(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
2023 年 6 月 22 日 (22.06.2023)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2023/108488 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 15/85 (2006.01) *C12N 15/52* (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01) *C12Q 1/02* (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/138383

(22) 国际申请日: 2021 年 12 月 15 日 (15.12.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 深圳先进技术研究院 (SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道1068号, Guangdong 518000 (CN)。 中国科学院深圳理工大学（筹）(SHENZHEN INSTITUTE OF ADVANCED TECHNOLOGY CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区桃源街道学苑大道1068号, Guangdong 518000 (CN)。

(72) 发明人: 潘璠 (PAN, Fan); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道1068号, Guangdong 518055 (CN)。 李奕葵 (LI, Yi Kui); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道1068号, Guangdong 518055 (CN)。

(74) 代理人: 深圳五邻知识产权代理事务所（普通合伙） (SHENZHEN WULIN INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY (GENERAL PARTNERSHIP)); 中国广东省深圳市龙华区龙华街道清华社区和平东路幸福城商业大厦A1106, Guangdong 518000 (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,

(54) **Title:** METHOD FOR SCREENING FOXP3-INHIBITING SMALL MOLECULE DRUGS

(54) 发明名称: 一种筛选抑制FOXP3小分子药物的方法

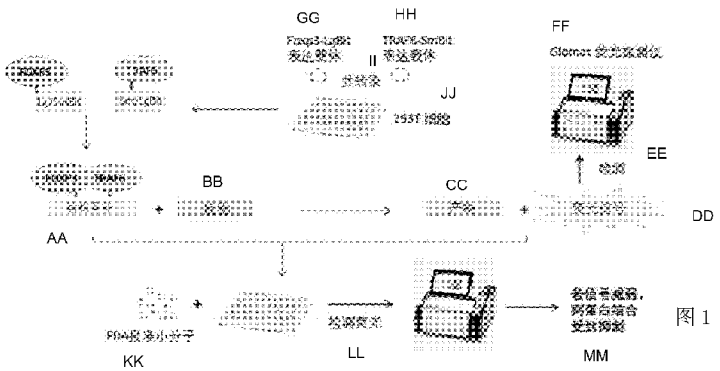


图 1

AA Structure complementation
BB Substrate
CC Product
DD Fluorescence signal
EE Detection
FF Glomax fluorescence detector
GG Foxp3-LgBit expression vector
HH TRAF6-SmBit expression vector
II Co-transfection
JJ 293T cell
KK FDA-approved small molecules
LL Fluorescence detection
MM If the signal weakens, the protein binding is suppressed

(57) **Abstract:** Disclosed is a method for screening FOXP3-inhibiting small molecule drugs. By combining NanoBiT live-cell protein-protein interaction detection technology with an FDA-approved small molecule drug library, the method screens out small molecules capable of effectively inhibiting the interaction between FOXP3 and TRAF6; and the efficacy of the small molecules is validated by means of a perfect immunofluorescence staining technique, an in-vitro Treg functionality experiment and a tumor-bearing mouse model.

WO 2023/108488 A1

[见续页]

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, IT, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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))。

(57) 摘要：本发明公开了一种筛选抑制FOXP3小分子药物的方法。本发明通过NanoBiT活细胞蛋白互作检测技术，结合FDA批准小分子药物库，对能有效抑制FOXP3和TRAF6相互作用的小分子进行筛选，并且通过完善的免疫荧光染色技术，体外Treg功能性实验，以及荷瘤小鼠模型验证了小分子的效力。

一种筛选抑制 FOXP3 小分子药物的方法

技术领域

本发明属于药物筛选领域，更具体地，涉及一种筛选抑制 FOXP3 小分子药物的方法。

背景技术

在肿瘤微环境中，Treg 细胞具有抑制其他 T 细胞免疫反应的功能，协助肿瘤生长。现阶段，Treg 主要通过分泌免疫抑制性的细胞因子或分子例如转化生长因子-β（TGF-β），及高表达免疫抑制受体例如细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4（CTLA-4）和程序性死亡受体 1（PD-1），发挥免疫抑制功能。

现阶段针对免疫抑制受体或者细胞因子的手段在癌症治疗研究中有一定的成效，但仍存在明显的不足。如 Ipilimumab（CTLA-4 抗体）对转移性黑素瘤病人的客观应答率仅有 10%-16%，而 TGF-β 抑制剂在临床治疗效果不佳并可导致心血管毒副作用。造成这些问题的主要原因是：肿瘤微环境中免疫抑制的机制复杂，针对单一靶点无法有效逆转。靶点的非特异性表达导致了脱靶毒性。

