

# 重组人源抗狂犬病毒单克隆抗体 SO57、SOJB 对狂犬病毒 G 蛋白亲和力的比较研究

程立均, 贾茜

(华北制药集团 新药研究开发有限责任公司, 石家庄 050015)

关键词: BIA; SO57; SOJB; G 蛋白; 亲和常数; 竞争结合反应

中图分类号: R373.9 文献标识码: A 文章编号: 1000-8721(2006)03-0230-03

一直以来, 狂犬病是一种严重的人类致死性传染病。对狂犬病暴露后的预防主要是采用抗狂犬病毒免疫球蛋白(RIG)结合狂犬疫苗注射的方法。目前使用的两类 RIG 为人 RIG(HRIG)和马 RIG(ERIG), 它们都是从免疫血清中分离出来的<sup>[1]</sup>。由于 HRIG 成本高且产量少, 质量难以控制, 有潜在病毒污染的风险; 而 ERIG 存在引起过敏反应等问题, 因此, 人们期望抗狂犬病毒人单克隆抗体能够取代 RIG, 用于狂犬病的暴露后预防<sup>[2]</sup>。在狂犬病毒的多种免疫原物质中, 狂犬病毒糖蛋白(以下简称 G 蛋白)是诱导产生抗病毒免疫保护的一种主要抗原<sup>[3]</sup>, 同时也是诱导产生病毒中和抗体并与之反应的唯一抗原<sup>[4]</sup>。针对 G 蛋白的抗狂犬病毒抗体中和细胞外的狂犬病毒, 并介导感染细胞的裂解及抗体依赖性的细胞毒性。在 Dietzschold 等发现的几株针对 G 蛋白的人单克隆中和抗体中, 中和毒株的范围最广、抗体效价最高的为 SO57, 除此之外, SOJB 也是目前研究较多的针对 G 蛋白的人单克隆中和抗体<sup>[1,2]</sup>。

抗体与抗原之间的相互作用以及对抗原的亲合力是考察抗体的重要方面。BIAcore 是从以表面等离子共振原理(SPR)为基础的生物分子相互作用实时分析技术(BIA)发展而来的仪器, 专门用于对两个或两个以上生物分子间的相互作用进行实时监控和分析。用 BIAcore 技术可以解决多种问题, 包括测定生物分子间是否存在相互作用, 结合的强弱、快慢程度, 以及结合位点分析等<sup>[5]</sup>。此研究利用 BIAcore2000 系统, 对 SO57、SOJB 与 G 蛋白的亲合力进行测定, 并分析两者与 G 蛋白的结合反应, 为重

组人源抗狂犬病毒单克隆抗体药物的设计开发提供理论依据。

具体试验材料如下: 重组人源抗狂犬病毒单克隆抗体 SO57、SOJB 由华北制药集团新药研发公司制备; 重组狂犬病毒 G 蛋白由美国 MTTI 公司提供; 人免疫球蛋白(hIgG)上海生物制品研究所生产; BIAcore2000 (Biacore AB, Sweden); CM5 芯片, 经羧甲基葡聚糖 CMD 预处理; HBS 缓冲液(10mmol/L HEPES, 150mmol/L NaCl, 3mmol/L EDTA, 0.005% P20, pH7.4); N-乙基-N'-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺(EDC)与 N-羟基琥珀亚胺(NHS)。

抗体的固定: CM5 芯片上共有 4 道可供标记配体, 第一道标记 hIgG 作为空白对照, 第二道标记 SO57, 第三道标记 SOJB, 标记量均为 2000RU。设定 BIAcore2000 工作室温度为 25℃, 流速为 5μl/min。先用 EDC 和 NHS 活化 CM5 芯片表面, 再分别耦联抗体样品, 最后用 1mol/L 乙醇胺封闭。

