



脑啡肽酶介导产生的BNP片段与心衰精准医疗 ——相关文献解读及专家意见分享

前言：

随着2015年大型临床多中心研究PARADIGM-HF研究结果的公布，证实了诺华的心衰新药ARNI（诺欣妥）相比一线心衰治疗药物依那普利在降低心血管不良事件和改善心衰有着显著提升。但是随着诺欣妥在临床上的广泛应用，很多临床医生对这些接受诺欣妥治疗的患者的NPs检测结果感到困惑。

针对目前的现状，HyTest开发了一种全新的BNP-neo 17检测系统可用于检测NEP裂解BNP后形成的neo 17片段，该新型标志物可用于反映患者体内NEP活性在未来对于患者进行疗效预评估具有潜在的应用价值。

关于NEO 17的最近发表文章的中文解读请见下文。

Detection of Neprilysin-Derived BNP Fragments in the Circulation: Possible Insights for Targeted Neprilysin Inhibition Therapy for Heart Failure

Evgeniya E. Feygina,^{1,2*} Marina M. Artemieva,³ Alexander B. Postnikov,^{1,2} Natalia N. Tamm,^{1,2}
Marina N. Bloshchitsyna,^{1,2} Natalia A. Medvedeva,³ Alexey G. Katrukha,^{1,4} and Alexander G. Semenov^{1,2}

译：王楠 校对：奚苏静

外周循环中脑啡肽酶介导产生的BNP片段的检测： 脑啡肽酶靶向抑制对于心衰治疗的见解与启示

心衰（HF）是一种全球流行性疾病，伴有高发病率和死亡率。目前，全球范围内受心衰影响的人数已经超过了2600万人。诺华于2014年推出了一种新型的心衰治疗药物，该药物为血管紧张素受体脑啡肽酶抑制剂（ARNi）——诺欣妥（Entresto）。据PARADIGM-HF试验结果显示，该药物可以使射血分数降低的患者的心脏死亡率及再入院率降低20%。然而，严格的试验入选标准、药物滴定的困难以及一些不良事件的报道均提示，对患者进行ARNi受益程度的预判可能是有意义的。

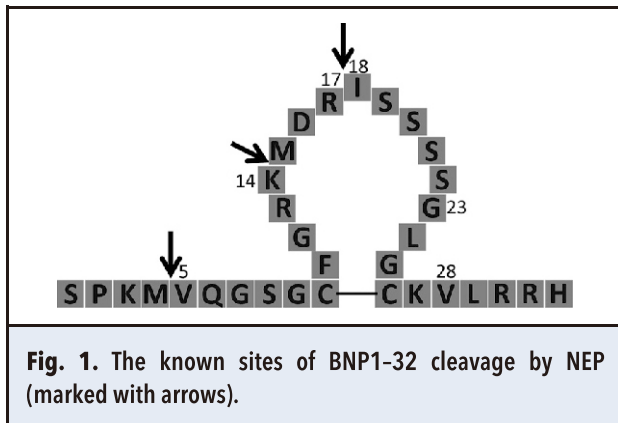
诺欣妥由两个活性成分组成，分别为血管紧张素受体II阻断剂缬沙坦和脑啡肽酶特异性抑制剂沙库巴曲。脑啡肽酶（NEP）是一种锌依赖型的金属蛋白酶，作用位点位于氨基酸的疏水残基。脑啡肽酶在体内广泛存在，在肾脏

中尤为丰富。NEP是一种跨膜蛋白，但是外周循环中也有报道显示有酶活性形式的NEP存在。NEP的底物有很多种，如缓激肽、肾上腺髓质素、脑啡肽、缩宫素、底物P、 β 淀粉样蛋白和利钠肽相关多肽（NPs）。对心衰而言，由于ANP和BNP具有心肌保护作用，因此其病理机制尤为重要。

