



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104955837 A

(43) 申请公布日 2015. 09. 30

(21) 申请号 201380059075. 0 (51) Int. Cl.
(22) 申请日 2013. 11. 12 C07K 14/705(2006. 01)
G01N 33/50(2006. 01)
(30) 优先权数据 G01N 33/68(2006. 01)
61/725144 2012. 11. 12 US A01K 67/027(2006. 01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2015. 05. 12
(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2013/073602 2013. 11. 12
(87) PCT国际申请的公布数据
W02014/072526 EN 2014. 05. 15
(71) 申请人 海德堡吕布莱希特—卡尔斯大学
地址 德国海德堡
(72) 发明人 S. 厄班 倪翼
(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公
司 72001
代理人 李慧惠 黄希贵

权利要求书2页 说明书11页
序列表13页 附图9页

(54) 发明名称

HBV 和 / 或 HDV 易感细胞、细胞系和非人动物的开发

(57) 摘要

本发明涉及新颖乙型肝炎病毒 (HBV) 和 / 或丁型肝炎病毒 (HDV) 受体及其用于开发易受 HBV 和 / 或 HDV 感染且可用于免疫学研究和 / 或用于筛选药物、进入后限制因子和宿主依赖因子的细胞、细胞系和非人动物的用途。其进一步涉及所述受体用于鉴定可用于治疗 HBV 和 / 或 HDV 感染的化合物的用途。

1. 乙型肝炎病毒 (HBV) 或丁型肝炎病毒 (HDV) 受体, 其具有
 - (a) SEQ ID NO:1 代表的氨基酸序列, 其是与 SEQ ID NO:1 至少 90% 相同的氨基酸序列, 或
 - (b) 包含以下的氨基酸序列
SEQ ID NO:2 或与 SEQ ID NO:2 至少 90% 相同的氨基酸序列, 和
具有通式 Pro-Tyr-X-Gly-Ile 的氨基酸序列, 其中 X 选自 Lys、Arg 和 Val。
2. 根据权利要求 1 的 HBV 或 HDV 受体, 其具有选自 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:3 至 8 的氨基酸序列, 和 / 或其中氨基酸序列 (b) 进一步包含氨基酸序列 Gly-Met-Ile-Ile-Ile-Leu-Leu。
3. 分离的核酸序列, 优选 DNA 序列, 其编码根据权利要求 1 或 2 的 HBV 或 HDV 受体。
4. 载体, 其包含根据权利要求 3 的核酸序列。
5. 根据权利要求 4 的载体, 所述载体是病毒转移载体, 优选选自慢病毒载体、逆转录病毒载体、疱疹病毒载体、腺病毒载体、杆状病毒载体和腺伴随病毒 (AAV) 载体。
6. 宿主细胞, 其包含根据权利要求 4 或 5 的载体或包含根据权利要求 3 的核酸序列, 所述载体或核酸序列已被人为引入所述宿主细胞。
7. 根据权利要求 6 的宿主细胞, 所述宿主细胞选自癌细胞系、干细胞系和原代肝细胞, 其中, 优选地, 所述癌细胞系选自肝细胞瘤细胞系。
8. 包含一种或多种转基因的转基因细胞或细胞系, 其中所述一种或多种转基因之一是根据权利要求 3 的核酸序列, 从而
使所述转基因细胞或细胞系易受 HBV 和 / 或 HDV 感染或
增加所述转基因细胞或细胞系对 HBV 和 / 或 HDV 感染的易感性, 或者允许所述转基因细胞或细胞系结合 HBV 和 / 或 HDV。
9. 包含根据权利要求 8 的一种或多种转基因细胞或细胞系或包含一种或多种转基因的非人转基因动物, 其中所述一种或多种转基因之一是根据权利要求 3 的核酸序列, 从而使所述转基因动物易受 HBV 和 / 或 HDV 感染或
增加所述转基因动物对 HBV 和 / 或 HDV 感染的易感性。
10. 根据权利要求 9 的非人转基因动物, 所述非人转基因动物选自小鼠、大鼠、兔、豚鼠和非人灵长类动物, 诸如食蟹猴和恒河猴。
11. 从根据权利要求 9 或 10 的非人转基因动物分离的肝细胞。
12. 用于产生细胞的方法, 所述细胞易受 HBV 和 / 或 HDV 感染, 或者具有对 HBV 和 / 或 HDV 感染的增加的易感性, 或者能够结合 HBV 和 / 或 HDV, 所述方法包括以下步骤
 - 提供细胞, 所述细胞不易受 HBV 和 / 或 HDV 感染, 或者具有对 HBV 和 / 或 HDV 感染的低易感性, 或者不能结合 HBV 和 / 或 HDV ; 和
 - 用根据权利要求 3 的核酸序列或用根据权利要求 4 或 5 的载体转染或转导所述细胞。
13. 根据权利要求 12 的方法, 所述方法进一步包括以下步骤
 - 在所述转染或转导所述细胞的步骤之前, 将细胞周期停滞或分化诱导剂添加至所述细胞。
14. 根据权利要求 12 或 13 的方法, 所述方法进一步包括以下步骤

- 敲除或敲低所述细胞的一个或多个内源基因。
- 15. 根据权利要求 12-14 中任一项的方法,所述方法进一步包括以下步骤
 - 将所述细胞永生化,以获得所述细胞的稳定细胞系。
- 16. 产生易受 HBV 和 / 或 HDV 感染的细胞的方法,所述方法包括以下步骤
 - 提供不易受 HBV 和 / 或 HDV 感染的细胞 ;和
 - 通过同源重组修饰所述细胞的对应于编码 SEQ ID NO:1 的人基因的内源基因,以便使用 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:5 的氨基酸 192 至 200、优选氨基酸 194 至 197 替代对应于 SEQ ID NO:1 的氨基酸 192 至 200、优选氨基酸 194 至 197 的氨基酸,和 / 或使用 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:4 或 SEQ ID NO:5 的氨基酸 155 至 165、优选氨基酸 156 至 162 替代对应于 SEQ ID NO:1 的氨基酸 155 至 165、优选氨基酸 156 至 162 的氨基酸。
- 17. 通过根据权利要求 12-16 中任一项的方法获得的细胞。
- 18. 非人转基因动物,其包含一种或多种根据权利要求 17 的细胞。
- 19. (a) SEQ ID NO:1 代表的氨基酸序列,其是与 SEQ ID NO:1 至少 90% 相同的氨基酸序列,或
 - (b) 包含以下的氨基酸序列
SEQ ID NO:2 或与 SEQ ID NO:2 至少 90% 相同的氨基酸序列,和
具有通式 Pro-Tyr-X-Gly-Ile 的氨基酸序列,其中 X 选自 Lys、Arg 和 Val,
作为 HBV 或 HDV 的受体的用途。
- 20. 根据权利要求 19 的用途,其中所述用途包括以下步骤
 - 将表达所述氨基酸序列的第一细胞暴露于已知结合所述 HBV 或 HDV 的受体的化合物且测量所述细胞的响应 ;
 - 将表达所述氨基酸序列的所述第一细胞的相同类型的第二细胞暴露于怀疑结合所述 HBV 或 HDV 的受体的候选化合物且测量所述第二细胞的响应 ;和
 - 将所述细胞的响应和所述第二细胞的响应进行比较,并基于此类比较确定所述候选化合物是否结合所述 HBV 或 HDV 的受体。
- 21. 用于鉴定可用于治疗 HBV 和 / 或 HDV 感染的化合物的方法,所述方法包括鉴定结合根据权利要求 1 或 2 的 HBV 或 HDV 受体和 / 或抑制 HBV 或 HDV 与根据权利要求 1 或 2 的 HBV 或 HDV 受体的结合的化合物的步骤。
- 22. 结合根据权利要求 1 或 2 的 HBV 或 HDV 受体和 / 或抑制 HBV 或 HDV 与根据权利要求 1 或 2 的 HBV 或 HDV 受体的结合的化合物,其用于治疗 HBV 和 / 或 HDV 感染,其中所述化合物不是 HBV L- 蛋白衍生脂肽或所述 HBV 或 HDV 受体的天然底物或结合伴侣。
- 23. 根据权利要求 22 的化合物,所述化合物选自(多)肽、抗体、适配体和有机化合物,诸如小分子和拟肽化合物。
- 24. 根据权利要求 6 或 7 的宿主细胞,或
根据权利要求 8 的转基因细胞或细胞系,或
根据权利要求 11 的肝细胞,或
根据权利要求 17 的细胞,或
根据权利要求 9、10 和 18 中任一项的非人转基因动物,
用于免疫学研究和 / 或用于筛选药物、进入后限制因子或宿主依赖因子的用途。

HBV 和 / 或 HDV 易感细胞、细胞系和非人动物的开发

[0001] 本发明涉及新颖乙型肝炎病毒 (HBV) 和 / 或丁型肝炎病毒 (HDV) 受体及其用于开发易受 HBV 和 / 或 HDV 感染且可用于免疫学研究和 / 或用于筛选药物、进入后限制因子和宿主依赖因子的细胞、细胞系和非人动物的用途。其进一步涉及所述受体用于鉴定可用于治疗 HBV 和 / 或 HDV 感染的化合物的用途。

[0002] 人乙型肝炎病毒 (HBV) 引起急性和慢性肝脏感染。3.5 亿人持续感染 (Cornberg 等人, *Minerva Gastroenterol Dietol* 2010, 56(4), 451-465)。慢性乙型肝炎仍将是一个主要的全球健康问题, 尽管有疫苗可用。治疗 (IFN α 和五种核苷类似物) 是有限的, 且主要是非治愈性的。

[0003] HBV 是嗜肝 DNA 病毒科的成员。嗜肝 DNA 病毒是最小的包膜 DNA 病毒, 其经由 pgRNA 中间体的逆转录复制。在装配过程中, 核衣壳获取称为大 (L)、中 (M) 和小 (S) 的三种病毒包膜蛋白。它们被编码在一个开放阅读框中, 并且共享对于膜锚定所需的 S 结构域。除了 S- 结构域以外, M 含有 55 个氨基酸的 N 端亲水性延伸 (preS2), 而 L 进一步延伸 107、117 或 118 个氨基酸 (基因型依赖性), 被称为 preS1 (Urban, *Future Virol.* 2008, 3(3), 253-264)。丁型肝炎病毒 (HDV) 是利用 HBV 包膜蛋白用于进入肝细胞的卫星拟病毒。已知 L 的肉豆蔻酰化的 preS1- 结构域在 HBV 和 HDV 感染性中发挥关键作用。

[0004] 嗜肝 DNA 病毒显示显著的物种特异性。小鼠和大鼠对于 HBV 是抗感染的事实已归因于缺乏一种或多种进入因子或存在进入后限制因子 (post-entry restriction factor)。由于将质粒编码的 HBV- 基因组递送至非易感物种的肝细胞促进病毒体分泌, 所以假设宿主约束条件与早期感染事件相关。HBV 的另一个特点是在体内选择性感染肝细胞的效力。物种特异性和非凡的肝脏向性与 HBV 感染的早期步骤 (例如, 特异性受体识别) 相关的假说是具有吸引力的。

[0005] 目前, 只有原代人 (PHH)、原代缅甸树鼩 (*tupeia belangeri*) (PTH) 肝细胞和分化的 HepaRG 细胞支持完整的 HBV 复制周期。后者是 DMSO 处理后能够分化成 PHH 样细胞的肝祖细胞系。原代小鼠 (PMH) 和原代大鼠肝细胞 (PRH) 对于 HBV 是抗感染的。因此, 小鼠和大鼠既不支持从头 HBV 感染, 也不支持病毒传播。(具有免疫能力的) 小动物模型的缺乏是 HBV 研究的一个主要障碍, 所述 HBV 研究要求阐明潜在的分子限制因子。其导致开发替代系统, 如具有超长 (over-length) HBV 基因组的整合物的 HBV 转基因小鼠, 或免疫缺陷的 PHH 移植的 uPA/Scid 小鼠。

[0006] 本发明人先前已经鉴定了 HBV L- 蛋白衍生的脂肽, 其阻断 HBV 和 HDV 感染 PHH 和 HepaRG 细胞 (Gripon 等人, *J Virol* 2005, 79(3), 1613-1622; Schulze 等人, *J Virol* 2010, 84(4), 1989-2000; WO 2009/092611 A1)。它们代表了 HBV 的 preS1- 结构域的 N- 端 47 个氨基酸 (HBVpreS/2-48_{myr}), 并且包括天然存在的肉豆蔻酸修饰。由于细胞与 HBVpreS/2-48_{myr} 预孵育阻断感染, 因此它们据推测针对受体 (address a receptor), 然而, 所述受体是迄今未知的。

[0007] 因此, 本发明的一个目标是鉴定负责这些 HBV L- 蛋白衍生脂肽的结合的受体。

[0008] 本发明的一个进一步目标是开发通过表达所述受体易受 HBV 和 / 或 HDV 感染的细

胞和细胞系。

[0009] 本发明的又一个进一步目标是提供易受 HBV 和 / 或 HDV 感染的非人转基因动物。

[0010] 此类转基因细胞、细胞系和动物然后可用于免疫学研究和 / 或用于筛选药物、进入后限制因子和宿主依赖因子 (host dependency factor)。此外,新鉴定的受体可用于鉴定可用于治疗 HBV 和 / 或 HDV 感染的进一步化合物。

[0011] 本发明的目标通过乙型肝炎病毒 (HBV) 或丁型肝炎病毒 (HDV) 受体解决,所述乙型肝炎病毒 (HBV) 或丁型肝炎病毒 (HDV) 受体具有

- (a) SEQ ID NO:1 代表的氨基酸序列,或
- (b) 包含以下的氨基酸序列,

SEQ ID NO:2 或与 SEQ ID NO:2 至少 90%、优选至少 91%、更优选至少 92% 相同的氨基酸序列,和

具有通式 Pro-Tyr-X-Gly-Ile [SEQ ID NO:11] 的氨基酸序列,其中 X 选自 Lys、Arg 和 Val。

[0012] 本发明的目标还通过乙型肝炎病毒 (HBV) 或丁型肝炎病毒 (HDV) 受体解决,所述乙型肝炎病毒 (HBV) 或丁型肝炎病毒 (HDV) 受体具有