亲和常数的测定: 用 HBS 将 G 蛋白稀释成 0、40nmol/L、80 nmol/L、160nmol/L、320nmol/L、640nmol/L 等 6 个浓度的溶液, 设定流速为 30μl/min, 以标记 hIgG 的第一道为对照, 将各浓度的 G 蛋白溶液相继通过标记 SO57 的芯片表面, 与耦联在芯片上的 SO57 反应, 记录传感图谱。利用 BIAcore2000 随机软件 BIAevaluation 对不同 G 蛋白浓度下的各条结合曲线进行分析, 计算 SO57 对 G 蛋白的亲合力常数, 同理测定 SOJB 对 G 蛋白的亲合力常数。

竞争结合试验: 以标记 hIgG 的第一道为对照, 在标记 SO57 的第二道上, 注射 G 蛋白(160nmol/L)通过芯片表面, 与耦联在芯片上 SO57 反应, 稳定结合后, 再注射 SOJB(200nmol/L)通过芯片表面, 观察并记录传感图谱, 看是否再有结合峰出现。同

收稿日期: 2005-12-22; 修回日期: 2006-02-13

作者简介: 程立均(1979-), 男, 石家庄人, 硕士, 现主要从事细胞工程药物的研发工作。

理, 在标记 SOJB 的第三道上, 先结合 G 蛋白 (160nmol/L), 再注射通过 SO57 (200nmol/L), 观察并记录传感图谱。具体操作步骤按 BIAcore2000 系列操作手册所述进行<sup>[6, 7, 8]</sup>。

通过 BIAcore Evaluationon 对不同 G 蛋白浓度下各条结合曲线的分析, 计算出 SO57 对 G 蛋白的亲合常数为  $3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ , SOJB 对 G 蛋白的亲合常数为  $3.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ 。可见, SO57、SOJB 对 G 蛋白均有较好的亲和力, SOJB 对 G 蛋白的亲和力大于 SO57。

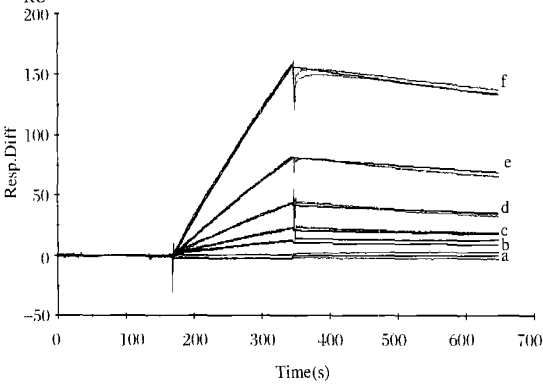


图 1 SO57 对 G 蛋白亲和常数测定的传感图谱

Figure 1 Sensorgram showing the procedure of determining affinity constant of SO57

G protein at different concentrations of 0(a), 40nM (b), 80nM (c), 160nM (d), 320nM (e) and 640nM (f) was injected across the SO57 immobilized surface.

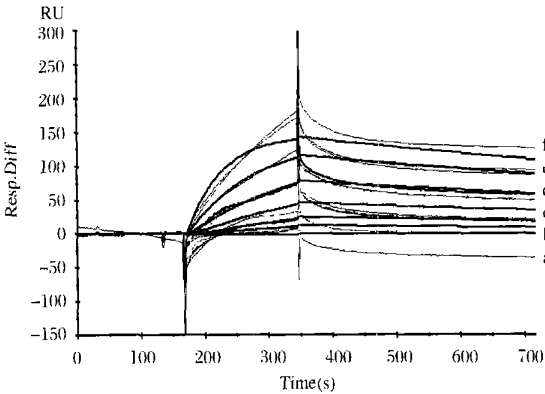


图 2 SOJB 对 G 蛋白亲和常数测定的传感图谱

Figure 2 Sensorgram showing the procedure of determining affinity constant of SOJB

G protein at different concentrations of 0(a), 40nM (b), 80nM (c), 160nM (d), 320nM (e) and 640nM (f) was injected across the SOJB immobilized surface.

