·生物医药前沿·

狂犬病人免疫球蛋白的药效学研究

刘　波[1],杨　硕[2],秦婷婷[1],张聪明[1],陆婷婷[1],李小姣[1],张　航[1],杨黎明[1],武志强[2],孙　勇[1]
(1 成都蓉生药业有限责任公司,成都 610041,2 成都生物制品研究所有限责任公司,成都 610023)

[摘要] **目的**:实验室内确认狂犬病人免疫球蛋白(human rabies immunoglobulin,HRIG)有效性。**方法**:通过动物体内实验展示 HRIG 所含中和抗体具有中和狂犬病病毒保护活体动物的作用;体外细胞学实验展示 HRIG 所含中和抗体具有中和病毒保护细胞作用。**结果**:中和抗体浓度 0.006 和 0.003 IU·mL^{-1}组小鼠存活率为 0,0.012 IU·mL^{-1}组小鼠存活率为 16.7%,0.024 IU·mL^{-1}组小鼠存活率为 41.7%,0.048 IU·mL^{-1}组小鼠存活率为 75.0%,0.095,0.190 和 0.380 IU·mL^{-1}组小鼠存活率为 100%;中和抗体浓度 0.317 和 0.951 IU·mL^{-1}组病毒感染细胞抑制率为 100%,0.106 IU·mL^{-1}组病毒感染抑制率为 99%,0.035 IU·mL^{-1}组病毒感染抑制率为 58%,0.012 IU·mL^{-1}组病毒感染抑制率趋近于 0,HRIG 降低病毒感染力的程度随着中和抗体浓度降低而降低。**结论**:HRIG 在体内外均能有效中和病毒,并具有良好的量效关系。

[关键词] 狂犬病人免疫球蛋白;药效学;有效性;量效关系
[中图分类号] R978.7　[文献标志码] A　[文章编号] 1003-3734(2021)19-1783-04

Pharmacodynamics study of human rabies immunoglobulin

LIU Bo[1], YANG Shuo[2], QIN Ting-ting[1], ZHANG Cong-ming[1], LU Ting-ting[1], LI Xiao-jiao[1], ZHANG Hang[1], YANG Li-ming[1], WU Zhi-qiang[2], SUN Yong[1]
(1 *Chengdu Rongsheng Pharmaceutical Co., Ltd., Chengdu* 610041, *China*; 2 *Chengdu Institute of Biological Products Co., Ltd., Chengdu* 610023, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To confirm the efficacy of human rabies immunoglobulin (HRIG). **Methods**: Animal experiments was used to show the protection effect of the neutralizing antibody contained in HRIG on living animals to neutralize rabies virus *in vivo*. The function of neutralizing antibody contained in HRIG to neutralize and protect cells was evaluated by cytology experiments *in vitro*. **Results**: The survival rate of mice was 0 in 0.006 and 0.003 IU·mL^{-1} groups, 16.7% in 0.012 IU·mL^{-1} group, 41.7% in 0.024 IU·mL^{-1} group, 75.0% in 0.048 IU·mL^{-1} group, and 100% in 0.095, 0.190 and 0.380 IU·mL^{-1} groups. The inhibition rate of virus-infected cells was 100% in 0.317 and 0.951 IU·mL^{-1}, 99% in 0.106 IU·mL^{-1}, 58% in 0.035 IU·mL^{-1}, close to 0 in 0.012 IU·mL^{-1}. The degree of HRIG reducing viral infectivity decreases as the concentration of neutralizing antibodies decreasing. **Conclusion**: HRIG can neutralize the virus effectively *in vivo* and *in vitro*, and has a good dose-response relationship.

