

胰岛素样生长因子结合蛋白4 (IGFBP-4) 片段

胰岛素样生长因子结合蛋白4(IGFBP-4)片段被认为是急性冠状动脉综合征(ACS) 患者主要不良心血管事件风险的潜力新生物标志物。它们由 IGFBP-4通过与妊娠相关血浆蛋白-A(PAPP-A)水解而形成。

IGFBP-4片段和PAPP-A

以前PAPP-A被认为是心血管疾病的潜在标志物。多项研究表明，在不稳定的动脉粥样硬化斑块中PAPP-A表达显著增加。此外，研究表明循环中高水平的PAPP-A可能表征斑块破裂的风险增加，进而可能导致严重的心脏不良事件 (MACE)。不幸的是，PAPP-A检测已被证实也可以识别与proMBP结合的PAPP-A，这与动脉粥样硬化斑块无关。此外，PAPP-A测量值也被证实受肝素的影响，肝素是一种常规用于治疗急性心肌梗塞患者的抗凝剂。总而言之，这些限制使得PAPP-A成为了监测斑块破裂的不可靠标志物。

PAPP-A是一种金属蛋白酶，其主要底物是IGFBP-4。PAPP-A特异性地将Met135-Lys136 之间的 IGFBP-4切割成两个片段：N端IGFBP-4(NT-IGFBP-4)和C端IGFBP-4 (CT-IGFBP-4) (见图1)。由于PAPP-A测量带来的挑战，我们的研究人员推测IGFBP-4片段可作为PAPP-A的替代标志物。

临床应用

IGFBP-4 片段可作为以下事件的强预测因子：

- ✓ 疑似急性冠状动脉综合征患者的中短期心脏事件和死亡
- ✓ I型糖尿病患者的长期心源性死亡
- ✓ 急性心肌梗死患者的短期至长期死亡率
- ✓ 急性心力衰竭患者的中短期全因死亡率

IGFBP-4作为诊断标志物

最近的研究表明，IGFBP-4片段可以预测急性冠状动脉综合征患者的不良心脏事件(1)。此外，片段的免疫测定不受肝素的影响，例如PAPP-A测定 (2)。这将使它们更适合用于接受肝素治疗的一部分患者样本。

