

[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 200810098830.7

[51] Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/15 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2008年12月3日

[11] 公开号 CN 101315385A

[22] 申请日 2008.5.15

[21] 申请号 200810098830.7

[30] 优先权

[32] 2007.5.29 [33] CN [31] 200710041403.0

[71] 申请人 中国科学院上海生命科学研究院

地址 200031 上海市徐汇区岳阳路320号

[72] 发明人 耿建国 徐维丽 陈 铭 王海波
王尽淘 张 雷 徐 涛

[74] 专利代理机构 上海智信专利代理有限公司

代理人 缪利明

权利要求书2页 说明书31页 附图12页

[54] 发明名称

一种炎症和血栓药物的靶标,以及针对该靶标的药物

[57] 摘要

本发明提供了蛋白 Naf1 和/或 PSGL-1 作为靶标用于筛选治疗炎症和/或血栓性疾病的药物以及用作炎症和/或血栓性疾病药物的药物靶标的用途,蛋白 Naf1 和/或 PSGL-1 的一种特异性抗体以及含有蛋白 Naf1 和/或 PSGL-1 的特异性抗体的药物,以及以蛋白 Naf1 和/或 PSGL-1 为药物靶标的、用于治疗炎症和/或血栓性疾病的药物,还提供了一种能阻断 Naf1 和 PSGL-1 的胞内区结合的肽段以及上述肽段用于炎症和/或血栓性疾病药物的应用。本发明提供的肽段能减弱白细胞的粘附,并能抑制体内的炎症反应,同时,也为免疫损伤、炎症、血栓形成及肿瘤转移等疾病的治疗提供新的方法。

- 1、蛋白 Naf1 的应用，其特征在于，作为靶标用于筛选治疗炎症和/或血栓性疾病的药物。
- 2、蛋白 Naf1 的应用，其特征在于，用作炎症和/或血栓性疾病药物的药物靶标。
- 3、蛋白 PSGL-1 的应用，其特征在于，作为靶标用于筛选治疗炎症和/或血栓性疾病的药物。
- 4、蛋白 PSGL-1 的应用，其特征在于，用作炎症和/或血栓性疾病药物的药物靶标。
- 5、如权利要求 1—4 中任一项所述的应用，其特征在于，所述药物阻断磷脂酰肌醇 3 位激酶 PI3K 的 p85 亚基结合到 PSGL-1 的胞内区。
- 6、如权利要求 1—4 中任一项所述的应用，其特征在于，所述药物阻断 Naf1 上第 552 位的酪氨酸的磷酸化。
- 7、如权利要求 1—4 中任一项所述的应用，其特征在于，所述药物阻断 Naf1 和 PSGL-1 的胞内区结合。
- 8、一种蛋白 Naf1 的特异性抗体。
- 9、一种治疗炎症和/或血栓性疾病的药物，其特征在于，所述药物含有如权利要求 8 所述的抗体。
- 10、一种蛋白 PSGL-1 的特异性抗体。
- 11、一种治疗炎症和/或血栓性疾病的药物，其特征在于，所述药物含有如权利要求 10 所述的抗体。
- 12、一种治疗炎症和/或血栓性疾病的药物，其特征在于，所述药物以蛋白 Naf1 为药物靶标。
- 13、一种治疗炎症和/或血栓性疾病的药物，其特征在于，所述药物以蛋白 PSGL-1 为药物靶标。
- 14、一种能阻断 Naf1 和 PSGL-1 的胞内区结合的肽段，其特征在于，所述肽段具有 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列。
- 15、如权利要求 14 所述的肽段，其特征在于，所述肽段在体内进一步阻断 P-选择素所诱导的整合素 β_2 的活化。
- 16、如权利要求 14 或 15 所述的肽段，其特征在于，所述肽段在体内抑制 P-选择素及其介导的细胞黏附与作用。

17、如权利要求 14—16 中任一项所述的肽段用于制备治疗炎症和/或血栓性疾病的药物的应用。

18、如权利要求 17 所述的应用，其特征在于，所述的肽段阻断 Naf1 和 PSGL-1 胞内区的结合。

19、如权利要求 18 所述的应用，其特征在于，所述的肽段在体内进一步阻断 P-选择素所诱导的整合素 β_2 的活化。

20、如权利要求 17—19 中任一项所述的应用，其特征在于，所述肽段抑制 P-选择素及其介导的细胞黏附与作用。

21、一种源于 Naf1 第 17 个外显子的肽段，其特征在于，所述肽段包含 SEQ ID NO: 1 上 594-626 位氨基酸序列。

22、如权利要求 21 所述的肽段，其特征在于，所述肽段还可以包含转导序列。

23、如权利要求 22 所述的肽段，其特征在于，所述转导序列为 HIV Tat。

24、如权利要求 21-23 中任一项所述的肽段，其特征在于，所述肽段阻断 PSGL-1 和 Naf1 的结合。

一种炎症和血栓药物的靶标，以及针对该靶标的药物

技术领域

本发明涉及生物医药领域，具体的讲，本发明涉及一种炎症和血栓药物的靶标，以及针对该靶标的药物。

背景技术

近年来细胞粘附分子及其研究已成为热点，对其调节细胞与胞外基质间相互作用等功能，以及在细胞生长发育、免疫应答、炎症反应、血液凝固、组织修复和肿瘤转移等生理和病理过程中的重要作用，也给予高度关注。

选择素（selectins）作为细胞粘附分子中一个家族，包括 P-selectin, E-selectin 和 L-selectin, 其主要功能为介导活化血小板、内皮细胞与白细胞、肿瘤细胞等粘附和相互作用，并与免疫损伤、炎症、血栓形成及肿瘤转移等密切相关。P-选择素（P-selectin）是选择素家族中的一个成员，分子质量为 140kDa 的膜糖蛋白，定位于血小板的 α 颗粒和内皮细胞棒管状（Weibel-palade）小体内。全长由 789 个氨基酸残基组成，N 末端 730 个氨基酸构成胞外区，C 末端 24 个氨基酸组成跨膜区，此外 35 个氨基酸组成胞浆短尾。胞外区包括 1 个凝集素样区、1 个表皮生长因子样区（EGF 区）和 9 个被称为补体调节蛋白的较短重复序列（SCR 区）。其中凝集素样区可以结合某些碳水化合物，是选择素结合配体部位。胞浆区可能与细胞骨架相连。P-选择素识别的是一些寡糖基团，主要是唾液酸化的路易斯寡糖（sialyl Lwex, sLex, 即 CD15s）或类似结构分子。

P-选择素糖蛋白配体 1（P-selectin glycoprotein ligand 1, PSGL-1, CD162）是一种具有同源二聚体结构的跨膜糖蛋白，表达于几乎所有白细胞表面，是迄今为止阐述得最为详尽的选择素配体。PSGL-1 与 P-选择素有高度的亲和性，同时也是 L-选择素和 E-选择素的配体。PSGL-1 是一个高度唾液酸化的黏蛋白，每个单体的相对分子量为 120 kDa 左右，其蛋白骨架上带有 1-3 个 N-连聚糖和数目众多的唾液酸化的 O-聚糖，唾液酸化（sialyl kx）和 O-聚糖（O-glycans）结构对 PSGL-1 功能发挥具有重要作用。

血小板和内皮细胞活化后，P-选择素被转运到细胞膜上（Blann AD, Nadar SK, Lip GY. Eur Heart. J. 2003; 24: 2166 -2179; McEver RP. Selectins. Curr. Opin. Immunol.1994;

6:75-84)。P-选择素和其白细胞上的配体 P-选择素配体 PSGL-1 相互结合，起始白细胞与内皮细胞或血小板的黏附过程。

尽管白细胞与内皮细胞之间的黏附作用是构成机体屏障的重要一环，但白细胞内皮细胞的过度黏附是有害的。例如，在缺血/再灌注损伤中，再灌注后细胞黏附增加会激发炎症渗出加剧，造成比缺血更大的组织和器官损害。血栓的发生发展涉及机体许多复杂的病理生理反应。血栓形成除与血浆中一些凝血因子有关外，更与 P-选择素介导的白细胞、内皮细胞和血小板之间的黏附密切相关 (Li N, Hu H, Lindqvist M, et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000. 20: 2702~2708)。黏附分子 P-选择素介导的血小板与内皮细胞间，以及这些细胞与白细胞之间的细胞黏附，是炎症和血栓形成病理生理过程中的基本现象和共同过程。通过各种途径和药物抑制和调节 P-选择素及其介导的细胞黏附与作用，已证明可成为炎症和血栓性疾病的有效防治手段。

抗细胞黏附最直接的是阻断受体配体之间的结合。在灵长类动物的血栓形成模型中，针对 P-选择素的单克隆抗体加速了血栓的溶解，并且在冠状动脉内皮损伤模型中，可减少血栓形成和缺血损伤。此外在静脉血栓形成的大鼠模型中，针对 P-选择素的单克隆抗体不仅具有有效的抗血栓作用，同时也可减少炎症细胞的浸润。目前抗 P-选择素抗体可通过导人用于血栓和/或炎症的定位诊断以及靶向性治疗，已成功的使用在前临床模型中。针对 P-选择素的抗体及人源化单抗也被研究开发，如重组可溶性 P-选择素糖蛋白配体-1 和小分子选择素抑制剂已进入临床试验，抗人 P-选择素凝集素-表皮生长因子功能域的单克隆抗体也已经申请中国专利 (申请号 200310108522.5)。

由于选择素均可识别唾液酸化的路易斯糖 x (sLex) 结构，所以 sLex 拟似剂因其高亲和力迅速被开发，如 TBC1269，分子量小于 1000，作为治疗哮喘和银屑病的候选药物已进入 II 期临床。非碳水化合物分子如 OC229648，在体外实验中较 TBC1269 有更强的抑制作用，且成功地应用于动物炎症模型。因此，抗黏附治疗将随着 P-选择素与炎症和血栓性疾病的研究深入和阐明，不失为一种防治手段，具有良好的临床应用价值和前景。

在起始黏附过程中，PSGL-1 不仅可通过与选择素间的作用建立白细胞与内皮细胞间联系，同时也可作为信号受体向细胞内传递信号引起白细胞的活化。P-selectin 结合 PSGL-1 能活化整合素 $\alpha_M\beta_2$ (Ma YQ, Plow EF, Geng JG. *Blood*. 2004;104:2549-2556)，但是该活化通路的具体分子机制尚不清楚。

整合素是一大类跨膜异二聚体粘附分子，表达在几乎所有真核细胞的表面，在细胞间和细胞与基质间的相互作用中起重要作用。整合素中的 β_2 家族常被称作白细胞整合素，

包括四个成员，由四个不同的 α 亚单位 (α_M , α_L , α_X 和 α_D) 和一个共同的 β_2 亚单位构成，其中表达在中性粒细胞上的 β_2 整合素主要是 $\alpha_M\beta_2$ (CD11bCD18, Mac-1) 和 $\alpha_L\beta_2$ (CD11cCD18, LFA-1)。这两种整合素能结合多种配基，包括血纤蛋白原，细胞间粘附分子 (ICAM-1, CD54)，凝血因子 X，补体通路产物 C3bi 和几种细胞外基质蛋白。Mac-1 和 LFA-1 和配体的结合依赖于白细胞活化时其对配体亲和性的提高和其自身聚集而提高的亲合力，也依赖于贮存于胞内的分子向细胞表面的分布。 β_2 整合素的活化对于炎症及血栓性疾病中白细胞在血管内皮表面的粘附起着关键的作用。

研究 PSGL-1 向细胞内传递信号的通路及其机制，可以找到新的与炎症性疾病和血栓性疾病等发生发展密切相关的介质和分子靶标。

发明内容

本发明的发明人对 P-选择素与其配基 PSGL-1 结合后的信号传导机制和体内功能进行了研究，研究结果显示：

1、磷脂酰肌醇 3 位激酶 (PI3K) 参与了该活化过程中的信号通路，PSGL-1 结合 P-选择素后，可使 PI3K 的 p85 亚基结合到 PSGL-1 的胞内区上，并能增强 PI3K 的激酶活性；

2、Naf1 和 PSGL-1 胞内区结合后，酪氨酸激酶 Src 在 P-选择素作用下被活化，进而磷酸化 Naf1，聚集 PI3K 的 p85 亚基结合到 Naf1 上；

3、Naf1 可作为转接蛋白，连接 PSGL-1 的胞内区和 PI3K 的 p85 亚基。

由于，P-选择素介导的血小板与内皮细胞间，以及这些细胞与白细胞之间的细胞黏附，是炎症和血栓形成病理生理过程中的基本现象和共同过程。通过各种途径和药物抑制和调节 P-选择素及其介导的细胞黏附与作用，已证明可成为炎症和血栓性疾病的有效防治手段。同时，抗黏附治疗作为一种防治手段，具有良好的临床应用价值和前景。而且， β_2 整合素的活化对于炎症及血栓性疾病中白细胞在血管内皮表面的粘附起着关键的作用。

因此，本发明的发明人根据上述研究结果，设计了一种能抑制 P-选择素引起的 β_2 整合素的活化的肽段 PSGL-1 胞内区肽段，并验证了该肽段的功能，确定该肽段能阻断 P-选择素活化 β_2 整合素，从而可进一步用于炎症及血栓性疾病药物。

本发明的一个目的在于，提供蛋白 Naf1 和 PSGL-1 作为靶标用于筛选治疗炎症和/或血栓性疾病的药物以及用作炎症和/或血栓性疾病药物的药物靶标的用途。

本发明的另一目的在于，提供蛋白 Naf1 和/或 PSGL-1 的一种特异性抗体以及一种含有蛋白 Naf1 和/或 PSGL-1 的特异性抗体的、用于治疗炎症和/或血栓性疾病的药物。

本发明还有一个目的在于，提供一种以蛋白 Naf1 和/或 PSGL-1 为药物靶标的、用于治疗炎症和/或血栓性疾病的药物。

本发明还有一个目的在于，提供一种能阻断 Naf1 和 PSGL-1 的胞内区结合的肽段以及上述肽段用于炎症和/或血栓性疾病药物的应用。

本发明还有一个目的在于，提供一种源于 Naf1 第 17 个外显子的多肽。

本发明对 P-选择素与其配基 PSGL-1 结合后的信号传导机制和体内功能进行了研究，针对该信号传导通路，以 Naf1 和/或 PSGL-1 为靶标，开发用于炎症及血栓性疾病的药物；Naf1 或 PSGL-1 的特异性抗体，以及含有所述特异性抗体的用于炎症及血栓性疾病的药物；提供的肽段 Tat-PSGL-1 在阻断 Naf1 和 PSGL-1 的结合的同时，还能减弱白细胞的粘附，并能抑制体内的炎症反应，从而为免疫损伤、炎症、血栓形成及肿瘤转移等疾病的治疗提供新的方法。

附图说明

图 1 显示 Naf1 α 和 PSGL-1 胞内区在酵母 Y190 中的相互结合。其中，图 1A 为 β -半乳糖苷酶报告基因结果；图 1B 为 His 报告基因的结果。

图 2 显示酵母双杂交筛选得到 Naf1cDNA，制备 Naf1 抗体。

其中，图 2A 为 Naf1 基因的氨基酸序列及构建的酵母双杂交“诱饵”（bait）简图；图 2B 为抗 Naf1 多抗的 Western 免疫印迹结果，分别检测 HL-60 裂解液、中性粒细胞裂解液和转染 pCMV-Naf1 的 293 裂解液，同时用抗 c-myc 的单抗 9E10 检测转染 pCMV-Naf1 的 293 裂解液认识同样大小的条带，证明该多抗特异识别 Naf1。

图 3 显示 Naf1 和 PSGL-1 胞内区特异性结合，以及 Naf1 和 PSGL-1 相互结合的结合位点。

其中：图 3A 为人中性粒细胞裂解液上清分别和预载有 GST 蛋白或融合蛋白 GST-Naf1 的谷胱甘肽基质（glutathione-sepharose）孵育的结果；图 3B 为结合在谷胱甘肽基质上的融合蛋白 GST-Naf1 和 GST 蛋白洗脱后用考马斯亮兰染色定量的结果；图 3C 为 293 细胞共转 PSGL-1 表达质粒 pCDNA3.1-PSGL-1 和带 c-myc tag 的 Naf1 表达质粒 pCMV-Naf1 或单转 pCMV-Naf1 的结果；图 3D 为 HL-60 细胞的裂解上清分别用抗 PSGL-1 多抗或兔免疫前 IgG 做免疫共沉淀的结果；图 3E 为 HL-60 细胞分别用人 IgG 或 P-Rg 刺

