

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680007172.5

[51] Int. Cl.

G12N 15/13 (2006.01)

G12N 5/10 (2006.01)

C07K 16/10 (2006.01)

C07K 14/145 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 39/205 (2006.01)

[43] 公开日 2008年2月27日

[11] 公开号 CN 101133158A

[51] Int. Cl. (续)

A61P 31/14 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[22] 申请日 2006.2.2

[21] 申请号 200680007172.5

[30] 优先权

[32] 2005. 2. 2 [33] US [31] 60/649,512

[86] 国际申请 PCT/US2006/003644 2006.2.2

[87] 国际公布 WO2006/084006 英 2006.8.10

[85] 进入国家阶段日期 2007.9.5

[71] 申请人 马萨诸塞州大学

地址 美国马萨诸塞州

共同申请人 美国疾病控制与预防中心

[72] 发明人 W·D·小托马斯 D·安布罗西诺
R·曼德尔

S·舍恩霍夫 G·J·巴布科克

C·鲁普雷希特

[74] 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

代理人 孟凡宏

权利要求书6页 说明书56页 序列表13页
附图9页

[54] 发明名称

人抗狂犬病抗体及其用途

[57] 摘要

本发明提供了与狂犬病病毒特异性结合的人单克隆抗体,其抗原结合部分,以及制备和应用该抗体及其抗原结合部分治疗受试者中狂犬病病毒的方法。

1. 一种分离的人单克隆抗体或其抗原结合部分,它与狂犬病病毒特异性结合并且抑制该病毒感染细胞的能力。
2. 权利要求1的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分在快速荧光灶抑制试验(RFFIT)中中和狂犬病病毒。
3. 权利要求1的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体在受试者体内抑制狂犬病病毒。
4. 权利要求1的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分
防止或抑制受试者中狂犬病病毒介导的神经元病理状况;
防止或抑制受试者中狂犬病病毒介导的脑脊髓炎; 或
防止或抑制受试者中狂犬病病毒介导的麻痹。
5. 权利要求1的抗体或其抗原结合部分,其中所述狂犬病病毒是选自下组的分离株: CVS-11分离株、ERA分离株、Pasteur病毒分离株、灰狐(德克萨斯州)分离株、灰狐(亚利桑那州)分离株、北极狐(阿肯色州)分离株、臭鼬(北方中部)分离株、臭鼬(南方中部)分离株、浣熊分离株、丛林狼(德克萨斯州)分离株、狗(德克萨斯州)分离株、蝙蝠(赤蓬毛蝠; 田纳西州)分离株、蝙蝠(大棕蝠-鼠耳蝠; 科罗拉多州)分离株、蝙蝠(鼠耳蝠; 华盛顿)分离株、蝙蝠(灰蓬毛蝠; 亚利桑那州)分离株、蝙蝠(东美油蝠; 阿拉巴马州)分离株、蝙蝠(巴西犬吻蝠; 阿拉巴马州)分离株、蝙蝠(银毛蝠; 华盛顿)分离株、蝙蝠(大棕蝠; 宾夕法尼亚州)分离株、猫鼬(纽约/波多黎各)分离株、狗(阿根廷)分离株、狗(Sonora)分离株、狗(加蓬)分离株、狗(泰国)分离株、及其组合。
6. 权利要求1的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体与狂犬病病毒G蛋白或其片段内的一个或多个表位特异性结合。
7. 权利要求6的抗体或其抗原结合部分,其中所述表位位于狂犬病

病毒 G 蛋白的氨基酸 19-524、19-439、19-422 或 336-342 之间。

8. 权利要求 6 的抗体或其抗原结合部分,其中所述表位包括选自抗原位点 I、抗原位点 II、抗原位点 III、抗原位点次要 A 及其组合的抗原位点。

9. 权利要求 6 的抗体或其抗原结合部分,其中所述表位选自线性表位、构象表位、不连续表位及其组合。

10. 权利要求 1 的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分以至少约 1×10^{-7} M、 1×10^{-8} M、 1×10^{-9} M、 1×10^{-10} M、 1×10^{-11} M、 1×10^{-12} M 或更好的 K_D 与狂犬病病毒的 G 蛋白或其片段特异性结合。

11. 权利要求 1 的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含可变重链区,该可变重链区包含与 SEQ ID NO: 1 (17C7) 或 SEQ ID NO: 15 (6G11) 的可变重链区氨基酸序列至少 80% 相同的氨基酸序列。

12. 权利要求 1 的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含可变轻链区,该可变轻链区包含与 SEQ ID NO: 2 (17C7) 或 SEQ ID NO: 16 (6G11) 的可变轻链区氨基酸序列至少 80% 相同的氨基酸序列。

13. 权利要求 1 的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含可变重链区,该可变重链区包含与 SEQ ID NO: 1 (17C7) 或 SEQ ID NO: 15 (6G11) 的可变重链区氨基酸序列至少 95% 相同的氨基酸序列。

14. 权利要求 1 的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含可变轻链区,该可变轻链区包含与 SEQ ID NO: 2 (17C7) 或 SEQ ID NO: 16 (6G11) 的可变轻链区氨基酸序列至少 95% 相同的氨基酸序列。

15. 权利要求 13 的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分还包含可变轻链区,该可变轻链区包含与 SEQ ID NO: 2 (17C7)

或 SEQ ID NO: 16 (6G11) 的可变轻链区氨基酸序列至少 95% 相同的氨基酸序列。

16. 一种分离的人抗体或其抗原结合部分，它与狂犬病病毒 G 糖蛋白上的表位特异性结合，该表位与被克隆 17C7、6G11、5G5、2B10 或 1E5 产生的抗体结合的表位重叠。

17. 一种分离的人抗体或其抗原结合部分，它与狂犬病病毒 G 糖蛋白上的表位特异性结合，该表位与被人血清免疫球蛋白或鼠单克隆抗体 MAb 1112-1 (A. T. C. C. 登记号: HB 10751) 结合的表位重叠。

18. 权利要求 17 的抗体或其抗原结合部分，其中所述抗体或其抗原结合部分与人血清免疫球蛋白或鼠单克隆抗体 MAb 1112-1 (A. T. C. C. 登记号: HB 10751) 竞争结合狂犬病病毒 G 蛋白。

19. 权利要求 1 的抗体或其抗原结合部分，其中所述抗体或其抗原结合部分的可变重链区包含与 SEQ ID NOs: 3-5 (17C7) 中的一个或多个或与 SEQ ID NOs: 17-19 (6G11) 中的一个或多个至少 80% 相同的一个或多个互补决定区 (CDR)。

20. 权利要求 1 的抗体或其抗原结合部分，其中所述抗体或其抗原结合部分的可变轻链区包含与 SEQ ID NOs: 6-8 (17C7) 中的一个或多个或与 SEQ ID NOs: 20-22 (6G11) 的一个或多个至少 80% 相同的一个或多个互补决定区 (CDR)。

21. 权利要求 1 的抗体或其抗原结合部分，其中所述抗体或其抗原结合部分的可变重链区包含与 SEQ ID NOs: 3-5 (17C7) 中的一个或多个或与 SEQ ID NOs: 17-19 (6G11) 中的一个或多个至少 95% 相同的一个或多个互补决定区 (CDR)。

22. 权利要求 1 的抗体或其抗原结合部分，其中所述抗体或其抗原结合部分的可变轻链区包含与 SEQ ID NOs: 6-8 (17C7) 中的一个或多个或与 SEQ ID NOs: 20-22 (6G11) 中的一个或多个至少 95% 相同的一个或多个互补决定区 (CDR)。

23. 权利要求1的抗体或其抗原结合部分, 其中可变重链区包含与SEQ ID NOs: 3-5 (17C7)中的一个或多个或与SEQ ID NOs: 17-19 (6G11)中的一个或多个的可变重链区CDR至少80%相同的三个CDR。

24. 权利要求1的抗体或其抗原结合部分, 其中可变轻链区包含与SEQ ID NOs: 6-8 (17C7)中的一个或多个或与SEQ ID NOs: 22-22 (6G11)中的一个或多个的可变重链区CDR至少80%相同的三个CDR。

25. 一种与狂犬病病毒特异性结合的分离的人单克隆抗体或其抗原结合部分, 其中该抗体或其抗原结合部分:

(a) 包含由人VH 3-30基因或VH 3-33基因编码或衍生的重链可变区; 且

(b) 包含由选自VK L6、VK L11、VK L13、VK L15、或VK L19的人VK基因编码或衍生的轻链可变区。

26. 权利要求25的抗体, 其中重链可变区由VH 3-33基因编码或衍生, 并且轻链可变区由VK L13编码或衍生。

27. 权利要求1的抗体或其抗原结合部分, 其中该抗体或其抗原结合部分抑制狂犬病病毒与哺乳动物细胞的结合。

28. 权利要求1的抗体或其抗原结合部分, 其中所述抗体或其抗原结合部分抑制狂犬病病毒G蛋白与哺乳动物细胞的结合。

29. 权利要求1的抗体, 其中所述抗体是全长抗体。

30. 一种分离的多肽, 其包含上述任一项权利要求的抗体的抗原结合部分。

31. 权利要求1的抗体或其抗原结合部分, 其中所述抗体或其抗原结合部分包含效应结构域。

32. 权利要求1的抗体或其抗原结合部分, 其中所述抗体或其抗原结合部分包含Fc结构域。

33. 权利要求1的抗体或其抗原结合部分, 其中所述抗体或其抗原结合部分是单链抗体。

34. 权利要求 1 的抗体或其抗原结合部分, 其中所述抗体或其抗原结合部分是 Fab 片段。

35. 权利要求 1 的抗体或其抗原结合部分, 其还包含标记或毒素。

36. 一种组合物, 其包含在药学上可接受的载体中的上述任一项权利要求的抗体或其抗原结合部分。

37. 一种组合物, 其包含两种或多种上述任一项权利要求的抗体, 其中所述抗体与狂犬病病毒的不同表位结合。

38. 一种分离的核酸, 其编码与狂犬病病毒结合的人抗体的可变区, 包含与 SEQ ID NO: 13 或 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 25 或 SEQ ID NO: 27 至少 90%相同的序列。

39. 一种表达载体, 其包含权利要求 38 的核酸。

40. 一种宿主细胞, 其包含权利要求 38 的核酸。

41. 一种狂犬病疫苗, 其包含分离的狂犬病 G 糖蛋白或其片段。

42. 一种试剂盒, 其包括一种或多种如权利要求 1 所述的分离的人单克隆抗体或其抗原结合部分, 和用于治疗狂犬病病毒介导的疾病的说明。

43. 一种治疗受试者的狂犬病病毒疾病的方法, 该方法包括:

以有效抑制狂犬病病毒疾病症状的量给受试者施用上述任一项权利要求的分离的人单克隆抗体或其抗原结合部分。

44. 权利要求 43 的方法, 其中所述受试者是人。

45. 权利要求 43 的方法, 其中给受试者静脉内、肌肉内或皮下施用所述抗体或其抗原结合部分。

46. 权利要求 43 的方法, 其中所述抗体或其抗原结合部分与第二治疗剂联合施用。

47. 权利要求 46 的方法, 其中所述第二治疗剂是第二种人抗体或其抗原结合部分。

48. 权利要求 46 的方法, 其中所述第二治疗剂是抗病毒剂。

49. 权利要求 46 的方法, 其中所述第二治疗剂是狂犬病病毒疫苗。

50. 权利要求 49 的方法, 其中所述狂犬病病毒疫苗是狂犬病病毒 G 蛋白或其片段。

51. 一种适合治疗哺乳动物中狂犬病病毒相关疾病或紊乱的组合物, 其包含在药学上可接受的载体中的权利要求 1 的人抗体或其抗原结合片段。

52. 权利要求 51 的组合物, 其中该组合物还包含第二种与狂犬病病毒结合的人抗体。

53. 一种治疗哺乳动物中狂犬病病毒相关疾病或紊乱的方法, 包括: 给该哺乳动物施用两种或多种与狂犬病病毒结合的抗体或其片段, 使狂犬病病毒对细胞的感染力受到抑制。

54. 权利要求 53 的方法, 其中所述与狂犬病病毒结合的抗体或其片段是选自 17C7、6G11、5G5、2B10 或 1E5 的人单克隆抗体。

55. 一种鉴定与狂犬病病毒或其糖蛋白特异性结合的抗体或其片段的方法, 包括使该抗体接触上述任一项权利要求的狂犬病 G 蛋白。

56. 权利要求 55 的方法, 其中所述抗体是人抗体血清、多克隆抗体或单克隆抗体。

57. 权利要求 55 的方法, 其中所述抗体与线性表位、构象表位或其组合特异性结合。

58. 权利要求 55 的方法, 其中确定所述抗体与一种以上的狂犬病病毒株具有交叉反应性。

59. 一种根据权利要求 54 的方法鉴定的抗体或其片段。

60. 一种重组狂犬病 G 蛋白, 其包含是线性表位、构象表位或其组合的表位, 并且在导入哺乳动物体内时能够诱导中和抗体。

61. 权利要求 60 的糖蛋白, 其中所述哺乳动物是人、灵长类动物或小鼠。

62. 权利要求 61 的糖蛋白, 其中所述小鼠是含有人免疫球蛋白序列的转基因小鼠。

人抗狂犬病抗体及其用途

相关信息

本申请要求 2005 年 2 月 2 日提交的美国临时专利申请 60/649,512 的优先权，该专利申请的全部内容引入本文作为参考。

在本说明书全文中引用的任何专利、专利申请和参考文献的内容均全文引入本文作为参考。

背景技术

狂犬病是一种由弹状病毒科（狂犬病毒属（lyssavirus））的 RNA 病毒感染引起的急性进行性脑炎。尽管在发达国家中人类狂犬病死亡极少（在美国每年通常不到 5 例死亡），但是在（例如）印度报告了相当多的死亡例数，在印度有 50,000 人死于该病，并且有超过 500,000 人得到治疗。甚至在美国，每年也有 15,000 到 40,000 人接受抗狂犬病治疗。一般来说，狗是该病的主要宿主，但是其他哺乳动物如浣熊、臭鼬、蝙蝠和狐狸也是常见的宿主。该病毒从动物宿主向人的传播通常是通过咬伤或抓伤穿过皮肤而发生的。由于狂犬病在人类中几乎总是致命的，甚至怀疑感染也必须用积极的接触后治疗方案来治疗。

人类狂犬病的接触后治疗包括适当的伤口处理、抗狂犬病血清免疫球蛋白浸润到伤口内和伤口周围的局部给药、以及通常在几天和几周内给予多剂量的狂犬病疫苗（关于狂犬病预防的综述，参见，例如，Rupprecht 和 Gibbons 等人，N Engl J Med 351:25 (2004)）。适当的伤口处理可以减少存活的进入患者的病毒量。抗狂犬病血清免疫球蛋白浸润该区域可以与狂犬病病毒结合，并且有助于清除狂犬病病毒，由此减少病毒载量（通过被动免疫）。给予多剂量的狂犬病疫苗（主动免疫）的方式通常是在第一次给药后进行加强免疫，可使患者产生有效的主动免疫，包括体液和细胞应答。当前抗狂犬病血清免疫球蛋白

的来源是从被接种的人类供体的血液中获得。抗狂犬病血清免疫球蛋白的其他来源，例如马或鼠，被认为是不可接受的。当前狂犬病疫苗的来源是在细胞系中产生以及化学灭活并冻干。尽管这些药剂如果及时施用是非常有效的，但是仍然存在一定的障碍。

例如，这些抗狂犬病药剂的生产厂家极少，而且它们仍然较昂贵，特别是在最需要它们的发展中国家。另外，人抗狂犬病血清免疫球蛋白由于是从人类供体的血清中获得的，因此必须高度纯化以防止任何偶然物质的传播。而且，抗狂犬病疫苗需要劳动密集的细胞培养和大量的灭活和纯化步骤。因此，需要改进的治疗和预防狂犬病感染的免疫疗法。

发明内容

本发明通过提供特异性结合广泛多种狂犬病病毒分离株并且抑制该病毒感染细胞的能力的重组完全人类的抗狂犬病单克隆抗体解决了上述问题。

在一个实施方案中，这通过所述抗体在体外中和（即抑制或阻断）狂犬病病毒的能力（例如通过 RFFIT 测定）得到了证明。在另一实施方案中，这通过抗体在受试者如动物或人体内抑制狂犬病病毒感染力的能力得到了证明。

本发明的人单克隆抗体可以以实际上不受限制的量并且以高度纯化的形式高效制备。因此，这些抗体适合预测、诊断和/或治疗接触或怀疑已经接触狂犬病的个体。本发明的抗体特别有利于狂犬病的接触后预防（PEP），因为它们不需要人抗狂犬病血清免疫球蛋白的供体来源。这些抗体可以用本领域公知的用于制备人抗体的多种技术生产。例如，如在本文中例举的，这些抗体可以在表达人免疫球蛋白基因片段的转基因动物例如含有人 Ig 基因座的转基因小鼠中产生。而且，这些抗体可以单独施用，或者（例如）与抗狂犬病疫苗或其他抗体联合施用，以提高感染狂犬病病毒的受试者（例如动物和人）的存活率。

因此，本发明提供了几个优点，包括但不限于如下几点：

- 完全人类重组抗狂犬病抗体，用于预测、诊断和/或治疗受试者中的狂犬病病毒或进行狂犬病病毒接触后预防（PEP），例如防止或抑制受试者中由狂犬病病毒介导的发病率或死亡率；

- 组合物（例如药物）和/或试剂盒，其中包含一种或多种完全人类重组抗狂犬病抗体，该抗体可以单独使用或者与商售疫苗联合使用，以治疗受试者的狂犬病感染和/或进行 PEP；和

- 改进的被动免疫治疗方法，用于治疗感染狂犬病病毒（例如需要狂犬病病毒接触后预防（PEP））的受试者，该方法可以单独使用或者与主动免疫疗法（狂犬病疫苗）联合使用。

在一个实施方案中，本发明的人单克隆抗体或其抗原结合部分与狂犬病病毒 G 糖蛋白特异性结合。特定抗体或其抗原结合部分与狂犬病病毒 G 糖蛋白 N 末端一半内的表位特异性结合。其他一些特定抗体或其抗原结合部分与狂犬病病毒 C 末端结构域内的表位特异性结合。这些表位可以存在于例如狂犬病病毒 G 糖蛋白的氨基酸 1-50、50-100、100-150、150-200、200-250、250-300、300-350、350-400、400-450、450-500、500-524 内，或其任意间隔、部分或范围内。在一个实施方案中，该抗体或其抗原结合部分特异性结合狂犬病病毒 G 糖蛋白的 N 末端一半内的表位，即大约在氨基酸残基 19-422 之间。在另一实施方案中，狂犬病 G 糖蛋白的表位包含氨基酸残基 336-442。在一个实施方案中，狂犬病 G 糖蛋白包含氨基酸残基 336 以及其变化，如取代或缺失。

在一个相关实施方案中，狂犬病 G 糖蛋白的表位包含线性表位、构象表位、不连续表位或这些表位的组合。

在另一相关实施方案中，狂犬病 G 糖蛋白的表位由抗原位点 I、抗原位点 II、抗原位点 III、抗原位点次要 A、或这些抗原位点的组合例如抗原位点 III 和次要位点 A 组成。

在另外一些实施方案中，人单克隆抗体或其抗原结合部分的特征为以小于约 10×10^{-6} M 的 K_D 与狂犬病病毒特异性结合。在一个具体

实施方案中，该抗体或其抗原结合部分以至少约 10×10^{-7} M、至少约 10×10^{-8} M、至少约 10×10^{-9} M、至少约 10×10^{-10} M、至少约 10×10^{-11} M 或至少约 10×10^{-12} M 的 K_D 或甚至更有利的 K_D 与狂犬病病毒（例如，狂犬病病毒 G 糖蛋白）特异性结合。

在各种其他实施方案中，该抗体或其抗原结合部分包含可变重链区，该可变重链区包含与克隆 17C7 (SEQ ID NO: 1)、6G11 (SEQ ID NO: 15)、5G5、2B10 或 1E5 产生的抗体的可变重链区氨基酸序列至少 80%、85%、90%、95%、98%、99% 或 99% 以上相同的氨基酸序列。

在另外一些实施方案中，该抗体或其抗原结合部分包含可变轻链区，该可变轻链区包含与克隆 17C7 (SEQ ID NO: 2)、6G11 (SEQ ID NO: 16)、5G5、2B10 或 1E5 产生的抗体的可变轻链区氨基酸序列至少 80%、85%、90%、95%、98%、99% 或 99% 以上相同的氨基酸序列。

在再另外一些实施方案中，该抗体或其抗原结合部分包含可变重链区和可变轻链区，该可变重链区包含与克隆 17C7 (SEQ ID NO: 1)、6G11 (SEQ ID NO: 15)、5G5、2B10 或 1E5 产生的抗体的可变重链区氨基酸序列至少 80%、85%、90%、95%、98%、99% 或 99% 以上相同的氨基酸序列，该可变轻链区包含与克隆 17C7 (SEQ ID NO: 2)、6G11 (SEQ ID NO: 16)、5G5、2B10 或 1E5 产生的抗体的可变轻链区氨基酸序列至少 80%、85%、90%、95%、98%、99% 或 99% 以上相同的氨基酸序列。

在某些其他实施方案中，该抗体或其抗原结合部分特异性结合与被克隆 17C7、6G11、5G5、2B10 或 1E5 产生的抗体结合的表位重叠的表位，和/或与克隆 17C7、6G11、5G5、2B10 或 1E5 产生的抗体竞争结合狂犬病病毒或其部分。

