

· 研究进展 ·

狂犬病病毒中和单抗表位鉴定和中和广谱性评价研究进展

王文波, 于传飞, 王兰* (中国食品药品检定研究院, 国家卫生健康委员会生物技术产品检定及标准化重点实验室, 国家药品监督管理局生物制品质量研究与评价重点实验室, 北京 102629)

摘要 目的: 对狂犬病病毒(RABV)中和单抗的研发进展及其表位和中和广谱性研究评价进行综述, 为行业提供参考。方法: 通过文献检索, 对国内外开展的狂犬病病毒中和单抗研究进行梳理和汇总。结果与结论: 中和抗体在狂犬病暴露后预防中发挥着重要的作用, 目前国内外已有多个RABV单抗品种上市并有多个品种处于临床评价阶段。RABV具有较高的突变频率且感染发病后致死率极高, 为了最大程度地中和自然流行的RABV病毒株, 以防止感染后狂犬病的发生, 在单抗候选药物研发时应对其表位和广谱性进行充分的研究评价。

关键词: 单抗; 狂犬病病毒; 表位鉴定; 中和广谱性

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2023)10-1172-008

doi:10.16153/j.1002-7777.2023.10.009

Progress in Epitope Mapping and Evaluation of Neutralization Spectrum of Neutralizing Monoclonal Antibody against Rabies Virus

Wang Wenbo, Yu Chuanfei, Wang Lan* (National Institutes for Food and Drug Control, NHC Key Laboratory of Research on Quality and Standardization of Biotech Products, NMPA Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Biological Products, Beijing 102629, China)

Abstract Objective: To review the research and development progress of neutralizing monoclonal antibody (mAb) against rabies virus (RABV), as well as its epitope mapping and evaluation of neutralization spectrum, in order to provide references for the industry. **Methods:** Through literature retrieval, the research on anti-RABV mAbs both domestically and internationally was summarized. **Results and Conclusion:** Neutralizing antibodies against RABV play an important role in post exposure prophylaxis (PEP). At present, there are several anti-RABV mAbs been approved or at clinical trails both domestically and internationally. RABV has high mutation rate, and has almost 100% mortality rate once clinical symptoms appear after infection. To maximize the neutralization activity against naturally circulating RABV strains and avoid fatal rabies, the epitope and neutralization spectrum of anti-RABV mAb candidates should be carefully studied during research and development stage.

Keywords: monoclonal antibody; rabies virus; epitope mapping; neutralization spectrum

基金项目: 国家重点研发计划蛋白类生物制品主成分及其相关成分精准定量检测技术研究(编号 2021YFF0600804)

作者简介: 王文波 Tel: (010) 53852177; E-mail: qinghaiminhe@163.com

通信作者: 王兰 Tel: (010) 53852159; E-mail: iamouran@163.com

狂犬病 (Rabies) 是由狂犬病毒属病毒 (Lyssavirus) 感染引起的急性传染病, 通常在感染者出现临床症状后, 死亡率几乎可达100%, 全球每年大约有59000人死于狂犬病。我国是狂犬病高发国家, 狂犬病在中国已经有超过2000年的历史, 自2005年开始实施狂犬病的监测以来, 我国狂犬病死亡病例数显著降低, 但仍是我国传染病中致死数排名前五的疾病。

由于接种疫苗后机体诱导针对狂犬病病毒 (Rabies Virus, RABV) 的免疫反应需要一定的时间, 因此在病毒暴露后接受狂犬免疫球蛋白 (Rabies Immunoglobulin, RIG) 被动免疫是狂犬病暴露后预防 (Post Exposure Prophylaxis, PEP) 的重要组成部分。人狂犬免疫球蛋白 (Human Rabies Immunoglobulin, HRIG) 供应紧张且价格较高, 而马来源的免疫球蛋白具有一定的免疫原性, WHO建议研发单抗制品来替代目前的RIG。由于狂犬病发病后致死率高, 而单抗识别表位特异性强但单一, 因此WHO建议至少由2种以上的单抗来组成“组合制剂”, 从而可以最大程度地对各种RABV进行中和。目前全球已有多个狂犬单抗/组合制品处于上市或临床评价阶段。

