwellenwerts eingesetzt wurde. Es ist dem Fachmann bekannt, dass ein bestimmter Schwellenwert von der Kalibrierung im Assay abhängen kann. Es ist dem Fachmann bekannt, dass ein bestimmter Schwellenwert von der Empfindlichkeit und/oder der Spezifität abhängen kann, die dem Praktiker akzeptabel erscheint.

[0094] Die Sensitivität und Spezifität eines diagnostischen Tests hängen von mehr als nur der analytischen „Qualität“ der Tests ab; vielmehr hängen sie auch von der Definition dessen ab, was ein abnormes Ergebnis darstellt. In der Praxis werden im Allgemeinen Receiver-Operating-Characteristic (ROC)-Kurven berechnet, indem der Wert einer Variablen in Proportion zu deren relativer Häufigkeit in „normalen“ (d. h. in offenbar gesunden) und „erkrankten“ Populationen (d. h. Patienten mit einer Infektion) aufgezeichnet wird. Je nach der jeweiligen diagnostischen Fragestellung muss die Referenzgruppe nicht unbedingt „normal“ sein, sondern kann auch aus einer Gruppe von Patienten bestehen, die an einer anderen Krankheit oder einem Zustand leiden, der sich von der erkrankten Gruppe von Interesse unterscheidet. Für jeden bestimmten Marker wird sich die Verteilung von Markerwerten für Subjekte mit und ohne Krankheit wahrscheinlich überschneiden. Unter solchen Bedingungen unterscheidet ein Test nicht mit absoluter 100-prozentiger Genauigkeit zwischen normal und erkrankt, und der Bereich der Überlappung zeigt an, wo der Test nicht zwischen normal und erkrankt unterscheiden kann. Es wird ein Schwellenwert ausgesucht, über dem (oder unter dem, je nachdem, wie ein Marker sich bei der Krankheit verändert) der Test als abnormal gilt und unter dem der Test als normal angesehen wird. Die Fläche unter der ROC-Kurve ist ein Maß für die Wahrscheinlichkeit, dass die wahrgenommene Messung die richtige Identifizierung eines Zustands ermöglicht. ROC-Kurven können auch verwendet werden, wenn die Testergebnisse nicht unbedingt eine akkurate Zahl ergeben. Solange man die Ergebnisse in eine Rangfolge bringen kann, kann man eine ROC-Kurve erstellen. Zum Beispiel können die Ergebnisse eines Tests für „erkrankte“ Proben nach Schwere geordnet werden (z. B. 1= niedrig, 2= normal und 3= hoch). Diese Rangfolge kann mit den Ergebnissen der „normalen“ Population korreliert werden, um eine ROC-Kurve zu erzeugen. Diese Verfahren sind aus dem Stand der Technik bekannt (siehe z. B. Hartley et al., 1982). Vorzugsweise wird ein Schwellenwert so ausgewählt, dass sich ein ROC-Kurvenbereich von mehr als etwa 0,5, weiter bevorzugt von mehr als etwa 0,7 ergibt. Der Begriff „ungefähr“ bezieht sich in diesem Zusammenhang auf +/- 5 % einer gegebenen Messung.

[0095] Sobald der Schwellenwert mithilfe einer früheren Studienkohorte und unter Berücksichtigung aller genannten Aspekte bestimmt worden ist, kann ein Mediziner die vorbestimmten Schwellenwerte für das erfindungsgemäße Verfahren zur Diagnose eines Zustands verwenden und entscheiden, ob das Subjekt einen Wert über oder unter dem vorbestimmten Schwellenwert aufweist, um eine entsprechende Diagnose zu stellen.

[0096] DPP3-Konzentrationen in Gewebe-Homogenaten und Körperflüssigkeiten können mit mehreren handelsüblichen DPP3-ELISA Kits (z. B. von LifeSpan BioSciences) gemessen werden. Alle diese Assays beruhen auf dem Prinzip eines Sandwich-Assays und sind nur für die Forschung nutzbar.

[0097] Das Standardverfahren zur Messung von DPP3-Werten ist die Bestimmung der DPP3-Aktivität mit fluorogenem Substrat (z. B. Arg-Arg- β -Naphtylamid) in einem Flüssigphasenassay (Ellis & Nuenke 1967). Im Handel erhältliche Kits (z. B. von BPS Bioscience) enthalten in der Regel gering-bindende schwarze Mikrotiterplatten, rekombinante DPP3, fluorescenes Substrat und die jeweiligen Puffer. Diese Kits werden regelmäßig als Screeningassay für DPP3-Substrate und Hemmer verwendet.

[0098] Im erfindungsgemäßen Verfahren zur Diagnose eines Zustands bei einem Subjekt, mit dem nekrotische Prozesse einhergehen bzw. der mit solchen in Zusammenhang steht, ist diese Probe aus der Gruppe umfassend Vollblut, Serum und Plasma ausgewählt. Die im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens verwendete Körperflüssigkeit kann ebenfalls aus der Gruppe umfassend Blut, Serum, Plasma, Liquor, Urin, Speichel, Sputum und Pleuraergüsse ausgewählt sein.

[0099] Nekrotische Prozesse sind hier als alle körperlichen Prozesse definiert, die zum Tod der Zellen und zur Freisetzung von DPP3 aus dem Zytoplasma der Zellen in den extrazellulären Raum und/oder Körperflüssigkeiten führen. Diese Prozesse umfassen, sind aber nicht beschränkt auf Nekrose, Apoptose, Nekroptose, Eryptose.

[0100] In einer spezifischen Ausführungsform dieses Verfahrens zur Diagnose einer Krankheit oder eines Zustands bei einem Subjekt, mit denen nekrotische Prozesse einhergehen bzw. die mit solchen im Zusammenhang stehen, ist die Krankheit ausgewählt aus der Gruppe umfassend Herzinsuffizienz, chronische Herzinsuffizienz, akute Herzinsuffizienz, Myokardinfarkt, Schlaganfall, Leberinsuffizienz, Brandwunden, traumatische Verletzungen, schwere Infektion (mikrobiisch, viral (z. B. AIDS), parasitär (z. B. Malaria)), systemisches inflammatorisches Response-Syndrom (SIRS) oder Sepsis, Krebs, akute Nierenverletzung, Störungen des Zentralnervensystems (z. B. Krampfanfälle, neurodegenerative Erkrankungen), Autoimmunerkrankungen, Gefäßerkrankungen (z. B. Kawasaki-Syndrom) und Hypotonie. Tabelle 1 führt die klinischen Symptome/Krankheiten, die mit nekrotischen Prozessen einhergehen bzw. die mit solchen im Zusammenhang stehen, und das jeweilige nekrotische Ereignis auf.

[0101] In einer weiteren Ausführungsform ist die Krankheit ausgewählt aus der Gruppe umfassend akute Herzinsuffizienz, Myokardinfarkt, Leberinsuffizienz, Brandwunden, schwere Infektion (mikrobiisch, viral (z. B. AIDS), parasitär (z. B. Malaria)), systemisches inflammatorisches Response-Syndrom (SIRS) oder Sepsis, Krebs und akute Nierenverletzung,

[0102] In einer Ausführungsform ist diese Krankheit Hypotonie.

Klinisches Symptom/Krankheit	Nekrotisches/apoptotisches Ereignis	Referenz
Akute Herzinsuffizienz	Plötzlicher Tod von Zellen/Gewebeteilen/Orga-nen	Fischer et al. 2005, Zong et al. 2006
Myokardinfarkt		
Schlaganfall		
Leberinsuffizienz/-verletzung		
Niereninsuffizienz/-verletzung		
Brandwunden		Lanier et al. 2011
Traumatische Verletzungen (z. B. Schä-del-Hirn-Trauma); Polytrauma		Raghupathi 2004
Virale + mikrobiische + parasitäre Infek-tionen	Absterben von Makrophagen, Wirtszellen-Ly-se	Zong et al. 2006; Fink et al. 2005
AIDS	Fortschreitendes Absterben von Immunzellen	Fischer et al. 2005
Sepsis	Nekrose durch Immunantwort/Apoptose von Immunzellen	Pinheiro da Silva et al. 2009
Malaria	Lyse der Wirts-Erythrozyten (Eryptose)	Lang et al. 2015
Neurodegenerative Erkrankungen (z. B. AD, Huntington)	Langsam fortschreitender neuronaler Zelltod	Fischer et al. 2005
Weitere Erkrankungen des ZNS (z. B. Krampfanfälle)	Exzitotoxischer Zelltod	Zong et al. 2006
Krebs	Vermehrte Entzündungen	Wallach et al. 2014
Autoimmunerkrankung		
Kawasaki-Syndrom	Vermehrte Entzündungen und Nekrose der kleinen Blutgefäße	Dimitradas et al. 2014

Tabelle 1: Krankheiten, die mit nekrotischen Prozessen einhergehen bzw. die mit solchen im Zusammenhang stehen.

[0103] Die Apoptose ist der Vorgang des programmierten Zelltods, der in multizellulären Organismen auftreten kann. Biochemische Ereignisse führen zu charakteristischen Veränderungen (Morphologie) und dem Tod von Zellen. Zu diesen Veränderungen gehören Blebbing, Zellschrumpfung, Kernfragmentierung, Chromatinverdichtung und chromosomal DNA-Fragmentierung. Einen Überblick findet man bei Elmore 2007.

[0104] Die Nekrose ist eine Form der Zellschädigung, die zum vorzeitigen Tod der Zellen im lebenden Gewebe durch Autolyse führt (Vanlangenakker et al. 2008). Nekrose wird von Faktoren außerhalb der Zelle oder des Gewebes wie z. B. Infektionen, Toxinen oder Traumata hervorgerufen, die zum fehlregulierten Abbau der Zellkomponenten führen.

[0105] Während die Apoptose oft positive Auswirkungen auf den Organismus hat, ist die Nekrose fast immer schädlich und kann tödlich verlaufen.

[0106] Zelltod durch Nekrose folgt nicht dem apoptotischen Signaltransduktionsweg, sondern es werden verschiedene Rezeptoren aktiviert, die zum Verlust der Zellmembranintegrität und zur unkontrollierten Freisetzung von Produkten des Zelltods in den extrazellulären Raum führen. Dies löst im umliegenden Gewebe eine entzündliche Reaktion aus, die nahegelegene Phagozyten daran hindert, die abgestorbenen Zellen zu lokalisieren und durch Phagozytose zu beseitigen. Aus diesem Grund ist es oft notwendig, nekrotisches Gewebe chirurgisch im sogenannten Debridement-Verfahren zu entfernen. Unbehandelte Nekrose führt zu einer Anhäufung von verwesendem Zellgewebe und Zellrückständen an oder in der Nähe der Zelltodstelle.

[0107] Eine Form der programmierten Nekrose, auch als Nekroptose bezeichnet, ist als eine alternative Form des programmierten Zelltods erkannt worden. Die Nekroptose dient möglicherweise als Zelltod-Sicherungsmechanismus für die Apoptose, wenn die Apoptose-Signalwege durch endogene oder exogene Faktoren wie Viren oder Mutationen blockiert sind (Linkermann et al. 2014). Vor Kurzem wurden noch weitere Arten von geregelter Nekrose entdeckt, die mehrere Signalereignisse mit Nekroptose und Apoptose gemeinsam haben (Vanden Berghe et al. 2014).

[0108] Herzinsuffizienz ist eine Herzerkrankung, die auftritt, wenn eine strukturelle oder funktionelle Störung des Herzens dessen Fähigkeit beeinträchtigt, den Körperbedürfnissen durch ausreichende Durchblutung gerecht zu werden. Der Zustand kann eine Vielzahl von Symptomen hervorrufen, insbesondere Kurzatmigkeit in Ruhe oder bei Bewegung, Anzeichen einer Flüssigkeitsstauung wie Lungenstauung oder Knöchelschwellungen und objektive Hinweise auf Abnormalitäten in der Struktur oder Funktion des Herzens im Ruhezustand.

[0109] Herzinsuffizienz ist ein klinisches Syndrom, das durch eine Konstellation von Symptomen und Anzeichen charakterisiert ist, die durch eine Störung der Herzfunktion hervorgerufen werden. Sie ist eine der führenden Krankheits- und Todesursachen in Industrieländern, mit einer Prävalenz von 1-2 %. Es wird zwischen chronischer und akuter Herzinsuffizienz unterschieden. Bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz wird zwischen stabiler chronischer Herzinsuffizienz, Verschlechterung der Anzeichen und Symptomatik der chronischen Herzinsuffizienz und akuter Dekompensation der chronischen Herzinsuffizienz unterschieden. Akute Herzinsuffizienz ist als der schnelle Eintritt von Anzeichen und Symptomen einer Herzinsuffizienz definiert, der eine dringende Behandlung oder Krankenhauseinweisung erfordert. Akute Herzinsuffizienz kann entweder als neue Erkrankung (Neuaufreten akuter Herzinsuffizienz bei einem Patienten ohne vorhergehende Herzfunktionsstörungen) oder als akute Dekompensation einer chronischen Herzinsuffizienz auftreten. Akute Herzinsuffizienz ist die führende Ursache für die stationäre Behandlung von Erwachsenen über 65. Trotz deutlicher Verbesserungen in der Prognose für Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz, die vor allem mit therapeutischen Fortschritten über die letzten Jahrzehnte zusammenhängen, sind die kurz- und langfristigen Aussichten für Patienten, die mit dekompensierter Herzinsuffizienz ins Krankenhaus eingewiesen werden, weiterhin sehr schlecht. Fast 25 % aller Patienten, die mit akuter Herzinsuffizienz stationär behandelt werden, benötigen innerhalb von 30 Tagen nach der Entlassung aus dem Krankenhaus weitere stationäre Behandlung, während < 50 % weitere 5 Jahre nach dem Krankenhausaufenthalt überleben. Zusätzlich zur deutlich reduzierten Lebenserwartung und Lebensqualität der betroffenen Patienten stellt akute Herzinsuffizienz eine enorme finanzielle Belastung für das Gesundheitswesen dar. Die Gesamtkosten der Herzinsuffizienz wurden allein in den USA im Jahr 2012 auf 31 Milliarden US\$ geschätzt, wobei der Großteil dieser Kosten mit Krankenhausbehandlungen zusammenhängt. Schätzungen zufolge werden sich diese Kosten bis zum Jahr 2030 aufgrund der alternden Bevölkerung auf die noch nie zuvor erreichte Summe von 70 Milliarden US\$ erhöhen.

[0110] Herzinsuffizienz umfasst ein breites Spektrum von Patienten, von Fällen mit normaler linksventrikulärer Ejektionsfraktion (LVEF), auch als Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion bezeichnet, die in der Regel als Anteil $\geq 50\%$ betrachtet werden, bis zu Fällen mit reduzierter linksventrikulärer Ejektionsfraktion, auch als Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion bezeichnet, die in der Regel als Anteil <40 % gelten. Patienten mit einer LVEF im Bereich von 40-49 % stellen eine „Grauzone“ dar, die als Herzinsuffizienz mit mittlerer Ejektionsfraktion definiert ist (Ponikowski et al. 2016).

[0111] Herzinsuffizienz kann entweder als akute oder als chronische Herzinsuffizienz auftreten.

[0112] Der Begriff „akut“ bezieht sich auf plötzliches Eintreten sowie auf schwere oder dekompensierte Herzinsuffizienz in Hinblick auf Episoden, in denen ein Patient, bei dem eine Änderung in der Herzinsuffizienz auftritt, Anzeichen und Symptome zeigt, die eine dringende Behandlung und Krankenhauseinweisung erfordern.

[0113] Der Begriff „chronisch“ bezieht sich auf eine langfristige Erkrankung. Die chronische Herzinsuffizienz ist ein langfristiger Krankheitszustand, der normalerweise durch die Behandlung der Symptome stabil gehalten wird (stabile chronische Herzinsuffizienz).

[0114] Stabile chronische Herzinsuffizienz ist gekennzeichnet durch:

- i) das Vorliegen von strukturellen oder funktionellen Herzstörungen, die die Fähigkeit des Herzens beeinträchtigen, den Körperbedürfnissen durch ausreichende Durchblutung gerecht zu werden,
- ii) das Fehlen von Volumenüberlastung (manifestiert durch Lungen- und/oder systemische Stauung) und/oder tief greifende Störung der Herzleistung (manifestiert durch Hypotonie, Niereninsuffizienz und/oder Schocksyndrom),

wobei der Patient keine dringende Behandlung oder Behandlungsanpassung und keine stationäre Behandlung benötigt.

[0115] Chronische Herzinsuffizienz mit Verschlechterung der Anzeichen und Symptomatik ist gekennzeichnet durch:

- (i) das Vorliegen von strukturellen oder funktionellen Herzstörungen, die die Fähigkeit des Herzens beeinträchtigen, den Körperbedürfnissen durch ausreichende Durchblutung gerecht zu werden,
- (ii) Volumenüberlastung (manifestiert durch Lungen- und/oder systemische Stauung) und/oder tief greifender Abfall der Herzleistung (manifestiert durch Hypotonie, Niereninsuffizienz und/oder Schocksyndrom),

wobei der Patient keine dringende Behandlung und keine stationäre Behandlung, aber eine Behandlungsanpassung benötigt.

[0116] Chronische Herzinsuffizienz kann auch dekompensieren (dies wird als akute dekompensierte Herzinsuffizienz oder akute dekompensierte chronische Herzinsuffizienz bezeichnet), zumeist im Zusammenhang mit einer zwischenzeitlichen

Erkrankung (wie zum Beispiel Lungenentzündung), Myokardinfarkt, Herzrhythmusstörungen, unkontrolliertem Bluthochdruck oder mangelnder Kooperation des Patienten beim Einhalten von Flüssigkeitseinschränkungen, Diätvorschriften oder Medikamenteneinnahme. Nach der Behandlung können Patienten mit akuter dekompensierte chronischer Herzinsuffizienz zu einem Krankheitszustand der stabilen chronischen Dekompensation zurückkehren (stabile chronische Herzinsuffizienz).

[0117] Neu aufgetretene akute Herzinsuffizienz und akute dekompensierte chronische Herzinsuffizienz sind gekennzeichnet durch:

- (i) das Vorliegen von strukturellen oder funktionellen Herzstörungen, die die Fähigkeit des Herzens beeinträchtigen, den Körperbedürfnissen durch ausreichende Durchblutung gerecht zu werden,
- (ii) Volumenüberlastung (manifestiert durch Lungen- und/oder systemische Stauung) und/oder tief greifender Abfall der Herzleistung (manifestiert durch Hypotonie, Niereninsuffizienz und/oder Schocksyndrom),

wobei der Patient dringende Behandlung oder Behandlungsanpassung und eine Krankenhauseinweisung benötigt.

Akute Herzinsuffizienz		Chronische Herzinsuffizienz	
Neue aufgetretene akute Herzinsuffizienz	Akute dekompensierte Herzinsuffizienz = akute dekompensierte chronische Herzinsuffizienz	Anzeichen/ Symptomatik einer Verschlechterung der chronischen Herzinsuffizienz	Stabile chronische Herzinsuffizienz

[0118] Die oben aufgeführten Definitionen der akuten Herzinsuffizienz für neu eingetretene akute Herzinsuffizienz oder akute dekompensierte Herzinsuffizienz oder akute dekompensierte chronische Herzinsuffizienz oder Verschlechterung der Anzeichen/Symptome von chronischer Herzinsuffizienz entsprechen der Einteilung von Voors et al. 2016.

[0119] In einer spezifischen Ausführungsform dieses Verfahrens zur Diagnose einer Krankheit oder eines Zustands bei einem Subjekt, mit denen nekrotische Prozesse einhergehen bzw. die mit solchen in Zusammenhang stehen, kann die DPP3-Aktivität mithilfe eines Flüssigphasen-Aktivitätsassays oder eines Enzymfänger-Aktivitätsassays bestimmt werden.

[0120] In einem Flüssigphasenassay werden Körperflüssigkeitsproben in direkten Kontakt mit fluorogenen Substraten (z. B. Arg-Arg-β-NA) gebracht. Da im Plasma sehr viele verschiedene Aminopeptidasen enthalten sind (Sanderink et al. 1988), ist es möglich, dass das verwendete Substrat von anderen Peptidasen als DPP3 gespalten wird. Um dieses Problem zu umgehen, ist die Verwendung eines Enzymfänger-Aktivitätsassays zum Nachweis von spezifischer DPP3-Aktivität ein bevorzugtes Verfahren.

[0121] In einer spezifischen Ausführungsform zur Bestimmung der aktiven DPP3 umfasst ein Enzymfänger-Assay die folgenden Schritte:

- Kontaktieren der Probe mit einem Fänger-Binder, der an Vollängen-DPP3 bindet, aber vorzugsweise die DPP3-Aktivität in einem Flüssigphasenassay weniger als 50 %, bevorzugt um weniger als 40 %, und weiter bevorzugt um 30 % hemmt. Zur Verhinderung der Hemmung von DPP3 sollte der Fänger-Binder DPP3 nicht in der Region um das aktive Zentrum und die Substratbindungsregion (Aminosäuren 316-669 der SEQ ID Nr. 1) binden.
- Trennung der an diesen Fänger-Binder gebundenen DPP3 von der Körperflüssigkeitsprobe,
- Hinzufügen des DPP3-Substrats zur abgetrennten DPP3,
- Quantifizieren der aktiven DPP3 durch Messen der Umwandlung eines DPP3-Substrats,
- Bewertung der gemessenen Signale im Vergleich zu nicht-erkrankten Kontrollen. Der Schwellenwert kann vorbestimmt sein, z. B. durch Messen der DPP3-Konzentration und/oder der DPP3-Aktivität in gesunden Kontrollgruppen und Berechnung des entsprechenden 75. Perzentils. Die Obergrenze des 75. Perzentils definiert den Schwellenwert für die Unterscheidung zwischen gesunden und erkrankten Patienten.

[0122] In einer spezifischen Ausführungsform wird die Bestimmung der aktiven DPP3 nach dem oben beschriebenen erfindungsgemäßem Verfahren durchgeführt.

[0123] In einer spezifischen Ausführungsform dieses Verfahrens zur Diagnose einer Krankheit oder eines Zustands bei einem Subjekt, mit denen nekrotische Prozesse einhergehen bzw. die mit solchen in Zusammenhang stehen, ist dieser Binder aus der Gruppe umfassend Antikörper, Antikörperfragment oder nicht-Ig-Gerüst ausgewählt.

[0124] In einer spezifischen Ausführungsform dieses Verfahrens zur Diagnose einer Krankheit oder eines Zustands bei einem Subjekt, mit denen nekrotische Prozesse einhergehen bzw. die mit solchen in Zusammenhang stehen, ist dieses Verfahren ein Enzymfänger-Assay (ECA, US5612186A, US5601986A). In diesem Assay ist der DPP3-Binder ein Antikörper.

[0125] In einer spezifischen Ausführungsform dieses Verfahrens zur Diagnose einer Krankheit oder eines Zustands bei einem Subjekt, mit denen nekrotische Prozesse einhergehen bzw. die mit solchen in Zusammenhang stehen, ist dieser Fänger-Binder auf einer Oberfläche immobilisiert. Ein Binder, der mit DPP3-Protein reagiert, aber nicht zu mehr als 50 %, bevorzugt zu weniger als 40 %, bevorzugt zu weniger als 30 % in die Peptidase-Aktivität eingreift, kann auf einer Festphase immobilisiert werden. Zur Verhinderung der Hemmung von DPP3 sollte der Fänger-Binder DPP3 nicht in der Region um das aktive Zentrum und die Substratbindungsregion (Aminosäuren 316-669 der SEQ ID Nr. 1) binden.