激的结果；图 3F 为 PSGL-1 胞内区及缺失突变体的氨基酸序列简图；图 3G 为 293 细胞共转 PSGL-1 缺失突变体和 Naf1 的结果；图 3H 为 PSGL-1 胞内区点突变示意图，黑体氨基酸（R、N、Y、S、P、T、E）被突变为丙氨酸（A）；图 3I 为 93 细胞共转 PSGL-1 缺失突变体和 Naf1 或 PSGL-1 野生型和 Naf1 的结果；图 3J 为 Naf1C 端缺失突变示意图；图 3K 为 Naf1C 端缺失突变和 PSGL-1 免疫共沉淀的结果。

图 4 显示 Naf1 介导 PSGL-1 和 p85 的结合。

其中，图 4A 为 293 细胞共转表达 PSGL-1, p85 和 Naf1 的载体或对照空载体 pCMV 的结果；图 4B 为 293 细胞共转表达 p85 和 Naf1 的载体或对照空载体 pCMV 的结果；图 4C 为 293 细胞共转表达 p85 和 Naf1Y552F、Naf1 的载体或对照空载体 pCMV 的结果；图 4D 为 293 细胞共转表达 PSGL-1, p85 和 Naf1 或 Naf1Y552F 的载体或对照空载体 pCMV 的结果。

图 5 显示 PSGL-1/Naf1/p85 在人中性粒细胞中形成复合物，P-Rg 刺激能活化 Src，进而磷酸化 Naf1 并增强 PI3K 激酶活性的结果。

其中，图 5A 为人中性粒细胞分别和对照缓冲液 PBS (-)，10 $\mu\text{g/ml}$ 的人 IgG (hIgG) 或 P-selectin Rg (P-Rg) 孵育 20 分钟后，免疫印迹检测结果；图 5B 为用人 IgG (hIgG) 或 P-selectin Rg (P-Rg) 刺激人中性粒细胞后，用 3B8 免疫检测的结果；图 5C 为抗 PSGL-1 多抗或免疫前兔 IgG 从人中性粒白细胞的细胞裂解液上清中免疫共沉淀 PI3K，然后用免疫沉淀物去催化底物磷脂酰肌醇 (phosphatidylinositol, PI) 和 ^{32}P 标记的 ATP，后产物放射自显影图，图中箭头标记为 PIP；图 5D 为取斑点强度的相对值，将三次独立实验结果取平均值的结果；图 5E 为白细胞和 PP2, DMSO 室温孵育、裂解后，用 Naf1 抗体将 Naf1 免疫沉淀后 3B8 和 5C4 的免疫检测结果；图 5F 为白细胞的处理同 5E, 其它实验同图 5A；图 5G 为白细胞刺激后直接裂解，裂解液分别用 Src 抗体和抗 Src416 位酪氨酸磷酸化抗体免疫检测的结果。

图 6 显示 P-selectin 通过 Naf1 和 p85 通路活化 $\alpha_M\beta_2$ 整合素的结果。

其中，图 6A 为人中性粒白细胞或 HL-60 细胞的粘附细胞检测结果；图 6B 为用退火的 S1 和 S4 电转 HL-60 细胞后，抗 Naf1 多抗免疫印迹检测结果；图 6C 为转染 S1 和 S4 的 HL-60 细胞的免疫共沉淀检测 PSGL-1 和 p85 的结合的结果；图 6D 为转染 S1 和 S4 的 HL-60 细胞的细胞粘附结果。

图 7 显示突变体 Naf1Y552F 阻断 PSGL-1 和 p85 的结合并阻断 P-选择素活化 $\alpha_M\beta_2$ 整合素的信号通路的结果。

其中，图 7A 为带有 Naf1Y552F 或 LacZ 基因的病毒颗粒感染 HL-60 后，用抗 Naf1 抗体免疫检测的结果；图 7B 为带有 Naf1Y552F 或 LacZ 基因的病毒颗粒感染 HL-60 后，免疫共沉淀检测 PSGL-1 和 p85 的结合的结果；图 7C 为带有 Naf1Y552F 或 LacZ 基因的病毒颗粒感染 HL-60 后，细胞粘附检测结果。

图 8 显示 PSGL-1 胞内区 Tat 融合多肽被细胞吞噬，并阻断 PSGL-1 和 Naf1 的结合的结果。

其中，图 8A 为所构建的融合多肽示意图；图 8B 为标记 FITC 的融合多肽用和小鼠中性粒细胞孵育后，共聚焦显微镜结果；图 8C 和 D 为将结合有融合多肽的 Ni beads 和人 (C) 或小鼠 (D) 中性粒细胞裂解液孵育，结合下来的 Naf1 用 Naf1 多抗 Western 免疫检测的结果；图 8E 为将融合多肽加到中性粒细胞裂解液中，用 Western 检测的结果。

图 9 为 PSGL-1 胞内区肽段在体外和体内阻断 P-选择素活化整合素的示意图。

其中，图 9A 为人中性粒细胞分别和融合肽段孵育 30 分钟后，用 hIgG 和 P-Rg 刺激的粘附实验结果；图 9B 为用小鼠的中性粒细胞和小鼠 fibrinogen 重复 A 的结果的示意图；图 9C 为人中性粒细胞分别和融合肽段或抗体孵育后，用 hIgG 和 P-Rg 刺激的粘附实验结果；图 9D 为小鼠预先被静脉注射入相关试剂后，显微观察提睾肌上微血管中的滚动和粘附白细胞的结果；图 9E 为小鼠预先被静脉注射入相关试剂后，急性腹膜炎实验结果。

图 10 为 HL-60 细胞表达相应病毒后，用流式细胞仪结合相应抗体或 P-Rg 分别检测 α_M 亚基 (A)，PSGL-1 (B) 的表达和 P-Rg 的结合 (C) 的结果。

图 11 为分离小鼠中性粒细胞，和肽段孵育后，用流式细胞仪结合相应抗体或小鼠 P-Rg 分别检测 α_M 亚基 (A)，PSGL-1 (B) 的表达和小鼠 P-Rg 的结合 (C) 的结果。

图 12 为抑制 HL-60 细胞内源的 Naf1 表达不影响细胞表面的 PSGL-1 和 α_M 亚基的表达以及 P-Rg 和 PSGL-1 的结合的结果。

其中，图 12A 为电转 S1 或 S4 的 HL-60 细胞用抗 α_M 亚基的抗体 44a 孵育的结果，对照用小鼠 IgG；图 12B 为用兔 IgG 做对照，流式细胞仪测细胞表面荧光强度的结果；图 12C 为用人 IgG 做对照，将 P-Rg 和电转后的 HL-60 细胞孵育后，用流式细胞仪测细胞表面荧光强度的结果。

图 13 为 P-选凝素对 P-选凝素敲除小鼠中的深静脉血栓的作用的示意图，其中，C57 为直接结扎 C57 小鼠的实验结果，PKO 为直接结扎 P-selectin KO 鼠的实验结果，mP-Rg

为 P-selectin KO 鼠静脉注射小鼠 P-Rg 的实验结果, 12CA5 为 P-selectin KO 鼠静脉注射 12CA5 的实验结果, *表示 $p < 0.05$, **表示 $p < 0.01$ 。

图 14 为体内注射 Tat-PSGL-1 抑制小鼠深静脉血栓的结果, 其中, 分别以体内注射 Tat-PSGL-1 Mut 或生理盐水的小鼠为对照。

具体实施方式

以下结合具体实施例, 对本发明作进一步说明。应理解, 以下实施例仅用于说明本发明而非用于限定本发明的范围。

下列实施例中未注明具体条件的实验方法, 通常按照常规条件, 如《分子克隆实验指南(第三版)》(J.萨姆布鲁克 等著, 2003)中所述的条件和方法进行。

本发明中使用的材料:

人胚肾转化细胞株 293 (CRL-1573) 和 293T、骨髓样白血病细胞株 HL-60 (CRL-240) 均购自美国组织培养采集中心 (ATCC)。以上细胞株分别用添加 10% 灭活胎牛血清、4mM L-谷氨酰胺、100 单位/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素的 DMEM 培养液 (293 和 293T 细胞) 或 RPMI-1640 培养液 (HL-60 细胞), 在 37 $^{\circ}$ C 下 5%CO₂ 培养箱中培养。

抗人 α -Tubulin 单抗 anti- α -Tubulin (clone B 5-1-2)、人和鼠 IgG 均购自 Sigma 公司 (St. Louis, MO)。KPL-1 (抗 PSGL-1 单抗), CBRM1/5 (α M 亚基的阻断性单抗), 2PH1 (小鼠 PSGL-1 的阻断性单抗), M1/70 (小鼠 Mac-1 的阻断性单抗), M17/4 (小鼠 LFA-1 的阻断性单抗), RB40.34 (小鼠 P-selectin 的阻断性单抗) 和亚型对照抗体购自 BD Pharmingen 公司 (San Diego, CA)。单抗 38 购自 Axxora 公司 (San Diego, CA)。抗 p85 多抗购自 Upstate 公司 (Lake Placid, NY)。9E10 (抗 c-myc 单抗), IB4 (β 2 亚基的阻断性单抗), OKM1 (α M 亚基的非阻断性单抗) 和 44a (α M 亚基的阻断性单抗) 均购自美国组织培养采集中心 (ATCC)。人纤维蛋白原购自 Enzyme Research Laboratories (South Bend, IN), pCDNA3.1/Hygro 载体购自 Invitrogen 公司, pCMV-Tag 3B 载体购自 Stratagene 公司, 其它试剂购自 Sigma 公司。

蛋白 12CA5 (购自美国组织培养采集中心, ATCC), 为 HA 单抗, 具有与小鼠 P-Rg (mP-Rg) 同样的 Fc 片段, 在实验中可作为 mP-Rg 的对照。

人 P-选择素和受体球蛋白融合蛋白 (P-selectin Rg, P-Rg)、G1 (P-选择素向白细胞粘附的阻断性单抗)、PS1 (P-选择素向白细胞粘附的非阻断性单抗) 见文献 (Ma L, Raycroft L, Asa D, Anderson DC, Geng J-G. J Biol Chem. 1994; 269: 27739-27746; Geng J-G,

Bevilacqua MP, Moore KL, et al. *Nature*.1990;343:757-760.); 免疫前兔 IgG 和抗人 PSGL-1 肽段兔多抗的制备, 采用文献 (J.G., Raub T.J., Baker C. A., Sawada G. A., Ma L., and Elhammer Å. *P. J. Cell Biol.* 1997; 137: 743-754.) 所述的方法; pCEP4F 载体见文献 (Zhu X, Mancini M A, Chang K H, Liu C Y, Chen C F, Shan B, Jones D, Yang-Feng T L, Lee W H. *Mol Cell Biol.* 1995; 15: 5017-5029)。

在本发明的下述实施例中, P-选凝素敲除小鼠 (PKO, 购自 Jackson Laboratory) 和对照 C57 小鼠 (购自中科院上海实验动物中心), 其余未具体提及的小鼠则购自中科院上海实验动物中心, 为 SPF 级饲养。p110 $\delta^{D910A/D910A}$ 突变小鼠参见文献 (Okkenhaug K, Bilancio A, Farjot G, Priddle H, Sancho S, Peskett E, Pearce W, Meek SE, Salpekar A, Waterfield MD, Smith AJ, Vanhaesebroeck B. *Science*. 2002; 297:1031-4)。

本发明中采用的实验方法具体如下:

1、融合蛋白表达和抗体制备

参考 Amersham Pharmacia Biotech 的操作手册《GST Gene Fusion System》, 将酵母双杂交获得的 Naf1 cDNA 片段(编码 394-629 位氨基酸)克隆进载体 pGEX-4T-2 (Amersham Pharmacia Biotech), 制备 GST 融合蛋白。

用构建的 GST 融合蛋白作为免疫原免疫兔子, 以制备抗 Naf1 的多抗, 多抗的特异性通过免疫印迹真核表达带有 c-myc-tag 的 Naf1 α 得到确认。

Naf1 的特异性抗 Y552 位酪氨酸磷酸化单抗 3B8 和对照单抗 5C4, 通过将特定肽段免疫小鼠制备, 再通过 ELISA 方法筛选而获得。

该过程中, 所使用的肽段的氨基酸序列如下: HLCGAYPYAUPPMPAMVPHH (其中, U 为 pY, 即为磷酸化的酪氨酸), 而对照肽段与 U 对应的氨基酸为未磷酸化的酪氨酸, 其序列如下: HLCGAYPYAYPPMPAMVPHH。

2、GST pull-down 实验

分离人中性粒细胞, 分离方法参见文献 (Ma YQ, Plow EF, Geng JG. *Blood*. 2004; 104: 2549-2556); 再将分离得到的人中性粒细胞在冰浴的 CHAPS 裂解液 (3%CHAPS, 20mM Tris, pH7.4, 150mM NaCl, 0.1%BSA, 1mM PMSF, 2 μ g/ml aprotinin, 2 μ g/ml leupeptin, 1 μ g/ml pepstaninA) 中裂解1小时后, 裂解物于12,000g, 4 $^{\circ}$ C 离心10分钟, 收集裂解上清。

于4℃条件下,取含有约 10^7 个白细胞的裂解上清,与10 μ l预载有等量的GST或GST融合蛋白的glutathione-sepharose beads (Amersham Pharmacia Biotech公司),共孵育4小时。

孵育后,将glutathione-sepharose beads用清洗液(0.05% Triton X-100, 20 mM Tris, pH7.4, 150mM NaCl)清洗3遍后,以非还原1 \times SDS上样缓冲液煮沸洗脱,然后通过Western免疫印迹进行检测。

其中,所用的GST或GST融合蛋白,经表达纯化后通过Coomassie Blue染色进行定量。

3、免疫共沉淀和Western免疫印迹法

293 细胞通过磷酸钙法(Chen C., and Okayama H.. Mol. Cell. Biol. 1987; 7: 2745-2752)共转染进以下载体: pCMV-Naf1 载体, 编码 PSGL-1 野生型或突变型的载体或相应的表达载体。

转染 48 小时后,细胞用冰浴的1 \times PBS洗涤,并在冰浴的裂解缓冲液(1% Triton X-100, 50mM HEPES, pH 7.4, 150mM NaCl, 0.5mM EGTA, 10%甘油 (glycerol), 1mM PMSF, 2 μ g/ml aprotinin, 2 μ g/ml leupeptin, 1 μ g/ml pepstainA,) (在有关磷酸化的实验中,该裂解液中另外添加磷酸酶抑制剂 10mM NaF 和 1mM Na₃VO₄) 中裂解 1 小时,再将裂解物于 12,000g, 4℃离心 10 分钟,收集离心上清。上清与相应抗体及 protein A-sepharose beads (Amersham Pharmacia Biotech 公司),于 4℃孵育 6-8 小时,然后用清洗缓冲液(0.05% Triton X-100, 20mM Tris, pH7.4, 150mM NaCl)清洗 3 遍后,将免疫沉淀复合物或相应的细胞裂解液上清与还原性 1 \times SDS 上样缓冲液混合,煮沸 5 分钟,经由 SDS-PAGE 电泳后,电转到 PVDF 膜上,用相应的一抗和 HRP 标记的二抗去检测,最后采用 ECL 化学发光试剂盒(上海普飞生物技术有限公司)显色。

4、激酶活性测定

分离得到的人中性粒白细胞,在含 2%胎牛血清的 M199 培养基中饥饿 2 个小时,再用 10 μ g/ml 的人 IgG (hIgG) 或 P-selectin Rg (P-Rg) 在 22℃刺激 15 分钟后,于裂解液(配方同方法“免疫共沉淀和 Western 免疫印迹法”中所述)中裂解细胞,再用抗 PSGL-1 多抗(对照用免疫前兔 IgG)免疫共沉淀磷脂酰肌醇 3 位激酶 (PI3Ks), PI3K 激酶活性测定参照文献(Wallasch C., Weiss F.U., Niederfellner G., Jallal B., Issing W., and Ullrich A. EMBO. J. 1995; 14: 4267-75) 中的方法。

5、siRNA 抑制实验

5.1、HL-60 的 siRNA 转染

使用 Amaxa 公司的 Nucleofector Device (program T-19) 和 the Cell Line Specific Nucleofector Kit V (Amaxa, Cologne, Germany) 进行转染。其中, 退火 dsRNAi oligonucleotides (购自 Ambion, Austin, TX) 的转染浓度为 1 μ M, 其序列分别为:

S1: 5'-GGAGAAUCCCCGGCUGAAGTT-3' /3' -TTCCUCUUAAGGGCCGACUUC-5';