- (a) SEQ ID NO:1 代表的氨基酸序列,或
- (b) 包含以下的氨基酸序列,

SEQ ID NO:2 或与 SEQ ID NO:2 至少 90%、优选至少 91%、更优选至少 92% 相同的氨基酸序列,和

在对应于 SEQ ID NO:1 的氨基酸 158 的位置具有 Gly 或在对应于 SEQ ID NO:1 的氨基酸 158 和 159 的位置具有序列 Gly-Ile。

[0013] SEQ ID NO:1 是人牛磺胆酸钠协同转运多肽 Ntcp/SLC10A1。

[0014] 在本发明的优选实施方案中,“SEQ ID NO:1 代表的氨基酸序列”是指与 SEQ ID NO:1 至少 90%、优选至少 91%、更优选至少 92%、更优选至少 95% 或 99% 相同或与 SEQ ID NO:1 相同的氨基酸序列。

[0015] 所述氨基酸序列 (b) 优选包含两个区域或结构域:

(1) 包含人 Ntcp 的氨基酸 265 至 291 (或具有至少 90、91 或 92% 同一性的序列) 的区域或结构域

QLCSTILNVAFPPEVIGPLFFFPLLYM

[SEQ ID NO: 2];

(2) 包含具有以下通式的氨基酸序列的区域或结构域

PYXGI

[SEQ ID NO: 11];

其中 X 选自 K、R 和 V。

[0016] 在一个实施方案中,所述氨基酸序列 (b) 的区域或结构域 (2) 包含 (至少)

- Gly,其在对应于 SEQ ID NO:1 的氨基酸 158 的位置,

诸如在具有通式 PYXGI [SEQ ID NO: 11] 的氨基酸序列中;

或

- 包含或具有在对应于 SEQ ID NO:1 的氨基酸 158 和 159 的位置的序列 Gly-Ile,

诸如在具有通式 PYXGI [SEQ ID NO: 11] 的氨基酸序列中。

[0017] 在一个实施方案中,所述氨基酸序列 (b) 不包含多于 450 个氨基酸,优选不多于 400 个氨基酸。

[0018] 在一个实施方案中,所述氨基酸序列 (b) 进一步包含氨基酸序列 **Gly-Met-Ile-Ile-Ile-Leu-Leu [SEQ ID NO: 12]**。

[0019] 在该实施方案中,所述氨基酸序列 (b) 包含三个区域或结构域:

(1) 包含人 NTCP 的氨基酸 265 至 291 (或具有至少 90、91 或 92% 同一性的序列) 的区域或结构域

QLCSTILNVAFPPEVIGPLFFFPLLYM [SEQ ID NO: 2];

(2) 包含具有以下通式的氨基酸序列的区域或结构域

PYXGI [SEQ ID NO: 11];

其中 X 选自 K、R 和 V。

[0020] (3) 包含以下氨基酸序列的区域或结构域

GMIILL [SEQ ID NO: 12]。

[0021] 本发明的目标还通过如上定义的具有选自 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:3 至 8 的氨基酸序列的 HBV 或 HDV 受体来解决。

[0022] 本发明的目标还通过编码如上定义的 HBV 或 HDV 受体的分离的核酸序列、优选 DNA 序列来解决。

[0023] 本发明的目标还通过包含如上定义的核酸序列的载体来解决。

[0024] 在一个实施方案中,所述载体是病毒转移载体,优选选自慢病毒载体、逆转录病毒载体、疱疹病毒载体、腺病毒载体、杆状病毒载体和腺伴随病毒 (AAV) 载体。慢病毒载体允许产生稳定细胞系,腺病毒载体和 AAV 可用于体外转导原代肝细胞或体内转导小鼠,并且使它们瞬时易受 HBV 和 / 或 HDV 感染。

[0025] 本发明的目标还通过包含如上定义的载体或包含如上定义的核酸序列的宿主细胞来解决,所述载体或核酸序列已被人为引入所述宿主细胞。

[0026] 在一个实施方案中,术语“人为引入”是指这样的事实,所述核酸序列在非内源性启动子,例如天然不与所述宿主细胞中的所述核酸序列联系的启动子的控制下表达。

[0027] 根据本发明的特别优选的细胞是癌细胞系、干细胞系和原代肝细胞,其中,优选地,所述癌细胞系选自肝细胞瘤细胞系,例如人、小鼠或大鼠肝细胞瘤细胞系。优选的人肝细胞瘤细胞系包括 HuH7、HepG2 和 HepaRG。优选的小鼠肝细胞瘤细胞系包括 Hep56. 1D 和 Hepa1-6。在一个实施方案中,将所述原代肝细胞永生代。

[0028] 本发明的目标还通过包含一种或多种转基因的转基因细胞或细胞系来解决,其中所述一种或多种转基因之一是如上定义的核酸序列,从而

使所述转基因细胞或细胞系易受 HBV 和 / 或 HDV 感染或

增加所述转基因细胞或细胞系对 HBV 和 / 或 HDV 感染的易感性,或者允许所述转基因细胞或细胞系结合 HBV 和 / 或 HDV。

[0029] 本发明的目标还通过包含如上定义的一种或多种转基因细胞或细胞系或包含一种或多种转基因的非人转基因动物来解决,其中所述一种或多种转基因之一是如上定义的

核酸序列,从而

使所述转基因动物易受 HBV 和 / 或 HDV 感染或

增加所述转基因动物对 HBV 和 / 或 HDV 感染的易感性。

[0030] 根据本发明的优选的非人转基因动物选自小鼠、大鼠、兔、豚鼠和非人灵长类动物,诸如食蟹猴和恒河猴。特别优选的转基因动物是小鼠。

[0031] 在一个实施方案中,所述非人转基因动物具有免疫能力。

[0032] 本发明的目标还通过从如上定义的非人转基因动物分离的肝细胞来解决。

[0033] 本发明的目标还通过用于产生细胞的方法来解决,所述细胞易受 HBV 和 / 或 HDV 感染,或具有对 HBV 和 / 或 HDV 感染的增加的易感性,或者能够结合 HBV 和 / 或 HDV,所述方法包括以下步骤

- 提供细胞,所述细胞不易受 HBV 和 / 或 HDV 感染,或者具有对 HBV 和 / 或 HDV 感染的低易感性,或者不能结合 HBV 和 / 或 HDV ;和

- 用如上定义的核酸序列或用如上定义的载体转染或转导所述细胞。

[0034] 在一个实施方案中,所述细胞不易受 HBV 和 / 或 HDV 感染或不能结合 HBV 和 / 或 HDV。

[0035] 在一个实施方案中,所述方法进一步包括以下步骤

- 在所述转染或转导所述细胞的步骤之前,将细胞周期停滞或分化诱导剂添加至所述细胞。

[0036] 在一个实施方案中,所述细胞周期停滞或分化诱导剂是 DMSO,其中,优选地,添加 DMSO 至 0.1 至 5% (v/v)、更优选 0.5 至 2.5% (v/v) 的范围中的最终浓度。

[0037] 在一个实施方案中,所述方法进一步包括以下步骤

- 敲除或敲低所述细胞的一个或多个内源基因。

[0038] 在一个实施方案中,所述细胞的所述内源基因是编码所述细胞的天然 NTCP/SCL10A1 多肽(即人 NTCP/SCL10A1 的同源物,其无法使所述细胞易受 HBV 和 / 或 HDV 感染和 / 或无法允许所述细胞结合 HBV 和 / 或 HDV) 的基因。此类敲除或敲低有助于防止内源(非人)基因的显性负效应。

[0039] 在一个实施方案中,所述敲除或敲低所述细胞的一个或多个内源基因借助 shRNA-载体来实现。在一个实施方案中,如上定义的核酸序列和 shRNA 两者都包含在单一载体中。

[0040] 在一个实施方案中,所述方法进一步包括以下步骤

- 将所述细胞永生化,以获得所述细胞的稳定的细胞系。

[0041] 在一个实施方案中,所述细胞选自肝细胞瘤细胞系,例如人肝细胞瘤细胞系,诸如 HuH7、HepG2 和,特别是, HepaRG。在另一个实施方案中,所述细胞是原代肝细胞。

[0042] 本发明的目标还通过产生易受 HBV 和 / 或 HDV 感染的细胞的方法来解决,所述方法包括以下步骤

- 提供不易受 HBV 和 / 或 HDV 感染的细胞 ;和

- 通过同源重组修饰所述细胞的对应于编码 SEQ ID NO:1 的人基因的内源基因,以便使用 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:5 的氨基酸 192 至 200、优选氨基酸 194 至 197 替代对应于 SEQ ID NO:1 的氨基酸 192 至 200、优选氨基酸 194 至 197 的氨基酸,和 / 或

用 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:4 或 SEQ ID NO:5 的氨基酸 155 至 165、优选氨基酸 156 至 162 替代对应于 SEQ ID NO:1 的氨基酸 155 至 165、优选氨基酸 156 至 162 的氨基酸。

[0043] 不希望受某种理论束缚,本发明人相信对应于氨基酸 155 至 165、且特别是氨基酸 157 和 158 (Gly) 的区域参与 HBV 和 / 或 HDV 的结合,而对应于氨基酸 192 至 200、且特别是氨基酸 195 至 197 (Ile-Leu-Leu) 的区域参与 HBV 和 / 或 HDV 感染 (例如通过介导细胞进入步骤,诸如膜融合)。

[0044] 本发明的目标还通过由上述方法获得的细胞和通过包含至少一种此类细胞的非人转基因动物,例如小鼠 (诸如 uPA/Scid 小鼠) 来解决。

[0045] 本发明的目标还通过以下作为 HBV 或 HDV 的受体的用途来解决

(a) SEQ ID NO:1 代表的氨基酸序列,或

(b) 包含以下的氨基酸序列,

SEQ ID NO:2 或与 SEQ ID NO:2 至少 90%、优选至少 91%、更优选至少 92% 相同的氨基酸序列,和

具有通式 Pro-Tyr-X-Gly-Ile [SEQ ID NO:11] 的氨基酸序列,其中 X 选自 Lys、Arg 和 Val。

[0046] 在本发明的优选实施方案中,“SEQ ID NO:1 代表的氨基酸序列”是指与 SEQ ID NO:1 至少 90%、优选至少 91%、更优选至少 92%、更优选至少 95% 或 99% 相同或与 SEQ ID NO:1 相同的氨基酸序列。

[0047] 也可以使用如上定义的氨基酸序列 (b) 的其他实施方案。

[0048] 在一个实施方案中,所述用途包括以下步骤

- 将表达所述氨基酸序列的第一细胞暴露于已知结合所述 HBV 或 HDV 的受体的化合物且测量所述细胞的响应;

- 将表达所述氨基酸序列的所述第一细胞的相同类型的第二细胞暴露于怀疑结合所述 HBV 或 HDV 的受体的候选化合物且测量所述第二细胞的响应;和

- 将所述细胞的响应和所述第二细胞的响应进行比较,且基于此类比较确定所述候选化合物是否结合所述 HBV 或 HDV 的受体。

[0049] 已知结合所述 HBV 或 HDV 的受体的化合物包括某些 HBV preS- 衍生脂肽,如,例如, WO 2009/092611 A1 中所定义。

[0050] 本发明的目标还通过用于鉴定可用于治疗 HBV 和 / 或 HDV 感染的化合物的方法来解决,所述方法包括鉴定结合如上定义的 HBV 和 / 或 HDV 受体和 / 或抑制 HBV 和 / 或 HDV 与如上定义的 HBV 和 / 或 HDV 受体的结合的化合物的步骤。

[0051] 本发明的目标还通过用于治疗 HBV 和 / 或 HDV 感染的结合如上定义的 HBV 和 / 或 HDV 受体和 / 或抑制 HBV 和 / 或 HDV 与如上定义的 HBV 和 / 或 HDV 受体的结合的化合物来解决,其中所述化合物不是 HBV L- 蛋白衍生脂肽或所述 HBV 和 / 或 HDV 受体的天然底物或结合伴侣 (例如天然存在的胆汁盐,诸如牛磺胆酸钠)。

[0052] 本发明的目标还通过如上定义的化合物在制备用于治疗 HBV 和 / 或 HDV 感染的药物中的用途来解决。

[0053] 本发明的目标还通过治疗 HBV 和 / 或 HDV 感染的方法来解决,所述方法包括将如上定义的化合物施用于有需要的主体。

[0054] 在一个实施方案中,所述化合物选自(多)肽、抗体、适配体和有机化合物,诸如小分子和拟肽化合物(peptidomimetic compound)。有用的有机化合物也可包括胆汁盐的衍生物。

[0055] 如本文所使用的术语“小分子”意指非聚合的低分子量有机化合物。

[0056] 在一个实施方案中,所述化合物在约对应于 SEQ ID NO:1 的氨基酸 155 至 165、优选氨基酸 156 至 162 的位点结合如上定义的 HBV 和 / 或 HDV 受体。

[0057] 本发明的目标还通过以下用于免疫学研究和 / 或用于筛选药物、进入后限制因子或宿主依赖因子的用途来解决

如上定义的宿主细胞,或
如上定义的转基因细胞或细胞系,或
如上定义的肝细胞,或
如上定义的细胞,或
如上定义的非人转基因动物。

[0058] SEQ ID NO:1 至 10 是指以下序列:

SEQ ID NO:1 (人 N TCP)

```
MEAHNASAPFNFTLPPNFGKRPTDLALSVILVFMLFFIMLSLGCTMEFSKIKAHLWKP KGLA
IALVAQY GIMPLTAFVLGKVFRLKNIEALAILVCGCSPGGNLSNVFSLAMK GDMNLSIVMTT
CSTFCALGMMPLLLYIYSRGIYDGD LKDKVPYKGIVISLVLVLI PCTIGIVLKS KRPQYMR Y
VIKGGMI I ILLCSVAVTVLSAINVGKSIMFAMTPLL IATSSLMPFIFG FLLGYVLSALFCLNG
RCRRTVSMETGCQNVQLCSTILNVAFPPEVIGPLFFF PLLYMI FQLGEGLLLI AIFWCYEKF
KTPKDKTKMIYTAATTEETIPGALGNGTYKGEDCSPCTA
```

