



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102649814 A

(43) 申请公布日 2012. 08. 29

(21) 申请号 201010592921. 3

(22) 申请日 2011. 02. 24

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所  
地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

(72) 发明人 赫荣乔 周园

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任  
公司 11021

代理人 王旭

(51) Int. Cl.

*C07K 14/435* (2006. 01)

*C12N 9/64* (2006. 01)

*A61K 38/48* (2006. 01)

*C07K 1/36* (2006. 01)

*A61P 1/16* (2006. 01)

*A61P 35/02* (2006. 01)

*C12Q 1/37* (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 13 页  
序列表 17 页 附图 7 页

(54) 发明名称

具有 HBeAg 降解酶活性的蚯蚓蛋白及其应用

(57) 摘要

本发明提供了一种具有 HBeAg 降解酶活性的蚯蚓蛋白, 以及含有其的药物组合物。本发明还提供了所述蚯蚓蛋白在制备治疗 HBeAg 相关性疾病的药物中的应用, 所述 HBeAg 相关性疾病包括乙型肝炎, 乙型肝炎引起的肝硬化, 以及 e 抗原阳性和表面抗原阳性的乙型肝炎病毒携带者等。另外, 本发明还提供一种分离含有所述蚯蚓蛋白的粗酶提取物的方法以及由该方法制备的蚯蚓蛋白粗酶提取物及其在制备治疗 HBeAg 相关性疾病的药物中的应用。

1. 一种蚯蚓蛋白,具有选自下列(a)-(b)中的一种序列:
  - (a) SEQ ID NO. 1-16 任一项所示的氨基酸序列;
  - (b) 与(a)中所述的任一种氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列,其中上述氨基酸序列均具有由H<sup>43</sup>, D<sup>91</sup>, S<sup>188</sup>组成的催化三联体,以及所述蚯蚓蛋白具有HBeAg降解酶活性。
2. 如权利要求1所述的蚯蚓蛋白,其特征在于所述HBeAg降解酶活性为从HBeAg的C端开始,在141位精氨酸和142位谷氨酸处降解HBeAg。
3. 一种药物组合物,包括至少一种权利要求1或2所述的蚯蚓蛋白作为活性成分,以及一种或多种药用的载体、赋形剂、稀释剂或辅料。
4. 一种蚯蚓蛋白粗酶提取物的制备方法,其特征在于包括以下步骤:
  - 1) 将蚯蚓用蒸馏水洗涤、浸泡并在室温下静置10~48小时,以排除体内的泥沙;
  - 2) 将蚯蚓匀浆、离心,将上清液透析;
  - 3) 将经透析的上清液经大豆胰蛋白酶抑制剂-亲和层析柱吸附,除去未吸附杂蛋白后,用平衡液从所述层析柱上洗脱所述蚯蚓蛋白粗酶提取物。
5. 一种由权利要求4所述的方法制备的蚯蚓蛋白粗酶提取物。
6. 如权利要求5所述的蚯蚓蛋白粗酶提取物,其特征在于包括至少一种或两种以上的如权利要求1或2所述的蚯蚓蛋白。
7. 如权利要求5或6所述的蚯蚓蛋白粗酶提取物,其特征在于包括具有以下氨基酸序列的蛋白:SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 14, SEQ ID NO. 15,其中SEQ ID NO. 1丰度最高。
8. 一种药物组合物,包括权利要求5-7中任意一项所述的蚯蚓蛋白粗酶提取物作为活性成分,以及一种或多种药用的载体、赋形剂、稀释剂或辅料。
9. 权利要求1-3中任一项所述的蚯蚓蛋白或药物组合物,或权利要求5-8中任意一项所述的蚯蚓蛋白粗酶提取物或药物组合物在制备治疗或预防HBeAg相关疾病的药物中的应用。
10. 如权利要求9所述的应用,其特征在于所述HBeAg相关疾病选自乙型肝炎、e抗原和/或表面抗原阳性的乙型肝炎病毒携带者、由乙型肝炎引起的肝硬化或肿瘤。
11. 如权利要求1-3中任一项所述的蚯蚓蛋白或药物组合物,或如权利要求5-8所述的蚯蚓蛋白粗酶提取物或药物组合物在制备诊断HBeAg的试剂中的应用。

## 具有 HBeAg 降解酶活性的蚯蚓蛋白及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明提供了一种具有 HBeAg 降解酶活性的蚯蚓蛋白,以及含有其的药物组合物。本发明还提供了所述蚯蚓蛋白在制备治疗 HBeAg 相关性疾病的药物中的应用,所述 HBeAg 相关性疾病包括乙型肝炎,乙型肝炎引起的肝硬化,以及 e 抗原阳性和表面抗原阳性的乙型肝炎病毒携带者等。另外,本发明还提供一种分离含有所述蚯蚓蛋白的粗酶提取物的方法及由所述方法制备的蚯蚓蛋白粗酶提取物及其在制备治疗 HBeAg 相关性疾病的药物中的应用。

### 背景技术

[0002] 乙型肝炎,简称乙肝,是由乙型肝炎病毒 (HBV) 引起的传染病。通过血液与体液传播,具有慢性携带状态。本病在我国广泛流行。据有关资料,肝炎检测阳性的患者已经达到 1.89 亿,而应就诊未就诊人数 (携带者) 将近 4 亿。是当前危害人民健康最严重的传染病。多见于儿童及青壮年。乙肝临床表现多样化,易发展为慢性肝炎和肝硬化,少数病人可转变为原发性肝癌,这些疾病对病人以及社会的危害更加严重。

[0003] 发病过程:一般来说,肝细胞受乙肝病毒入侵后,乙肝病毒本身并不直接引起肝细胞的病变。乙肝病毒只是利用肝细胞摄取的养料赖以生存并在肝细胞内进行复制。病毒复制的表面抗原、e 抗原和核心抗原都释放在肝细胞膜上,激发人体的免疫系统来辨认,并发生反应。这种在肝细胞膜上发生的抗原抗体反应可造成肝细胞的损伤和破坏,从而产生一系列临床症状。

[0004] 治疗手段:我国多数患者是在围生期或年幼时感染 HBV 造成免疫耐受,往往形成慢性感染,这些患者需要积极而有效的治疗,否则可能发展为肝硬化甚至肝癌,导致死亡。然而迄今尚无一种可靠的治疗方法能清除或永久抑制 HBV 的复制,从而终止肝脏的炎症和坏死。慢性乙型肝炎目前的治疗目标是:①抑制 HBV 复制 (HBsAg、HBeAg 消失);②非扩增法检测不出 HBV DNA 水平;③病情改善,ALT 复常;④肝组织学改善;⑤减少肝脏失代偿、肝硬化、肝细胞肝癌的发生率。目前用于治疗乙肝的药物主要包括干扰素、核苷酸类似物等抗病毒药物和胸腺肽等免疫调节药物。

[0005] 1. 传统干扰素与聚乙二醇干扰素:干扰素目前仍是治疗乙型肝炎的一线药物,它具有明确的疗程,疗效好,可使 HBsAg 消失和抗 HBs 产生,无耐药性等优点,但是由于同时存在副作用较多、不能使用于失代偿性肝硬化患者、注射治疗麻烦及代价昂贵等缺点而限制了其使用。在美国,很多的医生倾向于选择核苷 (酸) 类似物治疗慢性乙肝。

[0006] 2. 拉米夫定:短期用拉米夫定对 HBV DNA 的抑制作用、HBeAg 转阴率、HBeAg 血清转换率及血清 ALT 复常率均优于干扰素,而且服用方便,可以用于失代偿性肝硬化及肝移植前后患者,但是其持续应答率不及干扰素,而且存在一个较突出的耐药性问题,且随着服用时间的延长,耐药性也会逐渐增加。

[0007] 3. 阿德福韦酯:是一新型核苷 (酸) 类似物,口服阿德福韦酯是阿德福韦的前体,能有效抑制乙肝病毒复制、改善组织学、延缓疾病进展成肝硬化、肝功能失代偿及肝癌,它

的耐药性发生低于拉米夫定,且对拉米夫定耐药者有很好的治疗效果,但是长期服用有一定肾毒性,需定期监测血清肌酐和血磷。

[0008] 4. 恩替卡韦 :是环戊酰鸟苷类似物,我国 SFDA 去年年底刚批准用于慢性乙型肝炎的治疗。

[0009] 5. 其他 :其他还在进行 II、III 期临床试验的药物有恩曲他滨、特必夫定、克拉夫定。

[0010] 6. 免疫调节治疗 :免疫调节治疗是治疗慢性乙型肝炎的重要手段之一,目前用于治疗乙型肝炎的免疫调节药物主要是胸腺肽。胸腺肽刺激 T 细胞,增强非特异性免疫功能,其不良反应小,耐受性好,使用安全,对于有抗病毒治疗指针,但不能耐受或不愿接受干扰素和核苷酸类似物治疗的患者可选用胸腺肽。

[0011] 乙型肝炎病毒 e 抗原 (HBeAg) :HBeAg 是一种非颗粒分泌型核壳蛋白,是 preC 蛋白翻译后加工的产物,作为 HBV 感染的血清标志发现于 1973 年。随后的研究发现,该抗原并非病毒复制所必须的蛋白,由 HBV DNA C 区编码,随 HBV 复制而增加,临床上将其作为判断 HBV 活动性复制的指标之一。美国健康研究中心 2007 年发现,慢性乙肝 e 抗原持续阳性会极大地增加肝硬化和肝癌的危险。他们研究分析了乙肝基因型对 HBeAg 清除的影响。被调查的阿拉斯加州 1158 名本地患者,平均年龄在 20.5 岁,乙肝基因型为 A、B、C、D、F。研究发现,基因型为 C 的患者 HBeAg 转阴的可能性比其它基因型更难,且 e 抗原清除时间更长。其中 50% 的 A、B、D 型患者不到 20 年有 e 抗原转阴,而 C 型需要 47.8 年。但是,这些 HBeAg 转阴后,C、F 型的 HBeAg 很快就会回复。因此,乙肝标志物中 HBeAg 转阴,并产生 HBeAb 是判断病情趋向和药物疗效的一个重要指标。

[0012] HBeAg 有两个已确认的抗原决定簇 :第一个位于其 N 端第 84 ~ 99 位氨基酸残基,为线性表位,第二个表位位于 136 ~ 145 氨基酸残基,为非线性表位,它需要与前 C 区部分氨基酸残基相互作用才能表现出抗原性。位于前 C 区 -7 位的半胱氨酸与 C 区中 61 位的半胱氨酸形成二硫键,构成 HBeAg 区别于 HBcAg 的独特的二级结构,同时该二硫键还抑制 HBeAg 形成蛋白质颗粒。

[0013] 虽然 HBeAg 在 HBV 生命周期中的生物学功能还存在争议,病毒复制并不需要它,但是 HBeAg 在肝炎及肝癌患者中还有重要的免疫调节作用。在乙肝病毒标志物 (HBV-M) 检测中,在 DNA 检测开始前,HBeAg 是活动性 HBV 复制和感染的标准标记物。e 系统的检测尤为重要,它对 HBV 复制与否的判定、是否具有传染性、以及临床抗病毒治疗效果如何等方面均具有重要价值。

[0014] 蚯蚓俗称地龙,其种类繁多,资源丰富。蚯蚓作为药物使用,在我国已有 1200 多年的历史。最原始的方法是利用整个鲜蚯蚓或干蚯蚓 ;随着发展,后来发现蚯蚓的药用价值与其中含有的多种化学成分有关。目前已经分离到多种不同纯度的蚯蚓成分,其中包括纤溶酶、纤溶酶原激活剂、钙调素和钙调素结合蛋白、胆碱酯酶、过氧化氢酶、超氧化物歧化酶 SOD、促髓系细胞增殖组分、抗微生物蛋白、收缩血管蛋白、溶血蛋白、免疫球蛋白样粘连物和抗肿瘤蛋白、抗菌肽等,取得了较大的进展。

[0015] 近年来在蚯蚓体内发现有一组蛋白,其氨基酸序列分别为 SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13, SEQ ID NO. 14,

SEQ ID NO. 15, SEQ ID NO. 16。目前的实验证明这组蛋白都是糖基化的丝氨酸蛋白酶,但该组蛋白的其他功能尚不清楚。

### 发明内容

[0016] 为此,本发明人进行了大量的试验,并且意外地首次发现,SEQ ID NO. 1-16 的蛋白在与 HBeAg 孵育过程中可迅速将其降解,并通过细胞试验、动物试验也证明它们在体内和体外均具有 HBeAg 降解酶(下面实施例和附图中还称为“HBeAgase”)活性。

[0017] 因此,在第一个方面,本发明的目的是提供一种蚯蚓蛋白,其具有选自下列(a)-(b)中的一种序列:(a)SEQ ID NO. 1-16 任一项所示的氨基酸序列;(b)与(a)中所述的任一种氨基酸序列具有 80% 以上的同源性的氨基酸序列,其中上述氨基酸序列均具有由 H<sup>43</sup>, D<sup>91</sup>, S<sup>188</sup> 组成的催化三联体,以及所述蚯蚓蛋白具有 HBeAg 降解酶活性。

[0018] 在第二个方面,本发明提供了一种药物组合物,包括本发明的蚯蚓蛋白作为活性成分,以及一种或多种药用的载体、赋形剂、稀释剂或辅料。

[0019] 在第三个方面,本发明涉及本发明的蚯蚓蛋白或药物组合物在制备治疗或预防 HBeAg 相关疾病的药物中的应用。在一个优选的实施方案中,所述 HBeAg 相关疾病选自乙型肝炎、e 抗原和 / 或表面抗原阳性的乙型肝炎病毒携带者、由乙型肝炎引起的肝硬化或肿瘤。

[0020] 在第四个方面,本发明提供了一种蚯蚓蛋白粗酶提取物的制备方法,其包括以下步骤:

[0021] 1) 将蚯蚓用蒸馏水洗涤、浸泡并在室温下静置 10 ~ 48 小时,以排除体内的泥沙;