[0126] In einer spezifischen Ausführungsform des Verfahrens zur Bestimmung der aktiven DPP3 in einer Körperflüssigkeitsprobe eines Subjekts kann der Binder aus der Gruppe von Antikörper, Antikörperfragment, nicht-Ig-Gerüst oder Aptameren ausgewählt werden.

[0127] Die Probe fließt über den immobilisierten Binder und DPP3, falls vorhanden, bindet an den Binder und wird ebenfalls zum Nachweis immobilisiert. Daraufhin kann ein Substrat hinzugefügt werden und das Reaktionsprodukt kann nachgewiesen werden, um das Vorhandensein und die Menge von DPP3 in der Probe anzuzeigen. Für die Zwecke der vorliegenden Beschreibung kann sich der Begriff „Festphase“ auf alle Materialien oder Behälter beziehen, in denen oder auf denen der Assay durchgeführt werden kann. Diese umfassen, sind aber nicht beschränkt auf poröse Materialien, nicht-poröse Materialien, Reagenzgläser, Kavitäten, Glasplättchen, Agarose-Harze (z. B. Sepharose von GE Healthcare Life Sciences), magnetische Materialien (z. B. Dynabeads™ oder Pierce™ Magnetkugeln von Thermo Fisher Scientific) usw.

[0128] Binder, die aus Proteinen oder Peptiden hergestellt wurden (z. B. Antikörper, Antikörperfragmente, nicht-Ig-Gerüst) werden durch Verfahren umfassend physikalische Adsorption (z. B. elektrostatische Wechselwirkung oder hydrophobe Wechselwirkung), Bioaffinitäts-Immobilisierung (z. B. Avidin-Biotin, Protein A/G/L, His-Tag und Ni²⁺-NTA, GST-Tag und Gluthation, DNA-Hybridisierung, Aptamere), kovalente Bindung (z. B. Amin und N-Hydroxysuccinimid) oder eine Kombination dieser Immobilisierungsverfahren auf der Festphase immobilisiert (Kim & Herr 2013). Binder, die aus Oligonukleotiden hergestellt wurden (z. B. Aptamere) können durch Nutzung des (Strept-)Avidin-Biotin-Systems auf der Festphase immobilisiert werden (Müller et al. 2012, Deng et al. 2014).

[0129] In einer spezifischen Ausführungsform dieses Verfahrens zur Diagnose einer Krankheit oder eines Zustands bei einem Subjekt, mit denen nekrotische Prozesse einhergehen bzw. die mit solchen im Zusammenhang stehen, ist dieser Trennschritt ein Waschschritt, mittels dessen Bestandteile der Probe, die nicht an den Fänger-Binder gebunden sind, aus der gefangenen DPP3 entfernt werden.

[0130] In einer spezifischen Ausführungsform dieses Verfahrens zur Diagnose einer Krankheit oder eines Zustands bei einem Subjekt, mit denen nekrotische Prozesse einhergehen bzw. die mit solchen im Zusammenhang stehen, wird die DPP3-Substratumwandlung mit einem Verfahren gemessen, das ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend: Fluoreszenz fluorogener Substrate (z. B. Arg-Arg-2NA, Arg-Arg-AMC), Farbveränderung chromogener Substrate, Lumineszenz von Substraten, die an Aminoluciferin gekoppelt sind (Promega Protease-Glo™ Assay), Massenspektrometrie, HPLC/FPLC (Umkehrphasen-Chromatografie, Größenausschlußchromatografie), Dünnschichtchromatografie, Kapillarzonen-elektrophorese, Gelelektrophorese gefolgt von Aktivitätsfärbung (immobilisierte, aktive DPP3) oder Western-Blot (Ab-spaltungsprodukte).

[0131] In einer spezifischen Ausführungsform dieses Verfahrens zur Diagnose einer Krankheit oder eines Zustands bei einem Subjekt, mit denen nekrotische Prozesse einhergehen bzw. die mit solchen im Zusammenhang stehen, kann das Substrat ausgewählt sein aus der Gruppe umfassend Angiotensin II und III, Leu-enkephalin, Met-enkephalin, Endomorphin 1 und 2, Valorphin, β-Casomorphin, Dynorphin, Proctolin, ACTH und MSH oder Di- und Tripeptiden, die an ein Fluorophor, ein Chromophor oder ein Aminoluciferin gekoppelt sind (Promega Protease-Glo™-Assay). Di- oder Tripeptide, die durch DPP3 gespalten werden, umfassen, sind aber nicht beschränkt auf 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. Fluorophore umfassen, sind aber nicht beschränkt auf β-Naphtylamid (2-Naphtylamid, βNA, 2NA), 4-Methoxy-β-naphtylamid (4-Methoxy-2-naphtylamid) und 7-Amido-4-methylcumarin (AMC, MCA; Abramic et al. 2000, Ohkubo et al. 1999). Die Spaltung dieser fluorogenen Substrate führt zur Freisetzung von fluoreszierendem β-Naphtylamin bzw. 7-Amino-4-methylcumarin. Chromophore umfassen, sind aber nicht beschränkt auf p-Nitroanilid-diazetat (pNA). Die Hydrolyse einer Peptid-pNA-Bindung in den chromogenen Substraten führt zur Freisetzung von pNA, das dadurch wiederum seine Farbe ändert. Damit ist die Änderung der Absorption (DA/min.) direkt proportional zur enzymatischen Aktivität. Unter Verwendung des Protease-Glo™ Assay von Promega wird nach der Spaltung durch DPP3 Aminoluciferin freigesetzt und dient als Substrat für eine gekoppelte Luciferase-Reaktion, die eine nachweisbare Lumineszenz emittiert.

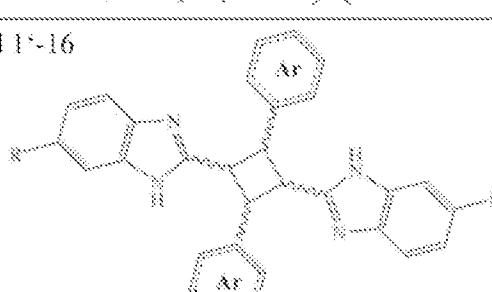
[0132] In einer bevorzugten Ausführungsform wird die DPP3-Aktivität durch Zugabe des fluorogenen Substrats Arg-Arg-βNA und die Überwachung der Fluoreszenz in Echtzeit gemessen.

[0133] Eine weitere wichtige Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist ein Hemmer der Aktivität von DPP3 zur Verwendung bei der Vorbeugung oder Behandlung eines Zustands bei einem Subjekt, mit dem nekrotische Prozesse einhergehen bzw. der mit solchen in Zusammenhang steht.

[0134] Hemmer sind Moleküle, die vorzugsweise eine wesentliche Hemmwirkung auf die DPP3-Aktivität haben. Bei diesen Molekülen kann es sich um Peptide und kleine Moleküle (siehe Tabelle 2) oder um Antikörper (siehe Tabelle 3) handeln. Eine wesentliche Hemmwirkung bedeutet eine Hemmung zu mehr als 80 % in einem Flüssigphasenassay wie oben beschrieben, bevorzugt mehr als 90 %, weiter bevorzugt fast oder genau 100 % Hemmung.

[0135] Peptidhemmer von DPP3 umfassen, sind aber nicht beschränkt auf Spinorphin, synthetische Derivate von Spinorphin (Tynorphin und andere Peptide, siehe Tabelle 2; Yamamoto et al. 2000), Propioxatin A und B (US4804676) und synthetische Propioxatin A-Analoga (Inaoka et al. 1988).

[0136] Niedermolekulare Hemmer von DPP3 umfassen, sind aber nicht beschränkt auf Fluostatine und Benzimidazol-Derivate. Die Fluostatine A und B sind Antibiotika, die in *Streptomyces* sp. TA-3391 erzeugt werden, die ungiftig sind und eine stark hemmende Wirkung auf die DPP3-Aktivität haben. Bisher sind 20 verschiedene Derivate von Benzimidazol synthetisiert und veröffentlicht worden (Agic et al. 2007; Rastija et al. 2015), wobei die beiden Verbindungen 1' und 4' die stärkste Hemmwirkung zeigen (Agic et al. 2007).

Category	Chemical Structure	Reference
fluostatins	Fluostatin A  Fluostatin B 	Akiyama et al. 1998
small molecules	Compound 1  Compound 2  Compound 3  Compound 4 	Agic et al. 2007
benzimidazol derivatives	Compound 1'-8'  R: Arphenyl Ar: 4-Cl-phenyl Ar: 2-furyl Ar: 2-thienyl R: Arphenyl Ar: 4-Cl-phenyl Ar: 2-furyl Ar: 2-thienyl	
	Compound 1'-16  R: Arphenyl Ar: 4-Cl-phenyl Ar: 2-furyl Ar: 2-thienyl R: Arphenyl Ar: 4-Cl-phenyl Ar: 2-furyl Ar: 2-thienyl R: Arphenyl Ar: 4-Cl-phenyl Ar: 2-furyl Ar: 2-thienyl R: Arphenyl Ar: 4-Cl-phenyl Ar: 2-furyl Ar: 2-thienyl	Rastija et al. 2015

Verbindungsart	Vollständiger Name/Aminosäuresequenz	Referenz
	<p>Propioxatin A und B</p> <p>A: R = H B: R = CH₃</p>	US 4894676 A/ Inaoka et al. 1986
	<p>Propioxatin-A-Analoga (Verbindung 1-17)</p> <p>1</p> <p>2</p> <p>3</p> <p>4</p> <p>5</p> <p>6</p> <p>7</p> <p>8</p> <p>9</p> <p>10</p> <p>11</p> <p>12</p> <p>13</p> <p>14</p> <p>15</p> <p>16</p> <p>17</p>	Inaoka et al. 1988
Peptide	Propioxatine und Propioxatine-A-Analoga	

Spinorphin und Spinorphin-Derivate	Spinorphin (LVVYPWT)	Yamamoto et al. 2000; Chiba et al. 2003
	Tynorphin (VVYPW)	
	Spinorphin derivatives (AVYPW, FIVPW, FVAPW, FVYPW, GVYPW, IVYPW, LVVPW, LVVYP, LVVYPW, LVYPW, PWT, SVYPW, VVYP, VVYPWT, VYP, VYPW, VYPWT, WVYPW, YAIPW, YPW, YPWT, YSIPW, YSVPW, YVYPW)	

Tabelle 2: Peptide und niedermolekulare DPP3-Hemmer

[0137] Der gewählte Hemmer kann pharmazeutisch verträglich, selektiv und/oder spezifisch für DPP3 sein und keine Zellmembranen und/oder die Blut-Hirnschranke durchdringen. Selektive und spezifische DPP3-Hemmer binden nicht an andere Proteine/Enzyme oder werden von anderen Proteinen/Enzymen gebunden und hemmen kein/keine andere/andere Enzym/Protease/Peptidase außer DPP3. Kleine Peptide können von unspezifischen Aminopeptidasen gebunden und gespalten werden und niedermolekulare Hemmer können leicht die Zellmembran und die Blut-Hirnschranke durchdringen. Anti-DPP3-Antikörper, anti-DPP3-Antikörperfragmente oder anti-DPP3-nicht-Ig-Gerüste binden DPP3 spezifisch und selektiv, ohne die Zellmembran oder die Blut-Hirnschranke zu durchdringen. Spezifische anti-DPP3-Antikörper, Antikörperfragmente oder nicht-Ig-Gerüste sind daher die bevorzugten Hemmer der DPP3-Aktivität.

[0138] Der Hemmer der DPP3Aktivität kann bei der Vorbeugung oder Behandlung einer Krankheit oder eines Zustands bei einem Subjekt, mit denen nekrotische Prozesse einhergehen bzw. die mit solchen in Zusammenhang stehen, eingesetzt werden, wobei der Hemmer ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend einen anti-DPP3-Antikörper oder ein anti-DPP3-Antikörperfragment oder ein anti-DPP3-nicht-Ig-Gerüst.

[0139] Der Hemmer oder Effektor der Aktivität von DPP3 kann bei der Vorbeugung oder Behandlung einer Krankheit oder eines Zustands bei einem Subjekt, mit denen nekrotische Prozesse einhergehen bzw. die mit solchen in Zusammenhang stehen, eingesetzt werden, wobei die Krankheit ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend Herzinsuffizienz, chronische Herzinsuffizienz, akute Herzinsuffizienz, Myokardinfarkt, Schlaganfall, Leberinsuffizienz, Brandwunden, traumatische Verletzungen, schwere Infektion (mikrobiisch, viral (z. B. AIDS), parasitär (z. B. Malaria)), systemisches inflammatorisches Response-Syndrom (SIRS) oder Sepsis, Krebs, akute Nierenverletzung, Störungen des Zentralnervensystems (z. B. Krampfanfälle, neurodegenerative Erkrankungen), Autoimmunerkrankungen, Gefäßerkrankungen (z. B. Kawasaki-Syndrom) und Hypotonie.

[0140] In einer weiteren Ausführungsform ist die Krankheit ausgewählt aus der Gruppe umfassend akute Herzinsuffizienz, Myokardinfarkt, Leberinsuffizienz, Brandwunden, schwere Infektion (mikrobiisch, viral (z. B. AIDS), parasitär (z. B. Malaria)), systemisches inflammatorisches Response-Syndrom (SIRS) oder Sepsis, Krebs und akute Nierenverletzung,

[0141] Der Hemmer der DPP3Aktivität kann bei der Vorbeugung oder Behandlung einer Krankheit oder eines Zustands bei einem Subjekt eingesetzt werden, wobei es sich bei der Krankheit oder dem Zustand um akute Herzinsuffizienz, Myokardinfarkt, Leberinsuffizienz, Krebs, akute Nierenverletzung und Hypotonie handelt.

[0142] Der Hemmer der DPP3Aktivität kann bei der Behandlung einer Krankheit oder eines Zustands bei einem Subjekt eingesetzt werden, wobei es sich bei der Krankheit oder dem Zustand um akute Herzinsuffizienz, Myokardinfarkt, Leberinsuffizienz, Krebs, akute Nierenverletzung und Hypotonie handelt.

[0143] Es kann sein, dass diese Krankheit nicht Alzheimer nicht Krebs und nicht rheumatoide Arthritis ist.

[0144] In einer spezifischen Ausführungsform ist diese Krankheit oder dieser Zustand Hypotonie.

[0145] In einer spezifischen Ausführungsform der Erfindung wird der Hemmer der Aktivität von DPP3 bei der Vorbeugung oder Behandlung eines Zustands bei einem Subjekt, mit dem nekrotische Prozesse einhergehen bzw. der mit solchen in Zusammenhang steht, eingesetzt, wobei der Hemmer ein einfach bindender oder mindestens zweifach bindender Antikörper ist.

[0146] In einer spezifischen Ausführungsform der Erfindung wird der Hemmer oder Effektor der DPP3-Aktivität bei der Vorbeugung oder Behandlung eines Zustands bei einem Subjekt, mit dem nekrotische Prozesse einhergehen bzw. der mit solchen in Zusammenhang steht, eingesetzt, wobei der Hemmer oder Effektor ein anti-DPP3-Antikörper oder ein anti-DPP3-Antikörperfragment oder ein anti-DPP3-nicht-Ig-Gerüst ist, der/das an SEQ ID Nr. 1 bindet, in einer spezifischen Ausführungsform, ein anti-DPP3-Antikörper oder ein anti-DPP3-Antikörperfragment oder ein anti-DPP3-nicht-Ig-Gerüst, der/das an SEQ ID Nr. 2 bindet.

[0147] In einer spezifischen Ausführungsform der Erfindung wird der Hemmer oder Effektor der DPP3-Aktivität bei der Vorbeugung oder Behandlung eines Zustands bei einem Subjekt, mit dem nekrotische Prozesse einhergehen bzw. der mit

solchen in Zusammenhang steht, eingesetzt, wobei der Hemmer oder Effektor ein Antikörper oder Fragment oder Gerüst ist, der/das eine minimale Bindungsaffinität zu DPP3 von höchstens 10^{-7} M aufweist.

[0148] Bei der Vorbeugung oder Behandlung einer Krankheit oder eines Zustands bei einem Subjekt, mit denen nekrotische Prozesse einhergehen bzw. die mit solchen in Zusammenhang steht, kann der Hemmer oder Effektor ein Antikörper oder Fragment oder Gerüst sein, der/das an Volllängen-DPP3 bindet und die Aktivität von DPP3 um mindestens 10 %, oder mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 60 %, noch weiter bevorzugt mehr als 70 %, noch weiter bevorzugt mehr als 80 %, noch weiter bevorzugt mehr als 90 %, noch weiter bevorzugt mehr als 95 % hemmt. Die Aktivität kann in einem Flüssigphasenassay wie oben beschrieben bestimmt werden.

[0149] Der Hemmer oder Effektor der DPP3-Aktivität kann bei der Vorbeugung oder Behandlung einer Krankheit oder eines Zustands bei einem Subjekt, mit denen nekrotische Prozesse einhergehen bzw. die mit solchen in Zusammenhang stehen, eingesetzt werden, wobei der Hemmer oder Effektor ein monospezifischer Antikörper oder ein monospezifisches Fragment oder ein monospezifisches Gerüst ist.

[0150] Ein monospezifischer anti-DPP3-Antikörper oder ein monospezifisches anti-DPP3-Antikörperfragment oder ein monospezifisches anti-DPP3-nicht-Ig-Gerüst bedeutet, dass dieser Antikörper oder dieses Antikörperfragment oder nicht-Ig-Gerüst an eine bestimmte Region bindet, die mindestens 5 Aminosäuren innerhalb der Ziel-DPP3 umfasst. Ein monospezifischer anti-DPP3-Antikörper oder ein monospezifisches anti-DPP3-Antikörperfragment oder ein monospezifisches anti-DPP3-nicht-Ig-Gerüst sind anti-DPP3-Antikörper oder anti-DPP3-Antikörperfragmente oder anti-DPP3-nicht-Ig-Gerüste, die alle eine Affinität für das gleiche Antigen haben.

[0151] In einer weiteren spezifischen und bevorzugten Ausführungsform ist der anti-DPP3-Antikörper oder das Anti-DPP3-Antikörperfragment oder das anti-DPP3-nicht-Ig-Gerüst, der/das an DPP3 anbindet, jeweils ein monospezifischer Antikörper, ein monospezifisches Antikörperfragment oder ein monospezifisches nicht-Ig-Gerüst, wobei monospezifisch bedeutet, dass dieser Antikörper, dieses Antikörperfragment oder dieses nicht-Ig-Gerüst an eine spezifische Region bindet, die mindestens 4 Aminosäuren innerhalb der Ziel-DPP3 umfasst. Erfindungsgemäße monospezifische Antikörper oder Fragmente oder nicht-Ig-Gerüste sind Antikörper oder Fragmente oder nicht-Ig-Gerüste, die alle eine Affinität für das gleiche Antigen haben. Monoklonale Antikörper sind monospezifisch, aber monospezifische Antikörper können auch auf andere Weise erzeugt werden als durch eine allgemeine Keimzelle.

[0152] Der Hemmer oder Effektor der DPP3-Aktivität kann bei der Vorbeugung oder Behandlung einer Krankheit oder eines Zustands bei einem Subjekt, mit denen nekrotische Prozesse einhergehen bzw. die mit solchen in Zusammenhang stehen, eingesetzt werden, wobei dieses Subjekt erhöhte DPP3-Werte aufweist. Ein erhöhter Wert ist ein Wert über einem vorbestimmten Schwellenwert.

[0153] Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist eine pharmazeutische Zusammensetzung umfassend einen Hemmer der DPP3-Aktivität, wie oben beschrieben, zur Verwendung bei der Vorbeugung oder Behandlung eines Zustands bei einem Subjekt, mit dem nekrotische Prozesse einhergehen bzw. die mit solchen in Zusammenhang steht.

[0154] Es wird ein Verfahren zur Vorbeugung oder Behandlung einer Krankheit oder eines Zustands bei einem Subjekt offenbart, mit denen nekrotische Prozesse einhergehen bzw. die mit solchen in Zusammenhang stehen, wobei ein Hemmer der DPP3-Aktivität verabreicht wird.

[0155] In einer spezifischen Ausführungsform des Verfahrens zur Vorbeugung oder Behandlung einer Krankheit oder eines Zustands bei einem Subjekt, mit denen nekrotische Prozesse einhergehen bzw. die mit solchen in Zusammenhang stehen, wird dieser Hemmer ausgewählt aus der Gruppe umfassend einen anti-DPP3-Antikörper oder ein anti-DPP3-Antikörperfragment oder ein anti-DPP3-nicht-Ig-Gerüst.

[0156] In einer spezifischen Ausführungsform des Verfahrens zur Vorbeugung oder Behandlung einer Krankheit oder eines Zustands bei einem Subjekt, mit denen nekrotische Prozesse einhergehen bzw. die mit solchen im Zusammenhang stehen, ist die Krankheit ausgewählt aus der Gruppe umfassend Herzinsuffizienz, chronische Herzinsuffizienz, akute Herzinsuffizienz, Myokardinfarkt, Schlaganfall, Leberinsuffizienz, Brandwunden, traumatische Verletzungen, schwere Infektion (mikrobiisch, viral (z. B. AIDS), parasitär (z. B. Malaria)), systemisches inflammatorisches Response-Syndrom (SIRS) oder Sepsis, Krebs, akute Nierenverletzung, Störungen des Zentralnervensystems (z. B. Krampfanfälle, neurodegenerative Erkrankungen), Autoimmunerkrankungen, Gefäßerkrankungen (z. B. Kawasaki-Syndrom) und Hypotonie.

[0157] In einer spezifischen Ausführungsform des Verfahrens zur Vorbeugung oder Behandlung einer Krankheit oder eines Zustands bei einem Subjekt, mit denen nekrotische Prozesse einhergehen bzw. die mit solchen in Zusammenhang stehen, ist der Hemmer ein einfacher bindender oder mindestens zweifach bindender Antikörper.

[0158] In einer spezifischen Ausführungsform des Verfahrens zur Vorbeugung oder Behandlung einer Krankheit oder eines Zustands bei einem Subjekt, mit denen nekrotische Prozesse einhergehen bzw. die mit solchen in Zusammenhang stehen, ist dieser Hemmer ein anti-DPP3-Antikörper oder ein anti-DPP3-Antikörperfragment oder ein anti-DPP3-nicht-Ig-Gerüst, der/das an SEQ ID Nr. 1 bindet, in einer spezifischen Ausführungsform, ein anti-DPP3-Antikörper oder ein anti-DPP3-Antikörperfragment oder ein anti-DPP3-nicht-Ig-Gerüst, der/das an SEQ ID Nr. 2 bindet.

[0159] In einer spezifischen Ausführungsform des Verfahrens zur Vorbeugung oder Behandlung einer Krankheit oder eines Zustands bei einem Subjekt, mit denen nekrotische Prozesse einhergehen bzw. die mit solchen in Zusammenhang stehen, ist dieser Hemmer ein Antikörper oder Fragment oder Gerüst, der/das eine minimale Bindungsaffinität zu DPP3 von höchstens 10^{-7} M aufweist.

[0160] In einer spezifischen Ausführungsform des Verfahrens zur Vorbeugung oder Behandlung einer Krankheit oder eines Zustands bei einem Subjekt, mit denen nekrotische Prozesse einhergehen bzw. die mit solchen in Zusammenhang stehen, ist dieser Hemmer oder Effektor ein monospezifischer Antikörper oder ein monospezifisches Fragment oder ein monospezifisches Gerüst.

