

鼠单克隆抗-HBs的单克隆抗独特型 抗体的制备及其免疫原性的研究

Ⅱ. Ab2-1的免疫原性研究

王海涛 陈万荣 蒋豫图

(军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京100071)

提 要

用一株单克隆抗独特型抗体细胞株, Ab2-1免疫4只BALB/c小鼠和2只家兔。每只小鼠每次经腹腔接种100 μ gAb2-1, 共接种4次; 每只家兔每次经皮下注射1mgAb2-1, 共注射4次。经免疫的小鼠和家兔都产生了抗-HBs, 经两种竞争性抑制试验证实, 这些抗-HBs是特异性的。小鼠抗-HBs滴度为 2^{-6} 至 2^{-9} ; 家兔抗-HBs滴度从 2^{-10} 至 2^{-12} 。这些资料提示: 单克隆抗独特型抗体能模拟HBsAg, 具有类似HBsAg的免疫原性。

关键词: 抗独特型抗体 单克隆抗体 乙型肝炎疫苗

乙型病毒性肝炎是目前世界上重要传染病之一。在我国, 约有一亿人携带乙型肝炎表面抗原(HBsAg)。此外, 乙型肝炎病毒可能是肝癌的主要病因。尽管血源性乙肝疫苗, 遗传工程乙肝疫苗已经广泛应用, 而且效果很好。但是, 仍约有5%的疫苗接种者对现有乙肝疫苗无应答, 一些HBsAg携带者母亲的婴儿以及免疫功能受损的人对乙肝疫苗应答较差^[1,2,3]。很可能这些无应答者感染乙型肝炎病毒后易成为HBsAg慢性携带者。因此, 有必要寻找另外途径生产疫苗以弥补现有乙肝疫苗的不足。

Kennedy等人^(4,5,6)首先用人乙型肝炎表面抗体(抗-HBs)制备出具有免疫原性的多克隆抗-Id, 但实用价值受到限制。Thanavala等^(7,8)用鼠单克隆抗-HBs制备出单克隆抗独特型抗体(抗-Id), 但未报告这种抗-Id是否具有免疫原性。

我们利用鼠单克隆抗-HBs制备出单克隆抗-Id⁽⁹⁾, 它们可能带有HBsAg的内部影象。本文报告其中一株抗-Id, Ab2-1在同种和异种动物中的免疫原性研究结果。

材 料 与 方 法

一、固相放射免疫测定(SPRIA)

HBsAg对Ab2-1与¹²⁵I-Ab1结合的抑制试验和Ab2-1对HBsAg与¹²⁵I-Ab1结合抑制试验如前文所述¹⁰⁾。

1. 免疫动物血清中抗-HBs的测定: HBsAg包被(100 μ l/孔, 10 μ l/ml)聚苯乙烯微量板,

本文于1986年8月9日收到。

4℃过夜; 1%牛血清白蛋白(BSA) 37℃封闭2小时; 洗板后, 分别加入免疫小鼠或家兔血清, 4℃3小时; 洗板后, 再分别加入¹²⁵I-羊抗鼠IgG和¹²⁵I-羊抗兔IgG, 4℃3小时; 洗板后, γ计数器计数, S/N≥2.1时判为阳性。阴性对照分别为正常小鼠和正常家兔1:10稀释的混合血清。

2. 免疫家兔血清抗正常小鼠IgG测定: 正常BALB/c小鼠IgG包被; 1%BSA封闭; 洗板后, 加入倍比稀释的免疫家兔血清, 4℃3小时; 洗板后, 加入¹²⁵I-羊抗兔IgG, 4℃3小时; 阴性对照为免疫前家兔血清。S/N≥2.1时判为阳性。

3. 免疫小鼠抗-HBs的特异性试验: 此项试验程序同前文^[9]的抗-Id对HBsAg与Ab₁结合的抑制试验, 只是用免疫小鼠血清代替抗-Id。

4. 免疫家兔抗-HBs的特异性试验: 用两种竞争性抑制试验证实家兔抗-HBs的特异性。

1) HBsAg包被, 1%BSA封闭; 洗板后, 同时加入50μl待检血清和50μl¹²⁵I-马抗-HBs;