[0022] 2) 将蚯蚓匀浆、离心,将上清液透析;

[0023] 3) 将经透析的上清液经大豆胰蛋白酶抑制剂 - 亲和层析柱吸附,除去未吸附杂蛋白后,用平衡液从所述层析柱上洗脱所述蚯蚓蛋白粗酶提取物。

[0024] 在第五个方面,本发明提供了一种上述方法制备的蚯蚓蛋白粗酶提取物。

[0025] 在一个优选的实施方案中,本发明的蚯蚓蛋白粗酶提取物包括至少一种具有下列氨基酸序列的蚯蚓蛋白:(a)SEQ ID NO. 1-16 任一项所示的氨基酸序列;(b)与(a)中所述的任一种氨基酸序列具有 80% 以上的同源性的氨基酸序列,其中上述氨基酸序列均具有由 H<sup>43</sup>, D<sup>91</sup>, S<sup>188</sup> 组成的催化三联体,以及所述蚯蚓蛋白具有 HBeAg 降解酶活性。

[0026] 在另一个优选的实施方案中,本发明的蚯蚓蛋白粗酶提取物包括具有以下氨基酸序列的蛋白:SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 14, SEQ ID NO. 15。在一个优选的实施方案中,SEQ ID NO. 1 的丰度为 9.65%,SEQ ID NO. 2 为 3.65%,SEQ ID NO. 11 和 SEQ ID NO. 12 的丰度为 5.1%,SEQ ID NO. 14 的丰度为 2.6%,SEQ ID NO. 15 的丰度为 4.3%。

[0027] 在第六个方面,本发明提供了一种药物组合物,其包括本发明的蚯蚓蛋白粗酶提取物作为活性成分,以及一种或多种药用的载体、赋形剂、稀释剂或辅料。

[0028] 在第七个方面,本发明涉及本发明的蚯蚓蛋白粗酶提取物或含有该蚯蚓蛋白粗酶提取物的药物组合物在制备治疗或预防 HBeAg 相关疾病的药物中的应用。在一个优选的实施方案中,所述 HBeAg 相关疾病选自乙型肝炎、e 抗原和 / 或表面抗原阳性的乙型肝炎病毒携带者、由乙型肝炎引起的肝硬化或肿瘤。

[0029] 本发明具有以下的有益效果：

[0030] 1. 本发明的蚯蚓蛋白具有降解 HBsAg 的酶活性，并且此活性基于氨基酸序列中由 H<sup>43</sup>, D<sup>91</sup>, S<sup>188</sup> 组成的催化三联体。

[0031] 2. 本发明的蚯蚓蛋白的 HBsAg 降解酶活性对 HBeAg 的作用位点在 141 位精氨酸和 142 位谷氨酸两个氨基酸附近。

[0032] 3. 本发明还提供了一种蚯蚓蛋白粗酶提取物的制备方法，基于上面 1) 和 2) 的技术启示，本领域技术人员可以根据需要经过有限次的试验就可以制备出含有不同种类、不同组合的本发明的蚯蚓蛋白的蚯蚓蛋白粗酶提取物。

[0033] 4. 本发明的蚯蚓蛋白、粗酶组合物以及分别含有它们的药物组合物在对 HBsAg 相关疾病，诸如乙型肝炎的治疗中，尤其是对慢性乙型肝炎的治疗具有明显的优势，因为其特异性地降解 HBsAg，而非针对 HBV DNA，并且没有目前临床使用的其他药物的非特异性靶向作用所引起的副作用。

#### 附图说明

[0034] 图 1 是蚯蚓蛋白 SEQ ID NO. 1 与 HBeAg 蛋白共同孵育后 SDS-PAGE 图，其中图 1A 是 HBeAg 与不同浓度 SEQ ID NO. 1 在 37℃ 孵育 1h 的 SDS-PAGE 图 (M: 标准分子量; 1: 对照 (未加 SEQ ID NO. 1 的 HBeAg); 2-5: HBeAg 与 SEQ ID NO. 1 共同孵育; 6: 仅 6 μM SEQ ID NO. 1); 图 1B 是 HBeAg 蛋白与 SEQ ID NO. 1 在 37℃ 孵育不同的 SDS-PAGE 图 (M: 标准分子量; 1: 对照 (未加 SEQ ID NO. 1 的 HBeAg 蛋白); 2: 15min; 3: 30min; 4: 60min; 5: 90min; 6: 120min; 7: 仅 SEQ ID NO. 1)。

[0035] 图 2 是蚯蚓蛋白 SEQ ID NO. 1 与 HBeAg 蛋白共同孵育后的 western blotting 图，其中 1: 对照 (未加 SEQ ID NO. 1 的 HBeAg 蛋白); 2-5: HBeAg 与 SEQ ID NO. 1 共同孵育; 6: 仅 6 μM SEQ ID NO. 1。

[0036] 图 3 是 SEQ ID NO. 1 与 HBeAg 蛋白共同孵育后的 ELISA 图，其中 1: 对照 (未加 SEQ ID NO. 1 的 HBeAg 蛋白); 2-5: HBeAg 与 SEQ ID NO. 1 共同孵育。

[0037] 图 4 是图示采用大豆胰蛋白酶抑制剂-亲和层析法串联对氨基苯甲酰亲和层析法分离纯化蚯蚓蛋白粗酶提取物的方法流程的示意图。

[0038] 图 5 是本发明的分离纯化的蚯蚓蛋白粗酶提取物的 8 种同工酶 native-PAGE 图和 SDS-PAGE 图。其中图 5A: 8 种蚯蚓 HBeAg 降解酶同工酶的 native-PAGE 图 (1: EfP-0-1; 2: EfP-0-2; 3: EfP-I-1; 4: EfP-I-2; 5: EfP-II-1; 6: EfP-II-2; 7: EfP-III-1; 8: EfP-III-2; 9: 蚯蚓 HBeAg 降解酶混合组分); 图 5B: 8 种蚯蚓 HBeAg 降解酶同工酶的 SDS-PAGE 图 (1: EfP-0-1; 2: EfP-0-2; 3: EfP-I-1; 4: EfP-I-2; 5: 标准分子量; 6: EfP-II-1; 7: EfP-II-2; 8: EfP-III-1; 9: EfP-III-2; )。

[0039] 图 6 是图示本发明的蚯蚓蛋白粗酶提取物对 HBV 转基因小鼠的治疗作用的图。图 6A 图示 ALT 的变化; 图 6B 图示 AST 的变化; 图 6C 图示 HBsAg 的变化; 图 6D 为病理观察结果。其中 A 为生理盐水组 (10 倍); B 为本发明的蚯蚓蛋白粗酶提取物组 (10 倍); C 为拉米夫定组 (10 倍)。

[0040] 图 7 为图示 SEQ ID NO. 1 对 HepG 2. 2. 15 细胞水平的作用的图。图 7A 为 SEQ ID NO. 1 对 HBsAg 和 HBeAg 分泌的影响; 图 7B 为拉米夫定对 HBsAg 和 HBeAg 分泌的影响;

## 具体实施方式

[0041] 以下本文将通过具体的实施例来描述本发明。如未特别指明之处,可根据本领域技术人员所熟悉的参考书:如蛋白质技术手册(汪家政、范明主编,科学出版社)、抗体技术实验指南(沈关心、龚非力等译,科学出版社)、药理实验方法学(第三版,主编:徐淑云,人民卫生出版社)、分子生物学实验指导(刘进元,清华大学出版社)、分子克隆实验指南(第三版,黄培堂等译,科学出版社)等以及本文所引用的参考文献中所列的方法来实施。

[0042] 定义:

[0043] 在本发明中所述的“具有80%以上的同源性”具体指同样来源于蚯蚓的蛋白的氨基酸序列,其与本发明的SEQ ID NO. 1-18的序列具有80%以上,优选85%以上,更优选90%以上,还更优选95%以上,甚至99%以上的同源性,并且最优选地,其与SEQ ID NO. 1-16的序列之间某个位置上的氨基酸残基的差异仅为保守氨基酸置换。

[0044] 本文中所述的“疾病”应从广义上理解,即上述疾病可以是原发性的或继发性的(例如肝炎、肝炎继发性感染、肝炎继发性肾病等),或是隐性的或显性的(例如肝炎病毒携带者、病毒性肝炎等),或是并发症和/或合并症(例如,乙型肝炎性肾炎、肝原性糖尿病、肝炎合并溶血、妊娠合并输血性乙肝等)。

[0045] 本文中所述的“HBeAg相关疾病”是指疾病和/或其并发症的发生、发展、进展、恶化;疾病和/或其并发症的预防、缓解、减轻、消退;疾病和/或其并发症的诊断、预后、治疗方案选择、治疗反应监测、临床转归等与HBeAg的存在、表达、变化和清除等有密切联系,或相互有因果关系。例如,用于乙肝病毒携带者或活动性乙肝患者HBeAg的转阴;用于HBeAg阳性的肝硬化或肝癌患者的治疗;处于乙肝病毒感染高危(例如,大量输血或有经常病毒携带者接触可能性)的免疫缺陷患者的预防性应用;肝癌治疗中的某个阶段需要控制HBV的活动性;其他类型肝炎患者的预防性应用;用于HBeAg的诊断(例如通过本发明的蚯蚓蛋白的消耗量来间接定量测定HBeAg的含量)等等。因此,尽管本文中在很多地方提到乙型肝炎,但实际上本发明并不限于乙型肝炎,只要在某种疾病的诊断、预防、治疗中HBeAg的存在有一定的临床意义,均适用于本发明。

[0046] 本发明所述的“粗酶提取物”是指将蚯蚓用蒸馏水洗涤、浸泡并在室温下静置10~48小时后,将蚯蚓匀浆、离心,将上清液透析后所得的蛋白溶液为粗酶提取物。

[0047] 本发明发明所述的“催化三联体”是指丝氨酸蛋白酶家族的酶活性部位存在着三个极性残基——His, Asp和Ser,这三个极性残基形成催化三联体(catalytic triad)。

[0048] 具有HBeAg降解酶活性的蚯蚓蛋白:

[0049] 在本发明的一个实施方案中,提供一种蚯蚓蛋白,其具有选自下列(a)-(b)中的一种序列:(a)SEQ ID NO. 1-16任一项所示的氨基酸序列;(b)与(a)中所述的任一种氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列,优选85%以上,更优选90%以上,还更优选95%以上,甚至99%以上的同源性,并且最优选地,其与SEQ ID NO. 1-16的序列之间某个位置上的氨基酸残基的差异为保守氨基酸置换;其中上述氨基酸序列均具有由H<sup>43</sup>, D<sup>91</sup>, S<sup>188</sup>组成的催化三联体,以及所述蚯蚓蛋白具有HBeAg降解酶活性。

[0050] 在本发明中,蚯蚓选用正蚓科胜蚓属的赤子爱胜蚓(*Eisenia foetida*),蚯蚓蛋白主要分布于环带和胃的部分,特别是肠的前端。

[0051] 本发明人发现 SEQ ID NO. 1-16 氨基酸序列的共性是具有共同的功能域 :H<sup>43</sup>, D<sup>91</sup>, S<sup>188</sup> (其上编号对应于 SEQ ID NO. 1 氨基酸序列) 组成的催化三联体, 其中 SEQ ID NO. 2-SEQ ID NO. 10 具有 85% 以上的同源性。另外, 从功能上, 它们的共同特征是其 HBeAg 降解酶活性为从 HBeAg 的 C 端开始, 在 141 位精氨酸和 142 位谷氨酸处降解 HBeAg (见实施例 2 和表 1)。

[0052] 在本发明的另一个实施方案中, 提供了一种药物组合物, 包括本发明的蚯蚓蛋白作为活性成分, 以及一种或多种药用的载体、赋形剂、稀释剂或辅料。该药物组合物可根据需要由本领域技术人员根据常规制药方法制成为适当的剂型。

[0053] 在制备包括本发明的药物组合物的剂型过程中, 本发明的药物组合物通常与载体和 / 或赋形剂通过常规的混合、溶解、制粒、制锭研磨、乳化、封装、包埋或冻干等工艺进行制备, 本发明的药物稀释或包封在其中 (见 Remington' s Pharmaceutical Sciences, 第十五版, Hoover, J. E. 主编, Mack Publishing Co. (2003))。

[0054] 上述剂型可采取任何合适的给药方式, 该方式包括局部、经口、全身、经鼻、注射、透皮等途径。

[0055] 对于局部给药, 本发明的药物组合物可制成溶液、凝胶、油膏、乳膏、悬浮液等。

[0056] 全身制剂包括设计通过注射给药, 例如皮下、静脉内、肌肉内、瘤内、鞘内或腹膜内注射的剂型, 以及设计用于透皮、透粘膜口腔或肺部给药的剂型。

[0057] 可注射剂型包括本发明的药物组合物在水性或油性媒介中的无菌悬浮液、溶液或乳液。所述剂型还可含有悬浮剂、稳定剂和 / 或分散剂等。注射剂型可以单位剂型提供, 例如, 在安瓿中或多次剂量容器中, 可含有防腐剂。

[0058] 可注射剂型也可选择粉末的形式, 在使用前使用合适的媒介物, 包括但不限于无菌无热源水、缓冲液、葡萄糖溶液等重新配制。可注射剂型可通过直接静脉内注射、静脉快速滴注给药, 或通过加入输注溶液如 0.9% 氯化钠注射液或其他相容的输注溶液进行输注给药。

[0059] 对于口服给药, 本发明的药物组合物可使用药学可接受的赋形剂和 / 或添加剂通过常规的方式制备成例如锭剂、片剂或胶囊的剂型。

[0060] 用于口服给药的液体剂型可采取例如酞剂、溶液、糖浆剂或悬液的形式, 或可是粉末, 在使用前使用水或其他合适的媒介物进行配制。这种液体剂型可通过常规的方式使用药学可接受的添加剂来进行制备。