RABV作为RNA病毒具有较高的突变频率, 病毒突变进化引起的序列多样性会影响狂犬单抗的有效性。作为一种发病后致死率接近100%的疾病, 在狂犬单抗药物研发时应对候选单抗的表位、中和广谱性以及“组合制剂”中配对单抗的表位重叠/干扰情况进行充分的表征和评估, 以保证抗体药物可以最大程度地中和自然界流行的病毒株, 从而降低因发生中和逃逸产生的狂犬病致死风险。目前国内研发机构在狂犬单抗药理学研究中对于其表位及中和广谱性评价不够充分, 本文通过对狂犬单抗的研发进展及其表位和中和广谱性研究等方面进行综述, 旨在提高研发机构在狂犬单抗研发阶段对表位和中和广谱性评价的重视。

1 狂犬病病毒和G蛋白

1.1 狂犬病病毒

RABV属于弹状病毒科 (Rhabdoviridae) 狂犬病毒属 (Lyssavirus), 为单股负链RNA病毒, 具有典型的子弹形态。病毒基因组约为12 kb, 共编码5种蛋白, 包括RNA聚合酶 (L)、磷蛋白 (P)、核蛋白 (N)、基质蛋白 (M) 和糖蛋白

(G)。狂犬病毒属病毒除了经典的RABV外, 还包含Aravan Lyssavirus、Australian Bat Lyssavirus、Bokeloh Bat Lyssavirus、Duvenhage Lyssavirus和West Caucasian Bat Lyssavirus等其他16种病毒, 这些病毒通常被称为“狂犬相关病毒”。根据病毒间的抗原性和序列差异, 狂犬病毒属病毒被分为3个系统群 (Phylogroup), 其中RABV为Phylogroup I 病毒。感染狂犬病毒属病毒后均可引起狂犬病, 而其中RABV是引起人类和动物狂犬病的主要病毒, 其他狂犬病毒属病毒引起的人狂犬病病例较为罕见, 但近年来在中国也分离到了Irkut Virus (IRKV) 狂犬病毒属病毒, 中国台湾还发现了新的狂犬病毒属病毒 Taiwan Bat Lyssavirus (TWBLV)^[1]。对于同属于Phylogroup I 中的病毒, 现有的人用狂犬疫苗可以保护机体免受感染, 而对于序列/抗原性差异较大的Phylogroup II 和Phylogroup III 中的病毒, 人用狂犬疫苗基本不能保护。

1.2 G蛋白

G蛋白是I型跨膜蛋白, 通过同源三聚体形式在病毒表面形成刺突, 其表面富含的疏水性氨基酸对稳定三聚体的构象非常重要。RABV G蛋白基因共编码524个氨基酸形成G蛋白前体, 其N末端19个氨基酸为信号肽 (SP), 介导G蛋白锚定至内质网和高尔基体上进行糖基化等翻译后修饰, 形成505个氨基酸组成的成熟G蛋白。成熟的G蛋白由三部分组成, 包括胞外区 (ED)、跨膜区 (TM) 和胞内区 (CD)^[2], 其中胞外区由1~439位氨基酸组成, 主要参与病毒与细胞受体的结合、膜融合等过程, 同时也是抗原表位的主要存在区域。

G蛋白直接参与RABV感染靶细胞, 与病毒的组织嗜性和毒力密切相关, 同时G蛋白作为唯一可以诱导中和抗体的病毒表面蛋白, 是中和抗体直接作用的靶标, 与疫苗和免疫球蛋白的保护性直接相关^[2-6]。G蛋白上存在多个抗原表位 (图1), 包括表位 I、表位 II (II a和II b)、表位 III、表位 IV、G5和minor a等。表位 I 包括线性及构象型表位, 位于226~231位氨基酸; 表位 II 为不连续构象表位, 位于198~200 (II a) 和34~42 (II b); 表位 III 是构象表位, 位于330~338; 表位 IV 和G5有重叠, 位于251位氨基酸和261~264位氨基酸; 表位 minor a 也称作G1, 位于342~343位氨基酸; 除以上表位外, 还存在一些新的抗原表位。