SEQ ID NO:2 (人 N TCP 的氨基酸 265 至 291)

```
QLCSTILNVAFPPEVIGPLFFF PLLYM
```

SEQ ID NO:3 (黑猩猩 N TCP)

```
MEAHNVSAPFNFTLPPNFGKRPTDLALSVILVFMLFFIMLSLGCTMEFSKIKAHLWKP KGLA
IALVAQY GIMPLTAFVLGKVFRLKNIEALAILVCGCSPGGNLSNVFSLAMK GDMNLSIVMTT
CSTFCALGMMPLLLYIYSRGIYDGD LKDKVPYKGIVISLVLVLI PCTIGIVLKS KRPQYMR Y
VIKGGMI I ILLCSVAVTVLSAINVGKSIMFAMTPLL IATSSLMPFIFG FLLGYVLSALFCLNG
RCRRTVSMETGCQNVQLCSTILNVAFPPEVIGPLFFF PLLYMI FQLGEGLLLI AMFWCYEKF
KTPKDKTKMTYTAATTEETIPGALGNGTYKGEDCSPCTA
```

SEQ ID NO:4 (猩猩 N TCP)

MEAHNASAPFNFTLPPNFGKRPTDLALSVILVFMLFFIMLSLGCTMEFSKIKAHLWKPKGLA
IALVAQYGIMPLTAFVLGKVFRLKNI EALAILVCGCSPGGNLSNVFSLAMKGMNLSIVMTT
CSTFCALGMMPLLLYIYSRGIYDGDLDKDKVPYRGIVISLVLVLI PCTIGIVLKS KR PQYMR Y
VIKGGMI I ILLCSVAVTVLSAINVGK SIMFAMT P LLIATSSLM PFI G FLLGYVLSALFCLNG
RCRRTVSMETGCQNVQLCSTILNVAFPPEVIGPLFFFPLLYMIFQLGEGLLLIAMFWCYEKF
KTPKGKTKMIYTAATTEETIPGALGNGTYKGEDCSPCTA

SEQ ID NO:5 (缅甸树鼩 / 树鼩 NTCP)

MEAHNLSAPLNFTLPPNFGKRPTDQALS VILVVM LLI M LSLGCTMEFSKIKAHFWKPKGLA
IALLAQYGIMPLTAFALGKVFPLNNIEALAILVCGCSPGGNLSNVFSLAMKGMNLSIVMTT
CSTFFALGMMPLLLYIYSGGIYDGDLDKDKVPYVGIVISLILVLI PCTIGIFLKS KR PQYV P Y
VTKAGMI I ILLSVAITVLSVINVGK SIMFVMT P HLLATSSLM PFI G FLLGYILSTLFR LNA
QCSRTVSMETGCQNVQLCSTILNVTFRPEVIGPLFFFPLLYMIFQLGEGLLLI AIYRCYEKI
KPSKD KTKVIYTA AKTEETIPGTLGNGTYKGEECS PGTA

SEQ ID NO:6 (小鼠 NTCP)

MEAHNVSAPFNFSLPPGFGHRATDTALSVILVVM LLI I M LSLGCTMEFSKIKAHFWKPKGVI
IAI VAQYGIMPLSAFLLGKVFHLTSIEALAILICGCSPGGNLSNLFTLAMKGMNLSIVMTT
CSSFTALGMMPLLLYIYSGGIYDGDLDKDKVPYK GIMLSLVMVLI PCAIGIFLKS KR PHYV P Y
VLKAGMI ITFSLSVAVTVLSVINVGNSIMFVMT P HLLATSSLM PFTGF LMGYILSALFRLNP
SCRRTISMETGFQNVQLCSTILNVTFPPEVIGPLFFFPLLYMIFQLAEGLLFIIIFRCYLKI
KPKQDQTKITYKAAATEDATPAALEKGT HNGN NPPTQPGLSPNGLNSGQMAN

SEQ ID NO:7 (大鼠 NTCP)

MEVHNVSAPFNFSLPPGFGHRATDKALS I I LVLM LLI I M LSLGCTMEFSKIKAHLWKPKGVI
VALVAQFGIMPLAAFLLGKIFHLSNIEALAILICGCSPGGNLSNLFTLAMKGMNLSIVMTT
CSSFSALGMMPLLLYVYSGGIYDGDLDKDKVPYK GIMISLVIVLI PCTIGIVLKS KR PHYV P Y
ILKGGMI ITFLLSVAVTALSVINVGNSIMFVMT P HLLATSSLM PFSGFLMGYILSALFQLNP
SCRRTISMETGFQNIQLCSTILNVTFPPEVIGPLFFFPLLYMIFQLAEGLLIIIFRCYEKI
KPPKDQTKITYKAAATEDATPAALEKGT HNGNI PPLQPGSPNGLNSGQMAN

SEQ ID NO:8 (狗 NTCP)

MDAPNITAPLNFTLPPNFGKRPTDKALS I I LVFLLLI I M LSLGCTMEFSKIKAHFWKPKGLV
IALIAQYGIMPLTAFTLGKVFRLNNIEALAILVCGCSPGGT LSNV FSLAMKGMNLSIVMTT
CSTFFALGMMPLLLYIYSNGIYDGDLDKDKVPYK GIVSSLVLVLI PCTIGIFLKA KR PQYV R Y
IKKGGMI IMLLLSVAITALSVINVGK SIRFVMT P HLLATSSLM PFI G FLLGYILSALFRLDG
RCSRTVSMETGCQNVQLCSTILNVTFPPEVIGPLFFFPLLYMIFQLGEGVFLISIFRCYEKI
KPSKD KTKMIYTA AATEEITPGALGNGTHKGEECS PCTAAPS P SGLDSGEKAIQCDQLEKAK
DKRNTKEESFSSIGSSNYQN

SEQ ID NO:9 (食蟹猴 NTCP)

```
MEAHNASAPFNFTLPPNFGKRPTDLALSIIILVFMLFFVMLSIGCTMEFASKIKAHLWPKPKGLA
IALVAQYGYMPLTAFVLGKVFQLNNEALAILVCGCSPGGNLSNVFSLAMKGMNLSIVMTT
CSTFCALGMMPLLLYLYTRGIYDGDLDKDKVPYGRIIISLVPVLIPTIGIVLKSRRPQYMRV
VIKGGMIIILLCSVAVTVLSAINVGKSIMFAMTPLLIIATSSLMPFIFGFLGVLGYSALFCLNG
RCRRTVSMETGCQNVQLCSTILNVAFPPEVIGPLFFFPLLYMIFQLGEGLLLIAMFRCYEKF
KTPKDKTKMIYTAATTEETIPGALGNGTYKGEDCSPCTA
```

SEQ ID NO:10 (猪 NTCP)

```
MEALNESAPINFTLPHNFGKRPTDLALSVILVFMLLIIMLSIGCTMEFGRIRAHFRKPKPKGLA
IALVAQYGYMPLTAFALGKLFRLNNEALAILICGCSPPGGNLSNIFALAMKGMNLSIMMTT
CSTFLALGMMPLLLYLYSRGIYDGTLDKDKVPYGSIVISLILILIPCTIGIILNTRPQYVRY
VIKGGTILLILCAIAVTVLSVLNVGKSILFVMTPHLVATSSLMPFTGFLLGYLLSALFRLNA
RCSRTVCMETGCQNVQLCSTILNVTFPPEVIGPLFFFPLLYMLFQLGEGLLFIAIFRCYEKT
KLSKDKMKTISAADSTEETIPTALGNGTHKGEECPPTQPSVV
```

[0059] 本发明人已经鉴定了在乙型肝炎病毒 (HBV) 和 / 或丁型肝炎病毒 (HDV) 感染中发挥关键作用的新颖 HBV preS1- 特异性受体, 人牛磺胆酸钠协同转运多肽 NTCP/SLC10A1。该受体或某些非人对应物的表达允许将先前不能结合 HBV 和 / 或 HDV 和 / 或不易受 HBV 和 / 或 HDV 感染的细胞转化为能够结合 HBV 和 / 或 HDV 和 / 或易受 HBV 和 / 或 HDV 感染的细胞。已经易受 HBV 和 / 或 HDV 感染的细胞 (例如, HepaRG 细胞) 显示 NTCP 表达后显著增加的易感性。

[0060] 此外, 来自各种物种的 NTCP/SLC10A1 序列的比对揭示推测负责 HBV 和 / 或 HDV 结合且赋予对 HBV 和 / 或 HDV 感染的易感性的特定氨基酸序列。可以例如通过同源重组将这些特定氨基酸序列引入不表现 HBV 和 / 或 HDV 结合或感染易感性或表现出低 HBV 和 / 或 HDV 结合或感染易感性的细胞 / 生物体的内源 NTCP/SLC10A1 基因中, 以便赋予或增加 HBV 和 / 或 HDV 结合能力和 / 或感染易感性。

[0061] 这些令人惊讶的发现允许开发 HBV 和 / 或 HDV 易感细胞、细胞系和非人动物, 其可用于免疫学研究和 / 或用于筛选药物、进入后限制因子和宿主依赖因子。此外, 该重要受体的鉴定将允许鉴定可用于治疗 HBV 和 / 或 HDV 感染的新颖化合物。

[0062] 现在参考附图, 其中

图 1 显示来自不同物种的牛磺胆酸钠协同转运多肽 NTCP/SLC10A1 的序列比对。描绘了支持肽结合和 HBV 感染的物种 (人、黑猩猩、猩猩、缅甸树鼩)、有能力结合 HBV-preS- 衍生脂肽、但不支持感染的物种 (小鼠、大鼠、狗) 和不能结合且不支持感染的物种。相同的氨基酸以黄色突出显示。非保守的氨基酸改变无阴影显示。在非结合物种食蟹猴和猪中不同的两个氨基酸 (157 和 158) (Meier 等人, Hepatology 2012; Schieck 等人, Hepatology 2012, 出版中) 表明必需结合位点 (通过框突出显示);

图 2 显示将人 NTCP 和小鼠 NTCP 瞬时转染入 HuH7 细胞中赋予 Atto645- 标记的 HBV preS- 脂肽 (称为 Myrcludex B, MyrB) 的结合。HuH7 细胞用编码 GFP 的质粒 (左)、编码

GFP 连同 NTCP 的质粒 (中) 和编码 GFP 和小鼠 NTCP 的质粒瞬时转染。转染后 3 天, 将细胞与荧光标记的 HBV preS- 脂肽孵育、洗涤且通过荧光显微镜分析。GFP 荧光显示在左上角, 细胞显示在左下角, 肽结合显示在右上角小图; 转染的且能够结合的细胞的合并图显示在右下角小图;

图 3 显示表达人或小鼠 NTCP 的稳定转导的 HepG2 细胞特异性结合 HBV preS- 脂肽。HepG2 细胞用 hNTCP (上图) 或 mNTCP (下图) 稳定转导, 且与 500 nM Atto- 标记的野生型 HBV preS- 脂肽 (左图) 或相同浓度的在必需 HBV 受体结合结构域中具有氨基酸改变的相应突变体肽 (右图) 孵育。肽的结合通过荧光显微镜可视化;

图 4 显示稳定转导的小鼠肝细胞瘤细胞 (Hep56. 1D 和 Hepa1-6) 特异性结合 HBV preS- 脂肽。HepG2、Hep56. 1D 和 Hepa1-6 细胞用 hNTCP 稳定转导, 且与 500 nM Atto- 标记的野生型 HBV preS- 脂肽孵育。肽的结合通过荧光显微镜可视化;

图 5 显示用人 NTCP 转染的 HuH7 细胞易受 HDV 感染。含有 HDV 的人血清接种的 HuH7 在接种后 4 天不显示 HDV 感染的任何标志物 (左图)。在用人 NTCP 表达质粒转染后, 观察到 HDV δ 抗原特异性染色 (右图);

图 6 显示 Hep56. 1D 小鼠细胞系中人 NTCP 的内源表达使得它们易受 HDV 感染。单独 (模拟) 或用人 NTCP (hNTCP) 转染的 Hep56. 1D 小鼠肝细胞瘤细胞系用含有 HDV 的血清感染 (右图)。在感染后 5 天计数表达丁型肝炎抗原的细胞。作为第二对照, 人 HuH7 细胞用人 NTCP 或小鼠 NTCP 转染且用 HDV 感染 (左图);

图 7 显示人 NTCP、但非小鼠 NTCP 的转染使得 HuH7 细胞易受丁型肝炎病毒 (HDV) 感染。HuH7 细胞用编码小鼠 NTCP (左小图) 或人 NTCP (右侧 4 个小图, 2 种不同的放大率) 的表达载体瞬时转染。在汇合时, 将细胞与含有 HDV 的患者血清孵育。感染后 4 天, 细胞用检测核 δ 抗原的抗血清染色;

图 8 显示 NTCP (人) 转染的小鼠 Hep56. 1D 细胞在用丁型肝炎病毒感染后的免疫荧光分析。Hep56. 1D 小鼠肝细胞瘤细胞系用小鼠 NTCP (左侧的 2 个小图) 或人 NTCP (hNTCP) (右侧的 4 个小图, 2 种不同的放大率) 转染, 用含有 HDV 的血清感染, 且用丁型肝炎抗原特异性抗体染色。

图 9 显示稳定表达人 NTCP 的 HepG2 和 HuH7 细胞变得易受乙型肝炎病毒 (HBV) 感染。hNTCP 稳定转导的 HepG2 和 HuH7 细胞系在不同浓度的诱导分化过程的 DMSO 下用 HBV 接种。在感染后第 5 天收集培养基且定量 HBeAg。作为感染的特定对照, 使用 HBV preS- 衍生脂肽 (MyrB) (左侧柱)。与 HepG2 细胞相比, HuH7 细胞产生较少量的病毒复制标志物, 其指示限制步骤的存在。