[0161] In einer spezifischen Ausführungsform des Verfahrens zur Vorbeugung oder Behandlung einer Krankheit oder eines Zustands bei einem Subjekt, mit denen nekrotische Prozesse einhergehen bzw. die mit solchen in Zusammenhang steht, ist der Hemmer oder Effektor ein Antikörper oder Fragment oder Gerüst, der/das an Volllängen-DPP3 bindet und die Aktivität von DPP3 um mindestens 10 %, oder mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 60 %, noch weiter bevorzugt mehr als 70 %, noch weiter bevorzugt mehr als 80 %, noch weiter bevorzugt mehr als 90 %, noch weiter bevorzugt mehr als 95 % hemmt.

[0162] In einer spezifischen Ausführungsform des Verfahrens zur Vorbeugung oder Behandlung einer Krankheit oder eines Zustands bei einem Subjekt, mit denen nekrotische Prozesse einhergehen bzw. die mit solchen in Zusammenhang stehen, weist dieses Subjekt einen erhöhten DPP3-Wert auf. Ein erhöhter Wert ist ein Wert über einem vorbestimmten Schwellenwert. Schwellenwerte sind oben definiert.

[0163] Weiterhin wird die Entfernung von DPP3 aus dem Blut des Patienten offenbart. Eine solche Entfernung kann durch mehrere Apherese-Techniken und/oder Affinitätschromatografie-Schritte erreicht werden (Balogun et al. 2010). Diese Verfahren umfassen, sind aber nicht beschränkt auf die Filterung von Patientenplasma durch einen Adsorber, der spezifische und hochgradig affine, an Agaroseharze gekoppelte DPP3-Antikörper enthält; siehe Beispiel 12 für eine Analyse der DPP3-Bindung an mögliche Adsorber-Materialien.

[0164] Eine pharmazeutische Zusammensetzung der Erfindung ist so formuliert, dass sie mit der vorgesehenen Darreichungsform vereinbar ist. Darreichungsformen sind in der Regel durch die Körperstelle, an der der Stoff verabreicht wird, klassifiziert. Häufige Beispiele umfassen orale, epikutane, subkutane, intradermale, sublinguale, intramuskuläre, intraarterielle, intravenöse und intraperitoneale Verabreichung.

[0165] Pharmazeutische Zusammensetzungen können auch über das zentrale Nervensystem (ZNS) verabreicht werden, zum Beispiel epidural (Synonym: peridural) durch Injektion oder Infusion in den Epiduralspace, intrazerebral (in das Großhirn) als direkte Injektion in das Gehirn, intrazerebroventrikulär (verabreicht in das ventrikuläre System des Gehirns) oder intrathekal (in den Rückenmarkskanal).

[0166] Ein Verfahren zur Diagnose einer Krankheit oder eines Zustands bei einem Subjekt, mit denen nekrotische Prozesse einhergehen bzw. die mit solchen in Zusammenhang stehen, umfasst:

- Bestimmung der Menge an Gesamt-DPP3 und/oder Bestimmung der Menge an aktiver DPP3 in einer Körperflüssigkeitsprobe des Subjekts,
- Vergleich der bestimmten Menge an Gesamt-DPP3 oder aktiver DPP3 mit einem vorbestimmten Schwellenwert,
- wobei bei dem Subjekt die Diagnose einer Krankheit oder eines Zustands vorliegt, mit denen nekrotische Prozesse einhergehen bzw. die mit solchen in Zusammenhang stehen, wenn die bestimmte Menge den vorbestimmten Schwellenwert übersteigt.

[0167] Dieses Verfahren kann zur Diagnose einer Krankheit oder eines Zustands bei einem Subjekt, mit denen nekrotische Prozesse einhergehen bzw. die mit solchen in Zusammenhang stehen verwendet werden, wobei die Menge an Gesamt-DPP3 oder aktiver DPP3 in der Einheit der Konzentration bestimmt wird.

[0168] Beim oben beschriebenen Verfahren kann die Probe ausgewählt sein aus der Gruppe umfassend Vollblut, Serum und Plasma. Die zu diagnostizierende Krankheit kann dabei ausgewählt seinesfalls aus der Gruppe umfassend Herzinsuffizienz, chronische Herzinsuffizienz, akute Herzinsuffizienz, Myokardinfarkt, Schlaganfall, Leberinsuffizienz, Brandwunden, traumatische Verletzungen, schwere Infektion (mikrobiisch, viral (z. B. AIDS), parasitär (z. B. Malaria)), systemisches inflammatorisches Response-Syndrom (SIRS) oder Sepsis, Krebs, akute Nierenverletzung, Störungen des Zentralnervensystems (z. B. Krampfanfälle, neurodegenerative Erkrankungen), Autoimmunerkrankungen, Gefäßerkrankungen (z. B. Kawasaki-Syndrom) und Hypotonie. Bei einem Verfahren kann die Menge an Gesamt-DPP3 und/oder die Menge an aktiver DPP3 in einer Körperflüssigkeitsprobe des Subjekts bestimmt werden, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:

- Kontaktieren der Probe mit einem Fänger-Binder, der spezifisch an Volllängen-DPP3 bindet,
- Trennung der an den Fänger-Binder gebundenen DPP3,

- Hinzufügen des DPP3-Substrats zu der abgetrennten DPP3,
- Quantifizieren der aktiven DPP3 durch Messen und Quantifizieren der Umwandlung eines DPP3-Substrats. Dabei kann der Fänger-Binder aus der Gruppe von Antikörper, Antikörperfragment oder nicht-Ig-Gerüst ausgewählt werden.

[0169] In einer weiteren Variante des Verfahrens ist der Fänger-Binder auf einer Oberfläche immobilisiert.

[0170] Der Trennschritt im Verfahren kann beispielsweise ein Waschschnitt sein, mittels dessen Bestandteile der Probe, die nicht an den Fänger-Binder gebunden sind, aus der aufgefangenen DPP3 entfernt werden.

[0171] Die Umwandlung von DPP3-Substrat kann gemäss einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung durch ein Verfahren erfasst werden, das ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend: Fluoreszenz fluorogener Substrate (z. B. Arg-Arg-βNA, Arg-Arg-AMC), Farbveränderung chromogener Substrate, Lumineszenz von Substraten, die an Aminoluciferin (Promega Protease-Glo™ Assay) gebunden sind, Massenspektrometrie, HPLC/FPLC (Umkehrphasen-Chromatografie, Größenausschlusschromatografie), Dünnschichtchromatografie, Kapillarzonenelektrophorese, Gel-elektrophorese gefolgt von Aktivitätsfärbung (immobilisierte, aktive DPP3) oder Western-Blot (Abspaltungsprodukte).

[0172] Das Substrat kann ausgewählt sein aus der Gruppe umfassend: Angiotensin II, III und IV, Leu-enkephalin, Met-enkephalin, Endomorphin 1 und 2, Valorphin, β-Casomorphin, Dynorphin, Proctolin, ACTH und MSH, oder Dipeptide gekoppelt an ein Fluorophor, ein Chromophor oder Aminoluciferin, wobei das Dipeptid Arg-Arg ist.

[0173] Dabei ist das Dipeptid vorzugsweise an ein Fluorophor, ein Chromophor oder Aminoluciferin gekoppelt, wobei das Dipeptid Arg-Arg ist.

[0174] Vorzugsweise wird das oben beschriebene Diagnoseverfahren mindestens zweimal durchgeführt.

[0175] Der Hemmer der Aktivität von DPP3 kann bei der Vorbeugung oder Behandlung einer Krankheit oder eines Zustands bei einem Subjekt verwendet werden, mit denen nekrotische Prozesse einhergehen bzw. die mit solchen in Zusammenhang stehen. Dabei ist der Hemmer ausgewählt aus der Gruppe umfassend einen anti-DPP3-Antikörper oder ein anti-DPP3-Antikörperfragment oder ein anti-DPP3-nicht-Ig-Gerüst.

[0176] Die vorzugbeugende oder zu behandelnde Krankheit ist dabei vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe umfassend Herzinsuffizienz, chronische Herzinsuffizienz, akute Herzinsuffizienz, Myokardinfarkt, Schlaganfall, Leberinsuffizienz, Brandwunden, traumatische Verletzungen, schwere Infektion (mikrobiisch, viral (z. B. AIDS), parasitär (z. B. Malaria)), systemisches inflammatorisches Response-Syndrom (SIRS) oder Sepsis, Krebs, akute Nierenverletzung, Störungen des Zentralnervensystems (z. B. Krampfanfälle, neurodegenerative Erkrankungen), Autoimmunerkrankungen, Gefäßerkrankungen (z. B. Kawasaki-Syndrom) und Hypotonie.

[0177] Gemäss einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist der Hemmer ein einfacher bindender oder mindestens zweifach bindender Antikörper.

[0178] Dabei ist der Hemmer vorzugsweise ein anti-DPP3-Antikörper oder ein anti-DPP3-Antikörperfragment oder ein anti-DPP3-nicht-Ig-Gerüst, der/das an SEQ ID Nr. 1, insbesondere an SEQ ID Nr. 2 bindet.

[0179] Eine weitere bevorzugte Ausführungsform des Hemmers ist ein Antikörper oder Fragment oder Gerüst, der/das eine minimale Bindungsaaffinität zu DPP3 von höchstens 10^{-7} M aufweist.

[0180] Vorzugsweise ist der Hemmer ein monospezifischer Antikörper oder ein monospezifisches Fragment oder ein monospezifisches Gerüst.

[0181] Gemäss einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist der Hemmer ein Antikörper oder Fragment oder Gerüst, der/das an Volllängen-DPP3 bindet und die Aktivität von DPP3 um mindestens 10 %, oder mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 60 %, noch weiter bevorzugt mehr als 70 %, noch weiter bevorzugt mehr als 80 %, noch weiter bevorzugt mehr als 90 %, noch weiter bevorzugt mehr als 95 % hemmt.

[0182] Vorzugsweise ist der Hemmer selektiv bzw. spezifisch für DPP3 und durchdringt keine Zellmembranen und/oder die Blut-Hirnschranke.

[0183] Das Subjekt weist in einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung eine Menge von Gesamt-DPP3 bzw. eine Menge von aktiver DPP3 in einer Körperflüssigkeitsprobe des Subjekts auf, die über einem vorbestimmten Schwellenwert liegt.

[0184] Die vorliegende Erfindung betrifft des Weiteren eine pharmazeutische Zusammensetzung umfassend einen Hemmer der Aktivität von DPP3 wie oben beschrieben, zur Verwendung bei der Vorbeugung oder Behandlung eines Zustands bei einem Subjekt, mit dem nekrotische Prozesse einhergehen bzw. der mit solchen in Zusammenhang steht.

[0185] Der erfindungsgemäss Hemmer der Aktivität von DPP3 kann in einem Verfahren zur extrakorporalen Entfernung von DPP3 aus Plasma umfassend Apherese und Affinitätschromatografie verwendet werden.

[0186] Ein erfindungsgemässes Verfahren zur Bestimmung von aktiver DPP3 in einer Körperflüssigkeitsprobe eines Subjekts, umfasst vorzugsweise die folgenden Schritte:

- Kontaktieren der Probe mit einem Fänger-Binder, der spezifisch an Volllängen-DPP3 bindet,
- Trennung der an den Fänger-Binder gebundenen DPP3,
- Hinzufügen des DPP3-Substrats zu der abgetrennten DPP3,
- Quantifizieren der aktiven DPP3 durch Messen und Quantifizieren der Umwandlung eines DPP3-Substrats.

[0187] Dabei kann der Fänger-Binder ausgewählt sein aus der Gruppe bestehend aus Antikörper, Antikörperfragment oder nicht-Ig-Gerüst.

[0188] Vorzugsweise ist der Fänger-Binder ein Antikörper.

[0189] Der Fänger-Binder kann auch auf einer Oberfläche immobilisiert sein.

[0190] Gemäss einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist der Trennschritt ein Waschschritt, mittels dessen Bestandteile der Probe, die nicht an den Fänger-Binder gebunden sind, aus der aufgefangenen DPP3 entfernt werden.

[0191] In einem bevorzugten erfindungsgemässen Verfahren zur Bestimmung von aktiver DPP3 in einer Körperflüssigkeitsprobe eines Subjekts wird die Umwandlung des DPP3-Substrats durch ein Verfahren ermittelt, das ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend: Fluoreszenz fluorogener Substrate (z. B. Arg-Arg-βNA, Arg-Arg-AMC), Farbveränderung chromogener Substrate, Lumineszenz von Substraten, die an Aminoluciferin (Promega Protease-Glo™ Assay) gebunden sind, Massenspektrometrie, HPLC/ FPLC (Umkehrphasen-Chromatografie, Größenausschlusschromatografie), Dünnschichtchromatografie, Kapillarzonenelektrophorese, Gelelektrophorese gefolgt von Aktivitätsfärbung (immobilisierte, aktive DPP3) oder Western-Blot (Abspaltungsprodukte).

[0192] Das Substrat ist vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe umfassend: ein Dipeptid gekoppelt an ein Fluorophor, ein Chromophor oder Aminoluciferin, wobei das Dipeptid Arg-Arg ist.

[0193] Im erfindungsgemässen Verfahren gemäss einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die Probe ausgewählt aus der Gruppe umfassend Vollblut, Serum und Plasma. Die vorliegende Erfindung betrifft des Weiteren ein Assay oder Kit zur Bestimmung von aktiver DPP3 in einer Körperflüssigkeitsprobe eines Subjekts, umfassend:

- einen Fänger-Binder, der spezifisch an Volllängen-DPP3 bindet,
- ein DPP3-Substrat.

[0194] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemässen Assays oder Kits ist der Fänger-Binder ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Antikörper, Antikörperfragment oder nicht-Ig-Gerüst.

[0195] Vorzugsweise hemmt der Fänger-Binder in einem Flüssigphasenassay weniger als 50 % der DPP3-Aktivität, bevorzugt weniger als 40 %, weiter bevorzugt weniger als 30 %.

[0196] Die bindende Region von DPP3 für den Fänger-Binder liegt vorzugsweise nicht innerhalb der Region der Aminosäuren 316 - 669 von SEQ ID Nr. 1.

[0197] In einem besonders bevorzugten erfindungsgemässen Assay oder Kit ist der Fänger-Binder ein Antikörper.

[0198] Vorzugsweise ist der Binder auf einer Oberfläche immobilisiert.

[0199] Das Substrat ist vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus: Angiotensin II, III und IV, Leu-enkephalin, Met-enkephalin, Endomorphin 1 und 2, Valorphin, β-Casomorphin, Dynorphin, Proctolin, ACTH und MSH, oder einem Dipeptid gekoppelt an ein Fluorophor, ein Chromophor oder Aminoluciferin, wobei das Dipeptid Arg-Arg ist.

[0200] Offenbart wird ausserdem die Anwendung eines Verfahrens zur Bestimmung von aktiver DPP3 in einer Körperflüssigkeitsprobe eines Subjekts wie oben beschrieben oder eine Verwendung eines Assays oder Kits nach wie oben beschrieben, in einem Verfahren zur Diagnose oder Überwachung einer Krankheit oder eines Zustands bei einem Subjekt, mit denen nekrotische Prozesse einhergehen bzw. die mit solchen in Zusammenhang stehen, wie oben beschrieben.

BEISPIELE

1. Beispiel 1

[0201] Die DPP3-Aktivität im Plasma einer Vielzahl von erkrankten Patienten (Patienten mit akutem Myokardinfarkt, kardiogenem Schock, septischem Schock und Leberinsuffizienz) wurde mithilfe eines spezifischen DPP3-Fänger-Aktivitätsassays ermittelt und mit den DPP3-Plasmaaktivitäten gesunder Kontrollgruppen verglichen.

1.1. Studienkohorte:

[0202] Plasmaproben wurden von 388 Patienten entnommen, die bei der ersten Vorstellung direkt in die Notaufnahme eingewiesen wurden. Basierend auf ihrer endgültigen Diagnose konnten diese Patienten in 4 Untergruppen unterteilt werden: Patienten mit akutem Myokardinfarkt, kardiogenem Schock, septischem Schock und Leberinsuffizienz. Als Kontrollgruppe dienten Plasmaproben von 93 gesunden Subjekten.

1.2. hDPP3-Fänger-Aktivitätstest:

[0203] Die DPP3 der Plasmaproben ($10 \mu\text{l}$) wird zunächst in einem Affinitätsreinigungsschritt angereichert und seine Aktivität durch die Zugabe des fluorogenen Substrats Arg-Arg- β NA gemessen (eine detaillierte Beschreibung ist in Beispiel 4 gegeben). Die berechneten Steigungen (in nmol β NA/Min pro ml Probe [$\text{nmol } \beta\text{NA min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$]) der zunehmenden Fluoreszenz der unterschiedlichen Proben beziehen sich auf die Probenmenge von $10 \mu\text{l}$.

1.3 Ergebnisse:

[0204] Der Vergleich der Proben der Patienten mit denen der gesunden Kontrollsubjekte wies erheblich höhere DPP3-Aktivitätswerte bei allen Patienten mit schweren Erkrankungen oder Organversagen auf (Fig. 10)

2. Beispiel 2

[0205] Bei diesem Versuch wurde die Wirkung einer rekombinanten hDPP3-Injektion in gesunde Ratten durch Blutdrucküberwachung untersucht.

2.1. Verfahren:

[0206] 2-3 Monate alte Wistar-Rattenmännchen (Charles River Laboratories, Deutschland) wurden für diese Studie verwendet. Zur Messung und Aufzeichnung des Blutdrucks wurde ein Katheter (Introcan-W; 22 G/I"; B. Braun) in die A. carotis communis dextra (rechte Halsschlagader) eingeführt. Humane Dipeptidylpeptidase 3 mit einem N-terminalen GST-Tag (recGST-hDPP3) wurde über die Schwanzvene injiziert.

[0207] Die Tiere wurden zunächst mit Isofluran zum Wiegen anästhesiert (Gesamtgewicht in g) und anschließend mit intraperitonealer (i.p.) Urethan-Injektion von $1,2 \text{ g / kg Körpergewicht}$ ($c = 0,4 \text{ g / ml}$) zur Langzeitbetäubung. Der ventrale Bereich des Nackens wurde rasiert und mit Ethanol abgerieben. Die Gefäße wurden vorbereitet und die Katheter eingeführt. Beide Katheter wurden abschließend mit einer heparinisierten isotonen Natriumchlorid-Lösung gespült. Die Druckwandler (medex logical, Medex Medical Ltd.) wurden dann an das Patientenüberwachungssystem (Datex-Ohmeda, GE) angeschlossen. In einem an den Blutdruck-Monitor angeschlossenen Laptop Computer wurden die Blutdruckdaten separat mittels S/5 Collect Software aufgezeichnet.

[0208] Den Ratten wurde recGST-hDPP3 $0,2 \text{ mg/kg}$ in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) in die Schwanzvene injiziert. Der Blutdruck wurde durchgehend vor und nach der DPP3-Injektion überwacht.

2.2. Ergebnisse:

[0209] Die Injektion von rekombinanter GST-hDPP3 in gesunde Ratten hat eine sofortige Senkung des Blutdrucks zur Folge (Fig. 11).

3. Beispiel 3

[0210] Erzeugung von Antikörpern und Bestimmung der Bindungsfähigkeit von DPP3: Mehrere Maus-Antikörper wurden erzeugt und auf ihre Bindungsfähigkeit mit humarer DPP3 in einem Sandwich- oder Aktivitätsassay untersucht (siehe Tabelle 3).

3.1. Verfahren:

- Peptide/Konjugate zur Immunisierung:

[0211] DPP3-Peptide zur Immunisierung wurden zwecks Konjugation der Peptide an Rinderserumalbumin (BSA) mit einem zusätzlichen N-terminalen Cystein (sofern in der gewählten DPP3-Sequenz kein Cystein vorhanden ist), siehe Tabelle 3 (JPT Technologies, Berlin) synthetisiert. Die Peptide waren mittels Sulfolink-Kopplungsgel (Perbio-science, Bonn) kovalent an das Rinderserumalbumin (BSA) gebunden. Das Kopplungsverfahren wurde nach den Anweisungen von Perbio ausgeführt. Die rekombinante GST-hDPP3 wurde von USBio hergestellt.

- Immunisierung von Mäusen, Immunzellenfusion und Screening:

[0212] BALB/c-Mäusen wurden an Tag 0 intraperitoneal (i.p.) mit $84 \mu\text{g}$ GST-hDPP3 oder $100 \mu\text{g}$ DPP3-Peptid-BSA-Konjugaten (emulgiert in TiterMax Gold Adjuvans) injiziert, an Tag 14 mit $84 \mu\text{g}$ bzw. $100 \mu\text{g}$ (emulgiert in komplettem Freund-Adjuvans) und an Tag 21 mit $42 \mu\text{g}$ bzw. $50 \mu\text{g}$ (in inkomplettem Freund-Adjuvans). An Tag 49 erhielten die Tiere eine

intravenöse Injektion von 42 µg GST-hDPP3 oder 50 µg in Salzlösung gelösten DPP3-Peptid-BSA-Konjugaten. Drei Tage später wurden die Mäuse getötet und die Immunzellenfusion durchgeführt.

[0213] Splenozyten von den immunisierten Mäusen und Zellen der Myeloma-Zelllinie SP2/0 wurden mit 1 ml 50 %igem Polyethylenglykol für 30 Sek. bei 37 °C fusioniert. Nach der Reinigung wurden die Zellen in Zellkulturplatten mit 96 Kavitäten ausgesät. Hybrideklone wurden durch HAT-Selektion gewonnen [RPMI 1640 Zellkulturmedium ergänzt mit 20 % fötalem Kälberserum und HAT Supplement]. Nach einer Woche wurde das HAT-Medium für drei Durchgänge durch HT-Medium ersetzt und anschließend wieder das normale Zellkulturmedium verwendet.

[0214] Die Zellkulturüberstände wurden zwei Wochen nach der Fusion hauptsächlich auf rekombinante DPP3 bindende Ig-Antikörper untersucht. Deswegen wurde rekombinante GST-markierte DPP3 (USBiologicals, Salem, USA) in Zellkulturplatten mit 96 Kavitäten (100 ng/ Kavität) immobilisiert und mit 50 µl Zellkulturüberstand pro Kavität für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Waschen der Platte wurden 50 µl/Kavität POD-Kaninchchen-Anti-Maus-IgG hinzugefügt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschritt wurden 50 µl Chromogenlösung (3,7 mM o-Phenyldiamin in Citrat/Wasserstoff-Phosphat-Puffer, 0,012 % H₂O₂) zu jeder Kavität hinzugefügt, 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und die Farbreaktion durch Zugabe von 50 µl 4N-Schwefelsäure gestoppt. Absorption wurde bei 490 nm ermittelt.

[0215] Die positiv getesteten Mikrokulturen wurden zur Vermehrung in 24- Kavitäten-Platten transferiert. Nach einem wiederholten Test wurden die ausgewählten Kulturen mittels limitierter Verdünnung kloniert und umkloniert und die Isotypen bestimmt.

- Herstellung monoklonaler Maus-Antikörper

[0216] Gegen die GST-markierte humane DPP3 oder DPP3-Peptide gerichtete Antikörper wurden mit standardmäßigen Antikörpererzeugungsverfahren (Marx et al., 1997) hergestellt und mit Protein A gereinigt. Die Antikörper wiesen dabei basierend auf der SDS-Gelelektrophorese Reinheitsgrade von ≥ 90 % auf.

