



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109354623 A

(43)申请公布日 2019.02.19

(21)申请号 201811226868.8

C12N 5/10(2006.01)

(22)申请日 2012.04.25

C12N 15/867(2006.01)

(62)分案原申请数据

A01K 67/027(2006.01)

201280072562.6 2012.04.25

A61K 49/00(2006.01)

(71)申请人 华辉安健(北京)生物科技有限公司

地址 102206 北京市昌平区科技园区生命园路20号院7号楼1层102室

(72)发明人 李文辉 严欢 钟国才 徐广伟

何文辉 隋建华 景志毅 黄屹

(74)专利代理机构 北京睿阳联合知识产权代理

有限公司 11758

代理人 张颖

(51)Int.Cl.

C07K 14/705(2006.01)

C12N 15/12(2006.01)

权利要求书3页 说明书40页

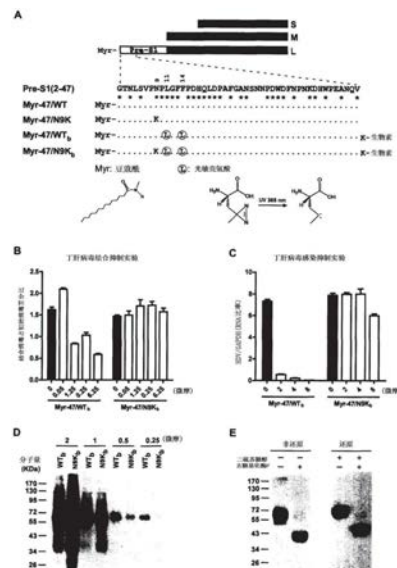
序列表5页 附图17页

(54)发明名称

乙型肝炎病毒功能性受体的组成以及相关应用

(57)摘要

本发明主要涉及了通过调节NTCP的蛋白、多核苷酸的表达和/或功能以及其与病毒的相互作用来治疗或预防哺乳动物的乙型肝炎和/或丁肝病毒感染,以及感染引起的相关疾病的组成和方法。这一发明也提出了通过外源表达SLC10A1基因而获得HBV和/或HDV易感性的细胞系和非人转基因动物模型用于筛选针对病毒感染和相关疾病的候选药物。



1. 乙型肝炎病毒 (HBV) 或丁型肝炎病毒 (HDV) 的功能性受体, 其具有选自如下的氨基酸序列:

- (a) SEQ ID NO:1 所显示的人 NTCP 蛋白的氨基酸序列;
- (b) SEQ ID NO:2 所显示的树鼩 NTCP 蛋白的氨基酸序列;
- (c) SEQ ID NO:3 所显示的黑猩猩 NTCP 蛋白的氨基酸序列; 和

(d) 与上述 (a) - (c) 任一项的氨基酸序列有至少 90% 同一性, 并且具有作为乙型肝炎病毒 (HBV) 或丁型肝炎病毒 (HDV) 的功能性受体的活性的氨基酸序列。

2. 分离的核苷酸, 其编码权利要求 1 所述的乙型肝炎病毒 (HBV) 或丁型肝炎病毒 (HDV) 的功能性受体。

3. 一种易受 HBV 或 HDV 感染的细胞, 所述细胞中外源转入了权利要求 2 所述的核苷酸序列。

4. 根据权利要求 3 所述的易受 HBV 或 HDV 感染的细胞, 所述易受 HBV 或 HDV 感染的细胞在转入权利要求 2 所述的核苷酸序列前是不易受 HBV 或 HDV 感染的细胞。

5. 根据权利要求 4 所述的易受 HBV 或 HDV 感染的细胞, 所述不易受 HBV 或 HDV 感染的细胞选自失去 HBV 或 HDV 感染敏感性的原代人肝细胞或原代树鼩肝细胞或黑猩猩原代肝细胞, 人或树鼩肝癌细胞, 小鼠或大鼠肝细胞。

6. 根据权利要求 4 所述的易受 HBV 或 HDV 感染的细胞, 所述不易受 HBV 或 HDV 感染的细胞为肝癌细胞 Huh-7 或 HepG2。

7. 根据权利要求 3 所述的易受 HBV 或 HDV 感染的细胞, 所述易受 HBV 或 HDV 感染的细胞是外源转入权利要求 2 的分离的核苷酸序列的小鼠或大鼠的肝细胞。

8. 稳定表达权利要求 1 所述的乙型肝炎病毒 (HBV) 或丁型肝炎病毒 (HDV) 的功能性受体的 Huh-7 或 HepG2 细胞系。

9. 人 NTCP 蛋白的突变体, 所述突变体具有 SN105/106AA 和/或 E257A 突变, 或者所述突变体具有 Q68A 和/或 S226A 突变。

10. 权利要求 1 限定的乙型肝炎病毒 (HBV) 或丁型肝炎病毒 (HDV) 的功能性受体的胞外结构域。

11. 权利要求 11 的胞外结构域, 所述胞外结构域选自 NTCP 的 17-27, 73-89, 142-152, 207-217 或 275-278 残基。

12. 载体, 所述载体编码树鼩 NTCP 蛋白或其变体, 或者编码人 NTCP 蛋白或其变体, 或者编码黑猩猩 NTCP 蛋白或其变体。

13. 权利要求 12 的载体在构建 NTCP 基因敲除或基因敲入非人转基因动物模型中的应用。

14. 权利要求 12 的载体在构建乙型肝炎病毒和/或丁型肝炎病毒感染的非人转基因动物模型中的应用。

15. 载体系统, 所述载体系统包含一个能够与人类、黑猩猩或树鼩的 SLC10A1 基因序列同源重组的载体以及一个能够进行人类 NTCP 蛋白、黑猩猩 NTCP 蛋白或树鼩 NTCP 蛋白的外源表达的载体。

16. 权利要求 15 的载体系统在构建 NTCP 基因敲除或基因敲入非人转基因动物模型中的应用。

17. 权利要求15的载体系统在构建乙型肝炎病毒和/或丁型肝炎病毒感染的非人转基因动物模型中的应用。

18. 建立乙型肝炎病毒感染和/或丁型肝炎病毒感染的非人转基因动物模型的方法, 所述方法包括通过转基因技术将受体非人动物的原SLC10A1基因替换为表达外源人类SLC10A1基因、黑猩猩SLC10A1基因或树鼩SLC10A1基因的基因敲入小鼠; 或者所述方法包括首先基因敲除受体非人动物的SLC10A1基因, 然后进一步改造成表达来自人类的SLC10A1基因、或来自树鼩的SLC10A1基因。

19. 权利要求13, 14, 16和17任一项所述的应用, 权利要求18所述的方法, 其中所述的非人动物是小鼠、大鼠、非人灵长类动物、非人哺乳动物。

20. 用于稳定表达hNTCP的HepG2细胞系, 所述细胞系中转染了人NTCP的表达载体。

21. 用于获得稳定表达hNTCP的HepG2细胞系的方法, 所述方法包括如下步骤: (1) 用人NTCP基因表达载体转染HepG2细胞; 以及 (2) 将转染人NTCP基因表达载体的HepG2细胞在含有DMSO的原代肝细胞维持培养基中培养。

22. 根据权利要求21的方法, 所述含有DMSO的原代肝细胞维持培养基由如下成分构成: 5 μ g/ml的转铁蛋白, 10ng/ml的EGF, 3 μ g/ml的胰岛素, 2mM的L-谷氨酰胺, 18 μ g/ml的氢化可的松, 40ng/ml的地塞米松, 5ng/ml的亚硒酸钠, 2%的DMSO, 含有100U/ml青霉素和100 μ g/ml链霉素的Williams E培养基。

23. 用于培养转染人NTCP基因表达载体的HepG2细胞、原代树鼩肝细胞PTH, 原代人肝细胞PHH或原代树鼩成纤维细胞PTF的原代肝细胞维持培养基, 所述培养基含有DMSO。

24. 根据权利要求23的培养基, 所述培养基由如下成分构成:

5 μ g/ml的转铁蛋白, 10ng/ml的EGF, 3 μ g/ml的胰岛素, 2mM的L-谷氨酰胺, 18 μ g/ml的氢化可的松, 40ng/ml的地塞米松, 5ng/ml的亚硒酸钠, 2%的DMSO, 含有100U/ml青霉素和100 μ g/ml链霉素的Williams E培养基。

25. 用于筛选治疗和/或预防HBV和/或HDV感染或感染相关疾病的药物的方法, 所述方法包括使用权利要求3-7任一项限定的细胞, 或权利要求8限定的Huh-7或HepG2细胞系, 或由权利要求18的方法建立的非人转基因动物模型。

26. 权利要求3-7任一项限定的细胞, 或权利要求8限定的Huh-7或HepG2细胞系, 或由权利要求18的方法建立的非人转基因动物模型在筛选治疗和/或预防HBV和/或HDV感染或感染相关疾病的药物中的应用。

27. 用于治疗或预防哺乳动物乙型肝炎病毒和/或丁型肝炎病毒感染以及相关疾病的药物, 所述药物阻止或减少NTCP的蛋白质表达/功能, 或者所述药物阻止或减少NTCP与HBV和/或HDV之间的相互作用。

28. 根据权利要求27所述的药物, 所述药物为选自如下的胆汁酸: 牛黄石胆酸, 胆酸, 鹅脱氧胆酸, 甘氨酸胆酸, 牛磺胆酸, 脱氧胆酸, 石胆酸, 熊脱氧胆酸, 猪脱氧胆酸, 或者这些胆汁酸与牛磺酸或甘氨酸、硫酸或葡萄糖醛酸的缩合产物。

29. 根据权利要求27所述的药物, 所述药物为针对权利要求2限定的分离的核苷酸的19-23个核苷酸的dsRNA, siRNA, RNA干扰的载体或RNA干扰慢病毒。

30. 根据权利要求29所述的药物, 所述siRNA为选自如下的序列:

siRNA-1: 5'-CUAUGUAGGCAUUGUGAUAdTdT-3' (SEQ ID NO:4),

siRNA-2:5'-GUGUUAUCCUGGUGUUAUdTdT-3' (SEQ ID NO:5),
siRNA-3:5'-GGACAUGAAUCUCAGCAUdTdT-3' (SEQ ID NO:6),
siRNA-4:5'-GGGCAAGAGCAUCAUGUUdTdT-3' (SEQ ID NO:7),
siRNA-11:5'-GGGAAAUGGCACCUACAAAdTdT-3' (SEQ ID NO:8),
siRNA-405:5'-CACAAGUGCUGUAGAAUAdTdT-3' (SEQ ID NO:9),
siRNA-406:5'-CUAUAAGGCAUCGUGAUAdTdT-3' (SEQ ID NO:10),
siRNA-pool (4):5'-GGAUCGUCCUCAAUCCAAdTdT-3' (SEQ ID NO:11),
siRNA-pool (5):5'-GGAGUCAGCCGGAACAAdTdT-3' (SEQ ID NO:12),
siRNA-pool (6):5'-GGACAAGGUGCCCUAUAAdTdT-3' (SEQ ID NO:13),
siRNA-pool (7):5'-GGUGCUAUGAGAAUCCAAdTdT-3' (SEQ ID NO:14)。

31. 根据权利要求27所述的药物,所述药物为NTCP蛋白质的突变体,NTCP的片段,NTCP的可溶性多肽。

32. 根据权利要求31所述的药物,所述NTCP蛋白质的突变体具有SN105/106AA和/或E257A突变,或者所述突变体具有Q68A和/或S226A突变。

33. 权利要求11限定的胞外结构域在筛选用于治疗或预防哺乳动物乙型肝炎病毒和/或丁型肝炎病毒感染以及相关疾病的药物中的应用。

34. 根据权利要求33的应用,所述相关疾病为肝癌。

35. 阻止或减少NTCP的蛋白质表达/功能,或者阻止或减少NTCP与HBV和/或HDV之间的相互作用的物质在制备用于治疗或预防哺乳动物乙型肝炎病毒和/或丁型肝炎病毒感染以及相关疾病的药物中的应用。

36. 根据权利要求35的应用,所述相关疾病为肝癌。

37. 根据权利要求35的应用,所述哺乳动物为人,黑猩猩或树鼩。

乙肝肝炎病毒功能性受体的组成以及相关应用

本申请是2012年4月25日提交的中国专利申请号:201280072562.6的分案申请。

技术领域

[0001] 本发明主要涉及了通过调节NTCP的蛋白、多核苷酸的表达和/或功能以及其与病毒的相互作用来治疗或预防哺乳动物的乙肝病毒 (HBV) 和/或丁肝病毒 (HDV) 感染,以及感染引起的相关疾病的组成和方法。

背景技术

[0002] 全球约有两亿人感染过乙肝病毒 (HBV),目前约有三亿五千万人患有慢性乙型肝炎,这些人有较高机率进展为肝硬化、肝衰竭以及肝癌。全球超过半数的原发性肝癌与HBV感染有关。这些患者若同时被HBV的卫星病毒乙肝病毒 (HDV) 感染,会导致更快的病程进展并有更严重的临床症状 (Lavanchy et al., *J Viral Hepat* 11,97 (2004); Hughes et al., *Lancet* 378,73 (2011))。长期以来,病毒入侵的机制仍然不清晰、受体的分子本质也不清楚。HBV是一种包膜病毒,其基因组由一3.2kb的不完全双链环状DNA构成,含有四个相互重叠的读码框。HBV的外膜蛋白由小 (S)、中 (M)、大 (L) 三种多次跨膜的外膜蛋白组成,它们都含有S结构域,因而拥有共同的C端序列但N端起始的位置不同。(图1A) (Seeger et al., in *Field's Virology*, D.M.Knipe, P.M.Howley, Eds. (Lippincott, Williams, and Wilkins, Philadelphia, 2007), vol.2, pp.2977; Heermann et al., *J Virol* 52,396 (1984))。HDV是HBV的卫星病毒,其基因组为一单链RNA。HDV利用HBV的三种外膜蛋白进行包装,因此其生活史依赖于HBV的增殖。HDV是研究HBV入侵过程的常用工具,因为其早期入侵过程,特别是受体结合过程被认为与HBV是极其相似的 (Hughes et al., *Lancet* 378,73 (2011); Sureau, *Curr Top Microbiol Immunol* 307,113 (2006); Barrera et al., *J Virol* 78,5233 (2004))。L蛋白与S蛋白的完整性对于HBV、HDV的感染非常重要。其中L蛋白的preS1结构域一直被认为是与肝细胞表面特异性受体的关键区域 (Seyec et al., *J Virol* 73,2052 (1999); Blanchet&Sureau, *J Virol* 81,5841 (2007); Duff et al., *J Virol* 83,12443 (2009); Chouteau et al., *J Virol* 75,11565 (2001))。过去曾有许多蛋白被报道可以与preS1结合,然而这些蛋白没有一个在后续的实验中被认为是与病毒的感染过程中是必须的 (Glebe&Urban, *World J Gastroenterol* 13,22 (2007))。因此,目前仍然有必要开发有效的方法用于治疗 and 预防HBV和/或HDV感染以及相关疾病,同时我们也需要开发体外细胞感染系统和转基因动物模型用于筛选可以治疗与预防HBV和/或HDV的药物。

发明内容

[0003] 我们发现肝脏特异性表达的多次跨膜蛋白钠离子/牛磺胆酸共转运多肽 (NTCP) 可以与HBV和HDV通过L蛋白相互作用,是这两种病毒共同的功能性受体。基于这一发现,本发明涉及通过调节NTCP蛋白、多核苷酸的表达和/或功能以及其与病毒的相互作用来治疗或预防哺乳动物的乙肝病毒和/或丁肝病毒感染,以及感染引起的相关疾病的组合物和方法。

[0004] 从一方面来说,该发明提供了用于治疗或预防哺乳动物乙肝病毒/或丁肝病毒感染,以及所述感染的相关疾病的方法。所述方法包括对需要预防与治疗的哺乳动物使用有效量的药物来防止或降低NTCP的表达和/或功能,或防止或降低HBV和/或HDV与NTCP之间的相互作用。

[0005] 上述的哺乳动物可以是人类、黑猩猩、树鼩或其它动物,如表达人类、黑猩猩、树鼩NTCP的小鼠或大鼠。在一些实施方案中,这些动物还包括移植了人类、黑猩猩、树鼩原代肝细胞的动物。在一些实施方案中,这些方法可以用于治疗乙型肝炎病毒和/或丁型肝炎病毒的感染。在一些实施方案中,这些方法可以用于预防乙型肝炎病毒和/或丁型肝炎病毒的感染。在一些实施方案中,这些方法可以同时用于预防与治疗乙型肝炎病毒和/或丁型肝炎病毒的感染。这些分子不包括基于HBV的L蛋白的N端2-48残基的多肽或针对这一多肽的抗体。

[0006] 这些试剂可以是阻止或减少NTCP的表达和/或功能的试剂。在一些实施方案中,可以是靶向编码NTCP的基因的siRNA,包括针对树鼩SLC10A1的基于siRNA-1和siRNA4序列的siRNA,以及针对人SLC10A1的基于siRNA-11, siRNA-405, siRNA-406, siRNA-pool (4), siRNA-pool (5), siRNA-pool (6), siRNA-pool (7) 的序列的siRNA,以及靶向编码NTCP的基因的反义RNA。在一些实施方案中,这些试剂可以是一些抑制或修饰控制NTCP转录的核转录因子的分子。例如pan-RAR的激动剂TTNPB,全反式维甲酸(ATRA),9-顺式维甲酸(9CRA),等等。在一些实施方案中,这些分子可以是一些抑制或修饰组蛋白或基因组DNA修饰而调控NTCP表达的分子。如DNA甲基化抑制剂,包括胞嘧啶核苷酸类似物如5-azacytidine,5-aza-2'-deoxycytidine (5-azadC);MG98(一种反义的寡聚DNA针对DNA甲基化酶-1的mRNA的3'未翻译区);组蛋白去乙酰化酶抑制剂(HDAC抑制剂,HDI)如vorinostat(suberoylanilide hydroxamic acid,SAHA)和mocetinostat(MGCD0103)都在发明可能的应用之中。在一些实施方案中,这些分子也可以是能够抑制NTCP磷酸化和/或糖基化的分子,如Tunicamycin可以抑制所有的蛋白的N-糖基化过程,以及PI3K抑制剂如LY294002和wortmannin等。

[0007] 这一试剂可以是能够阻止或降低相关哺乳动物中HBV/HDV与NTCP的相互作用的分子。例如,某种特异性针对NTCP的抗体,通过特异性结合NTCP上负责结合乙型肝炎病毒和/或丁型肝炎病毒的某个区域发挥作用,例如一些胞外的结构域。在一些实施方案中,这胞外结构域可以是NTCP的17-27,73-89,142-152,207-217或275-278残基。在一些实施方案中,这些分子可以是NTCP的变体形式,如NTCP的突变体、NTCP的片断、NTCP的可溶性多肽。在一些实施方案中,这些片断来源于NTCP的膜外区域。在一些实施方案中,NTCP的突变体不支持乙型肝炎病毒和/或丁型肝炎病毒的感染但仍然有转运能力,如小鼠、大鼠的NTCP。在一些实施方案中,这些分子可以是NTCP的底物或其衍生物或类似物。在一些实施方案中,这些底物含有胆酸类分子的骨架,如牛磺石胆酸、石胆酸、鹅脱氧胆酸、甘氨酸胆酸、牛磺胆酸、脱氧胆酸、石胆酸、熊脱氧胆酸和猪脱氧胆酸。

[0008] 该方法包括进一步与此试剂一起施用药学上可接受的载体以及赋形剂。在一些实施方案中,这些试剂可以通过口服、经鼻、吸入、母婴传播、静脉注射、腹膜、皮下注射、肌肉注射、真皮下注射、局部、或直肠给药。在一些实施方案中,其中所述试剂施用到哺乳动物的肝脏中。在一些实施方案中,这些分子可以与一些用于防治乙型肝炎病毒和/或丁型肝炎病毒感染药物共同施用,这些药物可以是干扰素 α ,核苷酸类似物,非核苷酸类抗病毒药物以及非干扰素 α 类免疫增强性。在一些实施方案中,所述药物选自干扰素 α

(InterferonAlpha), 聚乙二醇干扰素 (Pegylated Interferon), 拉米夫定 (Lamivudine), 替比夫定 (Telbivudine), 阿德福韦 (Adefovir), 恩替卡韦 (Entecavir), 替诺福韦 (Tenofovir), 克拉夫定 (Clevudine), 恩曲他滨 (Emtricitabine), MIV-210, 氨多索韦 (Amdoxovir), NOV-205 (BAM205), LB80380 (ANA380), Myrcludex B, Bay41-4109, REP9AC, 硝唑尼特 (Nitazoxanide), 和胸腺素 α -1 (Thymosin alpha-1)。在一些实施方案中, 所述药物是 Myrcludex B。

[0009] 在另一方面, 本发明提供的试剂可以作为一些药物组合物用于治疗或预防哺乳动物的乙型肝炎病毒和/或丁型肝炎病毒感染以及相关疾病, 其药物组成合物中含有可以用于抑制或减少 NTCP 在该哺乳动物中的合成, 或阻断或减少哺乳动物中 NTCP 与 HBV 和/或 HDV 的相互作用的有效量的试剂, 或含有药学上可接受的药物载体以及赋形剂。

[0010] 在另一方面, 本发明提供的人类 NTCP 突变体可以含有 SN105/106AA 和/或 E257A 或其中的单独形式。在一些实施方案中, 人类 NTCP 突变体还可以含有 Q68A 和/或 S226。此外还有特异性结合突变体人类 NTCP 而不识别野生型人类 NTCP 的抗体。以及包含一段多核苷酸序列编码所述的突变体人类 NTCP 的序列的载体。此外还包括含有该载体的细胞和非人转基因动物。

[0011] 在另一方面, 本发明涉及抑制人的 NTCP 表达的双链 RNA 分子 (dsRNA) 的其中一条链与人的 SLC10A1 基因至少有 19 个核苷酸完全相同, 而另一条链则大部份与该链互补。dsRNA 的第一条链针对人的 SLC10A1 基因的 87-105, 652-670, 1136-1154。在一些实施方案中, dsRNA 可以由一段多聚核苷酸编码, 由此多聚核苷酸转录的第一链与第二链可以自身互补形成发卡结构。此外, 提供的可以是与人的 SLC10A1 基因的 mRNA 有至少 10 个的连续核苷酸序列互补的一条寡聚核苷酸序列, 此寡聚核苷酸序列可以来源于人的 SLC10A1 的 cDNA 的 87-105, 652-670, 1136-1154。

[0012] 在另一方面, 本发明提供了来源于树鼩 NTCP 或其突变体的一段孤立的多肽; 特异性结合树鼩 NTCP 或其变体的孤立的抗体或其抗原结合片断; 编码树鼩 NTCP 蛋白或其突变体的孤立的多聚核苷酸; 含有可以编码树鼩 NTCP 蛋白或其变体的该序列的载体, 或含有该载体的细胞或非人转基因动物。

[0013] 在另一方面, 本发明提供的抑制树鼩的 NTCP 表达的双链 RNA 分子 (dsRNA) 的其中一条链与树鼩的 SLC10A1 基因至少有 19 个核苷酸完全相同, 而另一条链则大部份与该链互补。dsRNA 的第一条链针对树鼩的 SLC10A1 基因的 83-101, 342-360, 456-483, 或 630-648。在一些实施方案中, dsRNA 可以由一段多聚核苷酸编码, 由此多聚核苷酸转录的第一链与第二链由此多聚核苷酸序列转录并自身互补形成发卡结构。此外, 提供的可以是与人的 SLC10A1 基因的 mRNA 有至少 10 个的连续核苷酸序列互补的一条寡聚核苷酸序列, 此寡聚核苷酸序列可以来源于树鼩的 SLC10A1 的 cDNA 的 83-101, 342-360, 456-483, 或 630-648。

[0014] 在另一方面, 本发明提供了含有可以编码合成人、树鼩、黑猩猩、小鼠、大鼠或其它哺乳动物的 NTCP 的多核苷酸序列的载体, 这些 NTCP 蛋白的 C 端含有 EGFP 或 C9 的标签。此外还提供了含有这些蛋白的载体的细胞或非人转基因动物。

[0015] 在另一方面, 本发明提供了整合含有外源表达 NTCP 的多核苷酸序列的非敏感的肝癌细胞株。在一些实施方案中, 这些细胞可以被乙型肝炎病毒和/或丁型肝炎病毒感染或结合。在一些实施方案中, 这些非易感染的肝癌细胞系是 Huh7 或 HepG2。

[0016] 本发明还涉及了使用这类细胞株来筛选候选药物治疗和/或预防乙型肝炎病毒和/或丁型肝炎病毒感染或感染相关的疾病。在一些实施方案中,这些候选药物可以是小分子化合物,包含突变体和/或野生型的NTCP的片断的多肽文库,特异性结合NTCP的抗体,针对NTCP的siRNAs或反义RNA,NTCP底物或NTCP底物的衍生物或类似物。在一些实施方案中,抗体结合到NTCP的胞外结构域。在一些实施方案中,这些抗体是单克隆抗体。还包括通过以上方法筛选出的候选药物。

[0017] 在另一方面,本发明涉及到在失去了易感性的原代肝细胞中转入可以外源表达NTCP的多核苷酸序列。在一些实施方案中,这些肝细胞可以被乙型肝炎病毒和/或丁型肝炎病毒感染或结合。在一些实施方案中,这种去了易感性的原代肝细胞是原代人肝细胞或原代树鼩肝细胞。

[0018] 本发明还涉及了应用这类细胞株来筛选治疗和/或预防乙型肝炎病毒和/或丁型肝炎病毒感染或疾病相关的感染的候选药物。在一些实施方案中,这些候选药物可以是小分子化合物,包含突变体和/或野生型的NTCP的片断的多肽文库,特异性结合NTCP的抗体,针对NTCP的siRNAs或反义RNA,NTCP底物或NTCP底物的衍生物或类似物。在一些实施方案中,抗体结合到NTCP的胞外结构域。在一些实施方案中,这些抗体是单克隆抗体。还包括通过以上方法筛选出的候选药物。

[0019] 在另一方面,本发明提供了可以构建NTCP的敲除/敲入的非人类转基因动物模型的载体系统,包含一个可以实现在SLC10A1位点进行同源重组的载体以及一个可以进行NTCP蛋白的外源表达载体。同时还提供了使用这个载体系统建立乙型肝炎病毒和/或丁型肝炎病毒感染的动物模型的方法,例如使用Zinc-finger和TALEN核酸酶的技术。此处涉及的主要是非人类转基因动物,如此方法构建的乙型肝炎病毒和/或丁型肝炎病毒敏感的小鼠或大鼠模型。

[0020] 在另一方面,本发明提供了乙型肝炎病毒和/或丁型肝炎病毒感染或相关疾病的非人类转基因动物,如小鼠或大鼠,这些动物含有可以外源表达NTCP及其变体的多核苷酸序列。在一些实施方案中,这些转基因动物可以被乙型肝炎病毒和/或丁型肝炎病毒感染或结合。这些外源的NTCP主要来源于人、黑猩猩或树鼩。

[0021] 本发明也提供了一个用所述动物模型筛选治疗和/或预防乙型肝炎病毒和/或丁型肝炎病毒感染或相关疾病的候选药物的应用。在一些实施方案中,这些候选药物可以是小分子化合物,包含突变体和/或野生型的NTCP的片断的多肽库,特异性结合NTCP的抗体,针对NTCP的siRNAs或反义RNA,NTCP底物或NTCP底物的衍生物或类似物。在一些实施方案中,抗体结合到NTCP的胞外结构域。在一些实施方案中,这些抗体是单克隆抗体。还包括通过以上方法筛选出的候选药物。

[0022] 在另一方面,本发明涉及了在某种哺乳动物中通过使用有效量的药剂来提高该哺乳动物中NTCP的表达和/或功能来治疗乙型肝炎病毒和/或丁型肝炎病毒的感染及其相关疾病的方法。这一方法也涉及了用于在该哺乳动物中治疗乙型肝炎病毒和/或丁型肝炎病毒的感染及其相关疾病的药物组合,包括提供有效量的该分子以及药学上可接受的药物载体以及赋形剂。在一些实施方案中,这些乙型肝炎病毒和/或丁型肝炎病毒的感染所引起的相关疾病为肝硬化和/或肝癌。

[0023] 这一试剂可以是一种蛋白。在一些实施方案中,该蛋白可以是小鼠或大鼠的NTCP

蛋白。在一些实施方案中,这一蛋白是一种NTCP的变体。在一些实施方案中,这些NTCP突变体不支持乙型肝炎病毒和/或丁型肝炎病毒的感染但具有有效的转运功能。在一些实施方案中,NTCP的变体形式包括一些细胞外区域的突变。在一些实施方案中,NTCP的变体形式可以含有Q68A的突变。

[0024] 这一有效分子可以是一种多核苷酸。在一些实施方案中,这种多核苷酸可以是DNA分子。在一些实施方案中,这些DNA分子编码小鼠或大鼠的NTCP蛋白。在一些实施方案中,DNA编码NTCP的变体形式。在一些实施方案中,这些NTCP突变体不支持乙型肝炎病毒和/或丁型肝炎病毒的感染但具有有效的转运功能。在一些实施方案中,NTCP的突变体形式包括一些细胞外区域的突变。在一些实施方案中,NTCP可以含有Q68A的突变。在一些实施方案中,DNA的载体可以是病毒载体。在一些实施方案中,该病毒载体可以是腺相关病毒8(AAV8)。在一些实施方案中,可以用非病毒载体腺把DNA也可以送到病变的肝脏。在一些实施方案中,这种非病毒载体是一种脂质体。

[0025] 在另一方面,本发明提供了诊断、预后或治疗监测乙型肝炎病毒和/或丁型肝炎病毒感染或相关疾病的方法。包括评价正经历乙型肝炎病毒和/或丁型肝炎病毒感染以及相关疾病或正接受相关疾病治疗的病人的NTCP的水平和功能。在一些实施方案中,也可以通过NTCP多肽蛋白的水平 and/或编码NTCP多肽蛋白的多核苷酸进行评估。本发明还提供了乙型肝炎病毒和/或丁型肝炎病毒感染或有关疾病的相关联的诊断项目,包括在乙型肝炎病毒和/或丁型肝炎病毒感染以及相关疾病的患者中确定NTCP基因状态。在一些实施方案中,这些乙型肝炎病毒和/或丁型肝炎病毒的感染所引起的相关疾病为肝硬化和/或肝癌。