[0063] 本发明现在借助以下实施例进一步描述, 所述实施例意在说明本发明, 而不是限制其范围。

实施例

[0064] 材料与方法

NTCP 的序列

来自不同物种的 NTCP 的蛋白序列从 Ensemble (www.ensemble.org) 获得。

[0065] 比对

来自不同物种的 NTCP 的蛋白的比对通过使用 Vector NTI 9.0 (Invitrogen) 生成。

[0066] 质粒和肽

含有人 NTCP (hNTCP) 的构建体 (pCMV6-XL4-hNTCP) 购自 Origene (USA)。hNTCP 和 NTCP 的开放阅读框通过 PCR 扩增, 并且插入用于瞬时 (pWPI-GFP) 或稳定表达 (pWPI-puro) 的 pWPI 慢病毒载体。

[0067] 用于抑制 HBV 感染的肽先前已经描述为 Myrcludex B (MyrB)。它是 N-肉豆蔻酰化的肽, 其包含 HBV L 蛋白的 47 个氨基酸。ATTO 645 和 ATTO 488 (ATTO-TEC, Germany) 是用于标记用于结合测定的肽的荧光染料。在必需结合位点 (氨基酸 11-15) 中具有丙氨酸取代的突变体肽被用作结合特异性的对照。

MyrB SEQ ID NO: 12

Myr - GTNLSVFNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWPEAANKVG - 酰胺

突变体 MyrB^{Ala11-15} SEQ ID NO: 13

Myr - GTNLSVFNPAAAAAADHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWPEAANKVG - 酰胺

[0068] 慢病毒转导

为了产生重组慢病毒, 在转染前一天接种 HEK 293T 细胞。将 3 μg 包膜蛋白表达构建体 pczVSV-G、9 μg HIV Gag-Pol 表达构建体 pCMV Δ R8.74 和 9 μg 慢病毒载体 pWPI 与 25 μg 聚乙烯亚胺混合, 然后添加至 293T 细胞。将含有慢病毒假颗粒 (pseudoparticles) 的上清液收获, 且通过超速离心浓缩。将沉淀的慢病毒颗粒重新悬浮在细胞培养基中。

[0069] 对于瞬时表达, 将肝细胞与慢病毒在 4% PEG8000 存在的情况下孵育。过夜孵育后去除接种物。将细胞用 PBS 洗涤一次, 并且培养 3 天, 用于表达目标蛋白。为了建立稳定的细胞系, 添加 2.5 μg/ml 嘌呤霉素以选择稳定转导的细胞。通常, 与未转导的细胞相比, 90% 肝细胞在选择后存活, 而没有显著形态差异。

[0070] 细胞

在该工作中使用四种肝细胞。它们中的两种衍生自人 (HuH-7 和 HepG2), 且另外两种衍生自小鼠 (Hep56.1D 和 Hepa1-6)。HEK 293T 细胞用于慢病毒产生。

[0071] 使用荧光标记的肽的结合测定

为了测定肝细胞的结合能力, 将瞬时或稳定转导的细胞与 200-500 nM 荧光标记的肽在细胞培养基中孵育 15-60 分钟。然后将细胞用 PBS 洗涤 3 次, 并且通过荧光显微镜分析。

[0072] HBV 和 HDV 感染测定

HBV 颗粒从 HepAD38 细胞获得。对于 HBV 或 HDV 感染, 将细胞用含有 4% PEG 8000 和 10-20 μl 病毒 (100x 病毒储液) 的培养基在 37°C 接种过夜。此后, 将细胞用 PBS 洗涤三次, 并且进一步培养 5 天。分泌到培养上清液中的乙型肝炎病毒抗原 (HBeAg) 的存在通过 Abbott HBeAg 测定 (Abbott Laboratories) 确定。HDV 感染通过用抗 HDV 血清免疫染色 HDV 感染的细胞来确定。

[0073] 结果

HepaRG 细胞系的发明导致衍生自大 (L) 病毒表面蛋白的 N 端 preS1 结构域的肽受体配体的鉴定, 其特异性结合至 HBV- 易感细胞且有效地阻断感染。肽内的必需位点的定位揭示

脂质部分的要求和保守序列 9-NPLGFFP-15 [SEQ ID NO:14] 的完整性。放射性和荧光标记肽配体,其应用于分析 preS/ 受体复合物小鼠、大鼠、狗、食蟹猴和黑猩猩的生物分布和各物种的原代肝细胞或肝细胞瘤细胞系的表达模式和周转动力学。结果揭示,所述受体:(i) 在肝脏中特异性表达,(ii) 在 HepaRG 细胞的分化过程中变得受诱导,(ii) 在 PMH 和 PRH 的去分化后下调,(iii) 显示与细胞骨架的关联,允许质膜内的较少横向移动,(iv) 显示内吞作用的有限速率,(v) 专门分选至基底外侧膜,(vi) 在人、小鼠、大鼠、狗、黑猩猩,但不是猪和食蟹猴中的保守结合结构域。

[0074] 基于这些结果,本发明人进行基于差异 affimetrix 的表达筛选。将经历 DMSO 诱导分化的 HepaRG 细胞中的上调基因从在 DMSO 不存在的情况下的去分化过程中的 PMH 中的下调基因中减去。将两次筛选中最突出的命中组合,并且经受上述定义的标准。牛磺胆酸钠协同转运多肽 (NTCP, SLC10A1) 是唯一符合这些标准的适当候选: NTCP,整合的多跨膜蛋白在分化肝细胞的基底外侧膜上排他表达。它几乎不在 HepG2、HuH7 和许多其它肝细胞瘤细胞系上表达。在以对应于 Myrcludex B 的饱和水平的水平的 DMSO 处理后,NTCP 在 HepaRG 细胞中被立即诱导。它与细胞骨架关联,并且经历缓慢和受调节 (PKC 依赖性) 的内吞作用。

[0075] 通过来自三组宿主的 NTCP (其感染和结合能力不同) 的序列比对 (图 1),本发明人定义了 NTCP 的两个关键氨基酸 (氨基酸 157 至 158)。共有序列 (KG) 存在于最易感和能够结合的宿主中。相反,不能结合的宿主如食蟹猴和猪不含有该基序。

[0076] 本发明人将 hNTCP 或 mNTCP 转导至 HuH-7 细胞中,并且进行肽结合测定 (图 2)。与具有空载体的对照 (模拟) 相比,人和小鼠衍生的 NTCP 两者都结合至肽。结合的肽的这些信号与共表达的 GFP 的量相关,这表明 NTCP 的表达水平。

[0077] 本发明人进一步生成稳定表达 hNTCP 或 mNTCP 的四种肝细胞 (HuH-7、HepG2、Hep56.1D 和 Hepa1-6)。所述细胞显示与野生型 (WT) 肽 (但不与突变体肽) 的同质结合 (图 3)。表达 hNTCP 或 mNTCP 的小鼠肝细胞瘤细胞同样显示与所述肽的强结合 (图 4)。

[0078] 尽管转染效率低 (~20%),但用 hNTCP 转染的 HuH-7 细胞可以被 HDV 感染 (图 5)。通过 hNTCP 获得的对 HDV 感染的易感性也可以在人和小鼠细胞两者中观察到 (图 6)。hNTCP 的瞬时转导赋予 HuH-7 细胞对 HDV 感染的易感性 (图 7),而支持肽结合的 mNTCP 蛋白不支持 HDV 感染。用 hNTCP 转导后,小鼠细胞系 Hep56.1D 支持 HDV 感染 (图 8)。

[0079] 通过 NTCP 获得的对 HBV 感染的易感性可以在稳定表达 hNTCP 的 HepG2 细胞中观察到 (图 9)。该感染可以由肽 Myrcludex B (MyrB) 特异性抑制,并且通过将 DMSO 添加至培养基而增强。表达 hNTCP 的 HuH-7 细胞似乎支持较低水平的 HBV 感染,表明与 HepG2 细胞相比,在 HuH-7 细胞中不存在支持 HBV 感染的未知辅因子。

[0080] 本说明书、权利要求和 / 或附图中公开的本发明的特征可以,单独和以其任何组合,是用于以其各种形式实现本发明的材料。

[0001]

序列表

<110> Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
 <120> HBV和/或HDV易感细胞、细胞系和非人动物的开发
 <130> U30474PCT
 <150> US 61/725,144
 <151> 2012-11-12
 <160> 15
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 349
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 1
 Met Glu Ala His Asn Ala Ser Ala Pro Phe Asn Phe Thr Leu Pro Pro
 1 5 10 15
 Asn Phe Gly Lys Arg Pro Thr Asp Leu Ala Leu Ser Val Ile Leu Val
 20 25 30
 Phe Met Leu Phe Phe Ile Met Leu Ser Leu Gly Cys Thr Met Glu Phe
 35 40 45
 Ser Lys Ile Lys Ala His Leu Trp Lys Pro Lys Gly Leu Ala Ile Ala
 50 55 60
 Leu Val Ala Gln Tyr Gly Ile Met Pro Leu Thr Ala Phe Val Leu Gly
 65 70 75 80
 Lys Val Phe Arg Leu Lys Asn Ile Glu Ala Leu Ala Ile Leu Val Cys
 85 90 95
 Gly Cys Ser Pro Gly Gly Asn Leu Ser Asn Val Phe Ser Leu Ala Met
 100 105 110
 Lys Gly Asp Met Asn Leu Ser Ile Val Met Thr Thr Cys Ser Thr Phe
 115 120 125
 Cys Ala Leu Gly Met Met Pro Leu Leu Leu Tyr Ile Tyr Ser Arg Gly
 130 135 140
 Ile Tyr Asp Gly Asp Leu Lys Asp Lys Val Pro Tyr Lys Gly Ile Val
 145 150 155 160
 Ile Ser Leu Val Leu Val Leu Ile Pro Cys Thr Ile Gly Ile Val Leu
 165 170 175
 Lys Ser Lys Arg Pro Gln Tyr Met Arg Tyr Val Ile Lys Gly Gly Met
 180 185 190
 Ile Ile Ile Leu Leu Cys Ser Val Ala Val Thr Val Leu Ser Ala Ile
 195 200 205
 Asn Val Gly Lys Ser Ile Met Phe Ala Met Thr Pro Leu Leu Ile Ala
 210 215 220
 Thr Ser Ser Leu Met Pro Phe Ile Gly Phe Leu Leu Gly Tyr Val Leu

[0002]

225 230 235 240

Ser Ala Leu Phe Cys Leu Asn Gly Arg Cys Arg Arg Thr Val Ser Met
245 250 255

Glu Thr Gly Cys Gln Asn Val Gln Leu Cys Ser Thr Ile Leu Asn Val
260 265 270

Ala Phe Pro Pro Glu Val Ile Gly Pro Leu Phe Phe Phe Pro Leu Leu
275 280 285

Tyr Met Ile Phe Gln Leu Gly Glu Gly Leu Leu Leu Ile Ala Ile Phe
290 295 300

Trp Cys Tyr Glu Lys Phe Lys Thr Pro Lys Asp Lys Thr Lys Met Ile
305 310 315 320

Tyr Thr Ala Ala Thr Thr Glu Glu Thr Ile Pro Gly Ala Leu Gly Asn
325 330 335

Gly Thr Tyr Lys Gly Glu Asp Cys Ser Pro Cys Thr Ala
340 345

<210> 2
<211> 27
<212> PRT
<213> 智人

<400> 2

Gln Leu Cys Ser Thr Ile Leu Asn Val Ala Phe Pro Pro Glu Val Ile
1 5 10 15

Gly Pro Leu Phe Phe Phe Pro Leu Leu Tyr Met
20 25

<210> 3
<211> 349
<212> PRT
<213> 黑猩猩(Pan troglodytes)(黑猩猩)

<400> 3

Met Glu Ala His Asn Val Ser Ala Pro Phe Asn Phe Thr Leu Pro Pro
1 5 10 15

Asn Phe Gly Lys Arg Pro Thr Asp Leu Ala Leu Ser Val Ile Leu Val
20 25 30

Phe Met Leu Phe Phe Ile Met Leu Ser Leu Gly Cys Thr Met Glu Phe
35 40 45

Ser Lys Ile Lys Ala His Leu Trp Lys Pro Lys Gly Leu Ala Ile Ala
50 55 60

Leu Val Ala Gln Tyr Gly Ile Met Pro Leu Thr Ala Phe Val Leu Gly
65 70 75 80

Lys Val Phe Arg Leu Lys Asn Ile Glu Ala Leu Ala Ile Leu Val Cys
85 90 95

Gly Cys Ser Pro Gly Gly Asn Leu Ser Asn Val Phe Ser Leu Ala Met
100 105 110

[0003]

