



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103102394 B

(45) 授权公告日 2014. 06. 25

(21) 申请号 201310062174. 6

CN 1609213 A, 2005. 04. 27, 全文.

(22) 申请日 2013. 02. 27

CN 101563362 A, 2009. 10. 21, 全文.

CN 101679475 A, 2010. 03. 24, 全文.

(73) 专利权人 北京大学人民医院

地址 100044 北京市西城区西直门南大街  
11 号

审查员 姚进孝

(72) 发明人 魏来 刘如玉

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限  
公司 11002

代理人 王朋飞 张庆敏

(51) Int. Cl.

C07K 7/08 (2006. 01)

C07K 16/10 (2006. 01)

C07K 16/06 (2006. 01)

A61K 38/10 (2006. 01)

A61K 39/29 (2006. 01)

A61P 31/14 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101319011 A, 2008. 12. 10, 全文.

权利要求书1页 说明书6页

序列表1页 附图2页

(54) 发明名称

丙型肝炎病毒B细胞表位肽 PUHI49 及其应用

(57) 摘要

本发明提供了一种新型的丙型肝炎病毒 B 细胞表位肽 PUHI49, 采用重叠肽的方法, 找到丙型肝炎病毒包膜蛋白新的线性保护性 B 细胞表位肽, 并获得了能够中和丙型肝炎病毒 1b 基因亚型 HCVpp 的保护性抗体, 这些抗体识别的表位肽, 其氨基酸组成为 FTIFKVRMYVGGVEHRLNAA, 位置为 624-643 (以丙型肝炎病毒 H77 为参考标准, Accession No. NC - 004102)。该保护性 B 细胞表位肽的确定, 为 HCV 治疗性抗体的研发和 HCV 预防性疫苗的研发提供了新的解决方案。

1. 丙型肝炎病毒 B 细胞表位肽 PUHI49, 其特征在于, 其氨基酸组成为 FTIFKVRMYVGGVEHRLNAA。

2. 权利要求 1 所述丙型肝炎病毒 B 细胞表位肽 PUHI49 在制备抗 1b 基因亚型 HCVpp 感染的药物中的应用。

3. 权利要求 1 所述丙型肝炎病毒 B 细胞表位肽 PUHI49 在制备 1b 基因亚型 HCVpp 预防性疫苗中的应用。

4. 根据权利要求 2 所述的应用, 其特征在于, 以 PUHI49 表位肽作为免疫原, 辅以佐剂免疫实验动物, 制备多克隆抗体。

5. 根据权利要求 2 所述的应用, 其特征在于, 以 PUHI49 表位肽作为免疫原, 辅以佐剂免疫实验动物, 采用杂交瘤技术和 DNA 重组技术, 制备出识别 PUHI49 表位肽抗原的人源化单克隆抗体。

6. HCV1b 亚型中和性抗体, 其是以权利要求 1 所述的丙型肝炎病毒 B 细胞表位肽 PUHI49 为免疫原, 辅以佐剂免疫实验动物, 制备的多克隆抗体。

7. 根据权利要求 6 所述的中和性抗体, 其特征在于, 将 PUHI49 表位肽与载体蛋白 KLH 偶联, KLH 偶联表位肽抗原和佐剂按等体积混合, 乳化后, 采用皮下注射法分 3 次免疫 Ba1b/c 小鼠, 免疫完成后, 收集血清中的抗体, 即得。

8. 根据权利要求 7 所述的中和性抗体, 其特征在于, 将 PUHI49 表位肽与载体蛋白 KLH 偶联, KLH 偶联表位肽抗原和佐剂按等体积混合, 乳化完全后, 分别于第 1 天、15 天、29 天以颈背部多点皮下注射法免疫 8-12 周龄的 Ba1b/c 小鼠, 共免疫 3 次, 第一次使用氟氏完全佐剂, 后两次使用不完全氟氏佐剂, 每只小鼠每次注射 500  $\mu$ l 乳化后抗原, 抗原量为 50  $\mu$ g, 免疫完成后, 收集血清中的抗体, 即得。

