

## · 综 述 ·

## 金黄色葡萄球菌肠毒素 B 功能表位及中和抗体研究进展

胡乃静<sup>1,2</sup>, 罗龙龙<sup>2</sup>, 乔春霞<sup>2</sup>, 张景海<sup>1</sup>

(1. 沈阳药科大学医疗器械学院, 辽宁 沈阳 1100162; 2. 军事科学院军事医学研究院毒物药物研究所, 抗毒药物与毒理学国家重点实验室, 北京 100850)

**摘要:**金黄色葡萄球菌(金葡菌)肠毒素 B(SEB), 是造成食物中毒乃至中毒性休克综合征的主要病因。SEB 也是一种超级抗原, 可以刺激 T 细胞, 能够同时与抗原呈递细胞上的主要组织相容性复合物 II 类分子和 T 细胞受体上的 V $\beta$  结合。随着 SEB 的结构逐步得到解析, 揭示了 SEB 结构与功能的关键表位。临床上尚无针对 SEB 中毒的有效疫苗和药物。SEB 中和抗体因其高特异性和低毒副作用, 成为研究者们研究的首选和重点, 从鼠源抗体、人鼠嵌合抗体到人源抗体等均有报道。本文对 SEB 功能表位及其中和抗体的研究进展进行综述。

**关键词:**金葡菌; 肠毒素 B; 表位; 中和抗体

中图分类号: R967

文献标志码: A

文章编号: 1000-3002-(2020)01-0045-07

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2020.01.007

葡萄球菌属 (*Staphylococcus*) 属于革兰阳性菌, 广泛分布于自然界, 如空气、水、土壤和物品表面, 也存在于人和动物的体表、鼻咽部及肠道。绝大多数葡萄球菌对人类不致病, 少数对人、兽致病, 其中致病力最强的是金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, 亦称金葡菌)。金葡菌能引起皮肤、组织和器官的化脓性炎症<sup>[1]</sup>, 人食用受到金葡菌污染的食物后会导致中毒。金葡菌可以产生多种能引发急性中毒的肠毒素, 目前已发现的金葡菌肠毒素 (staphylococcal enterotoxin, SE) 超过 33 种, 包括 SEA ~ SEE、SEI 及类肠毒素 G (enterotoxin-like serotypes G, selG)、selH 和 selJ ~ selU 等, 其中 SEA ~ SEE 被认为是引起中毒的主要毒素, 尤其是 SEB 的毒性大且稳定性强, 被认为是最强效的毒素之一<sup>[2]</sup>。在 SEB 解毒剂研究方面, 短肽<sup>[3]</sup>、细胞因子抑制剂<sup>[4]</sup>、T 细胞功能抑制分子 (如抗 B7 抗体等)<sup>[5]</sup>、减毒疫苗<sup>[6]</sup>和抗体<sup>[7]</sup>等均有报道, 抗体因其安全、高效成为研究重点。本文将综述 SEB 功能表位及其中和抗体的研究进展。

## 1 金葡菌肠毒素 B

SEB 为一单链多肽, 分子质量约为 28.5 ku, 包含 2 个结构域。结构域 1 在 N 端 1 ~ 120 位残基, 包含 2 个  $\beta$  片层和 3 个  $\alpha$  螺旋; 结构域 2 包括 C 端 127 ~ 239 个残基, 含 2 个  $\alpha$  螺旋、2 个短  $\beta$  折叠和 2 个  $\beta$  片层<sup>[8]</sup>。SEB 是一种外源性超抗原, 可以结合 T 细胞抗原受体 (T cell receptor, TCR)  $\beta$  链 V 区和抗原递呈细胞表面的主要组织相容性复合物 II (major histocompatibility complex II, MHC II) 类分子, 形成 MHC II - SEB-TCR 复合物<sup>[9]</sup>, 直接引起 T 细胞活化, 分泌干扰素  $\gamma$  (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ ) 和肿瘤坏死因子  $\beta$  (tumor necrosis factor- $\beta$ , TNF- $\beta$ ) 等炎症细胞因子。SEB 的晶体结构已由 PAPAGEORGIOU 等<sup>[10]</sup>解析, 解析度达 1.5 Å (0.15 nm)。在 SEB 的 N 端包括 3 个关键区域, 与 MHC II 类分子结合, 影响 T 细胞活性。9 ~ 23 位残基为双功能位点, 同时影响与 TCR 和 MHC II 类分子结合; 40 ~ 53 位残基在葡萄球菌中相对保守, 是肠毒素与 MHC II 类分子结合的重要位点; 60 和 61 位残基主要影响 TCR 活性<sup>[11]</sup>。

