

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810101356.9

[51] Int. Cl.

C12N 9/64 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

A61P 31/20 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

[43] 公开日 2009年9月9日

[11] 公开号 CN 101525610A

[22] 申请日 2008.3.5

[21] 申请号 200810101356.9

[71] 申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101 北京市朝阳区北沙滩大屯路15号

[72] 发明人 赫荣乔 王学清 陈 岚 潘 荣
肖 蓉

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司

代理人 王 旭

权利要求书3页 说明书36页 附图7页

[54] 发明名称

蚯蚓纤连蛋白酶在乙型肝炎治疗中的应用

[57] 摘要

本发明属于生物技术领域，本发明提供了蚯蚓纤连蛋白酶对纤维连接蛋白的降解作用；本发明还提供了所述蚯蚓纤连蛋白酶用于治疗乙型肝炎的应用，尤其是对慢性乙型肝炎，乙型肝炎引起的肝硬化的预防和治疗作用；本发明还提供了一种药物，所述药物包含所述蚯蚓纤连蛋白酶作为活性成分。

1. 蚯蚓纤连蛋白酶用于降解纤维连接蛋白的应用。
- 2 权利要求 1 的应用,其中所述蚯蚓纤连蛋白酶的氨基酸序列为 SEQ ID NO.1。
- 3 权利要求 1 的应用,所述蚯蚓纤连蛋白酶具有这样的氨基酸序列,其氨基酸序列具有 H⁴³, D⁹¹, S¹⁸⁸(其上编号对应于 SEQ ID NO.1 氨基酸序列)组成的催化三联体。
- 4 权利要求 1 或 3 的应用,所述蚯蚓纤连蛋白酶具有这样的氨基酸序列,所述氨基酸序列与 SEQ ID NO.1 具有 80%以上的同源性。
- 5 权利要求 1 或 3 的应用,所述蚯蚓纤连蛋白酶具有这样的氨基酸序列,所述氨基酸序列选自 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 所示的氨基酸序列。
- 6 蚯蚓纤连蛋白酶用于制备药物的应用,所述药物用于预防或治疗与纤维连接蛋白有关的疾病。
7. 权利要求 6 的应用,所述疾病为乙型肝炎,慢性乙型肝炎,肝硬化,肿瘤疾病。
8. 权利要求 6 或 7 的应用,所述蚯蚓纤连蛋白酶的氨基酸序列为 SEQ ID NO.1。
9. 权利要求 6 或 7 的应用,所述蚯蚓纤连蛋白酶具有这样的氨基酸序列,其氨基酸序列具有 H⁴³, D⁹¹, S¹⁸⁸(其上编号对应于 SEQ ID NO.1 氨基酸序列)组成的催化三联体。
10. 权利要求 6 或 7 的应用,所述蚯蚓纤连蛋白酶具有这样的氨基酸序列,所述氨基酸序列与 SEQ ID NO.1 具有 80%以上的同源性。
11. 权利要求 6 或 7 的应用,所述蚯蚓纤连蛋白酶具有这样的氨基酸序列,所述氨基酸序列选自 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 所示的氨基酸序列。

12.权利要求 6 的应用, 所述蚯蚓纤连蛋白酶作为选自 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 所示的氨基酸序列的单一组分使用。

13.权利要求 6 的应用, 其中所述蚯蚓纤连蛋白酶作为粗酶混合物使用, 所述混合物包括 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 所示的氨基酸序列中的两种或多种。

14.权利要求 13 的应用, 所述蚯蚓纤连蛋白酶作为粗酶混合物使用, 所述混合物主要成分有 SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2, SEQ ID NO.12, SEQ ID NO.13, SEQ ID NO.14, SEQ ID NO.15, 其中 SEQ ID NO.1 丰度最高。

15.一种用于治疗与纤维连接蛋白相关疾病的药物, 所述药物包含所述蚯蚓纤连蛋白酶作为活性成分。

16.权利要求 15 的药物, 其中所述纤维连接蛋白相关疾病为乙型肝炎, 慢性乙型肝炎, 肝硬化或肿瘤疾病。

17.权利要求 15 或 16 的药物, 所述蚯蚓纤连蛋白酶的氨基酸序列为 SEQ ID NO.1; 或具有 H⁴³, D⁹¹, S¹⁸⁸(其上编号对应于 SEQ ID NO.1 氨基酸序列)组成的催化三联体; 或与 SEQ ID NO.1 具有 80%以上的同源性; 或选自 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 所示的氨基酸序列。

18.权利要求 15 或 16 的药物, 其中所述蚯蚓纤连蛋白酶作为选自 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 所示的氨基酸序列的单一组分使用; 或作为粗酶混合物使用, 所述混合物包括 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 所示的氨基酸序列中的两种或多种。

蚯蚓纤连蛋白酶在乙型肝炎治疗中的应用

技术领域

本发明属于生物技术的领域，具体地说，本发明提供蚯蚓纤连蛋白酶降解纤维连接蛋白的应用，以及在乙型肝炎治疗中的应用。

背景技术

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。

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。

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。

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。

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。

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。

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。

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。

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。

随着乙型肝炎发病机理研究的深入，研究工作者发现纤维连接蛋白在乙型肝炎发病过程中发挥着重要作用。纤维连接蛋白(Fibronectin, FN)是一种存在于血液、体液及各种组织中的具有多种功能的糖蛋白，来源于肝细胞，枯否细胞和内皮细胞，通过与整合素结合调节细胞间的粘附、

免疫、凝血和血小板的聚集，另外在肿瘤与纤维化的发展与发病机制中，FN也起着重要的作用。

一、纤维连接蛋白的结构及功能

FN按分布不同可分为两种，一种是分布于血浆的血浆型FN(pFN)，另一种是广泛分布于人体内细胞表面的细胞型FN(cFN)。pFN是一种可溶性的蛋白质，在血液中浓度很高。血液中的可溶性的FN大部分是由肝细胞合成。cFN作为不溶性FN的一部分，可以掺入到细胞周围基质中，肝脏中的FN主要由内皮细胞，贮脂细胞及枯否细胞分泌。FN分子可以结合多种分子发挥其功能，如胶原蛋白、肝素、血纤维蛋白及细胞表面受体，其中与细胞表面受体的结合主要是通过FN分子中的RGD序列。识别RGD序列的一些粘素分子都可以识别FN中的RGD序列，所以FN可通过RGD与受体相连，从而发挥调节作用。

FN还具有病毒结合活性，与甲型肝炎病毒(HAV)结合后，发生HAV的屏蔽现象，可干预病毒检测的放免法，通过富含FN的血产品有助于肝炎病毒的频繁传播。有学者发现人肝脏中的FN通过与HBV前S2区编码的一特异抗原决定簇结合，从而使病毒在肝窦内循环时被肝细胞所吸收，促进病毒对肝细胞的作用。同时，在肝纤维化及肝细胞癌时，FN在RNA水平发生变化。

二、纤维连接蛋白与慢性肝炎、肝硬化

HCV和HBV感染后常进展为慢性病毒性肝炎。慢性肝病尤其是活动性病变，由于致病因素的持续作用和机体免疫功能失调，以致肝细胞持续受损，纤维组织不断增生而导致肝硬化。Martinez-Hernandez等提出FN在肝脏的纤维化过程中发挥重要的作用，可促使肝细胞分泌胶原，促进成纤维细胞的趋化性，促进成纤维细胞及肝细胞等与胶原基质的粘附作用。存在于成纤维细胞表面的细胞连结素，它与酸性粘多糖及胶原具有很强的亲和性，以FN为核心，结合粘多糖及胶原成为三元复合体，做成细网构造，被视为肝纤维化的基础。与正常人群相比较，慢性活动型肝炎(CAH)患者中FN水平明显增加。

血浆型FN绝大部分由肝细胞合成，炎症造成血浆中FN消耗导致血浆中FN降低，FN减少则反映了肝细胞合成蛋白质功能的减退，故在肝硬化

时，血浆FN水平则明显降低，然而在急、慢性肝炎时增加。Odenthal等提出在肝纤维化的急性阶段及接近纤维化阶段，细胞型的FN mRNA表达增加。Jarnagin等用鼠急性肝损伤模型检测到，内皮细胞主要产生EIII-A阳性的FN，相反被激活的贮脂细胞主要分泌EIII-B阳性FN。Shigeru等采用免疫组化及原位杂交法检测到了在肝纤维化区细胞型FN(EIII-APR阳性)沉积，提示细胞型FN在肝纤维化时起关键作用。在纤维化肝脏中，肝细胞与非实质细胞中细胞型FN的mRNA表达增加，而且表达FN的细胞也有所增加，细胞型FN在肝纤维化形成的早期发挥着重要的作用。

