



ТЕХНИЧЕСКОЕ ОПИСАНИЕ



Для исследований
и клинического
применения

Кардиомаркеры



ProBNP, BNP и NT-proBNP человека



Мозговой натрийуретический пептид (Brain Natriuretic Peptide, BNP) и N-концевой фрагмент предшественника BNP (proBNP), NT-proBNP – признанные биомаркеры для диагностики и прогнозирования сердечной недостаточности (СН). Эта болезнь настолько распространена среди

населения, что признается серьезной социальной проблемой, несущей вызов для системы общественного здравоохранения. По данным Американской кардиологической ассоциации, в США от нее страдает до 6,5 миллионов людей, причем ежегодно регистрируется около 1 миллиона новых случаев (1). По всему миру насчитывается более 23 миллионов человек, у которых подтверждена СН. Среди основных факторов риска СН - ишемическая болезнь сердца, гипертония и диабет, а также возраст старше 65 лет. Одной из важнейших характеристик СН является высокий уровень смертности.

BNP, NT-proBNP и proBNP как диагностические маркеры

Клинические руководства рекомендуют проводить измерения уровней BNP или NT-proBNP, чтобы исключить СН при первоначальном осмотре пациента с подозрением на острую СН. Оба этих биомаркера также могут быть использованы для наблюдения за течением заболевания. Клинические значения BNP и NT-proBNP схожи (2–3), и оба маркера в настоящее время используются в клинической практике.

У здоровых взрослых пороговый уровень BNP в плазме составляет 35 пг/мл, а NT-proBNP - 125 пг/мл (4). Важную роль играют возраст и пол, так как у пожилых людей и женщин показатели могут быть выше.

Клиническое использование

- ✓ Идентификация или исключение сердечной недостаточности (СН)
- ✓ Оценка степени тяжести СН
- ✓ Прогнозирование развития болезни
- ✓ Мониторинг медикаментозной терапии

Концентрации BNP или NT-proBNP коррелируют с тяжестью заболевания и могут увеличиваться в несколько сотен раз. Было установлено, что концентрации обоих пептидов могут быть повышены у бессимптомных пациентов уже на ранней стадии СН (I-ый функциональный класс по классификации Нью-Йоркской кардиологической ассоциации (NYHA). В то же время, у пациентов II, III и особенно IV класса выраженности симптомов СН по классификации NYHA, концентрация BNP и NT-proBNP в крови повышается значительно. Поэтому измерение пептидов в крови человека широко применяется для исследования пациентов с подозрением на СН, а также для оценки степени тяжести заболевания.

Определение концентрации BNP или NT-proBNP используется для стратификации риска у пациентов с различными сердечными патологиями. Как правило, риск появления осложнений выше у пациентов с более высокой концентрацией BNP и NT-proBNP в крови. У пациентов с хронической СН повышенные уровни обоих пептидов позволяют прогнозировать вероятность летального исхода, а в случае острого коронарного синдрома – развитие острой СН.

Помимо NT-proBNP и BNP, в образцах крови, полученных от пациентов с СН, обнаруживается повышенная концентрация их предшественника - proBNP1-108.

Биохимические особенности proBNP и его производных

Ген, кодирующий BNP, активируется в кардиомиоцитах в ответ на растяжение миокарда вследствие повышенной нагрузки под действием давления/объема. Это приводит к синтезу внутриклеточного предшественника рproBNP, состоящего из 134-аминокислотного остатка (а.о.). После удаления сигнального пептида пропептид расщепляется на биологически активный BNP (32 а.о.) и NT-proBNP (76 а.о.), о биологической активности которого ничего неизвестно. Как BNP, так и NT-proBNP, а также непроцессированный proBNP секретируются и далее циркулируют в кровотоке (см. Рисунок 1). BNP эффективно выводится из кровообращения, а период его полувыведения составляет около 20 минут. Период полувыведения NT-proBNP дольше (60–120 минут), что объясняет более высокую концентрацию NT-proBNP в крови по сравнению с BNP. ProBNP представляет собой O-гликозилированный белок с семью идентифицированными сайтами гликозилирования (5). Все сайты гликозилирования расположены в части NT-proBNP, в то время как BNP не гликозилируется. Статус гликозилирования остатка треонина в положении 71 (T71) имеет решающее значение в процессе преобразования

proBNP в BNP и NT-proBNP. Остаток T71 расположен близко к сайту расщепления, и конвертазозависимое расщепление проходит только если T71 не гликозилирован. Таким образом, большая часть нерасщепленного proBNP, обнаруженного в кровотоке, содержит O-гликан в положении T71, тогда как та же аминокислота в NT-proBNP не гликозилирована (6).

Реагенты для иммунодиагностических тест-систем

Наша компания занимается исследованием proBNP и его производных (BNP, NT-proBNP) на протяжении многих лет. Более того, наши ученые опубликовали ряд статей в рецензируемых научных журналах (подробнее на стр. 10-11). Мы предлагаем большой ассортимент хорошо охарактеризованных моноклональных антител (МоАт), которые позволяют разрабатывать чувствительные и надежные иммунодиагностические методы, подходящие для определения уровней proBNP, NT-proBNP и BNP в клинических образцах.

Мы также предлагаем различные рекомбинантные антигены, которые можно использовать в качестве калибраторов в иммунодиагностических методах.

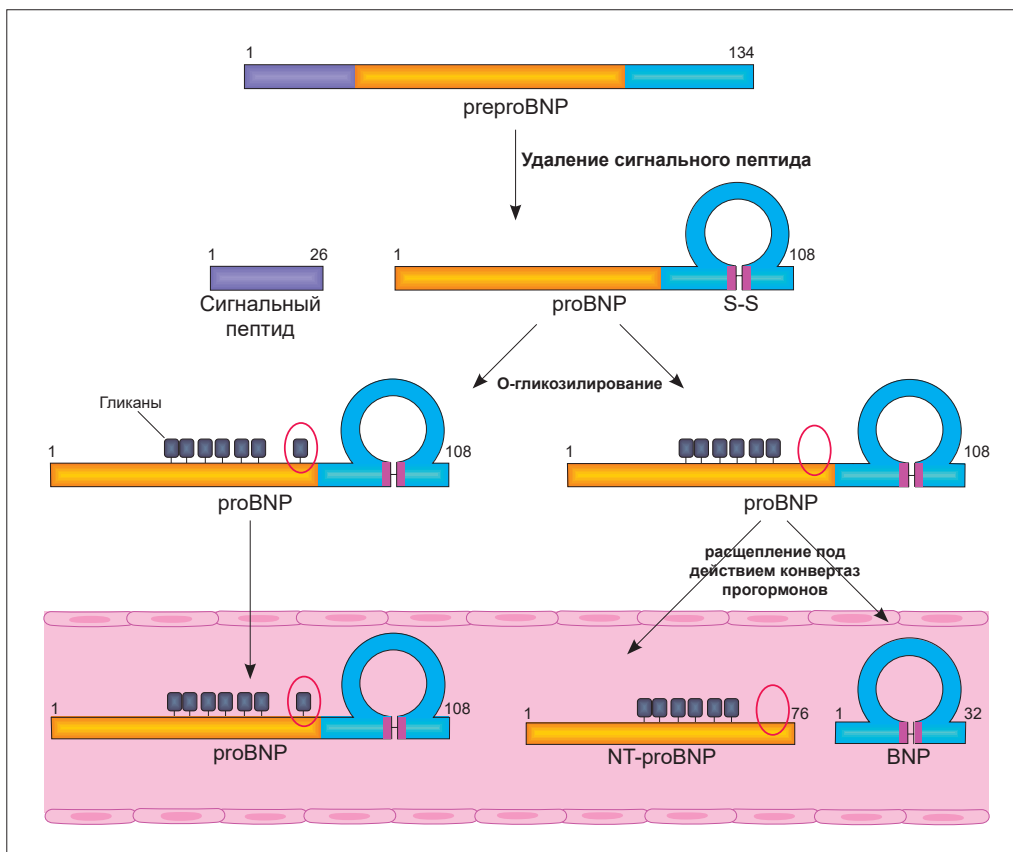


Рисунок 1. Схема процессинга proBNP. ProBNP образуется в результате трансляции и отщепления сигнального пептида молекулы rproBNP. Затем он гликозилируется в нескольких местах. Образуются два пула proBNP, которые различаются по статусу гликозилирования в положении T71: негликозилированные по T71 и молекулы, гликозилированные по этому сайту. Гликозилирование подавляет последующее расщепление proBNP. Только proBNP, который не гликозилирован в положении T71, может эффективно расщепляться с образованием BNP и NT-proBNP. Нерасщепленный proBNP, NT-proBNP и BNP высвобождаются в кровоток.

Иммунодиагностические тест-системы для определения уровня BNP

BNP человека представляет собой пептид 3,5 кДа, который образуется в результате расщепления proBNP на NT-proBNP (N-концевая часть) и BNP (C-концевая часть). BNP состоит из аминокислотных остатков 77-108 молекулы proBNP. Однако в молекуле BNP аминокислотные остатки обычно пронумерованы как 1-32. Расчетный pI BNP составляет 10,95.