[0061] 口服给药制剂可被配制成为可控释放剂型, 其制备工艺和方法在本领域中是公知的。优选片剂和胶囊剂型。

[0062] 对于长期药物递送, 本发明的药物组合物可制成缓释制剂以便通过植入或肌肉内注射给药。本发明的药物组合物可使用合适的聚合物或疏水材料 (例如, 在药学可接受的油中形成乳液) 或离子交换树脂进行配制。可选的是, 可使用制成为贴片透皮递送系统, 可缓慢地释放本发明的药物组合物经皮吸收。可使用渗透促进剂来促进本发明的药物组合物的经皮渗透。

[0063] 本发明的药物组合物的各种剂型将由医生根据相关因素来确定具体给药量, 这些因素包括被治疗的疾病、选择的给药途径、每个患者的年龄、体重和患者对治疗的反应情况、患者症状的严重性等。



[0064] 在本发明的一个实施方案中,涉及本发明的蚯蚓蛋白或药物组合物在制备治疗或预防 HBeAg 相关疾病的药物中的应用。

[0065] 在一个优选的实施方案中,所述 HBeAg 相关疾病选自乙型肝炎、e 抗原和 / 或表面抗原阳性的乙型肝炎病毒携带者、由乙型肝炎引起的肝硬化或肿瘤。

[0066] 本发明中提到的患者可以是任何哺乳动物,优选人类。

[0067] 本领域专业技术人员应该理解的是,本发明的范围并不限于上面所述的内容和具体实施方案。根据本发明所述的内容,对于本领域专业技术人员显而易见的是本发明的蚯蚓蛋白可以单独使用,也可以多种(例如,2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 或 16 种,甚至更多种本发明的蚯蚓蛋白)一起使用,视具体情况而定。另外,本发明的蚯蚓蛋白还可以与其他药物和治疗方法一起联合使用,可以由本领域技术人员根据相关因素来确定。

[0068] 蚯蚓蛋白粗酶提取物

[0069] 在本发明的一个实施方案中,提供了一种蚯蚓蛋白粗酶提取物的制备方法,其包括以下步骤:

[0070] 1) 选取 2 月龄、5-8cm 长的赤子爱胜蚓 (*E. fetida*) 于蒸馏水中清洗,然后将蚯蚓在室温下浸泡于蒸馏水中 12h,使其吐尽消化道中的污物。

[0071] 2) 将 1 公斤蚯蚓在 0.05M Tris-HCl 缓冲液中匀浆,于 4°C、8000rpm 离心 30min。取上清,对 85% 的硫酸铵平衡液于 4°C 透析过夜。

[0072] 3) 以 Sepharose-4B(10ml) 为载体,经羧基二咪唑 (800mg) 活化后,与大豆胰蛋白酶抑制剂配基偶联,制备亲和载体。制备好的亲和载体装柱,用 0.1mol/L NaHCO<sub>3</sub> 缓冲液 (pH 8.0) 平衡柱子。上清液经上亲和层析柱吸附,待流出液的酶活与上柱液一致时,表明吸附已达饱和,用 0.01mol/L NaHCO<sub>3</sub> 缓冲液 (pH 8.0) 平衡液洗去未吸附杂蛋白,再用以平衡液配制的 6mol/L 尿素溶液洗脱蚯蚓蛋白酶,对水透析除去尿素,得蚯蚓蛋白酶全组分,冻干保存。

[0073] 4) 将处理好的 DEAE-Cellulose-52 装柱,用 0.01mol/L pH8.0 磷酸盐缓冲液平衡;将亲和层析得到的粗酶液对上述平衡液透析,上柱,先用平衡液洗脱,再分别用含有 0.05、0.1、0.15、0.20、0.25、0.3mol/L NaCl 的平衡缓冲液分步洗脱,收集对应各洗脱峰的洗脱液。

[0074] 5) SEQ ID NO. 1 的蚯蚓蛋白酶可按照中国发明专利 ZL02116747.8 中所提供的方法进一步纯化,从而得到单一组分。

[0075] 由此,根据本发明的上述方法得到本发明的蚯蚓蛋白粗酶提取物。

[0076] 在一个优选的实施方案中,本发明的蚯蚓蛋白粗酶提取物包括至少一种具有下列氨基酸序列的蚯蚓蛋白:(a) SEQ ID NO. 1-16 任一项所示的氨基酸序列;(b) 与 (a) 中所述的任一种氨基酸序列具有 80% 以上的同源性的氨基酸序列,其中上述氨基酸序列均具有由 H<sup>43</sup>, D<sup>91</sup>, S<sup>188</sup> 组成的催化三联体,以及所述蚯蚓蛋白具有 HBeAg 降解酶活性。

[0077] 在另一个优选的实施方案中,本发明的蚯蚓蛋白粗酶提取物包括具有以下氨基酸序列的蛋白:SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 14, SEQ ID NO. 15, 其中 SEQ ID NO. 1 丰度最高。

[0078] 在此应注意,本发明的蚯蚓蛋白粗酶提取物不限于是从层析柱中洗脱的初始粗酶提取物,可以是经进一步提纯为单一组分后另行组合的混合物。

[0079] 本发明还提供了一种药物组合物,其包括本发明的蚯蚓蛋白粗酶提取物作为活性成分,以及一种或多种药用的载体、赋形剂、稀释剂或辅料。该药物组合物可根据需要由本领域技术人员根据常规制药方法制成为适当的剂型。

[0080] 在本发明的另一个方面,涉及上述蚯蚓蛋白粗酶提取物或含有该蚯蚓蛋白粗酶提取物的药物组合物在制备治疗或预防 HBeAg 相关疾病的药物中的应用。在一个优选的实施方案中,所述 HBeAg 相关疾病选自乙型肝炎、e 抗原和 / 或表面抗原阳性的乙型肝炎病毒携带者、由乙型肝炎引起的肝硬化或肿瘤。

## 实施例

[0081] 下面的实施例仅用于说明本发明,而不以任何方式解释为限制本发明的范围。因此,为简便起见,下面的实施例仅以本发明的蚯蚓蛋白 SEQ ID NO. 1 和根据本发明的提取方法提取的一组粗酶提取物来说明,因为本发明公开的其他蛋白与 SEQ ID NO. 1 一样具有催化 HBeAg 的催化三联体,因而同样具有降解 HBeAg 的作用(数据未显示)。同理,本发明提取的各种粗酶提取物在性质上类似,只不过有可能在各种蛋白的丰度上有所差异,因此其降解 HBeAg 的作用发生根本的变化。下面实施例中如未特别说明,所有试剂均是市售的。

[0082] 实施例 1 本发明的蚯蚓蛋白与 HBeAg 蛋白共同孵育试验

[0083] 实验方法与结果

[0084] 1. 取 HBeAg(北京华美生科生物技术有限公司)(66.7  $\mu$ M),加入一定浓度的本发明的蚯蚓蛋白(SEQ ID NO. 1 蛋白)(0 ~ 6  $\mu$ M)于 37 $^{\circ}$ C 孵育,分别于 15, 30, 45, 60, 90, 120min 取样,同时以空白 HBeAg 和本发明的蚯蚓蛋白(SEQ ID No. 1)(在 37 $^{\circ}$ C 孵育 120min)作为对照。

[0085] 2. 将上述孵育样品加入 5 $\times$ SDS-PAGE 上样缓冲液,煮沸 10 分钟,进行 15% SDS-PAGE,最后以考马斯亮蓝染色。

[0086] 3. SDS-PAGE 见图 1。结果显示空白 HBeAg 在 37 $^{\circ}$ C 孵育 120min 蛋白质条带无明显变化,HBeAg 与本发明的蚯蚓蛋白的孵育产物中蛋白条带迅速降解(见图 1A 和图 1B)。

[0087] 实施例 2 本发明的蚯蚓蛋白对 HBeAg 蛋白水解位置的分析

[0088] 实验方法与结果

[0089] 1. 将 66.7  $\mu$ M HBeAg 蛋白与本发明的蚯蚓蛋白(SEQ ID No. 1)(6  $\mu$ M)在 37 $^{\circ}$ C 孵育 60min,将酶解产物进行 15% SDS-PAGE 并转至 PVDF 膜(Millipore, USA)。

[0090] 2. 将膜进行考马斯亮蓝染色,将酶解产生的主要条带进行 N 端测序(仪器为 Applied Biosystem Automated Protein Sequencer, Applied Biosystem Inc., USA)。

[0091] 3. 由测序结果(见表 1)分析本发明的蚯蚓蛋白对 HBeAg 蛋白的作用是从 HBeAg 蛋白的 C 端开始,根据酶解片段与原蛋白片段分子量比对,分析本发明的蚯蚓蛋白对 HBeAg 的作用位点在 141 位精氨酸和 142 位谷氨酸两个氨基酸附近。

[0092] 表 1. HBeAg 蛋白及酶解片段蛋白的 N 端序列

[0093]

蛋白片段编号	N 端序列
a	TMITN

b	TMITN
---	-------

[0094] 实施例 3 本发明的蚯蚓蛋白与 HBeAg 蛋白共同孵育的 western blotting

[0095] 实验方法与结果

[0096] 1. 取 HBeAg (6.67  $\mu$  M), 加入一定浓度的本发明的蚯蚓蛋白 (SEQ ID No. 1) (0 ~ 0.6  $\mu$  M) 于 37°C 孵育, 于 60min 取样, 同时以空白 HBeAg 和本发明的蚯蚓蛋白 (SEQ ID No. 1) (在 37°C 孵育 60min) 作为对照。

[0097] 2. 将上述孵育样品加入 5×SDS-PAGE 上样缓冲液, 煮沸 10 分钟, 进行 15% SDS-PAGE。

[0098] 3. 70V 恒压转至 PVDF 膜 (Millipore, USA), 1h。

[0099] 4. 5% 脱脂牛奶 -PBST (0.01M 磷酸盐缓冲液, 0.05% Tween-20, pH 7.4), 室温封闭 1.5h。

[0100] 5. 1ml HBeAg 抗体 (Santa, USA), 室温 1.5h。5% 脱脂牛奶 -PBST 清洗 3 次, 每次 10min。

[0101] 6. 1ml 辣根过氧化物酶标记的 IgG 二抗 (北京中杉金桥生物技术有限公司), 37°C 孵育 1h, PBST 洗涤。

[0102] 7. 将膜在显色液 (北京中杉金桥生物技术有限公司) 浸泡 3min。曝光。由图 2 可见, 与蚯蚓蛋白 (SEQ ID No. 1) 孵育后的 HBeAg 蛋白不能被其抗体识别。

[0103] 实施例 4 本发明的蚯蚓蛋白与 HBeAg 蛋白共同孵育的 ELISA

[0104] 实验方法与结果

[0105] 1) 取 HBeAg (6.67  $\mu$  M), 加入一定浓度的本发明的蚯蚓蛋白 (SEQ ID No. 1) (0 ~ 0.6  $\mu$  M) 于 37°C 孵育, 于 60min 取样, 同时以空白 HBeAg 和本发明的蚯蚓蛋白 (SEQ ID No. 1) (在 37°C 孵育 60min) 作为对照。

[0106] 2) 取孵育后的样品加入乙型肝炎病毒 e 抗原诊断试剂盒 (北京万泰生物药业股份有限公司)。

[0107] 结果见图 3, 由图可见, HBeAg 与蚯蚓蛋白 (SEQ ID No. 1) 孵育后被降解。

[0108] 实施例 5 蚯蚓蛋白粗酶提取物的分离纯化

[0109] 实验方法与结果

[0110] 1. 选取 2 月龄、5-8cm 长的赤子爱胜蚓 (*E. fetida*) 于蒸馏水中清洗, 然后将蚯蚓在室温下浸泡于蒸馏水中 12h, 使其吐尽消化道中的污物。

[0111] 2. 将 1 公斤蚯蚓在 0.05M Tris-HCl 缓冲液中匀浆, 于 4°C、8000rpm 离心 30min。取上清, 对 85% 的硫酸铵平衡液于 4°C 透析过夜。

[0112] 3. 以 Sepharose-4B (10ml) 为载体, 经羧基二咪唑 (800mg) 活化后, 与大豆胰蛋白酶抑制剂配基偶联, 制备亲和载体。制备好的亲和载体装柱, 用 0.1mol/L NaHCO<sub>3</sub> 缓冲液 (pH 8.0) 平衡柱子。上清液经上亲和层析柱吸附, 待流出液的酶活与上柱液一致时, 表明吸附已达饱和, 用 0.01mol/L NaHCO<sub>3</sub> 缓冲液 (pH 8.0) 平衡液洗去未吸附杂蛋白, 再用以平衡液配制的 6mol/L 尿素溶液洗脱蚯蚓蛋白酶, 对水透析除去尿素, 得蚯蚓蛋白酶全组分, 冻干保存。

[0113] 4. 将处理好的 DEAE-Cellulose-52 装柱, 用 0.01mol/L pH8.0 磷酸盐缓冲液平衡;

将亲和层析得到的粗酶液对上述平衡液透析,上柱,先用平衡液洗脱,再分别用含有 0.05、0.1、0.15、0.20、0.25、0.3mol/L NaCl 的平衡缓冲液分步洗脱,收集对应各洗脱峰的洗脱液。

[0114] 5. SEQ ID NO. 1 的蚯蚓蛋白酶可按照中国发明专利 ZL02116747.8 中所提供的方法进一步纯化,从而得到单一组分。

[0115] (见图 4)。

[0116] 实施例 68 种蚯蚓蛋白粗酶提取物同工酶的含量及活性

[0117] 实验方法与结果

[0118] 1. 含量测定按 PIERCE 公司 Gycoprotein Carbohydrate Estimation Kit 说明书操作。

[0119] 2. 相对活性的检测采用 Fibrin-PAGE 后灰度扫描的方法。在常规聚丙烯酰胺凝胶电泳的基础上,在制备分离胶时,加入 1.5mol/L pH8.9 Tris-HCl 缓冲液配制的 20mg/mL 的纤维蛋白原,使其终浓度为 0.4mg/mL,加入适量凝血酶,以催化纤维蛋白原形成纤维蛋白,加入十二烷基硫酸钠 (SDS),使其终浓度为 0.1%,将不同量的蚯蚓匀浆液上样,电泳结束后,将胶置于 1% Triton-100 溶液中浸泡 1h,而后放入一倍 PBS (pH7.2) 溶液中浸泡,于 37°C 保温一定时间,用考马斯亮蓝 R-250 染色 10min,用 7% 的乙酸脱色 (见表 3)。分离的各组分与本发明的序列的对应关系见表 4。