三、纤维连接蛋白与肝细胞癌

细胞外基质(ECM)被认为在肿瘤、肿瘤侵袭及转移中发挥重要的作用。不同分化的肝癌其ECM定位不同。FN、FN受体(整合素 $\alpha 5$ 与 $\beta 1$)及其片段mAD2(恶性病变相关DNA连接蛋白2)的研究，提示整合素 $\alpha 5\beta 1$ 和FN与肝癌分化有关，并影响肝癌的侵袭性与转移。

现已证实FN参与慢性肝炎、肝硬化及肝癌的发生发展，主要通过选择性剪切和改变与受体的结合来发挥调节作用。其在分子水平中的调控机制仍不清楚，尚需进一步的研究。

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。

在蚯蚓体内有一组蛋白，其氨基酸序列选自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 (这15种氨基酸序列的共性：具有共同的功能域： H^{43} , D^{91} , S^{188} (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.11 与 SEQ ID NO.1 具有 85%以上的同源性)。本发明首次发现其在与血清孵育过程中可迅速降解血清组分纤维连接蛋白, 因此将其称为蚯蚓纤连蛋白酶。通过进行用所述蚯蚓纤连蛋白酶对 HepG 2.2.15 细胞水平的作用的研究, 发现蚯蚓纤连蛋白酶处理组对 HBsAg, HBeAg 的分泌具有抑制作用, 通过用所述蚯蚓纤连蛋白酶对 HBV 转基因小鼠的治疗作用的研究表明, 转基因小鼠血清中 ALT, AST 上升被抑制, HBsAg 分泌受到抑制, 并且其可使 HBsAg 转基因小鼠的肝脏坏死病变减轻。因此, 所述蚯蚓纤连蛋白酶可以用于制备预防或治疗与纤维连接蛋白相关的疾病, 如乙型肝炎的药物的应用。

发明内容

本发明的一个目的是提供蚯蚓纤连蛋白酶用于降解纤维连接蛋白的应用。

在一个实施方案中, 所述蚯蚓纤连蛋白酶的氨基酸序列为 SEQ ID NO.1。

在另一个实施方案中, 所述蚯蚓纤连蛋白酶具有这样的氨基酸序列, 其氨基酸序列具有 H⁴³, D⁹¹, S¹⁸⁸(其上编号对应于 SEQ ID NO.1 氨基酸序列)组成的催化三联体。

在一个实施方案中, 所述蚯蚓纤连蛋白酶具有这样的氨基酸序列, 所述氨基酸序列与 SEQ ID NO.1 具有 80%以上的同源性。

在一个实施方案中, 所述蚯蚓纤连蛋白酶具有这样的氨基酸序列, 所述氨基酸序列与 SEQ ID NO.1 具有 85%以上的同源性。

在一个实施方案中, 所述蚯蚓纤连蛋白酶具有这样的氨基酸序列, 所述氨基酸序列选自 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 所示的氨基酸序列。

在一个优选实施方案中, 所述蚯蚓纤连蛋白酶作为选自 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, 或 SEQ ID NO.15 所示的氨基酸序列的单一组分使用。

在一个优选实施方案中, 所述蚯蚓纤连蛋白酶作为粗酶混合物使用, 所述混合物包括 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 所示的氨基酸序列中的两种或多种。

在一个优选实施方案中, 所述蚯蚓纤连蛋白酶作为粗酶混合物使用, 所述混合物主要成分有 SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2, SEQ ID NO.12, SEQ ID NO.13, SEQ ID NO.14, 以及 SEQ ID NO.15, 其中 SEQ ID NO.1 丰度最高。

在一个实施方案中, 所述蚯蚓纤连蛋白酶的用量为 0~10 μ M。

在一个实施方案中, 所述蚯蚓纤连蛋白酶的用量为 0-2 μ M。

在一个实施方案中, 所述蚯蚓纤连蛋白酶的用量为 0-5 μ g/ml。

本发明的另一个目的是提供所述蚯蚓纤连蛋白酶用于制备药物的应用, 所述药物用于预防或治疗与纤维连接蛋白有关的疾病。

在一个实施方案中, 所述疾病为乙型肝炎, 慢性乙型肝炎, 肝硬化, 肿瘤等疾病。

在一个实施方案中, 所述蚯蚓纤连蛋白酶的氨基酸序列为 SEQ ID NO.1。

在另一个实施方案中, 所述蚯蚓纤连蛋白酶具有这样的氨基酸序列, 其氨基酸序列具有 H⁴³, D⁹¹, S¹⁸⁸(其上编号对应于 SEQ ID NO.1 氨基酸序列)组成的催化三联体。

在一个实施方案中, 所述蚯蚓纤连蛋白酶具有这样的氨基酸序列, 所述氨基酸序列与 SEQ ID NO.1 具有 80%以上的同源性。

在一个实施方案中, 所述蚯蚓纤连蛋白酶具有这样的氨基酸序列, 所述氨基酸序列与 SEQ ID NO.1 具有 85%以上的同源性。

在一个实施方案中, 所述蚯蚓纤连蛋白酶具有这样的氨基酸序列, 所述氨基酸序列选自 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 所示的氨基酸序列。

在一个优选实施方案中,所述蚯蚓纤连蛋白酶作为选自 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 所示的氨基酸序列的单一组分使用。

在一个优选实施方案中,所述蚯蚓纤连蛋白酶作为粗酶混合物使用,所述混合物包括 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 所示的氨基酸序列中的两种或多种。

在一个优选实施方案中,所述蚯蚓纤连蛋白酶作为粗酶混合物使用,所述混合物主要成分有 SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2, SEQ ID NO.12, SEQ ID NO.13, SEQ ID NO.14, SEQ ID NO.15, 其中 SEQ ID NO.1 丰度最高。

在一个优选实施方案中,所述蚯蚓纤连蛋白酶的剂量为 2000mg/kg 大鼠体重。

在一个优选实施方案中,所述蚯蚓纤连蛋白酶的剂量为 50mg/kg 小鼠体重。

本发明还提供一种用于治疗与纤维蛋白相关的疾病的药物,所述药物包含上述蚯蚓纤连蛋白酶作为活性成分。所述药物的有效量可以由本领域技术人员根据实际情况确定。

在一个实施方案中,所述疾病为乙型肝炎,慢性乙型肝炎,肝硬化,肿瘤等疾病。

在一个优选实施方案中,所述药物所用剂量为 2000mg/kg 大鼠体重。

在另一个优选实施方案中,所述药物所用剂量为 50mg/kg 小鼠体重。

所述药物的所用配制方法,使用方法以及所用的辅料为本领域技术人员所众所周知。

本发明所针对的对象，为哺乳动物，如人，小鼠，大鼠。在一个实施方案中，本发明所述的蚯蚓纤连蛋白酶以及包含其的药物针对人进行施用。

本发明通过蚯蚓纤连蛋白酶与人血清孵育后 SDS-PAGE 检测血清蛋白的变化，首次发现所述蚯蚓纤连蛋白酶有快速降解纤维连接蛋白的能力。本发明将所述蚯蚓纤连蛋白酶与血清共孵育，经 SDS-PAGE 发现有几个血清蛋白条带消失或者变淡。经质谱鉴定，得到一快速降解的蛋白为纤维连接蛋白。该蛋白在机体内有相当多的生理功能，其中之一就是与乙型肝炎病变的发展有关。用蚯蚓纤连蛋白酶降解纤维连接蛋白纯品，将降解片段进行 N 端测序，发现作用位点比较单一，主要集中在赖氨酸和精氨酸两个碱性氨基酸附近，具有典型的胰蛋白酶的特性，具有一定的水解特异性。

本实验还进行了所述蚯蚓纤连蛋白酶对 HepG 2.2.15 细胞水平的作用的研究。实验结果表明，与空白细胞相比，蚯蚓纤连蛋白酶处理组 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相比，蚯蚓纤连蛋白酶对 HBeAg 的分泌有更强的抑制作用。

本实验室还进行了蚯蚓纤连蛋白酶对 HBV 转基因小鼠的治疗作用的研究。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，使用蚯蚓纤连蛋白酶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，蚯蚓纤连蛋白酶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蚯蚓纤连蛋白酶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，蚯蚓纤连蛋白酶对 HBV 转基因小鼠的肝脏病变有一定的保护作用。