[**Key words**] human rabies immunoglobulin; pharmacodynamics; effectiveness; dose-effect relationship

狂犬病是由狂犬病病毒(rabies virus,RV)引起的人兽共患疾病。狂犬病病毒为弹状病毒科、狂犬病病毒属[1],具有高度嗜神经性。狂犬病病毒感染后,经典途径是由周围神经感染传入中枢神经系统进行大量繁殖,导致患者死亡。狂犬病是死亡率 100% 的高致死性疾病[2-3]。被带毒的动物咬伤或抓伤后,必须立即注射疫苗以获得保护,但是在疫苗注射后产生足够滴度保护性抗体尚需要一定的时

[作者简介] 刘波,女,医学生物高级工程师,主要从事血液制品特免球蛋白研制。E-mail:liuboxys@126.com。
[通讯作者] 孙勇,男,医学生物工程师,质量检定部副经理,主要从事血液制品质量控制。E-mail:sunyong3@sinopharm.com。

间,为了获得更好的保护,需要使用狂犬病人免疫球蛋白(human rabies immunoglobulin,HRIG)来获得被动免疫,所以,所有属于世界卫生组织(WHO)定义为Ⅲ类暴露的患者,都应在其黏膜上或穿透皮肤的伤口内使用 HRIG[4-5]。

HRIG 系用人用狂犬病疫苗免疫供血浆者,采集含高效价狂犬病抗体的血浆,经低温乙醇蛋白分离法分离纯化,并经低 pH 孵育灭活病毒制备的人免疫球蛋白液体制剂。HRIG 为被动免疫制剂,主要药效成份为狂犬病病毒特异性人免疫球蛋白,它无需机体应答就能够在患者的暴露部位立即提供中和抗体(neutralizing antibody)中和病毒[6],即直接提供被动保护。美国疾病预防控制中心(CDC)认为 HRIG 与狂犬病疫苗联用的保护率可达 100%[7]。

HRIG 中所含中和抗体对进入体内的狂犬病病毒产生中和效应,阻止狂犬病病毒侵入宿主细胞,防止狂犬病的发生。本研究通过小鼠体内实验,研究对活体动物的有效保护作用;通过体外敏感细胞实验,研究对细胞的有效保护作用。

材料与方法

1 实验样品和试剂

成都蓉生药业有限责任公司研制 HRIG,批号:201407P01,中和抗体效价为 231 IU·mL^{-1}。DMEM(Gibco 公司,货号:12100-038);胎牛血清(浙江天杭生物有限公司,货号:11012-8611);荧光标记狂犬病病毒核蛋白抗体(Fujirebio Diagnostics,Inc,货号:800-092)。

2 主要仪器

BSC-1500IIA2-X 生物安全柜(济南鑫贝西生物技术有限公司);IX73 荧光显微镜(奥林巴斯公司);2406 -2 型 CO_2 培养箱(Shellab 公司)。

3 细胞和病毒株

细胞株:仓鼠肾细胞(BSR,中国食品药品检定研究院);病毒株:狂犬病病毒 CVS-11 株、狂犬病病毒 CVS 株(中国食品药品检定研究院)。

4 实验动物

体重为 10 ~ 12 g(鼠龄约 17 ~ 19 d)的 SPF 级昆明小鼠[成都生物制品研究所有限责任公司,生产许可证号:SCXK(川)2011-008,使用许可证号:SYXK(川)2011-090]。小鼠饲养于 SPF 级动物房,每笼 6 只在 IVC-II 独立送风笼具中饲养,环境条件控制在室温 20 ℃ ~26 ℃、相对湿度 40% ~70%。

5 小鼠脑内中和实验

CVS 株按照《中华人民共和国药典》3512“狂犬病免疫球蛋白效价测定法”要求进行病毒制备建库和毒力预测。

先根据 CVS 株毒力情况,将病毒株稀释到 100 LD_{50},再进行 10 倍系列稀释到 1×10^{-3},将 1 ~ 1 × 10^{-3}倍稀释(即浓度 100,10,1,0.1 LD_{50})浓度病毒注射小鼠,每组 6 只,0.03 mL 脑内接种,观察记录小鼠死亡情况,建立起小鼠染毒死亡模型。

将样品 HRIG 作 8 个梯度稀释:0.380,0.190,0.095,0.048,0.024,0.012,0.006 和 0.003 IU·mL^{-1},将各稀释梯度的样品分别与 100 LD_{50}的 CVS 株攻击病毒悬液等量混合,并设生理盐水对照。37 ℃孵育 1 h 后,0.03 mL 小鼠脑内接种,每个稀释度及对照组各注射 12 只小鼠。根据模型结果,观察记录小鼠存活情况,计算小鼠存活率。