免疫检测试剂开发

HyTest提供多株单克隆抗体，用于开发定量检测NT-IGFBP-4和CT-IGFBP-4的免疫检测试剂。

此外，我们还提供NT-IGFBP-4和CT-IGFBP-4的重组蛋白。

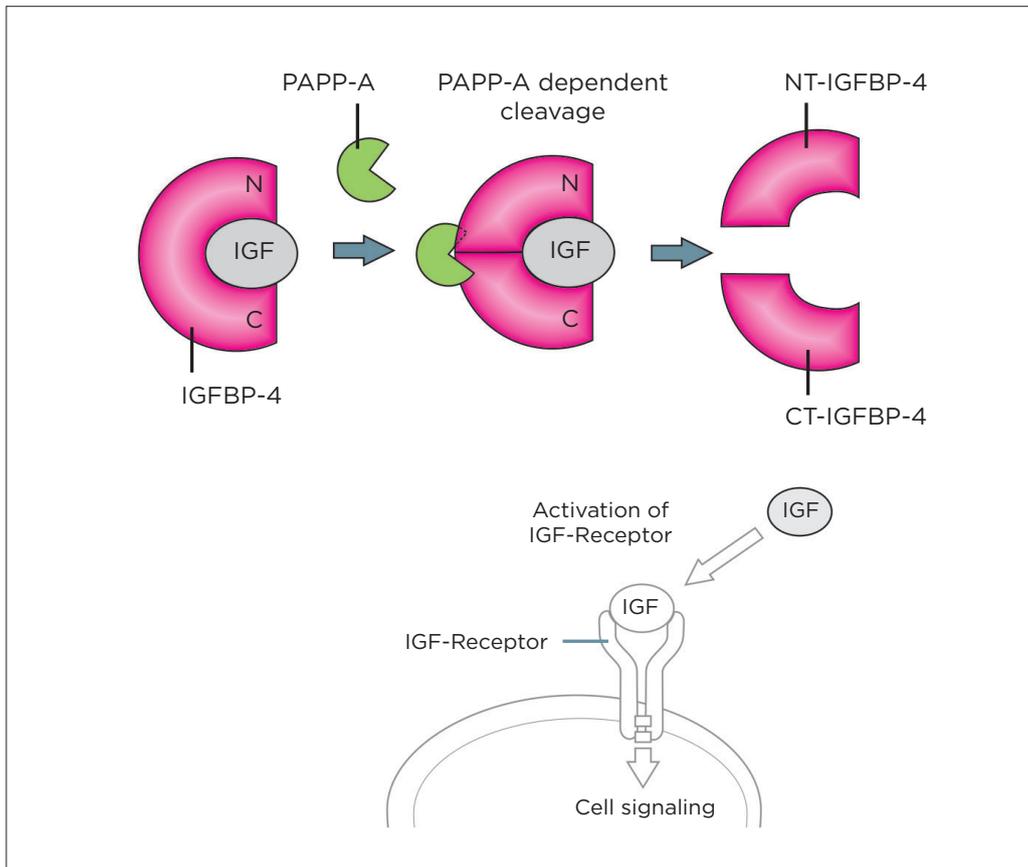


图1. PAPP-A水解IGFBP-4的示意图。PAPP-A 特异性水解Met135-Lys136之间的IGFBP-4，形成两个蛋白水解片段NT-和CT-IGFBP-4，同时IGF被释放。

动脉粥样硬化

动脉粥样硬化是一种进展缓慢的疾病，其中主要是脂质和炎症细胞在动脉壁中积聚形成斑块。斑块的形成可以在生命的早期开始，但它们可以在几十年内保持无症状。斑块使血液静脉变窄，并在某个点开始影响血流。这可能会导致胸痛等症状。