S4: 5'-GCUUUUGGAAGAGUCCCAGTT-3' /3' -CTCGAAAACCUUCUCAGGGUC-5'

其中, S4 能抑制内源的 Naf1 表达, S1 作为对照则不能抑制内源的 Naf1 表达。

转染 24 小时后, 收集细胞用于免疫共沉淀和 Western 免疫印迹、粘附实验和流式细胞分析。

5.2、293T 细胞转染

使用 LIPOFECTAMINE 2000 Reagent (Invitrogen 公司) 进行转染。其中, 退火 dsRNAi oligonucleotides 的转染浓度为 100 nM (其序列同 5.1, 分别为 S1 和 S4)。

转染 48 小时后, 收集细胞用于 Western 免疫印迹。

6、细胞粘附实验

人中性粒细胞或 HL-60 细胞在加或不加化合物 (用 DMSO 作对照) 的情况下, 用 10 μ g/ml hIgG 或 P-Rg 刺激, 然后将细胞加到预先铺有血纤蛋白原 (fibrinogen) 的 96 孔板中, 于 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 培养箱中放置 20 min。

当用抗体抑制时, 取 10 μ g P-Rg 先和 20 μ g 的 G1 F(ab')₂ 或者 20 μ g 的 PS1 F(ab')₂, 在 30 μ l 的 PBS 缓冲液 (1 \times PBS, 1mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂) 室温放置 15 分钟, 然后加到人中性粒细胞中; 或者人中性粒细胞预先和 10 μ g/ml 的 44a 和其亚形相配抗体 9E10 孵育。

当用化合物抑制时, 人中性粒细胞中在用 P-Rg 刺激前先和 0.1% DMSO, 25nM PP2, 150nM 渥曼青霉素 (Wortmannin) 或 10 μ M LY294002 在室温孵育 5 min。细胞粘附的操作参见文献 (Ma YQ, Plow EF, Geng JG. Blood. 2004;104:2549-2556) 所述的方法。

7、流式细胞仪分析

收集 HL-60 细胞或转染后的 HL-60 细胞, 用 1 \times PBS 洗一遍后, 重新悬浮于 PBS 缓冲液 (1 \times PBS, 0.5%BSA, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂), 并加入 10 μ g/ml 的 P-Rg 或 2 μ g/ml

的相应抗体；于 4℃ 孵育 1 小时后，再用 PBS 缓冲液洗一遍后，再重新悬浮于 PBS 缓冲液，加入 2 μg/ml 的相应 FITC 标记二抗；再于 4℃ 孵育 1 小时，用 PBS 缓冲液洗一遍后收集细胞重新悬浮于 PBS 缓冲液中，将细胞用于流式细胞仪分析(BD 公司的 FACScan®)。

8、TAT 融合蛋白表达与纯化

PSGL-1 的胞内区以人 PSGL-1 全长 cDNA 为模板，以下述引物对作为引物，PCR 扩增获得，其中，所用引物对的序列分别为：

5'-CTTATAATAGGATCCCGCCTCTCCCGCAAGGGCC-3'；

5'-TGGACCTGCAAGCTTCTAAGGGAGGAAGCTGTGC-3'；

人 PSGL-1 全长 cDNA 如 SEQ ID NO: 2 所示。

将获得的 PCR 产物，用 BamHI 和 HindIII 进行双酶切，并克隆到预先用 BamHI 和 HindIII 双酶切了的 pET30a (+) 载体 (Novagen) 中，构建的载体用来表达具有 6×His 的融合 PSGL-1 胞内区肽段 (PSGL-1 P)，PSGL-1 P 具有如 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列。

参照产品说明书，使用 MutanBEST Kit (TaKaRa) 将 Tat 序列 (YGRKKRRQRRR) 插进 pET30a (+) -PSGL-1-tail，所用引物对的序列分别为：

5'-AGACAGCGACGAAGAGACGACAAGGCCATGGCTGATA-3'；

5'-CCGCTTCTTCCTGCCATACACCAGACCAGAAGAATGATGA-3'；

所构建的载体被用来表达 Tat 和 6×His 融合的 PSGL-1 胞内区 (Tat-PSGL-1)，Tat-PSGL-1 具有如 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列。

Tat 和 6×His 融合的 PSGL-1 胞内区突变体 (Tat-PSGL-1 Mut) (其中, R345A, N346A, Y347A, P349A 为突变位点) 也是用 MutanBEST Kit (TaKaRa) 构建，所用引物对的序列分别为：

5'-GCTGCTGCCTCCGCCACCGAGATGGTCTGCATCTCA-3'；

5'-CACGGGGTACATGTGGCCCTTGCGGGAGAGGCG-3'。

Tat-PSGL-1 Mut 具有具有如 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列。

所构建载体通过测序验证，以确保构建结果正确。

融合多肽的表达和纯化依据 BD 公司操作手册 (BD TALON™ Metal Affinity Resins User Manual) 和文献 (Franken K.L., H.S. Hiemstra, K.E. Van Meijgaarden, Y. Subronto, J. Den Hartigh, T.H. Ottenhoff, and J.W. Drijfhout. *J.Exp.Med.* 2003; 197:63–75) 中的方法进行。

采用共聚焦显微技术, 检测融合多肽被细胞吸收情况。分离的小鼠中性粒白细胞和 FITC 标记的 PSGL-1 P, Tat-PSGL-1 或 Tat-PSGL-1 Mut 在 37℃ 孵育 30 分钟后, 固定细胞, 立即用共聚焦显微镜分析。

9、体内显微实验

雄性 C57 (体重约为 25 克/只), 静脉注射 PBS 或相应抗体或蛋白, 30 分钟后用 125mg/kg 氯胺酮 (ketamine), 12.5mg/kg 甲基噻嗪 (xylazine) 和 25μg/kg 硫酸阿托品 (atropine sulfate) 麻醉, 放于 37℃ 的保温板上, 并将其提睾肌剥出拉开, 用别针固定, 然后用倒置显微镜 (CK40-F200, Olympus) 观察 (20×物镜, 10×目镜)。观测方法如下:

选择直径为 20–40μm 的微静脉观察。将比血液中红细胞流动速度慢的滚动的白细胞定义为“滚动的白细胞”, 10 分钟内观察视野内所有的滚动细胞数除以 10 得到每个老鼠每分钟的平均滚动白细胞数。

将粘住超过 30 秒的白细胞定义为“粘附白细胞”, 计数 10 分钟内在约 150μm 长度的血管上粘附的细胞总数。

每只老鼠计数 3–5 个视野。

10、小鼠急性腹膜炎模型构建

Balb/c 小鼠 (6–8 周, 20g 体重) 用 1ml 3% 巯基乙酸培养基或生理盐水 (模型对照) 腹腔注射小鼠诱导急性腹膜炎, 2 小时后处死小鼠, 然后, 按照文献 (Yang K.K., Dorner B.G., Merkel U., Ryffel B., Schutt C., Golenbock D., Freeman M.W., and Jack R.S. *mice.J.Immunol.* 2002, 169: 4475–4480; Ajuebor M.N., Gibbs L., Flower R.J., Das A.M., and Perretti M. *Br.J.Pharmacol.* 1998,125: 319–326) 报道的方法, 计数腹腔中渗出的白细胞总数。

在肽段抑制或抗体对照实验中, 在注射巯基乙酸前 30 分钟, 采用尾静脉注射方式, 对实验小鼠注射肽段 (30μg/只) 或抗体 (10μg/只), 鼠 P-Rg (20μg/只)。

实施例1、酵母双杂交筛选与人PSGL-1胞内区结合的细胞内蛋白

参考 Clontech 公司的操作手册，将编码 PSGL-1 的胞内区 334—402 位氨基酸（序列如 SEQ ID NO: 3 所示）的 cDNA 片段克隆进载体 pAS2-1（Clontech 公司），构建重组质粒 pAS2-1-PSGL-1CT。

以该胞内区与 GAL4 的 DNA 结合结构域融合蛋白作为诱饵，应用 Clontech 公司的酵母双杂交系统（Matchmaker Two-Hybrid System），筛选人的白细胞 cDNA 文库，获得与人 PSGL-1 胞内区结合的细胞内蛋白。

根据激活 β -半乳糖苷酶报告基因和 His 报告基因的结果，得到了一些阳性克隆，然后对上述获得的这些阳性克隆进行测序分析。根据测序结果，其中一个克隆具有编码 Naf1 蛋白的部分序列。

又利用酵母 Y190 的上述报告基因共转空载体和无关蛋白作对照实验，结果如图 1 所示。

根据图 1 的结果，Naf1 和 PSGL-1 具有特异作用。

实施例 2、制备 Naf1

以 Human Leokocyte MATCHMAKER cDNA Library 文库（Clontech）作为模板，以 Naf1 forward 和 Naf1 reverse 作为引物，通过 PCR 制备全长 Naf1 cDNA 序列。

引物 Naf1 forward 和 Naf1 reverse 的序列如下：

Naf1 forward: 5'-TTACGGATCCATGGAAGGGAGAGGACCGTAC-3';

Naf1 reverse: 5'-CGCCAAGCTTAAATGACACAATCTGGTCTCACTG-3';

将获得的 PCR 产物以 BamHI 和 HindIII 双酶切，然后联接到同样经 BamHI 和 HindIII 双酶切的 pCMV-Tag 3B（Stratagene）载体，构建成带 c-myc-tag 的 Naf1 真核表达载体 pCMV-Naf1。

通过测序，确认 Naf1 cDNA 序列没有发生突变。

将全长 Naf1 cDNA 序列（序列为 SEQ ID NO: 1）连接入 pCEP4F 载体，构建成真核表达载体 pCEP4F-Naf1。

我们用细菌表达了 Naf1 全长和 His-tag 融合蛋白，然后，用该蛋白做抗原免疫兔子，得到了抗 Naf1 多抗，用该多抗检测了 HL-60 细胞和转染 Naf1（带 c-myc）的 293 细胞裂

解液，同时用抗 c-myc 的单抗 9E10 同时检测转染 Naf1 的 293 细胞裂解液，结果如图 2B 所示。

根据图 2B 的结果，该抗体特异识别转染 Naf1，HL-60 细胞内源表达 Naf1，同时用该多抗检测人中性粒细胞裂解液，也能测到人中性粒细胞表达 Naf1。

我们将克隆到的 Naf1 在 293 细胞内进行了表达，先用抗 FLAG 抗体将蛋白从细胞裂解液中免疫沉淀下来，然后用抗 Naf1 多抗免疫印迹检测免疫沉淀得到的蛋白，结果见图 2C。

根据图 2C 的结果，蛋白 Naf1 能在 293 细胞内表达，在还原条件下，Naf1 约为 80kDa。

实施例 3、Naf1 的功能

3.1、Naf1 和 PSGL-1 的结合位点

3.1.1、Naf1 和 PSGL-1 胞内区的结合具有特异性

利用含有 Naf1 序列的 GST 融合蛋白进行 pull-down 实验，结果见图 3A、3B。根据图 3A、3B 的结果，结合 GST-Naf1 的 beads 能从白细胞裂解物中将 PSGL-1 结合下来，而对照 GST 蛋白这不能。

该结果显示 Naf1 和 PSGL-1 胞内区的结合具有特异性。

3.1.2、Naf1 和 PSGL-1 胞内区在瞬时表达的哺乳动物细胞中能相互结合

在 293 细胞中共转染表达 PSGL-1 和 Naf1 或只转染表达 Naf1，用相应抗体进行免疫共沉淀试验，其中共转染表达 PSGL-1 和 Naf1 时，使用的抗体为兔 IgG、 α -PSGL-1，只转染表达 Naf1 时，使用的抗体为 α -PSGL-1、9E10，结果如图 3C 所示。

根据图 3C 的结果，用抗 PSGL-1 的抗体能将 Naf1 免疫共沉淀下来，而对照抗体则不能，只转染 Naf1 的细胞用抗 PSGL-1 的抗体和 9E10 做免疫沉淀作为免疫共沉淀对照，抗 PSGL-1 的抗体不能将 Naf1 从只转染 Naf1 的细胞中免疫共沉淀下来。

以上结果证明 Naf1 和 PSGL-1 胞内区在瞬时表达的哺乳动物细胞中能相互结合。

3.1.3、Naf1 和 PSGL-1 在正常生理状态下的相互作用

制备 HL-60 细胞裂解提取物，然后将 HL-60 细胞裂解提取物分别用抗 PSGL-1 兔源多抗和免疫前兔 IgG 做免疫沉淀并用 Western 分析，结果如图 3D 所示。

根据图 3D 的结果，抗 PSGL-1 多抗能将内源的 PSGL-1 及内源的 Naf1 免疫共沉淀下来，而对照免疫前兔 IgG 则不能。

进一步，在用 P-Rg 刺激的条件下做免疫共沉淀，结果如图 3E 所示。

根据图 3E 的结果，Naf1 和 PSGL-1 的结合不比人 IgG 对照增强。

上述结果说明，在正常生理条件下，Naf1 和 PSGL-1 是能相互结合的。

3.1.4、PSGL-1 胞内区与 Naf1 的结合的序列

对 PSGL-1 的胞内区进行缺失突变，将 PSGL-1 胞内区从 C 端向 N 端进行缺失突变，共构建了五个缺失突变体 (M1, M2, M3, M4, M5)，结果如图 3F 所示。

将这些缺失突变体和 Naf1 共转染进 293 细胞，然后进行免疫共沉淀实验，结果如图 3G 所示。

根据图 3G 的结果，M1, M2, M3 能将 Naf1 免疫共沉淀结合下来，而 M4 和 M5 则不能。

根据上述结果，可以推断出 PSGL-1 胞内区中 345 位到 351 位的 RNYSPTTE 序列，对 PSGL-1 和 Naf1 的结合是重要的。

3.1.5、PSGL-1 胞内区与 Naf1 的结合的关键位点

进一步对该序列进行点突变，将 345 位到 351 位的七个氨基酸分别突变为丙氨酸，构建了七个点突变体，结果见图 3H 所示。

然后，将点突变体和 Naf1 共转染进行免疫共沉淀实验，结果如图 3I 所示。

根据图 3I 结果，突变体 R345A, N346A, Y347A, P349A 不能将 Naf1 免疫共沉淀结合下来。

根据该结果，PSGL-1 胞内区 345, 346, 347, 349 位的氨基酸是 PSGL-1 和 Naf1 结合的关键位点。

3.1.6、Naf1 上对 PSGL-1 和 Naf1 结合关键的区段

对 Naf1 的 C 端进行缺失突变，结果如图 3J 所示。

这些缺失突变和 PSGL-1 免疫共沉淀的结果，结果如图 3K 所示。

根据图 3K 的结果，C3, C4, C5 突变体不能被 PSGL-1 的多抗免疫共沉淀下来，该结果显示第 17 个外显子对 PSGL-1 和 Naf1 结合起关键作用。

3.2、Naf1 中介导 PSGL-1 和 PI3K 的 p85 亚基的结合的关键结构域

3.2.1、体外 Naf1 介导 PSGL-1 和 PI3K 的 p85 亚基的结合

在 293 细胞中，共转染进表达 PSGL-1，p85 和 Naf1 的质粒载体或相应的对照空载体 pCMV，48 小时后裂解细胞。取细胞裂解液上清，分别用抗 PSGL-1 多抗或免疫前兔 IgG 免疫共沉淀，沉淀物用抗 p85 多抗免疫印迹检测，用 KPL-1 检测免疫沉淀下来的 PSGL-1，同时用抗 p85 多抗免疫印迹检测细胞裂解液上清中的 p85 作为对照，结果如图 4A 所示。

根据图 4A 结果，在共转染进表达 PSGL-1，p85 和 Naf1 的质粒载体的 293 细胞中，抗 PSGL-1 多抗能将 p85 免疫沉淀下来，而对照免疫前兔 IgG 则不能；在转染表达 PSGL-1，p85 和对照空载体 pCMV 的 293 细胞中，抗 PSGL-1 多抗则不能将 p85 免疫沉淀下来；用 KPL-1 检测，抗 PSGL-1 多抗能将 PSGL-1 免疫沉淀下来，而对照免疫前兔 IgG 则不能。

另一方面，293 细胞共转染进表达 p85 和 Naf1 的质粒载体或相应的对照空载体 pCMV，细胞裂解液上清用 9E10 或对照小鼠 IgG 做免疫共沉淀，免疫沉淀物分别用抗 p85 多抗和 9E10 检测，结果如图 4B 所示。