[0026] 在另一方面,本发明提供了筛选治疗和/或预防乙肝病毒和/或丁肝病毒感染的候选药物的筛选系统。包括:a) 乙肝病毒L蛋白的替代品;b) 稳定表达可以与乙肝病毒和/或丁肝病毒相互作用的哺乳动物NTCP的肝细胞株;c) 细胞培养成分;d) 检测试剂。在一些实施方案中,乙肝病毒L蛋白的代理病毒是用乙型肝炎病毒包膜蛋白的外膜包装的丁肝病毒或绒毛猴肝炎病毒(WMHV)。在一些实施方案中,检测试剂是丁肝病毒抗体或WMHV的抗体。在一些实施方案中,检测丁肝病毒抗体是丁肝病毒delta抗原的单克隆抗体4G5。

[0027] 本发明也涉及了用此筛选系统筛选治疗和/或预防乙肝病毒和/或丁肝病毒感染的候选药物。还包括通过该系统所找到的候选药物。

[0028] 在另一方面,本发明提供了使用有效量的分子通过阻止或降低哺乳动物NTCP的表达或的功能,或阻断或减少哺乳动物NTCP与乙肝病毒和/或丁肝病毒之间的相互作用,用于治疗 and/或预防乙型肝炎病毒和/或丁肝病毒感染或感染相关的疾病的应用。

[0029] 接受治疗的哺乳动物可能是一个人类、黑猩猩或树鼩,或者表达人类、黑猩猩或树鼩NTCP的其他哺乳动物。在一些实施方案中,这些动物还包括移植了人类、黑猩猩、树鼩原代肝细胞的动物。在一些实施方案中,这些方法可以用于治疗乙型肝炎病毒和/或丁型肝炎病毒的感染。在一些实施方案中,这些方法可以用于预防乙型肝炎病毒和/或丁型肝炎病毒的感染。在一些实施方案中,这些方法可以同时用于预防与治疗乙型肝炎病毒和/或丁型肝炎病毒的感染。这些分子不包括基于HBV的L蛋白的N端2-48残基的多肽或针对这一多肽的抗体。

[0030] 这些分子可以是能降低NTCP的合成或抑制NTCP的功能的分子。在一些实施方案中,可以是降低NTCP表达量的siRNA,包括针对树鼩SLC10A1的基于siRNA-1和siRNA4序列的

siRNA,以及针对人SLC10A1的基于siRNA-11,siRNA-405,siRNA-406,siRNA-pool (4),siRNA-pool (5),siRNA-pool (6),siRNA-pool (7)的序列的siRNA,以及针对NTCP的反义RNA。在一些实施方案中,这些分子可以是一些抑制或修饰控制NTCP转录的核转录因子的分子。在一些实施方案中,这些分子可以是一些抑制或修饰组蛋白或基因组DNA修饰而调控NTCP表达的分子。在一些实施方案中,这些分子也可以是能够抑制NTCP磷酸化和/或糖基化的分子。在一些实施方案中,这些分子可以是PI3K抑制剂,如LY294002和wortmannin等。

[0031] 所使用的分子可以阻断或抑制哺乳动物NTCP和乙肝病毒和/或丁肝病毒之间的相互作用。在一些实施方案中,某种特异性针对NTCP的抗体,通过特异性结合NTCP上负责结合乙型肝炎病毒和/或丁型肝炎病毒的某个区域发挥作用,例如一些胞外的结构域。在一些实施方案中,这胞外结构域可以是NTCP的17-27,73-89,142-152,207-217或275-278残基。在一些实施方案中,这些分子可以是NTCP的变体形式,如NTCP的突变体、NTCP的片断、NTCP的可溶性多肽。在一些实施方案中,这些片断来源于NTCP的膜外区域。在一些实施方案中,NTCP的突变体不支持乙型肝炎病毒和/或丁型肝炎病毒的感染但仍然有有效的转运能力,如小鼠、大鼠的NTCP。在一些实施方案中,这些分子可以是NTCP的底物或其衍生物或类似物。在一些实施方案中,这些底物含有胆酸类分子的骨架,如牛磺石胆酸、石胆酸、鹅脱氧胆酸、甘氨酸胆酸、牛磺胆酸、脱氧胆酸、石胆酸、熊脱氧胆酸和猪脱氧胆酸。在一些实施方案中,基因型识别可以使用一个估计算法,其中基因组单体型图可以用于此估计算法。

[0032] 进一步可使用的包括施用药学上可接受的载体或赋形剂的配合剂。在一些实施方案中,所述试剂是通过口服,经鼻,吸入,母婴传播,静脉内,腹膜内,皮下,肌内,皮内,局部或直肠途径给药。在一些实施方案中,所述试剂施用到哺乳动物的肝脏。在一些实施方案中,所述试剂的给药同时与其它疗和/或预防HBV和/或HDV感染的药物配合使用,其中所述药物选自干扰素,核苷类似物,非核苷类抗病毒药和组成的组中非干扰素的免疫增强剂。在一些实施方案中,所述药物选自干扰素 α (Interferon Alpha),聚乙二醇干扰素 (Pegylated Interferon),拉米夫定 (Lamivudine),替比夫定 (Telbivudine),阿德福韦 (Adefovir),恩替卡韦 (Entecavir),替诺福韦 (Tenofovir),克拉夫定 (Clevudine),恩曲他滨 (Emtricitabine),MIV-210,氨多索韦 (Amdoxovir),NOV-205 (BAM205),LB80380 (ANA380),Myrcludex B,Bay41-4109,REP9AC,硝唑尼特 (Nitazoxanide),和胸腺素 α -1 (Thymosin alpha-1)。在一些实施方案中,所述药物是Myrcludex B。感染引起的相关疾病的组成和方法。

附图说明

[0033] 图1显示了用光敏多肽Myr-47/WTb寻找原代树鼯肝细胞 (PTBs) 上结合preS1的分子。(A) HBV包膜蛋白和preS1结构域的N末端肽的示意图。preS1 (2-47): 乙肝病毒的L蛋白 (S472株,C型)的preS1域2-47残基。残基编号是基于D型HBV。(B) Myr-47/WTb剂量依赖性地抑制HDV病毒结合。PTBs预先用多肽处理,然后接种HDV,结合的病毒粒子通过RT-PCR定量。结果显示为总输入病毒基因组拷贝的百分比。显示的代表性的结果 (n=3-6)。(C) Myr-47/WTb而非Myr-47/N9Kb诱饵多肽可以抑制HDV感染。第6天感染 (DPI) 后,通过实时定量RT-PCR检测来测量病毒RNA的量。数据表示为病毒RNA拷贝数与GAPDH的比率。(D) 平板中培养与Myr-47/WTb (WTb),或Myr-47/N9Kb (N9Kb) PTBs进行了光交联,细胞裂解后,然后用

Streptavidin DynalT1磁珠沉淀,通过SDS-PAGE和用单克隆抗体2D3进行Western blot分析。(五)经过上述处理的250nMWTb肽交联的样品的分析结果在图D中显示。

[0034] 图2显示了从不同哺乳动物物种NTCP的蛋白质的序列比对。

[0035] 图3显示了人,树鼩,大鼠和小鼠的NTCP的蛋白质的氨基酸序列。还显示了人和树鼩NTCP的蛋白质和在C-末端EGFP标记。

[0036] 图4显示了光敏诱饵多肽抑制HDV结合和HBV感染的活性。(A)用HBV包膜蛋白包装的HDV病毒的制备并验证其与原代树鼩肝细胞(PTHs)的特异性结合与感染。左图:HDV与PTH的结合是L蛋白依赖性的。LS,LMS,MS和S包膜蛋白包装的HDV病毒粒子分别与PTH在16°C下孵育4小时,然后用冷PBS充分洗涤5次。细胞结合的病毒粒子用实时RT-PCR方法定量,GAPDH作为内参并用其对总输入病毒基因组拷贝数进行标化。来自三个独立实验的代表性结果以Means \pm S.D表示。中间和右边图所示:HDV病毒颗粒选择性地与PTH的结合而不是其他的细胞系进行结合。其结合实验的方法与左图类似。Myr-47/WT多肽竞争与HDV到PTHs以剂量依赖的方式结合。(B)关键的N端残基的L蛋白的preS1区域内的改变对HDV结合PTHs的影响。野生型(WT)和突变型HDV病毒粒子携带HBV包膜蛋白L和S。WT HDV含有野生型L蛋白,突变体HDV在L蛋白的preS1区标示的位点带有点突变。病毒结合实验的方法与A图中所用的方法类似。第9位,第11和第14至赖氨酸的突变降低HDV结合,而对F14L突变的耐受性良好。(C)光敏感诱饵肽Myr-47/WTb而不是对照肽Myr-47/N9Kb抑制HBV感染。肽在指定浓度与IX107拷贝的基因组当量的HBV病毒进行混合,然后与 1×10^5 PTHs在37°C下感染16小时,然后用PBS洗涤培养,每2天换一次培养基。感染后第6天用商业ELISA试剂盒测定分泌的病毒抗原HBsAg和HBeAg。感染的抑制程度用未处理的对照组进行标化,并表示为抑制率的百分比。

[0037] 图5显示了小鼠单克隆抗体2D3的目标残基为preS1的19-33位的残基。(A)多肽序列比对。preS1(-11-47):乙肝病毒(菌株S472)的preS1结构域的前58个氨基酸,氨基酸是根据D基因型的HBV的L蛋白进行编号;NC36与钥孔血蓝蛋白(KLH)结合作为免疫原肽免疫小鼠产生2D3;并合成了SP15,SD15,LA5,LD15和FG15肽用于2D3表位的确定。(B)确定2D3表位的肽竞争试验。2D3用protein G琼脂糖珠纯化。100 μ l的1微克/毫升的2D3加入到用100 μ l的5 μ g/ml的preS1(119)-His蛋白包被的96孔中。该多肽对应于乙肝S472的preS1的L蛋白的N末端119个氨基酸。preS1(119)-His是在大肠杆菌中产生,并以Ni+磁珠进行纯化。在指定浓度的竞争肽(SP15,SD15,LA15,LD15和FG15)的存在下通过ELISA测定2D3结合preS1(119)-His的活性。包含preS1的19-33残基的LD15肽残基剂量依赖性抑制2D3结合,说明2D3识别到这一区域内的表位。

[0038] 图6显示Western印迹分析与WTb的交联的分子。(A)200nM的非光敏感性Myr-47/WT肽(WT),而不是其N9K突变体与WTb诱饵多肽竞争与PTH细胞的交联。(B)PTH的培养时间延长后目标蛋白的丰度降低了。在PTHs贴壁于胶原包被的3.5厘米细胞培养板后1-6天,分别用200nM的WTb交联多肽进行分析。(C)WTb与原代肝细胞从人类(PHHs)交联。PHH细胞交联前一日接种于胶原蛋白包被的3.5厘米细胞培养板。200nM的WTb而非N9Kb交联到分子量约-39kDa的去糖基化的糖蛋白,非光敏感性的Myr-47/WT肽可以阻断WTb交联其靶蛋白。对于所有这三个图中,交联样品首先由Streptavidin T1磁珠进行沉淀,接着用PNGase处理,通过SDS-PAGE在还原条件下分离,并通过使用2D3抗体进行Western印迹分析。

[0039] 图7显示的靶蛋白的质谱分析。(A)中的PTH细胞与200nM的WTb或N9Kb诱饵肽进行

光交联,裂解后在1XRIPA缓冲液中陆续通过Streptavidin T1磁珠,2D3结合的磁珠,并Streptavidin T1磁珠进行纯化。每步纯化之前beads都经过充分的洗涤。在Streptavidin T1磁珠最后一步沉淀之前,样品分别如图示的分别用或不用PNGseF进行处理。最终纯化的样品进行SDS-PAGE和银染。框中区域表示切取进行质谱分析的条带。M:蛋白质分子量标记物。(B) 预测的树鼩NTCP (tsNTCP) 的蛋白质序列。蛋白质序列是从深度测序产生的树鼩肝细胞的转录组,并从两只树鼩的两个独立样本克隆了SLC10A1基因并通过测序证实了此序列。tsNTCP中所特有的一段25个氨基酸的插入序列用下划线标注了出来。在LC-MS/MS分析中鉴定到的tsNTCP两个肽段用绿色标注。(C) 显示了代表的MS/MS质谱与命中的多肽的具体参数。

[0040] 图8显示了通过树鼩肝细胞的Illumina深度测序的蛋白质组数据库中确定的PTH的转录组数据库。(A) 通过Illumina深度测序生成树鼩肝细胞的转录组和PTH蛋白质序列数据库的生物信息学工作流程。(B) 树鼩肝细胞蛋白质组数据库的输出的统计学分析。(C) 树鼩肝细胞蛋白质组数据库的形式。以FASTA文件中树鼩蛋白质序列第一个蛋白甘油三磷酸脱氢酶(GAPDH)为例子。树鼩肝细胞蛋白质组数据库中91479序列中保存在FASTA文件中作为补充的数据库。在FASTA序列标题行显示关于这些序列的产生过程和其同源分子的功能注释信息。(D) 饼图表示在树鼩和人原代肝细胞中表达的基因。跟据原代树鼩肝细胞和Hart等(Drug Metab Dispos 38,988 (Jun,2010))人报道的人原代肝细胞的转录信息和蛋白信息的注释,我们用Panther方法(Mi et al,Nucleic Acids Res 33,D284 (Jan 1,2005))来确定根据生物功能分布蛋白质序列的基因本体论信息(GO)。本研究中所生成的树鼩肝细胞蛋白质组数据库中显示了大部分的人类肝细胞蛋白质类型。

[0041] 图9显示NTCP的与preS1的N末端多肽和HDV病毒体结合。(A) 同样如在图1D-E中的方法类似,用200nm的Myr-47/WTb与转染了hNTCP,tsNTCP,tsNTCP-EGFP(tsNTCP融合的C-末端EGFP)的质粒或载体对照组质粒24小时后的293T细胞相进行交联。以多肽与PTHs交联的样品为阳性对照。(B) 转染了tsNTCP-EGFP或hSDC2-EGFP(编码人硫酸乙酰肝素蛋白聚糖核心蛋白,并在C末端融合EGFP蛋白(Syndecan-2))的293T细胞都分别与200nmWTb或N9Kb在非存在或不存在无光反应性Myr-47/WT竞争多肽的条件下孵育。结合的多肽用PE-Streptavidin进行标记,图像中显示了多肽信号与和细胞表面上的NTCP的信号的共同定位情况。(C) 转染hNTCP或对照质粒的293T细胞用200nm对应于preS1的N端59氨基酸的FITC标记的脂多肽处理后的图像。(D-F) 质粒转染24小时后的Huh-7细胞,与野生型HDV(D-E)或在的L蛋白上带有N9K突变HDV(F)与在存在或不存200nm的Myr-47/WT的多肽的情况下结合。结合的病毒粒子用定量RT-PCR测定。结果显示了转染了质粒的细胞上结合的病毒粒子数与对照的背景病毒数的倍数变化。

[0042] 图10显示了NTCP在HBV和HDV在肝细胞感染中的重要性。(A-B) 新鲜分离的PTH细胞在转染了用针对tsNTCP的siRNA或对照siRNA1天后接种到成纤维支持细胞。三天后,1X10⁵PTHs用1×10⁷基因组的当量的HBV进行感染。(A) 感染8天后(8DPI),通过用单克隆抗体17B9(红色)染细胞内HBV的S抗原(乙肝表面抗原)来观察细胞的感染情况。肝细胞通过CYP3A4抗体(绿)进行染色,细胞核用DAPI染色(蓝色)。(B) 在转染4天后,通过实时RT-PCR检测siRNA转染后NTCPmRNA的水平。数据用GAPDH进行标化,并显示为相对Huh-7细胞的表达水平。在6DPI测定乙肝病毒e抗原(HBeAg)的水平。(C-D) 与A组类似,1×10⁵转染了siRNA的

PTHs用 5×10^7 基因组的当量的HDV进行感染。(C)在6dpi,用单克隆抗体4G5(红色)染细胞内主要定位在核质的HDV delta抗原。(D)用定量实时RT-PCR检测在被感染的细胞内的HDV病毒RNA的水平。左—HDV总RNA;右—用特异性引物检测的Genomic和antigenomic的HDV RNA。(E-F)解冻液氮保存的原代人肝细胞并转染对hNTCP siRNA或对照的siRNA并在一天后重铺细胞。转染三天后,PHHs用100基因组当量的HBV进行感染。(E)通过ELISA测定分泌到在培养上清液中的病毒e抗原的水平。(F)通过相应的引物用定量实时RT-PCR测定在感染细胞中乙肝病毒的总RNA和3.5KB的RNA的拷贝数。

[0043] 图11显示了重组病毒AAV8和的Lenti-VSV-G感染的原代树鼩肝细胞。PTHs分离后铺在胶原包被的细胞板上,细胞铺板后三天,肝细胞用携带EGFP报告基因的重组腺病毒相关-virus8(AAV8)(A)或通过VSV-G携带EGFP基因的重组慢病毒假型(B)感染8小时。图片拍摄于感染后第6天。

[0044] 图12显示NTCP表达使细胞获得了对HDV和HBV感染的易感性。(A)在指定的细胞系和原代肝细胞中NTCP的mRNA表达水平。Huh-7用于标准化在其他细胞中NTCP的相对表达水平。(B)转染hNTCP表达质粒或载体对照后24小时内,Huh-7细胞用500基因组当量拷贝/细胞的HDV感染。感染8天后,通过免疫组化将HDV delta抗原染色为绿色,细胞核呈蓝色。(C)与B中的方法类似,Huh-7细胞转染了hNTCP后,在HBV入侵抑制剂存在或不存在的条件下用HDV感染,如:HBIG(B型肝炎免疫球蛋白),Myr-59,和抗HBsAg单克隆抗体17B9。HDV delta抗原特异性单克隆抗体4G5作为对照。于6dpi,感染细胞的HDV RNA拷贝用实时RT-PCR检测。(D)与B中的方法类似,Huh-7细胞转染了hNTCP后用HDV感染,在指定的感染后不同天数进行定量实时RT-PCR检测HDV病毒RNA在细胞中的水平。(E)PTHs中NTCP mRNA表达水平在体外培养过程中迅速下降。(F)体外培养13天的PTH在转染hNTCP或对照质粒后再重铺至支持细胞,细胞重铺后24小时以100个基因组拷贝/细胞感染HBV。感染8天后,细胞内的乙肝表面抗原用17B9染成红色,肝细胞用抗CYP3A4染成绿色,细胞核为蓝色。(G-H)表达hNTCP的HepG2稳定细胞系以100个基因组拷贝/细胞在Myr-59或HBIG的存在或不存在的条件下感染了HBV。分别用ELISA法和定量RT-PCR测定在感染4天,6天,分泌的HBeAg的(G)和感染后第6天的HBV的RNA(H)。

[0045] 图13显示了转染的NTCP的Huh7肝癌细胞能够支持HBV的体外感染。

[0046] 图14显示的HBV和HDV在不同培养天数的原代树鼩肝细胞上感染。原代树鼩肝细胞中分离并铺在胶原包被的48孔板中。在铺细胞后的所显示天数时,用 1×10^7 基因组当量的乙肝病毒(A)或 5×10^7 基因组当量的HDV(B)来感染 1×10^5 细胞。在病毒感染6和9天后,用商业化的ELISA试剂盒对HBV感染的细胞进行了检测;并在接种病毒后第7天使用实时RT-PCR对HDV感染进行了定量。

[0047] 图15显示表面在Hu7细胞人类NTCP突变体的表达水平。1,WT;2,Q68A;3,SN105/106AA;4,S226A;5,E257A。

[0048] 图16显示了preS1肽结合人NTCP突变体的活性。

[0049] 图17显示了HDV感染表达人NTCP的突变体的Huh7细胞的能力。

[0050] 图18显示牛磺胆酸(A)和牛磺石胆酸(B)的结构,和分别存在牛磺胆酸和牛磺石胆酸的情况下乙型肝炎病毒感染PTH的影响。

[0051] 图19显示了HDV感染转染人SLC10A1的原代小鼠肝细胞和原代大鼠肝细胞。PMH:原

级小鼠肝细胞;PRH:原代大鼠肝细胞;hA1:人类SLC10A1;pcDNA6:表达载体;RNA拷贝/细胞:HDV基因组RNA/细胞。

[0052] 图20显示了抑制磷脂酰肌醇3-激酶(PI3Ks)的槲皮素的吗啉衍生物LY294002,可以抑制HBV感染。

[0053] 图21显示转染NTCP的人肝癌细胞株HepG2细胞能够支持HBV在体外的感染。在感染4,7,和10天后检测乙肝病毒e抗原。感染12天后,检测了病毒特异性的RNA的水平。

[0054] 图22显示了NTCP在支持人类肝细胞在体外感染HBV的能力。

具体实施方式

[0055] 除非另有说明,本发明的实施将使用一系列分子生物学的常规技术(包括重组技术),微生物学,细胞生物学,生物化学,免疫学,药理学,这是本领域的技术范围内。这些技术在文献中充分说明,例如,分子克隆:实验室手册,第2版。(Sambrook等人,1989);寡核苷酸合成(M.J.Gait,ed.,1984);动物细胞培养(R.I.Freshney,ed.,1987);Methods in Enzymology(Academic Press,Inc.);Current Protocols in Molecular Biology(F.M.Ausubel et al,eds.,1987,and periodic updates);PCR:聚合酶链式反应(Mullis et al.,eds.,1994);和Remington,The Science and Practice of Pharmacy,20th ed.,(Lippincott,Williams&Wilkins 2003)。

[0056] 除非另有定义,本文所用的所有技术和科学术语与通常是由普通技术人员对本发明所属的技术领域中的理解具有相同的含义。所有专利,申请,公布的申请和其他出版物本文提及的是通过引用以其整体并入。如果列在本节中的定义是与所列的专利,申请,公布的申请和其他出版物相反的,或以其他方式不符合的定义,阐述在本节中的定义优先于通过引用并入本文的定义。

[0057] 如本文所使用的,单数形式“一”,“一个”和“该”包括复数引用,除非另有说明。例如,“a”的二聚物包括一个或者多个二聚体。

[0058] 术语“多肽”,“寡肽”,“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用,指的是任何长度的氨基酸聚合物,例如,至少5个,6个,7个,8个,9个,10个,20,30,40,50,100,200,300,400,500,1000以上的氨基酸。该聚合物可以是直链或支链,其可以包含修饰的氨基酸,并且其可被非氨基酸中断。该术语还包括已被天然地或通过介入修饰的氨基酸聚合物;例如,二硫键形成,糖基化,脂质化,乙酰化,磷酸化,或任何其他操作或修饰,如结合与标记组分。也包括在该定义内的是,例如,含有氨基酸的一种或多种类似物(包括例如,非天然氨基酸等),以及本领域已知的其他修饰的多肽。

[0059] 如本文所用的术语“突变体”是用来指具有与亲本多肽序列有某种程度的氨基酸序列同一性的多肽。一种突变体是类似于亲本序列,但具有至少一个取代,缺失或插入它们的氨基酸序列,使它们在序列不同于亲本多肽。在某些情况下,突变体已被处理和/或工程化以包含至少一个置换,缺失或插入它们的氨基酸序列,使它们在序列不同于母体。此外,突变体可以保留亲本多肽的一些功能特性,例如保持该亲本多肽的至少50%,60%,70%,80%,90%,95%,98%或99%的生物活性。

[0060] 的“抗体”是免疫球蛋白分子,通过位于免疫球蛋白分子的可变区的至少一个抗原识别位点能特异性结合靶抗原,诸如碳水化合物,多核苷酸,脂质,多肽等,并且可以是任何

类型的免疫球蛋白,如IgG抗体,IgM抗体,IgA,IgD和IgE抗体。IgY抗体,禽类如鸡的主要抗体类型,也包括在该定义之内。如本文所用的术语不仅包括完整的多克隆或单克隆抗体,而且它们的片段(例如Fab,的Fab'的F(ab')₂,的Fv),单链(ScFv),其突变体,天然存在的变体,融合蛋白,其包含具有所需特异性的,人源化抗体,嵌合抗体,以及免疫球蛋白分子,其包含所需特异性的抗原识别位点的任何其他修饰构型的抗原识别位点的抗体的部分。

[0061] 如本文所使用的,术语“抗原”是指专门由抗体通过其抗原识别位点结合的靶分子。所述抗原可以是单价或多价的,即它可具有一个或多个由一种或多种抗体识别的表位。可以通过抗体识别的各种抗原的实例包括多肽,低聚糖,糖蛋白,多核苷酸,脂质,等等。

[0062] 如本文所用,“表位”一词指的是至少约3至5个,一般5至10或15个,并且不超过约1,000个氨基酸(或者任何整数那里之间)的多肽序列所定义的一个序列,该序列本身或作为更大序列的一部分,可以结合针对这样的序列所产生的抗体。片段的长度没有严格的上限。例如,其可以包括近全长的抗原序列的,或者甚至是融合蛋白,其包含来自靶抗原的两个或多个表位的长度。在本发明使用的表位不限于具有由其所衍生的母体蛋白质的部分序列完全相同的序列,但也包括序列相同于天然序列,以及修改的天然序列,如缺失,加入和取代(保守性的)的序列。

[0063] 如本文所用,术语“特异性地结合”是指特异性结合对的结合特异性。一种特定目标的抗体与其它潜在的目标之间的识别是这样的结合的一个特征。特异性结合包含两个不同的分子,其中一个分子特异性地与通过化学或物理方法的第二分子结合。在一定意义上,两种分子都与它们彼此结合使得它们能够在具有类似特征的其它测定组分中区分出它们的结合伴侣。结合的两个组分分别被称为配体和受体(抗配体),特异性结合对(SBP)构件和SBP伙伴等。一种分子,也可以是某分子的聚合的SBP伙伴;例如某抗体针对一种第二抗体的免疫复合物,其对应的抗原可以被认为是一个免疫复合物的SBP伙伴。

[0064] 如本文所使用的,“标签”或“表位标签”指的是一段氨基酸序列,通常加到多肽的N和/或C末端。标签融合到蛋白上可以帮助其纯化和/或检测。典型的标签或标签多肽具有足够残基以提供由抗体识别的表位,或可以用作用于检测或纯化,但又足够短使得其不影响融合蛋白的活性。标签多肽通常是足够特异,以便抗体能够特异性结合于此并基本上不与其它多肽表位交叉反应。合适的标签多肽通常具有至少5或6个氨基酸残基,一般在约8-50个残基,多数是9-30个残基。该标签可以连在多聚体的一个或多个融合蛋白上,使得可以检测该多聚体或从样品或混合物中将其纯化。这样的标签是应用众所周知的,并且可以容易地合成和设计。示例性的标签多肽包括那些用于亲和纯化的标签,包括His标签,流感血凝素(HA)标签多肽及其抗体12CA5;在C-myc标签和识别它的8F9,3C7,6E10,G4,B7和9E10抗体;和单纯疱疹病毒糖蛋白D(gD)标签及其抗体。参见,e.g.,Field et al.(1988) Mol.Cell.Biol.8:2159-2165;Evan et al,(1985) Mol.Cell.Biol.5:3610-3616;Paborsky et al.(1990) Protein Engineering 3:547-553。

[0065] “多核苷酸”或“核酸”,如本文中可互换使用,指任何长度的核苷酸的聚合物,并包括DNA和RNA。核苷酸可以是脱氧核糖核苷酸,核糖核苷酸,修饰的核苷酸或碱基,和/或它们的类似物,或可以掺入到聚合物中通过DNA或RNA聚合酶的任何底物。多核苷酸可包含修饰的核苷酸,如甲基化的核苷酸和它们的类似物。如果可能的话,修饰的核苷酸结构可以在聚合物的组装之前或之后赋予。核苷酸的序列可以被非核苷酸成分中断。多核苷酸可以聚合

后再进一步被改造,例如通过结合某一标记成分。其它类型的修饰包括,例如,“帽子结构”,即一个或多个天然存在的核苷酸用类似物替代;核酸间修饰包括诸如例如那些具有不带电荷的连接(例如,甲基膦酸酯,磷酸三酯,phosphoamidates,cabamates等)和带电荷连接(例如硫代磷酸酯,二硫代磷酸酯等),含有侧基部分,诸如,例如蛋白质(例如核酸酶,毒素,抗体,信号肽,聚-L-赖氨酸等),具有嵌入剂(例如吡啶,补骨脂素等),含有螯合剂(例如金属,放射性金属,硼,氧化金属等),含有烷化剂的那些具有修饰的连接(例如, α 异头核酸等),以及多核苷酸的未修饰形式。此外,任何通常存在于糖中的羟基可被取代,例如,由膦酸酯,磷酸基团,由标准保护基团保护,或活化以制备附加的核苷酸的连接,或可被结合至固体支持物。5'和3'末端OH可磷酸化或者用胺或1-20个碳原子的有机加帽基团部分取代。其它羟基也可衍生成标准保护基团。多核苷酸还可以包含通常本领域已知的核糖或脱氧核糖的类似形式,包括,例如,2'-O-甲基-2'-O-烯丙基,2'-氟-或2'-叠氨基-核糖,碳环糖类似物, α -端基异构糖,差向异构糖诸如阿拉伯糖,木糖或来苏糖,吡喃糖,呋喃糖,景天庚的,无环类似物及脱碱基核苷类似物诸如甲基核糖核苷。一个或多个磷酸二酯键可以被备选的连接基团所取代。这些备选连接基团包括,但不限于以下实施方案,其中磷酸酯被P(O)S(“thioate”),P(S)S(“dithioate”),“(O)NR₂“amidate”),P(O)R,P(O)OR',CO或CH₂(“formacetal”),其中每个R或R'是独立的H或取代或未取代的烷基(1-20个C),任选含有醚(-O-)连接,芳基,烯基,环烷基,环烯基或芳基烷基。多核苷酸中的所有连接不需要是相同的。前面的描述适用于所有提及的多核苷酸在本文中,包括RNA和DNA。

[0066] 如本文中所使用的,“寡核苷酸”,通常是指短,一般是指单链,一般是合成的多核苷酸。通常是,但不一定是,长度小于约200个核苷酸。术语“寡核苷酸”和“多核苷酸”并不互相排斥。上面的说明多核苷酸同样完全适用于寡核苷酸。

[0067] 如本文所用,术语“同源物”用来指通过较小的修饰不同于天然存在的核酸(即“原型”或“野生型”核酸)的核酸,但是它保持了天然存在形式的基本核苷酸结构。这样的改变包括,但不限于:在一个变化或几个核苷酸,包括缺失(例如,核酸的截短版本)插入和/或取代。同源物可以具有增强,降低或基本相比于天然存在的核酸相似的性质。同源物可以是互补的或匹配的天然存在的核酸。同源物可以通过本领域中已知的用于核酸的产生的方法来合成,包括但不限于,DNA重组技术,化学合成,等等。

