(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 104436190 A
(43)申请公布日 2015.03.25

(21)申请号 201410597059.3
(22)申请日 2006.06.08
(30)优先权数据
60/688,872 2005.06.08 US
(62)分案原申请数据
200680027007.6 2006.06.08
(71)申请人 达纳-法伯癌症研究院公司
地址 美国马萨诸塞州
申请人 布赖汉姆妇女医院 埃默里大学 哈佛学院董事会
(72)发明人 高丹·弗里曼 阿琳·沙佩 大卫·M·多夫曼 拉菲·阿梅德 丹尼尔·巴伯 E·约翰·维尔瑞
(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.
A61K 39/395(2006.01)
A61K 48/00(2006.01)
A61K 38/17(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
G01N 33/574(2006.01)
G01N 33/68(2006.01)

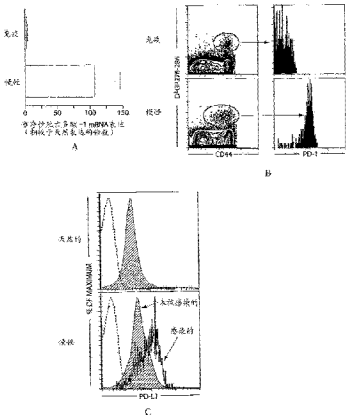
权利要求书2页 说明书37页
序列表3页 附图24页

(54)发明名称

通过抑制程序性细胞死亡1(PD-1)途经治疗持续性感染和癌症的方法及组合物

(57)摘要

本发明提供一种用于治疗、预防、或者缓解持续性感染的方法及组合物，例如慢性感染，潜伏性感染，以及慢感染和肿瘤。本发明的方法及组合物对于缓解与上述感染及肿瘤相关的一种或者多种症状同样是有效的。



CN 104436190 A

1. 一种化合物在制备用于缓解或者预防肿瘤症状的药物组合物中的应用，所述化合物能够降低宿主中程序性细胞死亡 -1(PD-1) 多肽的活性或者表达，其中

(1) 所述肿瘤是淋巴增殖性肿瘤；并且

(2) 所述化合物抗程序性死亡多肽 -1 抗体，抗程序性死亡多肽 -1 配体抗体，抗程序性死亡多肽 -1 配体 2 抗体，抗程序性死亡多肽 -1RNAi，抗程序性死亡多肽 -1 配体 RNAi，抗程序性死亡多肽 -1 配体 2RNAi，抗程序性死亡多肽 -1 反义 RNA，抗程序性死亡多肽 -1 配体反义 RNA，抗程序性死亡多肽 -1 配体 2 反义 RNA，显性负性程序性死亡多肽 -1 蛋白，显性负性程序性死亡多肽 -1 配体蛋白，或者显性负性程序性死亡多肽 -1 配体 2 蛋白。

2. 根据权利要求 1 的应用，其中所述的抗体是单克隆抗体，人源化抗体，去免疫化抗体，或者 Ig 融合蛋白。

3. 根据权利要求 1 的应用，其中所述药物组合物进一步包括一种第二种化合物。

4. 根据权利要求 1 的应用，其中所述的第二种化合物选自抗炎症化合物、抗肿瘤化合物或者止痛剂。

5. 根据权利要求 4 的应用，其中所述的第二种化合物降低细胞毒性 T 淋巴细胞抗原 -4(CTLA-4) 或者 B、T 淋巴细胞衰减因子 (BTLA) 的表达或者活性。

6. 根据权利要求 4 的应用，其中所述的第二种化合物降低肿瘤细胞的量。

7. 根据权利要求 4 的应用，其中所述的第二种化合物是抗细胞毒性 T 淋巴细胞抗原 -4 抗体，抗 B、T 淋巴细胞衰减因子抗体，抗 CD28 抗体，抗可诱导共刺激分子抗体，抗可诱导共刺激分子配体抗体，抗 B7-1 抗体，抗 B7-2 抗体，抗 B7-H3 抗体，或者抗 B7-H4 抗体。

8. 根据权利要求 1 的应用，其中所述淋巴增殖性肿瘤是血管淋巴瘤或者结节性淋巴细胞为主型的霍奇金淋巴瘤。

9. 根据权利要求 1 的应用，其中所述的降低程序性细胞死亡 -1(PD-1) 表达或者活性的化合物是一种抗程序性死亡多肽 -1 配体抗体，该抗程序性死亡多肽 -1 配体抗体可降低程序性细胞死亡 -1(PD-1) 的活性。

10. 根据权利要求 1 的应用，所述的降低程序性细胞死亡 -1(PD-1) 表达或者活性的化合物使免疫无能型 T 细胞的细胞毒性 T 细胞活性增加。

11. 根据权利要求 10 的应用，其中所述的细胞毒性 T 细胞活性是细胞因子的生成或者 T 细胞的扩增。

12. 一种化合物在制备用于使患有淋巴增殖性肿瘤的宿主的 T 细胞的扩增增加的药物中的应用，其中所述化合物抗程序性死亡多肽 -1 抗体，抗程序性死亡多肽 -1 配体抗体，抗程序性死亡多肽 -1 配体 2 抗体，抗程序性死亡多肽 -1RNAi，抗程序性死亡多肽 -1 配体 RNAi，抗程序性死亡多肽 -1 配体 2RNAi，抗程序性死亡多肽 -1 反义 RNA，抗程序性死亡多肽 -1 配体反义 RNA，抗程序性死亡多肽 -1 配体 2 反义 RNA，显性负性程序性死亡多肽 -1 蛋白，显性负性程序性死亡多肽 -1 配体蛋白，或者显性负性程序性死亡多肽 -1 配体 2 蛋白。

13. 根据权利要求 12 的应用，其中所述的 T 细胞已与抗程序性死亡多肽 -1 抗体，抗程序性死亡多肽 -1 配体 2 抗体，抗细胞毒性 T 淋巴细胞抗原 -4 抗体，抗 B、T 淋巴细胞衰减因子抗体，抗 CD28 抗体，抗可诱导共刺激分子抗体，抗可诱导共刺激分子配体抗体，抗 B7-1 抗体，抗 B7-2 抗体，抗 B7-H3 抗体，或者抗 B7-H4 抗体进行接触。

14. 根据权利要求 12 的应用，其中所述的淋巴增殖性肿瘤是血管淋巴瘤或者结节性淋

巴细胞为主型的霍奇金淋巴瘤。

15. 根据权利要求 12 的应用，其中所述的化合物是一种抗程序性死亡多肽 -1 配体抗体。

16. 根据权利要求 15 的应用，所述的抗程序性死亡多肽 -1 配体抗体是单克隆抗体，人源化抗体，去免疫化抗体，或者 Ig 融合蛋白。

17. 一种体外针对血管淋巴瘤或者结节性淋巴细胞为主型的霍奇金淋巴瘤进行样品分析的方法，包括 :(a) 提供一种样品，该样品包括免疫细胞 ;以及 (b) 测量该宿主样品中的程序性死亡多肽 -1 的表达或者活性，与阴性对照样品中的表达或者活性相比，程序性死亡多肽 -1 的表达或者活性的增加则表明该样品载有血管淋巴瘤或者结节性淋巴细胞为主型的霍奇金淋巴瘤。

18. 根据权利要求 17 的方法，其中所述的样品是血液样品，活体组织，或者骨髓样品。

19. 根据权利要求 17 的方法，其中所述的对照样品是一种来自于没有患有肿瘤的宿主的细胞。

通过抑制程序性细胞死亡 1(PD-1) 途经治疗持续性感染和癌症的方法及组合物

[0001] 本申请是 2006 年 6 月 8 日递交的申请号为 200680027007.6，发明名称为“通过抑制程序性细胞死亡 1(PD-1) 途经治疗持续性感染和癌症的方法及组合物”的分案申请。

[0002] 关于由联邦政府资助进行研究的声明

[0003] 本发明是利用 NIH(美国全国卫生研究所) 的 AI39671 和 CA84500 号拨款，在美国政府的资助下进行的。政府享有本发明的部分权利。

技术领域

[0004] 本发明大体上涉及治疗持续性感染和肿瘤的方法及组合物。

背景技术

[0005] 尽管预防性疫苗的出现已经显著的降低了病毒感染的死亡率，但使用这些疫苗对抗导致持续性感染的病毒 (例如，C 型肝炎病毒) 仅仅取得了有限的成功。与能够导致急性感染和自限性感染 (self-limited infections) 的病毒相比，针对引起持续性感染的微生物而进行的免疫应答通常是短暂的，并且不足以清除感染。因此，感染性微生物会在被感染的宿主体内保持一段长期的时间，不必然导致长期的宿主损伤。

[0006] 根除导致持续性感染的微生物的一个主要的障碍是这类微生物具备躲避宿主生物体的免疫系统的能力。例如，某些病毒和寄生虫下调宿主分子的表达，这些宿主分子的表达对于 T 细胞有效识别被感染细胞来说是必要的。持续性感染还导致抗原特异性 CD8+T 细胞的功能性损伤，这对于控制和根除病毒感染来说是至关重要的。尽管使用加入细胞因子佐剂的疫苗是有用的，但由此引起的免疫应答并不能成功的根除病原体。

[0007] 因此，需要更好的方法来治疗、预防或者缓解持续性感染。

发明内容

[0008] 本发明提供了用于治疗、预防或者减轻、或者缓和持续性感染或者肿瘤的一种或者多种症状的方法及组合物。本发明基于下述发现 ：当使用程序性死亡多肽 (PD-1) 进行诱导之后，抗原特异性 CD8+T 细胞对感染性制剂产生功能性耐受 (“衰竭的”)。因此，通过减少程序性死亡多肽 -1(PD-1)、程序性死亡多肽 -1 配体 (PD-L1) 或者程序性死亡多肽 -1 配体 2(PD-L2) 的表达或者活性，使功能性耐受 CD8+T 细胞的扩增、细胞因子的产生、以及感染性制剂 (例如，病毒，细菌，真菌，寄生虫，支原体或者肿瘤) 的清除速率都增加了，因而针对感染性制剂的特异性免疫应答被加强了。

[0009] 因此，本发明提供一种缓解或者预防持续性感染 (例如，病毒感染，细菌感染，真菌感染，支原体感染以及寄生虫感染) 或者肿瘤的症状的方法，该方法通过向需要接受治疗的宿主施用一种能够降低 CD28 类家族成员 (例如，程序性死亡多肽 -1，细胞毒性 T 淋巴细胞抗原 -4(CTLA-4)，B、T 淋巴细胞衰减因子 (BTLA) 以及它们的功能性片段或者突变体) 或者 CD28 类家族配体成员 (例如，程序性死亡多肽 -1 配体，或者程序性死亡多肽 -1 配体

2) 的活性或者表达的化合物来完成。或者，向该宿主施用一种抗原特异性 T 细胞或者抗原特异性 B 细胞，所述细胞与一种可以减少细胞中的程序性死亡多肽 -1 的表达或者活性的化合物相接触。例如，上述抗原特异性 T 细胞或者 B 细胞特异于一种病毒抗原。所述 T 细胞或者 B 细胞可以来自于宿主本身，也可以来自于与被治疗的宿主属于相同种类或者不同种类的其他宿主。

[0010] 除此之外，本发明描述了一种增加 T 细胞（例如，免疫无能型 T 细胞或者对抗原具有增强的耐受性的 T 细胞）的细胞毒素活性的方法，该方法通过将所述 T 细胞与能够减少程序性死亡多肽 -1 的活性或者表达的化合物相接触来完成。

[0011] 在本发明的上述所有方面中，持续性病毒感染来自于下述病毒的感染，例如肝炎病毒，人类免疫缺陷型病毒 (HIV)，人类 T 淋巴细胞白血病病毒 (HTLV)，疱疹病毒，Epstein-Barr 病毒，或者人乳头瘤病毒。持续性病毒感染还可以包括由潜伏性病毒引起的感染。肿瘤包括淋巴增殖性疾病例如血管淋巴瘤以及结节性淋巴细胞为主型的霍奇金淋巴瘤。期望的是，本发明的化合物通过增加被治疗宿主体内的细胞毒性 T 细胞活性（例如，加强细胞毒性细胞因子例如干扰素 γ (IFNγ)、肿瘤坏死因子 α (TNFα)、或者白细胞介素 -2(IL-2) 的产生，增强 T 细胞的扩增，或者增强病毒的清除）来增强抗原特异性免疫应答。例如，该化合物减少程序性死亡多肽 -1 配体 (PD-L1) 或者程序性死亡多肽 -1 配体 2(PD-L2) 的表达或者活性，或者减少程序性死亡多肽 -1(PD-1) 与程序性死亡多肽 -1 配体 (PD-L1) 间的相互作用，或者减少程序性死亡多肽 -1(PD-1) 与程序性死亡多肽 -1 配体 2(PD-L2) 间的相互作用。范例性的化合物包括抗体（例如，抗程序性死亡多肽 -1 抗体，抗程序性死亡多肽 -1 配体抗体，以及抗程序性死亡多肽 -1 配体 2 抗体），RNAi 分子（例如，抗程序性死亡多肽 -1RNAi 分子，抗程序性死亡多肽 -1 配体 RNAi 分子，以及抗程序性死亡多肽 -1 配体 2RNAi 分子），反义分子（例如，抗程序性死亡多肽 -1 反义 RNA，抗程序性死亡多肽 -1 配体反义 RNA，抗程序性死亡多肽 -1 配体 2 反义 RNA），显性负性蛋白（例如，显性负性程序性死亡多肽 -1 蛋白，显性负性程序性死亡多肽 -1 配体蛋白，显性负性程序性死亡多肽 -1 配体 2 蛋白）以及小分子抑制剂。抗体包括单克隆抗体，人源化抗体，去免疫抗体，以及 Ig（免疫球蛋白）融合抗体。一个范例性的抗程序性死亡多肽 -1 配体抗体包括克隆 EH12。

[0012] 除了减少程序性死亡多肽 -1(PD-1) 的表达或者活性的化合物之外，还可以向需要被治疗的宿主施用疫苗，该疫苗可以包括或者不包括佐剂或者灌泵升压注射器 (prime booster shot)。可选择的，向宿主施用另一种化合物，例如抗病毒化合物（例如，阿糖腺苷，无环鸟苷，丙氧鸟苷，valgancyclovir，核苷酸类逆转录酶抑制剂 (NRTI) 例如 AZT（齐多夫定），ddI（去羟肌苷），ddC（二脱氧胞苷），d4T（司他夫定），或者 3TC（拉米夫定），非核苷酸类逆转录酶抑制剂 (NNRTI) 例如奈韦拉平或者地拉韦定，蛋白酶抑制剂例如沙喹那韦，利托那韦，茚地那韦，或者奈非那韦，利巴韦林，以及干扰素），抗细菌化合物，抗真菌化合物，抗寄生虫化合物，抗炎症化合物，抗肿瘤化合物或者止痛剂。所述的另一种化合物也可以是减少细胞毒性 T 淋巴细胞抗原 4(CTLA-4) 或者 B、T 淋巴细胞衰减因子 (BTLA) 的表达或者活性的化合物。可以给宿主施用的其他范例性化合物是抗细胞毒性 T 淋巴细胞抗原 4 抗体，抗 B、T 淋巴细胞衰减因子抗体，抗 CD28 抗体，抗可诱导共刺激分子 (ICOS) 抗体，抗可诱导共刺激分子配体抗体，抗 B7-1 抗体，抗 B7-2 抗体，抗 B7-H3 抗体，以及抗 B7-H4 抗体。

[0013] 本发明进一步提供一种鉴定候选化合物的方法，所述候选化合物调节程序性死亡多肽 -1 的活性或者表达，该方法包括下述步骤：(a) 将表达程序性死亡多肽 -1 基因的细胞（例如，程序性死亡多肽融合基因）与候选化合物进行接触；(b) 测定程序性死亡多肽 -1 在细胞中的表达或者活性（例如，通过测定程序性死亡多肽 -1mRNA 或者蛋白质的表达）；以及 (c) 将程序性死亡多肽 -1 在细胞中的表达或者活性与其在对照细胞中的表达或者活性相比较，其中对照细胞没有与化合物进行接触。程序性死亡多肽 -1 在表达或者活性上的增加或者减少表明该候选化合物能够有效的调节程序性死亡多肽 -1 的活性或者表达。

[0014] 或者，上述筛选方法可以包括下列步骤：(a) 将过表达程序性死亡多肽 -1 基因的 T 细胞与候选化合物进行接触；以及 (b) 测定 T 细胞的细胞毒素活性；(c) 将该 T 细胞中的细胞毒素活性与对照细胞中的细胞毒素活性进行比较，其中对照细胞没有与化合物进行接触。这种活性的增加或者降低鉴定出该候选化合物能够有效的调节程序性死亡多肽 -1 的活性或者表达。细胞毒素活性包括细胞因子的生成，T 细胞的扩增以及病毒的清除。

[0015] 本发明进一步提供一种筛选方法，包括下列步骤：(a) 将程序性死亡多肽 -1 与候选化合物进行接触；(b) 测定上述候选化合物是否与程序性死亡多肽 -1 发生相互作用；以及 (c) 鉴定出该候选化合物对于调节程序性死亡多肽 -1 的表达或者活性是有效的。所期望的是，被鉴定的候选化合物与程序性死亡多肽 -1 发生相互作用，并且减少其活性。

[0016] 使用这里描述的筛选方法鉴定的候选化合物可以减少程序性死亡多肽 -1 与程序性死亡多肽 -1 配体间的相互作用，或者减少程序性死亡多肽 -1 与程序性死亡多肽 -1 配体 2 间的相互作用。这里描述的筛选方法中使用的细胞包括哺乳动物细胞例如啮齿动物细胞或者人类细胞。所述细胞是免疫细胞，例如 T 细胞。所期望的是，在这类筛选方法中使用的程序性死亡多肽 -1 是人类程序性死亡多肽 -1。

[0017] 这里还提供了一种用于诊断宿主是否已经患有持续性感染或肿瘤、或者存在患有持续性感染或肿瘤的危险的方法，包括下列步骤：(a) 提供一个来自于宿主的含有免疫细胞（例如，T 细胞或者 B 细胞）的样品；并且 (b) 测定程序性死亡多肽 -1 在样品中的表达或者活性。与对照样品中的表达或者活性相比，程序性死亡多肽 -1 的表达或者活性的增加鉴定出该宿主已经患有持续性感染或肿瘤，或者存在患有持续性感染或者肿瘤的危险。所期望的是，步骤 (b) 包括鉴定抗原特异性免疫细胞，例如病毒抗原，细菌抗原，寄生虫抗原，或者真菌抗原。

[0018] 还公开了一种为患有持续性感染或肿瘤、或者存在患有持续性感染或肿瘤的宿主选择治疗方式的方法。该方法包括下列步骤：(a) 提供一个来自于宿主的含有免疫细胞（例如，T 细胞或者 B 细胞）的样品；并且 (b) 测定程序性死亡多肽 -1 在免疫细胞中的表达或者活性，这样，与对照样品中的表达或者活性相比，程序性死亡多肽 -1 的表达或者活性的增加鉴定出该宿主已经患有持续性感染或肿瘤、或者存在患有持续性感染或者肿瘤的危险；以及 (c) 为诊断为已经患有持续性感染或肿瘤、或者被诊断为存在患有持续性感染或肿瘤的危险的宿主选择治疗方式，所述的治疗方式包括一种能够减少程序性死亡多肽 -1 的表达或者活性的化合物。所期望的是，步骤 (b) 包括鉴定抗原特异性免疫细胞，例如病毒抗原，细菌抗原，寄生虫抗原，或者真菌抗原。

[0019] 来自于宿主的样品包括血液样品，活体组织，以及骨髓样品。而且，对照细胞可以来自于不患有持续性感染或者不存在患有持续性感染的危险的宿主。

[0020] 本发明进一步提供了一种组合物，该组合物包括：(a) 能够降低程序性死亡多肽 -1 的活性水平的化合物；以及 (b) 另外一种化合物，例如抗病毒化合物，抗细菌化合物，抗真菌化合物，抗寄生虫化合物，抗炎症化合物，止痛剂，抗细胞毒性 T 淋巴细胞抗原 4 抗体，抗 B、T 淋巴细胞衰减因子抗体，抗 CD28 抗体，抗可诱导共刺激分子 (ICOS) 抗体，抗可诱导共刺激分子配体抗体，抗 B7-1 抗体，抗 B7-2 抗体，抗 B7-H3 抗体，或者抗 B7-H4 抗体。

[0021] 本发明还提供了一种试剂盒，该试剂盒包括 (a) 能够降低程序性死亡多肽 -1 的活性水平的化合物；以及 (b) 用于说明如何向宿主施用该化合物的说明书。或者，该试剂盒包括 (a) 能够降低程序性死亡多肽 -1 的活性水平的第一种化合物；(b) 另外一种化合物，例如抗病毒化合物，抗细菌化合物，抗真菌化合物，抗寄生虫化合物，抗炎症化合物，止痛剂，抗细胞毒性 T 淋巴细胞抗原 4 抗体，抗 B、T 淋巴细胞衰减因子抗体，抗 CD28 抗体，抗可诱导共刺激分子 (ICOS) 抗体，抗可诱导共刺激分子配体抗体，抗 B7-1 抗体，抗 B7-2 抗体，抗 B7-H3 抗体，或者抗 B7-H4 抗体；以及 (c) 用于说明如何向宿主施用所述第一种化合物和第二种化合物的说明书。

[0022] 与用于治疗、预防以及减轻或者缓解持续性感染的一种或者多种症状的标准治疗方法相比，本发明的方法提供了显著的优点。施用能够降低程序性死亡多肽 -1 的活性水平的治疗制剂增加了 CD8+T 细胞的细胞毒性，由此增加了对可引起持续性感染的感染性制剂的免疫应答。除此之外，本发明提供的筛选候选化合物的方法也涉及新疗法的鉴定，用来修饰损伤处理，而不仅仅是减轻症状。

[0023] 除非特别定义，这里使用的全部技术术语和科学术语都具有发明所属领域的普通技术人员理解的通常含义。尽管在本发明的实践或试验中可以使用与这里描述的方法和物质相类似或者等同的方法和物质，但下面描述了适合的方法和物质。这里提及的全部公开出版物、专利申请、专利、以及其他参考文件的全部内容都在此引入作为参考。如果产生矛盾，则以这里的详细描述包括定义为准。除此之外，这里提及的物质、方法和实施例仅仅是描述性的，并不构成限制。

[0024] 本发明的其他特征和优点将从下面的详细描述以及权利要求中体现出来。

附图说明

[0025] 附图 1A 的柱状图表示的是使用基因排列分析方法进行测量得到的转基因小鼠、经过淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒 (LCMV)Armstrong 免疫的（大约在感染后 30 天）感染型小鼠、或者 CD4 缺陷型 LCMV-C1-13 感染型小鼠（大约在感染后 30 天）的 $D^bGP33-41$ 特异性 T 细胞和 / 或 $D^bGP276-286$ 特异性 T 细胞中的程序性死亡多肽 -1mRNA 的水平。

[0026] 附图 1B 是流式细胞术试验得到的一系列图像，图像表明大约在感染之后的 60 天，在经过淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒 (LCMV)Armstrong 免疫的感染型小鼠和 CD4 缺陷型 LCMV-C1-13 感染型小鼠中，程序性死亡多肽 -1 在 CD8+ 四聚体阳性 ($tetramer^+$)T 细胞上进行表面表达。当使用 LCMV-C1-13 病毒（标记为“慢性”）产生慢性感染大约 60 天之后，免疫无能性 CD8+T 细胞在细胞表面上表达高水平的程序性死亡多肽 -1，但是当急性淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒 (LCMV)Armstrong 感染（标记为“免疫的”）被清除之后，病毒特异性 CD8+T 细胞不表达程序性死亡多肽 -1。

[0027] 附图 1C 是流式细胞术试验得到的一系列图像，图像证明了在患有慢性感染的小

鼠和未被感染的小鼠的脾细胞中存在程序性死亡多肽 -1。这证明了程序性死亡多肽 -1 在脾细胞中具有最高水平的表达，所述脾细胞是被病毒感染的。

[0028] 附图 2A 是一系列散点图，该图表明如果在感染后的第 23 天至第 27 天时对感染了 C1-13 的小鼠进行治疗，与未经治疗的对照组相比，$D^bNP396-404$ 特异性 CD8 T 细胞和 $D^bGP33-41$ 特异性 CD8 T 细胞的数量增加了大约 3 倍。为了确定是否会产生功能上的改变，测定应答于 8 个不同的淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒 (LCMV) 抗原决定基的干扰素 - γ (IFN- γ) 和肿瘤坏死因子 - α (TNF- α) 的生成。

[0029] 附图 2B 的散点图表明，当将所有已知的 CD8 T 细胞特异性计算在内时，淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒 (LCMV) 特异性 CD8 T 细胞的总数量增加了 2.3 倍。

[0030] 附图 2C 的一系列流式细胞术试验表明应答于 8 个不同淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒 (LCMV) 抗原决定基的干扰素 - γ (IFN- γ) 和肿瘤坏死因子 - α (TNF- α) 的生成。

[0031] 附图 2D 的散点图表明，在经过治疗的小鼠中更多的病毒特异性 CD8 T 细胞具有生成肿瘤坏死因子 - α (TNF- α) 的能力。

[0032] 附图 2E 的一系列柱状图表明，在脾、肝、肺以及血清中的程序性死亡多肽 -1 阻滞剂同样导致对病毒控制 (viral control) 的增强。

[0033] 附图 3A 的图表证明，与对照组 (标记为“untx”) 相比，在被感染后的第 46 天至第 60 天时使用抗程序性死亡多肽 -1 配体 (标记为“ α PD-L1”) 处理 CD-4 缺陷型 C1-13 感染型小鼠，小鼠的 DbGP33-41 特异性 CD8+T 细胞和 DbGP276-286 特异性 CD8+T 细胞 (标记为“GP33”和“GP276”) 会增加。这证明了与未经过处理的小鼠相比，使用抗程序性死亡多肽 -1 配体处理过的小鼠含有的 DbGP276-286 特异性脾脏 CD8+T 细胞增加了 7 倍，而 DbGP33-41 特异性脾脏 CD8+T 细胞增加了 4 倍。

[0034] 附图 3B 中的一系列图像证明，与对照组 (标记为“untx”) 相比，在被感染后的第 46 天至第 60 天时使用抗程序性死亡多肽 -1 配体 (标记为“ α PD-L1Tx”) 处理 CD-4 缺陷型 C1-13 感染型小鼠，小鼠脾内的 DbGP33-41 特异性 CD8+T 细胞和 DbGP276-286 特异性 CD8+T 细胞的频率 (frequency) 会增加。

[0035] 附图 3C 的一系列图像证明，经过抗程序性死亡多肽 -1 配体处理的小鼠的 DbGP276-286 特异性 CD8+T 细胞的扩增增加了，该结果是通过导入 BrdU(溴化脱氧尿嘧啶核苷) 和进行 Ki67 表达来测定的。

[0036] 附图 3D 的图表表明了小鼠产生了高水平的 CD8+T 细胞扩张，这证明其对外周血单个核细胞 (PBMC) 产生了显著的应答，该结果是通过比较外周血单个核细胞内 (PBMC) 的 $D^bGP276-286$ 特异性 CD8+T 细胞与脾内的 DbGP276-286 特异性 CD8+T 细胞而得到的。

[0037] 附图 4A 的一系列图表证明，与对照组相比，在经过抗程序性死亡多肽 -1 配体处理的小鼠中，生成干扰素 - γ (IFN- γ) 的 $D^bGP276-286$ 特异性 CD8+T 细胞增加了。在经过抗程序性死亡多肽 -1 配体处理的小鼠中，同样检测到 DbNP396-404 特异性 CD8+T 细胞、KbNP205-212 特异性 CD8+T 细胞、DbNP166-175 特异性 CD8+T 细胞以及 DbGP92-101 特异性 CD8+T 细胞的高频率。

[0038] 附图 4B 的图表证明，在经过抗程序性死亡多肽 -1 配体处理的小鼠中，50％的 DbGP276-286 特异性 CD8+T 细胞生成干扰素 - γ (IFN- γ)，而在对照组小鼠中，20％的 DbGP276-286 特异性 CD8+T 细胞生成干扰素 - γ (IFN- γ)。

[0039] 附图 4C 的一系列图像证明，与未经过处理的慢性感染型小鼠相比，经过抗程序性死亡多肽 -1 配体处理的慢性感染型小鼠产生较高水平的肿瘤坏死因子 -α (TNF-α)，但与经过淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒 (LCMV)Armstrong 感染的免疫小鼠相比，仍然产生较低水平的肿瘤坏死因子 -α (TNF-α)。

[0040] 附图 4D 的图表证明，与未经过处理的感染型小鼠相比，使用抗程序性死亡多肽 -1 配体对感染了 LCMV-C1-13 的小鼠进行处理会恢复病毒特异性 T 细胞的体外裂解活性，该结果是通过 ^{51}Cr 释放试验来测定的。

[0041] 附图 4E 的一系列图表证明，当使用 αPD-L1 对感染了 LCMV-C1-13 的小鼠进行处理后，其不同器官中的病毒滴度会降低。与未经过处理的对照小鼠相比，在使用抗程序性死亡多肽 -1 配体处理两周之后，其脾内的病毒滴度减少大约 3 倍，肝内的病毒滴度减少 4 倍，肺内的病毒滴度减少 2 倍，血清中的病毒滴度减少 2 倍。

[0042] 附图 5A 中的流式细胞术试验得到的一系列图像表示的是程序性死亡多肽 -1 的表面表达，其中使用特异于显性抗原决定基的 10 个人类免疫缺陷型病毒 (HIV) 四聚体，该显性抗原决定基作用于慢性 C 亚型人类免疫缺陷型病毒 (HIV) 感染。其中的百分含量指的是阳性程序性死亡多肽 -1(PD-1^+) 占四聚体阳性细胞 (tetramer$^+$cells) 的百分含量。

[0043] 附图 5B 的一系列图表证明，与抗逆转录病毒治疗初级个体中的 CD8 T 细胞总数相比 ($p < 0.0001$)，在 HIV(人类免疫缺陷型病毒)- 特异性 CD8 T 细胞中程序性死亡多肽 -1 的百分含量及平均荧光强度 (MFI) 发生了显著的上调，与 HIV(人类免疫缺陷型病毒)- 血清阴性对照组相比 (分别为 $p = 0.0033$ 以及 $p < 0.0001$)，感染了人类免疫缺陷型病毒后在全部 CD8 T 细胞总数中程序性死亡多肽 -1 的数量增加了。在此项试验中对来自于 65 个感染人类免疫缺陷型病毒的个体的 120 个人类免疫缺陷型病毒四聚体染色 (stains) 以及 11 个人类免疫缺陷型病毒血清阴性对照组进行了分析。