动脉粥样硬化斑块分为稳定斑块和不稳定斑块或易损斑块。后者容易破裂，这是一个可能导致突然血栓闭塞的事件。

斑块不稳定是一个高度复杂和多因素的过程。多项研究表明，不稳定的动脉粥样硬化斑块中 dPAPP-A的表达显着增加。

目前的诊断方法能在重症病例中准确检测冠状动脉狭窄，但它们无法揭示潜在的过程。因此，需要一种更准确的风险标志物。

IGFBP-4片段或许可以用作酶活性PAPP-A的替代标志物。

NT-IGFBP-4和CT-IGFBP-4特异性单克隆抗体

我们开发了2种独特的单克隆抗体，它们特异性识别IGFBP-4被PAPP-A蛋白水解时形成的新表位(1)。当与更接近全长IGFBP-4分子末端的单抗结合使用

时，可以开发两种单独的检测方法，仅检测NT-IGFBP-4或CT-IGFBP-4（参见图2）。

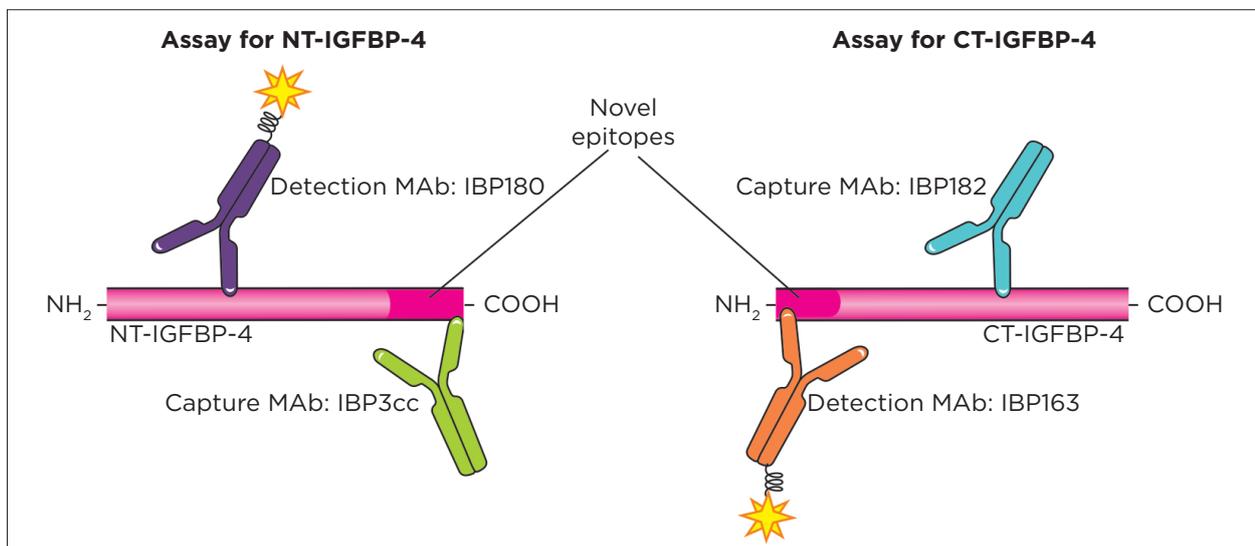


图2.仅检测NT-IGFBP-4（左）和CT-IGFBP-4（右）的荧光免疫分析示意图。单抗IBP3cc特异性识别NT-IGFBP-4的新表位，单抗IBP163特异性识别CT-IGFBP-4的新表位。

夹心法免疫检测试剂开发

NT-IGFBP-4 荧光免疫分析试剂。抗体配对IBP3-IBP180可用于检测N-IGFBP-4。IBP3仅识别切割片段，而IBP180识别两种形式。重组NT-IGFBP-4的校准曲线如图3A所示。

CT-IGFBP-4 荧光免疫分析试剂。使用IBP182作为捕获抗体，IBP163作为检测抗体。IBP182识别全长IGFBP-4和CT-IGFBP-4片段，而IBP163仅与全长IGFBP-4切割后形成的新表位结合。重组CT-IGFBP-4的校准曲线如图3B所示。

HRP标记系统的IGFBP-4片段ELISA检测。相同抗体配对使用HRP系统效果很好；然而，相反的选择显示更优的结果：IBP163-IBP182HRP用于CT-IGFBP-4测定和IBP180-IBP3HRP用于NT-IGFBP-4测定。

开发的IGFBP-4片段ELISA试剂检测全长IGFBP-4分子，显示较低的交叉反应性(<2%)，同时灵敏度适用于正常人群IGFBP-4片段的检测。NT-IGFBP-4和CT-IGFBP-4荧光免疫检测和ELISA的验证结果已在多个出版物中报道(1-6)。