该抗体或其抗原结合部分的可变重链和轻链区一般包括一个或多个互补决定区 (CDR)。这些 CDR 包括 CDR1、CDR2 和 CDR3 区。在特定实施方案中，可变重链 CDR 与克隆 17C7 (SEQ ID NOs: 3, 4, 5)、6G11 (SEQ ID NOs: 17, 18, 19)、5G5、2B10 或 1E5 产生的抗体的 CDR (也示于表 1 中) 至少 80%、85%、90%、95% 或 99% 或 99% 以上相同。在另外一些特定实施方案中，可变轻链 CDR 与克隆 17C7 (SEQ ID NOs: 6, 7,

8)、6G11 (SEQ ID NOs: 20, 21, 22)、5G5、2B10 或 1E5 产生的抗体的可变轻链区 CDR (也示于表 2 中) 至少 80%、85%、90%、95% 或 99% 或 99% 以上相同。

因此, 本发明的特定抗体或部分包含可变重链区和可变轻链区, 该可变重链区包含与克隆 17C7 (SEQ ID NOs: 3, 4, 5)、6G11 (SEQ ID NOs: 17, 18, 19)、5G5、2B10 或 1E5 产生的抗体的可变重链区 CDR 至少 80%、85%、90%、95%、98%、99% 或 99% 以上相同的一个或多个互补决定区 (CDR), 该可变轻链区包含与克隆 17C7 (SEQ ID NOs: 6, 7, 8)、6G11 (SEQ ID NOs: 20, 21, 22)、5G5、2B10 或 1E5 产生的抗体的可变轻链区 CDR 至少 80%、85%、90%、95%、98%、99% 或 99% 以上相同的一个或多个 CDR。

该抗体或其抗原结合部分的可变重链区也可以包括与克隆 17C7 (SEQ ID NOs: 3, 4, 5)、6G11 (SEQ ID NOs: 17, 18, 19)、5G5、2B10 或 1E5 产生的抗体的可变重链区的 CDR 至少 80%、85%、90%、95% 或 99% 或 99% 以上相同的全部三个 CDR, 和/或与克隆 17C7 (SEQ ID NOs: 6, 7, 8)、6G11 (SEQ ID NOs: 20, 21, 22)、5G5、2B10 或 1E5 产生的抗体的可变轻链区的 CDR 至少 80%、85%、90%、95% 或 99% 或 99% 以上相同的全部三个 CDR。

在本发明的另一实施方案中, 人抗体或其抗原结合部分 (a) 包括由人 VH 3-30-3 或 VH3-33 基因编码 (即, 是其产物) 或衍生的重链可变区; 和/或 (b) 包括由选自 V_K L6、V_K L11、V_K L13、V_K L15 或 V_K L19 的人 V_K 基因编码或衍生的轻链可变区。

本发明的人单克隆抗体包括全长抗体, 例如包含效应结构域 (例如 Fc 结构域), 以及抗体部分或片段, 如单链抗体和 Fab 片段。该抗体还可以与多种治疗剂 (例如抗病毒药或毒素) 和/或标记物连接。

在另一方面, 本发明提供了包含杂交瘤克隆 17C7、6G11、5G5、2B10 或 1E5 产生的抗体 (在此也称作 “17C7”, “6G11”, “5G5”, “2B10” 和 “1E5”) 的抗原结合部分的分离的多肽。

在另一方面，本发明提供了如下分离的核酸，其包括编码与 SEQ ID NOs: 13 或 23 至少 75%、80%、85%、90%、95%、99% 或 99% 以上相同的抗体重链可变区的序列。本发明也提供了如下分离的核酸，其包括编码与 SEQ ID NOs: 14 或 24 至少 75%、80%、85%、90%、95%、99% 或 99% 以上相同的抗体轻链可变区的序列。本发明还提供了包括单独（例如从一个或多个载体表达）的任意上述核酸或其组合的表达载体，以及包含这种表达载体的宿主细胞。

适合表达本发明的抗体的宿主细胞包括多种真核细胞，例如酵母细胞、哺乳动物细胞，例如中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞、NS0 细胞、骨髓瘤细胞或植物细胞。

在另一方面，本发明提供了组合物和试剂盒，其包括一种或多种如本文所述的分离的人单克隆抗体或其抗原结合部分，该抗体或其抗原结合部分与狂犬病病毒特异性结合并且抑制该病毒感染哺乳动物细胞的能力。该组合物或试剂盒还可以包括一种或多种与狂犬病病毒特异性结合的抗体（例如人单克隆或多克隆抗体）或其抗原结合部分。在一个实施方案中，多克隆抗体或其抗原结合部分与狂犬病病毒 G 糖蛋白特异性结合。在一个特定实施方案中，该组合物或试剂盒包括以下两者：(a) 与第一种狂犬病病毒分离株特异性结合的分离的人单克隆抗体；和 (b) 与第二种狂犬病病毒分离株特异性结合的分离的人单克隆抗体。

本发明还提供治疗受试者的狂犬病病毒病的方法，包括以有效抑制狂犬病病毒病例如狂犬病病毒介导的症状或发病率的量，给受试者施用如本文所述的（即，与狂犬病病毒特异性结合的）分离的人单克隆抗体或其抗原结合部分。

本发明的人单克隆抗体或其部分（和包含该抗体或其部分的组合物）可以通过多种合适的方式给受试者给药，例如静脉内（IV）、皮下（SC）、优选肌肉内（IM）。该抗体或其抗原结合部分可以单独给药或与另外一种治疗剂例如第二种人单克隆抗体或其抗原结合部分联合给药。在一个实例中，该第二种人单克隆抗体或其抗原结合部分

与第二种狂犬病病毒分离株特异性结合，该第二种狂犬病病毒分离株不同于与第一种抗体结合的分离株。在另一实例中，该抗体与另外一种药物如抗病毒剂一起给药。在另一实例中，该抗体与多克隆 γ -球蛋白（例如人 γ -球蛋白）一起给药。在另一实例中，该抗体在狂犬病病毒疫苗之前、之后或同时给药。

另一方面，本发明提供了制备与狂犬病病毒特异性结合的抗体或其抗原结合部分的方法。在一个实施方案中，该方法包括用包含狂犬病病毒例如活的或灭活的病毒的组合免疫具有包含人重链转基因和人轻链转基因的基因组的转基因非人动物，以及从该动物中分离抗体、抗体产生细胞或抗体编码核酸。狂犬病病毒可以通过（例如）化学处理和/或冻干来灭活。该方法可以进一步包括评价该抗体与狂犬病病毒或狂犬病病毒G糖蛋白的结合。

本发明也提供了通过在宿主细胞中表达编码人抗体的核酸（例如编码抗体的抗原结合区部分的核酸）制备抗体或其抗原结合部分的方法。在另一方面，本发明提供了包含上述核酸的杂交瘤或转染瘤。

本发明还提供了一种制备表达与狂犬病病毒特异性结合的抗体的杂交瘤的方法，包括用包含狂犬病病毒或狂犬病病毒G糖蛋白的组合免疫具有包含人重链转基因和人轻链转基因的基因组的转基因非人动物；从该动物中分离脾细胞；由该脾细胞产生杂交瘤；以及选择产生与狂犬病病毒或其狂犬病病毒蛋白质特异性结合的抗体的杂交瘤。

用人单克隆抗体治疗人类具有几个优点。例如，这些抗体在人体中比非人抗体免疫原性更低。治疗也很迅速，因为该抗体一到达感染部位并直接中和致病的狂犬病病毒，即可发生狂犬病病毒灭活。人抗体也比非人抗体更有效地定位于人体内的适当部位。此外，该治疗对于狂犬病病毒是特异性的，是重组和高度纯化的，并且与传统疗法不同，避免了污染偶发物质的潜在可能性。

通过下面的详述和权利要求书，本发明的其他特征和优点将是显而易见的。

附图说明

图 1 显示重组抗狂犬病人抗体 (即克隆 17C7) 的重链和轻链可变区的氨基酸序列。这些序列分别对应于 SEQ ID NO: 1 和 2。标出了各链的互补决定区 (CDR), 其对应于 SEQ ID NOs: 3、4 和 5 (重链) 和 6、7 和 8 (轻链)。

图 2 显示重组抗狂犬病人抗体 (即克隆 6G11) 的重链和轻链可变区的氨基酸序列。这些序列分别对应于 SEQ ID NO: 15 和 16。标出了各链的互补决定区 (CDR), 其对应于 SEQ ID NOs: 17、18 和 19 (重链) 和 20、21 和 22 (轻链)。

图 3 是狂犬病病毒 G 重组糖蛋白的示意图, 示出了为表位作图研究而分析的片段。通过免疫沉淀和免疫印迹法测定, 确定人抗体 17C7 与氨基酸残基 19-422 内的表位结合。

图 4 显示通过 RFFIT 测定, 与人血清 (hRIG) 相比较, 当 HuMab 17C7 从 1:5 连续稀释到 1:390625 时, 中和狂犬病病毒。

图 5, ERA-N 和 ERA-CO 糖蛋白在 293T 细胞中表达, 在密码子优化时容易表达 (A), 在细胞表面上表达时能够被 17C7 结合 (B-D)。

图 6 显示 HuMab 17C7 识别狂犬病 G 外功能区 (A), 在非还原条件下 (B) 以及对于 ERA 株的 G 蛋白 (C) 识别。

图 7 显示根据 ELISA (A) 和免疫印迹法 (B), HuMab 17C7 识别 N336K 和 N336D 突变 ERA 糖蛋白。

图 8 显示 HuMab 17C7 中和细胞的 ERA 假病毒感染 (A-B), 以及 ERA G 蛋白的各种突变在 17C7 结合方面的后果 (C-D)。

图 9 显示 ERA G 蛋白的各种突变在 17C7 结合方面的后果 (A-B)。

发明详述

为了清楚地理解说明书和权利要求书, 下面提供了如下定义。

定义

本文使用的术语“狂犬病病毒”是指由狂犬病病毒的 RNA 编码的病毒体或其部分，例如蛋白质部分，如狂犬病病毒 G 糖蛋白。

术语“抗狂犬病病毒抗体”是与狂犬病病毒或狂犬病病毒产生的或相关的蛋白质、碳水化合物、脂质或其他成分相互作用（例如结合）的抗体。“狂犬病病毒 G 糖蛋白抗体”是与狂犬病病毒的 G 糖蛋白或其片段结合的抗体。抗狂犬病病毒或 G 糖蛋白抗体可以结合表位，例如构象或线性表位，或该病毒或其组分的部分或片段。

术语“人抗体”是具有来源于人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。本文所述的人抗体可以包含不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基（例如，通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变引入的突变）。

抗狂犬病病毒抗体或其抗原结合部分可以单独施用或与第二种药剂联合施用。受试者可以是感染了或怀疑感染了狂犬病病毒或具有狂犬病病毒介导的疾病的症状（例如神经病理状况、脑脊髓炎、或抗狂犬病免疫球蛋白血清滴度）的患者。这种治疗可以用来治愈、康复、减轻、缓解、改变、矫正、改善、缓和、好转或影响感染和与感染有关的疾病、疾病的症状或患该病的倾向。对于狂犬病病毒感染的临床处理，“治疗”通常被理解为在发病之前预防或防止可能产生的感染。

有效治疗狂犬病病毒感染的抗狂犬病病毒抗体的量或“治疗有效量”是在单剂量或多剂量施用于受试者后有效抑制受试者的狂犬病病毒感染、疾病或其后遗症的抗体量。该抗体或抗体片段的治疗有效量可能根据诸如疾病状态、创伤部位、狂犬病病毒株或分离株、狂犬病病毒的动物载体、个体的年龄、性别和体重、以及该抗体或抗体部分在个体中引发所需应答的能力等因素而不同。治疗有效量也是抗体或抗体部分的治疗有益效果超过任何毒性或不利效果的量。抗体抑制可测量参数的能力可以在用于预测在人体中的效力的动物模型系统中评价。例如，如实施例中所述，抗狂犬病病毒抗体保护仓鼠免遭狂犬病病毒致死性攻击的能力可以预测其在人体中的效力。或者，也可以通过技术人员公知的试验在体外检测该化合物调节狂犬病病毒/细胞

相互作用例如结合、感染、毒力等的能力来评价抗体或抗体组合物的这种性质。体外试验包括结合试验如 ELISA 和中和试验。

抗狂犬病病毒抗体有效预防疾病的量或该抗体的“预防有效量”是指在单剂量或多剂量施用于受试者后有效预防或延缓狂犬病病毒发病或复发或抑制其症状的量。但是，如果需要较长的保护间期，可以施用增加的剂量或更频繁的给药。

例如表示两种状态之间量的差异的术语“拮抗”、“诱导”、“抑制”、“加强”、“提高”、“增加”、“降低”等是指两种状态之间的差异，例如统计学或临床显著的差异。

术语“特异性结合”或“与...特异性结合”是指抗体与狂犬病病毒或其部分以至少 1×10^{-6} M 的亲合力结合的能力，和/或与狂犬病病毒或其部分以至少两倍于对非特异性抗原的亲合力的亲合力结合的能力。

“抗体”是包含至少一个或两个重(H)链可变区(在此缩写为 VH)和至少一个或两个轻(L)链可变区(在此缩写为 VL)的蛋白质。VH 和 VL 区可以进一步再分为高变区，称为“互补决定区”(CDR)，高变区散布在被称为“构架区”(FR)的更加保守的区域中。构架区和 CDR 的范围已经准确定义(参见，Kabat, E. A. 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, 1991, 和 Chothia, C. 等, J. Mol. Biol. 196:901-917, 1987, 引入本文作为参考)。优选地，每个 VH 和 VL 由三个 CDR 和四个 FR 组成，它们从氨基端到羧基端以如下顺序排列：FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4。

抗体的 VH 或 VL 区还可包括全部或部分重链或轻链恒定区。在一个实施方案中，该抗体是两条免疫球蛋白重链和两条免疫球蛋白轻链的四聚体，其中免疫球蛋白重链和轻链例如通过二硫键链间连接。重链恒定区包括三个结构域：CH1、CH2 和 CH3。轻链恒定区由一个结构域 CL 组成。重链和轻链的可变区包含与抗体相互作用的结合结构域。

抗体的恒定区一般介导该抗体与宿主组织或因子（包括免疫系统的各种细胞（例如效应细胞）和经典补体系统第一成分(C1q)）的结合。术语“抗体”包括 IgA、IgG、IgE、IgD、IgM 型（以及它们的亚型）的完整免疫球蛋白，其中免疫球蛋白的轻链可以是 κ 或 λ 型。术语“免疫球蛋白”是指由基本由免疫球蛋白基因编码的一个或多个多肽组成的蛋白质。公认的人免疫球蛋白基因包括 κ 、 λ 、 α (IgA1 和 IgA2)、 γ (IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、 δ (IgD)、 ϵ (IgE) 和 μ (IgM) 恒定区基因，以及众多的免疫球蛋白可变区基因。全长免疫球蛋白“轻链”（约 25 K_D 和 214 个氨基酸）的 NH₂-末端（约 110 个氨基酸）由可变区基因编码，COOH-末端由 κ 或 λ 恒定区基因编码。全长免疫球蛋白“重链”（约 50 K_D 和 446 个氨基酸）类似地由可变区基因（约 116 个氨基酸）和上述其他恒定区基因之一如 γ （编码约 330 个氨基酸）编码。术语“免疫球蛋白”包括具有来自人或非人来源的 CDR 的免疫球蛋白。免疫球蛋白的构架可以是人、人源化或非人的构架，例如经修饰降低了在人体中的抗原性的鼠构架，或合成构架例如有序列。成熟的免疫球蛋白/抗体可变区一般不含前导序列。免疫球蛋白/抗体根据它们的恒定区可以进一步区别为不同类别（例如 IgA、IgD、IgE、IgG 或 IgM）和亚类或同种型（例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4）。

本文使用的术语抗体的“抗原结合部分”（或简称为“抗体部分”或“部分”）是指与狂犬病病毒或其组分（例如 G 糖蛋白）特异性结合的抗体的一部分，例如这样一种分子：其中一条或多条免疫球蛋白链不是全长的，但是其与狂犬病病毒或其组分特异性结合。术语抗体的“抗原结合部分”中所包括的结合部分的例子包括：(i) Fab 片段，即由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成的单价片段；(ii) F(ab')₂ 片段，即包含在铰链区处通过二硫键连接的两条 Fab 片段的双价片段；(iii) 由 VH 和 CH1 结构域组成的 Fd 片段；(iv) 由抗体单臂的 VL 和 VH 结构域组成的 Fv 片段；(v) 由 VH 结构域组成的 dAb 片段 (Ward 等 (1989) Nature 341: 544-546, 1989)；和 (vi) 分离的互补决定区 (CDR)，其具有足以特异性结合（例如）可变区的抗原结合部分的构架。轻链可

变区的抗原结合部分和重链可变区的抗原结合部分，例如 Fv 片段的两个结构域 VL 和 VH，可以利用重组方法通过合成连接体连接在一起，该连接体使它们能够形成一条蛋白质链，其中 VL 和 VH 区配对形成单价分子（称为单链 Fv (scFv)；参见，例如 Bird 等(1988) Science 242:423-426；和 Huston 等(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883)。这样的单链抗体也包括在术语抗体的“抗原结合部分”内。这些抗体部分用本领域技术人员公知的常规技术获得，并用与完整抗体相同的方法对这些部分进行实用性筛选。

术语“单特异性抗体”是指对特定靶标例如表位表现出单一结合特异性和亲和力的抗体。该术语包括“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”，后者在本文使用时是指具有单一分子组成的多种抗体或其部分的制剂。

本文使用的术语“重组”抗体是指通过重组方法制备、表达、产生或分离的抗体，例如用转染到宿主细胞内的重组表达载体表达的抗体，从重组组合抗体文库中分离的抗体，从人免疫球蛋白基因转基因动物（例如小鼠）中分离的抗体，或通过包括将人免疫球蛋白基因序列剪接为其他 DNA 序列的任意其他方法制备、表达、产生或分离的抗体。这些重组抗体包括人源化、CDR 移植的、嵌合、体外（例如通过噬菌体展示）产生的抗体，并且可以任选地包含来源于人种系免疫球蛋白序列的恒定区。

术语“基本相同”（或“基本同源”）是指第一氨基酸或核苷酸序列含有足够数目的与第二氨基酸或核苷酸序列相同或等同（例如具有相似的侧链，例如保守氨基酸置换）的氨基酸残基或核苷酸，从而该第一和第二氨基酸或核苷酸序列具有相似的活性。对于抗体来说，第二抗体与第一抗体具有相同的特异性并且具有第一抗体的至少 50% 的亲合力。

两个序列之间“同源性”的计算如下进行。为了最佳比较目的将这些序列进行比对（例如为了最佳比对可以在第一和第二氨基酸或核苷酸序列的一个或两个中引入空位，并且为了比较目的可以忽略非同源

序列)。为了比较目的而比对的参比序列的长度至少为参比序列长度的50%。然后比较相应氨基酸位点或核苷酸位点处的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列中的位点被与第二序列中相应位点处相同的氨基酸残基或核苷酸占据时,这些分子在该位点处相同(此处所用的氨基酸或核酸“同一性”等同于氨基酸或核酸“同源性”)。考虑为了两个序列之间进行最佳比对所需要引入的空位的数目和每个空位的长度后,两个序列之间的百分同一性是这两个序列共有的相同位点的数目的函数。

两个序列之间的序列比较和百分同一性的确定可以用数学算法来实现。两个氨基酸序列之间的百分同一性用已经整合入GCG软件包的GAP程序中的Needleman和Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:444-453, 1970的算法进行确定,其中使用Blossum 62评分矩阵,空位罚分为12,空位延伸罚分为4,移码空位罚分为5。

本文使用的术语“在低严格性、中严格性、高严格性或极高严格性条件下杂交”描述了杂交和洗涤的条件。进行杂交反应的指南可见*Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. 6.3.1-6.3.6, 1989,在此引用作为参考。该文献中描述了水性和非水性方法,可以使用其中任意一种。此处所指的具体杂交条件如下:

- 1) 低严格性杂交条件:约45°C下6X氯化钠/柠檬酸钠(SSC),随后至少在50°C下用0.2X SSC, 0.1% SDS洗涤两次(对于低严格性条件,洗涤温度可以提高至55°C);
- 2) 中严格性杂交条件:约45°C下6X SSC,然后在60°C下用0.2X SSC, 0.1% SDS洗涤一次或多次;
- 3) 高严格性杂交条件:约45°C下6X SSC,随后在65°C下用0.2X SSC, 0.1% SDS洗涤一次或多次;
- 4) 极高严格性杂交条件:在65°C下0.5M磷酸钠, 7% SDS,随后在65°C下用0.2X SSC, 1% SDS洗涤一次或多次。

应当理解,此处所述的抗体及其抗原结合部分可以具有另外的保守或非必需氨基酸置换,这对多肽功能没有实质性影响。具体置换是否被耐受,即是否不会不利地影响需要的生物学性质如结合活性,可以如Bowie等, *Science*, 247:1306-1310, 1990所述确定。“保守氨

“氨基酸置换”是指将氨基酸残基替换为具有相似侧链的氨基酸残基。具有相似侧链的氨基酸残基家族在本领域中已经定义。这些家族包括：具有碱性侧链（例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸）、酸性侧链（例如天冬氨酸、谷氨酸）、不带电荷极性侧链（例如天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸）、非极性侧链（例如甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸）、 β -分支侧链（例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸）和芳族侧链（例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸）的氨基酸。

“非必需”氨基酸残基是可能相对于多肽如结合剂如抗体的野生型序列而改变，但基本不改变生物活性的残基，而“必需”氨基酸残基则导致这样的改变。

除非另外定义，本文所用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域技术人员通常理解的同样的含义。尽管下面描述了合适的方法与材料，但是在本发明的实践或试验中也可以使用与此处所述相似或等同的方法与材料。如有冲突，以本说明书包括定义为准。另外，这些材料、方法和实施例都只是说明性的，不是限制性的。