外周循环中，NPs以无活性的前体形式（proANP和proBNP，这种形式的分子对脑啡肽酶不敏感）、具有活性的激素类多肽及相关系列降解片段等三种形式存在。ARNi对于NEP的抑制作用会阻止NPs的降解，这可能会改变无活性的NPs与活性激素NP之间的平衡关系，从而使外周循环中BNP的浓度水平升高。而ARNi对于NPs活性分子浓度水平的提升恰恰是其发挥疗效的重要机制之一。

在本研究中，研究人员通过NEP的酶切作用对BNP及相关的片段的生成进行了研究。在之前的研究中，研究者

已经确认了BNP上的NEP作用位点，其中对于NEP最为敏感的作用位点位于Met-4 和Val-5之间，其次是位于Arg-17 和 Ile-18的位点。BNP的截断会形成一些原本不存在于完整分子中的由蛋白水解产生的抗原表位（新生表位）。这些新生表位包括neo 5（包含N末端的Val-5）、neo 17（包含C末端的Arg-17）和neo18（包含N末端Ile-18）（如图1所示）。上述的新生表位均为NEP作用BNP后形成的特异性产物，因此包含有上述特异性新生表位的BNP片段可能在对于患者的区分鉴别方面有一定的临床意义。



BNP11-17aa的区域对于外周循环中的蛋白酶不敏感，因此相对比较稳定，这在之前的研究中已经得到了证实。因此可以推断，neo 17的新生表位也可能具有很高的稳定性。基于上述假设，本研究对于包含有neo 17表位的BNP片段进行了相关研究。

本研究设计了一种特异性识别BNP neo 17的夹心免疫检测系统，该系统与全长BNP分子无交叉反应。基于该检测系统，研究人员对动物模型和心衰患者的BNP neo 17进行了检测分析。

1.实验材料与与方法：

1.1 材料

合成的ANP1-28和BNP1-32由Bachem提供；BNP5-32片段及开环结构BNP（BNP5-32的5-17aa，和18-32aa，其中17-18位点被酶切）由Peptide 2.0提供；人重组proBNP由HyTest提供；重组脑啡肽酶分别由R&D systems（人源）和Sino Biological（鼠源）提供；沙库巴曲由MedCoo提供；所有BNP单抗均由HyTest提供；ANP单抗由Bio-Rad提供；其他信息详见原文。

1.2 BNP-neo 17夹心免疫检测系统

抗体配对为BNP-neo(17)多抗（捕获抗体）-- 50E1 26-32aa（检测抗体），更多信息详见原文。

1.3 BNP与ANP检测

BNP检测使用的系统为SES-BNP（HyTest），该系统可以等效识别完整的BNP和BNP-neo 17片段。

ANP检测使用的是竞争法免疫检测系统，捕获抗体为Mab 23/1，标记物为重组人proANP。

1.4 BNP裂解的体外试验

BNP分别与人NEP和鼠NEP在有或无沙库巴曲的条件下于37° 孵育1小时。

1.5 NP裂解的体内研究

对8只雄性Wistar大鼠进行麻醉，并在右侧股动脉和静脉进行插管。

ANP和BNP在无沙库巴曲的情况下的反应动力学是通过对小鼠进行口服氯化钠，及注射ANP、BNP及氯化钠混合物获得的。而ANP和BNP在有沙库巴曲的情况下的反应动力学是通过对小鼠注射ANP、BNP及沙库巴曲的混合物获得的。