SEB 中毒会引起一系列中毒反应乃至中毒性休克综合征, 临床表现为高热、低血压、红疹、体质量减轻和多器官功能衰竭甚至死亡, 病死率可达 50%<sup>[12]</sup>。人体接触 SEB 后潜伏期 4 ~ 6 h<sup>[13]</sup>。据估计, SEB 造成人群失能的半数有效剂量约为 0.4 ng·kg<sup>-1</sup>, 半数致死剂量可能为 0.02  $\mu$ g·kg<sup>-1</sup>; 同时, SEB 热稳

**基金项目:** 国家自然科学基金 (31370938); 国家科技重大专项 (2018ZX09J18101-002)

**作者简介:** 胡乃静, 硕士研究生, 主要从事抗体工程研究, E-mail: h547214399@163.com

**通讯作者:** 乔春霞, E-mail: bioqcx@126.com; 张景海, E-mail: jinghaizhang@foxmail.com

定性很强,100℃煮沸 30 min 也不能使其失活<sup>[2]</sup>;并且由于 SEB 容易雾化,可以被用来制造生物武器<sup>[14]</sup>。SEB 是联合国《禁止生物武器公约》核查清单所列举的 11 种毒素之一,已被美国国家过敏和传染病研究所归类为 B 类毒素。20 世纪 60 年代曾被美军列为常规储存的“标准”生物战剂。1972 年以来,特别是 2001 年美国炭疽“粉末事件”之后,美军一直努力寻求有效的针对 SEB 的预警和防治方法,但是至今仍无针对 SEB 人用疫苗或药物上市<sup>[13]</sup>。同时,在日常生活中,SEB 也是引起食物中毒的主要毒素之一。早在 2000 年,日本就爆发过“雪印奶粉”事件,14 000 多人感染<sup>[15]</sup>。我国每年也会出现类似的中毒病例。

更加值得一提的是,随着青霉素的问世,金葡菌引起的感染性疾病受到较大的控制。但随着抗生素的广泛使用,部分金葡菌产生了青霉素酶,能水解 β 内酰胺环,从而表现为青霉素耐药。基于此,一种耐青霉素酶的半合成青霉素——甲氧西林(meticillin)应运而生,1959 年用于临床后曾有效地控制了金葡菌产酶株的感染。然而,随着甲氧西林的使用,出现了耐甲氧西林金葡菌(meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA),给人们的健康带来了极大威胁。目前 MRSA 感染几乎遍及全球,已成为医院和社区感染的重要病原菌之一。2015 年,广州地铁系统曾检出 MRSA,这一事件向我国公共卫生、国民健康乃至反恐防生体系提出了强烈警示。而 SEB 蛋白序列保守,结构稳定,一直被认为是针对 MRSA 药物研发的良好靶点,受到研究者的广泛关注。

## 2 金葡菌肠毒素 B 功能表位

近年来,SEB 结构逐步得到解析,揭示了包括 TCR 表位和与 MHC II 分子结合的立体表位等结构信息<sup>[16]</sup>。TCR 表位包括<sup>18</sup>T<sup>19</sup>G<sup>20</sup>L<sup>22</sup>E<sup>23</sup>N<sup>26</sup>V<sup>60</sup>N<sup>90</sup>Y<sup>91</sup>Y<sup>177</sup>F<sup>178</sup>N<sup>210</sup>Q 等氨基酸残基,而 MHC II 分子结合表位包括<sup>43</sup>Q<sup>44</sup>F<sup>45</sup>L<sup>46</sup>Y<sup>47</sup>F<sup>65</sup>R<sup>67</sup>E<sup>89</sup>Y<sup>92</sup>Q<sup>94</sup>F<sup>96</sup>S<sup>98</sup>K<sup>115</sup>Y<sup>209</sup>D<sup>211</sup>S<sup>215</sup>M 等,二者相邻但并不重叠<sup>[8]</sup>。这些表位与相应靶分子结合的亲和力与 SEB 激活 T 细胞密切相关<sup>[2]</sup>。对 SEB 抗原保护性表位的鉴定和精细定位,将有助于阐明金葡菌感染后 SEB 在体内的应答机制,有利于设计基于 SEB 表位的保护性疫苗,有利于筛选和优化针对金葡菌乃至 MRSA 感染的抗体药物。