概述

狂犬病病毒是引起人类致死性脑炎的 RNA 病毒。本文提供了用于治疗 and 预防狂犬病病毒感染的动物、特别是人类受试者、更特别的是需要接触后狂犬病治疗或接触后预防（PEP）的人的方法和组合物。该组合物包括识别狂犬病病毒的蛋白质和其他分子组分（例如脂质、碳水化合物、核酸）的抗体，包括识别狂犬病病毒 G 糖蛋白的抗体或其部分。特别是提供了重组完全人类单克隆抗体。在某些实施方案中，在表达人免疫球蛋白基因区段的小鼠中产生这些人单克隆抗体（下文描述）。也提供了抗狂犬病病毒抗体的组合。

新方法包括给受试者施用可与狂犬病病毒结合的抗体（及其抗原结合部分），以抑制受试者的狂犬病病毒介导的疾病。例如，本文所述的人单克隆抗狂犬病病毒抗体能够中和狂犬病病毒并且抑制终末

期狂犬病感染和脑炎。在其他实例中，可以施用抗狂犬病病毒抗体（例如抗狂犬病病毒 G 糖蛋白单克隆抗体）的组合，以抑制狂犬病病毒介导的疾病。人单克隆抗体可以在狂犬病感染的创伤部位局部给药（浸润），任选地随后给予抗狂犬病疫苗。

1. 抗体的产生

免疫原

通常，用狂犬病病毒和/或狂犬病病毒表达的抗原免疫动物，以产生抗体。为了产生抗狂犬病病毒抗体，一般用灭活的狂犬病病毒免疫动物。例如，可以通过化学处理和/或冻干来灭活狂犬病病毒，几种狂犬病病毒疫苗可以购买到。

结合和中和狂犬病病毒的抗狂犬病病毒抗体能够与狂犬病病毒的特定表位例如狂犬病病毒 G 糖蛋白相互作用。例如，抗狂犬病病毒 G 糖蛋白抗体能够结合狂犬病病毒 G 糖蛋白的 N 末端区或 C 末端区或其蛋白质或片段的内部区域内的表位（参见实施例 4 和图 5）或其组合。在一个实例中，结合和中和狂犬病病毒的抗体与狂犬病病毒 G 糖蛋白的氨基酸 19-422 内的表位例如线性表位结合。在另一实例中，鉴定了一种抗体，该抗体与狂犬病病毒 G 糖蛋白的氨基酸 19-422 内的线性表位和/或构象表位结合。如本文所述，这些表位也可以用来鉴定其他与狂犬病结合的抗体。

在 HuMAb 小鼠中产生人单克隆抗体

可以用无法用于多克隆抗体的方法产生单克隆抗体。多克隆抗血清在动物与动物之间不同，而单克隆制剂则表现出均一的抗原特异性。鼠系统可用于产生单克隆抗体，免疫方案、分离和融合脾细胞的技术和产生杂交瘤的方法和试剂是众所周知的。单克隆抗体可以用多种技术产生，包括常规单克隆抗体方法，例如 Kohler 和 Milstein, *Nature*, 256: 495, 1975 的标准体细胞杂交技术。总的参见 Harlow,

E. 和 Lane, D. *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1988.

虽然这些标准技术是已知的,但是希望使用人源化或人抗体而不是鼠抗体来治疗人类受试者,因为人体会对来自小鼠和其他物种的抗体产生免疫应答。对鼠抗体的免疫应答被称为人抗鼠抗体或 HAMA 应答 (Schroff, R. 等, *Cancer Res.*, 45, 879-885, 1985), 是在人体中引起血清病并且导致鼠抗体从个体循环中被快速清除的情况。已经证明人体中的免疫应答是针对鼠免疫球蛋白的可变区和恒定区的。对于人体施用,人单克隆抗体比来源于其他动物的抗体和人多克隆抗体更安全。

产生人单克隆抗体的一种有用的动物是表达人免疫球蛋白基因而不是其自身鼠免疫球蛋白基因的转基因小鼠。这种转基因小鼠,例如“HuMAb™”小鼠,含有编码非重排的人重链(μ 和 γ)和 κ 轻链免疫球蛋白序列的人免疫球蛋白基因小基因座(minilocus),并且具有使内源 μ 和 κ 链基因座失活的定向突变(参见,例如, Lonberg, N. 等, *Nature* 368(6474): 856-859, 1994, 和美国专利 5,770,429)。因此,该小鼠表现为小鼠 IgM 或 κ 表达降低,而响应于免疫,引入的人重链和轻链转基因经历类别转换和体细胞突变,产生高亲和力的人 IgG κ 单克隆抗体 (Lonberg, N. 等, 见上;综述见 Lonberg, N. *Handbook of Experimental Pharmacology* 113: 49-101, 1994; Lonberg, N. 和 Huszar, D., *Intern. Rev. Immunol.*, 13: 65-93, 1995, 和 Harding, F. 和 Lonberg, N., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 764: 536-546, 1995)。

该转基因小鼠的制备详细描述于下面的文献中: Taylor, L. 等, *Nucleic Acids Research*, 20: 6287-6295, 1992; Chen, J. 等, *International Immunology* 5: 647-656, 1993; Tuailon 等, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 90: 3720-3724, 1993; Choi 等, *Nature Genetics*, 4: 117-123, 1993; Chen, J. 等, *EMBO J.*, 12: 821-830, 1993; Tuailon 等, *J. Immunol.*, 152: 2912-2920, 1994; Taylor, L. 等, *International Immunology*, 6: 579-591, 1994; 和 Fishwild, D.

等, *Nature Biotechnology*, 14: 845-851, 1996。进一步参见, 美国专利 5,545,806; 美国专利 5,569,825, 美国专利 5,625,126, 美国专利 5,633,425, 美国专利 5,661,016, 美国专利 5,770,429, 美国专利 5,789,650, 美国专利 5,814,318, 美国专利 5,874,299 和美国专利 5,877,397, 均属于 Lonberg 和 Kay, 以及 PCT 公布 WO 01/14424, WO 98/24884, WO 94/25585, WO 93/1227, 和 WO 92/03918。

为了产生针对一种抗原的完全人类单克隆抗体, 可以如 Lonberg, N. 等 *Nature*, 368(6474): 856-859, 1994、Fishwild, D. 等, *Nature Biotechnology*, 14: 845-851, 1996 和 WO 98/24884 所述用免疫原免疫 HuMAb 小鼠。优选地, 小鼠在第一次免疫时为 6-16 周龄。例如, 可以用灭活狂犬病病毒的纯化制剂腹膜内免疫 HuMAb 小鼠。为了产生针对狂犬病病毒蛋白质、脂质和/或碳水化合物分子的抗体, 可以用活的、杀死的或不存活的灭活的和/或冻干的狂犬病病毒免疫小鼠。在另一实施方案中, 狂犬病病毒 G 糖蛋白或其一个或多个片段可以用作免疫原。

当最初使用在弗氏完全佐剂中的抗原腹膜内 (IP) 免疫, 接着隔周用在弗氏不完全佐剂中的抗原腹膜内免疫 (最多共六次) 时, HuMAb 转基因小鼠产生最佳应答。免疫应答可以在免疫方案进程中用眼眶后取血获得的血浆样品进行监测。例如可以通过 ELISA 或流式细胞术筛查血浆, 具有足够效价的抗狂犬病病毒人免疫球蛋白的小鼠可用于融合。用抗原对小鼠静脉内加强免疫, 3 天后处死, 并且取出脾脏。预期每种抗原可能需要进行多个融合。每种抗原一般免疫数只小鼠。

分离小鼠脾细胞, 按照标准程序用 PEG 将其与小鼠骨髓瘤细胞系融合。然后对得到的杂交瘤进行抗原特异性抗体产生的筛选。例如, 使用 50% PEG, 将来自被免疫小鼠的脾淋巴细胞的单细胞悬液与六分之一数目的 P3X63-Ag8.653 非分泌小鼠骨髓瘤细胞 (ATCC, CRL 1580) 融合。细胞以大约 2×10^5 接种于平底微量滴定板中, 接着在含有 20% 胎克隆血清、18% “653” 条件培养基、5% Origen (IGEN)、4 mM L-谷氨酰胺、1 mM 丙酮酸钠、5mM HEPES、0.055 mM 2-巯基乙醇、50

单位/毫升青霉素、50 mg/ml 链霉素、50mg/ml 庆大霉素和 1× HAT (Sigma; HAT 在融合 24 小时后加入)的选择性培养基中培养两周。两周后,在用 HT 替换了 HAT 的培养基中培养细胞。然后通过 ELISA 对各孔的上清液进行人抗狂犬病病毒单克隆 IgM 和 IgG 抗体的筛选。将分泌抗体的杂交瘤再次平板接种,再次筛选,如果对于人 IgG 仍然是阳性,则通过有限稀释将抗狂犬病病毒单克隆抗体亚克隆至少两次。然后体外培养稳定的亚克隆,在组织培养基中产生少量抗体用于表征。

在一个实施方案中,用来产生抗狂犬病病毒人抗体的转基因动物含有至少一个、一般 2-10 个、有时 25-50 个或更多拷贝的 WO 98/24884 实施例 12 所述的转基因(例如 pHC1 或 pHC2),与含有一个拷贝的 WO 98/24884 实施例 5、6、8 或 14 所述轻链转基因的动物繁育,其后代与 WO 98/24884 实施例 10 所述的 J_H 缺失的动物繁育,所述专利的内容在此引用作为参考。对于这三种性状中的每一个来说,这些动物培育为纯合的。这些动物具有下列基因型:单拷贝(每个染色体单倍体组)的未重排的人重链小基因座(WO 98/24884 的实施例 12 描述),单拷贝(每个染色体单倍体组)的未重排的人 K 轻链构建体(WO 98/24884 的实施例 14 描述),和除去所有功能性 J_H 区段的每个内源小鼠重链基因座处的缺失(WO 98/24884 的实施例 10 描述)。这些动物与对于 J_H 区段缺失而言纯合的小鼠(WO 98/24884 的实施例 10 描述)繁育,产生对于 J_H 区段缺失而言为纯合的而对于人重链和轻链构建体而言为半合的后代。给产生的动物注射抗原,用于产生针对这些抗原的人单克隆抗体。

从该动物中分离的 B 细胞对于人重链和轻链是单特异性的,因为它们只含有一个拷贝的每种基因。此外,它们对于人或小鼠重链是单特异性的,因为由于如 WO 98/24884 实施例 9 和 12 所述引入的跨过 J_H 区的缺失,两个内源小鼠重链基因拷贝都无功能性。而且,大部分 B 细胞对于人或小鼠轻链是单特异性的,因为一个拷贝的重排人 κ 轻链

基因的表达将等位地和同型地排除在大部分 B 细胞中内源小鼠 κ 和 λ 链基因的重排。

在一个实施方案中，转基因小鼠将表现为产生具有重要的所有组成成分 (repertoire) 的免疫球蛋白，理想地基本类似于原始小鼠。因此，例如，在内源 Ig 基因已经灭活的实施方案中，总免疫球蛋白水平将为约 0.1-10 mg/ml 血清，例如 0.5-5 mg/ml 或至少约 1.0 mg/ml。当向转基因小鼠中引入能够实现从 IgM 到 IgG 的转换的转基因时，成年小鼠血清 IgG 与 IgM 的比例优选为约 10:1。在未成熟的小鼠中 IgG 与 IgM 的比例将更低。通常，超过约 10%，例如约 40-80% 的脾和淋巴结 B 细胞将只表达人 IgG 蛋白质。

转基因小鼠中的所有组成成分理想地接近于非转基因小鼠中所显示的，通常高达至少约 10%，优选 25-50% 或更高。通常产生至少约一千种不同的免疫球蛋白 (理想地为 IgG)，优选 10^4 - 10^6 或更多种，这主要取决于引入小鼠基因组中的不同 V、J、D 区的数目。一般地，免疫球蛋白对预先选择的抗原表现出至少约 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、 10^{-12} M、 10^{-13} M、 10^{-14} M 或更高、例如可达 10^{-15} M 或更高的亲和力。

HuMAb 小鼠能够产生通过转基因内转换重组而经历类别转换 (顺式转换) 并且表达对该狂犬病病毒具有反应性的免疫球蛋白的 B 细胞。该免疫球蛋白可以是人序列抗体，其中重链和轻链多肽由人转基因序列编码，该序列可包括通过体细胞突变和 V 区重组连接产生的序列，以及种系编码序列。这些人序列免疫球蛋白可以被称为与人 VL 或 VH 基因区段和人 JL 或 J λ 区段编码的多肽序列基本相同，尽管由于体细胞突变和不同的 V-J 和 V-D-J 重组连接而可能存在其他非种系序列。对于这些人序列抗体，每条链的可变区一般至少 80% 由人种系 V、J 基因区段编码，对于重链，由 D 基因区段编码。通常，至少 85% 的可变区由存在于转基因上的人种系序列编码。通常 90% 或 95% 或更多的可变区序列由存在于该转基因上的人种系序列编码。但是，由于通过体细胞突变和 VJ 和 VDJ 连接引入了非种系序列，人序列抗体通常具

有一些不由人 V、D 或 J 基因区段编码的可变区序列（较不常见地，恒定区序列），如在小鼠种系中的人转基因中所见到的。一般地，这些非种系序列（或各个核苷酸位点）将在 CDR 中或 CDR 附近聚簇，或者在已知体细胞突变聚集的区域中聚簇。

与狂犬病病毒结合的人序列抗体可以由同种型转换产生，从而产生含有人序列 γ 链（如 γ_1 、 γ_2 或 γ_3 ）和人序列轻链（如 κ ）的人抗体。这些同种型转换的人序列抗体通常含有一个或多个体细胞突变，一般位于可变区中，通常在 CDR 的约 10 个残基之中或之内，这是抗原攻击，特别是接着进行第二（或后续）抗原攻击引起的 B 细胞亲和成熟和选择的结果。这些高亲和力人序列抗体具有至少约 1×10^{-9} M、一般至少 5×10^{-9} M、通常高于 1×10^{-10} M、有时为 5×10^{-10} M 至 1×10^{-11} M 或更高的结合亲和力

抗狂犬病病毒抗体也能够在包括非转基因小鼠、人、兔和山羊的其他哺乳动物中产生。

抗狂犬病病毒抗体

与狂犬病病毒特异性结合的人单克隆抗体包括本文所述的克隆 17C7、6G11、5G5、2B10 和 1E5 产生的抗体（分别称为抗体克隆 17C7、6G11、5G5、2B10 和 1E5）。具有与 17C7、6G11、5G5、2B10 或 1E5 的可变重链和轻链区至少 80% 相同的可变重链区和可变轻链区的抗体也可以与狂犬病病毒结合。在有关实施方案中，抗狂犬病病毒抗体包含，例如，与 17C7、6G11、5G5、2B10 或 1E5 的可变重链和/或可变轻链的 CDR 至少 80% 相同的互补决定区 (CDR)。这些抗体克隆的可变重链区的 CDR 在下面的表 1 中显示。

表 1. 可变重链 CDR 氨基酸序列

| 抗体克隆 | 链 | CDR | 氨基酸序列 | SEQ ID NO: |
|------|---|------|--------------------|------------|
| 17C7 | H | CDR1 | TYAMH | 3 |
| 17C7 | H | CDR2 | VVSYDGR TKDYADSVKG | 4 |
| 17C7 | H | CDR3 | ERFSGAYFDY | 5 |

| 抗体克隆 | 链 | CDR | 氨基酸序列 | SEQ ID NO: |
|------|---|------|--------------|------------|
| 6G11 | H | CDR1 | GFTFSSYG | 17 |
| 6G11 | H | CDR2 | VAVIL | 18 |
| 6G11 | H | CDR3 | ARIAPAGSAFDY | 19 |

这些抗体克隆的可变轻链区的 CDR 在下面的表 2 中显示。

表 2. 可变轻链 CDR 氨基酸序列

| 克隆 | 链 | CDR | 氨基酸序列 | SEQ ID NO: |
|------|---|------|-------------|------------|
| 17C7 | L | CDR1 | RASQSVSSYLA | 6 |
| 17C7 | L | CDR2 | DASNRAT | 7 |
| 17C7 | L | CDR3 | QQRNNWP | 8 |

| 克隆 | 链 | CDR | 氨基酸序列 | SEQ ID NO: |
|------|---|------|------------|------------|
| 6G11 | L | CDR1 | QGISSV | 20 |
| 6G11 | L | CDR2 | DAS | 21 |
| 6G11 | L | CDR3 | QQFN SYPPT | 22 |

CDR 是免疫球蛋白中决定对特定抗原的特异性的部分。在某些实施方案中，具有序列变化（例如保守置换）的对应于表 1 和表 2 中 CDR 的 CDR 可以与狂犬病病毒结合。例如，与狂犬病病毒结合的抗体（或其抗原结合部分）中可以存在其中 CDR 中的 1、2、3、4 或 5 个残基或少于总残基的 20% 被置换或缺失的 CDR。

应当理解，本文公开的一个或多个 CDR（包括 CDR 衍生或共有序列）可以用于鉴定适合与狂犬病病毒表位结合的天然存在的 CDR。这些 CDR 也可以在可变区之间组合或交叉克隆，例如轻链 CDR 可以导入重链可变区中，重链 CDR 可以导入轻链可变区中，并进行筛查，以确保保留特异性结合。

人抗狂犬病病毒抗体可包含产生自或来源于特定人免疫球蛋白基因的可变区。例如，该抗体可包含产生自或来源于人 VH3-30-3 或 VH3-33 基因的可变重链区（参见，例如，Acc. No.: AJ555951, GI No.: 29836865; Acc. No.: AJ556080, GI No.: 29837087; Acc. No.: AJ556038, GI No.: 29837012, 和 GenBank®提供的其他人 VH3-33 重排基因片段）。该抗体也可以（或者另外）包含产生自或来源于人 V κ L6、V κ L11、V κ L13、V κ L15 或 V κ L19 基因的轻链可变区（关于重排人 V κ L19 基因片段的部分序列，参见，例如，GenBank® Acc. No.: AJ556049, GI No.: 29837033）。如本领域所知和上文该章节所述，通过向编码该区域的基因组区段中引入变异性的体内重组方法衍生重组抗体的可变免疫球蛋白区。因此，来源于人 VH 或 VL 基因的可变区可包含与非淋巴样组织中所见基因不同的核苷酸。这些核苷酸的差异一般集中在 CDR 中。

而且，上述抗体表现出与狂犬病病毒的结合活性，特别是，与一个或多个狂犬病 G 糖蛋白表位的结合活性。这些抗体还表现出狂犬病病毒中和活性和对狂犬病后遗症的体内保护效果，这在下文和实施例中进一步描述。

2. 抗体的产生和修饰

抗狂犬病病毒抗体的许多不同形式可用于抑制狂犬病病毒介导的疾病。这些抗体可以是不同的同种型，包括：IgG（例如，IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）、IgM、IgA1、IgA2、IgD 或 IgE。优选地，该抗体是 IgG 同种型，例如 IgG1。该抗体分子可以是全长的（例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 抗体），或者可以只包含抗原结合片段（例如 Fab、

F(ab')₂、Fv 或单链 Fv 片段)。其中包括单克隆抗体(例如人单克隆抗体)、重组抗体、嵌合抗体和人源化抗体,以及这些抗体的抗原结合部分。

在本发明中有用的抗狂犬病病毒抗体或其部分也可以是用编码所需抗体的免疫球蛋白轻链和重链的 DNA 转化的宿主细胞产生的重组抗体。重组抗体可以用公知的基因工程技术产生。例如,重组抗体可以如下产生:克隆编码所需抗体的免疫球蛋白轻链和重链的核苷酸序列,例如 cDNA 或基因组 DNA。然后将编码这些多肽的核苷酸序列插入表达载体中,使这两个基因与它们自己的转录和翻译表达控制序列有效连接。选择表达载体和表达控制序列与使用的表达宿主细胞相匹配。一般将两个基因插入同一表达载体中。可以使用原核或真核宿主细胞。

优选在真核宿主细胞中表达,因为这些细胞比原核细胞更可能装配并分泌正确折叠的且具有免疫活性的抗体。但是,产生的由于不正确折叠而失活的任何抗体都可以通过公知的方法复性(Kim 和 Baldwin, *Ann. Rev. Biochem.*, 51: 459-89, 1982)。宿主细胞可能产生完整抗体的部分,如轻链二聚体或重链二聚体,它们也可以是本发明的抗体同系物。

例如应用本领域公知的重组 DNA 技术与基因转染方法的组合,也可以在宿主细胞转染瘤中产生本文所述的抗体(Morrison, S., *Science*, 229:1202, 1985)。例如,在一个实施方案中,可以将目标基因,例如人抗体基因,连接到表达载体中,如真核表达质粒,如 WO 87/04462、WO 89/01036 和 EP 338 841 公开的 GS 基因表达系统中所用的真核表达质粒,以及本领域公知的其他表达系统。可以将含有克隆的抗体基因的纯化质粒引入真核宿主细胞如 CHO 细胞或 NS0 细胞中,或者其他真核细胞如植物来源的细胞、真菌或酵母细胞中。用于引入这些基因的方法可以是本领域所述的任何方法,如电穿孔法、脂转染法、脂转染胺法、(例如氯化钙介导的)转染或轰击转染法,在轰击转染法中用携带目标 DNA 的微粒轰击细胞(Rodin 等, *Immunol.*

Lett., 74(3):197-200, 2000)。将这些抗体基因导入宿主细胞中后，可以确定和选择表达该抗体的细胞。这些细胞代表转染瘤，然后可以扩增其表达水平，并且放大，以产生抗体。可以利用标准技术从这些培养上清液和/或细胞中分离和纯化重组抗体。

应当理解，在本发明中可以使用上述方法的变化形式。例如，可能需要用编码抗体的轻链或重链(但不是同时编码轻链和重链)的 DNA 转化宿主细胞。也可以利用重组 DNA 技术除去编码并非结合所必需的轻链和/或重链的某些或所有 DNA，例如，可以通过删除特定氨基酸来修饰恒定区。在此处所述的方法中可以使用由这些截短的 DNA 分子表达的分子。另外，也可以产生双功能抗体，其中一条重链和一条轻链能够与狂犬病病毒结合，而另外的重链和轻链对于该狂犬病病毒以外的一种抗原或该狂犬病病毒的另外一个表位是特异性的。