Lys Gly Asp Met Asn Leu Ser Ile Val Met Thr Thr Cys Ser Thr Phe
 115 120 125
 Cys Ala Leu Gly Met Met Pro Leu Leu Leu Tyr Ile Tyr Ser Arg Gly
 130 135 140
 Ile Tyr Asp Gly Asp Leu Lys Asp Lys Val Pro Tyr Lys Gly Ile Val
 145 150 155 160
 Ile Ser Leu Val Leu Val Leu Ile Pro Cys Thr Ile Gly Ile Val Leu
 165 170 175
 Lys Ser Lys Arg Pro Gln Tyr Met Arg Tyr Val Ile Lys Gly Gly Met
 180 185 190
 Ile Ile Ile Leu Leu Cys Ser Val Ala Val Thr Val Leu Ser Ala Ile
 195 200 205
 Asn Val Gly Lys Ser Ile Met Phe Ala Met Thr Pro Leu Leu Ile Ala
 210 215 220
 Thr Ser Ser Leu Met Pro Phe Ile Gly Phe Leu Leu Gly Tyr Val Leu
 225 230 235 240
 Ser Ala Leu Phe Cys Leu Asn Gly Arg Cys Arg Arg Thr Val Ser Met
 245 250 255
 Glu Thr Gly Cys Gln Asn Val Gln Leu Cys Ser Thr Ile Leu Asn Val
 260 265 270
 Ala Phe Pro Pro Glu Val Ile Gly Pro Leu Phe Phe Phe Pro Leu Leu
 275 280 285
 Tyr Met Ile Phe Gln Leu Gly Glu Gly Leu Leu Leu Ile Ala Met Phe
 290 295 300
 Trp Cys Tyr Glu Lys Phe Lys Thr Pro Lys Asp Lys Thr Lys Met Thr
 305 310 315 320
 Tyr Thr Ala Ala Thr Thr Glu Glu Thr Ile Pro Gly Ala Leu Gly Asn
 325 330 335
 Gly Thr Tyr Lys Gly Glu Asp Cys Ser Pro Cys Thr Ala
 340 345
 <210> 4
 <211> 349
 <212> PRT
 <213> 猩猩(Pongo pygmaeus)
 <400> 4
 Met Glu Ala His Asn Ala Ser Ala Pro Phe Asn Phe Thr Leu Pro Pro
 1 5 10 15
 Asn Phe Gly Lys Arg Pro Thr Asp Leu Ala Leu Ser Val Ile Leu Val
 20 25 30
 Phe Met Leu Phe Phe Ile Met Leu Ser Leu Gly Cys Thr Met Glu Phe
 35 40 45

[0004]

Ser Lys Ile Lys Ala His Leu Trp Lys Pro Lys Gly Leu Ala Ile Ala
 50 55 60
 Leu Val Ala Gln Tyr Gly Ile Met Pro Leu Thr Ala Phe Val Leu Gly
 65 70 75 80
 Lys Val Phe Arg Leu Lys Asn Ile Glu Ala Leu Ala Ile Leu Val Cys
 85 90 95
 Gly Cys Ser Pro Gly Gly Asn Leu Ser Asn Val Phe Ser Leu Ala Met
 100 105 110
 Lys Gly Asp Met Asn Leu Ser Ile Val Met Thr Thr Cys Ser Thr Phe
 115 120 125
 Cys Ala Leu Gly Met Met Pro Leu Leu Leu Tyr Ile Tyr Ser Arg Gly
 130 135 140
 Ile Tyr Asp Gly Asp Leu Lys Asp Lys Val Pro Tyr Arg Gly Ile Val
 145 150 155 160
 Ile Ser Leu Val Leu Val Leu Ile Pro Cys Thr Ile Gly Ile Val Leu
 165 170 175
 Lys Ser Lys Arg Pro Gln Tyr Met Arg Tyr Val Ile Lys Gly Gly Met
 180 185 190
 Ile Ile Ile Leu Leu Cys Ser Val Ala Val Thr Val Leu Ser Ala Ile
 195 200 205
 Asn Val Gly Lys Ser Ile Met Phe Ala Met Thr Pro Leu Leu Ile Ala
 210 215 220
 Thr Ser Ser Leu Met Pro Phe Ile Gly Phe Leu Leu Gly Tyr Val Leu
 225 230 235 240
 Ser Ala Leu Phe Cys Leu Asn Gly Arg Cys Arg Arg Thr Val Ser Met
 245 250 255
 Glu Thr Gly Cys Gln Asn Val Gln Leu Cys Ser Thr Ile Leu Asn Val
 260 265 270
 Ala Phe Pro Pro Glu Val Ile Gly Pro Leu Phe Phe Phe Pro Leu Leu
 275 280 285
 Tyr Met Ile Phe Gln Leu Gly Glu Gly Leu Leu Leu Ile Ala Met Phe
 290 295 300
 Trp Cys Tyr Glu Lys Phe Lys Thr Pro Lys Gly Lys Thr Lys Met Ile
 305 310 315 320
 Tyr Thr Ala Ala Thr Thr Glu Glu Thr Ile Pro Gly Ala Leu Gly Asn
 325 330 335
 Gly Thr Tyr Lys Gly Glu Asp Cys Ser Pro Cys Thr Ala
 340 345

<210> 5

[0005]

<211> 349
 <212> PRT
 <213> 缅甸树鼩 (*Tupaia belangeri*)
 <400> 5
 Met Glu Ala His Asn Leu Ser Ala Pro Leu Asn Phe Thr Leu Pro Pro
 1 5 10 15
 Asn Phe Gly Lys Arg Pro Thr Asp Gln Ala Leu Ser Val Ile Leu Val
 20 25 30
 Val Met Leu Leu Ile Met Met Leu Ser Leu Gly Cys Thr Met Glu Phe
 35 40 45
 Ser Lys Ile Lys Ala His Phe Trp Lys Pro Lys Gly Leu Ala Ile Ala
 50 55 60
 Leu Leu Ala Gln Tyr Gly Ile Met Pro Leu Thr Ala Phe Ala Leu Gly
 65 70 75 80
 Lys Val Phe Pro Leu Asn Asn Ile Glu Ala Leu Ala Ile Leu Val Cys
 85 90 95
 Gly Cys Ser Pro Gly Gly Asn Leu Ser Asn Val Phe Ser Leu Ala Met
 100 105 110
 Lys Gly Asp Met Asn Leu Ser Ile Val Met Thr Thr Cys Ser Thr Phe
 115 120 125
 Phe Ala Leu Gly Met Met Pro Leu Leu Leu Tyr Ile Tyr Ser Lys Gly
 130 135 140
 Ile Tyr Asp Gly Asp Leu Lys Asp Lys Val Pro Tyr Val Gly Ile Val
 145 150 155 160
 Ile Ser Leu Ile Leu Val Leu Ile Pro Cys Thr Ile Gly Ile Phe Leu
 165 170 175
 Lys Ser Lys Arg Pro Gln Tyr Val Pro Tyr Val Thr Lys Ala Gly Met
 180 185 190
 Ile Ile Ile Leu Leu Leu Ser Val Ala Ile Thr Val Leu Ser Val Ile
 195 200 205
 Asn Val Gly Lys Ser Ile Met Phe Val Met Thr Pro His Leu Leu Ala
 210 215 220
 Thr Ser Ser Leu Met Pro Phe Ile Gly Phe Leu Leu Gly Tyr Ile Leu
 225 230 235 240
 Ser Thr Leu Phe Arg Leu Asn Ala Gln Cys Ser Arg Thr Val Ser Met
 245 250 255
 Glu Thr Gly Cys Gln Asn Val Gln Leu Cys Ser Thr Ile Leu Asn Val
 260 265 270
 Thr Phe Arg Pro Glu Val Ile Gly Pro Leu Phe Phe Phe Pro Leu Leu
 275 280 285
 Tyr Met Ile Phe Gln Leu Gly Glu Gly Leu Leu Leu Ile Ala Ile Tyr

[0006]

序 列 表

290	295	300
Arg Cys Tyr Glu Lys Ile Lys Pro Ser Lys Asp Lys Thr Lys Val Ile 305 310 315 320		
Tyr Thr Ala Ala Lys Thr Glu Glu Thr Ile Pro Gly Thr Leu Gly Asn 325 330 335		
Gly Thr Tyr Lys Gly Glu Glu Cys Ser Pro Gly Thr Ala 340 345		
<210> 6		
<211> 362		
<212> PRT		
<213> 小家鼠(Mus musculus)		
<400> 6		
Met Glu Ala His Asn Val Ser Ala Pro Phe Asn Phe Ser Leu Pro Pro 1 5 10 15		
Gly Phe Gly His Arg Ala Thr Asp Thr Ala Leu Ser Val Ile Leu Val 20 25 30		
Val Met Leu Leu Leu Ile Met Leu Ser Leu Gly Cys Thr Met Glu Phe 35 40 45		
Ser Lys Ile Lys Ala His Phe Trp Lys Pro Lys Gly Val Ile Ile Ala 50 55 60		
Ile Val Ala Gln Tyr Gly Ile Met Pro Leu Ser Ala Phe Leu Leu Gly 65 70 75 80		
Lys Val Phe His Leu Thr Ser Ile Glu Ala Leu Ala Ile Leu Ile Cys 85 90 95		
Gly Cys Ser Pro Gly Gly Asn Leu Ser Asn Leu Phe Thr Leu Ala Met 100 105 110		
Lys Gly Asp Met Asn Leu Ser Ile Val Met Thr Thr Cys Ser Ser Phe 115 120 125		
Thr Ala Leu Gly Met Met Pro Leu Leu Leu Tyr Ile Tyr Ser Lys Gly 130 135 140		
Ile Tyr Asp Gly Asp Leu Lys Asp Lys Val Pro Tyr Lys Gly Ile Met 145 150 155 160		
Leu Ser Leu Val Met Val Leu Ile Pro Cys Ala Ile Gly Ile Phe Leu 165 170 175		
Lys Ser Lys Arg Pro His Tyr Val Pro Tyr Val Leu Lys Ala Gly Met 180 185 190		
Ile Ile Thr Phe Ser Leu Ser Val Ala Val Thr Val Leu Ser Val Ile 195 200 205		
Asn Val Gly Asn Ser Ile Met Phe Val Met Thr Pro His Leu Leu Ala 210 215 220		
Thr Ser Ser Leu Met Pro Phe Thr Gly Phe Leu Met Gly Tyr Ile Leu		

[0007]

225 230 235 240
Ser Ala Leu Phe Arg Leu Asn Pro Ser Cys Arg Arg Thr Ile Ser Met
 245 250 255
Glu Thr Gly Phe Gln Asn Val Gln Leu Cys Ser Thr Ile Leu Asn Val
 260 265 270
Thr Phe Pro Pro Glu Val Ile Gly Pro Leu Phe Phe Phe Pro Leu Leu
 275 280 285
Tyr Met Ile Phe Gln Leu Ala Glu Gly Leu Leu Phe Ile Ile Ile Phe
 290 295 300
Arg Cys Tyr Leu Lys Ile Lys Pro Gln Lys Asp Gln Thr Lys Ile Thr
 305 310 315
Tyr Lys Ala Ala Ala Thr Glu Asp Ala Thr Pro Ala Ala Leu Glu Lys
 325 330 335
Gly Thr His Asn Gly Asn Asn Pro Pro Thr Gln Pro Gly Leu Ser Pro
 340 345 350
Asn Gly Leu Asn Ser Gly Gln Met Ala Asn
 355 360
⟨210⟩ 7
⟨211⟩ 362
⟨212⟩ PRT
⟨213⟩ 褐家鼠(Rattus norvegicus)
⟨400⟩ 7
Met Glu Val His Asn Val Ser Ala Pro Phe Asn Phe Ser Leu Pro Pro
1 5 10 15
Gly Phe Gly His Arg Ala Thr Asp Lys Ala Leu Ser Ile Ile Leu Val
 20 25 30
Leu Met Leu Leu Ile Met Leu Ser Leu Gly Cys Thr Met Glu Phe
 35 40 45
Ser Lys Ile Lys Ala His Leu Trp Lys Pro Lys Gly Val Ile Val Ala
 50 55 60
Leu Val Ala Gln Phe Gly Ile Met Pro Leu Ala Ala Phe Leu Leu Gly
65 70 75 80
Lys Ile Phe His Leu Ser Asn Ile Glu Ala Leu Ala Ile Leu Ile Cys
 85 90 95
Gly Cys Ser Pro Gly Gly Asn Leu Ser Asn Leu Phe Thr Leu Ala Met
 100 105 110
Lys Gly Asp Met Asn Leu Ser Ile Val Met Thr Thr Cys Ser Ser Phe
 115 120 125
Ser Ala Leu Gly Met Met Pro Leu Leu Leu Tyr Val Tyr Ser Lys Gly
 130 135 140
Ile Tyr Asp Gly Asp Leu Lys Asp Lys Val Pro Tyr Lys Gly Ile Met

[0008]

145 150 155 160
Ile Ser Leu Val Ile Val Leu Ile Pro Cys Thr Ile Gly Ile Val Leu
165 170 175
Lys Ser Lys Arg Pro His Tyr Val Pro Tyr Ile Leu Lys Gly Gly Met
180 185 190
Ile Ile Thr Phe Leu Leu Ser Val Ala Val Thr Ala Leu Ser Val Ile
195 200 205
Asn Val Gly Asn Ser Ile Met Phe Val Met Thr Pro His Leu Leu Ala
210 215 220
Thr Ser Ser Leu Met Pro Phe Ser Gly Phe Leu Met Gly Tyr Ile Leu
225 230 235 240
Ser Ala Leu Phe Gln Leu Asn Pro Ser Cys Arg Arg Thr Ile Ser Met
245 250 255
Glu Thr Gly Phe Gln Asn Ile Gln Leu Cys Ser Thr Ile Leu Asn Val
260 265 270
Thr Phe Pro Pro Glu Val Ile Gly Pro Leu Phe Phe Phe Pro Leu Leu
275 280 285
Tyr Met Ile Phe Gln Leu Ala Glu Gly Leu Leu Ile Ile Ile Ile Phe
290 295 300
Arg Cys Tyr Glu Lys Ile Lys Pro Pro Lys Asp Gln Thr Lys Ile Thr
305 310 315 320
Tyr Lys Ala Ala Ala Thr Glu Asp Ala Thr Pro Ala Ala Leu Glu Lys
325 330 335
Gly Thr His Asn Gly Asn Ile Pro Pro Leu Gln Pro Gly Pro Ser Pro
340 345 350
Asn Gly Leu Asn Ser Gly Gln Met Ala Asn
355 360
<210> 8
<211> 392
<212> PRT
<213> 家犬(Canis familiaris)
<400> 8
Met Asp Ala Pro Asn Ile Thr Ala Pro Leu Asn Phe Thr Leu Pro Pro
1 5 10 15
Asn Phe Gly Lys Arg Pro Thr Asp Lys Ala Leu Ser Ile Ile Leu Val
20 25 30
Phe Leu Leu Leu Ile Ile Met Leu Ser Leu Gly Cys Thr Met Glu Phe
35 40 45
Ser Lys Ile Lys Ala His Phe Trp Lys Pro Lys Gly Leu Val Ile Ala
50 55 60
Leu Ile Ala Gln Tyr Gly Ile Met Pro Leu Thr Ala Phe Thr Leu Gly