[0044] 附图 5C 的一系列图表表示的是程序性死亡多肽 -1 在四聚体阳性细胞中进行抗原决定基特异性表达的百分数及平均荧光强度 (MFI)。

[0045] 附图 5D 的图表描述了对于多种可探测应答来说，个体中的不同抗原决定基特异性群体上的程序性死亡多肽 -1 阳性细胞百分数的变化。横线表示的是每个个体的程序性死亡多肽 -1 阳性人类免疫缺陷型病毒四聚体阳性细胞 (PD-1^+HIV tetramer$^+$cells) 的平均百分数。

[0046] 附图 6A 的一系列图表表明，人类免疫缺陷型特异性 CD8 T 细胞数量与血浆病毒载量之间不存在相关性，这是通过四聚体染色检验得到的结果，而在血浆病毒载量与四聚体阳性细胞上的程序性死亡多肽 -1 的百分数和程序性死亡多肽 -1 的平均荧光强度 (MFI) 之间存在正相关 (分别为 $p = 0.0013$ 和 $p < 0.0001$)。

[0047] 附图 6B 的一系列图表表明，人类免疫缺陷型特异性 CD8 T 细胞数量与 CD4 计数之间不存在相关性，而在 CD4 计数与人类免疫缺陷型病毒四聚体阳性细胞上的程序性死亡多肽 -1 的百分数和程序性死亡多肽 -1 的平均荧光强度 (MFI) 之间存在负相关 (分别为 $p = 0.0046$ 和 $p = 0.0150$)。

[0048] 附图 6C 的一系列图表表明，全部 CD8 T 细胞群上的程序性死亡多肽 -1 的百分数及程序性死亡多肽 -1 的平均荧光强度 (MFI) 与血浆病毒载量之间存在正相关 (分别为 $p = 0.0021$ 和 $p < 0.0001$)。

[0049] 附图6D的一系列图表表明，全部CD8 T细胞群上的程序性死亡多肽-1的百分数及程序性死亡多肽-1的平均荧光强度(MFI)与CD4计数之间存在负相关(分别为p＝0.0049和p＝0.0006)。

[0050] 附图7A的一系列流式细胞术试验图像表示的是来自于宿主SK222的B*4201 TL9特异性CD8 T细胞的代表性的表型染色，其中在该宿主中98％的B*4201 TL9特异性CD8 T细胞是程序性死亡多肽-1阳性的。

[0051] 附图7B的图表描述了来自于人的表型数据的概括，在这些人中大于95％的人类免疫缺陷型特异性CD8 T细胞是程序性死亡多肽-1阳性的。针对每种涉及到的表型标记物，分析7个到19个样品。横线表示的是四聚体阳性程序性死亡多肽-1阳性细胞的百分比中间值，这些细胞对于上述标记物来说是阳性的。

[0052] 附图8A的一系列流式细胞术试验图像表示的是来自于一个B*4201阳性宿主的典型的扩增检测数据。在抗程序性死亡多肽-1配体封闭抗体的存在下，使用肽刺激6天之后，B*4201 TL9特异性CD8 T细胞的百分含量从5.7％增加到12.4％。

[0053] 附图8B的线形图描述了扩增检测数据的概况，表明当抗程序性死亡多肽-1配体封闭抗体存在时，人类免疫缺陷型病毒特异性CD8 T细胞的扩增发生了显著的增加(n＝28，p＝0.0006，配对t检验)。

[0054] 附图8C的柱状图表示的是对于同一个个体患者来说，程序性死亡多肽-1/程序性死亡多肽-1配体阻滞剂对人类免疫缺陷型病毒特异性CD8 T细胞的扩增所起的不同作用。白色的柱表示的是仅使用肽时四聚体阳性细胞增加的倍数，黑色的柱表示的是同时使用肽和抗程序性死亡多肽-1配体封闭抗体时四聚体阳性细胞增加的倍数。对试验个体中的多于一个的抗原决定基进行CFSE(羧基荧光素双乙酸盐琥珀酸酯)检测，结果用星号、方块儿或者三角表示。

具体实施方式

[0055] 抗生素和疫苗在近几十年来的应用已经显著的降低了由微生物感染而导致的死亡率。然而，由于某些感染性制剂具备躲避宿主器官免疫系统的能力，使抗微生物治疗方式的成功受到了限制，也因此形成了持续性感染。例如，针对于例如肝炎病毒和人类免疫缺陷型病毒这样的病毒而激发的免疫应答不足以清除感染性制剂，该制剂仍然存在于被感染的宿主体内。在这类感染中，抗原特异性CD8+T细胞对感染性制剂产生功能性耐受，即以已知的“免疫无能”或者“衰竭”状态存在。免疫无能型T细胞失去其细胞毒素活性，即失去了生成细胞因子、扩增、以及清除感染性制剂的能力。

[0056] 本发明基于下述令人惊讶的发现：T细胞的免疫无能伴随着程序性死亡多肽-1表达的诱发，这种程序性死亡多肽-1的表达与某些类型的淋巴增殖性病变相关。因此，本发明提供了增加T细胞的细胞毒性的方法，该方法通过将T细胞与一种能够减少程序性死亡多肽-1、程序性死亡多肽-1配体(PD-L1)或者程序性死亡多肽-1配体2(PD-L2)的表达或者活性的制剂进行接触来完成的。更具体的，本发明提供了治疗或者预防持续性感染或者淋巴增殖性病变(例如，肿瘤，例如血管淋巴瘤和结节性淋巴细胞为主型的霍奇金淋巴瘤)的方法，该方法通过给宿主施用一种能够减少程序性死亡多肽-1的表达或者活性的制剂来完成。程序性死亡多肽-1、程序性死亡多肽-1配体或者程序性死亡多肽-1配体2

的表达或者活性的减少导致细胞毒性 T 细胞活性的增加，增加了对感染性制剂的特异性免疫应答。该方法提供的结果表明，给患有持续性感染的小鼠施用抗程序性死亡多肽 -1 配体 (PD-L1) 封闭抗体会增加免疫无能型 T 细胞的细胞毒素活性。特别的，阻断程序性死亡多肽 -1 的信号会诱发免疫无能型 CD8+T 细胞的扩张，增加细胞因子的生成以及增强病毒的清除。而且，经过抗程序性死亡多肽 -1 配体治疗后，患有持续性感染的 CD4 缺陷型小鼠的 CD8+T 细胞会产生扩增，并且恢复大部分的功能。

[0057] 为了使 T 细胞对异源蛋白产生应答，必须提供两种抗原呈递细胞信号 (APCs) 使 T 淋巴细胞休眠。第一信号使免疫应答具有特异性，该信号在识别了存在于主要组织相容性复合体 (MHC) 中的异源抗原多肽之后，经由 T 细胞受体 (TCR) 进行转导。第二信号，称为共刺激性信号，诱导 T 细胞扩增并具备功能性。共刺激既不是抗原特异性的，也不是主要组织相容性复合体限制性的，是由一种或者多种独特的细胞表面多肽引起的，这些细胞表面多肽是抗原呈递细胞 (APCs) 表达的。如果 T 细胞仅仅在 T 细胞受体中受到刺激，而不接收额外的共刺激性信号，它们会变得无应答，免疫无能，或者死亡，从而导致对免疫应答的下调节。

[0058] 在抗原呈递细胞 (APCs) 上表达的 CD80(B7-1) 和 CD86(B7-2) 蛋白是临界共刺激多肽。由于在初级免疫应答中 B7-2 占支配性地位，随后在免疫应答期间 B7-1 发生上调节，以延长初级 T 细胞应答或者共刺激刺激 T 细胞应答。B7 多肽能够向免疫细胞发出共刺激性信号或者抑制信号，来促进或者抑制免疫细胞应答。例如，当程序性死亡多肽 -1 配体 (B7-4) 以一种可溶形式存在时，将其与一种共刺激受体结合，其会诱发免疫细胞的共刺激或者抑制免疫细胞的共刺激。当与抑制性受体相结合时，B7-4 分子可以向免疫细胞传输一种抑制性信号。范例性的 B7 家族成员包括 B7-1，B7-2，B7-3（由抗体 BB-1 识别），B7h（程序性死亡多肽 -1 配体），以及 B7-4 和它们的可溶性片段或者衍生物。B7 家族成员与免疫细胞上的一种或者多种受体相结合，例如细胞毒性 T 淋巴细胞抗原 -4(CTLA-4)，CD28，可诱导共刺激分子 (ICOS)，程序性死亡多肽 -1 和 / 或其他受体，并且，B7 家族成员具有向免疫细胞传输抑制性信号或者共刺激性信号的能力，信号的种类取决于受体。

[0059] CD28 是一种主要在休眠性 T 细胞上表达的受体。当信号经过 T 细胞受体后，CD28 的结合和共刺激性信号的转导诱发 T 细胞进行扩增并且分泌白细胞介素 -2(IL-2)。细胞毒性 T 淋巴细胞抗原 -4(CD152) 是一种与 CD28 同源的受体，该受体在休眠性 T 细胞中缺失，但 T 细胞被激活后会诱导其表达。细胞毒性 T 淋巴细胞抗原 -4(CTLA-4) 在 T 细胞应答的负性调节中发挥作用。可诱导共刺激分子 (ICOS)，一种与 CD28 和细胞毒性 T 淋巴细胞抗原 -4 相关的多肽，参与白细胞介素 -10(IL-10) 的生产。程序性死亡多肽 -1，程序性死亡多肽 -1 配体及程序性死亡多肽 -1 配体 2 结合的受体，也被迅速诱导于 T 细胞表面。程序性死亡多肽同样在 B 细胞表面进行表达（应答于抗免疫球蛋白 M），也在胸腺细胞及骨髓细胞子集中表达。

[0060] 程序性死亡多肽 -1 的结合（例如通过交联或者聚合的方式）导致了免疫细胞中抑制性信号的传输，从而减少了免疫应答，随之增加了免疫细胞的免疫无能性。程序性死亡多肽 -1 家族成员与抗原呈递细胞上的一种或者多种受体相结合，例如程序性死亡多肽 -1 配体以及程序性死亡多肽 -1 配体 2。

[0061] 程序性死亡多肽 -1 配体和程序性死亡多肽 -1 配体 2 都是人类程序性死亡多肽 -1

的配体多肽，是 B7 多肽家族的成员。每种程序性死亡多肽 -1 配体含有一个信号序列，一个 IgV 结构域，一个 IgC 结构域，一个跨膜结构域，以及一个短的胞质尾区。这些配体在胎盘、脾脏、淋巴结、胸腺以及心脏中表达。程序性死亡多肽 -1 配体 2 还在胰腺、肺以及肝中表达，而程序性死亡多肽 -1 配体在胎儿的肝中、活化的 T 细胞以及内皮细胞中表达。两种程序性死亡多肽 -1 配体都在活化的单核细胞以及树突细胞中发生上调节。

[0062] 定义

[0063] 这里使用的“持续性感染”指的是感染性制剂（例如，病毒，细菌，寄生虫，支原体，或者真菌）不能从被感染宿主中被清除或者除去的感染，即使在诱发了免疫应答之后。持续性感染可以是慢性感染，潜伏性感染，或者慢感染。急性感染时间比较短（持续几天或者几个星期），并且可以通过免疫系统从机体中分解出来，而持续性感染可能持续几个月，几年，甚至是一生。这类感染也可能在一段长的时间内频繁复发，包括隐性感染以及产毒性感染阶段，不具备细胞杀伤能力或者甚至对宿主细胞产生过多的损伤。即使在免疫应答结束后，使用标准技术也可以在宿主中（例如，在被感染个体的特异性细胞内）检测到引起感染的感染性制剂。使用本领域已知的任何标准方法诊断患有持续性感染的哺乳动物，在例如下列文件中描述，美国专利号码 6368832，6579854 以及 6808710，美国专利申请公开号 码 20040137577，20030232323，20030166531，20030064380，20030044768，20030039653，20020164600，20020160000，20020110836，20020107363，以及 20020106730，上述所有文件在此引入作为参考。例如，在使用 PCR（聚合酶链式反应）分析法对来自于宿主生物样本中的衣原体种类进行探测之后，可以将该宿主诊断为患有持续性衣原体感染。没有被诊断为患有持续性感染的哺乳动物不需要依据本发明进行治疗。能够引起持续性感染的微生物包括病毒（例如，乳突淋瘤，肝炎病毒，人类免疫缺陷型病毒，以及疱疹病毒），细菌（例如，大肠埃希氏杆菌，以及衣原体属），寄生虫（例如，疟原虫，利什曼原虫属，裂体吸虫属，锥形虫属，弓形虫属）以及真菌。

[0064] “缓解持续性感染的症状”指的是在持续性感染发生之前或者之后，改善与持续性感染相关的任何状况或者症状。或者，缓解持续性感染的症状可以包括减少负载于宿主中的感染性微生物（例如，病毒，细菌，真菌，支原体，或者寄生虫），这种减少是相对于未接受治疗的对照组中的载量而言的。与未接受治疗的对照组相比，这种减少或者预防的程度为至少 5％，10％，20％，40％，50％，60％，80％，90％，95％，或者 100％，通过任何标准技术测得的结果。所期望的是，如果使用本领域任何的已知标准技术检测到持续性感染被完全清除了，这种情况就表明持续性感染被治愈了。接受持续性感染治疗的患者是医学从业者已经诊断为具有这种症状的人。诊断可以通过任何适当的方式进行。诊断和监测可以包括例如检测生物样品中（例如，活体组织，血液测试，或者尿液测试）的微生物载量，检测生物样品中微生物感染的替代标记（surrogate marker）的水平，检测与持续性感染相关的症状，或者检测持续性感染的典型免疫应答中存在的免疫细胞（例如，检测免疫无能型抗原特异性 T 细胞）。对于已经预防了持续性感染的形成的患者来说，可以接受或者不接受上述诊断。本领域技术人员应该明白，可以对这些患者进行上述标准测试，也可以在不进行检查的情况下确诊该患者由于具有一种或者多种危险因素（例如，家族病史或者接触感染性制剂）而存在患病的高度危险。

[0065] 这里使用的“程序性死亡多肽 -1(PD-1)”指的是能够与程序性死亡多肽 -1 配体

蛋白或者程序性死亡多肽 -1 配体 2 蛋白形成复合体的多肽，也因此参与免疫应答，例如 T 细胞的共刺激。本发明的程序性死亡多肽 -1 蛋白与天然存在的程序性死亡多肽 -1 在本质上等同（例如，参见 Ishida 等人于 1992 年在 EMBO J. 11 :3887-3895 中发表的文章；Shinohara 等人于 1994 年在 Genomics(《遗传学》)23 :704-706 中发表的文章，以及美国专利 NO. 5698520，在此引入作为参考）。程序性死亡多肽 -1 的信号可以通过例如减少 T 细胞的扩增、细胞因子的生成或者病毒的清除来降低 CD8+T 细胞的细胞毒性。根据本发明，程序性死亡多肽 -1 以低于对照水平的至少 5%，10%，20%，30%，40%，50%，60%，70%，80%，90%，或者多于 100% 的水平降低 CD8+T 细胞的细胞毒素活性，该结果是通过任何标准方法测量得到的。

[0066] “程序性死亡多肽 -1 基因”指的是编码程序性死亡多肽 -1 蛋白的核酸。

[0067] “程序性死亡多肽 -1 融合基因”指的是一个程序性死亡多肽 -1 启动子和 / 或与另外一个异源核酸序列形成可操作连接的程序性死亡多肽 -1 编码区域的全部或者一部分。在优选的实施方式中，所述的另外一个异源核酸序列是报道基因，该基因的表达可以被测定；报道基因包括但不局限于，编码葡萄糖苷酸酶 (GUS)、荧光素酶、氯霉素转乙酰酶 (CAT)、绿色荧光蛋白 (GFP)、碱性磷酸酶、以及 β - 半乳糖苷酶的基因。

[0068] “减少程序性死亡多肽 -1 的表达或者活性”指的是降低程序性死亡多肽 -1 的水平或者生物活性，这种降低是与未接受治疗的对照组中的程序性死亡多肽 -1 水平或者生物活性相比而言的。根据本发明，相对于未接受治疗的对照组相比，这种水平或者活性降低了至少 5%，10%，20%，30%，40%，50%，60%，70%，80%，90%，100%，甚至多于 100%。例如，如果将程序性死亡多肽 -1 与程序性死亡多肽 -1 配体、程序性死亡多肽 -1 配体 2 或者程序性死亡多肽 -1 配体和程序性死亡多肽 -1 配体 2 进行结合，程序性死亡多肽 -1 的生物活性会降低，从而导致程序性死亡多肽 -1 的信号减弱，因此增加 CD8+T 细胞的细胞毒性。这里使用的关于程序性死亡多肽 -1 的术语“活性”包括天然存在的程序性死亡多肽 -1 蛋白具有的任何活性，例如在活化的免疫细胞中调节抑制性信号的能力，例如通过与抗原呈递细胞上的天然配体相结合的方式。这种对免疫细胞中的抑制性信号的调节作用导致对扩增和 / 或由免疫细胞分泌的细胞因子进行的调节。程序性死亡多肽 -1 也可以调节共刺激性信号，通过与共刺激受体竞争结合 B7 分子来调节。因此，术语“程序性死亡多肽 -1 活性”包括程序性死亡多肽 -1 与其天然配体相结合的能力，调节免疫细胞共刺激性信号或者抑制性信号的能力，以及调节免疫应答的能力。因此，降低程序性死亡多肽 -1 的活性包括减少程序性死亡多肽 -1 与程序性死亡多肽 -1 配体或者程序性死亡多肽 -1 配体 2 的相互作用。这可以通过例如阻滞程序性死亡多肽 -1 配体或者程序性死亡多肽 -1 配体 2 来完成。

[0069] “免疫细胞”指的是在免疫应答中发挥作用的造血起源细胞。免疫细胞包括淋巴细胞（例如，B 细胞和 T 细胞），天然杀伤细胞，以及骨髓细胞（例如，单核细胞，巨噬细胞，嗜曙红细胞，肥大细胞，嗜碱细胞，以及粒细胞）。

[0070] “T 细胞”指的是 CD4+T 细胞或者 CD8+T 细胞。术语 T 细胞包括 TH1 细胞和 TH2 细胞。

[0071] 术语“T 细胞的细胞毒性”包括由 CD8+T 细胞活性介导的任何免疫应答。范例性的免疫应答包括细胞因子的生成，CD8+T 细胞的扩增，粒酶或者穿孔素的生成，以及感染性制剂的清除。

[0072] “无应答性”包括免疫细胞对刺激的屈光性 (refractivity)，例如经过活化受体或者细胞因子的刺激。无应答性可以发生在例如暴露于免疫抑制剂或者暴露于高剂量抗原的情况中。这里使用的术语“免疫无能性”或者“耐受性”包括对活化受体介导的刺激的屈光性。这种屈光性通常是抗原特异性的，并且在与 tolerizing 抗原的接触终止之后仍然持续。例如，T 细胞的免疫无能性（与无应答性相反）的特征是细胞因子例如白细胞介素 -2(IL-2) 的产量的缺失。当 T 细胞暴露于抗原并且在第二信号（共刺激性信号）缺失的条件下接受了第一信号 (T 细胞受体或者 CD-3 介导的信号）时，T 细胞的免疫无能性产生了。在这种情况下，将细胞重新暴露于相同抗原（即使这种重新暴露在共刺激分子存在的情况下发生）会导致生产细胞因子的失败，也因此导致了扩增的失败。然而，如果使用细胞因子（例如白细胞介素 -2) 对免疫无能型 T 细胞进行培养，所述 T 细胞可以对不相关抗原产生应答并且发生扩增。例如，由 T 淋巴细胞生成的白细胞介素 -2 的缺乏可以导致 T 细胞的免疫无能，该结果是通过 ELISA（酶联免疫吸附测定）进行测定的，或者使用指示细胞系进行的扩增试验来测定的。或者，可以利用报道基因的构建。例如，在 5’白细胞介素 -2 基因增强子或者在该增强子内发现的 AP1 序列多聚体的控制下，免疫无能型 T 细胞不能激发由异源启动子诱导的白细胞介素 -2 基因转录（参见 Kang 等人于 1992 年在 Science（《科学》）257 :1134 中发表的文章）。免疫无能的抗原特异性 T 细胞可以减少至少 10％，20％，30％，40％，50％，60％，70％，80％，90％，95％，或者甚至 100％的细胞毒素活性，与相应的对照组抗原特异性 T 细胞相比而言。

[0073] “纯化抗体”指的是至少 60％的重量不含蛋白质以及与其天然相关的天然存在的有机分子的抗体。优选的，该重量为抗体重量的至少 75％，更优选为 90％，最优选为至少 99％，抗体的例子例如程序性死亡多肽 -1 特异性抗体，程序性死亡多肽 -1 配体特异性抗体，或者程序性死亡多肽 -1 配体 2 特异性抗体。纯化抗体可以通过例如亲合色谱法来制备，该方法使用重组蛋白或者保守基序多肽以及标准技术完成。

[0074] “特异性结合”指的是识别和结合于一种抗原例如程序性死亡多肽 -1、程序性死亡多肽 -1 配体多肽、或者程序性死亡多肽 -1 配体 2 多肽的抗体在本质上不能与样品例如天然的含有蛋白的生物样品中的其他非抗原分子进行识别和结合。与程序性死亡多肽 -1、程序性死亡多肽 -1 配体多肽、或者程序性死亡多肽 -1 配体 2 多肽结合的优选抗体在下列文献中被公开 :美国专利 NO.6808710，美国专利申请 Nos.20040137577，20030232323，20030166531，20030064380，20030044768，20030039653，20020164600，20020160000，20020110836，20020107363，以及 20020106730，上述全部文件在此引入作为参考。

[0075] “中和抗体”指的是影响程序性死亡多肽 -1 的任何生物活性、特别是影响其减少免疫应答例如 T 细胞的细胞毒性的能力的抗体。所述中和抗体使程序性死亡多肽 -1 减少免疫应答的能力优选降低 50％，更优选降低 70％，最优选降低 90％或者更多。可以使用测试免疫应答的任意标准方法来评价潜在的中和抗体，包括使用这里描述的方法。

[0076] 涉及到蛋白或者多肽的“本质上等同”指的是与参考氨基酸序列相比，这类蛋白或者多肽表现出至少 75％、优选 85％、更优选 90％、最优选 95％、或者甚至 99％的同一性。对于蛋白或者多肽来说，比较序列的长度通常为至少 20 个氨基酸，优选至少 30 个氨基酸，更优选至少 40 个氨基酸，最优选至少 50 个氨基酸，或者是该蛋白或者多肽的全长。编码这类“本质上等同”的蛋白或者多肽的核酸构成了“本质上等同”的核酸的例子 ；由于遗传密码的

简并性，这类核酸被公认为包括编码上述蛋白或者多肽的任意序列。除此之外，“本质上等同”的核酸序列还包括在高度严格的条件下与参考核酸分子杂交的多核苷酸。

[0077] “高度严格的条件”指的是被设置为高温、低离子强度的任意条件，并且可以发生与下列条件下进行的相似的杂交：使用至少 40 个核苷长度的 DNA 探针、在含有 0.5M 磷酸氢钠的缓冲液中、PH 7.2、7％十二烷基磺酸钠 (SDS)、1mM 乙二胺四乙酸 (EDTA)、以及 1％牛血清白蛋白 (BSA)(片段 V)，65℃下进行的杂交，或者是在含有 48％甲酰胺、4.8XSSC、0.2M Tris- 盐酸的缓冲液中，PH 7.6，1X Denhardt’s 溶液，10％葡聚糖硫酸酯以及 0.1％十二烷基磺酸钠 (SDS)，42℃下进行的杂交。高度严格杂交的其他条件，例如 PCR(聚合酶链式反应)、Northern 杂交、Southern 杂交、或者原位杂交的条件是分子生物学领域的技术人员熟知的。参见例如 F.Ausubel 等人于 1998 年在 Current Protocol in Molecular Biology(《分子生物学当代规程》)，John Wiley&Sons，New York，N.Y 中发表的文章，该文章在此引入作为参考。

[0078] “本质上纯的”指的是已经与其天然共存的组分进行分离了的核酸、多肽或者其他分子。典型的，当所述多肽至少 60％、70％、80％、90％、95％、或者甚至 99％的重量不含蛋白质以及与其天然相关的天然存在的有机分子时，上述多肽是本质上纯的。例如，本质上纯的多肽可以通过从天然来源中提取的方式获得，或者通过在通常不表达蛋白的细胞中表达重组核酸的方法获得，或者通过化学合成的方法获得。

[0079] 术语“分离的 DNA”指的是不含有来自于有机体天然存在的基因组、与 DNA 侧面连接的基因的 DNA。因此，术语“分离的 DNA”包括例如 cDNA，克隆的基因组 DNA，以及合成 DNA。

[0080] “有效剂量”指的是减少或者预防高血压或者治疗或预防哺乳动物慢性感染所需要的以单独的或者组合物形式存在的化合物的量。活性化合物的有效剂量根据给药路径、宿主年龄、宿主体重、以及宿主的大致健康状况而不同。最终，主治医师或者兽医会决定合适的剂量以及给药方案。

[0081] “候选化合物”指的是天然存在的或者人工合成的化学制剂。候选化合物可以包括，例如，肽，多肽，合成有机分子，天然有机分子，核酸分子，肽核酸分子，以及上述物质的成分和衍生物。例如，根据本发明，一个有效的候选化合物能够减少程序性死亡多肽 -1 与程序性死亡多肽 -1 配体、程序性死亡多肽 -1 配体 2 或者与两者的结合。

[0082] 术语“药物组合物”指的是含有至少一种治疗活性制剂或者生物活性制剂、并且适合施用于患者的任意组合物。可以通过本领域已知的以及已经接受的方法制备上述组合物中的任意一种，例如，Remington 于 2000 年在 The Science and Practice of Pharmacy(《药剂学科学与实践》)20sup.th edition(ed.A R Gennaro)，Mark Publishing Co.，Easton，Pa 中发表的文章。

[0083] 治疗方法

[0084] 通过将 T 细胞与一种减少程序性死亡多肽 -1 的表达或者活性的化合物相接触，来增加 T 细胞的细胞毒性。所述 T 细胞是天然 T 细胞，记忆性 T 细胞或者活化 T 细胞。或者，所述 T 细胞是一种抗原特异性 T 细胞。这种抗原特异性 T 细胞对于感染性制剂来说是免疫无能的或者是耐受的。T 细胞的细胞毒性的特征是增加了的细胞扩增和细胞因子释放。

[0085] 本方法有效的缓解了各种感染和肿瘤引起的症状。通过向宿主施用程序性死亡多肽 -1 抑制剂，达到治疗或者预防感染或者肿瘤、或者缓解由此带来的症状的目的。所述的

宿主是哺乳动物例如人类，灵长类，鼠类，狗，猫，牛，马以及猪。所述的宿主患有感染或者存在患有感染的危险。所述患有感染或者存在患有感染危险的宿主可以进行适用于特殊感染的标准方法进行治疗。

[0086] 所述的感染例如细菌、病毒、真菌、支原体、或者寄生虫感染是一种持续性感染。持续性感染不同于急性感染，不能通过宿主免疫应答的诱发被有效的清除。感染性制剂和免疫应答达到一种平衡，使得被感染宿主在很长一段时间内保持着感染性，而不必须表现出症状。持续性感染包括例如，潜伏性感染，慢性感染以及慢感染。

[0087] 在慢性感染中，任何时刻都能够从机体中检测到感染性制剂的存在。然而，在一段很长的时间内该疾病的迹象和症状可能出现，也可能不出现。慢性感染的例子包括肝炎 B 腺病毒（由 B 型肝炎病毒引起）和肝炎 C 腺病毒（由 C 型肝炎病毒引起），细胞巨化病毒，Epstein-Barr 病毒，单纯疱疹病毒 1，单纯疱疹病毒 2，人类疱疹病毒 6，霍乱弧菌病毒，B 型肝炎病毒，D 型肝炎病毒，乳头瘤病毒，细小病毒 B19，多瘤病毒 BK，多瘤病毒 JC，麻疹病毒，风疹病毒，人类免疫缺陷型病毒 (HIV)，人类 T 细胞白血病病毒 I，以及人类 T 细胞白血病病毒 II。利什曼原虫、弓形虫、锥形虫、疟原虫、裂体吸虫、以及脑炎微孢子虫的感染可以引起寄生虫性持续性感染。

[0088] 在潜伏性感染中，感染性制剂（例如病毒）是表面上灭活和静止的，因此宿主并不总是表现出迹象或者症状。在潜伏性病毒感染中，在症状再次出现之前的很长一段时间内，病毒在宿主中保持一种平衡状态，然而，直到疾病被再次激活，才能检测到实际的病毒。潜伏性感染的例子包括由 HSV-1（发热性疱疹）、HSV-2（生殖疱疹）以及 VZV（禽痘带状疱疹）引起的感染。

[0089] 在慢感染中，感染性制剂的数量在一段相当长的时间内逐渐增加，在这个过程中观察不到明显的迹象或者症状。慢感染的例子包括获得性免疫功能缺陷综合症（由人类免疫缺陷型病毒 -1 以及人类免疫缺陷型病毒 -2 引起的），能在动物体内引起肿瘤的慢病毒属，以及朊病毒。

[0090] 除此之外，持续性感染通常作为急性感染的晚期并发症而被引发。例如，在急性麻疹感染之后可以发生亚急性硬化全脑炎 (SSPE)，或者在风疹感染之后可以发生退化性脑炎。

[0091] 肿瘤包括例如血管淋巴瘤或者结节性淋巴细胞为主型的霍奇金淋巴瘤。

[0092] 血管淋巴瘤 (AIL) 是一种激进（发展快速）类型的 T 细胞非霍奇金淋巴瘤，其标志是扩大的淋巴结点和血丙种球蛋白过多（血液中的抗体增多）。其他症状包括皮疹，发烧，体重减轻，阳性 Coomb’s 测试或者夜间盗汗。这种恶性疾病通常发生在成人当中。患者通常在 40 至 90 岁之间（年龄平均值为 65 岁左右），并且多为男性。当血管淋巴瘤发生时，肝脾肿大、溶血性贫血以及多克隆高血丙种球蛋白症也可能随之发生。在大约 40-50％的患者中还存在皮肤病变。

[0093] 结节性淋巴细胞为主型的霍奇金淋巴瘤是一种 B 细胞肿瘤，起源于具有变异的、非功能性免疫球蛋白基因的次级淋巴小结 B 细胞。与血管淋巴瘤相似，肿瘤细胞与滤泡性树突状细胞的网格结构相关联。程序性死亡多肽 -1 的在 T 细胞中的表达与结节性淋巴细胞为主型的霍奇金淋巴瘤中的 CD20+ 细胞相关，其表达方式与 CD57+T 细胞中的相似。CD57 与 CXCR5 被鉴定为次级淋巴小结相关 T 细胞的又一个标记，这个发现证明了下述结论：在结