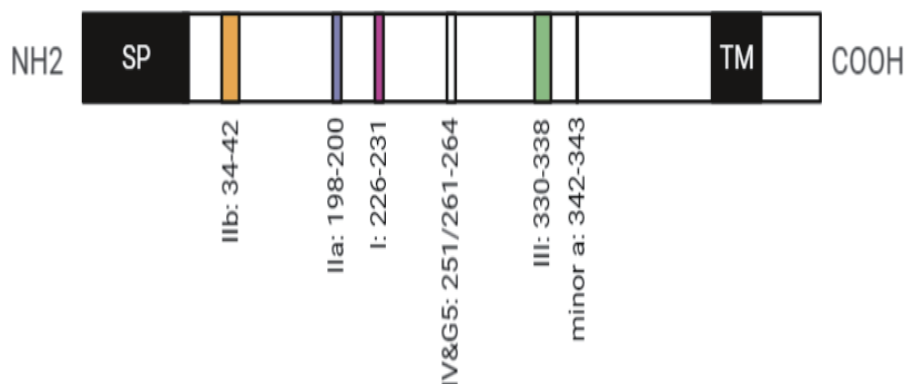


图1 RABV G蛋白抗原表位

RABV作为RNA病毒具有较高的突变频率^[7],其G蛋白基因突变频率约为 $3.2 \sim 3.9 \times 10^{-4}$ 核苷酸/位点/年^[8-9],导致RABV序列的多样性。尽管非同义突变/同义突变的比例相对较低,但仍会引起病毒的序列和抗原性发生改变。据报道,美国、伊朗、印度、波兰、尼日利亚以及巴西等地流行的RABV街毒G蛋白序列和抗原性与人用疫苗株存在差异^[10-14],而这些差异也会影响疫苗的保护效果^[14]。对于表位单一的狂犬单抗,如果识别表位发生变异,则会影响中和单抗的有效性,目前在G蛋白上也鉴定出了多个位点变异可以介导RABV对单抗的中和逃逸^[15-16]。笔者前期的研究^[6]也发现,在全球范围内,RABV街毒G蛋白序列与人用狂犬病疫苗株的序列相似度呈逐年下降的趋势,提示RABV街毒G蛋白序列呈多样性,抗原性可能发生了改变;同时笔者也发现尽管G蛋白抗原表位内的氨基酸相对比较保守,但仍存在着一定程度的变异,一些氨基酸突变会显著影响G蛋白的抗原性,尤其是表位Ⅲ中的位点(R333P、I338T等)对单抗、疫苗免疫血清和HRIG的中和敏感性均显著降低,而这些抗原变异株主要分离于2010年前后,呈现出广泛的宿主和地域分布且数量呈逐年增加的趋势。

2 狂犬病病毒单抗

2.1 单抗的筛选制备

与其他单抗类似,通常用于狂犬单抗筛选制备的方法主要有杂交瘤技术、噬菌体展示、人源抗体转基因小鼠、单个B细胞抗体制备技术等。在初步筛选获得中和单抗后,应选择表位保守且互补的至少2个单抗作为候选分子进一步开展研究。

2.2 狂犬病病毒单抗研发进展

WHO在20世纪90年代提出开发抗RABV单抗来

替代PEP中的狂犬免疫球蛋白。相比于血源性的狂犬免疫球蛋白,重组单抗在可及性、安全性、纯度以及价格方面都具有一定的优势,国内外多家研发机构开展了用于PEP的RABV单抗研发^[5, 17-18],目前印度血清研究所生产的狂犬单抗SII RMAb于2016年获批在印度上市,印度Zydus Calida公司的鼠源单抗组合制剂RabiMabs(Twinrab)于2019年在印度获批上市,我国华北制药有限公司生产的奥木替韦单抗(迅可[®])也于2022年1月获批上市,同时全球也有多个PEP单抗组合制剂处于临床或研发阶段(表1)。

SII RMAb(又名17C7, Rabishield)为单一组分的IgG1单抗,该抗体通过狂犬病疫苗免疫转基因小鼠后筛选获得,识别部分表位Ⅲ的构象性表位,在动物模型的暴露后预防和临床试验中都显示出良好的安全性和有效性^[19-20]。然而由于单抗识别表位单一,病毒在表位上发生突变可能会影响单抗的有效性,这也是单组分狂犬单抗在临床使用时潜在的风险点,如SII RMAb对非洲较为流行的N336D突变株只具有微弱的中和活性,而携带该突变的病毒株在北美洲的数量也在不断增加^[6],因此研发时应选择表位不重叠的至少2种单抗组成组合制剂,以减少中和逃逸的发生。