- Charakterisierung von Antikörpern - hDPP3-Inhibitionsanalyse

[0217] Für die Analyse der DPP3-Hemmfähigkeit der verschiedenen Antikörper und Antikörperklone wurde ein DPP3-Aktivitätstest in einem bekannten Verfahren (Jones et al., 1982) durchgeführt. Rekombinante GST-markierte hDPP3 wurde in einem Assaypuffer (25 ng/ ml GST-DPP3 in 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 und 100 µM ZnCl₂) verdünnt und 200 µl dieser Lösung mit 10 µg des jeweiligen Antikörpers bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer Stunde der Vorinkubation wurde fluorogenes Arg-Arg-βNA (20 µl, 2 mM)-Substrat zur Lösung hinzugefügt und die Erzeugung von freiem βNA über einen Zeitraum mit einem Twinkle LB 970 Mikroplatten-Fluorometer (Berthold Technologies GmbH & Co. KG) bei 37 °C überwacht. Die Fluoreszenz von βNA wird durch Anregung bei 340 nm und Emissionsmessung bei 410 nm ermittelt. Steigungen (in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU)/Min.) zunehmender Fluoreszenz der verschiedenen Proben werden berechnet. Die Steigung der GST-hDPP3 mit Pufferkontrolle wird als 100 %ige Aktivität bestimmt. Die hemmende Fähigkeit eines möglichen Fänger-Binders ist als Verringerung der GST-hDPP3-Aktivität durch Inkubation mit dem Fänger-Binder in Prozent definiert. Die sich daraus ergebenden verringerten DPP3-Aktivitäten sind in Fig. 1a und Tabelle 3 aufgeführt.

3.2. Ergebnisse:

[0218] Die folgende Tabelle enthält eine Auswahl von erhaltenen Antikörpern und deren maximale Hemmung (Tabelle 3). Die gegen die unten abgebildeten DPP3-Regionen gerichteten monoklonalen Antikörper wurden aufgrund ihrer Fähigkeit ausgewählt, native DPP3 zu binden (mAb-FL-DPP3_2555 als Festphase und _2553 als Tracer für den Immunoassay; Details sind Beispiel 4 zu entnehmen).

[0219] Für den Assay für die Aktivität von immobilisierter DPP3 (siehe Beispiel 6 und 7) war es notwendig, einen Festphasen-Antikörper zu wählen, der die DPP3-Aktivität nicht zu stark hemmt. Als Grenzwert für das Antikörper-Screening sollten Festphasen-Antikörper die DPP3-Aktivität nicht mehr als 50 % hemmen. Da mAbDPP3_2555 die geringste Inhibitionsrate aufwies (Tabelle 3, Figur 1 A),

[0220] Für die Erzeugung eines starken DPP3-Hemmers, der therapeutisch eingesetzt werden kann (siehe Beispiel 8-13), musste ein DPP3-Binder mit der höchsten Hemmung gewählt werden. Der monoklonale Antikörper mAbDPP3_1967 mit der Fähigkeit, die DPP3-Aktivität um 70 % zu hemmen, wurde als möglicher therapeutischer Antikörper gewählt (siehe Figur 1 A und Tabelle 3) und sämtliche weitere Analysen mit diesem Antikörper ausgeführt. Figur 1 B zeigt die Hemmungskurve von mAbDPP3_1967 mit einer mittleren Hemmkonzentration ($I_{C_{50}}$) von 0,2041 µg/ml.

Sequenz-nummer	Antigen/Immunogen	hDPP3-Region	Bezeichnung	Klon	Max. Hemmung von DPP3
SEQ-ID: 1	GST-markierte rekombinante FL-DPP3	1-737	mAb-FL-DPP3	2552	65 %
				2553	35 %
				2554	30 %
				2555	25 %
SEQ-ID: 2	CETVINPETGE-QIQS WYRSGE	474-493	mAb-pep1-DPP3	1963	60 %
				1964	60 %
				1965	70 %
				1966	65 %
				1967	70 %
				1968	65 %
				1969	70 %

Tabelle 3: Immunogensequenz, Bezeichnung und Eigenschaften von erzeugten Anti-DPP3-Antikörpern**4. Beispiel 4**

[0221] Bestimmung der Antikörperkombination, die hohe Signal-Rauschverhältnisse in einem hDPP3-Immunoassay erzielt.

4.1. Verfahren:**- Erzeugung monoklonaler Antikörper**

[0222] Gegen die GST-markierte humane DPP3 gerichtete Antikörper wurden mit standardmäßigen Antikörpererzeugungsverfahren (Marx et al., 1997) hergestellt und mit Protein A gereinigt. Die Antikörper wiesen dabei basierend auf der SDS-Gelektrophorese Reinheitsgrade von $\geq 90\%$ auf. Verschiedene Klone wurden auf ihre Fähigkeit, DPP3 zu binden, analysiert. Die sich daraus ergebenden positiven Klone wurden als Festphasen- oder Tracer-Antikörper verwendet.

- Festphase

[0223] 96-Kavitäten-Mikroplatten aus Polystyrol (Greiner Bio-One International AG, Österreich) wurden (1 Stunde bei Raumtemperatur) mit einem Anti-DPP3-Antikörperklon (Fänger-Antikörper; 1,5 µg Antikörper/ 0,25 ml 100 mmol/l NaCl, 50 mmol/L Tris/ HCl, pH 7,8) beschichtet. Nach dem Blockieren mit 5 %igem Rinderserumalbumin (BSA) wurden die Mikroplatten vakuumgetrocknet.

- Markierungsverfahren (Tracer)

[0224] 100 µg (100 µl) eines anderen anti-DPP3-Antikörpers (Nachweisantikörper, 1 mg/ ml in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), pH 7,4) wurden mit 10 µl Akridinum-NHS-Ester (1 mg/ml in Acetonitril, InVent GmbH, Deutschland; EP 0 353 971) gemischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der markierte anti-DPP3-Antikörper wurde mittels Gelfiltration HPLC an Shodex Protein 5 µm KW-803 (Showa Denko, Japan) gereinigt. Der gereinigte markierte Antikörper wurde in einer Testpufferlösung (50 mmol/1 Kaliumphosphat, 100 mmol/l NaCl, 10 mmol/1 Na₂-EDTA, 5 g/l Rinderserumalbumin, 1 g/l Maus-IgG, 1 g/l Rinder-IgG, 50 µmol/l Amastatin, 100 µmol/l Leupeptin, pH 7,4) verdünnt. Die endgültige Konzentration betrug ungefähr 7×10^6 relative Lichteinheiten (RLU) markierter Verbindung (ca. 20 ng markierter Antikörper pro 200 µl). Die Akridinumester-Chemolumineszenz wurde mit einem Centro LB 960 Luminometer (Berthold Technologies GmbH & Co. KG) gemessen.

- Kalibratoren

[0225] Eine Stammlösung (in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS)) von rekombinanter humarer GST- DPP3 (USBiological, USA) wurde linear verdünnt (unter Verwendung von 50 mmol/l Kaliumphosphat, 100 mmol/l NaCl, 10 mmol/l Na-

EDTA, 5 g/l Rinderserumalbumin, 1 g/l Maus-IgG, 1 g/l Rinder-IgG, 50 µmol/l Amastatin, 100 µmol/l Leupeptin, pH 7,4). Die Stammlösung wurde bei -80 °C gelagert. Kalibratoren wurden vor der Verwendung vorbereitet.

- hDPP3-Immunoassay

[0226] 10 µl der Probe (bzw. des Kalibrators) wurden in 96-Kavitäten-Mikroplatten pipettiert; nach Zugabe von markiertem und verdünntem Nachweisantikörper (200 µl) wurden die Platten 18-24 Stunden bei 2-8 °C inkubiert. Ungebundener Tracer wurde durch 4-maliges Waschen in 350 µl Waschlösung (20 mM PBS, pH 7,4, 0,1 % Triton X-100) entfernt. Die in den Kavitäten vorliegende Chemolumineszenz wurde mit dem Centro LB 960 Luminometer (Berthold Technologies GmbH & Co. KG) gemessen.

4.2. Ergebnisse:

[0227] Alle Antikörper wurden in einem Sandwich-Immunoassay als beschichtete Mikroplatten und markierte Antikörper kombiniert in den folgenden Variationen (Tabelle 4 und 5) verwendet. Die Inkubation wurde wie unter dem hDPP3-Immunoassay beschrieben durchgeführt. Die Ergebnisse sind als spezifisches Signal-/Hintergrundsignalverhältnis von rekombinanter humaner GST-DPP3 (bei 100, 10 und 1 ng/ml) und nativer hDPP3 in Plasmaproben gegeben.

		Tracer				
		Signal-Rausch-verhältnis (rek. DPP3)	2552	2553	2554	2555
SP-AB	2552	-	5210 496 46	258 26 3	8852 815 76	
	2553	2403 169 15	-	1773 86 8	3406 306 29	
	2554	428 31 4	3320 300 30	-	8388 750 71	
	2555	3819 273 25	1289 115 10	1906 102 8	-	
						100 ng/ml 10 ng/ml 1 ng/ml

Tabelle 4: Signal-Rauschverhältnis bei anti-DPP3-Antikörperpaaren - Messung von rekombinanter GST-hDPP3 (SP - Festphase).

		Tracer				
Signal-Rauschverhältnis (nat. DPP3)		2552	2553	2554	2555	
SP-AB	2552	-	2042 1499	2 2	2302 1579	nat. Probe 1
	2553	712 475	-	424 362	1163 977	nat. Probe 2
	2554	5 5	631 367	-	1087 527	
	2555	1513 894	737 527	702 400	-	

Tabelle 5: Signal-Rauschverhältnis bei anti-DPP3-Antikörperpaaren - Messung von menschlichen Plasmaproben (SP - Festphase).

[0228] Alle Kombinationen zeigten gute Signal-Rauschverhältnisse bei rekombinanter GST-hDPP3. Außerdem erzielten alle Kombinationen mit Ausnahme von 2552 und 2554 gute Signal-Rauschverhältnisse bei den nativen Proben. Folglich können alle verbleibenden Kombinationen für weitere Untersuchungen verwendet werden. In Bezug auf das höchste absolute relative Lichtsignal (RLU) haben wir 2555 als Festphasen-Antikörper und 2553 als markierten Antikörper verwendet.

5. Beispiel 5

[0229] Die DPP3-Konzentration im Plasma einer Reihe von erkrankten Patienten (Patienten mit akuter Herzinsuffizienz (AHF), Myokardinfarkt (MI), Sepsis, Krebs, akuter Nierenverletzung (AKI) und Infektionen der unteren Atemwege (LRTI)) wurde mithilfe eines hDPP3-Immunoassays ermittelt und mit DPP3-Plasmakonzentrationen von gesunden Kontrollgruppen verglichen.

5.1. Studienkohorte:

[0230] Plasmaproben wurden von 214 Patienten entnommen, die bei der ersten Vorstellung direkt in die Notaufnahme oder onkologische Abteilung eingeliefert wurden. Mit ihrer endgültigen Diagnose konnten diese Patienten in 6 Untergruppen unterteilt werden: Patienten mit akuter Herzinsuffizienz (AHF), Myokardinfarkt (MI), Sepsis, Krebs, akuter Nierenverletzung (AKI) und Infektionen der unteren Atemwege (LRTI). Als Kontrollgruppe dienten Plasmaproben von 93 gesunden Subjekten.

5.2. hDPP3-Immunoassay:

[0231] mAbDPP3_2555 wurde als Festphasen-Antikörper verwendet und mAbDPP3_2553 als markierter Tracer-Antikörper. Die Antikörperimmobilisierung, -markierung und -inkubation wurden wie in Beispiel 4 beschrieben durchgeführt.

5.3. Ergebnisse:

[0232] Zusammen mit den entsprechenden diagnostischen Details wurden die erzeugten Daten statistisch analysiert (Fig. 2 A). Alle Patienten zeigten deutlich erhöhte DPP3-Plasmakonzentrationen im Vergleich mit den gesunden Kontrollsubjekten (normal). In Tabelle 6 ist der Prozentsatz der Patienten mit DPP3-Werten über dem 75. Perzentil der Kontrollgruppe mit entsprechender Diagnose aufgeführt. Die Analyse der Plasma-DPP3-Spiegel weist auf das Krankheitsstadium eines Patienten hin. Diese Erkenntnisse können in den Bereichen der Diagnose eingesetzt werden sowie auch die Grundlage für therapeutische Behandlungen bilden, z. B. durch Hemmung von DPP3.

	Prozentsatz der Patienten mit DPP3-Werten über dem 75. Perzentil der Kontrollgruppe						
Indikation	AHF	MI	Sepsis	Krebs	AKI	LRTI	
Sandwichassay	48,7	64,3	85,5	91,7	51,4	53,3	

Tabelle 6: Vergleich der DPP3-Werte von verstorbenen Patienten und gesunden Subjekten in einem Sandwich-Immunoassay.

[0233] Die gleiche Studienkohorte wurde hinsichtlich ihrer Mortalität analysiert. Patienten, die nach der Einweisung in die Notaufnahme starben, wiesen erheblich höhere Plasma-DPP3-Werte auf als Notfallpatienten, die im Krankenhaus überlebten. Demnach weisen erhöhte DPP3-Konzentrationen auf eine schlechte Mortalitätsprognose hin (Fig. 2B).

6. Beispiel 6

[0234] Die Menge von DPP3 in Humanplasma kann nicht nur durch DDP3-Konzentrationen, sondern auch durch Aktivitätsassays bestimmt werden. Ein Standardverfahren ist ein löslicher Aktivitätsassay unter Verwendung von Arg-Arg- β NA als fluorogenes Substrat:

Die Bestimmung der Aktivität von nativer humaner DPP III erfolgte durch Hydrolyse von Arg-Arg- β -Naphthylamid (Bachem Holdig AG, Schweiz), um das fluoreszente β -Naphthylamin zu erhalten. 200 μ l Puffer (50 mM TRIS/HCl, pH 8,8, 0,04 % NaN₃, 50 μ M Amastatin, 100 μ M Leupeptin) und 10 μ l Probe (Humanplasma) wurden in schwarze 96-Kavitäten-Mikroplatten (Greiner Bio-One International GmbH, Österreich) pipettiert und bei 37 °C 10 Minuten lang vor-temperierte. Nach Hinzufügen von Substrat (20 μ l, 2 mM) wurde der Fluoreszenzanstieg 1 Stunde lang bei 37 °C in einem Twinkle LB 970 Mikroplatten-Fluorometer (Berthold Technologies GmbH & Co. KG) bei Anregungswellenlängen von 340 nm und Emissionswellenlängen von 410 nm überwacht. Die Berechnung der Steigung des Fluoreszenzanstiegs der verschiedenen Proben in Bezug auf das β NA ohne Kalibrator erfolgt in nmol β NA/min pro ml Probe [nmol β NA min⁻¹ ml⁻¹].

[0235] Es ist mit dem beschriebenen standardmäßigen, löslichen DPP3-Aktivitätsassay nicht feststellbar, ob die DPP3-Aktivität oder die Aktivität anderer Aminopeptidasen im Plasma gemessen wird. Zur Erzeugung DPP3-spezifischer Signale wird ein Enzymfänger-Assay durchgeführt. Dabei wird im ersten Schritt DPP3 durch Bindung an einen monokonalen Antikörper auf einer Oberfläche immobilisiert, und nach einem Waschschritt kann nur die spezifische DPP3-Aktivität gemessen werden:

Die Vorbereitung der Festphase erfolgte unter Verwendung schwarzer 96-Kavitäten-Mikroplatten (Greiner Bio-One International GmbH, Österreich) wie in Beispiel 5 beschrieben. 10 μ l Probe (Plasma oder Standard) und 200 μ l Puffer (50 mmol/l Kaliumphosphat, 100 mmol/l NaCl, 5 g/l Rinderserumalbumin, 1 g/l Maus-IgG, 1 g/l Rinder-IgG, 50 μ mol/l Amastatin, 100 μ mol/l Leupeptin, pH 7,4) wurden in die beschichteten Mikroplatten pipettiert und inkubiert (18-24 h, 2-8 °C, 600 U/min). Ungebundener Analyt wurde durch Waschen (3 × 350 μ l) mit Waschlösung entfernt. Nach Hinzufügen von Substrat (200 μ l, 100 μ M, in 50 mM Tris/HCl, pH (25 °C) 8,8, 0,04 % NaN₃) wurde der Fluoreszenzanstieg 1 Stunde lang bei 37 °C in einem Twinkle LB 970 Mikroplatten-Fluorometer (Berthold Technologies GmbH & Co. KG) bei Anregungswellenlängen von 340 nm und Emissionswellenlängen von 410 nm überwacht. Die Berechnung der Steigung des Fluoreszenzanstiegs der verschiedenen Proben in Bezug auf das β NA ohne Kalibrator erfolgt in nmol β NA/min pro ml Probe [nmol β NA min⁻¹ ml⁻¹].

[0236] Bei jedem Aktivitätsassaytyp wurde freies β NA als Assaykalibrator verwendet. Hierfür wurden im Twinkle LB 970 Mikroplatten-Fluorometer (Berthold Technologies GmbH & Co. KG) bei 37 °C und Anregungswellenlängen von 340 nm sowie Emissionswellenlängen von 410 nm die steigenden β NA-Konzentrationen (in 200 μ l, in 50 mM Tris/HCl, pH (25 °C) 8,8, 0,04 % NaN₃; 0, 4, 8, 16, 32, 64, 125, 250 μ M β NA) gemessen. Alle Probenmessungen wurden auf diesen β NA-Standard kalibriert.

7. Beispiel 7

[0237] Die Bestimmung der DPP3-Aktivität im Plasma von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen (Patienten mit akuter Herzinsuffizienz (AHF), Sepsis, akuter Nierenverletzung (AKI) und Infektionen der unteren Atemwege (LRTI)) erfolgte durch Einsatz des speziellen DPP3-Fänger-Aktivitätsassays und wurde mit der DPP3-Plasmaaktivität von gesunden Kontrollgruppen verglichen.

7.1 Verfahren:

[0238] Teile der in Beispiel 5 analysierten Kohorte wurden einem DPP3-spezifischen Enzymfänger-Aktivitätsassay unterzogen. In diesem Assay wird zuerst DPP3 aus Plasmaproben (10 μ l) durch einen Affinitätsreinigungsschritt angereichert. Danach wird ihre Aktivität durch Hinzufügen des fluorogenen Substrats Arg-Arg- β NA gemessen (ausführliche Beschreibung siehe Beispiel 6). Die berechneten Steigungen (in nmol β NA/min pro ml Probe [nmol β NA min⁻¹ ml⁻¹]) des Fluoreszenzanstiegs der verschiedenen Proben beziehen sich auf die Probengröße 10 μ l.

7.2. Ergebnisse:

[0239] Der Vergleich zwischen Patientenproben und Proben der gesunden Kontrollgruppen zeigte bei allen Patienten deutlich höhere DPP3-Aktivitätswerte (AHF, Sepsis, AKI und LTRI, Fig. 3).

[0240] Tabelle 7 zeigt den prozentualen Anteil von Patienten, deren DPP3-Werte sich oberhalb des 75. Perzentils der Kontrollgruppe befinden und deren jeweilige Diagnosen. Die Aktivität gibt eine bessere Unterteilung von gesunden Kontrollgruppen und erkrankten Patienten wieder.

	Prozentsatz der Patienten mit DPP3-Werten über dem 75. Perzentil der Kontrollgruppe					
Indikation	AHF	MI	Sepsis	Krebs	AKI	LRTI
Sandwichassay	48,7	64,3	85,5	91,7	51,4	53,3
Aktivitätsassay	77,8	N/A	87,0	N/A	70,0	85,7

Tabelle 7: Vergleich der DPP3-Werte erkrankter Patienten und gesunder Kontrollgruppen in einem Sandwich-Immunoassay und in einem Enzymfänger-Aktivitätsassay.

[0241] Für einen noch besseren Vergleich zwischen dem DPP3-Aktivitätsassay und dem Konzentrationsassay führten wir eine Receiver-Operating-Characteristic (ROC)-Analyse zur Trennung der gesunden Kontrollgruppen von Patienten mit akuter Herzinsuffizienz (Fig. 4 A) bzw. Sepsis (Fig. 4 B) durch. Die Werte der Fläche unter der Kurve (AUC) und das Konfidenzintervall (CI) sind in Tabelle 8 dargestellt. Im Vergleich zum Sandwich-Immunoassay ergab die Datenanalyse eine höhere Spezifität des Aktivitätsassays.

	Wert	Sandwichassay	Aktivitätsassay
Norm vs. AHF	AUC	0,6747	0,8506
	95 % CI	0,5638 - 0,7853	0,7482 - 0,9530
	p-Wert	< 0,005	< 0,0001
<hr/>			
Norm vs. Sepsis	AUC	0,8875	0,9384
	95 % CI	0,8270 - 0,9479	0,8865 - 0,9479
	p-Wert	< 0,0001	< 0,0001

Tabelle 8: Daten der ROC-Analyse (AUC - Fläche unter der Kurve; CI - Konfidenzintervall).

8. Beispiel 8

[0242] In diesem Versuch wurde die allgemeine Sicherheit steigender Dosierungen von mAbDPP3 in gesunden Mäusen überwacht.

8.1. Verfahren:

[0243] Zum Lieferzeitpunkt vier bis fünf Wochen alte weibliche BALB/c-Nude-Mäuse (CAnN.Cg-Foxn1nu/Crl) (Charles River GmbH, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Gewicht von ungefähr 15-18 g wurden unter optimalen hygienischen Bedingungen, klimatisiert mit 10-15 Luftaustauschen pro Stunde, in einem kontinuierlich überwachten Umfeld mit einer Temperaturzielspanne von 22 ± 3 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 30-70 %, bei 12 Stunden fluoreszierendem Kunstlicht/12 Stunden Dunkelheit gehalten. In jedem einzeln belüfteten Käfig (Individually Ventilated Cage, IVC) wurden höchstens vier Tiere gehalten, die mit Kost ernährt wurden, die aus M-Zucht (ssniff Spezialdiäten GmbH) und gemeinschaftlich genutztem sterilisierten Trinkwasser bestand.

[0244] Nach einer Akklimatisierungsphase von vier Tagen wurde mit der Verabreichung von mAbDPP3 begonnen: Es wurden vier Mäusen pro Gruppe drei verschiedene mAbDPP3-Konzentrationen (0,65 mg/kg, 1,9 mg/kg und 5,75 mg/kg) in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) injiziert. Die Verabreichung von mAbDPP3 erfolgte intraperitoneal (i.p.) am 1., 3., 5. und 7. Tag. Die Mäuse wurden 14 Tage lang beobachtet.

8.2. Ergebnisse:

[0245] Alle Mäuse überlebten die 14-tägige Behandlung ohne Nebenwirkungen, auch bei der höchsten Dosierung. MAAbD-PP3 kann in anderen Tierversuchen, die immer mit einer Konzentration von 1,9 mg/kg durchgeführt werden, sicher verwendet werden.

9. Beispiel 9

[0246] In diesem Beispiel wurde die allgemeine Sicherheit der Behandlung gesunder Ratten mit mAbDPP3 durch Überwachung des mittleren Blutdrucks untersucht.