本发明认为蚯蚓纤连蛋白酶在对乙型肝炎治疗中，对慢性乙型肝炎

的治疗更有优势。目前临床使用的乙型肝炎治疗药物，包括干扰素、拉米夫定、阿德福韦酯等主要使 HBsAg, HBV DNA 恢复到一定的水平。但乙型肝炎治疗的另一个困难是病变引起肝硬化的发生，蚯蚓纤连蛋白酶恰巧具有降解纤维连接蛋白的能力，不仅可以在一定程度上阻断病毒的传播，而且可以降低肝脏的纤维连接蛋白的量，缓解肝硬化的发生。

本发明认为蚯蚓纤连蛋白酶对乙型肝炎、尤其是慢性乙型肝炎预防和治疗作用机理之一是蚯蚓纤连蛋白酶有快速降解纤维连接蛋白的能力。由于纤维连接蛋白在机体内的生理功能很多，与细胞间的粘附、免疫、凝血和血小板的聚集以及老化都有关系，所以预期蚯蚓纤连蛋白酶对凝血、肿瘤等疾病也有一定的作用。

附图说明

图1：蚯蚓纤连蛋白酶与血清共同孵育后SDS-PAGE图

A：血清在37℃孵育不同时间后SDS-PAGE图（M：标准分子量；1：对照（未加蚯蚓纤连蛋白酶的血清）；2：15min；3：30min；4：45min；5：60min；6：90min；7：120min；8：180min）

B：蚯蚓纤连蛋白酶与血清在37℃共同孵育不同时间后SDS-PAGE图（M：标准分子量；1：对照（未加蚯蚓纤连蛋白酶的血清）；2：15min；3：30min；4：45min；5：60min；6：90min；7：120min；8：180min）

图2：MALDI-TOF MS 法鉴定被蚯蚓纤连蛋白酶迅速降解的条带

图3：蚯蚓纤连蛋白酶对纤维连接蛋白作用位点图

图4：大鼠口服蚯蚓纤连蛋白酶后血清中纤维连接蛋白相对含量的变化 (Mean±SD, n=6).

图5：蚯蚓纤连蛋白酶对HBV转基因小鼠的治疗作用

5-1：ALT的变化

5-2：AST的变化

5-3：HBsAg的变化

5-4：血清中纤维连接蛋白FN相对含量的变化

5-5：转基因小鼠肝脏病理观察结果

A：生理盐水组（10倍）

B: 蚯蚓纤连蛋白酶处理组 (10倍)

C: 拉米夫定组 (10倍)

图6 蚯蚓纤连蛋白酶对HepG 2.2.15细胞水平的作用

6-1: 蚯蚓纤连蛋白酶对HBsAg和HBeAg分泌的影响

6-2: 拉米夫定对HBsAg和HBeAg分泌的影响

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。

实施例:

实施例 1 蚯蚓纤连蛋白酶与血清共孵育试验

实验方法与结果

1. 取新鲜人血清, 稀释2倍, 加入一定浓度的蚯蚓纤连蛋白酶 (0~10 μ M) (SEQ ID NO.1) 于37 $^{\circ}$ C孵育, 分别于15, 30, 45, 60, 90, 120 和180min取样, 同时以空白血清 (在37 $^{\circ}$ C 孵育15, 30, 45, 60, 90, 120和180min) 作为对照。
2. 将上述血清酶解产物及空白血清孵育样品用去离子水稀释10倍, 加入2 \times SDS-PAGE上样缓冲液, 煮沸10分钟, 进行8% SDS-PAGE, 最后以考马斯亮蓝染色。
3. SDS-PAGE图见图1。结果显示空白血清在37 $^{\circ}$ C孵育不同时间蛋白质条带无明显变化 (见图1A)。血清与蚯蚓纤连蛋白酶的孵育产物中有一些蛋白条带迅速降解 (见图1B)。

实施例 2 典型蛋白条带的鉴定

实验方法与结果

仪器：日本岛津/KRATOS 激光离子化质谱仪 AX1MA-CFRTMPlus 型，质量数范围 1~500,000Da，质量数精度 < 5ppm，分辨率 20,000，灵敏度 10fmol。

步骤：

1. 将所选择的胶带‘a’用切胶笔切下，置于 eppendorf (EP) 管中，并记录点号及相应的位置；
 2. 加 50 μ L DDH₂O 洗两次，10min/次；
 3. 加 50 mM NH₄HCO₃/乙腈=1: 1 溶液 50 μ L，超声脱色 5min 或 37 $^{\circ}$ C 脱色 20min，吸干；
 4. 重复步骤 3，直至蓝色褪去；
 5. 加乙腈 50 μ L 脱水至胶粒完全变白，真空抽干 5min；
 6. 加 10 mM 二硫苏糖醇 (DTT) (10 μ L 1M DTT, 990 μ L 25mM NH₄HCO₃ 配制) 20 μ L，56 $^{\circ}$ C 水浴 1hr；
 7. 冷却到室温后，吸干，快速加 55 mM 碘代乙酰胺 (IAM) (55 μ L 1M IAM, 945 μ L 25mM NH₄HCO₃ 配制) 20 μ L，置于暗室 45min；
 8. 依次用 25 mM NH₄HCO₃、50% 乙腈溶液和 100% 乙腈洗，乙腈脱水到胶粒完全变白为止，真空抽干 5min；
 9. 将 0.1 μ g/ μ L 的胰蛋白酶储液以 25 mM NH₄HCO₃ 稀释 10 倍，每 EP 管加 2 μ L，稍微离心一下，让酶液充分与胶粒接触，4 $^{\circ}$ C 或冰上放置 30min，待溶液被胶块完全吸收，加 25mM NH₄HCO₃ 10-15 μ L 置 37 $^{\circ}$ C，消化过夜；
 10. 加入 2% 三氟醋酸 (TFA) 终止反应，使 TFA 终浓度为 0.1%，振荡混匀，10000rpm 离心。
 11. 消化产物上清液进行质谱分析 (参考蛋白质化学与蛋白质组学一书。夏其昌、曾嵘等，科学出版社)，获得酶解肽段的分子质量。
 12. 将不同肽段的分子质量结果与 NCBI 数据库进行比对 (MASCOT search program)。确定鉴定的蛋白质。
- 结果：鉴定结果表明，蛋白条带‘a’为纤维连接蛋白 (见图 2，在鉴定肽段中，有 21 个肽段与纤维连接蛋白的酶解肽段比对成功，可能性分数为 92，结果可靠。)

实施例 3 蚯蚓纤连蛋白酶对纤维连接蛋白水解位置的确定

实验方法与结果

1. 将 10 μ l 纤维连接蛋白 (Sigma-aldrich, USA, 1mg/ml) 与 2 μ l 蚯蚓纤连蛋白酶 (SEQ ID NO.1) (0~2 μ M) 在 37 $^{\circ}$ C 孵育不同时间, 将酶解产物进行 8% SDS-PAGE 并转至 PVDF 膜 (Millipore, USA)。
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), 确定水解位点。
3. 蚯蚓纤连蛋白酶对纤维连结蛋白的作用位点见图 3。结果显示蚯蚓纤连蛋白酶对纤维连结蛋白的作用位点比较单一, 主要集中在赖氨酸和精氨酸两个碱性氨基酸附近, 具有典型的胰蛋白酶的特性。

实施例 4 大鼠口服蚯蚓纤连蛋白酶后血清中纤维连接蛋白浓度的变化

实验方法与结果

1. 选择健康雄性 SD 大鼠 6 只(购自北京维通利华实验动物技术有限公司) (200~250g), 禁食 12 小时, 自由饮水。
2. 服药前取空白血 0.5ml。灌胃服用蚯蚓纤连蛋白酶 (粗酶, 硫酸铵沉淀法获得, 参考文献: Zhou J, Wu C, He RQ,(1998) J. Biochem. Mol. Bio.& Biophys. 5, 17-18, 主要成分有 SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2, SEQ ID NO.12, SEQ ID NO.13, SEQ ID NO.14, SEQ ID NO.15, 其中 SEQ ID NO.1 丰度最高) (每 kg 大鼠体重灌胃服用 2000mg 蚯蚓纤连蛋白酶), 定时取血 (0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 26h), 经眼眶静脉丛收集全血, 分离血清, 于-20 $^{\circ}$ C 保存备用。
3. ELISA 法测定上述血清中纤维连结蛋白的浓度:
 - (1) 将血清 (步骤 2 制得) 稀释 50 倍, 在 96 孔酶标板 (Corning incorporated Costar®, USA) 中每孔加入样品 50 μ l, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 小时, PBST (137mmol/L NaCl, 2.7mmol/L KCl, 10mmol/L Na₂HPO₄, 2mmol/L KH₂PO₄, 0.02% Tween 20, pH7.4) 洗涤。
 - (2) 加入 100 μ l 5% 马血清 (北京中杉金桥生物技术有限公司) 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 小时, PBST 洗涤。