转录因子作为药物靶点，有以下开发难点：转录因子同时具有与其他蛋白结合和与 DNA 结合的能力，丰富的结合位点难以简单抑制；转录因子缺乏酶活性以及与小分子药物结合的位点；转录因子主要分布在核内，难以被抗体等大分子标记识别。值得注意的是，FOXP3 的蛋白功能由多种翻译后修饰所调控，如甲基化、磷酸化和泛素化等修饰，对 FOXP3 的稳定、降解和核内转运等有重要调控意义。因此，通过调控该蛋白的翻译后修饰，可以间接改变其功能和稳定性。

泛素连接酶 TRAF6 需要通过直接与 FOXP3 结合，从而引导 FOXP3 多聚泛素化，促进其核内转运。在 Treg 中敲除 Traf6 会降低 FOXP3 表达，并显著提升荷瘤小鼠抵抗 B16 黑色素瘤和 MC38 结肠腺癌细胞的能力。

发明内容

针对相关技术的缺陷，本发明的目的在于从 FDA 批准的小分子药物库中筛选出能够抑制 TRAF6 与 FOXP3 结合的小分子，旨在解决转录因子作为药物靶点具有难以简单抑制、缺乏小分子药物结合位点、难以被抗体等大分子标记识别抑制的问题。

为实现上述目的，本发明的一个方面提供了一种筛选抑制 FOXP3 小分子药物的方法，包括如下步骤：

S1:构建分别被 LgBit 和 SmBit 融合标记的 FOXP3 和 TRAF6 质粒载体；

S2:通过共转染脂质体转染 293T 细胞，使其稳定表达目的蛋白；

S3:收获活细胞并转移到微孔板后，进行荧光检测，再加入 FDA 批准的小分子,在微孔板上进行初步筛选；

S4:初步选取出能阻碍 FOXP3 和 TRAF6 结合的小分子，取前 10 种。

进一步地，采用的质粒载体是 pBiT1.1 和 pBiT2.1-N/C 端载体。

进一步地,构建的质粒载体是pBit2.1-C Foxp3 载体和pBit1.1-N Traf6 载体。

进一步地，构建的质粒载体还可以是 pBit2.1-C Foxp3 载体和 pBit1.1-C Traf6 载体、pBit2.1-N Foxp3 载体和 pBit1.1-N Traf6 载体、pBit2.1-N Foxp3 载体和 pBit1.1-C Traf6 载体、pBit1.1-C Foxp3 载体和 pBit2.1-N Traf6 载体、pBit1.1-C Foxp3 载体和 pBit2.1-C Traf6 载体、pBit1.1-N Foxp3 载体和 pBit2.1-N Traf6 载体、pBit1.1-N Foxp3 载体和 pBit2.1-N Traf6 载体。

进一步地，该方法还包括：

步骤 S5：进行体内实验验证和体外实验验证,验证小分子药物的效果。

本发明的另一方面还提供了一种筛选抑制FOXP3核内转运的药物方法，包括如下具体步骤：

S1：使用eBioscience或Miltenyi初始CD4+分选试剂盒，从C56BL/6小鼠的脾脏和淋巴结中的纯化得到初始CD4+T细胞，加入100 U/ml IL-2和5 ng/ml TGF-β后可诱导Treg细胞分化，在72小时后可得到表达FOXP3的诱导型Treg（iTreg），在诱导细胞分化开始或过程中加入权利要求1-3任意一项中筛选出来的小分子，设置不同浓度梯度和不同时间实验组，72小时后可收获细胞，并使用细胞离心涂片机将细胞转移到玻片上，使用4%多聚甲醛固定细胞，0.5%Triton X 100透化细胞，1%BSA溶液封闭，FITC标记抗体染FOXP3和DAPI染料标记细胞核，最后使用激光扫描共聚焦显微镜进行观测，初步选取出可以阻碍FOXP3核内转运的抑制小分子；

S2：对初步筛选出来的小分子药物效果，分别进行体外实验和体内实验的验证。

进一步地，所述体外实验验证具体包括如下步骤：

通过Sony MA900流式分选细胞仪可以对Foxp3-Yfp+Cre和C56BL/6小鼠脾脏细胞进行分选，得到CD4+YFP+的小鼠Treg细胞和CD4+CD25-CD69Llo初始T细胞，将Treg细胞与荧光染料CTV标记的初始T细胞进行共培养72小时，在ThermoFisher Attune NxT流式细胞分析仪下分析细胞，可以观测到Treg显著抑制初始T细胞的分化，基于此实验，在共培养期间加入通过权利要求1中S4步骤或权利要求4中S1步骤筛选出的小分子，检验其是否有效抑制Treg的功能。

进一步地，所述体内实验验证具体包括以下步骤：

在C56BL/6小鼠皮下接种B16黑色素瘤细胞或MC38结肠癌细胞，每只小鼠接种大约1 x10^5个细胞，可构建荷瘤小鼠模型；在接种7天后每3天测量肿瘤大小；在肿瘤直径大于等于1cm后，注射抑制小分子给药后，继续每3天检测肿瘤大小，一共检测5次，给药后15天后对小鼠进行安乐死，