[0120] 表 3. 蚯蚓 HBeAg 降解酶的组合成分

[0121]

HB eAgase	糖含量 (%)	相对活性 (%)	表观分子量 (kD)
EfP-0-1	6.13	6.2	22.5
EfP-0-2	4.30	12.8	22.4
EfP-I-1	6.18	25.8	28.8
EfP-I-2	1.38	31.6	28.1
EfP-II-1	1.82	8.8	30.6
EfP-II-2	7.40	2.1	29.1
EfP-III-1	6.55	12.5	34.8
EfP-III-2	4.41	2.3	35.0
混合组分	4.40	100	-

[0122]

[0123] 表 4. 蚯蚓 HBeAg 降解酶与本发明的各序列的对应关系

[0124]

HB eAgase	SEQ ID NO.
EfP-0	SEQ ID NO. 14
EfP-I-1	SEQ ID NO. 15
EfP-I-2	SEQ ID NO. 16
EfP-II-1	SEQ ID NO. 11
EfP-II-2	SEQ ID NO. 12
EfP-III-1	SEQ ID NO. 1
EfP-III-2	SEQ ID NO. 2

[0125] 实施例 7 本发明的蚯蚓蛋白对 HBV 转基因小鼠的治疗作用

[0126] 实验方法与结果

[0127] 实验动物 :C57BL/6J-HBV 转基因小鼠 (来自北京大学医学部实验动物部)。转入的基因片段是编码包膜蛋白 HBsAg 的 S 基因, preS 基因以及编码 X 抗原的 X 基因 (参考文献:董宇红、席宏丽、田枫、康爱君, 苦参素对 HBsAg 转基因小鼠血清 Th1 和 Th2 细胞因子水平的影响中华实验和临床病毒学杂志, 2004, 18(3) 277-280。Chisarl FV. Hepatitis B virus transgenic mice: insights into the virus and the disease. Hepatology, 1995, 22 :1316-1325。)小鼠在北京大学医学部实验动物部符合 SPF 级动物饲养标准的环境中进行实验。

[0128] 2. 实验分组 :实验前进行动物的筛选, 选择 HBsAg 阳性 (按照商业购买试剂盒的操作步骤进行测定与评判, Hepanostika® HBsAg Ultra, Biomérieux, Netherlands) 的实验动物 27 只, 按照 HBV 转基因小鼠血清中分泌 HBsAg 的高低 (以 OD 值表示) 进行分组, 每组 9 只。

[0129] 阴性对照 :生理盐水 (0.9% NaCl)

[0130] 阳性对照 :拉米夫定 (灌胃剂量为 100mg 拉米夫定 /kg 小鼠体重)

[0131] 药物 :实施例 5 获得的蚯蚓蛋白粗酶提取物 (冻干粉), 灌胃剂量为 50mg 提取物 /kg 小鼠体重)

[0132] 3. 给药方案 :

[0133] (1) 灌胃 :每天灌胃一次, 持续 21 天, 观察至 30 天。

[0134] (2) 取血 :分别在用药前, 用药 10 天、20 天取血, 制备血清, 测定谷 - 丙转氨酶 (ALT), 谷 - 草转氨酶 (AST) (使用中生北控公司的 IFCC 推荐法, 仪器为日立 7170A 型全自动生化分析仪。操作步骤按照试剂盒说明书进行操作)。在用药后 7、14、21、30 天取血, 制备血清, 测定 HBsAg (使用试剂盒为 :Hepanostika® HBsAg Ultra, Biomérieux, Netherlands, 检测仪器为 BIO-TEK Instruments EL311 型酶标仪。操作步骤按照试剂盒说明书进行操作)。

[0135] 因为小鼠血容量有限, 为了保证小鼠的生存质量, 每次取血体积一般控制在 0.2ml

以下,并间隔足够的时间,所以测定 ALT、AST 的取血时间与测定 HBsAg 的取血时间不同。

[0136] (3) 取组织:在实验最后一天取血完成后,断颈处死小鼠,收集肝组织,部分保存于 4% 甲醛中固定,制备石蜡切片,HE 染色,进行肝脏病理变化观察;部分保存于液氮中备用。

[0137] 4. 检测指标:(1) 体重;(2) 谷-丙转氨酶 (ALT);(3) 谷-草转氨酶 (AST);(4) HBsAg;(5) 对肝脏的病理学观察。

[0138] 5. 实验结果:随着实验的进行,三个实验组动物活动状态没有显著性的差别。体重也没有显著性差异。与生理盐水组相比,转基因小鼠血清中 ALT,AST 上升有所抑制,结果见图 5A,5B。与生理盐水组相比,转基因小鼠血清中 HBsAg 有所降低,结果见图 5C。对转基因小鼠肝脏的病理学观察结果见图 5D。A:生理盐水组,肝小叶结构存在,肝细胞水肿,以肝小叶中央区为著。肝血窦和中央静脉明显扩张,点灶状肝细胞坏死,每 10 个低倍视野可见 12 个肝细胞坏死灶。B:肝小叶结构存在,肝细胞水肿,以肝小叶中央区为著。肝血窦和中央静脉明显扩张,点灶状肝细胞坏死和少量单核淋巴细胞浸润,每 10 个低倍视野可见 4 个肝细胞坏死灶。C:肝小叶结构存在,肝细胞水肿,以肝小叶中央区为著。肝血窦和中央静脉明显扩张,小灶状肝细胞微泡状脂肪性变性,每 10 个低倍视野可见 4 个肝细胞坏死灶。生理盐水组 6 只转基因小鼠,本发明的蚯蚓蛋白组 6 只转基因小鼠与拉米夫定组 6 只转基因小鼠的肝组织病理切片观察结果表明:与生理盐水组相比,蚯蚓蛋白实验动物组 HBsAg 转基因小鼠的肝脏坏死病变减轻,疗效与拉米夫定组类似。

[0139] 结果表明,与生理盐水阴性对照组相比,转基因小鼠血清中 ALT,AST 上升被抑制,HBsAg 分泌受到抑制,这两个指标均优于拉米夫定的治疗效果。生理盐水组及拉米夫定组转基因小鼠的血清 FN 随生存时间的延长而增加,使用本发明的蚯蚓蛋白后含量基本维持在恒定的水平。对肝脏的病理学观察结果显示,蚯蚓蛋白组对乙型肝炎有治疗作用,与生理盐水组相比,可使 HBV 转基因小鼠的肝脏坏死病变减轻,疗效与拉米夫定组类似。因此,本发明在 HBV 转基因小鼠水平证明本发明的蚯蚓蛋白对乙型肝炎转基因小鼠的 HBsAg 分泌有一定的抑制作用,对血清 ALT、AST 维持正常的水平有有益的帮助。乙型肝炎转基因小鼠病理切片观察发现,本发明的蚯蚓蛋白对 HBV 转基因小鼠的肝脏病变有一定的保护作用。

[0140] 实施例 8 本发明的蚯蚓蛋白对 HepG 2. 2. 15 细胞水平的作用

[0141] 1. 细胞系及培养条件:HepG 2. 2. 15 细胞系(军事医学科学院赠送,最初来源于纽约 Mount Sinai 医学中心),其特点是基因组中插入 HVB 基因(参考文献:Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA,Proc. Natl. Acad. Sci. USA,1987,84,1005-1009)。培养基为 DMEM 高糖培养基(Dulbecco's modified eagle medium,Gibco,Invitrogen Corporation,USA),同时加入 10% 的胎牛血清(PAA,Austria),380  $\mu$ g/ml 抗生素 G-418(Amresco,USA) 和青霉素-链霉素溶液(终浓度为 100units/ml 青霉素和 100  $\mu$ g/ml 链霉素,HyClone,USA)。培养条件为 CO<sub>2</sub> 培养箱,37℃ 培养。

[0142] 2. 实验分组:

[0143] 阳性对照:拉米夫定处理组;

[0144] 用药组:本发明的蚯蚓蛋白处理组(单一组分 SEQ ID NO. 1)。

[0145] 3. 用药方案

[0146] 将 HepG2. 2. 15 细胞进行接种 (96 孔板, 每孔  $1 \times 10^4$  个细胞)。细胞接种三天后, 分别加入不同浓度的本发明的蚯蚓蛋白 (培养基中药物终浓度为  $0-5 \mu\text{g/ml}$ ) 和拉米夫定 (培养基中药物终浓度为  $0-100 \mu\text{M}$ )。细胞接种六天时更换相应的含药培养基。在细胞接种九天时收集细胞培养基, 用于测定 HBsAg, HBeAg。

[0147] 4. HBsAg, HBeAg 的测定方法: 将步骤 3 收集的细胞培养基 12000rpm 离心 5min, 取适量, 采用乙型肝炎病毒 s 抗原及 e 抗原诊断试剂盒 (酶联免疫法, 华美生物工程公司) 按照说明书步骤进行测定。

[0148] 5. 实验结果见图 6, 结果表明, 与空白细胞相比, 本发明的蚯蚓蛋白处理组 HBsAg, HBeAg 的分泌均受到抑制, 细胞培养基中 HBsAg, HBeAg 含量有所下降 (图 7A)。

[0149] 实验结果表明, 与空白细胞相比, 本发明的蚯蚓蛋白处理组 HBsAg, HBeAg 的分泌均受到抑制, 细胞培养基中 HBsAg, HBeAg 含量有所下降。与拉米夫定阳性对照组 (图 7B) 相比, 本发明的蚯蚓蛋白对 HBeAg 的分泌有更强的抑制作用。

[0150] 参考文献

[0151] 1. Stephen E L, Josephine P S, Lisa R B, et al. Clearance of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B and genotypes A, B, C, D and F. *Gastroenterology*, 2007, 133 (5) : 1452-1457

[0152] 2. Milieh D, Liang T J. Exploring the biological basis of hepatitis B e antigen in hepatitis B virus infection. *Hepatology*, 2003, 38 (5) : 1075-1086

[0153] 3. Ou J H. Molecular biology of hepatitis B virus e antigen. *Gastroenterol Hepatol*, 1997, 12 : 178-187

[0154] 4. Parekh S, Zoulim F, Alan S H, et al. Genome replication, virion secretion, and e antigen expression of naturally occurring hepatitis B virus core promoter mutants. *J Virol*, 2003, 77 : 6601-6612

[0155] 5. Riedl P, Stober D, Oehninger G, et al. Priming Th1 immunity to viral core particles is facilitated by trace amount of RNA bound to its arginine-rich domain. *J Immunol*, 2002, 168 : 4951-4959

[0156] 6. Luiz Caetano da Silva ; Maria Luiza da Nova ; Suzane Kioko Ono-Nita, et al. Simultaneous quantitation of serum HBV DNA and HBeAg can distinguish between slow and fast viral responses to antiviral therapy in patients with chronic hepatitis B. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* (2009), 51 (5) : 261-268

[0001]

序列表-final.txt

## 序列表

&lt;110&gt; 中国科学院生物物理所

&lt;120&gt; 具有HBeAg降解酶活性的蚯蚓蛋白及其应用

&lt;130&gt; IB102960C

&lt;160&gt; 16

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 239

&lt;212&gt; PRT

<213> 赤子爱胜蚓(*Eisenia fetida*)

&lt;400&gt; 1

Met Ile Val Gly Gly Ile Glu Ala Arg Pro Tyr Glu Phe Pro Trp Gln  
1 5 10 15Val Ser Val Arg Arg Lys Ser Ser Asp Ser His Phe Cys Gly Gly Ser  
20 25 30Ile Ile Asn Asp Arg Trp Val Val Cys Ala Ala His Cys Met Gln Gly  
35 40 45Glu Ser Pro Ala Leu Val Ser Leu Val Val Gly Glu His Asp Ser Ser  
50 55 60Ala Ala Ser Thr Val Arg Gln Thr His Asp Val Asp Ser Ile Phe Val  
65 70 75 80Asn Glu Asn Tyr Asp Pro Arg Thr Leu Glu Asn Asp Val Ser Val Ile  
85 90 95Lys Thr Ala Ile Ala Ile Thr Phe Asp Ile Asn Val Gly Pro Ile Cys  
100 105 110Ala Pro Asp Pro Ala Asn Asp Tyr Val Tyr Arg Lys Ser Gln Cys Ser  
115 120 125Gly Trp Gly Thr Ile Asn Ser Gly Gly Ile Cys Cys Pro Ala Val Leu  
130 135 140Arg Tyr Val Thr Leu Asn Ile Thr Thr Asn Ala Phe Cys Asp Ala Val  
145 150 155 160

[0002]