(3) 加入 50 μ l 纤维连结蛋白抗体 (Sigma, USA), 37 $^{\circ}$ C 孵育 2h, PBST 洗涤。

(4) 加入 100 μ l 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 $^{\circ}$ C 孵育 1h, PBST 洗涤。

(5) 加入 100 μ l 显色剂暗处显色 10 分钟。加入 50 μ l 2M 的硫酸终止反应。

显色剂的配制方法为:

四甲基联苯胺 (TMB) 溶液 (6mg TMB 溶于 1ml N, N-二甲基甲酰胺) 100 μ l, 30% 双氧水 15 μ l, 0.1mol/L PB (1.0M NaH₂PO₄ 87.7ml, 1.0M Na₂HPO₄ 12.3ml, 稀释至 1000ml, pH6.0) 10ml。酶标仪 450 nm 测定 OD 值。用 OD 值的变化表征纤维连结蛋白浓度的变化 (以用药前纤维连结蛋白的 OD₀ 值为 100%, 用药后某一时刻 t 纤维连结蛋白的相对浓度

$$FN_t = \frac{OD_t}{OD_0} \times 100\%, \quad OD_t \text{ 为不同时间点测得的血清中纤维连结蛋白的 OD 值。}$$

4. 大鼠灌胃服用蚯蚓纤连蛋白酶后血清中纤维连接蛋白浓度的变化见图 4。结果显示纤维连接蛋白浓度首先随着时间的延长而降低, 约 4 小时达到最低点, 然后随时间的延长有所恢复。

实施例 5 蚯蚓纤连蛋白酶对 HBV 转基因小鼠的治疗作用

实验方法与结果

1. 实验动物: C57BL/6J-HBV 转基因小鼠 (购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。Chisari 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。

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(450nm)的大小表示)进行分组, 每组9只。

阴性对照: 生理盐水(0.9%NaCl)

阳性对照: 拉米夫定(灌胃剂量为100mg拉米夫定/kg小鼠体重)

药物: 蚯蚓纤连蛋白酶(混合物(与上同), 灌胃剂量为50mg 蚯蚓纤连蛋白酶/kg 小鼠体重)

3. 给药方案:

(1) 灌胃: 每天灌胃一次, 持续21天, 观察至30天。

(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)。

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。

(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。

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。

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5-1, 5-2。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5-3。转基因小鼠血清中纤维连接蛋白(FN)含量的变化见图5-4, 结果显示, 生理盐水组及拉米夫定组转基因小鼠的FN随生存时间的延长而增加, 蚯蚓纤连蛋白酶实验动物组

FN含量基本维持在恒定的水平。对转基因小鼠肝脏的病理学观察结果见图5-5。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,蚯蚓纤连蛋白酶处理组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,蚯蚓纤连蛋白酶实验动物组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。

实施例 6 蚯蚓纤连蛋白酶对 HepG 2.2.15 细胞水平的作用

1. 细胞系及培养条件: **HepG 2.2.15**细胞系 (Mount Sinai Medical College, New York), 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 μ g/ml 抗生素G-418 (Amresco, USA) 和青霉素-链霉素溶液 (终浓度为100 units/ml 青霉素和100 μ g/ml链霉素, HyClone, USA)。培养条件为CO₂培养箱, 37 $^{\circ}$ C培养。

2. 实验分组:

阳性对照: 拉米夫定处理组;

用药组: 蚯蚓纤连蛋白酶处理组 (单一组分 SEQ ID NO.1)。

3. 用药方案

将HepG2.2.15细胞进行接种 (96孔板, 每孔 1×10^4 个细胞)。细胞接种三天后, 分别加入不同浓度的蚯蚓纤连蛋白酶 (培养基中药物终浓度为0-5 μ g/ml) 和拉米夫定 (培养基中药物终浓度为0-100 μ 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。

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。

5. 实验结果见图 6，结果表明，与空白细胞相比，蚯蚓纤连蛋白酶处理组 HBsAg, HBeAg 的分泌均受到抑制，细胞培养基中 HBsAg, HBeAg 含量有所下降。

蚯蚓纤连蛋白酶的几种纯化产物的氨基酸序列列表

SEQ ID NO.1

MIVGGIEARP YEFWQVSVR RKSSDSHFCG GSIINDRWVV CAAHCMQGES
PALVSLVVGE HDSSAASTVR QTHDVDSIFV NENYDPRTLE NDVSVIKTAI
AITFDINVGP ICAPDPANDY VYRKSQCSGW GTINSGGICC PAVLRYVTLN
ITTNAFCDAV YTSDTIYDDM ICATDNTGMT DRDSCQGDSG GPLSVKDGSG
IFSLVGIVSW GIGCASGYPG VYSRVGFHAG WITDIITNN

SEQ ID NO.2

IVGGIEARPY EFPWQVSVRR KSSDSHFCGG SIINDRWVVC AAHCMQGEAP
ALVSLVVGEH DSSAASTVRQ THDVDSIFVN ENYDPATLEN DVSVIKTAVA
ITFDINVGPI CAPDPANDYV YRKSQCSGWG TINSGGVCCP AVLRYVTLNI
TTNAFCDAVY TSDTIYDDMI CATDNTGMTD RDSCQGDSGG PLSVKDGSGI
FSLVGIVSWG IGCASGYPGV YSRVGFHAGW ITDTITNN

SEQ ID NO.3

MELPPGTKIV GGIEARPYEF PWQVSVRRKS SDSHFCGCSI INDRWVVCAA
HCMQGEAPAL VSLVVGEHDR SAASTVRQTH DVDSIFVHED YNTNTLENDV
SVIKTSVAIT FDINVGPICA PDPANDYVYR KSQCSGWGTI NSGGICCPNV
LRYVTLNDTT NQYCEDVYPL NSIYDDMICA SDNTGGNDRD SCQGDSGGPL
SVKDGSGIFS LIGIVSWGIG CASGYPGVYS RVGFHAAWIT DIITNN

SEQ ID NO.4

MELPPGTKIV GGIEARPYEF PWQVSVRRKS SDSHFCGCSI INDRWVVCAA
HCMQGESPAL VSLVVGEHDS SAASTVRQTH DVDSIFVHED YNGNTFENDV
SVIKTVNAIA IDINVGPICA PDPANDYVYR KSQCSGWGTV NSGGVCCPNV
LRYVTLNVTT NAFCDIYSP LYTITSDMIC ATDNTGQNER DSCQGDSGGP
LSVKDGSGIF SLIGIVSWG IGCASGYPGVY ARVGSQTGWI TDIITNN

SEQ ID NO.5

MELPPGKIVG GIEARPYEFP WQVSVRRKSS DSHFCGGSII NDRWVCAAH
CMQGESPALV SLVVGEGHDSS AASTVRQTHD VDSIFVNENY DPRTLENDVS
VIKTAIAITF DINVGPICAP DPANDYVYRK SQCSGWGTIN SGGICCPAVL
RYVTLNITTN AFCDVYVYTS D TIYDDMICAT DNTGMTDRDS CQGDSGGPLS
VKDGSIGIFSL GGIVSWGIGC ASGYPGVYSR VGFHAGWITD TITNN

SEQ ID NO.6

MELPPGTKIV GGIEARPYEF PWQVSVRRKS SDSHFCGGSII INDRWVCAA
HCMQGEAPAL VSLVVGEGHDR SAASTVRQTH DVDSIFVHED YNANTLENDV
SVIKTSVAIT FDINVGPICA PDPANDYVYR KSQCSGWGTI NSGGICCPNV
LRYVTLNVTT NQFCEDVYPL NSIYDDMICA SDNTGGNDRD SCQGDSGGPL
SVKDGSIGIFS LIGIVSWGIG CASGYPGVYS RVGFHAAWIT DIITNN

SEQ ID NO.7

MLLLALASLV AVGFAQPPVW YPGGQCSVSQ YSDAGDMELP PGTKIVGGIE
ARPYEFPWQV SVRRKSSDSH FCGGSII INDR WVCAAHCMQ GESPALVSLV
VGEHDSSAAS TVRQTHDVDS IFVHEDYNGN TFENDVSVIK TVNAIAIDIN
DGPICAPDPA NDYVYRKSQC SGWGTINSGG VCCPNVLRVYV TLNVTTNAFC
DDIYSPLYTI TSDMICATDN TGQNERDSCQ GDSGGPLSVK DGNGIFSLIG
IVSWGIGCAS GYPGVYARVG SQTGWITDII TNN