获取肿瘤组织，在流式细胞分析仪下分析肿瘤组织中细胞类别 CD4，CD8，FOXP3 和细胞因子表达 IFN-γ，TNF-α，IL-17 水平，分析小分子药物对肿瘤生长和微环境的影响。

进一步地，体内实验的验证还能联合 CTLA-4 或 PD-1 单克隆抗体测试联合用药的抗癌效果。

与现有技术相比，本方法的技术方案能够取得以下有益效果：

（1）本发明结合 FDA 批准小分子药物库，对能有效抑制 FOXP3 和 TRAF6 相互作用的小分子进行筛选，并且通过完善的免疫荧光染色技术，体外 Treg 功能性实验，以及荷瘤小鼠模型验证了小分子的效力。通过本发明所构思的以上技术方案，与现有技术相比，由于筛选的是能够抑制 FOXP3 和 TRAF6 相互作用的小分子，使 FOXP3 做为药物靶点成为可能。

（2）本发明在进行药物筛选时，采用的是 FDA 批准小分子药物，将旧药新用和荧光检测系统结合，筛选出有效的小分子。与现有技术相比，由于对已经通过临床试验并上市的老药，进行再筛选，应用于新的靶点研究，缩短临床研究时间和扩展药物的应用范围，大大地提高了药物开发的效率和降低了成本。

附图说明

图 1 是 NanoBiT 技术筛选抑制 FOX3 和 TRAF6 结合的小分子的原理示意图；

图 2 是免疫荧光染色技术分析 FOXP3 核内分布以检验抑制小分子作用的示意图；

图 3 是 Treg 体外抑制增殖实验研究抑制小分子对 Treg 功能的影响示意图；

图 4 是荷瘤小鼠检验小分子药物抗癌效果示意图；

图 5 是 NanoLuc 荧光强度表现不同 FOXP3/TRAF6 融合蛋白结合的强度示意图。

具体实施方式

为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白，以下结合附图及实施例，对本发明进行进一步详细说明。应当理解，此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明，并不用于限定本发明。此外，下面所描述的本发明各个实施方式中所涉及到的技术特征只要彼此之间未构成冲突就可以相互组合。

本发明提供了一种筛选抑制 FOXP3 和 TRAF6 相互作用的小分子系统和方法。结合 FDA 批准小分子药物库，对能有效抑制 FOXP3 和 TRAF6 相互作用的小分子进行筛选，并且通过完善的免疫荧光染色技术，体外 Treg 功能性实验，以及荷瘤小鼠模型验证了小分子的效力。与现有技术相比，由于筛选的是能够抑制 FOXP3 和 TRAF6 相互作用的小分子，使 FOXP3 做为药物靶点成为可能。

本发明实施例提供了一种筛选抑制 FOXP3 和 TRAF6 结合的药物方法，该方法包括如下步骤：

S1:首先构建了分别被 LgBit 和 SmBit 融合标记的 FOXP3 和 TRAF6 质粒载体。采用的质粒载体是 pBiT1.1 和 pBiT2.1-N/C 端载体。由于融合位点可在目的蛋白的 N 端和 C 端，因此一共可以构建表达八种融合蛋白。在实验中发现 pBit2.1-C Foxp3 和 pBit1.1-N Traf6 表达出的融合蛋白荧光检测效果较好（如图 5 所示）。

S2:在构建质粒载体组合后，可通过共转染脂质体转染 293T 细胞，使其稳定表达目的蛋白。

S3:收获活细胞并转移到 96 微孔板后，加入反应底物 Furimazine 进行反应后，便可进行荧光检测。在此基础上，加入 FDA 批准的小分子,该小分子可以选自 Selleck 的 FDA 药物库，在 96 微孔板上进行筛选。

S4:初步选取出可以阻碍 FOXP3 和 TRAF6 结合的小分子，可以取前 10 种。

S5:对初步筛选出来的小分子药物效果，分别进行体外实验和体内实验的验证。进行体外实验验证具体方法如下：通过 Sony MA900 流式分选细胞仪可以对 Foxp3-Yfp+Cre 和 C56BL/6 小鼠脾脏细胞进行分选，得到 CD4+YFP+的小鼠 Treg 细胞和 CD4+CD25-CD69Llo 初始 T 细胞，将 Treg 细胞与荧光染料（如 CTV）标记的初始 T 细胞进行共培养 72 小时，在 ThermoFisher Attune NxT 流式细胞分析仪下分析细胞，可以观测到 Treg 显著抑制初始 T 细胞的分化。基于此实验，在共培养期间加入通过 S4 步骤筛选出的小分子，检验其是否能有效抑制 Treg 的功能；进行体内实验验证具体方法是在 C56BL/6 小鼠皮下接种 B16 黑色素瘤细胞或 MC38 结肠癌细胞，每只小鼠接种约 1 $x10^5$ 个细胞，可构建荷瘤小鼠模型；在接种 7 天后每 3 天测量肿瘤大小。在肿瘤直径大于等于 1cm 后，注射抑制小分子给药后，继续每 3 天检测肿瘤大小，一共检测 5 次，给药后 15 天后对小鼠进行安乐死，获取肿瘤组织，在流式细胞分析仪下分析肿瘤组织中细胞类别（CD4，CD8，FOXP3）和细胞因子表达（IFN-γ，TNF-α，IL-17）水平，分析小分子药物对肿瘤生长和微环境的影响。该实验可联合 CTLA-4 或 PD-1 单克隆抗体测试联合用药的抗癌效果。

