(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102282265 B
(45)授权公告日 2020.07.24

(21)申请号 200980154573.7

(22)申请日 2009.11.27

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 102282265 A

(43)申请公布日 2011.12.14

(30)优先权数据
61/118,570 2008.11.28 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2011.07.13

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2009/066023 2009.11.27

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2010/063011 EN 2010.06.03

(73)专利权人 埃默里大学
地址 美国佐治亚州
专利权人 达纳-法伯癌症研究院有限公司

(72)发明人 R·阿梅德 R·阿玛拉 V·韦露 K·蒂坦吉 G·弗里曼

(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司 72002
代理人 过晓东

(51)Int.Cl.
C12Q 1/02(2006.01)
C12N 5/0781(2006.01)
G01N 33/15(2006.01)
A61K 31/7105(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

(56)对比文件
WO 2008/083174 A2,2008.07.10,
Velu V.“Enhancing SIV-specific immunity in vivo by PD-1 blockade.”.《Nature》.2008,第458卷(第7235期),206-210.
Moir S.“Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals.”.《J Exp Med.》.2008,第205卷(第8期),1797-1805.

审查员 冯娟

权利要求书2页 说明书102页
序列表16页 附图33页

(54)发明名称

用于治疗传染病和肿瘤的方法

(57)摘要

这里公开了可用于减少主体内PD-1表达或者活性的PD-1拮抗剂。使用这种PD-1拮抗剂与来自传染性试剂或者肿瘤的抗原相结合能够提高对传染性试剂或者肿瘤细胞具有特异性的免疫反应。因此,患有传染病,例如持续性感染的主体可以使用PD-1拮抗剂治疗。另外,患有肿瘤的主体可以使用PD-1拮抗剂治疗。在几个实施例中,可以通过移植治疗有效量的能够识别所关心抗原的活化的T细胞,和通过给药治疗有效量的PD-1拮抗剂来治疗主体。这里还公开了用于检测给药PD-1拮抗剂的主体内PD-1拮抗剂功效的方法。在一些实施方案中,这些方法包括测定来自给药PD-1拮抗剂的主体的样品中记忆B细胞的增殖作用。

CN 102282265 B

1.用于体外确定PD-1拮抗剂的有效剂量的方法，包括：

确定由主体获得的第一样品中$CD20^+CD27^+CD21^-$记忆B细胞的体外增殖作用，

其中，与参照相比，来自第一样品的$CD20^+CD27^+CD21^-$记忆B细胞的体外增殖作用的增加表示第一剂量的PD-1拮抗剂是有效的，并且，其中与参照相比，$CD20^+CD27^+CD21^-$记忆B细胞增殖作用不存在显著的改变表示第一剂量的PD-1拮抗剂不是有效的；以及

所述方法的目的并非获得诊断结果。

2.根据权利要求1所述的方法，进一步包括

确定来自主体的第二样品中$CD20^+CD27^+CD21^-$记忆B细胞的体外增殖作用，

其中，与参照相比，来自第二样品的$CD20^+CD27^+CD21^-$记忆B细胞的体外增殖作用的增加表示第二剂量的PD-1拮抗剂是有效的，并且，其中与参照相比，$CD20^+CD27^+CD21^-$记忆B细胞增殖作用不存在显著的改变表示第二剂量的PD-1拮抗剂不是有效的。

3.根据权利要求2所述的方法，其中与参照相比，第一样品中$CD20^+CD27^+CD21^-$记忆B细胞增殖作用不存在显著的改变，并且其中，第二剂量高于第一剂量。

4.根据权利要求2所述的方法，其中与参照相比，来自第一样品的$CD20^+CD27^+CD21^-$记忆B细胞增殖作用增加，并且其中，第二剂量小于第一剂量。

5.用于体外确定PD-1拮抗剂功效的方法，包括

测定来自给药PD-1拮抗剂的主体的样本中$CD20^+CD27^+CD21^-$记忆B细胞的体外增殖作用；

其中与参照相比，来自样品的$CD20^+CD27^+CD21^-$记忆B细胞体外增殖作用的增加表示PD-1拮抗剂是有效的；以及

所述方法的目的并非获得诊断结果。

6.根据权利要求1-5中任意一项所述的方法，其中进一步包括测定来自该主体的一种样品中的$CD20^+CD27^-CD21^+$天然B细胞。

7.根据权利要求1-5中任意一项所述的方法，其中测定$CD20^+CD27^+CD21^-$记忆B细胞的增殖作用包括测定Ki67的表达。

8.根据权利要求7所述的方法，其中测定$CD20^+CD27^+CD21^-$记忆B细胞的增殖作用包括使用一种能够特异性结合Ki67的抗体。

9.根据权利要求1-5中任意一项所述的方法，其中测定$CD20^+CD27^+CD21^-$记忆B细胞的增殖作用包括测定溴代脱氧尿苷的整合。

10.根据权利要求1-5中任意一项所述的方法，其中测定$CD20^+CD27^+CD21^-$记忆B细胞的增殖作用包括使用荧光活化的细胞分选(FACS)。

11.根据权利要求1-5中任意一项所述的方法，其中所述样品从患有病毒性传染病的主体获得。

12.根据权利要求1-5中任意一项所述的方法，其中所述样品从患有持续的病毒性传染病的主体获得。

13.根据权利要求11所述的方法，其中，所述样品从被给药一种病毒抗原的主体获得。

14.根据权利要求11所述的方法，其中，所述病毒性传染病是由肝炎病毒、人类免疫缺陷性病毒(HIV)、人T-淋巴营养病毒(HTLV)、疱疹病毒、埃-巴二氏病毒、或者人乳头状瘤病毒造成的病毒性传染病。

15.根据权利要求1-5中任意一项所述的方法，其中所述样品从患有肿瘤的主体获得。

16.根据权利要求15所述的方法，其中所述样品从被给药一种肿瘤抗原的主体获得。

17.根据权利要求16所述的方法，其中，肿瘤结合抗原是优选表达的黑素瘤抗原、胚胎性癌肉瘤、生存素、周期素D、周期素E、蛋白酶3及其肽PR1、嗜中性弹性蛋白酶、组织蛋白酶G、MAGE、MART、酪氨酸酶、GP100、纽约食道癌1、癌胚抗原(CEA)或者前列腺特异性抗原(PSA)。

18.根据权利要求1-5中任意一项所述的方法，其中，所述样品通过具有真菌性传染病或者细菌性传染病的主体获得。

19.根据权利要求1-5中任意一项所述的方法，其中，PD-1拮抗剂是能够特异性结合PD-1的抗体、是能够特异性结合程序性死亡配位体1(PD-L1)的抗体，或者能够特异性结合程序性死亡配位体2(PD-L2)的抗体，一种小抑制性抗-PD-1RNAi，一种小抑制性抗-PD-L1 RNA，一种小抑制性抗-PD-L2 RNAi，一种抗PD-1反义RNA、一种抗PD-L1反义RNA、一种抗PD-L2反义RNA、一种显性阴性PD-1蛋白质、一种显性阴性PD-L1蛋白质、一种显性阴性PD-L2蛋白质，或者他们的结合物。

20.根据权利要求19所述的方法，其中，特异性结合PD-1的抗体是(1)一种单克隆抗体或者其功能性片段，(2)一种人源化抗体或者其功能性片段，或者(3)一种免疫球蛋白融合蛋白质。

21.根据权利要求19所述的方法，其中，特异性结合PD-L1的抗体是(1)一种单克隆抗体或者其功能性片段，(2)一种人源化抗体或者其功能性片段，或者(3)一种免疫球蛋白融合蛋白质。

22.根据权利要求19所述的方法，其中，特异性结合PD-L2的抗体是(1)一种单克隆抗体或者其功能性片段，(2)一种人源化抗体或者其功能性片段，或者(3)一种免疫球蛋白融合蛋白质。

23.根据权利要求1-5中任意一项所述的方法，其中，所述参照是在给药第一浓度的PD-1拮抗剂之前从主体中获得的样品或者标准值。

用于治疗传染病和肿瘤的方法

[0001] 优先权声明

[0002] 本申请要求2008年11月28号递交的美国临时专利申请第61/118,570号的优先权，该申请通过引用在此并入本文。

[0003] 政府支持声明

[0004] 本申请是在美国政府支持下完成的，美国国立卫生研究院(NIH)授予的资助号为RO1AI057029,RO1AI071852和RO1AI074417，政府对本发明享有某些权利。

技术领域

[0005] 本申请涉及拮抗剂的应用，具体的说，涉及用于治疗持续感染和肿瘤的PD-1拮抗物的应用，本发明还涉及用于确定PD-1拮抗剂有效剂量的方法。

背景技术

[0006] 宿主免疫应答的免疫抑制在持续感染和肿瘤免疫抑制过程中起着重要的作用。持续感染是一种传染病，这种传染病的病毒不明确，但是一直存在于受感染个体的特定细胞中。持续感染通常包括潜伏阶段和生产性感染阶段，在生产性感染阶段不会快速的致死诉诸细胞或者对宿主细胞产生过度损害。这里有三种持久性病毒-宿主相互作用：潜伏期、慢性感染和慢感染。潜伏性感染的特点在于初次感染之后持续存在的感染性病毒，并且可能包括慢性或者循环性疾病。慢感染的特点在于进行性疾病之后漫长的潜伏期。与潜伏的和慢性感染不同，慢感染可能不会从机型的病毒复制开始。在持续感染期间，病毒基因组或者被稳定的整合到细胞DNA中，或者被维持在附加体上。某些病毒会产生持续感染，所述病毒例如人类T细胞白血病病毒、埃-巴二氏病毒、细胞肥大病毒、疱疹病毒、水痘-带状疱疹病毒、家畜囊虫病、乳多空病毒、嗜异性鼠白血病病毒相关病毒(Xenotropic murine leukemia virus-related virus,XMRV)、朊病毒、肝炎病毒、腺病毒、微细小病毒和乳头状瘤病毒。

[0007] 用于维持持续感染的机制包括病毒和细胞基因表达的调节以及宿主免疫应答反应的修饰。通过各式各样的刺激可以使潜伏性感染再激活。所述刺激包括细胞生理学方面得变化、另一种病毒的过度感染和身体紧张或外伤。宿主免疫抑制反映常常与许多持续性病毒感染的再活化有关。

[0008] 许多研究表明在诊断出癌症的病人体内缺乏免疫反应。已经识别出许多与具体的癌症相关的肿瘤抗原。根据多重的实体肿瘤已经定义了许多肿瘤抗原：通过免疫性定义的MAGE 1、2、3;MART-1/黑素-A、gp100、癌胚抗原(CEA)、HER-2、粘蛋白(即，MUC-1)、前列腺-特异性抗原(PSA)、和前列腺酸性磷酸酶(PAP)。此外，病毒蛋白质，例如乙型肝炎病毒(HBV)、埃-巴二氏病毒蛋白(EBV)和人类乳头瘤(HPV)病毒蛋白已经被证明分别在肝细胞性肝癌、淋巴腺瘤、和颈部癌的发展过程中是十分重要的。然而，由于诊断出患有癌症的病人的免疫抑制作用，这些病人天生的免疫系统通常不能应答肿瘤抗原。

[0009] 被动免疫疗法和主动免疫疗法都已经被建议用于肿瘤的治疗过程中。被动免疫性

向所关心的主体提供了免疫反应的一种组分，例如抗体或细胞毒性T细胞。自动免疫疗法利用一种治疗剂来活化内源性免疫反应，所述治疗剂例如细胞因子、抗体或化合物，其中，所述免疫系统开始将肿瘤识别为外源物质。被动免疫疗法和主动免疫疗法二者的引入已经在特定的癌症类型的治疗方面取得了成功。

[0010] 总的来说，这里存在一种需要，来提供安全并且有效的治疗疾病的治疗方法，所述疾病例如，自身免疫性疾病、炎症性紊乱、变应性、移植排异反应、癌症、免疫缺陷、及其他与免疫系统有关的紊乱。这里还存在一种需要，来提供确定一种治疗剂的某一特定剂量是否能够有效治疗主体的方法，所述治疗剂例如，PD-1拮抗剂。

发明内容

[0011] PD-1拮抗剂降低了PD-1的表达和/或活性。患有传染病的患者，例如患有持续感染的患者可以使用程序性死亡-1多肽(PD-1)拮抗剂来治疗。患有肿瘤的患者也可以使用程序性死亡-1多肽(PD-1)拮抗剂来治疗。另外，该患者可以通过移植治疗有效量的活化的T细胞来治疗，所述活化的T细胞能够识别与治疗有效量的程序性死亡-1多肽(PD-1)拮抗剂结合的所关心的抗原。

[0012] 免疫反应可以在哺乳动物中测定。在几个实施方案中，这里公开的治疗方法包括B细胞的测定。在一些实施方案中，该方法包括测定来自主体的样品中记忆B细胞的增殖作用。

[0013] 在一些实施方案中，这里公开了用于测定PD-1拮抗剂在给药PD-1拮抗剂的主体体内功效的方法。这些方法包括测定来自给药PD-1拮抗剂的主体的样品中记忆B细胞的增殖作用，其中，与参照相比，来自样品中的记忆B细胞增殖作用的增加表示PD-1拮抗剂能够有效的治疗主体。

[0014] 这里还公开了用于确定对治疗主体有效的PD-1拮抗剂剂量的方法。这些方法包括对主体给药第一剂量的PD-1拮抗剂；确定来自主体的第一样品中记忆B细胞的增殖作用。与参照相比，来自第一样品的记忆B细胞增殖作用的增加表示第一剂量的PD-1拮抗剂能够有效的治疗主体。与参照相比，记忆B细胞增殖作用不存在显著的改变表示第一剂量的PD-1拮抗剂不足以治疗主体。

[0015] 根据下面对几个实施方案的详细说明，并参考附图，前述的和其他的特点和优势会变得更加显而易见。

附图说明

[0016] 图1A是一种条形图，显示了程序性死亡-1(PD-1)mRNA在$D^bGP33-41$和/或$D^bGP276-286$特异性T细胞中的水平，所述DbGP33-41和/或DbGP276-286特异性T细胞来自未实验的转基因老鼠，淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)阿姆斯特朗免疫(感染后大约30天)感染的老鼠或CD4-衰竭的LCMV-Cl-13感染的老鼠(感染后大约30天)，通过基因矩阵分析来调节。

[0017] 图1B是一系列流式细胞计量术实验图，显示了在LCMV阿姆斯特朗免疫和CD4衰竭LCMV-Cl-13感染的老鼠体内感染大约60天之后在CD8+四聚体T细胞上程序性死亡多肽PD-1表面表达。在用LCMV-Cl-13病毒进行慢性感染(标记为"慢性的")大约60天之后，无反应性的CD8+ T细胞在该细胞表面表达高水平的程序性死亡多肽(PD-1)，但是在清除急性LCMV阿

姆斯特朗感染之后(标记为“免疫”),病毒-特异性CD8+ T细胞不表达程序性死亡多肽(PD-1)。

[0018] 图1C是一系列流式细胞计量术实验图,显示了来自长期感染和未感染的老鼠体内的脾细胞中PD-L1的存在。这一结果证明PD-L1在被病毒感染的脾细胞上表达量是最高的。

[0019] 图2A是一系列散布图,显示了与未治疗的参照相比,当从感染后第23-37天开始对C1-13感染的老鼠进行治疗时,DbNP396-404特异性和DbGP33-41特异性CD8+ T细胞存在大约2倍的增加。为了确定在功能方面的变化,作为对8种不同的LCMV抗原决定簇的响应,测定IFN-γ和TNF-α的产量。图2B是一种散布图,显示了当测定所有已知的CD8+ T细胞特异性时,LCMV特异性CD8+ T细胞的总数存在2.3倍的增加。图2C是一系列流式细胞计图,显示了响应于8种不同的LCMV抗原决定簇时IFN-γ和TNF-α的产量。图2D是一种散布图,显示了受治疗的小鼠体内更多的病毒特异性CD8+ T细胞能够生产TNF-α。图2E是一系列直方图,显示了PD-L1阻断剂也会在脾、肝、肺和血清中导致增加的病毒控制。

[0020] 图3A显示,相对于参照(标记为“untx”),从感染后第46天到60天,在CD4-衰竭C1-13感染的老鼠体内,DbGP276-286特异性CD8+ T细胞(标记为GP33和GP276)的数目增加。所述老鼠用抗-PD-L1(标记为“PD-L1″)处理。这一结果说明,用抗-PD-L1(标记为″PD-L1″)处理后的老鼠比未被处理的老鼠多大约7倍的DbGP276-286特异性脾CD8+ T细胞和大约4倍的DbGP33-41特异性脾CD8+ T细胞。图3B是一系列流式细胞计实验图像,显示了与未被处理的参照(标记为“untx”)相比,从感染后第46天到60天,在用抗-PD-L1(标记为“PD-L1″)处理过的CD4-衰竭的C1-13感染后的老鼠的脾脏中,DbGP33-41和DbGP276-286特异性CD8+ T细胞出现的频率增加。图3C是一系列流式细胞计实验图像,显示了通过5-溴脱氧尿核苷结合和Ki67表达测定的抗PD-L1-处理后的小鼠体内DbGP276-286特异性CD8+ T细胞增加的增殖。图3D显示了具有高CD8+ T细胞扩张水平的小鼠,通过比较外周血液单核细胞(PBMC)中DbGP276特异性CD8+ T细胞和脾中的DbGP276-286特异性CD8+ T细胞显示了在外周血液单核细胞(PBMC)中可评估的反应。

[0021] 图4A是一系列图表显示了与参照相比,在抗-PD-L1-治疗后的老鼠体内能够产生IFN-γ的DbGP276-286和DbGP33-41特异性CD8+ T细胞的增加。在抗-PD-L1-治疗后的老鼠体内还检测出较高出现频度的DbNP396-404、KbNP205-212、DbNP166-175和DbGP92-101特异性CD8+ T细胞。图4B表明了在抗-PD-L1-治疗后的老鼠体内,50％的DbGP276-286特异性CD8+ T细胞能够产生IFN-γ,与此相比,在参照老鼠体内只有20％的DbGP276-286特异性CD8+ T细胞能够产生IFN-γ。图4C是一系列流式细胞计实验图像,表明了相对于未处理过的慢性感染后的老鼠,抗-PD-L1-处理的慢性感染后的老鼠能够产生较高水平的TNF-α,但是相对于用LCMV阿姆斯特朗病毒感染后的免疫老鼠,抗-PD-L1-处理的慢性感染后的老鼠只能产生的较低水平的TNF-α。图4D是使用51Cr释放试验测定的结果,显示了与未处理的感染的老鼠相比,用抗-PD-L1处理LCMV-C1-13感染的老鼠后,能够更新病毒特异性T细胞的体外溶解活性。图4E是一系列图标,表明在经过抗-PD-L1-处理的LCMV-C1-13感染老鼠的各个器官中病毒滴定度的减少。与未经处理的老鼠相比,在用抗-PD-L1治疗两星期后,在脾脏中,病毒滴定度减少了大约3倍,在肝脏中,病毒滴定度减少了4倍,在肺中,病毒滴定度减少了2倍,在血清中,病毒滴定度减少了2倍。

[0022] 图5A是一系列流式细胞计实验图像,显示了使用10种艾滋病病毒四聚物进行的

PD-1表面表达，所述艾滋病病毒四聚物对起支配作用的抗原决定簇具有特异性，所述起支配作用的抗原决定簇靶向慢性分化体C艾滋病病毒感染。所述百分比表示的是PD-1+四聚体细胞百分比。图5B是一系列图表显示了在未经抗逆转录病毒治疗的个体中，与总CD8+ T细胞群体相比，艾滋病病毒-特异性CD8+ T细胞上PD-1的百分比和MFI被显著的上调了($p<0.0001$)，并且，相对于艾滋病病毒-血清反应阴性的对照物，艾滋病病毒-感染的总CD8+ T细胞群种上的PD-1增加(p分别为$p=0.0033$和$p<0.0001$)。从65个艾滋病病毒-感染的个体和11个艾滋病病毒血清反应阴性对照物处获得120种艾滋病病毒四聚物着色体，对这些着色体进校分析。图5C显示了四聚体+细胞上PD-1+表达的中值百分比和MFI。图5D描绘了进行多重可检测反应的个体内不同抗原决定簇特异性群体上PD-1+细胞百分比的变化。横条信号表明各个个体内PD-1+艾滋病病毒四聚体细胞的中值百分比。

[0023] 图6A是一系列图表，表明在通过四聚体染色剂测定之后，艾滋病病毒-特异性CD8+ T细胞的数目和血浆病毒负载量之间没有关系，而在四聚体细胞上PD-1的百分比和MFI都与血浆病毒负载量成正比(p分别为$p=0.0013$和$p<0.0001$)。图6B是一系列图表，表示艾滋病病毒四聚体细胞和CD4计数之间没有关系，而四聚体细胞上PD-1的百分比和MFI都与CD4计数成反比(p分别为$p=0.0046$和$p=0.0150$)。图6C表明在总CD8+ T细胞群种上PD-1的百分比和MFI与血浆病毒负载量正向相关(p分别为$p=0.0021$和$p<0.0001$)。图6D描述了在总CD8+ T细胞群种上PD-1的百分比和MFI与CD4计数反向相关(p分别为$p=0.0049$和$p=0.0006$)。

[0024] 图7A是一系列流式细胞计实验图像，显示了从主体SK222获得的B*4201 TL9-特异性CD8+ T细胞的代表性的表型染色，在所述主体SK222中，98％的B*4201 TL9-特异性CD8+ T细胞是PD-1+。图7B表示了人的表型数据概要，在这些人中，95％以上的艾滋病病毒-特异性CD8+ T细胞是PD-1+。对于每个指定的表型标记物，分析7到19个样品。所述横条表明四聚体+PD-1+细胞的中值百分比，所述细胞对指定的标记物是阳性的。

[0025] 图8A是一系列流式细胞计实验图像，表示了a B*4201阳性主体的代表性的增值实验数据。在用肽刺激6天之后，在有抗-PD-L1阻断抗体参与的情况下，B*4201 TL9-特异性CD8+ T细胞的百分比从5.7％增加到12.4％。图8B是一种线状图，描述了概括性的增殖试验数据，该数据显示在有抗-PD-L1阻断抗体参与的情况下，艾滋病病毒-特异性CD8+ T细胞的增值作用有显著的增加($n=28$，$p=0.0006$，对偶T检验)。图8C是一种条形图，显示了各个病人身上PD-1/PD-L1阻断剂对艾滋病病毒-特异性CD8+ T细胞增殖作用的区别效应。白色信号棒显示了在肽单独存在的情况下四聚体+细胞的成倍增加，黑色信号棒显示了在肽和抗-PD-L1阻断抗体存在的情况下四聚体+细胞的成倍增加。对一个以上抗原决定簇进行CFSE试验的个体分别用星号、正方形或三角形符号表示。

[0026] 图9a-9d是一系列图和图表显示了在慢性感染的老鼠体内，与PD-L1阻断剂结合的治疗性疫苗对抗原-特异性CD8-T细胞出现率和病毒滴定度的协同效应。图9a是实验方案的示意图显示了在感染后第4周对LCMV克隆-13(CL-13)-感染的老鼠接种野生型牛痘病毒疫苗(VV/WT)或表达LCMV GP33-41单抗原决定簇的牛痘病毒疫苗(VV/GP33)。同时，每隔两天用或者不用抗PD-L1处理老鼠5次。图9b是一系列流式细胞计实验图像，显示了治疗后1星期GP33-特异性CD8-T细胞和GP276-特异性CD8-T细胞在PBMC中的频率。数目代表每个CD8-T细胞中四聚体-阳性细胞的频率。数据显示的是三个实验的数据。图9c-9d显示了治疗之后GP33-特异性CD8-T细胞和GP276-特异性CD8-T细胞在血液中的出现频率(图9c)和病毒滴定

度(图9d)。在指定的时间点,分别用四聚体染色剂和噬菌斑试验来检测血液中四聚体-阳性CD8-T细胞数目和病毒滴定度的变化。同时显示了用VV/WT或VV/GP33(直线)感染并用抗-PD-L1处理(阴影区)之后,个体老鼠(上面的四组)和多种老鼠(下面一组)中四聚体-阳性CD8-T细胞的数目和病毒滴定度。虚线表示了病毒检测限制,从三组实验中取平均值作为实验结果。

[0027] 图10a-10d是一种图表和数字图像,显示了小鼠不同的组织中增加的抗原特异性CD8-T细胞和提高的病毒控制,所述小鼠用结合有PD-L1阻断剂的治疗性疫苗处理。图10a是一系列流式细胞计实验图像显示了治疗4星期后GP33-特异性CD8-T细胞在不同的组织中的出现率。数字代表了每CD8-T细胞中GP33四聚体-阳性细胞的出现率。所述数据代表了两个实验的实验数据。图10b显示了治疗4星期后GP33-特异性CD8-T细胞在不同的组织中的数目。图10c是一系列条形图显示了治疗后2周(黑色柱)和4周(空白柱)后在指定的组织中的病毒滴定度。虚线表示病毒检测限制。每组的老鼠数n=6。从两组实验数据中取平均值作为结果。图10d是治疗两周后,带有LCMV抗原(红色)的脾免疫着色剂数字图像。放大倍数,×20。

[0028] 图11a-11d表示了通过治疗性疫苗结合PD-L1阻断剂造成的耗尽CD8-T细胞的提高的功能恢复。图11a是一系列流式细胞计试验图像,显示了接种疫苗的老鼠在治疗4星期后皮细胞中IFN-γ的产生和脱粒。使用指定的多肽,在αCD107/ab抗体存在的情况下刺激脾细胞,然后为了IFN-γ进行共染色。所示附图针对CD8-T细胞,并且代表了两个相互独立的试验。图11b显示了每个CD8-T细胞中IFN-γ^+CD107$^+$细胞的百分比,这里的CD-8细胞对图11a中所示的LCMV肽具有特异性,所述IFN-γ^+CD107$^+$细胞的百分比是从多个小鼠(对于每个反应n=6)中概况所得的。所得结果为两个实验所共有。图11c显示了CD8-T细胞中TNF-α的生产,其中,所述CD8-T细胞能够在接种疫苗的老鼠体内产生IFN-γ。在用GP33-41或者GP276-286肽刺激脾细胞之后,产生IFN-γ的CD8-T细胞是门控的,并且使用IFN-γ(X轴)对TNF-α(Y轴)绘制曲线。在曲线上较高或者较低的数值分别表示TNF-α^+细胞相对于IFN-γ^+细胞的频率和IFN-γ^+的平均荧光强度(MFI)。数据代表了两个相互独立的试验。图11d显示了用于图11c所示GP33-41或者GP276-286肽的每个IFN-γ^+细胞中TNF-α^+细胞的百分比,该百分比是从多个小鼠(对于每个反应n=6)中概况得到的。

[0029] 图12a-12b显示了与PD-L1阻断剂结合的治疗性疫苗的作用能够改变慢性感染的老鼠体内抗原特异性CD8-T细胞表型。图12a表示了GP33四聚体特异性CD8-T细胞在PBMC中治疗后指定的时间点的表型。针对GP33$^+$CD8-T细胞绘制柱状图。图中的百分数表示了能够高水平的表达CD27或者CD127的群体的出现频率。丝氨酸蛋白酶B在柱状图上的数值代表了表达的平均荧光强度(MFI)。这些数据代表了三个不同的试验。图12b显示了在治疗四周之后不同组织中GP33四聚体特异性CD8-T细胞的表型改变。针对GP33$^+$CD8-T细胞绘制柱状图。图中的百分数表示了能够高水平的表达CD127或者PD-1的群体的出现频率。丝氨酸蛋白酶B和Bcl-2在柱状图上的数值代表了表达的平均荧光强度(MFI)。这些数据代表了两个不同的试验。

[0030] 图13a-13e显示了与PD-L1阻断剂相结合的治疗性疫苗在恢复"无帮助性"耗尽的CD8 T细胞功能恢复方面的协同效应。图13a是方案的示意图。使小鼠的CD4 T细胞衰竭,然后用LCMV克隆-13感染。在感染七星期后,一些老鼠用野生型的疫苗性病毒(VV/WT)或者

LCMV GP33-41抗原决定簇表达性疫苗病毒(VV/GP33)接种疫苗。同时,使用αPD-L1或其同型体每三天治疗小鼠5次。在最初的抗体治疗5周之后,杀死老鼠进行分析。图13b是一系列流式细胞计图和一种柱状图,表示了治疗四星期后GP33-特异性CD8-T细胞在指定的组织中的出现频率。数值代表了每个CD-T细胞中GP33四聚体-阳性细胞的出现频率。另外还概括了治疗两星期之后在不同组织的CD8-T细胞中GP33-特异性细胞的出现频率。图13c是一系列流式细胞计图,表示了试验所得结果。其中在αCD107a/b抗体存在的情况下用GP33肽刺激脾细胞,并随后为了IFN-γ进行共染色。针对CD8-T细胞绘图。概括多个小鼠的对GP33肽具有特异性的CD8-T细胞中IFN-γ^+CD107$^+$细胞的百分率。图13d显示了在用GP33肽刺激之后每个Db-限制性GP33-41四聚体阳性细胞中IFN-γ^+细胞的百分比,该百分比从多个老鼠中概括得出。图13e表示了在治疗两星期后在指定的组织中的病毒滴定度柱状图。所有的制图都代表了两个试验并且所概括的结果味两个实现所共有(n=6只老鼠/组)。

[0031] 图14a-14b显示了在转移到天然携带的老鼠体内之后,PD1/PD-L1信号途径阻断剂能够增加抗原特异性T细胞的总数。全脾细胞被用于转移到经过或者没有经过抗PD-L1治疗的天然携带的老鼠体内。图14a代表了CD8+ T细胞特点的时间-点中建立的一组独立的流式细胞计图形,图14b表示了两个独立的试验中,Db GP33-特异性CD8 T细胞在外周血液中扩增的动力学(n=4只动物每组)。

[0032] 图15a-15e显示了在经过可应用的T细胞免疫治疗之后,PD1/PD-L1信号途径阻断剂能够提高抗原特异性CD8 T细胞中细胞因子的产生。在转移后第17天分离脾细胞并分析使用抗原性肽刺激后的细胞因子表达作用。图15a显示了在用定义的CD8抗原决定簇或者无肽参照物刺激5小时之后通过细胞内细胞因子染色评价的IFNγ的表达作用。图15b和图15d分别显示了TNFα或者107ab和IFNγ的二重表达作用(四角星代表CD8门百分比)。图15c和图15e显示了生产IFNγ同时生产TNFα或者107ab的细胞的百分比(n=3只动物/组)。

[0033] 图16A-图16B显示了在LCMV克隆-13感染的小鼠体内抗体分泌细胞增加的水平。通过ELISPOT和CD138染色对患有慢性LCMV感染的小鼠进行αPD-L1治疗,之后测定总抗体分泌细胞的水平。图16A显示了脾抗体分泌细胞总量,这是从三个独立的试验中概括所得的。图16B显示了脾脏中抗体分泌细胞(ASC)的增加可以通过标记物CD138来测定。如一个代表性的图中所示,抗体分泌细胞是CD138+和B220低/中值(淋巴细胞上的门阀)。

[0034] 图17显示,用抗-PD-L1治疗慢性LCMV感染的老鼠不会导致骨髓抗体分泌细胞水平的提高。在用ELISPOT计算在进行(α)PD-L1治疗14天之后,患有慢性LCMV感染的小鼠体内脾脏和骨髓中抗原分泌细胞的总数。线条表示了试验组的几何平均数。

[0035] 图18显示了共同给药αPD-L1和αCTLA-4会导致脾细胞中抗体分泌细胞的协同增加。对慢性LCMV感染的小鼠给药αPD-L1、αCTLA-4、或者二者一起给药14天,通过ELISPOT计算脾细胞中抗体分泌细胞的总数。线条表示了治疗组的几何平均数。

[0036] 图19A-19B显示了提高的B细胞和CD4 T细胞增殖作用和αPD-L1治疗的小鼠体内生发中心活性。图19A是CD4 T细胞和B细胞的流式细胞分析图,显示了αPD-L1治疗之后提高的Ki-67水平。如上面各栏所述,结果真对CD4或B细胞。图19B显示了表达PNA的B增加的出现频率和高水平的FAS,这一结果表明αPD-L1治疗的小鼠体内生发中心活性被提高。制图是概括了两个分别的试验结果的图像。

[0037] 图20A-20C表示了CD8和CD4细胞子集中的PD-1表达。图20A是一系列流式细胞计实

验图，显示了血液中CD8+/CD3+淋巴细胞之间PD-1和各种表型的标记物之间的共表达。图20B显示了各种表达PD-1的CD8+/CD3+和(D)CD4+/CD3+细胞子集的百分比。柱状图表示了PD-1在含有阳性(空心圆)和阴性(实心三角形)指定的标记物中的平均百分比。图20C代表了来自一个子集的表达PD-1的CD4+ T细胞的表型试验数据。

[0038] 图21A-B显示了PD-1在对慢性感染有特异性的CD8 T细胞中更好的表达。图21A是一系列流式细胞计实验图像，显示了Ebstein棒状病毒(EBV)、巨细胞病毒(CMV)、流行性感冒和牛痘病毒-特异性CD8 T细胞的代表性PD-1染色。并标明了在四聚体+细胞之间PD-1表达的荧光强度几何平均数(GMFI)。图21B显示了来自健康志愿者(n＝35)中EBV、CMV、流行性感冒和牛痘病毒-特异性CD8 T细胞上PD-1的概括信息。

[0039] 图22A-C显示了，抗-PD-L1阻断剂能够增加对慢性感染有特异性的CD8 T细胞体外增殖作用。图22A是一系列流式细胞计实验图像，显示了用CFSE标记淋巴细胞，然后在指定的情况下培养6天。所述图像显示了来自EBV和CMV阳性主体典型的染色。图22B是一种棒状图，显示了在用抗-PD-L1阻断抗体阻断之后的EBV、CMV、流行性感冒和牛痘病毒抗原-特异性反应。所述棒状信号显示了与单独使用肽相比，在肽和抗-PD-L1阻断抗体参与的情况下四聚体+细胞的成倍增加。图22C显示了抗PD-L1抗体阻断剂之后四聚体+细胞成倍增加和PD-1表达(培养之前)之间的关系。

[0040] 图23B-23C显示了在患有慢性HCV传染病的人体内，丙型肝炎病毒(HCV)特异性CD8+ T细胞能够表达PD-1。图23A是5个患有慢性HCV传染病的病人代表性的制图，显示了HCV特异性CD8+ T细胞上PD-1的表达。黑体的数值表示了在HCV特异性CD8+ T细胞(Y轴)上PD-1表达的出现率(X轴)。图中斜体的数字表示了四聚体阳性细胞在总CD8+ T细胞之中的出现率。在Y轴上，1073和1406能够识别四聚体HCV抗原决定簇特异性。通过“Pt”，随后通过病人数目识别病人。细胞聚集在CD8+淋巴细胞上。绘图以对数刻度来绘制。图23B表示了PD-1在来自健康供体(CD8健康的)的CD8+ T细胞上的表达、来自感染HCV病人(CD8HCV)的CD8+ T细胞上的表达和在CD8+HCV特异性T细胞(HCV tet+)上表达的比较。图23C显示了，与PD-1在对HCV具有特异性的CD8+ T细胞(HCV tet+)上的表达相比，在来自HCV感染的供体(HCV+)和健康供体(健康的)中对流行性感冒病毒具有特异性的CD8+ T细胞(Flu tet+)上PD-1的表达。使用未配对的T检验法比较同一病人体内总CD8+ T细胞相对于HCV特异性CD8+ T细胞上PD-1的表达。

[0041] 图24a-24d显示了肝中PD-1表达CD8+ T细胞的出现率大于外周血液中的出现率。图24a是来自5位患有慢性HCV传染病的病人的绘图，显示了与来自肝脏中的总CD8+ T细胞中的表达相比，PD-1在来自外周血液的总CD8+ T细胞中的表达。绘图中黑体的数字显示了淋巴细胞门的总CD8+ T细胞中能够表达PD-1的细胞的出现率。制图以对数比例绘制。图24b显示了PD-1在来自外周血液中CD8+ T细胞上的表达与在来自HCV慢性感染患者肝脏中CD8+ T细胞上的表达的比较。使用配对T检测法比较PD-1在同一病人体内表达的差异。图24c比较了与来自肝脏的CD8+效应因子记忆(TEM)细胞中PD-1表达相比，PD-1在来自外周血液的CD8+效应因子记忆(TEM)细胞中的表达。记忆子集可以通过CD62L和CD45RA的差异表达来识别。在图上部的黑体数字表示了细胞在每个象限的出现率。细胞被聚集在CD8+淋巴细胞上，所述TEM子集被控制(装箱)且PD-1的表达显示在下面的直方图中。虚线显示了PD-1在原态CD8+ T细胞(用作阴性群体)上的表达。直方图中的数字代表了表达PD-1细胞的出现率。在直方

图的下面，概括了十位患有慢性HCV传染病的病人体内CD8+ TEM细胞上PD-1表达出现率的比较。使用配对T检验法比较在同一病人体内，在来自周围血液中的CD8+ TEM上与在来自肝脏中的CD8+ TEM上PD-1表达的区别。图24d是代表两位患有慢性HCV传染病病人的绘图，显示了在来自周围血液的总CD8+ T细胞中与在来自肝脏的总CD8+ T细胞中，CD127表达的区别。黑体数字显示了总CD8+ T细胞上CD127表达的出现率。细胞聚集在CD8+淋巴细胞上。绘图以对数比例绘制。CD127在来自外周血液中的总CD8+ T细胞上的表达与在来自肝脏的总CD8+ T细胞上的表达的比较概括显示在下面的FACS图中。使用配对T检验法用于统计分析。

[0042] 图25显示了肝脏中的HCV特异性CD8+ T细胞表达一种耗尽的表型。表现了两个患有慢性HCV传染病的病人的外周血液和肝脏中，HCV特异性CD8+ T细胞上PD-1和CD127表达的代表性制图。第一排图代表了HCV四聚体阳性群体(方框)。方框上的数字代表了四聚体阳性细胞在CD3+淋巴细胞中的出现率。HCV四聚体的抗原决定簇特异性表示在Y轴上(1073)。第二和第三排图显示了来自两位患有慢性HCV传染病的病人的外周血液和肝脏中的HCV特异性CD8+ T细胞上PD-1和CD127的表达。黑体数字表示了HCV特异性CD8+ T细胞上PD-1或CD127表达的频率。绘图以对数刻度绘制，并聚集在CD3+ CD8+淋巴细胞上。在FACS绘图下边，显示了在来自外周血液中的总CD8+ T细胞和CD8+ HCV特异性T细胞上，相对于来自肝脏(HCV tet+肝)的HCV特异性CD8+ T细胞中PD-1表达(左侧)与CD127表达(右侧)的比较。在同一病人内部，使用配对T检测法比较表达作用。

[0043] 图26显示了PD-1/PD-L1途径阻断剂能够增加抗原刺激的HCV-特异性T细胞的扩增。在有IL-2和抗PD-L1抗体(上组)或抗PD-1抗体(下组)参与的情况下，使用同源肽抗原刺激来自两种分离的人白细胞抗原(HLA)-A2病人的CFSE标记的PBMC 6天。同样显示未经刺激的参照物。在每个象限中显示出增殖的CFSE低-和CFSE高-HCV-特异性人类白细胞抗原(HLA)-A2+CD8+ T细胞的百分比。

[0044] 图27A-27D显示了在猿免疫缺陷病毒(SIV)特异性CD8 T细胞上，在SIV239感染之后，提高的PD-1的表达。图27A显示了来自正常猕猴的总CD8 T细胞上PD-1的表达。图27B显示了SIV239感染的猕猴体内，总CD8 T细胞上和SIV gag-特异性CD8 T细胞上PD-1的表达。在SIV感染12星期后对PBMC进行分析。图27C提供了正常猕猴和SIV-感染猕猴中总CD8 T细胞和SIV-特异性CD8 T细胞上PD-1阳性细胞的概括信息。表示了感染12周之后SIV-感染的猕猴的数据。图27D(最后一组)提供了正常猕猴和SIV-感染猕猴中总CD8 T细胞和SIV-特异性CD8 T细胞上PD-1表达的平均荧光强度(MFI)的概括信息。

[0045] 图28A-28B分别是图和图表，显示了PD-1体外阻断剂能够提高SIV-特异性CD8 T细胞的扩增。来自Mamu A*01阳性猕猴的PBMC感染SHIV89.6P，用P11C肽(0.1毫克/毫升)在存在或者不存在抗PD-1阻断抗体(10毫克/毫升)的情况下几次该猕猴六天。在刺激三天之后，加入IL-2(50单位/毫升)。在刺激作用快结束的时候对细胞表面进行CD3、CD8和Gag-CM9四聚体染色。使用未刺激的细胞(nostim)作为阴性参照。根据散射作用将细胞集合在淋巴细胞上，然后在CD3上分析CD8和四聚体的表达。图28A是一种代表性的FACS图。图上的数字代表了四聚体阳性细胞相对于总CD8 T细胞的出现率。图28B提供了来自6只猕猴的概括性数据。使用感染12周之后获得的细胞进行分析。计算四聚体阳性细胞在P11C刺激的培养物和未刺激的细胞中的出现率之比，作为增加倍数。

[0046] 图29显示了LCMV感染之后，PD-L1、PD-L2和PD-1在不同的细胞型上的表达动力学。

用210^6pfu的克隆-13(CL-13)感染老鼠。在感染后指定的时间点,PD-L1、PD-L2、和PD-1在不同细胞型上的表达作为一种直方图被现实。PD-1在指定的细胞型上表达的平均荧光强度(MFI)被显示。

[0047] 图30a-30c是FACS图,显示了慢性SIV感染过程中体内PD-1阻断剂增加Gag-CM9-特异性CD8 T细胞并使其在血液和肠道中具有更好的功能性数量。图30a是短尾猿RRk10代表性的FACS图。图30b和30c是FACS图,显示了血液(图30b)和肠道(大肠黏膜组织)(图30c)中Gag-CM9-四聚体阳性CD8 T细胞的数量和表型。代表性的FACS图显示在左侧,所有Mamu A*01-阳性动物的概括显示在右侧。FACS图上的数字代表四聚体阳性细胞占总CD8 T细胞的百分比。箭头和垂直线表示了抗-PD-1抗体治疗或者参照抗体治疗。

[0048] 图31a-31b显示了慢性SIV感染过程中体内PD-1阻断剂增加多功能病毒特异性CD8 T细胞。图31a显示了Gag-特异性细胞因子-分泌CD8 T细胞占总CD8 T细胞的百分比。代表性的FACS图显示在左侧,该组的概括显示在右侧。箭头和垂直线表示了抗-PD-1抗体治疗或者参照抗体治疗。线代表抗-PD-1抗体治疗的短尾猿,且红线代表参照-抗体-治疗的短尾猿。图31b显示了细胞因子共表达亚组,表示为总细胞银子阳性细胞的百分比。这里显示了每组的平均百分数。

[0049] 图32a-32b显示了在慢性SIV传染病期间体内PD-1阻断剂提高SIV-特异性体液免疫。图32a显示了在SIV感染之后和体内PD-1阻断剂之前,血液中PD-1记忆($CD20^+CD27^+CD21^-$)和天然($CD20^+CD27^-CD21^+$)B细胞中的表达。图32b显示了加入阻断剂之后抗-SIV Env-结合抗体在血清中的滴定度。图32c显示了在加入阻断剂之后,Ki67在记忆和天然B细胞中的表达(增殖作用标志)。FACS图上的数字代表Ki67-阳性细胞占相对总细胞量的百分比。在SIV感染22周之后,同时使用抗-PD-1抗体和抗病毒性治疗剂治疗短尾猿Raf11和RJd11。

[0050] 图33a-33e显示了体内PD-1阻断剂降低了血浆病毒血症并延长感染SIV的短尾猿的存活时间。在传染病早期慢性阶段使用抗-PD-1抗体治疗短尾猿中的血浆病毒载量(图33a),在感染病晚期慢性阶段使用抗-PD-1抗体治疗短尾猿(图33b),和在SIV传染病的早期/晚期慢性阶段用参照抗体治疗短尾猿(图33c)。型号代表动物死亡。图33d显示了第0天到第28天(早期慢性研究)或第0天到第21天(晚期慢性研究)之间血浆病毒载量降低的倍数。图33e显示了用PD-1阻断剂治疗之后SIV-感染的短尾猴的存活量。

[0051] 序列表

[0052] 在所附序列表上列出的核酸和氨基酸顺序使用标准核苷酸碱基标准缩写字体来显示,氨基酸使用37C.F.R.1.822.规定的三个字母代码来表示。核酸序列只显示了其中一条核酸链,其互补链作为所显示链相对应的核酸链应该被理解为也被包括在本发明中。在所附序列表中:

[0053] SEQ ID NO:1是人PD-1的示范性的氨基酸顺序。

[0054] SEQ ID NO:2是老鼠PD-1的示范性的氨基酸顺序。

[0055] SEQ ID NO:3是人PD-L1的示范性的氨基酸顺序。

[0056] SEQ ID NO:4是人PD-L2的示范性的氨基酸顺序。

[0057] SEQ ID NO:5-12是人骨架结构区的示范性的氨基酸顺序。

[0058] SEQ ID NOs:13-35是人PD-1的示范性的氨基酸顺序。

[0059] SEQ ID NOs:36-43是主要的组织适合性肽的示范性的氨基酸顺序。

[0060] SEQ ID NO:44和SEQ ID NO:45是T细胞抗原决定簇氨基酸顺序。

[0061] SEQ ID NO:46是人PD-L2变体的示范性的氨基酸顺序。

[0062] SEQ ID NOs:47-52是抗原肽的示范性的氨基酸顺序。

[0063] SEQ ID Nos:53-56是引物的核苷酸序列。

具体实施方式：

[0064] 本发明的公开涉及PD-1拮抗剂在诱导免疫反应方面的应用，所述免疫反应例如对肿瘤或对持久性病毒感染的免疫反应。本发明的公开还涉及确定对治疗主体有效的PD-1拮抗剂剂量的方法。

[0065] 术语

[0066] 除非另有说明，这里使用的技术术语是根据其传统用法来使用的。在分子生物学领域普通术语的定义可以在在下列文献中找到：由牛津大学出版社与1994年出版的Benjamin Lewin所著的“基因V”(国际标准图书编号0-19-854287-9)；由Blackwell科学股份有限公司于1994年出版的Kendrew等人(编辑)的“分子生物学百科全书”(国际标准书号0-632-02182-9)；和由VCH出版股份有限公司于1995年出版的Robert A.Meyers(编辑)的“分子生物学和生物工艺学：综合性实验参考”(国际标准书号1-56081-569-8)。

[0067] 为了帮助这里公开的各种各样的实施方案的理解，本发明提供了关于下列专用名词的解释：

[0068] 变化：与某一参数的参照值相比，该参数发生统计学上显著的改变。在一个实施例中，“增加”是某一参数统计学上显著的提升，例如记忆B细胞与参照相比数量增加或者发生增殖作用。合适的统计分析方法在本领域内是已知的，并且包括但不局限于，T检验和ANOVA实验。在一些实施例中，具有的p值小于等于0.05.在其他的实施例中，显著的变化，例如显著的增加或者减少，是与两个标准偏差的平均值或者更大值。“不存在显著的变化”是指使用合适的统计学实验所得的数值的改变没有达到统计学的显著性。在一些实施例中，p值大于0.05。在其他的实施例中，“不存在显示的变化”是指所得的增加或者减少少于两个标准偏差的平均值。在一些实施方案中，“增加”或者“提升”，例如记忆B细胞的增殖作用的增加，是大约20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％的增加或者是2-倍、3-倍、4-倍或者5-倍的增加。在一个实施例中，“减少”或者“降低”是指某一参数统计学上显著的降低，例如，与参照相比，记忆B细胞的数量或者增殖作用显著的降低。合适的统计分析方法在本领域内是已知的，并且包括但不局限于，T检验和ANOVA实验。在一些实施方案中，“减少”，例如记忆B细胞的增殖作用的减少，是大约20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％的减少或者是2-倍、3-倍、4-倍或者5-倍的减少。

[0069] 反义、正义和反基因：DNA具有两个逆平行链，一个是5’→3’链，该链通常被叫做正链，另一个是3’→5’链，该链被认为是负链。由于RNA聚合酶以5’→3’的方向添加核酸，因此负链的DNA在RNA转录期间作为模板。如此，RNA转录产物所具有的序列与负链序列互补，与正链序列一致(只有尿嘧啶(U)被胸腺嘧啶(T)取代)。

[0070] 反义分子是能够与RNA或DNA正链特异性杂交或者互补的分子。正义分子是能够与DNA的负链特异性杂交或者互补的分子。反基因分子是指向DNA靶点的反义分子或者正义分

子。反义RNA(asRNA)是一种RNA分子,该分子与正义(编码的)核酸分子互补。

[0071] 扩增:当被用于涉及核酸时,扩增是指能够增加样品或者样本中核酸分子拷贝数目的方法。聚合酶链式反应是扩增技术的一个例子。在此反应中,从主体中收集生物样品,在能够允许样品中引物与核酸模板杂交的条件下使收集的生物样品与一对低聚核苷酸引物相接触。在合适的条件下,引物延长,从模板上分开,然后重新退火、延伸、和分离,从而扩增核酸的拷贝数目。体外扩增的产物可以通过电泳、限制性核酸内切酶裂解方式、低聚核苷酸杂交或结扎、和/或核酸测序,使用标准技术进行定性。体外扩增技术的其他例子包括链位移扩增(参见美国专利第5,744,311号);无转录作用等温扩增(参见美国专利第6,033,881号);修补链式反应扩增(参见WO 90/01069);连接酶连锁反应扩增(参见欧洲专利第EP-A-320 308号);间隙填充连接酶连锁反应扩增(参见美国专利第5,427,930号);偶联的连接酶检测和聚合酶链反应(参见美国专利第6,027,889号);和NASBA™ RNA无转录扩增(参见美国专利第6,025,134号)。

[0072] 抗体:抗体是一种多肽配位体,包括至少一种轻链或者重链免疫球蛋白可变区,所述可变区能够特异性识别和结合一种抗原决定簇(例如,一种抗原,例如肿瘤或者病毒抗原,或者他的片段)。抗体包括完整的免疫球蛋白及其本领域内已知的变体和部分,例如Fab'片段、F(ab)'$_2$片段、单链Fv蛋白("scFv")、和二硫化物稳定的Fv蛋白质("dsFv")。单链Fv蛋白("scFv")是一种融合蛋白,该融合蛋白中的免疫球蛋白轻链可变区和免疫球蛋白重链可变区通过一种连接体结合,而在二硫化物稳定的Fv蛋白质("dsFv")中,通过引入二硫键使链发生突变,从而稳定链的结合。本术语还包括抗体的基因工程形式,例如嵌合抗体(例如,人源化鼠抗体)、杂共轭配对抗体(例如,双特异性抗体)。参见,Pierce Catalog and Handbook(Pierce目录和手册),1994-1995(Pierce化学公司,Rockford,IL);Kuby,J.等人所著的Immunology(免疫学),第三版,W.H.Freeman&Co.公司,纽约,1997。

[0073] 一般的,免疫球蛋白具有重链和轻链。每种重链和轻链都包含一种恒定区域和一种可变区域(这里"区域"也可以叫做"区")。在结合时,重链和轻链可变区特异性的结合抗原。轻链和重链可变区包括一种骨架结构区域,该骨架结构区域由三个高超变区所中断,所述高超变区也叫做"互补性-决定区域"或"CDRs"。骨架结构区域和CDRs的范围已经被定义了(参见,Kabat等人的所著的"具有免疫重要性的蛋白质序列",美国健康和公共事业部,1991,该文献通过引证在此全部并入本文)。Kabat数据库是在线维持的。在同一个物种中,不同轻链或重链的骨架结构区域序列是相对保守的。抗体的骨架结构区域是构建轻链和重链的结合的骨架结构区域,该骨架结构区域能够用来定位和校准三维空间上的CDRs。

[0074] 所述CDR主要负责结合抗原的抗原决定簇。每个链的CDR一般被命名为CDR1、CDR2、和CDR3,从N末端开始顺序编号,也可以通过特定的CDR所在的链一般性的识别出来。因此,VHCDR3(CDR3的重链可变区)位于发现它的抗体的重链可变区上,其中,VL CDR1(CDR1的轻链可变区)位于发现它的抗体的轻链可变区上。

[0075] "VH"或者"VH"涉及免疫球蛋白重链的可变区,其包括Fv、单链Fv蛋白("scFv")、二硫化物稳定的Fv蛋白质("dsFv")或Fab的免疫球蛋白重链可变区。"VL"或者"VL"涉及免疫球蛋白轻链的可变区,包括Fv、单链Fv蛋白("scFv")、二硫化物稳定的Fv蛋白质("dsFv")或Fab的免疫球蛋白轻链可变区。

[0076] "单克隆抗体"是通过B－淋巴细胞单个克隆或者是通过细胞产生的抗体,在所述

细胞中，单个抗体的轻链和重链基因已经被转染了。单克隆抗体可以根据本领域内已知的方法进行制备，所述方法例如：使骨髓瘤细胞与免疫脾细胞相融合来制备杂交的抗体形成的细胞。单克隆抗体包括人源化的单克隆抗体。

[0077] “人源化的免疫球蛋白”是指一种免疫球蛋白，这种免疫球蛋白包括人免疫球蛋白骨架结构区域和一种或一种以上非人源免疫球蛋白(例如老鼠的免疫球蛋白、鼠的免疫球蛋白或合成的免疫球蛋白)的CDR的。提供CDR的非人源免疫球蛋白被命名为“供体”，提供骨架结构的人源免疫球蛋白被命名为：“受体”。在一个实施方案中，所有的CDR都来源于人源化免疫球蛋白中的供体免疫球蛋白，恒定区不是必须的，但如果存在的话，他们必须基本上与人源免疫球蛋白恒定区一致，那就是说，至少有大约85-90％的一致性，例如，至少大约95％或更多的一致性。从此，人源化免疫球蛋白的所有部分，可能除了某些CDR，都与天然的人源免疫球蛋白序列的相应部分基本上一致。人源化抗体是一种抗体，这种抗体包括一种人源化的免疫球蛋白轻链和一种人源化的免疫球蛋白重链。人源化抗体与作为供体抗体提供CDR的抗体结合相同的抗原。人源化免疫球蛋白或抗体的受体骨架结构具有有限个取代，所述取代由选自供体骨架结构的氨基酸进行。人源化单克隆抗体或其他单克隆抗体还可以具有其他的保守氨基酸取代作用，这些取代作用基本上不影响抗原结合或免疫球蛋白的其他功能。人源化的免疫球蛋白可以通过遗传工程构建(例如，参见美国专利第5,585,089号)。

[0078] “中和抗体”是能够干扰多肽，例如PD-1多肽任何一种生物学活性的抗体。例如，中和抗体可以干扰PD-1多肽从而降低免疫反应，所述免疫反应例如T细胞的细胞毒性。在几个实施例中，中和抗体可以减少PD-1多肽的能力从而将免疫反应降低大约50％、大约70％、大约90％或更多。可以使用任意标准试验来测定免疫应答，包括这里所描述的实验，从而确定可能的中和抗体。

[0079] 抗原：是指一种能够刺激动物体内产生抗体或者T细胞反应的化合物、组合物、或物质，包括能够注射入动物体内或者被动物体吸收的成分。抗原能够与特定的体液产生的或者细胞免疫产品发生反应，所述产品包括由异源免疫原诱导产生的抗原。术语“抗原”包括所有涉及到的抗原的抗原决定簇。“抗原决定簇(Epitope)”或“抗原决定簇(antigenic determinant)”涉及抗原上的一种位点，在此位点上B细胞或者T细胞进行应答。在一个实施方案中，当抗原决定簇与一种主要组织相容性复合体(MHC)分子相连接而存在时，T细胞对抗原决定簇作出反应。抗原决定簇可以从邻接的氨基酸或通过蛋白质的三级折叠连接的非邻接氨基酸形成。由邻接的氨基酸形成的抗原决定簇一般在暴露于变性溶剂之后能够被保持，而由三级折叠形成的抗原决定簇在用变性溶剂处理之后会失去治疗作用。一种抗原决定簇一般包括至少3个氨基酸或者更多，至少5个氨基酸、大约9个氨基酸，或者大约8-10个氨基酸，这些氨基酸以一种独特的空间构造存在。决定抗原决定簇空间构造的方法包括，例如，X-射线晶体衍射法和2-维核磁共振。

[0080] 抗原可以是一种组织特异性抗原，或一种疾病特异性抗原。这些术语并不是专有的，例如，组织特异性抗原还可以是一种疾病特异性抗原。组织特异性抗原可以再有限数目的组织中可以表达，例如，单个组织。具体的，组织特异性抗原的非限制性例子是前列腺特异性抗原、子宫特异性抗原、和/或睾丸特异性抗原。组织特异性抗原可以再一个以上组织中表达，例如，但不仅限于，一种抗原可以再超过一个生殖腺组织中表达，例如，在前列腺组

织和子宫组织中表达。疾病特异性抗原在疾病过程中偶然被表达。疾病特异性抗原非极限性的实施例是能够与肿瘤形成相关的抗原或者能够预言肿瘤形成的抗原。疾病特异性抗原是可以通过T细胞或B细胞识别的抗原。

[0081] 抗原-呈递细胞(APC):是指可以将结合有主要组织相容性复合体(MHC)I类分子或II类分子的抗原呈递到T细胞的细胞。抗原-呈递细胞(APC)包括,但是不局限于,单核细胞、巨噬细胞、树状细胞、非胸腺依赖性细胞(B细胞)、T细胞和郎格罕氏细胞。一种T细胞可以将抗原呈递到其他的T细胞(包括CD4+和/或CD8+ T细胞)上,这种T细胞就是一种抗原呈递T细胞(T-APC)。

[0082] B细胞:淋巴细胞的亚群,即,白血细胞(白细胞)。成熟的B细胞分化成血浆细胞,产生抗体和记忆B细胞。“B细胞原始粒子”是能够发展成为成熟B细胞的细胞。B细胞原始粒子包括干细胞、早期前-B细胞、晚期前-B细胞、大前体B细胞、小前体B细胞、和不成熟B细胞和过渡期B细胞。通常,早期前-B细胞(早期前B细胞表达,例如CD43或者B220)经历免疫球蛋白重链重排变成不成熟的B细胞。不成熟的B细胞包括T1和T2B细胞。例如,在老鼠中,不成熟的B细胞包括T1B细胞,即$AA41^{hi}CD23^{lo}$细胞。老鼠不成熟B细胞的其他实施例是T2B细胞,即$AA41^{hi}CD23^{hi}$细胞。在人体中,不成熟B细胞(例如,不成熟外周过渡性B细胞)包括$CD38^{hi}$,IgD^{+},$CD10^{+}$,$CD24^{hi}$,$CD44^{lo}$,$CD23^{lo}$和$CD1^{lo}$细胞。因此,不成熟B细胞包括B220(CD45R)表达细胞,其中,轻链和重链免疫球蛋白细胞基因倍重排。在一个实施方案中,不成熟的B细胞表达CD45R,class II,IgM,CD19和CD40。不成熟B细胞不显示替代轻链表达,但却表达Igαβ和RAG。不成熟B细胞可以发展为成熟的B细胞,成熟B细胞可以产生免疫球蛋白(例如,IgA、IgG或者IgM)。成熟B细胞具有获得的表面IgM和IgD,能够对抗原发生反应,并且表达特征标记物,例如CD21和CD23($CD23^{hi}CD21^{hi}$细胞)。B细胞可以被试剂活化,例如,被脂多糖(LPS)或者IL-4和抗IgM的抗体活化。B细胞和B细胞原始粒子常见的生物来源包括骨髓、外周血、脾脏和淋巴结。

[0083] 最初与抗原相遇的B细胞叫做“天然”B细胞。这种细胞在其细胞表面具有IgM和IgD。在一种B细胞原始粒子(例如,前定向小淋巴细胞)被抗原激活之后,该B细胞原始粒子分化成母细胞,母细胞分化成不成熟血浆细胞,不成熟血浆细胞可分化成成熟血浆细胞或者记忆B细胞。作为对特定抗原的反应,成熟血浆细胞分泌免疫球蛋白。记忆B细胞是经过细胞同型转换和体细胞超突变的B细胞,所述体细胞超突变通常在次级免疫反应(在首次抗原暴露之后的抗原暴露)过程中发生,但也可以在初级抗原反应中检测到。记忆B细胞的发展发生在淋巴滤泡(lymphoid follicles)的生发中心(GC),在淋巴滤泡(lymphoid follicles)的生发中心(GC),抗原产生的淋巴细胞进行超突变和亲和筛选,前提是在辅助性T细胞的影响下。记忆B细胞通常表达CD27。一般的,记忆B细胞还能在其细胞表面表达高亲和性抗原特异性免疫球蛋白(B细胞受体)。因此,记忆B细胞可以是$CD20^{+}CD27^{+}$,并且包括$CD20^{int}/CD21^{+}/CD27^{+}$(静态记忆)、$CD20^{hi}/CD21^{-}/CD27^{+}$(活化的记忆)。$CD20^{hi}/CD21^{-}/CD27^{-}$细胞是独特的“非常规或者组织记忆”B细胞。

[0084] 结合亲和性:抗体对抗原的亲和性。在一个实施方案中,通过Frankel et al., Mol.Immunol.,16:101-106,1979中描述的Scatchard方法的改良计算亲和性。在另一个实施方案中,结合亲和性通过抗原/抗体解离速度测定结合亲和性。在依旧另一个实施方案中,通过竞争性放射免疫试验测定高结合亲和性。在几个实施例中,高结合亲和性是至少大

约1x 10^{-8}M。在另一个实施方案中，高结合亲和性是至少大约1.5x 10^{-8}M、至少大约2.0x 10^{-8}M、至少大约2.5x 10^{-8}M、至少大约3.0x 10^{-8}M、至少大约3.5x 10^{-8}M、至少大约4.0x 10^{-8}M、至少大约4.5x 10^{-8}M、或者至少大约5.0x 10^{-8}M。

[0085] 结合或稳定的结合(低聚核苷酸)：如果足够量的低聚核苷酸形成碱基对或者与其靶分子核酸杂交，该低聚核苷酸就会结合或者稳定的结合到靶分子核酸上，从而允许检测结合。可以通过靶分子:低聚核苷酸复合物的物理或者功能性质检测结合。在靶分子和低聚核苷酸之间的结合可以通过本领域内已知的任何方法来检测，这些方法包括功能性结合实验和物理结合实验。例如，可以通过确定结合在生物合成过程中是否具有可探测到的效果来从功能角度检测结合，所述生物合成过程例如基因表达、DNA复制、转录、翻译等等。

[0086] 检测DNA或RNA的互补链结合的物理方法在本领域内是已知的，包括，例如脱氧核糖核酸酶I(DNase I)或化学足迹实验法、凝胶位移和亲合裂解试验、RNA分子印迹技术(Northernblotting)、点印迹技术和光吸收检测方法。例如，一个方法包括在220纳米到300纳米条件下，在温度缓慢增加时观察包含低聚核苷酸(或其类似物)和靶分子核酸的溶液光吸收的变化，由于该方法简单可靠，在本领域内被广泛应用。如果低聚核苷酸或类似物已经与它的靶分子结合了，在某一特定的温度下，该溶液的吸光度会有一个突增，这是由于低聚核苷酸(或类似物)与他的靶分子分离或熔融而造成的。

[0087] 低聚物及其靶分子核酸之间的结合通常通过温度(Tm)来定性，在此温度(Tm)下，50％的低聚物从其靶分子上熔化。较高的(Tm)相对于较低的(Tm)来讲，意味着更强或者更稳定的复合物。

[0088] 癌症或肿瘤：是指一种恶性的赘生物，该赘生物已经经历了特有的退行性变化同时伴有分化能力损失、发育增长率损失、侵入周围组织、并能够转移。生殖性癌症是指其最初起源在生殖组织中的癌症，所述生殖组织例如子宫、睾丸、卵巢、前列腺、输卵管或阴茎。例如，前列腺癌是一种恶性赘生物，发生在前列腺组织并从前列腺组织中扩散，并且，子宫癌是发生在子宫组织中或者从子宫组织中扩散开来的恶性赘生物，睾丸癌是发生在睾丸中的恶性赘生物。切缘癌是指在对患有癌症的患者进行任何能够减少或消除甲状腺癌的治疗之后仍然残留在患者体内的癌症。转移癌是指除了原始(最初)癌症起源位点之外，从该转移性癌起源位点转移出的在患者体内一个或者一个以上位点的癌症。

[0089] CD28(分化群28)：在T细胞上表达的细胞之一，能够提供共刺激性信号，共刺激性信号是T细胞活化所必须的。CD28是B7.1(CD80)和B7.2(CD86)的受体。当被toll样受体配位体活化时，在抗原呈递细胞(APCs)中B7.1的表达被上调。在抗原呈递细胞(APCs)中B7.2的表达是持续性的。CD28是唯一能够在天然T细胞上持续性表达的B7受体。

[0090] 化学疗法;化学治疗剂：如这里使用的，化学疗法或化学治疗剂是指任何能够有效治疗以非正常细胞生长为特征的疾病的化学试剂。这些疾病包括肿瘤、赘生物和癌症，以及以增生性生长为特征的疾病，例如，牛皮癣。在一个实施方案中，化学治疗剂是在治疗赘生物的过程中使用的试剂，所述被治疗的赘生物例如实体肿瘤。在一个实施方案中，化学治疗剂是一种放射性分子。本领域普通技术人员可以很容易的识别有效的化学治疗剂(例如，参见Slapak and Kufe,Principles of Cancer Therapy,(Slapak和Kufe所著的“癌症治疗原理”)Chapter 86in Harrison's Principles of Internal Medicine(内科医学的哈里森原理第86章)第14版;Perry et al.,Chemotherapy,Ch.17in Abeloff,Clinical

Oncology2nd ed.,©2000Churchill Livingstone,Inc(丘吉尔利文斯顿有限公司2000年出版的Perry等人编写的“化学疗法”第2版第17章,阿贝洛夫临床肿瘤学);Baltzer L,Berkery R(eds):Oncology Pocket Guide to Chemotherapy,2nd ed.St.Louis,Mosby-Year Book,1995(Mosby年鉴1995年,圣路易斯出版的Baltzer L、Berkery R编辑的“肿瘤学化学疗法口袋指南”第2版);Fischer DS,Knobf MF,Durivage HJ(eds):The Cancer Chemotherapy Handbook,4th ed.St.Louis,Mosby-Year Book,1993)(Mosby年鉴1993年,圣路易斯出版的Fischer DS、Knobf MF、Durivage HJ编辑的“癌症化学疗法手册”第4版))。这里所公开的免疫原多肽可以用于与其他的化学治疗剂相结合使用。

[0091] CD28:细胞表面抗原还被叫做T90/44抗原或者在T细胞上表达的Tp44。CD28是在T细胞上作用的共刺激性蛋白质的受体。CD28的天然配位体是大小为44-54kDa的糖蛋白,叫做B7-1或者CD80。还存在一种相关分子,B7-2。B7-1在活化的B细胞和其他抗原呈递细胞上表达。它可以被巨噬细胞,角质形成细胞,T细胞,B细胞,外周血树突状细胞和朗格汉斯细胞表达。B7-2可以在血液树突状细胞和朗格汉斯细胞、B细胞、巨噬细胞、枯否细胞、活化的单核细胞核和天然致死细胞克隆株中发现。B7和CD28在T细胞上的结合能够传递一种共刺激信号,这种共刺激信号激发T细胞增殖作用。

[0092] 参照水平(免疫参数):一种免疫参数的基线水平。在一些实施方案中,参照水平是不存在治疗剂的情况下,免疫系统某一成分的水平,例如,记忆B细胞或者增殖性记忆B细胞的水平。通过测定来自尚未用所关心的试剂处理的主体的样品来确定参照水平,或者通过测定来自用参照试剂处理过的主体的样品来确定参照水平。所述参照水平还可以是一种标准值,例如,在一段时间内测定的大量样品的平均值中确定的值。所述参照水平还可以在来自经过特定剂量的治疗剂处理之后的主体的样品中测定,其中,对于正在进行评价的主体不能给药所述剂量。参照可以从进行评价的主体中获得,也可以从不同的主体中获得。

[0093] 参照水平(多肽或者核酸):是指在某一条件下和/或特定的基因背景中,自然存在的正常的分子水平,例如多肽或者核酸的水平。在某些实施方案中,分子的参照水平可以在没有直接或者间接经历过治疗细胞或者物种中测定。在某些实施例中,参照水平可以是在没有与试剂接触的细胞中的水平,所述试剂例如PD-1拮抗剂。在其他的实施例中,参照水平可以是在没有给药PD-1拮抗剂的主体中的水平。

[0094] DNA(脱氧核糖核酸):脱氧核糖核酸(DNA)是一种长链聚合物,该聚合物包括绝大多数活体生物的遗传物质(一些病毒的基因包括在核糖核酸(RNA)中)。DNA聚合物中的重复单位是四个不同的核苷酸,每个都包括四个碱基之一,所述碱基包括腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶和胸腺嘧啶,这些碱基与脱氧核糖结合,在此脱氧核糖上附着有磷酸基。三个一组的核苷酸(被称为“密码子”)能够编码多肽中的每个氨基酸,或者停止信号。术语“密码子”也可以被用来指mRNA中的三个核苷酸的相应(互补)序列,所述mRNA是由该DNA序列转录得到的。

[0095] 除非另有规定,所有DNA分子表示的分子都包括该DNA分子的反向互补序列。除非上下文中明确要求是单链分子,DNA分子尽管只用单链表示,但是其意味着包含双链DNA分子的两条链。

[0096] 检测(detecting)或者测定(Detection)(细胞或者生物分子):是指在研究中定性或者定量确定生物分子或者特定的细胞型的存在,例如,记忆B细胞的存在。例如,定性或者定量确定在来自主体的样品中存在记忆B细胞,或者检测记忆B细胞的增殖作用。通常,生物

分子的测定，例如蛋白质、核酸的测定或者检测特定的细胞型或者细胞增殖作用，需要进行生物学实验，并不是简单的观察。例如，使用抗体或者核酸探针(都被标记过)的实验可以分别用于检测蛋白质或者细胞。使用PD-1拮抗剂治疗的功效的诊断(diagnosing)或者诊断(diagnosis)包括检测细胞或者生物分子中显著的改变，例如，记忆B细胞的增殖作用。

[0097] 编码：多核苷酸被认为能够编码一种多肽，如果在其天然状态或者使用本领域已知的方法进行处理之后，该多肽可以进行转录和/或翻译，从而产生mRNA和/或多肽或其片段。反义链是指这种核酸的互补序列，其编码的序列可以由此推断。

[0098] 表达：是指一种过程，在此过程中，基因编码的信息被转入构建物结构中，此过程存在于细胞中并在细胞中进行操作。表达的基因包括那些被转录为mRNA并随后被翻译成蛋白质的基因，还包括那些被转录为RNA但不被翻译为蛋白质(例如siRNA、转移核糖核酸和核糖体RNA)的基因。因此，靶分子序列，例如基因或基因启动区的表达可以导致mRNA、蛋白质或者二者的表达，靶分子序列的表达可以被抑制或提高(减少或增加)。