6 微量快速荧光灶抑制实验

BSR 细胞按照《中华人民共和国药典》检定用细胞要求进行逐级建库,CVS-11 株按照《中华人民共和国药典》3512 要求进行病毒制备建库和滴度预滴。

将病毒进行不同倍数稀释,加入 96 孔板,37 ℃孵育 1 h 后加入细胞,培养 24 h 后用荧光标记的抗狂犬病病毒核蛋白抗体进行荧光染色,以 95% ~ 100% 细胞感染的最低病毒浓度(即荧光灶 95% ~ 100% 的最高稀释倍数)作为攻击病毒浓度,建立起病毒感染细胞模型。

将样品在 96 孔板上进行梯度稀释,中和抗体含量分别为:0.951,0.317,0.106,0.035 和 0.012 IU·mL^{-1},与攻击浓度的病毒液等量混合。37 ℃孵育 1 h 后加入细胞,培养 24 h 后用荧光标记的抗狂犬病病毒核蛋白抗体进行荧光染色。观察记录荧光灶百分比,计算病毒感染抑制率:病毒感染抑制率/% =(1 - 病变率/%)×100%。

结　果

1 小鼠脑内中和实验

死亡模型结果:从 6 ~ 12 d 即可观察到 0 死亡逐步到全死亡全过程,0.1 ~ 100 LD_{50}浓度梯度病毒注射小鼠后,小鼠死亡梯度明显,4 ~ 14 d 可以观察到稳定的小鼠状态结果。因此,以 100 LD_{50}浓度为攻击浓度,以 4 ~ 14 d 作为结果记录时间,结果见表 1。

表 1 小鼠死亡模型结果

病毒浓度 /LD_{50}	注射后死亡数/只													死亡总数 /只
	d 1	d 2	d 3	d 4	d 5	d 6	d 7	d 8	d 9	d 10	d 11	d 12	d 13	d 14	
100	0	0	0	0	0	0	1	5	0	0	0	0	0	0	6
10	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	1	0	0	6
1	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	3
0.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

样品实验结果:0.006 和 0.003 IU·mL^{-1}组小鼠存活率为 0;0.012 IU·mL^{-1}组小鼠存活率为 16.7%;0.024 IU·mL^{-1}组小鼠存活率为 41.7%;0.048 IU·mL^{-1}组小鼠存活率为 75.0%;0.095,0.190 和 0.380 IU·mL^{-1}组小鼠存活率为 100%,结果详见表 2。

表 2 不同样品浓度组小鼠存活情况

抗体浓度 /IU·mL^{-1}	注射后存活数/只											存活率/%
	d 4	d 5	d 6	d 7	d 8	d 9	d 10	d 11	d 12	d 13	d 14	
0.380	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	100.0
0.190	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	100.0
0.095	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	100.0
0.048	12	12	12	12	12	12	10	9	9	9	9	75.0
0.024	12	12	12	12	9	9	9	5	5	5	5	41.7
0.012	12	12	12	11	2	2	2	2	2	2	2	16.7
0.006	12	12	12	9	2	2	2	2	2	0	0	0.0
0.003	12	12	12	9	1	0	0	0	0	0	0	0.0
对照组	12	12	12	10	0	0	0	0	0	0	0	0.0

2 微量快速荧光灶抑制实验

BSR 细胞感染模型荧光染色结果见图 1。

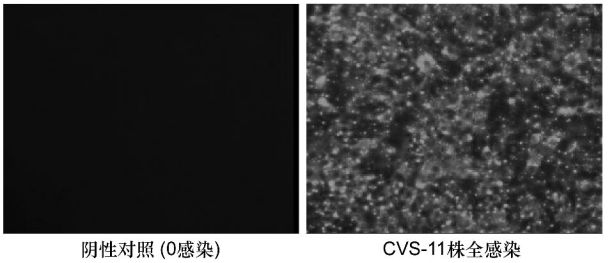


图 1 BSR 细胞感染模型

细胞实验结果:中和抗体浓度 0.317 和 0.951 IU·mL^{-1}组病毒感染细胞抑制率为 100%;0.106 IU·mL^{-1}组病毒感染抑制率为 99%;0.035 IU·mL^{-1}组病毒感染抑制率为 58%;0.012 IU·mL^{-1}组病毒感染抑制率趋近于 0。