2) 马抗-HBs包被, 1%BSA封闭; 洗板后, 同时加入50μl待检血清和等量¹²⁵I-HBsAg;

上述阴性对照均为1:10稀释免疫前家兔血清加等量的上述标记物。其它试验程序和抑制率计算同前文^[9]。

二、抗-Id免疫动物

纯化的抗-Id, Ab₂-1株经腹腔免疫4只成年BALB/c小鼠(本院实验动物中心), 100μg/只/次, 初次免疫加福氏完全佐剂, 加强免疫加福氏不完全佐剂。共免疫4次。免疫间隔分别为15、45、15天。第二、三、四次免疫后的10天取血。

两只成年家兔(本院实验动物中心)接受4次纯化的Ab₂-1皮下注射, 1mg/只/次。初次注射加福氏完全佐剂, 后3次注射加福氏不完全佐剂。注射间隔时间分别为15、21和42天。第三次和第四次注射后10天取血。

结 果

一、Ab₂-1与HBsAg和Ab₁之间的关系

鉴于8株抗-Id中, Ab₂-1与Ab₁的结合滴度最高, 1mg/ml为 8×10^{-9} ; 它对¹²⁵I-Ab₁与HBsAg结合的50%抑制所需浓度最低(1ng, 图1)。此外, HBsAg对Ab₂-1与

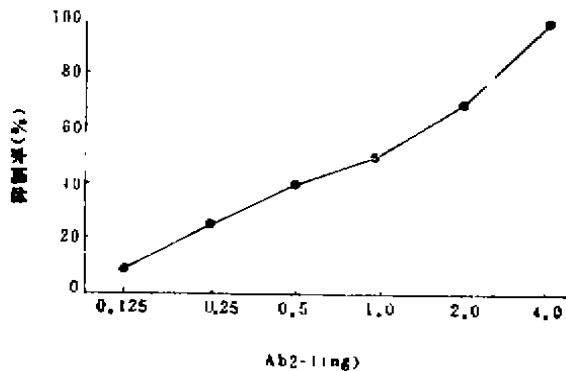


图1 Ab₂-1对¹²⁵I-Ab₁与HBsAg结合的抑制
Fig.1 Inhibition of Ab₂-1 on the combination between ¹²⁵I-Ab₁ and HBsAg

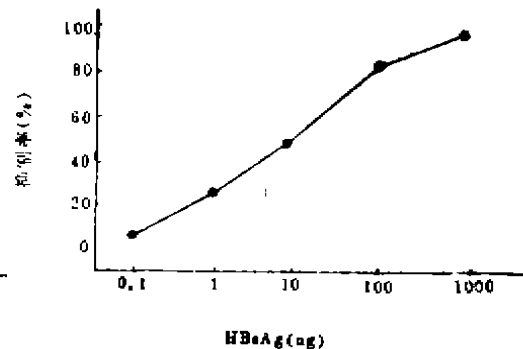


图2 HBsAg对¹²⁵I-Ab₁与Ab₂-1结合的抑制
Fig.2 Inhibition of HBsAg on the combination between ¹²⁵I-Ab₁ and Ab₂-1

Ab₁结合的50%抑制率所需浓度最低(约10ng, 图2)。因此, Ab₂₋₁很可能带有HBsAg的内部影象, 从而选择它作为免疫原性研究。

二、在同种动物中免疫原性

经Ab₂₋₁免疫的BALB/c小鼠都产生了抗-HBs, 但是, 经两次、三次和四次免疫后的抗-HBs滴度变化不大(表1)。

表1 Ab₂₋₁免疫BALB/c小鼠血清抗-HBs滴度
Table 1 Anti-HBs titres in sera of BALB/c mice immunized with Ab₂₋₁