[0099] 表达控制序列：是指一种核酸序列，能够调节与其可操作的连接的异源核酸序列的表达。当表达控制序列控制和调节一种核酸序列的转录以及在合适的情况下控制和调节其翻译过程时，表达控制序列可操作的与该核酸序列相连。因此，表达控制序列可以包括适当的启动子、增强子、转录终止子、位于蛋白质编码基因前面的起始密码子(即，ATG)、拼接信号、保持正确阅读基因框架从而保证mRNA被适当的翻译的元件、和终止密码子。术语“控制序列”至少包括，其存在能够影响表达的组分，还可以包括其他组分，这些其他组分的存在是有利的，例如，前导序列和融合配对序列。表达控制序列可以包括一种启动子。

[0100] 启动子是足够指导转录作用的最小序列。同时还包括一些启动子元素，这些启动子元素足够使依赖于启动子的基因表达过程的细胞型特异性、组织特异性变得可以通过外部信号或者试剂控制或者归纳；这些元素可以位于基因的5’或3’区域。可构建的和可归纳的启动子都被包括在本发明范围内(参见例如，Bitter et al.，Methods in Enzymology 153:516-544，1987(Bitter等人在1987年出版的“酶工程方法”第153期516-544页公开的文献))。例如，当在细菌系统内克隆时，可归纳的启动子，例如细菌噬菌体lambda的pL、plac、ptrp、ptac(ptrp-lac杂交启动子)等等，都可以被使用。在一个实施方案中，当在哺乳动物细胞系统中克隆时，可以使用来源于哺乳动物细胞基因组的启动子(例如金属硫蛋白启动子)或来源于哺乳动物病毒基因组的启动子(例如反向病毒长末端重复序列；腺病毒深启动子；牛痘病毒7.5K启动子)。通过重组DNA或合成技术产生的启动子可以被用来提供核酸序列的转录作用。

[0101] 异源的：是指来源于分离遗传来源或种族的物质。通常，特异性结合所关心的蛋白质的抗体不会特异性的结合异源蛋白质。

[0102] 宿主细胞：是指在其中载体可以进行繁殖并表达其DNA的细胞。该细胞可以是原核的或者是真核的。该细胞可以是哺乳动物的，例如人类的。该术语还包括任意宿主细胞的子代。本领域技术人员应当理解，由于在复制期间会发生突变，所有的后代可能不会与其母代细胞完全一致。然而，当使用“宿主细胞”时也包括其后代细胞。

[0103] 免疫反应：是指细胞免疫系统对刺激物的一种反应，所述免疫系统例如B细胞、T细胞或者单核细胞。在一个实施方案中，所述反应对一种特定的抗原具有特异性(“抗原特异性反应”)。在一个实施方案中，免疫反应是一种T细胞反应，例如CD4+反应或CD8+反应。在另

一个实施方案中，所述反应是B细胞反应，并导致特异性抗体的产生，或者记忆B细胞的增殖。B细胞反应可以使记忆B细胞反应或者血浆B细胞反应。血浆B细胞反应的一种实施例是抗体的产生。记忆B细胞反应的一种实施例是记忆B细胞的增殖作用。

[0104] 免疫细胞的“无反应作用”包括免疫细胞对刺激作用的折射系数，所述刺激作用例如通过活化受体或细胞因子的刺激作用。“无反应作用”可以由于暴露于免疫抑制剂或者暴露于高剂量的抗抗原而发生。如这里使用的，术语“无反应性”或者“耐受性”包括对活化受体调节的刺激作用的折射系数。这种折射系数通常具有抗原特异性，并在停止暴露于耐受化抗原之后还能维持这样的折射系数。

[0105] 例如，在T细胞中的无反应性(与无反应作用相反)的特点在于缺少细胞因子的产生(例如IL-2)。当T细胞暴露于抗原中并受到第一信号(一种T细胞受体或CD-3调节的信号)且在没有产生第二信号(一种共刺激信号)时，T细胞发生无反应性。在这种情况下，将所述细胞再暴露于同一个抗原(即使暴露发生在共刺激分子存在的情况下)会导致不能产生细胞因子，并因此，不能增值。然而，如果与细胞因子(例如，IL-2)一起培养的话，无反应性的T细胞可以与无关的抗原起反应并因此可以增值。例如，T细胞无反应性还可以通过由T淋巴细胞产生的IL-2缺失来观察，该过程通过酶联免疫吸附测定或通过含有指示剂的细胞株进行的增殖试验来调节。做为选择，还可以使用一种报道基因构建物。例如，无反应性的T细胞不能启动IL-2基因的转录作用，所述转录作用是在5’IL-2基因增强因子的控制下通过异源启动子诱导的IL-2基因的转录作用，或者是通过AP1序列的多聚体诱导的IL-2基因转录作用，所述AP1序列多聚体可以再增强因子内部被发现(Kang et al.Science 257:1134，1992)。无反应性的抗原特异性T细胞相对于其相应的参照抗原特异性T细胞在细胞毒素活性上减少了至少10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、95％、乃至100％。

[0106] 免疫原性肽：是指一种肽，所述肽包括等位基因-特异性基序或其他序列，从而所述肽能够结合主要组织相容性复合体(MHC)分子并且导致细胞毒性T细胞(“CTL”)反应或针对衍生出免疫原性肽的抗原的B细胞反应(例如，产生抗体或者记忆B细胞增殖作用)。

[0107] 在一个实施方案中，使用序列基序或者其他方法来识别免疫原性肽，所述方法例如本领域内已知的神经网络或多项式判断法。一般，使用运算法则来确定肽的结合阈从而通过分数来进行选择，所述分数能够赋予他们高的结合可能性，同时具有某一结合亲合力并具有免疫原性。所述运算法则或者基于特定氨基酸在特定位置的主要组织相容性复合体(MHC)结合的作用，或者基于特定的氨基酸在特定的位置对抗体结合的作用，或者基于包含基序的肽中特定取代作用的结合的作用。在免疫原性肽的含义中，保存残基是指肽中的某一特定位点上，以比通过随机分布所预计的情况具有显著增高的频率出现的残基。在一个实施方案中，保守残基是一种残基，在此残基上主要组织相容性复合体(MHC)结构能够与免疫原性肽提供一种接触点。

[0108] 免疫原性肽还可以通过测定其与特异性主要组织相容性复合体(MHC)蛋白质(例如，HLA-A02.01)的结合来识别，或者在存在于主要组织相容性复合体(MHC)蛋白质中时，通过他们刺激CD4和/或CD8的能力来识别。

[0109] 免疫原性组合物：是指一种组合物，包括一种免疫原性的多肽或编码免疫原性多肽的核酸，所述免疫原性的多肽能够导致对抗细胞表达多肽可测量的细胞毒性T细胞(“CTL”)反应，或者能够导致对抗所述多肽的可测量的B细胞反应(例如，产生能够特异性结

合所述多肽的抗体)。为了进行体外应用,免疫原性组合物可以由隔离的核酸、包括核酸/或免疫原性肽的媒介物组成。为了进行体内应用,所述免疫原性组合物通常包括核酸、包括核酸的媒介物、和/或在药学上可接受的载体中的免疫原性多肽,和/或其他的试剂。免疫原性组合物可以选择性地包括一种添加剂、一种PD-1拮抗剂、一种共刺激分子、或一种编码共刺激分子的核酸。根据本领域内已知的实验,可以方便的检测多肽或编码该多肽的核酸导致细胞毒性T细胞("CTL")反应的能力。

[0110] 免疫反应条件(体外):包括"足够形成免疫复合物的条件",所述免疫复合物能够允许抗体向特定抗原决定簇突起,从而使与该抗原决定簇的结合相对于与其他所有抗原决定簇的结合相比更容易检测,和/或更为排斥与其他所有抗原决定簇的结合。免疫反应条件取决于抗体结合反应的方式,并且基本上与免疫方案(例如ELISA或者放射免疫试验)、FACS中使用的条件或者体内面临的条件相同。参见Harlow&Lane,Antibodies,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Publications,New York(1988),该文描述了免疫试验方式和条件。这里描述的方法中使用的免疫反应条件是"生理条件",生理条件是指活哺乳动物或者哺乳动物细胞中常见的条件(例如,温度、摩尔渗透压浓度、pH值)。尽管已经认识到某些器官可能存在一些极端的条件,但是生物体内部和细胞内部环境通常具有的pH值为7(例如,从pH6.0到pH8.0,更为常见的是从pH6.5到pH7.5),以水作为主要溶剂,并且温度在大于0℃到小于50℃之间。摩尔渗透压浓度在能够支持细胞存活和增殖的范围内。

[0111] 抑制或治疗一种疾病:抑制一种疾病,例如抑制肿瘤生长或抑制持续感染是指抑制一种疾病的全面发展,或者减轻该疾病过程的生理学影响。在几个实施例中,抑制或治疗一种疾病是指减轻肿瘤或带有病原体的传染病的症状。例如,癌症治疗可以防止已知患有癌症的病人体内肿瘤伴随综合征的发展,或者能够减轻肿瘤的症状或者病征。在另一个实施方案中,传染病的治疗涉及抑制传染病的发展或者减轻所述传染病的症状。"治疗"是指一种治疗性介入,该治疗性介入能够改善一种疾病或与此疾病有关的病理学情况的症状或病征。治疗性的接种法涉及对已经感染上一种病原体的主体给药试剂。所述主体可以是无任何症状的,从而所述治疗可以防止所述症状的发生。治疗性疫苗还可以减少一种或者一种以上存在的症状的严重性,或者减少病原体的感染量。

[0112] 传染性疾病:是指任意由传染性试剂。传染性病原体的例子包括,但不仅限于:病毒、细菌、支原体和真菌。在一种特定的实施例中,传染性疾病是一种由至少一种传染性病原体造成的疾病。在另一个实施例中,传染性疾病是一种至少由两种不同类型的传染性病原体造成的疾病。传染性疾病可以作用于任何体系,可以是急性的(短期发作)或者慢性/持续性(长期发作)的,发作同时会引起或者不会引起发烧。传染性疾病可以感染任意年龄阶段并且可以相互感染。

[0113] 病毒引起的疾病通常在发生由已经存在于受体中的病毒重新活化产生的免疫抑制之后。持久性病毒感染具体的例子包括但不局限于,巨细胞病毒(CMV)肺炎、肠炎和视网膜炎;埃-巴二氏病毒(EBV)淋巴组织增生性疾病;水痘/疱疹(由水痘带状疱疹病毒引起);HSV-1和HSV-2粘膜炎;HSV-6脑炎、BK-病毒出血性膀胱炎;病毒流行性感冒;呼吸道合胞病毒(RSV)引发的肺炎;艾滋病(由艾滋病病毒引发的);和甲型肝炎、乙型肝炎或者丙型肝炎。

[0114] 其他的传染性病毒包括:逆转录病毒;小核粮核酸病毒(例如,骨髓灰质炎病毒、甲型肝炎病毒;肠道病毒,人考克塞基病毒、鼻病毒、埃可病毒);Calciviridae(例如,引起肠

胃炎的菌株)；披盖病毒科(Togaviridae)(例如，马脑脊髓炎病毒、风疹病毒)；黄病毒科(Flaviridae)(例如，登革热病毒、脑炎病毒、黄热病病毒)；冠状病毒科(Coronaviridae)(例如，冠状病毒)；弹状病毒科(Rhabdoviridae)(例如，水泡性口膜炎病毒、狂犬病病毒)；纤维病毒科(Filoviridae)(例如，ebola病毒)；副粘病毒科(例如，副流感病毒、流行性腮腺炎病毒、麻疹病毒、呼吸道合胞病毒)；流行性感冒病毒正黏液病毒科(Orthomyxoviridae)(例如，流行性感冒病毒)；布尼亚病毒科(Bungaviridae)(例如，Hantaan病毒、bunga病毒、白蛉病毒(Phleboviruses)和Nairo病毒)；Arena病毒(出血热病毒)；呼肠孤病毒科(例如，呼吸道肠道病毒、环状病毒(Orbiviruses)和轮状病毒)；双RNA病毒科(Birnaviridae)；嗜肝DNA病毒科(hepadnaviridae)(乙型肝炎病毒)；细小病毒科(parvoviridae)(细小病毒)；乳多空病毒科(Papovaviridae)(乳头状瘤病毒、多形瘤病毒)；腺病毒科(Adenoviridae)(绝大多数是腺病毒)；疱疹病毒科(Herpesviridae)(单纯疱疹病毒(HSV)1和单纯疱疹病毒(HSV)-2、水痘带状疱疹病毒、巨细胞病毒(CMV)、疱疹病毒)；痘病毒科(Poxviridae)(天花病毒、牛痘病毒、痘病毒)；和虹彩病毒科(Iridoviridae)(例如非洲猪瘟病毒)；和未分类的病毒(例如，海绵状脑病的病原体，delta肝炎的试剂(被认为是乙型肝炎病毒的缺陷型附属物)、非甲型感染的试剂、非乙型肝炎的试剂(1类＝内部传输；2类＝不经肠道传输(即，丙型肝炎)；诺沃克类病毒和与之有关的病毒、和星形病毒(astroviruses))。

[0115] 真菌传染病的例子包括但是不局限于：曲霉病；口腔白色念珠菌病(由白色念珠菌所引起)；隐球菌病(由隐球酵母属所引起)；和荚膜组织胞浆菌病。因此，传染性真菌的例子包括，但是不局限于，新型隐球菌、荚膜组织胞浆菌、厌酷球孢子菌、皮炎芽生菌、沙眼衣原体、白色念珠菌。

[0116] 传染性细菌的例子包括：幽门螺旋杆菌、伯氏疏螺旋体(Borelia burgdorferi)、通用型嗜肺军团菌(Legionella pneumophilia)、分支杆菌属(例如，肺结核分枝杆菌、小鼠抗鸟结核分枝杆菌、胞内分枝杆菌、M.kansaii、M.gordonae)、金黄色葡萄球菌、淋病奈瑟氏球菌、脑膜炎奈瑟氏球菌、单核细胞增多性李氏杆菌、酿脓链球菌(A组链球菌)、无乳链球菌(B组链球菌)、链球菌(易变组)、粪链球菌、牛链球菌、链球菌(厌氧菌属)、肺炎链球菌、致病性弯曲杆菌属、肠道球菌、流感嗜血杆菌、炭疽芽胞杆菌、白喉棒状杆菌、棒状杆菌属、红斑丹毒丝菌、肠梭状芽孢杆菌、破伤风杆菌、产气肠杆菌、肺炎克雷白杆菌、多杀巴斯德氏菌(Pasturella multocida)、畸形菌体、具核梭杆菌(Fusobacterium nucleatum)、念珠状链杆菌、苍白密螺旋体、细弱密螺旋体、钩端螺旋体属、和衣氏(以色列)放线菌(A.israelli)。其他的传染性有机体(例如真核原生生物)包括：恶性疟原虫和弓形虫抗体。

[0117] “持续感染”是指一种传染病，在此传染病中传染试剂(例如一种病毒、支原体、细菌、寄生虫、或真菌)是不确定的或者没有从受感染的宿主中排除，即使后来引发了免疫反应。持续感染可以是慢性感染、潜伏性感染或慢感染。潜伏性感染的特点在于在复发性疾病的亚阶之间缺乏可证明的传染性病毒。慢性感染的特点在于初次感染之后传染性病毒的持续性存在，并且慢性感染还可以包括慢性的或者复发性疾病。慢感染的特点在于进行性疾病之后延长的潜伏期。与潜伏性感染和慢性感染不同，慢感染可能不会以急性的病毒复制阶段作为开始。与急性传染相对短暂(持久几天到几星期)并能够通过免疫系统从身体中分解不同，持续感染可以持续，例如，几个月、几年、乃至一生。这些传染病还可以在很长的一段时间内经常复发乃至对宿主细胞产生过度破坏，所述很长的时间包括潜伏阶段和有效感

染阶段，但不会杀死细胞。持续感染经常包括潜伏期和有效感染两个阶段，但不会快速的杀死宿主细胞或者对宿主细胞产生过度损害。在持续病毒感染期间，病毒基因组既可以稳定的统一到细胞DNA中或者附加性的被维持。某些病毒会产生持续感染，所述病毒例如人T细胞白血病毒、埃-巴二氏病毒、巨细胞病毒、疱疹病毒、水痘-带状疱疹病毒、家畜囊虫病、乳多空病毒、朊病毒、肝炎病毒、腺病毒、细小病毒和乳头状瘤病毒。

[0118] 使用标准技术在宿主体内(例如受感染个体的大肺泡上皮细胞内部)可以发现引起感染的传染性试剂，即使已经进行了免疫反应之后。按照任何本领域内已知的标准方法可以诊断哺乳动物患有持续感染，所述方法在例如，美国专利第6,368,832号、美国专利第6,579,854号和美国专利第6,808,710号和美国专利申请公开号20040137577、美国专利申请公开号20030232323、美国专利申请公开号20030166531、美国专利申请公开号20030064380、美国专利申请公开号20030044768、美国专利申请公开号20030039653、美国专利申请公开号20020164600、美国专利申请公开号20020160000、美国专利申请公开号20020110836、美国专利申请公开号20020107363、和美国专利申请公开号20020106730，这些专利或专利申请在此通过引证并入本文。

[0119] “减轻持续感染的症状”是指改善与持续感染有关的任何状况或症状。做为选择，“减轻持续感染症状”可以包括相对于未经处理的参照中的量相比，减少主体内传染性微生物(例如病毒、细菌、真菌或寄生虫)的量。通过标准技术测定，与等量的未经处理的对照物相比较，这种减少或者预防程度最少是5％、10％、20％、40％、50％、60％、80％、90％、95％、或100％。理想的是，通过本领域内已知的标准方法检测到持续感染被完全的清除了，在这种情况下，持续感染被认为已经治愈。正在进行持续感染治疗的病人是经过专业医生诊断确定患有这种病症的病人。可以通过任何合适的方法进行诊断。诊断和检测可以包括，例如，检测生物样品(例如，组织活体检查、验血、或尿检验)中微生物的装载量、检测生物样品中微生物传染病的替代标记物水平、检测与持续感染有关的症状、或检测涉及到针对持续感染的免疫反应的免疫细胞(例如，检测抗原特异性T细胞，所述抗原特异性T细胞是无变应性的和/或被功能性的削弱)。对正在预防持续性感染发展的病人可以或者不可以进行这种诊断。本领域技术人员应当理解这些病人已经进行了如上所述的标准测试，或者由于存在一种或者一种以上的风险因素(例如家族病史或者接触传染试剂)，不经过检测就已经被识别具有很高的患病风险。

[0120] 分离的：是指一种“分离的”生物学组分(例如一种核酸或蛋白质或细胞器)基本上被分离或者从天然存在这些生物学组分的有机体细胞中区别于其他的生物学组分而纯化出来，也就是说，其他的染色体DNA和外染色体DNA和RNA、蛋白质和细胞器。“分离的”核酸和蛋白质包括通过标准纯化方法纯化的核酸和蛋白质。该术语还包括通过在宿主细胞中重组表达而制备的核酸和蛋白质以及化学合成的核酸。

[0121] 一种纯化的抗体占蛋白质和与其天然相关的其他天然存在的有机分子重量的至少60％。在某些实施例中，制得按重量计至少大约75％、至少大约80％、至少大约90％、至少大约95％或至少大约99％的抗体，例如PD-1、PD-L1、或PD-L2特异性抗体。纯化的抗体可以通过例如使用重组产生的蛋白质或者保守基序肽进行的亲和层析法，或者其他的标准技术来制备。

[0122] 标记物：一种直接或者间接与另外一种分子相连从而促进所述分子检测的可检测

的化合物或组合物。其中所述另外一种分子例如抗体或者蛋白。具体的，标记物的非限制性实施例包括荧光标记物、酶催化连接、和放射性同位素。在一个实施例中，“标记的抗体”是指将其他分子整合入抗体中。例如，所述标记物是一种可检测的标志，例如，将放射标记的氨基酸或者附着物整合入生物素化的多肽中，生物素化的多肽可以被标记的亲和素检测(例如，包含荧光标记的链霉亲和素或者酶活性可以通过光学检测或者比色法测定)。标记多肽和糖蛋白的各种方法在本领域内是已知的，可以使用。多肽标记物的实施例包括但不局限于如下物质：放射性同位素或放射性核苷酸(如^{35}S或^{131}I)，荧光标记物(如异硫氰酸荧光素(FITC)，罗丹明，稀土荧光粉)，酶标记物(例如辣根过氧化物酶，β-半乳糖苷酶，荧光素酶，碱性磷酸酶)，化学发光标记物，生物素基团，二级报道分子识别的预先确定的多肽抗原决定簇(如亮氨酸拉链对序列，二级抗体结合位点，金属结合域，抗原决定簇标记)，或磁剂，如钆螯合物。在一些实施方案中，标记物是由不同长度的连接间隔子所附着，以减少潜在的空间位阻。

[0123] 淋巴细胞：白血细胞的一种类型，与身体的免疫防御相关。淋巴细胞主要有两种类型：B细胞和T细胞。

[0124] 主要组织相容性复合体(MHC)：是不同种类中描述的组织相容性抗原系统的总称，包括人类白细胞抗原(“HLA”)。

[0125] 哺乳动物：该术语包括人类和非人类的哺乳动物。同样的，术语“主体”包括人类主体和动物主体。

[0126] 平均荧光强度(流式细胞仪)：流式细胞仪致力于细胞或粒子光强度测量，所述光强度既可以是激光散射光也可以是由荧光染料发射的荧光。光可以通过光电倍增管(PMT)进行检测，光电倍增管(PMT)通过一种放大器将光转换为电压，该电压与原始荧光强度和光电倍增管上的电压成正比。这些电压是连续分布的，通过模拟数字转换器(ADC)将这些连续分布的电压转换为离散分布，模拟数字转换器(ADC)将各个信号至于根据荧光强度的特定的频道中。ADC的分辨率越大，越能反映连续分布。

[0127] 流式细胞仪数据可以通过线性或对数尺度显示。在大多数生物情况下，都使用对数尺度显示，在生物情况下，分布率向右偏斜。在这种情况下，将分布率进行标准化从而获得实验结果-也就是说，实验结果是Log正常值，所得数据已经经过log-转化。线性信号通过线性放大器，而对数转换即可以通过对数放大器实现也可以由对照表(LUT)获取。在分析细胞计数器中，大多数模拟数字转换器(ADC)是10位，也就是说，他们将数据分成2e10或1024频道，但是，现在越来越多趋向于使用12-或14位的ADC以提供更大的数据解析。

[0128] 将从单一数据频道获得的数据(散射面或者荧光)显示在直方图中，其中x轴被分为1024个频道(对于10位ADC)。如果该数据是线性的，则可以容易地获得该频道的频道数和线性值。在对数尺度中，X轴也被分为1024个频道，但表示为4-log十进制(通常使用4-log十进制)。

[0129] 为了定量流式细胞仪的数据，可以使用多种分布的测定方法。通常，通过测量平均值和中位值来测定集中趋势。平均值是“平均数”，既可以是算数平均数也可以是几何平均数。算数平均值可以通过公式Sigma(x)/n计算，几何平均值通过公式n root(a1 x a2x a3....an)计算。通常，对对数放大的数据使用几何平均数，从而计算加权数据的分布，对线性数据或者线性刻度上显示的数据使用算数平均数。中位值是中位数值，即第50个百分数，

其中，有一半的数值在此之上，一半的数值在此之下。具有“高”表达和“低”表达的细胞可以分别根据整个群落的荧光度确定；这些参数可以方便地从流式细胞仪数据图上读出。

[0130] 赘生物：是指一种非正常细胞增殖作用产物，包括良性肿瘤和恶性肿瘤，以及其他的增殖性疾病。

[0131] 低聚核苷酸：一种长度高达大约100个核苷酸碱基的直线型多聚核苷酸序列。

[0132] 开放阅读框(ORF)：用于编码氨基酸的三个一组的一系列核苷酸(密码子)，期间没有任何内部终止密码子。该序列通常可被翻译成一种肽。

[0133] 可操作的连接：当第一核酸序列与第二核酸序列处于一种功能相关的关系时，第一核酸序列与第二核酸序列可操作的连接。例如，如果一种启动子影响一种编码序列的转录作用或者表达时，该启动子与该编码序列可操作的连接。通常，可操作的连接的DNA序列是相邻序列，且位于同一个需要加入两个蛋白-编码区域的阅读框中。

[0134] 药学上可接受的载体：所述药学上可接受的载体的应用是非常常见的。E.W.Martin等人编写的由Mack出版公司，Easton，PA出版的“雷明顿(Remington’s)药物科学”第15版描述了适用于这里所公开的融合蛋白质药物传递的组合物和制剂。

[0135] 通常，载体的天然性质取决于所使用的具体的给药方式。例如，肠胃外制剂通常包含作为媒介物的可注射的液体，所述可注射的液体包括药学上可接受的液体和生理学上可接受的液体，例如，水、生理盐水、盐类缓冲溶液、葡萄糖水溶液、甘油等等。对于固体组合物(例如粉末、药丸、药片或胶囊剂形式)，惯用的无毒性固体载体可以包括，例如，药用级的甘露醇、乳糖、淀粉或硬脂酸镁。除了生物学中性的载体之外，被给药的药物组合物还可以包括少量的无毒性辅助剂物质，例如润湿剂或者乳化剂、防腐剂、和pH缓冲剂等等，例如醋酸钠或单月桂酸山梨醇酐酯。

[0136] “治疗有效量”是指能够在治疗主体后实现理想的治疗效果的组合物或者细胞的量。例如，其可以包括导致免疫反应所必需的PD-1拮抗剂的量、导致抑制肿瘤生长或显著改变肿瘤或持续感染外在症状的PD-1拮抗剂的量。当对一主体给药时，通常使用能够实现目标组织浓度的剂量(例如，在淋巴细胞中的浓度)，该剂量已经显示出完成了体外作用。

[0137] 在特定的实施例中，治疗有效量是指能够有效诱导记忆B细胞增殖作用的试剂的量，例如，PD-1拮抗剂的量。在另一个特定的实施例中，治疗有效量是指能改改变主体所患有的疾病的表现和症状的PD-1拮抗剂的量，所述疾病例如，能够通过增加记忆B细胞反应和/或T细胞反应而改善的疾病。

[0138] 在治疗过程中，试剂的有效剂量，例如，PD-1拮抗剂的有效剂量可以以单一剂量的形式给药，也可以以多剂量的形式给药，例如，每日给药。但是，PD-1拮抗剂的有效剂量还取决于被治疗的主体、需要治疗的疾病的严重程度和类型、以及给药方式。这里描述的方法以相同的方式对人类和动物给药。因此，通用术语“被治疗的主体”应该被理解为包括所有需要增加理想的生物学效果的生物(例如，人、猩猩、狗、猫、马和牛)，所述生物学效果例如增加的免疫反应。

[0139] 多聚核苷酸：术语多聚核苷酸或核酸序列是指聚合物形式的核苷酸，具有至少10个碱基。一种重组多聚核苷酸包括一种多聚核苷酸，这种多聚核苷酸没有直接与两个编码序列相连，而在作为其衍生母体的有机体天然存在的基因组中，这种多聚核苷酸直接与所述编码序列相连(一个在5’末端相连，一个在3’末端相连)。因此所述术语包括，例如，一种

并入媒介物中的重组DNA;一种并入自发复制的质粒或者病毒中的重组DNA;或并入原核生物或真核生物基因组DNA中的重组DNA、或并入作为一种独立于其他序列的分离的分子(例如,一种互补DNA)而存在的基因组DNA的重组DNA。所述核苷酸可以是核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸、或者这两种核苷酸的改良型。该术语包括单链形式的DNA或者双链形式的DNA。

[0140] 多肽:是指任意的氨基酸链,无论其长度或者翻译后修饰(例如,糖基化作用或磷酸化作用)。一种多肽的长度可以在3到30个氨基酸之间。在一个实施方案中,多肽的长度在大约7到大约25个氨基酸之间。在另一个实施方案中,多肽的长度大约在8到大约10个氨基酸之间。在依旧另一个实施方案中,肽的长度大约为9个氨基酸。关于多肽,"包括"是指其他的氨基酸顺序或其他的分子可以被包括在所述分子中。"基本上由...组成"是指其他的氨基酸顺序不能被包括在所述分子中,但是其他的试剂(例如标记物或者化合物)可以被包括,且"由...组成"是指其他的氨基酸顺序和其他的试剂都不能包括在所述分子中。

[0141] 增殖作用:是指细胞分化产生子代,增殖作用可以使用本领域内已知的多种方法测定。这些方法包括,但不局限于,计算细胞总量的实验、计算特定细胞型数量的实验、KI-67实验、胸腺嘧啶整合、和溴代脱氧尿苷实验。

[0142] 程序性死亡(PD)-1:一种能够与PD-L1或者PD-L2蛋白质形成一种复合物的蛋白质,其涉及一种免疫反应,例如,T细胞的共刺激作用。通常,PD-1蛋白质基本上与天然存在的(野生型)PD-1相同(参见,例如,Ishida et al.EMBO J.11:3887-3895,1992,Shinohara et al.Genomics 23:704-706,1994;和美国专利第5,698,520号,所有文献通过引证在此全部并入本文)。在一些实施例中,PD-1信号能够通过减少T细胞增殖作用、产生细胞因子、或者清除病毒来减少,例如CD8+ T细胞细胞毒性。因此,通过任意标准方法测定可知,与参照水平相比,PD-1多肽能够将CD8+T细胞的细胞毒性减少至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、或者多达100%。

[0143] 如这里使用的,术语"活性"涉及PD-1多肽或蛋白质包括任意天然存在的PD-1蛋白质具有的活性,例如,能够通过,例如使用位于抗原呈递细胞上的天然配位体来调整活化的免疫细胞中的抑制性信号。这种调节免疫细胞中的抑制性信号的作用能够导致免疫细胞和/或免疫细胞分泌的细胞因子的增殖和/或存活率的调节。PD-1蛋白质还可以通过与一种结合B7分子的共刺激受体竞争来调整共刺激信号。因此,术语"PD-1活性"包括PD-1多肽或蛋白质结合其天然配位体的能力,调节免疫细胞共刺激或者禁止性信号的能力,以及调节所述免疫反应的能力。

[0144] "减少PD-1表达或活性"是指相对于参照物中PD-1蛋白质的水平或者生物活性,PD-1蛋白质的水平或者生物活性下降,所述参照物例如,未经处理的主体或样品。在一个具体的实施例中,相对于未经处理的参照物,所述水平或者活性减少了至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%,乃至大于100%。例如,如果PD-1蛋白质与PD-L1、PD-12或者二者的结合减少了,会导致PD-1蛋白质生物活性的减少,从而导致PD-1信号的减少,并因此导致CD8+ T细胞细胞毒性的增加。

[0145] "PD-1基因"是一种编码PD-1蛋白质的核酸。PD-1融合基因是一种与一种第二异源核酸序列可操作的连接的PD-1编码区域。PD-1融合基因包括PD-1启动子、或可以包括异源启动子。在一些实施方案中,第二异源核酸序列是一种报道基因,那就是说,其表达可以被检验的基因;报道基因包括,但不仅限于,编码葡糖醛酸酶(GUS)的基因、编码荧光素酶的基

因、编码氯霉素转乙酰酶(CAT)的基因、编码绿色荧光蛋白质(GFP)的基因、编码碱性磷酸酶的基因、和编码β-半乳糖苷酶的基因。

[0146] 样品(生物学样品):包括生物学样品,生物学样品包括液体、组织、细胞、及其亚组成部分,例如DNA、RNA和蛋白质。例如,在本申请中,常用的样品包括骨髓、脾脏、淋巴结、血液等等,外周血液(还可以包括可以分离出B细胞或者B细胞原始粒子的其他来源,包括尿液,唾液,组织活检,手术切除标本,细针穿刺材料,尸检材料等等)。

[0147] 特异性结合试剂:是指一种基本上只与设定的靶分子结合的试剂。因此,PD-1特异性结合试剂是一种基本上结合PD-1多肽而不是无关多肽的试剂。在一个实施方案中,所述特异性结合试剂是一种能够特异性的结合PD-1、PD-L1或PD-L2多肽的单克隆抗体或多克隆抗体。

[0148] 关于抗原,例如PD-1,术语"特异性结合"是指抗体或者其他的配位体优选的与一种含有这种抗原的细胞或组织完全的或者部分结合,而不与缺少这种抗原的细胞或者组织结合。当然,本领域技术人员应该理解,非特异性相互作用的某一程度可能存在于分子或非靶细胞或组织之间。然而,特异性结合可以被区别出来,由于其是通过抗原的特异性识别作用来调节的。虽然有选择反应性的抗体能够结合抗原,但是他们的结合亲合力比较低。特异性结合会导致抗体(或其他的配位体)和含有这种抗原的细胞之间的结合作用比抗体(或其他的配位体)和不含有所述抗原的配位体之间的结合更强壮。与不含有PD-1多肽的细胞或者组织相比,特异性结合一般会导致含有PD-1多肽的细胞或组织上结合抗体或其他配位体(每单位时间)的量增加2倍、例如,增加5倍、增加10倍、或者增加100倍以上。在这种情况下特异性结合需要一种抗体,这种抗体由于其对一种特定蛋白质的专一性而被选择出来。多种免疫试验方式适用于选择对特定的蛋白质具有特异性免疫活性的抗体或者其他配位体。例如,固-相酶联免疫吸附免疫测定试验(ELISA)是常用的用于选择对一种蛋白质具有特异性免疫活性的单克隆抗体。参见Harlow&Lane,Antibodies,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Publications,New York(1988)(Harlow&Lane等人编写的Cold Spring Harbor出版公司,纽约,于1988年出版的"抗体,一种实验手册")中的关于用于确定具体的免疫反应性的免疫测定技术形式和条件的描述。

[0149] T细胞:是一种对免疫反应至关重要的白血细胞。T细胞包括,但是不局限于,CD4+ T细胞和CD8+ T细胞。CD4+ T淋巴细胞是一种免疫细胞,该免疫细胞能够在其表面上携带一种标记物,所述表面被叫做分化4簇(CD4)。这些细胞又名辅助性T细胞,能帮助安排免疫反应,包括抗体应答以及杀伤性T细胞反应。CD8+T细胞携带"分化8簇"(CD8)标记物。在一个实施方案中,CD8+T细胞是一种细胞毒性T细胞。在另一个实施方案中,CD8+细胞是一种抑制性T细胞。当T细胞对呈递到抗原呈递细胞上的重要的特异性抗原作出反应时,T细胞被活化。

[0150] 转导/转染:转导细胞是一种细胞,在此细胞中已经通过分子生物学技术引入了一种核酸分子。如这里所使用的术语"转导"包括所有能够将核酸分子引入这种细胞的技术,包括用病毒媒介物转染、与质粒媒介物转化、和通过电穿孔、脂质转染法和加速粒子枪等技术引入无保护的DNA。

[0151] 媒介物:是指一种核酸分子通过被引入宿主细胞中来产生一种转换的宿主细胞。媒介物可能包括任意核酸序列,这种核酸序列能够在宿主细胞中复制,例如,作为复制的起源。媒介物可以包括一种或一种以上编码可选择的标记物及本领域内已知的其他遗传因子

的核酸。媒介物包括质粒媒介物，包括用于表达革兰氏阴性细菌细胞和革兰氏阳性细菌细胞的质粒。实例性的媒介物包括能够在大肠杆菌和沙门氏菌中表达的媒介物，所述媒介物还包括病毒媒介物，例如，但是不局限于，反向病毒、原痘、鸟痘病毒、传染性上皮瘤病毒、羊痘病毒、suipox、腺病毒、疱疹病毒、α病毒、杆状病毒、辛德毕斯病毒、牛痘病毒和脊髓灰质炎病毒媒介物。

[0152] 除非另有解释，这里使用的所有科学技术术语都与本发明所属领域普通技术人员通常的理解具有相同的含义。单数术语“一个(a)”、“一种(an)”也包括复数的意思，除非上下文另有清楚的说明。同样，术语“或者(or)”包括“和()and”的意思，除非上下文另有清楚的说明。本领域技术人员更应该理解的是所有的给定的核酸或者多肽的碱基尺寸或氨基酸尺寸，以及分子量或者分子质量是近似值，并且只起到描述的作用。尽管与本发明已经描述过的相似或者相同的方法和材料可以被用于实现或者检测这里所公开的发明，但是下面描述的是适当的方法和材料。术语“含有(comprise)”是指“包括(include)”。这里提到的所有的出版物、专利申请、专利及其他参考文献通过引证在此全部并入本文。如果有冲突的话，以本发明说明书，包括术语的解释为准。另外，所述材料、方法和实施例只起到说明性作用，并不作为一种限制。

[0153] 相关申请

[0154] 这里公开的主题内容与2007年12月26日递交的PCT申请第PCT/US2007/088851号、2005年6月8号递交的美国临时申请第60/688,872号、2006年6月8日递交的美国实用新型申请第11/449,919号和2006年6月8日递交的PCT申请PCT/US2006/22423的主题内容相关。该申请还与2006年12月27日递交的美国临时申请第60/877,518号有关。前述所用申请通过引证在此全部并入本文。

[0155] PD-1拮抗剂

[0156] 这里公开的方法包括PD-1途径抑制剂(PD-1拮抗剂)的使用。PD-1分子是免疫球蛋白基因总科的成员。人PD-1具有包含免疫球蛋白总科域的细胞外区域、横跨膜域和包括免疫受体酪氨酸基禁止基序(ITIM)的胞内区域((Ishida et al.,EMBO J.11:3887,1992;Shinohara et al.,Genomics 23:704,1994;美国专利第5,698,520号)。这些特点也定义了一种分子大族，叫做免疫抑制受体，所述免疫抑制受体还包括gp49B、PIR-B、和杀伤抑制受体(KIRs)(Vivier and Daeron(1997)Immunol.Today 18:286)。不局限于任何理论，人们相信这些受体的酪氨酰磷酸化的ITIM基序能够与包含磷酸酶S112-区域相互作用，这会导致抑制信号。这些免疫抑制受体的子集与主要组织相容性复合体(MHC)分子相结合，例如，杀伤抑制受体(KIRs)和CTLA4与B7-1和B7-2结合。

[0157] 在人体中，PD-1是一种50-55kDa的I型横跨膜受体，最初在经过活化作用导致的细胞凋亡的T细胞株中识别。PD-1在T细胞、B细胞和巨噬细胞上表达。PD-1的配位体是B7族成员PD-配位体1(PD-L1，又名B7-H1)和PD-L2(又名B7-DC)。

[0158] 在活体内，PD-1在活化的T细胞、B细胞和单核细胞上表达。实验数据表明PD-1与它的配位体在中枢免疫反应和外周免疫反应的下游调节作用下发生相互作用。特别是在野生型T细胞而不是在PD-1缺乏型T细胞中的增值在在有PD-L1参与的情况下被抑制。另外，PD-1-缺陷型老鼠表现出一种自身免疫表型。

[0159] 人PD-1的示范性的氨基酸顺序如下所述(还是参见Ishida et al.,EMBO J.11:

3887,1992;Shinohara et al.,Genomics 23:704,1994;美国专利第5,698,520号):

[0160] mqipqapwpv vwavlqlgwr pgwfldspdr pwnpptffpa llvvtegdna tftcsfsnts esfvlnwyrm spsnqtdkla afpedrsqpg qdcrfrvtql pngrdfhmsv vrarrndsgt ylcgaislap kaqikeslra elrvterrae vptahpspsp rpagqfqtlv vgvvggllgs lvllvwvlav icsraargti garrtgqplk edpsavpvfs vdygeldfqw rektpeppvp cvpeqteyat ivfpsgmgts sparrgsadg prsaqplrpe dghcswpl (SEQ ID NO: 1)

[0161] 老鼠PD-1的示范性的氨基酸顺序如下所述:

[0162] mwvrqvpwsf twavlqlswq sgwllevpng pwrsltfypa wltvsegana tftcslsnws edlmlnwnrl spsnqtekqa afcnglsqpv qdarfqiiql pnrhdfhmni ldtrrndsgi ylcgaislhp kakieespga elvvterile tstrypspsp kpegrfqgmv igimsalvgi pvllllawal avfcstsmse argagskddt lkeepsaapv psvayeeldf qgrektpelp tacvhteyat ivfteglgas amgrrgsadg lqgprpprhe dghcswpl (SEQ ID NO: 2)

[0163] 其他氨基酸序列公开在美国专利第6,808,710号和美国专利申请公开号2004/0137577、美国专利申请公开号2003/0232323、美国专利申请公开号2003/0166531、美国专利申请公开号2003/0064380、美国专利申请公开号2003/0044768、美国专利申请公开号2003/0039653、美国专利申请公开号2002/0164600、美国专利申请公开号2002/0160000、美国专利申请公开号2002/0110836、美国专利申请公开号2002/0107363、和美国专利申请公开号2002/0106730中,这些专利或专利申请在此通过引证并入本文。PD-1是免疫球蛋白(Ig)总科的成员,在它的细胞外区域包含单个Ig V样区域。PD-1的细胞质区域包含两个酪氨酸,其中与细胞膜最接近的酪氨酸(在老鼠PD-1中是VAYEEL(参见SEQ ID NO:2的氨基酸223-228))位于ITIM(免疫受体酪氨酸基抑制基序)内部。PD-1上免疫受体酪氨酸基抑制基序(ITIM)的存在表明该分子具有通过补充细胞质磷酸酶减弱抗原受体信号的功能。人和鼠PD-1蛋白质具有大概60%的氨基酸一致性,带有四个潜在的N-糖基化作用地点的保守区域和定义Ig-V区域的残基。在人和老鼠的进化同源基因之间,细胞质区域中的免疫受体酪氨酸基抑制基序(ITIM)和在羧基末端酪氨酸(在人和老鼠中分别为TEYATI(参见SEQ ID NO:2中的氨基酸166-181))周围的免疫受体酪氨酸基抑制基序(ITIM)样基序具有保守性。

[0164] 根据其结合PD-1的能力,PD-1是分子CD28/CTLA-4族的成员。在活体内,类CTLA4、PD-1作为抗-CD3的响应快速的生成在T细胞表面上(Agata et al.Int.Immunol.8:765,1996)。然而,与CTLA4相反,PD-1还产生在B细胞的表面上(作为对抗-免疫球蛋白M的应答)。PD-1还表达在胸腺细胞和骨髓细胞的子集上(Agata et al.(1996)supra;Nishimura et al.(1996)Int.Immunol.8:773)。

[0165] T细胞的无反应性伴随有PD-1表达的相互影响。这里公开了T细胞的细胞毒性可以通过将T细胞与一种能够减少PD-1表达或者活性的试剂相接触来增加。更准确的说,这里公开了能够用于减少PD-1表达或者活性的试剂可以用于增加免疫反应,使之达到一种病毒抗原或肿瘤抗原的程度。

[0166] 不局限于任何理论,PD-1表达或活性的减少会导致细胞毒性T细胞活性的增加,并

同事会增加其对传染性试剂的特异性免疫应答。为了使T细胞对外源蛋白做出反应，必须通过抗原-呈递细胞(APC)提供两种信号从而支撑T淋巴细胞。第一种信号赋予免疫反应特异性，在识别出存在于主要组织相容性复合体(MHC)中的外源抗原肽之后，该信号通过T细胞受体(TCR)被转导。第二种信号叫做共刺激作用，导致T细胞增殖并具有功能性。共刺激作用既不具有抗原特异性又不具有主要组织相容性复合体(MHC)限制，可以通过一种或一种以上抗原-呈递细胞(APC)表达的不同的细胞表面多肽来提供。如果T细胞只通过T细胞受体被刺激且没有收到其他的共刺激信号的话，他们会变得无反应、无活动力或死亡，从而导致免疫反应下调。

[0167] 在抗原-呈递细胞(APC)上表达的CD80(B7-1)和CD86(B7-2)蛋白质是至关重要的共刺激性多肽。尽管B7-2在最初的免疫响应期间起到了突出的作用，B7-1在免疫反应后期被上调从而延长最初的T细胞响应或者共刺激次要的T细胞响应。B7多肽能够向免疫细胞提供共刺激信号或抑制性信号，从而促进或抑制免疫细胞响应。例如，当与共刺激受体结合时，PD-L1(B7-4)当以可溶形式存在时会导致免疫细胞的共刺激作用或抑制免疫细胞共刺激作用。当与一种抑制性受体结合时，PD-L1分子可以向免疫细胞传播一种抑制性信号。示范性的B7族成员包括B7-1、B7-2、B7-3(通过抗体BB-1识别)、B7h(PD-L1)、和B7-4及其可溶解的片段或者衍生物。B7族成员在免疫细胞上结合一种或一种以上受体，例如CTLA4、CD28、ICOS、PD-1和/或其他的受体，并且，根据不同的受体，B7族成员具有向免疫细胞传播抑制性信号或共刺激信号的能力。

[0168] CD28是一种受体，可以在休眠T细胞上组成性表达。在信号通过T细胞受体之后，CD28的连接和共刺激信号的转导会导致IL-2的增殖和分泌。CTLA4(CD152)是与CD28相同的受体，在休眠T细胞中CTLA4是缺失的，但是在T细胞活化之后会导致他的表达。CTLA4在T细胞响应负调节中起到重要作用。ICOS是一种与CD28和CTLA4有关系的多肽，其包含在IL-10的生产过程中。PD-1是能够结合PD-L1和PD-L2的受体，他能够快速地在T细胞表面上诱导。PD-1还可以在B细胞的表面上被表达(作为抗免疫球蛋白M的响应)并且能够在胸腺细胞子集和骨髓细胞上被表达。

[0169] PD-1的接合(例如通过交联或通过聚集作用)会导致免疫细胞中抑制信号的传输，从而导致免疫响应的减少同时伴随免疫细胞无反应性的增加。PD-1族成员在抗原呈递细胞上结合一种或一种以上受体，例如PD-L1和PD-L2。PD-L1和PD-L2都是人PD-1配位体多肽，是B7族多肽的成员(参见上面)。每个PD-1配位体都包含一种信号序列、一种IgV区域、一种IgC区域、一种横跨膜区域和一种短细胞质尾部。在活体内，这些配位体已经被证明能够在胎盘、脾、淋巴结、胸腺和心脏中表达。PD-L2还可以在胰腺、肺和肝中被表达，而PD-L1可以在胎儿的肝、活化的T细胞和内皮细胞中表达。PD-1的两个配位体再活化的单核细胞和树突状细胞中被表达。

[0170] PD-L1示范性的氨基酸序列(2000年10月4号生效的GENBANK基因银行登记号：AAG18508)在下面进行了阐述：

[0171] mrifavfifm tywhllnaft vtvpkdlyvv eygsnmtiec kfpvekqldl aalivyweme dkniiqfvhg eedlkvqhss yrqrarllkd qlslgnaalq itdvklqdag vyrcmisygg adykritvkv napynkinqr ilvvdpvtse heltcqaegy pkaeviwtss dhqvlsgktt ttnskreekl fnvtstlrin tttneifyct frrldpeenh taelvipelp lahppnerth lvilgaillc lgvaltfifr lrkgrmmdvk kcgiqdtnsk kqsdthleet (SEQ ID NO: 3)

[0172] 一种示范性PD-L2前体氨基酸序列(2002年4月8号生效的GENBANK基因银行登记号:AAK15370)在下面进行了阐述:

[0173] miflllmlsl elqlhqiaal ftvtvpkely iiehgsnvtl ecnfdtgshv nlgaitaslq kvendtsphr eratlleeql plgkasfhip qvqvrdegqy qciiiygvaw dykyltlkvk asyrkinthi lkvpetdeve ltcqatgypl aevswpnvsv pantshsrtp eglyqvtsvl rlkpppgrnf scvfwnthvr eltlasidlq sqmeprthpt wllhifipsc iiafifiatv ialrkqlcqk lysskdttkr pvtttkrevn sai (SEQ ID NO: 4)

[0174] 一种示范性PD-L2前体氨基酸序列(2006年12月12号生效的GENBANK基因银行登记号:Q9BQ51)在下面进行了阐述:

[0175] miflllmlsl elqlhqiaal ftvtvpkely iiehgsnvtl ecnfdtgshv nlgaitaslq kvendtsphr eratlleeql plgkasfhip qvqvrdegqy qciiiygvaw dykyltlkvk asyrkinthi lkvpetdeve ltcqatgypl aevswpnvsv pantshsrtp eglyqvtsvl rlkpppgrnf scvfwnthvr eltlasidlq sqmeprthpt wllhifipfc iiafifiatv ialrkqlcqk lysskdttkr pvtttkrevn sai (SEQ ID NO:46)

[0176] PD-1拮抗剂包括能够减少PD配位体1(PD-L1)或者PD配位体2(PD-L2)表达或者活性的试剂或者能够减少PD-1和PD-L1之间相互作用或减少PD-1和PD-L2之间相互作用的试剂。示范性化合物包括抗体(例如一种抗PD-1抗体、一种抗-PD-L1抗体和一种抗-PD-L2抗体)、RNAi分子(例如抗PD-1RNAi分子、抗PD-L1RNAi、和抗PD-L2RNAi)、反义分子(例如抗PD-1反义RNA、抗PD-L1反义RNA、和抗PD-L2反义RNA)、显性负蛋白质(例如一种显性负PD-1蛋白质、一种显性负PD-L1蛋白质、和一种显性负PD-L2蛋白质)、和小分子抑制剂。

[0177] PD-1拮抗剂是指任意能够减少细胞中PD-1表达或者活性的试剂。与参照物中的表达及活性相比,PD-1表达或者活性被减少了大约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、或100%。活性方面示范性的减少了至少大约50%、至少大约60%、至少大约70%、至少大约80%、至少大约90%、至少大约95%、或完全没有可检测到的活性。在一个实施例中,所述对照物是没有被PD-1拮抗剂处理的细胞。在另一个实施例中,所述对照物是一种标准值,或者用一种已知不会影响PD-1活性的试剂,例如载体,处理后的细胞。PD-1的表达或活性可以通过任何本领域内已知的方法来确定,包括这里所描述的方法。任选的,PD-1拮抗剂抑制或减少PD-1与PD-L1、PD-L2或二者的结合。

[0178] A.抗体

[0179] 这里公开的方法中使用了能够特异性结合PD-1、PD-L1或PD-L2(或其联合)的抗体。抗体包括单克隆抗体、人源化抗体去免疫抗体、和免疫球蛋白(Ig)融合蛋白。多克隆的

抗-PD-1、抗PDL1或PD-L2抗体可以通过本领域内已知的方法来制备，例如，通过用PD-1配位体或者PD-1免疫原免疫适当的主体(例如，动物主体)、抗-PD-1、抗-PD-L1或抗-PD-L2抗体在免疫主体中的滴定值可以通过标准技术进行实时监控，例如使PD-1配位体或PD-1多肽固定进行酶联免疫吸附测定(ELISA)。

[0180] 在一个实施方案中，特异性结合PD-1、PD-L1或者PD-L2(或其结合)的抗体分子可以从哺乳动物(例如，从血清中)分离出来，并使用本领域普通技术人员已知的技术进行纯化，例如，抗体可以通过使用蛋白质A色层分离法进行纯化从而产生分离的免疫球蛋白G(IgG)抗体。

[0181] 产生抗体的细胞可以从主体处获得，并通过标准技术来制备单克隆抗体(参见Kohler and Milstein Nature 256:495 49,1995;Brown et al.,J.Immunol.(免疫学)127:539 46,1981;Cole et al.,Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy(单克隆抗体和癌症治疗),Alan R.Liss,Inc.,pp.77 96,1985;Gefter,M.L.et al.(1977)Somatic Cell Genet.3:231 36;Kenneth,R.H.in Monoclonal Antibodies:A New Dimension In Biological Analyses(在单克隆抗体中:一种生物学分析的新尺度).Plenum Publishing Corp.,New York,N.Y.(1980);Kozbor et al.Immunol.Today 4:72,1983;Lerner,E.A.(1981)Yale J.Biol.Med.54:387402;Yeh et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.76:2927 31,1976)。在一个实施例中，将永生的细胞株(一般是骨髓瘤细胞株)融合到淋巴细胞(通常是脾细胞)中，所述淋巴细胞是从用PD-1、PD-L1或PD-L2免疫的哺乳动物中获得的，且，所得杂交瘤细胞的培养物上清液被筛选来识别能够产生特异性结合所关心多肽的单克隆抗体的杂交瘤。

[0182] 在一个实施方案中，为了产生杂交瘤，从获得淋巴细胞的相同的哺乳动物种中获得永生的细胞株(例如骨髓瘤细胞株)。例如，可以通过将用PD-1、PD-L1或PD-L2肽免疫的老鼠中的淋巴细胞与一种永生的老鼠细胞株相融合来制备鼠科杂交瘤。在一个实施例中，使用的小鼠骨髓瘤细胞株对包含次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸腺嘧啶的培养基("HAT培养基")敏感。根据标准技术，任意大量的骨髓瘤细胞系都可以用作融合配体，包括，例如，P3-NS1/1-Ag4-1、P3-x63-Ag8.653或Sp2/O-Ag14骨髓瘤细胞系，这些细胞系可以从位于Rockville,Md的美国典型菌种保藏中心(ATCC)处获得。HAT-敏感的小鼠骨髓瘤细胞可以使用聚乙二醇("PEG")被融合到老鼠脾细胞中。融合产生的杂交瘤细胞随后使用HAT培养基进行筛选，HAT培养基能够杀死未融合的(已经非生产性融合的)骨髓瘤细胞。产生所关心的单克隆抗体的杂交瘤细胞可以通过，例如，筛选杂交瘤培养物上清液来检测，从而通过使用免疫试验(例如酶联免疫吸附测定试验(ELISA)或放射免疫测定法(RIA)测定能够结合PD-1、PD-L1或PD-L2分子的抗体的生成。

[0183] 作为可以替换的方法，为了制备隐藏单克隆抗体的杂交瘤，通过用PD-1、PD-L1或PD-L2筛选重组组合的免疫球蛋白文库(例如一种抗体噬菌体展示文库)从而分离免疫球蛋白文库中能够忒一些结合所述多肽的成员，来识别和分离能够特异性结合PD-1、PD-L1或PD-L2的单克隆抗体。用于产生和筛选噬菌体展示文库的试剂盒是可以商业购得的(例如，但不仅限于，Pharmacia公司和Stratagene公司)。尤其可以有效的用于生产和筛选抗体展示文库的方法和试剂的实施例可以在例如，美国专利第5,223,409号;PCT公开号WO 90/02809;PCT公开号WO 91/17271;PCT公开号WO 92/18619;PCT公开号WO 92/20791;PCT公开

号WO 92/15679;PCT公开号WO 92/01047;PCT公开号WO 93/01288;PCT公开号WO 92/09690;Barbas et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:7978-7982,,1991;Hoogenboom et al.,Nucleic Acids Res.(核酸研究)19:4133-4137,1991中发现.

[0184] 能够结合PD-1的抗体的氨基酸序列公开在,例如,美国专利公开号2006/0210567中,该申请通过引证在此并入本文。能够结合PD-1的抗体还公开在美国专利公开号2006/0034826中,该申请通过引证在此并入本文。在一些实施例中,抗体以至少10^7M^{-1}的亲合常数,例如至少10^8M^{-1}的亲合常数、至少5X 10^8M^{-1}的亲合常数或至少10^9M^{-1}的亲合常数特异性的结合PD-1或PD-L1或者PD-L2配位体。

[0185] 在一个实施例中,每个CDR的特异性决定区域的序列被确定。在特异性决定区之外的残基(非配位体接触位点)被取代。例如,上表所示任意一种CDR序列中,至多一个、两个或者三个氨基酸可以被取代。嵌合抗体包括来自一种抗体的骨架结构区域和来自另一种不同抗体的CDR区域,这种嵌合抗体的产生在本领域内是已知的。例如,使用常规的方法就可以产生人源化抗体。所述抗体或者抗体片段可以是一种人源化免疫球蛋白,这种人源化的免疫球蛋白具有来自供体单克隆抗体的互补决定区(CDRs)和免疫球蛋白和来自人受体免疫球蛋白重链和轻链骨架结构的重链可变区骨架结构和轻链可变区骨架结构,其中,所述来自供体单克隆抗体的互补决定区(CDRs)能够结合PD-1、PD-L1或PD-L2。通常,人源化的免疫球蛋白以至少10^7M^{-1}的亲合常数,例如至少10^8M^{-1}的亲合常数、至少5X 10^8M^{-1}的亲合常数或至少10^9M^{-1}的亲合常数特异性的结合PD-1或PD-L1或者PD-L2。

[0186] 通过将供体老鼠免疫球蛋白(例如,PD-1或PD-L1或者PD-L2)重链可变链和轻链可变链中获得的供体互补决定区(CDR)传递到人的可变区中,然后在要求维持亲和力的情况下用人骨架结构去的残基进行取代,就可以制备人源化单克隆抗体。来源于人源化单克隆抗体的抗体组分的使用排除了与供体抗体恒定区免疫原性有关的潜在问题。用于产生人源化单克隆抗体的技术在下列文献中进行了描述,例如:Jones et al.,Nature 321:522,1986;Riechmann et al.,Nature 332:323,1988;Verhoeyen et al.,Science 239:1534,1988;Carter et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.89:4285,1992;Sandhu,Crit.Rev.Biotech.12:437,1992;和Singer et al.,J.Immunol.150:2844,1993。这些抗体可以是任意同型体,但是在不同的实施方案中,所述抗体是一种免疫球蛋白G(IgG),包括但不仅限于IgG_1、IgG_2、IgG_3和IgG_4。

[0187] 在一个实施方案中,人源化免疫球蛋白重链可变区骨架结构的序列与供体免疫球蛋白重链可变区骨架结构的序列具有至少大约65%的一致性。因此,人源化免疫球蛋白重链可变区骨架结构的序列可以与供体免疫球蛋白重链可变区骨架结构的序列具有至少大约75%、至少大约85%、至少大约99%或至少大约95%的一致性。人骨架结构区和可以发生在人源化抗体骨架结构区中的突变在本领域内是已知的(参见,例如,在美国专利第5,585,089号,该专利通过引证在此并入本文)。

[0188] 示范性的人抗体是LEN和21/28CL。重链和轻链骨架结构的序列在本领域内是已知的。示范性的人单克隆抗体LEN的轻链骨架结构具有下述序列:

[0189] FR1: DIVMTQS PDSLAVSLGERATINC (SEQ ID NO: 5)

FR2: WYQQKPGQPPLLIY (SEQ ID NO: 6)

FR3: GVPDRPFGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC (SEQ ID NO: 7)

FR4: FGQGQTKLEIK (SEQ ID NO: 8)

[0190] 示范性的人单克隆抗体21/28'CL的重链骨架结构具有下述序列：

[0191] FR1: QVQLVQSGAEVKKPQASVKVSCKASQYTFT (SEQ ID NO: 9)

FR2: WVRQAPGQRLEWMG (SEQ ID NO: 10)

FR3: RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 11)

FR4: WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 12).

[0192] 抗体，例如老鼠的单克隆抗体、嵌合抗体和人源化抗体，包括全长分子及其片段，例如，Fab，F(ab')$_2$，和Fv，这些片段包括重链和轻链可变区并且能够特异性结合抗原决定簇。这些片段保持着一些选择性的结合其抗原或者受体的能力。这些片段包括：

[0193] (1)Fab，该片段包含抗体分子的一种单价抗原-结合片段，可以通过用木瓜蛋白酶消化整个抗体从而产生完整的轻链和重链的一部分，来生产所述片段；

[0194] (2)Fab'，是抗体分子的一种片段，可以通过用胃蛋白酶处理整个抗体，随后减少，产生完整的轻链和一部分重链而获得；每一抗体分子能够获得两个Fab'片段；

[0195] (3)(Fab')$_2$，是抗体分子的一种片段，可以通过用胃蛋白酶处理整个抗体且无需减少来获得；(Fab')$_2$是两个Fab'片段通过两个二硫键结合在一起的二聚体；

[0196] (4)Fv，一种包含在两个链中表达的轻链可变区和重链可变区的基因工程片段；和

[0197] (5)单链抗体(例如单链Fv蛋白("scFv"))是指一种基因工程分子，该基因工程分子包含轻链可变区和重链可变区，所述轻链可变区和重链可变区通过适当的多肽连接体连接形成一种基因融合的单链分子。

[0198] 制造这些片段的方法在本领域内是已知的(参见，例如，Harlow and Lane，Antibodies:A Laboratory Manual，Cold Spring Harbor Laboratory，New York，1988(Harlow和Lane编写的"抗体：实验手册"，由纽约的Cold Spring Harbor实验室在1988年出版))。在一些实施例中，所述可变区域包括在各个多肽中表达的轻链可变区和重链可变区。Fv抗体一般是大约25kDa，并且包含一种完全的抗原结合部位，在每个重链和每个轻链上具有三个CDR。为了生产这些抗体，所述VH和VL可以从两个宿主细胞核酸构建物中表达。如果VH和VL被非接触性表达，Fv抗体的各个链之间一般通过非共价相互作用结合在一起。然而，这些链在稀释时能够分离，因此这些方法已经发展处通过戊二醛、作用于分子间的二硫化物或肽连接体将这些链相交联。因此，在一个实施例中，所述Fv可以是二硫化物稳定的Fv蛋白质("dsFv")，在其中所述重链可变区和所述轻链可变区通过二硫键化学相连。

[0199] 在一种另外的实施例中，所述Fv片段包含通过肽连接体连接的VH和VL链。这些单链抗原结合蛋白(scFv)通过构建一种结构基因来制备，所述结构基因包括编码通过低聚核苷酸连接的VH和VL区域的DNA核酸序列。所述结构基因被插入表达媒介物中，随后将此表达媒介物引入宿主细胞，例如大肠杆菌中。所述重组宿主细胞合成单个多肽链，其中含有与两个V区域桥联的连接体肽。用于生产单链Fv蛋白("scFv")的方法在本领域内是已知的(参见Whitlow et al.，Methods:a Companion to Methods in Enzymology，Vol.2，page 97，

1991(Whitlow等人所著的“方法:酶学中方法的指南手册”,1991年第2卷第97页);Bird et al.,Science 242:423,1988;美国专利第4,946,778号;Pack et al.,Bio/Technology 11:1271,1993;和Sandhu,supra)。

[0200] 抗体片段可以通过抗体的蛋白水解作用水解或者通过在编码所述片段的大肠杆菌中表达来制备。抗体片段可以通过管用的方法使用胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化整个抗体来获得。例如,抗体片段可以通过用胃蛋白酶酶催化裂解抗体来制备,从而提供一种5S片段,叫做$F(ab')_2$。该片段可以使用硫醇还原剂和任选地一种二硫键裂解产生的硫氢基保护基团进行进一步的裂解,从而产生3.5S Fab'一价片段。作为选择,使用胃蛋白酶进行的酶催化裂解作用直接产生了两个单价Fab'片段和一种Fc片段(参见美国专利第4,036,945号和美国专利第4,331,647号,和其中包含的参考文献;Nisonhoff et al.,Arch.Biochem.Biophys.89:230,1960;Porter,Biochem.J.73:119,1959;Edelman et al.,Methods in Enzymology,Vol.1,page 422,Academic Press,1967;和Coligan et al.at sections 2.8.1-2.8.10and 2.10.1-2.10.4)。

[0201] 裂解抗体其他的方法,例如分离重链从而形成大家轻-重链片段、进一步裂解片段、或其他的酶技术、化学技术、或者遗传技术都可以被使用,只要片段能够结合被完整抗体所识别的抗原。

[0202] 本领域普通技术人员可以认识到可以产生抗体的保守变体。这种保守变体可以在抗体片段中使用,例如二硫化物稳定的Fv蛋白质("dsFv")片段或单链Fv蛋白("scFv")片段,在抗体片段中使用的保守变体仍然保有对正确折叠和VH和VL之间稳定作用至关重要的氨基酸残基,并且还保持所述残基的电荷性质,从而保持低pI值和低分子毒性。为了增加产量,在VH和VL区域可以产生氨基酸取代作用(例如最多一个、最多两个、最多三个、最多四个、或最多五个氨基酸取代作用)。保守氨基酸取代作用表提供了本领域普通技术人员已知的功能上相似的氨基酸。下面的六组例子提供了相互取代之后可以被认为是保守取代的氨基酸:

[0203] 1)丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T);

[0204] 2)天冬氨酸(D)、谷氨酸(E);

[0205] 3)天门冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q);

[0206] 4)精氨酸(R)、赖氨酸(K);

[0207] 5)异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、缬氨酸(V);和6)苯基丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W)。

[0208] 因此,本领域普通技术人员可以容易的评价所关心的抗体的氨基酸序列、定位上表中一个或一个以上氨基酸,识别保存性取代作用、并使用本领域内已知的分子技术产生保守变体。

[0209] 使用本领域普通技术人员已知的手段,效应分子,例如治疗性、诊断性、或者检测性基序可以与特异性结合PD-1、PD-L1或PD-L2的抗体相连。可以使用共价或者非公价附着方式。用于将效应分子与一种抗体相附着的方法可以根据效应分子化学结构的不同而变化。多肽通常包括多种官能团;例如羧酸(COOH)、游离胺(-NH2)或巯基(-SH)基团,这些官能团可以用于与抗体上适当的官能团起反应,从而导致效应分子的结合。做为选择,对抗体进行衍生使之暴露于其他的反应性官能团或者与其他的反应性官能团相附着。所述衍生作用

可能包括与大量任意的连接体分子相附着，所述连接体例如从Pierce化学公司，Rockford IL处获得的连接体。所述连接体可以使任意能够将抗体与效应分子相连的分子。所述连接体与抗体和所述效应分子都能够形成共价键。本领域普通技术人员已知的适当的连接体包括但是不局限于，直链或者支链碳连接体、杂环的碳连接体、或肽连接体。当所述抗体和效应分子是多肽时，所述连接体可以通过其侧基(例如通过半胱氨酸的二硫键)将构成的氨基酸连接到一起，或者连接到末端氨基酸的α碳氨基和羧基上。

[0210] 编码抗体的核酸序列可以通过任何适当的方法制备，包括，例如，适当序列的克隆，或者直接化学合成，例如，通过Narang et al.,Meth.Enzymol.68:90-99,1979(Narang等人1979年在“酶学方法”第68卷:90-99页的文献)所描述的磷酸三酯的方法;通过Brown et al.,Meth.Enzymol.68:109-151,1979(Brown等人1979年在“酶学方法”第68卷:109-151页的文献)所描述的磷酸二酯方法;通过Beaucage et al.,Tetra.Lett.22:1859-1862,1981所描述的二乙基亚磷酰胺的方法;通过Beaucage&Caruthers,Tetra.Letts.22(20):1859-1862,1981所描述的固相亚磷酰胺三酯方法，例如，使用如Needham-VanDevanter et al.,Nucl.Acids Res.12:6159-6168,1984所描述的自动合成仪;和美国专利第4,458,066号所描述的固体支持物方法。化学合成法能够产生一种单链低聚核苷酸。这种核苷酸可以通过与互补序列杂交被转变为双链DNA，或者通过使用该单链作为模板用DNA聚合酶聚合。本领域普通技术人员可以认识到，尽管DNA的化学合成通常局限于大约100个碱基的序列，但是更长的序列可以通过较短序列之间的连接而获得。

[0211] 通过克隆技术可以制备示范性的编码一种抗体的核酸编码序列，所述抗体能够特异性结合PD-1、PD-L1或者PD-L2。克隆和测序技术适当的例子和通过许多克隆实践足够指导本领域普通技术人员的说明可以在下列文献中被发现:Sambrook et al.,supra,Berger and Kimmel(eds.)，上述，和上述Ausubel等人的文献。生物学试剂和实验设备生产厂家的产品信息还提供了一些有用的信息。这些厂家包括西格马化学公司(圣路易斯，MO)、R&D系统公司(明尼阿波利斯，MN)、Pharmacia Amersham公司(Piscataway，NJ)、CLONTECH实验室股份有限公司(Palo Alto，CA)化学基因公司、Aldrich化学公司(密尔沃基，WI)、Glen研究股份有限公司、GIBCO BRL生命技术股份有限公司(Gaithersburg，MD)、Fluka Chemica-Biochemika Analytika公司(Fluka Chemie AG，巴赫，瑞士)、Invitrogen公司(圣地亚哥，CA)、和应用生物系统公司(Foster市，CA)、以及其他本领域已知的商业来源。

[0212] 核酸还可以通过扩增的方法来制备。扩增方法包括聚合酶链式反应(PCR)、连接酶链式反应(LCR)、基于转录作用的扩增体系(TAS)、自主维持的序列复制体系(3SR)。各式各样的克隆方法、宿主细胞、和体外扩增工艺对本领域普通技术人员都是已知的。

[0213] 在一个实施例中，可以使用的抗体通过向载体中插入一种cDNA来制备，所述cDNA编码能够特异性结合PD-1、PD-L1或PD-L2的抗体的可变区，且所述载体包括编码效应分子(EM)的cDNA。完成插入过程使可变区和效应分子(EM)在阅读框中被阅读，从而产生一个连续的多肽。因此，编码的多肽包含一种功能性的Fv区域和一种功能性的效应分子(EM)区域。在另一个实施方案中，编码可检测标记物(例如一种酶)的cDNA被连接到单链Fv蛋白(″scFv″)上，从而使标记物位于所述单链Fv蛋白(″scFv″)的羧基末端。在另一个实施例中，可检测标记物位于所述单链Fv蛋白(″scFv″)的氨基末端。在依旧另一个实施方案中，编码可检测标记物的cDNA连接到能够特异性结合PD-1、PD-L1或PD-l2的抗体重链可变区上，从而

使标记物位于重链可变区的羧基末端。所得重链可变区可以随后通过二硫键连接到能够特异性结合PD-1、PD-L1或PD-12的抗体的轻链可变区上。在依旧另一个实施例中，编码标记物的cDNA连接到能够特异性结合PD-1、PD-L1或PD-12的抗体得轻链可变区上，使所述标记物位于轻链可变区的羧基末端。所得轻链可变区可以随后通过二硫键连接到能够特异性结合PD-1、PD-L1或PD-12的抗体的重链可变区上。

[0214] 一旦编码抗体或其功能性片段的核酸被分离出来或者被克隆，蛋白质可以再重组工程细胞中表达，所述重组工程细胞例如，细菌细胞、植物细胞、酵母细胞、昆虫细胞和哺乳动物细胞。通过将DNA传递进入适当的宿主细胞，编码抗体或者其功能性片段的一种或者一种以上的DNA序列可以进行体外表达。所述细胞可以是原核细胞或者真核细胞。该术语还包括任意主体宿主细胞的子代细胞。应当理解的是，由于复制期间会发生突变，所有的子代细胞不一定与其母代细胞一致。稳定的传递方法是指外源DNA被持续的维持在宿主细胞中，这种方法在本领域内是已知的。

[0215] 编码抗体或其功能性片段的多聚核苷酸序列可以与表达参照序列可操作的相连。这里相连的是与一种编码序列可操作的结合的表达参照序列，从而在与表达参照序列相协调的情况下完成编码序列的表达。表达参照序列包括，但是不局限于适当的启动子、增强子、转录作用终止子、在蛋白质编码基因前面的起始密码子(即，ATG)、内含子拼接信号，从而保持基因的正确阅读框架，允许mRNA和终止密码子适当的翻译。