ZHAO 等<sup>[17]</sup>运用短肽重叠法精细定位 SEB 抗原的线性 B 细胞表位。他们利用无毒 SEB 突变体

免疫 BALB/c 小鼠,观察其对 MRSA 感染的保护作用。结果显示,SEB 突变体+磷酸铝组免疫小鼠的血清中 SEB 特异性抗体的滴度明显升高,且小鼠存活率为 80%,高于单用磷酸铝组(存活率 20%)及磷酸盐缓冲液组(全部死亡),表明 SEB 突变体可以诱导产生特异性中和抗体。利用重叠肽 ELISA 法筛选出 3 个 SEB 的 B 细胞表位,包括 SEB<sub>205-222</sub>, SEB<sub>97-114</sub> 和 SEB<sub>247-261</sub>。晶体结构显示,SEB<sub>97-112</sub> 位于 SEB 的内部环状区域,而 SEB<sub>207-222</sub> 和 SEB<sub>247-257</sub> 位于 SEB 外的 b-区域。在小鼠脾细胞体外培养模型中,3 条 SEB 多肽抗血清(抗 SEB<sub>97-112</sub> 血清,抗 SEB<sub>207-222</sub> 血清和抗 SEB<sub>247-257</sub> 血清)均能抑制 SEB 诱导 T 细胞增殖,下调 IL-2, IFN-γ 和 TNF-α 等细胞因子水平;同源性分析表明,SEB<sub>97-112</sub> 和 SEB<sub>207-222</sub> 在不同的金菌株中高度保守,提示这些表位可以作为良好药靶,有助于针对 MRSA 疫苗设计和药物开发。而且该团队开发了多重 B 细胞表位疫苗,评估 SEB 多重 B 细胞表位疫苗对 MRSA SEB 中毒的防治效果,并探讨其作用机制。除上述 3 个 B 细胞表位外,研究者们又找到了 3 个新的 B 细胞表位——SEB<sub>31-48</sub>, SEB<sub>133-150</sub> 和 SEB<sub>193-210</sub>,能够诱导小鼠产生保护性抗体;然后,他们联用 6 种表位对小鼠进行免疫,发现这一多重表位疫苗能诱导强烈的特异性 IgG<sub>1</sub> 免疫应答。而且在细菌清除方面,多表位疫苗似乎比 SEB 全抗原更有效,可以抵抗不同 MRSA 菌株的感染,发挥吞噬作用清除细菌<sup>[18]</sup>。

CHOI 等<sup>[11]</sup>构建了一系列无毒 SEB 突变体。小鼠脾细胞体外实验表明,这些突变体不激活 T 细胞,提示这些突变体中突变的氨基酸位点是 T 细胞激活的关键位点。免疫保护实验结果显示,SEB 突变体可有效诱导小鼠产生抗 SEB 中和抗体,保护小鼠抵御 SEB 毒性。用 SEB 突变体免疫后,小鼠血清中 IgG<sub>1</sub> 和 IgG<sub>3</sub> 水平明显升高,表明这些突变体能够同时诱导机体产生 Th1 和 Th2 免疫应答。在这一系列突变体中,双点突变体 S9(N23A 和 Y90A)和四点突变体 S19(N23A, Y90A, R110A 和 F177A)免疫能够完全保护小鼠抵抗致死剂量 SEB 的攻击,为中和抗体等药物的设计和效应优化提供了实验依据。

单克隆抗体的发现为 SEB 功能表位的确定提供了帮助。HAMAD 等<sup>[19]</sup>获得 4 株表位均不重叠的单抗 B334(IgG<sub>1</sub>), B327(IgG<sub>2b</sub>), B87(IgG<sub>1</sub>) 和 2B33(IgG<sub>1</sub>),证实 SEB 的 N23, N60 和 Y61 为 TCR 的结合表位,SEB 的 44~48 位氨基酸 FLYFD 为 MHC II 类分子的结合表位。XIA 等<sup>[20]</sup>利用多株单抗对 SEB 的识别开展了 SEB 功能表位的研究。他



们基于中和性抗 SEB 单抗 3E2, 分析了 SEB-3E2 Fab 复合物的晶体结构。显示 3E2 识别的中和表位位于 SEB 的 Y46 和 K71 等残基, 可以阻断 SEB 与 MHC II 类分子的相互作用, 抑制 SEB 功能。VARSHNEY 等<sup>[21]</sup>获得 4 株 IgG<sub>1</sub> 单克隆抗体 20B1, 6D3, 14G8 和 4C7, 首先确定 20B1, 14G8 和 6D3 识别位点不完全重叠。然后, 构建表达野生型 SEB 的 C 端缺失突变体与 20B1, 14G8 和 6D3 不结合, 推测 C 端可能为 SEB 的构象表位, 突变后导致 SEB 结构发生变化。最后, 根据 SEB 晶体结构衍生的计算机辅助三维模型重点研究了 7 个残基(135-Arg, 137-Phe, 186-Tyr, 188-Lys, 229-Lys, 231-Glu 和 233-Tyr)。鉴定 SEB 与抗体结合的位点可能为单抗 20B1 与残基 135-R, 137-F, 186-Y, 235-T 和 236-T 相互作用; 单抗 14G8 与残基 135-R, 137-F, 186-Y, 188-K, 231-E, 233-Y, 235-T 和 236-T 相互作用; 单抗 6D3 与残基 135-R 和 186-Y 相互作用; 单抗 4C7 与残基 135-R, 137-F, 186-Y, 188-K, 235-T 和 236-T 相互作用。总体来说, 对 SEB 线性 B 细胞表位、MHC II 类分子结合表位和 TCR 表位等的精细定位, 有助于深入了解 SEB 致病机制, 优化分子设计方案, 获得疗效更优的药物。