SEQ ID NO.8

MELPPGKIVG GIEARPYEFP WQVSVRRKSS DSHFCGGSII NDRWVCAAH
CMQGESPALV SLVVGEGHDSS AASTVRQTHD VDSIFVNENY DPRTLENDVS
VIKTAIAITF DINVGPICAP DPANDYVYRK SQCSGWGTIN SGGICCPAVL
RYVTLNITTN AFCDVYVYTS D TIYDDMICAT DNTGMTDRDS CQGDSGGPLS
VKDGSIGIFSL VGIVSWGIGC ASGYPGVYSR VGFHAGWITD TITNN

SEQ ID NO.9

MELPPGTKIV GGIEARPYEF PWQVSVRRKS TDSHFCCGSI INDRWVCAA
 HCMQGESPAL VSLVVGEGHDS SAASTVRQTH DVDSIFVNEN YNPRTLENDV
 SVIKTAIAIT FDINVGPIA PDPANDYVYR KSQCSGWGSI NSGGICCPAV
 LRYVTLNITT NAFCDVAVYTS DTIYDDMICA TDNTGMTDRD SCQGDSGGPL
 SVKDGSGIFS LVGIVSWGIG CASGYPGVYS RVGFHAGWIT DTITNN

SEQ ID NO.10

MELPPGKIVG GIEAGPYEFP WQVSVRRKPS DSHFCCGSI NDRWVCAAH
 CMQGESPALV SLVVGEGHDSS AASTVRQTHD VDSIFVNENY DPRTLENDVS
 VIKTAIAITF DINVGPICAP DPANDYVYRK SQCSGWGTIN SGGICCPAVL
 RYVTLNITTN AFCDAVYTS DTIYDDMICAT DNTGMTDRDS CQGDSGGPLS
 VKDGSGIFSL VGIVSWGIGC ASGYPGVYSR VGFHAGWITD TITNN

SEQ ID NO.11

IVGGIEARPY EFPWQVSVRR KSSDSHFCCG SIINDRWVVC AAHCMQGESP
 ALVSLVVGEGH DSSAASTVRQ THDVDSIFVH EDYNGNTFEN DVSVIKTVNA
 IAIDINVGPI CAPDPANDYV YRKSQCSGWG TVNSGGVCCP NVLRYVTLNV
 TTNAFCDDIY SPLYTITSDM ICATDNTGQN ERDSCQGDSDG GPLSVKDGSG
 IFSLIGIVSW GIGCASGYPG VYARVGSQTG WITDIITNN

SEQ ID NO.12

VVGGSDTTIG QYPHQLSLRV TGSCHSCGASL IGTTRAVTAA HCTGSAIAVY
 SILGGTTDRT VTNCATCVLR DLNFLNRHPA YDGNAPGYPN DVAVIGFAAV
 ATNTNLQAIS LATPSDGNFA GDSCVITGWG QTGSIGGLPD ALQLATMNVL
 TNADCTNTWG AVRINDGHIC VSAAGRSACS GDSGGPLECS NRLAGATSWG
 EASCDPSYPS VYTRVSYFYT WIIAQ

SEQ ID NO.13

MGGEQYIIGG SNASPGFEPW QLSQTRGGSH SCGASLLNAL NGLSASHCVD
 GAAPGTITVI AGLHDRSGTP GSQEVDTIGY TMHENYNQGT NTYANDIAIL

HFASAINIGG NVQAALLPAN NNNDYSDLTC VISGWGRTGS SNVLPDTLQK
ASIQVIGTTQ CQSLMGSIGN IWDNHICLYD NANNVGSCNG DSGGPLNCPD
GGTRVAGVTS WGVSSGAGNC LQTYPSVYTR TSAYLSWIAN NS

SEQ ID NO.14

VIGGTNASPG EFPWQLSQQR QSGSWSHSCG ASLLSSTSAL SASHCVDGVL
PNNIRVIAGL WQQSDTSGTQ TANVDSYTMH ENYGAGTASY SNDIAILHLA
TSISLGGNIQ AAVLPANNNN DYAGTTCVIS GWGRTDGTNN LPDILQKSSI
PVITTAQCTA AMVGVGGANI WDNHICVQDP AGNTGACNGD SGGPLNCPDG
GTRVVGVTWS VVSSGLGACL PDYPSVYTRV SAHLGWIGDN SR

SEQ ID NO.15

VIGGTNASPG EFPWQLSQQR QSGSWSHSCG ASLLSSTSAL SASHCVDGVL
PNNIRVIAGL WQQSDTSGTQ TANVDSYTMH ENYGAGTASY SNDIAILHLA
TSISLGGNIQ AAVLPANNNN DYAGTTCVIS GWGRTDGTNN LPDILQKSSI
PVITTAQCTA AMVGVGGANI WDNHICVQDP AGNTGACNGD SGGPLNCPDG
GTRVVGVTWS VVSSGLGACL PDYPSVYTRV SAYLGWIGDN SR

参考文献

1. 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒对纤维连接蛋白基因表达的调节。胃肠病学和肝病杂志 2004, 13 (1) : 85-87。
2. 纤维连接蛋白在慢性中毒性肝病中的变化及其意义。现代中西医结合杂志2003, 12 (16) : 1692-1693。
3. 纤维连接蛋白检测在肝病中的临床意义。中国热带医学2006, 6 (5) : 818-819。
4. Activation of fibronectin gene expression by hepatitis B virus x antigen. *Journal of Viral Hepatitis*, 2004, 11, 332–341.
5. Differentially expressed cellular genes following HBV: potential targets of anti-HBV drugs? *Journal of Viral Hepatitis*, 2005, 12, 357–363.
6. Fibronectin is essential for hepatitis B virus propagation in vitro: May be a potential cellular target? *Biochemical and Biophysical Research Communications* 344 (2006) 757–764.
7. Fibronectin of Human Liver Sinusoids Binds Hepatitis B Virus: Identification by an Anti-Idiotypic Antibody Bearing the Internal Image of the Pre-S2 Domain. *Journal of Virology*, Feb. 1995, p. 840–848.
8. Expression, localization and alternative splicing pattern of fibronectin messenger RNA in fibrotic human liver and hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, 1997, 27:843-853.
9. Latent fibronectin-degrading serine proteinase activity in N-terminal heparin-binding domain of human plasma fibronectin. *Eur. J. Biochem.* 1991, 201: 71 -77.
10. Collagen-binding domain of human plasma fibronectin contains a latent type-IV collagenase. *Eur. J. Biochem.* 1991, 201: 79-84.

序列表

<110> 中国科学院生物物理研究所

<120> 蚯蚓纤连蛋白酶在乙型肝炎治疗中的应用

<130> IB080567

<160> 15

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 239

<212> PRT

<213> 蚯蚓

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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> 3

<211> 246

<212> PRT

<213> 蚯蚓

<400> 3

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

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> 4

<211> 247

<212> PRT

<213> 蚯蚓

<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 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

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> 5

<211> 245

<212> PRT

<213> 蚯蚓

<400> 5

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

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

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> 7

<211> 283

<212> PRT

<213> 蚯蚓

<400> 7

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

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
225 230 235 240

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> 8

<211> 245

<212> PRT

<213> 蚯蚓

<400> 8

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 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

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> 9

<211> 246

<212> PRT

<213> 蚯蚓

<400> 9

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

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

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> 11

<211> 239

<212> PRT

<213> 蚯蚓

<400> 11

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

Ser 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 His
65 70 75 80

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

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

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

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

Thr Gly Gln Asn Glu 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 Ile Gly Ile Val
195 200 205

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

Val Gly Ser Gln Thr Gly Trp Ile Thr Asp Ile Ile Thr Asn Asn
225 230 235

<210> 12

<211> 225

<212> PRT

<213> 蚯蚓

<400> 12

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
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> 13

<211> 242

<212> PRT

<213> 蚯蚓

<400> 13

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

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> 14

<211> 192

<212> PRT

<213> 蚯蚓

<400> 14

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

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

<210> 15

<211> 242

<212> PRT

<213> 蚯蚓

<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
 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

