

重组人抗狂犬病病毒单抗 SO57、SOJB 对不同 狂犬病病毒毒株中和作用的研究

贾茜¹, 徐葛林², 赵伟¹, 吴杰², 郑新雄²

(1. 华北制药集团新药研究开发有限责任公司, 河北 石家庄 050015; 2. 武汉生物制品研究所, 湖北 武汉 430060)

摘要: 用不同的动物模型研究了具有专利的重组人抗狂犬病病毒单克隆抗体 SO57、SOJB 对不同狂犬病病毒株的中和作用, 100IU/kg 的 SO57 能 100% 保护被中国街毒株 SBD 攻击的中国仓鼠; 首次用小鼠模型模拟人体被狂犬病病毒攻击后的治疗情况, 在小鼠被 CVS 及中国街毒代表株攻击后, SO57 与 HRIG 具有相近的对小鼠的暴露后保护作用; 同时结果显示 HRIG 对 SBD 株攻击的保护率不能到达 100%, 仅使用疫苗是不能对感染病毒的小鼠百分之百的保护; SOJB 与 SO57 1:1 联合使用未显示比 SO57 单独使用更好的保护效果。SO57 极有可能在中国代替 HRIG 用于狂犬病病毒暴露后治疗。

关键词: 狂犬病病毒; 单克隆抗体; 中和作用; 狂犬病病毒暴露后治疗

中图分类号: R373.22 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8721(2006)04-0256-06

狂犬病是一种严重的人类致死性传染病, 根据全国疫情报告系统资料, 1998 年后狂犬病疫情年增长速度越来越高。2002 年发病数 1 122 例, 死亡 1 003 例; 2003 年发病数达到 2 009 例, 死亡 1 827 例。病死数占各种法定传染病死亡总数的 37.29%, 成为当年死亡人数最多的传染病, 2004 年和 2005 年死亡人数更是达到了 2 660 例和 2 537 例。对狂犬病暴露后的预防(PEP)主要是采用抗狂犬病病毒免疫球蛋白(RIG)结合狂犬病疫苗注射的方法。目前临床使用的有两类: 人抗狂犬病病毒免疫球蛋白(HRIG)和马抗狂犬病病毒免疫球蛋白(ERIG)^[1]。由于 HRIG 成本高且产量少, 难以满足我国的用药需求, 并且血源产品质量难以控制, 还有潜在病毒污染的风险; 而 ERIG 存在引起过敏反应等问题, 患者不能放心使用。临床上用单克隆抗体取代现有的血源抗体用于狂犬病病毒暴露后预防^[2]的必要性已经成为国际上研究者的共识。在 Dietzschold 等发现的几株针对 G 蛋白的人单克隆中和抗体中, SO57、SOJB 具有广泛的中和活性。也是目前研究较多的针对 G 蛋白的人单克隆中和抗体^[1, 2]。

研究表明, 我国狂犬病病毒街毒的分布有地域性的特点^[3, 4]。CQ92、“简”、SBD 分别分离自重庆犬、宁夏人和上海犬, 均为基因 1 型, 分属我国狂犬病病毒街毒 3 个基因亚组, 分别代表中国西部、北部

和东部毒株, 具有区域代表性^[4]。在小鼠模型的试验中我们选取了这 3 株狂犬病病毒街毒株做为暴露后治疗攻击毒株, 以考察 SO57 和 SOJB 对不同毒株的中和效力。

在中和抗体效价测定上, RFFIT 法是 WHO 推荐的一种中和试验方法, 普遍应用于抗狂犬病病毒免疫球蛋白药代动力学评价、新免疫程序和免疫途径的有效性分析以及检疫工作中。本实验中抗体的中和效价测定即采用了 RFFIT 法。

材料与方法

1 狂犬病病毒固定毒株(CVS) 实验用 CVS-11 病毒来自武汉生物制品研究所, 采用细胞和小鼠脑内传代分别用于 RFFIT 法效价测定和小鼠模型中。小鼠 CVS 暴露后预防模型中使用的 CVS-11 经过小鼠肌肉滴定实验确定 LD₅₀ 为 10⁻²。