[0009]

65	70	75	80
Lys Val Phe Arg	Leu Asn Asn Ile Glu Ala Leu Ala Ile Leu Val Cys		
	85	90	95
Gly Cys Ser Pro Gly Gly Thr Leu Ser Asn Val Phe Ser Leu Ala Met			
	100	105	110
Lys Gly Asp Met Asn Leu Ser Ile Val Met Thr Thr Cys Ser Thr Phe			
	115	120	125
Phe Ala Leu Gly Met Met Pro Leu Leu Leu Tyr Ile Tyr Ser Asn Gly			
	130	135	140
Ile Tyr Asp Gly Asp Leu Lys Asp Lys Val Pro Tyr Lys Gly Ile Val			
	145	150	155
Ser Ser Leu Val Leu Val Leu Ile Pro Cys Thr Ile Gly Ile Phe Leu			
	165	170	175
Lys Ala Lys Arg Pro Gln Tyr Val Arg Tyr Ile Lys Lys Gly Gly Met			
	180	185	190
Ile Ile Met Leu Leu Leu Ser Val Ala Ile Thr Ala Leu Ser Val Ile			
	195	200	205
Asn Val Gly Lys Ser Ile Arg Phe Val Met Thr Pro His Leu Leu Ala			
	210	215	220
Thr Ser Ser Leu Met Pro Phe Ile Gly Phe Leu Leu Gly Tyr Ile Leu			
	225	230	235
Ser Ala Leu Phe Arg Leu Asp Gly Arg Cys Ser Arg Thr Val Ser Met			
	245	250	255
Glu Thr Gly Cys Gln Asn Val Gln Leu Cys Ser Thr Ile Leu Asn Val			
	260	265	270
Thr Phe Pro Pro Glu Val Ile Gly Pro Leu Phe Phe Phe Pro Leu Leu			
	275	280	285
Tyr Met Ile Phe Gln Leu Gly Glu Gly Val Phe Leu Ile Ser Ile Phe			
	290	295	300
Arg Cys Tyr Glu Lys Ile Lys Pro Ser Lys Asp Lys Thr Lys Met Ile			
	305	310	315
Tyr Thr Ala Ala Ala Thr Glu Glu Ile Thr Pro Gly Ala Leu Gly Asn			
	325	330	335
Gly Thr His Lys Gly Glu Glu Cys Ser Pro Cys Thr Ala Ala Pro Ser			
	340	345	350
Pro Ser Gly Leu Asp Ser Gly Glu Lys Ala Ile Gln Cys Asp Gln Leu			
	355	360	365
Glu Lys Ala Lys Asp Lys Arg Asn Thr Lys Glu Glu Ser Phe Ser Ser			
	370	375	380

[0010]

Ile Gly Ser Ser Asn Tyr Gln Asn
 385 390

<210> 9
 <211> 349
 <212> PRT
 <213> 食蟹猴(Macaca fascicularis)

<400> 9

Met Glu Ala His Asn Ala Ser Ala Pro Phe Asn Phe Thr Leu Pro Pro
 1 5 10 15

Asn Phe Gly Lys Arg Pro Thr Asp Leu Ala Leu Ser Ile Ile Leu Val
 20 25 30

Phe Met Leu Phe Phe Val Met Leu Ser Leu Gly Cys Thr Met Glu Phe
 35 40 45

Ser Lys Ile Lys Ala His Leu Trp Lys Pro Lys Gly Leu Ala Ile Ala
 50 55 60

Leu Val Ala Gln Tyr Gly Ile Met Pro Leu Thr Ala Phe Val Leu Gly
 65 70 75 80

Lys Val Phe Gln Leu Asn Asn Ile Glu Ala Leu Ala Ile Leu Val Cys
 85 90 95

Gly Cys Ser Pro Gly Gly Asn Leu Ser Asn Val Phe Ser Leu Ala Met
 100 105 110

Lys Gly Asp Met Asn Leu Ser Ile Val Met Thr Thr Cys Ser Thr Phe
 115 120 125

Cys Ala Leu Gly Met Met Pro Leu Leu Leu Tyr Leu Tyr Thr Arg Gly
 130 135 140

Ile Tyr Asp Gly Asp Leu Lys Asp Lys Val Pro Tyr Gly Arg Ile Ile
 145 150 155 160

Leu Ser Leu Val Pro Val Leu Ile Pro Cys Thr Ile Gly Ile Val Leu
 165 170 175

Lys Ser Lys Arg Pro Gln Tyr Met Arg Tyr Val Ile Lys Gly Gly Met
 180 185 190

Ile Ile Ile Leu Leu Cys Ser Val Ala Val Thr Val Leu Ser Ala Ile
 195 200 205

Asn Val Gly Lys Ser Ile Met Phe Ala Met Thr Pro Leu Leu Ile Ala
 210 215 220

Thr Ser Ser Leu Met Pro Phe Ile Gly Phe Leu Leu Gly Tyr Val Leu
 225 230 235 240

Ser Ala Leu Phe Cys Leu Asn Gly Arg Cys Arg Arg Thr Val Ser Met
 245 250 255

Glu Thr Gly Cys Gln Asn Val Gln Leu Cys Ser Thr Ile Leu Asn Val
 260 265 270

[0011]

Ala Phe Pro Pro Glu Val Ile Gly Pro Leu Phe Phe Phe Pro Leu Leu
275 280 285

Tyr Met Ile Phe Gln Leu Gly Glu Gly Leu Leu Leu Ile Ala Met Phe
290 295 300

Arg Cys Tyr Glu Lys Phe Lys Thr Pro Lys Asp Lys Thr Lys Met Ile
305 310 315 320

Tyr Thr Ala Ala Thr Thr Glu Glu Thr Ile Pro Gly Ala Leu Gly Asn
325 330 335

Gly Thr Tyr Lys Gly Glu Asp Cys Ser Pro Cys Thr Ala
340 345

<210> 10
<211> 352
<212> PRT
<213> 野猪 (*Sus scrofa*)
<400> 10

Met Glu Ala Leu Asn Glu Ser Ala Pro Ile Asn Phe Thr Leu Pro His
1 5 10 15

Asn Phe Gly Lys Arg Pro Thr Asp Leu Ala Leu Ser Val Ile Leu Val
20 25 30

Phe Met Leu Leu Ile Ile Met Leu Ser Leu Gly Cys Thr Met Glu Phe
35 40 45

Gly Arg Ile Arg Ala His Phe Arg Lys Pro Lys Gly Leu Ala Ile Ala
50 55 60

Leu Val Ala Gln Tyr Gly Ile Met Pro Leu Thr Ala Phe Ala Leu Gly
65 70 75 80

Lys Leu Phe Arg Leu Asn Asn Val Glu Ala Leu Ala Ile Leu Ile Cys
85 90 95

Gly Cys Ser Pro Gly Gly Asn Leu Ser Asn Ile Phe Ala Leu Ala Met
100 105 110

Lys Gly Asp Met Asn Leu Ser Ile Met Met Thr Thr Cys Ser Thr Phe
115 120 125

Leu Ala Leu Gly Met Met Pro Leu Leu Leu Tyr Leu Tyr Ser Arg Gly
130 135 140

Ile Tyr Asp Gly Thr Leu Lys Asp Lys Val Pro Tyr Gly Ser Ile Val
145 150 155 160

Ile Ser Leu Ile Leu Ile Leu Ile Pro Cys Thr Ile Gly Ile Ile Leu
165 170 175

Asn Thr Lys Arg Pro Gln Tyr Val Arg Tyr Val Ile Lys Gly Gly Thr
180 185 190

Ile Leu Leu Ile Leu Cys Ala Ile Ala Val Thr Val Leu Ser Val Leu
195 200 205

[0012]

Asn Val Gly Lys Ser Ile Leu Phe Val Met Thr Pro His Leu Val Ala
 210 215 220

Thr Ser Ser Leu Met Pro Phe Thr Gly Phe Leu Leu Gly Tyr Leu Leu
 225 230 235 240

Ser Ala Leu Phe Arg Leu Asn Ala Arg Cys Ser Arg Thr Val Cys Met
 245 250 255

Glu Thr Gly Cys Gln Asn Val Gln Leu Cys Ser Thr Ile Leu Asn Val
 260 265 270

Thr Phe Pro Pro Glu Val Ile Gly Pro Leu Phe Phe Phe Pro Leu Leu
 275 280 285

Tyr Met Leu Phe Gln Leu Gly Glu Gly Leu Leu Phe Ile Ala Ile Phe
 290 295 300

Arg Cys Tyr Glu Lys Thr Lys Leu Ser Lys Asp Lys Met Lys Thr Ile
 305 310 315 320

Ser Ala Ala Asp Ser Thr Glu Glu Thr Ile Pro Thr Ala Leu Gly Asn
 325 330 335

Gly Thr His Lys Gly Glu Glu Cys Pro Pro Thr Glu Pro Ser Val Val
 340 345 350

<210> 11
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> HBV的结合区域

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<400> 11
 Pro Tyr Xaa Gly Ile
 1 5

<210> 12
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 12
 Gly Met Ile Ile Ile Leu Leu
 1 5

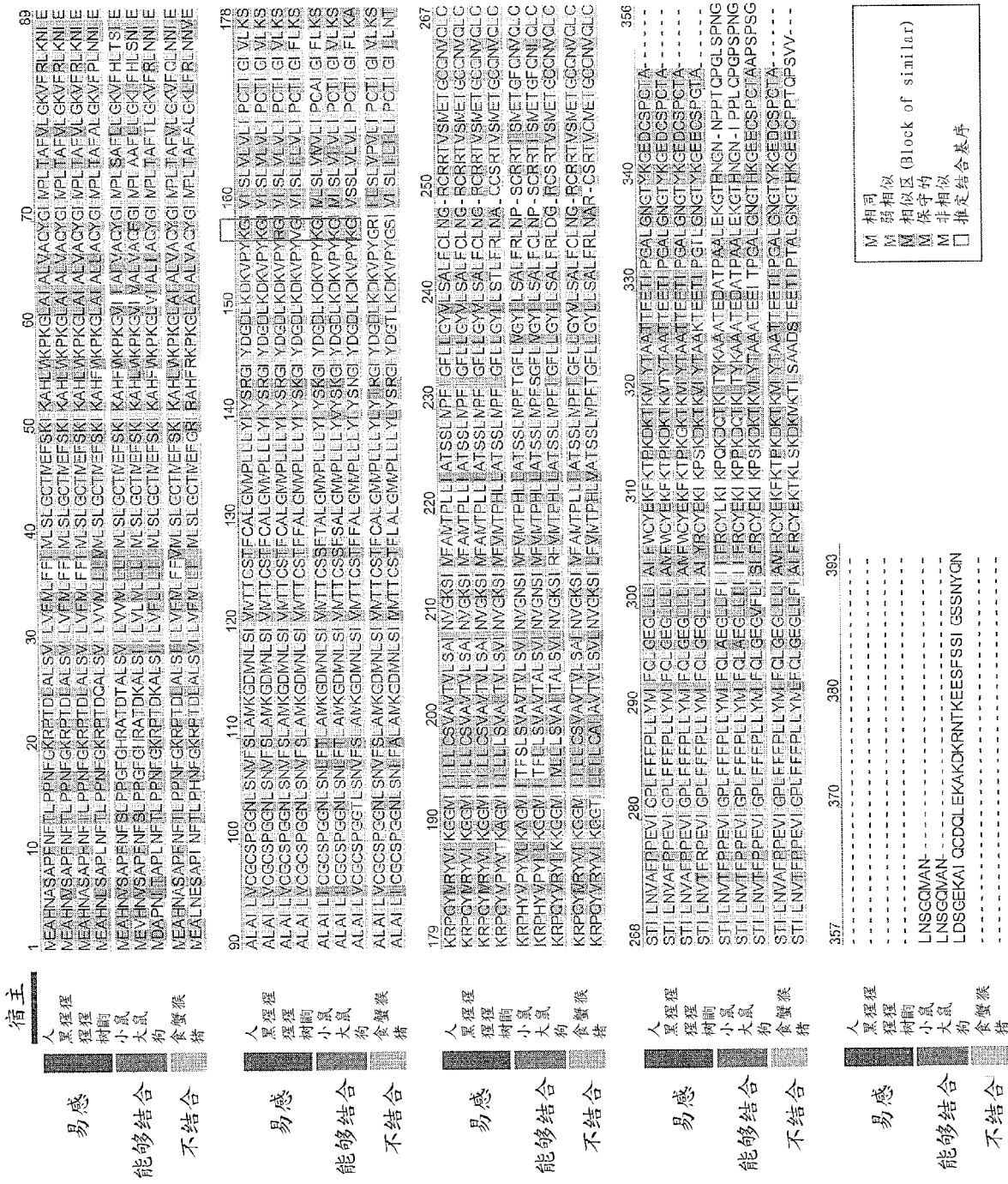
<210> 13
 <211> 47
 <212> PRT
 <213> 乙型肝炎病毒

<400> 13
 Gly Thr Asn Leu Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His
 1 5 10 15

Gln Leu Asp Pro Ala Phe Gly Ala Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp

[0013]

	20	25	30
Phe Asn Pro Asn Lys Asp His Trp Pro Glu Ala Asn Lys Val Gly	35	40	45
<210> 14			
<211> 47			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 突变体MyrB(Ala11-15)			
<400> 14			
Gly Thr Asn Leu Ser Val Pro Asn Pro Ala Ala Ala Ala Asp His	1	5	10 15
Gln Leu Asp Pro Ala Phe Gly Ala Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp	20	25	30
Phe Asn Pro Asn Lys Asp His Trp Pro Glu Ala Asn Lys Val Gly	35	40	45
<210> 15			
<211> 7			
<212> PRT			
<213> 乙型肝炎病毒			
<400> 15			
Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro	1	5	