BNP представляет собой пептидный гормон с натрийуретическими, сосудорасширяющими и ренин-ингибирующими свойствами (7-9). Он принадлежит к семейству структурно-сходных пептидных гормонов, которое также включает предсердный натрийуретический пептид (ANP), натрийуретический пептид С-типа (CNP) и уродилатин. Эти пептиды характеризуются кольцевой структурой из 17 аминокислот, которая образована дисульфидной связью между двумя остатками цистеина. Кольцевая структура является высоко гомологичной между различными натрийуретическими пептидами, причем 11 из 17 аминокислотных остатков являются идентичными среди всех пептидов. В BNP человека дисульфидная связь находится между остатками цистеинов в положениях C10 и C26 (см. Рисунок 2).

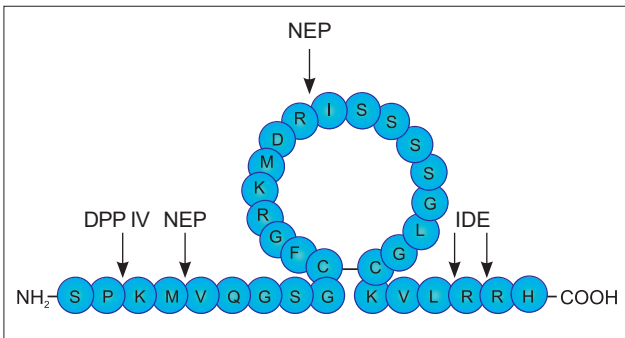


Рисунок 2. Схематическое изображение BNP человека и основных сайтов его протеолитической деградации различными протеазами. DPP IV представляет собой дипептидилпептидазу-4(ДПП-4), NEP представляет собой нейтральную эндопептидазу (неприлизин), IDE представляет собой инсулин-деградирующий фермент.

BNP является нестабильной молекулой

Известно, что BNP является нестабильной молекулой (10-11). В ряде исследований было показано, что BNP представлен множественными формами в крови у пациентов с СН, укороченными с N- и C-концов. Только небольшая часть BNP циркулирует как полноразмерная молекула BNP1-32 (12). Считается, что протеазы, такие как DPP IV и NEP, расщепляют BNP, что приводит к образованию BNP3-32 и BNP5-32 соответственно (13-14). Некоторые исследования показали, что IDE также может расщеплять BNP до более мелких пептидов (15-16). Известные сайты протеолитической деградации BNP представлены на Рисунке 2.

Иммунореактивные формы BNP в крови человека

Поскольку расщепление proBNP на NT-proBNP и BNP является лишь частичным и зависит от посттрансляционного гликозилирования белка, в кровоток попадают как BNP, так и proBNP. Обе эти формы распознаются антителами, специфичными к BNP, если эпитопы не разрушены под действием протеаз. Мы проанализировали образцы плазмы от пациентов с СН, используя гель-фильтрацию и измерив иммунореактивность BNP во фракциях после гель-фильтрации с помощью иммуноанализа на

основе пары высокочувствительных антител 50E1-24C5, которые способны обнаруживать различные формы BNP с одинаковой специфичностью. Согласно результатам исследования, BNP представлен двумя пиками с BNP-иммунореактивностью. Первый пик представляет форму proBNP, в то время как второй, меньший пик представляет форму BNP (см. Рисунок 3). Ранее мы показали, что преобладающей иммунореактивной формой BNP в крови человека является нерасщепленный proBNP (17).

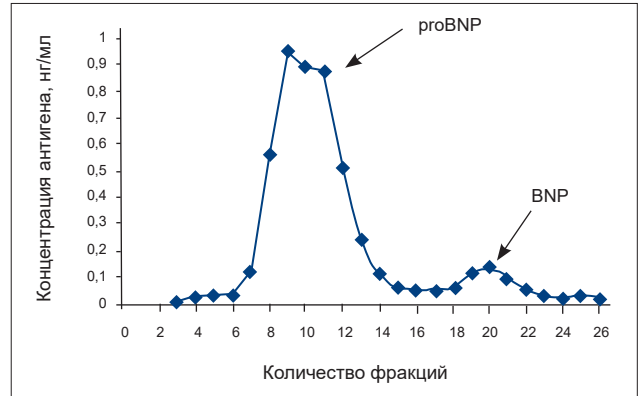


Рисунок 3. Исследования эндогенных proBNP и BNP с помощью гель-фильтрации. Белки из одного репрезентативного образца плазмы крови больного СН были разделены на колонке Superdex Peptide column (производитель GE Healthcare). Иммунореактивность BNP во фракциях измеряли с помощью иммуноанализа с использованием пары антител 50E1-24C5. Первый пик соответствует proBNP, второй пик - BNP.

Иммуноанализы на BNP сэндвич-типа

Мы предлагаем несколько MoAt, специфичных к разным эпитопам молекулы BNP (см. Рисунок 4). Различные комбинации MoAt позволяют разработать высокоспецифичные и чувствительные иммунодиагностические методы сэндвич-типа для количественного измерения BNP и proBNP в крови человека. Рекомендуемые пары антител для иммунодиагностических методов сэндвич-типа представлены в таблице 1.

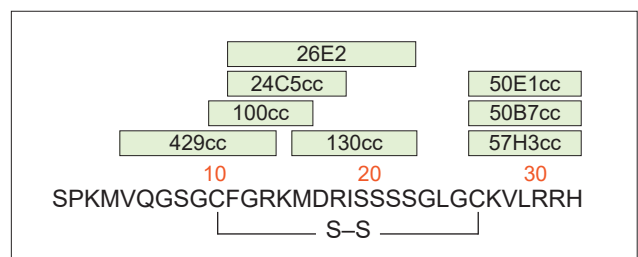


Рисунок 4. Схематическое изображение эпитопов антител к BNP.

Захватывающие антитела	Детекторные антитела
50E1cc	24C5cc
50E1cc	26E2
24C5cc	50B7cc
24C5cc	57H3cc
57H3cc	429cc
50E1cc	130cc
50E1cc	100cc
100cc	57H3cc

Таблица 1. Рекомендуемые пары MoAt к BNP для иммунодиагностических методов сэндвич-типа. Данные основаны на результатах, полученных с использованием метода флуоресценции с временным разрешением.

Все рекомендованные пары (захватывающие антитела - детекторные антитела) способны взаимодействовать как с пептидом BNP, так и с нерасщепленным proBNP с одинаковой эффективностью (см. Рисунок 5). Однако важно отметить, что кросс-реактивность доступных на рынке иммунодиагностических методов для определения BNP по отношению к proBNP варьируется (18-20). Все рекомендуемые нами комбинации антител были протестированы с образцами плазмы пациентов с СН. Поскольку антитела могут демонстрировать различную эффективность на разных платформах, мы рекомендуем попробовать по крайней мере четыре или пять комбинаций МоАт при разработке иммунодиагностических тестов. Это позволит отобрать пару антител, которая будет оптимально работать в необходимых условиях.

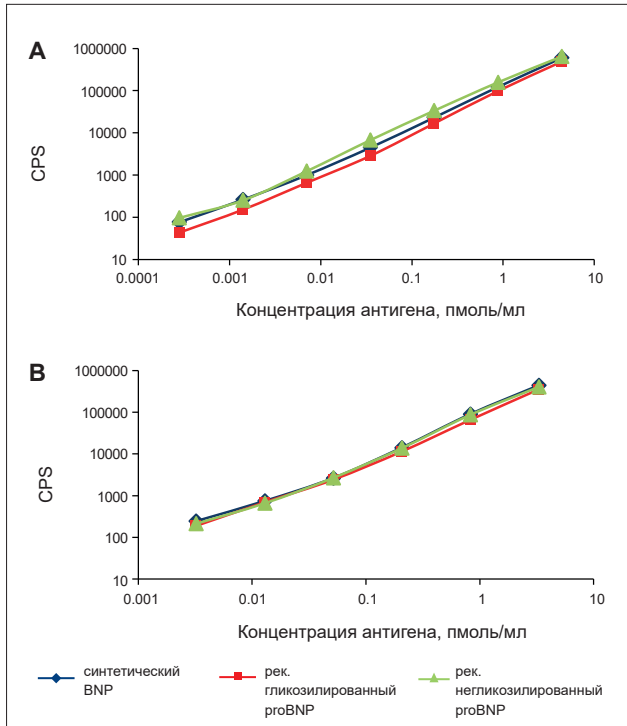


Рисунок 5. Калибровочные кривые для сэндвич-флюороиммуноанализов с тремя пептидами, содержащими мотив BNP1-32, на базе пар антител 50E1 - 24C5 (A) и 57H3-429 (B).