[0068] 如本文所用,“基本上互补的或基本上匹配”是指两个核酸序列具有至少90%序列同一性。一般而言地,所述两个核酸序列具有至少95%,96%,97%,98%,99%或100%序列同一性。此外,“基本上互补的或基本上匹配”是指两个核酸序列可以在高度严格条件(次)下可以杂交。

[0069] 一般而言,杂交体的稳定性是离子浓度和温度的函数。通常情况下,杂交反应先在低严格条件下进行,随后通过不同但不断提高严格性洗涤液进行洗涤。中等严格杂交是指允许核酸分子(如探针)结合的互补核酸分子的条件。杂交的核酸分子通常具有至少>60%同一性,例如包括70%>75%,80%),85%,90%),或95%的同一性。中等严格条件是在等同于50%甲酰胺杂交条件,5×Denhardt氏溶液,5×SSPE,0.2%SDS,42°C的条件下杂交,然后用0.2×SSPE,0.2%SDS在42°C的条件下洗涤。高严格条件,可以通过在50%甲酰胺,5×Denhardt氏溶液,5×SSPE,0.2%SDS在42°C条件下杂交,然后在0.1×SSPE和0.1%SDS在65°C下洗涤。低严格杂交是指相当于在10%甲酰胺的条件下,5×Denhardt氏溶液,6×SSPE,

0.2% SDS在22°C下杂交,然后在1XSSPE, >0.2%的SDS, 37°C下洗涤。Denhardt氏溶液中含有1%聚蔗糖, 1%聚乙烯吡咯烷酮, 和1%牛血清白蛋白(BSA)。20×SSPE(氯化钠, 磷酸钠, 亚乙基二酰胺二胺四乙酸(EDTA))含有3M氯化钠, 0.2M磷酸钠和0.025M(EDTA)。其他合适的中等严格性和高度严格的杂交缓冲液和条件是那些技术人员所公知的。

[0070] 如本文所用, 术语“RNA干扰”或“RNA干扰”通常指的是与目标有大部分或全部同源性的双链RNA分子或短发夹RNA分子可以降低或抑制的目标核酸序列的表达与的过程。术语“短干扰RNA”或“siRNA”或“RNAi试剂”是指一种约10–50个核苷酸(或核苷酸类似物)之间的RNA(或RNA类似物)可以引发RNA干扰过程。见Kreutzer et al, WO 00/44895; Zernicka-Goetz et al, WO 01/36646; Fire, WO 99/32619; Mello&Fire, WO 01/29058。如本文所用, siRNA分子包括RNA分子包含化学修饰的核苷酸和非核苷酸。术语“ddRNAi剂”指的是从外源载体转录的DNA指导的RNA干扰试剂。术语“短发夹RNA”或“shRNA的”指具有双链区和环区的RNA结构。在某些实施方案中, ddRNAi剂最初表示为的shRNA。

[0071] 如本文所使用的, “载体(或质粒)”指的是用于将异源DNA导入细胞进行表达或复制的独立元件。选择和使用这些载体是技术人员的技能范围内公知的。表达载体包括载体通过操作将调节序列(如启动子区)与能够表达的DNA相连得以实现这种DNA片段的表达。因此, 表达载体是指重组DNA或RNA构建体, 如质粒, 噬菌体, 重组病毒或其他载体, 通过导入到适当的宿主细胞时可以导致克隆的DNA的表达。合适的表达载体是相关技术人员的所公知的, 还包括那些真核细胞和/或原核细胞可复制的元件和那些保持微染色体或那些整合入宿主细胞基因组中的元件。

[0072] 如本文所用的“启动子区或启动子元件”是指有效连接到目标DNA或RNA一起来控制其转录的DNA或RNA的片段。启动子区包括足以进行RNA聚合酶识别, 结合和转录起始的特定序列。这部分启动功能的区域被称为启动子。此外, 启动子区包括调节RNA聚合酶的识别, 结合和转录起始活性的序列。这些序列可以是顺式作用的, 或者可以是响应于反式作用因子。取决于调节的性质, 启动子可以是组成型或调节型。在原核生物中考虑使用的示例性的启动子包括噬菌体T7和T3启动子, 等等。

[0073] 如本文所使用的, “有效的连接或有效的联系”是指DNA与核苷酸的调节和效应子序列, 如启动子, 增强子, 转录和翻译终止位点, 和其他信号序列的功能关系。例如, DNA的启动子的有效连接是指在DNA的启动子之间的物理和功能上的关系, 使得这种DNA的转录通过RNA聚合酶特异性识别, 结合启动子而起始。为了优化表达和/或体外转录, 可能必须去除, 添加或改变克隆的5'非翻译部分, 以消除额外的、潜在的不合适的备选翻译起始(例如, 启动)的密码子, 或在转录或翻译水平可能干扰或减少表达的其它序列。或者正好插入5'端起始密码子上游的通用的核糖体结合位点用于增强表达。参见, 例如, Kozak (1991) J. Biol. Chem. 266:19867–19870。这样的修改的需求(或必要性)可以根据经验确定。

[0074] “医治”或“治疗”或“缓解”指治疗性处理, 其目的是减缓(减轻), 甚至治愈目标的病理状况或紊乱或阻止复发病症的。如果接收的治疗剂的治疗量之后, 受试者显示了观察到特定疾病的一个或多个体征或症状的可观察和/或可测量的降低或消失, 被处理对象可认为是被成功地“治疗”。的疾病体征或症状的减少还可以由患者感受到。病人病情稳定也可被认为是有效的治疗。在一些实施方案中, 若患者在治疗后3个月, 6个月, 一年甚至二年或更长一段时间后处于无病患状态, 则说明治疗剂的治疗是有效的。对熟悉常规程序的适当领

域的技术人员医师而言,这些参数用于评估疾病的成功治疗和改善是容易测量的。

[0075] 术语“预测”或“预后”在本文中用来指一个患者对一种药物或一组药物有无反应的可能性或疾病可能的结果。在一个实施例中,预测指那些响应或结果的程度。在一个实施例中,该预测是指患者是否能够生存或治疗(例如用某种特定的治疗剂进行治疗)后是否有所改善,以及在一定的时间期间有没有疾病复发。通过对于任何特定患者选择最合适的治疗方法,本发明的预测方法可以在临床上用于制定治疗方案。本发明的预测方法对于确定患者对给定的治疗方案是否有效有重要参考价值,这些治疗方案包括一个给定的治疗剂或组合,外科手术干预,类固醇激素治疗等。

[0076] 如本文中所使用的语言“药学上可接受的载体”旨在包括任何和所有与药物施用相容的溶剂,分散介质,包衣,等渗和吸收延迟剂,和类似物。药学活性物质使用此类介质和试剂的应用是本领域公知的。见., Remington, *The Science and Practice of Pharmacy*, 20th ed., (Lippincott, Williams & Wilkins 2003)。除非任何常规介质或试剂与活性化合物都不相容,在组合物中这样使用是预期之中的。

[0077] 本文所表示的“药学上可接受的盐”是指给受试者使用的无毒的,生物学上可耐受的,或者以其他生物学上适用的游离酸或碱的盐。可参见, Berge, et al., *J. Pharm. Sci.*, 1977, 66, 1-19。优选的药学上可接受的盐是那些可以与组织接触的药理学有效且适于受试者且没有不适当的毒性、刺激性或过敏反应。本文所述的可具有足够酸性的基团,足够碱性的基团,这两种类型的官能团,或一种以上的每一种类型的,并且因此所述的化合物与各种无机或有机碱和无机酸和有机酸反应,形成药学上可接受的盐。

[0078] 的药学上可接受的盐例子包括硫酸盐,焦硫酸盐,硫酸氢盐,亚硫酸盐,亚硫酸氢盐,磷酸盐,磷酸一氢盐,磷酸二氢盐,偏磷酸盐,焦磷酸盐,氯化物,溴化物,碘化物,乙酸盐,丙酸盐,癸酸盐,辛酸盐,丙烯酸盐,甲酸盐,异丁酸盐,己酸盐,庚酸盐,丙炔酸酯,草酸盐,丙二酸盐,琥珀酸盐,辛二酸盐,癸二酸酯,富马酸盐,马来酸盐,1,4丁炔二酸,1,6己炔二酸,苯甲酸盐,氯苯甲酸盐,甲基苯甲酸盐,二硝基苯甲酸盐,羟基苯甲酸盐,甲氧基苯甲酸,邻苯二甲酸盐,磺酸盐,甲基磺酸盐,异丙基磺酸盐,苯磺酸盐,二甲苯磺酸盐,萘-1-磺酸盐,萘-2-磺酸酯,乙酸苯酯,苯基丙酸盐,苯基丁酸盐,柠檬酸盐,乳酸盐, γ -羟基丁酸酯,甘醇酸酯,酒石酸盐和扁桃酸盐。

[0079] 如本文所用的术语“治疗有效量”或“有效量”是对细胞、组织、或个体单独使用治疗剂或与其它治疗剂合用时,能够有效抑制或改善感染、或减缓感染或与感染相关的相关疾病的进展时该治疗剂的量。治疗有效剂量进一步指的是治疗剂足以导致症状的改善如,治疗、治愈、预防或改善相关症状或增加了治疗,治愈,预防或改善相关症状的机率的有效剂的量。当对单独的个体施用活性成分时,治疗有效剂量是指该单独成分的量。对组合应用言,无论是连续地或同时地组合给药,治疗有效剂量是指产生治疗效果的活性成分的剂量。特别情况下,有效量是抑制或减少病毒进入细胞的量。

[0080] 术语“组合”指的是可以是在同一个剂量单位形式下的固定组合,或其中部分化合物和其组合伙伴(例如,如下面所解释另一种药物的也称为“治疗剂“或”共活性剂“)可独立地同时使用或在一定时间间隔内分别使用,特别是当这些时间间隔使得组合伙伴表现出组合性,例如协同作用。这里所使用的术语“共同施用”或“组合施用”等包括对需要治疗的单个受试者(例如患者)施用所选择的组合,还包括不一定经过相同途径或同一时间给药的

治疗方案。如本文所用的术语“药物组合”通过混合或一种以上的活性成分的组合得到的产品,并且包括活性成分的固定和非固定组合。术语“固定组合”是指活性成分(例如化合物和其组合伴侣)以单一实体或剂量的形式同时施用给患者。术语“非固定组合”是指活性成分,例如,化合物和组合伴侣,都对患者给药以分开的实体以同时,共同或没有先后要求的依次使用,其中这类施用提供了在患者体内的两种化合物的有效治疗水平。后者也适用于鸡尾酒疗法,例如三种或更多种活性成分的共同施用。

[0081] 如本文所使用的,“生物学样品”是指从活的或病毒来源或大分子和生物分子的其它来源获得的任何样品,包括受试者的任何细胞类型或组织从其中的核酸或蛋白质,或可以可得到其它大分子。该生物样品可以是直接从生物源或所处理的样品获得的样品。例如,从生物样品扩增的分离的核酸。生物样品包括但不限于,体液,如血液,血浆,血清,脑脊髓液,滑液,尿液和汗液,动物和植物组织和器官样品和从由其衍生的经过处理的样品。

[0082] 术语“水平”被用于指代蛋白质或多核苷酸的存在和/或量,可以定性或定量地测定。在蛋白质或核苷酸水平A“质”的变化是指一种蛋白质或核苷酸的出现或消失是检测不到的或存在于从正常对照获得的样品。中的一种或多种蛋白质或核苷酸水平A“定量”转变是指在蛋白质或核苷酸水平的可测量的增加或减少时相比健康对照。

[0083] “健康对照”或“正常对照”是从没有HBV和/或HDV感染或与感染相关的疾病的个体上得到的生物样品。A“阴性对照”是指检测中被设计的缺乏任何特定的效果的样品,从而提供了一个测定的参考基准。

[0084] 应当理解的是,本文所述的本发明的各方面和实施方式包括“包含有”和/或“基本包含有”各方面和实施方式。

[0085] 在本公开内容中,本发明的各个方面都以范围形式显示。但应当理解,范围形式的描述仅仅是为了方便和简洁,不应被解释为对本发明的范围的硬性限制。因此,范围的描述应当被认为已经具体公开了所有可能的子范围以及该范围内的单个数值。例如,一个范围如从1到6的描述中,应考虑到具有具体公开的子范围如从1到3,从1到4,从1到5,从2到4,从2到6,从3至6等,以及范围内的单个数字,例如,1,2,3,4,5和6。不论范围的宽度如何,这一点都是适用的。

[0086] 下面的附图以及说明将进一步阐明本发明的其它的目的、优点和特点。

[0087] NTCP蛋白质和多核苷酸。

[0088] NTCP (SLC10A1) 是溶质载体蛋白的SLC10家族的创始成员之一。它是一种肝脏的钠-胆酸转运体,负责跨细胞膜钠和胆汁酸的共转运来维持胆汁酸的肠肝循环 (Hagenbuch & Meier, *J Clin Invest* 93,1326 (1994); Stieger, *Handb Exp Pharmacol*, 205 (2011))。NTCP是多次跨膜糖蛋白,推测其可能高达10跨膜,形成数个小的胞外区域 (Hu et al., *Nature* 478,408 (2011); Mareninova et al., *Biochemistry* 44,13702 (2005))。

[0089] (图2) 显示了用Clustalw2软件进行不同哺乳动物物种NTCP的蛋白质的序列比对。人类与其它物种的NTCP胞外区域(分别以橙色,蓝色,青色,绿色和灰色突出显示)是通过NTCP的一个细菌内的同源的钠离子胆酸共转运蛋白ASBT的晶体结构预测的 (Hu et al., *Nature* 478:408-411 (2011))。

[0090] 在患病的肝脏NTCP表达水平比正常肝脏显著更低。因此,通过基于(例如,腺病毒相关病毒8 (AAV8) 或其它病毒载体),或者非病毒载体(例如,脂质体等)的基因治疗方法将

SLC10A1基因转移到由于HBV和/或HDV的感染导致的患病肝脏以组织特异性表达NTCP有可能对治疗HBV和/或HDV的感染有帮助。

[0091] 适用于本发明的实施例的NTCP可以用重组DNA技术在各种宿主细胞中表达。pcDNA6可以用于表达来自人, 树鼯, 大鼠和小鼠(图3)的重组NTCP的蛋白质。在某些实施方案中, 蛋白质在C-末端可能具有EGFP或来源于视紫红质羧基末端(TETSQVAPA, C9)的9个氨基酸的序列标签。

[0092] 在一些实施方案中, 宿主细胞是从细菌, 真菌, 植物, 酵母, 昆虫或哺乳动物细胞中选择的。术语宿主细胞包括根据本声明表达NTCP的细胞和其子代细胞和其原生质体。在一些实施方案中, 宿主细胞是原核细胞, 通常是指细菌。

[0093] 为了用重组DNA技术制备本发明的实施方式的NTCP, 可以构建包含编码指定的NTCP氨基酸序列的DNA核酸序列的载体并将其转移到, 例如, 大肠杆菌细胞中。该载体可以是当被引入到大肠杆菌宿主细胞中, 可以整合入宿主细胞基因组中, 并且可以进行复制的任何载体。编码的NTCP的载体核酸可以通过操作连接到合适的在大肠杆菌宿主细胞中有转录活性启动子。该启动子可以衍生自宿主细胞中编码同源或异源的蛋白质的基因。而“诱导型启动子”可以指的是启动子被环境或发育阶段所调节。

[0094] 在一些实施方案中, NTCP编码序列可通过操作连接到至某信号序列。在一些实施方案中, 表达载体还可以包括终止序列。在一个实施例中, 终止序列和启动子序列可来自相同的来源。在另一个实施方案中, 终止序列可以是与宿主细胞同源。

[0095] 在一些实施方案中, 表达载体可包括可筛选标记。有代表性的可筛选标记的例子包括那些赋予抗生素抗性的基因(例如, 潮霉素和腐草霉素)。也可以用营养选择标记, 包括那些在本发明中使用的本领域常用的amdS, ARGB和pyr4等。

[0096] 包含编码的NTCP的多核苷酸的构造的表达载体可以是任何能在一个给定的宿主生物中自主复制的或整合到宿主的DNA中的载体。在一些实施方案中, 所述表达载体可以是质粒。在典型实施例中, 可以考虑使用两种类型的用于表达基因的表达载体。

[0097] 第一个表达载体可包含待表达基因本身的启动子, NTCP编码区和终止子的DNA序列。在一些实施方案中, 基因的截断可以通过删除不需要的DNA序列来获得(例如, 编码不想要的结构域的DNA)而让需要表达的区域由自身的转录和翻译调控序列来控制。

[0098] 还可以构建第二种类型的表达载体, 这种载体含有高水平的转录所需要的序列和可筛选的标记的序列。在一些实施方案中, NTCP基因或其部分的编码区可以被插入到该通用表达载体中, 使得它处于表达载体的启动子和终止子序列的转录控制下。在一些实施方案中, 基因或其部分可被插入的强启动子的下游。

[0099] 用于分别连接编码该NTCP、启动子、终止子和其他序列, 并把它们插入到合适的载体的方法是本领域公知的。一般情况下, 连接可以通过常用的限制性酶切位点来完成。如果这样的位点不存在, 则可以用合成的寡核苷酸接头来实现(Bennett&Lasure, More Gene Manipulations In Fungi, Academic Press, San Diego (1991) pp 70-76)。此外, 载体还可以用其它已知的重组技术构建(e.g., Invitrogen Life Technologies, Gateway Technology)。

[0100] 将导入一种DNA构建体或载体引入宿主细胞的方法包括如转化技术; 电穿孔; 核显微注射; 转导; 转染, (如, 脂转染介导的和DEAE-Dextrin介导的转染); 磷酸钙DNA沉淀物孵

育;用DNA包被的微粒高速轰击;和原生质体融合。一般的转化技术是本领域已知的(see, e.g.,Campbell et al,(1989)Curr.Genet.16:53-56)。

[0101] 在一些实施方案中,可以通过由编码NTCP的核酸构建的载体系统稳定地整合进宿主的染色体获得遗传上稳定的转化体。然后通过已知的技术来纯化转化体。

[0102] NTCP抗体,突变体和底物。

[0103] 通过本发明可以涉及任何可以阻止或减少NTCP的蛋白质和HBV/HDV病毒之间的相互作用分子。减少是指减少至少10%,20%,30%,40%,50%,60%,70%,80%,90%,95%,99%或更多NTCP和/或HBV HDV病毒之间的相互作用或HBV和/或HDV病毒的感染性。相互作用指的HBV和/或HDV病毒与NTCP的蛋白质的结合,这可能导致NTCP蛋白质的构象变化。

[0104] NTCP的抗体是可以阻止或减少NTCP和HBV和/或HDV之间的相互作用分子中的一种,诸如干扰的NTCP的蛋白质和HBV和/或HDV之间的相互作用的抗体。特异性结合NTCP的细胞外结构域的表位的抗体在可以被用作这样的分子。还涉及不结合NTCP的蛋白质特定表位但会抑制其转运功能的抗体。任何本领域公知的技术都可以用于筛选具有所需性质抗体。单克隆抗体、重组抗体、人源化抗体/人抗体、与其表位结合位点的片段,都在本发明的考虑范围之内。

[0105] 另一种阻止或减少NTCP和HBV和/或HDV之间的相互作用的分子,是NTCP的蛋白质的变体,如NTCP的突变体形式。初步数据表明影响NTCP生理功能的突变体也可能会干扰HBV感染。NTCP的胞外结构域残基的突变非常重要因为其很可能参与与HBV/HDV相互作用的相互作用。

[0106] Q68A,SN105/106AA,SN105/106AA,S226A和E257A四个可以干预NTCP的生理功能突变,通过构建并测试了它们的表面表达、与FITC标记的preS1肽(myr-59-1FITC)的结合活性、以及其做为HDV受体的能力。Q68A是一个抑制牛磺胆酸摄取的突变,位于SLC10A1-A6高度保守,但SLC10A7不保守的第三跨膜区(TM3)。SN105/106AA是一个破坏了钠离子1结合位点的突变,位处SLC10A1,A2,A4和A6保守的TM4b。S226A是磷酸化位点S226的突变,它定位位于的SLC10A1独有的TM8,能够显著增强表面的表达和牛磺胆酸的摄取。E257A位于TM9a,在SLC10A1-A6是高度保守的,这个突变的位点是两个钠离子结合的关键位点。

[0107] E257已被证明是维持牛磺胆酸的转运所必需的(Zahner et al,Eur.J.Biochem 270:1117-1127(2003))。通过研究细菌的同源的钠离子胆酸共转运蛋白ASBT,Q58和S105N106被认为是重要与钠离子结合重要的残基(Hu et al,Nature 478:408-411(2011))。S226的去磷酸化已被证明有利于NTCP的膜蛋白分布(Anwer et al,J Biol Chem 280,33687(2005))。

[0108] 其它类型的NTCP的变种还涉及NTCP的片段和可溶性NTCP多肽。包含细胞外结构域的NTCP的片段可能可以结合HBV和/或HDV并阻止它们与内源性NTCP相互作用而产生抗病毒作用。NTCP的变体形式的不支持与HBV和/或HDV的相互作用但可以正常地转运底物(例如,在小鼠或大鼠NTCP)也可用于治疗和/或预防感染。

[0109] NTCP底物或NTCP底物衍生物或类似物是另一种类型的可以阻止或减少NTCP和HBV和/或HDV之间的相互作用的试剂。NTCP是肝内主要的钠离子胆酸转运体,负责的跨细胞膜钠和胆汁酸的共转运并维持胆汁酸肠肝循环。胆汁酸是由肝脏中通过细胞色素P450-介导的胆固醇氧化的方式合成。它们主要与牛磺酸或甘氨酸结合,也可以与硫酸或葡萄糖醛酸。

胆汁盐包括一个大家族的分子,它们具有类固醇结构,含有四个环,五或八碳的侧链,以羧酸终止,并且含不同数目和构象的羟基基团。

[0110] 可以使用的胆汁酸包括但不限于:牛磺石胆酸,胆酸,鹅脱氧胆酸,甘氨酸胆酸,牛磺胆酸,脱氧胆酸,石胆酸,熊脱氧胆酸和猪去氧胆酸。其与牛磺酸或甘氨酸,以及硫酸或葡萄糖醛酸缩合的产物也可以用于阻止HBV/HDV感染。

[0111] 调整NTCP的表达/功能。

[0112] 通过任何机制增加、阻止或减少NTCP的蛋白质表达/功能的试剂都涵盖在本发明中,例如,转录,翻译,翻译后修饰等。NTCP的蛋白质的功能是指的钠离子胆酸转运体的功能,或者其作为HBV/HDV受体的功能。增加或减少指的是至少10%,20%,30%>40%>50%,60%,70%,80%,90%,95%,所表达的99%或更多的表达/功能的NTCP的蛋白质,或HBV和/或HDV病毒的感染活性。NTCP的功能也可以在蛋白质水平,细胞水平,或动物的水平(see, e.g., Hata et al., Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 285, G829 (2003); Zahner et al., Eur J Biochem 270, 1117 (2003); Ho et al., J Biol Chem 279, 7213 (2004); Murray et al., Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 301, G60 (2011); Meier & Stieger, Annu Rev Physiol 64, 635 (2002))。如本文所述,NTCP的蛋白质作为HBV/HDV受体的功能可以由NTCP和HBV/HDV病毒之间的相互作用,并通过HBV/HDV病毒感染表达的NTCP的蛋白质的细胞,组织或动物进行评估。任何测定病毒蛋白和核酸的方法都可以用于NTCP功能的评估,如ELISA,定量RT-PCR等。

[0113] 双链RNA(dsRNA)通过称为RNA干扰(RNAi)的方法指导mRNA的序列特异性降解。这个过程是已知发生在多种生物之中,包括哺乳动物和其他脊椎动物的胚胎。使用这些的dsRNA(或重组产生的或化学合成的相同或类似性质的寡核苷酸)的使SLC10A1 mRNA在哺乳动物细胞中的降解。在哺乳动物细胞中使用的长dsRNA的引发RNAi通常不实用,有可能是因为干扰素反应的有害影响。而本发明中用19-23个核苷酸的dsRNA特异性靶向特定基因的功能在功能基因组和治疗应用中是有用的。

[0114] 因此,本发明还涉及使用针对SLC10A1基因(例如,树鼩或人SLC10A1基因)的小干扰RNA(siRNA)序列, RNA干扰的载体, RNA干扰慢病毒。因此,在另一个方面,本发明提供了一种独立的用双链核糖核酸(dsRNA)分子来抑制人或树鼩的NTCP的表达的方法,其中dsRNA的第一条链与至少连续19个核苷酸的人或树鼩的SLC10A1基因是基本相同的,第二链与第一链基本上互补。在某些实施方案中,siRNA的靶序列设计基于人或树鼩的SLC10A1基因,一般长度为15~27,更多为19~23,最优19,20或21个连续碱基。

[0115] 针对中树鼩SLC10A1基因的siRNA:

siRNA-1: 5'-CUAUGUAGGCAUUGUGAUAdTdT-3',

siRNA-2: 5'-GUGUUAUCCUGGUGGUUAdTdT-3',

siRNA-3: 5'-GGACAUGAAUCUCAGCAUAdTdT-3',

siRNA-4: 5'-GGCAAGAGCAUCAUGUUUAdTdT-3',

以上siRNA是根据下面所示树鼩SLC10A1基因的编码区序列设计的:

>树鼩的SLC10A1的编码区

ATGGAGGCCACAACCTGTCCGCCCACTCAACTTACCCTGCCGCCCACTTTGGCAAACGCCCACTGACC
AGGCTCTGAGTGTTATCCTGGTGGTTATGCTATTAATTATGATGCTCTCGCTGGGCTGCACCATGGAATTCAGCAAG

ATCAAGGCCCACTTCTGGAAGCCAAAGGGGCTGGCCATCGCCCTGCTAGCTCAGTATGGCATCATGCCTCTCACTGC
 CTTTGCCTGGGGAAGGTCTTCCCACTGAACAACATAGAGGCACTGGCCATCCTGGTCTGTGGCTGCTCACCAGGGG
 GGAACCTGTCCAATGTCTTCAGTCTGGCCATGAAGGGGGACATGAATCTCAGCATTGTGATGACCACCTGCTCCACC
 TTCTTTGCCCTGGGCATGATGCCTCTCCTCTGTACATCTACTCCAAGGAATCTATGATGGGGACCTGAAGGACAA
 GGTGCCCTATGTAGGCATTGTGATATCACTGATCCTGGTTCTCATTCCCTTGCACCATTGGGATCTTCTCAAATCCA
 AACGGCCACAATATGTACCCTATGTTACTAAGGCGGGGATGATCATCATTCTCCTGCTCAGTGTGGCCATCACGGTC
 CTCTCCGTCATCAATGTGGGCAAGAGCATCATGTTTGCATGACGCCACACTTGCTGGCCACCTCCTCCCTGATGCC
 CTTTATTGGCTTCTGCTGGGCTACATTCTCTACTCTCTTTTCGCCTCAATGCACAGTGCAGCCGCACTGTCAGCA
 TGGAGACTGGATGCCAGAATGTTCAACTCTGTTCCACCATCCTCAATGTGACCTTTCGCCCCGAAGTCATTGGACCA
 TTGTTCTTTCTTCTCTCTCTACATGATCTTCCAACCTGGAGAAGGGCTGCTCCTTATTGCCATCTATCGGTGCTA
 CGAGAAAATCAAGACTTCCAAAGATAAAAAACAAAAGTGATCTACACAGCTGCTAAGACTGAAGAAACAATTCCTGGCA
 CTCTGGGAAACAGCACCCACAAATGTGAAGAGTACTCCCCTTACACGGTGGAAAACAGCACCCATAAATGTGAAGAG
 TACTCCCCTTCCACGGTAGGAAATGGCACCTACAAAGGCGAAGAGTGCTCCCCTGGCACAGCCTAG

以上为树鼩的SLC10A1的编码区。

[0116] 针对人类SLC10A1基因的siRNA:

siRN A-11:5'-GGGAAAUGGCACCUACAAAdTdT-3',

siRNA-405:5'-CACAAAGUCUGUAGAAUUAdTdT-3',

siRNA-406:5'-CUAUAAGGCAUCGUGAUAdTdT-3',

siRNA-pool (4):5'-GGAUCGUCCUAAAUCCAAdTdT-3', (Qiagen公司)

siRNA-pool (5):5'-GGAGUCAGCCGAGAACAAdTdT-3', (Qiagen公司)

siRNA-pool (6):5'-GGACAAGGUGCCCUAUAAdTdT-3', (Qiagen公司)

siRNA-pool (7):5'-GGUGCUAUGAGAAUUAAdTdT-3', (Qiagen公司)

以上siRNA是根据下面所示的人SLC10A1基因的以cDNA序列设计的:

>人SLC10a1的mRNA

TTCTATTTGCCAGAGCTTTTGTCCAGAACTCTCTGTCCTGAGAGGTGATTAAAGAAGGCATCCAGCAAGAA
 CTGCAACAAGAAACGGAGTCAGCCGAGAACAAGGAGTGGTCTTCCACTGCCTCACAGGAGGATGGAGGCCCAACG
 CGTCTGCCCCATTCAACTTCACCCTGCCACCCAACCTTTGGCAAGCGCCCCACAGACCTGGCACTGAGCGTCATCCTG
 GTGTTTCATGTTGTTCTTCATCATGCTCTCGCTGGGCTGCACCATGGAGTTCAGCAAGATCAAGGCTCACTTATGGAA
 GCCTAAAGGGCTGGCCATCGCCCTGGTGGCACAGTATGGCATCATGCCCCACGGCCTTTGTGCTGGGCAAGGTCT
 TCCGGCTGAAGAACATTGAGGCACTGGCCATCTGGTCTGTGGCTGCTCACCTGGAGGGAACCTGTCCAATGTCTTC
 AGTCTGGCCATGAAGGGGGACATGAACCTCAGCATTGTGATGACCACCTGCTCCACCTTCTGTGCCCTTGGCATGAT
 GCCTCTCCTCTGTACATCTACTCCAGGGGATCTATGATGGGGACCTGAAGGACAAGGTGCCCTATAAAGGCATCG
 TGATATCACTGGTCTGTTCTCATTCCCTTGCACCATAGGGATCGTCTCAAATCCAAACGGCCACAATACATGCGC
 TATGTCATCAAGGGAGGGATGATCATCATTCTTGTGTCAGTGTGGCCGTACAGTTCTCTGCCATCAATGTGGG
 GAAGAGCATCATGTTTGGCATGACACCACTCTGATTGCCACCTCCTCCCTGATGCCTTTTATTGGCTTTCTGCTGG
 GTTATGTTCTCTGCTCTCTTCTGCCTCAATGGACGGTGCAGACGCACTGTCAGCATGGAGACTGGATGCCAAAAT
 GTCCAACCTCTGTTCCACCATCCTCAATGTGGCCTTCCACCTGAAGTCATTGGACCACTTTTCTTCTTTCCCCTCCT
 CTACATGATTTTCCAGCTTGGAGAAGGGCTTCTCCTCATTGCCATATTTTGGTGCTATGAGAAATTCAGACTCCCA
 AGGATAAAAACAAAATGATCTACACAGCTGCCACAACCTGAAGAAACAATTCAGGAGCTCTGGGAAATGGCACCTAC