9.1. Verfahren:

[0247] Für diese Studie wurden 2-3 Monate alte männliche Wistar-Ratten (Charles River Laboratories, Deutschland) verwendet. Zur Messung und Aufzeichnung des Blutdrucks (BP) wurde ein Katheter (Introcan-W; 22 G/I"; B.Braun) in die Arteria carotis communis dextra (rechte Halsschlagader) eingeführt. Der Verabreichungs- und der Probenkatheter wurden in die Vena jugularis sinistra (linke Jugularvene) eingeführt.

[0248] Zuerst wurden die Tiere zum Wiegen (ganze g) mit Isofluran und mit intraperitonealer (i.p.) Injektion von 1,2 g/kg KG Urethan ($c = 0,4 \text{ g/ml}$) zur Langzeitanästhesie narkotisiert. Dann wurde der ventrale Bereich des Nackens rasiert und mit Ethanol gereinigt. Die Gefäße wurden vorbereitet und die Katheter eingeführt. Beide Katheter wurden abschließend mit einer heparinisierten isotonen Natriumchlorid-Lösung gespült. Die Druckwandler (medex logical, Medex Medical Ltd.) wurden dann an das Patientenüberwachungssystem (Datex-Ohmeda, GE) angeschlossen. In einem an den Blutdruck-Monitor angeschlossenen Laptop Computer wurden die Blutdruckdaten separat mittels S/5 Collect Software aufgezeichnet.

[0249] Die Ratten wurden mit PBS 1,9 mg/kg und 5,75 mg/kg mAbDPP3 in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) behandelt ($n = 3$ pro Gruppe). Die Verbindungen wurden über den Venenkatheter verabreicht. Der Blutdruck wurde 1 Stunde lang vor und über 6 Stunden lang nach Verabreichung der Verbindungen überwacht.

9.2 Ergebnisse:

[0250] Die Ratten sprachen gut auf die Behandlung mit mAbDPP3 an. Ratten, die mit einer hohen mAbDPP3-Dosis behandelt wurden, zeigten einen leichten Anstieg des mittleren Blutdrucks (Fig. 5). MAAbD-PP3 kann allgemein auch sicher in einem Rattenmodell verwendet werden, selbst in höheren Dosierungen.

10. Beispiel 10

[0251] In dieser Studie wurde analysiert, wie die Behandlung mit mAbDPP3 die Mortalität bei Sepsis in einem CLP-Mausmodell beeinflussen kann.

10.1. Verfahren:

[0252] Für diese Studie wurden 12-15 Monate alte männliche C57B1/6-Mäuse (Charles River Laboratories, Deutschland) verwendet. Unter leichter Isofluran-Narkose wurde chirurgisch eine Peritonitis induziert. Im linken oberen Quadranten der Peritonealhöhle (normale Lage des Zökum) wurden Inzisionen gesetzt. Das Zökum wurde freigelegt, und es wurde um das Zökum herum eine enge Ligatur mit Nähten distal zum Dünndarmansatz angebracht. Mit einer 24-Gauge-Nadel wurde eine Punktionswunde in das Zökum gesetzt, und es wurden kleine Mengen Zäkalinhals durch die Wunde exprimiert. Das Zökum wurde in die Peritonealhöhle zurückgelegt und der Bauchschnitt geschlossen. Die Tiere wurden schließlich in ihre Käfige mit ungehindertem Zugang zu Futter und Wasser zurückgegeben. Als Flüssigkeitersatz wurden 500 µl Kochsalzlösung s.c. verabreicht.

[0253] MAAbDPP3 (1,9 mg/kg in PBS) wurde gegenüber einem Vehikel (PBS) getestet. Die i.v.-Injektion der Verbindung und des Vehikels erfolgte 5 Minuten vor der zäkalen Ligation und Punktions (CLP) (präventive Behandlung) und nach vollständiger Ausprägung der Sepsis 2 Stunden nach der CLP (therapeutische Behandlung). Jede Gruppe bestand aus zehn Mäusen und wurde über einen Zeitraum von sieben Tagen beobachtet.

10.2. Ergebnisse:

[0254] Aus Figur 6 geht hervor, dass durch den mAbDPP3-Antikörper die Mortalität im Vergleich zur PBS-Verabreichung deutlich reduziert war. Nach vier Tagen überlebten 75 % der mit mAbDPP3 behandelten Mäuse. Im Gegensatz dazu waren nahezu alle mit dem Vehikel behandelten Mäuse nach vier Tagen tot.

11. Beispiel 11

[0255] Mittels eines septischen Schockmodells wurde in Ratten eine Herzinsuffizienz induziert, um sodann den Einfluss von mAbDPP3 auf die Herzfunktion zu beschreiben.

11.1. Verfahren:

- Studiendesign

[0256] Der Studienablauf ist in Figur 7 A unten dargestellt. Nach CLP oder Scheinoperation konnten die Tiere 20 Stunden lang mit ungehindertem Zugang zu Futter und Wasser ruhen. Danach wurden sie narkotisiert, es wurde eine Tracheotomie vorgenommen und ein arterieller und ein venöser Zugang gelegt. 24 Stunden nach der CLP wurden entweder mAbD-PP3 oder ein Vehikel (Kochsalzlösung) mit einer Dosierung von 2 mg/kg verabreicht. Die Hämodynamik wurde invasiv und kontinuierlich von t = 0 bis 3 h überwacht. Eine Echokardiografie des Herzens wurde sofort nach der Operation, 15 Minuten, 1 Stunde, 2 Stunden und 3 Stunden nach Injektion von mAbDPP3 oder Kochsalzlösung durchgeführt.

- CLP-Sepsismodell

[0257] Männliche Wistar-Ratten (2-3 Monate alt, 300 bis 400 g, Gruppengröße siehe Tabelle 1) aus dem Centre d'eleveage Janvier (Frankreich) wurden dem Zufall nach einer von drei Gruppen zugeteilt. Alle Tiere wurden mit Ketaminhydrochlorid (90 mg/kg) und Xylazin (9 mg/kg) intraperitoneal (i.p.) narkotisiert. Zur Induktion einer polymikrobiellen Sepsis wurde eine zäkale Ligation und Punktions (CLP) durchgeführt. Dazu wurde das Protokoll von Rittirsch mit geringfügigen Änderungen verwendet. Es wurde eine Inzision in der ventralen Mittellinie (1,5 cm) gesetzt, um eine Exteriorisation des Zäkums zu ermöglichen. Dann wurde das Zäkum knapp unter der Ileozäkalklappe ligiert und einmal mit einer 18-Gauge-Nadel punktiert. Danach wurde die Bauchhöhle in zwei Schichten geschlossen, Flüssigkeitssatz verabreicht (3 ml/100 g Körpergewicht subkutan injizierte Kochsalzlösung) und das Tier zurück in den Käfig verbracht. Scheintiere wurden einer Operation unterzogen, bei der ihr Zäkum nicht punktiert wurde.

- Invasiver Blutdruck

[0258] Hämodynamische Variablen wurden mittels des AcqKnowledge-Systems (BIOPAC Systems, Inc., USA) ermittelt. Es stellt ein vollautomatisches Blutdruckanalysesystem zur Verfügung. Der Katheter ist durch einen Drucksensor mit dem BIOPAC-System verbunden.

[0259] Die Ratten wurden für den Eingriff narkotisiert (Ketamin und Xylazin). Die Tiere wurden auf die Heizmatte verbracht, um die gewünschte Körpertemperatur von 37-37,5 °C zu erreichen. Der Temperaturfeedback-Fühler wurde in das Rektum eingeführt. Die Ratten wurden in Rückenlage auf dem Operationstisch gelagert. Die Trachea wurde geöffnet und ein Katheter (16 G) für ein externes Beatmungsgerät eingeführt, ohne die Halsschlagadern und Vagusnerven zu schädigen. Der arterielle Katheter wurde in die rechte Halsschlagader eingeführt. Vor der Ligatur ist die Halsschlagader vom Vagus getrennt.

[0260] Durch die linke Jugularvene wurde ein zentraler Venenkatheter für die Verabreichung von Medikamenten einge führt.

[0261] Nach der Operation konnten die Tiere ruhen, um den stabilen Zustand wie vor den hämodynamischen Messungen zu erreichen. Dann wurde der Basalblutdruck (BP) aufgezeichnet. Während der Datenerhebung wurde die Kochsalzinfusion über den arteriellen Zugang gestoppt.

- Echokardiografie

[0262] Die Tiere wurden mit Ketaminhydrochlorid narkotisiert. Der Brustkorb wurde rasiert und die Ratten in Dekubituslage positioniert.

[0263] Für die transthorakale Echokardiografieuntersuchung (TTE) wurde ein handelsübliches Vivid 7-Ultraschallsystem von GE Healthcare mit Hochfrequenz-Linearsonde (14 MHz) und Herzsonde (10 MHz) verwendet. Alle Untersuchungen wurden für die anschließende Offline-Analyse digital aufgezeichnet und gespeichert.

[0264] Graustufenbilder wurden bei einer Tiefe von 2 cm aufgezeichnet. Es wurden zweidimensionale Untersuchungen in parasternaler Langachsenansicht zur Messung des Durchmessers des Aortenannulus sowie der Pulmonalarterie veranlasst. Wir verwendeten auch den M-Modus zur Messung der linksventrikulären (LV) Dimensionen und zur Bewertung der fraktionellen Verkürzung (Fractional Shortening, FS, in %). Die linksventrikuläre fraktionelle Verkürzung (Left Ventricular Fractional Shortening, LVFS) wurde als LV enddiastolischer Durchmesser berechnet und in % angegeben. Deshalb wurde der Zeitpunkt der Enddiastole am maximalen Durchmesser des linken Ventrikels (LV) definiert. Dementsprechend wurde die Endstole als der kleinste Durchmesser im gleichen Herzzyklus definiert. Die Messung aller Parameter erfolgte manuell. Für jede Messung wurden drei Herzzyklen gemittelt.

[0265] In der gleichen parasternalen Langachsenansicht wurde mittels gepulstem Doppler der Pulmonalarteriendurchfluss aufgezeichnet. Das Geschwindigkeitszeitintegral des Pulmonalarteriendurchflusses wurde gemessen.

[0266] Aus der apikalen Fünf-Kammer-Ansicht wurde mittels des gepulsten Dopplers in Höhe der Mitralklappenspitze der Mitraldurchfluss aufgezeichnet.

- Versuchszeitpunkte und Tiergruppen

[0267] Basaler BP und Echokardiografie wurden nach der Operation erfasst. Dann wurden mAbDPP3 (2 mg/kg) oder Vehikel (Kochsalzlösung) injiziert (i.v., 5 Minuten nach der Operation), und es wurde mit der Verabreichung von Kochsalzinfusion begonnen. Die Speicherung der hämodynamischen Punkte (BP und Echokardiografie) erfolgte 15 Minuten nach mAbDPP3- bzw. Vehikelinjektion sowie 1, 2 und 3 Stunden danach. Es gab eine Kontrollgruppe und zwei CLP-Gruppen, die in der nachstehenden Tabelle zusammengefasst sind (Tabelle 9). Am Ende des Versuchs wurde das Tier eingeschläfert und es wurde Blut für die EDTA-Plasmagewinnung und Organe für die anschließende Analyse entnommen.

Gruppe	Gruppengröße	CLP	Behandlung
1 - Schein	7	nein	Kochsalzlösung
2 - CLP Kochsalzlösung	7	ja	Kochsalzlösung
3 - CLPmAbDPP3	10	ja	mAbDPP3

Tabelle 9: Versuchsgruppen

11.2. Ergebnisse:

[0268] Die septischen Ratten haben im Vergleich zu Scheintieren einen sehr niedrigen Blutdruck und eine reduzierte Verkürzungsfaktion des Herzens. Die Verabreichung von mAbDPP3 erhöhte deutlich die Verkürzungsfaktion (Fig. 7 B), erhöhte den mittleren Blutdruck (Fig. 7 C) und steigerte das Wohlbefinden der septischen Ratten erheblich.

12. Beispiel 12

[0269] Das Ziel der hier beschriebenen Studie war die Beurteilung der potenziell antiproliferativen Wirkung von mAbDPP3 in einem In-Vitro-Zellkultursystem unter Verwendung verschiedener Krebszelllinien.

12.1. Verfahren:

[0270] Eine Stammlösung aus mAbDPP3 (1 mg/ml in PBS) wurde verdünnt, um den Endkonzentrationsbereich zwischen 0-100 µg/ml abzudecken. Als Referenzsubstanz wurde PBS verwendet. Krebszellen aus etablierten Krebszelllinien (A549, HCT116, MDA-MB231) wurden in DMEM mit 10 % fötalem Kälberserum (FKS) und Penicillin/Streptomycin gezüchtet.

[0271] A549-Zellen sind adenokarzinomatöse menschliche alveolare basale Epithelzellen. Diese Zelllinie wurde zuerst durch Entfernung und Züchtung von karzinomatösem Lungengewebe im explantierten Tumor eines 58-jährigen Mannes begründet. Diese Zellen sind in der Natur squamös und für die Diffusion bestimmter Substanzen wie z.B. Wasser und Elektrolyte durch die Lungenalveolen verantwortlich. Im genannten Fall werden die A549-Zellen in vitro gezüchtet. Sie wachsen als Monolayerzellen, die der Kulturflasche anhaften. Ein weiteres Merkmal dieser Zellen besteht darin, dass sie Lecithin synthetisieren können und hohe Mengen entsättigter Fettsäuren enthalten. Die Zelllinie A549 wird weit verbreitet als In-vitro-Modell für ein pulmonales Epithelzellmodell des Typs II für den Arzneimittelmetabolismus und als Transfektionswirt verwendet.

[0272] Die Zelllinie HCT116 besteht aus menschlichen Dickdarmkrebszellen. Diese Epithelzellen haben bei der Kultivierung die Eigenschaft, anhaftend zu sein und stammen von einem männlichen Erwachsenen. Diese Zelllinie ist ein geeigneter Transfektionswirt. Die Linie hat eine Mutation in Codon 13 des ras-Protoonkogens und kann bei PCR-Assays als Positivkontrolle von Mutationen in diesem Codon verwendet werden.

[0273] Die Zelllinie MDA-MB231 besteht aus menschlichen Adenokarzinomzellen der Brust mit epithelialer Morphologie. Diese Zellen wurden aus pleuralen Effusionen eines Krebspatienten europäischer Abstammung isoliert.

[0274] Für jede Zelllinie wurden Suspensionszellkultur-Platten mit 96 Kavitäten vorbereitet. Es wurden 100 µl der untersten Schicht aus Weichagar (0,6 % Endkonzentration in Komplettmedium) ausgegossen und bis zum Aushärten ruhengelassen. Dann wurden 50 µl der oberen Schicht aus Weichagar (0,4 % Endkonzentration) mit entsprechenden Zellen und Zellzahl daraufgegeben und ausgehärtet, und die 96-Kavität-Platten wurden über Nacht bei 37°C und 10 % CO₂ inkubiert.

[0275] Am folgenden Tag wurden Verbindungen in die inneren Kavitäten der Platte hinzugefügt. Die Assays wurden anschließend in Zellkultur-Inkubatoren inkubiert. Schließlich wurden die Assays unter Verwendung von Alamar Blue entwickelt, und nach 3-5 Stunden Inkubation bei 37°C wurde die Fluoreszenzintensität bestimmt (Anregung: 560 nm; Emission: 590 nm). Zur Niedrig-Kontrolle wurden die Zellen mit 10-5 M Staurosporin (sechsfache Werte) behandelt. Zur Hoch-Kontrolle wurden die Zellen mit 0,1 % DMSO (Lösungsmittelkontrolle, sechsfache Werte) behandelt.

[0276] Die Rohdaten wurden in Prozent Weichagarwachstum im Verhältnis zu Hoch-Kontrollen (Lösungsmittel 0,1 % DMSO) und Niedrig-Kontrollen (10-5 M Staurosporin) konvertiert, die jeweils auf 100 % und 0 % festgelegt waren. Die Berechnung des IC₅₀-Wertes wurde mittels GraphPad Prism 5 Software mit einem variabel ansteigenden s-förmigen reakti-

onsangepassten Modell durchgeführt, wobei als untere Begrenzung 0 % Weichagarwachstum und als obere Begrenzung 100 % Weichagarwachstum verwendet wurden.

12.2. Ergebnisse:

[0277] Das Wachstum der drei Krebszelllinien (A549, HCT116, MDA-MB231) im Zellkultursystem wurde je nach verwendeter mAbDPP3-Dosierung (Fig. 8) bewertet. Die Bestimmung der IC₅₀-Werte erfolgte unter Verwendung von Standardparametern auf Grundlage des Lösungsmittelkontrollssignals als obere Begrenzung (100 % Weichagarwachstum) und des Staurosporinkontrollssignals als untere Begrenzung (0 % Weichagarwachstum). Die entsprechenden IC₅₀-Werte sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

[0278] Die Behandlung mit mAbDPP3 hatte auf alle drei geprüften Zelllinien antiproliferative Auswirkungen.

Zelllinie	Gewebequelle	Inkubationszeit	IC ₅₀
A549	Lunge	8 Tage	6,3 µg/ml
HCT116	Dickdarm	8 Tage	2,0 µg/ml
MDA-MB231	Brust	11 Tage	8,7 µg/ml

Tabelle 10: IC₅₀-Werte für die Behandlung mit mAbDPP3.

13. Beispiel 13

[0279] Das Ziel der hier beschriebenen Studie war die Beurteilung der Fähigkeit von mAbDPP3, die Tumorbildung in Xenograft-Modellen für Brust- und Dickdarmkrebs zu verhindern (Studie zur Hemmung des Tumorwachstums).

13.1. Verfahren:

[0280] Monolayer-MDA-MB-231-Zellen (Brustkrebs) und HCT-116-Zellen (Dickdarmkrebs) wurden jeweils in DMEM + 10 % FKS gezüchtet. Die Zellen wurden in feuchter Atmosphäre (90 % Luft und 10 % Kohlendioxid bei 37 °C) kultiviert. Das Medium wurde routinemäßig alle 3 Tage gewechselt. Konfluente Kulturen wurden alle 3-4 Tage 1:3 zu 1:3 unter Verwendung von Trypsin/EDTA getrennt und in einer Dichte von ungefähr 3-4 × 10⁶ Zellen/15 cm² + 25 ml Medium ausgesät.

[0281] Zum Lieferzeitpunkt vier bis fünf Wochen alte weibliche BALB/c-Nude-Mäuse (CAnN.Cg-Foxn1^{nu}/Crl) (Charles River GmbH, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Gewicht von ungefähr 15-18 g wurden unter optimalen hygienischen Bedingungen, klimatisiert mit 10-15 Luftaustauschen pro Stunde, in einem kontinuierlich überwachten Umfeld mit einer Temperaturzielspanne von 22 ± 3 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 30-70 %, bei 12 Stunden fluoreszierendem Kunstlicht/ 12 Stunden Dunkelheit gehalten. In jedem einzeln belüfteten Käfig (Individually Ventilated Cage, IVC) wurden höchstens 4 Tiere gehalten, die mit Kost ernährt wurden, die aus M-Zucht (ssniff Spezialdiäten GmbH) und gemeinschaftlich genutztem sterilisierten Trinkwasser bestand.

[0282] In dieser Studie werden menschliche MDA-MB-231-Brustkrebszellen und HCT-116-Dickdarmkrebszellen verwendet, die von ATCC zur Verfügung gestellt wurden. Die Zellsubkultivierung erfolgt innerhalb von fünf Durchgängen vor dem Inokulieren in die Mäuse. Der Maus werden per s.c.-Injektion 3x106 Zellen/0,1 ml in die rechte Flanke verabreicht. Wenn das Tumorvolumen 100-200 mm³ erreicht, werden die 20 Mäuse mit geeigneter Tumogröße nach Tumorvolumen und Körpergewicht in Gruppierungen randomisiert (zehn Mäuse pro Gruppe). Die Dosierung der Tiere erfolgt je nach Tumorvolumen, Körpergewicht und Startdosis. Die Gruppen sind in der nachstehenden Tabelle dargestellt (Tabelle 11).

Gruppe	Konzentration	Route	Schema	Matrix	Zelllinie	Beobachtungszeit	Tieranzahl
mAbDPP 3 - Brust	1,9 mg/kg	i.v.	Tage 1, 3, 5, 7, 9	PBS	MDA-MB231	24 Tage	10
mAbDPP 3- Dickdarm					HCT116	28 Tage	10
PBS - Brust	-	i.v.	Tage 1, 3, 5, 7, 9	PBS	MDA-MB231	24 Tage	10
Dickdarm					HCT116	28 Tage	10

Tabelle 11: Übersicht über die Behandlungsstrategie

[0283] Das Verhalten und Wohlbefinden der Tiere wurde täglich überwacht. Das Tumorwachstum wurde alle zwei Tage durch Messtastermessung über einen Zeitraum von 24 Tagen aufgezeichnet. Die Messung der Primärtumorgröße erfolgte per Messtaster (manueller Messtaster, OMC Fontana). Die Tumorgrößen wurden nach der Formel $V = W^2 \times L / 2$ (L = Länge und W = die senkrechte Tumorbreite, $L>W$) berechnet. Das individuelle relative Tumorvolumen (RTV) wurde folgendermaßen berechnet: $RTV = V_t/V_0$, wobei V_t das tägliche Volumen und V_0 das Volumen zu Behandlungsbeginn bezeichnet.

13.2. Ergebnisse:

[0284] In den Xenograft-Krebsmodellen wurde durch Verabreichung von mAbDPP3 die Bildung aller untersuchten Tumoren reduziert (Fig. 9 A-D). Brustzellentumore brauchen unter der Behandlung mit mAbDPP3 zwei Tage länger, um auf 20-fache Größe anzuwachsen (Fig. 9 B), und Dickdarmzellentumore brauchen zwei Tage länger, um auf zehnfache Größe anzuwachsen (Fig. 9 D). In diesem Modell wuchsen die durch die Dickdarmkrebszelllinie induzierten Tumore um ein Vielfaches langsamer als die durch die Brustkrebszelllinie induzierten Tumore.

14. Beispiel 14

[0285] Zur Beurteilung der möglichen Verwendung eines DPP3-Adsorbers zur Reinigung des Plasmas von überschüssiger DPP3 sollte analysiert werden, ob sich DPP3 hinreichend an eine antiDPP3-Säule bindet. Mittels Immobilisierung von DPP3-bindenden Antikörpern an GlycoLink-Säulen (Thermo Fisher) wurden Affinitätschromatografiesäulen vorbereitet. Die Bindung von DPP3 an diese Säulen wurde durch Messung der DPP3-Konzentration vor und nach dem Durchfluss durch die Säulen analysiert.

14.1 Verfahren:

[0286] In einem ersten Schritt wurden alle DPP3-bindenden Antikörper (mAbDPP3_2552, 2553, 2554, 2555) oxidiert und jeweils gemäß Lehrhandbuch an einer GlycoLink-Säule immobilisiert. Anschließend wurden rekombinante GST-hDPP3 (USBio) oder Patientenplasmaproben auf die Säule aufgegeben und die Bindung von DPP3 beobachtet.

- Oxidation von Antikörpern

[0287] Hierfür wurden 300 µl von 3 mg / ml der jeweiligen antiDPP3-Antikörperlösung in 700 µl GlycoLink Kopplungspuffer auf ein Endvolumen von 1 ml und einen pH < 6 verdünnt. Zur Oxidierung der Kohlenhydratgruppen der Antikörper wurden der Lösung 2,1 mg Natriummetaperiodat hinzugefügt, und sie wurde 30 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Das Oxidationsmittel wurde mittels Entsalzungssäulen aus der Antikörperlösung entfernt.

