



EB病毒糖蛋白中和抗体研究进展

洪俊平^{1,2,4†}, 钟玲^{1,3†}, 张琬琳³, 郑清炳², 徐淼³, 陈毅歆², 夏宁邵², 张晓^{1*}

1. 重庆医科大学药学院, 重庆 400016;

2. 厦门大学传染病疫苗研发全国重点实验室, 厦门大学国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心, 厦门 361005;

3. 华南恶性肿瘤防治全国重点实验室, 广东省鼻咽癌诊治研究重点实验室, 广东省恶性肿瘤临床医学研究中心, 中山大学肿瘤防治中心, 广州 510060;

4. University of Texas Health Science Center at Houston, Houston 77030, USA

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: zhangxiao@cqmu.edu.cn

收稿日期: 2024-09-15; 接受日期: 2024-11-15; 网络版发表日期: 2024-12-10

国家自然科学基金(批准号: 82371832)、重庆市自然科学基金(批准号: 2023NSCQ-MSX1536)和重庆市教育委员会科学技术研究计划(批准号: KJZD-M202400401, KJQN-202300453)资助

摘要 EB病毒(Epstein-Barr virus, EBV)属于人类疱疹病毒 γ 亚科, 是首个被鉴定的人类致癌病毒。EBV感染与人类传染性单核细胞增多症、多种淋巴瘤及上皮细胞肿瘤的发生发展密切相关, 每年全球因EBV相关肿瘤新增病例超过20万, 死亡病例超14万, 造成巨大的公共卫生和经济负担。然而, 目前尚无有效药物和疫苗获批上市。靶向病毒的特异性抗体是病毒学研究的重要工具。EBV中和抗体主要针对病毒包膜表面的糖蛋白, 这些糖蛋白在感染过程中发挥关键作用。对中和抗体的特性和功能研究, 不仅有助于深入理解病毒感染机制, 还为疫苗的理性设计提供了指导。此外, 因其优异的体内外中和活性, 这些抗体有望应用于EBV感染及相关疾病的治疗和预防。本文系统综述了靶向EBV不同包膜糖蛋白的中和抗体, 归纳其功能活性、结合表位及中和机制, 为EBV治疗性药物和疫苗的研发提供理论依据。

关键词 EB病毒, 糖蛋白, 中和抗体, 优势表位, 中和机制

EB病毒(Epstein-Barr virus, EBV)属于人类疱疹病毒 γ 亚科, 又称为人类疱疹病毒4型, 具有包膜及双链DNA基因组^[1]。EBV在人群中感染率极高, 成年人感染率高达95%, 且其感染与多种疾病密切相关, 包括传染性单核细胞增多症、多种淋巴瘤(霍奇金淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、NK/T淋巴瘤)及上皮细胞肿瘤(鼻咽癌、胃癌)等^[2]。全球每年新增EBV相关肿瘤病例超20万, 死亡病例超14万^[3]。此外, EBV感染还可引起多发

性硬化症、系统性红斑狼疮和类风湿关节炎等自身免疫性疾病^[4-7]。最新研究提示, EBV再激活可能与长新冠的发生相关^[8-10]。

与其他疱疹病毒类似, EBV的感染机制极为复杂。其具有双细胞嗜性, 主要感染淋巴B细胞和上皮细胞; 感染过程中需依赖表面多种糖蛋白的协同作用, 具体包括病毒的吸附、融合蛋白的激活以及融合蛋白介导的病毒包膜与宿主细胞膜或内体膜的融合等步骤。

引用格式: 洪俊平, 钟玲, 张琬琳, 等. EB病毒糖蛋白中和抗体研究进展. 中国科学: 生命科学, 2024, 54: 2385–2398

Hong J P, Zhong L, Zhang W L, et al. Research progress on neutralizing antibodies against Epstein-Barr virus glycoproteins (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2024, 54: 2385–2398, doi: [10.1360/SSV-2024-0181](https://doi.org/10.1360/SSV-2024-0181)

EBV编码表达13种包膜糖蛋白,其中糖蛋白gp350, gH, gL, gp42和gB在感染中起关键作用^[11]。在淋巴B细胞感染中,糖蛋白gp350与宿主细胞的CD21或CD35分子结合^[12,13],使病毒附着于B细胞表面;随后, gH/gL/gp42异源三聚体中的gp42与HLA-II结合^[14],将激活信号传递给gH/gL复合物,进一步促使gB蛋白介导的病毒包膜和宿主细胞膜或内体膜的融合。在上皮细胞感染中, gH/gL复合物通过其KGD区域与整合素 $\alpha\beta 5$, $\alpha\beta 6$ 和 $\alpha\beta 8$ 受体结合^[15],并通过gL与EphA2受体结合^[16],随后gH/gL激活gB蛋白,引起后续的膜融合过程。

参与EBV感染的糖蛋白是中和抗体的主要靶点,由于不同糖蛋白在病毒感染过程中的角色和功能不同,靶向它们的中和抗体在中和活性上存在差异。目前认为, gp350和gp42蛋白仅参与EBV感染淋巴B细胞,不参与上皮细胞的感染,因此,针对gp350和gp42的中和抗体能够高效阻断病毒对淋巴B细胞的感染,但对于上皮细胞模型无中和活性。相比之下, gH/gL和gB蛋白同时参与EBV对两种主要宿主细胞的感染,因此部分靶向这两类蛋白的中和抗体可在双感染模型中表现出高效的中和能力。然而,由于抗体结合表位和中和机制的不同,其中和效果也存在差异。本文聚焦于EBV中和抗体,系统综述了中和抗体筛选与鉴定、中和机制及结合表位等研究进展(表1)^[17],并提出EBV中和抗体研究面临的挑战和未来发展方向,以期为研发更高效的EBV中和抗体药物和疫苗设计提供重要参考。

1 gp350蛋白抗体研究进展

gp350是EBV包膜表面丰度最高的糖蛋白^[18],通过与宿主细胞膜表面的CD21和CD35蛋白高亲和力结合实现病毒吸附^[12,13,19],但其本身不参与病毒入侵的关键过程。靶向gp350的抗体是人血清中和B细胞感染抗体的主要成分^[20]。鼠源单克隆抗体72A1是较早筛选获得的EBV中和抗体,基于72A1的免疫共沉淀实验首次发现gp350/gp220是EBV中和抗体的靶点^[21]。72A1能够高效中和EBV感染B细胞,其半数有效中和浓度(half-maximal inhibitory concentration, IC_{50})可达到 $(0.08 \pm 0.003) \mu\text{g/mL}$ 。然而,由于gp350不参与病毒感染上皮细胞,所以72A1在常规的上皮细胞感染模型中无中和活性^[22]。

另外一株识别gp350的鼠源中和抗体C1同样能抑

制EBV感染B细胞,但研究表明,C1可以增强EBV对上皮细胞的感染,其具体识别表位尚不明确^[13,23]。Slabik等人^[24]筛选出两株高效中和抗体7A1和6G4,实验结果显示其中和效价高于72A1。在检测与不同毒株背景的EBV阳性细胞系结合活性时,7A1和6G4的结合比例比72A1高1.5~7倍,表明这两株抗体识别的表位在多种毒株中更为保守。基于抗体7A1的CAR-T细胞疗法能有效清除gp350阳性的B95-8肿瘤细胞系。在人源化小鼠模型中,75%的小鼠体内EBV传播被有效控制,发生EBER阳性B细胞恶性淋巴增生的小鼠比例显著降低,同时未观察到明显肿瘤形成,炎症反应发生率也明显降低^[24]。

另一项研究报道了15株gp350特异性鼠源单抗,详细分析了其结合活性、抗体可变区序列特性、中和活性以及识别表位。研究发现,这些抗体的CDR区序列与72A1存在显著差异,其中4株抗体(HB1, HB5, HB11和HB20)与72A1存在表位竞争。通过对gp350多肽库的结合实验,发现这些抗体主要识别三段序列: aa 1~101, aa 102~201和aa 402~501。其中, aa 102~201包含72A1结合表位和受体CD21结合表位^[25]。