重组抗原

HyTest提供N-IGFBP-4和C-IGFBP-4的纯化重组蛋白。这些蛋白质是表达于哺乳动物细胞系，不包含

任何标签。这些重组蛋白可作为免疫检测试剂的标准品或校准品，或作为各种应用的质量标准。

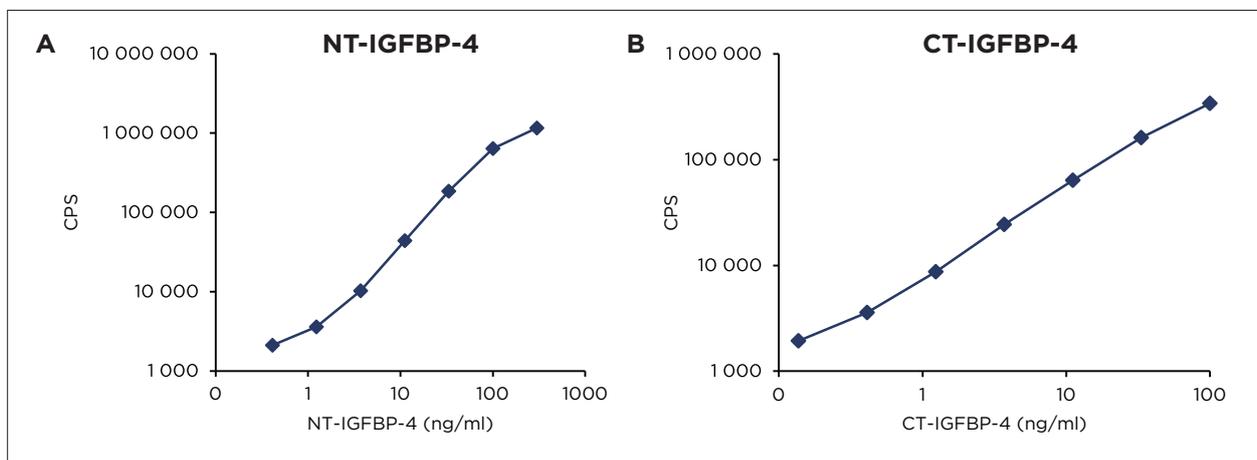


图 3. (A) NT-IGFBP-4 和 (B) CT-IGFBP-4 夹心法荧光免疫测定试剂的校准曲线。抗体配对IBP3-IBP180（捕获-检测）用于NT-IGFBP-4 测定，抗体配对IBP182-IBP163用于CT-IGFBP-4测定。

临床研究

IGFBP-4片段的临床效用已在若干项研究中开展。我们在下面罗列了研究NT-IGFBP-4和CT-IGFBP-4作为生物标志物而进行的关键临床研究。

I. Postnikov et al., 2012: Prediction of short-term to medium-term cardiac events and death in patients with suspected acute coronary syndrome

在文章(1)中，180名疑似非ST段抬高ACS患者的EDTA血浆样本中检测了IGFBP-4片段。非ST段抬高心肌梗死(non-STEMI)的诊断基于心肌缺血的体征或症状。

在6个月的随访期内，NT-IGFBP-4和CT-IGFBP-4均被证明是MACE的强预测因子，包括MI和心源性死亡（ROC曲线下面积值分别为0.86和0.81，见图4；自己的数据未在论文中发表）。

MACE的Kaplan-Meier生存曲线表明NT-IGFBP-4和CT-IGFBP-4与未来MACE风险增加相关：调整后的风险比分别为13.79和7.93。值得注意的是，大多数终点发生在前3个月内。