2 狂犬病病毒街毒株 3 株街毒(CQ92、“简”、SBD)均来自武汉生物制品研究所。CQ92 株为 1992 年分离于重庆狗脑, SBD 株为 1993 年分离于上海狗脑, “简”株为 1995 年分离于宁夏人脑^[4], 在发病动物或人的脑内收集的病毒经两代小鼠脑内传代后低温保藏。这 3 株毒株经过小鼠肌肉滴定实验确定的 LD₅₀ 分别为 10^{-1.47}、10^{-1.29}、10^{-2.0}。

3 重组人抗狂犬病病毒抗体 专利的^[5] SO57 和 SOJB 均由重组狂犬病病毒表达系统在 BSR 细胞中表达^[6, 7], HPLC 纯度 > 98%, 分子量分别是 150kD 和 170kD。两株抗体的基因序列的 GenBank 编号: SOJB Ig L, AY172962; SOJB Ig H, AY172958; SO57 Ig L, AY172960; SO57 Ig H, AY172957。NM57 是把上述 SO57 的基因转入 CHO 细胞后, 由稳定的重

收稿日期: 2006-02-27; 修回日期: 2006-04-19

作者简介: 通讯作者: 贾茜(1965-), 女, 正高级工程师, E-mail:

jiaqianzh@hotmail.com

组 CHO 细胞表达的单抗经纯化制得, 其质量符合 2005 版药典对重组 DNA 产品的质量要求; 以上单克隆抗体样品均来自于华北制药集团新药研究开发有限责任公司生物技术室。

4 狂犬病病毒疫苗 维尔博狂犬病病毒疫苗, 批号: u1652, 制造商: 安万特·巴斯德公司。用磷酸盐缓冲液按体积稀释 125 倍, 0.5 ml/只腹腔注射小鼠。

5 WHO 抗狂犬病病毒免疫球蛋白国际标准 购自 NATIONAL INSTITUTE FOR BIOLOGICAL STANDARDS AND CONTROL U. K. 30IU/vial 用含 10% 灭活小牛血清的 DMEM 培养基稀释至 2IU/mL。

6 HRIG 人抗狂犬病病毒免疫球蛋白, 来自武汉生物制品研究所。

7 RFFIT 倍比稀释抗体样品, 同时设阴、阳性血清对照。病毒用固定毒 CVS 株, 细胞用 BSR 细胞系, 标准为 WHO 抗狂犬病病毒免疫球蛋白国际标准。首先在 96 孔细胞培养板中倍比稀释待测抗体及标准品, 同时设阴、阳性对照, 再在各孔中加入 50⁴l 病毒稀释液, 37℃中和 1h; 然后每孔加入细胞约 5×10⁴ 个, 37℃、5% CO₂ 培养 24h。弃培养液, PBS 洗 1 次, 冷丙酮固定 7min, 干燥后, 加工作浓度的荧光素标记抗

狂犬病病毒 N 蛋白抗体(FITC-ANTI-RABIES GLOBULIN, LOT NO: 9C0254 CENTOCOR INC), 37℃ 1h 孵育, PBS 洗 3 次, 在荧光显微镜下观察, 记录每孔细胞荧光灶百分比, 计算出与病毒对照减少 50% 病毒对照细胞荧光灶的被检抗体的稀释度, 并通过与标准品比较, 计算出被测血清的抗体效价(IU)。单抗效价取同一样品多次测定的平均值。

8 暴露后治疗的中国仓鼠模型 用街毒 SBD 株肌肉注射 4~6 周龄(80~85g)中国仓鼠右侧腓肠肌 10 MLD₅₀/只, 4h 后, 用 SO57 或 SOJB 同侧腓肠肌注射。观察 36d, 统计存活的仓鼠数量。

9 单克隆抗体对 CVS 暴露后的治疗 16~18g 雌性 BALB/c 小鼠, 分成 8 组, 每组 10 只小鼠, 小鼠于 0d 大腿肌肉注射 80%致死量 CVS-11 病毒 0.1ml(染色确定部位), 0.5~1h 后同部位肌肉注射单抗或 HRIG, 0d、7d 分别于腹腔注射疫苗免疫。观察并记录小鼠的死亡情况。使用抗体的剂量为分别为 200IU/kg 和 400IU/kg, SO57+SOJB 为 1:1 混合, 阳性对照为 HRIG。死亡小鼠用脑涂片法检验是否感染狂犬病病毒。实验设计见表 1。

表 1 单克隆抗体对小鼠被 CVS 暴露后的治疗实验设计
Table 1 PEP experimental design in mouse model against CVS-11