节性淋巴细胞为主型的霍奇金淋巴瘤中的肿瘤细胞与次级淋巴小结相关 T 细胞之间具有高度相关性。

[0094] 程序性死亡多肽 -1 抑制剂是具备能够减少细胞中程序性死亡多肽 -1、程序性死亡多肽 -1 配体、或者程序性死亡多肽 -1 配体 2 的表达或者活性的能力的任何制剂。与对照细胞中的表达或者活性相比，程序性死亡多肽 -1 的表达或者活性被减少了至少 10％，20％，30％，40％，50％，60％，70％，80％，90％，或者 100％。所述对照细胞指的是没有使用程序性死亡多肽 -1 抑制剂进行处理的细胞。程序性死亡多肽 -1 的表达或者活性通过本领域任何的标准方法来测定，包括这里所描述的方法。可选择的，程序性死亡多肽 -1 抑制剂抑制或者减少程序性死亡多肽 -1 与程序性死亡多肽 -1 配体、程序性死亡多肽 -1 配体 2 之一的结合或者与两者的结合。程序性死亡多肽 -1 抑制剂包括多肽，多核苷酸，小分子拮抗剂，或者 siRNA。

[0095] 程序性死亡多肽 -1 抑制剂多肽包括，例如，能够减少程序性死亡多肽 -1 的表达或者信号的程序性死亡多肽 -1 抗体或其片段。范例性的抗体包括抗程序性死亡多肽 -1 抗体，抗程序性死亡多肽 -1 配体抗体，抗程序性死亡多肽 -1 配体 2 抗体，抗细胞毒性 T 淋巴细胞抗原 -4 抗体，抗 B、T 淋巴细胞衰减因子抗体，抗 CD28 抗体，抗可诱导共刺激分子抗体，抗可诱导共刺激分子配体抗体，抗 B7-1 抗体，抗 B7-2 抗体，抗 B7-H3 抗体，或者抗 B7-H4 抗体。

[0096] 或者，程序性死亡多肽 -1 抑制剂是一种能够影响程序性死亡多肽 -1 的生物活性（即程序性死亡多肽 -1 与程序性死亡多肽 -1 配体、程序性死亡多肽 -1 配体 2 之一的结合或者与两者的结合）的显性负性蛋白，或者是编码该显性负性蛋白的核酸。这种显性负性蛋白是含有下述序列的任何氨基酸分子，该序列与该显性负性蛋白相对应的野生型蛋白的至少 10 个、20 个、35 个、50 个、100 个、或者多于 150 个氨基酸具有至少 50％、70％、80％、90％、95％或者甚至 99％的序列同一性。例如，显性负性程序性死亡多肽 -1 发生变异，使其不能再与程序性死亡多肽 -1 配体相结合。

[0097] 上述显性负性蛋白可以作为一种表达载体进行施用。这种表达载体可以是非病毒载体，或者是病毒载体（例如，逆转录酶病毒载体，重组腺病毒相关病毒载体，或者重组腺病毒载体）。或者，这种显性负性蛋白可以作为重组蛋白直接进行全身施用，或者直接施用于被感染部位，通过利用微注射技术来实现。

[0098] 小分子包括，但不局限于，肽，模拟肽（例如，类肽），氨基酸，氨基酸类似物，多核苷酸，多核苷酸类似物，核苷，核苷类似物，分子量小于大约 5000 克的有机化合物以及无机化合物（包括异器官化合物以及有机金属化合物），分子量小于大约 2000 克的有机化合物或者无机化合物，分子量小于大约 1000 克的有机化合物或者无机化合物，分子量小于大约 500 克的有机化合物或者无机化合物，以及盐，酯，和这些化合物的其他药物可接受性形式。

[0099] 程序性死亡多肽 -1 抑制剂是一种反义分子，一种 RNA 干扰 (siRNA) 分子，或者是一种作用于程序性死亡多肽 -1 的表达或者活性的小分子拮抗剂。术语“siRNA”指的是阻止目标 mRNA 进行翻译的双链 RNA 分子。使用向细胞中导入 siRNA 的标准技术，包括以 DNA 为模板转录 siRNA 的技术。所述 siRNA 包括正义程序性死亡多肽 -1 核酸序列、正义程序性死亡多肽 -1 配体核酸序列、正义程序性死亡多肽 -1 配体 2 核酸序列、反义程序性死亡多肽 -1 核酸序列、反义程序性死亡多肽 -1 配体核酸序列、反义程序性死亡多肽 -1 配体 2 核酸序列，或者两者均包含。可选择的，从目标基因中构建一个 siRNA，这样在一个转录产物中

既含有正义序列也含有反义序列，例如发夹结构。在目标细胞中发生的 siRNA 与程序性死亡多肽 -1 转录产物、程序性死亡多肽 -1 配体转录产物、或者程序性死亡多肽 -1 配体 2 转录产物的结合会导致细胞生成的程序性死亡多肽 -1、程序性死亡多肽 -1 配体、或者程序性死亡多肽 -1 配体 2 的减少。其中寡核苷酸的长度为至少 10 个核苷，并且可以与天然存在的程序性死亡多肽 -1 转录产物、程序性死亡多肽 -1 配体转录产物、或者程序性死亡多肽 -1 配体 2 转录产物具有相同的长度。优选的，该寡核苷酸具有 19 到 25 个核苷的长度。最优选的，该寡核苷酸具有少于 75 个、50 个、25 个核苷的长度。

[0100] 其他适合的程序性死亡多肽 -1 抑制剂在例如下述文件中有所描述 :美国专利 No.6808710，美国专利申请 Nos.20040137577，20030232323，20030166531，20030064380，20030044768，20030039653，20020164600，20020160000，20020110836，20020107363， 和 20020106730，上述全部文件在此引入作为参考。

[0101] 程序性死亡多肽 -1 抑制剂的优选剂量是生物活性剂量。生物活性剂量是指能够诱发 CD8+T 细胞中的细胞毒素活性增加、导致针对感染性制剂的特异性免疫应答增加的剂量。所期望的是，这种程序性死亡多肽 -1 抑制剂具备将抗原特异性免疫细胞（例如，T 细胞如 CD8+T 细胞）中的程序性死亡多肽 -1 的表达或者活性减少至少 5％、10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、或者多于 100％的能力，这些百分数是相对于未经过处理的对照水平而言的。可以使用本领域已知的任何方法测定免疫细胞中的程序性死亡多肽 -1 的水平或者活性，包括例如 Western 印迹分析，免疫组织化学分析，酶联免疫吸附测定分析，以及 Northern 印迹分析。或者，可以通过评价程序性死亡多肽 -1 与程序性死亡多肽 -1 配体、程序性死亡多肽 -1 配体 2 中的一个或者两个的结合来测定程序性死亡多肽 -1 的生物活性。对程序性死亡多肽 -1 的生物活性的测定取决于它增加 CD8+T 细胞的细胞毒性的能力，包括例如细胞因子的生成，感染性制剂的清除以及抗原特异性 CD8+T 细胞的扩增。优选的，所述制剂减少程序性死亡多肽 -1 的表达或者活性，从而增加针对感染性制剂的特异性免疫应答，与未经处理的对照水平相比，这种增加为至少 5％、10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、或者多于 100％。因此，本发明所述的制剂是具有上述任意一种或者多种活性的任何制剂。尽管本发明的制剂优选的在 CD8+T 细胞中表达，可以理解，能够影响针对持续性感染的免疫应答的任何细胞都可以运用到本发明的方法中，包括例如 B 细胞。

[0102] 可选择的，给宿主施用一种或者多种其他的治疗剂。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，valgancyclovir，核苷酸类逆转录酶抑制剂 (NRTI)（例如，AZT（齐多夫定），ddI（去羟肌苷），ddC（二脱氧胞苷），d4T（司他夫定），或者 3TC（拉米夫定）），非核苷酸类逆转录酶抑制剂 (NNRTI)（例如，奈韦拉平或者地拉韦定），蛋白酶抑制剂（沙喹那韦，利托那韦，茚地那韦，或者奈非那韦，利巴韦林，或者干扰素），抗细菌化合物，抗真菌化合物，抗寄生虫化合物，抗炎症化合物，抗肿瘤化合物或者止痛剂。

[0103] 其他的治疗剂可以在施用程序性死亡多肽 -1 抑制剂之前、之中或者之后进行施用。例如，将程序性死亡多肽 -1 抑制剂与其他的治疗剂以至少 1 小时、2 小时、4 小时、6 小时、10 小时、12 小时、18 小时、或者多于 24 小时的时间间隔分别施用。可选择的，将其他的治疗剂与程序性死亡多肽 -1 抑制剂配置在一起。当所述其他的治疗剂存在于不同的组合

物中时，可以利用不同的给药路径。所述制剂的施用量是能够有效达到治疗、缓解或者预防感染的目的的量。

[0104] 程序性死亡多肽 -1 抑制剂及其他的治疗剂的浓度取决于很多因素，包括给药方式，作用位点，哺乳动物的生理状况，以及其他药物治疗因素。因此，可以使用滴定测量法确定治疗剂量，以获得最佳的安全性和功效性，这是在本领域技工的能力范围内的。确定特定情况下的合适剂量和给药方案在本领域技术人员的能力范围之内。

[0105] 可选择的，进一步向宿主施用疫苗，该疫苗能够引起针对于感染性制剂的保护性免疫应答，其中所述感染性制剂能够导致持续性感染。例如，给宿主接种能够针对人类免疫缺陷型病毒 (HIV)、肺结核、流行性感冒、或者 C 型肝炎引起免疫应答的疫苗。范例性的疫苗在例如下述文件中有所描述 :Berzofsky 等人于 2004 年在 J. Clin. Invest. (《临床研究杂志》)114 :456-462 中发表的文章。如果需要，可以使用灌泵升压注射器 (prime booster shot) 或者使用佐剂来接种疫苗。

[0106] 程序性死亡多肽 -1 抑制剂以足以增加 T 细胞例如 CD8+T 细胞的细胞毒性的量来施用。T 细胞的细胞毒性的增加导致免疫应答的增加以及持续性感染的缓解。例如可以通过免疫细胞例如 T 细胞或者 B 细胞扩增的增加、细胞因子生成量的增加、以及感染性制剂清除率的增加来测定免疫应答的增加。这种缓解包括缓解与持续性感染相关的一种或者多种症状。与未经过治疗的宿主相比，施用程序性死亡多肽 -1 抑制剂能够以至少 10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、或者 100％的水平缓解持续性感染或者缓解由持续性感染带来的一种或者多种症状。

[0107] 如果这种治疗取得了临床上的效果，例如减少了感染性制剂在宿主中的载量，则该治疗是有效的。当进行预防性的治疗时，“有效”指的是该治疗能够阻止或者预防感染的形成。可以利用任何本领域已知的用于诊断或者治疗特定感染的方法来测定这种有效性。

[0108] 治疗性给药

[0109] 本发明包括给宿主施用一种组合物，该组合物包括一种能够减少程序性死亡多肽 -1 的表达或者活性（在这里使用“程序性死亡多肽 -1 抑制剂”或者“治疗性组合物”表示）的化合物。

[0110] 治疗性化合物的有效剂量优选为大约 0.1 毫克 / 千克至大约 150 毫克 / 千克。本领域技术人员可以知晓，有效剂量根据给药路径、赋形剂的使用、以及与其他治疗方法共同使用的情况而有所变化，其中所述的其他治疗方法包括使用其他抗感染制剂或者治疗剂，用于治疗、预防或者缓解特定感染或者肿瘤引发的症状。通过使用标准方法对患有感染或者肿瘤（或者存在患有的危险）的哺乳动物例如人类患者进行诊断，来确定治疗方案。

[0111] 使用本领域已知的方法向这类个体施用药物化合物。优选的，该化合物通过口服给药、直肠给药、鼻内给药、局部给药或者非肠道注射给药形式施用，其中非肠道注射给药形式包括皮下注射、腹膜内注射、肌肉内注射、以及静脉内注射。所述化合物可以进行预防性的施用，或者是在检测到感染之后施用。可以选择的将该化合物配置成治疗性药物混合物中的一个组分的形式来治疗感染。适合于非肠道注射给药形式的混合物的例子包括活性制剂在等压盐溶液、5％葡萄糖溶液、或者在其他标准的药物学可接受赋形剂中形成的含水溶液的形式。标准的增溶剂例如聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 或者环糊精也可以作为药物学赋形剂来使用，用于运送治疗性化合物。

[0112] 这里描述的治疗性化合物可以利用通常的方法制备成组合物形式，以其他的给药方式进行施用。例如，将程序性死亡多肽-1抑制剂制备成胶囊或者片剂的形式用于口服给药。胶囊可以包含任何标准的药物学可接受原料例如凝胶或者纤维素。片剂可以根据传统的加工方法通过压缩治疗性化合物与固体载体以及润滑剂的混合物来制备。固体载体的例子包括淀粉和蔗糖膨润土(sugar bentonite)。以硬壳状片剂或者胶囊的形式施用该化合物，其中硬壳状片剂或者胶囊中含有粘合剂，例如乳糖或者甘露醇，传统的填充剂，以及成片剂。其他的形式包括药膏、栓剂、药糊、喷雾、药片、乳液、凝胶、重复吸收的海绵、或者泡沫形式。这类形式可以通过本领域熟知的方法进行制备。

[0113] 当所述的治疗性化合物是编码蛋白质的核酸时，该治疗性核酸以体内给药的形式被施用，促进其编码的蛋白质的表达，通过将其构建成合适的核酸表达载体的一部分并且进行施用，使其变为细胞内物质（例如，通过使用逆转录病毒载体，通过直接注射，通过使用微粒子轰击，通过涂覆脂质体或者细胞表面受体或者转染性制剂，或者通过与已知的进入核子中的同源盒样肽(homeobox-like peptide)联接施用（参见例如Joliot等人于1991年在Proc.Natl Acad Sci USA 88:1864-1868中发表的文章），以及类似的方法）。或者，将核酸治疗剂导入细胞内并且导入宿主细胞DNA中用于进行表达，以同源重组物的形式或者仍然以游离型载体的形式。

[0114] 使用标准基因治疗载体进行DNA的局部施用。这类载体包括病毒载体，包括那些来自于复制缺陷型肝炎病毒（例如，B型肝炎病毒，C型肝炎病毒）、逆转录病毒（参见例如WO89/07136;Rosenberg等人于1990年在N.Eng.J.Med.323(9):570-578中发表的文章）、腺病毒（参见例如Morsey等人于1993年在J.Cell.Biochem.(《细胞生物化学杂志》)，Supp.17E中发表的文章）、腺病毒相关病毒(Kotin等人于1990年在Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:2211-2215中发表的文章）、复制缺陷型单纯疱疹病毒(HSV;Lu等人于1992年在基因治疗会议上的摘要，摘要第66页，九月，22-26日，冷泉港实验室，冷泉港，纽约）的载体，以及这些载体的任意修饰形式。本发明可以应用能够完成核酸至真核细胞的体内转移的任意其他运送系统。例如，可以将核酸包裹在脂质体例如阳离子脂质体(Lipofectin试剂）中、受体介导的运送系统中、非病毒核酸基载体中、红细胞血影中、或者微球体中（例如微粒子;参见例如美国专利No.4789734;美国专利No.4925673;美国专利No.3625214;Gregoriadis于1979年在Drug Carrier in Biology and Medicine(《生物学和药物学药物载体》)，pp.287-341(Academic Press学术出版社）中发表的文章）。也可以施用裸DNA。

[0115] 用于进行基因治疗的DNA可以通过非肠道注射方式施用于患者，例如，静脉内注射，皮下注射，肌肉内注射，以及腹膜内注射。将DNA或者诱导剂置于药物学可接受性载体中进行施用，药物学可接受性载体即适用于向动物施用的生物学可相容性溶媒，例如生理盐水。治疗有效剂量指的是能够产生药物学期望性结果的剂量，例如，能够使被治疗动物体内的程序性死亡多肽-1基因产物减少的剂量。这种剂量可以由本领域普通技术人员确定。在药物领域已知，对于任意给定的患者来说，剂量取决于许多因素，包括患者的大小，体表面积，年龄，施用的特定化合物，性别，给药时间和给药途径，一般健康状况，以及同时施用的其他药物。剂量可以发生变化，但用于DNA的静脉内给药的优选剂量是大约10^6至10^{22}个拷贝数的DNA分子。典型的，施用于哺乳动物的质粒的剂量为大约1纳克DNA至大约5000微克DNA。所期望的是，组合物中含有大约5纳克至1000微克DNA，10纳克至800微克DNA，

0.1 微克至 500 微克 DNA，1 微克至 350 微克 DNA，25 微克至 250 微克 DNA，或者 100 微克至 200 微克 DNA。或者，可以向哺乳动物施用编码程序性死亡多肽 -1 抑制剂的重组腺病毒载体，可以以至少 10^5，10^6，10^7，10^8，10^9，10^{10}，或者 10^{11} 个蚀斑形成单位 (pfu) 的浓度来施用。

[0116] 将程序性死亡多肽 -1 基因产物溶于药物学可接受性载体例如生理盐水中，通过静脉内注射的方式进行施用。可以使用细胞内运送多肽的标准方法，例如将其包裹在脂质体中的方法。这类方法是本领域普通技术人员熟知的。可以预期，静脉内注射的剂量大约为每千克体重每天施用 1 至 100 摩尔本发明所述的多肽。本发明所述的组合物能够有效的用于非肠道注射给药，例如静脉内注射，皮下注射，肌肉内注射，以及腹膜内注射。

[0117] 将上述化合物直接与被接触组织进行接触，可以使程序性死亡多肽 -1 抑制剂发挥药效。因此，上述化合物可以通过局部给药形式施用。或者，程序性死亡多肽 -1 抑制剂可以通过全身给药形式施用。此外，可以将上述化合物灌输至（直接进入器官（例如肠或者肝）或者通过皮下方式）固体或者重复吸收性基质中进行施用，所述固体或者基质将化合物缓慢的释放到宿主的邻近组织和周围组织中。例如，在对胃肠感染的治疗中，可以将上述化合物进行全身施用（例如，静脉内注射，直肠内施用或者口服）或者局部施用（例如，直接施用到胃组织）。或者，将浸渍了程序性死亡多肽 -1 抑制剂的晶片或者可重复吸收的海绵直接与胃组织进行接触。通过晶片上的药物的扩散以及聚合物基质的侵蚀 (erosion) 使程序性死亡多肽 -1 抑制剂在体内缓慢的释放。作为另外一个实施例，可以通过向肝血管中注入含有程序性死亡多肽 -1 抑制剂的溶液来治疗肝感染（即肝炎病毒）。

[0118] 为了治疗神经感染，可以通过静脉内注射或者鞘内注射（即，直接注入到脑脊髓液中）的形式施用程序性死亡多肽 -1 抑制剂。如果要局部施用，可以将浸渍了上述化合物的晶片或者可重复吸收的海绵直接与中枢神经系统 (CNS) 组织进行接触。通过晶片上的药物的扩散以及聚合物基质的侵蚀，使上述化合物或者该化合物的混合物在体内缓慢的释放。或者，使用标准方法将化合物注入到大脑或者脑脊髓液中。例如，可以放置一个带有导管的磨孔环作为注射位点，该磨孔环在钻入头骨的磨孔处与头骨相接合，导管连接一个储液室，储液室内的液体通过穿透磨孔环上方隔膜的针或者探针流入。导管组（描述于例如美国专利 No. 5954687）提供了流体的流通路径，该路径适合于将流体传输至大脑、大脑旁或者大脑内部的选定位置，或适合于使流体从上述位置中流出，以保证在一段时间内完成药物的施用。

[0119] 为了治疗心脏感染，可以将化合物运送至例如心脏组织中（例如，心肌，心包膜，或者心内膜），通过穿透胸壁的直接冠状动脉内注射的方式，或者在荧光镜的引导下使用标准的经皮导管方法。因此，所述抑制剂可以被直接注射到组织中，或者通过插入肌体内腔的血管内支架或者导管被注入。可以使用任何种类的冠状动脉导管或者灌流导管来施用该组合物。或者，将组合物涂覆于或者浸渍于血管内支架上，所述支架被置于冠状血管内。

[0120] 可以通过例如吸入的方式施用该组合物以进行对肺部感染的治疗。所述组合物以气雾剂喷雾的形式通过压力容器或者压力分配器进行运送，其中含有适当的推进剂，例如气体或者喷雾器，所述气体是例如二氧化碳的气体。

[0121] 本领域技术人员应当理解，通过本发明的方法进行治疗的患者可以是通过上述相同的测试被诊断出患有持续性感染的患者，也可以是未经检查的、由于具备一种或者多种危险因素（例如，与感染性制剂接触，与被感染宿主接触，遗传倾向性，或者呈现出诱发继

发性感染的病理状态）而被鉴定为存在患有持续性感染的高度危险的患者。减少持续性感染的症状或者损伤也可以包括，但不局限于，缓解症状，减小疾病程度，稳定（即，不恶化）病情，延缓或者减慢疾病的发展，以及改善或者减轻病情。可以在保健提供者的严密监督下在家中进行治疗，也可以在保健机构进行治疗。

[0122] 测量免疫应答的方法

[0123] 根据本发明的方法进行治疗之后，测量免疫应答的方法是本领域熟知的。例如可以通过检测细胞因子的生成量、测量 T 细胞的扩增量、测量微生物制剂的清除率、以及测量 CD8+T 细胞的细胞毒性来评价 T 细胞的活性。这些测量方法在例如下述文件中有所描述：美国专利 No.6808710，美国专利申请 Nos.20040137577，20030232323，20030166531，20030064380，20030044768，20030039653，20020164600，20020160000，20020110836，20020107363，以及 20020106730，上述全部文件在此引入作为参考。

[0124] 可选择的，可以通过测量 CD8+T 细胞的扩增（例如，胸苷结合，溴化脱氧尿嘧啶核苷检测，以及细胞周期标记物（例如，Ki67 和 CFSE）的染色，在例如 Dong 等人（于 1999 年在 Nature（《自然》）5：1365-1369）的文章中有所描述）来评价程序性死亡多肽 -1 抑制剂增加 CD8+T 细胞的细胞毒性的能力。在一个实施例中，通过使用程序性死亡多肽 -1 抑制剂、如上所述的初级活化信号、以及 ^{3}H- 胸苷培养纯化 T 细胞来控制 T 细胞的扩增。通过测量胸苷结合来确定 T 细胞的扩增水平。

[0125] 也可以通过溶菌检测（lysis assays）（例如，^{51}Cr 的释放检测或者穿孔素的释放检测或者粒酶的释放检测）、半胱天冬蛋白酶活化的检测、或者测量微生物制剂从被感染宿主中的清除率来评价 CD8+T 细胞的细胞毒性。例如，可以检测治疗前后来自于被感染宿主的生物样品中（例如血清、脾脏、肝脏、肺、或者具有病毒趋向性的组织）的病毒载量。

[0126] 也可以测量细胞因子的生成量，例如干扰素 γ、肿瘤坏死因子 α、以及白细胞介素 -2 的生成量。例如，在程序性死亡多肽 -1 抑制剂以及初级活化信号存在的条件下，对纯化的 T 细胞进行培养。可以对上清液中各种细胞因子的水平进行测定，通过夹心酶联免疫吸附测定方法或者其他惯用的检测方法，例如参见 Dong 等人（于 1999 年在 Nature（《自然》）5：1365-1369）发表的文章。

[0127] 如果需要，可以通过程序性死亡多肽 -1 抑制剂诱发 T 细胞的共刺激的能力来评价它的功效性。例如，体外 T 细胞共刺激的方法包括向表达程序性死亡多肽 -1 的纯化 T 细胞提供第一活化信号或者初级活化信号，该信号来自于抗 CD3 单克隆抗体或者佛波酯，或者来自于 II 型主要组织相容性复合体的相关抗原。之后，可以使用本领域已知的几种常用方法中的任何一种来测定候选化合物制剂减少程序性死亡多肽 -1 的表达或者活性的能力，从而测定该化合物制剂向 T 细胞提供次级信号或者共刺激信号的能力，所述信号是调节免疫功能的必要条件。

[0128] B 细胞的应答可以通过抗原特异性酶联免疫吸附测定法（例如，淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒，人类免疫缺陷型病毒，肺结核或者疟疾）、浆细胞酶联免疫斑点法、记忆性 B 细胞检测法、B 细胞表现型、以及对次级淋巴小结的免疫组织化学分析进行评价。

[0129] 筛选方法

[0130] 本发明提供了一种筛选方法，该方法用于鉴定能够抑制程序性死亡多肽 -1 的表达或者活性的化合物。有效的化合物包括能够抑制程序性死亡多肽 -1 的生物活性或者减

少程序性死亡多肽 -1 的细胞水平的任何制剂。例如，候选化合物可以减少程序性死亡多肽 -1 与程序性死亡多肽 -1 配体、程序性死亡多肽 -1 配体 2 其中之一或者两者的结合。使用这类制剂作为先导化合物，例如，本发明的筛选方法也可以用来鉴定其他新的程序性死亡多肽 -1 特异性抑制剂，该抑制剂具有治疗、缓解、或者预防持续性感染、或者减轻这类感染带来的一种或者多种症状的功效。筛选方法可以包括大规模筛选技术。

[0131] “候选化合物”指的是天然存在的化学制剂或者人工合成的化学制剂。候选化合物可以包括，例如肽，多肽，合成有机分子，天然有机分子，核酸分子，肽核酸分子，以及上述物质中的成分或者衍生物。例如，本发明所述的有效的候选化合物减少程序性死亡多肽 -1 与程序性死亡多肽 -1 配体、程序性死亡多肽 -1 配体 2 其中之一或者两者的结合。

[0132] 可以使用许多方法来完成这样的筛选。在一种方法中，向表达程序性死亡多肽 -1 的细胞培养基中加入不同浓度的候选化合物。“程序性死亡多肽 -1 基因”指的是编码程序性死亡多肽 -1 蛋白的核酸。“程序性死亡多肽 -1 融合基因”指的是程序性死亡多肽 -1 启动子和 / 或与另外一种异源核酸序列形成可操作连接的程序性死亡多肽 -1 编码区域的全部或者一部分。在优选的实施方式中，所述的另外一种异源核酸序列是报道基因，其表达可以被测定 ；报道基因包括，但不局限于，编码葡萄糖苷酸酶 (GUS)、荧光素酶、氯霉素转乙酰酶 (CAT)、绿色荧光蛋白 (GFP)、碱性磷酸酶、以及 β - 半乳糖苷酶的基因。

[0133] 随后，通过例如标准的 Northern 印迹分析或者通过具有适当引物的实时 PCR（聚合酶链式反应）（参见 Ausubel 等人的文章，见上）来测定程序性死亡多肽 -1 的基因表达，Northern 印迹分析使用来自于程序性死亡多肽 -1 核酸分子的任意适当的片段作为杂交探针。将使用候选化合物得到的基因表达水平与不含候选化合物的对照培养基中的水平进行比较。如果需要，可以使用相同的常规方法和标准的免疫技术通过程序性死亡多肽 -1 的水平来测定候选化合物的作用，例如通过 Western 印迹或者利用程序性死亡多肽 -1 特异性抗体的免疫沉淀反应。例如，可以使用免疫检测来探测或者监测程序性死亡多肽 -1 的水平。可以使用以任何标准免疫检测形式存在的（例如，酶联免疫吸附测定或者放射免疫性测定）具有结合程序性死亡多肽 -1 的能力的多克隆抗体或者单克隆抗体来检测程序性死亡多肽 -1 的水平。还可以使用质谱分析、高效液相色谱、分光光度测定技术或者荧光分析技术、或者它们的组合来测定程序性死亡多肽 -1。

[0134] 或者，本发明的筛选方法可以用于鉴定候选化合物，所述候选化合物能够通过减少程序性死亡多肽 -1 与程序性死亡多肽 -1 配体、程序性死亡多肽 -1 配体 2 其中之一或者两者的结合来降低程序性死亡多肽 -1 的生物活性，与未经过处理的对照组相比，减少的量为至少 10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、95％、或者 100％。例如，可以检测候选化合物在天然表达程序性死亡多肽 -1 的细胞中降低程序性死亡多肽 -1 活性的能力，在使用 cDNA 转染程序性死亡多肽 -1 之后，或者在含有程序性死亡多肽 -1 的不含细胞的溶液中，下面将会进一步描述。候选化合物对程序性死亡多肽 -1 的结合作用或者活化作用可以通过放射性结合分析以及非放射性结合分析、竞争性分析、以及受体信号分析来测定。

[0135] 作为一个特殊的实施例，在候选化合物（例如，肽，多肽，合成有机分子，天然有机分子，核酸分子，或者上述物质的组分）存在的条件下培养能够表达编码程序性死亡多肽 -1 的核酸的哺乳动物细胞（例如，啮齿动物细胞）。上述细胞可以内源性表达程序性死

亡多肽 -1，或者可以通过本领域已知的任何标准技术（例如，转染以及病毒感染）将细胞遗传工程化，使其过表达程序性死亡多肽 -1。使用 Western 印迹分析测定这些细胞中程序性死亡多肽 -1 的表达水平，随后与对照细胞中相同蛋白的表达水平进行比较，所述对照细胞是没有与候选化合物进行接触的细胞。能够通过减少程序性死亡多肽 -1 的合成性或者生物活性因而促进其活性水平降低的化合物被认为是能够有效应用于本发明的。

[0136] 在一个特殊的实施例中，根据本发明，能够影响程序性死亡多肽 -1 与程序性死亡多肽 -1 配体、程序性死亡多肽 -1 配体 2 其中之一或者两者的结合（从而降低程序性死亡多肽 -1 的生物活性）、导致免疫应答的增加的化合物是有效的。如果一个分子具有降低程序性死亡多肽 -1 的生物活性的能力，这样的分子可以被用来例如作为治疗剂治疗、减轻、或者预防持续性感染，或者缓解与这类感染相关的一种或者多种症状。作为一个特殊的实施例，候选化合物可以与两种蛋白进行接触，第一种蛋白是与程序性死亡多肽 -1 在本质上等同的多肽，第二种蛋白是程序性死亡多肽 -1 配体或者程序性死亡多肽 -1 配体 2（即，在可以发生结合的条件下与程序性死亡多肽 -1 结合的蛋白，并且这种结合导致降低的免疫应答）。在这种特殊的筛选方法中，在加入候选化合物之后测定两种蛋白之间的相互作用。在加入候选化合物之后，程序性死亡多肽 -1 与第二种多肽的结合的减少（相对于不加入化合物时的结合）表明这种候选化合物具有抑制两种蛋白间的相互作用的能力。最终，本发明所述的筛选方法可以在例如不含细胞的系统或者在酵母双杂交系统中使用。如果需要，可以将两种蛋白中的一种或者候选化合物固定于前述的载体上，或者可以具有一个可探测基团。

[0137] 作为选择的，或者在此基础之上，可以从那些能够特异性结合程序性死亡多肽 -1 并因而抑制程序性死亡多肽 -1 的物质中筛选候选化合物。这类候选化合物的效果取决于其与程序性死亡多肽 -1 相互作用的能力。这种相互作用可以很容易的通过任何标准的结合技术以及功能检测进行测定（例如，那些描述于 Ausubel 等人发表的文章中的方法，见上）。例如，可以在体外测定候选化合物与程序性死亡多肽 -1 的相互作用及结合情况，并且可以通过任何标准检测（例如，这里描述的那些方法）来测定其调节免疫应答的能力。