在本文中，我们还介绍了用于检测IGFBP-4片段的单抗和新型免疫检测试剂的开发。

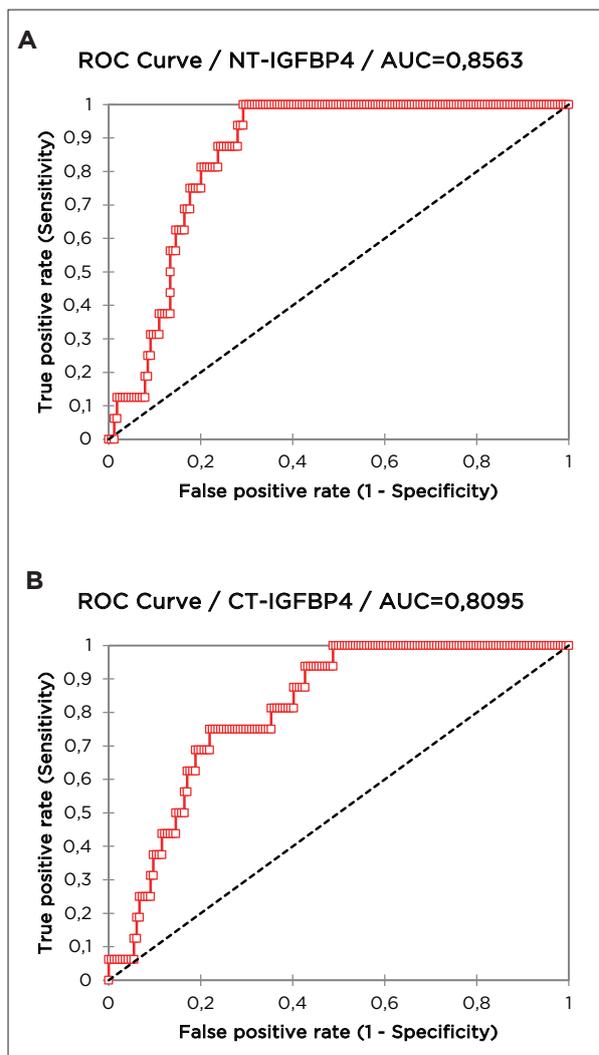


图 4. 基于NT-IGFBP-4(A)和CT-IGFBP-4(B)检测的6个月MACE预测的ROC曲线分析。使用IBP3-IBP144（捕获-检测）检测NT-IGFBP-4 (A)。使用IBP182-IBP163（捕获-检测）检测CT-IGFBP-4 (B)。

II. Hjortebjerg et al., 2015: Prediction of long-term cardiac death in patients with Type 1 Diabetes

Hjortebjerg 等(2015) 研究了IGFBP-4片段在I型糖尿病(T1D)患者中的预后价值(3)。对178例糖尿病伴随肾病的T1D患者和152例白蛋白尿正常的T1D患者进行了为期12.6年的前瞻性随访。

在对肾病和传统心血管危险因素进行调整后，NT-IGFBP-4和CT-IGFBP-4的高水平仍然是心血管死亡率的预后因素，风险比分别为5.81($P < .001$)和2.58($P = .030$) (见表1))。作为参考，NT-IGFBP-4和

CT-IGFBP-4浓度低于阈值的患者组的风险比为1。相比之下，本研究发现与总体或心血管死亡以及调整后的PAPP-A水平无关。

对于ROC分析，使用所有330名T1D患者。NT-IGFBP-4 ROC曲线下面积 [平均值 (95% 置信区间)] 为0.77 (95% 置信区间 0.71-0.84) 。 CT-IGFBP-4为0.74 (95% 置信区间 0.66-0.81) 。

表 1. 使用Cox回归分析NT-IGFBP-4和CT-IGFBP-4与心血管死亡率的关系。

		Cardiovascular Mortality	
		HR (95% CI)*	P Value
NT-IGFBP-4	Unadjusted	6.58 (3.75-11.57)	<.001
	Adjusted for nephropathy	4.13 (2.16-7.88)	<.001
	Adjusted for nephropathy and cardiovascular risk factors	5.81 (2.62-12.86)	<.001
CT-IGFBP-4	Unadjusted	4.90 (2.70-8.82)	<.001
	Adjusted for nephropathy	2.82 (1.43-5.55)	.003
	Adjusted for nephropathy and cardiovascular risk factors	2.58 (1.10-6.10)	.030

*HR: hazard ratio; CI: confidence interval

III. Hjortebjerg et al., 2017: Prediction of short-term to long-term mortality in patients with acute myocardial infarction

Hjortebjerg等人(2017)研究656名接受经皮冠状动脉介入治疗的ST段抬高型心肌梗死患者的NT-IGFBP-4和CT-IGFBP-4以及完整IGFBP-4的水平(7)。经过多变量调整后NT-IGFBP-4和CT-IGFBP-4水平仍然与所有终点相关,包括心血管死亡率,蛋白质浓度每增加一倍的风险比为2.54(95%置信区间1.59-4.07; $P<0.001$)和2.07(95%置信区间1.41-3.04; $P<0.001$)。将IGFBP-4片段纳入具有15个风险因素的临床模型改善了