Антитела подложки были биотинилированы, тогда как детекторные антитела были помечены стабильным хелатом европия (Eu^{3+}). В качестве антигенов использовали синтетический BNP (Bachem), рекомбинантный негликозилированный proBNP и рекомбинантный гликозилированный proBNP. Смесь антител (50 мкл) и антигена (50 мкл) инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре в планшетах, покрытых стрептавидином.

В качестве стандарта при разработке иммунодиагностических тестов на BNP мы рекомендуем использовать рекомбинантный гликозилированный proBNP (Кат. №8GBP3, см. стр. 8), поскольку иммунореактивность BNP в крови преимущественно представлена гликозилированным proBNP.

Калибровочные кривые. Во всех рекомендуемых нами комбинациях МоАт три полипептида, содержащих BNP, распознаются с одинаковой эффективностью: синтетический BNP, рекомбинантный негликозилированный proBNP и рекомбинантный гликозилированный proBNP. Репрезентативные калибровочные кривые для двух иммунодиагностических тестов с использованием пар антител 50E1-24C5 (A) и 57H3-429 (B) представлены на Рисунке 5. Ранее мы опубликовали подробное описание иммуноанализа с использованием пары антител 50E1-24C5, в котором установили, что его аналитическая чувствительность (с синтетическим BNP, используемым в качестве калибратора) менее 0,5 пг/мл (17). Другие пары

антител, перечисленные выше, также распознают BNP с чрезвычайно высокой чувствительностью.

Иммунодиагностические тесты с использованием антител HyTest к BNP показывают хорошую корреляцию с коммерческими иммунодиагностическими тестами. Мы провели измерение концентрации BNP в 40 образцах EDTA-плазмы от пациентов с СН. При измерении использовали два различных иммуноанализа с использованием наших антител, а также два коммерчески доступных иммунодиагностических тестов на BNP, в которых задействованы антитела с аналогичными эпитопами. На Рисунке 6 (A) мы сравнили наш иммуноанализ 57H3-429 с использованием антител, которые были специфичны к эпитопам 26-32 и 5-13, соответственно, с анализом Abbott iSTAT® BNP, в котором используется антитело с аналогичной специфичностью к эпитопам. Результаты измерений, полученных с помощью пары антител 57H3-429, хорошо коррелируют с результатами измерений, полученных с помощью иммунодиагностического метода Abbott iSTAT® BNP ($R^2=0,99$). На Рисунке 6 (B) мы сравнили результаты, полученные с использованием пары антител 50E1-130 (антитела, специфичные к эпитопам 26-32 и 15-22 соответственно), с результатами иммунодиагностического метода Siemens BNP, в котором используются антитела, специфичные к эпитопам 27-32 и 14-21. Результаты измерения BNP, полученные с использованием пары антител 50E1-130, показали хорошую корреляцию с результатами, полученными с использованием иммунодиагностического метода Siemens BNP ($R^2=0,97$).

Эпитопная специфичность антител, используемых в доступных на рынке иммунодиагностических тестах, представлена на веб-сайте IFCC (www.ifcc.org).

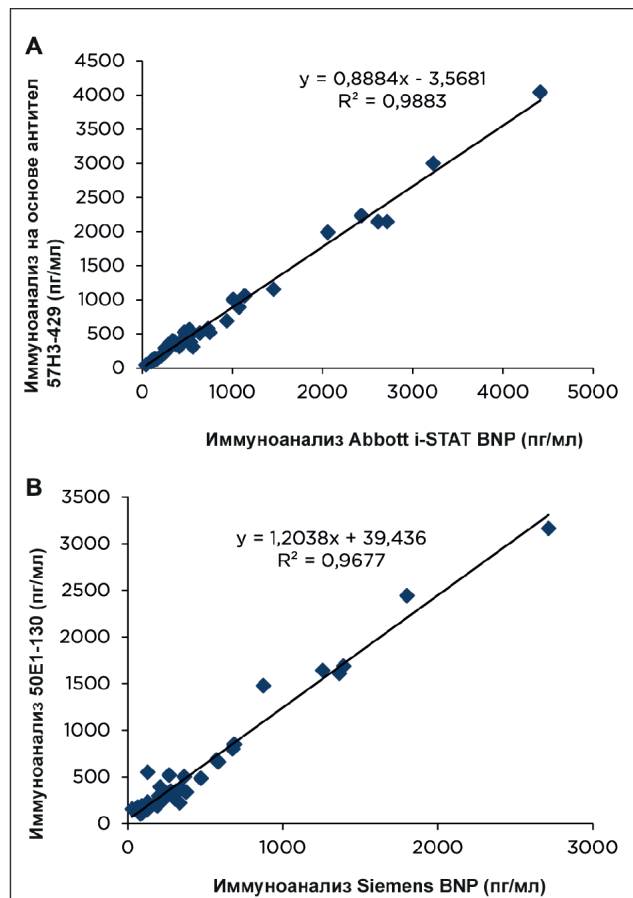


Рисунок 6. Иммуноанализы на основе антител HyTest показывает хорошую корреляцию с иммунодиагностическими тестами на BNP, представленными на рынке.

Ингибирование неприлизина и его влияние на иммунодиагностическое определение уровня BNP

Увеличение уровня эндогенного BNP путем блокировки его расщепления ингибитором неприлизина считается одной из возможных терапевтических стратегий при лечении СН. В новом препарате Entresto™ от Novartis, который был одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США для лечения СН, одним из активных компонентов является ингибитор неприлизина. Считается, что прохождение курса лечения данным препаратом может влиять на уровень BNP.

Большинство коммерчески доступных иммунодиагностических тестов для определения BNP спроектированы как иммуноанализы сэндвич-типа, в которых используются два МоАт, специфичных к удаленным друг от друга эпитопам. По крайней мере одно из антител специфично к кольцевой структуре, в то время как другое специфично к С-концу молекулы BNP. Поскольку один из сайтов расщепления неприлизина расположен в кольцевой структуре BNP (между остатками R17-I18; см. Рисунок 2), было бы разумным предположить, что иммуноанализ с использованием антител с эпитопами, содержащими сайт расщепления неприлизином, будет чувствительным к протеолитической активности неприлизина. Однако из-за сложной регуляции уровня натрийуретических пептидов, а также разнообразия различных форм СН однозначный ответ на этот вопрос отсутствует.

Мы исследовали влияние активности неприлизина на результаты, получаемые с использованием различных иммунодиагностических тестов на BNP, изучая чувствительность BNP и proBNP к расщеплению неприлизином. В результате было установлено, что иммуноанализ SES-BNP был устойчив к действию неприлизина, хотя молекула BNP1-32 была чувствительна к расщеплению неприлизином. Вероятно, это связано с тем, что эпитоп, который распознает захватывающее антитело 24C5, находится за пределами сайта расщепления неприлизина.

Иммуноанализ, в котором использовалось только одно из антител, специфичных к эпитопу 14-21, содержащему сайт расщепления неприлизином, ожидаемо был чувствителен к неприлизиному (21). Мы также обнаружили, что иммуноанализ с использованием пары антител 57H3-429 устойчив к действию неприлизина.

Мы показали, что proBNP, являющийся основной иммунореактивной формой BNP в крови, не расщепляется неприлизином. Следовательно, на результаты иммуноанализов, предназначенных только для определения уровня proBNP, не должны влиять такие лекарства, как Entresto™ (21).

Иммуноанализы для определения уровня NT-proBNP

NT-proBNP является N-концевой частью proBNP, которая состоит из 76 аминокислотных остатков и содержит семь сайтов O-гликозилирования. Какой-либо биологической активности у NT-proBNP обнаружено не было. Его период полувыведения в 3-6 раз дольше, чем у BNP, что означает, что он является более стабильным аналитом в клинических образцах. Клиническое значение NT-proBNP сходно с BNP. Расчетный рI NT-proBNP составляет 845, а молекулярный вес составляет 8,5 кДа. Однако из-за гликозилирования его кажущаяся молекулярная масса значительно выше (17).

Гликозилирование влияет на иммунодиагностическое определение NT-proBNP

Наши исследования выявили, что гликозилирование NT-proBNP отрицательно влияет на его иммунодиагностическое определение с использованием некоторых антител. Центральная часть молекулы NT-proBNP (а.о. 28-56) труднодоступна для взаимодействия с антителами из-за O-гликозилирования, тогда как области 13-27 и 61-76 хорошо распознаются антителами.

Чтобы оценить влияние гликозилирования на измерение NT-proBNP, мы проанализировали плазму от восьми пациентов с СН до и после дегликозилирования с помощью двух вариантов иммуноанализа. В первом варианте иммуноанализа (пара антител 15C4-13G12) использовались антитела, специфичные к участкам молекулы NT-proBNP без сайтов гликозилирования, а во втором варианте иммуноанализа (пара антител 11D1-13G12) - одно из антител было специфично к участку, содержащему сайты гликозилирования. Рисунок 7 показывает, насколько значительно повлияло дегликозилирование на уровень NT-proBNP, определяемый с помощью второго варианта иммуноанализа.