- Vorbereitung von GlycoLink-Säulen

[0288] Zum Katalysieren der Kopplungsreaktion wurde 0,1 M Anilin zum oxidierten Antikörper hinzugefügt. Dann wurde die Lösung auf eine equilibrierte GlycoLink-Säule gegeben und 4 Stunden lang bei Raumtemperatur inkubiert. Ungebundenes Material konnte durch die Säule durchfließen. Danach wurde die Säule gewaschen, equilibriert und bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

- Affinitätsreinigung von DPP3

[0289] Es wurde entweder rekombinante GST-hDPP3 oder Patientenplasma in Kopplungspuffer verdünnt (Endkonzentration von recDPP3 = 100 ng/ml, 1 ml; 1 ml Plasma + 1 ml Kopplungspuffer), auf die equilibrierte mAbDPP3-Säule gegeben und 30 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Der gesamte Durchfluss wurde zur Beurteilung von Bindungseffizienz und -kapazität aufbewahrt. Die Säule wurde gewaschen, gebundenes Protein mittels GlycoLink Elutionspuffer eluiert, und die Säule vor der Aufbewahrung equilibriert.

- Analyse von DPP3-Inhalt

[0290] Die DPP3-Konzentration von Proben und rekombinanter GST-hDPP3 vor der Affinitätsreinigung und des Durchflusses wurden mittels eines Sandwich-Lumineszenz-Immunoassays gemessen (Einzelheiten siehe Beispiel 4). Es wurden 20 µl Probe (oder Kalibrator) in beschichtete 96-Kavitäten-Mikroplatten pipettiert. Nach Hinzufügen von gekennzeichnetem verdünntem Antikörper (200 µl) wurden die Platten 18-24 Stunden lang bei 2-8 °C inkubiert. Die Entfernung von ungebundenem Tracer erfolgte durch viermaliges Waschen mit 350 µl Waschlösung (20 mM PBS, pH 7,4, 0,1 % Triton X-100). Kavitäten-gebundene Chemilumineszenz wurde mittels des Centro LB 960 Luminometers (Berthold Technologies GmbH & Co. KG) gemessen.

14.2 Ergebnisse:

[0291] Fast die gesamte DPP3 in Plasma und Lösungen aus rekombinanter DPP3 wird mittels Affinitätschromatografie aus den Proben entfernt (siehe Tabelle 12). Die verschiedenen mAbDPP3-Antikörper weisen eine unterschiedliche Affinität zu DPP3 auf. Da mAbDPP3_2555 die höchste Bindungsrate von recDPP3 aufweist, wurde dieser Antikörper für die

Verwendung in der Chromatografie von Plasmaproben ausgewählt. Aus Tabelle 12 wird ersichtlich, dass der DPP3-Plasmaspiegel durch Affinitätschromatografie stark reduziert werden kann. Diese Ergebnisse zeigen, dass es möglich wäre, bei der Apherese zur Reinigung von Patientenplasma von überschüssiger DPP3 einen DPP3-Adsorber zu verwenden.

Probe	immobilisierter Antikörper	C_{DPP3} [ng/ml]	
		vor GlycoLink	nach GlycoLink
rekombinantes GST-hDPP3	2552	100	16,3
	2553	100	21,6
	2554	100	14,1
	2555	100	8,5
Plasma 1	2555	18	1,2
Plasma 2		26,1	4,3
Plasma 3		37,5	3,7

Tabelle 12: Konzentrationen nativer oder rekombinanter DPP3 in Proben vor und nach Affinitätschromatografie mit den abgebildeten anti-DPP3-Antikörpern.

REFERENZEN

- [0292] Abrami ķ., M. et al., 2000. Human and rat dipeptidyl peptidase III: Biochemical and mass spectrometric arguments for similarities and differences. *Biological Chemistry*, 381 (Dezember), S.1233-1243.
- Abrami ķ., M., Zubanovi M. & Vitale, L., 1988. Dipeptidyl peptidase III from human erythrocytes. *Biol Chem Hoppe Seyler*, S.29-38.
- Agi ķ., D. et al., 2007. Novel amidino-substituted benzimidazoles: Synthesis of compounds and inhibition of dipeptidyl peptidase III. *Bioorganic Chemistry*, 35(2), S. 153-169.
- Almagro JC, Fransson J., 2008. Humanization of antibodies. *Front Biosci*. 2008 Jan 1;13:1619-33.
- Aoyagi, T. et al., 1993. Enzymatic Changes in Cerebrospinal Fluid of Patients with Alzheimer-Type Dementia. *J Clin Biochem Nutr*, 14, S. 133-139.
- Balogun, R.A. et al., 2010. Clinical applications of therapeutic apheresis. *Journal of clinical apheresis*, 25(5), S.250-64.
- Bar šun, M. et al., 2007. Human dipeptidyl peptidase III acts as a post-proline-cleaving enzyme on endomorphins. *Biological Chemistry*, 388(3), S.343-348.
- Berghe, T. Vanden et al., 2014. Regulated necrosis: the expanding network of nonapoptotic cell death pathways. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(2), S. 135-147.
- Bird et al., 1988. Single-chain antigen-binding proteins. *Science* 242:423-426.
- Chiba, T. et al., 2003. Inhibition of recombinant dipeptidyl peptidase III by synthetic hemorphin-like peptides. *Peptides*, 24(5), S.773-778.
- Couston, R.G. et al., Adsorption behavior of a human monoclonal antibody at hydrophilic and hydrophobic surfaces. *mAbs*, 5(1), S. 126-39.
- Deng, B. et al., 2014. Aptamer binding assays for proteins: The thrombin example-A review. *Analytica Chimica Acta*, 837, S. 1-15.
- Dhanda, S., Singh, J. & Singh, H., 2008. Hydrolysis of various bioactive peptides by goat brain dipeptidylpeptidase-III homologue. *Cell biochemistry and function*, 26(3), S.339-45.
- Dimitriades, V.R., Brown, A.G. & Gedalia, A., 2014. Kawasaki disease: pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Current rheumatology reports*, 16(6), S.423.
- Ellis, S. & Nuenke, J.M., 1967. Dipeptidyl Arylamidase III of the Pituitary: Purification and Characterization. *Journal of Biological Chemistry*, 242(20), S.4623-4629.
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), S.495-516.
- Fink, S.L. & Cookson, B.T., 2005. Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Infection and Immunity*, 73(4), S. 1907-1916.
- Fischer, U. & Schulze-Osthoff, K., 2005. New approaches and therapeutics targeting apoptosis in disease. *Pharmacological reviews*, 57(2), S. 187-215.
- Gamrekelashvili, J. et al., 2013. Peptidases released by necrotic cells control CD8 + T cell cross-priming, *journal of clinical investigation*, 123(11), S.4755-4768.
- Hartley et al, 1982. *Radiology* 143: 29-36
- Holliger P. et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:6444-8

- Hood et al., Immunology, Benjamin, N.Y., 2nd ed., 1984
- Hultschig C et al., *Curr Opin Chem Biol.* 2006 February; 10(1):4-10. PMID: 16376134) Hunkapiller & Hood, 1986. The growing immunoglobulin gene superfamily. *Nature* 323:15-16.
- Hust, M., Meyer, T., Voedisch, B., Rücker, T., Thie, H., El-Ghezal, A., Kirsch, M.I., Schütte, M., Helmsing, S., Meier, D., Schirrmann, T., Dübel, S., 2011. A human scFv antibody generation pipeline for proteome research. *Journal of Biotechnology* 152, 159-170
- Huston et al., 1988. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85:5879-5883.
- Igic, R. & Behnia, R., 2007. Pharmacological, immunological, and gene targeting of the renin-angiotensin system for treatment of cardiovascular disease. *Current pharmaceutical design*, 13(12), S.1199-214.
- Inaoka, Y. & Naruto, S., 1988. Propioxatins A and B, New Enkephalinase B Inhibitors, IV. Characterization of the Active Site of the Enzyme Using Synthetic Propioxatin Analogues. *J. Biochem.*, 104(5), S.706-711.
- Jones, T.H. & Kapralou, A, 1982. A rapid assay for dipeptidyl aminopeptidase III in human erythrocytes. *Analytical biochemistry*, 119(2), S.418-23.
- Kabat et al., 1983. Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services.
- Khaket, T.P. et al., 2012. Enkephalin degrading enzymes: metalloproteases with high potential for drug development. *Current pharmaceutical design*, 18(2), S.220-30.
- Kim, D. & Herr, A.E., 2013. Protein immobilization techniques for microfluidic assays. *Biomicrofluidics*, 7(4), S.41501.Kirk-Othmer, Encyclopedia of chemical technology, 4. Aufl., Chefredakteur, J. I. Kroschwitz; Redakteur, M. Howe-Grant, John Wiley & Sons, 1993, Bd. 15, S. 518-562
- Kumar, P. et al., 2016. Substrate complexes of human dipeptidyl peptidase III reveal the mechanism of enzyme inhibition. *Scientific Reports*, 6(März), S.23787.
- Lang, E. & Lang, F., 2015. Triggers, Inhibitors, Mechanisms, and Significance of Eryptosis: The Suicidal Erythrocyte Death. *BioMed Research International*, 2015, S.513518.
- Lanier, S.T. et al., Spatiotemporal progression of cell death in the zone of ischemia surrounding burns. Wound repair and regeneration: official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society, 19(5), S.622-32.
- Lanzavecchia, A. & Scheidegger, D., 1987. The use of hybrid hybridomas to target human cytotoxic T lymphocytes, *Eur. J. Immunol.* 17:105.
- Lee, C.M. & Snyder, S.H., 1982. Dipeptidyl-aminopeptidase III of rat brain. Selective affinity for enkephalin and angiotensin. *The Journal of biological chemistry*, 257(20), S. 12043-50.
- Li, J. et al., 2011. Peptide aptamers with biological and therapeutic applications. *Current medicinal chemistry*, 18(27), S.4215-22.
- Linkermann, A. & Green, D.R., 2014. Necroptosis. *New England Journal of Medicine*, 370(5), S.455-465.
- Liu, Y. et al., 2007. A genomic screen for activators of the antioxidant response element. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(12), S.5205-10.
- Marx et al., 1997. Monoclonal Antibody Production, ATLA 25, 121.
- Mazzocco, C. et al., 2006. Identification and characterization of two dipeptidylpeptidase III isoforms in *Drosophila melanogaster*. *FEBS Journal*, 273(5), S. 1056-1064. Meliopoulos, V.A. et al., 2012. MicroRNA regulation of human protease genes essential for influenza virus replication. *PLoS one*, 7(5), S.e37169.
- Müller, J. et al., 2016. Aptamer-Based Enzyme Capture Assay for Measurement of Plasma Thrombin Levels. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1380, S. 179-89. Müller, J. et al., 2012. Monitoring of plasma levels of activated protein C using a clinically applicable oligonucleotide-based enzyme capture assay. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 10(3), S.390-398.
- Ohkubo, I. et al., 1999. Dipeptidyl peptidase III from rat liver cytosol: purification, molecular cloning and immunohistochemical localization. *Biological chemistry*, 380(12), S.1421-1430.
- Patel, A., Smith, H.J. & Sewell, R.D., 1993. Inhibitors of enkephalin-degrading enzymes as potential therapeutic agents. *Progress in medicinal chemistry*, 30, S.327-78. Pinheiro Da Silva, F. & Nizet, V., 2009. Cell death during sepsis: Integration of disintegration in the inflammatory response to overwhelming infection. *Apoptosis*, 14(4), S.509-521.
- Ponikowski, P. et al., 2016. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *European Journal of Heart Failure*, 18(8), S.891-975. Prajapati, S.C. & Chauhan, S.S., 2011. Dipeptidyl peptidase III: a multi-faceted oligopeptide N-end cutter. *FEBS Journal*, 278(18), S.3256-3276.
- Raghupathi, R., 2004. Cell death mechanisms following traumatic brain injury. *Brain pathology (Zürich, Schweiz)*, 14(2), S.215-22.
- Rastija, V. et al., 2015. Synthesis, QSAR, and Molecular Dynamics Simulation of Amidino- substituted Benzimidazoles as Dipeptidyl Peptidase III Inhibitors. *Acta Chimica Slovenica*, 62, S.867-878.
- Rittirsch, D., Huber-Lang, M., Flierl, M. Ward, P.: Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and punc-ture, *Nature Protocols* 4,- 31 - 36 (2009)
- Sanderink, G.J., Artur, Y. & Siest, G., 1988. Human aminopeptidases: a review of the literature. *Journal of clinical chemistry and clinical biochemistry*. *Zeitschrift für klinische Chemie und klinische Biochemie*, 26(12), S.795-807.
- Schütte, M., Thullier, P., Pelat, T., Wezler, X., Rosenstock, P., Hinz, D., Kirsch, M.I., Hasenberg, M., Frank, R., Schirrmann, T., Gunzer, M., Hust, M., Dübel, S., 2009. Identification of a putative Crf splice variant and generation of recombinant antibodies for the specific detection of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS One* 4, e6625

- Shimamori, Y., Watanabe, Y. & Fujimoto, Y., 1986. Purification and Characterization of Dipeptidyl Aminopeptidase III from Human Placenta. *Chem. Pharm. Bull.*, 34(8), S.3333-3340.
- Šimaga, Š. et al., 1998. Dipeptidyl peptidase III in malignant and non-malignant gynaecological tissue. *European Journal of Cancer*, 34(3), S.399-405.
- Šimaga, Š. et al., 2003. Tumor cytosol dipeptidyl peptidase III activity is increased with histological aggressiveness of ovarian primary carcinomas. *Gynecologic Oncology*, 91(1), S.194-200.
- Singh, R. et al., 2014. Transcription factor C/EBP-beta mediates downregulation of dipeptidyl-peptidase III expression by interleukin-6 in human glioblastoma cells. *FEBS Journal*, 281, S. 1629-1641.
- Vandenberg, I., King, F. & Kuchel, P., 1985. Enkephalin Degradation by Human Erythrocytes and Hemolysates Studied Using 1H NMR Spectroscopy. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 242(2), S.515-522.
- Vanha-Perttula, T., 1988. Dipeptidyl peptidase III and alanyl aminopeptidase in the human seminal plasma: origin and biochemical properties. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 177(2), S. 179-95.
- Vanlangenakker, N. et al., 2008. Molecular mechanisms and pathophysiology of necrotic cell death. *Current molecular medicine*, 8(3), S.207-20.
- Voors, A.A. et al., 2016. A systems BIOlogy Study to Tailored Treatment in Chronic Heart Failure: rationale, design, and baseline characteristics of BIOSTAT-CHF. *European Journal of Heart Failure*, 18(6), S.716-726.
- Wallach, D., Kang, T.-B. & Kovalenko, A., 2014. Concepts of tissue injury and cell death in inflammation: a historical perspective. *Nature reviews. Immunology*, 14(1), S.51-9.
- Wattiaux, R. et al., 2007. Lysosomes and Fas-mediated liver cell death. *The Biochemical journal*, 403(1), S.89-95.
- Wild, David (2005). *The Immunoassay Handbook*, Elsevier LTD, Oxford; 3. Aufl., ISBN-13: 978-0080445267
- Xu, Y., Yang, X. & Wang, E., 2010. Review: Aptamers in microfluidic chips. *Analytica chimica acta*, 683(1), S. 12-20.
- Yamamoto, Y. et al., 2000. Characterization of tynorphin, a potent endogenous inhibitor of dipeptidyl peptidase III. *Peptides*, 21(4), S.503-8.
- Yamamoto, Y. et al., 1998. Inhibitory action of spinorphin, an endogenous regulator of enkephalin-degrading enzymes, on carrageenan-induced polymorphonuclear neutrophil accumulation in mouse air-pouches. *Life sciences*, 62(19), S. 1767-73.
- Zong, W.-X. & Thompson, C.B., 2006. Necrotic Cell Death as a Cell Fate. *Genes & Development*, 20, S. 1-5.
- Zuk et al., Enzyme Immunoassay--A Quantitative Immunoassay Requiring No Instrumentation, *Clinical Chemistry*, 31 (7): 1144-1150 (1985)

SEQUENZEN

[0293] SEQ ID NR: 1

hDPP3 AS 1-737

MADTQYILPNDIGVSSLDCREAFLSPTERLYAYHLSRAAWYGGGLAVLLQTSPEAP
YIYALLSRLFRAQDPDQLRQHALAEGLTEEEYQAFLVYAAVGVYSNMGNYKSFGDTK
FVPNLPKEKLERVILGSEAAQQHPEEVRLWQTGELMFSLEPRLRHLGLGKEGITY
PSGNCTMEDAKLAQDFLDSQNLSAYNRLFKEVDGEGKPYYEVRLASVLGSEPSLDS
EVTSKLKSYEFRGSPFQVTRGDYAPILKVVVEQLEKAKAYAANSHQGQMLAQYIESF
TQGSTEAHKRGSRFWIQDKGPIVESYIGFIESYRDPFGSRGEFEGFVAVVNKAMSAKFE
RLVASAEQLLKELPWPPTFEKDKFLTPDFSLDVLTFAGSGIPAGINIPNYDDI.RQTEG
FKNVSLGNVLAVAYATQREKLTLEEDDKDLYILWKGPSFDVQVGLHELLGHGSK
LFVQDEKGAFNFDQETVINPETGEQIQSWYRSGETWDSKFSTIASSYEECRAESVGLY
LCLHPQVLEIFGFEGADAEDVIYVNWLNMVRAGLLALEFYTPAAFNWRQAHMQARF
VILRVLI.EAGEGLVTITPTTGSDDGRPDARVRLDRSKIRSVGKPALERFLRRI.QVLKSTG
DVAGGRALYEGYATVTDAPPECFLTLRDTVLLRKESRKLIIVQPNTRELGSVDVQLLEY
EASAAGLIRSFSERFPEDGPELEEILTQLATADARFWKGSEAPSGQA

[0294] SEQ ID NR: 2

hDPP3 AS 474-493 (N-Cys)
CETVTNPETGEQIQSWYRSGE

BESCHREIBUNG DER FIGUREN

[0295]

Fig. Hemmung der DPP3-Aktivität

1:

- (A) Die Aktivität von rekombinanter GST-hDPP3 wurde bei Vorhandensein mehrerer unterschiedlicher antiDPP3-Antikörper gemessen. DPP3-bindende Antikörper, die gegen Peptide und/oder native DPP3 in voller Länge (Full Length, FL) produziert wurden, weisen eine stark hemmende Wirkung von bis zu 70 % auf.
- (B) Inhibitionskurve rekombinanter GST-hDPP3 mit hemmender mAbDPP3. Die Hemmung von DPP3 durch einen spezifischen Antikörper ist konzentrationsabhängig, wobei der IC₅₀-Wert ~0,2 µg/ml beträgt.

Fig. DPP3-Konzentration als diagnostischer Marker

2:

- (A) DPP3-Konzentration in EDTA-Plasma gesunder Kontrollgruppen und von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen (AHF - akute Herzinsuffizienz, MI-Myokardinfarkt, Sepsis, Krebs, AKI - akute Nierenverletzung, LRTI - Infektionen der unteren Atemwege). Die Medianwerte der Patientengruppen unterscheiden sich erheblich von denen der gesunden Kontrollgruppen (Mann-Whitney-Test p < 0,005).
- (B) Vergleich von DPP3-Konzentrationen in Plasma von Patienten, die kurz nach Aufnahme auf der Notaufnahme verstarben, und von überlebenden Patienten. Überlebende Patienten weisen deutlich geringere DPP3-Werte auf (Mann-Whitney-Test p < 0,05).

Fig. DPP3-Aktivität als diagnostischer Marker

3: DPP3-Aktivität in EDTA-Plasma gesunder Kontrollgruppen und von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen (AHF - akute Herzinsuffizienz, Sepsis, AKI - akute Nierenverletzung, LRTI - Infektionen der unteren Atemwege). Die Medianwerte der Patientengruppen unterscheiden sich erheblich von denen der gesunden Kontrollgruppen (Mann-Whitney-Test p < 0,0001).

Fig. ROC-Plot-Analyse der DPP3-Aktivität und des Konzentrationsassays.

4:

- (A) ROC-Analyse gesunder Kontrollgruppen und von Patienten mit AHF
- (B) ROC-Analyse gesunder Kontrollgruppen und von Patienten mit Sepsis.

Fig. Sicherheit der Behandlung mit mAbDPP3 (Blutdruck)

5: Gesunde Ratten, die mit PBS oder mAbDPP3 (5,75 mg/kg) behandelt wurden. Die Messung und Aufzeichnung des Blutdrucks (BP) erfolgte über einen Katheter, der in die Arteria carotis communis dextra eingeführt wurde. Der Verabreichungs- und der Probenkatheter wurden in die Vena jugularis sinistra eingeführt. Behandlung mit erhöht den relativen Blutdruck im Vergleich zu mit PBS behandelten Ratten leicht (n = 3 pro Gruppe).

Fig. Einfluss von mAbDPP3 auf die Mortalität septischer Mäuse

6: Septische Mäuse (CLP-Modell) wurden 5 Minuten vor und 2 Stunden nach CLP mit PBS oder mAbDPP3 (1,9 mg/kg) behandelt. Die Mortalität wurde sieben Tage lang überwacht. Der Kaplan-Meyer-Plot zeigt nach Behandlung mit mAbDPP3 eine höhere Überlebensrate bei septischen Mäusen.

Fig. Einfluss von mAbDPP3 auf Herzinsuffizienz bei septischen Ratten

7:

- (A) Versuchsdesign einer Studie zur Herzinsuffizienz von Ratten im septischen Schock.
- (B) CLP induziert bei Ratten Herzinsuffizienz, was durch eine reduzierte Verkürzungsfraktion im Vergleich zu Scheintieren angezeigt wird. Die Verkürzungsfraktion wird durch Behandlung mit mAbDPP3 deutlich erhöht (2 mg/kg; n ≥ 7 pro Gruppe; Mann-Whitney-Test p < 0,0001).

- (C) Der mittlere Blutdruck von mit einem Vehikel behandelten septischen Ratten sinkt mit der Zeit. Die Behandlung mit mAbDPP3 dagegen führt zu einer deutlichen Erhöhung des mBP (2 mg/kg; n ≥ 7 pro Gruppe; Mann-Whitney-Test p < 0,005).

Fig. Einfluss von mAbDPP3 auf In-vitro-Tumorwachstum

8: Weichagarassay mit Tumorzelllinien (Lungen-, Dickdarm- und Brustkrebs). Durch das Hinzufügen des antiD-PP3-Antikörpers wird das Tumorzellwachstum reduziert.

Fig. Einfluss von mAbDPP3 auf In-vivo-Tumorwachstum

9:

- (A) Mäuse mit Xenograft von Brusttumorzellen (n = 10 pro Gruppe) wurden mit PBS oder mAbDPP3 behandelt. Die Wachstumskurve des relativen Tumorvolumens zeigt über 24 Tage ein vermindertes Tumorzellwachstum bei mit mAbDPP3 behandelten Mäusen.
- (B) Vergleich der Zeit, die ein Brustzelltumor mit und ohne Behandlung mit mAbDPP3 für die 20-fache Erhöhung seines Volumens benötigt. Bei Behandlung mit mAbDPP3 dauert das Wachstum deutlich länger (Mann-Whitney-Test, p < 0,05).
- (C) Mäuse mit Xenograft von Dickdarmtumorzellen (n = 10 pro Gruppe) wurden mit PBS oder mAbDPP3 behandelt. Die Wachstumskurve des relativen Tumorvolumens zeigt über 30 Tage ein vermindertes Tumorzellwachstum bei mit mAbDPP3 behandelten Mäusen.
- (D) Vergleich der Zeit, die ein Dickdarmzelltumor mit und ohne Behandlung mit mAbDPP3 für die 10-fache Erhöhung seines Volumens benötigt. Bei Behandlung mit mAbDPP3 dauert das Wachstum länger.