[0138] 例如，可以使用基于色谱的技术鉴定结合于程序性死亡多肽 -1 的候选化合物。例如，使用标准技术从工程化细胞中纯化重组程序性死亡多肽 -1（例如，通过上面描述的方法），该工程化细胞表达程序性死亡多肽 -1，并且将重组程序性死亡多肽 -1 固定于柱上。之后，让候选化合物溶液流经该柱，由于具有与程序性死亡多肽 -1 结合的能力，特异于程序性死亡多肽 -1 的化合物被鉴定出来并被固定于柱上。为了分离上述化合物，对柱进行清洗以除去非特异性结合的分子，然后将目标化合物从柱中分离并且被收集。如果需要，通过这种方法（或者通过其他任何适当的方法）分离的化合物可以被进一步纯化（例如，通过高效液相色谱法）。

[0139] 新抑制剂的筛选以及先导化合物的优化可以通过下述方法进行评价，例如通过使用标准技术评价它们调节细胞毒性 T 细胞活性的能力或者调节免疫应答的能力来进行评价。除此之外，可以检测这些候选化合物作为抗微生物制剂（例如，上面所描述的）的能力。通过这种方法分离的化合物也可以被用来作为治疗剂治疗、减轻、或者预防持续性感染，或者缓解这类感染带来的一种或者多种症状。被鉴定为与程序性死亡多肽 -1 以小于或者等于 10mM 的亲合常数相结合的化合物被认为在本发明中是格外有效的。

[0140] 可能的治疗剂包括有机分子，肽，模拟肽，多肽，以及与编码程序性死亡多肽 -1 的核酸序列或者多肽相结合并因此抑制或者消除程序性死亡多肽 -1 活性的抗体。可能的抗微生物制剂还包括与这类多肽结合并且占用这类多肽的结合位点并因此阻止其与细胞结合分子相结合的小分子，这种方式阻止了其正常的生物活性。其他可能的抗微生物制剂包括反义分子。

[0141] 诊断方法和预测方法

[0142] 对肿瘤，例如血管 T 细胞淋巴瘤或者结节性淋巴细胞为主型的霍奇金淋巴瘤的探测是通过检查测试样品（即，来自于患者的样品）中的程序性死亡多肽 -1 含量来完成的。与对照样品相比，程序性死亡多肽 -1 水平的变化意味着宿主体内存在肿瘤。相对于对照样品而言，这种变化可以是程序性死亡多肽 -1 的增加或者减少。所述的对照样品是通过与测试样品相似的方式制备得到的（即，分离得到的）。

[0143] 样品是例如血液、血清、acsites fluid、尿液、或者其他体液。优选的该样品是 T 细胞或者 B 细胞。

[0144] 测定测试样品中的程序性死亡多肽 -1 的量，并且与正常对照水平的表达进行比较。正常对照水平指的是不存在肿瘤的宿主中通常存在的程序性死亡多肽 -1 的表达水平。来自于患者的样品中增加的程序性死亡多肽 -1 水平意味着该宿主患有肿瘤，或者存在患有肿瘤的危险。相反的，当以预防为目的应用本方法时，来自于患者的样品中相似水平的或者降低水平的程序性死亡多肽 -1 意味着该宿主不存在肿瘤或者不存在患有肿瘤的危险。来自于患者的样品中增加的程序性死亡多肽 -1 水平意味着该宿主患有肿瘤，或者存在患有肿瘤的危险。

[0145] 程序性死亡多肽 -1 的量的变化是统计学显著的。统计学显著指的是这种变化大于仅仅是偶然产生的变化。统计学显著性可以通过本领域已知的方法来确定。例如可以使用 p 值来确定统计学显著性。p 值是指在一个试验中由偶然因素导致的组间差别的概率值。($P(Z \geq Z_{观察})$)。例如，p 值为 0.01 指的是有百分之一的结果是由偶然因素导致的。p 值越低，表明组间差别更可能是由于不同处理方式而导致的。如果 p 值至少为 0.05，则表明这种变化是统计学显著的。优选的，p 值是 0.04，0.03，0.02，0.01，0.005，0.001 或者更低。

[0146] 试验、检测、或者方法的“诊断准确率”表示该试验、检测或者方法鉴别患有肿瘤、或者存在患有肿瘤的危险的患者的能力，所述“诊断准确率”是根据患者是否具有“临床显著存在的”程序性死亡多肽 -1 来决定的。“临床显著存在”指的是患者体内（通常是指来自于患者的样品）存在的程序性死亡多肽 -1 高于或者低于预定的点值（或者阈值），因此表明该患者患有肿瘤，这种相当高的蛋白水平是一种标记。

[0147] 术语“高度诊断准确率”以及“相当高度的诊断准确率”指的是借助预定点值对程序性死亡多肽 -1 进行测定的试验或者检测能够准确的（精确的）指示出肿瘤的存在或者不存在。优秀的试验应当具有优秀的准确率。因此，对于糖尿病患者来说，该试验只能显示出阳性试验结果，而无法将任何患者报告为“阴性”（不存在“假阴性”）。换句话说，该试验的“灵敏性 (sensitivity)”（实际阳性率）应当是 100％。另一方面，对于非糖尿病患者来说，该试验只能显示出阴性试验结果，而无法将任何患者报告为“阳性”（不存在“假阳性”）。换句话说，“特异性 (specificity)”（实际阴性率）应当是 100％。参见例如，O’Marcaigh AS，Jacobson RM 于 1993 年发表的文章“Estimating The Predictive Value Of A Diagostic

Test，How To Prevent Misleading Or Confusing Results(《估算诊断试验的预测值，防止产生误导和混乱的结果》)”，Clin.Ped.32(8)：485-491，该文章中讨论了在试验例如临床诊断试验中的特异性、灵敏性、以及阳性预测值和阴性预测值。

[0148] 改变试验（或者检测）的点值或者阈值通常会改变灵敏性和特异性，这种改变呈定性反比关系。例如，当点值减小时，参与试验的更多个体将会产生高于该点值或者阈值的试验结果。由于产生高于点值的试验结果的个体被认为患有被检测的疾病、状况或者症状，降低点值会导致更多的个体被认为是具有阳性结果的（即，他们患有肿瘤）。因此，与实际患有肿瘤的个体比例相比，会有更高比例的个体被该试验指定为患有肿瘤。因此，该试验的灵敏性（实际的阳性率）会增加。然而，与此同时，更多的假阳性会出现，因为更多实际上不存在疾病、状况、或者症状的人（即，实际上是“阴性”的人）会被该试验指定为具有高于点值的程序性死亡多肽-1，因而被报告为阳性（即，存在疾病、状况或者症状），而不会通过试验被准确的诊断为阴性。因此，该试验的特异性（实际的阴性率）会降低。类似的，升高点值将会导致降低的灵敏性和增大的特异性。因此，在评价一个用于诊断患者状况的医学试验、检测或者方法的时候，应当既考虑到灵敏性也考虑到特异性，并且要留意这种灵敏性和特异性是在何种点值的情况下测定的，因为灵敏性和特异性可以随着点值范围的变化而发生显著变化。

[0149] 然而，存在一种指示物，它能够用一个单一的数值代表全部点值范围内的试验、检测、或者方法的灵敏性和特异性。这种指示物是被讨论的试验、检测、或者方法的接受物操作特性(“ROC”)曲线。参见例如Shultz的文章“Clinical Interpretation Of Laboratory Procedures(《实验室工作程序的临床释义》)，第14章，Teitz的Fundamentals of Clinical Chemistry(临床化学基本原理)，Burtis和Ashwood(eds.编辑)，4thedition(第四版)，1996年，W.B.Saunders Company，192-199页；以及Zweig等人于1992年在Clin.Chem(临床化学)38(8)：1425-1428中发表的文章“ROC Curve Analysis：An Example Showing The Relationships Among Serum Lipid And Apolipoprotein Concentrations In Identifying Patients With Coronary Artery Disease(《接受物操作特性曲线分析：一个能够在诊断冠心病患者的方法中表示出血清油脂与阿朴脂蛋白浓度关系的例子》)”。

[0150] 接受物操作特性(ROC)曲线是一个x-y图，y轴表示灵敏性，其刻度在0到1(即100％)之间，灵敏性数值与1减去特异性得到的数值相反，特异性在x轴表示，其刻度在0到1(即100％)之间。换句话说，这是一个关于试验、检测或者方法的实际阳性率与假阳性率的图线。为了构建被讨论的试验、检测、或者方法的接受物操作特性(ROC)曲线，使用一种特别准确的方法或者“黄金标准”方法对患者进行评价，该方法不同于被讨论的试验、检测、或者方法，以确定患者针对于某种疾病、状况、或者症状来说实际上是阳性还是阴性(例如，冠状动脉血管造影术是用于检测冠状动脉粥样硬化的黄金标准方法)。同时使用被讨论的试验、检测或者方法对患者进行检查，针对于不同的点值，这些患者被诊断为属于阳性或者阴性。针对每个点值，得到一个灵敏性(实际的阳性率)数值以及一个1减去特异性得到的数值(该值等于假阳性率)，将每对x-y值作为一个点画在x-y图表中。连接这些点得到的“曲线”就是接受物操作特性(ROC)曲线。

[0151] 在曲线下的区域(“AUC”)就是以一个单一的数值代表全部点值范围内的试验、检测、或者方法的灵敏性和特异性的指示物。最大的曲线下区域(AUC)是1，最小的区域是二

分之一。曲线下区域越接近 1，表明试验的准确率越高。

[0152] “高度的诊断准确率”指的是试验或者检测（例如本发明所述的确定临床显著存在的程序性死亡多肽 -1、进而诊断出是否存在糖尿病的试验）的 AUC（该试验或者检测的 ROC 曲线下的区域）为至少 0.70，希望是至少 0.75，更希望是至少 0.80，优选至少 0.85，更优选至少 0.90，最优选至少 0.95。

[0153] “相当高度的诊断准确率”指的是试验或者检测的 AUC（该试验或者检测的 ROC 曲线下的区域）为至少 0.875，希望是至少 0.90，更希望是至少 0.925，优选至少 0.95，更优选至少 0.975，最优选至少 0.98。

[0154] 可选择的，也可以测定其他已知的生物标记物对特定肿瘤的表达来进一步指示宿主是否患有肿瘤。例如，测定 CD10，bcl-6，CD20，CD57，或者 CXCR5。

[0155] 可以使用任何适当的方式测定程序性死亡多肽 -1 以及其他生物标记物，但是通常使用下述方法进行测定：将来自于患者的样品与抗体进行接触，该抗体结合于程序性死亡多肽 -1 或者生物标记物，之后，测定是否生成反应产物。所述的抗体可以是单克隆抗体，多克隆抗体，嵌合抗体，或者是它们的片段，正如上面详细讨论过的，可以使用任何适当的免疫检测方法对反应产物进行探测。来自于患者的样品通常是如上所述的生物液，可以使用上述方法中使用过的相同的生物液样品。

[0156] 可以利用程序性死亡多肽 -1 的表达监测肿瘤的治疗过程。在该方法中，提供来自于经过治疗的宿主的生物样品，所述的治疗是例如针对肿瘤的外科手术治疗、化疗或者激素治疗。如果需要，在治疗前、治疗中、或者治疗后的不同时间点从宿主中提取生物样品。然后，测定程序性死亡多肽 -1 的表达，并与参考组进行对照，参考组是例如肿瘤病情已知的对照组。对参考样品进行治疗。或者，不对参考样品进行治疗。可选择的，先进行上述测定，为第二期 (second look) 外科观察操作及随后的外科观察操作做准备。例如，从已经接受了肿瘤的初级外科治疗以及随后的抗肿瘤制剂治疗的宿主中提取样品，以监测治疗进程。

[0157] 如果参考样品来自于不存在肿瘤的宿主，当测试样品中的程序性死亡多肽 -1 的量与参考样品相似或者有所减少时，表明该治疗是有效的。然而，当测试样品中的程序性死亡多肽 -1 的量与参考样品相比有所增加时，表明该治疗没有取得有效的临床成果或者预后。

[0158] “有效的”指的是该治疗导致程序性死亡多肽 -1 的量的减少，或者导致宿主体内的肿瘤的大小、传播、或者转移可能性被减小。使用标准临床技术对肿瘤进行评价。有效性是使用诊断或者治疗特定肿瘤的任何已知方法进行测定的。也可以利用程序性死亡多肽 -1 的表达来鉴定能对全身系统治疗产生应答的宿主，所述的全身系统治疗例如化疗、激素治疗或者放射治疗。在该方法中，在对宿主进行肿瘤外科手术治疗之前，从该宿主中提取生物样品。然后，测定程序性死亡多肽 -1 的表达，并且与来自于经过肿瘤外科切除术后的宿主的生物样品进行比较。如果在外科切除肿瘤之后程序性死亡多肽 -1 的量减少了，表明该患者可能对全身系统治疗产生了应答性。相反，如果在外科切除肿瘤之后程序性死亡多肽 -1 的量保持不变或者增加了，表明该患者可能没有对全身系统治疗产生应答性。

[0159] 可以使用本领域已知的任何方法通过蛋白或者核酸的水平来测定程序性死亡多肽 -1 或者其他肿瘤生物标记物的表达。例如，可以使用 Northern 杂交分析来测定基因表达，这种杂交分析使用的探针能够特异性识别这些序列中的一种或者多种。或者，使用逆转

录 PCR 技术对表达进行测定，例如使用特异于不同的基因表达序列的引物。也可以通过检测蛋白水平来测定表达，即测定由上述基因产物编码的肽的水平或者活性。这种方法是本领域已知的，包括例如基于针对上述基因编码的蛋白的抗体的免疫检测。可以使用任何生物材料来检测 / 量化所述蛋白或者其活性。或者，可以根据每种被检测蛋白的活性选择适当的方法来测定由标记基因编码的蛋白的活性。

[0160] 宿主优选是哺乳动物。所述哺乳动物是例如人类，非人类的灵长类，鼠类，狗，猫，马，或者牛。宿主通常是人类女性或者人类男性。该宿主之前被诊断为患有肿瘤，并且可能已经接受了肿瘤治疗。或者，该宿主之前没有被诊断为患有肿瘤。本发明能够有效应用于存在患有肿瘤危险的全部患者中。尽管每个种类的肿瘤都具有各自不同的危险因素，诱发肿瘤的危险随着年龄、性别、种族、个人病史及家族病史而增加。其他的危险因素与生活方式非常相关，同时某些感染、职业性照射以及某些环境因素也能够诱发肿瘤。

[0161] 通常通过质谱鉴定来诊断肿瘤，但也可以通过其他方式例如放射线诊断或者超声波诊断。通常使用肿瘤细胞减灭术进行治疗，然后使用抗肿瘤制剂进行治疗，抗肿瘤制剂例如多烯紫杉醇，长春瑞滨，吉西他滨，卡培他滨，或者环磷酰胺、氨甲喋呤和氟尿嘧啶的组合物；环磷酰胺、阿霉素（亚德利亚霉素）和氟尿嘧啶的组合物；阿霉素（亚德利亚霉素）和环磷酰胺的组合物；阿霉素（亚德利亚霉素）和环磷酰胺、紫杉醇、阿霉素，并且通过连续超滤 (CMF) 处理；或者环磷酰胺，表柔比星和氟尿嘧啶。除此之外，许多患者还需要接受放射治疗。

[0162] 根据本发明实施的免疫检测可以是同源检测或者是异源检测。在同源检测中，免疫反应通常包括特异性抗体（例如，程序性死亡多肽 -1）、标记分析物、以及待测样品。从标记分析物发出的信号在抗体与标记分析物结合处经过直接的或者间接的修饰。上述免疫反应以及对该反应程度的检测反应是在同源溶液中进行的。可以使用的免疫化学标记物包括自由基、放射性同位素、荧光染料、酶、抗菌素、或者辅酶。

[0163] 在异源检测方法中，使用的试剂通常是样品、抗体、以及能够生成可探测信号的工具。可以使用前面描述的样品。所述抗体通常被固定化于载体例如珠、平板或者载玻片上，并且与被怀疑为含有抗原的液相样本相接触。然后，从液相中分离出载体，并且使用能够产生可探测信号的工具在载体相或者液相中检测信号。这种信号与样品中存在的分析物有关。能够产生可探测信号的工具包括放射性标记、荧光标记、或者酶标记。例如，如果待测抗原上含有第二个结合位点，那么结合于该位点之上的抗体可以与一个可探测基团共轭连接，并且在分离步骤之前被加入到液相反应溶液中。存在于固体载体上的可探测基团表明在被测试样品中含有抗原。合适的免疫检测的例子是放射性免疫检测、免疫荧光方法、或者酶联免疫测定。

[0164] 本领域技术人员熟知能够有效用于上述方法中的许多特异性免疫测定方法以及由上述方法改变而来的方法。通常可参见 E.Maggio 于 1980 年所著的 Enzyme-Immunoassay（《酶法免疫检测》）(CRC Press，Inc.，Boca Raton，Fla.）；也可以参见 Skold 等人申请的、名称为“Methods for Modulating Ligand-Receptor Interactions and their Application（《调节配体 - 受体间相互作用的方法及这类方法的应用》）”的美国专利 No.4727022，Forrest 等人申请的、名称为“Immunoassay of Antigens（《抗原的免疫检测》）”的美国专利 No.4659678，David 等人申请的、名称为“Immunometric Assays Using

Monoclonal Antibodies(《使用单克隆抗体的免疫测量分析》)”的美国专利No.4376110，Litman等人申请的、名称为“Macromolecular Environment Control in Specific Receptor Assays(《特异性受体检测中的大分子环境控制》)”的美国专利No.4275149，Maggio等人申请的、名称为“Reagents and Method Employing Channeling(《使用通道的试剂以及方法》)”的美国专利No.4233402，以及Boguslaski等人申请的、名称为“Heterogeneous Specific Binding Assay Employing a Coenzyme as Label(《利用辅酶作为标记的异源特异性结合分析》)”的美国专利No.4230767。使用已知的技术例如沉淀法将抗体共轭结合于用于诊断检测的适当固体载体上（例如，珠，平板，载玻片或者孔，由例如乳胶或者聚苯乙烯的材料制成）。也可以使用已知的技术将这里描述的抗体共轭结合到可探测基团例如放射性标记（例如，35S，125I，131I）、酶标记（例如，辣根过氧化物酶，碱性磷酸酯酶）、以及荧光标记（例如，荧光素）之上。

[0165] 用于实施上述方法的诊断试剂盒可以通过许多方法来制备。在一种实施方式中，该诊断试剂盒包括(a)共轭结合于固体载体上的抗体（例如，程序性死亡多肽-1）以及(b)共轭结合于可探测基团上的另一个抗体。该试剂也可以包括助剂例如缓冲剂以及蛋白稳定剂例如多糖以及类似物。如果需要的话，该诊断试剂盒可以进一步包括：含有可探测基团的信号生成系统中的其他成员（例如，酶作用底物），减少试验背景干扰的制剂，控制剂，进行试验的仪器，以及类似物。或者，试验试剂盒包括(a)抗体，以及(b)针对共轭结合于可探测基团的抗体的特异性结合伙伴。该试剂盒也可以包括前面描述的助剂。可以以任何适当的形式包装该试验试剂盒，典型的将所有组分装在一个容器中，并且装入用于说明如何进行试验的说明书。

[0166] 本发明将下面描述的实施例作为部分基础。这些实施例的目的在于描述本发明，并不构成对发明的限制。

[0167] 实施例1：抗程序性死亡多肽-1配体抗体对慢性感染小鼠中程序性死亡多肽-1途径的抑制

[0168] 使用经过不同的淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)菌株感染的小鼠，来研究慢性病毒感染对CD8阳性T细胞功能的影响。淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)Armstrong菌株引起的急性感染能够在8天内被清除，留下一批长期存活的、具备高度功能性的休眠记忆性CD8阳性T细胞。相反，LCMV C1-13菌株在宿主中形成持续性感染，表现为能够持续3个月的病毒血。这种病毒不确定的停留在某些组织中，因而抗原特异性CD8阳性T细胞的功能被削弱。$D^bNP396-404$CD8阳性T细胞被物理性删除，而$D^bGP33-41$ CD8阳性T细胞以及$D^bGP276-286$ CD8阳性T细胞依然存在，但是丧失了扩增或者分泌抗病毒细胞因子例如干扰素-γ(IFN-γ)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)的能力。

[0169] C57BL/6小鼠购买自National Cancer Institute(国家肿瘤学会)(Frederick，MD)。使用2×10^6pfu个LCMV-C1-13对小鼠进行感染。在感染当天以及感染后的第二天，注射存在于PBS(磷酸缓冲液)中的500微克GK(杂交瘤细胞)1.5，以造成CD4缺失。通过给小鼠注射2×10^5pfu个LCMV Armstrong来获得淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)免疫型小鼠。

[0170] 对经过FACS(流式细胞术)纯化的天然$D^bGP33-41$特异性P14转基因CD8阳性T细胞、来自于LCMV Armstrong免疫型小鼠的DbGP33-41特异性记忆性CD8阳性T细胞、以及来

自于CD4阳性缺陷型LCMV C1-13感染型小鼠的$D^bGP33-41$CD8阳性T细胞以及$D^bGP276-286$ CD8阳性T细胞进行基因排列分析。使用如Kaech等人（于2002年在Cell(《细胞》)111：837-51中）描述的方法进行RNA分离和基因排列分析。与记忆性CD8阳性T细胞相比，程序性死亡多肽-1mRNA在衰竭的CD8阳性T细胞中高度表达（附图1A)。而且，程序性死亡多肽-1表达于LCMV C1-13感染型小鼠的CD8阳性T细胞表面，但经过LCMV Armstrong清除后，CD8阳性T细胞表面不存在程序性死亡多肽-1（附图1B)。与未感染的小鼠相比，慢性感染型小鼠在大部分淋巴细胞和抗原呈递细胞(APC)上表达了更高水平的程序性死亡多肽-1配体、程序性死亡多肽-1配体中的一种。因此，当程序性死亡多肽-1的表达被诱发时，伴随着病毒抗原的持续性存在以及CD8阳性T细胞的衰竭。

[0171] 为了验证在慢性淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒感染过程中阻滞程序性死亡多肽-1/程序性死亡多肽-1配体的路径能够恢复T细胞功能并且增强对病毒的控制，在慢性淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒感染过程中使用αPD-L1封闭抗体阻断程序性死亡多肽-1/程序性死亡多肽-1配体的共刺激。在感染后的第23天至第37天里，每隔三天向LCMV C1-13感染型小鼠（克隆10F.5C5或者10F.9G2)施用抗程序性死亡多肽-1配体的封闭单克隆抗体(200微克鼠用抗鼠类PD-L1 IgG2b单克隆抗体)。在第37天时，与未经处理的对照组相比，经过处理的小鼠中的$D^bNP396-404$特异性CD8阳性T细胞增加了大约2.5倍，而$D^bGP33-41$特异性CD8阳性T细胞增加了大约3倍（附图2A)。由于经过处理的小鼠和未经处理的小鼠的脾脏中具有大致相同数量的CD4+T细胞（每个脾脏中含有大约6×10^4个$IA^bGP61-80$ CD4+T细胞)，因而诱发的扩增是特异于CD8阳性T细胞的。

[0172] 除了CD8+T细胞扩增的增加，程序性死亡多肽-1信号的抑制也可以导致病毒特异性CD8阳性T细胞中的抗病毒细胞因子产量的增加。测定由CD8+T细胞在8个不同的CTL(细胞毒性T淋巴细胞）抗原决定基上生成的干扰素-γ(IFN-γ)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)。与未经处理的小鼠相比，经过处理的小鼠的联合应答高出了2.3倍（附图2B和2C)。在接受治疗之后，也观察到生产肿瘤坏死因子-α(TNF-α）的细胞的频率增加了2倍（附图2D)。病毒清除率也加速了，病毒从经过处理的小鼠的血清、脾脏和肝脏中清除了。在感染后的第37天（开始治疗后的第14天)，在经过治疗的小鼠的肺和肾内观察到降低的病毒滴度（大约10倍)。然而，未经处理的小鼠的上述全部组织内都显示出高水平的病毒（附图2E)。根据Ahmed等人（于1984年在J.Virol.51:34-41中）描述的方法利用Vero细胞测定血浆和组织匀浆中的病毒滴度。结果表明程序性死亡多肽-1抑制剂增加CD8+T细胞的扩增和病毒清除率，因此表明程序性死亡多肽-1信号的抑制能够恢复CD8+T细胞的功能。并且，程序性死亡多肽-1信号的抑制也可以增加B细胞的应答，因为在接受治疗后，脾脏中淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒特异性抗体分泌细胞的数量也增加了（大约10倍)。

[0173] CD4阳性($CD4^+$)T细胞在CD8+T细胞应答的产生和维持中起到了重要的作用。在这点上，当CD4+T细胞缺失时，待发的CD8+T细胞（所谓的“无功能型”CD8+T细胞）不能激发正常的免疫应答。并且，当CD4+T细胞缺失时，慢性淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒感染更加严重。因此，与CD4+T细胞的存在下生成的T细胞相比，在LCMV-C1-13感染中生成的无功能型T细胞表现出更严重的功能削弱。$D^bNP396-404$特异性CD8阳性T细胞被删除到无法探测的水平，而$D^bGP33-41$ CD8阳性T细胞和$D^bGP276-286$ CD8阳性T细胞完全丧失了分泌

干扰素 - γ (IFN- γ)、肿瘤坏死因子 - α (TNF- α) 的能力。

[0174] 当被 LCMV-C1-13 感染时，CD4 阳性 T 细胞发生了缺失，在感染发生后的第 46 天至第 60 天时，使用抗程序性死亡多肽 -1 配体抗体处理小鼠。在处理前后使用细胞内干扰素 - γ 染色不能探测到 LCMV- 特异性 CD4 阳性 T 细胞。在接受处理之后，与未经处理的小鼠相比，处理过的小鼠的脾脏内的 $D^bGP276-286$ CD8 阳性 T 细胞增加了大约 7 倍，$D^bGP33-41$ CD8 阳性 T 细胞增加了 4 倍 (附图 3A)。脾脏中的病毒特异性 CD8 阳性 T 细胞的数量也增加了 (附图 3B)。处理过的小鼠的病毒特异性 CD8 阳性 T 细胞的增加归因于扩增的增加，是通过导入溴化脱氧尿嘧啶核苷 (BrdU) 来检测的。对于未经处理的小鼠而言，向 43％的 $D^bGP276-286$ CD8 阳性 T 细胞中导入中间水平的溴化脱氧尿嘧啶核苷 (BrdU)，向 2％的 $D^bGP276-286$ CD8 阳性 T 细胞中导入高水平的溴化脱氧尿嘧啶核苷 (BrdU)，而对于经过处理的小鼠而言，向 50％的 $D^bGP276-286$ CD8 阳性 T 细胞中导入中间水平的溴化脱氧尿嘧啶核苷 (BrdU)，向 37％的 $D^bGP276-286$ CD8 阳性 T 细胞中导入高水平的溴化脱氧尿嘧啶核苷 (BrdU)。在处理过程中，导入 1 毫克 / 毫升溴化脱氧尿嘧啶核苷 (BrdU) 的饮用水溶液来进行溴化脱氧尿嘧啶核苷 (BrdU) 分析，并且根据操作者规程 (BD Biosciences，San Diego，CA) 来进行染色。而且，经过处理的小鼠含有更高百分含量的 CD8 阳性 T 细胞表达细胞周期相关蛋白 Ki67(60％比 19％，19％是未经处理的小鼠得到的结果，附图 3C)。在外周血单个核细胞中，CD8 阳性 T 细胞对处理的应答限制小鼠产生高水平的 CD8 阳性 T 细胞扩张。

[0175] 程序性死亡多肽 -1 的抑制同样增加了无功能型、衰竭的病毒特异性 CD8 阳性 T 细胞中抗病毒细胞因子的产生。在接受治疗后，产生干扰素 - γ (IFN- γ) 的 $D^bGP33-41$ CD8 阳性 T 细胞和 $D^bGP276-286$ CD8 阳性 T 细胞的数量显著增加了 (附图 4A)，尽管在经过处理的小鼠中也检测到更高数量的 $D^bNP396-404$ 特异性 CD8 阳性 T 细胞、$K^bNP205-212$ 特异性 CD8 阳性 T 细胞、D^bNP 166-175 特异性 CD8 阳性 T 细胞、以及 $D^bGP92-101$ 特异性 CD8 阳性 T 细胞 (附图 4A)。经过处理的小鼠中有 50％的 $D^bGP276-286$ 特异性 CD8 阳性 T 细胞能够生成干扰素 - γ (IFN- γ)，而在作为对照的未经处理的小鼠中有 20％的 $D^bGP276-286$ 特异性 CD8 阳性 T 细胞能够生成干扰素 - γ (IFN- γ) (附图 4B)。然而，由经过处理的小鼠的 $D^bGP276-286$ 特异性 CD8 阳性 T 细胞生成的干扰素 - γ (IFN- γ)、肿瘤坏死因子 - α (TNF- α) 的水平低于功能性 $D^bGP276-286$ 特异性记忆细胞 (附图 4C)。

[0176] 程序性死亡多肽 -1 的抑制也可以增加无功能型、衰竭的病毒特异性 CD8 阳性 T 细胞的细胞溶解酶活性。在进行治疗之后，使用 ^{51}Cr 释放检测 (Wherry 等人于 2003 年在 J.Virol.77 :4911-27 中发表的文章) 对病毒特异性 CD8 阳性 T 细胞的体外细胞溶解酶活性进行测定。与未经处理的小鼠相比，经过 2 周的治疗后，脾脏中的病毒滴度降低了大约 3 倍，肝脏中的病毒滴度降低了大约 4 倍，肺中的病毒滴度降低了大约 2 倍，而血清中的病毒滴度降低了大约 2 倍 (附图 4E)。

[0177] 这些结果证明了阻滞程序性死亡多肽 -1 途径能够细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 对慢性病毒感染的外周免疫耐受，因此丧失了 CD4 阳性 T 细胞功能的衰竭的 CD8 阳性 T 细胞并不是被不可逆灭活的。

[0178] 实施例 2 :抗病毒疫苗以及程序性死亡多肽 -1 抑制剂的施用

[0179] 在持续性感染过程中，推动 T 细胞应答的一种方法是治疗性的接种疫苗。该方法的基本原理是，在慢性病毒感染过程中，内源性抗原可能不能以最佳形式或者免疫原的形

式存在，因而以疫苗的形式提供抗原可以提供一种对病毒特异性 T 细胞和 B 细胞来说更加有效的刺激因素。使用慢性淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒 (LCMV) 小鼠模型，向小鼠施用表达 LCMV GP33 抗原决定基的重组牛痘病毒作为治疗性疫苗 (VVGP33)，该疫苗能够在某些慢性感染型小鼠中适度增强 CD8+T 细胞的应答。在接种了治疗性疫苗的小鼠中，有九分之五的慢性感染型小鼠表现出阳性应答，而在对照组小鼠中没有表现出对 GP33 的免疫应答的显著增加。当将这种治疗性疫苗的接种与程序性死亡多肽 -1 抑制剂联合使用时，与单独使用任何一种处理相比，淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒 (LCMV) 特异性 T 细胞的应答被推动到一个更高的水平，这种组合处理的作用比两种单独作用的叠加更加明显。