Таким образом, при разработке иммунодиагностических тестов для определения NT-proBNP следует принимать во внимание гликозилирование и его влияние на иммунодиагностическое определение NT-proBNP. Мы рекомендуем выбирать антитела, которые менее чувствительны к гликозилированию.

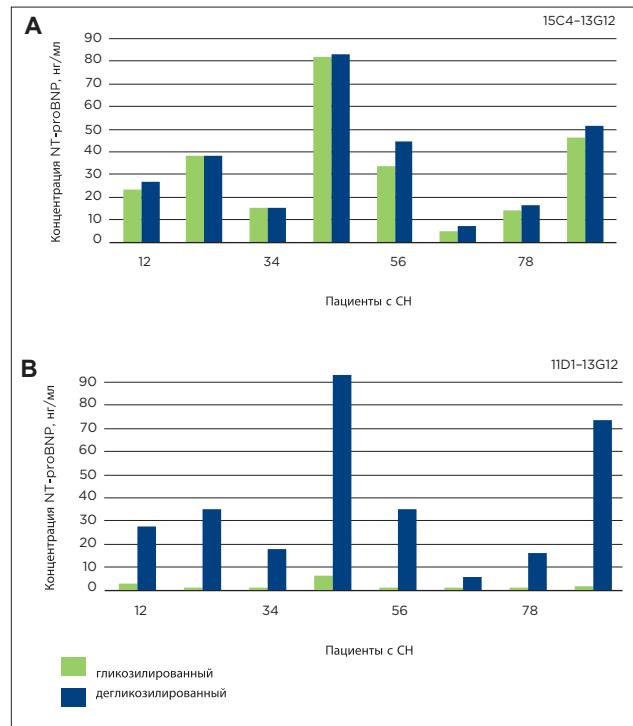


Рисунок 7. Влияние гликозилирования на определение уровня NT-proBNP на примере иммуноанализов на NT-proBNP с использованием различных антител. Образцы плазмы от восьми пациентов с СН до и после дегликозилирования были проанализированы с помощью двух разных иммуноанализов сэндвич-типа. Иммуноанализ 15C4-13G12 (А) показал практически идентичный результат для гликозилированного (зеленый) и дегликозилированного (синий) NT-proBNP. Пара МоАт 11D1-13G12 продемонстрировала высокую чувствительность к гликозилированию и детектировала только дегликозилированный NT-proBNP.

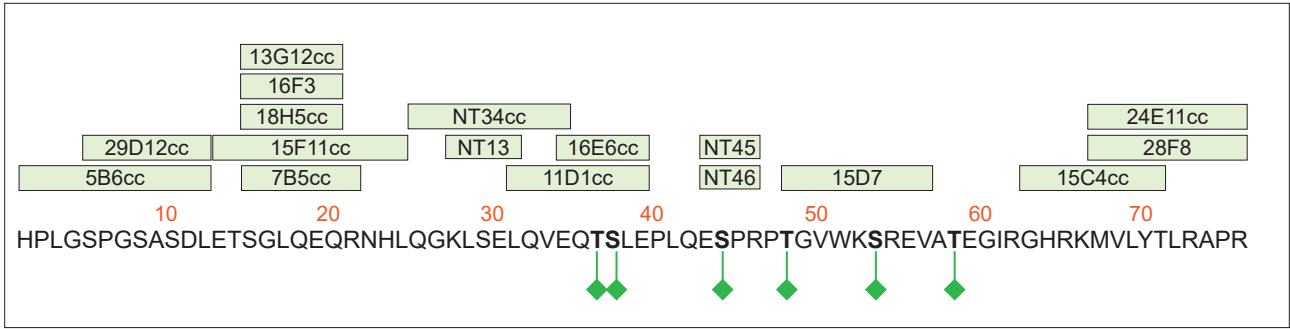


Рисунок 8. Схематическое изображение молекулы NT-proBNP с идентифицированными сайтами гликозилирования (зеленые ромбы) и эпитопами MoAt, специфичных к NT-proBNP, предлагаемых Хайтестом.

Иммуноанализ сэндвич-типа для определения уровня NT-proBNP

Наша компания предлагает ряд MoAt, специфичных ко различным эпитомам молекулы NT-proBNP человека (см. Рисунок 8). Обратите внимание, что большинство иммуноанализов на NT-proBNP так же в какой-то мере обнаруживают непротессированный proBNP. Мы тщательно протестировали все наши антитела к NT-proBNP в иммуноанализах сэндвич-типа в качестве захватывающих и детекторных антител с образцами крови пациентов с СН, а также с использованием наших рекомбинантных негликозилированных NT-proBNP и proBNP в качестве антигенов. На основании наших исследований мы рекомендуем выбирать антитела, специфичные к эпитомам за пределами центральной гликозилированной области (см. Таблицу 2). Эти пары MoAt были способны обнаруживать как эндогенные, так и рекомбинантные антигены с одинаковой эффективностью. В то же время пары MoAt, в которых по меньшей мере одно MoAt было специфично к N-концевой части NT-proBNP (а.о. 1–12), взаимодействовали только с рекомбинантными антигенами. Предположительно это связано с протеолизом эндогенного NT-proBNP в образцах. Иммуноанализы на основе пар MoAt, специфичных к центральной области NT-proBNP (а.о. 28–56), показывали сходные результаты, поскольку эпитопы содержат гликаны и, следовательно, плохо доступны для связывания с антителами.

Поскольку эффективность применения антител может меняться в зависимости от условий проведения анализа и иммунодиагностической платформы, мы рекомендуем попробовать все комбинации MoAt (захватывающие антитела-детекторные антитела), перечисленные в таблице 2, для отбора лучшей пары при разработке иммунодиагностического теста.

В качестве калибратора для иммунодиагностических тестов на NT-proBNP мы рекомендуем использовать рекомбинантный негликозилированный NT-proBNP (Кат. № 8NT2, см. стр. 9). Антитела, специфичные к различным областям NT-proBNP, распознают негликозилированный NT-proBNP, экспрессированный в *E. coli*, с одинаковой эффективностью.

Калибровочные кривые. Все иммуноанализы с использованием рекомендованных комбинаций MoAt показывают высокую чувствительность (10–15 пг/мл), хорошую кинетику и широкий линейный диапазон. Репрезентативная калибровочная кривая для иммуноанализа на основе пары MoAt 15C4–13G12 показана на Рисунке 9. Дополнительная информация об этом иммуноанализе доступна по ссылке 17.

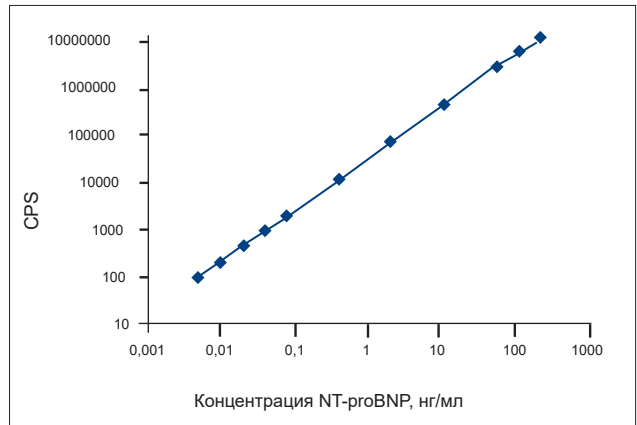


Рисунок 9. Калибровочная кривая для иммуноанализа на NT-proBNP с использованием антител 15C4–13G12. Захватывающее антитело 15C4 биотинилировали, а детекторное антитело 13G12 метили стабильным хелатом европия (Eu³⁺). Человеческий рекомбинантный негликозилированный NT-proBNP (кат. № 8NT2) использовали в качестве антигена. Смесь антител (по 50 мкл каждого) и антигена (50 мкл) инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре в покрытых стрептавидином планшетах.

Таблица 2. Рекомендуемые пары MoAt для иммуноанализа сэндвич-типа для определения уровня NT-proBNP. Данные основаны на результатах, полученных с использованием метода флуоресценции с временным разрешением.

Захватывающие антитела	Детекторные антитела	Захватывающие антитела	Детекторные антитела
NT13	NT45	NT45	NT13
15C4cc	13G12cc	NT45	18H5cc
15C4cc	29D12cc	NT46	NT13
15F11cc	24E11cc	NT46	15F11cc
15C4cc	18H5cc	15F11cc	NT45
29D12cc	NT34cc	15F11cc	NT46

Прототипные варианты наших иммуноанализов на NT-proBNP показали хорошую корреляцию с другими иммунодиагностическими тестами, доступными на рынке. На Рисунке 10 мы сравнили иммуноанализ на основе пары антител NT13-NT45, которые специфичны к эпитопам 27-31 и 43-46, с анализом Roche Elecsys® proBNP. Результаты измерений, полученные с использованием данного иммуноанализа, хорошо коррелировали с результатами иммунодиагностического теста Roche Elecsys proBNP II ($R^2=0.99$).