S1 中用到的 NanoBiT 技术其原理可参见图 1。

一种筛选抑制 FOXP3 核内转运的药物方法，该方法包括如下具体步骤：

S1 使用 eBioscience 或 Miltenyi 初始 CD4+分选试剂盒可从 C56BL/6 小鼠的脾脏和淋巴结中的纯化得到初始 CD4+T 细胞，加入 100 U/ml IL-2 和 5 ng/ml TGF-β 后可诱导 Treg 细胞分化，在 72 小时后可得到表达 FOXP3 的诱导型 Treg（iTreg）。在诱导细胞分化开始或过程中可加入一种筛选抑制 FOXP3 和 TRAF6 结合的药物方法 S4 中筛选出来的小分子，设置不同浓度梯度和不同时间实验组，72 小时后可收获细胞，并使用细胞离心涂片机将细胞转移到玻片上。使用 4%多聚甲醛固定细胞，0.5%Triton X 100 透化细胞，1%BSA 溶液封闭，FITC 标记抗体染 FOXP3 和 DAPI 染料标记细胞核，最

后使用激光扫描共聚焦显微镜进行观测，初步选取出可以阻碍 FOXP3 核内转运的抑制小分子。该技术流程可参见图 2。

S2：对初步筛选出来的小分子药物效果，分别进行体外实验和体内实验的验证。进行体外实验验证具体方法如下：通过 Sony MA900 流式分选细胞仪可以对 Foxp3-Yfp+Cre 和 C56BL/6 小鼠脾脏细胞进行分选，得到 CD4+YFP+的小鼠 Treg 细胞和 CD4+CD25-CD69Llo 初始 T 细胞，将 Treg 细胞与荧光染料(如CTV)标记的初始T细胞进行共培养72小时，在ThermoFisher Attune NxT 流式细胞分析仪下分析细胞，可以观测到 Treg 显著抑制初始 T 细胞的分化。基于此实验，在共培养期间加入通过 S4 步骤筛选出的小分子，检验其是否能有效抑制 Treg 的功能；进行体内实验验证具体方法是在 C56BL/6 小鼠皮下接种 B16 黑色素瘤细胞或 MC38 结肠癌细胞，每只小鼠接种约 1 $x10^5$ 个细胞，可构建荷瘤小鼠模型。在接种 7 天后每 3 天测量肿瘤大小。在肿瘤直径大于等于 1cm 后，注射抑制小分子给药后，继续每 3 天检测肿瘤大小，一共检测 5 次，给药后 15 天后对小鼠进行安乐死，获取肿瘤组织，在流式细胞分析仪下分析肿瘤组织中细胞类别（CD4，CD8，FOXP3）和细胞因子表达（IFN-γ，TNF-α，IL-17）水平，分析小分子药物对肿瘤生长和微环境的影响。该实验可联合 CTLA-4 或 PD-1 单克隆抗体测试联合用药的抗癌效果。

本领域的技术人员容易理解，以上所述仅为本发明的较佳实施例而已，并不用以限制本发明，凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

权 利 要 求 书

1.一种筛选抑制 FOXP3 小分子药物的方法，其特征在于，通过该方法能够筛选出抑制FOXP3与TRAF6结合的小分子药物,该方法包括如下步骤：

S1:构建分别被LgBit和SmBit融合标记的FOXP3和TRAF6质粒载体；

S2:通过共转染脂质体转染293T细胞，使其稳定表达目的蛋白；

S3:收获活细胞并转移到微孔板后，进行荧光检测，再加入FDA批准的小分子,在微孔板上进行初步筛选；

S4:初步选取出能阻碍FOXP3和TRAF6结合的小分子，取前10种。

2.如权利要求1所述的方法，其特征在于，采用的质粒载体是pBiT1.1和pBiT2.1-N/C端载体。

3.如权利要求 2 所述的方法，其特征在于，构建的质粒载体是pBit2.1-C Foxp3载体和pBit1.1-N Traf6载体。

4.如权利要求2所述的方法，其特征在于，构建的质粒载体还可以是pBit2.1-C Foxp3载体和pBit1.1-C Traf6载体、pBit2.1-N Foxp3载体和pBit1.1-N Traf6载体、pBit2.1-N Foxp3载体和pBit1.1-C Traf6载体、pBit1.1-C Foxp3载体和pBit2.1-N Traf6载体、pBit1.1-C Foxp3载体和pBit2.1-C Traf6载体、pBit1.1-N Foxp3载体和pBit2.1-N Traf6载体、pBit1.1-N Foxp3载体和pBit2.1-N Traf6载体。