[0180] 实施例 3 ：程序性死亡多肽 -1RNAi 对慢性感染型小鼠的程序性死亡多肽 -1 途径的抑制

[0181] RNA 干扰 (RNAi) 能够沉默哺乳动物细胞中的基因表达。将长的双链 RNAS(dsRNAs) 导入细胞中，并且继续处理成小的、沉默 RNAs(siRNAs)，后者能够作用于特异性 mRNA 分子或者小基团 mRNAs。当抗体不具备功能性时，这项技术尤其有效。例如，当单一拼接变体 (unique splice variants) 生成可溶性的程序性死亡多肽 -1 以及细胞毒性 T 淋巴细胞抗原 -4(CTLA-4) 时，可以使用 RNAi。

[0182] 将程序性死亡多肽 -1 沉默 RNAs 插入商业购买的 siRNA 表达载体例如 pSilencer™ 表达载体或者腺病毒载体中 (Ambion，Austin，TX)。之后，在体内或者体外将这些载体与目标衰竭的 T 细胞相接触 (参见实施例 4)。

[0183] 实施例 4 ：衰竭性 T 细胞的体外复壮

[0184] 使用磁性珠或者密度梯度离心方法，将病毒特异性衰竭 CD8 阳性 T 细胞从 LCMV-C1-13 慢性感染型小鼠中分离出来。将转染的 CD8 阳性 T 细胞与作用于程序性死亡多肽 -1 配体、程序性死亡多肽 -1 配体 2 或者程序性死亡多肽 -1 的单克隆抗体相接触。如实施例 1 中所述，程序性死亡多肽 -1 途径的抑制导致 CD8 阳性 T 细胞的复壮。因此，例如 CD8+T 细胞的扩增和细胞因子的生成被增加了。使用实施例 1 中描述的方法，将这些复壮的 CD8 阳性 T 细胞重新导入感染型小鼠中，并测定其病毒载量。

[0185] 实施例 5 ：新的 CD8 阳性 T 细胞复壮化合物的体外筛选

[0186] 可以使用体内筛选或者体外筛选的方法来鉴定能够调节程序性死亡多肽 -1 途径的化合物，这种鉴定基于它们逆转 CD8 阳性 T 细胞衰竭的能力，这种衰竭是由慢性病毒感染导致的。

[0187] 衰竭的 CD8 阳性 T 细胞来自于经过 LCMV-C1-13 慢性感染的小鼠，之后将其与试验化合物进行接触。使用例如 ELISA(酶联免疫吸附测定) 或者其他定量方法测量从接触的 T 细胞中释放的抗病毒细胞因子 (例如，干扰素 -γ 或者肿瘤坏死因子 -α) 的数量，并且与未接触过试验化合物的衰竭 T 细胞中释放的抗病毒细胞因子的数量相比较，如果后者能够释放出抗病毒细胞因子的话。与未经过处理的细胞释放的量相比，处理过的细胞释放出的抗病毒细胞因子的数量的增加证明了该化合物是一种程序性死亡多肽 -1 抑制剂，能够有效的调节 T 细胞活性。

[0188] 实施例 6 ：新的 CD8 阳性 T 细胞复壮化合物的体内筛选

[0189] 衰竭的 CD8 阳性 T 细胞来自于经过 LCMV-C1-13 慢性感染的小鼠。给感染型小鼠静脉内注射试验化合物。使用例如 ELISA(酶联免疫吸附测定) 或者其他定量方法测量释

放到血清当中的抗病毒细胞因子（例如，干扰素 -γ 或者肿瘤坏死因子 -α）的数量，并且测量未经过处理的小鼠血清中的抗病毒细胞因子的数量并进行比较。与未经过处理的小鼠相比，处理过的小鼠血清中检测到的抗病毒细胞因子的数量的增加证明了这种试验化合物是一种程序性死亡多肽 -1 抑制剂。或者，可以在使用试验化合物之前或者之后测定病毒滴度（例如，血清病毒滴度）。

[0190] 实施例 7 ：以黑猩猩作为模型的持续性 HCV(C 型肝炎病毒）感染的免疫治疗

[0191] 将黑猩猩作为人类 C 型肝炎病毒的感染模型。由 T 细胞免疫缺失导致的长期存活性病毒的持续包括 HCV- 特异性 CD4+T 辅助细胞的缺失以及 CD8+T 效应细胞活性的削弱或者改变。用针对细胞毒性 T 淋巴细胞抗原 -4(CTLA-4) 的抗体、针对程序性死亡多肽 -1 的抗体、或者两者的组合对持续感染型黑猩猩进行处理。把阻滞抑制性途径的效用与疫苗的接种相结合，其中接种的疫苗是具有重组结构的 HCV(C 型肝炎病毒）蛋白以及非结构性 HCV(C 型肝炎病毒）蛋白，并且测定这种方案能否增加病毒特异性记忆性 T 细胞的频率以及寿命。在持续性感染型人类和持续性感染型黑猩猩中，T 细胞免疫性的缺失是具有专一的 HCV- 特异性的。检测在 Treg 细胞（调控 T 细胞）存在时，感染型黑猩猩血液和肝脏中的细胞毒性 T 淋巴细胞抗原 -4(CTLA-4)、程序性死亡多肽 -1、B、T 淋巴细胞衰减因子 (BTLA) 及其配体的表达。随后，通过向黑猩猩提供人源化单克隆抗体，恢复其抗病毒活性，所述人源化单克隆抗体能够阻滞这些分子中的信号。

[0192] 使用人源化 α CTLA-4 抗体 (MDX-010，Medarex) 或者 α PD-1 抗体对持续性感染型黑猩猩进行处理。MDX-010 的初始剂量是 0.3 毫克 / 千克，两周之后，该剂量是 1.0 毫克 / 千克，之后以每三周为一个时间间隔，分别是 3 毫克 / 千克、10 毫克 / 千克和 30 毫克 / 千克。在使用抗体处理共刺激分子之后，测定体液和细胞内的免疫应答，以及 HCV(C 型肝炎病毒)RNA 的载量。在第 1、2、3、5、8 周时收集样品，之后以每月为一个时间间隔收集样品。样品包括 :1) 用于分析转氨酶、自身抗体、针对 HCV 的中和抗体、以及细胞因子应答的血清，2) 用于负载病毒和基因组进化的血浆，3) 用于体外测定免疫性、共刺激性 / 抑制性受体的表达和功能的外周血单个核细胞 (PBMC)，4) 用于分离肝内淋巴细胞和 RNA 的新鲜（未固定）肝脏，以及 5) 用于组织学分析和免疫组织化学分析的固定化（福尔马林 / 石蜡包埋的）肝脏。还要在 2 个或者 3 个时间点处收集区域淋巴结，用以通过免疫组织化学技术和分子技术评价共抑制性分子和接合变体的表达。按照这里描述的检测方法对这些治疗的安全性和有效性进行评价。

[0193] 为了确定接种 HCV(C 型肝炎病毒）抗原能够加强程序性死亡多肽 -1 的抗体的治疗有效性，按照如下方法对黑猩猩进行处理 :1) 在第 0 周、第 4 周及第 24 周，使用重组包膜糖蛋白 E1 和 E2（在 MF59 佐剂中）和其他蛋白 (core plus NS3,4,5，由 ISCOMS（免疫刺激复合物）配置成）对黑猩猩进行肌肉内免疫 ;2) 使用 1) 中所述的疫苗对其进行肌肉内免疫，但同时施用 α CTLA-4 抗体（每千克体重施用 30 毫克，在注射疫苗后的第 0 周、第 4 周以及第 24 周时通过静脉内注射方式施用）;3) 与 2) 相同，不同的是使用 α PD-1（或者 B、T 淋巴细胞衰减因子）抗体替代细胞毒性 T 淋巴细胞抗原 -4(CTLA-4) 抗体 ;4) 与 2) 和 3) 步骤相同，不同的是除使用疫苗之外，还使用细胞毒性 T 淋巴细胞抗原 -4 抗体和程序性死亡多肽 -1（或者 B、T 淋巴细胞衰减因子）抗体。在进行免疫之后的 1 年内，以每月为一个时间间隔，监测 HCV- 特异性 T 细胞和 B 细胞的应答。

[0194] 在这项分析中，用于检测 HCV- 四聚体和全部 T 细胞的标记物包括分化标记物（例如，CD45RA/RO，CD62L，CCR7，以及 CD27），活化标记物（例如，CD25，CD69，CD38，以及 HLA-DR（人白细胞位点 DR 抗原）），存活 / 扩增标记物（例如，bcl-2 以及 Ki67），细胞因子潜在标记物（例如，粒酶以及穿孔素），和细胞因子受体标记物 (CD122 以及 CD127)。在趋化因子 IP-10 的预治疗水平与聚乙二醇干扰素 - γ / 病毒唑的应答之间存在有趣的相关性。测定 IP-10 的水平，以研究在阴性调控途径或者 C 型肝炎病毒特异性 T 细胞应答与 IP-10 水平之间存在的潜在相关性。通过流式细胞术来完成抑制性受体和配体在外周血单个核细胞 (PBMC) 上的表达。

[0195] 实施例 8 ：在反应性淋巴组织中的程序性死亡多肽 -1 的免疫染色

[0196] 材料

[0197] 依照制度政策，病例材料 (case material) 来自于 Brigham&Women’s Hosptial，Boston，MA(Brigham 女子医院，波士顿，摩洛哥）。所有诊断都是依据世界卫生组织淋巴瘤分类系统 (Jaffe ES 等人于 2001 年）中描述的组织学特征核免疫表型特征来进行的，在所有的病例中，用于诊断的材料都经过血液病理学家的复查。

[0198] 免疫染色

[0199] 根据先前的描述 (Jones D 等人于 1999 年发表的文章 ；Dorfman DM 等人于 2003 年发表的文章），使用标准的间接亲合素 - 生物素辣根过氧化物酶法以及二氨基联苯胺显色反应进行程序性死亡多肽 -1 的免疫染色，该反应是在用福尔马林固定的、石蜡包埋的组织切片中进行的，在染色反应之前，先在 10mM PH6.0 的柠檬酸盐缓冲液中使用先前描述的抗人类程序性死亡多肽 -1 单克隆抗体 (2H7 ；5) 进行微波抗原修复。如果有至少 25％的肿瘤细胞表现出阳性染色，则认为该病例对程序性死亡多肽 -1 是具有免疫反应性的。在对所有病例的研究中，将程序性死亡多肽 -1 的染色与鼠类 IgG（免疫球蛋白 G) 同形对照抗体的染色进行比对，以证实染色特异性，其中对照抗体是经过稀释的，其具有与程序性死亡多肽 -1 相同的蛋白浓度。

[0200] 针对程序性死亡多肽 -1 的单克隆抗体 2H7 被用来对下列经福尔马林固定的、石蜡包埋的样本进行染色 ：反应性淋巴组织样本、胸腺样本、以及一系列患有 B 细胞和 T 细胞淋巴扩增疾病的病例样本。在扁桃腺样本中表现出反应性变化，包括滤泡增生，次级淋巴小结中的主要小淋巴细胞子集表现出程序性死亡多肽 -1 的细胞质染色，在滤泡内 T 细胞区域中观察到稀少的程序性死亡多肽 -1 阳性细胞。在次级淋巴小结中的程序性死亡多肽 -1 的染色式样实际上与使用针对 CD3 的抗体、泛 T 细胞标记物的染色式样是相同的，而针对 CD20 的抗体、泛 B 细胞标记物则将次级淋巴小结 B 细胞的绝大部分进行了染色。在反应性淋巴结和脾脏的组织切片中也观察到相似的结果。在成熟胸腺中没有观察到程序性死亡多肽 -1 的染色。

[0201] 实施例 9 ：石蜡包埋的 B 细胞和 T 细胞淋巴扩增病变组织切片中的程序性死亡多肽 -1 的免疫染色

[0202] 对一系列 B 细胞和 T 细胞淋巴扩增病变中的程序性死亡多肽 -1 表达进行了研究 ；研究结果概括在表 1 中。检测了 42 例 B 细胞淋巴扩增病变中的程序性死亡多肽 -1 的表达，包括前体 B 淋巴细胞性白血病 / 淋巴细胞性淋巴瘤的典型病例，以及一系列成熟 B 细胞的淋巴扩增病变，包括许多起源于滤泡的 B 细胞非霍奇金淋巴瘤，包括 6 个滤泡性淋巴瘤以及

7 个伯基特氏淋巴瘤。这些 B 细胞淋巴扩增病变中没有一个显示出程序性死亡多肽 -1 的染色。在某些病例中，出现非肿瘤反应性淋巴组织，并且表现出与在扁桃腺及前述提及的其他反应性淋巴组织中观察到的相同的程序性死亡多肽 -1 染色式样。

[0203] 类似的，在 25 例霍奇金淋巴瘤中，包括 11 例经典霍奇金淋巴瘤和 14 例淋巴细胞为主型的霍奇金淋巴瘤，肿瘤细胞中没有表现出程序性死亡多肽 -1 的染色。有趣的是，在全部 14 例淋巴细胞为主型的霍奇金淋巴瘤中，T 细胞周围肿瘤 CD20- 阳性 L&H 细胞对程序性死亡多肽 -1 是具有免疫反应性的，与淋巴细胞为主型的霍奇金淋巴瘤中的 CD57+T 细胞得到的染色式样相似。这些程序性死亡多肽 -1 阳性细胞是全部存在的 CD3+T 细胞群的子集。

[0204] 对一系列 T 细胞淋巴扩增病变中的程序性死亡多肽 -1 表达进行研究；研究结果概括在表 1 中。前体 T 细胞淋巴细胞性白血病 / 淋巴细胞性淋巴瘤、未成熟 T 细胞肿瘤病例中的程序性死亡多肽 -1 是阴性的，它们是外周胸腺后 T 细胞肿瘤，包括 T 细胞幼淋巴细胞性白血病，非特异性外周 T 细胞淋巴瘤，间变性大细胞淋巴瘤，以及成熟 T 细胞白血病 / 淋巴瘤。相反，全部 19 例含有程序性死亡多肽 -1 阳性细胞焦点 (foci) 的血管淋巴瘤病例也对泛 T 细胞标记物例如 CD3 产生免疫反应性。在扩张的 CD21+ 滤泡性树突状细胞 (FDC) 网格结构的焦点 (foci) 处一向存在程序性死亡多肽 -1 阳性细胞，这是血管淋巴瘤的一项重要特征。

[0205] 表 1 ：淋巴扩增病变中的程序性死亡多肽 -1 免疫染色

[0206]

	程序性死亡多肽 -1 免疫染色
B 细胞 LPDs	0/42*
B-LL/LL	0/3
CLL	0/4
MCL	0/4
FL	0/6
MZL	0/3
HCL	0/3
DLBCL	0/6
BL	0/7
LPL	0/3

MM	0/3
霍奇金淋巴瘤	0/25
经典型	0/11
结节性淋巴细胞为主型	0/14**
T 细胞 LPDs	18/55
T-LL/LL	0/5
T-PLL	0/3
AIL	19/19
PTCL,非特异性	0/14
ALCL	0/12
ATLL	0/3

[0207]

[0208] 缩写 :B-LL/LL- 前体 B 细胞淋巴细胞性淋巴瘤 / 淋巴细胞性白血病 ;CLL- 慢性淋巴细胞性白血病 ;MCL- 套细胞淋巴瘤 ;FL- 滤泡性淋巴瘤 ;MZL- 边缘区淋巴瘤 ;HCL- 毛细胞白血病 ;DLBCL- 弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 ;BL- 伯基特氏淋巴瘤 ;LPL- 淋巴浆细胞样淋巴瘤 ;MM- 多发性骨髓瘤 ;T-LL/LL- 前体 T 淋巴细胞性白血病 / 淋巴细胞性淋巴瘤 ;T-PLL-T 细胞幼淋巴细胞性白血病 ;AIL- 血管淋巴瘤 ;PTCL- 非特异性的外周 T 细胞淋巴瘤 ;ALCL- 间变性大细胞淋巴瘤 ;ATLL- 成熟 T 细胞白血病 / 淋巴瘤。

[0209] * 免疫反应性病例的数量 / 病例总数量

[0210] ** 在全部 14 个病例中肿瘤 L&H 细胞共晶组织 (rosettes) 中的程序性死亡多肽 -1 阳性细胞

[0211] 实施例 10 :程序性死亡多肽 -1 在 HIV- 特异性人类 CD8 T 细胞中的表达的一般研究方法

[0212] 使用下述方法完成实施例 11-14 中的试验。

[0213] 研究主体

[0214] 参与研究的慢性 C 亚型 HIV-1 感染型宿主由 McCord Hospital, Durban, South Africa 门诊 (McCord 医院, 德班, 南非), 以及 St.Mary's Hospital, Mariannhill,

South Africa 门诊（圣玛丽医院，Mariannhill，南非）提供。从患有该种感染的 65 个宿主中提取外周血，它们在被分析时是具有抗逆转录病毒治疗天性的 (antiretroviral therapy naïve)。宿主根据它们所表达的、与构建的 10 个 I 级四聚体相匹配的 HLA（人类白细胞抗原）等位基因（见下）来选择内含物。该组中的病毒载量中间值为 42800HIV-1RNA 拷贝数 / 毫升血浆 (163-750000 范围)，绝对 CD4 计数的中间值是 362(129-1179 范围)。不能获得有关感染过程中的信息。全部宿主都签定了关于此项研究的书面知情后同意，并被当地制度评论委员会认可。

[0215] 程序性死亡多肽 -1 抗体及程序性死亡多肽 -1 配体抗体的构建

[0216] 使用先前描述的方法制备单克隆抗体，该抗体能作用于人类程序性死亡多肽 -1 配体 (29E.2A3，鼠类 IgG2b) 以及程序性死亡多肽 -1(EH12，鼠类 IgG1)，并且显示出能够阻断程序性死亡多肽 -1 与程序性死亡多肽 -1 配体间的相互作用。

[0217] MHC（主要组织相容性复合体）I 级四聚体

[0218] 采用如前所述的方法 (Altman JD 等人于 1996 年发表的文章）合成的 10 个 HIV MHC（人类免疫缺陷型病毒主要组织相容性复合体）I 级四聚体被用于进行该项研究：A*0205 GL9(p24，GAFDLSFFL；序列 1)，A*3002 KIY9（整合酶，KIQNFRVYY；序列 2)，B*0801 DI8(p24，DIYKRWII；序列 3)，B*0801 FL8(Nef，FLKEKGGL；序列 4)，B*4201 RM9(Nef，RPQVPLRPM；序列 5)，B*4201 TL9(p24，TPQDLNTML；序列 6)，B*4201 TL10(Nef，TPGPGVRYPL；序列 7)，B*4201 YL9（放射性同位素指示剂，YPGIKVKQL；序列 8)，B*8101 TL9(p24，TPQDLNTML；序列 9)，以及 Cw0304 YL9(p24，YVDRFFKTL；序列 10)。用于表达 A*0205，A*3002 以及 Cw*0304 所构建的质粒由 Drs.Eugene Ravkov and John Altman，NIH Tetramer Core Facility，Atlanta，Georgia(Eugene Ravkov 博士和 John Altman 博士，美国全国卫生研究所四聚体核心研究所，亚特兰大，乔治亚州）友情提供。

[0219] HLA（人类白细胞抗原）I 级四聚体染色以及表型分析

[0220] 在 37℃时，使用四聚体对新鲜分离的外周血单个核细胞 (PBMC，五十万个）进行染色反应 20 分钟。然后使用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤细胞一次，制粒，并直接使用结合了异硫氰酸荧光素 (FITC) 的抗 CD8 抗体 (Becton Dickinson)、结合了藻红蛋白的抗程序性死亡多肽 -1 抗体（克隆型 EH12)、以及 ViaProbe(Becton Dickinson) 对细胞进行染色。在室温下将细胞培育 20 分钟后，使用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤细胞一次，并且使细胞重新悬浮在含有 1％多聚甲醛的 200 微升磷酸盐缓冲液 (PBS) 中，在荧光激活细胞分选仪 (FACSCalibur，Becton Dickinson) 上获得细胞。在荧光激活细胞分选仪 (FACSCalibur) 上最少获得 100000 个细胞。

[0221] CFSE（羧基荧光素双乙酸盐琥珀酸酯）扩增检测

[0222] 使用磷酸盐缓冲液 (PBS) 对一百万个新鲜分离的外周血单个核细胞 (PBMC) 进行洗涤两次，制粒，并且在 37℃时将其重新悬浮在 1 毫升 0.5uM 羧基荧光素双乙酸盐，琥珀酸酯 (CFSE，Molecular Probes) 中保持 7 分钟。使用磷酸盐缓冲液 (PBS) 将细胞洗涤两次后，将细胞重新悬浮在 1 毫升 R10 培养液（补充了谷胱甘肽、盘尼西林、链霉素、以及 10％胎牛血清 [FCS] 的 RPMI 1640) 中，并且置于 24 孔培养板的一个孔中。初步研究表明，最终浓度为 0.2 微克 / 毫升的肽产生了最佳的扩增应答，因此在每个检测中孔中的最终肽浓度为上述值。阴性对照孔中只含有存在于培养液中的外周血单个核细胞 (PBMC)，或者该培养液中

还含有纯化的抗 -PD-L1(10 微克 / 毫升),而阳性对照孔则使用 10 微克 / 毫升的植物血细胞凝集素 (PHA) 进行刺激。将细胞置于 37℃孵化器中培育 6 天之后,使用 2 毫升的磷酸盐缓冲液 (PBS) 对细胞进行洗涤,并且使用结合了 PE 的主要组织相容性复合体 (MHC)I 级四聚体、ViaProbe(Becton Dickinson) 以及抗 CD8-APC 抗体对细胞进行染色。在荧光激活细胞分选仪 (FACSCalibur) 上收集细胞,并且使用 CellQuest^{R} 软件 (Becton Dickinson) 对细胞进行分析。ViaProbe CD8 阳性淋巴细胞对细胞具有选通 (gate) 作用。用肽刺激作用缺失时的 CD8 阳性四聚体阳性细胞 ($CD8^{+}tetramer^{+}cells$) 的百分含量除以肽刺激作用存在时的 CD8 阳性四聚体阳性细胞的百分含量,得到四聚体阳性细胞的增加倍数。

[0223] 统计学分析

[0224] 使用 GraphPad Prism 软件 4.0 版本进行 Spearman 相关性 (斯皮尔曼相关性) 分析、Mann-Whitney 检验分析、以及配对 t 检验分析。所有检验精确到小数点后两位,$p < 0.05$ 被认为是显著的。

[0225] 实施例 11 :HIV- 特异性 CD8 T 细胞上的程序性死亡多肽 -1 的表达

[0226] 根据普遍的人类白细胞抗原 (HLA) 等位基因,和 Gag、Nef、整合酶以及放射性同位素指示剂中被频繁作用的抗原决定基 (Kiepiela P 等人于 2004 年发表的文章),合成 10 个主要组织相容性复合体 (MHC)I 级四聚体,这类四聚体对显性 C 亚型人类免疫缺陷型病毒 -1(HIV-1)CD8 T 细胞抗原决定基具有特异性,并且在这些细胞中能够直接观察到程序性死亡多肽 -1 的表面表达。对该组中的全部个体进行高溶解度人类白细胞抗原 (HLA) 分型,根据相关人类白细胞抗原 (HLA) 等位基因的表达,从中选择出 65 个具有抗逆转录病毒治疗天性的个体。对总数为 120 个不同的抗原决定基进行检测,代表性的人类免疫缺陷型病毒 (HIV) 四聚体阳性细胞上的程序性死亡多肽 -1 的体外染色在附图 5 中表示。程序性死亡多肽 -1 的表达容易的显现在这些四聚体阳性细胞上,并且这种表达显著的高于在来自于相同个体的全部 CD8 T 细胞群中的表达 ($p < 0.0001$) ;因此,在四聚体阳性 CD8 T 细胞以及全部 CD8 T 细胞群中的程序性死亡多肽 -1 的表达也显著的高于在人类免疫缺陷型病毒 - 血清反应阴性对照组中的表达 (附图 5B)。在参加试验的 10 个四聚体中,有 8 个能够导致至少一个人的程序性死亡多肽 -1 在抗原特异性 CD8 细胞上的表达水平为 100% (附图 5C)。在每个人类免疫缺陷型病毒四聚体应答中,有 3 个到 25 个不同的外周血单个核细胞 (PBMC) 被染色,有 68% 到 94% 的四聚体阳性细胞具有中间水平的程序性死亡多肽 -1 表达 (附图 5C)。通过对四聚体阳性细胞以及全部 CD8 T 细胞群上的程序性死亡多肽 -1 的平均荧光强度 (MFI) 的分析 (附图 5B,C),可以进一步证实上述发现。

[0227] 然后,利用多种可探测的应答进行检测,来判断人体内的程序性死亡多肽 -1 的表达水平是否存在抗原决定基特异性差别。在被检测的 65 个人当中,有 16 个个体分别产生 3 到 5 个四聚体阳性应答。对这 3 个宿主的每种应答进行分析,发现程序性死亡多肽 -1 的表达几乎相同,并且都接近 100% ;然而,其他 13 个个体则根据不同的抗原决定基而表现出不同程度的程序性死亡多肽 -1 的表达 (附图 5D)。这些数据表明,在同一个人中,在同时期抗原决定基特异性 CD8 T 细胞上的程序性死亡多肽 -1 的表达水平可以是不同的,这也许与近来研究得到的表明抗病毒有效性中存在的抗原决定基特异性差别的数据相一致 (Tsomides TJ 等人于 1994 年发表的文章 ;Yang O 等人于 1996 年发表的文章 ;Loffredo JT 等人于 2005 年发表的文章)。

[0228] 实施例 12：程序性死亡多肽 -1 的表达与人类免疫缺陷型病毒疾病进展之间的关系

[0229] 测定在人类免疫缺陷型病毒特异性 CD8 T 细胞上的程序性死亡多肽 -1 的表达与血浆病毒载量和 CD4 计数之间的关系，两者都是对人类免疫缺陷型病毒疾病进展的预示。与先前的研究相符合，四聚体阳性细胞数量与病毒载量或者 CD4 计数不能表现出任何明显的相关性（附图 6A，B）。相反，病毒载量与人类免疫缺陷型病毒四聚体阳性细胞上的程序性死亡多肽 -1 的表达百分数、病毒载量与人类免疫缺陷型病毒四聚体阳性细胞上的程序性死亡多肽 -1 的表达的平均荧光强度（MFI）呈现出显著的正相关（分别是 $p = 0.0013$ 以及 $p < 0.0001$；附图 6A）。CD4 计数与人类免疫缺陷型病毒四聚体阳性细胞上的程序性死亡多肽 -1 的表达百分数、CD4 计数与人类免疫缺陷型病毒四聚体阳性细胞上的程序性死亡多肽 -1 的表达的平均荧光强度（MFI）也呈现出负相关（分别是 $p = 0.0046$ 以及 $p = 0.0150$；附图 6B）。由于参与试验的四聚体大部分代表的只是宿主体内的人类免疫缺陷型特异性 CD8 T 细胞群的一部分，因而也需要检测程序性死亡多肽 -1 在全部 CD8 细胞上的表达与这些参数之间的关系。病毒载量与全部 CD8 细胞群上的程序性死亡多肽 -1 的表达百分数、病毒载量与全部 CD8 细胞群上的程序性死亡多肽 -1 的表达的平均荧光强度（MFI）呈现出显著的正相关（分别是 $p = 0.0021$ 以及 $p < 0.0001$；附图 6C），CD4 计数与全部 CD8 细胞群上的程序性死亡多肽 -1 的表达百分数、CD4 计数与全部 CD8 细胞群上的程序性死亡多肽 -1 的表达的平均荧光强度（MFI）也呈现出负相关（分别是 $p = 0.0049$ 以及 $p = 0.0006$；附图 6D）。检验上述组中 5 个宿主的程序性死亡多肽 -1 在 CMV- 特异性 CD8 T 细胞上的表达，与人类免疫缺陷型病毒特异性 CD8 T 细胞相比，程序性死亡多肽 -1 在这类细胞上的表达明显的减少（CMV 阳性四聚体阳性程序性死亡多肽 -1 的中间值为 23%，$p = 0.0036$，数据未显示），并且其与该宿主中的大批 CD8 T 细胞不同，这表明程序性死亡多肽 -1 的高度表达并不是所有的病毒特异性 CD8 T 细胞的一致特征。这些数据表明，在慢性人类免疫缺陷型病毒感染中，增加抗原的剂量会导致程序性死亡多肽 -1 在 CD8 T 细胞上增加的表达，这一结论与从慢性淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒（LCMV）感染型鼠科动物中得到的数据相符合，在后者中程序性死亡多肽 -1 的表达与 CD8 T 细胞的功能性衰竭有关（Barber DL 等人于 2005 年发表的文章）。而且，它们在经过大量的研究包括对多个抗原决定基进行了分析之后，得出了关于人类免疫缺陷型特异性 CD8 T 细胞与病毒载量或者 CD4 计数之间的第一个明确的相关性。

[0230] 实施例 13：程序性死亡多肽 -1 的表达与 CD8 T 细胞记忆性及功能间的相互关系

[0231] 接下来，通过许多额外添加的表型标记物来分析程序性死亡多肽 -1 的表达，这些标记物与 CD8 T 细胞的记忆性和功能相关，包括 CD27，CD28，CD45RA，CD57，CD62L，CD127，CCR7，穿孔素，粒酶 B，以及 Ki67（附图 7）。附图 7A 表示的是在一个个体的 B*4201 TL9 四聚体阳性细胞（$tetramer^{+}cell$）上上述标记物的典型染色情况，附图 7B 表示的是来自于 13 个宿主的总计数据。这些研究限于那些具有高于 95% 的程序性死亡多肽 -1 阳性的四聚体应答，因为 KwaZulu Natal 不能进行多于 4 种颜色的多参数流式细胞术。人类免疫缺陷型病毒阳性四聚体程序性死亡多肽 -1 阳性细胞（HIV $tetramer^{+}PD\text{-}1^{+}cells$）表达高水平的 CD27 和粒酶 B，非常低水平的 CD28、CCR7、以及细胞内 Ki67，低水平的 CD45RA 和穿孔素，以及中间水平的 CD57 和 CD62L（附图 7B）。这些数据表明，人类免疫缺陷型病毒特异性程序