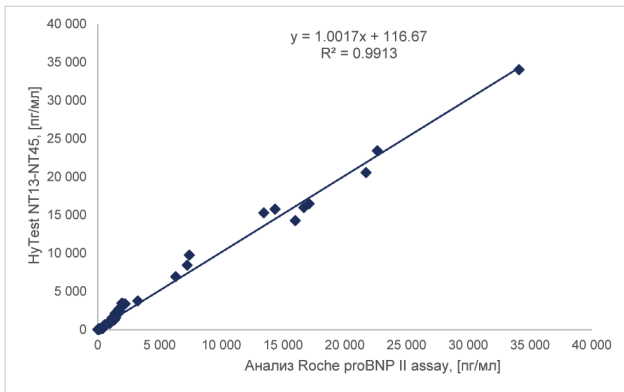


Рисунок 10. Иммуноанализ на основе антител Хайтеста показывает хорошую корреляцию с анализом Roche Elecsys® proBNP II.

Прототипные варианты иммуноанализов на NT-proBNP на основе антител, предлагаемых Хайтестом, имеют такую же клиническую ценность, что и иммунодиагностический тест Roche Elecsys proBNP II. Концентрации NT-proBNP измеряли в образцах плазмы ЭДТА от 51 пациента с диагнозом СН, и от 53 здоровых людей схожего возраста с помощью анализатора Roche Cobas® e411 и наших собственных прототипных иммуноанализов сэндвич-типа на основе антител 15C4-13G12 и 29D12-NT34. Точность диагностики оценивали по ROC-кривой. Наши иммуноанализы NT-proBNP основаны на MoAt, которые специфичны к участкам NT-proBNP, не содержащим гликанов, тогда как в анализе Roche одно MoAt специфично к частично гликозилированной области NT-proBNP (эпитоп 42-46 а.о.). Известно, что иммуноанализ Roche обнаруживает только субфракцию эндогенного NT-proBNP, поскольку данный иммуноанализ чувствителен к гликозилированию (22-24). ROC-AUC для иммуноанализа Roche составляла 0,965 (чувствительность 0,86, специфичность 0,98), 0,950 (чувствительность 0,84, специфичность 0,98) для иммуноанализа 15C4-13G12 и 0,951 (чувствительность 0,86, специфичность 0,93) для иммуноанализа 29D12-NT34. Таким образом, анализы прототипа HyTest были сопоставимы по клинической ценности с иммуноанализом Roche (Рисунок 10).

Стабильность эндогенного NT-proBNP в клинических образцах. Мы проанализировали стабильность NT-proBNP в образцах сыворотки от больных СН с помощью иммуноанализа на основе антител 15C4-13G12, в котором оба антитела специфичны к стабильной части молекулы (эпитопы 63-71 а.о. и 13-20 а.о. соответственно). Более 90% исходной иммунологической активности было обнаружено после 72 часов инкубации при + 4 ° С и приблизительно 85–90 % после инкубации объединенной сыворотки в течение 24 часов при комнатной температуре (см. Рисунок 12). Это указывает на то, что, иммуноанализ на основе антител, распознающих стабильные части молекулы, обеспечивает надежное количественное определение NT-proBNP в образцах, которые хранились при + 4 ° С или даже при комнатной температуре в течение относительно

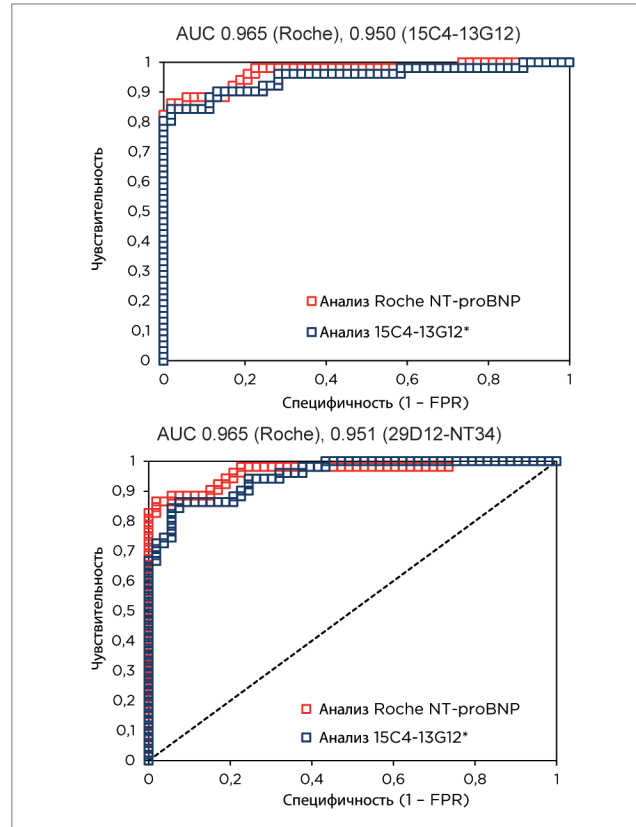


Рисунок 11. ROC-кривые диагностической значимости NT-proBNP при СН. Оценка проводилась с помощью иммуноанализов Roche Cobas e411 и иммуноанализов на основе антител HyTest 15C4-13G12 (слева) или иммуноанализа на основе антител HyTest 29D12-NT34 (справа).

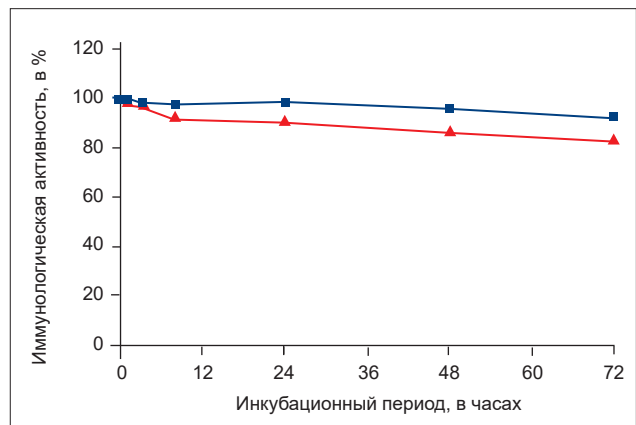


Рисунок 12. Стабильность эндогенного NT-proBNP при измерении с помощью иммуноанализа сэндвич-типа на основе антител 15C4-13G12. Объединенную сыворотку от пациентов с СН инкубировали при + 4 ° С (синий цвет) и при комнатной температуре (красный цвет) в течение 72 часов.

Иммуноанализы для определения proBNP

Как следует из ряда исследований, проведенных как нашей, так и другими научными группами, в образцах крови, полученных от пациентов с СН (17, 26-27) в значительных количествах обнаруживаются не только NT-proBNP и BNP, но и их предшественник proBNP. Расчетная pI proBNP составляет 10,12, а молекулярная масса составляет 11,9 кДа. Однако его кажущаяся молекулярная масса выше из-за O-гликозилирования (26).

Большинство коммерчески доступных иммунодиагностических тестов на BNP и NT-proBNP в различной степени перекрестно реагируют с proBNP.

Установлено, что уровень proBNP в крови имеет высокую степень корреляции с уровнями как BNP, так и NT-proBNP, и позволяет идентифицировать пациентов с СН и высоким риском летального исхода по причине сердечно-сосудистой патологии в течение длительного периода наблюдения (27). Еще одно исследование показывает, что уровень циркулирующего в крови proBNP связан с повышенным риском неблагоприятного исхода в результате сердечно-сосудистой патологии, независимо от BNP (28).

Иммунодиагностические методы, которые определяют уровень только proBNP, предположительно, могут иметь повышенную аналитическую специфичность по сравнению с коммерчески доступными иммунодиагностическими методами для определения уровней BNP и NT-proBNP.

Иммуноанализы на proBNP

Мы разработали прототипные варианты иммуноанализа на proBNP, в которых используется одно антитело, специфичное к эпитопу в BNP-части молекулы, а также еще одно антитело, специфичное к участку молекулы NT-proBNP. Схематическое представление этих эпитопов представлено на Рисунке 12. Мы рекомендуем пары МоАТ, указанные в таблице 3, так как они демонстрируют высокую чувствительность, хорошую кинетику и распознают рекомбинантный гликозилированный и негликозилированный proBNP, а также proBNP в крови пациентов с СН.

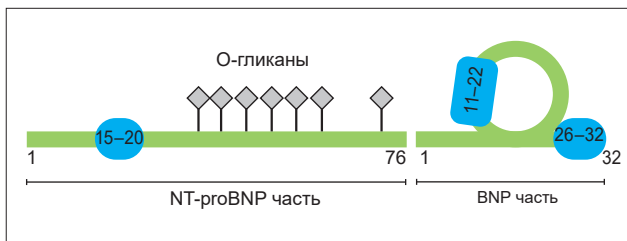


Рисунок 13. Расположение эпитопов, к которым специфичны МоАТ, рекомендуемые для разработки сэндвич-иммуноанализов на proBNP.