其余信息请参见原文。

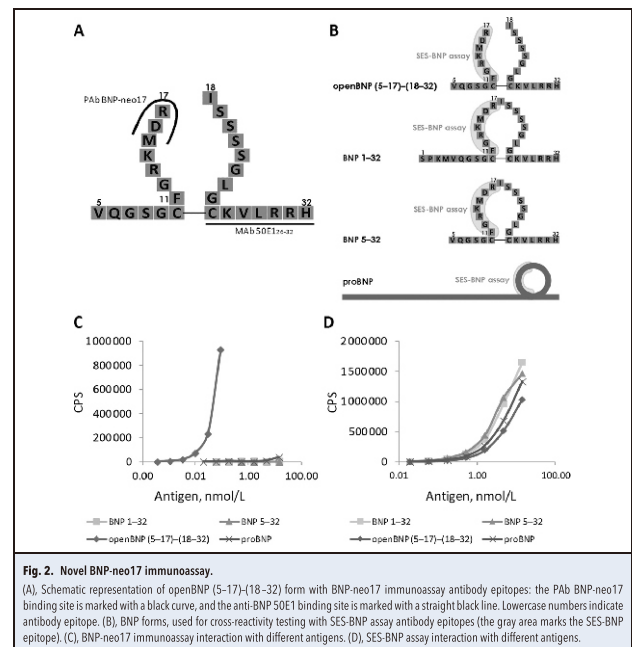
1.6 患者信息

详见原文。

2.结果与分析

2.1 BNP-neo 17免疫检测系统的建立

Fig.2，本研究建立了一种新型的BNP-neo 17的免疫检测系统，其中捕获抗体为特异识别neo 17表位的多抗，检测抗体为50E1（识别BNP的C末端），开环结构BNP（5-17）-（18-32）作为校准品。



2.2 NEP介导的BNP裂解的体外研究

为了进一步使用鼠模型研究NEP介导的BNP降解，研究者对人NEP和鼠NEP介导的BNP降解进行了体外研究。研究者将BNP在有沙库巴曲和无沙库巴曲的情况下分别与人和鼠NEP进行孵育，然后用BNP-neo 17的免疫检测系统对BNP-neo 17进行检测，以确认鼠NEP对于人BNP的裂解作用，以及沙库巴曲对该裂解反应的抑制作用。

用。

结果如图3所示，在人NEP和鼠NEP分别作用0.5和1小时后，均有BNP-neo 17产生。在无NEP存在的情况或在有NEP且有沙库巴曲存在的情况下，均无BNP-neo 17的产生。因此，可以确认鼠NEP可以在体外裂解人BNP并形成BNP-neo 17，且该反应可被沙库巴曲抑制。这也使得研究可以移至鼠模型内进行体内试验。

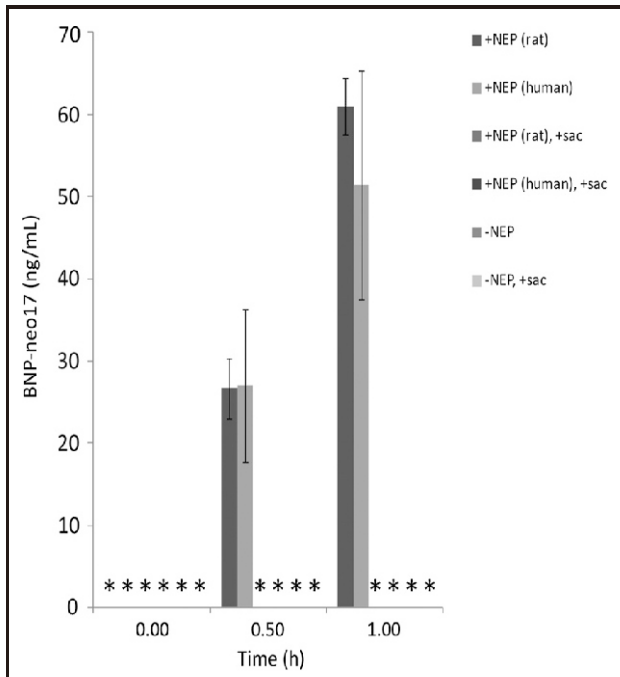


Fig. 3. In vitro BNP cleavage by rat and human NEP.

Measurements with BNP-neo17 immunoassay with openBNP (5-17)-(18-32) as calibrator. Error bars represent SD. Asterisks denote concentrations of BNP-neo17 below LOD.