## 丙型肝炎病毒 B 细胞表位肽 PUH149 及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于免疫学领域,具体地说,涉及丙型肝炎病毒 B 细胞表位肽 PUH149 及其应用。

### 背景技术

[0002] 丙型肝炎病毒(Hepatitis C virus,HCV)为单股正链 RNA 病毒,隶属于黄病毒科。HCV 基因组包括一个单一的长开放阅读框编码约由 3000 个氨基酸残基组成的聚合蛋白。聚合蛋白在细胞和病毒蛋白酶的作用下,裂解为三种主要结构蛋白和几种病毒复制必须的非结构蛋白。

[0003] HCV 基因组高度变异,高度变异的分离株之间仅有 60% 核苷酸序列是同源的。HCV 目前可分为 6 个基因型及不同亚型,HCV1b 和 2a 基因型在我国较为常见,其中以 1b 型为主。某些地区有 1a、2b 和 3b 型报道,6 型主要见于香港和澳门地区,在南方边境省份也可见此基因型。

[0004] 目前全球约有 1.8 亿人感染了 HCV,其中约 80% 的感染者会慢性化,进而发展为肝硬化和肝细胞性肝癌。在我国,HCV 慢性感染者约为 650 万。针对 HCV 慢性感染,最主要的治疗方式为干扰素联合利巴韦林的标准化治疗,但针对基因 1 型和 4 型治疗效果较差,且因毒副作用明显,治疗费用较高,而使大量 HCV 感染者被迫放弃治疗。由 HCV 感染导致的肝移植在西方国家已成为肝移植手术的最主要原因,在我国亦是重要原因之一,而标准化治疗方案对阻断 HCV 感染导致的移植肝脏再感染疗效较差,迫切需要新的预防、治疗方案。

[0005] 目前,已鉴定出较多的针对 HCV 包膜蛋白的保护性 B 细胞表位,例如 313-327、396-407、412-423 和 613-621 等,这些表位相应的抗体针对 HCV 具有较好的中和活性。研究较多的一条保护性线性 B 细胞表位肽 412-423 (QLINTNGSWHIN),其相应的抗体,命名为 HCV1,已完成临床二期实验,在黑猩猩动物模型中,250mg/kg HCV1 能完全阻断 HCV 代表株 H77 (1a 基因亚型)的感染。这表明在 HCV 感染导致的肝移植领域,该抗体在阻断移植肝脏 HCV 的再感染方面应用前景广阔,在 HCV 疫苗的研制方面,也有较为广阔的应用前景。一系列实验表明,保护性表位的鉴定,在 HCV 感染的预防和治疗领域,都具有十分广阔的应用前景。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种新型的丙型肝炎病毒 B 细胞表位肽 PUH149 及其应用。

[0007] 为了实现本发明目的,本发明提供了一种丙型肝炎病毒 B 细胞表位肽 PUH149,其氨基酸组成为 FTIFKVRMYVGGVEHRLNAA。

[0008] 本发明是将已报道的中国人 1b 基因亚型 HCV 分离株包膜蛋白序列进行序列比对,找出包膜蛋白全长的共识序列。应用重叠肽的方法,将 HCV 包膜蛋白全长(共识序列),即从第 192 位氨基酸至第 746 位氨基酸(以丙型肝炎病毒 H77 为参考标准,Accession No. NC\_004102),拆分为 57 条不同的多肽(不包括跨膜区),其中序列 192-35、384-413、