Таблица 3. Рекомендуемые пары МоАТ для сэндвич-иммуноанализов proBNP.

Захватывающие антитела	Детекторные антитела
50E1cc	16F3
50E1cc	18H5cc

Калибровочные кривые. Аналитическая чувствительность иммуноанализа на основе антител 50E1–16F3 с использованием рекомбинантного негликозилированного proBNP (кат. № 8PRO9) в качестве калибратора выше, чем 3 пг/мл (см. Рисунок 14).

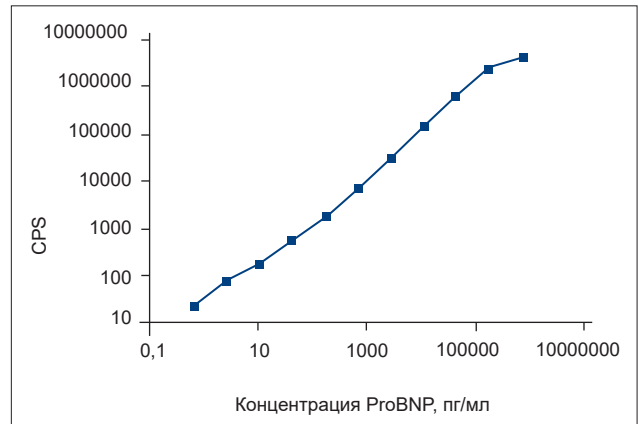


Рисунок 14. Калибровочная кривая для иммуноанализа на proBNP с использованием антител 50E1-16F3. Захватывающее антитело 50E1 биотинилировали, а детекторное антитело 16F3 метили Eu³⁺. Рекомбинантный негликозилированный proBNP (кат. № 8PRO9) использовали в качестве антигена. Смесь антител (по 50 мкл каждого) и антигена (50 мкл) инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре в планшетах, покрытых стрептавидином.

Рекомбинантные белки

Рекомбинантный гликозилированный proBNP человека

Мы предлагаем рекомбинантный proBNP человека, экспрессируемый в клеточной линии млекопитающих (Кат. №8GBP3). Этот белок гликозилируется и мигрирует при анализе методом электрофореза в ПААГ в виде диффузной полосы с кажущейся молекулярной массой приблизительно 20-25 кДа (см. Рисунок 15). Мы рекомендуем использовать гликозилированный proBNP в качестве калибратора для иммуноанализов на BNP и proBNP.

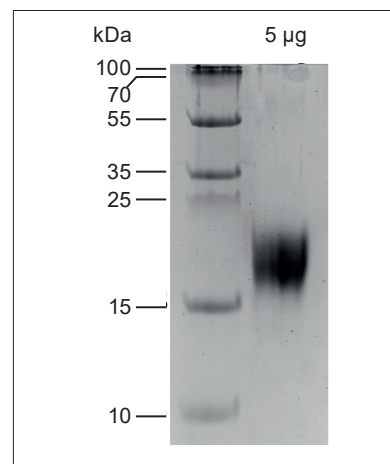
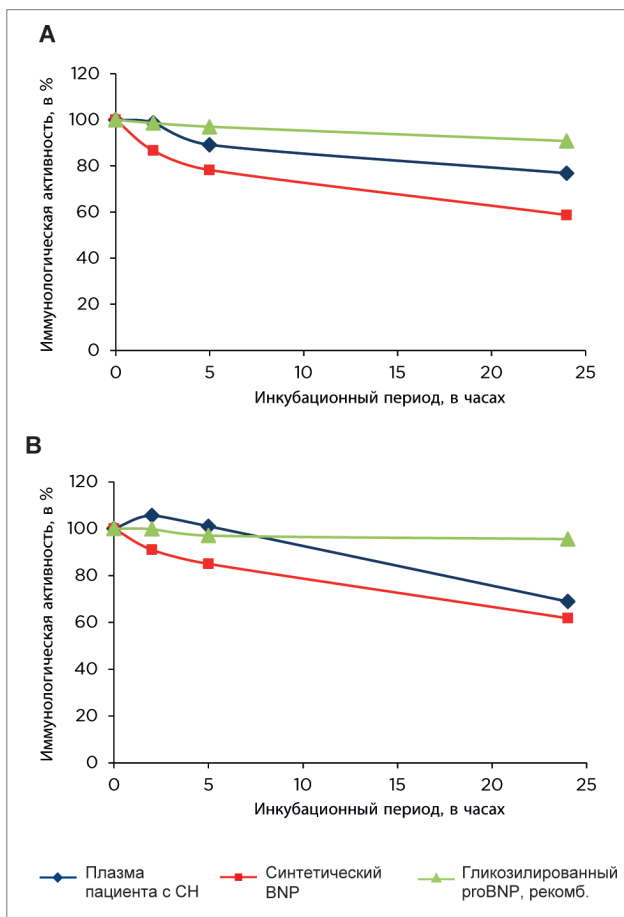


Рисунок 15. Электрофорез в ПААГ рекомбинантного гликозилированного proBNP (кат. № 8GBP3) в восстанавливающих условиях.

Гликозилированный proBNP как надежный стандарт для иммунодиагностических тестов на BNP. Концентрации BNP в плазме, измеренные различными иммунодиагностическими тест-системами, представленными на рынке, существенно различаются, что затрудняет интерпретацию результатов. Помимо специфичности антител к различным эпитопам, используемых в этих анализах, еще одним значимым фактором, способствующим таким расхождениям, может быть отсутствие общего калибратора для иммунодиагностических тестов разных производителей.

В настоящее время в некоторых иммуноанализах на BNP в качестве калибратора используется синтетический BNP. Однако существенная часть иммунореактивности BNP в клинических образцах представлена гликозилированным proBNP, который, распознается антителами, используемыми в различных иммунодиагностических тестах, по-разному. С другой стороны, синтетический BNP также относительно нестабилен при добавлении в плазму, что ограничивает его использование в качестве калибратора в иммуноанализах на BNP.

Преимуществом рекомбинантного гликозилированного proBNP является его сходство с эндогенным proBNP благодаря наличию O-гликанов, а также то, что он более стабилен по сравнению с синтетическим BNP. На Рисунке 16 представлено сравнение стабильности синтетического BNP, рекомбинантного гликозилированного proBNP и эндогенного proBNP (образец плазмы от пациента с СН), измеренных с помощью двух репрезентативных иммуноанализов на BNP. Рекомбинантный гликозилированный proBNP сохранял 90–96% его иммунореактивности в течение 24 часов при комнатной температуре, тогда как кажущаяся стабильность синтетического BNP была значительно ниже.



Рекомбинантный (негликозилированный) proBNP человека, экспрессируемый в E.coli

Рекомбинантный proBNP человека (Кат. №8PRO9; а.о. 1-108) экспрессирован в клетках *Escherichia coli*. Полипептид имеет ту же последовательность, что и эндогенный белок, за исключением дополнительного остатка метионина на N-конце. Антиген распознается BNP-специфичными МоАт (Кат. №4BNP2), а также всеми NT-proBNP-специфичными МоАт (Кат. №4NT1). Рекомбинантный ProBNP является высокоочищенным препаратом, с чистотой выше 95% согласно данным анализа методом электрофореза в ПААГ в трис-трициновой буферной системе (см. Рисунок 17) и исследованиям высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Антиген может быть использован в качестве калибратора или стандарта в иммуноанализах на BNP, NT-proBNP и proBNP. Калибровочные кривые с негликозилированным proBNP в качестве антигена представлены на Рисунке 5 для двух стандартных иммуноанализов на BNP и на Рисунке 14 для иммуноанализа на proBNP.

Рекомбинантный негликозилированный NT-proBNP

Рекомбинантный NT-proBNP человека (Кат. №8NT2; а.о. 1-76) экспрессирован в клетках *Escherichia coli*. Полипептид имеет ту же последовательность, что и эндогенный NT-proBNP, за исключением дополнительного Met-остатка на N-конце. Антиген распознается МоАт, которые специфичны для разных частей NT-proBNP (Кат. №4NT1).

Чистота NT-proBNP превышает 95% по данным, полученным методами электрофореза в ПААГ в трис-трициновой буферной системе (см. Рисунок 17) и ВЭЖХ. Антиген может быть использован в качестве калибратора или стандарта в иммуноанализе на NT-proBNP. Калибровочная кривая с рекомбинантным NT-proBNP в качестве антигена представлена на Рисунке 9 для иммуноанализа на NT-

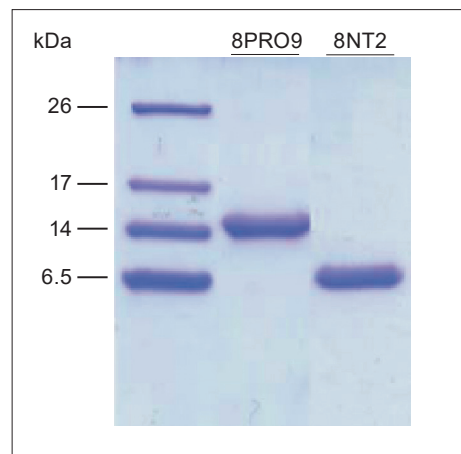


Рисунок 17. Электрофорез в ПААГ в трис-трициновой буферной системе в восстанавливающих условиях рекомбинантного негликозилированного proBNP (Кат. № 8PRO9) и рекомбинантного негликозилированного NT-proBNP (Кат. № 8NT2). В лунки вносили по 3 мкг каждого белка.