Group	Vaccine	SO57	SO57	SO 57+	SO 57+	HRIG	HRIG	CVS-11
		200IU/kg	400IU/kg	SOJB200IU/kg	SOJB400IU/kg	200IU/kg	400IU/kg	
A	+	+	—	—	—	—	—	+
B	+	—	—	+	—	—	—	+
C	+	—	—	—	—	+	—	+
D	+	—	+	—	—	—	—	+
E	+	—	—	—	+	—	—	+
F	+	—	—	—	—	—	+	+
G	+	—	—	—	—	—	—	+
Control	—	—	—	—	—	—	—	+

BALB/c female mice were challenged i. p. with CVS-11 on day 0 and lbeled the injection position with dye, then they were vaccinated i. m. with rabies vaccine and treated i. p. in the same part with 200 or 400 IU/kg of SO57, SO57+SOJB or HRIG, respectively after 0.5~1 h. Animals were monitored daily and euthanized when clinical signs of rabies appeared. ‘+’. Injected with; ‘—’. No injection.

10 单克隆抗体 SO57 和 SOJB 对小鼠街毒暴露后的治疗 16~18g 雌性 BALB/c 小鼠, 分成 5 组, 每组 10 只小鼠, 小鼠于 0d 大腿肌肉注射 80%致死量狂犬病病毒街毒株 0.1ml(染色确定部位), 0.5~1h 后同部位肌肉注射单抗或 HRIG, 0、7d 分别于腹腔注射疫苗免疫。观察小鼠的死亡情况, 并记录。使用抗体的量为 200IU/kg, SO57+SOJB 为 1:1 混合, 以 HRIG 为对照品, 死亡小鼠用脑涂片法检验是否感染狂犬病病毒。攻击毒株选取了 3 株街毒株: CQ92、“简”、SBD。3 株街毒株的试验设计见表 2。

11 NM57 对小鼠街毒暴露后的治疗 16~18g 雌性 BALB/c 小鼠, 分成 4 组, 每组 10 只小鼠, 小鼠于 0d 大腿肌肉注射 80%致死量狂犬病病毒街毒株 0.1ml(染色确定部位), 0.5~1h 后同部位肌肉注射单抗 NM57200IU/kg 或 HRIG200IU/kg, 0d、7d 分别于腹腔注射疫苗免疫。观察并记录小鼠的死亡情况。这项实验中只选取了一株街毒株“简”作为攻击毒株, 试验设计见表 3。

表 2 单克隆抗体 SO57 和 SOJB 对小鼠街毒暴露后的治疗实验设计
Table 2 PEP experimental design in mouse model against street rabies virus

Group	Vaccine	SO57	SO57+SOJB	HRIG	Street RV
		200IU/kg	200IU/kg	200IU/kg	
SO57	+	+	—	—	+
SO57+	+	—	+	—	+
SOJB	+	—	—	+	+
HRIG	+	—	—	+	+
Vaccine	+	—	—	—	+
Control	—	—	—	—	+

BALB/c female mice were challenged i. p. with street RVs on day 0 and labeled the injection position with dye, then they were vaccinated i. m. with rabies vaccine and treated i. p. in the same part with 200IU/kg SO57, SO57+SOJB, or HRIG, respectively after 0.5~1 h. Vaccine group received no antibody treatment. Control group received neither antibody nor vaccine treatment. Animals were monitored daily and euthanized when clinical signs of rabies appeared. ‘+’. Injected with; ‘—’. No injection.

表 3 NM57 对小鼠街毒“简”株暴露后的治疗实验设计
Table 3 PEP experimental design of NM57 in mouse model against street rabies virus ‘Jian’

Group	Vaccine	NM57 200IU/kg	HRIG 200IU/kg	“Jian” challenge
NM57	+	+	—	+
HRIG	+	—	+	+
Vaccine	+	—	—	+
Control	—	—	—	+

BALB/c female mice were challenged i.p. with street RV ‘Jian’ on day 0, and labeled the injection position with dye. They were vaccinated i.m. with rabies vaccine and treated i.p. in the same part with 200 IU/kg NM57 or HRIG. Vaccine group received no antibody. Control group received neither antibody nor vaccine. Animals were monitored daily and euthanized when clinical signs of rabies appeared. ‘+’, Injected with; ‘—’, No injection.