## 序列表-final.txt

Tyr Thr Ser Asp Thr Ile Tyr Asp Asp Met Ile Cys Ala Thr Asp Asn  
 165 170 175  
 Thr Gly Met Thr Asp Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro  
 180 185 190  
 Leu Ser Val Lys Asp Gly Ser Gly Ile Phe Ser Leu Val Gly Ile Val  
 195 200 205  
 Ser Trp Gly Ile Gly Cys Ala Ser Gly Tyr Pro Gly Val Tyr Ser Arg  
 210 215 220  
 Val Gly Phe His Ala Gly Trp Ile Thr Asp Ile Ile Thr Asn Asn  
 225 230 235  
 <210> 2  
 <211> 242  
 <212> PRT  
 <213> 赤子爱胜蚓(*Eisenia fetida*)  
 <400> 2  
 Val Ile Gly Gly Thr Asn Ala Ser Pro Gly Glu Phe Pro Trp Gln Leu  
 1 5 10 15  
 Ser Gln Gln Arg Gln Ser Gly Ser Trp Ser His Ser Cys Gly Ala Ser  
 20 25 30  
 Leu Leu Ser Ser Thr Ser Ala Leu Ser Ala Ser His Cys Val Asp Gly  
 35 40 45  
 Val Leu Pro Asn Asn Ile Arg Val Ile Ala Gly Leu Trp Gln Gln Ser  
 50 55 60  
 Asp Thr Ser Gly Thr Gln Thr Ala Asn Val Asp Ser Tyr Thr Met His  
 65 70 75 80  
 Glu Asn Tyr Gly Ala Gly Thr Ala Ser Tyr Ser Asn Asp Ile Ala Ile  
 85 90 95  
 Leu His Leu Ala Thr Ser Ile Ser Leu Gly Gly Asn Ile Gln Ala Ala  
 100 105 110  
 Val Leu Pro Ala Asn Asn Asn Asn Asp Tyr Ala Gly Thr Thr Cys Val  
 115 120 125  
 Ile Ser Gly Trp Gly Arg Thr Asp Gly Thr Asn Asn Leu Pro Asp Ile  
 130 135 140  
 Leu Gln Lys Ser Ser Ile Pro Val Ile Thr Thr Ala Gln Cys Thr Ala  
 145 150 155 160  
 Ala Met Val Gly Val Gly Gly Ala Asn Ile Trp Asp Asn His Ile Cys  
 165 170 175

[0003]

序列表-final.txt

Val Gln Asp Pro Ala Gly Asn Thr Gly Ala Cys Asn Gly Asp Ser Gly  
180 185 190

Gly Pro Leu Asn Cys Pro Asp Gly Gly Thr Arg Val Val Gly Val Thr  
195 200 205

Ser Trp Val Val Ser Ser Gly Leu Gly Ala Cys Leu Pro Asp Tyr Pro  
210 215 220

Ser Val Tyr Thr Arg Val Ser Ala Tyr Leu Gly Trp Ile Gly Asp Asn  
225 230 235 240

Ser Arg

<210> 3

<211> 238

<212> PRT

<213> 粉正蚓(Lumbricus rubellus)

<400> 3

Ile Val Gly Gly Ile Glu Ala Arg Pro Tyr Glu Phe Pro Trp Gln Val  
1 5 10 15

Ser Val Arg Arg Lys Ser Ser Asp Ser His Phe Cys Gly Gly Ser Ile  
20 25 30

Ile Asn Asp Arg Trp Val Val Cys Ala Ala His Cys Met Gln Gly Glu  
35 40 45

Ala Pro Ala Leu Val Ser Leu Val Val Gly Glu His Asp Ser Ser Ala  
50 55 60

Ala Ser Thr Val Arg Gln Thr His Asp Val Asp Ser Ile Phe Val Asn  
65 70 75 80

Glu Asn Tyr Asp Pro Ala Thr Leu Glu Asn Asp Val Ser Val Ile Lys  
85 90 95

Thr Ala Val Ala Ile Thr Phe Asp Ile Asn Val Gly Pro Ile Cys Ala  
100 105 110

Pro Asp Pro Ala Asn Asp Tyr Val Tyr Arg Lys Ser Gln Cys Ser Gly  
115 120 125

Trp Gly Thr Ile Asn Ser Gly Gly Val Cys Cys Pro Ala Val Leu Arg  
130 135 140

Tyr Val Thr Leu Asn Ile Thr Thr Asn Ala Phe Cys Asp Ala Val Tyr  
145 150 155 160

Thr Ser Asp Thr Ile Tyr Asp Asp Met Ile Cys Ala Thr Asp Asn Thr

[0004]

序列表-final.txt  
175

165    170

Gly Met Thr Asp Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu  
180    185    190

Ser Val Lys Asp Gly Ser Gly Ile Phe Ser Leu Val Gly Ile Val Ser  
195    200    205

Trp Gly Ile Gly Cys Ala Ser Gly Tyr Pro Gly Val Tyr Ser Arg Val  
210    215    220

Gly Phe His Ala Gly Trp Ile Thr Asp Thr Ile Thr Asn Asn  
225    230    235

<210> 4

<211> 246

<212> PRT

<213> 赤子爱胜蚓(Eisenia fetida)

<400> 4

Met Glu Leu Pro Pro Gly Thr Lys Ile Val Gly Gly Ile Glu Ala Arg  
1    5    10    15

Pro Tyr Glu Phe Pro Trp Gln Val Ser Val Arg Arg Lys Ser Ser Asp  
20    25    30

Ser His Phe Cys Gly Gly Ser Ile Ile Asn Asp Arg Trp Val Val Cys  
35    40    45

Ala Ala His Cys Met Gln Gly Glu Ala Pro Ala Leu Val Ser Leu Val  
50    55    60

Val Gly Glu His Asp Arg Ser Ala Ala Ser Thr Val Arg Gln Thr His  
65    70    75    80

Asp Val Asp Ser Ile Phe Val His Glu Asp Tyr Asn Thr Asn Thr Leu  
85    90    95

Glu Asn Asp Val Ser Val Ile Lys Thr Ser Val Ala Ile Thr Phe Asp  
100    105    110

Ile Asn Val Gly Pro Ile Cys Ala Pro Asp Pro Ala Asn Asp Tyr Val  
115    120    125

Tyr Arg Lys Ser Gln Cys Ser Gly Trp Gly Thr Ile Asn Ser Gly Gly  
130    135    140

Ile Cys Cys Pro Asn Val Leu Arg Tyr Val Thr Leu Asn Asp Thr Thr  
145    150    155    160

Asn Gln Tyr Cys Glu Asp Val Tyr Pro Leu Asn Ser Ile Tyr Asp Asp  
165    170    175

[0005]

序列表-final.txt

Met Ile Cys Ala Ser Asp Asn Thr Gly Gly Asn Asp Arg Asp Ser Cys  
180 185 190

Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Ser Val Lys Asp Gly Ser Gly Ile  
195 200 205

Phe Ser Leu Ile Gly Ile Val Ser Trp Gly Ile Gly Cys Ala Ser Gly  
210 215 220

Tyr Pro Gly Val Tyr Ser Arg Val Gly Phe His Ala Ala Trp Ile Thr  
225 230 235 240

Asp Ile Ile Thr Asn Asn  
245

<210> 5

<211> 247

<212> PRT

<213> 赤子爱胜蚓(Eisenia fetida)

<400> 5

Met Glu Leu Pro Pro Gly Thr Lys Ile Val Gly Gly Ile Glu Ala Arg  
1 5 10 15

Pro Tyr Glu Phe Pro Trp Gln Val Ser Val Arg Arg Lys Ser Ser Asp  
20 25 30

Ser His Phe Cys Gly Gly Ser Ile Ile Asn Asp Arg Trp Val Val Cys  
35 40 45

Ala Ala His Cys Met Gln Gly Glu Ser Pro Ala Leu Val Ser Leu Val  
50 55 60

Val Gly Glu His Asp Ser Ser Ala Ala Ser Thr Val Arg Gln Thr His  
65 70 75 80

Asp Val Asp Ser Ile Phe Val His Glu Asp Tyr Asn Gly Asn Thr Phe  
85 90 95

Glu Asn Asp Val Ser Val Ile Lys Thr Val Asn Ala Ile Ala Ile Asp  
100 105 110

Ile Asn Val Gly Pro Ile Cys Ala Pro Asp Pro Ala Asn Asp Tyr Val  
115 120 125

Tyr Arg Lys Ser Gln Cys Ser Gly Trp Gly Thr Val Asn Ser Gly Gly  
130 135 140

Val Cys Cys Pro Asn Val Leu Arg Tyr Val Thr Leu Asn Val Thr Thr  
145 150 155 160

Asn Ala Phe Cys Asp Asp Ile Tyr Ser Pro Leu Tyr Thr Ile Thr Ser  
165 170 175

[0006]

## 序列表-final.txt

Asp Met Ile Cys Ala Thr Asp Asn Thr Gly Gln Asn Glu Arg Asp Ser  
 180 185 190

Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Ser Val Lys Asp Gly Ser Gly  
 195 200 205

Ile Phe Ser Leu Ile Gly Ile Val Ser Trp Gly Ile Gly Cys Ala Ser  
 210 215 220

Gly Tyr Pro Gly Val Tyr Ala Arg Val Gly Ser Gln Thr Gly Trp Ile  
 225 230 235 240

Thr Asp Ile Ile Thr Asn Asn  
 245

<210> 6

<211> 242

<212> PRT

<213> 粉正蚓(Lumbricus rubellus)

<400> 6

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

Ser Gln Gln Arg Gln Ser Gly Ser Trp Ser His Ser Cys Gly Ala Ser  
 20 25 30

Leu Leu Ser Ser Thr Ser Ala Leu Ser Ala Ser His Cys Val Asp Gly  
 35 40 45

Val Leu Pro Asn Asn Ile Arg Val Ile Ala Gly Leu Trp Gln Gln Ser  
 50 55 60

Asp Thr Ser Gly Thr Gln Thr Ala Asn Val Asp Ser Tyr Thr Met His  
 65 70 75 80

Glu Asn Tyr Gly Ala Gly Thr Ala Ser Tyr Ser Asn Asp Ile Ala Ile  
 85 90 95

Leu His Leu Ala Thr Ser Ile Ser Leu Gly Gly Asn Ile Gln Ala Ala  
 100 105 110

Val Leu Pro Ala Asn Asn Asn Asn Asp Tyr Ala Gly Thr Thr Cys Val  
 115 120 125

Ile Ser Gly Trp Gly Arg Thr Asp Gly Thr Asn Asn Leu Pro Asp Ile  
 130 135 140

Leu Gln Lys Ser Ser Ile Pro Val Ile Thr Thr Ala Gln Cys Thr Ala  
 145 150 155 160

Ala Met Val Gly Val Gly Gly Ala Asn Ile Trp Asp Asn His Ile Cys  
 165 170 175

[0007]

## 序列表-final.txt

Val Gln Asp Pro Ala Gly Asn Thr Gly Ala Cys Asn Gly Asp Ser Gly  
180 185 190

Gly Pro Leu Asn Cys Pro Asp Gly Gly Thr Arg Val Val Gly Val Thr  
195 200 205

Ser Trp Val Val Ser Ser Gly Leu Gly Ala Cys Leu Pro Asp Tyr Pro  
210 215 220

Ser Val Tyr Thr Arg Val Ser Ala Tyr Leu Gly Trp Ile Gly Asp Asn  
225 230 235 240

Ser Arg

<210> 7

<211> 225

<212> PRT

<213> 双胸蚓(Lumbricus bimastus)

<400> 7

Val Val Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ile Gly Gln Tyr Pro His Gln Leu  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Val Thr Gly Ser His Ser Cys Gly Ala Ser Leu Ile Gly  
20 25 30

Thr Thr Arg Ala Val Thr Ala Ala His Cys Thr Gly Ser Ala Ile Ala  
35 40 45

Val Tyr Ser Ile Leu Gly Gly Thr Thr Asp Arg Thr Val Thr Asn Cys  
50 55 60

Ala Thr Cys Val Leu Arg Asp Leu Asn Phe Leu Asn Arg His Pro Ala  
65 70 75 80

Tyr Asp Gly Asn Ala Pro Gly Tyr Pro Asn Asp Val Ala Val Ile Gly  
85 90 95

Phe Ala Ala Val Ala Thr Asn Thr Asn Leu Gln Ala Ile Ser Leu Ala  
100 105 110

Thr Pro Ser Asp Gly Asn Phe Ala Gly Asp Ser Cys Val Ile Thr Gly  
115 120 125

Trp Gly Gln Thr Gly Ser Ile Gly Gly Leu Pro Asp Ala Leu Gln Leu  
130 135 140

Ala Thr Met Asn Val Leu Thr Asn Ala Asp Cys Thr Asn Thr Trp Gly  
145 150 155 160

Ala Val Arg Ile Asn Asp Gly His Ile Cys Val Ser Ala Ala Gly Arg

[0008]

序列表-final.txt

165 170 175

Ser Ala Cys Ser Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Glu Cys Ser Asn Arg  
180 185 190

Leu Ala Gly Ala Thr Ser Trp Gly Glu Ala Ser Cys Asp Pro Ser Tyr  
195 200 205

Pro Ser Val Tyr Thr Arg Val Ser Tyr Phe Tyr Thr Trp Ile Ile Ala  
210 215 220

Gln  
225

<210> 8

<211> 242

<212> PRT

<213> 双胸蚓(Lumbricus bimastus)

<400> 8

Met Gly Gly Glu Gln Tyr Ile Ile Gly Gly Ser Asn Ala Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Phe Pro Trp Gln Leu Ser Gln Thr Arg Gly Gly Ser His Ser Cys  
20 25 30

Gly Ala Ser Leu Leu Asn Ala Leu Asn Gly Leu Ser Ala Ser His Cys  
35 40 45

Val Asp Gly Ala Ala Pro Gly Thr Ile Thr Val Ile Ala Gly Leu His  
50 55 60

Asp Arg Ser Gly Thr Pro Gly Ser Gln Glu Val Asp Ile Thr Gly Tyr  
65 70 75 80

Thr Met His Glu Asn Tyr Asn Gln Gly Thr Asn Thr Tyr Ala Asn Asp  
85 90 95

Ile Ala Ile Leu His Phe Ala Ser Ala Ile Asn Ile Gly Gly Asn Val  
100 105 110

Gln Ala Ala Leu Leu Pro Ala Asn Asn Asn Asn Asp Tyr Ser Asp Leu  
115 120 125

Thr Cys Val Ile Ser Gly Trp Gly Arg Thr Gly Ser Ser Asn Val Leu  
130 135 140

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

Cys Gln Ser Leu Met Gly Ser Ile Gly Asn Ile Trp Asp Asn His Ile  
165 170 175

[0009]