444-523、544-613 和 624-717 中,每条多肽长度为 20 个氨基酸,相邻多肽重叠 10 个氨基酸;序列 404-453、514-553 和 604-633 中,每条多肽长度为 15 个氨基酸,相邻多肽重叠 10 个氨基酸。通过人工合成法合成这些多肽,分别将这些多肽免疫 Balb/c 小鼠,以获取多克隆抗体(抗血清),共免疫 3 次,每次间隔 2 周,50  $\mu$ g/次。将获得的多克隆抗体进行效价检测,方法包括间接 ELISA (参考文献:Ndongo N, Berthillon P, Pradat P, Vieux C, Bordes I, BerbyF, Maynard M, Zoulim F, Trepo C, Petit MA. Hepatology2010;52:1531-1542. )。将血清按比例稀释为 1:1000、1:2000、1:4000、1:8000、1:16000、1:32000、1:64000 和 1:128000 八个浓度,在 1:128000 稀释比例下,490nm 处 OD 值  $\geq$  0.25,且 1:128000 稀释浓度时多克隆抗体 OD 值与阴性对照孔 OD 值比值  $\geq$  2,被判定为多克隆抗体效价合格。将获得的 HCV 多克隆抗体,进行 HCV 假病毒颗粒(HCV-pseudotyped particles, HCVpp)中和实验,方法包括包装具有荧光素酶报告基因的 1a、1b、2a、3a、4a、5 和 6 共七种不同基因型/亚型的 HCVpp (参考文献:TongY, ZhuY, Xia X, LiuY, FengY, HuaX, Chen Z, Ding H, Gao L, WangY, Feitelson MA, Zhao P, Qi ZT. JVirol, 2011;85:2793-2802. ),然后将 57 种 HCV 多克隆抗体,分别按不同的稀释比例,与七种不同基因型/亚型的 HCVpp 分别混合,然后加入至预接种 Huh7.5 细胞的 96 孔板中,72 小时后检测荧光素酶活性,并与对照孔进行比较,以确定不同多克隆抗体中和 HCVpp 的活性(参考文献:Tarr AW, Urbanowicz RA, Jayaraj D, Brown RJ, McKeating JA, Irving WL, Ball JK. J Virol2012;86:2739-2749. ),进而确定保护性 B 细胞表位肽。

[0009] 实验结果表明,序列 624-643 (以丙型肝炎病毒 H77 为参考标准, Accession No. NC - 004102) 为保护性 B 细胞表位肽,相应的氨基酸组成为 FTIFKVRMYVGGVEHRLNAA,将其命名为 PUHI49,其相应的多克隆抗体能中和 1b 基因亚型 HCVpp。

[0010] 本发明还提供所述丙型肝炎病毒 B 细胞表位肽 PUHI49 在制备抗 HCV 药物及 HCV 预防性疫苗中的应用。以 PUHI49 表位肽作为免疫原,辅以佐剂免疫实验动物(如 Balb/c 小鼠),制备多克隆抗体。或者,以 PUHI49 表位肽作为免疫原,辅以佐剂免疫实验动物,采用杂交瘤技术和 DNA 重组技术,制备出识别 PUHI49 表位肽抗原的人源化单克隆抗体。将以上制得的多克隆抗体或单克隆抗体单独或联合用于阻断 1b 基因型慢性 HCV 感染者肝移植术中及术后 HCV 再感染。

[0011] 本发明进一步提供 HCV1b 基因亚型中和性抗体,其是以所述的丙型肝炎病毒 B 细胞表位肽 PUHI49 为免疫原,辅以佐剂免疫实验动物(如 Balb/c 小鼠),制备的多克隆抗体。

[0012] 前述的中和性抗体,将 PUHI49 表位肽分别与载体蛋白 KLH 和 BSA 偶联(其中,BSA 偶联表位肽用于免疫完成后 Balb/c 小鼠血清抗体滴度检测)(参考文献:Darwish IA, Alzoman NZ, Abuhejail RM, El-Samani TE. Chem Cent J2012;6:125. ),KLH 偶联表位肽抗原和佐剂按等体积混合,乳化后,采用皮下注射法分 3 次免疫 Balb/c 小鼠,免疫完成后,收集血清中的抗体,即得。

[0013] 具体地,将 PUHI49 表位肽分别与载体蛋白 KLH 和 BSA 偶联(其中,BSA 偶联表位肽用于免疫完成后 Balb/c 小鼠血清抗体滴度检测),KLH 偶联表位肽抗原和佐剂按等体积混合,乳化完全后,分别于第 1 天、15 天、29 天以颈背部多点皮下注射法免疫 8-12 周龄的 Balb/c 小鼠,共免疫 3 次,第一次使用氟氏完全佐剂,后两次使用不完全氟氏佐剂,每只小鼠每次注射 500  $\mu$ l 乳化后抗原,抗原量为 50  $\mu$ g,免疫完成后,血清中的抗体滴度采用间接