### 3 抗金葡菌肠毒素 B 中和抗体

抗体是体液免疫的主要效应分子, 属于糖蛋白分子, 能够特异性结合抗原, 对外来抗原或病原体起调理作用、中和毒素和病毒、发挥抗体依赖的细胞毒作用等。经过 40 多年的发展, 抗体药物已经成为生物技术药物的主流。由于鼠源单克隆抗体会产生人抗鼠抗体(human anti-mouse antibody, HAMA)反应, 上市的抗体基本都是人源化抗体或人源抗体。

金葡菌感染由多种毒素蛋白如 SEB, SEK 和 TSST-1 等介导, 而中和抗体的疗效已在中毒休克动物模型中被证实。例如, 抗 SEK 单抗 4G3, 5G2 和 9H2 等能够在体内保护小鼠, 提高金葡菌败血症的存活率, 抑制细胞因子产生。而且表位不同的 2 株抗体联用的保护效果更优<sup>[22]</sup>。与其他毒素相比, SEB 稳定性极强, 能够刺激 T 细胞激活, 诱导机体产生中毒性休克综合征<sup>[23]</sup>, 是金葡菌感染中的主要毒素。目前, 临床上尚无针对 SEB 中毒的有效疫苗或药物, 而治疗性抗体因其高特异性、低毒副作用, 成为研究的首选和重点。国内外多个研究小组陆续获得了一系列抗 SEB 中和抗体, 发挥抑制 SEB 诱导 T 淋巴细胞激活、在体内保护动物抵御 SEB 中

毒等功能。

#### 3.1 鼠源性单克隆抗体

针对 SEB 的鼠源性抗体已经被证实具有体内外保护活性。国内已有多个团队获得了抗 SEB 中和单抗, 如原第二军医大学(现海军医科大学)郭亚军教授团队利用杂交瘤技术获得了 6 株中和单抗 1A5, 4A3, 3E2, 3C1, 1D1 和 2G9, 能够有效阻断 SEB 诱导的人外周血单核细胞的激活, 发挥中和保护作用<sup>[24]</sup>。SINGH 等<sup>[25]</sup>利用噬菌体鼠源单链抗体片段(single chain antibody fragment, scFv)抗体库技术, 获得了亲和常数为  $3.16 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的抗体。郭亚军教授团队<sup>[26]</sup>还通过解析鼠源性单抗 m3E2 和 SEB 的晶体结构, 发现鼠源性单抗 m3E2 识别的关键氨基酸为 Y46 和 K71。在此基础上, 他们构建了双特异性抗体 3E2-4A3, 可同时阻断与 SEB 的 MHC II 和 TCR 功能域的结合; 体外功能实验证实, 该双特异性抗体的中和效果强于鼠源性单抗 3E2 和 4A3 抗体联用。

VARSHNEY 团队长期致力于 SEB 的作用机制研究及保护性药物的寻找。早在 2011 年, 他们就报道了一组鼠源抗 SEB 抗体, 并利用表位作图法(epitope mapping)鉴定了抗体识别的抗原表位。结果显示, 这些表位位于 SEB 羧基端 180~239。他们利用 T 细胞体外增殖实验以及 2 种体内 SEB 诱导鼠致死模型, 验证了单抗的体内外功能, 证实单克隆抗体 20B1 可以保护 HLA-DR3 转基因小鼠, 而单抗 14G8 和 6D3 单用时不具保护性, 但二者联合用药却显示出保护效果<sup>[21]</sup>。他们又利用产 SEB 的 MRSA 株细菌建立了脓毒症致死小鼠模型, 验证了单抗 20B1 的疗效。结果显示, 预先给予单抗 20B1 可以保护小鼠, 减少脓肿形成, 降低促炎细胞因子水平、淋巴细胞增殖和中性粒细胞募集<sup>[27-29]</sup>。

#### 3.2 人源化抗体和人源抗体

鼠源抗体存在明显的副作用, 因此人源化抗体及人源抗体成为抗体药物开发的主流。VARSHNEY 团队对单抗 20B1 进行了人源化改造, 获得了 2 株人源化抗体。小鼠体内实验结果显示, 2 株抗体能够作为万古霉素的辅助治疗, 用于 SEB 的中毒救治。同时, 他们还指出, 人源化单抗 20B1 的不同亚型突变体(IgG<sub>2a</sub> 或 IgG<sub>2b</sub>)体内疗效存在差异, 人源化单抗 20B1 的 IgG<sub>2a</sub> 突变体保护效应更强, 尽管二者在体外亲和力测定、T 细胞增殖测定等实验中并不显示明显差异<sup>[30-31]</sup>。