C统计和模型校准,并提供了增量预后贡献,如通过净重新分类改进和综合鉴别改进评估。

Kaplan-Meier分析表明,心血管事件导致的大多数死亡发生在前三个月(见图5)。

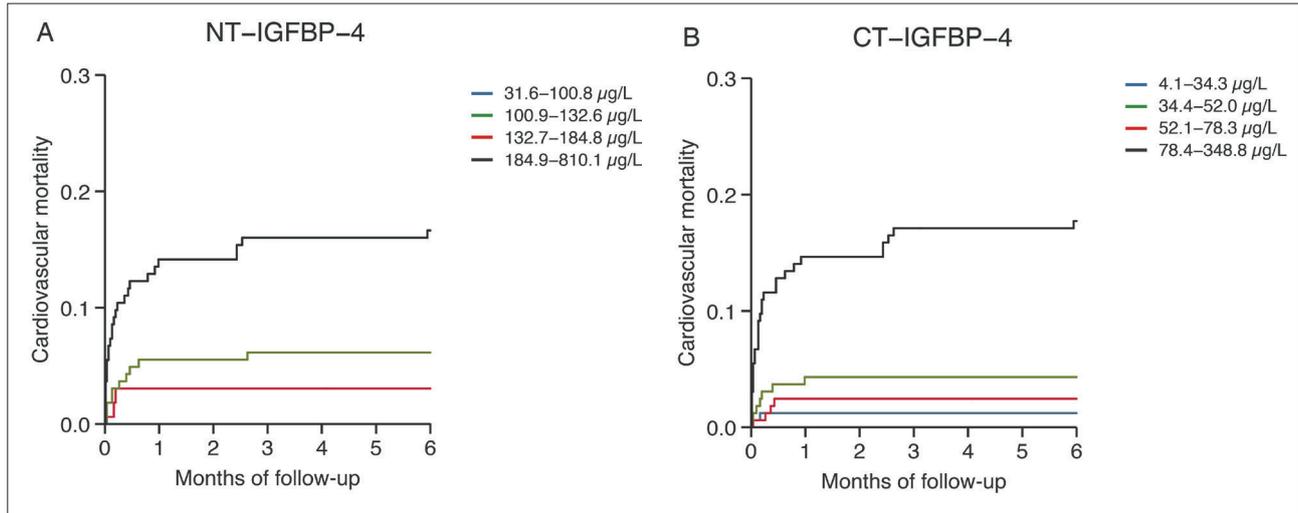


图5. 急性心肌梗死患者按NT-IGFBP4 (A) 和CT-IGFBP-4 (B) 阈值分层的6个月心血管死亡率; Kaplan-Meier分析。该图由Rikke Hjortebjerg博士友情提供。

IV. Postnikov et al., 2018: Prediction of short-term to medium-term all-cause mortality in patients with acute heart failure

由于进行性心力衰竭是急性心肌梗死后发病率和死亡率的主要原因,我们建议IGFBP-4片段也可用作心力衰竭(HF)结果预后的生物标志物(6)。我们评估了CT-IGFBP-4对急性HF患者全因死亡率的预后价值。CT-IGFBP-4在入院时对156名急性HF急诊患者的锂肝素血浆进行检测。CT-IGFBP-4检测随访1个月和1年的全因死亡

率: ROC曲线下面积分别为0.753和0.727。在调整多个临床和超声心动图变量后,CT-IGFBP-4是一个月和一年死亡率的独立风险生物标志物(见表2)。

表2. 急性心力衰竭患者CT-IGFBP-4水平在1年和1个月内随访全因死亡率的调整后危险几率HR (95% CI)。

	One month mortality		One year mortality	
	Hazard ratio, Univariate	Hazard ratio, Multivariate	Hazard ratio, Univariate	Hazard ratio, Multivariate
CT-IGFBP-4 ≥ 92.5 ng/ml	6.15 (2.12-17.79; $p=0.0008$)	5.39 (2.11-13.76; $p=0.0004$)	4.20 (2.11-8.39; $p<0.0001$)	3.26 (1.63-6.51; $p=0.0008$)