ELISA 方法进行检测。收集血清中的抗体,即得。

[0014] 本发明通过重叠肽的方法,找到丙型肝炎病毒包膜蛋白新的线性保护性 B 细胞表位肽,并获得了能够中和丙型肝炎病毒 1b 基因亚型 HCVpp 的保护性抗体,这些抗体识别的表位肽即为保护性 B 细胞表位肽,其氨基酸组成为 FTIFKVRMYVGGVEHRLNAA,位置为 624-643 (以丙型肝炎病毒 H77 为参考标准,Accession No.NC\_004102)。该保护性 B 细胞表位肽的确定,为 HCV 治疗性抗体的研发和 HCV 预防性疫苗的研发提供了新的解决方案。

#### 附图说明

[0015] 图 1 为本发明实施例 1 中筛选 HCV 包膜蛋白保护性 B 细胞表位肽的流程示意图。

[0016] 图 2 为本发明实施例 2 中保护性 B 细胞表位肽 624-643 (PUHI49) 相应抗体效价检测结果。

[0017] 图 3 为本发明实施例 3 中保护性 B 细胞表位肽 624-643 (PUHI49) 相应抗体的 1b 基因亚型 HCVpp 中和实验结果。

#### 具体实施方式

[0018] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。若未特别指明,实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段,所用原料均为市售商品。

[0019] 实施例 1 丙型肝炎病毒 B 细胞表位肽 PUHI49 的获得

[0020] 1.1 多肽抗原及多克隆抗体的制备

[0021] 在 NCBI 数据库中查找已报道的中国人 1b 基因亚型 HCV 分离株 HCV 全长蛋白质序列数据,将收集到的序列进行比对,找出包膜蛋白全长(以丙型肝炎病毒 H77 为参考标准,Accession No.NC - 004102,氨基酸残基位置为 192-747)的共识序列。从第 192 为氨基酸残基开始,人工合成长度为 20 个氨基酸的多肽,相邻多肽重叠 10 个氨基酸(例如第一条序列为 192-211,第二条则为 202-221,以此类推)。序列 404-453、514-553 和 604-633 包括 CD81 (HCV 侵入细胞的受体之一)可能的结合位点,在此序列范围内的每条合成多肽长度为 15 个氨基酸,相邻多肽重叠 10 个氨基酸。包膜蛋白跨膜区序列不在合成多肽范围之内,共合成 57 条多肽。将每条多肽分别与载体蛋白 KLH 和 BSA 偶联(参考文献:Darwish IA, Alzoman NZ, Abuhejail RM, El-Samani TE. Chem Cent J 2012;6:125.),其中,BSA 偶联多肽用于免疫完成后 Balb/c 小鼠血清抗体滴度检测,KLH 偶联多肽抗原和佐剂按等体积混合,乳化完全后分别于第 1 天、15 天、29 天以颈背部多点皮下注射的方法免疫 Balb/c 小鼠(8-12 周龄),共 3 次。第一次氟氏完全佐剂,后两次为不完全氟氏佐剂,每只小鼠每次注射 500  $\mu$ l 乳化后抗原,抗原量为 50  $\mu$ g。免疫完成后,血清中抗体滴度采用间接 ELISA 方法进行检测,结果显示 46 条多肽获得相应多克隆抗体(抗血清),11 条多肽未产生相应抗体。

[0022] 1.2 HCVpp 的制备

[0023] HCVpp 由 HCV 包膜蛋白 E1E2 表达质粒和 HIV gag/pol(pLP1)、HIV rev(pLP2)、编码荧光素酶的 pLenti6 质粒一起共转染 293T 细胞获得。HCV 包膜蛋白 E1E2 表达质粒是将 HCV 包膜蛋白 E1E2 编码序列克隆至 pCR3.1(Invitrogen)载体构建而成,转染 293T 细胞后,可以表达出 HCV 包膜蛋白 E1E2。本发明中所用 7 种不同基因型/亚型 HCV 包膜蛋白 E1E2DNA 编码序列来自于不同基因型 HCV 感染者,将这些 DNA 编码序列分别克隆