[0216] 编码抗体或其功能性片段的多聚核苷酸序列可以被插入一张表达载体中，所述表达载体包括，但不仅限于一种质粒、病毒或能够操作并允许序列插入或整合的其他媒介物，所述多聚核苷酸序列可以在原核生物或者真核生物中被表达。宿主包括微生物体、酵母、昆虫和哺乳动物。表达原核生物中所具有的真核或者病毒序列的方法在本领域内是众所周知的。在宿主中，能够表达和复制的生物学功能性病毒DNA载体和质粒DNA载体对本领域普通技术人员来讲是众所周知的。

[0217] 通过本领域普通技术人员已知的常用方法可以进行带有重组DNA的宿主细胞的转化。其中，所述宿主可以是原核生物，例如大肠杆菌，能够吸收DNA的感受态细胞可以从经历过指数生长期之后收获的细胞中制备，并随后用本领域内众所周知的$CaCl_2$方法处理。作为选择，还可以使用$MgCl_2$或者RbCl。如果需要的话，转化还可以在形成宿主细胞的原生质体之后，通过，例如电穿孔技术进行。

[0218] 当所述宿主是一种真核生物时，可以使用转染DNA的方法、常规机械方法和病毒载体，所述转染DNA的方法例如磷酸钙共沉淀法，常规机械方法例如微量注射、电穿孔、插入脂质体包裹的质粒。真核细胞还可以与编码抗体或其功能性片段的多聚核苷酸序列、以及一种编码可选择表型的第二外源DNA分子一起共转染，所述可选择的表型例如单纯性疱疹胸苷激酶基因。另一个方法是使用真核生物的病毒载体，例如猿猴病毒40(SV40)或牛乳头状瘤病毒，从而暂时感染或者转化真核细胞，并表达蛋白质(参见，例如，Eukaryotic Viral Vectors，Cold Spring Harbor Laboratory，Gluzman ed.，1982(冷泉海港实验室1982年出版的，Gluzman编写的“真核病毒载体”))。本领域普通技术人员可以容易的使用表达体系，例如质粒和媒介物，有效的在细胞中产生蛋白质，所述细胞包括较高等的真核细胞，例如COS、CHO、HeLa和骨髓瘤细胞系。

[0219] 重组表达多肽的分离和纯化可以通过传统方法进行，包括制备色谱法和免疫分离

法。一旦被表达，重组抗体可以按照本领域标准方法进行纯化，所述方法包括硫酸铵沉淀法、亲和层析柱、柱型色层分离法，等等(通常参见，R.Scopes，Protein Purification(“蛋白质纯化”)，Springer-Verlag，N.Y.，1982)。这里公开的基本上纯的组合物具有至少大约90到95％的均一性，为了进行医药方面得应用，可以使用均一性达到98到99％或更多的组合物。一旦被纯化，无论是部分纯化还是纯化到所希望的均一性，如果是进行治疗应用，所述多肽应该基本上不含内毒素。

[0220] 这里描述了表达单链抗体的方法和/或从例如大肠杆菌的细菌中重折叠到适当活性形式，包括单链抗体的方法，这些方法是本领域内已知的，并且适用于这里公开的抗体。参见，Buchner et al.，Anal.Biochem.205:263-270，1992；Pluckthun，Biotechnology9:545，1991；Huse et al.，Science 246:1275，1989和Ward et al.，Nature 341:544，1989，这些文献通过引证在此并入本文。

[0221] 通常，来自大肠杆菌或其他细菌的功能性异源蛋白质是从包涵体中分离出来的，并且需要使用强烈的变性剂进行增溶作用，然后再折叠。在增溶作用步骤中，如本领域所知，必须存在一种还原剂来分离二硫键。带有还原剂的示范性的缓冲液是：0.1M Tris，pH值为8，6M胍，2毫摩尔乙二胺四乙酸、0.3M DTE(二硫赤藓糖醇)。在低分子量硫醇试剂存在的情况下二硫键可以发生再氧化作用，如文献Saxena et al.，Biochemistry 9:5015-5021，1970所述，该文献在此通过引证全部并入本文，特别是上述Buchner等人的描述。

[0222] 复性一般通过使用缓冲剂稀释(例如，稀释100倍)变性的并减少的蛋白质来完成。一种示范性的缓冲剂包括0.1M Tris，pH值为8.0，0.5M L-精氨酸，8毫摩尔氧化型谷胱甘肽(GSSG)、和2毫摩尔乙二胺四乙酸。

[0223] 作为对两种链式抗体纯化方法的改良，分别对重链区和轻链区进行溶解和减少，随后合成再折叠溶液。当这两种蛋白质以某一摩尔比率混合时，可以获得一种示范性的产量，因此一种蛋白质必另一种蛋白质的摩尔量多5倍以上也不过量。理想的情况是在氧化还原-混合完成之后，向再折叠溶液中加入过量的氧化型谷胱甘肽或其他氧化型低分子量化合物。

[0224] 除了重组方法之外，这里公开的抗体及其功能性片段还可以完全地或者部分地使用标准肽合成方法来构造。在向序列中连续加入剩余氨基酸之后，长度小于大约50个氨基酸的多肽的固相合成可以伴随着所述序列C末端氨基酸与一种不可溶的支持物的附着。Barany&Merrifield，The Peptides:Analysis，Synthesis，Biology.Vol.2:Special Methods in Peptide Synthesis，Part A.pp.3-284(Barany和Merrifield所著的“肽：分析、合成、生物科学”第二卷：肽合成的特定方法，A部分，第3-284页)；Merrifield et al.，J.Am.Chem.Soc.85:2149-2156，1963，和Stewart et al.，Solid Phase Peptide Synthesis，2nd ed.，Pierce Chem.Co.，Rockford，Ill.，1984(Stewart等人所著，由Pierce化学公司，Rockford，Ill.在1984年出版的“固相肽合成”第2版)中描述了用于固相合成的技术。具有更大长度的蛋白质可以通过较短片段末端氨基和羧基凝结来合成。通过活化羧基末端(例如通过利用耦合试剂，例如N，N’-二环已基碳化二亚胺)形成肽键的方法在本领域内是十分著名的。

[0225] B.抑制性核酸

[0226] 在这里所公开的方法中，还可以使用能够减少PD-1、PD-L1或PD-L2表达和/或活性

的抑制性核酸。一个实施方案是一种小的抑制性RNA(siRNA)，用于干扰或者抑制靶分子基因的表达。编码PD-1、PD-L1和PD-L2的核酸序列公开在GENBANK中，登记号为NM_005018、AF344424、NP_079515、和NP_054862。

[0227] 通常，siRNAs是通过相对长的双链RNA分子经过Dicer或DCL酶裂解产生的(Zamore,Science,296:1265-1269,2002;Bernstein et al.,Nature,409:363-366,2001)。在动物和植物中，siRNAs被集中到RISC中并指导RISC的序列特异性核糖核酸酶活性，从而使mRNA或其他RNA靶分子在细胞质中裂解。在核中，siRNA还可以指导异染色质相关的组蛋白和DNA的甲基化作用，导致个体基因或大范围染色质区域的翻译停止。PD-1siRNAs是商业上可获得的，例如从圣克鲁斯生物工艺学公司购得(Santa Cruz Biotechnology,Inc.)。

[0228] 这里公开的内容提供了一种适用于干扰或者抑制靶基因表达的RNA，所述RNA包括大约15到大约40个核苷酸长度的双链RNA，在每个链的3'和/或5'末端悬垂者一种0到5-核苷酸。所述RNA序列基本上与靶基因的mRNA或者转录产物的一部分一致，所述靶基因是希望干扰或者抑制其表达的靶基因，例如PD-1、PD-L1或PD-L2。为了实现这里公开的目的，RNA序列“基本上与希望干扰或者抑制其表达的靶基因的mRNA或者转录产物的一部分一致”是指与该靶基因mRNA或者转录产物的特异性部分相比，其区别不超过大约30个百分比，并且在一些实施方案中，不超过大约10个百分比。在具体实施方案中，所述RNA序列与所述靶基因的mRNA或转录产物的一部分完全一致。

[0229] 因此，这里公开的siRNAs包括长度大约为15到大约40个核苷酸的双链RNA，在每个链的3'和/或5'末端悬垂者一种0到5-核苷酸。所述双链RNA序列基本上与编码PD-1、PD-L1或者PD-L2的核酸的mRNA或者转录产物的一部分一致(参见上面)，在具体的实施例中，双链RNA包含大约19到大约25个核苷酸，例如，大约20、21、或22个核苷酸，且这些核苷酸基本上与编码PD-1、PD-L1或者PD-L2的核酸一致。在另外的实施例中，双链RNA包含大约19到大约25个核苷酸，且这些核苷酸与编码PD-1、PD-L1或者PD-L2的核酸100％一致。在上下文中“大约”并不只指整数。在一个实施例中，“大约”20个核苷酸是指核苷酸的长度在19到21个之间。

[0230] 关于双链RNA的悬垂物，两个链之间的悬垂物长度是相互独立的，这就是说，一个链上悬垂物的长度不取决于另一个链上悬垂物的长度。在具体的实施例中，至少一个链上3'或者5'悬垂物的长度是0个核苷酸，且在有些情况下，在两个链上3'或者5'悬垂物的长度是0个核苷酸(因此，是一种惰性dsRNA)。在其他的实施例中，至少一个链上3'或者5'悬垂物的长度是1个核苷酸到5个核苷酸。更具体的，在某些实施例中，至少一个链上3'或者5'悬垂物的长度是2个核苷酸，或者在两个链上都是2个核苷酸。在特定的实施例中，dsRNA分子在两个链的3'悬垂物都是2个核苷酸。

[0231] 因此，在一个具体的提供RNA的实施方案中，双链RNA包括20、21或22个核苷酸，并且在两个链的3'末端的悬垂物长度都是2个核苷酸。在这里提供的RNA的实施方案中，双链RNA包含大约40-60％的腺嘌呤+尿嘧啶(AU)和大约60-40％的鸟嘌呤+胞嘧啶(GC)。更具体的，在具体的实施例中，双链RNA包含大约50％的AU和大约50％的GC。

[0232] 这里所描述的RNA是在例如双链RNA的反义链上进一步包括至少一个修饰核糖核苷酸的RNA。在特定的实施例中，所述修饰的核糖核苷酸位于至少一个链的3'悬垂物上，或者更具体的，在反义链的3'悬垂物上。可以预计的是，修饰核糖核苷酸的例子包括含有可检

测标记物的核糖核苷酸(例如,一种荧光基团,例如玫瑰精或FITC)、一种硫代磷酸盐核苷酸类似物、一种脱氧核苷酸(由于其碱基分子是核糖核酸而被认为是修饰的)、2'-氟尿嘧啶、2'-氨基尿嘧啶、2'-氨基胞嘧啶、4-硫尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-碘代尿嘧啶、5-(3-氨基烯丙基)-尿嘧啶、次黄嘌呤核苷、或2'O-Me-核苷酸类似物。

[0233] 在这里所公开的方法中还可以使用PD-1,PD-L1和PD-L2的反义分子和核糖酶分子。反义核酸是与至少一部分特异性mRNA分子互补的DNA分子或RNA分子(Weintraub,Scientific American 262:40,1990)。在细胞中,反义核酸与相应的mRNA杂交,形成一种双链分子。反义核酸干扰mRNA的翻译,这是由于细胞不会翻译双链的mRNA。优选的是大约15个核苷酸的反义低聚物,这是由于他们容易合成并且在引入靶细胞产生PD-1、PD-L1或者PD-L2时与更大的分子相比,产生问题的可能性更小。使用反义序列抑制基因体外翻译的方法在本领域内是为大家所熟知的(参见,例如,Marcus-Sakura,Anal.Biochem.172:289,1988)。

[0234] 一种反义低聚核苷酸的长度可以是,例如,大约5、10、15、20、25、30、35、40、45或50个核苷酸。反义核酸可以根据本领域内已知的方法使用化学合成法和酶催化连接反应进行构造。例如,反义核酸分子可以使用天然存在地核苷酸或各种修饰的核苷酸化学合成,其中,各种修饰的核苷酸进行修饰的目的是增加分子的生物学稳定性或者增加反义核酸和正义核酸之间双链形式的物理稳定性,例如,可以使用硫代磷酸衍生物和吖啶取代的核苷酸。可以用于产生所述反义核酸的修饰的核苷酸的例子包括5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-氯代尿嘧啶、5-碘代尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、4-乙酰胞密啶、5-(羰基氢氧基甲基)尿嘧啶、5-羰基甲基氨基甲基-2-硫代尿嘧啶-e、5-羰基甲基氨基甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、β-D-半乳糖基Q核苷、次黄嘌呤核苷、及其他。

[0235] 使用一种低聚核苷酸开始的转录作用被称为三链策略,这是由于所述开链核酸围绕双链DNA形成一种三链螺旋。因此,这种三链化合物可以被设计识别被选择的基因上的一种独特位点(Maher,et al.,Antisense Res.and Dev.1(3):227,1991;Helene,C.,Anticancer Drug Design 6(6):569),1991.)这里公开的方法中还可以使用这类抑制性低聚核苷酸。

[0236] 此外,还可以使用核糖酶,核糖酶是RNA分子所具有的能够特异性裂解其他的单链RNA的酶,在某种意义上类似于DNA限制性内切酶。通过对编码RNA的核苷酸序列进行修饰,有可能设计能够识别RNA分子中的特异性核苷酸序列并将其裂解(Cech,J.Amer.Med.Assn.260:3030,1988)。由于他们具有序列特异性,这种方法的主要优点在于只有具有特点序列的mRNA被钝化。

[0237] 核糖酶有两种基本类型,即,四膜虫型(Hasselhoff,Nature 334:585,1988)和"锤头状"型。四膜虫型核糖酶能够识别长度为4个碱基的序列,而"锤头状"型核糖酶能够识别长度为11-18个碱基的碱基序列。识别序列越长,序列专门存在于靶分子mRNA类中的可能性越大。因此,在使特异性mRNA种类钝化方面,锤头状型核糖酶优选于四膜虫型核糖酶,并且含有18个碱基的识别序列优选于较短的识别序列。

[0238] 本领域已知各种各样的传递系统,并且可用于给药作为治疗剂的siRNA及其他抑制性核酸分子。这种传递系统包括,例如,在脂质体中的胶囊化作用、微粒、微胶囊、纳米颗粒、能够表达治疗剂分子的重组细胞(参见,例如,Wu et al.,J.Biol.Chem.262,4429,

1987)、作为反转录病毒或者其他载体一部分构建的治疗性核酸,等等。

[0239] C.小分子抑制剂

[0240] PD-1拮抗剂包括从天然产物或者合成(或者半合成)提取物文库中以及化学文库中按照本领域已知的方法识别的分子。检测PD-1活性减少的筛选方法(例如检测细胞死亡的方法)可以有效用于从各种活性来源中识别化合物。使用多种化合物文库,各种各样的其他化合物以及化合物文库可以进行最初的筛选。因此,可以识别出能够结合PD-1、PD-L1或者PD-L2的分子、能够抑制PD-1、PD-L1和/或PD-L2表达的分子、和能够抑制PD-1、PD-L1和/或PD-L2活性的分子。这些小分子可以从组合文库、天然产物文库或其他的小分子文库中识别出来。另外,PD-1拮抗剂可以作为商业上可获得的化合物、以及识别的抑制剂商业上可获得的类似物被识别。

[0241] 检测提取物或者化合物的准确来源对于PD-1拮抗剂的识别并不是至关重要的。因此,PD-1拮抗剂实际上可以从许多化学提取物或者化合物中识别出来。这种可以作为PD-1拮抗剂的提取物或者化合物的例子包括,但是不局限于,植物提取物、真菌提取物、原核生物的提取物或动物提取物、发酵培养液、和合成化合物以及现存化合物的修饰物。还可以使用很多方法来进行多种化合物的随机合成或者直接合成(例如,半合成或者全合成),这些化合物包括但不限于,糖类化合物、脂类化合物、肽化合物和核酸化合物。合成的化合物文库可以从Brandon联合公司(Merrimack,N.H.)和Aldrich化学公司(Milwaukee,Wis.)商业上购得。PD-1拮抗剂可以从合成化合物文库中识别,所述合成化合物文库可以从许多公司商业上购得,这些公司包括Maybridge化学公司(Trevillet,Cornwall,英国)、Comgenex(普林斯顿,N.J.)、Brandon联合公司(Merrimack,N.H.)和Microsource(New Milford,Conn.)。PD-1拮抗剂还可以从一种罕见的化学文库中识别,例如,从Aldrich(Milwaukee,Wis.)公司购得的文库。PD-1拮抗剂能够以细菌、真菌、植物和动物提取物的形式从天然化合物文库中识别出来,所述细菌、真菌、植物和动物提取物可以通过许多来源商业上购得,包括Biotics公司(Sussex,英国),Xenova(Slough,英国)、Harbor Branch Oceangraphics研究所(Ft.Pierce,Fla.)、和PharmaMar公司,美国(剑桥,马萨诸塞州)天然产生的和合成产生的文库和化合物可以通过常规的化学、物理和生物化学方法容易的进行修饰。

[0242] 在多种化学类别中都可以发现可使用的化合物,但是通常都是有机化合物,包括小有机化合物。在这里公开的方法中使用的小有机化合物具有的分子量超过50道尔顿但小于大约2,500道尔顿,例如小于大约750道尔顿或小于大约350道尔顿。示范性的种类包括杂环、肽、糖类、类固醇、等等。所述化合物还可以被修饰从而提高功效、稳定性、药物相容性、等等。在几个实施方案中,可以使用的化合物对PD-1、PD-L1或者PD-L2的Kd值小于1nM、小于10nm、小于1μM、小于10μM、或小于1mM。

[0243] D.PD-1变体作为拮抗剂

[0244] 在一个实施方案中,PD-1蛋白质能够起到拮抗剂作用的变体可以通过筛选突变体的组合文库来识别,所述突变体例如PD-1蛋白质的点突变体或者截断突变体,从中识别出具有拮抗剂活性的蛋白质。在一个实施例中,所述拮抗剂是一种可溶解的PD-1蛋白质。

[0245] 因此,PD-1变体的文库可以通过在核酸水平下组合诱变来产生,并且通过多样化的基因文库编码获得。例如,PD-1变体的文库可以通过将合成的低聚核苷酸混合物酶连接到基因序列中来产生,从而潜在PD-1序列的退化性序列作为一种单独的多肽被表达,或者

作为选择，作为一类较大的包括所述PD-1类序列的融合蛋白(例如噬菌体显示蛋白)被表达。

[0246] 各种各样的方法都可以用于从退化的低聚核苷酸序列中产生潜在的PD-1变体文库。在自动DNA合成仪中可以进行退化性基因序列的化学合成法，并且所得合成基因随后结合到适合的表达载体上。使用符合规定的退化性基因，在一种混合物种，所有编码要求的潜在PD-1拮抗剂序列的序列都可以使用。合成退化性低聚核苷酸的方法在本领域内是已知的(参见，例如，Narang，et al.，Tetrahedron 39:3，1983；Itakura et al.Annu.Rev.Biochem.53:323，1984；Itakura et al.Science 198:1056，1984)。

[0247] 另外，编码序列的PD-1蛋白质片段的文库可以用于产生PD-1片段的群体，所述PD-1片段可以用于筛选并随后选择PD-1拮抗剂变体。在一个实施方案中，在大约每一个分子之间发生断口的情况下，用核酸酶处理PD-1编码序列的双链PCR片段，从而产生编码序列片段文库，变性所述双链DNA、对DNA进行复性从而形成双链DNA，这种双链DNA包括来自不同裂解产品的正义/反义对，除去单链部分从而通过用S1核酸酶处理再形成双链结构，并将所得片段文库结合到表达载体中。通过这种方法，PD-1的编码N-末端、C-末端和大小各异的内部片段的表达文库可以被产生。

[0248] 用于筛选组合文库基因产物的一些方法在本领域内是已知的，所述组合文库是通过点突变或者截断来制备的，另外，筛选具有选择性质的基因产物cDNA文库的技术在本领域内也是已知的。这种技术适用于快速筛选通过PD-1蛋白重组突变作用产生的基因文库。适用于高通量分析的用于筛选大基因文库的最广泛使用的技术通常包括将所述基因文库克隆进入可复制的表达载体中，用所得文库载体转化适当的细胞，并在检测到理想的活性能够促进载体分离的情况下，表达所述重组基因，其中，所述载体能够编码一种基因，正是对这种基因的产物进行的检测。循环总体诱变(REM)可以被用于与筛选试验结合来识别PD-1拮抗剂(Arkin and Youvan，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:7811 7815，1992；Delagrave et al.，Protein Eng.6(3):327 331，1993)。

[0249] 在一个实施方案中，基于细胞的实验可以被用于分析PD-1变体文库。例如，表达载体的文库可以被转入在正常情况下能够合成并分泌PD-1的细胞株中。然后，培养被转染的细胞并因此分泌出PD-1和一种特别的PD-1变体。在细胞上清液中，突变体表达PD-1活性的效果可以被检测，例如，通过任意一种功能性试验。然后，质粒DNA可以从细胞中回收，在此细胞中，内源性PD-1的活性被抑制，且独立的克隆体进一步被表征。

[0250] 模拟肽也可以被用作PD-1拮抗剂。肽的类似物通常被用于制药工业中，作为一种非肽类药物，肽的类似物具有类似于其模板肽的性质。这类非肽化合物通常以能够用计算机处理分子模型为目的而被研发。在结构上与治疗有效性肽相类似的肽的模仿物可以被用来产生等量的治疗或者预防作用。通常，模拟肽在结构上类似于模系多肽(例如，具有PD-1生物活性的多肽)，但是其中一种或者一种以上的肽键选择性地被--CH_2NH--、--CH_2S--、--CH_2--CH_2--、--CH.＝.CH--(顺式和反式)、--$COCH_2$--、--CH(OH)CH_2--、和--CH_2SO-连接键所取代。肽键可以通过本领域内已知的方法被取代(参见，例如，Morley，Trends Pharm.Sci.pp.463468，1980；Hudson et al.Int.J.Pept.Prot.Res.14:177 185，1979；Spatola，Life Sci.38:1243 1249，1986；Holladay，et al.Tetrahedron Lett.24:4401 4404，1983)。肽模仿物可以很经济的被制备，且是稳定的，并且具有增加的生命力或者吸

收。模拟肽的标记通常包括一种或者一种以上标记物的共价附着，所述标记物直接或者通过一种间隔体(例如通过一种酰胺基)附着到模拟肽的无干扰作为位点上，所述模拟肽是通过定量的结构-活性数据和/或分子模型来预测的。这种无干扰作用位点通常是不会与结合模拟肽而产生治疗作用的高分子直接接触的位点。模拟肽的衍生作用基本上不会妨碍模拟肽理想的生物学或者药理学活性。

[0251] 这里所公开的方法还可以使用阴性显性蛋白质或者编码阴性显性蛋白质的核酸，所述阴性显性蛋白质能够妨碍PD-1的生物活性(即结合PD-1与PD-L1、结合PD-1与PD-L2、或者与两者共同结合的活性)。阴性显性蛋白质可以是任意与该阴性显性蛋白质相应的野生型蛋白质的至少10、20、35、50、100、或多达150个氨基酸具有至少50％、70％、80％、90％、95％乃至99％序列一致性的氨基酸分子序列。例如，阴性显性PD-L1具有突变，因此可以比天然(野生型)PD-1更紧密的结合PD-1，但不会活化任何通过PD-1的细胞信号。

[0252] 阴性显性蛋白质可以通过表达载体给药。所述表达载体可以使一种非病毒载体或者一种病毒载体(例如，反转录病毒、重组腺病毒相关病毒、或一种重组腺病毒载体)。做为选择，使用例如显微注射技术，阴性显性蛋白质可以直接作为一种重组蛋白质进行系统性给药或者针对传染病区给药。

[0253] 多肽拮抗剂可以在原核生物或真核生物的宿主细胞中通过表达编码氨基酸序列的多聚核苷酸产生，通常作为较大的多肽(一种融合蛋白质，例如ras或酶)的一部分产生。作为选择，这种多肽可以通过化学方法合成。用于在重组宿主中表达异源蛋白质的方法、多肽的化学合成法和体外翻译法对本领域普通技术人员来讲是已知的(参见Maniatis el al.Molecular Cloning:A Laboratory Manual(1989),2nd Ed.,Cold Spring Harbor,N.Y.(Maniatis等人所著的纽约冷泉海港(Cold Spring Harbor)出版社于1989年出版的“分子克隆:实验室操作指南”第二版);Berger and Kimmel,Methods in Enzymology,Volume 152,Guide to Molecular Cloning Techniques(1987),Academic Press,Inc.,San Diego,Calif.(Berger和Kimmel所著的由加利福尼亚圣地亚哥的学术出版社股份有限公司于1987年出版的“酶学方法”第152卷“分子扩增技术指导”);Kaiser et al.,Science 243:187,1989(Kaiser等人在1989年“科学”第243卷187页的文献);Merrifield,Science 232:342,1986(Merrifield在1986年″科学″第232卷342页的文献);Kent,Annu.Rev.Biochem.57:957,1988(Kent等人在1988年“生物化学研究年报”第57卷957页的文献))。

[0254] 肽可以通过例如直接化学合成的方法生产，并且可以用作与一种配位体相互作用的PD-1的拮抗剂。肽可以作为修饰肽被产生，其上含有通过共价键附着到N-末端和/或C-末端的非肽基团。在某些优选的实施方案中，羧基末端或氨基末端、或者两个末端都可以被修饰。末端氨基和羧基最常见的修饰作用分别是乙酰化和酰胺化。氨基末端的修饰作用例如酰化作用(例如，乙酰化)或烷化作用(例如，甲基化)，羧基末端的修饰作用例如酰胺化。在各种实施方案中，可以引入氨基末端的修饰作用、羧基末端的修饰作用以及其他末端修饰作用，其中包括环化作用。某些氨基末端和/或羧基末端的修饰作用和/或肽核心序列的扩增可以提供效力的物理、化学、生物化学和药理学性质，例如:提高的稳定性、增加的效应和/或功效、以及增加的对血清蛋白酶的抵抗力、理想的药代动力学性质等等。

[0255] 治疗方法:向主体给药PD-1拮抗剂

[0256] 这里提供了处理多种传染病和癌症的方法。在这些方法中，通过对主体给药治疗有效量的PD-1拮抗剂来治疗、预防传染病或者癌症，或者减轻其症状。所述主体可以是任意哺乳动物，例如人、灵长类动物、老鼠、鼠、狗、猫、母牛、马和猪。在一些实施例中，所述主体是一种灵长类动物，例如一种人。在另外的实施例中，所述主体是一种鼠科主体，例如，老鼠。在一些实施方案中，该方法包括测定来自主体的样品中记忆B细胞增殖作用(参见如下)。在一些实施例中，这些方法还包括测定来自主体的样品中的天然B细胞。在其他的实施例中，这些方法包括测定表达CD28(CD28+)的T细胞。

[0257] 在其他的实施方案中，所述主体具有发展成传染病的风险。所述具有发展成传染病风险的主体是还没有具有患上所述传染病，但是已经被所关心的传染性试剂感染的主体。在其他的实施例中，所述主体患有传染病，例如患有持续感染，例如，慢性传染病。患有持续性感染的主体可以通过本领域普通技术人员，例如医生，已知的标准方法来确认。

[0258] 在一些实施例中，所述主体患有由于细菌病毒、真菌、或寄生虫产生的持续感染。通常，持续感染与急性传染相反，不能通过宿主免疫应答的相互作用有效的识别。所述传染性试剂和免疫反应达到平衡，因此，所述感染的主体在很长的一段时间内保持传染性但是不需要表现出任何症状。持续感染包括，例如，潜伏性传染、慢性传染和缓慢传染。持续感染有病毒造成，所述病毒例如，人T细胞白血病病毒、埃-巴二氏病毒、巨细胞病毒、疱疹病毒、水痘-带状疱疹病毒、家畜囊虫病、乳多空病毒、朊病毒、肝炎病毒、腺病毒、细小病毒和乳头状瘤病毒。

[0259] 在一种慢性感染中，所述传染性试剂可以一直在身体出检测出来。然而，病毒的现象和病症可以在很长的一段时间内被表达或者缺失。慢性感染的例子包括乙型肝炎(由乙型肝炎病毒(HBV)所引起)和丙型感染(由丙型肝炎病毒(HCV)所引起)、腺病毒、巨细胞病毒、埃-巴二氏病毒、单纯疱疹病毒1、单纯疱疹病毒2、人疱疹病毒6、水痘-带状疱疹病毒、乙型肝炎病毒、丁型肝炎病毒、乳头状瘤病毒、细小病毒B19、多型瘤病毒BK、多型瘤病毒JC、麻疹病毒、风疹病毒、人类免疫缺陷性病毒(HIV)、人T细胞白血病病毒I、和人T细胞白血病病毒II。寄生虫的持续感染可能是由于利什曼虫、弓型属、锥虫属、变形体、血吸虫属、和脑胞内原虫属感染的结果。

[0260] 在潜伏性感染中，传染性试剂(例如病毒)表面上是无活性并且潜伏的，因此，主体通常不显示病征或症状。在潜伏性病毒感染中，在症状出现之前，所述病毒在相当长的一段时间内在宿主体内保持平衡；然而，实际的病毒不能被检测到，直到疾病复发。潜伏性感染的例子包括由单纯疱疹病毒(HSV)-1(单纯疱疹)、单纯疱疹病毒(HSV)-2(外生殖器疱疹)、和水痘带状疱疹病毒VZV(水痘-扁砾病毒)所引起感染。

[0261] 在缓慢感染中，所述传染性试剂的数目杂相当长的一段时间内逐渐增加，在此期间，不会观察到明显的病症或者症状。缓慢感染的例子包括艾滋病(由艾滋病病毒-1和艾滋病病毒-2所引起)、在动物体内引起肿瘤的过滤性病毒和阮病毒。

[0262] 另外，持续感染经常起源于最近的急性传染并发症。例如，亚急性硬化性全脑炎(SSPE)发生在急性家畜囊虫病感染或退行性脑炎之后，作为风疹感染的结果发生。

[0263] 在一个非限制性实施例中，使用PCR分析技术检测来自个体的生物样品中的衣原体种类，从而诊断主体患有持续性衣原体感染。根据这里的公开，哺乳动物不必已经诊断出患有持续性感染。能够建立持续感染的微生物试剂包括病毒(例如乳头状瘤病毒、肝炎病

毒、人免疫缺陷型病毒和疱疹病毒)、细菌(例如大肠杆菌和披衣菌属)、寄生虫、(例如利什曼虫属、血吸虫属、锥虫属、弓型属)和真菌类。

[0264] 除了减少PD-1表达或者活性的化合物之外,被处理的主体还可以被给药一种疫苗。在一个实施例中,所述疫苗可以包括一种添加剂。在另一个实施例中,所述疫苗可以包括一种主要增效剂免疫作用(prime booster immunization)。所述疫苗可以是一种热致死疫苗、一种减毒弱疫苗、或一种亚单位疫苗。已经感染上病原体的主体可以使用一种治疗性疫苗,例如PD-1拮抗剂和抗原来治疗。所述主体可以是无症状的,因此所述治疗能够防止症状发展。所述治疗性疫苗还可以减少一种或者一种以上已经存在的症状的严重性,或者减少病原体的存在量。

[0265] 在一些治疗方法的实施例中,使用治疗有效量的PD-1拮抗剂和一种病毒抗原对主体给药。适当的病毒抗原的非限制的例子包括:流行性感冒HA、NA、M、NP和NS抗原;艾滋病病毒p24、pol、gp41和gp120;偏肺病毒(hMNV)F和G蛋白质;丙型肝炎病毒(HCV)E1、E2和核心蛋白质;登革热病毒(DEN1-4)E1、E2和核心蛋白质;人乳头状瘤病毒L1蛋白质;埃-巴二氏病毒gp220/350和EBNA-3A肽;巨细胞病毒(CMV)gB糖蛋白、gH糖蛋白、pp65、IE1(外显子4)和pp150;水痘带状疱疹病毒(VZV)IE62肽和糖蛋白E抗原决定簇;单纯疱疹病毒糖蛋白D抗原决定簇多瘤JC病毒多肽;XMRV多肽,以及其他抗原。抗原性多肽相应于天然存在的人或者动物病毒份礼物的多肽,或者可以被设计并合成一种或一种以上与天然(致病的或不致病的)分离物相比不存在的氨基酸取代作用。示范性的抗原如下所示:

[0266] 表1:所关心的示例性抗原(靶分子抗原)

[0267]

病毒抗原	所关心抗原的示例性抗原序列	SEQ ID NO:
BK	TLYKKMEQDVKVAHQ	13
	GNLPLMRKAYLRKCK	14
	TFSRMKYNICMGKCI	15
JC	SITEVECFL	16
埃-巴二氏病毒(EBV)	QPRAPIRPI	17
细胞巨化病毒(CMV)	NLVPMVATV	18
HPV	YMLDLQPET(T)	19
流行性感冒A	GILGFVFTL	20
真菌抗原		

[0268]

皮炎芽生菌	CELDNSHEDYNWNLWFKWCSGHGR	47
	TGHGKHFYDCDWDPSHGDYSWYLW	48
	DPSHGDYSWYLWDYLCGNGHHPYD	49
	DYLCGNGHHPYDCELDNSHEDYSW	50
	DPYNCDWDPYHEKYDWDLWNKWCN	51
	KYDWDLWNKWCNKDPYNCDWDPYH	52

[0269] 在其他的实施方案中,主体患有肿瘤。本方法包括对主体给药治疗有效量的PD-1拮抗剂,从而治疗肿瘤。在一些实施例中,也可以对所述主体给药治疗有效量的肿瘤抗原、

或者编码肿瘤抗原的核苷酸。PD-1拮抗剂和肿瘤抗原、或者编码肿瘤抗原的核苷酸可以被同时给药或顺序给药。

[0270] 给药PD-1拮抗剂会导致主体内肿瘤大小、发病率、或转移能力的下降。使用标准临床方法进行癌症评定。使用任意已知的用于诊断或者治疗具体肿瘤的方法确定功效。

[0271] 肿瘤(还叫做“癌症”)包括实体肿瘤和血液癌症。示范性的肿瘤包括表2中所列的肿瘤(伴随着已知的与这些癌症有关的肿瘤抗原)。

[0272] 表2:示例性的肿瘤及其肿瘤抗原

[0273]

肿瘤	肿瘤抗原
急性髓性白血病	胚胎性癌肉瘤（WT1）、优选表达的黑素瘤抗原（PRAME）、PR1、蛋白酶 3 、弹性蛋白酶、组织蛋白酶 G
慢性粒性白血病	胚胎性癌肉瘤（WT1）、优选表达的黑素瘤抗原（PRAME）、PR1、蛋白酶 3 、弹性蛋白酶、组织蛋白酶 G
脊髓发育不良综合征	胚胎性癌肉瘤（WT1）、优选表达的黑素瘤抗原（PRAME）、PR1、蛋白酶 3 、弹性蛋白酶、组织蛋白酶 G

[0274]

急性淋巴母细胞性白血病	优选表达的黑素瘤抗原（PRAME）
慢性淋巴细胞性白血病	生存素（Survivin）
非霍金氏淋巴瘤	生存素（Survivin）
多发性骨髓瘤	纽约食道癌 1（NY-Eso1）
恶性黑色素瘤	MAGE，MART，酪氨酸酶，优选表达的黑素瘤抗原（PRAME），GP100
乳腺癌	WT1，赫塞汀
肺癌	WT1
前列腺癌	前列腺特异性抗原（PSA）
结肠癌	癌胚抗原（CEA）
肾细胞癌（RCC）	纤维原细胞生长因子 5（FGF-5）

[0275] 所关心的示例性的肿瘤抗原如表3中所示

[0276] 表3:肿瘤抗原及其衍生的肽

[0277]

优选表达的黑素瘤抗原（PRAME）	LYVDSLFFL	21
胚胎性癌肉瘤（WT1）	RMFPNAPYL	22
生存素（Survivin）	ELTLGEFLKL	23
AFP	GVALQTMKQ	24
ELF2M	ETVSEQSNV	25
蛋白酶 3 及其肽 PR1	VLQELNVTV	26
嗜中性粒细胞弹性蛋白酶	VLQELNVTV	27
MAGE	EADPTGHSY	28
MART	AAGIGILTV	29
酪氨酸酶	RHRPLQEVYPEANAPIGHNRE	30
GP100	WNRQLYPEWTEAQRLD	31
NY-Eso-1	VLLKEFTVSG	32

[0278]

赫塞汀	KIFGSLAFL	33
癌胚抗原（CEA）	HLFGYSWYK	34
前列腺特异性抗原（PSA）	FLTPKKLQCV	35

[0279] 具体的非限制性的例子是血管免疫母细胞性淋巴瘤或结节性淋巴细胞为主型霍奇金淋巴瘤。血管免疫母细胞性淋巴瘤(AIL)是一种侵略性(快速发展的)T细胞非霍奇金淋巴瘤，具有扩大的淋巴结核高丙种球蛋白血症(血液中增加的抗体)的特点。其他的症状可以包括皮疹、发烧、体重减轻、阳性Coomb's试验(V型血凝板用于抗人球蛋白试验)或盗汗。这些恶性肿瘤通常在成人中发生。通常病人的年龄在40-90岁之间(平均大约65岁左右)且通常发生在男性身上。在血管免疫母细胞性淋巴瘤(AIL)发展过程中，也可能发生肝脾肿大、溶血性贫血和多克隆性高丙种球蛋白血症。大约40-50％的病人涉及皮肤问题。

[0280] 结节性淋巴细胞为主型霍奇金淋巴瘤是一种B细胞赘生物，其可能来源于B细胞生发中心，伴随有突变的无功能性的免疫球蛋白基因。与血管免疫母细胞性淋巴瘤相似，赘生性细胞与滤泡树状突细胞的网状组织有关。在结节性淋巴细胞为主型霍奇金淋巴瘤中与赘生CD20+细胞非常相关的T细胞中可以观察到PD-1的表达，观察方式类似于观察CD57+T细胞的方式。CD57和CXCR5一起，已经被认为是另一个与生发中心有关的T细胞的标志，这一发现支持了结节性淋巴细胞为主型霍奇金淋巴瘤中的赘生性细胞与生发中心有关的T细胞具有密切关系这一结论。

[0281] 使用本领域已知的任意方法都可以确定所关心的肿瘤抗原的表达在蛋白质或者核酸水平上的表达。例如，使用特异性识别一种或者一种以上这些序列的探针进行

Northern杂交分析就可以确定基因表达。作为选择，还可以使用反向转录的PCR试验测量表达作用，例如，使用对基因差异性表达序列具有特异性的引物进行试验。表达还可以在蛋白质水平下被确定，例如，通过测量这里描述的基因产物编码的肽的水平或者其活性。这种方法在本领域内是已知的，包括，例如，根据对所述基因编码的蛋白质的抗体进行的免疫测定技术。任意生物材料都可以被用于检测/定量评价所述蛋白质或其活性。

[0282] 在一个实施例中，主体之前已经被诊断为患有癌症。在另外的实施例中，主体之前已经针对癌症进行过治疗。然而，在某些实施例中，主体之前并没有被诊断为患有癌症。实性肿瘤的诊断可以通过在一种检测中识别重量进行，尽管也可以通过其他的方法进行，例如，通过放射性诊断或者超声诊断。癌症的治疗可以包括外科手术方法，或者可以包括化学治疗剂的使用，例如多西他塞、去甲长春花碱、吉西他滨、卡培他滨或环磷酰胺、氨甲蝶呤、和氟尿嘧啶的组合物；环磷酰胺、阿霉素和氟尿嘧啶；阿霉素和环磷酰胺；阿霉素和带有紫杉酚的环磷酰胺；阿霉素，随后是CMF(环磷酰胺、表柔比星和氟尿嘧啶)。另外，治疗方法还包括使用放射物。

[0283] 在一些实施例中，对主体给药治疗有效量的PD-1拮抗剂。还可以对主体给药治疗有效量的肿瘤抗原，或编码所述肿瘤抗原的核酸。这两项给药可以是同时发生的也可以是顺序进行的。

[0284] 为了治疗患有持续感染或肿瘤的主体，对所关心的主体给药治疗有效量的PD-1拮抗剂。在一个实施例中，治疗有效量的PD-1拮抗剂是一种具有生物活性的剂量，例如，能够诱导CD8+ T细胞细胞毒性增加从而增加对所述传染性制剂具有特异性的免疫反应的剂量。理想的是，所述PD-1拮抗剂具有将PD-1在抗原特异性免疫细胞(例如，T细胞，例如，CD8+ T细胞)中的表达或者活性减少到比未经处理过的对照物水平少至少5％、10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、或者多达100％的能力。PD-1在免疫细胞中的水平或活性可以通过本领域已知的任意方法来测定，所述方法包括，例如，Western印迹分析、免疫组织化学、酶联免疫吸附测定、和Northern印迹分析。作为选择，PD-1的生物活性可以通过评定PD-1与PD-L1、PD-L2或与两者的结合来测定。PD-1的生物活性可以根据其增加CD8+ T细胞细胞毒性的能力来确定，所述CD8+ T细胞细胞毒性包括，例如，细胞因子的产生、传染性试剂的清除和抗原特异性CD8+ T细胞的增殖。优选的，能够减少PD-1表达或者活性的试剂可以将传染性试剂或肿瘤具有特异性的免疫反应增加至与未经处理的对照物水平相比多至少5％、10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、或者多达100％。因此，本发明试剂可以是任意一种具有一种或者一种以上所述活性的试剂。尽管所述试剂优选在CD8+ T细胞中表达，本领域技术人员应当理解，任意能够影响持续感染免疫反应的细胞都可以适用于本发明所述的方法，这些细胞包括，例如，B细胞。

[0285] 选择性地，向主体给药一种或一种以上其他的治疗剂。其他的治疗剂包括，例如，抗病毒化合物(例如，阿糖腺苷、无环鸟苷、丙氧鸟苷、缬更昔洛韦(valgancyclovir)、核苷类似物反转录酶抑制剂(NRTI)(例如，AZT(叠氮胸苷)，ddI(二脱氧肌苷)、ddC(扎西他滨)、d4T(司他夫定)、或3TC(拉米夫定))，非核苷反转录酶抑制剂(NNRTI)(例如，(奈韦拉平(nevirapine)或地拉韦定(delavirdine))、蛋白酶抑制剂(沙奎那韦(saquinavir)、利托那韦(ritonavir)、茚地那韦(indinavir)、或那非那韦(nelfinavir))、病毒唑、或干扰素)、抗菌化合物、抗真菌化合物、抗寄生虫化合物、抗炎化合物、抗赘生试剂(化学治疗剂)或镇痛

药。

[0286] 其他的治疗剂可以在给药PD-1拮抗剂之前、同时、或者之后给药。例如，PD-1拮抗剂和其他的试剂作为分别得制剂在至少1小时、2小时、4小时、6小时、10小时、12小时、18小时、或者24个小时以上的时间内分别给药。选择性地，所述其他的试剂可以与PD-1拮抗剂一起配制成制剂。当不同的组合物中存在其他的试剂时，可以使用不同的给药途径。所述制剂按照本领域内已知的能够有效的治疗、减少或者防止传染的剂量给药。

[0287] PD-1拮抗剂和所述其他试剂的浓度取决于不同的因素，包括给药方法、靶向位点、哺乳动物的生理状态，及其他使用的治疗方法。因此，用滴定法测量治疗剂量，从而最优化其安全性和功效，这种方法对本领域技术人员来讲是已知的。对于特定位点确定合适的剂量和给药方法是本领域普通技术人员已知的。

[0288] 选择性地，主体进一步被给药一种疫苗，该疫苗能够针对造成持续感染的传染性试剂产生保护性的免疫反应。例如，对主体给药一种疫苗，该疫苗能够针对人类免疫缺陷性病毒(HIV)、肺结核、流行性感冒、XMRV、多瘤JC病毒或丙型肝炎病毒产生免疫反应。示范性的疫苗在例如Berzofsky等人的文献(J.Clin.Invest.114:456-462,2004)中进行了描述。如果需要的话，使用“prime-booster”注射器给药疫苗，或与辅助剂一起给药疫苗。所述疫苗还可以是一种肿瘤疫苗，例如一种治疗有效量的肿瘤抗原。在一些实施方案中，对主体给药一种治疗有效量的抗原性多肽，例如，一种病毒或者一种肿瘤抗原。

[0289] 可以对主体给药一种治疗有效量的肿瘤抗原或编码所述肿瘤抗原的核酸。多聚核苷酸包括一种重组DNA，所述重组DNA被整合入载体中，插入一种自主复制的质粒或者病毒中，或者插入原核生物或真核生物的基因组DNA中，或者作为一种独立于其他序列的单独的分子(例如，cDNA)存在。所述核苷酸是核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸、或者这两种核苷酸任意一种的改良形式。这里所述的术语包括DNA的单链或者双链形式。

[0290] 已经构建出许多病毒载体，包括，多形瘤，即，SV40(Madzak et al.,1992,J.Gen.Virol.,73:15331536)、腺病毒(Berkner,1992,Cur.Top.Microbiol.Immunol.(微生物免疫学),158:39-6;Berliner et al.,1988,Bio Techniques(生物技术),6:616-629;Gorziglia et al.,1992,J.Virol.,66:4407-4412;Quantin et al.,1992,Proc.Nad.Acad.Sci.USA,89:2581-2584;Rosenfeld et al.,1992,Cell,68:143-155;Wilkinson et al.,1992,Nucl.Acids Res.,20:2233-2239;Stratford-Perricaudet et al.,1990,Hum.Gene Ther.,1:241-256)、牛痘病毒(Mackett et al.,1992,Biotechnology(生物技术),24:495-499)、腺病毒相关病毒(Muzyczka,1992,Curr.Top.Microbiol.Immunol.,158:91-123;On et al.,1990,Gene,89:279-282)、疱疹病毒，包括单纯疱疹病毒(HSV)、CMV和EBV(Margolskee,1992,Curr.Top.Microbiol.Immunol.,158:67-90;Johnson et al.,1992,J.Virol.,66:29522965;Fink et al.,1992,Hum.Gene Ther.3:11-19;Breakfield et al.,1987,Mol.Neurobiol.,1:337-371;Fresse et al.,1990,Biochem.Pharmacol.,40:2189-2199)、辛德毕斯病毒(H.Herweijer et al.,1995,Human Gene Therapy(人类基因疗法)6:1161-1167;美国专利第5,091,309号和美国专利第5,2217,879号)、甲病毒属(S.Schlesinger,1993,Trends Biotechnol(生物技术发展趋势).11:18-22;I.Frolov et al.,1996,Proc.Natl.Acad.Sci.USA93:11371-11377)和鸟类反转录病毒(Brandyopadhyay et al.,

1984,Mol.Cell Biol.,4:749-754;Petropouplos et al.,1992,J.Virol.,66:3391-3397)、鼠类病毒(Miller,1992,Curr.Top.Microbiol.Immunol(微生物免疫学).,158:1-24;Miller et al.,1985,Mol.Cell Biol.(细胞生物学),5:431-437;Sorge et al.,1984,Mol.Cell Biol.,4:1730-1737;Mann et al.,1985,J.Virol.,54:401-407)和人源病毒(Page et al.,1990,J.Virol.,64:5370-5276;Buchschalcher et al.,1992,J.Virol.,66:2731-2739)。杆状病毒(苜蓿尺蠖多核多角体病毒;AcMNPV)载体在本领域内是已知的,并且是可以在商业上获得的(例如,位于加利福尼亚圣地亚哥的PharMingen公司;位于美国康涅狄格州Meriden的蛋白质科学公司;位于加利福尼亚La Jolla的Stratagene公司)。

[0291] 在一个实施方案中,编码肿瘤抗原或病毒抗原的多聚核苷酸被引入一种病毒载体中。适当的载体包括反转录病毒载体、原痘病毒(orthopox)载体、鸟痘病毒载体、传染性上皮瘤病毒载体、羊痘病毒载体、猪痘病毒载体、腺病毒载体、疱疹病毒载体、α病毒载体、杆状病毒载体、辛德毕斯病毒载体、牛痘病毒载体和脊髓灰质炎病毒载体。具体的示例性载体是痘病病毒载体,例如牛痘病毒载体、传染性上皮瘤病毒载体和高驯化性牛痘病毒(MVA)载体、腺病毒载体、杆状病毒载体等等。

[0292] 痘病毒的应用包括,原痘病毒、猪痘病毒、鸟痘病毒、和羊痘病毒。原痘病毒包括牛痘、先天性缺肢畸形、和浣熊痘病毒。原痘病毒应用的一个实施例是牛痘病毒。鸟痘病毒包括传染性上皮瘤病毒、金丝鸟痘病毒和鸽子痘病毒。羊痘病毒包括山羊痘疮和绵羊痘病毒。在一个实施例中,所述猪痘病毒是猪痘。用于表达的痘病毒载体的实施例在例如美国专利第6,165,460号中进行了描述,该专利通过引证在此并入本文。其他可以使用的病毒载体包括其他的DNA病毒以及RNA病毒,其中,所述DNA病毒例如疱疹病毒和腺病毒,RNA病毒例如反转录病毒和骨髓灰质炎病毒。

[0293] 在一些实施方案中,PD-1拮抗剂以足够增加T细胞,例如,足够增加CD8+ T细胞细胞毒性的量给药。T细胞细胞毒性的增加会导致增加的免疫反应以及减少的持续感染,或肿瘤减少的病征或症状。通过测定例如,免疫细胞,例如T细胞或B细胞的增殖作用的增加、细胞因子产量的增加、和传染性试剂清除速度的增加或者肿瘤量的减少,可以确定免疫反应的增加。因此,所述方法可以减轻与持续感染或肿瘤有关的一种或者一种以上的症状。因此,给药PD-1拮抗剂会减少持续性感染,抑制肿瘤的生长/大小,或将一种或一种以上与所述持续性感染或肿瘤有关的症状与未经治疗的主体相比,减少至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、或100%。

[0294] 如果治疗方法能够产生临床效果的话,所述治疗方法就是有效的,所述临床效果例如减少传染性试剂的负荷或者减少主体内的肿瘤负担。当治疗在生理学上被使用是,“有效的”是指所述治疗能够延迟或者防止感染形成,例如延迟六个月、一年、两年、三年或者更多。可以使用本领域普通技术人员已知的任意方法来确定诊断或者治疗特定传染病或者肿瘤的功效。

[0295] 因此,所述方法包括对主体给药一种药物组合物,所述药物组合物包括治疗有效量的PD-1拮抗剂。治疗剂化合物,例如一种抗体,的有效量是,例如,大约0.1毫克/千克到大约150毫克/公斤。本领域技术人员可以认识到,有效剂量会根据给药途径、使用的赋形剂、和共同给药的其他治疗方法的变化而变化,共同给药的其他治疗方法包括使用其他的抗感染试剂或者治疗剂,用于治疗、预防或减轻特定传染病或者癌症的症状。使用标准方法对患

有(或者有风险发展为)传染病病人或者癌症病人的人类患者进行一种治疗方案。

[0296] 使用本领域内已知的方法对个体给药PD-1拮抗剂。任意PD-1拮抗剂都可以被使用,例如这里公开的PD-1拮抗剂。另外,可以使用一种以上的拮抗剂。PD-1拮抗剂可以被局部给药,也可以被全身给药。例如,PD-1拮抗剂可以被口服给药、直肠给药、经鼻给药、局部肠胃外给药、皮下给药、腹膜内给药、肌内注射给药和静脉内给药。可以预防性的给药PD-1拮抗剂,或者在检测出传染病或者肿瘤之后给药。PD-1拮抗剂可以任选的被配制成治疗药物混合物的一种成分,来治疗传染病。适用于肠胃外给药的制剂的例子包括活性剂在等渗压盐溶液中的水溶液、5%葡萄糖溶液或其他标准的药学上可接受的赋形剂。标准增溶剂例如聚乙烯吡咯烷酮(PVP)或环糊精也可以作为药物赋形剂用于治疗剂化合物的传递。

[0297] 使用常规方法可以将这里描述的治疗剂化合物配制成适用于其他给药途径的组合物。例如,将PD-1拮抗剂配制成一种胶囊剂或一种片剂,用于口服给药。胶囊剂可以包括任何标准的药学上可接受的材料,例如明胶或纤维素。使用常规方法通过压缩治疗剂组合物和一种固体载体或润滑剂的混合物,可以配制片剂。固体载体的例子包括淀粉和糖斑脱土。PD-1拮抗剂可以以硬壳片剂或者胶囊剂的形式给药,其中包括一种粘合剂,例如乳糖或甘露糖醇,还包括一种常用的填充剂和制片试剂。其他的制剂包括软膏剂、栓剂、糊剂、喷雾剂、贴剂、乳膏剂、凝胶剂、再吸收海绵状物或者泡沫剂。使用本领域内已知的方法就可以制备这些制剂。

[0298] 另外,PD-1拮抗剂可以通过移植固体或再吸收基质给药(或者直接移植入器官(例如,肠或肝脏)中,或者进行皮下植入),所述固体或再吸收基质能够向主体内临近组织和周围组织中缓慢的释放化合物。例如,为了治疗肠胃传染病,所述化合物可以被全身给药(例如,静脉内、直肠或者口服给药)或者局部给药(例如,直接对胃组织给药)。做为选择,含有PD-1拮抗剂的压片或者再吸收海绵状物与胃组织直接接触。PD-1拮抗剂在体内通过药物从所述压片或者聚合基质的腐蚀物中扩散出来而缓慢释放。作为另一个实施例,肝脏的传染病(即,肝炎)可以通过向肝脏脉管系统中注入包含PD-1拮抗剂的溶液来治疗。

[0299] 其中,治疗剂化合物是一种编码PD-1拮抗剂的核酸,所述核酸可以体内给药从而促进编码蛋白质的表达,给药方法可以使将所述核酸构造为适当的核酸表达载体的一部分并给药使其成为细胞内载体(例如,通过使用反转录病毒载体、通过直接注入、通过利用微粒粒子辐射、通过用脂类或者细胞表面受体或者转染试剂包覆、或者通过将所述核酸与已知能够进入细胞核的间源异型框样肽相连给药)(参见,例如,Joliot,et al.,Proc Natl Acad Sci USA 88:1864-1868,1991),等等来进行。做为选择,向细胞内引入核酸治疗剂并通过同源重组或者保持附加体整合到宿主细胞DNA内部,用于进行表达作用。

[0300] 为了局部给药DNA,可以使用标准的基因治疗载体。这种载体包括病毒载体,病毒载体包括来源于具有复制缺陷的肝炎病毒(例如HBV和HCV)、反转录病毒(参见,PCT公开号WO 89/07136;Rosenberg et al.,N.Eng.J.Med.323(9):570-578,1990)、腺病毒(参见,Morsey et al.,J.Cell.Biochem.,Supp.17E,1993)、腺病毒相关病毒(Kotin et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:2211-2215,1990)、复制缺陷型单纯疱疹病毒(HSV;Lu et al.,Abstract(摘要),page 66(第66页),Abstracts of the Meeting on Gene Therapy(基因治疗会议摘要),Sept.22-26(9月22-26日举办),Cold Spring Harbor Laboratory(冷泉港实验室),Cold Spring Harbor(冷泉港),New York(纽约),1992)及其这些载体的

任意改进形式。可以使用任意其他的传递系统在活体内将核酸传递到真核细胞中。例如，所述核酸可以被包装入脂质体，例如阳离子性脂质体(Lipofectin)、受体-调节型传递系统、非病毒核酸-基载体、红细胞影、或微球体(例如，微粒；参见，例如，美国专利第4,789,734号；美国专利第4,925,673号；美国专利第3,625,214号)之中。无保护的DNA也可以被给药。

[0301] 关于核酸抑制剂，治疗有效量是指能够产生医学上所需要的结果的量，例如，能够减少被治疗的动物体内PD-1基因产物的量。本领域普通技术人员可以确定这一量。对任意指定的病人使用的剂量取决于许多因素，包括病人的大小、体表面积、年龄、给药的具体化合物、性别、给药时间和给药途径、健康状况、及同时给药的其他药物。给药剂量是可以变化的，但是静脉内给药DNA的优选剂量是大约106到1022个拷贝的DNA分子。

[0302] 通常，质粒以大约1纳克到大约5000微克的DNA量对哺乳动物给药。理想的是，组合物包括大约5纳克到1000微克的DNA、10纳克到800微克的DNA、0.1微克到500微克的DNA、1微克到350微克的DNA、25微克到250微克的DNA、或100微克到200微克的DNA。作为选择，向哺乳动物给药编码PD-1拮抗剂的重组腺病毒载体可以以至少105、106、107、108、109、1010、或1011空斑形成单位(pfu)的浓度来进行。

[0303] 在一些实施方案中，为了治疗神经系统传染病，可以静脉内给药或者鞘内给药(例如，通过直接向脑脊髓液中输液)PD-1拮抗剂。为了进行局部给药，含有化合物的压片或再吸收海绵状物被放置到直接与中枢神经系统(CNS)组织相接触的位置。化合物或者化合物的组合物在体内通过药物从所述压片或者聚合基质的腐蚀物中扩散出来而缓慢释放。做为选择，所述化合物使用标准方法被注入脑部或者脑脊髓液中。例如，带有导管的毛刺环可以被用作注射进样口，将其放置于颅骨处，使用毛刺部分钻入颅骨中。使用针或者管心针穿过位于毛刺换顶部的隔膜，将液体储存器连接到导管上。导管装置(如美国专利第5,954,687号的描述)提供了一种液体流动途径，该途径适用于液体从脑部、脑部附近、或者脑内部选择的位点传出或者传入脑部、脑部附近、或者脑内部选择的位点，从而在一定时间内完成给药。

[0304] 在其他的实施方案中，为了治疗心脏感染，可以通过直接冠状动脉内注射穿过胸腔壁，或者在荧光检查法指导下使用标准的经皮导管方法，将PD-1拮抗剂传递到心脏组织(例如心肌、心包膜、或心内膜)中。因此，PD-1拮抗剂可以制备被注射到组织中，或者可以从插入体腔的支架或者导管中注入。任何种类的冠状动脉导管或灌流导管都可以用来给药化合物。作为选择，PD-1拮抗剂被包覆或者包含于放入冠状血管中的支架上。

[0305] 肺部传染病可以通过例如吸入PD-1拮抗剂来给药。所述化合物可以以气雾剂喷雾的方式从加压容器或者分散混合器中传递出来，所述加压容器或者分散混合器包括一种适当的推进剂，例如，一种气体，例如，二氧化碳或喷雾器。

[0306] 本领域技术人员应当理解，被治疗的病人可以经受相同的测试来诊断患有持续性感染的主体，或者由于存在一种或者一种以上的风险因素(例如暴露于传染性试剂、暴露于被传染的主体、遗传倾向性或具有先于二次感染的病理学状况)，也可以不经过检查就识别出具有患病风险的人。持续性感染症状或损害的减少还可以包括，但不局限于，症状的减轻、疾病范围的减小、疾病状态的稳定(不恶化)、延缓或者延迟疾病过程、并改善或者减缓疾病状态。治疗过程可以在保健专家的密切监督下在家中进行，或者在卫生保健部门进行。

[0307] 使用这里公开的方法治疗之后，测定免疫反应的方法是本领域内已知的。T细胞的

活性可以通过，例如，检验细胞因子产生的试验、测定T细胞增殖的试验、测量微生物试剂清除作用的试验、和测量CD8+ T细胞细胞毒性的试验来评定。这些实验在美国专利第6,808,710号和美国专利申请公开号20040137577、美国专利申请公开号20030232323、美国专利申请公开号20030166531、美国专利申请公开号20030064380、美国专利申请公开号20030044768、美国专利申请公开号20030039653、美国专利申请公开号20020164600、美国专利申请公开号20020160000、美国专利申请公开号20020110836、美国专利申请公开号20020107363、和美国专利申请公开号20020106730中记载，这些专利或者专利申请在此通过引证全部并入本文。这里描述了B细胞反应的测定，例如记忆B细胞反应的测定。

[0308] 选择性地，通过测定CD8+ T细胞增殖作用的试验(例如，胸腺嘧啶核苷结合、5-溴脱氧尿核苷试验、和细胞周期标记物染色试验(例如，Ki67和CFSE))来评价PD-1拮抗剂增加CD8+ T细胞细胞毒性的能力，例如Dong等人的描述(Nature 5:1365-1369,1999)。在一个实施例中，通过将纯化的T细胞表达的PD-1与PD-1拮抗剂、如上所述的初级活化作用信号和3H-胸腺嘧啶脱氧核苷一起培养来检测T细胞增殖作用。

[0309] CD8+ T细胞细胞毒性还可以通过溶解试验(例如51Cr释放试验或检测穿孔蛋白(perforin)或颗粒酶(granzyme)试验)、检测caspase活化作用的试验、测定微生物试剂从受感染的主体中清除的试验来评价。例如，在来自受感染主体的生物样品(例如，血清、脾脏、肝脏、肺、或病毒聚集的其他组织)中的病毒可以再治疗之前或者之后进行测定。

[0310] 细胞因子，例如IFN、TNF-和IL-2的产生也可以被测定。例如，在有PD-1蛋白拮抗剂和一种初级活化作用信号存在的情况下培养纯化的T细胞。上清液中各种细胞因子的水平可以通过夹层酶联免疫吸附测定实验或者其他实验来测定，例如，Dong等人的文献(Nature 5:1365-1369,1999)中的描述。

[0311] 如果需要的话，PD-1拮抗剂的功效可以通过其诱导T细胞共刺激作用的能力来测定。例如，体外进行T细胞共刺激作用的方法包括提供一种纯化的T细胞，所述T细胞能通过抗CD3单克隆抗体或大戟二萜醇酯，或者通过与II类MHC有关的抗原表达PD-1和第一或者初级活化作用信号。通过本领域已知的若干常规方法中的任意一个，可以检测候选化合物试剂减少PD-1表达或活性，并因此向这些T细胞提供调整免疫功能所需的次级或者共次级信号的能力。

[0312] 对PD-1拮抗剂的B细胞反应可以通过LCMV特异性酶联免疫吸附测定、浆细胞ELISPOT、记忆型B细胞试验、B细胞表型和通过免疫组织化学进行的生发中心分析来测定。

[0313] 治疗方法：采用免疫疗法

[0314] 这里公开的是治疗所关心的主体的方法，例如治疗患有持续性感染或者肿瘤的主体的方法。所述方法包括给药治疗有效量的对所关心的抗原具有特异性的细胞毒性T细胞和一种治疗有效量的PD-1拮抗剂，所关心的抗原例如一种病毒抗原或者一种肿瘤抗原。在一些实施方案中，该方法还包括测定来自主体的样品中记忆B细胞的增殖作用(参见如下)。在另外的实施方案中，该反应包括测定来自主体的样品中的天然B细胞。在进一步的实施方案中，该方法还包括测定表达CD28的T细胞。在一些实施方案中，该方法包括测定中和抗体。因此，这里公开的方法包括测定中和抗体、记忆B细胞增殖作用、天然B细胞和表达CD28的T细胞中的至少一种。通过这里描述的方法可以测定这些参数中的两种或者三种。

[0315] 这里公开的是用于增加免疫反应，例如提高主体内免疫系统的方法。如这里所公

开的，给药纯化的抗原特异性T细胞和PD-1能够通过靶向针对病原体(例如病毒或者细菌)或者赘生物的免疫反应增加主体克服病理学症状的能力，所述病理学症状例如一种传染性疾病或者一种肿瘤。因此，通过从主体体外纯化并产生纯化的选择抗原特异性T细胞，随后引入治疗有效量的细胞，可以提高受体主体的免疫反应。给药治疗有效量的PD-1拮抗剂也可以提高受体的免疫反应。

[0316] 在这里提供了诱导受体对所关心的抗原产生免疫反应的方法。所述受体可以是任意所关心的主体，包括，患有慢性感染的主体，例如，患有病毒性传染病或者真菌性传染病的主体，或者患有肿瘤的主体。这些传染病如以上的定义。

[0317] 免疫缺陷性人群所患的传染病是异源移植干细胞受体和永久地免疫抑制器官移植受体体内常见的问题。这些主体所患的T细胞缺陷性传染病通常是由于已经存在于受体体内的病毒的复活。例如，一旦感染上，大多数疱疹族病毒(例如CMV、EBV、VZV、单纯疱疹病毒(HSV))都是潜伏的，并且被T细胞抑制。然而，当病人通过适应性疗法进行免疫抑制之后，潜伏的病毒开始复活。例如，在进行免疫抑制作用之后，会使CMV复活、能够在B细胞中产生肿瘤的埃-巴二氏病毒(EBV)复活(EBV淋巴组织增生疾病)、和能够造成出血性膀胱炎的BK病毒复活。另外，HIV传染病和先天性免疫缺陷症也是T细胞免疫缺陷症的病例。这些病毒性传染病和复活作用是进行免疫抑制的主体要面临的问题。

[0318] 在一些实施方案中，对进行骨髓移植之后的主体提供针对肿瘤的免疫反应。抗肿瘤免疫作用可以通过向主体给药能够识别肿瘤抗原的抗原特异性T细胞来提供。通过提供能够靶向、识别所关心的肿瘤抗原并与所关心的肿瘤抗原发生反应的T细胞对受体进行给药，能够提高受体对肿瘤的免疫反应。

[0319] 在一个实施例中，任选的，在有PD-1参与的情况下，所述方法包括从供体中分离一种供体细胞群，所述供体细胞群包括T细胞和一种抗原-呈递细胞(APC)，所述抗原-呈递细胞(APC)来自能够呈递所关心的抗原的供体，从而产生所述包括活化的供体CD4+和/或CD8+ T细胞的供体细胞群，所述活化的供体CD4+和/或CD8+ T细胞具有减少的能够识别所关心抗原的同种异性反应T细胞。治疗有效量的供体活化CD4+和/或CD8+细胞进入受体，因此，在受体内产生对所关心的抗原的免疫反应。给药纯化后的抗原特异性T细胞可以通过靶向针对病原体(例如，病毒或者真菌)或者赘生物的免疫反应增加主体克服病理学条件的能力，例如，增加克服传染性疾病或者肿瘤的能力。因此，在受体内产生针对所关心抗原的免疫反应。

[0320] 在一些实施方案中，该方法还包括对主体给药治疗有效量的PD-1拮抗剂。PD-1拮抗剂的给药在上面进行了详细的描述。

[0321] 来自所关心抗原的任意抗原性肽(例如，免疫原性片段)都可以被用于生产对所关心抗原具有特异性的T细胞群。在本领域内已知许多这样的抗原性肽，例如，病毒和肿瘤抗原(参见，例如，表1-3)。这里的公开不局限于使用特异性抗原性肽。来自所关心抗原的具体抗原性肽的例子包括，但是不局限于，病毒抗原、真菌抗原和肿瘤抗原，如表1-3中所示抗原。其他的抗原性肽在本领域内是已知的(例如参见Novellino et al.，Cancer Immunol.Immunother.54(3):187-207，2005和Chen et al.，Cytotherapy，4:41-8，2002，这两个文献在此通过引证并入本文)。

[0322] 虽然表1到表3公开了所关心全长抗原的具体片段，本领域普通技术人员应当理

解，其他的片段或者全长蛋白质也可以在这里公开的方法中使用。在一个实施例中，所关心的抗原是全长抗原序列的“免疫片段”。其中“免疫片段”是指蛋白质的一部分，当主要组织相容性复合体(MHC)的分子中的细胞呈递该蛋白质的一部分时，可以再T细胞活化试验中活化针对细胞表达蛋白质的T细胞。通常，能够结合主要组织相容性复合体(MHC)I类分子的片段是全长抗原的8-12个相邻的氨基酸，当然，也可以使用更长的片段。在一些实施例中，免疫原性片段被能够与抗原呈递细胞(APC)表面上的主要组织相容性复合体(MHC)分子特异性结合的片段，并且不需要进一步的处理抗原决定簇序列。在具体的实施例中，所述免疫原性片段是全长抗原序列中8-50个相邻的氨基酸，例如，全长抗原序列中8-20个氨基酸、8-15个氨基酸、8-12个氨基酸、8-10个氨基酸、或8、9、10、11、12、13、14、15或20个相邻的氨基酸。在某些实施例中，在足够使免疫原性片段与抗原呈递细胞(APC)表面上的主要组织相容性复合体(MHC)分子特异性结合并不需要保内过程的条件下，将抗原-呈递细胞(APC)与免疫原性片段一起培养。

[0323] 在一个实施例中，抗原包括来自所关心抗原的肽以及一种氨基酸序列，所述氨基酸序列含有主体人类白细胞抗原(HLA)分子的结合基序。这些基序在本领域内是为大家所熟知的。例如，人类白细胞抗原(HLA)-A2是一种人类普通等位基因。这些分子的结合基序包括具有9或者10个氨基酸的肽，其中，在第二位点上具有亮氨酸或甲硫氨酸，在最末位点上具有缬氨酸或亮氨酸(参见上述例子)。使用本领域已知的方法可以制备这些基序(例如，重组方法、化学方法等等)。根据所关心抗原氨基酸序列的已有了解，预计能够结合主要组织相容性复合体(MHC)的免疫原性片段序列可以使用公开的有效方法来确定。例如，使用常规方法，在网络上设计的人类白细胞抗原(HLA)结合基序(生物信息学和分子类型分析部分BIMAS)可以用来预测任意肿瘤抗原、病毒抗原或真菌联合抗原的抗原决定簇。然后，使用标准技术可以产生并且纯化所关心的抗原(全长蛋白质或其免疫原性片段)。例如，所关心抗原的抗原决定簇或全长序列可以通过标准方法进行重组合成或者化学合成来生产。基本上纯的肽制备方法会在非还原性聚丙烯酰胺凝胶上产生单一主要条带。在其他的实施例中，所关心的抗原报考已知粗品病毒溶解产物。

[0324] 在一个实施例中，所关心的抗原是一种肿瘤相关抗原，并且所述产生人类白细胞抗原(HLA)结合基序的氨基酸序列是编码亚优势或隐藏的抗原决定簇的基序。相对于其他分子中的抗原决定簇或者与其他结合人类白细胞抗原(HLA)分子的分子相比，对人类白细胞抗原(HLA)分子具有较低竞争结合亲合力的抗原决定簇可以被识别出。

[0325] 通过对单一氨基酸取代的抗原类似物和内源结合天然程序性肽测序，可以识别出相对于某一基序的至关重要的残基，所述基序是与人类白细胞抗原(HLA)抗原分子进行特异性结合所需的基序(参见，例如，Southwood et al.，J.Immunol.160:3363，1998(Southwood等人1998年在“免疫杂志”第160卷3363页的文献)；Rammensee et al.，Immunogenetics 41:178，1995(Rammensee等人1995年在“免疫遗传学”第41卷178页的文献)；Rammensee et al.，J.Curr.Opin.Immunol.10:478，1998(Rammensee等人1998年在“现有免疫学论点”第10卷478页的文献)；Engelhard，Curr.Opin.Immunol.6:13，1994(Engelhard 1994年在“现有免疫学论点”第6卷第13页的文献)；Sette and Grey，Curr.Opin.Immunol.4:79，1992(Sette和Grey 1992年在"现有免疫学论点"第4卷第79页的文献))。此外，人类白细胞抗原(HLA)-肽复合物的X射线结晶学分析显示肽内部的口袋型结