根据图 4B 的结果，9E10 能将 p85 免疫沉淀下来，而对照小鼠 IgG 则不能。同时，在共转染进表达 p85 和对照空载体 pCMV 的 293 细胞中，9E10 则不能将 p85 免疫沉淀下来。用 9E10 在 9E10 的免疫沉淀物中能检测到 Naf1，而对照小鼠 IgG 则不能将 Naf1 免疫沉淀下来。细胞裂解液上清直接用抗 p85 多抗检测 p85 的表达作为对照，各组间结果无明显差别。

以上结果直接证明了 Naf1 能作为转接蛋白，介导 PSGL-1 和 PI3K 的 p85 亚基的结合。

3.2.2、Naf1 中与 p85 的结合的关键结构域

将 Naf1 第 552 位的酪氨酸（Y）突变为 F（苯丙氨酸），构建 Naf1 的突变体，命名为 Naf1Y552F。

将该突变体和 p85 共转染进 293，用免疫共沉淀去检测，结果如图 4C 所示。

根据图 4C 的结果，Naf1 第 552 位的突变使 Naf1 失去了和 p85 结合的能力。

再将突变体 Naf1Y552F、p85、PSGL-1 共转染进 293 细胞，用抗 PSGL-1 多抗去免疫印迹检测，结果见图 4D。

根据图 4D 的结果,第 552 位的突变使 Naf1 失去了作为转接蛋白介导 PSGL-1 和 p85 结合的能力。

Naf1Y552F 突变体阻止了 552 位 Y 的磷酸化,因而该位点的磷酸化对于 Naf1 与 p85 的结合是关键。

3.3、人的中性粒细胞中, Naf1 第 552 位的酪氨酸磷酸化, 诱导 PSGL-1 和 PI3K 的 p85 的结合

3.3.1、在人的中性粒细胞中, Naf1 介导 PSGL-1 和 p85 的结合

分离人中性粒细胞后, 分别将人中性粒细胞和对照缓冲液 PBS (-), 10 μ g/ml 的人 IgG (hIgG) 或 P-selectin Rg (P-Rg) 在 37 $^{\circ}$ C 孵育 20 分钟, 用细胞裂解液裂解。取细胞裂解上清, 用抗 PSGL-1 多抗免疫共沉淀, 沉淀物用抗 p85 多抗免疫印迹检测, 结果见图 5A。

根据图 5A 的结果, p85 只有从 P-Rg 刺激后的中性粒细胞中才能免疫共沉淀下来(从图中可看出结合下来的 p85 量不多, 这和 p85 和细胞中很多蛋白都结合相一致), 而从加 PBS 或人 IgG 的中性粒细胞中不能被免疫共沉淀下来。抗 PSGL-1 多抗免疫沉淀下来的 PSGL-1 作为对照可以被 KPL-1 免疫印迹检测到, 细胞裂解上清直接用抗 p85 多抗免疫印迹检测作为对照。

在使用原髓样白血病细胞株 HL-60 重复上述实验时, 能完全重复上述实验的结果。

根据上述实验结果, 作为 P-selectin 配体的 PSGL-1, 和 P-Rg 结合后, 传递活化信号到细胞内将 PI3K 的 p85 亚基聚集并结合到其胞内区, 也就是说 P-selectin 能在人中性粒细胞中触发 PSGL-1/Naf1/p85 复合物的形成, 即在人的中性粒细胞中, Naf1 作为转接蛋白介导 PSGL-1 和 p85 的结合。

3.3.2、Naf1 第 552 位的酪氨酸磷酸化, 诱导 PSGL-1 和 p85 的结合

采用与实施例 3.3.1 相同的条件, 分别用人 IgG (hIgG) 或 P-selectin Rg (P-Rg) 刺激人中性粒细胞, 再将细胞直接用还原性上样缓冲液煮沸 5 分钟, 然后分别使用针对 Naf1 第 552 酪氨酸磷酸化的特异性单抗 3B8 和对照单抗 5C4 进行免疫检测, 结果如图 5B 所示。

根据图 5B 的结果, Naf1 第 552 位的酪氨酸磷酸化明显增强。

将人中性粒细胞用人 IgG 或 P-Rg 刺激 20 分钟后，用抗 PSGL-1 多抗或免疫前兔 IgG 从细胞裂解液上清中去免疫共沉淀 PI3K，然后去测免疫沉淀物的激酶活性，结果如图 5C 所示。

根据图 5C 的结果，当 P-Rg 刺激时，用抗 PSGL-1 多抗免疫沉淀下来的沉淀物的激酶活性比用人 IgG 刺激时增强，即 P-selectin 能增强人中性粒细胞中 PI3K 激酶的活性。

图 5D 为根据图 5C 的结果取三次实验结果的平均，标准偏差也同时标出（用 t-test 检验，其中 * 表示 $p < 0.05$ ）。

用 Src 激酶的特异抑制剂 PP2 先和细胞室温孵育 15 分钟，再用 P-Rg 刺激中性粒细胞 10 分钟，对照用其溶剂 DMSO，然后用 Naf1 的抗体将 Naf1 免疫沉淀下来。用抗 Naf1 第 552 酪氨酸磷酸化的特异单抗 3B8 免疫检测，同一张膜再用对照抗体 5C4 免疫检测，结果如图 5E 所示。

根据图 5E 的结果，PP2 能抑制 Naf1 第 552 位酪氨酸的磷酸化。

白细胞同上处理，细胞裂解后，用抗 PSGL-1 多抗免疫共沉淀，沉淀物用抗 p85 多抗免疫印迹检测，结果如图 5F 所示。

根据图 5F 的结果，当使用 PP2 抑制 Naf1 第 552 位酪氨酸的磷酸化时，同时也能抑制 P-selectin 诱导的 PSGL-1 和 p85 亚基的结合。

白细胞刺激后直接裂解，裂解液分别用 Src 抗体和抗 Src416 位酪氨酸磷酸化抗体免疫检测（能识别中性粒细胞中的 Hck, Lyn 的 416 酪氨酸磷酸化），结果如图 5G 所示。

根据图 5G 的结果，P-Rg 刺激能活化 Src 激酶。

上述实施例 3.3 中的实验结果显示，人的中性粒细胞中，Naf1 第 552 位的酪氨酸磷酸化，诱导 PSGL-1 和 PI3K 的 p85 的结合。

实施例 4、P-selectin 结合 PSGL-1，通过 Naf1 活化 p85，进而活化 $\alpha_M\beta_2$ 整合素

4.1、PI3K 参与从 P-selectin 到 $\alpha_M\beta_2$ 活化的信号通路

将 P-Rg 预先和 G1 F (ab')₂ (G1 是 P-selectin 向白细胞粘附的阻断性单体) 或 PS1 F (ab')₂ (PS1 是 P-selectin 向白细胞粘附的非阻断性单抗) 在 PBS 缓冲液 (1xPBS, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂) 室温孵育 15 分钟后，进行细胞粘附实验。

根据细胞粘附实验结果，G1 能中和 P-selectin Rg 诱导的活化（白细胞的粘附增强），而 PS1 则对 P-selectin Rg 诱导的活化没影响，说明该活化是 P-selectin Rg 和 PSGL-1 结合特异引导的。

将人中性粒细胞预先和44a（44a是 β_2 亚基的粘附阻断性单抗）或9E10（作为44a的亚型对照抗体）在PBS缓冲液（1xPBS, 1mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 ）室温孵育15分钟后，进行细胞粘附实验。

根据细胞粘附实验结果，44a能阻断人中性粒白细胞向固化的血纤蛋白原粘附的增强，而9E10没影响，证明 $\alpha_M\beta_2$ 在该过程中具有特异性。

当细胞预先和PI3K的特异性抑制剂wortmannin, LY294002和PP2孵育时，P-Rg诱导的人中性粒白细胞向固化的血纤蛋白原的粘附增强被抑制，对照DMSO没影响，说明PI3K参与从P-selectin到 $\alpha_M\beta_2$ 活化的信号通路。以上实验结果如图6A所示。

根据上述实验结果，P-selectin Rg能增加人中性粒白细胞或HL-60向固化的血纤蛋白原（fibrinogen）的粘附，而对照人IgG则不能。

4.2、Naf1 参与 P-选择素活化 $\alpha_M\beta_2$ 整合素的信号通路

在 HL-60 细胞中，分别转染 S1 和 S4 后，用相应抗体对 Naf1、PSGL-1、 α_M 、p85 和 tubulin 进行免疫印迹检测，结果如图 6B 所示。

根据图 6B 结果，当内源的 Naf1 表达被抑制下去时，PSGL-1, p85, α_M 的表达不受影响。

再用流式细胞术实验对其进行验证，结果如图 12 所示。

根据图 12 结果，在内源的 Naf1 表达被抑制下去时，HL-60 细胞表面的 PSGL-1 和 α_M 亚基的表达以及 P-Rg 和 PSGL-1 的结合不受影响。

同时，用 S1 和 S4 在 293T 细胞中也得到了和在 HL-60 中同样的抑制结果，结果如图 6B 所示。

在内源的 Naf1 表达被抑制下去时，用免疫共沉淀检测了 PSGL-1 和 p85 亚基的结合情况，结果如图 6C 所示。

根据图 6C 的结果，当内源的 Naf1 表达被抑制下去时，在 P-Rg 的刺激条件下，PSGL-1 和 p85 亚基的结合和对照相比明显减弱，和图 4A 的结果相一致，说明 Naf1 在 PSGL-1 和 p85 亚基的结合中起转接蛋白的作用。

在 HL-60 细胞中分别转染 S1 和 S4，再分别不刺激、P-Rg 刺激和 hIgG 刺激的情况下，进行细胞粘附实验，结果如图 6D 所示。

根据图 6D 的结果, 当 HL-60 细胞中的内源性 Naf1 被转染 S4 抑制下去时, P-Rg 刺激不能活化 $\alpha_M\beta_2$, 而转染对照 S1 的细胞则不受影响。

将 S4 和 Naf1 表达质粒共同转染 HL-60 后, 再进行细胞粘附实验。

结果显示, 相对于单转 S4 抑制 Naf1 后, 粘附细胞数有一定程度的恢复增加。

综合以上实验结果得出了以下结论: Naf1 作为转接蛋白介导 PSGL-1 和 p85 亚基的结合, 传递了从 PSGL-1 到 p85 的细胞内活化信号, 在 P-选择素活化 $\alpha_M\beta_2$ 整合素的信号通路中起重要作用。

实施例 5、Naf1 第 552 位酪氨酸的磷酸化对其传递 P-选择素活化 $\alpha_M\beta_2$ 整合素的信号起关键作用

参考操作手册, 使用 ViraPower lentiviral expression systems (invitrogen 公司), 将突变体 Naf1Y552F 构建成病毒颗粒, 同时构建带 LacZ 基因的病毒颗粒做为对照。将带 Naf1Y552F 的病毒颗粒感染 HL-60 细胞, 并检测了其表达, 结果如图 7A 所示。

根据图 7A 的结果, PSGL-1, p85, α_M 的表达不受 Naf1Y552F 过表达的影响。

并用流式细胞术实验进行了检测, 结果如图 10 所示。

根据图 10 的结果, 当 Naf1Y552F 过表达时, HL-60 细胞表面的 PSGL-1 和 α_M 亚基的表达以及 P-Rg 和 PSGL-1 的结合不受影响。

当在 HL-60 细胞中过表达 Naf1Y552F 时, 用免疫共沉淀检测了 PSGL-1 和 p85 的结合情况, 结果如图 7B 所示。

根据图 7B 的结果, 过表达的 Naf1Y552F, 能阻断 PSGL-1 和 p85 的结合。该结果说明, 突变体 Naf1Y552F 具有显性失活 (dominant-negative) 作用。

再用细胞粘附实验检测过表达 Naf1Y552F 的 HL-60 细胞上 $\alpha_M\beta_2$ 整合素的活化情况, 结果如图 7C 所示。

根据图 7C 的结构, 过表达 Naf1Y552F 的细胞, P-Rg 刺激不能增加细胞向铺有 fibrinogen 的板上的粘附, 过表达 LacZ 基因的 HL-60 细胞和正常细胞一样。该结果说明, 过表达 Naf1Y552F 时, 阻断了 P-选择素活化 $\alpha_M\beta_2$ 整合素的信号通路。

以上实验结果证明突变体 Naf1Y552F 能阻断 P-选择素活化 $\alpha_M\beta_2$ 整合素的信号通路, Naf1 第 552 位酪氨酸的磷酸化在该通路中起关键作用。

综合实施例 1-5 的结果，揭示了一条新的信号通路：P-选凝素结合 PSGL-1 引起 β_2 整合素的活化。PSGL-1 向胞内传递信号依赖其胞内区和 Naf1 的组成性结合，P-选凝素结合其配体 PSGL-1 后活化 Src 激酶，Src 激酶磷酸化 Naf1 YPPM 结构域上第 552 位的酪氨酸，磷酸化后的 YPPM 结构域能结合 PI3K 的 p85 亚基，通过 PI3K 最终从内到外传递信号使整合素 $\alpha_M\beta_2$ 和 $\alpha_L\beta_2$ 使处于活化状态。

由于，P-选择素介导的血小板与内皮细胞间，以及这些细胞与白细胞之间的细胞黏附，是炎症和血栓形成病理生理过程中的基本现象和共同过程。通过各种途径和药物抑制和调节 P-选择素及其介导的细胞黏附与作用，已证明可成为炎症和血栓性疾病的有效防治手段。同时，抗黏附治疗不失为一种防治手段，具有良好的临床应用价值和前景。而且， β_2 整合素的活化对于炎症及血栓性疾病中白细胞在血管内皮表面的粘附起着关键的作用。因此，根据实施例 1-5 的结果，可将蛋白 Naf1 和 PSGL-1 作为靶标用于筛选治疗炎症和/或血栓性疾病的药物以及用作炎症和/或血栓性疾病药物的药物靶标，筛选特异性抗体以及含有蛋白 Naf1 和/或 PSGL-1 的特异性抗体的、用于治疗炎症和/或血栓性疾病的药物，和以蛋白 Naf1 和/或 PSGL-1 为药物靶标的、用于治疗炎症和/或血栓性疾病的药物。

针对 Naf1 和/或 PSGL-1 设计肽段阻断此信号通路，很可能可以抑制 P-选凝素引起的 β_2 整合素的活化。以下实验即对该设想进行了验证。

实施例 6、PSGL-1 胞内区肽段的构建和表达

表达并纯化了 PSGL-1 胞内区的 6×His 融合多肽 (PSGL-1 P)，带有 HIV 病毒 Tat 序列的胞内区融合多肽 (Tat-PSGL-1) 和带有 R345A, N346A, Y347A, P349A 突变的胞内区融合多肽 (Tat-PSGL-1 Mut)，上述多肽的示意图见图 8A。

将上述多肽标记 FITC，然后和分离的小鼠中性粒细胞孵育，用共聚焦显微镜观察，结果如图 8B 所示。

根据图 8B 的结果，细胞能将带有 Tat 序列的融合多肽吞进细胞。

再用上述多肽分别结合人和小鼠中性粒细胞裂解液中的 Naf1，结果如图 8C，8D，8E 所示。

根据图 8C，8D 的结果，PSGL-1 P 和 Tat-PSGL-1 能将 Naf1 结合下来，而突变体 Tat-PSGL-1 Mut 则不能。根据图 8E 的结果，和 Tat-PSGL-1 Mut 相比，PSGL-1 P 和 Tat-PSGL-1 还能竞争白细胞裂解液中内源性的 PSGL-1 和 Naf1 的结合。

上述实验结果显示，表达的融合多肽 Tat-PSGL-1 具有进入细胞并结合 Naf1 的功能。

实施例 7、PSGL-1 胞内区肽段能在体外阻断 P-选择素活化 β_2 整合素

将上述肽段 (PSGL-1 P、Tat-PSGL-1 和 Tat-PSGL-1 Mut) 和分离的白细胞预先孵育, 然后进行细胞粘附实验, 结果如图 9A 所示。

根据图 9A 的结果, Tat-PSGL-1 能明显抑制 P-Rg 诱导的人中性粒白细胞向 fibrinogen 板上的粘附, 而 PSGL-1 P 因不能进细胞而没有抑制作用, Tat-PSGL-1 Mut 虽然能进细胞, 但不能阻断内源 PSGL-1 和 Naf1 的结合而没有抑制作用。

在小鼠中性粒白细胞和小鼠 fibrinogen 的板上重复了上述实验, 均获得了同样的结果, 如图 9B 所示。

做为对照, 多肽和细胞的孵育并不影响小鼠中性粒白细胞表面 PSGL-1 和 α_M 亚基的表达以及鼠 P-Rg 和 PSGL-1 的结合, 结果如图 11A, B, C 所示。