性死亡多肽 -1 阳性 T 细胞显示效应 / 效应记忆性表型，这与前面报导的人类免疫缺陷型病毒特异性 CD8 T 细胞的不同步成熟理论相符合 (Champagne P 等人于 2001 年发表的文章；Appay V 等人于 2002 年发表的文章；Hess C 等人于 2004 年发表的文章）。除此之外，通过进行病毒测序来确定这些细胞是否驱动免疫逃避反应 (Brown JA 等人于 2003 年发表的文章）。对 45 个这样的四聚体阳性应答进行评价，只有 5 个具有不同于南非 C 亚型保守序列的抗原决定基（数据未显示），这表明这些细胞在体内几乎不产生选择压力。

[0232] 先前针对淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒 (LCMV) 感染型小鼠模型进行的试验表明，通过导入抗程序性死亡多肽 -1 配体封闭抗体，在体内阻止程序性死亡多肽 -1/ 程序性死亡多肽 -1 配体间的相互作用，从而导致淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒 (LCMV) 特异性 CD8 T 细胞的功能的增强，该功能表现为细胞因子的生成，杀伤能力，扩增能力，以及最显著的，病毒载量的降低 (Barber DL 等人于 2005 年发表的文章）。

[0233] 实施例 14 ：程序性死亡多肽 -1/ 程序性死亡多肽 -1 配体途径的阻滞对人类免疫缺陷型病毒特异性 CD8 T 细胞的扩增的影响

[0234] 由于人类免疫缺陷型特异性 CD8 T 细胞也表现出被削弱的扩增能力 (Migueles SA 等人于 2002 年发表的文章；Lichterfeld M 等人于 2004 年发表的文章），需要在体外测定对程序性死亡多肽 -1/ 程序性死亡多肽 -1 配体的阻滞能否导致该项功能的增强。附图 8A 表示的是来自于 B*4201 阳性个体的代表数据。仅使用培养液对新鲜分离的、CFSE 标记的外周血单个核细胞 (PBMC) 进行培养，或者使用含有抗程序性死亡多肽 -1 配体抗体的培养液对其进行培养，在培养 6 天之后仍然能得到保留了 $CFSE^{hi}$ 标记的 B*4201-TL9 特异性 CD8 T 细胞群 (1.2％的 CD8 T 细胞）。仅使用 TL9 肽对经过 CFSE 标记的外周血单个核细胞 (PBMC) 进行刺激，保持 6 天，得到扩张 4.8 倍的 $CFSE^{lo}$B*4201 TL9 四聚体阳性细胞，当抗程序性死亡多肽 -1 配体封闭抗体存在时，用 TL9 肽对经过 CFSE 标记的外周血单个核细胞 (PBMC) 进行刺激，会进一步加强 TL9 特异性细胞的扩增，从而导致四聚体阳性细胞增加了 10.3 倍。在 28 个样品中进行 CFSE 扩增检测，使用或者不使用纯化的抗人类程序性死亡多肽 -1 配体封闭抗体。与仅使用肽刺激所产生的扩增的量相比，在肽和抗程序性死亡多肽 -1 配体封闭抗体同时存在时，人类免疫缺陷型病毒特异性 CD8 阳性 T 细胞的扩增发生了显著的增加（附图 8B ；$p = 0.0006$，配对 t 检验）。使用抗程序性死亡多肽 -1 配体封闭抗体导致的四聚体阳性细胞的增加倍数因为个体的不同以及相同个体中的抗原决定基的不同而发生变化（附图 8C），这又一次证明了在这些应答的功能性衰竭程度上存在抗原决定基特异性差别。

[0235] 其他实施方式

[0236] 尽管本发明结合了具体的实施方式进行描述，前述的具体内容意在描述本发明，并不限制本发明的范围，本发明的范围由随后的权利要求的范围来定义。其他方面的特征、优点以及修饰都落入随后的权利要求的范围之内。

[0001]

序列表

<110> 达纳—法伯癌症研究院
布赖汉姆妇女医院
埃默里大学
弗里曼·高丹
阿琳·沙佩
大卫·M·多夫曼
拉菲·阿梅德
丹尼尔·巴伯
约翰·E·维尔瑞

<120> 通过抑制程序性细胞死亡 1（PD-1）途经治疗持续性感染和癌症的方法及组合物

<130> 20363-030-061

<140> PCT/US2006/022423
<141> 2006-06-08

<150> 60/688,872
<151> 2005-06-08

<160> 10

<170> PatentIn 3.2 版

<210> 1
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HIV MHC I 类四聚体

<400> 1

Gly Ala Phe Asp Leu Ser Phe Phe Leu
1 5

<210> 2
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HIV MHC I 类四聚体

<400> 2

Lys Ile Gln Asn Phe Arg Val Tyr Tyr
1 5

[0002]

<210> 3
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HIV MHC I 类四聚体

<400> 3

Asp Ile Tyr Lys Arg Trp Ile Ile
1 5

<210> 4
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HIV MHC I 类四聚体

<400> 4

Phe Leu Lys Glu Lys Gly Gly Leu
1 5

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HIV MHC I 类四聚体

<400> 5

Arg Pro Gln Val Pro Leu Arg Pro Met
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HIV MHC I 类四聚体

<400> 6

Thr Pro Gln Asp Leu Asn Thr Met Leu
1 5

[0003]

<210> 7
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HIV MHC I类四聚体

<400> 7

Thr Pro Gly Pro Gly Val Arg Tyr Pro Leu
1 5 10

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HIV MHC I类四聚体

<400> 8

Tyr Pro Gly Ile Lys Val Lys Gln Leu
1 5

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HIV MHC I类四聚体

<400> 9

Thr Pro Gln Asp Leu Asn Thr Met Leu
1 5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HIV MHC I类四聚体

<400> 10

Tyr Val Asp Arg Phe Phe Lys Thr Leu
1 5

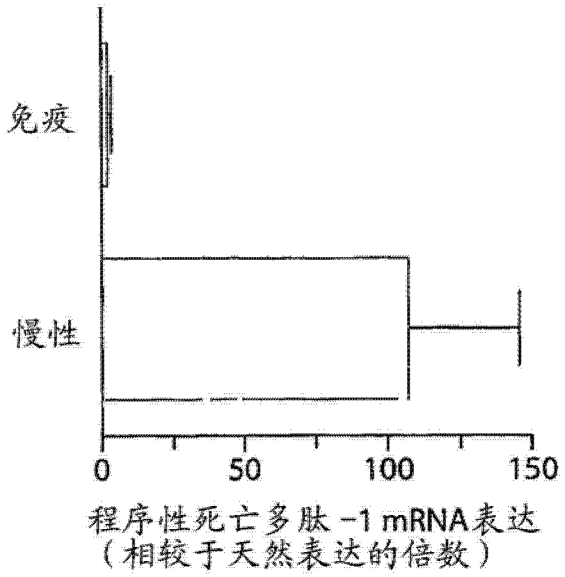

免疫
慢性
0
50
100
150
程序性死亡多肽 -1 mRNA表达
（相较于天然表达的倍数）

图 1A

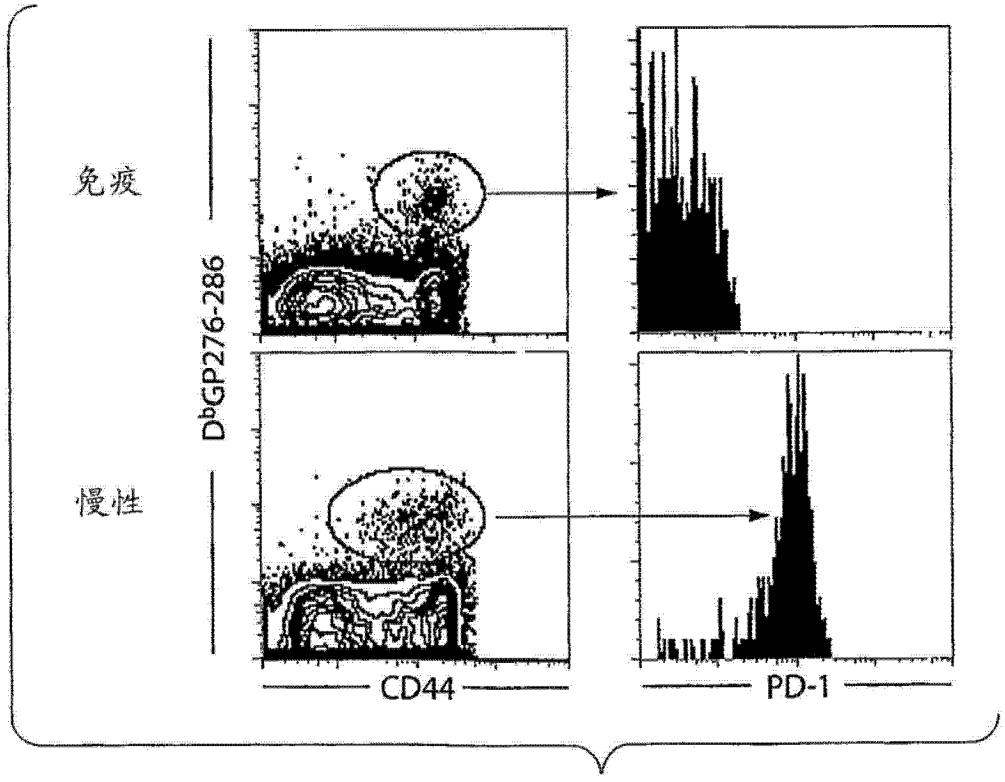

免疫
慢性
DbGP276-286
CD44
PD-1

图 1B

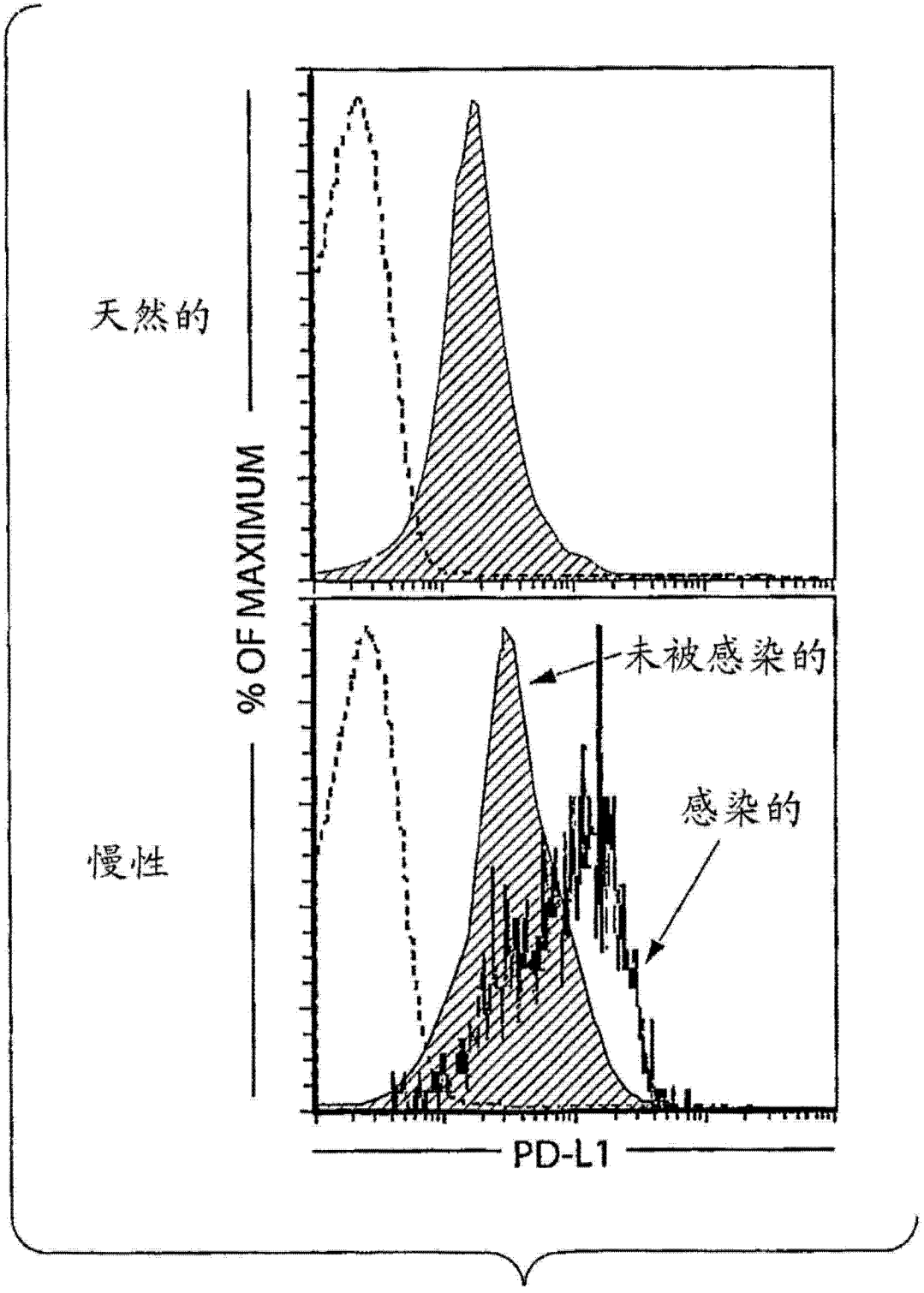


图 1C

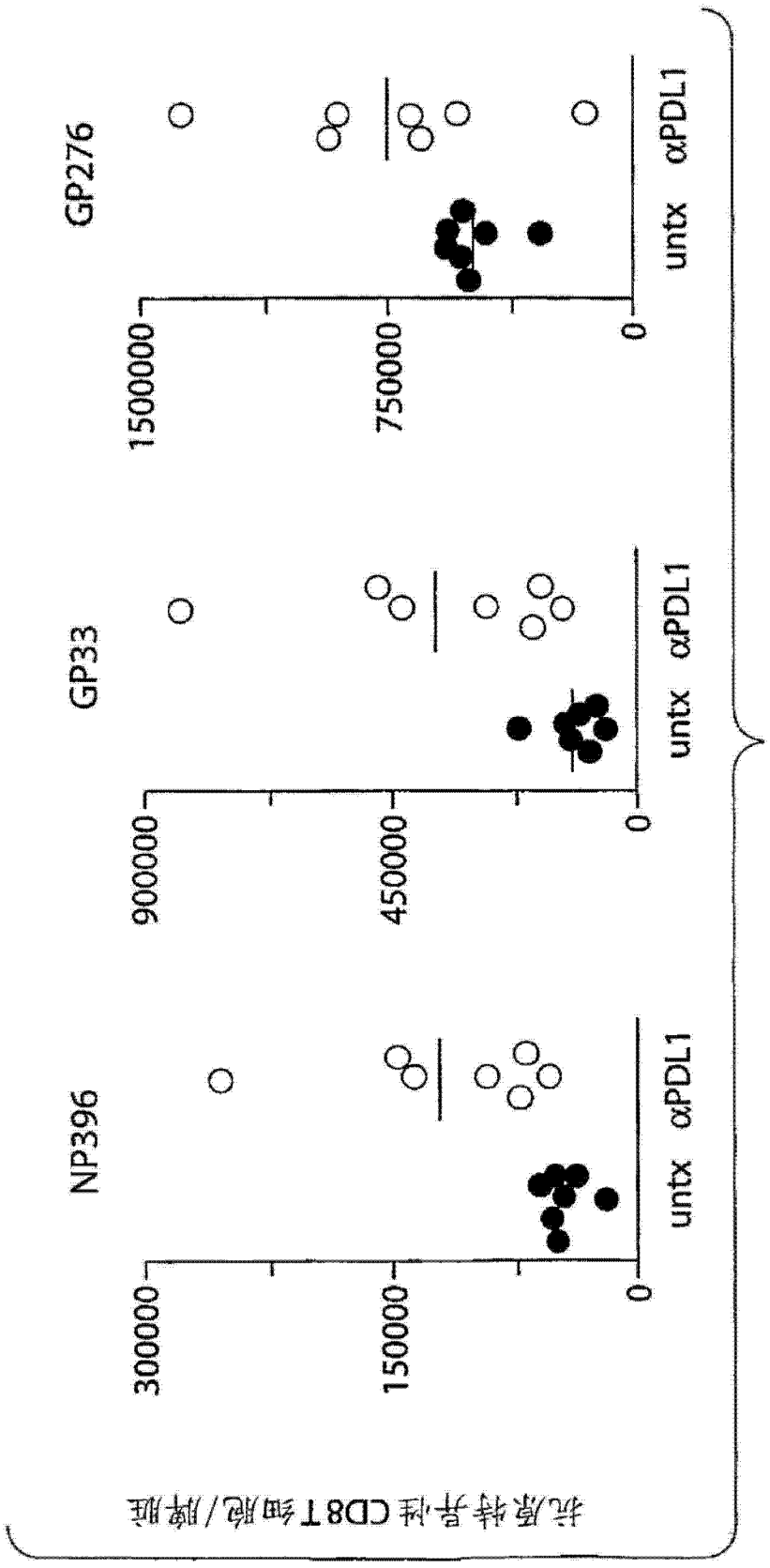

抗原特异性 CD8T 细胞/脾脏
NP396
GP33
GP276
300000
150000
0
900000
450000
0
1500000
750000
0
untx
αPDL1

图 2A

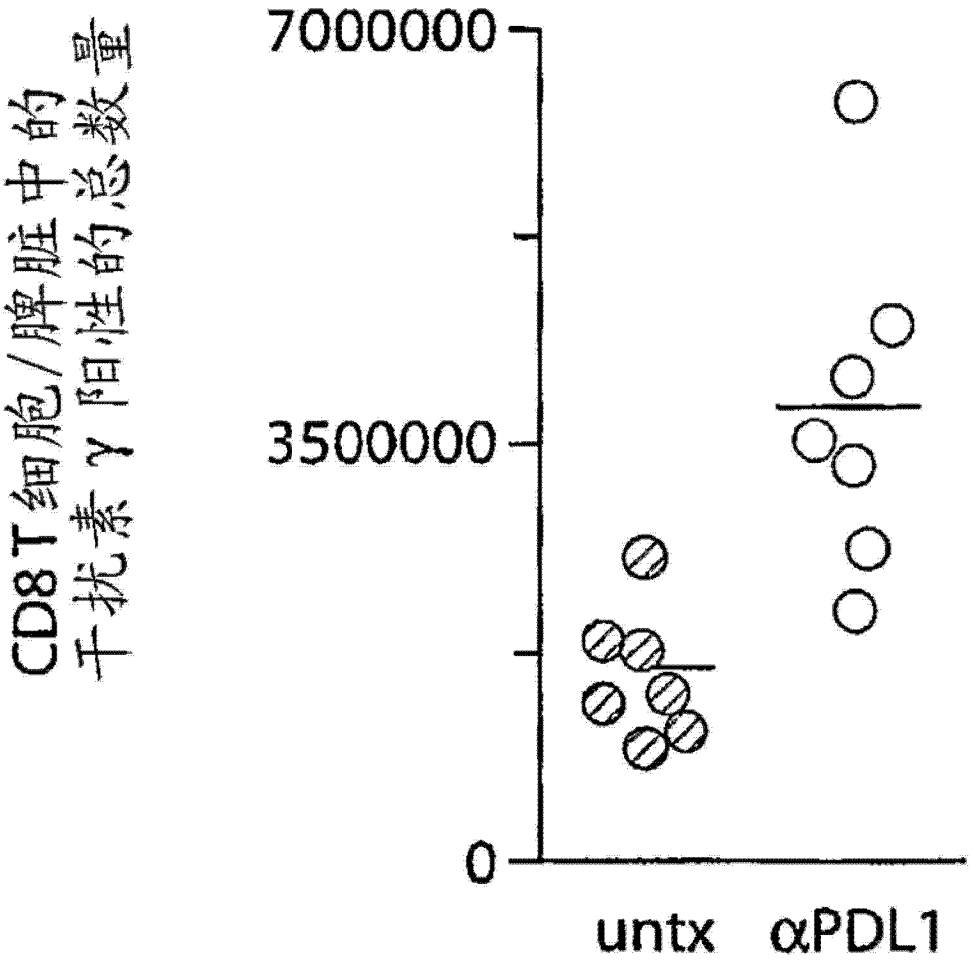


图 2B

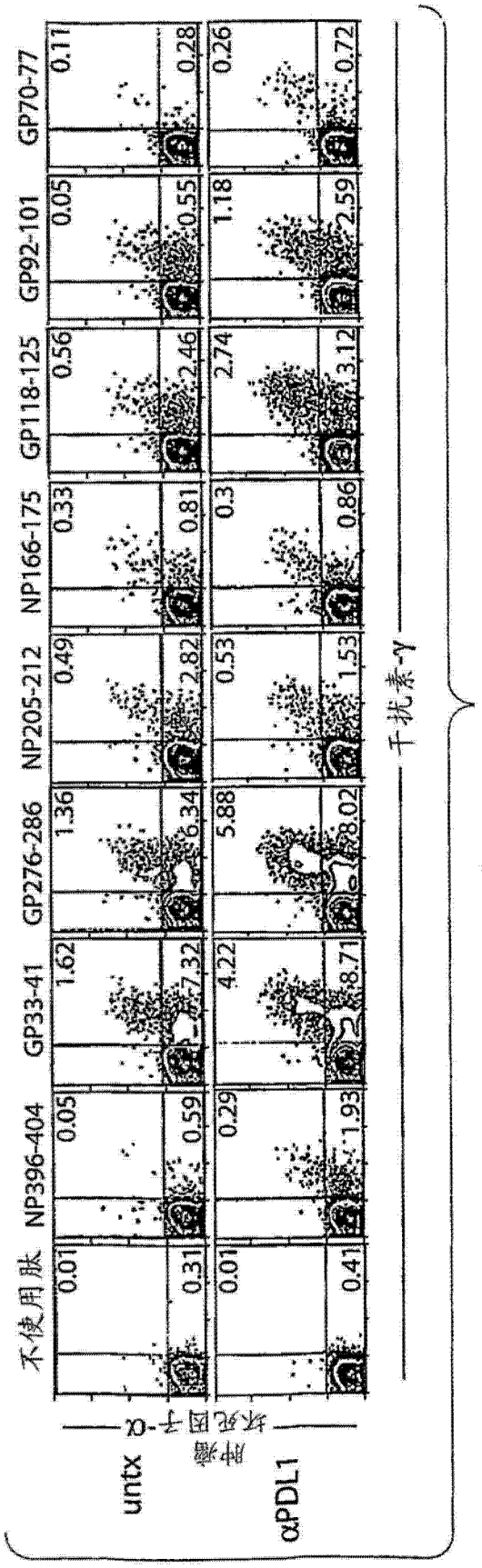

不使用肽
NP396-404
GP33-41
GP276-286
NP205-212
NP166-175
GP118-125
GP92-101
GP70-77
0.01
0.31
0.05
0.59
1.62
7.32
1.36
6.34
0.49
2.82
0.33
0.81
0.56
2.46
0.05
0.55
0.11
0.28
0.01
0.41
0.29
1.93
4.22
8.71
5.88
18.02
0.53
1.53
0.3
0.86
2.74
3.12
1.18
2.59
0.26
0.72
肿瘤坏死因子-α
untx
αPDL1
干扰素-γ

图 2C

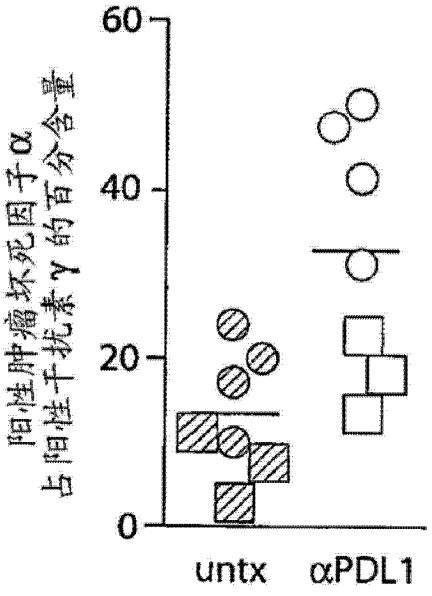

阳性肿瘤坏死因子α
占阳性干扰素γ的百分含量
60
40
20
0
untx
αPDL1

图 2D

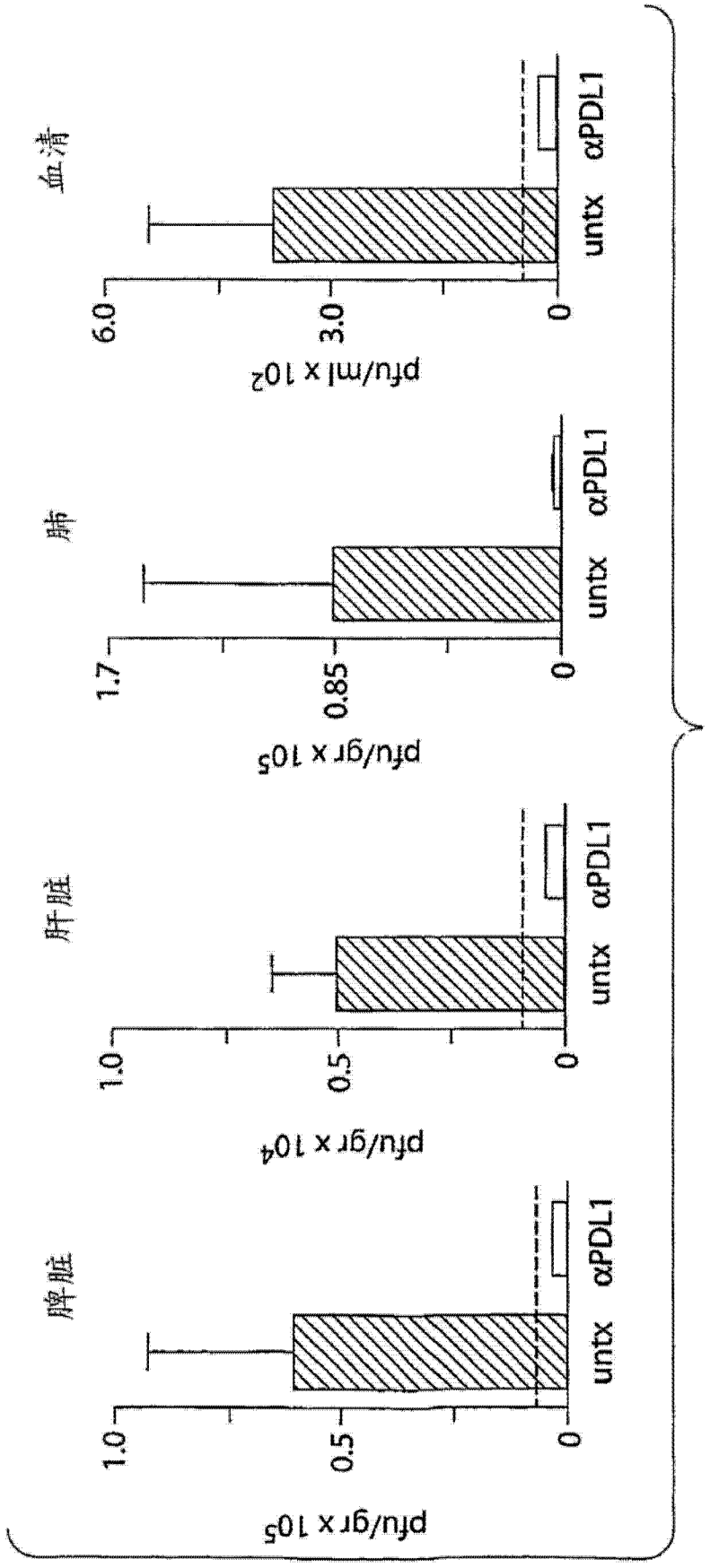

血清
pfu/ml x 10²
6.0
3.0
0
untx
αPDL1
肺
pfu/gr x 10⁵
1.7
0.85
0
untx
αPDL1
肝脏
pfu/gr x 10⁴
1.0
0.5
0
untx
αPDL1
脾脏
pfu/gr x 10⁵
1.0
0.5
0
untx
αPDL1

图 2E

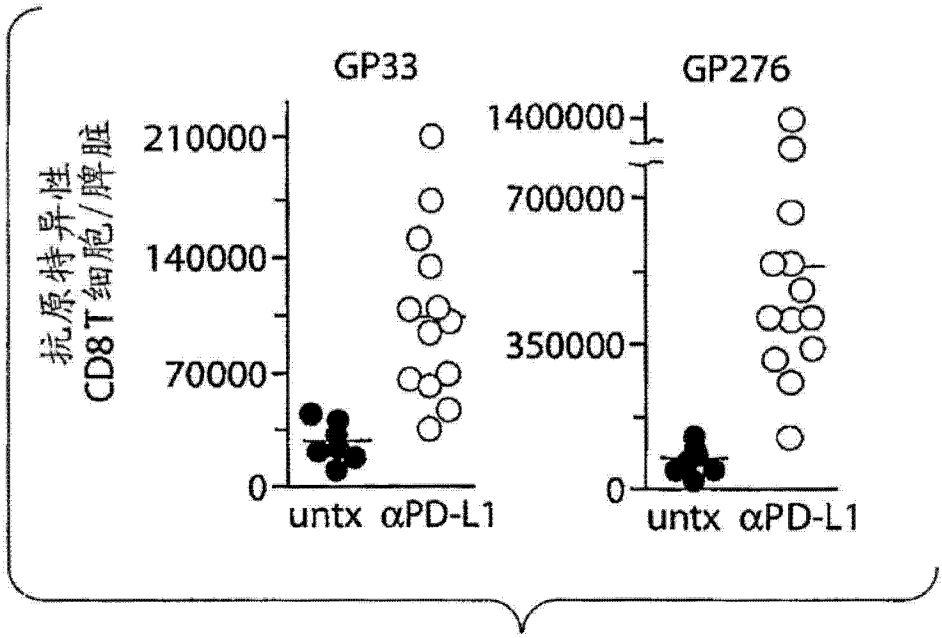

GP33
GP276
抗原特异性CD8 T细胞/脾脏
210000
140000
70000
0
1400000
700000
350000
0
untx αPD-L1
untx αPD-L1

图 3A

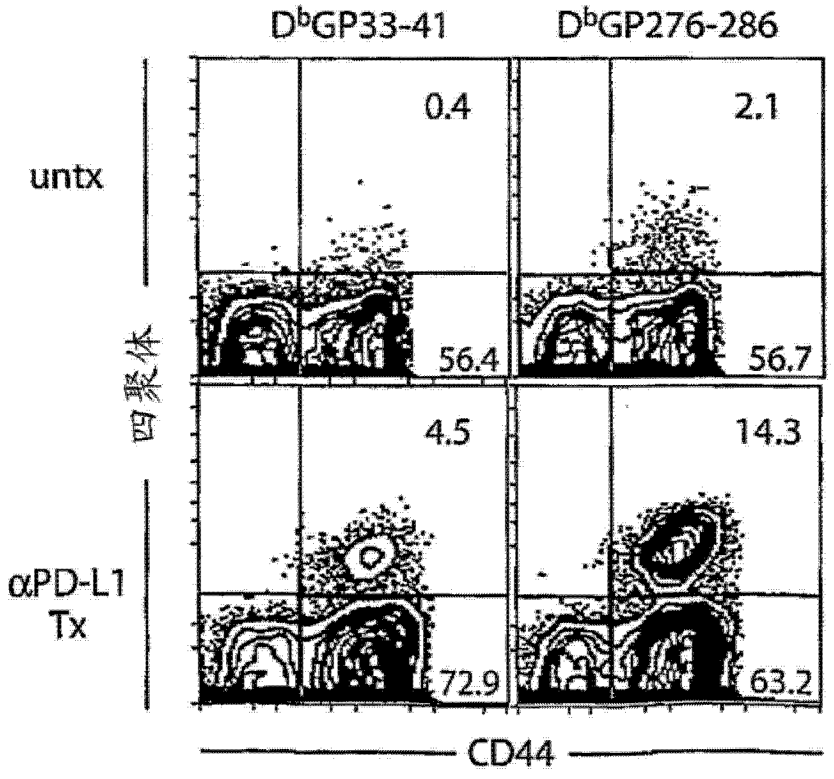

DbGP33-41
DbGP276-286
untx
αPD-L1 Tx
四聚体
0.4
2.1
56.4
56.7
4.5
14.3
72.9
63.2
CD44