Рисунок 16. Стабильность синтетического BNP по сравнению с эндогенным и рекомбинантным гликозилированным proBNP. Эндогенный proBNP (плазма от пациентов с СН - синий), рекомбинантный гликозилированный proBNP (зеленый) и синтетический BNP (красный) добавляли в образец EDTA-плазмы человека и инкубировали при комнатной температуре в течение различных периодов времени. Имунологическую активность измерялась с помощью двух иммуноанализов BNP: 50E1-24C5 (А) и 57H3-429 (В).

Ссылки

1. Benjamin, EJ et al. Heart disease and stroke statistics – 2017 update. *Circulation*. 2017, 135 (10): e146-e603.
2. Emdin, M et al. Comparison of brain natriuretic peptide (BNP) and amino-terminal ProBNP for early diagnosis of heart failure. *Clin Chem*. 2007, 53: 1289-1297.
3. Mueller, T et al. Diagnostic accuracy of B type natriuretic peptide and amino terminal proBNP in the emergency diagnosis of heart failure. *Heart*. 2005, 91: 606-612.
4. Ponikowski, P et al. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur. Heart J*. 2016, 37: 2129–2200.
5. Schellenberger, U et al. The precursor to B-type natriuretic peptide is an O-linked glycoprotein. *Arch Biochem Biophys*. 2006, 451: 160-166.
6. Semenov, AG et al. Processing of proBNP is suppressed by O-glycosylation in the region close to the cleavage site. *Clin Chem*. 2009, 55(3): 489-498.
7. Mair, J et al. The impact of cardiac natriuretic peptide determination on the diagnosis and management of heart failure. *Clin Chem Lab Med*. 2001, 39: 571-588.
8. Cowie, MR and Mendez, GF. BNP and congestive heart failure. *Prog Cardiovasc Dis*. 2002, 44: 293-321.
9. Pandey, KN. Biology of natriuretic peptides and their receptors. *Peptides*. 2005, 26: 901-932.
10. Belenky, A et al. The effect of class-specific protease inhibitors on the stabilization of B-type natriuretic peptide in human plasma. *Clin Chim Acta*. 2004, 340: 163-172.
11. Murdoch, DR et al. Disparity between studies of the stability of BNP in blood: comparison of endogenous and exogenous peptide. *Heart*. 1999, 81: 212-213.
12. Niederkofler, EE et al. Detection of endogenous B-type natriuretic peptide at very low concentrations in patients with heart failure. *Circ. Heart Fail*. 2008, 1(4): 258-264.
13. Brandt, I et al. Dipeptidyl-peptidase IV converts intact B-type natriuretic peptide into its des-SerPro form. *Clin Chem*. 2006, 52(1): 82-87.
14. Pankow, K et al. Successive action of meprin A and neprilysin catabolizes B-type natriuretic peptide. *Circ Res*. 2007, 101(9): 875-882.
15. Müller, D et al. Rat insulin-degrading enzyme: cleavage pattern of the natriuretic peptide hormones ANP, BNP, and CNP revealed by HPLC and mass spectrometry. *Biochemistry*. 1992, 31(45): 11138-11143.
16. Ralat, LA et al. Insulin-degrading enzyme modulates the natriuretic peptide-mediated signaling response. *J Biol Chem*. 2011, 286(6): 4670-4679.
17. Seferian, KR et al. The brain natriuretic peptide (BNP) precursor is the major immunoreactive form of BNP in patients with heart failure. *Clin Chem*. 2007, 53: 866-873.
18. Luckenbill, KN et al. Cross-reactivity of BNP, NT-proBNP, and proBNP in commercial BNP and NT-proBNP assays: preliminary observations from the IFCC Committee for Standardization of Markers of Cardiac Damage. *Clin Chem*. 2008, 54(3): 619-621.
19. Semenov, AG et al. Searching for a BNP standard: glycosylated proBNP as a common calibrator enables improved comparability of commercial BNP immunoassays. *Clin Biochem*. 2017, 50: 181-185.
20. Saenger, AK et al. Specificity of B-type natriuretic peptide assays: cross-reactivity with different BNP, NT-proBNP, and proBNP peptides. *Clin Chem*. 2017, 63(1): 351-358.
21. Semenov, AG and Katrukha, AG. Different susceptibility of B-type natriuretic peptide (BNP) and BNP precursor (proBNP) to cleavage by neprilysin: the N-terminal part does matter. *Clin Chem*. 2016, 62(4): 617-622.
22. Seferian, KR et al. Immunodetection of glycosylated NT-proBNP circulating in human blood. *Clin Chem*. 2008, 54: 866-873.
23. Nishikimi, T et al. The effect of glycosylation on plasma N-terminal proBNP-76 levels in patients with heart or renal failure. *Heart*. 2012, 98(2): 152-161.
24. Røsjø, H et al. Influence of glycosylation on diagnostic and prognostic accuracy of N-terminal pro-B-type natriuretic peptide in acute dyspnea: data from the Akershus Cardiac Examination 2 Study. *Clin Chem*. 2015, 61(8): 1087-1097.
25. Giuliani, I et al. Assay for measurement of intact B-type natriuretic peptide prohormone in blood. *Clin Chem*. 2006, 52: 1054-1061.
26. Liang, F et al. Evidence for functional heterogeneity of circulating B-type natriuretic peptide. *J Am Coll Cardiol*. 2007, 49: 1071-1078.
27. Waldo, SW et al. Pro-B-type natriuretic peptide levels in acute decompensated heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2008, 51: 1874-1882.
28. Dries, DL et al. Simultaneous assessment of unprocessed proBNP1-108 in addition to processed BNP32 improves identification of high-risk ambulatory patients with heart failure. *Circ Heart Fail*. 2010, 3(2): 220–227.

Подборка статей на тему proBNP и его производных от научных сотрудников Hytest.

Seferian KR, Tamm NN, Semenov AG, Mukharyamova KS, Tolstaya AA, Koshkina EV, Kara AN, Krasnoselsky MI, Apple FS, Esakova TV, Filatov VL, Katrukha AG. The brain natriuretic peptide (BNP) precursor is the major immunoreactive form of BNP in patients with heart failure. *Clin Chem*. 2007 May;53(5):866-873

В этом исследовании мы описываем разработку МоАт, специфичных к proBNP, NT-proBNP и BNP. С помощью тщательно охарактеризованных иммуноанализов с использованием этих антител, а также теста Beckman Access BNP, мы показываем, что proBNP является основным антигеном, который определяет иммунологическую активность BNP в крови пациентов с СН. Мы также демонстрируем, что соотношение proBNP к BNP в образцах плазмы значительно выше, чем считалось ранее.

Seferian KR, Tamm NN, Semenov AG, Tolstaya AA, Koshkina EV, Krasnoselsky MI, Postnikov AB, Serebryanaya DV, Apple FS, Murakami MM, Katrukha AG. Immunodetection of glycosylated NT-proBNP circulating in human blood. *Clin Chem*. 2008 May;54(5):866-873.

В этом исследовании мы изучили, как гликозилирование влияет на способность МоАт, специфичных к NT-proBNP, распознавать NT-proBNP в образцах плазмы, и показываем, что O-гликозилирование делает центральную область NT-proBNP почти недоступной для связывания с антителами. Это также относится к иммунодиагностическому тесту Roche Elecsys 2010 NT-proBNP, в котором используются поликлональные антитела, специфичные к эпитопам, частично гликозилированные, хотя эффект для данного иммунодиагностического теста не так сильно выражен. Кроме того, мы показываем, что влияние гликозилирования

на обнаружение антителами различается у образцов разных пациентов. Таким образом, можно утверждать, что характер гликозилирования NT-proBNP в образцах не является идентичным, что может привести к ошибкам в интерпретации результатов измерений.

Мы также показываем, что антитела, специфичные к N-концевой и C-концевой областям NT-proBNP, в меньшей степени подвержены влиянию гликозилирования, следовательно их рекомендуется использовать при разработке количественного иммуноанализа NT-proBNP.

Semenov AG, Postnikov AB, Tamm NN, Seferian KR, Karpova NS, Bloschitsyna MN, Koshkina EV, Krasnoselsky MI, Serebryanaya DV, Katrukha AG. Processing of pro-brain natriuretic peptide is suppressed by O-glycosylation in the region close to the cleavage site. Clin Chem. 2009 Mar;55(3):489-498.

В этом исследовании мы показываем, что эффективность процессинга proBNP с образованием NT-proBNP и BNP зависит от гликозилирования остатка треонина в положении 71 (Thr71) proBNP.