BALB/c	两次免疫 Second immunization	三次免疫 Third immunization	四次免疫 Fourth immunization
1	2 ⁻⁷	—	} 2 ⁻⁹
2	2 ⁻⁸	—	
3	—	2 ⁻⁸	} 2 ⁻⁸
4	—	2 ⁻⁸	
—未测定	}血清混合		
—Not detected	}Serum pool		

BALB/c小鼠的抗-HBs的特异性经两种不同的竞争性抑制试验所证实。但显示50%抑制率的血清终点滴度都不高(表2)。

表2 Ab₂₋₁免疫BALB/c小鼠抗-HBs的特异性试验
Table 2 Specific test for anti-HBs in BALB/c mice immunized with Ab₂₋₁

BALB/c	50%抑制时的血清滴度 Serum titre with 50% inhibition rate	
	125I-Ab ₁ 与HBsAg	125I-HBsAg与Ab ₁
1*	2 ⁻³	—
2	2 ⁻³	—
3**	2 ⁻⁴	2 ⁻⁴
4	2 ⁻³	2 ⁻³

- 未测定
* 1,2号小鼠结果为两次免疫后血清结果
** 3,4号小鼠结果为三次免疫后血清结果
— Not detected
* Mouse 1, 2 with two times of immunization
** Mouse 3, 4 with three times of immunization

三、在异种动物中的免疫原性

表3显示了经Ab₂₋₁免疫家兔血清中的抗-HBs滴度, 四次免疫后的滴度比三次免疫后的滴度有较大的增高。

从表3也可以看出, 家兔血清中的抗正常小鼠IgG的滴度很高, 2⁻²⁰, 大大高于血清中抗-HBs活性, 大约为1,000倍。

同样, 家兔的抗-HBs的特异性也为两种不同的竞争性抑制试验证实(表4)。

从上述结果不难得出结论: 单克隆抗-HBs的带内部影象的单克隆抗-Id, Ab₂₋₁株可以在同种和异种动物体内诱导出特异性的抗-HBs₀。

表 3 免疫家兔血清的抗-HBs 和抗正常小鼠 IgG 的滴度
Table 3 Serum anti-HBs and anti-mouse IgG in the immunized rabbits

Rabbit	抗-HBs滴度 Anti-HBs titre		与正常小鼠 IgG 结合滴度 Titre of anti-mouse IgG
	三次免疫 Third immunization	四次免疫 Fourth immunization	
	1	2 ⁻⁶	
2	2 ⁻⁷	2 ⁻¹²	2 ⁻¹¹

表 4 免疫家兔血清的抗-HBs 的特异性试验*
Table 4 Specific test for anti-HBs in the immunized rabbits

Rabbit	50% 抑制时的血清滴度 Serum titre with 50% inhibition rate	
	¹²⁵ I-HBsAg with horse anti-HBs	Horse ¹²⁵ I-anti-HBs with HBsAg
	1	2 ⁻⁵
2	2 ⁻⁵	2 ⁻⁵

* 四次免疫后的血清结果

* 4 times of immunization

讨 论

首次用抗-Id 诱导小鼠产生抵抗锥虫感染的免疫力是 Sacks 及其同事 1982 年的开创性工作^[10,11]。并由此项研究导致抗-Id 作为疫苗的构想。此后,利用抗-Id 作为免疫原在实验动物中成功地预防了细菌病^[12,13], 寄生虫病^[14,15]和病毒病^[16,17]。

我们利用鼠单克隆抗-HBs 制备出 8 株单克隆抗-Id⁽⁸⁾, 它们与 Ab₁ 的结合能被 HBsAg 所抑制。其中一株抗-Id, Ab₂-1 在小鼠和家兔体内能诱导出特异性抗-HSs。这说明, 单克隆抗-Id 确实是带有 HBsAg 内部影象的抗-Id, 能模拟 HBsAg, 在实验动物中具有类似 HBsAg 的免疫原性。从具有类似 HBsAg 免疫原性这一角度讲, 单克隆抗-Id 可以作为另一种预防乙型肝炎的疫苗。但是, 单克隆抗-Id 在异种动物体内诱异出的抗小鼠 IgG 的滴度大大高于抗-HBs 滴度, 约高 1,000 倍。这是抗-Id 疫苗目前所面临的共同难题。也是抗-Id 疫苗目前还限于动物实验的主要原因之一, 然而, 目前兴起的理论和技术有可能克服上述缺点, 如嵌合抗体 (Chimeric antibodies)、改造抗体 (reshaped antibodies), 工程化可变区 (engineering variable regions), 以及工程化稳定区 (engineering constant regions) 等, 能保留抗-Id 的优点, 弥补其不足, 从而为抗-Id 疫苗走向实用阶段开辟广阔前景^[18,19]。

