



N末端B型利钠肽前体--NT-proBNP 新克隆上市！

NT-proBNP属于B型利钠肽的衍生分子。当心脏受到外界压力刺激时，心肌细胞会合成preproBNP，随着分子N末端26个氨基酸的信号肽被切除，preproBNP形成成熟的proBNP。进一步，proBNP会在蛋白酶的作用下被裂解为BNP和NT-proBNP，并释放进入血液。NT-proBNP对于心衰筛查、排除诊断、治疗监测和预后评估均具有重要意义。NT-proBNP还对其他疾病的危险分层和预后评价具有重要价值，包括肺栓塞、肺动脉高压、冠心病、慢性肾病、心源性卒中、肿瘤和术前评估。此外，NT-proBNP也是心血管疾病预防及健康筛查的重要工具。

NT-proBNP形成过程中，分子会经历翻译后修饰，使其分子部分氨基酸被糖基化，这种糖基化呈现出明显的个体间及个体内异质性。目前，已知的NT-proBNP糖基化点位为Thr36、Ser37、Ser44、Thr48、Ser52、Thr58和Thr71。值得一提的是，HyTest科学家的研究发现，Thr71的糖基化是proBNP裂解的分子开关，当该位点为去糖基化状态时，proBNP会裂解为BNP和NT-proBNP；而当该位点为糖基化状态时，proBNP则不会发生裂解。据推测，这可能是由于糖基化产生的空间位阻阻断了蛋白酶的作用所致。另一方面，由于BNP具有心脏保护作用，proBNP的糖基化水平可能与疾病状态以及预后相关。

外周循环中的NT-proBNP由proBNP裂解而来。同时，完整的proBNP也可直接被释放进入血液。由于proBNP包含有完整NT-proBNP氨基酸序列，因此目前临床上使用的商品化NT-proBNP试剂所识别的待测物实际为糖基化与非糖基化的proBNP和NT-proBNP的混合物。而试剂对于混合物中不同组分的检出率或交叉反应率则取决于待测物的糖基化程度，以及试剂所选择的抗体对于糖基化的敏感程度。由于待测物糖基化呈高度异质性，使得结果准确性充满不确定性，因此试剂抗体的选择是检测结果准确性的关键。

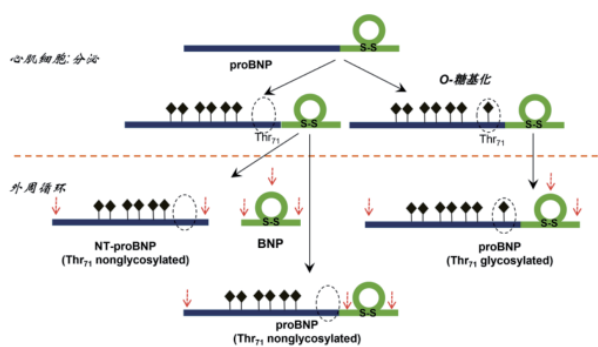


图1. NT-proBNP的释放形式。

NT-proBNP免疫检测系统建立

对于NT-proBNP免疫检测试剂的开发，糖基化是我们考虑是首要因素。由于NT-proBNP分子糖基化的存在，若检测试剂使用的抗体识别位点位于糖基化区域可能会导致结果的低估，从而对NT-proBNP的临床应用产生潜在影响。目前，应用于临床的商品化NT-proBNP检测试剂盒可主要分为两类。一类为部分识别糖基化区域的NT-proBNP试剂（Ser44非糖基化NT-proBNP试剂），这也是目前最为主流的NT-proBNP商品化试剂。该试剂使用的两株抗体中有一株抗体的识别位点为42-46aa，恰好位于Ser44的潜在糖基化位点上。因此，该类试剂仅能检出Ser44非糖基化的NT-proBNP。若NT-proBNP部分分子的Ser44发生糖基化，则会导致结果的低估，同时临近的Thr48的糖基化也可能导致结果的低估。另一类NT-proBNP试剂则是以HyTest产品概念为代表的总NT-proBNP检测试剂，该类试剂使用的抗体位于NT-proBNP分子两端的非糖基化区域，因此可检出外周循环中所有形式（糖基化与非糖基化）的总NT-proBNP(图2)。