至 pCR3.1 载体, 构建 HCV 包膜蛋白 E1E2 表达质粒, 具体方法参考 Lavillette D, Tarr AW, Voisset C, Donot P, Bartosch B, Bain C, Patel AH, Dubuisson J, Ball JK, Cosset FL. *Hepatology* 2005; 41: 265-274.。 HIV gag/pol (pLP1)、HIV rev (pLP2)、编码荧光素酶的 pLenti6 质粒购自 invitrogen 公司。HCVpp 的制备过程包括: 分别将 7 种不同基因型/亚型(基因 1a、1b、2a、3a、4a、5 和 6 型)的 HCV 包膜蛋白 E1E2 表达质粒与 HIV gag/pol (pLP1)、HIV rev (pLP2)、编码荧光素酶的 pLenti6 质粒一起共转染 293T 细胞, 转染后置于 37°C 细胞培养箱中, 孵育 48 小时后收集含有 HCVpp 的细胞培养上清, 即可获得 7 种不同基因型/亚型的 HCVpp(参考文献: Tong Y, Zhu Y, Xia X, Liu Y, Feng Y, Hua X, Chen Z, Ding H, Gao L, Wang Y, Feitelson MA, Zhao P, Qi ZT. *J Virol*, 2011; 85: 2793-2802. )。0.45 μm 滤器过滤后, 应用美国 PALL 公司 100K 超滤浓缩离心管浓缩 20 倍, 即可用于 HCVpp 中和实验。

#### [0024] 1.3 HCVpp 中和实验和荧光素酶活性检测

[0025] 将 Huh7.5 细胞预接种于含 DMEM 完全培养基的 96 孔板中, 接种密度为  $1 \times 10^4$ /孔。置于 37°C 细胞培养箱中孵育。第二天, 将含 HCVpp 的上清 (20 μl/孔) 和不同的多克隆抗体及阴性对照血清以不同的稀释比例混合 (多克隆抗体及阴性对照血清稀释比例分别为 1:50、1:100、1:200、1:400、1:800), 未加多克隆抗体及阴性血清的 HCVpp 上清亦作为对照, 并加入终浓度为 4 μg/ml 的聚凝胺 (polybrene), 总体积为 100 μl/孔 (不足 100 μl 用 DMEM 完全培养基补足至 100 μl), 37°C 孵育 1 小时, 然后加至 96 孔板中, 每个稀释浓度均做 3 个平行孔。37°C 孵育 5 小时后, 弃去细胞培养上清, 更换为新鲜的完全 DMEM 培养基, 37°C 孵育 72 小时。用荧光素酶检测系统 (Promega) 检测, 方法包括弃去细胞培养上清, PBS 洗 1 遍, 加入细胞裂解液 20 μl/孔, 孵育 10 分钟后加入底物荧光素 100 μl/孔, 放入至荧光发光检测仪读取数值。

#### [0026] 1.4 中和性多克隆抗体和保护性 B 细胞表位肽的确定

[0027] 与未加多克隆抗体和阴性对照血清的对照孔相比, 加入多克隆抗体后, 荧光素酶活性值降低 50% 及以上, 认为有中和活性。PUHI49 相应抗体在 1:50 稀释比例时, 能降低 1b 基因亚型 HCVpp 感染细胞荧光素酶活性约 50.2%, 可以认定为该多克隆抗体为中和性多克隆抗体, 其识别的表位肽, 即 PUHI49 (氨基酸组成为 FTIFKVRMYVGGVEHRLNAA), 为保护性 B 细胞表位肽。