构结合人类白细胞抗原(HLA)分子的裂口,所述人类白细胞抗原(HLA)分子以等位基因-特异性方式通过肽配位体调节残基产生;因此,这些残基能够确定包含这些残基的肽的人类白细胞抗原(HLA)结合力(参见,例如,Madden,Annu.Rev.Immunol.13:587,1995(Madden在1995年的"免疫研究年报"第13卷587页的文献);Smith et al.,Immunity 4:203,1996(Smith等人在1996年的"免疫性"第4卷203页的文献);Fremont et al.,Immunity 8:305,1998(Fremont等人在1998年的"免疫性"第8卷305页的文献);Stern et al.,Structure 2:245,1994(Stern等人在1994年的"结构"第2卷245页的文献);Jones,Curr.Opin.Immunol.9:75,1997(Jones在1997年的"现有免疫学论点"第9卷75页的文献);Brown et al.,Nature 364:33,1993(Brown等人1993年在"自然"第364卷33页的文献))。

[0326] 根据需要治疗的主体选择所关心的抗原,例如,如果主体需要增加抗病毒或抗真菌免疫能力,就要选择一种或一种以上靶病毒或真菌相关的抗原。示范性的所关心的病毒抗原包括从埃巴二氏病毒(EBV)、丙型肝炎病毒(HCV)、巨细胞病毒(CMV)、单纯疱疹病毒(HSV)、BK病毒、JC病毒、和人类免疫缺陷性病毒(HIV)中选择的抗原。示范性的所关心的真菌抗原包括从白色念珠菌、隐球酵母属、子囊酵母菌和组织胞浆菌属或其他的传染性试剂中选择的抗原。在另外的实施例中,主体需要增加抗肿瘤免疫性。示范性的所关心的肿瘤抗原包括WT1、PSA、PRAME。示范性的所关心抗原列在表1中。在某些实施例中,所关心抗原包括病毒抗原和肿瘤抗原、真菌抗原和肿瘤抗原,或病毒抗原、真菌抗原、和肿瘤抗原。

[0327] 为了治疗患有癌症的主体,根据受体肿瘤表达的蛋白质选择所关系的肿瘤抗原。例如,如果受体患有乳腺肿瘤,就选择乳腺肿瘤抗原。如果受体患有前列腺肿瘤,就选择前列腺肿瘤抗原,诸如此类。表2列出了示范性的肿瘤及其各自的肿瘤相关抗原,所述肿瘤相关抗原可用于产生纯化的抗原特异性T细胞,从而会患有特定肿瘤的主体给药。然而,本领域普通技术人员应当理解,相同的肿瘤或者其他肿瘤可以使用其他的肿瘤抗原进行治疗。

[0328] 在一个实施例中,抗原特异性T细胞能够识别一种肿瘤抗原,将治疗有效量的这种抗原特异性T细胞对患有、将会接受干细胞异源移植或自体移植的主体,或者已经接种肿瘤抗原疫苗的主体给药。例如,给药能够识别一种或一种以上肿瘤相关抗原的治疗剂量的抗原-特异性T细胞,所述肿瘤相关抗原例如表2或表3所列的至少一种所关心抗原。

[0329] 在具体实施例中,受体患有肿瘤,并且进行或者将要进行干细胞异源移植,在干细胞异源移植之后给药治疗有效量的供体肿瘤抗原-特异性T细胞和治疗有效量的PD-1拮抗剂,从而预防、减少、或者延迟肿瘤复发,或者治疗恶性增生复发。在进行大块切除术(debulking)之后,对主体引入纯化的抗原特异性T细胞。在依旧另一个实施例中,所述受体用所关心的肿瘤抗原接种疫苗,从受体中纯化出抗原特异性T细胞,随后与治疗有效量的PD-1拮抗剂一起再引入受体中,从而增加受体免疫系统对肿瘤的作用。

[0330] 给药治疗剂量的肿瘤抗原-特异性T细胞和治疗有效量的PD-1拮抗剂,可以起到预防作用,预防肿瘤在受体中复发,或者治疗复发的肿瘤。这种抗原特异性T细胞可以杀死包括肿瘤-相关抗原的细胞,或者可以帮助其他免疫细胞。

[0331] 在具体实施例中,受体患有肿瘤,并且进行或者将要进行干细胞异源移植来重新构建免疫性。在骨髓照射之后或者在给药能够去掉活着反作用骨髓功能的细胞毒类药物之后,给药治疗有效量的至少两种供体抗原特异性T细胞;能够特异性识别病毒相关抗原(或者真菌相关抗原)的抗原特异性T细胞和能够特异性识别肿瘤-相关抗原的抗原特异性T细

胞。另外，治疗有效量的PD-1拮抗剂可以被给药给主体。这种给药方式可以用于诱导抗肿瘤作用和抗病毒作用(例如抗病毒作用)。

[0332] 为了产生抗原特异性T细胞从而对所关心的主体给药，可以使包括T细胞的细胞与抗原-呈递细胞(APC)相接触从而呈递所关心的抗原，所述抗原-呈递细胞(APC)例如树状细胞或者T-抗原-呈递细胞(APC)。在一些实施例中，响应T细胞(例如淋巴细胞或者PBMC)被PD-1拮抗剂处理，并添加到呈递一种或一种以上所关心抗原的抗原-呈递细胞(APC)中，随后，在足够允许呈递抗原的抗原-呈递细胞(APC)和T细胞相互作用产生抗原-特异性T细胞的条件下培养。用PD-1拮抗剂处理响应T细胞，可以与抗原-呈递细胞(APC)相接触同时进行。此外，用PD-1拮抗剂处理响应T细胞，可以发生在与抗原-呈递细胞(APC)相接触之前。

[0333] 因此，这里提供的方法可以用于产生抗原特异性T细胞的富集群体。通常，T-抗原-呈递细胞(APC)向T细胞呈递抗原并以I类(CD8+ T细胞)和II类(CD4+ T细胞)限制方式诱导主要组织相容性复合体(MHC)-限制性反应。典型的T细胞反应被活化并增殖。因此，产生一种群体，该群体包括能够特异性识别所关心的抗原的T细胞。因此，将治疗有效量的这种细胞群体对主体给药，从而产生一种免疫反应，例如，对患有慢性感染或者肿瘤的主体给药。

[0334] 通常，抗原-呈递细胞(APC)和T细胞都是自体移植物。在具体、非限制性实施例中，所述抗原-呈递细胞(APC)和响应T细胞来源于相同的个体。然而，抗原-呈递细胞(APC)和响应T细胞也可以是同种同基因的。抗原呈递细胞(APC)可以用于向自体T细胞中呈递任何抗原。本领域普通技术人员应当理解，结合I类和II类主要组织相容性复合体(MHC)分子的抗原性肽可以被体外产生(例如，代替从细胞全长蛋白质中产生)，并且可以与细胞表面上的I类和II类主要组织相容性复合体(MHC)分子产生相互作用。通常，在I类和II类主要组织相容性复合体(MHC)分子环境中，抗原-呈递细胞(APC)呈递抗原。

[0335] 在一个实施例中，与抗原-呈递细胞(APC)共同培养的所关心的抗原是一种融合蛋白质，该融合蛋白质包括来自所关心的抗原的氨基酸序列(例如所关心的抗原中8-50个相邻的氨基酸，例如，8-15个或者8-12个相邻的氨基酸)。因此，可以像单个抗原性多肽中引入一系列主要组织相容性复合体(MHC)结合抗原决定簇，或者可以使用单链三聚物，其中每种三聚物都具有I类主要组织相容性复合体(MHC)分子、b2小球蛋白和所关心的抗原性肽(参见Nature 2005;vol.436,page 578(2005年的“自然”第436卷，578页))。在某些实施例中，只使用单个抗原，但是在其他的实施方案中，使用超过一个抗原，例如，使用至少2个不同的抗原、至少3个不同的抗原、至少4个不同的抗原、只少个不同的抗原、至少10个不同的抗原、至少15个不同的抗原、至少20个不同的抗原、乃至至少50个不同的抗原。

[0336] 在依旧其他的实施例中，所关心的抗原是一种全长抗原的氨基酸序列(全长真菌抗原、肿瘤抗原、或者病毒抗原，例如病毒溶解产物或者全长组织蛋白酶G)。在额外的实施例中，可以使用来自任意传染性试剂一种或者一种以上的抗原。在某些实施例中，所关心的全长抗原通过抗原呈递细胞(APC)来表达。

[0337] 抗原-呈递细胞(APC)可以通过本领域普通技术人员已知的任意方法来产生(参见，Melenhorst et al,Cytotherapy 7,supp.1,2005;Melenhorst et al.,Blood 106:671a,2005;Gagliardi et al.,Int.Immunol.7:1741-52,1995,这些文献通过引证在此并入本文)。在一个实施例中，为了产生T-抗原-呈递细胞(APC)，使用IL-2和能够特异性结合CD3(例如OKT3)的抗体活化供体周围血液单核细胞大约3天或更长时间，例如，活化大约1-2

个星期，例如，活化大约7到10天。

[0338] 已经观察到，在有呈递抗原参与的情况下，能够识别所述抗原的T细胞比不能特异性识别抗原的T细胞(因此不以抗原特异性方式结合)可以更为有力的结合呈递所关心的抗原的抗原-呈递细胞(APC)。在具体的实施例中，抗原特异性T细胞通过将抗原-呈递细胞(APC)暴露于靶分子肽抗原(例如，一种靶病毒或者肿瘤相关抗原)来选择，所述靶分子肽抗原在有PD-1拮抗剂参与的情况下靶向需要的T细胞，因此，抗原呈递细胞(APC)呈递与I类和/或II类主要组织相容性复合体(MHC)相联系的抗原。例如，抗原-呈递细胞(APC)可以被暴露于足够量的所关心的抗原中，从而充分利用抗原呈递细胞(APC)表面上的主要组织相容性复合体(MHC)分子，例如，至少1％的主要组织相容性复合体(MHC)分子被使用、至少5％、至少7.5％或者至少10％的主要组织相容性复合体(MHC)分子被使用，并且在有PD-1拮抗剂存在的情况下刺激靶分子T细胞与呈递所关心的抗原的抗原-呈递细胞(APC)的优先结合(与不呈递所关心抗原的抗原-呈递细胞(APC)相比较)。然后，在任选存在PD-1拮抗剂的情况下将抗原-呈递细胞(APC)与已经准备好的针对所关心抗原的T细胞群体一起培养，从而优选的活化所述细胞，因此产生一种细胞群体，该细胞群体富集需要的能够识别所关心抗原的T细胞。

[0339] 任选的在有PD-1拮抗剂参与的情况下将T细胞，例如，在PBMC或者淋巴细胞群体中呈递的T细胞与一种或者一种以上所关心的抗原一起培养，从而产生针对一种或一种以上所关心的抗原的T细胞群体。可以使用本领域内任意已知的方法制备T细胞。在具体的实施例中，在有纯化的靶肽抗原参与的情况下，或者任选的，在有PD-1拮抗剂参与的情况下培养PBMC或者淋巴细胞。在某些实施例中，所关心的抗原是一种病毒抗原或者肿瘤抗原，例如，但不仅限于，一个或一个以上表1中所列出的抗原。所关心的抗原可以以一种纯化的形式存在，例如以一种化学合成肽的形式存在。在其他的实施例中，所关心的抗原以一种非纯化的形式存在，例如，以粗品溶解产物，例如一种病毒溶解产物的形式存在。

[0340] 装入T细胞中的抗原的量可以使用本领域内已知的方法方便的确定。通常，如果抗原以纯化后的形式被使用，使用量大约是1-10微克/毫升。当使用病毒溶解产物时，使用量大约是0.1-100毫升的溶解产物，例如大约75毫升的溶解产物。当使用T-抗原-呈递细胞(APC)时，每4-6千万T细胞(或者淋巴细胞或者PBMC)使用大约4-6百万个呈递所关心抗原的T-抗原-呈递细胞(APC)。

[0341] 在具体的实施例中，在允许制备T细胞的条件下，通过将淋巴细胞与可溶性抗原或者病毒溶解产物一起培养5-7天来体外制备淋巴细胞。通过，例如，菲科尔(Ficoll)-3,4-二乙酰胺基-2,4,6-三碘苯甲酸钠离心作用回收能存活的T细胞，从而产生制备的T细胞。如果需要的话，制备的可存活的T细胞可以重新制备一次或者一次以上，例如，通过在与第一次制备相同的情况下将所述T细胞与抗原一起培养另外的5-7天，回收能存活的T细胞。

[0342] 在另一个实施例中，通过用抗原，例如，用疫苗形式的抗原接种主体来体内产生淋巴细胞。在这些实施例中，免疫作用后制备从主体内获得的T细胞。例如，如这里描述的，将从主体处获得淋巴细胞或者PBMC与抗原-呈递细胞(APC)在有PD-1拮抗剂参与的情况下一起培养，不需要进行其他的制备过程。

[0343] 所述方法还可以包括呈递所关心的抗原的抗原-呈递细胞(APC)的产生。例如，在足够使靶分子肽在抗原-呈递细胞(APC)表面上呈递的条件下将抗原-呈递细胞(APC)与足

够量的一种或者一种以上不同的肽一起培养。这一方法会产生一种抗原-呈递细胞(APC)，这种抗原呈递细胞能够在其表面得主要组织相容性复合体(MHC)分子上呈递所关心的抗原。这里公开的方法并不局限于在抗原呈递细胞(APC)表面上呈递所关心的抗原的具体方法。

[0344] 抗原可以被抗原呈递细胞(APC)表达，所述抗原呈递细胞(APC)既可以是天然存在的，也可以是通过插入一种基因来制备的，所述基因包括能够编码靶分子蛋白质(抗原)的DNA序列。编码所关心抗原的核酸可以作为信使RNA，或者使用一种载体，例如哺乳动物表达载体，或者一种病毒载体(例如，腺病毒载体、痘病病毒载体或者反转录病毒载体)被引入T细胞。编码所关心抗原的多聚核苷酸包括能够自动复制质粒或者病毒的重组DNA，或者包括被并入真核生物基因组DNA的重组DNA，或者包括作为独立于其他序列而存在的分离的分子存在的重组DNA。编码所关心抗原的核酸还可以通过使用电穿孔、脂质转染法、或者基于磷酸钙的转染作用来引入。

[0345] 已经构建出许多病毒载体，包括，多形瘤，即，SV40(Madzak et al.,1992,J.Gen.Virol.,73:15331536)、腺病毒(Berkner,1992,Cur.Top.Microbiol.Immunol.(微生物免疫学),158:39-6;Berliner et al.,1988,Bio Techniques(生物技术),6:616-629;Gorziglia et al.,1992,J.Virol.,66:4407-4412;Quantin et al.,1992,Proc.Nad.Acad.Sci.USA,89:2581-2584;Rosenfeld et al.,1992,Cell,68:143-155;Wilkinson et al.,1992,Nucl.Acids Res.,20:2233-2239;Stratford-Perricaudet et al.,1990,Hum.Gene Ther.,1:241-256)、牛痘病毒(Mackett et al.,1992,Biotechnology(生物技术),24:495-499)、腺病毒相关病毒(Muzyczka,1992,Curr.Top.Microbiol.Immunol.,158:91-123;On et al.,1990,Gene,89:279-282)、疱疹病毒，包括单纯疱疹病毒(HSV)、CMV和EBV(Margolskee,1992,Curr.Top.Microbiol.Immunol.,158:67-90;Johnson et al.,1992,J.Virol.,66:29522965;Fink et al.,1992,Hum.Gene Ther.3:11-19;Breakfield et al.,1987,Mol.Neurobiol.,1:337-371;Fresse et al.,1990,Biochem.Pharmacol.,40:2189-2199)、辛德毕斯病毒(H.Herweijer et al.,1995,Human Gene Therapy(人类基因疗法)6:1161-1167;美国专利第5,091,309号和美国专利第5,2217,879号)、甲病毒属(S.Schlesinger,1993,Trends Biotechnol(生物技术发展趋势).11:18-22;I.Frolov et al.,1996,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93:11371-11377)和鸟类反转录病毒(Brandyopadhyay et al.,1984,Mol.Cell Biol.,4:749-754;Petropouplos et al.,1992,J.Virol.,66:3391-3397)、鼠类病毒(Miller,1992,Curr.Top.Microbiol.Immunol(微生物免疫学).,158:1-24;Miller et al.,1985,Mol.Cell Biol.(细胞生物学),5:431-437;Sorge et al.,1984,Mol.Cell Biol.,4:1730-1737;Mann et al.,1985,J.Virol.,54:401-407)和人源病毒(Page et al.,1990,J.Virol.,64:5370-5276;Buchschalcher et al.,1992,J.Virol.,66:2731-2739)。杆状病毒(苜蓿尺蠖多核多角体病毒;AcMNPV)载体在本领域内是已知的，并且是可以在商业上获得的(例如，位于加利福尼亚圣地亚哥的PharMingen公司;位于美国康涅狄格州Meriden的蛋白质科学公司;位于加利福尼亚La Jolla的Stratagene公司)。

[0346] 在一个实施方案中，编码所关心抗原的多聚核苷酸可以被引入病毒载体中用于传递进入抗原呈递细胞。适当的载体包括反转录病毒载体、原痘病毒载体、鸟痘病毒载体、传

染性上皮瘤病毒载体、羊痘病毒载体、猪痘病毒载体、腺病毒载体、疱疹病毒载体、α病毒毒体、杆状病毒载体、辛德毕斯病毒载体、牛痘病毒载体和脊髓灰质炎病毒载体。具体的示范性载体是痘病病毒载体，例如牛痘病毒载体、传染性上皮瘤病毒载体和高驯化的牛痘病毒(MVA)载体、腺病毒载体、杆状病毒载体等等。

[0347] 痘病毒的应用包括，原痘病毒、猪痘病毒、鸟痘病毒、和羊痘病毒。原痘病毒包括牛痘、先天性缺肢畸形、和浣熊痘病毒。原痘病毒应用的一个实施例是牛痘病毒。鸟痘病毒包括传染性上皮瘤病毒、金丝鸟痘病毒和鸽子痘病毒。羊痘病毒包括山羊痘疮和绵羊痘病毒。在一个实施例中，所述猪痘病毒是猪痘。用于表达的痘病毒载体的实施例在例如美国专利第6,165,460号中进行了描述，该专利通过引证在此并入本文。其他可以使用的病毒载体包括其他的DNA病毒以及RNA病毒，其中，所述DNA病毒例如疱疹病毒和腺病毒，RNA病毒例如反转录病毒和骨髓灰质炎病毒。

[0348] 适当的载体公开在例如，美国专利第6,998,252号中，该专利在此通过引证并入本文。在一个实施例中，可以通过加入一种嵌合基因进行合成修饰重组痘病病毒，例如重组牛痘病毒，其中所述嵌合基因包括与侧链DNA序列在功能上等效的牛痘调整序列或者DNA序列，所述侧链DNA序列在天然情况下不与编码所关心抗原的侧链牛痘调整DNA序列相邻。包括这种嵌合基因的重组病毒在表达抗原方便是很有效的。在一个实施例中，疫苗病毒载体包括(A)由(i)编码一种抗原的第一DNA序列和(ii)一种痘病病毒启动子组成的部分，和该部分的侧链，其中，痘病病毒启动子与编码抗原多肽的DNA序列相邻近并且对编码抗原多肽的DNA序列发挥转录控制作用；(B)来自痘病病毒基因组次要区域的DNA。所述病毒载体可以编码一种可选择的标记物。在一个实施例中，所述痘病病毒包括，例如，一种胸腺嘧啶核苷激酶基因(参见美国专利第6,998,252号，该专利在此通过引证并入本文。

[0349] 任选的，在有有效量PD-1拮抗剂参与的情况下，在足够允许呈递抗原的抗原-呈递细胞(APC)和能够特异性免疫该抗原的T细胞(抗原-特异性T细胞)结合的条件下，将能够呈递足够密度抗原的抗原-呈递细胞(APC)群体与T细胞(例如淋巴细胞或者PBMC)一起培养。使用能够表达足够密度抗原的足够量的抗原-呈递细胞(APC)与主要组织相容性复合体(MHC)结合，刺激靶分子T细胞与抗原呈递细胞(APC)的结合。在具体的实施例中，至少20％的抗原-呈递细胞(APC)在抗原呈递细胞(APC)表面的主要组织相容性复合体(MHC)分子上呈递所需的抗原，例如至少30％的抗原-呈递细胞(APC)、至少40％的抗原-呈递细胞(APC)、至少50％的抗原-呈递细胞(APC)、或者至少60％的抗原-呈递细胞(APC)在抗原呈递细胞(APC)表面的主要组织相容性复合体(MHC)分子上呈递所需的抗原。最优T细胞量的增加能够随着所使用的抗原-呈递细胞(APC)的量而变化。在一些实施例中，T细胞:抗原-呈递细胞(APC)的比例至少是6:1，例如至少是8:1，至少是10:1，至少是12:1，至少是15:1，至少是16:1，至少是20:1，乃至至少是50:1。

[0350] 为了增加抗原特异性T细胞的数目，可以在有细胞因子，例如IL-2、IL-7、IL-12和IL-15参与的情况下培养来刺激细胞增殖。加入的细胞因子的量足够刺激T细胞的产生和增殖，并且可以使用常规方法确定。在某些实施例中，IL-2、IL-7、IL-12和IL-15的加入量是大约0.1-100IU/毫升，例如至少1IU/毫升、至少10IU/毫升、或者至少20IU/毫升。

[0351] 在足够量的抗原特异性T细胞与抗原-呈递细胞(APC)结合之后，产生能够特异性识别所关心抗原的T细胞。从而产生富集(例如纯化)抗原-特异性T细胞的群体，所述抗原特

异性T细胞对所关心的抗原具有特异性。在某些实施例中，所得的对所关心抗原具有特异性的T细胞群体至少30％是纯的，例如，至少40％是纯的，或者至少50％是纯的。使用本领域普通技术人员已知的任意方法可以评价抗原特异性T细胞群体的纯度。

[0352] 在一个实施例中，在刺激抗原特异性T细胞增殖期间，可以对细胞计数，从而确定细胞数目。当达到理想的细胞数时，确定其纯度。例如，可以通过使用呈递在抗原特异性T细胞表面上的标记物来确定纯度，同时评价抗原识别过程中细胞因子的产生，所述细胞因子，例如，干扰素(IFN)γ、肿瘤坏死因子(TNF)α、白细胞间介素(IL)-2、白细胞间介素(IL)-10、转化生长因子(TGF)β_1或者白细胞间介素(IL)-4。通常，抗原特异性T细胞对于CD3标记物、CD4标记物或者CD8标记物、和干扰素(IFN)-γ(对于活化的T细胞具有特异性)是阳性的。例如，使用不同颜色的抗CD3、抗CD4、抗CD8和抗IFN-γ进行荧光活化的细胞分类法(FACS)可以识别(同时，如果需要的话，分类)对于CD3标记物、CD4标记物或者CD8标记物、和干扰素(IFN)-γ有特异性的细胞群体。简要地，在有抗CD3、抗CD4、抗CD8和抗IFN-γ(分别附有不同的荧光基团)参与的情况下培养经过刺激的T抗原-特异性细胞，培养时间应足够抗体结合到细胞上。在除去未结合的抗体之后，使用常规方法进行荧光活化的细胞分类法(FACS)对细胞进行分析。抗原特异性T细胞是干扰素(IFN)γ阳性的、CD8阳性的或者CD4阳性的。在具体实施例中，所得抗原性T细胞群体相对于总的CD4+或者CD8+阳性细胞具有至少30％的纯度，例如相对于总的CD4+或者CD8+阳性细胞具有至少40％的纯度、至少50％的纯度、至少60％的纯度、或者至少70％的纯度。

[0353] 在另一个实施例中，该方法进一步包括确定抗原特异性T细胞的细胞毒性。用于确定细胞毒性的方法在本领域内是已知的，例如^{51}Cr-释放试验(例如，参见Walker et al.Nature 328:345-8,1987;Qin et al.Acta Pharmacol.Sin.23(6):534-8,2002;这些文献在此通过引证并入本文)。

[0354] 可以对抗原特异性T细胞进行一轮或者一轮以上的筛选过程，来增加抗原特异性T细胞的纯度。例如，经过上述步骤产生的纯化后的抗原特异性T细胞再次与呈递所关心抗原的抗原-呈递细胞(APC)一起在PD-1拮抗剂存在的情况下，在足够允许抗原-呈递细胞(APC)和纯化的抗原特异性T细胞结合的条件下培养。例如用白细胞间介素(IL)-2刺激所得的抗原特异性T细胞增殖。通常，经过连续使用抗原-呈递细胞(APC)刺激之后产生的能够与所关心抗原发生免疫反应的抗原特异性T细胞比只经过一轮筛选的抗原特异性T细胞更为纯净。在一个实施例中，产生的纯化的抗原特异性T细胞相对于所有存在的CD3+细胞具有至少90％的纯度，例如，具有至少95％的纯度或者至少98％的纯度。在一个具体的实施例中，产生的纯化后的抗原特异性T细胞相对于所有存在的CD4+细胞具有至少95％的纯度，例如，具有至少98％的纯度。在另一个实施例中，产生的纯化后的抗原特异性T细胞相对于所有存在的CD3+细胞具有至少90％的纯度，例如，具有至少93％的纯度。

[0355] 这里公开的内容还提供了一种治疗剂组合物，所述治疗剂组合物包括所述富集(例如纯化的)抗原-特异性T细胞和PD-1拮抗剂。在特定的实施例中，所得富集抗原特异性T细胞的群体(对所关心抗原具有特异性)以一种治疗剂量形式对需要的主体给药。所述PD-1拮抗剂也可以以治疗剂量形式对需要治疗的主体给药。

[0356] 在一个实施例中，产生的纯化的抗原特异性T细胞相对于所有存在的CD3+细胞具有至少30％的纯度，例如，具有至少40％的纯度、至少50％的纯度、至少80％的纯度、至少

90％的纯度、至少95％的纯度，或者至少98％的纯度。在另一个实施例中，产生的纯化的抗原特异性T细胞相对于所有存在的CD3+细胞具有至少50％的纯度，例如，具有至少60％的纯度、至少75％的纯度、至少80％的纯度、至少90％的纯度、至少93％的纯度。在低温贮藏之前或者在对受体输液之前，对扩展并选择的抗原特异性T细胞进行支原体试验、灭菌试验、内毒素试验和性质对照物试验，验证其功能和纯度。

[0357] 对主体给药治疗有效量的抗原-特异性T细胞。治疗有效量的纯化的抗原特异性T细胞的具体、非限制性实施例包括以大约$1X10^5$细胞每千克主体体重到大约$1X\ 10^9$细胞每千克主体体重给药的纯化后的抗原特异性T细胞，例如，从大约$1X\ 10^6$细胞每千克主体体重到大约$1X\ 10^8$细胞每千克主体体重，例如，从大约$5X\ 10^6$细胞每千克主体体重到大约$75X\ 10^6$细胞每千克主体体重，例如从大约$25X\ 10^6$细胞每千克主体体重到大约$50X\ 10^6$细胞每千克主体体重。

[0358] 纯化的抗原特异性T细胞可以以单一剂量或者多剂量形式给药，给药形式由临床医生决定。例如，根据要求的反应或者获得的反应，所述细胞可以每隔大约2个星期给药。在某些实施例中，一旦获得理想的反应，就不在给药抗原特异性T细胞。然而，如果受体显示一种或一种以上与传染病有关的症状或者存在肿瘤或者肿瘤生长，可以对患者给药治疗有效量的抗原特异性T细胞。给药可以是局部给药或者全身给药。

[0359] 这里公开的纯化的抗原特异性T细胞可以与一种药学上可接受的载体一起给药，例如，与一种盐一起给药。所述PD-1拮抗剂可以在如上所述的药学上可接受的载体中配制成制剂。在某些实施例中，其他的治疗剂可以与抗原特异性T细胞和PD-1拮抗剂一起给药。根据需要的作用，其他的治疗剂可以在给药抗原特异性T细胞之前、期间、或者之后给药。示范性的治疗剂包括，但是不局限于，抗微生物试剂、免疫刺激剂例如干扰素-α、化学治疗剂或者用来体外刺激T细胞的抗原的肽疫苗。在具体的实施例中，包括纯化的抗原特异性T细胞的组合物还可以包括一种或一种以上治疗剂。

[0360] 治疗方法和评价

[0361] 这里公开了给药治疗有效量的PD-1拮抗剂的方法，从而影响B细胞，例如，增加记忆B细胞的增值作用。这里提供了治疗方法，包括如上所述的对主体给药PD-1拮抗剂。这些方法包括测定B细胞，例如，但不局限于测定主体中记忆B细胞的增殖。在一些实施例中，该方法包括测定来自主体的样品中的天然B细胞。在一些实施例中，该方法包括测定CD28T细胞和/或测定针对所关心抗原的中和抗体。因此，这些方法可以包括测定记忆B细胞的增殖作用、天然B细胞、CD28T细胞核中和抗体中的一种或者一种以上。

[0362] 这里还提供了在治疗并测定PD-1拮抗剂对多种传染病和癌症的功效的方法。这里的公开包括确定治疗方法是否对所关心的主体有效。在这些方法中，选择所关心的主体，例如患有持续性传染病或者癌症的主体。对该主体给药治疗有效剂量的PD-1拮抗剂。在一些实施例中，评估记忆B细胞增殖作用可以确定治疗方法是否有效，和/或确定PD-1拮抗剂的剂量是否需要改变。在其他的实施例中，这些方法包括测定天然B细胞。在进一步的实施例中，该方法包括测定CD28T细胞和/或测定针对所关心抗原的中和抗体。因此，这些方法可以包括测定记忆B细胞的增殖作用、天然B细胞、CD28T细胞核中和抗体中的一种或者一种以上。

[0363] 主体可以是任意哺乳动物，例如，人、灵长类动物、老鼠、小鼠、狗、猫、牛、马和猪。

在一些实施例中，所述主体是一种灵长类动物，例如，人。在其他的实施例中，所述主体是一种鼠科动物，例如，老鼠。在一些实施方案中，所述主体具有发展成传染病的风险，如上所述。所述具有发展成传染病风险的主体是还没有具有患上所述传染病，但是已经被所关心的传染性试剂感染的主体。在其他的实施例中，被选者进行治疗的主体患有传染病，例如患有持续感染。在其他的实施方案中，所述主体具有发展成癌症的风险或者已经患有癌症，如上所述。这些主体可以通过本领域普通技术人员，例如医生，已知的标准方法来确认。这里描述的方法包括选择所关心的主体，并给药PD-1拮抗剂，如上所述。然后评价记忆B细胞增殖作用。在一些实施例中，还评价天然B细胞数量。

[0364] 在一些实施方案中，所述主体患有由细菌、病毒、真菌、或者寄生物造成的持续性传染病，如上所述。对该主体给药治疗有效剂量的PD-1拮抗剂来治疗该主体。然后评价记忆B细胞的增殖作用，从而确定治疗方法是否有效，和/或从而确定PD-1拮抗剂的剂量是否需要改变。与急性传染病所不同的是，持续性传染病通常不能通过诱导宿主免疫发应而有效的清除。感染试剂与免疫反应维持平衡状态，从而使受到感染的个体在很长一段时间内维持感染状态但不需要表现出任何症状。持续性传染病包括例如，潜伏性感染、慢性感染和缓慢感染。持续性传染病由某些病毒感染所造成，所述病毒例如人类T细胞白血病病毒，XMRV病毒，多瘤JC病毒，埃-巴二氏病毒，巨细胞病毒，疱疹病毒，水痘带状疱疹病毒，麻疹，乳多空病毒，朊病毒，肝炎病毒，腺病毒，细小病毒和乳头状病毒。其他的持续性传染病如上所述。这些方法可以包括测量天然B细胞、CD28T细胞和/或中和抗体。

[0365] 在进一步的实施方案中，所述主体患有癌症。对该主体给药治疗有效量的PD-1拮抗剂来治疗癌症，如上所述。然后测定记忆B细胞的增殖作用从而确定治疗方法是否有效，和/或从而确定PD-1拮抗剂的剂量是否需要改变。在一些实施例中，同时对主体给药治疗有效量的肿瘤抗原或者编码肿瘤抗原的核苷。PD-1拮抗剂和肿瘤抗原或者编码肿瘤抗原的核苷可以同时或者顺序给药。这些方法可以包括测定天然B细胞、CD28T细胞和/或中和抗体。

[0366] 在其他的实施方案中，该主体被给药治疗有效剂量的对所关心抗原具有特异性的细胞毒性T细胞和治疗有效剂量的PD-1拮抗剂，所述所关心抗原例如病毒抗原或者肿瘤抗原。如这里所公开的，给药纯化地抗原-特异性T细胞和PD-1能够通过靶向针对病原体(例如细菌或者真菌)的免疫反应或者通过靶向赘生物，增加主体克服病理学情况的能力，所述病理学情况例如传染病或者肿瘤。因此，体外扩增并生成来自主体的被选择的抗原特异性T细胞并引入治疗有效量的这些细胞，能够提高受体主体的免疫反应。给药治疗有效量的PD-1拮抗剂还可以提高受体的免疫反应。然后评价记忆B细胞增殖作用，从而确定这种治疗方法是否有效，和/或从而确定PD-1拮抗剂和/或细胞毒性T细胞的剂量是否需要改变。这些方法可以包括测定天然B细胞、表达CD28的(CD28+)T细胞和/或中和抗体。

[0367] 因此，这里描述的确定PD-1拮抗剂是否有效，和/或确定PD-1拮抗剂的剂量是否有效的方法可以与以上描述的任意一种方法(在任意一种主体中)结合使用。

[0368] 在一些实施方案中，测定记忆B细胞。与参照相比，来自生物学样品的记忆B细胞增殖作用的增加表示该PD-1拮抗剂的剂量能够有效的治疗主体，当与参照相比，记忆B细胞增殖作用不存在明显变化时，说明PD-1拮抗剂的剂量不能有效的治疗主体。

[0369] 在其他的实施方案中，该方法包括检测来自主体的生物样品中的中和抗体，当与参照相比中和抗体增加时，表示该PD-1拮抗剂的剂量能够有效的治疗主体，当与参照相比，

中和抗体不存在明显变化时，说明PD-1拮抗剂的剂量不能有效的治疗主体。在进一步的实施方案中，该方法包括检测来自主体的生物样品中表达CD28(CD28+)的T细胞，其中，当与参照相比CD28+T细胞增加时，表明该PD-1拮抗剂的剂量能够有效的治疗主体，当与参照相比，CD28+T细胞不存在明显变化时，说明PD-1拮抗剂的剂量不能有效的治疗主体。这些测定可以在测定记忆B细胞之外进行，也可以不测定记忆B细胞只进行这些测定。

[0370] 这里还公开了其他用于确定一种特定的PD-1拮抗剂、或者特定剂量的PD-1拮抗剂是否能够有效治疗主体的方法。这些方法包括测定记忆B细胞的增殖作用，例如，测定来自主体的样品中记忆B细胞的增殖作用。这些方法还包括测定来自主体的样品中天然B细胞。例如，CD27、CD20和CD21的表达被提高(参见如下)。在一些实施例中，在给药PD-1拮抗剂足够长时间之后进行记忆B细胞和/或天然B细胞的测定，从而降低主体中PD-1的活性。

[0371] 这些方法还可以用于评价能够有效治疗主体的PD-1拮抗剂的剂量。例如，这里公开的方法可以被用于确定对所关心的主题给药的剂量是否可以减少并且依然有效。这里公开的方法还可以用于确定对主体给药的剂量是否过低，是否必须增加剂量才能达到治疗有效性。

[0372] 在一些实施方案中，对主体给药第一剂量的PD-1拮抗剂。与参照相比，记忆B细胞的增殖作用增加，说明该剂量是有效的。在一些情况下，降低对主体给药的试剂的量是有好处的，例如，可以减低副作用。因此，如果第一剂量能够增加记忆B细胞的增殖作用，就可以对主体给药较低的第二剂量的PD-1拮抗剂，从而获得包括B细胞的第二样品。与参照相比，第二样品中记忆B细胞增殖作用的增加表示第二剂量的PD-1拮抗剂能够有效的治疗主体，从而确定较低的伎俩对于治疗主体也是治疗有效的。如果与参照相比，第二样品中的记忆B细胞增殖作用不存在显著的改变，则说明第二剂量的PD-1拮抗剂不能治疗有效的治疗主体。重复进行这一方法从而确定对所关心主体最低的治疗有效剂量。

[0373] 在其他的实施方案中，对主体给药第一剂量的PD-1拮抗剂。与参照相比，记忆B细胞的增殖作用没有增加表面该剂量不能治疗有效的治疗主体。如果第一剂量没有增加记忆B细胞的增殖作用，就对主体给药更高剂量的第二剂量，从而获得包含B细胞的第二样品。与参照相比，来自第二样品的记忆B细胞的增殖作用如果增加，则说明具有更高剂量的PD-1拮抗剂的第二剂量能够有效的用于治疗主体，从而确定这种更高的剂量对于治疗主体是治疗有效的。如果与参照相比，来自第二样品的记忆B细胞的增殖作用也不存在显著的变化，则说明PD-1拮抗剂的第二剂量也不能治疗有效地治疗主体，因此，需要剂量更高的第三剂量。因此，重复进行这一方法直到确定所关心主体治疗有效的剂量。

[0374] 这里公开的方法还可以用于确定某一特定的PD-1拮抗剂是否能够治疗有效的治疗主体，并且是否应该继续，或者用于确定这种特定的PD-1拮抗剂不能有效的治疗主体，因此应该使用不同的PD-1拮抗剂治疗主体。这些方法包括对主体给药某一特定的PD-1拮抗剂并评价来自该主体的样品中记忆B细胞的增殖作用。与参照相比，该主体中记忆B细胞增殖作用的增加说明该PD-1拮抗剂能改有效的治疗主体。与参照相比，该主体内记忆B细胞增殖作用不存在显著变化说明这种特定的PD-1拮抗剂不能治疗有效的治疗主体，因此，应该对主体给药不同的PD-1拮抗剂或者其他治疗剂。

[0375] 因此，使用这里描述的方法可以监测具体PD-1拮抗剂的功效或者确定PD-1拮抗剂的有效剂量。通常，与参照相比，来自给药PD-1拮抗剂的主体的样品中记忆B细胞增殖作用

的增加表明这种PD-1拮抗剂对主体是治疗有效的，和/或表面这一剂量足以治疗主体。

[0376] 通常，测定记忆B细胞的增殖作用包括从主体中获得包括B细胞的样品，并且确定该样品中是否存在增殖的记忆B细胞或者确定该样品中增殖的记忆B细胞的数量。在一些实施例中，所述样品是组织活检样品、血液样品、或者外周血单核细胞样品。例如，对所得样品进行纯化从而分离B细胞，例如，记忆B细胞和/或天然B细胞。在一些实施方案中，这些方法包括测定来自给药所关心的PD-1拮抗剂的主体的样品中，增殖的记忆B细胞的量和/或天然B细胞的量。在一些实施例中，将增殖的记忆B细胞的量和/或天然B细胞的量与惨叫相比较。对于增殖的记忆B细胞，所述参照可以是之前确定的标准值，或者是没有给药PD-1拮抗剂的主体内的增殖的记忆B细胞的量，或者是给药参照物质，例如只给药媒介物的主体内增殖记忆B细胞的量。相似的，对于天然B细胞，所述参照分别可以是之前确定的标准值，或者是没有给药PD-1拮抗剂的主体内的天然B细胞的量，或者是给药参照物质，例如例如只给药媒介物的主体内天然B细胞的量，或者是主体内天然B细胞的量。

[0377] 在一些实施例中，识别能够表达CD27的记忆B细胞，例如，与天然B细胞相比，能够表达CD20和CD27但是不表达CD21($CD20^{+}CD27^{+}CD21^{-}$)的细胞，天然B细胞能够表达CD20和CD21但不能够表达CD27($CD20^{+}CD27^{-}CD21^{+}$)。分离记忆B细胞和天然B细胞，和/或使用能够特异性结合CD20、CD21、和CD27的抗体进行检测。在一些实施方案中，记忆B细胞表达CD27($CD27^{+}$)。在一些实施例中，记忆B细胞被命名为$CD27^{+}CD21^{-}$B细胞，例如，$CD20^{hi}/CD21^{-}/CD27^{+}$(活化的记忆)。

[0378] 用于分离和检测B细胞的方法在本领域内是已知的，这里提供了示例性的方案。用于测定记忆B细胞增殖作用的方法和用于测定天然B细胞的方法在本领域内也是已知的。这些方法通常包括使用分子和/或生物化学技术，而不是单纯的视觉观察。在一些实施例中，使用荧光活化的细胞分类法(FACS)。通过将细胞与合适的标记抗体相接触，荧光活化的细胞分类法(FACS)可以用于分类(分离)细胞，例如不成熟的B细胞或者分化的血浆细胞或者记忆细胞。在一个实施方案中，可以使用一些抗体(例如结合CD27、CD20、CD21、CD45R、CD40、CD19的抗体，和/或IgM)和荧光活化的细胞分类法(FACS)生产基本上纯的不成熟B细胞、血浆细胞和/或记忆B细胞群落。

[0379] 测定来自主体的样品中CD28T细胞的方法也是已知的。这些方法通常包括使用分子和/或生物化学技术，而不是单纯的视觉观察。在一些实施例中，使用荧光活化的细胞分类法(FACS)。通过将细胞与合适的标记抗体相接触，荧光活化的细胞分类法(FACS)可以用于分类(分离)细胞，例如不成熟的B细胞或者分化的血浆细胞或者记忆细胞。在一个实施方案中，可以使用一些抗体(例如结合CD3,CD4,CD8和CD28的抗体)和荧光活化的细胞分类法(FACS)生产基本上纯的CD28+T细胞。用于检测中和抗体的方法在本领域内也是已知的。这些实验包括获得生物学样品和检测抗体与所关心的抗原的结合，以及例如，对于病毒来说，具体的中和作用实验，例如，对于HIV来讲。

[0380] 在其他众多精密的检测水平中，荧光活化的细胞分类法(FACS)使用多种色道、低角度和钝角光散射检测管和全电阻通道来分离或者分类细胞。只要不对多关心的细胞存活性产生伤害，就可以使用荧光活化的细胞分类法(FACS)。(荧光活化的细胞分类法(FACS)的示例性方法参见美国专利第5,061,620号)。

[0381] 但是，也可以使用哪个具有不同功效的其他技术来纯化或者分离所需的细胞群。

所使用的分离技术应该能够最大程度上保留所选择的细胞部分的存活能力。当然，所使用的具体技术应该取决于分离的功效、方法的细胞毒性、分离的方便程度和速度，以及需要什么样的仪器和/或技术能力。

[0382] 分离方法包括磁分离技术，使用包覆抗体的磁珠、亲和色谱、细胞毒性试剂、与一种单克隆抗体一起或者与补体相结合使用，分离方法还包括“淘选”，即使用一种与固体基质相附着的单克隆抗体，以及其他常见的技术。与磁珠和其他固体基质相附着的抗体能够用于直接分离，所述其他固体基质例如琼脂糖珠，聚苯乙烯珠，中空纤维膜和塑料培养皿。通过简单的将固体支持物从细胞悬浮液中物理分离出来就可以将与抗体相结合的细胞从细胞悬浮液中分离出来。与固相结合抗体相连的细胞的精确培养条件和培养时间取决于所使用系统所特有的多种因素。然而，本领域普通技术人员已知如何选择合适的条件。

[0383] 在能够表达所关心的标记物(例如，CD45R或者CD27)的细胞与和固相相连接的抗体结合足够长的时间之后，使用生理缓冲液习题或者冲洗未结合的细胞。然后，主要根据所使用的固相和抗体的性质，使用合适的方法，从固相中分离结合的细胞。

[0384] 抗体可以与生物素相结合，生物素可以在随后使用与支持物结合的亲和素或者链霉亲和素除去，或者在荧光活化的细胞分类法(FACS)中使用荧光染料除去，从而完成细胞分离。

[0385] 例如，通过CD45R或者CD27的细胞表面表达，表达CD45R和/或CD27的细胞首先从其他细胞中分离出来。在一个具体的非限制性实施例中，使用磁珠分离方法可以阳性筛选出$CD45R^+$或者CD27+细胞，其中，所述磁珠上包覆着对CD45R或者CD27具有反应性的单克隆抗体。然后从这些磁珠上移出$CD45R^+$或者CD27+细胞。

[0386] 通过培养释放或者其他方法可以使$CD45R^+$或者CD27+细胞从磁珠上释放出来。然后，如果需要的话，使用例如，FACSCAN®流式细胞仪(Becton Dickinson,San Jose,CA)，检查分离的$CD45R^+$或者CD27+细胞的纯度。在一个实施方案中，进行进一步的纯化作用，例如，使用荧光活化的细胞分类法(FACS)对从磁珠上释放的细胞群进行分类。在一个实施例中，为了检测或者分离不成熟的B细胞进行这种分类，从而检测II类MHC、IgM、CD19和CD40的表达。在另一个实施例中，除了II类MHC、IgM、CD19和CD40之外，在表达IgD和/或CD21的基础上分离和/或检测成熟B细胞。

[0387] 分析B细胞增殖作用的方法，例如记忆B细胞增殖作用的评价方法在本领域内是已知的。例如，可以使用膜染色稀释方法，这种方法包括用荧光染料对所关心的细胞进行体外化学标记。可以使用氚化了的核酸类似物(通常是^{3}H-胸腺嘧啶脱氧核糖核酸，^{3}H-TdR)或者溴代脱氧尿苷(BrdU)进行标记、使用FACS分析测定BrdU的整合。还可以使用增殖作用的代替性标记物，例如DNA物质和细胞周期相关的蛋白质。

[0388] 在一个实施例中，可以使用ki67或者PCNA的测定。Ki67抗原是一种原核细胞周期相关的核蛋白，在整个活细胞周期的各个阶段(G1,S,G2和M阶段)都可以被增殖细胞表达。这种蛋白不存在与静止态(G0)的细胞中。Ki67抗体能够有效的建立增殖作用。Ki67抗体能够用于从静止态细胞中定量增殖中的细胞(ki67指数)。Ki67是常规使用的细胞循环和增值作用的标记物；针对ki67的抗体是可以商业购得的，例如从ABCAM®，在免疫组织化学分析和FACS分析中这些方法可以有效使用这些抗体。

[0389] 在取样时，还可以使用其他方法来检测处于活性细胞周期中的细胞。在包含细胞

的生物样品中，使用能够利用稳定的同型体标记DNA的方法可以检测白细胞的增殖作用，例如记忆B细胞的增殖作用。通过从头合成途径(de novo synthesis pathway)可以统一的并且高度标记DNA。使用稳定的同型体标记物，例如2H-葡萄糖或者重水(^2H_2O或者$H_2{}^{18}O$)，对动物和人类是无毒的，因此通常被美国食品与药品管理局(FDA)认为是安全的(参见美国专利申请公开号2009/0155179)。稳定的同型体标记物整合入白细胞DNA的测量方法包括以下步骤：(i)从核染色质中提取DNA或者DNA从核染色质中释放，不需要进一步的分离，将DNA水解成为脱氧核糖核苷，(ii)从嘌呤脱氧核糖核苷中选择性的释放脱氧核糖，(iii)将嘌呤脱氧核糖衍生为一种挥发性衍生物(例如戊烷四乙酸，五氟甲苯四乙酰衍生物，或其他合适的衍生物)，这种挥发性衍生物适用于气相色谱/质谱(GC/MS)分析，(iv)对所述衍生物进行气相色谱/质谱(GC/MS)分析，(v)分析所述衍生物的同位素异位体质量丰度模式，和(vi)计算该模式的过量富集值，即，测量稳定的同型体整合。这些方法的具体实施方案已经被教导了(参见美国专利第5,910,40号)。

[0390] 体外实验

[0391] 这里公开了筛选PD-1拮抗剂的方法。这些方法包括确定所关心的试剂是否是一种PD-1拮抗剂。因此，这些方法包括对大量试剂进行筛选确定他们是否起到PD-1拮抗剂的作用。这里存在一系列化合物、小分子或抗体，并且该实验可以以高通量方式进行。

[0392] 这些方法还包括却具体的PD-1拮抗剂是否能够有效的治疗具体的所关心个体。因此，这里公开的方法可以用于“私人药物”，其中所述细胞群来自具体的所关心的个体，对大量潜在的PD-1拮抗剂进行试验确定最适合用于治疗特定个体的PD-1拮抗剂。

[0393] 这些方法包括，将包括记忆B细胞的分离的细胞群与一种试剂体外接触。在一些实施方案中，所述细胞群是外周血单核细胞或者纯化的记忆B细胞，例如，活化的记忆B细胞或者静止态的记忆B细胞。在一些实施例中，所述细胞群是记忆B细胞株。

[0394] 这些方法可以包括检测记忆B细胞的增殖作用和/或检测记忆B细胞分化成为抗体分泌细胞。在一些实施方案中，这里描述的方法包括检测IgM、IgG和抗体生成B细胞的实验。这些实验可以是ELISPOT实验。ELISPOT实验使用的技术与三明治酶联免疫吸附试验(ELISA)技术非常相似。将单克隆捕获抗体或者多克隆捕获抗体无菌包覆在PVDF(聚偏氟乙烯)-底板上。根据这些抗体对待检查的分析物的特异性进行选择。通常，平板被一种血清蛋白所封闭，所述血清蛋白不与试验中使用的任何抗体发生反应。在此之后，沿着抗原或者促细胞分裂剂将所关心的细胞以不同的密度涂布，然后放置在具有加湿作用的37℃CO_2的培养器中培养特定的时间。

[0395] 在高表面面积PVDF膜上，使用包覆的抗体原位捕获由活化的细胞分泌的细胞因子(或其他所关心的细胞产物，例如IgM或者IgG抗体)。洗涤小孔除去细胞、废物和媒介物成分，向小孔中加入对所选择的分析物具有特异性的生物素化的多克隆抗体。该抗体与靶分子不同的抗原决定簇发生反应，因此被用于检测所关心的捕获产物。在洗涤除去为结合的生物素化抗体之后，观察检测的产物，例如，使用一种亲和素酶和一种酶沉淀物。有颜色的终产物(斑点，通常是有颜色的)一般代表一个单独的生产产物的细胞。对这些斑点进行人工计数(例如，使用解剖显微镜)或者使用自动阅读器获得微孔图像，从而分析斑点数和大小。

[0396] 还要评价记忆B细胞的增殖作用。这里描述了合适的实验(参见上述)。用于分析B

细胞增殖作用的方法，例如评价记忆B细胞增殖作用的方法在本领域内是已知的。例如，可以使用膜染色稀释法(通常是^{3}H-胸腺嘧啶脱氧核糖核酸，^{3}H-TdR)或者溴代脱氧尿苷(BrdU)。可以使用FACS分析来测定BrdU的整合。还可以使用增殖作用代替性标记物，例如DNA成分或者细胞周期相关的蛋白质。在一个实施例中，可以使用ki67或者PCNA的测定。在取样时，也可以使用其他的方法来确定处于活性细胞周期中的细胞。在包含细胞的样品中，使用利用稳定的同型体标记DNA的方法可以测定白细胞的增殖作用，例如记忆B细胞的增殖作用。下面实施例部分提供了这一实验的一种示例性但非限制性的方案。

[0397] 总之，记忆B细胞增殖作用的增加和/或记忆B细胞分化成抗体分泌细胞的增加和/或抗体产量的增加，说明该试剂是一种PD-1拮抗剂。记忆B细胞增殖作用的增加、和/或记忆B细胞分化成为抗体分泌细胞的增加、和/或抗体产量的增加表明具体的PD-1拮抗剂能改有效的治疗主体。

[0398] 这里公开的内容通过以下的非限制性实施例来说明。

[0399] 实施例

[0400] 实施例1:在慢性感染的小鼠体内使用抗PD-L1抗体抑制PD-1途径

[0401] 感染有不同淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)的老鼠被用于研究慢性病毒性传染对CD8+ T细胞功能的作用。淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)Armstrong菌株会造成一种急性传染，这种急性传染在8天内会明显的显示出来，产生使用期长的高功能性的、记忆存储的CD8+ T细胞。相反，所述淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)Cl-13菌株会在宿主体内产生持续性感染，这种感染会导致持续长达3个月的病毒败血症。这种病毒保持在某些不确定的组织中，抗原特异性CD8+ T细胞的功能被减弱。当存在DbGP33-41和DbGP276-286 CD8+ T细胞但是这些细胞没有增值能力或者分泌抗病毒细胞因子能力时，DbNP396-404CD8+ T细胞从身体上消失，所述抗病毒细胞因子例如干扰素(IFN)-γ和TNF-α。

[0402] 从国家癌症研究所(Frederick,MD)购买C57BL/6老鼠。通过对老鼠进行静脉注射2x10^{6}pfu的淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)-Cl-13感染小鼠。在传染当天和传染之后第一天向小鼠注射500微克在磷酸缓冲液中的GK1.5排除CD4。对老鼠进行腹膜内注射2x105pfu淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)Armstrong菌株产生淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)免疫的老鼠。

[0403] 对荧光活化细胞分类法(FACS)-纯化的天然DbGP33-41特异性P14转基因CD8+ T细胞、来源于淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)Armstrong株免疫老鼠的DbGP33-41特异性记忆CD8+T细胞和来源于CD4+耗尽的淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)Cl-13感染老鼠的DbGP33-41特异性或者DbGP276-286特异性CD8+ T细胞进行基因排列分析。按照Kaech等人的文献(Cell 111:837-51,2002)进行RNA分离和基因排列分析。相对于记忆CD8+ T细胞，PD-1mRNA在耗尽的CD8+ T细胞中高度表达(图1A)。此外，在淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)Cl-13感染老鼠体内，PD-1在CD8+ T细胞表面上表达，但是在清除淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)Armstrong菌株后，不在CD8+ T细胞表面上呈递(图1B)。与未感染的老鼠相比，慢性感染的老鼠还可以在大多数淋巴细胞和抗原呈递细胞(APC)上高水平的表达PD-1、PD-L1的一种配位体。因此，病毒抗原的存活率和CD8+ T细胞消耗率与PD-1表达的影响有关。

[0404] 为了检验在慢性淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)传染病期间阻断PD-1/PD-

L1途径能够修复T细胞功能并提高病毒控制的假设，在慢性淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)传染期间使用αPD-L1阻断抗体破坏PD-1/PD-L1共抑制途径。从传染后第23天到27天，每三天对感染淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)Cl-13的老鼠(200毫克抗老鼠PD-L1IgG2b单克隆抗体(克隆10F.5C5或者10F.9G2))腹膜内给药(i.p.)针对PD-1的阻断单克隆抗体。在第37天，相对于未经处理的参照物，处理后的小鼠体内DbNP396-404特异性CD8+ T细胞增加大约2.5倍，且DbGP33-41特异性CD8+ T细胞增加大约3倍(图2A)。由于未经处理的小鼠和经过处理的小鼠脾脏中CD4+ T细胞的数目大致相等(每个脾脏中含有～$6x10^4$IAbGP61-80的CD4+ T细胞)，增殖作用的影响对CD8+ T细胞具有特异性。

[0405] 除了CD8+ T细胞增殖作用增加之外，PD-1信号的抑制作用还导致病毒特异性CD8+ T细胞中抗病毒细胞因子产量的增加。CD8+ T细胞对八种不同细胞毒性T细胞(“CTL”)反应抗原决定簇产生的干扰素(IFN)-γ和肿瘤坏死因子(TNF)-α可以被确定。与未经处理的老鼠相比，经过处理的小鼠体内结合反应提高了2.3倍(图2B和2C)。在治疗后，还观察到产生肿瘤坏死因子(TNF)-α的细胞出现率增加了2倍(图2D)。随着病毒从接受治疗的小鼠血清、脾脏和肝脏中清除，还可以促进病毒的清除。在治疗的小鼠体内，感染后第37天(开始治疗起第14天)可以观察到肺部和肾脏的病毒滴定度减少(大约10倍)。然而，未经处理的老鼠在所有这些器官中都显示出显著的病毒水平(图2E)。使用Vero细胞按照Ahmed等人文献(J.Virol.51:34-41,1984)的描述确定血清中的病毒滴定度和组织匀浆。结果显示，PD-1拮抗剂加速了CD8+ T细胞的增殖和病毒清除率，因此，这表明PD-1信号抑制作用能够修复CD8+ T细胞的功能。此外，由于治疗后脾脏中淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)特异性抗体分泌细胞数目也有所增加(>10倍)，PD-1信号的抑制作用还提高了B细胞反应。

[0406] CD4+ T细胞在产生和维持CD8+ T细胞反应方面起到了关键作用。在这一点上，在没有CD4+ T细胞的情况下CD8+ T细胞(也叫做“无助的”CD8+ T细胞)不能规范正常的免疫反应。此外，在不存在CD4+ T细胞的情况下，慢性淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)传染病更为严重。因此，在淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)-Cl-13感染期间，无助的T细胞与在有CD4+ T细胞参与的情况下产生的T细胞相比显示更为严重的功能性损伤。除去DbNP396-404特异性CD8+ T细胞直到不可发现的水平，DbGP33-41和DbGP276-286CD8+ T细胞完全失去了分泌IFN-γ和肿瘤坏死因子(TNF)-α的能力。

[0407] 在淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)-Cl-13感染的时候CD4+ T细胞被耗尽，从感染后第46天到60天，使用抗-PD-L1抗体处理老鼠。在治疗前后，淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)-特异性CD4+ T细胞不能被保内干扰素(IFN)-γ染色剂检测到。在处理之后，与未经处理的对照物老鼠相比，经过处理的老鼠在其脾脏中具有多大约7倍的DbGP276-286CD8+ T细胞和多大约4倍的DbGP33-41CD8+ T细胞(图3A)。同时还增加了脾脏中的病毒特异性CD8+ T细胞的数目(图3B)。处理后老鼠脾脏中的病毒特异性CD8+ T细胞的数目的增加是由于增殖作用的增加，入使用5-溴脱氧尿核苷结合作用的检测。以未经处理的老鼠中，43％的DbGP276-286 CD8+ T细胞与中等水平的5-溴脱氧尿核苷结合，2％的DbGP276-286 CD8+ T细胞与高水平的5-溴脱氧尿核苷结合，而在处理后的老鼠体内，50％％的DbGP276-286CD8+ T细胞与中等水平的5-溴脱氧尿核苷结合，37％的DbGP276-286 CD8+ T细胞与高水平的5-溴脱氧尿核苷结合。在治疗期间，通过加入饮用水中引入1毫克/毫升5-溴脱氧尿核苷进行5-溴脱氧尿核苷分析，根据操作指南(BD生物科学，圣地亚哥，CA)进行染色。此外，

经过处理的老鼠包括较高百分比的CD8+ T细胞，所述CD8+ T细胞能够表达与细胞周期相关的蛋白质Ki67(60％，在未经处理的老鼠中时19％，图3C)。对PBMC中CD8+T细胞治疗的反应被局限在具有高水平CD8+ T细胞扩增的老鼠体内。

[0408] PD-1抑制作用还增加了无效、耗尽的病毒特异性CD8+ T细胞中抗病毒细胞因子的产量。治疗之后，产生干扰素(IFN)-的DbGP33-41和DbGP276-286CD8+ T细胞的数目具有明显的增加(图4A)，同时可以再处理后的老鼠中检测到更多的DbNP396-404、KbNP205-212、DbNP166-175和DbGP92-101特异性CD8+ T细胞(图4A)。处理后老鼠中50％的DbGP276-286特异性CD8+ T细胞可以产生干扰素(IFN)-γ，相对的，在未经处理的对照物老鼠中，只有20％的DbGP276-286特异性CD8+ T细胞能够产生干扰素(IFN)-γ(图4B)。然而，治疗后老鼠体内DbGP276-286特异性CD8+ T细胞产生的干扰素(IFN)-γ和肿瘤坏死因子(TNF)-α的水平低于全功能性DbGP276-286特异性记忆细胞(图4C)。

[0409] PD-1抑制作用还增加了无效、耗尽的病毒特异性CD8+ T细胞中抗病毒细胞因子的溶解活性。治疗后，使用51Cr释放试验(Wherry et al.,2003.J.Virol.77:4911-27)，检测病毒特异性CD8+ T细胞的体外溶解活性。与未经处理的老鼠相比，治疗2星期后，脾脏中的病毒滴定度减少了大约3倍，肝脏中的病毒滴定度减少了大约4倍、肺中的病毒滴定度减少了大约2倍且血清中的病毒滴定度减少了大约2倍(图4E)。

[0410] 这里的结果显示，PD-1阻断剂能够破坏对慢性病毒性传染有耐受性的外周细胞毒性T细胞(“CTL”)反应，并且，不含CD4+ T细胞帮助的耗尽的CD8+ T细胞被不可逆的钝化。

[0411] 实施例2：抗病毒疫苗和PD-1拮抗剂的给药

[0412] 用于在持续性感染期间促进T细胞反应的方法是治疗剂接种法。该方法的原理是在慢性病毒传染期间，内原性抗原可能不以最佳方式或者免疫原性方式存在，并且以疫苗形式提供的抗原可以对病毒特异性T细胞和B细胞提供更为有效的刺激。使用慢性淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)模型，对老鼠给药一种重组牛痘病毒，所述重组牛痘病毒能够作为治疗剂疫苗(VVGP33)表达淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)GP33抗原决定簇，从而在慢性感染的老鼠中产生适度增强的CD8+ T细胞反应。在九只经过治疗剂疫苗处理的感染性老鼠中有四只表现出阳性反应，而对照老鼠中没有一个能显著性增加对GP33的免疫反应。当治疗剂接种法与PD-L1抑制剂结合时，与单独治疗剂治疗相比，淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)特异性T细胞反应被提高到更高的水平，并且结合治疗的效果好于添加剂。

[0413] 实施例3：在慢性感染的老鼠体内使用PD-1RNA干扰作用(RNAi)抑制PD-1途径

[0414] 核糖核酸干扰作用(RNAi)能够停止哺乳动物细胞中的基因表达。将长双链RNA(dsRNAs)引入细胞中，并随后加工成较小的静止的RNA(siRNA)，所述静止RNA(siRNA)靶向特异性mRNA分子或者小组的mRNA。这一技术尤其在抗体不具有功能性的位点有效。例如，RNAi可以在某一位置进行，在所述位置上，独特拼接变体能够产生溶解形式的PD-1和CTLA-4。

[0415] PD-1沉默子RNA被引入一种商业上可购得的siRNA表达载体中，例如，pSilencer™表达载体或者腺病毒载体(Ambion，Austin，TX)。随后这些载体与体内或者体外靶分子耗尽T细胞接触(参见随后的实施例4)。

[0416] 实施例4：耗尽的T细胞体外恢复活力

[0417] 使用磁珠或者密度离心作用从淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)-Cl-13慢性

感染老鼠中分离出病毒特异性耗尽的CD8+ T细胞。将转染的CD8+ T细胞和靶向PD-L1、PD-L2或者PD-1的单克隆抗体接触。如实施例1中所述，PD-1途径的抑制作用导致CD8+ T细胞回复活性。因此，例如，CD8+ T细胞增殖作用和细胞因子产量增加。回复活性的CD8+ T细胞可以再引入受感染的老鼠体内并按照实施例1所述的方法测定病毒装载量。

[0418] 实施例5：新型CD8+ T细胞恢复活性化合物的体外筛选

[0419] 根据慢性病毒性传染引起的调整PD-1途径化合物逆转CD8+T细胞消耗的能力，调整PD-1途径的化合物可以在体内或者体外筛选试验中识别。

[0420] 耗尽的CD8+ T细胞来源于慢性感染有淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)-Cl-13的老鼠，并且随后与一种检测化合物相接触。通过，例如，酶联免疫吸附测定或者其他的定量方法测定从接触T细胞中释放的抗病毒细胞因子(例如，干扰素(IFN)-γ或者肿瘤坏死因子(TNF)-α)的量，并将其与未与检测化合物相接触的耗尽T细胞中释放的抗病毒细胞因子的量进行比较，如果未与检测化合物相接触的耗尽T细胞中能够释放抗病毒细胞因子的话。如果处理后细胞释放的抗病毒细胞因子的量与未经处理的细胞释放的量相比有所增加的话，就可以识别出作为PD-1拮抗剂的化合物对调节T细胞活性有用。

[0421] 实施例6：新型CD8+ T细胞恢复活性化合物的体内筛选

[0422] 从慢性感染上淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)-Cl-13的小鼠中获得耗尽的CD8+ T细胞。对感染的老鼠静脉给药一种检测化合物，测定向处理后的老鼠和未经处理的老鼠血清中释放的抗病毒细胞因子(例如，干扰素(IFN)-γ或者肿瘤坏死因子(TNF)-α)的量，例如，通过酶联免疫吸附测定或者其他的定量方法测定，并进行比较。如果处理后老鼠血清中发现的抗病毒细胞因子的量与未经处理的老鼠血清中发现的量相比有所增加的话，就可以识别出这种检测化合物作为PD-1拮抗剂。做为选择，可以在用检测化合物处理之前或者之后确定病毒滴定度(例如，血清病毒滴定度)。

[0423] 实施例7：黑猩猩作为持续性HCV感染免疫治疗模型。

[0424] 黑猩猩提供了人体内HCV存活率的模型。T细胞免疫中导致病毒存活时间长的缺点包括HCV-特异性CD4+ T辅助细胞的缺乏和CD8+效应性T细胞活性的削弱或者改变。用针对CTLA-4、PD-1、或者二者结合的抗体处理持续性感染的黑猩猩。确定与接种疫苗结合的阻断抑制性途径的功效，其中，使用重组结构性和非结构性HCV蛋白质进行接种，同时确定这种策略是否可以提高病毒特异性记忆T细胞的出现率和寿命。T细胞免疫中的确定在持续性感染的人体内和黑猩猩体内具有排他地HCV-特异性。检测受感染的黑猩猩体内血液和肝脏中CTLA-4、PD-1、BTLA和他们的配位体的表达以及Treg细胞的存在。通过向黑猩猩传递阻塞信号穿过这些分子的人源化单克隆抗体可以恢复抗病毒活性。

[0425] 用人源化aCTLA-4抗体(MDX-010、Medarex)或者αPD-1抗体处理持续性感染的黑猩猩。MDX-010的首次剂量是0.3毫克/千克，2周以后是1.0毫克/千克，之后每隔三周分别是3、10、30毫克/千克。在使用针对共抑制性分子的抗体治疗后，确定由体液引起的免疫反应和细胞免疫反应，以及HCV RNA含量。在第1、2、3、5、8星期收集样品，随后每月收集样品。样品包括：1)血清，用于分析转氨酶、自身抗体、中和对HCV的抗体、和细胞因子反应，2)血浆，用于测定病毒含量和基因组进化，3)PBMC，用于体外测定免疫性、共刺激/抑制性受体表达和功能，4)新鲜的(未固定的)肝脏，用于分离肝内淋巴细胞和RNA，和5)固定(包裹入福尔马林/石蜡)的肝脏，用于组织学和免疫组织化学分析。还可以在第2或者第3时间点收集区域

淋巴结，通过免疫组织化学和分子技术来评价共抑制性分子和拼接变体的表达。按照这里的描述进行评价这些疗法功效和安全性的试验。

[0426] 为了确定接种HCV抗原是否能够增强抗体对PD-1的治疗性作用，按照下边步骤处理黑猩猩：1)在第0、4和24星期，用重组包裹糖蛋白E1和E2(在MF59添加剂中)及其他蛋白质(核心蛋白加NS 3、4、和5与ISCOMS一起配制)进行肌肉内免疫；2)使用步骤1)中使用的疫苗进行肌肉内免疫，同时与αCTLA-4抗体(每只老鼠给药30毫克/千克体重，在给药疫苗后第0、4、24星期静脉内给药)共同给药；3)与步骤2)一致，只是将CTLA-4抗体替换为αPD-1(或者BTLA)；4)与步骤2、3一致，只是使用CTLA-4和PD-1(或者BTLA)的结合抗体加入疫苗中。免疫后一年时间内，每隔一月检测HCV-特异性T细胞和B细胞反应。

[0427] 在这些分析中，检测HCV-四聚体+和总T细胞的标记物包括分化作用标记物(例如CD45RA/RO、CD62L、CCR7和CD27)、活化作用标记物(例如CD25、CD69、CD38和人类白细胞抗原(HLA)-DR)、存活/增殖作用标记物(例如bcl-2和Ki67)、细胞毒素标记物(例如颗粒酶(granzyme)和穿孔蛋白(perforin))、和细胞因子受体标记物(CD122和CD127)。治疗前趋化因子IP-10的水平和对PEG干扰素(IFN)-γ/病毒唑的反应之间存在重要性联系。测量IP-100水平来调查阴性调节途径或者HCV-特异性T细胞反应和IP-10水平之间的潜在关系。通过流式细胞计在PBMC上进行抑制性受体和配位体表达。

[0428] 实施例8：反应性淋巴组织中进行PD-1免疫染色

[0429] 从位于MA州波士顿的Brigham&Women医院按照制度上的政策购买试验材料。所有的诊断都是根据组织和免疫表型特点进行的，如“世界卫生组织淋巴组织瘤分类系统”(Jaffe ES等人2001年所著)中的描述，并且，在所有情况下，通过血液病理学评述诊断材料。

[0430] 在福尔马林固定的石蜡包埋的组织切片上进行PD-1免疫染色，随后，使用之前所述的(Jones D,et al.1999;Dorfman DM,et al.2003)一种标准间接抗生物素蛋白-生物素辣根过氧化酶方法和二氨基联苯胺显色法，在10毫摩尔柠檬酸盐缓冲剂，pH值为6.0时，使用之前描述的抗人PD-1单克隆抗体(2H7;5)修复微波抗原。如果至少25％的赘生性细胞显示出阳性染色，这种情况被认为对PD-1具有免疫活性。对所有研究的情况进行PD-1染色与稀释到相同蛋白质浓度的老鼠免疫球蛋白G等模式标本对照物抗体染色比较，来证实染色的特异性。

[0431] 使用PD-1的单克隆抗体2H7对福尔马林固定的石蜡包埋的反应性淋巴组织样品、胸腺样品，以及B细胞和T细胞淋巴组织增生疾病的大部分情况的样品进行染色。在扁桃体显示反应性变化，包括滤泡增生的样品中，在生发中心中主要小淋巴细胞子集对PD-1显示出细胞质染色剂，同时在滤泡间的T细胞区域观察到罕见的PD-1阳性细胞。生发中心中PD-1染色方式实际上与CD3抗体中观察到的一致，与CD20的抗体相反，一种pan-T细胞标记物、一种pan-B细胞标记物能够对大多数的生发中心B细胞染色。在反应性淋巴结和脾脏的组织切片中可以观察到相似的结果。在成熟的胸腺中，没有观察到PD-1染色剂。

[0432] 实施例9：在B细胞和T细胞淋巴组织增生性疾病的石蜡包埋组织切片中进行的PD-1染色

[0433] 研究对于PD-1表达的B细胞和T细胞淋巴组织增生性疾病；其结果概括在表4中。对四十二例B细胞淋巴组织增生性扰乱进行PD-1表达作用检测，包括前体B成淋巴细胞白血

病/成淋巴细胞性淋巴瘤代表性病例和成熟期B细胞淋巴组织增生性扰乱，包括许多滤泡起源的B细胞非霍奇金(Hodgkin)淋巴组织瘤，包括6例滤泡性淋巴瘤和7例伯基特淋巴瘤。没有一个B细胞淋巴组织增生性扰乱显示对PD-1染色。在一些情况下，非赘生反应性淋巴组织被呈递并显示如上面扁桃体及其他反应性淋巴组织所见的PD-1染色方式。

