

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2019 年 8 月 8 日 (08.08.2019)



(10) 国际公布号
WO 2019/149172 A1

(51) 国际专利分类号:
A61K 38/17 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/073451

(22) 国际申请日: 2019 年 1 月 28 日 (28.01.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201810112922.X 2018 年 2 月 5 日 (05.02.2018) CN

(71) 申请人: 中山大学 (SUN YAT-SEN UNIVERSITY)
[CN/CN]; 中国广东省广州市海珠区新港西路 135 号, Guangdong 510275 (CN)。

(72) 发明人: 王智 (WANG, Zhi); 中国广东省广州市越秀区陵园西路 56 号中山大学附属口腔医院, Guangdong 510055 (CN)。王茜 (WANG, Xi); 中国广东省广州市越秀区陵园西路 56 号中山大学附属口腔医院, Guangdong 510055 (CN)。房娟 (FANG, Juan); 中国广东省广州市越秀区陵园西路 56 号中山大学附属口腔医院, Guangdong 510055 (CN)。文书琼 (WEN, Shuqiong); 中国广东省广州市越秀区陵园西路 56 号中山大学附属口腔医院, Guangdong 510055 (CN)。

(74) 代理人: 北京知元同创知识产权代理事务所 (普通合伙) (BEIJING ORIGINTELLIGENCE IP LAW FIRM); 中国北京市海淀区上地三街 9 号嘉华大厦 E 座 1004 室刘元霞, Beijing 100085 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告 (条约第 21 条 (3))。
- 包括说明书序列表部分 (细则 5.2 (a))。

(54) Title: APPLICATION OF PIK3IP1 PROTEIN IN ADJUSTING T CELL REACTION AND PREPARING ANTI-TUMOUR DRUG

(54) 发明名称: PIK3IP1 蛋白在调节 T 细胞反应和制备抗肿瘤药物中的应用

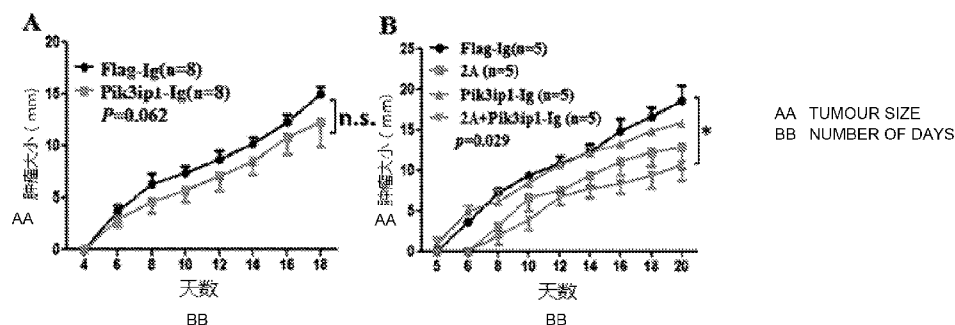


图 14

(57) Abstract: Provided are a method for a PIK3IP1 protein to adjust a T cell reaction for individual cancer treatment, a related application thereof, and a composition and a test kit product derived therefrom.

(57) 摘要: 本发明提供一种 PIK3IP1 蛋白在调节 T 细胞反应和用于个体癌症治疗的方法及其相关应用, 以及由此获得的组合物和试剂盒产品。

WO 2019/149172 A1

说明书

PIK3IP1蛋白在调节T细胞反应和制备抗肿瘤药物中的应用

本申请要求2018年2月5日向中国国家知识产权局提交的专利申请号为201810112922.X，发明名称为“PIK3IP1蛋白在调节T细胞反应和制备抗肿瘤药物中的应用”的在先申请的优先权。该在先申请的全文通过引用的方式结合于本申请中。

技术领域

本发明属于生物医药领域，具体涉及PIK3IP1蛋白在调节T细胞增殖、调控T细胞活化和制备抗肿瘤药物中的应用。

背景技术

T细胞是获得性免疫系统最核心的要素。根据T细胞表面的糖蛋白的不同，T细胞可以分为CD4⁺ T细胞和CD8⁺ T细胞。而循环性的CD4⁺和CD8⁺ T细胞在体内巡逻时可以区分这种蛋白是异物还是自身的多肽，外源性的蛋白会释放免疫系统处于危险的信号，导致T细胞激活，同时启动其他免疫细胞，然后杀死靶细胞。在对抗肿瘤免疫过程中，T细胞作为核心的执行者，首先被T细胞受体介导的抗原识别信号激活，同时众多的共刺激信号和共抑制信号精细调节T细胞反应的强度和质量，这些抑制信号即为免疫检查点。

在生理情况下，一方面参与维持对自身抗原的免疫耐受，避免自身免疫性疾病，另一方面避免免疫反应的过度激活对组织造成的损伤。肿瘤细胞可以通过免疫检查点，抑制T细胞激活，从而逃避免疫损伤。因此，通过不同方法增强T细胞的激活对肿瘤免疫治疗具有重要意义，其中针对免疫检查点的阻断是增强T细胞激活的有效策略之一。以免疫检查点阻断为代表的肿瘤免疫治疗与其它治疗的联合正在被日益关注。免疫系统可以识别肿瘤细胞表达的异常蛋白并将肿瘤细胞杀灭，但是在癌症患者身上，这个过程是有缺陷的。另外，肿瘤细胞可以调用其他多种机制逃避免疫系统的监视，也有一些肿瘤细胞会诱导调控T细胞限制细胞毒T细胞，导致其无法攻击肿瘤细胞。

机体的免疫反应受到多种类型免疫细胞、细胞因子等的调控，以抵御危险信号和外来抗原的攻击；T细胞在免疫应答过程中发挥了重要作用。调节机体免疫反应并维持自身抗原引起的免疫耐受，有赖于一个由共刺激和共抑制分子组成的复杂网络的参与。T细胞活化受协同信号网络的调控，这种调控贯穿于T细胞反应的全程。B7/CD28为代表的Ig超家族和TNF受体超家族的一些成员构成了T细胞共刺激分子的主体。这些协同信号通路的重要性在人类多种疾病中得到了证实，包括移植物抗宿主反应、自身免疫性疾病、感染和肿瘤。从数目众多的临床试验中可以看出，除了大家熟知的CTLA-4，越来越多的检查点调控分子及信号通路，如程序

性死亡分子（PD）-1和B7-H4通路被发现在多种疾病的治疗中发挥作用。近年来，新的检查点调控分子，如T细胞活化的V-区Ig抑制分子（VISTA）和B7-H6被陆续发现和证实。

负向关键调控因子近来成为肿瘤研究的前沿。近年来，抗体药物发展的另外一个新的方向是免疫检查点单抗，利用免疫检查点，肿瘤细胞可以抑制、削弱机体对肿瘤的免疫反应，可以通过抑制T细胞的活化来逃避免疫系统的攻击，而这种抗体可以激活T细胞、缩小肿瘤、提高病人生存率。这类受体包括CTLA-4和PD-1，当用单抗来阻断CTLA-4，PD-1或PD-L1，具有保护性的抗肿瘤免疫系统功能将会加强。2011年第一个免疫检查点抑制剂Yervoy获得FDA批准上市，用于治疗黑色素瘤；2014年9月，FDA通过加速批准程序批准了首个PD-1抑制剂Keytruda（pembrolizumab）上市，用于治疗不再对其他药物应答的晚期或无法切除的黑色素瘤。免疫检查点单抗（CTLA-4单抗、PD1/PDL1单抗）是肿瘤免疫治疗的最新成果，特别是在血液肿瘤和黑色素瘤方面，因具有良好的抗肿瘤活性，取得了重大的进展。Ipilimumab于2011年获批，针对转移性黑色素瘤的抗CTLA-4单抗，已被用于治疗晚期黑色素瘤，但是反应率低，抗CTLA-4治疗对患者有免疫毒性。MDX-1106，作为抗PD-1单抗，在临床上也是极具应用潜力的。研究表明MDX-1106的毒性比Ipilimumab低，但是在前列腺癌等癌症没有抑制肿瘤生长的能力，因为这些肿瘤并没有PD-L1的靶点。这说明，很多癌症仍存在一些关键的负向调控因子来破坏具有保护性的抗肿瘤免疫系统。

磷脂酰肌醇3激酶相互作用蛋白1（PI3K interacting protein1, PIK3IP1）是一个新近报道的能与磷脂酰肌醇3激酶（phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K）的p110亚基结合的蛋白，可以下调PI3K活性，抑制丝氨酸苏氨酸激酶（AKT， RAC-alpha serine/threonine-protein kinase）的活化。2012年，有研究报道了PIK3IP1蛋白可在T细胞上表达。通过在人白血病细胞系Jurkat和小鼠Th2细胞系D10细胞上过表达PIK3IP1蛋白，抑制了T细胞活化相关的转录信号分子NFAT、AP-1的活化。相反，用SiRNA在上述细胞系沉默掉PIK3IP1基因，能够增强Akt的磷酸化、促进T细胞的活化和IL-2的分泌。说明，新的PIK3IP1信号通路调控因子PIK3IP1可能抑制T细胞的活化。

发明内容

本发明发明人对PIK3IP1在常见的各组织、免疫细胞、肿瘤细胞系上等的表达进行了检测和分析。发现其在免疫细胞上表达较高，且表达强度与机体的免疫状态相关。尤其在T细胞有相对较特异的表达。机体的免疫反应受到一系列分子的调控，以保证机体抵御危险信号和外来抗原的攻击。其中，T细胞在维持体内免疫内稳态和免疫防御方面发挥了重要作用。

本发明对比研究了Pik3ip1敲除小鼠和野生型小鼠在经OVA抗原特异性免疫反应后T细胞的增殖情况，发现Pik3ip1敲除小鼠的T细胞的增殖能力强于野生型小鼠。说明在新抗原的急性刺激下，小鼠T细胞上Pik3ip1的表达对T细胞的增殖有抑制作用。

本发明对比研究了Pik3ip1敲除小鼠在MC38肿瘤模型中T细胞的反应和对肿瘤生长的影响。发现Pik3ip1缺失的T细胞在肿瘤抗原刺激下其增殖能力和IFN- γ 等效应分子分泌均强于野

生型小鼠。由此表明，在肿瘤抗原刺激下，小鼠T细胞上Pik3ip1的表达对T细胞反应有明显抑制作用，Pik3ip1表达降低可有效抑制肿瘤的生长。

本发明进一步研究了口腔鳞癌患者外周血淋巴细胞，同样发现，口腔鳞癌患者外周血CD4⁺和CD8⁺T细胞上PIK3IP1的荧光强度与其增殖能力呈负相关，即，CD4⁺和CD8⁺T细胞上PIK3IP1表达水平越高，相应细胞的增殖能力越弱。

此外，本发明发明人还具体研究了PIK3IP1ECD-Fc融合分子在体内可促进小鼠CD8⁺T细胞的增殖，并研究了PIK3IP1ECD-Fc融合分子单独使用或与4-1BB激活抗体2A（Anti-m4-1BB(2A)）联合应用对小鼠成瘤的免疫治疗效果。结果发现，PIK3IP1ECD-Fc融合分子和4-1BB激活抗体2A联合，能显著抑制肿瘤的生长。

在此基础上，本发明提出如下技术方案：

本发明的一个方面提供，PIK3IP1抑制剂在制备用于调控受试者免疫应答的药物中的用途。在本发明的一些实施方式中，所述PIK3IP1抑制剂选自PIK3IP1、PIK3IP1ECD和PIK3IP1ECD融合分子中的至少一个。在本发明的一些实施方式中，所述PIK3IP1抑制剂是能结合到PIK3IP1上的抗体，例如PIK3IP1的多克隆抗体或单克隆抗体。

PIK3IP1、PIK3IP1ECD、PIK3IP1ECD融合分子或PIK3IP1的抗体在制备用于调控受试者免疫应答的药物中的用途。

根据本发明，调控受试者免疫应答包括增强受试者免疫应答，例如增强受试者CD8⁺T细胞和/或CD4⁺T细胞的增殖。

作为本发明的一种实施方式，PIK3IP1抑制剂，例如，PIK3IP1、PIK3IP1ECD、PIK3IP1ECD融合分子或PIK3IP1的抗体，和抗原一同在制备用于增强受试者对抗原的免疫应答的药物中的用途，所述增强包括给受试者施用抗原和PIK3IP1抑制剂，例如，PIK3IP1、PIK3IP1ECD、PIK3IP1ECD融合分子或PIK3IP1的抗体，使得受试者对抗原的免疫应答得到增强。

根据本发明，所述抗原可以是癌性细胞、肿瘤抗原、病毒抗原、细菌抗原等。可以使用的抗原非限制性实例包括黑素瘤的抗原肽，诸如肽gp100、MAGE抗原、Trp-2、MART1和/或酪氨酸酶。在本发明的一个实施方式中，所述抗原是gp100，更优选为hgp100₂₅₋₃₃。在本发明的另一个实施方式中，所述抗原是OVA，更优选为OVA₂₅₇₋₂₆₄。在本发明的再一个实施方式中，所述抗原是癌性细胞，例如MC38细胞，B16细胞，B16-F10细胞等。

本发明的第二个方面提供，PIK3IP1抑制剂在制备免疫治疗肿瘤药物中的用途。在本发明的一些实施方式中，所述PIK3IP1抑制剂选自PIK3IP1、PIK3IP1ECD和PIK3IP1ECD融合分子中的至少一个。在本发明的一些实施方式中，所述PIK3IP1抑制剂是能结合到PIK3IP1上的抗体，例如PIK3IP1的多克隆抗体或单克隆抗体。

PIK3IP1、PIK3IP1ECD、PIK3IP1ECD融合分子或PIK3IP1的抗体在制备免疫治疗肿瘤药物中的用途。

根据本发明，PIK3IP1抑制剂，例如，PIK3IP1、PIK3IP1ECD、PIK3IP1ECD融合分子或

PIK3IP1的抗体通过增强用药者的免疫应答实现治疗肿瘤的效果。

根据本发明，PIK3IP1抑制剂，例如，PIK3IP1、PIK3IP1ECD、PIK3IP1ECD融合分子或PIK3IP1的抗体，可以抑制肿瘤细胞的生长。

根据本发明，不受特殊理论的限制，发明人推测在体内，PIK3IP1、PIK3IP1ECD或PIK3IP1ECD融合分子可能作为PIK3IP1的竞争性抑制剂阻断了PIK3IP1活化带来的T细胞增殖或活性的抑制作用。

PIK3IP1抑制剂，例如，PIK3IP1、PIK3IP1ECD、PIK3IP1ECD融合分子或PIK3IP1的抗体，还可以联合其他的肿瘤标准治疗方法，用于治疗肿瘤。

PIK3IP1抑制剂，例如，PIK3IP1、PIK3IP1ECD、PIK3IP1ECD融合分子或PIK3IP1的抗体，可以有效联合化疗方案，并有可能减少所施用的化疗剂的剂量。这种联合的一个例子是，PIK3IP1、PIK3IP1ECD、PIK3IP1ECD融合分子或PIK3IP1的抗体联合达卡巴嗪(decarbazine)来治疗黑素瘤。另一个例子是，PIK3IP1、PIK3IP1ECD、PIK3IP1ECD融合分子或PIK3IP1的抗体联合白介素-2(IL-2)来治疗黑素瘤。

PIK3IP1抑制剂，例如，PIK3IP1、PIK3IP1ECD、PIK3IP1ECD融合分子或PIK3IP1的抗体，和化疗剂联合使用的科学原理是，大多数化疗剂的细胞毒性作用使肿瘤细胞死亡，肿瘤细胞死亡导致抗原呈递途径中肿瘤抗原水平升高。通过细胞死亡带来与PIK3IP1抑制剂，例如，PIK3IP1、PIK3IP1ECD、PIK3IP1ECD融合分子或PIK3IP1的抗体协同作用的其它联合疗法还可以包括放射治疗、手术等。此外，血管发生抑制剂也可以与PIK3IP1、PIK3IP1ECD、PIK3IP1ECD融合分子或PIK3IP1的抗体联合，对血管发生的抑制同样能导致肿瘤细胞死亡，使肿瘤抗原进入抗原呈递途径。

肿瘤通过多种机制来规避宿主的免疫监视。可以通过抑制肿瘤表达的具有免疫抑制性的蛋白质的活性来解除这些机制，所述蛋白质包括例如TGF- β 和Fas配体等。针对这些蛋白质中的每一种的抗体也可以与PIK3IP1抑制剂，例如，PIK3IP1、PIK3IP1ECD、PIK3IP1ECD融合分子或PIK3IP1的抗体联合使用，以抵消肿瘤的免疫抑制效果并促进宿主的肿瘤免疫应答。

此外，能够激活宿主免疫响应性的其它抗体也可以与PIK3IP1抑制剂，例如，PIK3IP1、PIK3IP1ECD、PIK3IP1ECD融合分子或PIK3IP1的抗体联合使用。这些抗体包括树突细胞表面上激活DC功能和抗原呈递的分子。例如，抗CD40抗体能够有效提高T辅助细胞活性，可以与PIK3IP1抑制剂，例如，PIK3IP1、PIK3IP1ECD、PIK3IP1ECD融合分子或PIK3IP1的抗体联合使用。针对T细胞共刺激性分子诸如CTLA-4、OX-40、4-1BB和ICOS等的激活性抗体，也可以提高T细胞活性。

因此，本发明的一个实施方式提供，PIK3IP1抑制剂，例如，PIK3IP1、PIK3IP1ECD、PIK3IP1ECD融合分子或PIK3IP1的抗体，单独或者和另一种或多种治疗剂联合在制备治疗肿瘤药物中的用途。

根据本发明，所述另一种或多种治疗剂包括但不限于肿瘤化疗剂，能够活化T细胞的化合物，血管生成抑制剂等。

在本发明的一个具体实施方式中，所述另一种治疗剂是4-1BB的激活性抗体，例如4-1BB激活性抗体2A。

本发明的一个实施方式是提供，PIK3IP1、PIK3IP1ECD、PIK3IP1ECD融合分子或PIK3IP1的抗体和4-1BB的激活性抗体，例如2A，联合在制备治疗肿瘤的药物中的用途。

根据本发明，其中PIK3IP1、PIK3IP1ECD、PIK3IP1ECD融合分子或PIK3IP1的抗体以亚治疗剂量施用。

根据本发明，其中4-1BB的激活性抗体，例如2A，以亚治疗剂量施用。

根据本发明，其中PIK3IP1、PIK3IP1ECD、PIK3IP1ECD融合分子或PIK3IP1的抗体和4-1BB的激活性抗体，例如2A，各自以亚治疗剂量施用。

在某些实施方案中，可以PIK3IP1、PIK3IP1ECD、PIK3IP1ECD融合分子或PIK3IP1的抗体和抗体2A的治疗性组合与药学上可接受的载体混合作为单一组合物同时施用，或者可以将每种活性成分分别与药学上可接受的载体混合，作为分开的组合物同时施用。在另一个实施方案中，可以序贯施用PIK3IP1、PIK3IP1ECD、PIK3IP1ECD融合分子或PIK3IP1的抗体和抗体2A的组合，例如，先施用PIK3IP1、PIK3IP1ECD、PIK3IP1ECD融合分子或PIK3IP1的抗体后施用抗体2A，或者先施用抗体2A后施用PIK3IP1、PIK3IP1ECD、PIK3IP1ECD融合分子或PIK3IP1的抗体。另外，如果序贯施用超过一个剂量的联合疗法，可以在每次施用时颠倒序贯施用的次序或保持相同次序，序贯施用可以与同时施用或其任意组合联合。例如，第一次施用PIK3IP1、PIK3IP1ECD、PIK3IP1ECD融合分子或PIK3IP1的抗体和抗体2A的组合可以是同时的，第二次施用可以是序贯的，先施用PIK3IP1、PIK3IP1ECD、PIK3IP1ECD融合分子或PIK3IP1的抗体后施用抗体2A，而第三次施用可以是序贯的，先施用抗体2A后施用PIK3IP1、PIK3IP1ECD、PIK3IP1ECD融合分子或PIK3IP1的抗体等。另一种代表性的剂量给药方案可以包括第一次施用是序贯的，先施用抗体2A后施用PIK3IP1、PIK3IP1ECD、PIK3IP1ECD融合分子或PIK3IP1的抗体，而后续施用可以是同时的。