2.3 NEP介导的BNP裂解的体内研究

研究者对有/无沙库巴曲的小鼠注射BNP，并在不同时间测试BNP-neo 17和总BNP，以考察外周循环中NEP介导的BNP裂解的情况。因为ANP是NEP更倾向的作用底物，因此此次研究中也把ANP与BNP以等分子量混合进行了注射，以控制NEP的抑制效率。ANP的测试方法为竞争免疫分析法。

在NEP被抑制的情况下，ANP的半衰期平均为9.1分钟，并且其平均浓度会在4分钟左右达到最大值（最大值为171.1ng/mL），如图4A所示。在无沙库巴曲的情况下，ANP的浓度显著降低。说明，在本次试验中NEP的活性被沙库巴曲有效抑制。而相比于ANP，BNP在有沙库巴曲的情况下变化不显著，其对应的半衰期分别为8.5分钟和5.7分钟，同时对应的最大峰值分别为72.5 和 84.0 ng/mL（Fig. 4B）。

BNP-neo 17的检测结果显示，在注射了沙库巴曲后，鼠外周循环中的BNP-neo 17浓度显著降低，最大值仅为0.26ng/mL，而无沙库巴曲的情况下BNP-neo 17的最大值浓度为1.68。另外还观察到，在有无沙库巴曲存在

的情况下，BNP-neo 17的差异可达13.2倍（Fig. 4C）。

研究者通过计算BNP-neo 17与总BNP的比值对BNP-neo 17的产生与清除的比率进行了研究。结果显示，当沙库巴曲存在时，BNP-neo 17占总BNP的比例随着时间的推移出现了显著变化，并在20分钟达到了27倍（Fig. 4D）。

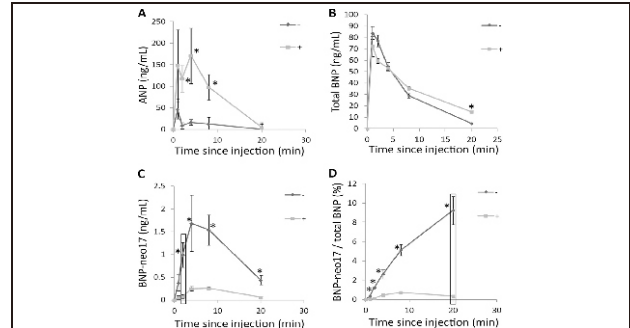


Fig. 4. Change in average NP concentration in rat plasma with (+) and without (-) NEP inhibition by sacubitril. (A), ANP immunoassay ($P = 0.4619, 0.0028, 0.0014, 0.0135, \text{ and } 1.0000$ at 1, 2, 4, 8 and 20 min, respectively). (B), SE5-BNP assay ($P = 0.5435, 0.7132, 0.9581, 0.1893, \text{ and } 0.0002$ at 1, 2, 4, 8 and 20 min, respectively). (C), BNP-neo17 immunoassay ($P = 0.0550, 0.0008, 0.0014, 0.0002, \text{ and } 0.0027$ at 1, 2, 4, 8 and 20 min, respectively). (D), BNP-neo17/total BNP ($P = 0.0246, 0.0008, 0.0002, 0.0002, \text{ and } 0.0009$ at 1, 2, 4, 8 and 20 min, respectively). Error bars represent standard error of the mean (SE). If error bars are not visible, they are smaller than the marker size. Asterisks mark points where parameter difference $\pm$ sacubitril was statistically significant.