RabiMabs由印度Zydus Cadila公司生产,包含2种针对不同表位的鼠源狂犬单抗M777-16-3和62-71-3,临床试验结果表明RabiMabs在至少长达84天的保护窗口作用方面不劣于HRIG。CL184为荷兰Crucell公司研发的狂犬单抗组合制剂,由2个人源单抗CR57和CR4098组成,分别识别抗原表位I和表位Ⅲ,体外中和试验表明CL184可以中和多种RABV街毒,该产品目前完成了临床II

期试验^[15-16, 21]，但终止了进一步的开发。

我国华北制药有限公司除已上市的奥木替韦单抗，也开发了狂犬单抗组合制剂，包含两种单抗：NM57S和NC08。NM57S针对抗原表位 I，NC08针对抗原表位 II，NM57S/NC08组合制剂对我国境内代表性RABV街毒具有中和作用，在动物模型上的暴露后预防效果与HRIG相当，并且不影响狂犬病疫苗诱导的中和抗体水平，该产品目前已完成 II 期临床。SYN023为兴盟生物（Synermore Biologics）研发生产的组合制剂^[22]，由2个表位不重叠的人源化单抗CTB011和CTB012组成，其中CTB011表位为抗原表位 III 及附近的氨基酸，CTB012识别不连续但保守的表位。体外试验表明，SYN023可以对北美来源的10株RABV街毒以及全球来源的25株RABV街毒进行有效中和，中和效果与HRIG相当或者更优；在动物模型上，对我国来源的15株RABV街毒有效。目前SYN023应用于狂犬病暴露后预防的临床试验在美国完成 I 期和 I b/II 期临床，在美国和菲律宾开展的 II b/III 期临床研究也即将完成，并已在中国提交上市申请。除此之外，国内智翔（上海）医药科技有限公司的狂犬双特异抗体GR1801以及长春百克生物科技股份的全人源抗狂犬病病毒单克隆抗体CBB1

也在开展相应的临床试验。除上述已上市或处于临床评价阶段的抗体，目前还有多个单抗处在研发阶段，如单抗RVC20和RVC58组合制剂分别识别表位 I 和表位 III^[23]，不仅能够中和多种RABV街毒，同时对其他狂犬病毒属病毒也能够有效中和。

PEP措施可以有效预防狂犬病的发生，但狂犬病在出现临床症状发病后的致死率接近100%。目前对于狂犬病发病后的治疗尚无有效手段，密尔沃基疗法（Milwaukee Protocol）也存在较大的争议^[24]。对于狂犬单抗，目前临床应用场景均为在暴露后预防中替代狂犬免疫球蛋白来使用，仅有最新的一个临床前研究用于狂犬病发病后的治疗^[25]。该研究表明，通过外周和脑内同时输注RVC20/RVC58单抗组合制剂可以临床治愈狂犬病发病的小鼠，在接受RVC20/RVC58单抗组合制剂治疗后，发病小鼠症状明显改善、炎症特征恢复正常且检测不到病毒载量。进一步研究发现，对RVC20/RVC58两个单抗的Fc进行LALA（L234A和L235A）突变后不能避免小鼠因狂犬病导致的死亡，LALA突变可以消除单抗与Fc受体和补体的结合，但不影响单抗的中和活性，提示狂犬单抗的Fc在病毒清除中发挥着重要作用，这也为狂犬病的治疗性单抗药物研发提供了新思路。

表 1 国内外抗狂犬病病毒单抗药物研究进展

抗体名称	抗原表位	抗体类型	研发进展
SII RMAb (17C7, Rabishield)	III	全人源单抗	印度上市
RabiMabs (M777-16-3和62-71-3)	II / I	鼠源单抗组合制剂	印度上市
SYN023 (CTB011和CTB012)	III/其他保守位点	人源化单抗组合制剂	中国提交上市申请；美国及菲律宾 II b/III 期
CL184 (CR57和CR4098)	I / III	全人源单抗组合制剂	II 期临床完成（菲律宾、美国、印度），已终止
奥木替韦单抗（迅可，NM57）	I	全人源单抗	中国上市
NM57S/NC08	I / II	全人源单抗组合制剂	已完成 II 期临床
GR1801	I 和 III	双特异抗体	III 期临床
CBB1	未知	全人源单抗	I 期临床