任选的是，PIK3IP1、PIK3IP1ECD、PIK3IP1ECD融合分子或PIK3IP1的抗体和4-1BB的激活性抗体，例如抗体2A的组合可以进一步联合其他免疫原剂，诸如癌性细胞、纯化的肿瘤抗原等。可以使用的免疫原剂的非限制性实例包括黑素瘤抗原的肽，诸如肽gp100、MAGE抗原、Trp-2、MART1和/或酪氨酸酶。

同样，PIK3IP1、PIK3IP1ECD、PIK3IP1ECD融合分子或PIK3IP1的抗体和4-1BB的激活性抗体，例如抗体2A的组合可以进一步联合标准的肿瘤治疗方法。例如，PIK3IP1、PIK3IP1ECD、PIK3IP1ECD融合分子或PIK3IP1的抗体和抗体2A的组合联合达卡巴嗪(decarbazine)治疗黑素瘤，PIK3IP1、PIK3IP1ECD、PIK3IP1ECD融合分子或PIK3IP1的抗体和抗体2A的组合联合白介素-2(IL-2)来治疗黑素瘤。

本发明的第三个方面是提供，一种药物组合物，其包含PIK3IP1抑制剂，例如，PIK3IP1、PIK3IP1ECD、PIK3IP1ECD融合分子或PIK3IP1的抗体，和药学上可接受的载体。

根据本发明，该药物组合物用于调控受试者的免疫应答。所述调控受试者免疫应答包括增强受试者免疫应答，例如增强受试者CD8⁺T细胞和/或CD4⁺T细胞的增殖。

根据本发明，该药物组合物用于治疗肿瘤。所述治疗肿瘤通过增强用药者的免疫应答，来实现抑制肿瘤生长的治疗效果。

根据本发明，所述药物组合物还可以以联合疗法的方式施用，即联合其他治疗剂，例如，其他的免疫调节剂或肿瘤治疗药物。

根据本发明，所述药物组合物还可以进一步含有另一种或多种治疗剂。所述治疗剂包括但不限于肿瘤化疗剂，能够活化T细胞的化合物，血管生成抑制剂等。

在本发明的一个具体实施方式中，所述另一种治疗剂是4-1BB的激活性抗体，例如抗体2A。

单剂量形式的药物组合物中活性成分的量，可以根据受试者及具体的给药途径而变化。一般而言，在药物组合物中，PIK3IP1抑制剂，例如，PIK3IP1、PIK3IP1ECD、PIK3IP1ECD融合分子或PIK3IP1的抗体的重量百分比为大约0.01%到大约99%，优选大约0.1%到大约70%，最优选大约1%到大约30%。

对于PIK3IP1抑制剂，例如，PIK3IP1、PIK3IP1ECD、PIK3IP1ECD融合分子或PIK3IP1的抗体，其剂量范围为大约0.0001-100mg/kg，更通常为0.01-5mg/kg体重。例如，剂量可以是0.3mg/kg体重、1mg/kg体重、3mg/kg体重、5mg/kg体重或10mg/kg体重或在1-10mg/kg的范围内。示例性的治疗方案可以是每周施用一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每月一次、每3个月一次或每3-6个月一次。对于PIK3IP1抑制剂，例如，PIK3IP1、PIK3IP1ECD、PIK3IP1ECD融合分子或PIK3IP1的抗体而言，优选的剂量方案包括经静脉内施用1mg/kg体重或3mg/kg体重，其利用下列剂量给药方案之一来给予：(i)每四周一次剂达六个剂量，然后每三个月一剂；(ii)每三周一剂；(iii)给予一次3mg/kg体重，随后每三周给予1mg/kg体重。

本发明药用组合物中活性成分的实际剂量水平可以变化，从而获得对于特定患者和给药途径能有效实现治疗性应答而对患者无毒的活性成分用量。选定的剂量水平将取决于多种药动学因素，包括给药途径，用药时间，药物代谢情况，所治疗患者的年龄、性别、体重、大体健康状态和既往病史等。

本发明的一个实施方式还提供，包含PIK3IP1、PIK3IP1ECD、PIK3IP1ECD融合分子或PIK3IP1的抗体和4-1BB的激活性抗体，例如抗体2A的药物试剂盒。

该试剂盒还可以进一步包含用于治疗肿瘤的说明书。

在本发明的一个具体实施方案中，所述药物试剂盒中将PIK3IP1、PIK3IP1ECD、PIK3IP1ECD融合分子或PIK3IP1的抗体和4-1BB的激活性抗体，例如抗体2A以单位剂量形式共同包装。

在本发明的另一个具体实施方案中，所述药物试剂盒中分别将PIK3IP1、PIK3IP1ECD、PIK3IP1ECD融合分子或PIK3IP1的抗体和4-1BB的激活性抗体，例如抗体2A以各自的单位剂量形式分别包装。

本发明的第四个方面是提供，一种调控受试者免疫应答的方法，其包括给受试者施用PIK3IP1抑制剂，例如，PIK3IP1、PIK3IP1ECD、PIK3IP1ECD融合分子或PIK3IP1的抗体，使得受试者的免疫应答得到调控。优选的是，PIK3IP1抑制剂，例如，PIK3IP1、PIK3IP1ECD、PIK3IP1ECD融合分子或PIK3IP1的抗体，增强、刺激或增加受试者的免疫应答。

根据本发明，所述增强、刺激或增加受试者的免疫应答包括但不限于，促进CD4⁺T细胞和/或CD8⁺T细胞的增殖。

本发明的一个实施方式中提供，一种增强受试者对抗原的免疫应答的方法，其包括给受试者施用抗原和PIK3IP1抑制剂，例如，PIK3IP1、PIK3IP1ECD、PIK3IP1ECD融合分子或PIK3IP1的抗体，使得受试者对抗原的免疫应答得到增强。

根据本发明，所述抗原可以是癌性细胞，肿瘤抗原，病毒抗原，细菌抗原等。可以使用的抗原非限制性实例包括黑素瘤的抗原肽，诸如肽gp100、MAGE抗原、Trp-2、MART1和/或酪氨酸酶。在本发明的一个实施方式中，所述抗原是gp100，更优选为hgp100₂₅₋₃₃。在本发明的另一个实施方式中，所述抗原是OVA，更优选为OVA₂₅₇₋₂₆₄。在本发明的再一个实施方式中，所述抗原是癌性细胞，例如MC38细胞，B16细胞，B16-F10细胞等。

本发明的第五个方面是提供，一种在个体中治疗肿瘤或延迟肿瘤进展的方法，所述方法是给所述个体治疗有效量的PIK3IP1抑制剂，例如，PIK3IP1、PIK3IP1ECD、PIK3IP1ECD融合分子或PIK3IP1的抗体。

根据本发明，所述方法还包括给予所述个体另一种或多种治疗剂。

根据本发明，所述另一种或多种治疗剂包括但不限于其他的活化T细胞的化合物，肿瘤化疗剂，血管生成抑制剂等。

根据本发明，所述PIK3IP1抑制剂，例如，PIK3IP1、PIK3IP1ECD、PIK3IP1ECD融合分子或PIK3IP1的抗体，和另一种或多种治疗剂各自在单独的组合物中同时施用，所述PIK3IP1抑制剂，例如，PIK3IP1、PIK3IP1ECD、PIK3IP1ECD融合分子或PIK3IP1的抗体，和另一种治疗剂在同一个组合物中同时施用，或者，所述PIK3IP1抑制剂，例如，PIK3IP1、PIK3IP1ECD、PIK3IP1ECD融合分子或PIK3IP1的抗体，和另一种治疗剂各自在单独的组合物中间隔一段时间先后施用或顺序施用。在本发明的一个实施方式中，所述另一种治疗剂是4-1BB的激活性抗体，例如抗体2A。

根据本发明，其中施用所述PIK3IP1抑制剂，例如，PIK3IP1、PIK3IP1ECD、PIK3IP1ECD融合分子或PIK3IP1的抗体，相比于未经治疗的个体或用其他治疗剂的单一疗法治疗的个体，增加T细胞的增殖。T细胞的增殖平均比例至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%或至少约90%。

在本发明的一个实施方式中，施用所述PIK3IP1抑制剂，例如，PIK3IP1、PIK3IP1ECD、PIK3IP1ECD融合分子或PIK3IP1的抗体和2A，相比于未经治疗的个体或用所述PIK3IP1抑制

剂,例如,PIK3IP1、PIK3IP1ECDPIK3IP1ECD融合分子或PIK3IP1的抗体、2A或其他治疗剂的单一疗法治疗的个体,肿瘤体积减少。

在以上描述的技术方案的一些实施方式中,PIK3IP1包含选自SEQ ID NO.1、2、3、4、5、6、7、8和/或17的序列;在一些实施方式中,PIK3IP1由选自SEQ ID NO.1至8之一的序列组成。

在以上描述的技术方案的一些实施方式中,PIK3IP1ECD包含选自SEQ ID NO.9和/或10的序列;在一些实施方式中,PIK3IP1ECD由选自SEQ ID NO.9或10的序列组成。

在以上描述的技术方案的一些实施方式中,PIK3IP1ECD融合分子包含选自SEQ ID NO.9和/或10的序列。在一些实施方案中,PIK3IP1ECD融合分子的至少一个融合伴侣选自Fc、白蛋白和聚乙二醇。在一些实施方案中,PIK3IP1ECD融合分子的至少一个融合伴侣是Fc。在一些实施方案中,PIK3IP1ECD融合分子的至少一个融合伴侣是IgG Fc。在一些实施方案中,所述IgG Fc的碱基序列由选自SEQ ID NO.15或16的序列组成。在一些实施方案中,PIK3IP1ECD融合分子的碱基序列由选自SEQ ID NO.11至14之一的序列组成。

在以上描述的技术方案的一些实施方式中,PIK3IP1的抗体可以是PIK3IP1的多克隆抗体、PIK3IP1的单克隆抗体。

在以上描述的技术方案中,所述肿瘤包括通常对免疫疗法有响应的肿瘤,包括但不限于黑色素瘤、白血病、肺癌、肝癌、卵巢癌、宫颈癌、皮肤癌、膀胱癌、结肠癌、乳腺癌、神经胶质瘤、肾癌、胃癌、食道癌、口腔鳞状细胞癌、头颈癌;优选为黑色素瘤、白血病、肺癌、肝癌、结肠癌、乳腺癌、神经胶质瘤、胃癌、口腔鳞状细胞癌。

在一些实施方案中,所述肿瘤是转移性的。

在一些实施方案中,所述肿瘤优选为结肠癌、黑色素瘤、口腔鳞状细胞癌、肝细胞癌。

在以上描述的技术方案中,所述肿瘤化疗剂包括但不限于:烷化剂、氮芥类、塞替派类、亚硝脲类、甲基磺酸酯类、铂类化合物、丝裂霉素等,具体如:氮芥、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、异环磷酰胺、塞替派、卡莫司汀、司莫司汀、白消安、顺铂、奥沙利铂、卡铂、草酸铂、丝裂霉素等;影响核酸合成的药物,例如二氢叶酸还原酶抑制剂、胸腺核苷合成酶抑制剂、嘌呤核苷合成酶抑制剂、核苷酸还原酶抑制剂、DNA多聚酶抑制剂,具体如:甲氨蝶呤、5-FU、FT-207、卡培他滨、6-巯基嘌呤、6-TG、羟基脲、阿糖胞苷、吉西他滨、培美曲塞等;作用于核酸转录的药物,例如放线菌素D、柔红霉素、阿霉素、表阿霉素、阿克拉霉素、光辉霉素等;作用于DNA复制的拓扑异构酶I抑制剂,例如伊立替康、拓扑替康、羟基喜树碱等;作用于有丝分裂M期干扰微管蛋白合成的药物,例如紫杉醇、多西他赛、长春花碱、长春新碱、长春瑞滨、鬼臼碱类、高三尖杉酯碱等。

在以上描述的技术方案中,所述能够活化T细胞的化合物包括但不限于T细胞共刺激性分子的激活性抗体,例如:CTLA-4、OX-40、4-1BB或ICOS等的激活性抗体,抗CD40抗体等。在一些实施方案中,所述能够活化T细胞的化合物为4-1BB的激活性抗体,例如抗体2A。

在以上描述的技术方案中,所述血管生成抑制剂包括但不限于:抑制血管内皮生长因子

的作用的那些抑制剂，例如来那度胺、沙利度胺、抗血管内皮细胞生长因子抗体例如贝伐单抗，VEGF受体酪氨酸激酶抑制剂凡德他尼(vandetanib)(ZD6474)、瓦他拉尼(vatalanib)(PTK787)、舒尼替尼(SU11248)、阿西替尼(AG-013736)、帕唑帕尼(GW786034)和4-(4-氟-2-甲基咪唑-5-基氧基)-6-甲氧基-7-(3-吡咯烷-1-基丙氧基)喹唑啉等。

本申请中的序列和描述

SEQ ID NO.	描述	序列
1	人 PIK3IP1 同工型1的氨基酸序列	MLLAWVQAFL VSNMLLAEAY GSGGCFWDNG HLYREDQTSP APGLRCLNWL DAQSGLASAP VSGAGNHSYC RNPDEDPRGP WCYVSGEAGV PEKRPCEDLR CPETTSQALP AFTTEIQEAS EGPGADEVQV FAPANALPAR SEAAAVQPVI GISQVRMNS KEKKDLGTLG YVLGITMMVI IIAIGAGIIL GYSYKRGKDL KEQHDQKVCE REMQRITLPL SAFTNPTCEI VDEKTVVVHT SQTPVDPQEG TTPLMGQAGT PGA
2	人 PIK3IP1 合成同工型的氨基酸序列	MLLAWVQAFL VSNMLLAEAY GSGGCFWDNG HLYREDQTSP APGLRCLNWL DAQSGLASAP VSGAGNHSYC RNPDEDPRGP WCYVSGEAGV PEKRPCEDLR CPETTSQALP AFTTEIQEAS EGPGADEVQV FAPANALPAR SEAAAVQPVI GISQVRMNS KEKKDLGTLG YVLGITMMVI IIAIGAGIIL GYSYKRGKDL KEQHDQKVCE REMQRITLPL SAFTNPTCEI VDEKTVVVHT SQTPVDPQEG STPLMGQAGT PGA
3	人 PIK3IP1 同工型2的氨基酸序列	MLLAWVQAFL VSNMLLAEAY GSGGCFWDNG HLYREDQTSP APGLRCLNWL DAQSGLASAP VSGAGNHSYC RNPDEDPRGP WCYVSGEAGV PEKRPCEDLR CPETTSQALP AFTTEIQEAS EGPGADEVQV FAPANALPAR SEAAAVQPVI GISQVRMNS KEKKDLGTLG GRI
4	小鼠 PIK3IP1 的氨基酸序列	MLLAWVHTFL LSNMLLAEAY GSGGCFWDNG HLYREDQPSP APGLRCLNWL AAQGSRESLT EPSPGNHNYC RNPDQDPRGP WCYISSETGV PEKRPCEDVS CPETTSQAPP PSSAMELEEK SGAPGDKEAQ VFPPANALPA RSEAAEVQPV IGISQLVRMN SKEKKDLGTL GYVLGITMMV IILAIGAGII VGYTYKRGKD LKEQHEKKAC EREMQRITLP LSAFTNPTCE TVDENTIIVH SNQTPADVQE GSTLLTGQAG TPGA
5	小鼠 PIK3IP1 同工型X1的氨基酸序列	MLLAWVHTFL LSNMLLAEAY GSGGCFWDNG HLYREDQPSP APGLRCLNWL AAQGSRESLT EPSPGNHNYC RNPDQDPRGP WCYISSETGV PEKRPCEDVS CPGTRPGTTE TTSQAPPPSS AMELEEKSGA PGDKEAQVFP PANALPARSE AAEVQPVIGI SQLVRMNSKE KKDLGTLGYV LGITMMVIIL AIGAGIIVGY TYKRGKDLKE QHEKKACERE MQRITLPLSA FTNPTCETVD ENTIIVHSNQ TPADVQEGST LLTGQAGTPG A
6	小鼠 PIK3IP1 同工型X2的氨基酸序列	MLLAWVHTFL LSNMLLAEAY GSGGCFWDNG HLYREDQPSP APGLRCLNWL AAQGSRESLT EPSPGNHNYC RNPDQDPRGP WCYISSETGV PEKRPCEDVS CPGTRPGTTE TTSQAPPPSS AMELEEKSGA PGDKEAQVFP PANALPARSE AAEVQPVIGI SQLVRMNSKE KKDLGTLGYV LGITMMVIIL AIGAGIIVGY TYKSLRTAFG RLPILGQFPD LQELDLAALN SKLSGCPVQK PGGRT
7	小鼠 PIK3IP1 同	MLLAWVHTFL LSNMLLAEAY GSGGCFWDNG HLYREDQPSP APGLRCLNWL AAQGSRESLT EPSPGNHNYC RNPDQDPRGP