AAAGGGGAGGACTGCTCCCCTTGACAGCCTAGCCCTTCCCCTGGTGGCCTGGATTCTGGTCCCAAAGCAATTCTGA
AAGCCAGTGTGGTAAACTAGAGAGAGCAGCAAAAACACCAGTCTTGCCTGAGTCTTTCTCCAGCATTTCAGTACAT
CTATCAGAATCATCAAGTCTTGGCCGGAACACAGACAGGGTGTCTACCCAAGAAGCCTCACCTATCCCCAACTTAG
AATTTGCTACTTATTTTAAAGACTTGTTCAGTGACTGTAACTCTATGAAACCAGAAACCGAATCTGCCTCTTGCTG
GGATCTCTAAAAGTGTCTGATAAGCATCTTAAAGTCACTCAATTCCTGAACTAATCAATATATATGTTTAAACCCATT
ACTCAAATACCCAAATCCCATTCCAAGTTTTGTGACCCAAAAGAGAAATAAATGCTCACAAGTGCTGTAGAATTAAA
CTTCAGAAGTTCTAACCT

以上为人SLC10a1的mRNA。

[0117] 具体地,本发明涉及介导的RNAi的siRNA分子。本发明的siRNA分子也可以包含3'羟基基团。siRNA分子可以是单链或双链;此类分子可以平端或包含突出端(例如,5',3')。在具体的实施方案中,siRNA分子是双链的,可以含有平端或包含突出端。

[0118] 在一个实施方案中,siRNA分子的至少一条链3'具有约1至约6个核苷酸的长度的突出端(例如,嘧啶核苷酸,嘌呤核苷酸)。在其他实施方案中,3'突出端约1至5个核苷酸,约1至3个核苷酸或从约2至长度为约4个核苷酸。在一个实施方案中,siRNA分子是双链的,一条链具有3'突出端与另一条链可以是平端或具有突出端。在将siRNA分子可以是双链且都包含突出端的实施方案中,每条链的突出端的长度可以是相同的或不同。在特定实施例中,本发明的siRNA包含那些配对并且在两个3'核苷酸端具有约1至3突出端,特别是约2个,的21个核苷酸链长度的siRNA。为了进一步提高本发明的RNA的稳定性,在3'突出端可以加以稳定化阻止降解。在一个实施方案中,所述RNA是由包括嘌呤核苷酸,如腺苷或鸟苷核苷酸稳定。或者用修饰的核苷酸类似物代替嘧啶核苷酸的,如通过2'-脱氧胸苷替换3'突出端的2个尿苷核苷酸的替换是可以容忍的,并且不影响RNAi的效率。由于没有2'羟基,显著提高了突出端在组织培养基中对核酸酶的抗性。

[0119] 本发明的siRNA分子可以使用多种技术人员在本领域中已知的技术来获得。例如,所述siRNA可以通过化学合成或使用本领域已知的重组表达的方法产生。所述siRNA也可以使用体外系统中获得。在体外系统中也可以用于获得约19至约23个核苷酸长度的siRNA介导的SLC10A1基因的mRNA的RNAi。

[0120] 用体外系统获得siRNA序列的方法还可以包括从混合的RNA序列中分离所需RNA的方法。siRNA分子可以使用多种技术人员在本领域中已知的技术进行分离。例如,凝胶电泳可用于siRNA的分离,凝胶切片可以分开所需的RNA和需要除去的RNA。

此外,非变性方法,如非变性柱色谱,也可用于分离所产生的RNA。此外,色谱法(例如,大小阻排色谱法),甘油梯度离心,和抗体亲和纯化可被用于分离的siRNA。在体外系统中,也可以直接使用在本文描述的方法分离的RNA-蛋白质复合物(例如,介导的SLC10A1基因的mRNA表达的RNA干扰的方法)。

[0121] 本文所描述的siRNA可以以各种不同的方式被使用。例如,siRNA分子可以用于介导细胞或生物体的基因的mRNA的RNA干扰。在一个具体的实施方案中,siRNA被导入人体细胞或人体,以介导细胞或在个体中的细胞的RNA干扰,例如以预防或治疗的疾病或不良状况。在该方法中,通过靶向导致或促进该疾病或不良状况基因(或多个基因),用RNAi的办法降低相应基因的mRNA(与靶基因的转录产物)。在本实施例中,靶向相应的mRNA(与靶基因的mRNA)的降解的siRNA的将被导入细胞或生物体。在其对应的mRNA的降解发生的条件下,细

胞或生物体的状态不受影响,从而介导基因在细胞或生物体中的RNA干扰。在所述的siRNA引入到不会出现通常RNAi过程的细胞的情况下,需要在这样的细胞中引入介导RNAi所需要的因素或在这样的细胞中诱导表达所需要的因子。或者,通过其他方法产生的与可以用于介导RNAi的siRNA有相同或足够类似的组成的siRNA(例如,化学合成,DNA重组表达)也可以类似地用于介导RNAi。这样的siRNA可以包含一个或多个核苷酸的添加、缺失、替换或包含一个或多个核苷酸修改、和/或可包括非核苷酸成分。

[0122] 在一些实施方案中,shRNA的可包括正义序列,包含与SLC10A1基因中的靶序列基本相同的核苷酸序列,和一段反义序列,其中正义和反义片段通过一个形成环的间隔序列分开。环的序列可以包括从由UUCAAGAGA,AUG,CCC,UUCG,CCACC,CTCGAG,AAGCUU和CCACACC中的序列组成。

[0123] 同时,本发明还公开了一种SLC10A1RNAi的慢病毒及其制备和用途。表达上述siRNA的核酸构建体可以通过基因克隆的方法来构建并包装成表达上述siRNA的慢病毒。细胞实验证明,上述的siRNA序列可以特异性沉默的内源表达在肝细胞中的SLC10A1基因。

[0124] 在一些实施方案中,编码上述的siRNA的DNA序列可以包含在慢病毒载体中。在某些实施方案中,慢病毒载体可进一步包含启动子序列。在某些实施方案中,慢病毒载体可以进一步包含肝细胞中可检测的核苷酸序列,其中所述可检测标记物可以是绿色荧光蛋白(GFP)。在某些实施方案中,慢病毒载体可以选自pLKO的组中选择。l-puro,pLKO.l-CMV-tGFP,pLKO.l-puro-CMV-tGFP,pLKO.l-CMV-Neo,pLKO.l-Neo,pLKO.l-Neo-CMV-tGFP,pLKO.l-puro-CMV-TagCFP,pLKO.l-puro-CMV-TagYFP,pLKO.l-puro-CMV-TagRFP,pLKO.l-puro-CMV-TagFP635,pLKO.l-puro-UbC-TurboGFP,pLKO.l-puro-UbC-TagFP635,pLKO-puro-IPTG-1xLac0,pLKO-puro-IPTG-3xLac0,pLP1,pLP2,pLP/VSV-G,pENTR/U6,pLenti6/BLOCK-iT-DEST,pLenti6-GW/U6-laminshrna,pcDNA1.2/V5-GW/lacZ,pLenti6.2/N-Lumio/V5-DEST,pGCSIL-GFP and Lenti6.2/N-Lumio/V5-GW/lacZ。在一些实施方案中,设计用于针对SLC10A1的慢病毒可以稳定并特异地降低SLC10A1表达并有效地抑制HBV和/或HDV病毒的感染。

[0125] NTCP的表达与功能由多种机制来调控(reviewed by Stieger,Handb Exp Pharmacol,205(2011);Meier&Stieger,Annu Rev Physiol 64,635(2002))。所有可能调节NTCP的表达,修饰,或亚细胞分布的分子都有可能可用于预防/治疗的HBV/HDV感染和感染相关疾病。

[0126] 例如,NTCP是一种磷酸化的蛋白质,负责NTCP的磷酸化的蛋白激酶尚未被完全阐明。然而,磷酸化状态的对其功能有很大影响(Anwer et al,J Biol Chem 280,33687(2005);Webster et al,J Biol Chem 277,28578(2002);Schonhoff et al,Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 297,G1259(2009))。因此,激酶抑制剂可用于抑制和/或调节NTCP的功能。

[0127] NTCP是一种糖蛋白,糖基化状态是它的功能的关键(包括乙肝病毒感染)。因此,可以抑制和/或调节NTCP的功能的糖基化抑制剂也可考虑作为药物。

[0128] NTCP的转录可通过激活/抑制核因子,如RAR α -RXRa等,来调节SLC10A1基因的转录。也可以考虑通过靶向组蛋白或基因组DNA的修饰调节NTCP表达。

[0129] 药物组成。

[0130] 乙型肝炎病毒是一种DNA病毒,它有部分双链环状DNA的基因组。病毒复制时,通过用逆转录形成RNA中间体的形式,这实际上使它们与逆转录病毒相似。乙肝病毒的基因组是由特殊的不完全的双链环状DNA构成的。全长的链的一端与病毒DNA聚合酶相连。基因组全长链含有约3020-3320个核苷酸而不完整链大约有1700至2800的核苷酸。病毒颗粒(病毒体)由外脂质包膜和一个二十面体的核心蛋白组成的衣壳。核衣壳中含有病毒DNA和具有逆转录酶活性的DNA聚合酶。外膜蛋白包含涉及的病毒结合、入侵易感细胞的膜蛋白。该病毒颗粒直径约为42nm,但存在多形性的形式,包括缺乏核衣壳的丝状和球状体。这些颗粒不具有传染性,它们含有组成的病毒体的表面的一部分的脂质和蛋白质,即所谓的表面抗原(HBsAg),并且在病毒的生命周期中过量产生。急性病毒性肝炎与急性HBV感染有关。已经注意到,皮肤发痒可以指示所有类型的病毒性肝炎的可能的症状。这种疾病会持续几个星期,然后在大多数病人中逐渐好转。慢性HBV感染可以没有任何无症状,也可以导致肝脏的慢性炎症(慢性肝炎),在几年后导致肝硬化。这种类型的感染显着增加的肝细胞癌(肝癌)的发生率。乙肝病毒也被认为与膜性肾小球肾炎(MGN)的发展的有关。

[0131] HDV被认为是卫星亚病毒,因为它只可在HBV的存在下传播。HDV的传播可以通过同时感染乙型肝炎病毒(合并感染)或感染慢性乙型肝炎或乙肝病毒携带者(超感染)而发生。它具有外膜含有三个HBV包膜蛋白(称为大,中,小乙型肝炎表面抗原,和周围的内包核酸宿主脂质。核衣壳中含有约1679个核苷酸的单链环状RNA和约200分子的HDV Delta抗原(HDAg)。HDV基因组为一反义,单链的,闭合的环状RNA的核苷酸序列,并含有70%以上的自身互补,使得基因组形成一个称之为棒状的(rodlike)部分双链RNA。

[0132] 本发明提供了在哺乳动物中用于HBV和/或HDV感染,或感染相关的疾病的预防或治疗的药物组合物,包括任何在该哺乳动物中可以阻止或降低NTCP的表达/功能的试剂以及阻止或抑制所述哺乳动物中NTCP在和HBV和/或HDV之间的相互作用的试剂。

[0133] 本发明还涉及药学可接受的前体以及使用这些药学可接受的前体药剂的使用方法。术语“药物前体”是指指定化合物的前体,即,在给药于受试者后,通过化学或生理过程,如溶剂分解或酶裂解,或者在生理条件下(例如,在它的前体被带入到生理pH下转化成剂)转化产生在体内的化合物。“药学上可接受的前药”是药物前体是无毒的,生物学上可耐受的,并且以其他方式生物学上适于施用给受试者。选择和制备合适的前药衍生物的示例过程在例如Bundgaard,Design of Prodrugs(Elsevier Press,1985)中有描述。

[0134] 本发明还涉及药学药剂的活性代谢物,以及在本发明的方法中提到的这样的代谢物的用途。“药学活性代谢物”意指代谢的化合物或其盐在体内的药理活性产物。化合物的前药和活性代谢物可以使用本领域中已知的或可用常规技术来确定。参见,例如,Bertolini et al.,J.Med.Chem.1997,40,2011-2016;Shan et al.,J.Pharm.Sci.1997,86(7),765-767;Bagshawe,Drug Dev.Res.1995,34,220-230;Bodor,Adv Drug Res.1984,13,255-331;Bundgaard,Design of Prodrugs(Elsevier Press,1985);and Larsen,Design and Application of Prodrugs,Drug Design and Development(Krogsgaard-Larsen et al,eds.,Harwood Academic Publishers,1991)。

[0135] 本文所述的化合物的任何合适的剂型可以制备。通常参见Remington's Pharmaceutical Sciences,(2000)Hoover,J.E.editor,20th edition,Lippincott Williams and Wilkins Publishing Company,Easton,Pa.,pages 780-857。制剂的选择基

于合适的给药的适当的方式。一些常见的给药途径包括口服,肠胃外,通过吸入,局部,直肠,鼻,颊,阴道,通过植入缓释剂,或其他给药方法。在其中化合物具有足够的碱性或酸性以形成稳定的无毒酸或碱盐的情况下,可以以盐的方式给药。的药学上可接受的盐的例子是与形成生理学上可接受的阴离子,例如甲苯磺酸盐,甲磺酸盐,乙酸盐,柠檬酸盐,丙二酸盐,酒石酸盐,琥珀酸盐,苯甲酸盐,抗坏血酸盐, α -酮戊二酸和磷酸甘油酸形成的有机酸加成盐。也可以形成合适的无机盐,包括盐酸盐,硫酸盐,硝酸盐,碳酸氢盐和碳酸盐。药学上可接受的盐是使用本领域公知的标准方法获得,例如通过使足够碱性的化合物,如用适当的酸的胺,得到生理上可接受的阴离子。也可制成碱金属(如钠,钾或锂)或碱土金属(如钙)的羧酸盐。

[0136] 由于预期的化合物都以药物组合的方式使用,可以将化合物与药学上可接受的赋形剂和/或载体混合配制。例如,预期的化合物可以以天然化合物或药学上可接受的盐口服给药,或以生理盐溶液静脉注射。常规缓冲剂如磷酸盐,碳酸氢盐或枸橼酸盐可用于此目的。当然,本领域的普通技术人员可以修改说明中所指定的制剂以针对给药的具体途径提供提供多种制剂。特别是预期化合物可以被修饰,以使它们更溶于水或其他介质,其中,例如,可以用较小的修饰(形成盐,酯化等)较容易地实现,这些都在本领域中的普通技术范围内。为了配合发明中化合物的药代动力学使其在患者中获得最大的有益效果,修改给药途径和剂量的给药方案管理也在本领域的普通技术人员的基本技能范围之内。

[0137] 本文所述药剂一般可溶于有机溶剂如氯仿,二氯甲烷,乙酸乙酯,乙醇,甲醇,异丙醇,乙腈,丙三醇的药剂,N-二甲基甲酰胺,二甲基乙酰胺,二甲亚砷等。一个实施方案中,本发明提供了通过混合一种化合物与药学上可接受的载体的制剂。在一个方面中,制备制剂可使用的方法包括:a)通过水溶性有机溶剂,非离子溶剂,水溶性脂质,环糊精,维生素如维生素E中,脂肪酸,脂肪酸酯,磷脂,或其组合,溶解所述的药剂以提供一个解决方案;和b)加盐或含1-10%的碳水化合物溶液的缓冲液。在一个实例中,所述碳水化合物包括右旋糖。使用本发明方法制得的药物组合物在动物和临床应用是稳定并有用的。

[0138] 使用于本方法的水溶性的有机溶剂的例子包括并且不限于聚乙二醇(PEG),醇类,乙腈,N-甲基-2-吡咯烷酮,N,N-二甲基甲酰胺,N,N-二甲基乙酰胺,二甲亚砷,或它们的组合。醇的实例包括但不限于甲醇,乙醇,异丙醇,甘油或丙二醇。

[0139] 用于本方法的水溶性的非离子型表面活性剂的例子包括但并不仅限于CREMOPHOR®EL,polyethylene glycol modified CREMOPHOR®(polyoxyethyleneglyceroltriricinoleat 35),hydrogenated CREMOPHOR®RH40,hydrogenated CREMOPHOR®RH60,PEG-succinate,polysorbate 20,polysorbate 80,SOLUTOL®HS(polyethylene glycol 660 12-hydroxystearate),sorbitan monooleate,poloxamer,LABRAFIL®(ethoxylated persic oil),LABRASOL®(capryl-caproyl macrogol-8-glyceride),GELUCIRE®(glycerol ester),SOFTIGEN®(PEG 6caprylic glyceride),甘油,乙二醇,聚山梨醇酯,或它们的组合。

[0140] 在本方法中使用的水溶性脂质示例包括但不限于植物油,甘油三酸酯,植物油,或它们的组合。脂类油的实例包括但不限于蓖麻油,聚氧乙烯蓖麻油,玉米油,橄榄油,棉籽油,花生油,薄荷油,红花油,芝麻油,大豆油,氢化植物油,氢化大豆油中,甘油三酯的椰子油,棕榈籽油,和氢化形式,或其组合。

[0141] 在本方法中使用的脂肪酸和脂肪酸酯为示例包括但不限于油酸,甘油单酯,甘油二酯,单或聚乙二醇二脂肪酸酯,或它们的组合。

[0142] 在本发明方法中使用的环糊精的示例包括但不限于:阿尔法环糊精, β -环糊精,羟丙基- β -环糊精,或磺丁基醚- β -环糊精。

[0143] 本方法中使用磷脂的示例包括但不限于大豆磷脂酰胆碱,或二硬脂酰磷脂酰甘油和氢化形式或其组合。

[0144] 本领域的普通技术人员可以修改说明中所指定的制剂以针对给药的具体途径提供多种制剂。特别是预期化合物可以被修饰,以使它们更溶于水或其他介质。为了配合发明中化合物的药代动力学使其在患者中获得最大的有益效果,修改给药途径和剂量的给药方案管理也在本领域的普通技术人员的基本技能范围之内。

[0145] 为了实施本发明中的方法,增加、阻止或减少NTCP的表达/功能,和/或阻止或抑制NTCP和HBV和/或HDV之间的相互作用的试剂、以及它们的药物组合物可通过口服,肠胃外,吸入,局部,经直肠,经鼻,经颊,阴道,通过植入缓释剂,或其他给药方法使用。本文所用的术语“肠胃外”包括皮下,皮内,静脉内,肌内,关节内,动脉内,滑膜内,胸骨内,鞘内,病灶内和颅内注射或输注技术。

[0146] 可根据使用在本领域中已知的技术来配制适当的分散剂或润湿剂和悬浮剂,一种无菌的可注射制剂,例如无菌可注射水性或油性悬浮液。无菌注射制剂还可以是在无毒的肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌注射溶液或悬浮液。可以使用的可接受的赋形剂和溶剂包括甘露醇,水,林格氏溶液和等渗氯化钠溶液。合适的载体和其它药物组合物组分通常是无菌的。

[0147] 此外,无菌、不挥发性油通常用作溶剂或悬浮介质(例如合成的单或双甘油酯)。脂肪酸,如油酸及其甘油酯衍生物作为药学上可接受的油,可用于制备注射剂,如橄榄油或蓖麻油,尤其是它们的聚氧乙基化的版本。这些油溶液或悬浮液也可含有长链醇稀释剂或分散剂,或羧甲基纤维素或类似的分散剂。在药学上可接受的固体,液体或其它剂型的制备中常用的各种乳化剂或生物利用度增强剂也可以用于配制的目的。

[0148] 用于口服给药的组合物可以是任何口服可接受的剂型,包括但不限于,片剂,胶囊剂,乳剂和水性悬浮液,分散体和溶液。在用于口服使用的片剂的情况下,常用的载体包括乳糖和玉米淀粉。润滑剂,如硬脂酸镁,也可加入。对于以胶囊形式的口服给药,有用的稀释剂包括乳糖和干燥的玉米淀粉。当水悬浮液或乳剂口服给药时,活性成分可悬浮或溶解于油相中与乳化剂或悬浮剂。如果需要的话,某些甜味剂,调味剂或着色剂可以被加入。鼻用气雾剂或吸入组合物可根据技术公知的药物制剂的领域中,并且可以被制备为在溶液,例如生理盐水、采用合适的防腐剂(例如,苯醇)、吸收促进剂以提高生物利用度来制备、和/或其他增溶剂或在本领域中公知的分散剂。

[0149] 此外,增加,阻止或减少NTCP的表达/功能的试剂,和/或阻止或减少NTCP和HBV和之间的相互作用的试剂/或HDV可以单独使用或与其它抗感染组合施用来治疗各种感染或病症。根据本发明的组合疗法包括本发明的至少一种化合物或功能性衍生物和至少一种其它药物活性成分的共同施用。所述活性成分(S)和药物活性剂可单独或一起施用。所述活性成分(S)和药物活性剂(S)和给药的相对时间的量可以为达到所需的联合治疗最佳效果来选择。

[0150] 在一些实施方案中,调节NTCP的表达和/或相互作用的试剂可以与用于治疗HBV和/或HDV感染的已知的药物共同施用,其中药物选自干扰素,核苷类类似物,非核苷类抗病毒药物和非干扰素的免疫增强剂。

[0151] 目前,有在美国几个美国FDA批准的药物治疗慢性乙肝:自干扰素 α (Interferon Alpha),聚乙二醇干扰素 (Pegylated Interferon),拉米夫定 (Lamivudine),替比夫定 (Telbivudine),阿德福韦 (Adefovir),恩替卡韦 (Entecavir),替诺福韦 (Tenofovir)。

[0152] 其它药物包括:克拉夫定 (Clevudine),恩曲他滨 (Emtricitabine),MIV-210,氨多索韦 (Amdoxovir),NOV-205 (BAM205),LB80380 (ANA380),Myrcludex B,Bay41-4109,REP9AC,硝唑尼特 (Nitazoxanide),和胸腺素 α -1 (Thymosin α -1)。

[0153] 此外,Myrcludex B是一种的源自的preS1HBV外膜蛋白的用于抑制病毒入侵的药物,目前在临床试验阶段。Myrcludex B已被证明通过结合一个未知的细胞成分(最有可能是受体)能抑制HBV/HDV体外感染和动物模型感染的感染。用Myrcludex B来治疗的想法是由在欧洲的两个著名研究机构,即法国国家健康与医学研究所 (INSERM) 和德国海德堡大学开发的。先导化合物可以阻止HBV和HDV进入肝细胞。通过使用入侵抑制剂,随着不断进行的感染过程,健康的肝细胞可被保护,感染细胞的数量应该会在几个月内显著下降。免疫系统可随后重新获得对病毒复制的控制,省去或缩短病毒复制抑制剂的长期使用。HBV和HDV使用相同的受体进入细胞。最近完成的第一阶段临床研究的Myrcludex B优良的安全性和药代动力学特性的过程中获得的最新结果显示其在细胞和动物模型中对HBV和HDV感染都很有效。

[0154] 细胞系和转基因动物。

[0155] 可以通过稳定地表达人类/树鼩或其他NTCP或通过转染编码NTCP的载体的对HBV/HDV不敏感的细胞系(例如,HepG2细胞或染Huh7,或其它肝脏的细胞,或有肝细胞特性的细胞)来构建可以支持的HBV/HDV感染的细胞系。其他细胞包括长期培养对病毒感染不再敏感的原代肝细胞。人/树NTCP的表达可以导致转染细胞系对病毒感染的易感性。

[0156] 进一步提供了非人转基因动物模型。在本领域中公知的任何转基因的方法可用于生成的动物模型,例如,敲除和/或敲入小鼠模型或SLC10A1基因被对应的人的SLC10A1的人源化动物模型。例如,内源性SLC10A1基因表达可以通过ZFN-被消除、TALEN介导的基因敲除或其他技术。一个SLC10A1基因敲除小鼠可进一步改造成表达来自另一物种的SLC10A1基因,如人或树鼩。此外,还可以构建将小鼠的原SLC10A1基因替换为表达外源SLC10A1基因的基因敲入小鼠。

[0157] 相关的细胞系和非人类的转基因动物模型可用于筛选对HBV的和/或HDV感染或与其相关的疾病所述感染的候选药物。

[0158] 下面的例子来说明本发明的相关内容,但不仅限于本发明的内容。

[0159] 乙肝病毒感染仍是一个重大的公共健康问题,每年约有一百万人死于HBV感染相关性疾病。共同感染HBV和HDV的病人有更严重的疾病。这两种病毒进入细胞的过程是由HBV的包膜蛋白上的大(L)的包膜蛋白的preS1结构域与受体结合区域相互作用所介导的。然而在细胞受体的分子本质一直是未知的。目前我们已发现NTCP作为肝脏胆汁酸转运体可以特异性结合的病毒L蛋白的preS1结构域。通过siRNA降低NTCP的表达水平可以抑制原代肝细胞中HBV和HDV的感染。NTCP的表达使得原本对感染不敏感的Huh-7可以支持HDV的入侵,并

且使对感染不敏感的原代肝细胞重新获得对HBV感染的易感性。这些有数据表明NTCP是HBV和HDV的一种功能性受体。

[0160] NTCP作为HBV和HDV的入侵受体的功能的新发现提出了关于它在病毒感染相关疾病的发病过程中的角色有关的一系列有趣的问题。目前的可采用的抗HBV治疗的手段对于有高机率发展为肝硬化和肝细胞癌的HBV慢性感染是不够充分或没有明显效果的(Lai& Yuen, N Engl J Med 359, 2488 (2008))。NTCP作为HBV和HDV功能性受体的发现使我们能更好地了解HBV和HDV感染而NTCP成为了开发新的预防和治疗对病毒及其相关疾病的潜在靶点。

[0161] 材料和方法。

[0162] 原代树鼩肝细胞(PTHs)的分离与培养。成年树鼩(*Tupaia belangeri chinensis*)购至中国科学院昆明动物研究所,并饲养于北京生命科学研究所的树鼩动物设施。所有的研究均按照研究所批准的操作流程进行并遵守北京生命科学研究所制定的实验动物饲养与使用的相关制度。PTH细胞通过文献所述的两步灌注方法从麻醉的树鼩(100-150g)肝脏(Walter等人, *Hepatology* 24, 1 (1996))获得。灌注后的细胞悬浮液通过一个70 μ m的细胞过滤网过滤,并以50g离心3分钟沉淀获得。

[0163] 含有PTHs将细胞沉淀重悬在补充有10%FBS, 5 μ g/ml转铁蛋白, 5nG/ml的亚硒酸钠, 2mM的L-谷氨酰胺, 100U/ml青霉素和100 μ g/ml链霉素的Williams E培养基的贴壁培养基中。然后将细胞贴壁在胶原包被的细胞培养盘或板。贴壁四小时后,培养介质改变为原代肝细胞维持培养基(PMM),其含有5 μ g/ml转铁蛋白, 10ng/ml的EGF, 3 μ g/ml的胰岛素, 2mM的L-谷氨酰胺, 18 μ g/ml氢化可的松, 40ng/ml地塞米松, 5ng/ml的亚硒酸钠, 2%DMSO, 100U/ml青霉素和100 μ g/ml链霉素的Williams E培养基。细胞用常规培养基培养于37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂的加湿培养箱中,并每2天更换一次培养基。

[0164] 人原代肝(PHHs)和原代树鼩成纤维细胞(PTF)细胞。PHHs从Becton Dickinson公司(美国新泽西州)或上海R&D公司(上海,中国)购买。细胞用与上述的PTH同样的贴壁培养基和维持培养基进行培养。原代成纤维细胞从成年树鼩中分离并用作支持细胞用于培养肝细胞(Khetani et al, *Hepatology* 40, 545 (2004); Huang et al, Manuscript in preparation (Briefly, PTF cells),这是从成年树鼩皮肤分离出的原代成纤维细胞,用作支持细胞与肝细胞共培养。PTF接种到平板上达到约80%密度。24小时后,分离的肝细胞贴壁在预先贴壁的PTF上方。细胞共培养在PMM和培养基中,并每两天换一次液。

[0165] 细胞系。人胚肾细胞系,293和293T,人类宫颈癌细胞系HeLa细胞,人肝癌HepG2细胞都购至美国典型培养物保藏中心(ATCC);人肝癌细胞系Huh-7, SMMC-7721(SMMC)和BEL-7404(BEL)来自中国中科院细胞库的细胞株保藏中心。除非另有说明,细胞将用补充有10%胎牛血清和1%青霉素/链霉素的DMEM培养基(Dulbecco's Modification of Eagle's Medium, Invitrogen公司),在37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂加湿培养箱中进行培养。

[0166] 病毒。HDV:为了表达HDV的RNPs,我们构建了一个包含CMV启动子的控制下的首尾相连的HDV的cDNA.的三聚体的核酸序列的质粒,其中I型的HDV(AF425644.1GenBank登录号)的基因组cDNA通过从头合成的方法得到。另一个质粒用于在内源性HBV控制元件的控制下表达HBV的野生型或突变型HBV外膜蛋白,它含有HBV(基因型D, Genbank登录号: U95551.1)基因组2431至1990的片断,或通过定点突变含有特定的突变。如前所述(Sureau