讨 论

狂犬病病毒几乎在一切哺乳动物的神经组织中都可以增殖,也可以在禽类组织中增殖。历史上曾经用兔脑、小鼠脑、羊脑培养狂犬病病毒来制备疫苗,国际标准攻击毒株 CVS 株的传代增殖在小鼠脑内进行,因此我们选用小鼠进行体内药效学实验。药效学研究通常是先建立起相应疾病的动物模型,然后在此基础上进行相关的药物药效实验。由于狂犬病病毒是高度嗜神经性病毒,如果用病毒对小鼠脑直接攻击,再注射 HRIG,病毒会快速入侵神经细胞进行大量复制,避开与 HRIG 接触,从而无法体现 HRIG 是否有抗病毒保护作用;因此我们采用小鼠脑内中和法进行实验,将一定毒力病毒与不同浓度 HRIG 进行体外混合,在一定温度下充分接触一定时间,再进行小鼠脑内接种,该方法能直观体现不同浓度 HRIG 的保护作用。

关于体外细胞学实验,由于狂犬病病毒在敏感细胞中增殖时细胞形态改变不明显,我们采用快速荧光灶抑制法进行实验,用荧光标记的抗狂犬病病毒核蛋白抗体进行荧光染色,用荧光灶展示病毒感染,荧光灶量与细胞中病毒感染量成正相关,本品中中和抗体可以中和病毒,从而降低病毒感染保护细胞,体现为荧光灶的减少。通过样品不同中和抗体量降低病毒感染力度呈现中和抗体含量变化对细胞的保护力度的改变。

本次小鼠体内实验结果显示，≤0.006 IU·mL^{-1}浓度组对小鼠没有保护作用，≥0.012 IU·mL^{-1}浓度组的存活率随样品抗体浓度增加而升高，其中≥0.095 IU·mL^{-1}浓度组对小鼠具有良好的保护作用，实验时间内(14 d)小鼠存活率均为100%。

体外细胞学实验结果显示，HRIG对CVS-11株具有较强的中和能力，0.106 IU·mL^{-1}可以保护99%细胞，接近全保护，且随着中和抗体含量降低，降低病毒感染力度，即对细胞的保护力度降低(从100%降到趋近于0)。

动物体内实验和体外细胞学实验证实了本品具有动物体内的抗病毒保护作用，也具有较强的中和病毒保护细胞免受病毒感染的能力，且量效关系良好。WHO建议，人血清中狂犬病抗体的最低保护水平是0.5 IU·mL^{-1}[8]，HRIG的推荐注射剂量为20 IU·kg^{-1}，《中华人民共和国药典》中要求HRIG中和抗体效价不低于100 IU·mL^{-1}。HRIG产品按推荐剂量使用后，血清中和抗体水平应不低于0.5 IU·mL^{-1}。本品中和抗体效价符合国家药典的标准要求，按推荐剂量使用于WHO定义为Ⅲ类暴露的患者，将具有良好的保护药效。

[参 考 文 献]

[1] KING A, CIRCK L. Rabies-Related Viruses[M]//CAMPBELL JB, CHARLTON KM. Rabies. Beston:Kluwer Academic Publishers, 1988: 177-199.

[2] WANG YP, GUO SY. Research progress of rabies vaccine[J]. *J Appl Virol*, 2012, 1(1): 10-19.

[3] 张永振，熊成龙，邹洋，等. 贵州省安龙县狂犬病的流行病学研究[J]. 中国病毒学，2006, 21(4): 394-440.

[4] WHO. WHO expert consultation on rabies, First Report, WHO Technical Report Series 931[EB/OL]. (2005). http://www.who.int/rabies/rabnet.

[5] 董关木. 狂犬病的防治、疫苗和抗血清的安全性探讨[J]. 中国预防医学杂志, 2006, 7(4): 362-365.

[6] 卢锦汉. 医学生物制品学[M]. 北京：人民卫生出版社, 1995: 565.

[7] Centers for Disease Control. Recommendations of the immunization practices advisory committee (ACIP): rabies prevention in the United States 1984[J]. *MMWR*, 1984, 33(28): 393-402.

[8] 杨丹波，罗时定，吴强. 狂犬病人免疫球蛋白与狂犬病的防治[J]. 中国输血杂志, 2008, 21(11): 893-895.

编辑：刘卓越/接受日期：2021-08-25