根据图 11A, B, C 的结果, P-Rg 刺激能增强人中性粒白细胞向 ICAM-1 板的粘附, 而这种增强能被 β_2 亚基的阻断抗体 IB4 完全阻断, α_M 和 α_L 的阻断抗体 CBRM1/5 和 38 都只能部分阻断, 当两种抗体共同作用时, 才能完全阻断, 而抗体亚型对照没有任何影响。以上结果说明, P-Rg 对 $\alpha_M\beta_2$ 和 $\alpha_L\beta_2$ 这两种整合素都能活化。

Tat-PSGL-1 能完全抑制 P-Rg 诱导的人中性粒白细胞向 ICAM-1 板上的粘附, 而对照 PSGL-1 P 和 Tat-PSGL-1 Mut 则没有影响, 以上结果如图 9C 所示。

上述实验结果, 显示 PSGL-1 信号通路对 $\alpha_M\beta_2$ 和 $\alpha_L\beta_2$ 的活化都起作用。

实施例 8、PSGL-1 胞内区肽段能在体内阻断 P-选择素活化 β_2 整合素

将 PSGL-1 胞内区融合多肽预先静脉注射入小鼠体内, 30 分钟后观察因手术引起的白细胞在血管壁上的滚动和粘附, 以 α_M 和 α_L 的阻断抗体 M1/70 和 M17/4 作为对照, 结果如图 9D 所示。

根据图 9D 的结果, 和对照小鼠相比, 融合多肽不影响白细胞的滚动, 而 Tat-PSGL-1 能明显减少血管壁上粘附的白细胞数, PSGL-1 P 和突变体 Tat-PSGL-1 Mut 则不影响粘附的白细胞。 α_M 和 α_L 的阻断抗体 M1/70 和 M17/4 不影响白细胞滚动, 对粘附有一定影响, 两者结合抑制效果较明显, 小鼠 P-selectin 的阻断性单抗 RB40.34 对滚动和粘附都有明显抑制作用, 亚型对照抗体则没有作用。

根据上述实验结果, 手术造成的白细胞的滚动和粘附是依赖于 P-selectin 的, 而且除可介导白细胞滚动的功能外, PSGL-1 还可以介导信号通路, 从而活化整合素, 因而在体内具有重要功能。

实施例 9、在小鼠急性腹膜炎模型中 PSGL-1 胞内区肽段能在体内阻断 P-选择素活化 β_2 整合素

进行小鼠急性腹膜炎模型实验，结果如图 9E 所示。

根据图 9E 的结果，在小鼠急性腹膜炎模型中，相对于对照 PSGL-1 P 以及突变体 Tat-PSGL-1 Mut，Tat-PSGL-1 能明显减少白细胞向腹腔的浸润，作为对照，M1/70 和 M17/4 共同注射和 RB40.34 也能明显减少白细胞的浸润，亚型对照抗体则没有作用。

上述实验结果说明，白细胞向腹腔的浸润依赖 α_M ， α_L 和 P-selectin。

根据上述实验结果，通过肽段 Tat-PSGL-1 特异性地抑制 PSGL-1 和 Naf1 的结合，从而阻断 PSGL-1 介导的整合素的活化，可以在体内抑制炎症反应。

实施例 10、P-选凝素恢复 P-选凝素敲除小鼠中的深静脉血栓

分别结扎 P-选凝素敲除小鼠和对照 C57 小鼠，以造深静脉血栓，2 天后检测血栓长度和重量，并根据血栓的质量长度比作图，结果如图 13 所示。

根据图 13 的结果，P-选凝素敲除小鼠中诱导出的深静脉血栓要比对照小鼠 C57 轻。

然后，将小鼠 P-Rg 和对照蛋白 12CA5 分别以静脉注射的方式注射进 P-选凝素敲除小鼠体内，然后结扎小鼠下腔静脉，以造深静脉血栓，2 天后检测血栓长度和重量，并根据血栓的质量长度比作图，结果如图 13 所示。

根据图 13 的结果，向 P-选凝素敲除小鼠中静脉注射 mP-Rg 后，小鼠的深静脉血栓得以恢复，而注射对照蛋白 12CA5 则没有恢复作用。

上述结果说明，P-selectin 在深静脉血栓中起重要作用，有可能针对其信号通路抑制深静脉血栓。

实施例 11、阻断性多肽抑制小鼠深静脉血栓

将多肽 Tat-PSGL-1 和突变多肽 Tat-PSGL-1 Mut 分别以静脉注射的方式注射进小鼠体内，然后结扎小鼠下腔静脉，以造深静脉血栓，2 天后检测血栓长度和重量，同时，以注射生理盐水的小鼠作为对照，并根据血栓的质量长度比作图，结果如图 14 所示。

图 14 的结果表明，体内注射肽段 Tat-PSGL-1 能明显抑制小鼠的深静脉血栓，而多肽 Tat-PSGL-1 Mut 对小鼠的深静脉血栓没有抑制作用。

综合实施例 6—10 的结果，阻断 PSGL-1 和 Naf1 结合后，在体内和体外都能阻断 P-selectin 所诱导的整合素活化，同时，在体内也能减弱炎症反应，并能抑制深静脉血栓的生成。这条信号通路具有重要的生理功能。该信号通路中的关键性蛋白，如 PSGL-1 和 Naf1，可作为筛选针对这条信号通路拮抗剂的靶标，从而研制获得炎症和/或血栓性疾病的药物。

另外，Naf1 上第 17 个外显子对 PSGL-1 和 Naf1 的结合起关键作用，因此，对于本领域的工作人员来说，针对该外显子设计阻断蛋白是显而易见的，例如，在 Naf1 的 594-626 位的氨基酸的基础上加上一个来自 HIV 病毒转录反式作用子的蛋白转导序列 (HIV Tat)，因此也是本发明所要求保护的。

序列表

<110> 中国科学院上海生命科学研究院

<120> 一种炎症和血栓药物的靶标, 以及针对该靶标的药物

<130> P5081028

<160> 6

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 2801

<212> DNA

<213> Human

<400> 1

```

agtgagccga ggagccttca tagggacagc cgcccctggt gcacacaccc tcgtattctc      60
ctgcccttcc ccagccaggc gggcaccacg gcaggggctg agctaccctc atggaaggga      120
gaggaccgta ccgatctac gaccctgggg gcagcgtgcc ctcaggagag gcatccgcag      180
cttttgagcg cctagtgaag gagaattccc ggctgaagga aaaaatgcaa gggataaaga      240
tgttagggga gcttttggaa gagtcccaga tggaaagcag caggctccgg cagaaggcag      300
aggagctagt gaaggacaac gagctgctcc caccacette tcctccttg ggctccttg      360
accccctggc tgagctcaca ggaaaggact caaatgtcac agcatctccc acagcccctg      420
catgccccag tgacaagcca gcaccagtcc agaagcctcc atccagtggc acctcctctg      480
aatttgaagt ggtcactcct gaggagcaga atcaccaga gagcagcagc catgccaatg      540
cgatggcgct gggccccctg ccccgtagg acggcaacct gatgctgcac ctgcagcgcc      600
tggagaccac gctgagtgtg tgtgccgagg agccggacca cggccagctc ttcaccacc      660
tgggccgcat ggccctggag ttcaaccgac tggcatcaa ggtgcacaag aatgagcagc      720
gcacctcat tctgcagacc ctgtgtgagc agcttcggaa ggagaacgag gctctgaagg      780
ccaagttgga taaggcctg gaacagcggg atcaggctgc cgagaggctg cgggaggaaa      840

```

atttgagct caagaagttg ttgatgagca atggcaacaa agagggtgcg tctgggcggc	900
caggctcacc gaagatggaa gggacaggca agaaggcagt ggctggacag cagcaggcta	960
gtgtgacggc aggtaaggtc ccagaggtgg tggccttggg cgcagccgag aagaaggtga	1020
agatgctgga gcagcagcgc agtgagctgc tggaagtga caagcagtgg gaccagcatt	1080
tccggtccat gaagcagcag tatgagcaga agatcactga gctgcgtcag aagctggctg	1140
atgtgcagaa gcaggtgact gacctggagg ccgagcggga gcagaagcag cgtgactttg	1200
accgcaagct cctcctggcc aagtccaaga ttgaaatgga ggagaccgac aaggagcagc	1260
tgacagcaga ggccaaggag ctgcgcaaaa aggtcaagta cctgcaggat cagctgagcc	1320
cactcaccgg acagcgtgag taccaggaaa aggagatcca gcggctcaac aaggccctgg	1380
aggaagcact gagcatccaa accccgccat catctccacc aacagcattt gggagcccag	1440
aaggagcagg ggccctccta aggaaacagg agctgggtcac gcagaatgag ttgctgaaac	1500
agcaggtgaa gatcttcgag gaggacttcc agagggagcg cagtgatcgt gagcgcata	1560
atgaggagaa ggaagagctg aagaagcaag tggagaagct gcaggcccag gtcaccctgt	1620
caaatgcca gctaaaagca ttcaaagatg aggagaaggc aagagaagcc ctgacacagc	1680
agaagaggaa agcaaaggcc tcaggagagc gttaccatgt ggagccccac ccagaacatc	1740
tctgcggggc ctaccctac gcctaccgc ccatgccagc catggtgcca caccatggt	1800
tcgaggactg gtcccagatc cgctaccccc ctcccccat ggccatggag caccgcccc	1860
cactcccaaa ctgcgcctc ttccatctgc cggaatacac ctggcgtcta ccctgtggag	1920
gggttcgaaa tccaaatcag agctcccaag tgatggaccc tcccacagcc aggcctacag	1980
aaccagagtc tccaaaaat gaccgtgagg ggcctcagtg agaccagatt gtgtcattg	2040
gctccacctt catcttgag agccagctga tctcagattg ccaagaaact agaagccact	2100
tgcacggtgt ggccagagcc tcagctggat gagaggctga gatgggtggc cagcttgat	2160

accagtcct gaactgagct gtttacagga ctggggaggc tccaccaga aggccttcat 2220
 ttgtactctg ctgggagtga ctgggaaaaa ctccttcct gctgctgagt ggagagaggc 2280
 ctcatccggc ttgaccac catccgttgc agaagcctcc aggagcagca atcctaagag 2340
 tgggaggcag ccaagacccc cttcctcaa aacctcccgg aagtggtttc aggcctcta 2400
 gttgccatga ccaatttgtg tgtgtgtta attttgcct caagctctgt agcaggacct 2460
 gccccacgca caccctacc cctctgtgag gagctgtggg aagtgtgggt ttgtctccag 2520
 aacagaagag aatgatggat attctggctc tggggcctc tccaccacca ctacagtag 2580
 cttgctgaa gccatcacag atgggagaag gccatgccag ccacgtccgc cgaggggccc 2640
 cagcctgaag ctgccaggcc ctgaggttca gaccctggac cccatagctg gaggcctgtg 2700
 gtgccagaag cccagattag ggtggctgtc catccctgga tagctatttg cacgaatcat 2760
 ggacataaat ccaagttgaa gaagaaaaa aaaaaaaaa a 2801

<210> 2
 <211> 2550
 <212> DNA
 <213> Human

<400> 2
 acacacagcc attgggggtt gctcggatcc gggactgccg cagggggtgc cacagcagtg 60
 cctggcagcg tgggctggga cttgtcact aaagcagaga agccacttct tctgggccc 120
 cgaggcagct gtccatgct ctgctgagca cgggtgtgcc atgcctctgc aactcctcct 180
 gttgctgac ctactgggcc ctggcaacag cttgcagctg tgggacacct gggcagatga 240
 agccgagaaa gccttgggtc ccctgcttgc ccgggaccgg agacaggcca ccgaatatga 300
 gtacctagat tatgatttcc tgccagaaac ggagcctcca gaaatgctga ggaacagcac 360
 tgacaccact cctctgactg ggcttggaac ccctgagtct accactgtgg agcctgctgc 420
 aaggcgttct actggcctgg atgcaggagg ggcagtcaca gagctgacca cggagctggc 480

caacatgggg aacctgtcca cggattcagc agctatggag atacagacca ctcaaccagc 540
agccacggag gcacagacca ctccactggc agccacagag gcacagacaa ctcgactgac 600
ggccacggag gcacagacca ctccactggc agccacagag gcacagacca ctccaccagc 660
agccacggaa gcacagacca ctcaaccac aggcctggag gcacagacca ctgcaccagc 720
agccatggag gcacagacca ctgcaccagc agccatggaa gcacagacca ctccaccagc 780
agccatggag gcacagacca ctcaaaccac agccatggag gcacagacca ctgcaccaga 840
agccacggag gcacagacca ctcaaccac agccacggag gcacagacca ctccactggc 900
agccatggag gccctgtcca cagaaccag tgccacagag gccctgtcca tggaacctac 960
taccaaaaga ggtctgttca tacccttttc tgtgtcctct gttactcaca agggcattcc 1020
catggcagcc agcaatttgt ccgtcaacta cccagtgggg gccccagacc acatctctgt 1080
gaagcagtgc ctgctggcca tcctaattctt ggcgctgggtg gccactatct tcttctgtgt 1140
cactgtgggtg ctggcgggtcc gcctctcccg caagggccac atgtaccccg tgcgtaatta 1200
ctccccacc gagatggtct gcattctcct cctgtttgcct gatgggggtg aggggcccctc 1260
tgccacagcc aatggggggcc tgtccaaggc caagagcccc ggccctgacgc cagagcccag 1320
ggaggaccgt gaggggggatg acctcacct gcacagcttc ctcccttagc tctctctgcc 1380
atctgttttg gcaagacccc acctccacgg gctctctctgg gccacccctg agtgcccaga 1440
ccccattcca cagctctggg cttctctgga gaccctggg gatggggatc ttcaggggaag 1500
gaactctggc cacccaaaca ggacaagagc agcctggggc caagcagacg ggcaagtgga 1560
gccacctctt tctccctcc gcggatgaag cccagccaca tttcagccga ggtccaaggc 1620
aggaggccat ttacttgaga cagattctct ctttttctct gtccccatc ttctctgggt 1680
ccctctaaca tctcccatgg ctctccccgc ttctctgggt cactggagtc tctcccat 1740
gtaccaagg aagatggagc tccccatcc cacacgact gcactgcat tgtcttttgg 1800

ttgccatggt caccaaacag gaagtggaca ttctaaggga ggagtactga agagtgacgg 1860
 acttctgagg ctgtttcctg ctgctcctct gacttggggc agcttgggtc ttcttgggca 1920
 cctctctggg aaaaccagg gtgaggttca gcctgtgagg gctgggatgg gtttcgtggg 1980
 cccaagggca gacctttctt tgggactgtg tggaccaagg agcttccatc tagtgacaag 2040
 tgacccccag ctatgcctc ttgccttccc ctgtggccac tttccagggt ggactctgtc 2100
 ttgttactg cagtatccca actgcaggtc cagtgcaggc aataaatatg tgatggacaa 2160
 acgatagcgg aatccttcaa gggttcaagg ctgtctcctt caggcagcct tcccgaatt 2220
 ctccatcct cagtgcagga tgggggctgg tctcagctg tetgccctca gccctggcc 2280
 cccaggaag cctctttcat gggctgttag gttgacttca gttttgcctc ttggacaaca 2340
 ggggtcttg tacatccttg ggtgaccagg aaaagttcag gctatggggg gccaaaggga 2400
 gggctgcccc tccccacca gtgaccactt tattccactt cctccattac ccagttttgg 2460
 cccacagagt ttgtcccc ccaaacctcg gaccaatc cctctaaaca tcaatctatc 2520
 ctctgttaa agaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2550

<210> 3
 <211> 69
 <212> PRT
 <213> Human

<400> 3

Arg Leu Ser Arg Lys Gly His Met Tyr Pro Val Arg Asn Tyr Ser Pro
 1 5 10 15

Thr Glu Met Val Cys Ile Ser Ser Leu Leu Pro Asp Gly Gly Glu Gly
 20 25 30

Pro Ser Ala Thr Ala Asn Gly Gly Leu Ser Lys Ala Lys Ser Pro Gly
 35 40 45

Leu Thr Pro Glu Pro Arg Glu Asp Arg Glu Gly Asp Asp Leu Thr Leu
 50 55 60

His Ser Phe Leu Pro
65

<210> 4
<211> 119
<212> PRT
<213> Human

<400> 4
Met His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser
1 5 10 15
Gly Met Lys Glu Thr Ala Ala Ala Lys Phe Glu Arg Gln His Met Asp
 20 25 30
Ser Pro Asp Leu Gly Thr Asp Asp Asp Lys Ala Met Ala Asp Ile
 35 40 45
Gly Ser Arg Leu Ser Arg Lys Gly His Met Tyr Pro Val Arg Asn Tyr
 50 55 60
Ser Pro Thr Glu Met Val Cys Ile Ser Ser Leu Leu Pro Asp Gly Gly
65 70 75 80
Glu Gly Pro Ser Ala Thr Ala Asn Gly Gly Leu Ser Lys Ala Lys Ser
 85 90 95
Pro Gly Leu Thr Pro Glu Pro Arg Glu Asp Arg Glu Gly Asp Asp Leu
 100 105 110
Thr Leu His Ser Phe Leu Pro
 115