图 3B

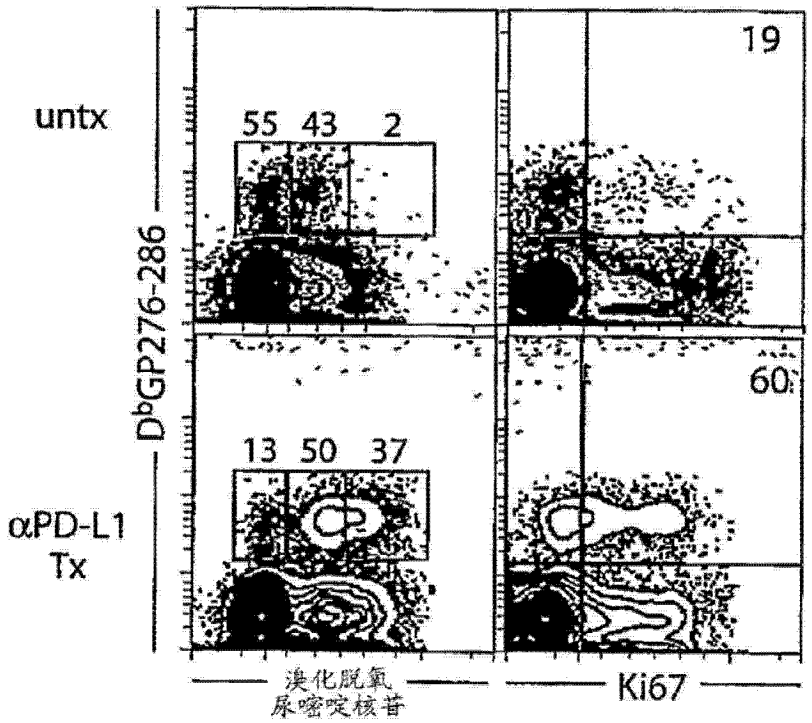

untx
αPD-L1
Tx
55 43 2
19
13 50 37
60
DbGP276-286
溴化脱氧
尿嘧啶核苷
Ki67

图 3C

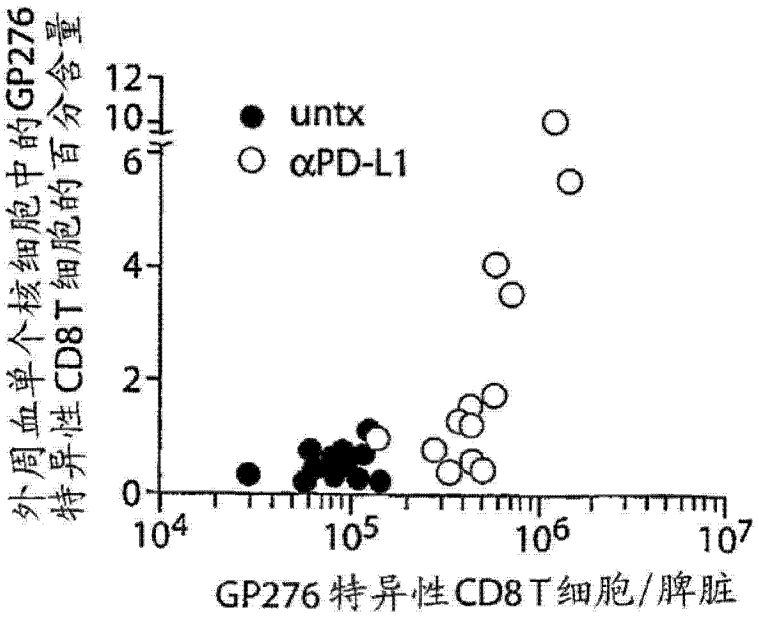

外周血单个核细胞中的GP276
特异性CD8T细胞的百分含量
untx
αPD-L1
GP276特异性CD8T细胞/脾脏

图 3D

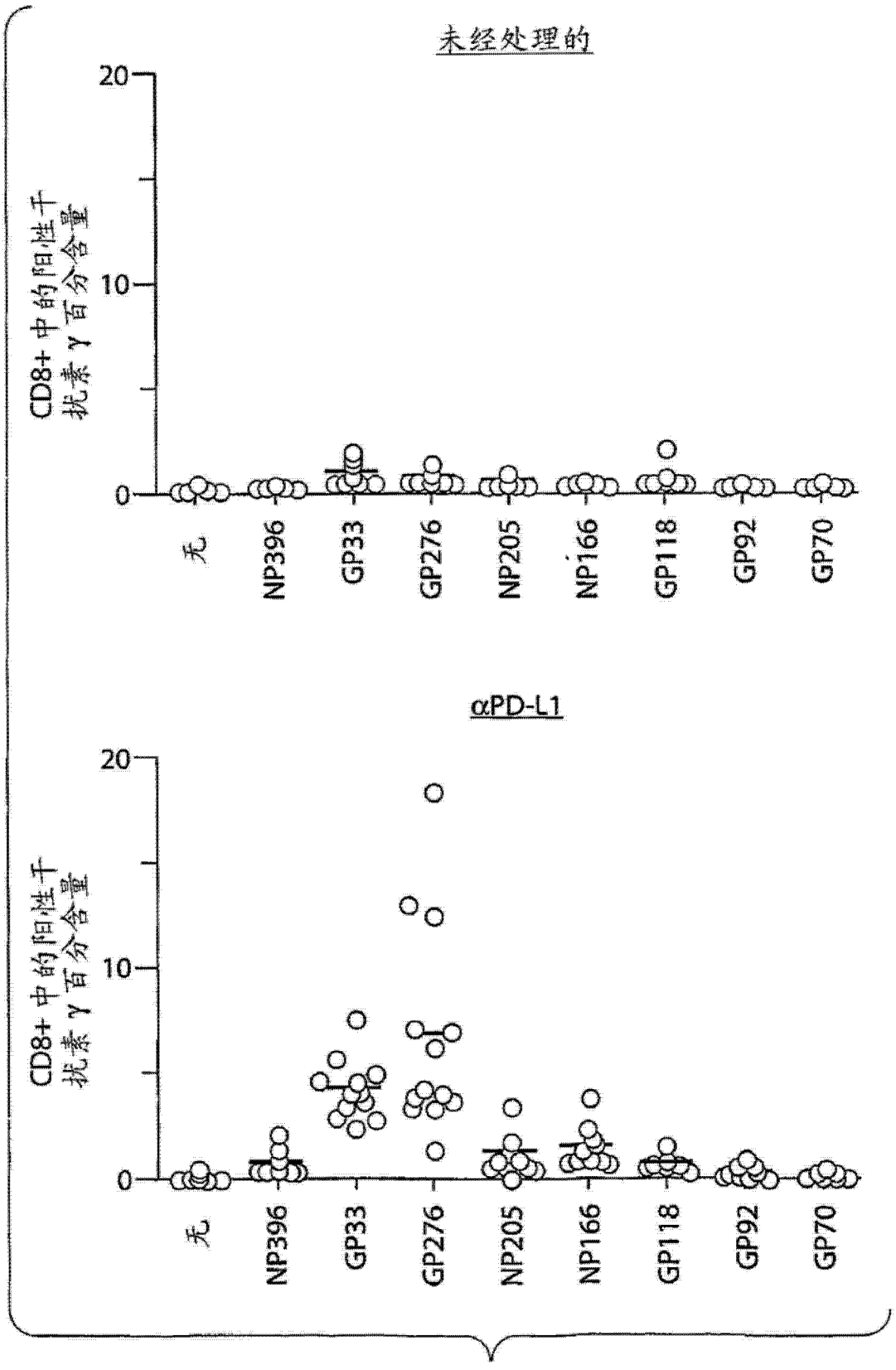

未经处理的
CD8+ 中的阳性干扰素γ百分含量
20
10
0
无
NP396
GP33
GP276
NP205
NP166
GP118
GP92
GP70
αPD-L1
CD8+ 中的阳性干扰素γ百分含量
20
10
0
无
NP396
GP33
GP276
NP205
NP166
GP118
GP92
GP70

图 4A

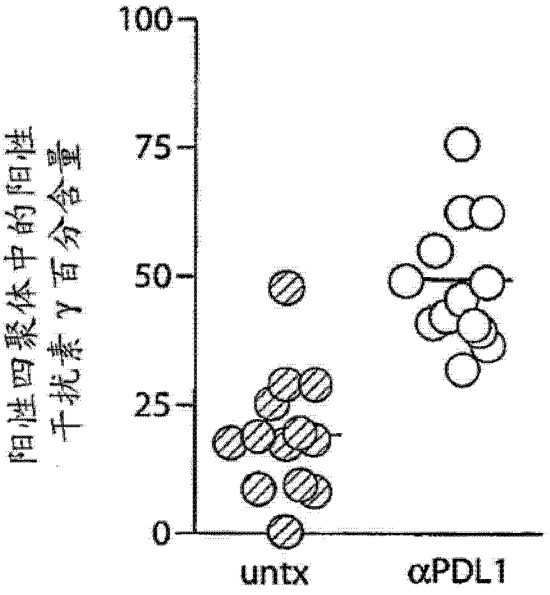

100
75
50
25
0
阳性四聚体中的阳性
干扰素γ百分含量
untx
αPDL1

图 4B

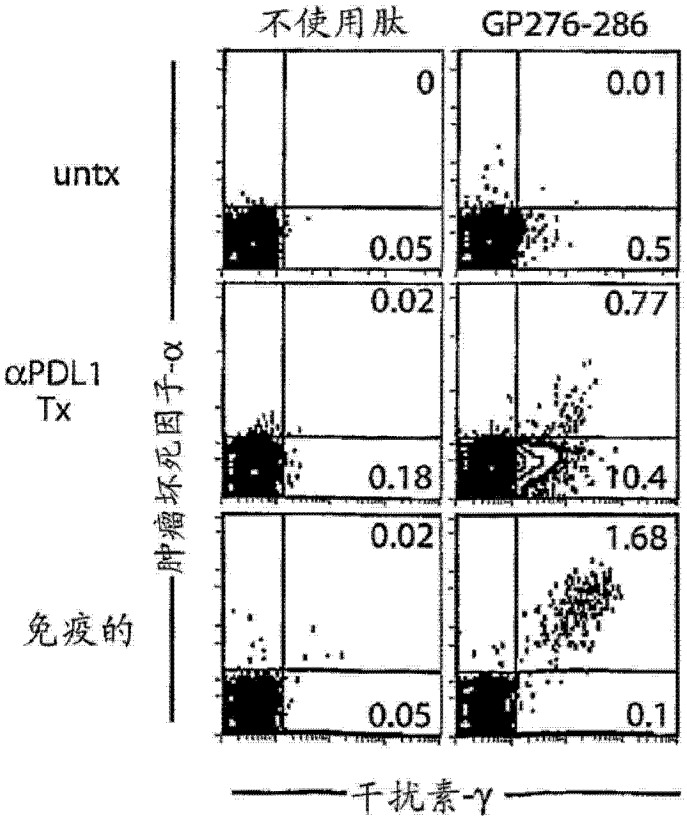

不使用肽
GP276-286
untx
αPDL1
Tx
免疫的
0
0.01
0.05
0.5
0.02
0.77
0.18
10.4
0.02
1.68
0.05
0.1
肿瘤坏死因子-α
干扰素-γ

图 4C

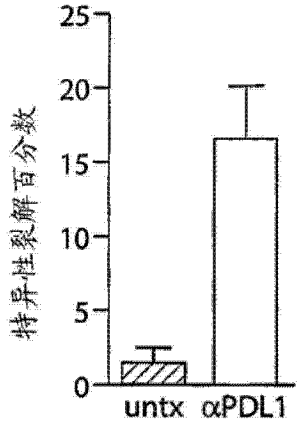

25
20
15
10
5
0
特异性裂解百分数
untx
αPDL1

图 4D

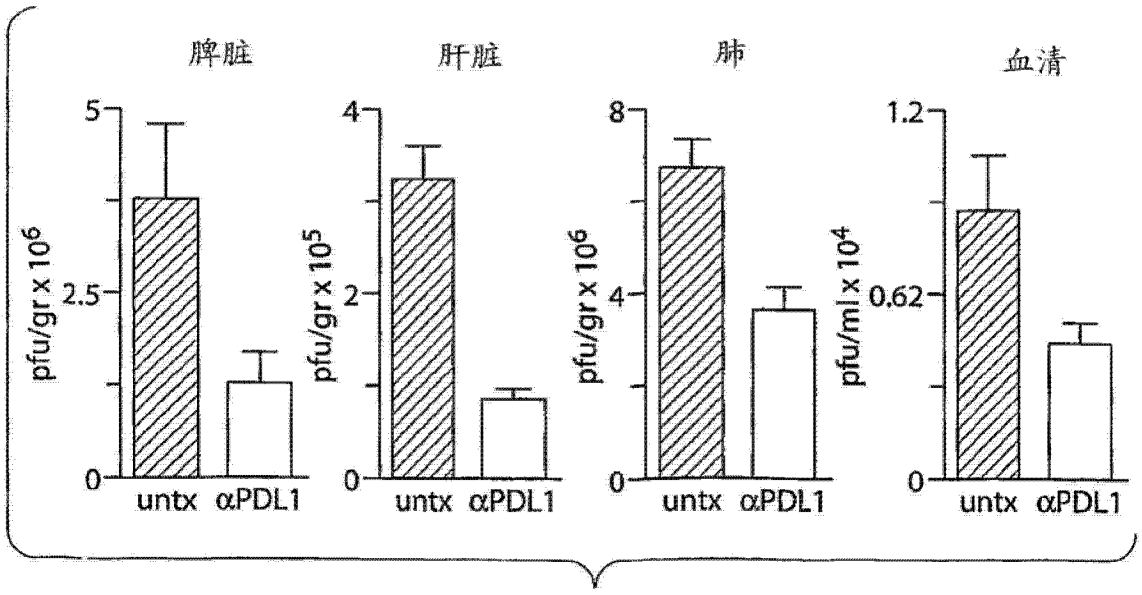

脾脏
肝脏
肺
血清
pfu/gr x 10^6
pfu/gr x 10^5
pfu/gr x 10^6
pfu/ml x 10^4
5
2.5
0
4
2
0
8
4
0
1.2
0.62
0
untx
αPDL1
untx
αPDL1
untx
αPDL1
untx
αPDL1

图 4E

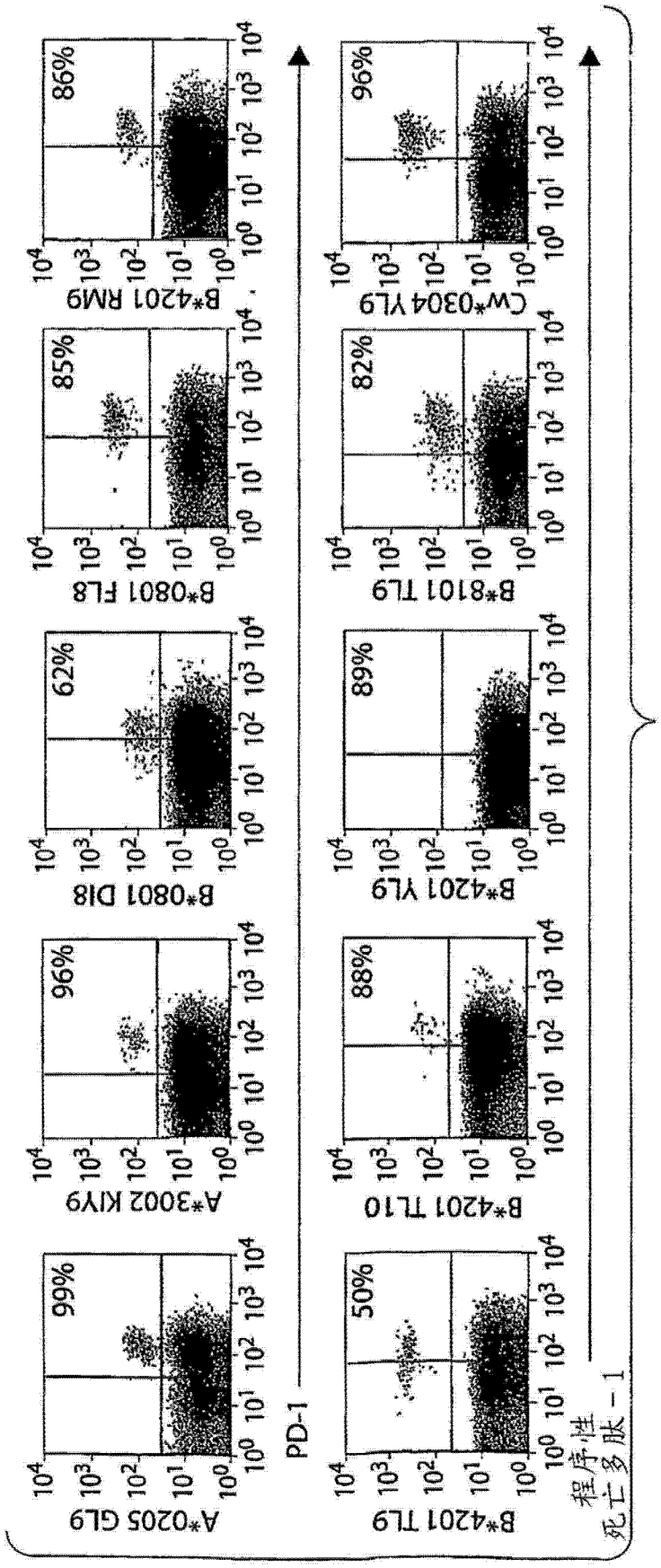

A*0205 GLG
A*3002 KIY9
B*0801 DI8
B*0801 FLB
B*4201 RM9
B*4201 TLG
B*4201 TL10
B*4201 YLG
B*8101 TLG
Cw*0304 YLG
99%
96%
62%
85%
86%
50%
88%
89%
82%
96%
PD-1
程序性死亡多肽-1

图 5A

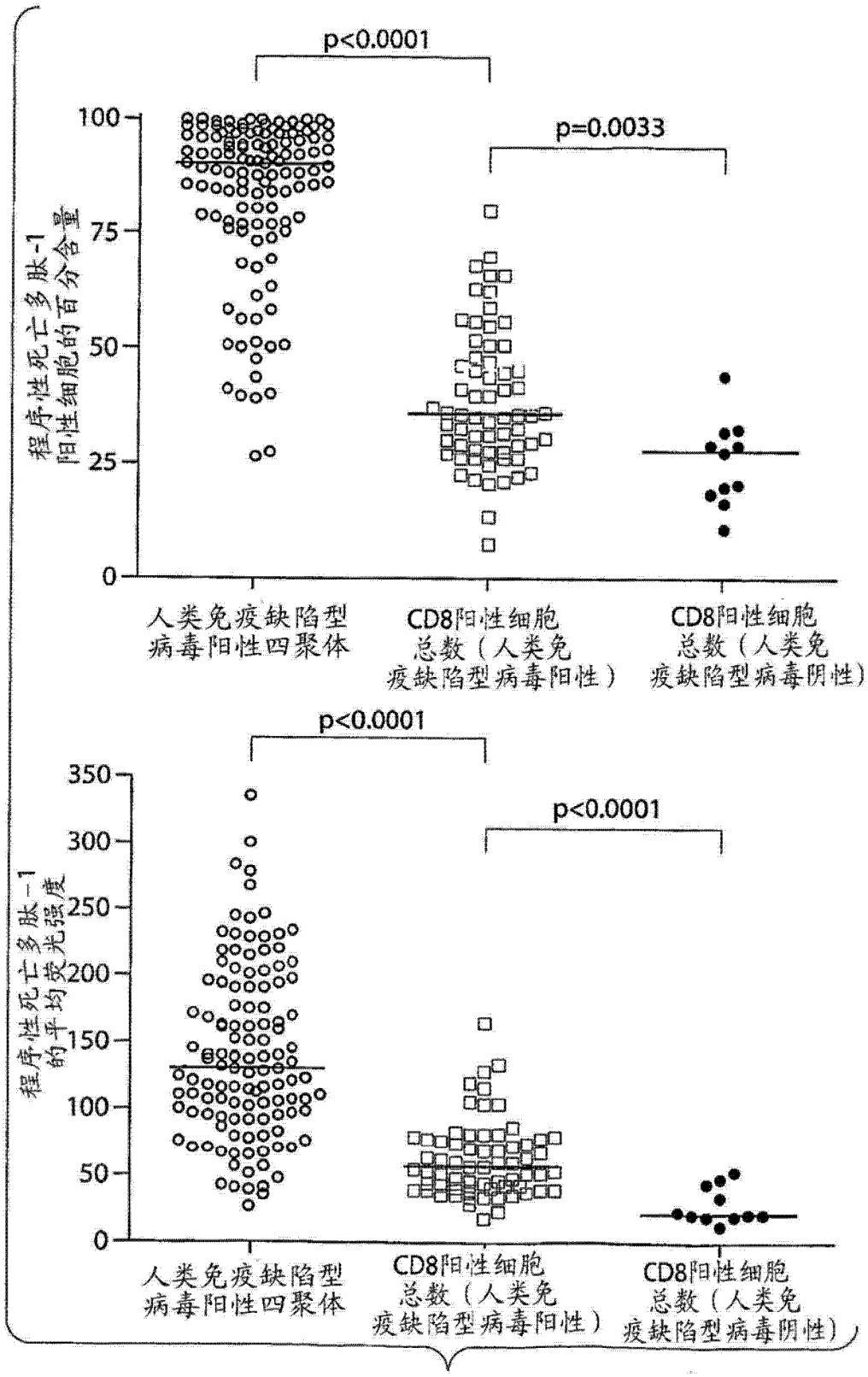

p<0.0001
p=0.0033
程序性死亡多肽-1
阳性细胞的百分含量
100
75
50
25
0
人类免疫缺陷型
病毒阳性四聚体
CD8阳性细胞
总数（人类免
疫缺陷型病毒阳性）
CD8阳性细胞
总数（人类免
疫缺陷型病毒阴性）
p<0.0001
p<0.0001
程序性死亡多肽-1
的平均荧光强度
350
300
250
200
150
100
50
0
人类免疫缺陷型
病毒阳性四聚体
CD8阳性细胞
总数（人类免
疫缺陷型病毒阳性）
CD8阳性细胞
总数（人类免
疫缺陷型病毒阴性）

图 5B

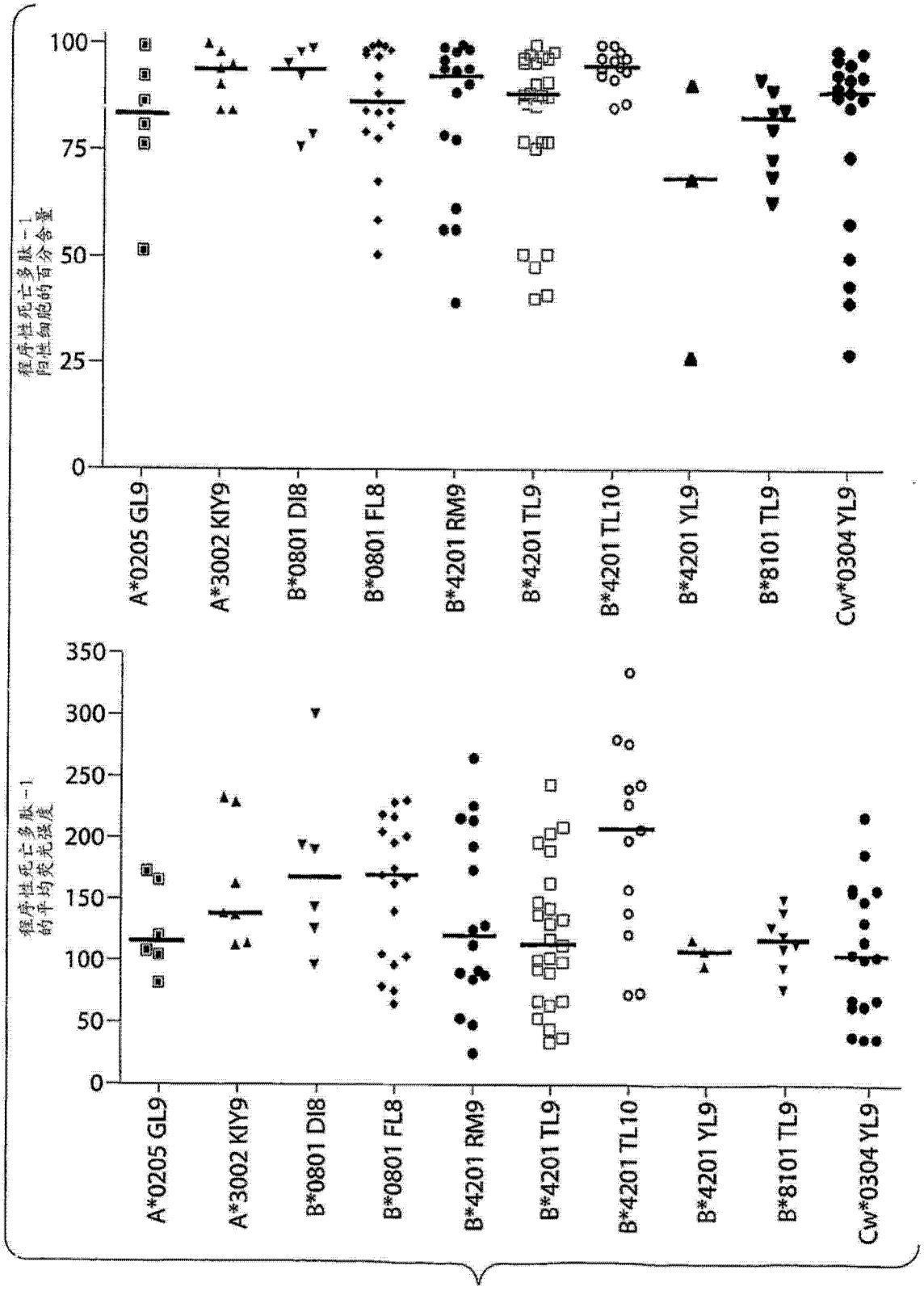

程序性死亡多肽-1
阳性细胞的百分含量
100
75
50
25
0
A*0205 GL9
A*3002 KIY9
B*0801 DI8
B*0801 FL8
B*4201 RM9
B*4201 TL9
B*4201 TL10
B*4201 YL9
B*8101 TL9
Cw*0304 YL9
程序性死亡多肽-1
的平均荧光强度
350
300
250
200
150
100
50
0
A*0205 GL9
A*3002 KIY9
B*0801 DI8
B*0801 FL8
B*4201 RM9
B*4201 TL9
B*4201 TL10
B*4201 YL9
B*8101 TL9
Cw*0304 YL9

图 5C

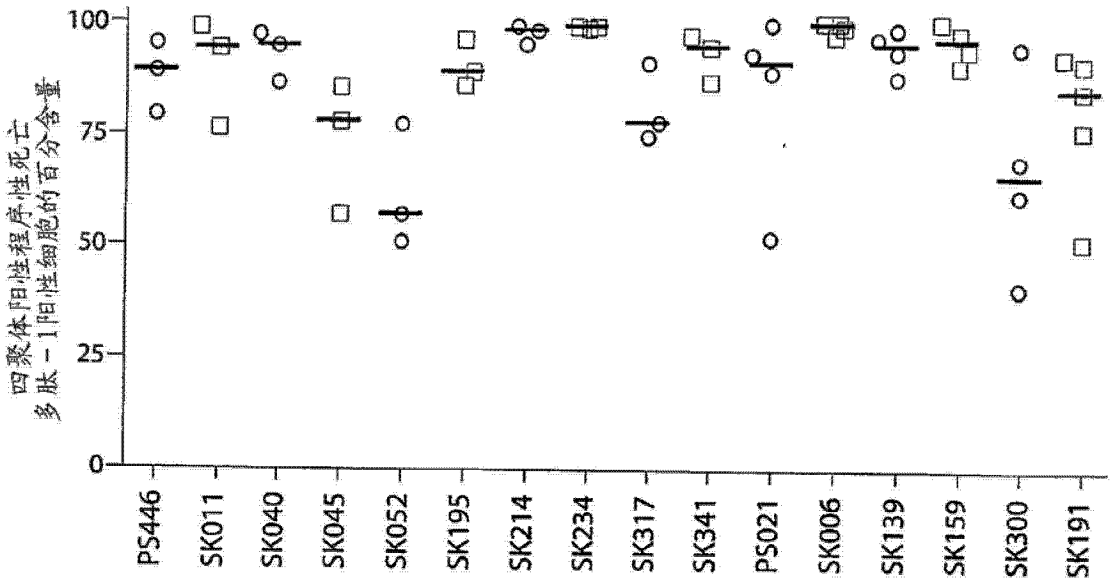

四聚体阳性程序性死亡
多肽-1阳性细胞的百分含量
100
75
50
25
0
PS446
SK011
SK040
SK045
SK052
SK195
SK214
SK234
SK317
SK341
PS021
SK006
SK139
SK159
SK300
SK191