[0434] 类似地，在25例霍奇金淋巴组织瘤中，包括11例典型的霍奇金淋巴组织瘤和14例淋巴细胞显著性霍奇金淋巴组织瘤，赘生性细胞不显示PD-1染色。有趣的是，在所有14例淋巴细胞显著性霍奇金淋巴组织瘤中，位于T细胞周围的赘生性CD20-阳性L&H细胞对PD-1具有免疫活性，这与淋巴细胞显著性霍奇金淋巴组织瘤中的CD57+T细胞的染色方式相似。PD-1-阳性细胞是呈递的总CD3+T细胞群体的子集。

[0435] 为了表达PD-1，研究T细胞淋巴组织增生性疾病；结果概括在表4中。前体T细胞成淋巴细胞白血病/成淋巴细胞性淋巴瘤的例子中，不成熟的T细胞的赘生物对PD-1是阴性的，其他的不成熟的T细胞的赘生物是外周赘生物、后-胸腺T细胞赘生物，包括T细胞前淋巴细胞白血病的赘生物、外周T细胞淋巴组织瘤赘生物，未特别指明的退行发育的大细胞淋巴组织瘤赘生物、和成熟的T细胞白血病/淋巴组织瘤赘生物。相反，所有19例血管免疫母细胞性淋巴组织瘤都包括PD-1-阳性细胞中心，所述PD-1-阳性细胞对pan-T细胞标记物，例如CD3具有免疫活性。在扩增的CD21+滤泡树状细胞(FDC)网络的中心上能够持续发现PD-1-阳性细胞，这是血管免疫母细胞性淋巴组织瘤的一种特性。

[0436] 表4.在淋巴组织增生性疾病中的PD-1免疫染色

[0437]

	PD-1 免疫染色
B 细胞 LPDs	0/42*
B-LL/LL	0/3
CLL	0/4

[0438]

MCL	0/4
FL	0/6
MZL	0/3
HCL	0/3
DLBCL	0/6
BL	0/7
LPL	0/3
MM	0/3
霍奇金淋巴组织瘤	0/25
典型的霍奇金淋巴组织瘤	0/11
小节淋巴细胞显著的霍奇金淋巴组织瘤	0/14**
T 细胞 LPDs	18/55
T-LL/LL	0/5
T-PLL	0/3
AIL	19/19
PTCL，未明确指定的	0/14
ALCL	0/12
ATLL	0/3

[0439] 缩写:B-LL/LL-前体B细胞成淋巴细胞性淋巴瘤/成淋巴细胞的白血病;CLL-慢性淋巴细胞性白血病;MCL-成熟细胞淋巴组织瘤;FL-滤泡性淋巴瘤;MZL-边缘区淋巴组织瘤;HCL-毛细胞白血病;DLBCL-扩散大B细胞淋巴组织瘤;BL-伯基特淋巴瘤;LPL-成淋巴细胞性淋巴瘤;MM-多发性骨髓瘤;T-LL/L-前体T成淋巴细胞白血病/成淋巴细胞性淋巴瘤;T-PLL-T细胞前淋巴细胞白血病;AIL-血管免疫母细胞性淋巴组织瘤;PTCL-外周T细胞淋巴组织瘤,未特别指明的;ALCL-退行发育的大细胞淋巴组织瘤;ATLL-成熟T细胞白血病/淋巴组织瘤。

[0440] *免疫活性病例/病例总数的数值

[0441] **在14/14病例中,PD-1-阳性细胞在赘生性L&H细胞周围形成瓣状体

[0442] 实施例10:研究PD-1在HIV-特异性人CD8+ T细胞上表达的一般方法

[0443] 下列方法被用于进行实施例11-14中详细描述的试验。

[0444] 主体:患有慢性进化型C型HIV-1传染病的研究参与者,这些参与者是从南非德班的McCord医院和南非Mariannhill的Mary's医院的门诊诊所处征集来的。从65位主体中获得外周血液,这些主体在分析开始时没有经过抗逆转录病毒治疗。根据主体表达人类白细胞抗原(HLA)等位基因与构造的(见下文)十个I类四聚体匹配度选择主题。这些群体中病毒含量中间值是42,800HIV-1RNA拷贝/毫升血浆(在163-750,000范围内),并且完全CD4计数的中间值是362(在129-1179范围内)。关于感染持续时间的信息时不可利用的。所有的主体提供了书面通知表示同意进行此研究,本研究经过了当地制度检查组的批准。

[0445] PD-1和PD-L1抗体的构建:按照之前的描述制备针对人PD-L1(29E.2A3、老鼠IgG2b)和PD-1(EH12、老鼠IgG1)的单克隆抗体,并且已经显示出阻断PD-1:PD-L1的相互作用。

[0446] I类主要组织相容性复合体(MHC)四聚体:按照之前的描述(Altman JD,et al.1996)合成10个I类艾滋病病毒主要组织相容性复合体(MHC)四聚体用于本研究:A*0205 GL9(p24,GAFDLSFFL;SEQ ID NO:1),A*3002 KIY9(整合酶,KIQNFRVYY;SEQ ID NO:2),B*0801 DI8(p24,DIYKRWII;SEQ ID NO:3),B*0801 FL8(Nef,FLKEKGGL;SEQ ID NO:4),B*4201 RM9(Nef,RPQVPLRPM;SEQ ID NO:5),B*4201 TL9(p24,TPQDLNTML;SEQ ID NO:6),B*4201 TL10(Nef,TPGPGVRYPL;SEQ ID NO:7),B*4201 YL9(RT,YPGIKVKQL;SEQ ID NO:8),B*8101 TL9(p24,TPQDLNTML;SEQ ID NO:9),和Cw0304 YL9(p24,YVDRFFKTL;SEQ ID NO:10)。

[0447] I类人类白细胞抗原(HLA)四聚体染色和表型分析:在37℃下,用四聚体染色新分离的外周血液单核细胞(PBMC,0.5百万)20分钟。然后用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤细胞一次,压成丸,直接用荧光素硫脲(FITC)-结合的抗CD8(购自Becton Dickinson公司)、藻红蛋白-结合的抗PD-1(克隆EH12)、和ViaProbe(购自Becton Dickinson公司)染色。在室温条件下培养细胞20分钟,在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中洗涤一次,再悬浮在200微升的含有1%多聚甲醛的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中,在荧光-活化的细胞分类器(FACSCalibur™,购自Becton Dickinson公司)上获得。在FACSCalibur™上至少获得100,000件。

[0448] CFSE增殖试验:在磷酸盐缓冲盐水中洗涤一百万新近分离的外周血液单核细胞(PBMC)两次,压成丸,37℃下再悬浮在1毫升的0.5微摩羧基荧光素二乙酸酯、琥珀酰胺酯(CFSE,分子探针)中7分钟。在磷酸盐缓冲盐水中洗涤细胞两次,再悬浮入1毫升R10媒介物(补充有谷胱甘肽(glutiathione)、青霉素、链霉素和10%胎牛血清(FCS))中,并在24孔板的一个孔中铺平。最初的研究显示最后浓度为0.2微克/毫升的肽能够产生最佳的增殖反应,因此这就是用来进行每个实验的孔中的最终浓度。阴性对照孔由单独位于媒介物中的外周血液单核细胞(PBMC),或者与纯化的抗PD-L1(10微克/毫升)一起位于媒介物中的外周血液单核细胞(PBMC)组成,使用10微克/毫升的植物血凝素(phytohemagluttinin)(PHA)刺激阳性参照孔。在37℃培养器中培养6天后,用2毫升磷酸盐缓冲盐水洗涤细胞并用PE-结合的I类主要组织相容性复合体(MHC)四聚体、ViaProbe(购自Becton Dickinson公司)和抗CD8-抗原呈递细胞(APC)抗体染色。在FACSCalibur上获得细胞并用CellQuest软件(购自Becton Dickinson公司)分析。细胞被聚集在ViaProbe-CD8+淋巴细胞上。通过将在有肽参与的情况下CD8+四聚体+细胞的百分比除以不存在肽刺激作用的情况下CD8+四聚体+细胞

的百分比来计算四聚体+细胞的增加倍数。

[0449] 统计分析:使用GraphPad Prism 4.0a版进行斯皮尔曼相关性、Mann-Whitney试验、和对偶T检验分析。所有的试验都是2-tailed,其中p<0.05的p值被认为是重要的。

[0450] 实施例11:HIV特异性CD8+ T细胞上的PD-1表达

[0451] 根据流行的人类白细胞抗原(HLA)等位基因和Gag、Nef、整合酶和RT中常见的靶点抗原决定簇,合成对显性HIV-1 C集病毒CD8+ T细胞抗原决定簇具有特异性的10个I类主要组织相容性复合体(MHC)四聚体,允许直接目测这些细胞上表达PD-1的表达。在全部群体中进行高分辨率人类白细胞抗原(HLA)分类,并且根据相应人类白细胞抗原(HLA)等位基因的表达,选择65位没有经过抗逆转录病毒治疗的人用于研究,检查了总共120个单独的抗原决定簇,图5A表现了代表性艾滋病病毒四聚体+细胞上PD-1的体外染色。在这些四聚体+细胞伤可以容易的表现,且比来自同样个体的总CD8+ T细胞群体具有显著较高的表达(p<0.0001);PD-1依次在四聚体+CD8+ T细胞和总CD8+ T细胞群体上的表达比在HIV-血清反应阴性的对照物上的表达显著增加(图5B)。对于检查的十个四聚体中的八个,至少识别出一个人,在此人体内抗原特异性CD8+西欧包的表达水平式100%(图5C)。从3到25个个体中获得的外周血液单核细胞(PBMC)分别染色进行艾滋病病毒四聚体反应,PD-1表达水平的中值在68%到94%的四聚体+细胞范围内(图5C)。通过分析四聚体+细胞和总CD8+ T细胞群体上PD-1的平均荧光强度(MFI)可以进一步确认该发现(图5B、C)。

[0452] 下一步要确定的是,按照具有多重可检测反应的人体内PD-1表达水平,是否有证据说明抗原决定簇-特异性差异。被检查的65人中,有16人每人具有3-5个四聚体阳性。所述十六个主体中三个的PD-1表达几乎是一致的,并且对每个分析的反应都接近100%;然而,其他的13个个体由于抗原决定簇不同,显示不同方式的PD-1表达(图5D)。这些数据表明,PD-1在单个个人体内同时期抗原决定簇特异性CD8+ T细胞中的表达作用可以是有区别的表达,或许,根据现有数据表明了在抗病毒功效方面的抗原决定簇-特异性差异(Tsomides TJ,et al.1994;Yang O,et al.1996;Loffredo JT,et al.2005)。

[0453] 实施例12:PD-1表达和HIV疾病进程之间的关系

[0454] 确定PD-1在HIV特异性CD8+ T细胞上的表达和血浆病毒含量和CD4+细胞数之间的关系,这些都是HIV疾病进程的预报因子。根据上边的研究结果,四聚体阳性细胞数目和病毒含量或者CD4+细胞数之间的关系不能显示任何显著的相关性(图6A、B)。相反的,病毒含量和PD-1在HIV四聚体阳性细胞上的表达百分比和MFI之间存在显著的阳性关系(分别为p=0.0013和p<0.0001,图6A)。在CD4计数和PD-1在HIV四聚体阳性细胞上的表达百分比和MFI之间还存在逆相关作用(分别是p=0.0046和p=0.0150;图6B)。由于实验的四聚体只可能代表这些主体中一小部分的HIV-特异性CD8+ T细胞,还可以检测PD-1在所有CD8+细胞中的表达和这些参数之间的关系。病毒含量和PD-1在总CD8+ T细胞群体上的表达百分比和MFI之间存在显著的阳性关系(分别为p=0.0021和p<0.0001,图6C),在CD4计数和PD-1在总CD8+ T细胞群体上的表达百分比和MFI之间还存在逆相关作用(分别为p=0.0049和p=0.0006;图6D)。在相同的组中,检测5个主题中PD-1在CMV-特异性CD8+ T细胞上的表达,在这些细胞中,与HIV-特异性CD8 T细胞相比,显著减少的PD-1被表达(中间值23%CMV四聚体+PD-1+,p=0.0036),并且与相同个体中大量CD8+T细胞不同,这表明高PD-1表达不是所有病毒特异性CD8+ T细胞的统一特点。这些数据说明,慢性HIV传染病中抗原量的增加会导致

PD-1在CD8+ T细胞上的表达作用增加，同时，与患有慢性淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)传染病的老鼠所得数据一致，体内PD-1表达与功能性耗尽的CD8+ T细胞相关(Barber DL,et al.2005)。此外，包括多重抗原决定簇分析的大型研究提供了HIV特异性CD8+ T细胞和病毒含量或者CD4计数之间明确的相关性。

[0455] 实施例13:PD-1表达和CD8 T细胞记忆状态和功能之间的关系

[0456] 下一步，根据许多其他与CD8+ T细胞记忆状态与作用有关的表型标记物，包括CD27、CD28、CD45RA、CD57、CD62L、CD127、CCR7、穿孔蛋白(perforin)、颗粒酶(granzyme)B、和Ki67分析PD-1的表达(图7)。图7A显示了来自一个个体的B*4201 TL9四聚体+细胞上对于这些标记物的代表性的染色过程，同时图7B显示了针对13个主体的结合数据。这些研究局限于PD-1阳性大约95％的四聚体反应，这是由于大于4种颜色的多参数流式细胞计不再KwaZulu Natal有效的范围内。所述HIV四聚体+PD-1+细胞表达高水平的CD27和颗粒酶(granzyme)B;极低水平的CD28、CCR7和胞内Ki67;低水平的CD45RA和穿孔蛋白(perforin);一级中等水平的CD57和CD62L(图7B)。这些数据表明，HIV-特异性PD-1+ T细胞显示一种效应因子/效应因子记忆表型，并且与上述关于HIV-特异性CD8+ T细胞非对称的成熟作业的报道一致。另外，测序病毒从而确定这些细胞是否驱动免疫逃逸。评价了45个四聚体阳性反应，其中只有5个的病毒抗原决定簇与南非C进化共有序列不同，这说明，这些细胞在体内发挥少量的选择压力。

[0457] 使用淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)模型在老鼠体内进行上述实验，结果显示，通过输液抗PD-L1阻断抗体在体内阻断PD-1、PD-L1的相互作用会使淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)特异性CD8+ T细胞的功能提高，从而通过细胞因子产生、杀死能力、增殖能力、和最显著，减少病毒含量来调节。从15个HIV+主体中新近分离的外周血液单核细胞(PBMC)短期(12小时)体外抗原特异性刺激作用不能增加干扰素(IFN)-γ、肿瘤坏死因子(TNF)-α或者白细胞间介素(IL)-2的产量，无论是不是存在1微克/毫升纯化的抗PD-L1抗体。

[0458] 实施例14:在HIV特异性CD8+T细胞增殖过程中阻断PD-1/PD-L1途径的作用

[0459] 由于HIV特异性CD8+ T细胞还可以显示削弱的增殖能力(2004)，因此需要确定阻断PD-1/PD-L1是否可以体外提高这一功能。图8A显示了B*4201-阳性个体的代表性数据。将新分离的CFSE-标记的外周血液单核细胞(PBMC)与培养基单独培养，或者与含有抗PD-L1抗体的培养基一起培养，培养6天之后，得以维持B*4201-TL9-特异性CD8+ T细胞(1.2％的CD8+ T细胞)群体，所述B*4201-TL9-特异性CD8+ T细胞能够维持CFSEhi。使用TL9肽单独进行为期6天的CFSE-标记的外周血液单核细胞(PBMC)模拟实验，能够产生4.8倍扩增的CFSElo B*4201 TL9四聚体+细胞，反之，在有抗PD-L1阻断抗体参与的情况下，用TL9肽进行的CFSE-标记的外周血液单核细胞(PBMC)刺激作用能够进一步提高TL9-特异性细胞的增殖作用，在四聚体+细胞中导致10.3倍的增加。在存在或者不存在纯化的抗人PD-L1阻断抗体的情况下对28种样品进行CFSE增殖试验。在有肽和抗PD-L1阻断抗体参与的情况下观察到的HIV特异性CD8+ T细胞的增殖作用与单独使用肽进行刺激之后产生的增殖作用相比，前者增殖的量具有显著的增加(图8B:p＝0.0006，对偶T检验)。由于个体不同和给定的个体内部抗原决定簇不同，在有抗PD-L1阻断抗体参与的情况下四聚体+细胞增加的倍数也存在变化(图8C)，这再次显示了这些反应功能耗尽程度中存在的抗原决定簇特异性差异。

[0460] 实施例15:治疗性疫苗接种法与阻断PD-1抑制性途径相结合协同改善慢性病毒性传染病的免疫控制:组合治疗性疫苗的方案研究

[0461] T细胞的功能性损伤时许多慢性传染病的明确特点,其包括细胞因子增殖、细胞溶解和抗原特异性T细胞的增殖。在多种不同的持续性病原体传染病中,包括人类HIV、HBV、HCV、和TB中可以观察到失活的T细胞免疫反应,在慢性感染期间的T细胞失活作用可能与感染抗原的数量和持久性有关,并开始于最接近T细胞受体信号的断裂、抑制性蛋白质的上调或者共刺激性蛋白质的下调、以及附属信号和细胞因子信号的缺陷。耗尽的T细胞产生的缺点是造成宿主无力去除持续性病原体的最初原因。在慢性感染期间,耗尽的病毒特异性CD8 T细胞上调两种关键的抑制性蛋白质:PD-1和CTLA-4。PD-1的体内阻断剂能够增加病毒特异性CD8 T细胞的数目和功能,并因此减少病毒含量。

[0462] 现有的疫苗接种法在治疗慢性病毒性传染病方面存在若干缺点。具体而言,在治疗性疫苗接种之后,不会观察到有效促进的抗病毒CD8 T细胞反应。另外,响应性T细胞在慢性感染期间的高病毒含量和低增殖能力很可能限制治疗性疫苗接种的有效性。因此,发展能够有效促进宿主内生性T细胞反应从而控制慢性感染的治疗性疫苗方法是十分重要的。

[0463] 使用一种已知的、由淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)克隆-13传染病诱导的慢性感染模型来确定PD-1拮抗剂与一种治疗性疫苗结合使用的效果。使用能够表达淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)GP33抗原决定簇的牛痘病毒作为治疗性疫苗,来检测抗原决定簇特异性CD8 T细胞免疫反应。治疗性疫苗与抗PD-L1抗体结合用于阻断抑制性途径,从而抗原特异性CD8 T细胞增殖的协同效应和持续性病毒问题的解决方法。

[0464] 本实验使用了下列方法:

[0465] 老鼠和传染病:从杰克逊实验室(Bar Harbor,ME)购得C57BL/6老鼠(4-到6-周大的雌性小鼠)。按照美国立卫生研究所动物护理指南的规定将老鼠饲养在不含有病原体的动物饲养栏中。进了进行最初的慢性感染,如前所述,用$2X10^6$PFU的淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)克隆-13(CL-13)感染老鼠。之前已经描述了用于确定病毒滴定度的病毒生长和噬菌斑实验。

[0466] 体内抗体阻断剂和治疗性疫苗接种法:从用CL-13感染4周之后开始,每三天对老鼠进行腹膜内给药200微克的鼠抗-老鼠PD-L1(10F:9G2)。在第一次用抗PD-L1处理的时间点,腹膜内给药$2X10^6$PFU能够表达GP33-41抗原决定簇(VV/GP33)的重组牛痘病毒,所述重组牛痘病毒作为治疗性疫苗,或者作为参照疫苗腹膜内给药野生型牛痘病毒(VV/WT)。

[0467] 淋巴细胞分离:按照之前的描述从组织和血液中分离出淋巴细胞。在摘除之前用冰冻的磷酸盐缓冲盐水灌注肝脏和肺从而进行淋巴细胞分离。

[0468] 流式细胞计:按照之前的描述制备并使用I类主要组织相容性复合体(MHC)肽四聚体。所有的抗体都是从BD Pharmingen公司获得的,除了颗粒酶(granzyme)B(Caltag公司)、Bcl-2(R&D系统公司)和CD127(eBioscience公司)之外。按照(Barber etal.,Nature 439:682,2006)的描述进行所有表面细胞因子和胞内细胞因子染色。为了检测脱粒作用,在有布雷菲德菌素(brefeldin)、莫能菌素(monensin)、抗CD107a-FITC、和抗CD107b-FITC参与的情况下刺激脾细胞5小时。

[0469] 同焦点显微镜检查法:从老鼠体内切除脾脏并在OCT(TissueTek)中冷冻。从这些单元中切除10-20毫米恒温部分并固定在冰冻的丙酮中10分钟。为了进行免疫荧光分析,使

用下列抗体对这些部分进行染色:ER-TR7,来检测网状细胞(Biogenesis公司,金斯顿,NH);和多克隆抗淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)荷兰猪血清。使用Alexa氟488山羊抗鼠和Alexa氟568山羊抗荷兰猪1g(分子探针)使染色作用显形,并通过同焦点显微镜检查法(Leica微型系统AG,德国)分析。使用ImageJ(国家卫生研究所)和Photoshop(adobe系统公司)制备图像。

[0470] 这些结果显示,治疗性疫苗和抗PD-L1抗体的结合在抗原特异性CD8 T细胞增殖和解决持续性病毒方面能够显示一种协同效果。治疗性疫苗可以通过阻断PD-1/PD-L1抑制性途径有效的促进CD8 T细胞修复。通过组合治疗性疫苗接种法能够系统的实现提高的抗原特异性CD8 T细胞的增殖作用和促进的病毒控制(图9a-9d和图10a-10d)。组合治疗性疫苗功能活化的CD8 T细胞急剧增加(图11a-d)。另外,在阻断PD-1/PD-L1途径期间,使用表达特异性抗原决定簇的载体的治疗性疫苗能够提高CD8 T细胞的增殖作用,所述CD8 T细胞对载体编码的抗原决定簇具有特异性(图9和11)。在用组合疫苗处理的实验组中的抗原特异性CD8 T细胞上可以观察到增加的CD127表达水平,这一现象反映出长时记忆T细胞反应的产生,而PD-1和颗粒酶(granzyme)B减少的表达水平与持续性病毒的解决方法相关(图12a-12b)。

[0471] 治疗性疫苗与PD-L1阻断剂的结合在恢复“无效”耗尽的CD8 T细胞功能方面能够产生一种协同效果(参见图13a-13e)。使用淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)克隆-13感染不含有CD4 T细胞的老鼠。在感染7周之后,对一些老鼠接种野生型牛痘病毒(VV/WT)或者表达淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)GP33-41抗原决定簇的牛痘病毒(VV/GP33)。同时,每三天用αPD-L1或者其同种型处理老鼠5系。抗体初次处理两周之后,杀死老鼠进行分析。所得结果表示在图13a中。检查GP33特异性CD8 T细胞的出现率(图13b)。用GP33肽在有aCD107a/b抗体参与的情况下刺激脾细胞,然后与干扰素(IFN)-γ共染色。所显示的图像聚集在CD8-T细胞上(图13c)。用GP33肽刺激之后,确定每个Db-限制性GP33-41四聚体阳性细胞中IFN-γ^+细胞的百分比(图13d),作为病毒滴定度显示(图13e)。所得结果显示了治疗性疫苗与PD-L1阻断剂结合的协同效应。

[0472] 这些结果显示,在慢性感染期间,阻断阴性调节途径和促进CD8 T细胞的结合可被用于发展治疗性疫苗,从而改善患有慢性感染或者恶性疾病的患者体内的T细胞反应。能够促进T细胞反应和降低病毒含量的治疗性介入作用,例如使用PD-1拮抗剂,可以增加无病存活率并减少病毒的传播。对于慢性病毒性传染病和持续性细菌、寄生虫传染病可以使用有效的治疗性疫苗接种法。该方法也对治疗恶性疾病有效。

[0473] 实施例16:通过阻断PD-1/PD-L1途径增强T细胞免疫治疗法

[0474] 发展一种治疗并除去慢性病毒性传染病,例如人类免疫缺陷性病毒和丙型肝炎的方法是十分重要的。CDC最近报道了超过一百万的美国人感染有人类免疫缺陷性病毒,这证明需要更多有效的治疗方法。确定淋巴细胞的抑制性信号如何促进病原体持续避开宿主免疫应答的能力是十分重要的。

[0475] 在慢性感染淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)期间,已经证明抑制性免疫受体PD-1(B7/CD28族共刺激受体的成员)及其配位体(PD-L1)被急剧上调。使用淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)模型进行的其他研究显示,在慢性感染最近阶段,当CD8 T细胞耗尽时,阻断PD-1/PD-L1途径能够显著的增加内源抗病毒CD8 T细胞反应。耗尽的T细胞功能被

损害并且在遭遇抗原时不能进行有效的免疫反应。但是，阻断PD-1/PD-L1途径能够反向耗尽并修复其功能能力。数据显示在超过直接使用抗PD-L1治疗的时间内，这一作用能够很好的持续。

[0476] 为了(1)在继承性转移免疫(记忆)脾细胞到先天感染(载体)老鼠体内过程中，评价抗PD-L1提高抗病毒CD8 T细胞的增值作用和存活率方面的能力；(2)评价在有PD-1/PD-L1阻断剂存在的情况下扩增的病毒特异性、记忆CD8 T细胞的功能；和(3)为了确定多种分化作用标记物在有PD-1/PD-L1阻断剂存在的情况下扩增的病毒特异性、记忆CD8 T细胞中的表达。在发育良好的慢性病毒性传染病细胞免疫疗法模型中评价PD-1途径的作用。这里描述的模型与肿瘤T细胞细胞免疫疗法的模型在限制这些治疗方法适应性免疫屏障方面是相似的(例如，腐蚀或者抑制T细胞/抗肿瘤反应)。新近感染或者在子宫内感染淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)的老鼠不能进行内源性淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)特异性免疫反应并在老鼠存活期内维持血液和所有组织中传染性的高水平淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)。这些动物是天然载体并且基本上可以耐受病原体。当来自淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)免疫的老鼠体内的脾细胞被适应性的转移到天然载体中时，所述传递的免疫记忆细胞迅速地经历扩增过程并建立一种有力的针对病毒的免疫反应。当高剂量的脾细胞被转移时，大约2/3的接受适应性细胞免疫疗法的动物完全不含所述传染病。

[0477] 这些实验使用下列材料和方法：

[0478] 老鼠和传染病：从杰克逊实验室(Bar Harbor，缅因州)购得C57BL/6老鼠(4-到6-周大的雌性小鼠)。用2X10^{5}PFU的淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)Armstrong株感染老鼠。先天载体老鼠衍生自新近感染的老鼠(10^{4}PFU淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)克隆-13，脑内)，并在埃默里大学(亚特兰大，美国乔治亚州州名)内繁殖。

[0479] 适应性免疫疗法和体内抗体阻断：从淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)免疫的老鼠(传染后30-90天)内分离出4X10^{6}个完整的脾细胞并静脉转移到6-12周大的淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)载体老鼠中。在适应性免疫疗法之后，在15天内，每三天给药一次200微克的鼠-抗-老鼠-PD-L1(10F.9G2)。

[0480] 流式细胞计和四聚体染色：按照之前的描述生产与淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)GP33-41相复合的H-2Db的I类主要组织相容性复合体(MHC)四聚体。所有的抗体都购自BD/Pharmingen(圣地亚哥，CA)。按照之前的描述分离周围血液单核细胞和脾细胞并且对其进行染色。使用FACSCalibur流动血细胞计数器(BD)获得数据并且使用FlowJoe软件(Tree Star股份有限公司，Ashland，OR)分析。

[0481] 胞内细胞因子染色：为了进行胞内细胞因子染色，在有或者没有指定肽(.2微克/毫升)和布雷菲德菌素A参与的情况下，在37℃下培养10^{6}个脾细胞5-6小时。对表面标记物染色之后，细胞被胞内细胞因子渗透并使用制剂(购自BD/Pharmigen公司)染色。

[0482] 可以获得下面的结果：

[0483] 抗PD-L1疗法能够增加病毒特异性CD8 T细胞的数目：在第7、11、15、22、和35天，从治疗的或者未经治疗的动物体内分离出外周血液单核细胞(PBMC)。通过四聚体染色评价对DbGP33抗原决定簇具有特异性的细胞。在两个独立的实验中发现，在适应性转移后第一个15天内，当统一表示为每百万外周血液单核细胞(PBMC)中的Db GP33阳性细胞数目时，用抗PD-L1疗法治疗的动物明显的发展处更多的淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)特异性

CD8 T细胞。这一数据表明在正常的记忆T细胞中，PD-1/PD-L1途径产生增殖抑制程度的作用。而且，这些经过表面，该途径的抑制作用可以加速再次免疫反应的发展和保持，所述再次免疫反应是适应性转移到高抗原含量的慢性感染病例中之后产生的。

[0484] PD-1/PD-L1阻断剂能够提高抗原特异性CD8 T细胞的功能：再适应性转移第17天后，从治疗后的或者未经治疗的动物体内分离脾细胞并进行炎症性细胞因子(干扰素(IFN)-γ和肿瘤坏死因子(TNF)α)或者CD107ab(溶酶体结合的膜蛋白，LAMP)表达分析。与未经治疗的动物相比，接受抗PD-L1阻断剂治疗的动物体内所有指定的CD8抗原决定簇、干扰素(IFN)γ表达都被提高了(图15a)。另外，在抗PD-L1疗法之后，干扰素(IFN)γ和肿瘤坏死因子(TNF)α和CD107ab的共表达也被提高了(图15b-15e)。这些发现表明，与从未经治疗的动物体内获得的脾细胞相比，根据炎症性细胞因子产量和细胞溶解颗粒的释放，在PD-L1阻断剂存在的情况下进行扩增的适应性转移的记忆脾细胞具有功能上的优先性。

[0485] 实施例17：在PD-1阻断期间的鼠B细胞反应

[0486] 为了确定在慢性感染淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)传染病期间PD-1阻断剂是否能够提高B细胞反应，进行下列实验。在控制慢性淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)传染病方面，B细胞和T细胞反应都是至关重要的，因此，在慢性感染淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)的老鼠体内改善B细胞反应也可以帮助降低病毒含量和提高T细胞功能。

[0487] 本实验使用了下列材料和方法：

[0488] 老鼠和病毒：从杰克逊实验室(位于缅因州Bar Harbor)购买四到六星期大的雌性C57Bl/6老鼠。在传染前，通过给药gk1.5抗体使慢性感染淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)的老鼠耗尽CD4 T细胞。上面数据显示，在给药病毒之前0-2天给药500微克的gk1.5会导致脾脏和淋巴节中CD4 T细胞的数目下降95-99％，在超过2到4周的时间里，CD4 T细胞数目慢慢的恢复。在慢性感染开始第0天对老鼠静脉内给药$2x10^6$PFU的淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)克隆-13菌株。通过在Vero细胞上进行一种6天噬菌斑试验确定病毒的滴定度。

[0489] 通过ELISPOT检测ASC：通过用0.84％NH4CL处理并随后再悬浮在补充有5％FCS的RPMI中，排除脾脏和骨髓单细胞悬浮液中的血红细胞。通过在底部铺有硝化纤维的96孔多屏幕HA过滤板(微孔)上平铺细胞来检测抗体分泌细胞。在此之前，4℃下使用100微升的5微克/毫升的山羊抗老鼠IgG+IgM+IgA(Caltag/Invitrogen)包覆平板过夜。然后用磷酸盐缓冲盐水/0.2％吐温洗涤平板3次，随后用磷酸盐缓冲盐水洗涤1次，并且用RPMI+10％FCS阻断2小时，从而防止非特异性结合。阻断培养基被替换为100微升的RPMI+5％FCS，并且将50微升的$1x10^7$细胞/毫升进行连续的三倍稀释之后铺平板。在37℃下5％的二氧化碳中培养平板6小时。去掉细胞并且用磷酸盐缓冲盐水洗涤3次然后用磷酸盐缓冲盐水/0.2％吐温洗涤3次。然后，用在磷酸盐缓冲盐水/0.2％吐温/1％FCS中按1/1000的比例稀释的生物酰化的山羊抗鼠免疫球蛋白G(Caltag/Invitrogen)包覆孔，并在4℃下培养过夜。除去次要抗体并且能够磷酸盐缓冲盐水/0.2％吐温洗涤平板。在室温条件下，培养在磷酸盐缓冲盐水/0.2％吐温中按1/1000的比例稀释的抗生物素蛋白-D HRP(载体)1小时。用磷酸盐缓冲盐水/0.2％吐温洗涤平板3次并用磷酸盐缓冲盐水洗涤平板3次，然后通过加入100毫升的辣根过氧化酶-H2O2色素蛋白底物进行检测。通过向pH值为4.8的10毫升0.1M的醋酸钠缓冲剂

中加入150微升新制备的AEC溶液(每毫升二甲基甲酰胺(Sigma公司)溶解10毫克的3-氨基-9-乙基咔唑(ICN)的溶液),并通过0.2毫米孔径的薄膜过滤制备所述底物,并在使用前加入150毫升的3%的H2O2之后立即使用。在3-5分钟后出现粒状的红斑,通过用自来水进行彻底的冲洗终止反应。使用装配有垂直白炽灯的立体显微镜对斑点计数。

[0490] 总骨髓细胞的确定:为了计算骨髓中总ASC反应,由于^{59}Fe分布研究已经显示12.6%的总鼠骨髓位于两股骨结合处,因此将两个股骨的反应乘以系数7.9。在股骨、胫骨、humorous、肋骨或者胸骨的骨髓细胞ASC活性之间没有检测到差异。典型的,两个成熟的股骨产生$2.0x10^7$到$2.5x10^7$总骨髓细胞。

[0491] 流式细胞计:从Pharmingen公司购买直接结合的抗体(抗B220、抗CD4、抗CD138抗CD95、抗Ki67、抗生物素酰化的IgD),或者载体labs(PNA)。从Molecular Probes公司购买链霉和素-抗原呈递细胞(APC),在4℃下,在补充有1%FCS和0.1%叠氮化钠的磷酸盐缓冲盐水中进行所有的染色。然后将细胞固定在2%的甲醛(在磷酸盐缓冲盐水中)中并且在荧光活化的细胞分类法(FACS)Calibur上使用CellQuest软件(购自BD Biosciences公司)进行分析。

[0492] 统计分析:使用GraphPad Prism 4.0a版(GraphPad,圣地亚哥,CA)进行试验,使用未配对的T检验分析。所有的试验都是2-tailed,具有95%的置信区间。

[0493] 在进行体内PD-1阻断之后,抗体分泌细胞在脾细胞中的总数被提高了:在感染后,用抗αPD-1处理感染上淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)克隆-13的鼠大约60天。在两周内,每三天对老鼠给药200微克的αPD-L1。用αPD-1处理14天之后,杀死老鼠并通过ELISPOT和流式细胞计染色计算脾脏中抗体分泌细胞的数目。在三个独立的实验中,用αPD-L1处理的老鼠与未经处理的老鼠相比,脾脏中抗体分泌细胞(ASC)的水平显著的增加了($p=0.011$)(图16A)。通过下调B细胞标记物并表达CD138(syndecam-1)可以将ASC与B细胞分别开来。根据ELISPOT结果,用αPD-L1处理的老鼠体内能够观察到$B220^{low/int}$ CD138+细胞数目的增加(图16B)。

[0494] 用αPD-1治疗感染慢性淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)的老鼠不会导致骨髓抗体分泌细胞水平的提高。同时确定了在用αPD-1治疗期间骨髓内部抗体分泌细胞是否被提高。大多数存活期长的浆细胞存在于骨髓内部,并且,这些浆细胞对长时间维持血清抗体水平是至关重要的。感染后,用αPD-L1处理感染慢性淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)的老鼠大约60天。用αPD-L1处理后第14天,通过ELISPOT调节脾脏和骨髓抗体分泌细胞水平。虽然处理两星期后,脾脏中抗体分泌细胞的数目被提高,但在此时间点,骨髓中的抗体分泌细胞数目并没有变化(图17)。

[0495] 用αPD-L1和αCTLA-4共同治疗感染慢性淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)的老鼠,会导致脾脏内抗体分泌细胞水平协同性增加:同时进一步调查了使用另外一种阴性调节分子,CTLA-4阻断信号是否能够提高PD-1阻断期间观察到的效应。与B7结合的CTLA-4被认为既与阳性共刺激分子CD28竞争,和/或,又能够提供直接对抗TCR的信号。分别用αPD-L1、αCTLA-4或者二者的结合治疗感染淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)克隆-13的老鼠,同时有一部分感染的老鼠不进行任何治疗,开始治疗两星期后,通过ELISPOT测定抗体分泌细胞的水平。虽然用αCTLA-4对抗体分泌细胞水平没有产生任何影响,但是将αCTL-4与αPD-L1共同使用进行治疗会导致抗体分泌细胞的协调增加,增加后抗体分泌细胞的量在单

独使用αPD-L1治疗之后所观察到的抗体分泌细胞的量之上(图18)。

[0496] 在αPD-L1治疗的小鼠体内具有提高的B细胞和CD4 T细胞增殖作用和生发中心活性:通过在CD4 T细胞和B细胞中进行增加的Ki-67染色,对αPD-L1治疗的慢性小鼠的脾脏进行流式细胞计分析,结果显示出提高的增殖作用水平。通过高水平的PNA和FAS染色可以识别脾脏生发中心反应内部的B细胞。在αPD-L1治疗之后,与未经治疗的参照物相比,PNA+FAS+B细胞的出现率有大幅增加(图19a-19b)。

[0497] 实施例17:人T细胞中PD-1的表达

[0498] CD8 T细胞对于许多慢性传染病的控制是必不可少的。如这里公开的,在慢性抗原刺激作用之后,CD8 T细胞被耗尽,这是低增生性状态和产生抗病毒细胞因子能力损失相互影响的特点。耗尽的T细胞能够高水平表达程序性死亡-1(PD-1),并且,PD-1还可以通过T细胞活化作用上调,或者通过PD-1配位体、PD-L1和PD-L2引发。这里公开了,在老鼠的慢性病毒性传染病期间,PD-1抑制性途径是CD8 T细胞消耗的重要调节剂。作为慢性感染的应答作用,病毒特异性CD8 T细胞维持高水平的PD-1表达,但这并不作为对已经成功消除的传染病的应答作用。阻断PD-1/PD-L1相互作用的作用会导致CD8 T细胞增殖作用提高,产生抗病毒细胞因子,并减少病毒含量。

[0499] 这里评价了在人体内中对慢性感染具有特异性的CD8 T细胞是否表达PD-1,以及PD-1阻断剂是否提高CD8 T细胞反应。所述研究(1)确定了PD-1在人外周血液单核细胞(PBMC)子集:CD4、CD8、B细胞、NK、单核细胞、DC上的表达方式;(2)确定了表达PD-1的CD4和CD8 T细胞的表型;(3)确定了慢性持续性抗原(埃-巴二氏病毒(EBV)和细胞肥大病毒(CMV))和急性分解抗原(流行性感冒病毒和牛痘)-特异性细胞上PD-1的表达作用;以及(4)决定了PD-1/PD-L1相互作用对抗原-特异性细胞增殖作用的阻断效应。

[0500] 在本研究中使用了下列材料和方法:

[0501] 血液样品:从36位对EBV、CMV、流行性感冒病毒或者牛痘病毒呈血清反应阳性的健康个体处获得外周血液样品。根据对EBV、CMV、流行性感冒或者牛痘病毒蛋白质具有特异性的I类人类白细胞抗原(HLA)四聚体匹配的人类白细胞抗原(HLA)等位基因表达作用,选择这些主体。使用淋巴细胞-分离介质(Cellgro公司,位于Herndon,VA)从血液样品中分离外周血液单核细胞(PBMC)。

[0502] 抗体、肽和四聚体:获得藻红蛋白-结合的抗人PD-1(EH12、鼠IgG1)和非结合的人PD-L1(29E.2A3、鼠IgG2b)。直接结合的抗体从位于圣地亚哥,CA的Beckman Coulter公司处获得(抗CD3、CD11a、CD27、CD28、CD38、CD45RA、CD57、CD62L和颗粒酶(granzyme)-B);从位于圣地亚哥,CA的BD Pharmingen公司处获得(CD8、CD95、CD195、人类白细胞抗原(HLA)-DR、Ki-67和穿孔蛋白(perforin));以及从位于明尼阿波利斯,MA的R&D系统公司处获得(CCR7)。在位于美国乔治亚州亚特兰大的Emory大学肽合成实验室中制备肽。表达人类白细胞抗原(HLA)-A2、人类白细胞抗原(HLA)-B7和人类白细胞抗原(HLA)-B8的质粒构建物可以由位于美国乔治亚州亚特兰大NIH(美国立卫生研究所)四聚体核心研究室提供,其还可以提供一种抗原呈递细胞(APC)标记的I类主要组织相容性复合体(MHC)/肽四聚体,所述四聚体携带EBV(人类白细胞抗原(HLA)-A2-GLCTLVAML(SEQ ID NO:36)、人类白细胞抗原(HLA)-B8-RAKFKQLL(SEQ ID NO:37)和FLRGRAYGL(SEQ ID NO:38))的细胞毒性T细胞(“CTL”)反应抗原决定簇;以及CMV(人类白细胞抗原(HLA)-A2-NLVPMVATV(SEQ ID NO:39)、人类白细胞

抗原(HLA)-B7-TPRVTGGGAM(SEQ ID NO:40))、流行性感冒病毒(人类白细胞抗原(HLA)-A2-GILGFVFTL(SEQ ID NO:41))和牛痘病毒(人类白细胞抗原(HLA)-A2-CLTEYILWV(SEQ ID NO:42)和KVDDTFYYV(SEQ ID NO:43))。

[0503] 免疫表型和CFSF增殖作用:用抗体或者四聚体染色毛细血管化的(Heparinised)人全血样品(200微升),然后使用CellQuest软件在FACS Calibur上进行分析(Ibegbu et al.J Immunol.174:6088-6094,2005),或者使用FACSDiva软件(购自BD免疫血细胞计数器系统公司)在LSRII流动血细胞计数器上进行分析。对于CFSE试验,彻底的洗涤外周血液单核细胞(PBMC)($2x10^6$/毫升),并用3mM羧基荧光素二乙酸酯、琥珀酰胺酯(CFSE,Molecular Probes公司)在室温下黑暗环境中标记5分钟(参见,例如,Weston and Parish,J Immunol Methods 133:87-97,1990)。单独使用肽(1毫克/毫升)或者使用肽和抗PD-L1抗体(10毫克/毫升)一起刺激CFSE标记的外周血液单核细胞(PBMC)。参照培养基或者由外周血液单核细胞(PBMC)单独组成、或者由外周血液单核细胞(PBMC)和抗PD-L1抗体组成、或者由外周血液单核细胞(PBMC)和一种同种型对照抗体(IgG2b;10 1毫克/毫升)组成。在37℃下培养6天之后,所述细胞被洗涤,并用四聚体与抗CD3和抗CD8抗体一起进行细胞外染色。

[0504] 可以获得下面的结果:

[0505] PD-1在外周血液单核细胞(PBMC)子集上的表达方式:检测PD-1在健康个体的外周血液单核细胞(PBMC)子集上的表达。可以看出,CD8+ T细胞、CD4+ T细胞和单核细胞(CD14+)都能表达高水平的PD-1,B细胞(CD20+)表达了低水平的PD-1,NK细胞(CD56+)和DC(CD11c+)不表达PD-1。

[0506] PD-1优选的在效应因子记忆CD8和CD4 T细胞之间表达:检测从正常健康个体中获得的CD8 T细胞共表达PD-1和多种与分化作用状态和功能相关的表型标记物的能力(图20A)。总体来说,天然、中央记忆表型CD8 T细胞只表达低水平的PD-1,而表达多种与效应因子/效应因子记忆/或者耗尽表型标记物的CD8 T细胞可以表达高水平的PD-1(图20B)。该数据显示PD-1可以优选的在效应因子记忆CD8 T细胞之间表达。当检测CD4 T细胞时,可以发现相似的趋势(图20C)。

[0507] 在持续性抗原特异性记忆CD8 T细胞上上调PD-1:为了评价对人慢性感染有特异性的CD8 T细胞是否显示增加的PD-1,通过用EBV-四聚体、CMV-四聚体、流行性感冒-四聚体和牛痘病毒-特异性四聚体染色,将PD-1在对慢性持续性感染病毒(EBV和CMV)有特异性的CD8 T细胞上的表达与在对急性病毒(流行性感冒病毒和牛痘病毒)具有特异性的T细胞上的表达相比较(图21A-21B)。图21A显示了EBV-特异性CD8 T细胞、CMV-特异性CD8 T细胞、流行性感冒病毒-CD8 T细胞和牛痘病毒-特异性CD8 T细胞上代表性的PD-1GMFI。与流行性感冒病毒-特异性CD8 T细胞($p=0.0335$)和牛痘病毒-特异性CD8 T细胞($p=0.0036$)上PD-1的表达相比,在EBV-特异性CD8 T细胞上PD-1的表达有所增加(图21A-21B)。相似地,CMV-特异性CD8 T细胞比流行性感冒病毒-特异性CD8 T细胞($p=0.0431$)和牛痘病毒-特异性CD8 T细胞更频繁的表达PD-1(图21A-21B)。该结果显示PD-1表达和抗原经历之间的关系。

[0508] 抗PD-L1阻断剂增加慢性持久性病毒特异性CD8 T细胞的增殖作用:评价PD-1阻断剂是否提高持续性抗原-特异性CD8 T细胞反应,与老鼠体内观察到的结果相似。用EBV-特异性肽、CMV-特异性肽、流行性感冒病毒特异性肽或者牛痘病毒-特异性肽在有或者没有抗-PD-L1抗体存在的条件下刺激CFSE标记的细胞。6天之后,比较单独用肽刺激的培养物与

用肽刺激之后用抗-PD-L1阻断的培养物之间四聚体+ CFSElo细胞和CD8+ CFSElo细胞的百分比。图22A表示了CMV-特异性CD8 T细胞和EBV-特异性CD8 T细胞增值作用的代表性流式细胞计图。图22B显示了CMV(n＝5)、EBV(n＝6)、流行性感冒(n＝2)和牛痘(n＝2)血清反应阳性个体的集合数据。阻断PD-1/PD-L1与抗-PD-L1抗体之间的相互作用会导致EBV-特异性CD8 T细胞和CMV-特异性CD8 T细胞增殖作用的增加，然而，用抗-PD-L1阻断之后，流行性感冒病毒-特异性CD8 T细胞和牛痘病毒-特异性CD8 T细胞不显示增殖。该结果说明，在有肽加抗PD-L1阻断抗体参与的情况下，与单独使用肽进行刺激相比，EBV-特异性CD8 T细胞或CMV-特异性CD8 T细胞的出现率增加了高达3.5倍。评价抗-PD-L1抗体阻断之后抗原特异性CD8 T细胞增殖作用是否增加的过程与该细胞表达的PD-1有关。这些数据表明了PD-1表达和抗原-特异性CD8 T细胞增殖作用之间的正向相关性(p＝0.0083)(图22C)。

[0509] 实施例18：在慢性人HCV传染病中的肝脏渗透性淋巴细胞显示耗尽的表型，以及高PD-1表达和低CD127表达。

[0510] 如下所述进行试验，慢性HCV传染、外周HCV-特异性T细胞表达高水平PD-1的证明，以及阻断PD-1/PD-L1相互作用的证明导致提高的增殖能力。重要的是，肝内HCV-特异性T细胞不仅能够表达高水平的PD-1，而且能够减少IL-7受体α(CD127)，以及一种具有HCV抗原特异性并且被划分到肝脏中的耗尽的表型，和病毒复制位点。

[0511] 目前，没有疫苗能够预防HCV传染病，并且只有许可的疗法、α干扰素(IFNα)，α干扰素(IFNα)无论是单独使用还是与核苷类似物病毒唑结合使用都是昂贵的，并且对于大多数流行的基因型(基因型1)只与至多50％的清除率有关，同时会产生显著的副作用。有效抗HCV治疗剂选择的贫乏突出了对有效介入治疗的需要，所述介入治疗具有增加或者补充天然免疫反应的目的，该疗法可以单独使用，也可以与抗病毒药物疗法结合，来预防HCV传染病有害的后果。

[0512] 目前，对PD-1表达及其在慢性HCV传染病中T细胞消耗中的作用知之甚少，尤其是肝脏的主动感染的位点。本研究通过测定PD-1在患有慢性HCV传染病的病人肝脏和外周血液中的抗原特异性CD8+ T细胞中的表达，以图更好的理解HCV传染病的T细胞表型。

[0513] 本研究使用了下列材料和方法：

[0514] 主体：抗体筛选的十七位患有慢性HCV传染病(HCV抗体和HCV PCR阳性)并且对HIV阴性的病人应征参与本研究。所有的病人在应征之前都没有进行HCV抗病毒疗法。通过荧光活化的细胞分类法(FACS)分析十五位病人中的7位对人类白细胞抗原(HLA)-A2呈阳性。表5概括了病人的特点。

[0515] 表5.病人的人口统计资料和临床数据

[0516]

病人身份证明	性别	年龄	HLA-A2	HCV表型	病毒含量基线(IU/ml)	ALT
153 HCV*	男	43	+	2b	7,340,000	25
178 HCV*	女	48	+	2	18,330,000	62
179 HCV	男	54	-	1a	197,000	197
183 HCV	女	56	+	1a	1,170,000	45
190 HCV	男	52	-	1a	5,990,000	27
193 HCV	男	66	+	1a	16,120,000	30
601 HCV	男	60	-	1b	4,690,000	25
602 HCV	男	48	-	1a	586,000	80
603 HCV	男	58	+	1a	1,820,000	36
604 HCV	男	58	-	1a	2,850,000	57
605 HCV	女	30	-	1	819,000	57
606 HCV	男	50	-	1b	591,000	18
607 HCV	男	59	+	3a	343,000	31
608 HCV	男	57	-	1b	395,000	16
609 HCV	男	55	+	1a	833,000	67
611 HCV	男	53	-	1a	1,220,000	88
613 HCV	男	59	-	1b	6,160,000	40

[0517] HCV抗体试验，病毒含量确定和基因型：按照厂家提供的说明书(Abbott诊断法，Abbott Park,Ill;Bio-Rad实验室,Hercules,CA)使用试剂盒通过酶联免疫吸附测定进行HCV抗体试验。使用实时RT-PCR试验(罗氏分子系统公司,Alameda CA)进行HCV病毒含量的定量测定。使用实时RT-PCR试验(Abbott诊断法,Abbott Park,Ill)和线性探针试验(LIPA)(拜耳公司诊断法,Research Triangle Park,NC)进行HCV基因定型。

[0518] 外周血液单核细胞：收集每个病人的乙二胺四乙酸和肝素抗凝聚血液(50-70毫

升),或者直接用于荧光活化的细胞分类法(FACS)染色或者用于外周血液单核细胞(PBMC)分离。使用Ficoll-Paque加密度梯度法(Amersham,Oslo,挪威)分离外周血液单核细胞(PBMC),在磷酸盐缓冲盐水中洗涤两次,然后或者立即进行分析或者被冷冻保存在含有90%胎牛血清(Hyclone)和10%二甲基亚砜(Sigma-Aldrich公司,圣路易斯,MO)的培养基中。

[0519] 肝活组织检查:通过超声导纱针活体检查或者通过颈内静脉荧光检查技术获得肝脏组织,并且立即放入包括10%胎牛血清(Hyclone,Logan,UT)的RPMI-1640培养基(Gibco)中进行免疫试验。另外的片段被固定在福尔马林溶液中进行组织学检查。

[0520] 肝内T细胞分离:在包括10%胎牛血清(Hyclone,Logan,UT)的RPMI-1640培养基(Gibco,Carlsbad,CA)中获得肝脏活体检查样品,将此样品用相同的介质洗涤3次,去掉细胞碎片和RBC。使用自动机械崩解系统(组织匀浆器(Medimachine),Becton Dickinson,San Jose,CA)进行肝脏渗透性淋巴细胞的分离。将样品放入50微摩Medicon中,然后放入组织匀浆器(Medimachine)中运行15秒。使用注射器在注射部分去掉崩解的样品。用包括10%胎牛血清(Hyclone,Logan,UT)的RPMI培养基(Gibco,Carlsbad,CA)洗涤Medicon两次,以保证最大程度的细胞恢复。所得细胞立即用作荧光活化的细胞分类法(FACS)染色。

[0521] 抗体、人类白细胞抗原(HLA)-A2四聚体和流式细胞计:按照厂家提供的说明书,使用FITC、PE、PerCP和抗原呈递细胞(APC)标记的单克隆抗体或者四聚体对细胞染色,使用FACS Calibur(Becton Dickinson,San Jose,CA)进行流细胞计数法。用FlowJo软件(Treestar)分析荧光活化的细胞分类法(FACS)数据。使用下列从BD Pharmingen公司(BD生物科学,San Jose,CA)购得的单克隆抗体:Anti-CD8 PerCP和抗CD45RA抗原呈递细胞(APC)。从Beckman Coulter公司(Fullerton,CA)购买抗CD62L FITC、CD3 FITC和CD127 PE。按照(Dorfman et al.,Am.J.Surg.Pathol.30:802-810,2006)的描述制备抗-PD-1PE结合的抗体(克隆EH12)。人类白细胞抗原(HLA)-A2对下列CD8+ T细胞抗原决定簇具有特异性:HCV 1073:CINGVCWTV(SEQ ID NO:44);HCV-1406:KLVALGINAV(SEQ ID NO:45)。在FACSCaliber(BD生物科学公司,San Jose,CA)上进行流式细胞收集,并使用FlowJo软件(v8.1.1版)进行分析。

[0522] CFSE标记和抗体阻断剂:用磷酸盐缓冲盐水洗涤10x0^6外周血液单核细胞(PBMC)并用3微摩的CFSE(Molecular Probes公司)标记。将细胞调节到1x10^6细胞/毫升并在有2微克/毫升A2-HCV 1073(CINGVCWTV,SEQ ID NO:44)肽参与的情况下培养。在刺激作用之后第3天,加入10U/毫升的白细胞间介素(IL)-2。每个实验中都包含未刺激的参照物。在刺激作用的时候,向细胞培养物中加入浓度为10微克/毫升的特异性阻断抗体(抗PD-L1;克隆#_29E和抗PD-1;克隆#_EH12(上述Dofman等人的文献))。将细胞培养6天,收获并用表面抗体和四聚体染色,随后使用流细胞计数法进行分析。

[0523] 统计分析:对结果制表并使用GraphPad Prism(v4)分析。使用配对T检测在同一病人内部进行比较。使用未配对的T检测在不同病人之间进行比较。

[0524] 可以获得下列结果:

[0525] 在HCV特异性CD8+ T细胞上的PD-1表达:如上所述,十七位患有慢性HCV传染病(并且对HIV阴性)的病人被研究(表5)。15位病人经历血液和肝脏制样,通过流式细胞分析进行定型,这些所有的病人在登记参加研究之前都没有经过任何药理学抗病毒治疗。7位病人是

人类白细胞抗原(HLA)-A2阳性的,并且通过人类白细胞抗原(HLA)四聚体染色能够在外周显示出HCV特异性CD8+ T细胞(表5)。评价这些HCV特异性CD8+ T细胞的PD-1的表达(图23A)。PD-1在健康的供体外周血液中总CD8+ T细胞上的表达与在HCV感染病人外周血液CD8+ T细胞中的表达并没有显著区别(图23B)。相反,从外周血液中获得的大多数HCV-特异性四聚体阳性CD8+ T细胞样品都是PD-1阳性的(是指85%是阳性的,SEM 3.6)(图23A),且与总CD8+ T细胞的表达相比,具有显著较高的表达作用($p<0.0001$)(图23B)。还调查了抗原特异性CD8+ T细胞上分化作用功能分子、共刺激作用功能分子、通讯功能分子和效应功能分子的表达。HCV-特异性四聚体阳性细胞显示出一种记忆表型(高CD11a、低CD45RA),较早的分化作用标记物(高CD27、高CD28、中间表达水平的CCR7和CD62L)和低水平的效应功能颗粒酶(granzyme)B和穿孔蛋白(perforin)介质。有趣地是,这些外周血液中的HCV四聚体阳性T细胞能够表达高水平的CD127(白细胞间介素(IL)-7受体链),在低水平下表达的表型标记物能够识别削弱的记忆T细胞分化作用。

[0526] 为了确定CD8+ T细胞的表型是否与非慢性感染的设置不同,对没有感染上HCV的5位健康的人类白细胞抗原(HLA)-A2+供体进行流行性感冒病毒特异性T细胞检查。结果显示,表达PD-1的外周流行性感冒病毒四聚体CD8+ T细胞的百分比是49%(SEM 14.1)(图23C)。通过四聚体分析还可以确认出7个人类白细胞抗原(HLA)-A2阳性慢性HCV病人中的5个具有流行性感冒病毒特异性CD8+ T细胞。在慢性感染HCV病人体内,表达PD-1的流行性感冒病毒特异性T细胞的百分比与健康供体的百分比没有显著的不同。重要的是,7位人类白细胞抗原(HLA)-A2+ HCV病人中的五位还具有可检测的流行性感冒病毒特异性CD8+ T细胞,对每个病人,比较对非慢性(流行性感冒病毒)感染和慢性(HCV)传染有特异性的T细胞中PD-1的表达。流行性感冒病毒特异性T细胞和HCV-特异性T细胞之间PD-1表达的差异是显著的(图23C)。HCV特异性CD8+ T细胞表达PD-1的百分比(通过83%,SEM 6.4)大约PD-1+流行性感冒病毒特异性CD8+ T细胞的百分比(49%,SEM 12.3)($p=0.048$)(图23C)。

[0527] PD-1在人外周血液和肝脏渗透性淋巴细胞上的表达:分析外周血液和干燥活体检查,得到15位患有慢性HCV感染的病人的PD-1表达。图24a显示了五个病人的代表性流式细胞计分析结果。在外周血液中,27%(SEM 3.4)的CD8+ T细胞是PD-1+,在肝脏中,这种细胞的出现率增加了2倍(57%,SEM 3.6)(图24b)。因此,肝脏中富集高水平的PD-1表达细胞,而天然细胞能够表达高水平的CD62L和CD45RA,在肝脏中,大多数CD8+ T细胞是CD62L低/CD45RA低表达细胞,与一种记忆表型一致(图24c)。对肝脏和外周中记忆细胞群体的特异性分析说明,在肝脏中的PD-1表达相比于外周中的表达有所提高(图24c)。这些数据说明,肝内T细胞中表达PD-1的细胞所占百分比的增加不仅仅是由于缺少天然群体造成的。更准确的说,比外周血液相比,肝脏中存在一种优先富集的PD-1+CD8+ T效应因子记忆(CD62L低/CD45RA低)细胞(图23C)。

[0528] CD127在人外周血液和肝脏渗透性淋巴细胞上的表达:为了维持记忆CD8+ T细胞,需要白细胞间介素(IL)-7(Kaech et al.,Nat Immunol 4:1191-8,2003),并且其受体的α链,CD127,在持续性淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)和γ疱疹病毒传染病中的抗原特异性T细胞上被下调(参见,例如,Fuller et al.,J Immunol 174:5926-30,2005(Fuller等人2005年在“免疫学杂志”第174卷5926-5930页发表的文献))。在慢性感染期间损失的CD127与细胞因子产生的减少、对细胞凋亡的敏感度以及记忆病毒特异性CD8+ T细胞持续

在宿主体内的能力的降低有关。因此，急性乙型肝炎病毒(HBV)传染病的治疗方法与CD127表达的上调有关，并伴随有PD-1表达的损失(Boettler et al.,J Virol 80:3532-40,2006(boettler等人2006年在“病毒杂志”第80卷3532-40页的文献))。有趣的是，在慢性HCV病人中，只有20％(SEM 4.8)的总外周CD8+ T细胞是CD127阴性细胞，但是在肝脏CD8+ T细胞提取物中，这一百分比增加到58％(SEM 4.4)(图24d)。从此，肝脏中富集一种耗尽的表型，该表型具有高的PD-1和低CD127细胞支配作用。这一数据显示慢性HCV病人中的肝脏渗透性CD8+ T细胞不与外周CD8+ T细胞群体呈表型镜像。在病毒感染外周血液中的T细胞和单核细胞的传染病中，低水平的CD127与功能性或者记忆T细胞缺陷相关(Boutboul et al., Aids 19:1981-6,2005)。在本研究中，肝内细胞的区域化显示一种耗尽的表型，这一特点说明表型与持续性病毒复制的位点密切相关。

[0529] PD-1和CD127在肝脏中HCV抗原特异性CD8+ T细胞上的表达：参与本研究的病人中有两位人类白细胞抗原(HLA)-A2病人还具有通过在肝脏中进行四聚体染色后可看作是相同的HCV特异性群体(图25)。对于这些个体，将肝脏中HCV特异性四聚体阳性CD8+ T细胞上PD-1和CD127的表达直接与外围血液中HCV特异性四聚体阳性CD8+ T细胞上PD-1和CD127的表达相比较。来自外周血液中的HCV特异性CD8+ T细胞主要是PD-1阳性的(平均85％，SEM 3.6)和CD127阳性(平均84％，SEM 4.0)，而肝脏中HCV特异性CD8+ T细胞主要是PD-1阳性的(平均92％)但是只有很少的CD127阳性(平均13％)(图25)。在病毒复制位点，表达高水平PD-1的CD127阴性细胞好像变多。与肝内部分相比，外周抗原特异性CD8+ T细胞对CD127的表达具有差异性，这与为了产生CD127下调作用而进行的抗原接触(暴露)的水平和时间有关。在患有淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)传染病的老鼠中，暴露于持续性抗原产生慢性传染病，CD127被持续性下调，反之，使用GP33短时间的暴露于淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)抗原只会对CD127表达产生暂时的抑制，并且不能诱导T细胞耗尽(Lang et al.,Eur J Immunol 35:738-45,2005(Lang等人2005年在“欧洲免疫杂志”第35卷738-45页发表的文献))。根据抗原有效性，还观察到暴露时间也会影响CD62L和CD127的表达，而持续性抗原会导致CD62L和CD127的持续性下调(Bachmann et al.,J Immunol 175:4686-96, 2005(Bachmann等人2005年在“免疫学杂志”第175卷4686-96页发表的文献))。不局限于某一理论，在慢性HCV传染病中，在外周血液中检测到的少量HCV特异性CD8+ T细胞不能持续性暴露于足量抗原中以维持低水平的CD127。因此，T细胞可能“相信”病毒已经被清除了。

[0530] PD-1/PD-L1的阻断剂会导致HCV特异性四聚体阳性CD8+ T细胞的增殖作用增加：来自患者的证据表明，阻断PD-1/PD-L1与抗PD-L1或者抗PD-1抗体之间的相互作用能够增加HCV-特异性T细胞的增殖能力(图26)。在用同源肽刺激6天之后，通过检测羧基荧光素琥珀酰胺酯(CFSE)低四聚体标记的CD8+ T细胞的出现率可以说明，在有白细胞间介素(IL)-2和HCV-特异性肽参与的情况下加入阻断抗体会导致HCV特异性T细胞增殖作用增加4倍。

[0531] 这一结果显示，在传染位点，肝脏中，能够表达PD-1的HCV特异性CD8+ T细胞具有高出现率。其次，来自患有慢性HCV传染病病人的外周血液中的大多数HCV特异性CD8+ T细胞都能表达高水平的CD127。通过研究与效应因子功能损伤和T细胞耗尽有关的PD-1表达，来确定慢性HCV传染病中T细胞表型的特点。结果显示肝脏中大多数HCV特异性T细胞都能表达PD-1，但是缺失CD127，一种与T细胞耗尽一致的表型。因此，PD-1拮抗剂被用作治疗剂来治疗HCV传染病。

[0532] 实施例19:PD1阻断剂诱导SIV-特异性CD8细胞体外扩增

[0533] 抗病毒CD8 T细胞在控制HIV/SIV感染方面起到至关重要的作用。通过在SIV感染猕猴暂时体内耗尽期间病毒再现,显示出CD8 T细胞的中心性作用。据此,目前使用的疫苗策略目的是引发抗病毒CD8 T细胞的高出现率,这种疫苗策略包括猕猴中致病性的SHIV和SIV激发作用(参见,例如Barouch et al.,Science 290,486-92(2000);Casimiro et al.,J Virol 79,15547-55(2005)。

[0534] 抗病毒CD8 T细胞的功能和出现率对慢性病毒性传染病,例如HIV(Migueles et al.Nat Immunol 3,1061-8,2002)和淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)的控制都是至关重要的。有效的抗病毒CD8 T细胞具有许多功能性质,包括能够产生不同的细胞因子,细胞毒素能力和高增殖低凋亡能力。在慢性病毒性传染病中,病毒-特异性CD8 T细胞经历与这些功能中的许多功能缺失有关的耗尽(Zajac et al.,J Exp Med 188,2205-13,1998)。相似的,来自患有进行性疾病的个体中的HIV-特异性CD8 T细胞已经被证明具有功能损伤。这些CD8 T细胞可以产生细胞因子,例如,干扰素(IFN)-,但是这些细胞产生白细胞间介素(IL)-2的能力、表达穿孔蛋白(perforin)(Appay et al.,J Exp Med 192,63-75,2000(Appay等人2000年在"表达医学杂志"第192卷63-75页的文献))的能力和增殖能力受到损伤,其中,白细胞间介素(IL)-2是一种对T细胞增殖和存活至关重要的细胞因子;穿孔蛋白(perforin)是一种对细胞溶解功能值至关重要的分子;CD8 T细胞增殖能力是对HIV和SIV控制至关重要的性质(参见,例如,Harari et al.,Blood 103,966-72,2004(Harari等人2004年在"血液"第103卷966-72上发表的文献))。HIV-特异性T细胞表达高水平的PD-1,且这种表达作用与病毒败血症的水平呈正比。体外瞬时阻断PD-1和PD-L1的相互作用能够修复HIV特异性T细胞功能。

[0535] 用致病性SIV239感染猕猴之后,检测PD-1在SIV特异性CD8 T细胞上的表达。结果显示SIV-特异性CD8 T细胞表达高水平的PD-1,并且PD-1:PDL-1途径体外阻断剂能够导致这些细胞提高的扩增作用。可以获得下列结果:

[0536] SIV239感染之后SIV-特异性CD8 T细胞上提高的PD-1表达:调查正常猕猴和SIV感染的猕猴体内CD8 T细胞上PD-1的表达水平,从而理解PD-1表达的作用及其控制SIV传染之间的关系。来自正常健康的猕猴的总CD8 T细胞中有显著的比例(40-50%)表达PD-1(图27A)。PD-1的表达作用主要局限于记忆细胞,并在天然CD8 T细胞上缺失。在来自SIVmac239感染猕猴的总CD8 T细胞中也可以观察到相似的PD-1表达方式(图27B和C)。然而,大多数的SIV Gag CM9特异性CD8 T细胞(>95%)对PD-1表达是呈阳性的,并且相比于总CD8 T细胞(MFI值为220),这些SIV Gag CM9特异性CD8 T细胞中有显著的比例可以进一步上调PD-1表达(MFI值为580)(图27D)。总起来说,这些结果显示,来自正常SIV感染猕猴的显著比例的记忆CD8 T细胞能够表达PD-1并且PD-1的表达水平在SIV特异性CD8 T细胞上被显著提高了。

[0537] PD-1的体外阻断剂导致SIV-特异性CD8 T细胞扩增的提高:为了研究PD-1阻断剂对SIV-特异性CD8 T细胞功能的作用,在存在或者不存在人PD-1分子阻断抗体的条件下进行增殖试验,所述人PD-1分子与猕猴PD-1进行交叉反应。从感染上猿类和人类免疫缺陷性病毒89.6P(SHIV 89.6P)的Mamu A*01阳性恒河猴身上收集外周血液单核细胞(PBMC),用P11C肽(Gag-CM9抗原决定簇)在存在或者不存在抗PD-1阻断抗体的情况下刺激所述外周血液单核细胞(PBMC)6天。在刺激作用结束时,评价Gag CM-9四聚体阳性细胞的出现率。使用

未进行刺激的细胞作为阴性参照。如图28A-28B所示，用P11C肽进行的刺激作用会导致四聚体阳性细胞的出现率增加4-80倍。此外，在6个实验猕猴中的4个中，在有抗PD-1阻断抗体参与的情况下用P11C肽进行刺激作用所产生的四聚体阳性细胞出现率的增加，比在不存在阻断抗体的情况下用P11C肽进行刺激作用产生的四聚体阳性细胞出现率增加高2-4倍。

[0538] 这些结果显示在SIV感染的猕猴体内，PD-1阻断剂能够提高SIV-特异性CD8 T细胞的增殖能力。

[0539] 实施例20：PD-L2的作用

[0540] PD-1配位体存在不同的表达方式：PD-L1被组成性表达并且再生血细胞和非生血细胞中都被上调到较高的量，反之，PD-L2只在树状细胞(DCs)和巨噬细胞上诱导表达。虽然评价PD-L2在T细胞活化方面的作用的研究已经显示了PD-L2的抑制性功能，但是其他的研究也报道了PD-L2能够刺激T细胞增殖作用和刺激细胞因子产生。为了概括PD-L2在T细胞免疫反应中的作用，在淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)Armstrong株感染之后，检查PD-L2在不同体外细胞型上的表达(图29)。与PD-L1表达相反，在非常短的时间内(感染后1-4天)，PD-L2在树状细胞(DC)上被限制性表达。这一结果显示PD-L2的表达与树状细胞(DC)调节作用密切相关，并导致对T细胞活化作用的调节。

[0541] 实施例21：在健康人血液中大多数效应因子记忆CD8 T细胞上表达的PD-1

[0542] 调查来自健康人血液的CD3+/CD8+ T细胞上PD-1的表达作用。在人血中，20-60％的CD8 T细胞表达PD-1。检测T细胞分化状态和PD-1表达之间的关系。根据CD45RA和CCR7表达方式，CD3+/CD8+ T细胞是一种天然的、中央记忆(TCM)、效应因子记忆(TEM)、和末端分化的效应因子(TEMRA)子集。PD-1不能被天然T细胞和三分之一的TCM和TEMRA表达。相反，60％的TEM表达PD-1。这些数据说明，从健康成人血液中分离的大多数TEM能够表达PD-1。

[0543] 根据这些分析，以CD45RA和CCR7表达为基础，T细胞再被分成多种群体。在CD45RA表达和PD-1表达之间还发现了另外的关系。具体而言，具有最低CD45RA表达的CCR7-/CD8+ T细胞包括最高的PD-1+细胞比例。总之，TEM能显著的表达PD-1，TEMRA和TCM能够较少的表达PD-1，且在天然CD8 T细胞中不表达PD-1。

[0544] 这些数据说明，在健康成人之中，一大部分TEM CD8 T细胞表达PD-1.为了表征PD-1+CD8 T细胞的性质，进一步检验PD-1和若干T细胞分化作用标记物的共表达。大多数PD-1+CD8 T细胞产生与受到的抗原和效应因子/效应因子记忆分化作用有关的标记物。例如，在PD-1表达过程中富集CD11a+/CCR7-/CD62L-/CD45RA-/KLRG1+/颗粒酶(granzyme)B+/穿孔蛋白+CD8 T细胞。相反，天然表型(CD11a-/CCR7+/CD62L+/CD45RA+/KLRG1-)CD8 T细胞表达低水平的PD-1。因此，PD-1优选的在经受抗原的CD8 T细胞上表达，并具有效应因子/效应因子记忆性质。

[0545] 实施例22：在健康人血液中的大多数效应因子记忆CD4 T细胞表达PD-1

[0546] 然后调查CD3+ CD4+ T细胞之间PD-1的表达。在健康成人的血液中，百分之三十的CD4 T细胞表达PD-1。与CD8 T细胞相似，天然CD4 T细胞表达少量的PD-1。当少量的TCM CD4 T细胞表达PD-1时，PD-1的表达作用优选的在TEM CD4 T细胞中富集(50％)。

[0547] 为了进一步表征表达PD的CD4 T细胞的性质，对来自健康个体血液中的CD4+/CD3+ T细胞进行试验，检验PD-1和若干T细胞分化作用标记物的共表达。与CD8 T细胞类似，PD-1表达富集在具有效应因子/效应因子记忆表型的CD4 T细胞上，所述细胞包括CD62L-、CD95

+、CD45RA-、CCR7-、和CCR5+细胞。

[0548] 实施例23:PD-1在对EBV和CMV感染有特异性的CD8 T细胞上更高水平的表达

[0549] 为了检测PD-1是否与病毒抗原持久性有关,比较EBV、CMV、流行性感冒病毒和牛痘病毒特异性CD8 T细胞上PD-1的表达。EBV和CMV特异性CD8 T细胞表达高水平的PD-1。相反,流行性感冒病毒特异性记忆CD8 T细胞表达中间水平的PD-1,牛痘病毒特异性CD8 T细胞表达低水平的PD-1。因此,对于慢性感染(EBV和CMV)有特异性的记忆CD8 T细胞比对急性感染(流行性感冒病毒和牛痘病毒)有特异性的记忆CD8 T细胞表达较高水平的PD-1。这些结果显示对于慢性感染(EBV和CMV)有特异性的CD8 T细胞比对急性感染(流行性感冒病毒和牛痘病毒)有特异性的CD8 T细胞表达较高水平的PD-1。对普通感染有特异性的CD8 T细胞可以表达高水平的PD-1。

[0550] 实施例24:抗PD-L1阻断剂增加对人EBV和CMV感染有特异性的CD8 T细胞的增殖作用

[0551] 依据体外刺激作用,PD-1抑制性途径的阻断导致HIV-特异性CD8 T细胞克隆增殖作用提高。由于对于普通慢性感染具有特异性的CD8 T细胞也表达PD-1,检验阻断PD-1/PD-L1途径是否可以提高对EBV、CMV、以及牛痘病毒(一种能够导致PD-1记忆CD8 T细胞的急性传染)具有特异性的CD8 T细胞的增殖作用。从个体血液中分离出来的淋巴细胞包括对CMV、EBV具有特异性的CD8 T细胞,用CFSE标记该细胞并在不同的情况下培养6天。正如所料,用培养基单独培养,或者用培养基与抗PD-L1抗体一起培养新近分离的外周血液单核细胞(PBMC)不会导致病毒特异性CD8 T细胞的增殖。用病毒衍生的肽刺激外周血液单核细胞(PBMC)6天从而除去四聚体+CD8 T细胞。然而,在有抗PD-L1阻断抗体参与的情况下,外周血液单核细胞(PBMC)的肽刺激作用进一步提高了EBV和CMV-特异性CD8 T细胞的除去,从而与单独使用肽相比,增殖作用成倍增加。由抗PD-L1阻断抗体诱导的提高的除去作用根据个体的变化而变化,甚至,在给定的个体内部的不同抗原决定簇之间也存在变化。此外,PD-1阻断剂不会导致牛痘病毒或者流行性感冒病毒特异性CD8 T细胞增殖作用的增加。通过在培养基中阻断PD-L1而提高的除去作用的程度与刺激作用之前抗原特异性CD8 T细胞表达的PD-1的量有关。这些数据表明,在对慢性感染有特异性的CD8 T细胞上进行的PD-1表达能够在抗原刺激作用下抑制其增值能力。

[0552] 实施例25:持续的PD-1阻断剂进一步增加对慢性感染有特异性的CD8 T细胞的增殖作用

[0553] 根据体外刺激作用,加入PD-L1阻断抗体会导致对EBV和CMV具有特异性的CD8 T细胞除去作用的增加。加入一次抗PD-L1单克隆抗体(第0天),并且在6天培养期结尾的时候评价增殖作用。老鼠体内抗PD-L1治疗包括多次注射阻断抗体。此外,在对这些老鼠的研究中,体内PD-L1阻断剂导致对慢性病毒抗原具有特异性的CD8 T细胞之间PD-1表达的快速上调。为此,检验重复加入抗PD-L1刺激T细胞培养物是否会进一步提高增值作用。在第0、2、4天加入抗-PD-L1单克隆抗体产生的EBV特异性CD8 T细胞积累作用大于在第0天加入一次单克隆抗体产生的积累作用。对于CMV特异性CD8 T细胞也可以观察到相似的数据。这些数据表明持续阻断PD-1信号可以最优化增加对慢性抗原具有特异性的CD8 T细胞数目的能力。

[0554] 实施例26:实施例27中描述的研究的其他方法

[0555] 研究组:对十四个感染SIV的印度恒河猴(猕猴)进行研究。八个猕猴被用于早期慢

性阶段研究，用200 TCID50的SIV251进行静脉感染。六只猕猴被用于晚期慢性阶段，其中三只用SIV251静脉感染，另外三只用SIV239静脉感染。所有的猕猴，除了RDb11，都是Mamu B08和Mamu B17等位基因是阴性的。RDb11是Mamu B17等位基因阳性的。

[0556] 体内抗体治疗：对猕猴注射部分人源化的鼠抗-人PD-1抗体(克隆EH12-1540)(Dofrman et al.,Am J Surg Pathol 30,802-810(2006))或者注射参照抗体(SYNAGIS)。抗-PD-1抗体具有与人IgG1(经过突变减少FcR和补体结合)结合的鼠可变重链区(Xu et al.,Cell Immunol 200,16-26(2000))和与人κ相连的鼠可变轻链区。EH12克隆株与猕猴PD-1结合，并封闭PD-1与其配位体的体外相互作用(Velu et al.,J Virol 81,5819-5828(2007))。SYNAGIS是一种人源化的鼠单克隆抗体(IgG1κ)，这种单克隆抗体对呼吸道合胞体病毒(Medimmune公司)具有特异性。以3毫克每千克体重的剂量在第0、3、7和10天静脉给药抗体。

[0557] 免疫反应：使用之前描述的方法分离来自血液中的外周血单核细胞和来自直肠的活组织检查物质中的白细胞(Velu et al.,J Virol 81,5819-5828(2007)。按照之前的描述，进行四具体染色(Amara et al.,Science 292,69-74(2001))、胞内细胞因子生产(Kannanganat et al.,J Virol 81,8468-8476(2007))和抗-SIV Env结合抗体测量(Lai et al.,Virology 369,153-167(2007))。

[0558] B细胞反应：用分别与不同荧光素结合的抗CD3(SP34-2克隆株，购自BD Biosciences)、CD20(2H7，购自e-Biosciences)，CD21(B-ly4，购自Becton Dickson)CD27(M-T2712，购自Becton Dickson)和PD-1(EH-12克隆株)表面染色总量100微升的血液。水解细胞并用FACS水解液固定，然后根据说明书，使用通透剂FACS perm(BD Biosciences)通透细胞。然后使用与藻红蛋白结合的抗-Ki67抗体(B56克隆株，购自Becton Dickson)。对细胞进行胞内ki67染色。在染色之后，洗涤细胞并使用LSRII(BD Biosciences)收获，然后使用$F_{LOW}J_O^{TM}$软件分析。

[0559] 抗-PD-1抗体的滴定和猴对抗PD-1抗体的血清抗体反应：为了测定抗-PD-1抗体水平，用山羊抗-鼠免疫球蛋白(前吸收人免疫球蛋白，购自Southern Biotech公司)包覆培养板，使用不同稀释度的血清阻断并培养，从而获得阻断抗体。使用与HRP结合的抗鼠IgG(前吸收人免疫球蛋白，购自Southern Biotech公司)检测结合的抗体。使用相同的方式捕获已知量阻断抗体，使用该抗体产生标准曲线。为了测定猴抗-PD-1抗体的抗体免疫反应水平，用抗-PD-1抗体(5微克/毫升)包覆培养板，使用不同稀释度的血清阻断并培养，从而获得抗-阻断抗体。使用与HRP结合的抗-人-λ-链-特异性抗体(购自Southern Biotech公司)检测结合的抗体。由于只有保守区的重链和轻链是人源化的，并且保守区的轻链是κ，所以所检测到的抗体不结合阻断抗体。是用抗-猕猴免疫球蛋白捕获已知量的纯化的猕猴免疫球蛋白，并由此制作标准曲线，使用标准曲线估计捕获的猴免疫球蛋白的量。

[0560] 定量SIV拷贝数：如之前描述的，使用定量化实时PCR(Amara et al.,Science 292,69-74(2001))检测SIV拷贝数。提取所有的物种并双倍扩增，报道平均结果。

[0561] Tat TL8抗原决定簇的扩增和测序：使用限制稀释的RT-PCR扩增包含Tat TL8抗原决定簇的具有350个核苷的片段。使用QIA_{AMP}^{TM}病毒RNA迷你试剂盒(Qiagen)从而血浆中提取病毒RNA、使用SIVmac239-特异性引物Tat-RT3(5′-TGGGGATAATTTTACACAAGGC-3′)和反转录酶III(Superscript III)(Invitrogen)，按照手册方案，对vRNA进行反转录。稀释所得的

cDNA，然后在巢式PCR中凭经验确定所得cDNA的拷贝数。使用Expand HiFi PCR试剂盒(罗氏应用化学)，用下列引物以每反应大约0.2的拷贝进行巢式PCR：

[0562] 外部引物：

[0563] Tat-F1(5'-GATGAATGGGTAGTGGAGGTTCTGG-3')(SEQ ID NO:53)

[0564] Tat-R2(5'-CCCAAGTATCCCTATTCTTGGTTGCAC-3')(SEQ ID NO:54)

[0565] 内部引物:

[0566] Tat-F3(5'-TGATCCTCGCTTGCTAACTG-3')(SEQ ID NO:55)

[0567] Tat-R3(5'-AGCAAGATGGCGATAAGCAG-3')(SEQ ID NO:56).