本发明范围内也包括其中特定氨基酸已经被置换、缺失或添加的抗体。具体地，优选的抗体在构架区内含有氨基酸置换，例如改善了与抗原的结合。例如，可以将选择的免疫球蛋白链的少量受体构架残基置换为相应的供体氨基酸。优选的置换位置包括与 CDR 相邻的或能够与 CDR 相互作用的氨基酸残基(参见，例如，美国专利 5,585,089)。从供体中选择氨基酸的标准在美国专利 5,585,089 (例如第 12-16 栏)中记载，该专利的内容在此引用作为参考。受体构架可以是成熟的人抗体构架序列或共有序列。需要时，可以改变本发明抗体的 Fc 区，以调节效应功能，例如，补体结合和/或 Fc 受体结合。构架改变和/或适合改变(例如取代、缺失或插入)的恒定区的标准和亚类在美国专利 Nos. 6,548,640; 5,859,205; 6,632,927; 6,407,213; 6,054,297; 6,639,055; 6,737,056; 和 6,673,580 中记载。

“共有序列”是由相关序列家族中最常出现的氨基酸(或核苷酸)组成的序列(参见，例如 Winnaker, *From Genes to Clones* (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany 1987))。在蛋白质家族中，共有序列中的每个位置都被该家族中该位置处最常出现的氨基酸

所占据。如果两个氨基酸出现的频率相等，则共有序列中可以包括其中的任一个。免疫球蛋白的“共有构架”是指共有免疫球蛋白序列中的构架区。

抗狂犬病病毒抗体或其抗原结合部分可以衍生化或者连接到另外一个功能分子（例如，另外一个肽或蛋白质）上。例如，抗体可以与另外一种或多种分子实体如另外一种抗体、可检测试剂、细胞毒性剂、药剂和/或能够介导与另外一种分子连接的蛋白质或肽（如链霉抗生物素核心区或多组氨酸标记）功能连接（通过化学偶联、基因融合、非共价连接或其他方式）。

一种类型的衍生化抗体（或其片段）是通过将两个或多个（相同类型或不同类型的）这样的蛋白质交联在一起而产生的。合适的交联剂包括具有被适当间隔区隔开的两个不同反应基的异双功能交联剂（例如间马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羧基琥珀酰亚胺酯）或同双功能交联剂（例如辛二酸二琥珀酰亚胺酯）。这些交联剂可从 Pierce Chemical Company, Rockford, IL 获得。

可以衍生化（或标记）抗体（或其片段）的有用的可检测试剂包括荧光化合物、各种酶、辅基、发光材料、生物发光材料和放射性物质。荧光可检测试剂的例子包括荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明和藻红蛋白。蛋白质或抗体也可以用可检测的酶衍生化，如碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶、乙酰胆碱酯酶、葡萄糖氧化酶等。当蛋白质用可检测的酶衍生化时，通过加入被该酶用来产生可检测反应产物的其他试剂来检测该蛋白质。例如，当存在可检测试剂辣根过氧化物酶时，加入过氧化氢和二氨基联苯产生可以检测到的有色反应产物。蛋白质也可以用辅基（例如链霉抗生物素蛋白/生物素和抗生物素蛋白/生物素）衍生化。例如，抗体可以用生物素衍生化，并且通过间接测定抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白的结合进行检测。

标记的蛋白质和抗体可以用于许多（例如）诊断和/或实验情况中，包括：(i) 通过标准技术如亲和层析或免疫沉淀法分离预定的抗原；和(ii) 检测预定的抗原（例如细胞裂解物或患者标本中的（例

如)狂犬病病毒,或狂犬病病毒蛋白、碳水化合物或脂质,或其组合),以监测组织中的病毒和/或蛋白质水平,作为临床检验程序的一部分,例如确定特定治疗方案的效果。

也可以对病毒目标,例如狂犬病蛋白,如G糖蛋白或其片段使用上述任何蛋白质衍生化/标记技术。

3. 筛选方法

可以用多种公知技术表征抗狂犬病病毒抗体与狂犬病病毒的结合。抗体一般首先通过ELISA进行表征。简言之,微量滴定板用在PBS中的目标抗原例如狂犬病病毒或其G糖蛋白或部分包被,然后用在PBS中稀释的无关蛋白质如牛血清白蛋白(BSA)封闭。将来自用目标抗原如狂犬病疫苗免疫的小鼠的血浆稀释液加入各孔中,在37°C下温育1-2小时。用PBS/Tween 20洗板,然后与偶联到碱性磷酸酶上的山羊抗人IgG Fc特异性多克隆试剂在37°C下温育1小时。洗涤后,平板用ABTS底物显色,在OD 405下分析。优选地,用显示最高效价的小鼠进行融合。

如上所述的ELISA试验可以用来筛选抗体,从而选择产生对狂犬病病毒显示阳性反应性的抗体的杂交瘤。然后将产生优选以高亲和力与狂犬病病毒结合的抗体的杂交瘤进行亚克隆,并进一步表征。然后每个杂交瘤选择一个保留亲本细胞反应性的克隆(根据ELISA),用于制备细胞库,并用于抗体纯化。

为了纯化抗狂犬病病毒抗体,选择的杂交瘤可以在滚瓶、两升旋转摇瓶或其他培养系统中生长。过滤上清液,浓缩,之后用蛋白A-sepharose (Pharmacia, Piscataway, N.J.)进行亲和层析,以纯化蛋白质。在将缓冲液更换为PBS后,可以通过分光光度法测定浓度。

为了确定选择的单克隆抗体是否与独特的表位结合,可以用商售试剂(Pierce, Rockford, Ill.)将每种抗体生物素化。生物素化的MAb的结合可以用链霉抗生物素标记的探针检测。可以进一步通过免疫沉

淀或免疫印迹法检测抗狂犬病病毒抗体与狂犬病病毒或狂犬病病毒蛋白的反应性。

本发明的特定抗体的特征为与狂犬病G糖蛋白的一个或多个表位结合。例如，狂犬病G糖蛋白的表位可以是线性表位、构象表位、不连续表位、或这些表位的组合。

在一个实施方案中，狂犬病G糖蛋白的表位由抗原位点I、抗原位点II、抗原位点III、抗原位点次要A、或这些抗原位点的组合例如抗原位点III和次要位点A组成。

在另一实施方案中，狂犬病G糖蛋白的表位包含氨基酸残基336-442。在一个特定实施方案中，狂犬病G糖蛋白包含氨基酸残基336和任选的其变化，如取代或缺失（例如，参见，表9）。

用于测定抗狂犬病病毒抗体活性的其他试验包括中和试验。体外中和试验可以测定抗体抑制病毒的细胞致病作用、感染力或病毒在培养细胞之上或之中的存在的能力（见下文实施例3）。可以利用体内中和或存活试验在合适的动物模型中测定狂犬病病毒的中和，它是减少的发病率和/或死亡率的函数（见下文的实施例5）。

4. 药物组合物和药盒

在另一方面，本发明提供组合物，例如药学上可接受的组合物，其包含与药学上可接受的载体配制在一起的此处所述的抗体分子或其抗原结合部分。

“药学上可接受的载体”包括在生理学上匹配的任何及所有溶剂、分散介质、等渗剂和吸收延迟剂等。这些载体适合于静脉内、肌内、皮下、肠胃外、直肠、脊柱或表皮施用（如通过注射或输注）。

本发明的组合物可以是多种形式。包括，例如，液体、半固体和固体剂型，如液体溶液（例如注射和输注溶液）、分散液或悬浮液、脂质体和栓剂。优选的形式取决于预期的给药方式和治疗用途。有用的组合物是可注射或可输注的溶液的形式。一种有用的施用方式是肠胃外（例如静脉内、皮下、腹膜内、肌肉内）施用。例如，抗体或其

抗原结合部分可以通过静脉内输注或注射施用。在另一个实施方案中，抗体或其抗原结合部分通过肌肉内或皮下注射施用。

本发明的组合物可以与以下物质共同施用：a) 一种或多种其他抗体，例如抗狂犬病抗体，b) 狂犬病蛋白，例如狂犬病疫苗，c) 毒素，d) 其他治疗剂（例如抗病毒剂），和/或 e) 标记物。

本文使用的短语“肠胃外施用”意思是除肠内施用和局部施用以外的施用方式，通常是通过注射，包括但不限于静脉内、肌肉内、动脉内、鞘膜内、囊内、眼眶内、心内、皮内、颅内、腹膜内、经气管、皮下、角质层下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注。

治疗组合物在生产和贮存条件下一般应当是无菌的和稳定的。该组合物可以配制为溶液、微乳剂、分散液、脂质体或其他适合高抗体浓度的有序结构。通过将活性化合物（即抗体或抗体部分）以需要的量掺入合适的溶剂中，并且根据需要加入以上列举的成分中的一种或其组合，接着过滤除菌，可制备无菌注射液。通常，通过将活性化合物掺入到含有基本分散介质和选自上面所列举的其他所需成分的灭菌载体中制备分散液。对于用于制备无菌注射液的灭菌粉末剂来说，有用的制备方法是真空干燥和冷冻干燥，该方法由其先前无菌过滤的溶液得到活性成分加任何其他所需成分的粉末。例如通过应用包衣如卵磷脂，在分散液的情况下通过维持所需的颗粒大小，和通过应用表面活性剂，可维持溶液的适当的流动性。通过在组合物中包含延迟吸收剂，例如单硬脂酸盐和明胶，可以实现注射型组合物的延长的吸收。

本文所述的抗体或抗体部分可以通过本领域公知的多种方法施用，并且用于多种治疗用途。本领域技术人员应当知道，施用途径和/或方式根据需要的结果而不同。

在某些实施方案中，抗体或其抗体部分可以例如与惰性稀释剂或可同化食用的载体一起经口施用。该化合物（和其他成分，如果需要的话）也可以包封在硬壳或软壳的明胶胶囊中、压制成片剂或直接加入受试者的饮食中。对于经口治疗性施用而言，化合物可以与赋形剂

一起加入并且以可摄入的片剂、含化片、糖锭剂、胶囊、酞剂、悬浮剂、糖浆、糯米纸囊剂等形式使用。为了通过肠胃外施用以外的方式施用本发明的化合物，可能有必要向该化合物上涂覆阻止其失活的材料或者共同施用该化合物与该材料。治疗性组合物可以用本领域公知的医疗装置施用。

调节剂量方案，以提供最佳的所需反应(例如，治疗反应)。例如，可以施用单一大丸剂，可以随时间推移施用几次分开的剂量，或者可以根据治疗状况的紧急情况所指示的，按比例减小或增加剂量。特别有利的是将肠胃外组合物配制成容易施用并且剂量均匀的剂量单位形式。此处使用的剂量单位形式是指适合作为接受治疗的受试者的单位剂量的物理不连续单位；每一个单位含有预定量的活性化合物，该预定量的活性化合物经计算与所需的药物载体组合产生所需的治疗效果。本发明剂量单位形式的规格取决于且直接依赖于(a)活性化合物的独特特性和所要达到的具体疗效，和(b)配制用于治疗个体敏感性的这种活性化合物的技术中所固有的限制。

本发明抗体或抗原结合部分的治疗或预防有效量的示例性的、非限制性的范围是 0.1-60 mg/kg，例如 0.5-25 mg/kg，1-2 mg/kg 或 0.75-10 mg/kg。在一个实施方案中，抗狂犬病病毒抗体(或其抗原结合部分)的给药量为或者大约为 0.125 mg/kg、0.25 mg/kg、0.5 mg/kg 或其区间或范围。还应当理解，对于任何具体受试者来说，应当根据个体需要和施用组合物者或监督组合物施用者的专业判断来随时间推移调节具体剂量方案，此处所述的剂量范围只是说明性的，并非限制要求保护的组合物的范围或实施。

本发明范围内也包括含有抗狂犬病病毒抗体或其抗原结合部分的试剂盒。该试剂盒可包含一个或多个其他要素，包括：使用说明；其他试剂，例如标记物、治疗剂或用于将抗体与标记物或治疗剂整合或偶联的试剂，或用于制备所施用抗体的其他材料；药学上可接受的载体；和用于向受试者施用的装置或其他材料。

抗体的各种组合可以包装在一起。例如，一个试剂盒可以包括可与狂犬病病毒结合的抗体（例如包含 17C7、6G11、5G5、2B10、1E5 的可变重链和/或轻链区的抗体，或其组合）。这些抗体可以混合在一起或者分开包装于试剂盒内。

使用说明可以包括例如在具有狂犬病病毒接触症状或适应症或怀疑接触了狂犬病病毒的患者中进行治疗性应用的说明，包括建议剂量和/或给药方式。其他说明可包括将抗体与螯合剂、标记物或治疗剂偶联的说明，或者例如从未反应的偶联成分中纯化偶联抗体的说明。

该试剂盒可包括可检测标记物、治疗剂和/或用于将标记物或治疗剂与抗体螯合或偶联的试剂。偶联剂包括诸如 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 的试剂。在这些情况中，该试剂盒可包括一个或多个用于进行反应的反应容器或分离装置，例如层析柱，用于将终产物与起始材料或反应中间物分离开来。

该试剂盒还可包括至少另外一种试剂，如诊断或治疗剂，例如此处所述的诊断或治疗剂，和/或另外一种或多种抗狂犬病病毒抗体（或其部分），必要时它们配制在一个或多个分开的药物制剂中。

其他试剂盒可以包括用于被动免疫治疗的优化的编码抗狂犬病病毒抗体的核酸，和/或用作（例如）疫苗（主动免疫治疗）的狂犬病病毒蛋白或其片段，和用于表达该核酸的说明。

5. 治疗方法和组合物

本发明的抗体和抗原结合片段具有体外和体内治疗、预防和诊断用途。例如，这些抗体可以（例如）在体外或离体地对培养的细胞施用，或者在体内对动物例如人类受试者施用，以治疗、抑制、预防复发和/或诊断狂犬病病毒和狂犬病相关疾病。

本文使用的术语“受试者”包括人和非人动物。术语“非人动物”包括所有脊椎动物，例如哺乳动物和非哺乳动物，例如非人灵长类动物、小鼠、狗、猫、猪、牛和马。

蛋白质和抗体可以（例如）在体外或离体地用于培养的细胞。例如，可以在体外在培养基中培养细胞，并且通过向该培养基中加入抗狂犬病病毒抗体或其片段进行接触步骤。可以对受试者中存在的病毒体或细胞进行该方法，作为体内（例如治疗或预防）方案的一部分。对于体内实施方案，接触步骤在受试者中进行，包括在使抗体或其部分与受试者中（例如在伤口中或周围，或在神经元来源的细胞上或附近）存在的狂犬病病毒或其任意部分结合的有效条件下，向该受试者施用抗狂犬病病毒抗体或其部分。

本文描述了施用抗体分子的方法。该分子的适当使用剂量取决于受试者的年龄和体重和使用的具体药物。抗体分子可以用作配体结合的竞争剂，以抑制或减少不需要的相互作用，例如抑制狂犬病病毒与细胞例如神经元细胞的结合和/或感染。

抗狂犬病病毒抗体（或其抗原结合部分）可以与其他抗狂犬病病毒抗体（例如其他单克隆抗体、多克隆 γ -球蛋白，例如含有抗狂犬病免疫球蛋白的人血清）联合施用。能够使用的抗体组合包括抗狂犬病病毒抗体或其抗原结合部分和/或抗狂犬病病毒 G 蛋白抗体或其抗原结合部分。抗狂犬病病毒或 G 蛋白抗体可以是包括该抗体的可变区的抗体克隆 17C7、6G11、5G5、2B10 和/或 E5，或具有与该抗体的可变区至少 90%相同的可变区的抗体。在一个实施方案中，抗狂犬病病毒抗体可以是 17C7 或其部分，或具有与前述抗体如 17C7、6G11、5G5、2B10 和/或 E5 的可变区至少 90%相同的可变区的抗体。抗狂犬病病毒抗体（例如 17C7、6G11、5G5、2B10 和/或 E5）的组合可以提供对狂犬病、特别是例如特定狂犬病分离株的有效抑制（见表 11-13）。适合用本发明的抗体治疗、检测、诊断等的典型狂犬病病毒分离株包括，例如，CVS-11 分离株、ERA 分离株、Pasteur 病毒分离株、灰狐（德克萨斯州）分离株、灰狐（亚利桑那州）分离株、北极狐（阿肯色州）分离株、臭鼬（北方中部）分离株、臭鼬（南方中部）分离株、浣熊分离株、丛林狼（德克萨斯州）分离株、狗（德克萨斯州）分离株、蝙蝠（赤蓬毛蝠 (*Lasiurus borealis*)；田纳西州）分离株、蝙蝠（大棕蝠 (*Eptesicus*

fuscus)-鼠耳蝠 (*Myotis* spp.) ; 科罗拉多州)分离株、蝙蝠(鼠耳蝠 (*Myotis* spp.)); 华盛顿)分离株、蝙蝠(灰蓬毛蝠 (*Lasiurus cinereus*); 亚利桑那州)分离株、蝙蝠(东美油蝠 (*Pipistrellus subflavus*) ; 阿拉巴马州)分离株、蝙蝠(巴西犬吻蝠 (*Tadarida brasiliensis*); 阿拉巴马州)分离株、蝙蝠(银毛蝠 (*Lasionycterus noctivagans*) ; 华盛顿)分离株、蝙蝠(大棕蝠 (*Eptesicus fuscus*); 宾夕法尼亚州)分离株、猫鼬(纽约/波多黎各)分离株、狗(阿根廷)分离株、狗(Sonora)分离株、狗(加蓬)分离株、狗(泰国)分离株、及其组合。

应当理解,本发明的任何药剂,例如抗狂犬病病毒抗体或其片段,可以(例如)以不同的比例或含量联合,用于改善疗效。实际上,本发明的药剂可以配制为混合物,或者利用本领域公知的技术进行化学或遗传连接,从而产生具有抗狂犬病病毒结合性质例如与(例如)狂犬病病毒G糖蛋白的多表位结合性质的共价连接的抗体(或共价连接的抗体片段)。通过测定单独的或与另一种药物联合的药剂的一个或多个参数,如亲和力、亲合力或生物学效能,可以指导组合配制。在靶向、清除和/或隔离狂犬病病毒或其抗原中,本发明的药剂也可以与提高治疗剂的进入、半衰期或稳定性的其他药剂联合施用。

在治疗活性方面,例如在狂犬病病毒相关疾病的抑制、预防、感染和/或治疗方面,这些联合治疗优选是加合的,甚至是协同性的。应用这样的联合治疗能够减少达到所需效果所需的治疗剂(例如抗体或抗体片段混合物,或交联的或基因融合的双特异性抗体或抗体片段)的剂量。

本发明也提供了免疫原性组合物,其含有免疫原性有效量的狂犬病病毒成分例如狂犬病病毒G糖蛋白或其片段,并且能够用于产生抗狂犬病病毒抗体。狂犬病病毒蛋白序列中的免疫原性表位可以如本文所述(参见例如实施例4)或者按照本领域公知的方法鉴定,含有这些表位的蛋白质或片段可以用多种手段加入到疫苗组合物中。合适的组合物可以包括,例如,脂肽(例如, Vitiello等, J. Clin. Invest.