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

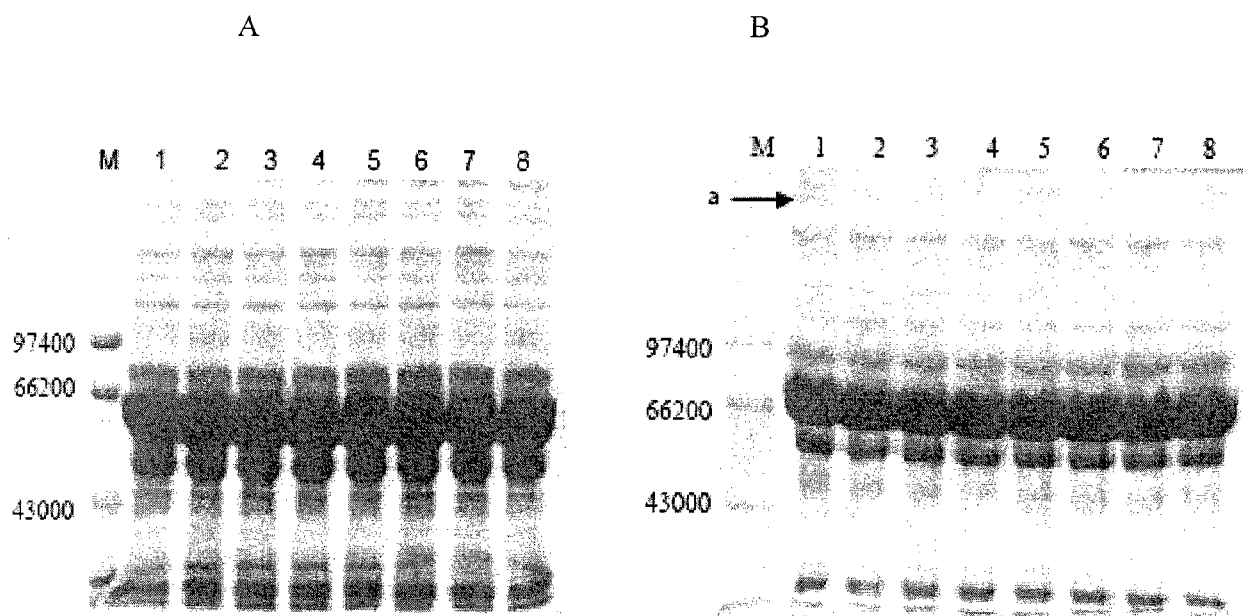


图 1

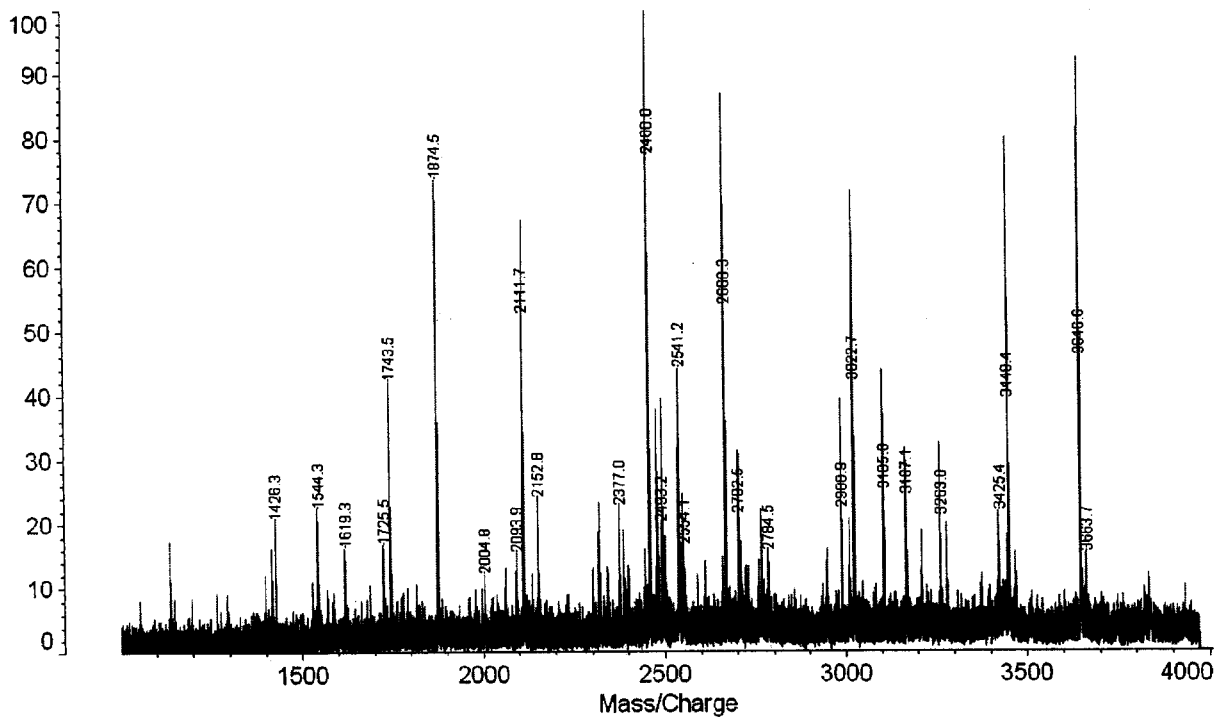


图 2

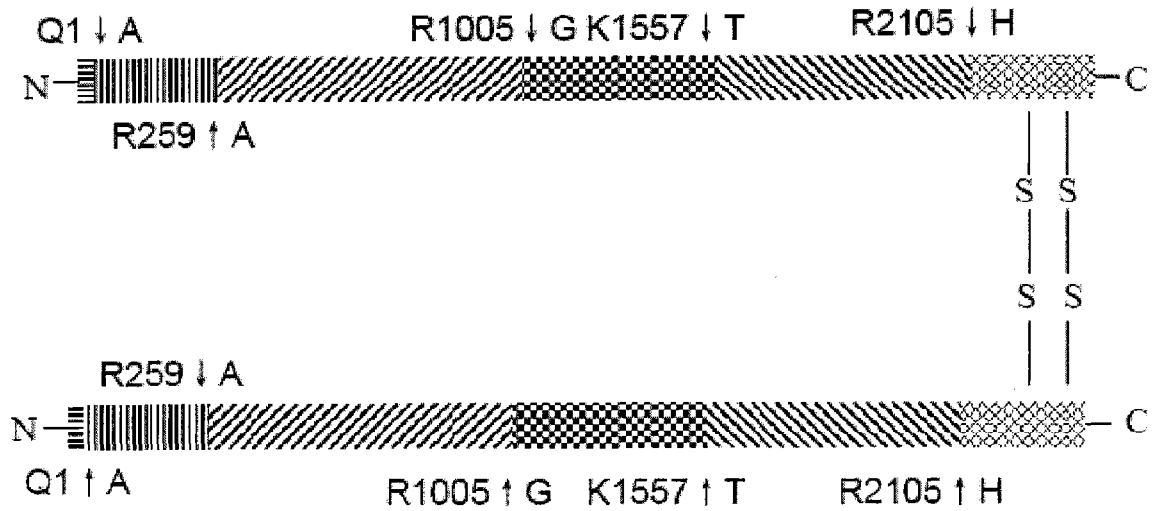


图3

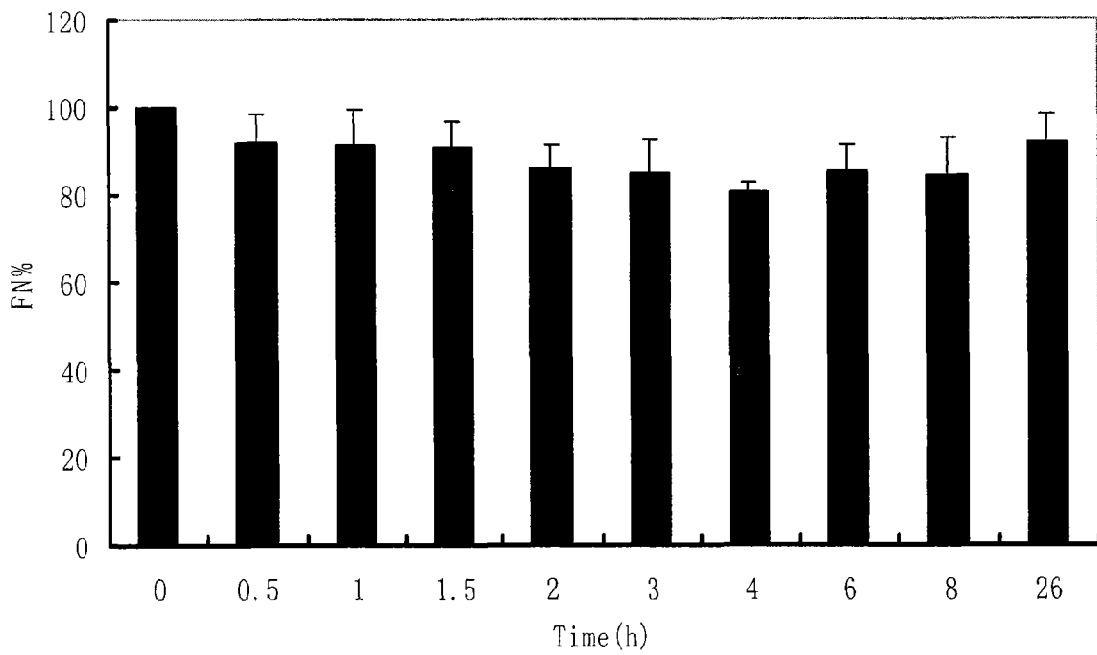