[0568] 使用如下方案循环进行第一轮反应：维持94℃一分钟，随后，维持94℃三十秒、55℃三十秒和68℃一分钟，进行10个循环，之后再进行25个如上10个循环相同的循环，只是对每个循环多进行5秒钟的扩增时间，随后在68℃下最后扩增7分钟。使用如下方案循环进行第二轮反应：维持94℃一分钟，随后，维持94℃三十秒、53℃三十秒和68℃一分钟，进行35个循环，随后在68℃下最后扩增7分钟。在使用ExoSap-IT(USB Corporation)清洗之后，在自动测序仪上使用内部引物对PCR产物进行直接测序。使用Sequencher 4.8(Gene Codes Corporation)集合重叠群。除去包括含有双色谱峰的核酸的扩增子。

[0569] 统计分析：使用线性混合效应模型确定抗-PD-1抗体治疗的动物和参照-抗体治疗的动物在血液化学中的区别，并完成血液计数值。使用邦费罗尼方法调节多个实验的P值。进行成对t检验比较PD-1阻断之前和之后的免疫反应。如果所得数据不是正态分布，但是Log正态分布的话，就对数据进行Log-转化。进行Wilcoxon铁和检验比较各个组之间病毒装载量降低的倍数。进行曼特尔-亨塞尔数秩检验比较各个组之间的存活曲线。使用S-PLUS 8.0进行统计学分析，双侧$p<0.05$被认为是统计学上显著的。

[0570] 实施例27：PD-1阻断剂诱导的记忆B细胞增殖作用

[0571] 慢性免疫缺陷性病毒感染的特点是细胞和人体抗病毒免疫反应失调。因此，能够提高和/或恢复病毒特异性免疫功能的免疫调节治疗可以阻止疾病进程。在慢性猿免疫缺陷病毒(SIV)感染期间，研究猕猴体内共抑制受体程序性细胞死亡1(PD-1)阻断剂的安全性和免疫恢复能力。已经证实，利用PD-1抗体的PD-1阻断具有很好的耐受性，并且能够导致病毒特异性CD8 T细胞的快速扩增并具有改善的功能性。在作为SIV感染主要感染源的血液以及内脏中也可以观察到提高的T细胞免疫性。PD-1阻断剂还会导致记忆B细胞的增殖作用和SIV-包裹的特异性抗体的增加。这些改善的免疫反应与血浆病毒装载量的显著降低有关系并且延长了感染SIV病毒的猕猴的存活时间。即使在淋巴细胞严重减少的情况下，阻断剂仍然在慢性感染的早期阶段(10周)以及晚期阶段(90周)有效。这些结果显示，在通过阻断单一抑制性通道造成的病原性免疫缺陷病毒感染阶段，细胞内和体内的免疫反应都有所增强，并且该结果识别了一种新型的人类免疫缺陷病毒/获得性免疫缺陷综合症治疗方法，并且显示，B细胞的监测可以用于评价治疗的效果。

[0572] 在慢性感染期间，病毒-特异性T细胞显示不同程度的功能损伤(Wherry et al., Immunity 27,670-684(2007);Klenerman et al.,Nat Immunol 6,873-879(2005))。虽然这些T细胞保持一些抗病毒能改，但是与在急性感染中观察到的抗病毒T细胞相比，他们具有较少的多功能性。T细胞功能上的这一缺点是造成宿主不能除去持续性病原体。Zajac et al.,J Exp Med 188,2205-2213(1998);Galimore et al.,J Exp Med 187,1383-1393

(1998))公开了在鼠持续性LCMV感染期间病毒-特异性T细胞的耗尽,和在其他的病毒性传染病中,包括人类免疫缺陷性病毒(HIV)、人类乙型肝炎病毒(HBV)和人类肝炎C病毒(HCV)感染(Letvin et al.,Nat Med 9,861-866(2003);Pantaleo et al.,Nat Med 10,806-810(2004);Rehermann et al.,Nat Rev Immunol 5,215-229(2005))鼠持续性LCMV感染期间病毒-特异性T细胞的耗尽。耗尽的病毒-特异性CD8 T细胞能够高度表达共抑制性受体PD-1(Barber et al.,Nature 439,682-687(2006);Sharpe et al.,Nat Immunol 8,239-245(2007))。在HIV-I-特异性(Petrovas et al.,J Exp Med 203,2281-2292(2006);Day et al.,Nature 443,350-354(2006))和SIV-特异性(Velu et al.,J Virol 81,5819-5828(2007))中,PD-1也被上调。CD8 T细胞和PD-1体外阻断剂能够提高细胞因子的产生并增加这些细胞的生产力。在慢性免疫缺陷病毒感染期间,使用SIV/猕猴模型评价PD-1阻断剂在体内的安全性和病毒特异性细胞免疫和体液免疫方面的效果。

[0573] 使用对人PD-1具有特异性的抗体进行PD-1阻断,所述对人PD-1具有特异性的抗体能够体外阻断猕猴PD-1和其配位体(PDLs)之间的相互作用(Velu et al.,J Virol 81,5819-5828(2007)。在慢性SIV感染的早期(10周)和晚期(～90周)阶段进行阻断。9只猕猴(五只在早期阶段、4只在晚期阶段)接受抗-PD-1抗体,五只猕猴(三只在早期阶段两只在晚期阶段)接受一种同型体参照抗体(Synagis,抗-鲁斯氏肉瘤病毒(RSV)-特异性)(Malley et al.,J Infect Dis 178,1555-1561(1998))。

[0574] 在慢性感染期间的PD-1阻断会导致SIV-特异性CD8 T细胞在所有猕猴的血液中快速扩增(图30a,b)。在7个使用抗-PD-1-抗体治疗的猕猴和三个参照-抗体治疗的猕猴中,使用主要组织相容性复合体(MHC)I四聚体复合物研究CD8 T细胞对两个免疫显性抗原决定簇,Gag CM9和Tat SL8/TL8的反应性(Allen et al.,Nature 407,386-390.(2000)),所述猕猴表达Mamu A*01组织相容性分子。大多数Gag-CM9四聚物特异性CD8 T细胞在阻断之前表达PD-1。在PD-1阻断之后,Gag-CM9四聚物-特异性CD8 T细胞快速扩增,在7-21天达到顶峰。在峰值反应中,在第0天,这些水平比其各自的水平高大约2.5-11倍(P＝0.007),并维持上升趋势直到第28-45天(图30b)。在慢性SIV感染的早期阶段和晚期阶段也可以观察到相似的结果。在两种Mamu A*01-阴性动物(RTd11和RDb11)中,在阻断14天之后,也可以观察到Gag-特异性干扰素(IFN)-γ阳性CD8 T细胞的出现率增加3-4倍,这说明PD-1阻断剂能够提高病毒-特异性CD8 T细胞的出现率,CD8 T细胞被非Mamu A*01等位基因所限制。如预期的,SIV-特异性CD8 T细胞的扩增不能在使用参照抗体治疗的猕猴体内发现(图30)。

[0575] PD-1阻断还与病毒特异性CD8 T细胞出现率显著增加有关,所述病毒特异性CD8 T细胞经历活跃的体内细胞分化,具有改善的功能性(图30b)。与SIV-特异性CD8 T细胞快速增加相一致,在阻断后第7天,共表达ki67(增殖细胞标示物)的Gag-CM9四聚物-特异性CD8细胞的出现率也增加(P＝0.01)。同样,还能观察到共表达穿孔蛋白和重组人颗粒酶B的Gag-CM9四聚物-特异性CD8 T细胞(细胞溶解能力,p值分别为P＝0.001和P＝0.03)、CD28(共刺激能力,p＝0.001)、CD127(增殖能力,P＝0.0003)(Kaech et al.,Nat Immunol 4,1191-1198(2003))和CCR7(淋巴结复位能力;P＝0.001)出现频率的增加(Salusto et al,Nature 401,708-712.(1999))。在阻断之后,还能观察到瞬间的四聚体-阴性和Ki67-阳性CD8 T细胞的出现率成1.5-2倍的增加。这是由于对Gag上其他抗原决定簇和其他SIV蛋白,以及该动物所患有的其他慢性病毒性传染病蛋白具有特异性的CD8 T细胞的增加。在三只

使用参照抗体治疗的猕猴体内没有观察到这些标记物的显著增强。

[0576] 值得注意的是，在阻断之后，没有观察到Tat-TL8-特异性CD8 T细胞的扩增。这是由于这些病毒并没有被Tat-TL8-特异性CD8 T细胞识别，众所周知，只有当他们同时受到穿过T细胞受体的信号时，PD-1阻断剂才能导致T细胞的扩增。为了检验这种可能性，从三只感染SIV251并在感染早期阶段接受阻断抗体的Mamu A*01-阳性猕猴中，在阻断开始之前，对其血浆中的病毒基因组测序。在这些病毒基因组相当于Tat TL8抗原决定簇区域中确实发现突变。所有的这些突变已经显示出或者被预计能改减少Tat SL8/TL8肽与Mamu A*01 MHC分子的结合，并导致Tat-TL8-特异性CD8 T细胞的识别出现遗漏(Allen et al.,Journal of Immunology 160,6062-6071(1998);Allen et al.,Nature 407,386-390.(2000))。这一结果说明，PD-1的体内阻断不会导致对病毒抗原决定簇逃逸突变株具有特异性的抗体扩增。

[0577] PD-1阻断剂还会导致结肠直肠粘膜组织(内脏)中Gag-CM9-特异性CD8 T细胞的扩增，其中，所述结肠直肠粘膜组织是SIV/HIV复制的优选位点(Pierson et al.,Annu Rev Immunol 18,665-708(2000))(图30c)。尽管扩增在7只猕猴中的一个的血液中式明显的，但是在7只猕猴中，还有两只不能观察到扩增。与在血液中相比，扩增在内脏中达到峰值的时间更为延后，在第42天，并且，与他们各自第0天的水平相比，峰值在2-倍或3-倍范围内(P＝0.003)。与在血液中相似，在阻断之后，内脏中能够共表达Ki67(P＝0.01)、穿孔蛋白(P＝0.03)、重组人颗粒酶B(P＝0.01)和CD28(P＝0.01)的Gag-CM9四聚物-特异性细胞也增加。

[0578] PD-1拮抗剂也能提高功能性抗-病毒CD8 T细胞的数量并导致多功能性细胞的产生，所述多功能性细胞能够共同生产细胞因子IFN-γ、肿瘤-坏死因子(TNF)-α和白细胞介素(IL)-2(图31)。在晚期慢性感染期间，PD-1阻断开始进行的当天，Gag-特异性IFN-γ-阳性细胞具有较低的出现率，并且不能共表达肿瘤-坏死因子(TNF)-α和白细胞介素(IL)-2(图31a)。然后，在阻断之后，在全部四只使用PD-1抗体治疗的猕猴体内，Gag-特异性IFN-γ-阳性细胞的出现率增加(p＝0.03)，从而使他们获得共表达肿瘤-坏死因子(TNF)-α和白细胞介素(IL)-2的能力。IFN-γ-阳性细胞扩增的峰值出现在第14-21天，峰值水平比其各自第0天的水平要高2-10倍。在第21天，大约16％的全部Gag-特异性细胞共表达全部三种细胞因子，并且大约30％共表达肿瘤-坏死因子(TNF)-α和白细胞介素(IL)-2(图31b)。与此相比，在第0天，小于1％的Gag-特异性细胞共表达全部三种细胞因子(P＝0.01)，并且大约14％共表达肿瘤-坏死因子(TNF)-α和白细胞介素(IL)-2。阻断之后，在感染早期慢性阶段也可以观察到相似的结果。

[0579] 慢性免疫缺陷病毒感染与B细胞功能失调有关(De Milito,Current HIV Research 2,11-21(2004);Moir and Faucci,J Allergy Clin Immunol 122,12-19;quiz 20-11(2008))，但是对PD-1在调节B细胞功能/耗尽方面的作用却知之甚少。分析在SIV感染的猕猴体内进行PD-1阻断之后的B细胞反应的特点。在PD-1阻断之前分析PD-1在不同B细胞子集上的表达显示，与天然B细胞($CD20^+CD27^-CD21^+$；图32a，P<0.001)相比，PD-1有限在记忆B细胞($CD20^+CD27^+CD21^-$)上表达。体内PD-1的阻断导致阻断28天之后SIV-特异性结合抗体的滴定度呈2-8倍的增加(p<0.001；图32b)。

[0580] 研究同时使用抗-PD-1抗体和抗一反转录病毒治疗的感染SIV的猕猴体内记忆B细胞的增殖作用，并早在第3天就能观察到ki67+记忆B细胞，而不是天然B细胞的显著增加(增

殖)(图32c)。这一结果显示了在慢性SIV感染期间,PD-1-PDL途径在调节B细胞功能失调方面的作用。中和试验显示,与简单的可中和的实验室改造的SIV251相比,中和滴定度增加了两倍,与难以中和的野生型SIV251或SIV239相比,滴定度没有增加。在九只用抗-PD-1抗体治疗的动物中的两只中,阻断之后,只观察到最小的SIV-特异性抗体扩增(<2倍)。值得注意的是,阻断前,与其他七只动物相比(60-90%的总B细胞),在这两只动物中总记忆B细胞的出现率是下降的(大约40%的总B细胞),这说明阻断前SIV-特异性记忆B细胞的水平可以确定阻断后SIV-特异性抗体的扩增水平。

[0581] PD-1阻断能够导致血浆病毒血症(p=0.03)的显著降低并延长SIV-感染的猕猴的存活时间(P=0.001;图33)。在早期慢性阶段,第10天开始,在五只使用抗-PD-1抗体治疗的猕猴中的两只中出现病毒装载量的下降,并在此后直到90天的时间内维持这一水平或者更低(图33a)。在一只猕猴中,病毒装载量短暂的下降,并且,在剩余的两只猕猴中,短暂增加,并回到阻断之前的水平。与早期慢性阶段相反,在晚期慢性阶段用抗-PD-1抗体治疗的四只猕猴在第7天显示短暂的病毒血症增加,但是在第21天,病毒装载量快速的减少,直到低于各自第0天的水平(图33b)。然而在第43天,病毒RNA恢复到阻断之前的水平。与预计相同,在使用参照抗体治疗的五只猕猴体内没有观察到任何显著的血浆病毒装载量的下降(图33c)。在阻断之后第21-28天,使用抗-PD-1抗体治疗的动物体内的病毒RNA水平与其各自第0天的水平相比下降2-10倍(p=0.03,图33d)。在阻断之后第150天,参照组的五只猕猴中的四只被艾滋病相关症状致死(例如,食欲不振、腹泻、重量减轻),而使用抗-PD-1抗体治疗的组中全部九只动物任然存活(P=0.001;图33e)。

[0582] 在所有晚期阶段治疗的动物体内和部分早期阶段治疗的动物体内观察到的血浆病毒血症水平的初始上升可能与活化的CD4 T细胞出现率的增加有关。在阻断之后,测定Ki67-阳性总CD4 T细胞的百分比和SIV-Gag-特异性IFN--生产CD4 T细胞(病毒复制的优选靶分子(Douek et al.,Nature 417,95-98(2002)))的出现率。这些分析显示,在阻断后第7-14天,Ki67-阳性CD4 T细胞的百分比短暂的增加(p=0.002),并且在感染晚期阶段进行治疗的动物中这一增加值高于在感染早期阶段治疗的动物(p=0.015)。同样,也可以观察到Gag-特异性CD4 T细胞的出现率的增加,但这一增加只发生在感染晚期阶段被治疗的动物体内。在使用参照抗体治疗的猕猴体内没有观察到活化的CD4 T细胞的显著增加。这一结果说明,活化的CD4 T细胞能够促进所观察到的阻断后血浆病毒水平的原始上升。

[0583] 在使用PD-1进行阻断之前,在抗-PD-1抗体治疗组和参照抗体治疗组之间血浆中的病毒装载量给定值和血液和内脏中的总CD4 T细胞病毒装载量是相似的。但是,在体内阻断之前,Gag CM9+细胞和共表达穿孔蛋白、重组人颗粒酶B或CD28的Gag CM9+细胞在这两个治疗组之间的出现率是不相似的(图30b)。这产生一种可能性,即在PD-1阻断之后,这些区别能改促进Gag CM9+细胞的扩增。为了研究阻断之前Gag CM9+细胞出现率对阻断之后他们自身扩增的影响,在阻断开始之前,该根据Gag CM9+细胞出现率将使用抗-PD-1抗体治疗的组分为两个亚组,例如,一个亚组与参照抗体治疗的组相比有相似的Gag CM9+细胞水平,另一个亚组与参照抗体治疗的组相比有较高的Gag CM9+细胞水平。然后分子阻断后这两个亚组的CM9+细胞的扩增。在PD-1阻断后,这两个亚组动物体内CM9+细胞的扩增都是明显的,无论在阻断之前他们是否具有较低的或者较高的水平。使用根据CM9+细胞共表达分子的频率进行的亚组分析,也可以得到相似的结果所述CM9+细胞共表达分子具有更好的T细胞功能,

例如，穿孔蛋白、重组人颗粒酶B、CCR7、CD127或CD28。然而，在阻断之前，具有较高CM9+CD28+细胞水平的动物中，倾向于具有更好的CM9+CD28+细胞扩增，这说明，CD28表达能够作为一种生物标记物，预测体内PD-1阻断的结果。

[0584] 为了评价PD-1阻断的安全性，在阻断之后，对血清蛋白、离子、脂类、肝和肾酶、和全血细胞计数进行多方面的分析。这些分析显示，在抗-PD-1-抗体治疗组和参照抗体治疗组的猕猴中，这些被检测的参数没有显著变化。同样的，使用抗-PD-1抗体处理之后，血清中抗-核抗体(ANA)的水平(自身免疫的测量)也不发生显著的变化。

[0585] 表6:在抗-PD-1抗体治疗后，血液的生物化学参数

[0586]

标记物	预感染* (n=8)	SIV 感染之后，PD-1 阻断的天数* (n=5)		
生物化学曲线		第 0 天	第 14 天	第 56 天
ALT (U/L)	16.8 ± 5.0	27 ± 11.6	24.8 ± 7.7	27 ± 7.9
AST (U/L)	33.1 ± 8.2	35.0 ± 8.3	29.8 ± 3.6	49.0 ± 18.5
碱性磷酸酶 (U/L)	466 ± 135	410 ± 367	367 ± 78	451 ± 89
胆红素(g/L)	0.2 ± 0.1	0.16 ± 0.1	0.12 ± 0.0	0.2 ± 0.2
肌酸酐(mg/dL)	0.9 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.66 ± 0.1	0.6 ± 0.1
总蛋白量 (g/dL)	7.3 ± 0.3	7.0 ± 0.3	7.24 ± 0.4	6.9 ± 0.4
白蛋白 g/L	4.5 ± 0.3	4.28 ± 0.2	4.1 ± 0.2	4.1 ± 0.2
球蛋白 (g/dL)	2.7 ± 0.2	2.72 ± 0.3	3.14 ± 0.3	2.8 ± 0.2
白蛋白/球蛋白 (比率)	1.7 ± 0.2	1.62 ± 0.2	1.32 ± 0.1	1.4 ± 0.1
葡萄糖 (mg/dL)	82 ± 16	69 ± 8	66 ± 9	64 ± 8.0
胆固醇 (mg/dL)	161 ± 32	149 ± 32	145 ± 20	140 ± 18
甘油三脂 (mg/dL)	58 ± 19	64 ± 12	60 ± 7	73 ± 34
血浆尿素氮(mg/dL)	18 ± 3	17 ± 3	17 ± 3	16 ± 3
血浆尿素氮/肌酐酸（比率）	21 ± 3	24 ± 5	26 ± 5	26 ± 5
脂类 (U/L)	21 ± 17	20 ± 7	21 ± 9	23 ± 10
肌酐酸磷酸激酶 (U/L)	428 ± 272	537 ± 303	486 ± 129	462 ± 312**
γ谷氨酰转移酶(U/L)	74 ± 23	66 ± 16	58 ± 18	71 ± 15
钙 (mg/dl)	10 ± 0.5	10 ± 0.2	10 ± 0.5	10 ± 0.3
氯 (mEq/L)	110 ± 3	107 ± 3	108 ± 1	107 ± 2
钾 (mEq/L)	4 ± 0.3	4 ± 0.2	4 ± 0.1	4 ± 0.6
钠 (mEq/L)	150 ± 5	149 ± 3	149 ± 1	147 ± 2
磷(mg/dL)	5 ± 0.9	5 ± 0.6	5 ± 0.8	6 ± 0.4

[0587] *数值代表平均值+标准差

[0588] **使用第91天的数值，由于第56天的RBC水解

[0589] 表7:在抗-PD-1抗体治疗后的全血细胞计数

[0590]

细胞型	预感染* (n=8)	SIV 感染之后，PD-1 阻断的天数* (n=5)		
		第 0 天	第 14 天	第 56 天
红血细胞(百万/立方微米)	5.7 ± 0.3	5.9 ± 0.3	5.4 ± 0.4	5.9 ± 0.3
血细胞比容 (%)	41 ± 1	42 ± 1	38 ± 2	41 ± 2
白血细胞 (每微升)	8500 ± 2171	9260 ± 3685	7500 ± 2068	7800 ± 1972
嗜中性粒细胞 (计数/微升)	3685 ± 1883	3274 ± 2124	2573 ± 865	2028 ± 1585
白细胞 (计数/微升)	4477 ± 1583	4700 ± 1791	4235 ± 1880	5041 ± 1705
单核细胞 (计数/微升)	166 ± 116	635 ± 374	336 ± 123	350 ± 206
嗜曙红细胞(计数/微升)	161 ± 155	591 ± 580	277 ± 275	342 ± 175
嗜碱性细胞(计数/微升)	10 ± 29	29 ± 65	78 ± 78	37 ± 53
血小板(计数/微升)	341 ± 64	275 ± 45	364 ± 79	241 ± 74

[0591]

[0592] *数值代表平均值±标准差

[0593] 在一只猕猴中，阻断10天之后ANA的水平增加大约3倍，但是在第56天恢复到第0天的水平。这些结果显示，在慢性SIV感染期间使用抗-PD-1抗体治疗不会导致可见的毒性。这与最近的一项研究结果相一致，所述研究显示PD-1阻断剂对于患有晚期血液恶性肿瘤的患者是安全的(Berger et al.,Clin Cancer Res 14,3044-3051(2008))。

[0594] 体内阻断之后，研究部分人源化的抗-PD-1抗体在血清中的药代动力学。在阻断第14和28天之后，抗-PD-1抗体的滴定度快速下降，这与猕猴产生的针对抗-PD-1抗体鼠免疫球蛋白可变域的抗体反应相一致。因此，完全人源化的抗-PD-1抗体能够进行更长时间的治疗，并可以进一步提高体内阻断的效力。

[0595] 这些结果显示，在慢性SIV感染期间，PD-1的体内阻断是安全的，并且能够使SIV-特异性多功能性CD8 T细胞快速扩增并恢复，同时提高B细胞反应。即使在高水平的持续性病毒血症和艾滋病中，在慢性感染的早期阶段以及晚期阶段进行阻断都能观察到扩增。直肠结肠粘膜组织是SIV/HIV复制的优选位点，在此位点也能观察到扩增(Pierson et al., Annu Rev Immunol 18,665-708(2000))。重要的，PD-1阻断会导致血浆病毒装载量的明显减少，并同时延长SIV-感染的猕猴的生存时间。这些结果是非常显著的，通常认为，对共抑制相关分子CTLA-4的阻断不能使感染SIV的猕猴体内病毒特异性CD8 T细胞扩增，也不能减少病毒血浆装载量(Cecchinato et al.J Immunol 180,5439-5447(2008))。通过使用于抗-反转录病毒和/或治疗性疫苗结合使用可以进一步的改善PD-1阻断的治疗效益。

[0596] 实施例28:实施例29的材料和方法

[0597] 动物、SIV接种和感染阶段:使用印度恒河猴(猕猴)和乌白眉猴。通过静脉接种进行SIV感染，根据感染阶段将动物分组，分别为:-急性(静脉感染后两周)、早期慢性感染(静脉感染后10-12周)和晚期慢性感染(静脉感染后≥1.5年)。

[0598] 病毒的装载量测定:按照之前的描述，通过定量实时PCR确定血浆病毒装载量(Amara et al.,Science 292:69-74,2001)。提取所有的病毒RNA样品并进行试验，一式两份，记录平均结果并用此平均结果进行分析。

[0599] 使用流式细胞计进行表型分析:使用100毫升全血样品和多参数、多颜色分析法进

行表面淋巴细胞染色。从尸检组织中获得淋巴细胞。使用下列抗体:针对CD3(SP34-2克隆株)、CD21(B-Ly4克隆株)、CD27(克隆株M-T2712)、CD80(克隆株L307.4)、CD11c(克隆株S-HCL-3)的老鼠抗-人抗体;全部购自BD BIODSCIENCES公司;针对CD20(克隆株2H7、购自eBIOSCIENCES)、CD40(克隆株MAB89、购自BECKMAN COULTER)、CD95(克隆株DX2,购自CALTAG)的老鼠抗-人抗体和PD-1(克隆株EH-12)。在LSRII流式细胞仪上进行细胞分析,使用FLOWJO软件8.8.2版本进行数据分析。

[0600] 伴刀豆凝集素A酶联免疫吸附测定法测定SIV env-特异性抗体的滴定度和亲合力:使用封端蛋白质测量抗-env IgG抗体的滴定度,所述封端抗体是在短暂朱安然的293T细胞中使用DNA/89.6VLP(51)生产的。简要的,用溶解于10mM Hepes缓冲剂中的25毫克/毫升的伴刀豆凝集素A(Con A)包覆96孔酶联免疫吸附平板(Costar,Corning生命科学公司),并在4℃下培养过夜。使用包含0.05%吐温-20的磷酸缓冲液(PBS-T)洗涤平板6次,向每个小孔中加入100微升的VLP,然后在室温条件下培养1小时,在室温条件下,使用100微升封闭缓冲液(具有4%乳清和5%奶粉的PBS-T)洗涤每个小孔并在室温下封闭1小时。再次洗涤平板并在PBS-T/4%乳清中连续稀释实验血清,向小孔中加入双份,并在室温条件下培养1小时。对于酶联免疫吸附试验,使用PBS-T洗涤平板6次,然后用辣根过氧化酶-结合的抗-猴IgG(购自Rockland免疫化学公司)和四甲基苯(TMB)底物(KPL)检测结合的抗体,使用100毫升2N H_2SO_4的终止反应,使用山羊抗-猴IgG(购自Rockland免疫化学公司)和恒河猴IgG(化学纯)产生每个平板的标准曲线。利用SOFTMAX 2.3软件按需要制备标准曲线使样品的浓度在其范围内,样品的浓度表示为微克抗体每毫升血清。

[0601] 在env抗体酶联免疫吸附测定的修正法中,通过测定抗体-封端的复合物对离液序列高的试剂NaSCN洗提的抵抗力来确定抗体对病毒封端蛋白质的亲和力。向平板中加入实验血清,一式四份,从1:100开始,进行三倍稀释。在实验血清在伴刀豆球蛋白A env酶联免疫吸附中结合之后,在洗涤之前,使用磷酸缓冲液处理两份中的一份,另一份用1.5M NaSCN处理10分钟,使用辣根过氧化物酶-结合的抗-猴IgG和TMB底物检测。使用100毫升2NH_2SO_4的终止反应。将使用NaSCN治疗的小鼠中产生O.D.为0.5的血清稀释度除以使用磷酸缓冲液治疗的小鼠中产生O.D.为0.5的血清稀释度,然后乘以100,以此计算亲合力指数。

[0602] 中和试验:根据之前的报道(51,52),在5.25.EGFP.Luc.M7细胞(TCLA SIVmac25)和TZM-bl细胞(293T假病毒)中,单轮感染之后,作为荧光素酶(luc)报道基因表达减少的函数测量中和作用。报道的数值是在与病毒参照孔相比相对发光单位(RLUs)减少50%的血清稀释度。

[0603] 细胞凋亡试验:在四种不同的情况下,将来自7只SIV-感染的猕猴体内的PBMC放置于96孔原地组织培养板中,每孔2.5x 10^5个细胞:只含有完全的RPMI-1640培养基(自发凋亡)、完全的RPMI-1640培养基+10纳克/毫升可溶His-标记的rhFasL(R&D Systems公司)(Fas-调节的细胞凋亡)和完全的RPMI-1640培养基+10纳克/毫升可溶His-标记的rhFasL+10微克/毫升抗-PD-1封闭抗体。在37℃下,将平板培养24小时,此后,将针对CD20、CD27、CD21和膜联蛋白(Annexin V)的细胞染色,然后立即在LSRII流式细胞仪上进行分析。

[0604] 在CMV启动基因和新霉素抵抗性基因存在的条件下,使用表达HLA-A2的质粒转染Huh-7.5细胞(53),选择克隆株并繁殖,然后,用表达全长INCYTE人cDNA PD-L1(OPEN BIOSYSTEMS公司,Huntsville,AL)的第二质粒(pCDNA3.1-Zeo)转染。进行对新霉素和博莱

霉素(Zeocin)具有抵抗力克隆株的第二轮筛选和繁殖。使用流式细胞仪正是HLA-A2和PD-L1的表达。使用Huh-7.5.A2.PD-L1细胞评价PD-L1调节的活化记忆B细胞的细胞凋亡,使用Huh-7.5细胞作为参照。实验前,将两种细胞系接种在独立的24孔板上,在37℃下培养一天。使用NHP特异性CD20微珠(Miltenyi Biotec)从PBMC中分离B细胞,将分离的B细胞加入细胞系中,在37℃下平板培养24小时,此后,将针对CD20、CD27、CD21和膜联蛋白(Annexin V)的细胞染色,然后立即在LSRII流式细胞仪上进行分析。

[0605] 体外PBMC刺激和记忆B细胞ELISpot试验:刺激PBMC并将其用于按照Crotty等描述的方法(23)改良后的记忆B细胞ELISpot试验中。简单的说,将PBMC放置于无菌24孔组织培养平板(Costar)中,浓度为每孔0.5x 10^6个细胞,在包含b-2巯基乙醇的完全RPMI-1640培养基中,在三种不同情况下培养:只有培养基(参照);1:1000稀释的促细胞分裂剂混合物-商陆丝裂素,固定的金黄色葡萄球菌Cowan菌株,1:10,000稀释的SAC(SIGMA公司)和6毫克/毫升CpG ODN-2006(Qiagen-Operon公司);促细胞分裂剂混合物+10微克/毫升抗-PD-1封闭抗体(克隆株1540-29C9,由GF提供),一式三份。在37℃下在5%的二氧化碳中培养6天。

[0606] 在培养的第5天,用10微克/毫升的亲和纯化的山羊抗-猴IgM和IgG(Rockland免疫化学公司)和1微克/毫升的SIVmac239 gp130包覆96孔过滤的ELISpot平板,在4℃下培养过夜。

[0607] 在第6天,用PBS-T洗涤平板一次,用PBS洗涤三次,然后用RPMI-1640在37℃下封闭2小时。将培养的PBMC洗涤两次,然后加入制备好的ELISpot平板中,在37℃下培养6小时。然后用PBS洗涤平板三次,用PBS-T洗涤三次,然后与在PBS-T/1%FCS中稀释的1微克/毫升生物素结合的抗-猴IgM(用于检测总IgM ASC)或者1微克/毫升抗-猴IgG(用于检测总IgG和抗-gp130ASC)一起在4℃下培养过夜。然后用PBS-T洗涤平板四次,在室温条件下与在PBS-T/1%FCS中稀释的5微克/毫升HRP-结合的亲和素D(Vector实验室)一起培养1小时。用3-氨基-9-乙基咔唑(AEC)洗涤四次,并生长。使用ELISpot平板阅读器对生长平板上的斑点计数。数据表示为每10^6PBMC的斑点数。

[0608] 统计学分析:使用GRAPHPAD**PRISM®**进行统计学分析。

[0609] 实施例29:在慢性传染病进程中的记忆B细胞和PD-1

[0610] 在恒河猴的外周血中可以识别出四种不同的B细胞亚组:托系恒河猴B细胞划分的特点。在健康RM的外周血中的四种不同的B细胞亚组是:$CD20^{int}/CD21^{+}/CD27^{-}$(天然的),$CD20^{int}/CD21^{+}/CD27^{+}$(静止记忆),$CD20^{hi}/CD21^{-}/CD27^{+}$(活化的记忆)和$CD20^{hi}/CD21^{-}/CD27^{-}$(不常见的记忆或者组织记忆),这些细胞都具有明显不同的CD20的平均荧光强度(MFI)($p<0.0001$)。天然和活化的B细胞是主要的亚组,分别占总B细胞数的37%和36%。随后是组织记忆B细胞(18%)和静止记忆B细胞(9%)。对细胞进行表面IgM和IgD染色,结果发现,与人不同,这里事实上不存在只含有IgM的细胞。天然B细胞也分为只含有IgD的细胞和$IgD^{+}IgM^{+}$。所有的三种记忆亚组有大约20%的只含有IgD的细胞租场;剩下的静止B细胞是$IgD^{+}IgM^{+}$(~50%)和$IgD^{-}IgM^{-}$(~30%)。活化的记忆B细胞是种类变换亚组,其中大约60%是$IgD^{-}IgM^{-}$且大约20%是$IgD^{+}IgM^{+}$。另一方面,组织样记忆B细胞绝大多数是IgD+IgM+(~70%),只有大约10%是IgD-IgM-)。因此,恒河猴中能够识别出一种新型的B细胞,这种B细胞与缺乏CD27表达的活化的记忆B细胞亚组不同,但是也是$CD21^{-}$细胞。这种B细胞与细胞中特有的组织样记忆B细胞相似,其限定的表面标记物在人体中是免疫调节分子FCRL4。

[0611] 为了进一步确定这些亚组的特点，评价标记物CD40、CD80、CD95、CD11的活化表达和分化作用。事实上，所有的天然和精致记忆B细胞和大于70％的静止B细胞是$CD40^{hi}$，而大多数活化的记忆B细胞(大于70％)是$CD40^{int}$。活化的记忆B细胞表达最多的CD80，CD95和CD11c，紧接着是静止记忆B细胞。CD11c只在活化的和非常见记忆B细胞中表达，其中，天然B细胞表达很少量的CD80，CD95和CD11c。

[0612] SIV感染导致活化记忆B细胞的耗尽：在此研究中，我们使用静脉途径进行SIV感染，这与非人类哺乳动物中更为快速的疾病进程有关，使用这一途径感染，高达30％的动物在感染后六个月之内发展为艾滋病。某些动物已经发展出现艾滋病样症状或者充分发展为艾滋病，并于感染后24周死亡，这类动物被归类为快速进程，其他的所有动物被分类为典型进程。在HIV和SIV感染之后，B细胞区域最先可以观察到得变化之一是总B细胞数量的显著下降，但是对于特异性B细胞亚组已经被删除的那些却并不明显。据发现，早在SIV感染后两周，无论疾病发展进程的速度怎样，外周血液总B细胞就已经严重的耗尽。在快速进程和典型进程中，感染后第12周B细胞的数量开始重新结合，但是B细胞数与感染前水平明显不同($P<0.0001$)。通常，在SIV感染之后，记忆B细胞快速耗尽，同时活化的记忆B细胞的百分比和数量也显著下降。在感染后第12周，快速进程失去82％的活化的记忆B细胞，而典型进程只失去23％。与快速进程相比，典型进程中，活化的记忆B细胞在感染后第12周恢复到感染前水平。快速进程和典型进程在活化的记忆耗尽方面显著的对比提示，调查活化记忆B细胞是否耗尽对于SIV发病机理和疾病进程有重要意义。

[0613] 活化的记忆B细胞的耗尽是快速疾病进程的早期预告：已经显示，设定点的病毒装载量(感染后12周)是SIV感染临床结果的一种很好的预告。分析快速进程和病毒装载量之间的关系，快速进程和典型进程具有相似的病毒装载量峰值(感染后两周)($p=0.8$)；然而，在快速进程中的设定点的病毒装载量的log值大于典型进程中的log值($P<0.0001$)。已知早在感染后两周就可以观察到活化的记忆B细胞百分比的差异，假定活化的记忆B细胞的耗尽是快速疾病进程更为早期的预告。血液中心记忆((CD28+CD95+,TCM))和内脏CD4+ T细胞中也可以作为SIV感染疾病进程的标记物，因此，在所有这些标记物中进行比较，从而评价每种的预测值。SIV感染两周之后，快速进程与典型进程相比，具有明显下降的活化记忆B细胞的百分比。并且活化的记忆B细胞是仅有的在快速进程和典型进程中具有显著不同的分布的细胞子集($P<0.001$)。感染12周之后，在快速进程中，活化的记忆B细胞早已耗尽($P<0.0001$)，在快速进程和典型进程之间，TCM和内脏CD4+ T细胞的比例也出现重大区别($P<0.01$)(图3B，底部图)。为了进一步证实活化的记忆B细胞的两周-耗尽能够有效的用作疾病进程的早期标记物，对两周和12周设定点(SIV感染后12周)的活化记忆B细胞、内脏CD4+ T细胞和TCM细胞病毒装载量百分比进行相关分析。然而，第2周和第12周活化的记忆B细胞与设定点的病毒装载量是反向相关的，只有第12周德内脏CD4+百分比与设定点的病毒血症相关，TCM完全不与设定点的病毒血症显示相关性。因此，在恒河猴(RM)中，活化的记忆B细胞的缺失是快速疾病进程的早期预告，比病毒装载量峰值、TCM和内脏CD4+ T细胞具有更早的预兆价值。

[0614] 在快速SIV感染进程中，活化的记忆B细胞的耗尽削弱SIV-特异性体液免疫反应和对其他非SIV-感染的抵抗力：由于B细胞区域的快速破坏，患有快速SIV感染的恒河猴显示具有低的抗体反应。机会致病菌的感染和非SIV相关抗原是SIV-感染动物的重要致死原因。

活化的记忆B细胞的损失对于动物快速发展SIV抗原和非SIV抗原的体液反应具有重要的影响。因此，测量快速进程和典型进程中，SIV env-结合抗体的血清滴定度；据发现，对于9只快速进程的动物进行试验发现，在第12周，只有2只具有正常的env抗体反应，在第20周，只有1只动物还能维持抗体滴定度。在感染20周之后剩余7只快速进程动物的SIV env抗体滴定度都是不可检测到得。另一方面，典型进程的动物在感染后第12周具有很强的env抗体反应，在第20周甚至具有更高的滴定度。

[0615] 细菌机会性感染是SIV-感染的动物的主要致死原因，这些感染的病原体通常是鞭毛虫。在预先存在的体液免疫中，测量血清抗体对鞭毛蛋白(从鼠伤寒沙门氏菌中分离的FliC)的滴定度是一种评估活化的记忆B细胞损失的作用的方法。尽管开始时抗-FliC抗体的滴定度是相当的，但是在感染20周之后，与典型进程相比，快速进程的滴定度显著下降($p=0.001$)，而典型进程的滴定度没有改变($p=0.9$)(图5C)。在初始感染SIV之后的6个月的时间内，分析两个组的临床感染数据，据发现，在SIV感染之后，动物体内存在多种其他的感染。这些感染包括细菌的感染(弯曲杆菌属细菌、志贺氏杆菌、肠致病性大肠杆菌)、寄生虫感染(毛滴虫属、鞭虫、贾第鞭毛虫)和酵母菌感染(念珠菌属)。快速进程的动物在感染后1个月就死于这些感染，并且，在三个月的时间里，大于50％的快速进程动物被感染，而与此相比，只有大于10％的典型进程动物感染。快速进程的动物的感染速率在整个6个月的时间内维持不变。

[0616] 体外PD-1阻断减少Fas-调节的细胞凋亡，和PD-1结合诱导的活化的记忆B细胞的细胞凋亡：PD-1主要在恒河猴的记忆B细胞上表达。在SIV感染前后，在所有B细胞亚组上更为详细评价PD-1的表达，据发现，与天然B细胞相比，所有的三种记忆B细胞亚组表达更高量的pd-1(平均荧光强度，MFI)($P<0.001$)。与其他的亚组相比，活化的记忆细胞不但具有最高的PD-1表达量，而且具有最高的PD-1+细胞比例($P<0.001$)。在SIV感染之后，无论疾病的进程状态如何，PD-1+记忆B细胞都优先耗尽。这产生一种可能性，即PD-1可能在活化的记忆B细胞耗尽方面起作用。

[0617] 值得注意的是，在感染HIV的人体体内，记忆B细胞最初经历自发细胞凋亡和通过Fas-FasL途径的死亡受体-诱导的细胞凋亡，但是，很少有信息公开在SIV感染期间，Fas-FasL途径对B细胞细胞凋亡的作用。为了确定活化的记忆B细胞对Fas调节的细胞凋亡的易感性并识别PD-1对活化的记忆B细胞耗尽可能的作用，从7只感染SIV的动物体内获得PBMC，在具有和没有与PD-1阻断剂结合的sFasl存在的情况下，培养PBMC，并分析活化的记忆B细胞上Annexin-V表达，在培养24小时候对表达进行评价。在所有的6只动物体内，在向培养基中加入sFasL之后细胞凋亡显著增大，进行PD-1阻断之后，在4只动物体内发现FasL调节的细胞凋亡减少，这说明PD-1促进活化记忆B细胞的细胞凋亡。

[0618] 为了进一步确定PD-1对活化的记忆B细胞细胞凋亡的作用，使用人肝癌细胞系，用PD-L1转染的Huh-7.5(Huh-7.5.A2.PD-L1)作为表达PD-1的活化的记忆B细胞的配位体来源。通过流式细胞仪确定的PD-L1的表达显示，在没有转染的Huh-7.5细胞(参照)中没有观察到PD-L1的表达，而与此相比较，在Huh-7.5.A2.PD-L1细胞上，>90％的PD-L1被表达。与参照孔相比，在七只实验动物中，有五只在存在PD-L1的条件下培养的活化的记忆B细胞的细胞凋亡具有增长的凋亡速率。在一个动物(4)中，无论有或者没有PD-L1，都观察到相似的细胞凋亡速率，在另一个动物(3)中，自发细胞凋亡的速率>30％，并且加入PD-L1没有明显的

改变细胞凋亡。因此，在SIV感染期间的PD-1信号对活化的记忆B细胞细胞凋亡发挥作用。

[0619] 已经显示，阻断PD-1-PD-L1相互作用能够增加HIV-特异性CD8+ T细胞增殖和存活能力。因此，体外PD-1阻断对活化的记忆B细胞自发性细胞凋亡和Fas-调节的细胞凋亡的效果。在记忆B细胞ELISPot试验中，评价体外阻断对来自SIV-感染的动物体内的记忆B细胞存活能力、多克隆刺激作用导致的增殖能力和分化成抗体分泌细胞(ASC)能力的作用。阻断导致Fas-调节的活化的记忆B细胞细胞凋亡的轻微减少，但是不会对自发性细胞凋亡产生影响。在PD-1阻断抗体存在的情况下的细胞刺激作用能获得更好的增殖并产生较高数量的针对总IgM和IgG以及env-特异性斑点的ASC。

[0620] 恒河猴活化的记忆B细胞具有较低的BAFF-R表达，SIV感染会进一步降低这种表达：B细胞活化因子属于TNF族，BAFF(又名B-赖氨酸)是一种重要的B细胞体内平衡调节因子(21)，$CD21^{-}$B细胞在食蟹猕猴中显示能够表达较少的自身受体，BAFF-R。HIV病人的$CD21^{low}$B细胞液表达较低水平的BAFF-R。已经发现，与天然记忆B细胞和静止记忆B细胞相比，活化的记忆B细胞和组织记忆B细胞表达最低水平的BAFF-R。感染后2周，表达进一步减少，但是有趣的是，在第12周恢复。因此，低的BAFF-R表达可能是活化记忆B细胞减少的一种促进因素。

[0621] 体外PD-1阻断增加记忆B细胞增殖作用和抗体生产：调查记忆B细胞上PD-1的存在是否会影响他们增殖和分化成为抗体分泌细胞(ASC)的能力。根据已经描述过的实验，设计一种体外elispot实验，来跟踪IgM、IgG和SIV gp130生产记忆B细胞。在多克隆刺激下，在早期(12周，n＝3)和晚期(大于1年，n＝2)慢性感染中都存在显著增加的IgM($P<0.05$)和IgG($P<0.01$)抗体分泌细胞(ASC)。与不存在阻断抗体的细胞刺激相比，在PD-1阻断抗体存在的情况下的细胞刺激作用能获得更好的增殖并产生较高数量的斑点。然而，gp130-特异性抗体分泌细胞(ASC)只在晚期慢性后体内时可检测的，例如，使用IgM和IgG抗体分泌细胞(ASC)，多克隆刺激导致gp130特异性抗体分泌细胞数目的显著增加，PD-1的阻断进一步增加抗体分泌细胞的数目。

[0622] 体内PD-1阻断产生增加的SIV env结合抗体滴定度，同时具有较高的亲和力，和增加的中和抗体滴定度：患有慢性SIV感染的恒河猴体内的PD-1阻断会导致增加的SIV env结合抗体滴定度。体内PD-1阻断之后，测量env抗体的亲和力。已经发现，在治疗的动物体内，不但具有增加的env抗体滴定度，而且具有增加的结合抗体的亲和力。在参照抗体治疗的动物体内，情况不是这样，在参照抗体治疗的动物体内，治疗后亲合度减少。

[0623] 也评价PD-1治疗的动物体内的中和活性，已经发现，在治疗的动物体内，尽管针对主要SIV分离物的中和作用不是显著的不同，针对TCLA SIV菌株的中和作用是显著不同的，实验动物中的两只显示中和抗体滴定度增加3-6倍。

[0624] 在白颈白眉猴中B细胞亚组的分布：白颈白眉猴是SIV的天然宿主，与恒河猴相比，它即使具有持续高度的病毒滴定度也不会发展为艾滋病，这使白颈白眉猴成为一种有趣的“参照”模型，用于研究恒河猴体内病原性SIV传染病。对未感染的(n＝8)和SIV-感染的(n＝10)白颈白眉猴(SM)进行研究。健康的白颈白眉猴比健康的恒河猴具有少的多的循环性总B细胞，与恒河猴不同，在感染的白颈白眉猴中，不能看到循环性总B细胞百分比的下降。在白颈白眉猴(SM)中识别出相同的B细胞亚组，但是这些亚组在白颈白眉猴(SM)中的分布于在恒河猴中的分布不同。天然B细胞构成主要的外周血B细胞亚组(>40％)，在恒河猴中，大多

数记忆B细胞亚组是组织样记忆B细胞和未活化的记忆B细胞。与恒河猴相似，白颈白眉猴(SM)中<10％的循环记忆B细胞是静止记忆B细胞，但是与恒河猴相比，白颈白眉猴(SM)中的活化的记忆B细胞的百分比显著较少。在SIV感染之后，没有发生活化的记忆B细胞的耗尽；事实上，静止和活化的记忆B细胞的百分比都略微增大，尽管这些变化还没有达到统计学显著性。PD-1在白颈白眉猴(SM)B细胞亚组上的表达与在恒河猴中的一样，在活化的记忆B细胞中表达量最高，与恒河猴所不同，在组织记忆B细胞中的表达量也同样高。在恒河猴和白颈白眉猴(SM)之间的另一个显著差异是，与恒河猴不同，在白颈白眉猴(SM)感染SIV之后，PD-1表达细胞的比例上升。

[0625] 实施例30：确定PD-1拮抗剂功效的方法

[0626] PD-1拮抗剂对治疗主体的功效可以通过测量B细胞来确定，例如，通过测量中和抗体的存在，记忆B细胞的增殖作用，天然B细胞，和/或通过测量CD28+T细胞。通常，中和抗体统计学上的增大、记忆B细胞、天然B细胞的增殖，和/或通过测量CD28+T细胞表明PD-1拮抗剂用于治疗主体是有效的。可以使用，例如，如美国专利第7,378,276号和/或美国专利第6,376,459号中描述的方法测量B细胞，这两篇专利通过引证在此全部并入本文。PD-1拮抗剂包括能够特异性结合PD-L1和PD-L2的抗体，参见例如，美国专利第7,432,059号。

[0627] 确定PD-1拮抗剂的功效包括，从主体中获得生物样品。从人类主体中，例如，从患有持续性传染病的主体内收集生物样品，例如，血液样品或者外周血液单核细胞样品。使用FACS分析法测定增殖的记忆B细胞、天然B细胞和/或CD28+T细胞得存在。通过使用，例如酶联免疫吸附法测定中和抗体的存在，将增殖的记忆B细胞、天然B细胞和/或CD28+细胞、和/或中和抗体的存在于参照相比较，所述参照例如，在用PD-1拮抗剂进行治疗之前从主体中获得的样品。进行统计检验。与参照相比，在对主体给药之后，在来自主体的血液样品中，记忆B细胞和/或中和抗体和/或CD28+T细胞的增殖作用统计学上显著增加，表示这种PD-1拮抗剂能够有效的治疗主体。然而，天然B细胞不受PD-1拮抗剂给药的影响。

[0628] 对多种类型的主体进行治疗和实验。这些主题包括患有HIV感染的主体、患有异向性鼠科白血病毒有关病毒(XMRV)传染病的主体、和患有多瘤病毒JC传染病的主体。PD-1拮抗剂可以与抗反转录病毒治疗一起给药，例如，用于治疗HIV和XMRV。适当的主体也包括患有肿瘤的主体，例如，患有实体肿瘤或者淋巴瘤或者白血病的主题。这些主题还可以给药一种化学治疗剂或者肿瘤抗原。

[0629] 显而易见地，这里所描述的方法或者组合物的确切细节可以再不脱离本发明精神的条件下进行变化或者修饰。我们要求保护所有包括在所附权利要求书所概括的范围和精神中的所有修饰和变化。

序列表

<110> 埃默里大学
达纳一法伯癌症研究院有限公司
R·阿梅德
R·阿玛拉
V·韦露
K·蒂坦吉
G·弗里曼

<120> 用于治疗传染病和肿瘤的方法

<130> 6975-76374-24

<150> US 61/118,570
<151> 2008-11-28
<160> 56

<170> PatentIn 3.5版

[0001] <210> 1
<211> 288
<212> PRT
<213> 现代人

<400> 1

```
Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln
1               5                  10                  15
Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp
            20                  25                  30
Asn Pro Pro Thr Phe Phe Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp
        35                  40                  45
Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val
    50                  55                  60
Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala
65                  70                  75                  80
Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg
                85                  90                  95
Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg
            100                 105                 110
Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu
        115                 120                 125
Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val
    130                 135                 140
Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro
145                 150                 155                 160
Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly
                165                 170                 175
```

Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys
180 185 190
Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro
195 200 205
Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly
210 215 220
Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro
225 230 235 240
Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly
245 250 255
Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg
260 265 270
Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
275 280 285

<210> 2
<211> 288
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 2

[0002]

Met Trp Val Arg Gln Val Pro Trp Ser Phe Thr Trp Ala Val Leu Gln
1 5 10 15
Leu Ser Trp Gln Ser Gly Trp Leu Leu Glu Val Pro Asn Gly Pro Trp
20 25 30
Arg Ser Leu Thr Phe Tyr Pro Ala Trp Leu Thr Val Ser Glu Gly Ala
35 40 45
Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Leu Ser Asn Trp Ser Glu Asp Leu Met
50 55 60
Leu Asn Trp Asn Arg Leu Ser Pro Ser Asn Gln Thr Glu Lys Gln Ala
65 70 75 80
Ala Phe Cys Asn Gly Leu Ser Gln Pro Val Gln Asp Ala Arg Phe Gln
85 90 95
Ile Ile Gln Leu Pro Asn Arg His Asp Phe His Met Asn Ile Leu Asp
100 105 110
Thr Arg Arg Asn Asp Ser Gly Ile Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu
115 120 125
His Pro Lys Ala Lys Ile Glu Glu Ser Pro Gly Ala Glu Leu Val Val
130 135 140
Thr Glu Arg Ile Leu Glu Thr Ser Thr Arg Tyr Pro Ser Pro Ser Pro
145 150 155 160
Lys Pro Glu Gly Arg Phe Gln Gly Met Val Ile Gly Ile Met Ser Ala
165 170 175
Leu Val Gly Ile Pro Val Leu Leu Leu Leu Ala Trp Ala Leu Ala Val
180 185 190
Phe Cys Ser Thr Ser Met Ser Glu Ala Arg Gly Ala Gly Ser Lys Asp
195 200 205
Asp Thr Leu Lys Glu Glu Pro Ser Ala Ala Pro Val Pro Ser Val Ala
210 215 220
Tyr Glu Glu Leu Asp Phe Gln Gly Arg Glu Lys Thr Pro Glu Leu Pro
225 230 235 240
Thr Ala Cys Val His Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Thr Glu Gly
245 250 255
Leu Gly Ala Ser Ala Met Gly Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Leu Gln
260 265 270
Gly Pro Arg Pro Pro Arg His Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
275 280 285

<210> 3
<211> 290
<212> PRT
<213> 现代人

<400> 3

Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu
1 5 10 15
Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr
20 25 30
Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu
35 40 45
Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile
50 55 60
Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser
65 70 75 80
Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn
85 90 95
Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr
100 105 110
Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val
115 120 125
Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val
130 135 140
Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr
145 150 155 160
Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser
[0003] 165 170 175
Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn
180 185 190
Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr
195 200 205
Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu
210 215 220
Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His
225 230 235 240
Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr
245 250 255
Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys
260 265 270
Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu
275 280 285
Glu Thr
290

<210> 4
<211> 273
<212> PRT
<213> 现代人

<400> 4

Met Ile Phe Leu Leu Leu Met Leu Ser Leu Glu Leu Gln Leu His Gln
1 5 10 15
Ile Ala Ala Leu Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Glu Leu Tyr Ile Ile
20 25 30

[0004]

```
Glu His Gly Ser Asn Val Thr Leu Glu Cys Asn Phe Asp Thr Gly Ser
        35                  40                  45
His Val Asn Leu Gly Ala Ile Thr Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn
    50                  55                  60
Asp Thr Ser Pro His Arg Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu
65                  70                  75                  80
Pro Leu Gly Lys Ala Ser Phe His Ile Pro Gln Val Gln Val Arg Asp
                85                  90                  95
Glu Gly Gln Tyr Gln Cys Ile Ile Ile Tyr Gly Val Ala Trp Asp Tyr
            100                 105                 110
Lys Tyr Leu Thr Leu Lys Val Lys Ala Ser Tyr Arg Lys Ile Asn Thr
        115                 120                 125
His Ile Leu Lys Val Pro Glu Thr Asp Glu Val Glu Leu Thr Cys Gln
    130                 135                 140
Ala Thr Gly Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Pro Asn Val Ser Val
145                 150                 155                 160
Pro Ala Asn Thr Ser His Ser Arg Thr Pro Glu Gly Leu Tyr Gln Val
                165                 170                 175
Thr Ser Val Leu Arg Leu Lys Pro Pro Pro Gly Arg Asn Phe Ser Cys
            180                 185                 190
Val Phe Trp Asn Thr His Val Arg Glu Leu Thr Leu Ala Ser Ile Asp
        195                 200                 205
Leu Gln Ser Gln Met Glu Pro Arg Thr His Pro Thr Trp Leu Leu His
    210                 215                 220
Ile Phe Ile Pro Ser Cys Ile Ile Ala Phe Ile Phe Ile Ala Thr Val
225                 230                 235                 240
Ile Ala Leu Arg Lys Gln Leu Cys Gln Lys Leu Tyr Ser Ser Lys Asp
                245                 250                 255
Thr Thr Lys Arg Pro Val Thr Thr Thr Lys Arg Glu Val Asn Ser Ala
            260                 265                 270
Ile
```

<210> 5
<211> 23
<212> PRT
<213> 现代人

<400> 5

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1               5                   10                  15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys
            20
```

<210> 6
<211> 14
<212> PRT
<213> 现代人

<400> 6