2010 年, TILAHUN 等<sup>[32]</sup>鉴定了 2 株抗 SEB 嵌合抗体 Ch82M 和 Ch63。结果显示, 2 株单抗的亲

和常数均为  $\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 均能够抑制 SEB 诱导的人和小鼠 T 细胞增殖, 而且 2 株抗体联用的中和效应强于单抗单用。HLA-DR3 转基因小鼠中毒模型的治疗结果显示, 单抗显示部分保护, 而双抗联用可以发挥完全保护效应。

人源抗 SEB 抗体也有报道。DROZDOWSKI 等<sup>[33]</sup>利用人“MORPHO-DOMA”技术, 从血清抗 SEB 阳性的健康人外周血中分离 B 细胞, 获得了人源单抗 154。在外周血单核细胞模型中, 该抗体能够抑制 SEB 诱导促炎因子, 例如 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  的分泌, 保护小鼠抵御脂多糖联合 SEB 100  $\mu\text{g}$ (ip) 的毒性。

LARKIN 等<sup>[34]</sup>也利用噬菌体库方法筛选到了 10 株人源抗 SEB 功能单抗, 与 SEB 结合的亲和力与多克隆 IgG 的亲和力相当。体外细胞抑制模型中, 抗体作用的  $\text{IC}_{50}$  达到  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  水平。进一步利用脂多糖联合 SEB 2.5  $\mu\text{g}$  构建小鼠中毒模型, 证实这些抗体能够发挥良好的体内保护效应; 选择 4 株 Fab 抗体序列构建表达载体并制备全抗, 体外实验结果显示, 人源抗体与 SEB 结合的亲和力与 Fab 相近, 但细胞抑制功能增强了 250 倍, 提示上述抗体能够作为潜在的抗 SEB 治疗药物。

此外, KARAUZUM 等<sup>[35]</sup>使用噬菌体展示技术, 筛选获得了一系列抗 SEB 特异性人源 Fab 抗体 GCI119, GCI120 和 GCI121, 并分别利用哺乳动物细胞表达系统和烟草表达系统实现了人源抗体的表达。这些抗体作用于 SEB 的 MHC II 结合区域, 亲和常数可以达到  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  水平。体内外实验结果显示, 2 种表达系统获得的抗体功能类似。在小鼠中毒休克模型中, 利用不同剂量的 SEB 攻击小鼠 1 h 后给予 200  $\mu\text{g}$  优化前的抗体 GCI064, GCI073, GCI075 和 GCI079 治疗, 小鼠几乎能够被完全保护, 且血清中 IFN- $\gamma$  和 IL-2 水平显著降低。

2019 年, CHEN 等<sup>[36]</sup>在上述工作的基础上运用噬菌体库进行筛选, 获得一株与 SEB 的 TCR 功能域作用的抗体 GC132, 然后经过亲和力成熟改造获得亲和力更高的抗体 IgG-GC132a。氢-氘交换与质谱联用技术检测结果表明, IgG-GC132a 在  $\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$  水平仍具有较强活性; 在体内中和毒性方面 IgG-GC132a 也非常有效, 可发挥完全保护效应。

### 3.3 单域抗体 (single domain antibodies, sdAb)

除了传统抗体, 抗 SEB sdAb 的研究也有报道。sdAb 仅包含重链可变区 (variable-region heavy-chain, VH), 分子质量约为 15 ku, 制备相对容易, 稳定性高, 组织穿透性强, 是近年来抗体分子

研究的热点。目前, 抗 SEB sdAb 被认为可以用于 SEB 的高效检测, 同时兼具成为治疗性抗体的可能。GRAEF 等<sup>[37]</sup>筛选了抗 SEB 特异性的 sdAb A3, 并探讨了基于该抗体开发诊断、治疗性药物的可行性。A3 具有高亲和常数 ( $K_d=75 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 且与 SEB 的相似分子 SEA、SED 和志贺毒素等均无交叉反应。该抗体热稳定性很强 ( $T_m$  值约  $85^\circ\text{C}$ ), 即使加热到  $95^\circ\text{C}$  变性后还能够重折叠恢复活性。利用 A3 作为捕获和检测分子开发了基于 Luminex 的检测方法, 检测限 (LOD) 达到  $64 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 为了能够进行双夹心免疫测定, 需要另一株识别 SEB 不同表位的 sdAb。因此, 该团队进一步分离并鉴定了 14 株 sdAb, 找到了可配对进行双夹心测定、具有良好灵敏度的单克隆抗体 03B2A, S222 和 2F2, 并建立了 sdAb 双夹心检测方法<sup>[34]</sup>。利用这一方法检测 SEB 的检测限能够低至  $64 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ , 与之前 Luminex 方法的检测限接近。同时, ZANGANEH 等<sup>[38]</sup>构建了噬菌体 sdAb 库, 经过 5 轮生物淘选, 利用噬菌体 ELISA 进行克隆筛选, 从中筛选出一系列高亲和力抗 SEBsdAb, 其中 C7 和 C21 亲和力最高。ELISA 结果显示, 抗体亲和常数为约  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 具有良好的应用前景。