为评估72A1的临床发展潜力,多项研究对其体内保护效果进行了验证。在一项SCID小鼠实验中,用来自EBV阳性病人的外周免疫细胞接种小鼠后进行EBV攻毒,结果显示,72A1保护组无小鼠出现EBV阳性肿瘤(0/12),而对照组67%(8/12)的小鼠检测到肿瘤形成,表明72A1具有良好的体内保护效果^[26]。在另一项初步的人体实验中,将72A1注射至一名健康成人和四名EBV阴性、等待肝移植的儿童体内,结果显示,成人和三名儿童未发生不良反应,但另外一名儿童出现过敏反应。这提示72A1还是需要进行人源化改造,以避免潜在的人抗鼠抗体(human anti-mouse antibody, HAMA)效应,从而进一步开展临床研究。

在一项恒河猴的保护实验中,研究者分别使用靶向gp350蛋白的72A1抗体和靶向gH/gL蛋白的E1D1抗体作为B细胞感染模型和上皮细胞感染模型的代表性中和抗体,评估其防护口腔途径攻毒感染的效果^[27]。结果显示,在每组3只恒河猴中,仅72A1保护组的一只猴子表现出“清除性免疫”效果(1/3),而感染对照组和E1D1保护组的恒河猴均出现感染症状。这进一步表明,高滴度的B细胞感染中和抗体对于预防病毒感染的重要性。

表 1 EBV抗体信息汇总表^{a)}
Table 1 Summary of EBV antibodies^{a)}

糖蛋白	抗体	种属	B细胞中和 (IC ₅₀ , μg/mL)	上皮细胞中和 (IC ₅₀ , μg/mL)	人源化小鼠病毒血症 (>10 copies/μL)	人源化小鼠 存活率	参考文献
gp350	72A1	小鼠	0.08±0.003	NA	NA	75%	[22]
	C1	小鼠	NA	NA	NA	NA	[23]
	7A1	大鼠	NA	NA	NA	NA	[24]
	6G4	大鼠	NA	NA	NA	NA	[24]
	HB1	小鼠	NA	NA	NA	NA	[25]
	HB2	小鼠	NA	NA	NA	NA	[25]
	HB3	小鼠	NA	NA	NA	NA	[25]
	HB5	小鼠	NA	NA	NA	NA	[25]
	HB6	小鼠	NA	NA	NA	NA	[25]
	HB7	小鼠	NA	NA	NA	NA	[25]
	HB8	小鼠	NA	NA	NA	NA	[25]
	HB9	小鼠	NA	NA	NA	NA	[25]
	HB10	小鼠	NA	NA	NA	NA	[25]
	HB11	小鼠	NA	NA	NA	NA	[25]
	HB12	小鼠	NA	NA	NA	NA	[25]
	HB14	小鼠	NA	NA	NA	NA	[25]
	HB17	小鼠	NA	NA	NA	NA	[25]
	HB20	小鼠	NA	NA	NA	NA	[25]
	HB22	小鼠	NA	NA	NA	NA	[25]
	R1	兔	NA	NA	NA	NA	[30]
gHgL	3G1	小鼠	NA	NA	NA	NA	[31]
	4C7	小鼠	NA	NA	NA	NA	[31]
	4E1	小鼠	NA	NA	NA	NA	[31]
	4F4	小鼠	NA	NA	NA	NA	[31]
	8D11	小鼠	NA	NA	NA	NA	[31]
	10E4	兔	15.15	0.74	√	50%	[34]
	6H2	小鼠	7.01	0.13	×	100%	[33,34]
	E1D1	小鼠	NA	0.02±0.01	NA	NA	[38]
	CL59	小鼠	NA	0.52±0.25	NA	NA	[22]
	CL40	小鼠	14.5±2.44	0.89±0.21	NA	NA	[22]
	AMMO1	人	0.16±0.06	0.42±0.02	×	100%	[22,34,39]
	1D8	人	0.238	0.123	×	100%	[39]
	769A7	人	0.20±0.05	0.08±0.01	NA	NA	[38]
gp42	769B10	人	0.09±0.01	0.02±0.01	×	60%	[38]
	769C2	人	0.15±0.04	0.03±0.02	√	20%	[38]
	769C5	人	0.24±0.01	0.03±0.02	NA	NA	[38]
	770F7	人	0.22±0.09	0.02±0.02	√	0%	[38]
	770F8	人	0.37±0.24	0.03±0.02	NA	NA	[38]
gp42	F-2-1	小鼠	0.59±0.07	NA	√	80%	[44]
	3H3	小鼠	NA	NA	NA	NA	[17]
	2C3	小鼠	NA	NA	NA	NA	[46]
	2E4	小鼠	NA	NA	NA	NA	[46]
	3D3	小鼠	NA	NA	NA	NA	[46]

(表1续)

糖蛋白	抗体	种属	B细胞中和 (IC ₅₀ , μg/mL)	上皮细胞中和 (IC ₅₀ , μg/mL)	人源化小鼠病毒血症 (>10 copies/μL)	人源化小鼠 存活率	参考文献
gp42	4D8	小鼠	NA	NA	NA	NA	[46]
	4H7	小鼠	NA	NA	NA	NA	[46]
	4H8	小鼠	NA	NA	NA	NA	[46]
	6B8	小鼠	NA	NA	NA	NA	[46]
	6C1	小鼠	NA	NA	NA	NA	[46]
	11G10	小鼠	NA	NA	NA	NA	[46]
	1A7	兔	0.51	NA	NA	NA	[47]
	6G7	兔	0.28	NA	NA	NA	[47]
	3E8	兔	NA	NA	NA	NA	[34]
	5E3	兔	0.2	NA	×	100%	[34]
	A10	猴	0.04±0.01	NA	×	80%, 100%	[48]
	4C12	小鼠	1.50±0.02	NA	√	100%	[48]
	2B7	人	NA	NA	√	0%	[34]
	2C1	人	0.171	NA	×	83.3%	[34]
gB	CL55	小鼠	NA	NA	NA	NA	[43]
	AMMO2	人	NA	NA	NA	NA	[22]
	AMMO3	人	NA	NA	NA	NA	[22]
	AMMO4	人	NA	NA	NA	NA	[22]
	AMMO5	人	NA	0.16±0.09	√	66.7%	[22,52]
	8A9	小鼠	0.75	NA	NA	NA	[52]
	8C12	小鼠	5.39	NA	NA	NA	[52]
	3A3	兔	2.97	0.08	×	100%	[53]
	3A5	兔	4.90	0.31	×	100%	[53]

a) NA表示未检测, ×表示没有发生病毒血症, √表示发生病毒血症

近期, Singh等人^[28]在一项EBV中和抗体体内保护评价中, 使用72A1鼠源抗体可变区融合人源IgG1恒定区构建的嵌合抗体, 在人源化小鼠模型中开展实验. 感染后4周, 72A1保护组中一只小鼠死亡, 存活的小鼠中有一只出现脾脏肿大并伴有大面积肿瘤. 此外, 该组还观察到因EBV感染引起的病毒血症, 以及相关免疫细胞比例的变化趋势, 如hCD19⁺ B细胞减少, hCD19⁺hCD27⁺hCD38^{hi}浆母B细胞和CD8⁺ T细胞比例升高. 该研究发现, 72A1体外高效中和活性在体内保护实验中未能完全体现, 这可能与体内外感染机制差异、动物模型的局限性及抗体嵌合改造的差异有关.

目前尚无关于72A1与gp350免疫复合物的报道, 其具体识别表位仍不明确. 然而, 72A1能够阻断gp350与受体CD21的结合, 这提示其识别的表位可能与受体结合表位相似^[13,19]. 研究发现, gp350的三种突变组合 (Mut3: D208R, E210R; Mut2: W162A, D163A, N164A;

Mut1: P158A, Y159A, I160A)会削弱受体CD21的结合能力, 同时也影响72A1的结合. 这表明72A1的识别位点与CD21的结合位点存在表位重叠^[12]. 另一项研究通过计算机模拟预测72A1在gp350上的识别序列, 实验结果显示, 多肽DDRTTLQLAQNPVYIPETY-PYIKWDN能够特异性结合72A1, 并阻断72A1与gp350的结合^[29].