95:341 (1995))、包封于聚(DL-丙交酯-共聚-乙交酯) (“PLG”)微球体中的肽组合物(参见,例如, Eldridge 等, *Molec. Immunol.* 28:287-94 (1991); Alonso 等, *Vaccine* 12:299-306 (1994); Jones 等, *Vaccine* 13:675-81 (1995))、包含于免疫刺激复合物(ISCOMS)中的肽组合物(参见,例如, Takahashi 等, *Nature* 344:873-75 (1990); Hu 等, *Clin. Exp. Immunol.* 113:235-43 (1998))和多抗原肽系统(MAPs) (参见,例如, Tam, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:5409-13 (1988); Tam, *J. Immunol. Methods* 196:17-32 (1996))。

可以与本发明的免疫原性组合物一起使用的有用的载体是众所周知的,包括,例如,甲状腺球蛋白、白蛋白如人血清白蛋白、破伤风类毒素、聚氨基酸如聚 L-赖氨酸、聚 L-谷氨酸、流感、乙型肝炎病毒核心蛋白等。这些组合物可含有生理学耐受的(即可接受的)稀释剂,如水或盐水,典型的是磷酸盐缓冲溶液。这些组合物和疫苗一般还含有佐剂。如不完全弗氏佐剂、磷酸铝、氢氧化铝或明矾等佐剂是本领域公知的材料的例子。另外,将靶抗原例如狂犬病病毒蛋白(或其片段、失活衍生物或类似物)与脂质如三棕榈酰-S-甘油半胱氨酰-丝氨酰-丝氨酸(P₃CSS)偶联,可以引发 CTL 应答。

抗狂犬病抗体可以与其他药剂如用于治疗狂犬病病毒介导的疾病的组合物联合施用。例如,可以与抗狂犬病抗体联合施用的治疗剂包括用于治疗、预防或抑制狂犬病的抗病毒剂、血清免疫球蛋白和/或疫苗(例如,疫苗,如 RabAvert™ (Chiron), 吸附狂犬病疫苗(Bioport), 和 Imovax™ Rabies (Aventis), 和/或免疫球蛋白,如 BayRab™ (Bayer)和 Imogam™ Rabies-HT (Aventis))。该抗体可以在狂犬病病毒疫苗之前、之后或同时施用。

6. 其他方法

可以通过标准技术,例如亲和层析或免疫沉淀法,利用抗狂犬病抗体(例如单克隆抗体)分离狂犬病病毒。而且,也可以利用抗狂犬病抗体检测(例如血清标本中的)狂犬病病毒,例如,用来筛查标本

中狂犬病病毒的存在/接触。可以在诊断上应用抗狂犬病抗体监测组织中病毒的水平，作为临床检验程序的一部分，例如，确定特定治疗方案的效果。另外，狂犬病病毒表位，例如G糖蛋白表位（线性、构象或其组合）也可以用作免疫原或者作为靶标来鉴定中和性抗狂犬病结合分子，包括，例如，人血清、多克隆抗体、单克隆抗体或其片段。

示例

在实施例中，除非另外说明，使用如下的材料与方法。

材料与方法

通常，除非另外说明，本发明的实施使用常规化学、分子生物学、重组DNA技术、免疫学（特别是例如抗体技术）和标准多肽制备技术。参见，例如，Sambrook, Fritsch 和 Maniatis, *Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press* (1989); *Antibody Engineering Protocols (Methods in Molecular Biology)*, 510, Paul, S., Humana Pr (1996); *Antibody Engineering: A Practical Approach (Practical Approach Series, 169)*, McCafferty, 编著, Irl Pr (1996); *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow 等, C. S. H. L. Press, Pub. (1999); 和 *Current Protocols in Molecular Biology*, 编著. Ausubel 等人, John Wiley & Sons (1992)。参见，例如，Smith 等人, *A rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for determining rabies virus-neutralizing antibody*, pages 181-189 and Chapter 15 in *Laboratory Techniques in Rabies*, 4th ed., edited by Meslin 等人, Geneva : World Health Organization (1996)。

小鼠的免疫和杂交瘤的分离

HuMab 小鼠 (Medarex) 是含有人免疫球蛋白基因和失活的小鼠重链基因和κ轻链基因的转基因小鼠。HuMab 小鼠在第一周一般使用完全

弗氏佐剂注射约为人用剂量 1/10 的商售狂犬病疫苗，在随后数周使用 RIBI 佐剂，总共 6-8 周。利用狂犬病包膜糖蛋白 ELISA 测定血清应答，当认为血清应答达到最大时杀死动物。通过将脾细胞和配体细胞 (P3X63Ag8.653 小鼠骨髓瘤细胞) 融合产生杂交瘤，利用狂犬病糖蛋白 ELISA 针对反应性筛选得到的上清液。通过蛋白 A Sepharose 层析法 (Amersham) 从杂交瘤培养液中纯化阳性抗体。

RFFIT

RFFIT 试验如本领域所述进行。使用的狂犬病病毒株、街病毒分离株和小鼠成神经细胞瘤细胞 (MNA) 均来自美国疾病控制和预防中心 (Center from Disease Control and Prevention, Atlanta, USA)。

细胞和细胞培养

从 ATCC 获得的 HEK-293T/17 细胞在添加 10%胎牛血清和 100IU 青霉素-链霉素的 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基 (DMEM)(完全培养基) 中在 37°C 和 5% CO₂ 下培养。将细胞收集到含有 5 mM EDTA 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 中。

狂犬病糖蛋白的克隆

利用狂犬病 G 蛋白的氨基酸序列 (ERA 株, Genbank: AF406693) 设计包括氨基酸 1-524 的全长糖蛋白的密码子优化形式的狂犬病糖蛋白基因。将合成基因克隆到 pcDNA3.1Myc/His (Invitrogen) 内与 c-Myc 和 6-组氨酸 (His) 标记处于阅读框内。这些免疫标记能够允许容易地纯化和检测。构建截短形式的标记的糖蛋白编码基因，其含有整个外功能区 (20-439 位氨基酸)。通过从全长糖蛋白克隆中 PCR 扩增需要的片段，随后限制性消化，并连接到 pcDNA3.1Myc/His (Invitrogen) 内，进行截短，通过 DNA 序列分析来证实。

为了分离编码各种狂犬病 G 糖蛋白株的天然基因，用 CVS-11、臭鼬-CA、赤蓬毛蝠、灰蓬毛蝠和 ERA 狂犬病病毒 (疾病控制和预防中心，

USA) 感染 MNA 细胞。使用 Trizol 试剂从被感染的细胞或病毒体中提取 RNA。分两步进行 RT-PCR。首先, 使用 Ambion Retroscript 试剂盒合成 cDNA, 然后用 Turbo Pfu (Stratagene) 和狂犬病病毒特异性引物扩增狂犬病糖蛋白编码基因。将狂犬病糖蛋白编码基因克隆到哺乳动物表达载体 pCDNA3.1MycHis (Invitrogen) 中的 HindIII/Xba I 位点处, 与 c-Myc 和 His 表位标记处于阅读框内。利用定点诱变合成重组基因, 这些基因编码在归为抗原位点 I、II、III 和次要位点 a 的残基处突变的狂犬病糖蛋白。利用含有所需点突变的重叠引物从先前克隆的密码子优化的 ERA 糖蛋白的 pCDNA3.1Myc/His 载体中扩增全长突变糖蛋白基因。用 DpnI 消化 PCR 扩增的 DNA, 除去未扩增的野生型起始模板, 转化到细菌内, 通过测序筛选预期的突变。证实每个突变体的全长编码序列, 将得到的构建体克隆到 pCDNA3.1Myc/His 表达载体内。

重组糖蛋白的表达

使用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 如厂商所述将所有构建体转染到 HEK-293T/17 细胞中。细胞在 150 mm 组织培养皿中的 15ml DMEM-10%胎牛血清 (FCS) 中生长到 85%汇合。向细胞中添加与 75ul Lipofectamine 混合的 30 μ g DNA, 将培养板在 37 $^{\circ}$ C 下温育过夜。对于分泌型可溶性蛋白质来说, 在转染后 24、48、72 小时吸出培养基并贮存, 或者对于膜结合蛋白质来说, 弃去培养基。

重组蛋白的纯化、免疫沉淀和 Western Blot

通过与镍-次氨基三乙酸 (Ni-NTA) 珠 (Invitrogen) 一起温育, 随后进行柱过滤, 并用 250mM 咪唑进行蛋白质洗脱, 从细胞培养上清液中纯化狂犬病糖蛋白 ERA20-439 和 CVS-1120-439, 它们均含有 Myc 和 His 表位标记。为了免疫沉淀全长膜结合糖蛋白, 使用 PBS/5mM EDTA 将被转染的细胞从培养板上脱离下来, 并溶解在 PBS, 1% CHAPS, 1X 完全蛋白酶抑制剂中。通过离心使细胞裂解液澄清, 与 HuMab 17C7

或对照非狂犬病 HuMab 和蛋白 A Sepharose 一起温育。通过 SDS-PAGE 分析免疫沉淀的蛋白质，用于随后进行分析。

对于免疫印迹分析，将蛋白质在 2X Laemmli 样品缓冲液 (+/-BME) 中煮沸 5 分钟，使用 10 或 12% Novex 凝胶 (Invitrogen) 分析。如厂商所述将凝胶转移到 Immobilon P (Millipore) 上，进行免疫印迹分析。使用小鼠抗-Myc 抗体 9E10 (0.2 μ g/ml) (BD Pharmingen) 或 HuMab 17C7 (2 μ g/ml) 然后使用辣根过氧化物酶偶联的抗小鼠或抗人 IgG (1:5000 Jackson ImmunoResearch) 检测蛋白质。膜与增强化学发光试剂 (Amersham) 一起温育 1 分钟，对 X-Omat-AR 膜曝光不同的时间长度。

细胞表面染色

在转染 48 小时后收集用编码全长狂犬病 G 蛋白的构建体转染的细胞，与不同浓度的 HuMabs 一起温育。使用藻红蛋白标记的抗人 IgG (Jackson) 检测 HuMabs 的结合，使用 FACSscan 以及 CellQuest 软件 (Becton Dickinson) 进行流式细胞术。

ELISA

对所有杂交瘤进行捕获 ELISA，以鉴定产生人 IgG 的杂交瘤。ELISA 平板用 3 μ g/ml 山羊抗人 κ 轻链抗体 (Southern Biotech) 包被。平板用洗涤缓冲液 (PBS, 0.05% Tween) 洗涤，用封闭缓冲液 (PBS, 1%BSA, 0.05%Tween) 封闭，洗涤，然后将样品加到平板上 (用封闭缓冲液 1:2-1:400 稀释)。用山羊抗人 IgG-AP 第二抗体 (Jackson ImmunoResearch) 检测结合，洗板，用溶于 1M 二乙醇胺的 1mg/ml 对硝基苯磷酸二钠盐显色 20 分钟。在 405nm 下读板。

利用捕获糖蛋白 ELISA 检测 HuMab 17C7 与 CVS-1120-439 和密码子优化的 ERA20-439 的相互作用。平板用 7.5 μ g/ml 小鼠抗-c-Myc 抗体 9E10 (BD Pharmingen) 或鸡抗-c-Myc 抗体 (Molecular Probes) 包被。平板与纯化的糖蛋白或去污剂增溶的细胞裂解液一起温育，然后与 5 μ g/ml 的第一抗体 (HuMab 17C7 和小鼠抗狂犬病糖蛋白 R0012 (US

Biological))一起温育。使用碱性磷酸酶偶联的山羊抗人第二抗体 (Jackson ImmunoResearch) 检测结合, 然后如上所述显色。

HuMab 17C7 抗性病毒的产生

在第 1 天将小鼠成神经细胞瘤细胞以 1.5×10^5 细胞/ml 的密度接种于板孔中。在第 2 天将 1×10^1 至 10^8 FFU/ml 的 CVS-11 狂犬病病毒与 IU/ml HuMab 17C7 ($133 \mu\text{g/ml}$) 在 37°C 下温育 1 小时。将病毒/抗体混合物加到细胞中, 在 37°C 下温育 3-12 小时。从细胞中除去病毒/抗体混合物, 用培养基洗涤细胞一次, 然后加入含有 IU/ml HuMab 17C7 的新鲜培养基再保持 60 小时。在第 5 天, 从玻片上吸取含有可能的 HuMab 17C7 抗性病毒的培养基, 标记, 并贮存在 4°C 。然后为了检测狂犬病感染的细胞的存在, 通过与 1:40 稀释的 Centicor FITC 抗狂犬病 IgG (Fujirebio Diagnostics) 在 $36^\circ\text{C}/0.5\% \text{CO}_2$ 下温育 30 分钟, 将玻片染色。然后洗涤玻片, 在荧光显微镜 (FITC 滤光片) 下以 200x 的放大倍数检查。从含有 1-5 个荧光灶的孔中取出病毒, 在 HuMab 17C7 的存在下在 MNA 细胞中扩增 3 天。检测扩增的病毒在存在和不存在 HuMab 17C7 的相应条件下感染 MNA 细胞的能力。6 孔板中的 MNA 细胞用 HuMab 17C7 抗性病毒感染。从病毒感染的细胞中提取 RNA, 进行逆转录, 使用 CVS-11 糖蛋白特异性引物 PCR 扩增糖蛋白编码序列。通过对完整编码序列进行测序来分析糖蛋白编码基因中的突变。

狂犬病假病毒

含有插入到 *nef* 基因内的萤火虫萤光素酶基因的复制缺陷型 Env-, Vpr- HIV 骨架 pNL4-3. Luc. R-E-与狂犬病糖蛋白编码质粒共转染到 293T 细胞内。pNL4-3. Luc. R-E-试剂通过 NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, and NIH 获得。在转染 48-72 小时后收获假病毒颗粒, 使用 centricon 浓缩器 (Millipore) 浓缩 30 倍, 并在 -80°C 下冻存。通过连续稀释病毒, 然后感染并检测, 确定假病毒制品的每秒萤光素酶计数 (见下文)。对

于中和测定，每秒约 50,000 计数的假病毒与抗体一起以及在不含抗体的情况下在室温下温育 1 小时。在存在 2 μ g/ml polybrene 的条件下将抗体/病毒混合物加到 HOS 细胞(ATCC# CRL-1543)上，于 4 $^{\circ}$ C 以 800G 离心 2 小时，然后在 37 $^{\circ}$ C/5% CO₂下温育。在感染 72 小时后使用 Bright-Glo 试剂(Promega)按照厂商的方案测定萤光素酶活性。

实施例

在下面的实施例中进一步描述本发明，这些实施例不是限制权利要求书中所述的本发明的范围。

实施例 1. 抗狂犬病病毒单克隆抗体的产生

含有人免疫球蛋白基因的转基因小鼠如以上标题为“在 HuMAb 小鼠中产生人单克隆抗体”一节中所述产生，并且由 Medarex, Milpitas, CA 提供，将其用 6 剂商售狂犬病疫苗免疫。该疫苗与弗氏完全佐剂一起施用，然后用另外的狂犬病疫苗和不完全弗氏佐剂加强免疫。狂犬病疫苗由已经灭活并冻干的完整的狂犬病病毒组成。从被免疫的动物中分离脾 B 细胞，与小鼠骨髓瘤(P3X)细胞融合。产生克隆杂交瘤，并通过 ELISA 筛选。培养得到的杂交瘤，利用检测人 κ/γ 抗体链的酶联免疫吸附测定(ELISA)来检测候选人 IgG 抗体以供进一步分析。被命名为 54.17C7、108.6G11、35.5G5.1E12.149、35.2B10.1G11.3FG、和 35.1E51G1.4CB 的克隆在本文中分别被称为克隆 17C7、6G11、5G5、2B10 和 1E5，进一步通过抗原特异性 ELISA 试验确定它们与狂犬病病毒 G 糖蛋白的特异性结合。另外，选择这 5 个杂交瘤克隆，通过针对大量不同狂犬病分离株的 RFFIT 试验确定它们中和小鼠神经元细胞的狂犬病感染(参见实施例 3)。

因此，通过 RT-PCR 从 mRNA 扩增示例性克隆的 cDNA，克隆，并测序。每个克隆发现一个重链 V 区共有序列(表 7)。所有 5 个克隆都使用来源于两个种系 V 区基因之一的 VH 区，但是使用不同的 J 序列。来自示例性克隆 17C7 和 6G11 的 VH 和 VL 区的氨基酸序列在图 1-2 中

显示 (SEQ ID NOs: 1、2、15 和 16)。对于抗体重链和轻链可变区 (SEQ ID NOs: 3-8; 17-22) 标出了互补决定区 (即, CDR1、CDR2 和 CDR3)。将编码每个克隆的抗原结合部分的 DNA 克隆到载体中, 以表达为给人施用的人抗体。抗体克隆 17C7 和 6G11 的轻链和重链的核酸和氨基酸序列在序列表中提供 (分别为 SEQ ID NOs: 9-12 和 SEQ ID NOs: 23-26)。

表 7. 抗体克隆和基因组成

| HuMab | 克隆名称 | HuMab 小鼠基因型 |
|----------|------|-------------|
| 54.17C7 | 17C7 | 雌性 Hco12 |
| 108.6G11 | 6G11 | 雄性 Hco7 |
| 35.5G5 | 5G5 | 雄性 Hco7 |
| 35.1E5 | 1E5 | 雄性 Hco7 |
| 35.2B10 | 2B10 | 雄性 Hco7 |

| HuMab | 可变区轻链 | | 可变区重链 | | |
|----------|-----------------|--------------|----------------------|-------------------|--------------|
| 54.17C7 | VK: IGKV3-11*01 | JK: IGKJ4*01 | VH: IGHV3-30-3*01 | D: IGHD3-3*01 | JH: IGHJ4*02 |
| 108.6G11 | VK: IGKV1-13*02 | JK: IGKJ2*02 | VH: IGHV3-33*05 | D: IGHD6-13*01 | JH: IGHJ4*02 |

(*上表使用 IMGT 命名法)

实施例 2. 抗狂犬病病毒抗体的结合活性

应用标准技术通过 ELISA 测定每种抗体与狂犬病病毒特别是狂犬病病毒糖蛋白 G 的结合。抗狂犬病病毒抗体对于狂犬病病毒糖蛋白 G 的亲合力也用 Biacore® 仪器测定, 该仪器用表面等离子共振技术检测生物分子结合的相互作用。将每种抗体加到蛋白 A 包被的传感器芯片上, 使狂犬病病毒糖蛋白 G 流经该芯片, 以测定结合。可以测定范围为 $1 \times 10^{-6} \text{M}$ 的 K_D 、 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 的 K_D 、 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 的 K_D 、 $1 \times 10^{-9} \text{M}$

的 K_D 、 $1 \times 10^{-10}M$ 的 K_D 、 $1 \times 10^{-11}M$ 的 K_D 、 $1 \times 10^{-12}M$ 的 K_D 以及更高（或其内部或范围）的结合常数。具有有利的结合常数的抗狂犬病病毒抗体指示该抗体具有适合在人类治疗中使用的亲和力。

当对（密码子优化的）狂犬病 G 糖蛋白的外功能区检测时，抗体 17C7 通过 Biacore 分析检测，其结合亲和力至少为 $1.36E-8 M$ 。

实施例 3. 抗狂犬病病毒抗体中和狂犬病病毒

在一系列实验中检测 17C7、6G11、5G5、2B10 和 1E5 杂交瘤表达的抗体的体外狂犬病病毒中和活性（见下面的表 8-11）。

具体而言，使用快速荧光灶抑制试验（RFFIT）测定狂犬病中和活性，该方法利用荧光标记的抗体检测小鼠成神经细胞瘤细胞的狂犬病病毒感染。RFFIT 试验是医学和公共卫生专家用来测定特定抗体制品中和狂犬病病毒（即，抑制其感染细胞的能力）的效力的一种标准试验。该试验一般使用固定的病毒（CVS11）进行，但是也可以使用来自被感染动物的分离株进行。该试验如下进行：将标准量的病毒与抗体稀释液一起或者在没有抗体稀释液的情况下加入到小鼠成神经细胞瘤细胞单层中。培养该单层，然后使用荧光标记的抗狂犬病核蛋白单克隆抗体检测被感染的成神经细胞瘤细胞的灶（foci）。使用荧光显微镜显示并计数灶。然后报告结果，即没有荧光灶的显微镜视野数为 50% 时的抗体浓度（稀释度）。所有试验都包括用于比较的标准狂犬病免疫球蛋白制品（SRIG）。针对来自北美的各种脊椎动物的具有公共卫生意义的一组狂犬病病毒分离株检测抗狂犬病人单克隆抗体 17C7、6G11、5G5、2B10 和 1E5。

表 8 显示了选择的抗体与现有的疗法（即，人抗狂犬病血清；“SRIG”）相比，对一组狂犬病病毒分离株的体外中和测定结果。数字表示抗体可以被稀释而仍然显示出 50% 的中和活性的稀释倍数，即在体外阻断狂犬病病毒感染鼠成神经细胞瘤细胞的能力。较高浓度的 17C7 对选择的分离株的结果显示在下面的组中。

表 8. 毒株中和结果

| 狂犬病病毒 | SRIG | 17C7 上清液或2 mg/ml* | 6G11 1mg/ml | 5G5 2IU/ml 或 1mg/ml* | 1E5 2IU/ml 或 1mg/ml* | 2B10 2IU/ml 或 1mg/ml* |
|---------------------|------|-------------------------|----------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| CVS-11 | 145 | 1100 | 230 | ≥ 1400* | ≥ 1400* | ≥ 1400* |
| ERA | 85 | >1400 | ≥ 1400 | 230 | 250 | 230 |
| Pasteur病毒 | 17 | >1400 | 1100 | 95 | 145 | 65 |
| 浣熊, SE US | 110 | >1400 | 1300 | ≥ 1400* | ≥ 1400* | ≥ 1400* |
| 灰狐, TX | 54 | >1400 | 1100 | 95 | 95 | 110 |
| 灰狐, AZ | 50 | >1400 | 1300 | 480 | 480 | 230 |
| 北极狐, AK | 54 | >1400 | 1200 | 1000* | 800* | ≥ 1400* |
| 丛林狼, TX | 95 | >1400 | 1200 | 60 | 60 | 60 |
| 狗/丛林狼, TX | 50 | >1400 | 1100 | 60 | 60 | 75 |
| 臭鼬, 北方中部 | 170 | 200 | 210 | 230 | 250 | 270 |
| 臭鼬, 南方中部 | 54 | >1400 | ≥ 1400 | 1300* | ≥ 1400* | ≥ 1400* |
| 臭鼬, CA | 29 | >1400 | 800 | 1300* | 1200* | ≥ 1400* |
| 蝙蝠, 赤蓬毛蝠, TN | 42 | 320* | <5 | <5* | <5* | 7* |
| 蝙蝠, 大棕蝠- 鼠耳蝠, CO | 95 | 625 | 200 | 70 | 95 | 60 |
| 蝙蝠, 鼠耳蝠, WA | 50 | >1400 | 700 | ≥ 1400* | ≥ 1400* | ≥ 1400* |
| 蝙蝠, 灰蓬毛 蝠, AZ | 25 | 270* | <5 | <5* | <5* | 85* |
| 蝙蝠, 东美油 蝠, AL | 29 | 390 | 13 | 36 | 45 | 36 |
| 蝙蝠, 巴西犬吻 蝠, AL | 50 | ≥ 1400 | 125 | 180 | 210 | 125 |
| 蝙蝠, 银毛蝠, WA | 42 | ≥ 1300 | 36 | 40 | 25 | 50 |
| 蝙蝠, 大棕蝠, PA | 11 | ≥ 1400 | <5 | 11 | 16 | 29 |
| 猫鼬, NY/波多黎 各 | 230 | ≥ 1400 | ≥ 1400 | 320 | 390 | 250 |
| 狗, 阿根廷 | 54 | ≥ 1400 | ≥ 1400 | 1300* | 1200* | 1300* |
| 狗, Sonora | 56 | ≥ 1400 | ≥ 1400 | 19 | 33 | 56 |
| 狗, 加蓬 | 54 | ≥ 1400 | ≥ 1400 | 45 | 19 | 50 |
| 狗, 泰国 | 56 | ≥ 1400 | ≥ 1400 | 17 | 14 | 40 |
| 非狂犬病狂犬病病毒 | | | | | | |
| Lagos | <5 | <5 * | nd | nd | nd | nd |
| Mokola | <5 | <5 * | nd | nd | nd | nd |
| Duvenhage | 13 | <5 * | nd | nd | nd | nd |
| 欧洲蝙蝠病毒1 | 42 | <5 * | nd | nd | nd | nd |
| 欧洲蝙蝠病毒2 | 40 | <5 * | nd | nd | nd | nd |
| 澳大利亚蝙蝠病毒 | 54 | >1400 * | nd | nd | nd | nd |