HuH-7 细胞

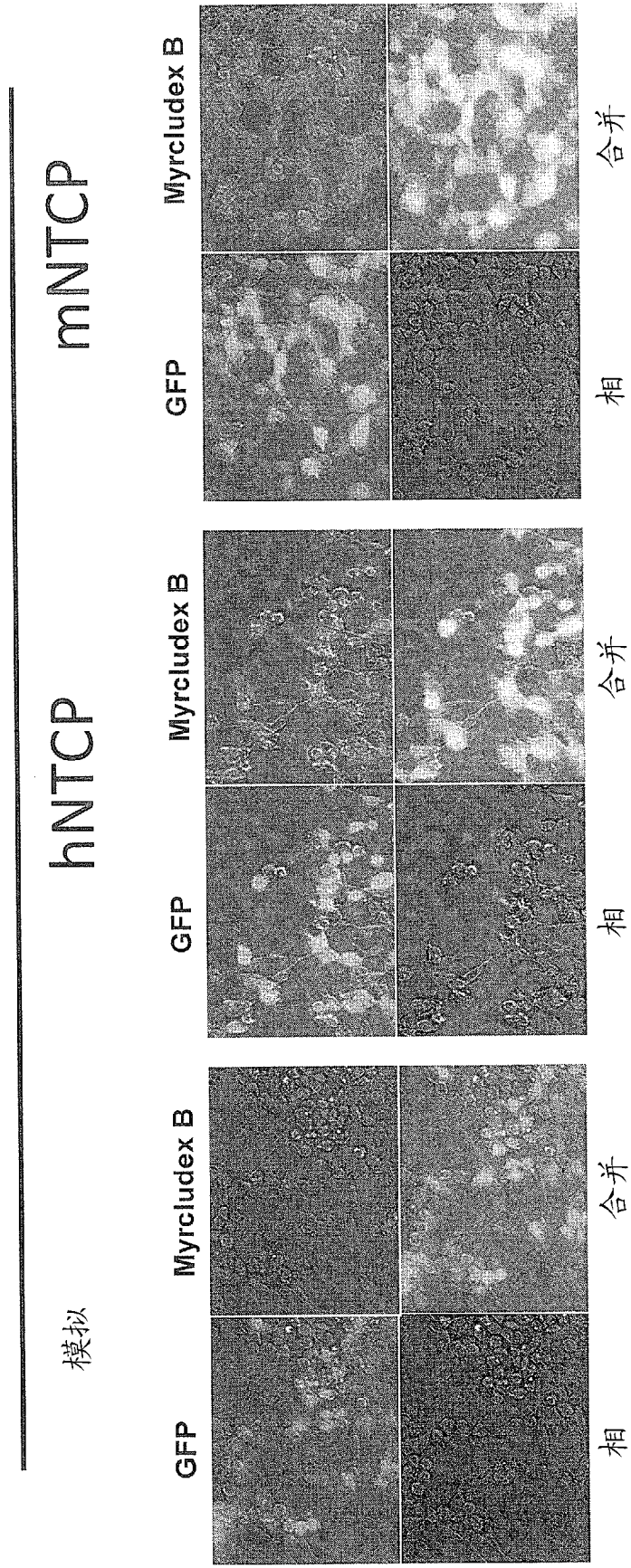


图 2

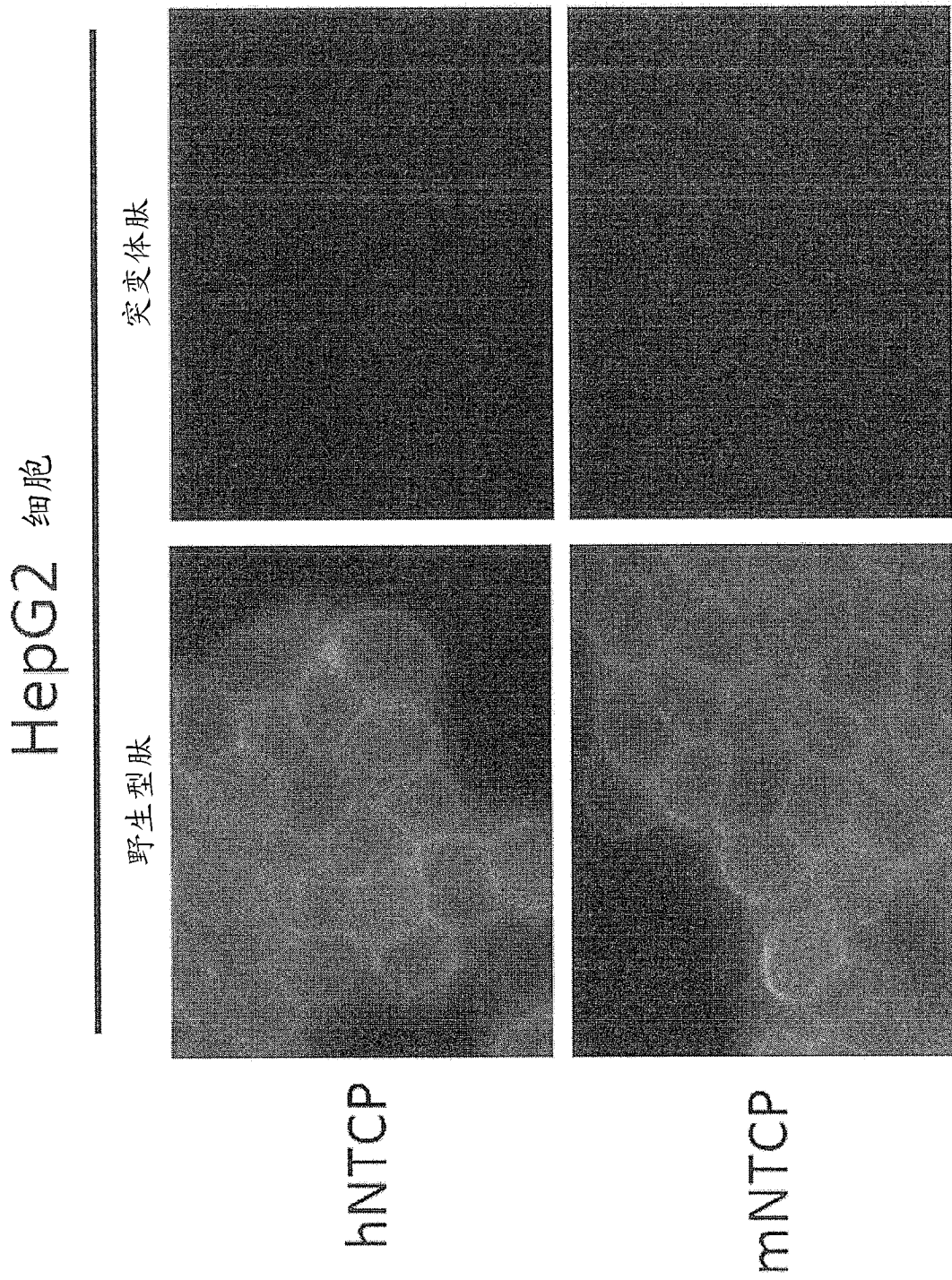


图 3

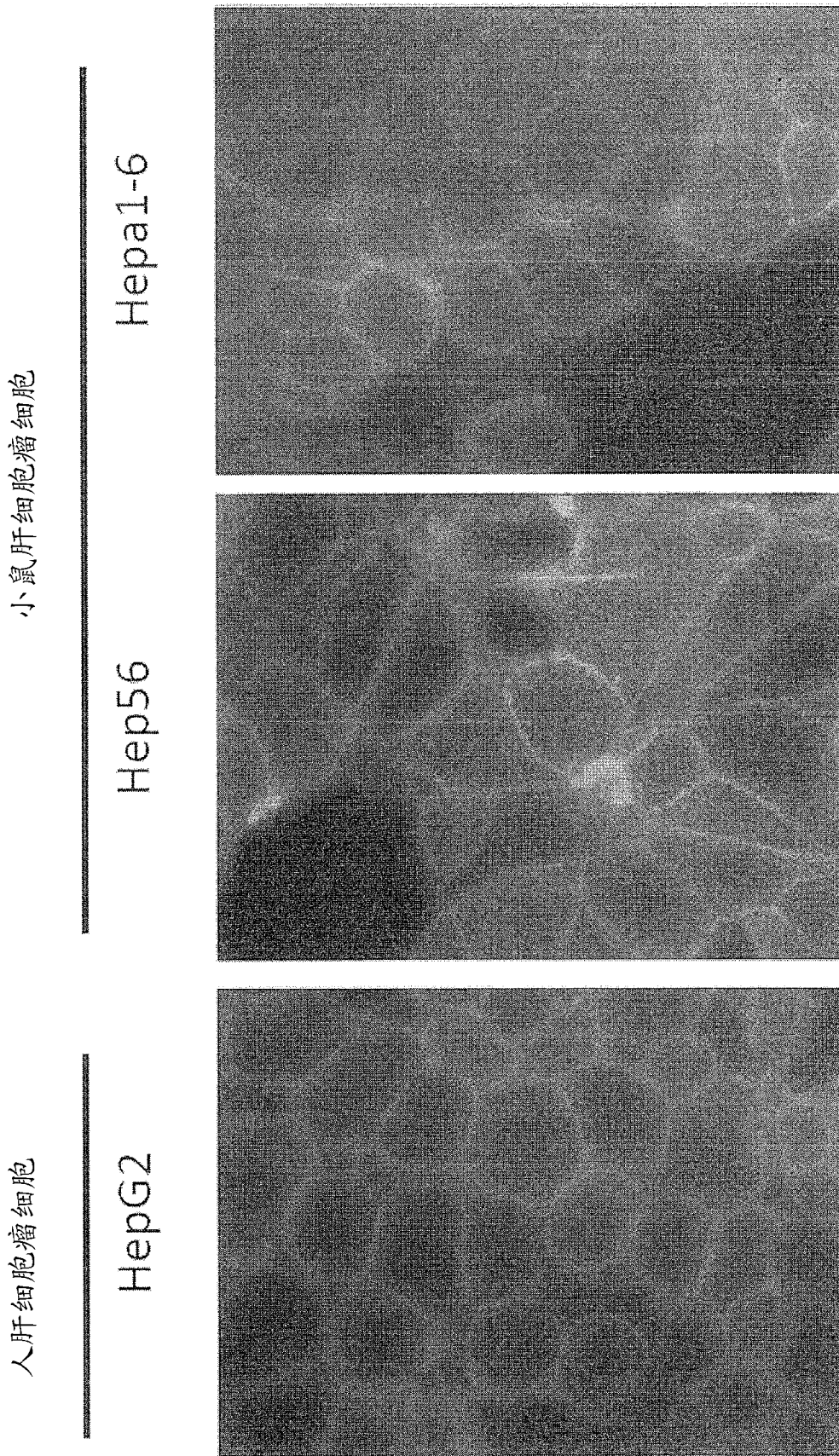


图 4

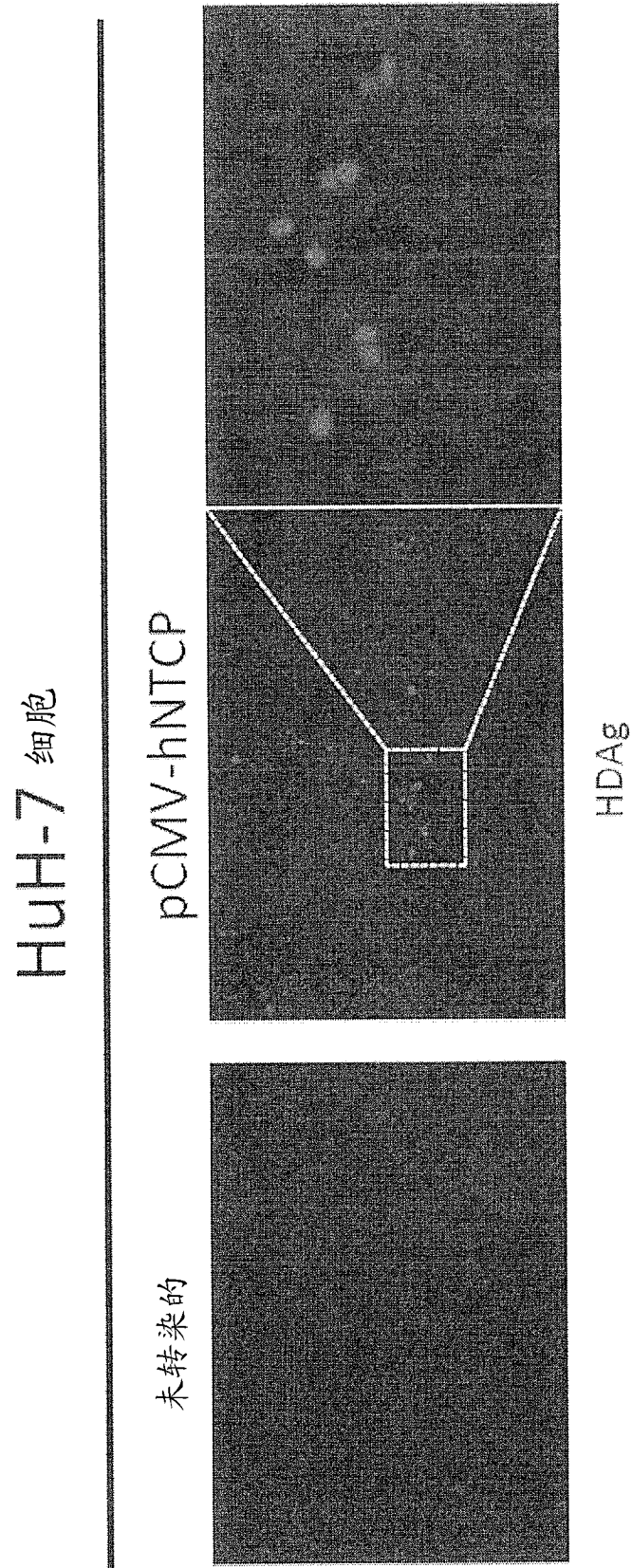


图 5