3 狂犬病病毒单抗表位鉴定

3.1 基于抗原抗体结合的表位鉴定

通过酶联免疫吸附试验 (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA)、表面等离子共振 (Surface Plasmon Resonance, SPR) 等抗原抗体结合试验, 可以对狂犬单抗结合的表位区域进行初步的鉴定。一方面, 通过合成线性表位肽段与单抗的直接结合, 可以确定单抗是否针对该表位。目前已知的RABV G蛋白表位中表位 I 和G5为线性表位, 合成表位 I 和G5的线性表位肽段后通过ELISA、SPR、免疫印迹试验 (Western Blot, WB) 等手段可以检测待测单抗是否针对该表位, 除此之外, 还可以进一步通过合成包含不同氨基酸突变的表位 I 和G5肽段来分析单抗的识别位点。另一方面, 可以利用表位明确的单抗, 通过对G蛋白三聚体或病毒颗粒的竞争性结合试验来判定待测单抗的表位是否与其相关。

3.2 基于活病毒的表位鉴定

传统的基于活病毒开展的病毒学和免疫学分析在病毒研究以及预防和治疗用制品的研发和评价中发挥了重要的作用, 基于RABV活病毒的中和试验方法如快速免疫荧光灶抑制试验 (Rapid Fluorescence Focus Inhibition Test, RFFIT)、荧光抗体病毒中和试验 (Fluorescent Antibody Viral Neutralization, FAVN) 是世界卫生组织 (WHO) 和国际兽医局 (OIE) 推荐的RABV中和抗体检测的金标准。对于狂犬单抗的表位研究, 可以结合“3.1”项在获得初步的表位区域信息后, 通过反向遗传学/病毒拯救等方式获得具有定点氨基酸突变的活病毒株, 然后通过病毒中和试验研究单抗的表位; 同时, 还可以通过活病毒与单抗的共培养以获得单抗耐药毒株并对其G蛋白序列进行测定, 通过G蛋白氨基酸序列的改变来确定耐药位点/表位; 然而该方法操作复杂、耗时较长, 同时不易获得耐药株, 需要对单抗浓度进行摸索; 在获得耐药株后, 通常其G蛋白序列伴随着多个氨基酸位点的突变, 需结合其他手段进一步确认与单抗表位相关的具体氨基酸突变。

3.3 基于假病毒的表位鉴定

由于活病毒需要的实验室生物安全等级较高, 同时活病毒的制备以及检测也较复杂, 使其应用受到了一定的限制。假病毒 (Pseudovirus) 是病

毒衣壳蛋白或者包膜蛋白包裹携带有报告基因的异源核酸形成的类似于真病毒的单轮感染性病毒颗粒, 具有包装制备简单、操作安全等特点。假病毒表面的包膜蛋白与活病毒的包膜蛋白高度相似, 可介导假病毒进入宿主细胞, 因此可用于研究病毒的细胞嗜性、受体识别、感染力等, 同时也可用于疫苗和抗体研发以及抗病毒药物的筛选。另一方面, 在假病毒系统上可以对病毒包膜蛋白进行精确的定点突变和改造, 在病毒抗原性评价和单抗表位研究中具有其特殊优势, 如通过丙氨酸扫描 (Alanine Scanning) 结合假病毒系统和中和试验, 可以对单抗的表位进行深度分析。目前用于RABV假病毒的包装系统主要有HIV-1、VSV和MLV包装系统, 基于RABV假病毒的中和活性检测数据与活病毒方法具有良好的相关性, 英国国家生物制品检定所 (NIBSC) 的Giada Mattiuzzo博士也在推动RABV假病毒中和方法收录于欧洲药典RIG各论中^[26]。

利用假病毒系统, 可以对狂犬单抗的表位进行深度表征, 包括单抗识别的表位序列、结合的关键位点, 以及中和逃逸位点和逃逸的氨基酸种类等信息, 结合G蛋白序列数据库还可以进一步获得表位的保守率以及中和逃逸突变的自然流行情况, 为狂犬单抗的筛选和药学研究提供重要支持。目前已有多项研究利用RABV假病毒研究单抗的表位。笔者课题组之前收集并分析了全球2890条RABV街毒G蛋白序列, 并构建了包含147株RABV假病毒的假病毒库^[6], 包含91株单个氨基酸突变假病毒株, 以及56株国内外代表性流行街毒株, 用于狂犬单抗的表位研究和中和广谱性评价。目前利用该假病毒库, 已对国内多家研发企业的27个狂犬单抗、双特异抗体以及不同单抗混合的组合制剂进行了评价, 并获得了较为丰富的表位信息和广谱性数据, 包括表位区域、识别的关键氨基酸位点和种类、中和逃逸的氨基酸突变种类及自然界流行比例, 以及对国内外代表性街毒株和其他狂犬病毒属病毒的中和广谱性。