	工型 X3 的氨基酸序列	WCYISSETGV PEKRPCEDVS CPETTSQAPP PSSAMELEEK SGAPGDKEAQ VFPPANALPA RSEAAEVQPV IGISQLVRMN SKEKKDLGTL GYVLGITMMV IILAIGAGII VGYTYKSLRT AFGRLPILGQ FPDQLQELDLA ALNSKLSGCP VQKPGGRT
8	小鼠 PIK3IP1 同工型 X4 的氨基酸序列	METTSQAPP SSAMELEEK GAPGDKEAQV FPPANALPAR SEAAEVQPV GISQLVRMNS KEKKDLGTLG YVLGITMMVI ILAIGAGIIV GYTYKRKDL KEQHEKKACE REMQRITLPL SAFTNPTCET VIDENTIIVHS NQTPADVQEG STLLTGQAGT PGA
9	人 PIK3IP1E CD 氨基酸序列	MLLAWVQAFL VSNMLLAEAY GSGGCFWDNG HLYREDQTSP APGLRCLNWL DAQSGLASAP VSGAGNHSYC RNPDEDPRGP WCYVSGEAGV PEKRPCEDLR CPETTSQALP AFTTEIQEAS EGPGADEVQV FAPANALPAR SEAAAVQPV GISQVRMNS KEKKDLGT
10	小鼠 PIK3IP1E CD 氨基酸序列	MLLAWVHTFL LSNMLLAEAY GSGGCFWDNG HLYREDQPSP APGLRCLNWL AAQGSRESLT EPSPGNHNYC RNPDQDPRGP WCYISSETGV PEKRPCEDVS CPETTSQAPP PSSAMELEEK SGAPGDKEAQ VFPPANALPA RSEAAEVQPV IGISQLVRMN SKEKKDLGTL
11	hPIK3IP1E CD-mIgG Fc 融合分子的碱基序列	atgctgttg cctgggtaca agcattcctc gtcagcaaca tgctcctagc agaagcctat ggatctggag gctgtttctg ggacaacggc cacctgtacc gggaggacca gacctcccc gcgcggggcc tccgtgcct caactggctg gacgcgcaga gcgggctggc ctcggcccc gtgtcggggg ccggcaatca cagtactgc cgaaaccgg acgaggacc gcgcggggcc tggtgctacg tcagtggcga ggccggcgtc cctgagaaac ggcttgcca ggacctgcgc tgtccagaga ccacctcca ggccctgcc gccttcacga cagaaatcca ggaagcgtct gaaggccag gtgcagatga ggtgcaggtg ttcgtcctg ccaacgccct gccgctcgg agtgaggcgg cagctgtgca gccagtatt gggatcagcc agcgggtgcg gatgaactcc aaggagaaaa aggacctggg aactgatctg gagccagag gggccacaat caagccctgt cctccatgca aatgcccgac acctaacctc ttgggtggac catcgtctt catcttccct ccaaagatca aggatgtact catgatctcc ctgagcccca tagtcacatg tgtgtgtgtg gatgtgagcg aggatgacct agatgtccag atcagctggt ttgtgaacaa cgtggaagta cacacagctc agacacaaac ccatagagag gattacaaca gtactctccg ggtggtcagt gccctcccca tccagacca ggactggatg agtggcaagg agtgcaaatg caaggtcaac aacaagacc tccagcgcc catcgagaga accatctcaa aacccaaagg gtcagtaaga gtccacagg tatatgtctt gctccacca gaagaagaga tgactaagaa acaggtcact ctgacctgca tggtcacaga ctcatgcct gaagacattt acgtggagtg gaccaacaac gggaaaacag agctaaacta caagaacact gaaccagtcc tggactctga tggttcttac ttcatgtaca gcaagctgag agtggaaaag aagaactggg tggaaagaaa tagctactcc tgttcagtgg tccacgaggg tctgcacaat caccacacga ctaagagctt ctccgggact ccgggtaaat gatc
12	hPIK3IP1E CD-hIgG Fc 融合分子的碱基序列	atgctgttg cctgggtaca agcattcctc gtcagcaaca tgctcctagc agaagcctat ggatctggag gctgtttctg ggacaacggc cacctgtacc gggaggacca gacctcccc gcgcggggcc tccgtgcct caactggctg gacgcgcaga gcgggctggc ctcggcccc gtgtcggggg ccggcaatca cagtactgc cgaaaccgg acgaggacc gcgcggggcc tggtgctacg tcagtggcga ggccggcgtc cctgagaaac ggcttgcca ggacctgcgc tgtccagaga ccacctcca ggccctgcc gccttcacga cagaaatcca ggaagcgtct gaaggccag gtgcagatga ggtgcaggtg ttcgtcctg ccaacgccct gccgctcgg agtgaggcgg cagctgtgca gccagtatt gggatcagcc agcgggtgcg gatgaactcc aaggagaaaa aggacctggg aactgatcta tctctagag tcgacgagcc caaatctgt gacaaaactc acacatgcc accgtgccc ggtaagccag ccagggcctc gccctccagc

		tcaaggcggg acaggtgccc tagagtagcc tgcattccagg gacaggcccc agccgggtgc tgacacgtcc acctccatct ctctccagc acctgaactc ctgggggggac cgtcagttct cctcttcccc ccaaaaccca aggacacct catgatctcc cggacccttg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagacct tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtgtgcagc gtctcaccg tctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg aaaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg tgggaccctg ggggtgcgag ggccacatgg acagaggccg gctcggccca ccctctgccc tgagagtac cgctgtacca acctctgtcc ctacaggga gccccagaa ccacaggtgt acacctgcc cccatcccgg gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcttg tcaaaggctt atatcccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgct cccgtgctgg actccgacgg ctctctctc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacct ctctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgaga agagcctct cctgtctccg ggtaaatga
13	Pik3ip1EC D-hIgG Fc 融合分子的碱基序列	atgctgttg cttgggtaca cacatttctt ctacgaaca tgccttggc agaagcctat ggatctggag gctgctctg ggacaacggc cacctgtacc gggaggacca gccctgccc gcgccgggtc tccgtgcct caactggttg gccgcgaag gcagccgca gtcgtcacc gagcccagcc cgggcaacca caactactgc cggaaaccgg accaggacc gcgcgggccc tggtgctaca tcagcagcga gaccggcgtc cctgaaaagc ggccctgca ggacgtgagt tgcccagaga ccacttcca agcaccaccg ccatctctg ccatggagct ggaagagaag tctggtgcac caggtgacaa agaggcacag gtgttccctc ctgtaacgc cctaccagcc aggagtgagg cagccgaggt gcagccagt atcgggatca gtcagctgt gaggatgaac tccaaggaaa aaaaagacct aggaactctg gatctatct ctagagtcga cgagccaaa tctgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccaggtg agccagccca ggctcgcgc tccagctcaa ggggggacag gtgcctaga gtagcctgca tccaggga ggcaccagcc gggtgctgac acgtccacct ccatctctc ctacgacct gaactcctgg ggggaccgtc agtctctc tcccccaa aaccaagga caccctcatg atctccgga ccctgaggt cacatgcgtg gtggtggacg tgagccagca agacctgag gtcaagtca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtc taccgtct gcaccaggac tggtgaatg gcaaggagta caagtgaag gtctcaaca aagccctccc agcccccac gagaaaacca tctcaaagc caaaggtggg acccggtggg tgcgagggcc acatggacag aggcgggctc ggcccacct ctgcctgag agtgaccgt gtaccaacct ctgtccctac agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgcccaca tccgggatg agctgacaa gaaccaggtc agcctgacct gcctgtcaa aggttataat cccagcgaca tgcctgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttctctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaactgtctc tcatgtccg tgatgatga ggctctgcac aacctacta cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aatga
14	Pik3ip1EC D-mIgG Fc 融合分子的碱基序列	atgctgttg cttgggtaca cacatttctt ctacgaaca tgccttggc agaagcctat ggatctggag gctgctctg ggacaacggc cacctgtacc gggaggacca gccctgccc gcgccgggtc tccgtgcct caactggttg gccgcgaag gcagccgca gtcgtcacc gagcccagcc cgggcaacca caactactgc cggaaaccgg accaggacc gcgcgggccc tggtgctaca tcagcagcga gaccggcgtc cctgaaaagc ggccctgca ggacgtgagt tgcccagaga ccacttcca agcaccaccg ccatctctg ccatggagct ggaagagaag tctggtgcac caggtgacaa agaggcacag gtgttccctc ctgtaacgc cctaccagcc aggagtgagg cagccgaggt gcagccagt atcgggatca gtcagctgt gaggatgaac tccaaggaaa aaaaagacct aggaactctg gatctggagc ccagaggggc cacaatcaag ccctgtctc catgcaaatg cccagcact aacctcttg gtggaccac cgtcttctc ttccctcaa agatcaagga tgtactcat atctccctga gcccatagt cacatgtgtg gtggtggatg tgagcgagga tgaccagat gtccagatca gctggttgt gaacaacgtg

		gaagtacaca cagctcagac acaaaccat agagaggatt acaacagtac tctccgggtg gtcagtgecc tccccatcca gcaccaggac tggatgagtg gcaaggagtg caaatgcaag gtcaacaaca aagacctccc agcgcccatc gagagaacca tctcaaaacc caaagggtca gtaagagctc cacaggtata tgtcttgcct ccaccagaag aagagatgac taagaaacag gtcactctga cctgcatggt cacagacttc atgcctgaag acatttacgt ggagtggacc aacaacggga aaacagagct aaactacaag aacactgaac cagtctctga ctctgatggt tcttacttca tgtacagcaa gctgagagtg gaaaagaaga actgggtgga aagaaatagc tactctgtt cagtgggtcca cgagggtctg cacaatcacc acacgactaa gagcttctcc cggactccgg gtaaatgac
15	小鼠 IgGFc 碱基序列	gatctggagc ccagaggggc cacaatcaag ccctgtctc catgcaaatg cccagcacct aacctcttgg gtggaccatc cgtcttcac tccctccaa agatcaagga tgtactcatg atctccctga gcccatagt cacatgtgtg gtggtggatg tgagcgagga tgaccagat gtccagatca gctggtttgt gaacaacgtg gaagtacaca cagctcagac acaaaccat agagaggatt acaacagtac tctccgggtg gtcagtgecc tccccatcca gcaccaggac tggatgagtg gcaaggagtg caaatgcaag gtcaacaaca aagacctccc agcgcccatc gagagaacca tctcaaaacc caaagggtca gtaagagctc cacaggtata tgtcttgcct ccaccagaag aagagatgac taagaaacag gtcactctga cctgcatggt cacagacttc atgcctgaag acatttacgt ggagtggacc aacaacggga aaacagagct aaactacaag aacactgaac cagtctctga ctctgatggt tcttacttca tgtacagcaa gctgagagtg gaaaagaaga actgggtgga aagaaatagc tactctgtt cagtgggtcca cgagggtctg cacaatcacc acacgactaa gagcttctcc cggactccgg gtaaatgac
16	人 IgGFc 碱 基序列	gatctatcct ctagagtcga cgagcccaaa tcttgtaga aaactcacac atgcccaccg tgcccaggta agccagccca ggccctgccc tccagctcaa ggccgggacag gtgccctaga gtagcctgca tccagggaca ggccccagcc ggggtgctgac acgtccacct ccattcttcc ctcagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttctc tccccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccgga ccctgaggt cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga agacctgag gtcaagtcca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgaag gtctccaaca aagccctccc agccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggtggg acccgtgggg tgcaggggcc acatggacag aggccggctc ggcccaccct ctgccctgag agtgaccgct gtaccaacct ctgtccctac agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg agctgacca gaaccaggtc agcctgacct gcctgggtcaa aggcttatat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cgagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aatga
17	人 PIK3IP1 变体的氨 基酸序列	MNSKEKKDLG TLGYVLGITM MVIIAIGAG IILGYSYKRG KDLKEQHDQK VCEREMQRIT LPLSAFTNPT CEIVDEKTVV VHTSQTPVDP QEGTTPLMGQ AGTPGA

术语

为了使本发明更加容易理解，首先对一些术语进行定义。如本申请中使用的，除非在本文中有明确描述，否则下列的每一个术语应当具有下文所述的含义。其它定义在本申请全文中给出。

本文所用的术语“PIK3IP1”是指磷脂酰肌醇3激酶相互作用蛋白1（PI3K interacting protein1, PIK3IP1），其能与磷脂酰肌醇3激酶（phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K）的p110

亚基结合，可以下调PI3K活性，抑制丝氨酸苏氨酸激酶的活化，包含其天然存在的等位基因形式和经加工的各种同工型。术语“PIK3IP1”还指来自人物种和非人物种诸如小鼠、大鼠或灵长类的PIK3IP1。有时通过诸如用于人PIK3IP1的h PIK3IP1、用于鼠PIK3IP1的m PIK3IP1等术语来指示来自特定物种的PIK3IP1。在本发明的一些实施例中，还用Pik3ip1指代小鼠的PIK3IP1蛋白。

示例性的PIK3IP1包括但不限于，由选自SED ID NO.1、2、3、4、5、6、7、8和17的氨基酸序列组成。

术语“PIK3IP1抑制剂”是指能够阻断PIK3IP1活化或活性的化学物质，从而能够抑制PIK3IP1活化造成的T细胞增殖或活性的抑制。所述化学物质可以是小分子化合物，蛋白质，多肽，DNA，RNA等。所述的蛋白质或多肽可以是如本发明中所述的PIK3IP1胞外域，或PIK3IP1胞外域的融合蛋白，也可以是PIK3IP1的抗体，例如多克隆抗体和单克隆抗体。

术语“PIK3IP1胞外域”（PIK3IP1 Extracellular domain “PIK3IP1ECD”）包括全长PIK3IP1ECD、PIK3IP1ECD片段和PIK3IP1ECD变体。如本文所用的，术语“PIK3IP1ECD”指PIK3IP1多肽，其缺少胞内域和跨膜域，具有或没有信号肽。如本文所用的，术语“全长PIK3IP1ECD”指延伸至胞外域的最后氨基酸的PIK3IP1ECD，并且可以包括或不包括N-末端信号肽。在一些实施方案中，PIK3IP1ECD是人PIK3IP1ECD，由选自SEQ ID NO.9的氨基酸序列组成。在一些实施方案中，PIK3IP1ECD是鼠PIK3IP1ECD，由选自SEQ ID NO.10的氨基酸序列组成。

当PIK3IP1ECD“由”选自SEQ ID NO.9和10的序列“组成”时，PIK3IP1ECD可含有或不含有多种翻译后修饰，诸如糖基化和唾液酸化。换言之，当PIK3IP1ECD由特定的氨基酸序列组成时，其在连续的氨基酸序列中不含有另外的氨基酸，但可能含有对氨基酸侧链、N末端氨基和/或C-末端羧基的修饰。

如本文所用的，术语“PIK3IP1ECD片段”指从全长ECD的N和/或C末端缺失一个或多个残基并保持和全长PIK3IP1ECD相同结合能力的PIK3IP1ECD。PIK3IP1ECD片段可以包括或不包括N-末端信号肽。

如本文所用的，术语“PIK3IP1ECD变体”指含有氨基酸添加、缺失和取代并保持和亲代PIK3IP1ECD相同结合能力的PIK3IP1ECD。此类变体可与亲代PIK3IP1ECD具有至少90%、92%、95%、97%、98%或99%同一性。两个多肽的同一性可通过相似性得分来测量，所述测量方法是本领域已知的，例如使用确定相似性的具有缺省设置的Bestfit程序来比较两个多肽的氨基酸序列的同一性或相似性。

术语“PIK3IP1ECD融合分子”指包含PIK3IP1ECD和一个或多个“融合伴侣”的分子。在一些实施方案中，PIK3IP1ECD和融合伴侣是共价连接的。若融合伴侣也是多肽（“融合伴侣多肽”），则PIK3IP1ECD和融合伴侣多肽可以是连续的氨基酸序列的部分，且融合伴侣多肽可与PIK3IP1ECD的N末端或C末端相连接。在这样的情况下，PIK3IP1ECD和融合伴侣多肽可自编码PIK3IP1ECD和融合伴侣多肽两者的编码序列被翻译为单一的多肽（“PIK3IP1ECD融合蛋

白”)。在一些实施方案中, PIK3IP1ECD和融合伴侣通过其他方式共价连接, 诸如, 除肽键外的化学键。在另外的实施方案中, PIK3IP1ECD和融合伴侣可通过“接头”来融合, 所述接头由至少一个氨基酸或化学部分组成。

在一些实施方案中, PIK3IP1ECD多肽和融合伴侣是非共价连接的, 例如使用结合对将它们连接。示例性的结合对包括但不限于, 生物素和亲和素或链霉亲和素、抗体和其抗原等。

示例性的融合伴侣包括但不限于, 免疫球蛋白Fc结构域、白蛋白和聚乙二醇。一些示例性的Fc结构域的碱基序列示于SEQ ID NO.15和16。在一些实施方案中, Fc结构域选自IgG1Fc、IgG2Fc、IgG3Fc和IgG4Fc。

在一些实施方式中, PIK3IP1ECD融合分子包含PIK3IP1ECD和一个融合伴侣, 所述融合伴侣为Fc。在一个具体实施方式中, PIK3IP1ECD融合分子的碱基序列由选自SEQ ID NO.11、12、13和14的碱基序列组成。

在一些实施方案中, PIK3IP1ECD融合分子包含信号肽。在一些实施方案中, PIK3IP1ECD融合分子缺少信号肽。在一些实施方案中, PIK3IP1ECD融合分子的PIK3IP1ECD部分包括选自SEQ ID NO:9和10的序列。在一些实施方案中, PIK3IP1ECD融合分子的PIK3IP1ECD部分由选自SEQ ID NO: 9和10的序列组成。并且, 因为PIK3IP1ECD与融合分子相连接, 在PIK3IP1ECD的N末端和/或C末端可能存在另外的氨基酸, 但那些氨基酸并非来自PIK3IP1序列, 但可来自, 例如, 接头序列或融合伴侣序列。

以下是可用于本发明的非限制性的示例性融合伴侣。

如本文所讨论的, 可将PIK3IP1ECD与至少一种融合伴侣组合, 产生PIK3IP1ECD融合分子。这些融合伴侣可促进纯化, 或者使PIK3IP1ECD融合分子的体内半衰期延长。PIK3IP1ECD的合适的融合伴侣包括例如, 聚合物, 诸如水溶性聚合物, 免疫球蛋白的恒定结构域; 人血清白蛋白(HSA)的全部或部分; 胎球蛋白A; 胎球蛋白B; 亮氨酸拉链结构域; 四连接素三聚化结构域; 甘露糖结合蛋白(也称作甘露糖结合凝集素), 例如, 甘露糖结合蛋白1; 和Fc区。

为了本发明的治疗目的, 所述的融合伴侣不会产生中和抗原性反应或其他不利反应。

聚合物, 例如, 水溶性的聚合物, 作为融合伴侣使用以降低PIK3IP1ECD融合分子在水性环境中(诸如生理环境中)的沉淀。本发明所采用的聚合物是药学上可接受的聚合物, 包括但不限于, 聚乙二醇(PEG)、聚乙二醇丙醛、乙二醇/丙二醇的共聚物、单甲氧基-聚乙二醇、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇(PVA)、聚乙烯基吡咯烷酮、聚-1,3-二氧戊环、聚-1,3,6-三氧杂环己烷、乙烯/马来酸酐共聚物、聚(β -氨基酸)(无论是均聚物或无规共聚物)、聚(正乙烯基吡咯烷酮)聚乙二醇、聚丙二醇均聚物(PPG)和其他聚氧化烯(polyakylene oxide)、聚环氧丙烷/环氧乙烷共聚物、聚氧乙烯化的多元醇(POG)(例如, 甘油)和其他聚氧乙烯化的多元醇、聚氧乙烯化山梨糖醇或聚氧乙烯化葡萄糖、结肠酸或其他碳水化合物聚合物, 聚蔗糖(Ficoll)或葡聚糖及其混合物。

通常, 可在使蛋白质与活化的聚合物分子反应的任何合适的条件下进行化学衍生。可用

于将聚合物与活性部分连接的活化的基团包括碘、马来酰亚胺、巯基、硫醇、三氟甲基磺酸盐、三氟乙基磺酸酯、氮丙啶(aziridine)、环氧乙烷和5-吡啶基。通常将本发明的聚合物在氨基酸的 α 或 ϵ 氨基或反应性硫醇基上与PIK3IP1ECD连接。

此外,可将本发明的PIK3IP1ECD与标记物序列融合。标记物氨基酸序列可以是六聚组氨酸肽,六聚组氨酸为融合蛋白的纯化提供了便利。

在不同的实施方案中,寡聚化对融合蛋白提供了一些功能优点,包括但不限于,多价、增加的结合强度和不同的结构域的组合功能。因此,在一些实施方案中,融合伴侣包含寡聚化结构域,例如,二聚化结构域。示例性的寡聚化结构域包括但不限于,卷曲螺旋结构域,包括 α -螺旋卷曲螺旋结构域;胶原蛋白结构域;胶原蛋白样结构域;和某些免疫球蛋白结构域。示例性的卷曲螺旋多肽融合伴侣包括但不限于,四连接素卷曲螺旋结构域;软骨寡聚基质蛋白的卷曲螺旋结构域;血管生成素卷曲螺旋结构域;和亮氨酸拉链结构域。

可用作融合伴侣的许多Fc结构域是本领域中已知的。在一些实施方案中,融合伴侣是Fc免疫球蛋白结构域。Fc融合伴侣可以是在天然存在的抗体中发现的野生型Fc、其变体或其片段。非限制性的示例性Fc融合伴侣包括包含人IgG(例如,人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)的铰链结构域以及CH2和CH3恒定结构域的Fc。另外的示例性Fc融合伴侣包括但不限于,人IgA和IgM。

在一些实施方案中,融合伴侣是白蛋白。示例性的白蛋白包括但不限于,人血清白蛋白(HSA)和能够增加与其融合的多肽的血清半衰期或生物利用率的HSA片段。

融合伴侣的示例性的连接

可将融合伴侣共价地或非共价地与PIK3IP1ECD的N末端或C末端连接。连接还可发生在PIK3IP1ECD中除N末端或C末端的位置,例如,通过氨基酸侧链(例如,半胱氨酸、赖氨酸、丝氨酸或苏氨酸的侧链)来连接。