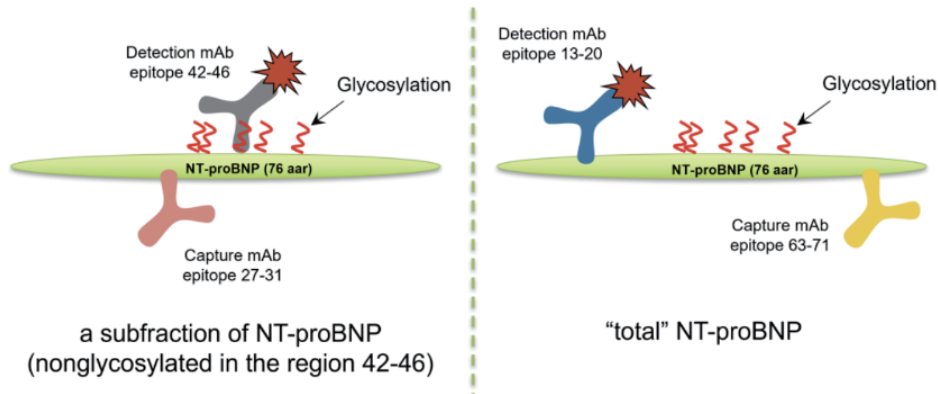


图2. NT-proBNP检测模型概览

根据HyTest科学家与武汉亚心医院张主任团队的最新研究结果显示，总NT-proBNP试剂的结果较Ser44非糖基化NT-proBNP试剂结果高2倍左右。当对样本进行去糖基化处理后，Ser44非糖基化NT-proBNP试剂检测结果显著升高，且两组试剂的检测结果趋于一致，而总NT-proBNP则不受去糖基化处理的影响，样本去糖基化前后的检测结果基本保持不变（图3）。由此我们可以看出，若检测试剂的抗体位于分子糖基化区域，会导致结果的显著低估。虽然两种不同NT-proBNP试剂结果差异显著，但是通过对所有入组病例样本测试的ROC曲线分析显示，Ser44非糖基化的NT-proBNP与总NT-proBNP试剂对于心衰诊断具有等效的价值（0.943 vs 0.935）。

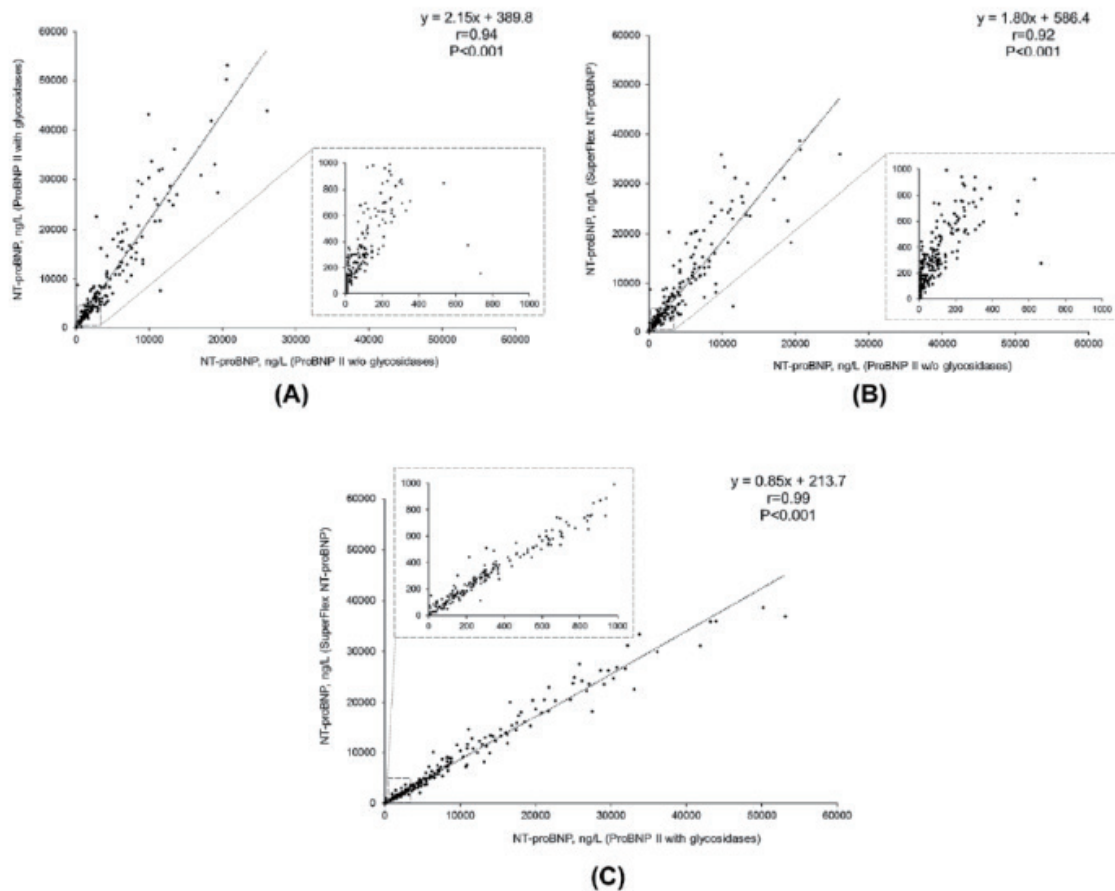


图3. 糖基化对于NT-proBNP检测试剂结果的影响。

图片来源：Ling Li, Alexander Semenov, CCLM, 2022. <https://doi.org/10.1515/cclm-2022-1194>