DPP3-Aktivität als diagnostischer Marker (II)

10: DPP3-Aktivität in EDTA-Plasma gesunder Kontrollgruppen und von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen (akuter Myokardinfarkt (AMI), kardiogener Schock, septischer Schock und Leberinsuffizienz). Die Medianwerte der Patientengruppen unterscheiden sich erheblich von denen der gesunden Kontrollgruppen (Mann-Whitney-Test p < 0,05).

Fig. Einfluss von DPP3 auf den Blutdruck gesunder Ratten

11: Gesunde männlichen Wistar-Ratten wurden 0,2 mg/kg rekombinante GST-hDPP3 injiziert. Die Messung und Aufzeichnung des Blutdrucks (BP) erfolgte über einen Katheter, der in die Arteria carotis communis dextra eingeführt wurde. DPP3 wurde per i.v.-Injektion in die Schwanzvene verabreicht. Die DPP3-Injektion hat eine Senkung des BP zur Folge.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Diagnose eines Zustands bei einem Subjekt, mit dem nekrotische Prozesse einhergehen und/oder der mit solchen in Zusammenhang steht, umfassend:
 - Bestimmung der Menge an Gesamt-DPP3 und/oder Bestimmung der Menge an aktiver DPP3 in einer Körperflüssigkeitsprobe des Subjekts,
 - Vergleich der bestimmten Menge an Gesamt-DPP3 oder aktiver DPP3 mit einem vorbestimmten Schwellenwert,
 - wobei bei dem Subjekt die Diagnose eines Zustands vorliegt, mit dem nekrotische Prozesse einhergehen und/oder der mit solchen in Zusammenhang steht, wenn die bestimmte Menge den vorbestimmten Schwellenwert übersteigt,
 - wobei die Probe ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend Vollblut, Serum und Plasma.
2. Verfahren nach Anspruch 1 zur Diagnose eines Zustands bei einem Subjekt, mit dem nekrotische Prozesse einhergehen und/oder der mit solchen in Zusammenhang steht, wobei die Menge an Gesamt-DPP3 oder aktiver DPP3 in der Einheit der Konzentration bestimmt wird.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 2 zur Diagnose eines Zustands bei einem Subjekt, mit dem nekrotische Prozesse einhergehen und/oder der mit solchen in Zusammenhang steht, wobei die Menge an Gesamt-DPP3 und/oder die Menge an aktiver DPP3 in einer Körperflüssigkeitsprobe des Subjekts bestimmt wird und die folgenden Schritte umfasst:
 - Kontaktieren der Probe mit einem Fänger-Binder, der spezifisch an Vollängen-DPP3 bindet,
 - Trennung der an den Fänger-Binder gebundenen DPP3,
 - Hinzufügen eines DPP3-Substrats zu der abgetrennten DPP3,
 - Quantifizieren der aktiven DPP3 durch Messen und Quantifizieren der Umwandlung des DPP3-Substrats.
4. Verfahren nach Anspruch 3 zur Diagnose eines Zustands bei einem Subjekt, mit dem nekrotische Prozesse einhergehen und/oder der mit solchen in Zusammenhang steht, wobei der Fänger-Binder aus der Gruppe von Antikörper, Antikörperfragment oder nicht-Ig-Gerüst ausgewählt ist.

5. Verfahren nach Anspruch 3 oder 4 zur Diagnose eines Zustands bei einem Subjekt, mit dem nekrotische Prozesse einhergehen und/oder der mit solchen in Zusammenhang steht, wobei der Fänger-Binder ein Antikörper ist.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 5 zur Diagnose eines Zustands bei einem Subjekt, mit dem nekrotische Prozesse einhergehen und/oder der mit solchen in Zusammenhang steht, wobei der Fänger-Binder auf einer Oberfläche immobilisiert ist.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 6 zur Diagnose eines Zustands bei einem Subjekt, mit dem nekrotische Prozesse einhergehen und/oder der mit solchen in Zusammenhang steht, wobei der Trennschritt ein Waschschnitt ist, mittels dessen Bestandteile der Probe, die nicht an den Fänger-Binder gebunden sind, aus der aufgefangenen DPP3 entfernt werden.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 7 zur Diagnose eines Zustands bei einem Subjekt, mit dem nekrotische Prozesse einhergehen und/oder der mit solchen in Zusammenhang steht, wobei die Umwandlung des DPP3-Substrats durch ein Verfahren erfasst wird, das ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend: Fluoreszenz fluorogener Substrate, insbesondere Arg-Arg-βNA oder Arg-Arg-AMC, Farbveränderung chromogener Substrate, Lumineszenz von Substraten, die an Aminoluciferin gebunden sind, Massenspektrometrie, HPLC/ FPLC insbesondere Umkehrphasen-Chromatografie oder Größenausschlußchromatografie, Dünnschichtchromatografie, Kapillarzonenelektrophorese, Gelelektrophorese gefolgt von Aktivitätsfärbung oder Western-Blot.
9. Verfahren nach Anspruch 3 bis 8 zur Diagnose eines Zustands bei einem Subjekt, mit dem nekrotische Prozesse einhergehen und/oder der mit solchen in Zusammenhang steht, wobei das DPP3-Substrat ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend: Angiotensin II, III und IV, Leu-enkephalin, Met-enkephalin, Endomorphin 1 und 2, Valorphin, β-Casomorphin, Dynorphin, Proctolin, ACTH und MSH, oder Dipeptid gekoppelt an ein Fluorophor, ein Chromophor oder Aminoluciferin, wobei das Dipeptid Arg-Arg ist.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 9 zur Diagnose eines Zustands bei einem Subjekt, mit dem nekrotische Prozesse einhergehen und/oder der mit solchen in Zusammenhang steht, wobei das DPP3-Substrat das Dipeptid Arg-Arg ist, gekoppelt an ein Fluorophor, ein Chromophor oder Aminoluciferin.
11. Verfahren zur Überwachung eines Zustands bei einem Subjekt, mit dem nekrotische Prozesse einhergehen und/oder der mit solchen in Zusammenhang steht, wobei das Diagnoseverfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10 mindestens zweimal durchgeführt wird.
12. Hemmer der Aktivität von DPP3 zur Verwendung bei der Vorbeugung oder Behandlung eines Zustands bei einem Subjekt, mit dem nekrotische Prozesse einhergehen und/oder der mit solchen in Zusammenhang steht, wobei der Hemmer ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend einen anti-DPP3-Antikörper oder ein anti-DPP3-Antikörperfragment oder ein anti-DPP3-nicht-Ig-Gerüst.
13. Hemmer der Aktivität von DPP3 nach Anspruch 12 zur Verwendung bei der Vorbeugung oder Behandlung eines Zustands bei einem Subjekt, mit dem nekrotische Prozesse einhergehen und/oder der mit solchen in Zusammenhang steht, wobei der Hemmer ein einfach bindender oder mindestens zweifach bindender Antikörper ist.
14. Hemmer der Aktivität von DPP3 nach Anspruch 12 oder 13 zur Verwendung bei der Vorbeugung oder Behandlung eines Zustands bei einem Subjekt, mit dem nekrotische Prozesse einhergehen und/oder der mit solchen in Zusammenhang steht, wobei der Hemmer ein anti-DPP3-Antikörper oder ein anti-DPP3-Antikörperfragment oder ein anti-DPP3-nicht-Ig-Gerüst ist, der/das an SEQ ID Nr. 1, insbesondere an SEQ ID Nr. 2 bindet.
15. Hemmer der Aktivität von DPP3 nach einem der Ansprüche 12 bis 14 zur Verwendung bei der Vorbeugung oder Behandlung eines Zustands bei einem Subjekt, mit dem nekrotische Prozesse einhergehen und/oder der mit solchen in Zusammenhang steht, wobei der Hemmer ein Antikörper oder Fragment oder Gerüst ist, der/das eine minimale Bindungsaffinität zu DPP3 von höchstens 10^{-7} M aufweist.
16. Hemmer der Aktivität von DPP3 nach einem der Ansprüche 12 bis 15 zur Verwendung bei der Vorbeugung oder Behandlung eines Zustands bei einem Subjekt, mit dem nekrotische Prozesse einhergehen und/oder der mit solchen in Zusammenhang steht, wobei der Hemmer ein monospezifischer Antikörper oder ein monospezifisches Fragment oder ein monospezifisches Gerüst ist.
17. Hemmer der Aktivität von DPP3 nach einem der Ansprüche 12 bis 16 zur Verwendung bei der Vorbeugung oder Behandlung eines Zustands bei einem Subjekt, mit dem nekrotische Prozesse einhergehen und/oder der mit solchen in Zusammenhang steht, wobei der Hemmer ein Antikörper oder Fragment oder Gerüst ist, der/das an Volllängen-DPP3 bindet und die Aktivität von DPP3 um mindestens 10 %, bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 60 %, noch weiter bevorzugt mehr als 70 % hemmt.
18. Hemmer der Aktivität von DPP3 nach einem der Ansprüche 12 bis 17 zur Verwendung bei der Vorbeugung oder Behandlung eines Zustands bei einem Subjekt, mit dem nekrotische Prozesse einhergehen und/oder der mit solchen in Zusammenhang steht, wobei der Hemmer selektiv, bevorzugt spezifisch, für DPP3 ist und entweder Zellmembranen nicht durchdringt, oder die Blut-Hirnschranke nicht durchdringt, oder weder Zellmembranen noch die Blut-Hirnschranke durchdringt.

19. Hemmer der Aktivität von DPP3 nach einem der Ansprüche 12 bis 18 zur Verwendung bei der Vorbeugung oder Behandlung eines Zustands bei einem Subjekt, mit dem nekrotische Prozesse einhergehen und/oder der mit solchen in Zusammenhang steht, wobei das Subjekt eine Menge von Gesamt-DPP3 und/oder eine Menge von aktiver DPP3 in einer Körperflüssigkeitsprobe des Subjekts aufweist, die über einem vorbestimmten Schwellenwert liegt.
20. Pharmazeutische Zusammensetzung umfassend einen Hemmer der Aktivität von DPP3 nach einem der Ansprüche 12 bis 19 zur Verwendung bei der Vorbeugung oder Behandlung eines Zustands bei einem Subjekt, mit dem nekrotische Prozesse einhergehen und/oder der mit solchen in Zusammenhang steht.
21. Verfahren zur Bestimmung von aktiver DPP3 in einer Körperflüssigkeitsprobe eines Subjekts, umfassend die Schritte:
 - Kontaktieren der Probe mit einem Fänger-Binder, der spezifisch an Volllängen-DPP3 bindet,
 - Trennung der an den Fänger-Binder gebundenen DPP3,
 - Hinzufügen eines DPP3-Substrats zu der abgetrennten DPP3,
 - Quantifizieren der aktiven DPP3 durch Messen und Quantifizieren der Umwandlung des DPP3-Substrats.
22. Verfahren zur Bestimmung von aktiver DPP3 in einer Körperflüssigkeitsprobe eines Subjekts nach Anspruch 21, wobei der Fänger-Binder ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Antikörper, Antikörperfragment oder nicht-Ig-Gerüst.
23. Verfahren zur Bestimmung von aktiver DPP3 in einer Körperflüssigkeitsprobe eines Subjekts nach Anspruch 21 oder 22, wobei der Fänger-Binder ein Antikörper ist.
24. Verfahren zur Bestimmung von aktiver DPP3 in einer Körperflüssigkeitsprobe eines Subjekts nach einem der Ansprüche 21 bis 23, wobei der Fänger-Binder auf einer Oberfläche immobilisiert ist.
25. Verfahren zur Bestimmung von aktiver DPP3 in einer Körperflüssigkeitsprobe eines Subjekts nach einem der Ansprüche 21 bis 24, wobei der Trennschritt ein Waschschnitt ist, mittels dessen Bestandteile der Probe, die nicht an den Fänger-Binder gebunden sind, aus der aufgefangenen DPP3 entfernt werden.
26. Verfahren zur Bestimmung von aktiver DPP3 in einer Körperflüssigkeitsprobe eines Subjekts nach einem der Ansprüche 21 bis 25, wobei die Umwandlung des DPP3-Substrats durch ein Verfahren ermittelt wird, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehen aus: Fluoreszenz fluorogener Substrate, insbesondere Arg-Arg-βNA oder Arg-Arg-AMC, Farbveränderung chromogener Substrate, Lumineszenz von Substraten, die an Aminoluciferin gebunden sind, Massenspektrometrie, HPLC/ FPLC, insbesondere Umkehrphasen-Chromatografie oder Größenausschlußchromatografie, Dünnschichtchromatografie, Kapillarzonenelektrophorese, Gelelektrophorese gefolgt von Aktivitätsfärbung oder Western-Blot.
27. Verfahren zur Bestimmung von aktiver DPP3 in einer Körperflüssigkeitsprobe eines Subjekts nach einem der Ansprüche 21 bis 26, wobei das DPP3-Substrat ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend: ein Dipeptid gekoppelt an ein Fluorophor, ein Chromophor oder Aminoluciferin, wobei das Dipeptid Arg-Arg ist.
28. Verfahren zur Bestimmung von aktiver DPP3 in einer Körperflüssigkeitsprobe eines Subjekts nach einem der Ansprüche 21 bis 27, wobei die Probe eine Blutprobe ist, die ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend Vollblut, Serum und Plasma.
29. Assay zur Bestimmung von aktiver DPP3 in einer Körperflüssigkeitsprobe eines Subjekts, umfassend:
 - Ein Fänger-Binder, der spezifisch an Volllängen-DPP3 bindet,
 - Ein DPP3-Substrat.
30. Assay zur Bestimmung von aktiver DPP3 in einer Körperflüssigkeitsprobe eines Subjekts nach Anspruch 29, wobei der Fänger-Binder aus der Gruppe von Antikörper, Antikörperfragment oder nicht-Ig-Gerüst ausgewählt ist.
31. Assay zur Bestimmung von aktiver DPP3 in einer Körperflüssigkeitsprobe eines Subjekts nach Anspruch 29 oder 30, wobei der Fänger-Binder in einem Flüssigphasenassay weniger als 50 % der DPP3-Aktivität hemmt, bevorzugt weniger als 40 %, weiter bevorzugt weniger als 30 %.
32. Assay zur Bestimmung von aktiver DPP3 in einer Körperflüssigkeitsprobe eines Subjekts nach einem der Ansprüche 29 bis 31, wobei die bindende Region von DPP3 für den Fänger-Binder nicht innerhalb der Region der Aminosäuren 316 - 669 von SEQ ID Nr. 1 liegt.
33. Assay zur Bestimmung von aktiver DPP3 in einer Körperflüssigkeitsprobe eines Subjekts nach einem der Ansprüche 29 bis 32, wobei der Fänger-Binder ein Antikörper ist.
34. Assay zur Bestimmung von aktiver DPP3 in einer Körperflüssigkeitsprobe eines Subjekts nach einem der Ansprüche 29 bis 33, wobei der Fänger-Binder auf einer Oberfläche immobilisiert ist.
35. Assay zur Bestimmung von aktiver DPP3 in einer Körperflüssigkeitsprobe eines Subjekts nach einem der Ansprüche 29 bis 34, wobei das DPP3-Substrat ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend: Angiotensin II, III und IV, Leu-enkephalin, Met-enkephalin, Endomorphin 1 und 2, Valorphin, β-Casomorphin, Dynorphin, Proctolin, ACTH und MSH, oder ein Dipeptid gekoppelt an ein Fluorophor, ein Chromophor oder Aminoluciferin, wobei das Dipeptid Arg-Arg ist.

CH 713 803 B1

Fig. 1 A:

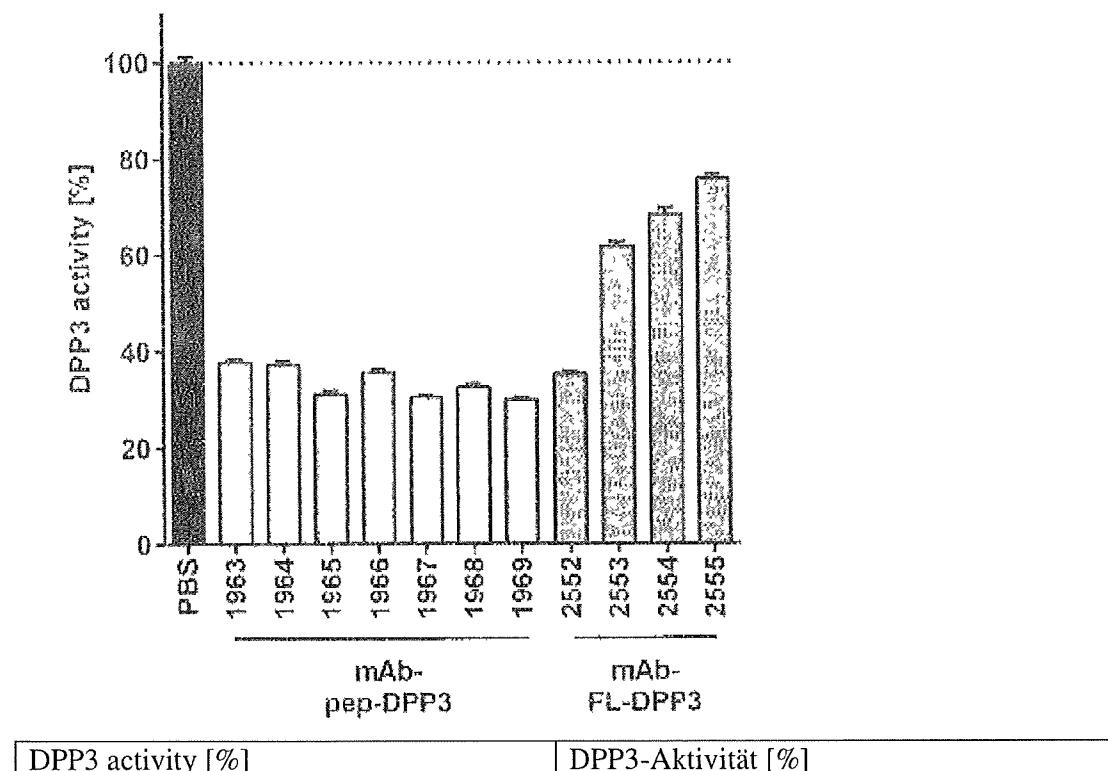


Fig. 1 B:

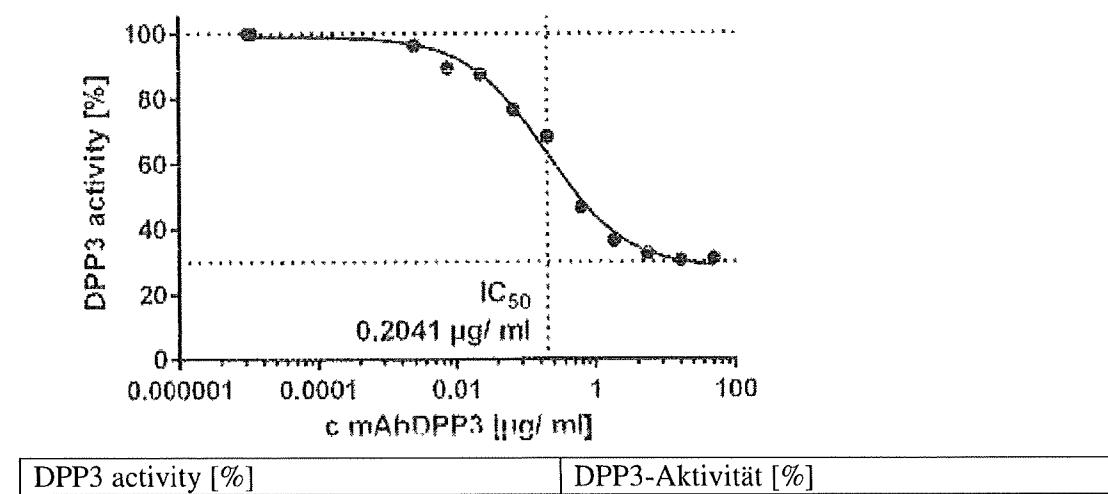
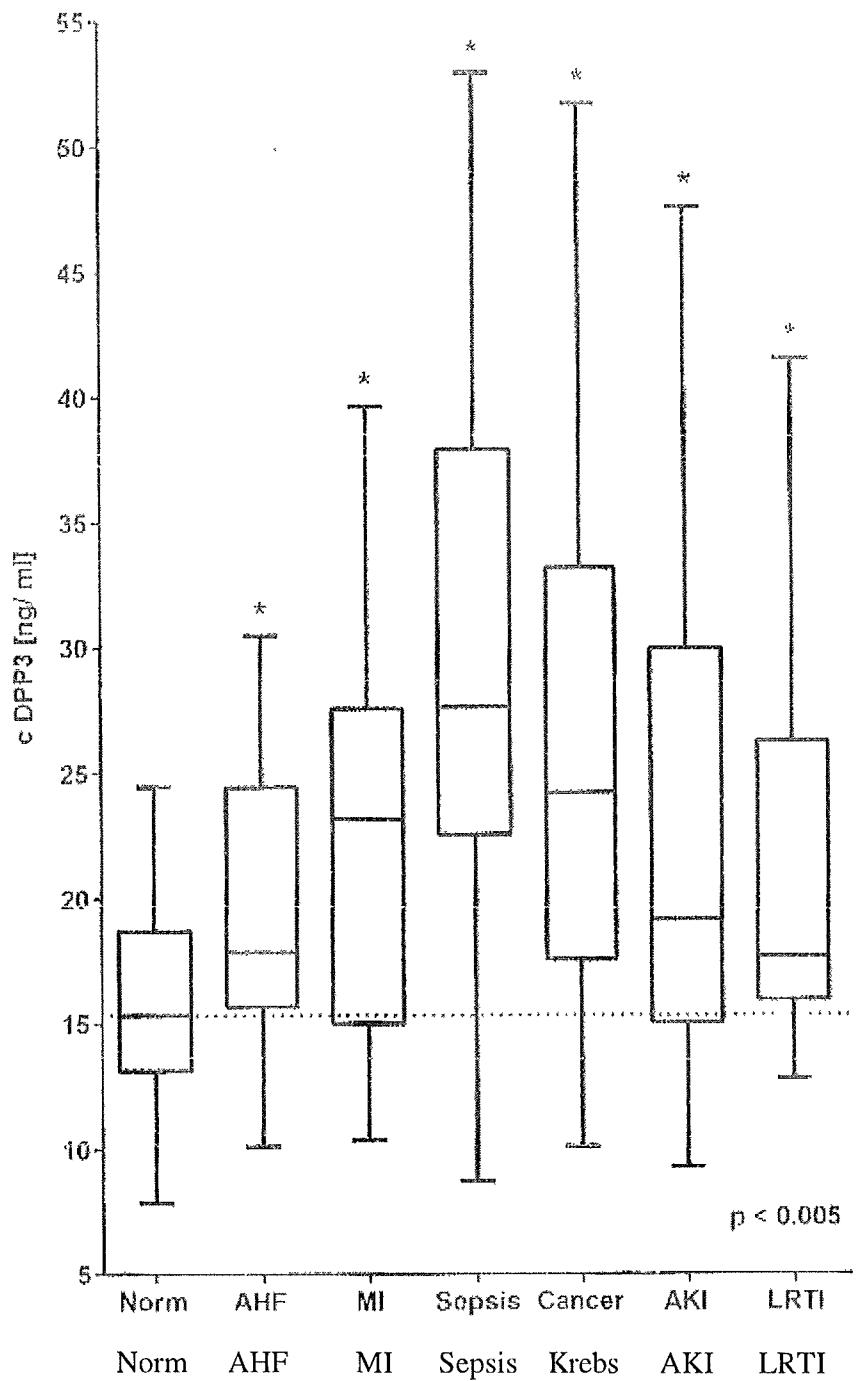