最初，根据中和狂犬病病毒株CVS-11的能力筛查每种HuMAb。然后针对来自北美、南美、欧洲、非洲和亚洲的具有公共卫生意义的一大组分离株更广泛地检测中和HuMAb。显著地，与HuMabs 2B10和5G5不同，HuMAb 17C7中和大多数狂犬病病毒分离株（表8）。对一种从美国加利福尼亚的臭鼬中分离的街道狂犬病病毒（臭鼬-CA）测定50%终点中和滴度。HuMAb17C7（测试浓度为0.03mg/ml）针对加利福尼亚臭鼬计算的滴度为1:12,898，证明HuMAb 17C7强烈中和该街道病毒。

为了更好地理解如何将单个人单克隆抗体的效能与多克隆hRIG进行比较，在RFFIT试验中使用CVS-11狂犬病病毒检测相同抗体浓度的HuMAb 17C7和hRIG。hRIG的50%终点滴度为1:224，而HuMAb 17C7为1:7029（图4）。因此，在同等的抗体浓度下，HuMAb 17C7比hRIG更强地抑制CVS-11的感染。这些初步实验揭示HuMAb 17C7能够中和多种狂犬病病毒分离株，中和程度从低抗体剂量时对臭鼬CA分离株的强烈中和（0.03 μg/ml; 1:12,898）到较高抗体剂量时对CVS-11的强度较低的中和（2mg/ml; 1:7029）不等。

针对最初在对杂交瘤上清液的RFFIT检测中不显示中和的狂犬病分离株（赤蓬毛蝠，TN和灰蓬毛蝠，AZ），使用不同浓度的纯化的17C7进行重复检测，在该重复检测中证明能够中和这两种病毒。这些数据提示HuMAb 17C7与来自赤蓬毛蝠-TN和灰蓬毛蝠-AZ分离株的狂犬病糖蛋白上的中和表位相互作用（表9）。

表9. 在针对从北美蝙蝠中分离的狂犬病病毒（赤蓬毛蝠和灰蓬毛蝠）的RFFIT中HuMabs 2B10、17C7和5G5的50%终点中和（滴度的倒数）

| 狂犬病分离株 | hRIG (2IU/ml) | 17C7 (2mg/ml) | 2B10 (1.5mg/ml) | 5G5 (1mg/ml) |
|--------------|------------------|------------------|--------------------|-----------------|
| 蝙蝠, 赤蓬毛蝠, TN | 42 | 320 | 7 | <5 |
| 蝙蝠, 灰蓬毛蝠, AZ | 25 | 270 | 85 | <5 |

也检测了HuMab 17C7克隆中和非狂犬病狂犬病病毒的能力。狂犬病病毒(lyssaviruses)不是一个重要的世界范围上的公共卫生问题,但是在少数人类病例中导致致死性的疾病。这些事件以及某些狂犬病病毒在野生动物宿主中的流行已经导致最近对狂犬病生物制剂是否具有针对非狂犬病狂犬病病毒的保护能力的兴趣。在改良的RFFIT试验中检测时, HuMab 17C7能够有力地中和澳大利亚蝙蝠狂犬病病毒。计算的HuMab17C7 (检测浓度为2mg/ml)针对澳大利亚蝙蝠狂犬病病毒的滴度大于1:1400,证明HuMab 17C7中和澳大利亚蝙蝠狂犬病病毒(表10)。

表10. 在RFFIT中HuMabs17C7针对从狂犬病病毒的50%终点中和(滴度的倒数)

| 狂犬病病毒属 | hRIG (2IU/ml) | HuMab 17C7 (2mg/ml) |
|-------------|------------------|------------------------|
| 狂犬病(CVS-11) | 270 | >1400 |
| Lagos | <5 | <5 |
| Mokola | <5 | <5 |
| Duvenhage | 13 | <5 |
| 欧洲蝙蝠狂犬病病毒1 | 42 | <5 |
| 欧洲蝙蝠狂犬病病毒2 | 40 | <5 |
| 澳大利亚蝙蝠狂犬病病毒 | 54 | >1400 |

这些数据表明,在RFFIT试验中,抗狂犬病单克隆抗体能够中和来自多种北美脊椎动物的具有公共卫生意义的狂犬病病毒分离株。

实施例 4. 抗狂犬病病毒G糖蛋白抗体的表位作图

通过免疫印迹法和免疫沉淀试验确定被每种单克隆抗体结合的狂犬病病毒糖蛋白 G 的表位（见图 3）。

使用聚合酶链反应（PCR）和基因工程技术构建来自 ERA 狂犬病病毒分离株的密码子优化的全长合成人狂犬病病毒 G 糖蛋白基因。将该基因和缺失衍生物克隆到用于在人 293T 细胞中表达的 pCDNA3.1A (Invitrogen) 中。使用标准技术进行免疫印迹和免疫沉淀实验。使用重组表达的狂犬病病毒 G 糖蛋白的结果显示人单克隆抗体 17C7 对狂犬病 G 糖蛋白外功能区的 NH₃ 末端 19-422 位氨基酸内的表位作图。人单克隆抗体 5G5、2B10、1E5 在免疫印迹实验中不与可溶性 G 糖蛋白片段反应。

为了进一步在体外检测 HuMab 17C7 与狂犬病糖蛋白的相互作用，克隆并表达了来自多种狂犬病病毒株和分离株的狂犬病病毒糖蛋白。最初从 pcDNA3.1 Myc/His (Invitrogen) 哺乳动物表达载体中克隆并表达了野生型 CVS-11 糖蛋白，但是在转染的人细胞中以低水平表达。为了克服这种低水平的表达，使用本领域公知的技术构建了密码子优化形式的 ERA 狂犬病糖蛋白编码基因 (*era-co*)。也克隆了其他 G 蛋白 (ERA (*era-n*), 来自美国加利福尼亚州的臭鼬分离株 (臭鼬-*ca*), 和蝙蝠分离株赤蓬毛蝠-*tn* 和灰蓬毛蝠-*az*)。ERA 糖蛋白编码基因的密码子优化导致表达水平比野生型 ERA 糖蛋白显著提高 (图 5A)，作为用于许多后续实验的有用的试剂。

确定 HuMab 17C7 从溶解的 *era-co* (未显示)、*era-n*、臭鼬-*ca*、赤蓬毛蝠-*tn* 和灰蓬毛蝠-*az* 分离株感染的细胞中免疫沉淀出糖蛋白 (图 5B)。使用流式细胞术进一步显示 HuMab 17C7 也依赖于剂量地结合在其细胞表面上表达 ERA-CO、ERA-N、赤蓬毛蝠-TN 和灰蓬毛蝠-AZ 糖蛋白的细胞 (图 5C 和 D)。这些数据表明 HuMab 17C7 与来自多种毒株和分离株的狂犬病病毒糖蛋白特异性结合。

为了更好地表征 HuMab 17C7 识别的表位，检测 17C7，并且确定其识别不具有糖蛋白胞质结构域或跨膜结构域的可溶形式的狂犬病糖蛋白 (氨基酸 20-439)。在 ELISA 中也确定 HuMab 17C7 识别包括

氨基酸 20-439 的分泌型可溶形式的 ERA 糖蛋白 (ERA-C020-439) 和 CVS-11 糖蛋白 (CVS-1120-439) (图 6A)。令人惊讶的是, 在含有还原剂和 SDS 的样品缓冲液中温育后, 在 SDS-PAGE 凝胶中 HuMab 17C7 识别变性的 ERA-C020-439 和 ERACO。然而, 当不加还原剂准备样品时, 信号的强度大大提高 (图 6B)。

在没有还原剂时, 在 SDS-PAGE 中未观察到对 CVS-1120-439 糖蛋白的这种识别 (图 6C)。这些数据表明 HuMab 17C7 识别 ERA 狂犬病糖蛋白上的不连续表位。HuMab 17C7 识别狂犬病病毒糖蛋白的次要位点 a 和抗原位点 III。

为了更好地理解 HuMab 17C7 识别狂犬病病毒糖蛋白上的哪些区域, 构建了能够在 HuMab 17C7 的存在下生长的狂犬病病毒。为了产生 HuMab 17C7 抗性病毒, 细胞培养 CVS-11 株和臭鼬-CA 分离株。从 CVS-11 病毒原种中分离 HuMab 17C7 抗性病毒。对这些 CVS-11 衍生的病毒的糖蛋白编码序列进行分析, 揭示在所分析的 8 种病毒 (CVS1-8) 中具有 3 点突变。令人感兴趣的是, 在两例中鉴定到天冬酰胺 336 处的氨基酸改变。一种病毒含有 Asn 到 Lys 的改变, 多种病毒含有 Asn 到 Asp 的改变。两种病毒含有 336 位 Asn 到 Asp 的改变, 以及 426 位 Gln 到 Lys 的改变。天冬酰胺 336 位于以前被确定为抗原位点 III 的一部分的区域内 (表 11)。

为了确定天冬酰胺 336 是否是 HuMab 17C7 结合的关键残基, 将 ERA-co 构建体中的天冬酰胺 336 残基突变为在 CVS-11 衍生的抗性病毒中发现的残基。如图 5 和 6 所示, ERA 糖蛋白被 HuMab 17C7 强烈识别; 与 CVS-11 相比, HuMab 17C7 也强烈中和在糖蛋白序列上与臭鼬-CA 高度相似的 ERA 病毒。因此, 在这组实验中, Asp 336 残基显示对于 HuMab 17C7 中和 CVS-11 病毒是重要的, 对于保持 ERA 糖蛋白内的 HuMab 17C7 表位也是重要的。表达突变的糖蛋白 ERA-CO N336K 和 ERA-CO N336D, 并测定 HuMab 17C7 的识别。在 ELISA 中 HuMab 17C7 识别突变糖蛋白, 然而 HuMab 17C7 与 ERA-CO N336K 糖蛋白的结合与野生型相比大大降低 (图 7A)。根据小鼠抗狂犬病糖蛋白单克隆抗体的相当的结合显示,

在ELISA测定中捕获的野生型和突变糖蛋白的水平是类似的(图7A)。使用His标记进行免疫沉淀,然后用Myc标签抗体进行免疫印迹分析,显示突变糖蛋白都具有适当的分子量(图7B)。与ERA-CO N336K糖蛋白相比,HuMab 17C7更容易免疫沉淀ERA-CO和ERA-CO N336D糖蛋白(图7B),这与在ELISA中观察到的ERA-CO N336K结合的降低相一致。与野生型ERA-CO相反,在非还原条件下在Western blot中突变蛋白不被识别(图7B)。我们也产生了ERA-CO N336D Q426K和ERA Q426K,ELISA和免疫印迹结果分别与ERA-CO N336D和ERA-CO Q426K相似,显示Q426K突变不影响HuMab 17C7的结合。

为了确定HuMab 17C7的识别是否与中和活性相关,使用ERA-CO糖蛋白产生狂犬病糖蛋白假型HIV-1假病毒(10, 20)。观察到这些假病毒颗粒感染人细胞(图8A),HuMab 17C7强烈抑制野生型ERA-CO假病毒的感染,显示降至100pM的显著抑制(图8B)。检测了1000nM的无关的非狂犬病HuMabs,它们不中和狂犬病假病毒。令人感兴趣的是,HuMab 17C7也抑制ERA-CO N336K和ERA-CO N336D假病毒的感染(图8C),这与观察到的HuMab 17C7识别ERA-CO N336K和ERA-CO N336D糖蛋白相一致。

与HuMab 17C7类似,hRIG也以依赖于剂量的方式抑制所有狂犬病假病毒(图8D)。这些数据证明,使CVS-11病毒对HuMab 17C7中和不敏感的突变降低而不消除ERA糖蛋白的HuMab 17C7识别和ERA假病毒的中和。

为了检测其他良好表征的抗原位点是否被HuMab 17C7识别,产生了一组突变糖蛋白,它们含有以前对于在影响抗原位点I、II、III和次要位点a的残基上发生改变的mAb抗性病毒报道的氨基酸改变(表11)。HuMab 17C7容易从细胞裂解液中免疫沉淀所有突变糖蛋白,例外是R333I、K342T、G343E糖蛋白,它们在抗原位点III的一部分(氨基酸33)和次要位点a(氨基酸342和343)中突变。通过产生分开的R333I位点III突变体和K342T、G343E次要位点a突变体,进一步表征了对于HuMab 17C7结合重要的决定簇。在ELISA和免疫印迹分析中

R333I位点III突变体被HuMab 17C7识别，而K342T、G343E次要a和R333I、K342T、G343E位点III/次要a突变体的识别较差19(图9A和9B)。K342T、G343E和R333I、K342T、G343E突变体被商品狂犬病单克隆抗体识别(图9A)，具有适宜的分子量(图9B)，表明这些糖蛋白以相当的水平表达。因此，确定了HuMab 17C7不能与次要位点a突变体结合是由于糖蛋白的氨基酸342和343突变，证明了这些氨基酸对于HuMab 17C7识别狂犬病糖蛋白是重要的(表12)。

另外，还比较了狂犬病病毒分离株和非狂犬病狂犬病病毒在氨基酸336、342和343处的糖蛋白序列。对于HuMab 17C7重要的残基在不同的狂犬病病毒株和澳大利亚蝙蝠狂犬病病毒之间保守，但是在其他狂犬病病毒之间不保守(表13)。将来自全世界，包括北美、南美、中国和印度的人、蝙蝠和食肉动物分离株的154种狂犬病病毒的糖蛋白序列进行比较。序列比较揭示天冬酰胺336为93%保守，赖氨酸342为98%保守，甘氨酸343为99%保守。这些数据表明对于HuMab 17C7识别狂犬病病毒而言重要的残基高度保守。

表11. HuMab 17C7抗性病毒

| 病毒 | 氨基酸数 | 氨基酸改变 | 密码子改变 | 靠近抗原位点 |
|--------|------|-----------|-----------|--------|
| CVS1 | 336 | Asn → Lys | AAT → AAG | III |
| CVS2-6 | 336 | Asn → Asp | AAT → GAT | III |
| CVS7-8 | 336 | Asn → Asp | AAT → GAT | III |
| CVS7-8 | 426 | Glu → Asp | CAG → AAG | N/A |

表12. HuMab 17C7识别位点I和位点II突变的糖蛋白

| 重组糖蛋白中的突变 | HuMab 17C7结合 | 抗原位点 |
|---------------------|--------------|---------|
| R333I | + | III |
| K342T, G343E | - | 次要a |
| R333I, K342T, G343E | - | 次要a和III |
| K226E, L231P | + | I |
| G34E | + | II |
| G40V, S42P, M44I | + | II |
| K198E | + | II |

表13. 狂犬病病毒和狂犬病毒属其他病毒的氨基酸330-345

| 病毒 | Genbank ID | 氨基酸330-345 |
|---------|------------|------------------|
| CVS-11 | AF085333 | KSVRTWNEIIPSKGCL |
| ERA-CO | AF406693 | KSVRTWNEILPSKGCL |
| 臭鼬-CA | N/A | KSVRTWNEILPSKGCL |
| 赤蓬毛蝠-TN | N/A | KSVKRWNEVIPSKGCL |
| 灰蓬毛蝠-AZ | N/A | KSVKRWNEVIPSKGCL |
| 天然ERA | N/A | KSVRTWNEIIPSKGCL |
| ABLV | AF406693 | KSVRTWNEIIPSKGCL |
| EBLV-1 | AF298143 | KSVREWTEVIPSKGCL |
| EBLV-2 | AF298145 | KSIREWTDVIPSKGCL |
| Lagos | AF429312 | LKVDNWSEILPSKGCL |
| Mokola | MVU17064 | KRVDRWADILPSRGCL |

HuMab 17C7 由于能够以较高的反应性与非还原的蛋白质结合, 因此识别不连续表位。HuMab 17C7 与狂犬病糖蛋白的相互作用也是独特的, 因为它能够免疫沉淀多种狂犬病分离株的膜结合糖蛋白, 并且中

和所有这些分离株，但是在 ELISA 和免疫印迹分析中只能与一部分分泌型可溶性糖蛋白相互作用。

HuMab 17C7 识别非还原的蛋白质表明狂犬病糖蛋白的抗原位点 II、次要位点 a、或未知的构象决定簇对于 HuMab 17C7 的识别是重要的。突变糖蛋白的分析揭示在次要位点 a 处的 2 个氨基酸改变显著降低了 HuMab 17C7 对狂犬病糖蛋白的识别。这两个氨基酸改变破坏了狂犬病糖蛋白上的 HuMab 17C7 结合位点，和/或导致对于 HuMab 17C7 结合重要的狂犬病糖蛋白三级结构发生改变。

这些数据显示，HuMab 17C7 抗性病毒表明天冬酰胺 336 对于 HuMab 17C7 中和是重要的。残基 336 处的氨基酸改变破坏了狂犬病糖蛋白上的 HuMab 17C7 结合位点，和/或导致对于 HuMab 17C7 结合重要的狂犬病糖蛋白结构发生改变。

通过定点诱变产生的突变糖蛋白的分析也揭示了 HuMab 17C7 既识别次要位点 a 也识别抗原位点 III 的一部分。

总之，这些结果表明 HuMab 17C7 识别广泛保守的表位。HuMab 17C7 的宽交叉反应性指示它可以代替 RIG 用于接触后预防。

实施例 5. 施用抗狂犬病病毒抗体保护仓鼠避免致死性狂犬病病毒攻击

检测了抗体保护仓鼠避免致死剂量的狂犬病病毒攻击的能力（见表 14-15）。

也在仓鼠接触后预防（PEP）模型中检测了人单克隆抗体 17C7，以确定其作为人类狂犬病病毒感染的预防的潜力。用致死剂量的狂犬病病毒经仓鼠后腿的腓肠肌进行攻击。攻击病毒最初从得克萨斯州丛林狼中分离。在该模型中，未治疗的动物在不到 2 周内死于狂犬病病毒感染。

简要地说，用 50 μ l 狂犬病病毒经动物的腓肠肌进行攻击，并在 24 小时后在相同部位给予抗狂犬病病毒抗体。动物（n=9）用单剂量的 19 mg/kg 商售人狂犬病血清来源的免疫球蛋白（HRIG, Imogam,

Aventis) 或各种剂量 (5、0.5 或 0.25 mg/kg) 的人单克隆抗体 17C7 治疗。未治疗攻击组的所有动物都在攻击 2 周内死于狂犬病。在攻击 63 天后的存活百分比显示 0.25 mg/kg 剂量的该单克隆抗体比商售人免疫球蛋白具有更好的保护 (表 14)。

进行类似的实验, 其中在动物接触狂犬病后用抗体进行治疗, 另外, 用狂犬病疫苗治疗。在狂犬病攻击 1、3、7、14、28 天后以 50 μ l 的注射体积向与攻击部位相对的腓肠肌施用商业人用疫苗。如前所述施用抗体。攻击 53 天后的存活百分比显示 0.125 mg/kg 剂量的该单克隆抗体比商售人免疫球蛋白具有更好的保护 (表 15)。

抗体单独施用以及与疫苗一起施用, 表 14-15 中显示的结果证明在接触病毒后单独地 (见表 14) 或与狂犬病疫苗联合 (表 15) 给予本发明的抗体可以保护用致死剂量的狂犬病病毒攻击的仓鼠。

为了证明 17C7 不干扰疫苗应答, 给予仓鼠 17C7 和狂犬病疫苗。如表 16 所示, 动物甚至在给予 17C7 时也对疫苗具有应答, 由此证明 17C7 抗体不干扰疫苗应答。

表 14. 用人单克隆抗体对狂犬病的接触后保护^a

| 样品 | IU/kg | mg/kg | 存活 |
|----------------|-------|-------|-----|
| A 人狂犬病免疫球蛋白 | 15 | 8.0 | 5/9 |
| B “ “ | 6 | 4.0 | 4/9 |
| C “ “ | 1 | 0.4 | 0/9 |
| D “ “ | 0.05 | 0.0 | 0/9 |
| E hu MoAb 17C7 | 26 | 1.7 | 9/9 |
| F “ “ | 7 | 0.9 | 9/9 |
| G “ “ | 1 | 0.1 | 6/9 |
| H “ “ | 0.05 | 0.0 | 1/9 |
| I 对照 | - | - | 0/9 |

^a 在接种得克萨斯州丛林狼狂犬病病毒分离株(#323) 24小时后, 在8个治疗组(每组9只动物) 中在病毒接种部位施用人单克隆抗体17C7 (26 IU/kg; 7 IU/kg、1 IU/kg 或0.05 IU/kg) 或商售人狂犬病免疫球蛋白(15 IU/kg、6 IU/kg、1 IU/kg或0.05 IU/kg) 开始预防。非治疗对照组由9只动物组成。

表 15. 包括疫苗的狂犬病接触后预防: 人单克隆抗体与人狂犬病免疫球蛋白的比较^a

| 样品 | IU/kg | mg/kg | 第 90 天的存活 |
|-------------|-------|-------|-----------|
| A 人狂犬病免疫球蛋白 | 20 | 21 | 17/18 |
| B 人单克隆抗体 | 20 | 1 | 17/18 |
| C “ “ | 10 | 0.5 | 16/18 |
| D “ “ | 2 | 0.1 | 16/18 |
| E 对照 | - | - | 0/18 |