然而，心衰患者外周循环中NT-proBNP的非糖基化程度显著高于非心衰患者。低浓度的NT-proBNP水平与心脏结构以及心衰发生风险相关。由此可以推测，这些低估的NT-proBNP可能对于那些处于心衰风险期的患者更具意义。因此，总NT-proBNP检测相比Ser44非糖基化NT-proBNP试剂，在心衰预测、特定人群风险筛查、疾病状态检测以及治疗监测方面会更具优势。此外，使用Ser44非糖基化NT-proBNP试剂建立的参考值存在明显的地域和种族差异，这可能也与不同人群糖基化水平差异有关。因此，使用总NT-proBNP试剂可能更有助于提升检测结果的一致性。

由此可见，针对糖基化对于NT-proBNP的影响，我们可以根据临床预期用途对NT-proBNP试剂开发制定针对策略：

a. 基于现有NT-proBNP心衰诊疗用途，可使用识别NT-proBNP糖基化区域的抗体开发非糖基化的NT-proBNP试剂；对应此应用场景，总NT-proBNP也适用。

针对该类试剂，HyTest推出了新一代重组单抗产品，相比初代鼠单抗产品，亲和力和灵敏度得到了进一步提升，可用于开发高性能NT-proBNP定量检测试剂。尤其侧向层析平台上，新一代单抗的单位微球抗体标记用量相比初代产品可减少30-50%，有助于客户进一步降低生产成本。同时，推荐配对与主流商品化试剂存在良好的相关性。推荐配对如表1所示，代表性配对的校准曲线和样本测试结果如图4所示。

表1. 侧向层析平台NT-proBNP配对推荐

捕获抗体	检测抗体
NT13 New!	NT45 New!
15F11cc	NT45 New!
15F11cc	16E6cc

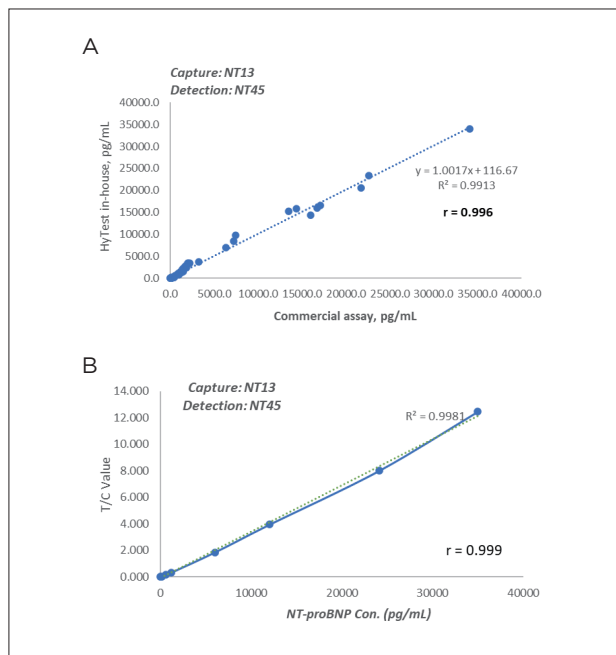


图4. 代表性配对的校准曲线(A)和样本相关性测试结果(B)。

b. 基于未来NT-proBNP更加多样化的临床应用场景，如心衰早筛、心血管风险筛查、健康人心脏功能评测、疾病发展以及治疗监测等。则推荐使用识别非糖基化区域的抗体开发总NT-proBNP检测试剂。该模型已被我国2022年新发布的《B型利钠肽及N末端B型利钠肽前体实验室检测与临床应用中国专家共识》所推荐。

针对该类试剂，我们推荐使用识别NT-proBNP 13-24aar和63-73aar的非糖基化区域的抗体进行配对。该类配对可完全规避NT-proBNP分子糖基化的影响，从而检出外周循环中总NT-proBNP。配对推荐如表2所示，代表性配对的校准曲线和样本测试结果如图5所示。