等人,《病毒学杂志》66,1241(1992)),HDV病毒主要由转染Huh-7获得。HBV:乙肝病毒是从书面同意的乙肝患者血清离心从而获得的。HBV在该研究中使用的基因型为B或C(序列已呈递到Genbank,登录号为JQ412089和JQ412091)。AAV8重组病毒:通过共转染293细胞与AAV8包装,EGFP基因转导和腺病毒辅助相关质粒获得携带EGFP报告基因的重组腺相关病毒8(AAV8)的方法类似于以下文献如所述(Xiao et al, J Virol 72,2224(1998)),AAV8-HBV重组病毒携带重组的1.3拷贝的HBV基因组(Dong et al, Bing Du Xue Bao 26,425(2010))从五加公司(北京,中国)购买。Lenti-VSV-G:是一种以HIV-1基因组为基础含有水泡性口炎病毒糖蛋白和携带萤火虫荧光素酶或绿色荧光蛋白报告基因的慢病毒基础的假病毒。通过在293T细胞上共转染HIV基因包装,gag/pol的表达、和报告基因表达的相关质粒生产这些病毒,如(Sui et al, J Virol 79,5900(2005))所述。

[0167] 病毒有关实验在北京生命科学研究所的BSL-2实验室进行。

[0168] 抗体。2D3是特异性靶向的HBV L蛋白的preS1结构域的19-33个氨基酸的小鼠单克隆抗体(mAb)(亚型的IgG1)。4G5是识别HDV delta抗原的小鼠单抗(的IgG1)。两者都使用常规杂交瘤技术制备。17B9,特异性针对乙肝病毒S蛋白的小鼠单克隆抗体由林江教授在中国兰州生物制品研究所友情提供。免疫荧光染色和免疫印迹的第二抗体从Invitrogen公司(美国加利福尼亚州)或Sigma-Aldrich公司(密苏里州,美国)购买的。乙肝免疫球蛋白(HBIG)来自中国国家食品药品检验所,北京。

[0169] 肽,化合物,ELISA和其它试剂盒。含非天然氨基酸L-2-氨基-4,4-azipentanoic酸(L-光-亮氨酸)的多肽由美国多肽公司公司(American Peptide Company Inc.加州,美国)合成。对应于乙肝病毒L蛋白的preS1区域(EU554535.1C型,菌株S472,GenBank中)的N端肽由中科亚光多肽合成公司合成(北京,中国)。测定HBsAg和HbeAg的ELISA试剂盒购自万泰药业有限公司(北京,中国)。实时定量PCR试剂盒和逆转录酶试剂均来自Takara公司(北京,中国)。Streptavidin偶联的磁珠(的Dynabeads®MyOne™Streptavidin T1),包被缩水甘油醚(环氧树脂)基团(的Dynabeads®M-270Epoxy)磁珠从Life Technologies公司购买。2D3磁珠是根据说明书的方法将2D3到通过共价键交联到Dynabeads®M-270Epoxy磁珠制成。其他试剂购自New England Biolabs(马萨诸塞州,美国),Life Technologies公司(加利福尼亚州,美国)或Sigma-Aldrich公司(密苏里州,美国)。

[0170] 测定HDV或HBV基因组等价物的拷贝数。首先依照制造商的说明用Trizol试剂提取含病毒RNA的总RNA。通过Takara公司的Primerscript RT试剂盒将总RNA逆转录成cDNA并用2μl cDNA进行实时PCR测定。测定HDV的引物与HDV RNA基因组上的delta抗原编码区互补:5'-TCTTCTCGGTCAACCTCTT-3'(正向),和5'-CAAGGAGAGGC AGGATC AC-3'(反向)。HBV-DNA则用特异性引物直接测定:5'-GAGTGTGGATTTCGCACTCC-3'(正向)和5'-GAGGCGAGGGAGTTCTTCT-3'(反向)。实时PCR用ABI7500快速实时定量PCR系统(Applied Biosystems,USA)进行。最后用已知的核酸的量的标准品得出的标准曲线来计算与病毒基因组当量的拷贝数。

[0171] 实时定量RT-PCR特异性检测HDV基因组。特异性检测HDV基因组的由Freitas等人所述的方法进行。在逆转录反应中使用引物HDV398R(5'-CGCTTCGGTCTCCTCTAACT-3')测定的基因组RNA;在逆转录反应中使用引物HDV288F(5'-GCAGACAAATCACCTCCAGA-3')测定反义基因组RNA(Fig.S10B);TaqMan探针为5'-AGAGCTCTGACGCGGAGGAGTAAGC-3'。所有定量PCR

(qPCR)检测都使用ABI7500快速实时PCR仪(Applied Biosystems公司)进行分析。定量HBV特异性的RNA。用Trizol试剂依照制造商的说明从HBV感染的细胞中分离总RNA。并通过自Takara PrimeScript™ RT试剂盒将总RNA反转录成cDNA。采用实时定量RT-PCR检测HBV特异性的RNA水平。引物HBV2270F(5'GAGTGTGGATTCGCACTCC-3')和HBV2392R(5'-GAGGCGAGGGAGTTCTTCT-3')用于HBV3.5KB转录本,HBV1805F(5'-TCACCAGCACCATGCAAC-3')和HBV1896R(5'-AAGCCACCAAGGCACAG-3')对所有HBV特异性转录本(Fig.S10B)。用ABI7500快速实时系统仪器(Applied Biosystems,USA)进行实时PCR反应。最后用已知的核酸的量的标准品得出的标准曲线来计算与病毒RNA的拷贝数。

[0172] HDV病毒结合和抑制试验。HDV结合实验通过以下方法进行,将 5×10^7 拷贝基因组当量的HDV与 1×10^5 靶细胞在4%PEG8000的存在下在16℃结合4小时,接着用冷的PBS(pH 7.4)充分洗涤4次,然后将细胞直接裂解并用Trizol试剂提取RNA并反转录为cDNA。然后通过实时定量PCR测定病毒的RNA基因组拷贝数以及内部对照甘油三磷酸脱氢酶(GAPDH)mRNA的表达量。对于结合抑制实验,不同浓度的多肽或其它待测试的试剂在细胞与病毒孵育之前与细胞在16℃条件下预先与细胞结合1小时。

[0173] 病毒感染和抑制试验。在PTH细胞贴壁于24或48孔板后48-72小时(除非另有说明)后,分别以500和100的基因组当量的HDV和HBV分别感染PTH细胞。除非另有说明,通常用 5×10^7 拷贝基因组当量的HDV或 1×10^7 拷贝的基因组当量的HBV感染 1×10^5 细胞16小时。感染后用培养基洗涤细胞三次并培养在PMM中并每2天定期更换培养基。对于HDV感染,在16小时的病毒感染过程中加入了4%的PEG(Barrera et al, J Virol 78, 5233 (2004))。

[0174] 对于病毒感染的抑制实验,肽或其它试剂在病毒感染之前在37℃下与待感染的细胞预孵育1小时。HDV的感染按上述通过RT-PCR测定病毒基因组RNA或通过指定的感染天数后用单克隆抗体4G5染HDV细胞内抗原来评估。对于HBV感染,可以用商业化ELISA试剂盒测定分泌的HBsAg和HBeAg病毒抗原的量或,用特异性针对乙肝表面抗原的单克隆抗体17B9在指定感染天数后染细胞内的HbsAg。

[0175] 从感染细胞测定病毒抗原的方法。感染后从感染细胞收集上清液,用商业ELISA试剂盒(万泰药用)依照制造商的指示检测上清中分泌的病毒抗原HBsAg和HbeAg的水平。在某些情况下,HbsAg的水平用WHO的HBsAg参考血清进行标化(由来自北京的国家食品药品检验所的Zhenglun Liang博士提供)。

[0176] 构建树鼯转录组深度测序所需的cDNA文库。PTH由如上所述的方法分离得到。PTH的mRNA由Oligo-dT磁珠从10微克总RNA中纯化。mRNA通过与二价阳离子在94℃,5分钟孵育裂成小片段。cDNA第一链的合成通过用随机引物和Superscript II逆转录酶(Invitrogen)与片段化的mRNA合成。然后通过核糖核酸酶H除去双链cDNA的RNA模板并用DNA聚合酶I合成第二链。T4 DNA聚合酶和Klenow DNA聚合酶形成的cDNA平端通过Klenow片段(无3'至5'外切酶)在磷酸化DNA片段的3'平末端用加上了一个“A”碱基。将cDNA与接头连接,然后用2%琼脂糖凝胶分离。纯化 200 ± 25 个左右大小的片段并用产商提供的引物大量扩增。然后PCR产物用QIAquick PCR纯化试剂盒(Qiagen)纯化,定量和稀释用于簇生成与深度测序。用Illumina公司的Genome Analyzer IIx技术(Illumina公司,圣地亚哥,美国)的测序试剂盒(version 5)的进行的72轮的双末端测序。Illumina公司CASAVA pipeline V1.8.1用于序列提取与过滤。

[0177] Illumina公司测序测定的原代树鼩肝细胞的转录组生物信息学分析。从cDNA文库深度测序数据从头构建转录组：上述的肝细胞cDNA文库深度测序结果的253919616-对72nt序列使用默认参数提供给Trinity (Grabherr et al, Nat Biotechnol 29,644 (2011)) r20110519,生成的209063个转录本平均长度为1,421nt (最小300nt,最大21,043nt和scaffold N50为3,674nt)。蛋白质序列鉴定：在序列组装之后,用GENSCAN使用默认参数 (Burge&Karlin, J Mol Biol 268,78 (1997)) 确定编码区序列和这些转录物编码的蛋白质的序列。79989转录物中鉴定出了91479个蛋白质序列,它们代表了组装的结果的38%。转录本和蛋白质序列的质量控制：所有的组装转录本首先使用BLASTx (Camacho et al., BMC Bioinformatics 10,421 (2009)) 与以下数据库进行比对：美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 人类蛋白质参考序列 (RefSeq) 项目 (release date 27Jun 2011;ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/H_sapiens/rnRNA_Prot/), Universal Protein Resource (UniProt) 的UniProt人类蛋白质组知识库 (UniProtKB) (release 2011 06:ftp://ftp.uniprot.org/pub/databases/uniprot/current_release/knowledgebase/proteomes/) 和NCBI非冗余蛋白质序列数据库 (release date 6Jul 2011:ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/db/FASTA/)。选择了至少65%的同一性,70%的最低总覆盖率和的最低单独命中覆盖率大于40%的结果进行分析。这些结果对应30093的转录本,占组装序列结果的14%。所有鉴定的蛋白质序列分别用BLASTp (Camacho et al., BMC Bioinformatics 10,421 (2009)) 对以上所述的三个数据库进行比对 (卡马乔等人, BMC生物信息学10,421 (2009))。选择了至少65%的同一性,70%的最低总覆盖率和的最低单独命中覆盖率大于40%的结果进行分析。这些命中结果对应于42328鉴定的蛋白质序列,占总的识别结果的46%以上。通过将有质量控制的这两个过程筛选出的转录本和蛋白质序列进行合并,并从39871转录本中得出的总50951蛋白质序列都被包括在内。

[0178] 蛋白质序列的注释：通过质量控制标准的转录和蛋白序列蛋白质的序列被选择进行功能注释。每个选择的蛋白质序列首先通过与blastp (Camacho et al., BMC Bioinformatics 10,421 (2009)) 相匹配的其相应从NCBI的人类蛋白序列进行标注。那些在第一步骤中未能标注的序列再通过类似的注释过程提交给UniprotKB人类蛋白质组和NCBI的非冗余蛋白质序列数据库。由前面的步骤未能得到注释的蛋白质序列将根据提交其相应的转录本进行注释。与蛋白质序列相应的转录本的可由BLASTx (Camacho et al., BMC Bioinformatics 10,421 (2009)) 通过NCBI人蛋白质序列的命中,UniProtKB人类蛋白质组或NCBI的非冗余蛋白质序列数据库进行注释进行注释。树鼩肝细胞蛋白质的生成序列数据库：所有鉴定的蛋白质序列都被包含在肝细胞蛋白质序列数据库中。该蛋白质序列都被标注了对应的功能注释。未成功注解的蛋白序列都标有“未鉴定的蛋白质”。将树鼩肝细胞转录产生总共50951注解和40528未注释的蛋白序列合并到数据库中。对于数据库中的每个蛋白质序列生成一个名为GI的数字ID。树鼩肝细胞分蛋白质分析：Panther (Mi et al., Nucleic Acids Res 33,D284 (2005)) 被用来对这项研究中产生的原代树鼩肝细胞的蛋白质序列 (PTHS) 所注释的转录本和蛋白质以及Hart et al, Drug Metab Dispos 38,988 (2010) 所报告的原代人肝细胞 (PHHs) 的转录本进行分类研究。

[0179] 免疫荧光显微镜分析。原代细胞,或转染并表达NTCP或对照质粒的Huh-7或293T细胞在4℃下,用冷PBS进行3次,用3%BSA封闭1h,并用4%多聚甲醛 (PFA) 固定10分钟,随后在

指定浓度下在4℃用一抗或生物素标记的肽结合约4小时。固定后,细胞用合适的二抗或PE标记的-Streptavidin(eBioscience公司)染色。若用于染细胞内抗原,在加抗体之前将细胞用0.5% TritonX-100处理10mins。用尼康的EclipseTi荧光显微镜或Zeiss LSM510 Meta共聚焦显微镜对细胞进行成像分析。

[0180] 实施例1、使用诱饵多肽进行光交联并用串联亲和纯化纯化目标分子。

[0181] 含有L-photoleucine的野生型诱饵(WTb)或对照诱饵肽(N9Kb)避光溶解在DMSO并用Williams E培养基稀释至工作浓度。L-photoleucine含有光活化diazirine环,其在365nm的UV光照射下导致diazirine环的氮的损失和产生具活性的卡宾基团,其半衰期很短并可在几乎零距离发生共价交联。对于串联纯化,诱饵肽与培养于胶原包被的细胞板上的 1×10^7 原代肝细胞共同孵育之后,用PBS充分洗涤后,用CL-1000紫外交联仪(UVP,CA,USA)用365nm紫外线照射细胞进行交联20分钟,交联时细胞放在冰上,距离灯管约5厘米。交联后将细胞洗涤一次,以除去残余的游离肽,随后用1ml RIPA缓冲液(radioimmunoprecipitation assay, pH 7.4)裂解,RIPA缓冲液含有的50mM的Tris,150mM NaCl缓冲液、0.1% SDS、0.5% 脱氧胆酸钠、1% NP40和1x的蛋白酶抑制剂混合物(Roche)。细胞裂解液与100 μ l streptavidin T1磁珠共沉淀,并用1ml RIPA缓冲液充分洗涤至少6次,然后加入50 μ l非还原性SDS-PAGE上样缓冲液(100mM Tris-HCl (pH6.8)、2% SDS、10% 甘油)煮5min。洗脱的样品用冷的RIPA缓冲液稀释至1ml的最终体积并与和沉淀用100 μ l (1×10^8) 2D3结合的M-270磁珠在4℃下结合6小时,用1ml RIPA缓冲液洗涤5次,然后用100 μ l非还原性上样缓冲液煮沸5分钟洗脱。

[0182] 将洗脱液(PNGaseF处理或不处理)用RIPA缓冲液稀释到1ml并用100 μ l streptavidin T1磁珠共沉淀,然后每次用1ml RIPA缓冲液洗涤并再沉淀6次,最后通过20 μ l SDS上样缓冲液煮沸5分钟洗脱,洗脱的样品用12% SDS-PAGE分离并用银染进行分析。若在存在或不存在竞争性多肽的条件下对原代细胞、细胞系或转染了表达NTCP的质粒或对照质粒Huh-7或293T细胞进行交联实验分析,WTb或N9Kb诱饵肽施加到 2×10^6 细胞上的进行交联分析,光交联的方法如上所述。交联样品中streptavidin T1磁珠沉淀并通过SDS-PAGE分离,并随后2D3抗体进行Western blot分析。

[0183] 实施例2、LC-MS/MS和数据分析

[0184] 从银染蛋白胶上将目标条带切下,然后按照参考文献中提到的方法进行胶内还原、烷基化、和胰蛋白酶酶解(Shevchenko et al, Nat Protoc 1, 2856 (2006))。酶解后,将含有0.1%甲酸的肽段混合溶液上到一根填充了10微米YMC碳18填料(YMC, Kyoto, Japan)的4厘米长、75微米内径的熔融石英毛细管柱中。在脱盐后,柱子中的样品通过Waters nano ACQUITY超高效液相色谱(Water, MA, USA)进行分离并洗脱到LTQ-Orbitrap Velos质谱中(Thermo Fisher Scientific, MA, USA)。其中UPLC(超高效液相色谱)分离梯度如下,首先是30分钟从0%乙腈升到30%乙腈,再用10分钟进一步升到80%乙腈,在80%的乙腈上保持10分钟后,最后用5分钟从80%乙腈降回到0%乙腈。质谱对样品以数据依赖(data-dependent)模式进行二级分析,其中一级谱扫描在Orbitrap中进行,分辨率设定为60000。每一个一级谱扫描(300-2000m/z)伴随着4个碎裂能量为35%的data-dependent CID串联二级谱(MS/MS)扫描和4个碎裂能量为40%、扫描分辨率为15000(orbitrap中)的data-dependent HCD串联二级谱(MS/MS)扫描。一级扫描的自动增益控制(AGC target)值设定为

500,000,离子阱 (ion trap) 中的二级谱扫描自动增益控制值设定为10,000,Orbitrap中的二级谱扫描自动增益控制值设定为50,000。此外,对于每个已经被选中进行二级质谱分析的目标离子会进行30秒钟的动态排除。

[0185] 实验中所产生的串联质谱图使用Linux操作系统下安装的ProLuCID蛋白库搜索算法(Xu et al, Mol Cell Proteomics 5, SI 74 (2006))进行了母离子质量误差为 ± 100 ppm、碎片离子质量误差为 ± 400 ppm、半酶切特异性、半胱氨酸上存在着57.0215Da质量差的静态修饰(羧基酰胺化所造成)的搜索,搜索中所使用的目标蛋白数据库是添加了反向序列和增补了bait肽段序列的由Illumina深度测序结果所拼接出的树鼯肝脏蛋白数据库。ProLuCID的搜索结果再进一步使用DTASelect 2.0算法(Tabb et al., J Proteome Res 1, 21 (2002))进行假阳性率为1% (--fp 0.01)、肽段质量误差为不超过10ppm (-DM 10)的过滤,最终鉴定出的蛋白所含肽段的数量设定为1以上。

[0186] 实施例3、对用siRNA处理过的细胞进行病毒感染

[0187] 对以下四条针对树鼯SLC10A1基因的siRNA:

tsNTCP-si1:5'-CUAUGUAGGCAUUGUGAUAdTdT-3',
tsNTCP-si2:5'-GUGUUAUCCUGGUGGUUAUdTdT-3',
tsNTCP-si3:5'-GGACAUGAAUCUCAGCAUUdTdT-3',
tsNTCP-si4:5'-GGGCAAGAGCAUCAUGUUUdTdT-3')

和一个阴性对照siRNA:Ctrl-si:5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUdTdT-3'进行了测试。

[0188] 简而言之,在PTH初次贴壁24小时后用lipofectamine 2000 (Invitrogen公司)转染20nM的siRNA。转染后一天PTH用胰蛋白酶处理,并铺板于胶原包被的预先接种从成年树鼯中分离的并作为肝细胞的支持细胞原代树鼯成纤维细胞(PTF)的细胞的48孔板中(Khetani et al, Hepatology 40, 545 (2004); Huang et al, Manuscript in preparation)简而言之,将PTF细胞,即从成年树鼯皮肤分离的原代成纤维细胞,在与肝细胞共培养用作支持细胞。PTH贴壁后达到约80%的密度,24个小时后,将分离的肝细胞预先播种的PTF上方贴壁。细胞共培养中在PMM培养基中,每两天更换一次培养基。三天后,细胞用HBV, HDV, AAV8-HBV或的Lenti-VSV-G感染8小时 (siRNA转染后4天)。

[0189] 感染后指定天数后测定被感染的细胞所分泌的抗原HBsAg和HBeAg,以及从Lenti-VSV-G感染后释放的荧光素酶。对于免疫荧光染色,将细胞用4%PFA固定,并用抗CYP3A4抗体 (Sigma) 和单克隆抗体17B9分别检测在肝细胞中的细胞色素P4503A4和HBsAg。图片由Zeiss共聚焦显微镜拍摄。

[0190] 为了在转染siRNA的PTHs中测定NTCP的基因敲除的效率,一小部分用于上述的感染实验并同样被转染的PTH细胞在转染一天后用测定同胰蛋白酶消化后重新贴壁于胶原包被的48孔板并继续培养三天,然后用定量实时RT-PCR检测NTCP mRNA的水平。

[0191] 实施例4、HDV感染的受体结合, Huh-7细胞。

[0192] Huh-7细胞使用Lipofectamine2000转染NTCPs表达质粒或对照质粒24小时后,用HDV4%PEG8000的存在下进行感染。 1×10^5 细胞在入侵抑制剂的存在或不存在的条件下与 5×10^7 基因组当量的HDV孵育24小时。培养基每隔两天更换一次。感染第6天后,将细胞固定并用单克隆抗体4G5染细胞内的HDV delta抗原。细胞裂解物中HDV病毒基因组RNA的拷贝数则通过RT-PCR定量。

[0193] 实施例5、在失去了敏感性的原代肝细胞在补充受体分子后进行HBV感染。

[0194] 在肝脏灌注后第13天的细胞用胰酶消化并重贴于胶原包被的12孔板上。第二天,用Lipofectamine2000 (Invitrogen) 对肝细胞转染hNTCP表达质粒或对照载体质粒。转染一天后,PTH的细胞用胰蛋白酶消化并重新接种到该被预先接种PTF的48孔板中。次日,PTHs与HBV孵育8小时后,用PMM洗涤三次除去残留的病毒并每二天换一次液。在感染后第6天及8,用商业ELISA试剂盒检测了培养上清中HBsAg和HBeAg。感染第10天后,将细胞用4%PFA固定,并用0.5% TritonX-100通透,然后在肝细胞中用抗CYP3A4抗体 (Sigma) 染细胞色素CYP3A4,并用mAb17B9染HBsAg。

[0195] 实施例6、鉴定preS1的相互作用的分子

[0196] 通过近零距离光交联 (Suchanek et al., Nat Methods 2, 261 (2005)) 和串联亲和纯化的方法被来寻找与preS1相互作用的分子。对应于L蛋白N末端2-48残基的并在其N-末端豆蔻酰化修饰的preS1脂多肽已被证明可以通过结合一个未知的细胞成分来有效地阻止HBV和HDV感染肝细胞,而这一分子最有可能是病毒受体 (Gripon et al., J Virol 79, 1613 (2005); Engelke et al, Hepatology 43, 750 (2006); Glebe et al., Gastroenterology 129, 234 (2005); Barrera et al, J Virol 79, 9786 (2005); Schulze et al, J Virol 84, 1989 (2010))。我们用一种新的光交联的方法合成诱饵多肽来寻找与preS1的相互作用的分子,这一多肽类似于野生型2-48脂肽 (Myr-47/WT),但区别是某些残基替换成了具有光激活的活性的氨基酸,可以用它来捕捉与它相互作用的分子 (图1A)。树鼩 (*tupaia belangeri*) 是除人类和黑猩猩之外唯一一种可以被乙肝病毒感染 (Glebe et al., J Virol 77, 951 (2003); Walter et al, Hepatology 24, 1 (1996)) 的物种,我们从树鼩肝脏中分离其原代肝细胞作为靶细胞。为了最大限度地提高光交联的效率,已知对于病毒感染最关键的区域 (9-15aa) 中的两个残基 (leu11和phe14) 被L-photo-leucine (L-2-amino-4,4-azipentanoic acid) 所替代,其在UV照射下可以发生近零距离交联 (Suchanek et al, Nat Methods 2, 261 (2005))。Leu11在各基因型的HBV间是100%保守而14号残基在大多数基因型中是苯丙氨酸,但在部分F和G的基因型HBV毒株中为亮氨酸。如图1B-C和图4所示,诱饵肽 (以下命名为Myr-47/WTb或WTb) 在这两个位置上含光敏亮氨酸的多肽仍可剂量依赖性抑制病毒结合和感染原代肝细胞。类似WTb但在第9残基含有额外突变 (N9K) 的多肽则失去了这些活性。含N9K的多肽,命名为Myr47/N9Kb (或以下N9Kb) 作为WTb的对照诱饵多肽。无论是WTb和N9Kb肽的N端都有豆蔻酰化修饰而在C末端赖氨酸残基上都含有生物素标记 (图1A)。

[0197] 为了能够利用额外的表位识别并结合诱饵肽以及与它们的相互作用的分子,我们制备了特异性识别到preS1 (9-15aa) 相邻区域的表位的单克隆抗体 (mAb), 名为2D3 (图5)。

[0198] 将WTb或N9Kb诱饵肽以不同浓度施加到原代树鼩肝细胞 (PTHs) 上,并通过UV光的照射进行交联。交联的诱饵肽和相关分子通过streptavidinT1磁珠沉淀并用SDS-PAGE分离。使用2D3作为检测抗体进行Western blot出现了几个条带,物别是两个WTb和N9K (2 μ M) 交联样品的65KDa周围有很明显弥散的条带 (图1D)。然而在降低浓度后,N9Kb样品中的主带的强度相对于WTb肽迅速下降,最后几乎不可见,而信号在WTb样品的主要条带一直保持。此外,WTb的信号而非N9Kb的信号一经PNGaseF去糖基化就移位到~43kDa,表示两个条带,虽然大小类似但代表不同的蛋白,和WTb交联的蛋白是单一的一种高度N-糖基化的蛋白 (图1E)。此外,非光反应Myr47/WT肽而非一个类似的含有N9K突变的多肽可以有效竞争WTb的交

联(图6A)。该WTb交联蛋白没有分子间二硫键,因为它无论非还原和还原条件下的迁移位置相同(图1E)。有趣的是,WTb交联的蛋白条带只能在贴壁的肝细胞得到,而不能从来自相同细胞的裂解物中交联得到(数据未显示),指示目标蛋白的天然构象是用诱饵肽高效交联的必要条件。值得注意的是,随着细胞体外培养的时间行长,该靶蛋白的丰度迅速下降(图6B)。我们也在人原代肝细胞(PHHs)和非HBV易感的人肝癌细胞系中进行了交联,只在PHH细胞中的WTb的交联样品中可以交联到具有比在PTH的细胞稍小的分子量的信号条带。类似于的PTHs,PHH细胞交联的蛋白也被糖基化修饰并可以被Myr-47/WT多肽来竞争(图6C)。

[0199] 亲和纯化随后通过质谱法分析寻找靶蛋白的分子信息。纯化过程是在严格的条件下进行的并主要包括三个串联的步骤:用streptavidinT1磁珠捕捉所有生物素标记的蛋白质;筛选出与2D3磁珠结合的靶蛋白;并且接着用streptavidinT1磁珠再次纯化以除去残余的与诱饵肽非共价交联的蛋白。纯化的样品通过煮沸洗脱,随后用SDS-PAGE电泳分离,然后银染。可以在~65kDa见到一明显的条带,其与通过Western blot观察到的条带在相同的位置,它在PNGaseF处理后转移到43kDa周围(图7A)。我们切下了这两个目标的条带和对照N9Kb多肽43kDa的凝胶条带,诱饵肽交联的样品进行胰蛋白酶切后用LTQ-Orbitrap Velos的质谱仪进行分析。串联质谱的结果根据包含多数树鼩肝细胞蛋白的一种树鼩肝细胞蛋白质数据库进行检索,这一数据库是通过树鼩的深度测序确定肝细胞转录组构建的(图8)。从WTb诱饵多肽而不是在从对照N9Kb诱饵多肽组中糖基化(~65kDa)和去糖基化(~43kDa)的凝胶切片与蛋白质序列数据库中匹配到了两个独立的胰蛋白酶片段,来源于人牛磺胆酸钠共转运多肽(NTCP)的同源蛋白。树鼩NTCP的蛋白质序列同一性与人相比高达83.9%,相对于人的NTCP在其C末端邻近的位置具有25个氨基酸的一组插入序列(图7B),其与质谱分析高置信水平的两个肽中的一个肽(TEETIPGTLGNSTH)含有此插入的四个残基(下划线表示)(图7C)。这些数据表明,NTCP是与WTb诱饵肽特异性相互作用的蛋白。

[0200] NTCP主要在肝脏表达(Stieger,Handb Exp Pharmacol,205(2011)),这与HBV和HDV的嗜肝性是一致的。它定位于肝细胞血窦面(基底)的细胞质膜(Stieger等,Gastroenterology107,1781(1994)),位置正好适合受体在血源性HBV和HDV中的作用。尽管病毒可能会首先将通过硫酸肝素肝细胞(Schulze et al.,Hepatology 46,1759(2007))相互作用,但乙肝病毒的L蛋白和NTCP之间的特异性相互作用是有效感染所必需的。雄性大鼠NTCP的表达显著高于雌性(Simon et al.,Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 287,G782(2004)),有趣的是,流行病学研究表明,男性接触乙肝病毒后出现HBsAg血清阳性转换的频率比女性要高(London et al,Proc Natl Acad Sci U S A 74,2561(1977))。人肝细胞癌(HCC)中NTCP表达低并与癌细胞分化程度(Kullak-Ublick et al.,Gastroenterology 113,1295(1997);Zollner et al,Liver Int 25,367(Apr,2005))以及HBV相关性肝硬化。NTCP的表达和亚细胞分布在生理条件下被精确地调节,它占肝的大多数甚至全部的Na⁺依赖性胆汁酸转运(Stieger,Handb Exp Pharmacol,205(2011))。

[0201] 实施例7、NTCP和HBV/HDV之间的相互作用

[0202] 为了研究NTCP是否确实与病毒直接相互作用,我们克隆人类和树鼩NTCPs并先验证其与WTb诱饵肽和天然残基的N末端豆蔻酰化preS1肽结合。当在293T细胞(图9A)中过表达时,两种NTCPs能够有效地与WTb发生交联。WTb,而不是对照N9Kb肽可以与表达树鼩NTCP(tsNTCP)与绿色荧光标签(tsNTCP-EGFP)293T细胞结合,并与细胞表面的tsNTCP-EGFP共定

位,而此结合可以被Myr-47/WT肽竞争(图9B)。此外,一野生型的preS1肽可以特异性识别转染293T细胞而表达的人的NTCP(hNTCP)(图9C)。然后检验了病毒结合到表达NTCP细胞的水平。无论是tsNTCP和hNTCP都可以促进HDV病毒的特异性结合。Huh-7中转染NTCPs,但不是几个先前报道的候选受体,可以显著增加HDV结合细胞的能力,并且Myr-47/WT多肽可以容易地竞争此结合(图9D-E)。此外,在其L包膜蛋白的preS1结构域带有pN9K突变的无感染性的突变体的HDV病毒不结合表达hNTCP或tsNTCP的Huh-7细胞(图9F)。这些数据共同表明NTCP和L蛋白的preS1结构域之间的特异性相互作用直接介导的HDV病毒粒子的结合靶细胞。