可以肯定地说, 目前的抗-Id 乙肝疫苗不可能完全取代现有的乙肝疫苗。但也许能应用于那些对目前乙肝疫苗无应答和应答差的人, 还有可能用于那些 HBsAg 携带者。因为现有研究表明, 对某一抗原呈现的免疫耐受状况可由给予该抗原不同形式的分子所打破^[20]。因此, 有必要在体外进行这类实验。

参 考 文 献

- [1] Stevens, C.E. et al., 1984, *Viral Hepatitis and Liver Diseases*, 275-291, Florida: Grune and Stratton.
- [2] Beasley, R.P. et al., 1983, *Lancet*, ii, 1099.
- [3] Hadler, S.C. et al., 1986, *New Eng J Med*, 315: 209.
- [4] Kennedy, R.C. et al., 1983, *J Immunol*, 130: 385.
- [5] Kennedy, R.C. et al., 1986, *Virology*, 148: 389.
- [6] Kennedy, R.C. et al., 1986, *Science*, 232: 220.
- [7] Thanavala, Y. et al., 1985, *Immunology*, 55: 197.
- [8] Thanavala, Y. et al., 1986, *J Exp Med*, 164: 227.
- [9] 王海涛等, 实验和临床病毒学杂志 (待发表)
- [10] Sacks, D.L. et al., 1982, *J Exp Med*, 155: 1108.
- [11] Sacks, D.L. et al., 1985, *J Immunol*, 135: 4155.
- [12] McNamara, M.K. et al., 1984, *Science*, 226: 1325.
- [13] Stein, K. and Soderstrom, T., 1984, *J Exp Med*, 160: 1001.
- [14] Sacks, D.L. and Sher, A., 1983, *J Immunol*, 131: 1511.
- [15] Grayh, J.M. et al., 1985, *Nature*, 316: 74.
- [16] Reagan, K.J. et al., 1983, *J Virol*, 48: 660.
- [17] Ertl, H.C.J. and Finberg, R.W., 1984, *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 81: 2858.
- [18] Marx, J.L., 1986, *Science*, 229: 455.
- [19] Vernooyen, M. and Riechmann, L., 1988, *BioEssays*, 8: 74.
- [20] Kieber-Emmons, T. et al., 1986, *Intern Rev Immunol*, 1: 1.

The Preparation of Monoclonal Anti-idiotypic Antibodies Against Mouse Monoclonal Anti-HBs and Their Immunogenicity

II. The Study on Immunogenicity of Ab₂-1

Wang Hai-tao, Chen Wan-rong, Jiang Yu-tu

(Institute of Microbiology and Epidemiology Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071)

The Ab₂-1 was used to immunize four BALB/c mice and two rabbits. Each mouse received inoculation of 100 μ g of Ab₂-1 for four times intraperitoneally. Each rabbit was injected with 1 mg of Ab₂-1 for four times subcutaneously. All the mice and rabbits immunized with Ab₂-1 produced anti-HBs antibodies, specificity of which also was confirmed by two types of competitive inhibition test (SPRIA). The titers of mouse anti-HBs were from 2⁻⁶ to 2⁻⁹, the anti-HBs titers of rabbit sera varied from 2⁻¹⁰ to 2⁻¹². These data indicate that monoclonal anti-idiotypic antibodies could mimic HBsAg and possess the immunogenicity of HBsAg.

Key words: Anti-idiotypic antibodies Monoclonal antibodies HB vaccines