结 果

1 RFFIT 法测定 3 株抗体的效价

使用 WHO 抗狂犬病病毒免疫球蛋白国际标准, RFFIT 法测定用于动物实验模型的抗体的中和效价。结果见表 4。

表 4 RFFIT 法测定待评估抗体的效价

Antibodies	Potency (IU/ mL)
SO57	2745
SOJB	803
NM 57	384
HRIG	54

2 暴露后治疗的中国仓鼠模型 中国仓鼠在 SBD 株病毒暴露后, 抗体的治疗对动物的保护结果见图 1。

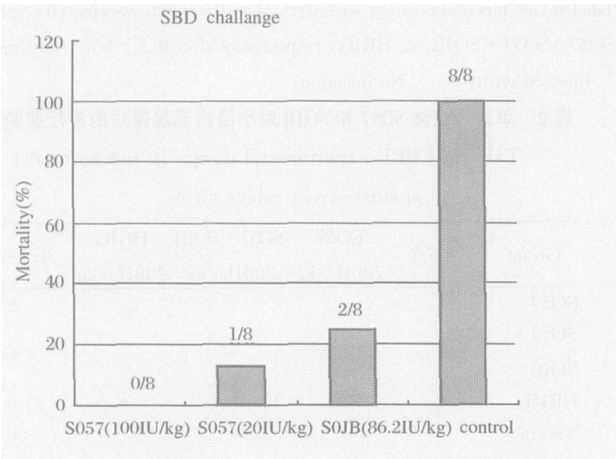


图 1 中国仓鼠模型 CVS-11 暴露后治疗效果
Figure 1 PEP in hamster model by SO57 and SOJB comparing with that of HRIG

3 单克隆抗体 SO57 和 SOJB 对小鼠被 CVS 病毒暴露后的治疗 BALB/c 小鼠被 CVS 病毒攻击后, 疫苗与抗体的联合治疗效果见图 2。

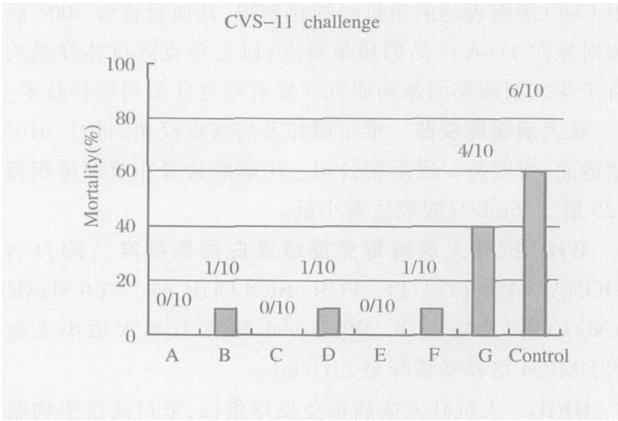


图 2 单克隆抗体 SO57 和 SOJB 对 CVS 暴露后小鼠的治疗
Figure 2 PEP in mouse model by SO57, SOJB and HRIG when challenged with CVS-11

4 单克隆抗体 SO57 和 SOJB 对小鼠街毒暴露后的治疗 BALB/c 小鼠被街毒 CQ92、“简”、SBD 攻击后, 疫苗与抗体的联合治疗效果分别见图 3、4、5。

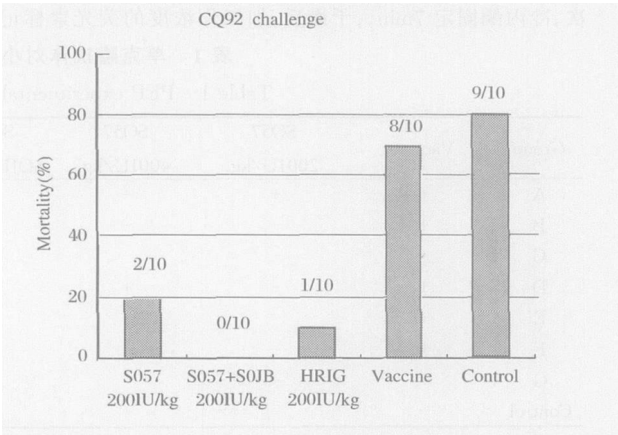


图 3 单克隆抗体 SO57 和 SOJB 对街毒 CQ92 株暴露后小鼠的治疗
Figure 3 PEP in mouse model by SO57, SOJB and HRIG when challenged with street virus C Q92