<210> 5
<211> 102
<212> PRT
<213> Human

<400> 5
Met His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Tyr Gly Arg Lys
1 5 10 15

Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Asp Asp Lys Ala Met Ala Asp Ile Gly
 20 25 30

Ser Arg Leu Ser Arg Lys Gly His Met Tyr Pro Val Arg Asn Tyr Ser
 35 40 45

Pro Thr Glu Met Val Cys Ile Ser Ser Leu Leu Pro Asp Gly Gly Glu
 50 55 60

Gly Pro Ser Ala Thr Ala Asn Gly Gly Leu Ser Lys Ala Lys Ser Pro
 65 70 75 80

Gly Leu Thr Pro Glu Pro Arg Glu Asp Arg Glu Gly Asp Asp Leu Thr
 85 90 95

Leu His Ser Phe Leu Pro
 100

<210> 6

<211> 102

<212> PRT

<213> Human

<400> 6

Met His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Tyr Gly Arg Lys
 1 5 10 15

Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Asp Asp Lys Ala Met Ala Asp Ile Gly
 20 25 30

Ser Arg Leu Ser Arg Lys Gly His Met Tyr Pro Val Ala Ala Ala Ser
 35 40 45

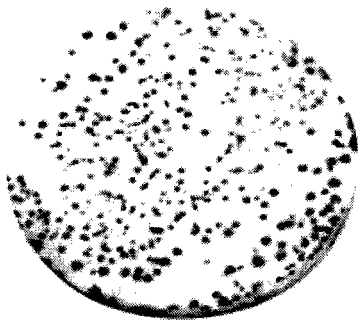
Ala Thr Glu Met Val Cys Ile Ser Ser Leu Leu Pro Asp Gly Gly Glu
 50 55 60

Gly Pro Ser Ala Thr Ala Asn Gly Gly Leu Ser Lys Ala Lys Ser Pro
 65 70 75 80

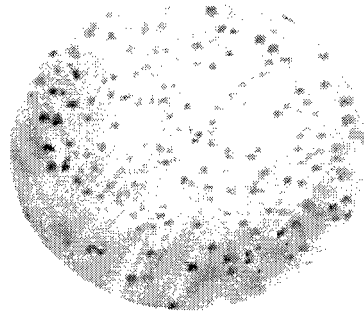
Gly Leu Thr Pro Glu Pro Arg Glu Asp Arg Glu Gly Asp Asp Leu Thr
 85 90 95