表2. 总NT-proBNP配对推荐

捕获抗体	检测抗体
15C4cc	18H5cc

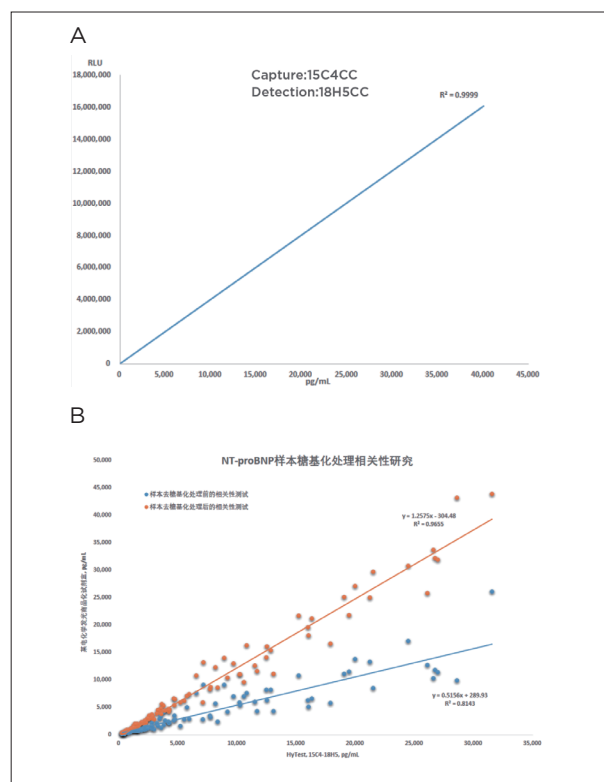


图5. 总NT-proBNP代表性配对的校准曲线(A)和样本相关性测试结果(B)。

除抗体选择外，合适的抗原也是NT-proBNP试剂开发的关键要素。由于NT-proBNP的糖基化呈现出高度的个体间和个体内差异。因此，想要获得具有代表性的天然糖基化NT-proBNP几乎不可能（图6）。同时，NT-proBNP的糖基化还会影响抗体的识别，从而进一步增大试剂间结果差异。因此，对于NT-proBNP试剂开发过程中的校准品抗原，我们仅建议选用非糖基化的NT-proBNP抗原。一方面，非糖基化NT-proBNP可被不同位点的抗体等效识别；另一方面，使用非糖基化NT-proBNP可消除糖基化抗原带来的异质性，有助于推进NT-proBNP检测标准化。

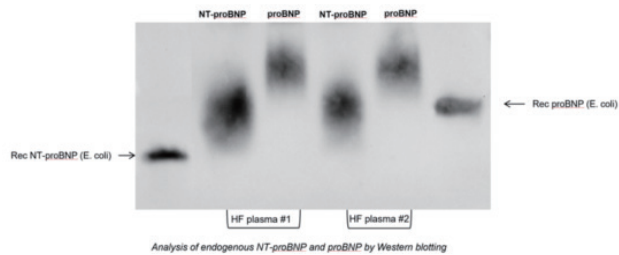


图6. 不同患者内源性NT-proBNP的WB结果分析。

HyTest提供的重组非糖基化NT-proBNP抗原，有大肠杆菌表达（纯度大于95%），可用于不同NT-proBNP试剂的校准品制备。该抗原已经被中国计量科学院选为NT-proBNP国家标准物质原料，标物号为GBW(E)091242，这也是全球范围内首个NT-proBNP的有证标准物质。

订购信息

单克隆抗体

品名	货号	克隆号	亚型	备注
NT-proBNP,N端利钠肽前体	4NT1cc	5B6cc	IgG1	体外生产, EIA, WB, a.a.r. 1-12
		29D12cc	IgG2a	体外生产, EIA, WB, a.a.r. 5-12
		15F11cc	IgG2b	体外生产, EIA, WB, a.a.r. 13-24
		13G12cc	IgG2a	体外生产, EIA, WB, a.a.r. 13-20
		18H5cc	IgG1	体外生产, EIA, WB, a.a.r. 13-20
		7B5cc	IgG1	体外生产, EIA, WB, a.a.r. 15-21
		NT34cc	IgG1	体外生产, EIA, WB, a.a.r. 25-34
		11D1cc	IgG1	体外生产, EIA, WB, a.a.r. 31-39
		16E6cc	IgG1	体外生产, EIA, WB, a.a.r. 34-39
		15C4cc	IgG2b	体外生产, EIA, WB, a.a.r. 63-71
		24E11cc	IgG2a	体外生产, EIA, WB, a.a.r. 67-76
		NT13	IgG	重组兔抗, EIA, a.a.r. 27-31
		NT45	IgG	重组兔抗, EIA, a.a.r. 43-46
		NT46	IgG	重组兔抗, EIA, a.a.r. 43-46
	4NT1	16F3	IgG1	EIA, WB, a.a.r. 15-20
		15D7	IgG1	EIA, WB, a.a.r. 48-56
		28F8	IgG2a	EIA, WB, a.a.r. 67-76

new!

抗原

品名	货号	纯度	来源
NT-proBNP,N端利钠肽前体,重组	8NT2	>95%	重组