^a 在用来自自然感染的丛林狼的唾液腺匀浆(得克萨斯州丛林狼狂犬病病毒分离株 #323) 进行狂犬病病毒接种(50 μ l 1:1000 ($10^{6.8}$ MICLD₅₀/ml) 24小时后, 在4个治疗组(A-D) (每组18只仓鼠) 中在病毒接种部位施用人单克隆抗体17C7(20 IU/kg; 10 IU/kg或2 IU/kg) 或商售人狂犬病免疫球蛋白(20 IU/kg) 开始预防。50 μ l 体积的商售狂犬病疫苗施用于左腓肠肌。在第3、7、14、28天施用额外剂量的疫苗。非治疗对照组由18只动物组成。

表 16. 狂犬病疫苗和抗体联合应用后狂犬病病毒中和抗体的效价的几何平均值

| 组 | 天 | | | | |
|----------------|------|-------|-----------|------------|-----------|
| | 3 | 7 | 14 | 28 | 42 |
| 人狂犬病 Ig + 疫苗 | 15 | 26 | 1,315 | 10,013 | 5,878 |
| +/- St Dev | 9-26 | 13-50 | 1241-1393 | 3730-26873 | 4293-8049 |
| B hu MoAb + 疫苗 | 12 | 22 | 339 | 4,442 | 6,704 |
| +/- St Dev | 8-17 | 11-45 | 129-8889 | 2754-7158 | 6257-7189 |
| C hu MoAb + 疫苗 | 10 | 17 | 404 | 9,304 | 5,812 |
| +/- St Dev | 9-11 | 9-31 | 181-900 | 1186-21378 | 4708-7161 |

^a 三个治疗组 (A-C) 的动物在左腓肠肌肌肉内接受人单克隆抗体 17C7 (25 IU/kg (B 组) 或 15 IU/kg (C 组)) 或商售人狂犬病免疫球蛋白 (25 IU/kg)。在右腓肠肌中给予 50 μ l 体积的商售狂犬病疫苗。在第 3、7、14、28 天施用额外剂量的疫苗。在第 3、7、14、28、42 天，向每组 6 只动物给予镇静剂，采血，对动物施以安乐死。

总之，这些数据表明 HuMab 17C7 总是提供对抗狂犬病的体内保护，并且可以代替 RIG 用于接触后预防。

实施例 6. 用于对人施用的抗狂犬病病毒抗体的产生

可以应用已知的技术克隆和重组表达本发明的人抗体，以促进或提高其产量。

使用标准重组 DNA 方法将编码抗体的可变重链和轻链的核酸序列克隆到 pIE-Ugamma1F 载体中。该载体在大肠杆菌中扩增，纯化，并转染到 CHO 细胞内。将被转染的细胞以每孔 4×10^5 细胞的密度接种到 96-孔培养皿中，并用 G418 对载体转染进行筛选。根据 G418 抗性选择抗性克隆，然后与其他转染瘤一起测定 IgG 的产生。通过在浓度逐渐增加的氨甲喋呤的存在下生长，提高抗体的表达。选择能够在 175 nM 氨甲喋呤中生长的培养物，用于克隆单细胞，以供进一步开发。将该培养物以低密度接种于 96 孔板中，导致产生起源于单细胞或克隆的培养物。针对人 IgG 的产生筛选这些培养物，一般选择产生最高水平

IgG 的细胞进一步应用。扩大氨甲喋呤扩增的克隆数，产生包括几十个细胞瓶的细胞库。可替代的，可以使用谷氨酸合成酶（GS）载体，以及使用例如甲硫氨酸砒亚胺实现细胞选择（参见，例如，美国专利 Nos. 5,827,739; 5,122,464; 5,879,936; 和 5,891,693）。

为了从被转染的细胞制备抗体，培养在前述步骤中分离的克隆的细胞，并且扩增，作为生物反应器的接种物。生物反应器一般容纳 500 升体积的培养基。细胞在生物反应器中培养，直到细胞生存力下降，这指示在培养物中已经产生了最大的抗体浓度。过滤除去细胞。将滤液加至蛋白 A 柱上。抗体与该柱结合，用低 pH 洗液洗脱。然后，将抗体加至 Q-Sepharose 柱上，除去残余的杂质，如 CHO 细胞蛋白质、DNA 和其他杂质（例如病毒污染物，如果存在的话）。从 Q-Sepharose 柱上洗脱抗体，纳米过滤，浓缩，在缓冲液如 PBS 中洗涤。然后将该制剂无菌分装到小瓶中用于施用。

其他实施方案

本领域技术人员应当认识到或者仅使用常规实验就能够确定本文所述的本发明特定实施方案的许多等同方案。这些等同方案包括在下面的权利要求书内。

序列表

<110> W. D. 小托马斯
 D. 安布罗西诺
 R. 曼德尔
 S. 舍恩霍夫
 G. J. 巴布科克
 C. 鲁普雷希特

<120> 人抗狂犬病抗体及其用途

<130> MJI-003PC

<150> 60/649512

<151> 2006-02-02

<160> 34

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 144

<212> PRT

<213> 人

<400> 1

```

Met Glu Phe Gly Leu Asn Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
 1                               5                               10                               15
Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln
 20                               25                               30
Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35                               40                               45
Ser Thr Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50                               55                               60
Glu Trp Val Ala Val Val Ser Tyr Asp Gly Arg Thr Lys Asp Tyr Ala
 65                               70                               75                               80
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85                               90                               95
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Val
 100                              105                              110
Tyr Phe Cys Ala Arg Glu Arg Phe Ser Gly Ala Tyr Phe Asp Tyr Trp
 115                              120                              125
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 130                              135                              140

```

<210> 2

<211> 127

<212> PRT

<213> 人

<400> 2

```

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1                               5                               10                               15
Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
 20                               25                               30
Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 35                               40                               45
Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 50                               55                               60
Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
 65                               70                               75                               80
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85                               90                               95
Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Ser Cys Gln Gln Arg Asn
 100                              105                              110
Asn Trp Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 115                              120                              125

```

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> 人

<400> 3

Thr Tyr Ala Met His
1 5

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 4

Val Val Ser Tyr Asp Gly Arg Thr Lys Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 5

Ser Gly Ala Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 6

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 7

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 8

Gln Gln Arg Asn Asn Trp Pro
1 5

<210> 9

<211> 705

<212> DNA

<213> 人

<220>

<223> 合成构建体

<400> 9

atggaagccc cagctcagct tctcttctc ctgtactct ggctcccaga taccaccgga 60
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
ctctcctgca gggccagtc gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 180
ggccaggctc ccaggtcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 240
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 300
gaagattttg cagttttatt ctgtcagcag cgtaacaact ggctcccac tttcggcgga 360
gggaccaagg tggagatcaa acgtacggtg gctgcacat ctgtcttcat ctcccggca 420
tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgc tctgttgtgt gccigtgaa taacttctat 480
cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgcc tccaatcggg taactcccag 540
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 600

ctgagcaaa g cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct g cgaagtcac ccatcagggc 660
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 705

<210> 10
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> 人

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 10
 Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1 5 10 15
 Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
 20 25 30
 Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 35 40 45
 Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 50 55 60
 Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
 65 70 75 80
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95
 Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Ser Cys Gln Gln Arg Asn
 100 105 110
 Asn Trp Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 115 120 125
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 130 135 140
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 145 150 155 160
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 165 170 175
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 180 185 190
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 195 200 205
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 210 215 220
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 11
 <211> 1407
 <212> DNA
 <213> 人

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 11
 atggagtttg ggctgaactg ggttttcttc gtigtctttt taagaggtgt ccagtgtcag 60
 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtcctt gagactctcc 120
 tgtgcagcct ctggattcac cttcagtacc tatgctatgc actgggtccg ccaggctcca 180
 ggcaaggggc tggagtgggt ggcagttgta tcatatgatg gacgactaa agactacgca 240
 gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300
 caaatgaaca gcctgagAAC tgaggacacg gctgtgtatt tctgtgCGAG agagaggttc 360
 tctggggcct actttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctcagcctcc 420
 accaagggcc catcggctct ccccttgcca ccctcttcca agagcacctc tgggggcaca 480
 gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttcccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 540
 tcaggcgcct tgaccagegg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc 600
 tactccctca gcagctggt gagcgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc 660
 tgcaacgtga atcaaacgcc gagcaacacc aaggtggaca agagagttga gcccAAATct 720
 tgtgacaaaa ctacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 780
 gtcttctctt tcccccaaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 840
 acatgctggtg tgggtgacgt gagccacgaa gacctgagg tcaagttcaa ctggtagctg 900
 gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgctgg aggagcagta caacagcagc 960
 taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 1020
 aagtgaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 1080
 aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga ggagatgacc 1140
 aagaaccagc tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 1200
 gagtgggaga gcaatgggca gccgggagAAC aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1260
 tccgacggct ccttcttctc ctatagcaag ctaccctggt acaagagcag gtggcagcag 1320

gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtcttgc acaaccacta cacgcagaag 1380
 agcctctccc tgctccggg taaatag 1407

<210> 12
 <211> 468
 <212> PRT
 <213> 人

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 12
 Met Glu Phe Gly Leu Asn Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 20 25 30
 Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Ser Thr Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ala Val Val Ser Tyr Asp Gly Arg Thr Lys Asp Tyr Ala
 65 70 75 80
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Phe Cys Ala Arg Glu Arg Phe Ser Gly Ala Tyr Phe Asp Tyr Trp
 115 120 125
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 130 135 140
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 145 150 155 160
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 165 170 175
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 180 185 190
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 195 200 205
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 210 215 220
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser
 225 230 235 240
 Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 245 250 255

 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 260 265 270
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 275 280 285
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 290 295 300
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 305 310 315 320
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 325 330 335
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 340 345 350
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 355 360 365
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 370 375 380
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 385 390 395 400
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 405 410 415
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 420 425 430
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 435 440 445
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 450 455 460
 Ser Pro Gly Lys
 465

<210> 13

<211> 432
<212> DNA
<213> 人

<400> 13
atggagtttg ggctgaactg ggttttcctc gttgctcttt taagagggtg ccagtgtcag 60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtcctt gagactctcc 120
tgtgcagcct ctggattcac cttcagtacc tatgctatgc actgggtccg ccaggctcca 180
ggcaaggggc tggagtgggt ggcaattgta tcatatgatg gacgcactaa agactacgca 240
gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300
caaatgaaca gcctgagaac tgaggacacg gctgtgtatt tctgtgcgag agagagggtc 360
tctggggcct actttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctcagcctcc 420
accaagggcc ca 432

<210> 14
<211> 381
<212> DNA
<213> 人

<400> 14
atggaagccc cagctcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtagca acagaaacct 180
ggccaaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 240
aggttcagtg gcagtggtgc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 300
gaagattttg cagtttatc ctgtcagcag cgtaacaact ggcctcccac tttcggcgga 360
gggaccaagg tggagatcaa a 381

<210> 15
<211> 125
<212> PRT
<213> 人

<400> 15
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Val Ile Leu Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr His Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ile Ala Pro Ala Gly Ser Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

<210> 16
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<400> 16
Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Val
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Lys Ala Pro Lys Phe Leu Ile
35 40 45
Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 17
<211> 8

<212> PRT
<213> 人

<400> 17
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
1 5

<210> 18
<211> 5
<212> PRT
<213> 人

<400> 18
Val Ala Val Ile Leu
1 5

<210> 19
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<400> 19
Ala Arg Ile Ala Pro Ala Gly Ser Ala Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 20
<211> 6
<212> PRT
<213> 人

<400> 20
Gln Gly Ile Ser Ser Val
1 5

<210> 21
<211> 3
<212> PRT
<213> 人

<400> 21
Asp Ala Ser
1

<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> 人

<400> 22
Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Pro Thr
1 5

<210> 23
<211> 708
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> CDS
<222> (1)... (708)

<400> 23
atg gac atg atg gtc ccc gct cag ctc ctg ggg ctt ctg ctg ctc tgg 48
Met Asp Met Met Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

ctc cca ggt gcc aga tgt gcc atc cag ttg acc cag tct cca tcc tcc 96
Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser
20 25 30

ctg tct gca tct gta gga gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt 144
 Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 35 40 45
 cag ggc att agc agt gtt tta gcc tgg tat cag cag aaa tca ggg aaa 192
 Gln Gly Ile Ser Ser Val Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Lys
 50 55 60
 gct cct aag ttc ctg atc tat gat gcc tcc agt ttg gaa agt ggg gtc 240
 Ala Pro Lys Phe Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val
 65 70 75 80
 cca tca agg ttc agc ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc 288
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 85 90
 atc agc agc ctg cag cct gaa gat ttt gca act tat tac tgt caa cag 336
 Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 100 105 110
 ttt aat agt tac cct ccc act ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc 384
 Phe Asn Ser Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 115 120 125
 aaa cgt acg gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat 432
 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 130 135 140
 gag cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac 480
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 145 150 155 160
 ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc 528
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 165 170 175
 caa tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac 576
 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Thr Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 180 185 190
 agc acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac 624
 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 195 200 205
 gag aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc 672
 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 210 215 220
 tcg ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt 708
 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 24
 <211> 236
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 24
 Met Asp Met Met Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15
 Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 20 25 30
 Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 35 40 45
 Gln Gly Ile Ser Ser Val Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Lys
 50 55 60
 Ala Pro Lys Phe Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val
 65 70 75 80
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 85 90
 Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 100 105 110
 Phe Asn Ser Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 115 120 125
 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp

130 135 140
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 145 150 155 160
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 165 170 175
 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 180 185 190
 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 195 200 205
 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 210 215 220
 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 25
 <211> 1404
 <212> DNA
 <213> 人

 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)... (1404)

<400> 25
 atg gag ttt ggg ctg agc tgg gtt ttc ctc gtt gct ctt tta aga ggt 48
 Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
 1 5 10 15

 gtc cag tgt cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag 96
 Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 20 25 30

 cct ggg agg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcg tct gga ttc acc ttc 144
 Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

 agt agc tat ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg 192
 Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

 gag tgg gtg gca gtt ata tta tat gat gga agt aat aaa tac cat gca 240
 Glu Trp Val Ala Val Ile Leu Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr His Ala
 65 70 75 80

 gac tcc gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac 288
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95

 acg ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg 336
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

 tat tac tgt gcg cga ata gca cca gct ggt tgg gcc ttt gac tac tgg 384
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Ile Ala Pro Ala Gly Ser Ala Phe Asp Tyr Trp
 115 120 125

 ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tgg gcc tcc acc aag ggc cca 432
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 130 135 140

 tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca 480
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 145 150 155 160

 gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg 528
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 165 170 175

 gtg tgg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg 576
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 180 185 190

 gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc 624
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 195 200 205

gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat 672
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 210 215 220

cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt gag ccc aaa tct 720
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser
 225 230 235

tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg 768
 Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 245 250 255

ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc 816
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 260 265 270

atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc 864
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 275 280 285

cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag 912
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 290 295 300

gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg 960
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 305 310 315

tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat 1008
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 325 330 335

ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc 1056
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 340 345 350

atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag 1104
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 355 360 365

gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag gtc 1152
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 370 375 380

agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg 1200
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 385 390 395 400

gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct 1248
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 405 410 415

ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc acc 1296
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 420 425 430

gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg 1344
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 435 440 445

atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg 1392
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 450 455 460

tct ccg ggt aaa 1404
 Ser Pro Gly Lys
 465

<210> 26
 <211> 468
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 26

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 20 25 30
 Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ala Val Ile Leu Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr His Ala
 65 70 75
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Ile Ala Pro Ala Gly Ser Ala Phe Asp Tyr Trp
 115 120 125
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 130 135 140
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 145 150 155 160
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 165 170 175
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 180 185 190
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 195 200 205
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 210 215 220
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser
 225 230 235 240
 Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 245 250 255
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 260 265 270
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 275 280 285
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 290 295 300
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 305 310 315 320
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 325 330 335
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 340 345 350
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 355 360 365
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 370 375 380
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 385 390 395 400
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 405 410 415
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 420 425 430
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 435 440 445
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 450 455 460
 Ser Pro Gly Lys
 465

<210> 27
 <211> 143
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 27
 Met Glu Phe Gly Leu Asn Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro
 20 25 30
 Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 35 40 45
 Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 50 55 60

Trp Val Ala Val Ile Leu Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr His Ala Asp
 65 70 75 80
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
 85 90 95
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 100 105 110
 Tyr Cys Ala Arg Ile Ala Pro Ala Gly Ser Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
 115 120 125
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 130 135 140

<210> 28
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 28
 Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1 5 10 15
 Asp Thr Thr Gly Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 20 25 30
 Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly
 35 40 45
 Ile Ser Ser Val Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Lys Ala Pro
 50 55 60
 Lys Phe Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
 65 70 75 80
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn
 100 105 110
 Ser Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 115 120 125

<210> 29
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人

<220>
 <221> 变体
 <222> 6
 <223> Xaa = Thr或Ser

<220>
 <221> 变体
 <222> 8
 <223> Xaa = Ala或Gly

<400> 29
 Gly Phe Thr Phe Ser Xaa Tyr Xaa Met His
 1 5 10

<210> 30
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人

<220>
 <221> 变体
 <222> 4
 <223> Xaa = Val或Ile

<220>
 <221> 变体
 <222> 5
 <223> Xaa = Ser或Leu

<220>
 <221> 变体
 <222> 9
 <223> Xaa = Arg或Ser

<220>
 <221> 变体
 <222> 10
 <223> Xaa = Ile或Asn

<220>
 <221> 变体
 <222> 12
 <223> Xaa = Asp或Tyr

<220>
 <221> 变体
 <222> 13
 <223> Xaa = Tyr或His

<400> 30
 Val Ala Val Xaa Xaa Tyr Asp Gly Xaa Xaa Lys Xaa Xaa Ala Asp Ser
 1 5 10 15
 Val Lys Gly

<210> 31
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人

<220>
 <221> 变体
 <222> 3
 <223> Xaa = Glu或Ile

<220>
 <221> 变体
 <222> 4
 <223> Xaa = Arg或Ala

<220>
 <221> 变体
 <222> 5
 <223> Xaa = Phe或Pro

<220>
 <221> 变体
 <222> 7
 <223> Xaa = Ala或Ser

<220>
 <221> 变体
 <222> 8
 <223> Xaa = Tyr或Ser

<400> 31
 Ala Arg Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 32
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人

<220>
 <221> 变体
 <222> 5
 <223> Xaa = Ser或Gly

<220>
 <221> 变体
 <222> 6
 <223> Xaa = Val或Ile

<220>
 <221> 变体
 <222> 9
 <223> Xaa = Tyr或Val

<400> 32
Arg Ala Ser Gln Xaa Xaa Ser Ser Xaa Leu
1 5 10

<210> 33
<211> 7
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> 变体
<222> 4
<223> Xaa = Asn或Ser

<220>
<221> 变体
<222> 5
<223> Xaa = Arg或Leu

<220>
<221> 变体
<222> 6
<223> Xaa = Ala或Glu

<220>
<221> 变体
<222> 7
<223> Xaa = Thr或Ser

<400> 33
Asp Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 34
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> 变体
<222> 4
<223> Xaa = Arg或Phe

<220>
<221> 变体
<222> 6
<223> Xaa = Asn或Ser

<220>
<221> 变体
<222> 7
<223> Xaa = Trp或Tyr

<400> 34
Cys Gln Gln Xaa Asn Xaa Xaa Pro
1 5

示例性抗狂犬病人
17C7抗体可变区的氨基酸序列

重链可变区 (17C7 VH)

(SEQ ID NO: 1)

前导区
 MEFGLNWNVFLVALLRGVQ CQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSIYAMHWVRQAP 60
 (SEQ ID NO: 3) CDR 1
 CDR 2
 GKGLEWVA VVSYDGR TKDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR TEDTAVYFCAR ERF 119
 (SEQ ID NO: 4)
 CDR 3
 SGAYFDYWGQGT LVTVSSASTKGP 144
 (SEQ ID NO: 5)

轻链可变区 (17C7 VL)

(SEQ ID NO: 2)

前导区
 MEAPAQLLFLLLLWL P D T T G E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S Y L A W Y Q Q K P 60
 (SEQ ID NO: 6) CDR 1
 CDR 2
 Q Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A R F S G S G S G T D F T L T I S S L E P E D F A V Y S C Q Q R N N W E P P T F G G 120
 (SEQ ID NO: 7) CDR 3
 (SEQ ID NO: 8)
 G T K V E I K 127

图1

示例性抗狂犬病人
6G11抗体可变区的氨基酸序列

重链可变区 (6G11 VH)

(SEQ ID NO: 15)

前导区
 MEFGLSWVELVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIL
 (SEQ ID NO: 17) (SEQ ID NO: 18)
 CDR 1 CDR 2
 YDGSNKYHADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAARIAPAGSAFDYWGQGLTVTVSSASTKGP
 (SEQ ID NO: 19)
 CDR 3

轻链可变区 (6G11 VL)

(SEQ ID NO: 16)

前导区
 MDMVPAQLLGLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQGISSVLAWYQOKSGKAPKFLIY
 (SEQ ID NO: 20)
 CDR 1
 DASLSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCOQFNSTPPTFGQGTKLEIK
 (SEQ ID NO: 21) (SEQ ID NO: 22)
 CDR 2 CDR 3