2.4 人类外周循环中BNP-neo 17的检测

BNP-neo 17也可能存在于人外周循环中，其所占总BNP的比例可能存在较大的个体间差异。为了验证该假设，研究者对32例心衰患者EDTA血浆进行了总BNP及BNP-neo 17的检测。

结果显示，32例样本的总BNP的结果分布为28.5–3384.5ng/L，其中19例患者为BNP-neo 17阳性，另外13例的BNP-neo 17的检测结果低于LoD值，整体的BNP-neo 17浓度分布水平非常低，仅为0–37.3ng/L，但是与总BNP浓度存在一定的相关性（ $r=0.784$ ）。

此外，BNP-neo 17/总BNP的比值也存在显著的个体间差异。其中，在19例BNP-neo 17阳性的患者中，有5例样本的结果为5.6%–11.7%（高占比水平），13例样本的结果为0.5%–5.5%（中等水平），还有一例为0.2%（低水平）（Fig. 5A）。另外，该比值与总BNP之间无相关性（Fig. 5B）。

因此可以得出结论，BNP-neo 17存在于外周循环中，并且其所占总BNP的比例独立于BNP水平。

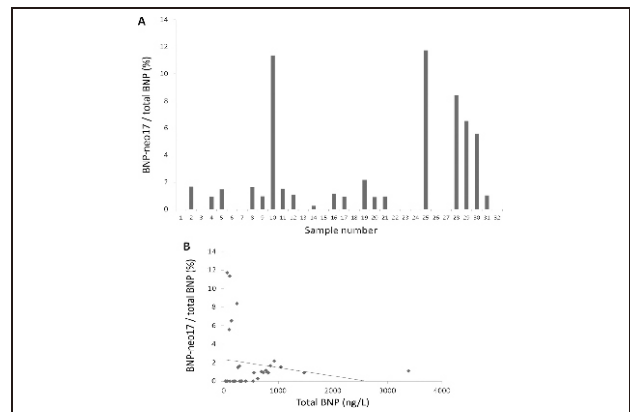


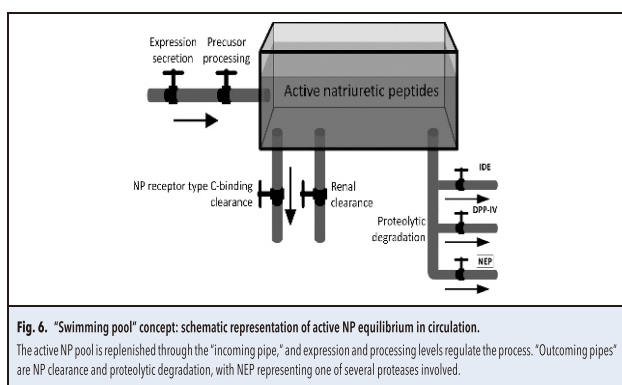
Fig. 5. BNP-neo17 measurement in HF patient plasma samples.

(A), BNP-neo17/total BNP ratio in HF patient plasma samples. (B), Correlation between BNP-neo17/total BNP ratio and total BNP concentrations ($r = -0.175, P = 0.680$).

3. 讨论与启示

NPs作为肾素血管紧张素系统及交感神经系统的调节因子，参与胞外液容积及血压的调节以及心脏肥大及心室重构的抑制。对于HF患者而言，ANP和BNP均会升高，后者更是被作为心衰标志物的金标准（包括NT-proBNP），但是这些NPs的免疫检测均不能反映出外周循环中真正具有活性的NPs的水平。对于HF患者，proBNP（BNP的非活性前体）是BNP的主要免疫活性形式。proBNP的裂解会产生具有活性的BNP，但是裂解水平存在个体间差异，这将进一步影响外周循环中NPs活性形式的水平，ANP也存在类似的情况。

研究者使用了“游泳池”的概念以表述活性NP的动态平衡。其中前体的表达分泌及裂解用进水管表示，活性NP的失活方式则用排水管表示。如图Fig.6所示，失活的方式包括NEP、二肽基肽酶IV、胰岛素降解酶和其他蛋白酶对于NP的裂解以及NP受体C和肾脏对于NP的清除。