在共价的或非共价的连接的实施方案中,接头可含于融合伴侣和PIK3IP1ECD之间。此类接头可以由至少一个氨基酸或化学部分组成。将融合伴侣与PIK3IP1ECD共价连接的示例性方法包括但不限于,将融合伴侣和PIK3IP1ECD作为单一的氨基酸序列来翻译和将融合伴侣与PIK3IP1ECD化学连接。当融合伴侣和PIK3IP1ECD作为单一的氨基酸序列来翻译时,在融合伴侣和PIK3IP1ECD之间可包括另外的氨基酸作为接头。在一些实施方案中,基于编码接头的多核苷酸序列来选择接头,以有利于将融合伴侣和/或PIK3IP1ECD克隆到单个表达构建体中(例如,可将含有特定的限制位点的多核苷酸置于编码融合伴侣的多核苷酸和编码PIK3IP1ECD的多核苷酸之间,其中含有限制位点的多核苷酸编码短的氨基酸接头序列)。当通过化学方式将融合伴侣和PIK3IP1ECD共价偶联时,在偶联反应过程中通常可包括不同大小的接头。

PIK3IP1ECD和PIK3IP1ECD融合分子表达和生产载体

提供了包含编码PIK3IP1ECD的多核苷酸的载体。还提供了包含编码PIK3IP1ECD融合分子的多核苷酸的载体。此类载体包括但不限于,DNA载体、噬菌体载体、病毒载体、逆转录

病毒载体等。

在一些实施方案中，选择的载体对于多肽在CHO或CHO来源的细胞中的表达是优化的。

宿主细胞

在不同的实施方案中，PIK3IP1ECD或PIK3IP1ECD融合分子可在原核细胞中表达，诸如细菌细胞；或在真核细胞中表达，诸如真菌细胞、植物细胞、昆虫细胞和哺乳动物细胞。可用于表达多肽的示例性真核细胞包括但不限于，COS细胞，293细胞，CHO细胞和NSO细胞。

将核酸导入到期望的宿主细胞中可通过本领域中已知的任何方法来实现，这些方法包括但不限于，磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖介导的转染、阳离子脂质介导的转染、电穿孔、转导、感染等。

PIK3IP1ECD多肽的纯化

可通过本领域中已知的多种方法纯化PIK3IP1ECD或PIK3IP1ECD融合分子。此类方法包括但不限于，亲和基质或疏水作用色谱的使用。合适的亲和配体包括PIK3IP1ECD或融合伴侣的任何配体。例如，蛋白A、蛋白G、蛋白A/G或抗体亲和柱可用于与Fc融合伴侣结合以纯化PIK3IP1ECD融合分子。

术语“信号肽”指位于多肽的N末端的氨基酸残基的序列，其促进多肽从哺乳动物细胞中分泌。在将多肽从哺乳动物细胞中运出之后可将信号肽裂解，形成成熟蛋白质。信号肽可以是天然的或合成的，并且它们对于其所连接的蛋白质可以是异源的或同源的。

术语“抗体”以最宽泛的意义使用，具体地涵盖合成抗体、单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体、胞内抗体、多特异性抗体、双特异性抗体、单价抗体、多价抗体、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、灵长类抗体、Fab片段、F(ab')片段、单链FvFc(scFvFc)、单链Fv(scFv)、抗独特型(抗Id)抗体和任何其他免疫活性抗体片段，只要它们展示出所希望的生物活性(即，标记相关或结合)即可。在更广的意义上，本发明的抗体包括免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子(即，含有抗原结合部位的分子)的免疫活性片段，其中这些片段可以或可以不与另一个免疫球蛋白结构域(包括但不限于Fc区或其片段)融合。此外，如在此更详细地概述的，术语抗体和多种抗体具体地包括Fc变体或其片段，包括全长抗体和包含Fc区的变体Fc-融合物，其任选地包含至少一个氨基酸残基修饰并且与免疫球蛋白的免疫活性片段融合。

“药学上可接受的载体”包括任何和全部的生理上相容的溶剂、分散介质、包衣、防腐剂、等渗剂、缓释剂等等。优选地，载体适合于静脉内、皮下、肌内、肠胃外、脊柱或表皮施用(例如，通过注射或输注)。本发明的药物组合物可以包括一种或多种药学上可接受的盐、抗氧化剂、水和非水性载体，和/或佐剂，如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。

“免疫应答”是指脊椎动物体内针对外来作用介质的生物学应答，该应答可保护生物体免于被这些作用介质或者由其造成的疾病的伤害。免疫应答是由免疫系统的细胞(例如，T淋巴细胞，B淋巴细胞，自然杀伤NK细胞，巨噬细胞，嗜酸性粒细胞，肥大细胞，树突细胞或嗜中性粒细胞)和由这些细胞的任一种或肝脏产生的可溶性大分子(包括抗体，细胞因子和补

体)的作用介导的,其导致脊椎动物机体入侵病原体、细胞或被病原体感染的组织、癌细胞或其它异常细胞,或者,在自身免疫性或病理性炎症中,针对正常的人细胞或组织的选择性靶向、结合、损害、破坏,和/或消除。

“免疫疗法”是指用包括诱导、强化、抑制或者修饰免疫应答的方法对患有疾病、具有发生疾病风险、或者疾病复发的受试者进行治疗。

“增强内源性免疫应答”意思是强化受试者体内现有的免疫应答的有效性或强度。此类效率和潜力的强化可以通过,例如,克服抑制内源性宿主免疫应答的机制,或者通过刺激强化内源性宿主免疫应答的机制来实现。

药物或治疗剂(例如本发明的PIK3IP1)的“治疗有效量”或“治疗有效剂量”是药物的任何如下所述的量,当单独使用或与另一种治疗剂组合使用该量的药物时,可促进疾病消退,疾病消退表现为疾病症状的严重程度降低、无疾病症状期的频率和持续时间增加、或者防止由患病导致的障碍或失能。药物的治疗有效量或剂量包括“预防有效量”或“预防有效剂量”,“预防有效量”或“预防有效剂量”是药物的任何如下所述的量,当将该量的药物单独施用或者与另一种治疗剂组合施用于具有发生疾病的风险或者遭受疾病复发的受试者时,可抑制疾病的发生或复发。治疗剂促进疾病消退或抑制疾病发展或复发的能力可以用技术人员已知的各种方法进行评估,例如在人类受试者的临床试验中,在可预测在人类中的效力的动物模型系统中,或者通过在体外测定系统中测定试剂的活性。

“亚治疗剂量”表示治疗化合物例如,亚治疗剂量的CTLA-4抗体为少于约3mg/kg(即抗CTLA-4抗体的已知剂量)的单剂抗体。

“癌症”是指一大类以异常细胞在体内不受控制地生长为特征的各种疾病,在本文中可与“肿瘤”互换使用。不受控制的细胞分裂和生长导致形成恶性肿瘤或细胞,它们侵入邻近组织,还可以通过淋巴系统或血流转移到身体的远端部分。

可以使用本发明免疫疗法治疗的癌症实例包括但不限于:骨癌症、胰腺癌症、皮肤癌症、头或颈部的癌症、乳腺癌、肺癌、皮肤或眼内恶性黑色素瘤、肾癌症、子宫癌症、卵巢癌症、结肠直肠癌、结肠癌症、直肠癌、肛门区域的癌症、胃癌症、睾丸癌症、子宫癌症、输卵管癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、阴道癌、外阴癌、食道的癌症、小肠的癌症、内分泌系统的癌症、甲状腺的癌症、甲状旁腺的癌症、肾上腺的癌症、软组织肉瘤、尿道的癌症、阴茎的癌症、血液恶性肿瘤、儿童实体瘤、淋巴细胞性淋巴瘤、膀胱的癌症、肾或输尿管的癌症、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)的肿瘤、原发性CNS淋巴瘤、肿瘤血管发生、脊椎轴肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西肉瘤、表皮样癌症、鳞状细胞癌症、环境诱导的癌症包括被石棉诱导的癌症,转移性癌症,和所述癌症的任意组合。在其它优选的实施方案中,癌症是黑色素瘤。

“受试者”是指接受本发明活性物质作用的生命体,在本申请中可与“用药者”互换使用。受试者可以是人或者动物,例如猴、大鼠、小鼠、狗、兔等。

通过以下实施例进一步举例说明本发明,这些实施例不应当被解释为具有限制作用。本

申请明确地通过提述并入本申请全文中引用的所有图和所有参考文献、专利和被公开专利申请的内容。

附图说明

图1 PIK3IP1和Pik3ip1电泳结果。

图2a-图2d 融合蛋白质谱鉴定结果。

图3 Anti-PIK3IP1多克隆抗体特异性的鉴定结果，使用小鼠抗人PIK3IP1抗体；按不同比例稀释多克隆抗体后，与稳定表达人PIK3IP1的CHO细胞转染株进行染色，流式细胞术对抗体效价鉴定结果。

图4 Anti-Pik3ip1多克隆抗体特异性的鉴定结果，使用大鼠抗小鼠Pik3ip1抗体；按不同比例稀释多克隆抗体后，与稳定表达小鼠Pik3ip1的CHO细胞转染株进行染色，流式细胞术对抗体效价鉴定结果。

图5 人外周血PIK3IP1表达的流式细胞术检测。PIK3IP1在人外周血PBMC中CD8⁺T细胞、CD4⁺T细胞、B细胞的表达较高，在CD56⁺NK细胞的表达较低。

图6 Pik3ip1在小鼠组织mRNA水平的表达情况检测。Pik3ip1在小鼠肌肉、PBMC、淋巴结和脾中表达水平较高。

图7 Pik3ip1在小鼠脾淋巴细胞表达的流式细胞术检测。Pik3ip1在脾CD8⁺T细胞、CD4⁺T细胞、B细胞、CD11b⁺细胞和CD11c⁺细胞上均有表达，其中，在T细胞、B细胞和CD11b⁺细胞的表达较高。

图8 Pik3ip1在常见小鼠细胞系中表达的流式细胞术检测，B16为小鼠黑色素瘤细胞系、P338D1为小鼠巨噬细胞系、DC2.4为小鼠树突状细胞系、CT26为小鼠结肠癌细胞系、EL4为小鼠T细胞淋巴瘤细胞系、MB49为小鼠膀胱癌细胞系。

图9 Pik3ip1在小鼠免疫激活过程中淋巴细胞上表达的流式细胞术检测。用100μg hgp100₂₅₋₃₃和CFA或单独用CFA乳化后免疫Pmel-1TCR转基因小鼠，24小时后，检测Pik3ip1在小鼠引流淋巴结中CD8⁺T细胞、CD11b⁺单核细胞、CD11c⁺DC细胞、CD19⁺B细胞的表达。

图10 用流式细胞术检测OVA抗原特异性免疫反应中Pik3ip1敲除小鼠和野生型小鼠的CD8⁺T细胞的增殖情况，经过抗原特异性免疫后，Pik3ip1敲除小鼠的CD8⁺T细胞的增殖高于野生型小鼠。左图为流式细胞检测图，右图为流式细胞检测荧光值统计图。图中KO代表Pik3ip1敲除小鼠，WT代表野生型小鼠。

图11 在Pik3ip1敲除小鼠和野生型小鼠中采用MC38肿瘤细胞建立肿瘤模型，用流式细胞术检测小鼠中CD4⁺和CD8⁺T细胞的增殖情况，24小时、48小时和72小时，Pik3ip1敲除小鼠的CD4⁺和CD8⁺T细胞的增殖均高于野生型小鼠的，其中48小时和72小时的差异具有显著性。图中KO代表Pik3ip1敲除小鼠，WT代表野生型小鼠。

图12 口腔鳞癌患者外周血淋巴细胞中PIK3IP1的表达与T细胞抑制状态之间的关系，CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞上的PIK3IP1的荧光强度与相应T细胞的增殖能力呈负相关，所述相关性均

具有显著性。

图13 Pik3ip1-Ig融合蛋白在小鼠体内发挥竞争抑制作用，促进CD8⁺T细胞的增殖；左图为Pik3ip1-Ig融合蛋白作用下，CD8⁺T细胞的增殖情况；右图为CD8⁺T细胞的增殖百分比统计（*p<0.05）。

图14 pik3ip1-Ig融合蛋白联合2A抑制小鼠B16-F10肿瘤的生长；A为Pik3ip1-Ig融合蛋白单独治疗，B16-F10肿瘤生长受抑制程度不明显（n.s. p>0.05）；B为Pik3ip1-Ig融合蛋白联合2A治疗，B16-F10肿瘤的生长受到明显抑制（*p<0.05）。

图15荷瘤C57BL/6小鼠大体观、肿瘤离体观；A为各组荷瘤小鼠大体观；B为各组肿瘤离体观。

具体实施方式

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。此外，应理解，在阅读了本发明所记载的内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本发明所限定的范围。

在以下实施例中，PIK3IP1代表人的PIK3IP1全长碱基序列及其蛋白产物，Pik3ip1代表鼠的Pik3ip1全长碱基序列及其蛋白产物，PIK3IP1-mIg代表由人的PIK3IP1胞外区和鼠的IgG Fc构成的融合蛋白，Pik3ip1-mIg代表由鼠的Pik3ip1胞外区和鼠的IgG Fc构成的融合蛋白，PIK3IP1-hIg代表由人的PIK3IP1胞外区和人的IgG Fc构成的融合蛋白，Pik3ip1-hIg代表由鼠的Pik3ip1胞外区和人的IgG Fc构成的融合蛋白，Flag-mIg为无序对照序列与鼠IgG Fc的融合蛋白，Flag-hIg为无序对照序列与人IgG Fc的融合蛋白。

以下实施例中：

1. 细胞和动物材料

正常人单个核细胞，分离自健康志愿者的外周血；

SPF级C57BL/6小鼠、BALB/c小鼠、Wistar大鼠购买自中山大学（大学城）实验动物中心，饲养于中山大学北校区实验动物中心；

Pmel-1 TCR转基因小鼠，293T细胞、小鼠黑色素瘤细胞系（B16-F10）、小鼠结肠癌细胞系CT26细胞、小鼠膀胱癌细胞系MB49细胞、CHO细胞系、杂交瘤2A、小鼠巨噬细胞系P338D1、小鼠树突状细胞系DC2.4、小鼠T细胞淋巴瘤细胞系EL4、MC38细胞系、质粒pMIgV、pHIgV由中山大学中山医学院陈列平教授课题组赠予。

hgp100特异性Pmel-1脾细胞和淋巴细胞取自Pmel-1 TCR转基因小鼠脾脏和淋巴结。

OT1小鼠购自南京大学模式动物研究所。

Pik3ip1^{-/-}小鼠，用TALENs法于赛亚生物公司（Cyagen Biosciences Inc.）进行敲除鼠的制备。

2. 细胞培养试剂

DMEM高糖培养基，RPMI 1640培养基，Ham's F10培养基，胰蛋白酶（0.25% Trypsin，0.02% EDTA）：美国Gibco公司；2-乙酰-2-去酰胺衍生物（ADT），盘尼西林，链霉素，L-

谷氨酸盐，羧基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺脂（CFSE）：美国Invitrogen公司。

hgp100₂₅₋₃₃多肽，氨基酸序列为KVPRNQDWL，纯度大于95%：由上海英潍捷基公司合成。

3. 质粒构建、细胞转染及融合蛋白纯化试剂

RNAiso Plus (9108Q)、PrimeScript™ RT reagent Kit试剂盒、SYBR Green qPCR Master Mix - SYBR Advantage (638320 Clontech)试剂盒：Takara 公司；All-In-One一步法逆转录试剂盒：美国 GeneCopoeia 公司；Lipofectamine 2000细胞转染试剂：上海英潍捷基公司；线性聚乙烯亚胺（Linear PEI）：美国 Polysciences公司；NucleoBond Xtra Maxi Plus质粒提取和纯化试剂盒：德国Macherey-Nagel公司；SDS-PAGE凝胶配制试剂盒：上海碧云天公司；琼脂糖胶回收试剂盒：德国QIAGEN公司；蛋白质相对分子量Marker：美国Thermo Scientific。

4. 细胞增殖和活化检测试剂

Cytofix/Cytoperm固定/破膜试剂盒、Anti- human CD4 Percp-cy5.5 、Anti- human CD4 BV421、Anti-human CD8 APC：美国BD公司；Anti-human CD69 Pe-cy7、Anti-human CD95 FITC、Anti-human HLA-DR Pe-cy7、Anti-human CD3（克隆号：OKT3）：美国Biolegend公司；Anti-human CD28、Anti-human CD25 APC、Anti-human Foxp3 PE、Anti-human CD25 PE：美国 eBioscience 公司；人CD4⁺T细胞磁珠阳性分选试剂盒、人CD8⁺T细胞磁珠阳性分选试剂盒、人CD3⁺T细胞磁珠阴性分选试剂盒：德国美天旎公司；重组人TGF-beta1、重组人IL-2：美国Peprotech公司。

5. 细胞凋亡检测实验材料和试剂

FITC Annexin V细胞凋亡检测、Anti-human CD4 BV421、Anti-human CD8 APC：美国BD公司。

6. 其他材料和试剂

1Kb DNA ladder Marker：加拿大Fermentas公司；SYBR Green qPCR SuperMix：德国罗氏公司；弗氏完全佐剂（CFA）、弗氏不完全佐剂（IFA）：美国Sigma 公司；蛋白A柱：美国GE公司；蛋白透析卡：美国Thermo Scientific；山羊抗小鼠Alexa Fluor 647 荧光二抗：北京博奥森公司；DAPI染色剂：上海英潍捷基公司；美天旎gentleMACS组织处理M管：德国美天旎公司；中性树胶、枸橼酸钠抗原修复液pH6.0、苏木素染色液、EDTA抗原修复液pH9.0：北京中杉金桥公司；TO型生物制片透明剂：广州中南化工仪器公司；DAB显色剂、即用型兔抗人CD3免疫组化单克隆抗体（克隆号SP7）、正常兔血清封闭液、免疫组化染色检测试剂盒：中国迈新生物公司；两步法GK500705小鼠/兔通用型：丹麦DAKO 公司；Anti- mouse CD3 FITC、Anti- mouse IFN-γAPC、Anti- mouse Ki67 PE：美国eBioscience 公司；Anti- mouse CD8 BV421：美国BD公司；佛波醇酯（PMA）：比利时Acros公司；钙离子霉素（Ionomycin calcium salt）：美国Thermo Fisher 公司；外周血单个核细胞（PBMC）分离试剂盒：stemcell公司。

7. 主要实验仪器

Axio observer Z1倒置显微镜、激光扫描共聚焦显微镜（LSM780）：德国ZEISS公司；

MACS分选器、MACS分选柱：德国美天妮公司；LightCycler® 480全自动荧光定量PCR仪：德国罗氏公司；BD FACSVerser 流式细胞仪：美国BD公司；M205FA体视荧光显微镜：莱卡仪器有限公司；ABI 9700 PCR仪：美国ABI 公司；全自动酶标仪：美国 Thermo Electron 公司；ScanScope病理切片扫描成像系统：美国Apero公司。

实施例1质粒的构建

1、人外周血总RNA获取

参照stemcell公司07811号产品的试剂盒说明书进行人外周血单个核细胞的分离，采用对应试剂盒提取鼠外周血单个核细胞。

采用Takara公司RNAiso Plus (9108Q)试剂盒，按其说明书进行细胞总RNA提取：用约0.5-1ml RNAiso Plus将酶消化或从组织中分离的细胞进行充分破碎和溶解；采用氯仿-异丙醇-75%乙醇提取RNA，用DEPC水将提取的RNA溶解，利用分光光度计测定RNA浓度，调整RNA浓度为500ng/μl左右，备用。

2、RNA逆转录合成cDNA

采用Takara公司PrimeScript™ RT reagent Kit试剂盒，按其说明书进行cDNA合成：

(1) 按如下比例配RNA-Primer Mix(总体积13μl)，变性RNA：

试剂	体积
总RNA	1μg
250 μM Random Primer	1μl
60 μM Oligo (dT)18	1μl
ddH ₂ O (RNase/DNase free)	调整总体积至13μl

(2) 按如下比例配置逆转录反应体系，总体积25μl：

试剂	体积 (μl)	终浓度
RNA-Primer Mix	13 μl	
5 × RT Reaction Buffer	5 μl	1×
25 mM dNTP	1 μl	1 mM
25 U/μl RNase Inhibitor	1 μl	1 U/μl
200 U/μl M-MLV RTase	1 μl	8 U/μl
ddH ₂ O (RNase/DNase-free)	to 25 μl	