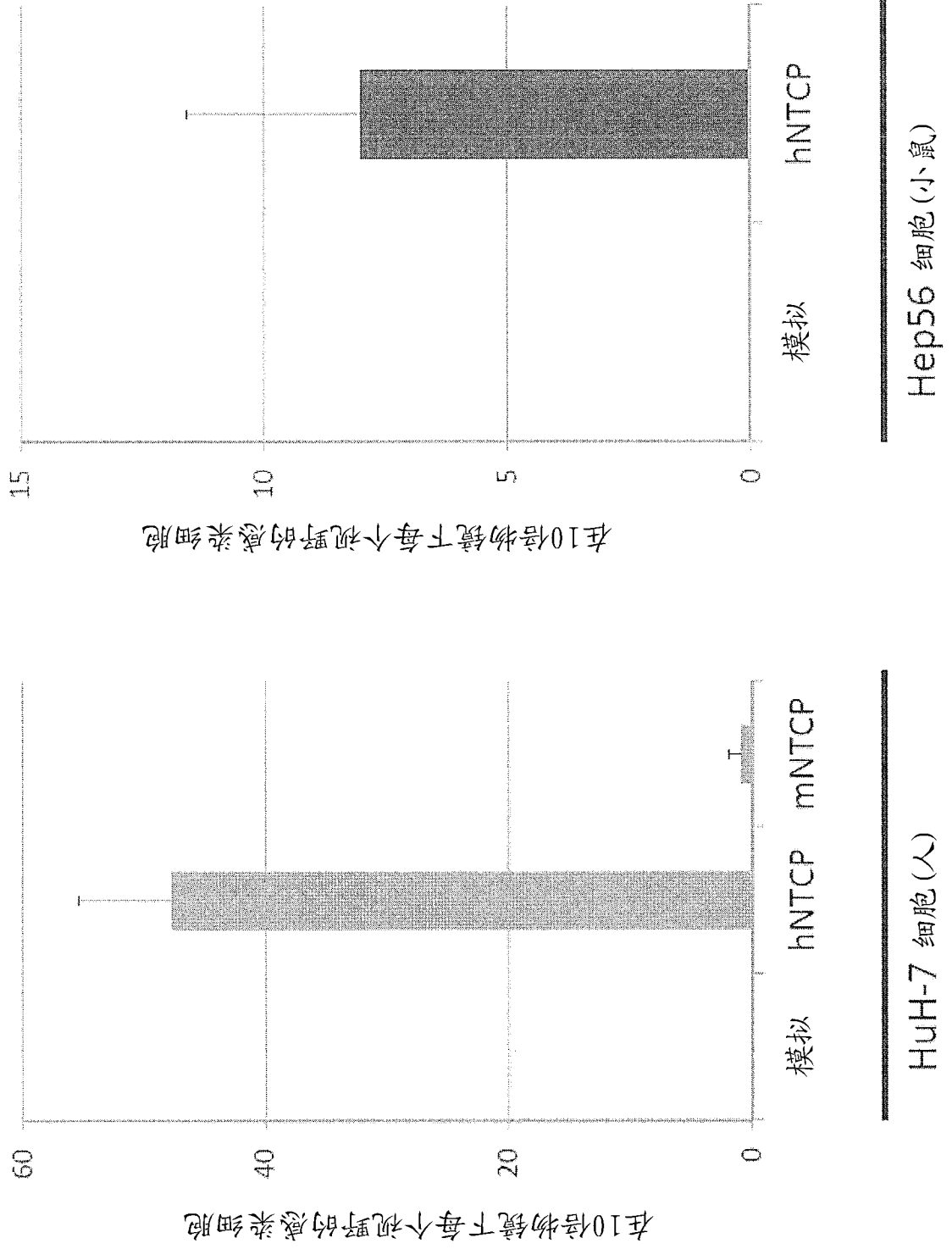


图 6

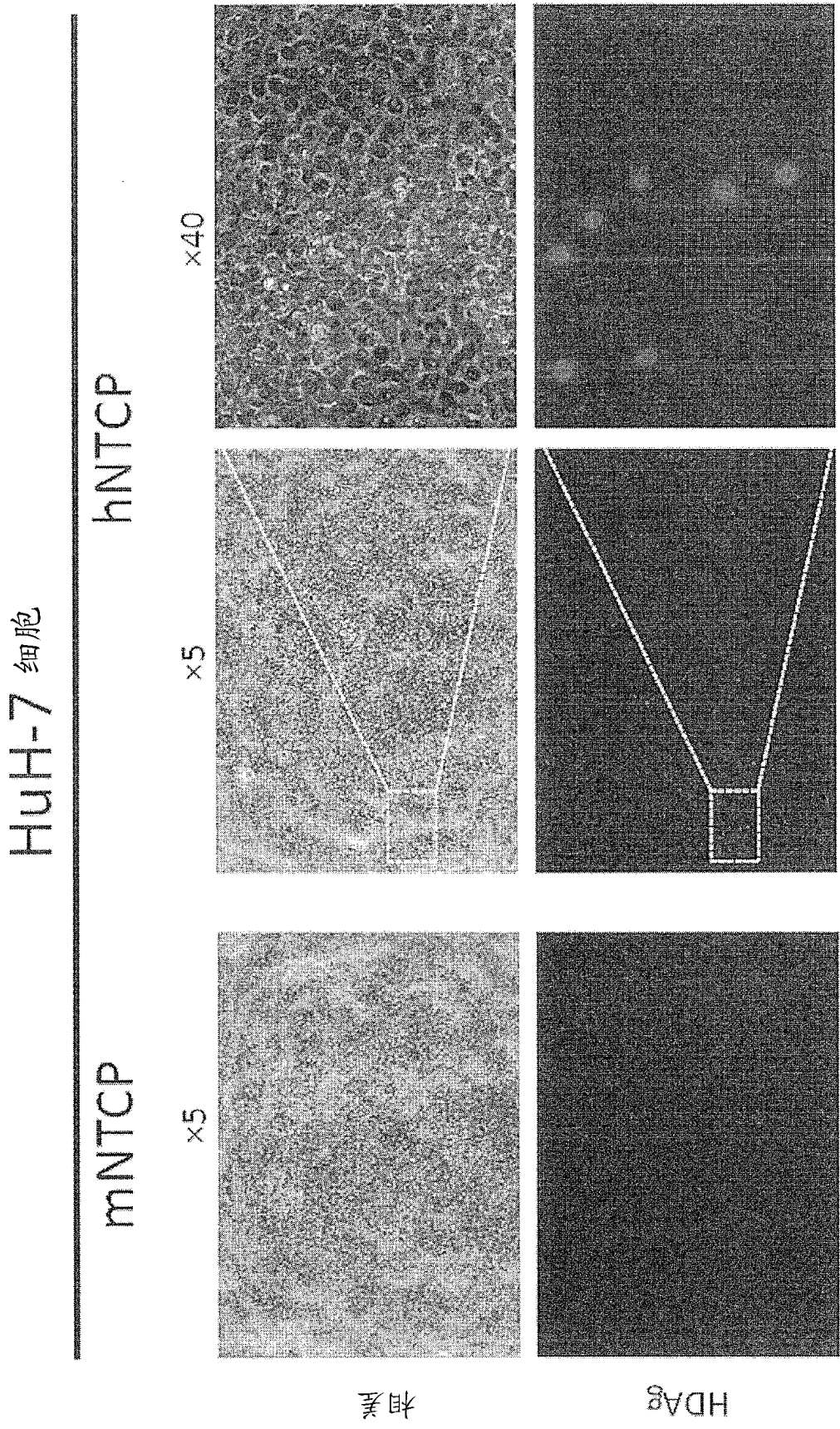
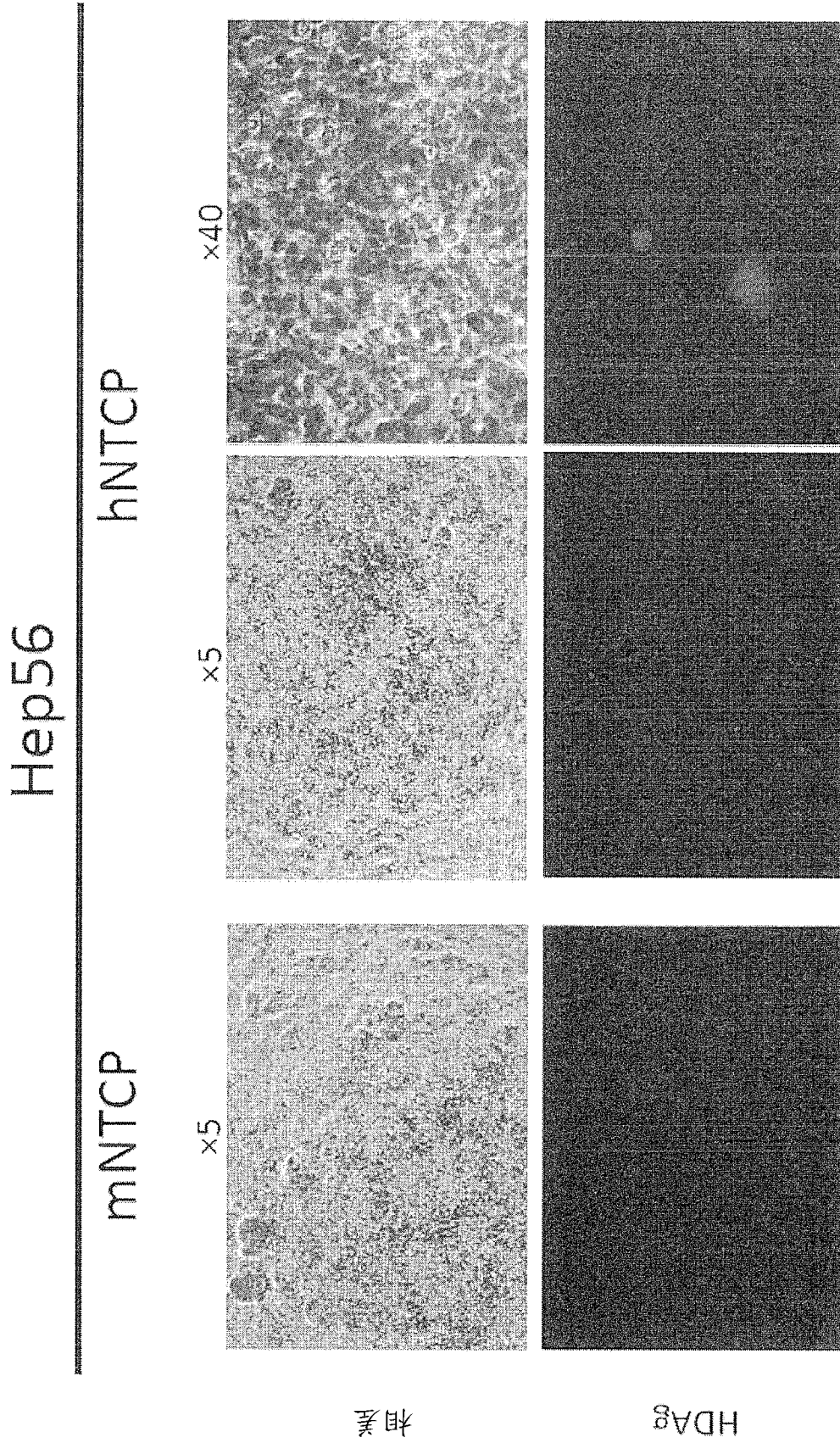


图 7



相差

HDAG

图 8

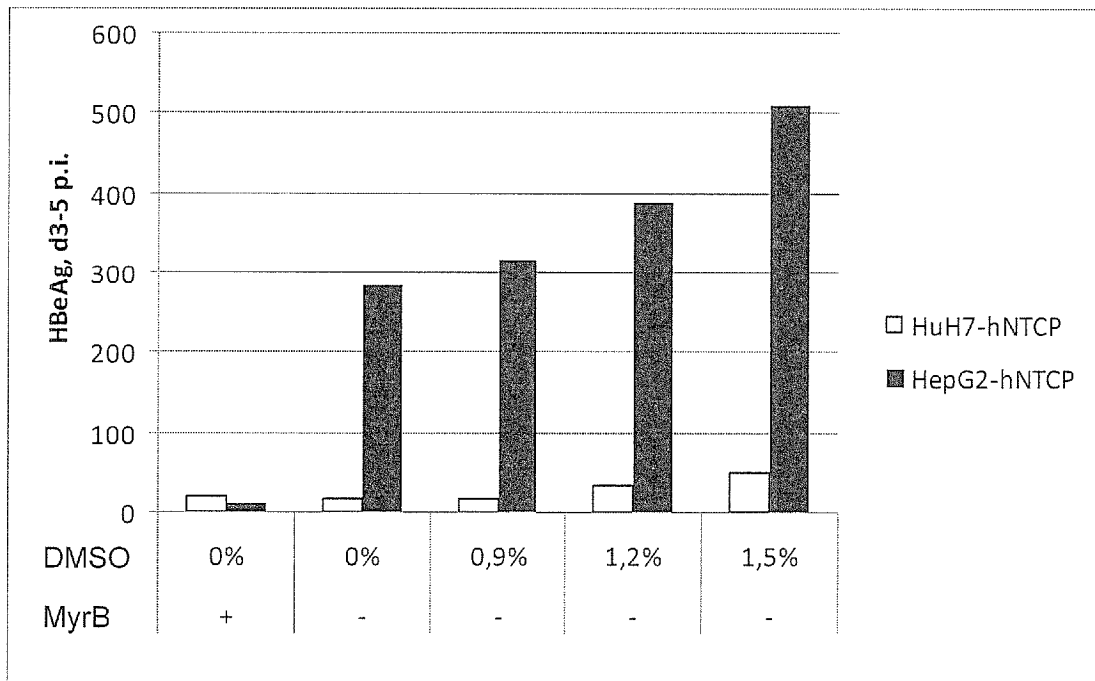


图 9