He等人^[30]从免疫gp350蛋白的兔子中分离出中和单抗R1, 该抗体能显著阻断gp350与受体CD21的相互作用, 并有效抑制EBV对B细胞的感染. 为探索基于吞噬作用的病毒免疫治疗潜力, 作者进一步将R1与靶向CD89的抗体结合, 构建了双特异性抗体R1-KH. R1-KH能够同时特异性识别gp350和CD89, 并结合被EBV感染的细胞系. 在体外实验中, R1-KH对EBV阳性细胞系表现出特异性的杀伤效果, 并以剂量依赖的方式介导针对EBV的吞噬作用. 在体内动物模型中, R1和R1-

KH均显著降低了小鼠外周血和器官中的病毒载量, 其中R1-KH的效果优于R1, 表明其能够更高效地抑制病毒在小鼠体内的感染和复制. 在小鼠淋巴瘤模型中, R1-KH同样高效抑制了EBV阳性淋巴瘤细胞的肿瘤生长和转移. 与PBS对照组相比, 治疗组小鼠表现出更高的生存率, 即使剂量低至0.1 mg/kg, 仍有60%的小鼠存活至实验终点. 此外, 作者还评估了R1-KH治疗噬血细胞性淋巴组织细胞增生症(hemophagocytic lymphohistiocytosis, HLH)的潜力. 结果显示, 在移植供体来源外周单个核细胞的小鼠中, R1-KH治疗显著降低了病毒载量并促进体重持续增长, 表明其能够有效清除小鼠体内的病毒. 以上结果表明, 双特异性抗体R1-KH不仅能从外周血和实体器官中中和EBV, 还可以通过CD89介导免疫细胞的吞噬作用清除EBV转化的淋巴瘤细胞. 在另一项研究中, Zheng等人^[31]从gp350免疫的小鼠中分离出五株针对gp350的鼠源单抗(3G1, 4C7, 4E1, 4F4和8D11), 均能够特异性结合EBV. 其中, 4E1, 8D11和3G1均能有效阻断病毒感染, 且4E1的中和效果最佳. 表位鉴定显示, 4E1识别的表位为aa 62~81, 与受体结合区表位不同(图1).

目前尚无正式发表的文章详细报道gp350与抗体复合物的结构, 但在PDB数据库中可以查询到Joyce团队上传的与gp350相关的受体复合物和抗体复合物结构数据(PDB No.: 8SGN, <https://www.rcsb.org/structure/8sgn>). 他们分享了两株猴源抗体(Cy137C02和Cy651H02)以及一株人源抗体(769A9)的结构数据(图1). 分析表位显示, 这三株抗体均与gp350的受体CD21结合区域存在不同程度的表位重叠, 推测其主要通过阻断gp350与受体CD21的结合来实现病毒中和. 这项研究成果的正式发表令人期待, 有望为理解gp350的作用机制及开发靶向gp350的抗体提供重要启发.

2 gH/gL蛋白的抗体研究进展

gH/gL是由I型跨膜蛋白gH和分泌型蛋白gL组成的异源二聚体^[32], 是EBV感染B细胞和上皮细胞的关键糖蛋白, 也是中和抗体的主要靶点. 兔源中和抗体10E4与鼠源中和抗体6H2, CL59, CL40和E1D1均识别gH/gL. 其中, 10E4和6H2在B细胞和上皮细胞感染模型中均表现出显著的中和活性^[33,34]. CL59, CL40和E1D1完全阻断了病毒对上皮细胞的感染, 但CL59和

CL40在B细胞模型中仅显示部分中和效果, 而E1D1则对B细胞感染无中和活性^[15,35-38]. 值得注意的是, 10E4和6H2联合使用时, 在两种感染模型中均显示出协同中和效果^[34].

靶向gH/gL蛋白的人源中和单抗AMMO1是首株在双细胞模型中均表现出高效中和活性的抗体, 其B细胞IC₅₀为(0.16±0.06) μg/mL, 上皮细胞IC₅₀为(0.42±0.02) μg/mL^[22]. Zhu等人^[39]筛选出另一株人源中和单抗1D8, 其在B细胞和上皮细胞感染模型中的IC₅₀分别为0.238和0.123 μg/mL. Chen等人^[38]近期筛选获得六株靶向gH/gL蛋白的人源中和单抗(769A7, 769B10, 769C2, 769C5, 770F7和770F8), 这些抗体在B细胞和上皮细胞感染模型中均表现出完全中和能力, 其针对B细胞IC₅₀为0.09~0.37 μg/mL, 针对上皮细胞IC₅₀为0.02~0.08 μg/mL.

多项研究对靶向gH/gL不同表位的抗体进行了体内保护实验评估. 识别gH/gL D-I的鼠源抗体E1D1在恒河猴实验中未能防止经口腔途径的病毒感染^[27]. 在人源化小鼠中, 识别D-I的10E4保护效果亦有限, 仅50%的保护组小鼠存活至实验终点^[34]. E1D1与10E4均与上皮细胞受体EphA2结合位点重叠, 可显著中和EBV对上皮细胞的感染, 但E1D1对B细胞感染无活性, 而10E4在B细胞模型中的中和能力较弱. 这表明, 靶向D-I表位的抗体难以在体内实现高效保护. 相比之下, 识别gH/gL D-IV的6H2在人源化小鼠模型中表现出完全保护效果, 能够预防病毒血症、脾脏肿瘤及死亡^[33]. 在人源化小鼠的动物保护实验中, CL40显示出比靶向D-IV的抗体CL59更好的保护效果, CL59保护组出现更严重的病毒血症并且伴随病毒感染引起的免疫细胞比例变化. 这可能与CL40的更长半衰期有关, 其注射一周后在血浆中的浓度是CL59的12倍^[28].

人源化小鼠尾静脉高剂量攻毒实验中, AMMO1能够显著预防病毒血症及急性感染引起的脾脏肿大^[28]. 此外, 由于AMMO1可以交叉结合并中和与EBV高度同源的恒河猴淋巴隐病毒(rhesus lymphocryptovirus, rhLCV), 在rhLCV感染恒河猴的实验中继续验证了其保护效果. 通过口腔黏膜感染rhLCV的恒河猴模型显示, AMMO1在3只恒河猴中均实现了“清除性免疫”^[28]. 在人源化小鼠模型的攻毒保护实验中, 1D8保护组小鼠体重维持正常水平并保护全部小鼠存活到实验终点, 而对照组小鼠因EBV感染全部死亡, 并且在

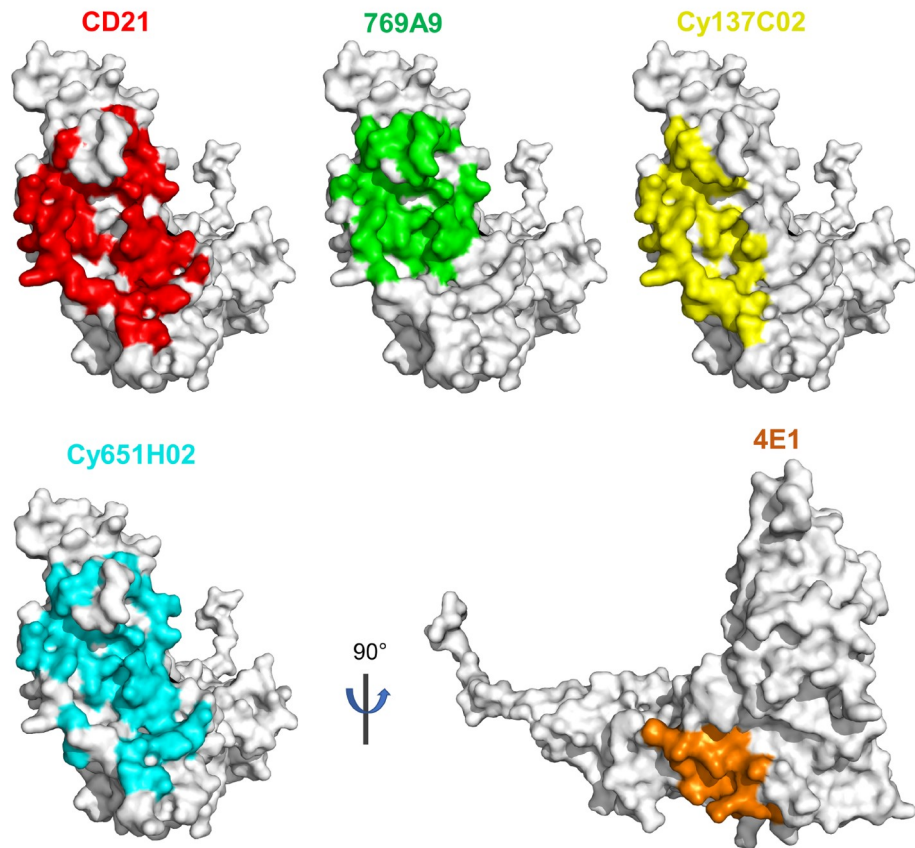


图 1 gp350受体结合表位及中和抗体表位示意图
Figure 1 Schematic diagram of receptor binding site and antibody epitope on gp350