图4

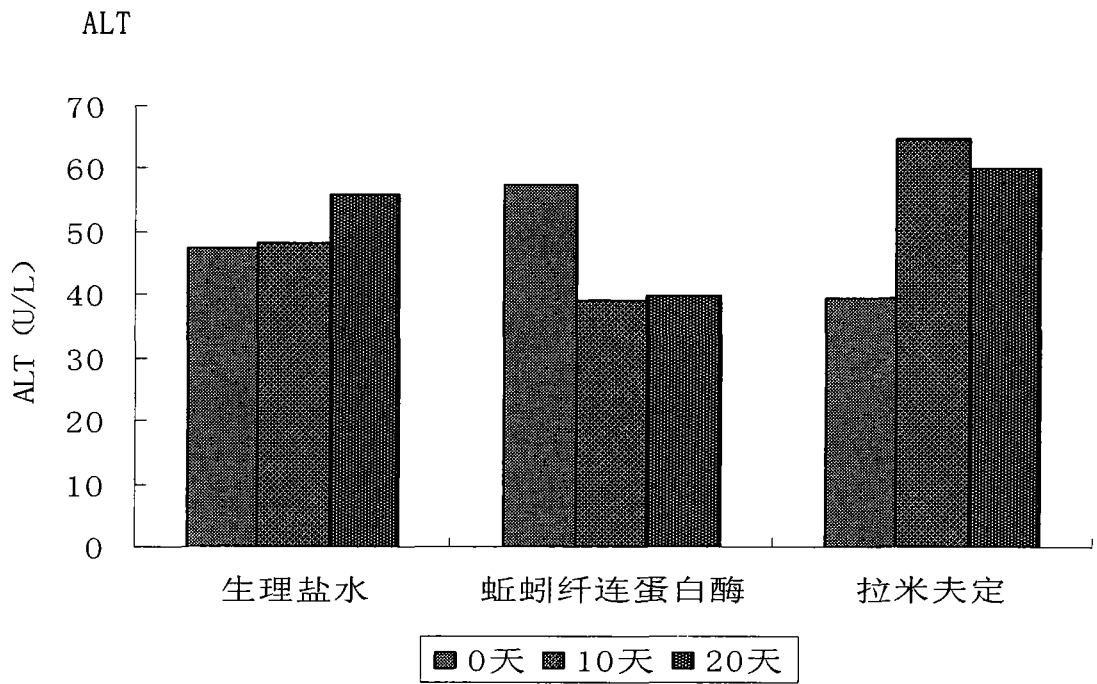


图5-1

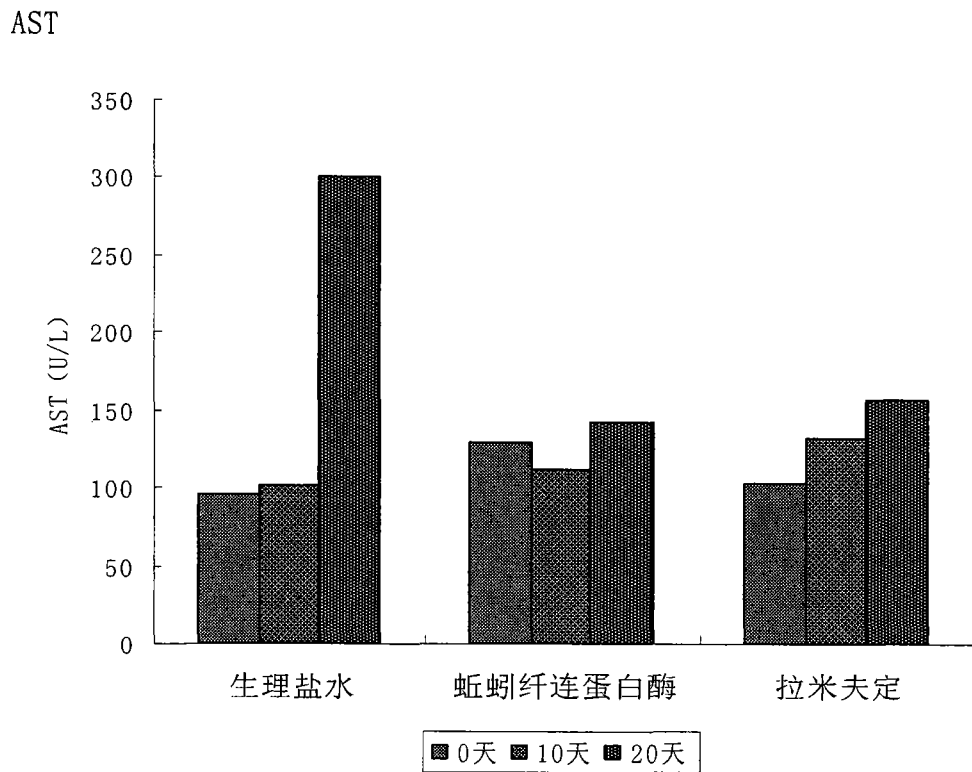


图5-2

HBsAg

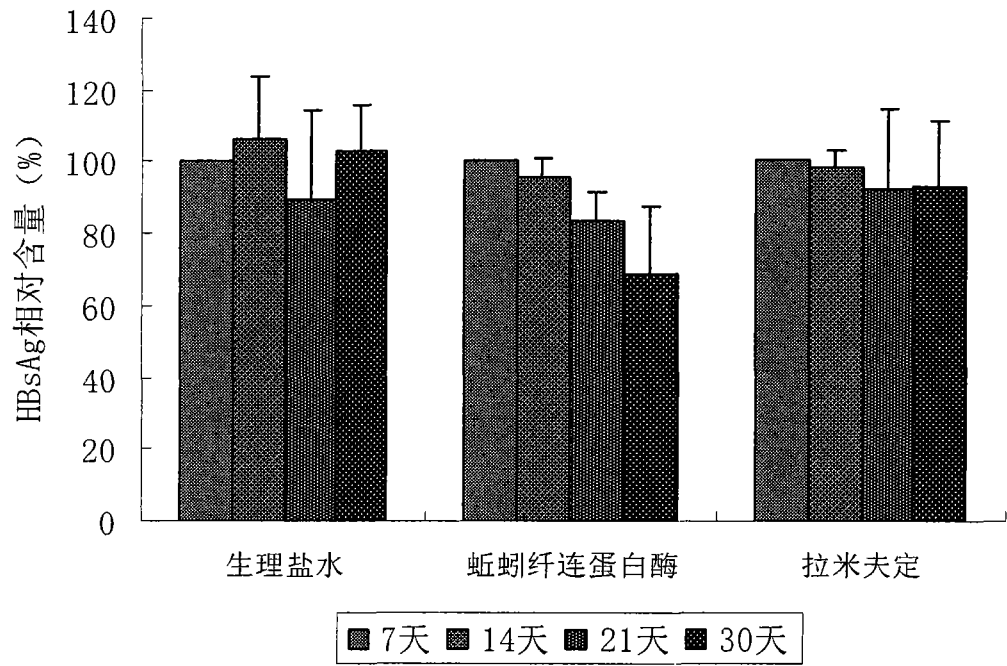


图5-3

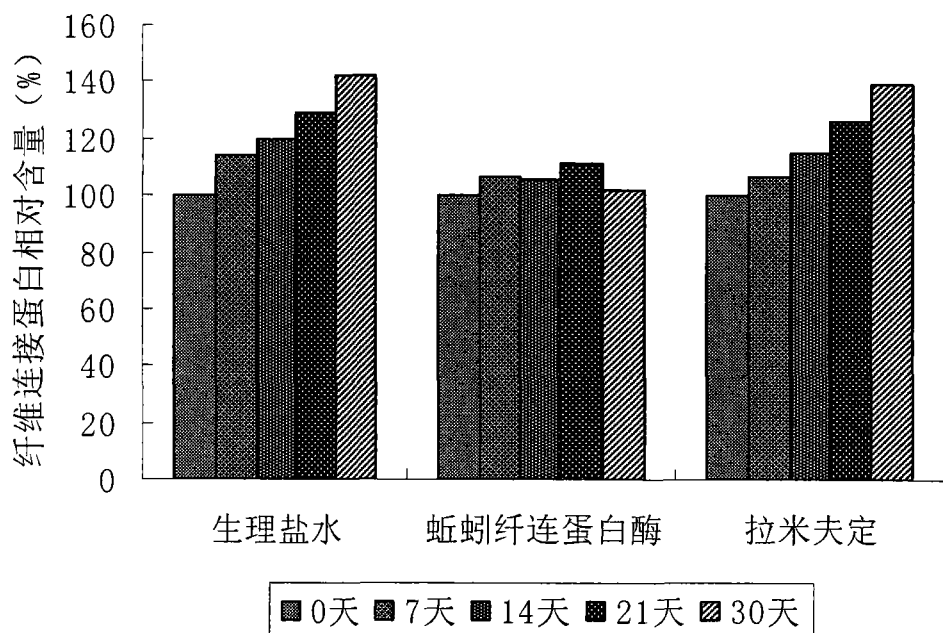
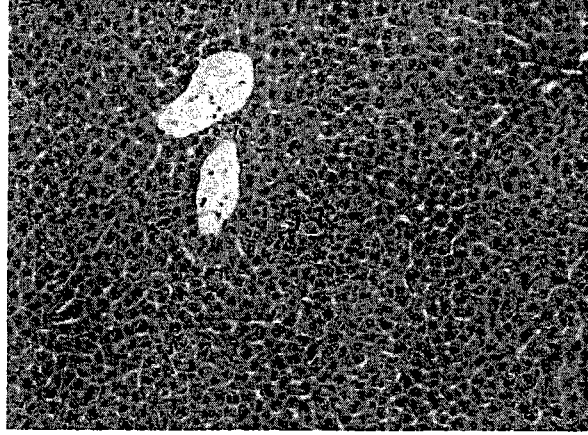