5.如权利要求1-4任意一项所述的方法，其特征在于，该方法还包括：

步骤S5：进行体内实验验证和体外实验验证，验证小分子药物的效果。

6.一种筛选抑制FOXP3小分子药物的方法,通过该方法能够筛选出抑制FOXP3核内转运的小分子药物，其特征在于，包括如下具体步骤：

S1：使用eBioscience或Miltenyi初始CD4+分选试剂盒，从C56BL/6小鼠的脾脏和淋巴结中的纯化得到初始 CD4+T 细胞，加入 100 U/ml IL-2和5 ng/ml TGF-β后诱导Treg细胞分化，在72小时后得到表达FOXP3的

诱导型 Treg，在诱导细胞分化开始或过程中加入权利要求 1-4 任意一项中筛选出来的小分子，设置不同浓度梯度和不同时间实验组，72 小时后收获细胞，并使用细胞离心涂片机将细胞转移到玻片上，使用 4%多聚甲醛固定细胞，0.5%Triton X 100 透化细胞，1%BSA 溶液封闭，FITC 标记抗体染 FOXP3 和 DAPI 染料标记细胞核，最后使用激光扫描共聚焦显微镜进行观测，初步选取出可以阻碍 FOXP3 核内转运的抑制小分子；

S2：对初步筛选出来的小分子药物效果，分别进行体外实验和体内实验的验证。

7.如权利要求 5 或权利要求 6 所述的方法，其特征在于，所述体外实验验证具体包括如下步骤：

通过 Sony MA900 流式分选细胞仪可以对 Foxp3-Yfp+Cre 和 C56BL/6 小鼠脾脏细胞进行分选，得到 CD4+YFP+的小鼠 Treg 细胞和 CD4+CD25-CD69Llo 初始 T 细胞，将 Treg 细胞与荧光染料标记的初始 T 细胞进行共培养 72 小时，在 ThermoFisher Attune NxT 流式细胞分析仪下分析细胞，可以观测到 Treg 显著抑制初始 T 细胞的分化，基于此实验，在共培养期间加入通过权利要求 1 中 S4 步骤或权利要求 6 中 S1 步骤筛选出的小分子，检验其是否有效抑制 Treg 的功能。

8.如权利要求 5 或权利要求 6 所述的方法，其特征在于，所述体内实验验证具体包括以下步骤：

在 C56BL/6 小鼠皮下接种 B16 黑色素瘤细胞或 MC38 结肠癌细胞，每只小鼠接种大约 1 $x10^5$ 个细胞，构建荷瘤小鼠模型；在接种 7 天后每 3 天测量肿瘤大小；在肿瘤直径大于等于 1cm 后，注射抑制小分子给药后，继续每 3 天检测肿瘤大小，一共检测 5 次，给药后 15 天后对小鼠进行安乐死，获取肿瘤组织，在流式细胞分析仪下分析肿瘤组织中细胞类别 CD4，CD8，FOXP3 和细胞因子表达 IFN-γ，TNF-α，IL-17 水平，分析小分子药物对肿瘤生长和微环境的影响。