Изучая иммунореактивность эндогенных NT-proBNP и proBNP в плазме пациентов с СН с помощью набора моноклональных антител, специфичных к различным участкам молекул, с использованием дегликозилирования, а также аланин-сканирующего мутагенеза, мы показываем как O-гликан в положении Thr71 ингибирует процессинг proBNP, тогда как proBNP с Thr71 без гликана легко расщепляется пропротеин конвертазой(ами).

Semenov AG, Tamm NN, Seferian KR, Postnikov AB, Karpova NS, Serebryanaya DV, Koshkina EV, Krasnoselsky MI, Katrukha AG. Processing of pro-B-type natriuretic peptide: furin and corin as candidate convertases. Clin Chem. 2010 Jul;56(7):1166-1176.

В этой статье мы представляем новые данные о механизмах процессинга proBNP. Наши результаты свидетельствуют об участии фурина и, в меньшей степени, корина в процессинге proBNP с образованием NT-proBNP и BNP. Мы впервые показываем, что у части эндогенного proBNP в плазме пациентов с СН отсутствует O-гликан в положении Thr71, который ингибирует расщеплению proBNP конвертазами на NT-proBNP и BNP. Эти данные расширяют наше представление о различных циркулирующих формах proBNP и его производных, а также о клеточных механизмах преобразования proBNP.

Semenov AG, Seferian KR. Biochemistry of the human B-type natriuretic peptide precursor and molecular aspects of its processing. Clin Chim Acta. 2011 May 12;412(11-12):850-60.

Цель данного обзора — обобщение данных в области созревания и процессинга человеческого proBNP, а также обсуждение потенциальных клинического применения proBNP и его производных.

Semenov AG, Seferian KR, Tamm NN, Artem'eva MM, Postnikov AB, Bereznikova AV, Kara AN, Medvedeva NA, Katrukha AG. Human pro-B-type natriuretic peptide is processed in the circulation in a rat model. Clin Chem. 2011 Jun;57(6):883-90.

В этом исследовании мы вводили человеческий proBNP крысам, после чего использовали различные иммуноанализы на BNP, NT-proBNP и proBNP, а также масс-спектрометрию, чтобы проанализировать, может ли proBNP подвергаться процессингу в кровотоке. Наши результаты показывают, что proBNP может расщепляться в кровотоке, что приводит к образованию активного BNP. Этот результат позволяет сделать вывод, что периферическое преобразование proBNP может быть важным регуляторным механизмом, а не простой деградацией.

Semenov AG, Katrukha AG. Different Susceptibility of B-Type Natriuretic Peptide (BNP) and BNP Precursor (proBNP) to Cleavage by Nprilysin: The N-Terminal Part Does Matter. Clin Chem. 2016 Apr;62(4):617-22.

В этой статье мы изучаем восприимчивость BNP и proBNP к протеолизу неприлизином *in vitro*. Наши данные, во-первых, свидетельствуют о том, что основная иммунореактивная форма BNP, proBNP, устойчива к деградации неприлизином, и, во-вторых, об эффекте ингибирования неприлизина (например, Entresto™ - недавно одобренное лекарство от СН, содержащее ингибитор неприлизина и рецептора ангиотензина II), который может проявляться по-разному в зависимости от используемого иммуноанализа. Мы предполагаем, что иммуноанализы на BNP с использованием антител, специфичных к области Arg17-Ile18, более чувствительны к изменениям активности неприлизина, чем иммуноанализы с антителами, специфичными к участкам молекулы BNP эпитопов, не содержащих этот сайт.

Semenov AG, Katrukha AG. Analytical Issues with Natriuretic Peptides – has this been Overly Simplified? EJIFCC. 2016 Jul; 27(3): 189–207.

В этом обзоре мы обобщаем данные о сложившемся в последнее время понимании сложности системы натрийуретических пептидов, а также обсуждаем связанные с этим аналитические вопросы, открывающие новые горизонты и ставящие новые вопросы для клинической диагностики.

Semenov AG, Tamm NN, Apple FS, Schulz KM, Love SA, Ler R, Feygina EE, Katrukha AG. Searching for a BNP standard: Glycosylated proBNP as a common calibrator enables improved comparability of commercial BNP immunoassays. Clin Biochem. 2017 Mar;50(4-5):181-185.

В этом исследовании мы, в сотрудничестве с группой профессора Fred S. Apple, сравнили шесть различных рекомбинантных белков, содержащих BNP, чтобы выяснить, уменьшит ли какой-либо из них вариативность результатов измерения для 5 коммерчески доступных иммунодиагностических тестов на BNP. В результате было установлено, что одна из форм, а именно гликозилированный proBNP, является хорошим кандидатом для использования в качестве общего калибратора для снижения вариативности между результатами, получаемыми с использованием различных иммунодиагностических тестов на BNP.

Патенты и торговые марки HyTest

Immunoassay Kit for Quantification of BNP and proBNP (US 9,145,459).

Stable Standards for BNP Immunoassays (EP 2084544, CN 101641601, CA 2669024).

Immunoassay for Quantification of an Unstable Antigen Selected from BNP and proBNP

(US 9,034,591, US 9,034,592, JP 5686593, CN 101842707, CA 268391, EP 2135087).

Информация для заказа

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА

Название продукта	Кат. №	Клон	Изотип	Примечания
BNP	4BNP2	26E2	IgG1	ИФА, ВБ, а.к.о. 11-22
	4BNP2cc	429cc	IgG1	<i>In vitro</i> , ИФА, а.к.о. 5-13
		100cc	IgG2a	<i>In vitro</i> , <i>In vitro</i> , ИФА, а.к.о. 10-15
		24C5cc	IgG1	<i>In vitro</i> , ИФА, ВБ, а.к.о. 11-17
		130cc	IgG1	<i>In vitro</i> , ИФА, а.к.о. 15-22
		50E1cc	IgG1	<i>In vitro</i> , ИФА, ВБ, а.к.о. 26-32
		50B7cc	IgG2a	<i>In vitro</i> , ИФА, ВБ, а.к.о. 26-32
		57H3cc	IgG2a	<i>In vitro</i> , ИФА, ВБ, а.к.о. 26-32
Иммунный комплекс (24C5-BNP/proBNP)	4BFab5	Ab-BNP4	IgG2a	ИФА (только в качестве пары с МоАт 24C5cc, кат.№ 4BNP2cc)
	4BFab5cc	Ab-BNP2cc	IgG2a	<i>In vitro</i> , ИФА (только в качестве пары с МоАт 24C5cc, кат.№ 4BNP2cc)
NT-proBNP	4NT1	16F3	IgG1	ИФА, ВБ, а.к.о. 15-20
		15D7	IgG1	ИФА, ВБ, а.к.о. 48-56
		28F8	IgG2a	ИФА, ВБ, а.к.о. 67-76
	4NT1cc	5B6cc	IgG1	<i>In vitro</i> , ИФА, ВБ, а.к.о. 1-12
		29D12cc	IgG2a	<i>In vitro</i> , ИФА, ВБ, а.к.о. 5-12
		15F11cc	IgG2b	<i>In vitro</i> , ИФА, ВБ, а.к.о. 13-24
		13G12cc	IgG2a	<i>In vitro</i> , ИФА, ВБ, а.к.о. 15-20
		18H5cc	IgG1	<i>In vitro</i> , ИФА, ВБ, а.к.о. 15-20
		7B5cc	IgG1	<i>In vitro</i> , ИФА, ВБ, а.к.о. 15-21
		NT34cc	IgG1	<i>In vitro</i> , ИФА, ВБ, а.к.о. 25-34
		NT13	IgG	ИФА, LF, а.к.о. 27-31, рекомбинантное кроличье антитело
		11D1cc	IgG1	<i>In vitro</i> , ИФА, ВБ, а.к.о. 31-39
		16E6cc	IgG1	<i>In vitro</i> , ИФА, ВБ, а.к.о. 34-39
		15C4cc	IgG2b	<i>In vitro</i> , ИФА, ВБ, а.к.о. 63-71
		NT45	IgG	ИФА, LF, а.к.о. 43-46, рекомбинантное кроличье антитело
		NT46	IgG	ИФА, LF, а.к.о. 43-46, рекомбинантное кроличье антитело
		24E11cc	IgG2a	<i>In vitro</i> , ИФА, ВБ, а.к.о. 67-76

АНТИГЕНЫ

Название продукта	Кат. №	Чистота	Источник
NT-proBNP, рекомбинантный	8NT2	>95%	Рекомбинантный
proBNP, рекомбинантный	8PRO9	>95%	Рекомбинантный
proBNP, гликозированный, рекомбинантный	8GBP3	>95%	Рекомбинантный

Обратите внимание, что данные, представленные в этой технической заметке, были подготовлены с использованием МоАт, полученных *in vivo*. Предполагается, что МоАт, произведенные в клеточных культурах, будут иметь аналогичные свойства.