## 4 结语

SEB 诱导 T 细胞活化, 引起中毒反应乃至毒性休克综合征, 危害极大; 同时, SEB 的热稳定性强、易雾化, 被认为是潜在的生物战剂, 一直是外军研究的重点; 此外, MRSA 的出现, 也为新型药物的开发提出了迫切要求。目前还无针对 SEB 感染的疫苗和药物上市, 只有疫苗 STEBVax 进入了 I 期临床阶段。SEB 表位结构特征的解析及中毒机制的逐步揭示, 为中和抗体的开发提供了结构基础, 使得新药发现不再拘泥于传统的免疫、库筛选等步骤, 能够基于结构及表位特征直接设计和优化人源化抗体; 同时, 治疗方案也从单一抗体治疗拓宽至多抗体联用/双特异抗体治疗等。但即使对 SEB 的研究不断获得突破, SEB 空窗期短、药效学评价复杂等问题还是给新药的临床应用带来了诸多难题, 亟需对 SEB 发病机制进行深入探索, 设计和优化安全性高、特异性好的抗体药物, 从而为金葡菌感染的防治提供良好的解决方案。

## 参考文献:

- [1] LOWY FD. *Staphylococcus aureus* infections [J].

- New Engl J Med*, 1998, **339**(8):520-532.
- [2] FRIES BC, VARSHNEY AK. Bacterial toxins-staphylococcal enterotoxin B[J]. *Microbiol Spectr*, 2013, **1**(2): 1-12.
- [3] RAJAGOPALAN G, SEN MM, DAVID CS. *In vitro* and *in vivo* evaluation of staphylococcal superantigen peptide antagonists[J]. *Infect Immun*, 2004, **72**(11):6733-6737.
- [4] WANG S, LI Y, XIONG H, CAO J. A broad-spectrum inhibitory peptide against staphylococcal enterotoxin superantigen SEA, SEB and SEC[J]. *Immunol Lett*, 2008, **121**(2):167-172.
- [5] SOYKUT EA, DUDAK FC, BOYACI IH. Selection of staphylococcal enterotoxin B (SEB)-binding peptide using phage display technology[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, **370**(1):104-108.
- [6] PAIVA CN, PYRRHO AS, LANNES-VIEIRA J, VACCHIO M, SOARES MB, GATTASS CR. *Trypanosoma cruzi* sensitizes mice to fulminant SEB-induced shock: overrelease of inflammatory cytokines and independence of Chagas' disease or TCR Vbeta-usage[J]. *Shock*, 2003, **19**(2):163-168.
- [7] MURAILLE E, DE SMEDT T, URBAIN J, MOSER M, LEO O. B7.2 provides co-stimulatory functions *in vivo* in response to staphylococcal enterotoxin B[J]. *Eur J Immunol*, 1995, **25**(7):2111-2114.
- [8] SWAMINATHAN S, FUREY W, PLETCHER J, SAX M. Crystal structure of staphylococcal enterotoxin B, a superantigen[J]. *Nature*, 1992, **359**(6398):801-806.
- [9] TONACINI J, STEPHAN D, VOGEL G, AVONDET MA, KALMAN F, CROVADORE J, *et al*. Intact *Staphylococcus* enterotoxin SEB from culture supernatant detected by MALDI-TOF mass spectrometry[J/OL]. *Toxins* (Basel), 2019, **11**(2)101 [2019-03-05]. <https://doi.org/10.3390/toxins11020101/>.
- [10] PAPAGEORGIOU AC, TRANTER HS, ACHARYA KR. Crystal structure of microbial superantigen staphylococcal enterotoxin B at 1.5 Å resolution: implications for superantigen recognition by MHC class II molecules and T-cell receptors[J]. *J Mol Biol*, 1998, **277**(1):61-79.
- [11] CHOI JY, SHIN S, KIM NY, SON WS, KANG TJ, SONG DH, *et al*. A novel staphylococcal enterotoxin B subunit vaccine candidate elicits protective immune response in a mouse model[J]. *Toxicon*, 2017, **131**:68-77.
- [12] KRAKAUER T, STILES BG. The staphylococcal enterotoxin (SE) family: SEB and siblings[J]. *Virulence*, 2013, **4**(8):759-773.
- [13] ROOS J, CHUE C, DIEULIIS D, EMANUEL P. The Department of Defense Chemical and Biological Defense Program: an enabler of the third offset strategy[J]. *Health Secur*, 2017, **15**(2):207-214.
- [14] DENAYER S, DELBRASSINNE L, NIA Y, BOTTELDOORN N. Food-borne outbreak investigation and molecular typing: high diversity of *Staphylococcus aureus* strains and importance of toxin detection[J]. *Toxins* (Basel), 2017, **9**(12).
- [15] YI L. Advancement in researdles of *Staphylococcus aureus* and its enterotoxin[J]. *Chin J Health Lab Tech* (中国卫生检验杂志), 2004, **4**:392-395.
- [16] DUDAK FC, SOYKUT EA, OGUZ ME, YASAR F, BOYACI IH. Thermodynamic and structural analysis of interactions between peptide ligands and SEB[J]. *J Mol Recognit*, 2010, **23**(4):369-378.
- [17] ZHAO Z, LI B, SUN HQ, ZHANG JY, WANG YL, CHEN L, *et al*. Fine-mapping of immunodominant linear B-cell epitopes of the *Staphylococcus aureus* SEB antigen using short overlapping peptides[J/OL]. *PLoS One*, 2014, **9**(3): e90445 [2019-03-05]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090445/>.
- [18] ZHAO Z, SUN H-Q, WEI S-S, LI B, FENG Q, ZHU J, *et al*. Multiple B-cell epitope vaccine induces a *Staphylococcus* enterotoxin B-specific IgG<sub>i</sub> protective response against MRSA infection[J/OL]. *Sci Rep*, 2015, **5**(1)12371 [2019-03-05]. <https://doi.org/10.1038/srep12371/>.
- [19] HAMAD AR, HERMAN A, MARRACK P, KAPPLER JW. Monoclonal antibodies defining functional sites on the toxin superantigen staphylococcal enterotoxin B[J]. *J Exp Med*, 1994, **180**(2):615-621.
- [20] XIA T, LIANG S, WANG H, HU S, SUN Y, YU X, *et al*. Structural basis for the neutralization and specificity of staphylococcal enterotoxin B against its MHC class II binding site[J]. *mAbs*, 2013, **6**(1):119-129.
- [21] VARSHNEY AK, WANG X, COOK E, DUTTA K, SCHARFF MD, GOGGER MJ, *et al*. Generation, characterization, and epitope mapping of neutralizing and protective monoclonal antibodies against staphylococcal enterotoxin B-induced lethal shock[J]. *J Biol Chem*, 2011, **286**(11):9737-9747.
- [22] AGUILAR JL, VARSHNEY AK, PECHUAN X, DUTTA K, NOSANCHUK JD, FRIES BC. Monoclonal antibodies protect from staphylococcal enterotoxin K (SEK) induced toxic shock and sepsis