Fig. 2 A:



AHF	akute Herzinsuffizienz
MI	Myokardinfarkt
AKI	akute Nierenverletzung
LRTI	Infektion der unteren Atemwege

Fig. 2 B:

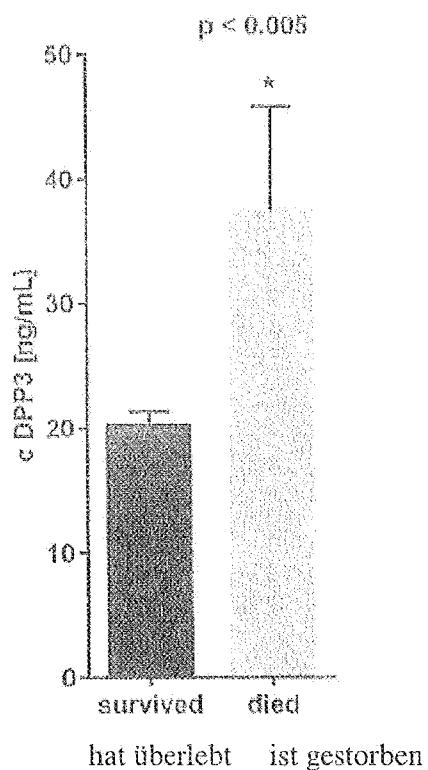
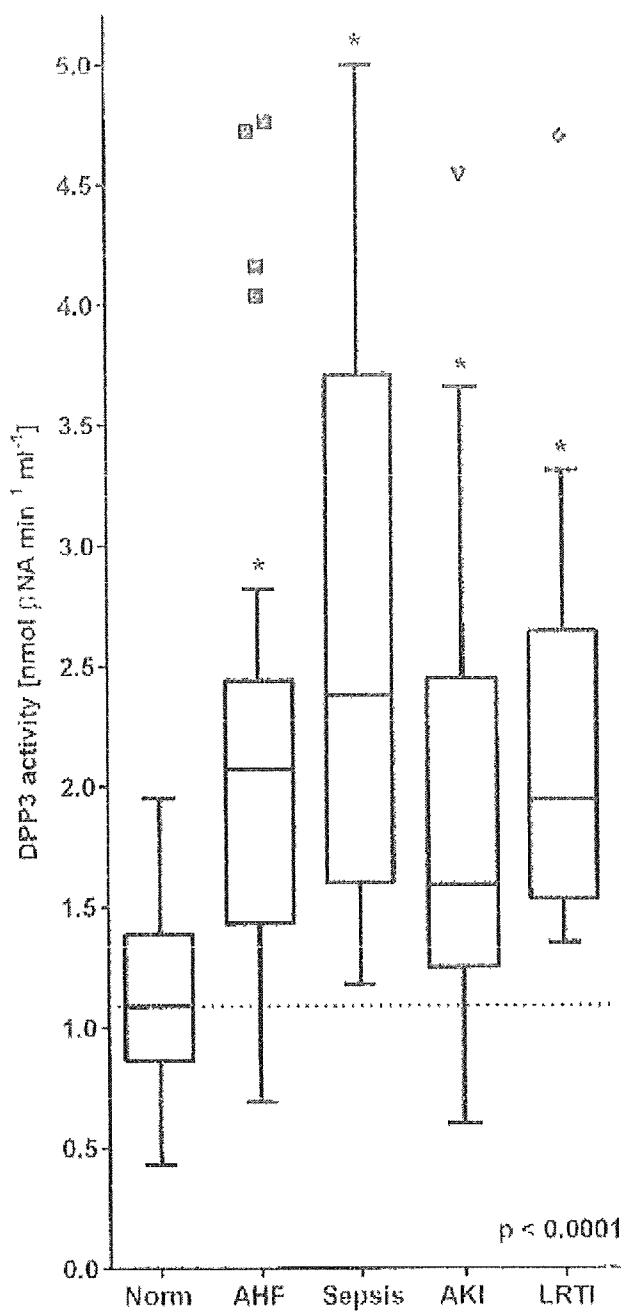
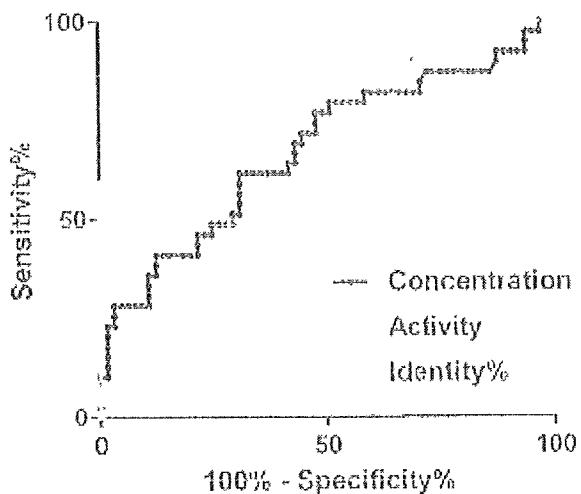


Fig. 3:



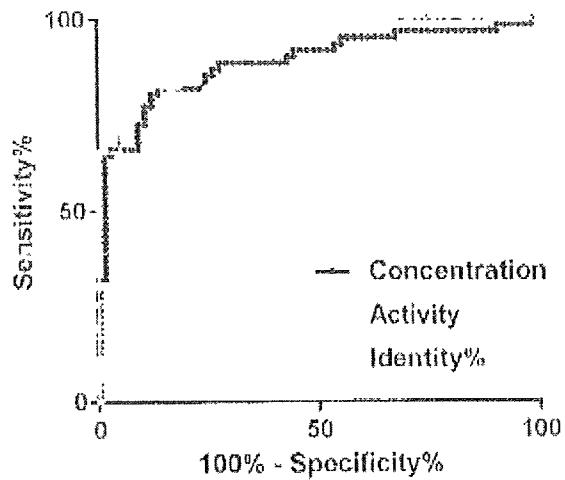
DPP3 activity [nmol β NA min $^{-1}$ ml $^{-1}$]	DPP3-Aktivität [nmol β NA min $^{-1}$ ml $^{-1}$]
AHF	akute Herzinsuffizienz
AKI	akute Nierenverletzung
LRTI	Infektion der unteren Atemwege

Fig. 4 A:



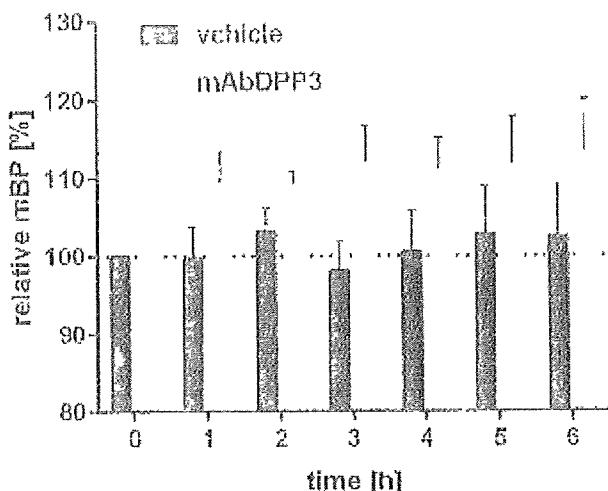
Sensitivity%	Sensitivität%
Concentration	Konzentration
Activity	Aktivität
Identity%	Identität%
100% - Specificity%	100% - Spezifität%

Fig. 4 B:



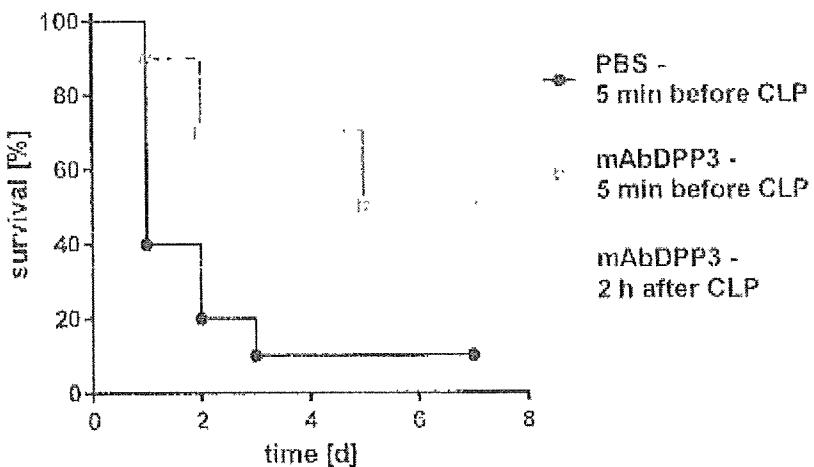
Sensitivity%	Sensitivität%
Concentration	Konzentration
Activity	Aktivität
Identity%	Identität%
100% - Specificity%	100% - Spezifität%

Fig. 5:



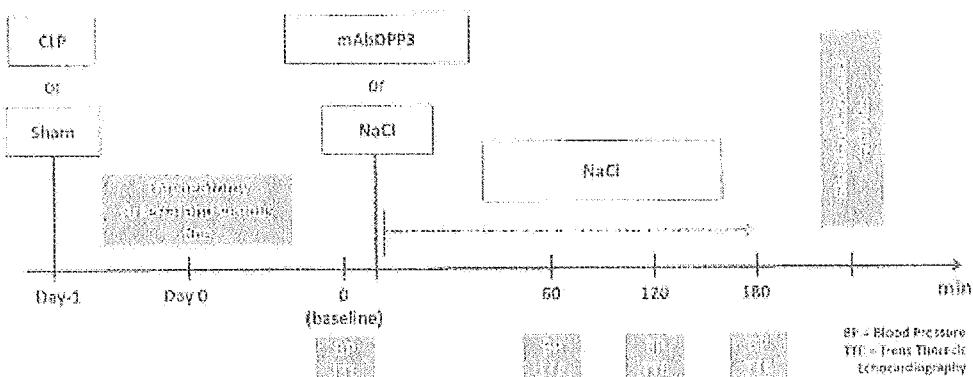
relative mBP [%]	relativer mBP [%]
vehicle	Vehikel
time [h]	Zeit [h]

Fig. 6:



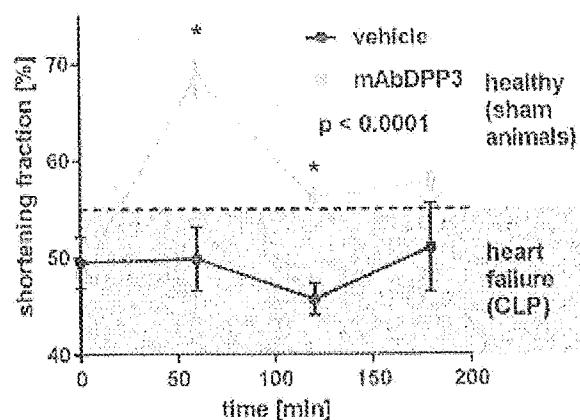
survival [%]	Überlebensrate [%]
PBS – 5 min before CLP	PBS – 5 Min. vor CLP
mAbDPP3 – 5 min before CLP	mAbDPP3 – 5 Min. vor CLP
mAbDPP3 – 2 h after CLP	mAbDPP3 – 2 h nach CLP
time [d]	Zeit [d]

Fig. 7 A:



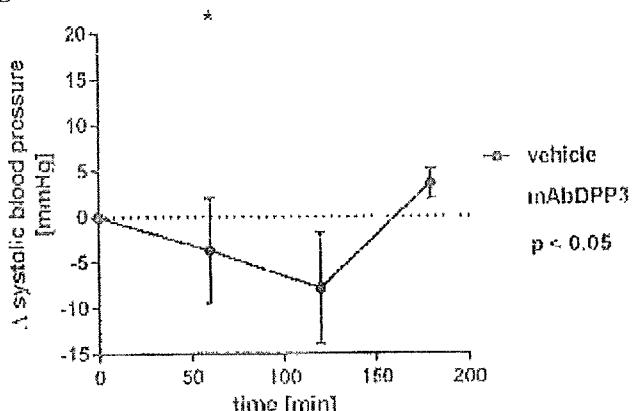
CLP or Sham	CLP oder Schein
Day -1/0	Tag 1/0
Tracheotomy Arterial and venous line	Tracheotomie Arterielle und venöse Linie
baseline	Basiswert
blood and tissues samples	Blut- und Gewebeproben
BP= Blood Pressure	BP = Blutdruck
TTE= Trans Thoracic Echocardiography	TTE = Transthorakale Echokardiografie

Fig. 7 B:



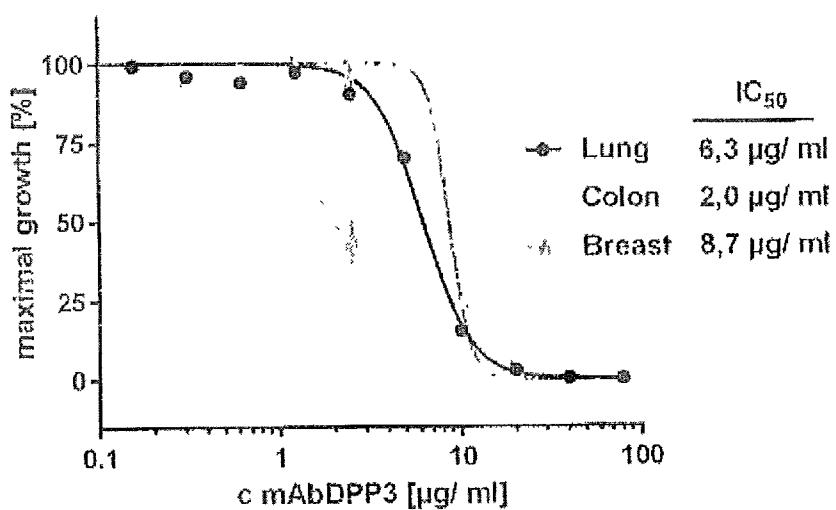
shortening fraction [%]	Verkürzungsfaktion [%]
vehicle	Vehikel
healthy (sham animals)	gesund (Scheintiere)
time [min]	Zeit [min]
heart failure (CLP)	Herzinsuffizienz (CLP)

Fig. 7 C:



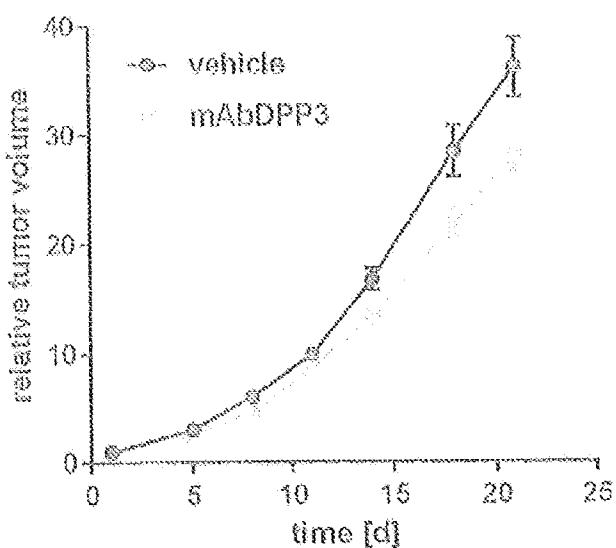
systolic blood pressure [mmHg]	systolischer Blutdruck [mmHg]
time [min]	Zeit [min]
vehicle	Vehikel

Fig. 8:



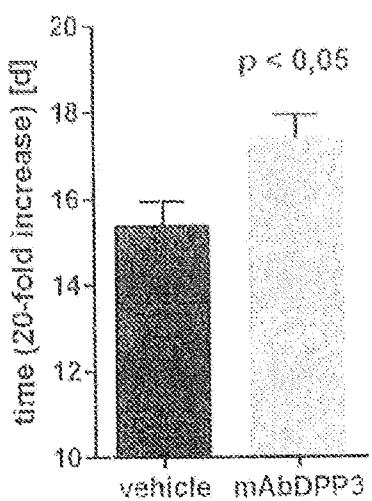
maximal growth [%]	Maximales Wachstum
Lung	Lunge
Colon	Dickdarm
Breast	Brust

Fig. 9 A:



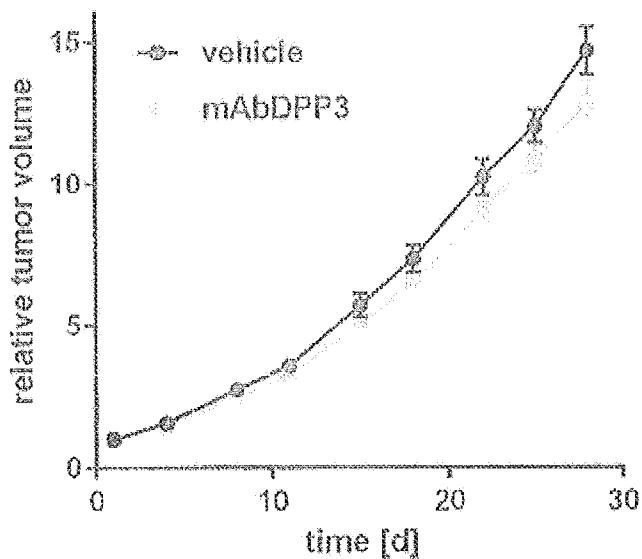
relative tumour volume	relatives Tumorvolumen
vehicle	Vehikel
time [d]	Zeit [d]

Fig. 9 B:



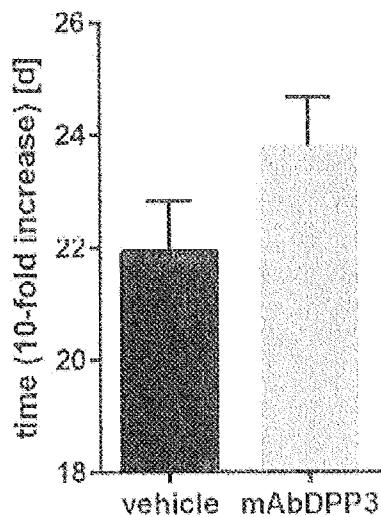
time (20-fold increase) [d]	Zeit (20-facher Anstieg) [d]
vehicle	Vehikel

Fig. 9 C:



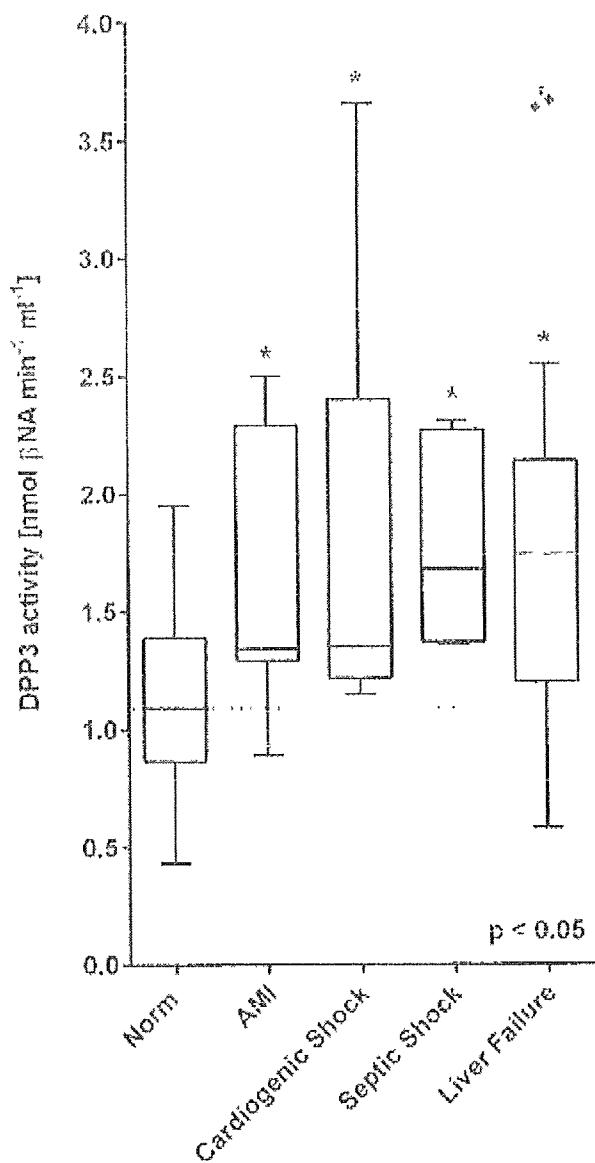
relative tumour volume	relatives Tumorvolumen
vehicle	Vehikel
time [d]	Zeit [d]

Fig. 9 D:



time (10-fold increase) [d]	Zeit (10-facher Anstieg) [d]
vehicle	Vehikel

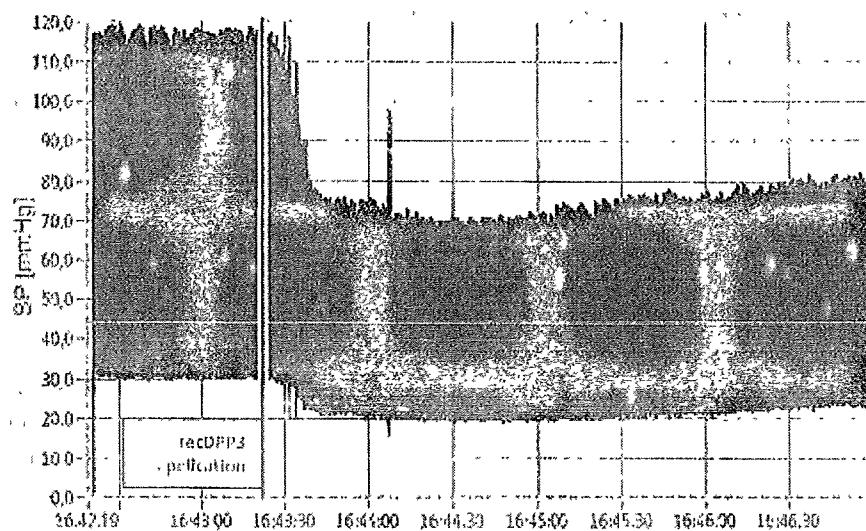
Fig. 10:



DPP3 activity [$\text{nmol } \beta\text{NA min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$]	DPP3-Aktivität [$\text{nmol } \beta\text{NA min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$]
Norm	Norm
AMI	akuter Myokardinfarkt
Cardiogenic Shock	Kardiogener Schock
Septic Shock	Septischer Schock
Liver Failure	Leberinsuffizienz

CH 713 803 B1

Fig. 11:



recDPP3 application	rek. DPP3 Anwendung
---------------------	---------------------