ARNi中NEP抑制剂对于活性NP水平的影响是通过“蛋白水解阀门”的方式进行的。NP通过NEP抑制的方式进行活性修复，称之为“利钠肽的恢复潜能（NP-RP）”；如果将BNP作为讨论对象，那么NP-RP也可称之为BNP-RP。如果proBNP的产生和裂解均维持在高水平，同时伴有NEP的高活性水平，那么则可称为高NP-RP；反之，若proBNP的裂解极其低效，脑啡肽酶抑制剂将不会使BNP活性升高，那么则称为低NP-RP。

基于上述内容，可以得出一个关于诺欣妥治疗策略的假设。若患者为高NP-RP，接受诺欣妥治疗后会获益显著；反之，若患者为低NP-RP，则疗效可能会不显著。因此，将高NP-RP和低NP-RP人群进行区分具有重要意义。然而，由于NP-RP涉及了包括proBNP的产生及裂解水平以及NEP活性等因素，直接对于NP-RP进行测定非常困难。

目前，已经有研究报道了通过合成的荧光底物检测NEP活性的方法。这类方法，仅考虑了分离后血液中的NEP活性而忽略了膜结合酶的活性（膜结合酶是NEP的酶活形式）。因此，该方法不足以体现NP-RP，因为测试结果不能反映出活性NP的产量。

对于NP-RP，最直接的测试方法是监测外周循环中

NEP介导产生的NP片段。ANP和BNP均是NEP的底物，但是ANP的半衰期更短，其可被体内多种酶快速降解，监测ANP片段将会非常复杂。因此，本研究选择BNP作为目标，对BNP-RP进行检测。基于NEP对于BNP的酶切位点及BNP的分子稳定性研究，BNP-neo 17是一种非常合适的备选分析物。

之前已经有研究证明了鼠模型可用于外周循环中BNP的研究，因此本研究选择鼠模型对BNP的体内降解进行了研究。通过使用NEP特异性抑制剂沙库巴曲，研究者得到了充足证据证明BNP-neo 17形成是NEP依赖性的。之前的研究显示，在沙库巴曲治疗后仍然有少量的NEP残留，这也与本研究发现了沙库巴曲治疗后仍有微量BNP-neo 17存在的结果相一致。因此可以确定，动物模型中BNP-neo 17确实是外周循环中NEP的作用产物。

通过人血浆测试，研究发现BNP-neo 17水平与总BNP水平中度相关。然而BNP-neo 17/BNP的比值与总BNP无相关性，说明BNP-neo 17在总BNP中的占比是一种能够反映BNP-RP的独立因子。尽管研究的样本群体很小，但是BNP-neo 17/BNP的比值结果仍然显示出了明显的差异性，即高水平、中水平和低水平或无法检出组。对于低水平组的结果，有人可能会认为NEP抑制将不会导致活性BNP的升高，因此该检测可能不具有重要意义。但是，由于proBNP不会被NEP降解，因此外周循环中不同截断形式的BNP是BNP-neo 17产生的唯一来源。而且这些肽段实际上在HF患者中的水平往往很低，因此可以推断BNP-neo 17的浓度水平可能会低于100ng/L。

BNP-neo 17可以作为基于NEP抑制剂治疗疗效监测的备选标志物。对BNP-neo 17进行检测可以用于患者的预区分，以鉴别NEP抑制剂治疗的受益人群。随着个体化医疗的不断发展，伴随式诊断将会使治疗诊断学向治疗应答监测及预后评估转变成为了可能。

BNP-neo 17检测的另一个潜在用途是HF治疗监测：将BNP-neo 17与其他标志物（如BNP或NT-proBNP）进行联检有助于监测血管紧张素脑啡肽酶抑制剂对于利钠肽活性恢复程度的效果，这也与脑啡肽酶抑制剂治疗直接相关。

然而，由于目前本研究的研究群体很小且HF样本均为急性心衰，因此在未来的研究中需要使用更大规模的接受了ARNi治疗的样本群体。

总之，本研究证实了BNP-neo 17在体内是经NEP裂解BNP所产生。同时，BNP-neo 17/总BNP的比值存在高度的个体间差异。这些结果均支持BNP-neo 17用于反映患者BNP-RP情况的可能性，使其可以作为NEP抑制剂治疗的伴随诊断的潜在标志物。