Leu His Ser Phe Leu Pro
 100

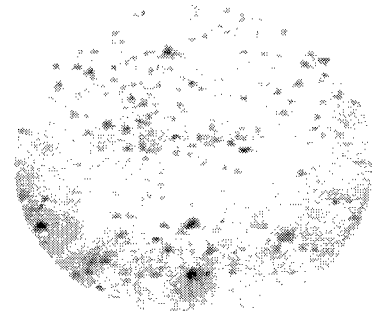
A



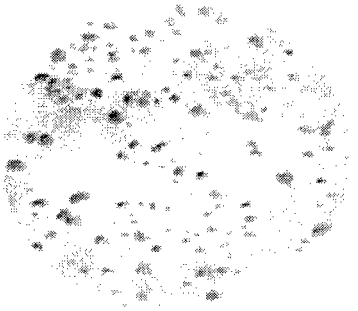
pCL1
-Leu



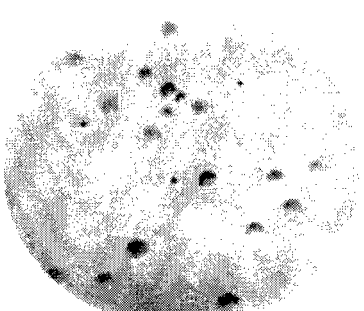
pACT2-Naf1 α
-Leu



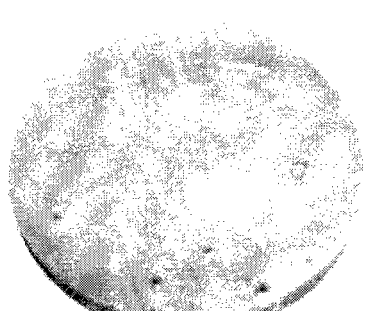
pAS2-1-PSGL-1CT
-Trp



pACT2-Naf1 α
pAS2-1
-Leu -Trp

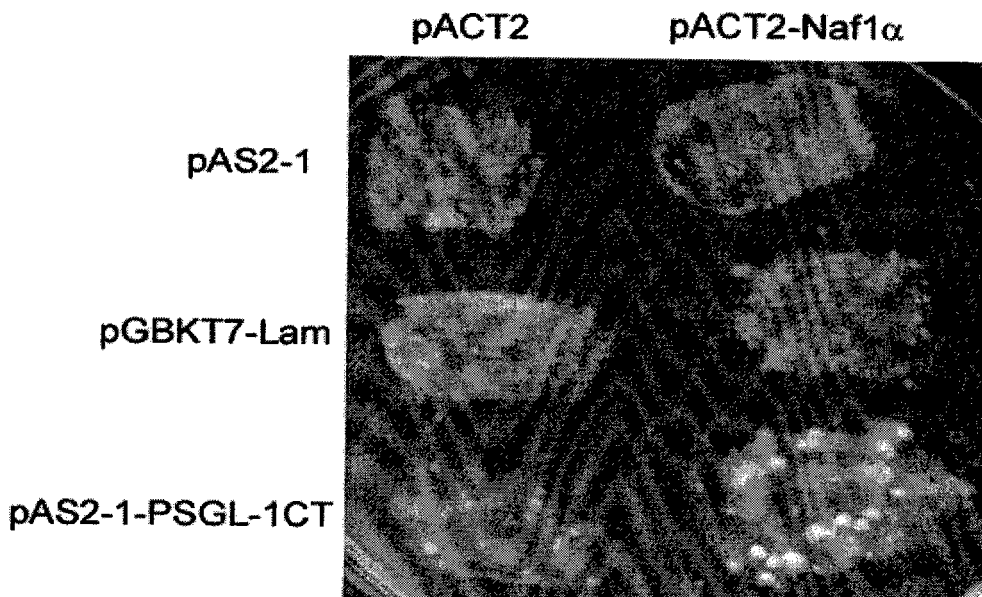


pACT2-Naf1 α
pGBKT7-Lam
-Leu -Trp



pACT2-Naf1 α
pAS2-1-PSGL-1CT
-Leu -Trp

B



-Leu, -Trp, -His, 20mM 3-AT

图 1

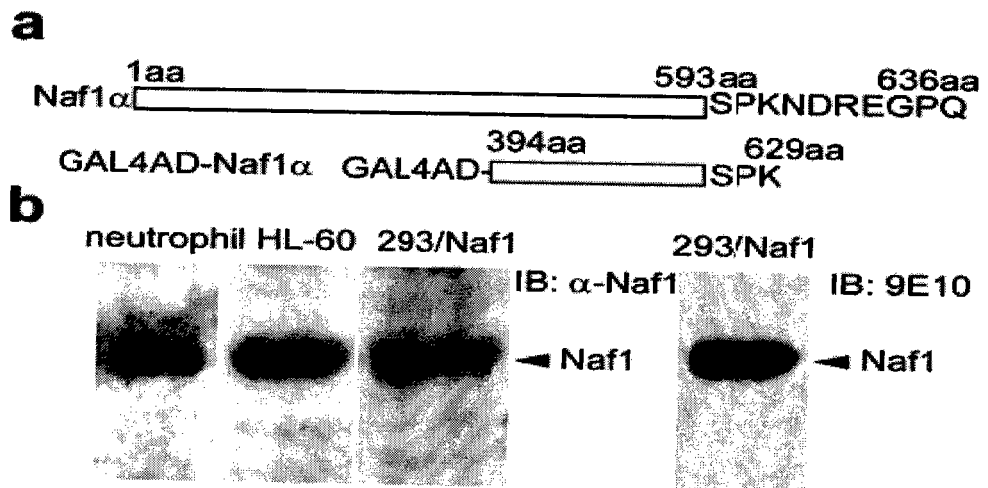


图 2

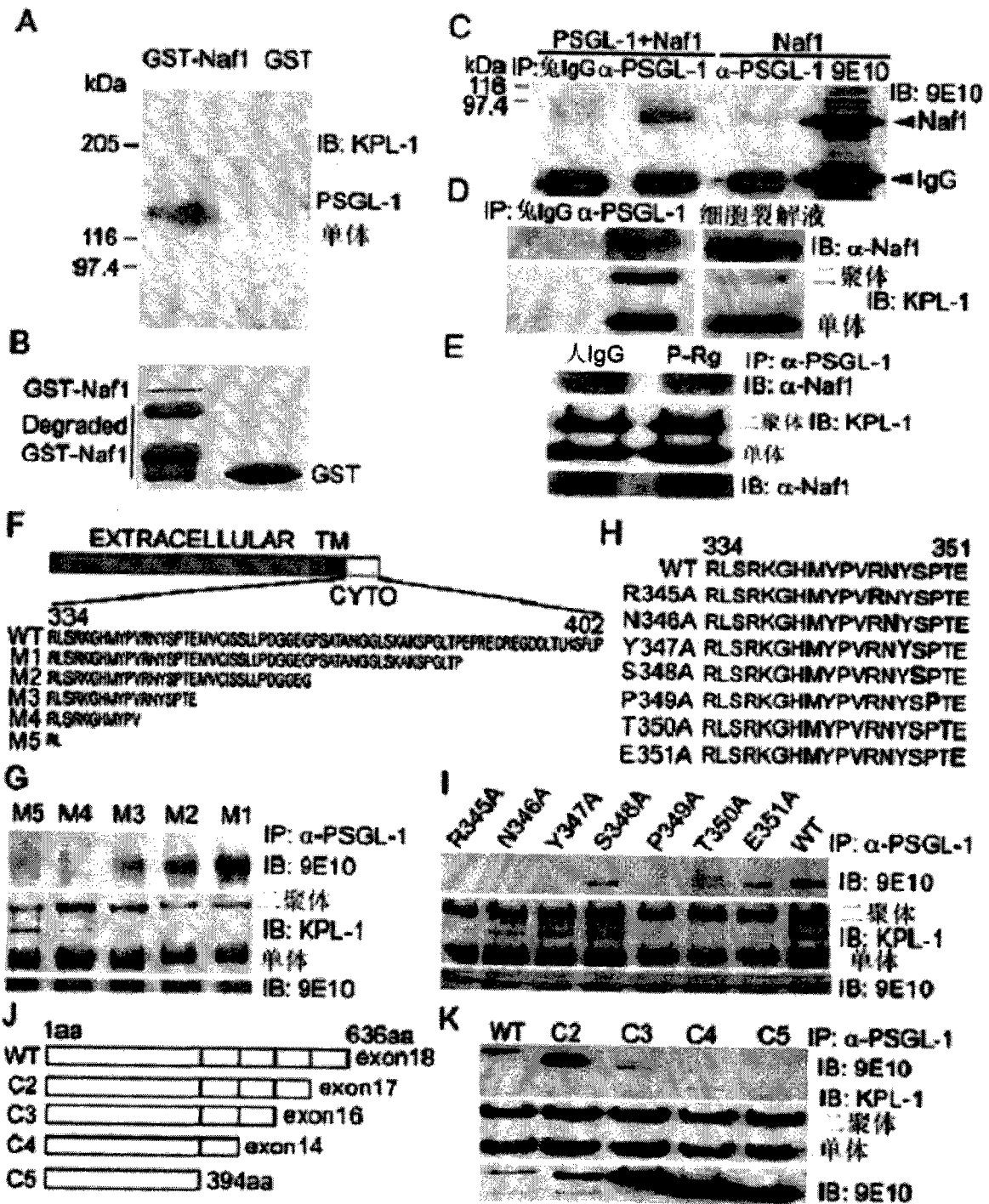


图 3

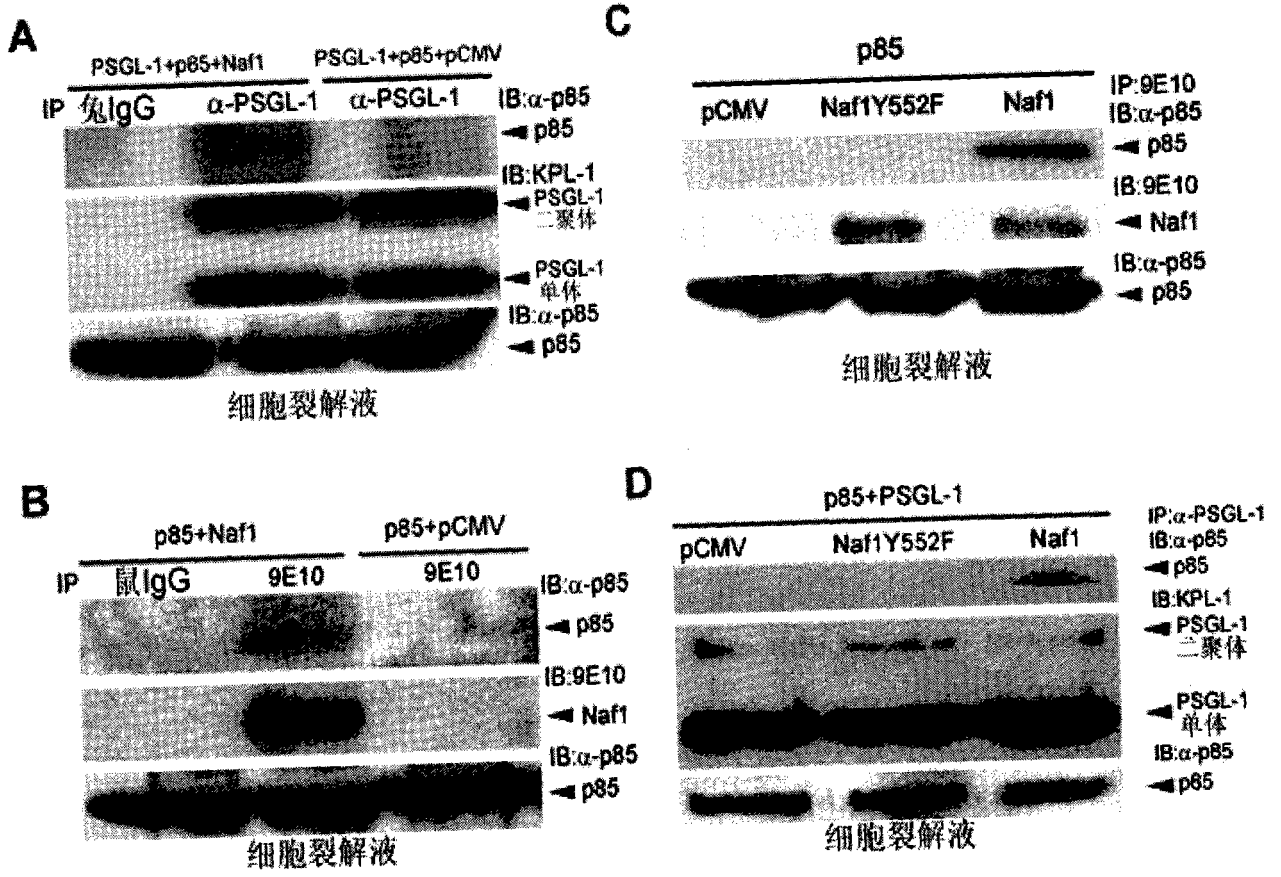


图 4

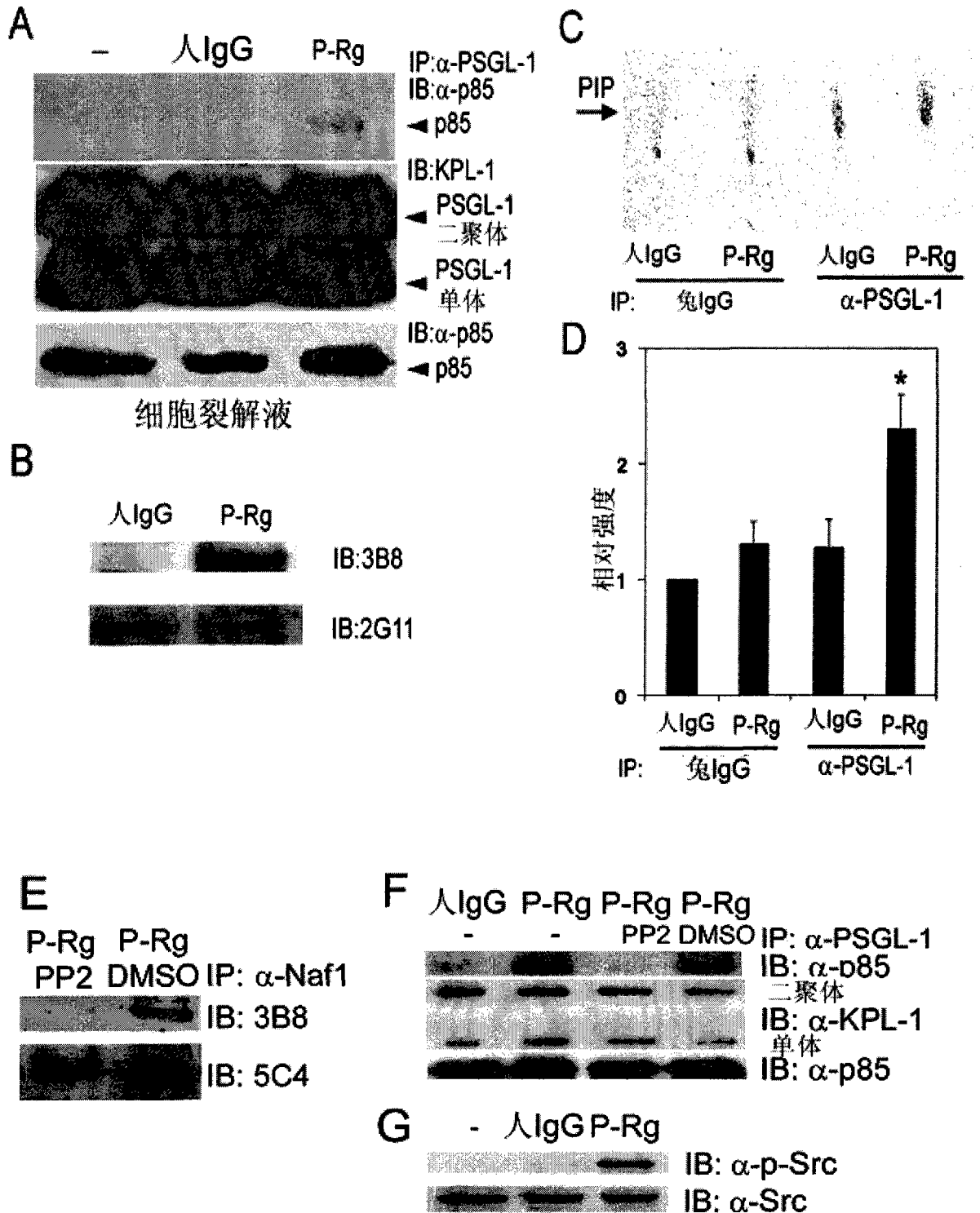


图 5

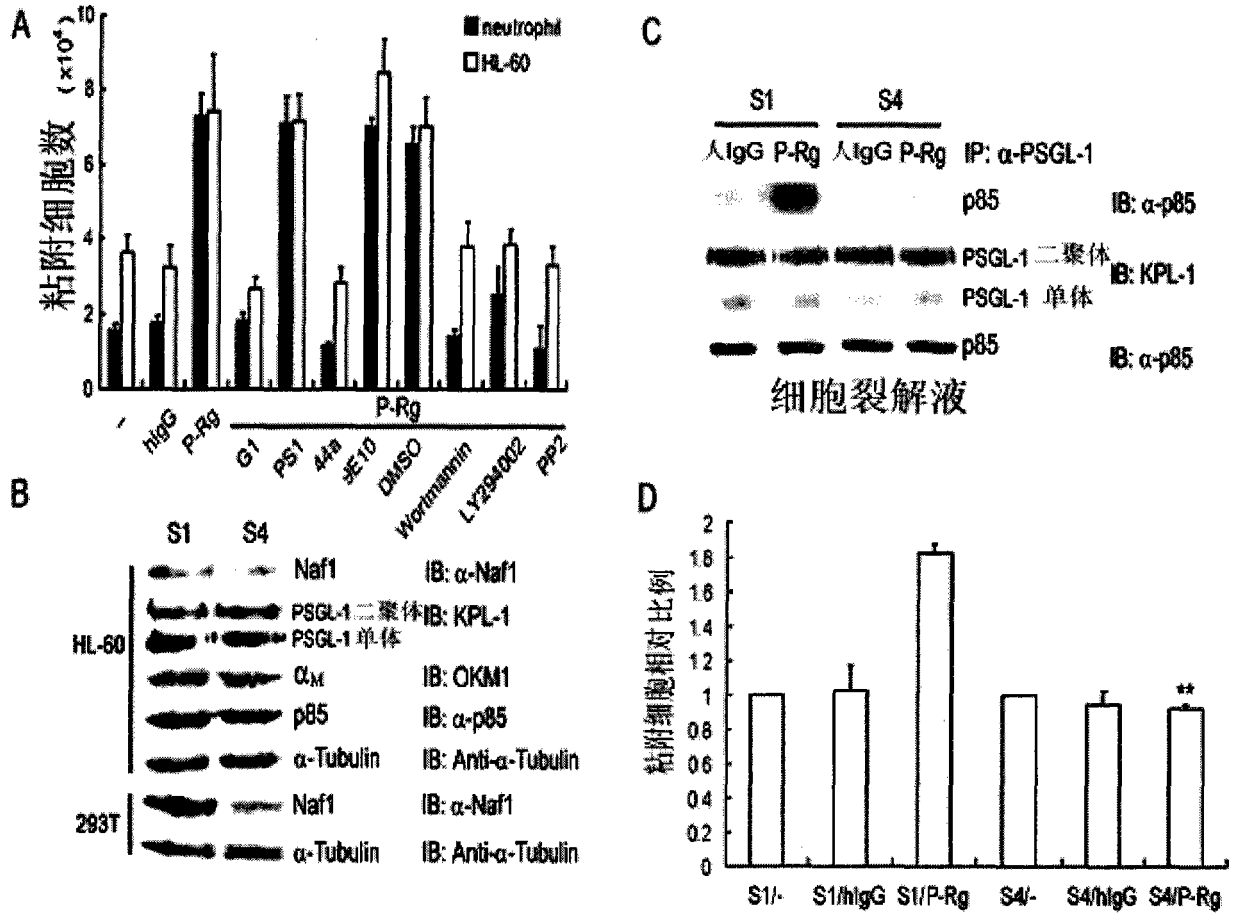


图 6

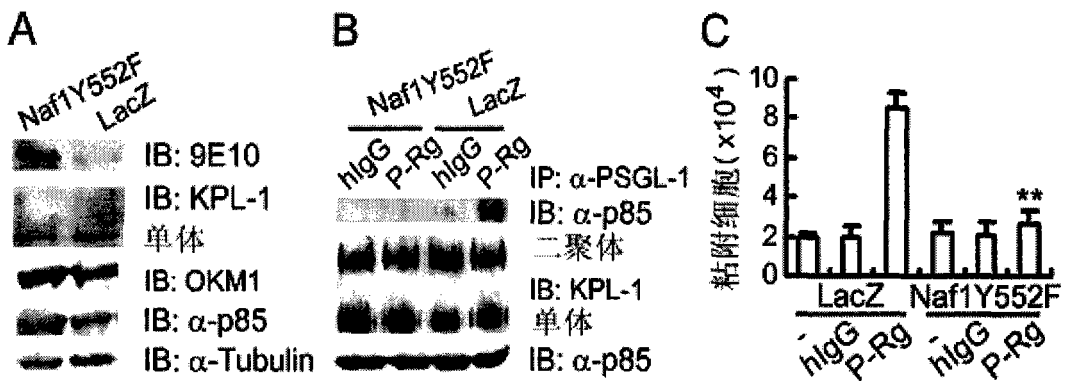


图 7

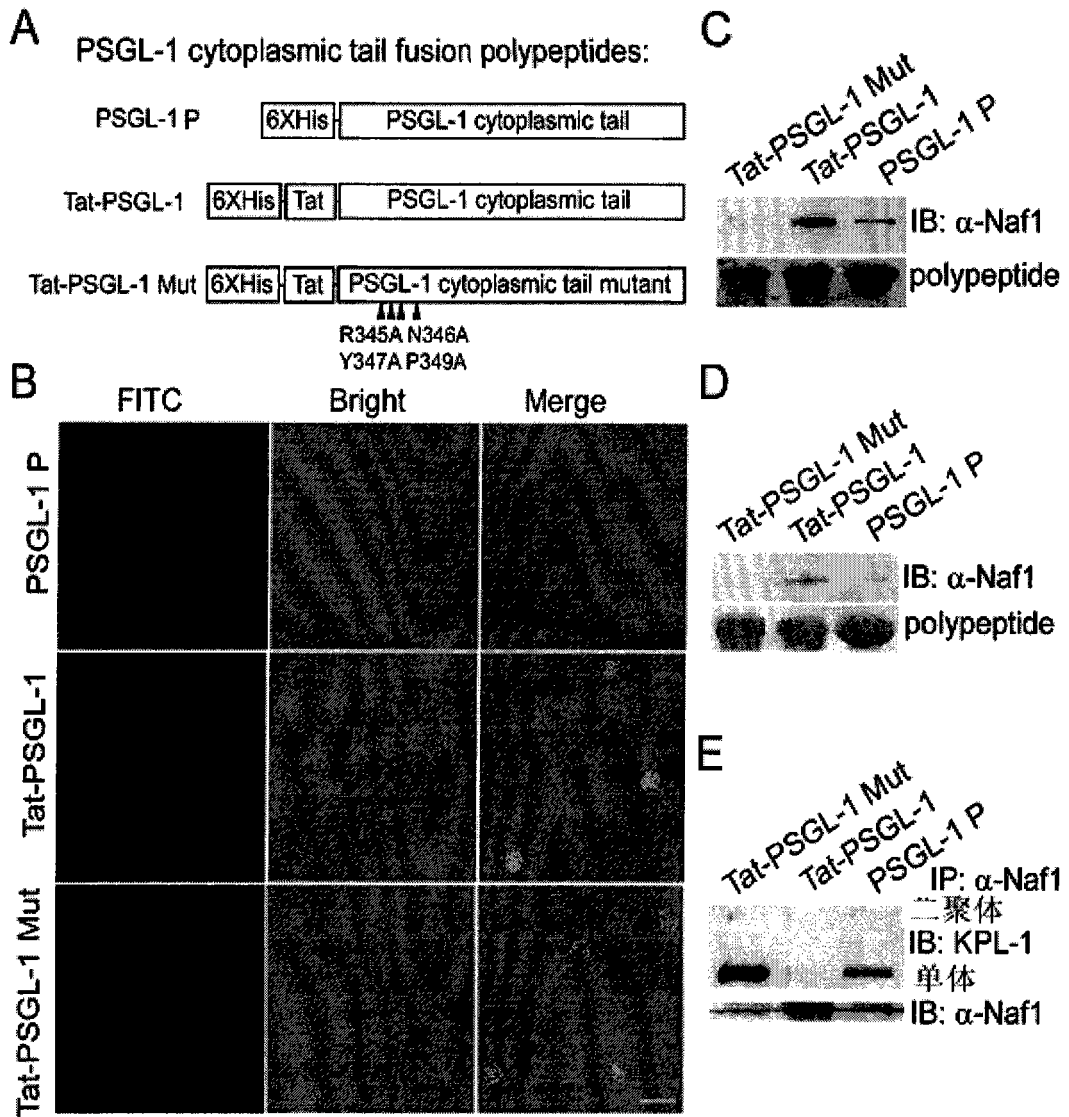


图 8

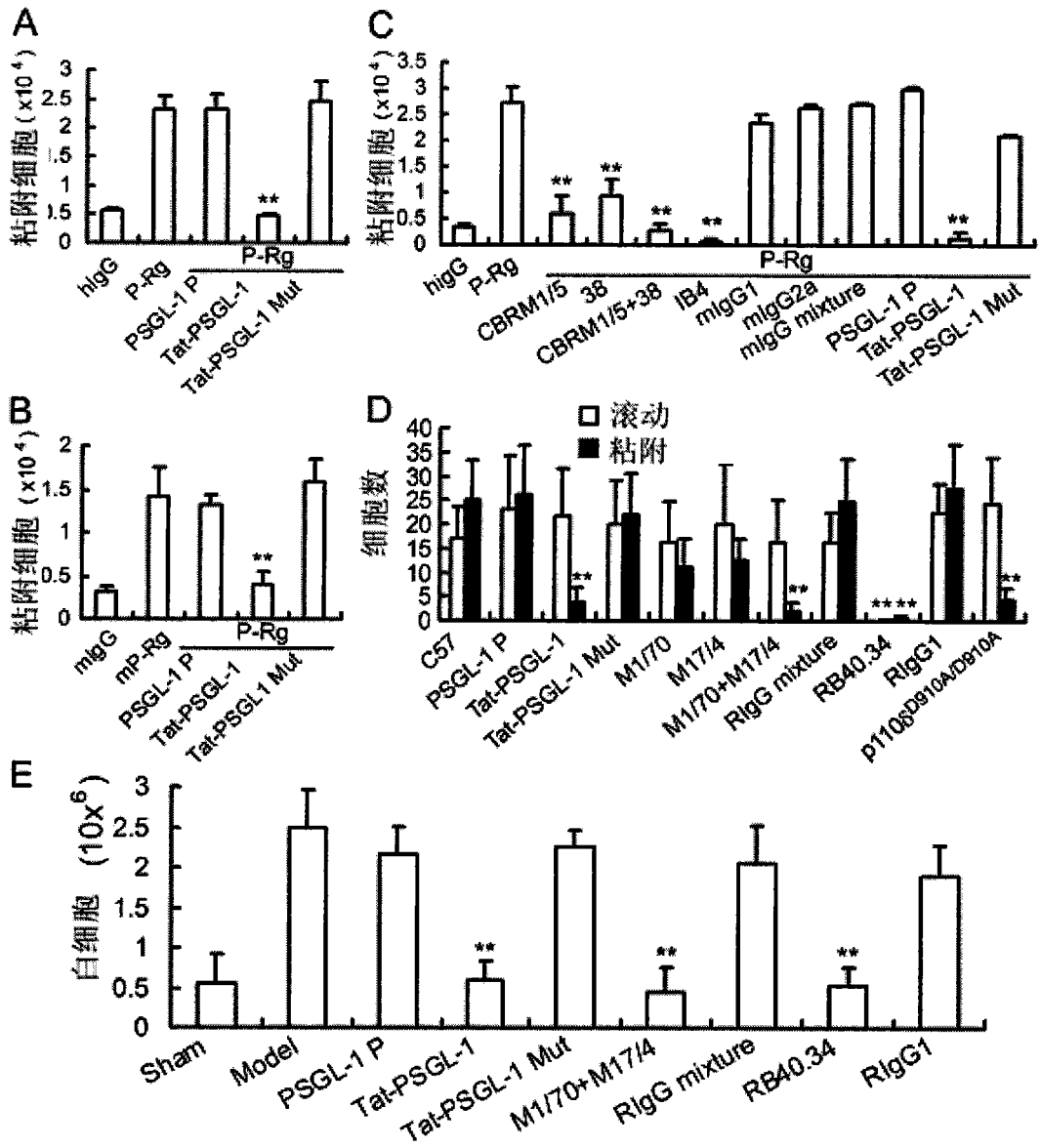


图 9

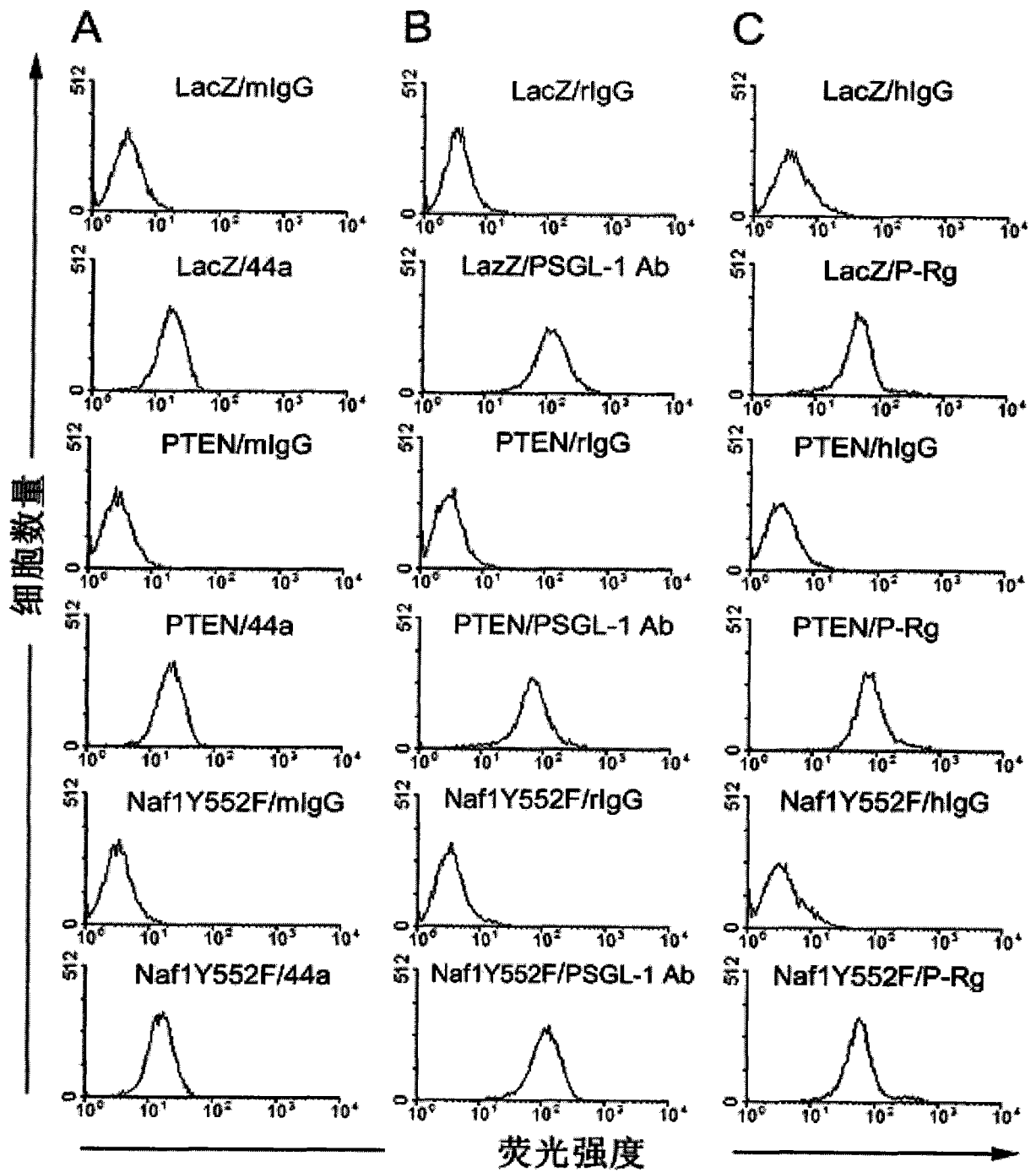


图 10

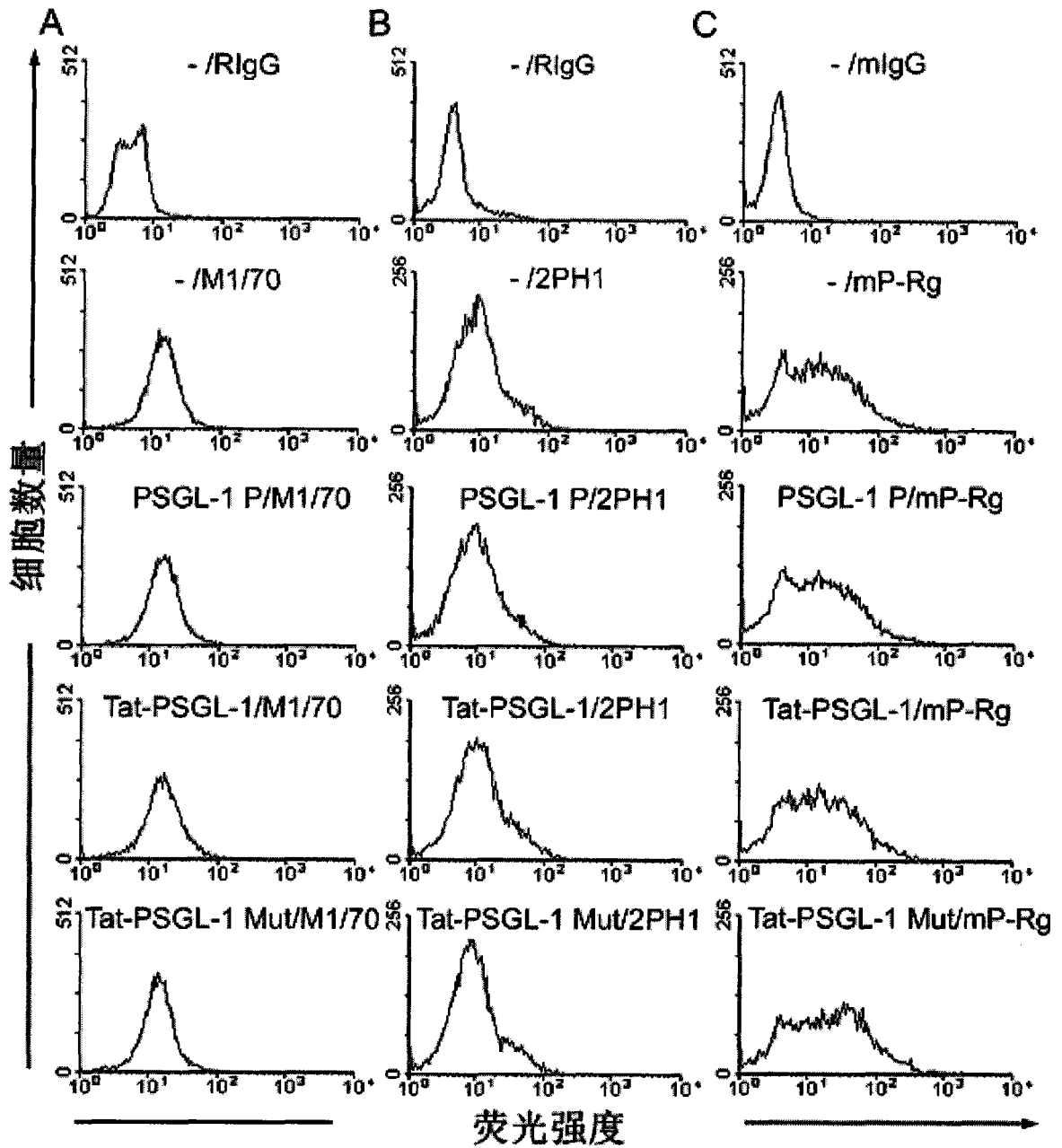


图 11