[0203] 为了确定HBV和HDV感染是否需要内源性表达的NTCP,原代树鼩肝细胞转染了靶向tsNTCP的siRNA(siRNA)然后重铺在支持细胞上并用病毒感染。与对照siRNA相比,HBV感染NTCP表达下调的肝细胞的能力显著下降,细胞内和细胞分泌的病毒抗原大大减少。感染程度的降低同NTCP的mRNA的沉默效率有很好的相关性,当NTCP表达下降到16%后,超过85%的病毒感染被阻断了(图10A)。NTCP在人体肝细胞支持真实的HBV感染的功能也被证实(图22)。同样,HDV感染NTCP下调的细胞也被有效抑制(图10B)。相比HBV和HDV,NTCP的下调并没有影响AAV8-HBV或的Lenti-VSV-G的感染(图10C),尽管如此它们可以感染肝细胞的感染,但其病毒入侵是由AAV8衣壳或VSV-G包膜介导的(图11)。这些数据表明NTCP是HBV和HDV感染的原代肝细胞所必需的重要分子。

[0204] 进一步研究了NTCP的表达使非敏感细胞获得对病毒感染的能力。人肝癌细胞系中NTCP表达是很低且不容易支持HBV或HDV感染,如Huh-7细胞的NTCP的mRNA水平比在人和树鼩的原代肝细胞(图12A)低约10000次以上。我们尝试了NTCP表达是否使Huh-7细胞可以被病毒感染。结果显示,转染的载体质粒的Huh-7细胞不可HDV感染,转染hNTCP的Huh-7细胞可以支持高效的HDV感染,程度与PTH的细胞相近,约有5-10%的细胞被感染,如图中显示的HDV delta抗原的染色结果,其主要分布在细胞核中(图12B),和HDV病毒基因组RNA也显著增加,达到每细胞3000拷贝(图12C)。此外,感染可以被已知的HBV入侵抑制剂包括Myr-47/WT肽和B型肝炎免疫球蛋白(HBIG)所抑制,显示在转染了hNTCP的Huh-7细胞中的HDV的感染是真正的HBV外膜蛋白介导的感染(图12C)。过去研究HBV外膜蛋白倡导的病毒入侵很困难,诱导分化后约2-4周的肝癌细胞系HepaRG(Gripone et al.,Proc Natl Acad Sci U S A 99,15655(2002)),以及树鼩和人原代肝细胞(Glebe et al.,J Virol 77,9511(2003);Walter et al,Hepatology 24,1(1996);Ochiya et al,Proc Natl Acad Sci U S A 86,1875(1989))是少数几种可支持包括入侵在内的完整病毒的生命周期细胞类型。表达NTCP的Huh7提供了一个方便研究病毒进入受乙肝病毒包膜蛋白介导的入侵过程的有价值的系统。

[0205] 同时进一步研究了外源表达NTCP的Huh-7和HepG2细胞是否能支持HBV感染。在优化的条件下,当细胞转染了hNTCP并随后用乙肝病毒颗粒感染可以观察到显著的病毒感染,如可以在测试期间观察到HBeAg和HBV3.5KB RNA和总HBV mRNA的大量积累。因此,尽管其他分子也可能参与了感染过程(如对细胞分化过程中发挥作用)(Seeger et al,in Field's Virology,D.M.Knipe,P.M.Howley,Eds.(Lippincott,Williams,and Wilkins,Philadelphia,2007),vol.2,pp.2977),NTCP是支持HBV感染的主要原因。

[0206] 实施例8、肝肿瘤细胞和转染的NTCP原代肝细胞能够支持HBV的体外感染。

[0207] 经常培养于在含10%FBS的DMEM中的Huh-7细胞,使用Lipofectamine2000转染表达NTCPs的质粒或对照载体。转染后将细胞培养在10%FBS的DMEM中12小时,然后将培养基

改变为PMM。转染48小时后,将细胞重新贴壁于树鼩初级成纤维细胞共培养并与HBV共孵育16小时。将细胞保持在PMM中每两天更换一次培养基。在感染后4,6,9天检测了HBsAg(图13)。还测试了不同的人肝癌细胞株HepG2并得到了类似的结果。在感染后4,7,10天检测了HBeAg并在感染后12天检测了病毒特异性RNA的表达水平(图21)。

[0208] 原代肝细胞从肝组织分离后对HBV和HDV体外感染的敏感性通常只能保持几天。而与以前的报告中大鼠细胞的情况相符合(Liang et al, Hepatology 18, 1162 (1993)), 原代培养的PTH中NTCP mRNA水平(图12D)和蛋白水平(图6)显著减少。可推测, PTH细胞对HBV感染短暂的易感性(图14)在很大程度上由于NTCP表达的快速下降引起的, 外源表达NTCP可能重新使这些细胞获得对HBV感染的易感性。为了测试这一点, 我们在NTCP不再表达和不再易感的PTH上转染人类NTCP并随后检测HBV感染。

[0209] 通过细胞内染色(HBsAg)可以看出, 用hNTCP而不是对照质粒转染PTH细胞可以明显恢复细胞对HBV感染的敏感性, 肝细胞总量的约3%~5%被感染(图12E)。与对照进行比较, 从NTCP-转染细胞分泌的病毒抗原的水平也显著增高(图12F)。虽然感染性尚未达到新分离培养的PTH水平, 考虑PTH细胞相对低的转染效率(~15-20%), 通过NTCP染所获得的易感性是显著的。

[0210] 实施例9

[0211] 一、影响NTCP生理功能的突变也以影响HBV感染。

[0212] 我们构建了四个突变可以影响NTCP的生理功能的突变, 并测试了它们的表面表达水平、与FITC标记的preS1肽(My_r-59-FITC)的结合活性, 以及作为HDV受体的能力。

[0213] Huh7细胞转染了C-末端含有C9标签的野生型-和突变型人NTCP。转染36小时后, 分离细胞, 细胞表面蛋白用用磺基-NHS-LC-生物素进行生物素化标记, 然后用1%CHAPS的PBS裂解细胞, 然后用StraptavidinT1磁珠沉淀, 用抗C9抗体进行Western blot检测。NTCP突变体的表面表达: 野生型和突变体NTCP表面表达水平相近(除了Q68A)(图15)。

[0214] 二、preS1肽(My_r-59-FITC)结合的活性。

[0215] Huh7细胞用野生型-和突变型人NTCP转染, 转染36小时后, 细胞用My_r-59-FITC染色(图16)。

[0216] 三、作为HDV受体的功能。

[0217] Huh7细胞用野生型-和突变型人NTCP转染, 转染36小时后, 细胞用HDV病毒感染, 感染5天后用RT-PCR测定在感染的Huh7细胞内HDV基因组。结果显示带有Q68A, SN105/106AA, E257A突变的NTCP支持HDV感染的能力明显减弱(图17)。

[0218] 实施例10、在胆汁酸盐的存在下用HBV感染原代树鼩肝细胞

[0219] 原代树鼩肝细胞中分离后贴壁于胶原包被平板上, 在指定的浓度牛磺胆酸或牛磺石胆酸的存在下用 1×10^7 基因组当量的HBV感染 1×10^5 原代树鼩肝细胞16小时(图18B)。感染后除去药物并每两天更换一次培养基。在感染后第6天用商业化的ELISA试剂盒测定上清中HBV的抗原水平。在所测试的胆酸盐浓度下细胞存活率没有明显变化(图18)。

[0220] 实施例11、NTCP的转基因(基因敲除/敲入)小鼠或大鼠作为HBV/HDV体内感染模型

[0221] 据观察, NTCP从人类或树鼩可以支持HDV的入侵, 但小鼠或大鼠不行。人们已经知道了小鼠肝细胞可以支持显著的HBV和HDV复制, 因此, HBV/HDV不能感染这些细胞的主要限制因素是在病毒入侵水平。

[0222] 从小鼠或大鼠原代肝细胞进行分离并转染人NTCP表达质粒,然后接种HDV病毒。人类NTCP转染的细胞可能被HDV感染(图19)。

[0223] 由于从小鼠分离的原代肝细胞的低转染效率和的低存活率,因此,“功能获得实验”没有达到理想的效率。但是,的确有数据显示NTCP是制约HBV/HDV感染的小鼠或大鼠的主要因素。因此,NTCP的转基因(基因敲除/敲入)小鼠或大鼠将是研究的HBV/HDV在体内感染一个非常有用的模型。

[0224] 实施例12、激酶抑制剂对HBV感染的初步数据

[0225] LY294002,抑制磷酸肌醇3-激酶(PBKs)的槲皮素吗啉衍生物,可以抑制乙肝病毒感染(图20)。使用50 μ M的LY294002进行了time-course实验:结果表明,化合物加得越早,抑制HBV感染的效果更强,这表明它可能在HBV感染的早期入侵过程起作用,很可能是通过抑制NTCP磷酸化。

[0226] 实施例13、通过HBV外膜蛋白包装的HDV建立HBV/HDV大规模筛选系统

[0227] 一个包含CMV启动子控制的头尾相连HDV基因组的三聚体的质粒可以表达HDV的RNP,其中HDV1.0 \times cDNA(基因型I,GenBank登录号:AF425644.1)通过全基因合成得到。另一个质粒用于在内源的元件的控制下表达HBV的外膜蛋白,这个基于pUC18的质粒含有HBV基因组(基因型D,Genbank登录号:U95551.1)2431至1990bp的野生型的片段,或含有通过定点诱变产生的带有点突变的外膜蛋白。HDV病毒粒子通过如前所述的方法转染Huh-7细胞得到。

[0228] 通过在HepG2细胞中转染人NTCP/pcDNA3.1载体并通过G418筛选得到稳定表达NTCP的HepG2细胞系。细胞在含有特定成分的培养条件下培养。细胞培养用原代肝细胞维持培养基(PMM),其中含有5 μ g/ml转铁蛋白,10ng/ml的EGF,3 μ g/ml的胰岛素,2mM的L-谷氨酰胺,18 μ g/ml氢化可的松,40ng/ml地塞米松,5ng/ml的亚硒酸钠,2%DMSO,100U/ml青霉素和100 μ g/ml链霉素的Williams E培养基。细胞用常规培养基培养于37 $^{\circ}$ C,5%CO₂的加湿培养箱中,并每2天更换一次培养基。

[0229] 使用鼠单克隆抗体4G5通过免疫荧光检测HDV核内delta抗原分析感染结果。

[0230] 上述所包含的实施例仅用于说明目的,并不限制本发明的范围。上述内容有可能有许多改变。以上述的实施例修改和变化对本领域中的那些技术人员将是显而易见,因此仅通过所附的权利要求的范围来限定本发明的意图。

参考文献

1.D.Lavanchy,Hepatitis B virus epidemiology,disease burden,treatment,and current and emerging control measures.J Viral Hepat 11,97(Mar,2004) .

2.S.A.Hughes,H.Wedemeyer,P.M.Harrison,Hepatitis delta virus.Lancet 378,73(Jul 2,2011) .

3.C.Seeger,F.Zoulin,W.S.Mason,in Field's Virology,D.M.Knipe,P.M.Howley,Eds.(Lippincott,Williams,and Wilkins,Philadelphia,2007),vol.2,pp.2977.

4.K.H.Heermann et al.,Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence.J Virol 52,396(Nov,1984) .

5.C.Sureau,The role of the HBV envelope proteins in the HDV replication cycle.CurrTop Microbiol Immunol 307,113(2006) .

6.A.Barrera,B.Guerra,H.Lee,R.E.Lanford,Analysis of host range phenotypes of primate hepadnaviruses by in vitro infections of hepatitis D virus pseudotypes.J Virol 78,5233 (May,2004) .

7.J.Le Seyec,P.Chouteau,I.Cannie,C.Guguen-Guillouzo,P.Gripon,Infection process of the hepatitis B virus depends on the presence of a defined sequence in the pre-S1 domain.J Virol 73,2052 (Mar,1999) .

8.Blanchet,C.Sureau,Infectivity determinants of the hepatitis B virus pre-S domain are confined to the N-terminal 75amino acid residues.J Virol 81, 5841 (Jun,2007) .

9.Le Duff,M.Blanchet,C.Sureau,The pre-S 1 and antigenic loop infectivity determinants of the hepatitis B virus envelope proteins are functionally independent.J Virol 83,12443 (Dec,2009) .

10.Chouteau et al.,A short N-proximal region in the large envelope protein harbors a determinant that contributes to the species specificity of human hepatitis B virus.J Virol 75,11565 (Dec,2001) .

11.Glebe,S.Urban,Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry.World J Gastroenterol 13,22 (Jan 7,2007) .

12.Suchanek,A.Radzikowska,C.Thiele,Photo-leucine and photo-methionine allow identification of protein-protein interactions in living cells.Nat Methods 2,261 (Apr,2005) .

13.Gripon,I.Cannie,S.Urban,Efficient inhibition of hepatitis B virus infection by acylated peptides derived from the large viral surface protein.J Virol 79,1613 (Feb,2005) .

14.Engelke et al.,Characterization of a hepatitis B and hepatitis delta virus receptor binding site.Hepatology 43,750 (Apr,2006) .

15.Glebe et al.,Mapping of the hepatitis B virus attachment site by use of infection inhibiting preS 1 lipopeptides and tupaia hepatocytes.Gastroenterology 129,234 (Jul,2005) .

16.Barrera,B.Guerra,L.Notvall,R.E.Lanford,Mapping of the hepatitis B virus pre-S 1 domain involved in receptor recognition.J Virol 79,9786 (Aug, 2005) .

17.Schulze,A.Schieck,Y.Ni,W.Mier,S.Urban,Fine mapping of pre-S sequence requirements for hepatitis B virus large envelope protein-mediated receptor interaction.J Virol 84,1989 (Feb,2010) .

18.Glebe et al.,Pre-s1 antigen-dependent infection of Tupaia hepatocyte cultures with human hepatitis B virus.J Virol 77,9511 (Sep,2003) .

19.Walter,R.Keist,B.Niederost,I.Pult,H.E.Blum,Hepatitis B virus infection of tupaia hepatocytes in vitro and in vivo.Hepatology 24,1 (Jul,1996) .

20.Hagenbuch,P.J.Meier,Molecular cloning,chromosomal localization,and

functional characterization of a human liver Na⁺/bile acid cotransporter. *J Clin Invest* 93,1326 (Mar,1994) .

21.Stieger,The role of the sodium-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP)and of the bile salt export pump (BSEP) in physiology and pathophysiology of bile formation.*Handb Exp Pharmacol*,205 (2011) .

22.J.Hu,S.Iwata,A.D.Cameron,D.Drew,Crystal structure of a bacterial homologue of the bile acid sodium symporter ASBT.*Nature* 478,408 (Oct 20,2011) .

23.O.Mareninova et al.,Topography of the membrane domain of the liver Na⁺-dependent bile acid transporter.*Biochemistry* 44,13702 (Oct 25,2005) .

24.P.Gripon et al.,Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus.*Proc Natl Acad Sci U S A* 99,15655 (Nov 26,2002) .

25.T.Ochiya et al.,An in vitro system for infection with hepatitis B virus that uses primary human fetal hepatocytes.*Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 1875 (Mar,1989) .

26.D.Liang,B.Hagenbuch,B.Stieger,P.J.Meier,Parallel decrease of Na⁽⁺⁾-taurocholate cotransport and its encoding mRNA in primary cultures of rat hepatocytes.*Hepatology* 18,1162 (Nov,1993) .

27.B.Stieger et al.,In situ localization of the hepatocytic Na⁺/Taurocholate cotransporting polypeptide in rat liver.*Gastroenterology* 107, 1781 (Dec,1994) .

28.A.Schulze,P.Gripon,S.Urban,Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate proteoglycans.*Hepatology* 46,1759 (Dec,2007) .

29.F.R.Simon,J.Fortune,M.Iwahashi,I.Qadri,E.Sutherland,Multihormonal regulation of hepatic sinusoidal Ntcp gene expression.*Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287,G782 (Oct,2004) .

30.W.T.London,J.S.Drew,Sex differences in response to hepatitis B infection among patients receiving chronic dialysis treatment.*Proc Natl Acad Sci U S A* 74,2561 (Jun,1977) .

31.G.A.Kullak-Ublick et al.,Chlorambucil-taurocholate is transported by bile acid carriers expressed in human hepatocellular carcinomas.*Gastroenterology* 113,1295 (Oct,1997) .

32.G.Zollner et al.,Hepatobiliary transporter expression in human hepatocellular carcinoma.*Liver Int* 25,367 (Apr,2005) .

33.S.Lee,S.Kim,Gene regulations in HBV-related liver cirrhosis closely correlate with disease severity.*J Biochem Mol Biol* 40,814 (Sep 30,2007) .

34.C.L.Lai,M.F.Yuen,Chronic hepatitis B~new goals,new treatment.*N Engl J Med* 359,2488 (Dec 4,2008) .

35.S.R.Khetani,G.Szulgit,J.A.Del Rio,C.Barlow,S.N.Bhatia,Exploring

interactions between rat hepatocytes and nonparenchymal cells using gene expression profiling. *Hepatology* 40,545 (Sep,2004) .

36. Y.H.Huang, .Feng, X.Xu, G.Gao, Z.Zhong, G.Qi, Y.Yan, H.Song, M.Fu, L.Chen, P.Sun, Y.Li, W, An efficient hepatitis B virus infection system on tupaia primary hepatocytes co-culturing with hepatic stellate cells. Manuscript in preparation.

37. C.Sureau, A.M.Moriarty, G.B.Thornton, R.E.Lanford, Production of infectious hepatitis delta virus in vitro and neutralization with antibodies directed against hepatitis B virus pre-S antigens. *J Virol* 66,1241 (Feb,1992) .

38. X.Xiao, J.Li, R.J.Samulski, Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J Virol* 72,2224 (Mar,1998) .

39. X.Y.Dong et al., [Establishment of hepatitis B virus (HBV) chronic infection mouse model by in vivo transduction with a recombinant adeno-associated virus 8 carrying 1.3 copies of HBV genome (rAAN8-1.3HBV)]. *Bing Du Xue Bao* 26,425 (Nov,2010) .

40. J.Sui et al., Evaluation of human monoclonal antibody 80R for immunoprophylaxis of severe acute respiratory syndrome by an animal study, epitope mapping, and analysis of spike variants. *J Virol* 79,5900 (May,2005) .

41. M.G.Grabherr et al, Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat Biotechnol* 29,644 (Jul,2011) .

42. C.Burge, S.Karlin, Prediction of complete gene structures in human genomic DNA. *J Mol Biol* 268,78 (Apr 25,1997) .

43. C.Camacho et al., BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 10,421 (2009) . 44. H.Mi et al., The PANTHER database of protein families, subfamilies, functions and pathways. *Nucleic Acids Res* 33, D284 (Jan 1, 2005) .

45. S.N.Hart et al., A comparison of whole genome gene expression profiles of HepaRG cells and HepG2 cells to primary human hepatocytes and human liver tissues. *Drug Metab Dispos* 38,988 (Jun,2010) .

46. A.Shevchenko, H.Tomas, J.Havlis, J.V.Olsen, M.Mann, In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc* 1, 2856 (2006) .

47. V.J.Xu T, Park SK, Cociorva D, Lu B, et al, ProLuCID, a fast and sensitive tandem mass spectra-based protein identification program. *Mol Cell Proteomics* 5, SI 74 (2006) .

48. D.L.Tabb, W.H.McDonald, J.R.Yates, 3rd, DTASelect and Contrast: tools for assembling and comparing protein identifications from shotgun proteomics. *J Proteome Res* 1,21 (Jan-Feb,2002) .

49. D. Zahner, U. Eckhardt, E. Petzinger, Eur J Biochem 270, 1117 (Mar, 2003) .
50. M. S. Anwer et al., J Biol Chem 280, 33687 (Sep 30, 2005) .
51. P. J. Meier, B. Stieger, Annu Rev Physiol 64, 635 (2002) .
52. C. R. Webster, U. Srinivasulu, M. Ananthanarayanan, F. J. Suchy, M. S. Anwer, J Biol Chem 277, 28578 (Aug 9, 2002) .
53. C. M. Schonhoff et al., Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 297, G1259 (Dec, 2009) .
54. S. Hata et al., Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 285, G829 (Nov, 2003) .
55. D. Zahner, U. Eckhardt, E. Petzinger, Eur J Biochem 270, 1117 (Mar, 2003) .
56. R. H. Ho, B. F. Leake, R. L. Roberts, W. Lee, R. B. Kim, J Biol Chem 279, 7213 (Feb 20, 2004) .
57. W. Murray, A. J. Thosani, P. Wang, A. W. Wolkoff, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 301, G60 (Jul, 2011) .
58. Yan, G. Zhong, G. Xu, Z. Jing, W. He, X. Feng, Z. Gao, Y. Huang, Y. Qi, H. Wang, L. Fu, M. Song, P. Chen, Y. Sun, J. Sui, W. Li, Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. Submitted to Science, on Feb. 20, 2012.

序列表

<110> 华辉安健(北京)生物科技有限公司
 <120> 乙肝肝炎病毒功能性受体的组成以及相关应用
 <130> 1N2168HA66A
 <141> 2012-04-25
 <160> 3
 <170> SIPOSequenceListing 1.0
 <210> 1
 <211> 349
 <212> PRT
 <213> 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

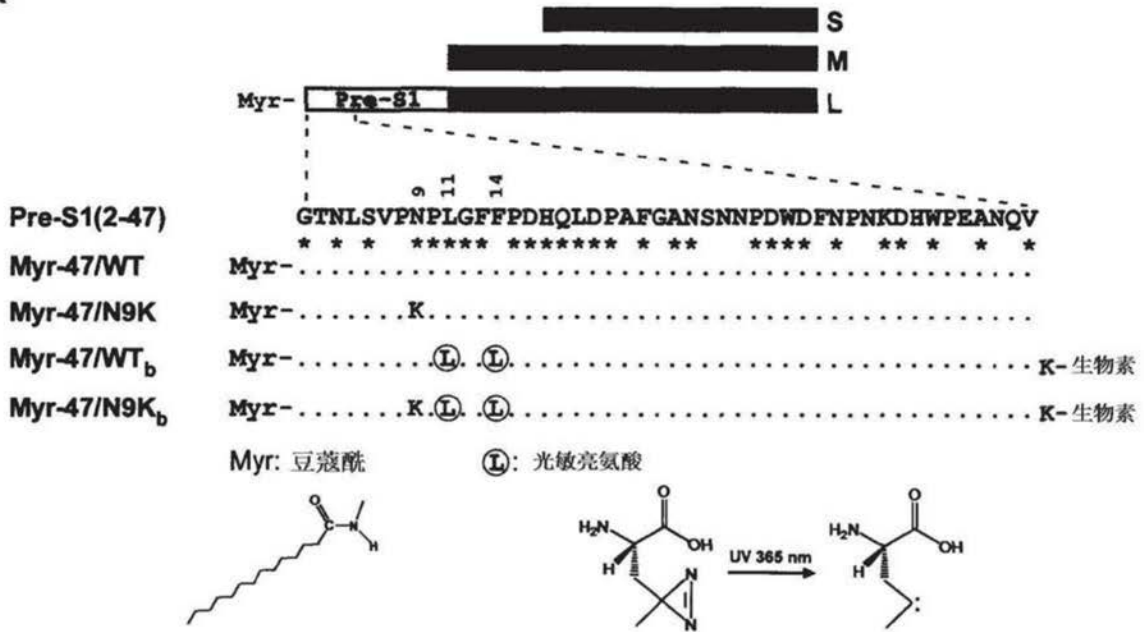
Asn Val Gly Lys Ser Ile Met Phe Ala Met Thr Pro Leu Leu Ile Ala
 210 215 220
 Thr Ser Ser Leu Met Pro Phe Ile Gly Phe Leu Leu Gly Tyr Val Leu
 225 230 235 240
 Ser Ala Leu Phe Cys Leu Asn Gly Arg Cys Arg Arg Thr Val Ser Met
 245 250 255
 Glu Thr Gly Cys Gln Asn Val Gln Leu Cys Ser Thr Ile Leu Asn Val
 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> 379
 <212> PRT
 <213> Tupaia belangeri
 <400> 2
 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
 290 295 300
 Arg Cys Tyr Glu Lys Ile Lys Thr 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
 Ser Thr His Lys Cys Glu Glu Tyr Ser Pro Tyr Thr Val Glu Asn Ser
 340 345 350
 Thr His Lys Cys Glu Glu Tyr Ser Pro Ser Thr Val Gly Asn Gly Thr
 355 360 365
 Tyr Lys Gly Glu Glu Cys Ser Pro Gly Thr Ala
 370 375
 <210> 3
 <211> 349
 <212> PRT
 <213> Pan troglodytes
 <400> 3
 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
 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

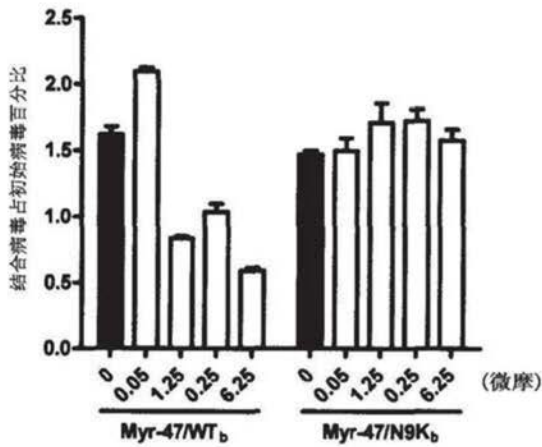
				325						330				335
Gly	Thr	Tyr	Lys	Gly	Glu	Asp	Cys	Ser	Pro	Cys	Thr	Ala		
				340						345				