逆转录反应条件如下：37℃逆转录反应10min，然后加热至85℃反应5min使逆转录酶失活，终止反应。

3、荧光定量PCR反应

采用Takara公司 SYBR Green qPCR Master Mix - SYBR Advantage (638320 Clontech)试剂盒，按照其说明书进行操作：以扩增人PIK3IP1为例，

设计并合成QPCR引物，用于扩增PIK3IP1：F: ATGCTGTTGGCCTGGGTA；R:

CGGGACTCCTGGGGCCTGA;

反应体系如下:

总体积	20 μ l
cDNA	2 μ l
上、下游引物	2 μ l
灭菌水	6 μ l
2 $\times$ SYBR Green qPCR SuperMix	10 μ l

在Roche LightCycler 480 Real-Time PCR仪上进行反应, 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 5min; 95 $^{\circ}$ C 10sec; 58 $^{\circ}$ C 20sec; 72 $^{\circ}$ C 30sec, 40 cycles; 溶解曲线分析: 95 $^{\circ}$ C 5sec; 65 $^{\circ}$ C 1min; 97 $^{\circ}$ C 5 min; 40 $^{\circ}$ C 10sec 至冷却。

4、质粒构建

质粒载体为pMIgV (PIK3IP1-mIg、Pik3ip1-mIg) 和pHIgV (PIK3IP1-hIg、Pik3ip1-hIg) 者, 酶切位点选择为Bgl II 和EcoR I。质粒载体为PCDNA3.1者(PIK3IP1和鼠Pik3ip1全长序列), 酶切位点选择XhoI I 和Ecor I。

设计正、反向PCR引物:

	上游引物	下游引物
人PIK3IP1全长序列 (SEQ ID NO.1)	ATGCTGTTGGCCTGGGTA	CGGGACTCCTGGGGCCTGA
鼠Pik3ip1全长序列 (SEQ ID NO.4)	atgctgttggttggg	tggcaccctggggcctga
人 PIK3IP1 胞外区序列 (SEQ ID NO.9)	ATGCTGTTGGCCTGGGTA	GAAAAAGGACCTGGGAACT
鼠 Pik3ip1 胞外区序列 (SEQ ID NO.10)	atgctgttggttgggta	aaaagacctaggaactctg

分别混合之前逆转录的人的cDNA、鼠的cDNA, 分别作为模板进行PCR, 扩增相应序列; PCR反应体系如下:

	试剂体积 (μ l)
原始模板	2
上游引物	2.5
下游引物	2.5
PrimeSTAR Max Premix(2 $\times$)	25
ddH ₂ O	补足至50

PCR反应条件如下:

95 $^{\circ}$ C 5min,
 95 $^{\circ}$ C 10sec
 55 $^{\circ}$ C 20sec, } 30 个循环

72 °C 30sec,
72 °C 10min,
4 °C至冷却;

实验结果验证:

分别取上述3μl PCR产物，跑2%的琼脂糖凝胶电泳，观察电泳后条带大小，是否与目的基因相同。全长碱基序列的PCR结果如图1所示，人PIK3IP1全长碱基序列为792bp，鼠Pik3ip1全长碱基序列为795bp，证明获得了人和鼠的全长碱基序列，经测序，结果正确。

用Qiagen胶回收试剂盒回收得到PCR产物。胶回收产物和载体质粒，选择对应的酶切反应酶分别进行双酶切。

使用的反应体系，如下:

试剂体积	
胶回收产物或载体质粒	不多于750ng或不多于2μg
QuickCut酶（购自Qiagen）胶回收产物共加3.33μl/载体共加2μl	
缓冲液	10μl
灭菌水	补足至100μl
酶切反应条件：胶回收产物37℃，酶切40min	
质粒37℃，酶切50-55min;	
酶切产物经琼脂糖凝胶电泳，胶回收得到目的条带进行连接:	
试剂体积（μl）	
载体	1
目的基因片段	7
T4连接酶	1
连接酶缓冲液	1

连接反应条件：37℃连接2小时，或16℃连接2小时，4℃过夜;

用所述方法，还分别构建了PIK3IP1-hIg，PIK3IP1-mIg，Pik3ip1- hIg，Pik3ip1- mIg（对应的碱基序列分别为SEQ ID NO.12、11、13、14）的质粒。

将构建好的质粒转化入细菌，培养获得目的克隆菌，将测序后序列正常的阳性克隆菌进行扩大培养。

采用NucleoBond Xtra Maxi Plus质粒提取和纯化试剂盒，按照说明书的指引进行质粒抽提和纯化。

实施例2 PIK3IP1-Ig、Flag-Ig融合蛋白质粒分别转染293T细胞和CHO稳转株的构建

1、采用线性聚乙烯亚胺（PEI）进行质粒转染。

以PIK3IP1-hIg融合蛋白质粒为例，方法如下:

培养293T细胞，以PEI（μg）：DNA总量（μg）=3:1配置PEI和DNA的混合溶液，加入细

胞培养皿中转染6-8小时后, 换含1%FBS和2mM丙戊酸的新鲜DMEM培养基, 继续培养细胞, 5天后, 收集细胞培养皿上清, 融合蛋白已分泌至上清中。

2、融合蛋白的提取、纯化和鉴定

细胞转染后5天, 收集细胞培养上清离心获得上清液, 采用GE公司高亲和力蛋白A柱, 按照其使用说明书进行融合蛋白的提取和纯化。之后将收集到的蛋白, 移入蛋白透析袋中, 在pH7.2-7.4的1×PBS中4℃透析过夜。透析后的蛋白用于后续实验。

融合蛋白跑SDS-PAGE凝胶, 考马斯亮蓝染色后切胶, 送质谱鉴定。

10%SDS-PAGE分离胶的配制 (5ml)

试剂体积 (ml)	
蒸馏水	1.3
30% Acr-Bis(29:1)	1.7
1M Tris, pH8.8	1.9
10% SDS	0.05
10% 过硫酸铵	0.05
TEMED	0.002

5%SDS-PAGE浓缩胶的配制 (2ml)

试剂体积 (ml)	
蒸馏水	1.4
30% Acr-Bis(29:1)	0.33
1M Tris, pH6.8	0.25
10% SDS	0.02
10% 过硫酸铵	0.02
TEMED	0.002

鉴定结果如图2a-图2d所示。根据质谱鉴定结果, 确定所纯化融合蛋白分别为PIK3IP1-hIg, PIK3IP1-mIg, Pik3ip1- hIg, Pik3ip1- mIg。

3、CHO稳转株的构建和鉴定

以人PIK3IP1稳转株构建为例: 培养CHO细胞系的Ham's F10全培养基配制方法如下: 500ml Ham's F10培养基含10%FBS、1%Hepes、1%链霉素和青霉素混合液、1×ADT。

将复苏后的CHO细胞系培养至传代2次, 细胞状态良好后, 取 1×10^5 细胞加入24孔板的一个孔内, 将该孔培养基调整至1ml, 待孔板内细胞长至融合度约90%, 吸去培养基。加适量PBS洗一遍, 后换为200μl无抗生素培养基。

用invitrogen公司Lipofectamin™ 2000试剂盒, 按说明书操作转染: 将0.8-1μg 表达PIK3IP1全长序列、载体为PCDAN3.1的质粒DNA加入50μl Opti-MEM中混合均匀。将2μl转染试剂Lipo2000加入50μl Opti-MEM中混合均匀。将稀释后的转染试剂逐滴加入稀释后的质粒DNA中, 将DNA- Lipo2000复合物加入铺有细胞的孔中。混匀后, 将24孔板放置于5%CO₂ 37℃

细胞培养箱；转染后6-8小时，吸去孔内液体，换为Ham's F10全培养基。继续将孔板放置于5%CO₂ 37℃细胞培养箱48小时。

取100mm×20mm细胞培养皿9个，每个培养皿加入含1000μg/ml G418的Ham's F10全培养基20ml，将24孔板内用500μl培养基重悬的CHO细胞按体积比1:100（1个细胞培养皿）、1:5000（3个细胞培养皿）、1:10000（2个细胞培养皿）、1:20000（1个细胞培养皿），即分别加入细胞悬液200μl、4μl、2μl、1μl至细胞培养皿中，将剩下的细胞悬液全部加入一个培养皿中，另将未做过转染正常培养的CHO细胞加入一个细胞培养皿作为筛选对照。混匀细胞后，于5%CO₂ 37℃细胞培养箱中培养；在细胞培养皿中培养5-7天后，取出培养皿，吸去原培养基，换含1000μg/ml G418的Ham's F10全培养基20ml。于5%CO₂ 37℃细胞培养箱中继续培养；一般转至培养皿中10天后可以观察到细胞单克隆形成。待未经转染的筛选对照培养皿中的细胞全部死亡时，进行转染PIK3IP1质粒的CHO细胞亚克隆挑选。

取1/3或一半细胞进行流式细胞术或WB鉴定，挑选出表达强度最高的2-3个克隆，进行细胞培养，冻存备用。

按照如上方法还制备了Pik3ip1稳转株、PIK3IP1-hIg稳转株，PIK3IP1-mIg稳转株，Pik3ip1-hIg稳转株，Pik3ip1- mIg稳转株。

实施例3 多克隆抗体的制备

选择SPF级6-8周龄雌性Balb/c小鼠2-3只，用于人PIK3IP1多抗的制备；选择SPF级体重200g左右雌性Wista大鼠，用于小鼠Pik3ip1多抗的制备。

初次免疫：免疫前，于免疫动物尾静脉取适量血液，提取血清，分装冻存，作为阴性对照的血清；每只小鼠按100μl CFA和等体积的100μg人PIK3IP1-mIg融合蛋白乳化后，注射于Balb/c小鼠双侧腋下及腹股沟，不少于4个点；每只大鼠按500μl CFA和等体积的500μg鼠Pik3ip1-mIg融合蛋白乳化后，注射于大鼠双侧腋下及腹股沟皮下，不少于4个点；免疫后2周，取免疫动物尾静脉血，制备血清，用ELISA或流式细胞术检测抗体效价。

第2次和第3次免疫：每只小鼠按100μl IFA和等体积的50μg人PIK3IP1-mIg融合蛋白，充分乳化后免疫小鼠；每只大鼠按500μl IFA和等体积的250μg鼠Pik3ip1-mIg融合蛋白，充分乳化后免疫大鼠；每次免疫后2周，检测抗体效价。

若免疫后第2或3次血清按1:10万倍稀释后，ELISA检测OD450值约1.5，或流式检测1:1000倍稀释有明显阳性峰，则可腹腔注射50μg人PIK3IP1-mIg融合蛋白或250μg鼠Pik3ip1-mIg融合蛋白，增强免疫；增强免疫后3-5天，处死动物，下腔静脉取血，制备多克隆抗体血清。

实施例4 多克隆抗体特异性的检测（以小鼠抗人PIK3IP1多克隆抗体为例）

转染PIK3IP1的293T细胞接种于玻璃底培养皿，加10%FBS的DMEM培养基培养过夜；吸去培养基，用PBS清洗2遍，4%多聚甲醛室温固定15min。吸去固定液，PBS漂洗3min，洗2遍；10%正常山羊血清室温封闭30min；吸去封闭血清，加入小鼠抗人PIK3IP1多克隆血清1:

200稀释后4℃孵育过夜；PBS漂洗3min，洗3遍；山羊抗小鼠Alexa Fluor 647 荧光二抗1:1000稀释，常温避光孵育1小时；PBS漂洗3min，洗3遍；10μg/ml WGA常温孵育10min；PBS漂洗3min，洗3遍；DAPI染色液染核3min；PBS漂洗3min，洗3遍；培养皿滴加抗淬灭封片剂，盖玻片封片。共聚焦显微镜观察，拍照。

采用免疫荧光和流式细胞染色对血清进行特异性和结合强度的检测。免疫荧光结果发现anti-PIK3IP1和anti-Pik3ip1多克隆抗体能分别与瞬时转染后的293T细胞膜上表达的PIK3IP1和Pik3ip1分子特异性结合。

流式细胞染色显示，实施例2制备的稳定表达PIK3IP1和Pik3ip1分子的CHO细胞株，能与不同稀释比例的anti-PIK3IP1和anti-Pik3ip1多克隆抗体呈现不同强度的结合，且多克隆抗体1:1000倍稀释后仍然能出现阳性染色（结果参见图3和图4）。

实施例5 Pik3ip1在细胞和组织中的定位表达研究

1、Pik3ip1在Pmel-1TCR转基因小鼠免疫激活过程中淋巴细胞上的表达

取hgp100₂₅₋₃₃多肽100μg和CFA等体积乳化，另取等量CFA与等体积PBS乳化；于雌性6-8周龄Pmel-1 TCR转基因小鼠右侧皮下广泛注射100μl hgp100₂₅₋₃₃多肽和CFA的乳化剂。另一组小鼠则皮下注射CFA与PBS的乳化剂100μl进行免疫；免疫24小时后，处死小鼠。取引流淋巴结，制备单细胞悬液，检测免疫过程中CD8⁺T细胞、CD11b⁺单核细胞、CD11c⁺DC细胞、CD19⁺B细胞上Pik3ip1的表达。

2、流式细胞术检测

收集待染色的细胞，用1%FBS的流式缓冲液洗1-2遍，2000rpm离心3min；标记好待用的流式管，若为多色染色，则每一个荧光需进行单独染色，以供调节荧光补偿；将离心后的细胞用流式缓冲液重悬，调整细胞浓度为 10^6 - 10^8 /ml，取100μl细胞悬液加入流式管中。按产品的说明向每个流式管中加入human-Ig或mouse-Ig等混匀，封闭细胞上的Fc受体。向封闭后的流式管内，加入一抗。混匀后，置于4℃冰箱，孵育30min。加入约2-3ml流式缓冲液，终止一抗染色。2000rpm离心3min。弃去上清，使流式管中细胞悬液的总体积约100μl。加入合适剂量的荧光二抗，混匀后，置于4℃冰箱，避光孵育30min；加入约2-3ml流式缓冲液，终止荧光二抗染色。洗涤细胞，2000rpm离心3min，弃上清。视细胞的数量，加入约300-400μl流式缓冲液。混匀后，流式上机检测。

3、PIK3IP1在人外周血主要淋巴细胞亚群的表达

本发明的发明人分离了健康人PBMC，采用流式细胞术对PIK3IP1在PBMC中主要淋巴细胞亚群的表达情况进行了检测。结果如图5所示，发现PIK3IP1在人外周血CD8⁺T细胞、CD4⁺T细胞、B细胞的表达较高。

4、Pik3ip1在小鼠组织、脾淋巴细胞亚群和常见细胞系的表达

本发明的发明人检测了小鼠Pik3ip1在PBMC、眼、脾、脑、卵巢、肺、淋巴结、膀胱、胰腺、肾、肝、小肠、胸腺、心脏、肌肉、子宫和睾丸中mRNA水平的表达情况，结果如图6所

示,发现其在肌肉、PBMC、淋巴结和脾中表达水平较高。

5、Pik3ip1在小鼠脾淋巴细胞表达的流式细胞术检测

本发明的发明人分离并制备了小鼠脾单细胞悬液,采用流式细胞术对Pik3ip1在脾主要淋巴细胞亚群的表达情况进行了检测。结果如图7所示,发现Pik3ip1在CD8⁺T细胞、CD4⁺T细胞、B细胞、CD11b⁺细胞和CD11c⁺细胞上均能检测到表达,在T细胞、B细胞和CD11b⁺细胞的表达较高。

6、Pik3ip1在小鼠常见细胞系的表达

本发明的发明人检测了Pik3ip1在小鼠黑色素瘤细胞系B16、小鼠巨噬细胞系P338D1、小鼠树突状细胞系DC2.4、小鼠结肠癌细胞系CT26、小鼠T细胞淋巴瘤细胞系EL4、小鼠膀胱癌细胞系MB49的表达,结果如图8所示,发现Pik3ip1在P338D1、DC2.4、EL4高表达。

7、Pik3ip1在小鼠免疫激活过程中淋巴细胞上的表达

本发明的发明人用100 μ g hgp100₂₅₋₃₃多肽和CFA乳化后特异性免疫,或单独用CFA乳化后非特异性免疫Pmel-1TCR转基因小鼠。免疫激活24小时后,检测Pik3ip1在Pmel-1TCR转基因小鼠引流淋巴结中CD8⁺T细胞、CD11b⁺单核细胞、CD11c⁺DC细胞、CD19⁺B细胞的表达。结果如图9所示,发现Pik3ip1在上述淋巴细胞上的表达,随免疫激活强度的不同呈现变化。

实施例6 抗原特异性免疫反应中Pik3ip1 缺失增强了T细胞增殖

1、day0, CFSE-标记的 3×10^5 个OT1小鼠脾细胞尾静脉转输入Pik3ip1^{-/-}(Pik3ip1 knock-out, KO)和野生型小鼠(wild-type, WT)中。

2、day1, KO和WT鼠均腹腔免疫 OVA₂₅₇₋₂₆₄(100 μ g), 其中以CFA作为佐剂。

3、day2, 小鼠牺牲, 淋巴细胞进行流式分析, 观察CD8⁺T细胞的增殖情况。

结果如图10所示: KO鼠的CD8⁺T细胞增殖能力比WT鼠的强, 表明Pik3ip1的缺失有利于T细胞增殖。

实施例7 肿瘤模型中Pik3ip1 缺失增强了T细胞增殖

1、anti-mCD3, anti-mCD28扣板: anti-mCD3, anti-mCD28单克隆抗体, 各配成终浓度0.125 μ g/ml, 各50 μ l/孔加入96孔板, 封板, 4 $^{\circ}$ C过夜; 吸去孔内未结合的蛋白溶液, 按100 μ l/孔加入冷的PBS, 重复洗板至少3遍。

2、 2×10^5 个MC38肿瘤细胞皮下接种在KO和WT鼠的侧翼。

3、两周后, 取出KO和WT鼠的脾细胞, 制成单细胞悬液, 用stem cell公司的EasySepTMmouseCD4⁺T cell isolation kit和EasySepTMmouseCD8⁺T cell isolation kit, 按照试剂盒说明书操作, 分选出CD4⁺和CD8⁺T细胞。按 3.5×10^5 细胞/孔加入anti-mCD3, anti-mCD28扣板的孔板中。

4、在24小时、48小时和72小时检测T细胞增殖情况。

结果如图11所示: 24小时、48小时和72小时, Pik3ip1敲除小鼠的CD4⁺和CD8⁺T细胞的增

殖均高于野生型小鼠的，其中48小时和72小时的差异具有显著性。

实施例8 PIK3IP1 与癌症患者 T 细胞的抑制状态有关

1、从中山大学附属口腔医院随机选取口腔鳞癌（Oral Squamous Cell Carcinoma, OSCC）患者5例，抽取每个患者10ml外周血，参照stemcell公司07811号产品的试剂盒说明书进行外周血单个核细胞的分离，得到每个患者的PBMC。

2、流式分析每个样品PIK3IP1的表达强度，得到平均荧光强度值（Mean Fluorescence Index, MFI）值。

3、anti-hCD3, anti-hCD28扣板：anti-hCD3, anti-hCD28单克隆抗体，各配成终浓度0.125 μ g/ml，各50 μ l/孔加入96孔板，封板，4 $^{\circ}$ C过夜；吸去孔内未结合的蛋白溶液，按100 μ l/孔加入冷的PBS，重复洗板至少3遍。

4、CFSE标记每个样品，加入扣有anti-hCD3, anti-hCD28的孔板中。

5、两天后收集样品，通过流式分析OSCC和HCC患者CD4 $^{+}$ 与CD8 $^{+}$ T细胞的CFSE比例确定增殖强度。

结果如图12所示：OSCC患者外周血的CD4 $^{+}$ 和CD8 $^{+}$ T细胞中PIK3IP1的荧光强度与其增殖强度呈负相关，且所述相关性均具有显著性。表明OSCC患者外周血的CD4 $^{+}$ 和CD8 $^{+}$ T细胞中PIK3IP1的表达强度与相应细胞的增殖能力负相关，PIK3IP1的表达会抑制相应细胞的增殖。