- by USA300 *Staphylococcus aureus* [J]. *Virulence*, 2017, **8**(6):741-750.
- [23] PINCHUK IV, BESWICK EJ, REYES VE. Staphylococcal enterotoxins [J]. *Toxins* (Basel), 2010, **2**(8):2177-2197.
- [24] KANG YS, WANG HJ, YANG HO, TAN WL, ZHANG B, WEI YQ, *et al.* Secrening and characterization of neutralizing monoclonal antibodies against staphylococcal enterotoxin B [J]. *Curr Immunol* (现代免疫学), 2010, **30**(4):298-302.
- [25] SINGH PK, AGRAWAL R, KAMBOJ DV, GUPTA G, BOOPATHI M, GOEL AK, *et al.* Construction of a single-chain variable-fragment antibody against the superantigen staphylococcal enterotoxin B [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2010, **76**(24):8184-8191.
- [26] WANG HJ. Function and mechanism study of a potent neutralizing antibody against staphylococcal enterotoxin B(高效抗SEB中和保护性抗体的作用及其机制研究) [D]. Shanghai: The Second Military Medical University (第二军医大学), 2013.
- [27] VARSHNEY AK, WANG X, SCHARFF MD, MACINTYRE J, ZOLLNER RS, KOVALENKO OV, *et al.* Staphylococcal enterotoxin B-specific monoclonal antibody 20b1 successfully treats diverse *Staphylococcus aureus* infections [J]. *J Infect Dis*, 2013, **208**(12):2058-2066.
- [28] VARSHNEY AK, WANG X, AGUILAR JL, SCHARFF MD, FRIES BC. Isotype switching increases efficacy of antibody protection against staphylococcal enterotoxin B-induced lethal shock and *Staphylococcus aureus* sepsis in mice [J/OL]. *MBio*, 2014, **5**(3):e01007-01014 [2019-03-05]. [https://mbio.asm.org/content/5/3/e01007-14/](https://mbio.asm.org/content/5/3/e01007-14). DOI: 10.1128/mBio.01007.
- [29] DUTTA K, VARSHNEY AK, FRANKLIN MC, GOGGER M, WANG X, FRIES BC. Mechanisms mediating enhanced neutralization efficacy of staphylococcal enterotoxin  $\beta$  by combinations of monoclonal antibodies [J]. *J Biol Chem*, 2015, **290**(11):6715-6730.
- [30] MACINTYRE JL, VARSHNEY AK, WANG X, GATTO S, FRIEDMAN C, LIU Y, *et al.* Optimization of experimental conditions for functional *in vitro* characterization of humanized antibodies specific for staphylococcal enterotoxin B [J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, **28**(1):354-358.
- [31] VARSHNEY AK, WANG X, MACINTYRE J, ZOLLNER RS, KELLEHER K, KOVALENKO OV, *et al.* Humanized staphylococcal enterotoxin B (SEB)-specific monoclonal antibodies protect from SEB intoxication and *Staphylococcus aureus* infections alone or as adjunctive therapy with vancomycin [J]. *J Infect Dis*, 2014, **210**(6):973-981.
- [32] TILAHUN ME, RAJAGOPALAN G, SHAH-MAHONEY N, LAWLOR RG, TILAHUN AY, XIE C, *et al.* Potent neutralization of staphylococcal enterotoxin B by synergistic action of chimeric antibodies [J]. *Infect Immun*, 2010, **78**(6):2801-2811.
- [33] DROZDOWSKI B, ZHOU Y, KLINE B, SPIDEL J, CHAN YY, ALBONE E, *et al.* Generation and characterization of high affinity human monoclonal antibodies that neutralize staphylococcal enterotoxin B [J/OL]. *J Immun Based Ther Vaccin*, 2010, **8**:9 [2019-03-05]. <https://doi.org/10.1186/1476-8518-8-9/>.
- [34] LARKIN EA, STILES BG, ULRICH RG. Inhibition of toxic shock by human monoclonal antibodies against staphylococcal enterotoxin B [J/OL]. *PLoS One*, 2010, **5**(10):e13253 [2019-03-05]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013253/>.
- [35] KARAUZUM H, CHEN G, ABAANDOU L, MAHMOUDIEH M, BOROUN AR, SHULENIN S, *et al.* Synthetic human monoclonal antibodies toward staphylococcal enterotoxin B (SEB) protective against toxic shock syndrome [J]. *JBiol Chem*, 2012, **287**(30):25203-25215.
- [36] CHEN G, KARAUZUM H, LONG H, CARRANZA D, HOLTSBERG FW, HOWELL KA, *et al.* Potent neutralization of staphylococcal enterotoxin B *in vivo* by antibodies that block binding to the T-cell receptor [J]. *J Mol Biol*, 2019, **431**(21):4354-4367.
- [37] GRAEF RR, ANDERSON GP, DOYLE KA, ZABETAKIS D, SUTTON FN, LIU JL, *et al.* Isolation of a highly thermal stable lama single domain antibody specific for *Staphylococcus aureus* enterotoxin B [J/OL]. *BMC Biotechnol*, 2011, **11**:86 [2019-03-05]. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-86/>.
- [38] ZANGANEH S, ROUHANI NEJAD H, MEHRABADI JF, HOSSEINI R, SHAHI B, TAVASSOLI Z, *et al.* Rapid and sensitive detection of staphylococcal enterotoxin B by recombinant nanobody using phage display technology [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2019, **187**(2):493-505.