参考文献

1. Postnikov, A. B. et al. N-terminal and C-terminal fragments of IGFBP-4 as novel biomarkers for short-term risk assessment of major adverse cardiac events in patients presenting with ischemia. Clin. Biochem. 45, 519-524 (2012).
2. Hjortebjerg, R. et al. PAPP-A and IGFBP-4 fragment levels in patients with ST-elevation myocardial infarction treated with heparin and PCI. Clin. Biochem. 48, 322-328 (2015).
3. Hjortebjerg, R. et al. IGFBP-4 Fragments as Markers of Cardiovascular Mortality in Type 1 Diabetes Patients With and Without Nephropathy. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 100, 3032-3040 (2015).
4. Konev, A. A. et al. Characterization of endogenously circulating IGFBP-4 fragments—Novel biomarkers for cardiac risk assessment. Clinical Biochemistry 48, 774-780 (2015).
5. Konev, A. A. et al. Glycosylated and non-glycosylated NT-IGFBP-4 in circulation of acute coronary syndrome patients. Clin. Biochem. (2018). doi:10.1016/j.clinbiochem.2018.03.004
6. Postnikov, A. B. et al. C-terminal fragment of IGFBP-4 is independently associated with mortality in patients hospitalized due to acute heart failure. Poster presentation at ESC Heart Failure 2018, <http://u.to/MmpyEg> (P1828).
7. Hjortebjerg, R. et al. Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 4 Fragments Provide Incremental Prognostic Information on Cardiovascular Events in Patients With ST-Segment Elevation Myocardial Infarction. J Am Heart Assoc 6, (2017).

专利

Detection of IGFBP-4 Fragments as a Diagnostic Method

EP 2448969, US 9012610, US 9964549, JP 5840605, KR 101767611 and CN 102471379. This invention describes a method for diagnosing of cardiovascular diseases, which comprises detection of IGFBP-4 (insulin-like growth factor binding protein-4) fragments in patients' blood. It provides antibodies as well as epitopes for antibodies, specific to proteolytic fragments (both N- and C-terminal) of IGFBP-4 originated from IGFBP-4 molecule after its cleavage by specific protease PAPP-A. Antibodies could be used for development of immunoassay methods for quantitative or qualitative detection of IGFBP-4 fragments in human blood.

Method for Determining the Risk of cardiovascular Events Using IGFBP Fragments

US 10191066. This invention describes the method for determining the risk of future major adverse cardiovascular events, which comprises detection of proteolytic fragments of IGFBP-4 or IGFBP-5 (insulin-like growth factor binding protein 4 or insulin-like growth factor binding protein 5) in patients' blood. The present invention provides antibodies and immunoassays, suitable for specific measurement of proteolytic fragments of IGFBPs. In current invention the IGFBP fragments are suggested to be utilized as blood biomarkers for the risk prediction of major adverse cardiovascular events (MACE).

订购信息

单克隆抗体

产品名称	货号	克隆号	亚型	备注
胰岛素样生长因子结合蛋白4	4IGF4	IBP3cc	IgG3	体外生产, EIA
		IBP163	IgG1	EIA
		IBP180	IgG2a	EIA
		IBP182	IgG2b	EIA

抗原

产品名称	货号	纯度	来源
NT-IGFBP-4, 人, 重组	8NGP4	>90%	重组
CT-IGFBP-4, 人, 重组	8ILG4	≥90%	重组

请注意, 技术报告中提供的部分或全部数据是使用体内生产的单克隆抗体制备的。体外生产的单克隆抗体具有相同的性能。