A



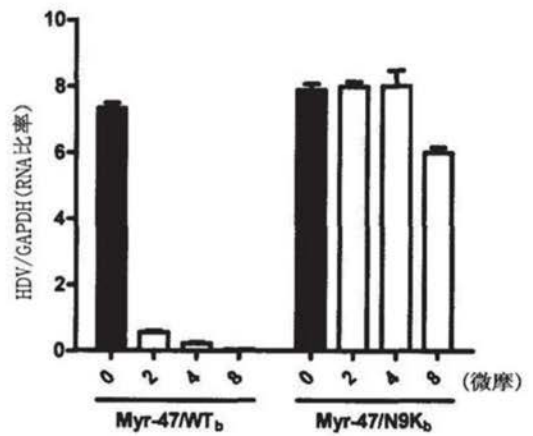
B

丁肝病毒结合抑制实验

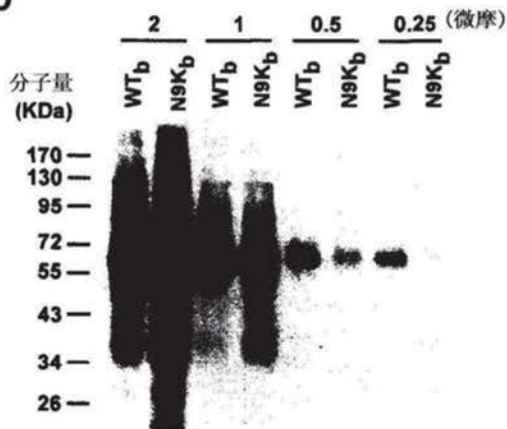


C

丁肝病毒感染抑制实验



D



E

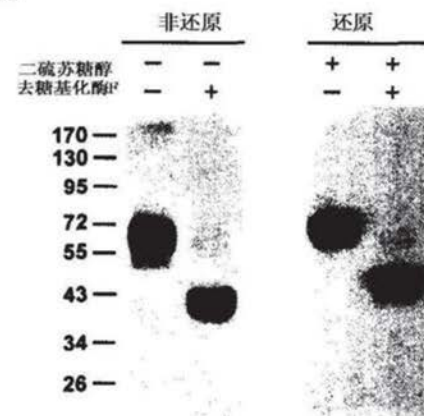


图1

人类	MEAHNASAPFNFTLPFNFGKRPTDLALSVILVFMFLFFIMLSLGCMEFSKIKAHLWPKGLAIALVAQYG	70
黑猩猩	MEAHNVASAPFNFTLPFNFGKRPTDLALSVILVFMFLFFIMLSLGCMEFSKIKAHLWPKGLAIALVAQYG	70
猴	MEAHNASAPFNFTLPFNFGKRPTDLALSIIIVFMFLFFVMSLGCMEFSKIKAHLWPKGLAIALVAQYG	70
树鼯	MEAHNLSAPLNFTLPFNFGKRPTDQALSIVLVVMLLIMLSLGCMEFSKIKAHFWKPKGLAIALVAQYG	70
马	MEAHNASTPLNFTLPFNFGKRPTDLALSVILVLMFLIVMFLSLGCMEFGKIKAHFWKPKGLAIALVAQYG	70
猪	MEALNESAPINFTLPFNFGKRPTDLALSVILVFMFLIIMLSLGCMEFGIRIRAHFRKPKGLAIALVAQYG	70
狗	MDAPNITAPLNFTLPFNFGKRPTDKALSIIIVFLLLIIMLSLGCMEFSKIKAHFWKPKGLVIALIAQYG	70
小鼠-剪接型 1	MEAHNVASAPFNFTLPFGFGRATDALSIVLVVMLLIMLSLGCMEFSKIKAHFWKPKGVI IAIVAQYG	70
小鼠-剪接型 2	MEAHNVASAPFNFTLPFGFGRATDALSIVLVVMLLIMLSLGCMEFSKIKAHFWKPKGVI IAIVAQYG	70
大鼠	MEVHNVSAPFNFTLPFGFGRATDKALSIIIVLMLLIMLSLGCMEFSKIKAHLWPKGVIIVALVAQFG	70
	*.: * :*:**:* * .**:* ** ***:***.:**:*:*****.:**:*: ***: :**:*:	
人类	IMPLTAFVLGKVFRLKNIEALAILVCGCSPGGNLSNVFSLAMKGMNLSIVMTTCSTFCALGMMPLLLYI	140
黑猩猩	IMPLTAFVLGKVFRLKNIEALAILVCGCSPGGNLSNVFSLAMKGMNLSIVMTTCSTFCALGMMPLLLYI	140
猴	IMPLTAFVLGKVFRLNNEALAILVCGCSPGGNLSNVFSLAMKGMNLSIVMTTCSTFCALGMMPLLLYL	140
树鼯	IMPLTAFALGKVFPLNNEALAILVCGCSPGGNLSNVFSLAMKGMNLSIVMTTCSTFFALGMMPLLLYI	140
马	IMPLTAFALGKVFQLNNEALAILVCGCSPGGNLSNIFSLAMKGMNLSIVMTTCSTFFALGMMPLLLYI	140
猪	IMPLTAFALGKLFRLNNEALAILICGCSPPGNLSNIFALAMKGMNLSIMMTTCSTFFALGMMPLLLYL	140
狗	IMPLTAFTLGKVFRLNNEALAILVCGCSPGGTNSNVFSLAMKGMNLSIVMTTCSTFFALGMMPLLLYI	140
小鼠-剪接型 1	IMPLSAFLLGKVFHLTSEALAILICGCSPPGNLSNFLTAMKGMNLSIVMTTCSSFTALGMMPLLLYI	140
小鼠-剪接型 2	IMPLSAFLLGKVFHLTSEALAILICGCSPPGNLSNFLTAMKGMNLSIVMTTCSSFTALGMMPLLLYI	140
大鼠	IMPLAFLGKIFHLNIEALAILICGCSPPGNLSNFLTAMKGMNLSIVMTTCSSFSALGMMPLLLYV	140
	*****:* ***: * .:*****:*****.***:*:*****:*****:* *****:	
人类	YSRGIYDGDLDKDKVPYKIVISLVLVLPCTIGIVLKSQRQYMRVYIKGGMI ILLCSVAVTVLSAINV	210
黑猩猩	YSRGIYDGDLDKDKVPYKIVISLVLVLPCTIGIVLKSQRQYMRVYIKGGMI ILLCSVAVTVLSAINV	210
猴	YTRGIYDGDLDKDKVPYGRILSLVPLVLPCTIGIVLKSQRQYMRVYIKGGMI ILLCSVAVTVLSAINV	210
树鼯	YSKGIYDGDLDKDKVPYVGVISLVLVLPCTIGIFLKSQRQYVYVTKAGMI ILLLSVAITVLSVINV	210
马	YSRGIYEGDLKDKVPYGGIVISLVLVLPCTIGIFLNAKRQYARYMVKSGMI IMLLFSVAVAALSAINV	210
猪	YSRGIYDGTLDKDKVPYGSIVISLVLLIPCTIGIILNTRKRPQYVRYVYIKGGTILLILCAIIVTVLSVLNV	210
狗	YSNGIYDGDLDKDKVPYKIVSSLVLVLPCTIGIFLAKRQYVRYIKGGMI IMLLSVAITVLSVINV	210
小鼠-剪接型 1	YSKGIYDGDLDKDKVPYKIMLSLVMLVLPCTAIGIFLKSQRPHYVYVYVTKAGMIITFSLVAVTVLSVINV	210
小鼠-剪接型 2	YSKGIYDGDLDKDKVPYKIMLSLVMLVLPCTAIGIFLKSQRPHYVYVYVTKAGMIITFSLVAVTVLSVINV	210
大鼠	YSKGIYDGDLDKDKVPYKIMISLVIVLPCTIGIVLKSQRPHYVYVYVTKAGMIITFLLSVAVTVLSVINV	210
	*.:**:* ***** * : ***: *****:***.*:***:* * : *.* * : : :*:**:*:	
人类	GKSIMFAMTPLLIIATSSLMPIFGFLGVLVLSALFCLNGRCRRTVSMETGCQNVQLCSTILNVAF	280
黑猩猩	GKSIMFAMTPLLIIATSSLMPIFGFLGVLVLSALFCLNGRCRRTVSMETGCQNVQLCSTILNVAF	280
猴	GKSIMFAMTPLLIIATSSLMPIFGFLGVLVLSALFCLNGRCRRTVSMETGCQNVQLCSTILNVAF	280
树鼯	GKSIMFVMTPHLLATSSLMPIFGFLGVLVLSALFCLNGRCRRTVSMETGCQNVQLCSTILNVTF	280
马	GKSIMFVMTPHLLATSSLMPIFGFLGYLMSALFRLNGRCRRTVSMETGCQNVQLCSTILNVTF	280
猪	GKSILFVMTPHLVATSSLMPIFGFLGVLVLSALFRLNARCRTVSMETGCQNVQLCSTILNVTF	280
狗	GKSIRFVMTPHLLATSSLMPIFGFLGYLSALFRLDGRCSRTVSMETGCQNVQLCSTILNVTF	280
小鼠-剪接型 1	GNSIMFVMTPHLLATSSLMPIFGFLMGYLSALFRLNPSCRRTISMETGFQNVQLCSTILNVTF	280
小鼠-剪接型 2	GNSIMFVMTPHLLATSSLMPIFGFLMGYLSALFRLNPSCRRTISMETGFQNVQLCSTILNVTF	280
大鼠	GNSIMFVMTPHLLATSSLMPIFGFLMGYLSALFQNLNPSCRRTISMETGFQNIQLCSTILNVTF	280
	*:*** * .*** * :***** ***:**:* ** * : * * : .*** ***:*****:*****:	
人类	PLFFFFLLYMI FQLGEGLLIIAIFWCYEKFKTPKDKTKMIYTAATTEETIPGALG-----	335
黑猩猩	PLFFFFLLYMI FQLGEGLLIIAMFWCYEKFKTPKDKTKMIYTAATTEETIPGALG-----	335
猴	PLFFFFLLYMI FQLGEGLLIIAMFRCYEKFKTPKDKTKMIYTAATTEETIPGALG-----	335
树鼯	PLFFFFLLYMI FQLGEGLLIIAIFRCYEKIKTSKDKTKVIYTAATEETIPGLGNSTHKCEEYSPYTV	350
马	PLFFFFLLYMI FQLGEGLLIIALFRCYEKMKPSKDKTKMIYTAATTEETIPGALG-----	335
猪	PLFFFFLLYML FQLGEGLLIIAIFRCYEKTKLSKDKMKTISAADSTEETIPTALG-----	335
狗	PLFFFFLLYMI FQLGEGVFLISIFRCYEKIKPSKDKTKMIYTAATEETIPGALG-----	335
小鼠-剪接型 1	PLFFFFLLYMI FQLAEGLLFIIIFRCYLKIKPKQDKTKITYKAAATEDATPAALE-----	335
小鼠-剪接型 2	PLFFFFLLYMI FQLAEGLLFIIIFRCYLKIKPKQKGY-----	317
大鼠	PLFFFFLLYMI FQLAEGLLIIIFRCYEKIKPKQDKTKITYKAAATEDATPAALE-----	335
	*****:***.*:***: * : * * : * .:	
人类	-----NGTYKGEDCSPCTA-----	349
黑猩猩	-----NGTYKGEDCSPCTA-----	349
猴	-----NGTYKGEDCSPCTA-----	349
树鼯	NSTHKCEEYSPSTVGNNGTYKGEEDCSPGTA-----	379
马	-----NGTHKGECSPCTA-----	349
猪	-----NGTHKGEECPPTQPSVV-----	352
狗	-----NGTHKGEECSPCTAAPSPSGLDSGEKAIQCDQLEKAKDKRNTKEESFSSIGSSNYQN	392
小鼠-剪接型 1	-----KGTHNG-NNPPTQPGSPNGLNSGQMAN-----	362
小鼠-剪接型 2	-----KGTHNG-NNPPTQPGSPNGLNSGQMAN-----	317
大鼠	-----KGTHNG-NIPPLQPGSPNGLNSGQMAN-----	362

图2

> 人类 SLC10A1

MEAHNASAPFNFTLPPNFGKRPTDLALSIVLVFMLFFIMLSLGCTMEFSKIKAHLWKPKGLAIALVAQYGIMPLTAFVL
 GKVFRLKNIIEALAILVCGCSPGGNLSNVFSLAMKGMNLSIVMTTCSTFCALGMMPLLLYIYSRGIYDGLDKDKVPYKG
 IVISLVLVLIPTIGIVLKSRRPQYMRVVIKGGMI I ILLCSVAVTVLSAINVGKSIMFAMTPLLIATSSLMPF IGFLG
 YVLSALFCLNGRCRRTVSMETGCQNVQLCSTILNVAFPPEVIGPLFFFPLLYMIFQLGEGLLLIAIFWCYEKFKTPKDK
 TKMIYTAATTEETIPGALGNGTYKGEDCSPTA

> 树鼩 SLC10A1

MEAHNLSAPLNFTLPPNFGKRPTDQALSIVLVVMLLIMLSLGCTMEFSKIKAHFWKPKGLAIALLAQYGIMPLTAFAL
 GKVFPLNNIEALAILVCGCSPGGNLSNVFSLAMKGMNLSIVMTTCSTFFALGMMPLLLYIYSKGIYDGLDKDKVPYVG
 IVISLILVLIPTIGIFLKSRRPQYVPYVTKAGMI I ILLSVAITVLSVINVGKSIMFVMTPHLLATSSLMPF IGFLG
 YILSTLFRNLNAQCSRTVSMETGCQNVQLCSTILNVTFRPEVIGPLFFFPLLYMIFQLGEGLLLIAIYRCYEKIKTSKDK
 TKVIYTAATEETIPGTLGNSTHKCEEYSPYTVENSTHKCEEYSPSTVGNNGTYKGEESPGTA

> 大鼠 SLC10A1

MEVHNVSAPFNFSLPPGFGHRATDKALS I IIVLMLLLIMLSLGCTMEFSKIKAHLWKPKGVIVALVAQFGIMPLAALL
 GKIFHLSNIEALAILICGCSPPGGNLSNFLTAMKGMNLSIVMTTCSSFSALGMMPLLLYVYSKGIYDGLDKDKVPYKG
 IMISLVIVLIPTIGIVLKSRRPHYVPYVILKGGMI ITFLLSVAVTALSVINVGNSIMFVMTPHLLATSSLMPFSGFLMG
 YILSALFQLNPSRRTISMETGFQNIQLCSTILNVTFPPEVIGPLFFFPLLYMIFQLAEGLLIIIFRCYEKIKPPKDK
 TKITYKAAATEDATPAALEKGTHNGNIPPLQPGPSPNGLNSGQMAN

> 小鼠—剪接型 1 SLC10A1

MEAHNVSAPFNFSLPPGFGHRATDTALSIVLVVMLLLIMLSLGCTMEFSKIKAHFWKPKGVIIAIVAQYGIMPLSAFLL
 GKVFHLTSIEALAILICGCSPPGGNLSNFLTAMKGMNLSIVMTTCSSFTALGMMPLLLYIYSKGIYDGLDKDKVPYKG
 IMLSLVMVLIPCAIGIFLKSRRPHYVPYVILKAGMI ITFSLSVAVTVLSVINVGNSIMFVMTPHLLATSSLMPFTGFLMG
 YILSALFRLNPSRRTISMETGFQNVQLCSTILNVTFPPEVIGPLFFFPLLYMIFQLAEGLLFIIIFRCYLKIKPKQDK
 TKITYKAAATEDATPAALEKGTHNGNPPPTQPLSPNGLNSGQMAN

> 人类 SLC10A1-EGFP

MEAHNASAPFNFTLPPNFGKRPTDLALSIVLVFMLFFIMLSLGCTMEFSKIKAHLWKPKGLAIALVAQYGIMPLTAFVL
 GKVFRLKNIIEALAILVCGCSPGGNLSNVFSLAMKGMNLSIVMTTCSTFCALGMMPLLLYIYSRGIYDGLDKDKVPYKG
 IVISLVLVLIPTIGIVLKSRRPQYMRVVIKGGMI I ILLCSVAVTVLSAINVGKSIMFAMTPLLIATSSLMPF IGFLG
 YVLSALFCLNGRCRRTVSMETGCQNVQLCSTILNVAFPPEVIGPLFFFPLLYMIFQLGEGLLLIAIFWCYEKFKTPKDK
 TKMIYTAATTEETIPGALGNGTYKGEDCSPTAAPVATMVSKEELFTGVVPILEVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYG
 KLTLLKFICTTGKLPVWPPTLVTTLTYGVCFSRYPDHMQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTL
 VNRIELKIDFKEDGNILGHKLEYNYNHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDN
 HYLSTQSALS KDPNEKRDMVLEFVTAAGITLGMDELYK

> 树鼩 SLC10A1-EGFP

MEAHNLSAPLNFTLPPNFGKRPTDQALSIVLVVMLLIMLSLGCTMEFSKIKAHFWKPKGLAIALLAQYGIMPLTAFAL
 GKVFPLNNIEALAILVCGCSPGGNLSNVFSLAMKGMNLSIVMTTCSTFFALGMMPLLLYIYSKGIYDGLDKDKVPYVG
 IVISLILVLIPTIGIFLKSRRPQYVPYVTKAGMI I ILLSVAITVLSVINVGKSIMFVMTPHLLATSSLMPF IGFLG
 YILSTLFRNLNAQCSRTVSMETGCQNVQLCSTILNVTFRPEVIGPLFFFPLLYMIFQLGEGLLLIAIYRCYEKIKTSKDK
 TKVIYTAATEETIPGTLGNSTHKCEEYSPYTVENSTHKCEEYSPSTVGNNGTYKGEESPGTAAPVATMVSKEELFTG
 VVPILEVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLLKFICTTGKLPVWPPTLVTTLTYGVCFSRYPDHMQHDFFKSAMP
 EGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKIDFKEDGNILGHKLEYNYNHNVYIMADKQKNGIKVNFKIR
 HNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDMVLEFVTAAGITLGMDELYK

图3

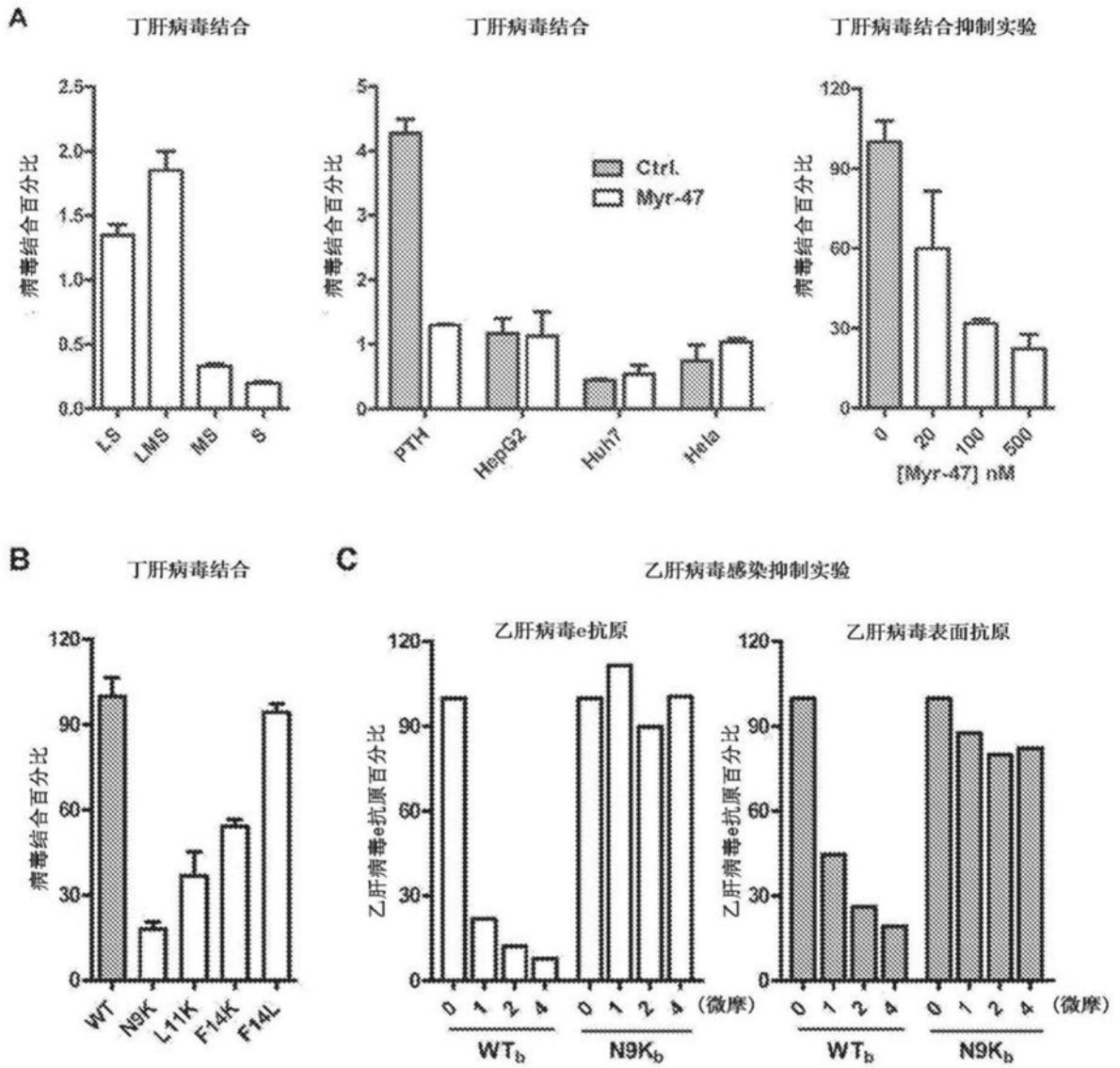


图4

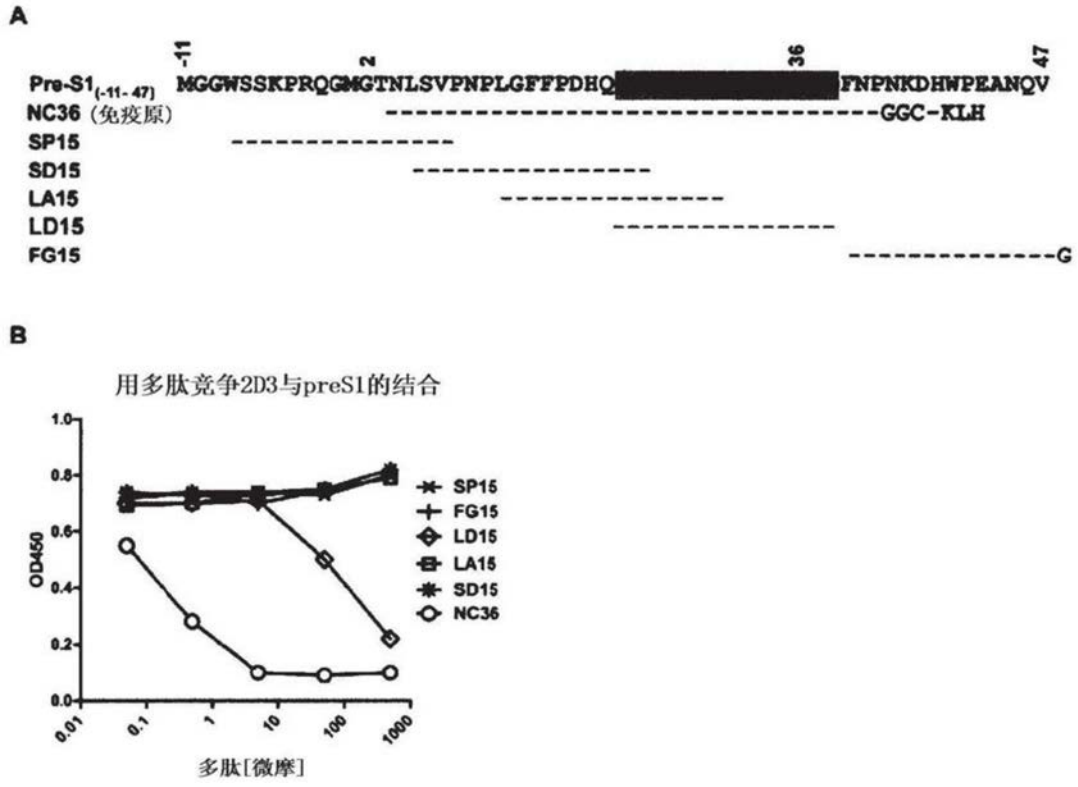


图5

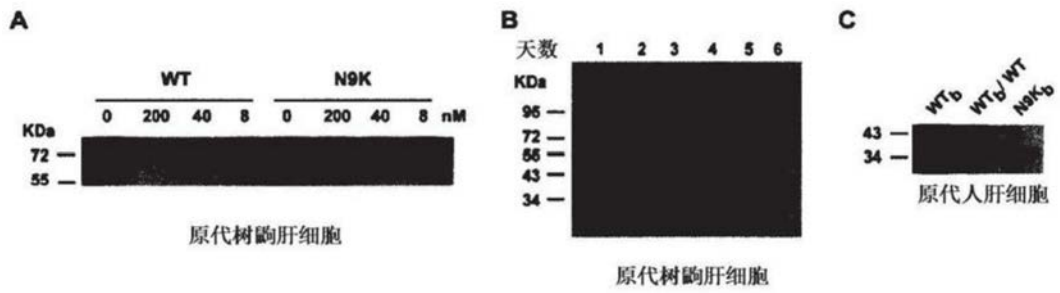


图6

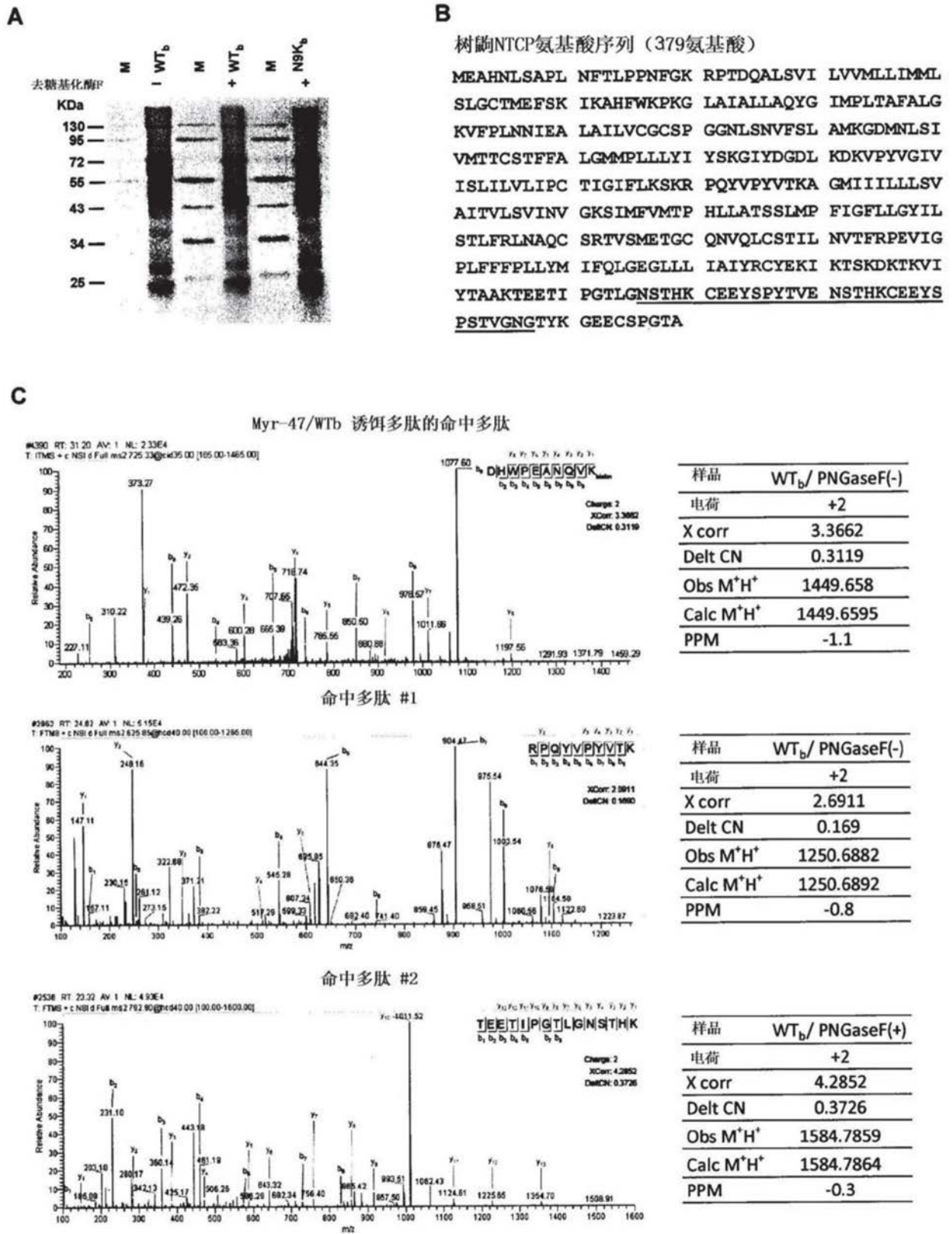


图7

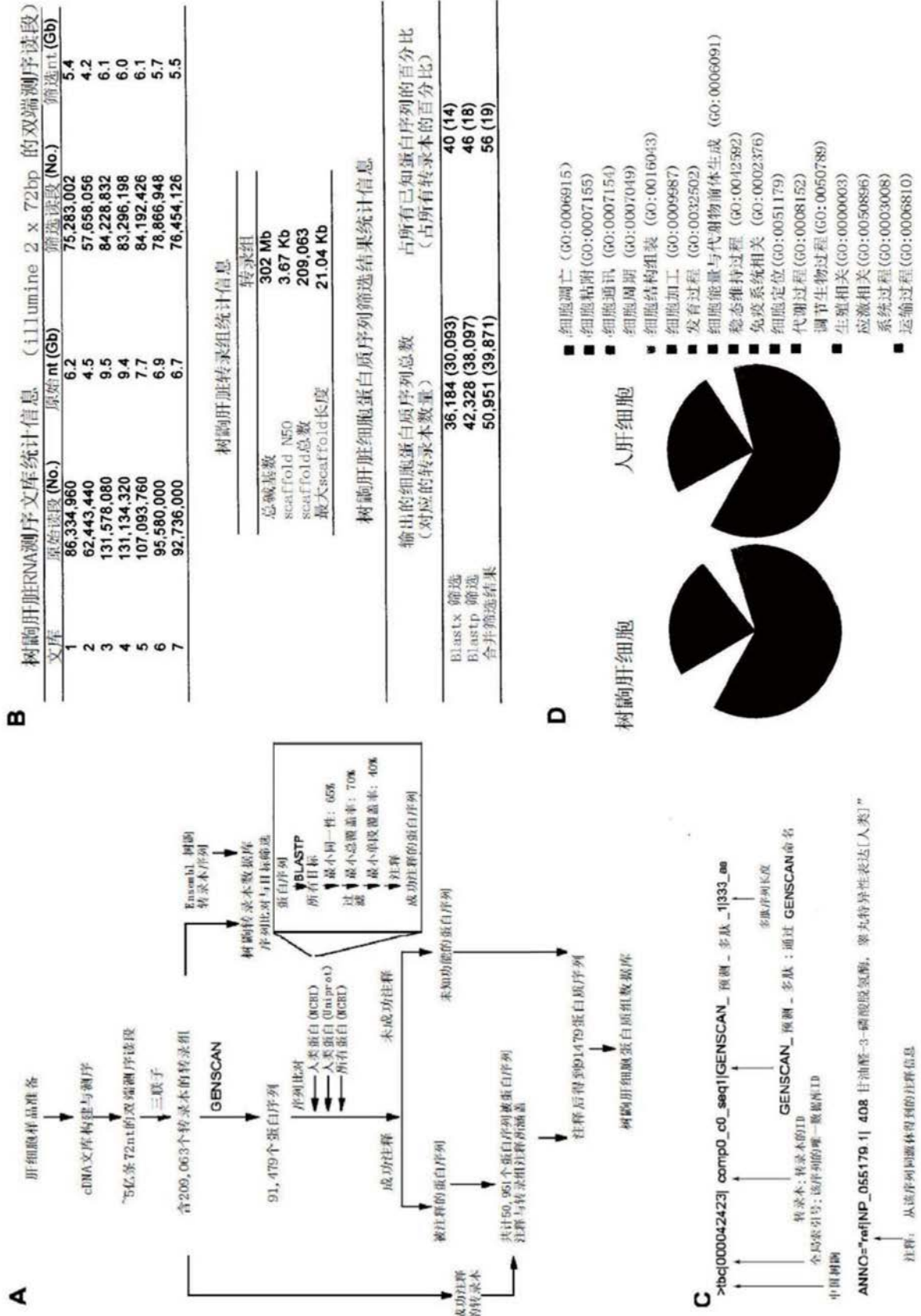


图8

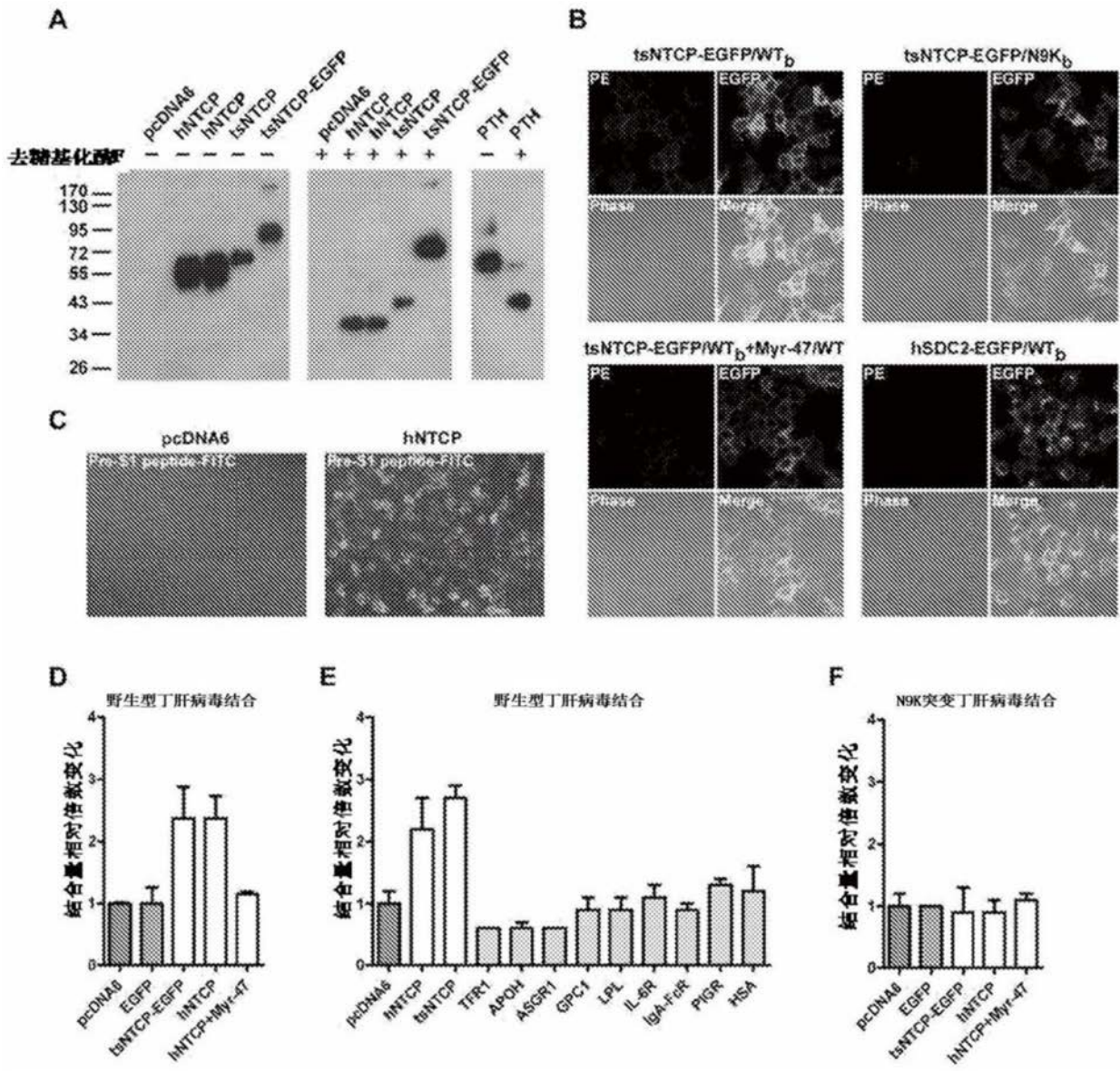


图9

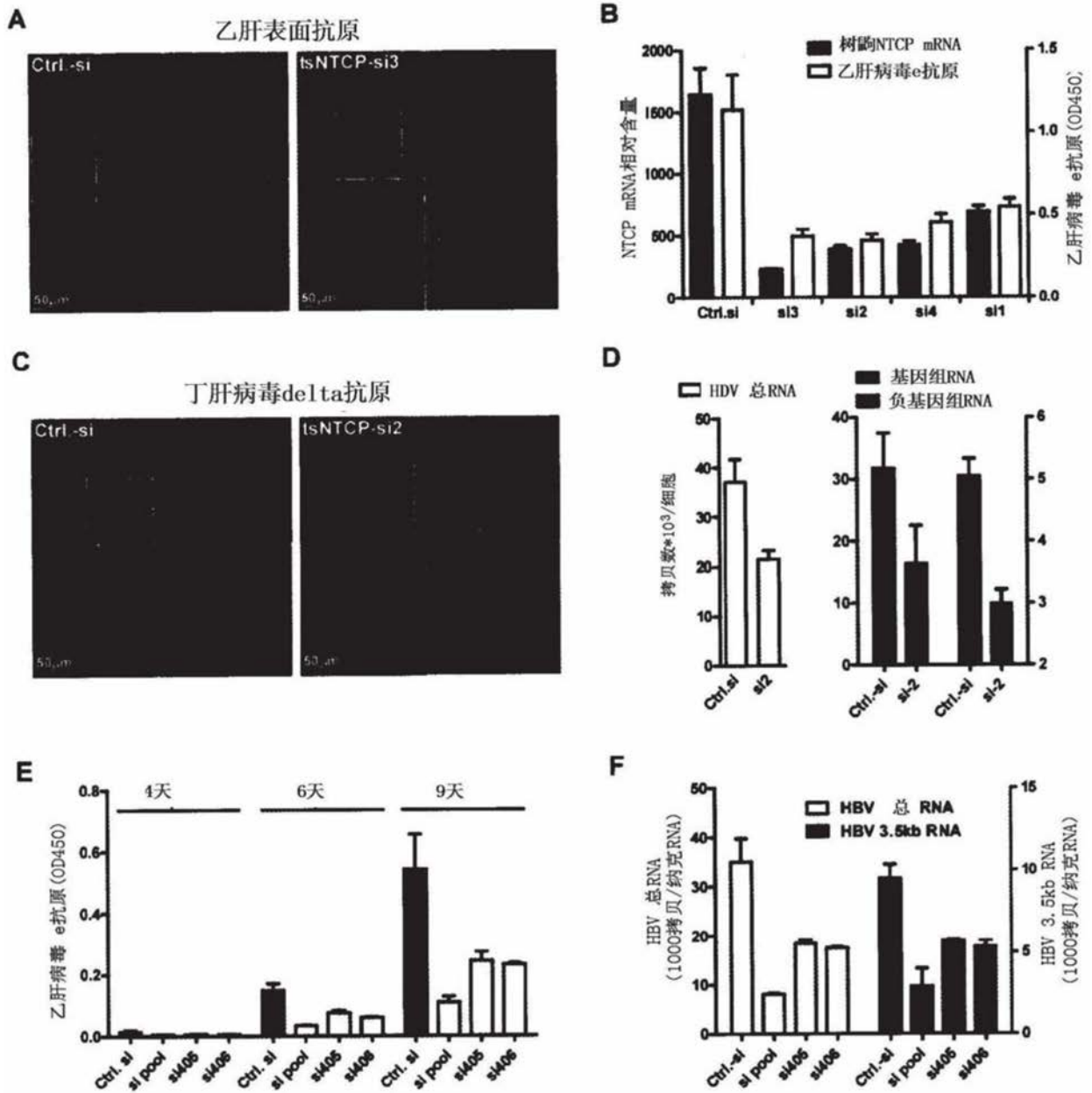


图10

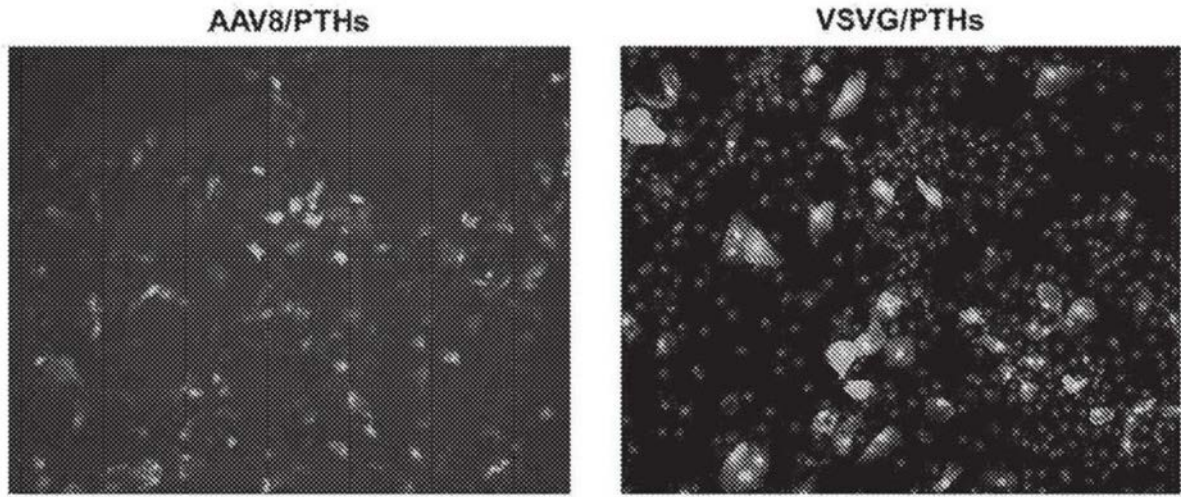


图11

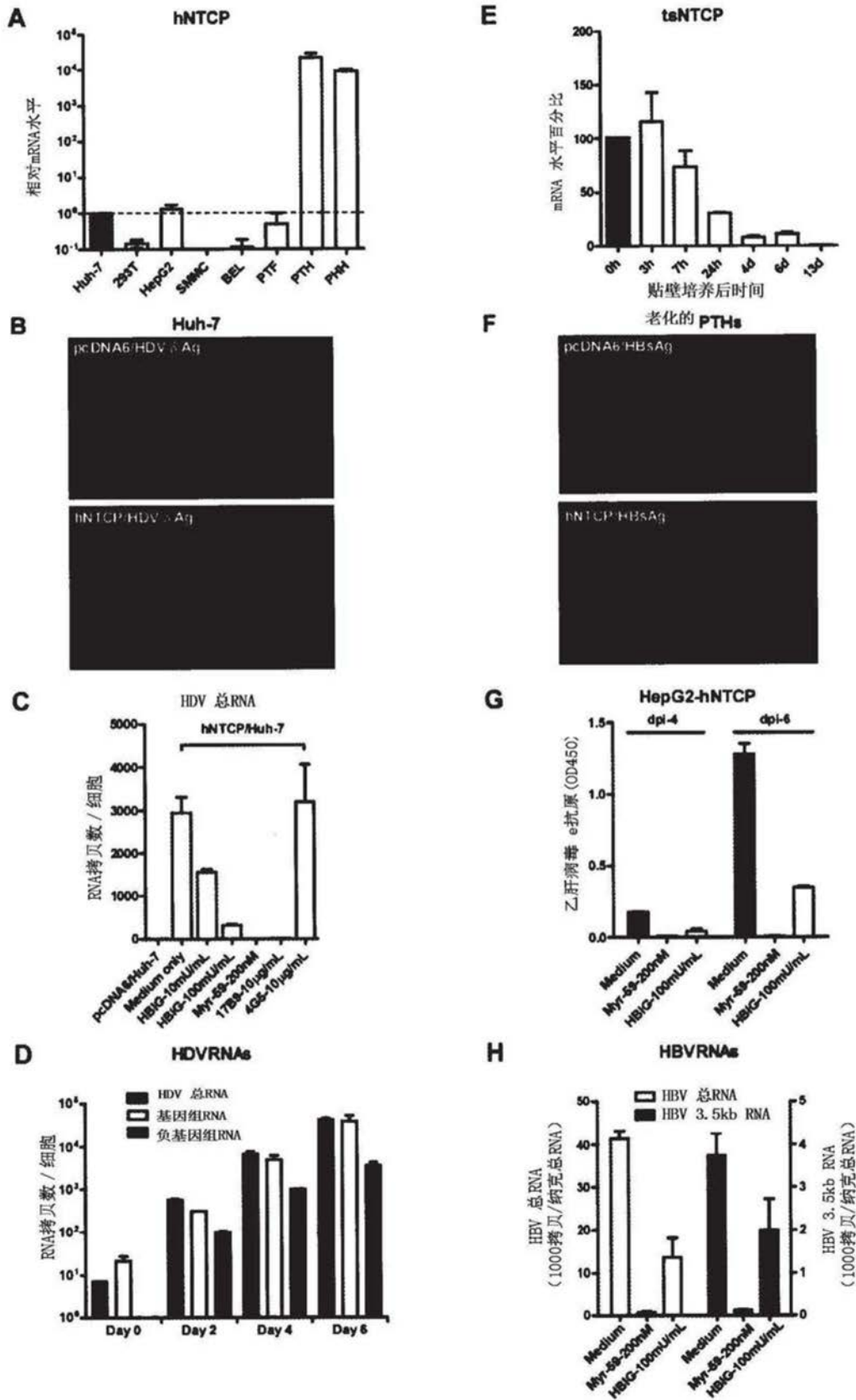


图12

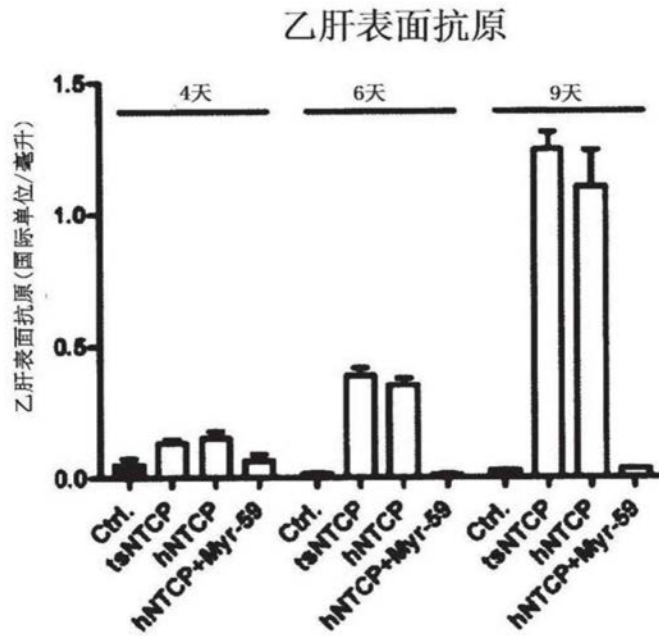
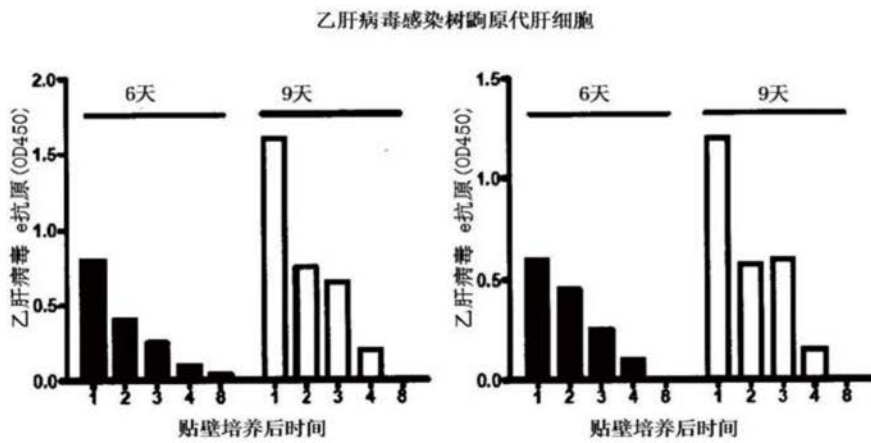


图13

A



B

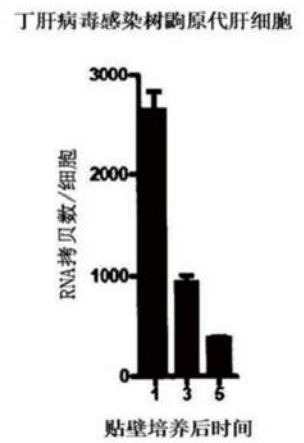


图14

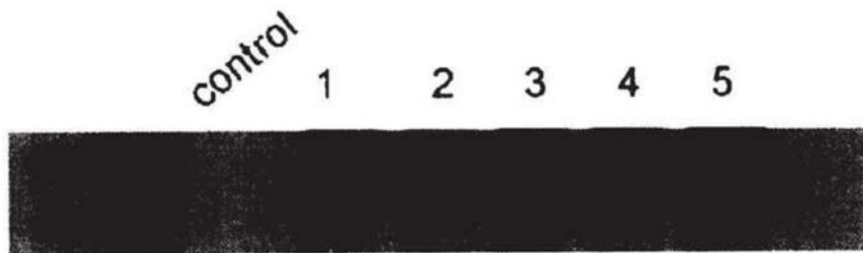


图15

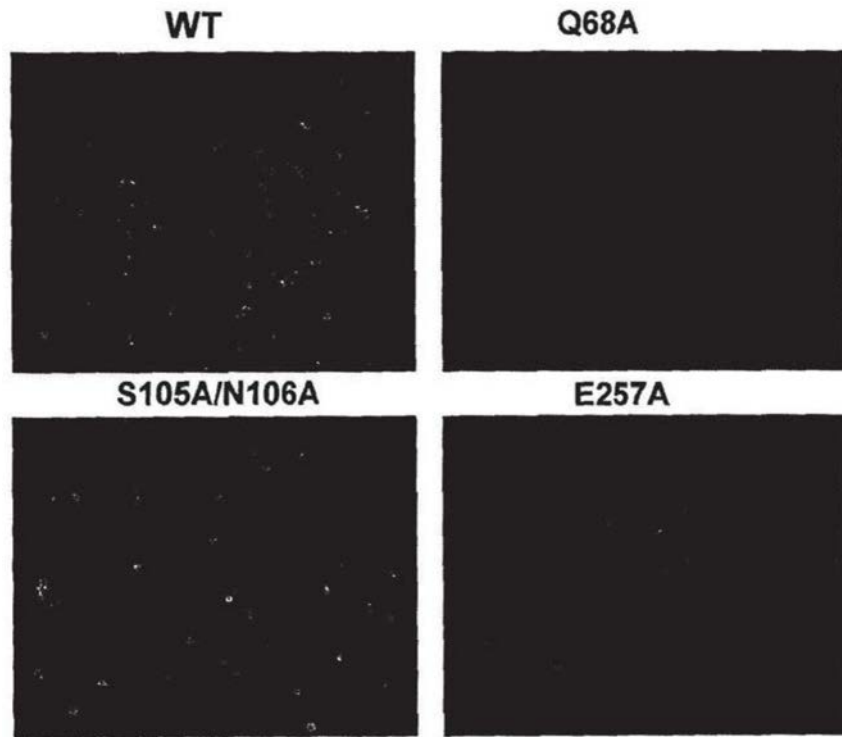


图16

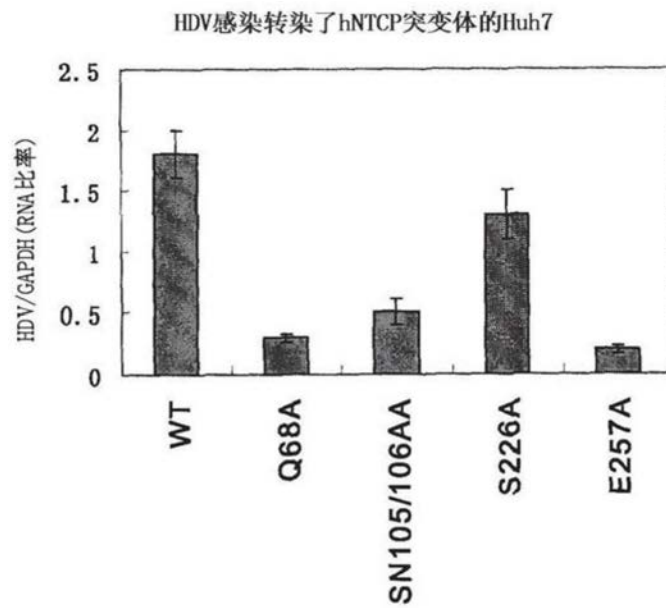


图17

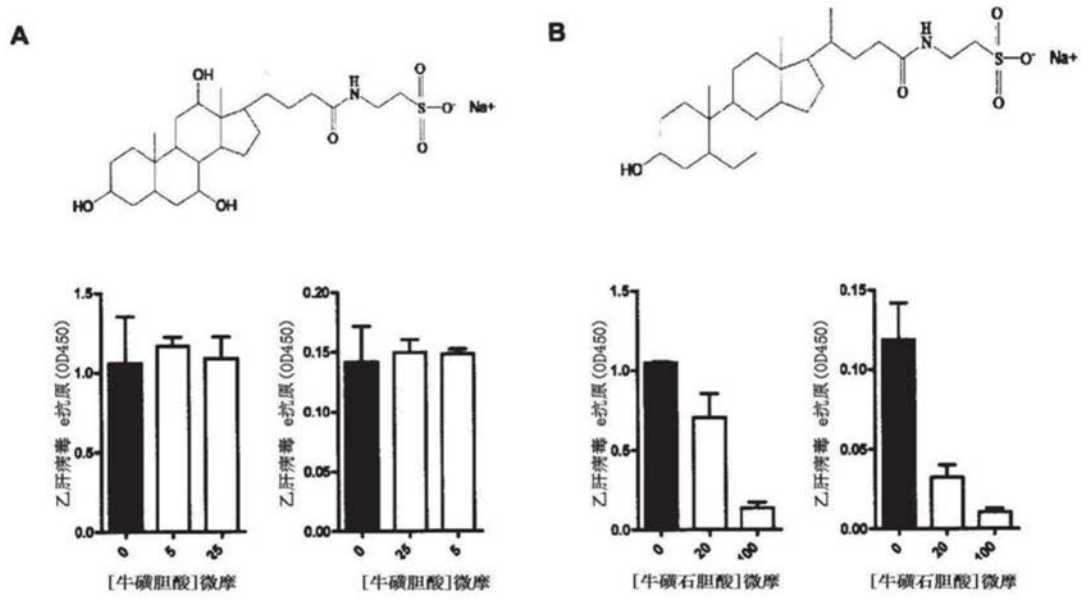


图18

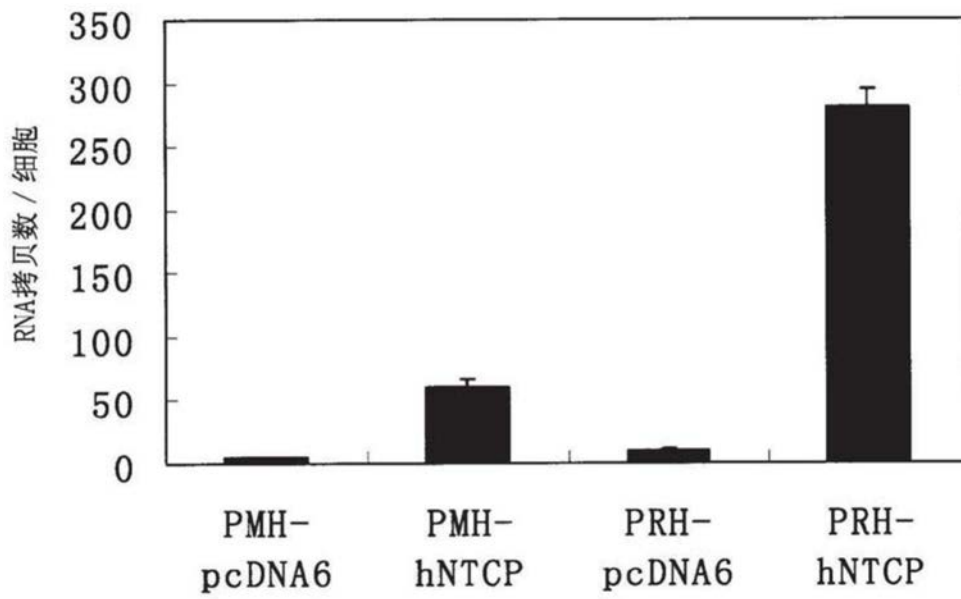


图19

LY294002 抑制乙肝病毒感染

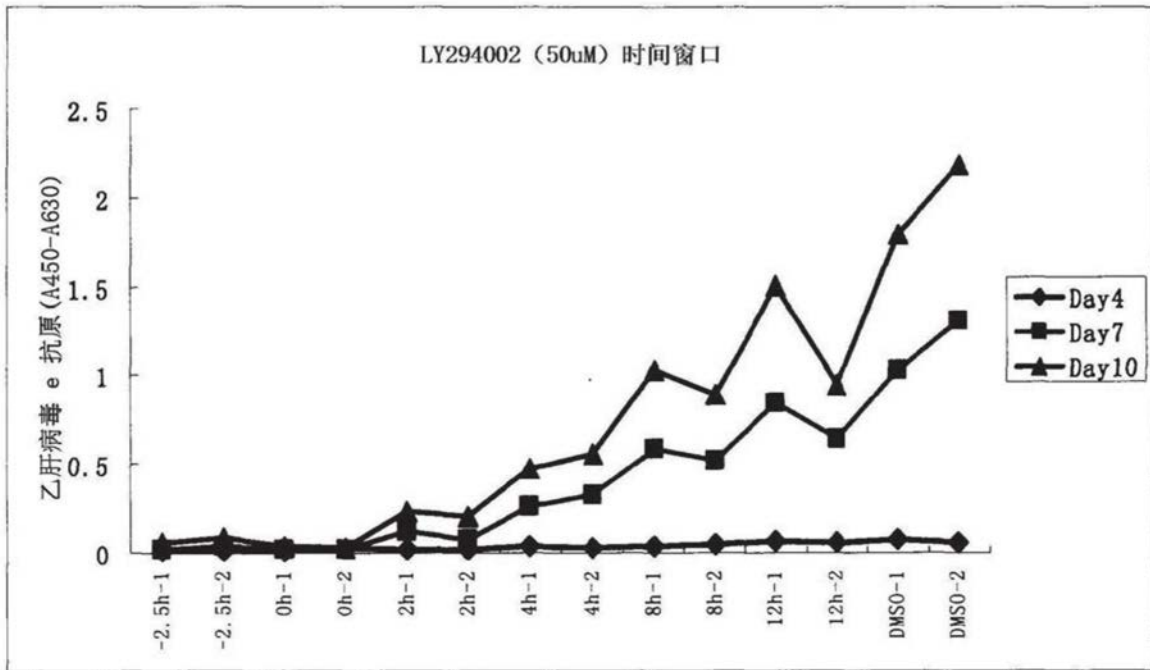
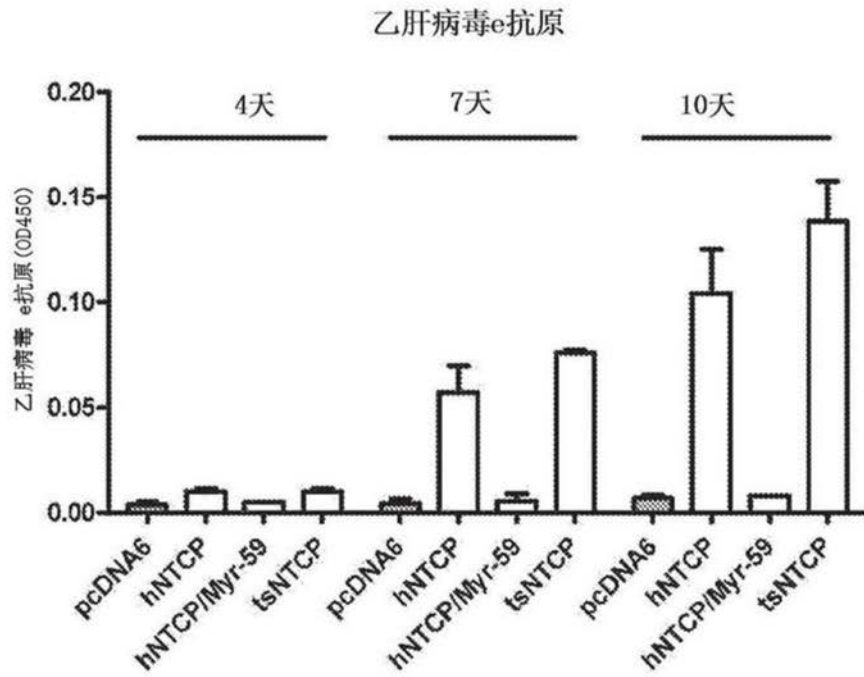


图20

A



B

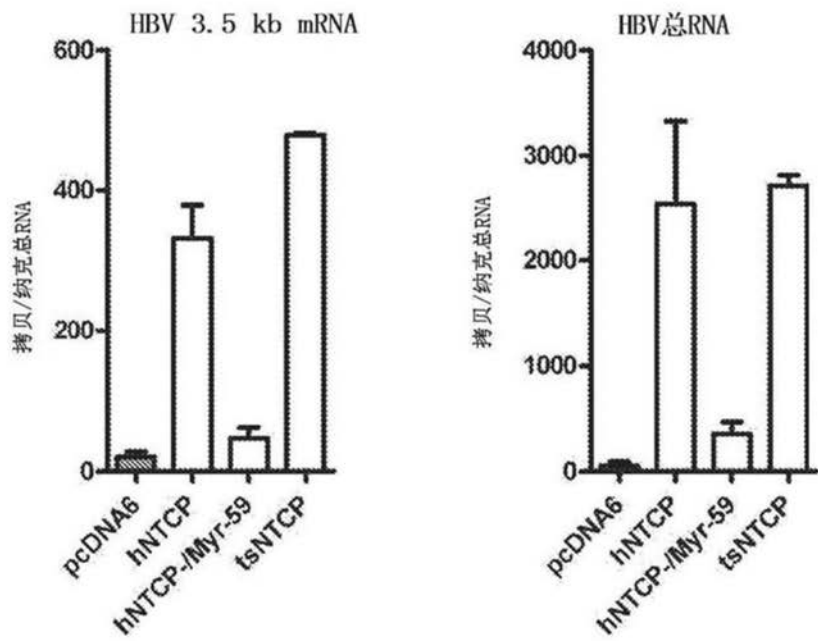


图21

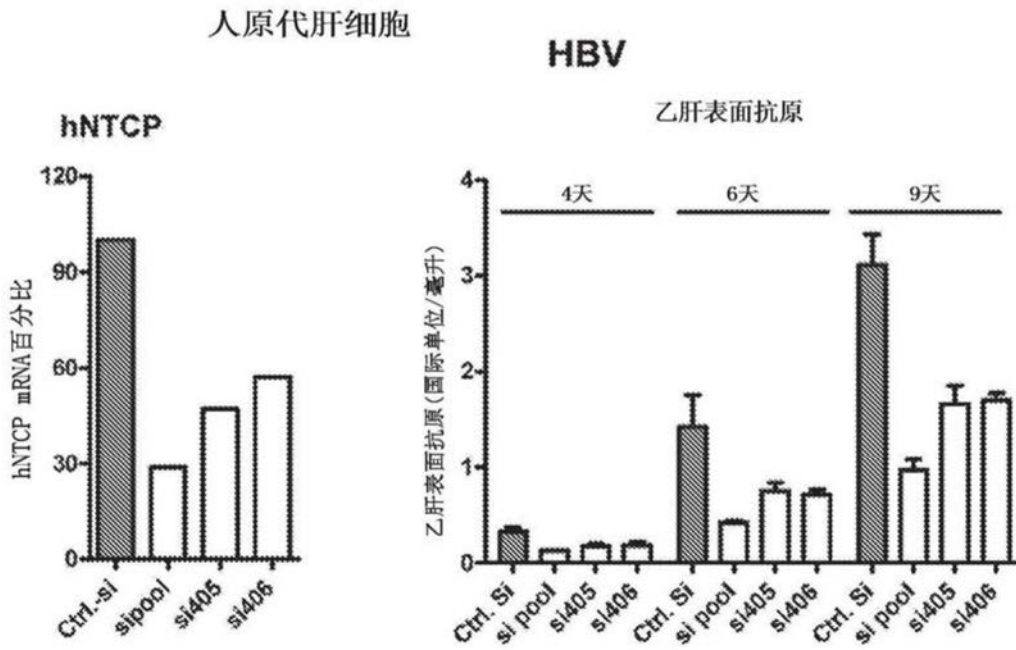


图22