续:

随着HyTest科学家对BNP-neo 17进行相关研究的文章发表,随后Clinical Chemistry杂志编辑Antoni Bayes-Genis和Julio Núñez在其发表的社论(Clinical Chemistry Oct 2019, 65 (10) 1187-1189; DOI: 10.1373/clinchem.2019.308478)中提到了HyTest开发的BNP-neo 17检测系统,我们摘取了neo 17相关部分进行了翻译分享:

Clinical Chemistry 65:10
000-000(2019)

Editorials

Step by step Tward Biomarker-Based Precision Medicine in Heart Failure

Antoni Bayes-Genis^{1,2*} and Julio Núñez^{3,4}

译:杨晨辰 校对:王楠

在这期的临床化学中,Feygina及其同事们研究了NEP作用产生的BNP衍生碎片。BNP分子上有许多NEP水解的位点,这些位点有着不同的水解敏感性。最敏感的位点在Met-4和Arg-17之间,其次是Arg-17和Ile-18之间的位点。NEP裂解BNP的位点是已知的,这些位点分别是neo 5(C末端Arg-17),neo 17(C末端Arg-17)和neo 18(N末端Ile-18)。在这篇研究中,作者开发了一种全新的检测BNP-neo 17位点的免疫检测系统,并且与全片段的BNP分子没有交叉反应。首先他们证明了体外BNP-neo 17是在NEP存在的情况下生成的。其次,他们在注射有BNP的大鼠(经过和未经过沙库巴曲处理)中进行了全面的体内生物合成和生物降解的分析。最后,他们还确证了未接受沙库巴曲缬沙坦治疗的心衰患者外周循环中存在着BNP-neo 17。该研究产生的反响是多方面的。

在这篇研究中,作者提供了一种检测系统,可检测新型的、潜在预测性的生物标志物BNP-neo 17,可以用来识别最有可能对某些治疗(例如通过ARNI沙库巴曲缬沙坦的NEP抑制治疗)有反应的个体。的确,BNP-neo 17可用来反映射血分数降低的患者体内NEP活性。对于检测替代标志物而不是检测循环NEP本身的浓度或活性,人们可能会质疑其合理性。NEP浓度在射血分数降低的患者

体内是变化的,尽管在一些情况下NEP浓度可用来预测患者心血管死亡和心衰住院的事件。但是,目前NEP检测主要的限制是临床实践中缺乏可靠、重复性高的检测试剂。目前有许多基于荧光底物的方法可用于检测NEP活性。但是这些检测NEP活性的方法的主要缺点是没有考虑到外周循环中产生的利钠肽的活性。因此,BNP-neo 17的出现可能是一种很好的替代品。在临床应用之前,该检测系统还需要进一步开发和改进,但是目前提供的数据表明该检测系统已经足够可靠。然而BNP-neo 17水平较高(反应NEP活性)的患者是否比那些BNP-neo 17水平较低患者在接受ARNI治疗之后有更好的临床表现,这超出了该文章的研究范围。心衰临床医生应当能够准确鉴别有更高NEP活性的心衰患者并且加大ARNI的使用剂量。

此外,BNP-neo 17也可作为监控NEP抑制治疗的药物动力学标志物。BNP-neo 17也许能提供接受沙库巴曲缬沙坦治疗对于利钠肽活性恢复程度的信息,从而评估NEP抑制治疗的效率。虽然作者提供了心衰患者外周循环中存在BNP-neo 17初步证据,但是他们未能提供接受ARNI治疗患者中存在BNP-neo 17的证据。

总结

由此可见,BNP-neo 17的初步研究结果已经得到了业界专家的认可。然而,由于缺少后续临床样本的验证,该研究还需持续深入进行。相信,随着后续相关临床研究的进行,BNP-neo 17临床应用价值的面纱将被进一步揭开。