3.4 其他表位鉴定技术

除上述表位鉴定方法外, 还可以通过流式细胞术和结构分析等手段对狂犬单抗的表位进行研究。在表达RABV G蛋白的质粒上分别进行单个氨基酸突变后, 将其转染至细胞 (如HEK293细胞) 中使G蛋白表达在细胞膜表面, 从而构建表达突变

G蛋白的细胞库。通过流式细胞术等手段检测狂犬单抗与细胞的结合,从而确定影响单抗与G蛋白结合的氨基酸突变,然而由于单个氨基酸位点的突变也会影响G蛋白的表达量及其在细胞膜表面的插入量和定位,对于与狂犬单抗结合下降或不结合的氨基酸突变,还应结合其他评价手段进行确认。另外,通过冷冻电镜、X-ray晶体衍射等技术对单抗Fab与G蛋白复合物的结构分析也可以获取表位信息^[27-30],然而由于G蛋白表面富含疏水性氨基酸且融合前(Pre-fusion)构象形式的G蛋白不稳定,表达可溶性且结构稳定的G蛋白三聚体较为困难,通过在G蛋白上引入H270P突变或对融合环(Fusion Loop)的改造^[29-30]来稳定G蛋白融合前构象,可以表达纯化稳定的G蛋白三聚体。通过分子结构水平获得的单抗与G蛋白的结合位点,仍需通过结合/中和试验进行确认。

4 狂犬病毒单抗中和广谱性评价

狂犬单抗的中和广谱性,即其能够中和自然界流行街毒株的广度,是确保狂犬单抗在临床使用中有效性的关键指标,狂犬单抗应能够最大程度中和自然界流行的街毒株,避免因中和逃逸导致的狂犬病发生。目前对于中和广谱性的评价通常在活病毒上开展,通过对不同基因分支、宿主和地域等来源的RABV街毒进行中和试验来评价单抗的中和广谱性。然而由于活病毒资源相对紧张,同时受病毒流行、分离收集和毒株资源等因素的影响,在中和试验中采用的活病毒株不能完全涵盖宿主、地域、基因分支(China I-VI)以及流行时间等因素,同时基于基因/序列分析挑选的毒株也不能完全代表流行毒株的抗原特性,而对于国外流行病毒株,以及同样会引起狂犬病的其他狂犬病毒属病毒(Lyssavirus)的中和广谱性评价也会受限,因此基于活病毒的狂犬单抗中和广谱性评价可能存在一定的局限。

假病毒系统在狂犬单抗的中和广谱性评价中也有一定的应用,通过假病毒系统可以将街毒株的G蛋白包装成假病毒,从而解决某些活病毒株无法获取的问题,如之前笔者发现I338T突变使病毒对单抗、疫苗免疫血清和HRIG的中和敏感性均显著降低,然而目前自然界携带I338T的RABV街毒全球仅有2株(中国、美国各1株)^[6]。通过在数据库(NCBI、Uniport等)中收集RABV街毒的G蛋白序

列并结合序列分析,可以获得不同国家/地域RABV的流行特征,同时结合宿主(如犬)、狂犬病高发地域,以及基因型和已有的抗原性数据(如单个氨基酸突变对抗原性的影响),挑选具有代表性的街毒株构建假病毒,从而进行单抗的中和广谱性评价。

活病毒和假病毒评价系统具有各自优势,基于活病毒的中和活性检测是狂犬单抗评价的金标准;而假病毒系统由于病毒包装制备相对简便,在获取街毒株G蛋白序列后即可制备相应的假病毒,解决了活病毒不易获取的问题。在狂犬单抗评价中应结合活病毒/假病毒两种评价系统,对其广谱性进行充分的评价。