[0028] 筛选 HCV 包膜蛋白保护性 B 细胞表位肽的流程示意图如图 1 所示。

#### [0029] 实施例 2 保护性 B 细胞表位肽 624-643 (PUHI49) 相应抗体制备及效价检测

##### [0030] 1.1 保护性 B 细胞表位肽 624-643 (PUHI49) 相应抗体制备

[0031] 将人工合成的丙型肝炎病毒 B 细胞表位肽 PUHI49 表位肽分别与 KLH 和 BSA 偶联 (参考文献: Darwish IA, Alzoman NZ, Abuhejail RM, El-Samani TE. *Chem Cent J* 2012; 6: 125. ), 其中, BSA 偶联表位肽用于免疫完成后 Balb/c 小鼠血清抗体滴度检测, KLH 偶联表位肽抗原和佐剂按等体积混合, 乳化完全后分别于第 1 天、15 天、29 天以颈背部多点皮下注射的方法免疫 Balb/c 小鼠 (8-12 周龄), 共 3 次。第一次氟氏完全佐剂, 后两次为不完全氟氏佐剂, 每只小鼠每次 500 μl 乳化后抗原, 抗原量为 50 μg。

##### [0032] 1.2 保护性 B 细胞表位肽 624-643 (PUHI49) 相应抗体效价检测

[0033] 免疫完成后, 血清抗体滴度采用间接 ELISA 方法进行检测。具体方法包括: 将 BSA 偶联的相应表位肽抗原包被于 96 孔板中, 用含 10% 山羊血清的 1×PBS 进行封闭, 200 μl/

孔,37℃孵育 1 小时。用 PBS 洗 3 遍后,加入不同稀释比例的多克隆抗体(抗血清),稀释比例分别为 1:1000、1:2000、1:4000、1:8000、1:16000、1:32000、1:64000 和 1:128000,37℃孵育 2 小时。用 PBST (含 0.05%Tween20 的 1×PBS)洗 4 遍后,加入偶联辣根过氧化物酶的抗小鼠 IgG 抗体,37℃孵育 1 小时。PBST 洗 4 遍后,加入底物室温孵育 30 分钟,2N HCL 终止反应,测定 490nm 处的 OD 值。多克隆抗体的每个稀释浓度均做 3 个平行孔。分别以稀释比例和 OD 值为横纵坐标作图,如果线性关系良好且多克隆抗体在 1:128000 稀释浓度时 OD 值  $\geq 0.25$ ,且 1:128000 稀释浓度时多克隆抗体 OD 值与阴性对照孔 OD 值比值  $\geq 2$ ,说明该多克隆抗体效价良好,可用于 HCVpp 中和实验。

[0034] 保护性 B 细胞表位肽 624-643 (PUHI49) 相应抗体效价检测结果如图 2 所示。

[0035] 实施例 3B 细胞表位肽 624-643 (PUHI49) 相应抗体中和 1b 基因亚型 HCVpp 感染 Huh7.5 细胞的检测

[0036] 将所获得的多克隆抗体进行 HCVpp 中和实验。方法包括将 Huh7.5 细胞预接种于含 DMEM 完全培养基的 96 孔板中,接种密度为  $1 \times 10^4$ /孔。置于 37℃细胞培养箱中孵育。第二天,将含 HCVpp 的上清(20  $\mu$ l/孔)和不同的多克隆抗体及阴性对照血清以不同的稀释比例混合(多克隆抗体及阴性对照血清稀释比例分别为 1:50、1:100、1:200、1:400、1:800),未加抗体及阴性血清的 HCVpp 上清亦作为对照,并加入终浓度为 4  $\mu$ g/ml 的聚凝胺(polybrene),总体积为 100  $\mu$ l/孔(不足 100  $\mu$ l 用 DMEM 完全培养基补至 100  $\mu$ l),37℃孵育 1 小时,加至 96 孔板中,每个稀释浓度均做 3 个平行孔。37℃孵育 5 小时后,弃去细胞培养上清,更换为新鲜的完全 DMEM 培养基,37℃孵育 72 小时。用荧光素酶检测系统(Promega)检测,方法包括弃去细胞培养上清,PBS 洗 1 遍,加入细胞裂解液 20  $\mu$ l/孔,孵育 10 分钟后加入底物荧光素 100  $\mu$ l/孔,放入至荧光发光检测仪读取数值。将检测结果进行统计分析,与未加多克隆抗体和阴性对照血清的对照孔相比,加入多克隆抗体后荧光素酶活性值降低 50% 及以上,认为具有中和活性。从而进一步验证该抗体对某一种或几种基因型/亚型的 HCVpp 是否具有中和活性。