图 2

狂犬病病毒糖蛋白的表位作图

蛋白质结构示意图

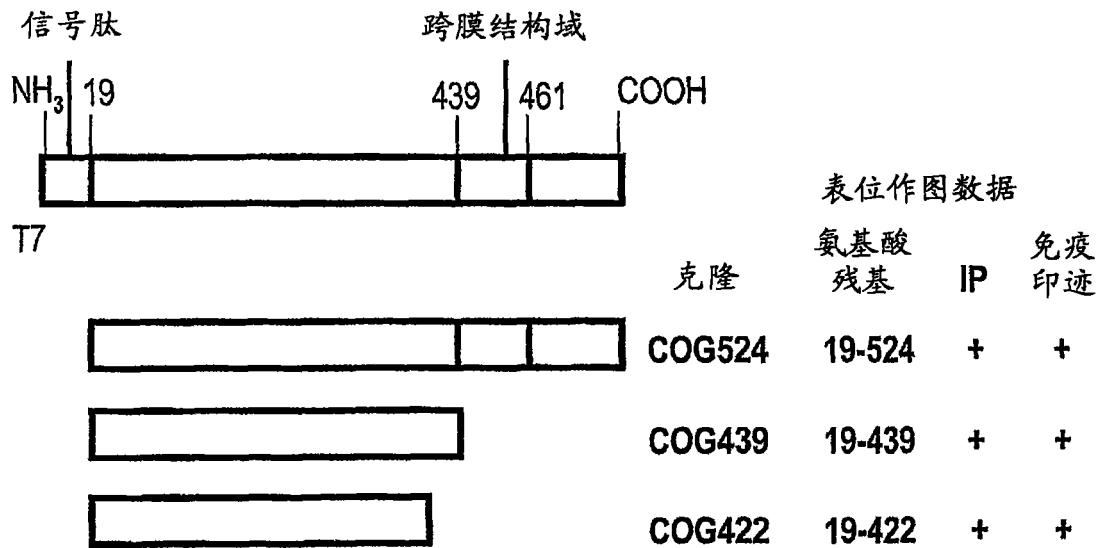


图 3

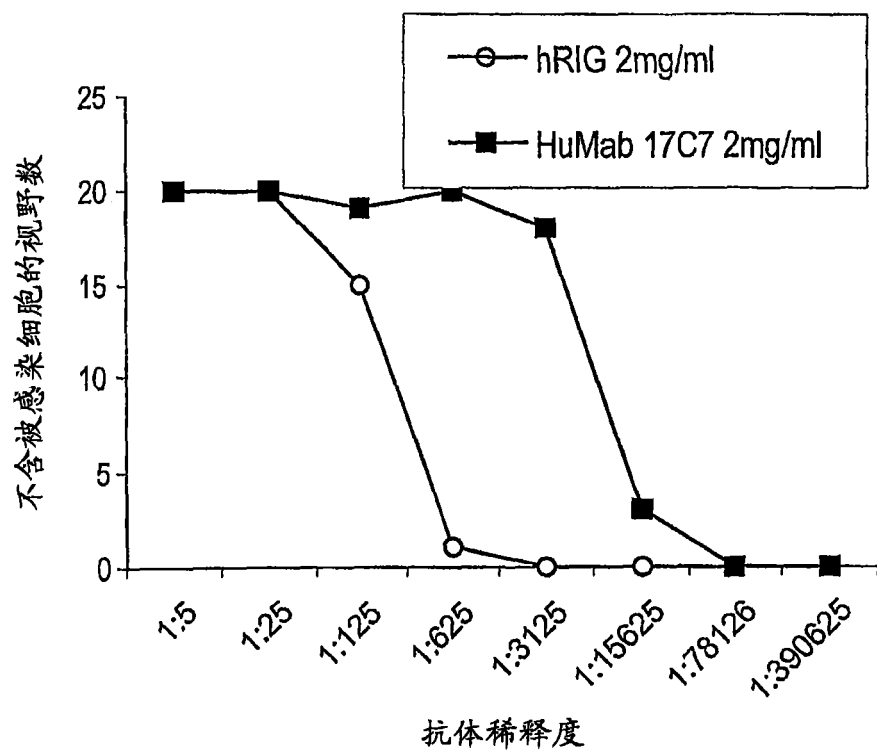


图 4

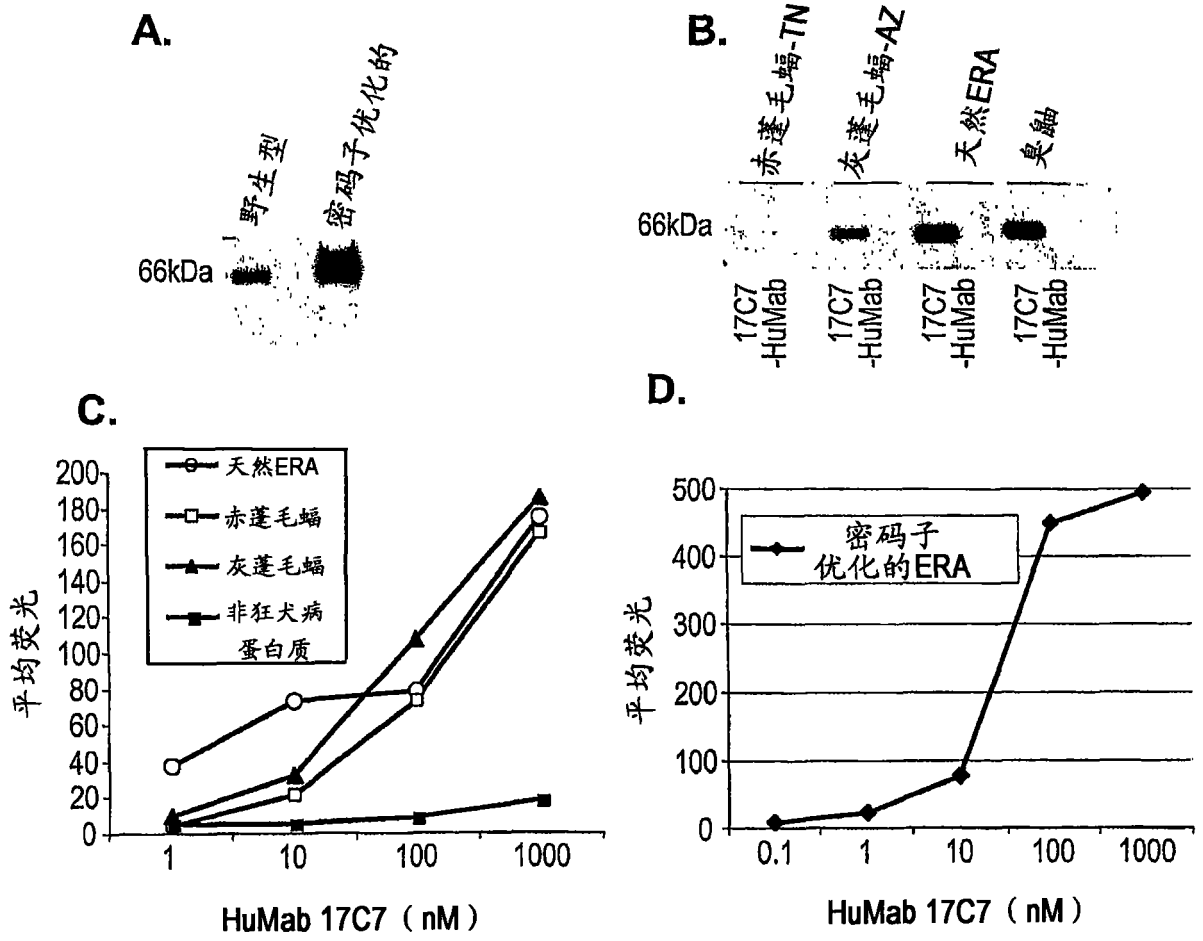


图 5

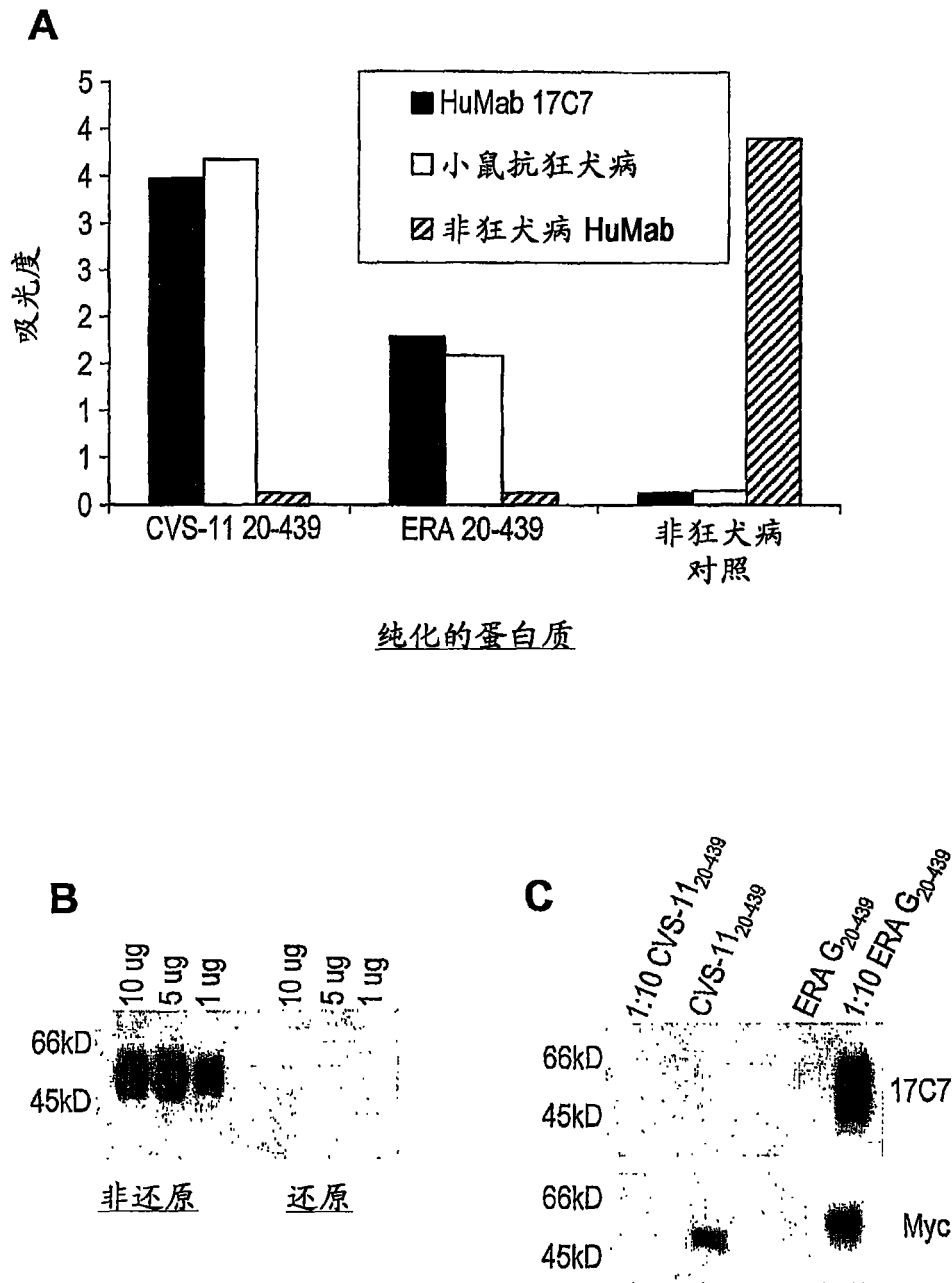


图6

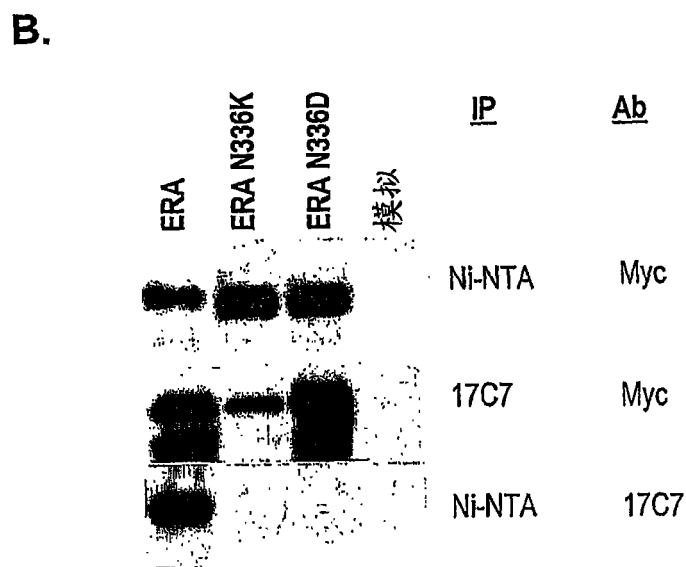
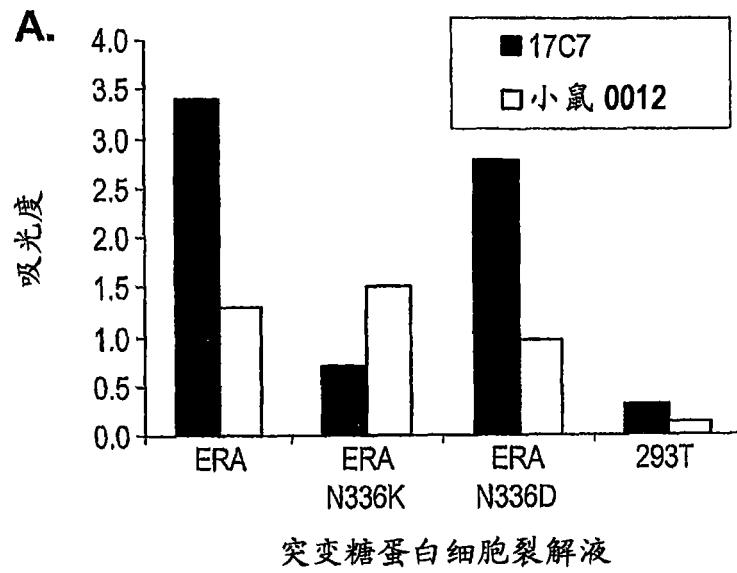


图 7

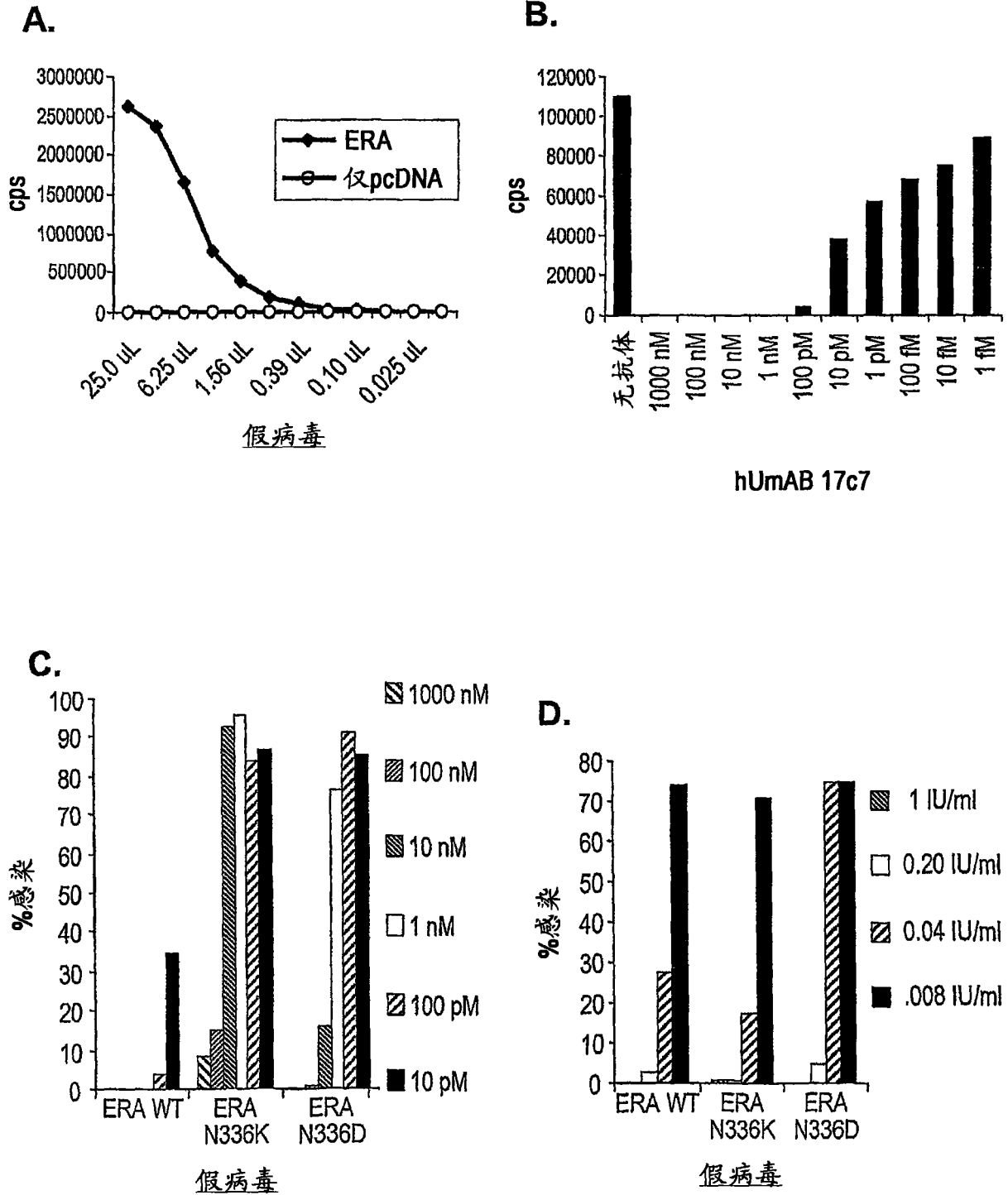


图 8

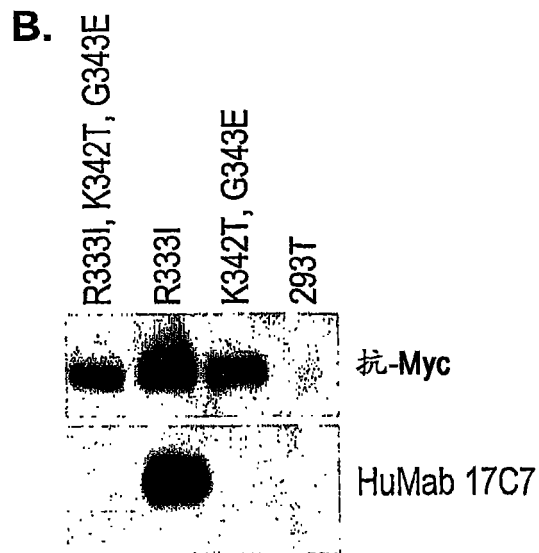
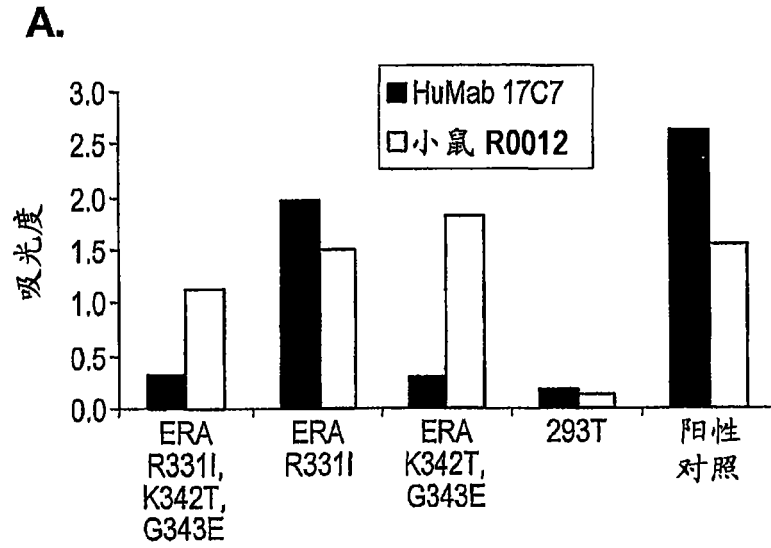


图9

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 人抗狂犬病抗体及其用途 | | |
| 公开(公告)号 | CN101133158A | 公开(公告)日 | 2008-02-27 |
| 申请号 | CN200680007172.5 | 申请日 | 2006-02-02 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 马萨诸塞大学 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 马萨诸塞州大学 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 马萨诸塞州大学 | | |
| [标]发明人 | WD小托马斯 D安布罗西诺 R曼德尔 S舍恩霍夫 GJ巴布科克 C鲁普雷希特 | | |
| 发明人 | W·D·小托马斯 D·安布罗西诺 R·曼德尔 S·舍恩霍夫 G·J·巴布科克 C·鲁普雷希特 | | |
| IPC分类号 | C12N15/13 C12N5/10 C07K16/10 C07K14/145 A61K39/395 A61K39/205 A61P31/14 G01N33/53 | | |
| CPC分类号 | C07K2317/34 C12N2760/20222 C07K2317/92 C07K2317/21 C07K16/10 A61K39/205 C07K2317/76 C07K14/005 C12N2760/20234 A61K39/12 A61K39/42 A61K2039/507 C07K2317/14 C07K2317/30 C07K2317/56 | | |
| 优先权 | 60/649512 2005-02-02 US | | |
| 其他公开文献 | CN101133158B | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明提供了与狂犬病病毒特异性结合的人单克隆抗体，其抗原结合部分，以及制备和应用该抗体及其抗原结合部分治疗受试者中狂犬病病毒的方法。

示例性抗狂犬病人
17C7抗体可变区的氨基酸序列

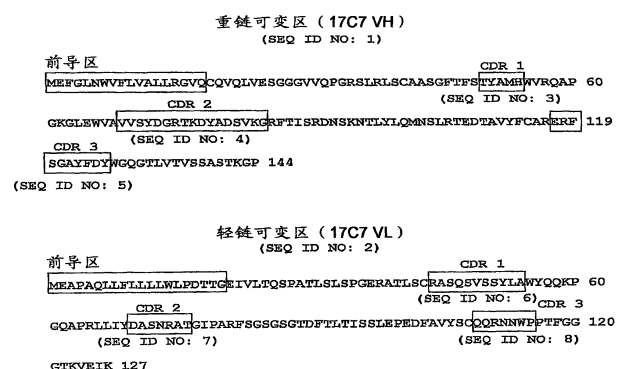


图 1