图 5D

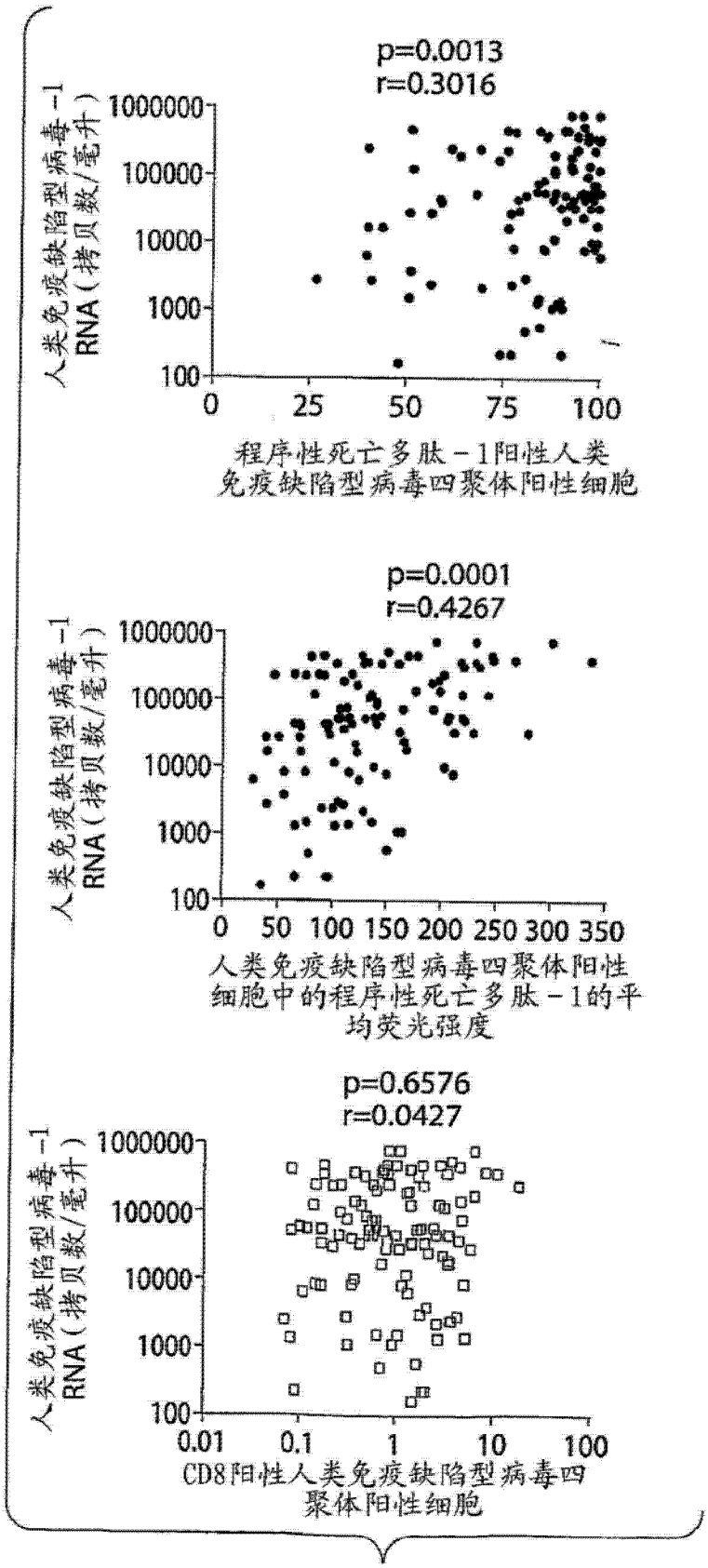

p=0.0013
r=0.3016
人类免疫缺陷型病毒-1 RNA(拷贝数/毫升)
1000000
100000
10000
1000
100
0
25
50
75
100
程序性死亡多肽-1阳性人类免疫缺陷型病毒四聚体阳性细胞
p=0.0001
r=0.4267
人类免疫缺陷型病毒-1 RNA(拷贝数/毫升)
1000000
100000
10000
1000
100
0 50 100 150 200 250 300 350
人类免疫缺陷型病毒四聚体阳性细胞中的程序性死亡多肽-1的平均荧光强度
p=0.6576
r=0.0427
人类免疫缺陷型病毒-1 RNA(拷贝数/毫升)
1000000
100000
10000
1000
100
0.01
0.1
1
10
100
CD8阳性人类免疫缺陷型病毒四聚体阳性细胞

图 6A

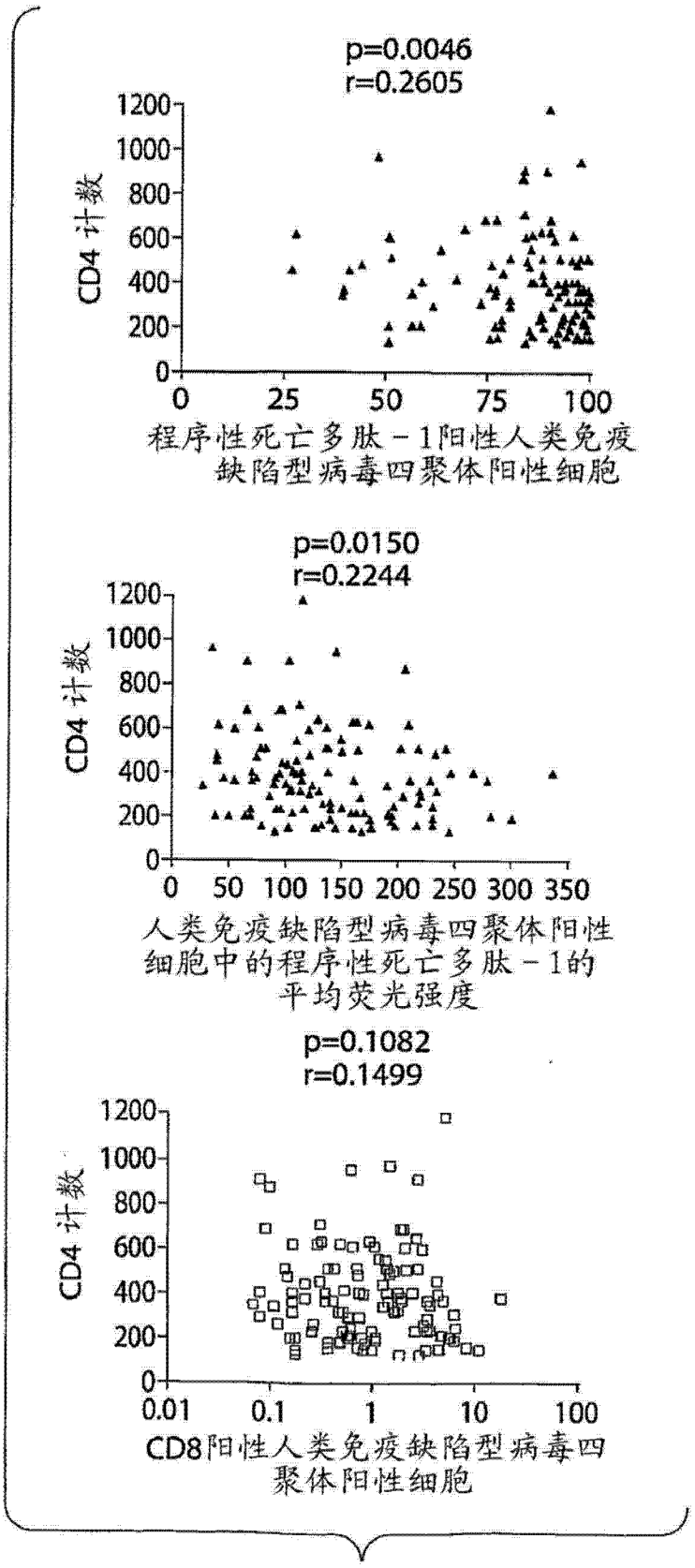

p=0.0046
r=0.2605
CD4 计数
1200
1000
800
600
400
200
0
0
25
50
75
100
程序性死亡多肽－1阳性人类免疫缺陷型病毒四聚体阳性细胞
p=0.0150
r=0.2244
CD4 计数
1200
1000
800
600
400
200
0
0
50
100
150
200
250
300
350
人类免疫缺陷型病毒四聚体阳性细胞中的程序性死亡多肽－1的平均荧光强度
p=0.1082
r=0.1499
CD4 计数
1200
1000
800
600
400
200
0
0.01
0.1
1
10
100
CD8阳性人类免疫缺陷型病毒四聚体阳性细胞

图 6B

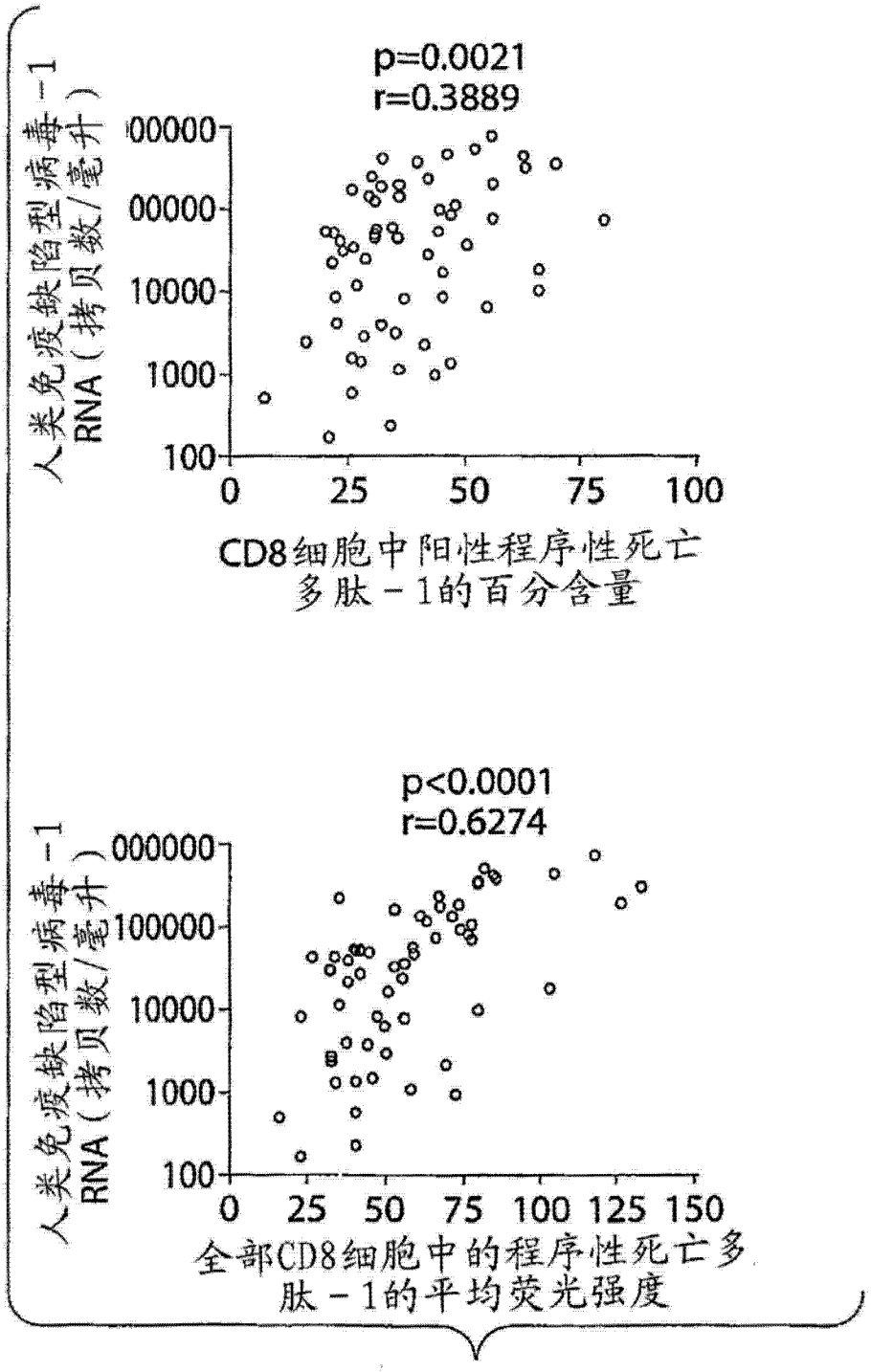

p=0.0021
r=0.3889
人类免疫缺陷型病毒－1 RNA（拷贝数/毫升）
00000
00000
10000
1000
100
0
25
50
75
100
CD8细胞中阳性程序性死亡多肽－1的百分含量
p<0.0001
r=0.6274
人类免疫缺陷型病毒－1 RNA（拷贝数/毫升）
000000
100000
10000
1000
100
0
25
50
75
100
125
150
全部CD8细胞中的程序性死亡多肽－1的平均荧光强度

图 6C

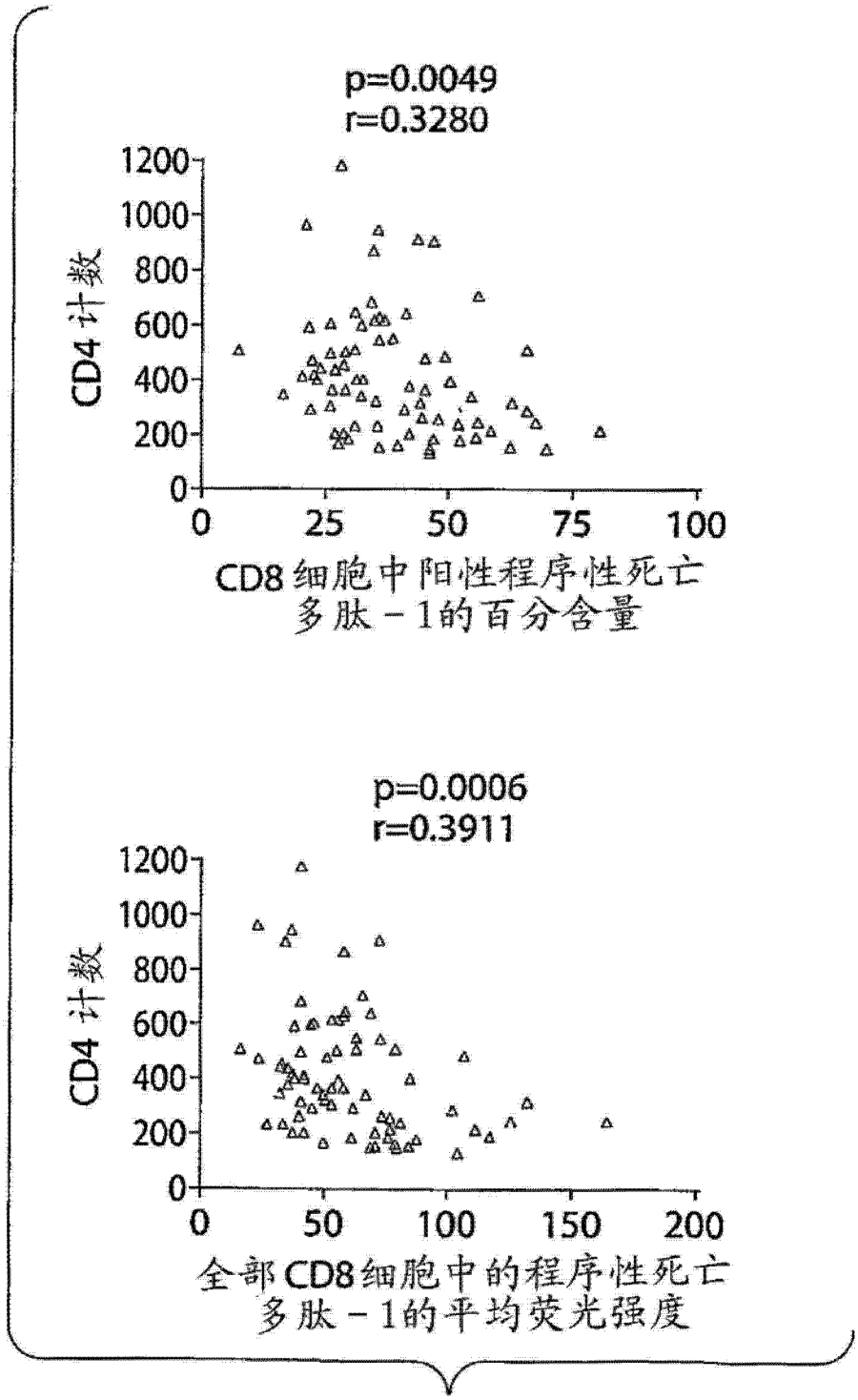

p=0.0049
r=0.3280
CD4 计数
1200
1000
800
600
400
200
0
0
25
50
75
100
CD8 细胞中阳性程序性死亡
多肽－1的百分含量
p=0.0006
r=0.3911
CD4 计数
1200
1000
800
600
400
200
0
0
50
100
150
200
全部 CD8 细胞中的程序性死亡
多肽－1的平均荧光强度

图 6D

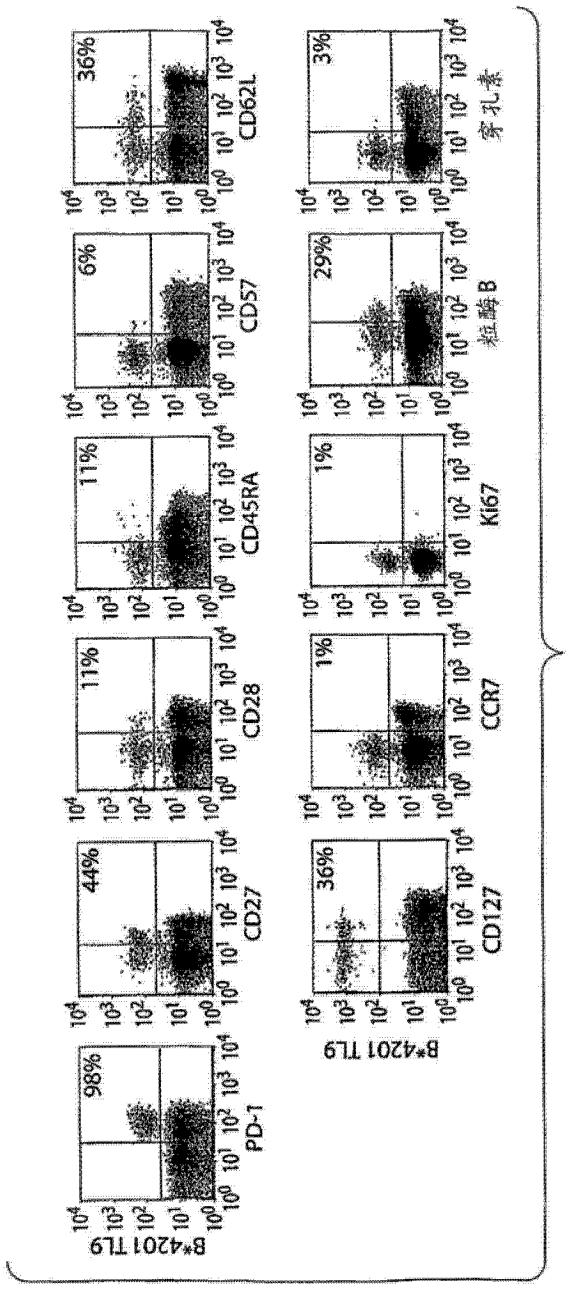

B*4201 TL9
98%
PD-1
44%
CD27
11%
CD28
11%
CD45RA
6%
CD57
36%
CD62L
B*4201 TL9
36%
CD127
1%
CCR7
1%
Ki67
29%
粒酶B
3%
穿孔素

图 7A

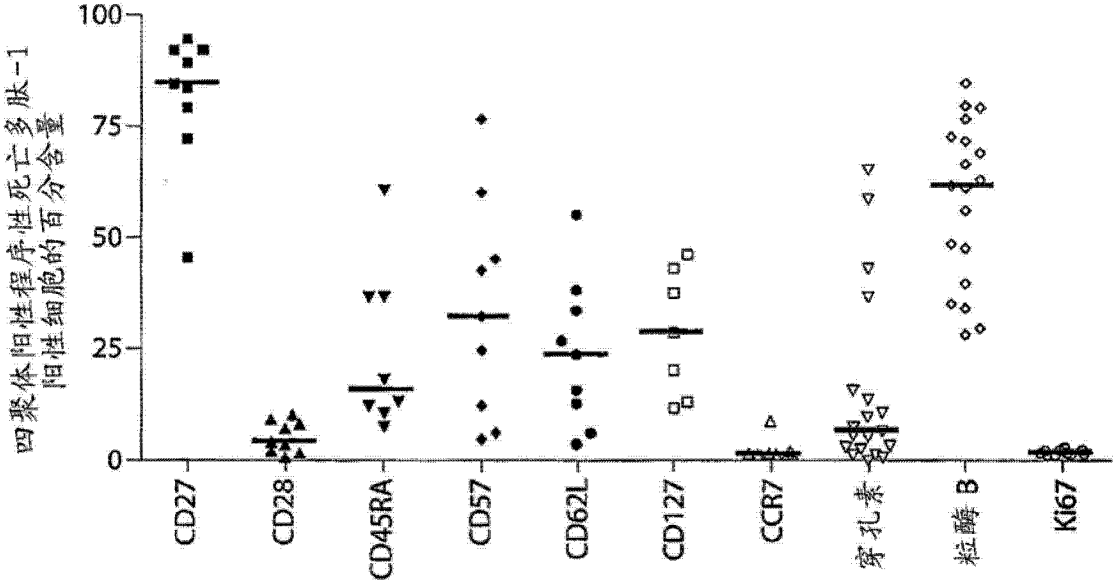

四聚体阳性程序性死亡多肽-1
阳性细胞的百分含量
100
75
50
25
0
CD27
CD28
CD45RA
CD57
CD62L
CD127
CCR7
穿孔素
粒酶 B
Ki67

图 7B

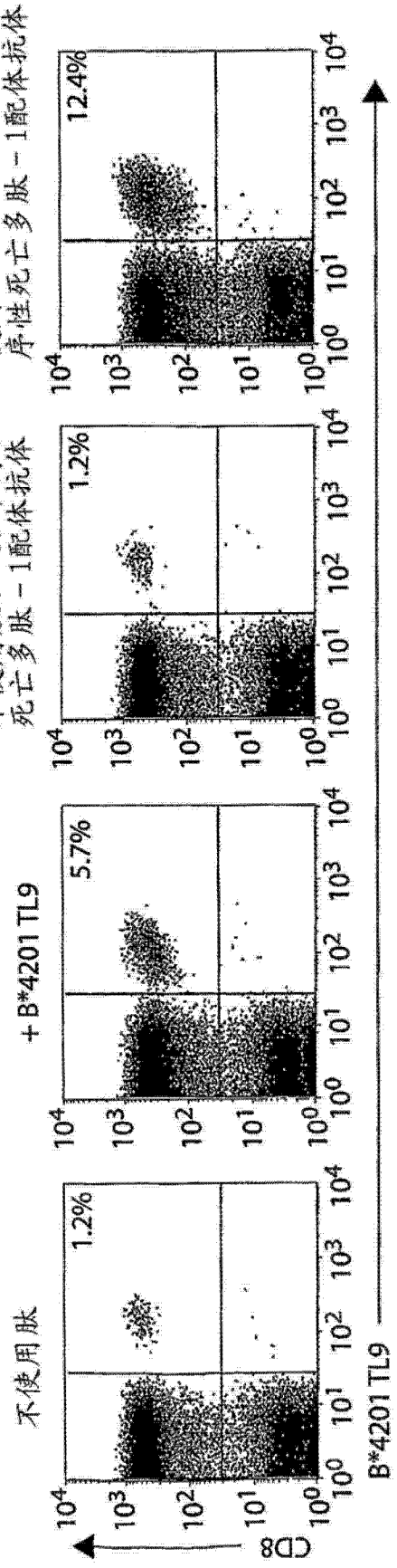

不使用肽
+ B*4201 TL9
不使用肽以及抗程序性死亡多肽－1配体抗体
使用 B*4201 TL9 以及抗程序性死亡多肽－1配体抗体
1.2%
5.7%
1.2%
12.4%
CD8
B*4201 TL9

图 8A

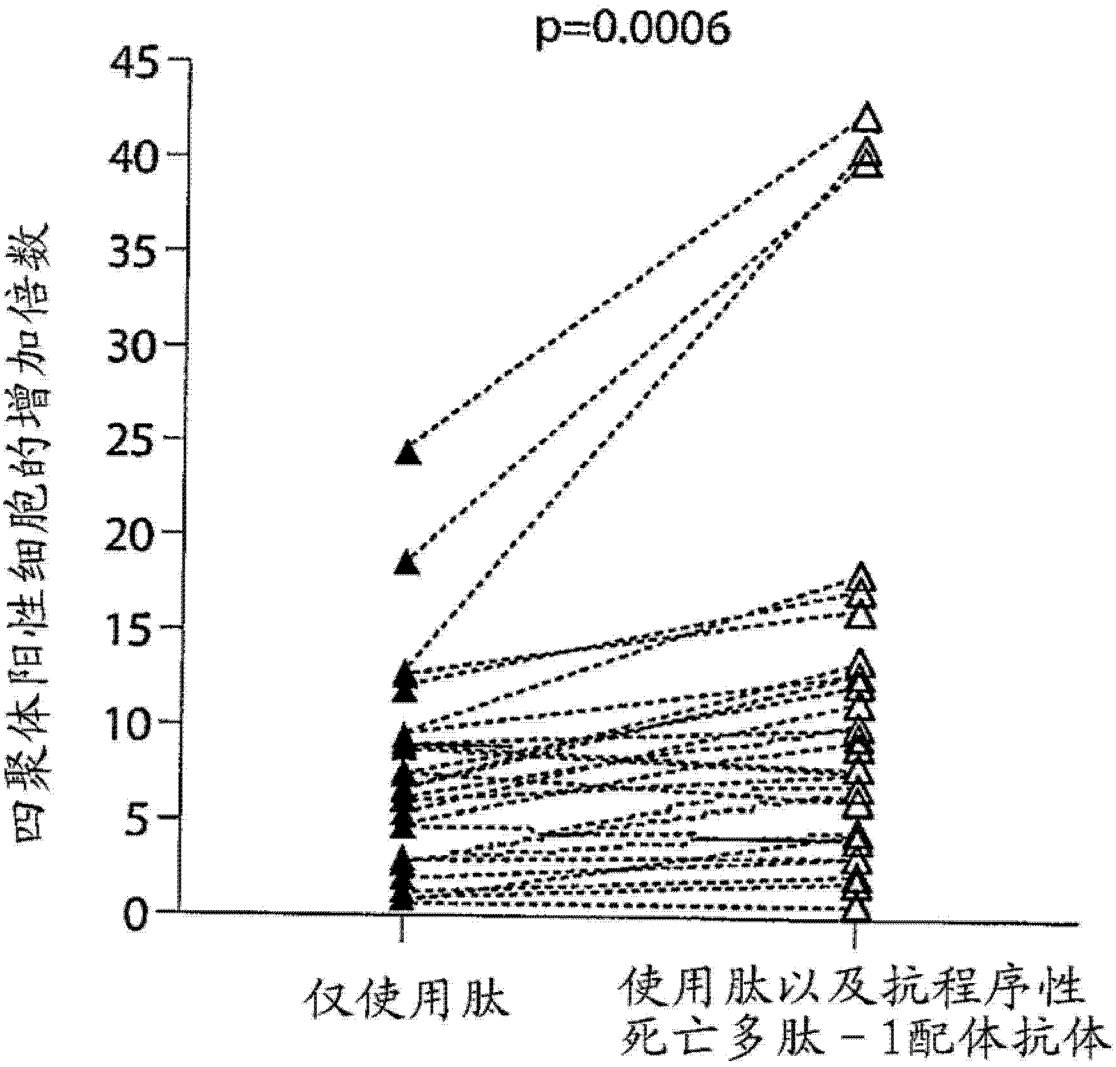

p=0.0006
四聚体阳性细胞的增加倍数
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
仅使用肽
使用肽以及抗程序性死亡多肽－1配体抗体

图 8B

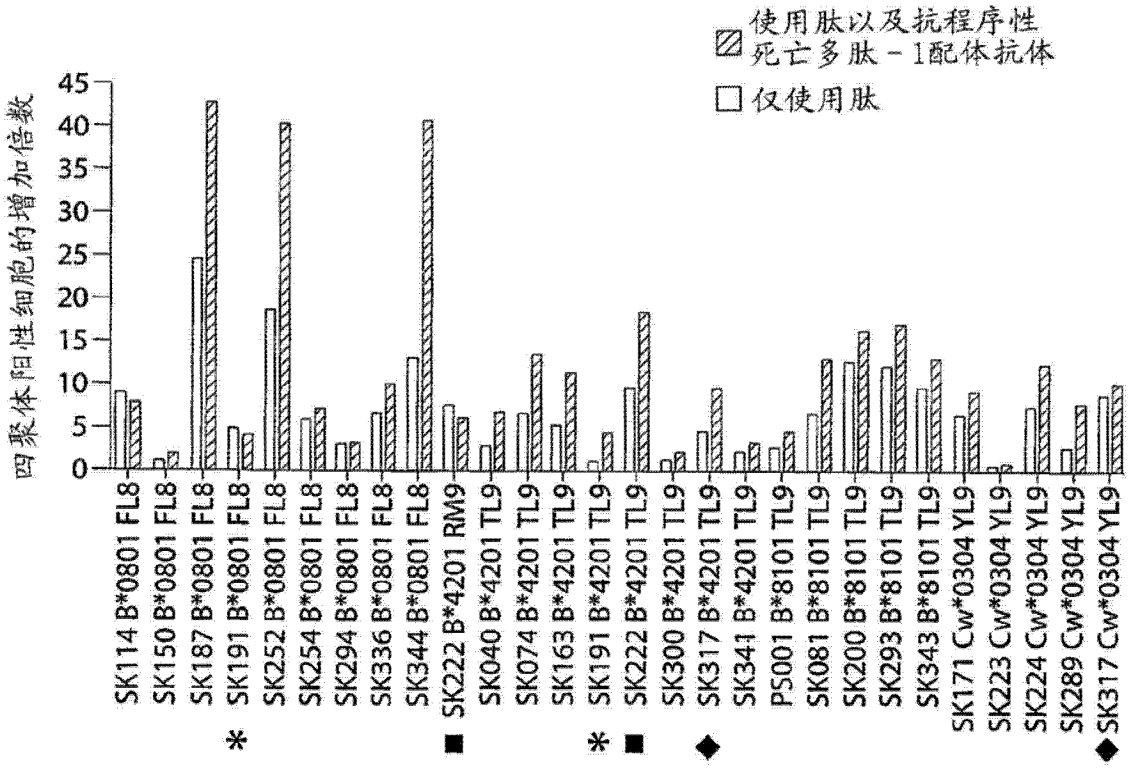

使用肽以及抗程序性死亡多肽－1配体抗体
仅使用肽
四聚体阳性细胞的增加倍数
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
SK114 B*0801 FL8
SK150 B*0801 FL8
SK187 B*0801 FL8
SK191 B*0801 FL8
SK252 B*0801 FL8
SK254 B*0801 FL8
SK294 B*0801 FL8
SK336 B*0801 FL8
SK344 B*0801 FL8
SK222 B*4201 RM9
SK040 B*4201 TL9
SK074 B*4201 TL9
SK163 B*4201 TL9
SK191 B*4201 TL9
SK222 B*4201 TL9
SK300 B*4201 TL9
SK317 B*4201 TL9
SK341 B*4201 TL9
PS001 B*8101 TL9
SK081 B*8101 TL9
SK200 B*8101 TL9
SK293 B*8101 TL9
SK343 B*8101 TL9
SK171 Cw*0304 YL9
SK223 Cw*0304 YL9
SK224 Cw*0304 YL9
SK289 Cw*0304 YL9
SK317 Cw*0304 YL9

图 8C