[0037] 保护性 B 细胞表位肽 624-643 (PUHI49)相应抗体的 1b 基因亚型 HCVpp 中和实验结果如图 3 所示。

[0038] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范畴。

[0039] 参考文献

[0040] Ndongo N, Berthillon P, Pradat P, Vieux C, Bordes I, Berby F, Maynard M, et al. Association of Anti-E1E2 Antibodies with Spontaneous Recovery or Sustained Viral Response to Therapy in Patients Infected with Hepatitis C Virus. *Hepatology* 2010; 52:1531-1542.

[0041] Tong Y, Zhu Y, Xia X, Liu Y, Feng Y, Hua X, Chen Z, et al. Tupaia CD81, SR-BI, claudin-1, and occludin support hepatitis C virus infection. *J Virol* 2011; 85:2793-2802.

[0042] Tarr AW, Urbanowicz RA, Jayaraj D, Brown RJ, McKeating JA, Irving WL, Ball JK. Naturally occurring antibodies that recognize linear epitopes in the amino

terminus of the hepatitis C virus E2protein confer noninterfering, additive neutralization. J Virol2012;86:2739-2749.

[0043] Darwish IA, Alzoman NZ, Abuhejail RM, El-Samani TE. Synthesis of hapten and preparation of specific polyclonal antibody with high affinity for lenalidomide, the potent drug for treatment of multiple myeloma. Chem Cent J2012;6:125.

[0044] Lavillette D, Tarr AW, Voisset C, Donot P, Bartosch B, Bain C, Patel AH, et al. Characterization of host-range and cell entry properties of the major genotypes and subtypes of hepatitis C virus. Hepatology2005;41:265-274.



[0001]