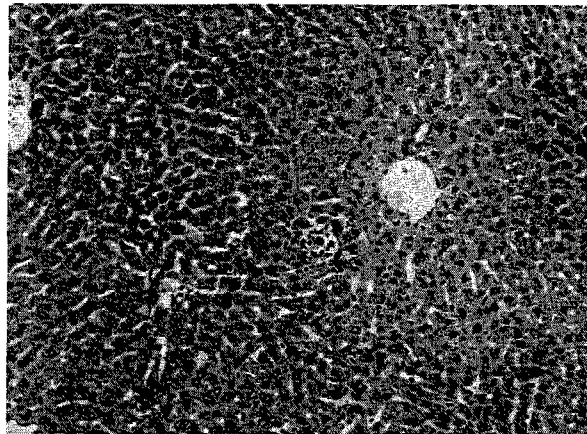


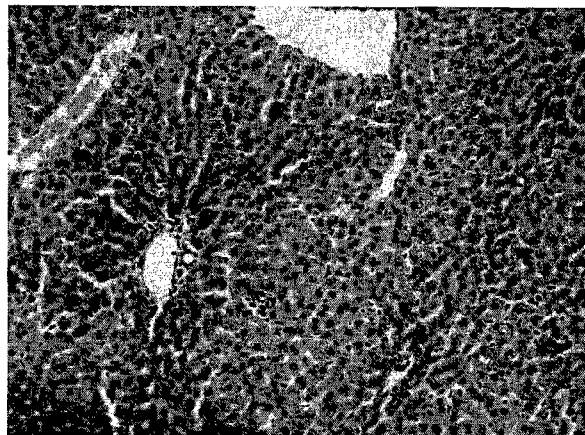
图5-4



A



B



C

图 5-5

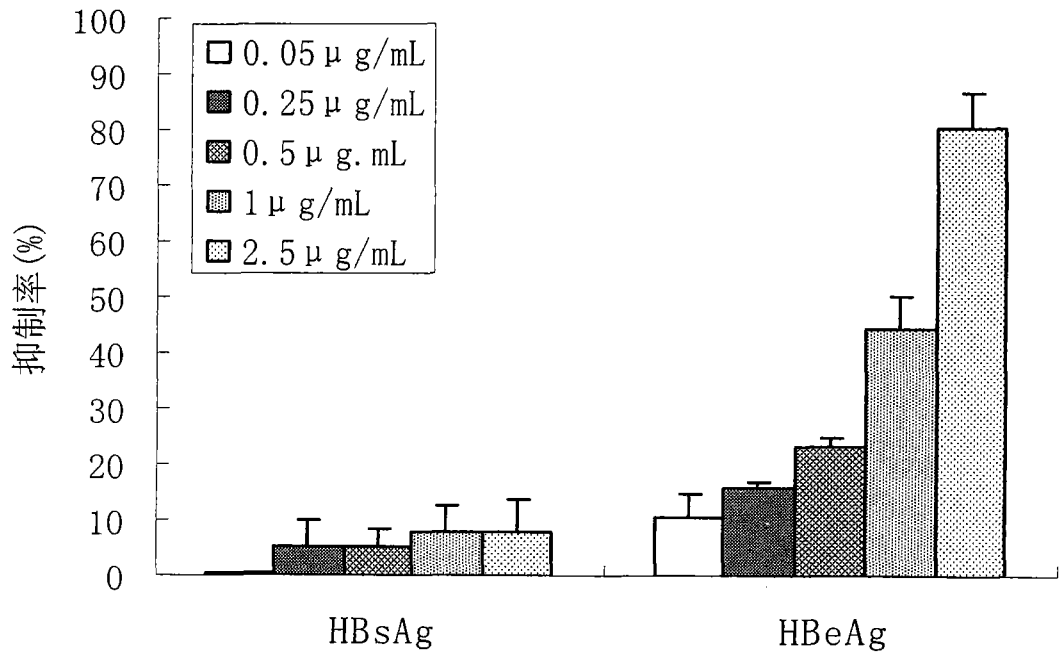


图 6-1

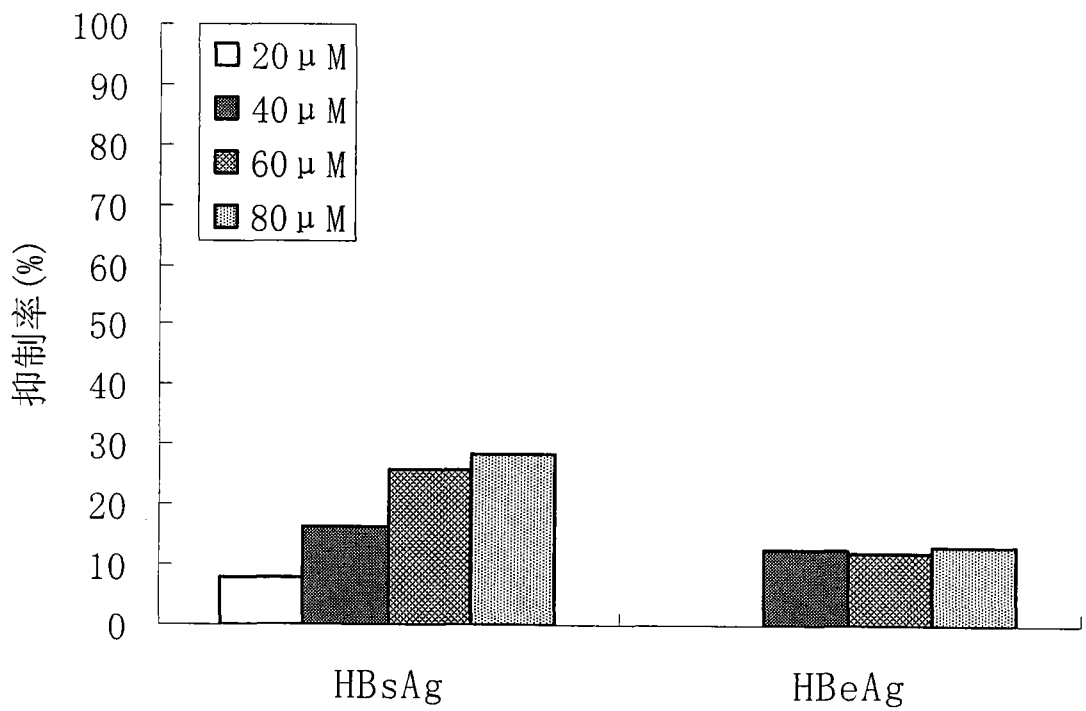


图 6-2