9. 如权利要求 6 所述的方法，其特征在于，体内实验的验证还能联合 CTLA-4 或 PD-1 单克隆抗体测试联合用药的抗癌效果。

10. 如权利要求 7 所述的方法，其特征在于，所述荧光染料为 CTV。

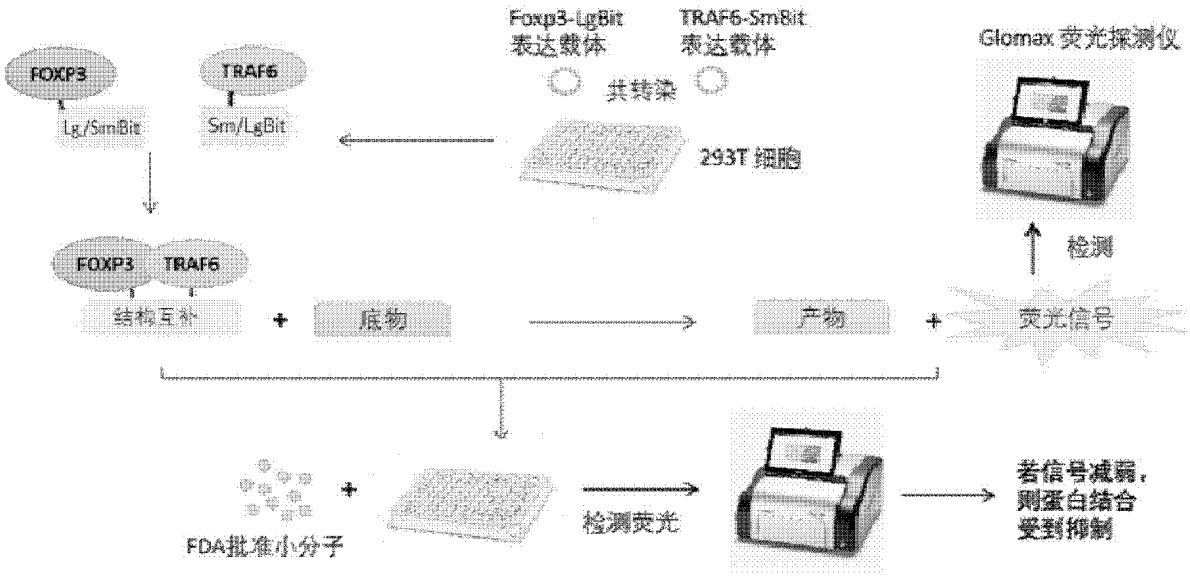

Foxp3-LgBit
表达载体
TRAF6-SmBit
表达载体
Glomax 荧光探测仪
FOXP3
TRAF6
Lg/SmBit
Sm/LgBit
共转染
293T 细胞
检测
FOXP3
TRAF6
结构互补
底物
产物
荧光信号
FDA批准小分子
检测荧光
若信号减弱，
则蛋白结合
受到抑制

图 1

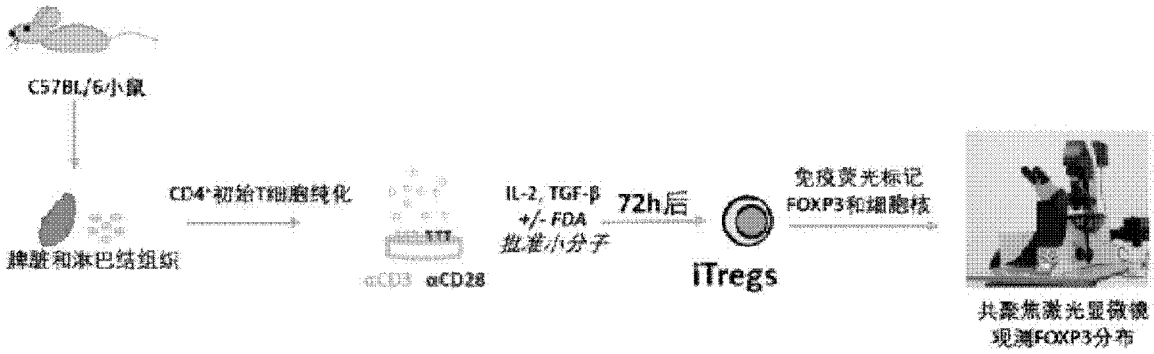

C57BL/6小鼠
脾脏和淋巴结组织
CD4+初始T细胞纯化
αCD3
αCD28
IL-2, TGF-β
+/- FDA
批准小分子
72h后
iTregs
免疫荧光标记
FOXP3和细胞核
共聚焦激光显微镜
观测FOXP3分布

图 2

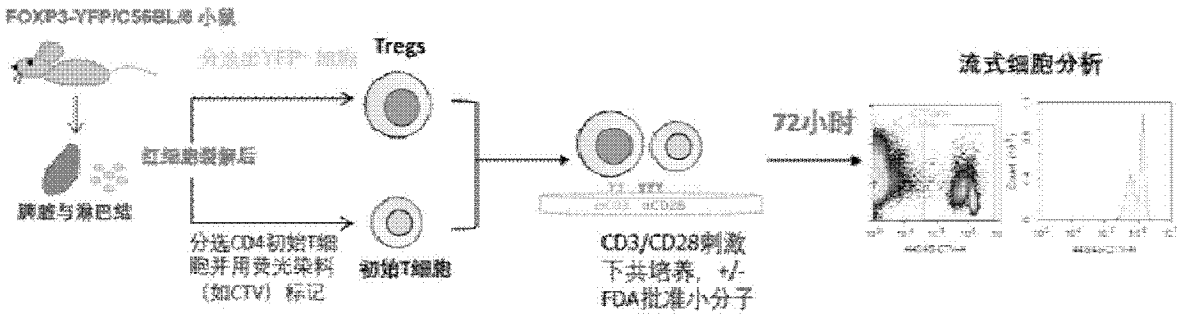

FOXP3-YFP/C56BL/6 小鼠
Tregs
脾脏与淋巴结
分选CD4初始T细
胞并用荧光染料
（如CTV）标记
初始T细胞
CD3/CD28刺激
下共培养，+/-
FDA批准小分子
72小时
流式细胞分析