5 小结

对于发病后致死率接近100%的狂犬病,为了保证临床有效性并避免因中和逃逸产生的致死风险,用于暴露后预防的抗体药物应具有广泛的中和广谱性,能够最大程度中和自然流行的街毒株。在狂犬病单抗药物研发和临床评价前,应结合ELISA、SPR、假病毒/活病毒等多种技术和手段,对其表位及中和广谱性进行充分的表征和评价,并合理选择针对不同表位的单抗组成组合制剂或构建双特异抗体以增强对RABV街毒的中和能力。同样,对于其他抗病毒单抗,尤其是针对突变频率较高的RNA病毒(RSV、SARS-CoV-2等),由于病毒突变会影响单抗的治疗/预防效果从而导致临床无效(如Regeneron公司的RSV单抗Suptavumab因对B亚型RSV无效而宣布Ⅲ期临床失败^[31]、多个新冠单抗也因对变异株无效而被FDA撤销紧急使用授权^[32]),应对其表位和广谱性进行充分的评估,并对变异株流行情况进行监测。

参考文献:

- [1] Hu S C, Hsu C L, Lee F, et al. Novel Bat Lyssaviruses Identified by Nationwide Passive Surveillance in Taiwan, 2018–2021[J]. *Viruses*, 2022, 14(7): 1562.
- [2] Wang W, Long C, Wang L, et al. Pseudotyped Viruses for Lyssavirus [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2023, 1407: 191–208.
- [3] Hellgren F, Cagigi A, Arcoverde Cerveira R, et al. Unmodified Rabies mRNA Vaccine Elicits High Cross-neutralizing Antibody Titers and Diverse B Cell Memory

- Responses[J]. Nat Commun, 2023, 14 (1) : 3713.
- [4] Astray R M, Jorge S A, and Pereira C A. Rabies Vaccine Development by Expression of Recombinant Viral Glycoprotein[J]. Arch Virol, 2017, 162 (2) : 323–332.
- [5] Fan L, Zhang L, Li J, et al. Advances in the Progress of Monoclonal Antibodies for Rabies[J]. Hum Vaccin Immunother, 2022, 18 (1) : 2026713.
- [6] Wang W, Ma J, Nie J, et al. Antigenic Variations of Recent Street Rabies Virus[J]. Emerg Microbes Infect, 2019, 8 (1) : 1584–1592.
- [7] Hanada K, Suzuki Y, and Gojobori T. A Large Variation in the Rates of Synonymous Substitution for RNA Viruses and Its Relationship to a Diversity of Viral Infection and Transmission Modes[J]. Mol Biol Evol, 2004, 21 (6) : 1074–1080.
- [8] Bourhy H, Reynes J M, Dunham E J, et al. The Origin and Phylogeography of Dog Rabies Virus[J]. J Gen Virol, 2008, 89 (11) : 2673–2681.
- [9] Troupin C, Dacheux L, Tanguy M, et al. Large-Scale Phylogenomic Analysis Reveals the Complex Evolutionary History of Rabies Virus in Multiple Carnivore Hosts[J]. PLoS Pathog, 2016, 12 (12) : e1006041.
- [10] Ajorloo M, Mirzaei H, Sadeghi Y, et al. Evaluation and Phylogenetic Analysis of Regular Rabies Virus Vaccine Strains[J]. Arch Iran Med, 2018, 21 (3) : 101–110.
- [11] Patel A C, Upmanyu V, Ramasamy S, et al. Molecular and Immunogenic Characterization of BHK–21 Cell Line Adapted CVS–11 Strain of Rabies Virus and Future Prospect in Vaccination Strategy[J]. Virus Disease, 2015, 26 (4) : 288–296.
- [12] Orłowska A, Zmudzinski J F. Molecular Epidemiology of Rabies Virus in Poland[J]. Arch Virol, 2014, 159 (8) : 2043–2050.
- [13] Okoh A E. Antigenic Characterization of Rabies Virus Isolates from Vaccinated Dogs in Plateau State, Nigeria[J]. Vet Res Commun, 2000, 24 (3) : 203–211.
- [14] Zanluca C, Aires L R, Mueller P P, et al. Novel Monoclonal Antibodies that Bind to Wild and Fixed Rabies Virus Strains[J]. J Virol Methods, 2011, 175 (1) : 66–73.
- [15] Bakker A B, Marissen 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.
- [16] Marissen W E, Kramer R A, Rice A, et al. Novel Rabies Virus–neutralizing Epitope Recognized by Human Monoclonal Antibody: Fine Mapping and Escape Mutant Analysis[J]. J Virol, 2005, 79 (8) : 4672–4678.
- [17] Esposito S, Amirthalingam G, Bassetti M, et al. Monoclonal Antibodies for Prophylaxis and Therapy of Respiratory Syncytial Virus, SARS–CoV–2, Human Immunodeficiency Virus, Rabies and Bacterial Infections: An Update from the World Association of Infectious Diseases and Immunological Disorders and the Italian Society of Antinfective Therapy[J]. Front Immunol, 2023, 14: 1162342.
- [18] De Melo G D, Hellert J, Gupta R, et al. Monoclonal Antibodies against Rabies: Current Uses in Prophylaxis and in Therapy[J]. Curr Opin Virol, 2022, 53: 101204.
- [19] Gogtay N, Thatte U, Kshirsagar N, et al. Safety and Pharmacokinetics of a Human Monoclonal Antibody to Rabies Virus: A Randomized, Dose–escalation Phase 1 Study in Adults[J]. Vaccine, 2012, 30 (50) : 7315–7320.
- [20] Sloan S E, Hanlon C, Weldon W, et al. Identification and Characterization of a Human Monoclonal Antibody that Potently Neutralizes a Broad Panel of Rabies Virus Isolates [J]. Vaccine, 2007, 25 (15) : 2800–2810.
- [21] Franka R, Carson W C, Ellison J A, et al. *in vivo* Efficacy of a Cocktail of Human Monoclonal Antibodies (CL184) Against Diverse North American Bat Rabies Virus Variants [J]. Trop Med Infect Dis, 2017, 2 (3) : 48.
- [22] Chao T Y, Ren S, Shen E, et al. SYN023, a Novel Humanized Monoclonal Antibody Cocktail, for Post-exposure Prophylaxis of Rabies[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2017, 11 (12) : e0006133.
- [23] De Benedictis P, Minola A, Rota Nodari E, et al. Development of Broad-spectrum Human Monoclonal Antibodies for Rabies Post-exposure Prophylaxis[J]. EMBO Mol Med, 2016, 8 (4) : 407–421.
- [24] Zeiler F A, Jackson A C. Critical Appraisal of the Milwaukee Protocol for Rabies: This Failed Approach Should be Abandoned[J]. Can J Neurol Sci, 2016, 43 (1) : 44–51.