实施例9 Pik3ip1-mIg在体内促进gp100特异性Pmel-1CD8 $^{+}$ T细胞的增殖

1、Pik3ip1-mIg融合蛋白对CD8 $^{+}$ T细胞体内增殖影响的研究方法

取雌性6-8周龄Pmel-1 TCR转基因小鼠2只，用CO $_2$ 处死后，取脾，研磨制成细胞悬液，用ACK裂解红细胞，0.22 μ m无菌滤网过滤离心，PBS重悬细胞，制备成单细胞悬液；用CFSE标记细胞。

用PBS调整细胞浓度为1 $\times 10^7$ /毫升，每只C57BL/6小鼠尾静脉注射250-300 μ l细胞悬液，共注射10只6-8周龄雌性C57小鼠；过继转输gp100特异性Pmel-1脾细胞后第1天，按每只小鼠hgp100₂₅₋₃₃多肽100 μ g，与CFA配成100 μ l总体积充分乳化后，给予每只实验鼠右侧皮下注射，同时分别对3只小鼠腹腔注射Pik3ip1-mIg，7只小鼠腹腔注射Flag-mIg融合蛋白，剂量均为200 μ g，300 μ l/只；于过继转输后第2天开始，每天分别处死1只腹腔给予Flag-mIg融合蛋白小鼠，取引流淋巴结制成单细胞悬液。流式抗体Anti- mouse CD90.1 APC，Anti- mouse CD8 BV421染色标记细胞；流式上机检测CD90.1、CD8双阳性细胞CFSE的增殖峰比例。待检测到明显而规则的增殖峰出现时，则处死实验组和对照组各3只小鼠，检测CD8 $^{+}$ T细胞的增殖水平。

2、结果

为了研究Pik3ip1-mIg融合蛋白在体内对CD8 $^{+}$ T细胞增殖的影响，本研究检测了gp100特异性Pmel-1脾细胞过继转输C57BL/6后，hgp100₂₅₋₃₃多肽和CFA乳化免疫小鼠，腹腔给予Pik3ip1-mIg融合蛋白和Flag-mIg 4天后，gp100特异性Pmel-1CD8 $^{+}$ T细胞体内增殖的情况。由

图13可以看出：与给予Flag-mIg对照蛋白相比，Pik3ip1-mIg融合蛋白促进了gp100特异性Pmel-1CD8⁺T的增殖。Pik3ip1-mIg融合蛋白组CD8⁺T细胞增殖平均比例为88.32%，而Flag-mIg组CD8⁺T细胞的增殖平均比例为53.34%，明显低于Pik3ip1-mIg融合蛋白组。

实施例10 Pik3ip1-mIg融合蛋白增强2A对小鼠B16-F10成瘤的免疫治疗效果——Pik3ip1-mIg联合2A治疗抑制B16-F10肿瘤的生长

1、4-1BB激活抗体Anti-m4-1BB（2A）的提取和纯化

复苏杂交瘤2A并培养，将培养基连同细胞离心后取上清，0.45μm过滤器过滤上清，收集滤液置于冰上或4℃保存；用亲和力蛋白G柱进行Anti-m4-1BB（2A）的纯化，提纯后的抗体移入蛋白透析卡中，在pH7.2-7.4的1×PBS中，4℃透析24-48小时。

2、Pik3ip1-mIg融合蛋白联合2A治疗小鼠恶性黑色素瘤实验方法

复苏DC2.4细胞并培养，用1ml含10%FBS的RPMI 1640培养基重悬细胞，按工作浓度为5-8μM的gp100₂₅₋₃₃多肽标记DC2.4细胞后，用适量PBS重悬细胞，配成 3.5×10^6 细胞/毫升。

按前述方法制备Pmel-1 TCR转基因小鼠脾和（或）淋巴结细胞单细胞悬液，按每300μl细胞悬液至少 1×10^7 /细胞的比例重悬细胞；体重相近的SPF级6-8周龄雌性C57BL/6小鼠，设置实验小鼠组别为：Flag-mIg对照组、Pik3ip1-mIg治疗组、2A治疗组、Pik3ip1-mIg联合2A治疗组。每组至少5只小鼠，皮下广泛注射标记了hgp100₂₅₋₃₃多肽的DC2.4细胞悬液100μl/小鼠，同时尾静脉注射gp100特异性Pmel-1脾细胞悬液300μl。

小鼠免疫一周后，将细胞浓度为 3×10^6 /ml的B16-F10细胞悬液按每只小鼠100μl皮下注射成瘤；自皮下成瘤后每3天，经腹腔给予对应组300μl PBS配制的蛋白溶液，分别含200μg Flag-mIg、200μg Pik3ip1-mIg、200μg 2A、200μg Pik3ip1-mIg+200μg 2A；观察肿瘤生长情况，待可于皮下摸及肿瘤开始，每隔一天用电子游标卡尺测量并记录肿瘤大小，直至肿瘤长至平均直径约1.5cm。肿瘤平均直径计算方法为：（长径+宽径）/2。

3、结果

通过研究Pik3ip1-mIg融合蛋白对小鼠黑色素瘤的治疗，明确该蛋白对CD8⁺T杀伤肿瘤功能的影响。本发明发明人构建了Pik3ip1-mIg融合蛋白单独和联合2A治疗小鼠B16-F10肿瘤生长的模型。结果发现：如图14A所示，Pik3ip1-mIg融合蛋白对B16-F10肿瘤的生长有抑制作用，但作用不显著（ $p=0.062$ ）。如图14B所示，Pik3ip1-mIg融合蛋白联合2A治疗B16-F10成瘤，能明显抑制肿瘤的生长（ $p=0.029$ ）。

于成瘤后20天，采集实验各组荷瘤小鼠的大体观、离体肿瘤的照片。由图15A可以看出：大体看来，Pik3ip1-mIg融合蛋白联合2A治疗组，B16-F10成瘤较Flag-mIg组、单独给予Pik3ip1-mIg融合蛋白组、单独给予2A组平均直径小；其次为单独给予2A组；单独给予Pik3ip1-mIg融合蛋白组瘤体平均直径稍小于Flag-mIg组。由图15B肿瘤离体后的影像也能看出相同的结果。

以上，对本发明的实施方式进行了说明。但是，本发明不限于上述实施方式。凡在本发明的精神和原则之内，所做的任何修改、等同替换、改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

权利要求

1. PIK3IP1抑制剂在制备用于调控受试者免疫应答的药物中的用途；优选，所述PIK3IP1抑制剂是PIK3IP1、PIK3IP1ECD、PIK3IP1ECD融合分子或PIK3IP1的抗体。

2. PIK3IP1抑制剂和抗原一同在制备用于增强受试者对抗原的免疫应答的药物中的用途，所述增强包括给受试者施用抗原和PIK3IP1抑制剂，使得受试者对抗原的免疫应答得到增强；优选，所述PIK3IP1抑制剂是PIK3IP1、PIK3IP1ECD、PIK3IP1ECD融合分子或PIK3IP1的抗体。

3. 如权利要求1或2所述的用途，其特征在于，所述调控受试者免疫应答或增强受试者免疫应答为增强受试者CD8⁺T细胞和/或CD4⁺T细胞的增殖。

4. 如权利要求2或3所述的用途，其特征在于，所述抗原是癌性细胞、肿瘤抗原、病毒抗原、细菌抗原；

优选所述抗原为黑素瘤的抗原肽；更优选为肽gp100、MAGE抗原、Trp-2、MART1和/或酪氨酸酶；更优选为hgp100₂₅₋₃₃；

优选所述抗原是OVA，更优选为OVA₂₅₇₋₂₆₄；

优选所述抗原是癌性细胞，更优选为MC38细胞，B16细胞，和/或B16-F10细胞。

5. PIK3IP1抑制剂单独或者和另一种或多种治疗剂联合在制备治疗肿瘤药物中的用途；优选，所述PIK3IP1抑制剂是PIK3IP1、PIK3IP1ECD、PIK3IP1ECD融合分子或PIK3IP1的抗体。

6. PIK3IP1抑制剂和4-1BB的激活性抗体联合在制备治疗肿瘤的药物中的用途；优选所述4-1BB的激活性抗体是抗体2A；优选，所述PIK3IP1抑制剂是PIK3IP1、PIK3IP1ECD、PIK3IP1ECD融合分子或PIK3IP1的抗体。

7. 如权利要求5或6所述的用途，其特征在于，所述肿瘤是对免疫疗法有响应的肿瘤；

优选所述肿瘤选自黑色素瘤、白血病、肺癌、肝癌、卵巢癌、宫颈癌、皮肤癌、膀胱癌、结肠癌、乳腺癌、神经胶质瘤、肾癌、胃癌、食道癌、口腔鳞状细胞癌、头颈癌；

优选，所述肿瘤是转移性的；

优选，所述肿瘤为结肠癌、黑色素瘤、口腔鳞状细胞癌、肝细胞癌。

8. 一种用于调控受试者免疫应答或治疗肿瘤的药物组合物，其包含PIK3IP1抑制剂，和药学上可接受的载体；

优选，所述药物组合物进一步含有另一种或多种治疗剂；

优选，所述PIK3IP1抑制剂是PIK3IP1、PIK3IP1ECD、PIK3IP1ECD融合分子或PIK3IP1的抗体。

9. 如权利要求1-7任一项所述的用途或权利要求8所述的药物组合物，其特征在于，所述PIK3IP1包含选自SEQ ID NO.1、2、3、4、5、6、7和/或8的序列；所述PIK3IP1ECD包含选自SEQ ID NO.9和/或10的序列；PIK3IP1ECD融合分子包含选自SEQ ID NO.9和/或10的序列；

优选，所述PIK3IP1由选自SEQ ID NO.1、2、3、4、5、6、7或8的序列组成；

优选，所述PIK3IP1ECD由选自SEQ ID NO.9或10的序列组成；

优选，所述PIK3IP1ECD融合分子的至少一个融合伴侣选自Fc、白蛋白和聚乙二醇；

优选，所述PIK3IP1ECD融合分子的至少一个融合伴侣是Fc；

优选，所述PIK3IP1ECD融合分子的至少一个融合伴侣是IgGFc；更优选所述IgGFc的碱基序列由选自SEQ ID NO.15或16的序列组成；

优选，所述PIK3IP1ECD融合分子的碱基序列由选自SEQ ID NO.11、12、13或14的序列组成。

10. 如权利要求5所述的用途或权利要求8所述的药物组合物，其特征在于，所述另一种或多种治疗剂选自肿瘤化疗剂，能够活化T细胞的化合物，和/或血管生成抑制剂；

优选，所述肿瘤化疗剂选自氮芥、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、异环磷酰胺、塞替派、卡莫司汀、司莫司汀、白消安、顺铂、奥沙利铂、卡铂、草酸铂、丝裂霉素、甲氨蝶呤、5-FU、FT-207、卡培他滨、6-巯基嘌呤、6-TG、羟基脲、阿糖胞苷、吉西他滨、培美曲塞、放线菌素D、柔红霉素、阿霉素、表阿霉素、阿克拉霉素、光辉霉素、伊立替康、拓扑替康、羟基喜树碱、紫杉醇、多西他赛、长春花碱、长春新碱、长春瑞滨、鬼臼碱类和高三尖杉酯碱组成的组；

优选，所述能够活化T细胞的化合物选自T细胞共刺激性分子的激活性抗体；更优选为CTLA-4、OX-40、4-1BB或ICOS的激活性抗体，抗CD40抗体；更优选为4-1BB激活性抗体2A；

优选，所述血管生成抑制剂选自来那度胺、沙利度胺、贝伐单抗、凡德他尼、瓦他拉尼、舒尼替尼、阿西替尼、帕唑帕尼和4-(4-氟-2-甲基吡啶-5-基氧基)-6-甲氧基-7-(3-吡咯烷-1-基丙氧基)喹唑啉组成的组。