图 3

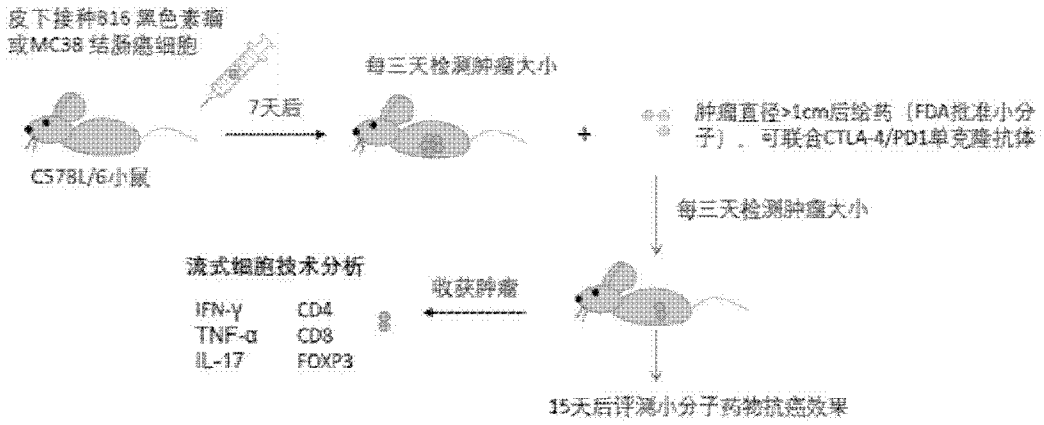

皮下接种B16黑色素瘤
或MC38结肠癌细胞
每三天检测肿瘤大小
7天后
肿瘤直径>1cm后给药（FDA批准小分子），可联合CTLA-4/PD1单克隆抗体
C57BL/6小鼠
每三天检测肿瘤大小
流式细胞技术分析
收获肿瘤
IFN-γ
TNF-α
IL-17
CD4
CD8
FOXP3
15天后评测小分子药物抗癌效果

图 4

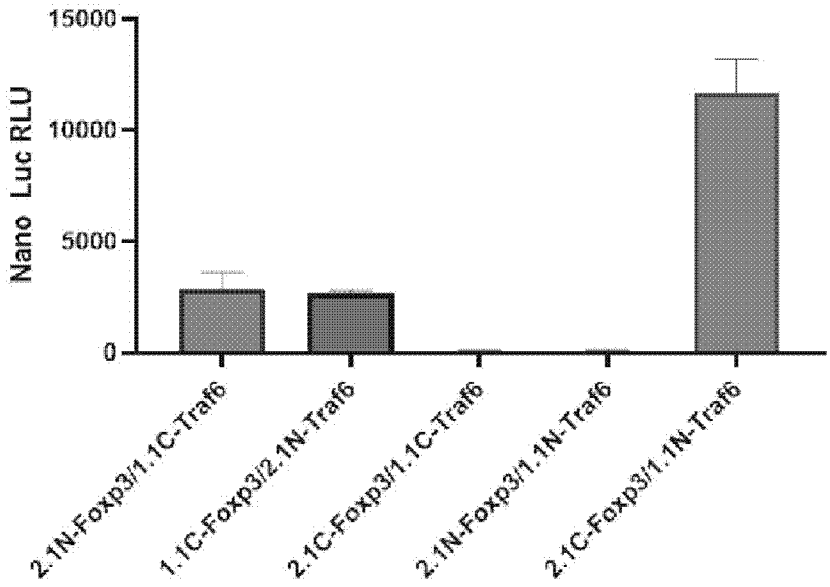

15000
10000
5000
0
Nano Luc RLU
2.1N-Foxp3/1.1C-Traf6
1.1C-Foxp3/2.1N-Traf6
2.1C-Foxp3/1.1C-Traf6
2.1N-Foxp3/1.1N-Traf6
2.1C-Foxp3/1.1N-Traf6

图 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2021/138383

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/85(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/12(2006.01)i; C12N 15/52(2006.01)i; C12Q 1/02(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)

C12N, C12Q

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, CNTXT, DWPI, SIPOABS, CATXT, USTXT, EPTXT, WOTXT, KRTXT, JPTXT, CPEA, CNKI, WEB OF SCIENCE, PUBMED, 百度学术搜索, BAIDU XUESHU SEARCH: 筛选, 抑制, 小分子, 药物, 肿瘤, 荧光, FOXP3, TRAF6, NanoBiT, LgBit, SmBit, Treg, screening, inhibit+, small molecule , tumor, Fluorescence