## 序列表-final.txt

Cys Leu Tyr Asp Asn Ala Asn Asn Val Gly Ser Cys Asn Gly Asp Ser  
 180 185 190

Gly Gly Pro Leu Asn Cys Pro Asp Gly Gly Thr Arg Val Ala Gly Val  
 195 200 205

Thr Ser Trp Gly Val Ser Ser Gly Ala Gly Asn Cys Leu Gln Thr Tyr  
 210 215 220

Pro Ser Val Tyr Thr Arg Thr Ser Ala Tyr Leu Ser Trp Ile Ala Asn  
 225 230 235 240

Asn Ser

<210> 9  
 <211> 245  
 <212> PRT  
 <213> 赤子爱胜蚓(Eisenia fetida)

<400> 9

Met Glu Leu Pro Pro Gly Lys Ile Val Gly Gly Ile Glu Ala Arg Pro  
 1 5 10 15

Tyr Glu Phe Pro Trp Gln Val Ser Val Arg Arg Lys Ser Ser Asp Ser  
 20 25 30

His Phe Cys Gly Gly Ser Ile Ile Asn Asp Arg Trp Val Val Cys Ala  
 35 40 45

Ala His Cys Met Gln Gly Glu Ser Pro Ala Leu Val Ser Leu Val Val  
 50 55 60

Gly Glu His Asp Ser Ser Ala Ala Ser Thr Val Arg Gln Thr His Asp  
 65 70 75 80

Val Asp Ser Ile Phe Val Asn Glu Asn Tyr Asp Pro Arg Thr Leu Glu  
 85 90 95

Asn Asp Val Ser Val Ile Lys Thr Ala Ile Ala Ile Thr Phe Asp Ile  
 100 105 110

Asn Val Gly Pro Ile Cys Ala Pro Asp Pro Ala Asn Asp Tyr Val Tyr  
 115 120 125

Arg Lys Ser Gln Cys Ser Gly Trp Gly Thr Ile Asn Ser Gly Gly Ile  
 130 135 140

Cys Cys Pro Ala Val Leu Arg Tyr Val Thr Leu Asn Ile Thr Thr Asn  
 145 150 155 160

Ala Phe Cys Asp Ala Val Tyr Thr Ser Asp Thr Ile Tyr Asp Asp Met  
 165 170 175

[0010]



序列表-final.txt

Ile Cys Ala Thr Asp Asn Thr Gly Met Thr Asp Arg Asp Ser Cys Gln  
180 185 190

Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Ser Val Lys Asp Gly Ser Gly Ile Phe  
195 200 205

Ser Leu Gly Gly Ile Val Ser Trp Gly Ile Gly Cys Ala Ser Gly Tyr  
210 215 220

Pro Gly Val Tyr Ser Arg Val Gly Phe His Ala Gly Trp Ile Thr Asp  
225 230 235 240

Thr Ile Thr Asn Asn  
245

<210> 10

<211> 246

<212> PRT

<213> 粉正蚓(Lumbricus rubellus)

<400> 10

Met Glu Leu Pro Pro Gly Thr Lys Ile Val Gly Gly Ile Glu Ala Arg  
1 5 10 15

Pro Tyr Glu Phe Pro Trp Gln Val Ser Val Arg Arg Lys Ser Ser Asp  
20 25 30

Ser His Phe Cys Gly Gly Ser Ile Ile Asn Asp Arg Trp Val Val Cys  
35 40 45

Ala Ala His Cys Met Gln Gly Glu Ala Pro Ala Leu Val Ser Leu Val  
50 55 60

Val Gly Glu His Asp Arg Ser Ala Ala Ser Thr Val Arg Gln Thr His  
65 70 75 80

Asp Val Asp Ser Ile Phe Val His Glu Asp Tyr Asn Ala Asn Thr Leu  
85 90 95

Glu Asn Asp Val Ser Val Ile Lys Thr Ser Val Ala Ile Thr Phe Asp  
100 105 110

Ile Asn Val Gly Pro Ile Cys Ala Pro Asp Pro Ala Asn Asp Tyr Val  
115 120 125

Tyr Arg Lys Ser Gln Cys Ser Gly Trp Gly Thr Ile Asn Ser Gly Gly  
130 135 140

Ile Cys Cys Pro Asn Val Leu Arg Tyr Val Thr Leu Asn Val Thr Thr  
145 150 155 160

Asn Gln Phe Cys Glu Asp Val Tyr Pro Leu Asn Ser Ile Tyr Asp Asp  
165 170 175

[0011]

## 序列表-final.txt

Met Ile Cys Ala Ser Asp Asn Thr Gly Gly Asn Asp Arg Asp Ser Cys  
180 185 190

Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Ser Val Lys Asp Gly Ser Gly Ile  
195 200 205

Phe Ser Leu Ile Gly Ile Val Ser Trp Gly Ile Gly Cys Ala Ser Gly  
210 215 220

Tyr Pro Gly Val Tyr Ser Arg Val Gly Phe His Ala Ala Trp Ile Thr  
225 230 235 240

Asp Ile Ile Thr Asn Asn  
245

<210> 11

<211> 241

<212> PRT

<213> 赤子爱胜蚓(Eisenia fetida)

<400> 11

Pro Gly Lys Ile Val Gly Gly Ile Glu Ala Arg Pro Tyr Glu Phe Pro  
1 5 10 15

Trp Gln Val Ser Val Arg Arg Lys Ser Ser Asp Ser His Phe Cys Gly  
20 25 30

Gly Ser Ile Ile Asn Asp Arg Trp Val Val Cys Ala Ala His Cys Met  
35 40 45

Gln Gly Glu Ser Pro Ala Leu Val Ser Leu Val Val Gly Glu His Asp  
50 55 60

Ser Ser Ala Ala Ser Thr Val Arg Gln Thr His Asp Val Asp Ser Ile  
65 70 75 80

Phe Val Asn Glu Asn Tyr Asp Pro Arg Thr Leu Glu Asn Asp Val Ser  
85 90 95

Val Ile Lys Thr Ala Ile Ala Ile Thr Phe Asp Ile Asn Val Gly Pro  
100 105 110

Ile Cys Ala Pro Asp Pro Ala Asn Asp Tyr Val Tyr Arg Lys Ser Gln  
115 120 125

Cys Ser Gly Trp Gly Thr Ile Asn Ser Gly Gly Ile Cys Cys Pro Ala  
130 135 140

Val Leu Arg Tyr Val Thr Leu Asn Ile Thr Thr Asn Ala Phe Cys Asp  
145 150 155 160

Ala Val Tyr Thr Ser Asp Thr Ile Tyr Asp Asp Met Ile Cys Ala Thr

[0012]

序列表-final.txt

	165	170	175
Asp Asn Thr Gly Met Thr Asp Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly	180	185	190
Gly Pro Leu Ser Val Lys Asp Gly Ser Gly Ile Phe Ser Leu Gly Gly	195	200	205
Ile Val Ser Trp Gly Ile Gly Cys Ala Ser Gly Tyr Pro Gly Val Tyr	210	215	220
Ser Arg Val Gly Phe His Ala Gly Trp Ile Thr Asp Thr Ile Thr Asn	225	230	235
Asn			
<210>	12		
<211>	246		
<212>	PRT		
<213>	赤子爱胜蚓(Eisenia fetida)		
<400>	12		
Met Glu Leu Pro Pro Gly Thr Lys Ile Val Gly Gly Ile Glu Ala Arg	1	5	10
Pro Tyr Glu Phe Pro Trp Gln Val Ser Val Arg Arg Lys Ser Ser Asp	20	25	30
Ser His Phe Cys Gly Gly Ser Ile Ile Asn Asp Arg Trp Val Val Cys	35	40	45
Ala Ala His Cys Met Gln Gly Glu Ala Pro Ala Leu Val Ser Leu Val	50	55	60
Val Gly Glu His Asp Arg Ser Ala Ala Ser Thr Val Arg Gln Thr His	65	70	75
Asp Val Asp Ser Ile Phe Val His Glu Asp Tyr Asn Ala Asn Thr Leu	85	90	95
Glu Asn Asp Val Ser Val Ile Lys Thr Ser Val Ala Ile Thr Phe Asp	100	105	110
Ile Asn Val Gly Pro Ile Cys Ala Pro Asp Pro Ala Asn Asp Tyr Val	115	120	125
Tyr Arg Lys Ser Gln Cys Ser Gly Trp Gly Thr Ile Asn Ser Gly Gly	130	135	140
Ile Cys Cys Pro Asn Val Leu Arg Tyr Val Thr Leu Asn Val Thr Thr	145	150	155
			160

[0013]

序列表-final.txt

Asn Gln Phe Cys Glu Asp Val Tyr Pro Leu Asn Ser Ile Tyr Asp Asp  
165 170 175

Met Ile Cys Ala Ser Asp Asn Thr Gly Gly Asn Asp Arg Asp Ser Cys  
180 185 190

Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Ser Val Lys Asp Gly Ser Gly Ile  
195 200 205

Phe Ser Leu Ile Gly Ile Val Ser Trp Gly Ile Gly Cys Ala Ser Gly  
210 215 220

Tyr Pro Gly Val Tyr Ser Arg Val Gly Phe His Ala Ala Trp Ile Thr  
225 230 235 240

Asp Ile Ile Thr Asn Asn  
245

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 283

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 双胸蚓(Lumbricus bimastus)

&lt;400&gt; 13

Met Leu Leu Leu Ala Leu Ala Ser Leu Val Ala Val Gly Phe Ala Gln  
1 5 10 15

Pro Pro Val Trp Tyr Pro Gly Gly Gln Cys Ser Val Ser Gln Tyr Ser  
20 25 30

Asp Ala Gly Asp Met Glu Leu Pro Pro Gly Thr Lys Ile Val Gly Gly  
35 40 45

Ile Glu Ala Arg Pro Tyr Glu Phe Pro Trp Gln Val Ser Val Arg Arg  
50 55 60

Lys Ser Ser Asp Ser His Phe Cys Gly Gly Ser Ile Ile Asn Asp Arg  
65 70 75 80

Trp Val Val Cys Ala Ala His Cys Met Gln Gly Glu Ser Pro Ala Leu  
85 90 95

Val Ser Leu Val Val Gly Glu His Asp Ser Ser Ala Ala Ser Thr Val  
100 105 110

Arg Gln Thr His Asp Val Asp Ser Ile Phe Val His Glu Asp Tyr Asn  
115 120 125

Gly Asn Thr Phe Glu Asn Asp Val Ser Val Ile Lys Thr Val Asn Ala  
130 135 140

Ile Ala Ile Asp Ile Asn Asp Gly Pro Ile Cys Ala Pro Asp Pro Ala  
145 150 155 160

[0014]

## 序列表-final.txt

```

Asn Asp Tyr Val Tyr Arg Lys Ser Gln Cys Ser Gly Trp Gly Thr Ile
                165                      170                      175

Asn Ser Gly Gly Val Cys Cys Pro Asn Val Leu Arg Tyr Val Thr Leu
                180                      185                      190

Asn Val Thr Thr Asn Ala Phe Cys Asp Asp Ile Tyr Ser Pro Leu Tyr
                195                      200                      205

Thr Ile Thr Ser Asp Met Ile Cys Ala Thr Asp Asn Thr Gly Gln Asn
                210                      215                      220

Glu Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Ser Val Lys
                225                      230                      235

Asp Gly Asn Gly Ile Phe Ser Leu Ile Gly Ile Val Ser Trp Gly Ile
                245                      250                      255

Gly Cys Ala Ser Gly Tyr Pro Gly Val Tyr Ala Arg Val Gly Ser Gln
                260                      265                      270

Thr Gly Trp Ile Thr Asp Ile Ile Thr Asn Asn
                275                      280

<210> 14
<211> 245
<212> PRT
<213> 赤子爱胜蚓(Eisenia fetida)

<400> 14
Met Glu Leu Pro Pro Gly Lys Ile Val Gly Gly Ile Glu Ala Arg Pro
1                    5                      10

Tyr Glu Phe Pro Trp Gln Val Ser Val Arg Arg Lys Ser Ser Asp Ser
                20                      25                      30

His Phe Cys Gly Gly Ser Ile Ile Asn Asp Arg Trp Val Ala Cys Ala
                35                      40                      45

Ala His Cys Met Gln Gly Glu Ser Pro Ala Leu Val Ser Leu Val Val
                50                      55                      60

Gly Glu His Asp Ser Ser Ala Ala Ser Thr Val Arg Gln Thr His Asp
65                      70                      75                      80

Val Asp Ser Ile Phe Val Asn Glu Asn Tyr Asp Pro Arg Thr Leu Glu
                85                      90                      95

Asn Asp Val Ser Val Ile Lys Thr Ala Ile Ala Ile Thr Phe Asp Ile
                100                     105                     110

Asn Val Gly Pro Ile Cys Ala Pro Asp Pro Ala Asn Asp Tyr Val Tyr
                115                     120                     125

```

[0015]

序列表-final.txt

Arg Lys Ser Gln Cys Ser Gly Trp Gly Thr Ile Asn Ser Gly Gly Ile  
130 135 140

Cys Cys Pro Ala Val Leu Arg Tyr Val Thr Leu Asn Ile Thr Thr Asn  
145 150 155 160

Ala Phe Cys Asp Ala Val Tyr Thr Ser Asp Thr Ile Tyr Asp Asp Met  
165 170 175

Ile Cys Ala Thr Asp Asn Thr Gly Met Thr Asp Arg Asp Ser Cys Gln  
180 185 190

Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Ser Val Lys Asp Gly Ser Gly Ile Phe  
195 200 205

Ser Leu Val Gly Ile Val Ser Trp Gly Ile Gly Cys Ala Ser Gly Tyr  
210 215 220

Pro Gly Val Tyr Ser Arg Val Gly Phe His Ala Gly Trp Ile Thr Asp  
225 230 235 240