```
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Leu Leu Ile Tyr
1               5                   10
```

<210> 7
<211> 32
<212> PRT
<213> 现代人

<400> 7

Gly Val Pro Asp Arg Pro Phe Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 8
<211> 11
<212> PRT
<213> 现代人

<400> 8

Phe Gly Gln Gly Gln Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 9
<211> 30
<212> PRT
<213> 现代人

<400> 9

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gln Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gln Tyr Thr Phe Thr
20 25 30

[0005]

<210> 10
<211> 14
<212> PRT
<213> 现代人

<400> 10

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10
<210> 11
<211> 32
<212> PRT
<213> 现代人

<400> 11

Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15
Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 12
<211> 11
<212> PRT
<213> 现代人

<400> 12

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 13
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性抗原肽

<400> 13

Thr Leu Tyr Lys Lys Met Glu Gln Asp Val Lys Val Ala His Gln
1 5 10 15

<210> 14
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性抗原肽

<400> 14

Gly Asn Leu Pro Leu Met Arg Lys Ala Tyr Leu Arg Lys Cys Lys
1 5 10 15
<210> 15
<211> 15
<212> PRT
[0006] <213> 人工序列

<220>
<223> 示例性抗原肽

<400> 15

Thr Phe Ser Arg Met Lys Tyr Asn Ile Cys Met Gly Lys Cys Ile
1 5 10 15

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性抗原肽

<400> 16

Ser Ile Thr Glu Val Glu Cys Phe Leu
1 5

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 示例性抗原肽

<400> 17

Gln Pro Arg Ala Pro Ile Arg Pro Ile
1 5

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性抗原肽

<400> 18

Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val
1 5

<210> 19
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性抗原肽

[0007] <400> 19

Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr
1 5 10

<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性抗原肽

<400> 20

Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu
1 5

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性抗原肽

<400> 21

Leu Tyr Val Asp Ser Leu Phe Phe Leu
1 5

<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性抗原肽

<400> 22

Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
1 5

<210> 23
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性抗原肽

<400> 23

Glu Leu Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu
1 5 10

[0008]

<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性抗原肽

<400> 24

Gly Val Ala Leu Gln Thr Met Lys Gln
1 5

<210> 25
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性抗原肽

<400> 25

Glu Thr Val Ser Glu Gln Ser Asn Val
1 5

<210> 26
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性抗原肽

<400> 26

Val Leu Gln Glu Leu Asn Val Thr Val
1 5

<210> 27
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性抗原肽

<400> 27

Val Leu Gln Glu Leu Asn Val Thr Val
1 5

<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性抗原肽

[0009]

<400> 28

Glu Ala Asp Pro Thr Gly His Ser Tyr
1 5

<210> 29
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性抗原肽

<400> 29

Ala Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
1 5

<210> 30
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性抗原肽

<400> 30

Arg His Arg Pro Leu Gln Glu Val Tyr Pro Glu Ala Asn Ala Pro Ile
1 5 10 15
Gly His Asn Arg Glu
20

<210> 31
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性抗原肽

<400> 31

Trp Asn Arg Gln Leu Tyr Pro Glu Trp Thr Glu Ala Gln Arg Leu Asp
1 5 10 15

<210> 32
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性抗原肽

<400> 32

[0010] Val Leu Leu Lys Glu Phe Thr Val Ser Gly
1 5 10

<210> 33
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性抗原肽

<400> 33

Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu
1 5

<210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性抗原肽

<400> 34

His Leu Phe Gly Tyr Ser Trp Tyr Lys
1 5

<210> 35
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性抗原肽

<400> 35

Phe Leu Thr Pro Lys Lys Leu Gln Cys Val
1 5 10

<210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性抗原肽

<400> 36

Gly Leu Cys Thr Leu Val Ala Met Leu
1 5

<210> 37
<211> 8
<212> PRT
[0011] <213> 人工序列

<220>
<223> 示例性抗原肽

<400> 37

Arg Ala Lys Phe Lys Gln Leu Leu
1 5

<210> 38
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性抗原肽

<400> 38

Phe Leu Arg Gly Arg Ala Tyr Gly Leu
1 5

<210> 39
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 示例性抗原肽

<400> 39

Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val
1 5

<210> 40
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性抗原肽

<400> 40

Thr Pro Arg Val Thr Gly Gly Gly Ala Met
1 5 10

<210> 41
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性抗原肽

[0012] <400> 41

Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu
1 5

<210> 42
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性抗原肽

<400> 42

Cys Leu Thr Glu Tyr Ile Leu Trp Val
1 5

<210> 43
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性抗原肽

<400> 43

Lys Val Asp Asp Thr Phe Tyr Tyr Val
1 5

<210> 44
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性抗原肽

<400> 44

Cys Ile Asn Gly Val Cys Trp Thr Val
1 5

<210> 45
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性抗原肽

<400> 45

Lys Leu Val Ala Leu Gly Ile Asn Ala Val
1 5 10

[0013]

<210> 46
<211> 273
<212> PRT
<213> 现代人

<400> 46

Met Ile Phe Leu Leu Leu Met Leu Ser Leu Glu Leu Gln Leu His Gln
1 5 10 15
Ile Ala Ala Leu Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Glu Leu Tyr Ile Ile
20 25 30
Glu His Gly Ser Asn Val Thr Leu Glu Cys Asn Phe Asp Thr Gly Ser
35 40 45
His Val Asn Leu Gly Ala Ile Thr Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn
50 55 60
Asp Thr Ser Pro His Arg Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu
65 70 75 80
Pro Leu Gly Lys Ala Ser Phe His Ile Pro Gln Val Gln Val Arg Asp
85 90 95
Glu Gly Gln Tyr Gln Cys Ile Ile Ile Tyr Gly Val Ala Trp Asp Tyr
100 105 110
Lys Tyr Leu Thr Leu Lys Val Lys Ala Ser Tyr Arg Lys Ile Asn Thr
115 120 125
His Ile Leu Lys Val Pro Glu Thr Asp Glu Val Glu Leu Thr Cys Gln
130 135 140
Ala Thr Gly Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Pro Asn Val Ser Val
145 150 155 160
Pro Ala Asn Thr Ser His Ser Arg Thr Pro Glu Gly Leu Tyr Gln Val
165 170 175

Thr Ser Val Leu Arg Leu Lys Pro Pro Pro Gly Arg Asn Phe Ser Cys
180 185 190
Val Phe Trp Asn Thr His Val Arg Glu Leu Thr Leu Ala Ser Ile Asp
195 200 205
Leu Gln Ser Gln Met Glu Pro Arg Thr His Pro Thr Trp Leu Leu His
210 215 220
Ile Phe Ile Pro Phe Cys Ile Ile Ala Phe Ile Phe Ile Ala Thr Val
225 230 235 240
Ile Ala Leu Arg Lys Gln Leu Cys Gln Lys Leu Tyr Ser Ser Lys Asp
245 250 255
Thr Thr Lys Arg Pro Val Thr Thr Thr Lys Arg Glu Val Asn Ser Ala
260 265 270
Ile

<210> 47
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性抗原肽

<400> 47

Cys Glu Leu Asp Asn Ser His Glu Asp Tyr Asn Trp Asn Leu Trp Phe
1 5 10 15
Lys Trp Cys Ser Gly His Gly Arg
20

[0014]

<210> 48
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性抗原肽

<400> 48

Thr Gly His Gly Lys His Phe Tyr Asp Cys Asp Trp Asp Pro Ser His
1 5 10 15
Gly Asp Tyr Ser Trp Tyr Leu Trp
20

<210> 49
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性抗原肽

<400> 49

Asp Pro Ser His Gly Asp Tyr Ser Trp Tyr Leu Trp Asp Tyr Leu Cys
1 5 10 15
Gly Asn Gly His His Pro Tyr Asp
20

<210> 50
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性抗原肽

<400> 50

Asp Tyr Leu Cys Gly Asn Gly His His Pro Tyr Asp Cys Glu Leu Asp
1 5 10 15
Asn Ser His Glu Asp Tyr Ser Trp
20

<210> 51
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性抗原肽

<400> 51

Asp Pro Tyr Asn Cys Asp Trp Asp Pro Tyr His Glu Lys Tyr Asp Trp
1 5 10 15
Asp Leu Trp Asn Lys Trp Cys Asn
20

[0015]

<210> 52
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性抗原肽

<400> 52

Lys Tyr Asp Trp Asp Leu Trp Asn Lys Trp Cys Asn Lys Asp Pro Tyr
1 5 10 15
Asn Cys Asp Trp Asp Pro Tyr His
20

<210> 53
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的低聚核苷酸引物

<400> 53

gatgaatggg tagtggaggt tctgg 25

<210> 54
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的低聚核苷酸引物

<400> 54
cccaagtatc cctattcttg gttgcac 27

<210> 55
<211> 20
<212> DNA
[0016] <213> 人工序列

<220>
<223> 合成的低聚核苷酸引物

<400> 55
tgatcctcgc ttgctaactg 20

<210> 56
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的低聚核苷酸引物

<400> 56
agcaagatgg cgataagcag 20

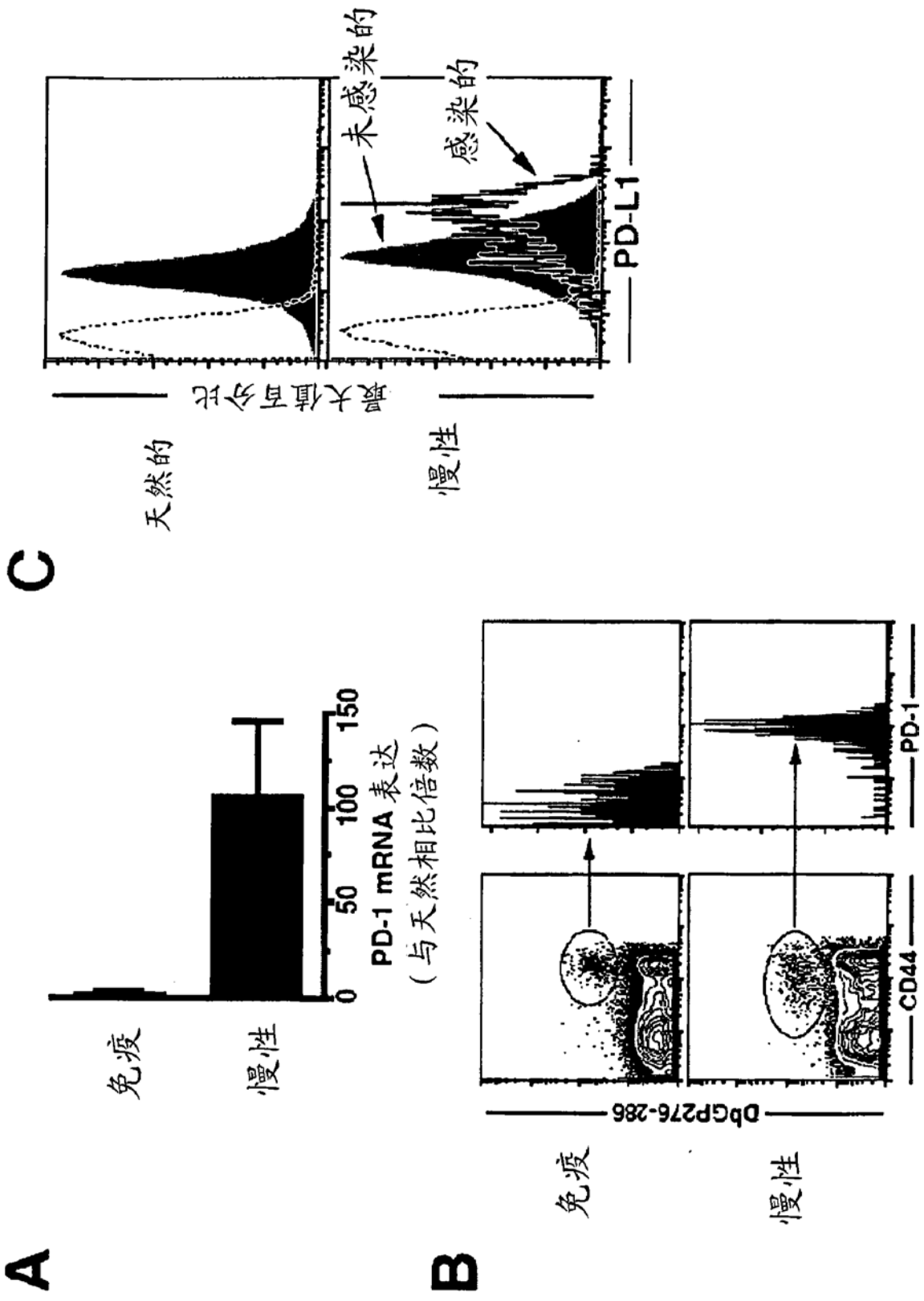

A
免疫
慢性
0
50
100
150
PD-1 mRNA 表达
（与天然相比倍数）
B
免疫
慢性
DbGP276-286
CD44
PD-1
C
天然的
慢性
肿大淋巴结
未感染的
感染的
PD-L1

图1

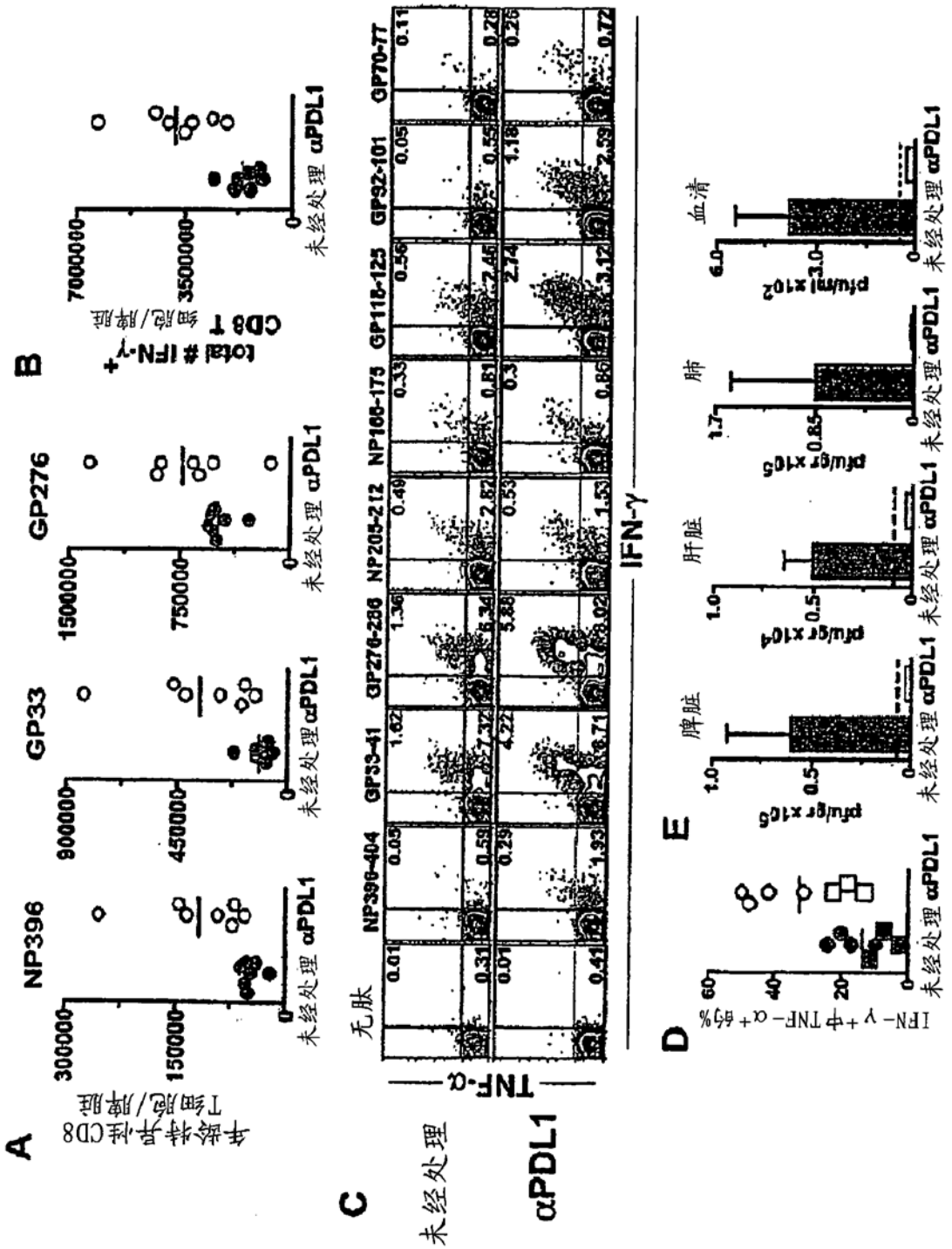

A
NP396
GP33
GP276
B
未经处理
αPDL1
C
无肽
未经处理
αPDL1
TNF-α
IFN-γ
D
E
脾脏
肝脏
肺
血清
未经处理
αPDL1

图2

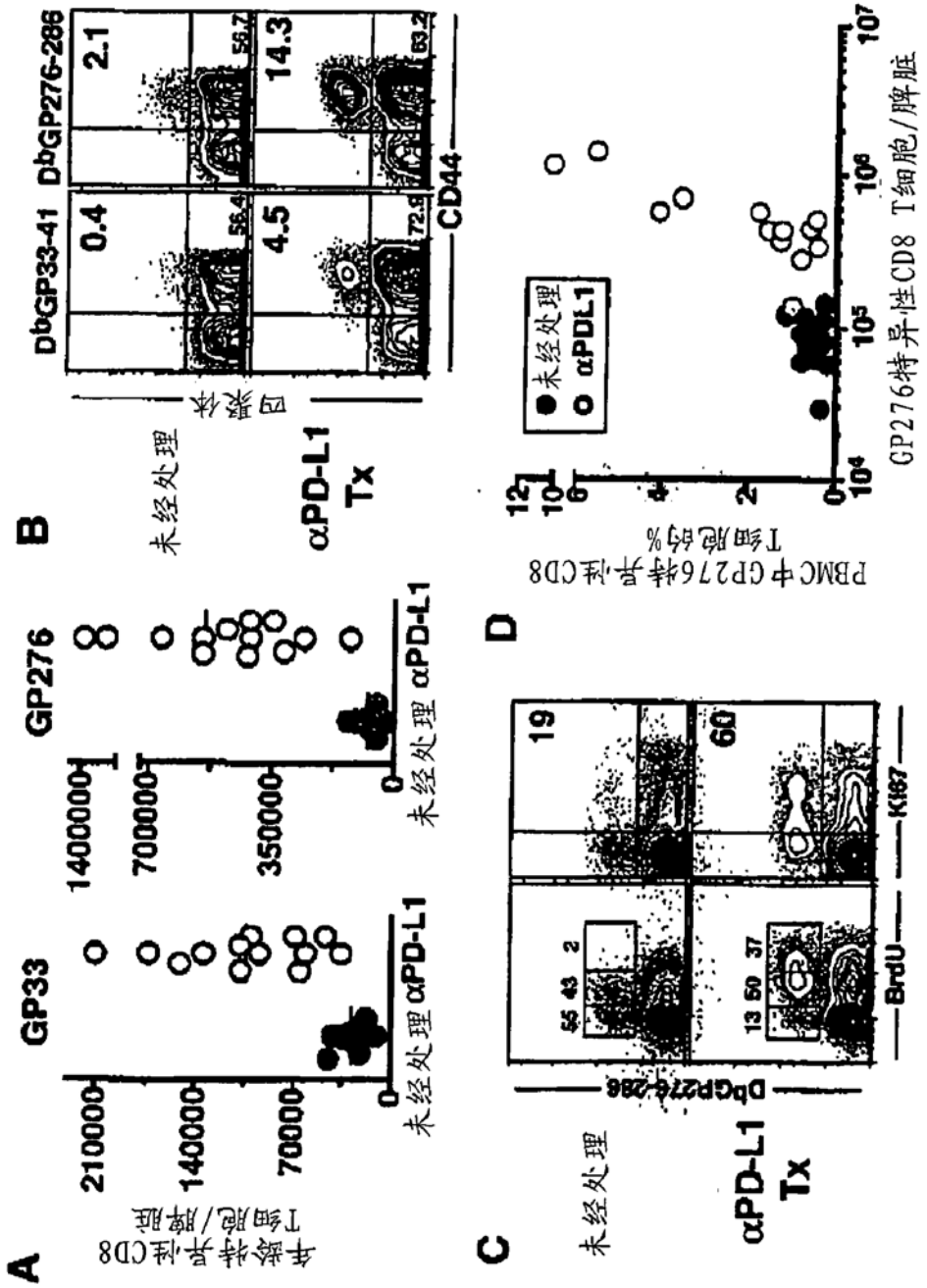

A
GP33
GP276
未经处理
αPD-L1
B
未经处理
αPD-L1
Tx
DbGP33-41
DbGP276-286
CD44
C
未经处理
αPD-L1
Tx
BrdU
Ki67
D
未经处理
αPDL1
GP276特异性CD8 T细胞/脾脏

图3

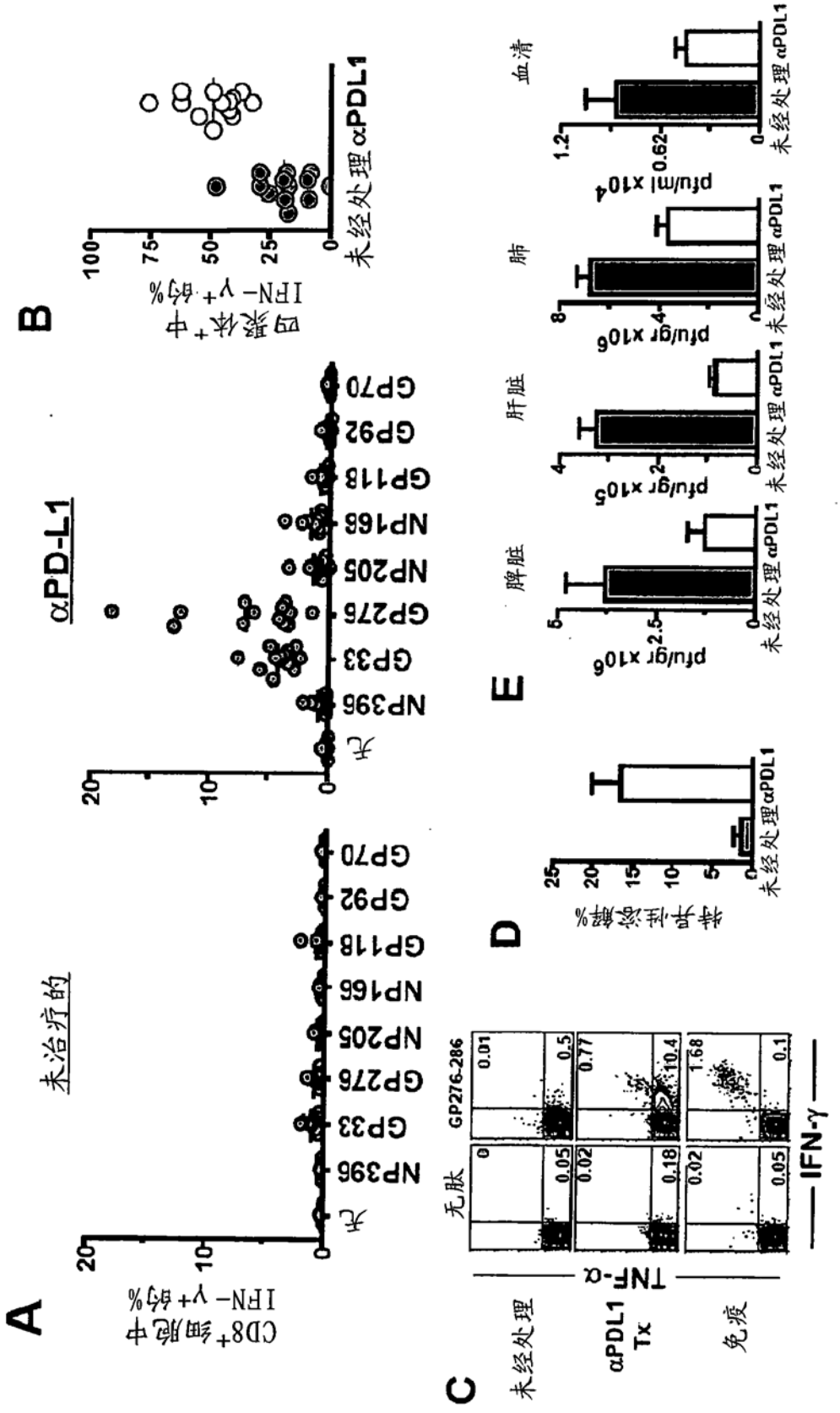

A
未治疗的