脾脏内发现典型的弥漫性大B淋巴瘤的形成^[39]。与其他gH/gL抗体相比, 769B10和770F7治疗组的小鼠表现出更高的生存率和更低的病毒载量, 尤其是769B10在抑制EBV复制及淋巴瘤形成方面效果最佳^[38]。抗体的功能活性与结合表位和中和机制密切相关。研究表明, 靶向gH/gL D-I/D-II的抗体(如AMMO1, 1D8和769B10)具有更强的中和活性。这是因为gH/gL D-I/D-II区域是激活gB蛋白的关键区域, 在病毒感染B细胞和上皮细胞的过程中均起重要作用。

目前, 部分gH/gL中和抗体的表位信息如图2^[40]所示。晶体结构分析显示, E1D1的识别表位位于gL蛋白, 其表位与gH/gL受体EphA2的结合区域存在重叠^[41], 因此, 推测E1D1通过直接阻断gH/gL与EphA2的结合来实现上皮细胞的中和。抗体10E4同样主要结合在gL蛋白上, 虽然其表位未与EphA2结合表位直接重叠, 但10E4结合后可引起gL蛋白构象变化, 从而影响gL与

EphA2的结合^[34]。晶体结构显示, CL40的识别表位位于gH/gL蛋白的D-II和D-III的交界处^[42], 点突变验证和透射电子显微镜分析将CL59的识别范围定位在gH/gL蛋白的D-IV^[42,43]。抗体6H2同样靶向gH/gL D-IV, 其与gH/gL/gp42复合物结合后产生空间位阻, 抑制gp42与HLA-II受体的结合, 从而实现对B细胞的中和^[33,34]。AMMO1识别gH/gL D-I/D-II的不连续表位, 与CL40存在部分表位重叠。AMMO1能够阻断gH/gL与B淋巴细胞和上皮细胞表面受体的结合, 表现出较强的膜融合抑制活性。然而, AMMO1并不阻断gH/gL与EphA2的结合。推测其中和机制可能通过抑制gH/gL的变构, 进而干扰融合激活信号传递至gB蛋白, 从而抑制膜融合; 另一种可能性是其Fc端产生潜在位阻作用。具体的中和机制仍需进一步研究^[22]。1D8的结合位点位于gH/gL D-I/D-II形成的凹槽上方, 其能有效抑制gH/gL与上皮细胞和B淋巴细胞表面受体的结合, 且具有高效的膜

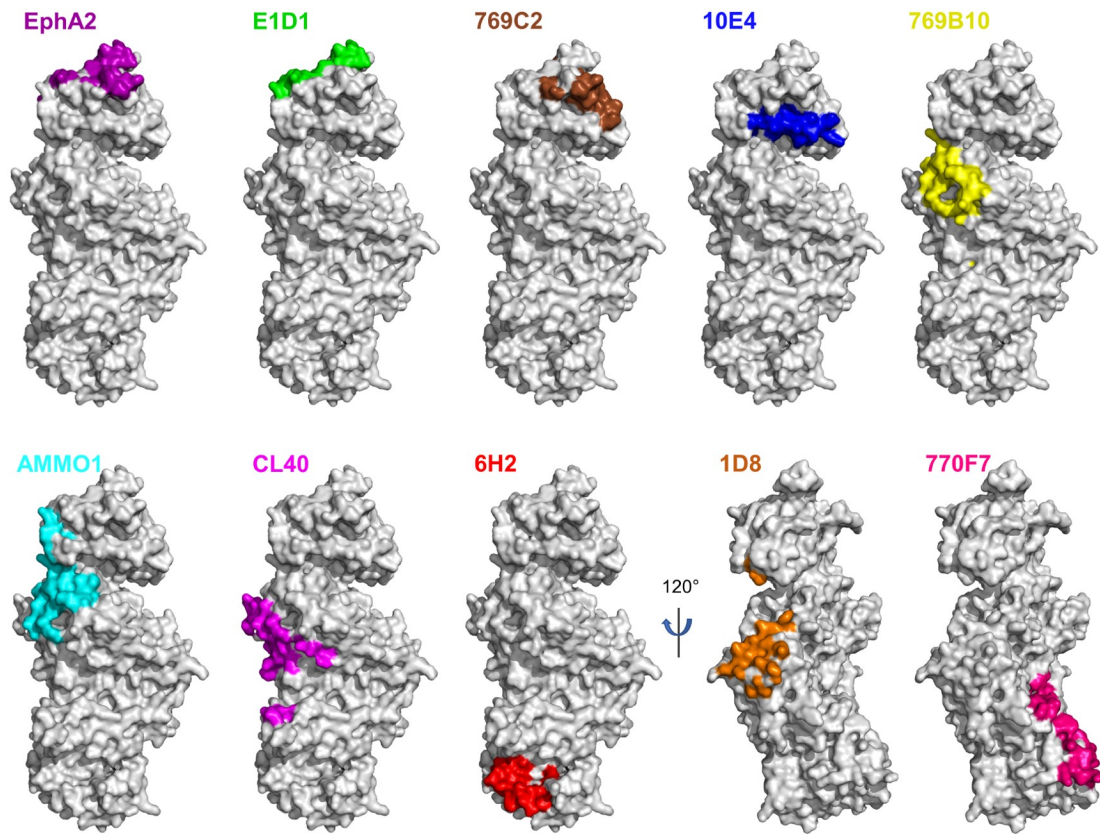


图 2 gHgL受体结合表位及中和抗体表位示意图^[22,33,34,38-42]
Figure 2 Schematic diagram of receptor binding site and antibody epitope on gHgL^[22,33,34,38-42]

融合抑制能力^[39]。Chen等人^[38]通过结构分析发现, 770F8和769C2靶向gH/gL的D-I区域, 769B10和769A7识别D-I/D-II区域, 769C5结合D-II/D-III交界处, 而770F7则靶向D-IV。这些抗体均表现出较高的膜融合抑制活性。769B10, AMMO1和CL40之间均存在表位竞争^[20]。结合AMMO1和769B10的动物保护实验结果可见, gH/gL D-I/D-II区域是gH/gL蛋白的优势表位区, 具有诱导更强中和活性抗体产生的潜力。

3 gp42蛋白的抗体研究进展

gp42蛋白是EBV感染B淋巴细胞所必需的糖蛋白, 属于II型膜蛋白。最早报道的鼠源中和单抗F-2-1靶向gp42蛋白, 能够高效阻断EBV对B淋巴细胞的感染, 但无法中和对上皮细胞的感染。研究数据显示, F-2-1可以抑制gp42蛋白与B淋巴细胞的结合, 推测其机制是阻断gp42与受体HLA-II之间的相互作用^[36,37,44,45]。本

团队^[46]通过鼠杂交瘤技术筛选出9株靶向gp42蛋白N端区域的非中和鼠源单抗。其中, 6株抗体(2C3, 2E4, 3D4, 4D8, 6B8, 6C1)识别gp42的aa 44~61区域, 3株抗体(4H7, 4H8, 11G10)识别aa 67~81区域。所有抗体均表现出与gp42蛋白的高亲和力结合, 其中识别aa 67~81区域的3株抗体可用于gp42的Western blot检测, 并显示出与rhLCV病毒gp42蛋白的交叉反应性。这些抗体的筛选为gp42 N端表位的鉴定及功能研究提供了重要工具。此外, 本团队^[47]筛选出2株靶向gp42蛋白的兔源中和单抗1A7和6G7, 其B细胞感染模型的中和IC₅₀分别为0.51和0.28 μg/mL。在后续实验中, 6G7表现出较强的体内保护效果。在人源化小鼠攻毒实验中, 6G7组小鼠均存活至实验终点, 并成功避免了EBV感染引起的肿瘤, 与已报道的gH/gL中和单抗AMMO1表现出相当的保护活性。通过表位替换实验, 鉴定出1A7和6G7分别识别gp42的aa 149~163和174~183区域(图3)。此外, 这两株抗体均能有效抑制gH/gL/gp42复合物介导