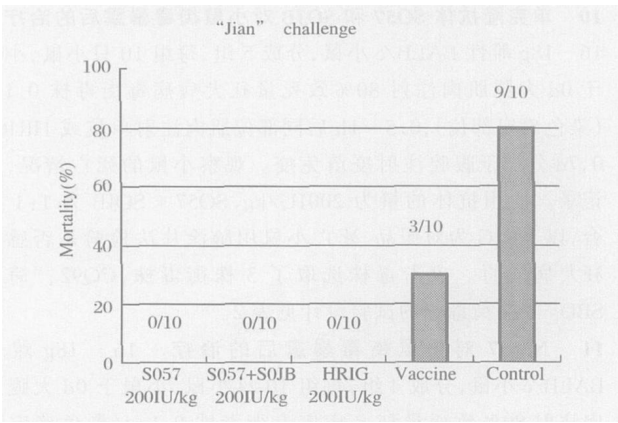


图 4 单克隆抗体 SO57 和 SOJB 对街毒“简”株暴露后小鼠的治疗
Figure 4 PEP in mouse model by SO57, SOJB and HRIG when challenged with street virus ‘jian’

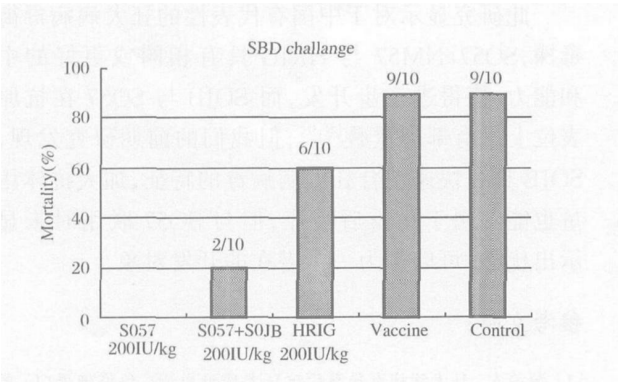


图 5 单克隆抗体 SO57 和 SOJB 对小鼠街毒 SBD 株暴露后的治疗

Figure 5 PEP in mouse model by SO57, SOJB and HRIG when challenged with street virus SBD

5 NM57 对小鼠街毒暴露后的治疗 BALB/c 小鼠被街毒“简”攻击后, 疫苗与 NM57 抗体的联合治疗效果见图 6。

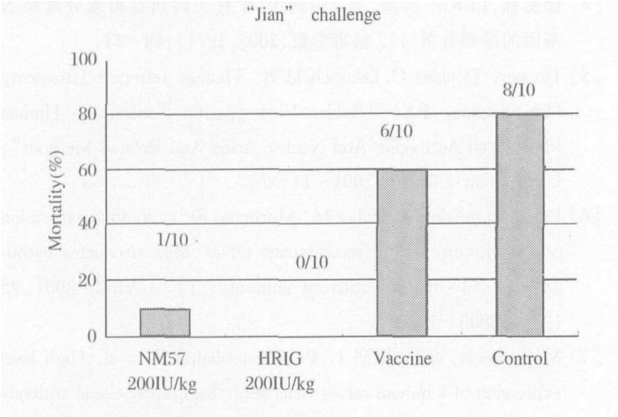


图 6 单克隆抗体 NM57 对小鼠街毒“简”株暴露后的治疗

Figure 6 PEP in mouse model by NM57 and HRIG when challenged with street virus “Jian”

讨 论

SO57 和 SOJB 是 Dietzschold B. 等从免疫后的志愿者外周血 B 淋巴细胞中利用杂交瘤技术制备的人抗狂犬病病毒单克隆抗体, 这两株抗体经重组病毒表达系统在 BSR 细胞中制备^[6], 它们能够高效和广泛地中和狂犬病病毒并且对狂犬病病毒攻击的实验室啮齿动物可以起保护作用。荷兰 Crucell 的研究者们利用重组 PER.C6 细胞表达系统, 制备了单克隆抗体 CR57 和 CRJB, 对这两株抗体做了深入研究^[9]。已有的资料表明 SO57 和 CR57 对狂犬病病毒固定株及街毒株的中和谱相当广泛, 除来源于 Skunk (美国中南部), Bat (*Eptesicus fuscus*-Myotis spp., CO) 及 EB2 与 HRIG 显示有差别外, 对其余各