## Advances in functional epitopes and neutralizing antibodies of *Staphylococcus aureus* enterotoxin B

HU Nai-jing<sup>1,2</sup>, LUO Long-long<sup>2</sup>, QIAO Chun-xia<sup>2</sup>, ZHANG Jing-hai<sup>1</sup>

(1. School of Medical Devices, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;

2. State Key Laboratory of Toxicology and Medical Countermeasure, Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Beijing 100850, China)

**Abstract:** *Staphylococcus aureus* enterotoxin B (SEB), produced by *Staphylococcus aureus*, is responsible for food poisoning and toxic shock syndrome. SEB is also a superantigen, that can stimulate a large part of T-cells. It can bind simultaneously to major histocompatibility complex class II molecules in antigen-presenting cells and to the T-cell receptors that incorporate V $\beta$  chains. As the structure of SEB is gradually analyzed, the key epitopes of the structure and function are revealed. However, no effective vaccine or drug against SEB is in clinic use. Therapeutic antibodies are safe and highly specific with low side effects, which promise to be satisfactory drug candidates. Mouse antibodies, chimeric human-mouse antibodies, and human antibodies *et al* have been reported. In this paper, we review the functional epitopes of SEB and the development of anti-SEB neutralizing antibodies.

**Key words:** *Staphylococcus aureus*; enterotoxin B; epitope; neutralizing antibody

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (31370938); and National Science and Technology Major Project of China (2018ZX09J18101-002)

**Corresponding author:** QIAO Chun-xia, E-mail: bioqcx @126.com; ZHANG Jing-hai, E-mail: jinghaizhang@foxmail.com

(收稿日期: 2019-03-28 接受日期: 2020-01-13)

(本文编辑: 齐春会)