Thr Ile Thr Asn Asn  
245

<210> 15

<211> 242

<212> PRT

<213> 赤子爱胜蚓(*Eisenia fetida*)

<400> 15

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

Ser Gln Gln Arg Gln Ser Gly Ser Trp Ser His Ser Cys Gly Ala Ser  
20 25 30

Leu Leu Ser Ser Thr Ser Ala Leu Ser Ala Ser His Cys Val Asp Gly  
35 40 45

Val Leu Pro Asn Asn Ile Arg Val Ile Ala Gly Leu Trp Gln Gln Ser  
50 55 60

Asp Thr Ser Gly Thr Gln Thr Ala Asn Val Asp Ser Tyr Thr Met His  
65 70 75 80

Glu Asn Tyr Gly Ala Gly Thr Ala Ser Tyr Ser Asn Asp Ile Ala Ile  
85 90 95

Leu His Leu Ala Thr Ser Ile Ser Leu Gly Gly Asn Ile Gln Ala Ala  
100 105 110

Val Leu Pro Ala Asn Asn Asn Asn Asp Tyr Ala Gly Thr Thr Cys Val

[0016]

序列表-final.txt  
125

115    120

Ile Ser Gly Trp Gly Arg Thr Asp Gly Thr Asn Asn Leu Pro Asp Ile  
130    135    140

Leu Gln Lys Ser Ser Ile Pro Val Ile Thr Thr Ala Gln Cys Thr Ala  
145    150    155

Ala Met Val Gly Val Gly Gly Ala Asn Ile Trp Asp Asn His Ile Cys  
165    170

Val Gln Asp Pro Ala Gly Asn Thr Gly Ala Cys Asn Gly Asp Ser Gly  
180    185    190

Gly Pro Leu Asn Cys Pro Asp Gly Gly Thr Arg Val Val Gly Val Thr  
195    200    205

Ser Trp Val Val Ser Ser Gly Leu Gly Ala Cys Leu Pro Asp Tyr Pro  
210    215    220

Ser Val Tyr Thr Arg Val Ser Ala His Leu Gly Trp Ile Gly Asp Asn  
225    230    235    240

Ser Arg

- <210> 16
- <211> 246
- <212> PRT
- <213> 赤子爱胜蚓(Eisenia fetida)

<400> 16

Met Glu Leu Pro Pro Gly Thr Lys Ile Val Gly Gly Ile Glu Ala Arg  
1    5    10    15

Pro Tyr Glu Phe Pro Trp Gln Val Ser Val Arg Arg Lys Ser Thr Asp  
20    25    30

Ser His Phe Cys Gly Gly Ser Ile Ile Asn Asp Arg Trp Val Val Cys  
35    40    45

Ala Ala His Cys Met Gln Gly Glu Ser Pro Ala Leu Val Ser Leu Val  
50    55    60

Val Gly Glu His Asp Ser Ser Ala Ala Ser Thr Val Arg Gln Thr His  
65    70    75    80

Asp Val Asp Ser Ile Phe Val Asn Glu Asn Tyr Asn Pro Arg Thr Leu  
85    90    95

Glu Asn Asp Val Ser Val Ile Lys Thr Ala Ile Ala Ile Thr Phe Asp  
100    105    110

[0017]

序列表-final.txt

```

Ile Asn Val Gly Pro Ile Cys Ala Pro Asp Pro Ala Asn Asp Tyr Val
    115                                120                    125

Tyr Arg Lys Ser Gln Cys Ser Gly Trp Gly Ser Ile Asn Ser Gly Gly
    130                                135                    140

Ile Cys Cys Pro Ala Val Leu Arg Tyr Val Thr Leu Asn Ile Thr Thr
    145                                150                    155                    160

Asn Ala Phe Cys Asp Ala Val Tyr Thr Ser Asp Thr Ile Tyr Asp Asp
    165                                170                    175

Met Ile Cys Ala Thr Asp Asn Thr Gly Met Thr Asp Arg Asp Ser Cys
    180                                185                    190

Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Ser Val Lys Asp Gly Ser Gly Ile
    195                                200                    205

Phe Ser Leu Val Gly Ile Val Ser Trp Gly Ile Gly Cys Ala Ser Gly
    210                                215                    220

Tyr Pro Gly Val Tyr Ser Arg Val Gly Phe His Ala Gly Trp Ile Thr
    225                                230                    235                    240

Asp Thr Ile Thr Asn Asn
    245

```



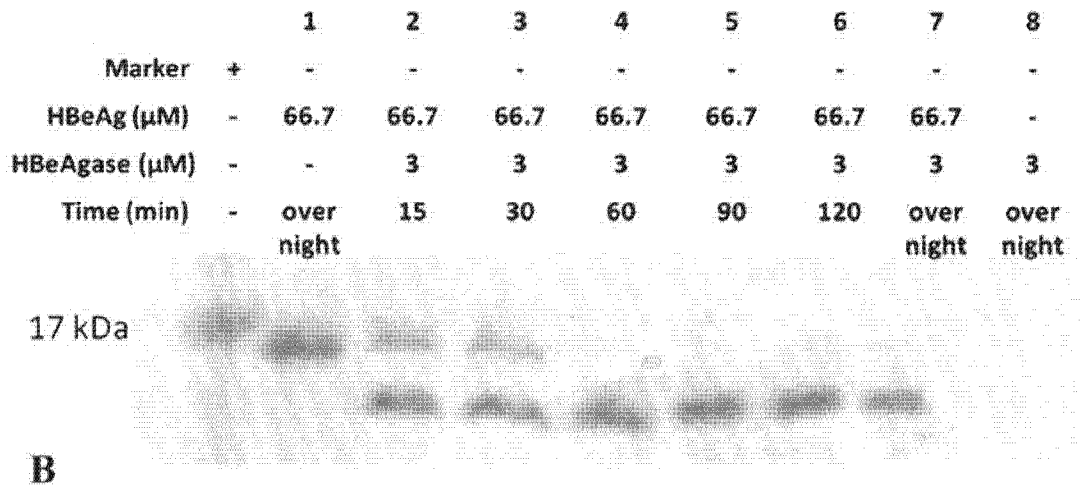
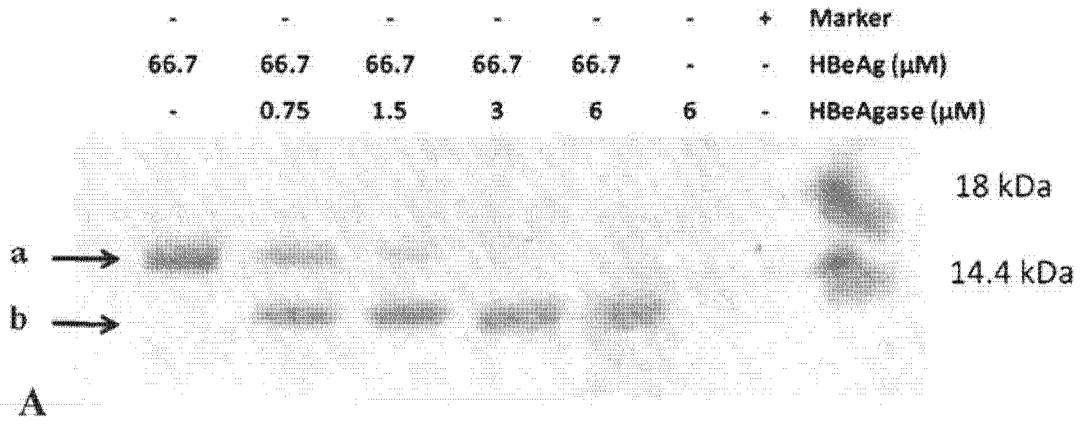


图 1

	1	2	3	4	5	6
Marker	+	-	-	-	-	-
HBeAg ( $\mu\text{M}$ )	-	66.7	66.7	66.7	66.7	-
HBeAgase ( $\mu\text{M}$ )	-	-	0.75	1.5	3	6

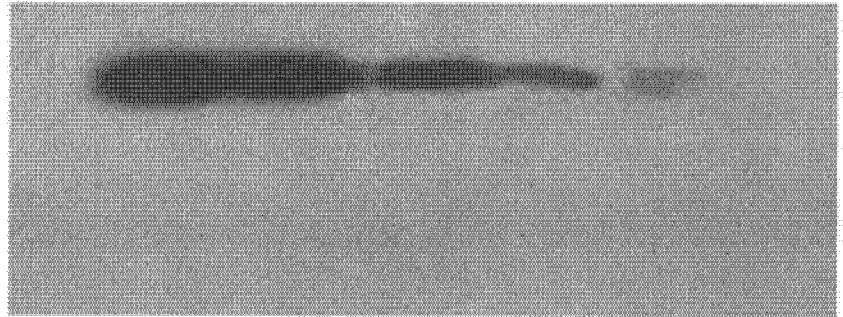


图 2

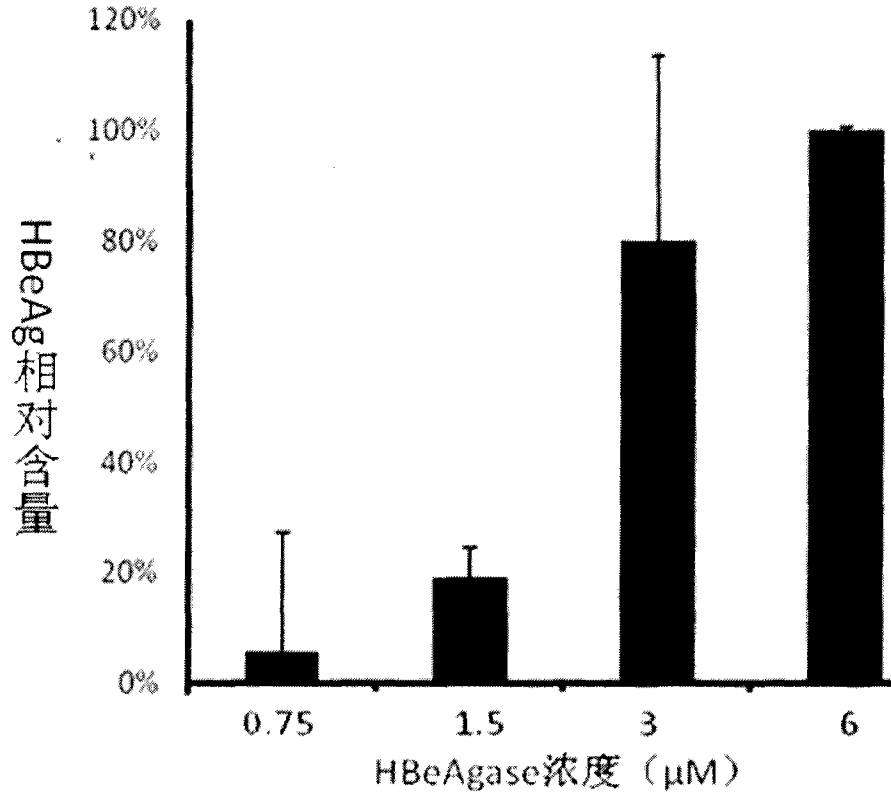


图 3

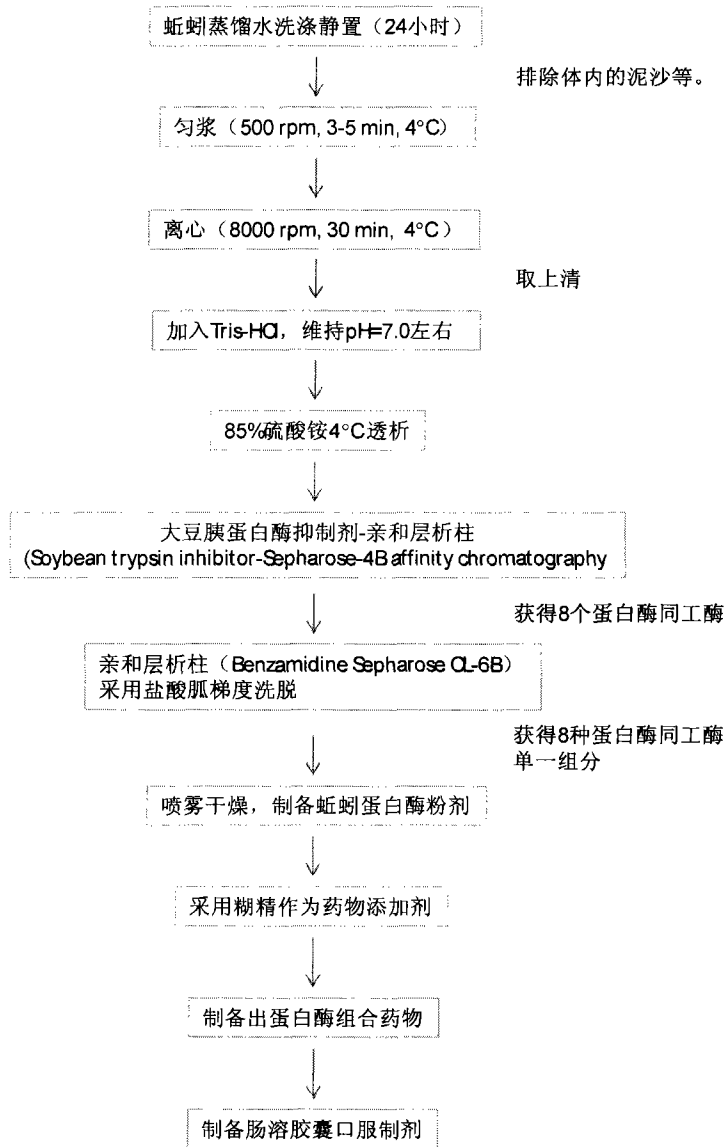
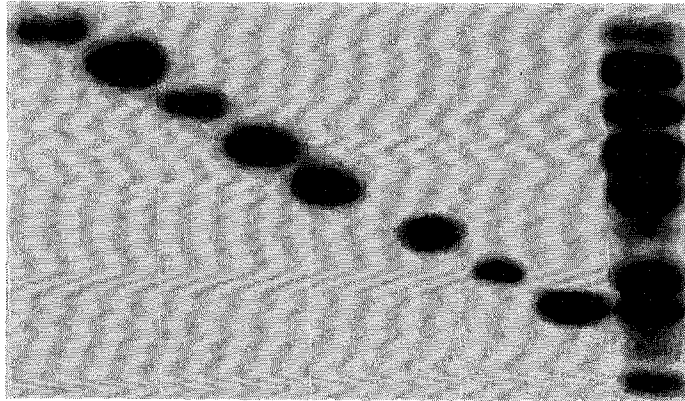