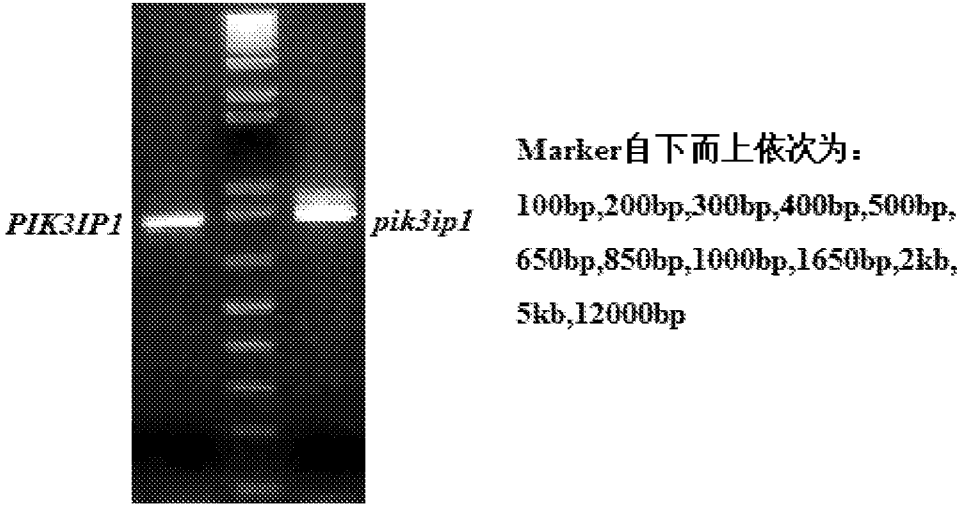


图 1

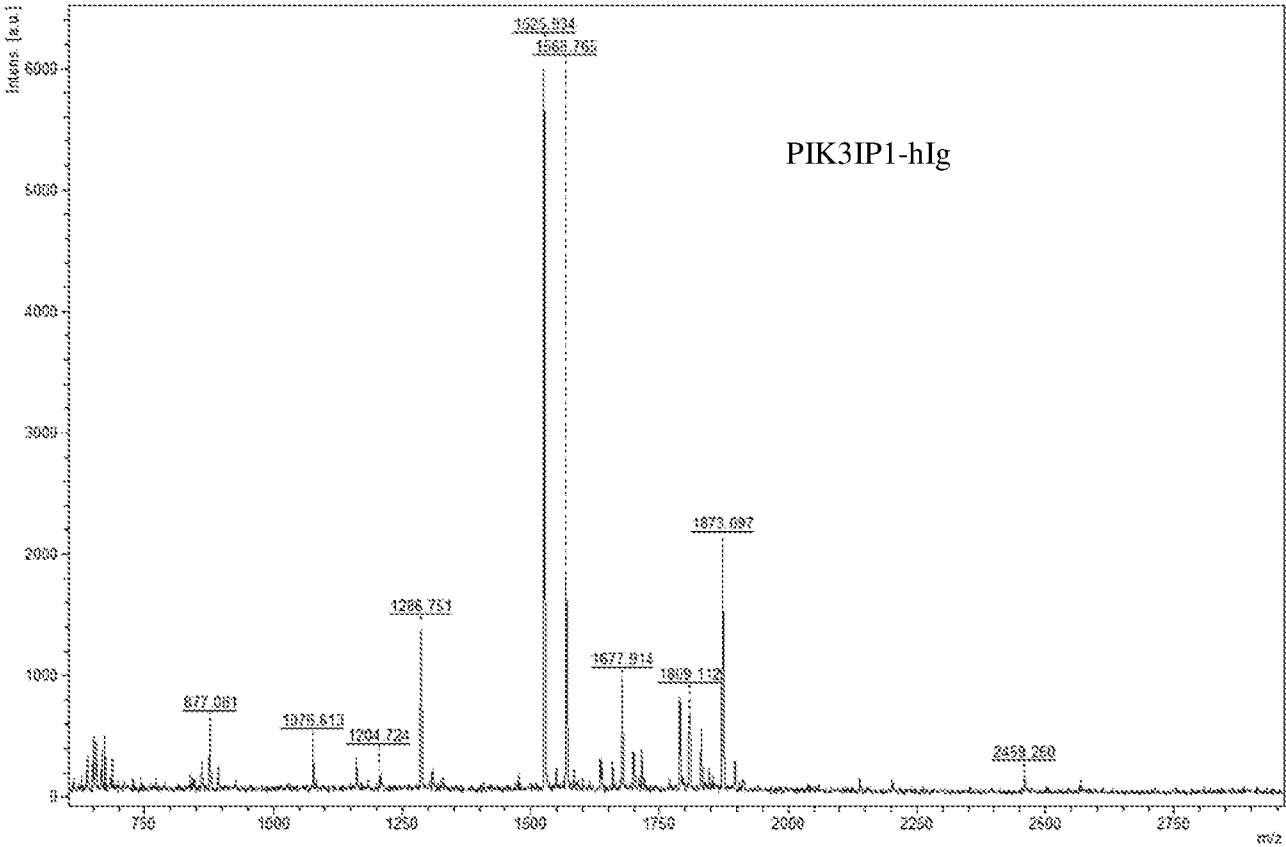


图 2a

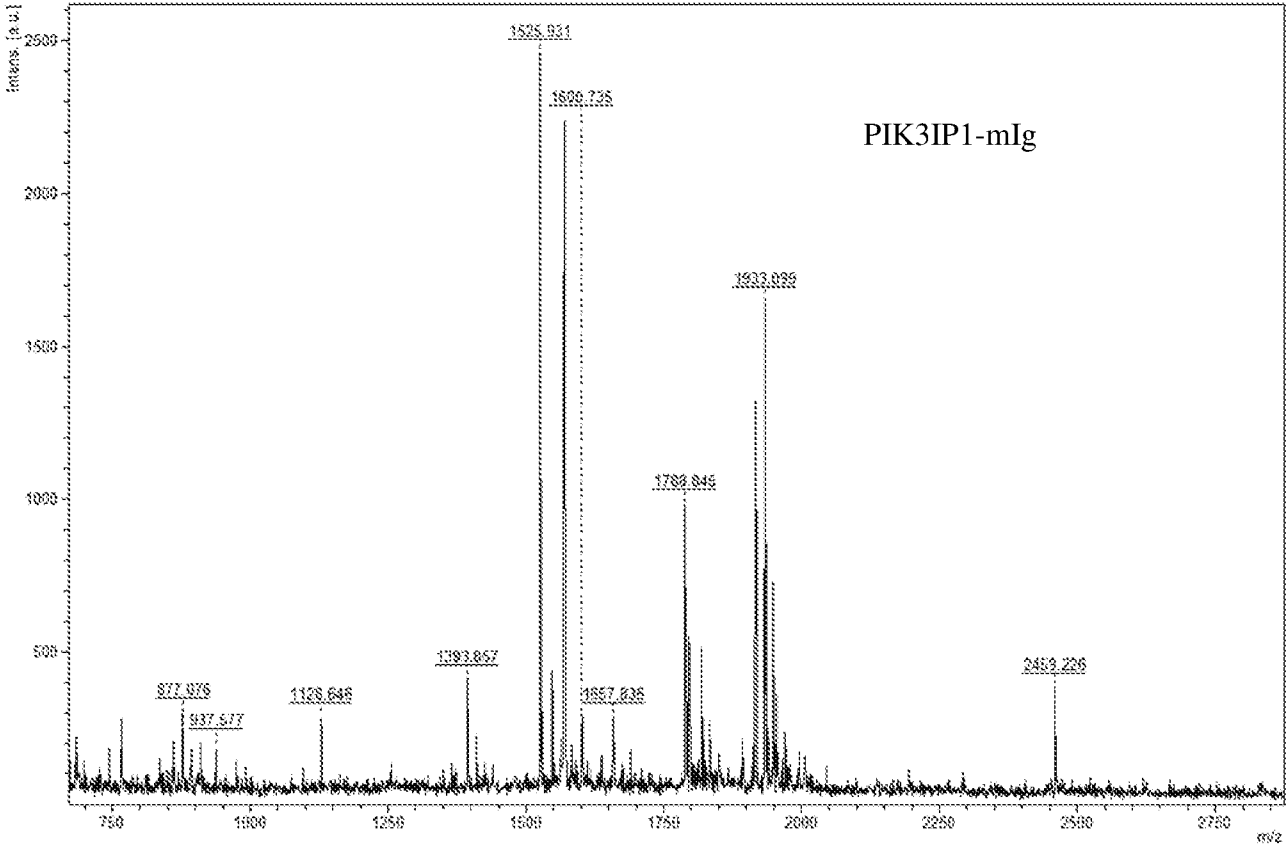


图 2b

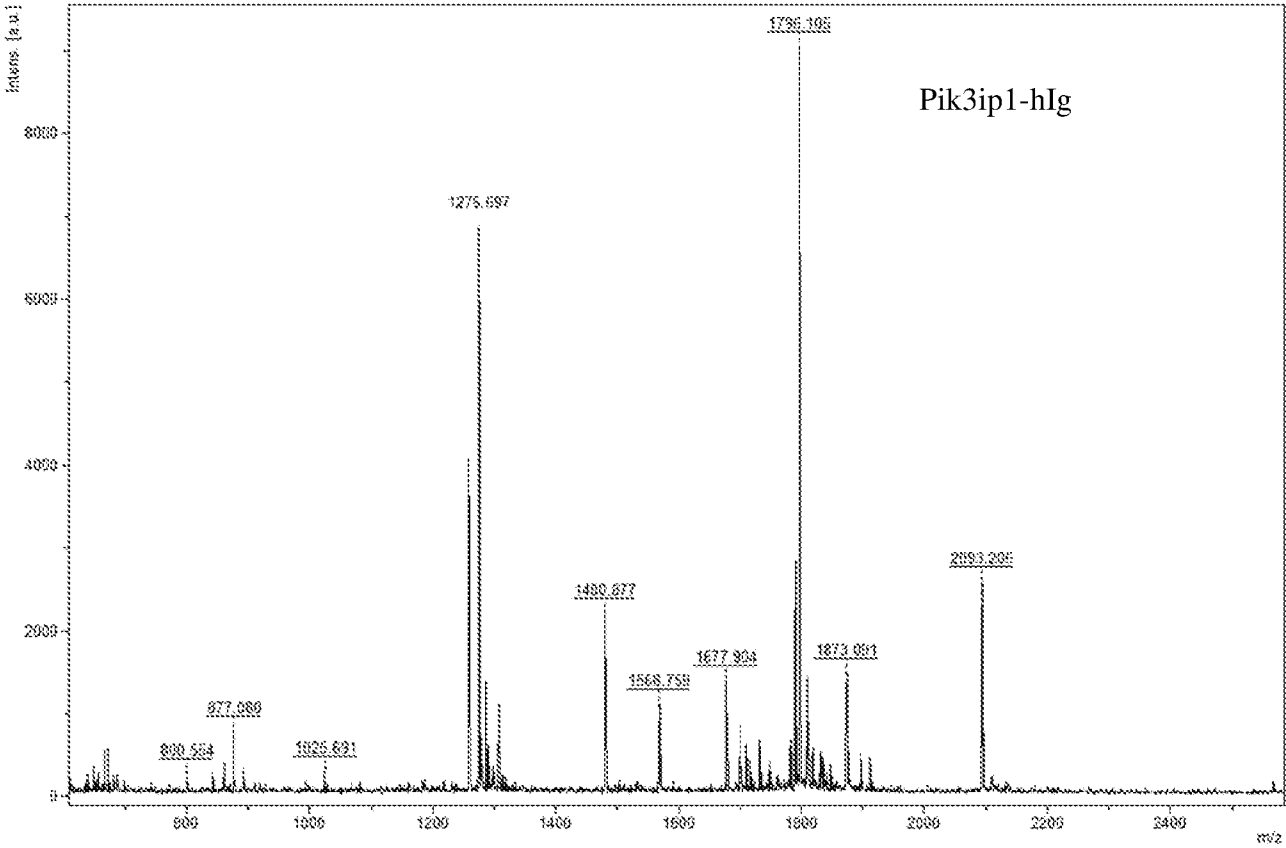


图 2c

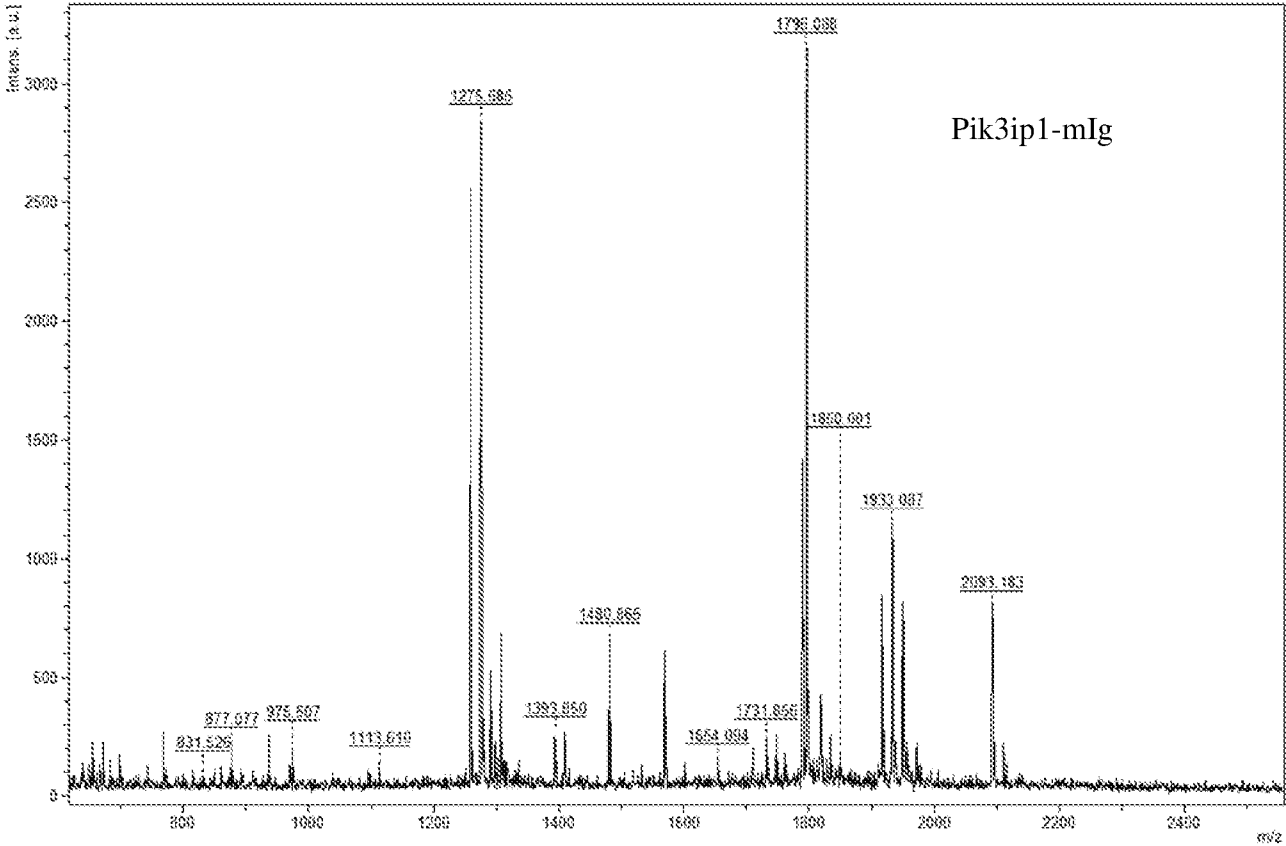


图 2d

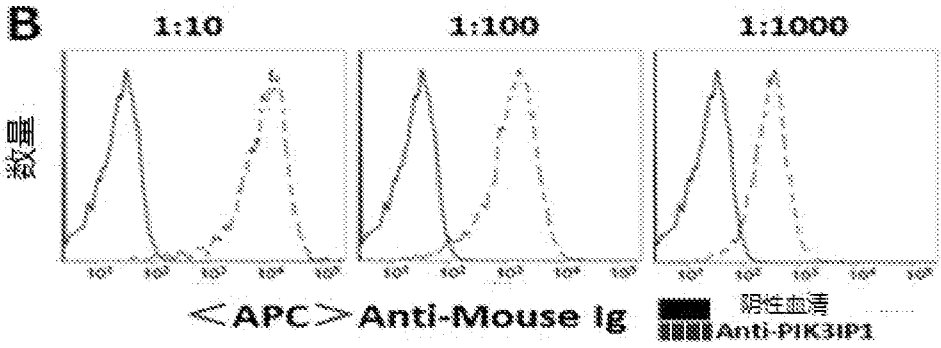


图 3

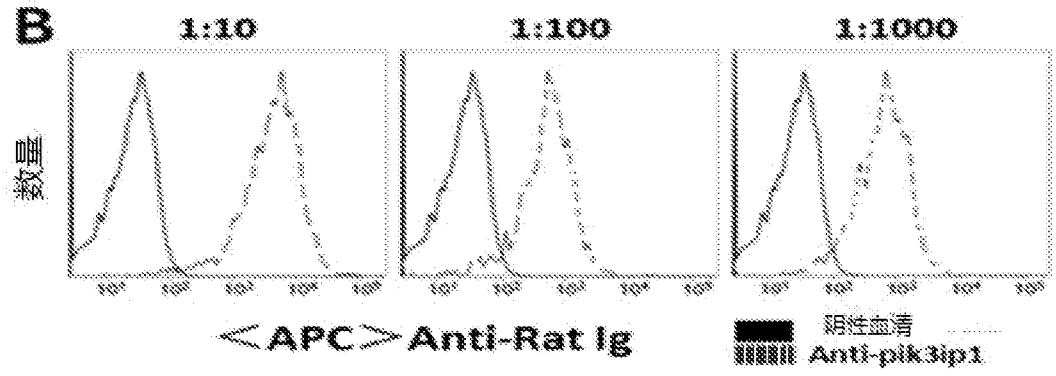


图 4

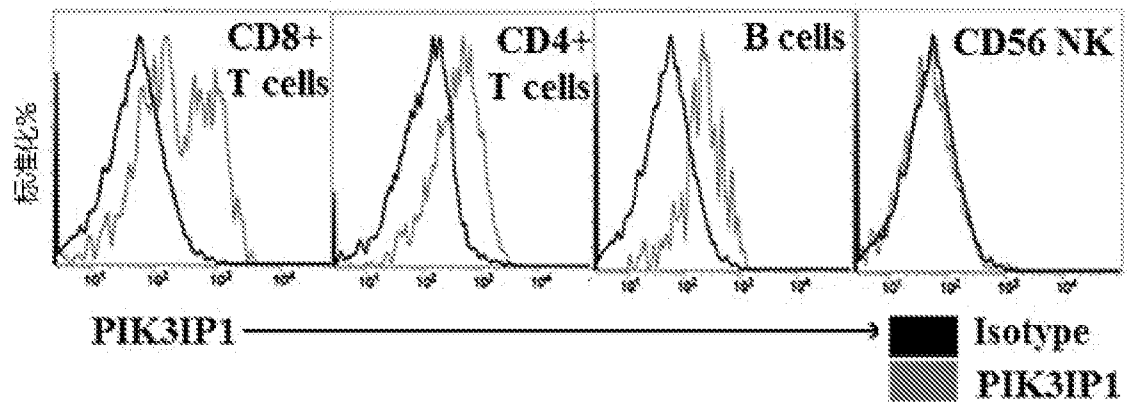


图 5

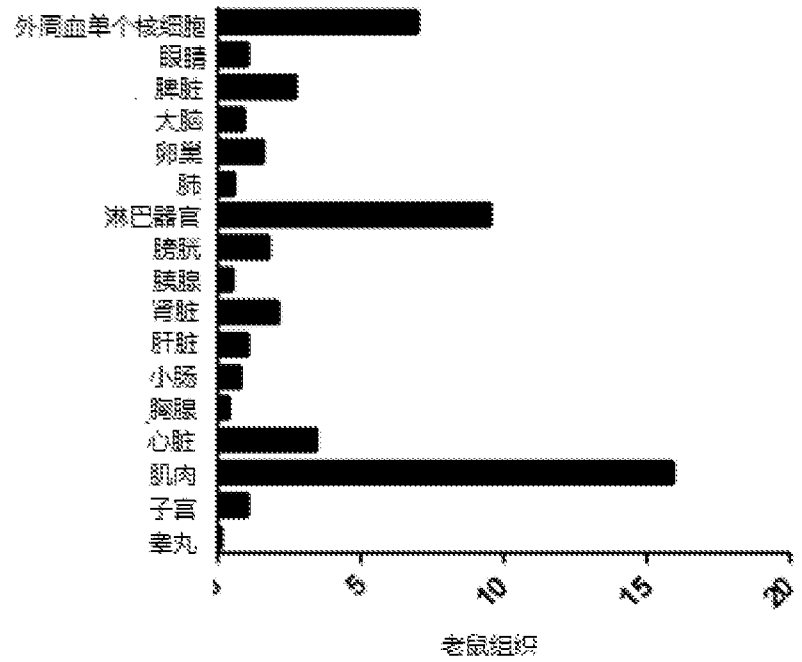


图 6

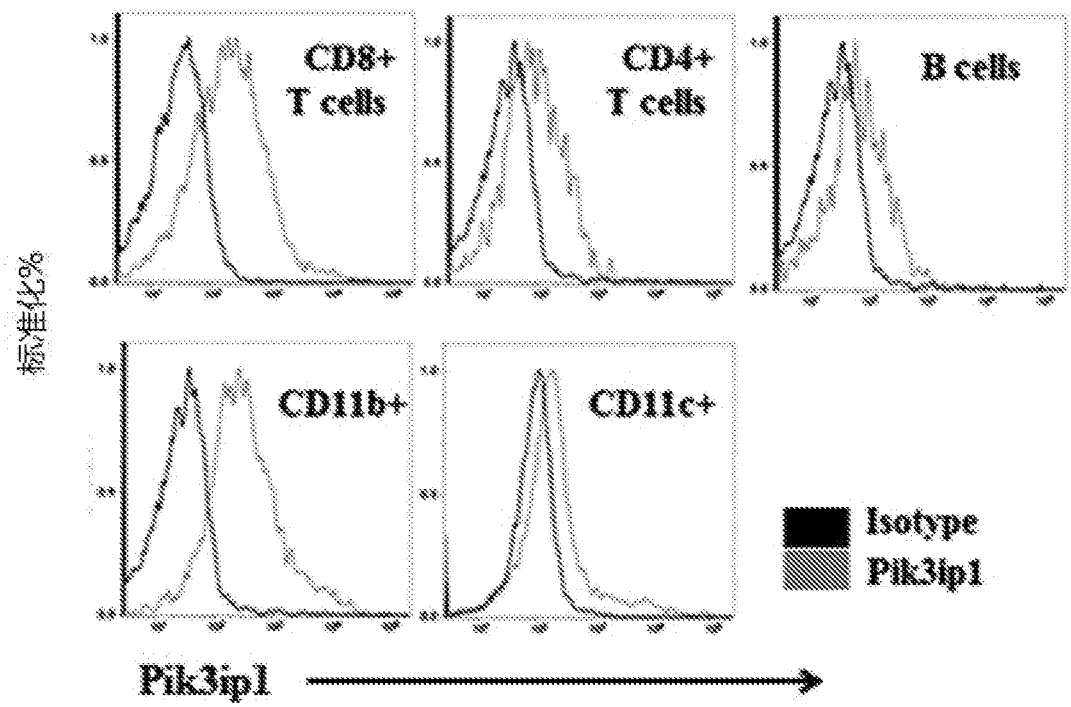


图 7

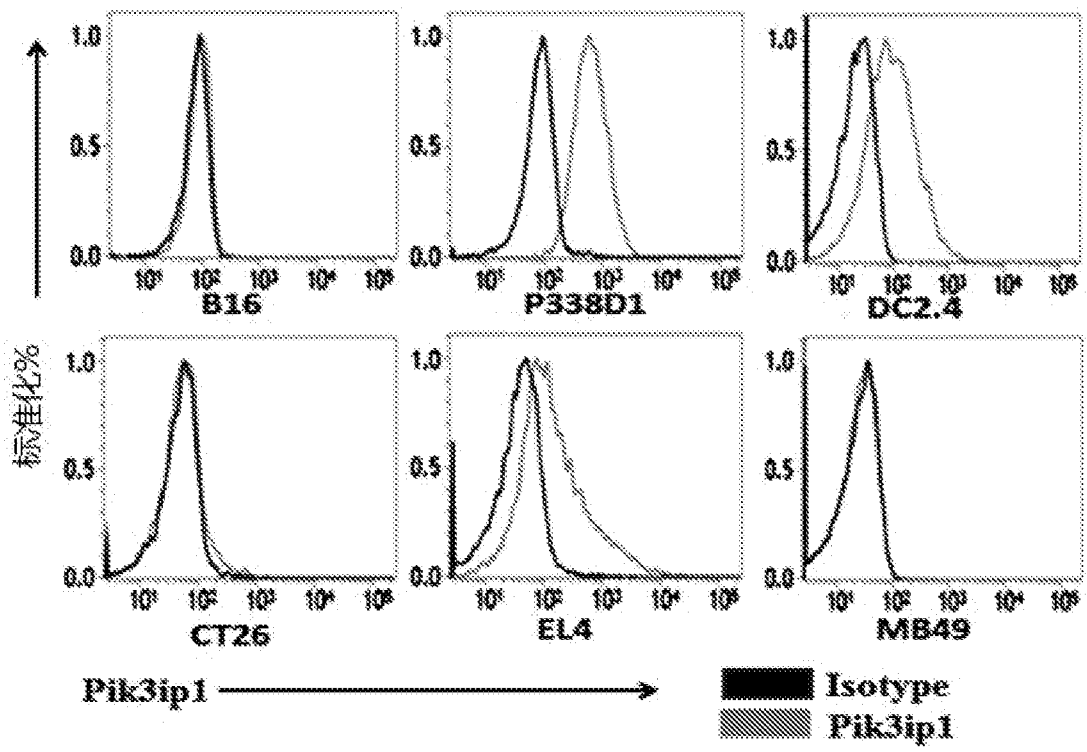


图 8

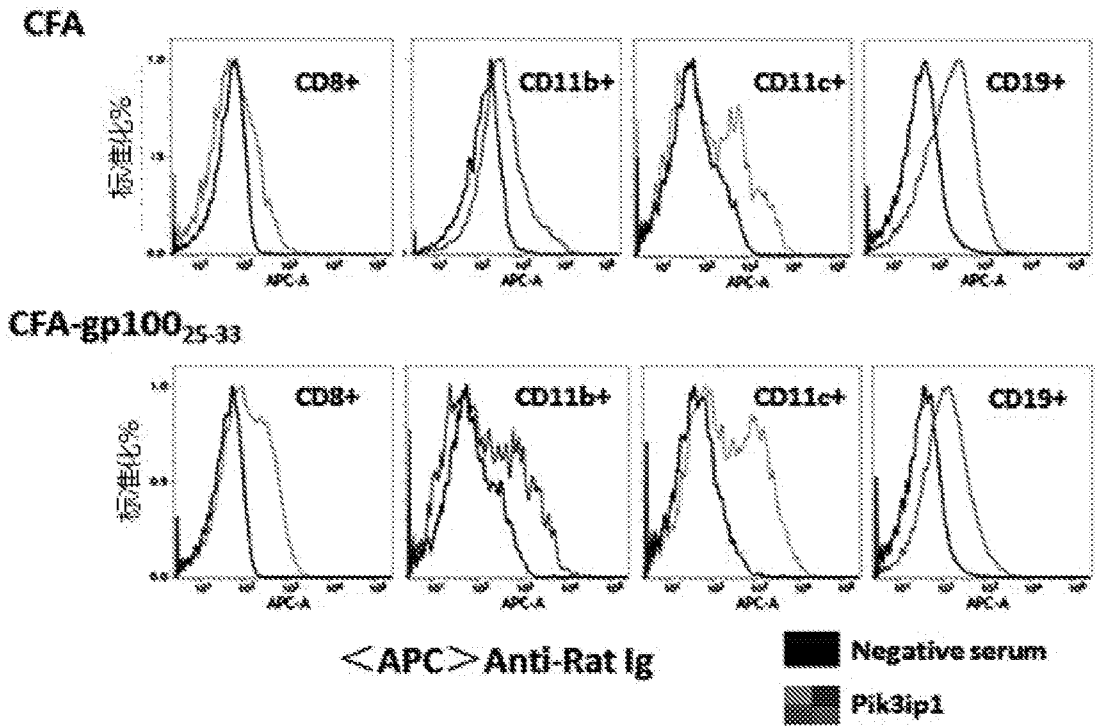


图 9

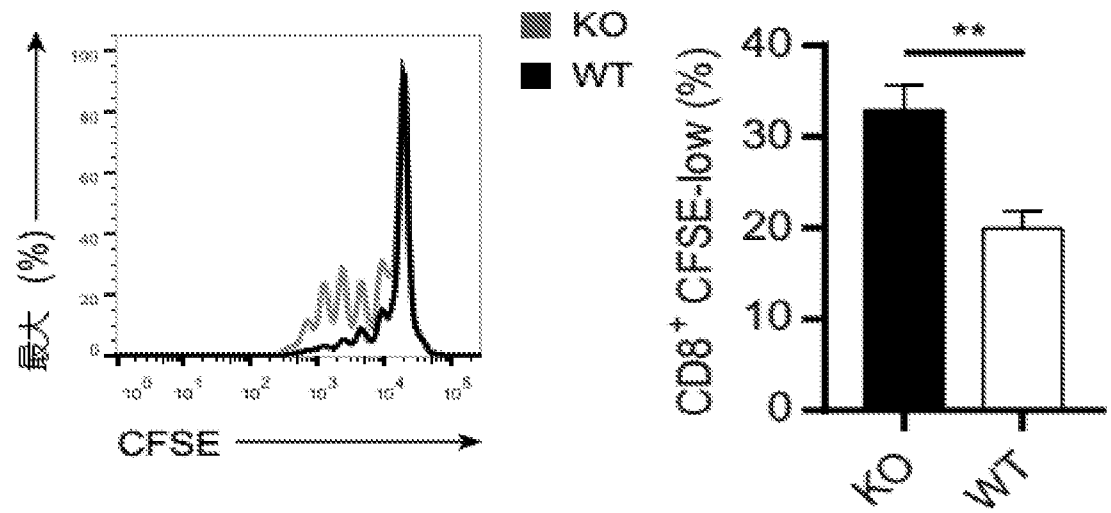


图 10

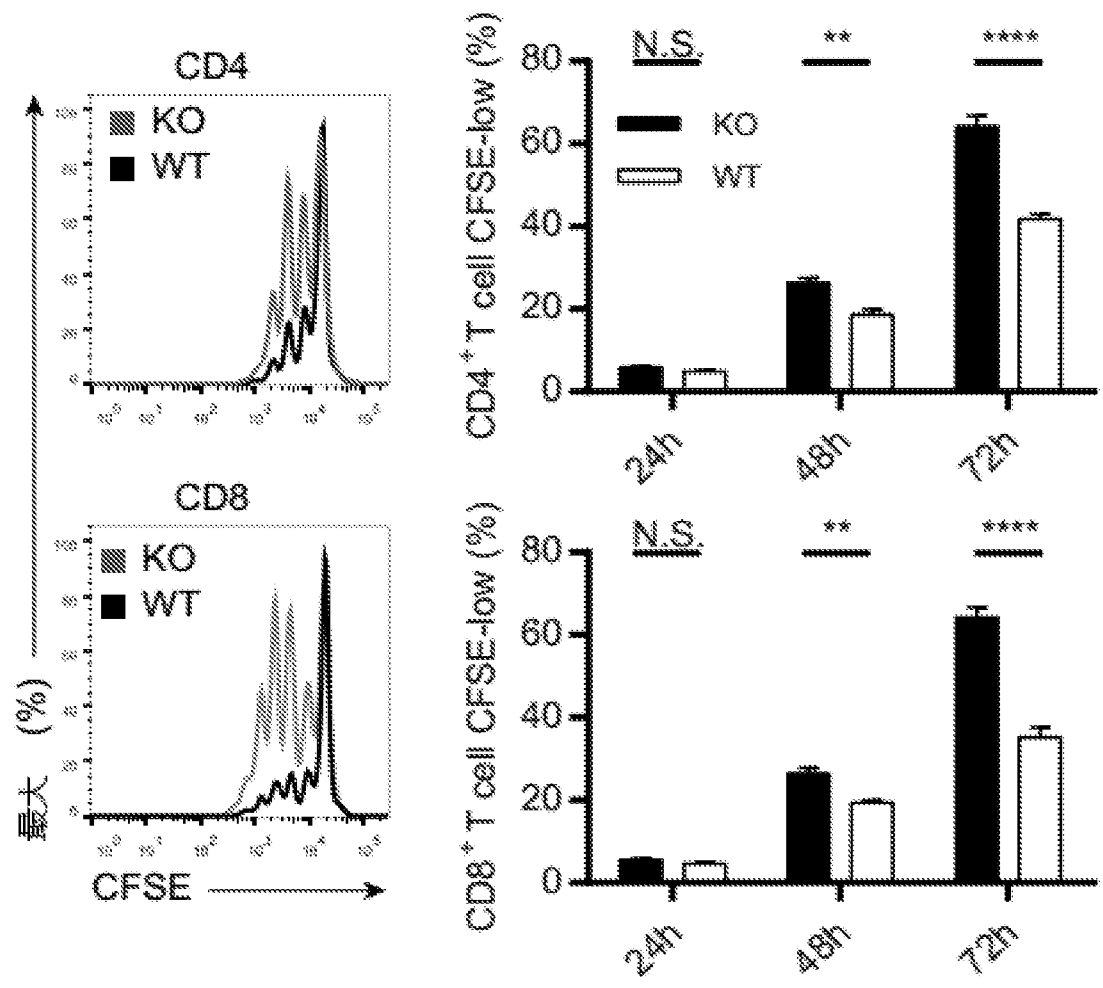


图 11

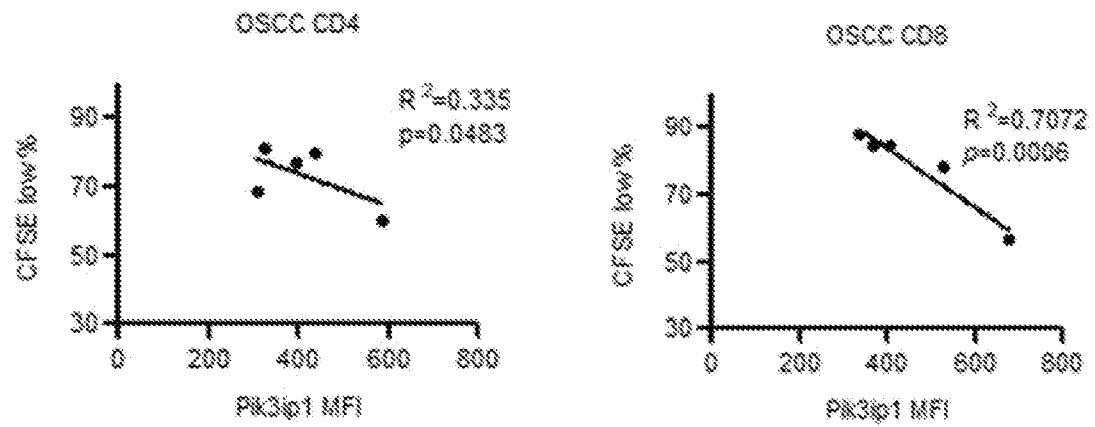


图 12

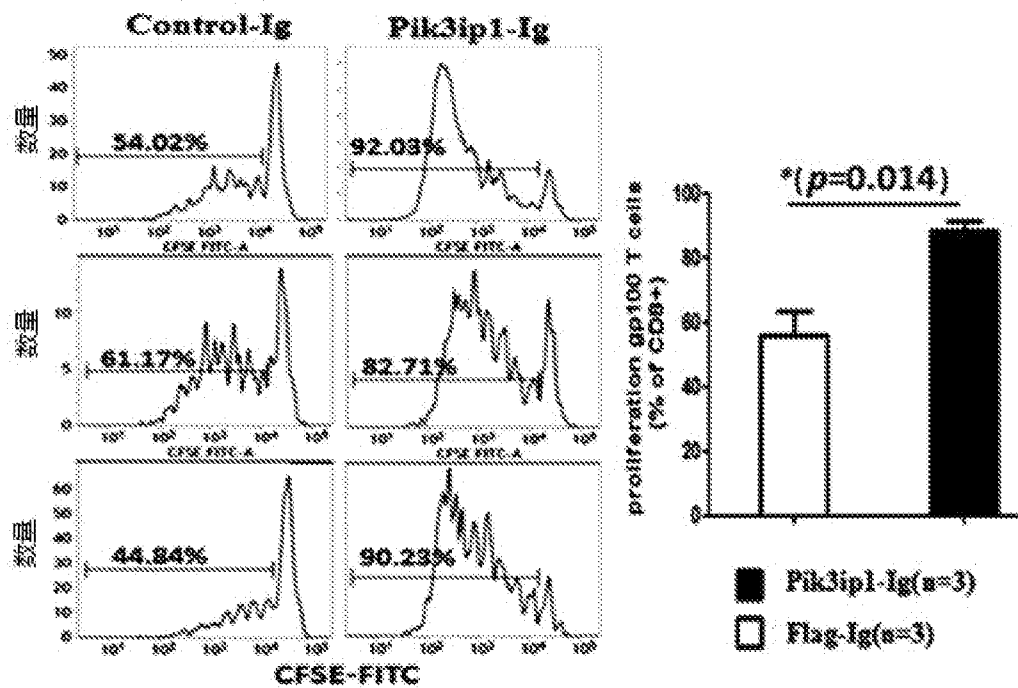


图 13

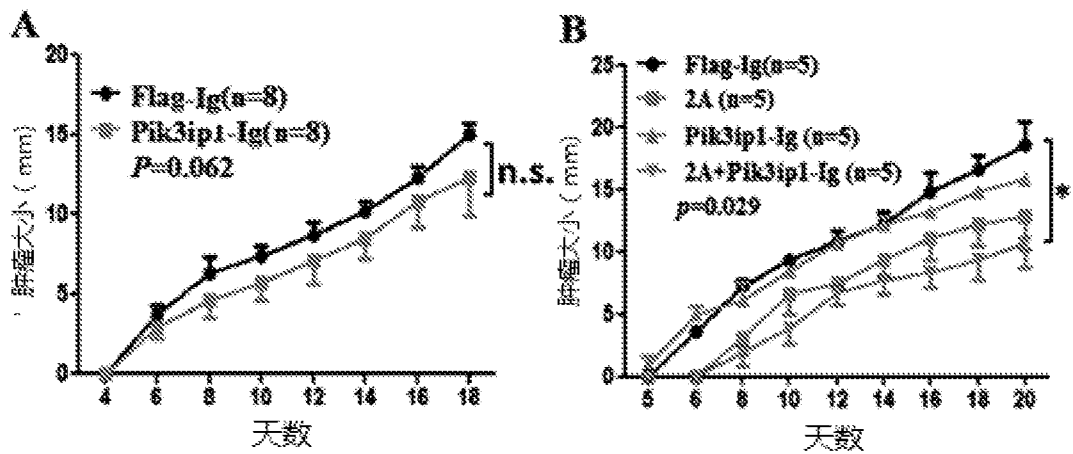


图 14

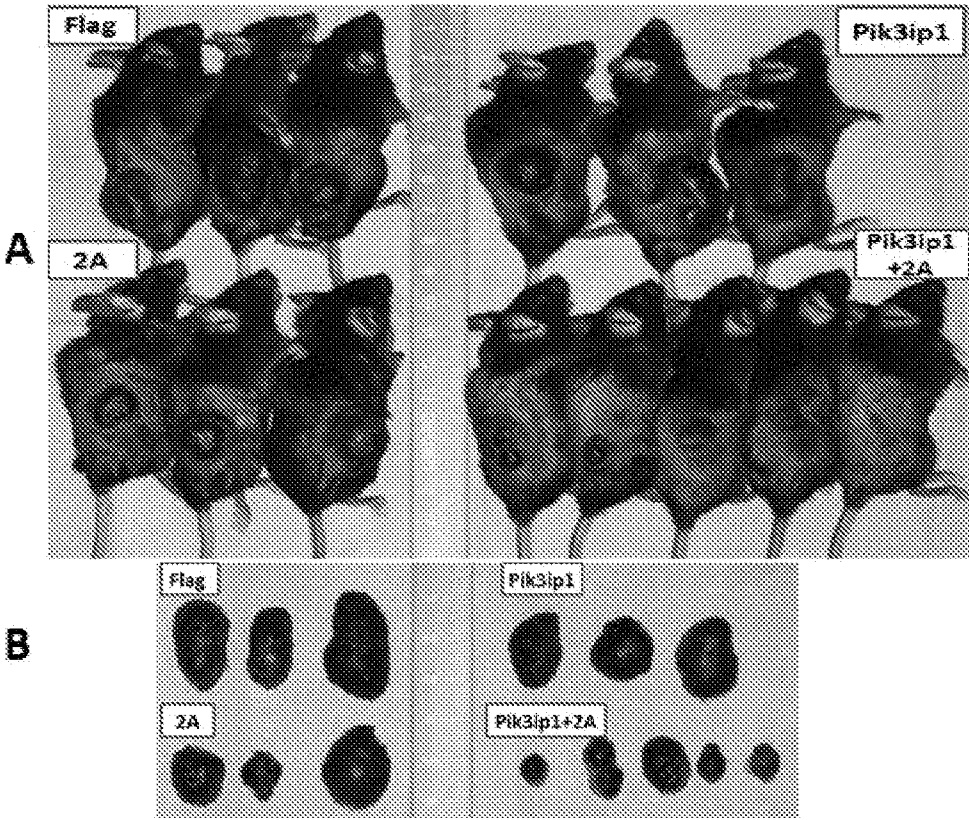


图 15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/073451

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 38/17(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, CPRSABS, DWPI, SIPOABS, CNKI, ISI Web of Knowledge: 磷脂酰肌醇3激酶, 抑制剂, 免疫应答, 肿瘤, 癌症, PI3K, phosphatidylinositol, kinase, PIK3IP1, interacting protein 1, cancer; GENBANK, EMBL, 中国专利生物序列数据库, searched sequences: SEQ ID NOs: 1-14. China Patents Biological Sequence Search System: search for SEQ ID NOs: 1-14.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2016025734 A1 (CHILDRENS MEDICAL CENTER ET AL.) 28 January 2016 (2016-01-28) claims 1 and 2	1, 5, 7, 8, 10
X	WO 2016092508 A1 (MASSACHUSETTS GEN HOSPITAL ET AL.) 16 June 2016 (2016-06-16) abstract	1, 5, 7, 8, 10
A	CN 1314476 A (SHANGHAI BODE GENE DEVELOPMENT CO., LTD.) 26 September 2001 (2001-09-26) entire document	1-10
A	CN 107223163 A (F HOFFMANN-LA ROCHE AG) 29 September 2017 (2017-09-29) entire document	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

03 April 2019

Date of mailing of the international search report

30 April 2019

Name and mailing address of the ISA/CN

National Intellectual Property Administration, PRC (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/073451

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2016025734	A1	28 January 2016	None			
WO	2016092508	A1	16 June 2016	JP	2018506511	A	08 March 2018
				WO	2016092508	A9	11 January 2018
				CN	108367003	A	03 August 2018
				EP	3229803	A1	18 October 2017
CN	1314476	A	26 September 2001	None			
CN	107223163	A	29 September 2017	RU	2017125053	A	24 January 2019
				US	2017306418	A1	26 October 2017
				KR	20170095893	A	23 August 2017
				JP	2018508469	A	29 March 2018
				BR	112017012553	A2	31 July 2018
				SG	11201704852S	A	28 July 2017
				MX	2017008421	A	23 March 2018
				CA	2969830	A1	30 June 2016
				IL	252796	D0	31 August 2017
				EP	3237638	A1	01 November 2017
				WO	2016105503	A1	30 June 2016
				AU	2015371312	A1	29 June 2017

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/073451