αPD-L1
CD8+细胞中IFN-γ+的%
NP396
GP33
GP276
NP205
NP166
GP118
GP92
GP70
B
四聚体+中IFN-γ+的%
未经处理
αPDL1
C
未经处理
αPDL1 Tx
免疫
无肽
GP276-286
TNF-α
IFN-γ
D
特异性溶解%
E
脾脏
肝脏
肺
血清
pfu/gr x10⁶
pfu/gr x10⁵
pfu/ml x10⁴

图4

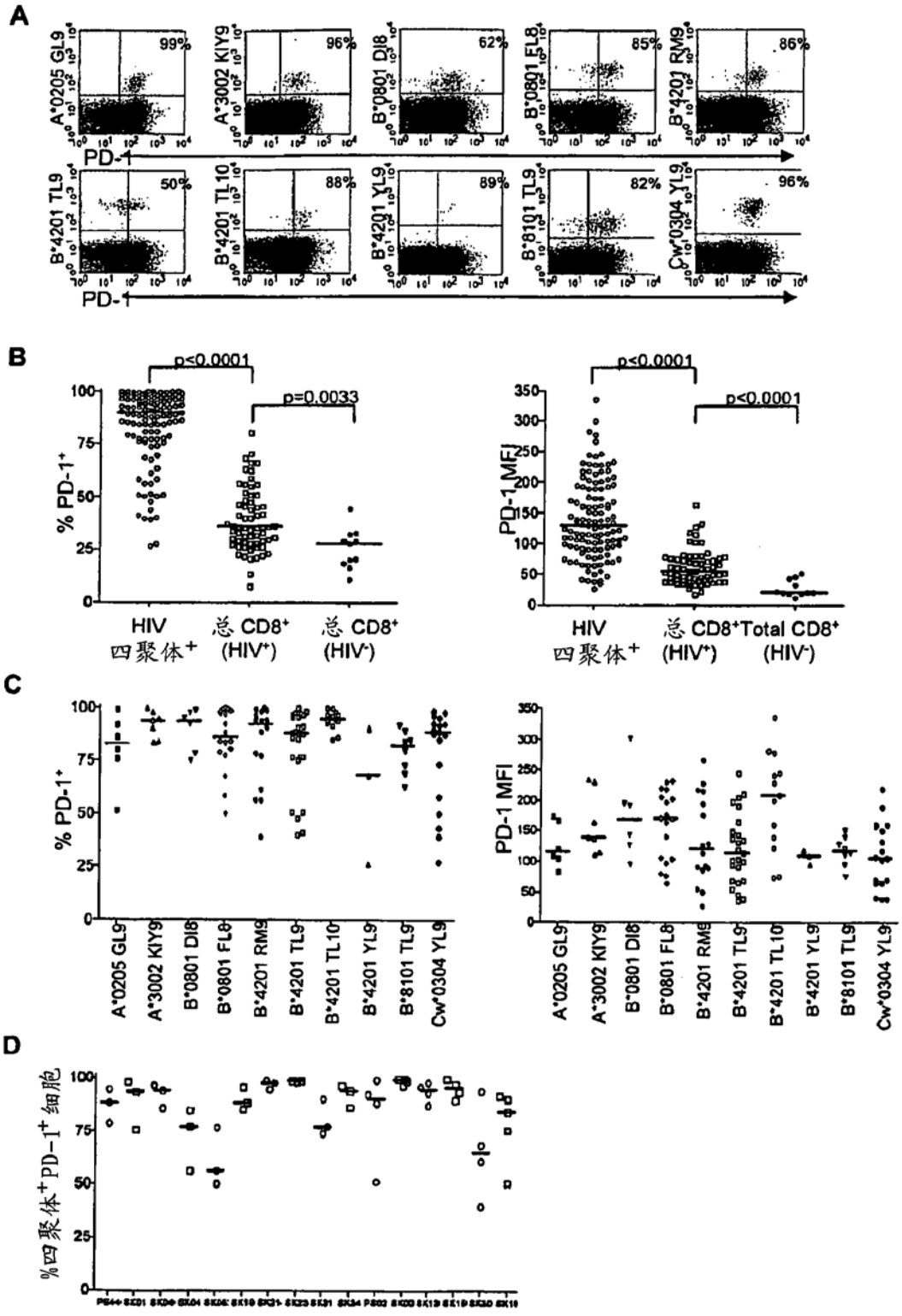

A
A*0205 GL9
99%
A*3002 KIY9
96%
B*0801 DI8
62%
B*0801 FL8
85%
B*4201 RM9
86%
PD-1
B*4201 TL9
50%
B*4201 TL10
88%
B*4201 YL9
89%
B*8101 TL9
82%
Cw*0304 YL9
96%
PD-1
B
p≤0.0001
p=0.0033
% PD-1+
HIV 四聚体+
总 CD8+ (HIV+)
总 CD8+ (HIV-)
p≤0.0001
p≤0.0001
PD-1 MFI
HIV 四聚体+
总 CD8+ (HIV+)
Total CD8+ (HIV-)
C
% PD-1+
PD-1 MFI
A*0205 GL9
A*3002 KIY9
B*0801 DI8
B*0801 FL8
B*4201 RM9
B*4201 TL9
B*4201 TL10
B*4201 YL9
B*8101 TL9
Cw*0304 YL9
D
%四聚体+PD-1+细胞

图5

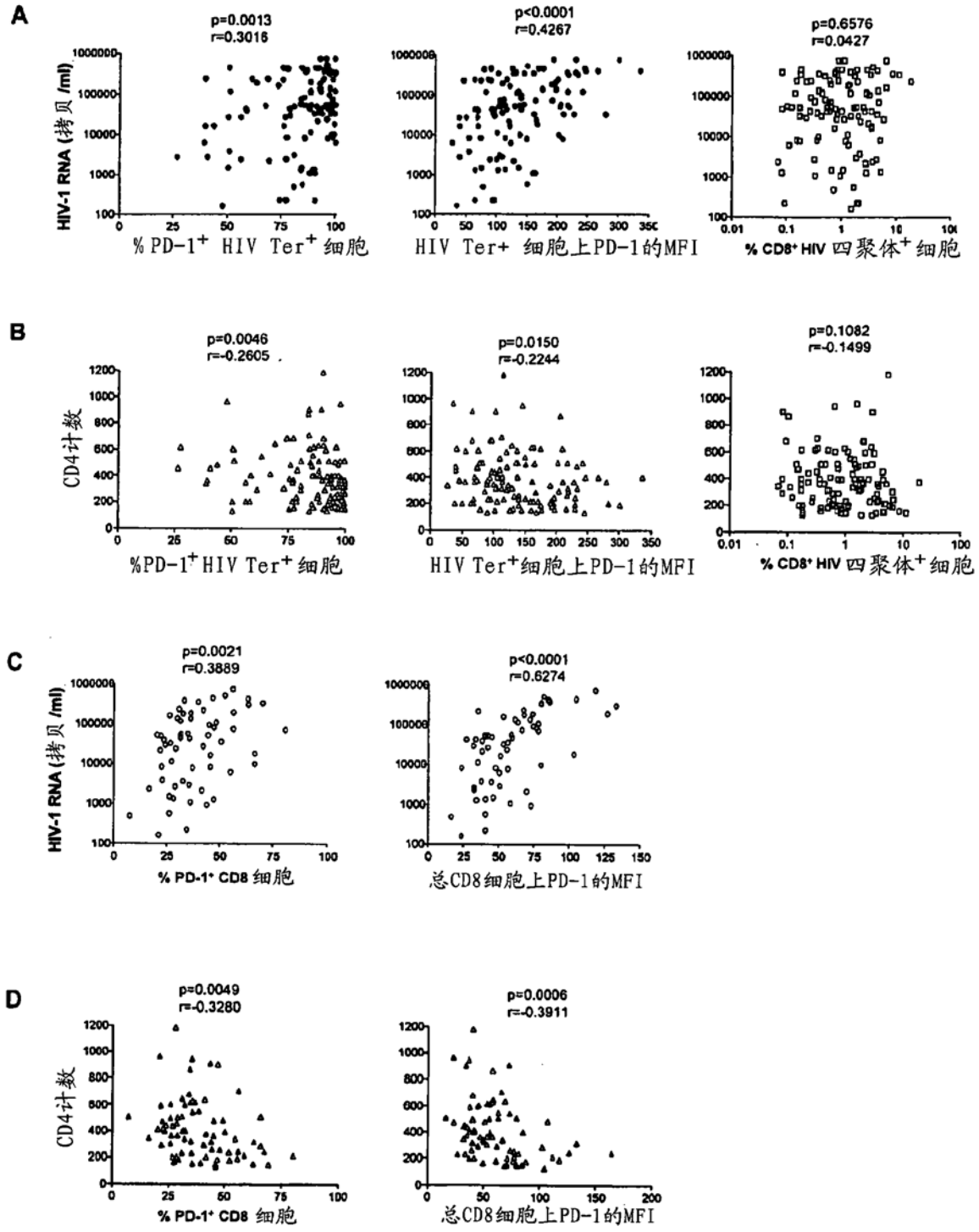

A
p=0.0013
r=0.3016
HIV-1 RNA (拷贝/ml)
% PD-1+ HIV Ter+ 细胞
p<0.0001
r=0.4267
HIV Ter+ 细胞上PD-1的MFI
p=0.6576
r=0.0427
% CD8+ HIV 四聚体+ 细胞
B
p=0.0046
r=-0.2605
CD4计数
%PD-1+HIV Ter+ 细胞
p=0.0150
r=-0.2244
HIV Ter+细胞上PD-1的MFI
p=0.1082
r=-0.1499
% CD8+ HIV 四聚体+ 细胞
C
p=0.0021
r=0.3889
HIV-1 RNA (拷贝/ml)
% PD-1+ CD8 细胞
p<0.0001
r=0.6274
总CD8细胞上PD-1的MFI
D
p=0.0049
r=-0.3280
CD4计数
% PD-1+ CD8 细胞
p=0.0006
r=-0.3911
总CD8细胞上PD-1的MFI

图6

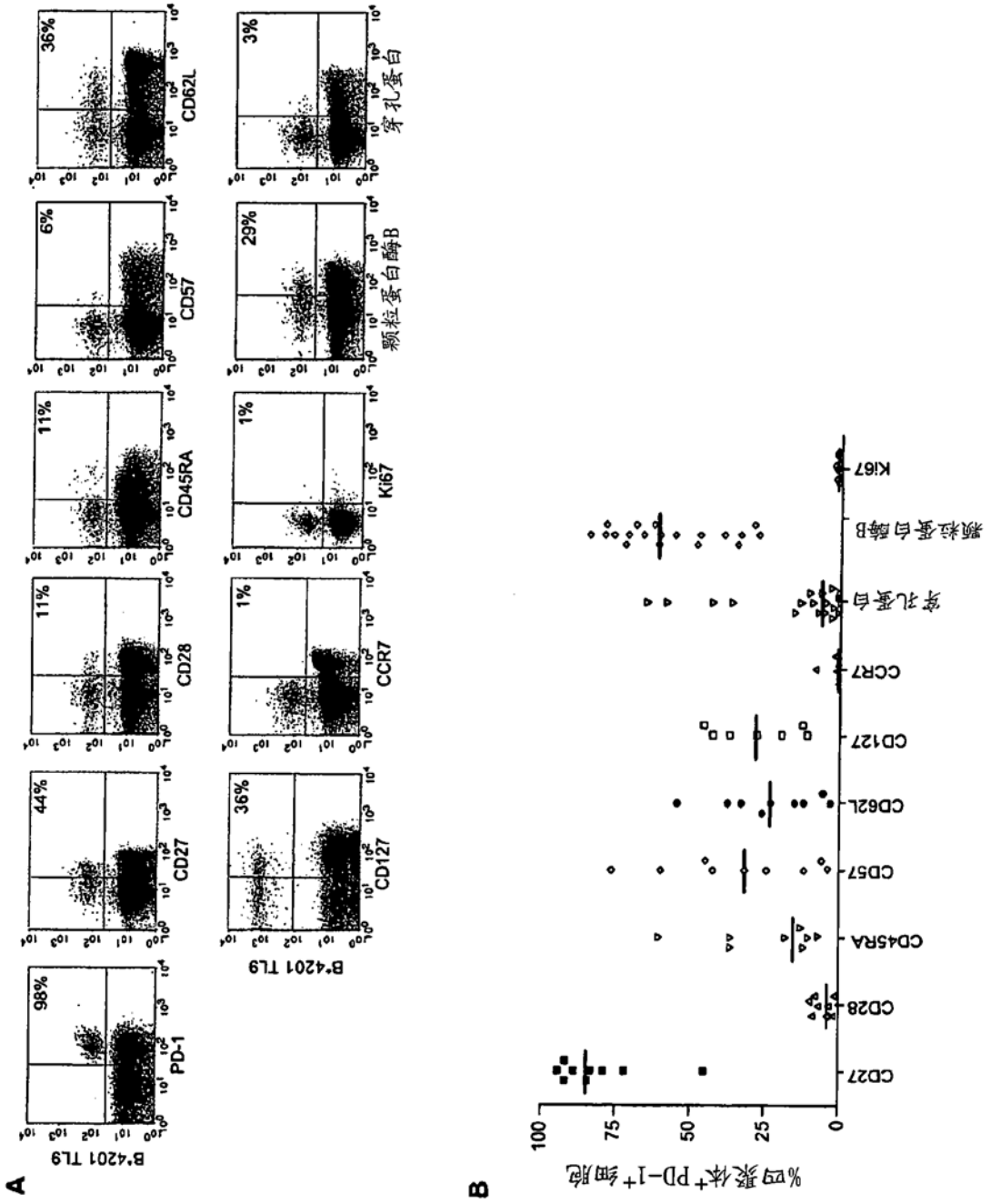

A
B*4201 TLA
98%
PD-1
44%
CD27
11%
CD28
11%
CD45RA
6%
CD57
36%
CD62L
B*4201 TLA
36%
CD127
1%
CCR7
1%
Ki67
29%
颗粒蛋白酶B
3%
穿孔蛋白
B
%四聚体+PD-1+细胞
100
75
50
25
0
CD27
CD28
CD45RA
CD57
CD62L
CD127
CCR7
穿孔蛋白
颗粒蛋白酶B
Ki67

图7

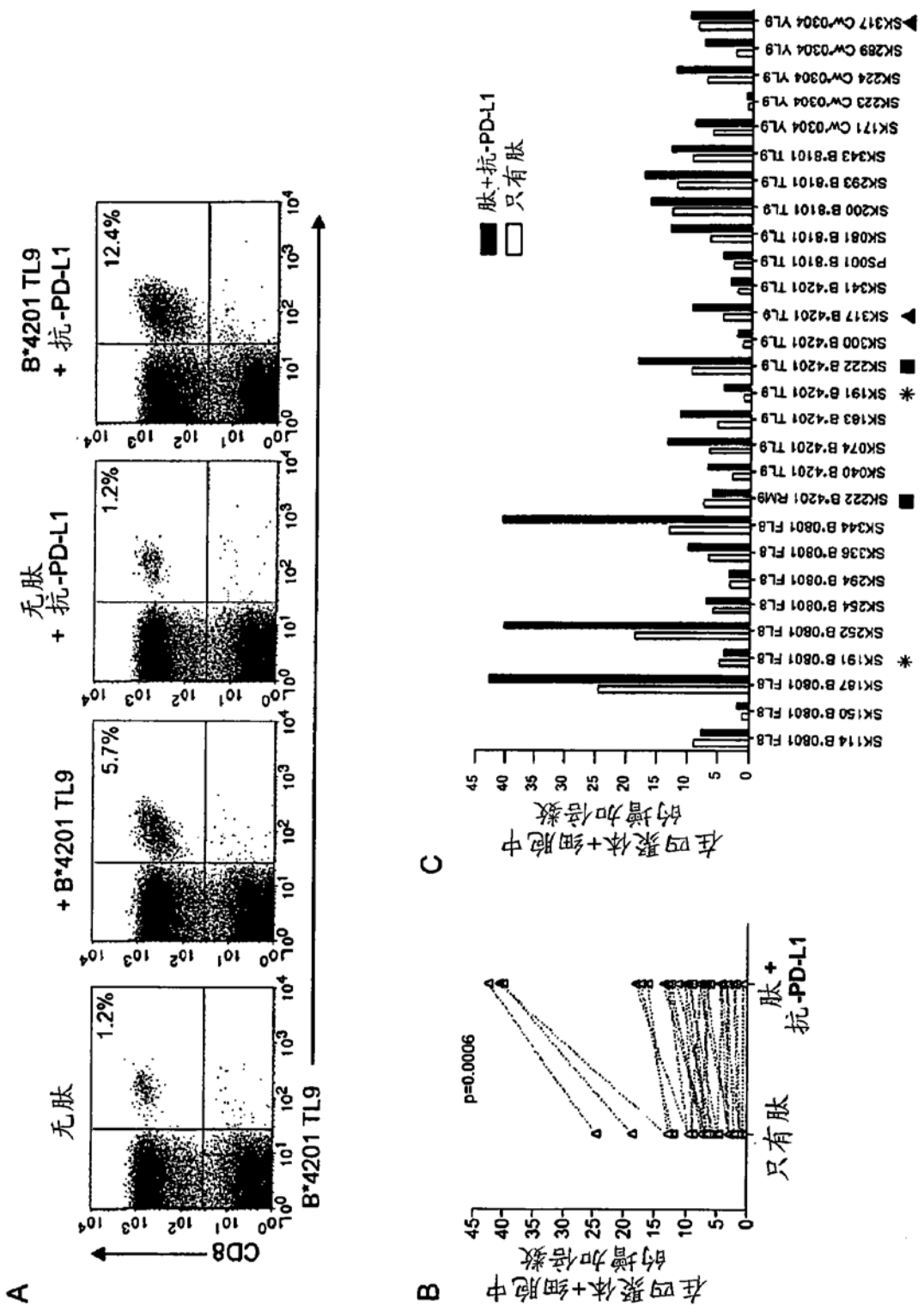

A
无肽
1.2%
+ B*4201 TL9
5.7%
无肽
+ 抗-PD-L1
1.2%
B*4201 TL9
+ 抗-PD-L1
12.4%
CD8
B*4201 TL9
B
在四聚体+细胞中
的增加倍数
p=0.0006
只有肽
肽+
抗-PD-L1
C
肽+抗-PD-L1
只有肽
在四聚体+细胞中
的增加倍数
SK114 B*0801 FLB
SK150 B*0801 FLB
SK187 B*0801 FLB
SK191 B*0801 FLB
SK252 B*0801 FLB
SK254 B*0801 FLB
SK294 B*0801 FLB
SK336 B*0801 FLB
SK344 B*0801 FLB
SK222 B*4201 RM9
SK040 B*4201 TLB
SK074 B*4201 TLB
SK163 B*4201 TLB
SK191 B*4201 TLB
SK222 B*4201 TLB
SK300 B*4201 TLB
SK317 B*4201 TLB
SK341 B*4201 TLB
PS001 B*8101 TLB
SK081 B*8101 TLB
SK200 B*8101 TLB
SK293 B*8101 TLB
SK343 B*8101 TLB
SK171 Cw*0304 YLB
SK223 Cw*0304 YLB
SK224 Cw*0304 YLB
SK289 Cw*0304 YLB
SK317 Cw*0304 YLB

图8

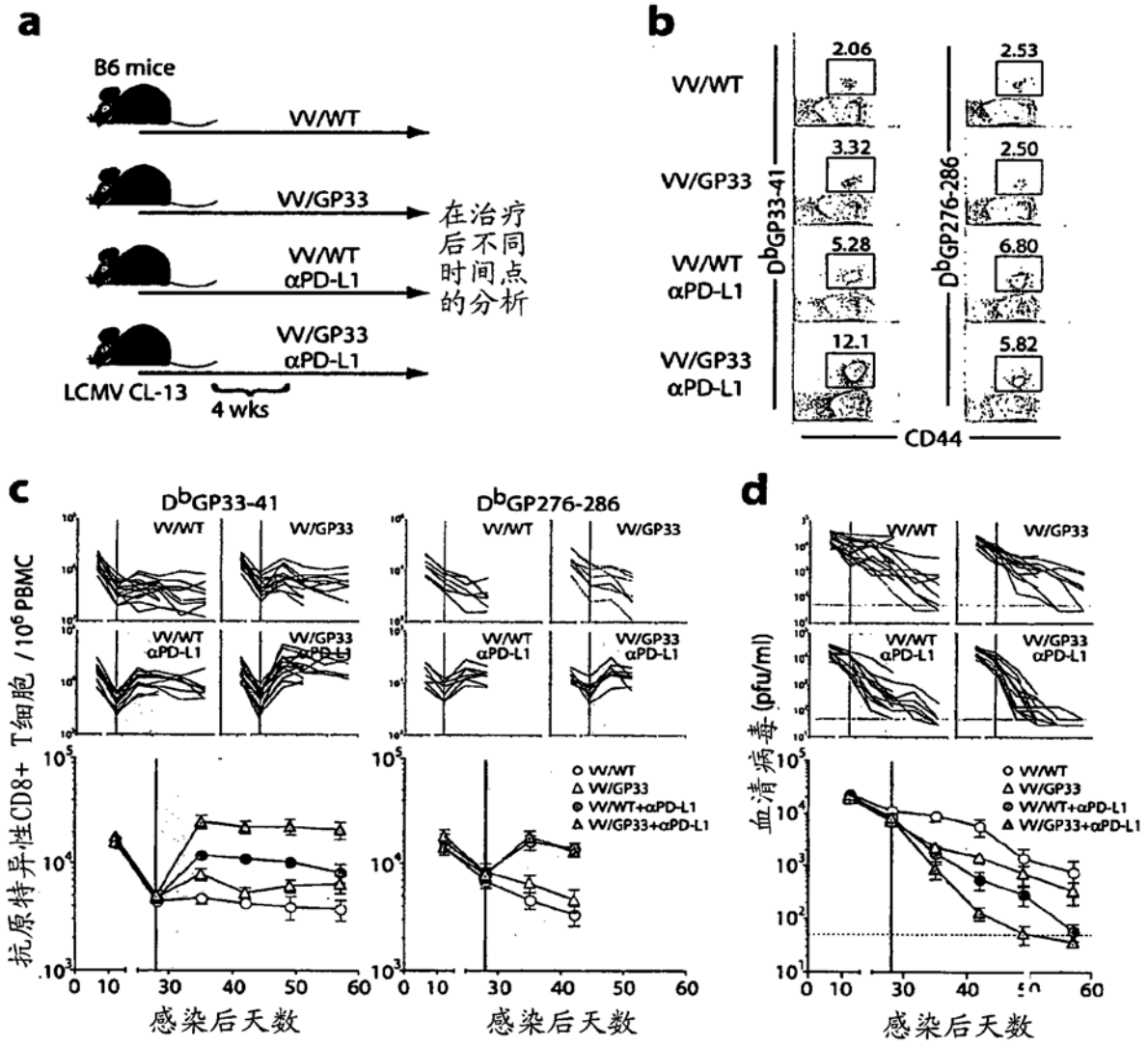

a
B6 mice
VV/WT
VV/GP33
VV/WT αPD-L1
VV/GP33 αPD-L1
在治疗后不同时间点的分析
LCMV CL-13
4 wks
b
VV/WT
VV/GP33
VV/WT αPD-L1
VV/GP33 αPD-L1
DbGP33-41
DbGP276-286
2.06
2.53
3.32
2.50
5.28
6.80
12.1
5.82
CD44
c
DbGP33-41
DbGP276-286
VV/WT
VV/GP33
VV/WT αPD-L1
VV/GP33 αPD-L1
抗原特异性CD8+ T细胞 /10^6 PBMC
感染后天数
d
血清病毒 (pfu/ml)
感染后天数

图9

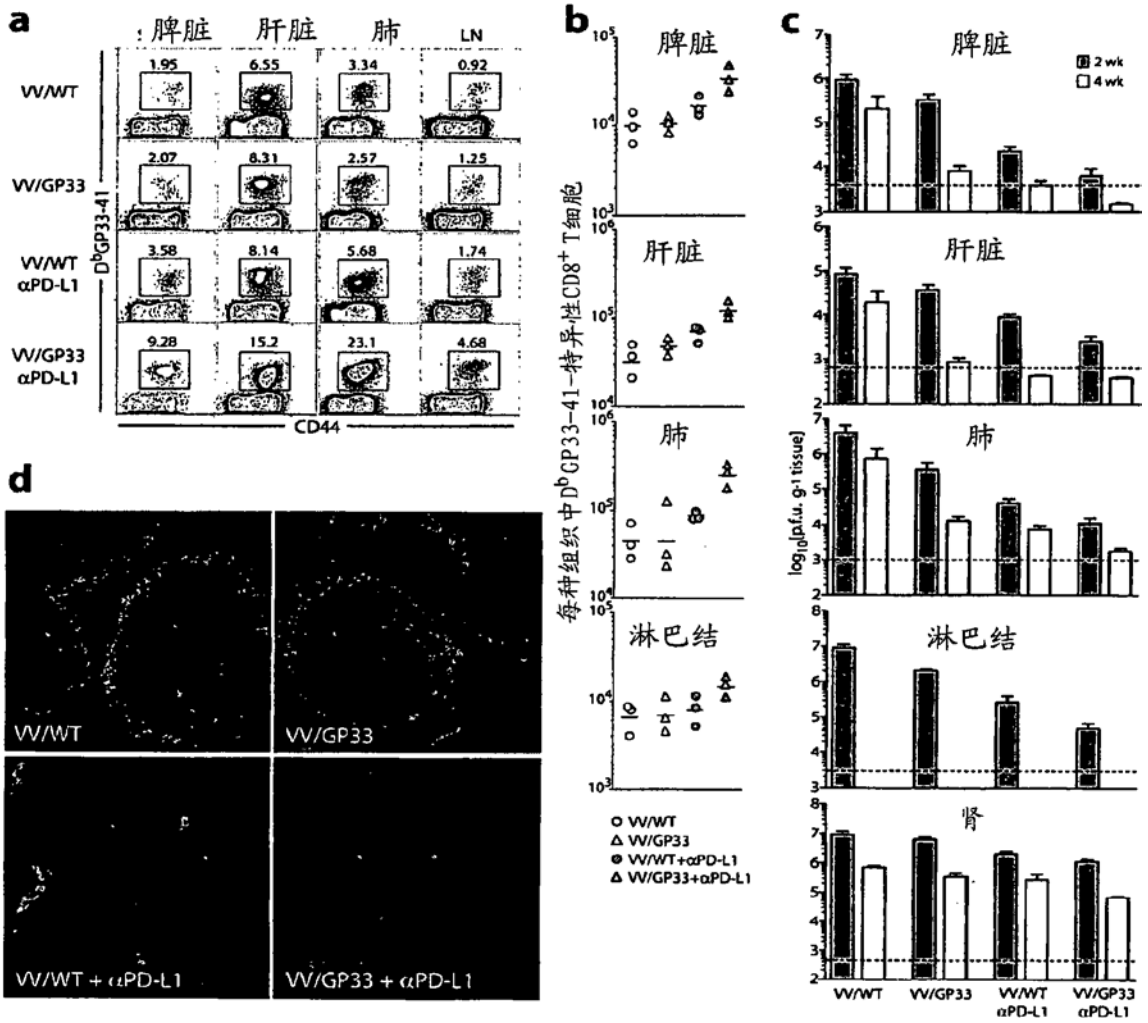

a
脾脏
肝脏
肺
LN
VV/WT
VV/GP33
VV/WT αPD-L1
VV/GP33 αPD-L1
1.95
6.55
3.34
0.92
2.07
8.31
2.57
1.25
3.58
8.14
5.68
1.74
9.28
15.2
23.1
4.68
DbGP33-41
CD44
b
脾脏
肝脏
肺
淋巴结
每种组织中DbGP33-41-特异性CD8+T细胞
VV/WT
VV/GP33
VV/WT+αPD-L1
VV/GP33+αPD-L1
c
脾脏
肝脏
肺
淋巴结
肾
2 wk
4 wk
log10[p.f.u. g-1 tissue]
VV/WT
VV/GP33
VV/WT αPD-L1
VV/GP33 αPD-L1
d
VV/WT
VV/GP33
VV/WT + αPD-L1
VV/GP33 + αPD-L1

图10

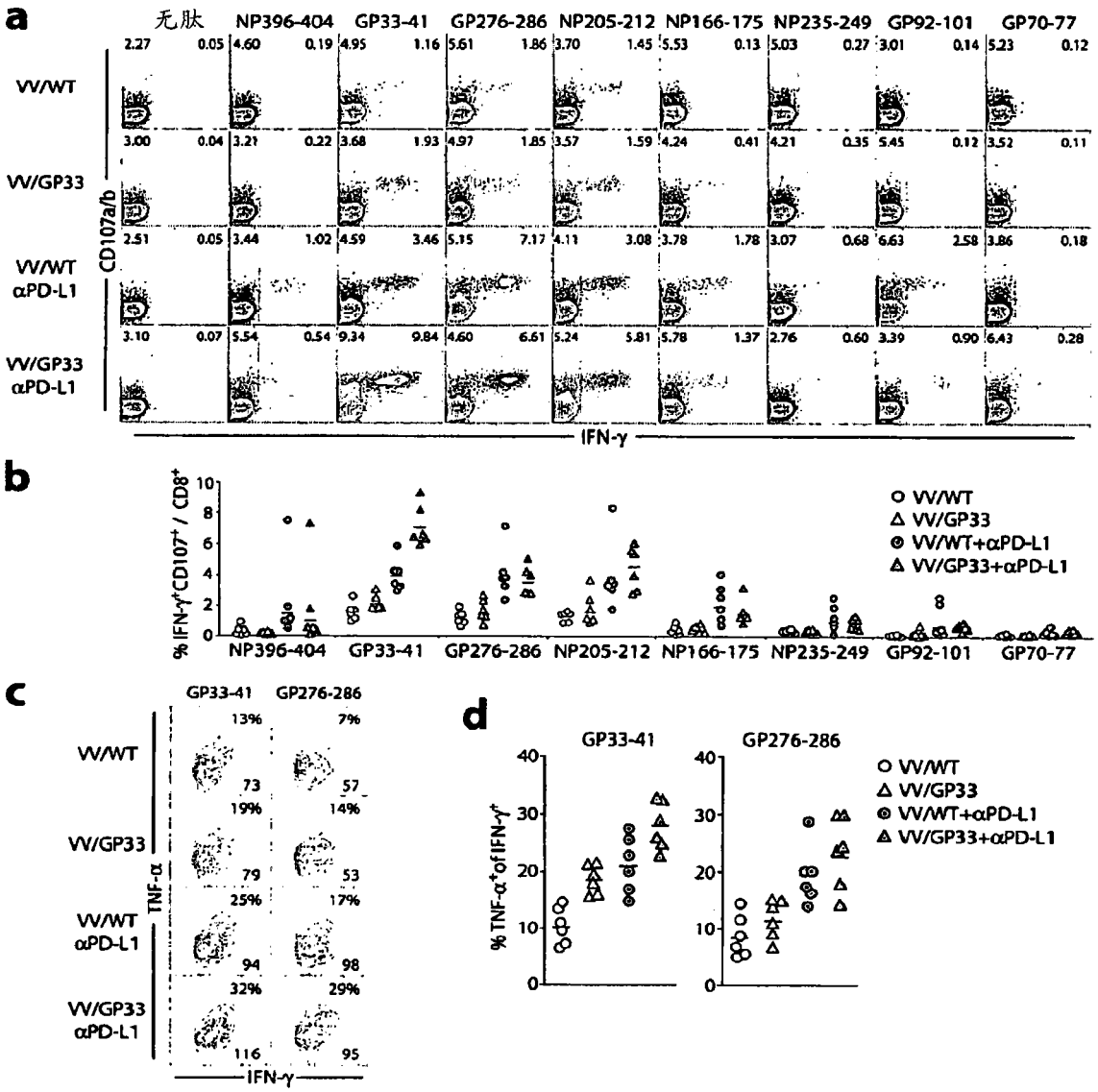

a
无肽
NP396-404
GP33-41
GP276-286
NP205-212
NP166-175
NP235-249
GP92-101
GP70-77
VV/WT
VV/GP33
VV/WT αPD-L1
VV/GP33 αPD-L1
CD107a/b
IFN-γ
b
% IFN-γ+CD107+ / CD8+
VV/WT
VV/GP33
VV/WT+αPD-L1
VV/GP33+αPD-L1
c
GP33-41
GP276-286
TNF-α
IFN-γ
d
% TNF-α+of IFN-γ+

图11

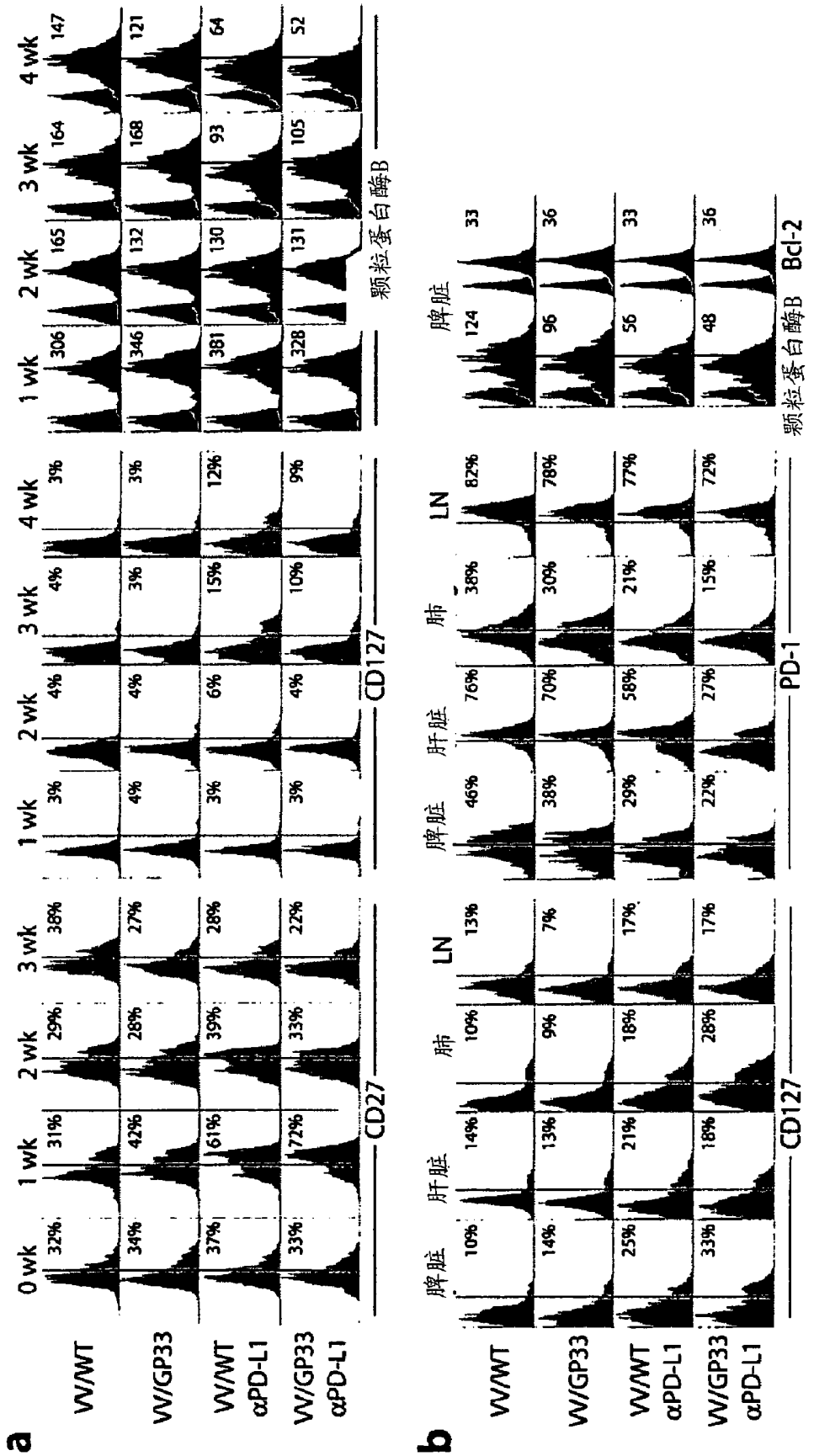

a
0 wk
1 wk
2 wk
3 wk
4 wk
VV/WT
VV/GP33
VV/WT αPD-L1
VV/GP33 αPD-L1
CD27
CD127
颗粒蛋白酶B
b
脾脏
肝脏
肺
LN
PD-1
颗粒蛋白酶B
Bcl-2

图12

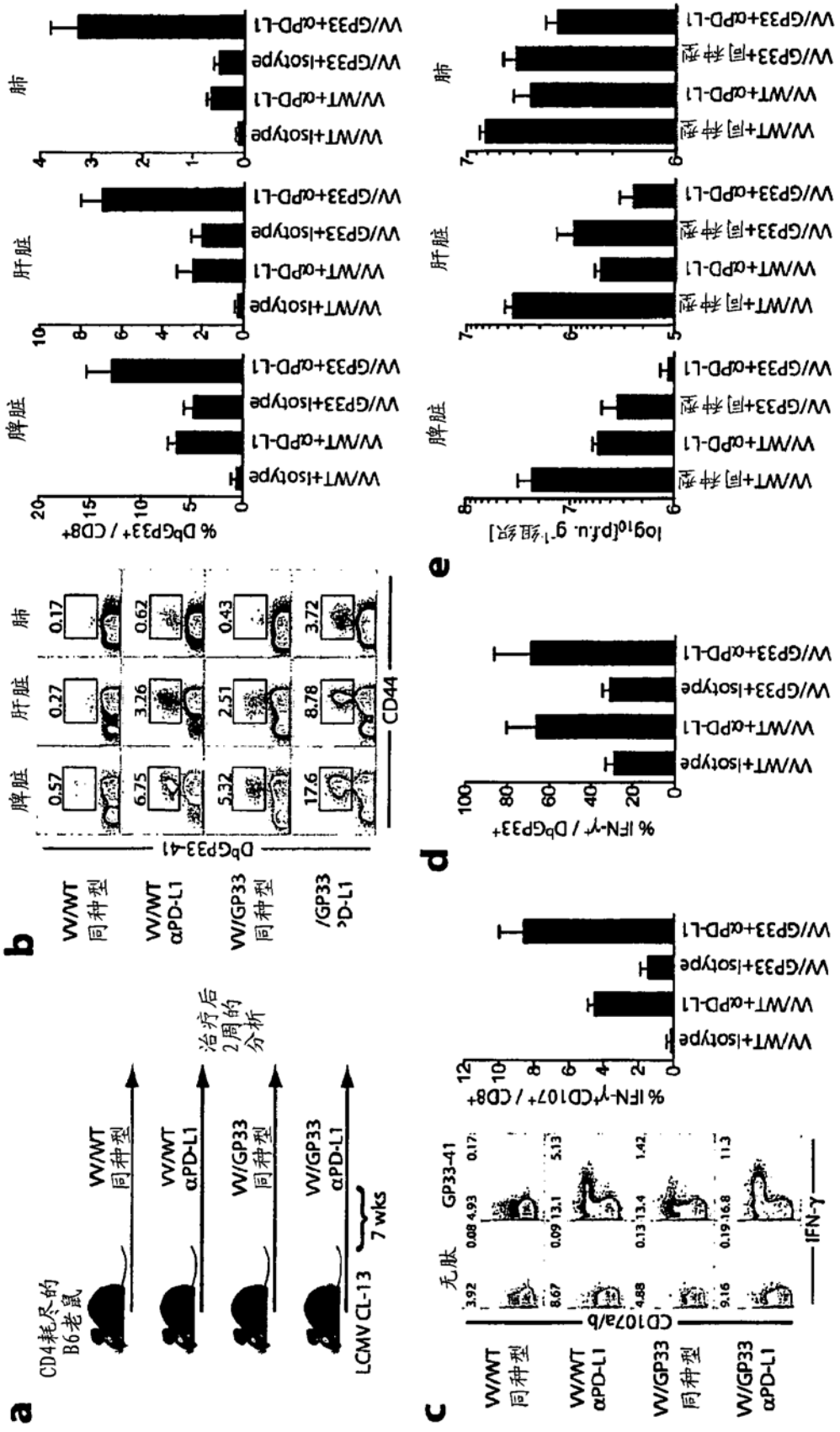

a
CD4耗尽的B6老鼠
VV/WT 同种型
VV/WT αPD-L1
VV/GP33 同种型
VV/GP33 αPD-L1
LCMV CL-13
7 wks
治疗后2周的分析
b
VV/WT 同种型
VV/WT αPD-L1
VV/GP33 同种型
/GP33 αPD-L1
DbGP33-41
CD44
脾脏
肝脏
肺
0.57
6.75
5.32
17.6
0.27
3.26
2.51
8.78
0.17
0.62
0.43
3.72
% DbGP33+ / CD8+
VV/WT+isotype
VV/WT+αPD-L1
VV/GP33+isotype
VV/GP33+αPD-L1
c
无肽
GP33-41
CD107a/b
IFN-γ
0.08 4.93
0.09 13.1
0.13 13.4
0.19 16.8
0.17
5.13
1.42
11.3
3.92
8.67
4.88
9.16
% IFN-γ+CD107+ / CD8+
d
% IFN-γ+ / DbGP33+
e
log10[p.f.u. g-1组织]
VV/WT+同种型
VV/GP33+同种型
肺
肝脏
脾脏

图13

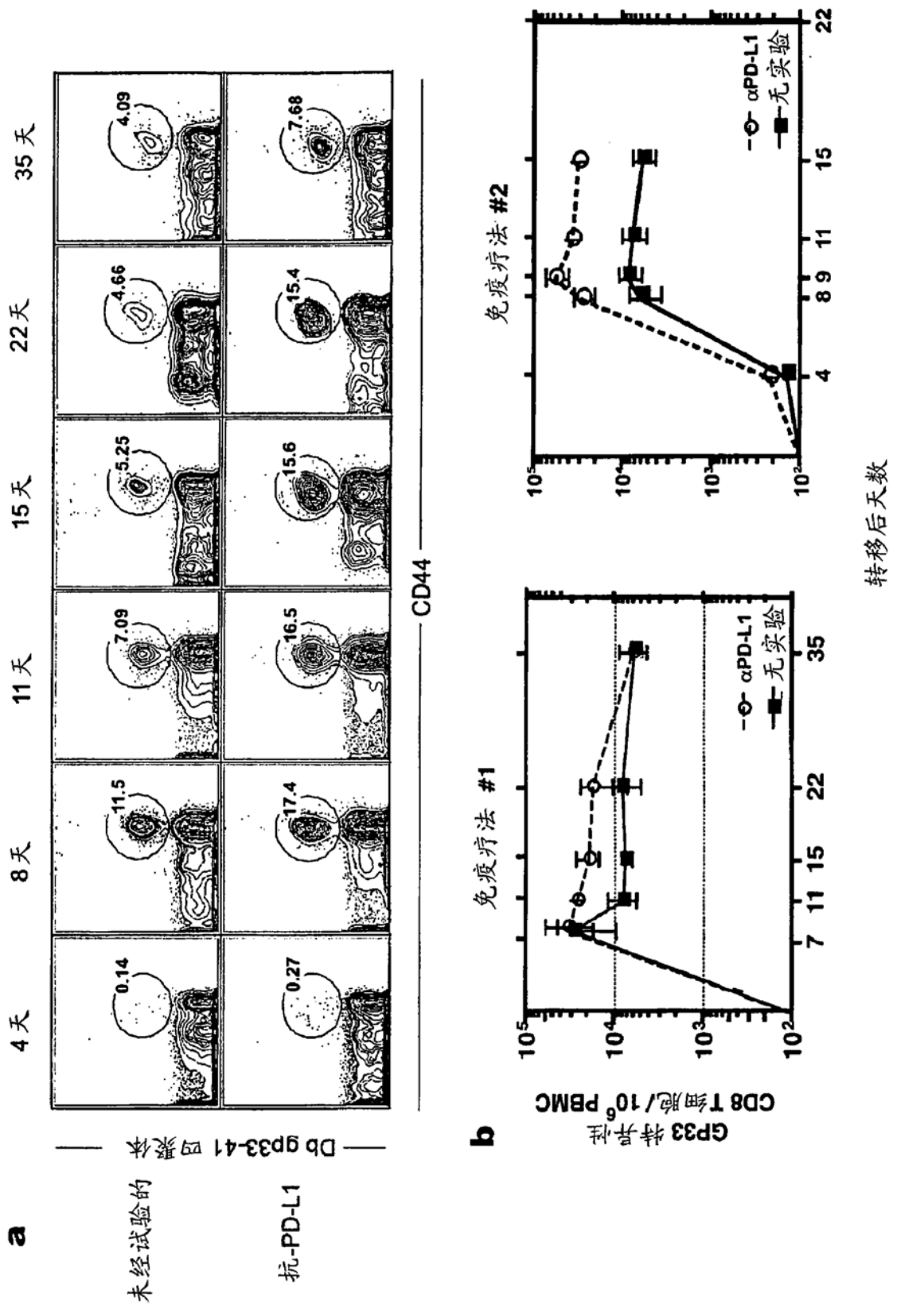

a
4 天
8 天
11 天
15 天
22 天
35 天
0.14
11.5
7.09
5.25
4.66
4.09
0.27
17.4
16.5
15.6
15.4
7.68
CD44
Db gp33-41 四聚体
未经试验的
抗-PD-L1
b
GP33 特异性
CD8 T细胞/10^6 PBMC
免疫疗法 #1
αPD-L1
无实验
免疫疗法 #2
转移后天数

图14

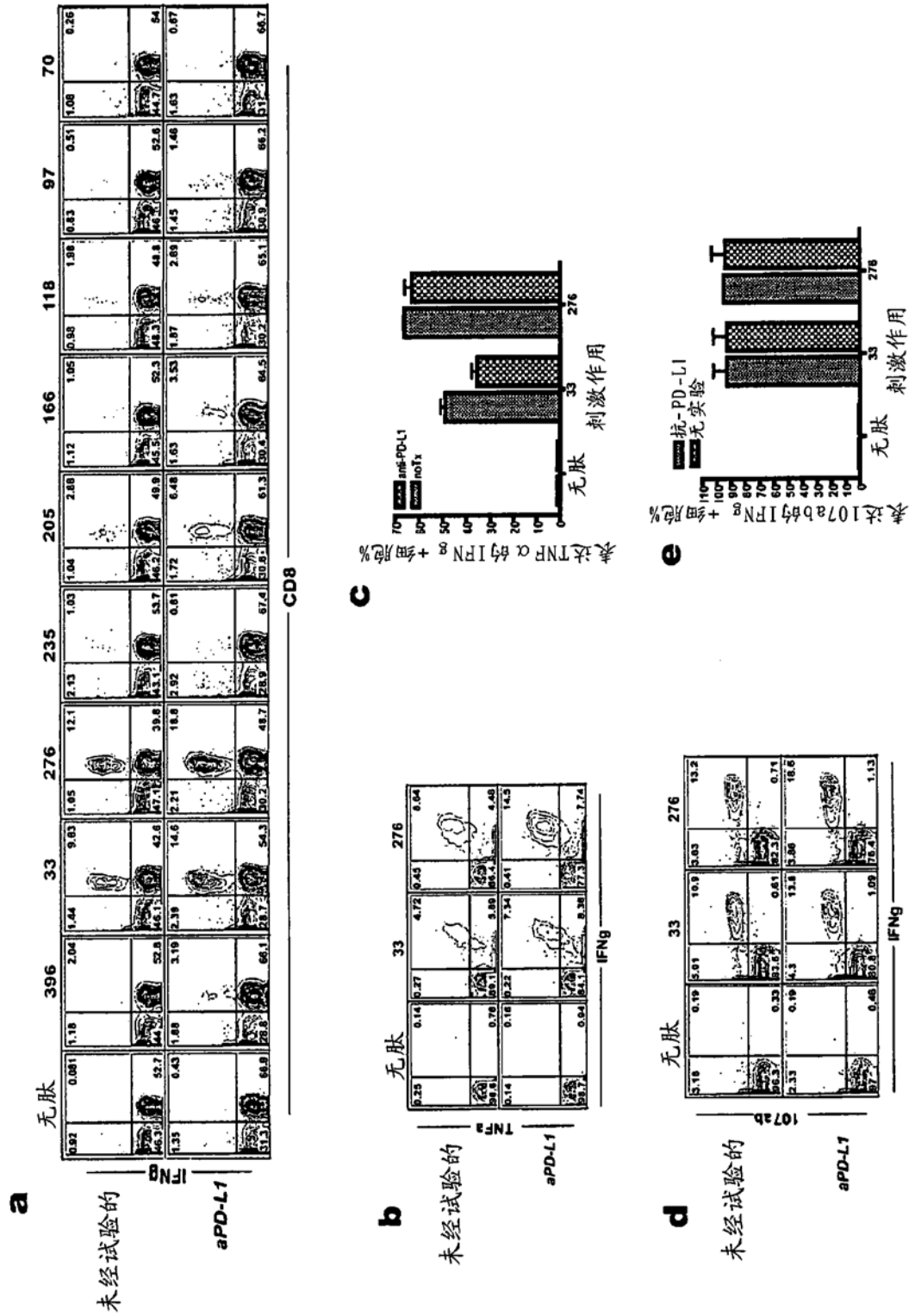

a
无肽
396
33
276
235
205
166
118
97
70
未经试验的
aPD-L1
CD8
b
无肽
33
276
未经试验的
aPD-L1
IFNg
c
anti-PD-L1
no tx
无肽
刺激作用
d
无肽
33
276
未经试验的
aPD-L1
IFNg
e
抗-PD-L1
无实验
无肽
刺激作用

图15

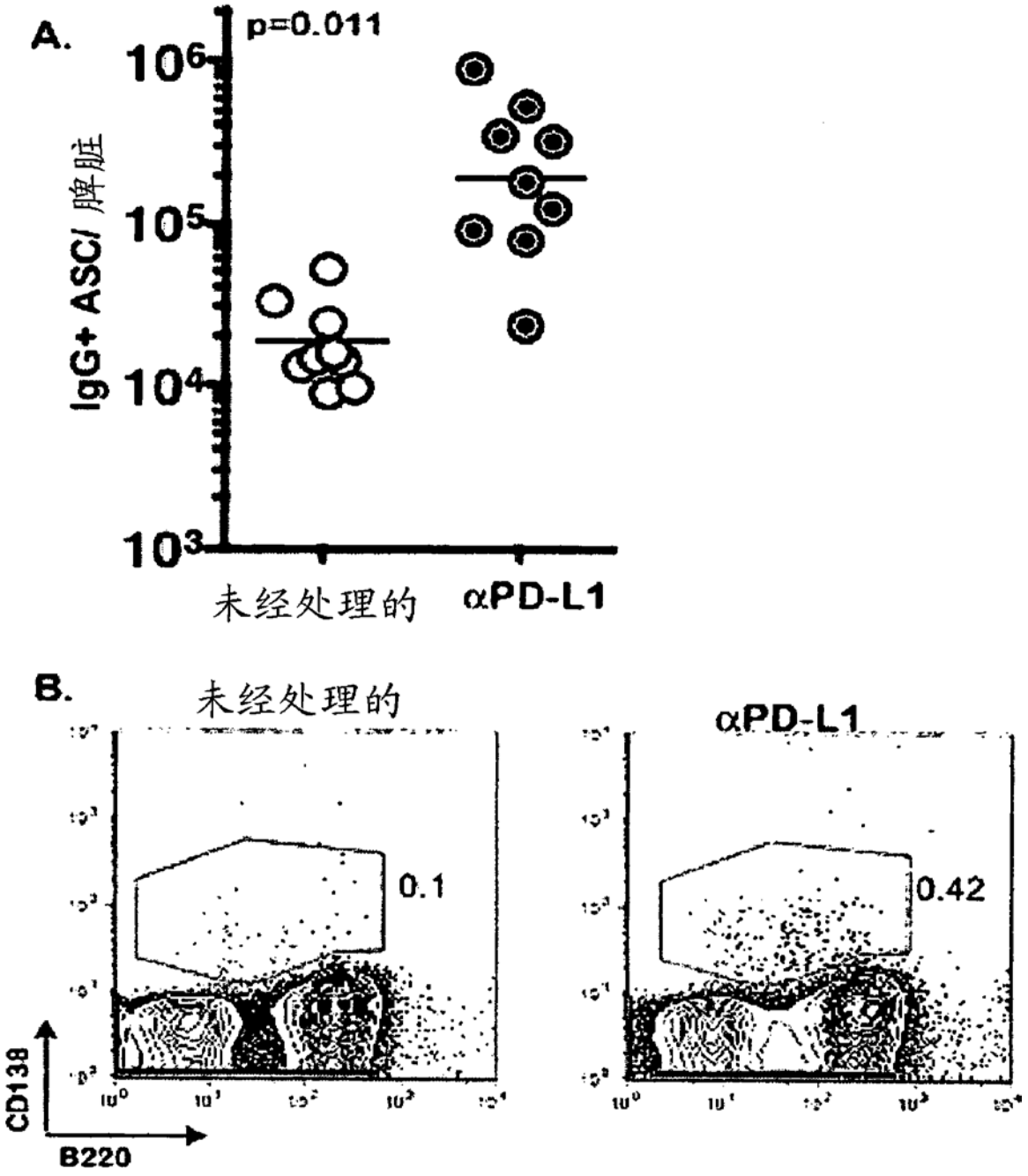

A.
p=0.011
IgG+ ASC/ 脾脏
10^6
10^5
10^4
10^3
未经处理的
αPD-L1
B.
未经处理的
αPD-L1
0.1
0.42
CD138
B220

图16

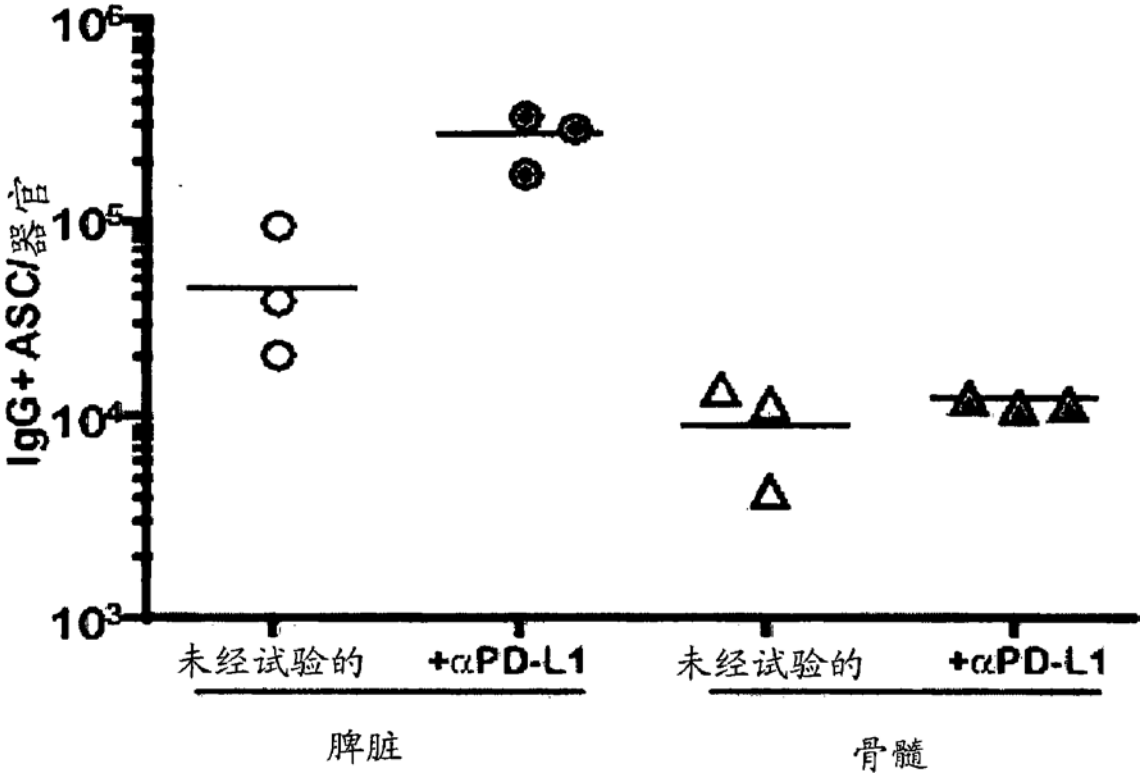

IgG+ ASC/器官
10^6
10^5
10^4
10^3
未经试验的
+αPD-L1
未经试验的
+αPD-L1
脾脏
骨髓

图17

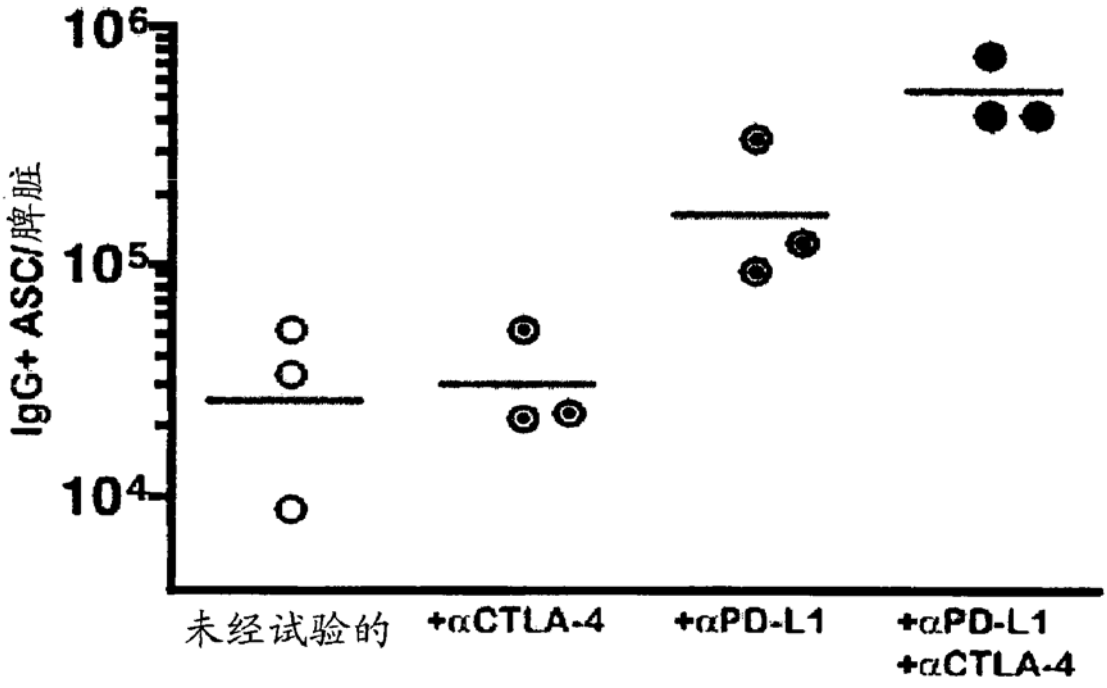

IgG+ ASC/脾脏
10^6
10^5
10^4
未经试验的
+αCTLA-4
+αPD-L1
+αPD-L1
+αCTLA-4

图18

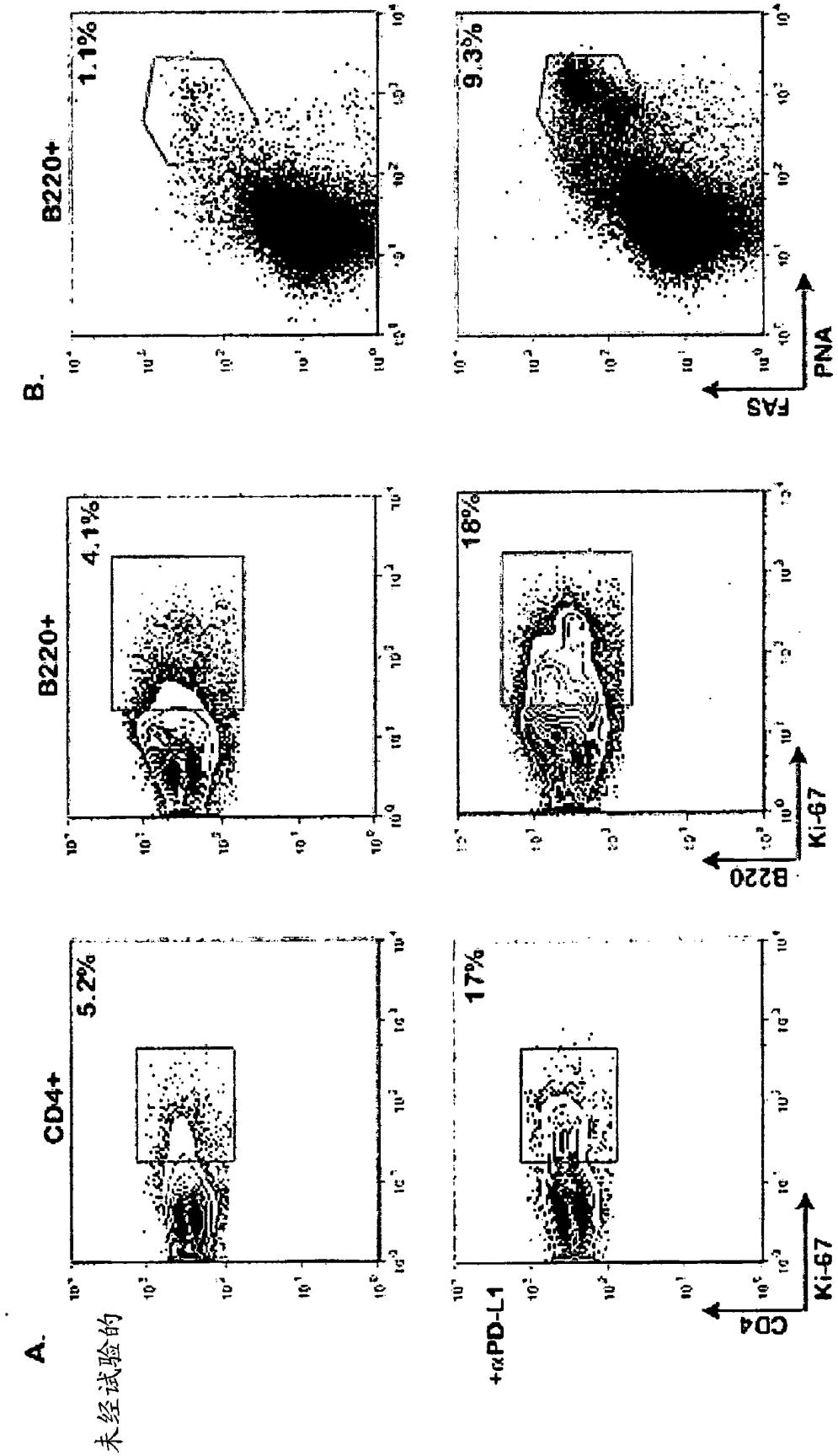

A.
未经试验的
CD4+
5.2%
+αPD-L1
17%
CD4
Ki-67
B220+
4.1%
18%
B220
Ki-67
B.
B220+
1.1%
9.3%
FAS
PNA

图19

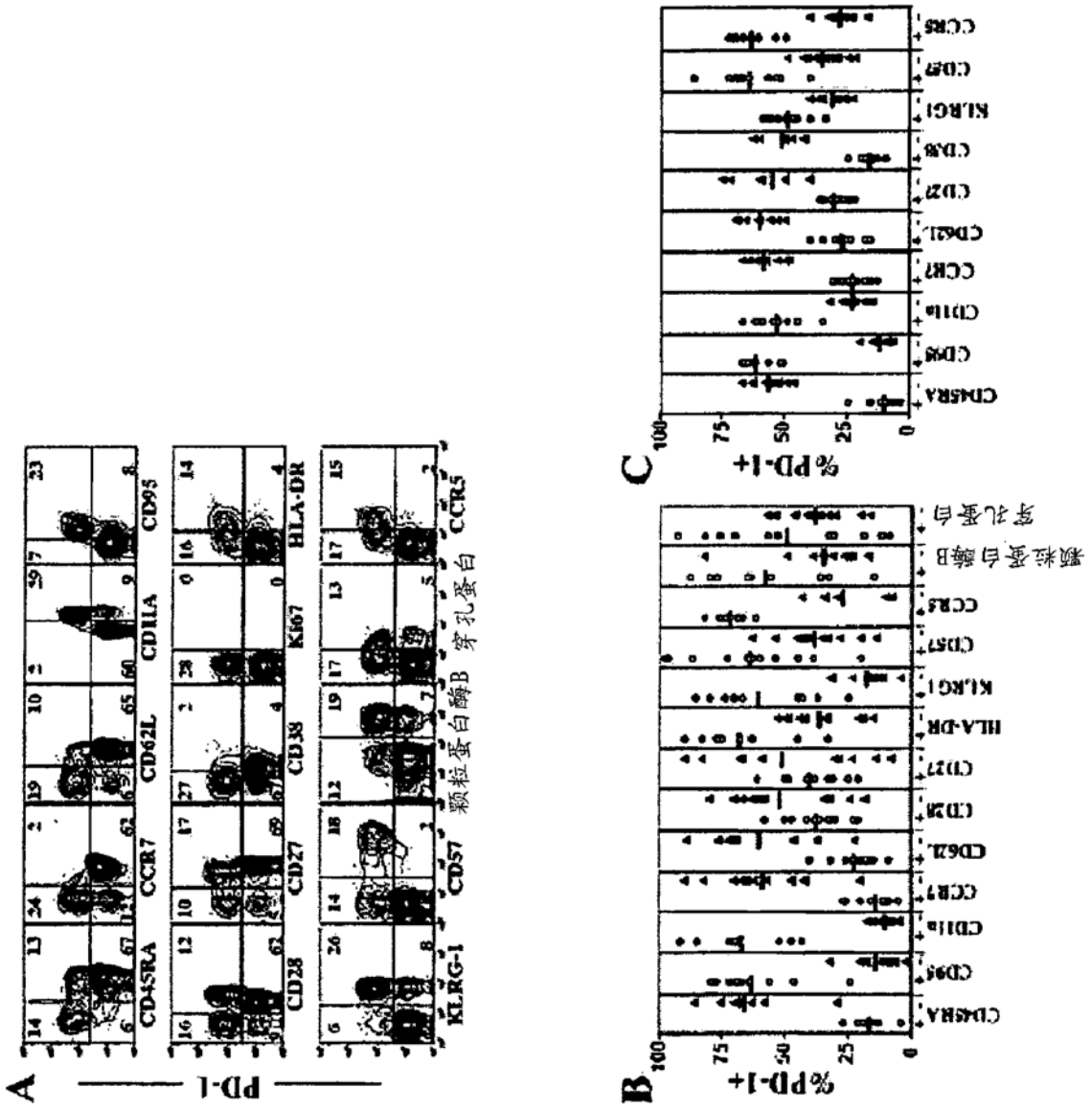

A
PD-1
CD45RA
CCR7
CD62L
CD11A
CD95
CD28
CD27
CD38
Ki67
HLA-DR
KLRG-1
CD57
颗粒蛋白酶B
穿孔蛋白
CCR5
B
%PD-1+
C
%PD-1+
CD45RA
CD95
CD11a
CCR7
CD62L
CD28
CD27
HLA-DR
KLRG1
CD57
CCR5
颗粒蛋白酶B
穿孔蛋白

图20

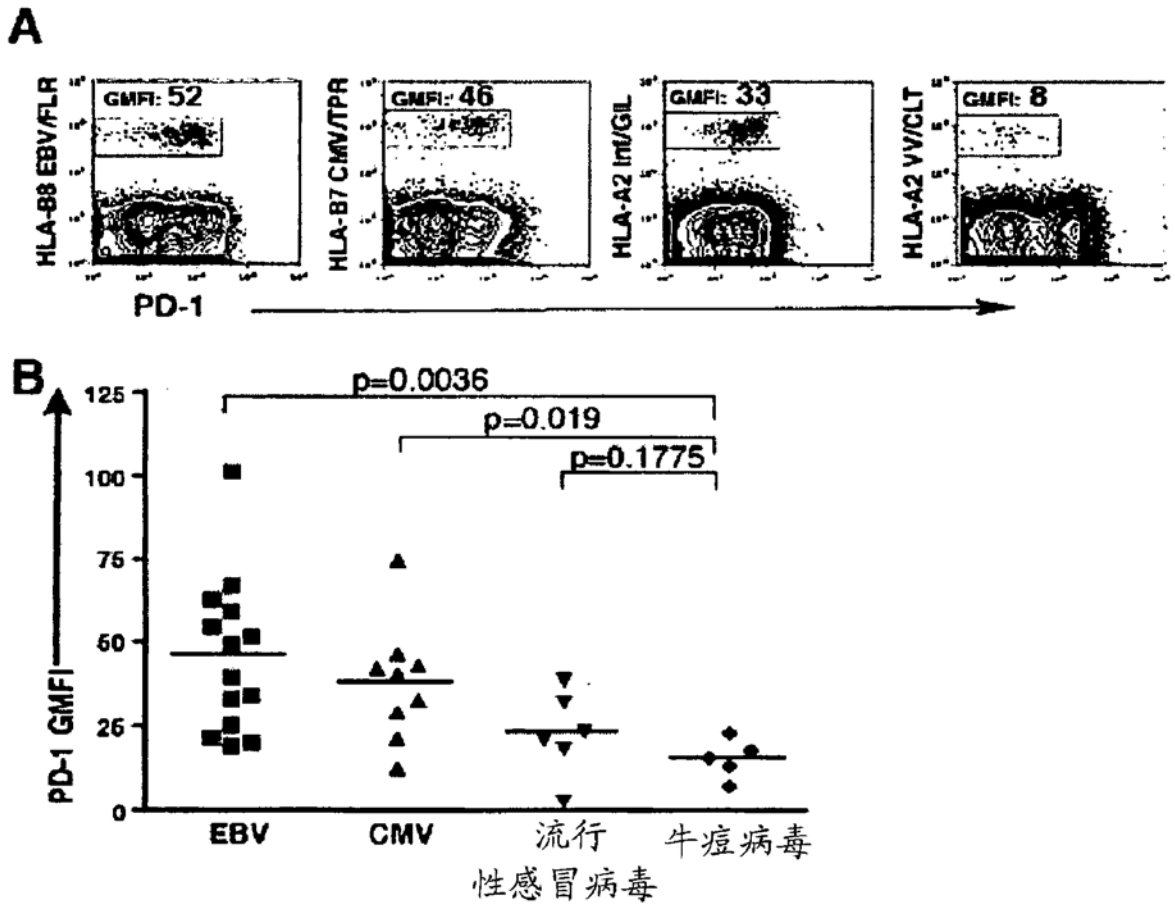

A
HLA-B8 EBV/FLR
GMFI: 52
HLA-B7 CMV/TPR
GMFI: 46
HLA-A2 Inf/GIL
GMFI: 33
HLA-A2 VV/CLT
GMFI: 8
PD-1
B
p=0.0036
p=0.019
p=0.1775
PD-1 GMFI
125
100
75
50
25
0
EBV
CMV
流行性感冒病毒
牛痘病毒

图21

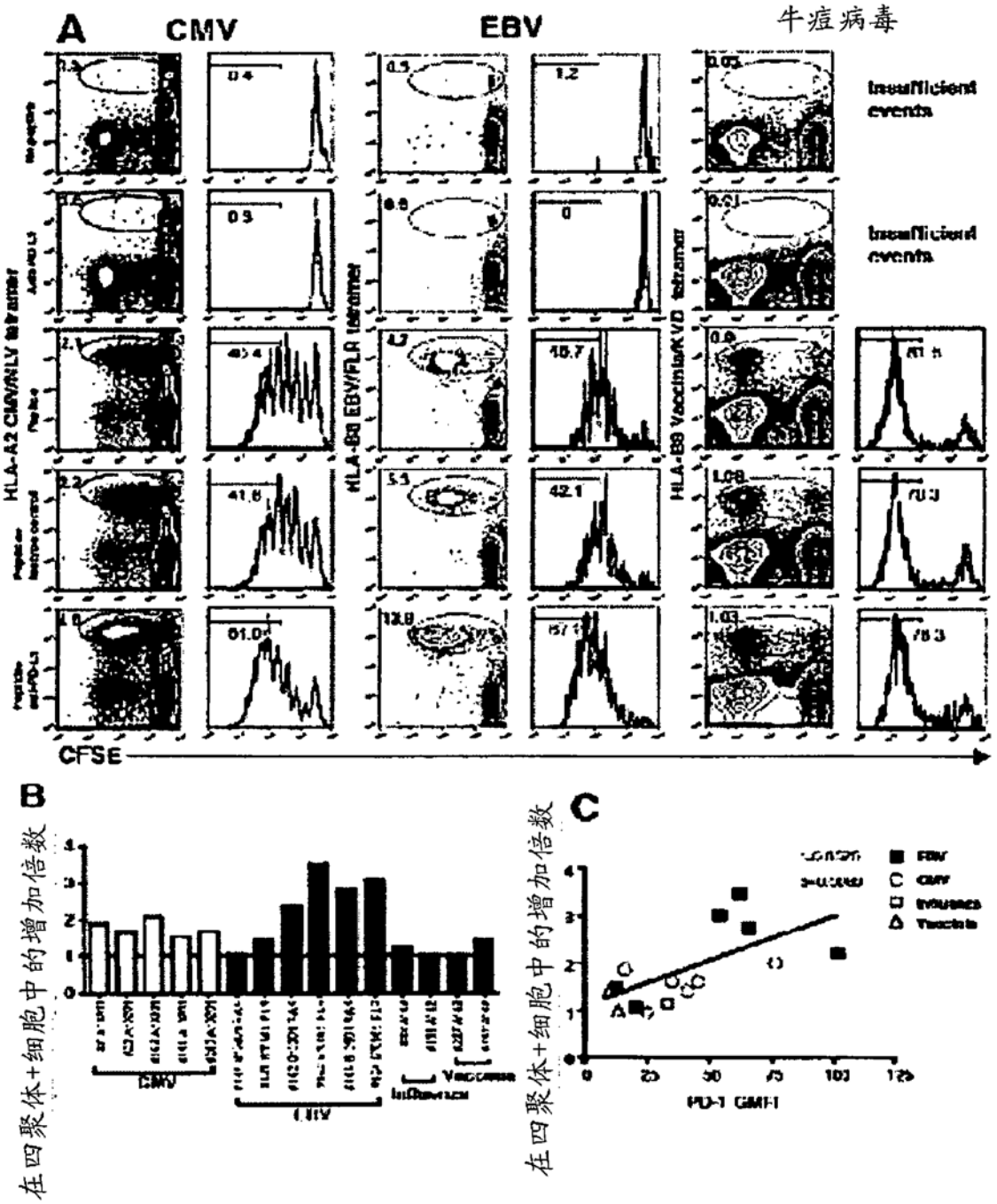

A
CMV
EBV
牛痘病毒
Insufficient events
Insufficient events
CFSE
B
在四聚体+细胞中的增加倍数
CMV
EBV
Influenza
Vaccinia
C
在四聚体+细胞中的增加倍数
PD-1 GMFI

图22

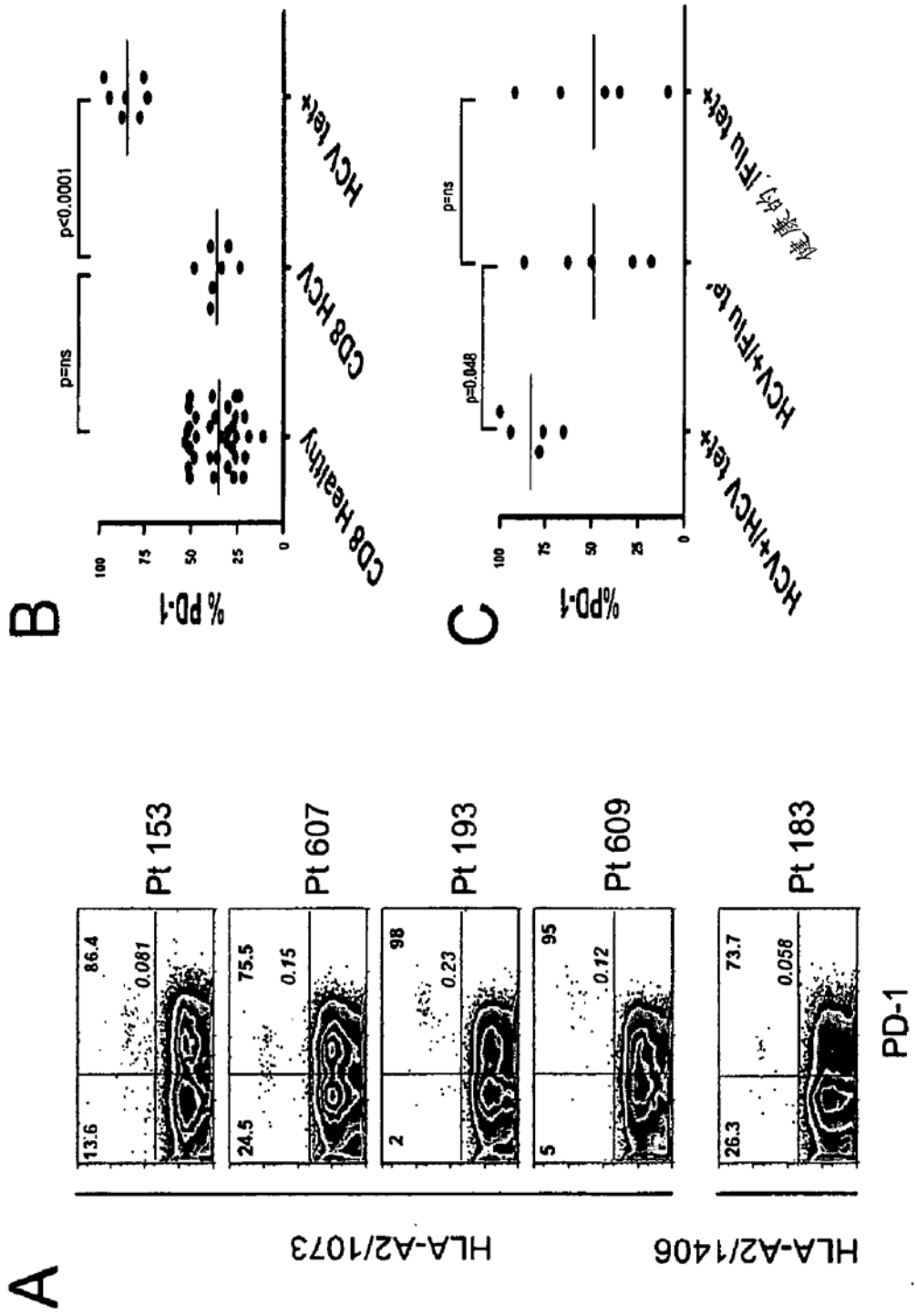

A
HLA-A2/1406
HLA-A2/1073
Pt 153
Pt 607
Pt 193
Pt 609
Pt 183
13.6
86.4
0.081
24.5
75.5
0.15
2
98
0.23
5
95
0.12
26.3
73.7
0.058
PD-1
B
% PD-1
p<0.0001
p=ns
CD8 Healthy
CD8 HCV
HCV tet+
C
%PD-1
p=0.048
p=ns
HCV+/HCV tet+
HCV+/Flu tet+
健康的/Flu tet+

图23

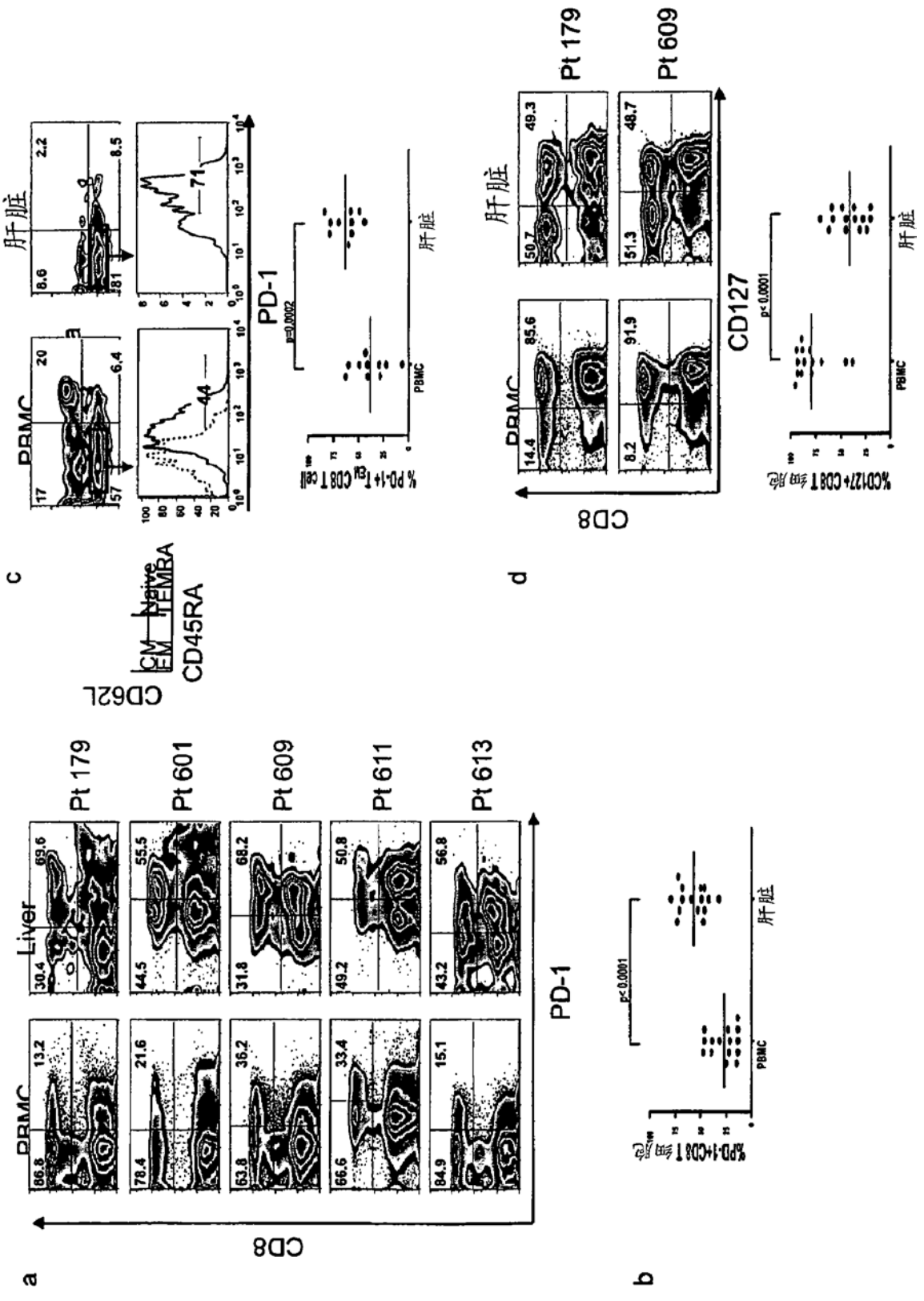

a
Liver
PBMC
Pt 179
Pt 601
Pt 609
Pt 611
Pt 613
CD8
PD-1
b
肝脏
PBMC
p< 0.0001
c
肝脏
PBMC
CD62L
CD45RA
CM
EM
naive
TEMRA
PD-1
p=0.0002
d
肝脏
PBMC
Pt 179
Pt 609
CD8
CD127
p< 0.0001

图24

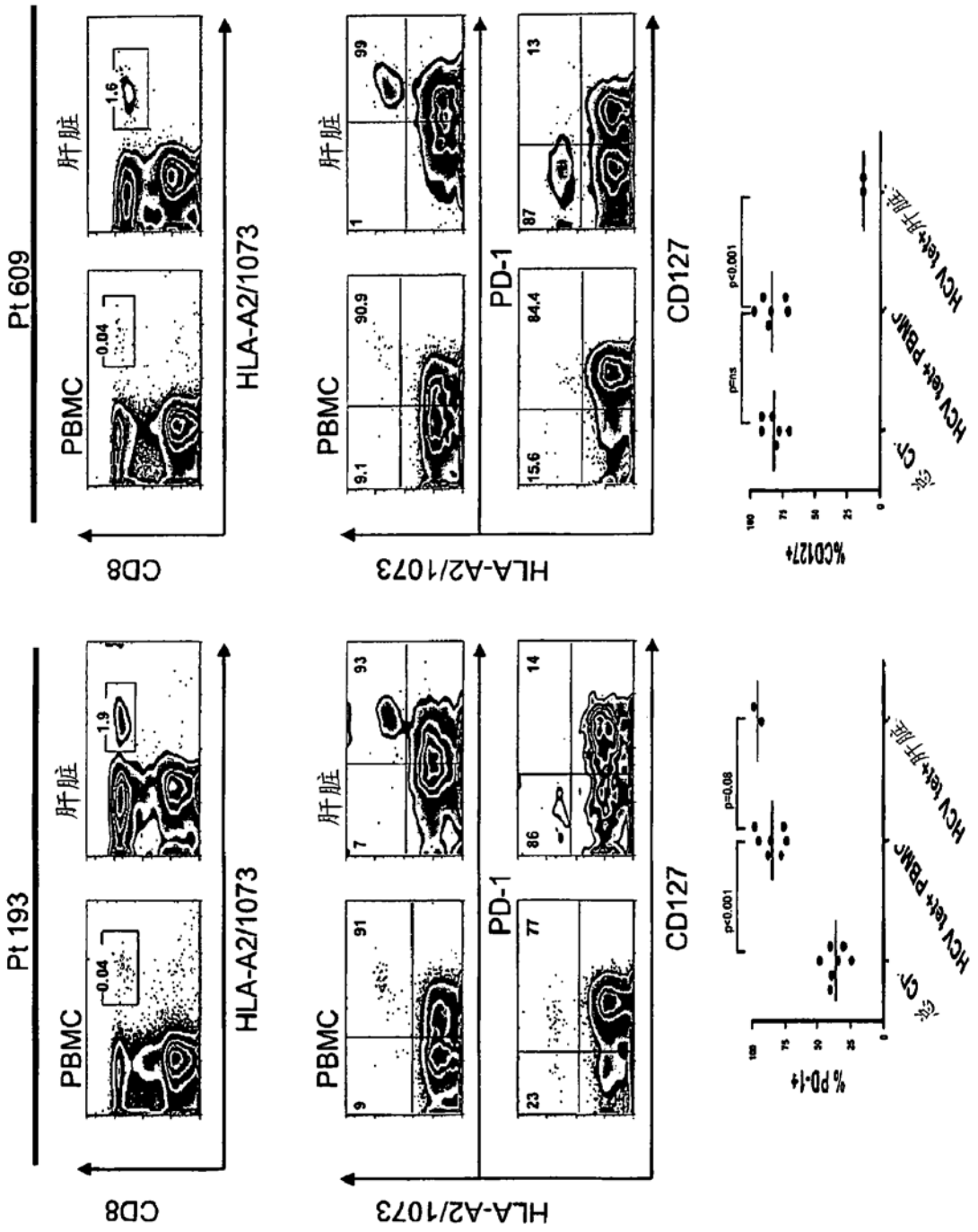

Pt 609
PBMC
肝脏
CD8
HLA-A2/1073
0.04
1.6
HLA-A2/1073
PD-1
CD127
9.1
90.9
15.6
84.4
1
99
87
13
%CD127+
p=ns
p<0.001
CV
HCV left+ PBMC
HCV left+肝脏
Pt 193
1.9
7
93
86
14
9
91
23
77
% PD-1+
p<0.001
p=0.08

图25

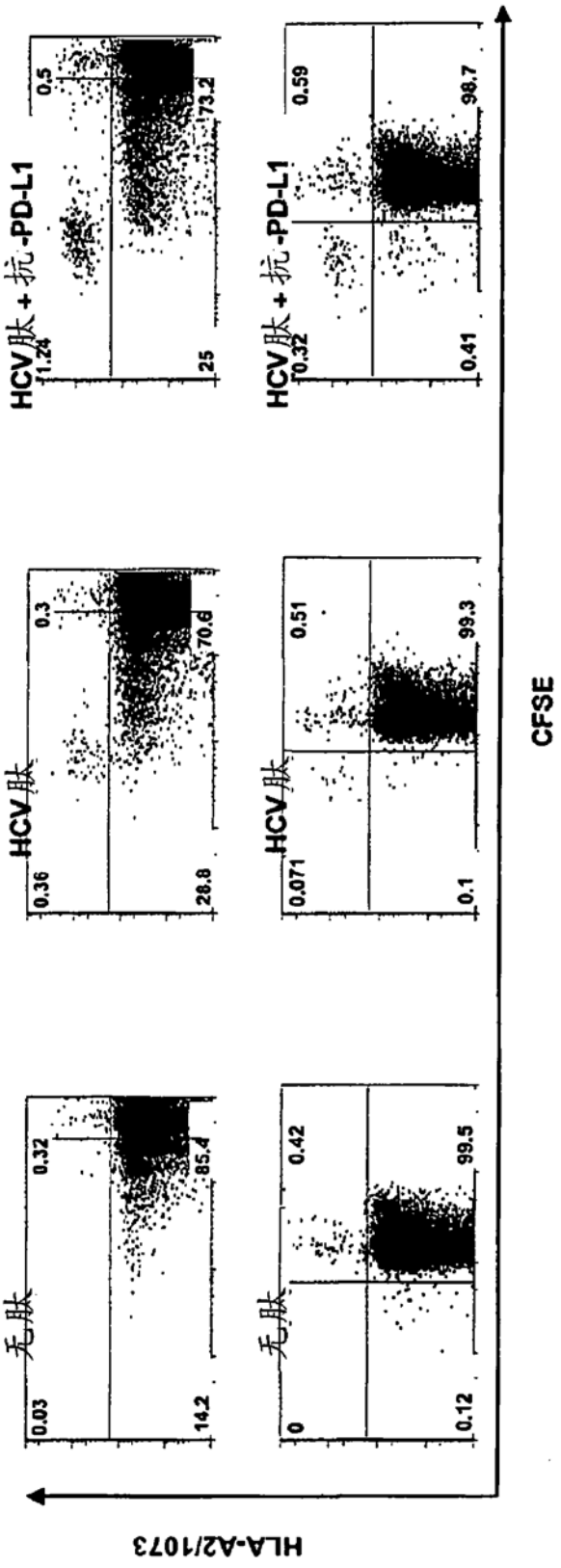

HCV肽 + 抗-PD-L1
HCV肽
无肽
0.5
73.2
1.24
25
0.59
98.7
0.32
0.41
0.3
70.6
0.36
28.8
0.51
99.3
0.071
0.1
0.32
85.4
0.03
14.2
0.42
99.5
0
0.12
CFSE
HLA-A2/1073

图26

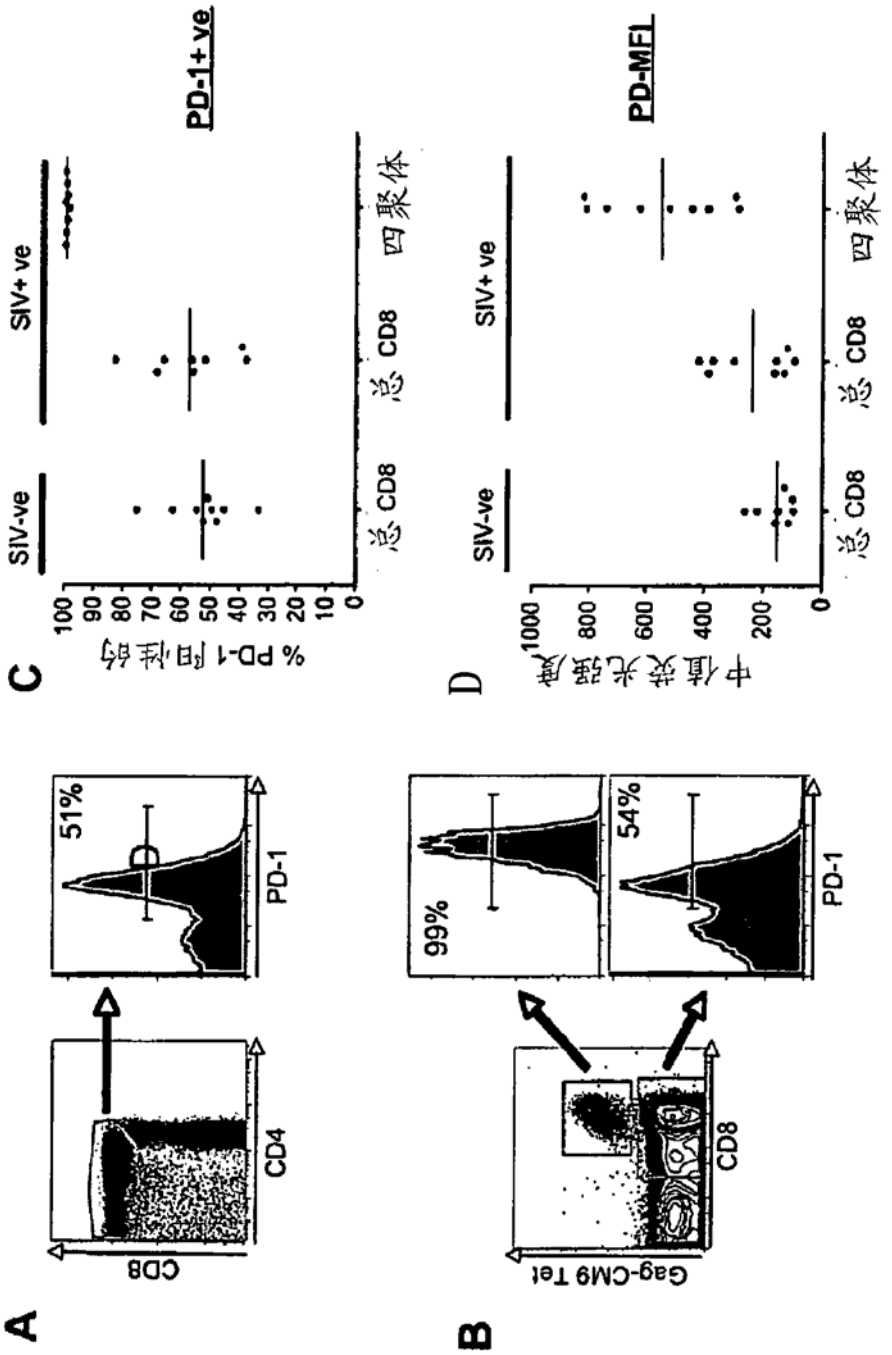

A
CD8
CD4
51%
PD-1
B
Gag-CM9 Tet
CD8
99%
54%
PD-1
C
SIV-ve
SIV+ ve
PD-1+ ve
% PD-1 阳性的
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
总 CD8
总 CD8
四聚体
D
SIV-ve
SIV+ ve
PD-MFI
中值荧光强度
1000
800
600
400
200
0
总 CD8
总 CD8
四聚体

图27

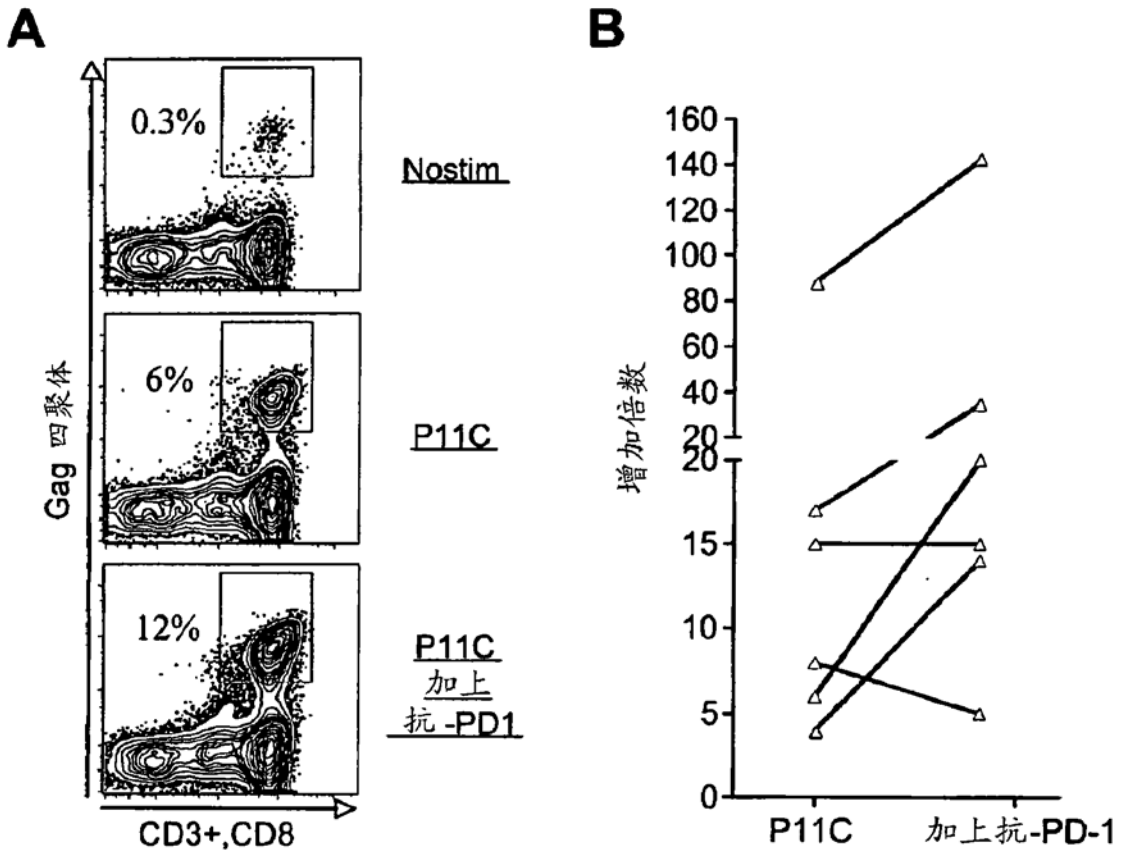

A
0.3%
Nostim
6%
P11C
12%
P11C
加上
抗-PD1
Gag 四聚体
CD3+,CD8
B
增加倍数
160
140
120
100
80
60
40
20
20
15
10
5
0
P11C
加上抗-PD-1

图28

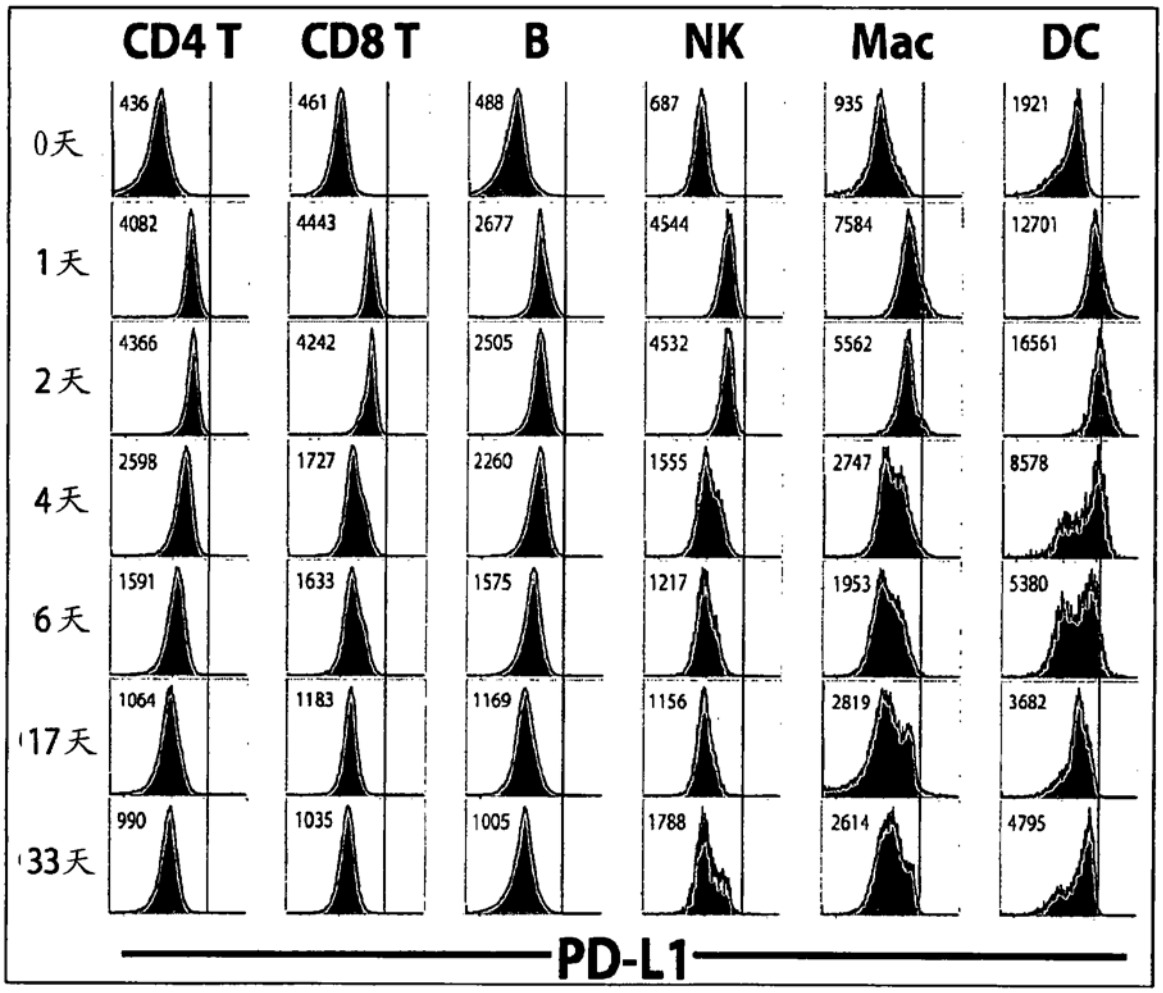

CD4 T
CD8 T
B
NK
Mac
DC
0天
1天
2天
4天
6天
17天
33天
436
461
488
687
935
1921
4082
4443
2677
4544
7584
12701
4366
4242
2505
4532
5562
16561
2598
1727
2260
1555
2747
8578
1591
1633
1575
1217
1953
5380
1064
1183
1169
1156
2819
3682
990
1035
1005
1788
2614
4795
PD-L1

图29

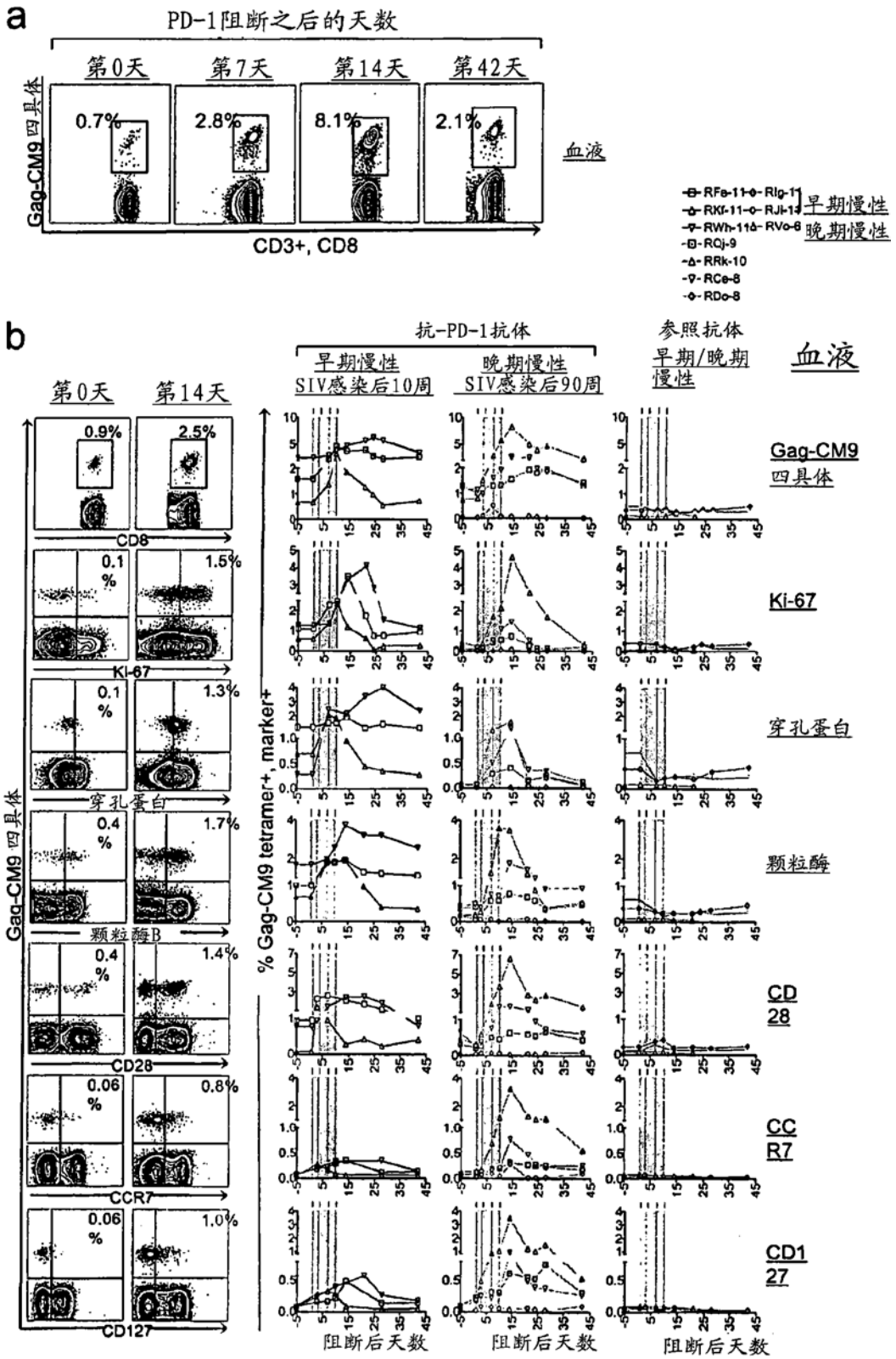

a
PD-1阻断之后的天数
第0天
第7天
第14天
第42天
0.7%
2.8%
8.1%
2.1%
Gag-CM9 四具体
CD3+, CD8
血液
RFe-11 RIg-11
RKf-11 RJi-11
RWh-11 RVo-8
RCj-9
RRk-10
RCe-8
RDo-8
早期慢性
晚期慢性
b
抗-PD-1抗体
参照抗体
早期慢性
SIV感染后10周
晚期慢性
SIV感染后90周
早期/晚期慢性
血液
第0天
第14天
0.9%
2.5%
CD8
0.1 %
1.5%
Ki-67
0.1 %
1.3%
穿孔蛋白
0.4 %
1.7%
颗粒酶B
0.4 %
1.4%
CD28
0.06 %
0.8%
CCR7
0.06 %
1.0%
CD127
Gag-CM9 四具体
% Gag-CM9 tetramer+, marker+
Gag-CM9 四具体
Ki-67
穿孔蛋白
颗粒酶
CD 28
CC R7
CD1 27
阻断后天数
阻断后天数
阻断后天数

图30

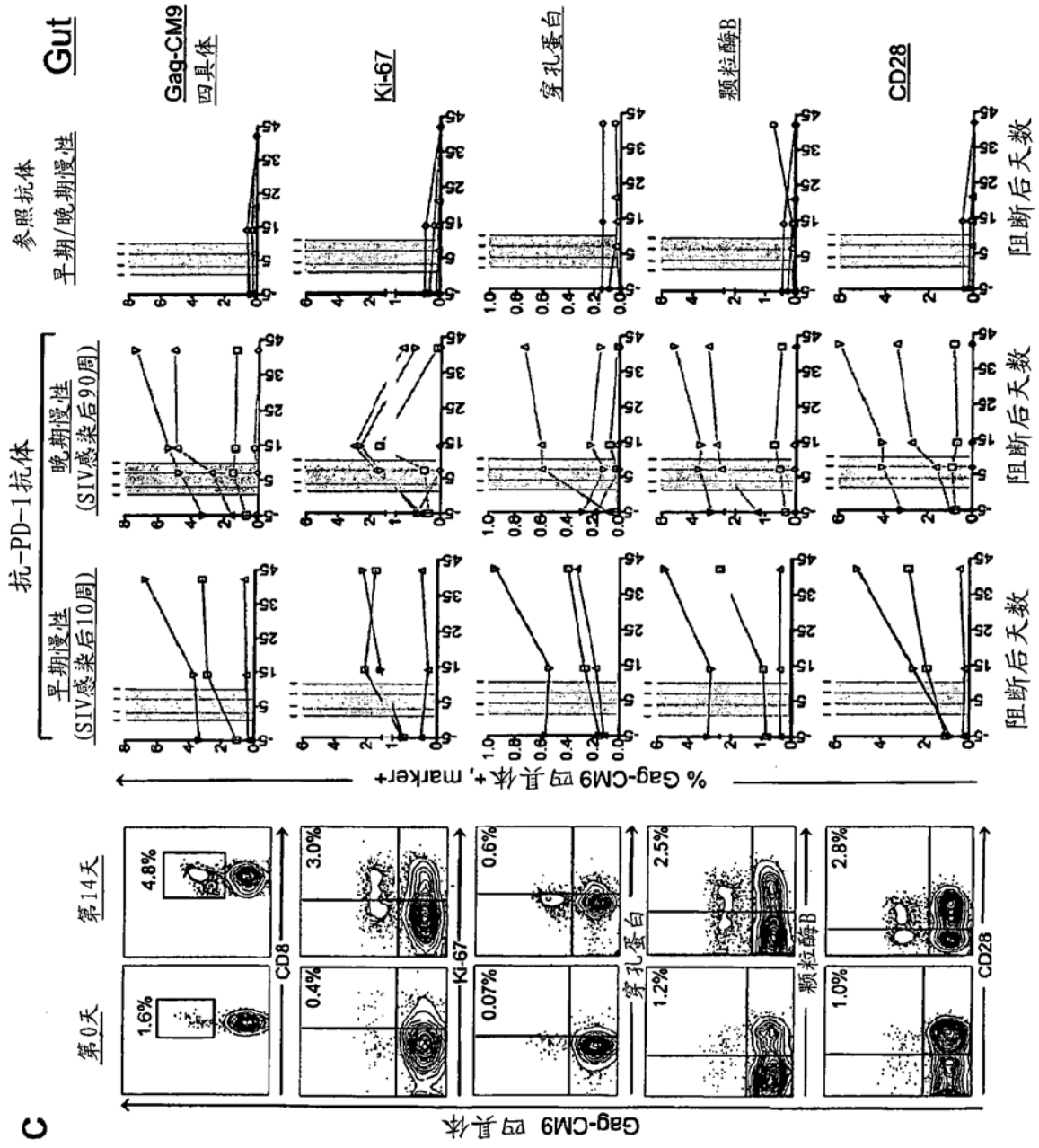

Gut
参照抗体
早期/晚期慢性
Gag-CM9
四聚体
Ki-67
穿孔蛋白
颗粒酶B
CD28
阻断后天数
抗-PD-1抗体
晚期慢性
(SIV感染后90周)
早期慢性
(SIV感染后10周)
% Gag-CM9 四聚体+, marker+
C
第0天
第14天
1.6%
4.8%
0.4%
3.0%
0.07%
0.6%
1.2%
2.5%
1.0%
2.8%
CD8
Ki-67
穿孔蛋白
颗粒酶B
CD28
Gag-CM9 四聚体

图30(继续)

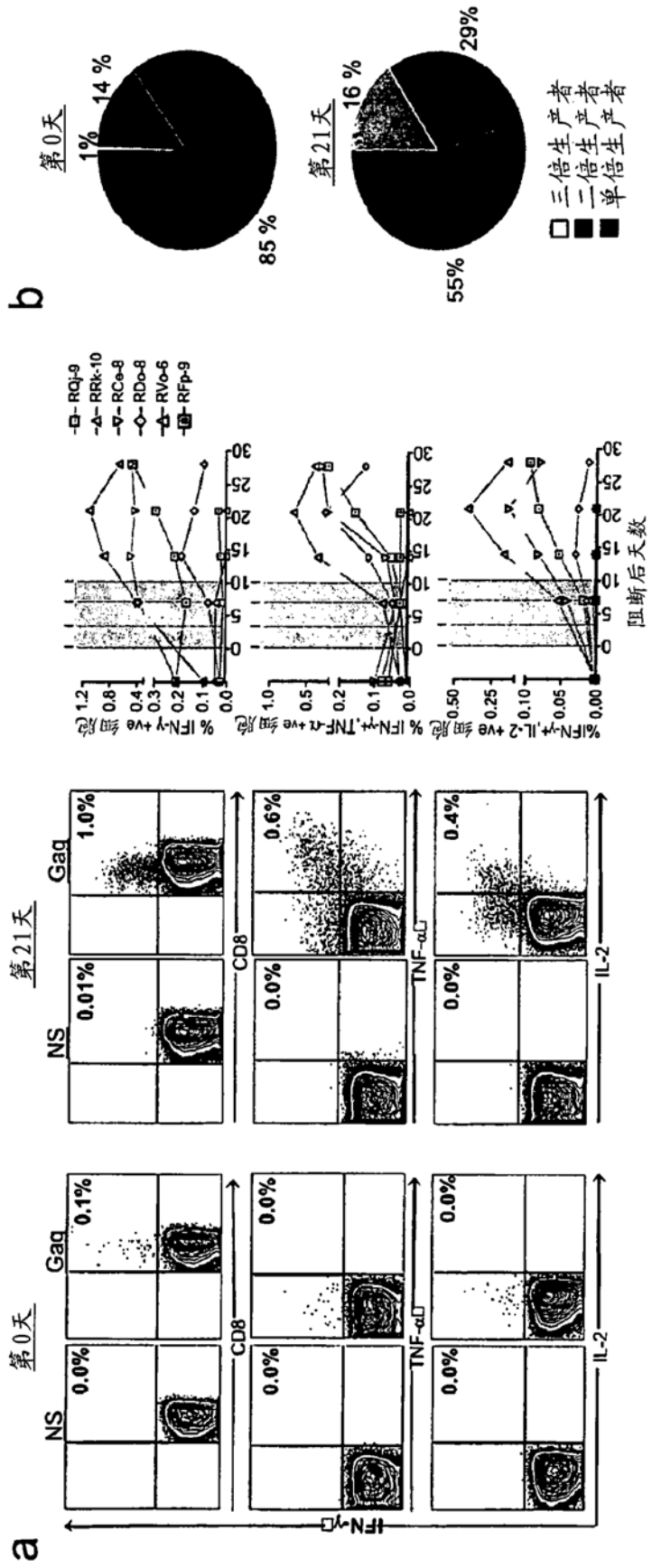

a
第0天
第21天
NS
Gag
0.0%
0.1%
0.01%
1.0%
0.6%
0.4%
IFN-γ
CD8
TNF-α
IL-2
b
第0天
第21天
1%
14 %
85 %
16 %
29%
55%
三倍生产者
二倍生产者
单倍生产者
RQj-9
RRk-10
RCe-8
RDo-8
RVo-6
RFp-9
% IFN-γ +ve 细胞
% IFN-γ+,TNF-α +ve 细胞
%IFN-γ+,IL-2 +VE 细胞
阻断后天数

图31

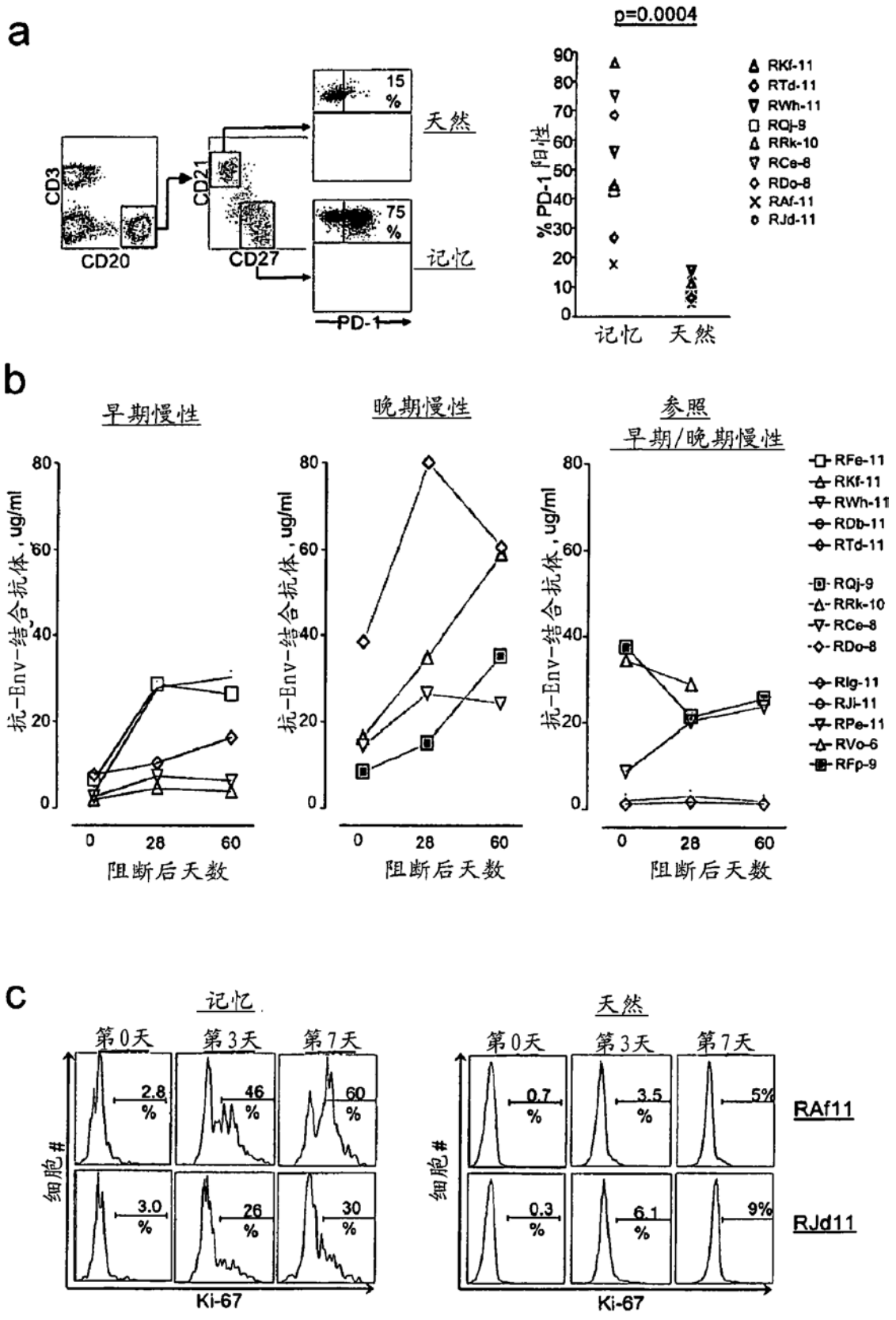

a
p=0.0004
CD3
CD20
CD21
CD27
PD-1
15 %
75 %
天然
记忆
% PD-1 阳性
记忆 天然
RKf-11
RTd-11
RWh-11
RQj-9
RRk-10
RCe-8
RDo-8
RAf-11
RJd-11
b
早期慢性
晚期慢性
参照
早期/晚期慢性
抗-Env-结合抗体, ug/ml
阻断后天数
RFe-11
RKf-11
RWh-11
RDb-11
RTd-11
RQj-9
RRk-10
RCe-8
RDo-8
RIg-11
RJi-11
RPe-11
RVo-6
RFp-9
c
记忆
天然
第0天
第3天
第7天
细胞 #
Ki-67
2.8 %
46 %
60 %
3.0 %
26 %
30 %
0.7 %
3.5 %
5%
0.3 %
6.1 %
9%
RAf11
RJd11

图32

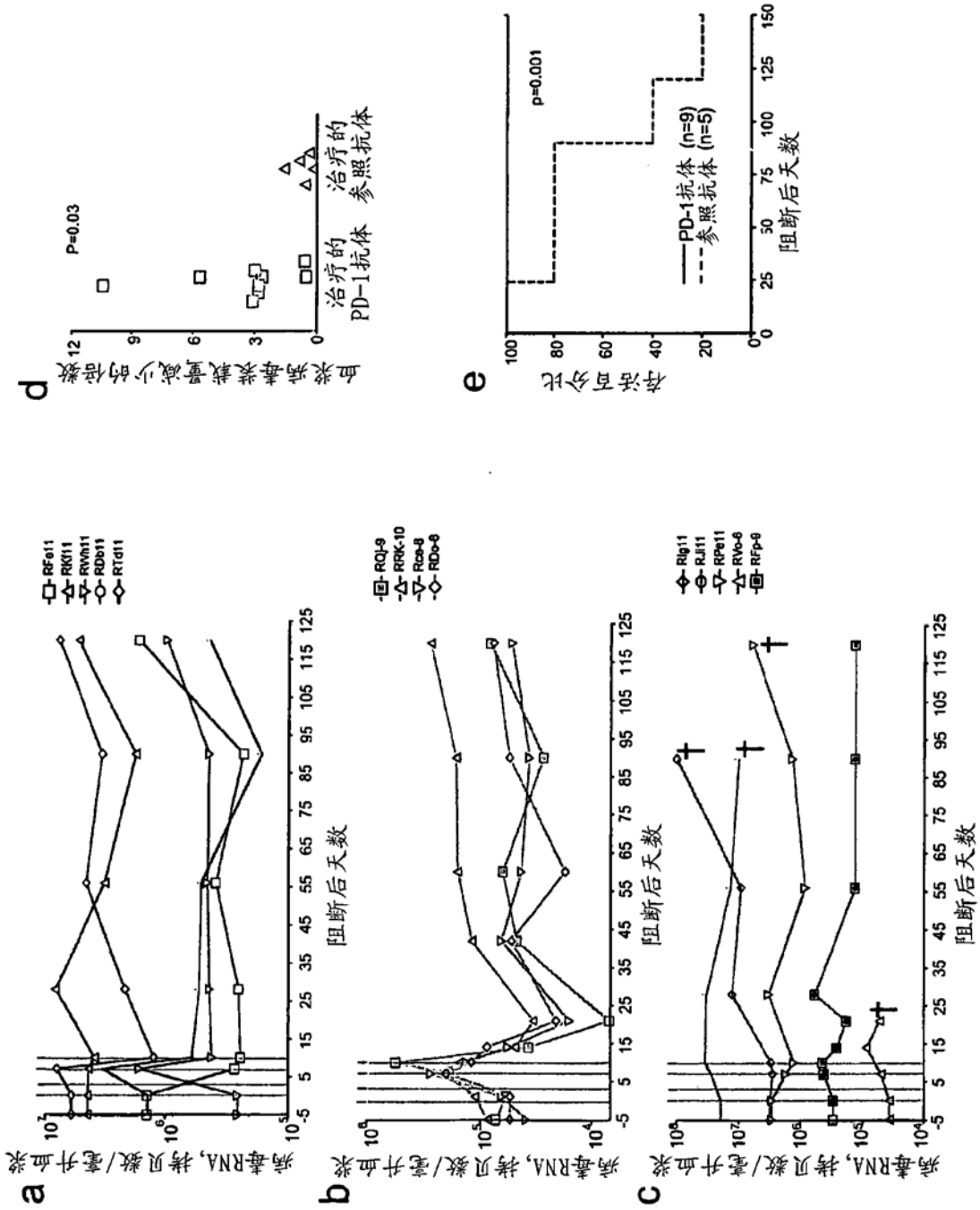


图33