竞争结合试验结果显示, G 蛋白与芯片上包被的抗体结合后, 不再与另一株抗体有结合反应(图

3、图 4), 说明 SO57、SOJB 两株抗体不能同时与 G 蛋白结合, 原因应该是 SO57 与 SOJB 的表位存在重叠或表位非常接近。

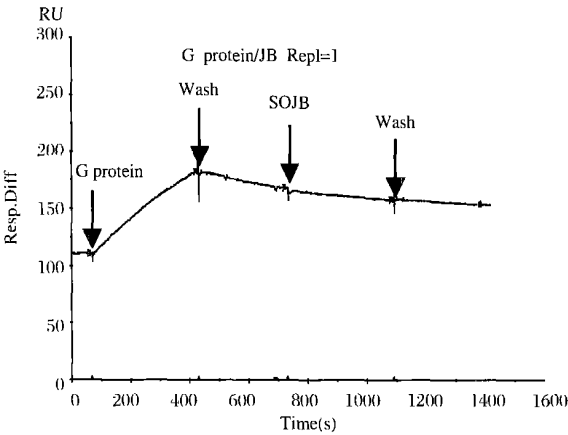


图 3 SO57、SOJB 与 G 蛋白竞争结合的传感图谱(第二道)

Figure 3 Sensorgram showing binding competition of two antibodies to G protein

G protein of 160nM was injected across the SO57 immobilized surface and then SOJB of 200nM was injected.

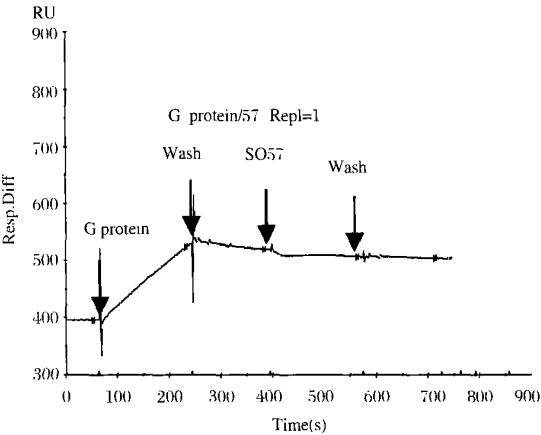


图 4 SO57、SOJB 与 G 蛋白竞争结合的传感图谱(第三道)

Figure 4 Sensorgram showing binding competition of two antibodies to G protein

G protein of 160nM was injected across the SO57 immobilized surface and then SO57 of 200nM was injected.

SO57 识别 G 蛋白上一段连续的氨基酸序列, 为线性表位; 而 SOJB 识别的是非线性的空间表位<sup>[1]</sup>, 与 SO57 的表位存在部分重叠, 因此, SO57 和 SOJB 识别的表位不完全相同。Wilfred E 等<sup>[1]</sup>的最新研究表明, SO57 能够识别的最小区域为 G 蛋白上 226 ~ 231 位氨基酸, 其中, 又以第 226 位、229 ~ 231 位最为关键。而 SOJB 识别的表位是由第 182 位氨基酸和 229 ~ 231 位氨基酸两部分共同构成的, 两株抗体识别的表位具有一段重叠的区域:

229~231 位氨基酸,由此导致 SO57、SOJB 不能同时与 G 蛋白结合。这与我们所做的竞争结合试验的结果是一致的。我们利用快速荧光灶抑制试验法(RFFIT)对 SO57、SOJB 的中和效价进行了测定,结果与 Dietzschold<sup>[9]</sup>报道的相一致:SO57 的效价为 2200 IU/mg,SOJB 的效价为 240 IU/mg。此外,我们还利用小鼠中和试验法对 SO57、SOJB 进行了效价测定,结果与 RFFIT 的试验结果一致。以上结果显示,SO57 的效价远高于 SOJB。目前发现的狂犬病毒毒株 99% 都能够被 SO57 所识别,只有两株蝙蝠体内发现的狂犬病毒毒株和一些人为诱变的毒株能够逃逸 SO57 的中和<sup>[2]</sup>,因此,就我国国内而言,SO57 的中和作用谱覆盖了所有现存的狂犬病毒毒株。由此可见,SO57 很有希望开发为用于狂犬病毒暴露后治疗的重组人源化单抗药物。对于 SOJB 来说,其识别的狂犬病毒毒株范围较 SO57 更广<sup>[1]</sup>,并且,此实验结果证明它对 G 蛋白的亲合力要高于 SO57,因此,若能在基因构建方面解决其效价较低的问题,SOJB 将与 SO57 一起,成为狂犬病暴露后治疗用首选高效药物。

#### 参考文献:

[1] Marissen W E, Kramer R A, Rice A, et al. Novel rabies virus—

neutralizing epitope recognized by human monoclonal antibody: Fine mapping and escape mutant analysis[J]. J Virol. 2005, 79 (8): 4672—4678.

[2] Dietzschold B, Gore M, Casali P, et al. Biological characterization of human monoclonal antibodies to rabies virus[J]. J Virol. 1990, 64 (6): 3087—3090.

[3] Dietzschold B, Gore M, Marchadier D, et al. Structural and immunological characterization of a linear virus—neutralizing epitope of the rabies virus glycoprotein and its possible use in a synthetic vaccine[J]. J Virol. 1990, 64 (8): 3804—3809.

[4] Dietzschold B, Wiktor T J, Macfarlan R, et al. Antigenic structure of rabies virus glycoprotein: ordering and immunological characterization of the large CNBr cleavage fragments[J]. J Virol. 1982, 44 (2): 595—602.

[5] 沈平. 生物传感技术的新应用—生物分子相互作用分析技术(BIA)[J]. 现代仪器使用与维修, 1998, (3): 5—8.

[6] BIAcore. BIAcore2000 Instrument Handbook[M]. 2001. 5—1—5—32.

[7] BIAcore. BIAcore Sensor Surface Handbook[M]. 2003. 25—39.

[8] BIAcore. BIAevaluation Software Handbook[M]. 2003. 4—1—4—31.

[9] Prosiński M, Faber M, Hanlon C A, et al. Development of a cocktail of recombinant expressed human rabies virus—neutralizing monoclonal antibodies for postexposure prophylaxis of rabies[J]. J Infect Dis. 2003, 188(1): 53—56.

## Affinity Comparison of Two Recombinant Human Anti-rabies Monoclonal Antibodies (SO57, SOJB) with Rabies Virus G Protein

CHENG Li-jun, JIA Qian

(NCPC New Drug Research and Development Co. Ltd., Shijiazhuang 050015, China)

**Abstract:** It is desirable to develop potent rabies virus neutralizing human monoclonal antibodies (McAbs) to replace human or equine polyclonal immunoglobulin in the rabies virus postexposure treatment. Using BIAcore2000, affinity constants of McAbs with rabies virus glycoprotein (G protein) were determined taking human immunoglobulin as control, and affinity constants were calculated using BIAevaluation software. The affinity of McAb SOJB with rabies virus G protein was higher than that of SO57. Competition binding analyses ran on BIAcore2000 revealed that SO57 and SOJB competed for binding to rabies virus G protein, suggesting that epitopes recognized by SO57 and SOJB overlapped. Furthermore, the neutralizing potency of SO57 was significantly greater than that of SOJB as RFFIT showed. So it is desirable to develop SO57 firstly for rabies virus postexposure treatment.

**Key words:** Biomolecular Interaction Analysis (BIA); G protein; affinity constant; competition binding

Corresponding author: CHENG Li-jun, Tel: 86-311-85993043; E-mail: kinclj@163.com