图 4

泳道	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
上样量	10	10	10	10	10	10	10	10	-	$\mu\text{l}$
蚯蚓HBeAg降解酶混合物	-	-	-	-	-	-	-	-	20	$\mu\text{g}$

A



泳道	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
上样量	10	10	10	10	10	10	10	10	10	$\mu\text{l}$

B

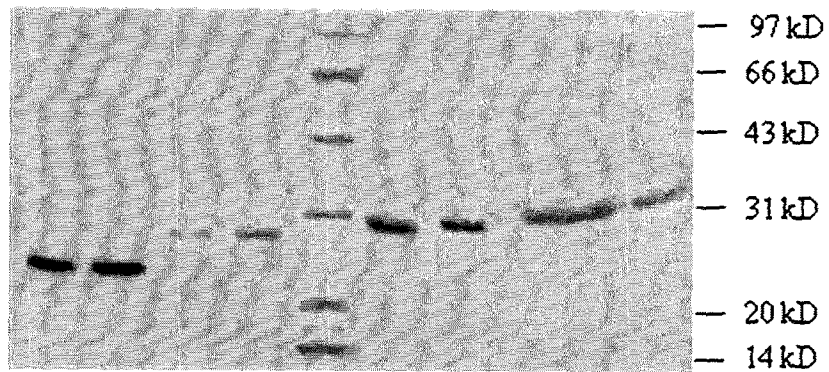
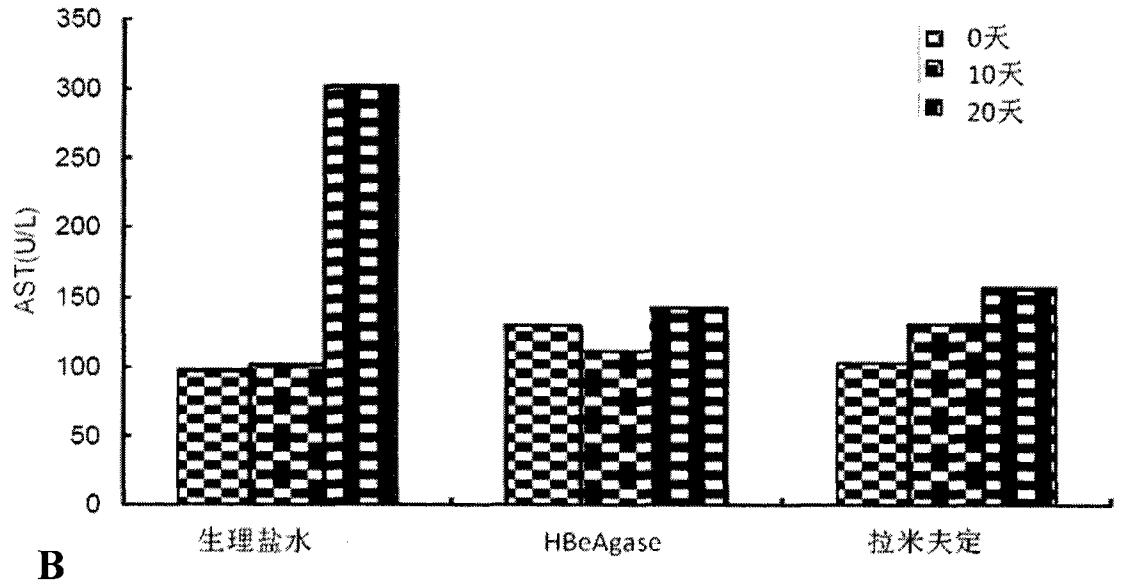
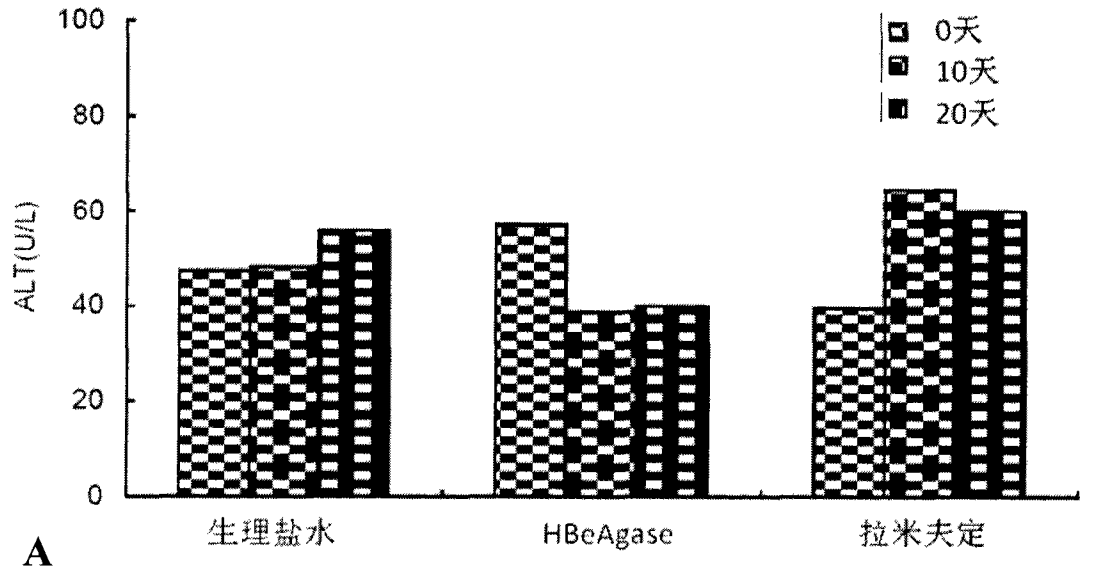


图 5



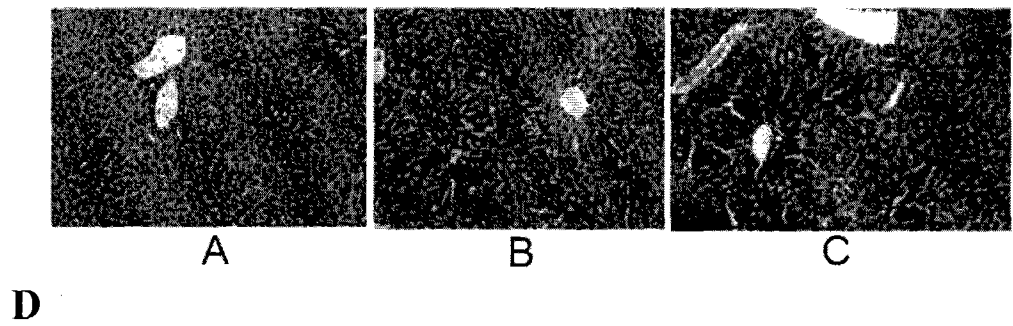
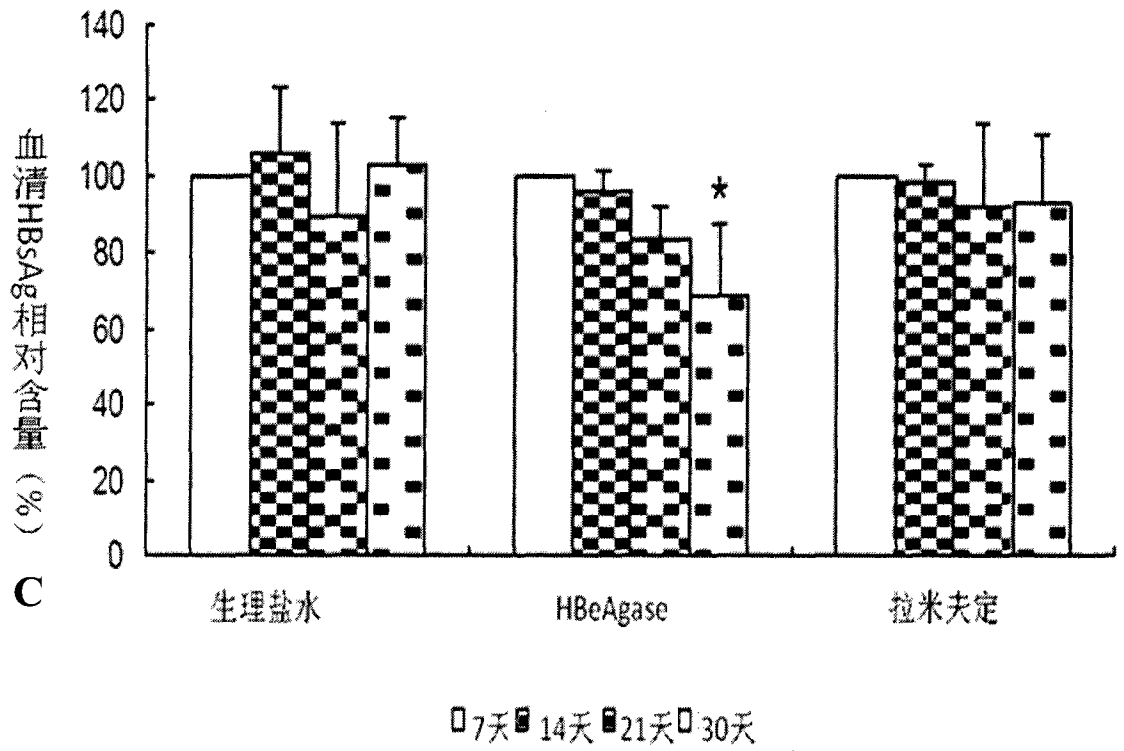


图 6

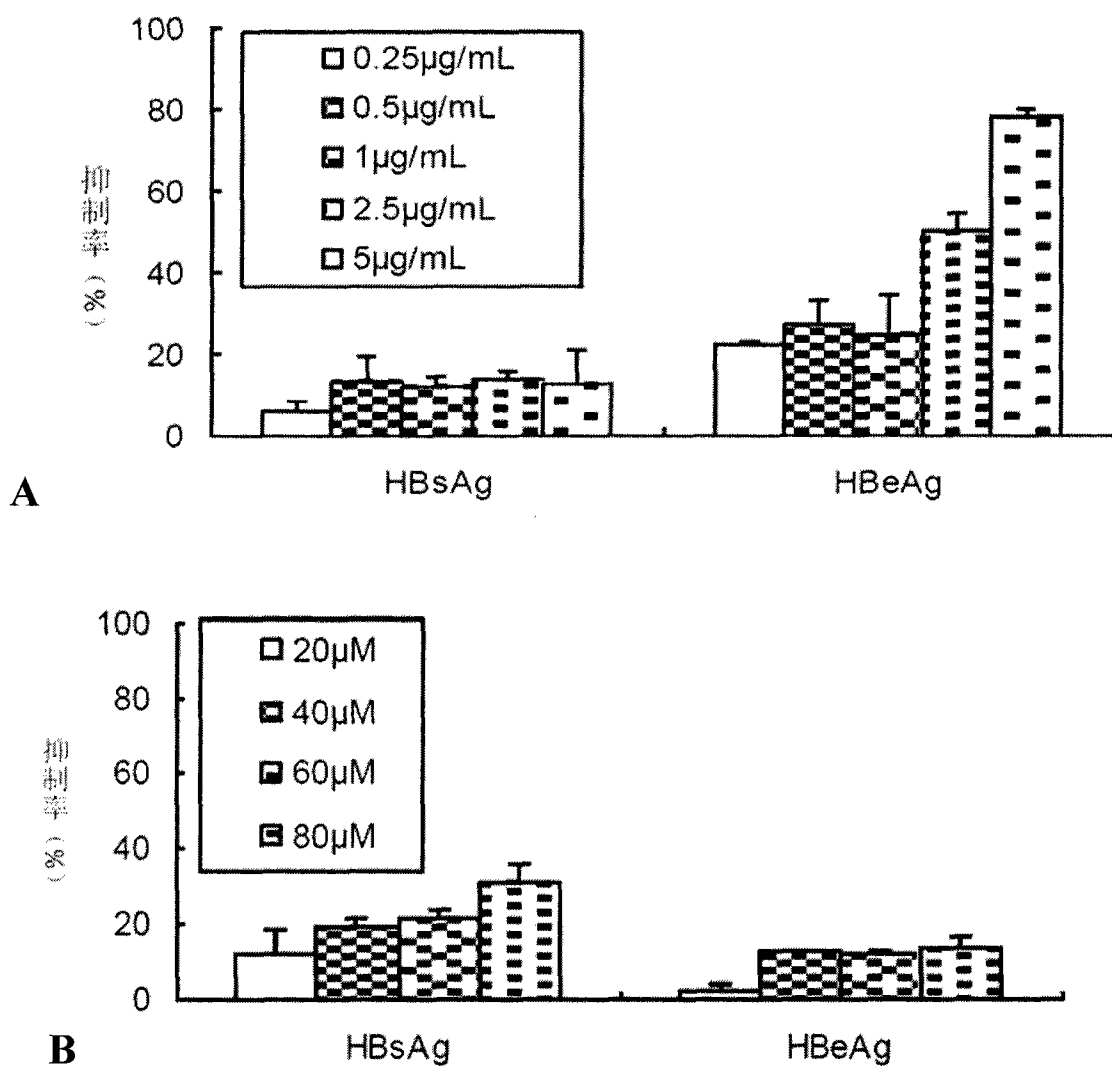


图 7