株不同来源的狂犬病病毒均具有中和活性。SO57 和 CR57 对狂犬病病毒固定株及街毒株的中和谱见表 5。

表 5 SO57 和 CR57 对狂犬病病毒固定株及街毒株的中和谱

Table 5 Breadth of SO57 and CR57 neutralization against Fixed and street rabies viruses

Lyssavirus (source and/or strain)	HRIG	SO57/CR57
CVS-11	+	+
Raccoon,	+	+
Gray	+	+
Gray	+	+
Arctic	+	+
Coyote,	+	+
Dog/Coyote	+	+
Skunk, north central	+	+
Skunk, south central	+	-
Skunk, CA	+	+
Mongoose,	+	+
Dog, Argentina	+	+
Dog, Sonora	+	+
Dog, Gabon	+	+
Dog, Thailand	+	+
Bat, <i>Lasiurus borealis</i> , TN	+	+
Bat, <i>Eptesicus fuscus</i> - <i>Myotis</i> spp., CO	+	-
Bat, <i>Myotis</i> spp., WA	+	+
Bat, <i>Lasiurus cinereus</i> , AZ	+	+
Bat, <i>Lasiurus cinereus</i> , NY	+	+
Bat, <i>Pipistrellus subflavus</i> , AL	+	+
Bat, <i>Tadarida brasiliensis</i> , AL	+	+
Bat, <i>Lasionycteris noctivagans</i> ,	+	+
Bat, <i>Pipistrellus hesperus</i> , CA	+	+
WA Bat, <i>Eptesicus fuscus</i> , PA	+	+
Bat, <i>Desmodus rotundus</i> , TN/MX	+	+
Bat, <i>Desmodus rotundus</i> , Brazil	+	+
PM	+	+
ERA	+	+
DRV-4	+	+
SHBRV-18	+	+
EB1	-	-
EB2	+	-
Lagos bat	-	-
Mokola	-	-

此研究把 SO57 的基因转入重组 CHO 细胞表达, 经纯化制得的单抗命名为 NM57。因使用与 SO57 完全相同的基因序列, 因此 SO57、CR57 及 NM57 理论上应具有相似的生物学活性。在此项研究中所采用的单克隆抗体, 无论是由重组病毒系统表达的 SO57 还是用重组 CHO 细胞表达的 NM57, 确实具有相似的生物学活性, 在狂犬病病毒暴露后治疗小鼠模型中对小鼠的保护率相近。

在本研究中经过多次试验, 将批号 u1652 的维

尔博疫苗以体积比 1:125 倍稀释后, 0d、7d 免疫小鼠, 在 14d 时测得小鼠血清的中和抗体浓度是 25IU/mL, 因而确定在小鼠暴露后治疗模型中疫苗的用量。

抗体与疫苗对狂犬病病毒暴露后治疗的小鼠模型鲜有先例, 在 CVS 攻击组中, 200IU/kg 的剂量(换算成人用剂量应为 20IU/kg)的 SO57 和 HRIG, 具有相同的保护效果。但相同剂量的联用 SOJB 与 SO57 混合抗体未显示更好的保护效果。不论是 SO57 还是 HRIG, 提高抗体用量并未得到 100% 的保护效果。究竟是抗体用量与 10% 的死亡率相关还是偶然因素引起的, 值得今后深入研究。

在街毒攻击试验中, SO57 均与 HRIG 显示了相当或更好的保护效果, 特别是对中国流行株 SBD 的保护, SO57 为 100% 而 HRIG 仅为 40%, 应值得警惕。我国未对 HRIG 与街毒流行株的保护进行过详尽的研究(至少无公开报道), 对我国狂犬病的防控十分不利。另一个现象是, 无论 CVS 攻击还是街毒攻击, 仅靠疫苗的保护是不够的, 特别是对 SBD 株和 CQ92 株, 单纯疫苗的保护效果只有 20% 左右; 对于简株, 因潜伏期相对较长, 单独使用疫苗有 70% 的保护率, 也说明在缺少抗体与疫苗的联合使用情况下, 对某些狂犬病病毒毒株的感染, 疫苗本身有一定的防治效果, 但不可能 100% 保护。所以提醒被犬咬伤的病人切不可抱侥幸心理, 只注射疫苗, 一定要按照 WHO 推荐的方法处理伤口以及同时注射抗体与疫苗。