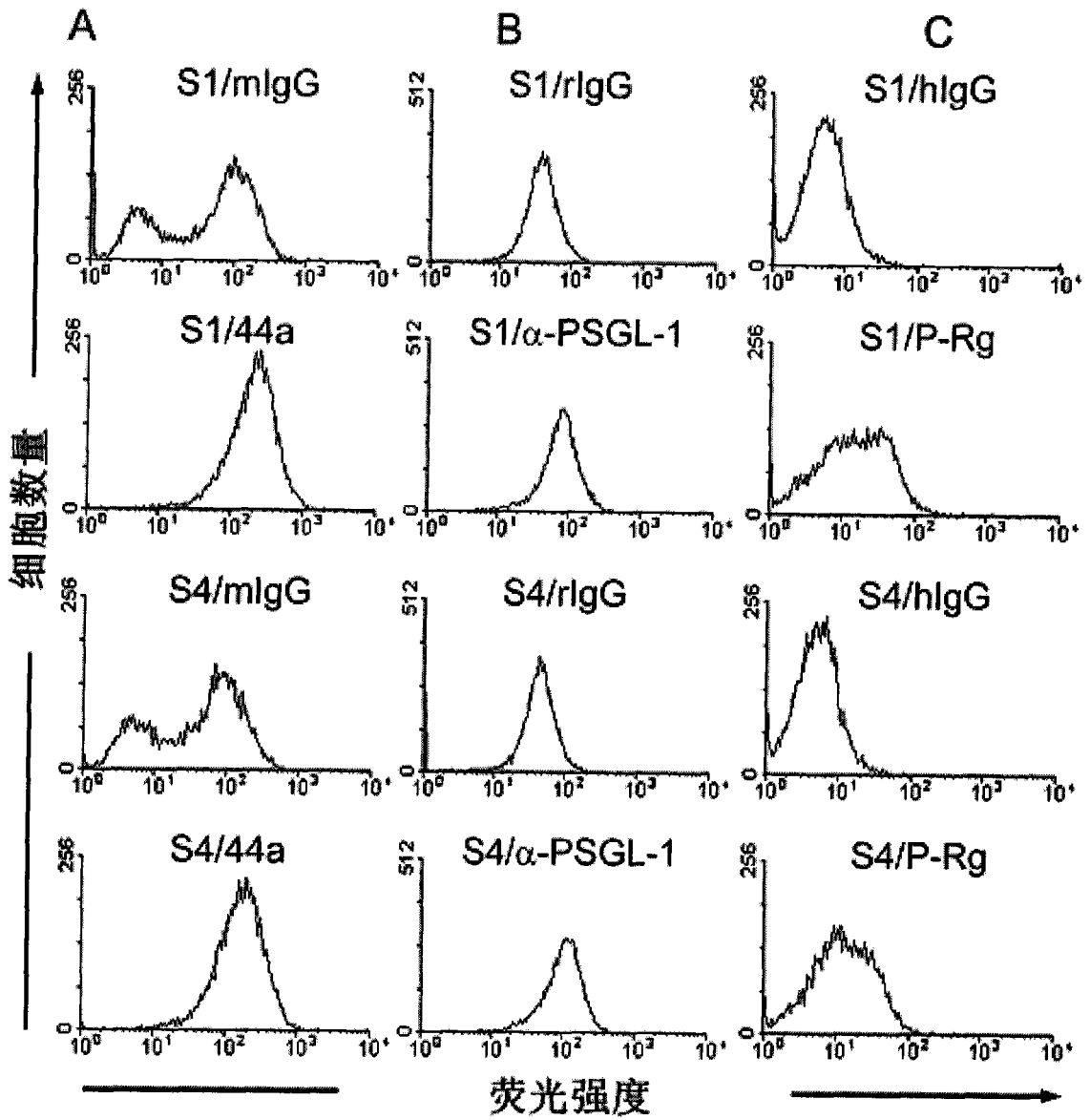


图 12

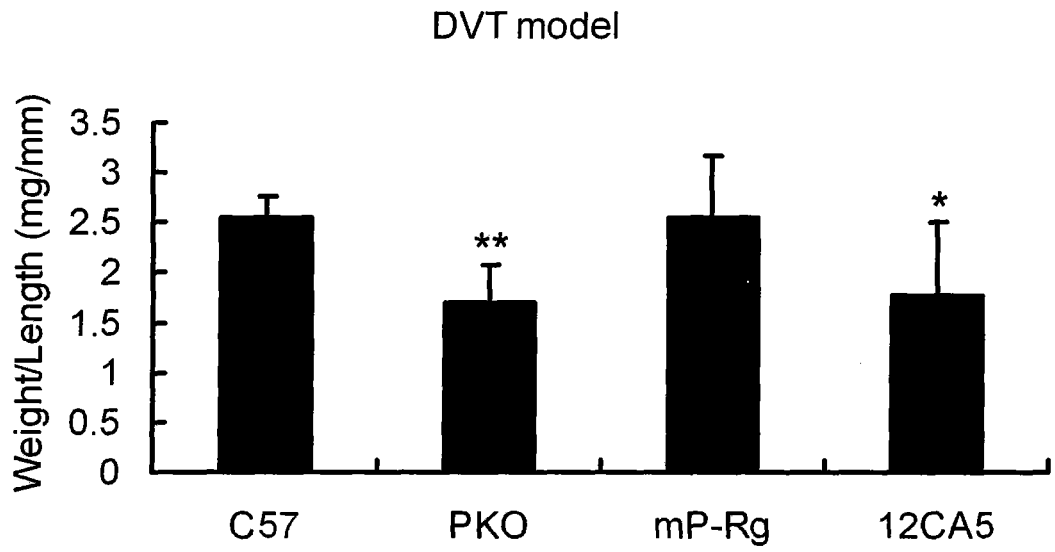


图 13

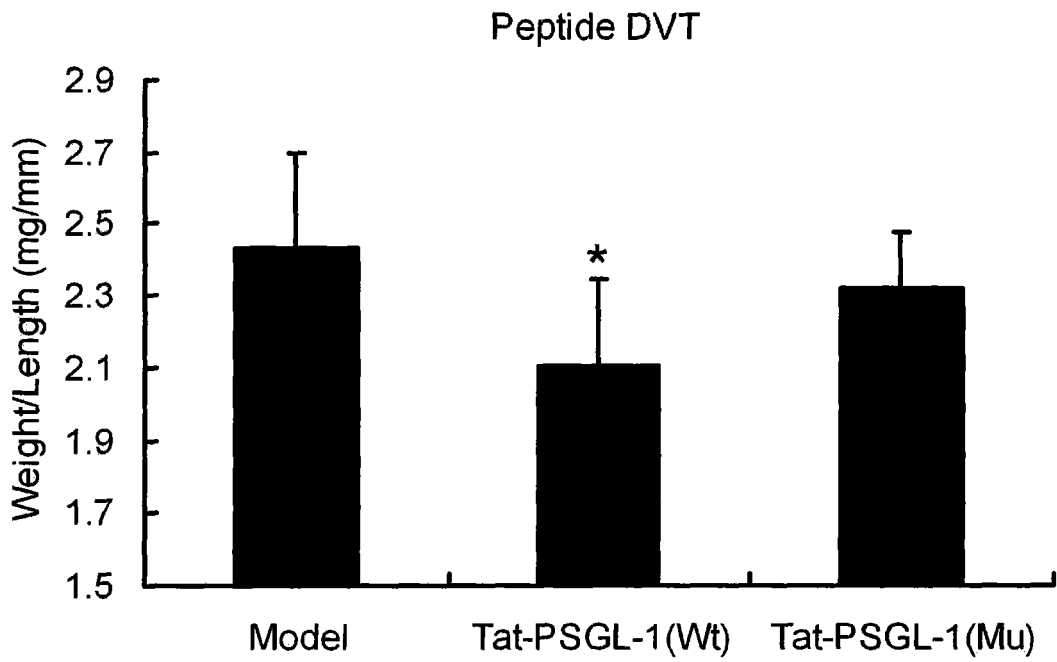


图 14

专利名称(译)	一种炎症和血栓药物的靶标,以及针对该靶标的药物		
公开(公告)号	CN101315385A	公开(公告)日	2008-12-03
申请号	CN200810098830.7	申请日	2008-05-15
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院上海生命科学研究院		
申请(专利权)人(译)	中国科学院上海生命科学研究院		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院上海生命科学研究院		
[标]发明人	耿建国 徐维丽 陈铭 王海波 王尽淘 张雷 徐涛		
发明人	耿建国 徐维丽 陈铭 王海波 王尽淘 张雷 徐涛		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/15 G01N33/53		
代理人(译)	缪利明		
优先权	200710041403.0 2007-05-29 CN		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了蛋白Naf1和/或PSGL - 1作为靶标用于筛选治疗炎症和/或血栓性疾病的药物以及用作炎症和/或血栓性疾病药物的药物靶标的用途, 蛋白Naf1和/或PSGL - 1的一种特异性抗体以及含有蛋白Naf1和/或PSGL - 1的特异性抗体的药物, 以及以蛋白Naf1和/或PSGL - 1为药物靶标的、用于治疗炎症和/或血栓性疾病的药物, 还提供了一种能阻断Naf1和PSGL - 1的胞内区结合的肽段以及上述肽段用于炎症和/或血栓性疾病药物的应用。本发明提供的肽段能减弱白细胞的粘附, 并能抑制体内的炎症反应, 同时, 也为免疫损伤、炎症、血栓形成及肿瘤转移等疾病的治疗提供新的方法。