## 序列表

&lt;110&gt; 北京大学人民医院

&lt;120&gt; 丙型肝炎病毒 B 细胞表位肽 PUHI49 及其应用

&lt;130&gt; KHP13112035.6

&lt;160&gt; 1

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 丙型肝炎病毒

&lt;400&gt; 1

Phe Thr Ile Phe Lys Val Arg Met Tyr Val Gly Gly Val Glu His Arg

1                    5                    10                    15

Leu Asn Ala Ala

20

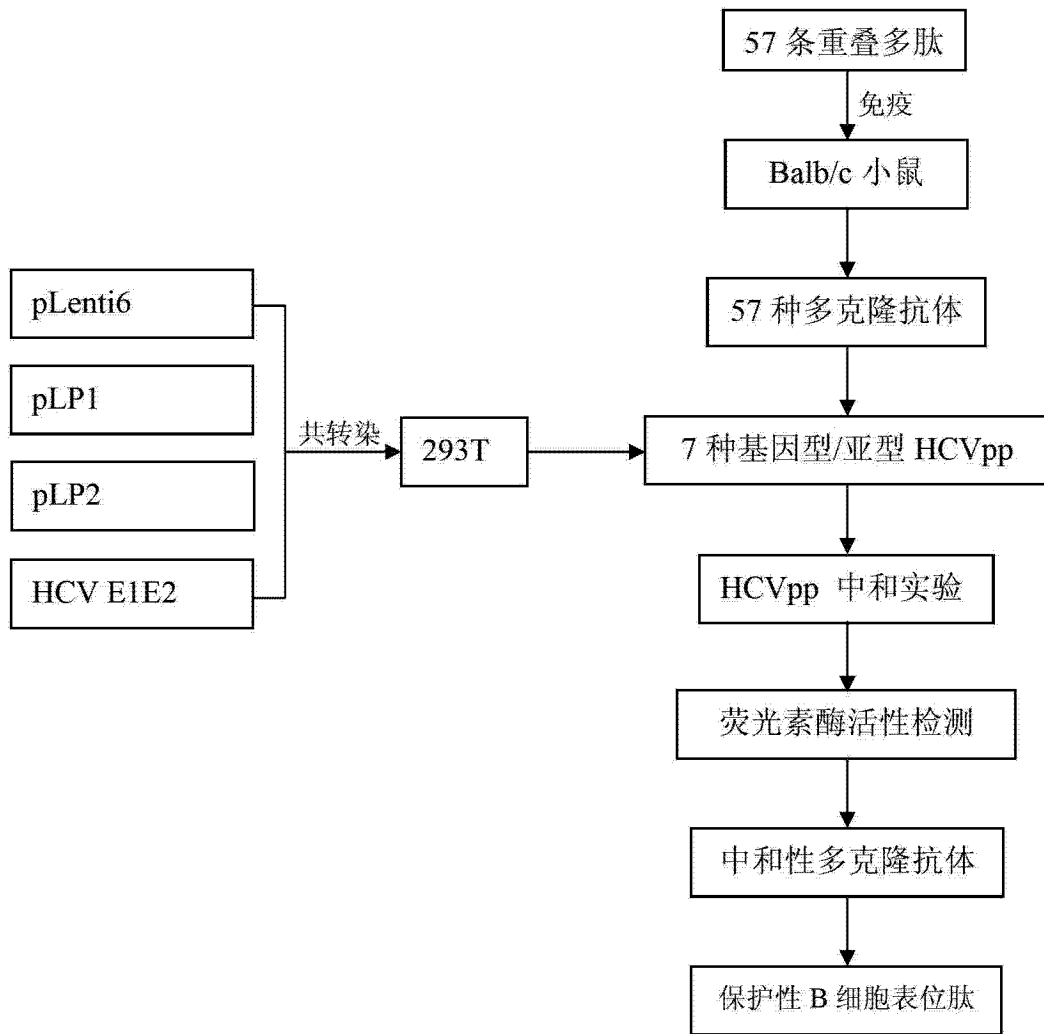


图 1

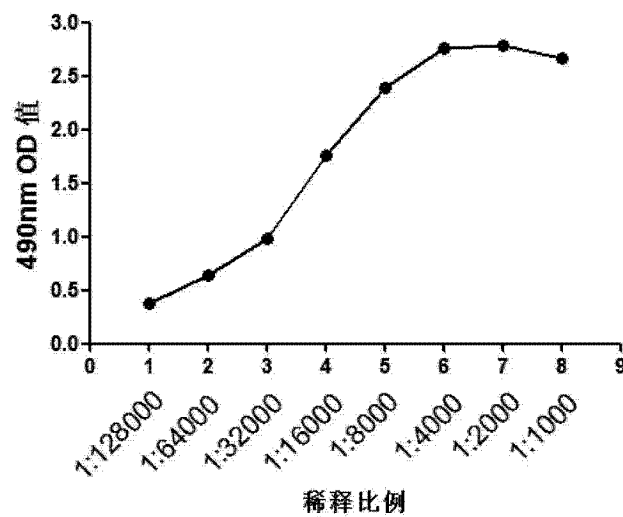


图 2

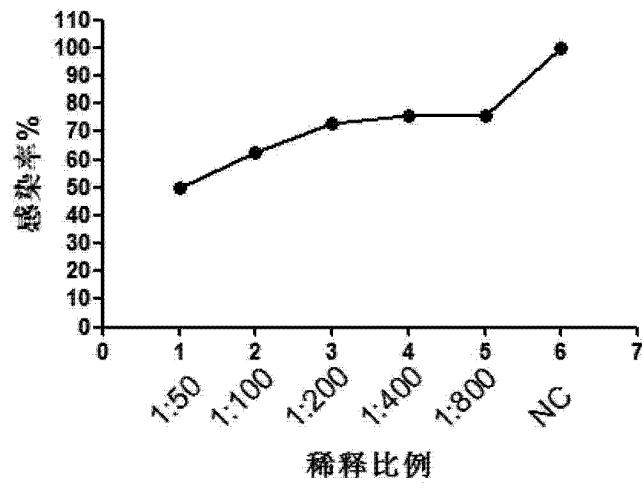


图 3