被国际上认可的中国仓鼠暴露后治疗模型中, 由于实验设计中没有预期单抗会 100% 保护被狂犬病病毒街毒株攻击的中国仓鼠, 所以 SOJB 只试验了一个剂量。这个实验中, SO57 显示了极大的潜力, 单独使用 100IU/kg 的 SO57 能够完全保护被 SBD 株攻击的中国仓鼠。而 SOJB 也显示了高达 70%~80% 的保护率。

此研究显示对于中国有代表性的狂犬病病毒街毒株, SO57/NM57 与 HRIG 具有相同或更好的中和能力, 值得进一步开发, 而 SOJB 与 SO57 在抗原表位上虽有部分重叠^[8-9], 但我们的前期研究发现, SOJB 具有快速结合狂犬病病毒的特征, 加大抗体用量也能够用于暴露后治疗, 但与 SO57 联用时未显示出优势, 可以作为一个潜在的开发对象。

参考文献:

- [1] 董关木. 狂犬病病毒暴露后抗狂犬病血清(免疫球蛋白)的地位和应用[J]. 中国计划免疫, 2005, 11(2):144—146.
- [2] Dietzschold B, Gore M, Casali P. Biological characterization of human monoclonal antibodies to rabies virus[J]. J Virology, 1990, 64(6):3087—3090.
- [3] 刘胜牙, 严家新, 徐葛林, 等. 我国流行的 4 株狂犬病病毒街毒 G 蛋白基因序列及分子流行病学研究[J]. 中国生物制品学杂志, 2004, 17(3):129—132.
- [4] 徐葛林, Li Ku, 吴杰, 等. 中国 19 个狂犬病病毒街毒分离株 N 基因的序列分析[J]. 病毒学报, 2002, 18(1):48—51.
- [5] Hooper, Douglas C, Dietzschold B. Thomas Jefferson University (Philadelphia, PA) “ Rabies Virus-Specific Neutralizing Human Monoclonal Antibodies And Nucleic Acids And Related Methods”, USA patent: 848832, 2001—11—22.
- [6] Pulmanausahakul R, Faber M, Morimoto K, et al. Overexpression of Cytochrome c by a recombinant rabies virus attenuates pathogenicity and enhances antiviral immunity [J]. J Virol, 2001, 75(22):10800—10807.
- [7] Morimoto K, Schnell M J, Pulmanausahakul R, et al. High level expression of a human rabies virus-neutralizing monoclonal antibody by a rhabdovirus-based vector[J]. Immunol Meth, 2001, 252:199—206.
- [8] Champion J M, Kean R B, Rupprecht C E, et al. The development of monoclonal human rabies virus-neutralizing antibodies as a substitute for pooled human immune globulin in the prophylactic treatment of rabies virus exposure[J]. Immunol Meth, 2000, 235:81—90.
- [9] Bakker A B H, Maissen W E, Kramer R A, et al. Novel human monoclonal antibody combination effectively neutralizing natural rabies virus variants and individual *in vitro* escape mutants[J]. J Virol, 2005, 79(14):9062—9068.

Study on Neutralizing Potency to Different Rabies Virus Strains of the Recombinant Human Anti-rabies Virus McAbs SO57 and SOJB

JIA Qian¹, XU Ge-lin², ZHAO Wei¹, WU Jie², ZHENG Xin-xiong²

(1. North China Pharmaceutical Group Corporation, Shijiazhuang 050015, China;

2. Wuhan Institute of Biological Products, Wuhan 430060, Hubei, China)

Abstract: Neutralizing potency of the patent recombinant anti-rabies virus McAbs, SO57 and SOJB, have been investigated broadly to different rabies virus strains in various animal models. 100% Chinese Hamsters could be protected by 100IU/kg SO57 against China prevalent street rabies virus named SBD. We firstly established the mouse model to simulate human postexposure prophylaxis (PEP) by rabies virus and found SO57 had the same function with HRIG against CVS or three China typical street rabies viruses. However, HRIG could not 100% protect the mice challenged with SBD street virus, rabies virus vaccine alone could not save life from rabies virus infection. The cocktail containing SOJB and SO57 (1:1) did not do better than SO57 alone. SO57 alone can be used for PEP and replaces HRIG in China.

Key words: rabies virus; monoclonal antibody; neutralizing potency ; postexposure prophylaxis