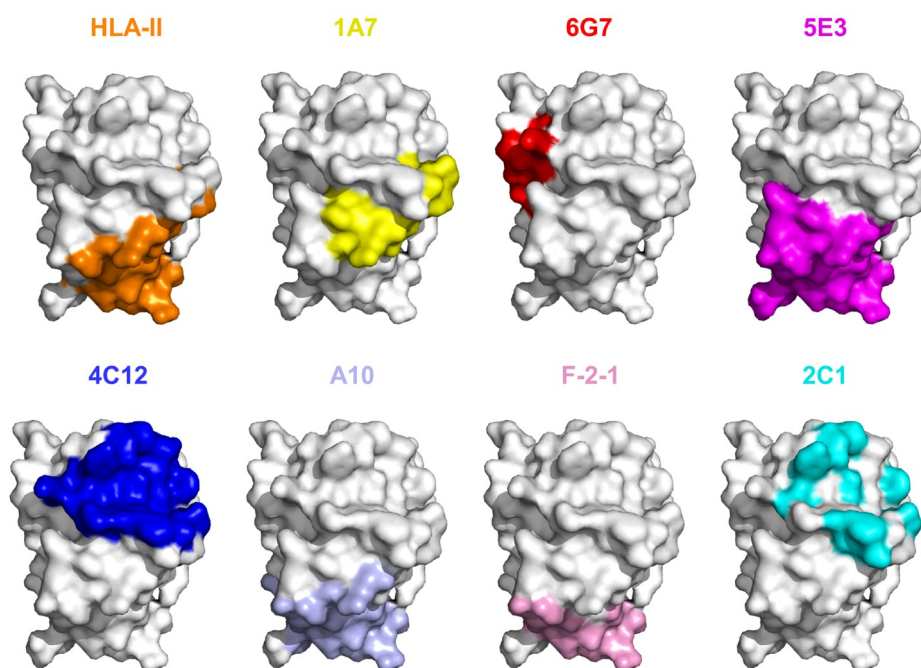


图3 gp42受体结合表位及中和抗体表位示意图^[34,47-50]

Figure 3 Schematic diagram of receptor binding site and antibody epitope on gp42^[34,47-50]

的膜融合。

在另一项研究中,本团队^[34]分离获得了两株靶向gp42蛋白的兔源单抗3E8和5E3。其中,3E8无中和活性,两株抗体的表位不发生竞争。5E3显示出较高的B细胞中和活性,IC₅₀为0.2 μg/mL。与gH/gL特异性中和抗体联合使用时,5E3在体外实验中表现出协同中和效果。体内实验显示,5E3单独使用以及基于5E3的三抗体鸡尾酒疗法(5E3, 6H2和10E4)均能有效抑制EBV在人源化小鼠体内引发的病毒血症、免疫细胞变化、肿瘤形成及动物死亡。

为探究5E3的中和机制,本团队利用冷冻电子显微镜技术解析了包含gH, gL, gp42三个糖蛋白及四个单抗(6H2, 10E4, 5E3, 3E8)的七元复合物,分辨率为3.59 Å。结构分析显示,5E3主要与gp42蛋白的loop(aa 104~112)和helix(aa 147~155)相互作用(图3)。通过抗体与人血清的竞争实验,发现识别与5E3类似表位的抗体在人血清中占据优势。后续细胞结合和膜融合实验进一步证实,5E3能够抑制gH/gL/gp42复合物与B细胞膜表面的结合,并阻断后续的膜融合过程。受体阻断实验表明,5E3能够阻断gp42与其受体HLA-II的结合,这与结构分析中5E3表位与受体结合表位重叠的结果相

吻合^[34]。这项研究首次综合报道了gp42蛋白中和表位与非中和表位的结构信息。人血清竞争实验结果进一步表明, gp42是重要的中和抗体识别靶点。

Bu等人^[48]从免疫gH/gL/gp42蛋白的猕猴中分离出单抗A10,从免疫gp42蛋白的小鼠中筛选获得单抗4C12。两株抗体均特异性识别gp42蛋白。为更好地比较和评价gp42抗体,研究者将F-2-1, A10和4C12的恒定区替换为人源IgG1恒定区。表位竞争实验显示, F-2-1与A10存在表位竞争,可能识别相似或部分重叠的表位,而4C12与另外两株抗体无明显表位竞争。在B细胞中和实验中, A10展现出强中和活性, IC₅₀为(0.04±0.01) μg/mL, 显著优于F-2-1((0.59±0.07) μg/mL)和4C12((1.50±0.02) μg/mL)。在膜融合抑制实验中, A10与4C12的抑制效率相当,均显著优于F-2-1。在受体阻断实验中, A10能够高效阻断gp42或gH/gL/gp42与HLA-II的结合, F-2-1次之,而4C12无法阻断gp42与HLA-II的相互作用。A10还能完全阻断gp42或gH/gL/gp42与B细胞膜的结合,而F-2-1仅部分抑制, 4C12无抑制效果。晶体结构分析表明, A10和F-2-1的识别表位有约80%重叠,并与HLA-II结合表位部分重叠,而4C12结合gp42的C端,其表位与

A10和F-2-1完全不同。

在动物保护实验中, A10治疗组的人源化小鼠生存率在两组实验中分别为100%和80%。F-2-1和4C12治疗组的小鼠生存率分别为80%和100%。A10治疗组未出现病毒血症, 而F-2-1组80%的小鼠和4C12组全部小鼠在外周血中检测到EBV病毒拷贝。病理分析显示, F-2-1组20%的小鼠在至少一个器官表面出现病变, 而A10组未发现器官病变。两次动物实验中, 仅一只A10组小鼠出现淋巴细胞增生性疾病(lymphoproliferative diseases), 但未形成淋巴瘤。F-2-1组有一只小鼠出现淋巴瘤, 而4C12组未见淋巴瘤形成。综上所述, 在三株gp42中和抗体中, A10在抑制因EBV感染引发的人源化小鼠病毒血症和淋巴瘤方面表现出最佳效果。

人类是EBV的天然宿主, 而B细胞是EBV的主要感染细胞。B细胞表达EBV包膜糖蛋白gp350和gp42的受体CD21和HLA-II, 因此筛选针对gp350和gp42的人源抗体具有极大挑战。Zhao等人^[49]创新性地利用EBV阳性人群的外周血单个核细胞样品, 构建人源scFv噬菌体展示抗体库, 成功分离出靶向gp42蛋白的人源单抗2B7和2C1, 其能高效中和EBV对B细胞的感染。此外, 在多种HLA-II阳性上皮细胞模型中, 这些gp42中和抗体也表现出显著的中和作用。冷冻电子显微镜结构解析表明, 2B7和2C1识别gp42上的不同表位(图3), 这与表位竞争实验结果一致。两株抗体的表位均不同于gp42与受体HLA-II的结合表位。其中, 2C1识别表位与gp42的疏水口袋部分重叠。突变实验显示, 2C1通过其与gp42疏水口袋类似的疏水表面, 与gp42发生疏水相互作用。

在受体阻断实验中, 2B7和2C1均未直接阻断gp42或gH/gL/gp42复合物与HLA-II的结合, 也不影响gH/gL/gp42与受体EphA2的结合。这两株抗体在结合gp42蛋白后可能会诱导其构象变化, 从而降低gp42与HLA-II结合的亲和力, 最终抑制病毒感染。