A. 主题的分类 A61K 38/17(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类																	
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) A61K 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNABS, CPRSABS, DWPI, SIPOABS, CNKI, ISI Web of Knowledge: 磷脂酰肌醇3激酶, 抑制剂, 免疫应答, 肿瘤, 癌症, PI3K, phosphatidylinositol, kinase, PIK3IP1, interacting protein 1, cancer; GENBANK, EMBL, 中国专利生物序列数据库, searched sequences: SEQ ID NOs:1-14																	
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>US 2016025734 A1 (CHILDRENS MEDICAL CENTER等) 2016年 1月 28日 (2016 - 01 - 28) 权利要求1-2</td> <td>1, 5, 7, 8, 10</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WO 2016092508 A1 (MASSACHUSETTS GEN HOSPITAL等) 2016年 6月 16日 (2016 - 06 - 16) 摘要</td> <td>1, 5, 7, 8, 10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 1314476 A (上海博德基因开发有限公司) 2001年 9月 26日 (2001 - 09 - 26) 全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 107223163 A (F HOFFMANN-LA ROCHE AG) 2017年 9月 29日 (2017 - 09 - 29) 全文</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	US 2016025734 A1 (CHILDRENS MEDICAL CENTER等) 2016年 1月 28日 (2016 - 01 - 28) 权利要求1-2	1, 5, 7, 8, 10	X	WO 2016092508 A1 (MASSACHUSETTS GEN HOSPITAL等) 2016年 6月 16日 (2016 - 06 - 16) 摘要	1, 5, 7, 8, 10	A	CN 1314476 A (上海博德基因开发有限公司) 2001年 9月 26日 (2001 - 09 - 26) 全文	1-10	A	CN 107223163 A (F HOFFMANN-LA ROCHE AG) 2017年 9月 29日 (2017 - 09 - 29) 全文	1-10
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
X	US 2016025734 A1 (CHILDRENS MEDICAL CENTER等) 2016年 1月 28日 (2016 - 01 - 28) 权利要求1-2	1, 5, 7, 8, 10															
X	WO 2016092508 A1 (MASSACHUSETTS GEN HOSPITAL等) 2016年 6月 16日 (2016 - 06 - 16) 摘要	1, 5, 7, 8, 10															
A	CN 1314476 A (上海博德基因开发有限公司) 2001年 9月 26日 (2001 - 09 - 26) 全文	1-10															
A	CN 107223163 A (F HOFFMANN-LA ROCHE AG) 2017年 9月 29日 (2017 - 09 - 29) 全文	1-10															
☐ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。																	
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件																	
国际检索实际完成的日期 2019年 4月 3日		国际检索报告邮寄日期 2019年 4月 30日															
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		受权官员 李岚 电话号码 (86-10) 62411619															

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/073451

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
US	2016025734	A1	2016年 1月 28日	无			
WO	2016092508	A1	2016年 6月 16日	JP	2018506511	A	2018年 3月 8日
				WO	2016092508	A9	2018年 1月 11日
				CN	108367003	A	2018年 8月 3日
				EP	3229803	A1	2017年 10月 18日
CN	1314476	A	2001年 9月 26日	无			
CN	107223163	A	2017年 9月 29日	RU	2017125053	A	2019年 1月 24日
				US	2017306418	A1	2017年 10月 26日
				KR	20170095893	A	2017年 8月 23日
				JP	2018508469	A	2018年 3月 29日
				BR	112017012553	A2	2018年 7月 31日
				SG	11201704852S	A	2017年 7月 28日
				MX	2017008421	A	2018年 3月 23日
				CA	2969830	A1	2016年 6月 30日
				IL	252796	D0	2017年 8月 31日
				EP	3237638	A1	2017年 11月 1日
				WO	2016105503	A1	2016年 6月 30日
				AU	2015371312	A1	2017年 6月 29日