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 111100902 A (FUDAN UNIVERSITY) 05 May 2020 (2020-05-05) see embodiments 1-3	1-8
Y	US 2013122046 A1 (LI BIN et al.) 16 May 2013 (2013-05-16) see embodiments 1-9	1-8
A	US 2015190370 A1 (LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN et al.) 09 July 2015 (2015-07-09) see embodiments 1-4	1-8
A	US 2014030218 A1 (UDALOVA IRINA ALEXANDROVNA et al.) 30 January 2014 (2014-01-30) see abstract	1-8
A	CN 108368535 A (DISCOVERX CORP.) 03 August 2018 (2018-08-03) see claims 23-30	1-8
A	NI, Xuhao et al. "TRAF6 directs FOXP3 localization and facilitates regulatory T-cell function through K63-linked ubiquitination" *The EMBO Journal*, Vol. 38, No. 9, 18 March 2019 (2019-03-18), pp. 1-18, see abstract	1-8

☐ 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	Date of mailing of the international search report
30 August 2022	**21 September 2022**
Name and mailing address of the ISA/CN **China National Intellectual Property Administration (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/CN2021/138383

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	111100902	A	05 May 2020	None			
US	2013122046	A1	16 May 2013	WO	2012003810	A1	12 January 2012
				CN	102309757	A	11 January 2012
				EP	2591797	A1	15 May 2013
US	2015190370	A1	09 July 2015	CA	2880374	A1	06 March 2014
				EP	2703384	A1	05 March 2014
				US	2016228408	A1	11 August 2016
				PL	2888228	T3	31 October 2019
				DK	2888228	T3	15 July 2019
				WO	2014033122	A1	06 March 2014
				EP	2888228	A1	01 July 2015
				ES	2734286	T3	05 December 2019
				AU	2013307369	A1	19 February 2015
US	2014030218	A1	30 January 2014	WO	2012093258	A2	12 July 2012
CN	108368535	A	03 August 2018	US	2018275133	A1	27 September 2018
				EP	3183580	A1	28 June 2017
				US	2016054322	A1	25 February 2016
				WO	2016028804	A1	25 February 2016
				JP	2018527921	A	27 September 2018
				CA	2995351	A1	23 February 2017
				WO	2017030606	A1	23 February 2017

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2021/138383

A. 主题的分类

C12N 15/85(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/12(2006.01)i; C12N 15/52(2006.01)i; C12Q 1/02(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)

C12N, C12Q

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, CNTXT, DWPI, SIPOABS, CATXT, USTXT, EPTXT, WOTXT, KRTXT, JPTXT, CPEA, CNKI, WEB OF SCIENCE, PUBMED, 百度学术搜索： 筛选，抑制，小分子，药物，肿瘤，荧光，FOXP3，TRAF6，NanoBiT，LgBit，SmBit，Treg，screening，inhibit+，small molecule ，tumor，Fluorescence

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
Y	CN 111100902 A (复旦大学) 2020年5月5日 (2020-05-05) 参见实施例1-3	1-8
Y	US 2013122046 A1 (LI BIN等) 2013年5月16日 (2013-05-16) 参见实施例1-9	1-8
A	US 2015190370 A1 (LUDWIG MAXIMILIANS UNIVERSITÄT MÜNCHEN等) 2015年7月9日 (2015-07-09) 参见实施例1-4	1-8
A	US 2014030218 A1 (UDALOVA IRINA ALEXANDROVNA等) 2014年1月30日 (2014-01-30) 参见摘要	1-8
A	CN 108368535 A (欧陆迪斯卡沃爱克斯公司) 2018年8月3日 (2018-08-03) 参见权利要求23-30	1-8
A	Xuhao Ni等. "TRAF6 directs FOXP3 localization and facilitates regulatory T-cell function through K63-linked ubiquitination" EMBO J., 第38卷，第9期，2019年3月18日 (2019-03-18)， 第1-18页 参见摘要	1-8

☐ 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	国际检索报告邮寄日期
2022年8月30日	2022年9月21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 魏春宝 电话号码 62411028

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2021/138383

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)
CN	111100902	A	2020年5月5日	无			
US	2013122046	A1	2013年5月16日	WO	2012003810	A1	2012年1月12日
				CN	102309757	A	2012年1月11日
				EP	2591797	A1	2013年5月15日
US	2015190370	A1	2015年7月9日	CA	2880374	A1	2014年3月6日
				EP	2703384	A1	2014年3月5日
				US	2016228408	A1	2016年8月11日
				PL	2888228	T3	2019年10月31日
				DK	2888228	T3	2019年7月15日
				WO	2014033122	A1	2014年3月6日
				EP	2888228	A1	2015年7月1日
				ES	2734286	T3	2019年12月5日
				AU	2013307369	A1	2015年2月19日
US	2014030218	A1	2014年1月30日	WO	2012093258	A2	2012年7月12日
CN	108368535	A	2018年8月3日	US	2018275133	A1	2018年9月27日
				EP	3183580	A1	2017年6月28日
				US	2016054322	A1	2016年2月25日
				WO	2016028804	A1	2016年2月25日
				JP	2018527921	A	2018年9月27日
				CA	2995351	A1	2017年2月23日
				WO	2017030606	A1	2017年2月23日