为进一步评估抗体的体内保护效果, 在人源化小鼠模型中进行了实验。结果显示, 2C1对EBV感染具有显著保护作用。2C1治疗组小鼠的外周血EBV DNA拷贝数(<10 copies/ μ L)显著低于2B7治疗组(>100 copies/ μ L)和PBS对照组(>1000 copies/ μ L)。此外, 2C1治疗组的小鼠体重变化较稳定, 与2B7组和PBS对照组相比差异显著。生存曲线结果表明, 2C1治疗组83.3%的小鼠存活至实验终点, 而2B7组和PBS对照组小鼠均在5周

内死亡。病理分析显示, 2C1组小鼠肝脏、脾脏和肾脏中的EBV DNA拷贝数显著低于对照组, 进一步验证了2C1对EBV复制的抑制作用。此外, 2B7和2C1在两种细胞模型中均表现出膜融合抑制活性, 上皮细胞中的抑制效果与HLA-II表达水平密切相关。尽管2B7和2C1无法直接阻断gp42与受体的结合, 其中和机制可能是通过影响gH/gL/gp42-HLA-II复合物的结构, 从而间接抑制对gB的激活, 最终干扰gB诱导的膜融合。血清与抗体结合竞争实验表明, 2C1具有较高的阻断效率。这表明, 与2C1表位类似的抗体在人类EBV感染人群中可能普遍存在。

4 gB蛋白的抗体研究进展

gB蛋白是III型膜融合蛋白, 其C端为单次跨膜区域, 是疱疹病毒中保守性最高的糖蛋白^[51]。作为EBV的关键融合蛋白, gB参与病毒包膜与细胞膜或内体膜的融合。早期仅报道了一株靶向gB的非中和鼠单抗CL55^[15,43], 主要用作gB蛋白相关检测的工具抗体。2018年, Snijder等人^[22]报道了4株靶向gB蛋白的单抗(AMMO2~AMMO5), 其中AMMO5是首株具有中和活性的gB特异性单抗, 能够完全中和EBV对上皮细胞的感染, 但无法完全阻断病毒对B细胞的感染。通过重叠肽库实验, AMMO5的识别表位被鉴定为⁴¹⁰PSPPAP-PSPPAPSAAR⁴¹⁹(图4)^[52]。近期, 本团队^[52]筛选出两株针对gB蛋白的中和鼠单抗8A9和8C12。这两株抗体均能完全阻断EBV对B细胞的感染, IC₅₀分别为0.75和5.39 μ g/mL。表位分析表明, 8A9和8C12均识别偏线性表位, 其中8A9还能识别rhLCV的gB蛋白, 说明其识别表位在EBV和rhLCV gB蛋白之间具有保守性。进一步研究显示, 8A9和8C12均靶向gB蛋白的D-II区域, 与AMMO5的表位不同。

此外, 本团队^[53]还筛选出两株高效中和抗体3A3和3A5, 能够高效中和两种体外细胞模型的感染, 并表现出协同作用。在B细胞感染模型中, 3A3和3A5的中和IC₅₀分别为2.97和4.90 μ g/mL, 两者联合使用的IC₅₀为0.49 μ g/mL; 在上皮细胞感染模型中, 3A3和3A5的中和IC₅₀分别为0.08和0.31 μ g/mL, 联合IC₅₀为0.06 μ g/mL。3A3和3A5均能高效抑制gB介导的膜融合。在人源化小鼠模型中评价了两株抗体的体内保护效果, 结果显示, 3A3和3A5保护组小鼠均能存活到实

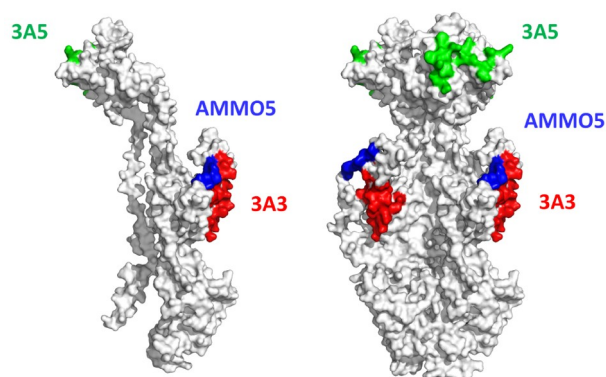


图4 gB中和抗体表位示意图

Figure 4 Schematic diagram of receptor binding site and antibody epitope on gB

验终点,但AMMO5保护组小鼠出现2只小鼠死亡,两株抗体的保护效果要优于AMMO5。在抗体与人血清的竞争实验中,3A3和3A5能达到30%~40%的竞争率,联合使用的竞争率达到70%左右,说明识别类似3A3和3A5表位的抗体是人血清中gB抗体的主要占比。3A3与3A5没有表位竞争,可以同时结合到gB蛋白上,通过冷冻电子显微镜技术解析gB蛋白与两个抗体的分辨率为3.9 Å三元复合物结构。从结构上可以看出3A3识别gB蛋白D-II,3A5识别gB蛋白的D-IV(图4)。

5 讨论

EBV在人群中广泛感染,并与癌症、自身免疫性疾病等多种疾病的发生和发展密切相关。然而,由于其感染机制的复杂性,目前尚无有效的治疗性药物或疫苗获批上市。深入了解EBV的感染过程及机制,对于阐明病毒特性和推动相关抗病毒研究具有重要意义。病毒特异性抗体是机体应对病毒感染的重要防御分子,解析其功能机制不仅有助于全面认识不同病毒抗原的免疫原性特征,也能为开发阻断病毒感染的治疗性药物和预防性疫苗提供重要指导。

在EBV抗体研究领域,尚缺乏大规模、系统性的体液免疫分析。现有研究主要集中于少量抗体的活性及机制解析。一方面,人群中普遍存在EBV感染,需要选择不同类型的代表性样本,以比较不同人群对EBV感染或再激活的体液免疫应答差异;另一方面,对于一些关键EBV糖蛋白(如gp350, gp42和gB),仍缺乏足够数量的代表性抗体作为参考,相关表位及体液免疫

反应的关联性理解尚需深入。

缺乏gp350和gp42高效中和抗体的部分原因在于,分离针对这两种糖蛋白的人源抗体存在技术挑战。gp350和gp42分别与B细胞表面受体CD21和HLA-II结合,无法通过商品化抗体对其受体进行阻断封闭。这种受体的高特异性结合在流式细胞分选过程中造成了严重的非特异性干扰^[22],从而增加了筛选针对gp350和gp42人源抗体的难度。通过噬菌体展示技术,避免了对gp350和gp42特异性B细胞的分离,可以筛选获得针对gp350和gp42蛋白的中和人源抗体。然而,通过噬菌体展示库技术获得的抗体轻重链属于组合配对。若进一步探究抗体的进化与成熟机制,仍需开发新技术以获得天然配对的抗体。

除噬菌体筛选技术外,开发更高效的受体阻断剂,设计糖蛋白受体结合区的突变位点,以及利用全人源抗体小鼠模型,均有望为获得天然配对的gp350和gp42抗体提供更多可能性。未来,随着高通量测序技术的发展,抗体组学分析将有助于揭示EBV感染或EBV疫苗接种诱导的B细胞抗体谱变化。这一技术不仅能加深对病毒诱导体液免疫特征的理解,还将为EBV疫苗的理性设计提供强有力的支持。

gH/gL蛋白在EBV感染过程中同时参与上皮细胞和淋巴B细胞的感染。然而,抗体E1D1和CL59在这两种感染模型中的中和效价存在显著差异^[22,42],这表明gH/gL在病毒感染不同宿主细胞时发挥了不同功能。这种功能差异可能源于gH/gL在不同细胞类型中的感染过程中,与gB蛋白的相互作用机制存在差异。相关抗体的研究为理解糖蛋白不同区段和表位在病毒感染中的功能差异提供了新视角。

作为EBV的融合蛋白,gB蛋白存在融合前构象(prefusion)和融合后构象(postfusion)。根据已有融合蛋白研究经验,融合前构象通常包含高效中和表位,可诱导更高比例的中和抗体,其效价显著优于融合后构象诱导的抗体。然而,目前用于抗体筛选的gB蛋白均为融合后构象,其诱导中和抗体的比例较低(2/13)^[53],未来的研究可以借鉴HCMV^[27]和HSV-1^[54]融合前构象gB蛋白稳固策略,用于gB蛋白的设计与生产。通过使用融合前构象的gB蛋白进行疫苗开发和抗体筛选,有望获得更高效的中和抗体。