- [25] de Melo G D, Sonthonnax F, Lepousez G, et al. A Combination of Two Human Monoclonal Antibodies Cures Symptomatic Rabies[J]. *EMBO Mol Med*, 2020, 12 (11) : e12628.
- [26] Bentley E M, Mather S T, Temperton N J. The Use of Pseudotypes to Study Viruses, Virus Sero-epidemiology and Vaccination[J]. *Vaccine*, 2015, 33 (26) : 2955-2962.
- [27] Callaway H M, Zyla D, Larrous F, et al. Structure of the Rabies Virus Glycoprotein Trimer Bound to a Prefusion-specific Neutralizing Antibody[J]. *Sci Adv*, 2022, 8 (24) : eabp9151.
- [28] Hellert J, Buchrieser J, Larrous F, et al. Structure of the Prefusion-locking Broadly Neutralizing Antibody RVC20 Bound to the Rabies Virus Glycoprotein[J]. *Nat Commun*, 2020, 11 (1) : 596.
- [29] Ng W M, Fedosyuk S, English S, et al. Structure of Trimeric Pre-fusion Rabies Virus Glycoprotein in Complex with Two Protective Antibodies[J]. *Cell Host Microbe*, 2022, 30 (9) : 1219-1230.
- [30] Yang F, Lin S, Ye F, et al. Structural Analysis of Rabies Virus Glycoprotein Reveals pH-dependent Conformational Changes and Interactions with a Neutralizing Antibody[J]. *Cell Host Microbe*, 2020, 27 (3) : 441-453.
- [31] Simoes E A F, Forleo-Neto E, Geba G P, et al. Suptavumab for the Prevention of Medically Attended Respiratory Syncytial Virus Infection in Preterm Infants[J]. *Clin Infect Dis*, 2021, 73 (11) : e4400-e4408.
- [32] Zhou D, Ren J, Fry E E, et al. Broadly Neutralizing Antibodies against COVID-19[J]. *Curr Opin Virol*, 2023, 61 : 101332.

(收稿日期 2023年4月27日 编辑 王雅雯)