在EBV研究实验中,多种动物模型,包括猕猴、恒河猴、人源化小鼠、兔子和树鼯等,均可实现不同程

度的EBV感染,反映由感染引起的疾病特征^[55]。在近期的EBV中和抗体体内保护研究中,恒河猴和人源化小鼠是使用最广泛的动物模型。恒河猴因其生理结构和免疫系统与人类的高度相似性,成为一种重要模型,可更准确地模拟人类EBV感染的情况。然而,在实验条件下,需要使用与EBV高度同源的rhLCV感染恒河猴,因此用于评估的抗体需对rhLCV具有交叉反应性。但部分抗体对rhLCV的反应活性较低,可能无法充分反映抗体的真实体内保护效果。此外,恒河猴实验成本较高,操作复杂,这些现实因素也是研究者需要权衡的重要问题。

相比之下,小鼠模型,尤其是人源化小鼠模型,由于成本较低且广泛使用,成为另一重要选择。人源化小鼠能部分模拟人类免疫系统,用于支持EBV感染研究。该模型可实现B细胞感染,并诱发EBV阳性淋巴瘤的形成,但因缺乏人类上皮细胞,无法再现EBV在体内的上皮感染特征。因此,目前尚无一种动物模型能够

完全模拟EBV在人体内的感染并满足所有研究需求。每种模型都有其优缺点,需根据具体研究目的和条件选择使用。未来,期待更多研究团队开发出更接近人类免疫系统、更具操作性和成本效益的动物模型,以助力EBV疫苗和抗体研究。

包括EBV在内的疱疹病毒具有相似的生命周期和复杂的感染机制,多种糖蛋白在病毒吸附、融合以及与宿主细胞相互作用中发挥关键作用。在抗病毒研究中,针对糖蛋白的中和抗体开发,不仅为阻断病毒感染提供了有效手段,还为深入理解不同糖蛋白的免疫应答机制和病毒感染路径提供了重要线索。EBV中和抗体研究中积累的经验可以广泛应用于其他疱疹病毒的研究开发。这些经验包括糖蛋白功能的理解、关键靶点的筛选、多靶点联合抗病毒策略的制定、免疫表位的解析,以及疫苗的理性设计。基于疱疹病毒共性机制的泛疱疹病毒抗体与疫苗研发,有望实现更高效、更全面的防治目标。

参考文献

- 1 Cohen J I. Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med*, 2000, 343: 481–492
- 2 Cohen J I, Mocarski E S, Raab-Traub N, et al. The need and challenges for development of an Epstein-Barr virus vaccine. *Vaccine*, 2013, 31: B194–B196
- 3 Cohen J I, Fauci A S, Varmus H, et al. Epstein-Barr virus: an important vaccine target for cancer prevention. *Sci Transl Med*, 2011, 3: 107fs7
- 4 Bjornevik K, Cortese M, Healy B C, et al. Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science*, 2022, 375: 296–301
- 5 Lanz T V, Brewer R C, Ho P P, et al. Clonally expanded B cells in multiple sclerosis bind EBV EBNA1 and GlialCAM. *Nature*, 2022, 603: 321–327
- 6 Vietzen H, Berger S M, Kühner L M, et al. Ineffective control of Epstein-Barr-virus-induced autoimmunity increases the risk for multiple sclerosis. *Cell*, 2023, 186: 5705–5718.e13
- 7 Zandman-Goddard G, Berkun Y, Barzilai O, et al. Exposure to Epstein-Barr virus infection is associated with mild systemic lupus erythematosus disease. *Ann N Y Acad Sci*, 2009, 1173: 658–663
- 8 Su Y, Yuan D, Chen D G, et al. Multiple early factors anticipate post-acute COVID-19 sequelae. *Cell*, 2022, 185: 881–895.e20
- 9 Chen T, Song J, Liu H, et al. Positive Epstein-Barr virus detection in coronavirus disease 2019 (COVID-19) patients. *Sci Rep*, 2021, 11: 10902
- 10 Xie Y, Cao S, Dong H, et al. Clinical characteristics and outcomes of critically ill patients with acute COVID-19 with Epstein-Barr virus reactivation. *BMC Infect Dis*, 2021, 21: 955
- 11 Hutt-Fletcher L M. EBV glycoproteins: where are we now? *Future Virol*, 2015, 10: 1155–1162
- 12 Szakonyi G, Klein M G, Hannan J P, et al. Structure of the Epstein-Barr virus major envelope glycoprotein. *Nat Struct Mol Biol*, 2006, 13: 996–1001
- 13 Ogembo J G, Kannan L, Ghiran I, et al. Human complement receptor type 1/CD35 is an Epstein-Barr virus receptor. *Cell Rep*, 2013, 3: 371–385
- 14 Sathiyamoorthy K, Jiang J, Hu Y X, et al. Assembly and architecture of the EBV B cell entry triggering complex. *PLoS Pathog*, 2014, 10: e1004309
- 15 Chesnokova L S, Hutt-Fletcher L M. Fusion of Epstein-Barr virus with epithelial cells can be triggered by $\alpha\text{v}\beta 5$ in addition to $\alpha\text{v}\beta 6$ and $\alpha\text{v}\beta 8$, and

- integrin binding triggers a conformational change in glycoproteins gH/gL. *J Virol*, 2011, 85: 13214–13223
- 16 Zhang H, Li Y, Wang H B, et al. Ephrin receptor A2 is an epithelial cell receptor for Epstein-Barr virus entry. *Nat Microbiol*, 2018, 3: 1–8
- 17 Kirschner A N, Omerović J, Popov B, et al. Soluble Epstein-Barr virus glycoproteins gH, gL, and gp42 form a 1:1:1 stable complex that acts like soluble gp42 in B-cell fusion but not in epithelial cell fusion. *J Virol*, 2006, 80: 9444–9454
- 18 Edson C M, Thorley-Lawson D A. Epstein-Barr virus membrane antigens: characterization, distribution, and strain differences. *J Virol*, 1981, 39: 172–184
- 19 Tanner J, Weis J, Fearon D, et al. Epstein-barr virus gp350/220 binding to the B lymphocyte C3d receptor mediates adsorption, capping, and endocytosis. *Cell*, 1987, 50: 203–213
- 20 Bu W, Joyce M G, Nguyen H, et al. Immunization with components of the viral fusion apparatus elicits antibodies that neutralize Epstein-Barr virus in B cells and epithelial cells. *Immunity*, 2019, 50: 1305–1316.e6
- 21 Hoffman G J, Lazarowitz S G, Hayward S D. Monoclonal antibody against a 250,000-dalton glycoprotein of Epstein-Barr virus identifies a membrane antigen and a neutralizing antigen. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, 77: 2979–2983
- 22 Snijder J, Ortego M S, Weidle C, et al. An antibody targeting the fusion machinery neutralizes dual-tropic infection and defines a site of vulnerability on Epstein-Barr virus. *Immunity*, 2018, 48: 799–811.e9
- 23 Thorley-Lawson D A, Geilinger K. Monoclonal antibodies against the major glycoprotein (gp350/220) of Epstein-Barr virus neutralize infectivity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, 77: 5307–5311
- 24 Slabik C, Kalbarczyk M, Danisch S, et al. CAR-T cells targeting Epstein-Barr virus gp350 validated in a humanized mouse model of EBV infection and lymphoproliferative disease. *Mol Ther Oncolytics*, 2020, 18: 504–524
- 25 Mutsunguma L Z, Rodriguez E, Escalante G M, et al. Identification of multiple potent neutralizing and non-neutralizing antibodies against Epstein-Barr virus gp350 protein with potential for clinical application and as reagents for mapping immunodominant epitopes. *Virology*, 2019, 536: 1–15
- 26 Haque T, Johannessen I, Dombagoda D, et al. A mouse monoclonal antibody against Epstein-Barr virus envelope glycoprotein 350 prevents infection both *in vitro* and *in vivo*. *J Infect Dis*, 2006, 194: 584–587
- 27 Mühle J, Aye P P, Quink C, et al. Neutralizing antibodies against Epstein-Barr virus infection of B cells can protect from oral viral challenge in the rhesus macaque animal model. *Cell Rep Med*, 2021, 2: 100352
- 28 Singh S, Homad L J, Akins N R, et al. Neutralizing antibodies protect against oral transmission of lymphocryptovirus. *Cell Rep Med*, 2020, 1: 100033
- 29 Tanner J E, Coinçon M, Leblond V, et al. Peptides designed to spatially depict the Epstein-Barr virus major virion glycoprotein gp350 neutralization epitope elicit antibodies that block virus-neutralizing antibody 72A1 interaction with the native gp350 molecule. *J Virol*, 2015, 89: 4932–4941
- 30 He H, Lei F, Huang L, et al. Immunotherapy of Epstein-Barr virus (EBV) infection and EBV-associated hematological diseases with gp350/CD89-targeted bispecific antibody. *Biomed Pharmacother*, 2023, 163: 114797
- 31 Zheng J, Zeng X, Zeng L, et al. Preparation of monoclonal antibodies against Epstein-Barr virus glycoprotein 350. *Virus Genes*, 2023, 59: 670–677
- 32 Matsuura H, Kirschner A N, Longnecker R, et al. Crystal structure of the Epstein-Barr virus (EBV) glycoprotein H/glycoprotein L (gH/gL) complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 22641–22646
- 33 Hong J, Zhong L, Zheng Q, et al. A neutralizing antibody targeting gH provides potent protection against EBV challenge *in vivo*. *J Virol*, 2022, 96: e0007522
- 34 Hong J, Zhong L, Liu L, et al. Non-overlapping epitopes on the gH/gL-gp42 complex for the rational design of a triple-antibody cocktail against EBV infection. *Cell Rep Med*, 2023, 4: 101296
- 35 Balachandran N, Oba D E, Hutt-Fletcher L M. Antigenic cross-reactions among herpes simplex virus types 1 and 2, Epstein-Barr virus, and cytomegalovirus. *J Virol*, 1987, 61: 1125–1135
- 36 Li Q, Turk S M, Hutt-Fletcher L M. The Epstein-Barr virus (EBV) BZLF2 gene product associates with the gH and gL homologs of EBV and carries an epitope critical to infection of B cells but not of epithelial cells. *J Virol*, 1995, 69: 3987–3994
- 37 Molesworth S J, Lake C M, Borza C M, et al. Epstein-Barr virus gH is essential for penetration of B cells but also plays a role in attachment of virus to epithelial cells. *J Virol*, 2000, 74: 6324–6332

- 38 Chen W H, Kim J H, Bu W, et al. Epstein-Barr virus gH/gL has multiple sites of vulnerability for virus neutralization and fusion inhibition. *Immunity*, 2022, 55: 2135–2148.e6
- 39 Zhu Q Y, Shan S, Yu J, et al. A potent and protective human neutralizing antibody targeting a novel vulnerable site of Epstein-Barr virus. *Nat Commun*, 2021, 12: 6624
- 40 Sathiyamoorthy K, Hu Y X, Möhl B S, et al. Structural basis for Epstein-Barr virus host cell tropism mediated by gp42 and gHgL entry glycoproteins. *Nat Commun*, 2016, 7: 13557
- 41 Su C, Wu L, Chai Y, et al. Molecular basis of EphA2 recognition by gHgL from gammaherpesviruses. *Nat Commun*, 2020, 11: 5964
- 42 Sathiyamoorthy K, Jiang J, Möhl B S, et al. Inhibition of EBV-mediated membrane fusion by anti-gHgL antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114: E8703–E8710
- 43 Wu L, Borza C M, Hutt-Fletcher L M. Mutations of Epstein-Barr virus gH that are differentially able to support fusion with B cells or epithelial cells. *J Virol*, 2005, 79: 10923–10930
- 44 Strnad B C, Schuster T, Klein R, et al. Production and characterization of monoclonal antibodies against the Epstein-Barr virus membrane antigen. *J Virol*, 1982, 41: 258–264
- 45 Chesnokova L S, Nishimura S L, Hutt-Fletcher L M. Fusion of epithelial cells by Epstein-Barr virus proteins is triggered by binding of viral glycoproteins gHgL to integrins $\alpha\beta 6$ or $\alpha\beta 8$. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 20464–20469
- 46 Hong J, Wei D, Wu Q, et al. Antibody generation and immunogenicity analysis of EBV gp42 N-terminal region. *Viruses*, 2021, 13: 2380
- 47 Wu Q, Zhong L, Wei D, et al. Neutralizing antibodies against EBV gp42 show potent *in vivo* protection and define novel epitopes. *Emerg Microbes Infects*, 2023, 12: 2245920
- 48 Bu W, Kumar A, Board N L, et al. Epstein-Barr virus gp42 antibodies reveal sites of vulnerability for receptor binding and fusion to B cells. *Immunity*, 2024, 57: 559–573.e6
- 49 Zhao G X, Fang X Y, Bu G L, et al. Potent human monoclonal antibodies targeting Epstein-Barr virus gp42 reveal vulnerable sites for virus infection. *Cell Rep Med*, 2024, 5: 101573
- 50 McShane M P, Longnecker R. Cell-surface expression of a mutated Epstein-Barr virus glycoprotein B allows fusion independent of other viral proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 17474–17479
- 51 Backovic M, Longnecker R, Jardetzky T S. Structure of a trimeric variant of the Epstein-Barr virus glycoprotein B. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 2880–2885
- 52 Hong J, Wei D, Zhong L, et al. Glycoprotein B antibodies completely neutralize EBV infection of B Cells. *Front Immunol*, 2022, 13: 920467
- 53 Zhang X, Hong J, Zhong L, et al. Protective anti-gB neutralizing antibodies targeting two vulnerable sites for EBV-cell membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2022, 119: e2202371119
- 54 Vollmer B, Pražák V, Vasishtan D, et al. The prefusion structure of herpes simplex virus glycoprotein B. *Sci Adv*, 2020, 6: eabc1726
- 55 Sun C, Chen X, Kang Y, et al. The status and prospects of Epstein-Barr virus prophylactic vaccine development. *Front Immunol*, 2021, 12: 677027

Research progress on neutralizing antibodies against Epstein-Barr virus glycoproteins

HONG JunPing^{1,2,4}, ZHONG Ling^{1,3}, ZHANG WanLin³, ZHENG QingBing², XU Miao³,
CHEN YiXin², XIA NingShao² & ZHANG Xiao¹

1 College of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

2 State Key Laboratory of Vaccines for Infectious Diseases, National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in Infectious Diseases, Xiamen University, Xiamen 361005, China;

3 State Key Laboratory of Oncology in South China, Guangdong Key Laboratory of Nasopharyngeal Carcinoma Diagnosis and Therapy, Guangdong Provincial Clinical Research Center for Cancer, Sun Yat-sen University Cancer Center, Guangzhou 510060, China;

4 The University of Texas Health Science Center at Houston, Houston 77030, USA

Epstein-Barr virus (EBV), a member of the human herpesvirus γ subfamily, is the first identified human oncogenic virus. EBV infection is closely associated with the development of infectious mononucleosis, various lymphomas, and epithelial cell tumors, contributing to over 200000 tumor cases and more than 140000 deaths globally each year. This significant public health and economic burden underscores the urgent need for effective therapeutics and vaccines. Currently, no approved drugs or vaccines specifically target EBV. Neutralizing antibodies, which primarily target glycoproteins on the EBV envelope involved in viral entry, serve as valuable tools for virological research. Evaluating the properties and functional activities of these antibodies enhances our understanding of EBV infection mechanisms and informs rational vaccine design. Additionally, neutralizing antibodies exhibit potent *in vivo* and *in vitro* activity, offering promising potential for the prevention and treatment of EBV infections and associated diseases. This review systematically explores neutralizing antibodies targeting EBV envelope glycoproteins, summarizing their functional characteristics, binding epitopes, and neutralizing mechanisms. By providing insights into these antibodies, the article aims to establish a robust theoretical foundation for the development of therapeutic drugs and vaccines against EBV.

Epstein-Barr virus, glycoprotein, neutralizing antibody, immunodominant epitope, neutralizing mechanism

doi: [10.1360/SSV-2024-0181](https://doi.org/10.1360/SSV-2024-0181)